

Dosage de résidus de vert de malachite dans les poissons d'élevage par chromatographie de paires d'ions et oxydation en ligne du métabolite leuco-base = Analysis of malachite green residues in fish by ion pairing chromatography and on-line oxidation of ...

Autor(en): **Edder, Patrick / Cominoli, André / Corvi, Claude**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **88 (1997)**

Heft 3

PDF erstellt am: **14.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982327>

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.

Dosage de résidus de vert de malachite dans les poissons d'élevage par chromatographie de paires d'ions et oxydation en ligne du métabolite leuco-base

Analysis of Malachite Green Residues in Fish by Ion Pairing Chromatography and On-line Oxidation of the Leuco-base Metabolite

Key words: Malachit Green, Leuco Malachit Green, On-line oxidation, Cultured fish, Ion pair chromatography

Patrick Edder, André Cominoli et Claude Corvi
Service du chimiste cantonal, Genève

Introduction

Le vert de malachite (VM) est un fongicide et un antiparasitaire couramment utilisé pour les poissons d'élevage (pisciculture). Le VM est métabolisé par les poissons sous une forme leucobase (VM-L) dans les œufs, les alevins et les muscles (1-4). Le temps d'élimination, notamment dans les truites, est long et il est fort probable que des poissons traités gardent un minimum résiduel de VM dans leur chair tout au long de leur vie (1, 4).

Le vert de malachite appartient à la famille des triphénylméthanés (fig. 1) et est considéré comme cancérigène par le United States National Center of Toxicology Research (1, 4). Des résidus de ce composé dans l'alimentation présentent donc un risque pour la santé et leur contrôle dans les poissons provenant de pisciculture est d'intérêt.

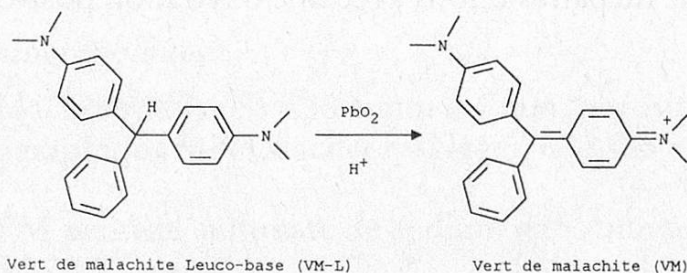


Fig. 1. Oxydation du vert de malachite leuco-base en vert de malachite chromatique

En Suisse, le VM n'est pas enregistré comme médicament vétérinaire pour les animaux de rente et l'Office fédéral de la santé publique l'a estimé comme toxicologiquement inoffensif pour des résidus inférieurs à 10 µg/kg. Cette teneur représente la somme VM + VM-L.

Principe du dosage

Le VM-L est oxydé à l'aide du dioxyde de plomb (PbO_2) en vert de malachite carbinol-base. Ce dernier existe en milieu acide ($pK_a = 6,9$) sous une forme de cation imminium, qui absorbe intensément dans le visible à 618 nm, alors que le VM-L n'absorbe que dans le spectre UV. L'étape d'oxydation du VM-L en VM est une étape cruciale et délicate (1, 6). En effet, la majeure partie du VM présent dans le poisson se trouve sous la forme leuco-base et doit être oxydée en cation imminium pour être détectée. La possibilité de détecter le VM dans le visible est très intéressante et permet, en plus d'une grande sensibilité, une augmentation de la sélectivité de l'analyse par suppression des interférences provenant de la matrice. C'est pourquoi, la plupart des méthodes publiées comprennent une étape d'oxydation du VM-L en VM, en raison du gain de sensibilité et de sélectivité engendré par la détection dans le visible. Cette étape peut être mise en œuvre selon deux voies: soit off-line par réaction d'une aliquote de l'extrait avec 10 mg d'un mélange cérite 545- PbO_2 (90:10) (1,5,6), soit on-line au moyen de ce même mélange situé dans un réacteur d'oxydation placé entre la colonne chromatographique et le détecteur UV-Visible (2,3,7,8).

La seconde approche est plus séduisante et comporte plusieurs avantages:

- une diminution de manipulation et des risques de contaminations;
- une réduction du temps d'analyse;
- une augmentation de la surface de contact et du rendement d'oxydation;
- un meilleur contrôle de la cinétique de réaction réglée par le débit de la phase mobile;
- une diminution de temps entre l'étape d'oxydation et la mesure du VM.

Ce travail présente une méthode analytique simple, permettant de doser simultanément le VM et le VM-L dans les poissons à des teneurs comprises entre 2 et 50 µg/kg.

La méthode est basée sur une extraction du VM et du VM-L de la chair de poisson par de l'acétonitrile (ACN) en milieu acide, suivie d'un dosage par chromatographie liquide de paires d'ions avec une oxydation post-colonne du VM-L.

Partie expérimentale

Appareillage

- Broyeur Büchi
- Polytron PCU Kinematica
- Centrifugeuse Megafuge 1,0 Heraeus AG
- HPLC SSI avec pompe SSI 222 D, mélangeur SSI 232 D Gradient, four SSI 505 LC
- Détecteur UV-Visible Thermo Separations Products, Spectra Series UV100

Matériel et réactifs

Colonne d'oxydation en PEEK 30 mm x 4,6 mm i.d. (MISA, Genève). Filtres seringues Millipore HV 0,45 μm .

ACN pro-analysis (Merck) pour l'extraction et Lichrosolv (Merck) pour la chromatographie. HClO_4 70%, CH_3COOH glacial, acide citrique, CH_2Cl_2 pro analysis (Merck).

Pentanesulfonate de sodium, dioxyde de plomb (PbO_2) pro analysis (Merck), Célite 545 (Merck).

Vert de malachite oxalate (Merck) et Vert de malachite Leucobase (Sigma).

Mode opératoire

Extraction

Le poisson est préparé en filets, sans la peau. La chair est ensuite broyée au moyen d'un système à couteau en céramique (Büchi). L'analyse est réalisée par extraction de 10 g de chair de poisson, qui sont placés dans un tube à centrifuger de 100 ml. On additionne ensuite 40 ml d'ACN acide (1 l ACN + 0,8 ml HClO_4 60%) et 5 g de Na_2SO_4 . Le mélange est mixé 5 min au Polytron. Après adjonction de 10 ml de CH_2Cl_2 , le mélange est mixé pendant 1 min, puis centrifugé pendant 5 min. Le surnageant est récupéré et évaporé à sec.

Le résidu est repris par 4 ml d'ACN et 100 μl de tampon citrate 0,1 M pH 5,0. La solution est finalement filtrée sur 0,45 μm (filtre seringue) avant injection chromatographique.

Conditions chromatographiques

Précolonne MN (Macherey-Nagel) C18 4 mm x 4 mm, porosité 3 μm .

Colonne chromatographique MN (Macherey-Nagel) C18 125 mm x 4 mm, porosité 3 μm .

Phase mobile: 0,01 M pentane sulfonate de sodium dans une solution acétonitrile: acide acétique 0,1 M 70:30 v:v

Débit d'élution: 1,5 ml/min
Température de colonne: 40 °C
Volume injecté: 50 µl
Détection: 618 nm

Résultats et discussion

Oxydation du VM-L en VM

Choix de la nature de la phase mobile

La nature des solvants a une influence sur l'équilibre de réaction du VM-L en VM-cation imminium. La chromatographie liquide qui précédera donc l'étape d'oxydation se fera sur phase inverse (C18) au moyen d'une phase mobile polaire composée d'ACN et d'acide acétique 0,1 M. La littérature indique un pH optimum pour la réaction d'oxydation situé entre 4,0–6,0. Pour autant qu'une mesure de pH ait une réelle signification en milieu $\geq 70\%$ ACN, des solutions contenant 10 à 30% acide acétique 0,1 M donnent un pH se situant dans cette échelle.

La réaction d'oxydation de VM-L en VM est parfaitement quantitative (rendement de 95–102%, et répétabilité $\leq 2\%$ correspondant à celle mesurée par l'injection de VM) si elle a lieu dans un milieu ACN/CH₃COOH 0,1 M (pour des proportions de CH₃COOH 0,1 M variant entre 10 et 30%).

La séparation du VM et du VM-L en phase inverse au moyen d'une phase mobile constituée de ACN/CH₃COOH 0,1 M (90:10) s'est montrée excellente, mais principalement basée sur les interactions dues aux silanols libres de la phase stationnaire et donc extrêmement sensible aux variations de pH et de force ionique. Par conséquent, des effets de matrice très importants ont été observés et l'application de la méthode aux extraits de poisson était trop versatile.

Par contre, la chromatographie de paire d'ions s'est révélée être la méthode de choix, car elle permet de stabiliser la force ionique et d'obtenir une séparation basée sur des interactions plus importantes. Pour autant que l'extrait soit tamponné avant l'injection (100 µl de tampon citrate 0,1 M pH 5,0 additionnés aux 4 ml d'ACN utilisés pour dissoudre l'extrait de poisson), la chromatographie n'est plus perturbée par la matrice et les temps de rétention du VM et VM-L demeurent stables.

La mise en œuvre de la chromatographie de paire d'ions s'effectue au moyen des mêmes solvants additionnés d'un contre ion tel que le pentane sulfonate de sodium. La présence de 0,01 M de pentane sulfonate de sodium dans la phase mobile ne provoque aucune perturbation sur la réaction d'oxydation.

Caractérisation de la séparation

Le tableau 1 ci-dessous résume les caractéristiques de la séparation obtenue dans ces conditions. Le réacteur d'oxydation ne provoque pas d'importants élargisse-

Tableau 1. Caractérisation de la séparation chromatographique

Paramètre	VM	VM-L
Temps de rétention t_r	2,31	3,36
Facteur de capacité k'	1,28	2,37
Sélectivité	1,85	
Nombre de plateaux théo. N	1174	2164
Asymétrie b/a	1,47	1,50
Résolution	3,17	

ments, ni d'asymétrie des pics et l'efficacité de la séparation reste très satisfaisante avec une parfaite résolution du VM et VM-L.

Contrairement aux techniques d'oxydation off-line (1,5,6), la réaction en ligne du VM-L avec le PbO_2 s'effectuant juste avant la détection, on n'observe pas de produits de dégradation (déméthylation de la forme leuco-base par le PbO_2).

La figure 2 présente le chromatogramme obtenu après l'injection d'un standard de VM et VM-L 12,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (soit l'équivalent pour l'analyse de 10 g de poisson contenant 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en VM et VM-L).

Cinétique de la réaction d'oxydation

Le rendement d'oxydation du VM-L en VM en fonction du temps de contact du VM-L dans le réacteur est mesuré afin de déterminer le débit de phase mobile optimum. Le débit est varié entre 0,5 et 2 ml/min. Dans tous les cas, l'oxydation de VM-L est quantitative, même pour des débits de 1,5 et 2 ml/min. La cinétique de réaction est donc extrêmement rapide, certainement grâce à la grande surface de contact permise par le réacteur.

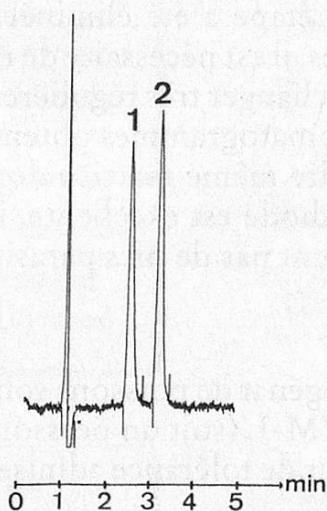


Fig. 2. Chromatogramme d'une solution standard.
1 = Vert de malachite (0,63 ng); 2 = Vert de malachite leuco-base (0,63 ng)

La tranche de débit permettant des conditions d'oxydation optimale est comprise entre 0,5 et 2,0 ml/min.

Durée de vie du réacteur d'oxydation

La durée de vie du réacteur d'oxydation est estimée par percolation à 1 ml/min d'une solution contenant 25 µg/kg VM-L dans la phase mobile à travers le réacteur. L'oxydation du VM-L en VM est suivie par détection du VM à 618 nm. Aucune diminution du rendement d'oxydation n'est observée après 270 min. La masse de VM-L oxydée est 6,8 µg de VM-L, ce qui représente plus de 10 000 injections de 50 µl de VM-L 10 µg/kg. Le nombre d'injections n'est donc pas un facteur limitatif.

Toutefois, on constate une diminution du rendement d'oxydation après deux ou trois jours d'utilisation intensive. Par contre, après remplacement du mélange Célite 545-PbO₂, les mêmes performances sont observées. Etant donné la facilité de remplacement du réacteur d'oxydation, le mélange est changé avant chaque série importante d'analyses.

La figure 3 représente schématiquement l'ensemble de la procédure adoptée.

Validation de la méthode

Sélectivité

Une matrice homogène de poisson est préparée à partir de huit échantillons de truite (préparation des filets et broyage) et analysée selon la procédure développée. La plupart des laboratoires utilise une étape de dégraissage au moyen d'hexane. Cependant, ceci provoque des pertes importantes (40–60 %) du VM leuco-base. Or ce dernier est la forme prépondérante présente dans la chair du poisson après un traitement au vert de malachite, ce qui conduit à des rendements faibles et une imprécision importante de la mesure (répétabilité d'environ 20%). Les tests qui ont mis en évidence cette perte du VM-L dans l'hexane ont également démontré que l'absence de dégraissage permettait également d'obtenir des chromatogrammes très propres. C'est pourquoi cette étape a été éliminée. Cependant, afin d'éviter des problèmes chromatographiques, il est nécessaire de rincer le système abondamment après une série d'analyses et de changer très régulièrement la précolonne analytique.

La figure 4 présente les chromatogrammes obtenus pour l'analyse de 10 g de cet homogénat, ainsi que pour cette même matrice dopée par 10 µg/kg de VM et de VM-L. La sélectivité de la méthode est excellente, les chromatogrammes obtenus sont très propres et ne présentent pas de pics parasites dus à la matrice.

Recouvrements et répétabilité

Six portions de 10 g d'homogénat de poissons sont dopées par 100 µl de solution contenant 1 mg/kg de VM et VM-L (soit un poisson contenant 10 µg/kg de VM et VM-L, ce qui constitue la valeur de tolérance admise) et analysées selon la méthode décrite précédemment.

Résumé du mode opératoire

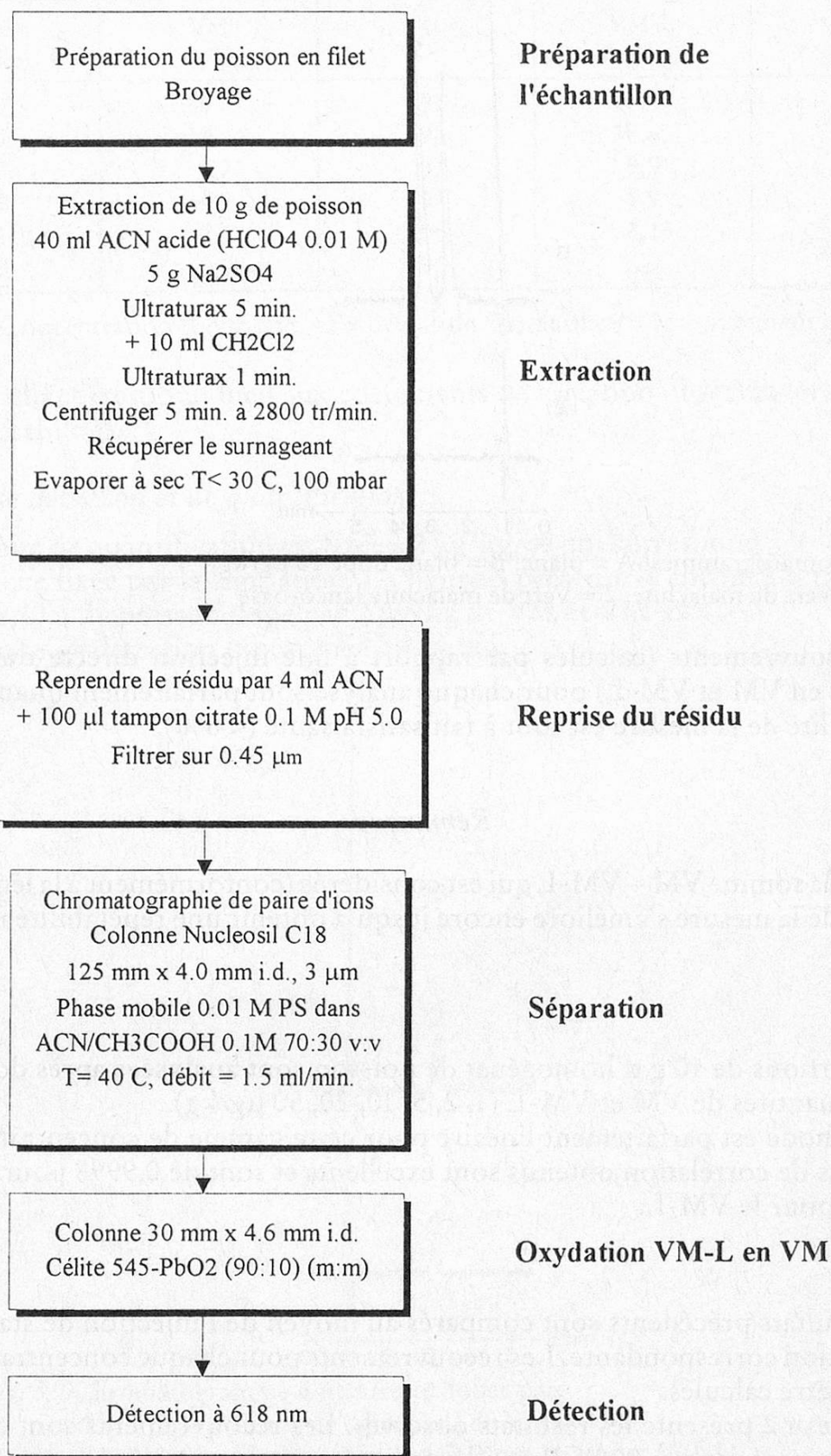


Fig. 3. Représentation schématique de la procédure analytique

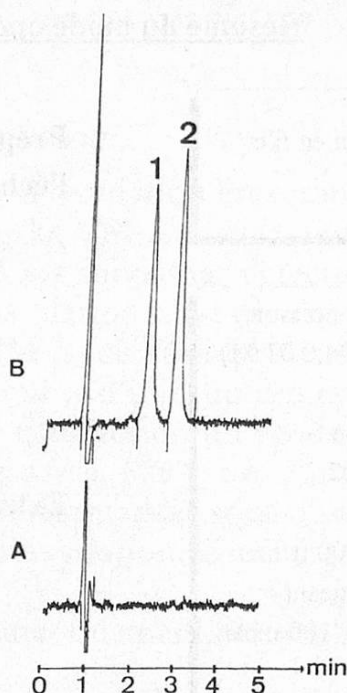


Fig. 4. Chromatogrammes: A = blanc; B = blanc dopé 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$
1 = Vert de malachite; 2 = Vert de malachite leuco-base

Les recouvrements (calculés par rapport à une injection directe du contenu équivalent en VM et VM-L) pour chaque analyse sont parfaitement quantitatifs et la répétabilité de la mesure est tout à fait satisfaisante ($< 6\%$).

Remarque

Si c'est la somme VM + VM-L qui est considérée (conformément à la législation), la fidélité de la mesure s'améliore encore jusqu'à obtenir une répétabilité inférieure à 3%.

Linéarité

Des portions de 10 g d'homogénat de poisson sont analysées après dopage par diverses quantités de VM et VM-L (1, 2, 5, 10, 20, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

La méthode est parfaitement linéaire pour cette gamme de concentrations. Les coefficients de corrélation obtenus sont excellents et sont de 0,9998 pour le VM et de 0,9992 pour le VM-L.

Exactitude

Les résultats précédents sont comparés au moyen de l'injection de standard de concentration correspondante. Les recouvrements pour chaque concentration peuvent alors être calculés.

Le tableau 2 présente les résultats observés. Les recouvrements sont excellents et toujours supérieurs à 90%. Par ailleurs les recouvrements moyens pour le VM et VM-L sont respectivement de 96 et 97% avec des coefficients de variation de 5,5

Tableau 2. Exactitude de la mesure entre 1 et 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

C théo. ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	VM ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	η VM %	VM-L ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	η VM-L %
50	46	92	47,5	95
20	19	95	18,6	93
10	9,7	97	9,9	99
5	4,7	94	4,9	98
2	2,1	105	2,15	107
1	0,9	90	0,9	90

C théo. = Concentration théorique; sd = déviation standard; η = recouvrement en %.

6,1% (ce qui correspond bien aux coefficients de variation observés lors de l'étude de la répétabilité).

Limites de détection et de quantification

La limite de quantification est fixée à 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ce qui correspond à $1/5$ de la valeur de tolérance fixée par la législation. La figure 5 présente le chromatogramme d'un extrait de 10 g de poisson dopé par 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de VM et VM-L.

La limite de détection est estimée à 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

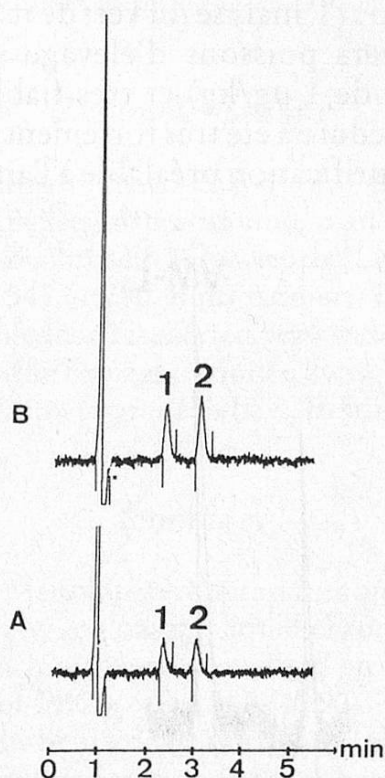


Fig. 5. Chromatogramme d'une truite dopée par:
 A = 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (limite de détection) de VM et VM-L;
 B = 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (limites de quantification) de VM et VM-L.
 1 = Vert de malachite; 2 = Vert de malachite leuco-base

Application de la méthode

La méthode a été appliquée à de nombreuses espèces de poissons provenant de pisciculture. Les analyses de truites, d'ombles, de carpes, de brochets, de saumons, de loup de mer et de dorades sont parfaitement possibles au moyen de cette méthode et aucun effet de matrice significatifs n'a été mis en évidence. En fait, les chromatogrammes obtenus sont dans tous les cas similaires à ceux observés lors du développement de la méthode et on n'observe pas de pics parasites.

Sur un lot de 28 échantillons testés, deux truites et deux dorades se sont révélées positives, dont deux avec des teneurs en VM-L de 160 et 180 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La figure 6 présente le chromatogramme obtenu pour l'analyse d'une truite saumonée contenant 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de vert de malachite leuco-base. Remarquons que, conformément aux données de la littérature, seule la forme métabolisée a été détectée.

Afin de confirmer les rendements d'analyse, les échantillons de poissons négatifs en VM et VM-L ont été dopés par 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de VM et VM-L. Les recouvrements observés alors sont toujours supérieurs à 95% et correspondent tout à fait aux valeurs mesurées avec l'homogénat de poisson.

Conclusions

La méthode développée pour l'analyse du vert de malachite (sous sa forme native et/ou métabolisée) dans divers poissons d'élevage s'est révélée simple, rapide, sensible (limite de détection de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) et très fiable (recouvrements > 95% et répétabilité > 7-8%). La procédure a été très fortement simplifiée par le fait qu'après extraction, aucune étape de purification préalable à l'analyse HPLC n'est nécessaire

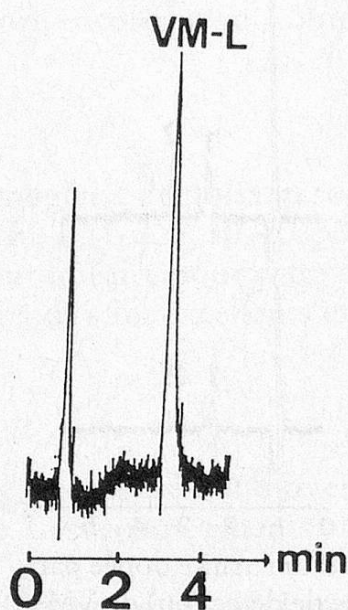


Fig. 6. Chromatogramme correspondant à l'analyse d'une truite saumonée contenant 4 ppb de VM-L.

et que l'oxydation du VM-L en une forme chromatique est effectuée en ligne juste avant la détection. La sélectivité de la méthode est très élevée et assurée principalement par le choix judicieux du solvant d'extraction, l'acétonitrile. Ce solvant permet d'une part une très bonne élimination des protéines, et d'autre part une très faible solubilisation des graisses. La détection dans le domaine du visible constitue également une contribution importante vis-à-vis de la sélectivité de la procédure.

Remerciements

Nous remercions Mlle Frédérique Berger pour la partie pratique des analyses.

Résumé

Une méthode d'analyse de résidus de vert de malachite (VM) et de son principal métabolite, le vert de malachite leuco-base (VM-L) dans les poissons d'élevage par chromatographie liquide de paires d'ions et détection à 618 nm est présentée. Le VM-L est oxydé en ligne juste avant la détection par un réacteur contenant un mélange PbO₂-célite 545 (10:90). La sélectivité de la méthode est très élevée et cette dernière peut être appliquée à de nombreuses espèces de poissons d'élevage. Les recouvrements sont supérieurs à 90% pour une gamme de concentrations comprise entre 2 et 50 µg/kg. La méthode est linéaire et présente une répétabilité de l'ordre de 7-8%. Les limites de détection et de quantification (1 et 2 µg/kg) sont excellentes. La procédure est très simple et rapide, parfaitement adaptée aux analyses de routine.

Zusammenfassung

Es wird eine einfache und schnelle Ionen-Paar-HPLC-Methode mit Detektion im visuellen Bereich (618 nm) für die Rückstandsbestimmung von Malachitgrün und dessen Metaboliten Leucomalachitgrün in Zuchtfisch beschrieben. Leucomalachitgrün wird vor der Detektion mittels PbO₂/Celite 545 (10/90 m:m) oxidiert. Die Selektivität der Methode ist sehr gut, und sie kann für verschiedene Fischarten verwendet werden. Die Wiederfindungsraten sind immer besser als 90% für Konzentrationen zwischen 2-50 µg/kg. Die Wiederholbarkeit beträgt 7-8% und die Nachweisgrenzen bzw. Bestimmungsgrenzen 1 bzw. 2 µg/kg.

Summary

A method for the analysis of Malachite Green residues and its major metabolite, the leuco Malachite Green in cultured fish by ion pairing liquid chromatography and detection at 618 nm is presented. The leuco Malachite Green is oxidised on line just before the detection by a reactor containing a mixture of PbO₂-celite 545 (10:90). The selectivity of the method is very high and this procedure can be used for the control of a wide variety of fish species. Recoveries are better than 90% in a concentration range between 2-50 µg/kg. The method is linear and shows a repeatability around 7-8%. The limits of detection and quantification (1 and 2 µg/kg) are very satisfactory. This procedure is very simple, fast and may be used for routine analyses.

Bibliographie

1. Dafflon, O., Gobet, H. et Koch, H.: Détermination du vert de malachite dans le poisson par chromatographie liquide haute performance. *Trav. chim. aliment. hyg.* **83**, 215–223 (1992).
2. Allen, J.J., Gofus, J.E. and Meinertz, J.R.: Determination of malachite green residues in the eggs, fry, and adult muscle tissue of rainbow trout. *J.A.O.A.C.* **77**, 553–557 (1994).
3. Plakas, S., El Said, K.R., Stehly, G.R. and Roybal, J.E.: Optimization of a liquid chromatographic method for determination of malachite green and its metabolites in fish tissues. *J.A.O.A.C.* **78**, 1888–1894 (1995).
4. Bauer, K., Dangschat, H., Knöppler, H.O. und Neudegger, J.: Aufnahme und Ausscheidung von Malachitgrün bei Regenbogenforellen. *Arch. Lebensmittelhyg.* **39**, 97–102 (1988).
5. Dafflon, O., Gobet, H. et Koch, H.: Détermination du cristal violet dans le poulet par chromatographie liquide haute performance. *Trav. chim. aliment. hyg.* **85**, 523–531 (1994).
6. Fink, W. und Auch, J.: Nachweis von Malachitgrün-, Kristallviolett- und Brillantgrün-Rückständen in Speisefischen mittels HPLC. *Dtsch. Lebensm. Rundschau* **89**, 246–251 (1993).
7. Allen, J.J. and Meinertz, J.R.: Post-column reaction for simultaneous analysis of chromatic and leuco forms of malachite green and crystal violet by high performance liquid chromatography with photometric detection. *J. Chromatogr.* **536**, 217–222 (1991).
8. Roybal, J.E., Pfenning, A.P., Munns, R. K. and Holland, D.C.: Determination of malachite green and its metabolite, leucomalachite green, in catfish tissue by liquid chromatography with visible detection. *J.A.O.A.C.* **78**, 453–457 (1995).

Dr. Patrick Edder
Service du chimiste cantonal
22, Quai Ernest-Ansermet
Case postale 166
CH-1211 Genève 4