المجلة الدولية للتنمية ـ المجلد الثالث عشر العدد الثالث (2024) :17-28
International Journal of Development, Vol.13, No. (3) (2024):17-28
ISSN: 2314-5552 ISSN: 2314-5560 (Online)
www. jaid.journals.ekb.eg e-mail: ijd_fas@yahoo.com

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

لطيفة نصر الهويزل[1]، عبد الله أبو بكر أحمد[1]، عادل محمد أبو شوفة[2]، رفيق محمد التاجوري[3]
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

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 HPLC - UV بطول موجي 365 نانومتر. أوضحت نتائج الدراسة وجود بقايا التتراسيكلين في 13عينة (26 %) ، حيث أحتوت 11 عينة (22 %) على بقايا التتراسيكلين، بمتوسط تركيز (19.89 ± 2.2، 17.2 ± 1.7، 24.5 ± 2.6، 24.1 ± 1.5)(ميكروجرام/ لتر) لمناطق سبها، بني وليد، ترهونة، وادي الربيع على التوالي، كما أحتوت عينتين (4 %) على بقايا الكلورتتراسيكلين بمتوسط 46 ± 2 (ميكروجرام/ لتر) لمنطقة وادي الربيع فقط، ولا وجود لبقايا الأوكسيتتراسيكلين 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($P\geq0.05$) بين تركيز التتراسيكلين في عينات الحليب المجمعة من منطقتي سبها وبني وليد والمجمعة من منطقتي ترهونة ووادي الربيع بينما وجد فرق معنوي واضح ($P\leq0.05$) في تركيزه في عينات الحليب المجمعة من منطقتي ترهونة ووادي الربيع مقارنةً بتركيزه في عينات الحليب المجمعة من منطقتي سبها وبني وليد. و هناك فرق معنوي واضح ($P\leq0.05$) في تركيز الكلورتتراسيكلين في عينات الحليب المجمعة من منطقة وادي الربيع مقارنة 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 (100ميكروجرام/ 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، الأوكسيتتراسيكلين

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 اهتماما متزايداً بحليب الإبل في هذه الآونة 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 ألبان 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 المسئولة عن إصابة الجسم بالأمراض السرطانية[(2)]. بالرغم من كل هذه المزايا

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 لاحقا 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 أخر غير مباشر لوصول بقايا المضادات الحيوية إلى الإنسان، حيث أدت هذه البقايا إلى خسارة في صناعة منتجات الحليب (مثل الجبن والزبد واللبن) في أوروبا قدرت بأكثر من 200.000.000 يورو سنوياً .وبالرغم من هذه الخسائر فقد تبين أن حوالي من 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 بفترات الأمان (الفترة بين إعطاء الدواء وجمع المنتجات الحيوانية) الخاصة بها يؤدي إلى ترسب بقاياها في المنتجات الحيوانية[5].

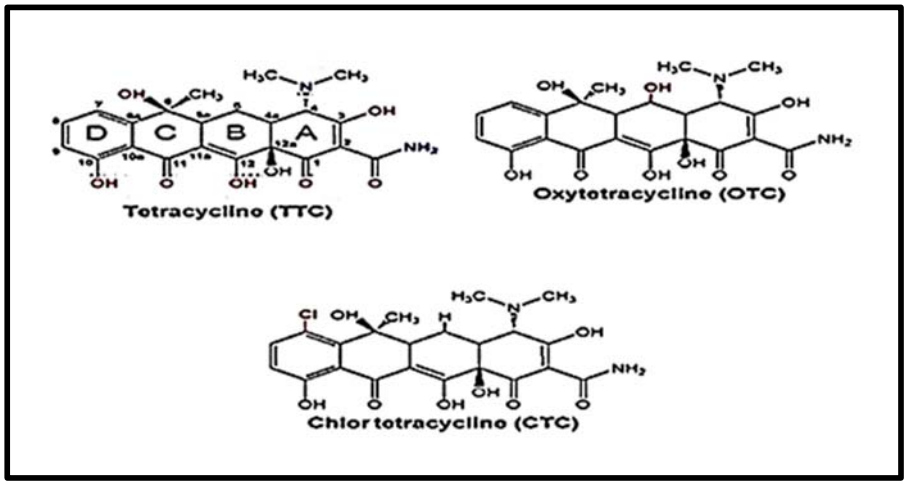
التتراسيكلينات من بين أكثر الأصناف البيطرية الشائعة الاستخدام في أنظمة التربية الحيوانية خاصة المنتجة للحليب[6] منها التتراسيكلين، الأوكسي تتراسيكلين، الكلورتتراسيكلين فهي من المضادات الحيوية الواسعة الطيف والأكثر استخدامًا لعلاج العدوى البكتيرية السالبة جرام والموجبة جرام في البشر والحيوانات[7] ولأغراض 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 والكلورتتراسيكلين) 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 أخر 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 والكلورتتراسيكلين 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} ^{3} $^{+}$/، وZn^{+2} لأنها تتشابك مع التتراسيكلين مما يؤدى 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].



شكل (1). التركيب الكيميائي للمضاد الحيوي التتراسيكلين، الأوكسيتتراسيكلين، الكلورتتراسيكلين

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 المزدوج 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 ــ بني وليد ــ الهيشة الجديدة ــ ترهونة ــ 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 الثلاث. (التتراسيكلين، الكلورتتراسيكلين، الأوكسيتتراسيكلين).

3. تحضير العينة

تم وفقاً لكل من [18، 19])، خلط 1.5 ملي من عينة الحليب مع 6 ملي من محلول مكلفين المنظم (PH 4.0 ±0.05) 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 إلي أنبوبة بوليبروبيلين معقمة سعتها 10ملي, 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 0.45µm 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 التتراسيكلين 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 تسمي (الإمرار المتماثل).

4. المنحنيات القياسية للمعايرة

تم تحضير المحاليل القياسية للمعايرة (المحاليل الأصلية Individual stock solutions) بإذابة 25 ملجم تتراسيكلين في25 ملي ميثانول (تركيزه 1000 جزء في المليون) لكل نوع من التتراسيكلين.

والمحاليل المخففة (work solutions) تم تحضـــيرها لكل مضـــاد حيوي بتخفيف المحاليل الأصـــلية عند مدى (001. 0mg/ml -0.01 mg/ml) في الميثانول وفقاً لمستوى بقايا المضـاد المتوقعة. ثم تم إعداد محاليل قياسـية 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، أمريكا) ، (كاشف UV-vis طرازSPD-20AV ، اليابان) تم ضبطه على 365 نانومتر، (وجهاز أخذ عينات تلقائي طرازSIL-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 µm
- معدل التدفق 0.8 ملي / دقيقة.
- درجة الحرارة الفرن 25°C.
- الكاشف UV/Vis at 365 nm
- حجم الحقن 30 µL

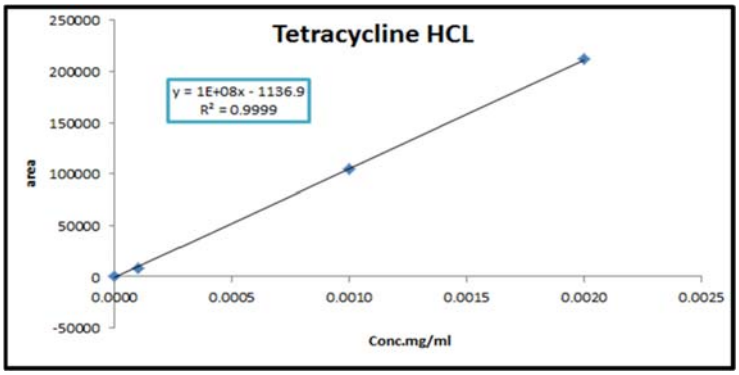
الطور المتحرك (mobile phase) خليط من:

حمض الأكساليك 05.مول/ لتر 75%

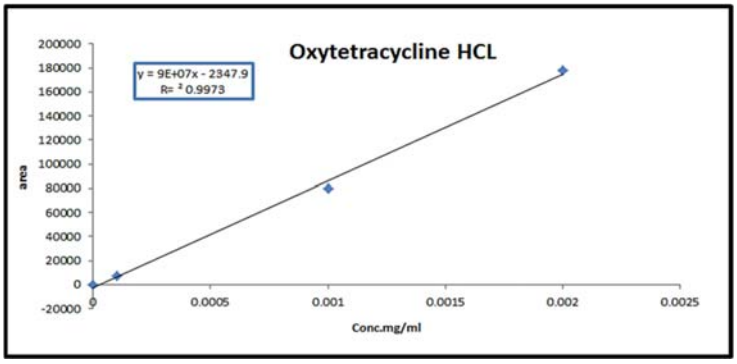
أسيتون ترايل 24%

ميثانول (حجم / حجم/حجم) **10**%، عند (PH = 4) تم خلطها وتصفيتها من خلال مرشح 0.45µm بولي فينايل داي فلورايد.

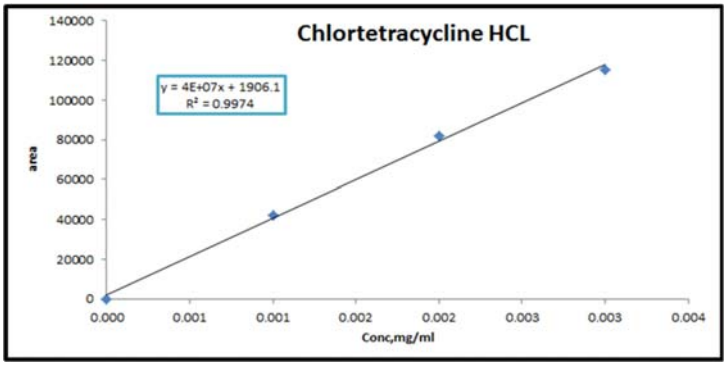
تم اكتشاف التتراسيكلين عند زمن الاحتفاظ البالغ 3.07 دقيقة، الأوكسيتتراسيكلين عند زمن الاحتفاظ البالغ 2.72 دقيقة، الكلورتتراسيكلين عند زمن الاحتفاظ البالغ 5.09 دقيقة.



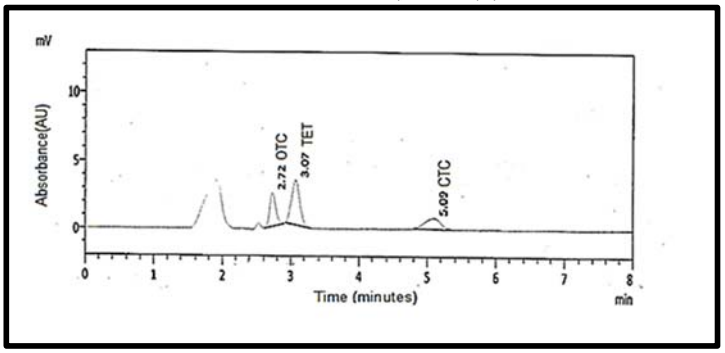
شكل (2) منحني المعايرة للتتراسيكلين.



شكل (3). منحني المعايرة للأوكسي تتراسيكلين.



شكل (4). منحني المعايرة للكلور تتراسيكلين.



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

6. التحليل الإحصائي

تم إجـــراء تحـــليل البيـــانات باستـــخدام برنامـــج الـــرزم الإحصائيـــة للعلـــوم الاجتماعيـــة (IBM SPSS Statistics 20) [21] والتعبير عن النتائج على أنها متوسط التركيز ± الخطأ المعياري (Mean ±SD).

النتائج والمناقشة

تم التأكد من صـــحة الطريقة المتبعة في تحديد بقايا التتراســيكلين ومشـــتقاته في عينات الحليب من خلال تحديد المعادلة الخطية لمنحنيات المعايرة القياسية ونسبة الاسترداد والانحراف المعياري النسبي لمحاليل المعايرة القياسية وزمن الاحتفاظ بمحاليل المعايرة القياســية وحدود الكشـــف والحدود الكمية وغيرها من النتائج وهي تتفق مع قرار المفوضـــية الأوروبية EC/2002/657. كما هو مبين بالجدول (2)، الذي يوضـــح بعض النتائج المتحصـــل عليها من تحليل جهاز (HPLC) لمحاليل المعايرة القياسية.

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

العامل	التتراسيكلين	الأوكسيتتراسيكلين	الكلورتتراسيكلين
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=106345733.5 X	Y=86788120.8 X	Y=38636600 X
أقل منطقة ذروة (mg/ml)	8643	7314	41821
أعلي منطقة ذروة (mg/ml)	211949	178105 M	115459
زمن الاحتفاظ (دقيقة) Retention time	3.07	2.72	5.09
معامل الارتباط Correlation coefficient	0.999	0.997	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 %	1.4	1.2	5.2
نسبة الاسترداد Recovery %	2.65±91.5	2.49±93.5	3.71±88.1

أظهرت نتائج التحليل الإحصائي لبيانات الدراسة (تحديد بقايا التتراسيكلين والأوكسي تتراسيكلين والكلورتتراسيكلين في حليب الإبل المحلية) بواسطة جهاز السائل اللوني عالي الأداء انخفاض مستوي تركيز بقايا التتراسيكلين 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[9، 10، 11]. كما هو مبين بالجدول رقم (4،3) والشكل رقم (7،6) أن التراكيز المتبقية من التتراسيكلين 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 التتراسيكلين في 13 عينة (26 %)، بحيث 11عينة (22 %) احتوت على بقايا التتراسيكلين، عينتين 2 (4 %) احتوت على بقايا الكلورتتراسيكلين بمتوسط تركيز (19.89 ± 2.2 ميكروجرام/ لتر، 17.2 ± 1.7 ميكروجرام/ لتر، 24.5 ± 2.6 ميكروجرام/ لتر، 24.1 ± 1.5 ميكروجرام/ لتر (تراكيز التتراسيكلين)، 46 ± 2 ميكروجرام/ لتر (تركيز الكلورتتراسيكلين) للخمسة مناطق على التوالي. ولا وجود لبقايا الأوكسيتتراسيكلين 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).

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

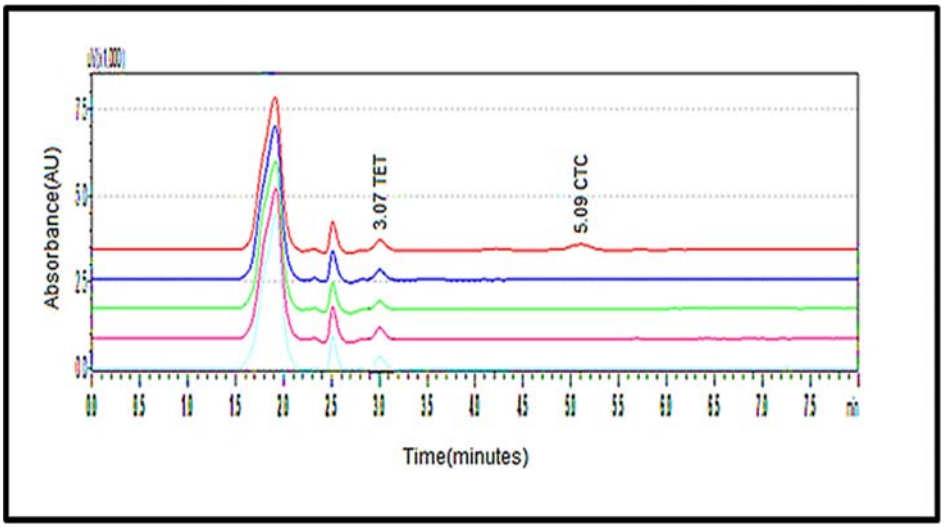
المضاد الحيوي	المنطقة					العدد الكلي للعينات ن = 50
	*الهيشة الجديدة ن = 10	سبها ن = 10	بني وليد ن = 10	ترهونة ن = 10	وادي الربيع ن = 10	
التتراسيكلين	0	(10) 2	(10) 2	(10) 2	(10) 5	(%22) 11
الأوكسيتتراسيكلين	0	0	0	0	0	0
الكلورتتراسيكلين	0	0	0	0	(10) 2	(%4) 2
الإجمالي	0	(10) 2	(10) 2	(10) 2	(10) 7	(%26)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

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

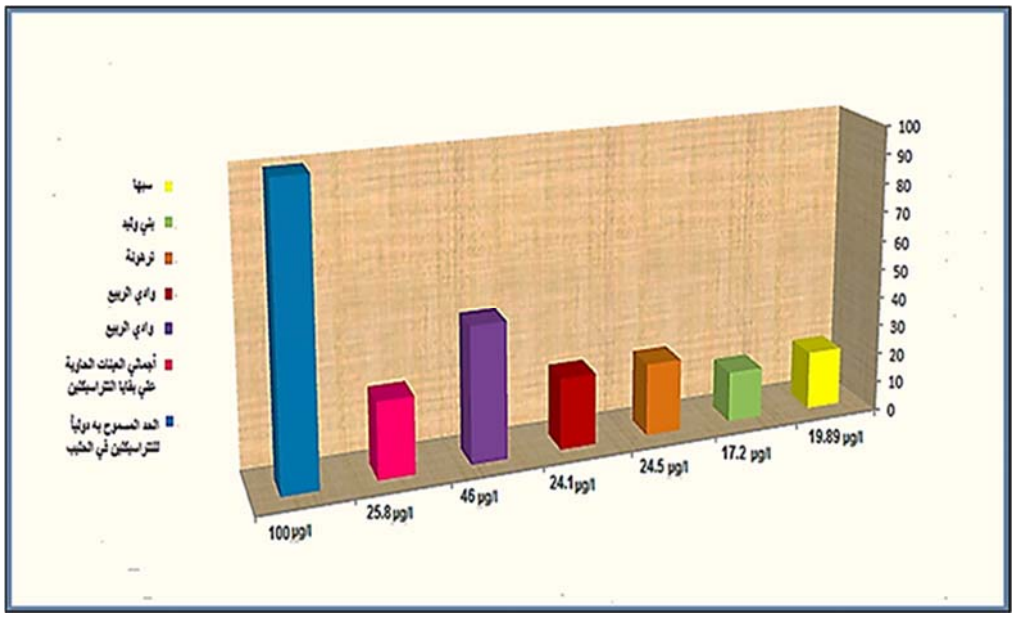
جدول (4) تركيز بقايا المضادات الحيوية (ppb) في عينات حليب الأبل التي تم تحليلها (ن=عشرة لكل منطقة).

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

*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 للكلور تتراسيكلين كان 44 ميكرو جم / لتر، أما أعلى تركيز فكان 48 ميكرو جم / لتر. بينت النتائج عدم وجود فرق معنوي ($P\geq0.05$) بين تركيز التتراسيكلين في عينات الحليب (المحتوية على بقاياه) المجمعة من منطقتي سبها وبني وليد وكذلك عدم وجود فرق معنوي ($P\geq0.05$) بين تركيز التتراسيكلين في عينات الحليب (المحتوية على بقاياه) المجمعة من منطقتي ترهونة ووادي الربيع. بينما سجلت النتائج وجود فرق معنوي واضح ($P\leq0.05$) في تركيز التتراسيكلين في عينات الحليب (المحتوية على بقاياه) المجمعة من منطقتي ترهونة ووادي الربيع مقارنةً بتركيزه في عينات الحليب (المحتوية على بقاياه) المجمعة من منطقتي سبها وبني وليد. كما أوضحت النتائج أن هناك فرق معنوي واضح ($P\leq0.05$) في تركيز الكلورتتراسيكلين في عينات الحليب (المحتوية على بقاياه) المجمعة من منطقة وادي الربيع مقارنة بتركيز التتراسيكلين في عينات الحليب (المحتوية على بقاياه) المجمعة من جميع المناطق المذكورة بما فيها منطقة وادي الربيع. ومن من خلال النتائج المتحصل عليها أتضح أن جميع التراكيز كانت ضمن الحد الأقصى المسموح به دولياً لبقايا التتراسيكلين في الحليب أي أقل من (100ميكروجرام/ 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 الكلورتتراسيكلين ولم يوجد بقايا الأوكسي تتراسيكلين حيث متوسط تركيز كل مضاد موضح بالجدول (2). أما المتوسط الكلي لكل مضاد فكان 21.42±3.5 للتتراسيكلين، 46 ±2 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 [26،25] 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 3.6 ± 7.01 ميكروجرام/ لتر. تناولت دراسة[8] تركيز بقايا المضادات الحيوية (الأوكسيتتراسيكلين - التتراسيكلين - الكلورتتراسيكلين-الدوكسي سيكلين) في (187) عينة حليب أبقار تجارية (33 عينة حليب معقم و154 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 و14.97% من العينات احتوت على بقايا المضادات بمستوي أقل من الحد المسموح به. أفاد[28] في إثيوبيا عن وجود بقايا الأوكسيتتراسيكلين 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 مستوي أعلى من الحد المسموح به. وجد[18] في دراسة بجمهورية التشيك لقياس مستوي التتراسيكلين بأنواعه في (170) عينة حليب بقر خام (57 عينة حليب غير معبأ) و(113) عينة أخذت من خزانات الحليب) فأظهرت النتائج بأن

التتراسيكلين موجود في كل العينات ولكن بتراكيز منخفضة، الكلور تتراسيكلين لا وجود له في العينات، أما الأوكسيتتراسيكلين 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 أردبيل بإيران (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 بمعني 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 أعلي 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، الا ان 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 أخر يقاربه في التركيب الكيماوي أو مقاومة متعددة)،

التوصيات

1. يجب استخدام المضادات الحيوية المصنعة من قبل مصادر موثوقة ومعروفة ومصرح 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، وفقًا 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 ببنودها والالتزام بمعاييرها.
9. ليست هناك دراسات موازية معتمَدة 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 glycylcyclines. J. Antimicrobial Chemotherapy, 58 (2):256-265.
18- Navratilova, P.; Borkovcova, I.; Dračkova, 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 1st 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[1], Abdullah A. Ahmed[1], Adel M. Abu Shufa[2] and Rafig M. Tagiuri[3]

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 ± 2.2, 17.2 ± 1.7, 24.5 ± 2.6, 24.1 ± 1.5 µg/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 ± 2 (µg/L) for Wadi Al-Rabie area only. Also, there was no oxytetracycline residues in analyised 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 µg/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.