University of Tehran Press

Journal of Veterinary Research

Homepage: jvr.ut.ac.ir

Online ISSN: 2251-6190

Original Article

J Vet Res, Volume 79, Number 2, 2024, 71-80

Optimization of Boiling Process and Effect of Citric Acid and Sodium Chloride on Enrofloxacin Residues in Chicken Meat Using Response Surface Method

Hossein Arash[1]✉, Ashkan Jebelli Javan[2]✉, Seyyed Hesamoddin Emadi Chashmi[3]✉, Mahnoosh Parsaeimehr[2]✉, Azadeh Salimi[2]✉

[1] *Graduated from the Faculty of Veterinary, Medicine Semnan University, Semnan Province, Iran*
[2] *Department of Hygiene, Faculty of Veterinary, Medicine Semnan University, Semnan Province, Iran*
[3] *Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary, Medicine Semnan University, Semnan Province, Iran*

Received: *1 January 2024,* ***Accepted:*** *4 March 2024*

10.22059/jvr.2024.362969.3389

Abstract

BACKGROUND: Despite the beneficial effects of antibiotics in treating livestock diseases and increasing their weight, their residual effects on food can cause harmful effects on both livestock and humans and endanger human health. The presence of antibiotic residues in food, especially meat, and its transfer to the body of consumers is one of their most important harmful effects. One of the practical ways to reduce drug residues in meat is to use heating methods such as cooking in boiling water.

OBJECTIVES: This research aimed to use a suitable cooking method and optimize its conditions in terms of salt content. Organic acids (citric acid) and cooking time to reduce antibiotic residues.

METHODS: For this purpose, fifteen 20-day-old Ras broiler chickens were used. To clean their bodies from possible antibiotic residues, the chickens were kept for 10 days and given antibiotic-free food. Then, the antibiotic enrofloxacin was injected into the chest muscle, and 24 hours later, they were killed. Based on the protocol provided by Design Expert software, 18 treatments with different cooking time ranges and percentages of salt and citric acid were designed and implemented, and the drug residue after cooking the samples was determined by HPLC (high-performance liquid chromatography) method.

RESULTS: Based on the obtained results, proper cooking methods and optimization of its conditions, such as the amount of salt, organic acids (citric acid), and cooking time, had a significant effect on the reduction of enrofloxacin antibiotic residues. Also, after optimizing the process by the software, the best conditions to achieve the minimum amount of antibiotics could be achieved by the cooking time of 26.59 minutes, 2.95% w/v salt, and 1.49% v/v citric acid.

CONCLUSIONS: By cooking properly and adding ingredients such as acids and salt at the optimum level, the amount of antibiotics in chicken meat can be reduced.

Keywords: Antibiotics, Chicken, Cooking, Enrofloxacin, Health

Copyright © The Author(s). Publisher: University of Tehran Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Azadeh Salimi, Tel/Fax: +9821-88257355

How to cite this article:

Arash H, Jebelli Javan A, Emadi Chashmi S H, Parsaeimehr M, Salimi A. Optimization of Boiling Process and Effect of Citric Acid and Sodium Chloride on Enrofloxacin Residues in Chicken Meat Using Response Surface Method. Journal of Veterinary Research, 2024; 79(2): 71-80. doi: 10.22059/jvr.2024.362969.3389

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Actual and coded levels of independent variables.
Table 2. Experimental and predicted values of responses (Percentage of antibiotic reduction).
Table 3. Analysis of variances of regression coefficients of processed models.
Figure 1. Standard curve of enrofloxacin.
Figure 2. A: Standard sample of enrofloxacin, B: Enrofloxacin of treated sample.
Figure 3. Effect of citric acid and sodium chloride on the reduction of antibiotics in chicken tissue.
Figure 4. Effect of citric acid and time of heating on the reduction of antibiotics in chicken tissue.
Figure 5. Effect of sodium chloride and time of heating on the reduction of antibiotics in chicken tissue.

مجله تحقیقات دامپزشکی
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۶۱۹۰-۲۲۵۱
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی
دوره ۷۹، شماره ۲، ۱۴۰۳، ۸۰-۷۱

بهینه‌سازی فرایند آب‌پز کردن و تأثیر اسیدسیتریک و کلرید سدیم بر بقایای انروفلوکساسین گوشت مرغ با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

حسین آرش[۱]، اشکان جبلی جوان[۲]، سیدحسام الدین عمادی چاشمی[۳]، مهنوش پارسایی‌مهر[۲]، آزاده سلیمی[۲]

[۱] دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
[۲] گروه بهداشت، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
[۳] گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۱ دی ماه ۱۴۰۲ ، **تاریخ پذیرش:** ۱۴ اسفند ماه ۱۴۰۲

10.22059/jvr.2024.362969.3389

چکیده

زمینه مطالعه: علی‌رغم اثرات مفیدی که آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های دام و افزایش وزن آن‌ها دارند، اما سوءمصرف آن‌ها می‌تواند موجب عوارض زیان‌باری در دام و انسان شود و سلامت جامعه را به خطر اندازد. وجود بقایای آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی، به‌خصوص گوشت و انتقال آن به بدن مصرف‌کنندگان، یکی از مهم‌ترین اثرات زیان‌بخش می‌باشد. یکی از روش‌های کاربردی کاهش باقیمانده دارویی در گوشت، به‌کارگیری روش‌های حرارت‌دهی مانند آب‌پز کردن است.

هدف: مطالعه با هدف استفاده از روش پخت مناسب و بهینه‌سازی شرایط آن ازنظر میزان نمک، اسیدهای آلی (اسیدسیتریک) و زمان پخت برای کاهش بقایای آنتی‌بیوتیک انجام شد.

روش‌کار: ۱۵ جوجه گوشتی نژاد راس ۲۰ روزه مورد استفاده قرار گرفتند. برای پاک کردن بدن آن‌ها از بقایای آنتی‌بیوتیک احتمالی، جوجه‌ها ۱۰ روز نگهداری شدند و غذای عاری از آنتی‌بیوتیک به آن‌ها داده شد. سپس آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین به عضله سینه پرندگان تزریق و پس از گذشت ۲۴ ساعت از تجویز دارو، کشتار انجام شد. براساس پروتکل ارائه‌شده توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت (Design expert)، ۱۸ تیمار با میزان‌های متفاوت زمان پخت، درصد نمک و درصد اسیدسیتریک طراحی و اجرا شدند و باقیمانده دارویی پس از پخت نمونه‌ها، با روش HPLC تعیین گردید.

نتایج: براساس یافته‌های مطالعه حاضر، روش پخت مناسب و بهینه‌سازی شرایط آن ازنظر میزان نمک، اسیدهای آلی (اسیدسیتریک) و زمان پخت، بر کارایی آب‌پز کردن و در کاهش بقایای آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین نقش بسزایی داشت. همچنین پس از بهینه‌سازی فرایند توسط نرم‌افزار، بهترین شرایط برای رسیدن به حداقل مقدار آنتی‌بیوتیک (حداکثر میزان کاهش درون بافت گوشت) شامل مدت‌زمان پختن ۲۶/۵۹ دقیقه، مقدار نمک ۲/۹۵ درصد و میزان اسیدسیتریک ۱/۴۹ درصد تعیین شد.

نتیجه‌گیری نهایی: با ارائه زمان پخت مناسب و افزودن ترکیباتی مانند اسیدهای خوراکی و نمک در حد مطلوب، می‌توان میزان آنتی‌بیوتیک در بافت گوشت مرغ را کاهش داد.

کلمات کلیدی: آنتی‌بیوتیک، انروفلوکساسین، بهینه‌سازی، سلامت، مرغ

کپی‌رایت © نویسندگان. ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

نویسنده مسئول: آزاده سلیمی، گروه بهداشت، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

مقدمه

ازدیاد جمعیت کره زمین، نیاز روزافزون به مواد غذایی را می‌طلبد و به همین دلیل در حال حاضر، بیشتر فعالیت‌ها درزمینه افزایش منابع غذایی و بهینه‌سازی فرایند و نگهداری این منابع است و متخصصان می‌کوشند بتوانند از حداقل امکانات، بیشترین بهره را ببرند. دراین‌بین،

محصولات پروتئینی نقش بسیار مهمی در تأمین نیازهای غذایی انسان ایفا می‌کنند و منابع اصلی تأمین پروتئین‌ها، انواع گوشت و حبوبات می‌باشند (۱).

از طرفی، گوشت طیور نقش بسیار مهمی در تأمین پروتئین ایفا می‌کند و در حفاظت از سیستم عصبی بدن نیز مؤثر می‌باشد. سطح بالایی از ویتامین B_3 (نیاسین) در گوشت مرغ موجود است که از بیماری‌های ناشی از بالا رفتن سن جلوگیری می‌کند. فیله مرغ علاوه‌بر اینکه حاوی مقادیر زیادی نیاسین است سرشار از سلنیوم نیز می‌باشد که در بدن یک آنتی‌اکسیدان محسوب می‌شود. همچنین ازآنجاکه گوشت مرغ حاوی چربی‌های اشباع‌نشده است، در مقایسه با گوشت قرمز مفیدتر است و یکی از کم‌خطرترین گوشت‌ها به حساب می‌آید. اسیدآمینه ترپتوفان موجود در گوشت مرغ نیز از آمینواسیدهای مهم و ضروری است که در افزایش سطح سروتونین در مغز مؤثر می‌باشد و به خواب راحت و مفید کمک زیادی می‌کند. از خواص دیگر این اسیدآمینه می‌توان به ویژگی ضدافسردگی آن اشاره کرد. فسفر گوشت مرغ علاوه‌بر اینکه بر عملکرد پروتئین‌ها برای ترمیم سلول‌ها و بافت‌ها کمک زیادی می‌کند در ساختمان دندان‌ها و استخوان‌ها مؤثر است (۲).

باوجوداین، استفاده از گوشت طیور عاری از خطر نیز نیست و یکی از دلایل آن استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌منظور جلوگیری از بیماری و افزایش راندمان رشد است. وجود باقیمانده آنتی‌بیوتیک در لاشه طیور و انتقال آن به بدن مصرف‌کنندگان ممکن است باعث ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیک و ازدیاد حساسیت در انسان شود (۳). بنابراین غیر از نیاز به پژوهش‌هایی درزمینه یافتن جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها برای پرورش طیور، ارائه راهکارهای ساده که امکان کاهش سطح آنتی‌بیوتیک در بافت مرغ حین طبخ را مهیا کند نیز امری ضروری می‌باشد. از این جمله می‌توان به نقش تیمارهای حرارتی در این زمینه اشاره کرد. طی مطالعات صورت‌گرفته، فرایند حرارتی مانند سرخ کردن می‌تواند باعث تبدیل آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند تایلوزین به متابولیت‌های کم‌خطر آن شامل تایلوزین B دسمیکوزین و تایلوزین A شود (۴).

همچنین گزارش شد که آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین در گوشت مرغ تحت فرایند کباب کردن کاهش پیدا می‌کند و این فرایند به تخریب اکسی‌تتراسایکلین و تولید محصولات آن ازجمله $(\propto -apo-otc)$ و $(\beta-apo-otc)$ و کاهش غلظت سمی این آنتی‌بیوتیک منجر می‌شود (۵). مطالعات صورت‌گرفته درزمینه آنتی‌بیوتیک سولفامتازین نیز نشان دادند در محصولات غذایی که تحت فرایند مایکروویو قرار گرفته بودند، این فرایند حرارتی به تخریب و از بین رفتن آنتی‌بیوتیک و تبدیل شدن آن به متابولیت‌های کم‌خطر منجر شد و افزایش دما مدت‌زمان مایکروویو میزان سمیت آن را به مقدار بیشتری کاهش داد (۶).

از دیگر روش‌های متداول طبخ گوشت مرغ، فرایند پخت در آب است. براساس گزارشات موجود، آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین در گوشت مرغ تحت فرایندهای مختلف پختن کاهش پیدا می‌کند و این روش‌های حرارتی به تخریب انروفلوکساسین و تولید محصولات آن (سیپروفلوکساسین) منجر می‌شود. درنتیجه غلظت سمی این آنتی‌بیوتیک کاهش پیدا می‌کند. دراین‌بین نقش روش پخت در آب، محسوس‌تر می‌باشد و در این روش، به‌دلیل تراوش بخش عمده آنتی‌بیوتیک به درون فاز مایع، میزان کاهش مشاهده‌شده بیشتر بوده است (۴، ۷). همچنین میزان اسیدیته و قدرت یونی ناشی از حضور نمک‌ها در محیط نیز از عوامل دیگری می‌باشند که براساس مطالعات صورت‌گرفته، ممکن است بر کاهش میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیک در بافت گوشت مرغ مؤثر باشند (۸).

از طرفی دیگر، در راستای رسیدن به بهترین روش‌ها با حداقل هزینه، استفاده از روش‌های بهینه‌سازی مورد توجه قرار گرفته‌اند. درواقع بهینه‌سازی عبارت است از بهبود عملکرد یک سیستم، فرایند یا تولید به‌منظور دستیابی به بهترین نتایج. از میان چندین روش موجود در این زمینه، روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology) رایج‌ترین روش موجود است (۹).

باتوجه‌به آنچه بیان شد، یافتن بهترین روش طبخ و تأثیر برخی افزودنی‌ها برای رسیدن به پایین‌ترین سطح آنتی‌بیوتیکی در بافت گوشت مرغ امری ضروری است که می‌تواند به بالا رفتن سطح سلامت جامعه کمک شایان توجهی کند و مطالعاتی که بتوانند روشی ساده، دردسترس و امکان‌پذیر به مصرف‌کننده ارائه دهند بسیار اندک بودند. در همین راستا، هدف از مطالعه حاضر، یافتن و به‌کارگیری یک روش پخت مناسب و ساده و بهینه‌سازی شرایط آن ازنظر میزان نمک، اسیدهای آلی (اسیدسیتریک) و زمان پخت به‌منظور از بین بردن بقایای آنتی‌بیوتیک در بافت گوشت مرغ و ارتقای کیفی و افزایش ایمنی غذایی بود.

مواد و روش کار

پس از دریافت کد اخلاق (IR.SU.REC/۱۴۰۲/۹)، ۱۵ جوجه گوشتی ۲۰ روزه نژاد راس ۳۰۸ تهیه شدند و برای پاک کردن بدن آن‌ها از بقایای آنتی‌بیوتیک احتمالی، ۱۰ روز نگهداری و غذای عاری از آنتی‌بیوتیک به آن‌ها داده شد. پس از پایان این دوره، ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم انروفلوکساسین به عضله سینه پرندگان تزریق شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از تجویز دارو، پرندگان کشتار شدند و نمونه‌هایی به وزن ۱۰ گرم از محل گوشت سینه گرفته شد و پس از ثبت مشخصات تا زمان انجام آزمایشات در ظروف سترون از جنس پلی‌اتیلن و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد گردیدند.

براساس طرح ارائه‌شده توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپرت نسخه ۱۱/۰/۳، هجده پروتکل متفاوت ازنظر زمان فرایند حرارتی (۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه)، مقدار اسیدسیتریک (۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد حجمی/حجمی) و مقدار نمک کلرید سدیم (۱، ۲ و ۳ درصد وزنی/حجمی) جهت پخت نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. بدین‌منظور، نمونه‌های ۱۰ گرمی با ضخامت ۲ سانتی‌متر در ۱۰۰ سی‌سی آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حاوی درصدهای مشخص نمک و اسید، غوطه‌ور و در زمان‌های مقرر خارج شدند و باقیمانده دارویی پس از پخت آن‌ها با روش HPLC تعیین گردید. نتایج حاصله به‌عنوان پاسخ‌های نهایی در نرم‌افزار وارد و آنالیز گردیدند. بدین‌منظور از دستگاه Water preplc HPLC مدل ۴۰۰۰ ساخت آمریکا استفاده شد. همچنین ستون مورداستفاده C_{18} ۱۲۵×۴ میلی‌متر (۵ میکرومتر ساخت آمریکا) بود.

جهت آماده‌سازی نمونه‌ها برای تزریق به HPLC، از روش Thomas-Gasco و همکاران در سال ۲۰۲۲، با کمی تغییرات استفاده شد (۱۰). بدین‌منظور ۵ گرم از هر نمونه برداشته شد. ۱۵ میلی‌لیتر حلال استخراج به آن اضافه گردید و به‌مدت ۳ تا ۵ دقیقه با ورتکس مخلوط شد تا کاملاً یکنواخت گردیدند. سپس به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و محلول شفاف روی آن برداشته شد و pH آن با محلول سود ۰/۱ مولار روی ۷ تنظیم گردید. از این محلول ۱ میلی‌لیتر برداشته و داخل لوله‌آزمایش ریخته شد. به آن ۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و مخلوط گردید. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه و به‌مدت ۱ تا ۲ دقیقه با ورتکس مخلوط گردید. درنهایت فاز زیرین که کلروفرم بود برداشته شد و داخل ویال ریخته شد و با نیتروژن خشک گردید. ۱۰۰ میکرو لیتر از فاز متحرک به داخل ویال ریخته شد و با ورتکس مخلوط و درنهایت نمونه به دستگاه تزریق گردید.

به‌منظور استخراج توسط فاز جامد، از کارتریج استفاده شد (Sep-Pak®Vacl cc ۱۰۰ میلی‌گرم). ابتدا کارتریج با ۲/۵ میلی‌لیتر متانول و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر آب (HPLC grade) آماده گردید. محلول استخراجی و صاف‌شده از مرحله قبل روی آن ریخته و سپس، ابتدا با ۳ میلی‌لیتر آب و بعد با ۳ میلی‌لیتر بافر ۰/۲ مولار دی سدیم هیدروژن فسفات (pH=۹) و نهایتاً با ۵ میلی‌لیتر آب شست‌وشو شد. در مرحله بعد کارتریج توسط هوا خشک گردید و انروفلاکساسین با ۳/۵ میلی‌لیتر متانول از آن شسته شد. مواد خارج‌شده در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت خشک گردیدند و در ۲۵۰ میلی‌لیتر بافر ۰/۲ مولار دی سدیم هیدروژن فسفات حل و ۳۰ ثانیه ورتکس شدند و سپس در دور ۴۴۰۰ گرم به‌مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و لایه رویی جدا گردید.

برای آماده‌سازی استاندارد، ۱۰ میلی‌گرم از انروفلوکساسین خالص داخل ACN حل گردید و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس از این غلظت، استوک‌هایی با غلظت ۱۰ تا ۶۴۰ (۱۰-۲۰-۴۰-۸۰-۱۶۰-۳۲۰-۶۴۰) میکروگرم در میلی‌لیتر آماده و از هر غلظت ۲۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق شد. سرعت فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم گردید. نهایتاً براساس غلظت‌های مختلف استانداردها و سطح زیر پیک‌ها نمودار استاندارد ترسیم شد (تصویر ۱).

جدول ۱. سطوح واقعی و کدشده متغیرهای مستقل.

نماد	متغیرهای مستقل	سطوح کدشده		
		-۱	۰	۱
X_1	زمان فرایند حرارتی (دقیقه)	۱۰	۲۰	۳۰
X_2	درصد اسیدسیتریک (حجمی/حجمی)	۰/۵	۱	۱/۵
X_3	درصد نمک کلرید سدیم (وزنی/حجمی)	۱	۲	۳

جدول ۲. مقادیر تجربی و پیش‌بینی‌شده پاسخ (درصد کاهش مقدار آنتی‌بیوتیک).

شماره آزمایش	متغیرهای مستقل			متغیر وابسته (پاسخ)	
	زمان فرایند حرارتی (دقیقه)	درصد اسیدسیتریک (حجمی/حجمی)	درصد نمک کلرید سدیم (وزنی/حجمی)	درصد کاهش مقدار آنتی‌بیوتیک در بافت گوشت مرغ	
	X۱	X۲	X۳	مقادیر تجربی	مقادیر پیش‌بینی‌شده
۱	۲۰	۱	۲	۷۹/۲۳	۷۴/۲۱
۲	۲۰	۱	۲	۷۷/۶۹	۷۴/۲۱
۳	۱۰	۱/۵	۱	۷۰/۰۰	۷۴/۷۸
۴	۲۰	۱	۲	۷۶/۹۲	۷۴/۲۱
۵	۲۰	۱	۲	۷۸/۴۶	۷۴/۲۱
۶	۱۰	۱	۲	۶۹/۲۳	۷۰/۵۵
۷	۳۰	۰/۵	۳	۶۶/۹۲	۷۳/۶۴
۸	۳۰	۱/۵	۳	۹۳/۵۳	۹۵/۵۸
۹	۳۰	۱	۳	۷۶/۹۲	۸۰/۹۵
۱۰	۳۰	۱/۵	۱	۸۵/۳۸	۸۲/۱۰
۱۱	۱۰	۰/۵	۱	۴۶/۹۲	۵۲/۸۴
۱۲	۲۰	۱	۱	۶۴/۶۱	۶۷/۴۷
۱۳	۳۰	۰/۵	۱	۵۶/۱۵	۶۰/۱۶
۱۴	۳۰	۱	۲	۷۳/۷۴	۷۷/۸۷
۱۵	۱۰	۰/۵	۳	۶۲/۳۰	۶۶/۳۲
۱۶	۲۰	۱/۵	۲	۸۴/۶۱	۸۵/۱۸
۱۷	۱۰	۱/۵	۳	۹۰/۷۶	۸۸/۲۵
۱۸	۲۰	۰/۵	۲	۸۲/۳۰	۶۳/۲۴

جدول ۳. آنالیز واریانس ضرایب رگرسیونی مدل برازش‌شده.

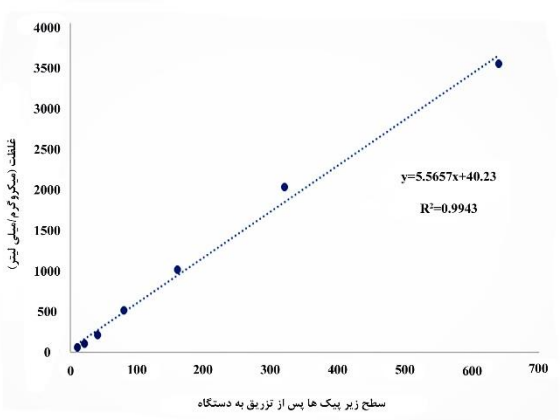
متغیرها	ضرایب رگرسیون	*F*	*P*
X_0	۳۱/۴۷		
X_1	۰/۳۶	۳/۰۰	۰/۱۰۵۲
X_2	۲۱/۹۳	۲۶/۹۴	۰/۰۰۰۱
X_3	۶/۷۳	۱۰/۱۶	۰/۰۰۶۶
R^2	۰/۷۴۱۲		
Adj-R^2	۰/۶۸۵۸		

برای بهینه‌سازی فرایند، با روش سطح پاسخ، از طرح مرکب مرکزی (Central composite design) با نقاط مرکزی در هر وجه (Face center) و ۴ نقطه مرکزی برای بررسی تأثیر ۳ متغیر مستقل استفاده شد. سطوح کدشده و واقعی متغیرها که توسط نرم‌افزار ارائه شده بودند، در جدول ۱ ارائه شدند.

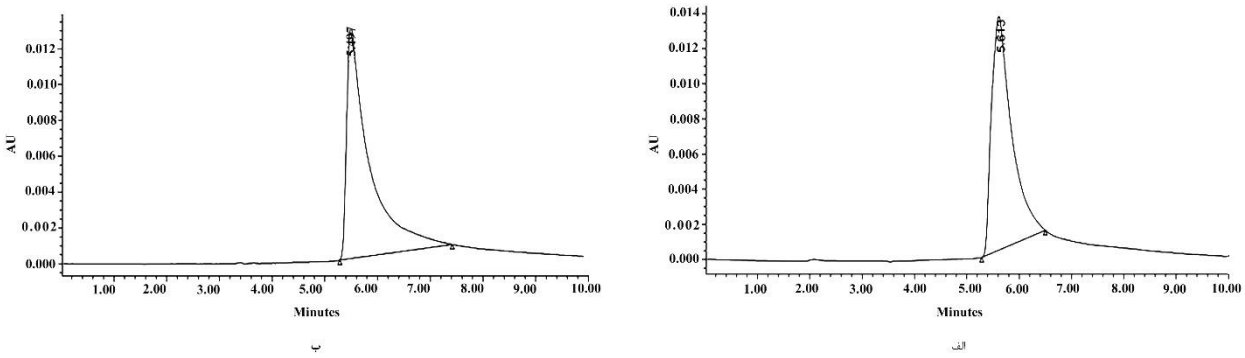
معنی‌دار بودن یا نبودن هریک از ضرایب مدل‌های ارائه‌شده توسط نرم‌افزار، ازطریق بـررسی *P*-value مشخص گردید و مقادیری که ارزشی بالاتر از ۰/۰۵ داشتند، معنی‌دار نبودند و از مدل‌ها حذف شدند تا مدل‌های جدیدی با پارامترهای معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) به دست آیند. کیفیت مدل‌های مناسب ازطریق بررسی ضریب همبستگی و ضریب همبستگی تنظیم‌شده بررسی گردیدند. همچنین برای بررسی تصویری و گرافیکی تأثیرات متغیرهای مستقل، بنابر توصیه سایر محققین، از طرح‌های سه‌بعدی و مدل‌های رگرسیونی استفاده شد (۱۱).

نتایج

تصویر ۲ (الف و ب)، کروماتوگرام انروفلوکساسین در استاندارد و یکی از نمونه‌های گوشت را نشان می‌دهد. زمان بازداری (timeRetention) انروفلوکساسین حدود ۴/۵ دقیقه و منحنی درجه‌بندی انروفلوکساسین در محدوده غلظت ۱۰ تا ۶۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، خطی و از ضریب رگرسیون بالایی (R^2=۰/۹۹) برخوردار بود.



تصویر ۱. منحنی استاندارد انروفلوکساسین.



تصویر ۲. الف: نمونه استاندارد انروفلوکساسین؛ ب: نمونه انروفلوکساسین استحصال‌شده از گوشت مرغ تیمارشده.

تعیین مدل‌های رگرسیونی مناسب: درصد کاهش آنتی‌بیوتیک موجود در بافت گوشت مرغ، پس از اعمال تیمارهای طراحی‌شده، در جدول ۲ آورده شده است. همچنین با آنالیز داده‌ها، مقادیر بهینه‌شده با مدل خطی تعریف شدند. ضریب همبستگی به‌دست‌آمده برای مدل نهایی معادل ۰/۷۴۱۲ بود. همان‌طور که در جدول ۲ مشخص است، مقادیر تجربی به‌دست‌آمده هم‌خوانی مناسبی با مقادیر پیش‌بینی‌شده توسط روش سطح پاسخ داشتند.

از جدول تحلیل واریانس‌ها برای بررسی معنی‌دار بودن یا نبودن پارامترهای مدل‌ها نیز استفاده شد (جدول ۳). متغیرهایی که بیشترین تأثیر را بر درصد کاهش مقدار آنتی‌بیوتیک داشتند، به‌ترتیب پارامتر خطی درصد اسیدسیتریک، پارامتر خطی درصد نمک (P<۰/۰۵) و درنهایت پارامتر خطی زمان فرایند بوده‌اند که اثر معنی‌داری در مدل نداشت. میزان انروفلوکساسین در نمونه گوشت مرغ بدون تیمارهای پخت با کنترل ۱۳۰ میکروگرم در کیلوگرم (ppb) محاسبه گردید. همچنین معادله رگرسیونی به‌دست آمده برای محاسبه میزان کاهش آنتی‌بیوتیک بر اساس پارامترهای حقیقی به صورت فرمول شماره ۱ ارائه شد.

فرمول شماره ۱:

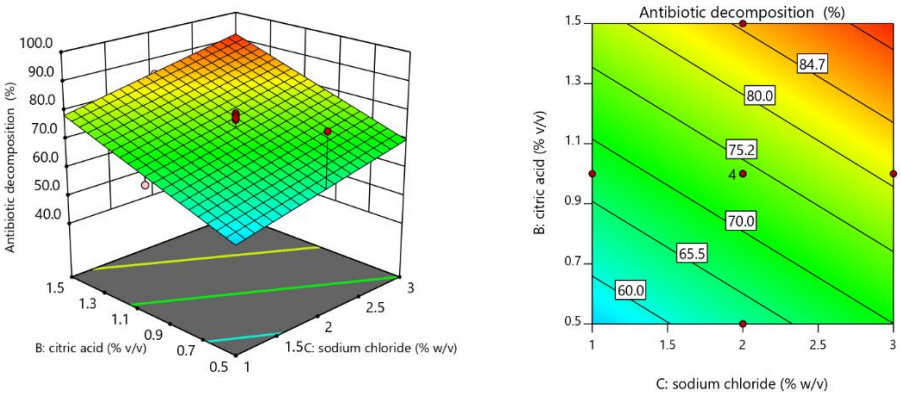
$$Y=۳۱/۴۷+۰/۳۶X_۱+۲۱/۹۳X_۲+۶/۷۳X_۳$$

$X_۱$: زمان فرایند (دقیقه)

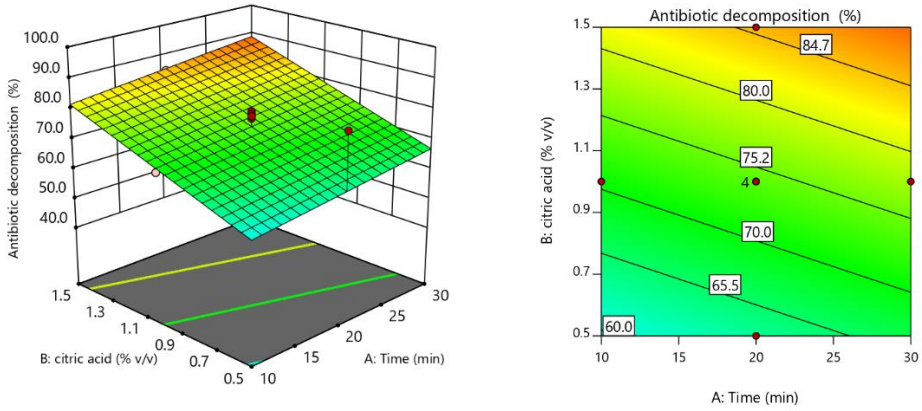
$X_۲$: درصد اسیدسیتریک (حجمی/حجمی)

$X_۳$: درصد کلرید سدیم (وزنی/حجمی)

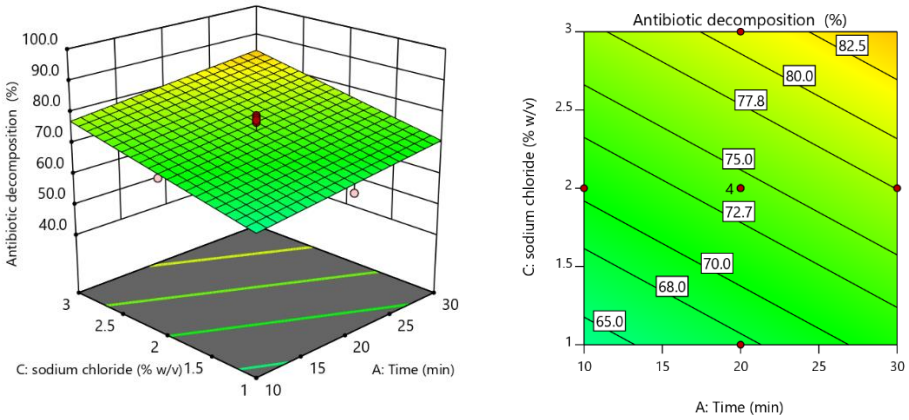
بررسی نمودارهای سه‌بعدی و کانتور مدل رگرسیونی: برای مشهود شدن اثر متغیرهای مستقل بر پاسخ، ارائه طرح‌های سه‌بعدی و کانتور بسیار مؤثر می‌باشد (۱۱). برای ترسیم این طرح‌ها، در هر طرح ۲ متغیر مستقل و ۱ متغیر وابسته درحالی‌که سومین متغیر مستقل در مقدار مرکزی خود (مقدار میانی که توسط نرم‌افزار با داشتن مقادیر حداکثر و حداقل ارائه‌شده بود) ثابت نگهداشته شده بود، به تصویر کشیده شدند. بدین‌ترتیب ۳ طرح سه‌بعدی و کانتور به دست آمد که در هر طرح، یکی از متغیرهای مستقل در مقدار میانی خود ثابت قرار گرفت (زمان روی ۲۰ دقیقه، اسیدسیتریک، ۱ درصد و کلرید سدیم ۲ درصد) و تأثیر ۲ متغیر دیگر بر پاسخ در تصاویر شماره ۳ الی ۵ ترسیم گردید.



تصویر ۳. تأثیر مقدار درصدی اسیدسیتریک و کلرید سدیم بر میزان کاهش آنتی‌بیوتیک در بافت گوشت مرغ.



تصویر ۴. تأثیر مقدار درصدی اسیدسیتریک و زمان فرایند حرارتی بر میزان کاهش آنتی‌بیوتیک در بافت گوشت مرغ.



تصویر ۵. تأثیر مقدار درصدی کلرید سدیم و زمان فرایند حرارتی بر میزان کاهش آنتی‌بیوتیک در بافت گوشت مرغ.

در تصویر ۳، با ثابت گرفته شدن زمان فرایند حرارتی، تأثیر ۲ پارامتر مقدار کلرید سدیم و اسیدسیتریک به تصویر کشیده شده است. همان‌طور که مشخص است، افزایش مقدار اسید و نمک در محیط موجب افزایش تجزیه آنتی‌بیوتیک گردیده و صفحه ترسیم‌شده از اثر این دو تیمار، شیب تندی داشت که نشان‌دهنده تأثیر قابل‌توجه و معنی‌دار این دو پارامتر بر میزان کاهش آنتی‌بیوتیک در بافت گوشت مرغ می‌باشد. با بررسی این نمودار، این نتیجه حاصل شد که تأثیر افزایش مقدار اسید در غلظت‌های پایین نمک در کاهش درصد آنتی‌بیوتیک به‌طور معنی‌دار بیشتر از تأثیر افزایش غلظت نمک در مقادیر پایین اسید بود و به‌عبارت‌دیگر اثر اسید (با غلظت کم) با غلظت‌های بالای نمک تا حدودی خنثی شده بود.

در تصویر ۴، با ثابت گرفته شدن مقدار کلرید سدیم، تأثیر ۲ پارامتر زمان فرایند حرارتی و مقدار اسیدسیتریک به تصویر کشیده شده است. همان‌طور که در تصویر مشخص است، افزایش مقدار اسید و زمان فرایند، درمجموع موجب کاهش آنتی‌بیوتیک گردیده و صفحه ترسیم‌شده از اثر این دو تیمار نیز نشان‌دهنده شیب تندی می‌باشد. البته با تحلیل تصویر به‌دست‌آمده مشخص گردید تأثیر اسیدسیتریک بر شیب صعودی نمودار بسیار بیشتر و معنی‌دارتر از اثر زمان فرایند حرارتی بود که پیش‌تر نیز در جدول تحلیل واریانس این تأثیر مشخص‌شده بود.

در تصویر ۵، با ثابت گرفته شدن مقدار اسیدسیتریک، تأثیر ۲ پارامتر زمان فرایند حرارتی و مقدار نمک کلرید سدیم به تصویر کشیده شده است. همان‌طور که در تصویر مشخص است، افزایش مقدار نمک و زمان فرایند، درمجموع موجب کاهش آنتی‌بیوتیک گردیده و صفحه ترسیم‌شده از اثر این دو تیمار نیز شیب مثبت داشت. تحلیل تصویر به‌دست‌آمده نشان داد تأثیر افزایش مقدار نمک بر شیب صعودی نمودار، بسیار بیشتر و معنی‌دارتر از اثر زمان فرآیند حرارتی است که پیش‌تر نیز در جدول تحلیل واریانس این تأثیر مشخص شده بود.

بهینه‌سازی شرایط پخت برای رسیدن به حداقل میزان آنتی‌بیوتیک در بافت گوشت مرغ: برای پیدا کردن مشخصات روش پخت بهینه توسط نرم‌افزار، در قسمت بهینه‌سازی، برای هریک از متغیرهای مستقل، محدوده مناسب تعریف شد، سپس به متغیر وابسته براساس میزان اهمیت آن، وزن ارزشی مناسب داده شد و نهایتاً تحلیل انجام گردید (۱۲). بدین‌منظور، برای متغیرهای مستقل محدوده حداقل تا حداکثر (in range) تعریف شد و حد تخریب آنتی‌بیوتیک، حداکثر در نظر گرفته شد. همچنین وزن داده‌شده به متغیرهای مستقل، ۳ و وزن پاسخ ۵ تعیین گردید. براساس بهینه‌سازی ارائه‌شده، زمان فرایند، ۲۶/۵۹۱ دقیقه، اسیدسیتریک، ۱/۴۹۱ درصد حجمی / حجمی، کلرید سدیم، ۲/۹۵۴ درصد وزنی / حجمی و میزان کاهش آنتی‌بیوتیک در شرایط بهینه اعمال‌شده، ۹۳/۸۱۹ درصد پیش‌بینی شد. همچنین میزان مطلوبیت (Desirability) معادل ۱ بود.

بحث

همان‌طور که نتایج مطالعه حاضر نشان داد مدت‌زمان حرارت‌دهی، درصد نمک و درصد اسید، هر سه در کاهش میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین در گوشت مرغ تأثیر مثبت داشتند. براساس نتایج مطالعات پیشین، با افزایش زمان پخت، میزان تبدیل و تخریب ساختار آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش و سمیت آن‌ها کاهش می‌یابد. در این زمینه به‌طور ویژه، انروفلوکساسین به محصولات آن، مانند سیپروفلوکساسین تبدیل می‌شود و درنتیجه غلظت سمی این آنتی‌بیوتیک کاهش پیدا می‌کند (۴، ۵، ۷).

گزارش‌های موجود نشان دادند افزایش مدت‌زمان حرارت‌دهی، موجب آزاد شدن بیشتر آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین از بافت به محیط‌های آبی شده و درنتیجه غلظت این آنتی‌بیوتیک در بافت کاهش می‌یابد (۱۳).

در ارتباط با تأثیر هم‌زمان اسیدهای آلی و نمک و حرارت در کاهش باقیمانده انروفلوکساسین در گوشت مرغ مطالعه مشابهی صورت نگرفته است و مطالعه حاضر برای اولین‌بار به این موضوع می‌پردازد، اما Wetzstein و همکاران در سال ۱۹۹۷، اثبات کردند که گلوکورونیداسیون، دآلکیلاسیون و همچنین اکسیداسیون گروه‌های آمین از مهم‌ترین روش‌های متابولیزه شدن فلوروکینولون‌ها می‌باشند. همچنین ثابت شده است که آزاد شدن یون کلر پس از انحلال در آب از مهم‌ترین کاتالیزورهای اکسیداسیون گروه‌های آمین به ایمین‌ها می‌باشد، بنابراین کاهش میزان باقیمانده انروفلوکساسین با افزایش درصد نمک در آب را می‌توان این‌گونه توجیه کرد (۱۴). همچنین براساس نقش حضور نمک‌ها بر میزان حلالیت پروتئین‌ها، افزایش نمک تا حدودی می‌تواند انحلال‌پذیری پروتئین را افزایش دهد (salting in) که دلیل آن، افزایش انرژی الکترواستاتیکی بین مولکول‌های پروتئین بیان شده است، اما با افزایش قدرت

یونی به دلایلی مانند رقابت مولکول‌های نمک با مولکول‌های پروتئین برای اتصال با آب، انحلال‌پذیری کاهش می‌یابد (salting out). در این راستا، Zhao و همکاران در سال ۲۰۲۰ بیان کردند افزایش غلظت مولی نمک به انحلال‌پذیری بیشتر اکتومیوزین منجر می‌شود (۱۵). براین‌اساس و با بررسی نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر، افزایش نمک به سمت مقادیر حداکثری، به دناتوره شدن پروتئین و تراوش آب و مواد محلول به محیط پیرامون در حین پخت منجر شد که میزان آنتی‌بیوتیک اندازه‌گیری‌شده در بافت را کاهش داد، اما در مقادیر کمتر به‌دلیل پایداری و انحلال‌پذیری بیشتر، خروج این مواد از بافت کمتر بود و بنابراین مقدار آنتی‌بیوتیک در بافت بالاتر بود.

به‌موازات این اثر کاهش pH گوشت تحت تأثیر اسید آلی در حین تیمار حرارتی می‌تواند به‌طور معنی‌داری میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها را بیشتر از pH طبیعی کاهش دهد که این امر به نزدیک شدن pH به نقطه ایزوالکتریک گوشت مرغ (حدود pH=۵) مرتبط است که در این شرایط ظرفیت نگهداری آب (water holding capacity) به کمترین میزان خود می‌رسد و سبب خروج بخشی از بقایای درونی همراه ترشح آب از گوشت می‌شود. Richardson و همکاران در سال ۲۰۰۷ بیان کردند با افزایش غلظت مولی نمک و کاهش اسیدیته، ویژگی‌هایی مانند قابلیت اتصال به آب (water binding capacity) افزایش می‌یابد (۱۶). باتوجه‌به آنچه بیان گردید، حل شدن نمک در آب با افزایش قدرت یونی، تأثیر بسزایی در انحلال انروفلوکساسین کاتیونی در آب دارد (۱۷، ۱۸).

Hosein و همکاران در سال ۲۰۱۱، ثابت کردند در غلظت‌های کم اسید، نمک با افزایش اسمولاریتی و همچنین pH مانع از اثر اسید شده و تأثیر آنتاگونیستی با اسید دارد که البته با افزایش غلظت اسید این اثر آنتاگونیستی از بین رفت. همان‌طور که نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد نمک تا حدودی مانع از اثر اسید در غلظت کم در کاهش غلظت انروفلوکساسین شد (۱۹).

طبق یافته‌های مطالعه حاضر و نتایج محققین دیگر درباره اثرات روش پخت آب‌پز کردن بر باقیمانده آنتی‌بیوتیک در گوشت مرغ می‌توان این‌گونه نتیجه‌گیری کرد که روش پخت مناسب و بهینه‌سازی شرایط آن ازنظر میزان نمک، اسیدهای آلی (اسیدسیتریک) و زمان پخت، بر کارایی آب‌پز کردن و از بین بردن بقایای آنتی‌بیوتیک نقش بسزایی دارد.

نتیجه‌گیری نهایی: باتوجه‌به اهمیت فراورده‌های پروتئینی حیوانی ازجمله گوشت طیور و همچنین پروتکل‌های پرورشی که در حال حاضر بر مبنای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در راستای جلوگیری از شیوع بیماری و افزایش راندمان رشد می‌باشند، یافتن روش‌هایی در طبخ که به کاهش اثر منفی این دسته از مواد بر مصرف‌کنندگان کمک کند، امری ضروری است. در مطالعه حاضر، مبنای استفاده از زمان‌های مختلف پخت به‌صورت آب‌پز، میزان نمک و مقدار اسیدسیتریک و بررسی اثر این متغیرها بر باقیمانده آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین بود و براساس نتایج به‌دست‌آمده، افزایش زمان پخت و استفاده از نمک و اسید، نقش بسزایی بر کاهش محتوای این آنتی‌بیوتیک در نمونه‌های بررسی‌شده داشت، بنابراین با پیشنهاد این روش‌ها می‌توان خطر مصرف گوشت طیور برای مصرف‌کنندگان را کاهش داد. همچنین بهترین شرایط برای رسیدن به حداقل مقدار آنتی‌بیوتیک (حداکثر میزان کاهش درون بافت گوشت) شامل مدت‌زمان پختن ۲۶/۵۹ دقیقه، درصد نمک ۲/۹۵ و درصد اسید ۱/۴۹ بود.

سپاسگزاری

از کلیه کارکنان دانشکده دامپزشکی دانشگاه سمنان، مسئولین آزمایشگاه‌ها و سایر اساتیدی که با نقطه‌نظرات ارزنده خود در مسیر مطالعه حاضر همراهی کردند تقدیر و تشکر می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Diez JG, Concalves C, Grispoldi L, Cenci-Goga B, Saraiva C. Determining food stability to achieve food security. Sustainability. 2021;13(13):7222-7235. doi: 10.3390/su13137222

2. Bohrer BM. Nutrient density and nutritional value of meat products and non-meat foods high in protein. Trends Food Sci Technol. 2017;65:103-112. doi: 10.1016/j.tifs.2017.04.016

3. Kazeminia S, Rashidi H, Ghalekhani N, Ghasemzadeh A, Nasiri N, Sharifi H. Detection of antibiotic residues in poultry carcasses in Kerman poultry abattoirs during 2015-2016. J Vet Res. 2021,75(2):166-172. doi: 10.22059/jvr.2018.250157.2751

4. Heshmati A, Salar Amoli J, Kamkar A, Hassan J, Jahed GH. Experimental study of the effects of cooking methods on Tilmicosin residues in chicken. J Vet Res. 2014;69(3):283-290. . doi: 10.22059/jvr.2014.51739

5. Nguyen V, Li C, Zhou G. The degradation of oxytetracycline during thermal treatments of chicken and pig meat and the toxic effects of degradation products of oxytetracycline on rats. J Food Sci Technol. 2015;52(5):2842-2850. doi: 10.1007/s13197-014-1306-x

6. Hussein MA, Ahmed MM, Morshedy AM. Effect of cooking methods on some antibiotic residues in chicken meat. J Vet Res. 2016;64(2):225-231.

7. Hassan MA, Reham AA, Nahla AAE, Ghanem MA. Enrofloxacin residues in chicken meat and giblets. Benha Vet Med J. 2019;36(1):175-183. doi: 10.21608/bvmj.2019.103409

8. Yin F, Dong H, Zhang W, Zhu Z, Shang B. Antibiotic degradation and microbial community structures during acidification and methanogenesis of swine manure containing chlortetracycline or oxytetracycline. Bioresour Technol. 2018;250:247-255. doi: 10.1016/j.biortech.2017.11.015 PMID: 29174902

9. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta. 2008;76(5):965-977. doi: 10.1016/j.talanta.2008.05.019 PMID: 18761143

10. Tomas-Gasco A, Nazir K, Esposito P, Minguillon C, Barron D. Effect of diverse cooking treatments on enrofloxacin residues and its metabolites in chicken tissues by LC-MS. ACS Food Sci Technol. 2022;2(10):1639-1649. doi: 10.1021/acsfoodscitech.2c00232

11. Gharibzahedi SMT, Mousavi SM, Hamedi M, Ghasemlou M. Response surface modeling for optimization of formulation variables and physical stability assessment of walnut oil in-water beverage emulsions. Food Hydrocoll. 2012;26:293-301. doi: 10.1007/s11947-011-0763-8

12. Yolmeh M, Jafari SM. Application of response surface methodology in the food industry process. Food Bioproc Tech. 2017;10:413-433. doi: 10.1007/s11947-016-1855-2

13. Javadi A, Mirzaei H, Khatibi S. Experimental study on effect of roasting, boiling and microwave cooking methods on enrofloxacin antibiotic residues in edible poultry tissues. Afr J Pharm Pharmacol. 2011;5(2):214-218. doi: 10.5897/AJPP10.378

14. Wetzstein HG, Schmeer N, Karl W. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus Gloeophyllum striatum: identification of metabolites. App Environ Microbiol. 1997; 63(11):4372-4281. doi: 10.1128/aem.63.11.4272-4281.1997

15. Zhao D, He J, Zou X, Nian Y, Xu X, Zhou G, Li C. Influence of salting process on the structure of in vitro digestibility of actomyosin. J Food Sci Thechnol, 2020;57(5):1763-1773. doi: 10.1007/s13197-019-04210-w PMID: 32327787

16. Rechardson IR, Jones JM. The effect of salt concentration and pH upon water binding, water holding and protein extractability of turkey meat. Int J Food Sci, 2007;22(6):683-692. doi: 10.1111/j.1365-2621.1987.tb00537.x

17. Hazra S, Kushawaha AK, Yadav D, Dolui P, Deb M, Elias AJ.Table salt as a catalyst for the oxidation of aromatic alcohols and amines to acids and imines in aqueous medium: effectively carrying out oxidation reactions in sea water. Green Chem. 2019;21:1929-1934. doi: 10.1039/C9GC00497A

18. Vivienne EE, Josephine OKO, Anaelom NJ. Effect of temperature (cooking and freezing) on the concentration of oxytetracycline residue in experimentally induced birds. Vet World. 2018;11(2):167-180. doi: 10.14202vetworld.2018.167-171 PMID: 29657398

19. Hosein AM, Breidt FJr, Smith CE. Modeling the effects of sodium chloride, acetic acid, and intracellular pH on survival of *Escherichia coli* O157:H7. App Environ Microbiol. 2011;77(3):889-95. doi: 10.1128/AEM.02136-10