

Kontrola malahitnog zelenila u proizvodima akvakulture

Bilandžić N., B. Solomon Kolanović, I. Varenina¹

pregledni rad

Sažetak

Malahitno zelenilo (MZ) se tradicionalno koristi kao trifenilmetanska boja u tekstilnoj industriji, kao pigment te kao prehrambeni aditiv. U uzgoju riba koristi se kao vrlo učinkovit fungicid, parasitocid, antiprotozoan i bacteriocid. U organizmu ribe MZ se metabolizira u leukomalaitno zelenilo (LMZ) koji se zbog svojih lipofilnih svojstava zadržava u masnom tkivu kroz duže vrijeme. Brojna istraživanja *in vitro* i *in vivo* pokazala su citotoksična, te karcinogena, mutagena i teratogena svojstva MZ i LMZ. Zbog toga je primjena MZ zabranjena u životinjskih vrsta namijenjenim ishrani u Sjedinjenim Državama odnosno zemljama Europske Unije. Usprkos zabrani MZ se još uvijek koristi u intenzivnom ribnjačarstvu te su ostaci MZ i LMZ najčešći u incidenciji nedozvoljenih tvari u proizvodima akvakulture. Zbog toga je Europska Unija propisala granicu najmanje zahtjevnih učinkovitosti izvedbe metoda (MRPL, eng. minimum required performance limit) od 2 µg/kg za određivanje MZ i LMZ. Danas se za kvantifikaciju ostataka MZ i LMZ u tkivima riba primjenjuju metode tekućinske kromatografije i tekućinske kromatografije tandemске spektrometrije masa. Usprkos zabrani korištenja u zemljama Europske Unije sustavno se pronalaze povišene koncentracije MZ i LMZ u svim vrstama ribe i ribljih proizvoda. U periodu od 2002. do 2011. godine sustavom brzog uzburjavanja za hranu i hranu za životinje (RASFF, eng. Rapid Alert System for Food and Feed) povišene koncentracije MZ i LMZ utvrđene su u 123 uzorka riba i proizvoda. Najveći broj od 50 uzorka zabilježen je 2005. godine. U ukupnom broju pozitivnih uzoraka 47 uzoraka podrijetlom je iz Vijetnama, 12 iz Indonezije, 10 iz Kine i 3 iz Tajlanda odnosno 58,5 % uzoraka podrijetlom je iz Azije. Prema tome kontrola MZ i LMZ je izrazito važna za zaštitu zdravlja potrošača.

KLjučne riječi: malahitno zelenilo, leukomalaitno zelenilo, ribe, akvakultura

Uvod

Malahitno zelenilo (MZ) se koristi kao trifenilmetanska boja u tekstilnoj industriji, kao pigment te kao prehrambeni aditiv (Singh i sur., 2011). Tradicionalno se koristi kao boja za materijale kao što su svila, koža i papir. Milijuni kilograma MZ i srodnih trifenilmetanskih boja se godišnje proizvede u tu svrhu. Malahitno zelenilo određeno je u različitim vrstama hrane u Indiji te je utvrđena veća prisutnost u ruralnim krajevima nego u urbanim prodavaonicama hrane (Tripathi i sur., 2007).

U intenzivnoj proizvodnji ribe malahitno zelenilo se koristi se kao jedan od vrlo učinkovitih fungicida, parazitocida, antiprotozoana i bacteriocida (Cha i sur., 2001; Riet i sur.,

2005; Yang i sur., 2007.). Zbog svoje učinkovitosti te relativno niske cijene koštanja atraktivan je agens za liječenje pri uzgoju riba u zatvorenim sustavima, kao što su ribnjaci i jezera u slatkovodnoj, bočatoj i morskoj vodi, odnosno u akvarijima. Izrazito je toksičan i smrtonosan za sve morske i slatkovodne beskrležnjake, alge i biljke.

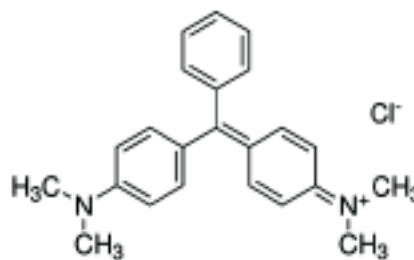
Zbog teratogenih i karcinogenih svojstva MZ je 1991. godine u Sjedinjenim Državama (Marking i sur., 1994) odnosno 1997. godine u Europskoj Uniji zabranjen za primjenu u životinjskim vrstama namijenjenim ishrani (EC, 1990). Usprkos zabrani, MZ se još uvijek koristi u prehrambenoj proizvodnji te su ostaci MZ i metabolita leukomalaitnog

zelenila (LMZ) najčešći u incidenciji nedozvoljenih tvari u proizvodima akvakulture (VRC 2001-2010; Olesen, 2007).

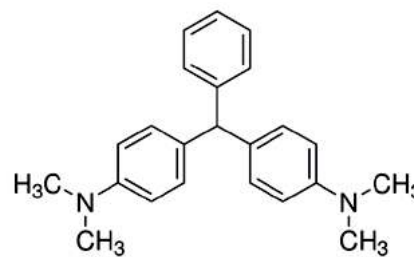
Ostaci MZ i LMZ utvrđeni u tkivima riba mogu također potjecati iz okoliša zbog onečišćenja usljed primjene kao bojila te ispuštanja u potoke ili pritoka bez ikakve prethodne obrade (Pourreza i Elhami, 2007). Stoga je kontrola MZ i LMZ u proizvodima akvakulture neophodna u svrhu zaštite zdravlja ljudi.

Struktura i mehanizam djelovanja malahitnog zelenila

Molekula MZ (Slika 1), 4-[[4-dimetilaminofenil]fenil-metil]-N,N-dimetilaminil, aktivna je u oksidiranom



Slika 1. Strukturna formula malahitnog zelenila.



Slika 2. Strukturna formula leukomalaitnog zelenila.

obliku, a inaktivna u obliku nekromorfne molekule LMZ (Slika 2). U organizmu ribe MZ se metabolizira u LMZ te pretežito u obliku tog metabolita zaostaje u tkivima (Henderson i sur., 1997). Zbog lipofilnih svojstava LMZ se zadržava u masnom tkivu riba kroz duži vremenski period (Stammati i sur., 2005; Mitrowska i sur., 2008).

U istraživanju na morskim mačkama (*Ictalurus punctatus*) MZ je dodano u koncentraciji od 0,8 mg/kg u bazen, ribe su izložene jedan sat i zatim ispirane i premještene u bazen s protočnom vodom. Određene su MZ koncentracije MZ u svim tkivima, a najviše u masnom tkivu te najniže u mišićnom tkivu i plazmi. Kon-

centracije MZ nisu mjerljive nakon 14 dana nakon tretmana dok je LMZ određen i nakon 42 dana (Plakas i sur., 1996). U istraživanju na jeguljama (*Anguilla anguilla*) dodatkom MZ u vodu u koncentraciji 0,1 mg/l kroz 24 sata, MZ je mjereno i 80 dana nakon izlaganja (Bergwerff i sur., 2004). Koncentracija LMZ prvi dan nakon tretmana iznosila je 831 µg/kg te je kontinuiran pad mjenen do 15 µg/kg određen 100-tog dana nakon tretmana. Koncentracije LZM mogu se odrediti čak i u riba koje su uzgojene iz jaja tretiranih s MZ kao fungicidom (Meinertz i sur., 1995).

Mehanizam djelovanja MZ na bakterijsku stanicu još nije poznat, ali postoje pretpostavke da djeluje

kao respiratorni otrov inhibirajući proizvodnju energije bitne za vitalne metaboličke procese. Druga pretpostavka temelji se na ometanju replikacijskog procesa DNK molekule zbog sposobnosti *interkaliranja* u intramolekularne prostore DNA te interakcije s fosfatnim kosturom i nukleotidima (Renwick i sur., 2010).

Toksikologija malahitnog i leukomalaitnog zelenila

Tijekom posljednja tri desetljeća provedeno je niz *in vitro* i *in vivo* istraživanja MZ sa svrhom utvrđivanja citotoksičnosti, te potencijalno karcinogenih, mutagenih i teratogenih svojstava. Provedeno je niz toksikoloških studija primjenom MZ u miševa i štakora (Meyer i Jorgenson, 1983; Clemmensen i sur., 1984; Rao i Fernandes, 1996). Utvrđeno je da je akutna oralna toksičnost MZ izražena kao LD₅₀ u dvije različite vrste štakora iznosi 275 i 520 mg/kg t.j.m. (Meyer i Jorgenson, 1983).

U *in vitro* istraživanjima utvrđeno je da MZ pokazuje snažnu citotoksičnost prema bakterijskim stanicama i stanicama sisavaca (Clemmensen i sur., 1984; Fessard i sur., 1999). MZ smanjuje sposobnost proliferacije stanica te smanjuje aktivnost mitohondrija što nije slučaj pri primjeni LMZ (Stammati i sur., 2005; Olesen, 2007).

Niz istraživanja pokazalo je da MZ ima mutagena i teratogena svojstva (Culp i sur., 2002; Mittelstaedt i sur., 2004.). *In vitro* istraživanja na stanicama hrčka pokazala su da potiče oštećenja kromosoma te može uzrokovati greške u mehanizmu regulacije kontrole razvoja stanica (Rao i sur., 2001). Primjena MZ u vodi za piće u štakora u dozama 1,88, 3,75 i 7,5 mg/kg t.j.m./dan uzrokovala je povećanje N-nitrozodietilamin induciranih preneoplastičnih lezija jetre i na najnižoj primjenjenoj koncentraciji (Rao i Fernandes, 1996). Primjena MZ i LMZ u miševa povećava promjene

¹ dr. sc. Nina Bilandžić, znanstvena savjetnica, Božica Solomon Kolanović, dipl. ing. preh. tehnol., Ivana Varenina, dipl. ing. biotehnol., Laboratorij za određivanje rezidua, Odjel za veterinarsko javno zdravstvo, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

na DNA koje se povećavaju sukladno povećanju primijenjenih doza (Culp i sur., 1999). Također, mutageni utjecaj utvrđen je primjenom LMZ u miševa pri primjeni najviše doze od 61,2 mg/kg tj. m./dan kroz 16 tjedana (Mittelstaedt i sur., 2004). Nedavne studije pokazuju da LMZ pokazuje veća mutagena i karcinogenitna svojstva (Culp i sur., 2002; Mittelstaedt i sur., 2004). Primjenom MZ i LMZ u štakora utvrđen je nastanak adenoma stanica folikula štitne žlijezde, hepatocelularnog adenoma i adenoma mliječne žlijezde, kao i adenoma intersticijskih stanica testisa (Culp i sur., 2006). U zečeva MZ je pokazalo teratogene efekte u bredih životinja odnosno povećane incidencija anomalija fetusa (Meyer i sur., 1983). Također je utvrđen utjecaj na smanjenje rasta odnošen na gubitak tjelesne mase zečeva.

Također, utvrđeno je da LMZ i MZ inhibiraju homeostazu hormona štitne žlijezde. U slučajevima kronične inhibicije sinteze hormona može doći do nastanka folikularnih tiroidnih tumora (Doerge i sur., 1998).

Metode u kontroli ostataka malahitnog i leukomalitnog zelenila

Zbog gore opisanih potencijalnih štetnih učinaka u Europskoj Uniji je propisana granica najmanje zahtjevanje učinkovitosti izvedbe metode (MRPL, eng. minimum required performance limit) za određivanje MZ i LMZ od 2 µg/kg, te predstavlja minimalnu koncentraciju MZ i LMZ u uzorku koju primijenjena metoda mora kvantificirati (EC, 2004). U literaturi je objavljeno samo nekoliko postupaka za određivanje MZ i LMZ u životinjskim tkivima. Tekućinska kromatografija s detekcijom u vidljivom dijelu spektra tradicionalno se koristi za određivanje ovih spojeva osiguravajući granice određivanja ispod 2 µg/kg za svaku supstancu (Plakas i sur., 1995; Tarbin i sur., 1998; Bergwerff i Scherpenisse,

2003; Mitrowska i sur., 2005.). Danas se teži razvoju metoda veće osjetljivosti i većeg potvrdnog karaktera kako bi se osiguralo ispunjavanje strogih zakonskih zahtjeva. Stoga se kvantifikacija MZ i LMZ u tkivima riba provodi metodama tekućinske kromatografije i tekućinske kromatografije tandemске spektrometrije masa (LC-MS/MS). Ove dvije metode postižu granice određivanja (LOD) od 1,0 i 0,1 µg/kg (Van de Riet i sur., 2005; Andersen i sur., 2006; Tao i sur., 2011). U svrhu monitoringa primjenjuju se i brze, specifične i osjetljive imunoenzimске analize (Yang i sur., 2007; Xing i sur., 2009).

lonska priroda MZ doprinosi detekciji spektrometrijom masa i poboljšava osjetljivost kod primjene ionizacije elektroraspršenjem (ESI). Tehnika fotoionizacije pri atmosferskom tlaku (APPI) smatra se prikladnijom za analizu LMZ od ionizacije elektroraspršenjem (ESI) te je postignuta dvostruko veća osjetljivost za LMZ u ekstraktima ribe i veća robustnost prema komponentama matriksa i supresiji iona u odnosu na metodu u kojoj se primjenjuje ESI tehnika (Bergwerff i Scherpenisse, 2003). Kako bi se poboljšala osjetljivost metode kod primjene ESI izvora iona potrebno je nakon kromatografskog odjeljivanja ionizirati molekule LMZ u roditeljsku molekulu. Najčešće se to izvodi dodatkom olovo (IV) oksida (PbO₂) u eluent, obično u tvz. oksidacijskom reaktoru koji je serijski spojen na cijeli sustav. Bez obzira da li se oksidacija LMZ odvija off-line ili serijski, osjetljivost signala za LMZ mora biti manja ili barem jednaka signalu MZ.

Ekstrakcija MZ iz homogeniziranog ribljeg tkiva provodi se mješavinom McIlvaine pufera (pH 3) i acetonitrila nakon čega se provodi kruto fazna ekstrakcija na bazi kationske izmjene (kolonice punjene aromatskom sumporastom kiselinom), čime se MZ odvoji od slabo polarnih kom-

ponenata tkiva (Bergwerff i Scherpenisse, 2003). U svrhu smanjenja demetilacije molekule MZ dodaje se askorbinska kiselina s N,N,N',N'-tetrametil-,1,4-fenilendiamin-2HCl. Nakon postkolonske oksidacije s PbO₂, uzorci su analizirani na LC-UV₆₂₀ i LC-MS/MS (ESI u pozitivnom ionizacijskom modu) te su postignute granice određivanja za MZ i LMZ od 1 µg/kg za LC-UV₆₂₀ te 0,2 µg/kg za LC-MS/MS (Bergwerff i Scherpenisse, 2003). Oksidacija LMZ u MZ može se postići i dodatkom 2,3-diklor-5,6-dicijano-1,4-benzokinona pri čemu je prednost da nije potrebna primjena oksidacijskih reaktora (Andersen i sur., 2006). Postignuta granica određivanja tekućinska kromatografije LC-UV₆₁₈ je 1 µg/kg.

Ostaci u uzorcima ribe i ribljih proizvoda

Uzimajući u obzir potencijalnu nanakanu korištenja MZ te vjerojatnost zagađenja vodenih tokova, kontrola MZ i LMZ neophodna je u proizvodima akvakulture. Usprkos zabrani korištenja u zemljama Europske Unije sustavno se pronalaze povišene koncentracije MZ i LMZ u svim vrstama ribe i ribljih proizvoda. U Velikoj Britaniji su povišene koncentracije MZ i LMZ utvrđene u uzorcima riba iz uzgoja od 2001. do 2010. godine (VRC, 2001-2010). Najveći broj uzoraka s povišenim koncentracijama određen je 2001., 2002. i 2003. kada je u ukupno 99, 141 i 168 uzoraka određeno 16, 1417 uzoraka. Pri tome su utvrđene najviše koncentracije od: 35 µg/kg MZ u mišićnom tkivu lososa te 500 µg/kg LCG u mišićnom tkivu pastreve. U periodu od 2004. do 2010. godine povišene koncentracije utvrđene su u svega 7 uzoraka. Ovakvi rezultati su postignuti poduzimanjem strogih kontrolnih mjera u ribogojilištima sa utvrđenim visokim koncentracijama ova dva spoja. U Danskoj su između 2000. i 2005. godine određene koncentracije LMZ: 2000. godine u 4 uzorka < 4 µg/kg; 2003. u 1 uzorku od 28 µg/

Tablica 1. Broj i vrsta uzoraka s povišenim koncentracijama MZ i LMZ utvrđenih RASFF sustavom u vremenu od 2002. do 2011. godine.

Vrste riba i proizvoda	Broj uzoraka s povišenim koncentracijama MZ i LMZ										
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Ukupno
jegulja	1	1	12	7	2						23
morska mačka			21	8	5	1	1	1	1		37
tilapija			6	5	1	2			1		15
pastrava	1	2	3	1	1	1	2			3	14
losos		11	2	1					1		15
ika										1	1
repovi škampa									1		1
zmijoglavka								1			1
žuta morska mačka				1			1				2
crna morska mačka			1								1
mliječnica			1	3							4
crvenorepa zlatna riba		1	1								2
azijski lubin				1							1
žutorepa kraljevska riba			3								3
jaja pastreve			1							1	2
ostalo				2							2
Ukupno	2	11	18	50	17	10	2	4	4	5	123

Tablica 2. Najviše koncentracije MZ i LMZ utvrđene RASFF sustavom u vremenu od 2001. do 2011. godine.

Godina	Utvrđeno u zemlji EU	Zemlja podrijetla proizvoda	Riba i riblji proizvodi	Koncentracija malahitnog zelenila (MZ) i leukomalitnog zelenila (LMZ) (µg/kg)
2010.	Velika Britanija	Kina	tilapija (<i>Oreochromis niloticus</i>)	LMZ 20
2007.	Danska	Kina	jegulja (<i>Anguilla anguilla</i>)	LMZ 330
2006.	Poljska	Indonezija	jegulja (<i>Anguilla anguilla</i>)	MZ 8,4 LMZ 409,4
2006.	Poljska	Indonezija	jegulja (<i>Anguilla anguilla</i>)	LMZ 38,5; 111,2; 5680
2005.	Velika Britanija	Malazija	azijski lubin (<i>Lates calcarifer</i>)	MZ 12 LMZ 416
2005.	Njemačka	Nizozemska	jegulja (<i>Anguilla anguilla</i>)	MZ 2035; 4872
2005.	Njemačka	Švedska	jaja pastreve	MZ 579; 619
2004.	Njemačka	Njemačka	jegulja (<i>Anguilla anguilla</i>)	MZ 5 – 70
2004.	Velika Britanija	Velika Britanija	tilapija (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	MZ 12 LMZ 86
2002.	Njemačka	Njemačka	jegulja (<i>Anguilla anguilla</i>)	MZ 384; 39,4; 524

kg i 2005. u 1 uzorku 2,7 µg/kg (Olesen, 2007). Također, u 2003. godini koncentracije LMZ više od 100 µg/kg izmjerene su u 19 uzoraka jegulje podrijetlom iz Kine. U 2005. godini u 2 uvozna uzorka koncentracije LMZ iznosile su 5,6 i 6,1 µg/kg.

Primjenom sustava brzog uzbunjivanja za hranu i hranu za životinje (RASFF, eng. Rapid Alert System for Food and Feed) u zemljama Europske Unije utvrđene su povišene koncentracije MZ i LMZ u 123 različitim vrsta riba i ribljih proizvoda u periodu od 2002. do 2011. godine (RASFF, 2011). U RASFF sustav prijavljuju se pozitivni nalazi proizvoda koji su upućeni na tržište Europske Unije. Najveći broj od 50 uzoraka, s povišenim koncentracijama MZ i LMZ, zabilježen je 2005. godine (Tablica 1). Pri tome se najveći broj pozitivnih uzoraka (21) odnosio na uzorke morske mačke podrijetlom iz Vijetnama. Slučajevi najviših utvrđenih koncentracija MZ i LMZ u pojedinim vrstama ribe i ribljih proizvoda prikazani su u Tablici 2.

U ukupnom broju pozitivnih uzoraka 47 uzoraka podrijetlom je iz Vijetnama, 12 iz Indonezije, 10 iz Kine i 3 iz Tajlanda odnosno 58,5 % uzoraka podrijetlom je iz Azije. Prema vrsti uzorka najveći broj pozitivnih uzoraka bio je: 37 morske mačke (*Pangasius hypophthalmus*), 23 jegulje (*Anguilla anguilla*), 15 tilapije (*Oreochromis niloticus*) te 15 lososa (*Salmo salar*).

Koncentracije MZ izmjerene su u rasponu od 0,3 µg/kg do najviše vrijednosti od 4872 µg/kg izmjerene 2006. godine u uzorku jegulje podrijetlom iz Nizozemske. Koncentracije LMZ kretale su se u rasponu od 1,08 µg/kg do najviše od 5680 µg/kg određene u Poljskoj 2006. godine u uzorcima jegulje podrijetlom iz Indonezije. U Velikoj Britaniji je 2010. godine LMZ od 20 µg/kg određeno je u smrznutim štapićima tilapije podrijetlom iz Kine (RASFF, 2011). Obzirom na broj uzoraka s povišenim

koncentracijama MZ i LMZ te zemlju EU u kojoj su određeni utvrđeno je: 37 u Velikoj Britaniji, 19 u Njemačkoj, 14 u Poljskoj, 12 u Estoniji, 11 u Nizozemskoj, 9 u Belgiji, 6 u Grčkoj, po 4 u Češkoj Republici i Danskoj, a u ostalima manje.

U Republici Hrvatskoj se proizvode slatkovodne ribe šaran i pastrva odnosno morske ribe lubin, komarča i tuna. Godišnje se ukupno proizvede preko 16 tisuća tona ribljih preradevina. U Hrvatskoj se provodi kontrola ostataka MZ te dosadašnji rezultati ne ukazuju na zabrinutost za potrošače (Bilandžić i sur., 2012).

Prikazani rezultati ukazuju da je kontrola MZ i LMZ od primarne važnosti za zaštitu zdravlja potrošača.

Zaključak

Malahitno zelenilo se zbog svoje učinkovitosti kao fungicid, paraziticid, antiprotozoan i baktericid te relativno niske cijene koštanja, smatra atraktivnim agensom u uzgoju riba u zatvorenim sustavima, kao što su ribnjaci i jezerca odnosno akvariji u slatkovodnoj, bočatoj i morskoj vodi. Međutim zbog utvrđenih citotoksičnih, teratogenih i karcinogenih svojstva od 1997. godine zabranjen je u Europskoj Uniji za primjenu u životinjskim vrstama namijenjenih ishrani. Usprkos zabrani malahitno zelenilo se još uvijek koristi u prehrambenoj proizvodnji te su njegovi ostaci te ostaci metabolita leukomalaitnog zelenila najčešći u incidenciji nedozvoljenih tvari u proizvodima akvakulture.

Zbog gore opisanih potencijalnih učinaka u Europskoj Uniji je propisana granica najmanje zahtjevane učinkovitosti izvedbe metode od 2 µg/kg. Danas se kontrola ostataka ova dva spoja u tkivima riba provodi metodama tekućinske kromatografije i tekućinske kromatografije tandemске spektrometrije masa visoke osjetljivosti.

U zadnjem desetljeću u zemljama Europske Unije sustavno se pronalaze povišene koncentracije ova dva spoja u svim vrstama ribe i ribljih proizvoda. Primjenom sustava brzog uzbuđivanja za hranu i hranu za životinje RASFF (engl. Rapid Alert System for Food and Feed) utvrđene su povišene koncentracije malahitnog zelenila i leukomalaitnog zelenila u 123 uzorka. U ukupnom broju uzoraka 58,5 % uzoraka podrijetlom je iz Azijskih zemalja. Najveći broj pozitivnih uzoraka objedinjavao je vrste riba morskog mačka, jegulja, tilapija i losos. Sukladno navedenom kontrola ostataka malahitnog zelenila i leukomalaitnog zelenila u proizvodima akvakulture neophodna je u svrhu očuvanja sigurnosti hrane.

Literatura

Andersen, W. C., S. B. Turnipseed, J. E. Roybal (2006): Quantitative and confirmatory analyses of malachite green and leucomalachite green residues in fish and shrimp. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4517–4523.

Bergwerff, A. A., P. Scherpenisse (2003): Determination of residues of malachite green in aquatic animals. *J. Chromatogr. B* 788 (2), 351–359.

Bergwerff, A. A., R. W. Kuiper, P. Scherpenisse (2004): Persistence of residues of malachite green in juvenile eels (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture* 233(1/4), 55–63.

Bilandžić, N., I. Varenina, B. Solomun Kolanović (2012): Surveillance of malachite green residues in farmed fish over a three-year period in Croatia. *Food Contr.*, 26, 393–396.

Cha, C. J., D. R. Doerge, C. E. Cerniglia (2001): Biotransformation of malachite green by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4358–4360.

Clemmensen, S., J. C. Jensen, N. J. Jensen, O. Meyer, P. Olsen, G. Würtzen (1984): Toxicological studies on malachite green: a triphenylmethane dye. *Arch. Toxicol.* 56(1), 43–45.

Hrvatska gospodarska komora (2010): Ribarstvo I prerada ribe. Hrvatska gospodarska komora Sektor za poljoprivredu, prehrambu i industriju I šumarstvo, Zagreb, Hrvatska. Dostupno na: http://www2.hgk.hr/en/depts/agriculture/ribarstvo_2010.pdf

Doerge, D. R., M. I. Churchwell, T. A. Gehring, Y. M. Pu, S. M. Plakas (1998): Analysis of malachite green and metabolites in fish using liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12 (21), 1625–1634.

EC (1990): Council Regulation 2377/90/EEC of 26 June 1990 on 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.* L224, 1–8.

EC (2002): Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun.* L221, 8–28.

EC (2004): Commission Decision 2004/25/EC, as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin. *Off. J. Eur. Commun.* L6, 38–39.

Culp, S. J., L. R. Blankenship, D. F. Kusewitz, D. R. Doerge, L. T. Mulligan, F. A. Beland (1999): Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite during short-term feeding to Fischer 344 rats and B6C3F1 mice. *Chem.-Biol. Interact.* 122, 153–170.

Culp, S. J., F. A. Beland, R. H. Heflich, R. W. Benson, L. P. Blankenship, P. J. Webb, P. W. Mellick, M. G. Manjanatha (2002): Mutagenicity and carcinogenicity in relation to DNA adduct formation in rats fed leucomalachite green. *Mut. Res.* 506–507, 55–63.

Culp, S. J., P. W. Mellick, R. W. Trotter, K. J. Greenlees, R. L. Kodell, F. A. Beland (2006): Carcinogenicity of malachite green chloride and leucomalachite green in B6C3F1 mice and F344 rats. *Food Chem. Toxicol.* 44(8), 1204–1212.

Fessard, V., T. Godard, S. Huet, A. Mourrot, J. M. Poul (1999): Mutagenicity of malachite green and leucomalachite green in vitro tests. *J. Appl. Toxicol.* 19(6), 421–430.

Henderson, A. L., T. C. Schmitt, T. M. Heinze, C. E. Cerniglia (1997): Reduction of malachite green to leucomalachite green by intestinal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(10), 4099–4101.

Marking, L. L., J. J. Rach, T. M. Schreier

(1994): Evaluation of antifungal agents for fish culture. *Prog. Fish-Cult.* 56, 225–231.

Meinertz, J. R., G. R. Stehly, W. H. Gingerich, J. L. Allen (1995): Residues of [14C]-malachitegreen in eggs and fry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after treatment of eggs. *J. Fish Dis.* 18, 239–247.

Meyer, F. P., T. A. Jorgenson (1983): Teratological and Other Effects of Malachite Green on Development of Rainbow Trout and Rabbits. *Transac. Am. Fish. Soc.* 112(6), 818–824.

Mitrowska, K., A. Posnyniak, J. Zmudzki (2005): Determination of malachite green and leucomalachite green residues in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection. *J. Chromat. A*, 1089, 187–19294–100.

Mitrowska, K., A. Posnyniak, J. Zmudzki (2008): Determination of malachite green and leucomalachite green residues in water using liquid chromatography with visible and fluorescence detection and confirmation by tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1207, 94–100.

Mittelstaedt, R. A., N. Mei, P. J. Webb, J. G. Shaddock, V. N. Dobrovolsky, L. J. McGarrity, S. M. Morris, T. Chen, F. A. Beland, K. J. Greenless (2004): Genotoxicity of malachite green and leucomalachite green in female Big Blue B6C3F1 mice. *Mutat. Res.* 561, 127–138.

Olesen, P. T. (2007): Risk assessment of malachite green in food. National Food Institute, Technical University of Denmark, Søborg, Denmark.

Plakas, S. M., K. R. El Said, G. R. Stehly, J. E. Roybal (1995): Optimization of a liquid chromatographic method for determination of malachite green and its metabolites in fish tissues. *J. AOAC Int.* 78 (6), 1388–1394.

Plakas, S. M., K. R. El Said, G. R. Stehly, W. H. Gingerich, J. L. Allen (1996): Uptake, tissue distribution, and metabolism of malachite green in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*).

Can. *J. Fish. Aquat. Sci.* 53(6), 1427–1433.

Pourreza, N., Sh. Elhami (2007): Spectrophotometric determination of malachite green in fish farming water samples after cloud point extraction using non-ionic surfactant Triton X-100. *Anal. Chim. Acta* 596, 62–65.

Rao, K. V., C. L. Fernandes (1996): Progressive effects of malachite green at varying concentrations on the development of N-nitrosodimethylamine induced hepatic preneoplastic lesions in rats. *Tumori* 82(3), 280–286.

Rao, K. V., D. M. Mahudawala, A. A. Redkar (2001): Abrogation of cell cycle checkpoint controls during malignant transformation of syrian hamster embryo cells is associated with decreased sensitivity to apoptosis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 20(3), 177–188.

RASFF (2011): Rapid alert system for food and feed: Dostupno na: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=searchResultList&startRow=101>

Renwick, A., J.-C. Leblanc, R. W. Setzer (2010): Application of the margin of exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. Example: Leucomalachite green. *Food Chem. Toxicol.* 48, 575–580.

Stammati, A., C. Nebbia, I. D. Angelis, A. G. Albo, M. Carletti, C. Rebecchi, F. Zampaglioni, M. Dacasto (2005): Effects of malachite green (MG) and its major metabolite, leucomalachite green (LMG), in two human cell lines. *Toxicol. In Vitro* 19(7), 853–858.

Singh, G., T. Koerner, J.-M. Gelinias, M. Abbott, B. Brady, A.-C. Huet, C. Charlier, P. Delahaut, S. B. Godefroy (2011): Design and characterization of a direct ELISA for the detection and quantification of leucomalachite green. *Food Addit. Contam. A* 28, 731–739.

Tao, Y., D. Chen, X. Chao, H. Yu, P. Yuanhu, Z. Liu, L. Huang, Y. Wang, Z. Yuan (2011): Simultaneous determination of malachite green, gentian violet and their leuco-metabolites in shrimp and salmon by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with accelerated solvent extraction and auto solid-phase clean-up. *Food Control* 22, 1246–1252.

Tarbin, J. A., K. A. Barnes, J. Bygrave, W. H. H. Farrington (1998): Screening and confirmation of triphenylmethane dyes and their leuco metabolites in trout muscle using HPLC-vis and ESP-LC-MS. *Analyst* 123 (12), 2567–2571.

Tripathi, M., S. K. Khanna, M. Das (2007): Surveillance on use of synthetic colours in eatables vis a vis Prevention of Food Adulteration Act of India. *Food Contr.* 18, 211–219.

Van de Riet, J. M., C. J. Murphy, J. N. Pearce, R. A. Potter, B. G. Burns (2005): Determination of malachite green and leucomalachite green in a variety of aquacultured products by liquid chromatography with tandem mass spectrometry detection. *J. AOAC Int.* 88, 744–749.

VRC (2001-2010): Veterinary Residues Committee's Annual Report on surveillance for Veterinary Residues in Food in UK for 2001 to 2010. Dostupno na: <http://www.vmd.defra.gov.uk/vrc/Reports/annual.htm>

Xing, W., L. He, H. Yang, C. Sun, D. Li, X. Yang, Y. Li, A. Deng (2009): Development of a sensitive and group-specific polyclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of malachite green and leucomalachite green in water and fish. *J. Sci. Food Agric.* 89, 2165–2173.

Yang, M. C., J. M. Fang, T. F. Kuo, D. M. Wang, Y. L. Huang, L. Y. Liu, P. H. Chen, T. H. Chang (2007): Production of antibodies for selective detection of malachite green and the related triphenylmethane dyes in fish and fishpond water. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8851–8856.

Dostavljeno: 2.12.2011.
Prihvaćeno: 1.4.2012.

www.meso.hr