Archive of SID

تعیین مدت ماندگاری اکسی تتراسیکلین در عضله و کبد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) به روش HPLC

طاهره ناجی*[1]، همایون حسین زاده[2]، مهناز قمی[3] و بهاره بهرامی[4]

۱، ۳، ۴ـ گروه علوم پایه، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

۲ـ موسسهٔ تحقیقات شیلات ایران، تهران.

تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۷

تاریخ پذیرش: ۹۰/۶/۸

چکیده

آنتی بیوتیک اکسی تتراسیکلین (OTC) تنها دارو از خانوادهٔ تتراسیکلین‌هاست که از تاییدیهٔ FDA (وزارت غذا و بهداشت) جهت جلوگیری و درمان بیماری‌ها در آبزیان برخوردار است. هدف از این مطالعه تعیین میزان ماندگاری اکسی تتراسیکلین در عضله و کبد ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*) از طریق کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به روش تک دوز بود.

بر اساس فارماکوپهٔ آبزیان دز ۵۰-۲۵ میلی گرم به هر کیلو گرم وزن زنده ماهی، مقدار۰/۰۴ میلی لیتر از محلول قابل تزریق اکسی تتراسیکلین ۱۰درصد به صورت عضلانی، به تعداد ۱۲ عدد در چهار گروه هر گروه ۳ عدد کپور پرورشی با محدوده وزنی ۸۰-۴۰ گرم تزریق گردید و مقدار باقیماندگی آن در عضله و کبد پس از۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، با تغلیظ توسط فاز جامد (SPE)، به روش HPLC موردسنجش قرار گرفت.

بیشترین غلظت OTC در بافت عضله، ۶ ساعت و در کبد ۲۴ساعت پس از تزریق به ترتیب ۱۷/۳۷و ۳/۷۳ میکرو گرم در گرم و کمترین غلظت در عضله و کبد، ۷۲ ساعت پس از تزریق به ترتیب ۹/۵۲و ۰/۲۹ میکرو گرم در گرم بدست آمد که این غلظتها نشان دهندهٔ سیر نزولی غلظت OTC در عضله در حد فاصل ۶ تا ۷۲ ساعت می‌ماند. ولی به دلیل توزیع مجدد دارو در بافت کبد، ۲۴ ساعت پس از تزریق، غلظت دارو به طور چشمگیری ($P < ۰/۰۵$) افزایش یافته و سپس تا ۷۲ ساعت به تدریج کاهش یافت.

واژگان کلیدی

اکسی تتراسیکلین، مدت ماندگاری، عضله، کبد، کپور معمولی، کروماتوگرافی مایع

* نگارنده پاسخگو: naji_t@iaups.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

رشد جمعیت جهان و افزایش میزان نیاز به پروتئین باعث شد، بشر به مصرف بیشتر انواع آبزیان از جمله ماهی‌ها، سخت پوستان، نرم تنان و سایر آبزیان روی آورد. ماهی کپور معمولی بعنوان یکی از اصلی‌ترین ماهیان پرورشی دنیا شناخته شده است. این گونه بطور گسترده‌ای در اروپا ،آسیا و خاور دور پرورش داده می‌شود. با توجه به رشد جمعیت، ضروری است که آبزیان پرورشی در شرایط کنترل شده تولیدگردند تا مصرف کنندگان از سلامت آبزیان مطمئن باشد و بدون هیچ گونه نگرانی آن را مصرف نماید (کیوان و همکاران، ۱۳۸۷).

یکی از هدف‌های آبزی پروری افزایش نرخ بازده تولید برای به حداکثر رساندن سود دهی می‌باشد.افزایش تراکم یکی از روش‌های افزایش بازده تولید است اما این امر ممکن است میزان ابتلا به بیماری را در ماهیان پرورشی افزایش دهد.این امر به سبب کاهش کیفیت آب و به وجود آمدن شرایط استرس زا ایجاد می‌گردد. ماهیان پرورشی اغلب تحت تأثیر عفونت‌های باکتریایی قرار دارند. یکی از معمول‌ترین روش‌های درمان، استفاده از انواع آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد.اما بکارگیری آنتی بیوتیک‌ها جهت درمان بیماری‌های ماهیان پرورشی به طور گسترده مورد انتقاد قرار گرفته است، که از دلائل آن افزایش توانایی مقاومت باکتری‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌ها، از بین بردن فلور میکروبی محیط زیست، هزینه بالای این داروها و عوارض جانبی این داروها بر ماهی و میگو می‌باشد. ثابت گردیده است که برخی از آنتی بیوتیک‌ها سیستم ایمنی را سرکوب می‌کنند و موجودات آبزی را بیشتر مستعد پذیرش بیماری‌های باکتریایی، ویروسی و انگلی می‌نمایند (Hassan,2007).

کنترل محصولات حیوانی خوراکی به منظور تعیین مقدار تتراسیکلین یکی از اساسی‌ترین فعالیت‌ها در برنامه کنترل باقی مانده‌های دارویی است. دلیل این امر، استفادهٔ وسیع از این دسته از آنتی بیوتیک‌هاست. معمولا آزمایش‌های میکروبیولوژیک برای تعیین مقدار تتراسیکلین در غذا استفاده می‌شود، اما این آزمایش‌ها دقیق نیستند زیرا نمی‌توان مقدار واقعی تتراسیکلین را تعیین کرد، به همین دلیل از روش‌های آنالیز و کروماتوگرافی که دقیق و با حداقل خطا هستند استفاده می‌شود (Gajda & Posyniak, 2007).

اکسی تتراسیکلین (OTC) یکی ازآنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف در درمان عفونت‌های باکتریایی است که برای کنترل امراض در مزارع پرورش ماهی به طور بی رویه مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به اینکه پس از استفاده از داروهای مختلف به خصوص آنتی بیوتیک‌ها میزانی از آنها در بافت‌های ماهی باقی می‌ماند، کیفیت ماهی کاهش یافته و آن را به عنوان یک منبع غذایی سالم و ایمن به خطر می‌اندازد، بنابراین باقی مانده داروها و یا آنتی بیوتیک‌ها برای مصرف کنندهٔ نهایی که انسان می‌باشد نیز خطرناک بوده و مشکلات عدیده‌ای را به وجود می‌آورد (Zhang & Li, 2007 Xu & Rogers, 1995). تتراسیکلین‌ها با اتصال به کلسیم و دیگر کاتیون‌های دو ظرفیتی می‌توانند در روده عفونت پیشرونده و یا در بعضی افراد منجر به ایجاد حساسیت شود به خصوص وقتی که بیش از حد مجاز به مصرف برسد (Arias,2005) هم چنین مصرف انواع تتراسیکلین و اکسی تتراسیکلین تاریخ گذشته می‌تواند به سلول‌های پروگزیمال کلیه آسیب رسانده و منجر به سندرم فانکونی شوند.(Black,1984)

اکسی تتراسیکلین در ماهی کپور معمولی نیز باعث تضعیف ایمنی سلولی (با مهار پاسخ anti-SRBC) و ایمنی هومورال (تاخیر در پاسخ آنتی بادی) می‌شود (Salehzadeh, 2006).

مطالعات نشان داده است که اکسی تتراسیکلین حتی با دوزهای پنج برابر حد طبیعی برای قزل آلای دریاچه‌ای سمی نمی‌باشدولی باعث تضعیف بسیاری از فعالیت‌های سیستم ایمنی می‌شود(عبدی، ۱۳۸۵)با توجه به اینکه اطلاعاتی از مدت بازماندگی اکسی تتراسیکلین درماهی کپور در دست نمی‌باشد، لذا هدف ازانجام این تحقیق، تعیین میزان بازماندگی اکسی تتراسیکلین در عضله و کبد ماهی کپور معمولی در دوره‌های زمانی مختلف بود.

مواد و روش‌ها

۱۵ قطعه بچه ماهی کپور معمولی در محدودهٔ وزن ۸۰ ـ۴۰ گرم، از مزرعه پرورش ماهیان گرم آبی در استان گیلان خریداری و به آزمایشگاه آبزیان واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی منتقل گردید. آن‌ها به مدت یک هفته در چهار آکواریوم که در هر یک سه عدد ماهی بود در شرایط آزمایشگاهی (دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد، غلظت اکسیژن محلول ۷ـ۶ میلی گرم در لیتر) نگهداری شدند تا با محیط سازگار شوند. پس از پایان این دوره، تعداد ۱۲ عدد از نمونه‌ها به عنوان گروه تک دوز انتخاب گردید.ماهی‌ها در ۴ تیمارو ۳ تکرار مورزد بررسی قرار گرفتند. میزان اکسی تتراسیکلین به نسبت ۵۰-۲۵ میلی گرم در کیلو گرم (عبدی، ۱۳۸۵)۰/۰۴میلی لیتر از محلول قابل تزریق اکسی تتراسیکلین ۱۰ درصد (۱۰۰ میلی گرم OTC در هر میلی لیتر) به عضله ماهیان تزریق شد و پس از ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نمونه‌گیری از بافت عضله و کبد آنها بعمل آمد.۳ عدد از ماهی‌ها نیز به عنوان گروه شاهد تحت تزریق عضلانی با نرمال سالین قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای تعیین میزان بازماندگی اکسی تتراسیکلین در بافت عضله و کبد، پس از خارج‌کردن نمونه‌ها از فریزر توزین و سپس با اسکالپل خرد شدند. جهت هموژن‌کردن نمونه‌ها آنها را در شیکر قرار داده و به ازاء هر گرم بافت، ۴ میلی لیتر بافر Na_2EDTA ۰/۱ مولار با pH=۴ به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد. پس از سانتریفیوژ با دور ۸۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه، محلول رویی جدا شده و رسوب ته لوله بار دیگر با همان مقدار بافر Na_2EDTAمخلوط و (با دور ۸۰۰۰، ۳۰ دقیقه) سانتریفیوژ گردید. محلول رویی جدا شده به محلول قبلی افزوده شد و این عمل بار دیگر با نصف مقدار بافر Na_2EDTA تکرار شده و محلول رویی را با محلول‌های مراحل قبل مخلوط کرده و با فیلتر ۰/۲ میکرون (فیلتر سر سرنگی سلولز استات، استریل، مقاوم به THF) فیلتر گردید (Malvisi, 1996; Xu, 1995).

انجام عمل تغلیظ با استفاده از فاز جامد صورت گرفت. ابتدا کارتریج SPE (C18) به پمپ خلاء وصل شده و با ۲ میلی لیتر متانول (HPLC grade) و ۲ میلی لیتر محلول ۱ درصد متانول در آب شستشو داده شد. نمونه فیلتر شده به کارتریج اضافه شد و پس از عبور بافر از کارتریج و خروج آن، ۰/۲ میلی لیتر متانول مجددا به کارتریج اضافه گردید تا باقی ماندهٔ بافر نیز خارج شود. سپس مجددا ۱ میلی لیتر متانول روی کارتریج ریخته شد تا متانول و اکسی تتراسیکلین با هم از کارتریج خارج شوند. پس از تبخیر متانول، ۰/۲ میلی لیتر از فاز مایع مورد استفاده در دستگاه HPLC را که شامل بافر فسفات (pH=۲): استونیتریل: تتراهیدروفوران (v/v ۹:۴:۸۷)بود به اکسی تتراسیکلین اضافه شد تا دارو در آن حل شود. آنگاه ۵۰ میکرولیتر از آن را به دستگاه HPLC (مدل shimadzu، ستون C 18، به طول ۱۵ سانتی متر و قطر ۴/۶ میلی متر، دتکتور UV، طول موج ۳۵۵ نانومتر) تزریق گردید و پیک دارو مشاهده و ثبت گردید (Malvisi, 1996).

جهت بررسی توزیع نرمال داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk و برای بررسی آماری داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون Tukey استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از تزریق عضلانی به مقدار ۵۰ میلی گرم اکسی تتراسیکلین در هر کیلوگرم وزن تر ماهی و میانگین مقدار بازماندگی برحسب میکروگرم درگرم در بافت عضله و کبد در ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در جدول (۱) ارائه گردیده است. در ماهی‌های گروه کنترل بازماندگی از دارو مشاهده نشد.

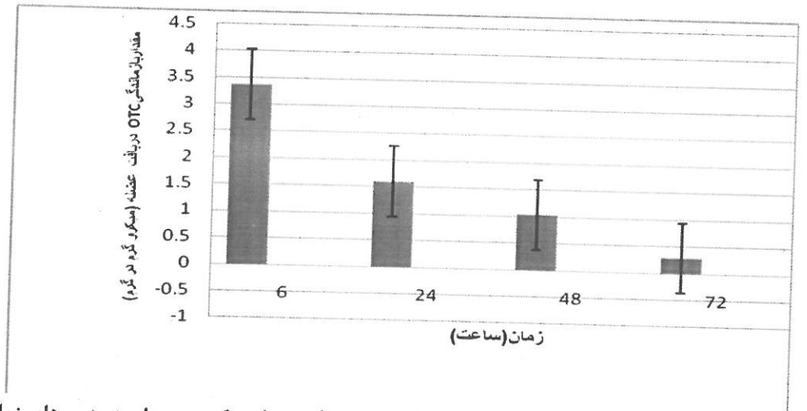
www.SID.ir

Archive of SID

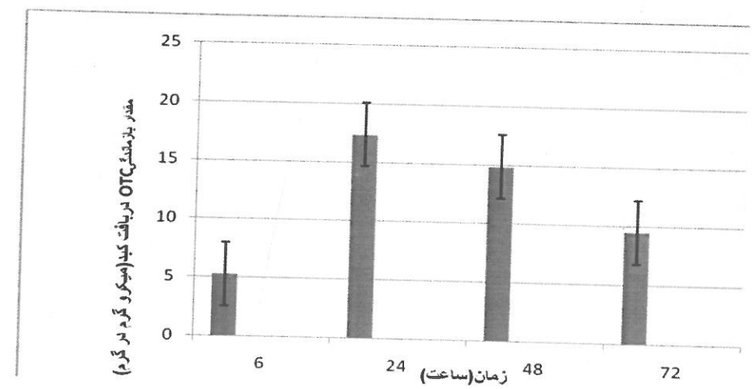
جدول ۱ـ میانگین مقدار و انحراف معیار بازماندگی اکسی تتراسیکلین در دوره‌های زمانی مختلف برحسب میکروگرم در گرم پس از تزریق عضلانی دربافت عضله و کبد بچه ماهی کپور معمولی

نوع بافت	مقدار بازماندگی (میکروگرم در گرم)			
	۶ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
عضله	۳/۳۷± ۰/۱	۱۱/۳۰۶ ±۰/	۱/۰۳۷ ±۰/۲	۰/۲۹±۰/۰۲
کبد	۵/۲۶ ±۰/۲	۱۷/۳۷ ±۰/۱	۱۴/۸۶±۰/۱	۹/۵۲ ±۰/۲

نتایج آنالیز آماری نشان‌دهنده کاهش غلظت اکسی تتراسیکلین در بافت عضله ماهی کپور معمولی طی دوره زمانی ۶ تا ۷۲ ساعت پس از تزریق می‌باشد (شکل ۱).



شکل۱ـ نمودار تغییرات مقدار غلظت OTC)میکروگرم در گرم)در عضلهٔ بچه ماهی کپور معمولی در دوره‌های زمانی مختلف (آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است).



شکل۲ـ نمودار تغییرات مقدار غلظت OTC)میکروگرم در گرم)دربافت کبد بچه ماهی کپور معمولی در دوره‌های زمانی مختلف (آنتنک‌ها نشان‌دهنده انحراف معیار است).

شکل(۲) نمودار تغییرات مقدارغلظت اکسی تتراسیکلین را در بافت کبد پس از تزریق عضلانی دردوره‌های زمانی مختلف نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که ۶ ساعت پس از تزریق، غلظت OTC به کمترین مقدار خود می‌رسد (۵/۳۶میکرو گرم در گرم) و پس از ۲۴ ساعت به طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) افزایش یافته و به بیشترین مقدار خود

رسید (۱۷/۳۷ میکرو گرم در گرم). پس از آن، در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق، غلظت OTC در کبد کاهش یافت(به ترتیب ۱۴/۸۶ و۹/۵۲ میکرو گرم در گرم) که این کاهش معنی‌دار نمی‌باشد (P>۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

مقایسه نتایج مربوط به مقدار باز ماندگی آنتی بیوتیک‌ها در ماهیان مختلف کاری دشوار است زیرا اینگونه نتایج متاثر از روش‌های آزمایش، گونه ماهی و شرایط درمانی است (میرزرگر و همکاران، ۱۳۷۹)

بررسی‌های انجام شده در پژوهش اخیر نیز (شکل ۱) حاکی از تغییرات غلظت بافتی اکسی تتراسیکلین در عضله در طی زمان پس از تزریق عضلانی می‌باشد. با توجه به نتایج این مطالعه، بیشترین غلظت OTC در عضله، ۶ ساعت پس از تزریق و به میزان ۳/۳۷ میکرو گرم در گرم در ازای تزریق ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم دارو بود.

در این تحقیق میانگین غلظت اکسی تتراسیکلین عضله، ۲۴ ساعت پس از تزریق عضلانی به ۱/۶۰۳ میکرو گرم در گرم رسیده بود. در حالی که میانگین غلظت OTC عضله، ۲۴ ساعت پس از تجویز خوراکی دارو در میگوی ببری سیاه (مونودون) به میزان ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم، ۳/۱ میکرو گرم در گرم (Uno, 2005) و پس از تجویز خوراکی به میزان ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در کپور علفخوار، ۵/۵۰ میکرو گرم در گرم بود (Zhang & Li, 2007).

غلظت OTC در بافت عضله، ۴۸ ساعت پس از تزریق، کاهش یافته و به طور میانگین به ۱/۰۳۷ میکرو گرم در گرم می‌رسد که طبق بررسی‌های آماری این کاهش غلظت در مقایسه با میزان ساعت ۲۴، معنی‌دار نمی‌باشد (P >۰/۰۵). این در حالی است که غلظت OTC در بافت عضله، ۴۸ ساعت پس از تجویز خوراکی دارو به میزان ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم در میگوی ببری سیاه، ۲/۴ میکرو گرم در گرم (Uno, 2006) و پس از تجویز خوراکی به میزان ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم در کپور علفخوار، ۴/۵میکرو گرم بر گرم بدست آمده بود (Zhang & Li, 2007 Nordlander,1987).

در این پژوهش کمترین میزان غلظت OTC در بافت عضله در ۷۲ ساعت پس از تزریق عضلانی دارو و به طور میانگین، ۰/۲۹ میکرو گرم بر گرم مشاهده گردید. بررسی آماری نشان دهندهٔ کاهش معنی‌دار سطح OTC در فاصله زمانی ۲۴ تا ۷۲ است (P<۰/۰۵). غلظت OTC در عضله در زمان ذکر شده، در تجویز خوراکی دارو به میزان ۵۰ در میگوی ببری سیاه، ۰/۵ میکرو گرم در گرم (Uno, 2005) و در تجویز خوراکی دارو به میزان ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم درکپور علفخوار، ۴ میکرو گرم در گرم گزارش شد (Zhang & Li, 2007).

نتایج تحقیق حاضر، بیانگر روند رو به کاهش غلظت OTC در بافت عضله با گذشت زمان می‌باشد.

نمودار تغییرات غلظت بافتی OTC در کبد در برابر زمان پس از تزریق عضلانی ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم دارو (شکل ۲) نشان می‌دهد که کمترین غلظت OTC در کبد، ۶ ساعت پس از تزریق و به میزان ۵/۲۶ میکرو گرم بر گرم می‌باشد.

۲۴ ساعت پس از تزریق عضلانی OTC، غلظت دارو در کبد به میزان قابل توجهی افزایش داشت و به ۱۷/۳۷ میکرو گرم بر گرم رسید این امر می‌تواند ناشی از توزیع مجدد دارو یا تجمع دارو در کبد باشد (P < ۰/۰۵).

در پژوهش Zhang & Li (2007) در تجویز خوراکی OTC به میزان ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم در کپور علفخوار، توزیع مجدد دارو در کبد از روز ششم (۹/۸۸میکرو گرم در گرم) تا روز هشتم (۱۰/۸۹ میکرو گرم در گرم) بود و ۲۴ ساعت پس از تجویز دارو، غلظت OTC در کبد کپور علفخوار، ۷/ ۱۷ میکرو گرم در گرم رسید.

با توجه به شکل (۲)، ۴۸ ساعت پس از تزریق عضلانی OTC، غلظت دارو در کبد کاهش یافته و به ۸۶/۱۴ میکرو گرم در گرم رسید. در حالیکه پس از۴۸ ساعت در تجویز خوراکی دارو به میزان ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم، غلظت OTC در کبد کپور علفخوار، ۱۶ میکرو گرم در گرم گزارش شد (Zhang & Li, 2007).

www.SID.ir

Archive of SID

پس از ۷۲ ساعت از تزریق، غلظت OTC در کبد روند کاهشی داشته و به ۹/۵۲ میکرو گرم در گرم رسید. غلظت OTC در کبد ۷۲ ساعت پس از تجویز خوراکی به مقدار ۵۰ میلی گرم در کیلوگرم در کپور علفخوار، ۱۳/۵ میکرو گرم در گرم گزارش شد (Zhang & Li, 2007).

نتایج حاصل از این تحقیق و نیز تحقیقات Zhang & Li (2007) بیانگر این مساله است که در تزریق عضلانی و نیز تجویز خوراکی OTC، پس از مدتی، غلظت دارو در کبد افزایش یافته و سپس مجددا کاهش می‌یابد که این امر می‌تواند ناشی از توزیع مجدد یا تجمع دارو در کبد باشد.

منابع

کیوان، ا. ناجی، ط. و عاطف یکتا، ع. ۱۳۸۷. بررسی اثرات سمی Fe^{2+} بر بافت آبشش، کبد، کلیه و عضله ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio L.*). پایان نامه کارشناسی ارشد دانشکدهٔ علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، ایران.

عبدی، ک. ۱۳۸۵.اطلاعات و کاربرد داروهای آبزیان.پرتو واقعه با همکاری انتشارات دانش نگار.تهران، ایران.

میرزرگر، س.سلطانی، م. و رستمی، م. ۱۳۷۹.ارزیابی باقی ماندهٔ آنتی بیوتیک‌ها در درمان تجربی ماهیان کپور معمولی و قزل‌آلای رنگین کمان به روش میکروبیولوژیک و کروماتوگرافی توأم با بیواتوگرافی.مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۵(۱): ۲۷ـ۲۱.

Arias,M.,Garcia-Falcon,M.S.,Garcia-Rio,L.,Mejuto,J.C.,Rial-Otero,R. & Simal-Gandara,J. 2005. inding constants of oxytetracycline to animal feed divalent cations. Journal of Food Engineering, 78: 69-73.

Black, W. & Gentry, R.1984.The distribution of oxytetracycline in the tissues of swine following a single oral dose. Can. Vet. J., 25:158-161.

Gajda,A. & Posyniak, A. 2009. Tetracyclines and their epimers in animal tissues by High-Performance Liquid Chromatography. Bull. Vet. Inst. Pulawy., 53:263-267.

Hassan,S.,Shaddad,A.,Eltayeb,I.,Omar,M.,&Homeida,A.2007.Detection of long-acting oxytetracycline residue levels in tissue of desert sheep following intramuscular injection.Int.J.Pharmacol., 3: 299-301.

Malvisi, J., Rocca, G., Anfossi, P. & Giorgetti, G. 1996.Tissue distribution and residue depletion of oxytetracycline in Sea bream (*Sparus aurata*) and Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) after oral administration. Aquaculture,147:159-168.

Nordlander, I., Johnsson, H.& Osterdahl, B.1987.Oxytetracyclineresidue in Rainbow trout analyzed by a rapid HPLC method. Food Additives&Contaminants, 4(3): 291-296.

Salehzadeh,F.,Madani,R.,Salehzadeh,A.,Rokni,N. & Golchinefar,F. 2006.Oxytetracycline residue in chicken tissues from Tehran slaughterhouses in Iran. Pakistan Journal of Nutrition,5:377-381.

Uno, K., Aoki, T., Kleechaya, W., Tanasomwang, V. & Ruangpan, L. 2006. Pharmacokinetics of oxytetracycline in Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and the effect of cooking on the residues. Aquaculture, 254: 24-31.

Xu, D., & Rogers, W. 1995. Oxytetracycline residue in the muscle of *Nile Tilapia*.Asian Fisheries Science, 8:113-120.

Zhang, Q. & Li, X. 2007. Pharmacokinetics and residue elimination of oxytetracycline in Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Aquaculture, 272: 140-145.

www.SID.ir