DOI: 10.22092/vj.2019.127485.1610
شماره ۱۲۹ زمستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

تکنیک نوین اندازه‌گیری گروه‌ها مختلف و هم‌زمان آنتی‌بیوتیک‌ها در بافت مرغ سبز بر اساس روش خودکار شده کروماتوگرافی مایع و اسپکترومتری جرمی

• **عبدالله توسلی**
گروه شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران
• **سید ناصر عزیزی (نویسنده مسئول)**
گروه شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران
• **عبدالرئوف صمدی میبدی**
گروه شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران

تاریخ دریافت: ۳۰-۰۵-۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۰۶-۰۷-۱۳۹۸
Email: azizi@umz.ac.ir

چکیده

امروزه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها جهت مصارف پیشگیری، کنترل و درمان بیمارها در صنعت پرورش طیور غیرقابل‌اجتناب است و در این میان نیاز به روشی مدرن که در عین حساسیت و ویژگی بالا و کاربری راحت و سریع جهت کنترل مخاطرات استفاده روزافزون آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی بسیار ارزشمند است ازاین‌رو در این مطالعه برای نخستین بار، بر اساس تلفیق اتوماتیک شده دو دستگاه کروماتوگرافی مایع و دستگاه طیف سنج جرمی، آنتی بیوتیک در مرغ سبز کشور مورد اندازه گیری و پایش قرار گرفت. در مرحله آماده‌سازی مقدار نمونه مورداستفاده در مقایسه با روش های کلاسیک کمتر و مراحل آماده‌سازی نیز کوتاه است. ترتیب مراحل، تعداد و استفاده از ترکیبات حلال‌های آلی و نمک‌های به‌صورت بهینه‌ای صرفه‌جویی شده است. به‌واسطه استفاده از استاندارد داخلی از نوع ایزوتوپ پایدار کنترل مراحل استخراج، تخلیص، تزریق و محاسبات خطاهای احتمالی همانند فرونشست یونی، خطای تزریق، اصلاح درصد بازیافت دارو و اصلاح زمان بارداری برطرف گردید و همچنین به واسطه امکان تزریق حجم‌های بالا، حساسیت روش بهبود یافت. با استفاده از دو دستگاه کروماتوگرافی مایع، یکی به‌عنوان تخلیص نمونه و دیگری برای جداسازی، امتیازات ویژه‌ای فراهم می آورد طوری که هرکدام به تنهایی فاقد این ویژگی هستند و ضمن خودکار بودن روش سبب کاهش زمان آنالیز، هزینه‌های آزمون و افزایش دقت آزمون در مقایسه به روش های کلاسیک گردید. روش پیشنهادی قابلیت جستجوی آنتی‌بیوتیک در مرغ سبز تولیدی را دارا است.

کلمات کلیدی: بافت مرغ، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، اسپکترومتری جرمی متوالی، آنتی‌بیوتیک، چند کلاسه، خودکارشده

Veterinary Researches & Biological Products No 129 pp: 151-160

Novel automated technique for determination of multiresidue and multiclass antibiotics in chicken tissue by Liquid chromatography tandem mass spectrometry

By: Tavassoli, A., Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar, Iran. Azizi, S.N., (Corresponding Author) Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar, Iran. and Samadi-Maybodi, A., Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar, Iran.

Received: 2019-08-21 **Accepted: 2019-09-28**

Email: azizi@umz.ac.ir

Today, the use of antibiotics for the prevention, control and treatment of poultry industry is unavoidable and on the other hand requiring a modern approach that providing high sensitivity and specificity, convenient and rapid method to detection antibiotics. Therefore, in this study, for the first time, a wide range of antibiotics used in poultry industry were studied and monitored based on liquid chromatography techniques. Therefore, two liquid chromatography-mass spectrometers were used to prepare the samples with acetic acid and acetonitrile and z-sep+ compounds and with internal standards of antibiotic groups of sulfonamides, quinolones and tetracycline and comprised the results with conventional common method. Because of using of polymeric interface, absorption a large number of antibiotics was possible, so a wide range of antibiotics could be measured without any setting back in static phase efficiency. At the preparation, the amount of sample used is lower than that of classical methods and the preparation steps get shorter. Steady isotope of internal standard caused controls in the extraction, purification, injection and calculations of possible errors such as ion subsidence, injection error, percent recovery of drug and retention time correction and also the possibility to inject high volumes and increase the sensitivity in this method was improved. Therefore, exploitation two liquid chromatography devices, one for sample preparation provides big advantages, which alone lacks this feature. Meanwhile, simultaneously automate method reduces analysis time, test costs and increases accuracy compared to classical method and the sample preparation gets very convenient and allows the ability to search for antibiotics in the produced green chicken.

Keyword: Chicken tissue, multiclass, multiresidue, Liquid chromatography, tandem mass spectrometry, automated

مقدمه

گوشت مرغ دومین پروتئین پرمصرف جهان و طبق برخی آمارها ۳۶ درصد تأمین بار پروتئینی بر عهده صنعت طیور است (۱۲). ایالات متحده امریکا در صدر کشورهای تولیدکننده است و ایران یکی از بزرگ‌ترین تولیدکنندگان گوشت طیور در خاورمیانه با تولید متوسط دو میلیون تن سالانه است (۱۴). آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر ضد انگل‌ها در صنعت طیور جهت اهداف مختلفی از قبیل درمان، کنترل، پیشگیری (عمدتاً در کوکسیدیوزیس و التهاب نکروتیک روده) و محرک رشد مورداستفاده قرار می‌گیرد (۱۳). از سال ۲۰۰۶ استفاده از این ترکیبات جهت محرک رشد در کشورهای عضو اتحادیه اروپا ممنوع شده و از سال ۲۰۱۷ استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در دام‌ها و یا خوراک دامی که نهایتاً به مصرف انسان می‌رسد محدود و دسته‌بندی شدند که با توجه به باقیمانده دارویی در بدن دام و طول دوره منع مصرف دستورالعمل‌های مختلفی به دام‌پزشکان و فعالان این حوزه توصیه‌شده است (۱۲). استفاده بی‌رویه از این ترکیبات و حضور متابولیت های آن‌ها در بافت‌های خوراکی دام اثرات سوء در سلامت مصرف‌کنندگان از قبیل بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، حساسیت‌ها، تغییر فلور گوارشی، کم‌خونی، سمیت و سرطان‌زایی را به همراه دارد و امروزه یکی از مخاطراتی است که بهداشت عمومی را تهدید می‌کند(۱۰). به‌تبع با پیشرفت فنّاوری و حضور داروهای جدید مخاطراتی نو ایجاد گردیده است و طیف وسیعی از این داروها در صنعت دام به‌خصوص پرورش مرغ استفاده می‌گردد و نیاز به کنترل دارند. برحسب مخاطرات تعدادی از این داروها، منع مصرف دارند (۶) و بقیه آن‌ها با رعایت حداکثر مقدار مجاز در محصول نهایی، قابل‌استفاده می‌باشند که این مقادیر در مصوبات اتحادیه اروپا به شماره ۲۳۷۷/۹۰ برای محصولات دامی لیست شده است (۷). ویژگی این روش‌های کنترل محصولات دامی، شرایطی دارد که در دستورالعمل شماره ۲۰۰۲/۶۵۷

اتحادیه اروپا ذکرشده است (۵). روش‌های مختلفی جهت بررسی این ترکیبات مورداستفاده قرار می‌گیرد که شامل روش‌هایی بر اساس مهار رشد باکتری‌ها (FPT) (۹,۱۰,۱۴,۱۶) و روش‌های ایمنولوژیک مانند الایزا (ELISA) است که علی‌رغم راحتی و کم‌هزینه بودن، برای بررسی چند کلاسه از آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار زمان‌بر می‌باشد و ویژگی کمی دارند (۲, ۴, ۱۶) از آنجایی‌که طیف این آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار زیاد می‌باشند نیاز به آزمون‌هایی باقابلیت اندازه‌گیری گروه‌های مختلف به‌صورت هم‌زمان دارند(۱, ۳, ۸, ۹, ۱۱) روش کروماتوگرافی مایع به علت استفاده از تکنیک‌های پیشرفته استخراج ، تغلیظ و شناسایی به‌واسطه شناساگرهای مختلف بسیار کارآمد هستند طوری که مقادیر بسیار کم، با دقت و ویژگی بالا تفکیک و شناسایی می‌شوند (۱۵).

اسپکترومتری جرمی (MS) به واسطه قابلیت جستجوی تعداد زیاد آنالیت در واحد زمان، قابلیت جستجوی اثر انگشتی در آزمون‌های تائیدی، قابلیت تشخیص جامع آنالیت‌ها و حساسیت بالایی که دارد از دستگاه‌های معمول آزمون آنتی‌بیوتیک‌ها در باقیمانده‌های دارویی گردیده است (۱۷) از آنجایی که بافت نمونه‌های بیولوژیکی در اندازه‌گیری باقیمانده دارویی پیچیده است نیاز به انجام مراحل آماده‌سازی و تخلیص پرهزینه و زمان‌بری دارد.

در این مطالعه برای اولین بار برای دستیابی به روشی نوین، سریع، حساس، خودکار، با پوشش طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، از دو دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به‌صورت تمام‌خودکار استفاده گردید یکی جهت تخلیص و دیگری برای جداسازی و انتقال آنالیت ها به دستگاه اسپکترومتری جرمی متوالی (Tandem mass spectrometry) استفاده شد (شکل ۱). به‌واسطه استفاده از دستگاه اسپکترومتری جرمی متوالی به‌عنوان شناساگر در این مطالعه، از نقش اثرانگشتی آن در شناسایی کیفی، از حساسیت بالای آن در شناسایی کمی و دستیابی به حد تشخیص پائین و همچنین از سرعت جاروب بالای آن در جستجوی تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها بهره گرفته شد، طوری که ویژگی‌های مناسب آزمون‌های غربالگری و تائیدی مهیا شد تا طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها در بافت مرغ سبز تولیدی کشور، با صرف کمترین زمان و حجم حلال استخراج، کاهش هزینه آماده‌سازی نمونه و با حساسیت بسیار مطلوب در یک مرحله کاری دستگاه، تشخیص و اندازه‌گیری شوند.

مواد و روش‌کار

مواد شیمیایی و استانداردها

تمام مواد و حلال‌های کروماتوگرافی با خلوص مناسب اسپکترومتری جرمی، از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. استانداردها و استانداردهای داخلی از شرکت‌های سیگما آلدریچ، الجی‌سی و اچ‌پی‌سی خریداری و محلول مادر آن‌ها به غلظت ۱۰۰ µg/ml در استونیتریل تهیه شدند محلول‌های استاندارد مادر در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری و تا شش

جدول ۱- تنظیمات دستگاهی، سرعت فاز متحرک، سرعت و زمان آماده سازی ستون جاذب آنلاین

۱-HPLC	حلال ↓/ زمان (دقیقه) ←	۰ تا ۳	۳ تا ۵	۵-۹	۹ تا ۱۵
	استونیتریل حاوی ۵٪ اسید استیک	٪۵	٪۵۰	٪۹۵	٪۵
	آب حاوی ۵٪ اسید استیک	٪۹۵	٪۵۰	٪۵	٪۹۵
	سرعت جریان ml/min	۰/۴	۰/۱	۰/۴	
۲-HPLC	فاز متحرک↓ / زمان (دقیقه) ←	۰ تا ۳	۳ تا ۱۳		۱۳-۱۵
	استونیتریل حاوی mM۱ اسید استیک	٪۳۰	٪۳۰-٪۹۰		٪۳۰
	آب حاوی mM۱ اسید استیک	٪۷۰	٪۷۰-٪۱۰		٪۷۰
	سرعت جریان ml/min	۰/۴			
Switching valve	زمان (دقیقه)←	۰ تا ۳	۳ تا ۵	۵-۹	۹ تا ۱۵
	موقعیت←	موقعیت الف	موقعیت ب	موقعیت الف	موقعیت الف
	مراحل استخراج فاز ساکن←	ورود نمونه	شویش جاذب	شستشو جاذب	آماده سازی جاذب

یونیزاسیون از نوع الکترواسپری با ولتاژ الکترواسپری ۵۵۰۰ ولت در مد مثبت، سرعت جریان گاز محافظ صفحه (Curtain) ۲۰ واحد، سرعت جریان تبخیر حلال (Desolvation)، ۵۰ واحد بهینه سازی شد.

ماه قابل‌استفاده بودند و غلظت‌های کاری روزانه تهیه و به‌صورت زنجیره توسط آب رقیق شدند. ستون‌های آنلاین استخراج فاز ساکن از نوع HLB (شرکت واترز، کشور آمریکا) خریداری گردید. ستون کروماتوگرافی از نوع فنیل-هگزیل به ابعاد ۱۵۰×۱/۲ mm (MN، کشور آلمان) خریداری و به کار گرفته شد. پودر z-sep+ (حاوی پودر اکسید زیرکونیوم و اکتادسیل سیلیس) از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شد.

دستگاه‌وری

دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا مدل سری ۲۰۰ (کمپانی پرکین‌المر، کشور آمریکا) مجهز به سیستم تزریق خودکار، دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا مدل فلکسار (کمپانی پرکین‌المر، کشور آمریکا)، دستگاه اسپکترومتری جرمی متوالی مدل ای‌پی‌آی ۳۲۰۰ (ای‌بی سایکس، کشور آمریکا) به همراه یک دستگاه تغییردهنده مسیر حرکت حلال کروماتوگرافی در این مطالعه به کار گرفته شد و مطابق طرح کلی نشان داده‌شده در (شکل ۱) جانمایی شد و توسط نرم‌افزار آنالیست ویرایش ۱/۶/۲، تمام مراحل کار کنترل گردید فاز متحرک، حلال انتقال نمونه، سرعت جریان، زمان و سایر تنظیمات دستگاهی در (جدول ۱) نشان داده‌شده است. دستگاه ورتکس مدل وی‌ایکس ۱۰۰ (لبِنت، کشور آمریکا) به کار گرفته شد. همچنین از ترازو مدل ۰/۱ mg (ساتریوس، کشور آلمان) در توزین نمونه و ترازو مدل ۰/۰۱ mg (ساتریوس، کشور آلمان) در تهیه استانداردهای مرجع و ترازو مدل ۰/۱ mg (ساتریوس، کشور آلمان) در تهیه معرف‌ها استفاده شد. برای سانتریفیوژ از مدل‌های ۱۶KC-۲ (سیگما، کشور آلمان) استفاده گردید. از دستگاه دیونایزر با قابلیت‌های فازمعکوس اسمزی و رزین‌های تبادل یونی و تابش نور ماورا بنفش مدل (اس‌جی، کشور آلمان) استفاده گردید. از دستگاه آسیاب مدل جی‌ام ۳۰۰ (Restsch، کشور آلمان) برای آماده‌سازی و همگن‌سازی نمونه‌های واقعی استفاده گردید.

آماده‌سازی نمونه

۰/۵ گرم از نمونه بافت همگن مرغ در میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری توزین شد ۲۵ µl مخلوط استاندارد داخلی (۱ µg/ml) جهت ارزیابی عملکرد و تصحیح خطاهای احتمالی اضافه شد و ۳۰ دقیقه در این حالت رها گردید. در ادامه ۲۵۰ µl محلول آبی حاوی ۱۰ mM از EDTA و اسید استیک ۰/۵ درصد اضافه و ورتکس گردید و ۲۵۰ µl محلول استونیتریل حاوی اسید استیک ۰/۵ درصد اضافه و ورتکس گردید. محتویات لوله به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۸۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید و فاز رویی به لوله دیگری حاوی ۱۰۰ mg از z-sep+ (به‌منظور حذف چربی‌ها و ماکرو مولکول‌ها) منتقل و ورتکس گردید. محتویات لوله طبق شرایط فوق سانتریفیوژ و محلول حاصل، یک‌به‌یک با آب رقیق و به ویال مخصوص دستگاه منتقل شد.

نتایج و بحث

تنظیمات دستگاهی همان‌طور که در (جدول ۱) نیز به آن اشاره شده تنظیم و بهینه‌سازی شده است. مدت‌زمان انتقال نمونه توسط (HPLC-۱) به روی جاذب ۳ دقیقه انتخاب گردید در این مرحله از قرار گرفتن دارو روی جاذب، زمان آنالیز، اطمینان از عدم حذف دارو و حصول اطمینان از خروج مزاحمت‌ها مدنظر قرار گرفت و با اتصال مستقیم بعد از جاذب به شمارش گر جرمی، از عدم خروج دارو در طول این زمان اطمینان حاصل شد. با تغییر جهت مسیر حرکت (HPLC-۲)، فاز متحرک از روی جاذب عبور می‌نماید و ۳۰ درصد از فاز آلی برای شروع شویش و واجذب و انتقال به ستون کروماتوگرافی انتخاب گردید در این مرحله از شویش داروها از روی جاذب، در مدت‌زمان دو دقیقه واجذب گردید و دوباره مسیر حلال‌ها به حالت اولیه برگردانده می‌شود و جاذب با ۹۵ درصد استونیتریل در مدت ۴ دقیقه شسته شده (HPLC-۱) و عاری از سابقه تزریق قبلی می‌گردد و بعدازآن جاذب باحالت آغازین بر می‌گردد تا آماده تزریق بعدی گردد در این فاصله، دستگاه دیگر (HPLC-۲) داروها را از روی جاذب به روی ستون کروماتوگرافی منتقل می‌نماید و با تغییر در نسبت حلال‌ها، داروها را به تفکیک قطبیت به دستگاه اسپکترومتری جرمی منتقل می‌نماید تمام این زمان‌ها و سرعت جریان‌ها بهینه‌سازی شده است که کروماتوگرام‌های آن‌ها برای دسته سولفانامیدها در شکل ۲، کوئینولون‌ها در شکل ۳، تتراسایکلین‌ها در شکل ۵ نشان

جدول ۲- مقایسه روش پیشنهادی با روش کلاسیک

	روش کلاسیک	روش پیشنهادی
توزین (گرم)	۵	۰/۵
حجم حلال آلی استخراج (ml)	۷۳	۰/۲۵
مقدار پودر شیمیایی (gr)	۲۰	۰/۱
ستون SPE به ازای هر ۱۰۰ نمونه (عدد)	۱۰۰	۱
نیاز به تبخیر حلال	نیاز دارد	نیاز ندارد
زمان آماده سازی نمونه به ازای ۶ نمونه (ساعت)	۳	۰/۵

جدول ۳ - پارامترهای دستگاهی

ردیف	آنالیت	علامت اختصاری	زمان بازداری	یون مادر	پتانسیل V	یون غربالگری
				Q۱	DP/EP	Q3Quan
۱	Oxytetracycline	OTC	۵,۲	۴۶۱	۶,۵/۳۶	۴۲۶
۲	Tetracycline	TET	۵,۵	۴۴۵	۵/۳۶	۴۱۰
۳	Chlortetracycline	CTC	۶,۵	۴۷۹	۶,۵/۴۱	۴۶۲
۴	Doxycycline	DOX	۶,۹	۴۴۵	۵/۳۶	۴۱۰
۵	Sulfanilamide	SNL	۴,۵	۱۷۳	۹/۲۶	۱۵۶
۶	Sulfadiazine	SDZ	۴,۷	۲۵۱	۵/۳۶	۱۵۶
۷	Sulfathiazole	STZ	۴,۹	۲۵۶	۵/۳۶	۱۵۶
۸	Sulfamethazine	SMZ	۵,۷	۲۷۹	۴,۵/۴۱	۱۸۶
۹	Sulfameter	SME	۵,۸	۲۸۱	۴/۳۶	۱۵۶
۱۰	Trimethoprim	TRI	۶,۵	۲۹۱	۳,۵/۵۶	۲۳۰
۱۱	Sulfachloropyridazine	SCP	۶,۷	۲۸۵	۴/۳۱	۱۵۶
۱۲	Sulfadoxine	SDX	۶,۹	۳۱۱	۴/۴۱	۱۵۶
۱۳	Sulfamethoxazole	SMX	۷,۳	۲۵۴	۵/۳۶	۱۵۶
۱۴	Sulfamerazine	SMR	۷,۵	۲۶۴	۴,۵/۶۶	۱۵۶
۱۵	Sulfamethizole	SMTZ	۷,۵	۲۷۱	۵/۳۶	۱۵۶
۱۶	Sulfisoxazole	SIX	۷,۵	۲۶۸	۵/۳۶	۱۵۶
۱۷	Sulfabenzamide	SBZ	۸,۱	۲۷۷	۷,۵/۳۱	۱۵۶
۱۸	Sulfaquinoxaline	SQX	۸,۵	۳۰۱	۳/۴۶	۲۰۸
۱۹	Sulfadimethoxine	SDM	۸,۵	۳۱۱	۴/۴۱	۱۵۶
۲۰	Sulfanitran	SNT	۹,۸	۳۳۶	۶/۴۱	۱۵۶
۲۱	Desethylene ciprofloxacin	DCIP	۵,۲	۳۰۶	۳,۵/۳۶	۲۶۸
۲۲	Ciprofloxacin	CIP	۵,۴	۳۳۲	۳,۵/۴۱	۲۴۵
۲۳	Enrofloxacine	ENR	۵,۶	۳۶۰	۵/۴۱	۳۱۶
۲۴	Marbofloxacin	MER	۵,۰	۳۶۳	۴,۵/۷۰	۳۴۵
۲۵	Difloxacin	DIF	۶,۲	۴۰۰	۴,۵/۵۰	۳۸۲
۲۶	Oxolinic acid	OXO	۸,۴	۲۶۲	۴,۵/۵۳	۲۴۴
۲۷	Flumequine	FLU	۹,۴	۲۶۲	۴,۵/۴۴	۲۴۴
۱-IS	(Demeclocycline (IS	DMC	۶,۱	۴۶۵	۶/۳۶	۴۴۸
۲-IS	(IS) ۱۳C۶-Sulfathiazole	۱۳C۶-STZ	۴,۹	۲۶۲	۵/۳۶	۱۶۲
۳-IS	(IS) Sulfamethazine-d۶	SMZ-D۶	۵,۶	۲۸۵	۴,۵/۳۶	۱۶۲
۴-IS	(IS) Ciprofloxacin D۸	CIP-D۸	۵,۴	۳۴۰	۵/۴۱	۳۲۲

ادامه جدول ۳ - پارامترهای دستگاهی

انرژی V	یون تائیدی	انرژی V	منحنی کالیبراسیون	ضریب همبستگی	LOD	LOQ
CE	Q۳Qual۱	CE		R2	ng/gr	ng/gr
۲۱	۴۴۳	۱۹	۰,۰۳۲ - x ۰,۵۶۰ = y	۰,۹۹۷۶	۲,۵	۷,۵
۲۱	۱۵۴	۳۵	۰,۰۷۵ - x ۱,۶۲۰ = y	۰,۹۹۸۷	۱,۵	۴,۵
۲۷	۴۴۴	۲۳	۰,۰۰۷ - x ۰,۱۴۸ = y	۰,۹۹۴۵	۳,۵	۱۰,۵
۲۱	۱۵۴	۳۵	۰,۰۳۴ - x ۰,۵۳۴ = y	۰,۹۹۸۷	۴	۱۲,۰
۱۱	۹۲	۲۵	۰,۰۲۲ - x ۰,۴۴۰ = y	۰,۹۹۵۳	۳,۵	۱۰,۰
۳۵	۹۲	۱۷	۰,۰۱۹ - x ۰,۴۳۱ = y	۰,۹۹۷۱	۳	۹,۰
۲۹	۹۲	۴۱	۰,۰۹۶ - x ۲,۰۰۰ = y	۰,۹۹۸۹	۱,۵	۵,۰
۲۱	۹۲	۴۳	۰,۳۳۴ – x ۳,۱۲۰ = y	۰,۹۹۶۰	۱,۰	۳,۰
۲۱	۱۰۸	۳۶	۰,۰۵۱ – x ۲,۲۰۰ = y	۰,۹۹۸۸	۱,۱	۳,۵
۲۳	۱۲۳	۳۷	۰,۳۴۰ – x ۳,۹۴۰ = y	۰,۹۹۷۸	۲,۰	۶,۰
۱۹	۹۲	۴۱	۰,۱۳۶ - x ۲,۵۴۰ = y	۰,۹۹۹۱	۱,۰	۳,۰
۲۳	۹۲	۵۰	۰,۲۸۲ - x ۴,۹۲۰ = y	۰,۹۹۵۰	۱,۰	۳,۰
۱۹	۱۰۸	۳۵	۰,۱۲۳ - x ۳,۲۲۰ = y	۰,۹۹۸۸	۱,۱	۳,۳
۲۵	۹۲	۴۱	۰,۰۰۹ - x ۰,۱۱۹ = y	۰,۹۹۰۶	۲,۵	۷,۵
۱۷	۹۲	۳۷	۰,۰۰۷ - x ۰,۱۵۰ = y	۰,۹۹۵۱	۳,۲	۱۰,۰
۱۷	۹۲	۳۹	۰,۲۲۲ - x ۳,۸۰۰ = y	۰,۹۹۴۸	۱,۲	۳,۶
۱۷	۹۲	۳۹	۰,۱۳۰ - x ۳,۱۳۰ = y	۰,۹۹۸۴	۱,۲	۳,۶
۱۷	۱۴۶	۱۷	۰,۰۱۲ - x ۰,۱۰۹ = y	۰,۹۹۶۶	۲,۴	۷,۲
۲۳	۹۲	۵۰	۰,۲۵۲ - x ۴,۸۵۰ = y	۰,۹۹۷۰	۱,۰	۳,۰
۱۷	۱۹۸	۱۹	۰,۰۳۵ - x ۱,۲۹۰ = y	۰,۹۹۸۷	۲,۱	۶,۵
۴۱	۲۸۸	۱۹	۰,۰۴۱ - x ۱,۴۷۱ = y	۰,۹۹۸۹	۲,۰	۶,۰
۲۵	۳۱۴	۲۱	۰,۰۴۷ - x ۱,۵۶۰ = y	۰,۹۹۸۵	۱,۵	۴,۵
۲۱	۳۴۲	۲۱	۰,۰۳۸ - x ۱,۴۸۲ = y	۰,۹۹۹۷	۱,۵	۴,۵
۳۰	۳۲۰	۲۲	۰,۰۱۷ - x ۰,۳۲۴ = y	۰,۹۹۸۷	۲,۶	۸,۰
۳۰	۳۵۶	۲۸	۰,۰۳۹ - x ۱,۴۵۰ = y	۰,۹۹۹۱	۱,۹	۶,۰
۲۵	۲۱۶	۴۰	۰,۱۴۱ - x ۳,۴۱۰ = y	۰,۹۹۹۴	۱,۱	۳,۳
۲۵	۲۰۲	۴۵	۰,۱۳۵ - x ۳,۳۴۰ = y	۰,۹۹۹۲	۱,۱	۳,۳
۲۱						
۱۷						
۲۱						
۲۱						

داده‌شده است. جاذب (HLB) به کار رفته در این مطالعه پلیمری با گروه‌های عاملی آب‌دوست و آب‌گریز در طول مسیر به ابعاد ۱×۰/۲۱ سانتی‌متر است که امکان جذب تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها را علاوه بر گروه‌های فوق‌الذکر می‌دهد؛ بنابراین امکان سنجش طیف وسیع‌تری از آنتی‌بیوتیک‌ها نیز وجود دارد. به‌واسطه پلیمری بودن و شرایط شویش، در بیشتر از ۱۰۰ نمونه کاهشی در کارایی این فازهای ساکن مشاهده نگردید. همان‌طور که در مقایسه نتایج روش های مختلف شناسایی و جستجوی آنتی‌بیوتیک‌ها که در جدول ۲ مشاهده می‌شود. در مرحله آماده‌سازی نمونه در مطالعه حاضر مقدار نمونه مورداستفاده در مقایسه با روش های کلاسیک کمتر است و مراحل آماده‌سازی نمونه در طول زمان صرف شده در مقایسه با روش کلاسیک، به میزان قابل‌توجهی کاسته شده است در مورد ترتیب مراحل نیز همان‌طور که مشاهده می‌شود، استفاده از مراحل متعدد و استفاده از ترکیبات حلال‌های آلی و نمک‌های حین آماده‌سازی به‌صورت بهینه‌ای صرفه‌جویی شده است. علاوه بر کنترل و مقایسه آزمون با روش کلاسیک، صحت نتایج نیز توسط اسپایک گذاری ارزیابی‌شده است و همچنین در این مطالعه از استاندارد داخلی از نوع ایزوتوپ پایدار داروی مورد مطالعه (برای هر دسته یک استاندارد داخلی استفاده گردید)، برای کنترل مراحل استخراج، تخلیص، تزریق و محاسبات استفاده گردید و خطاهای احتمالی همانند فرونشست یونی، خطای تزریق، اصلاح درصد بازیافت دارو و اصلاح زمان بارداری برطرف می‌گردید. ازآنجایی‌که در روش های اسپکترومتری جرمی، قطر داخلی ستون‌های کروماتوگرافی معمول ۲ میکرومتر است، تزریق حجم‌های بالای ۱۰ میکرولیتر توصیه نمی‌گردد ولی در روش پیشنهادی از فاز استخراج جامد استفاده‌شده و آنالیت روی جاذب به‌صورت بر خط تغلیظ می‌گردد و امکان تزریق حجم‌های بالا وجود دارد و حساسیت روش را می‌توان با توجه به نیاز افزایش داد به‌طوری‌که در این روش با تزریق ۲۰۰ میکرولیتر حساسیت روش به‌طور عمده‌ای افزایش یافت که این تمایز موجب می‌گردید تا مراحل آماده‌سازی سریع و راحت انجام گردد.

ازآنجایی‌که مطالعه حاضر تدوین یک روش بدیع در شناسایی آنتی‌بیوتیک‌ها در ماتریکس پیچیده‌ای مانند بافت مرغ است، فاکتور های صحه‌گذاری و دقت آزمون انجام شد که در جدول ۳ به آن اشاره‌شده است. ضمن استفاده از این آزمون در خصوص نمونه‌های واقعی، در گوشت مرغ سبز تولیدی کشور، به کار گرفته شد که مواردی از حضور سولفادیمتوکسین (شکل ۵) و انروفلوکساسین یافت و گزارش گردید.

نتیجه‌گیری

دستگاه کروماتوگرافی فاز مایع با کارایی بالا در تلفیق با اسپکترومتری جرمی از روش‌های آزمون استاندارد و بین‌المللی در تشخیص باقیمانده‌ها در بافت است با افزودن دستگاه کروماتوگرافی مایع دیگری به این ساختار به‌عنوان آماده‌سازی نمونه امتیازات ویژه‌ای به این روش‌های استاندارد آزمون اضافه کرد به‌طوری هرکدام از تجهیزات به‌صورت منفرد فاقد این ویژگی‌های ذکرشده، بودند. ضمن خودکار بودن روش در ویژگی‌های زمان آنالیز، دقت آزمون، هزینه‌های آزمون در مقایسه با روش‌های کلاسیک به‌صورت معنی‌داری بهینه شد. به‌واسطه این طرح آماده‌سازی نمونه بسیار راحت و سریع بوده و قابلیت جستجوی آنتی‌بیوتیک در مرغ سبز تولیدی را دارا است. با فرض اعتماد به پاسخ مهار میکروبی آزمون تائیدی موردنیاز خواهد بود کما اینکه تمام نمونه‌های غربالگری شده توسط آزمون‌های الایزا و مهار میکروبی و موارد مشکوک توسط این طراحی آزمون می‌گردد. ازنظر سرعت آماده سازی و پاسخ تائیدی قابل‌رقابت با هر آزمون دیگری هست. طوری که امکان انجام آزمون در پلیت‌های ۹۶ چاهکی نیز قابل انجام است. ازآنجاکه ویژگی ساختار شیمیایی آنتی‌بیوتیک‌ها طوری ست که گروه‌های عاملی قطبی یا غیر قطبی دارند می‌توان اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها را با جاذب به‌کاررفته در این مطالعه تغلیظ و تخلیص کرد.

تشکر و قدردانی

از مدیران، معاونین و همکاران محترم سازمان دامپزشکی کشور به‌واسطه پشتیبانی مالی، از مدیران و معاونین مرکز ملی تشخیص، آزمایشگاه‌های مرجع و مطالعات کاربردی به‌خصوص همکاران محترم، خانم دکتر صالحی و دکتر بابا پور تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

A. Kaufmann, P. B., K. Maden, S. Walker, M. Widmer. 2011. De- 1-velopment of an improved high resolution mass spectrometry based multi-residue method for veterinary drugs in various food matrices. .*Anal Chim Acta* 700: 86-94

Adrian, J., F. Fernandez, F. Sanchez-Baeza and M. P. Marco. 2012. 2-Preparation of antibodies and development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of doxycycline .antibiotic in milk samples. *J Agric Food Chem* 60: 3837-3846

Chung, S. W. C. and C.-H. Lam. 2015. Development of a 15-class 3-multiresidue method for analyzing 78 hydrophilic and hydrophobic veterinary drugs in milk, egg and meat by liquid chromatography-.tandem mass spectrometry. *Analytical Methods* 7: 6764-6776

Cooper, K. M., J. V. Samsonova, L. Plumpton, C. T. Elliott and 4-D. G. Kennedy. 2007. Enzyme immunoassay for semicarbazide--the nitrofuran metabolite and food contaminant. *Anal Chim Acta* 592: .64-71

EC. 2002. The performance of analytical methods and the inter- 5-pretation of results. In: DECISION C, editor. 2002/657/EC. Official .*Journal of the European Communities*

EC. 2003. The setting of minimum required performance limits 6-(MRPLs) for certain residues in food of animal origin. In: DECISION C, editor. 2003/181/EC. *Official Journal of the European* .*Union*

EC. 2005. Establishment of maximum residue limits of veterinary 7-medicinal products in foodstuffs of animal origin. In: COMMIS-.SION E, editor. 2377/90/EC

Garrido Frenich, A., M. Aguilera-Luiz Mdel, J. L. Martinez Vidal 8-and R. Romero-Gonzalez. 2010. Comparison of several extraction

used in poultry. *Journal of veterinary pharmacology and therapeu-.tics* 41: 761-789

Reig, M. and F. Toldrá. 2008. Veterinary drug residues in meat: 13-.Concerns and rapid methods for detection. Meat science 78: 60-67

Wong, E. 2018. differential gene expression in lung tissue of 14-wooden breast syndrome affected and unaffected commercial broiler chickens. university of Delaware

Yu, P., C. Chen, H. Liu, Y. Deng and N. J. S. p. Xue. 2019. 15-Simultaneous determination of tetracyclines, fluoroquinolones, and sulfonamides in chicken manure using solid-phase extraction and .high performance liquid chromatography. 37: 518-524

Zhang, S., Z. Zhang, W. Shi, S. A. Eremin and J. Shen. 2006. 16-Development of a chemiluminescent ELISA for determining chlor-.amphenicol in chicken muscle. *J Agric Food Chem* 54: 5718-5722

Zweigenbaum, J. 2011. Mass spectrometry in food safety, meth- 17-.ods and protocls. Humana Press. UK

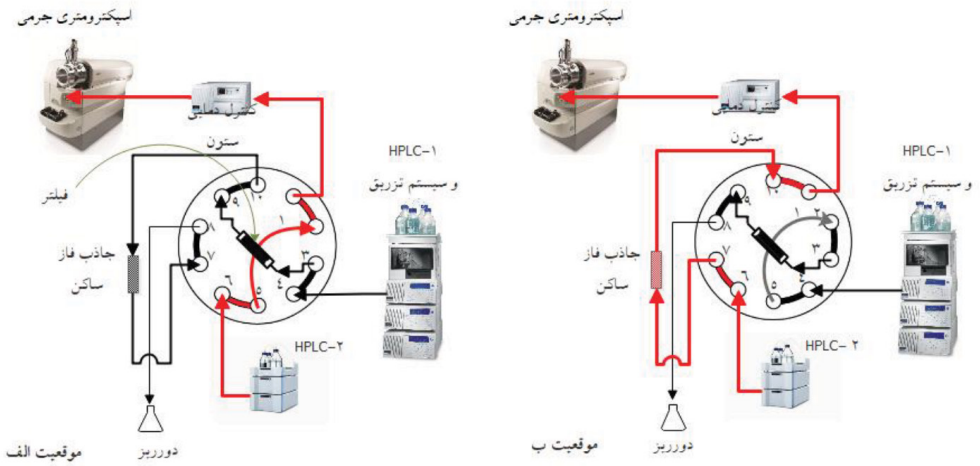
techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrom-.etry. *Anal Chim Acta* 661: 150-160

K. Granelli, C. B. 2007. Rapid multi-residue screening of antibiot- 9-ics in muscle and kidney by liquid chromatography-electrospray ion-.ization–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 586: 289–295

Moon, S. L., J. S. Bedi, J. P. S. Gill and R. S. Aulakh. 2018. 10-Studies on Antibiotic Residues in Chicken and its Public health Sig-.nificance. *Advances in Bioresearch* 9

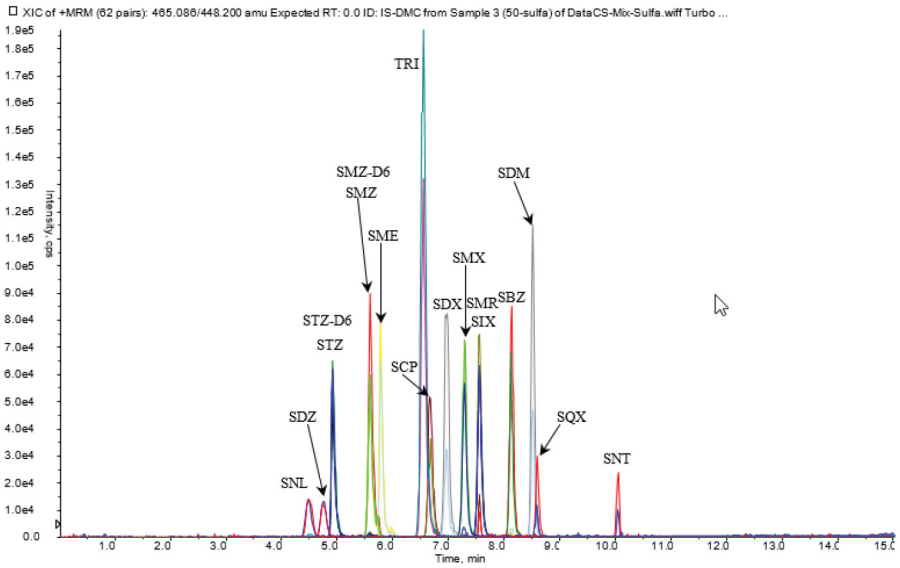
Nikolaos S. Thomaidis, M. E. D. 2015. Multi-residue determina- 11-tion of 115 veterinarydrugs pharmaceutical residues in milk powder butter, fish tissue eggsusing liquid chromatography–tandem mass .spectrometry. *Anal Chim Acta* 880: 103-121

Patel, T., T. Marmulak, R. Gehring, M. Pitesky, M. O. Clapham 12-and L. A. Tell. 2018. Drug residues in poultry meat: A literature re-view of commonly used veterinary antibacterials and anthelmintics

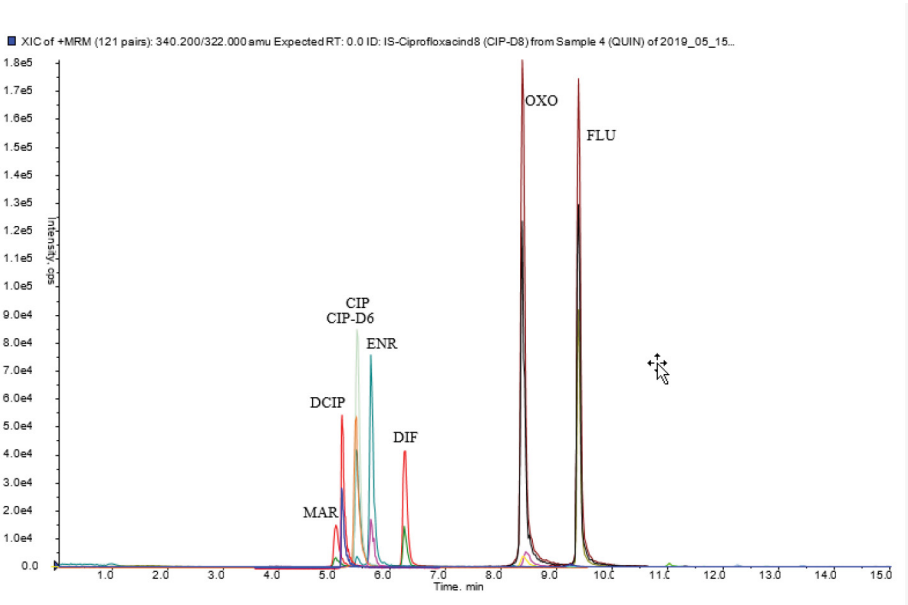


شکل ۱ - چیدمان دستگاهی در حالت استخراج فاز جامد آنلاین.

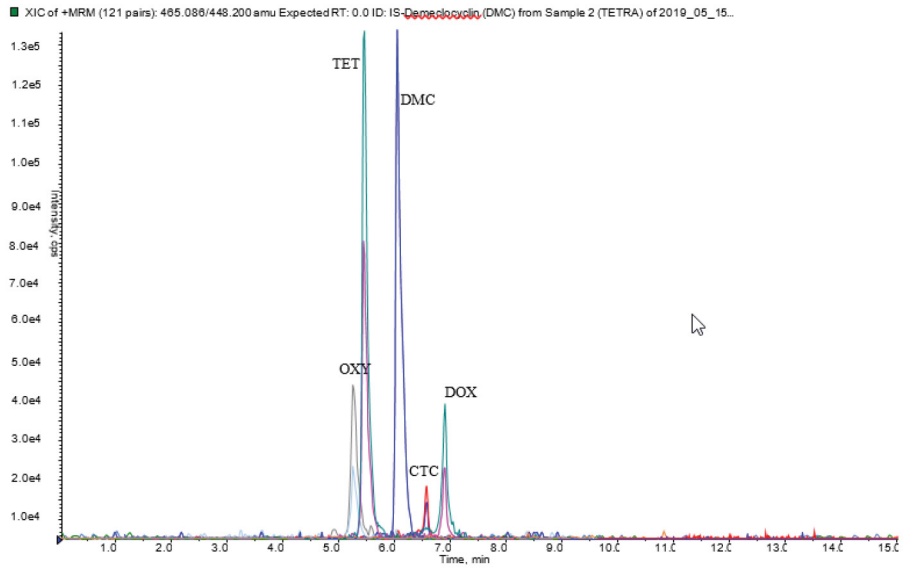
الف: توسط سیستم HPLC-۱ مجهز به سیستم تزریق خودکار، حجم بالایی از نمونه تزریق می‌گردد و توسط پمپ‌های همان دستگاه از روی جاذب آنلاین در مسیر، عبور داده می‌شود و آنالیت تزریق‌شده روی جاذب نگه‌داشته می‌شود و ناخالصی‌ها از روی آن حذف می‌گردند در این حالت پمپ HPLC-2 در حال آماده‌سازی ستون تجزیه‌ای در نگه‌دارنده ستون است - با تغییر مسیر ایجادشده توسط سویچ - ب: گونه های جذب شده در جاذب به ستون کروماتوگرافی مایع و در ادامه جداسازی به اسپکترومتر جرمی منتقل و شمارش می گردد و در طول این مدت، ستون آنلاین توسط پمپ دیگر با حلال آلی شستشه می شود و در ادامه برای تزریق بعدی آماده می گردد.



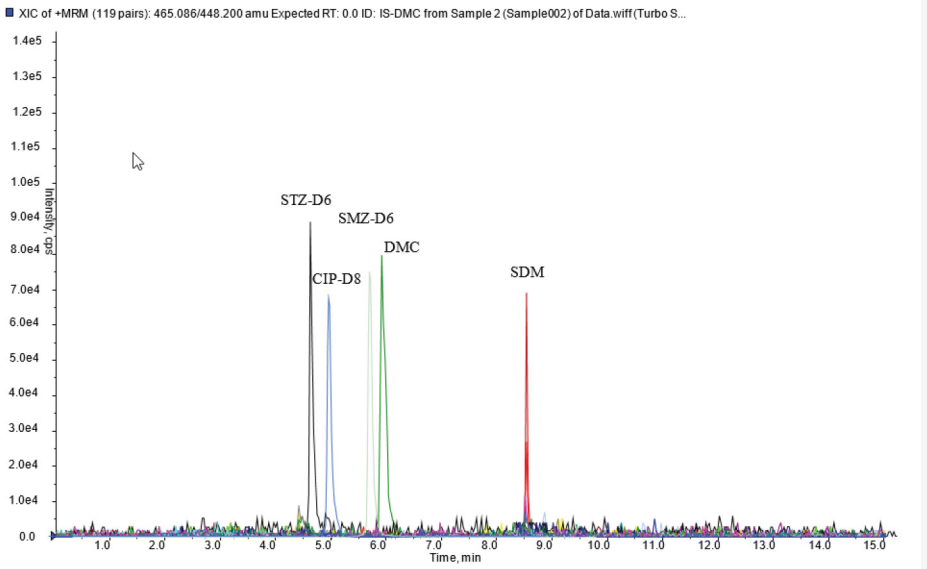
شکل ۲- کروماتوگرام باقیمانده های دارویی گروه سولفانامیدها.



شکل ۳- کروماتوگرام باقیمانده های دارویی گروه کوئینولون ها.



شکل ۴ کروماتوگرام باقیمانده های دارویی گروه تتراساسکلین ها.



شکل ۵ کروماتوگرام نمونه واقعی- حاوی سولفادیمتوکسین.