

تعیین مدت ماندگاری اکسی تتراسیکلین در عضله و کبد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به

روش HPLC

طاهره ناجی*^۱، همایون حسین زاده^۲، مهناز قمی^۳ و بهاره بهرامی^۴
 ۱،۳،۴ - گروه علوم پایه، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران
 ۲- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران.

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۷

تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۸

چکیده

آنتی بیوتیک اکسی تتراسیکلین (OTC) تنها دارو از خانواده تتراسیکلین هاست که از تاییدیه FDA (وزارت غذا و بهداشت) جهت جلوگیری و درمان بیماری‌ها در آبزیان برخوردار است. هدف از این مطالعه تعیین میزان ماندگاری اکسی تتراسیکلین در عضله و کبد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از طریق کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به روش تک دوز بود.

بر اساس فارماکوپه آبزیان دز ۲۵-۵۰ میلی گرم به هر کیلو گرم وزن زنده ماهی، مقدار ۰/۰۴ میلی لیتر از محلول قابل تزریق اکسی تتراسیکلین ۱۰ درصد به صورت عضلانی، به تعداد ۱۲ عدد در چهار گروه هر گروه ۳ عدد کپور پرورشی با محدوده وزنی ۸۰-۴۰ گرم تزریق گردید و مقدار باقیماندگی آن در عضله و کبد پس از ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، با تغلیظ توسط فاز جامد (SPE)، به روش HPLC مورد سنجش قرار گرفت.

بیشترین غلظت OTC در بافت عضله، ۶ ساعت و در کبد ۲۴ ساعت پس از تزریق به ترتیب ۱۷/۳۷ و ۳/۷۳ میکرو گرم در گرم و کمترین غلظت در عضله و کبد، ۷۲ ساعت پس از تزریق به ترتیب ۹/۵۲ و ۰/۲۹ میکرو گرم در گرم بدست آمد که این غلظتها نشان دهنده سیر نزولی غلظت OTC در عضله در حد فاصل ۶ تا ۷۲ ساعت می ماند. ولی به دلیل توزیع مجدد دارو در بافت کبد، ۲۴ ساعت پس از تزریق، غلظت دارو به طور چشمگیری ($P < 0/05$) افزایش یافته و سپس تا ۷۲ ساعت به تدریج کاهش یافت.

واژگان کلیدی

اکسی تتراسیکلین، مدت ماندگاری، عضله، کبد، کپور معمولی، کروماتوگرافی مایع

*نگارنده پاسخگو: naji_t@iaups.ac.ir

مقدمه

رشد جمعیت جهان و افزایش میزان نیاز به پروتئین باعث شد، بشر به مصرف بیشتر انواع آبزیان از جمله ماهی‌ها، سخت پوستان، نرم تنان و سایر آبزیان روی آورد. ماهی کپور معمولی بعنوان یکی از اصلی‌ترین ماهیان پرورشی دنیا شناخته شده است. این گونه بطور گسترده‌ای در اروپا، آسیا و خاور دور پرورش داده می‌شود. با توجه به رشد جمعیت، ضروری است که آبزیان پرورشی در شرایط کنترل شده تولید گردد تا مصرف کنندگان از سلامت آبزیان مطمئن باشد و بدون هیچ گونه نگرانی آن را مصرف نماید (کیوان و همکاران، ۱۳۸۷).

یکی از هدف‌های آبرزی پروری افزایش نرخ بازده تولید برای به حداکثر رساندن سود دهی می باشد. افزایش تراکم یکی از روش‌های افزایش بازده تولید است اما این امر ممکن است میزان ابتلا به بیماری را در ماهیان پرورشی افزایش دهد. این امر به سبب کاهش کیفیت آب و به وجود آمدن شرایط استرس زا ایجاد می گردد. ماهیان پرورشی اغلب تحت تأثیر عفونت‌های باکتریایی قرار دارند. یکی از معمول‌ترین روش‌های درمان، استفاده از انواع آنتی بیوتیک‌ها می باشد. اما بکارگیری آنتی بیوتیک‌ها جهت درمان بیماری‌های ماهیان پرورشی به طور گسترده مورد انتقاد قرار گرفته است، که از دلایل آن افزایش توانایی مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌ها، از بین بردن فلور میکروبی محیط زیست، هزینه بالای این داروها و عوارض جانبی این داروها بر ماهی و میگو می باشد. ثابت گردیده است که برخی از آنتی بیوتیک‌ها سیستم ایمنی را سرکوب می کنند و موجودات آبرزی را بیشتر مستعد پذیرش بیماری‌های باکتریایی، ویروسی و انگلی می نمایند (Hassan, 2007).

کنترل محصولات حیوانی خوراکی به منظور تعیین مقدار تتراسیکلین یکی از اساسی‌ترین فعالیت‌ها در برنامه کنترل باقی مانده‌های دارویی است. دلیل این امر، استفاده وسیع از این دسته از آنتی بیوتیک‌هاست. معمولاً آزمایشات میکروبیولوژیک برای تعیین مقدار تتراسیکلین در غذا استفاده می شود، اما این آزمایش‌ها دقیق نیستند زیرا نمی توان مقدار واقعی تتراسیکلین را تعیین کرد، به همین دلیل از روش‌های آنالیز و کروماتوگرافی که دقیق و با حداقل خطا هستند استفاده می شود (Gajda & Posyniak, 2007).

اکسی تتراسیکلین (OTC) یکی از آنتی بیوتیک‌های وسیع‌الطیف در درمان عفونت‌های باکتریایی است که برای کنترل امراض در مزارع پرورش ماهی به طور بی رویه مورد استفاده قرار می گیرد. با توجه به اینکه پس از استفاده از داروهای مختلف به خصوص آنتی بیوتیک‌ها میزانی از آنها در بافت‌های ماهی باقی می ماند، کیفیت ماهی کاهش یافته و آن را به عنوان یک منبع غذایی سالم و ایمن به خطر می اندازد، بنابراین باقی مانده‌های داروها و یا آنتی بیوتیک‌ها برای مصرف کننده نهایی که انسان می باشد نیز خطرناک بوده و مشکلات عدیده‌ای را به وجود می آورد (Xu & Rogers, 1995, Zhang & Li, 2007). تتراسیکلین‌ها با اتصال به کلسیم و دیگر کاتیون‌های دو ظرفیتی می تواند در روده عفونت پیشرونده و یا در بعضی افراد منجر به ایجاد حساسیت شود به خصوص وقتی که بیش از حد مجاز به مصرف برسد (Arias, 2005) هم چنین مصرف انواع تتراسیکلین و اکسی تتراسیکلین تاریخ گذشته می تواند به سلول‌های پروگزیمال کلیه آسیب رسانده و منجر به سندرم فانکونی شوند (Black, 1984).

اکسی تتراسیکلین در ماهی کپور معمولی نیز باعث تضعیف ایمنی سلولی (با مهار پاسخ anti-SRBC) و ایمنی همورال (تاخیر در پاسخ آنتی بادی) می شود (Salehzadeh, 2006).

مطالعات نشان داده است که اکسی تتراسیکلین حتی با دوزهای پنج برابر حد طبیعی برای قزل آلابی دریاچه‌ای سمی نمی باشد ولی باعث تضعیف بسیاری از فعالیت‌های سیستم ایمنی می شود (عبدی، ۱۳۸۵) با توجه به اینکه اطلاعاتی از مدت بازماندگی اکسی تتراسیکلین در ماهی کپور در دست نمی باشد، لذا هدف از انجام این تحقیق، تعیین میزان بازماندگی اکسی تتراسیکلین در عضله و کبد ماهی کپور معمولی در دوره‌های زمانی مختلف بود.

مواد و روش‌ها

۱۵ قطعه بچه ماهی کپور معمولی در محدوده وزن ۸۰-۴۰ گرم، از مزرعه پرورش ماهیان گرم آبی در استان گیلان خریداری و به آزمایشگاه آبرزیان واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی منتقل گردید. آن‌ها به مدت یک هفته در چهار آکواریوم که در هر یک سه عدد ماهی بود در شرایط آزمایشگاهی (دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد، غلظت اکسیژن محلول ۶-۷ میلی گرم در لیتر) نگهداری شدند تا با محیط سازگار شوند. پس از پایان این دوره، تعداد ۱۲ عدد از نمونه‌ها به عنوان گروه تک دوز انتخاب گردید. ماهی‌ها در ۴ تیمار و ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. میزان اکسی تتراسیکلین به نسبت ۵۰-۲۵ میلی گرم در کیلو گرم (عبدی، ۱۳۸۵) 0.4 میلی لیتر از محلول قابل

تزریق اکسی تتراسیکلین ۱۰ درصد (۱۰۰ میلی گرم OTC در هر میلی لیتر) به عضله ماهیان تزریق شد و پس از ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نمونه گیری از بافت عضله و کبد آنها بعمل آمد. عدد از ماهی ها نیز به عنوان گروه شاهد تحت تزریق عضلانی با نرمال سالیین قرار گرفتند. سپس نمونه ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

برای تعیین میزان بازماندگی اکسی تتراسیکلین در بافت عضله و کبد ، پس از خارج کردن نمونه ها از فریزر توزین و سپس با اسکالپل خرد شدند. جهت هموژن کردن نمونه ها آنها را در شیکر قرار داده و به ازاء هر گرم بافت، ۴ میلی لیتر بافر Na_2EDTA ۰/۱ مولار با $\text{pH}=4$ به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد. پس از سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه ، محلول رویی جدا شده و رسوب ته لوله بار دیگر با همان مقدار بافر Na_2EDTA مخلوط و (با دور ۸۰۰۰ ، ۳۰ دقیقه) سانتریفیوژ گردید. محلول رویی جدا شده به محلول قبلی افزوده شد و این عمل بار دیگر با نصف مقدار بافر Na_2EDTA تکرار شده و محلول رویی را با محلول های مراحل قبل مخلوط کرده و با فیلتر ۰/۲ میکرون (فیلتر سر سرنگی سلولز استات، استریل، مقاوم به THF) فیلتر گردید . (Malvisi, 1996; Xu, 1995)

انجام عمل تغلیظ با استفاده از فاز جامد صورت گرفت. ابتدا کارتریج SPE (C18) به پمپ خلاء وصل شده و با ۲ میلی لیتر متانول (HPLC grade) و ۲ میلی لیتر محلول ۱ درصد متانول در آب شستشو داده شد. نمونه فیلتر شده به کارتریج اضافه شد و پس از عبور بافر از کارتریج و خروج آن ، ۰/۲ میلی لیتر متانول مجدداً به کارتریج اضافه گردید تا باقی مانده بافر نیز خارج شود. سپس مجدداً ۱ میلی لیتر متانول روی کارتریج ریخته شد تا متانول و اکسی تتراسیکلین با هم از کارتریج خارج شوند . پس از تبخیر متانول ، ۰/۲ میلی لیتر از فاز مایع مورد استفاده در دستگاه HPLC را که شامل بافر فسفات ($\text{pH}=2$) : استونیتریل : تتراهیدروفوران (۹:۴:۸۷ v/v) بود به اکسی تتراسیکلین اضافه شد تا دارو در آن حل شود . آنگاه ۵۰ میکرولیتر از آن را به دستگاه HPLC (مدل shimadzu ، ستون C 18 ، به طول ۱۵ سانتی متر و قطر ۴/۶ میلی متر ، دکتور UV ، طول موج ۳۵۵ نانومتر) تزریق گردید و پیک دارو مشاهده و ثبت گردید (Malvisi, 1996).

جهت بررسی توزیع نرمال داده ها از آزمون Shapiro-Wilk و برای بررسی آماری داده ها از آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و جهت مقایسه میانگین ها از آزمون Tukey استفاده شد.

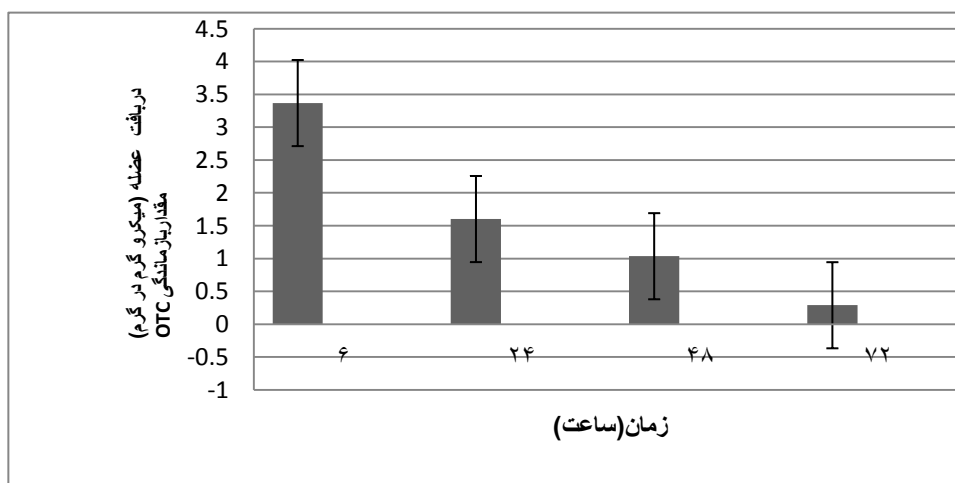
نتایج

نتایج حاصل از تزریق عضلانی به مقدار ۵۰ میلی گرم اکسی تتراسیکلین در هر کیلوگرم وزن تر ماهی و میانگین مقدار بازماندگی برحسب میکروگرم در گرم در بافت عضله و کبد در ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در جدول (۱) ارائه گردیده است . در ماهی های گروه کنترل بازماندگی از دارو مشاهده نشد .

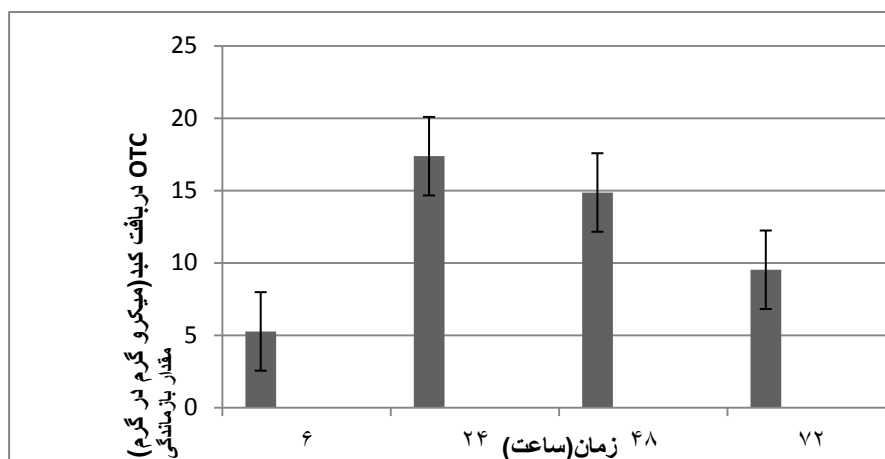
جدول ۱- میانگین مقدار بازماندگی اکسی تتراسیکلین در دوره های زمانی مختلف بر حسب میکروگرم در گرم پس از تزریق عضلانی دریافت عضله و کبد بچه ماهی کپور معمولی

مقدار درصد بازماندگی (میکروگرم در گرم)				نوع بافت
۷۲ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	۶ ساعت	
۰/۲۹±۰/۰۲	۱/۰۳۷±۰/۰۲	۱۱/۳۰۶±۰/۰۱	۳/۳۷±۰/۰۱	عضله
۹/۵۲±۰/۰۲	۱۴/۸۶±۰/۰۱	۱۷/۳۷±۰/۰۱	۵/۲۶±۰/۰۲	کبد

نتایج آنالیز آماری نشان دهنده کاهش غلظت اکسی تتراسیکلین در بافت عضله ماهی کپور معمولی طی دوره زمانی ۶ تا ۷۲ ساعت پس از تزریق می باشد (شکل ۱).



شکل ۱- نمودار تغییرات مقدار غلظت OTC (میکروگرم در گرم) در عضله بچه ماهی کپور معمولی در دوره های زمانی مختلف



شکل ۲- نمودار تغییرات مقدار غلظت OTC (میکروگرم در گرم) در بافت کبد بچه ماهی کپور معمولی در دوره های زمانی مختلف

شکل (۲) نمودار تغییرات مقدار غلظت اکسی تتراسیکلین را در بافت کبد پس از تزریق عضلانی در دوره های زمانی مختلف نشان می دهد. نتایج نشان داد که ۶ ساعت پس از تزریق، غلظت OTC به کمترین مقدار خود می رسد (۵/۳۶ میکرو گرم در گرم) و پس از ۲۴ ساعت به طور معنی داری ($P < 0/05$) افزایش یافته و به بیشترین مقدار خود رسید (۱۷/۳۷ میکرو گرم در گرم). پس از آن، در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق، غلظت OTC در کبد کاهش یافت (به ترتیب ۹/۵۲ و ۱۴/۸۶ میکرو گرم در گرم) که این کاهش معنی دار نمی باشد ($P > 0/05$).

بحث و نتیجه گیری

مقایسه نتایج مربوط به مقدار باز ماندگی آنتی بیوتیک ها در ماهیان مختلف کاری دشوار است زیرا اینگونه نتایج متاثر از روش های آزمایش، گونه ماهی و شرایط درمانی است (میرزرگر و همکاران، ۱۳۷۹). بررسی های انجام شده در پژوهش اخیر نیز (شکل ۱) حاکی از تغییرات غلظت بافتی اکسی تتراسیکلین در عضله در طی زمان پس از تزریق عضلانی می باشد. با توجه به نتایج این مطالعه، بیشترین غلظت OTC در عضله، ۶ ساعت پس از تزریق و به میزان ۳/۳۷ میکرو گرم در گرم در ازای تزریق ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم دارو بود. در این تحقیق میانگین غلظت اکسی تتراسیکلین عضله، ۲۴ ساعت پس از تزریق عضلانی به ۱/۶۰۳ میکرو گرم در گرم رسیده بود. در حالی که میانگین غلظت OTC عضله، ۲۴ ساعت پس از تجویز خوراکی دارو در میگوی ببری سیاه (مونودون) به میزان ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم، ۳/۱ میکرو گرم در گرم (Uno, 2005) و پس از تجویز خوراکی به میزان ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در کپور علفخوار، ۵/۵۰ میکرو گرم در گرم (Zhang & Li, 2007) بود.

غلظت OTC در بافت عضله، ۴۸ ساعت پس از تزریق، کاهش یافته و به طور میانگین به ۱/۰۳۷ میکرو گرم در گرم می رسد که طبق بررسی های آماری این کاهش غلظت در مقایسه با میزان ساعت ۲۴، معنی دار نمی باشد ($P > 0/05$). این در حالی است که غلظت OTC در بافت عضله، ۴۸ ساعت پس از تجویز خوراکی دارو به میزان ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم در میگوی ببری سیاه، ۲/۴ میکرو گرم در گرم (Uno, 2006) و پس از تجویز خوراکی به میزان ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در کپور علفخوار، ۴/۵ میکرو گرم بر گرم بدست آمده بود (Zhang & Li, 2007; Nordlander, 1987).

در این پژوهش کمترین میزان غلظت OTC در بافت عضله در ۷۲ ساعت پس از تزریق عضلانی دارو و به طور میانگین، ۰/۲۹ میکرو گرم بر گرم مشاهده گردید. بررسی آماری نشان دهنده کاهش معنی دار سطح OTC در فاصله زمانی ۲۴ تا ۷۲ است ($P < ۰/۰۵$). غلظت OTC در عضله در زمان ذکر شده، در تجویز خوراکی دارو به میزان ۵۰ در میگوی ببری سیاه، ۰/۵ میکرو گرم در گرم (Uno, 2005) و در تجویز خوراکی دارو به میزان ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در کپور علفخوار، ۴ میکرو گرم در گرم گزارش شد (Zhang & Li, 2007). نتایج تحقیق حاضر، بیانگر روند رو به کاهش غلظت OTC در بافت عضله با گذشت زمان می باشد. نمودار تغییرات غلظت بافتی OTC در کبد در برابر زمان پس از تزریق عضلانی ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم دارو (شکل ۲) نشان می دهد که کمترین غلظت OTC در کبد، ۶ ساعت پس از تزریق و به میزان ۵/۲۶ میکرو گرم بر گرم می باشد.

۲۴ ساعت پس از تزریق عضلانی OTC، غلظت دارو در کبد به میزان قابل توجهی افزایش داشت و به ۱۷/۳۷ میکرو گرم بر گرم رسید این امر می تواند ناشی از توزیع مجدد دارو یا تجمع دارو در کبد باشد ($P < ۰/۰۵$). در پژوهش Zhang & Li (2007) در تجویز خوراکی OTC به میزان ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم در کپور علفخوار، توزیع مجدد دارو در کبد از روز ششم (۹/۸۸ میکرو گرم در گرم) تا روز هشتم (۱۰/۸۹ میکرو گرم در گرم) بود و ۲۴ ساعت پس از تجویز دارو، غلظت OTC در کبد کپور علفخوار، ۱۷/۷ میکرو گرم در گرم رسید. با توجه به شکل (۲)، ۴۸ ساعت پس از تزریق عضلانی OTC، غلظت دارو در کبد کاهش یافته و به ۸۶/۱۴ میکرو گرم در گرم رسید. در حالیکه پس از ۴۸ ساعت در تجویز خوراکی دارو به میزان ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم، غلظت OTC در کبد کپور علفخوار، ۱۶ میکرو گرم در گرم گزارش شد (Zhang & Li, 2007). پس از ۷۲ ساعت از تزریق، غلظت OTC در کبد روند کاهشی داشته و به ۹/۵۲ میکرو گرم در گرم رسید. غلظت OTC در کبد ۷۲ ساعت پس از تجویز خوراکی به مقدار ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم در کپور علفخوار، ۱۳/۵ میکرو گرم در گرم گزارش شد (Zhang & Li, 2007). نتایج حاصل از این تحقیق و نیز تحقیقات Zhang & Li (2007) بیانگر این مساله است که در تزریق عضلانی و نیز تجویز خوراکی OTC، پس از مدتی، غلظت دارو در کبد افزایش یافته و سپس مجددا کاهش می یابد که این امر می تواند ناشی از توزیع مجدد یا تجمع دارو در کبد باشد.

فهرست منابع

- کیوان، ا. ناجی، ط. و عاطف یکتا، ع. ۱۳۸۷. بررسی اثرات سمی Fe^{2+} بر بافت آبشش، کبد، کلیه و عضله ماهی کپور معمولی
- (*Cyprinus carpio L.*). پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، ایران.
- عبدی، ک. ۱۳۸۵. اطلاعات و کاربرد داروهای آبزیان. پرتو واقعه با همکاری انتشارات دانش نگار. تهران، ایران.
- میرزرگر، س. سلطانی، م. و رستمی، م. ۱۳۷۹. ارزیابی باقی مانده آنتی بیوتیک ها در درمان تجربی ماهیان کپور معمولی و قزل
- آلای رنگین کمان به روش میکروبیولوژیک و کروماتوگرافی توأم با بیواتوگرافی. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۲۱-۲۷: (۱)۵۵.

Arias, M., Garcia-Falcon, M.S., Garcia-Rio, L., Mejuto, J.C., Rial-Otero, R. & Simal-Gandara, J. 2005. Binding constants of oxytetracycline to animal feed divalent cations. *Journal of Food Engineering*, 78:69-73.

Black, W. & Gentry, R. 1984. The distribution of oxytetracycline in the tissues of swine following a single oral dose. *Can. Vet. J.*, 25:158-161.

Gajda, A. & Posyniak, A. 2009. Tetracyclines and their epimers in animal tissues by High-Performance Liquid Chromatography. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.*, 53:263-267.

Hassan, S., Shaddad, A., Eltayeb, I., Omar, M., & Homeida, A. 2007. Detection of long-acting oxytetracycline residue levels in tissue of desert sheep following intramuscular injection. *Int. J. Pharmacol.*, 3: 299-301.

Malvisi, J., Rocca, G., Anfossi, P. & Giorgetti, G. 1996. Tissue distribution and residue depletion of oxytetracycline in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after oral administration. *Aquaculture*, 147:159-168.

Nordlander, I., Johnsson, H. & Osterdahl, B. 1987. Oxytetracycline residue in Rainbow trout analyzed by a rapid HPLC method. *Food Additives & Contaminants*, 4(3): 291-296.

Salehzadeh, F., Madani, R., Salehzadeh, A., Rokni, N. & Golchinfar, F. 2006. Oxytetracycline residue in chicken tissues from Tehran slaughterhouses in Iran. *Pakistan Journal of Nutrition*, 5:377-381.

Uno, K., Aoki, T., Kleechaya, W., Tanasomwang, V. & Ruangpan, L. 2006. Pharmacokinetics of oxytetracycline in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the effect of cooking on the residues. *Aquaculture*, 254:24-31.

Xu, D., & Rogers, W. 1995. Oxytetracycline residue in the muscle of *Nile Tilapia*. *Asian Fisheries Science*, 8:113-120.

Zhang, Q. & Li, X. 2007. Pharmacokinetics and residue elimination of oxytetracycline in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture*, 272:140-145.