بررسی باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین در عسل‌های تولیدی برخی کندوهای عسل استان خوزستان با استفاده از روش HPLC

علی فضل‌آرا[۱*]، حسین نجف‌زاده‌ورزی[۲] و بهاره ایزدی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۲۰

چکیده

تتراسایکلین‌ها در درمان بیماری لوک آمریکایی و اروپایی در زنبوران عسل به فراوانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. عدم توجه زنبورداران به توصیه‌های دامپزشکی در خصوص میزان و زمان مصرف دارو سبب افزایش بیش از حد مجاز باقی‌مانده‌ها، در عسل می‌گردد. با توجه به عوارض حاصل از این باقی‌مانده‌ها، نظیر مقاومت دارویی، ازدیاد حساسیت در مصرف‌کنندگان و ....، در مطالعه‌ی حاضر باقی‌مانده دو داروی تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین در برخی نمونه‌های عسل مصرفی در خوزستان به روش HPLC بررسی گردید. تعداد ۶۰ نمونه عسل از زنبورستان‌های استان خوزستان جمع‌آوری و مراحل آماده‌سازی جهت جستجوی باقی‌مانده داروهای تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین صورت گرفت. بدین منظور ۵ گرم عسل را جهت استخراج در ۲۵ میلی‌لیتر بافر مک ایوان حل کرده و کاملاً هموژن نموده و از صافی عبور داده و پس از کالیبره کردن دستگاه HPLC ، مقدار ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه تزریق شد. سپس میزان باقی‌مانده داروهای مورد مطالعه، در عسل، تعیین شد. این بررسی نشان داد که ۱۴ (۲۳/۳۳ درصد) نمونه‌ی عسل فاقد هر دو باقی‌مانده تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین بود حال آن که ۳۱ (۵۱/۶۶ درصد) نمونه دارای هر دو نوع باقی‌مانده بود. میانگین و خطای معیار باقی مانده‌ی دارویی تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین در نمونه‌ی عسل‌های حاوی باقی‌مانده آنتی‌بیوتیکی به ترتیب ۳۱/۳۸±۱۱۹/۲۳ و ۳۷/۰۲±۱۶۷/۶۳۶ میکروگرم بر کیلوگرم بود و در مجموع ۴۶ (۷۶/۶۷ درصد) نمونه از مجموع ۶۰ نمونه‌ی عسل مورد بررسی در مطالعه‌ی حاضر، از نظر باقی‌مانده آنتی‌بیوتیکی، مثبت بوده و اختلاف معنی‌داری با مقدار صفر اعلام شده از سوی اتحادیه‌ی اروپا، کدکس الیمانتاریوس و نیز سازمان غذا و دارو داشتند ($P\leq ۰/۰۵$).

کلمات کلیدی: تتراسایکلین، اکسی‌تتراسایکلین، عسل، HPLC

مقدمه

فراورده‌های زنبورعسل به عنوان موادی طبیعی در محیط‌های آلوده به مواد مختلف، تولید می‌شوند. در سالیان اخیر بررسی‌های زیادی روی منابع آلوده کننده‌ی فراورده‌های زنبورعسل، به ویژه عسل انجام گرفته است که مهم‌ترین آن‌ها بررسی میزان آلودگی عسل با انواع آنتی‌بیوتیک‌های مصرف شده در کلنی‌ها است (Bogdanov 2006). باقی مانده‌های آنتی‌بیوتیکی به علت مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها علیه بیماری‌هایی هم‌چون لوک آمریکائی و لوک اروپائی و یا به عنوان داروی پیشگیری به وجود می‌آیند (Thompson et al. 2005). در اروپا مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در پرورش زنبور مجاز نیست. در حالی که در بسیاری کشورها به میزان فراوان استفاده می‌شوند (Peres et al. 2010). در تعداد زیادی از کشورهای اتحادیه‌ی اروپا میزان حداکثر باقی‌مانده مجاز آنتی‌بیوتیک‌ها مشخص نشده است، که بدین معنی است که اجازه‌ی مصرف به عسل‌های واجد باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها داده

[۱*] استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: Fazlara2000@yahoo.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استاد گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

[۳] دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

نمی‌شود. با این حال تعدادی از کشورهای اروپائی از جمله سوئیس، انگلیس و بلژیک محدوده‌هایی را تعیین نموده‌اند که در حد ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ میلی‌گرم در کیلوگرم برای هر گروه آنتی‌بیوتیک است (Li et al. 2008). در حال حاضر وجود آنتی‌بیوتیک‌ها در عسل مشکل بسیار حادی را برای تجارت عسل ایجاد کرده است. تجارب کشورهای اتحادیه‌ی اروپا و نیوزلند نشان می‌دهد که کنترل دراز مدت بیماری لوک آمریکائی بدون استفاده از دارو هم صورت می‌گیرد (Bogdanov et al. 2007). ولی متأسفانه در حال حاضر در ایران از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در کلنی‌های زنبور عسل استفاده می‌شود که تنها در موارد بسیار نادری بر مبنای تشخیص بیماری‌های باکتریایی کلنی‌ها صورت می‌گیرد و بیش از ۶۰ درصد زنبورداران مناطق مختلف ایران بدون رعایت اصول بهداشت فراورده‌های زنبور عسل، اقدام به مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، به ویژه اکسی‌تتراسیکلین در فصل تولید عسل می‌نمایند.

عوارض وجود باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی؛ شامل ایجاد مقاومت‌های دارویی میکروب‌ها، اختلالات گوارشی، عوارض کبدی و نیز ازدیاد حساسیت در مصرف‌کنندگان و در مواردی تا حد شوک‌های آنافیلاکتیک و .... می‌باشد (Bogdanov 2006) . بدین دلیل از سوی مراجع بین‌المللی بهداشتی غذا نظیر FDA، WHO، APHA مقادیر حد مجازی از این نوع باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی، در فرآورده‌های مختلف منشاء جانوری و از جمله عسل تعیین شده است. از سوی دیگر در معاملات تجاری و واردات و صادرات محصولات غذایی نیز به میزان وجود باقی‌مانده‌ها در حدود مجاز بین‌المللی استناد می‌گردد (Peres et al. 2010). لذا با توجه به این امر و از آن جایی که استان خوزستان از نظر تعداد زنبوردار و کلونی در رتبه‌ی ۱۴ و با تولید سالیانه بیش از ۹۰۰ تن عسل از نظر تولید عسل در رتبه‌ی ۱۸ کشوری قرار دارد (مرکز آمار ایران، ۱۳۹۱) و بر اساس جستجو در منابع موجود، اطلاعاتی در مورد وضعیت باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی در عسل‌های ایران وجود ندارد، بررسی باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین در برخی نمونه عسل‌های استان خوزستان مد نظر قرار گرفت.

مواد و روش کار

به منظور انجام مطالعه‌ی حاضر تعداد ۶۰ نمونه عسل طی ۶ ماه از مجموع ۷۳۴ کندودار دارای بیش از ۲۰ کندو (کلنی) زنبور عسل در استان خوزستان جمع‌آوری شد. با توجه به مدیریت یکسان در مورد کندوهای یک زنبورستان، از هر زنبورستان یک کندو حاوی عسل به طور تصادفی انتخاب و یکی از شان‌های محتوی عسل موجود در آن نیز به طور تصادفی انتخاب گشته و با کمک دستگاه اکسترکتور عسل آن استخراج و پس از مخلوط کردن، حداقل به میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر عسل در ظروف شیشه‌ای سالم، تمیز و خشک، نمونه تهیه می‌گردید (موسسه‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۲). سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و نسبت به بررسی میزان احتمالی باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین اقدام می‌شد. به منظور آماده‌سازی نمونه‌های عسل، از بافر مک ایوان[1] استفاده شد که به منظور تهیه‌ی آن مقدار ۱۱/۸ گرم اسید سیتریک مونوهیدرات (شرکت مرک) به همراه ۱۳/۷۲ گرم Na_2HPO_4 (شرکت مرک) و ۳۳/۶۲ گرم Na_2EDTA (شرکت مرک) در یک لیتر آب مقطر حل می‌گردید. این محلول به صورت هفتگی تهیه و در یخچال نگهداری می‌شد. از هر نمونه عسل ۵ گرم با قاشق فلزی برداشته و در بشر ریخته می‌شد. ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر از بافر مک ایوان به هر نمونه عسل اضافه می‌شد و به وسیله‌ی همزن شیشه‌ای هموژن و مجدداً به منظور حلالیت بهتر، مجدداً ۱۵ میلی‌لیتر بافر به محلول اضافه می‌گردید. محتوی هر بشر به لوله آزمایش جداگانه ریخته و با دستگاه مخلوط کن به خوبی مخلوط می‌گردید و نهایتاً از تامپون

1- McIlvaine Buffer

عبور داده شد. مایع جرم‌گیری شده توسط فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرون فیلتر شده و مقدار ۳ میلی‌لیتر از آن در ۲ عدد میکرو تیوب ۱/۵ میلی‌لیتری اپندورف ریخته می‌شد. نمونه‌های آماده‌سازی شده تا زمان تزریق به دستگاه HPLC در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند (Li et al. 2008).

جهت کالیبراسیون دستگاه، ابتدا رقت‌های مختلفی از ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۱۵۰۰۰، ۳۰۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از استاندارد خالص تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین (شرکت سیگما) در حلال فاز متحرک (متانول HPLC) (شرکت مرک) تهیه شد (محلول‌های استاندارد). ترکیب فاز متحرک متشکل از ۳۰ درصد آب مقطر دیونیزه و ۷۰ درصد استونیتریل (شرکت مرک) در نظر گرفته شد. در مرحله بعد و پس از اطمینان از صحت عملکرد دستگاه HPLC (Smartline شرکت Knaur آلمان) کم‌ترین غلظت محلول استاندارد به دستگاه تزریق شد. با توجه به شرایط دستگاه و حساسیت آشکارساز از بین رقت‌های تهیه شده از استانداردها، کم‌ترین مقدار قرائت شده به عنوان حد تشخیص[1] در نظر گرفته شد که این میزان بر اساس محاسبه، معادل ۳ برابر میزان پارازیت[2] ایجاد شده در نمودار بلانک می‌باشد. به همین ترتیب مقدار ۱۰ برابر میزان پارازیت مذکور به عنوان حد یا آستانه اندازه‌گیری[3] در نظر گرفته شد. بدین نحو حد آستانه اندازه‌گیری برای هر دو داروی تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین ۰/۲۵μg/ml تعیین گردید. منحنی حاصل از تزریق محلول استاندارد و زمان بازداری نمونه[4] به وسیله‌ی نرم‌افزار تعیین شد. با استفاده از رقت‌های بعدی و نیز با تغییرات سرعت جریان فاز متحرک و زمان‌های مختلف، دماهای مختلف ستون دستگاه و تکرار سه بار هر رقت در روزهای مختلف، بهترین دمای ستون و جریان برای مشاهده‌ی پیک‌های محلول‌های استاندارد تعیین شد که بهترین دمای ستون ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و بهترین جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود. طول موج مناسب آشکارساز UV برای تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین نیز ۳۵۵ نانومتر تعیین گردید (Li et al. 2008).

بررسی بازدهی[5] دستگاه HPLC با اضافه کردن غلظت‌هایی از استاندارد داروهای تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین معادل ۸۰، ۴۵۰ و ۸۰۰ میکروگرم در کیلوگرم به ۵ نمونه عسل و تزریق به دستگاه انجام گردید، میزان میانگین و انحراف معیار حاصل از ۳ بار تکرار نمونه‌های مذکور بیانگر میزان بازدهی یا راندمان روش کار و دستگاه به میزان ۹۱/۶±۴/۶ و ۹۳/۲±۵/۳ به ترتیب برای اکسی‌تتراسایکلین و تتراسایکلین بود. در ضمن، حد دقت[6] انجام آزمایش‌ها با بررسی و تکرار کروماتوگرام‌ها و تزریق نمونه‌های استاندارد در زمان‌های مختلف و اسپایک کردن کروماتوگرام استاندارد روی نمونه‌های عسل تعیین شد. بدین نحو که بررسی دقت روش کار با استفاده از ۳ نمونه‌ی تهیه شده‌ی فوق‌الذکر و تزریق مکرر آن‌ها به دستگاه HPLC در زمان‌های مختلف در یک روز (۶ مرتبه) و نیز در ۶ روز متفاوت مورد بررسی قرار گرفت تا این که نهایتاً به صحت عملکرد روش، اطمینان حاصل گردید.

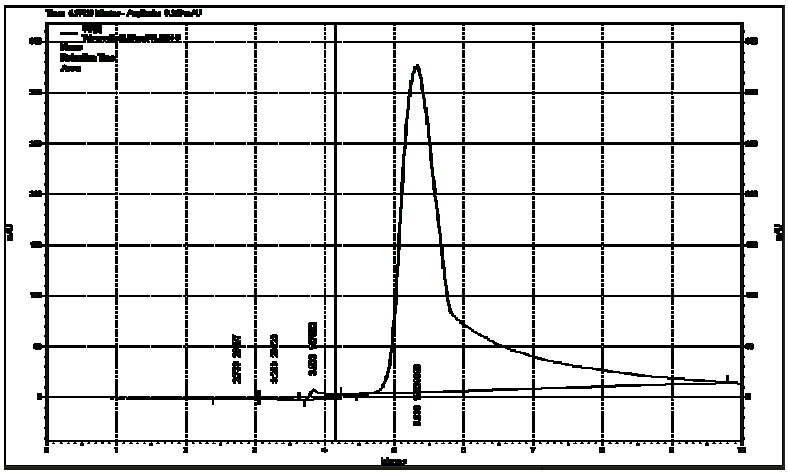
به وسیله‌ی سرنگ هامیلتون ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه فیلتر شده به طور جداگانه به دستگاه HPLC تزریق می‌شد. بعد از تزریق هر نمونه به دستگاه HPLC، کروماتوگرام‌ها ثبت و سطح زیر پیک‌ها (AUC)[7] تعیین گردید. مقدار تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین موجود در

1- Detection limit or limit of detection
2- Noise
3- Limit of quantitation
4- Retention Time
5- Recovery
6- Precision
7- Area Under Curve

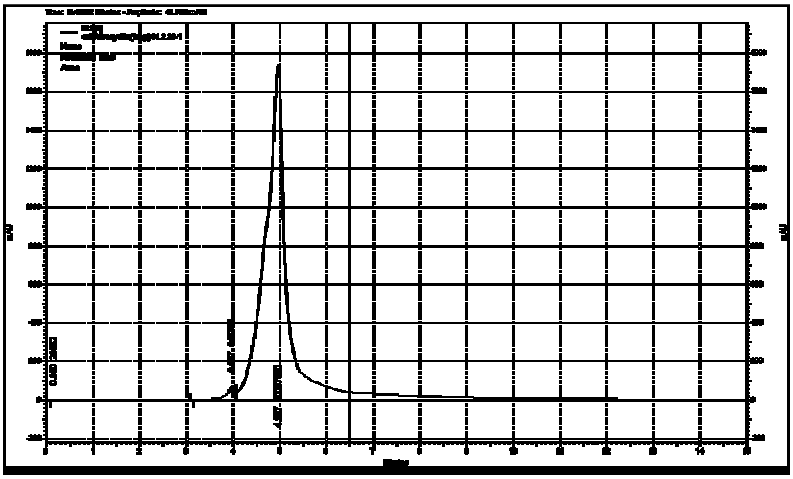
نمونه‌ها با استفاده از معادلات خط حاصله از نمونه‌های استاندارد و بر اساس سطح زیر پیک‌های کروماتوگرام برای هر نمونه برحسب میکروگرم در کیلوگرم محاسبه می‌گردید. لازم به ذکر است با تکرار تزریق استانداردها و رسم منحنی استاندارد و تعیین رگرسیون معادله خط غلظت- سطح زیر منحنی، صحت عملکرد دستگاه ارزیابی شد و با بررسی نمودار حلال بدون نمونه (بلانک) و خطی بودن آن درستی روش کار مشخص گردید نهایتاً نتایج حاصله با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج

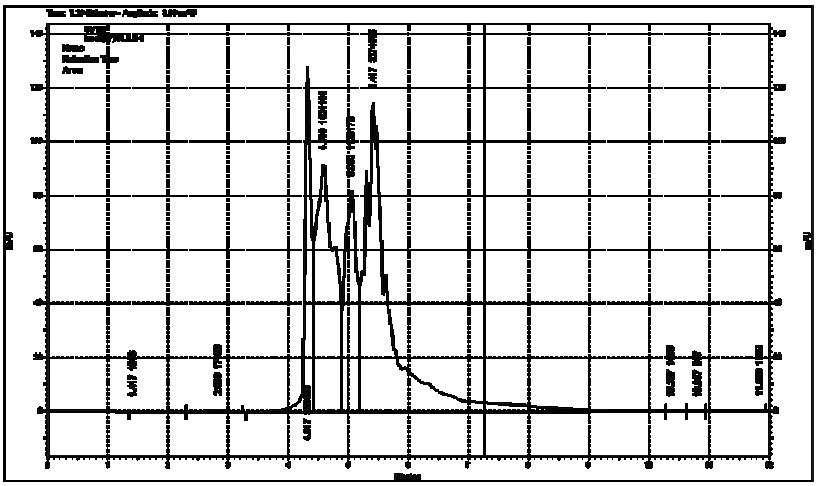
با توجه به شرایط کالیبراسیون دستگاه HPLC زمان بازداری تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین به ترتیب ۵/۳۳ و ۴/۹۶ دقیقه تعیین گردید (تصاویر ۱ و ۲) و سپس با تزریق مقادیر مختلف تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین محلول‌های استاندارد، نمودار منحنی‌های استانداردهای مربوطه بر اساس سطح زیر پیک کروماتوگرام‌ها رسم شد و معادلات خط آن‌ها تعیین گردید و بر اساس معادلات خط حاصله، مقدار آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه بر حسب میکروگرم بر کیلوگرم در هر یک از نمونه‌های عسل محاسبه شد.



تصویر ۱: کروماتوگرام استاندارد تتراسایکلین



تصویر ۲: کروماتوگرام استاندارد اکسی‌تتراسایکلین



تصویر ۳: یکی از کروماتوگرام‌های نمونه‌ی عسل

با توجه به پیک کروماتوگرام‌های به دست آمده با استانداردهای تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین، معادله‌ی خط یا نمودار منحنی استاندارد تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین به ترتیب به صورت $X+10^{8}$ $Y=(5\ 10^{6})$ و نیز $Y=(8\ 10^{6})\ X+(5\ 10^{7})$ حاصل شد. ارتباط خطی بودن[1] غلظت با سطح زیر منحنی به ترتیب برای تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین با رگرسیون $R^2=0/9116$ و $R^2=0/9905$ به دست آمد.

Y: سطح زیر منحنی که پیک تتراسایکلین و یا اکسی‌تتراسایکلین را نشان می‌دهد.

X: غلظت دارو

با قرار دادن سطح زیر منحنی حاصل از تزریق نمونه‌ی عسل در معادله‌ی به دست آمده مقدار تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین بر حسب µg/kg به دست آمد.

از تعداد ۶۰ نمونه‌ی عسل مورد بررسی، به ترتیب ۲۳ (۳۸/۳۳ درصد) و ۲۰ (۳۳/۳۳ درصد) نمونه‌ی فاقد درصد باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین بودند. هم‌چنین به ترتیب ۳۷ (۶۱/۶۶ درصد) و ۴۰ (۶۶/۶۶ درصد) نمونه‌دارای باقی‌مانده تتراسایکلین و اکسی-تتراسایکلین بالاتر از حد مجاز بودند. تعداد ۳۱ (۵۱/۶۶ درصد) نمونه دارای هر دو نوع باقی‌مانده دارویی و ۱۴ (۲۳/۳۳ درصد) نمونه هم فاقد هر دو باقی‌مانده تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین بودند. ۶ (۱۰ درصد) نمونه فقط دارای یک نوع باقی‌مانده و از نوع اکسی‌تتراسایکلین بودند و تعداد ۹ (۱۵ درصد) نمونه دارای یک نوع باقی‌مانده و از نوع تتراسایکلین بودند. میزان حداقل باقی‌مانده‌ی تتراسایکلین در کل نمونه‌ها صفر و حداکثر آن ۱۰۲۲/۲۳ میکروگرم بر کیلوگرم بود. میزان حداقل باقی‌مانده‌ی اکسی‌تتراسایکلین در کل نمونه‌ها نیز صفر و حداکثر آن ۱۰۱۴/۶۹ میکروگرم بر کیلوگرم بود. میزان حداقل باقی‌مانده‌ی تتراسایکلین در نمونه‌های مثبت از نظر باقی‌مانده ۱۲/۹۳ میکروگرم بر کیلوگرم و حداکثر آن ۱۰۲۲/۲۳ میکروگرم بر کیلوگرم بود. این در حالی است که میزان حداقل باقی‌مانده اکسی‌تتراسایکلین در نمونه‌های مثبت از نظر باقی‌مانده ۱۰/۸۴ میکروگرم بر کیلوگرم و حداکثر آن ۱۰۱۴/۶۹ میکروگرم بر کیلوگرم بود (جدول ۱). لازم به ذکر است با توجه به محدودیت دستگاه به خصوص آشکارساز UV، کمترین غلظت باقیمانده‌ها در نمونه‌های عسل، مقادیر ذکر شده در فوق شناسایی شد که ممکن است مقادیر پایین‌تری با دستگاه یا آشکارسازهای دیگر شناسایی شود. بنابراین در مواردی که مقدار صفر اعلام شده است به معنای غیرقابل شناسایی (Non-detectable) بوده است.

1- Linearity

جدول ۱: میزان حداقل، حداکثر و میانگین باقیمانده‌ی داروهای تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین در نمونه‌های عسل

نوع دارو	کل نمونه‌های عسل			نمونه‌های عسل حاوی باقیمانده		
	حداقل دارو µg/kg	حداکثر دارو µg/kg	میانگین میزان دارو میانگین± خطای معیار	حداقل دارو µg/kg	حداکثر دارو µg/kg	میانگین میزان دارو میانگین± خطای معیار
تتراسایکلین	۰	۱۰۲۲/۲۳	۷۳/۵۳± ۲۰/۶۸	۱۲/۹۳	۱۰۲۲/۲۳	۱۱۹/۲۳±۳۱/۳۸
اکسی‌تتراسایکلین	۰	۱۰۱۴/۶۹	۲۶/۶۴± ۱۱۱/۷۶	۱۰/۸۴	۱۰۱۴/۶۹	۱۶۷/۶۳۶±۳۷/۰۲

نتایج انجام آزمون آماری One-Sample T Test در مورد باقی‌مانده تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین در نمونه‌های عسل مورد بررسی با حد استاندارد کشورهای اتحادیه‌ی اروپا، کدکس الیمانتاریوس و نیز سازمان غذا و دارو آمریکا که همگی در حد صفر می‌باشند، اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p\leq ۰/۰۵$). به عبارت دیگر مقدار باقی‌مانده این دو آنتی‌بیوتیک در نمونه‌های عسل مورد مطالعه به طور معنی‌داری بیشتر از حدود استانداردهای ذکر شده در فوق بود. به همین ترتیب مقایسه‌ی آماری نتایج حاصله از تحقیق حاضر با حد ارفاقی اتحادیه‌ی اروپا به میزان ۲۵ µg/kg و نیز حد مجاز عسل‌های تولیدی استرالیا و کانادا به میزان ۳۰۰ µg/kg انجام شد که نتایج به طور معنی‌داری بیشتر از حدود ذکر شده در فوق بودند ($p\leq ۰/۰۵$).

بحث

بر اساس نتایج مطالعه‌ی حاضر تعداد ۴۶ (۷۶/۶۷ درصد) نمونه از مجموع ۶۰ نمونه مورد بررسی دارای باقی‌مانده آنتی‌بیوتیکی بودند که بیش از سه چهارم عسل‌های مورد مطالعه را تشکیل می‌دهد. تعیین MRLS ملی برای هر کشوری لازم و ضروری است اما متأسفانه در کشور ما برای داروهای دامپزشکی از جمله داروهای آنتی‌بیوتیکی مصرفی در زنبور عسل حد مجاز تعیین نشده است. در ایران قریب به ۱۰ سال پیش استاندارد شماره‌ی ۷۰۸۷ در مورد روش نمونه‌برداری عسل برای کنترل باقی‌مانده داروهای دامی در سال ۱۳۸۲ از سوی موسسه‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب شده است (موسسه‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۸۲). هر چند که از سوی موسسه‌ی مذکور یا سایر مراکز نظارتی مانند سازمان دامپزشکی کشور و نیز بر اساس جستجو در منابع موجود هیچ‌گونه اطلاعاتی در مورد حد مجاز باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی در عسل‌های مصرفی در ایران ذکر نشده است، لذا در مطالعه‌ی حاضر با توجه به دقت بالای تکنیک HPLC از این تکنیک برای بررسی باقی‌مانده تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین در عسل به منظور روشن شدن وضعیت موجود استفاده گردید.

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در زنبورداری در برخی کشورهای اروپایی ممنوع و غیرقانونی است. در اتحادیه‌ی اروپا حد مجاز استاندارد برای باقی‌مانده‌ی دارویی در عسل در نظر گرفته نشده است. این بدین معنا است که عسل‌های حاوی باقی‌مانده نباید عرضه شوند. البته اتحادیه‌ی اروپا یک حد مجاز ارفاقی برای اکسی‌تتراسایکلین در عسل‌هایی که در داخل اروپا تولید می‌شوند، به میزان ۲۵ µg/kg در نظر گرفته است و در مورد عسل‌های وارداتی باید عاری از باقی‌مانده باشند (Peres et al. 2010). از سوی دیگر برخی کشورها مثل سوئیس و بلژیک حد مجاز ۲۰ µg/kg را برای انواع تتراسایکلین‌ها در عسل تعیین نموده‌اند (Khong et al. 2005).

در آمریکا، کانادا و آرژانتین استفاده از آنتی‌بیوتیک جهت درمان لوک ممنوع می‌باشد. حد مجاز برای داروهای دامپزشکی در عسل در استرالیا نیز مشخص شده است که برای اکسی‌تتراسایکلین ۳۰۰ ppb مشخص شده است و بقیه آنتی‌بیوتیک‌ها غیرمجازند. حد مجاز برای

اکسی‌تتراسایکلین و اریترومایسین در کانادا به ترتیب ۳۰۰ ppb و ۳۰ ppb می‌باشد (Johnson and Jadon 2010).

موارد متعددی از مطالعات در مورد باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی در عسل به انجام رسیده است. در فاصله‌ی سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۲، تعداد ۲۴۸ نمونه عسل تولیدی در بلژیک مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۴ (۱/۶ درصد) نمونه دارای باقی‌مانده‌ی استرپتومایسین و به ترتیب ۲ (۲/۸ درصد) و ۳ (۴/۲ درصد) نمونه از ۷۲ نمونه که از نظر تتراسایکلین و سولفانامید مورد بررسی قرار گرفتند، دارای باقی‌مانده بودند. هم‌چنین به ترتیب در ۵۰ و ۹۳ نمونه عسل مورد بررسی از نظر باقی‌مانده بتالاکتام‌ها و کلرامفنیکل، هیچ باقی‌مانده‌ای مشاهده نشد. از تعداد ۱۰۸ نمونه عسل‌های وارداتی به بلژیک نیز ۵۱ (۴۷/۲ درصد) نمونه دارای باقی‌مانده استرپتومایسین بودند. حال آن که به ترتیب ۲۹ (۲۹/۶ درصد) و ۳۱ (۳۱/۶ درصد) نمونه عسل از ۹۸ نمونه مورد بررسی از نظر تتراسایکلین و سولفانامید دارای باقی‌مانده بودند. هم‌چنین ۴۰ (۴۷/۱ درصد) نمونه عسل از مجموع ۸۵ نمونه دارای باقی‌مانده‌ی کلرامفنیکل بودند و در هیچ کدام از ۱۸ نمونه عسل مورد بررسی از نظر آنتی‌بیوتیک‌های بتا لاکتام، باقیمانده‌ای از این خانواده ملاحظه نگردید. در مجموع این مطالعات به ترتیب آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، تتراسایکلین و اکسی-تتراسایکلین معادل ۱۰ تا ۷۱، ۱۰ تا ۳۰ و ۱۰ تا ۱۱ µg/kg گزارش شدند. هم‌چنین در مجموع ۴ نوع سولفانامید با نام‌های سولفاتیازول (µg/kg ۴۳۰-۳۳)، سولفامتوکسازول (µg/kg ۷۳-۲۰)، سولفادیمیدین و سولفادیازین (هر یک کمتر از ۲۰µg/kg) در نمونه عسل‌های مورد مطالعه شناسایی شدند (Reybrock 2003).

در سوئیس از ۷۵ نمونه عسل مورد بررسی، ۱۳ (۱۷ درصد) نمونه دارای باقی‌مانده کلرامفنیکل بودند که ۶ نمونه دارای باقی‌مانده بین µg/kg ۰/۸ تا ۰/۹ و ۲ نمونه هم دارای باقی‌مانده µg/kg ۵ بودند (Ortelli et al. 2004). هم‌چنین در یونان ۲۵۱ نمونه عسل با تکنیک HPLC از نظر تتراسایکلین مورد ارزیابی قرار گرفتند که ۲۹ درصد از نمونه‌ها مثبت بودند. بیش‌تر آن‌ها به میزان ۰/۰۱۸ تا ۰/۰۵۵mg/kg و برخی نیز بیش از ۰/۱۰۰mg/kg دارای باقی‌مانده تتراسایکلین بودند (Saridaki et al. 2006). در اسپانیا بررسی ۱۷ نوع آنتی‌بیوتیک (ماکرولیدها، تتراسایکلین‌ها، کوئینولون‌ها و سولفانامیدها) به ترتیب روی ۱۶ و ۵ نمونه عسل جمع‌آوری شده از سوپر مارکت‌ها و زنبورداری‌ها صورت گرفت. نتایج حاکی از آن بود که یک نمونه از عسل‌های سوپر مارکت حاوی ۸/۶µg/kg سارافلوکساسین و یک نمونه از عسل‌های زنبورداری‌ها نیز دارای مقادیر بسیار ناچیزی از تایلوزین، سولفادیمیدین و سولفاکلرپیریدازین بود (Vidal et al. 2009). حال آن که نتایج مطالعه‌ی دیگر روی ۵۷۶ نمونه عسل در شمال اسپانیا حاکی از آن بود که ۲۴ (۴ درصد) نمونه دارای باقی‌مانده‌ی تتراسایکلین در محدوده‌ی بین ۱۵ تا ۹۲۰µg/kg بودند (Bonvehi and Gutierrez 2009). در آلمان نیز با بررسی به ترتیب ۴۷ و ۳۰ نمونه عسل وارداتی و تولید داخل ملاحظه شد که ۲۲ نمونه (تقریباً ۵۰ درصد) از عسل‌های وارداتی از کشورهای آرژانتین، چین و کانادا دارای باقی‌مانده آنتی‌بیوتیکی و عمدتاً سولفامتوکسازول بودند. حال آن که صرفاً یک نمونه از عسل‌های تولید داخل، دارای باقی‌مانده آنتی‌بیوتیکی بود (Naumann et al. 2012).

هم‌چنین در بررسی۵۰ نمونه عسل در ترکیه، تمامی نمونه‌ها عاری از سولفانامیدها و اکسی‌تتراسایکلین تشخیص داده شدند (Gunes et al. 2009).

در بررسی نمونه‌های عسل در انگلستان با تکنیک HPLC در طول ۱۲ هفته پس از درمان با دو روش دارودهی به صورت مایع و پودر، میزان باقی‌مانده اکسی‌تتراسایکلین در روش درمانی به شکل مایع، بالاتر بود و حدود ۸ هفته پس از درمان به میزان ۳/۷mg/kg رسید (Thompson et al. 2005).

همان طور که در مطالعات فوق مشهود می‌باشد، بسیاری از کشورهای جهان همواره به بررسی و پایش

میزان باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی در عسل‌های تولیدی و نیز وارداتی و مقایسه‌ی آن با حدود تعیین شده می‌پردازند که در این رابطه بر اساس جستجو در منابع موجود، اطلاعاتی در مورد ایران وجود ندارد . از آن‌جایی که باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیکی علاوه بر عوارض ناشی از آن‌ها در مصرف‌کنندگان سبب افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها و موارد پاسخ به درمان دارویی می‌گردد، فقدان کنترل باقی‌مانده‌ها در غذاهای با منشاء دامی در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران یک مشکل جدی است و علاوه بر تهدید برای سلامت مصرف‌کنندگان مانع از صادرات این تولیدات به کشورهایی نظیر اتحادیه‌ی اروپا می‌شود که MRLS[1] برای آن‌ها تعیین شده است. به همین علت، ضروری است که ضمن تدوین هرچه سریع‌تر مقادیر MRLS برای انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در فرآورده‌های زنبور عسل روش‌های سریع‌تری برای جستجوی باقی‌مانده در غذاها با منشاء دامی در دسترس قرار گیرد. هم‌چنین نظارت دقیق‌تری بر عسل‌های ارائه شده در بازار مصرف اعم از تولید داخل و یا وارداتی صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان‌نامه از محل اعتبار پژوهانه‌ی سال ۱۳۹۱ دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شده است که بدین وسیله ازحوزه معاونت پژوهشی دانشگاه قدردانی و تشکر می‌نماید.

منابع

مرکز آمار ایران (۱۳۹۱). دفتر آمارهای کشاورزی – بهره‌برداری پرورش دهنده‌ی زنبور و مقدار تولید عسل بر حسب استان‌های ایران.

موسسه‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۸۲). عسل – باقی‌مانده‌ی داروهای دامی – روش نمونه‌برداری برای کنترل – روش آزمون. استاندارد ملی ایران به شماره‌ی ۷۰۸۷.

Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. Apidologie, 37: 1-18.

Bogdanov, S.; Haldimann, M.; Luginbuhl, W. and Gallmann, P. (2007). Minerals in honey: enveironmental, geographical and botanical aspects. Journal of Apicultural Research and Bee World. 46(4): 269-275.

Bonvehi, S.J. and Gutierrez, A.L. (2009). Residue of antibiotics and sulfanamides in honey from Basque country (NE spain). Journal of Food Agriculture, 85: 63-72.

Gunes, M.E.; Gunes, N. and Cibik, R. (2009). Oxytetracyclin and sulfanamide residue analysis of honey sample from southern Marmara region in Turkey. Bulgarian Journal of Agricultural Sciences, 15(2): 163-167.

Johnson, S. and Jadon, N. (2010). Antibiotic residues in honey. Center for science and environment, India, pp:11-15, 20-21.

Khong, S.P.; Hammel, Y.A. and Guy, P.A. (2005). Analysis of tetracyclines in honey by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrophotometry, 19: 493–502.

Li, J.; Chen, L.; Wang, X.; Jin, H.; Ding, L.; Zhang, K. et al. (2008). Determination of tetracyclines residues in honey by on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography. Talanta, 75: 1245–1252.

Naumann, G.; Mahart, E.; Hinnelreich, A. and Mohring, A. (2012). Traces of contamination-well preserved in honey. Journal of Consumer Protection and Food Safety, 7(1): 35-43.

Ortelli, D.; Edder, P. and Corvi, C. (2004). Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Chromatographia, 59 (1-2): 61-64.

Peres, G.T.; Rath, S. and Reyes, F.G. (2010). A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey. Food Control, 21: 620–625.

Reybroeck, W. (2003). Residues of antibiotics and sulfonamides in honey on the Belgian market. Apiacta, 38: 23-30.

Saridaki-Papakonstadinou, P.M.; Andredakis, S.; Burriel, A. and Tsachev, I. (2006). Determination of tetracycline residues in Greek honey. Trakia Journal of Sciences, 4(1): 33-36.

Thompson, H.M.; Waite, R.J.; Wilkins, S.; Brown, M.A.; Bigwood, T.; Shaw, M. et al. (2005). Effects of European foulbrood treatment regime on oxytetracycline levels in honey extracted from treated honeybee (*Apis mellifera*) colonies and toxicity to brood. Food Additives and Contaminants, Part A. 22(6): 573 – 578.

Vidal, T.L.; Aguilera-Luiz Mdel, M.; Romero-Gonzalez, R. and Frenich, A.G. (2009). Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(5): 1760-1767.

Survey on tetracycline and oxytetracycline antibiotic residues in honeys produced in some honey hives in Khuzestan province using HPLC method

Fazlara, A.[1]; Najafzadeh Varzi, H.[2] and Izadi, B.[3]

Received: 13.02.2013 Accepted: 11.12.2013

Abstract

Tetracyclines have been used for treatment of European and American foulbrood in beekeeping since years ago. Lack of attention to veterinary recommendations by beekeepers about time and dosage of antibiotics consumption leads to increase antibiotics residues in honey more than standard or Maximum Residual Limits (MRL). In attention to the side effects of antibiotic residues like drug resistance, consumers hyperesthesia etc., the investigation for tetracycline and oxytetracycline residues was considered in some consumed honey samples in Khuzestan province by HPLC method. Totally 60 honey samples were collected from Khuzestan beekeepers and processed based on the protocol for investigation of tetracycline and oxytetracycline residues. According to this matter and in order to extract antibiotic residues, 5 g of each honey sample was mixed and dissolved with 25 ml of McIlvaine buffer and filtered. Then after calibration of HPLC system, 20 µl of each solution was injected to HPLC system and finally the amounts of tetracycline and oxytetracycline residues were determined for each sample. This study showed that 14 (23.33%) samples of whole investigated honeys had no antibiotic residues while 31 (51.66%) out of 60 collected honey samples contaminated to both tetracycline and oxytetracycline residues. The means of tetracycline and oxytetracycline residues in positive samples were equal to 119.23±31.38 and 167.636±37.02 µg/kg respectively. In conclusion, in present study 46 (76.67%) out of 60 studied honey samples contained antibiotic residues. These results showed significant difference with zero µg/kg limits as MRL determined by European Union, Codex Alimentarius and Food and Drug Administration ($p \leq 0.05$).

Key words: Tetracycline, Oxytetracycline, Honey, HPLC

1- Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Basic sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
3- DVM Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Fazlara, A., E-mail: Fazlara2000@yahoo.com