مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

کاربرد روش جدید استخراج جفت‌شده به کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای پایش آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلینی در شیر گاو

حافظ راثی[۱]، محمدرضا افشارمقدم[۲و۳]، جلیل خندقی[۴*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی ، سراب، ایران.

۲- استادیار مرکز تحقیقات آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

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

۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی ، سراب، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله:

تاریخ دریافت: ۲۹ /۰۷/ ۹۹

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۱۷

کلمات کلیدی:

تتراسایکلین،

شیر،

میکرواستخراج فاز جامد پخشی،

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.

DOI: 10.52547/fsct.18.04.27

* مسئول مکاتبات:

khandaghi@iausa.ac.ir

چکیده

استفاده بی رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت پرورش دام سبب تجمع باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در محصولات دامی مختلف مانند گوشت، شیر و تخم مرغ خواهدشد. مصرف مواد غذایی حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها مشکلاتی مانند افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و ایجاد آلرژی را به‌دنبال دارد. به همین دلیل پایش باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها بخصوص در محصولات غذایی پرمصرف و سودمند مانند شیر و لبنیات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این کار پژوهشی روش میکرواستخراج فاز جامد پخشی برای استخراج آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین، کلرتتراسایکلین و داکسی‌سایکلین از ۵۰ نمونه شیر و اندازه‌گیری کمی آنها به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا توسعه داده‌شد. برای این منظور اثر پارامترهای مختلف موثر در کارایی استخراج مانند حجم عامل رسوب دهنده، نوع و مقدار جاذب، قدرت یونی، زمان و دبی دمیدن هوا، نوع و حجم سورفاکتانت و نوع و حجم حلال‌شوینده بهینه‌سازی شد. نتایج تحقیق نشان داد که همه نمونه‌های شیر دارای باقیمانده تتراسایکلین بوده و مقدار آن در محدوده ۱۴۶ تا ۳۱۹ نانوگرم در میلی‌لیتر متغیراست. دیگر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در نمونه‌ها یافت نشد. از مزایای روش استخراج پیشنهادی می‌توان به قدرت جداسازی بالا و امکان آنالیز مخلوط آنالیت ها با حساسیت بالا اشاره کرد به‌طوریکه تحت شرایط بهینه، کارایی روش پیشنهادی ۹۱-۸۰ درصد و حدود تشخیص در محدوده‌ی ۰/۳۳-۰/۱۷ نانوگرم در میلی‌لیتر و محدوده‌ی خطی روش در گستره‌ی ۲۰۰۰-۰/۶۳ نانوگرم در میلی‌لیتر بدست آمدند.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-08]

[DOI: 10.52547/fsct.18.113.339]

۱- مقدمه

تتراسایکلین‌ها یکی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج و پرمصرف در صنعت پرورش دام هستند که عمدتا شامل اکسی‌تتراسایکلین[1]، تتراسایکلین[2]، داکسی‌سایکلین[3] و کلرتتراسایکلین[4] بوده و روی طیف گسترده‌ای از باکتری‌ها موثرند [۱]. استفاده بی رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت پرورش دام منجر به افزایش باقیمانده‌های این مواد در محصولات غذایی دامی مانند گوشت، شیر و فراورده‌های آن‌ها و در نهایت راهیابی این باقیمانده‌ها به بدن انسان می‌شود [۲]. آلودگی ماده غذایی سودمند و پرمصرفی مانند شیر به این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها علاوه بر دامن زدن به معضل افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، منجر به مهار کلسیم شیر شده و میزان این ماده معدنی پراهمیت را می‌کاهد [۳]. بنابراین پایش این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها در شیر بسیار حائز اهمیت می‌باشد و تاکنون مطالعات فراوانی در این مورد انجام شده‌است [۱، ۳، ٤، ٥]. به‌دلیل مخاطراتی که باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی برای مصرف کنندگان دارد، برای آن‌ها بیشینه مقدار مجاز تعریف شده است که این مقدار طبق قوانین کدکس[5] برای باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلینی در شیر گاو ۱۰۰ میکروگرم در لیتر تعیین شده است و استاندارد ملی ایران نیز، برای سه آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین، اکسی‌تتراسایکلین و کلرتتراسایکلین در شیر گاو ۱۰۰ میکروگرم در لیتر را بعنوان حد مجاز بیشینه تعیین نموده است [٦، ۷].

علیرغم پیشرفت‌های چند دهه اخیر در روش‌های تجزیه‌ای، امکان اندازه‌گیری مستقیم ترکیبات با غلظت‌های بسیار کم به‌ویژه در نمونه‌های دارای بافت پیچیده به‌طور کامل مقدور نمی‌باشد. این امر لزوم استفاده از مراحل آماده‌سازی نمونه جهت پیش‌تغلیظ آنالیت‌ها و حذف مزاحمت‌های بافت نمونه و همچنین تبدیل آنالیت‌ها به فرم منطبق با روش آنالیز و سیستم تجزیه‌ای را نشان‌می‌دهد [۸]. در این بین قسمت عمده زمان تجزیه نمونه‌ها صرف استخراج ترکیب مورد نظر می‌شود و این مرحله بر روی همه‌ی مراحل بعدی آنالیز تأثیرگذار است از این رو نقش شاخصی در شناسایی و اندازه‌گیری آنالیت‌ها دارد [۹]. مرحله دشوار در همه روش‌های آنالیز آنالیت‌ها در شیر هم استخراج آنالیت‌ها است چرا که شیر دارای ماتریکسی پیچیده از چربی‌ها، پروتئین‌ها، مواد معدنی و لاکتوز است و معمولا روش‌های به‌کار رفته برای استخراج ترکیبات گوناگون از شیر، زمان‌بر بوده و دارای مراحل متعددی می‌باشند [۱۰].

دو روش اصلی مورد استفاده برای آماده‌سازی و استخراج آنالیت‌های مختلف از مواد غذایی روش استخراج مایع-مایع[6] یا LLE [۱۱، ۱۲] و روش استخراج با فاز جامد[7] یا SPE [۱۳، ١٤] است. بعدها روش‌های ریزاستخراج بر پایه‌ی کاهش حجم حلال استخراج‌کننده، خودکار کردن و ساده‌تر شدن فرآیند استخراج معرفی و مورد توجه قرارگرفتند. ریزاستخراج با فاز جامد[8] اولین روش ریزاستخراج است که در سال ۱۹۹۰ به‌عنوان یک روش جدید پیش‌تغلیظ و آماده‌سازی نمونه معرفی شد [۱۵]. با استفاده از این تکنیک امکان استخراج و پیش‌تغلیظ آنالیت‌ها از ماتریکس نمونه به‌طور هم‌زمان وجود دارد به‌علاوه این تکنیک معایب روش‌های دیگر استخراج مانند گرفتگی کارتریج در SPE و استفاده از حلال‌های سمی در LLE را ندارد [١٦].

هدف کار پژوهشی حاضر توسعه یک روش کارآمد و نسبتاً سریع برای استخراج آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، اکسی‌تتراسایکلین، کلرتتراسایکلین و داکسی‌سایکلین از نمونه‌های شیر می‌باشد. برای این‌منظور از روش ریزاستخراج فاز جامد پخشی استفاده شده و اندازه‌گیری این ترکیبات به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به دتکتور آرایه دیودی[9] یا HPLC-DAD صورت‌گرفت. همچنین مقدار آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در ۵۰ نمونه شیر خام گاو بر اساس روش پیشنهادی پایش و اندازه‌گیری شد.

۲- روش کار

۲-۱- نمونه برداری و مواد شیمیائی

1. Oxytetracyclin
2. Tetracycline
3. Doxycycline
4. Chlortetracycline
5. Codex

6 . Liquid liquid extraction
7. Solid phase extraction
8. Dispersive solid phase microextraction
9. High Performance Liquid Chromatography-diode array detector

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-08]
[DOI: 10.52547/fsct.18.113.339]

در این کار پژوهشی ۵۰ نمونه شیر پاستوریزه و غیرپاستوریزه در بهار و تابستان سال ۱۳۹۹ از محل‌های عرضه در شهر تبریز به‌صورت تصادفی اخذ و برای انجام آزمایشات به مرکز تحقیقات ایمنی غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی تبریز منتقل و در دمای یخچال نگهداری شدند. در ادامه ۵۰ میلی‌لیتر از هر نمونه در دمای منفی ۱۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و خامه جمع شده در سطح هر نمونه جدا و باقیمانده شیر جهت آنالیز مورد استفاده قرارگرفت. یک نمونه شیر که از هیچ یک از آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در آن استفاده نشده بود، از یک تولید کننده تهیه و پس از اطمینان از عاری بودن آن از باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیک با استفاده از کیت الایزا (BT combo test kit)، به‌عنوان نمونه بلانک در فرایند بهینه‌سازی روش مورد استفاده قرار گرفت. محلول مادر از آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، اکسی‌تتراسایکلین، کلرتتراسایکلین و داکسی‌سایکلین (Sigma-Aldrich, USA) به غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر در متانول تهیه شد. سایر موادشیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Merck آلمان و با درجه خلوص تجزیه‌ای بوده است.

۲-۲-بهینه‌سازی شرایط استخراج

به منظور دستیابی به راندمان استخراج و فاکتور تغلیظ بالا، اثر عوامل موثر مانند مقدار عامل رسوب‌دهنده (از بین مقادیر۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم از اسید تری‌کلرواستیک)، نوع و مقدار جاذب (از میان مقادیر ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ از ۳ جاذب C_{18}، PSA [1] و کربن فعال‌شده)، قدرت یونی (با افزودن مقادیر صفر تا ۱۰ درصد وزنی/ حجمی از نمک NaCl)، مدت زمان و دبی دمیدن هوا (با بررسی سرعت جریان‌های ۰/۱ تا ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه در بازه ۵ الی ۴۰ ثانیه)، نوع و حجم سورفاکتانت (از بین سورفاکتانت‌های زانتات، بتائین و دودسیل بتائین در مقادیر ۵۰۰ الی ۱۰۰۰ میلی‌گرم به‌صورت جداگانه)، نوع و حجم حلال‌شوینده اتکتیک‌عمیق (با بررسی حجم‌های ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰و ۴۰۰ میکرولیتر از هر یک از حلال‌های تری‌بوتیل آمونیم‌کلرید-پروپانوئیک اسید، تری‌بوتیل آمونیم‌کلرید-اتیلین‌گلیکول و تری‌بوتیل آمونیم‌کلرید-استیک اسید) بر روی کارایی استخراج مورد بررسی قرارگرفتند. برای بررسی پارامترهای موثر در روش پیشنهادی از روش "یک پارامتر در یک زمان" استفاده شد. تاثیر این عوامل با مقایسه سطح زیر پیک حاصل از آنالیت‌ها در شرایط مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند [۵].

۲-۳-روش استخراج

در این کار پژوهشی روش ریزاستخراج فاز جامد پخشی شناور شده با هوا و با کاربرد حلال‌های اتکتیک عمیق به‌عنوان شویشگر برای استخراج و پیش‌تغلیظ آنتی‌بوتیک‌های تتراسایکلینی از نمونه شیر توسعه داده شده‌است. ابتدا مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه شیر شاهد آلوده شده با غلظت ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر از هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه یا نمونه‌های حقیقی به داخل یک لوله آزمایش منتقل و ۱۵۰ میلی‌گرم اسید تری‌کلرواستیک به داخل نمونه اضافه شد. مخلوط حاصل به‌مدت یک دقیقه ورتکس و پس از آن سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد کل فاز رویی برداشته و به داخل یک لوله استخراج دست‌ساز (یو شکل) منتقل شد. سپس ۱۰۰ میلی‌گرم از جاذب کربن فعال به‌همراه ۵۰۰ میلی‌گرم بتائین به‌عنوان سورفاکتانت به داخل محلول اضافه گردید. پس از آن قسمت باریک لوله خمیده به جریان هوا با دبی ۰/۴ میلی‌لیتر بر دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه متصل شد تا بتائین و هوا باعث جمع شدن جاذب زغال فعال در سطح محلول شود. در آخرین مرحله فاز رویی با یک اسپاتول برداشته و به داخل یک میکروتیوب منتقل شده و بر روی آن ۲۵۰ میکرولیتر از حلال اتکتیک عمیق تری‌بوتیل آمونیوم‌کلرید-پروپانوئیک اسید ریخته‌شد. پس از واجذبی آنالیت‌ها به‌کمک امواج اولتراسونیک، محلول رویی به دستگاه HPLC (Agilent1200- DAD system, USA) تزریق شد.

۲-۴-شرایط آنالیز با دستگاه کروماتوگرافی

به‌منظور دستیابی به حداکثر تفکیک و نتایج قابل اعتماد در سیستم کروماتوگرافی، جداسازی آنالیت‌ها در شرایط بهینه صورت گرفت. شرایط بهینه دستگاه برای آنالیز آنتی‌بیوتیک‌ها در جدول ۱ ذکر شده است.

1 . Primary secondary amine

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-08]

[DOI: 10.52547/fsct.18.113.339]

Table 1 Optimized condition of the HPLC-DAD for analysis of the selected tetracyclins in cow milk

Column	Zorbax SB–Aq C18 column, l=10 cm, ID= 4.6 mm, Particle size= 3 µm
Elution type	Gradient elution
Mobile phase	A gradient elution composed of solvent A (water containing formic acid (0.5%), and solvent B (acetonitrile: methanol, 33.3:66.6 (v/v)) were used as follows: from 0.0 to 3.0 min, 80% A and 20% B, from 3.0 to 6.0 min, a linear gradient from 20 to 80% B; from 6.0 to 7.0 min, 80% A and 20% B.
Injector	Temperature: 40 °C, Loop= 50 µL
Detection wavelength	Monitoring of the analytes was done at 335 nm for tetracycline and oxytetracycline, and 296 nm doxycycline and Chlortetracycline

۲-۵- بررسی مشخصات تجزیه‌ای

به منظور اعتبارسنجی روش بکاررفته برای آنالیز سموم ارگانوفسفره در این تحقیق، پس از ترسیم نمودار معیارگیری، محدوده خطی روش[1] (LR)، حدتشخیص[2] (LOD)، حداندازه‌گیری[3] (LOQ)، تکرارپذیری[4] (RSD%)، راندمان استخراج[5] (ER) و فاکتور تغلیظ[6] (EF) بررسی و محاسبه شدند [۱۷].

۲-۶-بررسی اثر ماتریکس در نمونه‌های شیر

مواد مختلفی از جمله پروتئین‌ها، لیپیدها، قندهای شیر ممکن است در اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه تداخل ایجاد نماید لذا به‌منظور بررسی اثر ماتریکس در نمونه‌های شیر، ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌های حقیقی با غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر نسبت به هر کدام از آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه آلوده‌شده و تحت شرایط بهینه با روش پیشنهادی استخراج و با HPLC مورد آنالیز قرارگرفت. سپس ۱۰میلی‌لیتر آب دیونیزه با همان غلظت‌ها از آنالیت‌ها آلوده شد و سپس مورد استخراج و آنالیز قرارگرفت. با مقایسه سیگنال‌های تجزیه‌ای بدست آمده برای هر یک از نمونه‌های شیر و آب دیونیزه، اثر ماتریکس مورد ارزیابی قرارگرفت [۱۸].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج بهینه‌سازی عوامل موثر در استخراج

۳-۱-۱- مقدار ماده رسوب‌دهنده

عوامل رسوب‌دهنده می‌توانند مزاحمت عواملی مانند پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، رنگدانه‌ها و غیره را حذف کنند. در این میان اسید تری‌کلرواستیک با توجه به مزیت‌هایی که دارد به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد با توجه به این که مقدار کم اسید تری‌کلرواستیک قادر به رسوب‌دهی تمام پروتئین‌ها نیست و مقدار زیاد آن می‌تواند ماهیت نمونه را تغییر دهد، بهینه‌سازی مقدار آن حائز اهمیت می‌باشد [۱۹]. نتایج به دست آمده در شکل ۳-۱ نشان داد که کارایی استخراج تا مقدار ۱۵۰ میلی‌گرم از اسید تری‌کلرواستیک افزایش یافته و پس از آن تقریبا ثابت باقی می‌ماند. بنابراین ۱۵۰ میلی‌گرم به عنوان مقدار بهینه اسید تری‌کلرواستیک انتخاب شد.

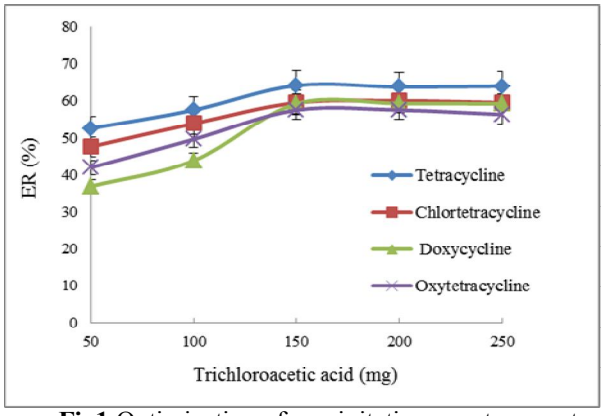

Fig1 Optimization of precipitating agent amount.

۳-۱-۲- نوع و مقدار ماده جاذب

در این کار پژوهشی از یک ماده جامد برای استخراج آنالیت‌های مورد بررسی از نمونه‌های شیر استفاده شد. ماده جامد بایستی دارای ابعاد و دانه‌بندی‌های منظم باشد تا بتواند به‌طور یکنواخت در داخل محلول حاوی آنالیت‌ها پخش گردد. از طرف دیگر این جاذب باید قابلیت جداشدن از داخل نمونه شیر طی فرایند سانتریفیوژ را داشته و از قدرت جذب بالایی برخوردار باشد [۲۰]. با در نظر گرفتن این شرایط سه جاذب C_{18} ، PSA و کربن فعال‌شده به‌عنوان جاذب استخراج‌کننده انتخاب گردید. با توجه به نتایج بدست آمده در استفاده از کربن فعال کارایی استخراج به بیشترین مقدار می‌رسد. مقدار

1. Linear range
2. Limit of detection
3. Limit of quantitation
4. Relative standard deviation
5. Extraction recovery
6. Enrichment factor

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-08]
[DOI: 10.52547/fsct.18.113.339]

جاذب نیز جزو پارامترهای موثر در کارایی روش ریزاستخراج فاز جامد پخشی می‌باشد. این تاثیر در کارایی استخراج به نسبت فاز جامد جاذب به حجم محلول نمونه مربوط است به‌طوریکه در مقادیر کم جاذب نسبت فاز کم بوده و راندمان استخراج پایین می‌باشد و با افزایش مقدار جاذب نسبت فازها افزایش یافته و راندمان استخراج افزایش می‌یابد [۲۰]. از این رو مقدار جاذب باید بهینه شود. با توجه به نتایج نمایش داده‌شده در شکل ۳-۳، مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم جاذب کربن فعال، به‌عنوان مقدار بهینه انتخاب گردید.

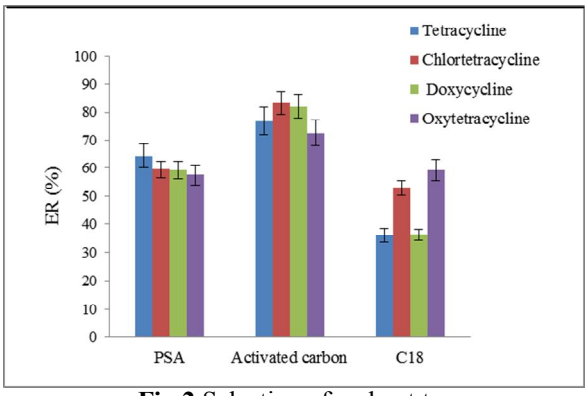

Fig 2 Selection of sorbent type.

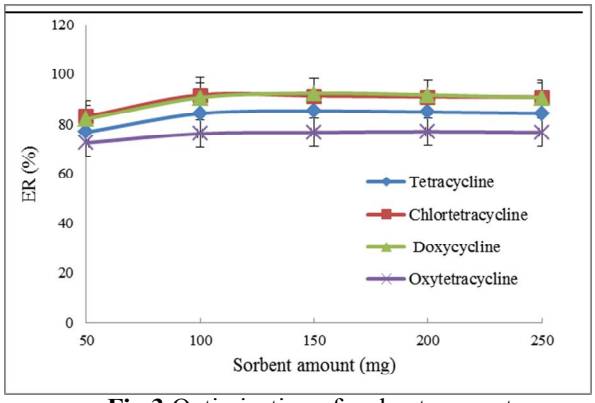

Fig 3 Optimization of sorbent amount.

۳-۱-۳- مدت زمان و دبی دمیدن هوا

به‌منظور پخش و شناورسازی جاذب در روش حاضر از دمیدن هوا استفاده شد. هوا منجر به افزایش سطح تماس جاذب با محلول آزمایشی شده و هم‌زمان به شناورسازی جاذب با کمک سورفاکتانت کمک می‌کند [۲۱]. از این‌رو سرعت دمیدن هوا به داخل محلول آزمایشی و مدت‌زمان آن بایستی مورد بهینه‌سازی قرارگیرد. بر اساس نتایج با افزایش سرعت جریان هوا تا ۰/٤ میلی‌لیتر در دقیقه سیگنال‌های تجزیه‌ای افزایش یافته و پس از آن ثابت‌مانده و مجدداً کاهش یافت. کاهش سیگنال‌ها در جریان هوای سریعتر می‌تواند به‌دلیل مدت‌زمان کم تماس جاذب با محلول آزمایش باشد. نتایج به‌دست آمده از بررسی مدت‌زمان دمیدن هوا نیز نشان داد که راندمان استخراج تا مدت‌زمان ۳۰ ثانیه افزایش و پس از آن تقریباً ثابت می‌ماند. از این‌رو ۳۰ ثانیه در ادامه آزمایشات انتخاب شد.

۳-۱-٤- نوع و حجم سورفاکتانت

سورفاکتانت در کنار جریان هوا منجربه شناور شدن فاز جامد جاذب در سطح محلول شده و امکان جداکردن آن بدون نیاز به سانتریفیوژ را فراهم می‌کند. از طرف دیگر حضور سورفاکتانت منجر به افزایش قدرت جذب آنالیت‌ها به سطح جاذب جامد می‌شود [۲۱]. از این‌رو نوع و حجم سورفاکتانت بایستی مورد بررسی قرار گیرد. نتایج نشان داد که در بین سورفاکتانت‌های مورد مطالعه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و به دلیل در دسترس بودن بتائین، این سورفاکتانت برای مراحل آتی انتخاب شد. نتایج ارزیابی مقدار سورفاکتانت نیز نشان داد که راندمان استخراج با افزایش مقدار سورفاکتانت کاهش می‌یابد. از آنجائیکه در مقادیر کمتر از ۵۰۰ میلی‌گرم فاز جامد جاذب بر روی محلول آزمایشی شناور نشد لذا ادامه آزمایشات با ۵۰۰ میلی‌گرم از بتائین انجام‌شد.

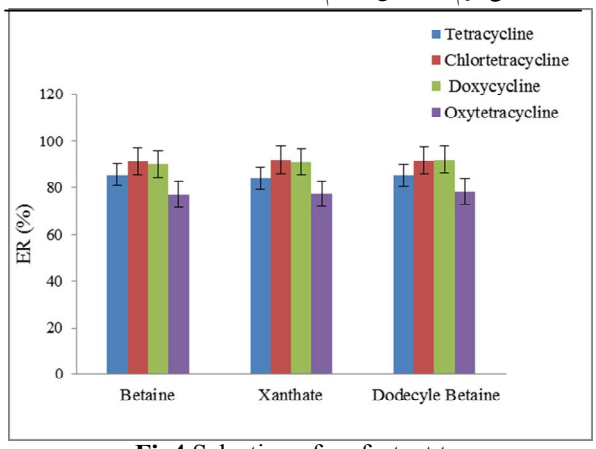

Fig4 Selection of surfactant type.

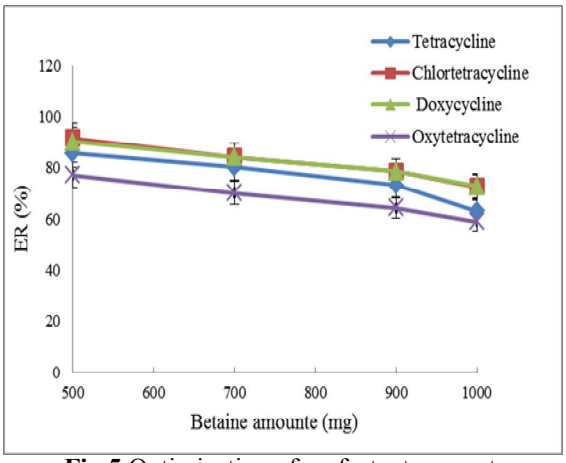

Fig 5 Optimization of surfactant amount.

۳-۱-۵- نوع و حجم حلال شوینده

در پژوهش حاضر از حلال‌های اتکتیک عمیق به‌دلیل سمیت کم‌تر آنها استفاده‌شد [۱٤]. نتایج حاصل از بررسی این پارامتر

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-08]
[DOI: 10.52547/fsct.18.113.339]

نشان داد که در بین حلال‌های اتکتیک عمیق انتخاب شده که باید دارای دو ویژگی قابلیت شویش آنالیت‌های جذب شده توسط جاذب و قابلیت انحلال در فاز آلی و آبی بوده تا قابل تزریق به سیستم HPLC باشد [۲۰]، تری‌بوتیل آمونیم کلرید-پروپانوئیک اسید بیشترین کارایی را داشت. حجم حلال شوینده نیز پارامتر موثر در روش پیشنهادی می‌باشد چراکه با افزایش حجم، آنالیت‌ها در فاز شسته‌شده رقیق بوده و فاکتورتغلیظ کم می‌شود [۲۲] لذا حجم حلال بایستی مورد بهینه سازی قرار گیرد. بر اساس یافته‌ها حجم ۱۵۰ میکرولیتر از حلال بالاترین کارایی را در روند استخراج نشان داد.

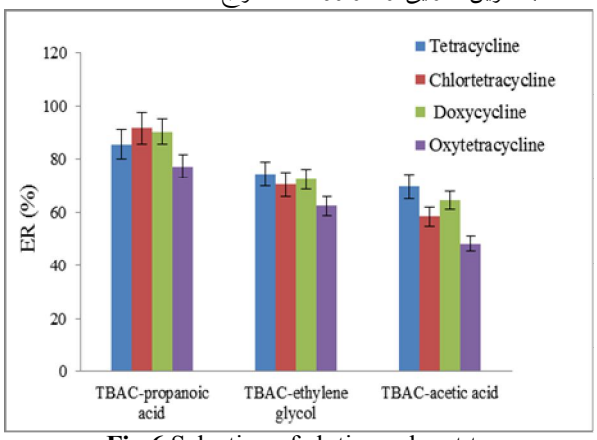

Fig 6 Selection of elution solvent type.

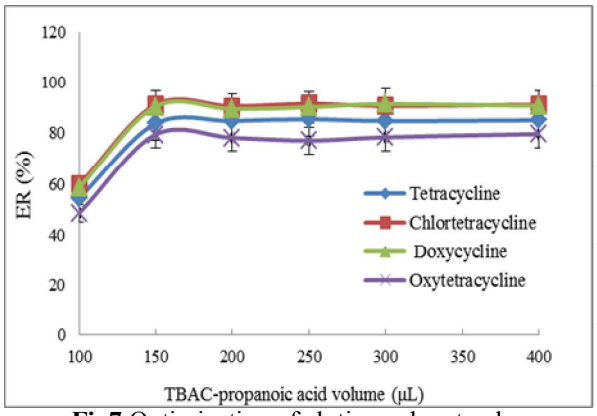

Fig7 Optimization of elution solvent volume.

۳-۱-۶- اثر نمک زنی

عموماً در روش‌های استخراج، افزایش نمک به محلول‌های آبی دو اثر متقابل دارد. اول اینکه حضور نمک باعث افزایش نیروی یونی فاز آبی شده و باعث کاهش حلالیت آنالیت‌ها در فاز آبی و انتقال آن‌ها به داخل حلال استخراج کننده می‌شود در نتیجه راندمان استخراج افزایش می‌یابد. دوم این که افزایش نمک به محیط استخراج می‌تواند محلولیت حلال استخراج‌کننده در فاز آبی را نیز کاهش داده و منجر به افزایش حجم فاز آلی جمع‌شده شود که این امر می‌تواند باعث کاهش سیگنال تجزیه‌ای در اثر رقیق‌سازی شود [۲۳]. هرکدام از اثرات بر دیگری برتری داشته باشد در این‌صورت تأثیر آن عامل غالب خواهد بود. در این مطالعه با افزایش مقدار NaCl راندمان استخراج کاهش یافت پس آزمایشات در غیاب نمک صورت‌گرفت.

۳-۲-نتایج مشخصات تجزیه‌ای روش

پارامترهای تجزیه‌ای روش حاضر تحت شرایط بهینه بدست آمدند. معادله رگراسیونی برای داده‌های حاصله در محدوده مورد بررسی (با استفاده از محلول‌های استانداردی با غلظت‌های ۰/۶، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰، ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۲۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه) ترسیم و از منحنی کالیبراسیون محدوده خطی روش برای هر یک از آنالیت‌ها بدست آمد. حد تشخیص و حد اندازه‌گیری روش به ترتیب برابر غلظت‌هایی در نظر گرفته شدند که در آن ها نسبت سیگنال به نویز به ترتیب برابر با ۳ و ۱۰ می‌باشند. به‌منظور بررسی تکرارپذیری و دقت روش از انحراف استاندارد نسبی(RSD ٪) استفاده شد. محاسبه فاکتورتغلیظ از مقایسه مساحت پیک آنالیت‌های محلول استاندارد با مساحت پیک آنالیت‌های موجود در شیر پس اجرای روش پیشنهادی و پس از انجام استخراج صورت گرفت. نتایج حاصل از مشخصات تجزیه‌ای روش در جدول ۲ ارائه شده است.

Table 2 Quantitative features of the developed method for the selected tetracyclins

Analyte	LR[a]	LOD[b]	LOQ[c]	r2[d]	RSD%[e]	ER ± SD[f]	EF ± SD[g]
Tetracycline	1.13-2000	0.33	1.13	0.995	4.9	84 ± 3	56 ± 3
Chlortetracycline	0.63-2000	0.17	0.63	0.994	5.9	91 ± 4	60 ± 8
Doxycycline	0.78-2000	0.23	0.78	0.998	8.3	90 ± 2	59 ± 4
Oxytetracycline	0.96-2000	0.29	0.96	0.999	6.6	80 ± 3	52 ± 3

a) Linear range (ng ml^{-1})
b) Limit of detection (S/N = 3) (ng ml^{-1})
c) Limit of quantification (S/N = 10) (ng ml^{-1})
d) Coefficient of determination
e) Relative standard deviation (n = 5)
f) Extraction recovery ± standard deviation (n = 3)
g) Enrichment factor ± standard deviation (n = 3)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-08]
[DOI: 10.52547/fsct.18.113.339]

به‌منظور ارزیابی کارایی روش پیشنهادی در استخراج آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر، برخی پارامترهای تجزیه‌ای روش حاضر از قبیل محدوده حد تشخیص، حد اندازه‌گیری، درصد انحراف‌استاندارد و میزان بازیافت آنالیت‌ها، با چند روش به‌کار رفته برای استخراج تتراسایکلین‌ها از نمونه‌های مختلف مقایسه شد که در جدول۳ به آن اشاره شده‌است. همه ارقام شایستگی روش حاضر قابل مقایسه با روش‌های دیگر است به‌طوریکه مقادیر حداندازه‌گیری و حد تشخیص بدست آمده به‌طور قابل توجه پایین‌تر از سایر روش‌ها بوده و راندمان استخراج آنالیت‌ها در روش حاضر، قابل مقایسه یا حتی پایین‌تر از سایر روش‌ها می‌باشد. دارا بودن مقدار پایین انحراف استاندارد نسبی که نشان‌دهنده تکرارپذیری بالای روش پیشنهادی است، مزیت دیگر این روش می‌باشد.

Table 3: Comparison of the proposed method with other methods in the extraction and determination of the tetracyclins determined by HPLC.

Sample preparation method	Sample	LOD[a]	LOQ[b]	RSD[c] (%)	ER[d] (%)	Reference
A	Meat and liver	<10 (ng g^{-1})	<15 (ng g^{-1})	<10	75-102.6	24
B	Milk	1.5-8.5 (ng ml^{-1})	5.1-28.4 (ng ml^{-1})	<8.4	70-113	1
C	Milk	100.6-109.7 (ng ml^{-1})	100.3-105.6 (ng ml^{-1})	<15.5	83.07-106.3	25
D	Meat	4.4-12 (ng g^{-1})	10-33 (ng g^{-1})	<11	76.5-95.5	26
E	Milk	0.17-0.33 (ng ml^{-1})	0.63-1.13 (ng ml^{-1})	<8.3	80-91	Present work

A) Accelerated solvent extraction method. B) Dispersive liquid–liquid microextraction based on hydrophobic deep eutectic solvents. C) QuEChERS Dispersive Extraction method. D) solid liquid extraction performed by two phase freezing method. E) dispersive solid-phase micro-extraction method. a) Limit of detection. b) Limit of quantification. c) Relative standard deviation. d) Extraction recovery.

۳-۳- نتایج آنالیز نمونه‌های حقیقی

۵۰ نمونه شیر طبق شرایط بهینه با روش پیشنهادی تغلیظ و تخلیص شدند و سپس با HPLC-DAD مورد آنالیز قرار گرفتند. شکل۳ کروماتوگرام‌های مربوط به تزریق مستقیم استاندارد آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه (هر کدام به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر) و یک نمونه‌ی شیر اسپایک نشده را نشان می‌دهد. مقایسه کروماتوگرام‌های حاصل از نمونه‌ها با کروماتوگرام حاصل از نمونه استاندارد نشان داد که همه نمونه‌های شیر آلوده به تتراسایکلین در بالاتر از حد مجاز تعیین شده توسط استاندارد ملی ایران بوده و سایر آنتی‌بیوتیک‌ها در نمونه‌های شیر وجود نداشتند. به‌منظور اندازه‌گیری غلظت آنالیت‌ها از روش افزایش استاندارد استفاده شد.

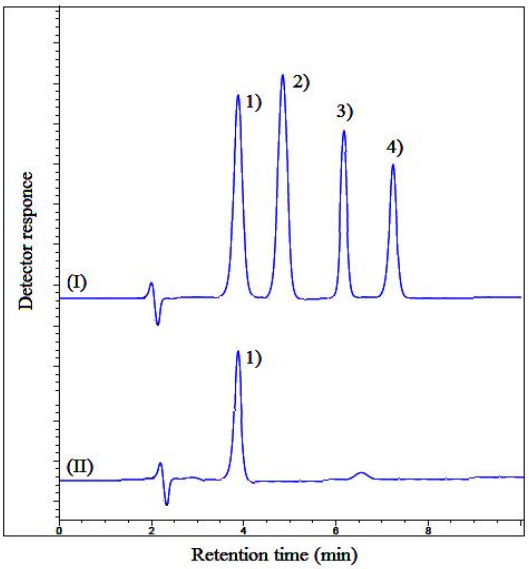

Fig 8 Typical HPLC–DAD chromatograms of direct injection of standard solution of the target analytes at a concentration of 10 ng L^{-1} (I) and unspiked milk sample (II) after performing the developed method. Peak identification: (1) Tetracycline, (2) Chlortetracycline, (3) Doxycycline, (4) Oxytetracycline.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-08]

[DOI: 10.52547/fsct.18.113.339]

۳-٤- بررسی اثر ماتریکس در نمونه‌های حقیقی

اثر ماتریکس شیر با مقایسه سیگنال‌های تجزیه‌ای بدست آمده برای هر یک از نمونه‌های حقیقی و آب دیونیزه مورد ارزیابی قرارگرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که ماتریکس نمونه‌ها تأثیر محسوسی در کارایی روش پیشنهادی ندارند.

Table 4 Results of assays to check the sample matrix effect for the analytes

Analyte	Mean relative recovery ± standard deviation (n = 3)			
	Sample1	Sample2	Sample3	Sample4
All samples were spiked with each analyte at a concentration of 2 ng ml^{-1}				
Tetracycline	97 ± 4	96 ± 4	90 ± 4	98 ± 4
Chlortetracycline	91 ± 5	94 ± 3	92 ± 4	97 ± 4
Doxycycline	92 ± 3	96 ± 4	99 ± 3	98 ± 5
Oxytetracycline	97 ± 4	93 ± 5	90 ± 5	98 ± 6
All samples were spiked with each analyte at a concentration of 5 ng ml^{-1}				
Tetracycline	94 ± 5	98 ± 4	97 ± 4	95 ± 4
Chlortetracycline	95 ± 7	93 ± 3	95 ± 5	92 ± 4
Doxycycline	94 ± 6	95 ± 5	96 ± 4	93 ± 7
Oxytetracycline	97 ± 3	96 ± 3	90 ± 6	98 ± 3
All samples were spiked with each analyte at a concentration of 10 ng ml^{-1}				
Tetracycline	97 ± 3	96 ± 2	97 ± 3	94 ± 3
Chlortetracycline	97 ± 5	91 ± 4	90 ± 4	98 ± 4
Doxycycline	99 ± 4	93 ± 4	92 ± 4	96 ± 5
Oxytetracycline	92 ± 4	94 ± 5	90 ± 4	95 ± 3

۳-۵- نتیجه‌گیری کلی

در اجرای روش توسعه داده‌شده در مطالعه حاضر از شناورسازی به‌کمک هوا و سورفاکتانت برای پخش ذرات فاز جامد و از حلال‌های اتکتیک عمیق به‌منظور شستن آنالیت‌های جذب‌شده در فاز جامد استفاده شد. از جمله مزایای روش پیشنهادی می‌توان به سادگی، قابل اعتماد بودن، ارزان بودن، مصرف کم حلال‌های آلی و زمان آنالیز کوتاه اشاره کرد. نتایج به‌دست آمده نشان دهنده پارامترهای تجزیه‌ای مطلوب می‌باشند به‌طوریکه تحت شرایط بهینه راندمان‌های استخراج ۹۱-۸۰ درصد و حدود تشخیص در محدوده‌ی ۰/۳۳-۰/۱۷ نانوگرم در میلی‌لیتر و محدوده‌ی خطی روش در گستره‌ی ۲۰۰۰-۰/۶۳ نانوگرم در میلی‌لیتر بدست آمدند.

روش مذکور به‌طور موفقیت‌آمیزی بر روی انواع آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در نمونه‌های شیر انجام‌گرفت و آنالیز نمونه‌های حقیقی نشان‌داد که همه نمونه‌های شیر دارای باقیمانده آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بوده و مقدار آن در محدوده ۱٤٦ تا ۳۱۹ نانوگرم در میلی‌لیتر متغیراست. دیگر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در نمونه‌ها یافت نشد.

٤- تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافعی ندارند.

٥- منابع

[1] 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.

[2] Bacanl, M. and Başaran, N. 2019. Importance of antibiotic residues in animal food. Food and Chemical Toxicology, 125, 462-466.

[3] Rasooli, A., Abdolmaleki, Z., Bokaii, S., Kamkar, A. and Shams, G. 2010. A cross-sectional study on oxytetracycline and tetracycline residues in pasteurized milk supplied in Tehran by an HPLC method. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 4, 1-3.

[4] Pogurschia, E., Ciric, A., Zugrav, C. and Patrascu, D. 2015. Identification of antibiotic residues in raw milk samples coming from the metropolitan area of bucharest. Agriculture and Agricultural Science Procedia, 6, 242-245.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-08]

[DOI: 10.52547/fsct.18.113.339]

[5] Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Food. 2nd revision, 2018; ISIRI no. 11101. [In Persian]

[6] Codex Alimentarius Commission. 2009. Maximum residue limits for veterinary drugs in foods. 32nd session. Available from: http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/index.

[7] Salehzadeh, F., Madani, R., Salehzade, A., Rokni, N. and Golchinefar, F. 2006. Oxytetracycline residue in chicken tissues from Tehran slaughterhouses in Iran. Pakistan Journal of Nutrition, 5, 377-381.

[8] Mitra, S. and Brukh, R. 2003. Sample Preparation: An Analytical Perspective. In: Winefordner, J.D. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Volume 162, 1st edition, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. pp. 12-35.

[9] Bidari, A., Ganjali, M.R., Norouzi, P., Hosseini, M.R.M. and Assadi, Y. 2011. Sample preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction. Food Chemistry, 126, 1840-1844.

[10] Mohebi, A., Samadi, M., Tavakoli, H.R. and Parastouei, K. 2020. Homogenous liquid–liquid extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of some antibiotics from milk samples before their determination by HPLC. Microchemical Journal, 154, 104988.

[11] Jeddy, M. and Khandaghi, J. 2019. Detection and quantification of phytosterols in yogurt using gas chromatography. Journal of food hygiene, 9, 59-71. [In Persian].

[12] Carvalho Oliveira, I.G. and Costa Queiroz, M.E. 2020. A micro salting-out assisted liquid-liquid extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine anandamide and 2-arachidonoylglycerol in rat brain samples. Journal of Chromatography B, 1158, 122351.

[13] Montes, R., Rodriguez, I., Ramil, M., Rubi, E. and Cela, R. 2009. Solid–phase extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for the sensitive determination of selected fungicides in wine. Journal of Chromatography A, 1216, 5459–5466.

[14] Zahiri, E., Khandaghi, J., Farajzadeh, M.A. and Afshar Mogaddam, M.R. 2020. Combination of dispersive solid phase extraction with solidification organic drop–dispersive liquid–liquid microextraction based on deep eutectic solvent for extraction of organophosphorous pesticides from edible oil samples. Journal of Chromatography A, 1627, 461390.

[15] Arthur, C. and Pawliszyn, J. 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. Analytical Chemistry, 62, 2145–2148.

[16] Djozan, D.j., Mahkam, M. and Ebrahimi, B. 2009. Preparation and binding study of solid–phase microextraction fiber on the basis of ametryn–imprinted polymer: Application to the selective extraction of persistent triazine herbicides in tap water, rice, maize and onion. Journal of Chromatography A, 1216, 2211–2219.

[17] Chandran, S. and Singh, R. 2007. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. International Journal of Pharmaceutical Sciences, 62, 4-14.

[18] European Commission Decision. 2002. Concerning the performance of analytical methods. Implementing Council Directive 657/EC.

[19] Afshar Mogaddam, M.R., Farajzadeh, M.A., Nemati, M., Lotfipour, F. and Ghorbanpour, H. 2020. Application of natural deep eutectic solvents-based in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of five acaricides in egg samples. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, In press.

[20] Mohebbi, A., Yaripour, S., Farajzadeh, M.A. and Afshar Mogaddam, M.R. 2018. Combination of dispersive solid phase extraction and deep eutectic solvent–based air–assisted liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry as an efficient analytical method for the quantification of some tricyclic antidepressant drugs in biological fluids, Journal of Chromatography A, 1571, 84-93.

[21] Barfi, B., Asghari, A., Rajabi, M. and Sabzalian, S. 2015. Organic solvent-free air-assisted liquid–liquid microextraction for optimized extraction of illegal azo-based dyes and their main metabolite from spices,

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-08]

[DOI: 10.52547/fsct.18.113.339]

cosmetics and human bio-fluid samples in one step. Journal of Chromatography B, 999, 15-25.

[22] Rastpour, N., Khandaghi, J., Farajzadeh, M.A. and Afshar Mogaddam, M.A. 2020. Deep eutectic solvent-based QuEChERS method combined with dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of benzoylurea insecticides in cabbage leaves samples. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, In press.

[23] Pil-Bala, B., Khandaghi, J. and Afshar Mogaddam, M.R. 2019. Analysis of endocrine-disrupting compounds from cheese samples using pressurized liquid extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. Food Analytial Methods, 12, 1604–1611.

[24] Yu, H., Tao, Y., Chen, D., Wang, Y. and Yuan, Z. 2011. Development of an HPLC–UV method for the simultaneous determination of tetracyclines in muscle and liver of porcine, chicken and bovine with accelerated solvent extraction. Food Chemistry, 124(3), 1131-1138.

[25] Marinou, E., Samanidou, V.F. and Papadoyannis, I.N. 2019. Development of a High Pressure Liquid Chromatography with Diode Array Detection Method for the Determination of Four Tetracycline Residues in Milk by Using QuEChERS Dispersive Extraction. Separations, 6(21), 1-9.

[26] Ahmadi, F., Shahbazi, Y. and Karami, N. 2015. Determination of tetracyclines in meat using two phases freezing extraction method and HPLC-DAD. Food Analytial Methods, 8, 1883–1891.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-08]

[DOI: 10.52547/fsct.18.113.339]

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Application of a new extraction method coupled to high performance liquid chromatography for tetracyclines monitoring in cow milk

Rasi, H. [1], AfsharMogaddam, M. [2,3], Khandaghi, J. [4*]

1. M.Sc Graduate of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.
2. Assistant Professor of Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
3. Assistant Professor of Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
4. Assistant Professor of Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.

ARTICIE INFO

Article History:

Received 2020/ 10/ 19
Accepted 2021/ 03/ 07

Keywords:

Tetracycline,
Milk,
Dispersive solid-phase micro-extraction,
HPLC.

DOI: 10.52547/fsct.18.04.27

*Corresponding Author E-Mail: khandaghi@iausa.ac.ir

ABSTRACT

Excessive use of antibiotics in the production of livestock has led to the accumulation of antibiotic residues in various livestock products such as meat, milk and egg. Consumption of foods containing antibiotics leads to problems such as increased antibiotic resistance and allergies. For this reason, monitoring residual antibiotics, especially in high-consumption and beneficial food products such as milk and dairy products, is of particular importance. In this research, a dispersive solid-phase micro-extraction method for the extraction of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and doxycycline antibiotics from 50 milk samples and their quantitative measurement by HPLC was developed. For this purpose, the effect of various parameters affecting the extraction efficiency such as the volume of the precipitating agent, the type and amount of solid adsorbent, ionic strength, aeration time and flow rate, type and amount of surfactant and type and volume of elution solvent were optimized. The results showed that all milk samples contained tetracycline residue and its concentration varied in the range of 146 to 319 ng / ml. No other antibiotics were found in the samples. The advantages of the proposed extraction method include high separation power and the possibility of analyzing a mixture of highly sensitive analytes, so that under optimal conditions, recoveries of the proposed method ranging from 80 to 91%, the LOD were in the range of 0.17-0.33 ng / ml and the linear range was in the range of 0.63-2000 ng / ml.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-08-08]

[DOI: 10.52547/fsct.18.113.339]