

뱀장어 유어(*Anguilla anguilla*)에 있어서 말라카이트 그린의 잔류성

Aldert A. Bergwerff, Raoul V. Kuiper, Peter Scherpenisse

요 약

말라카이트그린(MG) 및 L-말라카이트그린(LMG)의 소멸은 뱀장어 *Anguilla anguilla* 유생에서 100 일정도 걸린다. 실험뱀장어(평균체중: 4.1 g)가 23.0~26.5℃의 다양한 수온범위에 24시간동안 아주 낮은 농도(0.1 mg/l MG)에 약욕을 실시하였다. 처리한 후 실험뱀장어는 말라카이트그린이 없는 깨끗한 물이 들어 있는 수조로 옮겼다. 뱀장어가 수용된 수조에는 순환여과 된 사육수를 공급하였다. 일정한 시간 간격으로 수집된 10마리의 뱀장어 및 사육수의 샘플은 high-performance liquid chromatography (HPLC)으로 분석하였다. 말라카이트그린의 가장 높은 농도는 435 ±59 µg/kg (mean±S.D.)로서 처리시작 후 6시간에서 나타났다. L-말라카이트그린(LMG) 대사물의 농도는 비교적 높게 나타났으며 (>100 µg/kg), 처리시작 후 6시간 및 처리종료 후 1500시 사이에서 안정적으로 나타났고 최대농도는 831±231 µg/kg이었다. 비록 뱀장어는 체중이 증가하지는 않았지만 노출 후 24시간 후에도 L-말라카이트그린(LMG)은 여전히 전어체 kg당 15±12 µg/kg 함량이 존재하였다. 말라카이트 그린은 처리 이후 1920 및 2400시에서는 발견되지 않았다. 생물적 여과사육수와 순

환여과시스템에서는 말라카이트그린이 발견되지 않았다. 본 연구에서는 부가적으로 빠르게 성장하여 11개월 된 뱀장어 두 마리를 샘플하여 분석에 사용하였다. 두 마리의 뱀장어는 실험뱀장어(0.3g)일 때 0.15 mg l⁻¹ 농도의 말라카이트그린이 처리되었었다. 뱀장어의 근육조직에서는 지질 크로마토그래피-질량 분광광도계분석에 의해 말라카이트그린과 L-말라카이트그린이 측정 가능한 양으로 함유되지 않음을 확인할 수 있었다(< 0.2 µg kg⁻¹).

1. 서 론

네덜란드를 포함한 몇몇 유럽국가의 뱀장어 양식에서 뱀장어생산량과 뱀장어 양식장의 수는 중요한 요인으로 작용한다. 하지만 이러한 양식형태는 뱀장어 양식을 위한 종묘생산량의 심각한 문제를 가진다(Liewes and Haenen, 1993). 따라서 자연에서 길들여지지 않은 0.3 g정도 실험뱀장어를 여러 유럽국가의 강하구에서 포획하고 있는 실정이다. 이러한 양식방법은 야생에 존재하는 병원균을 양식장으로 옮길 수 있는 큰 위협성을 가지고 있다(Liewes and Haenen, 1993). 그러므로 대부분 경우 실험뱀장어를 뱀장어 양식장으로 수송하기 전에

예방의 목적으로 살충제 및 살균제를 처리한다. 또한 뱀장어를 양성하는 동안에도 사육수 악화, 스트레스 및 상처에 의한 감염과 관련하여 양식장 환경 저하에 대응하기 위해 부수적으로 항생물질을 사용되고 있다. 다양한 수의학적 약품 중에서, triphenyl-methane dye malachite green (MG)는 saprolegniasis, 백점병 및 섬모충감염을 포함한 어체내 균 또는 기생충 감염의 예방 및 치료를 위해 가장 널리 사용되는 물질이다(Liewes and Haenen, 1993; Scott, 1993; Southgate, 1993). 현재 유럽연합규정은 말라카이트그린의 사용을 허용하지 않는다. 말라카이트그린은 잠재적인 발암성, 돌연변이 및 기형을 유발할 수 있는 물질임으로 (Alderman, 1985), 유럽연합이외의 많은 국가에서도 금지하고 있다.

변온성 동물은 온혈성 동물에 비하여 물질대사가 느리기 때문에 말라카이트그린의 잔여물이 체내에 오랜 시간으로 지속될 수 있다(Yndestad, 1993). 예를 들어, channel catfish를 21°C에서 1시간동안 0.8 mg/L 농도로 말라카이트그린을 처리하였을 때 근육조직에는 0.710 mg/kg가 남아있었고, 심지어 처리이후 336시간에 지방조직을 측정하였을 시 26.7 mg/kg이 남아있었다(Plakas et al., 1996). 특히 일차 대사산물인 L-말라카이트그린 (Leuco-malachite green)은 지속성을 가지는 잔여물로서 수온 12~14°C에 수용된 무지개 송어를 대상으로 6일간 0.2 mg/L농도로 처리하여 10달 이후 근육 조직 분석 결과 2.43 µg/kg의 양으로 측정되었다(Plakas et al., 1996).

양식업자들을 대표하는 사람들은 어류의 자어기 단계와 균 감염에 민감한 시기인 5g 이 되기 전까지의 어류에 말라카이트그린을 포함한 몇몇의 약품을 처리함에 있어서 허가를 제안한 바 있

다(Greutink et al., 2002). 이러한 제안은 위에 명시된 단계에 처리된 어류가 성어가 되었을 시에 처리된 약품의 잔여물이 나타나지 않으며, 이들의 어체로부터 나온 가식부는 인체에 유해성을 내포하지 않음을 시사한다. 따라서 본 연구는 뱀장어 성어기에 말라카이트그린 잔여물의 지속성과 관련하여 체중 5 g까지 말라카이트그린 처리된 뱀장어에서 말라카이트그린의 잔여물을 측정하는 것을 목적으로 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 뱀장어 노출실험

합성수지의 소형수조에 23°C의 깨끗한 물을 40 L로 채워 넣었다. 10 ml의 수용성 말라카이트그린(403 mg/L)를 첨가하여 충분히 혼합시켜서 수조의 말라카이트그린농도가 0.10 mg/L 이 되게 하였다. 일반적인 수의학적 방법(P. Werkman, Leusden, The Netherlands, personal communication)에 따라서 앞서 준비한 수조에 하루 절식시킨 평균 무게 4.1 g(1.5~7.4 g)의 유럽산 뱀장어 450마리를 말라카이트그린이 함유된 물에 24시간 노출시켰다. 노출시키는 동안 수온은 23.0~26.5°C, pH는 7.0~7.8범위였다. 말라카이트그린 처리 이후, 뱀장어를 생물학적 여과의 순환여과시스템인 상업용 뱀장어 양식장에 말라카이트그린이 함유되어있지 않은 물로 채워진 폴리에스테르 탱크(600 L)로 수송하였다. 이 물은 완전하게 투명한 것이 아니라 몇몇의 미립자 물질이 관찰되었다. 사료는 지속적으로 공급하였고, 21.6~27.5°C의 사육수온에서 양성되었다. 사육실험동안에 1일 2회 pH를 점검하였으며, pH는 6.0~7.8범위를 나타냈다. 말라카이트그린의 처리전과 처리하는 동안 그

리고 처리 된 후에 2400(100일)이 되기까지 일정한 시간간격으로 10마리씩의 뱀장어를 수집하였다. 물의 시료은 뱀장어를 수송하기 전의 시점을 제외하고 모든 분석 시점에서 채취하였으며 또한 말라카이트그린을 첨가하기 전의 수조에서도 물의 시료를 채취하였다. 물의 시료는 사육수 표면의 바로아래의 물을 50 ml 튜브로 샘플하였다. 뱀장어는 수조로부터 나오자마자 -20℃로서 채운을 낮추어 안락사 시켰다.

2.2. 말라카이트그린의 잔여물측정

말라카이트그린 잔여물의 분석에 대해서는 새우류 및 어류에서 최근 연구된 바 있다(Bergwerff and Scherpenisse, 2003). 간단히 설명하면, 머리를 포함하여 실험장어를 얇게 썰어낸 후, 2 g의 조직은 48 mM *p*-toluene sulfonic acid와 0.15 mM의 N,N,N',N'-tetramethyl-1,4-phenylenediamine으로 구성된 McIlvaine buffer (pH 3.0) 2 ml이 들어있는 micro Ultra-Turrax (UT)에 혼합되었다. UT는 12 ml의 acetonitrile을 이용하여 깨끗하게 세척하였다. 튜브는 원심분리를 실시하여 상등액을 취하고 침전된 물질은 2 ml McIlvaine buffer(pH 6)와 12 ml acetonitrile 혼합물과 함께 500 rpm, 10분간 platform shaker하여 다시 추출되었다. 추출물은 원심분리되어 상등액은 혼합되었다. 그리고 6 ml dichloromethane를 첨가한 후 15℃에서 3400× g로 5분간 원심분리하여 점액성물질을 제거하였다. 잔여물이 함유된 분리물질은 더욱 순화시켜서 aromatic sulfonic acid solid-phase extraction cartridge (3 ml, 500 mg; J.T. Baker, The Netherlands)으로 농축되어졌다. 카트리지는 1.5 ml methanol로 세척하였으며 질소가스를 이용하여 건조시켰다. 시료의 분리는 0.3 mM ascorbic acid와 1.25% (wt/vol) am-

monium hydroxide가 함유된 3 ml methanol를 이용하여 수행하였다. 용출액은 질소를 흘려보내어 감압여과 하였다. 잔여물질은 내부표준물질인 10 µg/ml brilliant green의 20 µl을 사용하여 강화시켰으며 55% (vol/vol) acetonitrile 및 40%(vol/vol), 50 mM의 sodium acetate buffer(pH 4.5)의 980 µl 혼합물 및 methanol 및 1 mg/ml ascorbic acid의 혼합물을 사용하여 용해하였다. 약육 및 사육수 시료의 경우, 1 ml의 물에 50 mM ammonium acetate (1 ml), 1 mg/ml ascorbic acid (50 µl), acetonitrile (2.85 ml), 10 µg/ml brilliant green(100µl)를 첨가, 혼합하여서 HPLC분석에 이용하였다.

HPLC 시스템은 첫 단계인 Phenomenex LUNA phenyl-hexyl (3 µm; 50×4.6 mm)과 두 번째 단계인 Phenomenex LUNA C₈ (3 µm; 50×4.6 mm)으로 구성되었다. HPLC 컬럼은 0.6 ml/min의 조건으로 60% (vol/vol) acetonitrile과 40% (vol/vol) 0.05 M ammonium acetate buffer (pH 4.5)의 혼합물을 첨가하여 분리하였다. Lead (IV) oxide와 celite이 3:1로 혼합된 물질로서 채워진 포스트컬럼 반응기는 HPLC 컬럼과 연결되었다. 분리된 물질은 L-말라카이트그린의 포스트컬럼 산화과정으로 크롬을 함유하는 말라카이트그린으로 전환시킨 후 620 nm에서 측정되었다. 각 말라카이트그린 및 L-말라카이트그린을 위한 LOD검출범위는 1 µg/kg이었다. 결과들은 Bergwerff and Scherpenisse(2003)의 연구방법으로서 liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS)를 이용하여 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

샘플은 모든 어체조직을 포함하고 있었으며 조직구성에서 시각적인 차이가 나타났으나 말라카

이트그린 및 L-말라카이트그린 (N = 36)의 함유량은 각 $61 \pm 6\%$ 및 $88 \pm 10\%$ 으로 나타나면서 회복되었으며, 이는 성숙된 상품크기의 뱀장어의 근육조직에서 측정된 값과 유사하였다(Bergwerff and Scherpenisse, 2003). 본 연구의 분석절차는 비교적 정밀하며 정확도를 가지기 때문에 자어기 뱀장어의 잔여물 측정을 위한 방법으로서 적절하다고 판단된다.

말라카이트그린의 잔여물은 말라카이트그린의 처리전의 수조에서는 발견되지 않았다. 본 연구에서 수행된 수의학적 처리는 상업적 뱀장어 양식장의 환경과 유사하게 수행되었다. 말라카이트그린의 처리를 위해 준비된 수조의 사육수 분석에서 말라카이트그린 처리 전에 준비한 0.1 mg/L 농도보다 현저하게 낮은 0.032 mg/L 로 나타났다 (Fig. 1).

L-말라카이트그린은 말라카이트그린의 처리동안이나 처리 이후에 어떠한 분석시점에서도 발견되지 않았다. 사육수에 말라카이트그린을 처리한 이후로 12시간이 경과한 후에 말라카이트그린은 명백하게 나타나지 않았으며 (Fig. 1), 수의학처리 방법(P. Werkman, Leusden, The Netherlands, per-

sonal communication)에 따라서 노출시간을 12시간으로 지정하기도 한다.

Bauer et al.(1988)의 연구에 따르면 수중의 말라카이트그린농도가 지수적인 감소로 나타나는 것은 말라카이트그린이 흡수되는 송어의 밀도와 상호연관이 있다고 보고한 바 있다. 비록 사육수 샘플이 처리이후에 즉시 채취된다고 하더라도 실험 시작시 지정된 농도와 실질적인 농도사이의 상대적인 큰 오차는 어류에게 흡수되어 지는 것으로 해명될 수 있다. 말라카이트그린을 처리할 때 입자성 물질과 퇴적물이 시각적으로 발견되지 않았으며, 약육을 위한 사육수가 준비된 이후에도 수조의 벽에서 녹색의 침전물질이 관찰되지 않았음에도 불구하고 작은 부유입자 또는 수조벽에 용해된 약품의 일부분이 거의 동시에 관찰되었다. 또한 말라카이트그린은 발견되지 않은 파생물로 일부 감소되었을 수 있다.

어류의 수의학적 처리와 관련되어 단지 소수의 어류용 항생제만이 침투성 테스트가 이루어진다. 전형적으로, 본 연구에서 실시된 말라카이트그린 처리를 포함하여 다양한 어류의 약품처리는 유능한 수의사와 같은 사람으로부터 교육을 받는다.

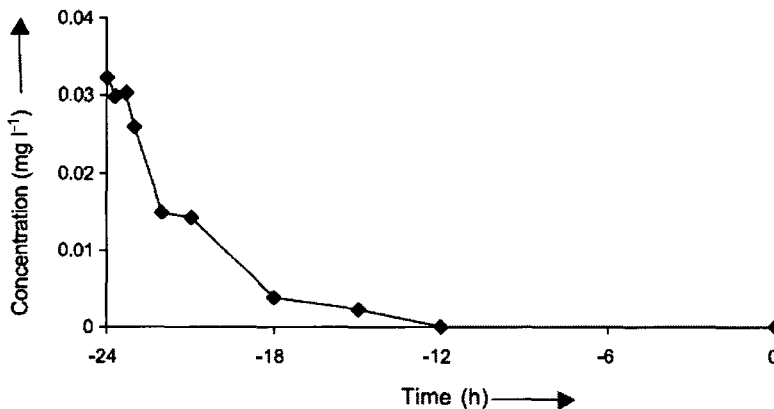


Fig. 1. Averaged concentrations of MG in the bath water during treatment of European glass eel (*A. anguilla*) for 24 h. An initial concentration of 0.1 mg l^{-1} MG was aimed.

물에서 말라카이트그린이 상대적으로 빠르게 사라지는 것은 관상어와 다른 양식 어류종에 대한 약육시에 증명되었으며, 말라카이트그린의 처리 시간과 농도의 관점에서 논의되어 질만 하다.

자어기 뱀장어로부터 근육조직, 피부 및 장기 부분을 충분한 양으로 분리하는 것은 불가능하다. 따라서 뱀장어 전어체를 이용하여 말라카이트그린의 잔여물 추출분석이 수행되었다. 본 연구가 수행되기 이전에 잔여물의 자료조사에서 어류를 생산하는 일련의 과정 중에 낮은 농도(만성)로 처리하거나 명확하지 않은 농도의 빠른 치료법 제안한다. 하지만 이러한 농도는 본 연구에 있어서 의미가 없는 것으로 판단된다.

0.1 mg/L의 농도로 말라카이트그린을 처리 하였을 때, 처리이후 6시간에 샘플된 전어체 뱀장어에서 가장 높은 평균 말라카이트그린 농도인 $435 \pm 59 \mu\text{g/kg}$ ($343 \sim 523 \mu\text{g/kg}$)가 나타났다(Table 1, Fig. 2).

말라카이트그린 처리가 종료된 이후 1920시간에서 말라카이트그린의 농도는 분석된 모든 시료에서의 LOD보다 낮게 나타났다. 이전에 연구에서 말라카이트그린의 분명한 소거 및 변형에 대해서 무지개송어(Bauer et al., 1988)와 채널메기(Roybal et al., 1995)를 대상으로 연구된 바가 있다. Bauer et al.(1988)의 연구에서는 수온만이 다를 뿐 본 연구의 노출방법과 유사하였으나 108일(약 2600시간)에서도 무지개송어의 근육내에 $1 \mu\text{g/kg}$ 의 말라카이트그린이 함유되어 있음을 보고한 바 있다.

뱀장어 전어체에서 L-말라카이트그린의 농도는 특정한 피크를 형성하지 않고 비교적 높게 나타났다(Fig. 2). L-말라카이트그린의 농도는 말라카이트그린처리의 종료이후 72시간에 샘플된 뱀장

어에서 $831 \pm 231 \mu\text{g/kg}$ ($542 \sim 1295 \mu\text{g/kg}$)으로 나타나며 가장 높은 농도를 보였다. 말라카이트그린의 처리가 종료된 2400시 이후에는 샘플된 뱀장어 전어체에서 $15 \pm 12 \mu\text{g/kg}$ 의 L-말라카이트그린이 나타났다. 순환여과시스템을 통하여 말라카이트그린이 처리된 수조로 되돌아오는 사육수에는 실험이 진행된 기간동안에 측정될 만큼의 말라카이트그린의 잔여물이 발견되지 않았으며, 마지막 분석시점에 측정된 L-말라카이트그린의 농도를 뱀장어내에 존재하는 L-말라카이트그린의 영속성으로 설명하였다. L-말라카이트그린의 영속성은 초기에 나타나는 농도에 좌우되며 이들의 대사물이 가지는 비이온성 및 친지방성의 특징으로 배출이 일어난다. 심지어 말라카이트그린의 처리이후 140일에 약 $20 \mu\text{g/kg}$ 의 L-말라카이트그린이 송어에서 발견된 바 있다(Bauer et al., 1988).

한편, 본 연구에서 얻어진 자료는 말라카이트그린 및 L-말라카이트그린에 대한 확실한 반감기(half-life)수치를 구하기 위한 약물대사학적 방법으로는 적당하지 않았다. 게다가 주목할 것은 L-말라카이트그린의 농도곡선 아래로 나타나는 전체 넓이는 말라카이트그린의 곡선이 지정하는 넓이보다 더 크다고 나타났다. 이러한 결과는 복잡한 흡수, 물질대사 및 제거과정을 암시한다. 말라카이트그린의 흡수는 아마도 비이온화 된 carbinol 유사체를 통한 흡수로서 발생하는 움직임에 따르지 않고 수용성 수산기이온이 말라카이트그린의 양이온과 결합함으로써 진행된다(Plakas et al., 1996).

본 연구가 진행되는 동안 실험뱀장어는 성장하지 않았다. 무게측정을 위한 뱀장어 샘플은 무작위로 선택되었고 전문적인 기술로 양성을 하였음에도 불구하고, 말라카이트그린을 처리한 100일째 체

Table 1
Averaged tissue concentrations of residues of MG found in glass eel treated with MG

Time point (h)	Residue				N
	MG		LMG		
	Averaged concentration (range) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	S.D. ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Averaged concentration (range) ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	S.D. ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	
Prior to treatment	4	4	7	5	9
- 24 ^a	21 (12-28)	4	7 (3-12)	3	10
- 23.67	95 (79-125)	13	21 (12-37)	7	10
- 23.33	194 (131-267)	44	68 (40-141)	31	9
- 23	218 (167-262)	24	84 (45-137)	25	10
- 22	388 (283-469)	51	177 (154-250)	32	10
- 21	381 (255-456)	66	263 (205-372)	49	10
- 18	435 (343-523)	59	446 (349-635)	87	10
- 15	411 (281-501)	71	543 (469-605)	44	10
- 12	411 (314-543)	75	613 (448-799)	95	10
0	206 (141-275)	47	639 (452-940)	176	10
0.33	236 (172-352)	60	675 (519-839)	111	10
0.67	196 (109-284)	63	586 (367-824)	139	10
1	245 (123-318)	66	746 (647-1004)	106	10
2	208 (110-263)	50	659 (480-880)	141	10
3	205 (113-359)	73	766 (533-926)	112	10
6	178 (148-288)	44	699 (484-919)	134	9
9	168 (129-242)	37	689 (585-783)	76	10
12	142 (95-173)	27	676 (613-777)	65	10
24	97 (54-128)	21	690 (552-767)	64	10
48	44 (32-57)	9	761 (590-949)	125	10
72	30 (16-49)	12	831 (542-1295)	231	9
96	21 (10-38)	9	714 (464-913)	150	10
120	18 (5-42)	10	667 (399-932)	176	10
240	9 (4-13)	4	576 (419-733)	93	9
480	7 (2-13)	4	505 (323-658)	100	9
720	2 (n.d. ^b -4)	1	420 (231-669)	143	9
1152	2 (n.d.-5)	2	304 (140-473)	111	10
1487	2 (n.d.-8)	3	139 (75-253)	57	9
1920	n.d. (n.d.-n.d.)	n.a. ^c	28 (n.d.-84)	25	9
2400	n.d. (n.d.-n.d.)	n.a.	15 (n.d.-43)	12	10

Samples were taken at given time points from the start (-24 h) to the end of the exposure (0 h), and after treatment (from 0 to 2400 h). The range of concentrations determined in a series per time point is given as minimum and maximum concentrations.

S.D. = standard deviation.

^a These samples were taken immediately after preparation of the MG-containing bath water.

^b n.d., not detected.

^c n.a., not applicable.

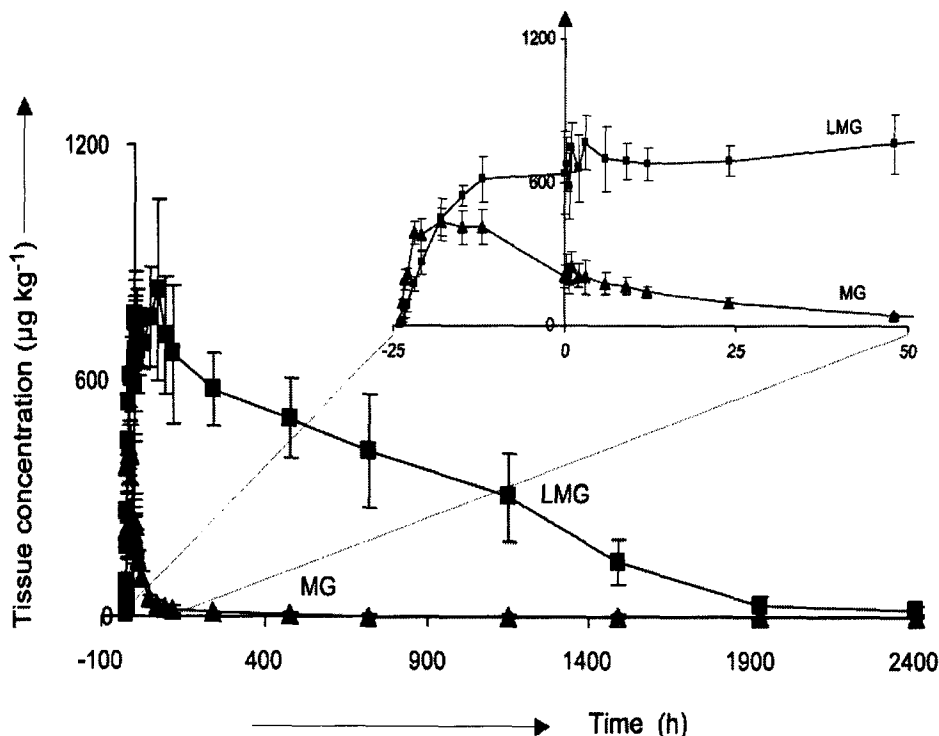


Fig. 2. Averaged concentrations of MG (▲) and LMG (■) in European glass eel (*A. anguilla*) treated through a water bath for 24 h at 0.1 mg l^{-1} MG and at approximately 25°C . After exposure, fish were transferred to an MG-free tank (time point 0) and sampled up to 2400 h (100 days) for HPLC analysis. Vertical bars indicate the standard deviation of the average value (for details, see Table 1). The figure is enlarged with respect to the time scale up to 50 h after treatment in the upper right corner.

중을 측정 한 결과 실험 시작시와 유사하게 $3.5 \pm 1.5 \text{ g}$ ($n = 10$)으로 나타났다. 본 연구에서 뱀장어가 성장하였다면, 물질대사 및 배출기작의 변화와 발달이 나타나는 시점 또는 희석된 L-말라카이트그린이 체부피를 증가시켜 L-말라카이트그린이 감춰지는 효과로 인해 L-말라카이트그린을 측정할 수 없었을지도 모른다. 이러한 효과를 평가하기 위해 말라카이트그린이 처리되었으며 빠르게 성장한 성어기 뱀장어 2마리를 상업성 양식장에서 구입하였다. 상기된 연구에서 수행한 말라카이트그린에 대한 분석을 하기 11개월 전에 이들의 뱀장어가 평균체중 0.3g 일 때 0.15

mg/L 농도의 말라카이트그린으로 처리되었었다. 노출실험은 생물적인 여과장치로서 하루에 5~10% (vol/vol)의 신선한 물이 공급되어지는 순환여과 시스템에서 수행되었다. 분석을 위해 균질화된 뱀장어 어체의 무게는 각 78 및 90g이었으며, HPLC 및 LC-MS/MS (LOD at 0.2 µg/kg)으로 분석한 결과 L-말라카이트그린 및 말라카이트그린 잔여물이 존재하지 않았다.

말라카이트그린이 가지는 영속성에도 불구하고, 실험뱀장어에 처리된 말라카이트그린은 성장한 어체에서는 잔여물을 남기지 않은 것으로 여겨진다. 하지만 말라카이트그린의 잔여물이 나타나지

않았으나, 소위 500 degree-days라고 불리는 말라카이트그린의 소멸기간에 대해서는 신중히 고려되어야 한다. 본 연구에서 마지막 분석시점에서 나타난 말라카이트그린의 농도는 약 60,000 degree-days를 요구하였음을 명시해야 할 것이다. Standing Committee on the Food Chain and Animal Health of the European Commission은 말라카이트그린과 L-말라카이트그린의 합으로서 2 µg/kg을 이른바 최소요구수치(MRPL)로 지정하였으며, 상기에 측정된 농도는 지정된 수치보다 매우 높게 나타났다.

뱀장어는 상품크기 뱀장어의 가식부 무게의 약 25%정도를 차지하는 높은 지방의 함량을 가지고 있기 때문에(Belitz and Grosch, 1999), 앞서 보고된 연구(Máchová et al., 1996; Plakas et al., 1996)에 따르면 성어기 뱀장어에서는 말라카이트그린이 천천히 제거되는 것으로 추측된다. 자어기 뱀장어에 말라카이트그린을 처리하는 것은 성어기뱀장어와 가식부에서 말라카이트그린 잔여물이 발견되지 않을 수도 있으나, 조건에 맞지 않는 농도의 처리는 상품형 크기의 뱀장어에서도 인체의 건강을 위협하는 잔여물을 형성할 수 있다.

참 고 문 헌

- Alderman, D., 1985. Malachite green-a review. *J. Fish. Dis.* 8, 289-298.
- Bauer, K., Dangschat, H., Knöppler, H.-O., Neudegger, J., 1988. Aufnahme und Ausscheidung von Malachitgrün bei Regenbogenforellen. *Arch. Lebensm.hyg.* 39, 97-102 (in German, with English abstract).
- Belitz, H.D., Grosch, W., 1999. *Food Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin.
- Bergwerff, A.A., Scherpenisse, P., 2003. Determination of residues of malachite green in aquatic animals. *J. Chromatogr., B* 788, 351-359.
- Greutink, T., Leijen, C., Brandwijk, A., Van Gaalen, L., 2002. Geneesmiddelen voor kweekvis-Achter in de fuik zit de paling. Expertisecentrum LNV, Ministerie van Landbouw, Natuurbeheer en Visserij, Ede/Wageningen, p. 41 (in Dutch).
- Liewes, E., Haenen, O., 1993. The veterinary approach to eels. In: Brown, L. (Ed.), *Aquaculture for Veterinarians: Fish Husbandry and Medicine*. Pergamon, New York, pp. 311-326.
- Máchová J., Svobodová Z., Svobodnik, J., Piacka, V., Vykusová B., Kocová A., 1996. Persistence of malachite green in tissues of rainbow trout after a long-term therapeutic bath. *Acta Vet. BRNO* 65, 151-159.
- Plakas, S.M., el Said, K.R., Stehly, G.R., Gingerich, W.H., Allen, J.L., 1996. Uptake, tissue distribution, and metabolism of malachite green in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 53, 1427-1433.
- Roybal, J.E., Pfenning, A.P., Munns, R.K., Holland, D.C., Hurlbut, J.A., Long, A.R., 1995. Determination of malachite green and its metabolite, leucomalachite green, in Catfish (*Ictalurus punctatus*) tissue by liq-

- uid-chromatography with visible detection.
J. AOAC Int. 78, 453-457.
- Scott, P., 1993. Therapy in aquaculture. In: Brown, L. (Ed.), Aquaculture for Veterinarians: Fish Husbandry and Medicine. Pergamon, New York, pp. 131-152.
- Southgate, P., 1993. Disease in aquaculture. In: Brown, L. (Ed.), Aquaculture for Veterinarians: Fish Husbandry and Medicine. Pergamon, New York, pp. 91-129.
- Yndestad, M., 1993. In: Haagsma, N., Ruiter, A., Czedik-Eysenberg, P.B. (Eds.), Problems with Drug Residues in Farmed Fish. Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, Veldhoven, The Netherlands, pp. 115-124.