Food Hygiene, Vol. 14, No. 53, Spring 2024

"Research article" DOI: 10.71876/jfh.2024.3121433

Development of a microwave-assisted extraction combined with homogenous liquid-liquid microextraction for the extraction of chloramphenicol and florfenicol from chicken meat samples before their analysis using high performance liquid chromatography-diode array detector

Hamedfar, A. H.[1], Javadi, A.[1,2*], Afshar Mogaddam, M. R.[3], Mirzaei, H.[1]

1. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary, Tabriz Medical Science, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Health Promotion Research Center, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
3. Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
*Corresponding author: Javadi@iaut.ac.ir
(Received: 2024/1/17 Accepted: 2024/4/29)

Abstract

Residues of drugs used in poultry farming are recognized as significant pollutants, posing potential risks to consumer health. Among these, antibiotics are widely administered to combat infectious diseases, with residues frequently detected in various products, including chicken meat. Given the high consumption of chicken in the country, it is crucial to monitor commonly used antibiotics such as chloramphenicol and florfenicol in these products. In this study, a combined method of microwave-assisted extraction and homogenous liquid-liquid microextraction was employed to extract chloramphenicol and florfenicol from chicken meat samples. The extracted antibiotics were subsequently analyzed using high-performance liquid chromatography with a diode array detector. Under optimal conditions, extraction recoveries were 60% for chloramphenicol and 66% for florfenicol, demonstrating the method's efficiency. The detection limits were 0.20 ng/g for chloramphenicol and 0.17 ng/g for florfenicol, indicating the method's sensitivity to low concentrations. Notably, florfenicol residues were detected in two of the ten chicken samples tested.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Homogenous liquid-liquid microextraction, Microwave-assisted extraction, Chloramphenicol, Florfenicol, HPLC, Chicken meat

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.71876/jfh.2024.3121433

استخراج با کمک امواج مایکروویو ترکیب شده با میکرواستخراج مایع-مایع هموژن برای استخراج کلرامفنیکل و فلورفنیکل از نمونه‌های گوشت مرغ قبل از آنالیز با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

اندازه‌گیری باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و فلورفنیکل در نمونه‌های گوشت مرغ

امیرحسین حامدفر[۱]، افشین جوادی[۱و۲*]، محمدرضا افشارمقدم[۳]، حمید میرزایی[۱]

۱- گروه بهداشت مواد غذایی،دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۲-مرکز تحقیقات ارتقاء سلامت، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۳- مرکز تحقیقات ایمنی غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: Javadi@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۱۷ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۲/۱۰)

چکیده

باقی‌مانده داروهای مورد استفاده در پرورش طیور در محصولات، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آلاینده‌ها شناخته شده و می‌توانند سلامت مصرف‌کننده را تهدید کنندآنتی‌بیوتیک‌ها یک دسته پرکاربرد از داروها می‌باشند که به منظور مبارزه با انواع مختلف بیماری‌های عفونی استفاده شده و باقیمانده آن‌ها به وفور در محصولات مختلف مانند نمونه‌های گوشت مرغ یافت می‌شوند. با توجه به این نکات و مصرف بالای گوشت مرغ در کشور، اندازه‌گیری باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های پر مصرف مانند کلرامفنیکل و فلورفنیکل در این محصولات بسیار حائز اهمیت است. در این کار پژوهشی، از ترکیب روش استخراج کمک‌شده با امواج مایکروویو و میکرواستخراج مایع-مایع هموژن به منظور استخراج آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و فلورفنیکل از نمونه‌های گوشت مرغ استفاده می شود. در این راستا از پیوالیک اسید به عنوان فاز استخراج کننده استفاده شده که دارای سمیت پایینی می‌باشد و به‌دلیل خاصیت اسیدی در محلول‌های قلیایی توانایی تشکیل فاز همگن با سطح تماس نامحدود دارد. در ادامه کار، آنتی‌بیوتیک‌های استخراج شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به دتکتور دیود آرایه ای آنالیز می‌شوند. در شرایط بهینه، راندمان استخراج روش ارائه شده برای کلرامفنیکل و فلورفنیکل به ترتیب ۶۰ و ۶۶ درصد بود که نشان دهنده کارایی بالای روش ارائه شده است. مقادیر حد تشخیص برای کلرامفنیکل و فلورفنیکل نیز ۰/۲۰ و ۰/۱۷ نانوگرم بر گرم بدست آمدند که نشانگر امکان آنالیز غلظت‌های پایین می‌باشد. همچنین با توجه به نتایج از ده نمونه گوشت آزمایش شده، در دو نمونه آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل یافت شد.

واژه‌های کلیدی: میکرواستخراج مایع-مایع هموژن، استخراج با کمک امواج مایکروویو، کلرامفنیکل، فلورفنیکل، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، گوشت مرغ

مقدمه

پروتئین از جمله مهم‌ترین مغذی‌ها برای تولید ماهیچه‌ها در بدن انسان بوده و تامین میزان کافی از آن در رژیم غذایی حائز اهمیت است (Berryman *et al*., 2021). انواع مختلف گوشت مانند گوشت قرمز، مرغ و ماهی منبع غنی از پروتئین می‌باشند (Chen *et al*., 2020). گوشت مرغ با توجه به اینکه ارزان ترین گوشت در اغلب کشورهاست نسبت به بقیه موارد بیشتر مورد مصرف قرار می‌گیرد. با توجه به اینکه عوامل بیماری زا مانند باکتری ها، قارچ‌ها و انگل‌ها می‌توانند باعث ایجاد تلفات و کاهش تولید مرغ شوند، نیاز به استعمال و مصرف دارو برای پرورش مرغ همواره امری ضروری و غیرقابل اجتناب است (Barros *et al*., 2021). در این میان بدلیل کارایی بالایی که آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان و پیشگیری از بیماری‌ها دارند، متاسفانه انواع مختلفی از آنها بدون در نظر گرفتن عوارض جانبی و دوره دفع دارویی توسط مرغداران به عنوان درمان، پیشگیری و محرک رشد مورد استفاده قرار می‌گیرند. دسته دارویی فنیکول‌ها آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف، جدید و بسیار قوی هستند که در مقابل بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی موثر می‌باشند. کلرامفنیکل و فلورفنیکل از مهمترین آنتی‌بیوتیک‌های فنیکولی می‌باشند که امروزه در صنعت پرورش طیور به طور گسترده ای استفاده می‌شوند (Zhang *et al*., 2008). استفاده نادرست و بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند منجر به حضور باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی شده و سلامت مصرف‌کننده را تحت تاثیر قرار دهد. ایجاد آلرژی، اختلالات متابولیکی، ایجاد میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و *کاهش* حساسیت در برابر درمان آنتی‌بیوتیکی در مصرف‌کننده از جمله مضرات باقیمانده آنتی‌بیوتیک در بدن انسان به شمار می روند (Yang *et al*., 2014). بنابراین، کنترل باقی‌مانده دارو های مورد استفاده در پرورش مرغ به ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها از اهمیت فراوانی برخوردار است. جهت تعیین باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در مواد غذایی روش‌های مختلفی وجود دارد که از جمله مهمترین آن‌ها می توان به روش‌های کروماتوگرافی اشاره کرد. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High-performance liquid chromatography) مهم‌ترین ابزار تجزیه‌ای برای آنالیز باقیمانده انواع مختلف آنتی‌بیوتیک در مواد غذایی می‌باشد (Önal 2011). نکته مشترک در اندازه‌گیری موادی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی مانند گوشت مرغ پیچیدگی ماتریس آن‌ها و نیاز به آماده‌سازی نمونه ها قبل از تزریق به سیستم تجزیه‌ای می‌باشد. نمونه‌های غذایی به دلیل اینکه دارای انواع مختلفی از ترکیبات در ماتریس خود می‌باشند، امکان آنالیز مستقیم آن‌ها وجود ندارد. از طرف دیگر به دلیل اینکه غلظت باقی‌مانده این مواد پایین می‌باشد نیاز به تغلیظ آنالیت‌ها قبل از اندازه‌گیری وجود دارد(Seifrtová *et al.* 2009). بنابراین توسعه روش آماده‌سازی آسان و کارا برای استخراج آنتی‌بیوتیک از بافت مواد غذایی مانند گوشت مرغ از اهمیت بالایی برخوردار است.

میکرواستخراج مایع-مایع هموژن (HLLME) یک روش آماده‌سازی نمونه است که در آن آنالیت‌ها از داخل محلول نمونه به یک محلول هموژن حاوی حلال قابل اختلاط با آب استخراج می‌شوند (Dmitrienko *et al*., 2020). شرط اولیه این روش تشکیل محلول

هموژن از حلال استخراج کننده و محلول نمونه است که منجر به سطح تماس بالا بین آنها و در نتیجه راندمان استخراج بالا می شود. در ادامه، محلول هموژن با تغییر دما، تغییر pH و افزودن نمک جدا می شود (Ramezani *et al*,. 2022). تنها مشکل HLLME این است که نمی‌توان آن را مستقیماً روی نمونه‌های جامد اعمال کرد. بنابراین، روش استخراج دیگری مانند استخراج با کمک امواج مایکروویو (Microwave-assisted extraction) قبل از انجام HLLME برای استخراج آنالیت‌ها از ماتریس جامد به فاز مایع مناسب در دمای بالا لازم است.

هدف از این کار پژوهشی، معتبرسازی و استفاده از روش استخراج کمک شده با تابش های مایکروویو (MAE) ترکیب شده با HLLME برای استخراج آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و فلورفنیکل از بافت نمونه گوشت مرغ و سپس اندازه‌گیری آن با استفاده از HPLC مجهز به دتکتور دیود آرایه ای (Diode array detector) می‌باشدآنتی‌بیوتیک‌های انتخاب شده از پرکاربرد ترین ترکیبات متعلق به آنتی‌بیوتیک‌های آمفنیکول بوده و قابلیت استفاده در درمان انواع عفونت ها دارند. این آنتی‌بیوتیک‌ها دارای سمیت چشمگیری برای انسان‌ها بوده و مصرف آن در بسیاری از کشور ها ممنوع شده است (Balizs *et al*,. 2003). همچنین میزان غلظت مجاز برای این آنتی‌بیوتیک‌ها بسیار کم (۰/۳ میکروگرم بر گرم بر اساس توصیه اتحادیه اروپا) (European Commission 2003) می‌باشد و اندازه‌گیری آن‌ها نیازمند اجرای روش‌های تجزیه‌ای حساس می‌باشد.

مواد وروش‌ها

- نمونه برداری و مواد شیمیائی

۱۰ نمونه گوشت مرغ به صورت تصادفی از سوپرمارکت های سطح شهر (تبریز، استان آذربایجان شرقی، ایران) تهیه شدند. همچنین یک نمونه گوشت مرغ از تولید کننده محلی که بنا به اظهارات خودش در پرورش مرغ از هیچ گونه آنتی‌بیوتیک استفاده نکرده تهیه شد. این نمونه به عنوان بلانک در بهینه‌سازی و اعتبار بخشی روش ارائه شده مورد استفاده قرار گرفت.

- مواد شیمیائی

استاندارد های کلرامفنیکل و فلورفنیکل از شرکت سیگما (Sigma, USA) تهیه شدند. پیوالیک اسید، بوتیریک اسید، سدیم هیدروکسید، بافر آمونیاکی، هیدروکلریک اسید، سدیم کلرید، متانول و آب با خلوص بالا از شرکت مرک (Merck, Germany) تهیه شدند.

- شرایط آنالیز با HPLC-DAD

شرایط بهینه HPLC مجهز به DAD برای آنالیز کلرامفنیکل وفلورفنیکل در جدول یک ذکر گردیده است.

جدول (۱)- شرایط بهینه‌ی HPLC-DAD

نوع ستون	Centurysil C_{18}، طول: ۲۵۰ میلی‌متر، ID: ۴/۶ میلی‌متر، اندازه ذرات: ۵ میکرومتر
فاز متحرک	متانول: آب (۴۵ : ۵۵ **v/v**)، میزان جریان: ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه
تزریق کننده	دما: ۳۵ درجه سلسیوس، لوپ: ۲۰ میکرولیتر
طول موج	۲۷۷ نانومتر برای کلرامفنیکل و ۲۲۵ نانومتر برای فلورفنیکل

بهینه‌سازی شرایط استخراج

در ادامه کار، کلیه پارامترهای تاثیرگذار بر فرایند استخراج مانند نوع (از بین پیوالیک اسید و بوتیریک اسید) و حجم حلال استخراج کننده (در محدوده ۱۵۰ تا ۲۲۵ میکرولیتر)، pH (در محدوده ۶ تا ۱۲)، توان مایکروویو (در محدوده ۹۰ تا ۳۶۰ وات)، مدت زمان قرار گرفتن در معرض مایکروویو (در محدوده ۳۰ تا ۱۲۰ ثانیه) و حجم محلول هیدروکلریک اسید (در محدوده ۰/۲۵ تا ۱/۲۵ میلی لیتر) مورد بررسی و آزمایش قرار گرفتند. در این مرحله از روش "یک پارامتر در یک زمان" برای بررسی پارامترهای موثر در فرایند استخراج استفاده شد. تاثیر این عوامل با مقایسه سطح زیر پیک حاصل از آنالیت‌ها در شرایط مختلف مورد بررسی قرار گرفته اند.

- مشخصات تجزیه‌ای

در این مرحله، جهت اعتبار بخشی به روش ارائه شده، محدوده خطی روش (Linear range)، حد تشخیص (Limit of detection)، حد اندازه‌گیری (Limit of quantitation)، مجذور ضریب همبستگی، تکرارپذیری (RSD%)، و راندمان استخراج (Extraction recovery) بررسی و محاسبه شدند.

- روش استخراج

ابتدا ۳ گرم از گوشت مرغ برداشته شده و پس از بریده شدن به قطعات کوچک به داخل یک ظرف مناسب در بسته منتقل شد. سپس مخلوط ۳ میلی لیتر آب دیونیزه که pH آن با استفاده از بافر آمونیاکی در مقدار ۱۰ تنظیم شده و ۱۷۵ میکرولیتر پیوالیک اسید به نمونه اضافه شد. در ادامه ظرف به داخل مایکروویو (با توان ۱۸۰ وات) منتقل شده و به مدت ۹۰ ثانیه در آن نگه داشته شد. در ادامه مخلوط به دست آمده با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شده و فاز رویی آن برداشته شده و پس از عبور از کاغذ صافی به داخل بدنه سرنگ شیشه ای وارد شد. در ادامه ۰/۷۵ میلی لیتر هیدروکلریک اسید (۱ مولار) به صورت قطره قطره از قسمت نوک سرنگ به داخل محلول وارد شد. با این عمل حالت هموژن شکسته شده و آنالیت‌ها به داخل پیوالیک اسید استخراج شدند. پس از فشار دادن پیستون سرنگ حلال به بالای سرنگ منتقل شده، حجم مناسبی از آن برداشته شده و جهت آنالیز به سیستم HPLC تزریق شد.

یافته‌ها

- نتایج بهینه‌سازی عوامل موثر در استخراج

-نوع حلال استخراج کننده

نتایج بدست آمده در نمودار ۱ نشان می‌دهد که حلال پیوالیک اسید کارایی بالایی برای استخراج کلرامفنیکل و فلورفنیکل از نمونه‌های گوشت مرغ داشته و به عنوان حلال استخراج کننده مناسب برای مطالعات بعدی انتخاب شد. حجم حلال استخراج کننده

با توجه به نتایج مشاهده شده، ۱۷۵ میکرولیتر از پیوالیک اسید برای استخراج موثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه از نمونه گوشت مرغ کافی است. از این رو ۱۷۵ میکرولیتر از پیوالیک اسید در مطالعات بعدی استفاده شد.

-میزان pH

با توجه به نتایج بدست آمده در شکل ۲، با افزایش pH نمونه از ۶ تا ۱۰ راندمان استخراج کلرامفنیکل و فلورفنیکل افزایش یافته و پس از آن تغییر قابل ملاحظه‌ای مشاهده نمی شود. بنابراین، آزمایشات بعدی با تنظیم pH نمونه در ۱۰ (با استفاده از بافر آمونیاکی) صورت گرفت.

بهینه‌سازی توان مایکروویو

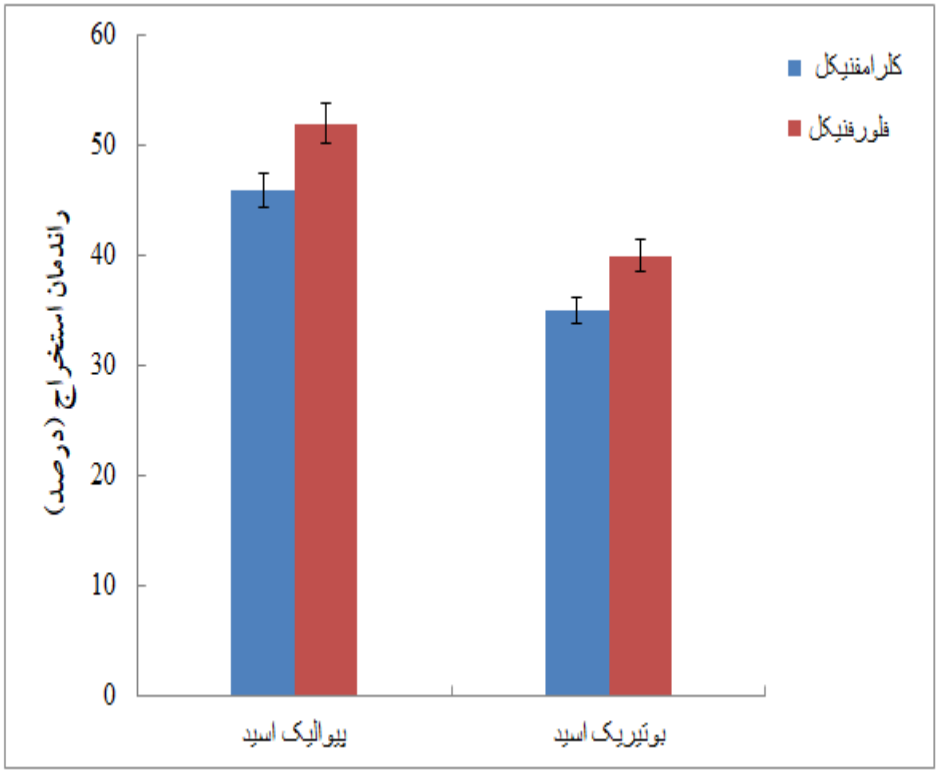
با در نظر گرفتن نتایج بدست آمده در نمودار ۳، با افزایش توان مایکروویو از ۹۰ تا ۱۸۰ وات راندمان‌های استخراج آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه افزایش یافته و پس از آن کاهش پیدا می‌کنند. فلذا، مطالعات بعدی با استفاده از مایکروویو با توان ۱۸۰ وات صورت می‌گیرد.

بهینه‌سازی مدت زمان قرار گرفتن نمونه در داخل مایکروویو

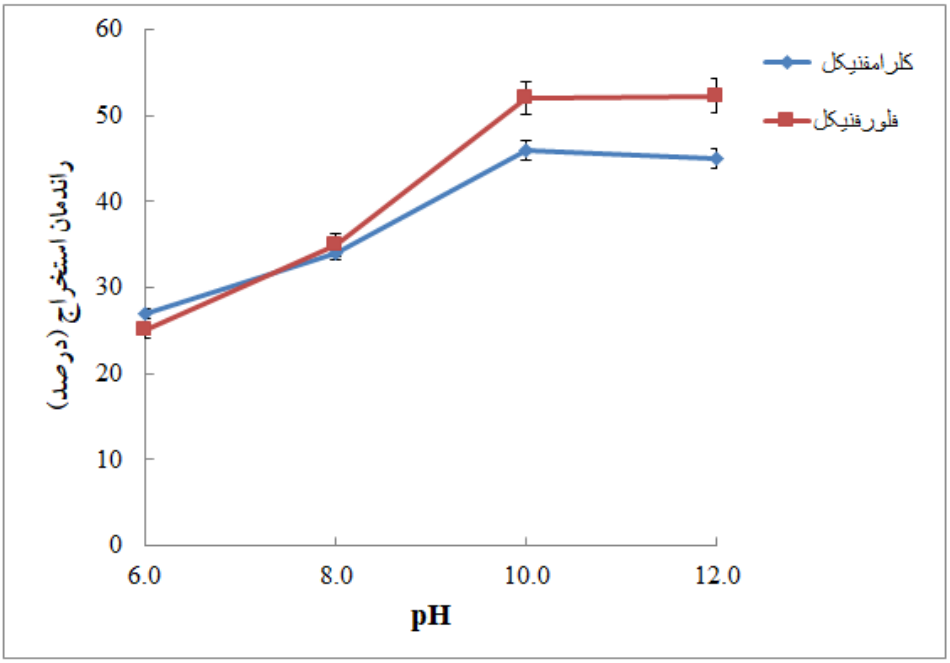
مطابق نتایج نشان داده شده در نمودار ۴، با افزایش مدت زمان قرار گرفتن نمونه در داخل مایکروویو تا ۹۰ ثانیه، راندمان استخراج آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه افزایش یافته و پس از آن کاهش می‌یابد. بنابراین در مطالعات بعدی نمونه به مدت ۹۰ ثانیه در داخل مایکروویو قرار گرفت.

بهینه‌سازی حجم محلول هیدروکلریک اسید

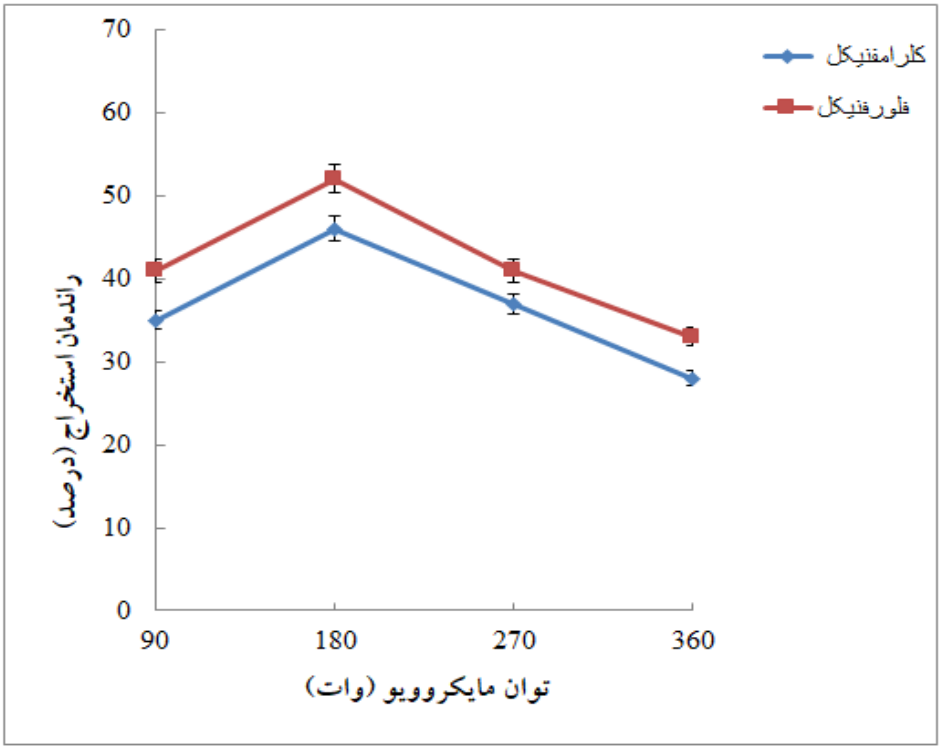
با در نظر گرفتن نتایج بدست آمده در نمودار ۵، با افزایش حجم محلول هیدروکلریک اسید تا ۰/۷۵ میلی‌لیتر، راندمان‌های استخراج افزایش یافته و پس از آن کاهش پیدا می‌کنند. بنابراین مطالعات بعدی با استفاده از ۰/۷۵ میلی‌لیتر محلول هیدروکلریک اسید ۱ مولار صورت می‌گیرد.



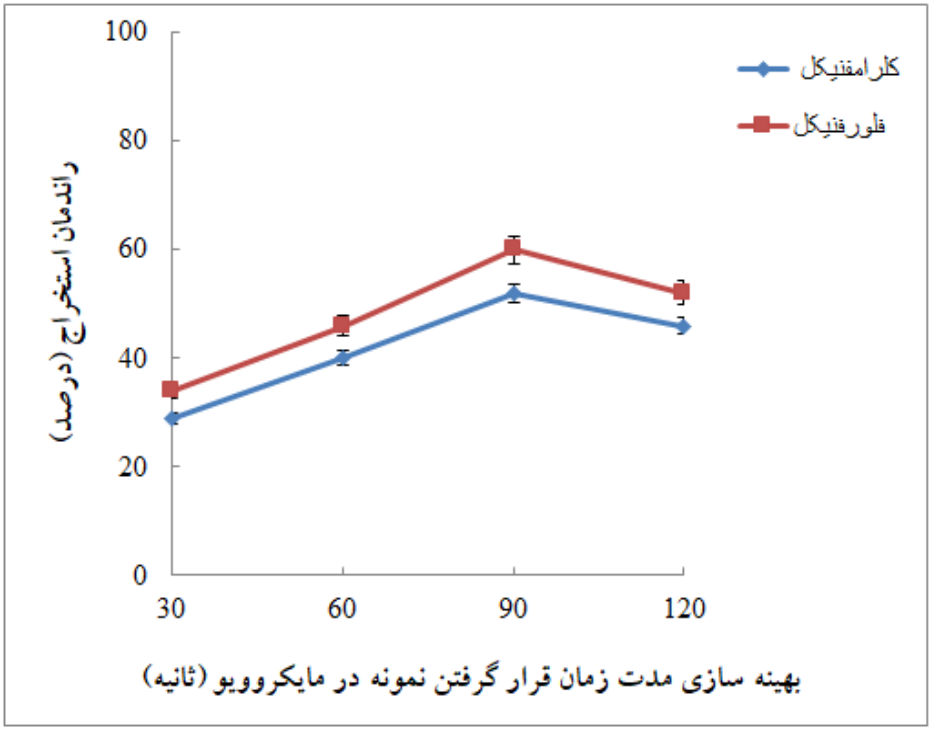
نمودار (۱)- انتخاب نوع حلال استخراج کننده



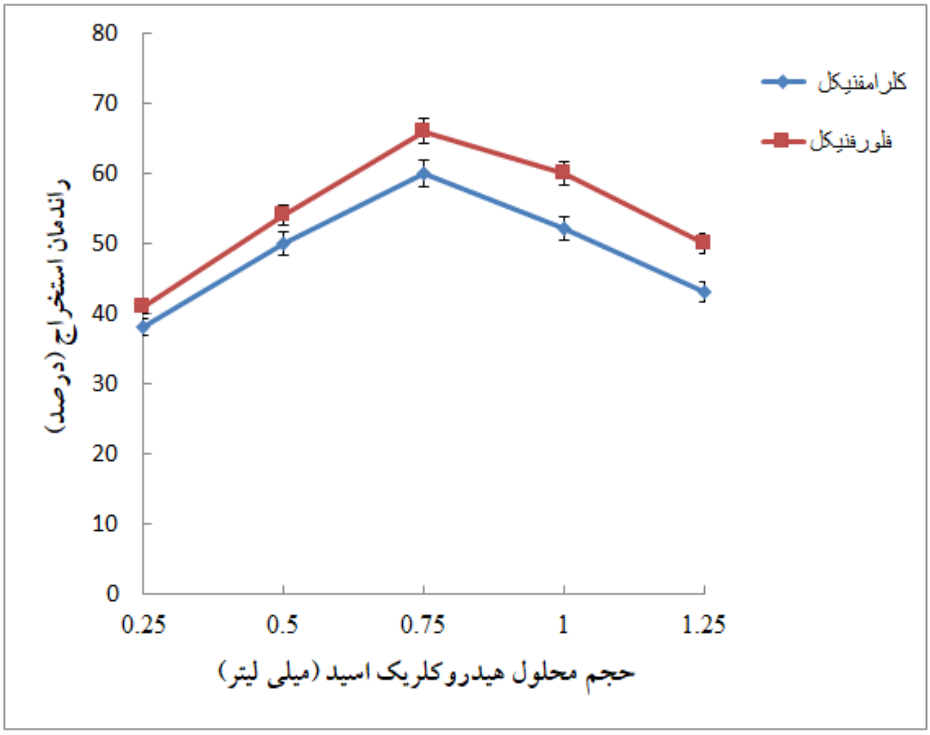
نمودار (۲)- بهینه‌سازی pH



نمودار (۳)- بهینه‌سازی توان مایکروویو



نمودار (۴)- بهینه‌سازی مدت زمان قرار گرفتن نمونه در مایکروویو



نمودار (۵)- بهینه‌سازی حجم محلول هیدروکلریک اسید

- نتایج مشخصات تجزیه‌ای

از رسم نمودار کالیبراسیون برای آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه، مقادیر مجذور ضریب همبستگی (r^2) و محدوده خطی روش (Linear range) بدست آمد. حد تشخیص (Limit of detection) و حد اندازه‌گیری (Limit of quantification) به ترتیب برابر غلظت‌هایی در نظر گرفته شدند که در آن‌ها نسبت سیگنال به نویز ۳ و ۱۰ می‌باشد. برای ارزیابی تکرارپذیری روش، از انحراف استاندارد نسبی (Relative standard deviation, RSD%) استفاده شد. نتایج بدست آمده در جدول ۱ خلاصه شده‌اند.

جدول (۱)- ارقام شایستگی بدست آمده با روش ارائه شده

آنالیت	محدوده خطی (نانوگرم در گرم)	حد تشخیص (نانوگرم در گرم)	حد اندازه‌گیری (نانوگرم در گرم)	مجذور ضریب همبستگی	انحراف استاندارد نسبی (٪) (n=۶)	راندمان استخراج ± انحراف استاندارد (n=۳)	فاکتور تغلیظ ± انحراف استاندارد (n=3)
کلرامفنیکل	۰/۶۷-۲۰۰۰	۰/۲۰	۰/۶۷	۰/۹۹۷	۴/۰	۶۰ ± ۳	۹۰ ± ۵
فلورفنیکل	۰/۵۷-۲۰۰۰	۰/۱۷	۰/۵۷	۰/۹۹۸	۳/۸	۶۶ ± ۴	۹۹ ± ۶

- نتایج بررسی اثر ماتریکس و آنالیز نمونه‌های حقیقی

در این مرحله، جهت بررسی اثر ماتریکس نمونه‌های گوشت مرغ آزمایش شده، ۵ نمونه به صورت تصادفی انتخاب شده و همراه با نمونه بلانک با غلظت‌های ۲، ۱۰ و ۲۵ نانوگرم در گرم از کلرامفنیکل و فلورفنیکل آلوده شدند. نتایج بدست آمده در جدول ۲ (مقادیر بازیابی های نسبی در محدوده ۸۸ تا ۱۰۰ درصد) نشان می‌دهند که ماتریکس نمونه‌های بررسی شده تاثیر چندانی در کارایی روش پیشنهادی ندارند. در ادامه، به منظور تعیین غلظت آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در نمونه‌های آزمایش شده، روش پیشنهادی در شرایط بهینه بر روی ۱۰ نمونه گوشت اجرا شده و با HPLC-DAD آنالیز شدند. با توجه به نتایج بدست آمده در ۲ نمونه از ۱۰ نمونه بررسی شده باقیمانده آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل با غلظت‌های ۱۴/۳ و ۲۳/۶ نانوگرم بر گرم یافت شد.

جدول (۲)- بررسی اثر ماتریکس نمونه‌های گوشت مرغ بررسی شده

آنالیت	بازیابی‌نسبی ± انحراف استاندارد (n=۳) نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ۴	نمونه ۵
	نمونه‌های اسپایک‌شده با هریک از آنالیت‌ها به غلظت ۲ نانوگرم بر گرم				
کلرامفنیکل	۹۰ ± ۱	۸۸ ± ۱	۹۳ ± ۱	۹۰ ± ۱	۸۹ ± ۲
فلورفنیکل	۹۵ ± ۴	۹۳ ± ۳	۹۶ ± ۴	۹۲ ± ۲	۹۴ ± ۳
	نمونه‌های اسپایک‌شده با هریک از آنالیت‌ها به غلظت ۱۰ نانوگرم بر گرم				
کلرامفنیکل	۹۴ ± ۳	۹۲ ± ۳	۹۳ ± ۱	۹۵ ± ۲	۹۳ ± ۳
فلورفنیکل	۹۳ ± ۱	۹۳ ± ۴	۹۶ ± ۲	۹۳ ± ۳	۹۳ ± ۲
	نمونه‌های اسپایک‌شده با هریک از آنالیت‌ها به غلظت ۲۵ نانوگرم بر گرم				
کلرامفنیکل	۹۶ ± ۲	۹۴ ± ۲	۹۵ ± ۲	۹۶ ± ۲	۹۶ ± ۴
فلورفنیکل	۹۵ ± ۳	۹۳ ± ۲	۱۰۰ ± ۳	۹۷ ± ۴	۹۸ ± ۳

بحث و نتیجه‌گیری

در این کار پژوهشی، از ترکیب روش‌های MAE و HLLME برای استخراج کلرامفنیکل و فلورفنیکل از نمونه‌های گوشت مرغ قبل از اندازه‌گیری آنها با HPLC-DAD استفاده شد.

در تمامی روش‌های استخراج انتخاب حلال استخراج کننده مناسب جهت استخراج موثر آنالیت‌ها از بافت نمونه یک پارامتر مهم و اساسی است. در روش MAE، مقادیر اندکی از حلال آلی به همراه آب برای استخراج آنالیت‌ها استفاده می شود (Mandal *et al.*, 2007). براساس ماهیت روش MAE، استخراج کننده مورد استفاده باید دارای نقطه جوش بالایی باشد. در کار فعلی، امتزاج پذیری استخراج کننده به کار رفته در آب نیز باید با تغییر pH تغییر کند. با توجه به این نکات، انتخاب حلال استخراج کننده مناسب بسیار ضروری است.

تغییر حجم حلال استخراج مورد استفاده، می‌تواند بر راندمان استخراج روش و حجم فاز جدا شده در مرحله تأثیر بگذارد که این نیز می‌تواند تکرارپذیری نتایج را تحت‌تأثیر قرار دهد (Alizadeh Panahi *et al*,. 2023). در حجم‌های کمتر از حلال استخراج کننده به دلیل غلظت بالای آنالیت‌ها در فاز آلی سیگنال تجزیه‌ای بیشتر خواهد بود که این امر باعث کاهش حد تشخیص روش خواهد شد. از سوی دیگر در حجم‌های پایین حلال استخراج کننده ممکن است فاز آلی جمع نشود و یا اینکه مقدار فاز جمع شده به قدری ناچیز باشد که برداشتن آن مشکل باشد. لذا حجم حلال استخراج کننده باید بهینه‌سازی شود.

pH محلول نمونه یک پارامتر اساسی در روش ارائه شده می‌باشد. حلال های استخراج کننده استفاده شده براساس پدیده پروتون زدایی در محلول آبی حل می‌شوند. مشخص است که برای این پدیده باید pH محلول بالاتر از pK_a حلال استفاده شده (این مقدار برای پیوالیک اسید برابر ۵/۰۳) باشد. بنابراین pH در محدوده ۶ تا ۱۲ نیاز به بهینه‌سازی دارد.

در روش‌های مبتنی بر MAE، قرار گرفتن نمونه در معرض امواج مایکروویو با توان‌های مختلف می‌تواند راندمان استخراج آنالیت‌ها را تحت تاثیر قرار دهد (Maran *et al*,. 2013). با تابش مایکروویو دمای محلول افزایش یافته و می‌تواند سرعت انتقال جرم و ضریب انتشار آنالیت‌ها و در نتیجه راندمان‌های استخراج را تحت تاثیر قرار دهد. در توان‌ها و در نتیجه دما های پایین به دلیل اینکه سرعت انتقال آنالیت‌ها و ضرایب انتشار پایین می‌باشند استخراج آنالیت‌ها به طور مؤثری صورت نمی‌گیرد. در توان‌ها و دما های بالا نیز ممکن است آنالیت‌ها و نمونه تخریب شوند. بنابراین بهینه‌سازی توان مایکروویو یک گام اساسی در روش‌های مبتنی بر MAE می‌باشد.

مدت زمان قرار گرفتن نمونه تحت امواج مایکروویو نیز می‌تواند دمای محلول نمونه و کارایی روش پیشنهادی را با توجه به توضیحات قبلی تحت تاثیر قرار دهد (هر چه قدر زمان قرار گرفتن نمونه در داخل مایکروویو بیشتر می شود، دمای نمونه نیز بیشتر افزایش پیدا می کند) (Maran *et al*,. 2013). با توجه به این نکته، مدت زمان قرار گرفتن نمونه در داخل مایکروویو نیز نیاز به بهینه‌سازی دارد.

در روش پیشنهادی از محلول هیدروکلریک اسید به عنوان عامل جداکننده فاز در مرحله HLLME استفاده می شود (با افزودن هیدروکلریک اسید محلول هموژن شکسته شده و یون های پیوالات پروتون دهی شده و به صورت قطرات ریز پیوالیک اسید آزاد می‌شوند). در حجم‌های کم از این محلول حالت ابری شکل و جدایش فاز به طور کامل نمی‌تواند اتفاق بیافتد و راندمآن‌ها پایین است. در حجم‌های بالاتر نیز حجم فاز جمع شده زیاد بوده و پدیده رقیق‌سازی اتفاق افتاده و دوباره راندمان کاهش می‌یابد. بنابراین حجم محلول هیدروکلریک اسید به عنوان یک پارامتر مهم نیاز به بهینه‌سازی دقیق دارد.

در مطالعه حاضر، از ترکیب MAE با HLLME به عنوان روش آماده‌سازی کارآمد برای استخراج و پیش تغلیظ آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و فلورفنیکل از نمونه‌های مختلف گوشت مرغ استفاده شد. با توجه به نتایج، راندمان استخراج بالا، حدود تشخیص و اندازه‌گیری پایین و تکرار پذیری مناسب از جمله ویژگی‌های مناسب روش ارائه شده است. اثر ماتریکس ناچیز و زمان استخراج کوتاه نیز از دیگر مزایای اصلی روش ارائه شده می‌باشد.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله هیچگونه تعارض منافعی ندارند.

منابع

- Barros A., Novo C.S., Feddern V., Coldebella A., Scheuermann G.N. (2021). Determination of eleven veterinary drugs in chicken meat and liver. Applied Sciences, 11: 8731.
- Balizs G, Hewitt A. (2003). Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. Analytica Chimica Acta, 492:105-131.
- Berryman, C.E., Lieberman H.R., Pasiakos S.M. (2021). Greater protein intake at breakfast or as snacks and less at dinner is associated with cardiometabolic health in adults. Clinical Nutrition, 40: 4301-4308.
- Chen X., Liang L., Xu X. (2020). Advances in converting of meat protein into functional ingredient via engineering modification of high-pressure homogenization. Trends in Food Science and Technology, 106: 12-29.
- Dmitrienko, S.G., Apyari, V.V., Gorbunova, M.V., Tolmacheva, V.V., Zolotov, Y.A. (2020). Homogeneous liquid–liquid microextraction of organic compounds. Journal of Analytical Chemistry, 75: 1371-1383.
- European Commission. 2003. Commission Decision of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin. Official Journal of European Union.L71, 17-18.
- Önal A. (2011). Overview on liquid chromatographic analysis of tetracycline residues in food matrices. Food Chemistry, 127: 197-203.
- Ramezani, A.M., Ahmadi, R., Yamini, Y. (2022). Homogeneous liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvents. Trends in Analytical Chemistry, 11: 116566.

- Seifrtová M., Nováková L., Lino C., Pena A., Solich P. (2009). An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. Analytica Chimica Acta, 649: 158-179.
- Yang X., Zhang S., Yu W., Liu Z., Lei L., Li N., Zhang H., Yu Y. (2014). Ionic liquid-anionic surfactant based aqueous two-phase extraction for determination of antibiotics in honey by high-performance liquid chromatography. Talanta, 124: 1-6.
- Zhang S., Liu Z., Guo X., Cheng L., Wang Z., Shen J. (2008). Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 875: 399-404.
- Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S.J. (2007). Microwave assisted extraction—an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. Pharmacognosy reviews. 1: 7-18.
- Alizadeh Panahi, A., Javadi, A., Afshar Mogaddam, M.R. (2023). A microwave-assisted extraction method combined with magnetic ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of chloramine–T from fish samples prior to its determination by high-performance liquid chromatography. Journal of Separation Science, 17: 2200893.
- Maran, J.P., Sivakumar, V., Thirugnanasambandham, K., Sridhar R. (2013). Optimization of microwave assisted extraction of pectin from orange peel. Carbohydrate polymers, 97: 703-709.