

قابل چاپ است

توسعه روش استخراج فاز جامد پخشی تلفیق شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در اندازه گیری میزان آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلینی پر کاربرد از نمونه‌های تخم مرغ و مطالعه تاثیر امواج میکروویو در مقدار آن‌ها

استخراج فاز جامد پخشی آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلینی از نمونه های تخم مرغ

چکیده

آنتی بیوتیک‌ها ترکیبات شیمیایی هستند که امروزه به طور گسترده‌ای برای درمان بیماری‌ها در حیوانات در سراسر جهان استفاده می‌شوند. عدم رعایت زمان منع مصرف و نیز مصرف بیش از میزان توصیه شده، سبب وجود باقی مانده آنتی بیوتیک در مواد غذایی مانند تخم مرغ می‌شود که می‌تواند اثرات نامطلوبی بر روی سلامت مصرف کننده داشته باشد. **بنابراین** پایش باقی مانده آنتی بیوتیک‌ها در نمونه‌های مختلف مواد غذایی به ویژه در محصولات پر مصرف مانند تخم مرغ اهمیت فراوانی دارد. هدف از این مطالعه توسعه روش آنالیز کارآمد برای اندازه گیری میزان آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلینی پر کاربرد در نمونه‌های تخم مرغ می‌باشد. **بنابراین** در کار پژوهشی حاضر یک روش آماده سازی مبتنی بر استخراج فاز جامد پخشی ترکیب شده با میکرواستخراج مایع- مایع پخشی برای استخراج آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلینی (اکسی تتراسایکلین، تتراسایکلین، داکسی سایکلین و کلروتتراسایکلین) از نمونه‌های تخم مرغ ارائه داده می‌شود. آنالیزهای استخراج شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به دتکتور دیود آرایه‌ای آنالیز می‌شوند. تحت شرایط بهینه حدود تشخیص و اندازه گیری به ترتیب در محدوده‌های ۰/۱۶-۰/۲۵ و ۰/۵۴-۰/۸۳ نانوگرم بر گرم حاصل شدند. راندمان استخراج روش ارائه شده در محدوده ۶۵-۸۲٪ بدست آمد. در تعدادی از نمونه‌ها نیز اکسی تتراسایکلین (در ۶ نمونه از ۱۵ نمونه بررسی شده) یافت شد. **مطالعه تاثیر امواج فرابنفش در میزان آنتی بیوتیک های مورد مطالعه نشان داد که این امواج می تواند میزان آنتی بیوتیک مورد مطالعه را به طور قابل توجهی کاهش دهد.**

کلید واژه‌ها: استخراج فاز جامد پخشی، چارچوب آلی- فلزی، آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلینی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، تخم مرغ

مقدمه

امروزه با توجه به ارزش غذایی بالای تخم مرغ (منبع خوبی از پروتئین‌ها، ویتامین‌ها و املاح ضروری برای بدن انسان بوده و همه‌ی اسیدهای آمینه‌ی مورد نیاز بدن را داراست)، این محصول به طور گسترده‌ای در سفره غذایی مردم سراسر جهان استفاده می‌شود. بنابراین به منظور حفظ سلامت مردم نیاز است تا نمونه‌های تخم مرغ عاری از هر گونه آلودگی باشد. باقی مانده داروها به عنوان یکی از مهم ترین آلوده کننده‌های مواد غذایی مانند تخم مرغ شناخته می‌شوند که

در نتیجه استفاده بیش از حد مرغداران از دارو ایجاد می‌شود (Wang *et al.*, 2017). آنتی‌بیوتیک‌ها یک دسته پرمصرف از داروها بوده و در صنعت پرورش دام و طیور جهت درمان و پیشگیری از بیماری‌ها یا به‌عنوان هورمون رشد استفاده می‌شوند (Huang *et al.*, 2019). آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان مواد ضد میکروبی شناخته می‌شوند که از متابولیسم ثانویه میکروارگانیسم‌ها و یا به صورت سنتزی تولید شده و در غلظت‌های پایین قادر به تخریب باکتری‌ها یا ممانعت از رشد آنها از طریق تأثیر بر عناصر ساختمانی یا متابولیسمی مورد نیاز برای زندگی آنها می‌باشند (Babapour *et al.* 2012). این ترکیبات شیمیایی بر اساس ساختار شیمیایی در دسته‌های مختلفی تقسیم‌بندی می‌شوند که از جمله مهمترین آنها می‌توان به آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها، تتراسایکلین‌ها و آمفینیکول‌ها اشاره کرد (Moudgil *et al.*, 2019). استفاده بی‌رویه و نامناسب از این مواد (عدم رعایت دوز توصیه شده و عدم توجه به مدت زمان منع مصرف آنها) باعث شده است که مقدار قابل توجهی از این مواد در داخل گوشت، شیر، تخم و سایر فرآورده‌ها وجود داشته باشد (Menkem *et al.*, 2019). حضور آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی می‌تواند سلامت مصرف‌کننده را تحت تأثیر قرار داده و منجر به ایجاد آلرژی، اختلالات متابولیسمی، ایجاد میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و کاهش حساسیت در برابر درمان آنتی‌بیوتیکی در مصرف‌کننده شود (Yang *et al.*, 2014). بنابراین اندازه‌گیری و پایش میزان باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی مختلف مانند تخم مرغ بسیار حائز اهمیت است.

از طرف دیگر یکی از مهمترین چالش‌های پیشروی صنایع غذایی کاهش یا حذف آلاینده‌های محصولات مانند آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. تا به امروز، از روش‌های مختلفی برای حذف یا کاهش آلاینده‌های شیمیایی در مواد غذایی مختلف استفاده شده است که از آن جمله می‌توان به استفاده از اشعه فرابنفش اشاره کرد (Rahmani *et al.*, 2015; Nascimento and Azevedo, 2013). این روش از طریق تغییر و تخریب ساختار مولکولی آلاینده‌ها، سبب مهار انتقال و کاهش قابلیت دسترسی آنها به بافت هدف و حذف آنها می‌گردد (Birmpha *et al.*, 2014). پرتوهای الکترومغناطیس با طول موج ۱۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر پرتوهای فرابنفش هستند. به‌طور کلی طیف فرابنفش در سه ناحیه طول موجی ۳۱۵ تا ۴۰۰، ۲۸۰ تا ۳۱۵ و ۲۰۰ تا ۲۸۰ (بیشترین آثار بیولوژیک اشعه فرابنفش بر میکروارگانیسم‌ها در این ناحیه می‌باشد). امروزه در صنایع غذایی از پرتو فرابنفش به خصوص در طول موج‌های پایین به‌عنوان یک فناوری غیرحرارتی به منظور ضد عفونی و کاهش بار میکروبی مواد غذایی استفاده می‌شود (Simon *et al.*, 2013).

در اغلب موارد از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance Liquid Chromatography) برای آنالیز آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از جمله تتراسایکلین‌ها استفاده می‌شود (Oka *et al.*, 2000). نمونه‌های غذایی به دلیل اینکه دارای انواع مختلفی از ترکیبات در ماتریس خود می‌باشند، امکان آنالیز مستقیم آنها با دستگاه‌های تجزیه‌ای بدون آماده‌سازی وجود ندارد (Seifrtová *et al.*, 2009). از طرف دیگر به دلیل اینکه غلظت باقی‌مانده این مواد پایین می‌باشد نیاز به تغلیظ آنالیت‌ها قبل از اندازه‌گیری وجود دارد. استخراج فاز جامد پخشی (Dispersive solid phase extraction) یکی از شناخته شده‌ترین روش‌های آماده‌سازی نمونه‌های غذایی است. در این روش، ذرات جاذب به طور مستقیم به داخل محلول نمونه اضافه می‌شود (Wu *et al.*, 2013). در ادامه کار، به‌منظور پخش موثر ذرات جاذب و رسیدن به کارایی بالای استخراج در مدت زمان کم، مخلوط نمونه و جاذب ورتکس و یا اولتراسونیک می‌شود. در

این مرحله، آنالیت‌ها با برهمکنش‌های فیزیکی و شیمیایی جذب جامد می‌شوند. این ذرات پس از جدا شدن از محلول نمونه (به کمک فرآیند سانتریفیوژ)، با حلال آلی مناسب شسته می‌شوند تا واجذب آنالیت‌ها اتفاق بیفتد. با توجه به فرآیند استخراج، انتخاب جاذب مناسب می‌تواند کارایی آن را به‌طور قابل توجهی تحت تاثیر قرار دهد (Scigalski and Kosobucki 2020). با توجه به این نکته، شیمیدان‌ها تلاش‌های بسیاری برای معرفی جاذب‌های جدید صورت داده‌اند. در نتیجه این تلاش‌ها، جاذب‌های جدیدی مانند چارچوب‌های آلی-فلزی (Metal-organic frameworks) معرفی شده‌اند. این جاذب‌ها مواد هیبریدی متخلخل هستند که از طریق خودآرایی یون‌ها/خوشه‌های فلزی و لیگاندهای آلی تشکیل شده و دارای تخلخل و مساحت سطح بالایی هستند (Pang et al., 2021).

هدف از کار پژوهشی حاضر، توسعه روش آماده‌سازی جدید مبتنی بر ترکیب روش DSPE و میکرواستخراج مایع-مایع پخش (Dispersive liquid-liquid microextraction) برای استخراج آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلینی از نمونه‌های تخم‌مرغ می‌باشد. آنالیت‌های استخراج شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به دکتور دیود آرایه‌ای (Diode array Detector) استفاده شد. علاوه بر این در این مطالعه برای نخستین بار تاثیر استفاده از امواج فرابنفش در کاهش محتوای آنالیت‌های مورد مطالعه در نمونه‌های تخم‌مرغ مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

- نمونه برداری و مواد شیمیایی

۱۵ نمونه تخم‌مرغ از سوپرمارکت‌های سطح شهر تبریز (استان آذربایجان شرقی، ایران) به صورت تصادفی تهیه شدند. همچنین چند نمونه تخم‌مرغ از تولید کنندگان محلی که در پرورش مرغ از آنتی‌بیوتیک استفاده نکردند تهیه شده و به عنوان بلانک در بهینه‌سازی روش پیشنهادی مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی آزمایش‌ها در دانشکده شیمی دانشگاه تبریز انجام گرفت.

- مواد شیمیایی

استاندارد اکسی تتراسایکلین، تتراسایکلین، داکسی‌سایکلین و کلروتتراسایکلین، نیکوتینیک اسید و مایعات یونی مغناطیسی شامل ۱-هگزیل-۳-متیل ایمیدازولیوم تتراکلوروفرات ($[C_6MIM][FeCl_4]$) و ۱-بوتیل-۳-متیل ایمیدازولیوم تتراکلوروفرات ($[C_4MIM][FeCl_4]$) از شرکت سیگما (Sigma, USA) تهیه شدند. تری‌کلرواستیک اسید، $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ، سدیم هیدروکسید، هیدروکلریک اسید، سدیم کلرید، استون، متانول، ایزوپروپانول، فرمیک اسید و استونیتریل و آب با خلوص بالا از شرکت مرک (Merck, Germany) تهیه شدند.

- شرایط آنالیز با HPLC-DAD

به منظور افزایش قابلیت جداسازی سیستم کروماتوگرافی، پارامترهای دخیل در فرآیند جداسازی با دستگاه HPLC مورد بهینه‌سازی قرار گرفت. شرایط بهینه HPLC مجهز به DAD برای آنالیز آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در جدول یک ذکر گردیده است.

جدول ۱- شرایط بهینه‌ی HPLC-DAD

نوع ستون	Zorbax-SB-Aq C ₁₈ , طول: ۱۵۰ میلی‌متر، ID: ۴/۶ میلی‌متر، اندازه ذرات: ۵ میکرومتر
فاز متحرک	آب حاوی ۰/۵ درصد فرمیک اسید (A) و مخلوط استونیتریل: متانول (۷۰ : ۳۰ v/v) (B)، میزان جریان: ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه
تزریق کننده	دما: ۳۵ درجه سلسیوس، لوپ: ۲۰ میکرولیتر
برنامه شویش	۸۰ درصد A و ۲۰ درصد B (تا دقیقه ۳)، تغییر به صورت خطی تا ۸۰ درصد B (از دقیقه ۳ تا ۶)، تغییر به صورت خطی تا ۸۰ درصد A (از دقیقه ۶ تا ۸)، ۸۰ درصد A و ۲۰ درصد B (تا دقیقه ۱۰)
طول موج	۳۳۵ نانومتر برای اکسی‌تتراسایکلین و تتراسایکلین و ۲۹۶ نانومتر برای داکسی‌سایکلین و کلروتتراسایکلین

- سنتز MOF

برای سنتز چارچوب آلی-فلزی، ۱/۰۹ گرم نمک کبالت کلراید شش آبه با ۰/۵۶۲ گرم نیکوتینیک اسید مخلوط شده و به داخل ۱۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه ریخته شده در یک بشر ۱۰۰ میلی‌لیتری شیشه‌ای اضافه شدند. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه همزده شده و pH آن با استفاده از محلول سود ۱ مولار که به صورت قطره قطره اضافه گردید در ۷ تنظیم شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۱۸۰ درجه سانتیگراد اتوکلاو شد. در ادامه، رسوب به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی فیلتر شد. در نهایت محصول به دست آمده چند بار با آب دیونیزه شسته شده و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت در آون خشک شد (Mohebbi *et al.*, 2022). لازم به ذکر است که خواص MOF سنتز شده در کار ذکر شده گروه تحقیقاتی ما به طور کامل مورد بحث قرار گرفته است.

- بهینه‌سازی شرایط استخراج

در این مرحله، پارامترهای مختلف تاثیرگذار بر فرایند استخراج مانند غلظت محلول تری‌کلرواستیک اسید (در محدوده ۱۰ تا ۲۵ درصد وزنی/حجمی)، حجم محلول تری‌کلرواستیک اسید (در محدوده ۱/۵ تا ۳/۵ میلی‌لیتر)، مدت زمان ورتکس (از میان مدت زمان‌های ۱ تا ۵ دقیقه)، مقدار جاذب (در محدوده ۵ تا ۲۵ میلی‌گرم)، مدت زمان جذب (در محدوده ۱ تا ۵ دقیقه)، اثر نمک‌زنی (با افزودن نمک سدیم کلرید در محدوده ۰/۰ تا ۷/۵ درصد وزنی/حجمی)،

نوع حلال شوینده (از بین حلال‌های آلی شامل متانول، استون، ایزوپروپانول و استونیتریل)، حجم حلال شوینده (در محدوده حجم‌های ۰/۲۵ تا ۱/۲۵ میلی‌لیتر)، مدت زمان واجذب (در محدوده ۱ تا ۵ دقیقه)، نوع حلال استخراج‌کننده (از بین مایعات یونی مغناطیسی $[C_4MIM][FeCl_4]$ و $[C_6MIM][FeCl_4]$) و حجم حلال استخراج‌کننده (در محدوده حجم‌های ۶۰ تا ۸۰ میکرولیتر) مورد بررسی قرار گرفتند. جهت رسیدن به بیشترین کاهش محتوای آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در نمونه‌ها، اثر مدت زمان قرار گرفتن نمونه در معرض امواج فرابنفش (در محدوده ۳۰ تا ۱۲۰ دقیقه) نیز مورد بررسی قرار گرفت. در کلیه مراحل بهینه‌سازی، روش "یک پارامتر در یک زمان" برای بررسی پارامترهای موثر در فرایند استخراج مورد استفاده قرار گرفت. تاثیر این عوامل با مقایسه سطح زیر پیک حاصل از آنالیت‌ها در شرایط مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند.

- مشخصات تجزیه‌ای

به‌منظور معتبرسازی روش پیشنهادی، پس از رسم منحنی کالیبراسیون برای هر کدام از آنالیت‌ها، محدوده خطی روش (Linear range)، حد تشخیص (Limit of detection)، حد اندازه‌گیری (Limit of quantitation)، مجذور ضریب همبستگی، تکرارپذیری (RSD%)، راندمان استخراج (Extraction recovery) و فاکتور تغلیظ (Enrichment factor) بررسی و محاسبه شدند.

- روش استخراج

ابتدا ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرو استیک اسید (۲۰ درصد وزنی/حجمی) به ۲ گرم نمونه تخم‌مرغ اضافه شده و مخلوط به‌دست آمده به مدت ۳ دقیقه ورتکس شد. پس از سانتریفیوژ (با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه)، فاز رویی به یک لوله دیگر منتقل شده و پس از اختلاط با ۱۵ میلی‌گرم از جاذب به مدت ۳ دقیقه ورتکس شد. پس از سانتریفیوژ (با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه)، فاز رویی با استفاده از سرنگ حذف شده و ذرات جامد جاذب با استفاده از ۱ میلی‌لیتر استونیتریل شسته شد (هم‌زمان با ورتکس نمودن مخلوط به مدت ۳ دقیقه). پس از سانتریفیوژ (با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه)، فاز شوینده برداشته شده و پس از اختلاط با ۶۰ میکرولیتر از $[C_6MIM][FeCl_4]$ به داخل ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه تزریق شد. سپس در حضور آهنربا، مایع یونی مغناطیسی حاوی آنالیت‌های استخراج شده در داخل لوله جمع شده و به HPLC-DAD تزریق شد.

- ارزیابی تاثیر امواج فرابنفش بر کاهش آنتی‌بیوتیک‌ها در نمونه تخم‌مرغ:

در این مرحله، ۲ گرم از نمونه تخم‌مرغ برداشته شده و با ۲۰۰ نانوگرم بر گرم از آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه آلوده شدند. سپس نمونه به‌دست آمده تحت امواج فرابنفش با توان ۱۳۰ وات قرار گرفت (بدین منظور از یک راکتور خانگی مجهز به یک لامپ UV فشار-متوسط جیوه استفاده شد). در ادامه نمونه‌ها با روش ذکر شده در قسمت بالا استخراج شدند.

یافته‌ها

- نتایج بهینه‌سازی عوامل موثر در استخراج

غلظت محلول تری کلرو استیک اسید

مطابق نتایج بدست آمده در نمودار ۱، با افزایش غلظت محلول تری کلرواستیک اسید تا ۲۰ درصد وزنی/حجمی راندمان استخراج آنالیت‌های مورد مطالعه افزایش یافته و پس از آن بدون تغییر باقی می‌ماند. در نتیجه ۲۰ درصد وزنی/حجمی به‌عنوان غلظت بهینه محلول تری کلرواستیک اسید انتخاب شد.

- حجم محلول تری کلرو استیک اسید

با توجه به نتایج، راندمان استخراج آنالیت‌ها با افزایش حجم محلول تری کلرواستیک اسید (۲۰ درصد وزنی/حجمی) تا ۲/۵ میلی‌لیتر کارایی روش پیشنهادی افزایش یافته و پس از آن ثابت می‌ماند. بنابراین ۲/۵ میلی‌لیتر به‌عنوان حجم بهینه محلول تری کلرو استیک اسید انتخاب شد.

- مدت زمان ورتکس

با در نظر گرفتن نتایج به‌دست آمده، با افزایش مدت زمان ورتکس تا ۳ دقیقه راندمان استخراج افزایش یافته و بعد از آن ثابت می‌ماند. در نتیجه در این مرحله ۳ دقیقه به‌عنوان مدت زمان بهینه انتخاب شد.

- مقدار جاذب

همان‌طورکه در نمودار ۲ مشخص است، راندمان استخراج آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در ۱۵ میلی‌گرم بیشترین مقدار بوده و بعد از آن کاهش پیدا کرده است. از این‌رو ۱۵ میلی‌گرم به‌عنوان مقدار بهینه انتخاب و در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت.

- مدت زمان جذب

مطابق نتایج به‌دست آمده، با افزایش مدت زمان ورتکس مخلوط نمونه و ذرات جاذب تا ۳ دقیقه کارایی روش افزایش یافته و پس از آن بدون تغییر باقی می‌ماند.

- اثر نمک زنی

نتایج بدست آمده از آزمایشات مربوط به افزایش نمک نشان داد که افزودن نمک منجر به کاهش سیگنال‌های تجزیه‌ای در مقادیر مختلف شده و اثر منفی بر روی عملکرد روش دارد. بنابراین، آزمایشات بعدی در غیاب نمک انجام شد.

- نوع حلال شوینده

نتایج بدست آمده در نمودار ۳ نشان می‌دهد که آنالیت‌های مورد مطالعه از سطح جاذب توسط استونیتریل بهتر از سایر حلال‌های آزمایش شده شسته می‌شوند. بنابراین، استونیتریل به عنوان حلال واجدبی انتخاب شد.

- حجم استونیتریل

مطابق نتایج بدست آمده، با افزایش حجم استونیتریل تا ۱ میلی‌لیتر، راندمان‌های استخراج افزایش یافته و بعد از آن با افزایش بیشتر حجم، کاهش می‌یابند. در نتیجه ۱ میلی‌لیتر به عنوان حجم بهینه استونیتریل انتخاب شد.

- مدت زمان واجذب

نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که برای برقراری تعادل در مرحله‌ی واجذب ۳ دقیقه کافی است. بنابراین، ۳ دقیقه به‌عنوان زمان بهینه‌ی واجذب در آزمایشات بعدی انتخاب شد.

- نوع حلال استخراج‌کننده

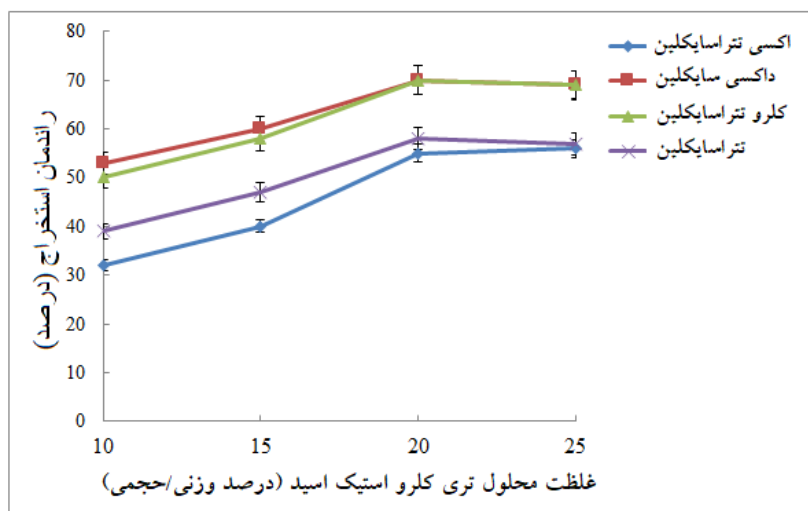
با توجه به نتایج نشان داده شده در نمودار ۴، مایع یونی مغناطیسی $[FeCl_4][C_6MIM]$ بالاترین کارایی استخراج را برای آنالیت‌ها نشان می‌دهد و به عنوان حلال استخراج‌کننده در مراحل بعدی انتخاب شد.

- حجم حلال استخراج‌کننده

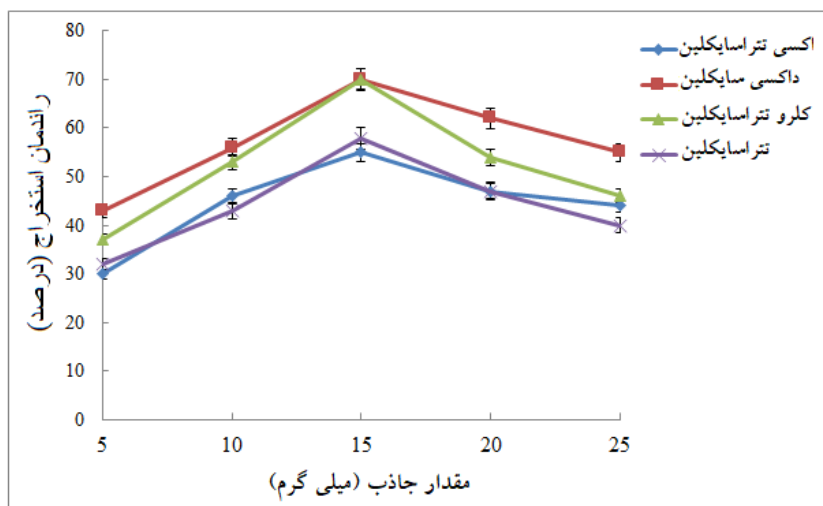
با افزایش حجم حلال استخراج‌کننده از ۶۰ تا ۸۰ میکرولیتر، تغییر قابل ملاحظه‌ای در راندمان استخراج آنالیت‌های مورد مطالعه مشاهده نمی‌شود. بنابراین، ۶۰ میکرولیتر به عنوان حجم بهینه انتخاب شد.

- اثر مدت زمان فرابنفش در کاهش غلظت آنالیت‌ها

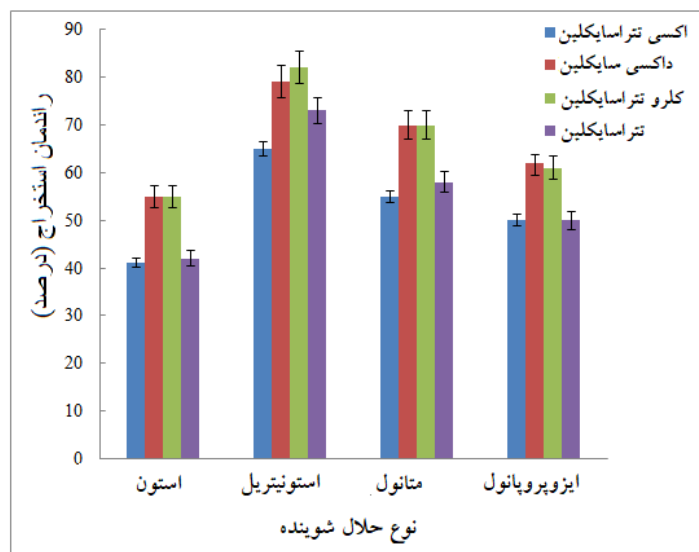
مطابق نتایج نشان داده شده در نمودار ۵، با افزایش مدت زمان در معرض پرتو قرار گرفتن نمونه تخم‌مرغ تا مدت زمان ۹۰ دقیقه، غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در نمونه کاهش یافته و پس از آن کاهش در غلظت آنالیت‌ها مشاهده نمی‌شود.



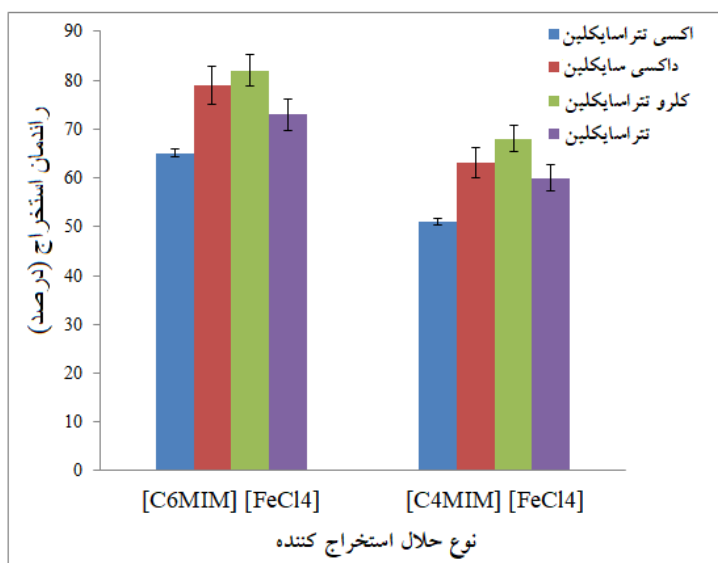
نمودار ۱- بهینه‌سازی غلظت محلول تری‌کلرواستیک اسید



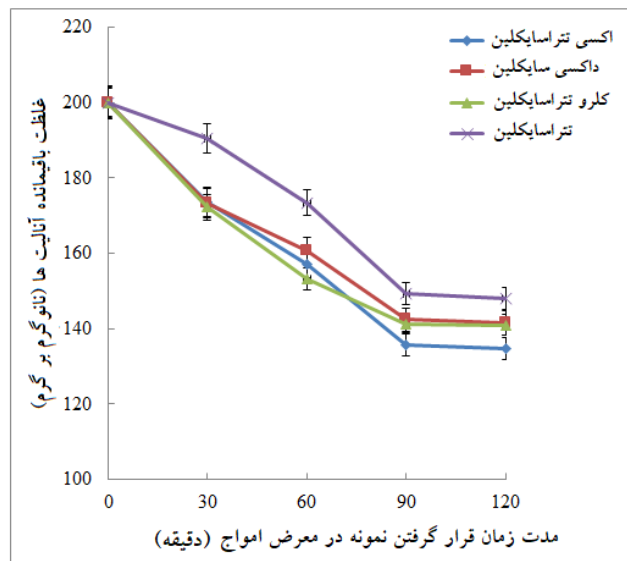
نمودار ۲- بهینه‌سازی مقدار جاذب



نمودار ۳- انتخاب نوع حلال شوینده



نمودار ۴- انتخاب نوع حلال استخراج کننده



نمودار ۵- تاثیر مدت زمان قرارگرفتن تحت امواج فرابنفش در کاهش غلظت آنالیت‌های مورد مطالعه

- نتایج مشخصات تجزیه‌ای

از رسم نمودار کالیبراسیون برای هر یک از آنالیت‌ها، مقادیر مجذور ضریب همبستگی (R^2) و محدوده خطی روش بدست آمد. حد تشخیص (LOD) و حد اندازه‌گیری (LOQ) به ترتیب برابر غلظت‌هایی در نظر گرفته شدند که در آن‌ها نسبت سیگنال به نویز ۳ و ۱۰ می‌باشد. برای ارزیابی تکرارپذیری و دقت روش، از انحراف استاندارد نسبی (RSD%) استفاده شد. ارقام شایستگی روش ارائه شده در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲- ارقام شایستگی به دست آمده با روش پیشنهادی

آنالیت	محدوده خطی (نانوگرم در گرم)	حد تشخیص (نانوگرم در گرم)	حد اندازه‌گیری (نانوگرم در گرم)	مجذور ضریب همبستگی	انحراف استاندارد نسبی (%) (n=6)	راندمان استخراج \pm انحراف استاندارد (n=3)
اکسی تتراسایکلین	۰/۸۳-۲۰۰۰	۰/۲۵	۰/۸۳	۰/۹۹۸	۳/۵	۶۵ \pm ۳
داکسی ساییکلین	۰/۶۴-۲۰۰۰	۰/۱۹	۰/۶۴	۰/۹۹۵	۳/۸	۷۹ \pm ۳
کلرو تتراسایکلین	۰/۵۴-۲۰۰۰	۰/۱۶	۰/۵۴	۰/۹۹۵	۴/۱	۸۲ \pm ۴
تتراسایکلین	۰/۷۱-۲۰۰۰	۰/۲۱	۰/۷۱	۰/۹۹۸	۴/۵	۷۳ \pm ۲

- نتایج بررسی اثر ماتریکس و آنالیز نمونه‌های حقیقی

به منظور بررسی اثر ماتریکس در نمونه‌های تخم مرغ آزمایش شده، پنج نمونه به صورت تصادفی انتخاب شده و به همراه نمونه بلانک با آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه به غلظت‌های ۵ و ۲۵ نانوگرم در گرم آلوده شدند. با توجه به نتایج بدست آمده در جدول ۳ که به صورت مقادیر بازیابی‌های نسبی (در محدوده ۸۷ تا ۱۰۵ درصد) گزارش شدند، ماتریکس نمونه‌های تخم مرغ تأثیری بر کارایی روش پیشنهادی ندارند.

برای بررسی قابلیت روش ارائه شده در اندازه‌گیری آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه در نمونه‌های حقیقی، نمونه‌های تخم مرغ تهیه شده با روش پیشنهادی استخراج شده و با HPLC-DAD آنالیز شدند. مطابق نتایج بدست آمده، در ۶ نمونه از ۱۵ نمونه تخم مرغ بررسی شده اکسی تتراسایکلین در محدوده غلظتی ۲۵/۴ تا ۴۸/۷ نانوگرم بر گرم یافت شد. در قدم بعدی، نمونه‌های بررسی شده برای ارزیابی تأثیر فرابنفش در کاهش محتوی اکسی تتراسایکلین به مدت ۹۰ دقیقه در معرض امواج فرابنفش با توان ۱۳۰ وات قرار گرفتند. مطابق نتایج به دست آمده، پس از قرار گرفتن نمونه‌ها در معرض امواج فرابنفش میزان اکسی تتراسایکلین در نمونه‌ها در محدوده ۱۷/۱ تا ۳۲/۹ نانوگرم بر گرم می‌باشد.

جدول ۳- بررسی اثر ماتریکس نمونه‌های تخم مرغ

بازیابی نسبی \pm انحراف استاندارد (n=۳)					
آنالیت	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ۴	نمونه ۵
نمونه‌های اسپایک شده با هریک از آنالیت‌ها به غلظت ۵ نانوگرم بر گرم					
اکسی تتراسایکلین	۹۲ \pm ۳	۹۰ \pm ۳	۸۹ \pm ۲	۹۷ \pm ۱	۹۵ \pm ۲
داکسی سایکلین	۸۷ \pm ۲	۹۲ \pm ۲	۹۶ \pm ۴	۹۹ \pm ۲	۹۹ \pm ۳
کلروتتراسایکلین	۹۴ \pm ۴	۹۹ \pm ۴	۹۵ \pm ۲	۹۹ \pm ۴	۱۰۰ \pm ۴
تتراسایکلین	۹۰ \pm ۲	۹۶ \pm ۲	۹۷ \pm ۳	۹۵ \pm ۳	۹۹ \pm ۲
نمونه‌های اسپایک شده با هریک از آنالیت‌ها به غلظت ۲۵ نانوگرم بر گرم					
اکسی تتراسایکلین	۹۶ \pm ۳	۹۵ \pm ۴	۹۵ \pm ۲	۹۹ \pm ۴	۹۹ \pm ۲
داکسی سایکلین	۹۲ \pm ۱	۹۶ \pm ۲	۹۹ \pm ۳	۱۰۲ \pm ۴	۱۰۲ \pm ۳
کلروتتراسایکلین	۹۸ \pm ۳	۱۰۵ \pm ۵	۱۰۰ \pm ۴	۱۰۰ \pm ۳	۱۰۳ \pm ۴
تتراسایکلین	۹۵ \pm ۲	۹۹ \pm ۳	۹۹ \pm ۲	۹۸ \pm ۲	۹۹ \pm ۳

در این مطالعه، از ترکیب روش‌های DSPE و DLLME مبتنی بر استفاده از مایع یونی مغناطیسی به منظور استخراج آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلینی از نمونه‌های تخم‌مرغ قبل از آنالیز آنها با HPLC-FLD استفاده شد. بعلاوه امکان استفاده از امواج فرابنفش در کاهش محتوای آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلینی در نمونه‌های تخم‌مرغ مورد ارزیابی قرار گرفت. در مورد نمونه‌های مواد غذایی با درصد بالای پروتئین مانند شیر و تخم‌مرغ، قبل از ارائه روش تجزیه‌ای مناسب رسوب دهی پروتئین‌ها ضروری است (Mohebbi *et al.*, 2022). از شناخته‌شده‌ترین و کارآمدترین عوامل رسوب‌دهنده پروتئین می‌توان تری‌کلرواستیک اسید را نام برد. بنابراین غلظت و حجم محلول تری‌کلرواستیک اسید مورد استفاده از جمله پارامترهای مهمی است که می‌تواند کارایی مرحله رسوب‌دهی پروتئین و به طبع آن راندمان استخراج روش پیشنهادی را تحت تاثیر قرار دهد.

در این مطالعه، برای افزایش سطح تماس بین عامل رسوب‌دهنده (تری‌کلرواستیک اسید) با نمونه تخم‌مرغ از فرآیند ورتکس استفاده می‌شود (Mohebbi *et al.*, 2022). بنابراین مدت زمان ورتکس در این مرحله قابلیت تغییر نتایج را داشته و نیاز به بهینه‌سازی دارد.

یکی از مهم‌ترین پارامترهای تاثیرگذار در کارایی روش پیشنهادی، مقدار جاذب (MOF) می‌باشد (Asgharinezhad *et al.*, 2014). تغییر مقدار MOF، سایت‌های مختلفی را برای جذب آنالیت‌ها از محلول نمونه فراهم می‌کند. به‌طور کلی با افزایش مقدار جاذب، نسبت فاز جامد به نمونه افزایش یافته و راندمان استخراج افزایش می‌یابد. لازم به ذکر است که در مقادیر بالای جاذب ممکن است پراکندگی جاذب در محلول نمونه کاهش یابد. فلذا مقدار جاذب در روش ارائه شده باید بهینه گردد.

به‌طور کلی، کارایی روش DSPE به سطح تماس بین جاذب مورد استفاده و محلول نمونه بستگی دارد. برای افزایش سطح تماس، از ورتکس نمودن محلول نمونه و جاذب استفاده می‌شود. بنابراین مدت زمان ورتکس در این مرحله که به عنوان مدت زمان جذب نیز شناخته می‌شود باید بهینه شود.

یکی از راه‌های افزایش بازده استخراج در روش‌های استخراج مختلف افزایش قدرت یونی محلول با افزودن نمک به فاز آبی می‌باشد (Baghaei *et al.*, 2022). به‌طور کلی در این روش‌ها، افزایش نمک بر محلول‌های آبی دو اثر دارد. نخست این که افزودن نمک می‌تواند باعث کاهش حلالیت آنالیت‌ها در فاز آبی شده و در نتیجه سبب افزایش انتقال آن‌ها به داخل جاذب و افزایش راندمان استخراج گردد. دوم این که افزایش نمک، ویسکوزیته‌ی محلول آبی را افزایش داده و با کاهش ضریب انتشار آنالیت‌های مورد نظر می‌تواند تاثیر منفی بر روی کارایی استخراج داشته باشد. هر کدام از اثرات بر دیگری برتری داشته باشد در این صورت تاثیر آن عامل غالب خواهد بود. بنابراین نیاز است تا اثر نمک زنی مطالعه شود.

در کار پژوهشی حاضر، آنالیت‌های جذب شده باید از سطح جاذب شسته شده و واجذب شوند و سپس فاز آلی حاوی آنالیت‌های استخراج شده مورد استفاده قرار گیرد. حلال واجذب‌کننده باید بر روی جاذب بی‌اثر باشد و تمام آنالیت‌ها را از سطح جاذب واجذب کند. بنابراین حلال‌هایی با ویسکوزیته پایین و قدرت حل‌کنندگی بالا نسبت به

آنالیت‌ها به عنوان حلال واجذب کننده ترجیح داده می‌شوند (Wu et al., 2009). با توجه به این نکات، انتخاب حلال مناسب بسیار ضروری است.

حجم حلال واجذب کننده نیز پارامتر مهمی است زیرا می‌تواند کارایی استخراج را در هر دو مرحله DSPE (حجم کم حلال قادر به واجذب کامل آنالیت‌ها نیست) و DLLME (حجم کم حلال نمی‌تواند حلال استخراج کننده را به طور موثری پخش کند) تحت تاثیر قرار دهد (Wu et al., 2009). به همین دلیل حجم حلال شوینده بایستی مورد بهینه‌سازی قرار گیرد.

کارایی شویش آنالیت‌ها در مرحله واجذبی به سطح تماس بین جاذب حاوی آنالیت‌ها و حلال واجذب کننده بستگی دارد. برای افزایش سطح تماس، از ورتکس نمودن مخلوط حلال واجذب کننده و جاذب استفاده می‌شود. بنابراین، مدت زمان ورتکس در این مرحله را زمان واجذب نامیده شده و نیاز به بهینه‌سازی دارد.

انتخاب یک حلال استخراج کننده‌ی مناسب در روش DLLME از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است (Almeida et al., 2012). در این روش از مایعات یونی مغناطیسی به دلیل سمیت کمتر آن‌ها به منظور تغلیظ آنالیت‌ها استفاده شده و حلال استخراج کننده با استفاده از حلال پخش کننده به صورت قطرات بسیار ریز در داخل فاز آبی پخش می‌شود. بنابراین انتخاب حلال استخراج کننده مناسب بسیار حائز اهمیت است.

حجم حلال استخراج کننده از دیگر پارامترهایی است که در روش DLLME تاثیر داشته و نیاز به بهینه‌سازی دارد. حجم حلال استخراج کننده می‌تواند حجم فاز آلی جمع‌آوری شده پس از استخراج، تکرارپذیری نتایج و کارایی استخراج را تحت تأثیر قرار دهد. 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.

مدت زمان فرارگرفتن نمونه در معرض امواج فرابنفش نیز پارامتری است که می‌تواند غلظت باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه را در نمونه تخم‌مرغ تحت تاثیر قرار دهد. افزایش مدت زمان می‌تواند بر تخریب و تغییر شکل ترکیبات هدف موثر بوده و منجر به کاهش غلظت باقی‌مانده آنالیت‌ها شود.

در ادامه، پارامترهای تجزیه‌ای (LOQ، RSD، LR، LOD) مربوط به روش پیشنهادی با پارامترهای تجزیه‌ای روش‌های دیگر که قبلاً برای تعیین آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه گزارش شده‌اند، مقایسه شدند. مطابق داده‌های جدول ۴، در روش حاضر، RSDها بهتر یا قابل مقایسه با موارد گزارش شده در سایر روش‌ها هستند که نشان دهنده تکرارپذیری قابل قبول روش پیشنهادی است. روش ارائه شده LOD و LOQهای کم‌تری را در مقایسه با روش‌های دیگر ارائه می‌دهد. این امر نشان دهنده کارایی بالایی روش پیشنهادی برای آنالیز غلظت‌های پایین آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه است. روش ارائه شده LRهای وسیع‌تری را در مقایسه با روش‌های دیگر ارائه می‌دهد. این نتایج حاکی از قابلیت بالای روش پیشنهادی در اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در نمونه‌های تخم‌مرغ می‌باشد.

جدول ۴- مقایسه کارایی روش پیشنهادی با سایر روش‌ها

منبع	روش	محدوده خطی (نانوگرم بر گرم)	حد اندازه‌گیری (نانوگرم بر گرم)	حد تشخیص (نانوگرم بر گرم)	انحراف استاندارد نسبی (درصد)	نمونه
(Gissawong <i>et al.</i> , 2019)	الف	۳-۱۰۰۰	۲/۳-۹/۹	۰/۷-۳/۰	۳/۱-۶/۶	تخم‌مرغ، شیر و عسل
(Sereshti <i>et al.</i> , 2020)	ب	۵/۱-۲۰۰	۵/۱-۲۸/۴	۱/۵-۸/۵	۰/۸-۱/۷	شیر
(Du <i>et al.</i> , 2019)	ج	۲۰-۸۰۰	۵/۵-۱۳/۷	۲/۳-۴/۶	۱/۵-۴/۶	تخم‌مرغ
-	روش حاضر	۰/۵۴-۲۰۰۰	۰/۵۴-۰/۸۳	۰/۱۶-۰/۲۵	۳/۵-۴/۵	تخم‌مرغ

الف) میکرواستخراج فاز مایع مبتنی بر سوپرامولکول کوپل شده با کروماتوگرافی مایع مجهز به دتکتور دیود آرایه‌ای
 ب) میکرواستخراج مایع-مایع پخشی مبتنی بر حلال اتکتیک عمیق کوپل شده با کروماتوگرافی مایع مجهز به دتکتور دیود آرایه‌ای
 ج) استخراج جذبی همزن مغناطیسی کوپل شده با کروماتوگرافی مایع مجهز دتکتور فلورسانس

در این کار پژوهشی، از یک روش آماده‌سازی موثر، حساس و قابل اعتماد مبتنی بر DSPE تلفیق شده با DLLME برای استخراج و پیش‌تغلیظ آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه از نمونه‌های مختلف تخم‌مرغ استفاده شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، راندمان استخراج بالا، حدود تشخیص و اندازه‌گیری پایین و تکرارپذیری مناسب از جمله ویژگی‌های مناسب روش پیشنهادی است. اثر ماتریکس ناچیز و زمان استخراج کوتاه نیز از دیگر مزایای اصلی روش ارائه شده می‌باشد.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافی ندارند.

منابع

- Almeida, C., Fernandes, J.O. and Cunha, S.C. (2012). A novel dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. *Food Control*, 25: 380-388.
- Asgharinezhad, A.A., Ebrahimzadeh, H., Mirbabaei, F., Mollazadeh, N. and Shekari, N. (2014). Dispersive micro-solid-phase extraction of benzodiazepines from biological fluids based on polyaniline/magnetic nanoparticles composite. *Analytica Chimica Acta*, 844: 80-89.
- Babapour, A., Azami, L. and Fartashmehr, J. (2012). Overview of antibiotic residues in beef and mutton in ardebil, north west of Iran. *World Applied Sciences Journal*, 19: 1417-1422.
- Baghaei, P.A.M., Afshar Mogaddam, M.R., Farajzadeh, M.A., Mohebbi, A. and Sorouraddin, S.M. (2022). Application of deep eutectic solvent functionalized cobalt ferrite nanoparticles

in dispersive micro solid phase extraction of some heavy metals from aqueous samples prior to ICP-OES. *Journal of Food Composition and Analysis*, pp. 105-125.

- Birmpa, A., Vantarakis, A., Paparrodopoulos, S., Whyte, P. and Lyng, J. (2014). Efficacy of three light technologies for reducing microbial populations in liquid suspensions. *BioMed Research International*, pp. 1-9.
- Du, F., Sun, L., Tan, W., Wei, Z., Nie, H., Huang, Z., *et al.* (2019). Magnetic stir cake sorptive extraction of trace tetracycline antibiotics in food samples: preparation of metal–organic framework–embedded poly HIPE monolithic composites, validation and application. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411: 2239–2248.
- Gissawong, N., Boonchiangma, S., Mukdasai, S. and Srijaranai, S. (2019). Vesicular supramolecular solvent–based microextraction followed by high performance liquid chromatographic analysis of tetracyclines. *Talanta*, 200: 203–211.
- Huang, L., Yu, W., Guo, X., Huang, Y., Zhou, Q. and Zhai, H. (2019). Chip–based multi–molecularly imprinted monolithic capillary array columns coated Fe₃O₄/GO for selective extraction and simultaneous determination of tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in eggs. *Microchemical Journal*, 150: 104097.
- Menkem, Z.E., Ngangom, B.L., Tamunjoh, S.S.A. and Boyom, F.F. (2019). Antibiotic residues in food animals: Public health concern. *Acta Ecologica Sinica*, 39: 411-415.
- Mohebbi, A., Nemati, M., Farajzadeh, M.A., Afshar Mogaddam, M.R. and Lotfipour, F. (2022). High performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of patulin and ochratoxin a in commercial fruit juices after their extraction with a green synthesized metal organic framework–based dispersive micro solid phase extraction procedure. *Microchemical Journal*, 179: 107558.
- Mohebbi, A., Nemati, M., Mogaddam, M.R.A., Farajzadeh, M.A. and Lotfipour, F. (2022). Dispersive micro–solid–phase extraction of aflatoxins from commercial soy milk samples using a green vitamin–based metal–organic framework as an efficient sorbent followed by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination. *Journal of Chromatography A*, 1673: 463099.
- Moudgil, P., Bedi, J.S., Aulakh, R.S., Gill, J.P.S. and Kumar, A. (2019). Validation of HPLC multi–residue method for determination of fluoroquinolones, tetracycline, sulphonamides and chloramphenicol residues in bovine milk. *Food Analytical Methods*, 12: 338–346.
- Nascimento, U.M. and Azevedo, E.B. (2013). Microwaves and their coupling to advanced oxidation processes: Enhanced performance in pollutants degradation. *Journal of Environmental Science and Health (Part A)*, 48: 1056-1072.
- Oka H., Ito, Y. and Matsumoto, H. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, 882: 109-133.
- Pang, Y.H., Lv, Z.Y., Sun, J.C., Yang, C. and Shen X.F. (2021). Collaborative compounding of metal–organic frameworks for dispersive solid-phase extraction HPLC–MS/MS determination of tetracyclines in honey. *Food Chemistry*, 355: 129411.
- Rahmani, A., Mehralipour, J., Shabanlo, A. and Majidi, S. (2015). Efficiency of ciprofloxacin removal by ozonation process with calcium peroxide from aqueous solutions. *The Journal of Qazvin University of Medical Sciences*, 19: 55-64 [In Persian].
- Ścigalski, P. and Kosobucki, P. (2020). Recent materials developed for dispersive solid phase extraction. *Molecules*, 25: 4869.
- Seifrtová, M., Nováková, L., Lino, C., Pena, A. and Solich, P. (2009). An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica Chimica Acta*, 649: 158-179.
- Sereshti, H., Semnani Jazani, 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.

- Simon, R.R., Borzelleca, J.F., DeLuca, H.F. and Weaver, C.M. (2013). Safety assessment of the post-harvest treatment of button mushrooms (*Agaricus bisporus*) using ultraviolet light. *Food and Chemical Toxicology*, 56: 278-289.
- Wang K., Lin K., Huang X., Chen M. (2017). A simple and fast extraction method for the determination of multiclass antibiotics in eggs using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65: 5064-5073.
- Wu X., Hong H., Liu X., Guan W., Meng L., Ye Y., *et al.* (2013). Graphene-dispersive solid-phase extraction of phthalate acid esters from environmental water. *Science of the Total Environment*, 444: 224-230.
- Wu, Q., Wang, C., Liu, Z., Wu, C., Zeng, X., Wen, J., *et al.* (2009). Dispersive solid-phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of some sulfonylurea herbicides in soil by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216: 5504-5510.
- Yang, X., Zhang, S., Yu, W., Liu, Z., Lei, L., Li, N., *et al.* (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.

Development of efficient analysis method for determination of extensively used tetracycline antibiotics in egg samples

Dispersive solid phase extraction of tetracycline antibiotics from egg samples

Abstract

Antibiotics are chemical compounds that nowadays are widely used to treat diseases in animals all over the world. Ignorance or negligence of withdrawal time or using antibiotics more than prescribed amount has caused the presence of their residues in foodstuffs like egg samples that can have adverse effects on consumer health. Therefore, monitoring the presence of antibiotics in various foodstuffs especially in highly consumed products like egg is of great importance. The aim of this study is Development of efficient analysis method for determination of extensively used tetracycline antibiotics in egg samples. So, in the present research, a dispersive solid phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction is proposed for the extraction of tetracycline antibiotics (oxytetracycline, tetracycline, doxycycline, and chlortetracycline) from egg samples. The extracted analytes are analyzed using high-performance liquid chromatography equipped with a diode array detector. Under the optimum condition, limits of detections and quantifications within the ranges of 0.16–0.25 and 0.54–0.83 ng g⁻¹ were obtained, respectively. Extraction recoveries has been

obtained in the range of 65–82%, respectively. Oxytetracycline was found in a number of samples (six out of fifteen investigated samples). Also, according to the obtained results, ultraviolet irradiation can reduce the residue amount of oxytetracycline significantly.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: DSPE, MOF, Tetracycline antibiotics, HPLC, Egg