

«مقاله کوتاه»

میزان باقیمانده انروفلوکساسین در گوشت مرغ و بوقلمون، به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در استان اصفهان

سهیل تیموری^۱، مجید غلامی آهنگران^{۲*}، امیر شاکریان^۳

۱. دانشآموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. دانشیار بخش بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۳. استاد بخش بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

*نوسنده مسئول مکاتبات: mgolamia1388@yahoo.com

(دریافت: ۹۶/۹/۵ پذیرش نهایی: ۹۶/۲/۱۲)

چکیده

این مطالعه با هدف مقایسه باقیمانده آنتیبیوتیک انروفلوکساسین در گوشت مرغ و بوقلمون در استان اصفهان با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام گرفت. به این منظور ۶۰ نمونه گوشت مرغ و بوقلمون در تابستان و پاییز ۱۳۹۵ جمع‌آوری و مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۴۸ نمونه از ۶۰ نمونه گوشت مرغ و بوقلمون (۸۰٪) واجد بقایای انروفلوکساسین بودند که حداقل غلظت انروفلوکساسین در نمونه‌های مثبت گوشت مرغ $27/64$ میکروگرم در کیلوگرم و حداکثر غلظت $254/68$ میکروگرم در کیلوگرم می‌باشد. حداقل و حداکثر بقایای انروفلوکساسین در گوشت بوقلمون $11/34$ و $50/84$ میکروگرم در کیلوگرم بود. علاوه بر این، میانگین بقایای انروفلوکساسین در گوشت مرغ $38/00 \pm 62/72$ میکروگرم در کیلوگرم و در نمونه‌های گوشت بوقلمون $21/36 \pm 15/31$ میکروگرم در کیلوگرم بود. با احتساب حداکثر مجاز باقیمانده دارویی انروفلوکساسین بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا (برابر 30 میکروگرم در کیلوگرم) $46/66$ ٪ نمونه‌های گوشت مرغ و 20 ٪ نمونه‌های گوشت بوقلمون دارای غلظت انروفلوکساسین بالاتر از حد مجاز می‌باشند. به طور کلی به منظور بهبود کیفیت بهداشتی گوشت طیور توصیه می‌شود قوانین ملی برای پایش باقیمانده آنتیبیوتیک در گوشت طیور قبل از کشتار اعمال گردد.

واژه‌های کلیدی: انروفلوکساسین، باقیمانده دارویی، بوقلمون، مرغ

مقدمه

وسيعی دارند. انروفلوكساسین يکی از مهم‌ترین و پر مصرف ترین آنتیبيوتیک متعلق به فلوروکینولون‌ها است که در صنعت طیور بسیار زیاد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Martinez *et al.*, 2006; Riviere and Papich, 2013). انروفلوكساسین از سال ۱۹۹۱ در درمان بیماری‌های عفونی طیور وارد شده و تا سال ۲۰۰۳ بیش از ۲۰٪ کل آنتیبيوتیک مصرفی در Martínez *et al.*, 2006) دامپزشکی را به خود اختصاص داده است (Dadgarnia *et al.*, 2017). این آنتیبيوتیک در ایران به طور گستردۀ در امر درمان بیماری‌های عفونی طیور استفاده می‌شود (Tajik *et al.*, 2011; Ebrahimzadeh *et al.*, 2014) استفاده شده است. لذا با توجه به دقت بالاتر HPLC نسبت به روش چهارپلیت و الیزا، در مطالعه اخیر میزان باقیمانده انروفلوكساسین با روش HPLC در مرغ و بوقلمون مقایسه شده است تا در جهت کنترل باقیمانده دارویی در گوشت مرغ و بوقلمون نگرش درستی نسبت به وضعیت باقیمانده این داروی پر مصرف، در گوشت گرم مرغ و بوقلمون حاصل شود.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌گیری

در این مطالعه ۳۰ نمونه از گوشت گرم مرغ و نمونه گوشت گرم بوقلمون در خط کشتار در کشتارگاه

آنٹیبيوتیک‌ها به طور گستردۀ برای درمان، پیشگیری و تحریک رشد در صنعت پرورش دام و طیور استفاده می‌شوند (Riviere and Papich, 2013). یکی از معضلات مهم در استفاده از آنتیبيوتیک‌ها وجود باقیمانده‌های دارویی در گوشت و فراورده‌های دام و طیور است که می‌تواند منجر به سرطان‌زاوی، ناقص‌الخلقه‌زاوی، جهش‌زاوی، ایجاد آلرژی و بروز مقاومت دارویی شود که نگرانی زیادی را برای مصرف کنندگان بوجود آورده است (Salehzadeh *et al.*, 2007). از مهم‌ترین آلاینده‌های شیمیایی مواد غذایی که از اهمیت بالایی در سلامت انسان برخوردار است، باقیمانده‌های آنتیبيوتیکی است که متأسفانه استفاده از این ترکیبات به طور روز افزون در صنعت پرورش دام و طیور رشد دارد (Martine *et al.*, 2010). در کشورهای پیشرفته اصولاً مصرف کنندگان به خطر بالقوه باقیمانده دارویی در فراورده‌های دامی آگاهند اما در کشورهای در حال توسعه علیرغم مصرف زیاد آنتیبيوتیک هیچ برنامه ملی برای ارزیابی باقیمانده‌های دارویی در محصولات دام و طیور وجود ندارد و در بسیاری از موارد پرورش دهنده‌گان دام و طیور بدون توجه به شیوه مصرف داروها خود سرانه به مصرف یوتیک‌ها می‌پردازند (Martinez *et al.*, 2006). برآورد می‌گردد که مصرف آنتیبيوتیک در دامپزشکی از سال ۲۰۱۰ تا ۲۰۳۰ از حدود ۶۳ هزار تن به ۱۰۵ هزار تن برسد و ۷۷٪ افزایش پیدا کند (Van Boeckel *et al.*, 2015).

فلوروکینولون‌ها از دسته آنتیبيوتیک‌هایی نسبتاً جدید و قوی هستند که در مقابل بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی کارآمد هستند و طیف ضرباکتریایی

کارتریج خارج شود. مایع خارج شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۸ درجه سانتی گراد انکوبه شد تا کامل خشک گردد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، ۲۵۰ میکرولیتر بافر ۰/۲ مولاری سدیم هیدروژن فسفات ($\text{pH} = ۹$) اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه ورتكس گردید تا مواد آماده شده کاملاً حل شود. سپس در دور ۴۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از جداسازی لایه رویی، ۲۰ میکرولیتر از مایع به دستگاه HPLC تزریق شد (Dadgarnia *et al.* 2017).

در این مطالعه از محلول انروفلوکساسین (باير، آلمان) به عنوان محلول استاندارد استفاده شد. در اين بررسی دمای ستون ۳۷ درجه سانتی گراد، ميزان سرعت جريان محلول يك ميلی لیتر در دقیقه، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و شناساگر UV با طول موج ۲۷۷ نانومتر بود. در اين مطالعه از دستگاه HPLC شركت Knauer آلمان و ستون C18 (با طول ۲۵ سانتي متر و قطر ۴ ميليمتر) استفاده شد و با نرم افزار EZ chrom كروماتوگرامها تجزيه و تحليل شد.

براي محاسبه غلظت ماده مجھول، حاصل تقسيم غلظت ماده استاندارد به مساحت منحنی استاندارد، در مساحت منحنی ماده مجھول ضرب شده و به عنوان غلظت ماده مجھول بيان شده است.

يافته‌ها

تزریق محلول استاندارد انروفلوکساسین به دستگاه HPLC منجر به دریافت كروماتوگرام و پيك مناسب گرديد. بررسی داده‌ها نشان داد ۸۰٪ نمونه‌های گوشت مرغ و ۸۰٪ نمونه‌های گوشت بوقلمون (۲۴ نمونه از ۳۰ نمونه) واجد بقایای انروفلوکساسین می‌باشند که حداقل

پاکيزه مرغ اصفهان در تابستان و پاییز ۹۵ جمع آوري و در کنار يخ به آزمایشگاه منتقل شد. از هر پرنده کشتار شده حدود ۵۰ گرم گوشت عضله سینه نمونه گيري شد. نمونه‌ها به شكل مجزا و از هر فارم پرورش ۵ نمونه تهيه شد که جهت استخراج و تزریق هر ۵ نمونه مخلوط و به عنوان يك نمونه شناخته استفاده شد. آزمایش نمونه‌ها به صورت سریالي و در هر نوبت ۵ فارم که در طی ۲۴ ساعت قبل نمونه گيري شدند بررسی شد. تمامی نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در یخچال نگهداري شدند.

- آماده‌سازی نمونه‌ها

در ابتدا از هر نمونه متعلق به يك فارم حدود ۱۰۰ ميلى گرم از عضله برداشت شده و جمعاً مقدار ۵۰۰ ميلى گرم از عضله سینه مورد آزمایش قرار گرفت. ۵۰۰ ميلى گرم از گوشت با ۷ سى سى اسييد كلريدر يك ۰/۱۵ مولار مخلوط شد و ۱۵ دقیقه پس از نگهداري در دمای ۳۵ درجه با دور ۴۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویي صاف و برای انتقال به کارتریج آماده شد.

- استخراج و HPLC

كارتریج با ۵ سى سى مخلوط آب و متانول مخصوص HPLC آماده شد. سپس مایع تهيه شده در مرحله قبلی، روی کارتریج ریخته شد و با ۳ سى سى آب مخصوص HPLC و ۳ سى سى بافر ۰/۲ مولاری سدیم هیدروژن فسفات ($\text{pH} = ۹$ ، شركت سیگما آلمان) و در نهايیت با ۵ ميلى لیتر آب مخصوص HPLC جهت پاکسازی مواد اضافه شسته شد. کارتریج‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداري و خشک شد و سپس به هر کارتریج ۳/۵ ميلى لیتر متانول اضافه شد تا انروفلوکساسین احتمالي از

نگرانی از آن جهت بیشتر احساس می‌شود که انروفلوكساسین نسبت به حرارت پخت مقاومت بالای دارد به طوری که روش‌های مختلف پخت مانند جوشاندن و سرخ کردن اثری بر باقیمانده انروفلوكساسین در گوشت ندارد (Lolo *et al.*, 2006). در مورد بررسی بقایای آنتی‌بیوتیکی در فراورده‌های طیور مطالعات متعددی صورت گرفته است. در ایران عمدۀ گزارش‌ها مربوط به بررسی بقایای آنتی‌بیوتیکی در ماکیان بوده است و تاکنون گزارشی در مورد بوقلمون وجود ندارد که در مطالعه اخیر به آن پرداخته شده است. در دهه گذشته عمدۀ مطالعات در ایران در خصوص بقایای آنتی‌بیوتیکی با روش‌های چهار پلیت (FTP) و الایزا بوده است به طوری که در یک مطالعه در استان مازندران با روش FPT از تعداد ۸۱۵ لاشه مرغ صنعتی، ۵۳۳ مورد آن حداقل دریکی از اعضای مورد آزمایش (عضله-کبد-کلیه)، دو عضو و یا هر سه عضو دارای باقیمانده آنتی‌بیوتیک بودند (Vahedi *et al.*, 2011). در مطالعه دیگری به مقایسه دو روش چهارپلیت و الایزا در تشخیص باقیمانده آنتی‌بیوتیکی در لاشه‌های کشتار شده مرغ در استان‌های شمال‌غرب ایران پرداخته شده است و نشان دادند در روش چهارپلیت ۲۸ لاشه از ۱۶۰ لاشه دارای باقیمانده انروفلوكساسین بودند حال این‌که در روش الایزا تنها ۲۴ مورد مثبت یافت شد (Tajik *et al.*, 2011). اخیراً با روش الایزا به بقایای انروفلوكساسین در ۹۰ لاشه مرغ گوشتی پرداخته شده است و بیان کردند که بیش از ۹۱ درصد لاشه‌های مرغ در تبریز واجد بقایای انروفلوكساسین است (Ebrahimzadeh *et al.*, 2014).

غلظت انروفلوكساسین در نمونه‌های گوشت مرغ مورد بررسی ۳/۶۴ میکرگرم در کیلوگرم و در نمونه‌های بوقلمون ۱۱/۳۴ میکرگرم در کیلوگرم می‌باشد. حداکثر غلظت در گوشت مرغ ۲۵۴/۶۸ میلی گرم در کیلوگرم و در گوشت بوقلمون ۵۰/۸۴ میکرگرم در کیلوگرم است. میانگین نمونه‌های مثبت در مرغ $47/50 \pm 67/19$ و در بوقلمون $26/70 \pm 11/96$ و میانگین تمامی نمونه‌های گوشت مرغ $38/00 \pm 62/72$ و میانگین تمامی نمونه‌های گوشت بوقلمون $21/36 \pm 15/31$ می‌باشد.

با احتساب MRL برابر ۳۰ میکروگرم در کیلوگرم (بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا) در بوقلمون ۶ مورد (۲۰٪) و در مرغ ۱۴ مورد (۴۷/۶۶٪) موارد مثبت و جمیعاً ۲۰ مورد از ۶۰ نمونه (۳۳/۳۳٪) کل نمونه‌ها دارای غلظت انروفلوكساسین بالاتر از MRL می‌باشند.

بحث و نتیجه‌گیری

اگرچه حداکثر غلظت قابل قبول باقیمانده دارویی یا به عبارتی MRL در مناطق مختلف بر اساس سطح فرهنگ و بهداشت متغیر است اما مقدار MRL انروفلوكساسین در بافت‌های مختلف توسط اتحادیه اروپا ۳۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم بیان شده است (Martine *et al.*, 2010). با توجه به این‌که تاکنون در مورد حداکثر غلظت قابل قبول آنتی‌بیوتیک‌ها در ایران استانداردی وجود ندارد لذا مبنای MRL در مطالعه اخیر سطح استاندارد اعلام شده از سوی اتحادیه اروپا بوده است. به هر حال باقیمانده انروفلوكساسین در حدود نیمی از گوشت‌های مرغ خطر جدی برای سلامت مصرف کنندگان به شمار می‌آید که چاره‌اندیشی مسئولین در حوزه بهداشت مواد غذایی را می‌طلبد. این

نمونه‌های گوشت مرغ دارای باقیمانده بالاتر از حد مجاز بودند در حالی که در مطالعه اخیر حدود نیمی (۴/۶۶ درصد) از گوشت‌های مرغ دارای باقیمانده انروفلوکساسین بالاتر از حد مجاز هستند. استفاده گسترده از انروفلوکساسین در درمان بیماری‌های عفونی طیور و عدم وجود قوانین کافی پایش آنتی‌بیوتیک در قبل از کشتار و عدم رعایت زمان پرهیز از مصرف دارو توسط بسیاری از پرورش دهنده‌گان می‌تواند دلیل این یافته باشد.

مقایسه میزان و درصد باقیمانده انروفلوکساسین در گوشت و بوقلمون در مطالعه اخیر نشان می‌دهد مقدار باقیمانده انروفلوکساسین در ۰/۲۰٪ نمونه‌های گوشت بوقلمون و ۴/۶۶٪ نمونه‌های گوشت مرغ بیشتر از حد مجاز است و میزان باقیمانده انروفلوکساسین در نمونه‌های گوشت بوقلمون به‌طور میانگین ۲۱ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم است حال آنکه میزان باقیمانده انروفلوکساسین در نمونه‌های گوشت مرغ به‌طور میانگین ۳۸ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم است که نشان می‌دهد متوسط سطح انروفلوکساسین در گوشت مرغ بالاتر از حد مجاز آنتی‌بیوتیک است. لذا لازم است پایش مستمر میزان آنتی‌بیوتیک در گوشت طیور در مرحله قبل از کشتار و عدم صدور مجوز کشتار در موارد عدم رعایت دوره پرهیز از مصرف انجام شود.

تعارض منافع

نویسنده‌گان هیچ گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

طبق اطلاعات موجود در مورد ارزیابی بقایای آنتی‌بیوتیکی در گوشت مرغ با روش HPLC تنها دو گزارش منتشر شده وجود دارد که به بقایای کلرامفینیکل (Tajik *et al.*, 2010) و اکسی تراسایکلین و انروفلوکساسین (Rokni *et al.*, 2007) در گوشت مرغ‌های کشتار شده در استان تهران پرداخته شده است. درباره بقایای آنتی‌بیوتیک در سایر گونه‌های طیور، فقط یک گزارش منتشر شده در خصوص بررسی بقایای انروفلوکساسین در گوشت بلدرچین موجود است که درصد آلدگی لاشه‌های واجد بقایای انروفلوکساسین را با روش HPLC در بلدرچین‌های منجمد عرضه شده در استان یزد ۲۲٪ بیان کرده‌اند (Dadgarnia *et al.*, 2017). مقایسه داده‌های پژوهشی در خصوص مرغ با داده‌های به‌دست آمده مطالعه حاضر نشان می‌دهد ۱۰۰٪ نمونه‌های اخذ شده در آن پژوهش دارای بقایای آنتی‌بیوتیکی بودند (Rokni *et al.*, 2017) حال آنکه در مطالعه اخیر ۸۰٪ نمونه‌ها واجد بقایای آنتی‌بیوتیکی بودند و برخی نمونه‌های مورد بررسی هیچ گونه بقایای از انروفلوکساسین نداشتند. این یافته می‌تواند به‌دلیل افزایش آگاهی برخی از پرورش دهنده‌گان نسبت به خطرات بقایای آنتی‌بیوتیکی و رعایت زمان پرهیز از مصرف توسط برخی پرورش دهنده‌گان طیور باشد اما از آنجایی که هیچ گونه قوانین ملی در این خصوص ارائه و یا اجرا نشده است هم‌چنان باقیمانده دارویی در درصد بالایی از گوشت مرغ در شرایط فعلی وجود دارد.

علاوه‌بر این مقایسه درصد موارد بالاتر از MRL در مطالعه‌ای نشان می‌دهد (Rokni *et al.*, 2017) در طی دهه اخیر درصد موارد بالاتر از حد مجاز به‌طور قبل توجهی افزایش یافته به‌طوری که در مطالعه نامبرده ۱۴٪

منابع

- Dadgarnia, M.A., Gholami-Ahangaran, M. and Shakerian A. (2017). The determination of enrofloxacin residue in quail meat, in Yazd by HPLC. Journal of Food Hygiene, accepted for publication. [In Persian]
- Ebrahimzadeh Attari, V., Mesgari Abbasi, M., Abedimanesh, N., Ostadrahimi, A. and Gorbani, A. (2014). Investigation of enrofloxacin and chloramphenicol residues in broiler chickens carcasses collected from local markets of Tabriz, northwestern Iran. Health Promotion Perspectives. 4(2): 151–157.
- Lolo, M., Pedreira, S., Miranda, J.M., Vázquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A., Fente, C. (2006). Effect of cooking on enrofloxacin residues in chicken tissue. Food Additive Contamination, 23(10): 988-993.
- Martín, B., Cornejo, J., Lapierre, L., Iragüen, D., Pérez, F., Hidalgo, H. and Andre, F. (2010). Withdrawal time of four pharmaceutical formulations of enrofloxacin in poultry according to different maximum residues limits. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 33: 246–251.
- Martinez, M., McDermott, P. and Walker, R. (2006). Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. Veterinary Journal, 172: 10-28.
- Riviere, J.E. and Papich, M.G. (2013). Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 9th edition, John Wiley & Sons, London, pp. 929-930.
- Rokni, N., Kamkar, A., Salehzadeh, F. and Madani R. (2007). Study on enrofloxacin residues in chicken tissues by HPLC. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 4(2): 11-16. [In Persian]
- Salehzadeh, F., Salehzadeh, A., Rokni, N., Madani, R. And Golchinefar, F. (2007). Enrofloxacin residue in Chicken tissues from Tehran slaughterhouses in Iran. Pakistan Journal of Nutrition, 6(4): 409-13.
- Tajik, H., Malekinejad, H., Razavi-Rouhani, S.M., Pajouhi, M.R., Mahmoudi, R. and Haghnazari, A. (2010). Chloramphenicol residues in chicken liver, kidney and muscle: a comparison among the antibacterial residues monitoring methods of Four Plate Test, ELISA and HPLC. Food and Chemical Toxicology, 48(8-9):2464-8.
- Tajik, H., Razavi Rouhani, S., Pajohi Alamoti, M. and Mahmoudi, R. (2011). Comparison of enrofloxacin residues in poultry tissues slaughtered in North West provinces of Iran by using FPT and Elisa. Journal of Urmia University of Medical Sciences, 22 (1):18-24 [In Persian].
- Vahedi, N., Motamedi, A. and Golchin, M. (2011). Determination of antibiotic residue in commercial poultry carcass by means of FPT (Four Plate Test) in Mazandaran province. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 8(1): 65-72. [In Persian]
- Van Boeckel, T.P. (2015). Global trends in antibiotic al use in food animals. Proceeding of National Academy of Science of USA, 112 (18): 5649-5654.

"Short communication"

The comparison of enrofloxacin residue in chicken and turkey meat, by high-performance liquid chromatography in Isfahan province

Teimuri, S.¹, Gholami-Ahangaran, M.^{2*}, Shakerian, A.³

1. Graduated in Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

*Corresponding Author: mgholamia1388@yahoo.com

(Received: 2017/5/2 Accepted: 2017/11/26)

Abstract

This study was carried out to compare the enrofloxacin residue in chicken and turkey meat in Isfahan province by HPLC. For this, totally 60 meat samples were collected from chicken and turkey carcasses during of summer and autumn of 2016. The results showed that 48 (80%) out of 60 chicken and turkey samples were positive for enrofloxacin residue. The minimum and maximum concentrations of enrofloxacin residue in chicken meat samples were 3.64 and 254.68 µg/Kg, respectively. The minimum and maximum concentrations of enrofloxacin residue in turkey meat samples were 11.34 and 50.84 µg/Kg, respectively. Furthermore, the average of enrofloxacin concentration in all chicken and turkey samples was 38.00 ± 62.72 and 21.36 ± 15.31 µg /Kg. The concentration of enrofloxacin in 46.66% of chicken samples and 20% of turkey samples were higher than European MRL standard. In conclusion, for improvement of hygienic quality in poultry meat, it is necessary to apply the national strategies for monitoring of antibiotic residue in meat before slaughter.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Chicken, Drug Residue, Turkey, Enrofloxacin