

# Détermination du vert de malachite dans le poisson par chromatographie liquide à haute performance = Quantification of malachite green in fish using high performance liquid chromatography

Autor(en): **Dafflon, O. / Gobet, H. / Koch, H.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **83 (1992)**

Heft 3

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982261>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

## Détermination du vert de malachite dans le poisson par chromatographie liquide à haute performance

Quantification of Malachite Green in Fish Using High Performance Liquid  
Chromatography

*O. Dafflon, H. Gobet et H. Koch*  
Office vétérinaire fédéral, Liebefeld-Berne

### Introduction

Le vert de malachite (VM) est un colorant qui fait partie de la classe des triphénylméthanes (fig. 1). Son sel d'oxalate, Bis-(4-diméthylamino-phényle)-phénylcarbénium-oxalate à cause de ses propriétés fongicides et antiparasitaires, est utilisé pour le poisson d'élevage. *Bauer* et al. (1) ont démontré que le temps d'élimination du VM chez la truite est long; il est fort probable qu'elle garde tout au long de sa vie un minimum résiduel. Dans le poisson, le VM est absorbé et métabolisé en grande partie sous forme de leucobase dans le tissu musculaire (1).

En 1982, la FAO/OMS citait: «Le VM peut provoquer des dommages pour la santé» (2). L'Office fédéral de la santé publique a considéré comme toxicologiquement inoffensif une quantité de résidus de 10 µg/kg et fixé cette teneur comme tolérance provisoire au sens de l'article 7a de l'ODA (3).

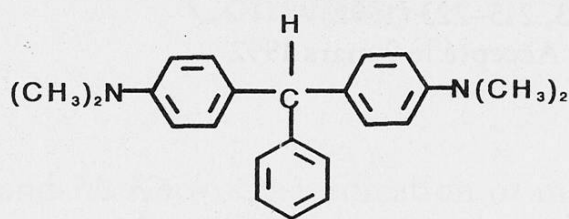
En Suisse, le VM n'est à ce jour pas enregistré comme médicament vétérinaire pour les animaux de rente.

Dans le cadre de notre office, nous avons effectué des contrôles de qualité chez la truite d'élevage, nous avons à plusieurs reprises mis en évidence des résidus de VM (tableau 1).

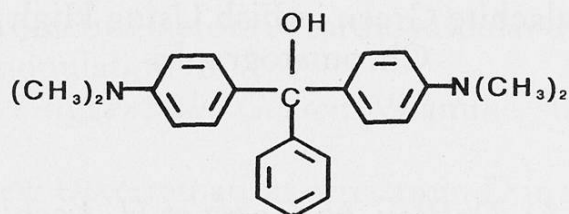
Les méthodes actuelles (1, 4) proposées à l'analyste pour la détermination du VM ont été modifiées pour notre application.

La méthode est basée sur une extraction du VM avec acétonitrile en milieu acide, suivie par un dégraissage avec hexane. La séparation du VM s'effectue à l'aide d'une chromatographie à paire d'ions et d'une élution isocratique.

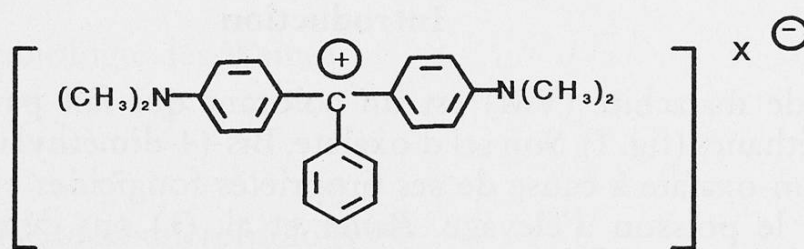
L'objectif de ce travail est de proposer une méthode simple et fiable pour le dosage en routine.



Leucobase



Carbinolbase



Vert de malachite

Fig. 1. Formule développée du vert de malachite: vert de malachite leucobase, vert de malachite carbinol et vert de malachite

## Partie expérimentale

### Réactifs

- Acétonitrile Chromasolv (Riedel-de-Haën 34851)
- Acide citrique monohydrate p.a. (Merck 244)
- Dichlorométhane Chromasolv (Riedel-de-Haën 34856)
- Dioxyde de plomb p.a. (Merck 7407)
- n-Hexane Chromasolv (Riedel-de-Haën 34859)
- Méthanol Chromasolv (Riedel-de-Haën 34860)
- Pentasulfonate de sodium monohydrate p.a. (Fluka 76955)

Acide perchlorique p.a. 60% (Merck 518)  
Sulfate de sodium p.a. (Merck 6649)  
Oxalate du vert de malachite microscopie (Merck 15942)  
Vert de malachite leucobase (Dr. Bender et Dr. Hobein 46395)  
Acide ortho-phosphorique p.a. (Merck 573)  
Solution d'hydroxyde de sodium 10 mol/l  
Solution d'étalonnage 25 µg/l  
Solution mère 100 mg/l, peser avec exactitude: 25 mg d'oxalate de VM dans 250 ml de méthanol. Diluer 1:4000 avec méthanol.  
Tampon citrate 1 mol/l pH 2,5  
Dans un ballon de 100 ml dissoudre 21,0 g d'acide citrique monohydrate p.a. (Merck 244) dans env. 50 ml H<sub>2</sub>O, ajouter 6,3 ml de NaOH 10 mol/l et compléter à 100 ml.

### *Appareillage*

Appareil HPLC, HP 1081B, Hewlett-Packard  
DéTECTEUR, Spectra 100, UV/VIS, Spectra-Physics  
Intégrateur, HP 3396 Series III, Hewlett Packard  
Agitateur mécanique, Vortex-Génie-2-Mixer, Auer Bittmann Soulié  
Évaporateur rotatif, Büchi  
Mixeur, Polytron, Kinematica

### *Mode opératoire*

#### *Traitement de l'échantillon*

Dans un verre à centrifuger de 100 ml, on introduit 10 g de matrice homogénéisée, 40 ml d'acétonitrile acide (0,8 ml d'acide perchlorique 60% par litre d'acétonitrile) et 5 g de sulfate de sodium. Mixer pendant 5 min avec polytron, ajouter 10 ml de dichlorométhane et mixer pendant 1 min. Centrifuger à 4000 tours/min pendant 5 min. L'extrait est évaporé à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif sous une pression de 100 mbar, température du bain-marie: 40 °C. L'extrait est repris par 10 ml d'acétonitrile et 5 ml d'hexane, agiter vigoureusement et décantier l'hexane. Répéter une deuxième fois le dégraissage. Évaporer l'extrait à sec (conditions d'évaporation ci-dessus mentionnées), le reprendre avec 4 ml de méthanol.

A 1,0 ml de cette solution, on ajoute 0,1 ml de tampon citrate pH 2,5 et 5 mg de dioxyde de plomb. A l'aide d'un agitateur mécanique, agiter vigoureusement pendant 30 secondes. Centrifuger à 4000 tours/min et injecter immédiatement l'extrait sur la colonne.

#### *Conditions chromatographiques*

Pré-colonne LiChrospher 100 RP-18, 4 x 4 mm (Merck 50957.0001)  
Colonne LiChrospher 100 RP-18, 250 x 4 mm (Merck 50833.0001)



Solution A  
Phase-mobile

Acétonitrile: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 mol/l (93 + 7)  
0,01 mol/l pentasulfonate de sodium dans  
la solution A

Débit de l'élution

1,0 ml/min

Température de la colonne

34 °C

Volume injecté

30 µl

Temps de chromatographie

9 min

UV/VIS Signal

618 nm

Temps de rétention

4,25 min

### Résultats et discussion

La leucobase est oxydée à l'aide du dioxyde de plomb en vert de malachite carbinol base (fig. 1). Ce dernier en milieu acide existe sous forme de cation imminium. La chromatographie à paire d'ions constitue donc une méthode de choix pour la séparation des résidus de VM. La détection dans le VIS supprime la grande partie des interférences provenant de la matrice. La technique du «Clean-up» de la matrice a l'avantage d'être simple et rapide. Elle facilite la mise en oeuvre sans endommager la colonne.

La figure 2 présente le chromatogramme d'un échantillon positif. Dans les conditions chromatographiques utilisées, on observe 3 pics, le VM pic principal

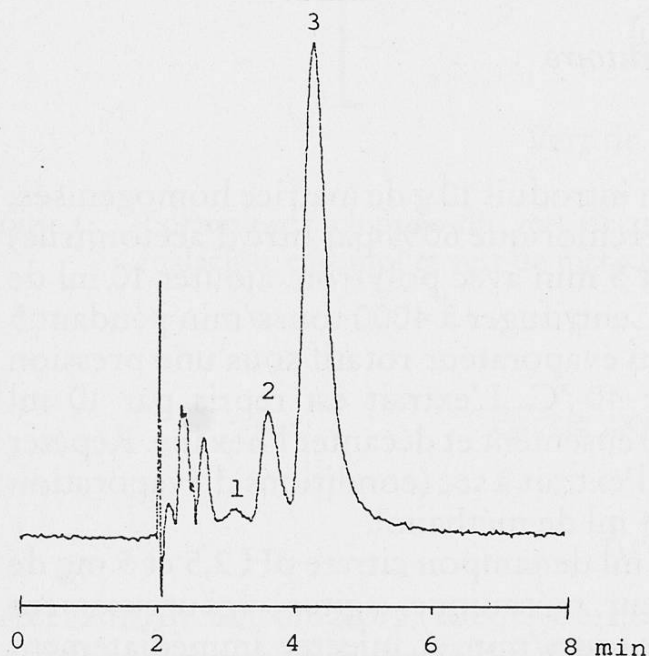


Fig. 2. Chromatogramme d'un échantillon positif (40 µg/kg). Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale

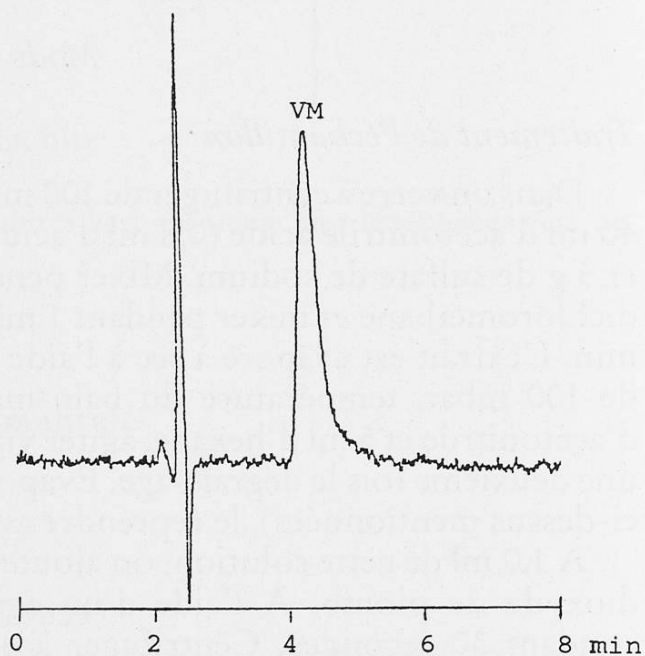


Fig. 2a. Chromatogramme d'une solution standard d'oxalate du vert de malachite (25 µg/µl). Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale

No 3: Temps de rétention ( $t_R$ ) = 4,27 min; pic No 2:  $t_R$  = 3,63 min et le pic No 1:  $t_R$  = 3,13 min. Les pics No 1 et 2 n'ont pas pu être identifiés, on pense qu'ils pourraient provenir soit:

- du produit de départ, c'est-à-dire de l'oxalate du VM qui a été absorbé par le poisson. En effet, nous avons analysé par GC-MS l'oxalate du VM, et avons identifié des dérivés déméthylés de la leucobase et des substances similaires;
- de la déméthylation de la leucobase lors de l'oxydation par le  $PbO_2$ . Comme le montrent les figures 3 et 4, en fonction de la concentration du  $PbO_2$  et du temps de réaction (temps d'agitation avec  $PbO_2$ ), on observe une augmentation du pic No 2 et une diminution du pic No 3. Le pic No 1 ne varie que très peu. L'oxydation de la leucobase a été optimisée sur la base des résultats obtenus à partir d'un échantillon positif (fig. 2). On a optimisé la réaction d'oxydation sur le pic principal No 3 (fig. 2) en évitant la formation de produits secondaires (pics No 1 et 2). Pour des raisons de sécurité des résultats et de commodité pour l'analyse de routine, on a fixé la concentration de  $PbO_2$  à 5 mg (dans le mélange de réaction) et le temps de réaction à 30 secondes.

Dans le cas d'échantillons positifs, les pics No 1 et 2 sont toujours présents et ils ne sont pas considérés pour la quantification des résidus du VM. Actuellement, on n'est pas en mesure de certifier avec exactitude la provenance de ces deux pics. Dans le cas contraire, il serait impératif de les prendre en considération pour le calcul du résultat final.

La quantification des résidus du vert de malachite se fait à partir d'une solution standard d'oxalate de VM (fig. 2a).

La calibration de l'intégrateur s'effectue au moyen d'une seule solution d'étalonnage (25  $\mu\text{g/l}$ ) après avoir contrôlé la linéarité de la réponse du détecteur pour les concentrations habituelles de travail, de 2,5 à 50  $\mu\text{g/l}$ . Les échantillons contenant des concentrations élevées sont dilués dans le domaine de la courbe d'étalonnage.

Pour éviter de «faux positifs», les échantillons positifs sont systématiquement analysés sans ajout de  $PbO_2$ . On observe une suppression du pic positif (fig. 3a).

### *Rapport d'examen 1991*

Le tableau 1 résume les résultats d'analyse des résidus du vert de malachite. 23,2% des échantillons analysés dépassent la tolérance de 10  $\mu\text{g/kg}$  fixée par l'Office fédéral de la santé publique (3).

### *Evaluation de la méthode*

Le taux de récupération a été contrôlé par addition directe de 10, 25 et 50  $\mu\text{g/kg}$  de vert de malachite leucobase dans un échantillon négatif. Les résultats sont résumés dans le tableau 2.

### *Remerciements*

Nous remercions le Dr. A. Mooser pour les mesures qu'il a effectuées avec le GC-MS.

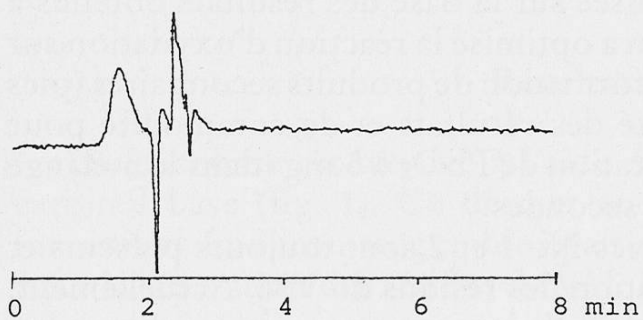


Fig. 3a. Sans ajout de  $\text{PbO}_2$

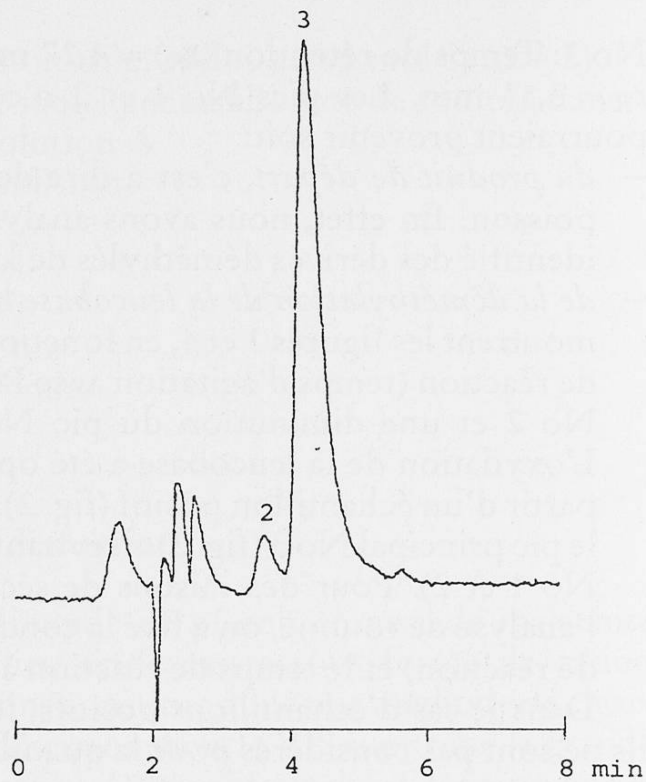


Fig. 3b. 1 mg de  $\text{PbO}_2$

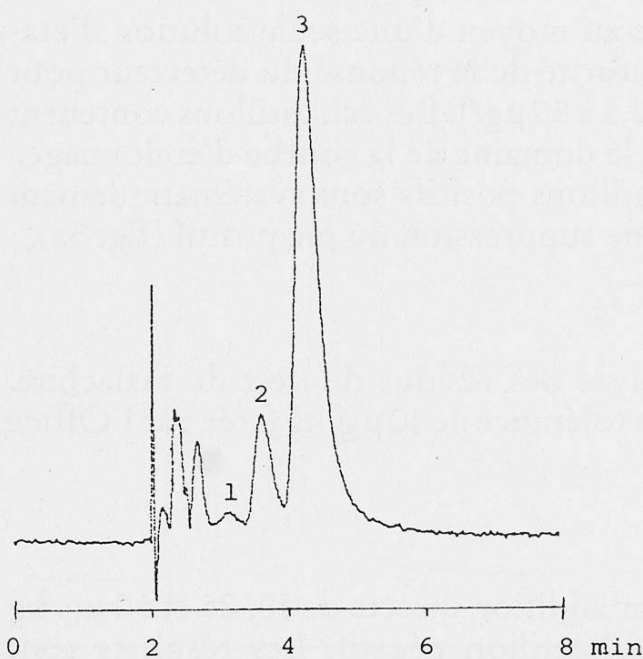


Fig. 3c. 5 mg de  $\text{PbO}_2$

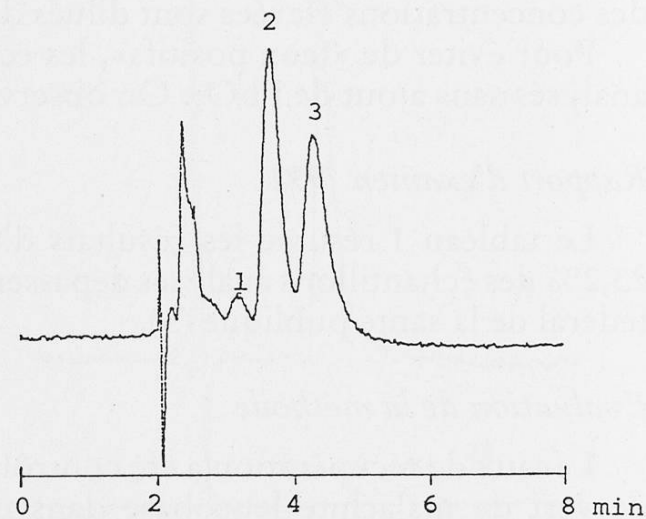


Fig. 3d. 20 mg de  $\text{PbO}_2$

Fig. 3. 4 chromatogrammes d'un échantillon positif ( $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Oxydation de la leucobase en fonction de la concentration du  $\text{PbO}_2$ , temps de réaction: 30 secondes (Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale)

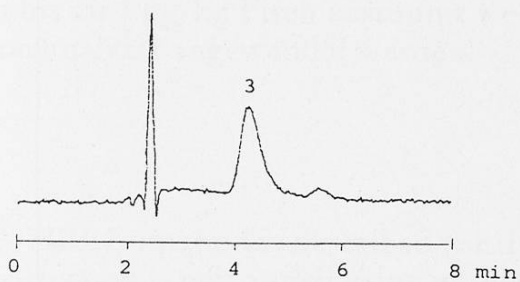


Fig. 4a. Temps de réaction: <1 seconde

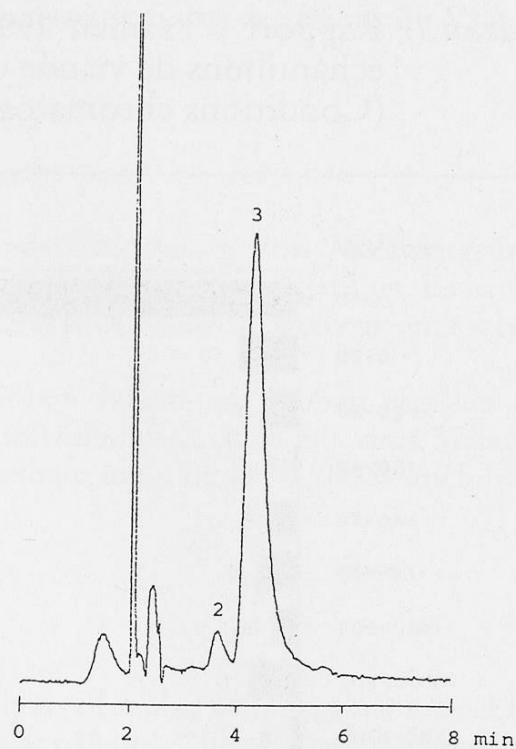


Fig. 4b. Temps de réaction: 2 secondes

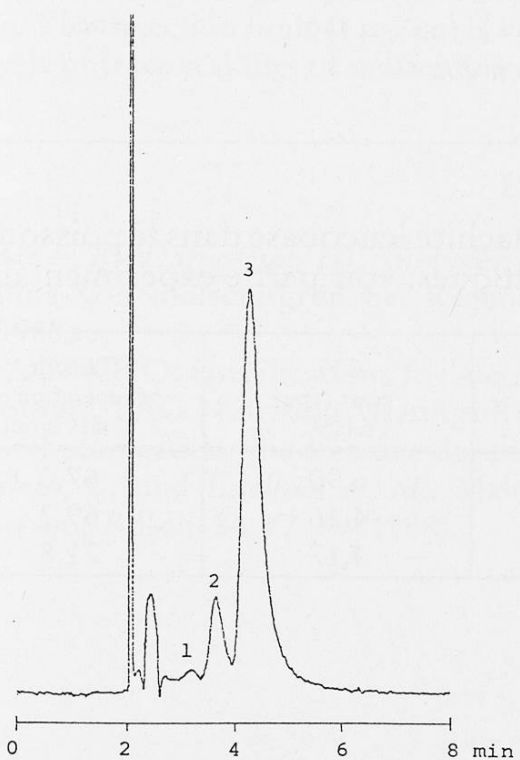


Fig. 4c. Temps de réaction: 30 secondes

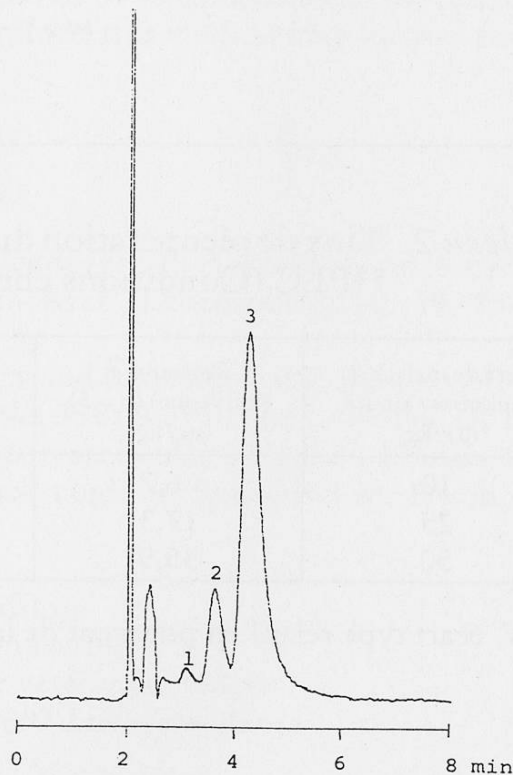


Fig. 4d. Temps de réaction: 120 secondes

Fig. 4. 4 chromatogrammes d'un échantillon positif (40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Oxydation de la leucobase en fonction du temps de réaction. Concentration du  $\text{PbO}_2$ : 5 mg (Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale)



Tableau 1. Rapport d'examen 1991 des résidus du vert de malachite dans 254 échantillons de viande de poisson importé.  
(Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale)

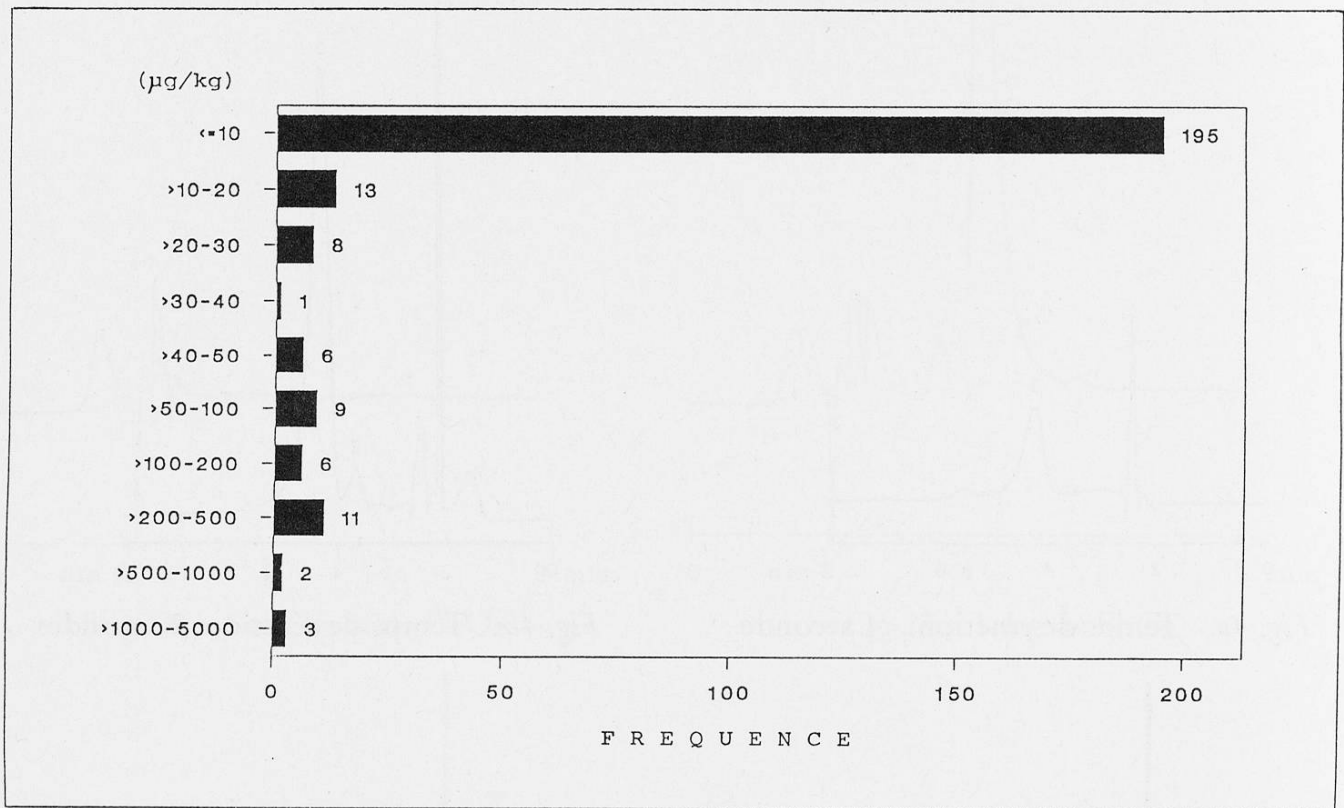


Tableau 2. Taux de récupération du vert de malachite leucobase dans le poisson par HPLC (Conditions chromatographiques: voir partie expérimentale)

Vert de malachite leucobase ajouté (µg/kg)	Retrouvé $\bar{x}$ (moyenne) (n = 5) (µg/kg)	$S_r$ écart type (µg/kg)	$CV_r$ écart type relatif <sup>1</sup>	Taux de récupération en % de l'ajout
10	6,7	0,46	6,90	67,0
25	17,3	0,72	4,16	69,2
50	35,9	1,50	4,17	71,8

<sup>1</sup>  $CV_r$  écart type relatif en pourcent de la moyenne

### Résumé

Une méthode par HPLC est décrite pour le dosage des résidus du vert de malachite (VM) dans le poisson d'élevage, avec détection spectrométrique dans le domaine du VIS à 618 nm. Le mode opératoire proposé est simple et rapide, il peut être utilisé pour l'analyse de routine. Les ajouts d'oxalate de VM à différents niveaux de concentration donnent un taux de récupération relativement élevé (67–72%). La limite de détection (1 µg/kg) est excellente; par

conséquent, cette méthode peut être utilisée pour l'analyse de traces de résidus du VM dans le poisson.

### *Zusammenfassung*

Diese HPLC-Methode beschreibt die Rückstandsbestimmung von Malachitgrün in Zuchtfisch. Die Messungen werden im visuellen Bereich bei 618 nm durchgeführt. Es handelt sich um ein unkompliziertes schnelles Verfahren, welches in der Routineanalytik angewendet werden kann.

Die mit verschiedenen Malachitgrünkonzentrationen versetzten Proben ergeben eine recht gute Wiederfindungsrate (67–72%), und die Empfindlichkeit ist so gut, dass Malachitgrün bis zu 1 µg/kg Fisch bestimmt werden kann. Deshalb kann diese Methode auch in der Spurenanalytik angewendet werden.

### *Summary*

A HPLC method is described for the residue analysis of malachite green in farmed fish. The detection is performed using visible spectroscopy at 618 nm. The proposed procedure is very simple, rapid and can be used for routine purposes. The results of spiked samples give recoveries with good precision (67–72%) at different levels of concentration of the malachite green. The detection limit (1 µg/kg) is very low. Therefore, this method may be used for the analysis of trace residues of malachite green in fish.

### *Bibliographie*

1. *Bauer, K., Dangschat, H., Knöppler, H.-O. und Neudegger, J.*: Aufnahme und Ausscheidung von Malachitgrün bei Regenbogenforellen. *Arch. Lebensmittelhyg.* **39**, 85–108 (1988).
2. *FAO/WHO*: Specifications for identity and purity and toxicological evaluation of food colours. *FAO Nutrition Meetings Report Series No. 38B; WHO/Food Add/66.25*, 1966.
3. *Communications du domaine des denrées alimentaires; circulaire No 3 du 20 mars 1991.*
4. *Klein, E. und Edelhäuser, M.*: Malachitgrün-Rückstände in Speisefischen. *Dtsch. Lebensm.-Rdsch.* **84**, 77–79 (1988).

O. Dafflon  
Section chimie  
Office vétérinaire fédéral  
CH-3097 Liebefeld-Berne