

تأثیر دو روش پخت آب‌پز و میکروویو بر باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیک تایلوزین در گوشت مرغ

علی حشمتی¹، ابوالفضل کامکار²، جمیله سالار آملی³، جلال حسن⁴، غلامرضا جاهد⁵

1- استادیار گروه تغذیه و بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان

2- نویسنده مسئول: دانشیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، پست الکترونی: akamkar@ut.ac.ir

3- دانشیار بخش سم شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

4- استادیار بخش سم شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

5- دانشیار گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت: 91/7/11

تاریخ پذیرش: 91/11/20

چکیده

سابقه و هدف: باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی نگرانی‌های مختلفی را ایجاد کرده است. با فراوری غذا قبل از مصرف به ویژه پختن احتمالا مقدار باقی‌مانده تغییر می‌کند. در این پژوهش تأثیر پخت گوشت به دو روش آب‌پز و میکروویو بر میزان باقی‌مانده‌ی تایلوزین در آن بررسی شد.

مواد و روش‌ها: به نمونه‌های گوشت مرغ چرخ شده، تایلوزین به سه میزان 200، 400 و 800 پی‌پی‌بی اضافه شد و سپس با روش‌های آب‌پز (10، 20 و 30 دقیقه) و میکروویو با توان 450 وات (1، 1/5 و 2 دقیقه) پخته شدند. مقدار تایلوزین قبل و بعد از پخت به روش HPLC اندازه‌گیری و مقدار درصد کاهش محاسبه شد.

یافته‌ها: در همه‌ی تیمارها مقدار تایلوزین نمونه‌ی پخته به طور معنی‌داری کمتر از نمونه‌ی خام بود ($p < 0/05$). اگرچه درصد کاهش تایلوزین با افزایش زمان میکروویو و آب‌پز به طور معنی‌داری بیشتر شد، اما در روش میکروویو تحت تأثیر مقدار اولیه‌ی تایلوزین نبود، ولی در روش آب‌پز عکس این حالت بود. اثر متقابل زمان پخت و مقدار اولیه‌ی تایلوزین بر مقدار درصد کاهش آن طی آب‌پز، معنی‌دار ولی در روش میکروویو غیر معنی‌دار بود.

نتیجه‌گیری: اگرچه پختن منجر به کاهش باقی‌مانده‌ی تایلوزین در گوشت می‌شود و در روش آب‌پز مقدار کاهش محسوس‌تر از میکروویو است، اما در هر صورت روش مطمئنی برای کاهش باقی‌مانده به حساب نمی‌آید. لازم است با مصرف درست تایلوزین در دام‌ها و رعایت زمان بازداری، مقدار باقی‌مانده‌ی آن را در گوشت کاهش داد.

واژگان کلیدی: تایلوزین، باقی‌مانده‌ی دارویی، پختن، HPLC، میکروویو

• مقدمه

باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی با منشاء دامی تهدیدی علیه سلامتی انسان است و در صورت استفاده از دز زیاد دارو در دام (over dosing) یا کشتار دام قبل از زمان بازداری دارو (withdraw period) و یا عدم رعایت اصول بهداشتی دیگر مثل تجویز نادرست، در گوشت یا سایر محصولات با منشا دامی یافت می‌شوند (1، 2). باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها برای مصرف کنندگان نگران‌کننده است؛ زیرا واکنش‌های آلرژیک (حساسیت) ایجاد می‌کند، مقاومت میکروبی در مقابل آنتی‌بیوتیک افزایش می‌دهد و فلور میکروبی طبیعی روده را از بین می‌برد.

به علاوه، باقی‌مانده‌های دارویی در تولید فراورده‌های تخمیری هم مشکل ایجاد می‌کنند (3، 4). سازمان‌های ذی‌صلاح برای حفظ سلامتی مصرف‌کنندگان حداکثر مجاز باقی‌مانده MRL (maximum residue limit) را در فراورده‌های مختلف از جمله گوشت تعیین کرده‌اند، مقدار MRL براساس فراورده‌های خام تعیین شده است، در حالی که گوشت و سایر محصولات دامی قبل از مصرف در معرض تیمارهای مختلف از جمله تیمارهای حرارتی قرار می‌گیرند. این تیمارهای حرارتی می‌توانند روی باقی‌مانده دارو تأثیر بگذارند و مقدار آن را در مواد غذایی تغییر دهند (5) بنابراین، فقط با اندازه‌گیری باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد

تایلوزین در گوشت انجام نشده است. در این مطالعه، تغییر بقایای این آنتی‌بیوتیک طی پخت به دو روش آب‌پز و مایکروویو بررسی شد.

• مواد و روش‌ها

مواد: استاندارد تایلوزین تارترات و کارتریج C18 از شرکت Sigma (آمریکا)، استات آمونیوم، اسید استیک، هیدروکسید سدیم با درجه آنالیتیک (analytical grade) و استونیتریل و متانول با درجه LC (Liquid chromatography) از شرکت Merck (آلمان) خریداری شد.

تجهیزات: تجهیزات مورد استفاده عبارت بودند از: دستگاه HPLC ساخت شرکت Waters (مدل 2695، آمریکا) مایکروویو ساخت شرکت Samsung (مدل M2340GN، کره جنوبی) دماسنج دیجیتالی ساخت شرکت GmbH (مدل TFA-301040، آلمان) ترازو دیجیتالی ساخت شرکت Sartorius (مدل BL2108، آلمان) همزن الکتریکی ساخت شرکت Gerhardt (آلمان)، سانتریفوز ساخت شرکت Universal (مدل 320R، آلمان).

روش‌ها

منحنی کالیبراسیون: محلول ذخیره‌ی تایلوزین (1000 پی‌پی‌ام) با حل کردن تایلوزین تارترات در آب تهیه شد. محلول کاری با مقدار 100 پی‌پی‌ام از محلول ذخیره تایلوزین در آب تهیه شد. محلول استاندارد با مقادیر 0/1، 0/25، 0/5، 0/75 و 1 پی‌پی‌بی از محلول کاری تهیه شد و پس از تزریق به HPLC منحنی کالیبراسیون رسم شد. هر کدام از استانداردها سه بار تزریق شد.

بازیابی تایلوزین: برای بررسی بازیابی (recovery) روش آنالیز، تایلوزین به مقادیر 200، 400 و 800 پی‌پی‌بی به نمونه‌ی گوشت اضافه شد و پس از هم‌زدن و استخراج، مقدار آن اندازه‌گیری شد. درصد بازیابی از تقسیم مقدار اندازه‌گیری شده به مقدار اضافه شده تعیین شد.

استخراج تایلوزین از گوشت و آب: برای استخراج تایلوزین از بافت گوشت از روش استخراج مایع - مایع تسهیل شده با نمک استفاده شد. به 2 گرم نمونه‌ی گوشت 0/5 میلی‌لیتر بافر استات آمونیوم (10 میلی‌مولار) و 4 میلی‌لیتر استونیتریل اضافه شد. نمونه به مدت 10 دقیقه با همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس به مدت 5 دقیقه سانتریفوز (5000 دور در دقیقه)، فاز فوقانی جدا و به آن 0/5 گرم کلرید سدیم اضافه شد. پس از مدت 30 ثانیه ورتکس شد و اجازه داده شد تا دو فاز شود. از فاز فوقانی 500 میکرولیتر

خام نمی‌توان میزان مواجهه‌ی (exposure) انسان با این ترکیبات را محاسبه کرد، زیرا ممکن است داده‌های مواد خام، دریافت روزانه‌ی قابل قبول (acceptable daily intake) باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها را تحت تأثیر قرار دهد (6). کدکس الیمنتاریوس (Codex Alimentarius) هم تأکید می‌کند که پژوهش کافی درباره‌ی تأثیر فراوری مواد غذایی بر باقی‌مانده دارویی انجام نشده و به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز است (7).

عمدتاً تأثیر دو روش فراوری یعنی تیمارهای حرارتی و نگهداری روی باقی‌مانده داروها مورد توجه است. با این توضیحات در صورتی که مشخص شود، بخشی از آنتی‌بیوتیک‌ها طی فراوری مواد غذایی به ویژه زمانی که در معرض تیمارهای حرارتی قرار می‌گیرند، از بین می‌روند، می‌توان گفت مقدار MRL برای باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها تغییر می‌کند. بنابراین آگاهی از این موضوع اهمیت زیادی دارد زیرا می‌تواند به تغییراتی در قوانین بین‌المللی باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها منجر شود و حد مجاز آن‌ها را در مواد غذایی تغییر دهد. در ضمن با اطلاع از تأثیر فرایندهای حرارتی روی باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها مشخص خواهد شد که کدام روش حرارتی باقی‌مانده را بیشتر کاهش می‌دهد تا همان روش برای آماده سازی ماده غذایی توصیه شود.

تحقیقات متعددی در زمینه‌ی اثرات پخت بر بقایای آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین G (9، 8)، تتراسیکین‌ها (12-10)، استرپتومایسین (14، 13)، نئومایسین (15)، جنتامایسین (16) و سولفانامید (17) انجام شده است. در پژوهشی اثر تیمارهای حرارتی بر آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولید در شیر بررسی شده است (18). تایلوزین یکی از آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولیدی است که به مقدار زیاد در دامپزشکی استفاده می‌شود. حد مجاز باقی‌مانده این دارو در اتحادیه‌ی اروپا 100 µg/kg در ماهیچه، کبد، کلیه و چربی و 50 µg/kg در شیر است (19). سرویس بازرسی ایمنی مواد غذایی (Food Safety Inspection Service) ایالات متحده کنترل باقی‌مانده این آنتی‌بیوتیک‌ها در گوشت را در برنامه‌های سالیانه خود قرار داده و نسبت به گزارش مواردی که مقدار آنتی‌بیوتیک بیش از حداکثر MRL است، اقدام می‌کند (20). بنابراین، از نظر مقامات بهداشتی مؤسسات بین‌المللی، کنترل باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها ضروری است. تاکنون، پژوهشی در خصوص تأثیر پخت بر باقی‌مانده‌ی

آماده‌سازی نمونه‌های گوشت: گوشت مرغ تازه از سطح عرضه شهر تهران تهیه و پس از انتقال به آزمایشگاه مرکز تحقیقات سم‌شناسی و مسمومیت‌های دامی دانشگاه تهران ران مرغ جدا و گوشت آن از استخوان تفکیک شد و کاملاً با چرخ گوشت همگن شد و تا زمان تیمار حرارتی در فریزر 20°C نگهداری شد. لازم به ذکر است، ابتدا گوشت چرخ شده از نظر باقی‌مانده‌ی تایلوزین مورد بررسی قرار گرفت و مقدار این آنتی‌بیوتیک در آن اندازه‌گیری شد. ولی مقدار تایلوزین آن کمتر از LOD روش اندازه‌گیری بود بنابراین، مقدار تایلوزین گوشت خام صفر در نظر گرفته شد. در زمان تیمارهای حرارتی گوشت از فریزر خارج و پس از قرار دادن آن در یخچال اجازه داده شد تا کاملاً یخ زدایی شود. پس از یکنواخت کردن، نمونه‌هایی به وزن 10 گرم توزین و آنتی‌بیوتیک تایلوزین تارترات در مقایر 200، 400 و 800 پی پی بی به آن‌ها اضافه و کاملاً همگن شد تا آنتی‌بیوتیک به طور یکنواخت در نمونه‌ها پخش شود. نمونه‌ها به شکل کاملاً گرد و کروی در آمد و تحت تیمارهای حرارتی مشابه با روش گزارش شده به وسیله‌ی Ibrahim (1994) قرار گرفت. البته، در این روش پخت تغییراتی به شرح ذیل انجام گرفت (12).

تیمار حرارتی آب‌پز: در داخل بشر مقدار 80 گرم آب ریخته و حرارت داده شد تا به جوش آید. سپس نمونه‌ی گوشت در داخل توری فلزی قرار گرفت و توری درون بشر فرو برده شد. به طوری که نمونه کاملاً در آب غوطه‌ور شد. نمونه طی مدت زمان‌های 10، 20 و 30 دقیقه تحت تیمار حرارتی قرار گرفت.

تیمار حرارتی مایکروویو: نمونه‌ی گوشت در داخل پلیت شیشه‌ای قرار داده شد و پس از گذاشتن در پلیت در داخل مایکروو قرار گرفت. نمونه طی مدت زمان‌های 1، 1/5 و 2 دقیقه در مایکروویو با توان 450 وات پخته شد.

محاسبه‌ی مقدار درصد کاهش تایلوزین: برای بررسی تأثیر تیمارهای حرارتی بر تایلوزین مقدار آن قبل و بعد از تیمار حرارتی اندازه‌گیری شد و با فرمول زیر مقدار کاهش محاسبه شد:

$$\times 100 = \frac{\text{مقدار تایلوزین نمونه‌ی پخته (میکروگرم)} - \text{مقدار تایلوزین نمونه‌ی خام (میکروگرم)}}{\text{مقدار تایلوزین نمونه‌ی خام (میکروگرم)}} - \text{درصد کاهش تایلوزین}$$

در داخل ویال ریخته شد و 500 میکرولیتر بافر استات آمونیوم (10 میلی‌مولار) به آن اضافه شد و سپس نمونه به HPLC تزریق شد.

با توجه به اینکه در روش آب‌پز مقداری از آنتی‌بیوتیک وارد آب پخت می‌شود، اندازه‌گیری آن در آب به دلیل رقیق شدن به صورت مستقیم ممکن نبود و از روش تخلیص با بکارگیری کارتریج C18 استفاده شد. ابتدا با عبور دادن 2 میلی‌لیتر استونیتریل و 2 میلی‌لیتر آب کارتریج آماده‌سازی شد سپس آب پخت از کارتریج عبور داده شد. برای شستن تایلوزین از کارتریج 2 میلی‌لیتر از متانول استفاده شد. 500 میکرولیتر از متانول در داخل ویال ریخته شد و پس از اضافه کردن استات آمونیوم (500 میکرولیتر) مقدار تایلوزین اندازه‌گیری شد.

روش آنالیز تایلوزین: تایلوزین به کمک دستگاه HPLC با ستون C18 (به طول 150 میلی‌متر و قطر داخلی 3/9 میلی‌متر و اندازه‌ی ذرات 4 میکرومتر) و آشکارساز Photodiode array اندازه‌گیری شد. روش آنالیز به صورت ایزوکراتیک با فاز متحرک الف: استونیتریل و ب: استات آمونیوم (10 میلی‌مولار) و 1% تری فلورو استیک اسید با نسبت 30 (فاز الف) به 70 (فاز ب) با سرعت جریان 1 میلی‌لیتر در دقیقه انجام گردید. حجم تزریق نمونه 20 میکرولیتر بود. تایلوزین در طول موج 289 نانومتر اندازه‌گیری شد.

محاسبه‌ی LOD و LOQ: برای محاسبه‌ی حد تشخیص (limit of detection) و حد تعیین مقدار کمی (Limit of quantification) ابتدا سه بار نمونه شاهد به HPLC تزریق شد و سطح نوفه در محل پیک تایلوزین اندازه‌گیری شده و انحراف معیار این سه بار تعیین شد. با فرمول زیر LOD و LOQ محاسبه شدند.

$$\text{LOD} = \frac{\text{انحراف معیار شاهد} \times 3}{\text{شیب خط کالیبراسیون}}$$

$$\text{LOQ} = \frac{\text{انحراف معیار شاهد} \times 10}{\text{شیب خط کالیبراسیون}}$$

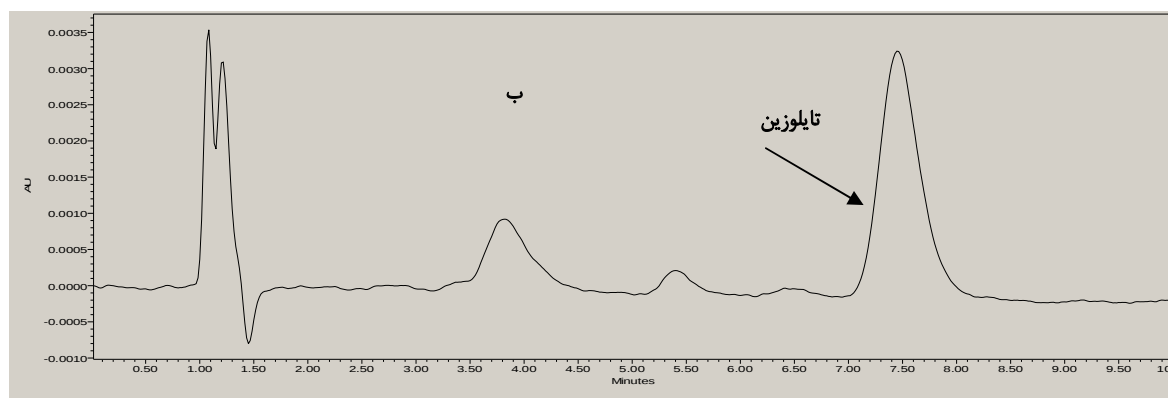
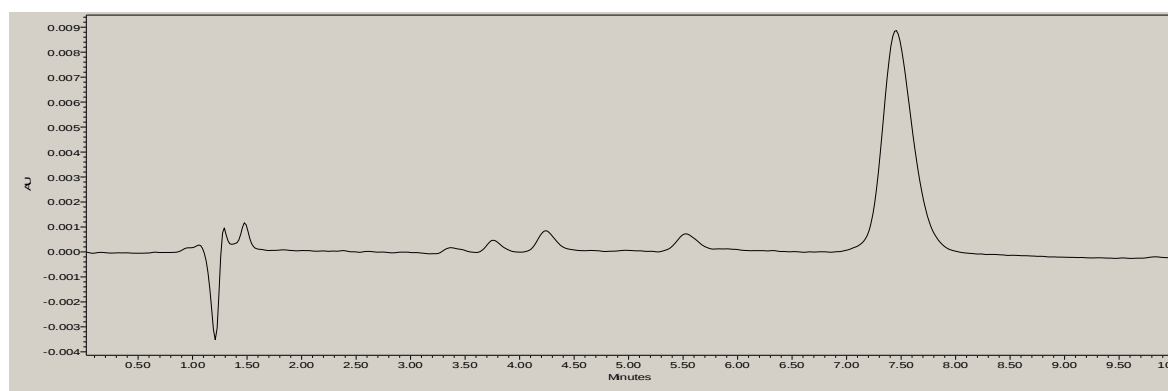
• یافته‌ها

اعتبار روش (Method validation): کروماتوگرام تایلوزین در نمونه‌های استاندارد و گوشت در شکل 1 نشان داده شده است. زمان بازداری تایلوزین حدود 7/4 دقیقه بود. منحنی کالیبراسیون تایلوزین (شکل 2) در محدوده‌های 0/1، 0/25، 0/5، 0/75 و 1 پی پی ام خطی و از ضریب رگرسیون بالایی برخوردار بود. معادله‌ی این خط عبارت است از:

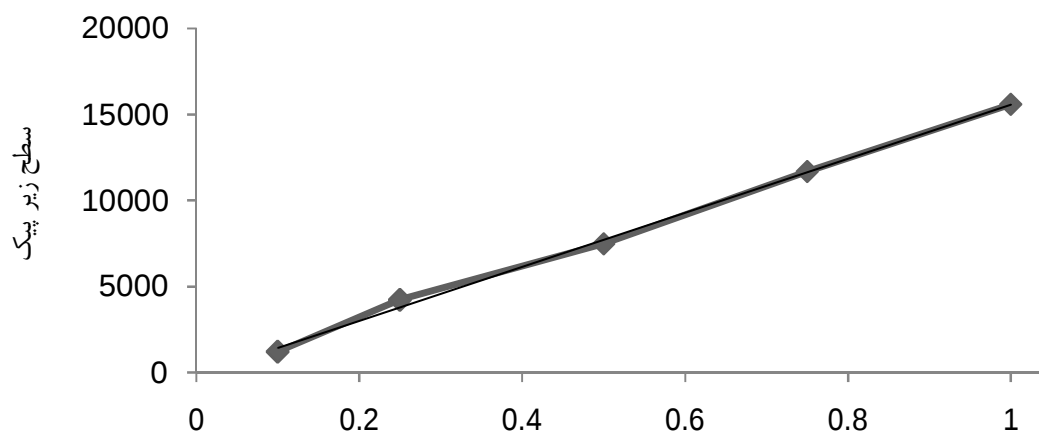
$$y = 15688x - 115 \quad R^2 = 0/997$$

LOD و LOQ روش آنالیز به ترتیب 15 و 49 پی پی بی بود چون MRL تایلوزین در گوشت 100 پی پی بی است، روش آنالیز به کار رفته در این تحقیق قادر به تعیین کمی تایلوزین در کمتر از نصف MRL است، مقدار بازیابی تایلوزین از گوشت در مقادیر 200، 400 و 800 پی پی بی به ترتیب 94/9٪، 94/3 و 98/1٪ (به طور متوسط 95/78٪) بود. با توجه به این موارد روش آنالیز و استخراج برای ادامه کار مناسب تلقی شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تیمارهای حرارتی سه بار تکرار شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS 16 استفاده شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها بررسی شد. سپس در صورتی که داده‌ها نرمال بودند، در هر کدام از تیمارها برای بررسی تفاوت بین مقدار تایلوزین نمونه‌ی گوشت خام و پخته از آزمون تی جفتی (paired T test) استفاده شد. برای بررسی تفاوت بین مقدار درصد کاهش تایلوزین در نمونه‌هایی که مقدار اولیه‌ی تایلوزین در آن‌ها متفاوت بود، ولی در مدت زمان یکسانی پخته شدند و همچنین در نمونه‌هایی که مقدار اولیه‌ی تایلوزین در آن‌ها یکسان بود، ولی در مدت زمان‌های مختلف به روش مایکروویو یا آب‌پز پخته شدند، روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (one way ANOVA) به کار رفت. برای مقایسه‌ی دو به دوی گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. برای بررسی اثر متقابل زمان‌های مختلف پخت و مقادیر متفاوت اولیه‌ی تایلوزین بر مقدار درصد کاهش آن در هر دو روش پخت، از آزمون آنالیز واریانس دوطرفه (two way ANOVA) به کار رفت.



شکل 1. کروماتوگرام الف) استاندارد تایلوزین ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) ب) تایلوزین اضافه و بازیابی شده از گوشت ($400 \mu\text{g g}^{-1}$)



شکل 2. منحنی کالبراسیون تایلوزین

تأثیر فرایند آب پز بر باقی مانده‌ی تایلوزین؛ مقدار تایلوزین در نمونه‌های آب پز شده به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) کمتر از نمونه‌ی خام بود (جدول 1). کاهش تایلوزین در نمونه‌هایی که مقدار اولیه‌ی تایلوزین آن‌ها 200، 400 یا 800 پی پی بی بود و در مدت 10، 20 و 30 دقیقه آب پز شدند، در جدول 2 نشان داده شده است. نتایج آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد، اگرچه بین مقدار درصد کاهش تایلوزین در نمونه‌هایی که به مدت 10 دقیقه آب پز شده بودند، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت، ولی درصد کاهش نمونه‌هایی که به مدت 20 و 30 دقیقه آب پز شدند، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول 3). بیشترین مقدار درصد کاهش (86/9%) به نمونه‌ای مربوط بود که به مدت 30 دقیقه آب پز شد و مقدار تایلوزین اولیه‌ی آن 800 پی پی بی بود. کمترین مقدار درصد کاهش (61/3%) به نمونه‌ای مربوط بود که به مدت 20 دقیقه آب پز شد و مقدار تایلوزین اولیه‌ی آن 200 پی پی بی بود هر چند که مقدار درصد کاهش آن اختلاف معنی‌داری با نمونه‌ی آب پز شده به مدت 10 دقیقه نداشت. بین مقدار درصد کاهش تایلوزین نمونه‌هایی که مقدار اولیه‌ی تایلوزین آن‌ها 200، 400 یا 800 پی پی بی بود، ولی در زمان‌های مختلف آب پز شدند، اختلاف معنی‌داری داشت. در همه‌ی نمونه‌ها افزایش زمان از 10 به 30 دقیقه سبب شد مقدار درصد کاهش تایلوزین بیشتر شود (جدول 3). نتایج آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد که مقدار درصد کاهش تایلوزین در روش آب پز نه تنها تحت تأثیر معنی‌دار زمان فرایند پخت است، بلکه به مقدار اولیه‌ی تایلوزین نیز بستگی دارد. بنابراین اثر متقابل زمان پخت و مقدار اولیه‌ی تایلوزین بر مقدار درصد آن معنی‌دار بود.

تأثیر فرایند میکروویو بر باقی مانده‌ی تایلوزین؛ در همه‌ی نمونه‌هایی که با میکروویو پخته شد، مقدار تایلوزین پس از میکروویو به طور معنی‌داری ($p < 0/05$) کمتر از نمونه‌ی خام بود (جدول 1). مقدار درصد کاهش تایلوزین در نمونه‌های گوشت که مقدار اولیه‌ی تایلوزین آن‌ها 200، 400 یا 800 پی پی بی بود و طی مدت 1، 1/5 و 2 دقیقه به روش میکروویو پخته شدند در جدول 1 نشان داده شده است. در همه‌ی تیمارها با افزایش زمان پخت از 1 به 2 دقیقه، مقدار درصد کاهش تایلوزین بیشتر شد در نمونه‌هایی که مقدار اولیه‌ی تایلوزین آن‌ها 200، 400 و 800 پی پی بی بود، پس از 2 دقیقه پخت به ترتیب 33/4%، 33/2% و 35/3% تایلوزین آن‌ها کاهش یافت. بین مقدار درصد کاهش تایلوزین در نمونه‌های گوشت که در زمان‌های یکسان به روش میکروویو پخته شدند و مقدار اولیه‌ی تایلوزین در آن‌ها 200، 400 یا 800 پی پی بی بود، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، اما مقدار درصد کاهش در نمونه‌هایی که مقدار اولیه‌ی تایلوزین آن‌ها یکسان بود ولی در زمان‌های 1، 1/5 یا 2 دقیقه پخته شدند، اختلاف معنی‌داری داشت (جدول 2). با افزایش زمان پخت، مقدار درصد کاهش نیز بیشتر شد. در نمونه‌ای که 800 پی پی بی تایلوزین داشت و به مدت 2 دقیقه با میکروویو پخته شد، بیشترین درصد کاهش (35/3%) مشاهده شد. بنابراین، اگرچه در روش پخت با میکروویو زمان تأثیر معنی‌داری بر مقدار درصد کاهش تایلوزین داشت، اما مقدار اولیه‌ی تایلوزین روی این مقدار اثر نداشت. با آزمون آنالیز واریانس دو طرفه نیز مشخص شد که اثر متقابل زمان میکروویو و مقدار اولیه‌ی تایلوزین بر کاهش آن در گوشت معنی‌دار نیست.

جدول 1. تغییر مقدار تایلوزین پس از پخت به روش مایکروویو و آب پز نسبت به مقادیر اولیه *

روش مایکروویو		روش آب پز		مقدار تایلوزین در نمونه، قبل از تیمار حرارتی** (نانوگرم)
زمان مایکروویو (دقیقه)	مقدار تایلوزین در نمونه، پس از پخت (نانوگرم)	زمان آب پز (دقیقه)	مقدار تایلوزین در نمونه، پس از آب پز (نانوگرم)	
	1/9±0/1		0/7±0/1	2/0
2/0	3/4±0/2	10/0	1/3±0/1	4/0
	7/8±0/5		2/5±0/2	8/0
	1/6±0/1		0/7±0/2	2/0
4/0	3/2±0/3	20/0	0/6±0/2	4/0
	6/9±0/4		1/8±0/1	8/0
	1/3±0/1		0/4±0/1	2/0
8/0	2/7±0/2	30/0	0/6±0/1	4/0
	5/2±0/2		1/1±0/1	8/0

* همه‌ی اعداد به صورت یک رقم معنی‌دار گزارش شده است.

** مقدار تایلوزین در نمونه‌ی گوشت خام به وزن 10 گرم

جدول 2. مقدار کاهش تایلوزین در گوشت پس از پخت با روش مایکروویو

مقادیر تایلوزین اولیه‌ی اضافه شده به نمونه (پی پی بی)				
200	400	800	میانگین	
مقدار درصد کاهش (میانگین ± انحراف معیار)				(دقیقه) زمان مایکروویو
4/4±2/8 ^{Ac}	14/3±6/1 ^{Ab}	2/8±6/2 ^{Ac}	7/2±27/1 ^c	1
20/4±0/4 ^{Ab}	21/2±6/3 ^{Ab}	14/3±4/3 ^{Ab}	17/87±5/6 ^b	1/5
33/4±6/1 ^{Aa}	33/2±4/9 ^{Aa}	35/3±2/1 ^{Aa}	33/9±4/2 ^a	2
19/4±13/2 ^A	22/8±9/7 ^A	17/4±14/79 ^A	19/6±1/3	میانگین

^A حروف بالانویس بزرگ غیر یکسان یعنی اختلاف معنی‌دار ($p < 0/05$) بین اعداد یک سطر.^a حروف بالانویس کوچک غیر یکسان یعنی اختلاف معنی‌دار ($p < 0/05$) بین اعداد یک ستون

* همه‌ی اعداد به صورت یک رقم معنی‌دار گزارش شده است.

جدول 3. مقدار کاهش تایلوزین در گوشت پس از پختن با روش آب پز *

مقادیر تایلوزین اولیه‌ی اضافه شده به نمونه (پی پی بی)				
200	400	800	میانگین	
مقدار درصد کاهش (میانگین ± انحراف معیار)				(دقیقه) زمان آب پز
64/7±1/4 ^{Ab} (15/2)**	68/5±1/8 ^{Ab} (13/7)	68/4±6/2 ^{Ac} (19/7)	67/2±2/4 ^c	10/0
61/3±4/4 ^{Bb} (17/2)	86/2±1/6 ^{Aa} (22/9)	77/3±1/1 ^{Cb} (22/3)	74/9±11/1 ^b	20/0
79/7±0/6 ^{Ba} (18/7)	85/5±1/3 ^{Aa} (23/2)	86/9±1/1 ^{Aa} (22/8)	84/0±3/4 ^a	30/0
68/6±8/8 ^C	80/1±8/7 ^A	77/5±8/1 ^B	75/4±9/6	میانگین

^A حروف بالانویس بزرگ غیر یکسان یعنی اختلاف معنی‌دار ($p < 0/05$) بین اعداد یک سطر می‌باشند.^a حروف بالانویس کوچک غیر یکسان یعنی اختلاف معنی‌دار ($p < 0/05$) بین اعداد یک ستون می‌باشند.

* تمام اعداد به صورت یک رقم معنی‌دار گزارش شده است.

** اعداد داخل پرانتز نشان دهنده درصدی از تایلوزین اولیه است که پس از آب پز در آب پخت یافت شد.

• بحث

می‌توان گفت تأثیر مایکروویو بر باقی‌مانده‌ی داروهای مختلف متفاوت است و در مورد برخی داروها باقی‌مانده آن پس از مایکروویو افزایش و در مورد برخی کاهش می‌یابد و به ترکیبات دیگری تبدیل می‌شود. احتمالاً کاهش تایلوزین در روش مایکروویو به علت تخریب آن است. اگرچه در این تحقیق ترکیبات حاصل شناسایی نشوند.

مقدار کاهش تایلوزین در شیر طی تیمار حرارتی 120°C به مدت 20 دقیقه 51% گزارش شده که از مقدار کاهش آن در آب‌پز کردن گوشت (86/9%) که در این تحقیق به دست آمد، کمتر است (18) کاهش باقی‌مانده‌ی سایر داروهای دامی نیز طی آب‌پز کردن گزارش شده است. نتایج این تحقیق، مشابه نتایج سایر تحقیقات انجام شده است. *Furusawa* و *Hanabusa* (2002) گزارش کردند مقدار سولفونامیدها در meatball آب‌پز شده به زمان پخت بستگی دارد و با افزایش زمان پخت مقدار کاهش سولفونامیدها بیشتر می‌شود. مقدار سولفونامیدها طی آب‌پز Meatball به مدت 12 دقیقه 45 تا 61 درصد کاهش یافت. این مقدار کمتر از کاهش تایلوزین (61 تا 87 درصد) است که در این تحقیق به دست آمد. علت کاهش به انتقال سولفونامید از گوشت به آب نسبت داده شد (17) کاهش انروفلوکساسین نیز طی آب‌پز کردن گوشت گزارش شده است (23) اگرچه پنی‌سیلین G در مقابل حرارت، پایدار است، اما در آب‌پز کردن مقدار زیادی از آن وارد آب می‌شود (9).

علت کاهش تایلوزین در روش آب‌پز به 2 مورد نسبت داده می‌شود:

1. انتقال از گوشت به آب: با آنالیز آب اطراف گوشت مشخص شد، مقداری از تایلوزین در همه‌ی نمونه‌هایی که آب‌پز شدند، به آب انتقال پیدا کرده است. این مقدار بین 13/7% تا 23/2% تایلوزین نمونه‌ی خام بود (جدول 3).

2. به نظر می‌رسد بقیه‌ی کاهش تایلوزین به علت تخریب آن طی حرارت و تبدیل به سایر ترکیبات باشد.

در خصوص پایداری تایلوزین در محیط‌هایی با pH مختلف و دماهای مختلف چند گزارش وجود دارد. تایلوزین A در محیط اسیدی ابتدا به تایلوزین B (دسمیکوزین desmycosin) تبدیل می‌شود و با افزایش دما میزان تبدیل بیشتر می‌شود. در نهایت، تایلوزین B به محصولات شناسایی نشده تجزیه می‌شود. در محیط قلیایی و خنثی، تایلوزین A به آلدول تالوزین A (tylosin A aldol) و برخی ترکیبات

تاکنون، درباره‌ی اثرات پخت بر باقی‌مانده‌ی آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولیدی در گوشت گزارشی به دست نیامده است. در یک مطالعه، اثر تیمارهای حرارتی بر آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولید مانند اریترومایسین، اسپیرامایسین و تایلوزین در شیر بررسی شده است (18). این آنتی‌بیوتیک‌ها در مقادیر مختلف به شیر اضافه شدند و نمونه‌ها در معرض سه نوع تیمار حرارتی قرار گرفتند (60°C به مدت 30 دقیقه، 120°C به مدت 20 دقیقه و 140°C به مدت 10 ثانیه). برای ارزیابی کاهش فعالیت آنتی‌بیوتیک‌ها از روش جلوگیری رشد میکروکوکوس لوتئوس (*Micrococcus luteus*) استفاده شد. تیمار حرارتی 120°C به مدت 20 دقیقه (تقلیدکننده‌ی استریلیزاسیون سنتی) به افت قابل توجه فعالیت ضد میکروبی اریترومایسین (93%)، اسپیرامایسین (51%) و تایلوزین (51%) منجر شد. در حالی که تیمار حرارتی 140°C به مدت 10 ثانیه (تقلیدکننده‌ی استریلیزاسیون به روش UHT) اثر کمتری داشت و فعالیت ضد میکروبی اریترومایسین، اسپیرامایسین و تایلوزین به ترتیب 30%، 35% و 12% بود. کمترین کاهش فعالیت ضد میکروبی طی تیمار حرارتی 60°C به مدت 30 دقیقه (تقلید کننده پاستوریزاسیون با دما کم) حاصل شد (21%) اریترومایسین و 13% اسپیرامایسین).

اثر روش پخت مایکروویو و آب‌پز بر باقی‌مانده‌ی سایر داروها در گوشت بررسی شده است. نتایج تحقیق حاضر شباهت به یافته‌های *Lan* و همکاران (2001) در خصوص تأثیر فرایند مایکروویو بر باقی‌مانده‌ی سولفامتازین در گوشت *Tilapia* است که با افزایش زمان پخت مقدار بیشتری از سولفامتازین کاهش یافت. البته، مقدار سولفامتازین کاهش یافته بیشتر از تایلوزین بود (21). *Oxfendazole* یکی از داروهای ضد انگلی است که تغییر باقی‌مانده‌ی آن طی مایکروویو بررسی شده و نتایج حکایت از این دارد که 64% دارو پس از مایکروویو در گوشت باقی می‌ماند و بقیه‌ی آن به ترکیبات دیگری تبدیل می‌شود. یافته‌های این مطالعه با یافته‌های برخی تحقیقات انجام شده در خصوص تأثیر مایکروویو بر باقی‌مانده داروها تناقض دارد. *Rose* و همکاران دریافتند که در پختن گوشت گاو و خوک با مایکروویو نه تنها مقدار آیورمکتین (ivermectin) و بنزیل پنی‌سیلین (benzylpenicillin) کاهش نمی‌یابد، بلکه به علت از دست دادن رطوبت هم افزایش پیدا می‌کند (22، 9). بنابراین،

طی پختن کاهش می‌یابد و در روش آب پز (75/4%) این مقدار بیشتر از روش مایکروویو (19/6%) است بنابراین، توصیه می‌شود در مواردی که احتمال حضور باقی‌مانده تایلوزین در گوشت وجود دارد، با پختن مناسب آن بتوان سطح سلامتی محصول را افزایش داد، دو روش آب پز و مایکروویو اگرچه موجب کاهش تایلوزین گوشت می‌شوند اما این واقعیت که باقی‌مانده تایلوزین باید از منبع آن یعنی مواجهه دام و طیور با تایلوزین کنترل شود؛ همچنان اهمیت اولیه خود را خواهد داشت. چون محصولات حاصل از تجزیه تایلوزین، مهم هستند، پیشنهاد می‌شود در تحقیقات بعدی شناسایی این ترکیبات شناسایی و اثرات سمی آن‌ها بررسی شود.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران جهت حمایت از این طرح به شماره 7507009/6/18 و مرکز تحقیقات سم شناسی و مسمومیت‌های دامی دانشگاه تهران نهایت تقدیر و تشکر را دارد.

قطبی شناسایی نشده تجزیه می‌شود. تجزیه‌ی تایلوزین تابع غلظت بافر، قدرت یونی، pH و دما است. فعالیت ضد میکروبی تایلوزین B (0/83) کمتر از تایلوزین A (1) است. تایلوزین B مشابه تایلوزین A یک آنتی‌بیوتیک است. بنابراین، ممکن است عوارضی مانند باقی‌مانده‌ی سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی داشته باشد، مانند: اثرات سو بر فلور میکروبی مصرف‌کنندگان و ایجاد مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک (24-27). هیچ اطلاعاتی در خصوص سمیت محصولات تجزیه‌ی شناسایی نشده تایلوزین گزارش نشده است. در این تحقیق به دلیل محدودیت امکانات آزمایشگاهی محصولات حاصل از تجزیه تایلوزین شناسایی نشوند.

با توجه به اینکه در این مطالعه تایلوزین به گوشت اضافه (Spike) شد، ممکن است داده‌های حاصل در خصوص مقدار درصد کاهش طی پخت با نمونه‌ی گوشت طبیعی که حاوی تایلوزین است اختلاف با هم داشته باشد. زیرا در حالت طبیعی، تایلوزین در داخل سلول‌ها است و احتمال دارد مقدار کمتری از آن وارد آب شود و مقدار کاهش آن کمتر از نتایج این تحقیق باشد. در هر صورت، از نتایج این تحقیق می‌توان نتیجه‌گیری کرد که باقی‌مانده‌ی تایلوزین در گوشت

References

1. Myllyniemi AL. Development of microbiological methods for the detection and identification of antimicrobial residues in meat [Ph.D dissertation]. Helsinki: University of Helsinki, 2004.
2. Kaneene JB, Miller R. Problems associated with drug residues in beef from feeds and therapy. *Rev sci tech Off int Epiz* 1997;16(2):694-708.
3. Botsoglou NA, Fletouris DJ. Benefits and risks of drug usage. *Drug residues in foods ,pharmacology, ,food safety, and analysi*. New York: Marcel Dekker, Inc; 2001.
4. Hassan AN, Frank JF. Starter cultures and their use. In: Marth EH, Steele JL, editors. *Applied dairy microbiology*. second ed. New York: Marcel Dekker, Inc; 2001.
5. Moats WA. The effect of processing on veterinary residue in foods. In: Jackson LS, Kniz MMG, Morgan JN, editors. *Impact of processing on food Safety*. New York: Kluwer Academic; 1999.
6. Botsoglou NA, Fletouris DJ. Stability of Residues During Food Processing. *Drug residues in foods ,pharmacology, food safety, and analysi*. New York: Marcel Dekker, Inc; 2001. p. 515-40.
7. Codex Alimentarius Commission. Committee on residues of veterinary drugs in foods, document control of veterinary drug residues in milk and milk products CX/RVDF, 01/8. Joint food and agriculture organization of the united nations–world health organization food standards programme, Rome.2001.
8. Guay R, Cardinal P, Bourassa C, Brassard N. Decrease of penicillin G residue incidence in milk: a fact or an artefact? *Int J Food Microbiol*. 1987;4(3):187-96.
9. Rose MD, Bygrave J, Farrington WHH, George Shearer G. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: Benzylpenicillin. *Analyst* 1997;122:1095–9.
10. Du WX, Marshall MR, Xu DH, Santerre CR, Wei CI. Retention of oxytetracycline residues in cooked channel catfish fillets. *J Food Sci* 1997;62(1):119-22.

11. Loksuwa J. The effect of heating on multiple residues of tetracyclines in milk. *Thammasat Int J Sci Tech* 2002;7(3):17-21.
12. Ibrahim A. Effect of cooking procedures on oxytetracycline residues in lamb muscle. *J Agric Food Chem* 1994;42:2561-3.
13. Inglis JM, Katz SE. Determination of streptomycin residues in eggs and stability of residues after cooking. *J Assoc Off Anal Chem* 1978;61(5):1098-102.
14. Katz SE, Levine PR. Determination of neomycin residues in eggs and stability of residues after cooking. *J Assoc Off Anal Chem* 1978;61(5):1103-6.
15. Pilet C, Toma B, Muzet J, Renard F. Investigation of the thermostability of several antibiotics. *research Medicine Veterinary* 1969;6:227-34.
16. Sireli UT, Filazi A, Cadirci O. Effect of cooking and storage times on gentamicin residues in eggs. *Ital J Food Sci* 2006;18(4):441-6.
17. Furusawa N, Hanabusa R. Cooking effects on sulfonamide residues in chicken thigh muscle. *Food Res Int* 2002;35:37-42.
18. Zorraquino MA, Althaus RL, Roca M, Molina MP. Heat treatment effects on the antimicrobial activity of macrolide and lincosamide antibiotics in milk. *J Food Protect* 2011;74(2):311-5.
19. European Commission. Commission Regulation (EC) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Union* 2010;L 15:1-72.
20. Food Safety and Inspection Service (FSIS). National residue program scheduled sampling plans. United States department of agriculture food safety and inspection service, office of public health science, Washington, DC. FSIS; 2008.
21. Lan CC, Hwang BS, Tu MF. Effect of microwave and roast treatment on the degradation of sulfamethazine residue in tilapia meat. *J Food Drug Anal* 2001;9(2):102-6.
22. Rose MD, Farrington WH, Shearer G. The effect of cooking on veterinary drug residues in food: 7. ivermectin. *Food Addit Contam* 1998;15(2):157-61.
23. Lolo M, Pedreira S, Miranda JM, Vazquez BI, Franco CM, Cepeda A, et al. Effect of cooking on enrofloxacin residues in chicken tissue. *Food Addit Contam* 2006;23(10):988-93.
24. Thompson TS, Pernal SF, Noot DK, Melathopoulos AP, Heever JPV. Degradation of incurred tylosin to desmycosin—Implications for residue analysis of honey. *Anal Chim Acta* 2007;586:304-11.
25. Teeter JS, Meyerhoff RD. Aerobic degradation of tylosin in cattle, chicken, and swine excreta. *Environ Res* 2003;93:45-51.
26. Paesen J, Cypers W, Pauwels K, Roets E, Hoogmartens J. Study of the stability of tylosin A in aqueous solutions. *J Pharm Biomed Anal* 1995;13(9):1153-9.
27. Aksenova IA, Ter-Sarkisian EM, Soifer RD, Florova GI, Iustratova LS. Effect of the pH of the medium and of temperature on tylosin stability. *Antibiotiki* 1984;29(3):179-82.

The effect of two methods cooking of boiling and microwave on tylosin residue in chicken meat

Heshmati A¹, Kamkar A^{*2}, Salaramoli J³, Hassan J⁴, Jahed Gh⁵

- 1- Assistant Prof, Dept. of Nutrition and Biochemistry, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
- 2- *Corresponding author: Associate Prof, Dept. of Food Control and Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran. E-mail: akamkar@ut.ac.ir
- 3- Associate Prof, Dept. of Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran
- 4- Assistant Prof, Dept. of Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran, Iran
- 5- Associate Prof, Dept. of Environment hygiene, Faculty of Hygiene, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received 2 Oct, 2012

Accepted 8 Feb, 2013

Background and objective: Antibiotic residue in food had made different concerns. Antibiotic residue may change during food processing before consumption especially cooking. The goal of this research is to determine the effect of two methods cooking of boiling and microwave on tylosin residues in meat.

Materials and Methods: Tylosin was added to minced meat samples in three level 200, 400 and 800 ppb and samples were cooked by boiling (10, 20 and 30 min) and microwave (1, 1.5 and 2 min). Tylosin amount was measured before and after cooking by HPLC and its reduction percent amount was calculated.

Results: In all treatments tylosin amount of cooked samples was significantly less than that of raw sample ($p < 0.05$). However tylosin reduction percent amount was significantly increased by boiling and microwave time increment, tylosin first amount had no effect on its reduction in microwave method but its effect is in verse in boiling method. Overall interaction effect of cooking time and tylosin first amount on its reduction percent amount in meat was significance in boiling method and insignificant in microwave method.

Conclusion: Although cooking result in reduction of tylosin residue in meat and its reduction amount in boiling is more than that in microwave, it isn't grantee for tylosin reduction and it is necessary to reduce tylosin in meat by its correct consumption in animals and withdrawal time consideration.

Keywords: Tylosin, Drug residue, Cooking, HPLC, Microwave