TETRACYCLINE RESIDUES IN CHICKEN PRODUCTS AND THEIR STABILITY DURING HEAT TREATMENTS

By

FATHY MOHAMED SABER MEHAYA

B.Sc. (Food Sci. Tech.), Fac. Agric., Kafer El-Sheikh Univ., Egypt, 2001

THESIS

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

MASTER OF SCIENCE

In

Agricultural Sciences

(Food Science)

Department of Food Science
Faculty of Agriculture
Cairo University
EGYPT

2010

APPROVAL SHEET

TETRACYCLINE RESIDUES IN CHICKEN PRODUCTS AND THEIR STABILITY DURING HEAT TREATMENTS

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Food Science)

By

FATHY MOHAMED SABER MEHAYA

B.Sc. (Food Sci. Tech.), Fac. Agric., Kafer El-Sheikh Univ., Egypt, 2001

Approval Committee

Dr. MOHAMED FARAG KHALLAF.....
Professor of Food Science, Fac. Agric., Ain Shams University

Dr. AHMED TAWFIC EL-AKEL.....
Professor of Food Science, Fac. Agric., Cairo University

Dr. NADIA ABD-ELRAHMAN SALAMA.....
Professor of Food Science, Fac. Agric., Cairo University

Dr. SALAH HUSSEIN ABOU-RAYA.....
Professor of Food Science, Fac. Agric., Cairo University

Date: 17/ 3 /2010

SUPERVISION SHEET

TETRACYCLINE RESIDUES IN CHICKEN PRODUCTS AND THEIR STABILITY DURING HEAT TREATMENTS

M.Sc. Thesis
In
Agric. Sci. (Food Science)

By

FATHY MOHAMED SABER MEHAYA
B.Sc. (Food Sci. Tech.), Fac. Agric., Kafer El-Sheikh Univ., Egypt, 2001

SUPERVISION COMMITTEE

Dr. NADIA ABD-ELRAHMAN SALAMA
Professor of Food Science, Fac. Agric., Cairo University

Dr. SALAH HUSSEIN ABOU-RAYA
Professor of Food Science, Fac. Agric., Cairo University

Dr. ALI RAGAB SHALABY
Researcher Professor, Food Technology Dept., NRC, Dokki, Egypt

Name of Candidate: Fathy Mohamed Saber Mehaya **Degree:** M.Sc.
Title of Thesis: Tetracycline Residues in Chicken Products and Their Stability During Heat Treatments
Supervisors: Dr. Nadia Abd-Elrahman Salama
Dr. Salah Hussein Abou-Raya
Dr. Ali Ragab Shalaby
Department: Food Science. **Approval: 17/3/2010**

ABSTRACT

The main aim of this study was to monitor tetracycline (TC) residues (oxytetracycline, tetracycline, chlorotetracycline and doxycycline) in chicken meat and liver. Development of a valid analytical method and the fate of TC residues during cooking was also considered. The calibration curves of the developed method were linear ($r^2 > 0.999$) and the sensitivity was 1.44, 1.9, 0.954 and 1.23 for OTC, TC, CTC and DC, respectively. Accuracy was 71.88–92.44.3% and 68.88–84.84% for meat and liver, respectively. Precision was lower than 10 % in all cases. Limit of detection (LOD) was 4.4, 5, 13 & 10ng for OTC, TC, CTC & DC, respectively. The corresponding values of limit of quantitation (LOQ) were 10, 13, 27 &22ng.

Among 150 chicken meat and liver samples (50 each of breast, thigh and liver) collected during one year starting from May 2006 to May 2007; 66 (44%) contained tetracycline residues including 21 (42%) breast, 19 (38%) thigh and 26 (52%) liver samples. The frequency of the residues in winter samples was 48 (64%), including 16 (64%) breast, 14 (56%) thigh and 18 (72%) liver, the corresponding values of samples collected in summer were 18 (24); 5 (20%), 5 (20%) and 8 (32%) liver. Moreover, a total of 12 (8%), 11 (7.33%) and 20 (13.33%) samples of breast, thigh and liver, respectively, have TCs residue above maximum residue limit.

The reduction in TC residues due to boiling and roasting (40 min) was from 41.81 - 91.46% and 13.65 - 72.08%, respectively, depending upon TC type. By microwaving (20min), TCs reduction was from 46.72- 100%. A linear relationship was observed between the $\log_{10}$ of TC concentration and the time of treatment. Whereas the D value of microwaving was 24.4 min, the D values of boiling and roasting were 53.2 min and 101.63 min, respectively. Regardless cooking procedure, DC antibiotic was the most heat stable while OTC was the most heat labile as evidenced by the higher and lower D values, respectively.

Key words: Tetracycline residues, chicken meat and liver, HPLC, heat treatment, thermostability and D value.

بقايا التتراسيكلينات فى منتجات الدجاج ومدى ثباتها أثناء المعاملات الحرارية

رسالة مقدمة من

فتحى محمد صابر مهيا

بكالوريوس علوم زراعية (علوم وتكنولوجيا الأغذية) جامعة كفر الشيخ، ٢٠٠١

للحصول علي درجة

الماجستير

في

العلوم الزراعية
(علوم الأغذية)

قسم علوم الأغذية
كـــلية الـــزراعة
جامعة القاهرة
مـــصـــر

٢٠١٠

بقايا التتراسيكلينات فى منتجات الدجاج ومدى ثباتها أثناء المعاملات الحرارية

رسالة الماجستير

في العلوم الزراعية

(علوم الأغذية)

مقدمة من

فتحى محمد صابر مهيا

بكالوريوس علوم زراعية (علوم وتكنولوجيا الأغذية) جامعة كفر الشيخ، ٢٠٠١

لجنة الحكم

الدكتور/ محمد فرج خلاف .....

أستاذ الصناعات الغذائية - كلية الزراعة - جامعة عين شمس

الدكتور / أحمد توفيق العاقل .....

أستاذ الصناعات الغذائية - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

الدكتور/ نادية عبد الرحمن سلامة .....

أستاذ الصناعات الغذائية - كلية الزراعة - جامعة القاهرة

الدكتور/ صلاح حسين أبو ريه .....

أستاذ الصناعات الغذائية – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

التاريخ ١٧ / ٣ /٢٠١٠

بقايا التتراسيكلينات فى منتجات الدجاج ومدى ثباتها أثناء المعاملات الحرارية

رسالة الماجستير
في العلوم الزراعية
(علوم الأغذية)

مقدمة من

فتحى محمد صابر مهيا
بكالوريوس علوم زراعية (علوم وتكنولوجيا الأغذية) جامعة كفر الشيخ، ٢٠٠١

لجنة الإشراف

الدكتور/ نادية عبد الرحمن سلامة
أستاذ الصناعات الغذائية ـ كلية الزراعة ـ جامعة القاهرة

الدكتور/ صلاح حسين أبو ريه
أستاذ الصناعات الغذائية – كلية الزراعة – جامعة القاهرة

الدكتور/ على رجب شلبى
أستاذ باحث بقسم الصناعات الغذائية – المركز القومي للبحوث

اسم الطالب : فتحى محمد صابر مهيا **الدرجة:** ماجستير

عنوان الرسالة: بقايا التتراسيكلينات فى منتجات الدجاج ومدى ثباتها أثناء المعاملات الحرارية

المشرفون : **الدكتور :** نادية عبد الرحمن سلامة
الدكتور : صلاح حسين ابو ريه
الدكتور : على رجب شلبى

قسم: علوم الأغذية **تاريخ منح الدرجة:١٧ / ٣ /٢٠١٠**

المستخلص العربي

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو رصد بقايا التتراسيكلينات فى منتجات الدجاج (لحوم وكبد). كذلك تناولت تطوير طريقة التحليل المستخدمة وتأثير المعاملات الحرارية عليها. أظهرت النتائج أن الارتباط بين نقاط المنحنى القياسى كان أكبر من ٠,٩٩٩ وحساسية الطريقة كانت ١,٤٤، ١,٩ ، ٠,٩٥٤ و ١,٢٣ لكل من الأوكسى تتراسيكلين والتتراسيكلين والكلورتتراسيكلين والدوكسى سيكلين على التوالى. وكانت نسبة الاسترجاع من ٧١,٨٨ إلى ٩٢,٤٤ و من ٦٨,٨٨ إلى ٨٤,٨٤ % لكل من لحم وكبد الدجاج على التوالى. وكان الانحراف المعيارى النسبى الذى يحدد دقة الطريقة أقل من ١٠% فى كل الحالات. كذلك كانت حدود الكشف ٤,٤ ، ٥ ، ١٣ ، ١٠ نانوجرام لكل من الأوكسى تتراسيكلين والتتراسيكلين والكلوروتتراسيكلين والدوكسى سيكلين على التوالى، وكانت النتائج المناظرة لها فى حدود التقدير الكمى هى ١٠ ، ١٣ ، ٢٧ ، ٢٢ نانوجرام.

ما بين ١٥٠ عينة لحوم وكبد دجاج (٥٠ عينه من كل من صدور ، أوراك وكبد دجاج) جمعت من أسواق مدينة الجيزة خلال الفترة من مايو ٢٠٠٦ إلى مايو ٢٠٠٧م ، ٦٦ (٤٤%) عينة كانت موجبة لبقايا التتراسيكلينات ومقسمة كالأتي: ٢١ (٤٢ %) عينة صدور ، ١٩ (٣٨%) عينة أوراك ، ٢٦ (٥٢%) عينة كبد. كما أظهرت النتائج أن بقايا التتراسيكلينات في الشتاء ٤٨ (٦٤%) وتشمل: ١٦ (٦٤%) عينة صدور ، ١٤ (٥٦%) عينة أوراك ، ١٨ (٧٢%) عينة كبد ، فى حين أن بقايا التتراسيكلينات فى العينات المجمعة في الصيف ١٨ (٢٤%) وتشمل: ٥ (٢٠%) عينة صدور ، ٥ (٢٠%) عينة أوراك ، ٨ (٣٢) عينة كبد. وكذلك أظهرت النتائج أن ١٢ (٨%) ، ١١ (٧,٣٣%) ، ٢٠ (١٣,٣٣%) من عينات الصدور والأوراك و الكبد على التوالي، كانت تحتوى على تركيزات أعلى من الحدود المسموح بها دولياً.

كما امتدت الدراسة لمعرفة تأثير المعاملات الحرارية على بقايا التتراسيكلينات فى العينات الموجبة لها وكان الاختزال الناتج عن الغليان والشى لمدة ٤٠ دقيقة يترواح بين ٤١,٨ إلى ٩١,٤٦% وبين ١٣,٦٥ إلى ٧٢,٠٨ % على التوالى. وترواح الاختزال بالمعاملة بموجات الميكروويف لمدة ٢٠ دقيقة بين ٤٦,٧٢ إلى ١٠٠%. كما لوحظ من النتائج أيضا وجود علاقة خطية بين لوغاريتم التركيز والوقت. كذلك أظهرت الدراسة قيمة D value (وهى الوقت اللازم لاختزال بقايا المضاد الحيوى الموجود فى لحوم الدجاج إلى ٩٠%) بالمعاملة بالميكروويف كانت ٢٤,٤ دقيقة وكانت ٥٣,٢ و ١٠١,٦٣ دقيقة فى حالة المعاملة بالغليان و الشى على التوالى. وطبقاً للمعاملات الحرارية وقيم D value المتحصل عليها فإن مركب الدوكسى سيكلين كان أكثر التتراسيكلينات ثباتاً حرارياً بينما كان الأوكسى تتراسيكلين أكثر التتراسيكلينات تأثرا بالحرارة .

الكلمات الدالة: بقايا التتراسيكلينات ، لحوم وكبد الدجاج ، التحليل الكروماتوجرافى عالى الأداء ، المعاملة الحرارية، الثبات الحرارى، D value.

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my sincere thanks, deepest gratitude and appreciation to ***Dr. NADIA ABD-ELRAHMAN SALAMA*** *and* ***Dr. SALAH HUSSEIN ABOU-RAYA*** *Professors of food science, Faculty of Agriculture, Cairo University for suggesting the problem, supervision, continued assistance and their guidance through the course of study and revision the manuscript of this thesis. Sincere thanks to* ***Dr. ALI RAGAB SHALABY*** *Researcher Professor of food technology, NRC, Giza for suggesting the problem, supervision, continued assistance and revision the manuscript of this thesis. Sincere thanks to* ***Dr. WAFAA HUSSIEM EMAM*** *Assistant Researcher Professor of food technology, NRC, Giza for suggesting the problem, supervision and continued assistance*

Grateful appreciation is also extended to all staff members of food technology Department, NRC, Giza

Special deep appreciation is given to my father, my late mother, my brothers, sisters, and my love.

CONTENTS

	Page
INTRODUCTION	1
REVIEW OF LITERATURE	9
1. Use of tetracyclines in livestock	9
2. Tetracycline residues in livestock edible parts as a result of their uses during the production	11
a. Poultry and poultry products	11
b. Other livestock and their products	15
3. Tetracycline residues in marketed livestock edible parts	16
a. Poultry and poultry products	16
b. Other livestock and their products	22
4. Legislation for veterinary antibiotics	24
5. Thermostability of tetracycline residues in foods of animal origin	25
6. Analytical methods of tetracycline residues	29
a. Extraction and clean-up of tetracycline residues in foods	30
b. Separation of tetracycline residues	34
c. Detection and quantification of tetracycline residues	41
MATERIALS AND METHODS	45
1. Material	45
a. Sampling	45
b. Chemicals and reagents	45
c. Apparatus	46
d. Standard solutions	46
e. Fortification of samples	46
2. Analytical methods	47
a. Extraction procedure	47
b. Clean-up techniques	48
c. Chromatographic separation of TCs	49
d. Detection and quantitation	50
3. Technological methods	50

a. Boiling..... **50**
b. Microwave oven..... **51**
c. Roasting..... **51**
4. Thermostability parameters, statistical analysis and experiments..... **51**
a. Thermostability parameters..... **51**
b. Statistical analysis. **52**
c. Experiments. **52**
RESULTS AND DISCUSSION..... **53**
1. Optimizing HPLC method for determining tetracycline residues in chicken meat and liver..... **53**
a. Optimization of chromatographic conditions..... **53**
1. Selection of the optimum detection wavelength..... **53**
2. Selection of the suitable mobile phase..... **54**
b. Clean up optimization..... **57**
c. Optimizing recovery..... **63**
d. The developed method..... **65**
e. Validation of the developed method..... **67**
1. Linearity and sensitivity **67**
2. Limit of detection and limit of quantitation **67**
3. Precision and accuracy **68**
2. Tetracycline residues in chicken meat and liver retailed at Giza city open markets– Egypt **71**
3. Stability of tetracycline residues in chicken meat during heat treatments..... **78**
SUMMARY..... **89**
REFERENCES **93**
ARABIC SUMMARY.....

LIST OF TABLES

No.	Title	Page
1.	Diode array detector response of the examined TCs at two wavelengths.....……	**53**
2.	Chromatographic parameters of TCs separated on Nuclosil 100C18 column with different mobile phases.……..….....	**56**
3.	Clean up step recovery of TCs added to different extracts.....	**61**
4.	Extraction recovery of TCs from spiked samples…….....	**66**
5.	Linearity, sensitivity, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of the developed method. ……..	**68**
6.	Precision and accuracy of the developed method for tetracycline in chicken meat and liver samples (n=18)…....…	**69**
7.	Frequency of total tetracycline residues in chicken samples collected during summer and winter seasons……...…	**72**
8.	Frequency of tetracycline compounds residue and their concentration ranges detected in the collected chicken samples. ……..……..……..	**74**
9.	Frequency of chicken samples containing tetracycline residues above maximum residue limits (MRLs)……..…..	**76**
10.	Reduction of tetracycline residues in chicken meat as affected by ordinary cooking methods. ……..……....……..	**82**
11.	Relationship between time of cooking method and reduction of TC residues in chicken meat. ……..….....	**84**
12.	Decimal reduction time values of TC residues in breast meat at different heat treatments. ……..……....……..	**88**

LIST OF FIGURES

No.	Title	Page
1.	Typical HPLC chromatogram of tetracyclines (100ng) each of OTC, TC, CTC and DC……..……..……..	**58**
2.	Typical HPLC chromatogram of blank chicken meat.....…	**58**
3.	Typical HPLC chromatogram of spiked chicken meat sample with 200 ng g^{-1} of each tetracyclines. ……..……	**59**
4.	Typical HPLC chromatogram of blank chicken liver. .....…	**59**
5.	Typical HPLC chromatogram of spiked chicken liver sample with 600 ng g^{-1} of each tetracyclines. ……..…..…	**60**
6.	Degradation curves of TCs residue in breast meat after roasting treatment. ……..….....	**85**
7.	Degradation curves of TC residues in thigh meat after roasting treatment. ……..……..…..…	**85**
8.	Degradation curves of TC residues in thigh meat after microwave treatment. ……..……..…..…	**86**
9.	Degradation curves of TC residues in breast meat after microwave treatment. ……..…..……..…	**86**
10.	Degradation curves of TC residues in thigh meat after boiling treatment..…..……..……..…..…	**87**
11.	Degradation curves of TC residues in breast meat after boiling treatment. ……..……..…..…	**87**

الملخص العربي

بقايا التتراسيكلينات فى منتجات الدجاج ومدى ثباتها أثناء المعاملات الحرارية

الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو رصد بقايا التتراسيكلينات فى أنسجة الدجاج (لحوم وكبد) المجمعة من اسواق مدينة الجيزة وذلك من خلال تطوير وتقدير صلاحية الطريقة التى تم استخدامها بالإضافة إلى ذلك تقدير الثبات الحرارى لبقايا مركبات التتراسيكلينات فى لحوم الدجاج أثناء المعاملات الحرارية.

أهم النتائج المتحصل عليها:-

١. **تحسين الطريقة المستخدمة فى تقدير بقايا التتراسيكلينات فى لحوم وكبد الدجاج.**

أ. عند استخدام طول موجى ٣٥١ نانومتر كان مُعامل استجابة الكاشف أفضل عنه فى حالة استخدام طول موجى ٣٦٥ نانومتر.

ب. تم الحصول على أفضل فصل لمركبات التتراسيكلينات باستخدام الطور المتحرك V عنه عند استخدام الأطوار المتحركة الأخرى.

ت. تم الحصول على قيم إزاحة (resolution) جيدة حيث كانت ٢,٧ ، ٥,٥٩ ، ٣,٥٥ بين الأوكسى تتراسيكلين - التراسيكلين ، التتراسيكلين - الكلوروتتراسيكلين و الكلوروتتراسيكلين - الدوكسى سيكلين.

ث. وجد أن كفاءة خطوة التنقية تأثرت بكل من محلول الاستخلاص ونوع العينة.

ج. تم الحصول على أعلى كفاءة للتنقية عند الاستخلاص بمحلول السترات المنظم بغض النظر عن المادة المستخلصة.

ح. نسبة الاسترجاع فى عينات لحوم الدجاج كانت أعلى منها فى حالة عينات الكبد بغض النظر عن محلول الاستخلاص.

خ. أعطى الاستخلاص بمحلول السترات المنظم مع الموجات فوق الصوتية أعلى معدل استرجاع فى كل من عينات اللحم والكبد مقارنة بطرق الاستخلاص الأخرى.

د. نسبة الاسترجاع فى عينات اللحوم كانت أعلى منها فى عينات الكبد وذلك لنفس طريقة الاستخلاص.

ذ. الطريقة المطورة تشمل استخلاص باستخدام محلول السترات المنظم مع الموجات الفوق صوتية ثم عملية التنقية باستخدام solid phase extraction . وتم الفصل باستخدام عمود Nuclosil 100 C18 باستخدام نظام فصل متدرج (الطور المتحرك V) بمعدل سريان ١ مللى لكل دقيقة.

ر. دراسة صلاحية الطريقة المطورة تشير إلى أن العلاقة بين استجابة الكاشف(DAD) و كمية التتراسيكينات المحقونة كانت خطية وذات ارتباط عالي ≤ ٠,٩٩٩١.

ز. حساسية الطريقة المعدلة كانت ١,٤٤، ١,٩ ، ٠,٩٥٤ و ١,٢٣ لكل من الأوكسى تتراسيكلين والتتراسيكلين والكلوروتتراسيكلين والدوكسى سيكلين على التوالي. كذلك كانت حدود الكشف ٤,٤ ، ٥ ، ١٣ ، ١٠ نانوجرام لكل من الأوكسى تتراسيكلين والتتراسيكلين والكلوروتتراسيكلين والدوكسى سيكلين على التوالى، وكانت النتائج المناظرة لها فى حدود التقدير الكمى هى ١٠ ، ١٣ ، ٢٧ ، ٢٢ نانوجرام .

س. كانت نسبة الاسترجاع من ٧١,٨٨ إلى ٩٢,٤٤ و من ٦٨,٨٨ إلى ٨٤,٨٤ % لكل من عينات لحم وكبد الدجاج على التوالى. وكان الانحراف المعيارى النسبى الذى يحدد دقة الطريقة المعدلة يتروح بين ٣,٩٥ إلى ٨,٠٨ % لكل من عينات لحم وكبد الدجاج على التوالى.