

مطالعه باقیمانده داروی فلورفنیکل در گوشت مرغ عرضه شده در استان چهارمحال و بختیاری با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

مازیار محمدی^۱، عزت اله فتحی هفشجانی^{۲*}، مجید غلامی آهنگران^۳

۱- دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۲- استادیار بخش بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
۳- دانشیار بخش بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

دریافت مقاله: ۰۲ بهمن ۱۳۹۸، ۲۰ اسفند ۱۳۹۸، پذیرش نهایی: ۲۵ اسفند ۱۳۹۸

چکیده

در بهار ۱۳۹۵ تعداد ۲۵ نمونه گوشت مرغ از کشتارگاه‌های شهرکرد جمع‌آوری شد و برای بررسی باقیمانده فلورفنیکل در گوشت با روش HPLC مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه‌ها پس از آماده‌سازی و مخلوط شدن با اسید کلریدریک و انتقال به کارتریج، استحصال شد و پس از خالص‌سازی در حجم ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق گردید. نتایج نشان داد که از مجموع ۲۵ نمونه ۵ نمونه دارای باقیمانده فلورفنیکل بود که یک نمونه از نظر مقداری بالاتر از حد مجاز وجود بقایای فلورفنیکل در گوشت مرغ بود. حداقل غلظت فلورفنیکل در نمونه‌های مورد بررسی ۱۵/۶ میکروگرم در کیلوگرم و حداکثر غلظت ۱۱۹/۰۷ میکروگرم در کیلوگرم می‌باشد. به‌طور کلی، با توجه به مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها در پرورش طیور، بهتر است کنترل بیشتری در مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها جهت کاهش باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در گوشت طیور انجام شود.

واژگان کلیدی: گوشت مرغ، باقیمانده دارویی، HPLC، فلورفنیکل

مقدمه

عوامل بیماری‌زای باکتریایی از مهم‌ترین آلودگی‌های عفونی در مراکز پرورش طیور هستند. این بیماری‌ها از دو جنبه واجد اهمیت هستند. از یک طرف با ایجاد عوارض و بیماری در طیور باعث تلفات و کاهش راندمان تولید می‌شوند و می‌توانند هزینه‌های تولید را افزایش دهند و از طرفی با انتقال ژن‌های مقاومت و بقایای دارویی در گوشت و تخم‌مرغ سلامت مصرف‌کنندگان را در معرض خطر قرار دهند (۱). عموماً بیماری‌های باکتریایی با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در مقاطعی از دوره پرورش کنترل شوند اما گاهی اوقات در سویه‌های حاد و یا مقاوم برای کنترل مناسب بیماری لازم می‌شود چند دوره از آنتی‌بیوتیک‌های متنوع، مصرف شود (۲).

آنتی‌بیوتیک‌ها مهم‌ترین گروه مواد ضد میکروبی هستند که به‌طور وسیع برای انسان و حیوان تجویز می‌گردند. سالانه بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ هزار تن آنتی‌بیوتیک در سطح جهان تولید می‌شود (۳) که براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت نیمی از آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده جهان در پزشکی و نیم دیگر در امور دامپزشکی، کشاورزی و پرورش آبزیان مصرف می‌شوند. متأسفانه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در دامپزشکی منجر به برجا گذاشتن باقیمانده‌هایی در گوشت، شیر و تخم‌مرغ می‌گردد (۴).

متأسفانه انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها بدون در نظر گرفتن عوارض جانبی و دوره دفع دارویی، علاوه بر دامپزشکان، توسط تکنسین‌های دامپزشکی و حتی افراد غیرکارشناس شاغل در این حرفه مورد استفاده قرار می‌گیرد که این امر باعث وجود باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیک و دیگر مواد شیمیایی حاصل از متابولیسم آنها در فرآورده‌های دامی می‌گردد (۵).

عدم مراعات دستورات نوشته شده بر روی داروها اخطارها و بالاتر از همه عدم رعایت زمان بین

آخرین مصرف دارو تا زمان ارائه دام به کشتارگاه از عوامل اصلی وجود مقادیر غیر مجاز مواد دارویی در حیوانات مولد غذا هستند (۶).

دسته دارویی فنیکل‌ها آنتی‌بیوتیک‌های جدید و بسیار قوی هستند که در مقابل بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی کارآمد و مؤثرند می‌باشند. فلورفنیکل یکی از مهم‌ترین داروهای این گروه است که امروزه در صنعت طیور بسیار زیاد مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴).

روش‌های مختلفی جهت تعیین باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی وجود دارد. از جمله این روش‌های جداسازی که دارای ضریب اطمینان بالایی هستند روش کروماتوگرافی است (۳). با توجه به گستردگی طیف اثر فلورفنیکل بر روی انواع باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی این دارو بیشتر از سایرین در مراکز پرورش مرغ در آخر دوره استفاده می‌شود. لذا در مطالعه حاضر به بررسی باقیماندگی این داروی پرمصرف در گوشت مرغ‌های عرضه شده در شهرکرد پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: نمونه‌ها از کشتارگاه‌های شهرکرد جمع‌آوری شد. زمان جمع‌آوری نمونه‌ها در فصل بهار و نمونه‌ها از عضله سینه مرغ تهیه گردید. نمونه‌ها به صوت تصادفی از هر واحد ۱۰ هزار قطعه‌ای یک نمونه (۱ و ۲) انتخاب گردید. جمعاً ۲۵ نمونه جمع‌آوری شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها: ۴۰۰ میلی‌گرم از هر نمونه گوشت مرغ با اسید کلریدریک ۰/۱۵ مولار مخلوط شد و پس از نگهداری در دمای ۳۵ درجه سلسیوس با دور ۴۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی صاف و برای انتقال به کارتریج آماده شد.

آزمون سنجش بقایای آنتی‌بیوتیک: ابتدا

مطالعه باقیمانده داروی فلورفنیکل در گوشت ...

مساحت استاندارد و قرار دادن آنها در معادله، غلظت ماده مجهول را به دست می آوریم.

نتایج

آنالیز نمونه‌ها نشان داد ۲۰ درصد از نمونه‌ها (۵ نمونه از ۲۵ نمونه) واجد بقایای فلورفنیکل در عضله مرغ‌های نمونه‌گیری شده بود (جدول ۱). حداقل غلظت فلورفنیکل در نمونه‌های مورد بررسی ۱۵/۶۰ میکروگرم در کیلوگرم و حداکثر غلظت ۱۱۹/۰۷ میلی‌گرم در کیلوگرم بود. میانگین نمونه‌های مثبت ۵۶/۶۴ و میانگین تمامی نمونه‌ها ۱۱/۳۲ می‌باشد. کروماتوگرام یک نمونه مثبت در تصویر ۲ ارائه شده است.

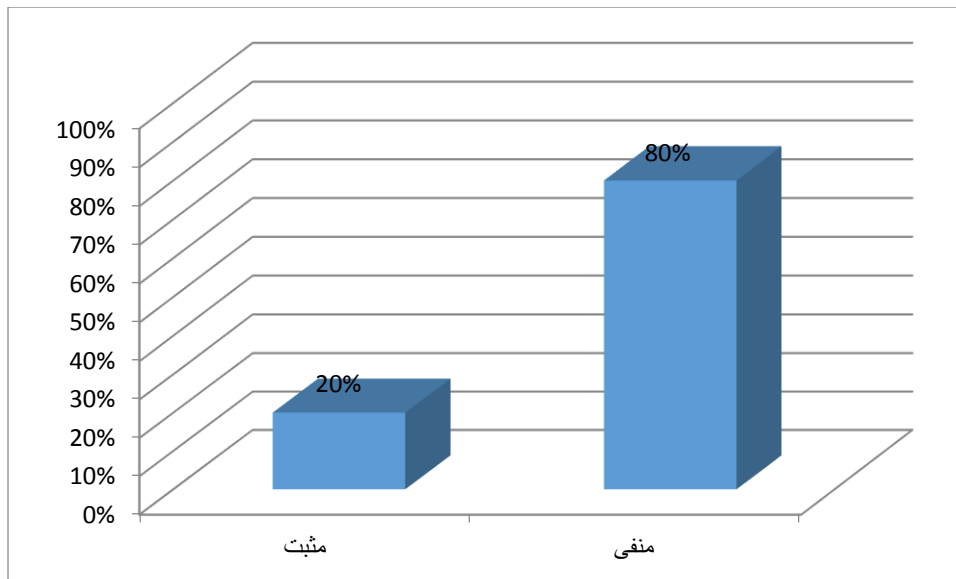
به احتساب MRL برابر ۳۰ میکروگرم در کیلوگرم (بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا) ۱۲ درصد کل نمونه‌ها دارای غلظت فلورفنیکل بالاتر از MRL بودند. (نمودار ۱).

کارتریج با ۵ سی‌سی مخلوط آب و متانول مخصوص Hplc آماده شد سپس مایع آماده شده مرحله قبل روی کارتریج ریخته شد و با آب مخصوص Hplc، سپس با بافر ۰/۲ مولار دی سدیم هیدروژن فسفات (PH=۹) شرکت سیگما آلمان) و در نهایت دوباره با آب مخصوص Hplc شسته شد. پس از خشک کردن کارتریج، به هر کارتریج ۳/۵ میلی‌لیتر متانول اضافه شد تا مواد از کارتریج خارج شود. مایع خارج شده از این مرحله در انکوباتور خشک شد و به آن ۲۵۰ میکرولیتر بافر دی سدیم هیدروژن فسفات اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس و سپس در دور ۴۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. از مایع روئی به‌دست آمده ۲۰ میکرولیتر به دستگاه Hplc تزریق شد.

نمونه استاندارد فلورفنیکل (تهیه شده از شرکت Sigma) را نیز به دستگاه تزریق کرده و با داشتن سطح زیر منحنی ماده مجهول، غلظت استاندارد و

جدول ۱- غلظت فلورفنیکل در نمونه‌های مثبت

غلظت فلورفنیکل (PPM)	RETENTION TIME	AREA	شماره نمونه
۱۵/۸۱	۶/۶۱	۳۲۹۳۱۲۵	۴
۱۱۹/۰۷	۶/۴۱	۲۴۸۰۶۸۰۷	۹
۱۵/۶۰	۶/۶۱	۳۲۵۱۶۳۷	۱۷
۶۹/۷۶	۶/۴۶	۱۴۵۳۳۸۳۲	۱۹
۶۲/۹۶	۶/۵۸	۱۳۱۱۸۵۷۶	۲۰



نمودار ۱- درصد نمونه‌های مثبت و منفی دارای بقایای فلورفنیکل

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج کلی مطالعه حاضر نشان داد که ۲۰ درصد نمونه‌های گوشت مرغ عرضه شده در شهرکرد واجد بقایای فلورفنیکل بود (۵ نمونه از ۲۵ نمونه) و از این تعداد ۲۰ درصد نمونه‌ها (یک نمونه از ۵ نمونه) واجد بقایای بالاتر از حد مجاز استاندارد بودند.

فلورفنیکل یک آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است که با توجه به شیوع بالای بیماری‌های میکروبی و از طرفی ممنوعیت مصرف داروی کلرامفنیکل (هم‌خانواده فلورفنیکل)، بیشتر مورد توجه واقع شده است. مصرف این دارو در سنین بالا گاهی همراه با عدم رعایت زمان پرهیز از مصرف است و این نگرانی را به وجود می‌آورد که به خوبی از بدن حذف نشده و باعث انتقال بقایای این دارو به مصرف‌کنندگان گوشت طیور شود. به همین دلیل در بررسی حاضر به تعیین میزان باقیمانده فلورفنیکل در گوشت مرغ پرداخته شده است. اگرچه مصرف این دارو عوارض ناشی از مصرف کلرامفنیکل مانند مسمومیت خونی را به همراه ندارد اما به دلیل خاصیت لیپوفیلیک

می‌تواند در بافت چربی تجمع یابد و تجمع آن در بدن مصرف‌کننده می‌تواند منجر به بروز مقاومت دارویی شود (۷). بنابراین بررسی باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی یکی از معیارهای ارزیابی بهداشت گوشت طیور عرضه شده می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

در خصوص بررسی بقایای آنتی‌بیوتیکی در گوشت مرغ مطالعات مختلفی صورت گرفته است که عمدتاً با تکنیک چهارپلیت و الیزا به ارزیابی پرداخته‌اند. تکنیک چهارپلیت و الیزا اگرچه می‌توانند بسیار با صرفه‌تر باشند اما از دقت کمتری برخوردار هستند. منفی کاذب مهم‌ترین پیامد استفاده از روش‌های چهارپلیت و الیزا است (۳، ۴). تعیین باقیمانده آنتی‌بیوتیک با روش کروماتوگرافی روش دقیق و حساس است که می‌تواند مقادیر جزئی وجود آنتی‌بیوتیک را در گوشت و یا محصولات فرعی ردیابی کند.

در رابطه با بقایای آنتی‌بیوتیکی در گوشت مرغ مطالعات مختلفی در ایران و سایر کشورها انجام شده است. در ایران تاجیک و همکاران در سال

میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در هر گرم (۷) به عنوان الگو پیروی می‌شود. آنچه مسلم است رعایت زمان پرهیز از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند در کاهش موارد بالاتر از سطح مجاز و ارتقای کیفیت بهداشتی گوشت مرغ مؤثر باشد. در مورد زمان پرهیز از مصرف فلورفینیکل در گوشت و محصولات فرعی مرغ مطالعات زیادی انجام شده است. شریف و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند باقیمانده فلورفینیکل در کبد به طور معنی‌دار بالاتر از سرم و گوشت است و برای دوز ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم به مدت ۵ روز تا ۵ روز و برای دوز ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم به مدت ۵ روز برای ۷ روز میزان باقیمانده فلورفینیکل در عضلات بالاتر از حد مجاز استاندارد خواهد بود (۱۲). به هر حال تا پس از مدت زمان اعلام شده نیز فلورفینیکل در عضلات قابل ردیابی است اما میزان آن پایین تر از حد مجاز است و به مرور زمان به صفر می‌رسد به طوری که Elsenhwy و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیان کردند که باقیمانده فلورفینیکل تا ۸ روز در عضلات قابل ردیابی است و بعد از آن به صفر می‌رسد اما در بافت‌هایی نظیر کبد و کلیه بقایای فلورفینیکل پس از ۸ روز نیز وجود دارد (۱۳). همچنین در بررسی دیگری بیان شده که غلظت فلورفینیکل در سرم، عضلات و کبد در ۳ روز پس از شروع درمان به حداکثر می‌رسد (۱۱) لذا باید به این نکته توجه داشت که به محض شروع درمان صرف نظر از اینکه دوره درمان به پایان رسیده یا خیر، دوره پرهیز از مصرف به شکل کامل رعایت شود.

لذا به‌طور کلی لازم است مراقبت‌های مستمر جهت کنترل بقایای آنتی‌بیوتیک در گوشت به منظور افزایش کیفیت بهداشتی گوشت و جلوگیری از مشکلات عدیده‌ای که ممکن است به دنبال بقایای آنتی‌بیوتیکی رخ دهد صورت بگیرد.

۲۰۰۶ با مطالعه‌ای بر روی گوشت مرغ در استان مازندران با استفاده از روش کروماتوگرافی مشخص نمودند که بیش از ۵۰ درصد نمونه‌های گوشت دارای مقدار قابل ملاحظه‌ای از آنتی‌بیوتیک است (۸). در مطالعه دیگری که در یکی از کشتارگاه‌های اطراف شیراز توسط خان ناظر و همکاران در سال ۱۳۸۷ صورت گرفته گزارش کردند که حدود ۵۴ درصد گوشت مرغ‌های کشتار شده دارای بقایای آنتی‌بیوتیکی است (۹). علاوه بر این در مطالعه دیگری واحدی و همکاران در سال ۱۳۹۰ بیان کردند ۴۴/۵ درصد گوشت مرغ شمال کشور دارای باقیمانده آنتی‌بیوتیکی است (۱۰). در رابطه با بقایای فلورفینیکل در گوشت طیور تاکنون در ایران بررسی صورت نگرفته است. در خارج از کشور یک گزارش از پاکستان وجود دارد. نسیم و همکاران در سال ۲۰۱۴ بقایای فلورفینیکل را با روش کروماتوگرافی در ۱۵۰ نمونه گوشت و کبد مرغ عرضه شده در نواحی مختلف پاکستان بررسی کردند و بیان نمودند که ۸۴ درصد نمونه‌ها دارای باقیمانده فلورفینیکل است که در ۶۷ درصد نمونه‌ها، بقایای فلورفینیکل بالاتر از حد مجاز می‌باشد (۱۱). وجود آلودگی پایین و درصد پایین‌تر آلودگی بیش از حد مجاز در مطالعه اخیر نسبت به مطالعه مشابه در پاکستان بیانگر تفاوت در نوع و الگوی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز سطح بهداشت و دانش تولیدکنندگان طیور است. اگرچه حجم نمونه مورد بررسی در مطالعه اخیر کمتر است و این مطالعه محدود به مرزهای جغرافیایی استان چهارمحال و بختیاری است اما به‌طور کلی، سطح مجاز آنتی‌بیوتیک‌ها در فرآورده‌های خوراکی تا حدودی تحت تأثیر سطح بهداشت یک جامعه است. با توجه به عدم وجود یک استاندارد مشخص برای بیان حد مجاز آنتی‌بیوتیک‌ها در گوشت و فرآورده‌های خوراکی، در شرایط فعلی سطح استاندارد اروپا به

References

- 1- **Dadgarnia M, Gholami-Ahangaran M, Shakerian A.** The determination of enrofloxacin residue in quail meat, in Yazd by HPLC. *Iran Food Hyg.* 2018; 8: 83-90 [In Persian].
- 2- **Teimuri S, Gholami-Ahangaran M, Shakerian A.** The comparison of enrofloxacin residue in chicken and turkey meat, by high performance liquid chromatography in Isfahan province. *Iran Food Hyg.* 2018; 8: 95-100 [In Persian].
- 3- **Salehzadeh F, Salehzadeh A, Rokni N, Madani R, Golchinefar F.** Enrofloxacin residue in Chicken tissues from Tehran slaughterhouses in Iran. *Pak J Nut.* 2007; 6(4): 409-13.
- 4- **Aarostrup FM.** Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005; 96: 271-281.
- 5- **Franco D, Wabb J, Taylor CE.** Antibiotic and Sulphonamide residues in meat: implication for human health. *J Food Protect.* 1995; 53(2): 175-178.
- 6- **Rokni N, Kamkar A, Salehzadeh F, Madani R.** Study on the Enrofloxacin Residues in Chicken Tissues by HPLC. *Iran J Food Sci Technol.* 2007; 4(13): 11-17 [In Persian].
- 7- **Marwa A, Elsenhwy Bakry HH, El-Ahawarby RM, Abou Salem ME, Elham A, Elshewy A.** Residual studies of florfenicol in broiler chicken. *Benha Vet Med J.* 2013; 24(1): 209-217.
- 8- **Tajick MA, Shohreh B.** Detection of Antibiotics Residue in Chicken Meat Using TLC. *Int J Poult Sci.* 2006; 5(7): 611-612.
- 9- **Khan Nazer AH, Hosseinzadeh S, Parvande H.** Determination of antibiotic residues in poultry carcasses using quadruple testing in slaughterhouses around Shiraz. *Iran J Vet Res.* 2008; 54 (3): 79-83 [In Persian].
- 10- **Vahedi N, Motamedi A, Golchin M.** Determination of antibiotic residues in the carcass of industrial poultry by FPT method in Mazandaran province. *Iran J Food Sci Technol.* 2011; 8(1): 65-72 [In Persian].
- 11- **Nasim A, Aslam B, Javed I, Ali A, Muhammad F, Razaa A, Zia-ud-Din S.** Determination of florfenicol residues in broiler meat and liver samples using RP-HPLC with UV-visible detection. *J Sci Food Agric.* 2016; 96: 1284-1288.
- 12- **El-Shafei RA, Eladi AH.** Determination of Florfenicol and Doxycycline Residues in Chickens by Microbiological Assay. *Int J Innov Appl Stud.* 2014; 7(3):1148-1155.
- 13- **Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE.** Diseases of poultry. 11th ed. Iowa: Iowa State University Press; 2013, P: 182-202.

The study of florfenicol residue in chicken meat in Charmahal-va-Bakhtiyari province by high purified liquid chromatography

Mazyar Mohammadi¹, Ezatollah Fathi-Hafshejani^{2*}, Majid Gholami-Ahangaran³

1- Graduated of Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2- Assistance Professor in Poultry Diseases Department, Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3- Associate Professor in Poultry Diseases Department, Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

Receive: January 22, 2020; Revise: March 12, 2020; Accept: March 15, 2020

Summary

In spring 2016, 25 poultry meat samples were collected from slaughterhouses in Shahrekord and tested by HPLC for fluorophenyl residues in meat. The samples were extracted after preparation and mixed with hydrochloric acid and transferred to the cartridge. After purification in 20 µl volume, the samples were injected into HPLC. The results showed that out of 25 samples, 5 samples (20%) had florfenicol residues, one of which had a higher concentration of florfenicol residues in poultry meat. The minimum concentration of florfenicol in the studied samples was 15.6 µg / kg and the maximum concentration was 119.07 µg /Kg. In general, given the widespread use of antibiotics in poultry farming, it is better to have more control over the use of antibiotics, to reduce the antibiotic residues in poultry meat.

Keywords: *Chicken, Drug residue, Florfenicol, HPLC*