

Kinetyka zanikania pozostałości barwników w tkankach i narządach ryb

Kamila Mitrowska

**Państwowy Instytut Weterynaryjny
- Państwowy Instytut Badawczy w Puławach
Zakład Farmakologii i Toksykologii**

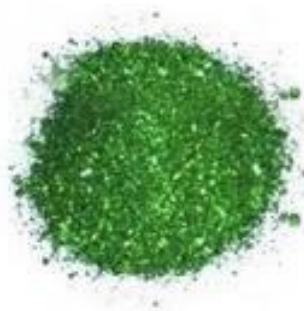
**Krajowe Laboratorium Referencyjne
dla pozostałości substancji
niezgodzonych oraz pozostałości
chemicznych i produktów leczniczych
w żywności pochodzenia zwierzęcego**



- **Charakterystyka barwników farmakologicznie czynnych stosowanych w hodowli ryb**
- **Kinetyka zanikania pozostałości barwników u ryb**
- **Wyniki badań kontrolnych pozostałości barwników w rybach w UE i Polsce**
- **Perspektywa zmian w Krajowym Programie Monitorowania Pozostałości Chemicznych**

Barwniki trifenylometanowe:

- zieleń malachitowa
- fiolet krystaliczny
- zieleń brylantowa



Barwniki tiazynowe:

- błękit metylenowy



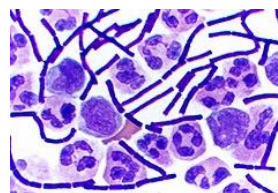
Barwniki akrydynowe:

- akryflawina (trypaflawina)
- proflawina



Jako substancje barwiące:

- w przemyśle tekstylnym i papierniczym
- w barwieniu cytochemicznym
- w kryminalistyce



Jako substancje farmakologicznie czynne:

- w medycynie ludzkiej do dezynfekcji
- w akwarystyce i hodowli ryb ozdobnych w chorobach bakteryjnych, grzybiczych i wywołanych przez pierwotniaki



- w hodowli ryb przeznaczonych do konsumpcji

ILLEGAL



Barwniki jako substancje farmakologicznie czynne

nie są zarejestrowanymi lekami weterynaryjnymi

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (UE) NR 37/2010

z dnia 22 grudnia 2009 r.

w sprawie substancji farmakologicznie czynnych i ich klasyfikacji w odniesieniu do maksymalnych limitów pozostałości w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego

odległe efekty działania **genotoksycznego**:

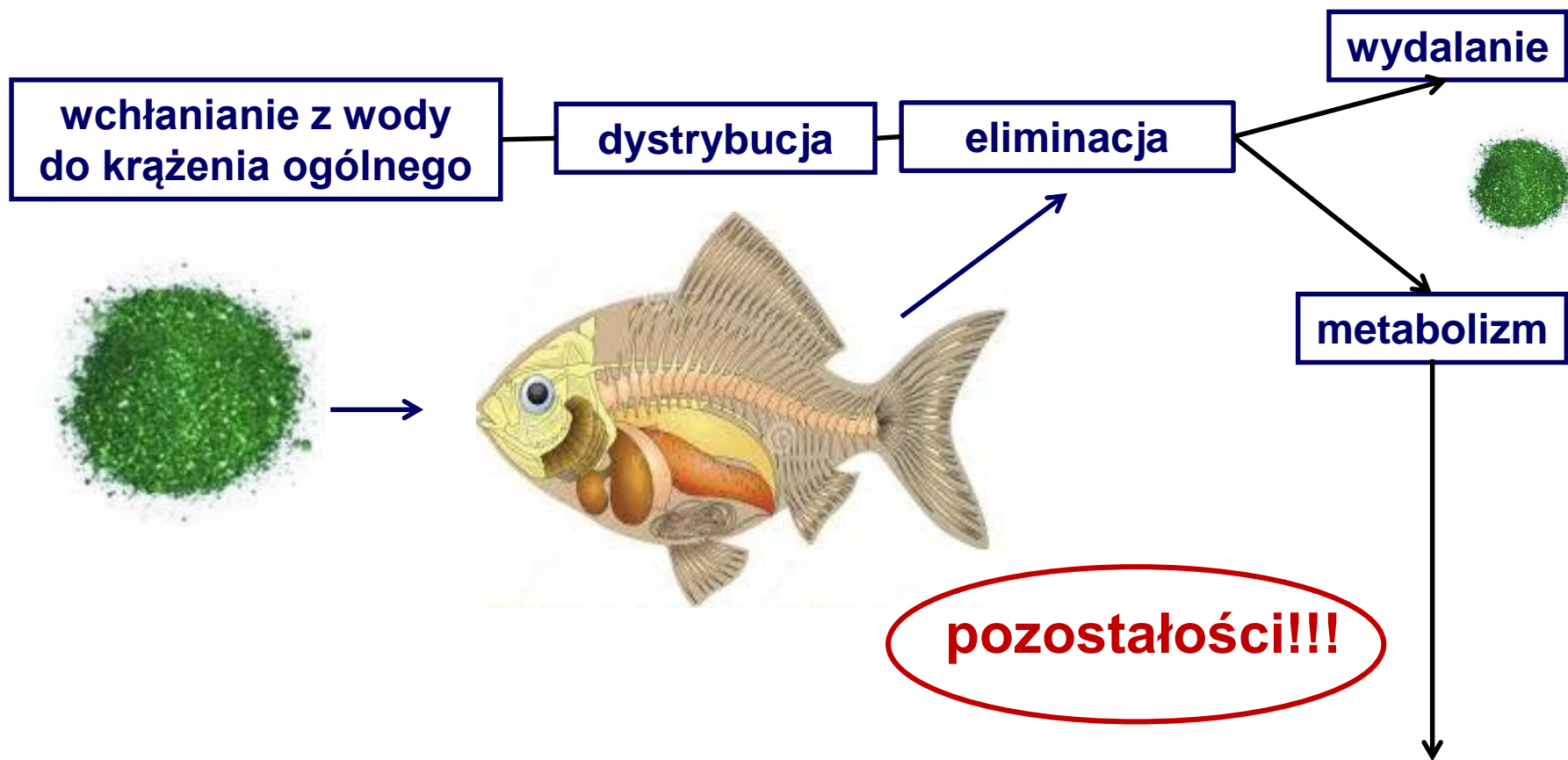
- mutagenne
- rakotwórcze
- teratogenne



Nie może być wyznaczone:

- **ADI** - dopuszczalne dzienne pobranie (ang. *Acceptable Daily Intake*)
- **MRL** - maksymalny limit pozostałości (ang. *Maximum Residue Limit*)

Barwniki – farmakokinetyka i kinetyka zanikania pozostałości u ryb



zieleń malachitowa -> zieleń leukomalachitowa
 fiolet krystaliczny -> fiolet leukokrystaliczny
 zieleń brylantowa -> zieleń leukobrylantowa
 błękit metylenowy -> azur B, azur A

Gatunek ryby Średnia masa	Stężenie w kąpeli	Czas kąpeli	Temp. kąpeli	pH kąpeli
pstrąg tęczowy (<i>Oncorhynchus Mykiss</i>) 204 g	0,2 mg/l	6 dni	12-14 °C	brak danych



Metabolit (forma leuko) stanowi pozostałość markerową w badaniach kontrolnych ryb

Najwyższe stężenia	Czas zanikania pozostałości
zieleń malachitowa: 242 µg/kg (0 godz.) (<u>121%</u>) suma zieleni malachitowej i zieleni leukomalachitowej: 980 µg/kg (8 tyg.) (490%)	zieleń malachitowa: < LOD (10 µg/kg) (2 mieś.) suma zieleni malachitowej i zieleni leukomalachitowej: <LOD (5 µg/kg) (12 mieś.)

Gatunek ryby Średnia masa	Stężenie w kąpeli	Czas kąpeli	Temp. kąpeli	pH kąpeli
pstrąg tęczowy (<i>Oncorhynchus Mykiss</i>) 20 g	1 mg/l	1 godz.	9-15 °C	7,4



Najwyższe stężenia	Czas zanikania pozostałości
zieleń malachitowa: 528 µg/kg (1 d.) (<u>53%</u>)	zieleń malachitowa: <CCα (0,6 µg/kg) (2,6 mieś.)
zieleń leukomalachitowa: 3 466 µg/kg (1 d.) (<u>347%</u>)	zieleń leukomalachitowa: 4,6 µg/kg (9,4 mieś.)

Gatunek ryby Średnia masa	Stężenie w kąpeli	Czas kąpeli	Temp. kąpeli	pH kąpeli
pstrąg tęczowy (<i>Oncorhynchus Mykiss</i>) 20 g	1 mg/l	3 godz.	9-15 °C	7,4



Czas ekspozycji ma większy wpływ na wchłanianie niż stężenie barwnika

Najwyższe stężenia	Czas zanikania pozostałości
zieleń malachitowa: 2 209 µg/kg (1 d.) (<u>221%</u>)	zieleń malachitowa: <CCα (0,6 µg/kg) (5 mieś.)
zieleń leukomalachitowa: 9 736 µg/kg (4 d.) (<u>974%</u>)	zieleń leukomalachitowa: 2,1 µg/kg (10 mieś.)

Gatunek ryby Średnia masa	Stężenie w kąpeli	Czas kąpeli	Temp. kąpeli	pH kąpeli
karp królewski (<i>Cyprinus caprio</i>) 100 g	2 mg/l	3 godz.	14-17 °C	7,8



U karpia wchłanianie jest niższe
ale czas zanikania dłuższy niż u pstrąga

Najwyższe stężenia	Czas zanikania pozostałości
zieleń malachitowa: 341 µg/kg (0 d.) (<u>17%</u>)	zieleń malachitowa: <LOQ (0,5 µg/kg) (3 mieś.)
zieleń leukomalachitowa: 843 µg/kg (1 d.) (<u>42%</u>)	zieleń leukomalachitowa: <LOQ (0,5 µg/kg) (11 mieś.)

Gatunek ryby Średnia masa	Stężenie w kąpieli	Czas kąpieli	Temp. kąpieli	pH kąpieli
pstrąg tęczowy (<i>Oncorhynchus Mykiss</i>) ikra 7 dni po zapłodnieniu	6 mg/l	6 razy po 30 min (7-25 d.)	10-14 °C	6,2



Najwyższe stężenia	Czas zanikania pozostałości
zieleń malachitowa: 569 µg/kg (0 d. od wylęgu jaj, czyli 27-29 d. po zapłodnieniu) (<u>10%</u>) zieleń leukomalachitowa: 2 400 µg/kg (0 d.) (<u>40%</u>)	zieleń malachitowa: < LOD (0,5 µg/kg) (1,5 mieś.) zieleń leukomalachitowa: < LOD (0,5 µg/kg) (2 mieś.)

Gatunek ryby Średnia masa	Stężenie w kąpielii	Czas kąpielii	Temp. kąpielii	pH kąpielii
węgorz europejski (<i>Anguilla anguilla</i>) przed kąpielą: 4,1 g po 100 d.: 3,5 g	0,1 mg/l	24 godz.	23-27 °C	7,4



Najwyższe stężenia	Czas zanikania pozostałości
zieleń malachitowa: 435 µg/kg (6 godz.) (<u>435%</u>) zieleń leukomalachitowa: 831 µg/kg (72 d.) (831%)	zieleń malachitowa: <LOD (0,2 µg/kg) (3 mieś.) zieleń leukomalachitowa: 15 µg/kg (3,5 mieś.)

Gatunek ryby Średnia masa	Stężenie w kąpiel	Czas kąpiel	Temp. kąpiel	pH kąpiel
węgorz europejski (<i>Anguilla anguilla</i>) przed kąpielą: 0,3 g po 11 mieś.: 84 g	0,15 mg/l	24 godz.	brak danych	brak danych



U ryb kąpanych na etapie ikry czy narybku nie stwierdza się pozostałości na etapie ryby handlowej

Najwyższe stężenia	Czas zanikania pozostałości
nie badano	zieleń malachitowa: <LOD (0,2 µg/kg) (11 mieś.) zieleń leukomalachitowa: <LOD (0,2 µg/kg) (11 mieś.)

Gatunek ryby Średnia masa	Stężenie w kąpielii	Czas kąpielii	Temp. kąpielii	pH kąpielii
łosoś atlantycki (<i>Salmo salar</i> L.) przed kąpielą: 100 g po 91 d.: 200 g	1 mg/l	5 godz.	15 °C	brak danych



Metabolit (forma leuko) stanowi pozostałość markerową w badaniach kontrolnych ryb

Najwyższe stężenia	Czas zanikania pozostałości
fiolet krystaliczny: 2,4 µg/kg (1 d.) fiolet leukokrystaliczny: 134 µg/kg (1 d.) (13%)	fiolet krystaliczny: < LOD (2 µg/kg) (0,5 mieś.) fiolet leukokrystaliczny: 20 µg/kg (3 mieś.)

Gatunek ryby Średnia masa	Stężenie w kąpeli	Czas kąpeli	Temp. kąpeli	pH kąpeli
pstrąg tęczowy (<i>Oncorhynchus Mykiss</i>)	0,1 mg/l	1 godz.	brak danych	brak danych



Najwyższe stężenia	Czas zanikania pozostałości
zieleń brylantowa: 27 $\mu\text{g/kg}$ (1 godz.) (<u>27%</u>)	zieleń brylantowa: 25 $\mu\text{g/kg}$ (2 godz.)
zieleń leukobrylantowa: 18 $\mu\text{g/kg}$ (1 godz.) (<u>18%</u>)	zieleń leukobrylantowa: 15 $\mu\text{g/kg}$ (2 godz.)

Błękit metylenowy

Gatunek ryby Średnia masa	Stężenie w kąpieli	Czas kąpieli	Temp. kąpieli	pH kąpieli
sum kanałowy <i>(Ictalurus punctatus)</i>	5 mg/l	1 godz.	25 °C	8



Najwyższe stężenia	Czas zanikania pozostałości
błękit metylenowy: 16 µg/kg (0 godz.) (<1%)	nie badano

Błękit metylenowy

Gatunek ryby Średnia masa	Stężenie w kąpeli	Czas kąpeli	Temp. kąpeli	pH kąpeli
pstrąg tęczowy (<i>Oncorhynchus Mykiss</i>) 200 g	2 mg/l	3 godz.	11°C	7



Najwyższe stężenia	Czas zanikania pozostałości
błękit metylenowy: 86 µg/kg (0 godz.) (<u>4%</u>) azur B: 43 µg/kg (0 godz.) (<u>2%</u>) azur A: 16 µg/kg (0 godz.) (<u>1%</u>)	błękit metylenowy: <LOQ (0,5 µg/kg) (3 tyg.) azur B: <LOQ (0,5 µg/kg) (3 tyg.) azur A: <LOQ (0,5 µg/kg) (3 tyg.)

Akryflawina

Gatunek ryby Średnia masa	Stężenie w kąpieli	Czas kąpieli	Temp. kąpieli	pH kąpieli
sum kanałowy (<i>Ictalurus punctatus</i>) 620 g	10 mg/l	4 godz.	24 °C	7



Najwyższe stężenia	Czas zanikania pozostałości
akryflawina: 22 µg/kg (12 godz.) (<1%)	akryflawina: <LOD (5 µg/kg) (2 tyg.)
proflawina: 85 µg/kg (12 godz.) (<1%)	proflawina: <LOD (5 µg/kg) (1 tydz.)

- Metabolity zieleni malachitowej i fioletu krystalicznego (barwniki trifenylometanowe), formy leuko, ze względu na długi czas zanikania stanowią pozostałości markerowe w badaniach kontrolnych ryb.
- Czas ekspozycji ma większy wpływ na wchłanianie niż stężenie zieleni malachitowej.
- U karpia wchłanianie zieleni malachitowej jest niższe ale czas zanikania dłuższy niż u pstrąga.
- U ryb kąpanych w roztworze zieleni malachitowej na etapie ikry czy narybku nie stwierdza się pozostałości po czasie gdy ryby osiągną wielkość handlową.
- Wchłanianie i dystrybucja do mięśni ryb błękitu metylenowego (<5%) i akryflawiny (<1%) są niskie porównując do barwników trifenylometanowych.

DYREKTYWA RADY 96/23/WE

z dnia 29 kwietnia 1996 r.

w sprawie środków monitorowania niektórych substancji i ich pozostałości u żywych zwierząt i w produktach pochodzenia zwierzęcego oraz uchylająca dyrektywy 85/358/EWG i 86/469/EWG oraz decyzje 89/187/EWG i 91/664/EWG

GRUPA A – Substancje o działaniu anabolicznym i substancje niedozwolone

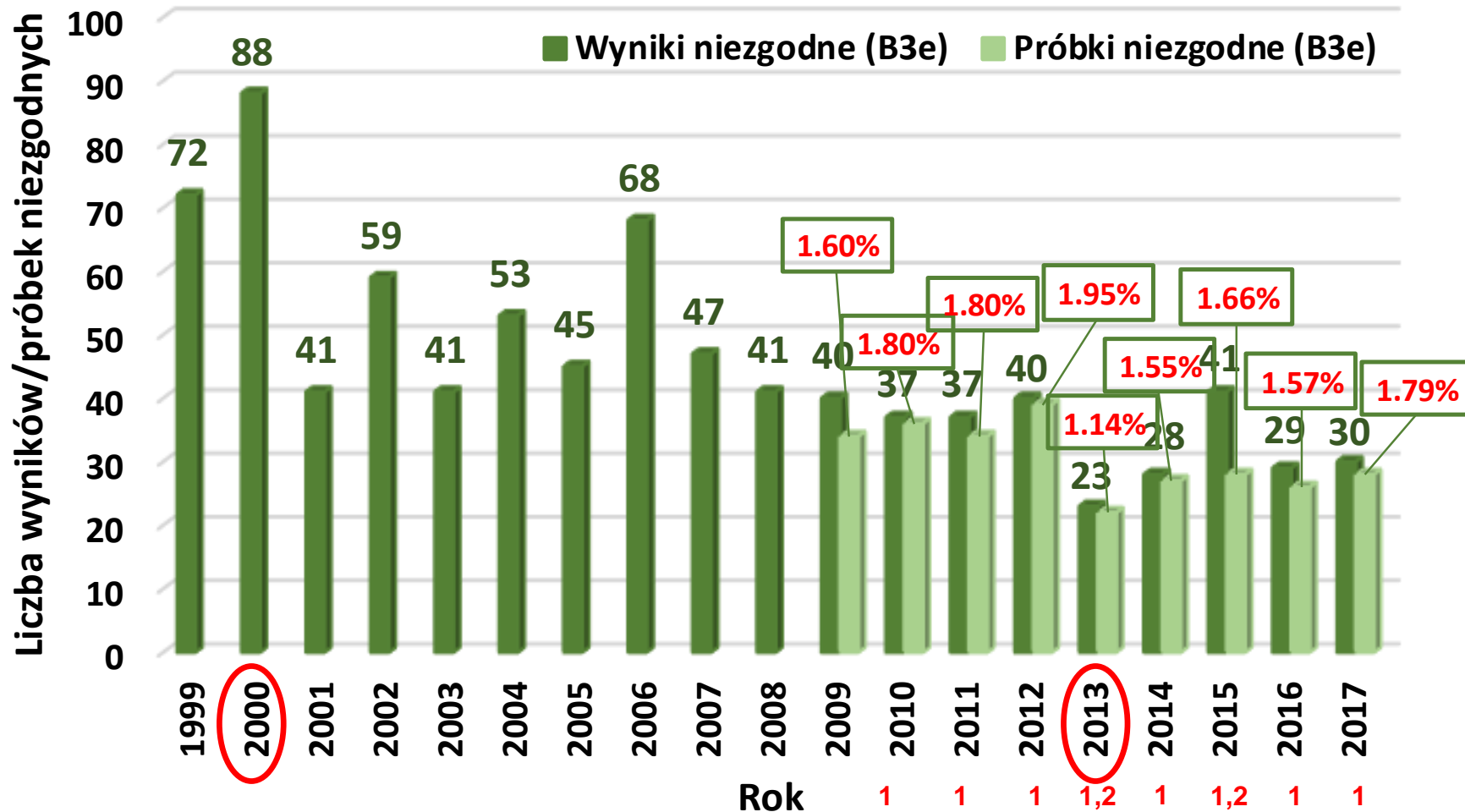
GRUPA B – Leki weterynaryjne i substancje skażające

1. Substancje przeciwbakteryjne, w tym sulfonamidy, chinolony
2. Inne leki weterynaryjne
3. **Substancje skażające środowisko i inne substancje**
 - a. Związki chloroorganiczne, w tym polichlorowane bifenyle (PcBs)
 - b. Związki fosforowoorganiczne
 - c. Pierwiastki chemiczne
 - d. Mikotoksyny
 - e. Barwniki**
 - f. Inne

Wyniki badań kontrolnych pozostałości barwników (grupa B3e) w rybach w UE (1999 - 2017 r.)



1,14% - 1,95%



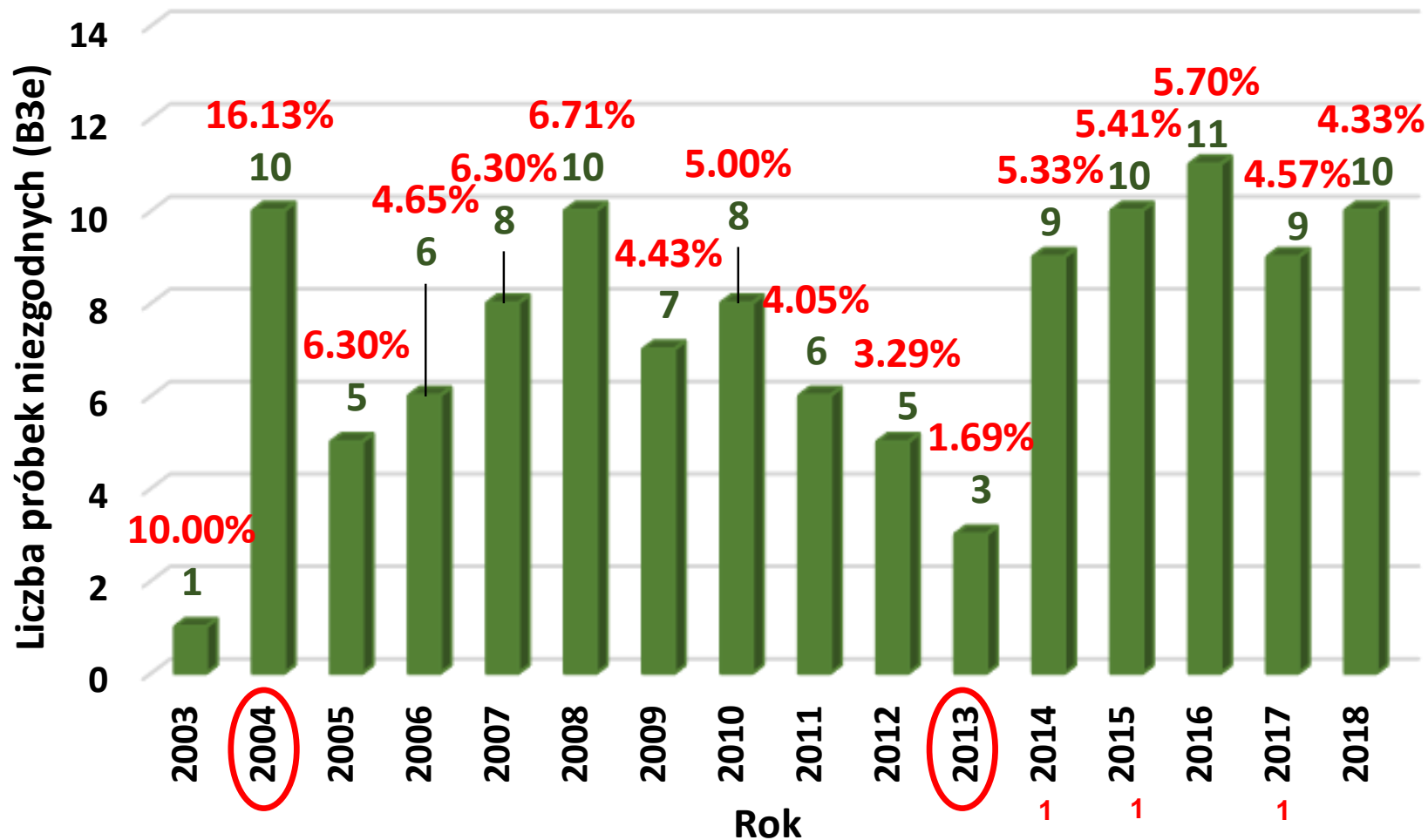
1 oprócz zieleni malachitowej i leukomalachitowej fiolet krystaliczny i leukokrystaliczny
2 dodatkowo zieleń brylantowa

Rok	Poszczególne kraje (liczba wyników niezgodnych)		
2004	Finlandia (12)	Francja (11)	Polska (10)
2005	Niemcy (11)	Czechy (9)	Francja (6)
2006	Austria (16)	Włochy (13)	Francja (10)
2007	Niemcy (12)	Polska (8)	Austria (6)
2008	Niemcy (18)	Polska (10)	Grecja (5)
2009	Niemcy (10)	Grecja (9)	Austria (9)
2010	Niemcy (15)	Polska (8)	Słowacja (4)
2011	Czechy (19)	Polska (6)	Austria (3)
2012	Czechy (15)	Polska/Niemcy (5)	Słowacja/Belgia (3)
2013	Czechy (9)	Polska (3)	Holandia/Słowacja/Niemcy (2)
2014	Polska (9)	Czechy (8)	Bułgaria/Wielka Brytania/Dania (2)
2015	Polska (10)	Niemcy (7)	Słowacja (6)
2016	Polska (11)	Czechy (10)	Niemcy (3)
2017	Czechy (14)	Polska (9)	Cypr/Hiszpania/Słowacja/Holandia (1)

Wyniki badań kontrolnych pozostałości barwników (grupa B3e) w rybach w Polsce (2003 - 2018 r.)



1,69% - 16,13%



¹ oprócz zieleni malachitowej i leukomalachitowej fiolet krystaliczny i leukokrystaliczny

7.4.2017

PL

Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej

L 95/1

I

(Akty ustawodawcze)

ROZPORZĄDZENIA

ROZPORZĄDZENIE PARLAMENTU EUROPEJSKIEGO I RADY (UE) 2017/625

z dnia 15 marca 2017 r.

w sprawie kontroli urzędowych i innych czynności urzędowych przeprowadzanych w celu zapewnienia stosowania prawa żywnościowego i paszowego oraz zasad dotyczących zdrowia i dobrostanu zwierząt, zdrowia roślin i środków ochrony roślin, zmieniające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001, (WE) nr 396/2005, (WE) nr 1069/2009, (WE) nr 1107/2009, (UE) nr 1151/2012, (UE) nr 652/2014, (UE) 2016/429 i (UE) 2016/2031, rozporządzenia Rady (WE) nr 1/2005 i (WE) nr 1099/2009 oraz dyrektywy Rady 98/58/WE, 1999/74/WE, 2007/43/WE, 2008/119/WE i 2008/120/WE, oraz uchylające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 854/2004 i (WE) nr 882/2004, dyrektywy Rady 89/608/EWG, 89/662/EWG, 90/425/EWG, 91/496/EWG, 96/23/WE, 96/93/WE i 97/78/WE oraz decyzję Rady 92/438/EWG (rozporządzenie w sprawie kontroli urzędowych)

- **Wykaz grup substancji objętych badaniami kontrolnymi** pozostałości chemicznych wg załącznika I przewodnika SANTE 2017/11987 do przewodnika Dyrekcji Generalnej ds. Zdrowia i Bezpieczeństwa Żywności (Health and Food Safety Directorate General (DG SANTE))
- **Wartości Minimalnego Wymagania Działania Metody (MMPR) –** *ang. Minimum Method Performance Requirement*) dla określonych substancji farmakologicznie czynnych w określonych matrycach zwierzęcych

Wykaz grup substancji objętych badaniami kontrolnymi pozostałości chemicznych wg załącznika I przewodnika SANTE 2017/11987

Grupa A - Zakazane lub niedozwolone substancje farmakologicznie czynne:

A1a – Stilbeny

A1b – Substancje tyreostatyczne

A1c – Steroidy

A1d – Laktony kwasu rezorcylowego, w tym zeranol

A1e – Beta-agoniści

A2 – Substancje farmakologicznie czynne zawarte w tabeli 2 w załączniku do rozporządzenia nr 37/2010 z grudnia 2009 r.

A3a – Barwniki:

Zieleń malachitowa (+ zieleń leukomalachitowa)

Fiolet krystaliczny (+ fiolet leukokrystaliczny)

Zieleń brylantowa (+ zieleń leukobrylantowa)

A3b – Pestycydy i biocydy

A3c – Substancje przeciwbakteryjne

A3d – Kokcydiostatyki i histomonostatyki

A3e – Hormony białkowe i peptydowe

A3f – Inne niedozwolone substancje farmakologicznie czynne

Grupa B - Dozwolone substancje farmakologicznie czynne



wszystkie wymienione w Tabeli 1 w załączniku do Rozporządzenia Komisji 37/2010 z wyznaczoną wartością **MRL** (*ang. Maximum Residue Limit*) - Maksymalny Limit Pozostałości (MLP)

B1a – Substancje przeciwbakteryjne

B1b – Insektycydy, fungicydy, substancje przeciwrobacze i przeciw pasożytnicze

B1c – Środki uspokajające

B1d – Niesteroidowe leki przeciwzapalne

B1e – Inne substancje farmakologicznie czynne wymienione w Tabeli 1 w załączniku do Rozporządzenia Komisji 37/2010

B2 – Kokcydiostatyki i histomonostatyki

Wartości Minimalnego Wymagania Działania Metody (MMPR) dla barwników wg zaleceń Unijnych Laboratoriów Referencyjnych (EURL)

- **Zieleń malachitowa (+ zieleń leukomalachitowa)**

MMPR = RPA = 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (obecnie 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

RPA (*ang. Reference Point for Action*) - Punkt odniesienia dla działań kontrolnych

- **Fiolet krystaliczny (+ fiolet leukokrystaliczny)**
- **Zieleń brylantowa (+ zieleń leukobrylantowa)**

MMPR = 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (obecnie ALARA)

 **Limit decyzyjny (CCalfa) < 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$**

Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy



Gdynia, 17-18 października 2019 „XLIV Szkolenie - Konferencja Hodowców Ryb Łososiowatych”

Dziękuję za uwagę!



Unia Europejska
Europejski Fundusz
Morski i Rybacki

