Archive of SID

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۸، شماره ۴، زمستان ۹۷، صفحات ۲۹۰ تا ۲۹۶

Original Article

بررسی میزان باقی مانده مالاشیت گرین در بافت عضلانی ماهی‌های قزل آلای رنگین کمانی پرورشی به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

سحر صفری[۱]، فرشاد هاشمیان[۲]، حسین رستگار[۳]، مهناز قمی[۴]

[۱] دانش آموخته دکتری داروسازی، گروه داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲] دانشیار، گروه داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۳] استاد، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۴] استادیار، دانشکده شیمی دارویی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: مالاشیت گرین که دارای اثرات درمانی ضد قارچی است، به صورت غیر قانونی در پرورش آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد. از آنجایی که این ماده تراتوژن است، نظارت بر عدم مصرف آن ضروری به نظر می‌رسد. هدف از مطالعه حاضر، اندازه گیری میزان احتمالی مالاشیت گرین باقی مانده در ماهی های قزل آلای رنگین کمانی پرورشی موجود در بازار تهران توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) بود.

روش بررسی: مطالعه حاضر به روش نمونه گیری تصادفی بر روی ۴۲ نمونه ماهی قزل آلای رنگین کمانی با میانگین وزنی ۸۵۰ تا ۱۰۰۰ گرم که از بازارنقاط مختلف تهران در تابستان ۱۳۹۶ خریداری شدند، انجام شد. پس از جداسازی فیله های مورد نظر، نمونه ها تا زمان آنالیز، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از انجام مراحل استخراج، مخلوط حاصل حاوی لوکومالاشیت گرین احتمالی بود که پس از اکسیداسیون آن به مالاشیت گرین، نمونه به دستگاه HPLC تزریق و آنالیز شد.

یافته‌ها: *در بررسی ۴۲ نمونه ، ۳ مورد آلودگی (۷/۱ ٪) در محدوده غلظتی ppb۹۱-۷۸ گزارش شد.*

نتیجه‌گیری: *با توجه نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر و سایر مطالعات، مالاشیت‌گرین نه تنها درایران، بلکه در بسیاری از کشورها همچنان به صورت غیرقانونی استفاده می‌شود. هر چند، بر اساس مطالعات پیشین، به نظر می رسد که میزان مصرف آن در صنعت آبزیان کشور رو به کاهش است. لذا، پیشنهاد می‌شود با ارتقای سیستم‌های نظارتی در صنعت پرورش آبزیان، از مواد جایگزین استفاده شود.*

واژگان کلیدی: *مالاشیت گرین، ماهی قزل آلای رنگین کمانی، کروموتوگرافی مایع با کارآیی بالا.*

مقدمه

مالاشیت گرین با فرمول شیمیایی C23H25CIN2، یک رنگ تری فنیل متان کاتیونیک است که به منظور رنگ آمیزی موادی چون ابریشم، پشم، چرم، پنبه و کاغذ استفاده می‌شود (۱، ۲). همچنین، به عنوان داروی کنترل عفونت های قارچی در صنعت پرورش آبزیان در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۵-۳). در واقع، از اواسط دهه ۱۹۳۰میلادی، خواص ضد قارچی مالاشیت گرین شناخته شد (۶). در دهه ۱۹۵۰، این ماده به عنوان یک ضد عفونی کننده بسیار موثر در برابر انگل های داخلی و خارجی کاربرد داشت. در دهه ۱۹۶۰، اثبات شد که مالاشیت گرین، موثرترین درمان در برابر انگلهای خارجی پروتئوزایی، به ویژه *Ichthyophthirius multifiliis* است (۵). علاوه بر این، اهمیت این ماده زمانی دو چندان شد که اثرات درمانی آن بر روی قارچ های گونه‌های *Saprolegnia* موجود در آب در تخم های ماهی (۷) و کاربرد

آدرس نویسنده مسئول: تهران، داروسازی بالینی، دانشکده داروسازی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، فرشاد هاشمیان (**email**: Hashemian.f@iaups.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۶/۱۳
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۷/۷/۱۵

www.SID.ir

Archive of SID

آن در درمان بیماری پرولیفراتیو کلیه (Proliferative Kidney disease) ماهی قزل آلا نشان داده شد (۸).

بخش عمده مالاشیت گرین پس از جذب توسط سیستم متابولیسم ماهی به فرم لیپوفیل لوکومالاشیت گرین احیا می‌شود. شواهد علمی حاکی از آن است که مالاشیت گرین و به ویژه فرم کاهش یافته آن، لوکومالاشیت گرین ممکن است برای مدت زمان طولانی، در بافت ماهی های خوراکی باقی بماند (۹، ۱۰). در سال ۲۰۰۰، به دلیل مشاهده مطالعاتی مبنی بر احتمال وجود اثرات سرطان زایی و خواص تراتوژنیک این ماده، استفاده از آن به عنوان یک دارو در صنعت پرورش آبزیان خوراکی توسط FDA ممنوع اعلام شد. در واقع، در بسیاری از کشورها از جمله آمریکا، کانادا و اتحادیه اروپا، استفاده از مالاشیت گرین در صنعت پرورش آبزیان ممنوع اعلام شده است (۱۰). نگرانی در خصوص پتانسیل سمیت در انسان و حضور مالاشیت و لوکومالاشیت در محیط آبزیان باعث افزایش نظارت در این زمینه به ویژه در زنجیره تامین مواد غذایی شده است (۵). متاسفانه دلایلی چون قیمت پایین و دسترسی آسان، باعث شده تا کماکان از این ماده به طور غیر قانونی در صنعت پرورش آبزیان استفاده شود (۱۱). سازمان غذا و کشاورزی سازمان ملل متحد (FAO)، مصرف سرانه ی آبزیان در ایران را در سال ۲۰۱۴ میلادی، میزان ۹/۲ کیلوگرم اعلام کرده است (۱۲). لذا، آنالیز کیفی آبزیان خوراکی به عنوان یک منبع غنی پروتئین مورد استفاده افراد، ضروری به نظر می‌رسد. هدف از مطالعه حاضر، اندازه گیری میزان مالاشیت گرین باقی مانده در بافت عضلانی ماهی‌های سردابی پرورشی موجود در بازار ایران توسط کروموتوگرافی مایع با کارآیی بالا است.

مواد و روشها

روش تهیه نمونه

مطالعه حاضر به روش نمونه گیری تصادفی بر روی ۴۲ نمونه ماهی قزل آلای رنگین کمانی با میانگین وزنی ۸۵۰ تا ۱۰۰۰ گرم که از بازار ۵ نقطه مختلف تهران (شمال، جنوب، شرق، غرب و مرکز) در تابستان ۱۳۹۶ خریداری شدند و با شماره گروه های مشخص از یکدیگر متمایز شدند، انجام شد. حجم نمونه با توجه به مطالعات گذشته انتخاب شد (۵). پس از جداسازی فیله ماهی‌های مورد نظر و تقسیم آن به قطعات کوچک ترمکعبی شکل، نمونه‌ها تا زمان آنالیز، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. محل انجام مطالعه، مرکز تحقیقات و آزمایشگاه آنالیز دستگاهی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی بود.

آماده سازی نمونه

جهت استخراج و خالص سازی مالاشیت گرین و لوکومالاشیت گرین احتمالی، روش استخراج توسط محلول اکسنده DDQ (۲و۳-دی کلرو ۵و۶-دی سیانو ۱و۴- بنزوکینون) که توسط فلاح و بارانی در سال ۲۰۱۴ استفاده شده است (۱۱)، با تغییر جزئی به کار گرفته شد. تغییر جزئی در مرحله آخر روش استخراج است که در مطالعه فلاح و بارانی، حل کردن نمونه خشک شده در مخلوط استونیتریل، بافر استات و اسید آسکوربیک انجام شده است. در حالی که در مطالعه حاضر، نمونه خشک شده تحت خلا در متانول رقیق شد. ابتدا نمونه مورد نظر در دمای محیط قرار داده شد تا ذوب شود. سپس، مقدار ۴ گرم از نمونه هموژنایز شده شامل سه بخش ماهی (سر، شکم و دم)، توسط ترازوی آنالیتیکال توزین شده و به یک بشر منتقل شد. پس از انتقال محتویات به یک لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتر، ۱۶ میلی‌لیتر استونیتریل اسیدی بدان افزوده شد و سپس تا حجم ۲۵ میلی‌لیتر توسط دی کلرومتان رقیق شد و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت زیاد، shake شد. مخلوط به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد و با سرعت rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد و سپس ۱۰ میلی‌لیتر از محلول رویی را در یک لوله فالکون، دکانته کرده و ۵ سی سی محلول ۰/۰۰۱ مولار DDQ اضافه شد و در یک محیط تاریک به مدت ۴۵ دقیقه تا یک ساعت قرار داده شد. محلول مذکور، به صورت دوره‌ای، هر ۱۵ دقیقه یک بار، shake شد. در این مدت، بن ماری را روی دمای ۴۰ درجه سانتیگراد تنظیم کرده و پس از طی زمان ذکرشده، محلول به یک ارلن درون بن ماری انتقال داده شد. محلول تحت جریان خلا قرار گرفته تا حدود ۳ میلی لیتر از آن باقی بماند. در این مرحله، ۳ میلی لیتر استونیتریل از کارتریج SCX عبور دادیم و آن را دور ریختیم. سپس ابتدا محلول حاصل از خشک شدن تحت خلا و سپس ۲/۵ سی سی استونیتریل را از کارتریج SCX عبور داده و حاصل هر دو مرحله را در یک ارلن ریخته و دوباره تحت جریان خلا در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا خشک شود. حاصل نهایی را در ۱ میلی‌لیتر متانول حل کردیم. مطابق با مطالعات پیشین، روش انجام شده به منظور خالص سازی و استخراج ماده کارسینوژن مالاشیت گرین در مطالعه حاضر، (استخراج توسط محلول اکسنده DDQ) در مقایسه با روش های دیگر، دارای راندمان بالاتری است (۱۳،۱۱).

www.SID.ir

Archive of SID

آنالیز نمونه

پس از انجام مراحل استخراج، مخلوط استخراج شده حاوی لوکومالاشیت گرین احتمالی است. به منظور اندازه گیری میزان باقی مانده مالشیت گرین و نیز یافتن میزان درصد بازیابی، غلظت های معین مختلفی از لوکومالاشیت گرین (فرم احیا شده)، به بافت ماهی اسپایک و در نهایت استخراج و توسط محلول DDQ اکسید شد تا مالاشیت گرین به دست آید. سپس، به وسیله سمپلر، ۵۰۰ µL از عصاره استخراج شده را برداشته و ۵۰Lµ از محلول مالاشیت گرین ۱۰ ppm می‌افزاییم تا غلظت نهایی ماده در محلول، ۱ ppm گردد. پس از اکسیداسیون لوکومالاشیت گرین به مالاشیت گرین و عبور حاصل استخراج از فیلتر ۰,۴۵ µm و مناسب بودن فشار، نمونه به دستگاه کروموتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)، تزریق شد. فاز متحرک در این جداسازی شامل ۶۰ ٪ استونیتریل و ۴۰ ٪ بافر سدیم استات بود. روش به کار رفته در شناسایی و اندازه‌گیری میزان مالاشیت گرین در این مطالعه روش استاندارد افزایشی بود. حسن این روش اندازه‌گیری مقادیر بسیار کم در نمونه‌ها است. در این روش به نمونه مورد نظر، حجم مشخص از غلظتی معین از ماده استاندارد مورد نظر که سطح زیر منحنی آن را از قبل می‌دانیم اضافه کرده و سپس نمونه را به دستگاه تزریق کردیم و سطح زیر منحنی را به‌دست آوردیم.

دستگاه HPLC مورد استفاده C18 (150mm*4.6µm id) ۹۱۳۱YONGLIN مجهز به vaccum degasser YL9101N، به همراه آشکارساز نور مرئی YL9120 UV/VIS، و پمپ YL9110 quaternary pump بود. فاز متحرک در این جداسازی شامل ۶۰٪ استونیتریل و ۴۰٪ بافر سدیم استات بود.

نرم افزار متصل به دستگاه کروموتوگرافی مایع با کارآیی بالا جهت آنالیز و محاسبه سطوح زیر منجنی، زمان بازداری در این مطالعه، Autochro-3000 بود. به منظور محاسبه معادلات خطوط و ضریب همبستگی از نرم افزار Microsoft Excel 2016 استفاده شد.

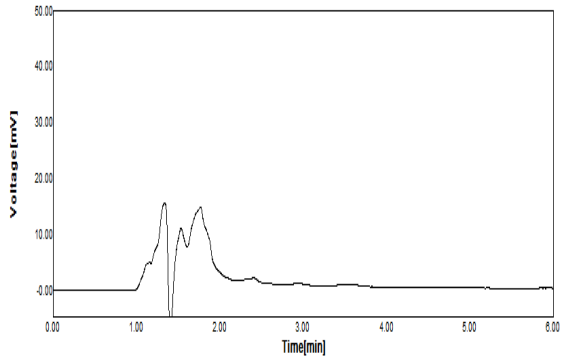
یافته‌ها

نتایج حاصل از تزریق استاندارد مالاشیت گرین به دستگاه HPLC در جدول ۱ و نمودار حاصل از تزریق نمونه شاهد بدون اضافه کردن استاندارد در نمودار ۱ قابل مشاهده است.

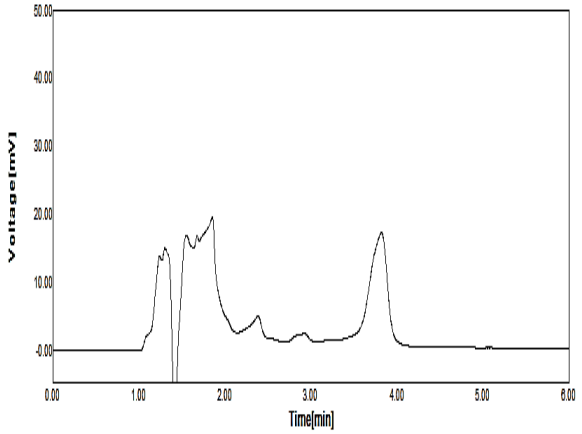
جدول ۱. نتایج حاصل از تزریق استاندارد مالاشیت گرین به دستگاه HPLC

(ppm) غلظت	۰/۰۱۱	۰/۰۲۳	۰/۰۴۶	۰/۰۹۳
سطح زیر منحنی	۲/۱	۴/۶	۹/۵	۱۸/۲
(ppm) غلظت	۰/۱۸	۰/۳۷	۰/۷۵	۱/۲۵
سطح زیر منحنی	۳۷/۳	۷۵/۱	۱۴۰/۵	۲۸۰/۹
(ppm) غلظت	۲/۵	۵	۱۰	۲۰
سطح زیر منحنی	۵۶۲/۸	۱۵۴۳	۳۵۹۴	۸۲۸۳

در این مطالعه سطح زیر منحنی محلول مالاشیت گرین با غلظت ۱ppm به‌عنوان استاندارد در نظر گرفته شد. کروموتوگرام حاصل از تزریق نمونه استاندارد 1 ppm در نمودار ۲ قابل مشاهده است.



نمودار ۱. نمودار حاصل از تزریق نمونه شاهد بدون اضافه کردن استاندارد



نمودار ۲. کروماتوگرام حاصل از تزریق استاندارد **ppm**۱ (در نمونه بلانک)

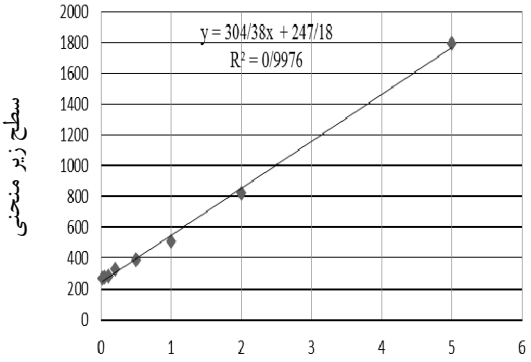
نتایج حاصل از استخراج غلظت‌های اسپایک شده به نمونه در جدول ۲ مشاهده می‌شود. جهت بررسی خطی بودن، معادله خط و ضریب همبستگی (r^2) محاسبه شد. r^2 برابر ۰/۹۹۷۶ به دست آمد. منحنی کالیبراسیون نمونه‌های اسپایک شده در نمودار ۳ قابل مشاهده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. نتایج حاصل از استخراج غلظت‌های اسپایک شده به نمونه

غلظت (ppm)	۰/۰۲	۰/۰۵	۱/۰	۲/۰
سطح زیر منحنی	۲۷۲/۴	۲۷۶/۶	۲۸۳/۸	۸/۳۳۰
غلظت (ppm)	۰/۵	۱	۲	۵
سطح زیر منحنی	۳۹۰/۸	۵۱۰/۸	۸۲۰/۸	۱۷۹۰/۸



غلظت(µg/ml)

نمودار ۳. منحنی کالیبراسیون نمونه‌های اسپایک شده

نتایج حاصل از تزریق محلول استخراج شده ازنمونه‌های ماهی‌های قزل‌آلای رنگین کمانی مورد مطالعه به دستگاه HPLC در جدول ۳ آمده است. نمودار حاصل از کروموتوگرام یک نمونه آلوده در نمودار ۴ مشاهده می‌شود. برای به دست آوردن دقت روش در طول یک روز از ۴ قسمت یک نمونه استخراج انجام شد. نتایج به دست آمده در جدول ۴ خلاصه شده است. برای محاسبه دقت بینابینی، در طول سه روز از ۴ قست یک نمونه استخراج انجام شد. نتایج به دست آمده در جدول ۵ خلاصه شده است. از آنجایی که سطح زیر منحنی نمونه بلانک با افزودن استاندارد و ایجاد غلظت ppm ۱ از مالاشیت گرین، پس از ۵ بار تکرار، برابر ۲۷۰ است، لذا نمونه‌های شماره ۱۲، ۱۷ و ۲۵ که در جدول با ستاره مشخص شده‌اند، حاوی مالاشیت گرین هستند. این نمونه‌ها به ترتیب از شمال، شمال و غرب تهران خریداری شدند.

برای پیدا کردن میزان مالاشیت گرین در این نمونه‌ها از معادله نمودار ۳ استفاده کردیم. با استفاده از این معادله غلظت مالاشیت گرین در نمونه‌های ۱۲، ۱۷، ۲۵ به ترتیب ۷۸/۵ ppb، ۹۱/۳ ppb و ۸۱/۵ ppb بود.

با استناد به توضیحات فروشندگان نمونه‌ها، محل استخرهای پرورشی این ماهی‌ها خارج از شهر تهران و در استان‌های شمال کشور، استان البرز و استان چهارمحال بختیاری بود.

جدول ۳. نتایج حاصل از تزریق محلول استخراجی از نمونه‌های حقیقی

نمونه	سطح زیر منحنی	نمونه	سطح زیر منحنی
۱	۲۵۰	۲۲	۲۵۴
۲	۲۵۳	۲۳	۲۷۰
۳	۲۶۰	۲۴	۲۶۰
۴	۲۵۵	۲۵	*۲۷۵
۵	۲۶۱	۲۶	۲۵۰
۶	۲۷۰	۲۷	۲۷۰
۷	۲۶۲	۲۸	۲۶۹
۸	۲۶۸	۲۹	۲۵۶
۹	۲۵۷	۳۰	۲۶۳
۱۰	۲۵۵	۳۱	۲۶۶
۱۱	۲۶۲	۳۲	۲۵۹
۱۲	*۲۷۱	۳۳	۲۶۰
۱۳	۲۷۰	۳۴	۲۵۲
۱۴	۲۵۲	۳۵	۲۷۰
۱۵	۲۵۸	۳۶	۲۶۷
۱۶	۲۷۰	۳۷	۲۵۳
۱۷	*۲۷۲	۳۸	۲۶۹
۱۸	۲۶۸	۳۹	۲۶۴
۱۹	۲۶۱	۴۰	۲۵۸
۲۰	۲۵۰	۴۱	۲۴۵
۲۱	۲۷۰	۴۲	۲۴۸

جدول ۴. جدول بررسی دقت در یک روز

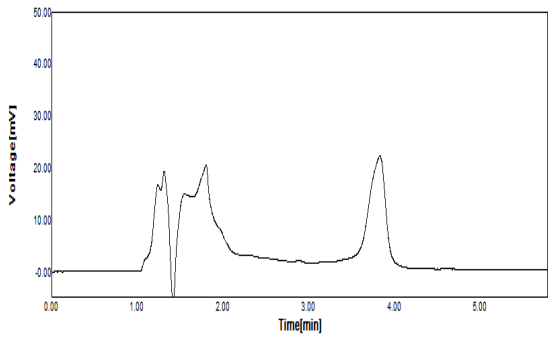
نام نمونه	S_1	S_2	S_3	S_4
سطح زیر منحنی تزریق ۱	۲۶۹	۲۶۵	۲۵۰	۲۶۲
سطح زیر منحنی تزریق ۲	۲۶۳	۲۷۱	۲۶۲	۲۷۰
میانگین سطح زیر منحنی	۲۶۶	۲۶۸	۲۶۵	۲۶۶
انحراف معیار	۴/۴۳			
درصد انحراف معیار نسبی	٪ ۱/۶۷			

جدول ۵. بررسی دقت در سه روز

نام نمونه	S1	S2	S3	S4
سطح زیر منحنی روز اول	۲۶۶	۲۶۸	۲۵۶	۲۶۶
سطح زیر منحنی روز دوم	۲۵۰	۲۶۰	۲۴۰	۲۵۴
سطح زیر منحنی روز سوم	۲۵۶	۲۵۳	۲۴۵	۲۶۰
میانگین کل	۲۵۷			
انحراف معیار	۸/۶۸			
درصد انحراف معیار نسبی	٪۳/۳۷			

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار۴. کروماتوگرام یک نمونه آلوده

بحث

فلاح و بارانی در سال ۲۰۱۴، مطالعه‌ای را بر روی بافت عضلانی ۱۴۴ نمونه ماهی قزل آلای رنگین کمانی جمع آوری شده از سراسر ایران انجام دادند. نتایج مطالعات آنها حاکی بر این بود که ۴۸/۶ ٪ نمونه‌ها دارای آلودگی با مالاشیت گرین در محدوده ۰/۳-۱۴۶/۱ µg/kg بودند. بیشترین میزان آلودگی (۵۲/۸ ٪) در نمونه‌های پرورش یافته در مناطق شمالی ایران و کمترین میزان آلودگی مربوط به نمونه های شمال غربی کشور با میزان آلودگی ۴۲/۸ ٪ گزارش شد (۱۱). نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر (میزان آلودگی ۷/۱ ٪ در محدوده غلظتی ppb۹۱-۷۸) تا حدودی با مطالعه فلاح و بارانی متفاوت است. از جمله دلایل تفاوت به دست آمده احتمالاتفاوت در مرحله آخر روش استخراج است. در قسمت پایانی روش استخراج و تخلیص در مطالعه حاضر، نمونه خشک شده تحت جریان خلا در متانول رقیق شد. درحالی که در مطالعه فوق، انحلال نمونه خشک شده در مرحله پایانی، در مخلوط استونیتریل، بافر استات و اسید آسکوربیک صورت گرفته بود. از آنجایی که مالاشیت گرین در محیط اسیدی، بیشتر یونیزه می‌شود، یکی از دلایل مشاهده بازه وسیع میزان اندازه گیری شده در مطالعه فوق، می‌تواند تفاوت در مرحله پایانی استخراج باشد. از دیگر دلایل احتمالی می‌توان به تفاوت‌های دستگاه های کروموتوگرافی مایع با کارآیی بالای مورد استفاده در مطالعه، تفاوت در خطای فردی اپراتور و کمتر شدن میزان استفاده از مالاشیت گرین در استخرهای ماهیان پرورشی را نام برد (هر چند که در هر دو مطالعه، غلظت مالاشیت گرین به دست آمده در محدوده سمی برای انسان و سایر موجودات قرار دارد).

مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۸، بر روی ماهی‌های قزل‌آلای رنگین کمانی و کپوردر مناطق شمال، جنوب، هراز و شهر کرد در ایران انجام شد ، نشان داد که تمامی نمونه‌های ماهی‌های قزل آلای رنگین کمان در دو منطقه هراز و شهر کرد و نمونه های کپور در دو منطقه شمال و جنوب، آلوده به مالاشیت گرین هستند و تنها تفاوت در میزان آلودگی در گوشت آنها است. به عنوان مثال، ماهی‌های قزل آلای منطقه هراز، با میانگین وزنی نیم کیلوگرم دارای میزان مالاشیت گرین کمتری نسبت به نمونه های ۱ کیلوگرمی همان منطقه بودند. ولی در نمونه‌های به دست آمده از جنوب، نمونه های نیم کیلوگرمی در مقایسه با نمونه های ۱ کیلوگرمی، دارای میزان بالاتری از مالاشیت گرین بودند. بنابراین، محققان این گونه نتیجه گیری کردند که وزن، احتمالا نمی‌تواند عامل تعیین کننده‌ای از نظر غلظت مالاشیت گرین در گوشت ماهی باشد و عوامل مختلفی می‌تواند بر تجمع این ماده در بافت تبدیل آن به لوکومالاشیت تاثیرگذار باشد (۱۴). از جمله این عوامل می‌توان به غلظت مالاشیت گرین در آب، مدت زمان در معرض قرارگیری ماهی با آن، مواد آلی موجود در آب، یون‌ها، دما و میزان pH اشاره کرد (۵). نتایج مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۴ در ایران انجام شد، نشان داد که میزان مالاشیت گرین تجمع یافته در بافت عضلانی ماهی قزل الای رنگین کمانی ۰,۳ تا ۱,۶ میلی گرم در کیلوگرم است (۱۵).

نتایج مطالعه دیگری که بر روی ۴۲ نمونه ماهی کپور و ۳۰ نمونه قزل الای رنگین کمانی طی سال های ۲۰۰۹ تا ۲۰۱۱ در کرواسی انجام شد، نشان داد که ۱۸/۱ ٪ از ماهی‌ها آلوده به مالاشیت گرین در سطح توکسیک هستند. این محققین پیشنهاد کردند که مطالعه بر روی میزان لوکومالاشیت گرین باقی مانده در بافت ماهیچه ایی ماهی ها نیز انجام پذیرد (۱۶). همچنین، در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ توسط تریپاتی و همکاران انجام شد مشخص شد که مالاشیت گرین در بسیاری از مواد غذایی موجود در بازار کشور هندوستان موجود است و این مقدار در مواد غذایی روستاییان بیشتر از مواد غذایی بازار شهرها است (۱۷). نتایج مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ در چین انجام گرفت، نشان داد که ۵۶/۱٪ از آبزیان پرورشی موجود در بازار مواد غذایی این کشور، آلوده به این ماده در سطوح غلظتی بین ppb۱۴۸-۰/۵ ppb هستند (۱۸). در مطالعه‌ای که اخیرا در مالزی انجام شد، میانگین باقی مانده مالاشیت گرین و لوکومالاشیت گرین در بافت ماهیچه‌ای ماهی‌های پر مصرف از قبیل تیلاپیای قرمز (*Oreochromis hybrid*)، گربه ماهی افریقایی (*Clarias gariepinus*)، بارامودی (*Lates calcarifer*) و گربه ماهی راه راه (*Panagasius hypophthalmus*) اندازه گیری شد. میانگین

www.SID.ir

Archive of SID

باقی مانده مالاشیت گرین و لوکومالاشیت گرین در بافت ماهیچه‌ای این ماهی‌ها، ۰/۵۳-۴/۱۰µg/kg به دست آمد (۱۹). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ با روش استخراجی مشابه روش انجام شده در مطالعه حاضر انجام شد، محققان موفق به اندازه‌گیری میزان مالاشیت گرین، لوکومالاشیت گرین، کریستال ویوله و فرم لوکوی آن در ماهی سالمون شدند که این امر موید آن است که روش استخراجی مورد استفاده تنها محدود به مالاشیت گرین نیست و می‌تواند برای استخراج سایر رنگ‌های خانواده تری فنیل متان که با مکانیسم مشابهی در بافت عضلانی ماهی ذخیره می‌شوند، استفاده شود (۲۰).

در کشور انگلستان طی یک برنامه طولانی مدت همه آبزیان خوراکی بین سال‌های ۲۰۰۱ تا ۲۰۱۱ از نظر وجود احتمالی مالاشیت گرین، کنترل شدند و هر ماده غذایی حاوی آن، از زنجیره غذایی خارج می‌شد. این امر، منجر به محدود شدن مصرف مالاشیت گرین شد. در سال‌های ۲۰۰۸، ۲۰۰۹ و ۲۰۱۱ هیچ کدام از نمونه‌های مورد آنالیز، آلوده به این ماده نبودند و در سال‌های ۲۰۰۷ و ۲۰۱۰ به ترتیب ۱۰۸ و ۱۰۱ نمونه ماهی قزل‌آلای پرورشی با بازه آلودگی ppb ۲۰-۶ یافت شدند (۱۱).

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، آلودگی به مالاشیت گرین در ۷/۱ ٪ نمونه های مورد بررسی در محدوده غلظتی ppb۹۱-۷۸ گزارش شد. هر چند، با مقایسه نتایج به دست آمده از مطالعات پیشین، به نظر می‌رسد که میزان مصرف این ماده توکسیک در صنعت آبزیان کشور رو به کاهش است. از آنجایی که مصرف مالاشیت گرین، تهدیدی برای سلامت انسان و سایر موجودات محسوب می‌شود، پیشنهاد می‌شود با ارتقای سیستم های نظارتی در صنعت پرورش آبزیان، از مواد جایگزین بدین منظور استفاده شود.

تشکر و قدردانی

منابع مالی ای مطالعه، توسط دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تامین شد. از کلیه کارشناسان مرکز تحقیقات و آزمایشگاه آنالیز دستگاهی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی که در انجام این مطالعه همکاری کردند، تشکر می‌شود.

REFERENCES

1. Safarík I, Safariková M. Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water. Water Res 2002;36:196-200.

2. Stammati A, Nebbia C, De Angelis I, Albo AG, Carletti M, Rebecchi C, et al. Effects of Malachite Green (MG) and Its Major Metabolite, Leucomalachite Green (LMG), in Two Human Cell Lines. Toxicology In Vitro 2005;19:853–858.

3. Alderman DJ. Malachite Green: A Review. J Fish Dis. 1985;8:289–298.

4. Chen RC, Wei KJ, Wang TM, Yu YM, Li JY, Lee SH, et al. Simultaneous Quantification of Antibiotic Dyes in Aquatic Products and Feeds by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. J Food Drug Anal 2013;21:339-46.

5. Sudova E, Machova J, Svobodova Z, Vesely T. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. Vet Med 2007;52:527–53

6. Foster FJ, Woodbury L. The use of malachite green as a fish fungicide and antiseptic. The Progressive Fish-Culturist 1936;3:7–9.

7. Alderman DJ, Polglase JL. A comparative investigation of the effects of fungicides on Saprolegnia parasitica and Aphanomyces astaci. Trans Br mycol Soc 1984;83:313–318.

8. Clifton-Hadley RS, Alderman DJ. The effects of malachite green upon proliferative kidney disease. J Fish Dis 1987;10:101–107.

9. Mitrowska K, Posyniak A. Determination of malachite green and its metabolite, leucomalachite green, in fish muscle by liquid chromatography. Bull Vet Inst Pulawy. 2004;48:173–176.

10. Andersen WC, Roybal JE, Turnipseed SB. Liquid chromatographic determination of malachite green and leucomalachite green (LMG) residues in salmon with in situ LMG oxidation. J AOAC Int 2005;88:1292-98.

11. Fallah AA, Barani A. Determination of malachite green residues in farmed rainbow trout in Iran. Food Control 2014;40:100-5.47.

12. FAO (Food and Agriculture Organization). 2015. “Fishery and Aquaculture Country Profiles, The Islamic Republic of Iran.” Retrieved 20.09.2018. Available from: http://www.fao.org/fishery/facp/IRN/en.

13. Andersen WC, Turnipseed SB, Roybal JE. Quantitative and confirmatory analyses of malachite green and leucomalachite green residues in fish and shrimp. J Agric Food Chem. 2006;54:4517-23.

www.SID.ir

Archive of SID

14. Motafeghi F, Javadi I, Allame SK. Investigation of Malachite Green Existence in Rainbow Trout (oncorhynchus Mykiss) and Common Carp (cyprinus Carpio) Flesh in the Area of North and South of Iran, Haraz and Shahr E Kord. Iranian Journal of Fisheries Sciences 2018;27:131-137. [In Persian]

15. Khodabakhshi AA, Dastjerdi V, Ghasemian M, Ebrahimi A. Determination of the amount of green malachite in the effluent and tissue tissues of the fish farms of Chaharmahal va Bakhtiari province. Journal of Sciences, technology and environment 2014;16:189-196. [In Persian]

16. Bilandzic N, Varenina IK, Kollanovic BS. Oraic D. Zrncic S. Malachite green residues in farmed fish in Croatia. Food Con. 2012;26:393–396.

17. Tripathi M, Khanna SK, Das M. Surveillance on use of synthetic colours in eatables vis a vis Prevention of Food Adulteration Act of India. Food Con 2007;18:211-9.

18. Fu WS, Zheng KC, Qiu WQ, Wang QL, Fang QM. Investigation and traceability of residual malachite green and its metabolite in freshwater fish. Journal of Food Safety and Quality 2013;4:176e182.

19. Kwan PP, Banerjee S, Shariff M, Ishak NA, Yusoff F. Quantitative analysis of malachite green and leucomalachite green residues in fish purchased from the markets in Malaysia. Food Con 2018;92:101-106.

20. Mitrowska K, Andrzej P, Zmudzki J. 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 Chromat. 2008;1207.1:94-100.

www.SID.ir