

Restindhold af malakitgrønt i dambrugsfisk

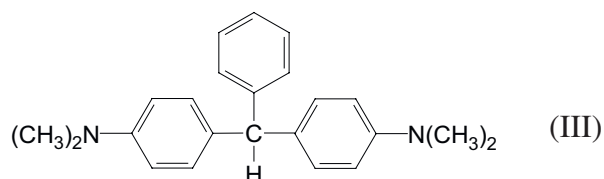
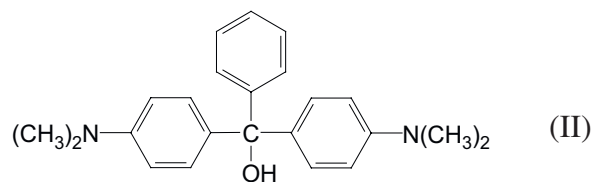
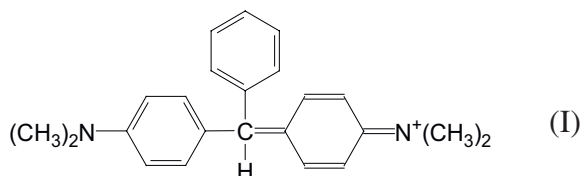
Malakitgrønt har tidligere været anvendt til sygdomsbekæmpelse hos dambrugsfisk. Imidlertid blev stoffet forbudt i Danmark i 1990 af Veterinærdirektoratet. En aktuel dambrugssag fra Herning viser, at placering af strafansvar ved ulovligt restindhold af malakitgrønt i fisk kan være svært bl.a. pga. stoffets persistens i miljøet [1]

Af Rie Romme Rasmussen, Afdeling for Fødevarekemi, Danmarks Fødevareforskning

Malakitgrønt er et N-metyleret diaminotriphenylmethan farvestof, der tidligere blev brugt verden over som et effektivt svampedræbende middel i dambrug [2]. I dag benyttes malakitgrønt som farvestof i papir- og tekstilindustrien [2,3]. Malakitgrønt er på EU's liste over farlige stoffer og er klassificeret af miljøstyrelsen som sundhedsskadelig og miljøfarlig [4].

Malakitgrønts kemiske egenskaber

Malakitgrønt kan nedbrydes til leucomalakitgrønt (figur 1) ved kemisk eller metabolisk reduktion [5]. Begge stoffer har samme toksikologiske effekter, omend der er en tendens til at leucomalakitgrønt er mere toksisk end malakitgrønt. Leucomalakitgrønt har været mistænkt for at være kræftfremkaldende, men en nyere undersøgelse har vist, at der skal meget store mængder til, før der kan spores en kræftfremkaldende effekt. En sikkerhedsvurdering af malakitgrønt og leucomalakitgrønt viser, at det



Figur 1. Kemiske strukturer.

(I) Malakitgrønt kation CAS RN: 569-64-2. Malakitgrønt fås som et chlorid CAS RN [569-64-2] og et oxalatsalt CAS-nummer [2437-29-8].

(II) Malakitgrønt carbinol CAS RN: 510-13-4.

(III) Leucomalakitgrønt CAS RN: 129-73-7.



indhold, der er fundet i danske fisk (tabel 1), ikke giver anledning til sundhedsmæssige betænkeligheder, selv hvis stofferne indtages over længere tid [6].

Malakitgrønt kan omdannes til en carbinol-form via reaktion med hydroxylioner. De to former har meget forskellige egenskaber, idet malakitgrønt carbinol (figur 1) er uladet og meget mere lipofil end malakitgrønt-ionen (figur 1). Malakitgrønts syrestyrkekonstant (pKa) er 6,9 [7]; ved pH 10 dominerer carbinol-formen, mens malakitgrønt ved pH 4 hovedsageligt findes på ion-form. Ligevægten indstilles inden for ca. 5 timer. Malakitgrønt carbinol er relativt tungtopløseligt i vand; ca. 0,5 mg/L [2], mens malakitgrønt chloridsalt er letopløseligt; 40000 mg/L [8].

Nedbrydning i fisk

Malakitgrønt optages gennem fisks gæller [9,10]. I fisk nedbrydes malakitgrønt primært til leucomalakitgrønt [11,12]. Adskillige undersøgelser har vist, at malakitgrønt elimineres hurtigt, ►

År	Produkt	Oprindelse	Antal prøver	Prøver med restindhold [#]	Malakitgrønt	Leuco-malakitgrønt
2005	Akvakultur	Import	5	2		5,6 og 6,1 µg/kg
2005	Akvakultur	Dansk	117	1		2,7 µg/kg
2004	Akvakultur	Dansk	43*	0*		
2003	Akvakultur	Dansk	23	1	2 µg/kg	28 µg/kg
2002	Ål	Kinesisk	26	19	1** - 300 µg/kg	> 100µg/kg
2002	Akvakultur	Dansk	20	0		
2001	Ørred	Dansk	20	0		
2000	1 ål 5 havørred 14 ørred	Dansk	20	4		< 4 µg/kg
1993	Laks	Norsk	54	0		
1991	Akvakultur	Dansk	49	2	4 og 5 µg/kg	
1989	Akvakultur	Dansk	20	6	5 – 17 µg/kg	Ikke undersøgt
1988	Akvakultur	Dansk	49	13	15 – 214 µg/kg	Ikke undersøgt

[#]) Behandling forbudt i 1990. I 1990 blev undersøgelse for malakitgrønt udvidet til også at omfatte nedbrydningsproduktet leucomalakitgrønt. Analyserne er udført af Fødevarerregion Ringsted og Danmarks Fødevarerforsknin.

^{*)} Derudover blev analyseret 95 mistankeprøver hvoraf 82 prøver var positive (1-60 mg/kg). Mistanken var begrundet i restindholdet påvist i en ørredprøve udtaget i 2003.

^{**) Metodenets detektionsgrænse.}

Tabel 1. Resultater af danske undersøgelser for malakitgrønt i akvakultur 1988 til 2005.

mens metabolitten leucomalakitgrønt har en signifikant lavere udskillelshastighed i ørred, havkat og ål [13,14,15,12,16]. Et tidligere studie har vist, at op til 12 µg/kg leucomalakitgrønt i ørred kunne måles 10 måneder efter dosering. Indholdet af malakitgrønt og leucomalakitgrønt var ved forsøgets start i alt 712 µg/kg målt straks efter 6 dages dosering med 0,2 mg malakitgrønt/L [15]. Leucomalakitgrønt har en markant længere halveringskonstant i fisk end malakitgrønt, hvilket tilskrives at leucomalakitgrønt ophobes i fedtvævet og muskel [5]. Halveringstiden for leucomalakitgrønt i ørredmuskel er i et forsøg beregnet til ca. 40 dage [13].

Spisefisk med malakitgrønt-rester

I 2002 producerede Danmark 36.000 tons akvakulturprodukter, hvilket udgjorde 7% af EU's samlede produktion [17]. I lighed med andre europæiske lande foretages der en løbende offentlig kontrol med restindholdet af veterinære lægemidler i fisk. Siden 1988 har undersøgelser for malakitgrønt været en del af den danske kontrol. Siden maj 1990 har det ikke været tilladt at benytte malakitgrønt til dambrugsfisk i Danmark, med mindre der var givet en specialtilladelse fra Veterinærdirektoratet [18]. Sådanne specialtilladelser er med sikkerhed ikke givet siden 2000 [19]. Anvendelsen af malakitgrønt som veterinært lægemiddel er heller ikke tilladt i EU. Ved den offentlige kontrol stiller EU krav om en følsom analysemetode, idet den fastsatte minimumsgrænse for en metodes ydeevne (MRPL) er 2 µg/kg for summen af malakit- og leucomalakitgrønt [20].

Resultaterne af den danske kontrol viser kun få fund af malakitgrønt og leucomalakitgrønt i danske akvakulturprodukter (tabel 1). Alligevel viser EU-landenes fødevarerkontrol af akvakulturprodukter, at malakitgrønt-rester er den hyppigste årsag til overskridelse af reglerne.

EU-Kommissionen bemærkede i den forbindelse, at restindhold i nogle tilfælde muligvis kan skyldes lang levetid af metabolitten leucomalakitgrønt i miljøet og derfor kan skyldes tidligere tiders brug af stoffet [17]. Fødevarermyndighederne i Canada har valgt at indføre en grænse ved indhold ≤ 1,00 µg/kg fisk, hvor det er relevant at undersøge om malakitgrønt-resterne evt. kan stamme fra forurening af vandmiljøet [3]. Ved kon-

trollen i EU i 2002 blev der påvist malakitgrønt-restindhold i 112 ud af 863 undersøgte akvakulturprøver. Af de 112 positive prøver var 53 prøver blevet udtaget på en konkret mistanke.

Ørred med malakitgrønt i dambrug ved Herning

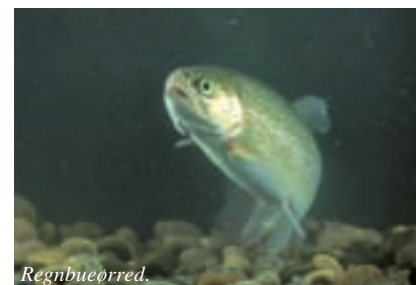
I december 2003 blev der fundet restindhold af malakitgrønt i en ørredprøve fra ét dambrug ved Herning. Påvisningen medførte politianmeldelse og samtidig et påbud om destruktion af alle fisk i dambruget. Ejerne af dambruget blev bl.a. anklaget for ulovlig behandling af fiskene i dambruget med malakitgrønt [21]. I den forbindelse blev i alt 95 mistankeprøver af fisk udtaget fra dambruget; heraf indeholdt 82 prøver restindhold af malakitgrønt og/eller leucomalakitgrønt (1-60 µg/kg).

Ejerne af dambruget benægtede at have benyttet malakitgrønt til behandling af fiskene. Ringkøbing Amt iværksatte derfor analyse af slamprøver. Opstrøms i vandløbssystemet og ved indløbet til dambruget blev der ikke konstateret malakitgrønt. I slamprøverne fra mikrosigten, bundfældning, bagkanal og nedstrøms dambruget blev der fundet malakitgrønt i koncentrationer på hhv. 0,010 mg/kg, 0,070 mg/kg, 0,140 mg/kg, 0,034 mg/kg slam (vådvægt). Resultaterne pegede således på, at udledningen af malakitgrønt stammede fra dambruget [22].

Vicepolitimesteren i Ringkøbing valgte 1. februar 2006 at trække retssagen mod ejerne tilbage [1], idet det ikke kunne bevises, at ejerne selv havde indgivet malakitgrønt [19]. Det blev bl.a. anført af ejerne, at restindholdet i fiskene kan stamme fra malakitgrønt ophobet i slam, som var tilført ved lovlig brug før 1990.

Malakitgrønts skæbne i vandmiljø

Malakitgrønt kan ophobes i dambrugsslam [22], da det bindes stærkt til organisk stof [23]. Dansk lovgivning kræver, at



dambrug jævnligt renses for slam [24]. Forurening af fisk med malakitgrønt, som er tilført damme i forbindelse med lovlig behandling i 1980'erne, burde derfor ikke være mulig, når dambruget er renses, som loven foreskriver. Der kan dog rejses tvivl om, hvorvidt fisk med restindhold af malakitgrønt evt. kan skyldes forurening af vandmiljøet. Imidlertid er malakitgrønts skæbne i vandmiljøet ikke klarlagt i tilstrækkeligt omfang. Det må forventes, at pH har en markant indflydelse på malakitgrønts skæbne, bl.a. pga. malakitgrønt-ionens omdannelse til carbinol-formen [2]. Malakitgrønt bindes stærkt til organisk stof [23], hvilket sandsynligvis forlænger stoffets levetid i miljøet, da nedbrydningshastigheden herved sænkes [25]. Omvendt kan visse organismer som fisk, bakterier og svampe nedbryde malakitgrønt [26], og under iltfattige forhold kan malakitgrønt nedbrydes langsomt (i størrelsesordenen uger) til leucomalakitgrønt under indvirkning af lys [27].

Behov for viden om malakitgrønts levetid i miljøet

I den aktuelle sag fra Herning var der ingen tvivl om, at fiskene ikke kunne anvendes som fødevarer pga. det forhøjede indhold af malakitgrønt. Kontrolanalyserne af akvakultur for malakitgrønt og leucomalakitgrønt fungerer, idet den langsomme udskilleleshastighed af leucomalakitgrønt i fisk kombineret med følsomme analysemetoder gør det relativt let at fastslå, om fisk har været eksponeret for malakitgrønt. Resultaterne af kontrollen viser relativt få fund af stofferne i danske akvakulturprodukter. Bl.a. EU-Kommissionen og de canadiske fødevarermyndigheder har rejst tvivl om, hvorvidt lavt restindhold af malakitgrønt evt. kan skyldes forurening af vandmiljøet. Ved fastlæggelse af hvem der bærer skylden for restindhold af malakitgrønt i fisk, mangler der viden om stoffet og dets nedbrydning i dambrugsslam og sedimenter i vandløb.

E-mail-adresse

Rie Romme Rasmussen: riro@dfvf.dk

Referencer

1. Skjern Byret 2006, Udskrift af retsbogen, 1.februar 2006 kl. 13.
2. Alderman, D. J., 1985, Malachite green: A review. *Journal of Fish Diseases*, **8**, 289-298.
3. Canadian Food Inspection Agency, 2006: Tilgængelig på: <http://www.inspection.gc.ca/english/corpaffr/newcom/2006/20060403e.shtml> den 22. august 2006
4. Miljøstyrelsen 2006: Listen over farlige stoffer, Tilgængelig på: <http://www.mst.dk/default.asp?Sub=http://www.mst.dk/kemi/02010100.htm> den 24. august 2006
5. Culp S. and Beland F. 1996, Malachite green: A toxicological review, *Journal of the American college of toxicology*, **15** (3): 219-238.
6. Danmarks Fødevarer- og Veterinærforskning 2004, Notits om malakitgrønt og leucomalakitgrønt i dambrugssørreder, j. nr. 2004-30-35-00030, akt 1.
7. Goldacre and Philips 1949 as cited in Alderman, D. J., 1985, Malachite green: A review. *Journal of Fish Diseases*, **8**, 289-298.
8. ChemIDplus 2006. Search: CAS-RN 569-64-2. ChemIDplus is a chemical dictionary and structure database provided by The United States, National Library of Medicine. Tilgængelig på: <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>, den 1. september 2006.
9. Allen JL and Hunn JB, 1986, Fate and distribution studies of some drugs used in aquaculture, *Veterinary and Human Toxicology*, **28**, suppl. 1:21-24. The gills are a major route of uptake and excretion of drugs when fish are exposed in bath treatments.
10. Kasuga Y, Hishida M, Tanahashi N and Arai M, 1992, Studies on disappearance of malachite green in cultured rainbow trout, *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*; **33** (6): 539-542.
11. Allen, J. L., Gofus J. E. and Meinertz, J. R., 1994, Determination of malachite green in the eggs, fry, and adult muscle of rainbow trout. *Journal of AOAC International*, **77**, 553-557.
12. Plakas, S. M., EL Said, K. R., Stehly, G. R., and Roybal J. E., 1995, Optimization of a liquid chromatographic method for determination of malachite green and its metabolites in fish tissues. *Journal of AOAC International*, **78**, 1388-1394
13. Bauer, K., Dangschat, H., Knöppler, H.-O., and Neudegger, J., 1988, Auf-

name und Ausscheidung von Malachitgrün bei Regenbogenforellen. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, **39**, 97-102.

14. Kuiper, R. V., Scherpenisse, P. and Bergweff, A. A., 2000, Persistence of residues of malachite green in European eel (*Anguilla anguilla*) after water-borne exposure of juvenile eels. EuroResidue IV Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food. Veldhoven, The Netherlands, 707-712.
15. Machova, J., Svobodova, Z., Svobodnik, J., Piacka, V., Vykusova, B. and Kocova, A., 1996, Persistence of malachite green in tissues of rainbow trout after a long-term therapeutic bath. *Acta veterinaria Brno*, **65**, 151-159
16. Roybal, J. E., Phenning, A. P., Munns, R. K., Holland, D. C., Hurlbut, J. A., and Long, A. R., 1995, Determination of malachite green and its metabolite, leucomalachite green, in catfish tissue by liquid chromatography with visible detection. *Journal of AOAC International*, **78**, 453-457 catfish- 24 timer
17. Europa Kommissionen 2004a: Commission Staff working paper on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2002 (Council Directive 96/23/EC). Tilgængelig på: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2002_en.pdf den 25. august 2006
18. Veterinærdirektoratet 1990, 'Bekendtgørelse om ændring af bekendtgørelse om begrænsning i anvendelse af lægemidler til husdyr', BEK nr 285 af 30/04/1990 (Gældende)
19. Fødevarestyrelsen 2006. Personlig kommunikation henholdsvis den 30. august og 15. september 2006.
20. Europa Kommissionen 2004b: Kommissionens beslutning af 22. december 2003 om ændring af beslutning 2002/657/EF for så vidt angår fastsættelse af minimumsgrænser for analysemetoders ydeevne (MRPL) vedrørende visse restkoncentrationer i animalske fødevarer. L 006 af 10/01/2004 s. 0038 – 0039.
21. Politimesteren i Ringkøbing 2004. Anklageskrift, j.nr. 400-86170-00011-04.
22. Ringkøbing Amt 2004: Udkast til internt notat. Aktindsigt vedr. journal nr. 8-75-1-681-4-04. Tilgængelig på: [http://www.ringamt.dk/internet/RADAOS.nsf/bb0e9d617fab1228c1256dc00027429f/c79d96fa2e2cc7d3c1256e6d003f27e3/\\$FILE/Malakitgr%C3%B8nt%20-%20Toudal%20Fiskeri.pdf](http://www.ringamt.dk/internet/RADAOS.nsf/bb0e9d617fab1228c1256dc00027429f/c79d96fa2e2cc7d3c1256e6d003f27e3/$FILE/Malakitgr%C3%B8nt%20-%20Toudal%20Fiskeri.pdf) den 24. august 2006
23. Sagar K., Smyth, MR., Wilson JG. and McLaughlin K 1994, High-performance liquid chromatographic determination of the triphenylmethane dye, malachite green, using amperometric detection at a carbon fibre microelectrode *Journal of Chromatography A*, **659**, 329-336.
24. Miljø- og Energiministeriet 1998, Bekendtgørelse om ferskvandsdambrug, BEK nr. 204 af 31/03/1998.
25. Klavins M and Babre K 2002, Decarboxylation and alkaline colour fading reactions in presence of humic substances, *Chemosphere* **49** (6): 685-689
26. Forgacs E, Cserhati T and Oros G, 2004, Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review, *Environment International* **30** (7): 953-971
27. Iwamoto K, 1935 as cited in Alderman, D. J., 1985, Malachite green: A review. *Journal of Fish Diseases*, **8**, 289-298.

Nyt om...

...anticancer

Kemikere ved Hoffmann-La Roche (Basel) og Lausanne Universitet har fremstillet et nyt stof; strukturen er vist på figuren. Stoffet hæmmer dannelse af cancer i hjernen. Forskerne mener, at de hermed har åbnet en helt ny vej.

Bos

Litteratur: 2005 Anticancer route targets
ECE-1. *Chemical & Engineering News*. 10. januar: 34.

