

## الكشف عن متبقيات المضاد الحيوي التتراسيكلين ومشتقاته في حليب الإبل المحلية في ليبيا

لطيفة نصر الهويل<sup>1</sup>، عبد الله أبو بكر أحمد<sup>1</sup>، عادل محمد أبو شوفة<sup>2</sup>، رفيق محمد التاجوري<sup>3</sup>

1. قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة طرابلس

2. قسم الكيمياء الطبية والصيدلانية، كلية الصيدلة، جامعة طرابلس

3. قسم الإنتاج الحيواني، مركز البحوث الزراعية والحيوانية - طرابلس

البريد الإلكتروني للباحث الرئيسي: [latifaflower@yahoo.com](mailto:latifaflower@yahoo.com)

تاريخ استلام البحث: 12 أكتوبر 2024، تاريخ الموافقة على النشر: 4 نوفمبر 2024

## المستخلص

يتم استخدام أنواع مختلفة من المضادات الحيوية في جميع أنحاء العالم في القطاع البيطري عشوائياً لتعزيز النمو أو العلاج أو الوقاية من الأمراض خاصة التهاب الضرع، لذلك أجريت هذه الدراسة بهدف تحديد بقايا التتراسيكلين والأوكسي تتراسيكلين والكلورتتراسيكلين في حليب الإبل المحلية، في 50 عينة جمعت عشوائياً من خمس مناطق داخل ليبيا؛ سبها، بني وليد، الهيشة الجديدة، ترهونة ووادي الربيع، بمعدل عشرة عينات من كل منطقة. حيث كانت منطقة الهيشة الجديدة هي منطقة الشاهد، تم قياس التراكيز المتبقية من التتراسيكلين في عينات الحليب باستخدام تقنية التحليل الكروماتوجرافي بواسطة جهاز السائل اللوني عالي الأداء UV - HPLC بطول موجي 365 نانومتر. أوضحت نتائج الدراسة وجود بقايا التتراسيكلين في 13 عينة (26%)، حيث أحتوت 11 عينة (22%) على بقايا التتراسيكلين، بمتوسط تركيز  $2.2 \pm 19.89$ ،  $1.7 \pm 17.2$ ،  $2.6 \pm 24.5$ ،  $1.5 \pm 24.1$  (ميكروجرام/ لتر) لمناطق سبها، بني وليد، ترهونة، وادي الربيع على التوالي، كما أحتوت عينتين (4%) على بقايا الكلورتتراسيكلين بمتوسط  $2 \pm 46$  (ميكروجرام/ لتر) لمنطقة وادي الربيع فقط، ولا وجود لبقايا الأوكسي تتراسيكلين في العينات التي تم تحليلها، هذا بالإضافة إلى خلو العينات المجمعة من منطقة الهيشة الجديدة من أي بقايا لأنواع التتراسيكلين الثلاث. لا يوجد فرق معنوي ( $P \geq 0.05$ ) بين تركيز التتراسيكلين في عينات الحليب المجمعة من منطقتي سبها وبني وليد والمجمعة من منطقتي ترهونة ووادي الربيع بينما وجد فرق معنوي واضح ( $P < 0.05$ ) في تركيزه في عينات الحليب المجمعة من منطقتي ترهونة ووادي الربيع مقارنةً بتركيزه في عينات الحليب المجمعة من منطقتي سبها وبني وليد. وهناك فرق معنوي واضح ( $P < 0.05$ ) في تركيز الكلورتتراسيكلين في عينات الحليب المجمعة من منطقة وادي الربيع مقارنةً بجميع المناطق المذكورة بما فيها منطقة وادي الربيع. نستنتج من هذه الدراسة بأن جميع التراكيز كانت ضمن الحد الأقصى المسموح به دولياً لبقايا التتراسيكلين في الحليب (100 ميكروجرام/ لتر). مع الأخذ في الاعتبار بأن مخاطر تناول الحليب المحتوي على بقايا المضادات الحيوية تكمن في انتشار البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية الشائعة الاستخدام في البشر والحيوانات من خلال السلسلة الغذائية.

الكلمات المفتاحية: متبقيات، حليب الإبل، التتراسيكلين، الكلورتتراسيكلين، الأوكسي تتراسيكلين

## المقدمة

يعتبر الحليب من الأغذية التي يتم تضمين استهلاكها كأغذية مهمة في النظام الغذائي الصحي والمتوازن لمجموعة واسعة من الفئات العمرية (1). وقد شهد العالم اهتماماً متزايداً بحليب الإبل في هذه الأونة الأخيرة، كما دلت الأبحاث العلمية أنه يمتلك تركيباً غذائياً مميزاً لاحتوائه على (86.9%) ماء ومستويات منخفضة من الدهون المشبعة والكوليسترول ومستويات عالية من الدهون غير المشبعة، وسكر اللاكتوز والعناصر المعدنية مثل الكالسيوم والماغنسيوم والصوديوم والبوتاسيوم والزنك والحديد الذي يعتبر مستواه أعلى بعشرة أضعاف المستويات الموجودة في حليب البقر، واحتوائه على نسبة جيدة من الفيتامينات مثل فيتامين A، B، E، وفيتامين (C) (3 - 5.5 مليجرام / 100 جرام) بنحو ثلاثة إلى خمسة أضعاف ما هو موجود في حليب البقر ومرة ونصف المرة في البان الأمهات من النساء. هذا ويحتوي حليب الإبل على عددٍ من البروتينات الوقائية من أبرزها اللاكتوفيرين الذي يعتبر مضاداً للبكتيريا والالتهابات ويمكن وصفه لمعالجة الكثير من الأمراض كأمراض البطن وخاصة المعدة والأمعاء والطحال ومرض الاستسقاء والأنيميا والبواسير وأمراض الربو وضيق التنفس وأمراض الكبد كاليرقان وتليف الكبد ومرض الكبد الوبائي المزمن ومرض السكري والضعف الجنسي بالإضافة إلى أنه يعمل على تقوية عضلة القلب و ترميم خلايا الجسم ومنع تكوين المركبات الكيميائية المسرطنة المسؤولة عن إصابة الجسم بالأمراض السرطانية (2). بالرغم من كل هذه المزايا

## لطيفة نصر الهويزل وآخرون

إلا أن حليب الإبل قد يكون عرضة لوجود بعض بقايا المضادات الحيوية فيه نتيجة لسوء استخدامها عند علاج بعض الأمراض (سواء بالحقن في العضلة أو في حلمات الضرع للسيطرة على التهاب الضرع أو تحاميل مهبلية لعلاج التهاب الرحم أو كإضافات للعلف ومياه الشرب) أو الوقاية منها أو كمنشطات للنمو التي تصل لاحقاً إلى المستهلك متسببة في ظهور العديد من الأمراض أهمها مقاومة البكتيريا لها. لذا فإن جودة الحليب وخلوه من أي أثر لبقايا المضادات الحيوية هي من أولويات سلامة وحماية المستهلكين (3). هذا بالإضافة إلى أن منتجات الحليب المختلفة هي مصدر آخر غير مباشر لوصول بقايا المضادات الحيوية إلى الإنسان، حيث أدت هذه البقايا إلى خسارة في صناعة منتجات الحليب (مثل الجبن والزبد واللين) في أوروبا قدرت بأكثر من 200.000.000 يورو سنوياً. وبالرغم من هذه الخسائر فقد تبين أن حوالي 80 إلى 90 ٪ من جميع المضادات الحيوية التي تدار في المجال البيطري في البلدان المتقدمة مثل الولايات المتحدة الأمريكية تستخدم كمحفزات للنمو (أي كمنشطات)، حيث يتجاوز هذا إجمالي استخدامها للرعاية الطبية البشرية (4)، ففي عام 2011 باعت شركات الأدوية ما يقرب من 30 مليون جنيه من المضادات الحيوية للماشية، حيث كشفت التقارير والأبحاث العلمية على أن سوء استخدام المضادات الحيوية وعدم التقيد بفترة الأمان (الفترة بين إعطاء الدواء وجمع المنتجات الحيوانية) الخاصة بها يؤدي إلى ترسب بقاياها في المنتجات الحيوانية (5).

التتراسيكلينات من بين أكثر الأصناف البيطرية الشائعة الاستخدام في أنظمة التربية الحيوانية خاصة المنتجة للحليب (6) منها التتراسيكلين، الأوكسي تتراسيكلين، الكلور تتراسيكلين فهي من المضادات الحيوية الواسعة الطيف والأكثر استخداماً لعلاج العدوى البكتيرية السالبة جرام والموجبة جرام في البشر والحيوانات (7) ولأغراض الوقاية وتعزيز النمو في العديد من البلدان حول العالم (8).

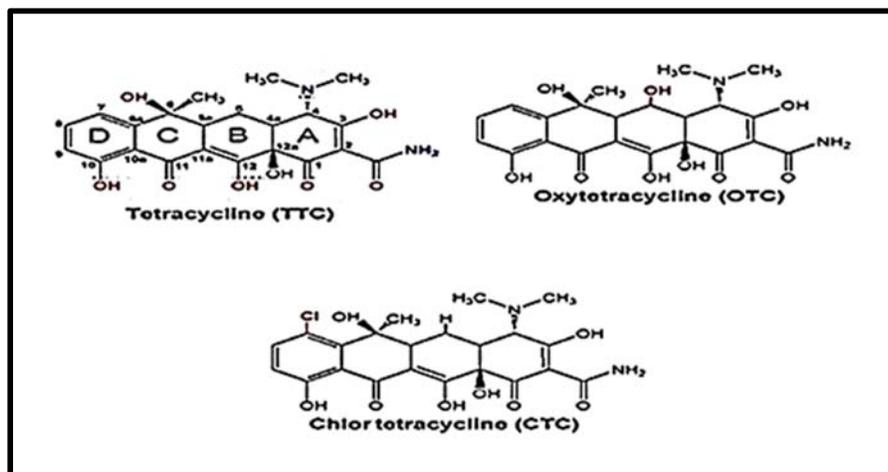
لقد حددت منظمة (FAO/ WHO) والاتحاد الأوروبي ولجنة الدستور الغذائي الحدود العليا لوجود بقايا المضادات الحيوية (التتراسيكلين والأوكسي تتراسيكلين والكلور تتراسيكلين) في الحليب ومنتجاته بحوالي 100 ميكروجرام/ لتر منفردة أو مجتمعة (9، 10، 11)، حيث نظم الحد الأقصى المسموح به على أساس السمية والامتصاص والتوزيع والتمثيل الغذائي والإفراز لهذه المضادات. تكمن مخاطر تناول الحليب المحتوي على بقايا المضادات الحيوية في انتشار البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية الشائعة الاستخدام في البشر والحيوانات من خلال السلسلة الغذائية (ظهور جينات مقاومة للمضاد الحيوي الذي تم استخدامه أو مضاد آخر يقاربه في التركيب الكيماوي أو مقاومة متعددة) مما يؤدي لفشل العلاج الطبي في كل من الحيوانات والبشر (12). في الدول النامية ارتفاع معدل انتشار مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية مرتبط بالتغيرات في ممارسات تربية الماشية (13).

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد متبقيات المضاد الحيوي التتراسيكلين والأوكسي تتراسيكلين والكلور تتراسيكلين في حليب الإبل المحلية بليبيا.

### المواد وطرائق البحث

يتكون الهيكل الأساسي للتتراسيكلين من أربع حلقات هيدروكربونية (حلقات بنزين) متجاورة (14) كما هو مبين بالشكل (1). وقواعده البلورية عبارة عن مركبات صفراء اللون عديمة الرائحة ومرة المذاق قليلاً وهي قابلة للذوبان بشكل طفيف في الماء 231 مليجرام / لتر عند درجة حرارة 25 درجة مئوية ودرجة pH 7. ثابت عند التسخين إذ لا يوجد فرق كبير بين متوسط تركيز بقايا التتراسيكلين في الحليب قبل وبعد التسخين (15) التتراسيكلين متوفر كمنتج بيطري في السوق الليبية كما مبين بالجدول (1) (16) يشكل التتراسيكلين مركبات غير قابلة للامتصاص مع الكاتيونات ثنائية التكافؤ وثلاثية التكافؤ مثل  $Ca^{+2}$ ،  $Mg^{+2}$ ،  $Al^{+3}$ ،  $Fe^{+2}$  و  $Zn^{+2}$  لأنها تتشابه مع التتراسيكلين مما يؤدي إلى تشكل معقدات ضعيفة الذوبان، يتم امتصاص التتراسيكلين بشكل ضعيف في الجهاز الهضمي للحيوانات (17). يمتص التتراسيكلين بسرعة عن طريق الحقن (في الوريد أو العضلة أو في حلمات الضرع للسيطرة على التهاب الضرع أو تحت الجلد)، ويخرج عن طريق البول والعصارة الصفراوية. يعطى تأثير ممتد المفعول عند حقنه بالعضل في الماشية والجمال والأغنام وتحت الجلد في الدواجن والرومي، يمتاز بقدرته على الانتشار بمختلف أنسجة الجسم بنسبة عالية من الإتاحة الحيوية وفترة نصف العمر ( $t_{1/2}$ ) له حوالي هو 8-10 ساعات وقد تصل إلى 57-105 ساعة وتسبب الفشل الكلوي علي حسب نوع التتراسيكلين المستخدم (14).

الكشف عن متبقيات المضاد الحيوي التتراسيكلين ومشتقاته في حليب الإبل المحلية في ليبيا



شكل (1). التركيب الكيميائي للمضاد الحيوي التتراسيكلين، الأوكسي تتراسيكلين، الكلور تتراسيكلين

جدول (1) التتراسيكلين متوفر كمنتج دوائي بيطري في السوق الليبية على النحو التالي.

Chemical name	Generic name	Trade name	Therapeutic Administration	Withdrawal period /day.
Tetracycline	Tetracycline hydrochloride	TetraMed 324 HCA (Avico®, Jordan)	Oral	14 – 7
5-Hydroxytetracycline	Oxytetracycline hydrochloride	Oxytetra – AL @ 500 powder (AAHP®, Algeria), Tetramad 50%® injection (Medmac®, Jordan), neomycin sulphate 500mg+oxytetracycline 300mg+bolusalfa A.Q 10g/10g intramamary syringe 10g	Oral / parenteral	28 - 15
7-Chlortetracycline	Chlortetracycline hydrochloride	Chlortetra vet – wsp100g sachet (Avico®, Jordan) (Adwia·Egypt)	Oral	10 – 4

## 1. المواد الكيميائية والكواشف

المواد الكيميائية ومحاليل المعايرة القياسية للتتراسيكلين TCs (نسبة النقاوة 99 %) والعمود الخاص بمرحلة الاستخلاص الصلبة (SPE- Oasis HLB -WAT094226) تم شراؤها من (ميرك -ألمانيا وسيجما، وترس -الولايات المتحدة الأمريكية) على التوالي. أما الميثانول والأسيتونيتريل الخاص بجهاز HPLC من كاليدون، كندا. تم تحضير الماء المقطر المزوج وغير المتأين من خلال وحدة تنقية المياه Millipore.

## 2. جمع العينات

تم جمع (50) عينة حليب إبل عشوائياً من خمسة مناطق من داخل ليبيا (سبها – بني وليد – الهيشة الجديدة – ترهونة – وادي الربيع) بمعدل (عشرة عينات من كل منطقة) حيث كل عينة حليب وضعت في أنبوبة بولي بروبيلين معقمة سعتها 50 ملي لها رقم خاص حسب المنطقة المأخوذة منها (code number) تم تحليلها بمركز الرقابة على الأغذية والأدوية فرع الفلاح / طرابلس. مع العلم بأن منطقة الهيشة الجديدة هي الشاهد لخلو عيناتها من بقايا المضادات الحيوية الثلاثة. (التتراسيكلين، الكلور تتراسيكلين، الأوكسي تتراسيكلين).

## لطيفة نصر الهويزل وآخرون

### 3. تحضير العينة

تم وفقاً لكل من (18، 19)، خلط 1.5 ملي من عينة الحليب مع 6 ملي من محلول مكلفين المنظم ( $0.05 \pm 4.0$  PH) في أنبوبة البوليبروبيلين المعقمة سعتها 10 ملي، رجت بواسطة الخلاط الكهربائي (vortex) لمدة دقيقة ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي (3000 دورة لمدة 10 دقائق)، بعد عملية الفصل بواسطة الطرد المركزي تم التخلص من طبقة الدهن الطافية أو العائمة ثم نقل الجزء المصفى إلى أنبوبة بوليبيروبيلين معقمة سعتها 10 ملي، أضيف 6 ملي من محلول مكلفين المنظم للجزء المتبقي وتم وضعه في جهاز الطرد المركزي (3000 دورة في 3 دقائق)، تم تصفية الجزء المتبقي من عملية الفصل (أ، ب) من خلال مرشح  $0.45 \mu\text{m}$  بولي فينايل داي فلورايد ثم إخضاعه للاستخلاص عن طريق مرحلة الاستخلاص الصلبة باستخدام (SPE cartridge Oasis HLB-WAT094226) (20). الذي تم تنشيطه ب 3 مل من الميثانول ثم شطفه ب 2 مل من الماء منزوع الأيونات. تم تحميل 10 ملي (الجزء المصفى من الطرد المركزي) بمعدل تدفق 0.5 مل / دقيقة. تم غسل العمود ب 1 مل من الميثانول بنسبة 5% في الماء منزوع الأيونات. تمت إزالة بقايا النترات باستخدام 1 مل من الميثانول 100% الخاص بجهاز HPLC بمعدل تدفق 0.5 مل / دقيقة. تم تبخير الحجم النهائي، حوالي 2 مل ثم حقنه في جهاز السائل اللوني عالي الأداء (HPLC) لتحليله. كل القياسات أخذت بنظام (isocratic mode) عندما تتم عملية فصل مواد المزيج مع المحافظة على التركيب الثابت لمكونات الطور المتحرك، فإن هذه العملية تسمى (الإمرار المتماثل).

### 4. المنحنيات القياسية للمعايرة

تم تحضير المحاليل القياسية للمعايرة (المحاليل الأصلية Individual stock solutions) بإذابة 25 ملجم نترات سيليكون في 25 ملي ميثانول (تركيزه 1000 جزء في المليون) لكل نوع من النترات سيليكون. والمحاليل المخففة (work solutions) تم تحضيرها لكل مضاد حيوي بتخفيف المحاليل الأصلية عند مدى (0.01 - 0.01 mg/ml) في الميثانول وفقاً لمستوى بقايا المضاد المتوقعة. تم إعداد محاليل قياسية مختلطة لمعايرة وحساب بقايا TCs في وقت واحد كما مبين بالأشكال (2، 3، 4، 5).

### 5. تحليل جهاز السائل اللوني عالي الأداء (HPLC)

تم استخدام جهاز (HPLC-Shimadzu, corp. Kyoto, Japan) الذي تم تجهيزه بمضخة Bamant طراز-LC-20AT، (كاشف UV-vis طراز SPD-20AV، اليابان) تم ضبطه على 365 نانومتر، (جهاز أخذ عينات تلقائي طراز SIL-ACHT، اليابان) تم إجراء الفصل في ظل ظروف متساوية.

الظروف الكروماتوغرافية كانت على النحو التالي:

– العمود Ascentis Express® C8

– الأبعاد 150mm \* 4.6mm \* 2.7  $\mu\text{m}$

– معدل التدفق 0.8 ملي / دقيقة.

– درجة الحرارة الفرن 25°C.

– الكاشف UV/Vis at 365 nm

– حجم الحقن 30  $\mu\text{L}$

الطور المتحرك (mobile phase) خليط من:

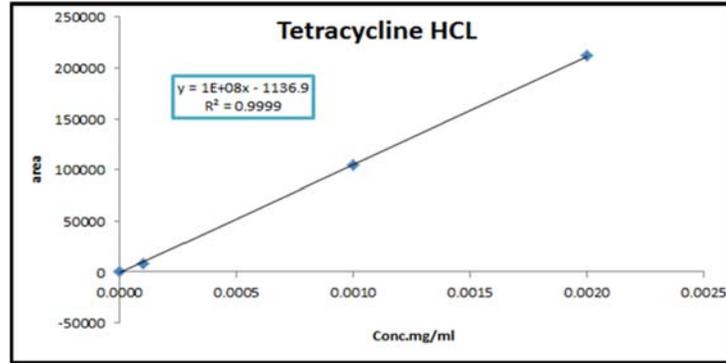
حمض الأكساليك 0.05 مول/لتر 75%

أسيتون ترايل 24%

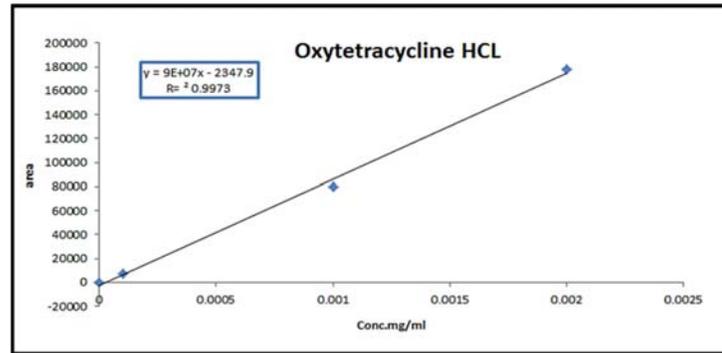
ميثانول (حجم / حجم/حجم) 10%، عند (PH = 4) تم خلطها وتصفيتها من خلال مرشح  $0.45 \mu\text{m}$  بولي فينايل داي فلورايد.

تم اكتشاف النترات سيليكون عند زمن الاحتفاظ البالغ 3.07 دقيقة، الأوكسيتترات سيليكون عند زمن الاحتفاظ البالغ 2.72 دقيقة، الكلور نترات سيليكون عند زمن الاحتفاظ البالغ 5.09 دقيقة.

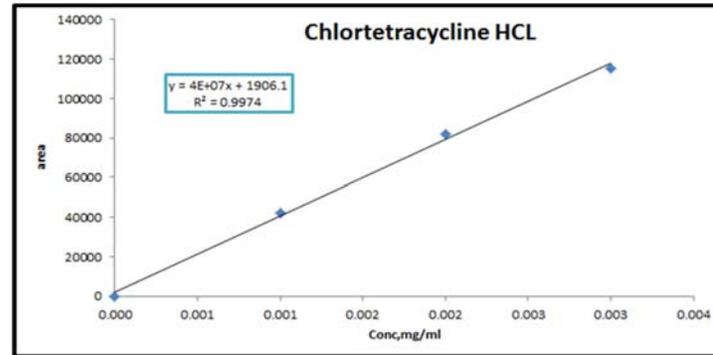
الكشف عن متبقيات المضاد الحيوي التتراسيكلين ومشتقاته في حليب الإبل المحلية في ليبيا



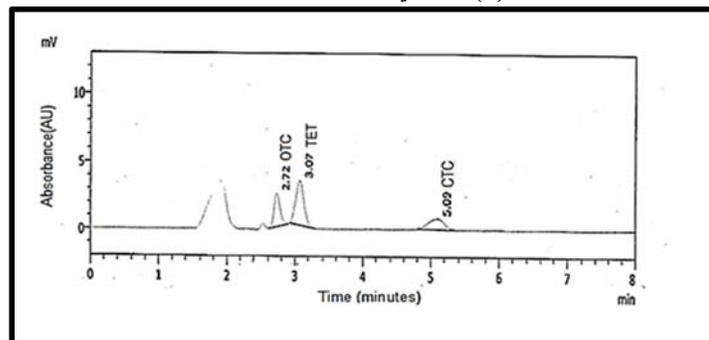
شكل (2) منحنى المعايرة للتتراسيكلين.



شكل (3) منحنى المعايرة للأوكسي تتراسيكلين.



شكل (4) منحنى المعايرة للكلور تتراسيكلين.



شكل (5). رسم كروماتوجرافي يوضح خليط محاليل المعايرة القياسية (التتراسيكلين، الأوكسي تتراسيكلين، الكلور تتراسيكلين بتركيز 0.001 mg/ml) مع زمن الاحتفاظ.

## لطيفة نصر الهويزل وآخرون

### 6. التحليل الإحصائي

تم إجراء تحليل البيانات باستخدام برنامج البرزم الإحصائية للعلوم الاجتماعية (IBM SPSS Statistics (20) <sup>(21)</sup> والتعبير عن النتائج على أنها متوسط التركيز  $\pm$  الخطأ المعياري (Mean  $\pm$ SD).

#### النتائج والمناقشة

تم التأكد من صحة الطريقة المتبعة في تحديد بقايا النتراتريكليين ومشتقاته في عينات الحليب من خلال تحديد المعادلة الخطية لمنحنيات المعايرة القياسية ونسبة الاسترداد والانحراف المعياري النسبي لمحاليل المعايرة القياسية وزمن الاحتفاظ بمحاليل المعايرة القياسية وحدود الكشف والحدود الكمية وغيرها من النتائج وهي تتفق مع قرار المفوضية الأوروبية EC/2002/657. كما هو مبين بالجدول (2)، الذي يوضح بعض النتائج المتحصل عليها من تحليل جهاز (HPLC) لمحاليل المعايرة القياسية.

#### جدول (2). بعض النتائج المتحصل عليها من تحليل جهاز (HPLC) لمحاليل المعايرة القياسية.

العامل	التتراسيكلين	الأوكسيبتتراسيكلين	الكلوروتتراسيكلين
نظام تركيز منحنى المعايرة الخطية (mg/ml) Linear Calibration Curve Concentration Range	0.0001 – 0.002	0.0001 – 0.002	0.001– 0.003
المعادلة الخطية The linear equation	Y=86788120.8 X	Y=106345733.5 X	Y=38636600 X
أقل منطقة ذروة (mg/ml)	7314	8643	41821
أعلى منطقة ذروة (mg/ml)	178105 M	211949	115459
زمن الاحتفاظ (دقيقة) Retention time	2.72	3.07	5.09
معامل الارتباط Correlation coefficient	0.997	0.999	0.997
حد الكشف (µg/l) The limit of detection (LOD)	5	5	20
الحد الكمي (µg/l) limit of quantification (LOQ)	15	15	60
معامل الاختلاف % C.V	1.2	1.4	5.2
نسبة الاسترداد % Recovery	2.49 $\pm$ 93.5	2.65 $\pm$ 91.5	3.71 $\pm$ 88.1

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي لبيانات الدراسة (تحديد بقايا النتراتريكليين والأوكسي تتراتريكليين والكلوروتتراسيكلين في حليب الإبل المحلية) بواسطة جهاز السائل اللوني عالي الأداء انخفاض مستوي تركيز بقايا النتراتريكليين في عينات الحليب التي تم تحليلها (50 عينة) حيث أنها كانت ضمن الحد المسموح بها أقل من (100 ميكروجرام/لتر) من قبل المنظمات العالمية مثل منظمة الأغذية والزراعة (FAO) ومنظمة الصحة العالمية (WHO) والاتحاد الأوروبي (10، 11). كما هو مبين بالجدول رقم (4،3) والشكل رقم (7،6) أن التراكيز المتبقية من النتراتريكليين المكتشفة في عينات الحليب (المجمعة من منطقة سبها وبني وليد وترهونة ووادي الربيع) باستخدام تقنية التحليل الكروماتوجرافي بواسطة جهاز السائل اللوني عالي الأداء HPLC-UV بطول موجي 365 نانومتر. كانت على النحو التالي: تم اكتشاف بقايا النتراتريكليين في 13 عينة (26%)، بحيث 11 عينة (22%) احتوت على بقايا النتراتريكليين، عينتين (4%) احتوت على بقايا الكلوروتتراسيكلين بمتوسط تركيز (2.2  $\pm$  19.89) ميكروجرام/ لتر، 1.7  $\pm$  17.2 ميكروجرام/ لتر، 2.6  $\pm$  24.5 ميكروجرام/ لتر، 1.5  $\pm$  24.1 ميكروجرام/ لتر (تراكيز النتراتريكليين)، 2  $\pm$  46 ميكروجرام/ لتر (تركيز الكلوروتتراسيكلين) للخمسة مناطق على التوالي. ولا وجود لبقايا الأوكسيبتتراسيكلين في جميع العينات التي تم تحليلها (50 عينة)، ربما كان هذا المضاد موجود في تراكيز أقل من حدود الكشف أولم يكن موجوداً في العينات على الإطلاق، (في جميع العينات التي تم تحليلها).

الكشف عن متبقيات المضاد الحيوي التتراسيكلين ومشتقاته في حليب الإبل المحلية في ليبيا

جدول (3). النسبة المئوية للمضادات الحيوية الثلاثة في عينات الحليب (ن = 50).

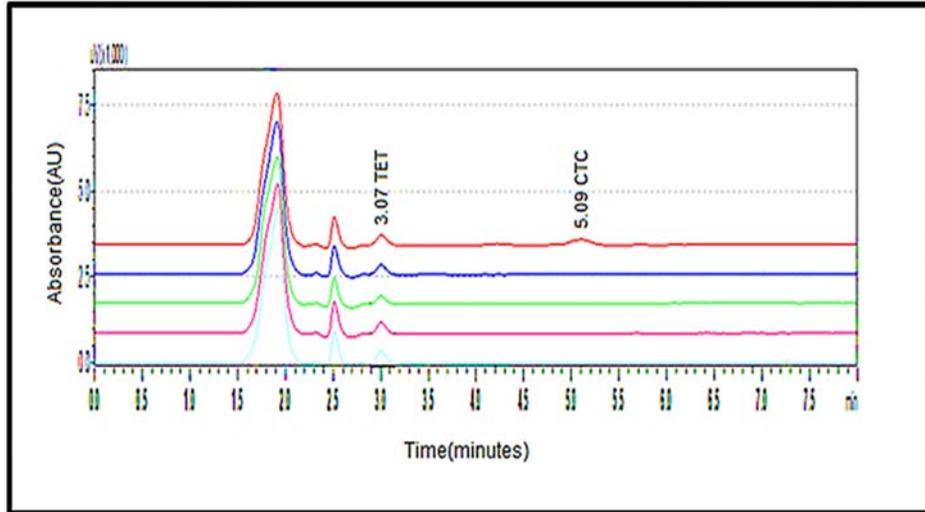
العدد الكلي للعينات ن = 50	المنطقة					المضاد الحيوي
	وادي الربيع ن = 10	ترهونة ن = 10	بني وليد ن = 10	سبها ن = 10	*الهيشة الجديدة ن = 10	
11 (22%)	5 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	0	التتراسيكلين
0	0	0	0	0	0	الأوكسيتتراسيكلين
2 (4%)	2 (10)	0	0	0	0	الكلورتتراسيكلين
13 (26%)	7 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	0	الإجمالي

\*منطقة الهيشة الجديدة هي الشاهد لخلو عيناتها من بقايا المضادات الحيوية الثلاث.

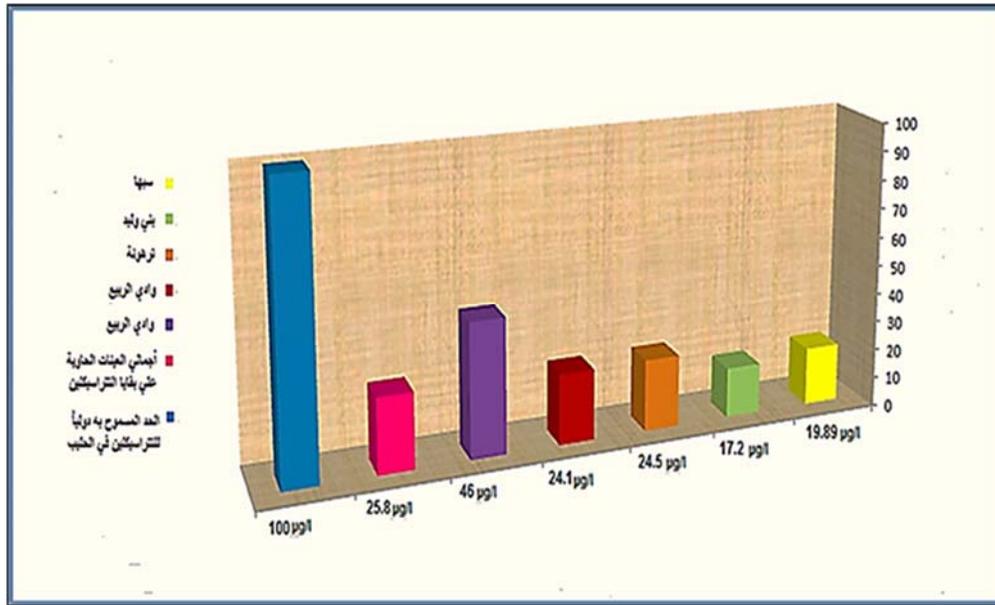
جدول (4) تركيز بقايا المضادات الحيوية (ppb) في عينات حليب الأبل التي تم تحليلها (ن=عشرة لكل منطقة).

الكلورتتراسيكلين		الأوكسيتتراسيكلين		التتراسيكلين		المنطقة
العينات الحاوية على بقايا المضاد		العينات الحاوية على بقايا المضاد		العينات الحاوية على بقايا المضاد		
العدد (%)	المتوسط ± الخطأ المعياري	العدد (%)	المتوسط ± الخطأ المعياري	العدد (%)	المتوسط ± الخطأ المعياري	
0 (0)	-----	0 (0)	-----	2 (20)	2.2±19.89	سبها
0 (0)	-----	0 (0)	-----	2 (20)	*2.6±24.5	ترهونة
0 (0)	-----	0 (0)	-----	2 (20)	1.7±17.2	بني وليد
2 (20)	2±46	0 (0)	-----	5 (50)	*1.5±24.1	وادي الربيع
الشاهد		الشاهد		الشاهد		الهيشة الجديدة

\*وجود فروق معنوية بينها وبين بقية التراكيز ( $P \leq 0.05$ ).



شكل (6) رسم كروماتوجرافي يوضح بعض العينات التي تحتوي على بقايا التتراسيكلين والكلورتتراسيكلين



شكل (7). تركيز بقايا التتراسيكلين (ppb) في (50) عينة حليب والحد المسموح به في الحليب.

من التحاليل وجد ان أقل تركيز تم الكشف عنه للتتراسيكلين كان 15.50 ميكرو جم / لتر، أما أعلى تركيز فكان 28.60 ميكرو جم/ لتر. وأقل تركيز للكور تتراسيكلين كان 44 ميكرو جم / لتر، أما أعلى تركيز فكان 48 ميكرو جم / لتر. بينت النتائج عدم وجود فرق معنوي ( $P \geq 0.05$ ) بين تركيز التتراسيكلين في عينات الحليب (المحتوية على بقاياها) المجمعة من منطقتي سبها وبني وليد وكذلك عدم وجود فرق معنوي ( $P \geq 0.05$ ) بين تركيز التتراسيكلين في عينات الحليب (المحتوية على بقاياها) المجمعة من منطقتي ترهونة ووادي الرين. بينما سجلت النتائج وجود فرق معنوي واضح ( $P \leq 0.05$ ) في تركيز التتراسيكلين في عينات الحليب (المحتوية على بقاياها) المجمعة من منطقتي ترهونة ووادي الرين مقارنة بتركيزه في عينات الحليب (المحتوية على بقاياها) المجمعة من منطقتي سبها وبني وليد. كما أوضحت النتائج أن هناك فرق معنوي واضح ( $P \leq 0.05$ ) في تركيز الكلور تتراسيكلين في عينات الحليب (المحتوية على بقاياها) المجمعة من منطقة وادي الرين مقارنة بتركيز التتراسيكلين في عينات الحليب (المحتوية على بقاياها) المجمعة المذكورة بما فيها منطقة وادي الرين. ومن خلال النتائج المتحصل عليها أتضح أن جميع التراكمات كانت ضمن الحد الأقصى المسموح به دولياً لبقايا التتراسيكلين في الحليب أي أقل من (100 ميكروجرام/ لتر).

كما وجد في هذه الدراسة ان بقايا التتراسيكلين في 13 عينة (26%)، واحتوت 11 عينة (22%) منها على بقايا التتراسيكلين، وعينتين (4%) احتوت على بقايا الكلور تتراسيكلين ولم يوجد بقايا الأوكسي تتراسيكلين حيث متوسط تركيز كل مضاد موضح بالجدول (2). أما المتوسط الكلي لكل مضاد فكان  $3.5 \pm 21.42$  للتتراسيكلين،  $2 \pm 46$  للكلور تتراسيكلين على التوالي. أفاد (22) أن 29.1% من عينات الحليب الخام التي تم تحليلها كانت أعلى من الحدود القصوى المسموح بها دولياً لبقايا التتراسيكلين. وبالمثل في الدراسة التي أجراها (23)، أعلى تركيز للتتراسيكلين كان 49.5 ميكروجرام / كجم. ومع ذلك فإن متوسط تركيز التتراسيكلين كان (2.83 ميكروجرام / كجم) أقل من مستوى MRL بأكثر ب 35 مرة، ومما تحصلنا عليه في دراستنا بحوالي 10 مرات. وجد (24) بقايا التتراسيكلين في 13% من عينات الحليب التي تم الكشف عنها بواسطة جهاز الأليزاء (ELISA) والمجمعة من مناطق مختلفة من دولة البنجاب. في بلدان أخرى من العالم كالبرازيل أبلغ كل من (25) و (26) عن ارتفاع ملحوظ في تركيز بقايا التتراسيكلين في عينات الحليب التي تم الكشف عنها 41 (27.2%)، 48 (18.5%)، كما وجد (27) في مصر بقايا التتراسيكلين في 30% من عينات الحليب بمتوسط تركيز  $7.01 \pm 3.6$  ميكروجرام/ لتر. تناولت دراسة (8) تركيز بقايا المضادات الحيوية (الأوكسي تتراسيكلين - التتراسيكلين - الكلور تتراسيكلين - الدوكسي سيكلين) في (187) عينة حليب أبقار تجارية (33 عينة حليب معقم و 154 عينة حليب مبستر) جمعت من 24 محل تجاري لبيع الحليب بإيران فكانت النتائج كالتالي: 19.78% من العينات احتوت على بقايا المضادات بمستوى أعلى من الحد المسموح به و 14.97% من العينات احتوت على بقايا المضادات بمستوي أقل من الحد المسموح به. أفاد (28) في إثيوبيا عن وجود بقايا الأوكسي تتراسيكلين في 70.58% من عينات الحليب الخام التي تم الكشف عنها بمتوسط تركيز 142 ميكروجرام / لتر بمعدل أعلى من الحدود القصوى. قام (29) بدراسة تركيز مستوى المضاد الحيوي التتراسيكلين في (432) عينة حليب أبقار مبستر من الحليب الذي يتم تسويقه من قبل بعض شركات الألبان في مدينة طهران بإيران ووجد أن (7) عينات فقط احتوت على مستوى أعلى من الحد المسموح به. وجد (18) في دراسة بجمهورية التشيك لقياس مستوى التتراسيكلين بأنواعه في (170) عينة حليب بقر خام (57 عينة حليب غير معبأ) و (113) عينة أخذت من خزانات الحليب) فأظهرت النتائج بأن

## الكشف عن متبقيات المضاد الحيوي التتراسيكلين ومشتقاته في حليب الإبل المحلية في ليبيا

التتراسيكلين موجود في كل العينات ولكن بتركيز منخفضة، الكلور تتراسيكلين لا وجود له في العينات، أما الأوكسي تتراسيكلين فموجود في حوالي (50.6%) من العينات التي تم تحليلها بمعدل يفوق الحد المسموح به. درس (30) تركيز بقايا المضاد الحيوي التتراسيكلين في (114) عينة حليب بقري (مبستر، معقم، خام) جمعت من الأسواق المحلية بمدينة أربيل بايران (24.4% حليب مبستر، 30% حليب معقم، 28.6% حليب خام) وأظهرت النتائج بأن من أجمالي العينات التي تم تحليلها احتوت على بقايا التتراسيكلين بمعدل أعلى من المستوي المسموح به (100 ميكرو جم/ لتر). حليب مبستر (87.1 ميكرو جم/ لتر)، حليب معقم (112 ميكرو جم/ لتر)، حليب خام (154.7 ميكرو جم/ لتر) أي بمعنى أن (25.4%) من العدد الكلي للعينات و(24.4%) من عينات الحليب المبستر و(30%) من عينات الحليب المعقم و(28.6%) من عينات الحليب الخام احتوت على بقايا كل من التتراسيكلين والأوكسي تتراسيكلين والكلور تتراسيكلين بمعدل أعلى من الحد المسموح به من قبل منظمة (WHO). أوضح (31) في دراسة أجريت في الأردن للكشف عن بقايا المضادات الحيوية في (70) عينة حليب إبل جمعت من جنوب الأردن أظهرت النتائج أن عينة 42 (60%) احتوت على بقايا المضادات الحيوية التتراسيكلين. في دراسة أجراها (32) للكشف عن تركيز التتراسيكلين في (734) عينة حليب إبل جمعت من (47) مزرعة ومركز توزيع في ولاية الخرطوم بالسودان أظهرت النتائج أن حوالي (42.4%) من العينات التي تم جمعها من المزارع و(23.2%) من العينات التي تم جمعها من مراكز توزيع الألبان، أي قرابة (152) ما يعادل (33.8%) عينة من أصل (734) عينة احتوت على بقايا التتراسيكلين بمستوي أعلى من الحد المسموح به. في معظم الدراسات التي تطرقنا لها كان معدل تركيز بقايا التتراسيكلين أعلى مما تحصلنا عليه في دراستنا هذه.

### الاستنتاج

هذه الدراسة أجريت بهدف الكشف عن بقايا التتراسيكلين والأوكسي تتراسيكلين والكلور تتراسيكلين في حليب الإبل المحلي. تم اكتشاف بقايا التتراسيكلين في 26% من عينات حليب الإبل المفحوصة، إلا أن جميع التراكيز كانت ضمن نطاق الحد المسموح به أقل من (100µg/L)، ولكن بسبب الأثر التراكمي لبقايا المضادات الحيوية فإنه يجب الأخذ بعين الاعتبار أنه حتى التراكيز القليلة لبقايا المضادات الحيوية في الأغذية من أصل حيواني وعلى الأمد الطويل تشكل خطر على صحة المستهلك. هذا بالإضافة إلى أن مخاطر تناول الحليب المحتوي على بقايا المضادات الحيوية تكمن في انتشار البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية الشائعة الاستخدام في البشر والحيوانات من خلال السلسلة الغذائية (ظهور جينات مقاومة للمضاد الحيوي الذي تم استخدامه أو مضاد آخر يقاربه في التركيب الكيماوي أو مقاومة متعددة)،

### التوصيات

1. يجب استخدام المضادات الحيوية المصنعة من قبل مصادر موثوقة ومعروفة ومصروح بها من قبل الجهات المختصة.
2. توعية وتوجيه مربي الحيوانات، ومصنعي الأغذية إلى مخاطر وجود تلك المتبقيات في الأغذية ذات المنشأ الحيواني على المستهلك مع مراعات التقيد بالجرعات الصحيحة سواء العلاجية أو الوقائية وكذلك التأكد من تاريخ صلاحيتها.
3. مراقبة المواد المستوردة لمعرفة الشركات التي تستخدم المضادات الحيوية في صناعة الأغذية وحظر الاستيراد منها.
4. ضرورة التأكد من خلو المنتجات الحيوانية (اللحوم والألبان) من بقايا المضادات الحيوية وذلك بمراعاة فترة السحب قبل ذبح الحيوان أو استهلاك منتجاته إلا بعد هذه المدة.
5. يجب استخدام المضادات الحيوية في حيوانات المزرعة بموجب وصفة طبية بيطرية، وفقاً للمبادئ التوجيهية التي يقدمها الطبيب البيطري.
6. يجب أن يتم توفير المعدات الحساسة والتقنيات التحليلية الحديثة ذات الأهمية القصوى في طرق الكشف (اختبارات الفحص الدوري).
7. أن يكون هناك الدعم الكافي للبحوث العلمية من حيث تمويل البحوث الزراعية والطبية الخاصة بدور استخدامات المضادات الحيوية في المجال الحيواني وما ينجم عنه من خطر على صحة المستهلك.
8. يجب أن تكون هناك مواصفة قياسية ليبية خاصة بالمضادات الحيوية لأجل العمل بينودها والالتزام بمعاييرها.
9. ليست هناك دراسات موازية معتمدة في ليبيا لذا يجب إجراء دراسات أخرى لتقييم بقايا الأدوية الأخرى في عينات الحليب لضمان سلامة المستهلك.

### المراجع

- 1- Pereira, P.C. (2014). Milk nutritional composition and its role in human health. Nutrition, 30(6):619-627.
- 2- Shori, A.B. (2015). Camel milk as a potential therapy for controlling diabetes and its complications: a review of in vivo studies. J. Food and Drug Analysis, 23(4): 609-618.

- 3- Orwa, J.D.; Matofari, J.W.; Muliro, P.S. and Lamuka, P. (2017). Assessment of sulphonamides and tetracyclines antibiotic residue contaminants in rural and peri urban dairy value chains in Kenya. *Int. J. Food Contamination*, 4(1): 1-11.
- 4- Bayou, K. and Haile, N. (2017). Review on Antibiotic residues in food of animal origin: economic and public health impacts. *Appl. J. Hygiene*, 6(1): 1-8.
- 5- Jank, L.; Martins, M.T.; Arsand, J.B.; Motta, T.M.C.; Feijó, T.C.; dos Santos Castilhos, T.; Hoff, R.B.; Barreto, F. and Pizzolato, T.M. (2017). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry multiclass method for 46 antibiotics residues in milk and meat: development and validation. *Food Analytical Methods*, 10(7): 2152-2164.
- 6- Zhang, Y.D.; Zheng, N.; Han, R.W.; Zheng, B.Q.; Yu, Z.N.; Li, S.L.; Zheng, S.S. and Wang, J.Q. (2014). Occurrence of Tetracyclines, Sulfonamides, Sulfamethazine and Quinolones in Pasteurized Milk and UHT Milk in China's Market. *Food Control*, 36(1):238-242.
- 7- Ibrahim, Z.; Shehi, A.; Hajrulai, Z.; Mata, E. and Murtezani, A. (2013). Detection and risk assessment of beta-lactam residues in Kosovo's milk using ELISA method. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5(4): 446-450.
- 8- Aalipour, F.; Mirlohi, M. and Jalali, M. (2014). Determination of antibiotic consumption index for animal originated foods produced in animal husbandry in Iran, 2010. *J. Environ. Health Sci. Eng.*, 12(42): 1-7.
- 9- European Commission .2010. Commission Regulation (EU) 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 Euro Union L15*:1–72.
- 10- Codex Alimentarius Commission (2015). Maximum Residue Limits (MRL) and Risk Management Recommendations (RMRS) for Residues of Veterinary Drugs in Foods. in *Proceedings of the 38th Session of the Codex Alimentarius Commission*, vol. (40): 1–40.
- 11- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (2012). At: <http://www.fao.org/3/Abp387e>.
- 12- Toutain, P.L.; A. Ferran, and A. Bousquet-Me' Lou (2011). Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. In: *Comparative and Veterinary Pharmacology, Handbook of Experimental Pharmacology* 199, F. Cunningham Et Al. (Eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Doi: 10.1007/978-3-642-10324-7\_2.
- 13- Pehrsson, E.C.; Tsukayama, P.; Patel, S.; Mejía-Bautista, M.; Sosa-Soto, G.; Navarrete, K.M.; Calderon, M.; Cabrera, L.; Hoyos-Arango, W.; Bertoli, M.T. and Berg, D.E. (2016). Interconnected Microbiomes and Resistomes in Low-Income Human Habitats. *Nature*, 533(7602):212-216.
- 14- Nelson, M.L. and Levy, S.B., 2011. The History of the Tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1241(1):17-32.
- 15- Kellnerová, E.; Navrátilová, P. and Borkovcová, I. (2015). Effect of pasteurization on the residues of tetracyclines in milk. *Acta Veterinaria Brno*, 83 (10): 21-26.
- 16- مركز الصحة الحيوانية ومركز الرقابة على الأغذية والأدوية (2018). تقرير. طرابلس – ليبيا.
- 17- Agwuh, K.N. and MacGowan, A. (2006). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 58 (2):256-265.
- 18- Navratilova, P.; Borkovcova, I.; Dračková, M.; Janštova, B. and Vorlova, L. (2009). Occurrence of tetracycline, chlortetracycline, and oxytetracycline residues in raw cow's milk. *Czech J. Food Sci.*, 27(5):379-385.
- 19- Michael, S.Y. and Kim, V. (2013). HPLC/UV Determination of Tetracyclines in Milk Using Mixed-Mode SPE and eXtended Performance [X P] 2.5 μm Columns, Waters Corporation, Milford, MA, Produced in the U.S.A. 720004582EN AG.
- 20- Harvey, D. (2019). *Classifying Separation Techniques*. Chemistry Libretexts.

- 21- SPSS "Statistical Package for Social Science"( 2008). Computer Software, IBM, SPSS Ver. 20.0, SPSS Company, London, UK.
- 22- Alomirah, H.; Al-Mazeedi, H.; Al-Zenki, S.; Al-Aati, T., et al. (2007). Pevalence of residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting antimicrobial residues in milk and dairy products in the state agents. Trends in Analytical Chemistry, (26): 967-979.
- 23- Bilandžić, N.; Solomun, K.B.; Varenina, I. and Jurković, Z. (2011). Concentrations of veterinary drug residues in milk from individual farms in Croatia. Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka, 61(3):260-267.
- 24- Zanella, G.N.; Mikcha, J.M.G.; Bando, E., Siqueira, V.L.D. and Machinski Jr, M. (2010). Occurrence and antibiotic resistance of coliform bacteria and antimicrobial residues in pasteurized cow's milk from Brazil. J. Food Protection, 73(9):1684-1687.
- 25- Bando, E.; Oliveira, R.C.; Ferreira, G.M.Z. and Machinski Jr, M. (2009). Occurrence of antimicrobial residues in pasteurized milk commercialized in the state of Paraná, Brazil. J. Food protection, 72(4): 911-914.
- 26- Gaurav, A.; Gill, J.P.S.; Aulakh, R.S. and Bedi, J.S. (2014). ELISA based monitoring and analysis of tetracycline residues in cattle milk in various districts of Punjab. Veterinary World, 7(1):26-29.
- 27- Ahmed, K.M.; Hafez, R.S.; Morgan, S.D. and Awad, A.A. (2015). Detection of some chemical hazards in milk and some dairy products. Afr. J. Food Sci. 9:187-193.
- 28- Rassouli, A.; Zamani, Z.; Bahonar, A.; Shams, G. and Abdolmaleki, Z. (2014). A trace analysis of oxytetracycline and tetracycline residues in pasteurized milk supplied in Tehran. Iranian J. Veter. Med., 8(2):119-123.
- 29- Syit, D.A. (2011). Detection and Determination of oxytetracycline and penicillin g antibiotic residue levels in bovine bulk milk from Debrezeit and Nazareth Dairy Farms. In: Proceedings of the 1<sup>st</sup> International Technology, Education and Environment Conference African Society for Scientific Research.
- 30- Abbasi, M. M.; Babaei, H.; Ansarin, M. and Nemati, M. (2011). Simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk samples by solid phase extraction and HPLC-FL method. Adv. Pharmac. Bull., 1(1): 34-39.
- 31- Hawari, A.D. and Hassawi, D.S. (2008). Mastitis in one humped she-camels (*Camelus dromedarius*) in Jordan. J. Biolog. Sci., 8(5):958-961.
- 32- Salman, M.A.; El Nasri, A.H. and Osman, M.A.I. (2012). Detection of antibiotic residues in milk using Delvo test kit and the disc assay methods in Khartoum State, Sudan. Uofk, J. Vet. Med. Anim. Prod., 3(2):3-15.

## Detection of residues of the antibiotic tetracycline and its derivatives in the milk of local camels in Libya

Latifa N. Al-Huwaizel<sup>1</sup>, Abdullah A. Ahmed<sup>1</sup>, Adel M. Abu Shufa<sup>2</sup> and Rafiq M. Tagiuri<sup>3</sup>

- 1- Department of Animal Production - Agricultural and Animal Research Center.
- 2- Medicinal and Pharmaceutical Chemistry Department, Pharmacy Faculty, University of Tripoli.
- 3- Department of Animal Production - Agricultural and Animal Research Center.

**E-mail: latifaflower@yahoo.com**

### ABSTRACT

Different types of antibiotics are used worldwide in the veterinary sector randomly to promote growth, treatment or prevention of diseases especially mastitis, so this study was conducted with the aim of identifying tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline residues in local camel milk, in 50 samples randomly collected from five regions within Libya; Sabha, Bani Walid, Al heisha Al Jadidah, Tarhuna and Wadi Al-Rabie, at a rate of ten samples from each region. Where the new Al Heisha area was the control area. The remaining concentrations of tetracycline in milk samples were measured using chromatographic analysis technique by HPLC-UV with a wavelength of 365 nm. The results of the study showed the presence of tetracycline residues in 13 (26%) samples, so that 11 (22%) samples contained tetracycline residues, with an average concentration of  $19.89 \pm 2.2$ ,  $17.2 \pm 1.7$ ,  $24.5 \pm 2.6$ ,  $24.1 \pm 1.5$   $\mu\text{g/L}$  for the areas of Sabha, Bani Walid, Tarhuna, Wadi Al-Rabie, respectively, besides 2 (4%) of samples containing chlortetracycline residues with an average of  $46 \pm 2$  ( $\mu\text{g/L}$ ) for Wadi Al-Rabie area only. Also, there was no oxytetracycline residues in analysed samples. The samples collected from Al Heisha Al jadidah area were free of any residue of the three tetracycline types. There was no significant difference ( $P \geq 0.05$ ) between tetracycline concentration in milk samples collected from Sabha and Bani Walid and those collected from Tarhuna and Wadi Al-Rabie regions. There was a clear significant difference ( $P \leq 0.05$ ) in the concentration of tetracycline in milk samples collected from Tarhuna and Wadi Al-Rabie regions compared to its concentration in milk samples collected from Sabha and Bani Walid areas. There is a significant difference ( $P \leq 0.05$ ) in the concentration of chlortetracycline in milk samples collected from Wadi Al-Rabie compared to all the mentioned areas, including Wadi Al-Rabie region. It was concluded from this study that all concentrations were within the internationally permissible maximum tetracycline residue in milk (100  $\mu\text{g/L}$ ). Keep in mind that the risk of consuming milk containing antibiotic residues lies in the spread of antibiotic-resistant bacteria commonly used in humans and animals through the food chain.

**Keywords:** Residues Camel Milk, Tetracycline, Chlortetracycline, Oxytetracycline.