

سنجش باقی مانده تتراسایکلین در گوشت مرغ مصرفی در شهر اهواز به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا

احسانی، ا.^۱، فضل آراء، ع.*^۲، مکتبی، س.^۲، نجف‌زاده ورزی، ح.^۳

دریافت: ۱۳۸۹/۶/۲۷ پذیرش: ۱۳۸۹/۹/۲۸

خلاصه:

تتراسایکلین از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی است که از ابتدای دوره پرورش طیور می‌تواند به عنوان داروی پیشگیری یا درمان‌کننده استفاده شود. عدم توجه مرغداران به توصیه‌های دامپزشکی در خصوص رعایت مدت زمان منع کشتار و مصرف طیور سبب افزایش بیش از حد مجاز باقیمانده‌ها در گوشت مصرفی طیور می‌گردد. با توجه به عوارض حاصل از این باقیمانده‌ها نظیر مقاومت دارویی میکروب‌ها و ازدیاد حساسیت در مصرف‌کنندگان و غیره، در مطالعه حاضر، باقی مانده تتراسایکلین در گوشت سینه مرغ گوشتی مصرفی شهر اهواز به روش HPLC بررسی شده است. در طی دو فصل سرد و گرم، ۱۰۰ عدد لاشه مرغ (در هر فصل ۵۰ عدد) از کشتارگاه‌های طیور شهر اهواز تهیه شد. نمونه‌ها از گله‌های مختلف و به صورت تصادفی تهیه شد. سپس لاشه‌ها سریعاً و در کنار یخ (در شرایط سرما) به آزمایشگاه مواد غذایی دانشکده دامپزشکی منتقل و مراحل آماده‌سازی جهت انجام جستجوی باقیمانده تتراسایکلین به روش HPLC صورت گرفت. بدین منظور عضله مرغ چرخ گردید و هموژنیزه شد، سپس مراحل استخراج و مشتق‌سازی تتراسایکلین انجام شد و نمونه‌ها به دستگاه HPLC تزریق شد و غلظت تتراسایکلین در عضلات سینه تعیین گردید. ۶۰ درصد از نمونه‌ها از نظر وجود باقیمانده تتراسایکلین مثبت بودند و میانگین و خطای معیار مقدار تتراسایکلین در عضلات سینه $5/54 \pm 39/18$ میکروگرم در کیلوگرم محاسبه شد و ۱۰ نمونه حاوی باقیمانده داروی تتراسایکلین بیشتر از حد مجاز اتحادیه اروپا (۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم) بودند. مقدار باقیمانده تتراسایکلین در عضلات سینه با حد استاندارد تعیین شده فوق اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) و همچنین بین دو فصل، اختلاف معنی‌داری ملاحظه نشد ($P > 0.05$). به عبارت دیگر مطالعه حاضر نشان می‌دهد که میزان مصرف تتراسایکلین و روند مدیریتی استفاده از این دارو در گله‌های پرورش طیور در فصول سرد و گرم سال از رویه ثابتی برخوردار است و زمان پرهیز دارو قبل از کشتار کنترل نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: باقیمانده بافتی، تتراسایکلین، گوشت مرغ، HPLC

۱. دانش‌آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۲. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

*نویسنده مسؤول: fazlara2000@yahoo.com

بیوتیکی هستند که به طور معمول از ابتدای دوره پرورش طیور به عنوان داروی پیشگیری و یا برای درمان در طول دوره پرورش در صنعت طیور مورد استفاده قرار می‌گیرند (Miranda و همکاران، ۲۰۰۹). از سوی دیگر عدم توجه مرغداران به توصیه‌های دامپزشکی در خصوص رعایت مدت زمان منع کشتار و مصرف طیور پس از آخرین تجویز دارو^۲، از جمله عواملی هستند که سبب افزایش بیش از حد مجاز باقی‌مانده‌ها از جمله باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در گوشت طیور مصرفی می‌گردد. در این میان، تحقیق حاضر، با توجه به عوارض حاصل از این باقی‌مانده‌ها نظیر مقاومت دارویی میکروب‌ها، ازدیاد حساسیت در مصرف‌کنندگان و غیره، شامل بررسی باقی‌مانده تتراسایکلین در گوشت طیور در شهر اهواز، انجام گرفت که نتایج حاصله ضمن روشن نمودن وضعیت موجود می‌تواند برای سازمان دامپزشکی، معاونت غذا و دارو وزارت بهداشت و سایر مراکز نظارتی قابل استفاده باشد.

مواد و روش کار:

۱- تهیه محلول بافر مک ایوان^۳:

جهت استخراج تتراسایکلین از بافت عضله مرغ، محلول بافر مک ایوان استفاده گردید (Miller و همکاران، ۲۰۰۷). برای تهیه این محلول، ۲۸ گرم سولفات دی‌سدیم^۴، ۱۲/۹ گرم اسیدسیتریک^۵، ۳/۷۲ گرم Na_2EDTA با ترازوی دیجیتال توزین و مخلوط شدند. سپس به این مخلوط ۸۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه شد. در مرحله بعد pH این ترکیب با اسید فسفریک 0.1 mol/L به ۴ رسانده شد. در نهایت حجم مخلوط حاضر با آب به یک لیتر رسانیده شد.

تولیدات طیور از منابع مهم تولید پروتئین هستند (Kabir و همکاران، ۲۰۰۴). در این بین گوشت طیور به علت بالا بودن درصد پروتئین نسبت به سایر گوشت‌ها، کم بودن افت پس از کشتار، قابلیت هضم بالا، سرعت رشد طیور و پایین بودن قیمت گوشت مرغ نسبت به سایر گوشت‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از طرفی تولید پروتئین با پرورش طیور ساده-تر، آسان‌تر و امکان‌پذیرتر از پرورش سایر دام‌هاست (قائم مقامی، ۱۳۸۳). تقاضا برای گوشت طیور در سطح جهان در حال افزایش است. براساس گزارش‌های سازمان خوار بار و کشاورزی^۱، سرعت افزایش تولید و مصرف گوشت طیور در جهان در سال‌های ۱۹۹۲-۱۹۹۹، ۵/۴ درصد در هر سال بوده است که در سال‌های ۱۹۹۹-۲۰۱۰ به ۳/۱ درصد در سال رسیده است. همچنین سرانه مصرف گوشت طیور در سال‌های ۱۹۹۸-۲۰۰۰ در سطح جهان، ۱۰/۶ کیلوگرم به ازای هر نفر بوده است که پیش بینی می‌شود در پایان سال ۲۰۱۰ به ۱۳/۰ کیلوگرم برای هر نفر برسد. میزان مصرف گوشت طیور در سال‌های ۱۹۹۸-۲۰۰۰ در ایران ۰/۸ میلیون تن بوده است که تا پایان سال ۲۰۱۰ به ۱/۱ میلیون تن خواهد رسید. همچنین سرعت رشد مصرف گوشت طیور در ایران در طی سال‌های ۱۹۹۲-۱۹۹۹، ۴/۷ درصد در هر سال بوده است که پیش بینی می‌شود در سال‌های ۱۹۹۹-۲۰۱۰ به ۳/۲ درصد برسد. طبق گزارش‌های FAO سرانه مصرف گوشت طیور در سال‌های ۱۹۹۸-۲۰۰۰ در ایران ۱۱/۵ کیلوگرم به ازای هر نفر بوده است که تا پایان سال ۲۰۱۰ به ۱۴/۱ کیلوگرم خواهد رسید (FAO^۱، ۲۰۱۰).

آنتی‌بیوتیک‌ها به طور گسترده برای درمان و همچنین گاهی به عنوان افزایش‌دهنده رشد استفاده می‌شوند (Pellegrini و همکاران، ۲۰۰۴). آنتی‌بیوتیک‌ها بیش از ۶ درصد همه تجویزها در پزشکی و بیش از ۷۰ درصد داروهای مصرف شده در دامپزشکی را تشکیل می‌دهند (Thiele-Bruhn، ۲۰۰۳). در بین داروهای مختلف، آنتی‌بیوتیک‌ها در پرورش طیور به طور وسیعی استفاده می‌شوند (Pellegrini و همکاران، ۲۰۰۴). تتراسایکلین‌ها از خانواده داروهای آنتی-

2- Withdrawal Period
3 - McIavaine Buffer
4- Na₂So₄
5- Citric Acid

1- Food and Agricultural Organization (FAO)

۲- تهیه نمونه‌ها و نمونه‌گیری:

تعداد ۱۰۰ عدد لاشه مرغ در طی دو فصل گرم (فروردین الی شهریور ۱۳۸۸) و سرد (مهر الی اسفند ۱۳۸۸) شش ماهه، (در هر فصل ۵۰ عدد) از کشتارگاه‌های منطقه اهواز تهیه شد. بدین صورت که نمونه‌ها از گله‌های مختلف و به صورت تصادفی تهیه گردید. از هر لاشه طیور مقدار ۱۵۰ - ۲۰۰ گرم از عضله سینه برداشت گردید. هر نمونه را به صورت جداگانه چرخ کرده، توسط دستگاه مخلوط کن کاملاً هموژنیزه و مخلوط می‌شد. سپس عملیات استخراج و مشتق‌سازی از گوشت همگن شده صورت می‌گرفت.

۳- استخراج و مشتق‌سازی:

از هر نمونه گوشت همگن شده، ۱ گرم برداشته و با ۵ میلی-لیتر از محلول بافر مک ایوان مخلوط گردید. محتوی فوق پس از مخلوط کردن، بمدت ۱۰ دقیقه در محیط قرار داده شد. سپس بمدت ۲۰ دقیقه و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه^۱ سانتریفیوژ گشته، فاز آلی (باقیمانده بالایی) در هر لوله آزمایش جدا شده و با عبور از کاغذ صافی به لوله آزمایش جدیدی منتقل می‌شد. لوله‌های آزمایش در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا خشک شوند. سپس در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان تزریق به دستگاه نگهداری می‌شدند (Miller و همکاران، ۲۰۰۷).

۴- کالیبره کردن دستگاه HPLC:

ابتدا رقت‌های مختلفی از ۲ تا ۲۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از استاندارد خالص تتراسایکلین در حلال فاز متحرک تهیه شد (محلول‌های استاندارد). ترکیب فاز متحرک متشکل از ۳۰ درصد آب مقطر دیونیزه و ۷۰ درصد استونیتریل بود. در

مرحله بعد پس از اطمینان از صحت عملکرد دستگاه

HPLC (شیمادزو ۱۰- ژاپن) و استفاده از ستون C₁₈ و آشکارساز UV، کمترین غلظت محلول استاندارد و به میزان ۲۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق شد.

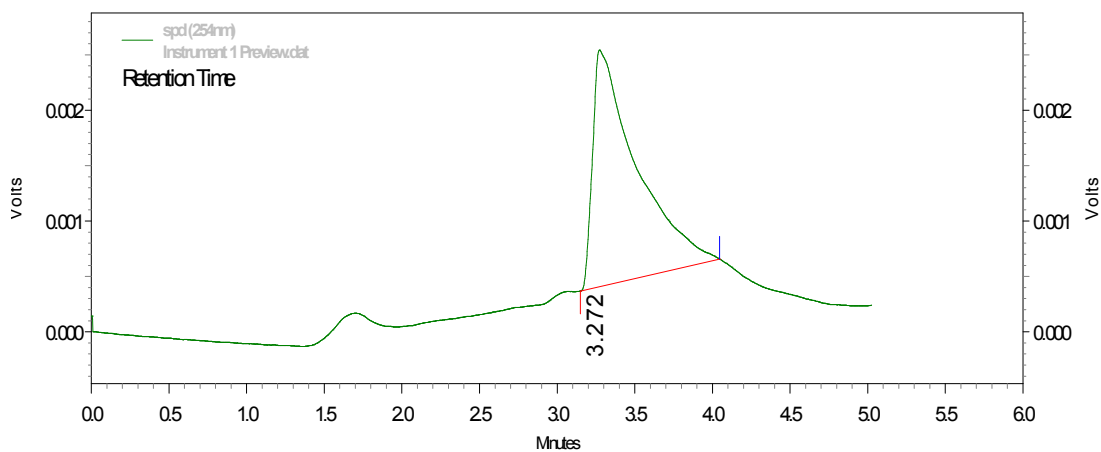
منحنی حاصل از تزریق فوق و زمان ماندگاری نمونه^۲ به وسیله نرم‌افزار تعیین شد (نمودار ۱) و با استفاده از رقت‌های بعدی و نیز با تغییرات سرعت جریان فاز متحرک و دماهای مختلف گرمخانه دستگاه و تکرار سه بار هر رقت در روزهای مختلف، بهترین دما و جریان برای مشاهده پیک‌های محلول‌های استاندارد تعیین شد. بهترین دمای گرم‌خانه، ۳۷ درجه سانتی‌گراد و بهترین جریان فاز متحرک، ۱ میلی‌لیتر در دقیقه تعیین شد. همچنین طول موج مناسب آشکارساز UV^۳ برای تتراسایکلین ۳۵۵ نانومتر تعیین گردید.

۵- تزریق نمونه‌ها به دستگاه HPLC و اندازه-گیری تتراسایکلین:

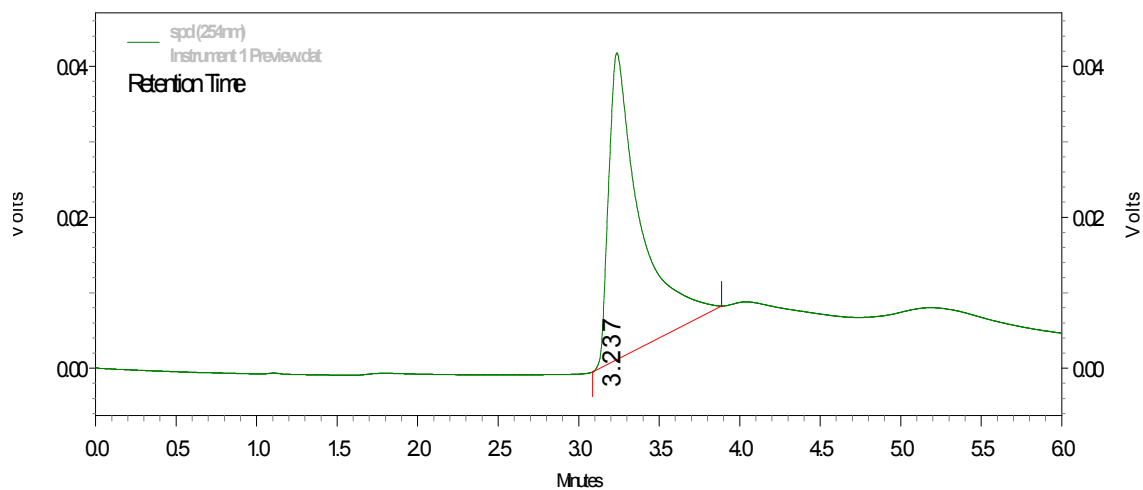
مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر متانول به هر یک از لوله‌های آزمایش مرحله قبلی اضافه و محتوای لوله‌ها به کمک شیکر مخلوط و از میکروفیلتر ۰/۴۵ میکرونی استریل عبور داده شده، به میکروتیوب اپندورف منتقل می‌شدند. به وسیله سرنگ هامیلتون^۴، ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه فیلتر شده به طور جداگانه به دستگاه HPLC تزریق و نتایج به شکل منحنی و نیز مشخص شدن سطح زیر منحنی^۵ به دست می‌آمد (نمودار ۲). مقدار تتراسایکلین موجود در هر نمونه با استفاده از معادله خط حاصل از نمونه‌های استاندارد و بر اساس سطح زیر منحنی، برحسب میکروگرم محاسبه می‌گردید.

2 - Retention Time
3 - UltraViolet
4 - Hamilton
5 - Area Under Curve (AUC)

1 - Round Per Minute (RPM)



نمودار ۱: نمودار HPLC نمونه استاندارد تتراسایکلین با غلظت ۲۰ میکروگرم



نمودار ۲: نمودار HPLC باقیمانده داروی تتراسایکلین در عضله سینه طیور (نمونه شماره ۱۷)

۵- تجزیه تحلیل آماری:

Test و با حد معنی‌داری ۵ درصد مورد تجزیه تحلیل و بررسی آماری قرار گرفتند.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16 و با استفاده از آزمون‌های آماری One Independent Sample T- و Sample T-Test

نتایج:

با تزریق مقادیر مختلفی از تتراسایکلین به دستگاه HPLC، دستگاه کالیبره شد و زمان ماندگاری تتراسایکلین با توجه به شرایط کالیبراسیون دستگاه HPLC حدود ۳ دقیقه تعیین گردید و با تزریق مقادیر مختلف تتراسایکلین خالص (ساخت شرکت سیگمای امریکا) در مرحله بعد، منحنی استاندارد به دست آمد. بر اساس سطح زیر منحنی (AUC) و غلظت تتراسایکلین محلول های استاندارد، نمودار منحنی استاندارد رسم شد و معادله خط تعیین گردید و بر اساس این معادله خط، مقدار تتراسایکلین بر حسب میکروگرم در هر یک از نمونه ها محاسبه شد.

بر اساس منابع، حداکثر میزان باقیمانده مجاز^{۱۱} (MRLs) برای تتراسایکلین در عضله مرغ در اتحادیه اروپا، ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم تعیین شده است (EC Regulation, ۱۹۹۶ و ۱۹۹۹).

در کل تحقیق، از تعداد ۱۰۰ عدد لاشه، ۶۰ لاشه دارای تتراسایکلین و ۴۰ لاشه عاری از تتراسایکلین بودند. از تعداد ۵۰ نمونه فصل گرم، ۲۶ نمونه دارای تتراسایکلین و ۲۴ نمونه فاقد تتراسایکلین بوده و از تعداد ۵۰ نمونه فصل سرد، ۳۴ نمونه حاوی تتراسایکلین و ۱۶ نمونه فاقد تتراسایکلین بودند. از تعداد ۱۰۰ عدد لاشه، ۱۰ لاشه حاوی باقیمانده تتراسایکلین بیشتر از حد مجاز MRL بودند که از این ۱۰ لاشه، ۴ لاشه مربوط به فصل گرم و ۶ لاشه مربوط به فصل سرد بودند.

حداقل میزان داروی تتراسایکلین در میان ۶۰ لاشه که حاوی باقیمانده تتراسایکلین بودند، ۲/۷۴ میکروگرم در کیلوگرم و حداکثر مقدار آن ۱۴۳/۷۶ میکروگرم در کیلوگرم محاسبه گردید. همچنین حداقل میزان باقیمانده داروی تتراسایکلین در ۲۶ نمونه حاوی تتراسایکلین در نمونه های فصل گرم، ۲/۷۴ میکروگرم در کیلوگرم و حداکثر مقدار آن ۱۴۰/۱۷ میکروگرم در کیلوگرم بود. حداقل میزان باقیمانده تتراسایکلین در ۳۴ نمونه حاوی تتراسایکلین در نمونه های فصل سرد نیز ۳/۰۱ و حداکثر میزان آن ۱۴۳/۷۶ میکروگرم در کیلوگرم تعیین گردید (جدول ۱).

بر اساس نتایج، میانگین و خطای معیار مقدار تتراسایکلین در عضلات سینه مورد بررسی، $39/18 \pm 5/54$ میکروگرم در کیلوگرم تعیین گردید و مقدار باقی مانده تتراسایکلین در عضلات سینه با حد استاندارد تعیین شده اختلاف معنی داری داشت ($P < 0/05$) و همچنین بین دو فصل اختلاف معنی داری ملاحظه نشد ($P > 0/05$).

به عبارت دیگر مطالعه حاضر نشان می دهد که میزان مصرف تتراسایکلین و روند مدیریتی استفاده از این دارو در گله های پرورش طیور در فصول سرد و گرم از رویه ثابتی برخوردار است و مدت زمان پرهیز دارو قبل از کشتار به درستی رعایت و کنترل نمی شود.

متوسط میزان دارو (Mean ± SE) خطای معیار ± میانگین	حداکثر دارو $\mu\text{g}/\text{kg}$	حداقل دارو $\mu\text{g}/\text{kg}$	فصل
$36/43 \pm 1/57$	140/17	2/74	نمونه‌های دارای تتراسایکلین در فصل گرم (26 نمونه)
$41/29 \pm 7/34$	143/76	3/01	نمونه‌های دارای تتراسایکلین در فصل سرد (34 نمونه)
$39/18 \pm 5/54$	143/76	2/74	نمونه‌های دارای تتراسایکلین در مجموع فصول سرد و گرم (60 نمونه)
$23/51 \pm 3/83$	143/76	0	کل عضلات مورد آزمایش (100 نمونه)

جدول ۱: میزان حداقل و حداکثر باقیمانده داروی تتراسایکلین در کل نمونه حاوی باقیمانده تتراسایکلین و در نمونه‌های حاوی باقیمانده تتراسایکلین در دو فصل سرد و گرم

در تولید طیور لازم و ضروری هستند و بطور کلی داروها برای پیشگیری و کنترل بیماری‌های عفونی و غیرعفونی و کاهش استرس ناشی از تغییرات محیطی، واکسیناسیون، نوک‌چینی^۲ و دیگر تکنیک‌های مدیریتی استفاده می‌شوند (Bird, ۱۹۹۶).

² - Debeaking

تولیدات طیور از مهمترین منابع پروتئینی هستند. به همین دلیل جوجه‌های گوشتی^۱ برای گوشت و تخمگذارها برای تخم مرغشان پرورش داده می‌شوند. همچنین داروهای دامپزشکی

1- Broiler

تتراسایکلین‌ها، آنتی‌بیوتیک‌هایی هستند که به طور گسترده به عنوان محرک رشد و اهداف درمانی در حیوانات مزرعه‌ای در بسیاری از کشورهای دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kuhne و همکاران، ۲۰۰۰; Mellon و همکاران، ۲۰۰۱). در واقع تتراسایکلین‌ها چندین دهه است که از رده‌های مهم داروهای آنتی‌بیوتیکی برای انسان و حیوان محسوب می‌شوند (Regulation EC، ۱۹۹۶ و ۱۹۹۹) و بیش از ۶۵ درصد آنتی‌بیوتیک‌های مجاز برای درمان در دامپزشکی در اتحادیه اروپا^۱، تتراسایکلین هستند (EMA، ۱۹۹۸).

استفاده گسترده از این داروها می‌تواند باعث مشکلات جدی شود که ناشی از باقیمانده‌های این داروها در شیر، گوشت، تخم مرغ و دیگر تولیدات دامی است. باقیمانده تتراسایکلین‌ها می‌تواند باعث مسمومیت مستقیم و واکنش‌های آلرژیک در افراد حساس شود. همچنین استفاده طولانی مدت از این داروها می‌تواند منجر به مقاومت دارویی در میکروارگانیسم‌ها شود (EC Regulation، ۱۹۹۶ و ۱۹۹۹). احتمال حضور باقیمانده دارویی در مواردی که داروها برای مدت طولانی استفاده می‌شوند یا وقتی که در دوز اضافه‌تر و خارج از توصیه‌ها داده می‌شوند، وجود دارد (Van Dresser و Wilcke، ۱۹۸۹). البته گاهی اوقات داروها به صورت اتفاقی و از راه غذاهایی که آلوده به دارو هستند در اختیار دام یا طیور قرار می‌گیرند (Al-Mazeedi و همکاران، ۲۰۱۰).

تجویز خوراکی و داخل ماهیچه‌ای تتراسایکلین به طیور منتج به باقی ماندن تتراسایکلین در عضلات و ارگان‌های طیور می‌شود. بیشترین غلظت تعیین شده در ۶ ساعت پس از مصرف بوده است. باقیمانده‌ها بتدریج و با افزایش زمان، کاهش می‌یابند و کمترین غلظت^۲ در ۲۴ ساعت پس از مصرف شناسایی شده است. بعد از ۴ روز هیچ باقیمانده‌ای از دارو در ارگان‌ها شناسایی نشده است. نتایج همچنین نشان داده است که باقیمانده‌ها در روش داخل عضلانی، بیشتر از روش تجویز خوراکی است و سریعتر هم ناپدید می‌شوند (EL-Ahwal و همکاران، ۱۹۹۸).

در زمینه بررسی باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در تولیدات دامی و مواد غذایی با منشأ دامی تحقیقات زیادی صورت گرفته است.

در مطالعه‌ای که توسط Al-Ghamdi و همکاران (۲۰۰۰)، در عربستان سعودی انجام شده است، ترکیبات تتراسایکلین باقیمانده در تولیدات طیور شامل تخم‌مرغ، کبد مرغ و لاشه مرغ مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه ۲۳ لاشه از ۳۳ لاشه (۶۹/۶۹ درصد) حاوی باقیمانده تتراسایکلین بودند. همچنین میزان تتراسایکلین در ۱۴/۴ درصد از تخم مرغ‌های خام فراتر از میزان MRLs بود. در مطالعه آنان به عنوان یک کشور در موقعیت جنوب غربی ایران که به لحاظ آب و هوایی با منطقه گرمسیری خوزستان در مطالعه حاضر شباهت دارد، تعداد لاشه‌های دارای باقیمانده تتراسایکلین، با لاشه‌های دارای تتراسایکلین در مطالعه حاضر که ۶۰ درصد بود همخوانی داشته است. این موضوع می‌تواند به دلیل شرایط مشابه آب و هوایی گرمسیری در این منطقه و تأثیر آن بر پرورش طیور، بروز بیماری‌ها و در نتیجه مصرف دارو باشد. (Al Mazeedi و همکاران، ۲۰۱۰)، در کویت نیز باقیمانده‌های تتراسایکلین را در طیور مورد بررسی قرار دادند که ۵ درصد نمونه‌ها دارای مقادیر تتراسایکلین بالاتر از میزان MRLs بودند، حال آن که بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، این میزان ۱۰ درصد بوده است.

در همین رابطه مطالعه‌ای توسط یوسف‌بیگی و همکاران (۱۳۸۴)، در منطقه شمال غربی ایران (ارومیه) بر روی لاشه‌های مرغ تازه کشتار شده، به منظور جستجوی باقیمانده آنتی‌بیوتیک بیش از حد مجاز با استفاده از روش کشت میکروبی، انجام شده است که در مطالعه آنان، از ۱۰۰ لاشه مرغ جمع‌آوری شده به صورت تصادفی از مراکز فروش در روزهای مختلف، ۲۹ درصد حاوی آنتی‌بیوتیک بیش از حد مجاز تشخیص داده شدند. در مطالعه‌ای دیگر Kabir و همکاران (۲۰۰۴)، در نیجریه باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی را بررسی کردند. این محققین بر این باورند که بر اساس نتایج تحقیقات آنان، جوجه‌های گوشتی میزان بیشتری (۳۳/۱ درصد) از باقیمانده‌های داروهای آنتی‌بیوتیکی نسبت به مرغ‌های تخمگذار (۲۳/۶ درصد) و مرغ‌های محلی (۴/۸ درصد) را نشان می‌دهند.

Miranda و همکاران (۲۰۰۹)، در طی پژوهشی در اسپانیا که برای اندازه‌گیری همزمان انواع تتراسایکلین‌ها در عضلات طیور بر روی ۲۴ نمونه از ران مرغ‌های تجاری صورت گرفت،

^۱ - Eu (European Union)

^۲ - Minimum Concentration (MC)

اظهار داشتند که در ۹ نمونه (۳۷/۵ درصد) از ران های مورد بررسی، تتراسایکلین شناسایی شد که در محدوده ۱۹۷/۸ تا ۲۵۶۴/۳ میکروگرم در کیلوگرم و در ۷ نمونه (۲۹/۲ درصد) از آنها، اکسی تتراسایکلین شناسایی شد که در محدوده ۸۳/۰ تا ۲۰۴۹/۳ میکروگرم در کیلوگرم بود و در هیچکدام از نمونه های مورد آزمایش، داکسی سایکلین شناسایی نشد.

در تعدادی از مطالعات نیز میزان باقیمانده داروی تتراسایکلین در ارگان های مختلف طیور مورد بررسی قرار گرفته است (نیازی و زمانی، ۱۳۸۲؛ EL-Ahwal و همکاران، ۱۹۹۸). در این رابطه می توان به تحقیقی که در مصر صورت گرفت، اشاره کرد. در این تحقیق میزان باقیمانده های تتراسایکلین در ارگان های طیور و بافت های آن تعیین گردید. از ۵۰ نمونه که به صورت اتفاقی از فروشگاه های محلی تهیه شدند، فقط ۲ نمونه کبد (۴ درصد) و ۵ نمونه کلیه (۱۰ درصد) حاوی باقیمانده تتراسایکلین بودند و هیچ باقیمانده آنتی بیوتیکی در هیچکدام از نمونه های سینه و ران شناسایی نشد. این محققین معتقدند که برای اطمینان از خروج کامل این آنتی بیوتیک از همه ارگان ها باید ۵ روز قبل از کشتار، ممنوعیت مصرف تتراسایکلین ها رعایت شده باشد (EL-Ahwal و همکاران، ۱۹۹۸). در همین زمینه، مطالعه دیگری بر روی جوجه های گوشتی با استفاده از روش HPLC در بلژیک انجام شده است، در این مطالعه، مقادیر باقیمانده تتراسایکلین ها در جوجه های گوشتی بعد از تجویز خوراکی اندازه گیری شد. همچنین در این مطالعه جوجه های گوشتی بمدت ۵ روز متوالی با تتراسایکلین به مقدار ۴۸۰ نانو گرم در کیلوگرم درمان شدند. ۴ روز پس از قطع دارو میانگین مقادیر باقیمانده تتراسایکلین در عضلات سینه به زیر مقادیر MRL رسید و ۸۶ نانوگرم در گرم تعیین شد (De Ruyck، ۱۹۹۹) که بر این اساس به نظر می رسد اعلام زمان ۵ روزه قطع مصرف تتراسایکلین ها قبل از کشتار توسط El-Ahwal و همکاران (۱۹۹۸)، صحیح باشد.

با توجه به تحقیقات انجام شده و نتایج حاصل از مطالعه حاضر که به منظور بررسی باقیمانده داروی تتراسایکلین در گوشت طیور انجام گرفت، علت وجود باقیمانده داروی تتراسایکلین در عضلات طیور را می توان به دلایل زیر مرتبط دانست:

۱- استفاده از دارو، فراتر از مقدار دوز تجویز شده.
۲- استفاده از دارو، بمدت زمان طولانی.
۳- عدم آموزش مرغداران جهت استفاده صحیح از داروها.
۴- عدم اجرای توصیه زمان قطع دارو قبل از کشتار.
۵- استفاده خودسرانه از دارو در مرغداری ها و بدون نظارت دامپزشک.

۶- عدم نظارت دقیق مسؤولان بهداشتی.
برای پیشگیری از مشکلات و عوارض ناشی از باقیمانده های آنتی بیوتیکی برای مصرف کننده ها، در تعدادی از کشورها مثل اتحادیه اروپا (Bogialli و همکاران، ۲۰۰۶) و آمریکا (FDA، ۱۹۹۸)، MRLs این ترکیبات در تولیدات دام، طیور و آبزیان تعیین شده است. MRLs در واقع، حداکثر غلظت های باقیمانده ها در نتیجه مصرف داروهای دامپزشکی مجاز یا شناخته شده قابل قبول در یک ماده غذایی است (Miranda و همکاران، ۲۰۰۹).

حد ماکزیمم باقیمانده ها (MRLs) برای تتراسایکلین، کلر تتراسایکلین و اکسی تتراسایکلین در تعدادی از بافت ها تعیین شده است که شامل ۰/۳ میلی گرم در کیلوگرم (۳۰۰ میکروگرم در کیلوگرم) در کبد، ۰/۶ میلی گرم در کیلوگرم (۶۰۰ میکروگرم در کیلوگرم) در کلیه، ۰/۲ میلی گرم در کیلوگرم (۲۰۰ میکروگرم در کیلوگرم) در تخم مرغ ها و ۰/۱ میلی گرم در کیلوگرم (۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم) در شیر و بافت های عضلانی می باشد (EC Regulation، ۱۹۹۶ و ۱۹۹۹). با این حال مقادیر MRLs در بسیاری از موارد از کشوری به کشور دیگر متفاوت است. برای تتراسایکلین ها در عضلات طیور در اتحادیه اروپا، ۰/۱ میلی گرم در کیلوگرم (۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم) برای هر تتراسایکلین مجاز است، در حالی که در آمریکا، ۲ میلی گرم در کیلوگرم (۲۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم) از تتراسایکلین ها در عضلات طیور مجاز است. در بیشتر کشورهای در حال توسعه، هیچ مقداری به عنوان MRLs توسط امور بهداشت آنها مشخص نشده است (Miranda و همکاران، ۲۰۰۹).

تعیین مقادیر MRLs ملی برای هر کشوری لازم و ضروری است و متأسفانه در کشور ما هنوز آن را برای داروهای دامپزشکی از جمله آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در طیور مشخص نکرده‌اند. در ایران نیز MRLs تتراسایکلین در مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تعیین نشده است. از آنجایی که باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیک‌ها علاوه بر عوارض ناشی از آنها در مصرف‌کنندگان، در نتایج آزمایش‌های میکروبیولوژی نظیر کشت‌های میکروبی و آنتی‌بیوگرام تأثیر مهمی داشته، باعث نتایج کاذب می‌شوند، لذا در مطالعه حاضر با توجه به دقت بالای تکنیک HPLC، از این تکنیک برای بررسی باقیمانده تتراسایکلین در گوشت طیور به منظور روشن شدن وضعیت موجود استفاده گردید.

فقدان کنترل باقیمانده‌ها در غذاهای با منشأ دامی در کشورهای در حال توسعه و از جمله ایران، یک مشکل جدی است که علاوه بر تهدیدی برای سلامت مصرف‌کنندگان، مانع از صادرات این تولیدات به کشورهایی می‌شود که MRLs در آنها تعیین شده است (Miranda و همکاران، ۲۰۰۹). به همین دلیل ضروری است که ضمن تدوین هر چه سریعتر مقادیر MRLs برای انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در فرآورده‌های دام، طیور و آبزیان، روش‌های سریع و اقتصادی برای جستجوی وجود باقیمانده‌ها در غذاهای با منشأ دامی در دسترس و قابل استفاده باشند تا بدین وسیله نظارت بهتری بر نحوه مصرف داروهای آنتی‌بیوتیکی و باقیمانده‌های ناشی از آنها صورت پذیرد.

قدردانی و تشکر:

مطالعه حاضر با اعتبارات پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفته است که بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.



Measurement of Tetracycline residue in consumed Broiler meats in Ahvaz City by HPLC

Ehsani, A.¹, Fazlara, A.*², Maktabi, S.², Najafzadeh, H.³

Received: 18.09.2010

Accepted: 19.12.2010

Abstract:

Tetracycline as the broad-spectrum antibiotic could be used for prevention or treatment of different diseases in poultry industries since the beginning of the growing period. Lack of attention to veterinarian recommendations regarding of prohibiting antibiotic therapy in the withdrawal period before slaughtering, leads to increase in antibiotic residuals in poultry meat more than the standard limit. This problem could be cause antibiotic-resistance bacteria or hyperesthesia in consumers. In this study, the level of Tetracycline in chicken breast meat in Ahvaz area was measured by HPLC method. One hundred samples of broiler carcasses (50 carcasses in the warm season and 50 carcasses in the cold season) were collected from Ahvaz abattoirs. The samples were selected from different flocks randomly. All samples were placed in bags, on ice, for transportation to the laboratory, and processed within 24h of collection. The pectoral muscle was removed and homogenized. Then tetracycline extraction and purification was carried out and samples were injected to the HPLC apparatus and tetracycline concentration was determined for each sample. This study showed 60% of samples were positive for tetracycline residues and the mean (and standard error) concentration of tetracycline in positive samples was $39.18 \pm 5.54 \mu\text{g}/\text{kg}$. The concentration of tetracycline for 10 samples was significantly higher ($p < 0.05$) than European legal concentration ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$). Also, difference between two seasons was not statistically significant ($p > 0.05$). It was concluded that tetracycline has been used in broiler farms in both warm and cold season based on similar management and the withdrawal period of antibiotic has not been controlled before slaughtering.

Key words: Tissue residues, Tetracycline, Meat of Poultry, HPLC

1. Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

3. Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

*Corresponding author: fazlara2000@yahoo.com

- قائم مقامی، س. ۱۳۸۳. بهداشت و بازرسی کشتارگاهی گوشت (دام و طیور)، چاپ اول، انتشارات مؤسسه آموزش عالی علمی-کاربردی جهاد کشاورزی، تهران، ۲-۴ و ۱۴۳-۱۴۵.
- نیازی، س.؛ زمانی، ع. ۱۳۸۲. بررسی تجربی باقیمانده دارویی اکسی تتراسایکلین در گوشت کبد و کلیه جوجه‌های گوشتی، مجموعه خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره دامپزشکی ایران، صفحه ۱۹۶.
- یوسف بیگی، ق.؛ اردلانی، خ.؛ اهری، ح. ۱۳۸۴. جستجوی بازمانده آنتی‌بیوتیک بیش از حد مجاز از لاشه‌های مرغ تازه کشتار شده. مجموعه خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره دامپزشکی ایران، صفحه ۱۳۹.

Al-Ghamdi, M.S., Al-Mustafa, An., EL-Morsy, F., Al-Faky, A., Haider, I., Essa, H. 2000. Residues of tetracycline compounds in poultry products in the eastern province of Saudi Arabia. *Public Health*, **114 (4)**, 300-304.

Al-Mazeedi, H.M., Abbas, A.B.O., Alomirah, H.F., Al-Jouhar, W.Y., Al-Mufty, S.A., Ezzelregal, M.M., Al-Owaish, R.A. 2010. Screening for tetracycline residues in food products of animal origin in the state of Kuwait using charm II radio immunoassay and LC/MS/MS methods. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control. Exposure and Risk Assessment*, **27 (3)**, 291-301.

Bird, H.R. 1996. Biological basis for the use of antibiotics in poultry feeds. In: *The Use of Drugs in Animal Feeds*. Publication No.1679, National Academy of Sciences, Washington DC., USA.

Bogialli, S., Curini, R., Corcia, A.D., Lagana, A., Rizzuti, G. 2006. A rapid confirmatory method for analyzing tetracycline antibiotics in bovine, swine, and poultry muscle tissues: Matrix solid-phase dispersion with heated water as extractant followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 1564-1570.

De Ruyck, H., De Ridder, H., Van Renterghem, R., Van Wambeke, F. 1999. Validation of HPLC method of analysis of tetracycline residues in eggs and broiler meat and its application to a feeding trial. *Food Additive*, **16(2)**, 47-56.

EL-Ahwal, A.M., El-Tawila, M.M., Elhay, A.A. 1998. Studies on the detection of tetracycline residues in poultry organs and tissues. *Journal of Egypt Public Health Association*, **73(1-2)**, 71-86.

European Communities Commission Regulation No.281/96. 1996. Amending annexes I and III to council regulation No 2377/90 laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limit of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities*, **L37**, 9-11.

European Communities Commission Regulation No.508/99. 1999. Amending annexes I to IV to council regulation No 2377/90 laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limit of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities*, **L60**, 16-52.

European Medicines Agency (EMA) 1998. Committee for veterinary medicinal products . Note for guidance environmental risk assessment for veterinary medicinal products other than GMO – containing and immunological products. London, UK. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Rapport nr. EMA/CVMP/055/96-FINAL.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2010. Corporate Document Repository 2010. Medium-term prospect for agricultural commodities, Poultry Meat Projection 2010, Table 2.21.

FDA (United State Food and Drug Administration). 1998. Rules and regulations, tolerances for residues of new animal drugs in food. Federal Register, **63(207)**, 57245-57248.

Kabir, J., Umoh, V.J., Audu – Okoh, E., Umoh, J.U., Kwaga, J.K.P. 2004. Veterinary drug use in poultry farms and determination of antimicrobial drugs residues in commercial eggs and slaughtered chicken in Kaduna state, Nigeria. Food Control, **15**, 99-105.

Kuhne, M., Wegmann, S., Kobe, A., Fries, R. 2000. Tetracycline residues in bones of slaughtered animals. Food Control, **11**, 175-180.

Mellon, M., Benbroock , C., Benbroock , K.L. 2001. Hogging It: Estimations of Antibiotic Abuse in Livestock. Union of Concerned Scientists, MA USA, p:109.

Miller, R.A., Reimschuessel, R., Carson, M.C. 2007. Determination of oxytetracycline levels in rainbow trout serum on a biphenyl column using high- performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B. **852**, 655-658.

Miranda, J.M., Rodriguez, J. M., Galan – Vidal, C.A. 2009. Simultaneous determination of tetracycline in poultry muscle by capillary zone electrophoresis. Journal of Chromatography A, **1216**, 3366-3371.

Pellegrini, G.E., Carpico, G., Coni, E. 2004. Electrochemical sensor for the detection and presumptive identification of quinolone and tetracycline residues in milk. Analytica Chimica Acta, **520**, 13-18.

Thiele – Bruhn, S. 2003. Pharmaceutical antibiotics compounds in soils – a review. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, **166 (2)**, 145-167.

Van Dresser, W.R., Wilcke, J.R. 1989. Drug residues in food animals. Journal of the American Veterinary Medical Association, **194**, 1701-1717.