

수산식품 중 말라카이트그린 및 류코말라카이트그린의 분석

최동미* · 홍순근 · 임무혁 · 정지윤 · 장문익 · 박건상 · 홍무기 · 우건조

식품의약품안전청, 식품평가부
(2005. 1. 6. 접수, 2006. 2. 13. 승인)

Analysis of malachite green and leuco-malachite green in sea food

Dongmi Choi*, Soongun Hong, Moohyeog Im, Jiyeon Jeong, Moonik Chang,
Kunsang Park, Mooki Hong and Gunjo Woo

Center for Food Evaluation, Korea Food & Drug Administration
#231 Jinheung-Ro, Eunpyung-Gu, Seoul 122-704, Korea

(Received January 6, 2006, Accepted February 13, 2006)

요 약: 고속액체크로마토그래피를 이용하여 어류 중 말라카이트그린 및 류코말라카이트그린의 최적 분석조건을 확립하고 국내유통 수산식품을 분석하였다. 균질화한 시료를 아세트니트릴로 추출하고 디클로로메탄에 분산시켜 농축 후 메탄올에 용해하여 분석하였다. 이동상으로는 아세트니트릴과 아세트이트 완충용액의 혼합용액을 사용하였으며, 검출파장은 620 nm이었다. 류코말라카이트그린을 말라카이트그린과 동시에 분석하기 위하여 산화납(IV) 컬럼을 분석컬럼 뒤에 연결하여 류코말라카이트그린을 말라카이트그린으로 산화하였다. 상관계수(r^2)는 말라카이트그린이 0.9989, 류코말라카이트그린이 0.9995이었으며, 검출한계는 신호대 잡음비 3 이상에서 말라카이트그린과 류코말라카이트그린의 합으로서 0.005 mg/kg이었다. 회수율은 84~98%(CV는 3~16%)로 만족할 만한 수준이었다. 분석결과 잉어 및 붕어 시료에서 류코말라카이트그린이 검출되었다.

Abstract: To determine malachite green and leuco-malachite green residues in sea food, a liquid chromatographic method has been optimized. The target compounds were extracted in the homogenized edible tissues with a mixture of Mcllvaine buffer-acetonitrile and partitioned against dichloromethane. After concentrating the lower layer, the resulting residues were re-dissolved in methanol and analyzed by the HPLC with visible detector at 620 nm using acetonitrile-acetate buffer. For the analysis of leuco-malachite green with malachite green simultaneously, post-column packed with lead(IV) oxide was used for oxidizing leuco-malachite green to malachite green. The correlation coefficients(r^2) was 0.9989 for malachite green, and 0.9995 for leuco-malachite green. The limit of detection was 0.005 mg/kg for the combined of malachite green and leuco-malachite green at signal/noise \geq 3. The recovery rate was within a reliable range of 84~98% (CV 3~16%). Leuco-malachite green were detected in carp and crusion carp.

Key words: malachite green, leuco-malachite green, sea food, HPLC

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-380-1674 Fax : +82-(0)2-382-4892

E-mail: mechoi@kfd.go.kr

1. 서 론

건강 지향적 생활수준이 높아짐에 따라 육류소비의 감소와 함께 어류, 패류 등 수산식품의 소비(44.5 kg/man/year)가 꾸준히 증가되고 있으며, 또한 인구증가로 인해 고효율의 식품생산이 요구되므로 어업 생산성 향상을 위하여 양식업이 발달하고 있다.^{1,2} 양식에 의한 어류 생산량은 1980년대 2천여톤에서 2000년대 7만여톤으로 20년간 35배가 증가되었으며, 이에 따라 어류 등의 질병관리가 무엇보다도 중요한 과제로 대두되고 있는 실정이다. 그러나 일단 어병이 발생하면 모든 문제점을 정확히 확인하고 치료하기는 어려우므로 수산 양식업의 경우 질병치료보다는 질병예방에 더욱 가치를 두고 있다.^{3,5}

어류의 경우 곰팡이, 원충 등 여러 원인에 의해 질병이 발생할 수 있다. 특히 문제가 될 수 있는 대표적인 곰팡이성 질병은 원인생물 *Saprolegnia*에 속하는 곰팡이에 의한 수생균병(Saprolegniasis)이다. 일반적으로 곰팡이는 사물기생이기 때문에 수생균은 건강한 어체에는 감염되지 않지만 어체가 어떠한 요인에 의해 손상을 받아 피사하게 되면 그 부분에 2차적으로 착생하여 발병하게 된다. 이와 같은 어병을 치료하는 유일한 방법으로는 균의 생활경로를 차단하는 것으로, 어류를 3일동안 감염된 물로부터 격리시키거나, 물을 살균하는 방법이 사용되고 있다.⁶

말라카이트그린은 비단, 양모, 가죽 등의 염색에 널리 사용되는 트리페닐메탄 염료의 일종이며, 진균류와 일부 원충류의 구제를 위하여 1930년대부터 사용해온 국소 방부제이다.⁷ 그러나 말라카이트그린이 많은 동물과 세포주에 발암, 돌연변이 및 기형을 발현하는 물질로 분류됨에 따라 미국에서는 1970년대 후반부터 회귀어종의 복원과 같이 국가적으로 필요한 경우에 한해서만 사용승인을 하고 있으며, 유럽연합에서는 등록 뿐 만 아니라 사용도 금지되고 있다. 영국에서는 2002년에 사용이 금지되었으며, 우리나라의 경우 식용 어류에 사용을 금지하고 있다. 이와 같이 말라카이트그린은 현재 사용이 금지되었으나 오랫동안 사용되어 왔으며 값이 싸고 방부효과가 뛰어나므로 영세양식업자들에 의해 오·남용이 우려되는 동물용의약품으로 추정되고 있다.⁸⁻¹¹ 따라서 식품의 안전을 제고하고 국민 건강을 증진시키기 위하여 식품 중 말라카이트그린의 잔류실태 조사가 선행되어야 한다.

양식어류인 송어나 메기 등 수산식품 중 말라카이트

트그린을 검출하기 위한 전처리 방법으로는 가식부를 취하여 균질화한 후 일정량을 취하여 액액추출법인 LLE(liquid liquid extraction)나 고상추출법인 SPE(solid phase extraction) 방법으로 추출하고 컬럼을 이용하여 정제하는 방법이 주로 이용되고 있다. 그러나 어류에 사용된 말라카이트그린은 대사되어 무색의 류코말라카이트그린으로 환원되므로 산화납(IV)을 충전한 컬럼을 분석컬럼 뒤에 부착하여 류코말라카이트그린을 말라카이트그린으로 산화한 후 분석하고 있다. 또한 기기분석법으로는 HPLC/VIS(high performance liquid chromatography/visible detector), HPLC/MS (high performance liquid chromatography/mass spectrometry), GC/MS(gas chromatography/mass spectrometry) 및 LC/APCI-MS(liquid chromatography/atmospheric chemical ionization-mass spectrometry)이 있으며, 검출된 말라카이트그린의 재확인을 위하여 LC/ESI-MS-MS(liquid chromatography/electrospray-mass spectrometry-mass spectrometry)를 사용하기도 한다.¹²⁻¹⁹

이에 본 연구에서는 수산식품 중 말라카이트그린 및 류코말라카이트그린을 분석함에 있어 간편하고 신속하며 보편적으로 사용할 수 있는 비용이 저렴한 방법을 확립하기 위하여 전처리 방법 및 HPLC/VIS를 이용한 기기의 분석조건을 최적화하고 국내 유통식품에 대해 분석한 결과를 보고하고자 한다.

2. 실험

2.1. 시약 및 시액

분석용 시약은 HPLC급 또는 잔류농약급을 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA), Wako Pure Chemical Industries Inc.(Osaka, Japan) 및 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)에서 구매하였다. 표준물질 말라카이트그린 옥살산염 및 류코말라카이트그린은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. 시료 전처리에 사용한 McIlvaine 완충액(pH 3.0)은 0.2M 제이인산나트륨(Na_2HPO_4) 용액 18.9 mL와 0.1M 구연산용액 81.1 mL를 혼합하여 제조하였으며, McIlvaine 완충액(pH 6.0)은 0.2M 제이인산나트륨(Na_2HPO_4) 용액 62.5 mL와 0.1M 구연산용액 37.5 mL를 혼합하여 제조하였다. TMB 용액은 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine이 1 mg/mL가 되도록 메탄올로 제조하였다. 산화납 컬럼(4.6 mm id, 50 mm)은 PbO_2 와 셀라이트를 3:1로 충전하여 사용하였다.

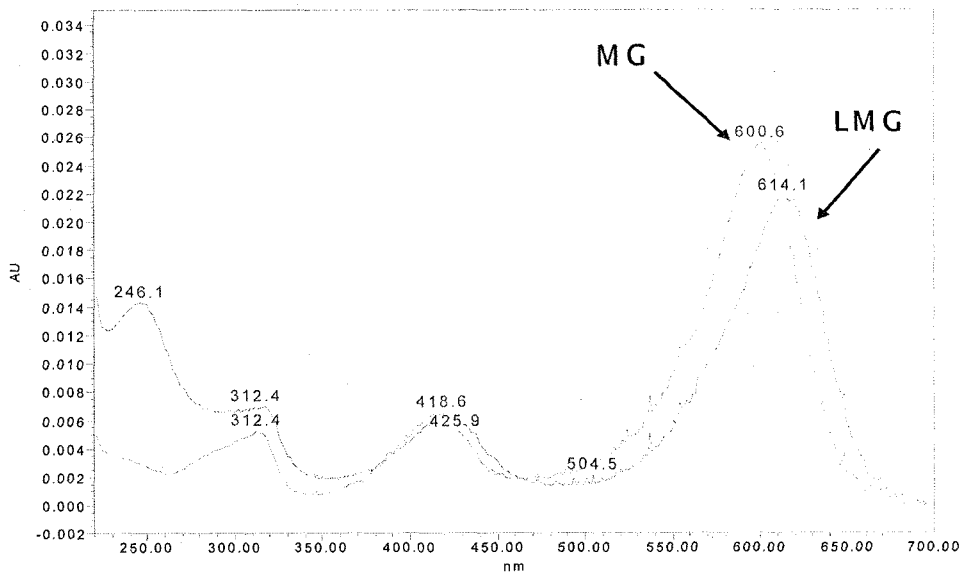
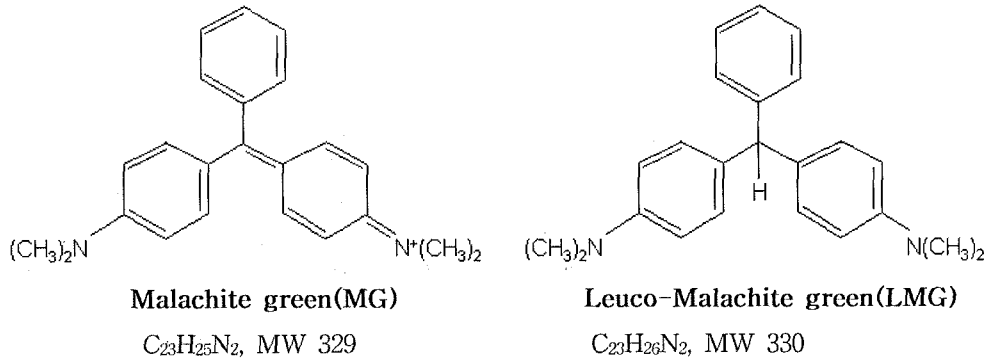


Fig. 1. Chemical structure, molecular formular, molecular weight and VIS absorption spectrum of malachite green and leuco-malachite green.

2.2. 기기

고속액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography) 및 photodiode array(PDA) 검출기는 Nanospace SI-2(Shiseido Fine Chemicals, Yokohama, Japan)을 사용하였으며, C₁₈ 컬럼은 Type UG120(Shiseido Fine Chemicals, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 확인에 필요한 가스크로마토그래피/질량검출기(Gas Chromatography/Mass Selective Detector)는 HP 6890N/5973 Inert(Agilent Technologies, China)를 사용하였다.

2.3. 실험방법

2.3.1. 대상물질

말라카이트그린 및 류코말라카이트그린의 구조식, 화학식, 분자량 및 가시부흡수스펙트럼은 Fig. 1과 같다.

2.3.2. 대상시료

시중에 유통되는 수산식품 중 양식이 가능한 새우(*Penaeus japonicus*, 10건), 연어(*Oncorhynchus keta*, 4건), 잉어(*Cyprinus carpio*, 4건), 붕어(*Carassius auratus*, 4건), 동자개(*Pseudobagrus fluvidraco*, 1건), 가물치(*Channa argus*, 3건), 장어(*Anguilla japonica*, 6건), 메기(*Parasilurus asotus*, 2건), 자라(*Trionyx sinensis*, 1건), 자라분말가공품(1건)을 도·소매 시장에서 구매하였다. 채취한 시료는 가식부만 분쇄·혼합하여 대상검체로 조제하였으며, 분석 전까지 냉동보관 하였다. 분석방법에 따른 회수를 측정을 위하여 말라카이트그린 및 류코말라카이트그린을 함유하지 않은 붕어, 잉어 및 장어에 표준용액 일정량을 첨가하여 시료로 조제하였다.

2.3.3. 실험방법

(1) 시료 중 대상물질 추출

냉동 보관한 시료를 해동하여 다시 균질화한 후 일정량(20 g)을 취해 McIlvaine 완충액(pH 3.0, 10 mL), 1M 1-hexanesulfonic acid(400 μ L), TMB 용액(200 μ L) 및 아세트니트릴(30 mL)를 가하여 5분간 균질화하고 원심분리(3,400 rpm, 15°C, 5분간)하여 층을 분리하였다. 상등액을 취하고 잔여물에 McIlvaine 완충액(pH 6.0, 10 mL) 및 아세트니트릴(30 mL)를 가하여 5분간 균질화하고 원심분리(3,400 rpm, 15°C, 5분간)하여 상등액을 모두 합한다. 이에 증류수(100 mL), 포화식염수(40 mL) 및 디클로로메탄(60 mL)를 가하고 추출하여 디클로로메탄 층을 취하고, 잔여물에 디클로로메탄(60 mL)를 가하여 추출조작을 반복한 후 디클로로메탄 층을 합하여 농축하고 메탄올(2 mL)에 용해하여 시험용액으로 하였다. 또한 말라카이트그린 및 류코말라카이트그린은 빛에 민감한 화합물이므로 최종 시험용액이 빛에 노출되지 않도록 갈색용기를 사용하였다.

(2) 기기 분석

HPLC 컬럼은 C₁₈(4.6 mm id, 150 mm, 5 μ m)를 사용하였으며 검출파장은 620 nm이었다. 이동상으로는 1-hexanesulfonic acid를 0.1% 함유하는 0.05M 초산 및 0.05M sodium acetate 용액(A)과 아세트니트릴(B)의 혼합용액을 사용하였다. 이동상의 기울기는 A:B가 초기 50:50에서 15분간 유지 후 5분 동안에 20:80으로 하여 10분간 유지하였다. 시료는 10 μ L를 주입하였으며 유속은 1.0 mL/min이었다. 분석결과 머무름 시간에 의해 정성 확인을 하였으며 피이크 면적법에 의해 정량을 하였다.

(3) 확인

GC 컬럼은 HP-5MS(0.25 mm id, 30 m, 0.25 μ m)를 사용하였으며 오븐온도는 초기 150°C에서 분당 10°C로 300°C까지 승온하여 300°C에서 15분간 유지하였다. 시료는 1 μ L를 splitless 방법으로 주입하였고, 주입구의 온도는 260°C이었다. 이동상으로는 He를 사용하였으며 유속은 1.0 mL/min이었다. 질량검출기는 EI positive mode로 이온화에너지는 70 eV이었다. 분석결과 머무름 시간 및 분자이온(M⁺)에 의해 확인을 하였다.

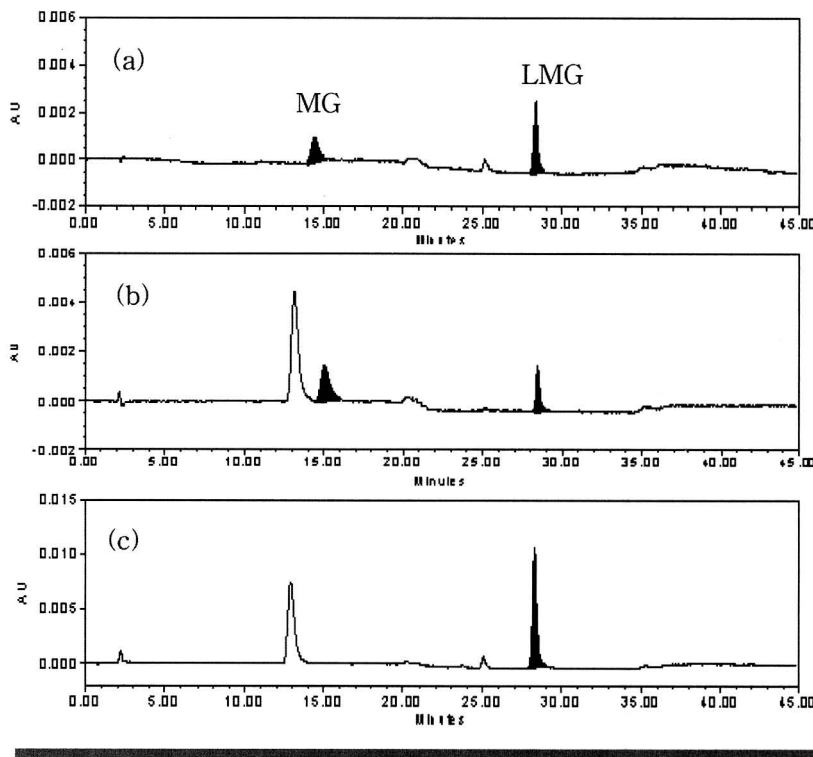


Fig. 2. Typical chromatogram of malachite green and leuco-malachite green for (a) standard mixture, (b) spiked sample, and (c) detected sample.

3. 결과 및 고찰

말라카이트그린 및 류코말라카이트그린의 표준물질, 표준물질을 첨가한 시료 및 검출시료에 대한 크로마토그램은 Fig. 2와 같으며, 말라카이트그린 및 류코말라카이트그린의 순으로 유출되었다. 검량선 작성을 위하여 말라카이트그린 및 류코말라카이트그린의 표준물질 6개 농도범위(0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 10 ppm)에서 측정·분석한 결과 상관계수(r^2)는 0.9989 및 0.9995로 Codex(국제식품규격위원회)에서 제시하는 기준인 $r^2 \geq 0.95$ 에 만족하는 수준이었으며, 검출한계는 신호대 잡음비 3 이상에서 말라카이트그린과 류코말라카이트그린의 합으로서 0.005 ppm(mg/kg)이었다 (Table 1).

분석방법의 효율을 재고하기 위하여 붕어, 잉어 및 장어에 표준물질(0.05, 0.1 및 0.2 ppm)을 첨가하여 회수율을 측정된 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 말라카이트그린의 경우 회수율은 84~98%, CV는 3~13%

Table 1. Calibration equations and LOD for malachite green and leuco-malachite green

Compounds	Calibration	r^2	LOD (ppm)
MG	$y=739.7x+335.1$	0.9989	0.005
LMG	$y=317.3x+131.5$	0.9995	(as a sum)

Table 3. Validation guidelines for analysis of veterinary drug residues by CODEX

Concentration (ppm)	Recovery (%)	CV (%)
≤ 0.001	50~120	≤ 35
$>0.001, \leq 0.01$	60~120	≤ 30
$>0.01, \leq 0.1$	70~110	≤ 20
>0.1	80~110	≤ 15

이었으며, 류코말라카이트그린의 경우 회수율은 88~98%, CV는 7~16%로, Table 3에 제시된 국제식품규격 Codex 기준인 회수율 70~110%, CV 20~15% 미

Table 2. Recoveries of malachite green and leuco-malachite green in the spiked food samples (% , n=3)

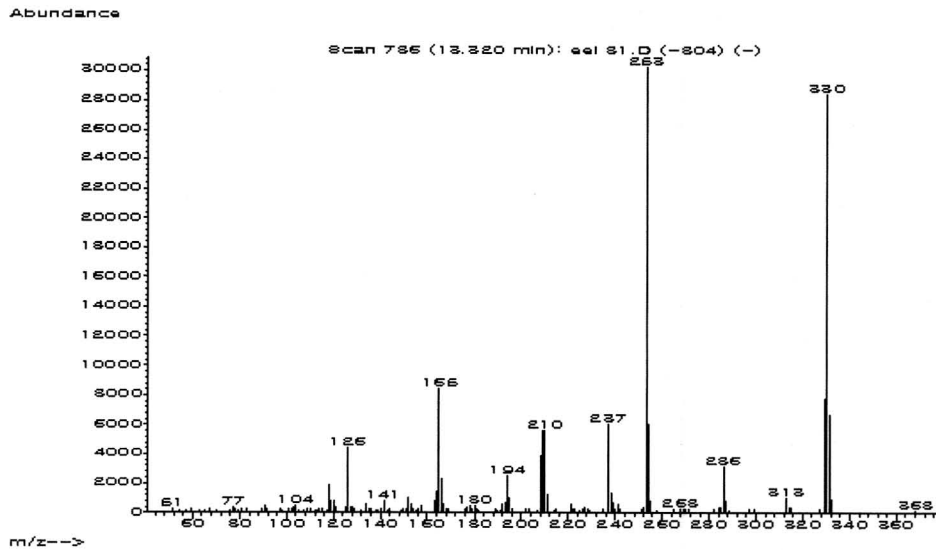
Food	Spiked (ppm)	Malachite green		Leucomalachite green	
		Recovery	CV	Recovery	CV
붕어 (<i>Carassius auratus</i>)	0.05	92	11	98	16
	0.1	84	9	88	15
	0.2	93	8	93	13
잉어 (<i>Cyprinus carpio</i>)	0.05	95	10	91	16
	0.1	87	3	92	8
	0.2	98	7	97	12
장어 (<i>Anguilla japonica</i>)	0.05	86	4	98	11
	0.1	90	13	94	7
	0.2	95	8	96	12

Table 4. Levels of MG and LMG detected in the food samples (ppm)

Food samples		No. of samples	MG	LMG
새우	(<i>Penaeus japonicus</i>)	10	nd ^a	- ^b
연어	(<i>Oncorhynchus keta</i>)	4	nd	-
잉어	(<i>Cyprinus carpio</i>)	4	nd	detected
붕어	(<i>Carassius auratus</i>)	4	nd	detected
동자개	(<i>Pseudobagrus fluvidraco</i>)	1	nd	nd
가물치	(<i>Channa argus</i>)	3	nd	nd
장어	(<i>Anguilla japonica</i>)	6	nd	nd
매기	(<i>Parasilurus asotus</i>)	2	nd	nd
자라	(<i>Trionyx sinensis</i>)	1	nd	nd
자라분말		1	nd	nd

a : less than LOD
b : not analyzed

(a) detected sample



(b) standard

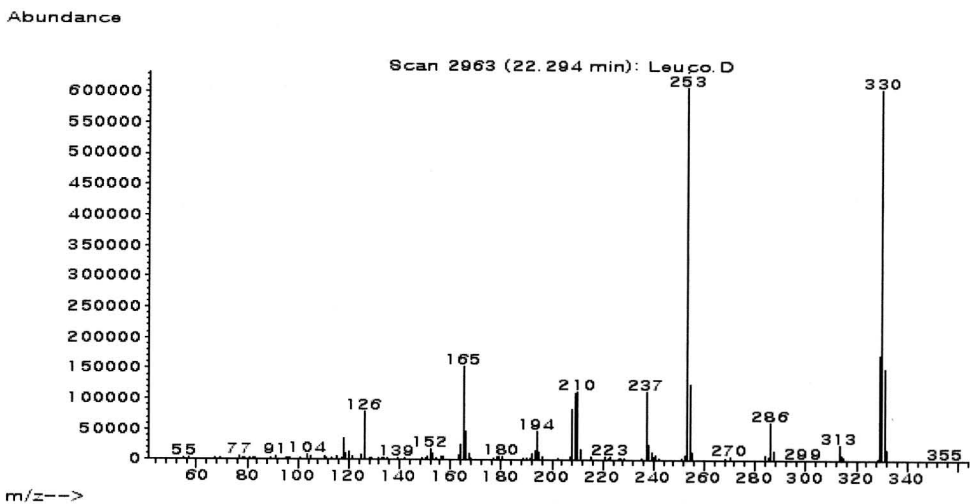


Fig. 3. Typical mass spectrum of leuco-malachite green for (a) detected sample and (b) standard.

만에 적합한 매우 만족한 결과를 얻었다.²⁰⁻²¹

또한 시료전처리 시에는 TMB 용액을 사용함으로써 분석 중에 발생할 수 있는 말라카이트그린과 류코말라카이트그린의 탈메칠화를 방지할 수 있었다.

이와 같이 최적화된 분석방법을 식품시료에 적용한 결과 새우(10건), 연어(4건), 잉어(4건), 붕어(4건), 동자개(1건), 가물치(3건), 장어(6건), 메기(2건), 자라(1건), 자라분말가공품(1건) 모든 대상 시료(36건)에서 말라카이트그린은 검출되지 않았으나, 잉어 및 붕어에서 류코말라카이트그린이 검출되었다(Table 4). 검출

된 류코말라카이트그린은 GC/MSD를 이용하여 확인하였다(Fig. 3).

네덜란드의 경우, 대부분이 양식으로 생산되는 무지개 송어에서 류코말라카이트그린이 17건중 13건에서 검출(검출량 < 0.015 ppm)되어 72%의 검출율을 나타내고 있으며, 장어는 10건 중 5건(검출량 < 0.10 ppm)으로 50%의 검출율을 보이고 있고, 신선 냉장 연어에서는 6건중 4건에서 검출한계(0.002 ppm)를 약간 초과(0.002~0.0026 ppm)한 류코말라카이트그린이 검출되었다. 두 경우 모두 말라카이트그린은 검출되지 않

고 류코말라카이트그린이 검출되었는데, 이는 *in vitro*, 즉, 실험실적으로 말라카이트그린은 류코말라카이트그린으로 환원되지 않으므로 어류 양식 중 말라카이트그린을 불법으로 사용했음을 암시해 주고 있다. 또한 식품에 잔류되어 있는 말라카이트그린은 매우 불안정하므로 냉장어류에서 미량이 검출되면 도살 시에는 상당히 높은 수준의 말라카이트그린이 잔류되었음을 추정할 수 있으며, 훈제연어 등 열에 의한 가공식품에서는 말라카이트그린 뿐 만 아니라 류코말라카이트그린도 검출되지 않았는데 이는 두 물질 모두 열에 불안정한 물질임을 시사해준다.

따라서 향후 유통식품의 안전을 확보하기 위하여 본 연구내용인 식품 중 말라카이트그린 및 류코말라카이트그린을 동시에 분석하는 방법은 어류, 패류 및 갑각류 등 수산식품 분석에 매우 유용하게 적용할 수 있으리라 사료된다. 또한 류코말라카이트그린은 불법으로 사용한 말라카이트그린 추적 시 표지물질로 매우 유용하게 이용될 것이다.

참고문헌

1. 보건복지부, 국민건강 · 영양조사, 2001.
2. 한국농촌경제연구원, 식품수급표 2000, 2001.
3. “수산용 항생제 관리시스템 구축”, 식품의약품안전청, 2003.
4. The Merck Veterinary Manual, 9th Ed., Merck & Co. Inc., USA, 2005.
5. 수산용약품사용안내, 국립수산과학원, 1996.
6. R. Durborow, D. Wise and J. Terhune, SRAC Publication No. 4700, 2003, (www.msstate.edu/dept/srac)
7. The Merck Index, 13th Ed., Merck & Co. Inc., USA, 2001.
8. S. Srivastava, R and Sinha, D. Roy, *Aquat. Toxicol.*, **66**, 319-329(2004).
9. D. Dorge, M. Churchwell, T. Gehring Y. Pu and S. Plakaskas, *Rapid Commun. Mass Spectrum.*, **12**, 1625-1634 (1998).
10. A. Bergwerft and P. Scherpenisse, *J. Chromatogr. B*, **788**, 351-359(2003).
11. 동물용의약품등편람, 한국동물약품협회, 2001.
12. L. Rushing and E. Hansen, *J. Chromatogr. B*, **700**, 223-231(1997).
13. A. Bergwerff, R. Kuiper and P. Scherpenisse, *Aquaculture*, **233**, 55-63(2004).
14. S. Turnipseed, J. Roybal, J. Hurlbut and A. Long, *J. AOAC. Int.*, **78**, 971-977(1995).
15. C. Hajee and N. Haagsma, *J. Chromatogr. B*, **669**, 219-227(1995).
16. L. Rushing and H. Thompson Jr., *J. Chromatogr. B*, **688**, 325-330(1997).
17. S. Turnipseed, J. Roybal, H. Rupp, J. Hurlbut and A. Long, *J. Chromatogr. B*, **670**, 55-62(1995).
18. L. Valle, C. Diaz, A. Zanooco and P. Richter, *J. Chromatogr. B*, **1067**, 101-105(2005).
19. P. Scherpenisse and A. Berberwerff, *Anal. Chim. Acta*, **529**, 173-177(2005).
20. Codex guidelines for the establishment of a regulatory programme for control of veterinary drug residues in foods, CODEX, CAC/GL 16, 1993.
21. FAO/IAEA 동물용의약품잔류분석기술 훈련자료집, 국립수과과학검역원, 2004.