

Rozmieszczenie i kinetyka zanikania zieleni malachitowej i zieleni leukomalachitowej w tkankach i narządach karpia^{*)}

KAMILA MITROWSKA, ANDRZEJ POSYNIAK, JAN ŻMUDZKI

Zakład Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Mitrowska K., Posyńnik A., Żmudzki J.

Tissue distribution and persistence of malachite green and leucomalachite green in common carp

Summary

Malachite green (MG) is a synthetic triphenylmethane dye that has been used worldwide as a fungicide and ectoparasiticide in cultured fish eggs, fingerlings and adult fish since the 1930s. Due to its potential animal carcinogenicity, mutagenicity, and teratogenicity, MG is not registered for veterinary use in many countries, including the European Union. The aim of this study was to investigate the tissue distribution and persistence of MG and its main metabolite, leucomalachite green (LMG), in carp after a therapeutic bath. On day 0, MG concentration in all tissues exceeded the initial concentration in therapeutic water (2 mg/l). Subsequently, the dye was rapidly and extensively metabolized to LMG, which was slowly eliminated from the tissues. Higher concentrations of MG and LMG were detected in the gills, liver and kidneys than in the spleen and muscles. The parent compound was more persistent in kidneys, liver and spleen (up to 112 days) than in the gills and muscles (up to 56 days). LMG concentrations declined more slowly in all tissues, being still detectable in kidneys and muscles 252 days after treatment.

Keywords: malachite green, leucomalachite green, tissue distribution, persistence, carp

Zieleń malachitowa (MG) jest syntetycznym barwnikiem trójfenylometanowym, który ze względu na wysoką skuteczność działania przeciw grzybom, pierwotniakom pasożytniczym, bakteriom chorobotwórczym znalazł zastosowanie w hodowli ryb, skorupiaków i mięczaków (5). Po zastosowaniu zieleni malachitowa szybko wchłania się do organizmu ryby głównie przez skórę i skrzela. Na efektywność tego procesu wpływa gatunek, wiek i stan fizjologiczny ryby oraz czynniki abiotyczne, przede wszystkim stężenie i czas ekspozycji barwnika oraz właściwości fizykochemiczne wody (10). W organizmach żywych MG jest redukowana do bezbarwnej zieleni leukomalachitowej (LMG). Forma ta ze względu na wysoką lipofilność bardzo długo pozostaje w organizmie ryby, a szybkość jej eliminacji zależy od zawartości tkanki tłuszczowej (2, 12).

Budowa chemiczna zieleni malachitowej i jej głównego metabolitu, zieleni leukomalachitowej oraz badania przeprowadzone na zwierzętach laboratoryjnych sugerują możliwość powstawania odległych efektów działania genotoksycznego, w tym: mutagennego, kan-

cerogennego i teratogennego (8). Z tego też względu stosowanie tego barwnika w hodowlach ryb przeznaczonych do spożycia stanowi ryzyko występowania toksycznych pozostałości w produktach spożywczych zwierzęcego pochodzenia, co stanowi poważne ryzyko zagrożenia zdrowia konsumentów.

W świetle obowiązujących przepisów prawnych MG nie jest zarejestrowana jako weterynaryjny produkt leczniczy i jej stosowanie u ryb hodowlanych jest niedozwolone (4). Zieleń malachitowa jest substancją, która nie powinna występować w mięśniach ryb przeznaczonych do konsumpcji w najmniejszym nawet stężeniu. Ponieważ laboratoria oznaczające MG i LMG stosują metody o różnej sprawności analitycznej, decyzją Komisji 2004/25/EC (3) wprowadzono wymagany minimalny poziom oznaczania (MRPL – Minimum Required Performance Limit) dla sumy MG i LMG, który wynosi 2 µg/kg. Znalezione stężenia sumy związków powyżej tej wartości kwalifikują próbkę jako niezgodną, a w konsekwencji żywność jako nie nadającą się do obrotu i konsumpcji.

Mimo że dostępne są informacje na temat losów zieleni malachitowej w organizmie różnych gatunków ryb, jednak brak jest danych na temat rozmieszcze-

^{*)} Praca została wykonana w ramach projektu badawczego nr 2 P06K 007 29.

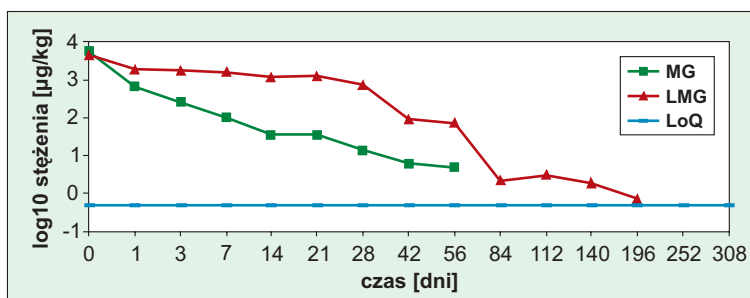
nia i kinetyki zanikania zieleni malachitowej w tkankach i narządach karpia, najbardziej popularnego gatunku ryb hodowlanych w Polsce. Mając na uwadze ochronę zdrowia konsumenta, przeprowadzono doświadczenie na karpkach określające rozmieszczenie i kinetykę zanikania zieleni malachitowej w tkankach i narządach karpia.

Materiał i metody

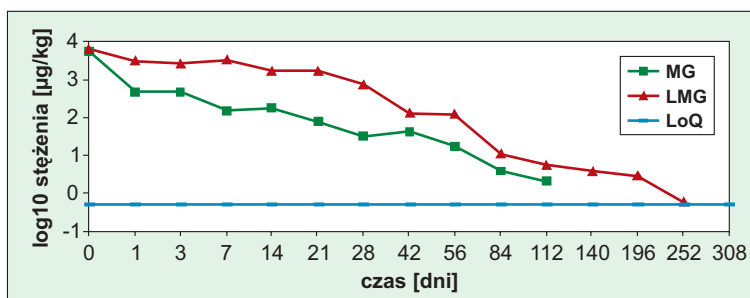
Doświadczenie przeprowadzono na narybku karpia królewskiego (*Cyprinus carpio* L.) pochodzącego z hodowli, w której nie stosowano zieleni malachitowej. Na wykonywanie doświadczeń na zwierzętach pozwolenie wydała Lokalna Komisja Etyczna do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (numer opinii 33/2004). W trakcie doświadczenia ryby znajdowały się w akwariach Zakładu Chorób Ryb PIWet-PIB w Puławach. Karpie ($n = 100$, średnia masa 100 ± 11 g) umieszczono w zbiorniku z wodą napowietrzaną i filtrowaną za pomocą zewnętrznych filtrów kubelkowych (Ehime, Niemcy). Po siedmiu dniach adaptacji ryby kąpano przez 3 godziny w roztworze zieleni malachitowej o stężeniu 2 mg/l. Jest to typowe postępowanie stosowane w zwalczaniu ichtioftiriozy (5). Następnie opłukano je w strumieniu bieżącej wody i przeniesiono do zbiornika z czystą natlenioną wodą. Podczas doświadczenia temperatura wody wahała się w granicach od 14°C do 17°C , a wartości pH pozostawały w zakresie od 7,5 do 8,1. Oprócz stanu zaniepokojenia ryb nie zaobserwowano żadnych widocznych objawów klinicznych wskazujących na toksyczne działanie barwnika. Podczas trwania doświadczenia ryby karmione były mieszanką karmy suszonej z larw wodzienia i ochotki z suchą karmą dla ryb akwariowych (Supervit Tropical, Polska). Ryby ($n = 6$) były losowo wyławiane i usypiane w 0., 1., 3., 7., 14., 21., 28., 42., 56., 84., 112., 140., 196., 252. i 308. dniu po zakończeniu ekspozycji na zieleń malachitową. Przed kąpielą sześć ryb losowo wyłowiono i traktowano jako kontrolę. Z każdej ryby wyizolowano: skrzela, nerki, wątrobotrzustkę, śledzionę oraz mięśnie ze skórą. Ponadto w 0., 10., 20., 30., 60., 90., 120., 150. i 180. minucie trwania kąpiele w zieleni malachitowej pobierano próbki wody. Wszystkie próbki pobrane podczas doświadczenia do czasu analizy przechowywano w zamrażarce w temperaturze $\leq -18^{\circ}\text{C}$. Do oznaczania MG i LMG w pobranych próbkach wykorzystano metodę chromatografii cieczowej z detektorami absorpcji światła widzialnego i fluorescencyjnym (LC-VIS/FLD), której granica oznaczalności (LoQ – Limit of Quantification) wynosi $0,5 \mu\text{g/kg}$ (11).

Wyniki i omówienie

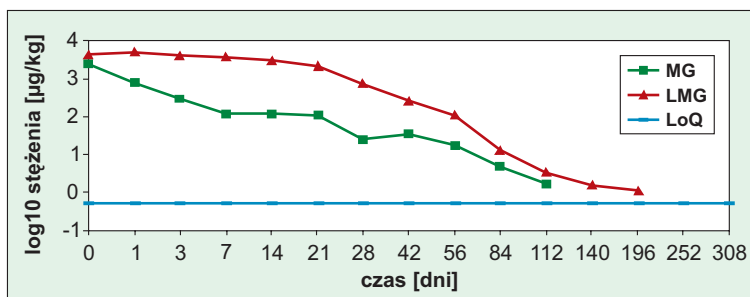
Średnie stężenia MG i LMG oznaczone w próbkach skrzeli, nerek, wątrobotrzustki, śledziony i mięśni karpia po ekspozycji na zieleń malachitową graficznie przedstawiono na ryc. 1-5.



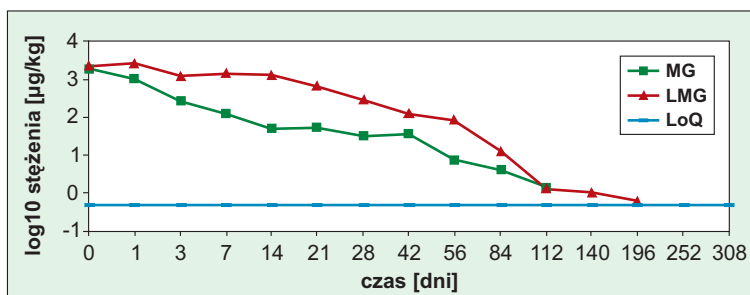
Ryc. 1. Średnie stężenia MG i LMG w skrzelach karpia po kąpiele w roztworze zieleni malachitowej



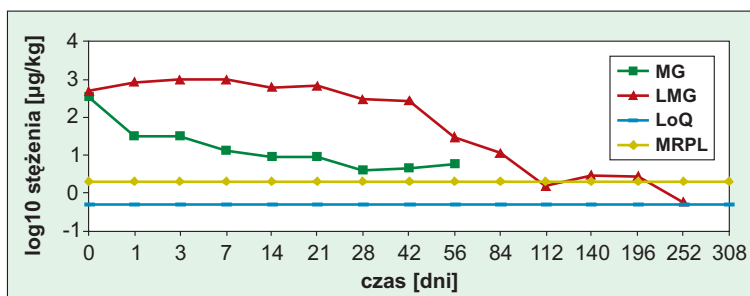
Ryc. 2. Średnie stężenia MG i LMG w nerkach karpia po kąpiele w roztworze zieleni malachitowej



Ryc. 3. Średnie stężenia MG i LMG w wątrobotrzustce karpia po kąpiele w roztworze zieleni malachitowej



Ryc. 4. Średnie stężenia MG i LMG w śledzionie karpia po kąpiele w roztworze zieleni malachitowej



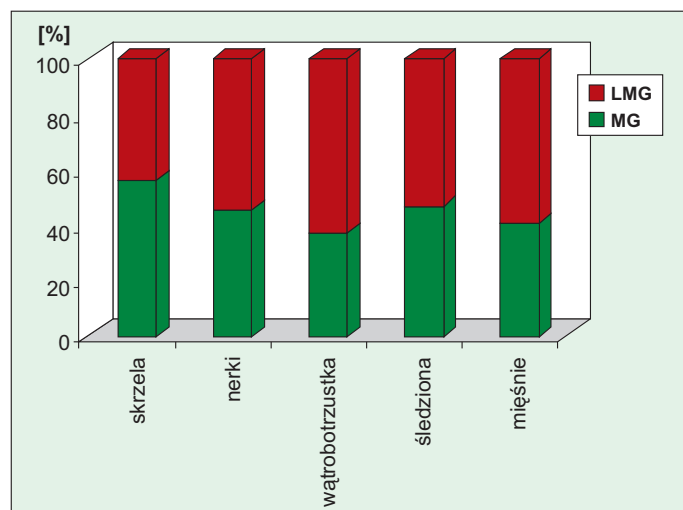
Ryc. 5. Średnie stężenia MG i LMG w mięśniach karpia po kąpiele w roztworze zieleni malachitowej

Analiza otrzymanych wyników pokazuje bardzo szybkie przechodzenie barwnika z wody do wszystkich narządów i tkanek ryby, a następnie równie szybkie metabolizowanie substancji macierzystej do zieleni leukomalachitowej.

Najwyższe stężenia MG stwierdzono bezpośrednio po zakończeniu kąpieli (w dniu 0.) we wszystkich badanych narządach i tkankach. W momencie zakończenia kąpieli (dzień 0.) oznaczone stężenia MG w skrzelach, nerkach i wątrobotrzustce przekraczały początkowe stężenie MG w wodzie w trakcie kąpieli w zieleni malachitowej. W analizowanych próbkach wody nie wykazano obecności LMG, a stężenie MG w wodzie w trakcie przeprowadzania kąpieli zmniejszyło się od wartości 2 mg/l do 1,5 mg/l.

Największe ilości MG oznaczono w skrzelach ($5845,50 \pm 542,04 \mu\text{g/kg}$), co dowodzi, że narząd ten odgrywa główną rolę w procesie wchłaniania barwnika do organizmu ryby. W nerkach stężenie MG również było wysokie i wynosiło $5531,44 \pm 1004,34 \mu\text{g/kg}$, co dodatkowo może tłumaczyć skuteczność zieleni malachitowej w przerostowej chorobie nerek. W wątrobotrzustce stężenie MG było nieco niższe i wynosiło $2495,24 \pm 851,61 \mu\text{g/kg}$, w śledzionie $1956,09 \pm 1863,67 \mu\text{g/kg}$, a w mięśniach $341,30 \pm 98,66 \mu\text{g/kg}$. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi otrzymanymi w badaniach przeprowadzonych na pstrągu tęczowym po kąpieli w roztworze zieleni malachitowej o stężeniu 1,6 mg/l przez 40 min. w temp. 16°C przy pH 7,6 (1).

Zieleń malachitowa bardzo szybko metabolizowana jest do zieleni leukomalachitowej, na co wskazują wyniki analiz próbek pobranych tuż po zakończeniu kąpieli. Stwierdzono, że we wszystkich narządach i tkankach, oprócz skrzeli, stężenie LMG było wyższe od stężenia macierzystej substancji. Najwyższy stosunek LMG do MG zaobserwowano w wątrobie, co świadczy o tym, że narząd ten jest miejscem najbardziej intensywnych procesów metabolicznych (ryc. 6).



Ryc. 6. Stosunek MG do LMG w narządach i tkankach karpia po zakończeniu kąpieli w roztworze zieleni malachitowej (dzień 0.)

W czasie, gdy stężenie MG szybko malało we wszystkich narządach i tkankach, stężenie LMG w wątrobotrzustce, śledzionie i mięśniach zwiększało się przez kilka pierwszych dni, a następnie bardzo wolno się zmniejszało. Również w skrzelach i nerkach, w których najwyższe stężenie LMG odnotowano bezpośrednio po zakończeniu kąpieli, stwierdzono powolne zanikanie metabolitu.

Zaobserwowany w organizmie karpia szybki metabolizm MG do pozbawionej ładunku i lipofilnej LMG pozostaje w zgodzie z wcześniej opisanymi doświadczeniami na pstrągu tęczowym (6, 9), węgorzu europejskim (7) i sumie kanałowym (12).

Zieleń malachitowa najdłużej utrzymywała się w nerkach ($2,08 \pm 0,54 \mu\text{g/kg}$), wątrobotrzustce ($1,74 \pm 0,47 \mu\text{g/kg}$) i śledzionie ($1,46 \pm 0,49 \mu\text{g/kg}$) (do 112. dnia), podczas gdy w skrzelach ($4,81 \pm 1,32 \mu\text{g/kg}$) i mięśniach ($5,85 \pm 1,75 \mu\text{g/kg}$) do 56. dnia trwania doświadczenia. W przypadku mięśni wyniki były zgodne z uzyskanymi przez Aldermana, który w doświadczeniu na pstrągu tęczowym (1) jako ostatni dzień występowania MG w mięśniach wyznaczył dzień 7. W badaniach tych stosowano metodę analityczną, której granica oznaczalności wynosiła $20 \mu\text{g/kg}$, czyli była znacznie wyższa niż granica oznaczalności metody wykorzystywanej w badaniach własnych, przeprowadzonych na karpniu królewskim ($\text{LoQ} = 0,50 \mu\text{g/kg}$). W innym doświadczeniu na pstrągu tęczowym (6) stężenie MG równe $1 \mu\text{g/kg}$ utrzymywało się do 40. dnia. W badaniach na sumie kanałowym (12, 13) stężenia MG wynoszące 6 i $12 \mu\text{g/kg}$ odnotowano w mięśniach w 14. dniu ($\text{LoQ} = 5 \mu\text{g/kg}$), a w doświadczeniach na węgorzu europejskim (7) stężenie $2 \mu\text{g/kg}$ oznaczono w 62. dniu po kąpieli ($\text{LoQ} = 0,2 \mu\text{g/kg}$). Odnośnie do wątrobotrzustki i nerek czas pozostawiania MG w karpniu jest nieco dłuższy niż ten opisany dla pstrąga (1).

W niniejszych badaniach zieleń leukomalachitową obecna była w nerkach i mięśniach jeszcze w 252. dniu od zakończenia eksperymentu, natomiast w skrzelach, wątrobotrzustce i śledzionie w 196. dniu.

W dniu 252. średnie stężenie LMG w mięśniach było niższe niż MRPL ($2 \mu\text{g/kg}$) i wynosiło $0,60 \pm 0,15 \mu\text{g/kg}$. Ostatnim dniem, w którym wykazano obecność LMG w mięśniach w stężeniu przekraczającym MRPL był dzień 196. ($2,85 \pm 0,50 \mu\text{g/kg}$). Natomiast okres, po jakim nie stwierdzano obecności LMG w mięśniach w ilościach przekraczających LoQ użytej metody, wynosił 308 dni.

Uzyskane wyniki pozostawiania LMG w mięśniach karpia są podobne do tych, które uzyskano podczas doświadczeń przeprowadzonych na innych gatunkach ryb. W tkance mięśniowej pstrąga tęczowego pozostałości zieleni leukomalachitowej ($2 \mu\text{g/kg}$) utrzymywały się nawet do 10 miesięcy po zastosowaniu 6-dniowego leczenia w dawce odpowiadającej stężeniu $0,2 \text{ mg/l}$, natomiast po 12 miesiącach nie stwierdzono obecności LMG przy LoQ stosowanej metody analitycznej równej $1 \mu\text{g/kg}$ (9). W doświadczeniu na su-

Tab. 1. Czas pozostawania MG i LMG w badanych narządach i tkankach karpia wyrażony w stopniach (°D)

Narząd/Tkanka	Czas pozostawania MG (°D)	Czas pozostawania LMG (°D)
Skrzela	868	3038
Nerki	1763	3906
Wątrobotrzustka	1763	3038
Śledziona	1763	3038
Mięśnie	868	3906

mie kanałowym (12) stężenia LMG równe 19 µg/kg odnotowano w mięśniach w 42. dniu (LoQ = 5 µg/kg). Po 24-godzinnej kąpieli węgorza europejskiego (4,1 g) w roztworze MG o stężeniu 0,1 mg/l pozostałości LMG utrzymywały się na poziomie 15 µg/kg po upływie 100 dni (7). W tej samej pracy autorzy wykazali, że węgorze europejskie (0,3 g) kapane w roztworze MG o stężeniu 0,15 mg/l po osiągnięciu masy ciała 100 g w wieku 11 miesięcy nie zawierały żadnych śladów MG i LMG przy stosowaniu metody, której LoQ wynosiła 0,2 µg/kg. Dlatego autorzy sugerują, by dopuścić stosowanie zieleni malachitowej we wczesnym stadium rozwojowym ryb w okresie, gdy ryby są najbardziej narażone na infekcje. Jednak po tym czasie każde stosowanie zieleni malachitowej może powodować występowanie pozostałości barwnika w okresie, gdy ryba nadaje się do sprzedaży.

Trudno jest porównywać dane pochodzące z różnych doświadczeń nie tylko z racji stosowania innych metod analitycznych, ale głównie ze względu na różnice w dawce i w czasie ekspozycji na zieleń malachitową oraz różną temperaturę i pH wody użytej podczas eksperymentów. Szybkość eliminacji LMG, podobnie jak innych substancji lipofilnych, zależna jest od zawartości lipidów w tkankach, od wieku i stanu fizjologicznego ryb. Znaczny wpływ mają również czynniki abiotyczne, przede wszystkim temperatura wody, która warunkuje szybkość procesów metabolicznych w organizmie ryby. Temperatura, twardość, zawartość tlenu i pH wody warunkują stopień jonizacji cząsteczek barwnika i wpływają na parametry farmakokinetyczne. Ponieważ ryby są organizmami zmienneo-temperaturowymi, szybkość procesu absorpcji, dystrybucji i eliminacji zieleni malachitowej wzrasta wraz ze wzrostem temperatury wody. Ze wzrostem pH wody maleje stopień jonizacji cząsteczki barwnika i wzrasta stopień wchłaniania przez organizm ryby (12). Możliwość pełniejszego porównania wyników daje stosowanie jednostki uwzględniającej temperaturę wody. Wyniki badań przeprowadzonych na karpniu wykazują 3906°D pozostawania LMG w mięśniach (tab. 1). Dane te są zgodne z uzyskanymi w doświadczeniu na pstrągu tęczowym (9), u którego czas pozostawania LMG w mięśniach wynosił 3900°D. Po uwzględnieniu temperatury wody czas pozostawania LMG w sumie kanałowym był równy 882°D (12), a w węgorzu europejskim 2500°D (7).

Podsumowanie

Badania przeprowadzone na karpniach wykazały wysokie tempo absorpcji i rozmieszczenia zieleni malachitowej we wszystkich narządach i tkankach, a następnie szybkie metabolizowanie do zieleni leucomalachitowej. Analiza stężeń MG i LMG w rybach pozwala określić czas zanikania zieleni malachitowej na ok. 2 miesiące oraz czas pozostawania zieleni leucomalachitowej w tkance mięśniowej na ok. 1 miesiąc po trzygodzinnej kąpieli ryb w roztworze zieleni malachitowej o stężeniu 2 mg/l.

Piśmiennictwo

1. Alderman D. J., Clifton-Hadley R. S.: Malachite green: a pharmacokinetic study in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Dis.* 1993, 16, 297-311.
2. 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*). *J. AOAC Int.* 1994, 77, 553-557.
3. Anon.: Commission Decision 2004/25/EC of 22 December 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPL) for certain residues in food of animal origin. *Off. J. Eur. Commun.* 2004, L 6, 38-39.
4. Anon.: Council Regulation 2377/90/EC of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Commun.* 1990, L 224, 1-8.
5. Antychowicz J.: Choroby i zatrucia ryb. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 1996.
6. Bauer K., Dangschat H., Knoppler H. O., Neudegger J.: Aufnahme und Ausscheidung von Malachitgrün bei Regenbogenforellen. *Arch. Lebensmittelhyg.* 1988, 39, 85-108.
7. Bergwerff A. A., Kuiper R. V., Scherpenisse P.: Persistence of residues of malachite green in juvenile eels (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture* 2004, 233, 55-63.
8. Culp S. J.: NTP technical report on the toxicity studies of malachite green chloride and leucomalachite green (CAS Nos. 569-64-2 and 129-73-7) administered in feed to F344/N rats and B6C3F₁ mice. *Toxic. Rep. Ser.* 2004, 71, 1-10.
9. Máchová J., Svobodová Z., Svobodník J., Piačka V., Vykusová 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.
10. Mitrowska K., Posylniak A.: Zieleń malachitowa – aspekty farmakologiczne, toksykologiczne i kontrola pozostałości. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 742-745.
11. Mitrowska K., Posylniak A., Żmudzki J.: Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 2005, 1089, 187-192.
12. Plaks S. M., El Said K. R., Stehly G. R., Gingerich W. H., Allen J. L.: Uptake, tissue distribution, and metabolism of malachite green in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). 1996 *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 1417-1433.
13. Plaks S. M., El Said K. E., Stehly G. R., Roybal J. E.: Optimization of a liquid chromatographic method for determination of malachite green and its metabolites in fish tissues. *J. AOAC Int.* 1995, 78, 1388-1394.

Adres autora: dr Kamila Mitrowska, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy;
e-mail: kamitro@piwet.pulawy.pl