

بهینه سازی شرایط استخراج ملامین و تعیین میزان آن در تخم مرغ به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

مسعود حاجی سلیمانی^۱، شعله عطایی^۲، علی گنجلو^{۳*}

- ۱- کارشناسی ارشد شیمی تجزیه، مرکز خدمات تخصصی کنترل کیفی و کمی آب و مواد غذایی جهاد دانشگاهی واحد زنجان، ایران
 ۲- کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی علوم و صنایع غذایی، مرکز خدمات تخصصی کنترل کیفی و کمی آب و مواد غذایی جهاد دانشگاهی واحد زنجان، ایران
 ۳- استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران
 (تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۲/۰۷)

چکیده

وجود ملامین در مواد غذایی یکی از موضوعات حائز اهمیت در زمینه ایمنی مواد غذایی و سلامت مصرف کنندگان می باشد. استخراج اولین قدم در راستای تعیین میزان ملامین در مواد غذایی است. لذا در پژوهش حاضر شرایط استخراج ملامین از تخم مرغ با استفاده از روش شناسی سطح پاسخ بر اساس طرح مرکب مرکزی بهینه گردید. درصد آب در فاز استخراج کننده حاوی آب/استونیتریل، حجم فاز استخراج کننده، زمان استخراج، pH فاز استخراج کننده و غلظت هیدروکلریک اسید در فاز استخراج کننده به عنوان متغیرهای مورد مطالعه برای بهینه سازی استخراج ملامین در نظر گرفته شدند. در نهایت مقدار ملامین موجود در چهار نشان تجاری تخم مرغ با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) به روش افزایش استاندارد اندازه گیری شد. شرایط بهینه استخراج به صورت ۳۹/۲۸ درصد آب در فاز استخراج کننده، ۵/۰۶ میلی لیتر حجم حلال استخراج کننده، ۱۲/۴۸ دقیقه زمان استخراج، pH برابر ۵/۰۴ و غلظت اسید برابر ۰/۷۳ مولار به دست آمد. مقدار ملامین در نمونه های تخم مرغ مورد مطالعه در محدوده ۰/۱۹-۰/۴۵ میلی گرم بر کیلوگرم به دست آمد. با توجه به میزان مجاز ملامین که توسط اتحادیه اروپا و سازمان غذا و داروی آمریکا تعیین شده است می توان نتیجه گیری نمود که مقدار ملامین نمونه های مورد مطالعه در محدوده مجاز استاندارد اتحادیه اروپا قرار دارد و تنها در دو نمونه مقدار آن بیش از استاندارد آمریکا است.

کلید واژگان: بهینه سازی، استخراج، ملامین، تخم مرغ، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.

*مسئول مکاتبات: aganjloo@znu.ac.ir

۱- مقدمه

ملامین (۲، ۴، ۶ - تری آمینو-۱، ۳، ۵ - تیرازین) یک ترکیب نیتروژن دار جامد آلی با بلور سفید است (شکل ۱). این ماده غالباً در ترکیب با فرمالدهید به صورت رزین ملامین که یک ترکیب پلیمری است یافت می شود. این ماده بسیار مقاوم به گرما و دارای ساختاری با استحکام بالا است. ملامین در بدن سوخت و ساز نمی شود و با نیمه عمر نزدیک به سه ساعت از طریق ادرار دفع می شود [۱]. ملامین به سه طریق خوراکی، تماس پوستی و تنفسی، انسان یا حیوانها را آلوده می کند. خوردن ملامین ممکن است سبب بروز سنگ کلیه، نارسایی های کلیوی، انسداد مجاری ادرار و مشکلات دیگر برای سلامتی شود [۲].

ملامین در سال ۲۰۰۷ زمانی که دامپزشکان گزارش کردند غذای حیوانهای خانگی آلوده به ملامین سبب مرگ و میر صدها حیوان بوده است تبدیل به یکی از موضوعهای چالش-انگیز شد [۳].

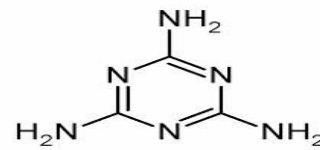


Fig 1 Melamine structure

هر چند که پیش ترسانچوو همکاران (۲۰۰۵) در مطالعه ای با هدف تعیین منبع ملامین و ترکیبهای آن به این نتیجه رسیدند که ملامین ممکن است در نتیجهی استفاده از آفتکشها با پایهی تیرازین نظیر سیرومازین که برای کنترل رشد حشرهها استفاده می شود در غذا و محیط زیست وجود داشته باشد و هم چنین بیان کردند که ملامین یک محصول تجزیه ای سیرومازین است [۴]. در مطالعه ای که به منظور بررسی وجود ملامین در کود توسط ال- سعید و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد آنها دریافتند که ممکن است مقداری از ملامین به دلیل اضافه کردن آن به کودهای مختلف در مواد غذایی وجود داشته باشد [۵]. براون و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه ای به بررسی غذای حیوانهای خانگی پرداختند. در این مطالعه مشخص شد که تعدادی از ترکیبهای تیرازین شامل ملامین و سیانوریک - اسید در این غذاها وجود دارد [۶]. در سال ۲۰۰۷، تولید جهانی ملامین ۱/۲ میلیون تن تخمین زده شد که در نوع خود رقم قابل توجهی است. نتیجهی این استفاده گسترده می تواند حضور ملامین در محیط زیست و زنجیره های غذایی باشد [۷].

در سال ۲۰۰۸، غلظت زیاد ملامین در شیرخشکهای چینی گزارش شد و سازمان بهداشت جهانی این رویداد آلودگی در چین را مورد بررسی قرار داد. نوزادانی که از شیرخشکهای آلوده به ملامین تغذیه می کنند نسبت به کودکان و افراد بزرگسال که مصرف کننده انواع غذاها هستند ملامین بیش تری را به ازای واحد وزن بدن دریافت می کنند [۸]. بیش از ۵۱۹۰۰ نوزاد و کودک خردسال در چین به سبب مشکلات ادراری، انسداد مجاری کلیوی و ابتلا به سنگ کلیه ناشی از مصرف شیرخشکهای آلوده به ملامین در بیمارستان بستری شدند. همچنین مرگ ۶ نوزاد در چین تایید شد [۹]. پس از آن، ملامین در شیر، ماست، دسرهای یخی، شیرخشک، غلات، شیرینی جات، کیک، بیسکویت، پودر پروتئین و برخی از مواد غذایی تهیه شده از شیر نیز یافت شد. همچنین مشخص شد که محصولات مختلف غیرلبنی چینی مانند آمونیوم بی-کربنات، خوراک دام، مواد تشکیل دهنده غذای حیوانها، تخم-مرغ و خامه های غیرلبنی نیز آلوده به ملامین هستند [۱۰]. دابسون و همکاران (۲۰۰۸) گلوتن گندم آلوده را که سبب بروز حادثه ای در سال ۲۰۰۷ بود، تجزیه و تحلیل کردند. داده های حاصل نشان داد که ترکیب تیرازین شامل موادی نظیر ملامین ۸/۴ درصد، سیانوریک اسید ۵/۳ درصد، آمیلید ۲/۳ درصد، آمیلین ۱/۳ درصد، اوره ملامین و متیل ملامین هر دو زیر ۱ درصد است [۱۱]. از آنجا که ملامین یک ترکیب سنتزی است اضافه کردن مستقیم آن به مواد غذایی و خوراکی مجاز نیست، اگرچه استفاده از آن در تهیه ظرفهایی که در تماس با مواد غذایی است ایرادی ندارد [۳]. به منظور حفظ سلامت عمومی و ایمنی مواد غذایی بسیاری از کشورها بیشینه حد مجاز باقیمانده (MRL¹) را برای ملامین در محصولات مختلف تعیین کرده اند. به عنوان مثال، اتحادیه اروپا بیشینه حد مجاز باقیمانده ملامین را در محصولات لبنی و غذاهای غنی از پروتئین ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم تعیین کرده است در حالی که سازمان غذا و داروی آمریکا این مقدار را در شیر و فرآورده های آن ۰/۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم در نظر گرفته و تاکید کرده است که شیرخشکهایی که به مصرف کنندگان آمریکایی فروخته می شوند باید به طور کامل عاری از ملامین و ترکیبهای آن باشد. در سال ۲۰۱۰، وزارت بهداشت چین استاندارد جدیدی را برای محصولات لبنی تدوین کرد و تاکید نمود که مواد غذایی نباید حاوی ملامین باشند. به عبارت

1. Maximum Residue Limit

دیگر هر نوع اقدامی در راستای اضافه کردن ملامین به محصولات لبنی خلاف قانون است، حتی اگر مقدار اضافه شده بسیار کم تر از MRL باشد [۱۲]. برای تشخیص و اندازه گیری ملامین در محصولات لبنی مختلف که احتمال آلودگی با ملامین در آنها وجود دارد از روش های مختلفی نظیر کروماتوگرافی گازی (GC)، کروماتوگرافی مایع (LC)، سنجش زیستی، کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (GC-MS) و کروماتوگرافی مایع- طیف سنجی جرمی (LC-MS) می توان استفاده کرد [۱۳]. این روش ها، فناوری های حساس مانند LC-MS تا روش های کم تر حساس مانند عیار سنجی مربوط به آنزیم (ELISA) را در بر می گیرد. روش های مختلف کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا توسط اهلینگ و همکاران (۲۰۰۷) برای اندازه گیری هم زمان ملامین، آمیلید، آمیلین و سیانوریک اسید در برنج، گندم و آرد ذرت به کار برده شد [۱۴]. ونکاتاسامی و سوا (۲۰۱۰) از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا برای اندازه گیری ملامین در شیر خشک استفاده کردند [۱۵]. آنها از تری فلئورو استیک اسید ۰/۱ درصد و متانول (۹۰:۱۰) به عنوان فاز متحرک استفاده کردند. پیشرفت های اخیر در زمینه روش های تجزیه ای اندازه گیری ملامین در پودر شیر، شیر خشک و غذای

حیوان های خانگی توسط سان و همکاران (۲۰۱۰) مرور شده است [۱۶]. آنها در مورد مزایا، مضرات و کاربردهای روش های کروماتوگرافی و غیر کروماتوگرافی بحث کردند. تیان و همکاران (۲۰۱۲) نیز روش های مختلف اندازه گیری ملامین را مجددا بررسی کردند [۱۷]. در این مطالعه، روش های کروماتوگرافی از جمله HPLC-UV و روش های غیر کروماتوگرافی مانند ELISA مقایسه شد. برخی از روش های مورد تایید برای اندازه گیری ملامین در جدول ۱ به طور خلاصه آورده شده است. آلودگی، اثرات بافت و بی ثباتی ماده مورد تجزیه برخی از مشکلات موجود در مسیر اندازه گیری ملامین می باشند [۱۸]. لذا تعیین شرایط بهینه استخراج ملامین از ماده هدف می تواند بر اندازه گیری میزان دقیق ملامین موثر باشد. با توجه به بررسی منابع انجام شده تاکنون مطالعه ای در زمینه جداسازی و اندازه گیری ملامین در تخم مرغ انجام نشده است. از طرفی با توجه به گرانتیتم بودن روش های استخراج نظیر استخراج با فاز جامد و یا ریز استخراج با فاز جامد بر آن شدیم تا در پژوهش حاضر ضمن بهینه سازی شرایط استخراج ملامین به روش مایع-مایع، مقدار ملامین موجود در چهار نشان تجاری تخم مرغ عرضه شده در شهر زنجان به عنوان یک محصول پروتئینی پر مصرف ارزیابی گردد.

Table 1 Summary of methods relevant to determination of melamine.

Method	Sample	Recovery (%)	LOQ (µg/kg)	LOD (µg/kg)	Reference
HPLC	Dairy products	82-122	105-340	35-110	(۱۹)
HPLC	Infant formula	97-101	200	100	(۱۵)
HPLC	Milk, Milk powder	81-84	1000	200	(۲۰)
HPLC	Milk	84-91	20	-	(۲۱)
HPLC	Milk	85-99	60	18	(۲۲)
HPLC-MS/MS	Infant formula	75-125	25	-	(۲۳)
HPLC-MS/MS	Milk, Infant formula	101-119	50	-	(۳)
HPLC-MS/MS	Milk, Infant formula, Yogurt	92-105	4	-	(۱۸)
GC-MS	Milk	65-106	1	0.3	(۲۴)
GC-MS/MS	Dairy products	81-92	5	2	(۲۵)
Electromembrane -LPME-HPLC	Dairy products	85-95	0.19	0.05	(۲۶)
HPLC-UV	Soil	95	5	-	(۲۷)
Magneticmolecularly imprinted polymer	Milk	96-98	-	-	(۲۸)
HPLC	Infant formula	93-97	10	-	(۲۹)

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد و دستگاه ها

گرفت. آب فوق خالص با دستگاه آب‌ساز (Millipore USA) تهیه شد.

۲-۲- آماده سازی استانداردهای ملامین

برای آماده سازی ۲۰۰ میلی لیتر محلول مادر استاندارد ملامین با غلظت نهایی ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر مقدار مشخصی از ملامین در حلال استونیتریل/آب حل گردید و در دمای ۴ درجه سلسیوس و محیط تاریک نگهداری شد. به منظور رسم منحنی استاندارد ملامین از غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۱، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر لیتر ملامین استفاده شد (شکل ۲). معادله خط با ضریب همبستگی بالا ($R^2=0.9998$) به دست آمد.

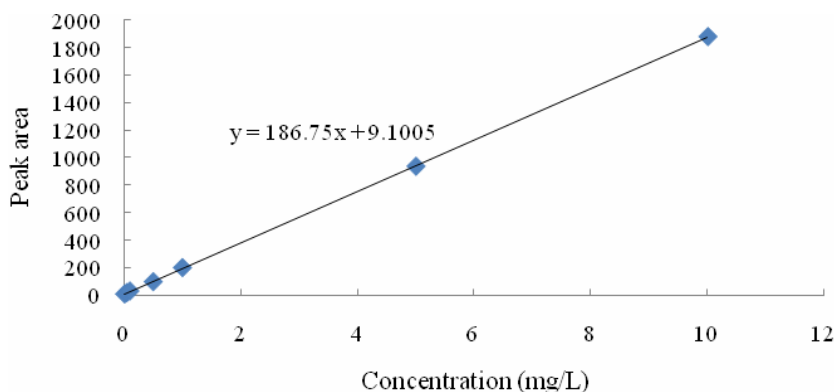


Fig 2 Standard calibration curve for melamine.

مدت ۱۵ دقیقه) منتقل شد و در ادامه محلول رویی توسط فیلتر سر سرنگی با منفذهای ۰/۴۵ میکرومتر صاف گردید. در نهایت محلول حاصل به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق شد.

۲-۴- شرایط تجزیه‌ای در دستگاه

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

به منظور اندازه گیری ملامین در فرآورده پروتئینی تخم مرغ، از سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد استفاده گردید. فاز متحرک شامل مخلوط استونیتریل و آب با نسبت ۹۵:۵ درصد حجمی بود. ۲۰ میکرولیتر نمونه تزریق شده توسط شیر کنترل (Rheodyne injector 3725i) به منظور جداسازی به داخل ستون تجزیه ای C18 با ابعاد $150 \times 4/6$ میلی متر با دمای ۳۰ درجه سلسیوس هدایت شد. پس از جداسازی نمونه در داخل ستون توسط آشکارساز مرئی - ماورا بنفش (Agilent 1200 series VWD) در طول موج ۲۳۰

نمونه‌های تخم مرغ به منظور بررسی وجود ملامین از چهار نشان تجاری معتبر و از فروشگاه‌های سطح شهر زنجان تهیه و پس از ورود به آزمایشگاه در یخچال (۴ درجه سلسیوس) نگهداری شدند. استونیتریل و استاندارد ملامین با خلوص بیش از ۹۹ درصد به ترتیب از شرکت‌های مرک آلمان و سیگما آلد ریچ آمریکا خریداری شدند. فیلترهای سر سرنگی یک بار مصرف با منفذهایی با قطر ۰/۴۵ میکرومتر (Teknokroma, Spain) برای خالص سازی نمونه‌ها استفاده شد. حمام فراصوت (Elmasonic S60 H, Germany)، دستگاه سانتریفیوژ (Sigma 3-30K, Germany) برای آماده سازی نمونه‌ها و دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (1200Agilent) برای اندازه گیری ملامین مورد استفاده قرار

۲-۳- آماده سازی نمونه‌ها

اندازه گیری ملامین در نمونه‌های غذایی به دلیل فراوانی کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌ها با سختی همراه است. بنابراین استخراج و جداسازی ملامین و ترکیب‌های مشابه آن پیش از اندازه گیری لازم و ضروری است. هدف اصلی از آماده سازی نمونه‌ها رسیدن به پایین ترین حد تشخیص با از بین بردن اثر بافت زمینه است که ممکن است روی شناسایی یا غنی سازی آنالیت‌ها اثر بگذارد. بدین منظور زرده و سفیده تخم مرغ با هم مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. میزان $1 \pm 0/001$ گرم از مخلوط حاصل توزین و در لوله پلاستیکی ریخته شد. سپس به آن مقادیر مشخصی از مخلوط آب/استونیتریل با نسبت‌های مختلف اضافه گردید (جدول ۲). پس از تنظیم pH مخلوط در محدوده مشخص، مخلوط در مدت زمان معین در حمام فراصوت قرار گرفت (جدول ۲). سپس نمونه به دستگاه سانتریفیوژ (۲۵۰۰۰ دور به

مابع با کارایی بالا تزریق گردید (شکل ۳). با استفاده از مساحت زیر منحنی به دست آمده برای هر یک از نمونه‌ها و انجام محاسبات مربوطه غلظت ملامین در نمونه‌های مورد مطالعه به دست آمد.

نانومتر شناسایی شد. برای اندازه گیری غلظت ملامین از روش افزایش استاندارد استفاده شد. بدین صورت که نمونه اول بدون افزودن استاندارد به دستگاه تزریق شد. به نمونه‌های بعدی به ترتیب ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرولیتر از استاندارد ۲۵ میلی گرم بر لیتر تهیه شده از محلول مادر، اضافه شد و به دستگاه کروماتوگرافی

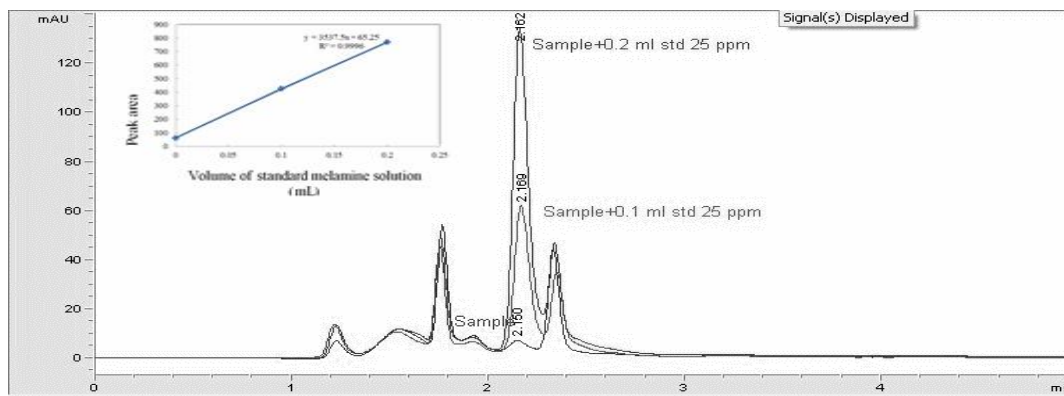


Fig 3 Chromatogram and standard addition curve of melamine.

۲-۵- طرح آزمایشات و تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش به منظور بهینه سازی فرایند استخراج ملامین از تخم مرغ پنج متغیر مستقل شامل درصد آب مورد استفاده در فاز استخراج کننده حاوی آب/استونیتریل، حجم فاز استخراج کننده، زمان استخراج، pH فاز استخراج کننده و غلظت هیدروکلریک اسید در فاز استخراج کننده با استفاده از روش شناسی سطح پاسخ آبراسطرح مرکب مرکزی^۳ مورد مطالعه قرار گرفت. سطوح بالا (+۱)، میانی (صفر) و پایینی (-۱) متغیرهای مستقل در جدول ۲ ارائه شده است. لازم به ذکر است که سطوح بالا و پایین متغیرهای مستقل بر اساس مطالعات اولیه انتخاب گردید. در جدول ۳ تیمارهای مورد مطالعه شامل ۵۰ تیمار با ۸ تکرار در نقطه میانی به صورت کاملا تصادفی آورده شده است. در روش شناسی سطح پاسخ برای هر پاسخ یک مدل تعریف می شود که مقدار پاسخ را می توان با استفاده از مدل چند جمله ای درجه دوم (رابطه ۱) به صورت درجه دوم کامل یا درجه دوم کاسته به دست آورد.

رابطه ۱
$$Y = \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_i^2 + \sum b_{ij} x_i x_j$$

در این رابطه b_0, b_i, b_{ii}, b_{ij} ضرایب رگرسیونی برای به ترتیب عرض از مبدا، اثرات خطی، درجه دوم و برهم کنش و x_i و x_j فراسنجه‌های مستقل هستند. برای ارزیابی کفایت مدل از آزمون ضعیف برازش، مقادیر ضریب همبستگی (R^2) و ضریب همبستگی اصلاح شده ($ADJ-R^2$) مدل استفاده شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، رسم نمودارهای سه بعدی و بهینه سازی فرایند از نرم افزار Design Expert 7.0.3 (Minneapolis, USA) استفاده شد. کلیه آزمایش‌ها با حداقل ۲ تکرار انجام شد و در نهایت سطح زیر پیک ملامین به عنوان پاسخ گزارش شد. از تکنیک بهینه سازی عددی برای تعیین شرایط بهینه با هدف به حداکثر رساندن غلظت ملامین استخراج شده از تخم مرغ استفاده شد. در نهایت به منظور تایید کارایی مدل، نتایج تجربی به دست آمده تحت شرایط بهینه با نتایج پیشگویی شده توسط مدل مقایسه گردید.

در این پژوهش به منظور بهینه سازی فرایند استخراج ملامین از تخم مرغ پنج متغیر مستقل شامل درصد آب مورد استفاده در فاز استخراج کننده حاوی آب/استونیتریل، حجم فاز استخراج کننده، زمان استخراج، pH فاز استخراج کننده و غلظت هیدروکلریک اسید در فاز استخراج کننده با استفاده از روش شناسی سطح پاسخ آبراسطرح مرکب مرکزی^۳ مورد مطالعه قرار گرفت. سطوح بالا (+۱)، میانی (صفر) و پایینی (-۱) متغیرهای مستقل در جدول ۲ ارائه شده است. لازم به ذکر است که سطوح بالا و پایین متغیرهای مستقل بر اساس مطالعات اولیه انتخاب گردید. در جدول ۳ تیمارهای مورد مطالعه شامل ۵۰ تیمار با ۸ تکرار در نقطه میانی به صورت کاملا تصادفی آورده شده است. در روش شناسی سطح پاسخ برای هر پاسخ یک مدل تعریف می شود که مقدار پاسخ را می توان با استفاده از مدل چند جمله ای درجه دوم (رابطه ۱) به صورت درجه دوم کامل یا درجه دوم کاسته به دست آورد.

2. Response surface methodology
3. Central composite design

Table 2 Levels of independent variables and related codes

Independent variables	Symbol	Codes and related levels		
		-1	0	+1
Water in extraction phase (%)	A	37.5	50.00	62.50
Volume of extraction phase (mL)	B	5.00	7.50	10.00
Extraction time (min)	C	7.50	10.00	12.50
pH of extraction phase	D	5.00	7.00	9.00
HCl concentration in extraction phase (M)	E	0.25	0.50	0.75

Table 3 Central composite design matrix and results of response variable.

Run	Independent variables					Peak area
	A (%)	B (mL)	C (min)	D	E (M)	
1	37.50	5.00	7.50	5.00	0.25	49.10
2	62.50	5.00	7.50	5.00	0.25	70.00
3	37.50	10.00	7.50	5.00	0.25	50.00
4	62.50	10.00	7.50	5.00	0.25	56.30
5	37.50	5.00	12.50	5.00	0.25	90.30
6	62.50	5.00	12.50	5.00	0.25	90.00
7	37.50	10.00	12.50	5.00	0.25	74.90
8	62.50	10.00	12.50	5.00	0.25	68.00
9	37.50	5.00	7.50	9.00	0.25	37.80
10	62.50	5.00	7.50	9.00	0.25	38.90
11	37.50	10.00	7.50	9.00	0.25	34.80
12	62.50	10.00	7.50	9.00	0.25	36.50
13	37.50	5.00	12.50	9.00	0.25	53.30
14	62.50	5.00	12.50	9.00	0.25	65.90
15	37.50	10.00	12.50	9.00	0.25	31.15
16	62.50	10.00	12.50	9.00	0.25	39.46
17	37.50	5.00	7.50	5.00	0.75	72.90
18	62.50	5.00	7.50	5.00	0.75	85.92
19	37.50	10.00	7.50	5.00	0.75	92.70
20	62.50	10.00	7.50	5.00	0.75	85.90
21	37.50	5.00	12.50	5.00	0.75	105.00
22	62.50	5.00	12.50	5.00	0.75	107.90
23	37.50	10.00	12.50	5.00	0.75	107.00
24	62.50	10.00	12.50	5.00	0.75	80.00
25	37.50	5.00	7.50	9.00	0.75	50.00
26	62.50	5.00	7.50	9.00	0.75	31.93
27	37.50	10.00	7.50	9.00	0.75	40.00
28	62.50	10.00	7.50	9.00	0.75	32.22
29	37.50	5.00	12.50	9.00	0.75	67.70
30	62.50	5.00	12.50	9.00	0.75	65.00
31	37.50	10.00	12.50	9.00	0.75	60.00
32	62.50	10.00	12.50	9.00	0.75	43.10
33	25.00	7.50	10.00	7.00	0.50	59.00
34	75.00	7.50	10.00	7.00	0.50	23.00
35	50.00	2.50	10.00	7.00	0.50	84.60
36	50.00	12.50	10.00	7.00	0.50	52.70
37	50.00	7.50	5.00	7.00	0.50	17.50
38	50.00	7.50	15.00	7.00	0.50	56.40
39	50.00	7.50	10.00	3.00	0.50	95.00
40	50.00	7.50	10.00	11.00	0.50	23.39
41	50.00	7.50	10.00	7.00	0.02	62.00
42	50.00	7.50	10.00	7.00	0.99	82.00
43 (C)	50.00	7.50	10.00	7.00	0.50	37.10
44 (C)	50.00	7.50	10.00	7.00	0.50	39.40
45 (C)	50.00	7.50	10.00	7.00	0.50	38.10
46 (C)	50.00	7.50	10.00	7.00	0.51	36.50
47 (C)	50.00	7.50	10.00	7.00	0.51	39.40
48 (C)	50.00	7.50	10.00	7.00	0.51	37.40
49 (C)	50.00	7.50	10.00	7.00	0.51	39.00
50 (C)	50.00	7.50	10.00	7.00	0.51	38.60

C: Centre point; A: Water in extraction phase (%); B: Volume of extraction phase (mL); C: Extraction time (min); D: pH of extraction phase and E: HCl concentration in extraction phase (M).

بر اساس مقادیر کد شده به صورت زیر به دست آمد:

رابطه ۲:

$$Y = +38.99 - 2.29 A - 5.34 B + 9.04 C - 17.53 D + 7.02 E - 3.35 AE - 4.17 BC - 4.27 DE + 8.22 B^2 + 5.86 D^2 + 9.06 E^2$$

در این رابطه Y: سطح زیر پیک ملامین، A: درصد آب مورد استفاده در فاز استخراج کننده، B: حجم فاز استخراج کننده، C: زمان استخراج، D: pH فاز استخراج کننده و E: غلظت هیدروکلریک اسید در فاز استخراج کننده می‌باشد.

با توجه به رابطه بالا و با توجه به علامت و ضرایب به دست آمده برای هر متغیر می‌توان نتیجه گرفت که pH فاز استخراج کننده و زمان استخراج به ترتیب بیشترین اثر منفی و مثبت را بر میزان پاسخ مورد مطالعه دارند. به علاوه نمودار پرتurbation متغیرهای مستقل مورد مطالعه بر فرایند استخراج ملامین از تخم مرغ برای بررسی حساسیت پاسخ به متغیرهای مورد مطالعه نیز رسم گردید (شکل ۴). وجود انحنای نمودار نشان‌دهنده حساسیت پاسخ به آن متغیر مستقل است در حالی که وجود خط صاف حاکی از عدم حساسیت پاسخ به متغیر مستقل مورد مطالعه می‌باشد [۳۰]. بر اساس شکل متغیر مستقل pH بیشترین تاثیر را بر میزان استخراج ملامین از تخم مرغ دارد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی تاثیر متغیرهای مستقل بر

استخراج ملامین از فراورده پروتئینی تخم مرغ

نتایج تجزیه و تحلیل واریانس برای میزان ملامین استخراج شده از تخم مرغ پس از انجام ۵۰ آزمایش طراحی شده در جدول ۴ ارائه شده است. با توجه به اینکه تمامی اثرات درجه دوم و برهمکنش متغیرهای مورد مطالعه تاثیر معنی‌داری ($p > 0.05$) بر پاسخ نداشتند آنها از معادله درجه دوم کامل حذف و مدل به صورت کاسته شده مجدداً بر داده‌های تجربی برازش گردید. بر اساس جدول ۴ مدل درجه دوم کاسته شده از نظر آماری معنی‌دار ($p > 0.05$) بود. آزمون ضعف برازش از لحاظ آماری نیز معنی‌دار ($p > 0.05$) بود که به دلیل بازه گسترده متغیرهای مورد مطالعه می‌باشد. ضرایب همبستگی (R^2) و همبستگی اصلاح شده ($ADJ-R^2$) برای مدل درجه دوم کاسته شده به ترتیب معادل ۰/۹۳ و ۰/۹۱ به دست آمد که بیانگر تطابق نسبتاً مناسب مدل برازش شده با داده‌های تجربی و دقت نسبتاً مطلوب مدل در پیش بینی پاسخ می‌باشد. مدل درجه دوم کاسته شده برای پیش بینی میزان استخراج ملامین

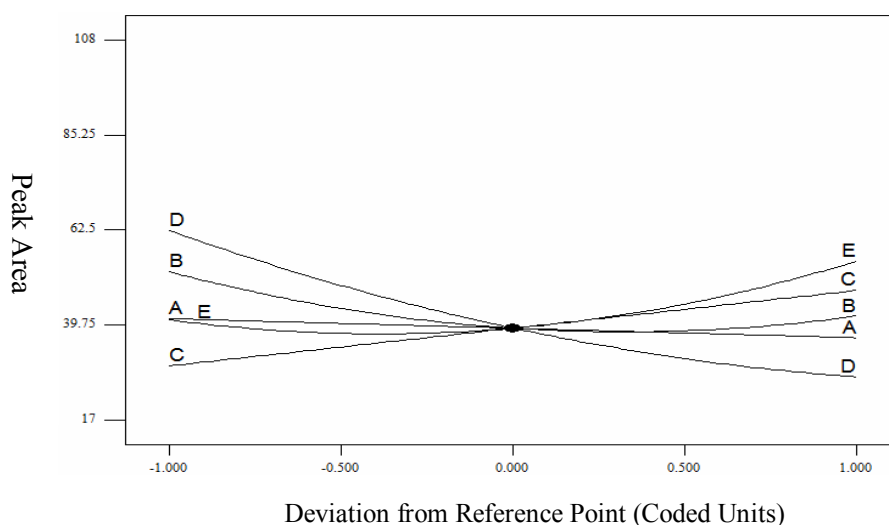


Fig 4 Perturbation plot showing the effect of process variables (A) Water in extraction phase (%), (B) Volume of extraction phase (mL), (C) Extraction time (min), (D) pH of extraction phase and (E) HCl concentration in extraction phase (M) on peak area (mV min).

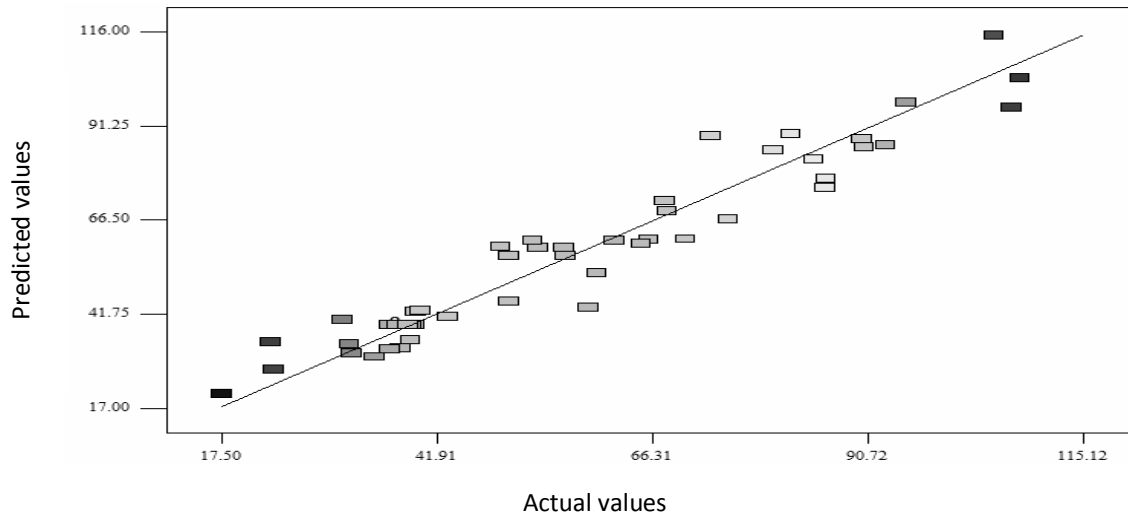


Fig 5 Plot of predicted crude extract yield related with experimental values.

Table 4 Analysis of variance (ANOVA) and coefficients of the final reduced regression equation.

<i>p</i> -value	F-value	Mean Square	df	Sum of Squares	Source
<0.0001	46.19	2388.14	11	26269.50	Model
0.050	4.06	209.86	1	209.86	A
<0.0001	22.02	1138.70	1	1138.70	B
<0.0001	63.20	3267.78	1	3267.78	C
<0.0001	237.87	12298.35	1	12298.35	D
<0.0001	38.14	1972.06	1	1972.06	E
0.012	6.93	358.05	1	358.05	AE
0.002	10.75	555.78	1	555.78	BC
0.001	11.27	582.94	1	582.94	DE
<0.0001	41.83	2162.58	1	2162.58	B ²
<0.0001	21.23	1097.74	1	1097.74	D ²
<0.0001	50.78	2625.66	1	2625.66	E ²
		51.70	38	1964.69	Residual
<0.0001	52.41	63.11	31	1956.26	Lack of fit
		1.20	7	8.43	Pure error
		0.9103	ADJ-R ²	0.9304	R ²

به علاوه، با افزایش حجم حلال استخراج کننده تا ۷/۵ میلی-لیتر، مقدار ملامین موجود در فاز استخراج کننده کاهش یافت که این کاهش به سبب رقیق شدن غلظت ملامین در حلال استخراج کننده می‌باشد. به عبارت دیگر چون تعداد مول‌های ملامین در طی فرایند استخراج مقدار معینی است با بالا رفتن حجم حلال میزان غلظت ملامین کاهش یافته که باعث کاهش مقدار پاسخ می‌گردد. با افزایش بیشتر حجم حلال استخراج کننده تا ۱۰ میلی‌لیتر تغییر چشمگیری در میزان پاسخ مورد مطالعه مشاهده نگردید.

در شکل ۷ برهمکنش میان درصد آب در فاز استخراج کننده و غلظت هیدروکلریک اسید در فاز استخراج کننده به تصویر

با استفاده از روش شناسی سطح پاسخ علاوه بر امکان پیشگویی مقدار بهینه متغیرهای مستقل و بررسی جداگانه اثر هر یک آنها بر پاسخ مورد مطالعه، می‌توان برهمکنش‌های موجود میان متغیرهای مستقل را به صورت نمودارهای سه بعدی نشان داد. برهمکنش بین حجم فاز استخراج کننده و زمان استخراج در شکل ۶ نشان داده شده است. بر اساس این شکل با افزایش زمان مجاورت فراورده پروتئینی و فاز استخراج کننده میزان پاسخ مورد مطالعه افزایش می‌یابد که دلیل این امر تکمیل بیشتر عمل استخراج با افزایش زمان می‌باشد. این روند افزایشی گویای سینتیکی بودن فرایند استخراج ملامین از فراورده پروتئینی می‌باشد.

pH فاز آبی می‌توان این نکته را بیان نمود که به دلیل وجود هیدروژن اسیدی در ساختار ملامین با افزایش میزان pH و کاهش غلظت یون هیدروژن میزان ورود ملامین به درون حلال استخراج کننده کاهش یافته که دلیل این امر به برهم‌کنش یون-های OH با H اسیدی ملامین می‌باشد که مانع از برهم‌کنش-های استخراجی می‌شود (شکل ۸). در مقابل با کاهش pH میزان قطبیت ملامین افزایش یافته و تبدیل به ترکیبی آب-دوست می‌شود که در نتیجه مقدار پاسخ افزایش می‌یابد.

کشیده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌گردد با افزایش درصد فاز آبی در حلال استخراج کننده حاوی استونتریل و آب به دلیل افزایش در قطبیت حلال استخراج کننده میزان استخراج ملامین از فراورده پروتئینی کاهش می‌یابد که این امر به قطبیت کم ملامین اشاره دارد. از طرفی با افزایش غلظت اسید که به معنای افزایش غلظت یون‌های کلرید می‌باشد میزان پاسخ مورد مطالعه افزایش می‌یابد. همان‌طور که در شکل ۸ ملاحظه می‌شود با افزایش pH مقدار استخراج ملامین کاهش یافت. در مورد روند تغییرات میزان استخراج با تغییر

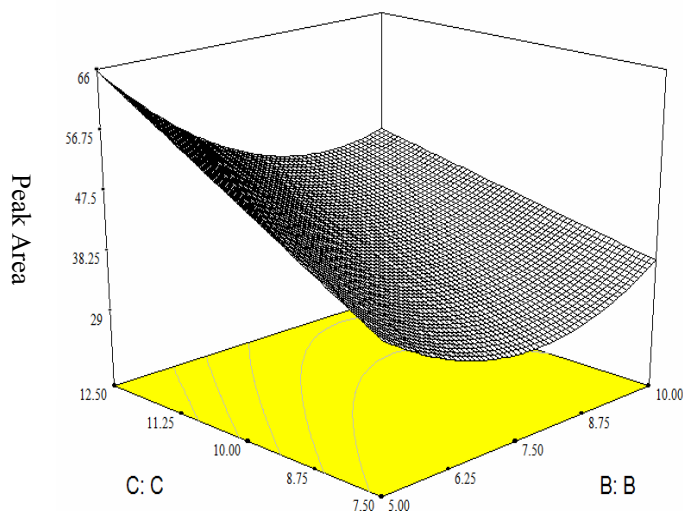


Fig 6 Response surface plot for peak area (mV min) as a function of (B) volume of extraction phase (mL), (C) extraction time (min).

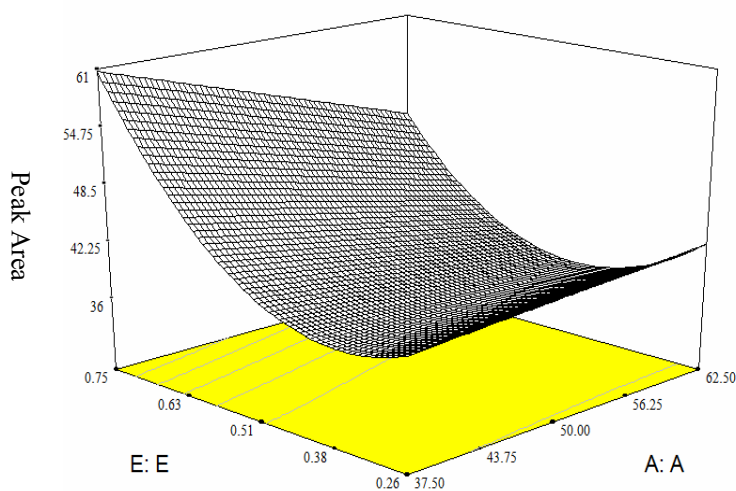


Fig 7 Response surface plot for peak area (mV min) as a function of (A) water in extraction phase (%) and (E) HCl concentration in extraction phase (M).

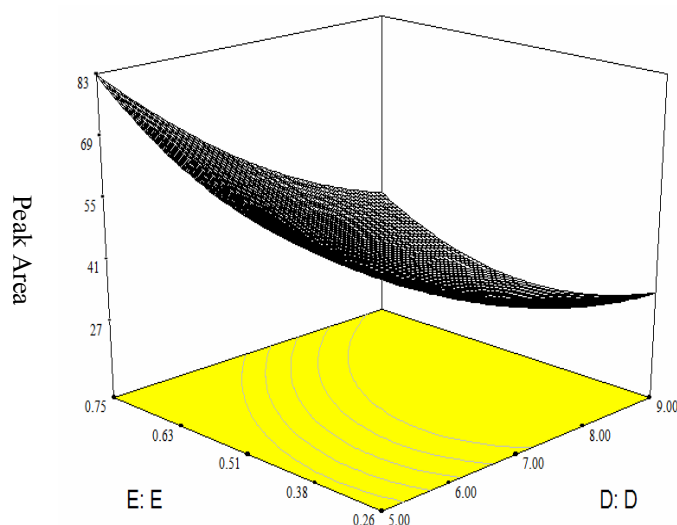


Fig 8 Response surface plot for peak area (mV min) as a function of (D) pH of extraction phase and (E) HCl concentration in extraction phase (M).

ملامین از فراورده پروتئینی تخم مرغ در جدول ۵ آورده شده است. به منظور بررسی صحت شرایط بهینه، فرایند استخراج ملامین بر اساس تیمار پیشنهادی در سه تکرار انجام شد و نتایج حاصل با نتیجه پیشگویی شده توسط مدل مقایسه گردید. عدم وجود اختلاف چشمگیر ($p > 0.05$) بین مقادیر به دست آمده کارآیی مدل را اثبات می‌کند.

Table 5 Optimum extraction conditions of melamine from egg.

A (%)	B (mL)	C (min)	D	E (M)	Melamine concentration (mg/Kg)	
					Experimental	Predicted
39.28	5.06	12.48	5.04	0.73	0.461	0.483

ملامینبا استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و به روش افزایش استاندارد اندازه گیری گردید. مقادیر ملامین اندازه گیری شده در جدول ۷ نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌گردد مقدار ملامین در تمام نمونه‌های مورد مطالعه کمتر از میزان مجاز ملامین اعلام شده توسط استاندارد اتحادیه اروپا (۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) است و تنها در دو نمونه مقدار ملامین بیش‌تر از استاندارد آمریکا (۰/۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) می‌باشد.

Table 6 Linear relationships between peak areas, concentrations and LOD and LOQ of melamine.

R ²	LOD (ppm)	LOQ (ppm)	Linear equation	Source
0.9998	0.0696	0.2322	Y=186.75+9.1005	Standard solution
0.9996	0.1157	0.3858	Y=3537.50+65.25	Egg sample

۲-۳- بهینه سازی شرایط استخراج ملامین از

تخم مرغ

به منظور بهینه سازی شرایط استخراج ملامین با هدف به حداکثر رساندن میزان ملامین استخراج شده از تخم مرغ از تکنیک بهینه سازی عددی استفاده شد. شرایط بهینه استخراج

۳-۳- تعیین میزان ملامین در تخم مرغ به روش

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

به منظور اعتبار سنجی روش استخراج پارامترهای اعتبار سنجی شامل گستره خطی، حد تشخیص (LOD)، حد اندازه گیری (LOQ) برای نمونه مورد مطالعه و محلول استاندارد ملامین به دست آمد که داده‌های حاصل در جدول ۶ آورده است. در نهایت نمونه‌های حقیقی از چهار نشان تجاری مختلف به صورت تصادفی از سطح شهر زنجان تهیه گردید. پس از استخراج ملامین از نمونه‌های حقیقی تحت شرایط بهینه، مقدار

Table 7 Melamine concentrations (mg/Kg) of different egg brands.

Standard deviation	Mean	3 th determination	2 nd determination	1 th determination	Commercial trademark
0.0043	0.452	0.457	0.450	0.449	A
0.0036	0.405	0.401	0.410	0.405	B
0.0033	0.194	0.199	0.191	0.193	C
0.0017	0.192	0.194	0.190	0.193	D

مربوطه صورت گیرد و همچنین تعیین مقدار ملامین در مواد غذایی در پارامترهای مورد آزمون در مراجع استاندارد قرار گیرد تا کنترل دقیقی بر روی سطح ملامین مواد غذایی عرضه شده در سطح کشور صورت گیرد.

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش با توجه به اهمیت بررسی وجود ملامین در مواد غذایی فرایند استخراج مایع-مایع ملامین از فرآورده پروتئینی تخم مرغ با در نظر گرفتن متغیرهای مستقل از جمله درصد آب مورد استفاده در فاز استخراج کننده حاوی آب/استونیتریل، حجم فاز استخراج کننده، زمان استخراج، pH، فاز استخراج کننده و غلظت هیدروکلریک اسید در فاز استخراج کننده با استفاده از روش شناسی سطح پاسخ بر اساس طرح مرکب مرکزیمورد مطالعه قرار گرفت و بهینه سازی گردید. بر اساس نتایج به دست آمده تمامی متغیرهای مستقل تاثیرات خطی معنی داری بر استخراج ملامین از تخم مرغ داشتند. با استفاده از تکنیک عددی شرایط بهینه استخراج به صورت ۳۹/۲۸ درصد آب در فاز استخراج کننده، ۵/۰۶ میلی لیتر حجم حلال استخراج کننده، ۱۲/۴۸ دقیقه زمان استخراج، pH برابر ۵/۰۴ و غلظت اسید برابر ۰/۷۳ مولار به دست آمد. مقدار ملامین در نمونه های تخم مرغ مورد مطالعه در محدوده ۰/۱۹-۰/۴۵ میلی گرم بر کیلوگرم به دست آمد. مقایسه نتایج به دست آمده بیانگر آنست که مقدار ملامین در تمام نمونه های مورد مطالعه کمتر از میزان مجاز ملامین اعلام شده توسط استاندارد اتحادیه اروپا است و تنها در دو نمونه مقدار ملامین بیش تر از استاندارد آمریکا بود. به علاوه نتایج اعتبار سنجی روش گویای حساسیت مطلوب روش اندازه گیری توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا می باشد به طوری که میزان LOD و LOQ در نمونه تخم مرغ قابل قبول است. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش می توان با جمع بندی شرایط بهینه استخراج و روش اندازه گیری به بررسی صحیح میزان ملامین در تخم مرغ و سایر فرآورده های مشابه پرداخت. در نهایت پیشنهاد می گردد با توجه به اهمیت تخم مرغ به عنوان یک محصول پرمصرف در سبد غذایی مردم به منظور جلوگیری از آلودگی تخم مرغ با ملامین کنترل دقیقی بر روی خوراکی طيور از سوی ارگان های

۵- منابع

- [1] OECD. 1998. Screening Information Data Set for Melamine, CAS No. #108-78-1 read at <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECDSDS/108781.pdf>, 17 Sept 2008.
- [2] Chen, Z., Yan, X. 2009. Simultaneous determination of melamine and 5-hydroxymethylfurfural in milk by capillary electrophoresis with diode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8742-8747.
- [3] Tyan, Y.C., Yang, M.H., Jong, S.B., Wang, C.K., Shiea, J. 2009. Melamine contamination. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 729-735.
- [4] Sancho, J.V., Ibanez, M., Grimalt, S., Pozo, O.J., Hernandez, F. 2005. Residue determination of cyromazine and its metabolite melamine in chard samples by ion-pair liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 530, 237-243.
- [5] El-Sayed, W.S., El-Baz, A.F., Othman, A.M. 2006. Biodegradation of melamine formaldehyde by *Micrococcus* sp. strain MF-1 isolated from aminoplastic wastewater effluent. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 57, 75-81.
- [6] Brown, C.A., Jeong, K.S., Poppenga, R.H., Puschner, B., Miller, D.M., Ellis, A.E. 2007. Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19, 525-531.
- [7] Bizzari, S., Yokose, K. 2008. Melamine. In: *Chemical economics handbook*. Menlo Park, CA, SRI

- methods for detection of melamine in compost and soil. *Science of the Total Environment*, 417-418, 255-262.
- [18] Tittlemier, S.A., Lau, B.P.Y., Menard, C., Corrigan, C., Sparling, M., Gaertner, D. 2009. Melamine in infant formula sold in Canada: Occurrence and risk assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5340-5344.
- [19] Zheng, X.L., Sheng, B.Y., Xian, K.L., Dai, Y.N. 2012. Determination of melamine in dairy products by HPLC-UV with NH₂ column. *Food Control*, 23, 245-250.
- [20] HealthCanada. 2008. The Government of Canada responds to reports of melamine in food products. Ottawa, Ontario, Health Canada, 3 October 2008 (<http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/chem-chim/melamine-eng.php>).
- [21] Wei, F., Lam, R., Cheng, S., Lu, S., Ho, D., Li, N. 2010. Rapid detection of melamine in whole milk mediated by unmodified gold nanoparticles. *Applied Physics Letters*, 96(13), 133702.
- [22] Sun, H.W., Wang, L.X., Ai, L.F., Liang, S.X. 2010. A sensitive and validated method for determination of melamine residue in liquid milk by reversed phase high performance liquid chromatography with solid-phase extraction. *Food Control*, 21(5), 686-691.
- [23] Smoker, M., Krynitsky, A.J. 2008. Interim method for determination of melamine and cyanuric acid residues in foods using LC-MS/MS: Version 1.0. U.S. Food and Drug Administration (FDA), Available from <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/DrugChemicalResiduesMethodology/ucm071673.htm>.
- [24] Li, J., Qia, H.Y., Shi, Y.P. 2009. Determination of melamine residues in milk products by zirconia hollow fiber sorptive micro extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 5467-5471.
- [25] Miao, H., Fan, S., Wu, Y.N., Zhang, L., Zhou, P.P., Li, J.G. 2009. Simultaneous determination of melamine, ammeline, and cyanuric acid in milk and milk products by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomedical Environmental Sciences*, 22(2), 87-94.
- [26] Fashi, A., Yaftian, M. R., Zamani, A. A. 2015. Determination of melamine in dairy Consulting Inc. (<http://www.sriconsulting.com/CEH/Public/Reports/673.3000/>).
- [8] Baldree, L.A., Stapleton, F.B. 1990. Uric acid metabolism in children. *Pediatric Clinics of North America*, 37, 391-418.
- [9] Xu, X.M., Ren, Y.P., Zhu, Y., Cai, Z.X., Han, J.I., Huang, B.F. 2009. Direct determination of melamine in dairy products by gas chromatography/mass spectrometry with coupled column separation. *Analytica Chimica Acta*, 650, 39-43.
- [10] Gossner, C.M.E., Schlundt, J., Embarek, P.B., Hird, S., Wong, D., Lo-Fo-, Beltran, J.J.O. 2009. The melamine incident: Implications for international food and feedsafety. *Environmental Health Perspectives*, 117, 1803-1808.
- [11] Dobson, R.L., Motlagh, S., Quijano, M., Cambron, R.T., Baker, T.R., Pullen, A.M. 2008. Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs. *Toxicological Sciences*, 106(1), 251-262.
- [12] Guo, Z., Gai, P., Hao, T., Wang, S., Wei, D., Gan, N. 2011. Determination of melamine in dairy products by an electrochemiluminescent method combined with solid-phase extraction. *Talanta*, 83, 1736-1741.
- [13] Wu, Q.Q., Fan, K.X., Sha, W., Ruan, H.Q., Zeng, R., Shieh, C.H. 2009. Highly sensitive detection of melamine based on reversed phase liquid chromatography mass spectrometry. *Chinese Science Bulletin*, 54, 732-737.
- [14] Ehling, S., Tefera, S., Ho, I.P. 2007. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of the adulteration of cereal flours with melamine and related triazine by-products ammeline, ammeline, and cyanuric acid. *Food Additives and Contaminants*, 24, 1319-1325.
- [15] Venkatasami, G., Sowa, J.R. 2010. A rapid, acetonitrile-free, HPLC method for determination of melamine in infant formula. *Analytica Chimica Acta*, 665, 227-230.
- [16] Sun, F.X., Ma, W., Xu, L.G., Zhu, Y.Y., Liu, L.Q., Peng, C.F. 2010. Analytical methods and recent developments in the detection of melamine. *Journal of Zhejiang University Science B*, 29, 1239-1294.
- [17] Tian, Y., Chen, L., Gao, L., Wu, M., Dick, W.A. 2012. Comparison of three

- [29] Hyuk Suh, J., Jung, J., Kim, B., Cho, H-D., Kim, J., Eom, T., Park, M., Wang, Y., Beom Han, S. 2017. Development of aqueous mobile phase using chaotrope for the chromatographic determination of melamine in infant formula. *Journal of Chromatography A*, 1496, 174-179.
- [30] Bimakr, M., Rahman, R.A., Salina Taip, F., Adzahan, N.M., Sarker, M.Z.I., Ganjloo, A. 2013. Supercritical carbon dioxide extraction of seed oil from winter melon (*Benincasa hispida*) and its antioxidant activity and fatty acid composition. *Molecules*, 18, 997-1014.
- products using electromembrane-LPME followed by HPLC. *Food Chemistry*, 188, 92-98.
- [27] Sarafraz Yazdi, A., Raouf Yazdinezhad, S., Heidari, T. 2015. Determination of melamine in soil samples using surfactant-enhanced hollow fiber liquid phase microextraction followed by HPLC-UV using experimental design. *Journal of Advanced Research*, 6(6), 957-966.
- [28] Anirudhan, T.S., Christa, J., Deepa, J.R. 2017. Extraction of melamine from milk using a magnetic molecularly imprinted polymer. *Food Chemistry*, 227, 85-92.

Optimization of extraction conditions and determination of melamine in egg using high-performance liquid chromatography

Haji Soliemani, M. ¹, Attaye, Sh. ², Ganjloo, A. ^{3*}

1. MSc in Analytical Chemistry, Quantitative and Qualitative Food and Water Control Center of JahadDaneshgahi, Zanjan Branch, Zanjan, Iran
2. MSc in Food Science and Technology, Quantitative and Qualitative Food and Water Control Center of JahadDaneshgahi, Zanjan Branch, Zanjan, Iran
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

(Received: 2018/05/12 Accepted:2019/04/27)

The presence of melamine in foods is one of the important issues in terms of food safety and consumer health. Extraction is the first step in determining the amount of melamine in foods. Therefore, in the current study, melamine extraction from egg was optimized using response surface methodology based on the central composite design. The percentage of water used in the extraction phase containing water/acetonitrile, extraction phase volume, extraction time, pH of extraction phase, and hydrochloric acid concentration in the extraction phase were considered as the studied variables for optimizing extraction conditions. Finally, the amount of melamine present in four brands of egg was measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) using internal standard method. Optimum extraction conditions were obtained in the form of 39.28% water in the extraction phase, 5.06 mL extraction solvent volume, 12.48 min extraction time, pH 5.04 and acid concentration of 0.73 M. The amount of melamine in the egg samples was in the range of 0.19-0.45 mg/kg. Regarding the amount of melamine authorized by the EU and the US Food and Drug Administration, it can be concluded that the melamine content of the samples is within the limits of the EU standard and only in two samples was more of the USFDA standard.

Keywords: Optimization; Extraction; Melamine; Egg; High-Performance Liquid Chromatography.

* Corresponding Author E-Mail Address: aganjloo@znu.ac.ir