

OZNACZANIE POZOSTAŁOŚCI ZIELENI MALACHITOWEJ I LEUKOMALACHITOWEJ W TKANCIE MIĘŚNIOWEJ RYB METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

DETERMINATION OF MALACHITE GREEN AND LEUKOMALACHITE GREEN RESIDUES IN FISH MUSCLE BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

Jelena Doroszkiewicz-Fiedoruk, Jolanta Masłowiecka, Lech Rodziewicz

Pracownia Badań Chemicznych Środków Spożywczych, Zakład Higieny Weterynaryjnej, Białystok

Słowa kluczowe: zieleń malachitowa, zieleń leukomalachitowa, oznaczanie pozostałości, tkanka mięśniowa ryb
Key words: malachite green (MG), leukomalachite green (LMG), residue determination, fish muscle

STRESZCZENIE

Zieleń malachitowa (MG) i leukomalachitowa (LMG) jest przedmiotem monitoringu w mięśniach ryb, dla których minimalna wymagana wartość graniczna wydajności metody analitycznej (MRPL) wynosi 2 µg/kg. Próbkę ekstrahowano mieszaniną buforu i acetonitrylu. Oczyszczanie próbek prowadzono metodą SPE na kolumnkach SCX. Do rozdzielu MG i LMG stosowano kolumnę chromatograficzną Luna Phenyl-Hexyl Phenomenex. Próbki były fortyfikowane LG i LMG w zakresie 2 – 25 µg/kg. Współczynniki zmienności powtarzalności (CV%) były niższe niż 14% dla MG i 16% dla LMG. Średni odzysk był w zakresie 65 – 83% dla MG i 70 – 73% dla LMG. Opracowana metoda spełnia wymagane kryteria metody do oznaczania pozostałości MG i LMG w próbkach tkanki mięśniowej ryb.

ABSTRACT

Malachite green (MG) and leukomalachite green (LMG) are subjected to monitoring fish muscle, with a minimum required performance limit (MRPL) set 2 µg/kg. Samples were extracted with acetonitrile-buffer mixture and cleaned up on SCX solid phase extraction (SPE) column. LC separation MG and LMG was done on column Luna Phenyl-Hexyl Phenomenex. Samples were fortified with MG and LMG between 2 – 25 µg/kg. The coefficients of variation (CV%) were lower than 14% for MG and 16% for LMG. The mean recoveries were in the range 65 – 83% for MG and 70 – 73% for LMG. This method fulfils the criteria for identification and determination of MG and LMG residues in the samples of fish muscle.

WSTĘP

Zieleń malachitowa (MG) podobnie jak fioleto krystaliczny i zieleń brylantowa jest syntetycznym barwnikiem zaliczanym do grupy barwników trifenylometanowych i występuje w postaci soli szczawianowej lub chlorowodoru. Ta farmakologicznie czynna substancja znalazła szerokie stosowanie w hodowli ryb, skorupiaków i mięczaków ze względu na silne działanie przeciwpasożytnicze, przeciwrzybicze i przeciwbakteryjne, mimo że nigdy nie została włączona do grupy

substancji leczniczych zarejestrowanych w Unii Europejskiej jako lek weterynaryjny [4, 8].

Obok działania farmakologicznego zieleń malachitowa wykazuje rozległe działania uboczne, głównie mutagenne, kancerogenne oraz teratogenne. W organizmach żywych jest ona metabolizowana pod wpływem enzymów do bezbarwnej formy zieleni leukomalachitowej (LMG), która może utrzymywać się w tkance mięśniowej ryb nawet do 10-11 miesięcy, a szybkość jej eliminacji zależy od zawartości tkanki tłuszczowej [1, 6].

Adres do korespondencji: Jelena Doroszkiewicz-Fiedoruk, Pracownia Badań Chemicznych Środków Spożywczych, Zakład Higieny Weterynaryjnej, 15-959 Białystok, ul. Zwycięstwa 26 a, tel. 085 651 02 29, fax 085 651 62 91, e-mail: fiedoruk@wiv.bianet.com.pl

Zieleń malachitowa i zieleń leukomalachitowa ze względu na toksyczność nie powinny znajdować się w tkance mięśniowej ryb przeznaczonych do konsumpcji, dlatego też we wszystkich krajach Unii Europejskiej od wielu lat prowadzone są badania monitoringowe w tym kierunku. Ze względu na stosowanie technik o zróżnicowanej sprawności analitycznej oznaczania MG i LMG wprowadzony został wymagany minimalny poziom oznaczania (MRPL – *ang. minimum required performance limit*) wynoszący 2 µg/kg dla sumy stężeń MG i LMG [4].

Badania kontrolne ryb na zawartość MG i LMG rozpoczęto w Polsce w 2003 roku. W 2003r na 10 przebadanych próbek stwierdzono 1 niezgodną z wymaganiami (przekroczony poziom MRPL), a w roku 2004 na 57 przebadanych próbek - 13 próbek niezgodnych z wymaganiami [7]. Zakład Higieny Weterynaryjnej w Białymstoku badania monitoringowe MG i LMG wykonuje od 2006 roku. Przebadano wówczas 33 próbki tkanki mięśniowej pochodzącej od ryb, z czego wykazano 2 próbki niezgodne. W 2007 roku na 27 przebadanych stwierdzono 4 niezgodne, zaś w pierwszej połowie roku 2008 na 14 próbek przebadanych stwierdzono 6 próbek niezgodnych. Badania prowadzone w ciągu 5 ostatnich lat wykazały, iż problem zieleni malachitowej i leukomalachitowej jest nadal aktualny.

Większość opracowanych metod oznaczania MG i LMG prowadzono przy zastosowaniu układu LC-MS/MS (chromatograf cieczowy sprzężony z tandemem spektrometrii mas) [2, 5, 11], który ze względu na wysoki koszt zakupu stanowi ograniczenia dla wielu laboratoriów.

Celem niniejszej pracy było opracowanie metody identyfikacji i oznaczania ilościowego zieleni malachitowej i zieleni leukomalachitowej w tkance mięśniowej ryb przy użyciu układu LC-DAD-FLD.

MATERIAŁ I METODY

Do opracowania metody identyfikacji i oznaczania pozostałości MG i LMG w tkance mięśniowej pochodzącej od ryb wykorzystano ogólnie stosowaną procedurę [3, 9, 10, 12], którą zmodyfikowano głównie w odniesieniu do procesu ekstrakcji poprzez dobór odpowiednich odczynników, sposobu oczyszczania ekstraktu na kolumnkach oraz ustalenie parametrów pracy chromatografu cieczowego.

Wyposażenie pomiarowe

Chromatograf cieczowy Hewlett Packard 1100 z detektorem DAD i FLD, pipety elektroniczne nastawne, waga laboratoryjna o dokładności ± 0,01 mg, pH-metr, zestaw do ekstrakcji SPE 12-G, system oczyszczania wody Millipore–Elix5, homogenizator laboratoryjny,

wirówka laboratoryjna, blok grzejny z urządzeniem do zawiewu azotu, wytrząsarka laboratoryjna typu Vortex, szkło laboratoryjne.

Odczynniki i roztwory

Woda, co najmniej o trzecim stopniu czystości, zgodnie z normą PN-ISO 3696:1999, acetonitryl czystości HPLC, metanol czystości HPLC, octan sodu czystości HPLC, kwas cytrynowy monohydrat, kwas p-toluenosulfonowy, chlorowodorek hydroksylaminy, dichlorometan czystości HPLC, kwas askorbinowy bezwodny, woda amoniakalna, 30%, kwas octowy 100%, kolumnienki Strata SCX 500 mg/3ml, chlorek sodu cz.d.a., aceton HPLC, wodorotlenek sodu bezwodny, glikol etylenowy min. 99,5%, 0,05 M bufor octanowy o pH 4,5, bufor cytrynowy o pH 4,0, 1M roztwór kwasu p-toluenosulfonowego, 25% roztwór hydroksylaminy, roztwór kwasu askorbinowego o stężeniu 1mg/ml, roztwór do kondycjonowania kolumnienek SPE (acetonitryl – kwas octowy 95:5, v/v), 5M roztwór wodorotlenku sodu, roztwór do elucji z kolumnienek SPE (acetonitryl – woda amoniakalna 30% 94:6 v/v), faza do rozpuszczenia (acetonitryl – bufor octanowy pH 4,5 – kwas askorbinowy 47,5 : 47,5 : 5 v/v/v), glikol etylenowy: metanol 10:90 v/v, substancja wzorcowa szczawianu zieleni malachitowej (Merck, nr kat. 1013980025), substancja wzorcowa zieleni leukomalachitowej (Sigma-Aldrich, nr kat. 125660).

Przygotowanie próbek do analizy

Materiał do badań stanowiły próbki mięśni pochodzące od ryb. Do czasu analizy próbki były przechowywane w temp. poniżej –20 °C. Przed rozpoczęciem badania próbkę mięśni o masie ok. 300 g doprowadzano do temperatury pokojowej i usuwano zewnętrzny tłuszcz oraz części niejadalne. Próbkę laboratoryjną rozdrabniano przy użyciu maszynki do mielenia mięsa i dokładnie mieszano.

Do próbek wirówkowych o pojemności 30 ml odważano po 5,0 g mięśni. Następnie dodawano po 0,5 ml 25% roztworu hydroksylaminy i 1M roztworu kwasu p-toluenosulfonowego oraz 5,0 ml buforu cytrynowego o pH 4,0 i homogenizowano ok. 1 min przy obrotach 8-10 tys. rpm. Następnie dodawano po 15 ml acetonitrylu i dalej homogenizowano przez kolejne 5 min. próbki odwirowywano przez 10 min przy szybkości ok. 3000 rpm. w temp. pokojowej. Supernatant zdekantowano do rozdzielaczy. Do próbek dodawano po 5,0 ml buforu octanowego o pH 4,5 oraz po 15 ml acetonitrylu, mieszano bagietką i wytrząsano na Vortexie przez 5 minut. Ponownie odwirowywano, zlewano do rozdzielaczy i dodawano po 10 ml dichlorometanu oraz po ok. 1,0 g chlorku sodu. Dokładnie wytrząsano aż do całkowitego rozpuszczenia soli i pozostawiano

do rozdziału faz. Dolną warstwę usuwano, a górną oczyszczano na kolumnkach SPE.

Kolumnienki z sorbentem SCX przemywano 3,0 ml roztworu do kondycjonowania. Górną warstwę z rozdzielaczy przepuszczano przez kolumnienki z prędkością 1-2 krople/sek. Po przejściu ekstraktu każdą kolumnienkę przemywano kolejno 2,5 ml acetonu, 2,5 ml metanolu i 2,5 ml acetonitrylu. Badane związki eluowano roztworem do elucji 2 razy po 2,5 ml do probówek, w których znajdowało się po 100 µl mieszaniny glikol etylenowy: metanol. Eluat zagęszczano w strumieniu azotu w temp. 50°C. Suchą pozostałość rozpuszczano w 0,5 ml fazy do rozpuszczania. Tak przygotowane ekstrakty analizowano na chromatografii cieczowym.

Analiza HPLC

Do rozdziału zieleni malachitowej i leukomalachitowej zastosowano kolumnę chromatograficzną Luna Phenyl-Hexyl o wymiarach 150 x 4,6 mm, wielkość ziarna 3 µm firmy Phenomenex oraz dodatkowo pre-kolumnę o tym samym wypełnieniu.

Analizę MG i LGM prowadzono przy zastosowaniu dwóch detektorów DAD i FLD w połączeniu on-line. DAD służył do identyfikacji i oznaczania ilościowego MG, zaś FLD do oznaczania LMG.

Warunki analizy HPLC: detektor DAD $\lambda = 600$ nm., detektor FLD Ex: $\lambda = 265$ nm., Em: $\lambda = 360$ nm., przepływ przez kolumnę 1,0 ml/min, temp. kolumny analitycznej 40°C, objętość dozowana 20,0 µl, faza ruchoma A - acetonitryl do HPLC, B - 60:20 ($V_1 + V_2$) acetonitryl do HPLC i bufor octanowy o pH 4,5, gradient stężeń 0,0-12,0 min B 40%, 12,0-12,1 min B 20%, 12,1-16,0 min B 40%.

Identyfikację MG i LMG przeprowadzono poprzez porównanie czasów retencji pików występujących w próbkach badanych, wzorcowych i wzbogaconych.

Zawartość poszczególnych związków w próbkach obliczono wykorzystując następujący wzór:

$$X = \frac{V \cdot C}{M}$$

gdzie:

X - zawartość związku w analizowanej próbce, µg/kg;

M - masa badanej próbki, g ;

V - objętość końcowa ekstraktu, ml;

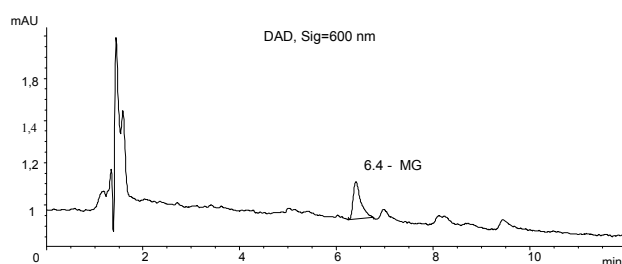
C - stężenie zieleni w próbce odczytane z krzywej wzorcowej, ng/ml

WYNIKI I DYSKUSJA

Opracowana metoda została walidowana. Wyznaczono następujące parametry statystyczne metody jak: specyficzność, liniowość, powtarzalność, dokładność, odtwarzalność oraz poprawność.

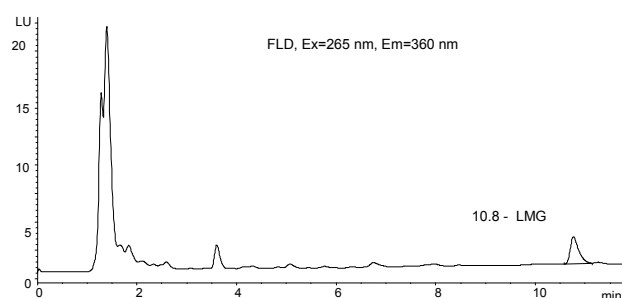
Specyficzność metody zbadano przy użyciu czystych wzorców chemicznych MG i LMG, próbek ślepych odczynnikowych (odczynniki stosowane w procesie analitycznym), ślepych matryc tkanki mięśniowej ryb (matryce nie zawierające MG i LMG) oraz matryc wzbogaconych pochodzących od ryb. Stwierdzono, że opracowana metoda jest specyficzna dla oznaczanych związków zieleni malachitowej i leukomalachitowej. Względny czas retencji MG i LMG w próbkach wzbogaconych do czasu retencji wzorców jest taki sam z tolerancją $\pm 2,5\%$.

Na ryc. 1 przedstawiono typowy chromatogram próbki mięśni ryby wzmocnione MG 2 µg/kg. Chromatogram uzyskano przy zastosowaniu układu LC-DAD.



Ryc. 1. Chromatogram LC-DAD z ekstraktu mięśni ryby, matryca wzmocniona MG 2 µg/kg
LC-DAD chromatogram of fish muscle extract, spiked matrix MG 2 µg/kg

Na ryc. 2 przedstawiono typowy chromatogram próbki mięśni ryby wzmocnione LMG 2 µg/kg. Chromatogram uzyskano przy zastosowaniu układu LC-FLD.



Ryc. 2. Chromatogram LC-FLD z ekstraktu mięśni ryby, matryca wzmocniona LMG 2 µg/kg
LC-FLD chromatogram of fish muscle extract, spiked matrix LMG 2 µg/kg

Zakres liniowości metody określono na podstawie krzywych wzorcowych przygotowanych w oparciu, o co najmniej 5 poziomów wzorca MG i LMG w zakresie 2 – 25 µg/kg. Współczynnik korelacji wyniósł powyżej 0,998.

Tabela 1 Statystyczna charakterystyka metody oznaczania MG i LMG w tkance mięśniowej ryb.
Statistical characteristics of the method for MG and LMG determination in fish muscle

Parametry statystyczne	Zieleń malachitowa				Zieleń leukomalachitowa			
	2,0	4,0	10,0	25,0	2,0	4,0	10,0	25,0
Wartość wzmacnienia (µg/kg)	2,0	4,0	10,0	25,0	2,0	4,0	10,0	25,0
Wartość średnia (µg/kg)	1,3	3,2	7,2	20,7	1,4	2,8	7,3	17,4
Odchylenie standardowe powtarzalności (µg/kg)	0,05	0,22	1,00	1,81	0,11	0,30	1,10	1,04
Współczynnik zmienności powtarzalności (%)	3,9	6,9	13,9	8,7	7,9	10,7	15,1	6,0
Średni odzysk (%)	64,3	79,2	72,1	82,8	72,3	71,1	72,8	69,8
Odchylenie standardowe odtwarzalności (µg/kg)	-	0,50	-	-	-	0,34	-	-
Współczynnik zmienności odtwarzalności (%)	-	16,4	-	-	-	11,8	-	-

W celu określenia powtarzalności i poprawność (odzysk) wzbogacono próbki mięśni ryb znanymi stężeniami mieszaniny MG i LMG na poziomie 2, 4, 10, i 25 µg/kg dla każdego związku. Współczynnik zmienności powtarzalności wynosił dla MG poniżej 14 %, zaś dla LMG 16 %. Średni odzysk wynosił w zakresie 61,5 – 86,5 %. Odtwarzalność metody badano na próbach wzbogaconych na poziomie 4 µg/kg. Współczynnik zmienności odtwarzalności wynosił dla MG poniżej 17%, zaś dla LMG 12%. W tabeli 1 przedstawiono uzyskane parametry statystyczne dla metody.

Opracowana i zwalidowana procedura jest stosowana w badaniach kontrolnych pozostałości MG i LMG w tkance mięśniowej ryb.

WNIOSKI

- Opracowana metoda identyfikacji i oznaczania zieleń malachitowej i leukomalachitowej LC-DAD-FLD pozwala na wykrycie tych związków na poziomie MRPL wynoszącym 2 µg/kg.
- Zwalidowana metoda oznaczania MG i LMG z powodzeniem jest stosowana w badaniach kontrolnych pozostałości tych związków w tkance mięśniowej ryb.

PIŚMIENNICTWO

- Allen J.L., Gofus J.E., Meinertz J.R.*: Determination of malachite green residues in the eggs, fry, and adult muscle tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). JAOAC Int. 1994, 77, 553-557.
- Bergwerff A. A., Scherpenisse P.*: Determination of residues of malachite green in aquatic animals. J. Chromatogr. 2003, 788, 351-359.
- Bergwerff A. A., Scherpenisse P.*: Determination of residues of malachite green in finfish by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 2004, 529, 173-177.
- Decyzja Komisji nr 2002/657/WE z dnia 12 sierpnia 2002 r. ustalająca kryteria dla metod analitycznych i ich interpretacji.
- Lee K.C., Wu J.L., Cai Z.*: Determination of malachite green and leucomalachite green in edible goldfish muscle by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. J. Chromatogr. 2006, 843(2), 247-51.
- Máchowá J., Svobodová Z., Svobodník J., Piačka V., Výkusová B., Kocová A.*: Persistence of malachite green in tissues of rainbow trout after a long-term therapeutic bath. Acta Vet. Brno 1996, 65, 151-159.
- Mitrowska K.*: Występowanie pozostałości zieleni malachitowej u ryb słodkowodnych. <http://www.pankarp.pl/ochronazdrowia.pdf>.
- Mitrowska K., Posyniak A.*: Zieleń malachitowa – aspekty farmakologiczne, toksykologiczne i kontrola pozostałości. Med. Wet. 2005, 61, 742-745.
- Mitrowska K., Posyniak A.*: Determination of malachite green and its metabolite, leucomalachite green, in fish muscle by liquid chromatography. Bull Vet Inst Pulawy 2004, 48, 173-176.
- Mitrowska K., Posyniak A., Żmudzki J.*: Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection. J. Chromatogr. 2005, 1089, 187-192.
- Riet J.M., Murphy C.J., Pearce J.N., Potter R.A., Burns B.G.*: Determination of malachite green and leucomalachite green in a variety of aquacultured products by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. JAOAC Inst. 2005, 88, 744-799.
- Srivastava S., Sinha R., Roy D.*: Toxicological effects of malachite green. Aquat. Toxicol. 2004, 66, 319-329.

Otrzymano: 15.08.2008

Zaakceptowano do druku: 17.06.2009