

«مقاله کوتاه»

تعیین باقیمانده انروفلوکساسین در گوشت بلدرچین‌های عرضه شده در یزد با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

محمدعلی دادگرنیا^۱، مجید غلامی آهنگران^{۲*}، امیر شاکریان^۳

۱. دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، 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

*نویسنده مسئول مکاتبات: mgolamia1388@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۴/۱۰/۶ پذیرش نهایی: ۹۶/۷/۱۵)

چکیده

آنتی‌بیوتیک‌ها عموماً به منظور پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف میکروبی به‌طور وسیع برای انسان و حیوان تجویز می‌گردند. این مطالعه باهدف ارزیابی باقیمانده داروی انروفلوکساسین در گوشت بلدرچین‌های عرضه‌شده در استان یزد با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام گرفت. به این منظور طی ۴ ماه پایانی سال ۹۳ تعداد ۵۰ نمونه گوشت بلدرچین منجمد از استان یزد جمع‌آوری و با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۲۲ درصد از نمونه‌ها (۱۱ نمونه از ۵۰ نمونه) واجد بقایای انروفلوکساسین در عضله بلدرچین‌های نمونه‌گیری شده بود که حداقل غلظت انروفلوکساسین در نمونه‌های مورد بررسی ۳/۰۸ میکروگرم در کیلوگرم و حداکثر غلظت ۱۱۷/۰۹ میکروگرم در کیلوگرم بود. میانگین بقایای انروفلوکساسین در عضلات بلدرچین‌های نمونه‌گیری شده ۸/۶۰ میکروگرم در کیلوگرم بود. بر مبنای استاندارد اتحادیه اروپا (۳۰ میکروگرم در کیلوگرم) ۱۴ درصد کل نمونه‌ها دارای غلظت انروفلوکساسین بالاتر از حد مجاز بود. به‌طور کلی به‌منظور بهبود کیفیت بهداشتی بلدرچین‌های گوشتی بهتر است قوانین مناسب جهت الزام رعایت پرهیز از مدت مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در فارم‌های پرورش بلدرچین اعمال شود.

واژه‌های کلیدی: انروفلوکساسین، باقیمانده دارویی، گوشت، بلدرچین

مقدمه

افزایش جمعیت جهان نیاز بشر به مواد پروتئینی را روز به روز افزایش می‌دهد و همین مسئله سبب شده است که بسیاری از حیوانات که گوشت آن‌ها برای انسان قابل مصرف می‌باشد به صورت اهلی پرورش یابند و با پرورش صنعتی آن‌ها بخشی از احتیاجات پروتئینی انسان برطرف گردد. پرورش بلدرچین امروزه جایگاه خاصی در صنعت پرورش طیور ایران پیدا کرده است که با توجه به تقاضای بیشتر مردم در مصرف گوشت و تخم بلدرچین و از طرفی اقتصادی بودن آن از نظر تولید، پیش‌بینی می‌شود که در آینده توسعه بیشتری پیدا کند (Vali, 2009).

آنتی‌بیوتیک‌ها عموماً به منظور پیشگیری و درمان بیماری‌های مختلف میکروبی به طور وسیع برای انسان و حیوان تجویز می‌گردند. علاوه بر آن به عنوان محرک رشد در پرورش دام و طیور مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ برآورد می‌شود مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در دامپزشکی از سال ۲۰۱۰ تا ۲۰۳۰ از حدود ۶۳ هزار تن به ۱۰۵ هزار تن برسد و ۶۷ درصد افزایش پیدا کند (Van Boeckel et al., 2015). بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت جهانی نیمی از آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده جهان در پزشکی و بقیه در امور دامپزشکی، کشاورزی و پرورش آبزیان مصرف می‌شوند. متأسفانه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در دامپزشکی منجر به برجا گذاشتن باقی‌مانده‌هایی در گوشت، شیر و تخم مرغ می‌گردد (Martinez et al., 2006). نگرانی‌های مختلفی درباره باقیمانده داروهای دامپزشکی بالاتر از حداکثر میزان باقی‌مانده (Minimum Residual Level: MRL) در فرآورده‌های دامی مورد مصرف انسان وجود دارد که

می‌تواند منجر به عوارض مختلفی مثل سرطان‌زایی، ناقص‌الخلقه‌زایی، جهش‌زایی، تولید آلرژی و تداخل در آزمایش‌های میکروبیولوژیکی و بروز مقاومت‌های دارویی گردد و امروزه مهم‌ترین عارضه بروز مقاومت دارویی می‌باشد (Salehzadeh et al., 2007).

روش‌های مختلفی برای تعیین باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی وجود دارد. از جمله این روش‌های جداسازی که دارای ضریب اطمینان بالایی می‌باشد روش کروماتوگرافی است (Tropilo and Stepien, 1989).

فلوروکینولون‌ها آنتی‌بیوتیک‌های جدید و بسیار قوی هستند که در مقابل بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و مایکوپلاسماها کارآمد و مؤثر می‌باشند. فلوروکینولون‌ها متابولیسم اسید نوکلئیک میکروب را مهار می‌کنند و طیف اثر ضدباکتریایی وسیعی دارند. انروفلوکساسین یکی از مهم‌ترین داروهای این گروه می‌باشد که امروزه در صنعت طیور مورد استفاده بسیار زیادی قرار می‌گیرد (Riviere and Papich, 2013).

یکی از شایع‌ترین بیماری‌های بلدرچین عفونت‌های باکتریایی است که کنترل این عفونت‌ها به شکل معمول با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری انجام می‌شود. حال با توجه به گستردگی طیف اثر انروفلوکساسین بر روی انواع باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و حتی مایکوپلاسماها این دارو بیش‌تر از سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در فارم‌های پرورش طیور استفاده می‌شود. لذا در مطالعه اخیر به تعیین باقی‌مانده این دارو پر مصرف در گوشت بلدرچین‌های عرضه شده در شهر یزد پرداخته شد.

مواد و روش‌ها**- نمونه‌گیری**

در این مطالعه ۵۰ نمونه از گوشت منجمد بلدرچین عرضه‌شده در شهر یزد طی ۴ ماه از ابتدای آذر ماه ۹۳ تا پایان اسفند ۹۳ جمع‌آوری شد. در هر هفته از ۳-۴ برند مختلف نمونه‌گیری شد. پس از تهیه نمونه‌ها، حدود ۵۰ گرم از عضله سینه هر بلدرچین اخذ شد و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید.

- آماده‌سازی نمونه‌ها

مقدار ۷ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱۵ مولار به ۴۰۰ میلی‌گرم عضله سینه بلدرچین اضافه و به شکل کامل همگن شد. نمونه‌های همگن شده بعد از نگهداری به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس با دور ۴۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و مایع رویی با سرنگ برداشت و از فیلتر سرنگی یک‌بار مصرف ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد و جمع‌آوری گردید.

- استخراج و روش HPLC

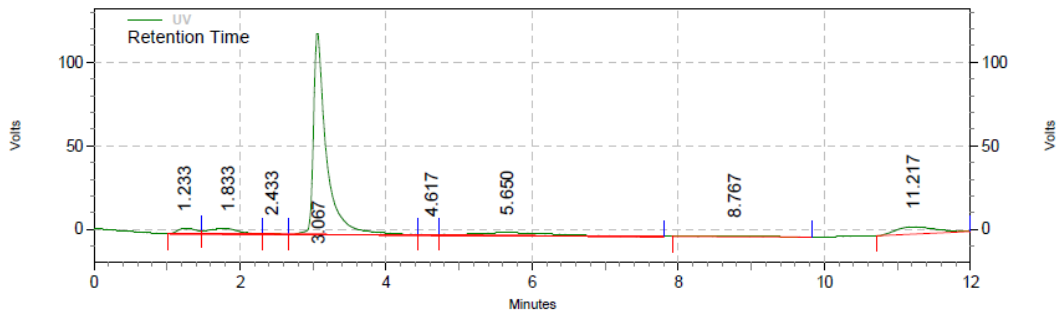
برای آماده‌سازی کارتریج‌ها ابتدا ۲/۵ میلی‌لیتر متانول و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر آب مخصوص HPLC درون کارتریج ریخته شد. پس از آماده‌سازی کارتریج، مایع فیلتر شده مرحله قبل روی کارتریج ریخته شد و کارتریج با ۳ میلی‌لیتر آب مخصوص HPLC و بعد با ۳ میلی‌لیتر بافر ۰/۲ مولار دی سدیم هیدروژن فسفات (pH=9) و در نهایت با ۵ میلی‌لیتر آب مخصوص HPLC جهت پاک‌سازی مواد اضافه شسته شد. کارتریج‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری و خشک شد و در مرحله بعد به هر کارتریج ۳/۵

میلی‌لیتر متانول اضافه شد تا انروفلوکساسین احتمالی از کارتریج خارج شود و مایع خارج شده از این مرحله درون لوله آزمایش به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۸ درجه سلسیوس نگهداری و خشک گردید. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، ۲۵۰ میکرولیتر بافر ۰/۲ مولاری سدیم هیدروژن فسفات (pH=9) به لوله‌های آزمایش اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط گردید تا مواد استخراج شده کاملاً حل شود. سپس در دور ۴۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و لایه رویی جدا شد و جهت تزریق به دستگاه HPLC فراهم گردید. در پایان ۲۰ میکرولیتر از محلول به دست آمده به دستگاه تزریق شد (Rokni et al., 2007). در این مطالعه از محلول انروفلوکساسین (Bayer, Germany) به عنوان محلول استاندارد استفاده شد. دمای ستون ۳۷ درجه سلسیوس، میزان سرعت جریان محلول یک میلی‌لیتر در دقیقه، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و شناساگر UV با طول موج ۲۷۷ نانومتر بود.

برای محاسبه غلظت ماده مجهول حاصل تقسیم غلظت ماده استاندارد به مساحت منحنی استاندارد، در مساحت منحنی ماده مجهول ضرب شده و به عنوان غلظت ماده استاندارد بیان شده است.

یافته‌ها

آنالیز محلول استاندارد پس از تزریق منجر به دریافت پیک مناسب گردید (نمودار ۱).



نمودار (۱) - کروماتوگرام طیف استاندارد انروفلوکساسین

کیلوگرم و میانگین تمامی نمونه‌ها مورد بررسی $21/28 \pm 8/60$ میکروگرم در کیلوگرم می‌باشد. بر اساس MRL استاندارد اتحادیه اروپا (برابر با ۳۰ میکروگرم در کیلوگرم)، ۶۳/۶۳ درصد موارد مثبت و ۱۴ درصد کل نمونه‌ها دارای غلظت انروفلوکساسین بالاتر از MRL بودند.

بر اساس تجزیه و تحلیل کروماتوگرام نمونه‌ها ۲۲ درصد از نمونه‌ها (۱۱ نمونه از ۵۰ نمونه) واجد بقایای انروفلوکساسین در عضله بلدرچین‌های نمونه‌گیری شده می‌باشد (جدول ۱) که حداقل غلظت انروفلوکساسین در نمونه‌های مورد بررسی $3/08$ میکروگرم در کیلوگرم و حداکثر غلظت $117/08$ میکروگرم در کیلوگرم می‌باشد. میانگین نمونه‌های مثبت $30/15 \pm 39/09$ میکروگرم در

جدول (۱) - تعداد، درصد و میانگین غلظت بقایای انروفلوکساسین در نمونه‌های مورد بررسی

مؤلفه	داده
تعداد	۵۰
تعداد و (درصد) نمونه‌های واجد بقایای انروفلوکساسین	۱۱ (۲۲ درصد)
تعداد و (درصد) نمونه‌های واجد بقایای انروفلوکساسین بالاتر از MRL	۷ (۱۴ درصد)
میانگین غلظت بقایای انروفلوکساسین در تمامی نمونه‌های مورد بررسی	$21/28 \pm 8/60$ میکروگرم در کیلوگرم
میانگین غلظت بقایای انروفلوکساسین در نمونه‌های واجد بقایای انروفلوکساسین	$30/15 \pm 39/09$ میکروگرم در کیلوگرم

بحث و نتیجه‌گیری

در دامپزشکی به خود اختصاص داده است (Salehzadeh et al., 2007). به همین دلیل در مطالعه اخیر به بررسی بقایای انروفلوکساسین در گوشت بلدرچین‌های عرضه شده در استان یزد با روش حساس و دقیق HPLC پرداخته شده است. نتایج مطالعه اخیر نشان داد ۲۲ درصد از بلدرچین‌های نمونه‌گیری شده واجد بقایای انروفلوکساسین در عضلات می‌باشند که

انروفلوکساسین یکی از مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین آنتی‌بیوتیک متعلق به فلوروکینولون‌ها است که در صنعت طیور بسیار زیاد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Riviere and Papich, 2013). انروفلوکساسین از سال ۱۹۹۱ در درمان بیماری‌های عفونی طیور وارد شده و تا سال ۲۰۰۳ بیش از ۲۰ درصد کل آنتی‌بیوتیک مصرفی

پلیت ۲۸ لاشه از ۱۶۰ لاشه دارای باقی‌مانده انروفلوکساسین بودند حال این‌که در روش الیزا تنها ۲۴ مورد مثبت یافت شد (Tajik et al., 2011).

طبق اطلاعات موجود در مورد ارزیابی بقایای آنتی‌بیوتیکی در گوشت مرغ با روش HPLC تنها دو گزارش منتشر شده وجود دارد به طوری که در یک مطالعه به بقایای کلرامفنیکل (Tajik et al., 2010) و در مطالعه دیگری به بقایای اکسی‌تتراسایکلین و انروفلوکساسین (Rokni et al., 2007) در لاشه مرغ کشتار شده در استان تهران پرداختند اما در سایر گونه‌های طیور گزارشی موجود نیست. مقایسه داده‌های مربوط به بقایای انروفلوکساسین در مرغ (Rokni et al., 2007) با داده‌های به دست آمده از مطالعه حاضر در خصوص بلدرچین نشان می‌دهد ۱۰۰ درصد نمونه‌های اخذ شده در مطالعه قبلی دارای بقایای آنتی‌بیوتیکی بودند در حالی‌که در مطالعه اخیر فقط ۲۲ درصد نمونه‌ها واجد بقایای آنتی‌بیوتیکی بودند و برخی نمونه‌های مورد بررسی هیچ‌گونه بقایایی از انروفلوکساسین نداشتند. این یافته می‌تواند دلیلی بر استفاده کمتر انروفلوکساسین در گله‌های بلدرچین باشد که این موضوع ممکن است به دلیل شیوع کم‌تر بیماری‌های میکروبی در بلدرچین و به عبارتی مقاومت بیشتر این پرنده نسبت به بیماری‌های باکتریایی باشد. علاوه بر این، مقایسه نتایج مطالعه قبلی (Rokni et al., 2007) با مطالعه اخیر نشان می‌دهد درصد موارد بقایای انروفلوکساسین بالاتر از MRL در مرغ کم‌تر از بلدرچین بوده است (۸/۸٪ در مقابل ۱۴٪). تعداد نمونه‌های کم‌تر در مطالعه حاضر و از طرفی فقدان قوانین کافی در خصوص پایش دوره‌ی پرهیز از مصرف

۱۴ درصد بلدرچین‌های عرضه شده از نظر بقایای انروفلوکساسین بالاتر از حد استاندارد قابل قبول می‌باشد. حداکثر غلظت قابل قبول باقی‌مانده دارویی یا به عبارتی MRL در مناطق مختلف بر اساس سطح فرهنگ مصرف گوشت و سایر فرآورده‌های دامی و بهداشت متغیر است. با توجه به این‌که تاکنون در مورد حداکثر غلظت قابل قبول آنتی‌بیوتیک‌ها در ایران استاندارد وجود ندارد لذا مبنای MRL در مطالعه اخیر سطح استاندارد اعلام شده از سوی اتحادیه اروپا بوده است. مقدار MRL انروفلوکساسین در بافت‌های مختلف توسط اتحادیه اروپا ۳۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم بیان شده است (Martinez et al., 2006).

در مورد بررسی بقایای آنتی‌بیوتیکی در فرآورده‌های طیور مطالعات متعددی صورت گرفته است. در ایران عمده گزارشات مربوط به بررسی بقایای آنتی‌بیوتیکی در ماکیان بوده است و تاکنون گزارشی در مورد بلدرچین وجود ندارد. در دهه گذشته عمده مطالعات در ایران در خصوص بقایای آنتی‌بیوتیکی با روش‌های چهار پلیت (FTP) و الیزا انجام شده است به طوری که در یک مطالعه در استان مازندران باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک در لاشه طیور صنعتی به روش FPT تعیین شده است. نتایج نشان داد از تعداد ۸۱۵ لاشه مورد آزمایش در این طرح، ۵۳۳ مورد آن حداقل در یکی از اعضای مورد آزمایش (عضله، کبد و کلیه)، دارای باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک بودند (Vahedi et al., 2010). علاوه بر این، در یک بررسی دیگر به مقایسه دو روش چهار پلیت و الیزا در تشخیص باقی‌مانده آنتی‌بیوتیکی در لاشه‌های کشتار شده مرغ در استان‌های شمال غرب ایران پرداخته شده است و نشان دادند در روش چهار

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب سپاس را از آقای مهندس منوچهر مؤمنی (کارشناس محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد) به دلیل همکاری در انجام HPLC به جا می آورند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

و عدم رعایت دوره پرهیز از مصرف باعث افزایش موارد بقایای انروفلوکساسین بالاتر از MRL شده است. به هر حال با توجه به فاصله زمانی حدود ده ساله بین مطالعه قبلی (Rokni *et al.*, 2007) و مطالعه اخیر، به نظر می رسد برای مقایسه وضعیت بقایای آنتی بیوتیکی در مرغ و بلدرچین نیاز به مطالعه هم زمان باشد.

به طور کلی با توجه به مزیت های فراوان گوشت بلدرچین اعم از پروتئین بالا، کلسترول پایین، آهن و فسفر و روی بالاتر نسبت به گوشت مرغ (Vali, 2009) اما نگرانی هایی در خصوص باقی مانده های آنتی بیوتیکی در گوشت بلدرچین وجود دارد که لازم است به منظور بهبود کیفیت بهداشتی گوشت بلدرچین قوانین مبنی بر الزام رعایت پرهیز از مدت مصرف آنتی بیوتیک ها در فارم های پرورش بلدرچین اعمال شود.

منابع

- 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 & Sonc, London, pp. 929-930.
- Rokni, N., Kamkar, A., Salehzadeh, F. and Madani R. (2007). Study on the Enrofloxacin residues in chicken tissues by HPLC. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 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 Haghazari, 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., Pajouhi 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 Science*. 22(1): 18-24. [In Persian]
- Tropilo, J. and Stepien, W. (1989). Occurrence of antibiotics and other inhibitory substance in poultry meat and eggs. *Medicine Veterinarian*, 43(3): 161-171.

-
- Vahedi, N., Motaghedi, A. and Golchin, M. (2011). Determination of antibiotic residues in industrial poultry carcasses by means of F. P. T. method in Mazandaran province. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 8(1): 65-72. [In Persian]
 - Vali, N. (2009). Principles of quail production. Islamic Azad University-Shahrekord Branch Publication, pp. 35-40. [In Persian]
 - Van Boeckel, T.P. (2015). Global trends in antibiotic use in food animals. *Proceeding of National Academy of Science of USA*, 112 (18): 5649-5654.

"Short Communication"

The determination of enrofloxacin residue in quail meat, in Yazd by HPLC

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

1. Graduated of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord- Iran
2. Associate Professor, Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord-Iran
3. Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord-Iran

*Correspondence Author's Email: mgholamia1388@yahoo.com

(Received: 2015/11/27 Accepted: 2017/10/7)

Abstract

Antibiotics are commonly prescribed for humans and animals for the prevention and treatment of various microbial diseases. This study was carried out for the evaluation of enrofloxacin residue in quail meat in Yazd city by HPLC. For this, 50 meat samples were collected from quail meats that supplied in Yazd from winter to spring in 2014-2015. Results showed that 11 samples (22%) were positive for enrofloxacin residue. The minimum and maximum concentrations of enrofloxacin in the samples were 3.08 and 117.09 µg/Kg, respectively. The mean value of enrofloxacin concentration in the positive samples was 8.6 ± 21.28 µg/Kg. The concentration of enrofloxacin in 14% of the samples was higher than European Maximum Residual Level (30 µg/Kg). In conclusion, for improvement of hygienic quality of quail meat, it is necessary to apply suitable strategy for legality of withdrawal time for antibiotic consumption.

Conflict of interest: None declared.

Key words: Quail, Drug residue, Enrofloxacin, Meat