

## مقایسه‌ی غلظت باقیمانده انروفلوکساسین در شیر کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان بالینی و سالم متعاقب تجویز داخل عضلانی به روش HPLC

محمد رضا گلستانی فر<sup>۱</sup>، زهره عبدالملکی<sup>۲\*</sup> و محمد امین اسلامپور<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته دکتری عمومی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

<sup>۲</sup> استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

<sup>۳</sup> استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۳

دریافت: ۱۳۹۸/۳/۷

### چکیده

مطالعات فارماکوکینتیکی داروها در بدن حیوانات سالم صورت می‌پذیرد. با توجه به این که در شرایط پاتولوژیک میزان نفوذپذیری داروها به فضاهای آناتومیک دستخوش تغییرات می‌شود، اطلاع از میزان نفوذپذیری آنتی‌بیوتیک‌ها در غدد پستانی مبتلا به عفونت می‌تواند در انتخاب آنتی‌بیوتیک مؤثر باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی غلظت انروفلوکساسین در شیر کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان بالینی و سالم پس از تجویز داخل عضلانی تک دوز دارو در گاوهای شیری بود. برای انجام این تحقیق از ۶ رأس گاو هلستاین شیروار مبتلا به ورم پستان درجه ۲ بالینی با عامل کلی فرمی، به روش آسپتیک نمونه شیر اخذ و به صورت همزمان در محیط بلاد آگار و مک کانکی کشت داده شد، سپس سویه‌های کلی فرم جدا شده به آزمایشگاه رفرانس ارسال گردید. بعد از تأیید عامل ورم پستان، انروفلوکساسین ۵ درصد (هیپرالونا) با دوز ۵ mg/kg B.W داخل عضلانی تزریق شد. سپس از کارتیه مبتلا و کارتیه ضربدری سالم در زمان‌های متفاوت نمونه شیر اخذ و برای آنالیز به آزمایشگاه ارسال شد. باقی‌مانده‌های انروفلوکساسین و متابولیت آن، سیپروفلوکساسین به روش استاندارد استخراج شد سپس غلظت داروها با روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) اندازه‌گیری شد. شرایط کروماتوگرافی شامل فاز متحرک متانول- استونیتریل با نسبت حجمی 76:24 (v/v) به روش ایزوکراتیک با سرعت جریان ۱ ml/min و شناساگر UV با طول موج ۲۸۰ نانومتر بود. نتایج مطالعه ما نشان داد که بین میزان انروفلوکساسین در نمونه‌های شیر دو گروه در ساعات اندازه‌گیری شده تفاوت معنی‌داری وجود ندارد، در حالی که مقدار سیپروفلوکساسین در ساعت ۱۲ در نمونه‌های شیر اخذ شده از کارتیه ورم پستانی، به طور معنی‌داری بیش‌تر از شیر کارتیه‌های سالم بود. بر اساس داده‌های به دست آمده از HPLC می‌توان نتیجه گرفت که الگوی نفوذ انروفلوکساسین در کارتیه‌های سالم و مبتلا به ورم پستان بالینی تفاوت معنی‌داری نداشت.

**کلمات کلیدی:** انروفلوکساسین، ورم پستان بالینی، کلی فرم، کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا

### مقدمه

انروفلوکساسین یک ترکیب فلوروکینولونی برگشت‌آزیم ژیراز (تیپ II توپرایزومراز) باعث ممانعت از همانندسازی و در نتیجه مرگ میکروارگانیسم‌ها می‌گردد. (Fluoroquinolones) است که از طریق مهار غیرقابل

\*نویسنده مسئول: زهره عبدالملکی، استادیار بخش فارماکولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

E-mail: zohreh.abdolmaleki@kia.ac.ir



شیمیایی خود، پروتون دار می شوند. عوامل کربوکسیل و آمین موجود در انروفلوکسازین و سیپروفلوکسازین به ترتیب با  $pka$  ۶ تا ۶/۱ و ۷/۸ تا ۸/۸، سبب می گردند  $pka$  دارو در  $pH$  فیزیولوژیک در نقطه ایزوالکتریک باشد. فلئورکینولون‌هایی مانند انروفلوکسازین و سیپروفلوکسازین ترکیبات لیپوفیل هستند، که سایر خصوصیات فیزیکیوشیمیایی دارو از جمله حلالیت آن در چربی در ورود دارو به شیر تاثیرگذار است (Tyczkowska, Voyksner, Anderson, & Papich, 1994; Varma, Ahmad, Sharma, Aggarwal, & Ahuja, 2003).

روش‌های متعددی به منظور تعیین باقی مانده آنتی-بیوتیکی که روش‌های میکروبیولوژیکی، کروماتوگرافی، الایزا و روش‌های فیزیکیوشیمیایی از متداول‌ترین آن‌ها می-باشد، در بین تمام این روش‌ها، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance Liquid Chromatography H.P.L.C) به علت حساسیت و ویژگی بالا از اهمیت بیش‌تری برخوردار است (Horwitz, 1975; Kinsella et al., 2009; Schenck & Callery, 1998).

مطالعات فارماکوکینتیکی در رابطه با انتشار و حذف داروها از بدن در حیوانات سالم صورت می‌پذیرد (Ambros et al., 2007; Avci & Elmas, 2014; Bajwa, 2007; Bansal, Srivastava, & Ranjan, 2007). مطالعات فارماکوکینتیکی فلورکینولون‌ها و به خصوص باقی مانده انروفلوکسازین در شیر نیز، در گونه‌های مختلف انجام شده است (Idowu, Peggins, Cullison, & Von Bredow, 2010; Marin, Escudero, FERNÁNDEZ-VARÓN, & Carceles, 2007; Varma et al., 2003; Waxman et al., 2001). با توجه به این که در شرایط پاتولوژیک میزان نفوذپذیری سلول‌های اندوتلیوم عروق و در نتیجه نفوذپذیری داروها به فضاهای آناتومیک بدن از جمله بافت پستان در مقایسه با شرایط فیزیولوژیک دستخوش تغییرات می‌شود (Pober & Sessa, 2007; Tedgui, 1996)، در نتیجه گمان می‌رود میزان باقی مانده آنتی‌بیوتیکی در شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک متفاوت باشد. اطلاع از

انروفلوکسازین بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های گرم منفی، گرم مثبت و همچنین مایکوپلاسما مؤثر است. خصوصیات فارماکوکینتیکی این آنتی‌باکتریال نشان می‌دهد که نیم تا دو ساعت پس از تزریق عضلانی، مقدار انروفلوکسازین در سرم خون به حداکثر می‌رسد، همچنین نفوذپذیری و انتشار دارو در بافت‌های مختلف بدن نسبتاً وسیع است و پس از یک بار تجویز دارو به طور متوسط غلظت آن تا ۲۴ ساعت در محدوده درمان باقی می‌ماند. دفع دارو از بدن از طریق مکانیسم‌های کلیوی بدون تغییر و غیرکلیوی (صفر) با تبدیل به سیپروفلوکسازین صورت می‌گیرد. انروفلوکسازین به طور مؤثری در درمان عفونت‌های ادراری، تنفسی، گوارشی و پوستی در گونه‌های مختلف حیوانی همچون نشخوارکنندگان بزرگ و کوچک، سگ، گربه و طیور استفاده می‌شود (Brown, 1996; Campoli-Richards et al., 1988; Neu, 1988; Riviere & Papich, 2018).

انروفلوکسازین در گاو شیری تنها در درمان عفونت‌های تنفسی از طرف انجمن غذا و داروی آمریکا اجازه مصرف دارد ولی خصوصیات فارماکودینامیک و کینتیک آن باعث شده که دامپزشکان از آن به صورت خارج از برچسب در درمان عفونت‌های دیگر به صورت گسترده استفاده کنند. در بیشتر مناطق دنیا انروفلوکسازین به عنوان داروی منتخب در درمان اورام پستان بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین با توجه به شیوع بالای ورم پستان می‌توان تخمین زد که این دارو یکی از پر مصرف‌ترین داروی آنتی-باکتریال در صنعت گاو شیری باشد (Halasa, Huijps, Østerås, & Hogeveen, 2007; Heringstad, Klemetsdal, & Ruane, 2000; Sawant, Sordillo, & Jayarao, 2005).

بررسی‌ها نشان می‌دهد که میزان ورود داروها در شیر و حبس آن‌ها طبق رابطه هندرسن-هاسلباخ تابعی از ضریب یونیزاسیون دارو ( $pka$ ) و  $pH$  شیر است، که عامل تعیین کننده و تاثیرگذار در حضور بعضی از داروها و باقی مانده آنتی‌بیوتیکی در شیر است. کینولون‌ها مولکول‌هایی آمفوتر هستند که در بخش‌های حاوی کربوکسیل و آمین ساختمان

گرفته شد که غده پستانی از لحاظ علائم بالینی سالم و فاقد هرگونه تورم، سفتی و گرما در زمان لمس باشد. همچنین همزمان با نمونه‌گیری از کارتیه مبتلا، از کارتیه سالم همان حیوان یک نمونه شیر اخذ و جهت کشت میکروبی به آزمایشگاه ارسال گردید. در صورتی که کارتیه مورد نظر فاقد علائم بالینی بوده و همچنین عدم حضور باکتری در آن مورد تایید قرار گرفت، آن کارتیه به عنوان کارتیه سالم وارد مطالعه شد. سپس از کارتیه مبتلا و از کارتیه ضربدری سالم آن به عنوان نمونه‌های گروه سالم نمونه شیر اخذ شد. جهت تعیین مقدار دارو در شیر در زمان‌های ۱، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق، نمونه‌ها اخذ و تحت شرایط دمایی مناسب به آزمایشگاه بخش فارماکولوژی دانشکده دامپزشکی منتقل شد.

#### مراحل آنالیز

مراحل آنالیز شامل مراحل استخراج، آماده‌سازی استانداردهای انروفلوکساسین، سیپروفلوکساسین و نمونه‌های اصلی و در نهایت سنجش مقادیر دارو بود.

#### استخراج

در مرحله اول با استفاده از روش فاز مایع-مایع انروفلوکساسین از شیر جدا شد و نمونه قابل تزریق به سیستم HPLC فراهم شد برای استخراج به ترتیب زیر عمل گردید: ۱۵cc از شیر با ۵۰µl اسید ارتوفسفریک یک نرمال مخلوط گردید و به مدت ۵s با ورتکس به شدت به هم زده شد، سپس ۲cc استونیتریل به مخلوط اضافه و به مدت ۱۰s ورتکس گردید. بعد از آن مخلوط فوق به مدت ۵min در دور ۴۰۰۰rpm در شرایط دمایی ۴°C سانتریفوژ شد. سپس مایع به دست آمده به فالكون ۱۵cc انتقال داده شد و ۳ml متیلن کلراید به لوله فالكون اضافه گردید و به مدت ۱۰s ورتکس گردید، در ادامه به مدت ۵min در شرایط ۴۰۰۰rpm در دمای ۴°C سانتریفوژ شد. در نهایت فاز آبی جدا شده با استفاده از سرسمپلر ۱۰۰۰ µL به ویال اتوسمپلر انتقال داده شد (Idowu et al., 2010).

چگونگی نفوذ دارو در غدد پستانی مبتلا به عفونت و همچنین غدد پستانی سالم و حذف آن‌ها از راه شیر می‌تواند در انتخاب آنتی‌بیوتیک کمک شایانی نماید. لذا با توجه به عدم وجود مطالعات کافی در رابطه با میزان نفوذ داروها در بافت پستان و حذف بخشی از آن از راه شیر در حالت پاتولوژیک، هدف از این انجام این طرح مقایسه غلظت انروفلوکساسین در شیر اخذ شده از کارتیه سالم در مقایسه کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان بالینی بود. در این مطالعه، پس از تزریق تک دوز از انروفلوکساسین به صورت عضلانی، به عنوان یکی از پرمصرف‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های تزریقی در درمان ورم پستان، به گاوهای دارای کارتیه مبتلا به ورم پستان کلی فرمی، در زمان‌های مختلف میزان حضور آنتی‌بیوتیک در شیر حاصل از کارتیه‌های سالم و مبتلا، با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تعیین مقدار شد.

#### مواد و روش کار

برای انجام این تحقیق ۶ رأس گاو هلشتاین شیروار مبتلا به ورم پستان درجه ۲ بالینی مبتلا به عامل کلی فرمی وارد مطالعه شدند. روش شناسایی گاوهای مورد مطالعه بدین قرار بود که از گاوهای مبتلا به ورم پستان درجه ۲ بالینی بعد از مشاهده علائم بالینی نمونه شیر به روش اسپتیک اخذ و جهت کشت میکروبی به آزمایشگاه واقع در گاوداری انتقال داده شد. در آزمایشگاه نمونه شیر بر اساس پروتکل کشت داخل گله به صورت همزمان در محیط بلاد آگار و مک کانکی کشت داده شد. نتایج کشت بعد از ۱۸ الی ۲۴ ساعت قرائت گردیده و گاوهای مبتلا به ورم پستان کلی فرمی براساس رشد کلونی در محیط مک کانکی و تولید رنگ صورتی شناسایی شدند. در نهایت ۶ سویه جداشده جهت تایید به آزمایشگاه رفرانس ارسال گردید. بعد از تایید عامل ایجاد کننده ورم پستان از داروی انروفلوکساسین ۵ درصد با نام تجاری هیپرالونا با دوز ۵ mg/kg به صورت داخل عضلانی تزریق شد. کارتیه سالم کارتیه‌ای در نظر

## تهیه محلول‌های استاندارد مادر (stock) و محلول‌های کاری روزانه

برای تهیه محلول‌های مادر انروفلوکسازین و سیپروفلوکسازین ۱۰ mg از هر کدام از پودرهای استاندارد برداشته و با محلول ۱۰ درصد اسید استیک (مخلوط ۹cc آب دوبار تقطیر دیونیزه + ۱cc اسید استیک خالص) به حجم ۱۰cc رسانده شد و بدین ترتیب محلول‌های مادر انروفلوکسازین و سیپروفلوکسازین با غلظت ۱ mg/ml به دست آمد. محلول‌های استاندارد کاری هر کدام از داروها نیز با رقیق ساختن محلول مادر با آب دیونیزه ساخته شدند. بدین صورت که که ۱cc از محلول مادر برداشته و با آب دوبار تقطیر دیونیزه در بالن ژوژه‌ای به حجم ۱۰cc رسانده شد و غلظت ۱۰۰ µg/ml به دست آمد و بدین شکل رقت-های بعدی نیز تهیه گردید. بعد از اتمام کار، لوله‌های حاوی محلول‌های مادر و محلول‌های روزانه کاری را در داخل فویل آلومینیومی پیچیده و محلول‌های مادر در فریزر با دمای ۲۰°C- و محلول‌های روزانه کاری در یخچال نگهداری شدند.

## آماده‌سازی دستگاه

قبل از انجام آنالیز نمونه‌های واقعی، ابتدا راه‌اندازی روش سنجش HPLC و معتبرسازی آن انجام گردید. بدین منظور غلظت‌های مختلف انروفلوکسازین و سیپروفلوکسازین (۰-۱۰۰۰ ng/ml) هر یک با ۳ بار تکرار در روزهای مختلف به ۵cc شیر اضافه شد (Spike) و همانند مراحل شرح داده شده در روش استخراج و کروماتوگرافی، روی نمونه‌های شیر حاوی مقادیر معلوم آنتی‌بیوتیک انروفلوکسازین مراحل مذکور انجام گردید. مشخصات آنالیز شامل صحت (Accuracy)، دقت (Precision)، میزان بازیافت (Recovery)، خطی بودن پاسخ‌ها (Linearity) و عدم وجود پیک مزاحم (Interference) به دست آمد.

## شرایط کروماتوگرافی

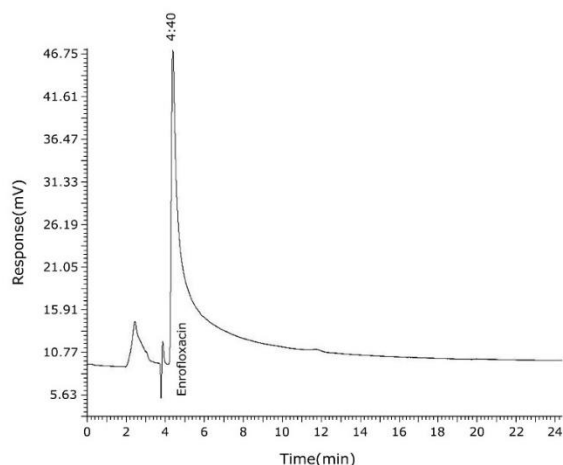
از دستگاه HPLC مدل ۲۰۰ PerkinElmer Series ساخت آمریکا مجهز به آشکارساز Visible/UV مدل ۲۰۰ Series و ستون جداسازی C18 (Agilent- 10cm, 4/6mm, 3/5µm) برای اندازه‌گیری انروفلوکسازین و سیپروفلوکسازین استفاده شد. شرایط کروماتوگرافی شامل فاز متحرک شامل مخلوطی از محلول متانول- استونیتریل با نسبت حجمی (v/v) ۷۶:۲۴ به روش ایزوکراتیک با سرعت جریان ۱ ml/min و شناساگر UV با طول موج ۲۸۰ نانومتر بود.

## راه‌اندازی روش و اعتبار بخشی آن

برای اندازه‌گیری انروفلوکسازین و سیپروفلوکسازین در نمونه‌های شیر در محدوده غلظت (۵-۲۰۰ ng/ml) بعد از استخراج طبق روش گفته شده، ۱ ml از محلول استخراج شده به دستگاه HPLC تزریق گردید. منحنی کالیبراسیون در محدوده غلظت انتخاب شده براساس سطح زیر منحنی (Peak area) رسم و محاسبه گردید. خطی بودن نتایج حاصل از روش آنالیز به صورت ضریب رگرسیون ( $r^2$ ) به دست آمد. برای به دست آوردن منحنی کالیبراسیون نمونه-های شیر Spike شده، غلظت‌های ناشناخته در نمونه‌های واقعی استفاده گردید. بر اساس معادله خط رگرسیون رابطه خطی  $Y = ax + b$  برقرار است که در این معادله Y نشان دهنده‌ی پاسخ دستگاه یا Peak area از داروهای آنالیز شده و X نشان دهنده غلظت آن‌ها در نمونه است.

صحت (Accuracy) با استفاده از میزان بازیافت (Recovery) محاسبه شد. ۱۰۰۰ µL از انروفلوکسازین اضافه شده (Spiked) شده در سطوح غلظتی (۵-۱۰۰ ng/ml) و از هر کدام ۳ تکرار، به دستگاه HPLC تزریق شد. بازیافت از طریق محاسبه درصد غلظت انروفلوکسازین بازیافت شده به غلظت اضافه شده (Spiked) به دست آمد. دقت (Precision) به وسیله معیار تکرارپذیری در یک روز (Intra-day) و سه روز متوالی (Inter-day) محاسبه شد. به منظور بررسی دقت در یک

نمونه شیر به ترتیب در Fig 1 & 2 نشان داده شده است. جهت ارزیابی خطی بودن و تعیین معادله خط کالیبراسیون در ماتریکس شیر در ۵ غلظت مختلف (n=3) جهت تعیین میزان انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین در نمونه‌ها در نظر گرفته شد. معادله خطی کالیبراسیون انروفلوکساسین به صورت  $y=0.887x+2.8714$  و ضریب رگرسیون برابر با  $r^2=0.997$  و معادله خطی کالیبراسیون سیپروفلوکساسین به صورت  $y=0.872x+2.2906$  و ضریب رگرسیون برابر با  $r^2=0.998$  به دست آمد. با توجه به این نتایج، درصد انحراف معیار نسبی به دست آمده از نمونه‌های استاندارد انروفلوکساسین کمتر از ۱۰ درصد بوده و کمترین آن مربوط به استاندارد ۱۰۰ ng/ml (۰/۲۹ درصد) و بیش‌ترین آن مربوط به استاندارد ۲۰۰ ng/ml (۹/۹۸ درصد) می‌باشد. همچنین درصد انحراف معیار نسبی از نمونه‌های استاندارد سیپروفلوکساسین کمتر از ۶/۵ درصد بوده و کمترین آن مربوط به استاندارد ۵۰ ng/ml (۱/۵ درصد) و بیش‌ترین آن مربوط به استاندارد ۱۰ ng/ml (در حدود ۶/۴۵ درصد) می‌باشد (Table 1).



**Figure 1. Chromatogram of blank bovine milk spiked with 200 ng/ml enrofloxacin with retention time of 4.40 minutes**

روز، سطوح غلظتی (۵-۱۰۰ ng/ml) به نمونه‌ها Spike شد و در سه نوبت به دستگاه تزریق شد. همچنین جهت بررسی دقت در ۳ روز متوالی، سطوح غلظتی (ng/ml) ۵-۱۰۰) به نمونه‌ها Spike شد و در سه نوبت به دستگاه HPLC تزریق گردید. سطح زیر منحنی هر پیک و درصد انحراف معیار نسبی (RSD%) هر پیک انروفلوکساسین محاسبه شد.

نتایج به دست آمده از تعیین غلظت انروفلوکساسین و متابولیت آن سیپروفلوکساسین در نمونه‌های شیر دو گروه کارتیبه سالم و کارتیبه‌های مبتلا به ورم پستان کلی فرمی در ساعات مختلف اندازه‌گیری به کمک نرم افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۲۵ تحلیل آماری شد. تفاوت غلظت آنتی‌بیوتیک در هر یک از گروه‌ها بین ساعات مختلف مطالعه برای شاخص‌های پیوسته به کمک آزمون آنالیز واریانس داده‌های تکراری (-Repeated Measured One-way ANOVA) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) و برای شاخص‌های ناپیوسته به کمک آزمون فریدمن (Friedman) و آزمون تعقیبی دانس (Dunns) با حد احتمال  $P<0/05$  انجام شد. تفاوت متغیرها بین گروه‌های کارتیبه سالم و کارتیبه مبتلا به ورم پستان برای شاخص‌های پیوسته به کمک آزمون T (T-test) و برای شاخص‌های ناپیوسته به کمک آزمون مان ویتنی (Mann-Whitney) با حد احتمال  $P<0/05$  انجام شد.

## نتایج

### معتبرسازی روش HPLC و ارزیابی خطی بودن

شرایط دستگاه HPLC جهت شناسایی و تعیین مقادیر استانداردهای انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین در شیر گاو بهینه شد. همچنین کروماتوگرام به دست آمده از غلظت اضافه شده (Spiked) انروفلوکساسین در سطح ۲۰۰ ng/ml و سیپروفلوکساسین در سطح ۱۰۰ ng/ml

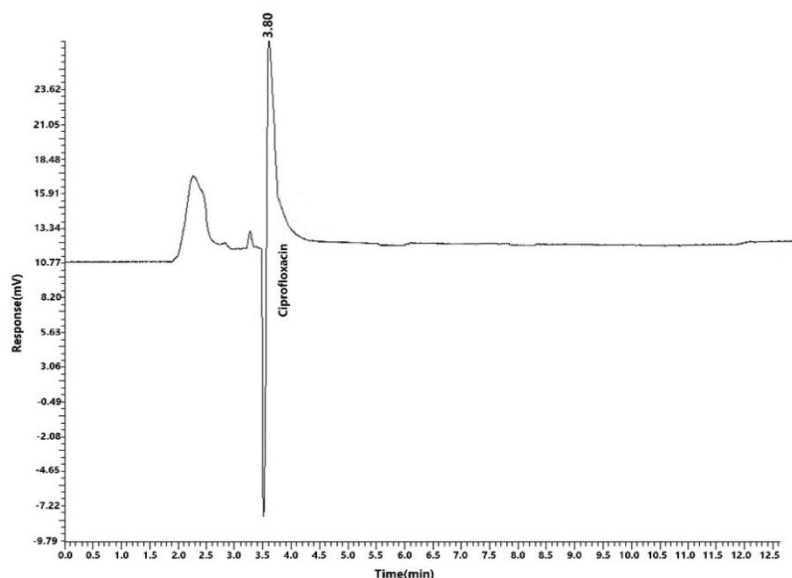


Figure 2. Chromatogram of blank bovine milk spiked with 100 ng/ml ciprofloxacin with retention time of 3.80 minutes

Table 1. Calibration curve statistics of enrofloxacin and ciprofloxacin concentrations in milk

| Analyte       | Concentration added (ng/ml) | Concentration found (ng/ml) ± S.D. | Relative Standard Deviation % (RSD %) |
|---------------|-----------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| Enrofloxacin  | 5                           | 4.77 ± 0.19                        | 4.00                                  |
|               | 10                          | 10.38 ± 0.49                       | 4.76                                  |
|               | 50                          | 48.07 ± 1.71                       | 3.56                                  |
|               | 100                         | 97.87 ± 0.29                       | 0.29                                  |
|               | 200                         | 177.06 ± 17.68                     | 9.98                                  |
|               | slope                       |                                    | 0.887                                 |
|               | r <sup>2</sup>              |                                    | 0.997                                 |
| Ciprofloxacin | 5                           | 4.63 ± 0.10                        | 2.07                                  |
|               | 10                          | 9.56 ± 0.62                        | 6.45                                  |
|               | 50                          | 47.17 ± 0.71                       | 1.50                                  |
|               | 100                         | 94.41 ± 1.48                       | 1.57                                  |
|               | 200                         | 174.22 ± 8.89                      | 5.10                                  |
|               | slope                       |                                    | 0.872                                 |
|               | r <sup>2</sup>              |                                    | 0.998                                 |

### دقت روش آزمایش

Intra-Day بین ۰/۳ الی ۴/۸ برای انروفلوکساسین بین ۱/۵ الی ۶/۵ برای سیپروفلوکساسین و درصد انحراف معیار نسبی برای آزمون Inter-Day برای انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین به ترتیب بین ۶/۷ الی ۱۰/۲ و ۶/۱ الی ۱۳/۸ محاسبه شد.

نتایج مربوط به تکرارپذیری ۴ نمونه با غلظت‌های مشخص ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ (ng/ml) از انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین در آزمایش‌های مربوط به یک روز (Intra-Day) و در همچنین در آزمایشات مربوط به سه روز متوالی (Inter-Day) در Tables 2 & 3 ارائه شده است. محدوده درصد انحراف معیار نسبی به دست آمده در آزمون

**Table 2. Intra-day precision value for the determination of enrofloxacin and ciprofloxacin concentrations in milk**

| Analyte       | Concentration added (ng/ml) | Concentration found (ng/ml) ± S.D | Relative Standard Deviation % (RSD %) |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Enrofloxacin  | 5                           | 4.77 ± 0.19                       | 4.0                                   |
|               | 10                          | 10.38 ± 0.49                      | 4.8                                   |
|               | 50                          | 48.07 ± 1.71                      | 3.6                                   |
|               | 100                         | 97.87 ± 0.29                      | 0.3                                   |
| Ciprofloxacin | 5                           | 4.63 ± 0.10                       | 2.1                                   |
|               | 10                          | 9.56 ± 0.62                       | 6.5                                   |
|               | 50                          | 47.17 ± 0.71                      | 1.5                                   |
|               | 100                         | 94.41 ± 1.48                      | 1.6                                   |

**Table 3. Inter-day precision value for the determination of enrofloxacin and ciprofloxacin concentrations in milk**

| Analyte       | Concentration added (ng/ml) | Concentration found (ng/ml) ± S.D | Relative Standard Deviation % (RSD %) |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| Enrofloxacin  | 5                           | 4.17 ± 0.43                       | 10.2                                  |
|               | 10                          | 9.52 ± 0.77                       | 8.1                                   |
|               | 50                          | 45.90 ± 3.55                      | 7.7                                   |
|               | 100                         | 90.91 ± 6.06                      | 6.7                                   |
| Ciprofloxacin | 5                           | 4.14 ± 0.57                       | 13.8                                  |
|               | 10                          | 9.34 ± 0.95                       | 10.1                                  |
|               | 50                          | 45.63 ± 3.19                      | 7.0                                   |
|               | 100                         | 91.14 ± 5.50                      | 6.1                                   |

### صحت روش آزمایش

بازیافت غلظت‌های مورد بررسی برای انروفلوکساسین ۸۶/۴۷ الی ۹۷/۳۶ و برای سیپروفلوکساسین بین ۸۵/۴ الی ۹۳/۷۲ محاسبه شد.

برای بررسی صحت روش، درصد بازیافت غلظت‌های مختلف ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ (ng/ml) از انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین بررسی شد که نتایج مربوطه در Table 4 نشان داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده درصد

**Table 4. Determination of accuracy value of method based on recovery**

| Analyte       | Concentration added (ng/ml) | Concentration found (ng/ml) ± S.D | Mean of Recovery % |
|---------------|-----------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| Enrofloxacin  | 5                           | 4.32 ± 0.46                       | 86.47              |
|               | 10                          | 9.74 ± 0.79                       | 97.36              |
|               | 50                          | 46.44 ± 3.27                      | 92.88              |
|               | 100                         | 92.64 ± 6.04                      | 92.64              |
| Ciprofloxacin | 5                           | 4.27 ± 0.61                       | 85.40              |
|               | 10                          | 9.37 ± 0.66                       | 93.72              |
|               | 50                          | 45.78 ± 3.27                      | 90.96              |
|               | 100                         | 92.74 ± 6.04                      | 92.74              |

بین دو گروه کارتیه سالم و کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان در هیچ یک از ساعات مطالعه با هم تفاوت معنی‌داری نداشت. اما میزان آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین در ساعت ۱۲ مطالعه در شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان به طور معنی‌داری بیشتر از گروه گاوهای سالم بود ( $P < 0.05$ ). حد احتمال برای مقایسه غلظت آنتی‌بیوتیک در هر یک از ساعات مطالعه بین گروه کارتیه سالم و کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان در Table 5 نشان داده شده است.

مقایسه غلظت انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین در ساعات مختلف مطالعه بین گروه‌های کارتیه سالم و کارتیه‌های مبتلا به ورم پستان

نتایج به دست آمده مربوط به شناسایی مقادیر انروفلوکساسین و سیپروفلوکساسین در نمونه‌های شیر به ترتیب در Fig 3a & 3b نشان داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده میزان انروفلوکساسین در نمونه‌های شیر

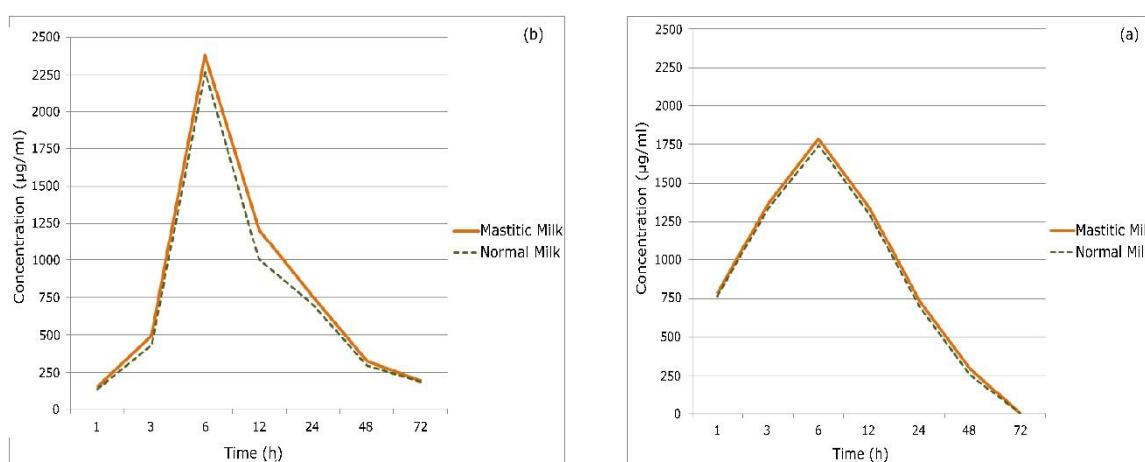


Figure 3. Evaluation of changes in the concentrations of enrofloxacin (a) and ciprofloxacin (b) ( $\mu\text{g/ml}$ ) in milk samples of healthy and mastitis groups at different hours of study

Table 5. P value of the comparison of enrofloxacin and ciprofloxacin concentrations in milk of healthy and mastitis groups at different hours of study

|   | Time (h) |       |       |        |       |       |              |
|---|----------|-------|-------|--------|-------|-------|--------------|
|   | 1        | 3     | 6     | 12     | 24    | 48    | 72           |
| Statistical comparison of enrofloxacin concentrations in milk of healthy and mastitis groups  | 0.589    | 0.485 | 0.309 | 0.699  | 0.485 | 0.093 | Not Detected |
| Statistical comparison of ciprofloxacin concentrations in milk of healthy and mastitis groups | 0.349    | 0.180 | 0.240 | 0.026* | 0.394 | 0.589 | 0.937        |

\* If the p value is less than 0.05, the difference between the two groups is statistically significant.

## بحث

درباره خصوصیات کینتیک داروها از فرآیندهای جمله جذب، انتشار و حذف آنها بخصوص از شیر در شرایط پاتولوژیک، دامپزشکان را در انتخاب آنتی‌بیوتیک در درمان

اطلاع از خصوصیات فارماکوکینتیک آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند به دامپزشکان در انتخاب درمان مناسب برای بیماری‌های عفونی کمک شایانی کند. فقدان اطلاعات لازم



سپس هدف کاربردی انجام مطالعه، که تعیین مقدار و مقایسه انروفلوکساسین در نمونه‌های شیر کارتیبه سالم و مقایسه آن با شیر حاصل از کارتیبه پستان مبتلا به ایکولای بود، محقق گردید. با توجه به این که داروی انروفلوکساسین در کبد به متابولیت فعال سیپروفلوکساسین تبدیل می‌گردد و از آن جا که این دو آنتی‌بیوتیک به لحاظ خواص فیزیوشیمیایی مشابه هم هستند، در طول فرآیند استخراج انروفلوکساسین از شیر، سیپروفلوکساسین نیز استخراج گردید. آنالیز نتایج آزمایش نشان داد که روش مورد استفاده در انجام آزمایش دارای دقت و صحت کافی برای تعیین غلظت داروهای استاندارد بود، به طوری که دقت روش به صورت درصد انحراف معیار نسبی (%RSD) برای انروفلوکساسین معیار تکرارپذیری در یک روز (Intra-Day) بین ۰/۳ الی ۴/۸ و برای سیپروفلوکساسین بین ۱/۵ الی ۶/۵ (Table 2) و برای سه روز متوالی (Inter-Day) به ترتیب بین ۶/۷ الی ۱۰/۲ و ۶/۱ الی ۱۳/۸ (Table 3) به دست آمد که یافته‌های فوق نشان داد که روش انجام آزمایش دارای دقت مناسبی بود. هم چنین صحت روش آزمایش به صورت درصد بازیافت برای غلظت‌های مختلف مورد بررسی انروفلوکساسین بین ۸۶/۴۷ الی ۹۷/۳۶ و برای سیپروفلوکساسین بین ۸۵/۴ الی ۹۳/۷۲ (Table 4) محاسبه شد که نشان از صحت روش آزمایش بود.

نتایج حاصل از تعیین غلظت انروفلوکساسین در نمونه‌های شیر بین دو گروه (Fig 3a)، نشان داد که میانگین غلظت انروفلوکساسین در هر یک از ساعات مطالعه در شیر کارتیبه مبتلا به ورم پستان بیش از کارتیبه سالم بود اما به لحاظ آماری در هیچ یک از ساعات مطالعه با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند ( $P < 0/05$ ). در حالی که میزان سیپروفلوکساسین در ساعت ۱۲ مطالعه در شیر کارتیبه‌های مبتلا به ورم پستان به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کارتیبه سالم بود (Fig 3b). در توجیه علت بالاتر بودن غلظت سیپروفلوکساسین در شیر نسبت به انروفلوکساسین می‌توان اشاره نمود که سیپروفلوکساسین در شیر بیش‌تر از انروفلوکساسین، یونیزه و در نتیجه حبس می‌گردد و در

ورم پستان به عنوان مهمترین بیماری عفونی گاو شیری دچار مشکل می‌کند (Erskine, Wagner, & DeGraves, 2003). عدم وجود منابع علمی قابل استناد در این زمینه علل مختلفی دارد از جمله موارد می‌توان به تنوع در عوامل میکروبی مولد ورم پستان، تنوع در آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در درمان ورم پستان، تنوع در شدت ورم پستان‌های بالینی (Ruegg, 2012) و تنوع در روش‌های اندازه‌گیری غلظت آنتی‌بیوتیک و نیز استانداردهای روش انجام آن اشاره کرد (Schenk & Callery, 1998). در این مطالعه جهت رفع موانع فوق‌الذکر دوز ۵mg/kg از داروی انروفلوکساسین به صورت داخل عضلانی تجویز شد و غلظت داروی انروفلوکساسین در کارتیبه‌های مبتلا به ورم پستان درجه دو ناشی از باکتری اشریشیاکلی با کارتیبه سالم مقابل آن کارتیبه ضربدری به روش مقایسه شد. انروفلوکساسین با توجه به دارا بودن خصوصیات از جمله حلالیت بالا در چربی (Suojala, Kaartinen, & Pyörälä, 2013)، نفوذپذیری بالا در شیر در مقایسه با پلاسما (Varma et al., 2003)، عدم تداخل ترکیبات موجود در شیر با دارو (Fang & Pyörälä, 1996) و تجمع متابولیت فعال آن، سیپروفلوکساسین در شیر (Rantala et al., 2002)، به صورت تئوریک به عنوان یک آنتی‌بیوتیک مناسب در درمان ورم پستان‌های بالینی مطرح می‌باشد. بررسی‌های محققین در مورد کارایی انروفلوکساسین در درمان ورم پستان‌های بالینی نتایج متناقضی را گزارش می‌کند (Suojala et al., 2013). به هر حال امروزه انروفلوکساسین به عنوان یکی از پرمصرف‌ترین داروها در درمان ورم پستان بالینی استفاده می‌شود. از طرفی، یکی از مهمترین چالش‌ها در زمینه تعیین مقدار آنتی‌بیوتیک در شیر، خون و سایر بافت‌ها، استانداردهای روش استخراج آنتی‌بیوتیک از محیط بیولوژیک و نیز آماده‌سازی آن جهت تزریق به دستگاه HPLC می‌باشد. در این مطالعه جهت تعیین مقادیر انروفلوکساسین در شیر با استفاده از دستگاه HPLC، ابتدا استانداردهای روش انجام آزمایش، یعنی استخراج آنتی-بیوتیک از شیر و سپس آماده‌سازی دستگاه صورت گرفت،

پلازما بالاتر است، همچنین با مقایسه سطح زیر منحنی غلظت دارو در شیر نسبت به پلازما ( $AUC_{milk}/AUC_{serum}$ ) به روش HPLC نشان دادند که غلظت اریترومایسین از راه داخل وریدی و داخل عضلانی به ترتیب برابر با ۶/۹ و ۲/۳۷ است که مشخص می‌گردد میزان ورود دارو به شیر در پی تجویز داخل وریدی قابل توجه است (Ambros et al., 2007). Avci و همکاران در سال ۲۰۱۴ با بررسی فارماکوکینتیک تیلوزین و تیل‌مایکوزین در گاوهای شیری سالم پس از تجویز تک دوز از داروها به صورت عضلانی، نشان دادند که میزان داروی تیلوزین در شیر تا ۹۶ ساعت بعد از تجویز قابل ردیابی است و در نتیجه تیلوزین مدت زمان پرهیز از مصرف طولانی‌تری نسبت به تیل‌مایکوزین خواهد داشت، همچنین غلظت هر دو دارو در شیر بیش از حد مجاز باقی‌مانده (Maximum Residue Level: MRL) یعنی  $50 \mu\text{g/ml}$  بود (Avci & Elmas, 2014). Idowu و همکاران در سال ۲۰۱۰ در مطالعه‌ای که در مرکز FDA آمریکا انجام گردید، به مقایسه پروفایل فارماکوکینتیک ایتروفلوکسازین و سیپروفلوکسازین در خون و شیر گاو هلشتاین سالم پس از تجویز تک دوز از ایتروفلوکسازین به صورت داخل وریدی پرداختند، نتیجه تحقیق آن‌ها نشان داد که میزان باقی‌مانده متابولیت سیپروفلوکسازین بیش از داروی اصلی آن یعنی ایتروفلوکسازین است (Idowu et al., 2010). نتایج مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد که میزان متابولیت سیپروفلوکسازین در شیر کارتیبه سالم و کارتیبه بیمار بیش از غلظت ایتروفلوکسازین در شیر دو گروه بود که با بخشی از نتایج مطالعه Idowu و همکاران که در مورد حضور سیپروفلوکسازین در شیر گاوهای سالم بود، مطابقت داشت. در تحقیقی که به منظور ارزیابی خصوصیات فارماکوکینتیک از جمله فراهمی زیستی دارو، حجم انتشار و میزان ورود دیفلوکسازین به شیر در بزهای شیروار سالم توسط Marin و همکاران در سال ۲۰۰۷ صورت گرفت، پس از تجویز  $5\text{mg/kg}$  از دیفلوکسازین از راه‌های مختلف از جمله داخل وریدی، داخل عضلانی و زیرپوستی، مشخص گردید که میزان ورود دارو از خون به

نتیجه غلظت سیپروفلوکسازین نسبت به ایتروفلوکسازین در شیر بالاتر است. مطالعات فارماکوکینتیک محققین تایید می‌نماید که غلظت ایتروفلوکسازین در شیر و سرم تقریباً شبیه به یکدیگر است، در حالی که غلظت سیپروفلوکسازین در شیر بیشتر از غلظت سرمی آن است (Varma et al., 2003). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که غلظت سیپروفلوکسازین در ساعات ۶ مطالعه در دو گروه شیر حاصل از کارتیبه مبتلا به ورم پستان کلی فرمی و گروه سالم بیش از ایتروفلوکسازین بود. غلظت سیپروفلوکسازین برخلاف ایتروفلوکسازین در شیر در دو گروه تا ۷۲ ساعت بعد از تجویز تک دوز از ایتروفلوکسازین قابل ردیابی بود. در نتیجه می‌توان این گونه نتیجه‌گیری کرد که داروی ایتروفلوکسازین و متابولیت آن به علت ماندگاری بالا در شیر می‌تواند در درمان ورم پستان‌های بالینی به کار رود و از آن‌جا که داروهای خانواده فلونوروکینولونی دارای خاصیت اثربخشی پس از تجویز (Post antibiotic effect) هستند، حتی اگر غلظت آن‌ها کم‌تر از MIC ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) ایتروفلوکسازین برای اجرام حساس) گردد، همچنان بر روی اجرام حساس همانند کلی‌فرم‌ها مؤثر خواهند بود (Brown, 1996; Riviere & Papich, 2018).

مطالعات متعددی در دنیا جهت تعیین پروفایل فارماکوکینتیک داروها به صورت تعیین درصد فراهمی زیستی داروها، بررسی میزان حجم توزیع، سرعت و میزان حذف دارو از بدن و همچنین از دیدگاه مخاطرات بهداشتی آن به شکل بررسی بقایای آنتی‌بیوتیک‌ها در شیر با استفاده از روش HPLC در حیوانات مختلف صورت گرفته است (Movassagh, 2012; Rasooli, Amani, Bahonar, Shams, & Abdolmaki, 2014; Rassouli, Abdolmaleki, Bokae, Kamkar, & Shams, 2010)، که مطالعه‌ی حاضر در ارتباط با تعیین غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در شیر با سایر مطالعات قابل مقایسه است. Ambros و همکاران در سال ۲۰۰۷ با مقایسه پروفایل کینتیک تجویز داخل عضلانی و داخل وریدی آنتی‌بیوتیک اریترومایسین در بزهای سالم، نشان دادند که غلظت اریترومایسین در شیر نسبت به

عضلانی می‌توان این دارو را تا ۴۸ ساعت و متابولیت آن، سیپروفلوکساسین، را تا ۷۲ ساعت پس از تجویز در شیر جستجو کرد. همچنین نتایج این بررسی نشان داد که الگوی انتشار کلی انروفلوکساسین در غده پستانی سالم و مبتلا به ورم پستان کلی‌فرمی تفاوتی با یکدیگر ندارد، البته میزان سیپروفلوکساسین در ساعت ۱۲ در شیر کارتی‌های مبتلا در مقایسه با کارتی‌های سالم به طور معنی‌داری بیش‌تر بود.

شیر بسیار وسیع است و تقریباً ۳۶ ساعت بعد از تجویز داخل وریدی و زیرپوستی و ۷۲ ساعت پس از تجویز داخل عضلانی، مقادیر دیفلوکساسین در شیر قابل ردیابی است (Marin et al., 2007). در این تحقیق نیز ثابت گردید که غلظت سیپروفلوکساسین بر خلاف انروفلوکساسین تا ۷۲ ساعت بعد از تجویز در شیر قابل ردیابی است. نتایج بررسی حاضر نشان داد که متعاقب تجویز ۵mg/kg از داروی انروفلوکساسین به صورت داخل

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کارشناس محترم آزمایشگاه شیمی تجزیه دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج سرکار خانم مهندس اشرفی و مدیریت محترم شرکت داروسازی کیمیفام که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند، قدردانی می‌شود.

### تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تعارض منافی ندارند.

### منابع مالی

این پژوهش با هزینه‌های شخصی انجام پذیرفته است.

### منابع

- Ambros, L., Montoya, L., Kreil, V., Waxman, S., Albarells, G., Rebuelto, M., . . . San Andres, M. (2007). Pharmacokinetics of erythromycin in nonlactating and lactating goats after intravenous and intramuscular administration. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 30(1), 80-85.
- Avei, T., & Elmas, M. (2014). Milk and blood pharmacokinetics of tylosin and tilmicosin following parenteral administrations to cows. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Bajwa, N., Bansal, B., Srivastava, A., & Ranjan, R. (2007). Pharmacokinetic profile of erythromycin after intramammary administration in lactating dairy cows with specific mastitis. *Veterinary research communications*, 31(5), 603-610.
- Brown, S. (1996). Fluoroquinolones in animal health. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 19(1), 1-14.
- Campoli-Richards, D. M., Monk, J. P., Price, A., Benfield, P., Todd, P. A., & Ward, A. (1988). Ciprofloxacin. *Drugs*, 35(4), 373-447.
- Erskine, R. J., Wagner, S., & DeGraves, F. J. (2003). Mastitis therapy and pharmacology. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 19(1), 109-138, vi.
- Fang, W., & Pyörälä, S. (1996). Mastitis-causing *Escherichia coli*: serum sensitivity and susceptibility to selected antibacterials in milk. *Journal of dairy science*, 79(1), 76-82.
- Halasa, T., Huijps, K., Østerås, O., & Hogeveen, H. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. *Veterinary Quarterly*, 29(1), 18-31.
- Heringstad, B., Klemetsdal, G., & Ruane, J. (2000). Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science*, 64(2), 95-106.
- Horwitz, W. (1975). *Official methods of analysis* (Vol. 222): Association of Official Analytical Chemists Washington, DC.

- Idowu, O., Peggins, J., Cullison, R., & Von Bredow, J. (2010). Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in lactating dairy cows and beef steers following intravenous administration of enrofloxacin. *Research in veterinary science*, 89(2), 230-235.
- Kinsella, B., Lehotay, S. J., Mastovska, K., Lightfield, A. R., Furey, A., & Danaher, M. (2009). New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 637(1), 196-207.
- Marin, P., Escudero, E., FERNÁNDEZ-VARÓN, E., & Carceles, C. (2007). Pharmacokinetics and milk penetration of difloxacin after intravenous, subcutaneous and intramuscular administration to lactating goats. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 30(1), 74-79.
- Movassagh, M. (2012). Identification of antibiotic residues in raw cow's milk collected from Ilkhchei region (south west of Tabriz) in spring of 1388. *Journal of Food Technology and Nutrition*, 9(3), 89-94.
- Neu, H. C. (1988). Quinolones: a new class of antimicrobial agents with wide potential uses. *The Medical clinics of North America*, 72(3), 623-636.
- Pober, J. S., & Sessa, W. C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 7(10), 803.
- Rantala, M., Kaartinen, L., Välimäki, E., Stryman, M., Hiekkaranta, M., Niemi, A., . . . Pyörälä, S. (2002). Efficacy and pharmacokinetics of enrofloxacin and flunixin meglumine for treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Veterinary Pharmacology and therapeutics*, 25(4), 251-258.
- Rasooli, A., Amani, Z., Bahonar, A., Shams, G., & Abdolmaki, Z. (2014). A trace analysis of oxytetracycline and tetracycline residues in pasteurized milk supplied in Tehran: a one-year study (April 2011-March 2012). *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 8(2), 119-123.
- Rassouli, A., Abdolmaleki, Z., Bokaei, S., Kamkar, A., & Shams, G. (2010). A cross-sectional study on Oxytetracycline and Tetracycline residues in pasteurized milk supplied in Tehran by an HPLC method. *International Journal of Veterinary Research*, 4(1), 1-68.
- Riviere, J. E., & Papich, M. G. (2018). *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*: John Wiley & Sons.
- Ruegg, P. L. (2012). New perspectives in udder health management. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 28(2), 149-163.
- Sawant, A., Sordillo, L., & Jayarao, B. (2005). A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *Journal of Dairy Science*, 88(8), 2991-2999.
- Schenck, F. J., & Callery, P. S. (1998). Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. *Journal of Chromatography A*, 812(1), 99-109.
- Suojala, L., Kaartinen, L., & Pyörälä, S. (2013). Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis—an evidence-based approach. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 36(6), 521-531.
- Tedgui, A. (1996). Endothelial permeability under physiological and pathological conditions. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 54(1), 27-29.
- Tyczkowska, K. L., Voyksner, R. D., Anderson, K. L., & Papich, M. G. (1994). Simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in bovine milk and plasma by ion-pairing liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 658(2), 341-348.
- Varma, R., Ahmad, A., Sharma, L., Aggarwal, P., & Ahuja, V. (2003). Pharmacokinetics of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin in cows following single dose intravenous administration. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 26(4), 303-305.
- Waxman, S., Rodriguez, C., González, F., De Vicente, M., San Andrés, M., & San Andrés, M. (2001). Pharmacokinetic behavior of marbofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in adult goats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 24(6), 375-378.

Received: 28.05.2019

Accepted: 22.02.2020

## Comparison of Enrofloxacin Concentration Residue in Milk of Healthy and Clinical Mastitic Quarters Following Intramuscular Administration by HPLC

Mohammad Reza Golestani Far<sup>1</sup>, Zohreh Abdolmaleki.<sup>2\*</sup> and Mohammad Amin Eslampour<sup>3</sup>

<sup>1</sup> DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

<sup>2</sup> Assistant professor, Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

Received: 28.05.2019

Accepted: 22.02.2020

### Abstract

Pharmacokinetic studies of drugs from the body are done in healthy animals. Regarding the pathological changes in the permeability of drugs to the anatomical spaces, the knowledge about the rate of permeability of antibiotic to infected mammary glands can be effective in the selection of antibiotics. The aim of this study is to evaluate the amount of enrofloxacin in milk of healthy and clinical mastitis quarters after single dose intramuscular injection in dairy cows. To do this research, from six Holstein lactating cattle with clinical grade 2 mastitis infected by *E. coli*, using aseptic method milk were taken and cultured in a blood Agar and McConkey environment. Finally, 6 isolates sent to the reference laboratory for approval. After confirming the cause of mastitis, Enrofloxacin 5% (hipralona) was injected intramuscularly at dose of 5 mg/kg B.W. Then, milk samples were taken at different times from healthy and clinical mastitis quarters and transferred to the laboratory to analyze. Enrofloxacin and its metabolite, Ciprofloxacin, were extracted by standard protocols. Then drug concentrations were measured using a high-performance liquid chromatographic (HPLC) method. Chromatographic conditions included a mobile phase as methanol-acetonitril solution (76:24 v/v) using an isocratic method with a flow rate of 1.0 ml/min and UV detection at 280nm. The results of our study showed that the amount of enrofloxacin in milk samples between two groups was not significantly different in hours of measurement. However, for ciprofloxacin at 12 h, it was significantly higher in milk of clinical mastitis quarters than in healthy ones. Based on the HPLC data, it can be concluded that the penetration pattern of enrofloxacin in healthy and clinical mastitis quarters had no significant difference.

**Keywords:** Enrofloxacin, Clinical mastitis, Coliform, HPLC

---

\* **Corresponding Author:** Zohreh Abdolmaleki, Assistant professor, Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran  
E-mail: zohreh.abdolmaleki@kiaiu.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).