

بررسی میزان باقیمانده انروفلوکسازین در تخم مرغ به روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

احسان زایرزاده^۱، محمد کاظم کوهی^{۲*}، آزاده فردی پور^۱، حمید راشدی^۳

۱- موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

۲- بخش سم شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

۳- دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده های فنی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۲۲)

چکیده

انروفلوکسازین آنتی بیوتیک بسیار مهمی است که سالانه در صنعت طیور کشور ایران مصرف بسیار زیادی دارد و باقیمانده این دارو در تخم مرغ های تولیدی می تواند باعث مشکلات عدیده ای شود. در این مطالعه تعداد ۴۰ مرغ تخمگذار نژاد لگهورن مورد بررسی قرار گرفت. مرغها به طور تصادفی به ۴ گروه ده تایی تقسیم شدند. در گروه اول، دوم و سوم به ترتیب به میزان ۲ mg/kg، ۵ mg/kg و ۱۰ mg/kg داروی انروفلوکسازین به روش داخل عضلانی به هر مرغ تزریق شد. گروه چهارم هم به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. همه پرندگان به مدت ۷ روز تحت آزمایش قرار گرفتند. در روزهای ۱ تا ۷ آزمایش و ۳، ۶ و ۹ روز پس از آخرین تزریق، تخم مرغهای تولید شده گروه های چهار گانه جمع آوری شد و مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه ها توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که در اثر افزایش دوز تزریقی انروفلوکسازین، میزان باقیمانده این دارو در تخم مرغ ها افزایش یافت. علاوه بر این میزان باقیمانده دارویی در پایان تزریقات (روز هفتم) در هر سه گروه به بیشترین غلظت رسید. همچنین میزان باقیمانده دارویی در تخم مرغ ها در روز نهم پس از اتمام تزریقات در هر سه گروه به صفر رسید. ولی در روز سوم و ششم در گروه سوم و در روز سوم در گروه دوم باقیمانده داروی انروفلوکسازین قابل تشخیص بود. در نهایت، می توان این گونه نتیجه گیری کرد که احتمالاً هر چه میزان دوز تجویز شده داروی انروفلوکسازین برای درمان یا پیشگیری گله بیشتر باشد بایستی زمان آخرین تجویز دارو تا برداشت تخم مرغ ها افزایش پیدا کند تا تمام دارو دفع گردد و میزان باقیمانده دارویی در تخم مرغ به حداقل برسد.

کلید واژگان: انروفلوکسازین، باقیمانده دارویی، تخم مرغ، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

۱- مقدمه

۳ تا ۸ ساعت متغیر است. فلوروکینولون ها در درمان عفونت های دستگاه های تنفسی، ادراری و گوارشی توسط ارگانسیم های گرم منفی از جمله گنوکوک ها، اشیریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه، کمپیلو باکتر ژژنی، آنتروباکتر، سالمونلا و شیگلا موثرند [۲، ۳]. امروزه از این داروها در صنعت طیور جهت پیشگیری و درمان بسیاری از بیماریهای باکتریایی استفاده می شود [۴].

فلوروکینولون ها آنتی بیوتیک های جدید و بسیار قوی هستند که در مقابل بسیاری از باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی کار آمد و موثر می باشند. فلوروکینولون ها متابولسم اسید نوکلئیک میکروب را مهار می کنند و طیف اثر ضد باکتریایی وسیعی دارند [۱]. تمامی فلوروکینولون ها فراهمی زیستی خوبی دارند. آنها قادرند به بیشتر بافتهای بدن نفوذ کنند. نیمه عمر این دسته از داروها بین

* مسئول مکاتبات: mkkoochi@ut.ac.ir

و مورد آزمایش قرار گرفت. تخم مرغهای هر گروه به طور جداگانه هموزن شد و قبل از انجام آزمایش در دمای ۲۰- نگهداری شد. پس از این مرحله جهت آنالیز نمونه ها به میزان ۳ گرم از هر نمونه هموزن برداشت شد. نمونه های هموزن قبل از تزریق به ستون، سانتریفیوژ شده و نهایتاً فیلتر شدند. نمونه ها توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (Knauer HPLC) ساخت کشور آلمان با پمپ (HPLC pump 1800) و آشکارساز UV (2600LWL) با استفاده از ستون (5 C18, (150×4.60 mm, μm) و نهایتاً نرم افزار تجزیه و تحلیل داده ها (C2000) مورد آنالیز قرار گرفتند.

۳- نتایج

در گروهی که ۲ mg/kg انروفلوکسازین دریافت کرده بودند، میزان باقیمانده این دارو در روز اول ۰/۰۰۹ mg/kg، در روز دوم ۰/۰۳ mg/kg، در روز سوم ۰/۰۸ mg/kg، در روز چهارم ۰/۱۲ mg/kg، در روز پنجم ۰/۱۳ mg/kg، در روز ششم ۰/۲۵ mg/kg و در روز هفتم ۰/۳۷ mg/kg به دست آمد. بنابراین، میزان غلظت این دارو در گروه اول روند افزایشی داشته است. در گروه دوم (۵ mg/kg)، غلظت انروفلوکسازین در روز اول ۰/۰۵ mg/kg، در روز دوم ۰/۱۲ mg/kg، در روز سوم ۰/۲۵ mg/kg، در روز چهارم ۰/۶۴ mg/kg، در روز پنجم ۰/۵۲ mg/kg، در روز ششم ۰/۹۵ mg/kg و در روز هفتم ۱/۰۲ mg/kg تشخیص داده شد. بنابر این روند تغییر غلظت باقیمانده دارویی افزایشی می باشد. در گروه سوم این آزمایش که ۱۰ mg/kg دارو دریافت کرده بودند غلظت انروفلوکسازین در روز اول ۰/۰۹ mg/kg، در روز دوم ۰/۳ mg/kg، در روز سوم ۰/۸ mg/kg، در روز چهارم ۱/۱ mg/kg، در روز پنجم ۱/۴ mg/kg، در روز ششم ۱/۶ mg/kg و در روز هفتم ۱/۹ mg/kg تشخیص داده شد. بالاترین میزان غلظت باقیمانده دارویی را تخم مرغهای گروه سوم در روز هفتم به خود اختصاص داد. همچنین میزان باقیمانده دارویی

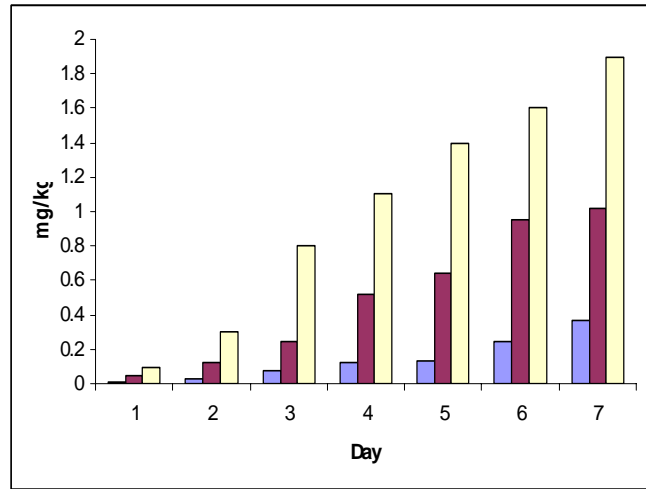
انروفلوکسازین یکی از مهمترین داروهای این گروه می باشد که امروزه در صنعت مرغداری مورد استفاده بسیار زیاد قرار می گیرد. به هر حال در کنار مزایا و فوایدی که این دارو دارد، دارای معایب و اثرات جانبی هم می باشد [۵]. حضور باقیمانده آنتی بیوتیکها در محصولات دامی و طیور می تواند باعث افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در دام و طیور و به دنبال آن در انسان شود، همچنین می تواند باعث به هم زدن فلور میکروبی روده انسان شود [۶]. علاوه بر این واکنشهای ایمنی و آلرژیک در افراد حساس می تواند در اثر حضور آنتی بیوتیکها در فرآورده های دام و طیور ایجاد شود [۷، ۸]. بسیاری از آنتی بیوتیکها نظیر تتراسیکلین، اکسی تتراسیکلین، کلر آمفنیکل و آمپی سیلین از مرغ به تخم مرغهای تولید شده منتقل می شوند. انتقال دارویی انروفلوکسازین خوراکی هم از طریق مرغ به تخم مرغ مشخص شده است [۵، ۹-۱۲] متاسفانه هنوز ارتباط بین دوز مصرفی آنتی بیوتیک انروفلوکسازین در طیور و میزان باقیمانده این دارو در تخم مرغ های تولیدی مشخص نشده است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط دوز مصرفی داروی انروفلوکسازین به صورت داخل عضلانی با میزان غلظت باقیمانده این دارو در تخم مرغ های تولیدی می باشد.

۲- مواد و روش کار

در این مطالعه تعداد ۴۰ مرغ تخمگذار نژاد لگهورن با متوسط وزن ۱/۵ کیلوگرم مورد بررسی قرار گرفت. مرغها به طور تصادفی به ۴ گروه ده تایی تقسیم شدند. در گروه اول به میزان ۲ mg/kg آنتی بیوتیک انروفلوکسازین، در گروه دوم ۵ mg/kg انروفلوکسازین و در گروه سوم ۱۰ mg/kg انروفلوکسازین به روش داخل عضلانی به هر مرغ تزریق شد. گروه چهارم هم به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد که در این گروه ۲ سی سی نرمال سالین به مرغها تزریق شد. همه پرندگان به مدت ۷ روز تحت آزمایش قرار گرفتند. تخم مرغ ها روزانه برداشت می شدند. البته در روزهای ۳، ۶ و ۹ روز پس از آخرین تزریق، تخم مرغهای تولید شده گروه های چهار گانه جمع آوری شد

افزایش نشان می دهد. گورلا و همکاران [۵] در مطالعه ای میزان باقیمانده داروی انروفلوکسازین را در تخم مرغ های تحت آزمایش با انروفلوکسازین خوراکی به میزان 5 mg/kg در آب آشامیدنی به مدت ۵ روز بررسی کردند. غلظت این دارو در سفیده تخم مرغ 1 mg/kg و در زرده تخم مرغ 0.3 mg/kg تشخیص داده شد. در همین مطالعه میزان باقیمانده داروی سیپروفلوکسازین بررسی شد که این دارو هم 5 mg/kg به مدت ۵ روز در آب آشامیدنی پرندگان استفاده شد، در نهایت میزان باقیمانده این دارو کمتر از 0.15 mg/kg در زرده و 0.18 mg/kg در سفیده تخم مرغ تشخیص داده شد. همچنین کان و همکاران [۱۳] (باقیمانده داروی سولفاکوئینوکسالین را که به میزان 20 mg/kg به مدت ۱۴ روز در خوراک مرغ ها استفاده شده بود بررسی کردند، 0.54 mg/kg و 0.26 mg/kg غلظت دارو به ترتیب در سفیده و زرده تشخیص داده شد. در مطالعه دیگری داروی آمپی سیلین به روش داخل عضلانی با دوز 40 mg/kg به مرغ تزریق شد، نتایج این مطالعه نشان داد که میزان باقیمانده دارو در تخم مرغ های گروهی که سه روز دارو در طی سه روز دریافت کرده بودند در مقایسه با گروههایی که دو دوز و یک دوز دارو دریافت کرده بودند بیشتر بود که نتیجه مطالعه ما با نتایج این مطالعه همخوانی دارد. همچنین میزان باقیمانده داروی آمپی سیلین در تخم هایی که ۹ روز پس از آخرین تزریق در گروههای سه گانه جمع آوری شده بود، صفر تشخیص داده شد [۱۰]. که این نتیجه هم با نتیجه مطالعه ما همخوانی دارد. در مطالعه حاضر ۹ روز پس از تزریق آخرین دوز، هیچ باقیمانده دارویی در تخم مرغهای گروههای سه گانه تشخیص داده نشد، در حالیکه باقیمانده دارویی ۳ روز پس از آخرین تزریق در تخم مرغ های گروه دوم تشخیص داده شد. همچنین انروفلوکسازین در روزهای ۳ و ۶ پس از آخرین تزریق در تخم مرغ های گروه سوم تشخیص داده شد. در نهایت، می توان این گونه نتیجه گیری کرد که احتمالاً هر چه میزان دوز تجویز شده داروی انروفلوکسازین برای درمان یا پیشگیری گله بیشتر باشد بایستی زمان آخرین تجویز دارو تا برداشت تخم مرغ ها افزایش پیدا کند تا تمام دارو دفع گردد و میزان باقیمانده دارویی در تخم مرغ به حداقل برسد.

انروفلوکسازین در گروه کنترل صفر تشخیص داده شد (شکل ۱).



شکل ۱ میزان باقیمانده داروی انروفلوکسازین در تخم مرغ های گروههای سه گانه در مدت هفت روز خاکستری: گروه اول 2 mg/kg سیاه: گروه دوم 5 mg/kg سفید: گروه سوم 10 mg/kg

در گروه اول آزمایش، غلظت داروی انروفلوکسازین پس از ۳، ۶ و ۹ روز پس از پایان تزریق دارو صفر تشخیص داده شد. در گروه دوم غلظت دارو سه روز پس از اتمام تزریق انروفلوکسازین 0.2 mg/kg و در روزهای ۶ و ۹ میزان باقیمانده دارو صفر تشخیص داده شد. همچنین میزان باقیمانده دارو در تخم مرغ های گروه سوم در روزهای ۳، ۶ و ۹ به ترتیب 0.4 mg/kg و 0.9 mg/kg و 0 تشخیص داده شد.

۴- بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که افزایش دوز تزریقی انروفلوکسازین در مرغ باعث افزایش میزان باقیمانده دارویی در تخم مرغ می شود به طوریکه در گروهی که بیشترین میزان دوز (10 mg/kg) انروفلوکسازین دریافت کرده بودند بیشترین غلظت باقیمانده دارو در روز هفتم در تخم مرغ ها مشاهده شد و کمترین میزان باقیمانده دارویی مربوط به گروه اول آزمایش (2 mg/kg) بود. با توجه به داده های به دست آمده در گروههای سه گانه، احتمالاً با افزایش میزان دوز تزریقی انروفلوکسازین، میزان باقیمانده دارویی در تخم مرغ های تولیدی هم به موازات افزایش دوز تزریقی

۵- منابع

- animal biological fluids by high performance liquid chromatography: Application in pharmacokinetic studies in pig and rabbit. *J. Chromatography B.*, 1999, 726: 175-184.
- [9] Omija, B.; Mitema, E. S.; et al. Oxytetracycline Residue Levels in Chicken Eggs after Oral Administration of Medicated Drinking Water to Laying Chickens. *Food. Addit. Contam.* 1994, 11, 641-647.
- [10] Donoghue, D.J, Hairstonh, H, Henderson, M, Mcdonald, M, Gaines, S and Donoghue, A.M, Modeling Drug Residue Uptake by Eggs: Yolks Contain Ampicillin Residues Even After Drug Withdrawal and Nondetectability in the Plasma. 1997 *Poultry Science* 76:458-462.
- [11] Roudaut, B.; Moretain, J. P.; et al. Excretion of Tetracycline and Chlortetracycline in Eggs after Oral Medication of Laying Hens. *Food Addit. Contam.* 1989, 6, 71-78.
- [12] Roudaut, B.; Moretain, J. P.; et al. Excretion of Oxytetracycline in Eggs after Medication of Laying Hens. *Food Addit. Contam.* 1987a, 4, 297-307.
- [13] Kan, C. A.; Jacobs, J. G. Bepalen van de verdelingscoefficient van een aantal sulfonamiden over water/organisch oplosmiddel, alsmede de verdeling over dooier/wit na toediening via voer aan leghennen; ID-DLO Internal Report 98.001, 1998; 37 pp.
- [1] Papich, M. G.. Antibacterial drug therapy. Focus on new drugs. *Vet. Clin. N. A.: Small Animal Practice* 1998., 28: 215-231
- [2] Katzung, B,G and Trevor, A,J, Masters, S,B, Pharmacology, seventh edition, 2005, 400- 418.
- [3] Johnston, A.M.,. Use of antimicrobial drugs in veterinary practice. *Br. Med. J.* 1998., 317: 665-667
- [4] Collignon P. Fluoroquinolone use in food animals [letter]. *Emerg Infect Dis.* 2005;11:1789-80.
- [5] Gorla, N.; Chiostrri, E.; et al. HPLC Residues of Enrofloxacin and Ciprofloxacin in Eggs of Laying Hens. *Int. J. Antimicrob. Agents* 1997, 9, 253-256.
- [6] Yorke, J.C. and P. Froc., Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by High-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatography A*, 2000, 882: 63-77.
- [7] Prescott, J.F. and J.D. Baggot., Fluroquinolons in antimicrobial therapy in veterinary medicine, 2nd end Iowa sate University press: Iowa, 1993, pp: 215-228.
- [8] Manceau, J., M. Gicquel and M. Laurentie., Simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in

Study of enrofloxacin residue in eggs using high performance liquid chromatography

Zayerzadeh, E. ¹, Koohi, M. K. ^{2*}, Fardipoor, A. ¹, Rashedi, H. ³

1- Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

2- Department of Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

3- Faculty of chemistry engineering, University of Tehran, Tehran, Iran

(Received:89/5/21 Accepted: 89/7/22)

Enrofloxacin is an important antibiotic in poultry industry in Iran. Also, antibiotic residue is a serious health problem in this industry. This study was conducted to determine whether the doses of enrofloxacin would produce drug residue transfer into eggs when administer to laying hens. Forty hens were assigned to equal groups (n = 10). 2, 5 and 10 mg/kg of enrofloxacin was injected to 1, 2 and 3 hens groups, respectively. All of groups were seven days under treatment. Then, eggs were collected at 1 to 7 days of treatment and 3, 6 and 9 days after last injection. Then, enrofloxacin residue was determined using high performance liquid chromatography. The results of this study showed that increment of administered dose of enrofloxacin caused to increase drug residue in eggs. Furthermore, maximum drug residue was observed at seventh day of injections. In addition, drug residue was decreased to zero at ninth day after last injections. On the other hand, enrofloxacin residue concentration was detectable in group two hens at third day after last injections and in group three hens at third and sixth day after last injections. In conclusion, for minimum detection of enrofloxacin residue concentration in eggs must be increased the time between last injection of drug and eggs collecting.

Keywords: enrofloxacin, high performance liquid chromatography, drug residue, eggs

*Corresponding author E-Mail address: mkkoohi@ut.ac.ir