بررسی وجود باقیمانده داروهای ضد قارچ از خانواده ایمیدازول شامل Ketoconazole وClotrimazole در شیر پاستوریزه کشور

هدایت حسینی[۱*]، محمد ایمانی[۲]، بهار شمشادی[۳]، روح اله فردوسی[۴]، فرزانه احمد خان بیگی[۲]، مرتضی پیرعلی همدانی[۵]

۱*- دانشیارگروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران- ایران

۲- دانشیار پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، تهران- ایران

۳- استادیار دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار- ایران

۴- پژوهشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی ، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران- ایران

۵- استاد گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

(تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۲۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۴)

چکیده

داروهای ضد بیماری‌های قارچی کاربرد وسیعی در درمان ضایعات قارچی دام‌ها دارند. ترکیبات خانواده ایمیدازول از مهمترین این ترکیبات هستند که می توانند از طریق تماس موضعی با پستان دام یاجذب پوستی وارد شیر و زنجیره غذایی انسان شوند و با مهار سنتز استروئیدها در بدن انسان و یا بروز آثار گوارشی ناخواسته اثرات سویی در ایمنی و سلامت شیر برجای گذارند.

در این تحقیق جداسازی و شناسایی باقیمانده داروهای ضد قارچ از خانواده ایمیدازول در تعداد 60 نمونه شیرپاستوریزه از واحد های لبنی با تولید بالا پس از معتبر سازی روش، مورد آزمون قرار گرفت. به این منظور از تکنیک میکرو استخراج مایع- مایع پخشی و دستگاه کروماتوگراف گازی به منظور آنالیز ۲ ترکیب ایمیدازولی استفاده شد.در شرایط بهینه استخراج، فاکتور تغلیظ بالا (۲۵۰- ۲۵ برابر) و حد تشخیص µg/ml ۰/۰۱ بدست آمد. نتایج آزمایشگاهی نشان دادند که منحنی‌های کالیبراسیون گونه‌های تجزیه‌ای موردنظر در محدوده µg/ml ۱- ۰/۰۱ خطی است. درصد انحراف معیار نسبی که نشان دهنده تکرارپذیری قابل قبول روش است، برای کتوکونازول ۶/۸ – ۱/۲ و برای کلوتریمازول ۵/۳ – ۰/۳ بدست آمد. درصد بازیابی برای داروی کتوکونازول ۹۵/۹٪ و کلوتریمازول ۱۰۱/۷۸ ٪ به دست آمد که نشان‌دهنده کارآمد بودن روش است.

آنالیز انجام شده روی ۶۰ نمونه شیر پاستوریزه در ماههای مختلف سال ،آلودگی به ترکیبات کتوکونازول و کلوتریمازول در شیر را با حد تشخیص (۰/۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر) نشان نداد.

نتایج آزمایشات انجام شده نشان می دهد باقیمانده داروهای ضد قارچ کتوکونازول وکلوتریمازول در نمونه های شیر پاستوریزه ۱۰ کارخانه بزرگ تولید کننده شیر پاستوریزه از حد تشخیص این روش آنالیز کمتر بوده و باقیمانده این ترکیبات ضد قارچ در نمونه های مورد مطالعه بعنوان یک آلاینده شیمیایی مخاطره آمیز مطرح نمی باشد.

کلید واژگان: شیر پاستوریزه، باقیمانده داروهای ضد قارچ ،جداسازی،شناسایی، معتبر سازی، کتوکونازول، کلوتریمازول

* مسئول مکاتبات: hedayat@sbmu.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-30]

۱- مقدمه

داروهای ضد بیماری‌های قارچی نقش برجسته‌ای در درمان ضایعات قارچی موضعی دام‌های شیری داشته و حتی گاهی به عنوان پروفیلاکسی به کاربرده می‌شوند. این ترکیبات می‌توانند از خانواده‌های مختلف شیمیایی باشند که مهمترین آنها Imidazole ها هستندکه با مهار آنزیم cytochrome P450 14α-demethylase مانع از تبدیل lanosterol به ergosterol می شوند. مشهورترین ترکیبات این خانواده Miconazole، Ketoconazole، Clotrimazole، Econazole، Bifonazole، Butoconazole، Fenticonazole، Isoconazole، Oxiconazole، Sertaconazole، Sulconazole و Tioconazole هستند. این ترکیبات همچنین سبب مهار سنتز استروئیدها در بدن انسان می‌شوند و آثار سمی ناخواسته‌ای به دنبال دارند [۱] .

داروهای ضدقارچ از خانواده ایمیدازول که بطور متداول در ایران استفاده می شوند شامل Ketoconazole ، Clotrimazole می باشد. این مواد کاربرد موضعی داشته و گستردگی کاربرد این فرآورده‌های موضعی برسطح پستان دام‌های شیرده می تواند سبب شود این ترکیبات به زنجیره غذایی انسان وارد شده و موجب بروز آثار جنبی زیان‌بار گوارشی و سیستمیک شوند. بخشی از این آثار جانبی به مهار سنتز استروئیدها و بخش دیگر به آثار ناخواسته گوارشی از جمله تغییر فلور دستگاه گوارش مربوط می‌شود که شامل کولیک، دردهای اپی‌گاستریک، تهوع، استفراغ و اسهال می‌شود [۲].

هانگ و همکاران روش سریع وحساسی را برای تعیین مقدار کمی داروهای کتوکونازول و دوستاکسل از پلاسمای موش گزارش کردند. آنالیز به روش کروماتوگرافی مایع با شناساگر اسپکتروسکوپی جرمی و استخراج به روش استخراج مایع- مایع با اتیل‌استات انجام شد. منحنی کالیبراسیون در محدوده ppm ۲۰-۰/۰۵ برای کتوکونازول خطی بود دقت آنالیز برای یک روز و روزهای مختلف در حد ۷٪ و صحت روش از ۹۵ تا ۱۱۰٪ تعیین شده است [۳].

آندروز و همکاران اندازه‌گیری داروی کتوکونازول را به روش استخراج فاز جامد در سرم انسانی گزارش کردند. پیش‌تغلیظ با استفاده از کارتریج Sep-Pak C18 انجام و آنالیز به روش HPLC فاز معکوس انجام شد. بازیابی روش تقریباً ۷۷٪ گزارش شده است[۴].

همدی و همکاران با استفاده از کروماتوگرافی مایع با ستون فضاویژه[1] توانستند انانتیومر کتوکونازول را در پلاسمای موش تعیین مقدار کنند. در این روش از استخراج مایع- مایع با تترا بوتیل متیل اتر استفاده شد. کمترین حد تعیین مقدار دارو ppm ۰/۰۶۲۵ و مقدار بازیابی دارو با این روش ۸۱/۳ تا ۸۹/۰ ٪ گزارش شده است[۵].

وینن و همکاران داروی قارچ‌کش کلوتریمازول و استاندارد داخلی آن (کتوکونازول) را به دو روش رسوب‌دهی پروتئین و استخراج مایع-مایع از پلاسمای موش جداسازی وآنالیز کردند. براساس مقایسه این دو روش، رسوب‌دهی پروتئین به‌عنوان روش استخراج مناسب برای پیش تغلیظ کلوتریمازول از پلاسما انتخاب شد. بازیابی روش استخراج ۹۸٪ گزارش شد. آنالیز داروها با استفاده از روش الکتروفورز مویین انجام شد که حد تشخیص آن ۰/۳ µmol L-1 و حد تعیین مقدار آن ۰/۵µmol L-1 گزارش شد [۶].

از آنجاکه با توجه به مطالعات کتابخانه‌ای وگزارشات، تا کنون گزارشی از جداسازی و تعیین مقدار این دو دارو در محیط پیچیده شیر ارائه نشده‌است این تحقیق بمنظور ارزیابی میزان این دو ترکیب در شیرهای پاستوریزه ۱۰ کارخانه پر تولید کشور انجام گردید.

۲- مواد و روش کار

۲-۱ تهیه نمونه

تعداد ۶۰ نمونه شیر پاستوریزه در چهار فصل مختلف سال تولیدشده توسط ۱۰ کارخانه پر تولید کشور نمونه برداری و در مجاورت سرما به آزمایشگاه منتقل شد.

۲-۲- روش استخراج

در روش استفاده شده برای استخراج SPE این دو داروی ایمیدازولی ، ازتانک استخراج که دارای مانیفولد ۲۰ تایی و سنجش خلاء تا mmHg ۷۶۲ استفاده شد و

1. Stereospecific

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-30]

برای ایجاد خلا مورد نیاز خرطوم آبی به تانک وصل گردید. همچنین برای استخراج از کارتریج Sep-Pak C18 با شماره WAT020515 از شرکت Waters استفاده شد. برای آماده سازی کارتریج ابتدا ۱۰ ml متانول و سپس ۱۰ ml آب یون‌زدایی شده با سرعت ۱ ml/min از کارتریج عبور داده شد. سپس ۵ ml محلول نمک سدیم کلراید ۲٪ و ۱۰ ml محلول بافر فسفات با pH= ۵/۸ با سرعت ۱ ml/min از آن عبور داده شد. بعد از بارگذاری محلول نمونه در کارتریج با سرعت ۱ ml/min کارتریج به مدت ۵ min با عبور هوا از آن خشک شد و با ۵ ml آب یون‌زدایی شده با سرعت ۲/۵ ml/min شسته شد سپس با محلول واجذب اتانول ۹۵ ٪ واجذب با سرعت ۱ ml/min انجام شد [۷و۸] . محلول حاصل (حاوی داروهای استخراج‌شده) در یک لوله آزمایش شیشه‌ای جمع‌آوری شد. حاصل استخراج در حمام آب ۵۰ °C با عبور جریان گاز نیتروژن به مدت ۴۵ min خشک شد. بعداز خشک شدن کامل ۱ ml استونیتریل به آن اضافه و به مدت ۳۰Sec با ورتکس همزده شد و سپس به مدت ۳ min در حمام اولتراسوند قرار گرفت. ۲۰ µl از این محلول به HPLC تزریق شد [۹و۱۰].

۲-۳- آزمون کروماتوگرافی

برای کروماتوگرافی کتوکونازول و کلوتریمازول از دستگاه کروماتوگراف مایع با کارآیی بالا مدل ۱۲۰۰ ساخت شرکت Agilent آمریکا با آشکارساز UV و ستون Eclips XDB C18 با اندازه ذره ۵ µm و طول ۴/۶mm× ۲۵۰ شرکتAgilent آمریکا استفاده شد. روش مورد استفاده فاز معکوس و سیستم ایزوکراتیک بود . فاز متحرک شامل یک سیستم ایزوکراتیک شامل ۸۵٪ استونیتریل و ۱۵٪ بافر استات سدیم(۲۰ mmol با pH= ۴/۶) بود که تنظیم pH توسط اسید استیک ۲M انجام گرفت. سرعت جریان فاز متحرک ۱ ml/min و حجم تزریق ۲۰ µL بود. همچنین از امواج اولتراسونیک برای گاززدایی فاز متحرک استفاده شد. طول موج بهینه برای به دست آوردن حداکثر پاسخ آشکارساز در ۲۱۲ nm انتخاب شد . دمای ستون ۳۵ °C و طول زمان آنالیز کروماتوگرافی ۵ min بود. اطلاعات توسط نرم افزارAgilent Chem Station پردازش شد [۱۱].

برای تعیین زمان بازداری داروها ابتدا حلال خالص استونیتریل بدون حضور داروها تزریق شد، سپس از محلول‌های کلوتریمازول و کتوکونازول با غلظت ppm ۴۰ در استونیتریل به طور جداگانه تهیه شد. در شرایط کاملا یکسان در فاز متحرک با ترکیب درصد استونیتریل: بافر (۸۵ : ۱۵) با بافر استات ۲۰Mm در pH=۴/۶ به‌ترتیب محلول کتوکونازول و کلوتریمازول به دستگاه تزریق شد. [۱۳و۱۲].

برای تعیین حد تشخیص روش، ۱۰ بار از حلال استونیتریل به دستگاه تزریق شد و سطح زیر پیک نویزها آن مشخص شد و محلول‌هایی با غلظت ۰/۱ ،۰/۲۵، ۰/۵ ،۱ ،۳ ،۵ ،۱۰ ،۲۰ ،۵۰ ،۷۰ و ppm۱۰۰از مخلوط داروها تهیه و بعداز به تعادل رسیدن ستون با شرایط بهینه به دستگاه تزریق شد. منحنی حاصل با رسم سطح زیر پیک بر حسب غلظت رسم شد. با استفاده از معادله منحنی کالیبراسیون و میانگین سطح زیر پیک نویز مقدار حد تشخیص تعیین شد.

برای تعیین حد تعیین مقدار اندازه گیری‌های متوالی سری غلظت‌های ۰/۱ ،۰/۲۵، ۰/۵ ،۱ ،۳ ،۵ ،۱۰ ،۲۰ ،۵۰ ،۷۰ و ppm ۱۰۰ از محلول‌های مخلوط هر دو دارو در شرایط بهینه انجام شد.

برای رسم منحنی کالیبراسیون محلول‌هایی در غلظت‌های مختلف در دو محدوده غلظتی مختلف غلظتهای کم (ppm ۵- ۰/۱) و غلظت‌های زیاد ppm (۱۰۰- ۱۰) تهیه و به دستگاه تزریق شد.

۲-۴- آنالیز آماری

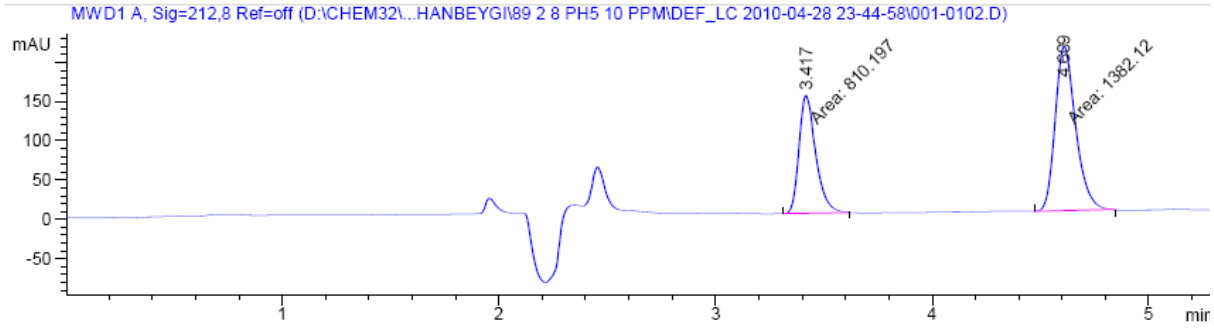
آنالیز آماری داده‌های حاصله با نرم افزارSPSS انجام گرفت و برای رسم نمودارها از نرم افزارExcel استفاده شد. با استفاده از روش آنالیز واریانس جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر حاصل از هر شاخص به کار رفت. به منظور تجزیه و تحلیل مقادیر کمی شرط نرمال بودن قبل از آزمون آنالیز واریانس با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و همگنی واریانس داده‌ها به وسیله آزمون لون تست گردید. همچنین جهت تعیین دقیق وجود یا عدم وجود تفاوت

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-30]

معنی‌دار بین تیمارهای از آزمون تفاوت حداقل معنی‌دار و جهت مقایسه میانگین‌های تیمارهای چند گانه با یکدیگر از آزمون دانکن استفاده شد. درتمامی مراحل تجزیه و تحلیل، خطای مجاز برای رد فرض صفر ۵ درصد در نظر گرفته شد

۳- نتایج

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود زمان مورد نیاز برای آنالیز ۵ دقیقه بوده که ابتدا پیک کتوکونازول در دقیقه ۳/۴ و سپس پیک کلوتریمازول در دقیقه ۴/۶ ظاهر شد. اختلاف زمان بازداری (R_t) برای دو پیک حدود ۱/۲ دقیقه بود. کروماتوگرام مربوط به حالت مخلوط داروها نشان دهنده میزان تفکیک ۹/۳۵ برای داروها بود .



شکل ۱ کرماتوگرام داروهای کلوتریمازول و کتوکونازول در شرایط بهینه

حساسیت روش با تعیین دو عامل حد تشخیص (LOD) و حد تعیین مقدار (LOQ) سنجیده شد نتایج جدول ۱ نشان می دهد حد تشخیص روش برای اندازه گیری داروهای کتوکونازول و کلوتریمازول ppm ۰/۰۱ و حد تعیین مقدارppm ۰/۱ بود و محدوده خطی منحنی کالیبراسیون نسبتاً وسیع و برای هر دو ترکیب ppm ۱۰۰-۰/۱ می‌باشد.

درصد انحراف استاندارد نسبی برای نه تکرار برای کتوکونازول ۷/۵-۰/۱ و برای کلوتریمازول ۸/۵-۰/۱ می باشد که نشان دهنده تکرار پذیری قابل قبول روش است [۱۴] .

با استفاده از معادله خط رگرسیون مقادیر داروهای استخراج شده از شیر محاسبه شد و درصد بازیابی داروهای کتوکونازول و کلوتریمازول با استفاده از فرمول مربوطه محاسبه گردید که بر این اساس درصد بازیابی کتوکونازول ۹۵/۹ و درصد بازیابی برای کلوتریمازول ۱۰۱/۷۸ تعیین گردید.

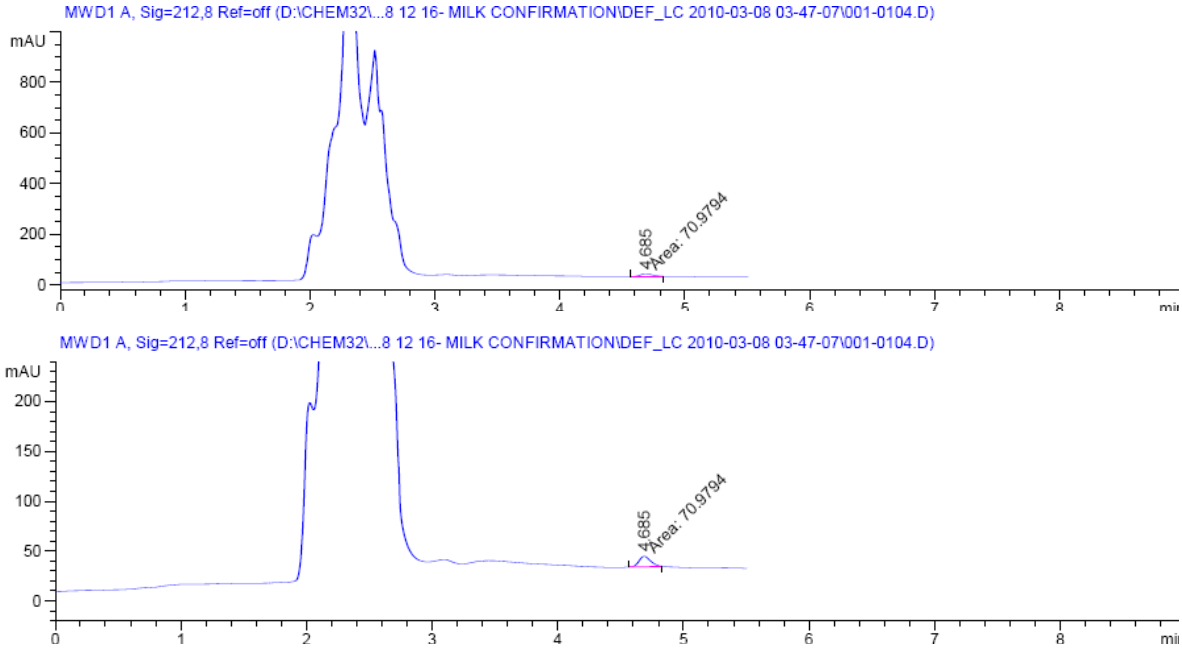
انجام مراحل آزمون روی ۶۰ نمونه شیر پاستوریزه مختلف کارخانه های فراورده های لبنی که بیشتری میزان تولید کشور را دارند، هیچگونه پیک مشکوکی که نشان دهنده وجود داروهای کتوکونازول و کلوتریمازول باشد را نشان نداد. فقط در یک نمونه شیر در زمان ۴/۶ دقیقه یک پیک با سطح زیر پیک ۷۰ مشاهده شد. با فرض اینکه پیک ناشناس مربوط به حضور کلوتریمازول باشد، سطح زیر پیک ۷۰درصد معادل غلظت حدود ppm ۰/۶ کلوتریمازول است که برای حجم ۵ میلی لیتر شیر مقداری غیر قابل اغماض بود. بدلیل اینکه داروی کلوتریمازول درست در زمان ۴/۶ دقیقه خارج می شود، لازم بود تست های تایید کننده برای حضور دارو روی نمونه شیر انجام گیرد. لذا برای این منظور از روش Fraction Collection استفاده شد. به این ترتیب که، از پنج بَچ مختلف شیر که تولید همان تاریخ بود مجددا نمونه برداری شد. و نمونه های حاصل به دستگاه تزریق شدند. پیک ۴/۶ دقیقه درست با همان سطح زیر پیک در تمام نمونه ها مشاهده شد. درست از زمان ۴/۶ دقیقه از مسیر خروجی بلافاصله بعد از دتکتور، فاز متحرک جمع آوری شد. پس از ۳ تزریق پیاپی برای هر نمونه و جمع آوری خروجی در فاصله زمانی ۵/۶-۴/۶ دقیقه، نمونه آماده تست شد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-30]

جدول ۱ معادله منحنی کالیبراسیون وشاخص های حساسیت آزمون

عامل شیمیایی		معادله کالیبراسیون	رنج خطی (ppm)	R^2	LOD (S/N= 3)	LOQ (S/N=10)
کتوکونازول	غلظت کم	y = ۷۹/۰۶۲x + ۱/۳۶	۰/۱-۱۰۰	۰/۹۹۹	۰/۰۱ ppm	۰/۱ ppm
	غلظت زیاد	y = ۸۰/۰۸۲ x –۹/۰۷۶۵	۰/۱-۱۰۰	۰/۹۹۹۹	۰/۰۱ ppm	۰/۱ ppm
کلوتریمازول	غلظت کم	y = ۱۳۵/۲۶x +۷/۲۹۶۶	۰/۱-۱۰۰	۰/۹۹۹۲	۰/۰۱ ppm	۰/۱ ppm
	غلظت زیاد	y = ۱۴۲/۴x – ۲۰۷/۱۶	۰/۱-۱۰۰	۱	۰/۰۱ ppm	۰/۱ ppm

غلظت کم: ppm ۵ – ۰/۱ – غلظت زیاد: ppm ۱۰۰ – ۱۰



شکل ۲ کروماتوگرام نمونه شیر پاستوریزه مشکوک به وجود کلوتریمازول، جهت وضوح بیشتر، کروماتوگرام دوم بزرگنمایی شده کروماتوگرام اول است.

طبق نتایج حاصل حضور ایکوزانوییک اسید، هگزان دی اوئیک اسید، پنتان دی اوئیک اسید و لاکتیک اسید با match quality حدود ۹۰ درصد برای نمونه های حاصل توسط دتکتور شناسایی شد. می توان به راحتی استنباط کرد که پیک حاصل با توجه به مواد تشخیص داده شده، مربوط به حضور چربی های غیر اشباع شیر بودند و هیچگونه نشانه ای از حضور داروی کلوتریمازول در شیر موجود نبود. همچنین در شکل ۲ کروماتوگرام نمونه شیر پاستوریزه که حاوی پیک مشکوک در ۴/۶ دقیقه بود آمده است.

۴- بحث

استخراج فاز جامد روشی جامع و کارآمد است که نسبتاً سریع بوده ، نیاز به مقدار کم نمونه دارد، استفاده کم از حلال، عدم تشکیل امولسیون و فاکتور تغلیظ بالا امکان

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-30]

پاک‌سازی وتغلیظ را قبل از استخراج و در یک مرحله آنالیز فراهم می‌سازد. این روش استخراج با کرواتوگرافی مایع با کارآیی بالا سازگار می‌باشد و به عنوان روش پیش تغلیظ قبل از آنالیز، قابل استفاده می‌باشد. بر اساس نتایج بدست آمده، حد تشخیص روش برای اندازه گیری داروهای کتوکونازول و کلوتریمازول بسیار پایین بوده ۰/۰۱ppm است. درصد انحراف استاندارد نسبی برای ۹ تکرار برای کتوکونازول ۶/۸ – ۱/۲ و برای کلوتریمازول ۵/۳ – ۰/۳ است که نشان دهنده تکرار پذیری قابل قبول روش است.همچنین درصد بازیابی برای داروی کتوکونازول ۹۵/۹٪ و کلوتریمازول ۱۰۱/۷۸ ٪ به‌دست آمد که نشان‌دهنده کارآمد بودن روش است.

ماریا و همکاران جداسازی و تعیین مقدار داروی میکونازول را در پلاسمای انسانی گزارش کردند. استخراج دارو به روش SPE با کارتریج C۱۸ انجام و بازیابی این روش ۸۵٪ گزارش شده است که در مقایسه با میزان بازیابی روش بکار رفته در این تحقیق از میزان بازیابی کمتری برخوردار بوده است [۱۵].

تورنر و همکاران به روش استخراج فاز جامد داروی کلوتریمازول را در ۲۱ نمونه سرم انسانی پیش‌تغلیظ کردند. آنالیز داروها به روش HPLC انجام شد. استخراج با استفاده از کارتریج Hypersil ODS C18 انجام گردید و درصد بازیابی بین ۱۰۳ تا ۱۱۸٪ و حساسیت روش ۰/۰۵mgL-1 گزارش شده است که نتایج این روش از نظر درصد بازیابی با روش بکار رفته دراین تحقیق بسیار مشابه است اما حساسیت تحقیق اخیر از حساسیت روش تورنر و همکاران بالاتر است [۱۶].

نتایج بدست آمده از آنالیز نمونه های شیر پاستوریزه ۱۰ کارخانجات لبنی پر تولید کشور نشان داد باقیمانده دو دارو ضد قارچ متداول و پر مصرف در درمان بیماریهای دامی یعنی کتوکونازول و کلوتریمازول در نمونه های شیر تحت مطالعه کمتر از حد تشخیص روش آزمون ۰/۰۱ppm بوده است.این موضوع از نظر بهداشت و ایمنی مواد غذایی از این جنبه حائز اهمیت است که نشان می دهد در بخش قابل توجهی از شیر پاستوریزه تولیدی کشور باقیمانده داروهای ضد قارچ ایمیدازولی کتوکونازول و کلوتریمازول در حد بسیار پائین است.از آنجا که این مطالعه اولین گزارش بررسی وجود باقیمانده داروهای ضد بیماریهای قارچی در کشور است بر اساس نتایج حاصل می توان نتیجه گیری نمود در نمونه های تحت مطالعه که قسمت عمده ای از تولید شیر کشور را تشکیل می دهند آلاینده شیمیایی باقیمانده ترکیبات ضد قارچ ایمیدازول بعنوان یک مخاطره که سلامت مصرف کنندگان را به خطر اندازد مطرح نمی باشد مصرف صحیح داروهای ضد قارچ و رعایت مدت زمان عدم مصرف شیر در طی دوره مصرف این داروها در دامهای شیرده ، پایین بودن میزان بیماریهای قارچی در دامداری های شیری کشور به دلیل شستشوی پستان دام در دو نوبت قبل از شیر دوشی با مواد ضد عفونی کننده ویا عدم توجه به ضایعات قارچی در دامهای شیری و عدم درمان آن با داروهای ضد قارچ از جمله عواملی است که ممکن است سبب شود باقیمانده داروهای ضد قارچ در شیر تولیدی کشور در حد بسیار پایین و غیر قابل تشخیص با روش های حساس آزمایشگاهی باشد.

۵- منابع

[1] International Dairy Federation, Chemical Residues in Milk and Milk Products, Document 113, International Dairy Federation, Brussels, Belgium 1979.

[2]N. A. Botsoglou, D.J. Fletouris ,Marcel Dekker, 2001, Drug Residues in Food Pharmacology, food safety, and analysis, , INC,ISBN 0-827-8959-8.

[3] Qing Huang , Wang Guang-Ji , Sun Jian-Guo , HU Xiao-Lin , LU Yi-Hong , Qlan Zhang , 2007 , Simultaneous determination of docetaxel and ketoconazole in rat plasma by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 21, 1009-1018.

[4] Dalia A. Hamdy and Dion R. Brocks, 2008, A stereospecific high-performance liquid chromatographic assay for the determination of ketoconazole enantiomers in rat plasma,Biomedical Chromatography, 22: 542–547.

[5] Fred A. Andrews, Lance R., et al., 1981, Liquid chromatographic assay of

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-30]

ketoconazole, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 19.110-113.

[6] Frank Wienen,Stefanie Laug, et al, 2003, Determination of clotrimazole in mice plasma by capillary electrophoresis, J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30, 1879-1887.

[7] Henry M., SPE technology: principles and practical consequences, in N. J. K.Simpson, ed., 2000, Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications, Marcel Dekker, New York, pp. 125–182.

[8] Wells M. J. M., 2000, Essential guides to method development in solid-phase extraction, in I. D. Wilson, E. R. Adlard, M. Cooke, and C. F. Poole, eds., Encyclopedia of Separation Science, Vol. 10, Academic Press, London, 4636–4643.

[9] Pesek J. J. and Matyska M. T., SPE sorbents and formats, in N. J. K. Simpson,ed.,2000, Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications, Marcel Dekker, New York, , pp. 19–38.

[10] Janathan Bones, Pavel Nesterenko, et al, 2006, Dual gradient LC method for the determination of pharmaceutical residues in environmental samples using a monolithic silica reversed phase column Intern.j.Environ.Anal.Chem, 86, 7.15, 487-504.

[11] Khashaba P.Y., El-Shabouri S.R., Emara K.M, Mohamed A.M., 2009, Simultaneous Determination of Miconazole Nitrate and Metronidazole in Different Pharmaceutical Dosage Forms by Gas Chromatography and Flame Ionization Detector (GC-FID),International Journal of Biomedical Science 6(1), 13-18, Mar 15, 2010.

[12] Bones, J and Nesterenko, PN and Thomas, K and Paull, B., 2006, *Dual gradient LC method for the determination of pharmaceutical residues in environmental samples using a monolithic silica reversed phase column.* International Journal of Environmental Chemistry, 86 (7). pp. 487-504. ISSN 0306-7319.

[13] Inoue K., Y. Mizuno Y.,et al, 2008, Determination of avoparcin in animal tissues and milk using LC-ESI-MS/MS and tandem-SPE J. Sep. Sci.,31,3871-3878.

[14] Yu-Luan Chen, Felder L., 2002, Development and Validation of A Method for the Determination of Ketoconazole in Human Plasma Using LC-MS/MS. Journal of Chromatography B, 774, 67–78.

[15] Maria Kobylinska, Kamila Kobylinska, et al., 1996, High-performance liquid chromatographic analysis for the determination of miconazole in human plasma using solid-phase extraction, Journal of Chromatography Biomedical Application, 685,191-195.

[16]Turner C.A., Turner A., et al., 1986, High performance liquid chromatographic determination of ketoconazole in human serum, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 18,757-763.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-30]

Separation and Identification of Imidazole-based Antifungal Residues in pasteurized Milk of Iran

Hosseini, H.[1*], Imani, M.[2], Shemshadi, B.[3], Ferdosy, R.A. [4], Ahmad Khan Beygi, F.[2], Pirali Hamedani, M.[5]

1- Associate Prof., National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical sciences, Tehran, Iran
2- Associate Prof., Research Institute of polymer & petro chemistry, Tehran, Iran
3- Assistant Prof., Islamic Azad University, Garmsar Branch, Garmsar, Iran
4- Lecturer, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical sciences, Tehran, Iran
5- Prof., Pharmacy Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 88/6/29 Accepted: 89/11/4)

Antifungal drugs have an important role for treatment of fungal skin diseases of livestock and prophylaxis. These compounds belong to the different chemical groups but Imidazole group is one of the most important groups.
In this study 60 pasteurized milk samples were analyzed by liquid-liquid microextraction and high performance liquid chromatography. And the efficiency of solid phase extraction and high performance chromatography-UV spectroscopy was evaluated in the extraction and determination of Ketoconazole and Clotrimazole analytes in milk.
In this research, after full validation, detection and quantitation limits were 0.01 $\mu g.ml^{-1}$ and 0.1 $\mu g.mL^{-1}$ for Ketoconazole and Clotrimazole. The linear range of calibration was relatively wide (0.01-100 $\mu g.ml^{-1}$). The relative standard deviation was 0.1-7.5% for Ketoconazole and 0.1-8.5% for Clotrimazole.
Monitoring of 60 pasteurized milk in different seasons for Clotrimazole and Ketoconazole residue with 0.01 ppm detection limit, demonstrated there is no detectable amounts of these antifungal residues in pasteurized milk.

Key words: Pasteurized milk, Antifungal residue, validation, Identification, Separation, Ketoconazole, Clotrimazole

* Corresponding author E-Mail address: hedayat@sbmu.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-11-30]