



ساخت و بررسی ذرات کروی حک شده مولکولی بعنوان جاذبی با کارایی عالی برای استخراج سریع و انتخابی نیکوتین آمید توسط ستون فاز جامد از گوشت گوساله و آرد گندم

علیرضا ریاضی^۱، رضا فرهوش^{۲*}، هاشم پوراآذرننگ^۳، کریستین اسکامان^۴، زینب رفتنی امیری^۵، علی شریف^۶

- ۱- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۳- استاد بازنشسته، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۴- دانشیار، گروه غذا، تغذیه و سلامت، دانشکده سیستم های زمین و غذا، دانشگاه بریتیش کلمبیا، ونکوور، کانادا.
- ۵- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
- ۶- استادیار بازنشسته، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۸

کلمات کلیدی:

پلیمریزاسیون رسوبی، ذرات کروی حک شده مولکولی، نیکوتین آمید، استخراج فاز جامد، نمونه های غذایی.

DOI: 10.52547/fsct.18.120.25

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.120.22.4

* مسئول مکاتبات:

rfarhoosh@um.ac.ir

ویتامین B₃ (نیکوتین آمید) بعنوان پیش ساز NAD و NADP در بسیاری از واکنش های حیاتی بدن دخیل می باشد. کمبود آن موجب بیماری پلاگرا می شود، لذا مواد غذایی را با این ویتامین غنی سازی می نمایند. همچنین مقادیر زیاد آن عوارضی بهمراه دارد. بنابراین اندازه گیری ارزان، سریع، انتخابی و حساس این ویتامین در مواد غذایی ضروری می باشد. در پژوهش حاضر، روش اندازه گیری نیکوتین آمید در گوشت گوساله و آرد گندم با بکارگیری شیوه خالص سازی به کمک استخراج توسط ستون فاز جامد مبتنی بر جاذب پلیمرهای حک شده و تعیین مقدار با HPLC-UV پیشنهاد گردید. روش پلیمریزاسیون رسوبی برای ساخت پلیمرهای کروی حک شده با نیکوتین آمید استفاده شد. اثرات اجزا پلیمر سازی شامل منومر های عملکردی و ایجاد کننده پیوند عرضی، قالب و حلال بر ویژگیهای پیوندی بررسی شد. رفتار پیوندی پلیمر توسط معادله Freundlich بخوبی مدل سازی شد و پلیمر انتخابگری بالایی برای نیکوتین آمید در برابر نیکوتینیک اسید، نشان داد. همچنین در مطالعه سینتیک، ۷۹٪ اتصال نیکوتین آمید و ۹۶/۵٪ آزاد شدن آن فوراً اتفاق افتاد. پلیمر برای خالص سازی نیکوتین آمید در ستون استخراج توسط فاز جامد پر شد، نمونه های غذایی تزریق، و خروجی با HPLC-UV آنالیز گردید. رفتار خطی مناسب برای استخراج نیکوتین آمید توسط ستون فاز جامد در دامنه ۱۴۸-۵۰۰۰ $\mu\text{g L}^{-1}$ ($R^2 = 0.99$) و بازیابی استخراج بالای ۷۷-۱۰۲٪ و ۸۱-۸۷٪ به ترتیب برای گوشت گوساله و آرد گندم بدست آمد. حد آشکارسازی (LOD) و حد اندازه گیری (LOQ) برای نیکوتین آمید به ترتیب $44 \mu\text{g L}^{-1}$ و $148 \mu\text{g L}^{-1}$ بود. انحراف استاندارد نسبی داخل-روز و بین-روز در دامنه ۲/۱۳٪ الی ۵/۳۱٪ برای آرد ($n = 4$) و ۱/۸۹٪ الی ۵/۲۲٪ برای گوشت ($n = 4$) بدست آمد که نشان دهنده صحت خوب روش برای آنالیز نمونه واقعی می باشد.

۱- مقدمه

ویتامین ها ترکیبات آلی محلول در آب/یا در چربی هستند که بعلت عملکرد فیزیولوژیک خود در متابولیسم، تشش ماهیچه، سیستم عصبی، رشد سلول، سلامت سیستم ایمنی و استخوان ها، حایز نقش های مهمی در سلامتی انسان می باشند [۷-۱]. واژه عمومی نیاسین به دو ویتامین ویتامین محلول در آب B₃؛ نیکوتین آمید (NAM) و نیکوتینیک اسید (NA) اطلاق می گردد [۸] و [۹]. نیکوتین آمید در بیش از ۲۰۰ واکنش اکسیداسیون آنزیمی در بدن انسان بعنوان پیش ساز نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NAD) و نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات (NADP) مرتبط می باشد [۱۰]. نیکوتین آمید بعنوان عامل آنتی اکسیدانی و ضد التهابی عمل نموده [۱۱]، همچنین قادر است ظاهر و الاستیسیته پوست را بهبود بخشیده [۱۴-۱۲] و به جریان مناسب خون کمک نماید [۱۵]. کمبود نیکوتین آمید به خستگی و کاهش اشتها منجر شده و در حالات بحرانی امکان ایجاد بیماری پلاگرا وجود دارد [۱۶]. از سوی دیگر، دریافت مقادیر زیاد نیکوتین آمید، که بطور گسترده ای در منابع طبیعی نظیر غلات و فرآورده های حیوانی وجود دارد، می تواند به قرمز شدن پوست و سردرد منجر شده که نشانه فشارخون میباشد [۸] و [۱۷]. بمنظور دریافت کافی نیکوتین آمید در جیره غذایی، این ویتامین به شیر نوزاد و غلات اضافه می گردد [۱۸]. لذا نظارت و تعیین مقدار نیکوتین آمید در مواد غذایی، شدیداً مورد توجه مطالعات سلامت محور و صنعت غذا می باشد. پروتکل های مختلفی نظیر شیمیایی، میکروبیولوژیکی و دستگاهی برای آنالیز کمی نیکوتین آمید در مواد غذایی گزارش شده اند [۸]. آنالیزهای متداول (شیمیایی) برپایه واکنش غیر اختصاصی با برومید سیانوژن می باشد که ماده ای سمی و ناپایدار است و آماده سازی نمونه پرزحمت و وقت گیری دارد [۱۷]. آنالیزهای میکروبیولوژیکی برای تعیین نیکوتین آمید، بسیار زمان بر بوده، غیر اختصاصی برای نیکوتین آمید می باشند و نیاز به شرایط به دقت رسیدگی شده محیط کشت ارگانسیم ها دارد [۱۹ و ۲۰].

بیشترین روشهای دستگاهی گزارشی شده برای تعیین نیکوتین آمید در نمونه های غذایی، اسپکتروفلوریمتری [۲۱]، اسپکتروفتومتری [۱۳]، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کروماتوگرافی مایع با کارایی فوق بالا [۴، ۲۲-۲۴]، الکتروشیمیایی [۲۵]، الکتروفورز موینیگی [۲۶-۲۸]، اسپکتروسکوپی رامان (SERS) [۲۹]، و HPLC-MS/MS [۳۰] می باشد. برخی از این روش ها نظیر HPLC-MS/MS، نیازمند روش های آماده سازی زمان بر و پیچیده، و دستگاههای گران قیمتی هستند که با پرسنل آموزش دیده قابل استفاده اند، لذا کاربرد آنها را محدود به آزمایشگاه های حرفه ای و مجهز می نماید. بطور معمول، تکنیک کروماتوگرافی به همراه دکتور UV، برای اندازه گیری کمی آنالیت های هدف استفاده می شود. بعلت پیچیدگی نمونه های واقعی و اختصاصیت پایین دکتور مذکور، به منظور بهبود نتایج اندازه گیری، به کارگرفتن یک روش آماده سازی نمونه، نظیر استخراج (توسط ستون) فاز جامد (SPE¹) برای حذف مواد مزاحم ضروری می باشد [۸، ۹، ۳۱ و ۳۲]. درحالیکه در استفاده از جاذب های SPE کلاسیک، با پیوندهای غیراختصاصی امکان جداسازی همزمان پاره ای^۲ ترکیبات مزاحم وجود دارد، جاذب های تمایلی^۳، نظیر پلیمرهای حک شده مولکولی (MIP^۴) موجب می شوند SPE سیستم ای کارا گردد که بطور اختصاصی مقادیر کم مواد هدف (مورد آنالیز) را از نمونه های پیچیده، تغلیظ و جدا نماید [۳۳ و ۳۴]. پلیمرهای حک شده مولکولی که از طریق پلیمریزاسیون منومرها در اطراف مولکولهای هدف اختصاصی (بعنوان قالب) ایجاد می شوند، جاذبی قوی و انتخابگر ایجاد نموده که در استخراج فاز جامد (MIP-SPE) آنالیت ها بکار گرفته می شوند [۳۵]. پلیمریزاسیون توده ای^۵، معمول ترین روش برای ساخت پلیمرهای حک شده مولکولی می باشد، اما وقت گیر و پرزحمت

1. Solid phase extraction
2. Partial co-extraction
3. Affinity sorbents
4. Molecularly imprinted polymers
5. Bulk polymerization

روش پلیمریزاسیون رسوبی سنتز شدند را بررسی نمودند و نشان دادند که پیوندهای هیدروژنی اتصال اصلی میان پلیمرهای حک شده مولکولی و نیکوتین آمید بودند. یک مطالعه نظری، پارامترهای موثر بر مورفولوژی، راندمان واکنش و ظرفیت اتصال مجدد را در خصوص پلیمرهای حک شده کروی بر پایه نیکوتین آمید از طریق تئوری عملکردی دانسیته مورد ارزیابی قرار داد [۴۱]. همچنین پلیمریزاسیون دو مرحله ای Swelling برای تولید ذرات کروی بمنظور تعیین مقدار نیکوتین آمید در نمونه های ادرار و سرم گزارش گردید [۴۷]. ملاحظه بررسی منابع در خصوص ذرات کروی حک شده با نیکوتین آمید تولید شده با فرآیند پلیمریزاسیون رسوبی با هدف کاربردشان برای آنالیز نمونه غذایی، تحقیق سیستماتیک و جامعی در خصوص پارامترهای موثر بر سنتز و کاربرد متعاقب آن در خلص سازی گوشت گوساله و آرد گندم را نشان نمی دهد. پژوهش حاضر به مطالعه پارامترهای موثر در پلیمریزاسیون رسوبی برای سنتز ذرات کروی حک شده با نیکوتین آمید پرداخته است. علاوه بر آن، در این تحقیق، شرایط عملیاتی بمنظور دستیابی به بیشینه کارایی MIP-SPE ارائه شده برای تصفیه نمونه بهینه شده است. نهایتاً، انتخابگری و حساسیت MIP-SPE ارائه شده متصل به HPLC-UV در تعیین نیکوتین آمید در نمونه های غذایی مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد شیمیایی

نیکوتین آمید، نیکوتینیک اسید، اسید متاکریلیک (MAA)، تری متیلول پروپان تری متاکریلات (TRIM)، اتیلن گلیکول دی متاکریلات (EGDMA)، لوریل پراکسید (LP) و متیل اتیل کتون (MEK) از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)) خریداری شد. حلالها با درجه HPLC، شامل کلروفرم، هپتان و استونیتریل از شرکت فیشر

است زیرا ابتدا بصورت توده سنتز شده، سپس بایستی به ذراتی با اندازه هایی برای کاربردهای MIP-SPE خرد (آسیاب) شود. چندین مشکل عملیاتی نظیر؛ ایجاد دور ریز پلیمر و شکل و اندازه نامنظم ذرات بدست آمده، که به سرعت های متفاوت انتقال جرم در استخراج آنالیت ها منجر می شود، مستقیماً به فرآیند آسیاب نمودن مرتبط می باشد. سایر تکنیک های پلیمریزاسیون شامل پلیمریزاسیون سوسپانسیونی، پلیمریزاسیون چند مرحله ای Swelling، و پلیمریزاسیون رسوبی، برای سنتز پلیمرهای با اشکال کروی بکار گرفته می شوند که این ذرات پلیمری بدست آمده بدلیل اندازه و شکل یکنواخت، کیفیت پر نمودن بهتر، و تعداد بیشتر صفحات تئوری، کارایی بهتری در کاربردهای MIP-SPE دارند [۱۱، ۳۶ و ۳۷]. پلیمریزاسیون رسوبی، بعنوان تکنیکی که در آن از سورفکتانت ها و پایدارکننده ها استفاده نمی شود، برای ساخت پلیمرهای حک شده مولکولی بصورت ذرات کروی تکی (جدا از هم) (یا دانه ای) در دامنه ابعاد زیر میکرومتر تا میکرومتر قابل استفاده است [۴۱-۳۸]. پلیمریزاسیون رسوبی، شامل پلیمریزاسیون رادیکال آزاد منومرهای عملکردی با مقادیر زیاد منومر ایجاد کننده پیوند عرضی در حضور حلال با مقادیر زیاد (بالتر از ۹۵ درصد حلال از نظر حجمی) می باشد. این شرایط به جدایی فازی و رسوب نمودن پلیمر تشکیل شده بصورت ذرات کروی هم شکل، از محلول منجر می گردد [۳۳ و ۴۲]. پلیمریزاسیون توده ای برای سنتز پلیمرهای حک شده مولکولی نیکوتین آمید بمنظور بررسی ویژگیهای پیوندی پلیمرهای بدست آمده [۴۳، ۴۴ و ۴۵]، رفتار جذب بعنوان جاذب در SPE [۱۱]، و ویژگیهای شناسایی در توسعه یک سنسور پیزوالکتریک [۴۶] مورد استفاده قرار گرفت.

سنتز و کاربرد پلیمرهای حک شده مولکولی کروی بر پایه نیکوتین آمید از طریق پلیمریزاسیون رسوبی بندرت گزارش شده است. Del Sole و همکاران [۱۰] پتانسیل انتقال دارو توسط پلیمرهای حک شده مولکولی کروی بر پایه نیکوتین آمید که با

6. Precipitation polymerization

نیز مقدار قالب یا نسبت قالب به منومر عملکردی بررسی گردید. در بررسی مذکور TRIM (با نسبت های مولی MAA: CL ۱:۴، ۱:۲، ۱:۱ و ۱:۳)، EGDMA (با نسبت های مولی MAA: CL ۱:۱، ۱:۲، ۱:۳، ۱:۴، ۱:۵ و ۱:۶) و قالب (NAM) (با نسبت های مولی MAA: NAM ۱:۱/۸، ۱:۳/۶، ۱:۴/۷) مورد آزمون قرار گرفت.

بعد از پلیمریزاسیون، ذرات پلیمر توسط عملیات سانتریفوژ جمع آوری شد و قالب ها با شستن توسط حجم های ۱۰ میلی لیتری محلول اتانول حاوی ۲۰ درصد اسید استیک ۱ مولار (V/V) خارج گشت تا زمانیکه هیچ قالبی در حلال شستشو در طول موج جذب ۲۶۲ نانومتر شناسایی نشد. نهایتاً، ذرات پلیمر توسط اتانول خالص شسته شدند و سپس در ۶۰ درجه سانتی گراد خشک شدند. پلیمرهای غیر حک شده (NIPs¹⁰) به شیوه مشابهی سنتز شدند با این تفاوت که قالبی در روند پلیمریزاسیون استفاده نشد.

۲-۳-۲- آزمایشات اتصال مجدد

بمنظور بررسی وابستگی اتصال (پیوند) ذرات کروی حک شده، ۲۰ میلی گرم پلیمر توزین و در یک میلی لیتر محلول ۱ mM نیکوتین آمید در استونیتریل به صورت سوسپانسیون درآمده، بمدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق تکان داده شد. سپس نمونه سانتریفوژ شد و محلول سرباره^{۱۱} با استفاده از فیلتر از جنس PTFE با مش ۰/۲ μm جدا گردید. غلظت نیکوتین آمید در سرباره (Q_{unbound}) با جذب در ۲۶۲ نانومتر تعیین شد. NAM پیوند شده به پلیمر (Q_{bound}) از تفاضل مقدار اولیه افزوده شده به مخلوط (Q_{initial}) و Q_{unbound} بدست آمد. در مطالعه ایزوترم، جذب مجدد دامنه غلظت های مختلف (۱-۱۸ mM) نیکوتین آمید در استونیتریل با استفاده از مدل های Langmuir، یا آنالیز شیب محدود کننده (Scatchard) و نیز Freundlich بررسی شد.

ظرفیت اتصال^{۱۲} (پیوند) (%B) براساس درصد قالب پیوند شده

(USA)Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ) خریداری شد. سایر مواد شیمیایی با درجه آنالیزی بدون هرگونه تصفیه استفاده شدند.

۲-۲- دستگاه ها

آنالیزهای مورفولوژیک ذرات کروی پلیمر بدست آمده با استفاده از اسکن میکروسکوپ الکترونی (SEM) برند Hitachi S4700 انجام پذیرفت. اندازه گیری های HPLC با استفاده از سیستم HPLC برند Knauer (آلمان) روی ستون (۲۵۰ × ۴/۶ mm²، Spherisorb C₁₈) مجهز به دتکتور Smartline 2600 UV-DAD انجام پذیرفت. کلیه داده های کروماتوگرافیک در طول موج ۲۶۲ نانومتر جمع آوری شد. عملیات سانتریفوژ نمونه ها با استفاده از سانتریفوژ برند Hettich MIKRO 20 (آلمان) انجام شد.

۲-۳-۳- سنتز پلیمر

۲-۳-۱- روش

پلیمرها با استفاده از روش پلیمریزاسیون رسوبی سنتز شدند [۳۸، ۴۸]. نیکوتین آمید (بعنوان قالب^{۱۰}) و MAA (منومر عملکردی) در حلال (بالتر از ۹۵ درصد حلال از نظر حجمی نسبت به بقیه اجزا) حل شدند. حلال های مورد استفاده جهت بررسی، استونیتریل، کلروفرم، متیل اتیل کتون (MEK) و هپتان/MEK با نسبت های ۵۰:۵۰ و ۳۰:۷۰ بود. سپس منومر ایجاد کننده پیوند عرضی^۸ (TRIM یا EGDMA) اضافه گردید. نهایتاً، LP (آغازگر^۹) تا غلظت نهایی ۲ درصد (وزنی/وزنی) کل وزن منومرها (عملکردی و ایجاد کننده پیوند عرضی) اضافه شد. فرآیند پلیمریزاسیون بمدت ۲۰ ساعت و در آون با دمای ۶۰ درجه سانتیگراد انجام شد. اثر نوع منومرهای ایجاد کننده پیوند عرضی (TRIM یا EGDMA)، نسبت منومر عملکردی به منومر ایجاد کننده پیوند عرضی (MAA: CL) و

10. Non imprinted polymers
11. Supernatant
12. Binding capacity

7. Template
8. Cross-linker (CL)
9. Initiator

۲-۳-۴- سیتیک اتصال مجدد و آزادسازی

برای بررسی سیتیک اتصال مجدد، پلیمر در محلول ۱ mM نیکوتین آمید در استونیتریل، پخش گردید. نمونه گیری در دامنه نقاط زمانی بین ۱ الی ۲۴۰ دقیقه و سپس در ۱۶ ساعت با برداشتن محلول واکنش انجام شد. در خصوص سیتیک آزادسازی، پلیمر در محلول ۱ mM نیکوتین آمید در استونیتریل، پخش گردید. پس از ۱۶ ساعت چرخش در دمای اتاق، نمونه سانتریفوژ شد و محلول سرباره خارج گردید. ۱ mL اتانول به پلت پلیمر اضافه شد، ورتکس گردید و تکان داده شد. نمونه گیری در بازه های زمانی ۰، ۲، ۵، ۱۰ و ۶۰ دقیقه انجام شد. نهایتاً غلظت نیکوتین آمید تعیین گردید.

۲-۳-۵- منحنی شکست (Breakthrough)

محلول آمیزه دو ویتامر (هرکدام ۵ ppm) در استونیتریل بعنوان بار تزریق^{۱۸} (ورودی) در استخراج توسط فاز جامد با ستون های MIP و NIP که بصورت خشک (۵۰ mg) از هر پلیمر بطور جداگانه پر شدند، استفاده شد. ابتدا ستون با استونیتریل (۲×۲ mL) مشروط شد. سپس محلول در چند مرحله به ستون تزریق شد. خروجی هر مرحله جمع آوری شد و باقیمانده های پیوند نشده به SPE توسط HPLC تعیین مقدار شد. تزریق ها در دو مرتبه (تکرار) انجام شد.

۲-۳-۶- بهینه سازی پروتکل استخراج توسط فاز جامد

برپایه پلیمرهای حک شده مولکولی

سه مرحله معمول در SPE شامل تزریق (ورودی)، شستشو^{۱۹} و شویش^{۲۰} بهینه سازی شدند. ۵۰ mg از پلیمرهای کروی MIP و NIP داخل کارتریج های خالی SPE بطور جداگانه بصورت خشک پر شدند. بمنظور بهینه نمودن فرآیند SPE با محلول های استاندارد، آمیزه (mL ۱) NAM و (هرکدام ۵ ppm) در استونیتریل، پس از مشروط نمودن با استونیتریل (۲×۲ mL) به ستون تزریق شد. پروتکل های SPE با اعمال نوع و حجم های

به یک گرم پلیمر بصورت زیر تعریف گردید:

$$\%B = (Q_{\text{bound}}/Q_{\text{initial}}) \times 100 \quad (1)$$

فاکتور حک شدن^{۱۳} (IF) یا اختصاصیت^{۱۴} بصورت نسبت ظرفیت اتصال MIP نسبت به NIP بیان می گردد:

$$IF = \%B_{\text{MIP}} / \%B_{\text{NIP}} \quad (2)$$

برای ارزیابی ایزوترم اتصال، مدل خطی Freundlich بکار گرفته شد. این مدل بصورت زیر میباشد (معادله ۳):

$$\text{Log } B = m \text{ log } F + \text{log } a \quad (3)$$

که در آن B ($\mu\text{mol/g polymer}$) و F (mM) به ترتیب غلظت قالب متصل شده و آزاد می باشند؛ m شاخص ناهمگنی^{۱۵} با مقادیر بین ۰ تا ۱ میباشد. ناهمگنی با افزایش m کاهش می یابد.

با استفاده از پارامترهای اتصال معادله Freundlich، منحنی توزیع تمایل^{۱۶} (معادله ۴) قابل حصول است:

$$N = 2.303 a \times m (1 - m^2) K^{-m} \quad (4)$$

می توان فرض نمود که K معادل 1/F می باشد. بنابراین، K_{min} و K_{max} به ترتیب معادل 1/F_{max} و 1/F_{min} می باشد. دو پارامتر اتصال دیگر قابل محاسبه می باشد؛ تعداد سایت های ظاهری ($\mu\text{mol g}^{-1}$, $N_{K_{\text{min}}-K_{\text{max}}}$) و وزن میانگین ثابت اتصال ظاهری (تمایل) ($K_{K_{\text{min}}-K_{\text{max}}}$) (mM⁻¹).

۲-۳-۳- بررسی انتخابگری^{۱۷}

انتخابگری (ε) پلیمرهای حک شده به نیکوتین آمید در مقایسه با نیکوتینیک اسید، بطور مستقل (مجزا) و با مخلوط ۱:۱ و ۲:۱ غلظتی نیکوتین آمید: نیکوتینیک اسید محاسبه گردید.

انتخابگری بصورت زیر محاسبه گردید:

(۵)

$$\varepsilon = \% \text{Bound NAM MIP} / \% \text{Bound NA MIP}$$

13. Imprinting factor

14. Specificity

15. Heterogeneity index

16. Affinity distribution (AD) curve

17. Selectivity

18. Loading

19. Washing

20. Eluting

مقادیر حد آشکارسازی^{۲۲} (LOD) و حد اندازه گیری^{۲۳} (LOQ) براساس $(3S_{bl}/m)$ و $(10S_{bl}/m)$ محاسبه می شود که S_{bl} و m به ترتیب انحراف معیار اندازه گیری محلول کنترل (Blank) و شیب (Slope) معادله خطی منحنی کالیبراسیون مرتبط می باشد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- سنتز پلیمر

با بررسی اثر حلال بر مورفولوژی و ویژگیهای پلیمر، مشاهده گردید هنگامیکه مخلوط MEK:Hep (۵۰ : ۵۰ و ۷۰ : ۳۰) دارای δ_h (ظرفیت پیوند هیدروژنی) به ترتیب ۱/۵۳ و ۲/۵۵ بعنوان حلال بکار گرفته شد، ذرات کروی با ابعاد میکرو منفرد تشکیل شد (جدول ۱). ارزیابی حلال ها با قطبیت و ظرفیت پیوند هیدروژنی متفاوت نشان داد که ظرفیت پیوند هیدروژنی پایین، نقش مهمتری نسبت به قطبیت در ایجاد ذرات کروی با ابعاد میکرو دارد. کلروفرم با δ_p ای (قطبیت) در دامنه مناسب برای تشکیل ذرات کروی با ابعاد میکرو، لیکن با δ_h بالاتر، ژلی نامنظم با ابعاد ماکرو تولید نمود که با نتیجه پژوهش Mistry [۵۱] مطابقت دارد، لیکن مغایر گزارش Del Sole و همکاران [۱۰] بوده که در شرایط مشابه حلال، ایجاد ذرات کروی با ابعاد میکرو منفرد را گزارش نمودند. Goh & Stover [۴۸]، نقشه مورفولوژی پلیمر را بصورت تابعی از δ_p و δ_h ارایه کردند. مخلوط MEK:Hep (۷۰ : ۳۰)، که منجر به بالاترین ظرفیت اتصال و فاکتور حک شدن برای MIP شد، بعنوان حلال مناسب برای آزمایشات دیگر انتخاب گردید. با استفاده از حلال MEK:Hep (۷۰ : ۳۰)، ذرات کروی با ابعاد میکرو منفرد با قطر تقریبی در دامنه ۱ تا ۱/۵ میکرومتر (μm) تشکیل شد (شکل ۱).

متفاوت حلال برای شستشو و شویس ستون ها استفاده شد. همه فراکسیون های جمع آوری شده و باقیمانده ها به کمک HPLC اندازه گیری شد. کلیه آزمایشات در دو تکرار انجام پذیرفت. در فرآیند بهینه نمودن MISPE، بازیابی^{۲۱} (R) بصورت ذیل محاسبه گردید:

(۶)

$$R = 100 \times (\text{مقدار ویتامین در مرحله تزریق} / \text{مقدار ویتامین خروجی هر مرحله})$$

۲-۴- روش استخراج نیکوتین آمید از نمونه های غذایی

غذایی

نیکوتین آمید براساس روش Takatsuki و همکاران [۵۰] همراه با اصلاحاتی استخراج شد. بطور خلاصه آب مقطر به نمونه غذایی (آرد گندم یا گوشت گوساله چرخ شده) اضافه شد، و با بهم زدن در دمای اتاق (Spiking در سطوح غلظتی ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ ppm نیکوتین آمید برای گوشت گوساله و در سطوح غلظتی ۲۰، ۳۰، و ۴۰ ppm برای آرد گندم با افزودن مقدار مناسب محلول نیکوتین آمید، قبل از مرحله هموژن کردن انجام شد) هموژن گشت، و مراحل رقیق سازی، سانتریفوژ، صاف نمودن با کاغذ صافی و ترسیب پروتیین ها با استفاده از ۱ mL $Zn(SO_4)$ اشباع و ۱ mL سود ۱ نرمال انجام پذیرفت. نهایتاً فیلتراسیون توسط کاغذ صافی و سپس فیلتر PTFE با مش $0.22 \mu m$ ، انجام و آن گاه محلول در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد، نمونه ها به SPE تزریق شدند و پروتکل بهینه بکار برده شد. نهایتاً، محلول شویس از نمونه کنترل و نمونه Spike شده با استفاده از HPLC آنالیز شد. با هدف مقایسه، نمونه کنترل و نمونه Spike شده بدون مرحله تصفیه مستقیماً با HPLC آنالیز شدند. همه آزمایشات با دو تکرار انجام شد.

در مرحله استخراج، بازیابی بطریق زیر محاسبه شد:

$$R = 100 \times (\text{مقدار ویتامین تزریق شده} / \text{مقدار ویتامین شویس شده}) \quad (۷)$$

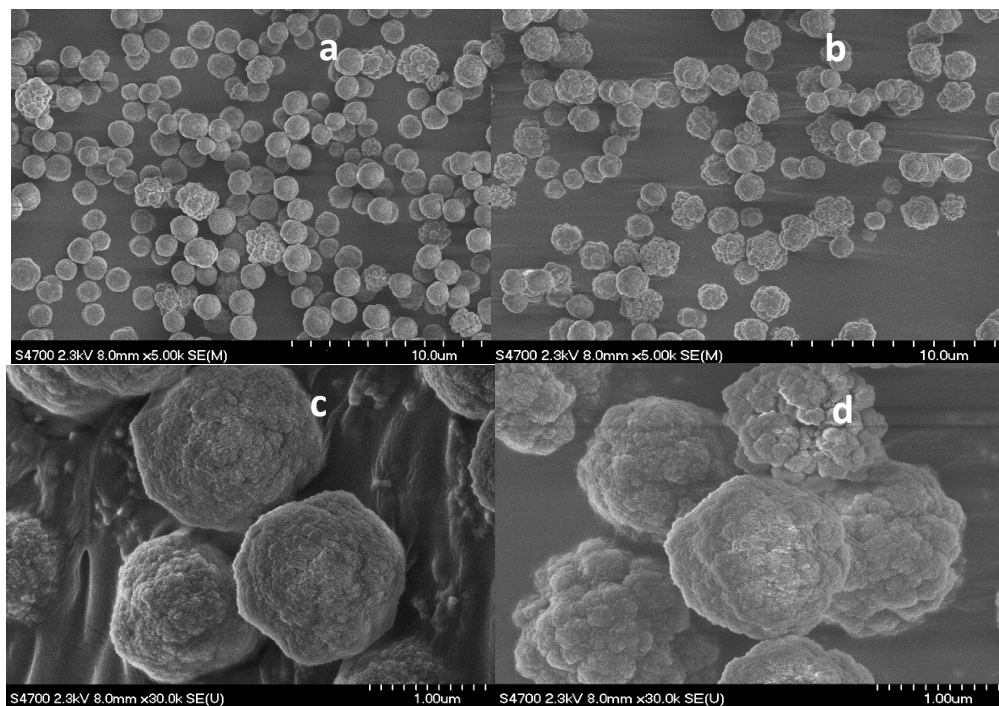
22. Limit of detection
23. Limit of quantification

21. Recovery

Table 1 Influence of solvent systems on polymer shape, binding capacity, and imprinting factor.

Solvent	Polar Hansen parameter δ_p (MPa ^{1/2})	Hydrogen-bonding Hansen parameter δ_h (MPa ^{1/2})	Binding Capacity (mg/g polymer)		Imprinting factor	Morphology NIP/MIP
			NIP	MIP		
Acetonitrile	18	6.1	-	-	-	Aggregate
Chloroform	3.1	5.7	-	-	-	Irregular macrogel
MEK	9.0	5.1	0.98±0.10 (9.7%)	0.85 ^x ±0.09 (11.1%)	0.86 ^x	Aggregate
MEK/Hep 50:50	4.5	2.55	0.87±0.04 (4.4%)	1.24 ^y ±0.07 (5.3%)	1.43 ^y	Microspheres
MEK/Hep 30:70	2.7	1.53	1.05±0.09 (8.8%)	2.08 ^z ±0.05 (2.5%)	1.98 ^z	Microspheres

^a From Polymer Handbook [52]. Within each column, different superscripts indicate significantly different values ($P < 0.01$). Values are the means of three replicates \pm standard deviation.

**Fig 1** Scanning electron micrographs of NIP (a, c) and MIP (b, d).

داد، ذرات کروی با ابعاد میکرو منفرد در همه نسبت های، MAA:EGDMA، مورد ارزیابی، مشاهده شد (جدول ۲). همچنین ظرفیت اتصال بطور معنی داری با تغییر نسبت MAA:EGDMA از ۱:۱ تا ۱:۶ کاهش یافت. این موضوع می تواند بعلاوه کاهش دسترسی مولکولهای NAM به سایت های اتصال در پلیمرهای حاوی مقادیر زیاد منومرهای ایجاد کننده پیوند عرضی باشد [۱۰].

نتایج حاصل از بررسی اثر نوع منومرهای ایجاد کننده پیوند عرضی بر مورفولوژی و ویژگیهای پلیمر، نشان داد، MIP هایی که با EGDMA ساخته شدند، ذرات کروی با ابعاد میکرو منفرد مشابه هم بودند درحالیکه TRIM ژل های نامنظم میکرو تولید نمود. بنابراین، EGDMA بعنوان منومر ایجاد کننده پیوند عرضی برای سایر آزمایشات انتخاب شد.

همچنین در بررسی اثر نسبت منومر عملکردی به منومر ایجاد کننده پیوند عرضی بر مورفولوژی و ویژگیهای پلیمر، نتایج نشان

Table 2 Influence of monomer:cross-linker (MAA:EGDMA) ratio. ^a

MAA:EGDMA ratio	Binding Capacity (mg/g polymer)		Imprinting factor
	NIP	MIP	
1:1	3.00 ± 0.08 (2.6%)	4.13 ^c ± 0.04 (0.9%)	1.38 ^c
1:2	1.75 ± 0.06 (3.3%)	3.00 ^b ± 0.10 (3.4%)	1.72 ^b
1:3	1.24 ± 0.06 (5.0%)	2.14 ^a ± 0.08 (3.8%)	1.73 ^b
1:4	1.05 ± 0.09 (8.8%)	2.08 ^a ± 0.05 (2.5%)	1.98 ^a
1:5	0.73 ± 0.02 (2.1%)	1.36 ^c ± 0.01 (1.0%)	1.87 ^{ab}
1:6	0.58 ± 0.04 (7.4%)	1.10 ^d ± 0.09 (8.3%)	1.88 ^{ab}

^a Within each column, different superscripts indicate significantly different values ($P < 0.01$).

Values are the means of three replicates ± standard deviation.

همکاران [۱۰]، ظرفیت اتصال پیوند بیشتر (و اختصاصیت مشابه) نسبت به پلیمر حاضر نشان داد، که این تفاوت می تواند مرتبط با حلال کمتر قطبی کلروفرم استفاده شده در آزمایش اتصال مجدد آن، نسبت به حلال قطبی تر استونیتریل بکار گرفته در مطالعه جاری باشد. دلیل آن ایجاد پیوند ضعیف تر میان نیکوتین آمید و پلیمر در حلال استونیتریل با توجه به برهم کنش بیشتر این حلال (قطبی تر از کلروفرم) با ویتامین می باشد [۴۱]. از آنجاییکه حلال کلروفرم موجب خوردگی لوله های پلی پروپیلن معمول مورد استفاده می گردد، بلحاظ عملیاتی قابلیت کاربرد ایمن چه در آزمایش اتصال مجدد و نیز بکارگیری در مرحله استخراج نمونه با ستون فاز جامد را ندارد.

در عین حال، در نسبت های پایین MAA:EGDMA، ۱:۱، پلیمر اختصاصیت کمی به اتصال نیکوتین آمید بعلت اتصال از طریق پیوند هیدروژنی تصادفی در ساختار متخلخل، علاوه بر سایت های اتصال اختصاصی نشان داد. پلیمر سنتز شده با استفاده از MAA:EGDMA، ۱:۴، بیشترین اختصاصیت را داشت و این نسبت برای کارهای بعدی انتخاب شد. مقایسه ویژگیهای پلیمر تحقیق حاضر با پلیمر تولید شده در شرایط مشابه لیکن تولید شده با روش پلیمریزاسیون توده ای [۴۴]، نشان از برتری این روش سنتز از لحاظ ظرفیت اتصال پیوند (۲ تا ۳ برابر) در عین برابری تقریبی فاکتور اختصاصیت دارد. هرچند پلیمر تولید شده به روش پلیمریزاسیون رسوبی در پژوهش Del Sole و

Table 3 Influence of template:functional monomer (NAM:MAA) ratio. ^a

NAM:MAA ratio	Binding Capacity (mg/g polymer)		Imprinting Factor
	NIP	MIP	
1:14.7	0.88 ± 0.03 (3.3%)	1.2 ^c ± 0.04 (3.2%)	1.38 ^c
1:3.6	1.05 ± 0.09 (8.8%)	2.08 ^b ± 0.05 (2.5%)	1.98 ^b
1:1.8	0.96 ± 0.07 (6.7%)	2.23 ^a ± 0.04 (1.6%)	2.32 ^a

^a Within each column, different superscripts indicate significantly different values ($P < 0.01$).

Values are the means of three replicates ± standard deviation.

را نمود، و برای بررسی های بعدی با استفاده از آنالیز ایزوترم پیوندی، انتخابگری و مطالعات سینتیک انتخاب گردید.

۲-۳- ایزوترم اتصال پیوند

اتصال NAM در غلظت های مختلف بمنظور مطالعه ویژگی پیوندها در پلیمرهای MIP و NIP مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). مدل خطی Freundlich بعنوان مدلی با بهترین برازش داده های تجربی انتخاب گردید که نمایانگر وجود سایت های پیوندی ناهمگن در MIP میباشد، که در غالب پلیمر ها معمول است [۵۴].

نهایتا در بررسی اثر افزایش غلظت NAM حین آماده سازی پلیمر، نتایج نشان از اثر مثبت بر ظرفیت اتصال و اختصاصیت داشت (جدول ۳). نسبت NAM:MAA، ۱:۱/۸، معادل ۱۲/۸ میلی مولار NAM، حد حلالیت NAM در سیستم حلال بود. Spivak [۵۳] اشاره نمود که افزایش غلظت قالب درحالیکه نسبت منومر عملکردی به منومر ایجاد کننده پیوند عرضی ثابت نگه داشته شود، کمپلکس پیش-پلیمر را بیشینه می نماید تا جایکه کل منومر عملکردی با قالب کمپلکس شود. هر کمپلکس در محلول پیش-پلیمر، بالقوه به سایت اتصال منجر می گردد. نسبت NAM:MAA، ۱:۱/۸، ایجاد بالاترین فاکتور حک شدن

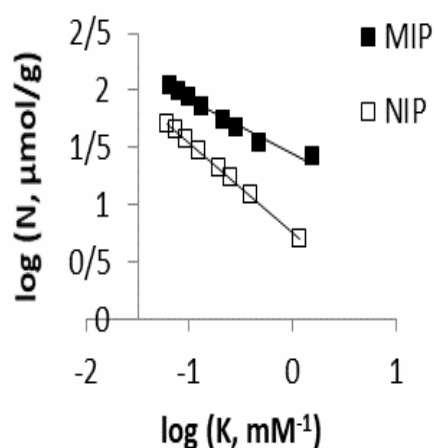


Fig 4 Affinity distribution curve of optimized MIP and its corresponding NIP

جذب NAM توسط MIP با توجه به مدل Freundlich $(R^2 = 0.99)$ ، حایز مقدار متعادل m ، مبین حضور سایت های ناهمگن می باشد (شکل ۳، جدول ۴). NIP میزان ناهمگنی کمتری نسبت به MIP متناظرش نشان داد که در سایر پژوهش ها بصورت مشابهی آمده است [۵۶ و ۵۵] منحنی توزیع تمایل (شکل ۴) تعداد سایت های اتصال که حایز ثابت اتصال (تمایل) (K) هستند را نشان می دهد.

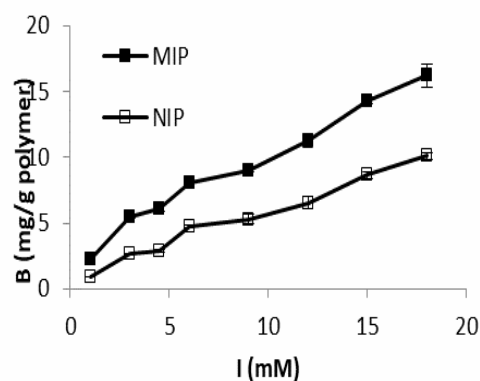


Fig 2 Binding isotherm of optimized NAM-imprinted polymer (MIP) and its corresponding non-imprinted polymer (NIP). Binding was carried out at 22 °C. Values and error bars are mean (\pm standard deviation) of three replicates.

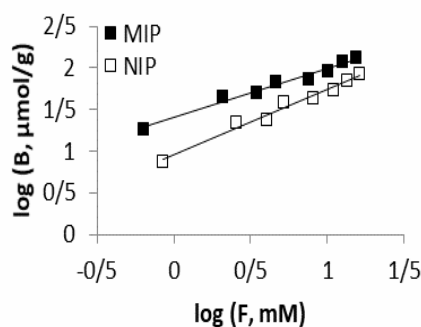


Fig 3 Freundlich binding isotherm of optimized MIP and its corresponding NIP (log-log format).

Table 4 The Freundlich isotherm model parameters (m and a), number of sites ($N_{K_{min}-K_{max}}$), and weighted average affinity ($K_{K_{min}-K_{max}}$) for NAM

Polymer type	m	$A[(\mu\text{mol g}^{-1})(\text{mM}^{-1})^m]$	$N_{K_{min}-K_{max}}(\mu\text{mol g}^{-1})$	$K_{K_{min}-K_{max}}(\text{mM}^{-1})$	R^2
MIP	0.59	25.25	69.48	0.30	0.98
NIP	0.79	8.93	26.76	0.23	0.98

۳-۳- ارزیابی انتخابگری

عامل بحرانی برای هر MIP انتخابگری می باشد، که بصورت نسبت ظرفیت اتصال برای قالب به ظرفیت اتصال برای آنالوگ آن تعریف می شود. اثر نیکوتینیک اسید، آنالوگ نیکوتین آمید که در مواد غذایی امکان حضور دارد، بر انتخابگری ارزیابی شد. MIP حایز ظرفیت اتصال (در بررسی جداگانه) برای NAM و NA به ترتیب با مقادیر ۲/۳۷ و ۰/۷۶ mg/g پلیمر و فاکتور حک شدن با مقادیر ۲/۳۱ و ۱/۹۵ بود. این اختلاف احتمالا بخاطر فقدان (کمی) پیوند هیدروژنی از طریق گروه آمین در

گزارش قبلی در خصوص مقادیر تعداد سایت های ظاهری و وزن میانگین ثابت اتصال ظاهری (تمایل) در خصوص ذرات کروی MIP NAM ساخته شده با روش پلیمریزاسیون رسوبی وجود ندارد. نتایج نشان داد، تعداد سایت های اتصال پیوند پژوهش حاضر ۸/۵ برابر سایت های اتصال ذرات پلیمری نامنظم MIP NAM ساخته شده به روش پلیمریزاسیون توده ای [۴۶] بوده که مبین برتری روش پلیمریزاسیون رسوبی در تحقیق حاضر می باشد.

این تحقیق سیستمک اتصال مجدد بسیار سریعتری نسبت به ذرات کروی نانو حک شده با اسید نالیدیکسیک که با تکنیک پلیمریزاسیون مشابهی با MAA و TRIM تولید شدند، نشان داد [۵۸]، که گزارش نمودند ۴۵ درصد کل اتصال مجدد بعد از نمونه گیری اولیه (۳۰ دقیقه) بدست آمد و به بیشینه ظرفیت اتصال در دقیقه ۱۲۰ رسید.

MIP نیکوتین آمید نیز سیستمک آزاد شدن سریعی نشان داد، بدین صورت که بخش غالب NAM متصل شده (۹۶/۵٪)، فوراً پس از افزودن نمونه ها به اتانل آزاد شدند (شکل ۶). در تحقیق Del Sole و همکاران [۱۰] سرعت آزاد شدن نیکوتین آمید از MIP تولید شده به روش پلیمریزاسیون رسوبی بررسی شد. در این پژوهش ۸۰ درصد نیکوتین آمید پس از ۳۰ دقیقه آزاد شد. که مبین سرعت آزاد شدن بسیار پایین تری نسبت مطالعه حاضر می باشد. سرعت آزاد شدن بسیار سریع، موجب می گردد، پلیمر حک شده نیکوتین آمید پژوهش حاضر، برای جداسازی های آنالیزی بسیار مناسب باشد.

۳-۵- مطالعه منحنی شکست (Breakthrough)

در این بخش، ظرفیت پلیمر، حجم تزریق مناسب، و غلظت در ستون SPE ارزیابی گردید. از آنجاییکه حجم ۱ میلی لیتر تزریق، اجازه جذب کامل نمونه تزریق شده را داد، بعنوان حجم بهینه تزریق انتخاب شد.

۳-۶- بهینه نمودن روش استخراج توسط فاز جامد

بمنظور حصول کارایی بیشینه جاذب سنتز شده در SPE برای استخراج NAM، عوامل موثر در هر مرحله بررسی گردید.

۳-۶-۱- مرحله تزریق

استونیتریل بعنوان یک حلال تزریق متداول انتخاب و نتایج نشان داد که حجم تزریق ۱ میلی لیتر محلول آمیزه دو ویتامر (هر کدام ۵ ppm) بعنوان شرایط تزریق بهینه قابل استفاده می باشد.

NA می باشد [۵۷]. جالب توجه تر اینکه، در مطالعات انتخابگری رقابتی که مخلوط NAM:NA، ۱:۱ و ۱:۲ ارزیابی شدند، ظرفیت اتصال NAM صرفاً بطور ناچیزی به ۲/۲ و ۲/۰۶ mg/g پلیمر، از مقدار ۲/۳۷ mg/g (در شرایط آزمون NAM به تنهایی) کاهش یافت. انتخابگری از مقدار ۳/۱ برای NAM و NA که بطور جداگانه ارزیابی شدند به ترتیب به ۲/۷ و ۱/۵ در شرایط بررسی در مخلوط های NAM:NA، ۱:۱ و ۱:۲، بعلت افزایش پیوند غیراختصاصی NA با پلیمر، کاهش یافت.

۳-۴- سیستمک

پلیمر حک شده NAM، سیستمک اتصال مجدد خیلی سریعی نشان داد. بخش غالب (۷۹٪) اتصال مجدد NAM، فوراً اتفاق افتاد با بیشینه اتصال در ۲۰ دقیقه و بدون تغییر در طی ۱۶ ساعت (شکل ۵).

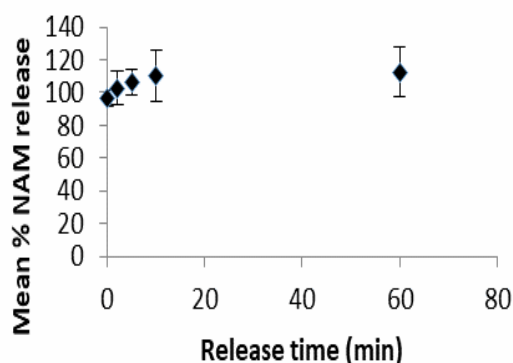


Fig 5 Time course of NAM (1 mM in acetonitrile) binding to MIP. Mean values (n = 2) with range bars are plotted.

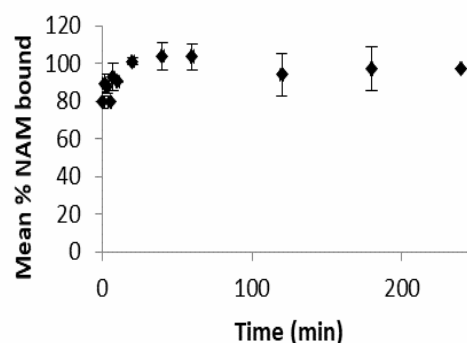


Fig 6 Mean %NAM release from MIP at different times. Mean values (n = 2) with range bars are plotted.

۳-۶-۲- مرحله شستشو

استونیتریل خالص بیشترین میزان پیوند اختصاصی بین نیکوتین آمید و MIP ها را حفظ نمود، درحالیکه اتصال های غیراختصاصی به حداقل رسید. بنابراین ۱ میلی لیتر استونیتریل بعنوان شرایط شستشو بهینه انتخاب شد.

بطور کلی شستشو بایستی آنالیت هایی با پیوندهایی غیراختصاصی با MIP را خارج نموده، لیکن آنالیت مورد نظر را حفظ نماید. با توجه به داده های جدول ۵، استفاده از ۱ میلی لیتر

Table 5 Conditions for optimization of SPE washing.

Wash type	Wash volume (mL)	Recovery in wash solvent (%) ^a			
		NIP-SPE		MIP-SPE	
		NA	NAM	NA	NAM
Acetonitrile + 5% MeOH	3	Not detected	96.1	Not detected	88.2
Acetonitrile + 3% MeOH	3	Not detected	71.4	Not detected	72.6
Acetonitrile + 1% MeOH	3	Not detected	60.1	Not detected	63.3
	3	Not detected	57.6	Not detected	46.8
Acetonitrile + 0.5% MeOH	2	Not detected	54.2	Not detected	32.4
	1	Not detected	52.8	Not detected	12.6
Acetonitrile	3	Not detected	55.7	Not detected	40.8
	1	Not detected	51.3	Not detected	4.9

^a Values are the means of two replicates.

Table 6 Conditions for optimization of SPE elution.

	Recovery (%) ^a			
	NIP-SPE		MIP-SPE	
	NA	NAM	NA	NAM
Elution 1st (1 mL MeOH)	88.14	40.08	99.60	82.75
Elution 2nd (1 mL MeOH)	12.10	4.58	Not detected	9.15

^a Values are the means of two replicates.

۳-۶-۳- مرحله شویش

حلال قطبی متانول (MeOH) در دو مرحله متوالی، با حجم های ۱ میلی لیتر به منظور شویش ویتامرها مورد استفاده قرار گرفت. ۲ میلی لیتر متانول قادر بود همه آنالیت ها را بشوید، این حجم بعنوان حلال شویش انتخاب گردید (جدول ۶). شکل ۷ مقادیر بازیابی هر مرحله را در MIP-SPE و NIP-SPE نشان می دهد.

۳-۷- کالیبراسیون روش

در این قسمت امکان جداسازی فرم آمیدی ویتامین از محلولهای استاندارد توسط SPE (در شرایط بهینه بدست آمده قبلی) در

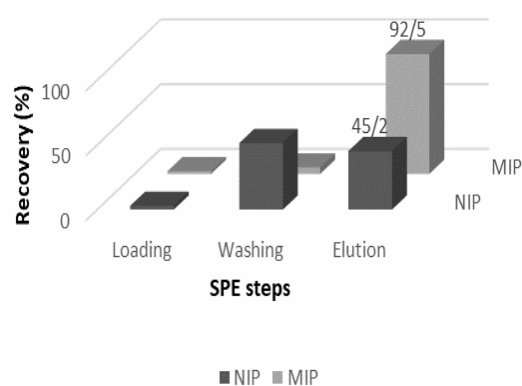


Fig 7 Recoveries (%) of each step of optimized NIP- and MIP-SPE for NAM (n = 2). Numbers on top of the columns are mean recoveries (%).

MIP-SPE-HPLC-UV حاضر را بعنوان شیوه ای سریع، ساده و قابل دسترس در مقایسه با غالب کارهای منتشر شده اخیر، نشان می دهد. عبارت دیگر حد اندازه گیری بهتر نسبت به گزارشاتی که از RP-HPLC^{۲۴} مشابه استفاده نمودند، می تواند ناشی از روش استخراج اختصاصی کارآمد تحقیق حاضر باشد که بر پایه ذرات پلیمری کروی حک شده می باشد. حد اندازه گیری روش حاضر در مقایسه با روش Wu و همکاران [۴۷] که در آن نیز از ذرات پلیمری کروی حک شده (تهیه شده به روش پلیمریزاسیون Swelling) استفاده شد، حدود ۶ برابر کوچک تر می باشد. اگرچه مقادیر بهتری تنها با روشهای آنالیز گران قیمت و خیلی پیچیده ای نظیر MS-MS-ESI قابل حصول بود. تکرارپذیری نتایج از طریق اندازه گیری های داخل-روزو بین-روز تکرارهای آزمایش های MIP-SPE مورد بررسی قرار گرفت و صحت خوب روش از طریق انحراف معیار استاندارد نسبی (RSD) بازیابی های مناسب جدول ۸ تایید شد.

قابلیت شیوه MIP-SPE برای حذف گونه های مزاحم شبکه، در شکل های ۸ و ۹ نمایش داده شده است. مقایسه کروماتوگرام های بدست آمده برای نمونه های تیمار شده با SPE و بدون تیمار با آن نشان می دهد که ساده تر بودن کروماتوگرام های نمونه تیمار شده با SPE، بعلاوه جذب انتخابی مولکول هدف NAM توسط MIP-SPE می باشد. علاوه بر آن در خصوص نمونه های آرد گندم، اثر ماتریس بقدری شدید بود که در کروماتوگرام نمونه تزریق مستقیم تیمار نشده با SPE، پیک NAM در زمان بازداری حدود ۷/۵ دقیقه بطور واضح قابل مشاهده نبود. درحالیکه، با بکار بردن MIP-SPE، گونه های مزاحم نمونه ها بطور موثری خارج گردید که موجب جداسازی پیک NAM گردید.

یک دامنه غلظتی مشخص (۰٫۲، ۱، ۲، ۴، ۵ ppm) برای MIP-SPE و (۰٫۴، ۱، ۲، ۴، ۵ ppm) برای NIP-SPE که براساس شرایط کاری مورد نیاز در آزمایشها انتخاب شدند، بررسی گردید. طبق نتایج، معادله های بدست آمده در دامنه کاری پژوهش، خطی بوده و حایز R^2 (۰/۹۹) مناسب می باشند. همچنین نتایج نشان داد بازیابی فرم آمیدی ویتامین در ستون حاوی پلیمرهای حک شده در دامنه ۸۸-۹۲ درصد و در ستون حاوی پلیمرهای کنترل در دامنه ۴۲-۴۵ درصد بوده است. لذا امکان جداسازی محلول های استاندارد فرم آمیدی با صحت مناسبی در دامنه خطی قابل انجام می باشد.

۳-۸- ارزیابی روش MIP-SPE-HPLC-UV

برای آنالیز نمونه های غذایی

از آخرین تحقیقات اندک در خصوص اندازه گیری نیکوتین آمید در مواد غذایی به کمک استخراج با پلیمرهای حک شده تولید شده به روش پلیمریزاسیون توده ای، پژوهش Del Sole و همکاران [۱۱] می باشد که علیرغم گزارش درصد بازیابی خوب (۸۷ درصد) در خصوص کبد حیوانی، فاقد سایر بررسی ها و اطلاعات در خصوص سطوح Spiking نمونه، کالیبراسیون روش و پارامترهای منتج، جهت مقایسه می باشد. در تحقیق حاضر، حد آشکارسازی (LOD)، حد اندازه گیری (LOQ)، درصد بازیابی (R%)، دامنه خطی (LR)، معادله خطی با ضریب همبستگی (R^2) بمنظور ارزیابی کارایی کاربردی پروتکل ارایه شده MIP-SPE برای اندازه گیری NAM محاسبه گردید. مقادیر بدست آمده در خصوص این پژوهش در مقایسه با چندین مطالعه منتشر شده قبلی در جدول ۷ آمده است. جدول مربوطه، پتانسیل کاربردی عالی روش ارایه شده

Table 7 Comparison of the current MIP-SPE-HPLC method with previously reported methods in the determination of NAM.

Method/ technique	Precision (RSD %)	Recovery (R%)	($\mu\text{g L}^{-1}$)LR ^a	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Sample(s)	Ref.
RRLC-MS/MS ^b	0.26–2.40	90.58–101.68	10–100	0.46	0.14	Plant root	[1]
Electrochemical	2.59–6.20	-	20–2000	32.30	9.72	Coffee	[25]
MEC/HPLC ^c	<6.00	96.72–102.12	-	1020	340	Food supplements	[59]
RP- HPLC	3.12	99.40	10000-200000	-	100	A Turkish cereal food	[60]
RP- HPLC	1.55-2.86	86.0-98.8	499-19960	900	300	Urine/serum	[47]
RP- ion pair-HPLC	1.9	107.20	2000–6000	1250.0	625.0	Multivitamin tablet	[61]
RP-HPLC	6.90–18.00	99.00	50–50,000	750	250	Honey	[62]
RP-HPLC	1.89-5.31	77.47-102.62	148.0-5000.0	148.0	44.0	Beef/Wheat flour	Our work

^a Linear Range

^b Rapid resolution liquid chromatography/tandem mass spectrometry

^c Micellar Electrokinetic Chromatography

Table 8 Precision values for the NAM MIP-SPE.

Sample	Spiked amount (ppm)	Intra-day (n=4)		Inter-day (n=4), 4 days, one run per day	
		Analyzed amount (ppm) (mean \pm SD)	RSD (%)	Analyzed amount (ppm) (mean \pm SD)	RSD (%)
Wheat flour	20	17.64 \pm 0.44	2.52	17.85 \pm 0.95	5.31
	30	26.10 \pm 0.75	2.89	26.47 \pm 0.56	2.13
	40	32.43 \pm 1.27	3.94	33.10 \pm 1.08	3.27
Beef	10	10.12 \pm 0.39	3.88	10.03 \pm 0.23	2.34
	20	18.61 \pm 0.77	4.12	18.10 \pm 0.38	2.12
	30	23.74 \pm 0.45	1.89	24.13 \pm 1.26	5.22

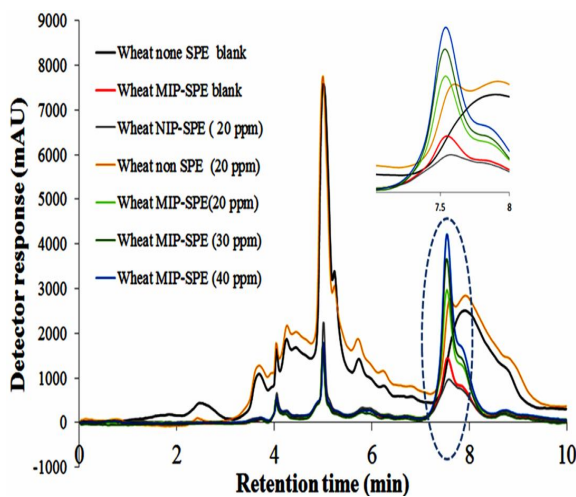


Fig 9 Chromatograms of direct injection and after MIP-SPE and NIP-SPE (eluting fraction) of control and spiked wheat flour samples.

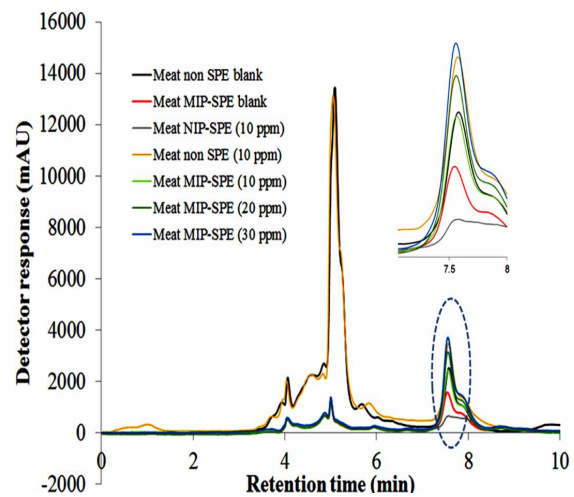


Fig 8 Chromatograms of direct injection and after MIP-SPE and NIP-SPE (eluting fraction) of control and spiked beef samples.

۴- جمع بندی

در این مطالعه، شرایط مورد نیاز تولید پلیمر حک شده کروی شکل اختصاصی برای NAM با ویژگی‌هایی مناسب برای SPE بررسی گردید. MEK/Hep (۳۰:۷۰) حلال ایده آل تولید ذرات کروی با ابعاد میکرو منفرد (جدا از هم) بود که نشان دهنده اهمیت انتخاب حلال مناسب براساس قطبیت و قدرت پیوند هیدروژنی می باشد. MIP های تولید شده با استفاده از MAA:EGDMA (۱:۴) و NAM:MAA (۱:۱/۸)، بهترین خصوصیات پیوندی (ظرفیت اتصال و فاکتور حک شدن) را نشان دادند. MIP در رفتار پیوندی (اتصال) خود ناهمگونی نشان داد که با استفاده از معادله Freundlich مدل شد. از آنجاییکه هدف مطالعه ما ساختن پلیمر حک شده با NAM مناسب برای خالص سازی با SPE، بود، ایجاد سایت‌ها با تمایل بالا، علاوه بر سایت‌هایی با تمایل کم، سودمند می باشد. MIP در آزمون های منفرد و رقابتی با NA انتخابگری بالایی داشت، و سیستیک اتصال و جداسازی سریعی نشان داد. مقایسه ویژگی‌های پلیمر ساخته شده در تحقیق حاضر به روش پلیمریزاسیون رسوبی نشان از برتری آن نسبت به پلیمر مشابه ساخته شده به روش پلیمریزاسیون توده ای داشت. کاربرد ذرات کروی مایکرو MIP ساخته شده، در استخراج SPE، مناسب بودن آن را برای استخراجی عالی از نمونه های غذایی و تعیین مقدار آن توسط HPLC-UV را تایید نمود.

۵- سپاسگزاری

از آقایان Benny Chan, Bastien Ioan, دکتر علی آقایی و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری - پژوهشکده ژنتیک و زیست فن آوری طبرستان، برای کمک های فنی طی انجام این تحقیق سپاسگزاریم. این پروژه با بودجه پژوهش ویتامین توسط دانشکده سیستم های زمین و غذا دانشگاه بریتیش کلمبیا کانادا و نیز با بودجه پژوهش تحصیلات تکمیلی دانشگاه فردوسی مشهد توسط وزارت علوم، تحقیقات و فن آوری مورد حمایت مالی قرار گرفت.

۶- منابع

- [1] Tayade, A.B., Dhar, P., Kumar, J., Sharma, M., Chaurasia, O.P., Srivastava, R.B. (2013). Sequential determination of fat- and water-soluble vitamins in *Rhodiola imbricata* root from trans-Himalaya with rapid resolution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 789, 65–73.
- [2] Asfaram, A., Ghaedi, M., Aliphanpour, E., Agarwal, S., Gupta, V.K. (2016). Application of response surface methodology and dispersive liquid-liquid microextraction by microvolume spectrophotometry method for rapid determination of curcumin in water, wastewater, and food samples. *Food Anal. Methods*, 9, 1274–1283.
- [3] Santos, J., Mendiola, J.A., Oliveira, M.B.P.P., Ibáñez, E., Herrero, M. (2012). Sequential determination of fat- and water-soluble vitamins in green leafy vegetables during storage. *J. Chromatogr. A*, 1261, 179–188.
- [4] Rudenko, A.O., Kartsova, L.A. (2010). Determination of water-soluble vitamin B and vitamin C in combined feed, premixes, and biologically active supplements by reversed-phase HPLC. *J. Anal. Chem*, 65, 71–76.
- [5] Antakli, S., Sarkees, N., Sarraf, T. (2015). Determination of water-soluble vitamins B1, B2, B3, B6, B9, B12 and C on C18 column with particle size 3 μ m in some manufactured food products by HPLC with UV-DAD/FID detection. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 7, 219–224.
- [6] Zeeb, M., Ganjali, M.R., Norouzi, P. (2010). Dispersive liquid-liquid microextraction followed by spectrofluorimetry as a simple and accurate technique for determination of thiamine (vitamin B1). *Microchim. Acta*, 168, 317–324.
- [7] Chatzimichalakis, P.F., Samanidou, V.F., Verpoorte, R., Papadoyannis, I.N. (2004). Development of a validated HPLC method for the determination of B complex vitamins in pharmaceuticals and biological fluids after solid phase extraction. *J. Sep. Sci.*, 27, 1181–1188.
- [8] Kirkland, J.B. Niacin. in: Zemleni, J., Suttie, J.W., Gregory III, J.F., Stover, P.J.

- Evaluation of NAD⁺ Precursor Vitamins in Human Nutrition. *Annu. Rev. Nutr.*, 28, 115-130.
- [19] Hirayama, S. (1991). Determination of a small amount of niacin in foodstuffs by high-performance liquid chromatography. *J. of Chromatography*, 588, 171-175.
- [20] Valls, F., Sancho, M. T., Fernandez-Muino, M. A., Checa, M. A. (2000). Simultaneous Determination of Nicotinic Acid and Nicotinamide in Cooked Sausages. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 3392-3395.
- [21] Mohamed, A.M.I., Mohamed, H.A., Abdel-Latif, N.M., Mohamed, M.R. (2011). Spectrofluorimetric determination of some water-soluble vitamins. *J. AOAC Int.*, 94, 1758-1769.
- [22] Lefebvre, P., Agadir, A., Comic, M., Gourmel, B., Hue, B., Dreux, C., Degos, L., Chomienne, C. (1995). Simultaneous determination of all-trans and 13-cis retinoic acids and their 4-oxo metabolites by adsorption liquid chromatography after solidphase extraction. *J. Chrom. B.*, 666 55-61.
- [23] El-Gindy, A., El-Yazby, F., Mostafa, A., Maher, M.M. (2004). HPLC and chemometric methods for the simultaneous determination of cyproheptadine hydrochloride, multivitamins, and sorbic acid. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35, 703-713.
- [24] Chamkouri, N. (2014). SPE-HPLC-UV for simultaneous determination of vitamins B group concentrations in Suaeda vermiculata. *Tech. J. Eng. Appl. Sci.*, 4, 439-443.
- [25] Santos, J.R., Rangel, A.O. (2015). Development of a chromatographic low pressure flow injection system using amperometric detection: application to the analysis of niacin in coffee. *Food Chem.*, 187, 152-158.
- [26] Han, S., Wu, K. (2015). Determination of Nicotinamide in Food and Human Fluid Samples by Capillary Electrophoresis Chemiluminescence. *J. of the C. Chemical Society*, 62, 73-78.
- [27] Delgado-Zamarreño, M.M., González-Maza, I., Sánchez-Pérez, A., Carabias-Martinez, R. (2002). Separation and simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble vitamins by electrokinetic (Eds.). (2014). Handbook of Vitamins. Boca Raton. CRC Press. 149-189.
- [9] Eitenmiller, R.R., Ye, L., Landen Jr., W.O. (2008). Niacin. in: Vitamin analysis for the health and food sciences. Boca Raton. CRC Press. 361-400.
- [10] Del Sole, R., Lazzoi, M.R., Vasapollo, G. (2010). Synthesis of nicotinamide-based molecularly imprinted microspheres and in vitro controlled release studies. *Drug Deliv.*, 17, 130-137.
- [11] R. Del Sole, A. Scardino, M.R. Lazzoi, G. Vasapollo, Molecularly imprinted polymer for solid phase extraction of nicotinamide in pork liver samples, *J Appl.Polymer Sci.* 120 (2011) 1634-1641.
- [12] Maksimovic', J.P., Kolar-Anic', L.Z., Anic', S.R., Ribic', D.D., Pejic', N.D. (2011). Quantitative determination of some water-soluble B vitamins by kinetic analytical Method based on the perturbation of an oscillatory reaction. *J. Braz. Chem. Soc.*, 22, 38-48.
- [13] Muszalska, I., Kiaszewicz, K., Kson', D., Sobczak, A. (2013). Determination of nicotinamide (vitamin B₃) in cosmetic products using differential spectrophotometry and liquid chromatography (HPLC). *J. Anal. Chem.*, 68, 1007-1013.
- [14] Xiao, X., Hou, Y., Du, J., Sun, D., Bai, G., Luo, G. (2012). Determination of vitamins B₂, B₃, B₆ and B₇ in corn steep liquor by NIR and PLSR. *Trans. Tianjin Univ.*, 18, 372-377.
- [15] Kotkar, R. M., Srivastava, A. K. (2008). Electrochemical behavior of nicotinamide using carbon paste electrode modified with macrocyclic compounds. *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.*, 60, 271-279.
- [16] Maiese, K., Chong, Z. Z., Hou, J., Shang, Y. C. (2009). The Vitamin Nicotinamide: Translating Nutrition into Clinical Care. *Molecules*, 14, 3446-3485.
- [17] Hamano, T., Mitsuhashi, Y., Aoki, N., Yamamoto, S. (1988). Simultaneous determination of niacin and niacinamide in meats by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography*, 457, 403-408.
- [18] Bogan, K. L., Brenner, C. (2008). Nicotinic Acid, Nicotinamide, and Nicotinamide Riboside: A Molecular

- poly(divinylbenzenemicrospheres). *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. 31, 3257-3263.
- [39] Ye, L., Cormack, P.A.G., Mosbach, K. (1999). Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay. *Anal. Commun.*, 36, 35-38.
- [40] Wang, J., Cormack, P.A.G., Sherrington, D.C., Khoshdel, E. (2003). Monodisperse, molecularly imprinted polymer microspheres prepared by precipitation polymerization for affinity separation applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 42, 5336-5338.
- [41] Del Sole, R., Lazzoi, M.R., Arnone, M., Sala, F.D., Cannoletta, D., Vasapollo, G. (2009). Experimental and computational studies on non-covalent imprinted microspheres as recognition system for nicotinamide molecules. *Molecules*. 14, 2632-2649.
- [42] Ye, L., Mosbach, K. (2001). Molecularly imprinted microspheres as antibody binding mimics. *React. Funct. Polym.*, 48, 149-157.
- [43] Fu, Q., Zheng, N., Li, Y.Z., Chang, W.B., Wang, Z.M. (2001). Molecularly imprinted polymers from nicotinamide and its positional isomers. *J. Molec. Recog.*, 14, 151-156.
- [44] Mookda, P., Singha, K., Weeranuch, K., Chatchai, T. (2008). Synthesis of nicotinamide imprinted polymers and their binding performances in organic and aqueous media. *e-Polymers*. 91, 1-9.
- [45] Wu, L., Zhu, K., Zhao, M., Li, Y. (2005). Theoretical and experimental study of nicotinamide molecularly imprinted polymers with different porogens. *Analytica Chimica Acta*. 549, 39-44.
- [46] Zhang, Z., Li, H., Liao, H., Nie, L., Yao, S. (2005). Influences of cross-linkers' amount on the performance of the piezoelectric sensor modified with molecularly imprinted polymers. *Sensors and Actuators B*, 105, 176-182.
- [47] Wu, D., Li, L., Zhu, Y., Li, Z., Zhu, Q. (2017). Preconcentration of Nicotinamide Using Molecularly Imprinted Microspheres for Solid-Phase Extraction with Determination by High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical letters*. 50, 16.
- [48] Goh, E.C.C., Stover, H.D.H. (2002). Cross-linked Poly(methacrylic acid-co-poly(ethylene capillary chromatography. *J Chromatogr A*, 953, 257-262.
- [28] Shabangi, M., Sutton, J.A. (2005). Separation of thiamin and its phosphate esters by capillary zone electrophoresis and its application to the analysis of water-soluble vitamins. *J Pharm Biomed Anal.*, 38, 66-71.
- [29] Sallum, L. F., Soares, F. L. F., Ardila, J. A., Carneiro, R. L. (2014). Optimization of SERS scattering by Ag-NPs-coated filter paper for quantification of nicotinamide in a cosmetic formulation. *Talanta*, 118, 353-358.
- [30] Lang, R., Yagar, E. F., Eggers, R., Hofmann, T. (2008). Quantitative investigation of trigonelline, nicotinic acid, and nicotinamide in foods, urine, and plasma by means of LC-MS/MS and stable isotope dilution analysis. *J. Agr. Food. Chem.*, 56, 11114-21.
- [31] Poole, C. F. (2003). New trends in solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry*. 22, 362-373.
- [32] Turiel, E., Marthin-Esteban, A. (2010). Molecularly imprinted polymers for sample preparation: A review. *Analytica Chimica Acta*. 668, 87-99.
- [33] Pichon, V. (2007). Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1152, 41-53.
- [34] Ghaderi, M. S., Afshar, M.G., Soleimani, S. (2012). Synthesis of molecularly imprinted polymer as a sorbent for solid phase extraction of bovine albumin from whey, milk, urine and serum. *Microchemical Journal*. 100, 1-7.
- [35] Martin-Esteban, A. (2013). Molecularly-imprinted polymers as a versatile, highly selective tool in sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*. 45, 169-181.
- [36] Chen, J., Bai, L., Zhang, Y., Chen, N., Zhang, Y. (2012). Fabrication of atrazine molecularly imprinted polymer microsphere by two step seed swelling polymerization method. *J.Chin. Chem. Soc.*, 59, 1493-99.
- [37] Shi, Y., Peng, D., Shi, C., Zhang, X., Xie Y., Lu, B. (2011). Selective determination of trace 17 β -estradiol in dairy and meat samples by molecularly imprinted solid-phase extraction and HPLC. *Food Chemistry*. 126, 1916-1925.
- [38] Li, K., Stover, H.D.H. (1993). Synthesis of monodisperse

- [56] Rushton, G.T., Karns, C.L., Shimizu, K.D. (2005). A critical examination of the use of the Freundlich isotherm in characterizing molecularly imprinted polymers (MIPs). *Analytica Chimica Acta*. 528, 107-113.
- [57] Li, Z., Yang, G., Liu, S., Chen, Y. (2005). Adsorption isotherms on nicotinamide-imprinted polymer stationary phase. *J. Chromatogr. Sci.*, 43, 362-366.
- [58] Abouzarzadeh, A., Forouzani, M., Jahanshahi, M., Bahramifar, N. (2012). Synthesis and evaluation of uniformly sized nalidixic acid-imprinted nanospheres based on precipitation polymerization method for analytical and biochemical applications. *Journal of Molecular Recognition*. 25, 404-413.
- [59] da Silva, D.C., Visentainer, J.V., de Souza, N.E., Oliveira, C.C. (2013). Micellar electrokinetic chromatography method for determination of the ten watersoluble vitamins in food supplements. *Food Anal. Methods*. 6, 1592-1606.
- [60] Ekinci, R., Kadakal, Ç. (2005). Determination of seven water-soluble vitamins in Tarhana, traditional Turkish cereal food, by high performance liquid chromatography. *Acta Chromatogr.* 15, 289-297.
- [61] Amidžić, R., Brboric, J., Čudina, O., Vladimirov, S. (2005). RP-HPLC determination of vitamins B1, B3, B6, folic acid and B12 in multivitamin tablets. *J. Serb. Chem. Soc.*, 70, 1229-1235.
- [62] Ciulu, M., Solinas, S., Floris, I., Panzanelli, A., Pilo, M.I., Piu, P.C., Spano, N., Sanna, G. (2011). RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. *Talanta*, 83, 924-929.
- oxide) methyl ether methacrylate) Microspheres and microgels prepared by precipitation polymerization: A morphology study. *Macromolecules*, 35, 9983-9989.
- [49] Rampey, A.M., Umpleby, R.J., Rushton, G.T., Iseman, J.C., Shah, R.N., Shimizu, K.D. (2004). Characterization of the imprint effect and the influence of imprinting conditions on affinity, capacity, and heterogeneity in molecularly imprinted polymers using the Freundlich isotherm-affinity distribution analysis. *Anal. Chem.* 76, 1123-1133.
- [50] Takatsuki, K., Suzuki, S., Sato, M., Sakai, K., Ushizawa, I. (1987). Liquid chromatographic determination of free and added niacin and niacinamide in beef and pork. *J. Assoc. Of Anal. Chem.*, 70, 698-702.
- [51] Mistry, R. (2012). Nicotinamide analysis using molecularly imprinted polymers. MSc. Thesis, The University of British Columbia, Vancouver, Canada.
- [52] Brandrup, J., Immergut, E.H., Grulke, E.A. (1999). *Polymer Handbook*, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc.,
- [53] D.A. Spivak, Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1779-1794.
- [54] R.J. Umpleby, S.C. Baxter, Y. Chen, R.N. Shah, K.D. Shimizu, Characterization of molecularly imprinted polymers with the Langmuir – Freundlich isotherm, *Anal. Chem.* (2001) 4584-4591.
- [55] Valero-Navarro, A., Gomez-Romero, M., Fernandez, J.F., Cormack, P.A.G., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A. (2011). Synthesis of caffeic acid molecularly imprinted polymer microspheres and HPLC evaluation of their sorption properties. *Journal of Chromatography A.*, 1218, 7289-7296.



Fabrication and Characterization of Molecularly Imprinted Microspheres as Highly Effective Sorbent for Fast and Selective Solid Phase Extraction of Nicotinamide in Beef and Wheat Flour Samples

Riazi, A. ¹, Farhoosh, R. ^{2*}, Poorazrang, H. ³, Scaman, C. ⁴, Raftani Amiri, Z. ⁵, Sharif, A. ⁶

1. Ph.D candidate, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.
3. Retired Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.
4. Associate Professor, Food, Nutrition and Health Program, Faculty of Land and Food Systems, The University of British Columbia (UBC), 2205 East Mall, V6T 1Z4, Vancouver, BC, Canada.
5. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Mazandaran, Iran.
6. Retired assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received 2021/07/05
Accepted 2021/09/19

Keywords:

Precipitation polymerization,
Molecularly imprinted
microsphere,
Nicotinamide,
Solid phase extraction,
Food sample.

DOI: 10.52547/fsct.18.120.25

DOR: 20.1001.1.20088787.1400.18.120.22.4

*Corresponding Author E-Mail:
rfarhoosh@um.ac.ir

Vitamin B₃ (Nicotinamide) is involved in many vital reactions in the human body as the precursor of NAD and NADP. NAM deficiency can lead to pellagra thus foods are fortified with this vitamin. On the other hand, high intakes of NAM can cause some symptoms. Hence, a cheap, rapid, selective and sensitive determination of NAM concentration in foods is crucial. The present study propose a NAM analysis method for beef and wheat flour by employing a molecularly imprinted polymer based solid phase extraction clean-up coupled with HPLC-UV. Precipitating polymerization technique for fabrication of NAM molecularly imprinted microspheres was utilized. The effects of polymer ingredients including functional monomer, cross-linker monomers, template and solvent were investigated on binding characteristics. The binding behavior of the polymer well modeled through Freundlich equation and the polymer showed high selectivity of NAM over nicotinic acid (NA). In a kinetic study, 79% of NAM binding and 96.5% of NAM release occurred immediately. The NAM imprinted microspheres were packed into SPE for NAM extraction, food samples injected and the output analyzed with HPLC-UV. Good linearity was obtained for solid phase extraction of NAM in the range 148–5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($R^2 = 0.999$) and high extraction recoveries of 77–102% and 81–87% were obtained for NAM in beef and wheat flour samples, respectively. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for nicotinamide were 44 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 148 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The overall inter-day and intra-day relative standard deviations of 2.13% to 5.31% for wheat flour ($n=4$), and 1.89% to 5.22% for beef samples were obtained, demonstrating good precision of the proposed method in its application for real sample analysis.