

مروری بر روش‌های میکرواستخراج مایع-مایع مبتنی بر حلال‌های اتکتیک عمیق در

شناسائی آنتی‌بیوتیک‌ها در شیر به روش کروماتوگرافی

کاربرد حلال‌های اتکتیک عمیق در میکرواستخراج آنتی‌بیوتیک‌های شیر

جلیل خندقی^۱، حمید میرزائی^۲، افشین جوادی^۲، رامین عطازاده^۳، محمدرضا افشارمقدم^{۴،۵*}

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران

۲. گروه بهداشت مواد غذایی، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۳. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد صوفیان، دانشگاه آزاد اسلامی، صوفیان، ایران

۴. مرکز ایمنی غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۵. مرکز تحقیقات آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات: mr.afsharmogaddam@yahoo.com

چکیده

وجود بقایای آنتی‌بیوتیک در محصولات غذایی به دلیل توسعه مقاومت ضدمیکروبی، تهدیدی جدی برای سلامت عمومی محسوب می‌شود که اثربخشی داروهای آنتی‌بیوتیک را در درمان عفونت‌ها کاهش می‌دهد. پرداختن به این چالش مستلزم نظارت دقیق در سراسر زنجیره تولید مواد غذایی است. این بررسی سیستماتیک بر نتایج مقالات اصلی و مروری اخیر (۱۴۰۴-۱۳۹۴) جمع‌آوری شده از پایگاه‌های داده علمی مختلف در مورد میکرواستخراج فاز مایع مبتنی بر حلال‌های اتکتیک عمیق در ترکیب با روش‌های کروماتوگرافی برای آنالیز بقایای آنتی‌بیوتیک در نمونه‌های شیر متمرکز است. تشخیص سطوح ناچیز این ترکیبات در نمونه‌های غذایی نیازمند استفاده از روش‌های تحلیلی پیشرفته با حساسیت و گزینش‌پذیری بالا است. در این زمینه، میکرواستخراج فاز مایع گزینه مناسبی برای این کار است زیرا با استفاده از مقادیر کمی حلال، آنالیت‌های هدف را به طور مؤثر تغلیظ می‌کند و بنابراین الزامات استانداردهای سختگیرانه در این زمینه را تأمین می‌کند. حلال‌های اتکتیک عمیق به عنوان جایگزین‌های سبز و سازگار با محیط زیست برای حلال‌های آلی معمولی در تجزیه مواد غذایی، توجه فزاینده‌ای را به خود جلب می‌کنند. ترکیب حلال‌های اتکتیک عمیق و تکنیک‌های میکرواستخراج، مصرف حلال را به حداقل می‌رساند و با اصول شیمی سبز سازگار است. این مطالعه ضمن بررسی پیامدهای مهم باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیک در مواد غذایی بر سلامت عمومی، کاربرد حلال‌های اتکتیک عمیق سازگار با محیط زیست را برای آماده‌سازی نمونه و استخراج این آلاینده‌ها از ماتریس‌های غذایی پیچیده برجسته می‌کند.

واژه‌های کلیدی: ریزاستخراج فاز مایع، حلال‌های اتکتیک عمیق، آنتی‌بیوتیک، شیر

مقدمه

پیشرفت صنعت غذا و تحولات بوجود آمده در آن، خطرات و نگرانی‌هایی را در مورد مصرف مواد غذایی جدید حاوی محتویات غیر ایمن به همراه داشته است (Cavazza et al., 2022). از جمله‌ی این مخاطرات می‌توان استفاده غیرقانونی و یا بیش از حد مجاز افزودنی‌ها، آلاینده‌های محیطی مانند فلزات سنگین و باقیمانده‌های دارویی و آلاینده‌های بیولوژیکی را نام برد. بسیاری از این مواد می‌توانند اثرات سرطان‌زایی، جهش‌زایی و سیتوتوکسیک داشته باشند (Gu et al., 2022)، لذا مقادیر قابل قبول مصرف روزانه یا ADI (Acceptable daily intake) و بدون عوارض جانبی یا NOAEL (No-observed adverse-effect level) معیارهایی برای ارزیابی سمیت بالقوه این مواد مضر هستند که توسط نهادهای ناظر بر بهداشت جامعه تعیین شده‌اند (Amchova et al., 2015).

دسته‌های رایج آنتی‌بیوتیک‌ها شامل بتالاکتام‌ها، کینولون‌ها، سولفونامیدها، ماکرولیدها و تتراسایکلین‌ها به طور گسترده‌ای برای درمان عفونت‌ها، پیشگیری از بیماری‌ها و افزایش رشد در دام‌های تولیدکننده غذا استفاده می‌شوند. بنابراین، استفاده نادرست می‌تواند منجر به باقی‌مانده‌های بالای آنتی‌بیوتیک در غذاهای مشتق‌شده از حیوانات، به ویژه در کبد، کلیه‌ها و چربی شود (Tajick & Shohreh, 2006). این باقی‌مانده‌ها خطرات جدی برای سلامت عمومی، از جمله واکنش‌های آلرژیک، سمیت مزمن، اختلال در میکروبیوتای روده و باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ایجاد می‌کنند که سالانه باعث میلیون‌ها عفونت و هزاران مرگ می‌شوند (Afshar Mogaddam & Vajdi Hokmabad, 2023; Tajallayi et al., 2023). به علاوه، بقایای آنتی‌بیوتیک ممکن است مانع تخمیر باکتریایی در محصولات مانند ماست و پنیر شده و باعث ضررهای اقتصادی و موانع تجاری شود (Dluhošová et al., 2024). برای حصول اطمینان از ایمنی مواد غذایی، سازمان‌های نظارتی بالاترین سطح مجاز باقی‌مانده‌های دارویی که برای مصرف بی‌خطر هستند را به عنوان حداکثر حد مجاز باقی‌مانده (MRL) تعیین کرده‌اند که معمولاً سطوح کمی پائینی دارند. بنابراین، تشخیص این باقی‌مانده‌ها هم نیاز به روش‌های تجزیه‌ای حساس داشته و هم آماده‌سازی نمونه را به یک مرحله حیاتی در آنالیز شیمیایی این مواد تبدیل می‌کنند (Rasi et al., 2021).

آماده‌سازی نمونه به عنوان گلوگاه هر فرآیند تجزیه‌ای و گامی حیاتی در آنالیز شیمیایی مواد غذایی به شمار می‌رود. این مرحله از فرایند تجزیه‌ای زمینه‌ساز بهبود قابلیت‌های روش تجزیه با افزایش دقت، صحت و گزینش پذیری است. با وجود پیشرفت‌های زیاد سیستم‌های شناسایی در دهه‌های اخیر، چیزی از نقش و اهمیت مرحله آماده‌سازی نمونه قبل از استفاده از این دستگاه‌های تجزیه‌ای کاسته نشده است (Bul dini et al., 2002). در طول مرحله آماده‌سازی، نمونه‌ها اغلب به شکلی سازگار با دستگاه تجزیه‌ای تبدیل شده و از اجزای ماتریکس مزاحم نیز پاک می‌شوند. از دیگر ویژگی‌های مرحله‌ی آماده‌سازی نمونه می‌توان تغلیظ آنالیت برای بالا بردن حساسیت روش را نام برد (Mitra & Brukh, 2003). در حالی که روش‌های سنتی مانند LLE (Liquid-liquid extraction) همچنان مفید هستند، تکنیک‌های جدیدتری برای رفع چالش‌های تجزیه‌ای و تضمین ایمنی مواد غذایی در حال توسعه هستند، به‌طوریکه پیشرفت‌های اخیر بر تکنیک‌های مینیاتوری و سازگار با محیط زیست برای افزایش حساسیت و کاهش اثرات زیست‌محیطی تمرکز دارند (Kechagia & Samanidou, 2017).

با توجه به اینکه روش‌های میکرواستخراج فاز مایع یا LPME (Liquid phase microextraction) یکی از متنوع‌ترین و در عین حال، پرکاربردترین روش‌های آماده‌سازی سبز نمونه‌های مواد غذایی برای آنالیز شیمیایی آن‌ها به‌شمار می‌رود، در این مطالعه مروری ضمن بیان اهمیت باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در شیر و معرفی حلال‌های سبز اتکتیک عمیق، مطالعات انجام گرفته در میکرواستخراج مایع-مایع مبتنی بر حلال‌های اتکتیک عمیق برای شناسایی کروماتوگرافیک انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در شیر را که در ده سال اخیر (۲۰۲۵-۲۰۱۵) جمع‌بندی و توضیح داده شده است.

مواد و روش‌ها

این مقاله از نوع مطالعه مروری (Systematic Review) است. جامعه مورد مطالعه شامل بیش از ۵۰ مقاله تحقیقی و مروری اصیل بوده که بدون سوگیری (Bias) از پایگاه‌های داده و موتورهای جستجوگر PubMed, SID, Google scholar, و Science direct در ۱۰ سال گذشته (۱۳۹۴ تا ۱۴۰۴) انتخاب و بررسی شده است. کلید واژه‌های شیمی سبز، آنتی‌بیوتیک، شیر، Deep eutectic solvent, Green chemistry, Antibiotic, Liquid liquid extraction, Dairy, Milk, و Chromatography برای این جستجو مورد استفاده قرار گرفتند.

- اهمیت باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی شیر

از زمان کشف اولین آنتی‌بیوتیک توسط فلمینگ، آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی، نیمه‌مصنوعی و سنتزی متنوعی معرفی و به طور گسترده برای پیشگیری و درمان عفونت‌ها در انسان استفاده می‌شوند. با این حال، آنتی‌بیوتیک‌های حیاتی برای پزشکی انسانی به‌طور گسترده در صنعت دام‌پروری نیز به عنوان محرک رشد و درمان و پیشگیری از عفونت‌ها استفاده می‌شوند که منجر به ایجاد باکتری‌های مقاوم می‌گردد (Bacanli & Başaran, 2019). بقایای آنتی‌بیوتیک در محصولات حیوانی مانند گوشت، تخم‌مرغ و شیر می‌تواند باعث بروز واکنش‌های آلرژیک، مسمومیت اندام‌ها، اختلالات تولیدمثلی و حتی سرطان شود. همچنین استفاده از کودهای طبیعی آلوده به آنتی‌بیوتیک، محیط زیست را تهدید می‌کند و این ترکیبات به عنوان آلاینده‌های آلی پایدار در خاک و آب باقی می‌مانند (Antos et al., 2024). یکی از چالش‌های اصلی در این مورد نبود سیستم نظارتی یکپارچه برای پایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در دام‌ها و ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی است. همچنین داده‌های آشکاری درباره میزان مصرف این داروها در دام‌ها وجود ندارد. از طرفی، سنجش دقیق آنتی‌بیوتیک‌ها و متابولیت‌های آنها در نمونه‌های غذایی و محیطی به دلیل پیچیدگی ماتریکس نمونه‌ها دشوار است (Montone et al., 2024).

نکته‌ی مهمی که کمتر به آن پرداخته شده است، راهیابی آنتی‌بیوتیک‌ها به مواد غذایی از طریق محیط و بخصوص آب‌های آلوده است. آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی و متابولیت‌های آن‌ها پس از دفع از بدن وارد سیستم‌های فاضلاب و محیط زیست می‌شوند. این ترکیبات می‌توانند ماه‌ها تا سال‌ها در خاک باقی مانده و در نهایت وارد زنجیره غذایی و تأمین آب شوند (Xu et al., 2014). مطالعات متعددی حضور آنتی‌بیوتیک‌ها را در آب‌های سطحی، زیرزمینی و حتی آب آشامیدنی گزارش کرده‌اند. دانشمندان عوامل متعددی مانند ساختار فیزیکی خاک، pH، محتوای کربن آلی و شرایط آب‌وهوایی را در بقای آنتی‌بیوتیک‌ها در آن موثر دانسته‌اند (Danner et al., 2019).

آنتی‌بیوتیک‌ها بر اساس معیارهای مختلفی مانند ساختار مولکولی و pK_a طبقه‌بندی می‌شوند. ضمن اینکه فعالیت دارویی به ساختار شیمیایی وابسته است و گروه‌های عاملی موجود در مولکول، رفتار فارماکوکینتیک و ویژگی‌هایی مانند حلالیت در آب یا چربی را تعیین می‌کنند، ساختار شیمیایی همچنین بر توسعه روش‌های تجزیه‌ای تأثیر می‌گذارد به‌طوری‌که انتخاب روش استخراج در آنالیز به حلالیت ترکیب در حلال‌های مختلف بستگی دارد (Khataei et al., 2022). آنتی‌بیوتیک‌ها به ۱۲ گروه تقسیم می‌شوند که هرکدام کاربردهای خاصی دارند و پس از مصرف می‌توانند در آب‌های محیطی یا زنجیره غذایی یافت شوند. در میان طیف گسترده‌ای از این ترکیبات دارویی، سازمان بهداشت جهانی فلوروکینولون‌ها، سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم، ماکرولیدها، گلیکوپپتیدها و پلی‌میکسین‌ها را به عنوان آنتی‌بیوتیک‌های "با بالاترین اولویت و اهمیت" درمانی برای انسان طبقه‌بندی می‌کند، زیرا گزینه‌های جایگزین این آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتریایی محدود هستند (Majdinasab et al., 2020).

– حلال‌های اتکتیک عمیق در شیمی سبز

به‌طور کلی، مراحل یک روش تجزیه‌ی شیمیایی شامل نمونه برداری، آماده سازی، اندازه‌گیری و آنالیز نمونه است. یکی از اصول مهم روش‌های آماده‌سازی سبز نمونه یا GSP (Green sample preparation) کاهش حجم نمونه است که سبب کاهش استفاده از حلال‌های استخراج‌کننده خواهد شد. بهترین مثال در این مورد توسعه‌ی روش‌های مینیاتوری بخصوص روش‌های ریزاستخراج (Micro-extraction) می‌باشد (Kokosa, 2013). همچنین، استفاده از حلال‌های بی‌خطر و به اصطلاح سبز بجای حلال‌های آلی خطرناک هم از اصول مهم دیگر در آماده سازی نمونه سبز می‌باشد (Lesan et al., 2023; Zare Sani et al., 2023).

در سال‌های گذشته، جنبه‌ی سبز بودن مایعات یونی به دلیل زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری نه چندان قوی آن‌ها به چالش کشیده شده است (Espino et al., 2016). برای حل این مشکل، حلال‌های اتکتیک عمیق یا DESs (Deep eutectic solvents) از سال ۲۰۰۴ ابداع شدند. حلال‌های اتکتیک عمیق از دو یا چند ترکیب آلی جامد با برقراری پیوندهای هیدروژنی تشکیل می‌شوند که در آن یک ترکیب دهنده‌ی پیوند هیدروژنی یا HBD (Hydrogen bond donor) و دیگری گیرنده پیوند هیدروژنی یا HBA (Hydrogen bond acceptor) است و مخلوط اتکتیک آن‌ها دارای نقطه ذوب کمتر از نقطه ذوب هر یک از اجزای تشکیل دهنده‌ی آن است (Florindo et al., 2019). در مقایسه با مایعات یونی، DES ها از نظر هزینه و سهولت آماده سازی، تجزیه پذیری زیستی و سمیت کمتر برتر هستند، به‌طوری‌که می‌توان آن‌ها را با یک روش سنتز ارزان و ساده و بر اساس گرم کردن محلول تشکیل دهنده‌ی آنها به دست آورد (Nezhad et al., 2024).

از دیگر ویژگی‌های این حلال‌ها می‌توان امکان تهیه‌ی حلال‌های اتکتیک عمیق طبیعی یا NADES (Natural Deep Eutectic Solvents) مشتق شده از ترکیبات طبیعی مانند قندها، اسیدهای آلی، مشتقات کولین، اسیدهای آمینه، اوره و ترپن‌ها را نام برد. NADES ها در دمای اتاق پایدار هستند و برای تجزیه با کروماتوگراف گازی سازگار هستند زیرا بسیاری از آن‌ها در دماهای بالاتر از ۲۰۰ درجه‌ی سلسیوس در درجه‌ی تزریق GC تجزیه می‌شوند (Bjelić et al., 2022; Nie et al., 2017).

- روش های میکرواستخراج مایع-مایع برپایه ی حلال های اتکتیک عمیق به کار رفته در شناسائی آنتی بیوتیک ها در

شیر

میکرواستخراج فاز مایع در دهه ۱۹۹۰ بر اساس اصول استخراج مایع-مایع توسعه یافت. مشابه میکرواستخراج فاز جامد (SPME)، این روش برای استخراج و تغلیظ آنالیت های هدف با استفاده از حداقل حجم حلال طراحی شده است. کارایی این روش به عوامل کلیدی مانند نوع و حجم حلال ها و همچنین مدت زمان استخراج بستگی دارد. روش LPME مزایای متعددی از جمله مقرون به صرفه بودن، قابلیت تنظیم آسان، ظرفیت بالای فاز استخراج و امکان تزریق مستقیم فاز نهایی به سیستم های مختلف تجزیه ای را دارد (Farajzadeh et al., 2014). بعدها و با گذشت زمان، LPME به چندین زیرگروه مختلف از جمله میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی یا HF-LPME (Hollow fiber liquid phase microextraction)، میکرواستخراج با قطره منفرد یا SDME (Single drop microextraction)، میکرواستخراج مایع-مایع پخشی یا DLLME (Dispersive liquid-liquid microextraction) و میکرواستخراج با جامدسازی قطره آلی شناور یا SFO-LPME (Solidified floating organic drop microextraction) توسعه یافته است (Câmara et al., 2022).

در یک روش میکرواستخراج مایع-مایع به کار رفته برای استخراج و پیش تغلیظ آنتی بیوتیک های تتراسایکلین از شیر، از حلال یوتکتیک عمیق آبگریز مبتنی بر تیمول و اسید اوکتانویک (۰/۳۵ : ۰/۶۵) و سپس استخراج معکوس آنالیت به فاز آبی استفاده شد. قابلیت های این روش در تعیین تتراسایکلین، کلرتراسایکلین و داکسی سایکلین در نمونه های شیر به روش HPLC-MS/MS نشان داده شد به طوریکه حد تشخیص برای تتراسایکلین و داکسی سایکلین ۵ نانوگرم بر کیلوگرم و برای کلرتراسایکلین ۵۰ نانوگرم بر کیلوگرم به دست آمد. همچنین حد اندازه گیری روش معرفی شده برای آنتی بیوتیک ها ۱۵-۱۵۰ نانوگرم بر کیلوگرم و دقت روش ۱۱ تا ۱۳ درصد (بر اساس انحراف استاندارد نسبی) حاصل شد (Cherkashina et al., 2022). دانشمندان دیگری برای اولین بار، روش میکرواستخراج مایع-مایع از طریق تشکیل حلال یوتکتیک عمیق آبگریز با تنظیم pH را برای تعیین سولفامتازین، سولفامتوکسازول، سولفاکینوکسالین و سولفادبازین در نمونه های شیر به کار بردند. در این مطالعه نشان داد حلال اتکتیک قلیایی حاوی ترپنوتید و اسید چرب اشباع از طریق اسیدی کردن محیط استخراج به صورت برجا (in situ) و بدون نیاز به حرارت دهی و استفاده از منابع انرژی کمکی تشکیل شد که در مقایسه با روش های مشابه موجود، فرآیند را به طور قابل توجهی ساده سازی کرده و زمان استخراج را به حداقل می رساند. فاکتورهای تغلیظ آنالیت ها در این تحقیق، بین ۲۲ تا ۱۰۳ متغیر بود و حدود تشخیص محاسبه شده ۵-۱ میکروگرم بر لیتر به دست آمد (Pochivalov et al., 2021). برای اولین بار و در سال ۲۰۲۴ از استخراج کومشی (Co-acervative extraction) برای میکرواستخراج فاز مایع انروفلوکساسین و تعیین غلظت آن در نمونه ی شیر با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا همراه با آشکارساز فلورسانس استفاده شد. در این استخراج حلال سوپرامولکولی (Supramolecular solvent) حاصل از ترکیب آمین های اولیه ی ۱-نونیل آمین به عنوان آمفی فیل (Amphiphile) همراه با حلال های یوتکتیک عمیق طبیعی آبگریز حاصل از منتول و اسید هگزانویک (با نسبت مولی ۱:۱) مورد استفاده قرار گرفت که منجر به اثر سینرژیک و توان استخراج بهتر شد به طوریکه بازده استخراج ۸۵ درصد فراهم گردید. پارامترهای تجزیه ای این روش ابداعی شامل محدوده ی خطی ۲۰-۲۵۰ میکروگرم در کیلوگرم، حد تشخیص ۷ میکروگرم در

کیلوگرم و مقادیر انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۷ درصد بود (Kurashov et al., 2024). برای استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها از شیر از روش‌های LLME مبتنی بر حلال‌های اتکتیک عمیق دیگری که بعضاً با کمک امواج فراصوت و گاهی با کمک امولسیفیکاسیون انجام شده است نیز استفاده شده که در جدول (۱) به آن‌ها اشاره شده است.

یکی از انواع روش‌های LPME بر پایه‌ی حلال‌های اتکتیک عمیق که در استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها از نمونه‌های شیر به کار رفته است میکرواستخراج مایع-مایع پخشی یا DLLME است. از زمان ابداع این روش در سال ۲۰۰۶، طیف گسترده‌ای از کاربردها برای آماده‌سازی و پیش تغلیظ ترکیبات گوناگون مانند آفت‌کش‌ها، نمونه‌های محیطی، مواد غذایی، داروها و لوازم آرایشی و بهداشتی توسط این تکنیک معرفی شده است (Rezaee et al., 2006; Hashemi et al., 2017; Limoei Khosrowshahi et al., 2022; Afshar Mogaddam et al., 2023; Nodrati et al., 2024). در روش DLLME مخلوطی از حلال‌های استخراج‌کننده و پخش‌کننده توسط سرنگ به داخل فاز حاوی آنالیت تزریق و سبب تشکیل یک محلول کدر (ابری) خواهد شد. پخش شدن قطرات ریز حلال استخراج‌کننده در محلول نمونه سبب ایجاد سطح تماس بسیار بالایی بین حلال و نمونه‌ی آبی می‌شود و در نتیجه زمان استخراج به میزان قابل توجه‌ای کاهش می‌یابد (Farajzadeh et al., 2014). از مزایای DLLME می‌توان به فاکتورهای تغلیظ و سرعت استخراج بالا، سادگی روش و هزینه‌های پایین، مصرف کم حلال‌های آلی سمی اشاره کرد. علیرغم مزایای فوق این روش دارای معایبی مانند کاهش ضریب توزیع به واسطه استفاده از حلال پخش‌کننده است که برای رفع معایب فوق، یک مرحله «کمکی» در روش DLLME، مانند فراصوت، ایجاد حباب هوا، سونیکاسیون، مایکروویو، جوشش یا Effervescence و ورتکس کردن اضافه و معرفی شده است (Dmitrienko et al., 2020).

در سال ۲۰۲۰ یک روش ساده و حساس میکرواستخراج مایع-مایع پخشی با کمک نمک‌زدایی (Salting-out) برپایه‌ی حلال یوتکتیک عمیق حاصل از n-دکانوئیک اسید و متیل تری اکتیل آمونیوم بروماید (با نسبت مولی ۲:۱) همراه با استخراج معکوس و کروماتوگرافی موئین الکتروکینتیکی میسلی (Micellar electro kinetic capillary chromatography) برای تعیین شش آنتی‌بیوتیک فلوروکینولون در نمونه‌های شیر، توسعه داده شد. محدوده‌ی خطی گسترده (۰/۸۰۰-۰/۲۰) میکروگرم بر میلی‌لیتر، حدود تشخیص کمتر از ۰/۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، درصد بازیابی ۸۷/۸-۱۱۴/۱ درصد و تکرارپذیری کمتر از ۷/۶ درصد (بر اساس مقادیر انحراف استاندارد نسبی) از ارقام شایستگی روش توسعه داده شده، معرفی شد (Yu et al., 2020). در پژوهش دیگری نیز برای اولین بار روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی با کمک فرآیند جوشش (Effervescence) مبتنی بر حلال اتکتیک عمیق سه جزئی متشکل از اسید هپتانوئیک آبگریز و تیمول (با نسبت مولی ۱:۲) حاوی اسید فرمیک هیدروفیل برای تولید حباب‌های CO₂ برای تعیین فلوروکینولون‌ها در نمونه‌های شیر با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و آشکارساز فلورسانس به کار گرفته شد. روش پیشنهادی موجب پراکندگی موثر ماده استخراج‌کننده شد که این امر سرعت فرآیند استخراج را افزایش داده و جداسازی فازها را بدون نیاز به سانتریفیوژ تسریع نمود. بازده استخراج ۸۶-۹۹ درصد و حدود تشخیص پائین بین ۰/۰۳ تا ۰/۰۶ میکروگرم بر لیتر موید کارایی خوب روش ابداعی بود (Barbayanov et al., 2022). از روش‌های DLLME مبتنی بر حلال‌های اتکتیک عمیق دیگری نیز به تنهایی و یا

بصورت تلفیق با روش‌های استخراج دیگر برای استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها از شیر استفاده شده که در جدول (۱) به آنها اشاره شده است.

جدول (۱) - برخی از روش های میکرواستخراج فاز مایع مبتنی بر حلال های اتکتیک عمیق به کاررفته در تعیین آنتی بیوتیک های شیر

روش استخراج	حلال اتکتیک عمیق	آنتی بیوتیک	دستگاه تجزیه ای	ارقام شایستگی				منبع
				محدوده ی خطی	حد تشخیص	تکرار پذیری (RSD%)	بازده استخراج (درصد)	
VA-ELLME	تیمول: اتیلن گلیکول: بنزیل الکل (۱:۲:۲)	تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین، داکسی سایکلین	HPLC-UV	۳-۵۰۰ میکروگرم در کیلوگرم	۰/۸۸-۲/۷۴ میکروگرم در کیلوگرم	کمتر از ۹	۶۸/۹-۱۰۲/۰	(Sereshti et al., 2022)
Ferromagnetic VA-LLME	منتول: اکتانویک اسید (۲:۱)	سیپروفلوکساسین، انروفلوکساسین	HPLC-UV	۱-۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر	۰/۳۰-۰/۳۵ میکروگرم در میلی لیتر	کمتر از ۷/۷	۸۴/۴-۹۵/۴	(Hou et al., 2022)
LLME	کولین کلراید: تیمول (۲:۱)	آمپی سیلین	LC-MS/MS	۳/۶-۳۶۱۲۷ میکروگرم در کیلوگرم	۳/۱ نانوگرم در گرم	کمتر از ۶/۳	۹۷/۲	Kiszkziel-Taudul et al., 2023
LLME	تیمول: دکانویک اسید (۱:۱)	تیگسیلین	LC-MS/MS	۰/۰۳-۴۰۰۰۰ میکروگرم در کیلوگرم	۰/۰۱ میکروگرم در کیلوگرم	۷/۸-۱۱/۷	۱۰۰/۲	Kiszkziel-Taudul & (Stankiewicz, 2023)
Ferromagnetic UA-LLME	کولین کلراید: فنول (۲:۱)	نورفلوکساسین، انروفلوکساسین	HPLC-UV	۵-۵۰۰۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر	۰/۳۵ میکروگرم در میلی لیتر	کمتر از ۳	۸۱-۱۰۴	(Meng et al., 2025)
DLLME	فسفو کولین کلراید: دی کلرواستیک اسید: بنزیل الکل (۱:۲:۲)	کلرامفنیکل، اکسی تتراسایکلین، داکسی سایکلین، پنی سیلین	HPLC-DAD	۶/۵-۲۵۰ میکروگرم در لیتر	۲/۰-۲/۸ میکروگرم در لیتر	کمتر از ۸	۶۵-۸۱	(Mohebi et al., 2020)
DLLME	تیمول: اتیلن گلیکول: بنزیل الکل (۱:۲:۲)	تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین، داکسی سایکلین	HPLC-UV	۵/۱-۲۰۰ میکروگرم در لیتر	۱/۵-۸/۵ میکروگرم در لیتر	کمتر از ۸/۴	۷۰-۱۱۳	(Sereshti et al., 2020)
DLLME	تیمول: اتیلن گلیکول: بنزیل الکل (۱:۲:۲)	سولفونامیدها	UPLC- MS/MS	۵-۵۰۰ میکروگرم در کیلوگرم	۰/۵-۱/۵ میکروگرم در کیلوگرم	کمتر از ۷/۵	۸۲/۶-۱۰۰/۱	(Shaaban et al., 2023)

Vortex-assisted emulsification liquid–liquid microextraction : VA-ELLME
Ferromagnetic vortex-assisted liquid-liquid microextraction : Ferromagnetic VA-LLME
Ferromagnetic Ultrasound-assisted liquid-liquid microextraction : Ferromagnetic UA-LLME
Dispersive liquid–liquid microextraction : DLLME
Vortex-assisted dispersive liquid–liquid microextraction : VA-DLLME
High performance liquid chromatography with diode-array detector : HPLC-DAD
High performance liquid chromatography with ultraviolet detector : HPLC-UV
Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry : UPLC-MS/MS
liquid chromatography-tandem mass spectrometry : LC-MS/MS

بحث و نتیجه‌گیری

آنتی‌بیوتیک‌ها و متابولیت‌های آن‌ها برای مدت طولانی در محیط‌زیست پایدار هستند و تجمع آن‌ها در محیط‌زیست و زنجیره‌ی غذایی تهدیدی جدی برای سلامتی جوامع بشری است، بنابراین توسعه روش‌های مؤثر برای تجزیه شیمیائی آن‌ها بسیار مهم است. روش‌های استخراج مبتنی بر حلال به‌طور گسترده برای استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها از نمونه‌های زیستی و محیطی مختلف استفاده‌شده است و برای بهبود پایداری زیست‌محیطی این تکنیک‌های استخراج، کوچک‌سازی و جایگزینی حلال‌های آلی خطرناک مرسوم با حلال‌های سبز موردتوجه ویژه‌ای قرار گرفته است.

این مقاله مروری بر جدیدترین تکنیک‌های میکرواستخراج مایع-مایع (LLME) مبتنی بر حلال‌های اتکتیک عمیق توسعه‌یافته برای شناسایی آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی ارائه می‌دهد. انواع مختلف این فناوری در این مطالعه بررسی شده است که نشان می‌دهد اخیراً علاقه فزاینده‌ای به توسعه‌ی انواع دوستدار محیط‌زیست روش‌های LLME وجود داشته است. مرحله استخراج میکرو برای دستیابی به عملکرد تجزیه‌ای مطلوب حیاتی است و این تکنیک‌ها به دلیل سهولت اجرا و استفاده از مواد و حلال‌های کم‌خطر نسبت به روش‌های مرسوم کلاسیک ارجح هستند. همچنین، اکثر آن‌ها به زمان کوتاه برای استخراج و حجم کمتری از معرف‌ها نیاز دارند. پیشرفت‌های اخیر در استفاده از حلال‌های اتکتیک عمیق برای استخراج ترکیبات آلی گوناگون، پتانسیل تحول‌آفرین آن‌ها در شیمی تجزیه را برجسته کرده است. این در حالی است که ادغام DES ها با تکنیک‌های میکرواستخراج، کارایی استخراج و پایداری زیست‌محیطی را به‌طور قابل توجه‌ای بهبود بخشیده است.

با وجود ویژگی‌های امیدوارکننده، چالش‌هایی مانند گرانبروی بالا و پایداری حرارتی حلال‌های اتکتیک عمیق هنوز وجود دارند. حلال‌های نوظهوری مانند حلال‌های اتکتیک عمیق طبیعی (NADES) و سوپرامولکول‌ها (SUPRAS) نویدبخش پیشرفت در این زمینه هستند. بنابراین، پژوهش‌های آینده می‌تواند بر توسعه‌ی نسل جدید حلال‌های سبز به همراه استانداردسازی پروتکل‌های آماده‌سازی برای بهبود تکرارپذیری و قابلیت کاربرد وسیع و تجاری و همچنین اتصال آنالین با دستگاه‌های تجزیه‌ای به منظور یکپارچه‌سازی پردازش نمونه‌ها متمرکز شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافع برای اعلام ندارد.

منابع

- Afshar Mogaddam, M., Khandaghi, J., and Vajdi HokmAbad, S. (2023). Use of Temperature-controlled Ionic Liquid-assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for the Detection of Amoxicillin, Cloxacillin and Erythromycin Residues in Cow Milk using High Performance Liquid Chromatography. Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology, 18(1): 119-126.
- Amchova, P., Kotolova, H., and Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. Regulatory Toxicology And Pharmacology, 73(3): 914-922.

- Antos, J., García-Cansino, L., García, M. Á., Ginter-Kramarczyk, D., Marina, M. L., Zembrzuska, J., Câmara, J. S., and Pereira, J. A. (2024). Microextraction techniques for antibiotics surveillance in the food chain and environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118009.
- Bacanlı, M., and Başaran, N. (2019). Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology*, 125: 462-466.
- Barbayanov, K., Timofeeva, I., and Bulatov, A. (2022). An Effervescence-Assisted Three-Component Deep Eutectic Solvent-Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction: Fluoroquinolones Determination in Foods. *Talanta*, 250: 123709.
- Bjelić, A., Hočevár, B., Grilc, M., Novak, U., and Likozar, B. (2022). A review of sustainable lignocellulose biorefining applying (natural) deep eutectic solvents (DESs) for separations, catalysis and enzymatic biotransformation processes. *Reviews in Chemical Engineering*, 38(3): 243-272.
- Buldini, P. L., Ricci, L., and Sharma, J. L. (2002). Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 975(1): 47-70.
- Câmara, J. S., Perestrelo, R., Olayanju, B., Berenguer, C. V., Kabir, A., and Pereira, J. A. (2022). Overview of different modes and applications of liquid phase-based microextraction techniques. *Processes*, 10(7):1347.
- Cavazza, A., Mattarozzi, M., Franzoni, A., and Careri, M. (2022). A spotlight on analytical prospects in food allergens: From emerging allergens and novel foods to bioplastics and plant-based sustainable food contact materials. *Food Chemistry*, 388: 132951.
- Cherkashina, K., Pochivalov, A., Shakirova, F., Shishov, A. Y., and Bulatov, A. (2022). Microextraction of tetracyclines from milk to deep eutectic solvents for the subsequent determination by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 77(3): 334-341.
- Danner, M.-C., Robertson, A., Behrends, V., and Reiss, J. (2019). Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects. *Science of the total environment*, 664: 793-804.
- Dluhošová, S., Bartáková, K., Vorlová, L., Navrátilová, P., Hanuš, O., and Samková, E. (2024). Dairy Chain Safety in the Context of Antibiotic Residues—Current Status of Confirmatory Liquid Chromatography Methods: A Review. *Antibiotics*, 13(11): 1038.
- Dmitrienko, S., Apyari, V., Tolmacheva, V., and Gorbunova, M. (2020). Dispersive liquid–liquid microextraction of organic compounds: An overview of reviews. *Journal of Analytical Chemistry*, 75: 1237-1251.
- Espino, M., de los Ángeles Fernández, M., Gomez, F. J., and Silva, M. F. (2016). Natural designer solvents for greening analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76: 126-136.
- Farajzadeh, M. A., Sorouraddin, S. M., and Afshar Mogaddam, M. R. (2014). Liquid phase microextraction of pesticides: a review on current methods. *Microchimica Acta*, 181: 829-851.
- Florindo, C., Lima, F., Ribeiro, B. D., and Marrucho, I. M. (2019). Deep eutectic solvents: overcoming 21st century challenges. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 18: 31-36.
- Gu, Y., Li, Y., Ren, D., Sun, L., Zhuang, Y., Yi, L., and Wang, S. (2022). Recent advances in nanomaterial-assisted electrochemical sensors for food safety analysis. *Food Frontiers*, 3(3): 453-479.

- Hashemi, B., Zohrabi, P., Kim, K.-H., Shamsipur, M., Deep, A., and Hong, J. (2017). Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97: 83-95.
- Hou, L., Ji, Y., Zhao, J., and Zhao, L. (2022). Deep eutectic solvent based-ferrofluid ultrasonic-assisted liquid–liquid microextraction for determination of quinolones in milk samples. *Microchemical Journal*, 179: 107664.
- Jafar Nezhad, F., Mirzaei, H., Khandaghi, J., Mogaddam, M. R. A., and Javadi, A. (2024). Simultaneous extraction and derivatization of biogenic amines during in-situ deep eutectic solvent-based liquid phase extraction from Doogh samples prior to HPLC analysis. *Microchemical Journal*, 205: 111327.
- Kechagia, M., and Samanidou, V. (2017). Trends in microextraction-based methods for the determination of sulfonamides in milk. *Separations*, 4(3): 23.
- Khandaghi, J., Afshar Mogaddam, M. R., and Vajdi Hokmabad, S. (2023). Development of a deep eutectic solvent-based extraction method for determination of tetracycline, Oxytetracycline and Enrofloxacin residues in cheese sample by high performance liquid chromatography. *Journal of food science and technology (Iran)*, 20(139): 79-92.
- Khataei, M. M., Epi, S. B. H., Lood, R., Spégel, P., Yamini, Y., and Turner, C. (2022). A review of green solvent extraction techniques and their use in antibiotic residue analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 209: 114487.
- Kiszkiel-Taudul, I., and Stankiewicz, P. (2023). Microextraction of tigecycline using deep eutectic solvents and its determination in milk by LC-MS/MS method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(30): 11716-11725.
- Kiszkiel-Taudul, I., Starczewska, B., and Jarosz, M. (2023). Microextraction of ampicillin from bovine milk using ionic liquids and deep eutectic solvents prior to its chromatographic determination with ultraviolet and tandem mass spectrometry detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 115, 104944.
- Kokosa, J. M. (2013). Advances in solvent-microextraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 43: 2-13.
- Kurashov, Y., Pochivalov, A., Petrova, A., Safonova, E., Garmonov, S., and Bulatov, A. (2024). Supramolecular solvents based on hydrophobic natural deep eutectic solvents and primary amines for preconcentration and determination of enrofloxacin in milk. *Talanta*, 279: 126666.
- Lesan, S., Mirzaei, H., Khandaghi, J., Afshar Mogaddam, M. R., and Javadi, A. (2023). Development of deep eutectic solvent based pressurized liquid extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction; application in extraction of aflatoxins from rice samples before HPLC–FLD. *Microchemical Journal*, 190: 108554.
- Limoei Khosrowshahi, B., Marzi Khosrowshahi, E., Afshar Mogaddam, M., and Khandaghi, J. (2022). Use of Dispersive Solid-Phase Extraction in Combination with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Assessment of Organophosphorus Pesticides in Fruit Juice Samples Using Gas Chromatography-Nitrogen-Phosphorus Detector. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 17 (2): 87-98. [In Persian]
- Majdinasab, M., Mishra, R. K., Tang, X., and Marty, J. L. (2020). Detection of antibiotics in food: New achievements in the development of biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 127: 115883.

- Meng, L., Tan, Y., and Xiao, W. (2025). Determination of Norfloxacin and Enrofloxacin in milk using deep eutectic solvent-based ferromagnetic fluid by UV-HPLC. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 46(5): 851-860.
- Mitra, S., and Brukh, R. (2003). *Sample preparation: an analytical perspective*. John Wiley pub. New Jersey, pp. 12-35.
- Mohebi, A., Samadi, M., Tavakoli, H. R., and Parastouei, K. (2020). Homogenous liquid-liquid extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of some antibiotics from milk samples before their determination by HPLC. *Microchemical Journal*, 157: 104988.
- Montone, C. M., Moneta, B. G., Laganà, A., Piovesana, S., Taglioni, E., and Cavaliere, C. (2024). Transformation products of antibacterial drugs in environmental water: identification approaches based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 238: 115818.
- Nie, J., Yu, G., Song, Z., Wang, X., Li, Z., She, Y., and Lee, M. (2017). Microwave-assisted deep eutectic solvent extraction coupled with headspace solid-phase microextraction followed by GC-MS for the analysis of volatile compounds from tobacco. *analytical methods*, 9(5): 856-863.
- Nodrati, A., Haghighat, A., Afshar Moghaddam, M., and Khandaghi, J. (2024). Combination of Liquid-phase Extraction with Dispersive Liquid-liquid Micro-extraction for the Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Honey Sample Using High-performance Liquid Chromatography. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 18(4): 93-102. [In Persian]
- Pochivalov, A., Cherkashina, K., Shishov, A., and Bulatov, A. (2021). Microextraction of sulfonamides from milk samples based on hydrophobic deep eutectic solvent formation by pH adjusting. *Journal of Molecular Liquids*, 339: 116827.
- Rasi, H., AfsharMogaddam, M., and Khandaghi, J. (2021). Application of a new extraction method coupled to high performance liquid chromatography for tetracyclines monitoring in cow milk. *Journal of food science and technology (Iran)*, 18(113): 339-349. [In Persian]
- Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M.R.M., Aghaee, E., Ahmadi, F., and Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography a*, 1116(1-2): 1-9.
- Sereshti, H., Jazani, S. S., Nouri, N., and Shams, G. (2020). Dispersive liquid-liquid microextraction based on hydrophobic deep eutectic solvents: application for tetracyclines monitoring in milk. *Microchemical Journal*, 158: 105269.
- Sereshti, H., Zarei-Hosseiniabadi, M., Soltani, S., and Taghizadeh, M. (2022). Green vortex-assisted emulsification microextraction using a ternary deep eutectic solvent for extraction of tetracyclines in infant formulas. *Food Chemistry*, 396: 133743.
- Shaaban, H., Mostafa, A., Alqarni, A. M., Alsultan, R., Aljarrash, Z., Al-Zawad, W., Al-Kahlah, S., and Amir, M. (2023). Dispersive liquid-liquid microextraction utilizing menthol-based deep eutectic solvent for simultaneous determination of sulfonamides residues in powdered milk-based infant formulas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 117: 105137.
- Tajallayi, M., Haghighat Asiabar, A., Afshar Mogaddam, M., and Khandaghi, J. (2023). Development of Dispersive Solid-phase Extraction Combined with Air-assisted Liquid-Liquid Microextraction for Determination of Sulfonamide Residues in Pasteurized Milk Samples using High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food Technology and Nutrition*, 21(1): 5-16. [In Persian]

- Tajick, M., and Shohreh, B. (2006). Detection of antibiotics residue in chicken meat using TLC. International journal of poultry science, 5(7): 611-612.
- Xu, J., Zhang, Y., Zhou, C., Guo, C., Wang, D., Du, P., Luo, Y., Wan, J., and Meng, W. (2014). Distribution, sources and composition of antibiotics in sediment, overlying water and pore water from Taihu Lake, China. Science of the total environment, 497: 267-273.
- Yu, K., Yue, M.-E., Xu, J., and Jiang, T.-F. (2020). Determination of fluoroquinolones in milk, honey and water samples by salting out-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent combined with MECC. Food Chemistry, 332: 127371.
- Zare Sani, M., Afshar Mogaddam, M. R., and Khandaghi, J. (2023). Combination of cold induced HLLME with an effervescence-assisted DLLME based on deep eutectic solvent decomposition; application in extraction of some pyrethroid and carbamate pesticides from edible oils. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 103(18): 6367-6382.

A review on the application of deep eutectic solvent-based liquid-liquid microextraction for the chromatographic determination of antibiotics in milk

Application of deep eutectic solvents in the microextraction of antibiotics from milk

Khandaghi, J.¹, Mirzaei, H.², Javadi, A.², Atazadeh, R.³, Afshar Mogaddam, M.R.^{4,5*}

1. Department of Food Science and Technology, Sara.C., Islamic Azad University, Sarab, Iran

2. Department of Food Hygiene, TaMS.C., Islamic Azad University, Tabriz, Iran

3. Department of Food Science and Technology, Sou.C., Islamic Azad University, Soufian, Iran

4. Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

5. Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Corresponding author: mr.afsharmogaddam@yahoo.com

Abstract

The presence of antibiotic residues in food products constitutes a serious threat to public health due to the development of antimicrobial resistance, which diminishes the efficacy of antibiotic drugs in treating infections. This systematic review is focused on the results of recent original and review articles (2015-2025) collected from various scientific databases on liquid phase microextractions based on deep eutectic solvents in combination with chromatographic methods for the analysis of antibiotic residues in milk samples. Addressing this challenge necessitates strict monitoring throughout the food production chain. Detecting trace levels of these compounds in food samples requires the application of advanced analytical methods characterized by high sensitivity and

selectivity. In this context, liquid phase microextraction is a suitable option for this task because it effectively concentrates the target analytes while using small amounts of solvent, thus meeting the requirements of stringent standards in this regard. Deep eutectic solvents are gaining increasing attention as green and environmentally friendly alternatives to conventional organic solvents in food analysis. The combination of deep eutectic solvents and microextraction techniques minimize solvent consumption, consistent with green chemistry principles. This study discusses the critical public health implications of antibiotic residues in foods while highlighting the application of environmentally friendly deep eutectic solvents for sample preparation and extraction of these contaminants from complex food matrices.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Liquid-phase microextraction, Deep eutectic solvents, Antibiotic, Milk