

“Research article”

DOI: 10.71499/jvcp.2024.3121450

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

Mohafez, N.¹, Javadi, A.^{2,3*}, Afshar Mogaddam, M.R.⁴, Mashak, Z.⁵

- 1- Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Mamaghan Branch, Islamic Azad University, Mamaghan, Iran.
- 2- Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary, Tabriz Medical Science, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
- 3- Professor, Health Promotion Research Center, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
- 4- Assistant Professor, Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
- 5- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

*Corresponding author's email: Javadi@iaut.ac.ir

(Received: 2024/5/5 Accepted: 2024/9/1)

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 the 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 eggs 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. Therefore, in the present research, a dispersive solid phase extraction combined with dispersive liquid-liquid micro-extraction 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. The extraction efficiency of the presented method was obtained in the range of 65–82%. Oxytetracycline was found in a number of samples (six out of fifteen investigated samples). Also, according to the obtained results, ultraviolet irradiation can significantly reduce the amount of oxytetracycline residues.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Dispersive solid phase extraction, Egg, High performance liquid chromatography, Metal-organic framework, Tetracycline antibiotics.

"مقاله پژوهشی"

DOI: 10.71499/jvcp.2024.3121450

توسعه روش استخراج فاز جامد پخشی تلفیق‌شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جهت اندازه‌گیری میزان آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلینی پر کاربرد در نمونه‌های تخم‌مرغ و مطالعه تاثیر امواج مایکروویو در مقدار آنها

ندا محافظ^۱، افشین جوادی^{۲*}، محمدرضا افشارمقدم^۴، زهره مشاک^۵

۱- دانشجوی دکترای گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ممقان، دانشگاه آزاد اسلامی، ممقان، ایران.

۲- استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- استاد مرکز تحقیقات ارتقاء سلامت، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

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

۵- دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

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

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۶/۱۱)

چکیده

آنتی‌بیوتیک‌ها 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 باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک در مواد غذایی مانند تخم‌مرغ می‌شود که می‌تواند اثرات نامطلوبی بر روی سلامت مصرف‌کننده داشته باشد. بنابراین پایش باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها در نمونه‌های مختلف مواد غذایی به‌ویژه در محصولات پر مصرف مانند تخم‌مرغ اهمیت فراوانی دارد. هدف از این مطالعه توسعه روش آنالیز کارآمد برای اندازه‌گیری میزان آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلینی پر کاربرد در نمونه‌های تخم‌مرغ می‌باشد. بنابراین در کار پژوهشی حاضر یک روش آماده‌سازی مبتنی بر استخراج فاز جامد پخشی ترکیب شده با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی برای استخراج آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلینی (اکسی‌تتراسایکلین، تتراسایکلین، داکسی‌سایکلین و کلروتتراسایکلین) از نمونه‌های تخم‌مرغ ارائه داده می‌شود. آنالیت‌های استخراج شده با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به دکتور دیود آرایه‌ای آنالیز می‌شوند. تحت شرایط بهینه حدود تشخیص و اندازه‌گیری به ترتیب در محدوده‌های ۰/۱۶-۰/۲۵ و ۰/۸۳-۰/۵۴ نانوگرم بر گرم حاصل شدند. راندمان استخراج روش ارائه شده در محدوده ۸۲-۶۵ درصد به دست آمد. در تعدادی از نمونه‌ها نیز اکسی‌تتراسایکلین (در ۶ نمونه از ۱۵ نمونه بررسی شده) یافت شد. مطالعه تاثیر امواج فرابنفش در میزان آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه نشان داد که این امواج می‌تواند میزان آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه را به‌طور قابل توجهی کاهش دهد.

کلیدواژه‌ها: استخراج فاز جامد پخشی، چارچوب آلی-فلزی، آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلینی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، تخم‌مرغ.

مقدمه

امروزه با توجه به ارزش غذایی بالای تخم‌مرغ (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 تخم‌مرغ عاری از هر گونه آلودگی باشد. باقی‌مانده داروها به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آلوده‌کننده‌های مواد غذایی مانند تخم‌مرغ 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 متابولیکی مورد نیاز برای زندگی آنها می‌باشند (Babapour et al., 2012). این ترکیبات شیمیایی براساس ساختار شیمیایی در دسته‌های مختلفی تقسیم بندی می‌شوند که از جمله مهم‌ترین آنها می‌توان به آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام‌ها، تتراسایکلین‌ها و آمفنیکول‌ها 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 متابولیکی، 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 تخم‌مرغ بسیار حائز اهمیت است (Menkem et al., 2019).

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 (Nascimento and Azevedo, 2013; Rahmani et al., 2015). 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 (Birmpa et al., 2014). پرتوهای الکترومغناطیس با طول موج ۱۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر، پرتوهای فرابنفش هستند. به‌طور کلی طیف فرابنفش شامل ۳ ناحیه طول موجی ۳۱۵ تا ۴۰۰، ۲۸۰ تا ۳۱۵ و ۲۰۰ تا ۲۸۰ (بیشترین آثار بیولوژیک اشعه فرابنفش بر میکروارگانیسم‌ها در ناحیه اخیر است) می‌باشد. امروزه در صنایع غذایی از پرتو فرابنفش به خصوص در طول موج‌های پایین به‌عنوان یک فناوری غیرحرارتی به

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).

با توجه به اهمیت مواد ذکر شده در بالا، هدف از انجام 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 بود که در طی آن از آنالیت‌های استخراج شده توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، مجهز به دکتور دیود آرایه‌ای (Diode Array Detector) استفاده شد. علاوه بر این، در مطالعه حاضر، برای نخستین بار تاثیر استفاده از امواج فرابنفش در کاهش محتوای آنالیت‌های مورد مطالعه در نمونه‌های تخم‌مرغ، مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌برداری

جهت انجام تحقیق حاضر، در این مطالعه مقطعی که در سال ۱۴۰۰ صورت پذیرفت، ۱۵ نمونه تخم‌مرغ از سوپرمارکت‌های سطح شهر تبریز (استان آذربایجان شرقی، ایران) به صورت تصادفی و همچنین ۱۵ نمونه تخم‌مرغ از تولید کنندگان محلی که در دوره پرورشی مرغ‌ها از آنتی‌بیوتیک استفاده نکرده بودند، تهیه شده و به عنوان نمونه‌های بلانک، در بهینه‌سازی روش پیشنهادی مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی آزمایش‌های

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 پخش (Dispersive solid phase extraction = DSPE) 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 (Ścigalski and Kosobucki, 2020). با توجه به این نکته، شیمیدان‌ها تلاش‌های بسیاری برای معرفی جاذب‌های جدید انجام داده‌اند که در نتیجه این

با خلوص بالا از شرکت مرک (Merck, Germany) تهیه شدند.

- شرایط آنالیز با HPLC-DAD (High-performance liquid chromatography with diode-array detection)

برای بررسی قابلیت روش ارائه شده در اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در نمونه‌های حقیقی، نمونه‌های تخم‌مرغ تهیه شده با روش پیشنهادی استخراج شده و با HPLC-DAD آنالیز شدند. 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 ۱ ارائه گردیده است.

تحقیق هم در دانشکده شیمی دانشگاه تبریز انجام گرفت.

- مواد شیمیائی استفاده شده

استانداردهای اکسی تتراسایکلین، تتراسایکلین، داکسی‌سایکلین، 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

جدول ۱- شرایط بهینه روش 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
تزریق‌کننده	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

دقیقه (آرمان نواندیشان بهسان، ایران) هم‌زده شده و pH آن با استفاده از محلول سود ۱ مولار (ایران شیمی، ایران) که به صورت قطره قطره اضافه گردید، در محدوده ۷ تنظیم شد. سپس مخلوط حاصله به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۱۸۰ درجه سلسیوس اتوکلاو شد. در ادامه، رسوب به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی

سنتز MOF (Metal-organic framework)

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

"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

به منظور 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 از محلول تری‌کلرو استیک اسید (۲۰ درصد وزنی / حجمی) به ۲ گرم نمونه تخم‌مرغ اضافه شده و مخلوط به دست آمده به مدت ۳ دقیقه ورتکس (AHN Biotechnologie، آلمان) شد. پس از سانتریفیوژ (آرمان نواندیشان بهسان، ایران)، 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

واتمن (GE Healthcare، آمریکا) فیلتر شد. در نهایت محصول به دست آمده چند بار با آب دیونیزه شسته شده و در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت در آون (فن آزما گستر، ایران) 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 $[C_6MIM][FeCl_4]$ و $[C_4MIM][FeCl_4]$ 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

(Wyckomar، کانادا) استفاده شد. در ادامه نمونه‌ها با روش ذکر شده در قسمت قبل، استخراج شدند.

یافته‌ها

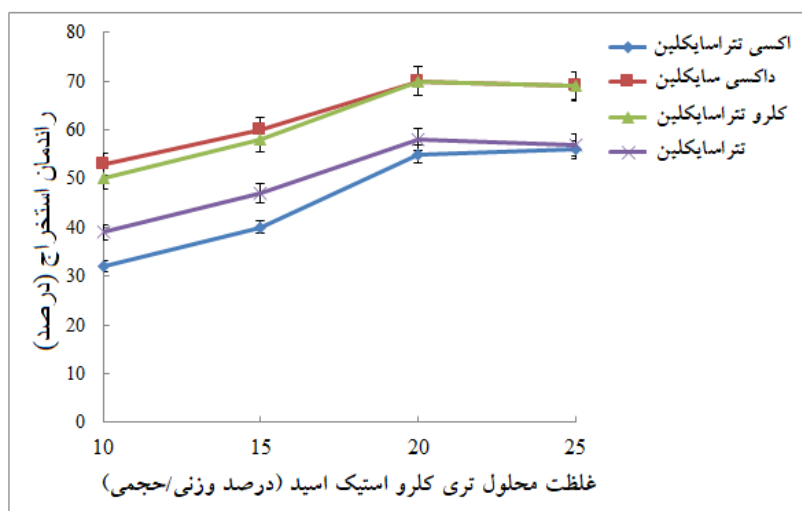
- نتایج بهینه‌سازی عوامل موثر در استخراج

غلظت محلول تری‌کلرو استیک اسید: مطابق نتایج ارائه شده در نمودار ۱، با افزایش غلظت محلول تری‌کلرواستیک اسید تا ۲۰ درصد وزنی/حجمی، راندمان استخراج آنالیت‌های مورد مطالعه افزایش یافته و پس از آن بدون تغییر باقی ماند. در نتیجه ۲۰ درصد وزنی/حجمی، به‌عنوان غلظت بهینه محلول تری‌کلرواستیک اسید انتخاب شد.

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

به‌منظور بررسی اثر ماتریکس در نمونه‌های تخم‌مرغ آزمایش شده، ۵ نمونه به‌صورت تصادفی انتخاب شده و به همراه نمونه بلانک با آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه به غلظت‌های ۵ و ۲۵ نانوگرم در گرم 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 فشارمتوسط جیوه



نمودار ۱- وضعیت بهینه‌سازی غلظت محلول تری‌کلرواستیک اسید

میلی‌لیتر به‌عنوان حجم بهینه محلول تری‌کلرو 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

- حجم محلول تری‌کلرو استیک اسید

با توجه به نتایج، راندمان استخراج آنالیت‌ها با افزایش حجم محلول تری‌کلرواستیک اسید (۲۰ درصد وزنی/حجمی) تا ۲/۵ میلی‌لیتر کارایی روش پیشنهادی افزایش یافته و پس از آن ثابت می‌ماند. بنابراین ۲/۵

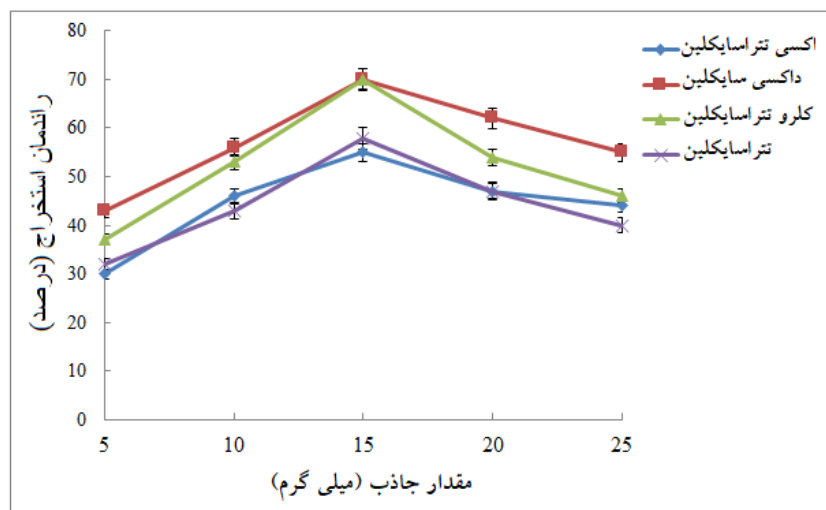
میلی گرم، بیشترین میزان بوده و بعد از آن کاهش پیدا کرده است. از این رو ۱۵ میلی گرم به عنوان مقدار بهینه انتخاب و در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت.

و بعد از آن ثابت می ماند. در نتیجه در این مرحله ۳ دقیقه به عنوان مدت زمان بهینه انتخاب شد.

- مقدار جاذب

همان‌طور که در نمودار ۲ مشخص است، راندمان

استخراج آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه در مقدار ۱۵



نمودار ۲- وضعیت بهینه‌سازی مقدار جاذب

روی عملکرد روش دارد. بنابراین، آزمایشات بعدی در غیاب نمک انجام شد.

- نوع حلال شوینده

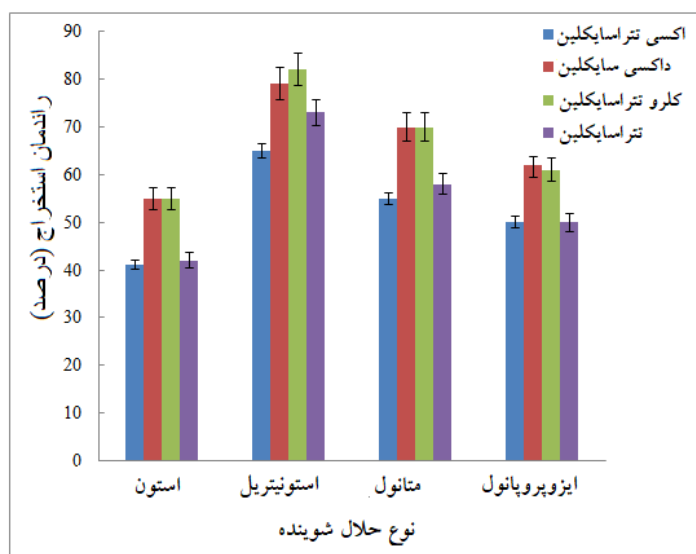
نتایج ارائه شده در نمودار ۳ نشان می دهد که آنالیت‌های مورد مطالعه از سطح جاذب توسط استونیتریل بهتر از سایر حلال‌های آزمایش شده شسته می شوند. بنابراین، استونیتریل به عنوان حلال واجدب انتخاب شد.

- مدت زمان جذب

مطابق نتایج به دست 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 می ماند.

- اثر نمک زنی

نتایج به دست آمده از آزمایشات مربوط به افزایش نمک نشان داد که افزودن نمک منجر به کاهش سیگنال های تجزیه ای در مقادیر مختلف شده و اثر منفی بر



نمودار ۳- وضعیت بهینه‌سازی نوع حلال شوینده

۳ دقیقه به‌عنوان زمان بهینه‌ی واجذب در آزمایشات بعدی انتخاب شد.

- نوع حلال استخراج‌کننده

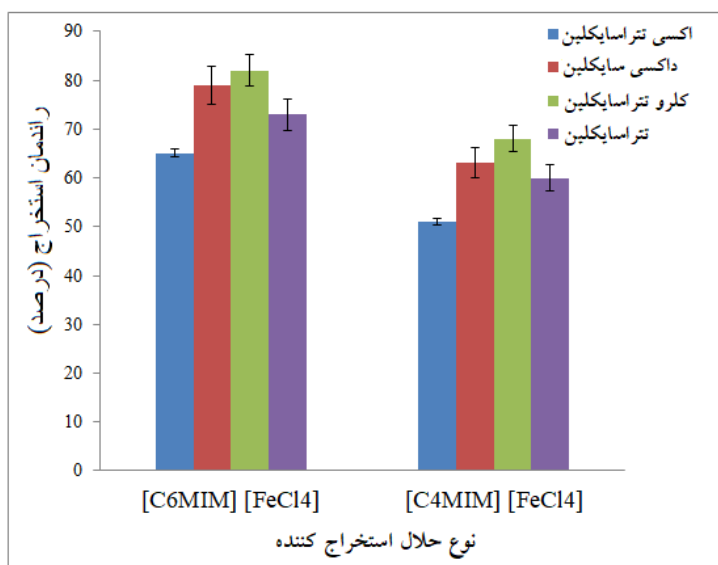
با توجه به نتایج ارائه شده در نمودار ۴، مایع یونی مغناطیسی $[FeCl_4]$ $[C_6MIM]$ بالاترین کارایی استخراج را برای آنالیت‌ها نشان داد و لذا به‌عنوان حلال استخراج‌کننده در مراحل بعدی انتخاب شد.

- حجم استون‌نیتریل

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

- مدت زمان واجذب

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهند که برای برقراری تعادل در مرحله‌ی واجذب ۳ دقیقه کافی است. بنابراین،



نمودار ۴- وضعیت بهینه‌سازی نوع حلال استخراج کننده

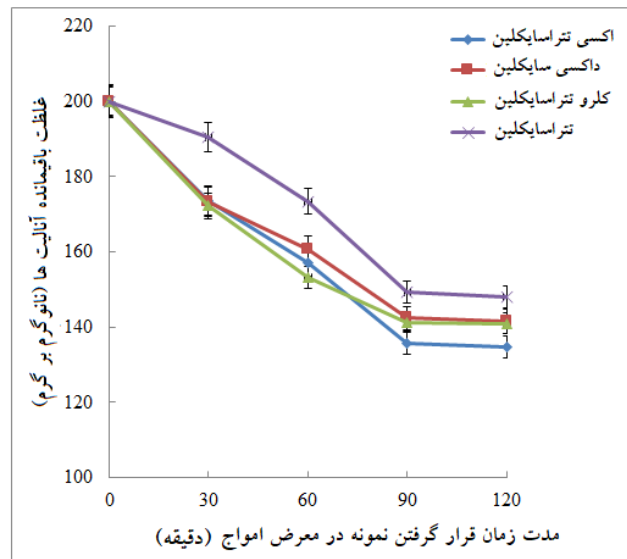
- حجم حلال استخراج کننده

با افزایش حجم حلال استخراج کننده 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 ارائه شده در نمودار ۵، با افزایش مدت

زمان قرار گرفتن نمونه تخم مرغ تا مدت زمان ۹۰ دقیقه، در معرض پرتوهای فرابنفش، غلظت آنتی بیوتیک‌ها در نمونه کاهش یافته و پس از آن کاهشی در غلظت آنالیت‌ها مشاهده نمی‌شود.



نمودار ۵- وضعیت بهینه‌سازی غلظت آنالیت‌های مورد مطالعه تحت تاثیر مدت زمان قرارگرفتن در معرض امواج فرابنفش

سیگنال به نویز ۳ و ۱۰ می‌باشد. برای ارزیابی تکرارپذیری و دقت روش، از انحراف استاندارد نسبی (RSD%) استفاده شد. ارقام شایستگی روش استفاده شده، در جدول ۲ ارائه شده‌است.

- نتایج مشخصات تجزیه‌ای

پس از ترسیم نمودار کالیبراسیون برای هر یک از آنالیت‌ها، مقادیر مجذور ضریب همبستگی (r^2) و محدوده خطی روش (LR) بدست آمد. حد تشخیص (LOD) و حد اندازه‌گیری (LOQ) به ترتیب برابر غلظت‌هایی در نظر گرفته شدند که در آن‌ها نسبت

جدول ۲- ارقام شایستگی به‌دست آمده با روش پیشنهادی در تحقیق

نوع آنالیت	محدوده خطی (نانوگرم در گرم)	حد تشخیص (نانوگرم در گرم)	حد اندازه‌گیری (نانوگرم در گرم)	مجذور ضریب همبستگی	انحراف استاندارد نسبی (درصد) (n=۶)	راندمان استخراج \pm انحراف استاندارد (n=۳)
اکسی‌تتراسایکلین	۰/۸۳-۲۰۰۰	۰/۲۵	۰/۸۳	۰/۹۹۸	۳/۵	۶۵ \pm ۳
داکسی‌سایکلین	۰/۶۴-۲۰۰۰	۰/۱۹	۰/۶۴	۰/۹۹۵	۳/۸	۷۹ \pm ۳
کلروتتراسایکلین	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

۱۰۵ درصد) گزارش شدند، مشخص شد که ماتریکس نمونه‌های تخم‌مرغ، تأثیری بر کارایی روش پیشنهادی ندارند.

- نتایج بررسی اثر ماتریکس و آنالیز نمونه‌های حقیقی

با توجه به نتایج بدست آمده در جدول ۳ که به صورت مقادیر بازیابی‌های نسبی (در محدوده ۸۷ تا

جدول ۳- بررسی اثر ماتریکس نمونه‌های تخم مرغ بر کارایی روش پیشنهادی تحقیق

بازایی نسبی \pm انحراف استاندارد (n=۳)					نوع آنالیت
نمونه ۵	نمونه ۴	نمونه ۳	نمونه ۲	نمونه ۱	
نمونه‌های اسپایک‌شده با هریک از آنالیت‌ها به غلظت ۵ نانوگرم بر گرم					
۹۵ \pm ۲	۹۷ \pm ۱	۸۹ \pm ۲	۹۰ \pm ۳	۹۲ \pm ۳	اکسی‌تتراسایکلین
۹۹ \pm ۳	۹۹ \pm ۲	۹۶ \pm ۴	۹۲ \pm ۲	۸۷ \pm ۲	داکسی‌سایکلین
۱۰۰ \pm ۴	۹۹ \pm ۴	۹۵ \pm ۲	۹۹ \pm ۴	۹۴ \pm ۴	کلروتتراسایکلین
۹۹ \pm ۲	۹۵ \pm ۳	۹۷ \pm ۳	۹۶ \pm ۲	۹۰ \pm ۲	تتراسایکلین
نمونه‌های اسپایک‌شده با هریک از آنالیت‌ها به غلظت ۲۵ نانوگرم بر گرم					
۹۹ \pm ۲	۹۹ \pm ۴	۹۵ \pm ۲	۹۵ \pm ۴	۹۶ \pm ۳	اکسی‌تتراسایکلین
۱۰۲ \pm ۳	۱۰۲ \pm ۴	۹۹ \pm ۳	۹۶ \pm ۲	۹۲ \pm ۱	داکسی‌سایکلین
۱۰۳ \pm ۴	۱۰۰ \pm ۳	۱۰۰ \pm ۴	۱۰۵ \pm ۵	۹۸ \pm ۳	کلروتتراسایکلین
۹۹ \pm ۳	۹۸ \pm ۲	۹۹ \pm ۲	۹۹ \pm ۳	۹۵ \pm ۲	تتراسایکلین

بحث و نتیجه‌گیری

آنتی‌بیوتیک‌ها یک دسته پرکاربرد از داروهای مورد استفاده در پرورش دام و طیور می‌باشند که باقی‌مانده آنها به وفور در محصولات لبنی و دامی مختلف مانند نمونه‌های شیر، تخم مرغ و گوشت یافت می‌شوند. اختلالات متابولیکی، ایجاد میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و کاهش حساسیت در برابر درمان آنتی‌بیوتیکی از جمله مشکلات باقی‌مانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی به شمار می‌رود (Kumar et al., 2020). بنابراین، در طی مطالعه حاضر، از ترکیب روش‌های DSPE و DLLME مبتنی بر استفاده از مایع یونی مغناطیسی به منظور استخراج آنتی‌بیوتیک‌های

مطابق نتایج بدست آمده، در ۶ نمونه از ۱۵ نمونه تخم‌مرغ بررسی شده اکسی‌تتراسایکلین در محدوده غلظتی ۲۵/۴ تا ۴۸/۷ نانوگرم بر گرم یافت شد. در قدم بعدی، نمونه‌های بررسی شده برای ارزیابی تاثیر فرابنفش در کاهش محتوی اکسی‌تتراسایکلین 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 اکسی‌تتراسایکلین در نمونه‌ها در محدوده ۱۷/۱ تا ۳۲/۹ نانوگرم بر گرم می‌باشد.

تتراسایکلینی از نمونه‌های تخم‌مرغ قبل از آنالیز آن‌ها با روش HPLC-FLD استفاده شد. بعلاوه امکان استفاده از امواج فرابنفش در کاهش محتوای آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلینی در نمونه‌های تخم‌مرغ مورد ارزیابی قرار گرفت.

- بهینه‌سازی عوامل موثر در استخراج

مطالعات نشان داده پروتئین‌های موجود در ماتریکس محصولات مانند نمونه‌های تخم‌مرغ می‌توانند استخراج آنالیت‌ها را در فرآیند استخراج محدود کنند. بنابراین، رسوب‌دادن پروتئین‌ها قبل از استفاده از روش استخراج ضروری است. از شناخته‌شده‌ترین و کارآمدترین عوامل رسوب‌دهنده پروتئین می‌توان تری‌کلرواستیک اسید را نام برد (Mohebbi *et al.*, 2022). همچنین نشان داده شده است تری‌کلرواستیک اسید با جدا کردن آب متصل به پروتئین، پروتئین‌ها را وادار می‌کند تا رسوب کنند. از آنجایی که آنالیت‌های محلول در نمونه بر روی یک جاذب جذب می‌شوند، بدیهی است که راندمان استخراج روش به برهمکنش بین جاذب و آنالیت بستگی دارد. بنابراین، غلظت و حجم محلول تری‌کلرواستیک اسید مورد استفاده از جمله پارامترهای مهمی است که می‌تواند کارایی مرحله رسوب‌دهی پروتئین و به دنبال آن راندمان استخراج روش پیشنهادی را تحت تاثیر قرار دهد (Nemati *et al.*, 2021). مطابق نتایج (نمودار ۱) با افزایش غلظت محلول تری‌کلرو استیک اسید راندمان استخراج افزایش یافت. تاثیر محلول در استخراج به ترتیب کلروتتراسایکلین < داکسی سایکلین < تتراسایکلین < بود. همچنین نتایج نشان داد با افزایش غلظت محلول تری‌کلرواستیک اسید تا ۲۰ درصد وزنی /

حجمی، راندمان استخراج آنالیت‌های مورد مطالعه افزایش یافته و پس از آن بدون تغییر باقی‌ماند. در نتیجه ۲۰ درصد وزنی / حجمی، به‌عنوان غلظت بهینه محلول تری‌کلرواستیک اسید انتخاب شد. همچنین، مدت زمان تماس محلول تری‌کلرواستیک اسید با نمونه تخم‌مرغ دیگر پارامتر مهمی است که می‌تواند کارایی روش ارائه شده را تحت تاثیر قرار دهد (Mohebbi *et al.*, 2022).

واضح است که استفاده از ورتکس با تغییر سطح تماس جاذب با محلول نمونه بر راندمان روش تاثیر بگذارد و باید بهینه شود، زیرا استفاده از ورتکس سبب افزایش سطح تماس بین عامل رسوب‌دهنده و نمونه‌شده و در نتیجه آن رسوب‌دهی پروتئین‌ها به طور موثر و در زمان کوتاه‌تری صورت می‌گیرد (Nemati *et al.*, 2021). بنابر این امر، در این مرحله از تحقیق، مدت زمان ورتکس (۱ تا ۵ دقیقه) بهینه‌سازی شد. با توجه به نتایج (نمودار ۱) راندمان استخراج آنالیت‌ها تا ۲ دقیقه هم‌زدن با ورتکس افزایش و سپس ثابت ماند. در نتیجه ۲ دقیقه به عنوان مدت زمان بهینه ورتکس برای ادامه تحقیق انتخاب شد.

از دیگر پارامترهای تاثیرگذار در کارایی روش پیشنهادی، مقدار جاذب (MOF) استفاده شده جهت حذف آنالیت‌ها 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 (Jamali *et al.*, 2013). بنابراین مقدار جاذب در روش ارائه شده

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 (*Khataei et al.*, 2022). برای بررسی اثر نمک‌زنی، غلظت‌های مختلف نمک طعام (۰، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ درصد وزنی/حجمی) به محلول آبی اضافه شد. نتایج نشان داد نمک زدایی در تحقیق حاضر غالب است و راندمان استخراج آنالیت‌ها با افزایش غلظت نمک طعام به وضوح کاهش یافت. می‌توان گفت که ویسکوزیته محیط با افزودن نمک به محیط استخراج افزایش می‌یابد و در این حالت انتقال جرم بین جاذب و محلول مختل می‌شود. این نشان می‌دهد که انتشار در انتقال جرم موثر است (*Pamık et al.*, 2023). بنابراین، آزمایش‌های بعدی در غیاب نمک طعام انجام شد.

آنالیت‌های جذب‌شده روی ذرات جامد باید از سطح جاذب با استفاده از حلال مناسب شسته شده و واجذب شوند. همچنین حلال مورد استفاده باید توانایی کافی در دفع آنالیت‌ها را داشته باشد و از طرفی باید بر روی جاذب بی‌اثر باشد. از طرفی وقتی به سیستم جداسازی تزریق می‌شود باید رفتار کروماتوگرافی خوبی داشته باشد (*Pamık et al.*, 2023). بنابراین حلال‌هایی با ویسکوزیته پایین و قدرت حل‌کنندگی بالا نسبت به آنالیت‌ها به عنوان حلال واجذب کننده ترجیح داده شدند (*Wu et al.*, 2009). بر اساس این معیارها، چندین حلال شامل متانول، استون، استونیتریل و

باید بهینه گردد. برای بهینه‌یابی پارامتر مذکور (مطابق نمودار ۲)، مقدار ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم از جاذب به صورت جداگانه در فرآیند استخراج استفاده شد. نتایج نشان داد بهینه مقدار جاذب جهت دستیابی به حداکثر راندمان استخراج برابر با ۱۵ میلی‌گرم می‌باشد. این نتایج تأیید می‌کند که تا ۱۵ میلی‌گرم، تعداد سایت‌های فعال افزایش می‌یابد، لذا منجر به حداکثر راندمان استخراج می‌شود. این در حالی است که راندمان استخراج در مقادیر بالاتر از ۱۵ میلی‌گرم به دلیل دفع ناقص آنالیت‌ها از سطح جاذب کاهش می‌یابد. در نتیجه، مقدار ۱۵ میلی‌گرم برای ادامه مطالعه استفاده شد. به‌طور کلی، کارایی روش DSPE به سطح تماس بین جاذب مورد استفاده و محلول نمونه (زمان جذب) بستگی دارد. زیرا دوره زمانی هم زدن مخلوط جاذب و محلول نمونه، می‌تواند از طریق افزایش سرعت انتقال جرم آنالیت از نمونه به جاذب، بر راندمان استخراج آنالیت‌ها تأثیر بگذارد و زمان استخراج را کاهش دهد. در نتیجه این مهم، استفاده از وورتکس و بهینه‌یابی زمان جذب، طی آزمایشات مستقل طی مدت زمان ۱ تا ۵ دقیقه انجام شد. مطابق نتایج راندمان استخراج آنالیت‌ها، طی ۳ دقیقه زمان جذب، حداکثر استخراج آنالیت‌ها صورت گرفت. در نتیجه، ۳ دقیقه به عنوان زمان جذب در آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

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

-بهینه‌سازی پارامترهای موثر در DLLME (Dispersive liquid-liquid microextraction)

انتخاب یک حلال استخراج‌کننده مناسب در روش DLLME از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. زیرا، بازده استخراج تقریباً تمام روش‌های ریز استخراج اساساً به حلال استخراج مورد استفاده بستگی دارد (Almeida *et al.*, 2012). در این مطالعه از مایعات یونی مغناطیسی به دلیل سمیت کمتر آن‌ها به منظور تغلیظ آنالیت‌ها استفاده شده و حلال استخراج‌کننده با استفاده از حلال پخش‌کننده به صورت قطرات بسیار ریز در داخل فاز آبی پخش می‌شود. بنابراین انتخاب حلال استخراج‌کننده مناسب بسیار حائز اهمیت است. در این مرحله، سه نوع حلال یوتکتیک سه جزئی شامل دکانویک اسید: DCA: DEAC (۷۰ میکرولیتر)، نونانویک اسید: DCA: DEAC (۶۳ میکرولیتر) و دکانویک اسید: DCA: DEAC (۶۰ میکرولیتر) مورد آزمایش قرار گرفت. بر اساس نتایج (نمودار ۴) آنالیت‌ها و برای ادامه مطالعه انتخاب شد. همچنین حجم حلال یوتکتیک در محدوده ۵۰ تا ۷۰ میکرولیتر (در فواصل ۵ میکرولیتر) بهینه‌سازی شد. زیرا حجم حلال استخراج‌کننده می‌تواند حجم فاز آلی جمع‌آوری شده پس از استخراج، تکرارپذیری نتایج و کارایی استخراج را تحت تأثیر قرار دهد. در حجم‌های کمتر از حلال استخراج‌کننده 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 استخراج‌کننده ممکن است فاز آلی جمع نشود و یا اینکه مقدار فاز جمع شده به

ایزوپروپانول مورد آزمایش قرار گرفتند. بر اساس نتایج ارائه شده در نمودار ۳، بازده استخراج این روش به ترتیب استونیتریل < متانول < ایزو پروپانول < استون بود. قابلیت بالای استونیتریل را می‌توان به قابلیت شستشو و پراکندگی بالای آن نسبت داد. با توجه به این نکته، استونیتریل برای استفاده در مطالعات زیر انتخاب شد.

در ادامه، حجم استونیتریل (به عنوان یک حلال دفع) که می‌تواند بر هر دو مرحله DSPE (حجم کم حلال قادر به واجذب کامل آنالیت‌ها نیست) و DLLME (حجم کم حلال نمی‌تواند حلال استخراج‌کننده را به طور موثری پخش کند) تأثیر بگذارد (Wu *et al.*, 2009)، جهت دستیابی به بالاترین راندمان استخراج بهینه شد. برای این منظور، حجم‌های مختلف استونیتریل (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۲۵ میلی‌لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج استفاده از ۰/۷۵ میلی‌لیتر استونیتریل، بالاترین راندمان استخراج را نشان داد. این نقطه تأیید می‌کند که در این حجم، دفع کامل آنالیت‌ها از سطح جاذب و پراکندگی مؤثر ماده استخراج‌کننده رخ می‌دهد. بنابراین ۰/۷۵ میلی‌لیتر استونیتریل جهت ادامه مطالعه به عنوان حلال شوینده/پخش‌کننده استفاده شد. از آنجاییکه زمان شستشو بر انتقال جرم آنالیت از جاذب به فاز مایع تأثیر می‌گذارد، یکی از پارامترهایی است که در بازیابی آنالیت‌ها باید بهینه شود (Naing *et al.*, 2016). برای مطالعه اثر زمان دفع بر راندمان استخراج آنالیت‌ها، آزمایش‌های متعددی با استفاده از ورتکس در مرحله دفع به مدت ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ دقیقه انجام شد. با توجه به نتایج، ۳ دقیقه برای دفع موثر آنالیت‌ها کافی بود.

در این مطالعه، پارامترهای تجزیه‌ای شامل حد تشخیص (limit of quantifications (LOD))، محدوده خطی (linear ranges (LR))، انحراف استاندارد نسبی (relative standard deviation (RSD)) و حد کمیت (limit of quantifications (LOQ)) ارزیابی و با استفاده از روش پیشنهادی در شرایط بهینه تعیین شدند. با توجه به داده‌ها (جدول ۱)، مقادیر LOD و LOQ به ترتیب از ۰/۲۱ تا ۰/۲۸ و از ۰/۷۰ تا ۰/۹۳ نانوگرم/گرم بود. در مقایسه با روش ارائه شده در این تحقیق، LOD و LOQ ها مقادیر کمتری را نشان دادند که این امر نشان دهنده کارایی بالای روش پیشنهادی برای آنالیز غلظت‌های پایین آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه است. همچنین مطابق نتایج، بازیابی استخراج در محدوده ۶۰ تا ۷۳ درصد بود. مقادیر RSD درون (n=6) و بین روز (n=4) برای آنالیت‌های مورد مطالعه در غلظت ۵ نانوگرم در گرم به ترتیب برابر یا کمتر از ۵/۱ و ۵/۶ درصد بود و در مقایسه با سایر روش‌ها، مقادیر قابل مقایسه‌ای را نشان دادند که نشان دهنده تکرارپذیری قابل قبول روش پیشنهادی است. خطی بودن روش ارائه شده به دست آمده از منحنی‌های کالیبراسیون همسان با ماتریس، برای LR های وسیع ($t_2 \geq 0/995$) عالی بود. این نتایج حاکی از قابلیت بالای روش پیشنهادی در اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در نمونه‌های تخم‌مرغ می‌باشد.

قدری ناچیز باشد که برداشتن آن مشکل باشد (Khafi *et al.*, 2023). با توجه به نتایج، بازده استخراج آنالیت‌ها تا ۶۰ میکرولیتر افزایش یافت و پس از آن ثابت ماند. بنابراین، ۶۰ میکرولیتر DEAC: DCA اسید دکانوئیک برای استفاده در ادامه روند تحقیق استفاده شد. برای این منظور، ابتدا نمونه تخم‌مرغ سفید حاوی آنالیت‌هایی با غلظت ۲۰۰ نانوگرم/گرم مشخص شد. پس از آن، نمونه در زمان‌های مختلف (۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه) در معرض یک لامپ UV (۱۳۰ وات) قرار گرفت. با توجه به نتایج در نمودار ۵، غلظت آنالیت تا ۹۰ دقیقه کاهش یافت و پس از آن ثابت ماند. لازم به ذکر است که در زمان نوردهی ۹۰ دقیقه، غلظت اکسی‌تتراسایکلین، داکسی‌سایکلین، کلروتتراسایکلین و تتراسایکلین به ترتیب ۳۵/۱، ۲۹/۸، ۳۱/۴ و ۲۷/۳ درصد کاهش یافت. همچنین مدت زمان قرارگرفتن نمونه در معرض امواج فرابنفش نیز در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. افزایش مدت زمان می‌تواند بر تخریب و تغییر شکل ترکیبات هدف موثر بوده و منجر به کاهش غلظت باقی‌مانده آنالیت‌ها شود. به جهت یافتن مدت زمان تابش بهینه، مدت زمان‌های ۳۰ تا ۱۲۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به نتایج تا مدت ۹۰ دقیقه در معرض قرار گیری نمونه‌ها، باقیمانده آنالیت‌ها در نمونه کاهش یافت و بعد از آنها تغییری در غلظت آنالیت‌ها مشاهده نشد.

-اعتبارسنجی روش

جدول ۴- مقایسه کارایی روش پیشنهادی با سایر روش‌ها

منبع	روش	محدوده خطی (نانوگرم بر گرم)	R2	حد اندازه‌گیری (نانوگرم بر گرم)	حد تشخیص (نانوگرم بر گرم)	انحراف استاندارد نسبی (درصد)	نمونه
(Gissawong <i>et al.</i> , 2019)	الف	۳-۱۰۰۰	۰/۹۹۸	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	۰/۹۹۶	۵/۱-۲۸/۴	۱/۵-۸/۵	۰/۸-۱/۷	شیر
(Du <i>et al.</i> , 2019)	ج	۲۰-۸۰۰	۰/۹۹۵	۵/۵-۱۳/۷	۲/۳-۴/۶	۱/۵-۴/۶	تخم‌مرغ
-	روش حاضر	۰/۵۴-۲۰۰۰	۰/۹۹۸	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 دکتور دیود آرایه‌ای
ب) میکرواستخراج مایع-مایع پخشی مبتنی بر حلال اتکتیک عمیق کوپل شده با کروماتوگرافی مایع مجهز به دکتور دیود آرایه‌ای
ج) استخراج جذبی همزن مغناطیسی کوپل شده با کروماتوگرافی مایع مجهز دکتور فلورسانس

سیاسگزاری

این مقاله مستخرج از پایان نامه دانشجویی می باشد لذا از راهنمایی‌های آزمایشگاهی توسط جناب آقای دکتر افشین جوادی و دکتر افشار مقدم و سرکار خانم دکتر زهره مشاک تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافع ندارند.

در کار پژوهشی حاضر، 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 به دست 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.

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(1): 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*, 24: 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(10): 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*, 117: 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*, 1: 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(10): 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(5): 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 soymilk 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(9): 1056-1072.
- Oka H., Ito, Y. and Matsumoto, H. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, 882(1-2): 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(2): 55-64. [In Persian]

- Ścigalski, P. and Kosobucki, P. (2020). Recent materials developed for dispersive solid phase extraction. *Molecule*, 25(21): 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(2): 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(7): 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(4): 278-289.
- Wang, K., Lin, K., Huang, X. and 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(24): 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(29): 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.