

ردیابی و ارزیابی باقی مانده آنتی بیوتیک های خانواده پنی سیلین در نمونه کبد، کلیه و گوشت گاو عرضه شده در میادین شهر تهران به روش کیت الایزا و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

میترا جلالی^۱، مریم عطایی^۲، بهروز اکبری آدرگانی^{۳*}

۱- کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

۲- دانشگاه آزاد، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه بهداشت مواد غذایی

۳- مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۵/۱۴)

چکیده

بقایای آنتی بیوتیک ها در گوشت و مواد غذایی دیگر با منشأ حیوانی اثرات نامطلوبی روی سلامت مصرف کننده دارد. در این پژوهش، ابتدا میزان بقایای آنتی بیوتیک های خانواده پنی سیلین در ۴۵ نمونه (۱۵ نمونه گوشت، ۱۵ نمونه کبد و ۱۵ نمونه کلیه) به روش الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس این نتایج از ۴۵ نمونه، ۴۳ نمونه آلوده به آنتی بیوتیک تشخیص داده شدند. بالاترین سطح آنتی بیوتیک هم در نمونه های کبد مشاهده شد اما بین نمونه های کبد و کلیه تفاوت آماری معنی داری مشاهده نشد ($p=0/895$). در ادامه، برای تعیین نوع و کمیت این آنتی بیوتیک ها از بین نمونه های آلوده، نمونه های با سطح آلودگی یکسان حذف شدند و بقیه نمونه ها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) از نظر میزان پنی سیلین G، آمپی سیلین و آموکسی سیلین مورد آنالیز قرار گرفتند. بر اساس نتایج این بررسی، میزان پنی سیلین G بالاترین مقدار را در بین انواع پنی سیلین داشت و پس از آن به ترتیب آمپی سیلین و آموکسی سیلین در رتبه های بعدی قرار گرفتند. همه انواع پنی سیلین در نمونه های کبد بالاتر از نمونه های گوشت و کلیه بود، اما تفاوت بین آن ها معنی دار نبود. همچنین، در همه نمونه ها همبستگی بالایی بین نتایج الایزا و HPLC وجود داشت و ضریب همبستگی (r^2) در همه گروه های مورد مطالعه اعم از نمونه های گوشت، کبد و کلیه بالای ۰/۹۹ بود. علاوه بر این مشخص شد در برخی نمونه ها، باقی مانده آنتی بیوتیک از بیشینه حد مجاز (MRL) استانداردهای جهانی فراتر بود. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، تنظیم و تدوین ضوابط و استانداردهای ملی مرتبط جهت کاهش میزان بقایای آنتی بیوتیک در مواد غذایی با منشأ حیوانی ضروری به نظر می رسد.

کلید واژگان: گوشت، کبد، کلیه، پنی سیلین، بقایای آنتی بیوتیک، الایزا، HPLC

* مسئول مکاتبات: analystchemist@yahoo.com

۱- مقدمه

آنتی بیوتیک ها داروهائی با منشاء طبیعی، نیمه سنتزی یا سنتزی می باشند و به طور وسیعی برای درمان بیماری های باکتریائی در انسان و حیوانات مورد استفاده قرار می گیرند. اهمیت این داروها به ویژه در پرورش حیوانات بسیار بالا است چرا که زمانی که به جیره حیوان افزوده می شوند، رشد را به طور قابل ملاحظه ای بهبود می بخشند. با این وجود، اتحادیه اروپا این فعالیت را از سال ۲۰۰۶ به بعد ممنوع کرده است. بسیاری از خانواده های آنتی بیوتیکی در دام پزشکی مورد استفاده قرار می گیرند که از آن جمله می توان به بتا-لاکتام ها (پنی سیلین^۱ و سفالوسپورین^۲)، تتراسایکلین^۳، کلرامفنیکل^۴، ماکرولیدها^۵، اسپکتینومایسین^۶، لینکوسامیدز^۷، سولفون آمید^۸، نیتروایمیدازول^۹، تریمتوپریم^{۱۰}، پلی مخلوطین^{۱۱}، کوئینولون^{۱۲} و ماکروسیکلیک ها^{۱۳} (آزاسیسین^۴، گلیکوپتید و آمینوگلیکوزید) اشاره نمود [۱]. بقایای داروهای دام پزشکی یا متابولیت های آنها در گوشت و مواد غذایی دیگر با منشأ حیوانی اثرات سمی روی سلامت مصرف کننده دارد. اضافه کردن آنتی بیوتیک ها به شکل مکمل به غذای حیوانات به عنوان یک خطر در بهداشت عمومی مطرح می باشد. نگرانی عمده روی باقی مانده آنتی بیوتیک در فرآورده های دامی نیست، بلکه مشکل عمده به وجود آمدن باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ها و عدم پاسخ به دزهای آنتی بیوتیکی است. زمانی که، یک فرد آنتی بیوتیک را به مقدار کم و در طولانی مدت از طریق مواد غذایی مصرف می نماید، باعث ایجاد مقاومت در باکتری های بیماریزا یا غیربیماریزای بدن خود می گردد. همچنین، در

افرادی که نسبت به مقادیر کم آنتی بیوتیک حساسیت بیشتری دارند، با مصرف مواد غذایی حاوی آنتی بیوتیک، میزان حساسیت احتمالی افزایش می یابد. استفاده گسترده از این آنتی بیوتیک ها منجر به ظهور گونه های مقاوم به ترکیبات ضد میکروبی شده و این مقاومت ممکن است به انسان نیز منتقل گردد. انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی به انسان از طریق زنجیره غذایی صورت می گیرد که طی آن ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک از فلور میکروبی دام به پاتوژن های انسانی منتقل می شوند [۲]. از طرفی، مصرف مقادیری ناچیز از باقی مانده های مواد ضد میکروبی، میکروفلور طبیعی روده انسان که بخش اساسی از فیزیولوژی انسان است، را تحت تأثیر قرار می دهد. این فلور به عنوان مانعی برای ایجاد کلونی توسط باکتری های پاتوژن در دستگاه گوارشی عمل می کند و نقش مهمی در هضم غذا دارد [۳]. اثرات بهداشتی دیگر آنتی بیوتیک ها شامل انواع واکنش های آلرژیک به ویژه در افراد حساس به آنتی بیوتیک، پایین آوردن میزان آلودگی میکروبی در دام ها و ممانعت از تشخیص آزمایشگاهی میکروارگانیسم های بیماریزا، اثرات سرطانزایی، جهش زایی در انسان، اختلالات جدار روده و جلوگیری از سنتز بر خی ویتامین ها می باشد [۴].

جهت حفظ سلامتی انسان در برابر این باقی مانده ها باید زمان حذف آنها مد نظر قرار گیرد. این زمان عبارت است از بازه زمانی بین زمان تجویز دارو به حیوان تا زمان کشتار به طوری که بتوان اطمینان حاصل کرد میزان باقی مانده ها به زیر حد مجاز رسیده است. از طرفی، مشخص شده فاکتورهای متعددی میزان این باقی مانده ها را پس از کشتار نیز تحت تأثیر قرار می دهد. اگرچه بسیاری از تحقیقات بر روش های پیشگیری و نیز تشخیص باقی مانده ها تمرکز یافته اند، برخی محققین نیز میزان تغییرات این باقی مانده ها را در بافت های حیوانی طی نگهداری و پخت مورد بررسی قرار داده اند. بسیاری از غذاهای حیوانی پیش از مصرف پخته شده یا روش های فرآوری دیگری، نظیر استفاده از افزودنی ها جهت افزایش قابلیت هضم، بهبود ویژگی های حسی، اشتها بر انگیز شدن و افزایش مدت زمان ماندگاری بر آنها اعمال می گردد. بنابراین لازم است

1. Penicilin
2. Tetracycline
3. Cephalosporin
4. Chloramphenicol
5. Macrolide
6. Spectinomycin
7. Lincosamides
8. Sulfonamide
9. Nitroimidazole
10. Trimethoprim
11. Plymechlotin
12. Quinolone
13. Macrocylic
14. Ansamycin

مطالعات جامعی در این زمینه انجام شود چرا که بیشتر داروهای دامپزشکی از حساسیت بالائی در برابر گرما برخوردارند. به طور کلی می‌توان گفت، فرآیند پخت نمی‌تواند به طور کامل سبب شکسته شدن باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی مختلف موجود در مواد غذایی حیوانی گردد اما این فرآیندها می‌توانند سبب کاهش میزان این باقی‌مانده‌ها شوند. بیشتر این باقی‌مانده‌ها در حین جوشیدن از بافت ماده غذایی وارد محیط آبی اطراف شده و بنابراین توصیه می‌شود، این آب دور ریخته شود. در عین حال برخی از این داروها نیز به حرارت مقاوم می‌باشند و می‌توانند در محاسبات میزان دریافتی روزانه توسط مصرف‌کنندگان مد نظر قرار گیرند. یکی دیگر از جنبه‌های مد نظر، بررسی سمیت متابولیت‌های حاصل از تجزیه این باقی‌مانده‌ها در حین فرآیند حرارتی است، چرا که ممکن است بر بدن انسان اثرات سوئی به دنبال داشته باشند [۵].

میزان بقایای ۴ آنتی‌بیوتیک اکسی‌تراسایکلین، کلرامفنیکل، انتروفلوکساسین و پنی‌سیلین در گوشت مرغ و گوساله مورد استفاده در مراکز ارتشی تهران با روش HPLC بررسی شد. نتایج نشان داد درصد آلودگی و سطح انتروفلوکساسین در

نمونه‌های طیور به ترتیب در تابستان و زمستان ۸۸ و ۱۰۰ درصد بود. برای کلرامفنیکل نیز آلودگی نمونه‌های مورد بررسی در هر دو فصل ۱۰۰ درصد بود. در نمونه‌های گوشت میزان آلودگی به پنی‌سیلین در فصل تابستان و زمستان به ترتیب ۷۶ و ۹۲ درصد بود. در مورد اکسی‌تراسایکلین نیز میزان آلودگی در تابستان و زمستان به ترتیب ۱۰۰ و ۷۲ درصد بود. به طور کلی نتایج نشان دهنده آن است که در ۹۹ درصد از نمونه‌ها آنتی‌بیوتیک‌ها وجود داشته و جز کلرامفنیکل، هیچ کدام از آنتی‌بیوتیک‌ها در سطوح بالاتر از MRL نبودند [۶].

مسگری عباسی و همکاران (۱۳۸۶)، از روش HPLC برای اندازه‌گیری باقی‌مانده سه آنتی‌بیوتیک اکسی‌تراسایکلین، تتراسایکلین و کلروتتراسایکلین در ۵۰۰ نمونه مختلف گوشت، کبد و کلیه جمع‌آوری شده از کشتارگاه‌های تبریز استفاده کردند. در مجموع، مقدار باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک در ۵ درصد از نمونه‌های کلیه و کبد و ۲۱/۷ درصد از کل نمونه‌های مورد بررسی بیشتر از حد مجاز مورد تأیید سازمان بهداشت جهانی بود. برخی پژوهش‌ها در زمینه باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک در جدول ۱ نشان داده شده است.

Table 1 Previous Reports about Residual Antibiotics in Some Foodstuffs

Variety of antibiotic	Food sample (No.)	Method	Result	Reference
Enrofloxacin	Liver, meat and kidney of poultry (270)	HPLC	44.27% of samples > MRL	[7]
Chloramphenicol	Meat of poultry (140)	ELISA	25 samples contain 14-311 ng	[8]
Total antibiotic	Milk (50)	Kopen test	Determined in 5 samples	[9]
Oxytetracycline & Tetracycline	Milk (15)	HPLC	80% of samples were rejected	[10]
penicillin G	Milk (992)	Beta star and plate	236 samples were rejected	[11]
Macrolide	Egg (200)	MHA (Mueller Hinton Agar)	12% of samples were rejected	[12]
Total antibiotic	Meat of goat, Cow, pig and egg (634)	Inhibited microbial Culture	21.1 % of samples were rejected	[13]
Sulfamide	Meat (157)	HPLC-FLD	Determined in 9 samples	[14]
20 antibiotics	Meat of poultry and domestic animals, and in milk (125)	HPLC/MS	Detected 15 antibiotics in all of samples	[15]

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه و جمع‌آوری نمونه‌ها

۴۵ نمونه متشکل از ۱۵ نمونه گوشت، ۱۵ نمونه کبد و ۱۵ نمونه کلیه گاو از میادین تره بار مختلف در سطح شهر تهران به طور تصادفی طی یک دوره زمانی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در شرایط مناسب با استفاده از یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش در شرایط انجماد (-18°C) نگهداری شدند. کلیه آزمون‌ها بر روی این نمونه‌ها به صورت دو بار تکرار انجام شد.

۲-۲- آماده سازی نمونه‌ها و اندازه گیری

باقیمانده با روش الایزا

برای این منظور از کیت‌های الایزا ۹۶ خانه مخصوص انواع پنی‌سیلین (EuroProxima, Netherlands) استفاده شد. در این روش، آنتی‌بادی، ترکیب آمپی‌سیلین-پراکسیداز ترب کوهی (HRP-) و محلول استاندارد یا نمونه به چاهک‌ها اضافه می‌شود. پنی‌سیلین آزاد استاندارد یا نمونه‌ها و کونژوگه آمپی‌سیلین-HRP برای اتصال به جایگاه ویژه آنزیم رقابت می‌کنند (الایزای رقابتی). قبل از شروع تست، نیاز به آماده‌سازی نمونه، بافر رقیق‌کننده، محلول‌های استاندارد، اتصال دهنده (کونژوگه)، بافر شستشو، آنتی‌بادی و محلول رنگی (کروموزن) طبق بروشور کیت‌های مورد استفاده است [۱۴].

طبق دستورالعمل شرکت سازنده، ابتدا ۱ گرم از نمونه‌ها در داخل لوله یکنواخت و سپس با ۴ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه ورتکس شد. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید و مایع روئی (سوپرناتانت) جدا شد. ۵۰ میکرولیتر از مایع روئی به ۳۵۰ میکرولیتر بافر رقیق‌کننده اضافه شد. در نهایت، ۵۰ میکرولیتر از این مخلوط برای تست در میکروپلیت‌های الایزا استفاده شد.

۲-۳- تهیه منحنی استاندارد

برای تعیین غلظت آنتی‌بیوتیک، ابتدا تفاضل OD همه چاهک‌ها از OD مربوط به میانگین چاهک‌های H_1 و H_2 به دست آمد. پس از به دست آوردن $B_{\max}$ غلظت‌های مختلف استاندارد، نمودار استاندارد بر مبنای لگاریتم غلظت (محور X) و $B_{\max}$ (محور Y) رسم شد. از روی معادله به دست آمده و $B_{\max}$ نمونه‌ها، جذب آن‌ها تعیین شد.

$B_{\max}$ (درصد)=

$100 \times \text{OD} / \text{OD } B_{\max}$ استاندارد صفر یا نمونه یا استاندارد

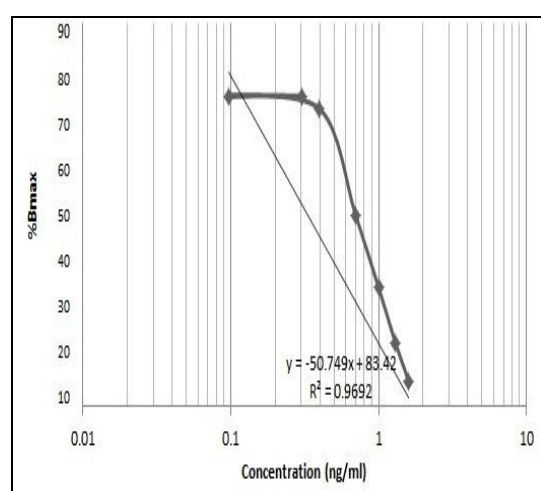


Diagram 1 Standard curve for penicillin compounds in ELISA Test

۲-۴- اندازه گیری غلظت آنتی بیوتیک‌های

خانواده پنی‌سیلین با استفاده از HPLC

۲-۴-۱- استخراج نمونه

جهت تعیین سطح دقیق آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین در نمونه‌های گوشت، کبد و کلیه که در روش الایزا حضور آنتی‌بیوتیک در آنها به اثبات رسیده بود، از روش HPLC استفاده شد. به طور خلاصه، ۱۰ گرم از بافت‌های محتوی آنتی‌بیوتیک، توزین، به قطعات کوچک تقسیم و در فالتکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شدند. سپس ۲۰ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی (PBS) با pH معادل ۷/۲ به آن افزوده شد. هموژن کردن با استفاده از هموژنایزر (مدل IKA VORTEX 3 آلمان) انجام گردید. سپس، مجدداً ۲۰ میلی‌لیتر از بافر PBS افزوده شده و نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه هم زده شدند و در نهایت به مدت ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسوند (مدل Fritsch-

پیک و منحنی کالیبراسیون استاندارد‌های مربوطه (نمودارهای ۲، ۳ و ۴) در طول موج ۲۵۴ نانومتر با آشکارساز UV تعیین شدند [۶].

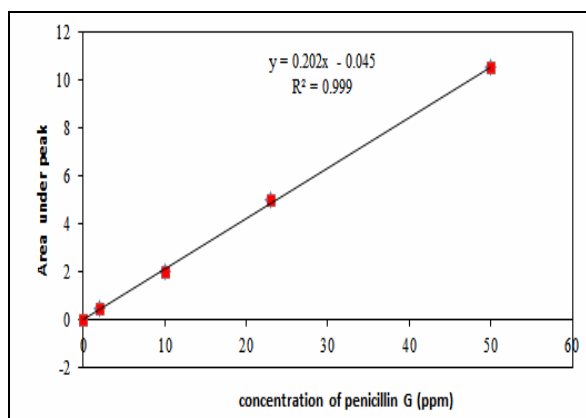


Diagram 2 Standard curve of penicillin G in HPLC test

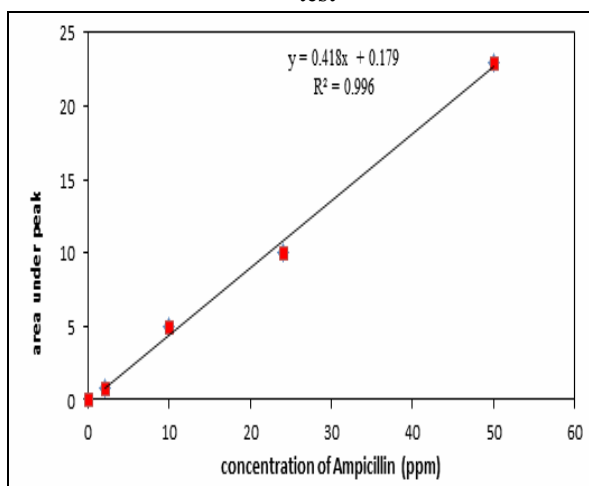


Diagram 3 Standard curve of Ampicillin in HPLC test

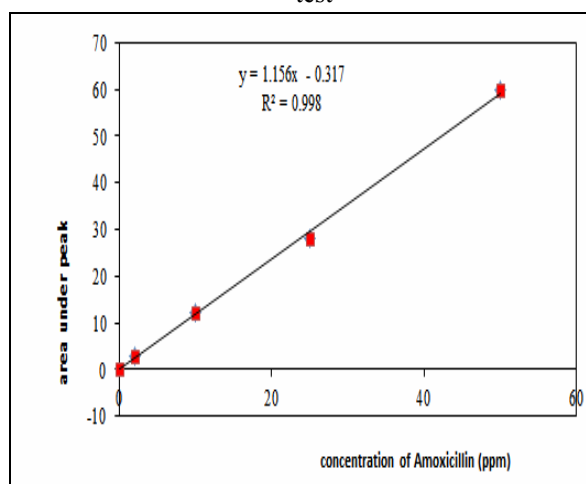


Diagram 4 Standard curve of Amoxicillin in HPLC test

55743 آلمان) جهت تکمیل فرایند استخراج قرار گرفتند. در ادامه، تیوپ‌ها در ۱۴۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و سوپرناتانت به لوله‌های جدیدی منتقل شد. ۳ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید به لوله‌ها افزوده شد و پس از ۲ دقیقه ورتکس کردن، نمونه‌ها در ۱۴۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و برای استخراج با فاز جامد آماده شدند [۱۵ و ۱۶].

۲-۴-۲- استخراج فاز جامد (SPE)

جهت انجام SPE، قبل از آغاز فرایند استخراج، کارتریج‌های C18 (JT. Baker, Netherlands) با استفاده از متانول (۲/۵ میلی‌لیتر) و آب با درجه مورد استفاده در HPLC (۲/۵ میلی‌لیتر) به صورت پی در پی شسته شدند. نمونه آماده شده در مرحله قبلی، از کارتریج عبور داده شد. سپس ستون با آب با درجه HPLC (۳ میلی‌لیتر)، محلول دی سدیم هیدروژن فسفات ۰/۲ مولار (pH=۹، ۳ میلی‌لیتر) و آب با درجه HPLC (۵ میلی‌لیتر) شسته شد و کارتریج تحت جریان ازت خشک گردید. آنتی‌بیوتیک‌ها با ۳/۵ میلی‌لیتر متانول شویش شده و آنتی‌بیوتیک شویش شده تحت جریان ازت خشک گردید. باقی‌مانده خشک مجدداً در ۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول دی سدیم هیدروژن فسفات ۰/۲ مولار (pH=۹) حل شد. تیوپ‌ها به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شد و سپس در ۴۴۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در ۴°C سانتریفیوژ صورت گرفت. سوپرناتانت به ویال‌های تزریق منتقل و ۲۵ میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق شد [۶].

۲-۴-۳- روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

فاز متحرک مورد استفاده برای این منظور استونیتریل بود. pH با افزودن اسید فسفریک ۸۵ درصد به استونیتریل روی ۲/۳ تنظیم گردید. سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، زمان انجام برای هر نمونه تقریباً ۱۵ دقیقه و ستون مورد استفاده نیز از نوع C18 بود. غلظت آنتی‌بیوتیک‌های خانواده پنی‌سیلین (پنی‌سیلین G، آمپی‌سیلین و آموکسی‌سیلین) با اندازه‌گیری سطح زیر پیک نمونه، مقایسه آن‌ها با سطح زیر

۲-۵- تعیین ^{15}LOD و ^{16}LOQ

جدول ۲ میزان LOD و LOQ مربوط به پنی سیلین G، آموکسی سیلین و آمپی سیلین را ارائه می دهد. به این منظور، ابتدا محلول شاهد (کلیه مواد موجود در ماتریکس نمونه به جز آنالیت) تهیه و بررسی شد. سپس، جهت ردیابی پیک ها، یک مخلوط از هر یک از استانداردها به دستگاه تزریق گردید. پس از مشخص شدن زمان خروج هر آنتی بیوتیک، نمونه شاهد ۳ بار به دستگاه تزریق شد و میزان سطح زیر پیک در محل خروج هر پیک گرفته شد و انحراف استاندارد به دست آمد. در نهایت با استفاده از معادلات زیر LOD و LOQ محاسبه شد:

$$\text{LOD} = 3.3 S_b / m \quad (2-3)$$

$$\text{LOQ} = 10 S_b / m \quad (3-3)$$

در این معادلات S_b انحراف استاندارد شاهد و m شیب خط را نشان می دهد.

Table 2 The LOD and LOQ values (ng/ml) for penicillin G, Ampicillin and Amoxicillin

Antibiotic	LOD	LOQ
Penicillin G	0.032	0.095
Ampicillin	0.022	0.068
Amoxicillin	0.004	0.011

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

توزیع داده ها با استفاده از آزمون شاپیرو ویلک سنجیده شد. با توجه به غیر نرمال بودن توزیع داده های کمی ($p < 0.05$)، در

این مطالعه، از آزمون های ناپارامتریک کروسکال والیس^{۱۷} در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد. نتایج بر اساس میانگین $\pm$ انحراف استاندارد گزارش شد. آزمون ها هم با دو تکرار انجام شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تعیین میزان پنی سیلین موجود در

نمونه های گوشت، کبد و کلیه به روش الیزا

جدول ۳ میزان آنتی بیوتیک های خانواده پنی سیلین (نانوگرم/ میلی لیتر) موجود در نمونه های گوشت، کبد و کلیه را نشان می دهد. از آنجایی که برای هر نمونه دوبار تکرار انجام شده و در آزمون آخر یکی از نمونه ها حذف شد؛ بنابراین نتایج آماری برای ۲۹ نمونه ارزیابی شده است. بر اساس نتایج جدول ۴-۱، بین غلظت آنتی بیوتیک نمونه های گوشت، کبد و کلیه تفاوت آماری معنی داری مشاهده شد ($p = 0.006$). بالاترین میزان آنتی بیوتیک در نمونه های کبد مشاهده شد ($28/33$ نانوگرم/میلی لیتر) اما بین گروه کبد و کلیه تفاوت آماری معنی داری دیده نشد ($p = 0.895$). همچنین، بر اساس نتایج مقایسه های دوگانه من ویتنی^{۱۸} با تصحیح بنفرونی^{۱۹}، غلظت بین گروه گوشت و کلیه ($p = 0.002$) و گوشت و کبد ($p = 0.012$) با هم تفاوت داشتند.

17. Kruskal-Wallis
18. Mann-Whitney
19. Boneferroni

15. Limit of Detection
16. Limit of Quantification

Table 3 Comparison of penicillin concentration (ng/ml) in different samples based on ELISA test

Group	Number	Mean $\pm$ SD	Quarter	P Value*
Meat	29	22.81 $\pm$ 16.63 ^{b**}	4.94(3.51-25.32)	0.006
Liver	29	29.15 $\pm$ 27.88 ^a	23.29(15.63-35.56)	
Kidney	29	28.33 $\pm$ 20.16 ^a	22.68(12.87-38.62)	

*Kruskal-Wallis Test

** Different Latin letters on the diagram show a significant difference between the samples

آلودگی یکسان حذف شدند و باقی مانده نمونه ها توسط HPLC مورد آنالیز قرار گرفتند. جدول های ۴، ۵ و ۶ به ترتیب میزان پنی سیلین G، آمپی سیلین و آموکسی سیلین را در نمونه های گوشت، کبد و کلیه نشان می دهد. نتایج نشان داد که میزان میانگین پنی سیلین G، آمپی سیلین و آموکسی سیلین در گروه کبد بالا بود. با این حال، بین غلظت آنتی بیوتیک های مورد بررسی در سه گروه گوشت، کبد و کلیه تفاوت آماری معنی داری مشاهده نشد.

۲-۳- تعیین میزان پنی سیلین موجود در

نمونه های گوشت، کبد و کلیه به روش

HPLC

همانگونه که ذکر شد، از ۴۵ نمونه مورد ارزیابی به روش الایزا، ۴۳ نمونه آلوده به آنتی بیوتیک تشخیص داده شدند. در واقع، با استفاده از الایزا غلظت کلی آنتی بیوتیک های خانواده پنی سیلین تعیین شد. از این رو، برای تعیین نوع و کمیت این آنتی بیوتیک ها از بین نمونه های آلوده، نمونه های با میزان

Table 4 concentration of penicillin G (ng / ml) in different samples based on HPLC test

Group	Number	Mean $\pm$ SD	Quarter	P Value*
Meat	9	26.90 $\pm$ 24.17	19.32(3.82-31.98)	0.642
Liver	9	33.22 $\pm$ 33.14	24.09(12.22-44.63)	
Kidney	10	30.02 $\pm$ 21.22	21.19(13.07-43.98)	

*Kruskal-Wallis Test

Table 5 concentration of Ampicillin (ng / ml) in different samples based on HPLC test

Group	Number	Mean $\pm$ SD	Quarter	P Value*
Meat	9	3.74 $\pm$ 3.63	3.12(1.11-4.62)	0.099
Liver	9	8.96 $\pm$ 8.67	5.62(3.76-11.10)	
Kidney	10	6.10 $\pm$ 3.97	4.63(2.87-10.21)	

*Kruskal-Wallis Test

Table 6 concentration of Amoxicillin (ng / ml) in different samples based on HPLC test

Group	Number	Mean $\pm$ SD	Quarter	P Value*
Meat	9	0.89 $\pm$ 0.81	0.75(0.002-1.05)	0.357
Liver	9	1.28 $\pm$ 1.08	1.32(0.002-2.01)	
Kidney	10	0.68 $\pm$ 0.59	0.28(0.002-1.01)	

*Kruskal-Wallis Test

در ۲۷۰ نمونه کبد، عضله و کلیه طیور گوشتی جمع آوری شده از ۹۰ مرغداری سطح استان تهران طی یک سال توسط HPLC حاکی از حضور این آنتی بیوتیک در تمامی این نمونه ها بود و ۲۴/۴۴ درصد از نمونه ها، حاوی مقادیر بالاتر از MRL بودند [۷]. در مطالعه دیگری، Donkor و همکاران

در مقایسه انواع پنی سیلین، میزان پنی سیلین G بالاترین مقدار را در بین انواع پنی سیلین داشت و پس از آن به ترتیب آمپی سیلین و آموکسی سیلین در رتبه های بعدی قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، درصد بالایی از نمونه ها آلوده به آنتی بیوتیک بودند. تعیین باقی مانده انروفلوکساین

نمونه های گوشت، روش HPLC توانست مقادیر اندک آنتی بیوتیک را ردیابی کند که می تواند به حساسیت بالای این روش برای تشخیص پنی سیلین مربوط باشد (Dia5). در نمونه های کبد همانند نمونه های گوشت، آزمون HPLC در بعضی نمونه ها توانایی بالاتری برای تعیین میزان آنتی بیوتیک از خود نشان داد اما در برخی نمونه ها نیز آزمون HPLC و الیزا کارایی یکسانی برای ردیابی پنی سیلین از خود نشان دادند (Dia6). در مورد نمونه های کلیه نیز مقایسه نتایج آزمون برای نمونه های مختلف، حاکی از همخوانی نتایج بدست آمده در آزمون الیزا با نتایج HPLC می باشد (Dia7).

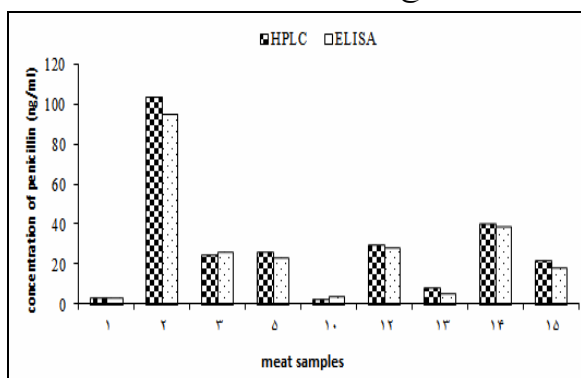


Diagram 5 Comparison of penicillin concentration of meat samples determined by ELISA and HPLC

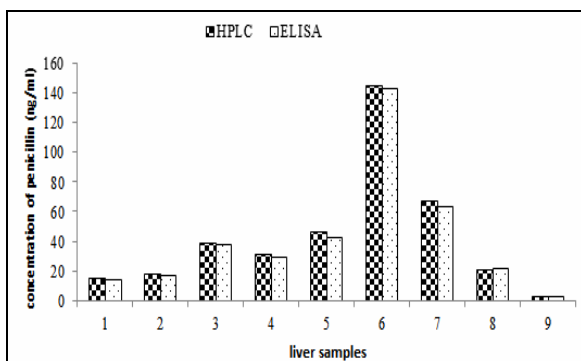


Diagram 6 Comparison of penicillin concentration of liver samples determined by ELISA and HPLC

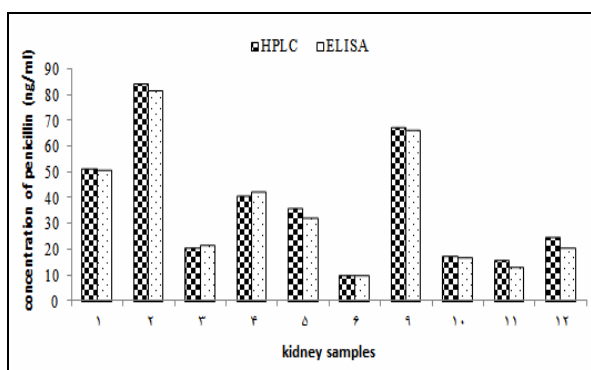


Diagram 7 Comparison of penicillin concentration Of kidney samples determined by ELISA and HPLC

(۲۰۱۱)، با ارزیابی بقایای آنتی بیوتیک ۶۳۴ نمونه از مواد غذایی با منشأهای مختلف حیوانی، شیوع کلی بقایای دارو در غذاهای با منشأ حیوانی ۲۱/۱ درصد گزارش کردند. در این بین، مقادیر شیوع بقایای دارو در مواد غذایی با منشأ حیوانی به این صورت است که گوشت گاو ۳۰/۸ درصد، شیر بز ۲۹/۳ درصد، گوشت خوک ۲۸/۶ درصد، گوشت گوسفند ۲۴ درصد و تخم مرغ ۶/۸ درصد آلودگی داشتند. نتایج به دست آمده از بررسی های ما نیز نشان داد ۴۳ نمونه از کل نمونه ها به مقادیری مختلفی از آنتی بیوتیک ها آلوده بودند. نتایج مطالعه توکلی و همکاران (۲۰۱۵) نیز نشان دهنده حضور بقایای ۴ آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین، کلرامفنیکل، انترفلوکساسین و پنی سیلین در ۹۹ درصد نمونه های گوشت مرغ و گوساله بود و البته در این مطالعه ما آلودگی به پنی سیلین G، آمپی سیلین و آموکسی سیلین نیز مشهود است. کلیه ها و کبد اندام دفعی محسوب می شوند و تجمع آنتی بیوتیک ها در اندام های دفعی بیشتر است. اما، توزیع آنتی بیوتیک در گوشت کمتر است [۲]. از طرفی، در نمونه های گوشت امکان کلین آپ، سریع و مناسب بوده و اثرات ماتریکس روی استخراج آنتی بیوتیک کمتر است [۱۷-۱۹، ۱۴]. به همین دلیل، در پژوهش حاضر نیز نمونه های کبد و کلیه بالاترین میزان آلودگی به آنتی بیوتیک را داشتند.

۳-۳- مقایسه نتایج الیزا و HPLC در سنجش میزان آنتی بیوتیک های خانواده پنی سیلین

با بررسی نتایج حاصل از الیزا، برای تأیید آزمون و اعتبار سنجی روش الیزا، از تست HPLC استفاده شد. بدین منظور نمونه هایی که در آزمون الیزا نتایج مشابهی داشتند حذف شده و باقی نمونه ها برای آزمون HPLC آماده سازی شدند. در ادامه مقایسه نتایج آزمون الیزا و HPLC برای نمونه های گوشت، کبد و کلیه به تفکیک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون های الیزا و HPLC جهت تعیین میزان آنتی بیوتیک پنی سیلین در نمونه های گوشت مورد مقایسه قرار گرفت. در بین نمونه های مورد بررسی، نمونه ۲ و ۱ به ترتیب بالاترین و کمترین میزان باقیمانده پنی سیلین را داشتند. این تفاوت می تواند به اختلاف در نوع نمونه و محل جمع آوری آن مربوط باشد. در مقایسه روش الیزا و HPLC در بیشتر

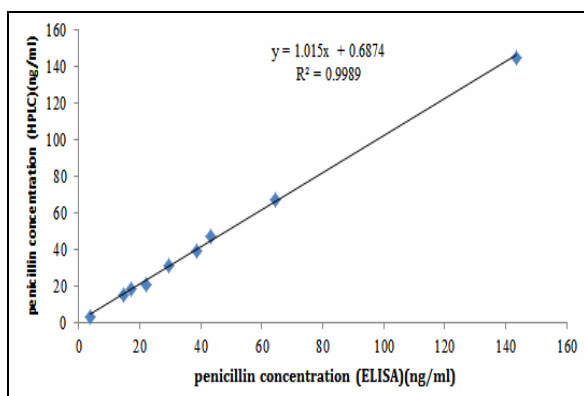


Diagram 8 Correlation between of result Of ELISA and HPLC in Liver samples

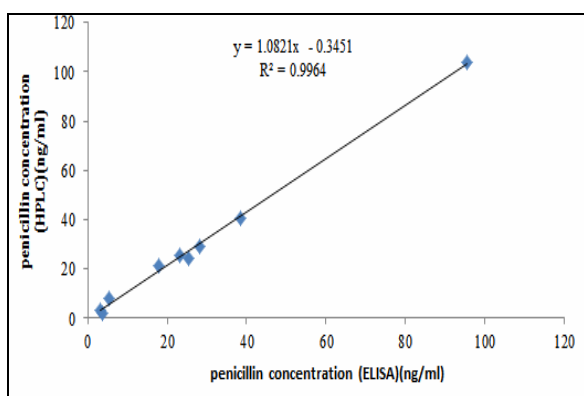


Diagram 9 Correlation between of result Of ELISA and HPLC in Meat samples

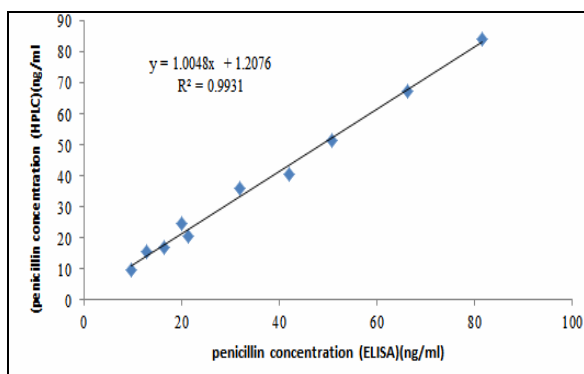


Diagram 10 Correlation between of result Of ELISA and HPLC in kidney samples

در مطالعه Tajik و همکاران (۲۰۱۰)، نیز نتایج حاصل از HPLC برای تعیین کلرامفنیکل در نمونه‌های گوشت، کبد و کلیه در راستای نتایج الایزا بود. Johnson و همکاران (۲۰۱۲)، از روش دو مرحله‌ای کیت الایزا-HPLC برای تشخیص و تعیین کمی آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، مالاکیت گرین، نیترو فوران و فلوروکوئینولون‌ها در نمونه‌های میگو استفاده کردند و نتایج حاکی از تأیید نتایج الایزا توسط کروماتوگرافی مایع مجهز به طیف‌سنج جرمی بود.

در تمامی روش‌های الایزا لازم است ساختار بتا-لاکتام تغییر کند تا آنتی‌بادی با انتخاب پذیری کافی تشکیل گردد. بنابراین، روش‌های الایزا از حساسیت بالا برای تشخیص پنی‌سیلین برخوردار نبوده و این عیب به ویژه در مورد آمینوپنی‌سیلین‌ها که متداول‌ترین پنی‌سیلین‌های مورد استفاده در جهان می‌باشند، بیشتر مشهود است. بنابراین، لزوم استفاده از روش‌های دقیق‌تر نظیر HPLC پس از تشخیص اولیه آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین در نمونه‌ها، جهت کمی‌سازی الزامی عنوان شده است [۱].

طرفی، الایزا اغلب پتانسیل بالایی برای اتصال غیر اختصاصی بین آنالیت‌های غیر هدف و آنتی‌بادی‌ها دارد و در نتیجه مستعد اثرات ماتریکس است. ترکیبات شیمیایی موجود در نمونه‌های حیوانی یا عصاره‌های نمونه مثل پروتئین، چربی، حلال‌ها و سایر ترکیبات ممکن است روی اتصال آنتی‌بادی و آنالیت مورد نظر مؤثر باشد. این اثر ماتریکس یک مشکل متداول برای الایزا به شمار می‌آید که حساسیت و اعتبار الایزای رقابتی را کاهش داده و موجب مثبت شدن کاذب با کاهش توسعه رنگ شود [۱۷]. در نتیجه، دلیل اختلاف نتایج الایزا و HPLC پژوهش حاضر نیز قابل توجه خواهد بود. در مطالعه Do و همکاران (۲۰۱۱)، جهت تشخیص حضور آنتی‌بیوتیک‌ها در گوشت خوک (سال ۲۰۱۵-۲۰۱۴)، از صد نمونه، ۱۸ نمونه توسط کیت میکروبیولوژیکی مثبت تشخیص داده شدند در حالی‌که در روش LC-MS-MS سولفامتازین در ۲۳ نمونه وجود داشت.

۳-۴- تعیین همبستگی بین نتایج الایزا و

HPLC

برای این منظور غلظت آنتی‌بیوتیک‌های تعیین شده توسط الایزا در برابر نتایج حاصل از HPLC ترسیم شد و ضریب همبستگی تعیین گردید. نمودارهای ۸، ۹ و ۱۰ به ترتیب همبستگی بین نتایج الایزا و HPLC را در نمونه‌های گوشت، کبد و کلیه نشان می‌دهد.

همانطور که مشخص است در همه نمونه‌ها همبستگی بالایی بین نتایج الایزا و HPLC وجود داشت در واقع، HPLC نتایج حاصل از الایزا را تأیید کرد. ارتباط خوبی بین نتایج الایزا و HPLC برای تعیین میزان بقایای نئوماکسین در نمونه‌های غذایی حیوانی نیز مشاهده شده است [۱۷].

۴- نتیجه گیری

بررسی بقایای آنتی بیوتیک های خانواده پنی سیلین در نمونه های گوشت، کبد و کلیه نشان داد ۹۵ درصد از نمونه ها حاوی این ترکیبات بودند. همچنین آزمون HPLC به عنوان یک روش تاییدی نتایج حاصل از الیزا تایید و تکمیل نمود. در این پژوهش نشان داده شد؛ آنتی بیوتیک ها به طور گسترده ای در صنعت دام و طیور استفاده می شوند و عدم رعایت دوره دفع دارویی قبل از کشتار، استفاده غیر مجاز به وسیله دامداران، تجویز بیش از حد توصیه شده و فقدان روش های سریع، دقیق و ارزان قیمت جهت کنترل بقایای آنتی بیوتیکی سبب شده، باقی مانده این داروها در مواد غذایی به طور قابل ملاحظه ای مشاهده شود.

با این حال در برخی از کشورهای جهان قوانین و مقرراتی در خصوص کنترل آلودگی مواد غذایی به آنتی بیوتیک ها و عرضه مواد غذایی سالم وضع شده است. برای مثال در آلمان یک درصد لاشه های گاوهای گوشتی و دو درصد لاشه های گوساله های کشتار شده باید به این منظور آزمایش شوند و یا احشا خوراکی که به صورت وارداتی وارد انگلستان می شوند قبل از توزیع در بازار می بایست توسط آزمایشگاه های وابسته به دولت، از نظر آلودگی به آنتی بیوتیک ارزیابی گردد. این موضوع ضرورت پژوهش های گسترده تری را به منظور شناسایی سایر آنتی بیوتیک ها و داروها در انواع فرآورده های غذایی با منشأ دامی (لبنیات، گوشت، مرغ، ماهی، تخم مرغ، عسل و غیره) با هدف کمک به برنامه ریزی برای ایجاد نظارت های لازم و بهینه کردن زنجیره تولید مواد غذایی جهت حفظ سلامت مصرف کنندگان و رفع موانع صادرات می طلبد. بنابراین سیاست های کلی در این زمینه باید بر اساس چهار اصل پیشگیری، پیگیری، نظارت و آزمایشات اکتشافی بنا گردد. علاوه بر این، یافتن آزمایشات سریع و حساس با کمترین زمان و بیشترین حساسیت آلودگی کمک کننده خواهد بود.

۵- منابع

- [2] Vahedi, N., Motaghdi, A., and Golchin, M. (2011). Determination of Antibiotic Residues in Industrial Poultry Carcasses in Mazandaran Province using the F.P.T Method, the Quarterly Iranian Food Science and Nutrition, volume 8(1), pp. 65-72[In Persian].
- [3] Reig, M. & Toldra, F. (2008). Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. Meat Science, 78, 60-67.
- [4] Pirsaeheb, M., Khamoutian, R., Dargahi, A., Torabi, S., & Ghasemzadeh, A. (2014). Study of Antibiotic Residues in Milk in Iran, Jiroft University of Medical Sciences, volume 1(2), pp. 94-105[In Persian]
- [5] Heshmati, A. (2015). Impact of cooking procedures on antibacterial drug residues in foods: A review. Journal of Food Quality and Hazards Control, 2, 33-37.
- [6] Tavakoli, H. R., Firouzabadi, M. S., Afsharfarnia, S., Jafari, N. J. & Sa'adat, S. (2015). Detection antibiotic residues by HPLC method in chicken and claves meat in diet of a military center in Tehran. Acta Medica Mediterranea, 31, 1427-1433.
- [7] Rokni, N., Kamkar, A., Salehzadeh, F., & Madani, R. (2007). Study of Enrofloxacin Residues in Broiler Tissues using HPLC, the Quarterly Iranian Food Science and Technology, volume 4(2), pp. 11-16[In Persian]
- [8] Rahimi A. & Jafarian, M. (2008). Study of Chloramphenicol Residues in Poultry Meat Tissues in Isfahan using the ELISA Method, the journal Veterinary Clinical Pathology, volume 2(3), pp. 203-207[In Persian]
- [9] Movassagh, M. H. (2012). Detection of Antibiotic Residues in Raw Cow Milk in the Ilkhchi District (Southwest of Tabriz), in Spring of 2009, Journal of Food Science and Nutrition, volume 9(3), pp. 89-94[In Persian]
- [10] Rahimabadi, A., Ospour, Y., and Sayehban, P. (2016). Study of Tetracycline and Oxytetracycline Residues in Milk at Milk Collection Centers in Gilan Province using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Iranian Veterinary Journal, volume 12(1), pp. 118-125[In Persian]
- [11] Ghanavi, Z., Mollayi, S. & Eslami, Z. (2013). Comparison between the amount of penicillin G residue in raw and pasteurized
- [1] Cháfer-Pericás, C., Maquieira, A. & Puchades, R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 29(9), 1038-1049.

- Standards and Test Methods), the Food and Drug Administration, pp. 166-170 [In Persian]
- [17] Wang, S., Xu, B., Zhang, Y. & He, J.X. (2009). Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of neomycin residues in pig muscle, chicken muscle, egg, fish, milk and kidney. *Meat Science*, 82, 53-58.
- [18] Do, M. H. N., Yamaguchi, T., Okihashi, M., Harada, K., Konishi, Y., Uchida, K. & Do Nguyen, P. (2016). Screening of antibiotic residues in pork meat in Ho Chi Minh City, Vietnam, using a microbiological test kit and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Control*, 69, 262-266.
- [19] Johnson, J. D. (2014). Detection and confirmation of veterinary drug residues in commercially available frozen shrimp (Doctoral dissertation, Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in The School of Nutrition and Food Sciences by Jessica Danielle Johnson BS, Louisiana State University).
- milk in Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(7), e12724.
- [12] Ehsani, A. & Hashemi, M. (2015). Determination of antibacterial drug residues in Commercial eggs distributed in Urmia, Iran. *Journal of Food Quality and Hazards Control*, 2(2), 61-65.
- [13] Wang, H., Ren, L., Yu, X., Hu, J., Chen, Y., He, G. & Jiang, Q. (2017). Antibiotic residues in meat, milk and aquatic products in Shanghai and human exposure assessment. *Food Control*, 80, 217-225.
- [14] Tajik, H., Malekinejad, H., Razavi-Rouhani, S. M., Pajouhi, M. R., Mahmoudi, R. & 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), 2464-2468.
- [15] Shi, X., Wu, A., Zheng, S., Li, R. & Zhang, D. (2007). Molecularly imprinted polymer microspheres for solid-phase extraction of chloramphenicol residues in foods. *Journal of Chromatography B*, 850(1), 24-30.
- [16] Akbari-adergani, B. & Shirkhan, F. (2016). Malt and Malt Products (Fundamentals of Production and Processing,

Detection and Evaluation of penicillin base antibiotics residue in the kidney, liver and meat of the cow distributed in Tehran's municipal markets by using ELISA kits followed by high performance liquid chromatography

Jalali, M.¹, Ataee, M.², Akbari-adargani, B.^{3*}

1. Departement of Agriculture College of food science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran
2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran
3. Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Organization, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

(Received: 2018/10/27 Accepted:2019/08/05)

Antibiotic residues in meat and other foods of animal origin have adverse effects on consumer health. In this study, first, penicillin residues of 45 samples (15 meat samples, 15 liver samples and 15 kidney samples) randomly collected from Tehran retailers were evaluated by ELISA method. Based on ELISA results, from total 45 samples, 43 cases were diagnosed as contaminated sample for antibiotic residues. The highest penicillin amount was observed for liver samples but there was no significant difference between kidney and liver samples ($p=0.895$). Subsequently, samples with equal amounts of penicillin were removed and other samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) regarding penicillin G, ampicillin and amoxicillin. Penicillin G had the most value among other penicillin groups followed by ampicillin and amoxicillin, respectively. Liver samples showed higher levels of penicillin groups compared to meat and kidney samples, but no significant difference was found among them. Also, there was good correlation between ELISA and HPLC results and R^2 of all samples was greater than 0.99. Moreover, it was demonstrated that antibiotic residues of some samples were above the maximum residue limit (MRL) stated by world standards. Obtained results show the necessity of monitoring antibiotic residues in food of animal origin by related organizations especially the institute of standards & industrial research of Iran and veterinary organization.

Keywords: Meat, Liver, Kidney, Penicillin, Antibiotic residues, ELISA, HPLC.

* Corresponding Author E- Mail Address: analystchemist@yahoo.com