

بررسی میزان آنتی بیوتیک تتراسایکلین در شیر خام با استفاده از طیف تبدیل فوریه مادون قرمز

علی قنبری^{۱*}، افشین آخوندزاده بستی^۲

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: ghanbari238@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۱

چکیده

با توجه به مصرف شیر در برنامه غذایی روزانه انسان به عنوان یکی از گروه‌های اصلی غذایی، بهداشت و سلامت این محصول از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این مطالعه از مادون قرمز نزدیک (FTNIR) و مادون قرمز دور (FTMID) برای بررسی میزان تتراسایکلین در شیر خام و مقایسه با روش مرجع HPLC استفاده شد. تعداد ۴۰ نمونه شیر (هر غلظت با ۱۰ نمونه تکرار) با غلظت‌های مختلف تتراسایکلین ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ ppb آماده گردیدند. همچنین با مقایسه نمونه شاهد با نمونه های حاوی تتراسایکلین، بیشترین تغییرات طیف مادون قرمز نزدیک در محدوده عدد موجی ۵۲۰۰ تا ۵۰۰۰ cm^{-1} و ۷۰۰۰ تا ۶۸۰۰ cm^{-1} و تغییرات طیف مادون قرمز میانه در محدوده عدد موجی ۷۰۰ تا ۶۰۰، ۱۷۰۰ تا ۱۵۰۰ و ۳۴۰۰ تا ۳۲۰۰ cm^{-1} رخ می دهد. با استفاده از این پیشگویی‌ها میزان تتراسایکلین به کمک روش NIR و MIR به ترتیب با ضریب همبستگی ۰/۹۹ و ۰/۹۰ و میزان خطای RMSEP ۱۸/۶۰ و ۲۰/۰۶ پیشگویی شد. با اینکه ضریب همبستگی هر دو روش بالا می باشد، اما میزان خطای روش پیشگویی برای هر دو روش مخصوصاً روش MIR بالا می باشد. اما نتایج طیف NIR به روش مرجع (HPLC) نزدیک تر است و می تواند جایگزین این روش شود. با توجه به میزان خطای کمتر NIR و مزایای این روش شناسایی نسبت به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، می توان این روش را جایگزین مناسبی برای روش های زمانبر و پرهزینه اندازه گیری تتراسایکلین در شیر معرفی نمود.

کلیدواژه ها: تبدیل فوریه مادون قرمز، تتراسایکلین، شیر خام.

مقدمه

پستان و بیماری‌های سیستمیک و موضعی در گاوهای شیری رایج شده است. عدم رعایت دوز توصیه شده دارو و عدم توجه به مدت زمان منع مصرف دارو، سبب حضور باقیمانده دارویی در مواد غذایی با منشأ دامی می شود (موثق، ۱۳۹۱؛ Meyer et al., 2000). احتمال وجود باقیمانده‌های دارویی در مواد غذایی به حدی بالا است که سازمان‌های ناظر بر ایمنی غذا در سطح جهان، بر عاری بودن مواد غذایی از این باقیمانده‌ها تأکید ویژه‌ای دارند. علاوه بر این، احتمال ایجاد مشکلات صنعتی در تولید

با توجه به مصرف شیر در برنامه غذایی روزانه انسان به عنوان یکی از گروه‌های اصلی غذایی، بهداشت و سلامت این محصول از الویت ویژه‌ای برخوردار است. شیر در معرض آلودگی‌های بسیاری است که سلامتی انسان را تهدید می کنند. از جمله آلوده‌کننده‌های شیر، مواد شیمیایی مثل آنتی بیوتیک‌ها، هورمون‌ها، ضد عفونی کننده‌ها، حشره‌کش‌ها، مایکوتوکسین‌ها و فلزات سنگین هستند (فلاحزاده و همکاران، ۱۳۸۵). از طرفی، امروزه استفاده از آنتی بیوتیک‌ها برای رشد مطلوب، کنترل ورم

فرآورده‌های تخمیری شیر در صورت وجود باقیمانده‌ی آنتی‌بیوتیکی در شیر، نیز وجود دارد (Katla et al., 2001).

تتراسایکلین‌ها جزء مهم‌ترین گروه‌های آنتی‌بیوتیکی هستند که از حدود ۵۰ سال قبل تا امروز به شکل گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این آنتی‌بیوتیک‌ها، فعالیت باکتریواستاتیک داشته و بطور گسترده‌ای برای درمان بیماری ورم پستان گاو به شکل خوراکی و با مقادیر کمتر از دوز درمانی استفاده می‌شوند (دباغ مقدم و همکاران، ۱۳۹۲). اگر میزان باقیمانده تتراسایکلین‌ها در فرآورده‌های دامی بیش از حد تحمل باشد، خطرات جدی را بویژه برای بیماران، جنین و کودکان به دنبال خواهد داشت. بنابراین بررسی دقیق باقیمانده تتراسایکلین‌ها در شیر که اغلب مورد مصرف گروه‌های آسیب‌پذیر می‌باشد، از الویت خاصی برخوردار است. طبق تجربیات دقیقی که در اواخر سال ۱۹۶۰ صورت گرفت، به طور رسمی تایید شده است که آنتی‌بیوتیک موجود در شیر در اثر حرارت متعارف پاستوریزاسیون از بین نرفته و برای از بین بردن آن حرارت و طول مدت بیشتری از آنچه که در روش‌های پاستوریزاسیون صورت می‌گیرد لازم می‌باشد (مرتضوی و روحانی، ۱۳۷۸).

تجویز آنتی‌بیوتیک‌ها به هر شکل و منظوری که صورت گیرد در هر حال مقداری از آنها به بافت پستان دام رسیده و در نتیجه در شیر و فرآورده‌های آن گهگاه از یک سو و در بهداشت عمومی از سوی دیگر اشکالات جدی ایجاد می‌نمایند. روش‌های گوناگون میکروبی، ایمونوشیمیایی و فیزیکوشیمیایی با هدف غربالگری، شناسایی و تعیین مقدار باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی با منشأ دامی ابداع شده است (عابدی‌شیرازی، ۱۳۷۳). انتخاب روش آنالیز به نوع آنتی‌بیوتیک، محدودیت‌های زمانی مورد انتظار، حساسیت روش و هزینه آن بستگی دارد (Popelk and Nagy, 2003). دو روش میکروبی و ایمونوشیمیایی به منظور بررسی‌های غربالگری و روش‌های

فیزیکوشیمیایی مانند اسپکتروفتومتری، اسپکتروفلوریمتری و نیز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) برای تعیین مقدار دقیق آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شوند (Boatto et al., 1999).

ناگی و پوپلک (۲۰۰۴) کارایی تست‌های تشخیص سریع آنتی‌بیوتیک‌ها را با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) مقایسه نمودند و ابراز داشتند که حساسیت بالا و همبستگی خوب نتایج با آزمایشاتی مانند Delvo Test قابل حصول است، در حالیکه روش‌های دیگر مانند روش انتشار دیسکی از حساسیت کمتری برخوردار می‌باشد. این محققان روش Delvo Test را یک روش مناسب برای تشخیص باقیمانده‌های دارویی در شیر معرفی نمودند و آن را با HPLC قابل مقایسه گزارش کردند (Nagy, 2004 Popelk and).

ترکیبات پیچیده مواد غذایی تعیین کیفی و کمی ترکیبات تشکیل دهنده آن‌ها را مشکل می‌کند، هنگامی که از روش‌های شیمیایی برای اندازه‌گیری، تجزیه و جداسازی ترکیبات مورد نظر استفاده می‌شود، تخریب مواد غذایی لازم بوده و این تخریب می‌تواند همراه با زحمت و مشکل ساز باشد و اغلب به انجام آزمایش‌های شیمیایی زیادی نیاز دارد که این آزمایش‌ها وقت گیر و هزینه‌بر می‌باشند. تمام این عوامل بر نیاز به روش‌های قابل اعتماد و غیر مخرب برای ارزیابی کیفیت مواد غذایی تاکید دارند. در این راستا، در سال‌های اخیر از طیف سنجی مادون قرمز به عنوان یک روش غیر مخرب و سریع به صورت گسترده‌ای در ارزیابی کیفیت مواد غذایی استفاده شده است. این روش دارای مزایایی است که از جمله می‌توان به سرعت بالا و صرف وقت کمتر اشاره کرد. طیف سنجی مادون قرمز در مقایسه با روش‌های مخرب هزینه کمتری دارد زیرا برای انجام آزمایش غیر از مصرف برق به دیگر مواد مانند معرف یا واکنش‌گرهای شیمیایی احتیاج نیست و می‌توان با تدوین یک مدل کالیبراسیون تعداد زیادی نمونه را مورد آنالیز قرار داد و نمونه‌ها احتیاجی به هیچ

تعداد ۴۰ نمونه شیر (هر غلظت با ۱۰ نمونه تکرار) با غلظت های مختلف تتراسایکلین ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ ppb آماده شد.

اندازه گیری با دستگاه FT-MIR
اندازه گیری FT-MIR با اسپکترومتر NEXUS^{۸۷۰} ساخت شرکت Thermo Nicolet مجهز به آشکارساز DTGS (دئو ترات تری گلیسین سولفات) و با منبع نوری سفید و دارای محدوده طیفی ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بر سانتی متر انجام شد.

اندازه گیری با دستگاه FT-NIR
اندازه گیری FT-NIR با اسپکترومتر NEXUS870 ساخت شرکت Thermo Nicolet مجهز به آشکارساز DTGS (دئو ترات تری گلیسین سولفات) و با منبع نوری سفید و دارای محدوده طیفی ۳۵۰۰ تا ۸۰۰۰ بر سانتی متر در فواصل ۳۲ بر سانتی متر انجام شد.

آماده سازی نمونه ها برای روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

به پنج گرم از نمونه شیر همگن شده، دو میلی لیتر محلول ۲۰٪ تری کلرواستیک اسید و ۲۰ میلی لیتر محلول بافر مک ایلواین افزوده شد. پس از مخلوط و سانتریفوژ کردن لوله ها فاز بالایی برای مرحله بعدی مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا ستون های SPE توسط عبور دادن سه میلی لیتر متانول و سه میلی لیتر آب فعال شدند، سپس فاز بالایی به دست آمده از مرحله قبل، به آرامی از روی آن ها عبور داده شد. پس از آن، ستون ها با ۲ میلی لیتر محلول متانول ۵٪ در آب شستشو داده شد و در نهایت تتراسایکلین با عبور سه میلی لیتر متانول از ستون ها جدا گردید. محلول متانولی به دست آمده زیر گاز ازت تبخیر شده و باقی مانده در یک میلی لیتر متانول حل و توسط فیلتر PTFE با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر صاف شد. ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق گردید. ارتفاع پیک

آماده سازی قبل از انجام آزمایش ندارند. طیف سنجی مادون قرمز می تواند اطلاعات زیادی در مورد کیفیت مواد غذایی در اختیار ما قرار دهد، همچنین می توان میزان ترکیباتی با ۰/۱ درصد غلظت را نیز به کمک این روش به صورت غیر مخرب و سریع تعیین نمود (Cen and He, 2007). اولین بار بن (۱۹۶۳) از طیف سنجی NIR در آنالیز ترکیبات غلات استفاده کرد. شائو و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از طیف سنجی بازتابشی مادون قرمز نزدیک به بررسی خصوصیات کیفی گوجه فرنگی مانند سفتی، مواد جامد حل شدنی و اسیدیته پرداختند و توانستند این خصوصیات را با ضریب همبستگی بالا به صورت غیر مخرب پیشگویی کنند (Shao, 2007). در همین راستا این تحقیق با هدف بررسی کمی حضور بقایای تتراسایکلین در شیر خام با استفاده از روش طیف سنجی مادون قرمز نزدیک و طیف سنجی مادون قرمز میانه انجام شد.

مواد و روش کار

مواد

نمونه های شیر خام بصورت تصادفی از مرکز جمع آوری شیر در تهران مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۱۷۵۶ تهیه گردید. همچنین از هیدروکلراید تتراسایکلین برای تهیه محلول استوک استاندارد (دو میلی گرم در میلی لیتر آب) استفاده شد.

روش کار

آماده سازی نمونه ها برای روش مادون قرمز نزدیک و میانه

محلول ها تا زمان آزمایش در دمای چهار درجه سلسیوس ذخیره و نگهداری شدند. با رقیق کردن محلول های استوک با آب مقطر، محلول های استاندارد با غلظت های مختلف ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ ppb تهیه گردید. سپس نمونه های شیر با محلول های استوک کار تتراسایکلین مخلوط شده، به طوری که یک میلی لیتر از محلول آنتی بیوتیک با چهار میلی لیتر از شیر با هم مخلوط شدند. در پایان

مقایسه میانگین داده‌ها براساس آزمون دانکن با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ و EXCEL نسخه ۲۰۱۰ (Chicago, USA) انجام شد. همچنین برای ارزیابی روش پیشگویی، میزان خطا در پیشگویی (RMSEP) خصوصیات کمی و ضریب همبستگی r^2 بین مقادیر اندازه-گیری شده توسط روش‌های پیشگویی شده توسط مادون قرمز تعیین شد.

نتایج

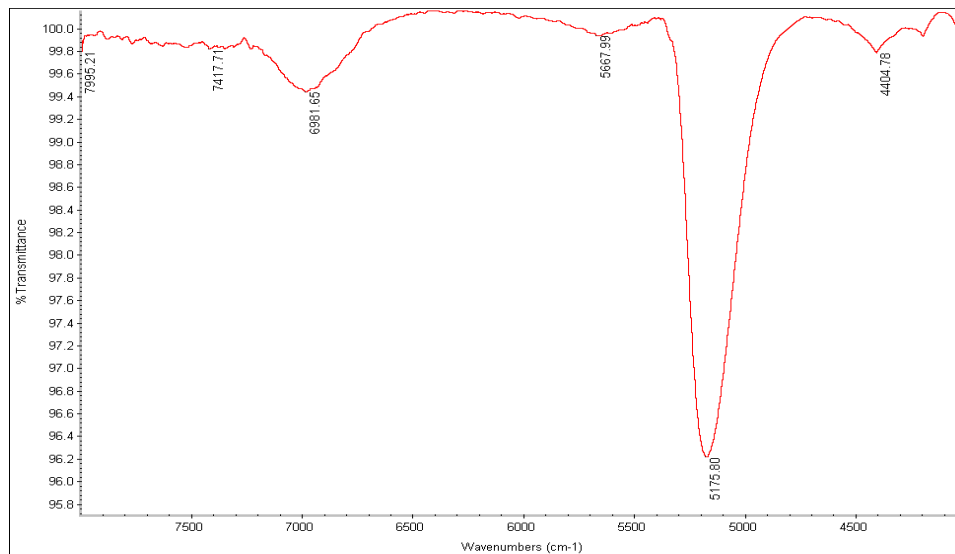
آنالیز مادون قرمز نزدیک (FT-NIR) طیف مادون قرمز نزدیک نمونه شیر خالص طیف مادون قرمز نزدیک نمونه شیر خالص در شکل ۱ مورد بررسی قرار گرفته است. طبق این طیف، شیر خالص در محدوده عدد موجی ۵۱۷۵/۸۰ و ۶۹۸۱/۶۵ به ترتیب با شدت جذب ۹۶/۲ و ۹۹/۵ دارای دو پیک شاخص می باشد.

های بدست آمده برای ارزیابی تتراسایکلین مورد استفاده قرار گرفت (هاشمی و ملائکه، ۱۳۷۹).

اندازه‌گیری با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری با دستگاه HPLC (ساخت شرکت KNAUER آلمان) با ستون C8 به ابعاد ۲۵۰ در ۴/۶ میلی متر LD و قطر ذرات پنج میکرومتر به همراه ستون محافظ مناسب از همین نوع با دمای ستون ۴۰ درجه سلسیوس. فاز متحرک این ستون شامل محلول ۰/۰۱ مولار اسید اگزالییک - استونیتریل با نسبت ۸۵/۱۵ حجمی/حجمی بود. همچنین سرعت جریان حلال در این ستون ۱/۵ میلی لیتر در دقیقه بود (هاشمی و ملائکه، ۱۳۷۹).

تجزیه و تحلیل آماری

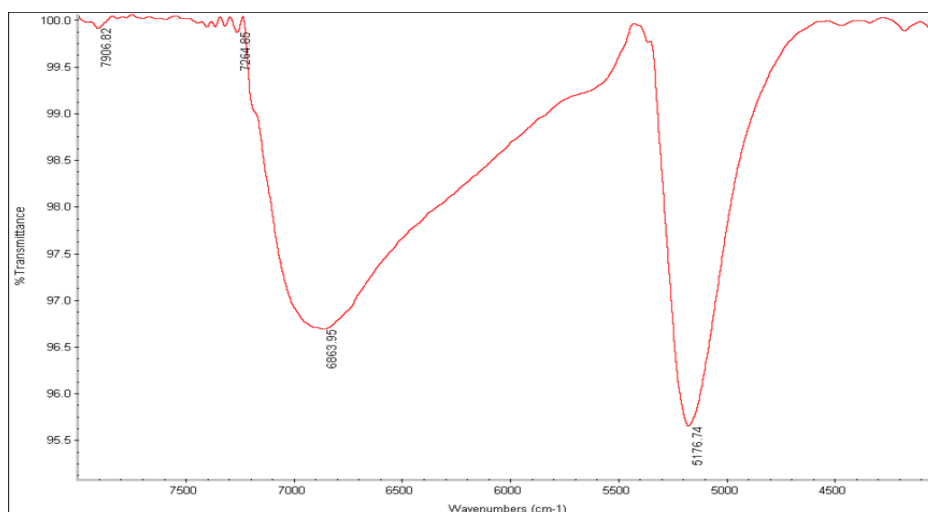
اختلاف بین تیمارهای مختلف، براساس طرح آماری فاکتوریل کاملاً تصادفی با استفاده از تحلیل واریانس (ANOVA) در سطح احتمال پنج درصد تعیین شد.



شکل ۱- طیف مادون قرمز نزدیک نمونه شیر خالص

تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر در محدوده عدد موجی ۵۱۷۶/۷۴ و ۶۸۶۳/۹۵ به ترتیب با شدت جذب ۹۵/۶ و ۹۶/۷ دارای دو پیک شاخص می باشد.

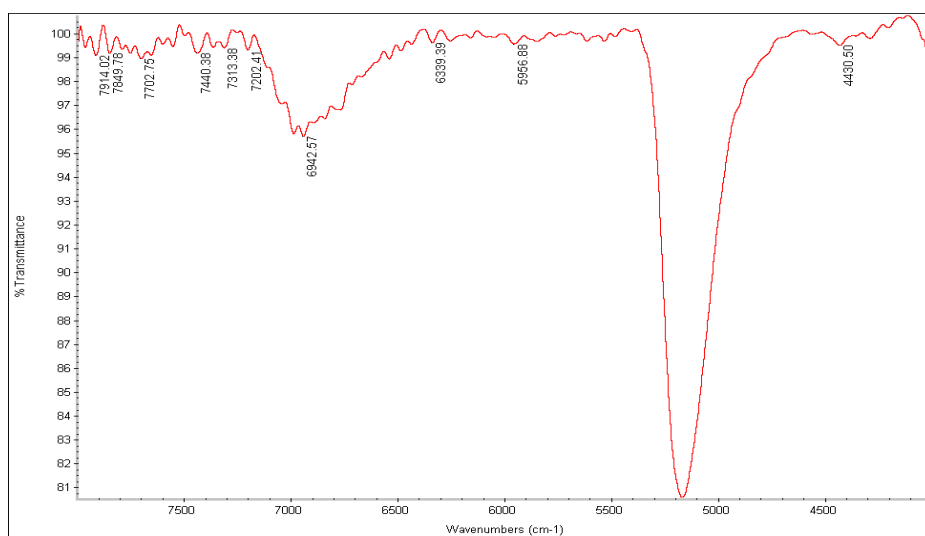
طیف مادون قرمز نزدیک تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر در طیف مادون قرمز نزدیک تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر در شکل ۲ مورد بررسی قرار گرفته است. طبق این طیف،



شکل ۲- طیف مادون قرمز نزدیک تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر

تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر در محدوده عدد موجی ۵۱۸۴/۲۲ و ۶۹۴۲/۵۷ به ترتیب با شدت جذب ۸۰/۸ و ۹۵/۸ دارای دو پیک شاخص می‌باشد.

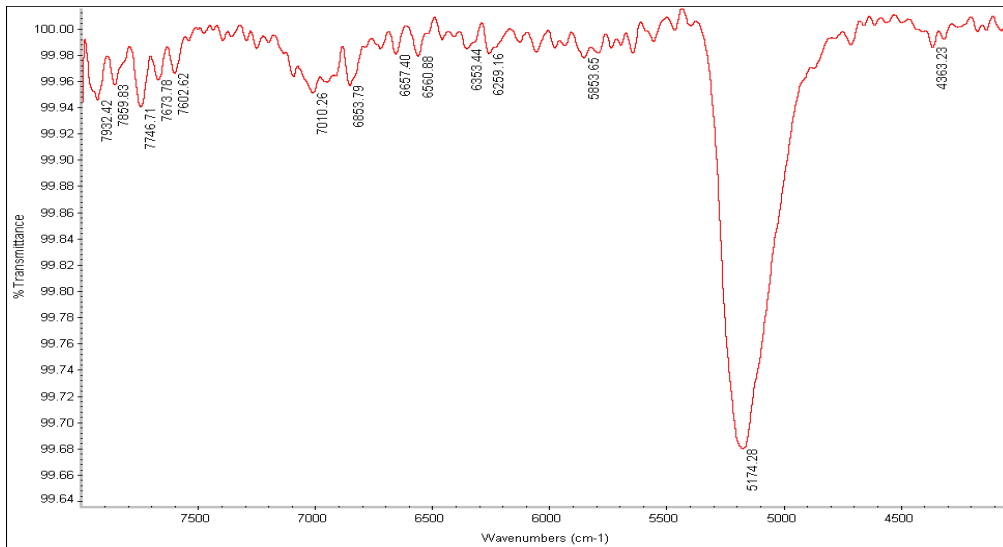
طیف مادون قرمز نزدیک تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر در طیف مادون قرمز نزدیک تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر در شکل ۳ مورد بررسی قرار گرفته است. طبق این طیف،



شکل ۳- طیف مادون قرمز نزدیک تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر

تتراسایکلین ۱۵۰ میکرولیتر در محدوده عدد موجی ۵۱۷۴/۲۸ با شدت جذب ۹۹/۶ دارای یک پیک شاخص می‌باشد.

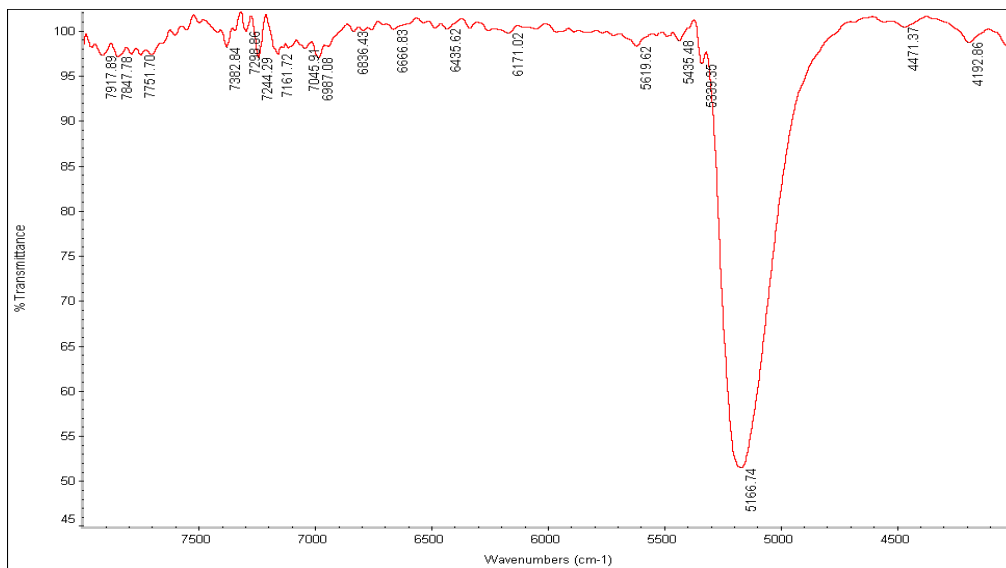
طیف مادون قرمز نزدیک تتراسایکلین ۱۵۰ میکرولیتر در طیف مادون قرمز نزدیک تتراسایکلین ۱۵۰ میکرولیتر در شکل ۴ مورد بررسی قرار گرفته است. طبق این طیف،



شکل ۴- طیف مادون قرمز نزدیک تتراسایکلین ۱۵۰ میکرولیتر

طبق این طیف، نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر در محدوده عدد موجی ۵۱۶۶/۷۴ با شدت جذب ۵۳/۴ دارای یک پیک شاخص می‌باشد.

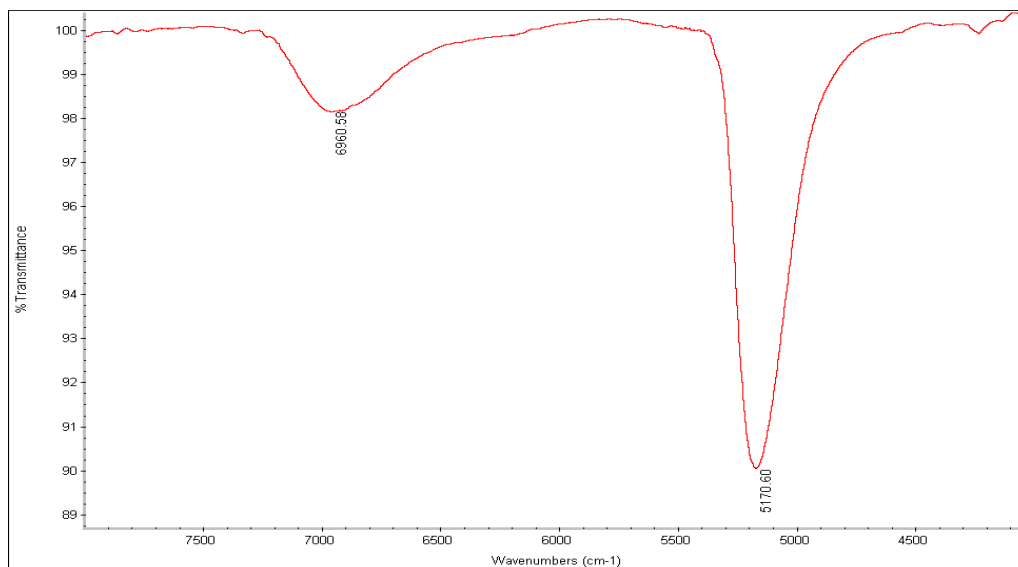
طیف مادون قرمز نزدیک نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر
طیف مادون قرمز نزدیک نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر در شکل ۵ مورد بررسی قرار گرفته است.



شکل ۵- طیف مادون قرمز نزدیک نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر

طبق این طیف، نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر در محدوده عدد موجی ۵۱۷۰/۶۰ و ۶۹۶۰/۵۸ به ترتیب با شدت جذب ۹۰/۴ و ۹۸/۳ دارای دو پیک شاخص می‌باشد.

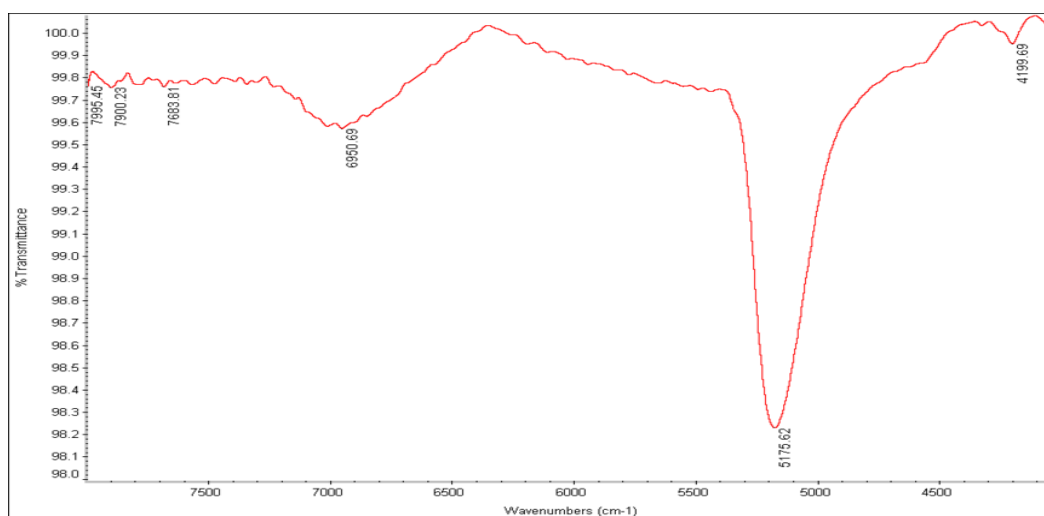
طیف مادون قرمز نزدیک نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر
طیف مادون قرمز نزدیک نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر در شکل ۶ مورد بررسی قرار گرفته است.



شکل ۶- طیف مادون قرمز نزدیک نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر

طبق این طیف، نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر در محدوده عدد موجی ۵۱۷۵/۶۲ و ۶۹۵۰/۶۹ به ترتیب با شدت جذب ۹۸/۲ و ۹۹/۶ دارای دو پیک شاخص می‌باشد.

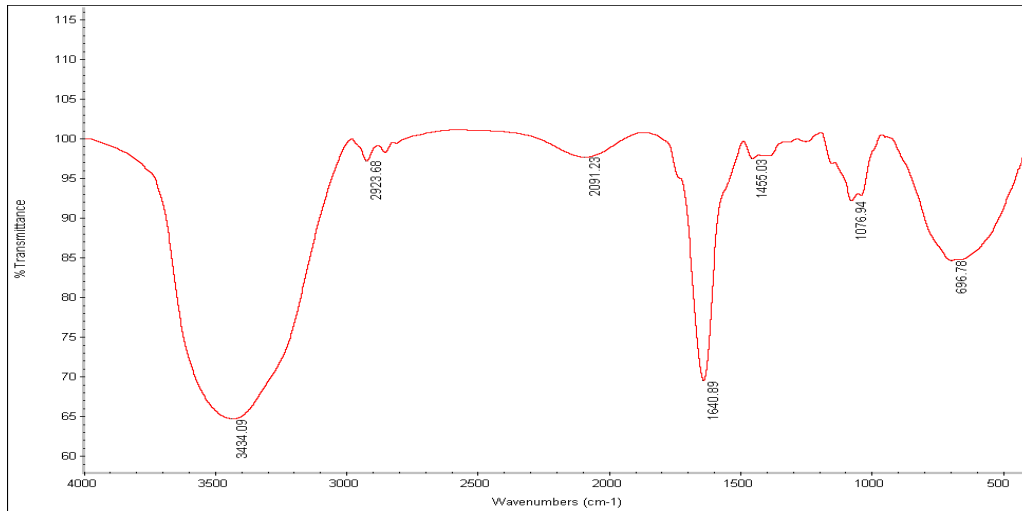
طیف مادون قرمز نزدیک نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۱۵۰ میکرولیتر در شکل ۷ مورد بررسی قرار گرفته است.



شکل ۷- طیف مادون قرمز نزدیک نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۱۵۰ میکرولیتر

در محدوده عدد موجی ۱۶۴۰/۸۹، ۶۹۶/۷۸ و ۳۴۳۴/۰۹ به ترتیب با شدت جذب ۷۱/۵، ۸۵/۴ و ۶۵/۲ دارای سه پیک شاخص می‌باشد.

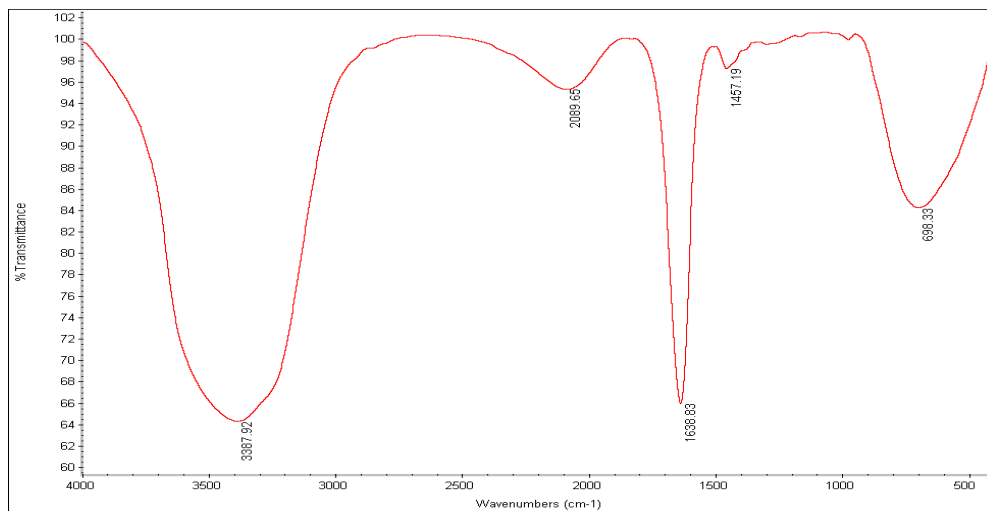
آنالیز مادون قرمز میانه (FT-MIR) طیف مادون قرمز میانه نمونه شیر خالص طیف مادون قرمز میانه نمونه شیر خالص در شکل ۸ مورد بررسی قرار گرفته است. طبق این طیف، نمونه شیر خالص



شکل ۸- طیف مادون قرمز میانه نمونه شیر خالص

تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر در محدوده عدد موجی ۶۹۸/۳۳، ۱۶۳۸/۸۳ و ۳۳۸۷/۹۲ به ترتیب با شدت جذب ۸۴/۳، ۶۷/۳ و ۶۴/۱ دارای سه پیک شاخص می‌باشد.

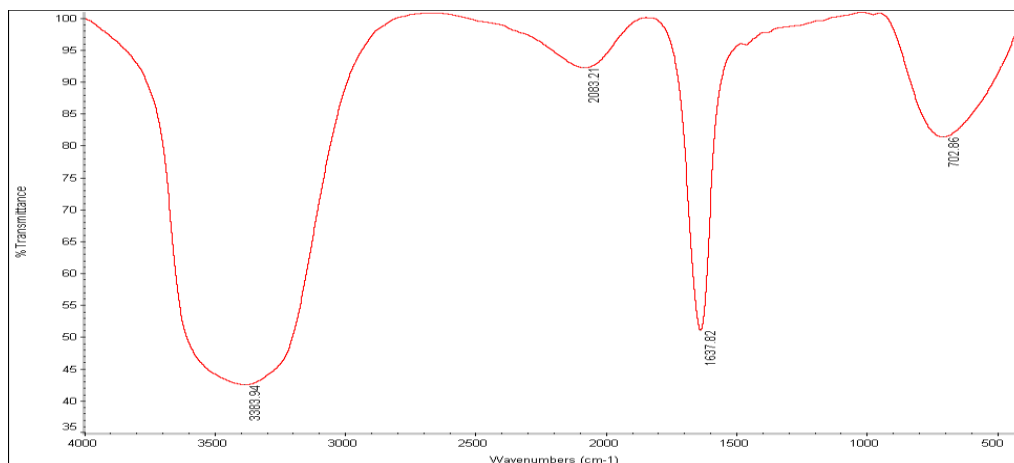
طیف مادون قرمز میانه تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر در طیف مادون قرمز میانه تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر در شکل ۹ مورد بررسی قرار گرفته است. طبق این طیف،



شکل ۹- طیف مادون قرمز میانه تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر

تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر در محدوده عدد موجی ۷۰۲/۸۶، ۱۶۳۷/۸۲ و ۳۳۸۳/۹۴ به ترتیب با شدت جذب ۸۲/۱، ۵۱/۵ و ۴۲/۸ دارای سه پیک شاخص می‌باشد.

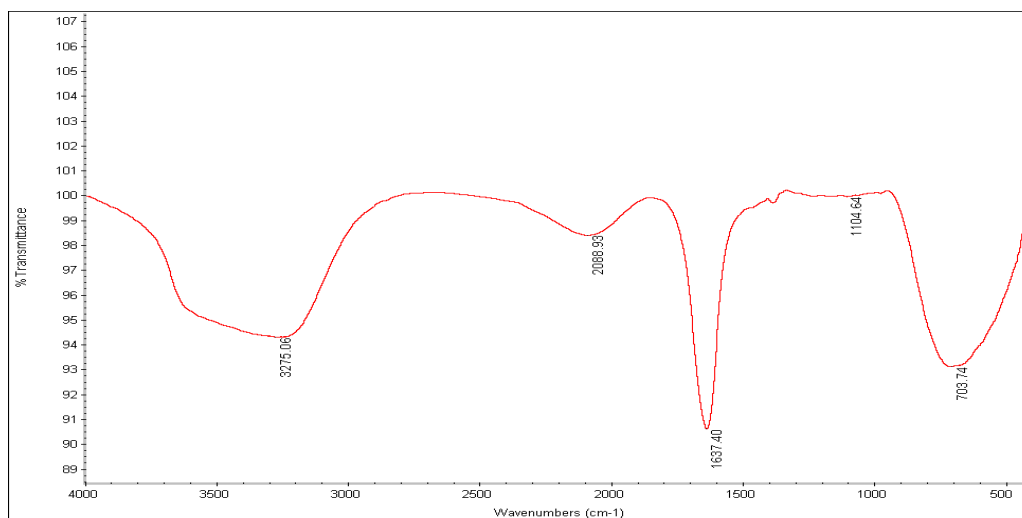
طیف مادون قرمز میانه تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر در طیف مادون قرمز میانه تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر در شکل ۱۰ مورد بررسی قرار گرفته است. طبق این طیف،



شکل ۱۰- طیف مادون قرمز میانه تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر

تتراسایکلین ۱۵۰ میکرولیتر در محدوده عدد موجی ۷۰۳/۷۴، ۱۶۳۷/۴۰ و ۳۲۷۵/۰۶ به ترتیب با شدت جذب ۹۱، ۹۳/۵ و ۹۴/۲ دارای سه پیک شاخص می‌باشد.

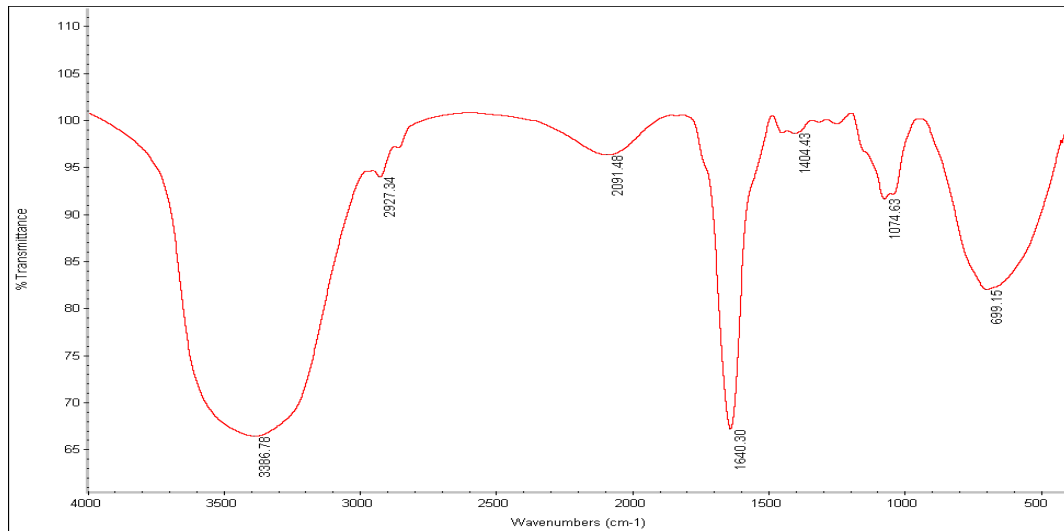
طیف مادون قرمز میانه تتراسایکلین ۱۵۰ میکرولیتر در طیف مادون قرمز میانه تتراسایکلین ۱۵۰ میکرولیتر در شکل ۱۱ مورد بررسی قرار گرفته است. طبق این طیف،



شکل ۱۱- طیف مادون قرمز میانه تتراسایکلین ۱۵۰ میکرولیتر

طبق این طیف، نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر در محدوده عدد موجی ۶۹۹/۱۵، ۱۶۴۰/۳۰ و ۳۳۸۶/۷۸ به ترتیب با شدت جذب ۸۳/۳، ۶۷/۵ و ۶۷ دارای سه پیک شاخص می‌باشد.

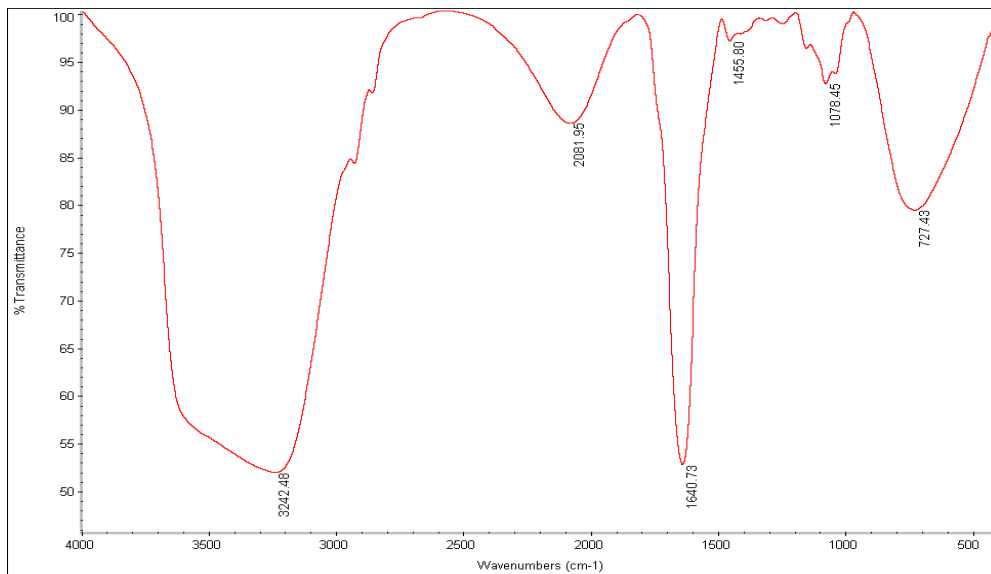
طیف مادون قرمز میانه نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر در طیف مادون قرمز میانه نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر در شکل ۱۲ مورد بررسی قرار گرفته است.



شکل ۱۲- طیف مادون قرمز میانه نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر

است. طبق این طیف، نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر در محدوده عدد موجی ۷۲۷/۴۳، ۱۶۴۰/۷۳ و ۳۲۴۲/۴۸ به ترتیب با شدت جذب ۷۹/۴، ۵۳/۸ و ۵۳/۱ دارای سه پیک شاخص می‌باشد.

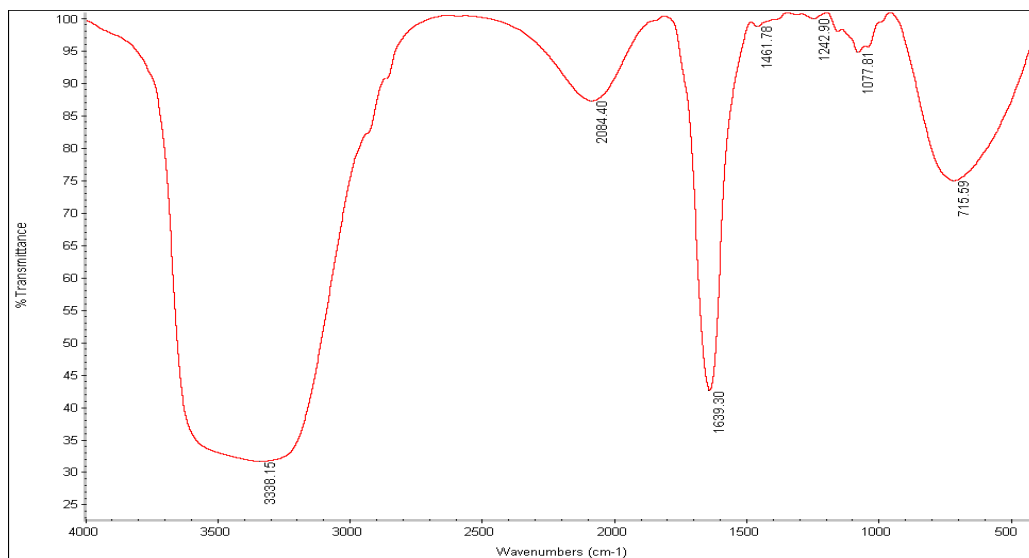
طیف مادون قرمز میانه نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر در شکل ۱۳ مورد بررسی قرار گرفته



شکل ۱۳- طیف مادون قرمز میانه نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر

است. طبق این طیف، نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۱۵۰ میکرولیتر در محدوده عدد موجی ۷۱۵/۵۹، ۱۶۳۹/۳۰ و ۳۳۳۸/۱۵ به ترتیب با شدت جذب ۷۵، ۴۳/۴ و ۳۱/۸ دارای سه پیک شاخص می‌باشد.

طیف مادون قرمز میانه نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۱۵۰ میکرولیتر در شکل ۱۴ مورد بررسی قرار گرفته

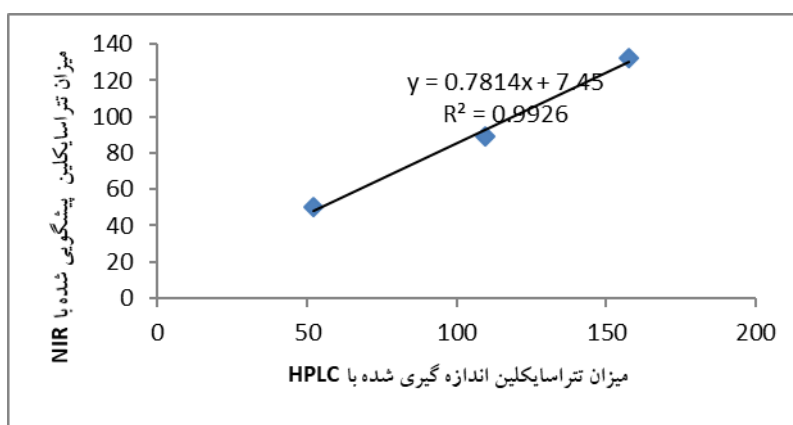


شکل ۱۴- طیف مادون قرمز میانه نمونه شیر حاوی تتراسایکلین ۱۵۰ میکرولیتر

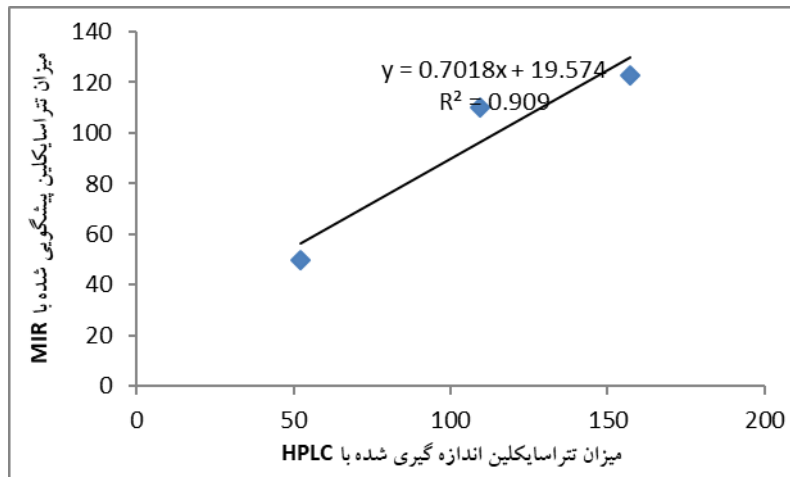
پیک ها و نتایج بدست در جدول ۱ و نتایج پیشگویی
 منحنی های کالیبراسیون میزان تتراسایکلین به کمک
 MIR و NIR در شکل های ۱۵ و ۱۶ نمایش داده شده
 است.

جدول ۱- معرفی پیک های در نظر گرفته شده و نتایج آماری بدست آمده

روش	محدوده پیک مورد بررسی (cm^{-1})	R^2	RMSEP
NIR	۵۲۰۰ - ۵۱۰۰	۰/۹۹	۱۸/۶۰
	۶۹۵۰ - ۶۸۵۰		
	۷۵۰ - ۶۵۰		
MIR	۱۷۰۰ - ۱۶۰۰	۰/۹۰	۲۰/۰۶
	۳۴۰۰ - ۳۳۰۰		



شکل ۱۵- نمودار کالیبراسیون و نتایج پیشگویی میزان تتراسایکلین در شیر با روش NIR (ppb)



شکل ۱۶- نمودار کالیبراسیون نتایج پیشگویی میزان تتراسایکلین در شیر با روش MIR (ppb)

استاندارد، کنترل و نمونه های مورد آزمایش اندازه گیری شد. میانگین جذب استانداردها در برابر غلظت، رسم و از معادله خطی رسم شده (منحنی استاندارد) برای تعیین غلظت نمونه های مورد آزمایش استفاده گردید. نتایج آزمون کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد که شیر های مورد استفاده به عنوان شاهد دارای مقادیر کمی باقی مانده تتراسایکلین بودند که موجب خطا در اندازه گیری تتراسایکلین نمونه ها می گردید (جدول ۲).

آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

نتایج حاصل از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی نشان داد که هر ۴ غلظت تتراسایکلین مورد آزمایش به طور توأم استخراج نمی شوند و در کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، به خوبی از هم جدا نمی شوند و این مساله ضعف این روش را نشان می دهد. البته این روش از حساسیت مناسب، جهت نشان دادن مقادیر تتراسایکلین ها در حد MRL (Maximum Residue Limit/Level) یا پایینتر برخوردار بود. میانگین جذب برای هر یک از نمونه های

جدول ۲- مقادیر تتراسایکلین به دست آمده برای هر یک از نمونه (برحسب میکروگرم در کیلوگرم) در آزمون کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

ردیف	نمونه	میزان تتراسایکلین
۱	شیر خام	۳/۱۷±۰/۲۹
۲	تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر	۵۰/۴۶±۰/۳۳
۳	تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر	۹۸/۴۰±۰/۱۸
۴	تتراسایکلین ۱۵۰ میکرولیتر	۱۵۹/۲۳±۰/۲۰
۵	شیر حاوی تتراسایکلین ۵۰ میکرولیتر	۵۲/۰۷±۰/۵۲
۶	شیر حاوی تتراسایکلین ۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۹/۵۵±۰/۰۸
۷	شیر حاوی تتراسایکلین ۱۵۰ میکرولیتر	۱۵۷/۲۹±۰/۴۳

بحث

فراورده های لبنی روش های سریعی همچون فرا صوت، جذب ماکروویو، تشدید مغناطیس هسته (NMR) و طیف سنجی مادون قرمز نزدیک (NIR) وجود دارد. در میان این روش ها، طیف سنجی مادون قرمز مورد توجه بوده و در بخش های مختلف صنایع لبنیات کاربرد وسیعی پیدا کرده

براساس بیشینه مقدار مجاز باقی مانده آنتی بیوتیک های دامی در شیر گاو در ایران، روش های مورد استفاده باید از دقت لازم برای شناسایی ترکیبات آنتی بیوتیکی برخوردار باشند. برای اندازه گیری غیر مخرب آنتی بیوتیک ها در

با توجه به ساختار تتراسایکلین و وجود حلقه های آروماتیک، انتظار می رود با افزودن این آنتی بیوتیک به نمونه شیر بیشترین تغییرات در دامنه فرکانس ۳۰۱۰ تا ۳۱۰۰ و ۶۹۰ تا ۹۰۰ رخ دهد. همچنین با مقایسه نمونه شاهد با نمونه های حاوی تتراسایکلین، بیشترین تغییرات طیف مادون قرمز نزدیک در محدوده عدد موجی ۵۲۰۰ تا ۵۰۰۰ و ۷۰۰۰ تا ۶۸۰۰ و تغییرات طیف مادون قرمز میانه در محدوده عدد موجی ۷۰۰ تا ۶۰۰، ۱۷۰۰ تا ۱۵۰۰ و ۳۴۰۰ تا ۳۲۰۰ رخ می دهد (جدول ۱). بر این اساس برای رسم نمودارهای کالیبراسیون، از روش استاندارد خارجی استفاده شد. بدین منظور در طیف NIR و MIR نمونه های معلوم، یک پیک جذبی به عنوان شاخص تتراسایکلین و یک پیک جذبی به عنوان شاخص شیر انتخاب گردید. با مقایسه این دو طیف، پیک های شاخص هر دو ماده به گونه ای انتخاب شدند که محل جذب آن ها با یکدیگر همپوشانی نداشته، شدت آنها نیز به راحتی قابل اندازه گیری باشد (Duray et al., 1997). با مشاهده نمودارهای ۱۵ و ۱۶ و مقایسه طیف ها در سه حالت شیرخالص، تتراسایکلین خالص و شیر حاوی تتراسایکلین می توان به این نتیجه دست یافت که شکل طیف برای آنها متفاوت بوده و در طول موج های مختلفی بیشینه (ماکزیمم) دارند. تمام طیف ها باید از یک الگو پیروی نمایند. این نتایج با نتایج سایر محققان مطابقت دارد (He et al., 2010; Sivakesava and Irudayaraj, 2002). با استفاده از این پیشگویی ها میزان تتراسایکلین به کمک روش NIR و MIR به ترتیب با ضریب همبستگی ۰/۹۹ و ۰/۹۰ و میزان خطای RMSEP ۱۸/۶۰ و ۲۰/۰۶ پیشگویی شد. ضریب همبستگی طیف مادون قرمز نزدیک با نتایج لی و همکاران در سال (۲۰۱۰) که بررسی شیر تقلب شده با کره گیاهی و نشاسته با روش طیف مادون قرمز نزدیک بود مطابقت داشت. دراکوا و همکاران (۲۰۰۹) تعیین مقدار آنتی بیوتیک پنی سیلین و گلوکز اسیلین با طیف

است (Rodriguez-Saona et al., 2001). در سال های اخیر از روش های طیف سنجی مادون قرمز به عنوان یک روش غیرمخرب و سریع به صورت گسترده ای در ارزیابی کیفیت و کمیت مواد غذایی استفاده شده است (CAO et al., 2012). با توجه به موضوعات مطرح شده، استفاده از NIR و MIR به عنوان ابزاری جهت آنالیز کمی، مستلزم اثبات کارایی این سیستم در جوابگوئی روش در غلظت های مختلف و ارتباط خطی در بین آن ها می باشد. به عبارتی دیگر این سیستم نیز می بایست از قانون بیرلامبرت تبعیت نماید. در این روش علاوه بر غلظت مواد، نحوه تهیه مواد نشان می دهد که اطلاع از همبستگی نقاط در طیف سنج مادون قرمز ضروری بوده و هر روش نمی تواند به عنوان روشی مناسب بکار رود. همانند استفاده از طیف های HPLC، ایجاب می کند که آزمایش کننده با اندازه گیری ارتفاع و یا سطح زیر منحنی باندهای جذبی خاص همبستگی نقاط بدست آمده از غلظت های مختلف را بررسی نماید و نشان دهد که در کدام روش ضریب همبستگی (R^2) تا چه حدی به عدد ۱ نزدیک است و ضریب تغییرات (CV) و یا RMSEP آزمایش در چه حدودی می باشد. این روش دارای مزایایی است که از جمله می توان به سرعت بالا و صرف وقت کمتر اشاره کرد. طیف سنجی مادون قرمز در مقایسه با روش های مخرب هزینه کمتری دارد زیرا برای انجام آزمایش غیر از مصرف برق به دیگر مواد مانند معرف یا واکنشگرهای شیمیایی احتیاج نیست و می توان با تدوین یک مدل کالیبراسیون تعداد زیادی نمونه را مورد آنالیز قرار داد و نمونه ها احتیاجی به هیچ آماده سازی قبل از انجام آزمایش ندارند. طیف سنجی مادون قرمز می تواند اطلاعات زیادی در مورد کیفیت مواد غذایی در اختیار ما قرار دهد، همچنین می توان میزان ترکیباتی با ۰/۱ درصد غلظت را نیز به کمک این روش به صورت غیر مخرب و سریع تعیین نمود (Stolker and Brinkman, 2005).

که در تحقیق فوق تنها یک نوع آنتی بیوتیک دامی مورد بررسی قرار گرفت و از آنجایی که احتمال همپوشانی پیک های جذبی تتراسایکلین با سایر آنتی بیوتیک ها در نمونه های واقعی وجود دارد و با توجه به میزان خطای پیشگویی هر دو روش، اصولاً استفاده از روش MIR برای موادی که تجزیه کمی آن ها مدنظر می باشد در مقایسه با روش های اندازه گیری توسط HPLC از کارایی کمتری برخوردار است و بهتر است از این روش منحصر در تجزیه کیفی مواد استفاده شود. از طرف دیگر روش NIR نسبت به روش HPLC دارای مزایایی است که عبارتند از: سرعت بالا، غیر مخرب بودن، هیچ آماده سازی خاصی برای نمونه لازم نیست. با توجه به میزان خطای کمتر NIR و مزایای این روش شناسایی نسبت به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا که به آن اشاره گردید، می توان این روش را جایگزین مناسبی برای روش های مخرب اندازه گیری تتراسایکلین در شیر معرفی نمود.

منابع

1. Ben-gera I., and Norris K.h.1968. determination of moisture content in soybeans by direct spectrophotometry. *Isr. J. Agric. Res.* 18: 125-132.
2. Boatto G., Pau A., Palomba, M., Arenare L., Cerri R. 1999. Monitoring of oxytetracycline in ovine mil by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 20 (1-2): 321- 6. PubMed PMID: 10704038.
3. Cen H., and He Y. 2007. Theory and application of near infrared reflectance spectroscopy in determination of food quality. *Trends in Food Sci & Technol.* 18: 72-83.
4. CAO J., ZHAO W. q., WEI Z. d. 2012. Rapid Detection of Plant-protein in Adulterated Raw Goat's Milk by Near Infrared Spectroscopy. *Academic Periodical of Farm Products Processing.* 3, 037 .
5. Dabbagh-Moghadam A., Tayibi L., Falahat-Pisheh H.R., Mahmoudian M.,

مادون قرمز نزدیک را مورد بررسی قرار دادند، که ضریب همبستگی برای پنی سیلین ۰/۹۵ و برای گلوکز اسیلین ۰/۸۷ بود. آن ها نتیجه گرفتند که بیشینه مقدار مجاز پنی سیلین را می توان با این روش تعیین کرد. ضریب همبستگی گزارش شده از نتایج تحقیق آنها کمتر از نتایج گزارش شده از تحقیق ما بود. ضریب همبستگی در نتایج سیواکساوا و همکاران برای طیف مادون قرمز نزدیک و مادون قرمز میانه به ترتیب ۰/۸۵ و ۰/۸۷ بود. در مطالعه حاضر با اینکه ضریب همبستگی هر دو روش بالا می باشد اما میزان خطای روش پیشگویی برای هر دو روش مخصوصاً روش MIR برخلاف نتایج سیواکساوا و همکاران (۲۰۱۵) بالا می باشد. هاشمی و ملائکه در سال ۱۳۷۹ به آنالیز کمی بلوکرها با استفاده از روش طیف تبدیل فوری مادون قرمز و مقایسه با روش HPLC پرداختند و نشان دادند که استفاده از طیف سنج FT-IR جهت آنالیز کمی سایمتیدین، رانیتیدین و فاموتیدین به صورت خالص و همچنین در قرص های مربوطه امکان پذیر می باشد که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. نوارچیان و همکاران در سال ۱۳۸۷ به بررسی مونومر باقیمانده در نمونه های تهیه شده از آکریل آکروپاس با استفاده از روش طیف تبدیل فوری مادون قرمز پرداختند. ۵ محلول با غلظت های مختلف وزنی از مونومر متیل متاکریلات تهیه کردند. میانگین میزان مونومر باقیمانده در نمونه تهیه شده از آگریل آکروپاراس در محدوده استاندارد ایزو می باشد. بررسی آماری نشان داد که تفاوت معنی دار مثبتی بین نتایج بدست آمده در این آزمون با استاندارد ایزو وجود دارد که با نتایج تحقیق ما مطابقت داشت.

نتیجه گیری کلی

مشکلات بهداشتی و کاهش حساسیت در برابر درمان آنتی بیوتیکی نگرانی در مورد وجود باقیمانده های دارویی در مواد غذایی را به حدی افزایش داده است. به همین دلیل سازمان های ناظر بر ایمنی غذا در سطح جهان، بر عاری بودن مواد غذایی از این باقیمانده ها تأکید دارند. از آنجایی

- tetracycline family antibiotics in pasteurized milk distributed in Tehran using high performance liquid chromatography (HPLC), scientific research journal of the University of Medical Sciences of the Islamic Republic of Iran, 11(4): 323-318.
7. Duray S.J., Gilbert, J.L., Lautenschlager, E.P. 1997. Comparison of chemical analysis of residual monomer in a chemical-cured dental acrylic material to an FTIR method. *Dental Materials*. 13: 240-245.
 8. Fallahzadeh, A.H., Mohsenzadeh M., Asadpour H.R. 2015. Determining the residual amount of gentamicin in raw milk delivered to Mashhad pasteurized milk factory and pasteurized milk obtained from the same raw milk, *Agricultural Sciences and Industries*. 20(7): 189-183.
 9. Hashemi D., Malaeke B. 2000. Quantitative analysis of H₂ blockers by infrared spectroscopy (FT-IR) and its comparison with HPLC method, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 3: 25-32.
 10. He B., Liu R., Yang R., Xu K. 2010. Adulteration detection in milk using infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation analysis. In: *BiOS*, pp. 75720P-75720P-75729, International Society for Optics and Photonics.
 11. Katla A.-K., Kruse H., Johnsen G., Herikstad H. 2001. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Inter J Food Microbiol*. 67: 147-152.
 12. Le Breton M. L., Savoy-Perroud M.C. Diserens J. M. 2006. Validation and comparison of the Copan Milk Test and Delvotest SP-NT for the detection of antimicrobials in milk. 5th International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, Antwerp 16-19 May.
 13. Meyer M., Bumgarner J., Varns J.L., Daughtridge J., Thurman E., Hostetler K.A. 2000. Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding
 - Kosari, N., Akbarin H., Sabzikar A. 2012. Investigating the residual amount of operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry. *Science of the Total Environment*. 248: 181-187.
 14. Mortazavi, S.A., Rouhani, M., 2000. Technology of milk and dairy products, Mashhad Ferdowsi University Press, Mashhad, 63-74, 112-96.
 15. Movasag M.H. 2012. Identification of antibiotic residues in raw cow's milk in Ilakhchi region (southwest of Tabriz) in the spring of 2012, *Food Science and Nutrition*. 89-94.
 16. Popelka D., Nagy J. 2004. Comparison of sensitivity of various screening assays and liquid chromatography technique for penicillin residue detection in milk. *J Bull Vet Inst Pulawy*. 48: 273-276.
 17. Rodriguez-Saona L.E., Fry F.S., McLaughlin M.A., Calvey E.M. 2001. Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy. *Carbohydrate Research*. 336: 63-74.
 18. Stolker A., Brinkman U.T. 2005. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review. *J Chromatogr A*. 1067: 15-53.
 19. Sivakesava S., Irudayaraj J. 2002. Rapid determination of tetracycline in milk by FT-MIR and FT-NIR spectroscopy. *J dairy Sci*. 85: 487-493.
 20. Shao Y., Gomez H., Pereir, G., Qiu Z., and Zhag Y. 2007. Visible/near infrared spectrometric technique for nondestructive assessment of tomato 'Heatwave' (*Lycopersicum esculentum*) quality characteristics. *J Food Engin*. 85: 672-678.

Evaluation of Tetracycline Antibiotic Level in Raw Milk using Infrared Fourier Transform Spectrum

Ghanbari A^{1*}, Akhondzadeh Basti A²

1. M.Sc. Graduated, Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Food Science and Technology, Tehran University, Tehran, Iran.

*Corresponding author: ghanbari238@gmail.com

Received: 11 March 2021

Accepted: 31 May 2021

Abstract

Due to the consumption of milk in the daily diet of humans as one of the main food groups, the health of this product is of particular importance. In this study, FTNIR and FTMIR were used to evaluate the amount of tetracycline in raw milk and compared with the reference HPLC method. Forty milk samples were prepared with different concentrations of tetracycline 0, 50, 100 and 150 ppb. Also, by comparing the control sample with the samples containing tetracycline, the most changes in the near-infrared spectrum occur in the wavelength range of 5200 to 5000 and 7000 to 6800 and the changes of the middle infrared spectrum occur in the wavelength range of 700 to 600, 1700 to 1500 and 3400 to 3200 cm^{-1} . Using these predictions, the amount of tetracycline was predicted by NIR and MIR methods with correlation coefficients of 0.99 and 0.90 and RMSEP error rates of 18.60 and 20.06, respectively. Although the correlation coefficient of both methods is high, but the error rate of the prediction method is high for both methods, especially the MIR method. But the results of the NIR spectrum are closer to the reference method (HPLC) and can replace this method. Due to the lower error rate of NIR and the advantages of this identification method compared to High Performance Liquid Chromatography, this method can be introduced as a suitable alternative to destructive methods of measuring tetracycline in milk.

Keywords: Fourier transform infrared spectrum, Tetracycline, Raw milk.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2022 Shahrekord Branch, Islamic Azad University

