



توسعه یک روش استخراج مبتنی بر حلال‌های یونی مغناطیسی برای اندازه‌گیری باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، اکسی‌تتراسایکلین و انروفلوکساسین در نمونه پنیر به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

جلیل خندقی^{۱*}، محمدرضا افشار مقدم^۳، صمد وجدی حکم‌آباد^۵

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران.

۲. گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

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

۴. مرکز آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

۵. گروه علوم دامی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ‌های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۲۷

کلمات کلیدی:

باقیمانده آنتی‌بیوتیک،

پنیر،

حلال یونی مغناطیسی،

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.

آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان بیماری‌های عفونی در حیوانات و همچنین به عنوان محرک‌های رشد در پرورش دام استفاده می‌شوند. بنابراین بخصوص در موارد استفاده بیش از حد از آنها، مقادیر باقیمانده آنها می‌تواند در مواد غذایی با منشاء حیوانی مانند محصولات لبنی وجود داشته باشد. از آنجائیکه مصرف مواد غذایی حاوی باقیمانده آنتی‌بیوتیک بر سلامتی انسان تأثیر منفی می‌گذارد لذا سازمان‌های نظارتی مانند اتحادیه اروپا حداکثر مجاز باقیمانده (MRLs) برای آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی با منشاء دامی تعیین کرده‌اند. هدف این تحقیق ارائه یک روش میکرواستخراج مبتنی بر حلال‌های یونی مغناطیسی برای پیش‌تخلیظ و آماده‌سازی باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، اکسی‌تتراسایکلین و انروفلوکساسین در پنیر و اندازه‌گیری آن‌ها به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به شناساگر آرایه دیودی بوده است. برای این منظور اثر پارامترهای مختلف موثر در کارایی استخراج بررسی و بهینه‌سازی شده و همچنین اثر ماتریکس پنیر در استخراج آنالیت‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تحقیق نشان داد که مقادیر باقیمانده اکسی‌تتراسایکلین و تتراسایکلین به ترتیب در ۴ و ۵ نمونه از پنیرهای آزمایش شده بیش از حد مجاز تعیین شده بود. باقیمانده انروفلوکساسین نیز در هیچ‌یک از نمونه‌ها یافت نشد. از مزایای روش استخراج پیشنهادی می‌توان به قدرت جداسازی بالا و امکان آنالیز مخلوط آنالیت‌ها با حساسیت بالا اشاره کرد به‌طوری‌که تحت شرایط بهینه، درصد بازیافت آنالیت‌ها ۸۰-۹۱ و حدود تشخیص و اندازه‌گیری به ترتیب کمتر از ۱/۸ و ۶ نانوگرم در گرم و بسیار کمتر از حد مجاز تعیین شده برای آنتی‌بیوتیک‌های هدف در پنیر (۱۰۰ نانوگرم در گرم) بود.

DOI: 10.22034/FSCT.20.139.79

DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.139.5.9

* مسئول مکاتبات:

Samad.Vajdi@iausa.ac.ir

۱- مقدمه

بهداشت و ایمنی شیر و فراورده‌های آن به‌عنوان یکی از گروه‌های اصلی غذایی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. یکی از آلاینده‌های رایج شیر آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که گروه‌های مختلفی از آن‌ها در صنعت دامپروری مورد استفاده قرار می‌گیرند. تتراسایکلین‌ها و فلوروکینولون‌ها از جمله رایج‌ترین آنتی‌بیوتیک‌ها به شمار می‌روند [۱]. استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت پرورش دام جهت کنترل و درمان بیماری‌های عفونی و یا به منظور تحریک رشد حیوان، منجر به افزایش باقیمانده‌های این مواد در غذاهای با منشأ دامی مانند شیر و فراورده‌های آن‌ها و در نهایت راهیابی این باقیمانده‌ها به بدن انسان می‌شود [۲]. اثرات سوء باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در غذاها از قبیل ایجاد واکنشهای آلرژی، بروز مقاومتهای آنتی‌بیوتیکی، سمیت و سرطانی، امروزه به یک نگرانی مهم تبدیل شده است [۳].

بنابراین پایش باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در شیر ضروری به نظر می‌رسد و برای این منظور تاکنون روش‌های گوناگونی شامل آزمون‌های ایمونولوژیکی، میکروبیولوژیکی و تجزیه‌ای ارائه شده‌اند [۴]. درحالیکه روش‌های میکروبیولوژیکی مانند FPT^۱ و یا روش‌های ایمونولوژیکی مانند ELISA^۲ از حساسیت کمتری برخوردار می‌باشد، روش کروماتوگرافی مایع به همراه استفاده از تکنیک‌های استخراج مختلف، قابلیت شناسایی انواع آنتی‌بیوتیک‌ها با دقت و ویژگی بالا را دارند [۵].

در روش‌های تجزیه‌ای معمولاً امکان اندازه‌گیری مستقیم مقادیر بسیار کم ترکیبات مخصوصاً در نمونه‌های دارای بافت پیچیده وجود ندارد و لذا استفاده از مراحل آماده‌سازی

نمونه و تغلیظ آنالیت‌های موجود در آن قبل از آنالیز نمونه با سیستم‌های تجزیه‌ای ضروری است [۶]. به دلیل اینکه شیر دارای ماتریکسی پیچیده از چربی‌ها، پروتئین‌ها، مواد معدنی و لاکتوز است، معمولاً روش‌های به‌کار رفته برای استخراج و پیش‌تغلیظ ترکیبات گوناگون از شیر، پیچیده بوده و بر روی هم‌هی مراحل بعدی آنالیز تأثیرگذار است [۷].

استخراج مایع-مایع^۳ یا LLE یکی از روش‌های اصلی مورد استفاده برای آماده‌سازی و استخراج آنالیت‌های مختلف از مواد غذایی می‌باشد [۸]. بعدها روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی بر پایه‌ی کاهش حجم حلال استخراج‌کننده، خودکار کردن و ساده‌تر شدن فرآیند استخراج معرفی و برای آنالیت‌های متعددی در مواد غذایی گوناگون بسیار مورد استفاده قرارگرفت [۹، ۱۰]. امروزه جایگزینی حلال‌های شیمیایی با حداقل آلاینده‌ی محیط زیست مانند حلال‌های اتکتیک عمیق با حلال‌های خطرناک شیمیایی مانند ترکیبات هالوژن‌دار بسیار مورد توجه است [۱۱].

هدف این مطالعه، تلفیق روش‌های استخراج مایع-مایع با روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی مبتنی بر حلال‌های یونی مغناطیسی در استخراج و پیش‌تغلیظ باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین و انروفلوکساسین از نمونه‌های پنیر و اندازه‌گیری آن‌ها با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به شناساگر آرایه دیودی^۴ بود.

۲- روش کار

۲-۱ نمونه برداری و مواد شیمیایی

آزمون‌های تحقیق حاضر بر روی تعداد ۳۰ نمونه پنیر خریداری شده به‌صورت تصادفی از محل‌های عرضه در شهر تبریز و در مرکز تحقیقات ایمنی غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شدند. در ادامه ۵۰ گرم از هر

3 -Liquid liquid extraction

4 -High Performance Liquid Chromatography-diode array detector

1 -Four plate test

2 -Enzyme-linked immunosorbent assay

نمونه خرد و یکنواخت شده و پس از خروج آب پنیر، مقدار ۲ گرم از آن جهت آنالیز مورد استفاده قرار گرفت. یک نمونه پنیر پس از اطمینان از عاری بودن از آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه با استفاده از کیت الایزا (BT combo test kit)، به عنوان نمونه بلانک در فرایند بهینه سازی مورد استفاده قرار گرفت. محلول مادر از آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین و انروفلوکساسین (Sigma-Aldrich, USA) به غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر در متانول تهیه شدند. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از شرکت Merck آلمان و با درجه خلوص تجزیه ای بوده است.

۲-۲ بهینه سازی شرایط استخراج

به منظور دستیابی به روش استخراج با کارایی بالا، اثر عوامل موثر در مرحله اول استخراج شامل نوع حلال استخراج کننده (از بین حلال‌های استونیتریل، متانول و استون)، مقدار حلال انتخاب شده (از بین مقادیر ۱ تا ۲/۵ میلی لیتر)، قدرت یونی (با افزودن مقادیر ۱۵ تا ۳۰ درصد وزنی/ حجمی از نمک NaCl در حجم‌های ۰/۵ تا ۲ میلی لیتر)، زمان سونیکاسیون (در مدت زمان ۱ تا ۷ دقیقه) و همچنین عوامل موثر در مرحله میکرواستخراج مایع-مایع پخشی شامل نوع حلال شوینده اتکتیک عمیق مغناطیسی (از میان حلال‌های ۱-هگزیل ۳-متیل ایمیدازولیوم تتراکلرو فرات، ۱- بوتیل ۳-متیل ایمیدازولیوم تتراکلرو فرات و ۱- بوتیل ۳-متیل ایمیدازولیوم دی برومو دی کلرو فرات) و اثر نمک زنی (با بکارگیری غلظت‌های صفر تا ۱۰ درصد وزنی/ حجمی از NaCl) بر روی کارایی استخراج مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی این پارامترها 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 [۶].

۲-۳ روش استخراج

در این کار پژوهشی تلفیق روش استخراج فاز مایع و روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی بر پایه حلال‌های اتکتیک

عمیق مغناطیسی برای استخراج و پیش تغلیظ آنتی بیوتیک‌های تتراسایکلین، اکسی تتراسایکلین و انروفلوکساسین از نمونه پنیر توسعه داده شده است. برای این منظور ۲ گرم نمونه پنیر آماده سازی شده به داخل یک لوله آزمایش منتقل و بر روی آن یک میلی لیتر محلول سدیم کلرید (۲۵ درصد وزنی/ حجمی) و یک میلی لیتر متانول اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۴ دقیقه تحت امواج اولتراسونیک قرار گرفته و سپس این مخلوط سانتریفوژ شده و فاز رویی (متانول حاوی آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه) برداشته شده و با ۵۴ میکرو لیتر حلال یونی مغناطیسی ۱-هگزیل ۳-متیل ایمیدازولیوم تتراکلروفرات مخلوط شد. مخلوط حاصل با یک سرنگ شیشه ای به داخل محلول سدیم کلرید (۲/۵ درصد وزنی-حجمی) پخش و حلال پخش شده با یک آهنربا جمع آوری شده و پس از جدا کردن فاز رویی، جهت آنالیز با HPLC-DAD (Agilent 1200- DAD system, USA) مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۴ شرایط آنالیز با دستگاه کروماتوگرافی

به منظور دستیابی به کارایی بالا در سیستم کروماتوگرافی، جداسازی آنتی بیوتیک‌ها در شرایط بهینه صورت گرفت. شرایط بهینه دستگاه در جدول ۱ ذکر شده است.

Table 1: Optimized condition of the HPLC-DAD for analysis of the selected antibiotics in cheese samples

Column	Xbridge C18 column, L=5 cm, ID= 4.6 mm, Particle size= 3.5 μ m
Elution type	Gradient elution
Mobile phase	A mixture of deionized water containing 0.2% formic acid (A) and methanol: ACN (30:70, v/v) (B) was utilized as the mobile phase at a flow rate of 0.2 mL min ⁻¹ with the following gradient elution: 80% A and 20% B, a linear gradient from 20 to 80% B from 3.0 to 6.0 min, a linear gradient from 20 to 80% A from 6.0 to 8.0 min, and with 80% A and 20% B for 2 min
Injector	Temperature: 40 °C, Loop= 50 μ L
Detection wavelength	Monitoring of the analytes was done at 335 nm for tetracycline and oxytetracycline, and 280 nm for enrofloxacin

محاسبه و مقادیر غلظتی یافت شده به مقادیر اولیه آنالیت‌ها تقسیم و تیایج به صورت درصد بازده استخراج نسبی گزارش گردید [۱۳].

۳- نتایج و بحث

۱-۳ نتایج بهینه‌سازی عوامل موثر در مرحله اول استخراج

۱-۱-۳ نوع و حجم حلال استخراج کننده

یک حلال استخراج کننده ایده‌آل باید دارای ویژگی‌هایی ماند حلالیت پایین در آب برای تشکیل سیستم دوفازی با آب، رفتار کروماتوگرافیکی مطلوب، سازگاری با محیط زیست بوده و حتی الامکان ارزان قیمت باشد. با در نظر گرفتن این خواص، سه حلال استونیتریل، متانول و استون در این کار مورد مطالعه قرار گرفتند [۱۴].

حجم حلال استخراج کننده نقش مهمی در کارایی روش‌های استخراج دارد به طوریکه افزایش آن سبب افزایش حجم فاز جمع شده پس از استخراج شده و فاکتور تغلیظ و بنابراین سیگنال‌های تجزیه‌ای نیز کاهش خواهند یافت. از طرفی کاهش حجم حلال، کارایی استخراج و تکرارپذیری را کم

۲-۵ بررسی مشخصات تجزیه‌ای

به منظور اعتبارسنجی روش بکاررفته برای استخراج آنتی بیوتیک‌ها در این تحقیق، پس از ترسیم نمودار معیارگیری^۱، محدوده خطی روش^۲ (LR)، حد تشخیص^۳ (LOD)، حد اندازه‌گیری^۴ (LOQ)، تکرارپذیری^۵ (RSD)، راندمان استخراج^۶ (ER) و فاکتور تغلیظ^۷ (EF) محاسبه شدند (۱۲).

۲-۶ بررسی اثر بافت پنیر در استخراج

موادی از قبیل پروتئین‌ها و لیپیدهای موجود در پنیر می‌توانند در استخراج آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه تداخل ایجاد نماید لذا به منظور بررسی اثر بافت^۸ در نمونه‌های پنیر، دو گرم از نمونه‌های حقیقی با غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر نسبت به هر کدام از آنتی بیوتیک‌های مورد مطالعه آلوده شده و تحت شرایط پیشنهادی استخراج و با HPLC مورد آنالیز قرار گرفت. سپس مقادیر آنالیت‌ها پس از اجرای روش پیشنهادی با استفاده از منحنی کالیبراسیون

1 -Calibration curve

2 -Linear range

3 -Limit of detection

4 -Limit of quantitation

5 -Relative standard deviation

6 -Extraction recovery

7 -Enrichment factor

8 -Matrix

می‌کند لذا بهینه‌سازی حجم حلال‌های استخراج‌کننده ضروری است [۱۵].

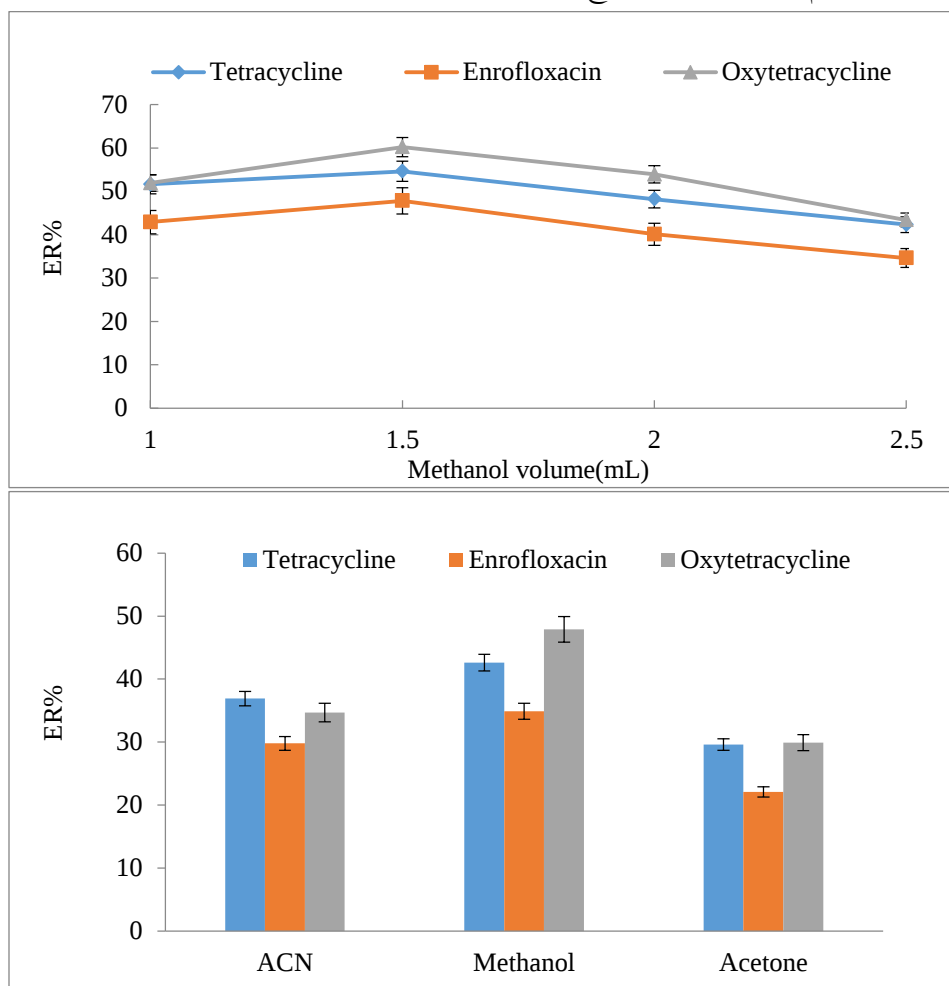


Fig1: Selection of extraction solvent type and volume in LLE step.

حلالیت آنالیت‌ها در فازآبی شده و در نتیجه راندمان استخراج را افزایش دهد، از سوی دیگر می‌تواند باعث افزایش ویسکوزیته فاز آبی و کاهش ضریب انتشار آنالیت در فازآبی شده و منجر به کاهش راندمان استخراج گردد [۱۶].

۳-۱-۲ قدرت یونی

بررسی تأثیر قدرت یونی در کارایی روش توسعه داده شده با افزودن مقادیر مختلفی از نمک سدیم کلرید به داخل فازآبی انجام شد. افزایش نمک به محلول‌های آبی در روش‌های استخراج اثر دوگانه دارد یعنی ضمن اینکه حضور نمک می‌تواند باعث افزایش نیروی یونی و کاهش

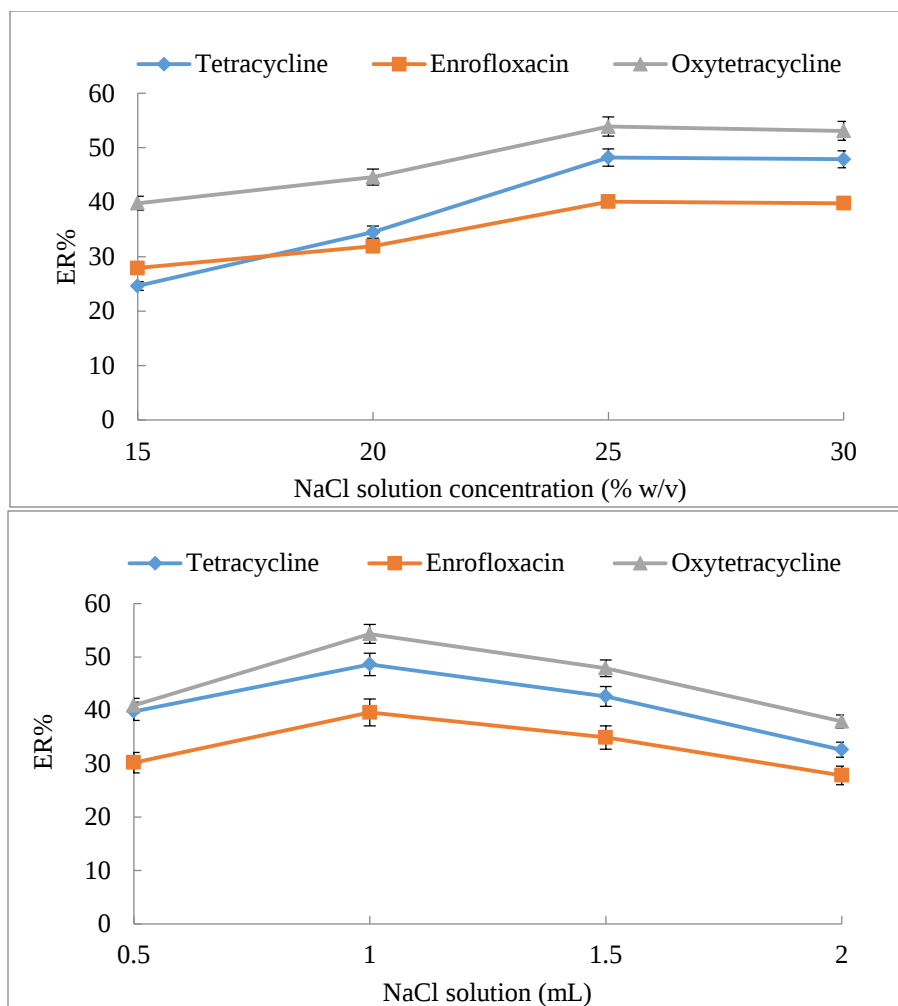


Fig2: Optimization of salt addition effect in LLE step.

با حلال استخراج‌کننده استفاده شده است. از این رو مدت زمان امواج اولتراسونیک در کارایی روش پیشنهادی موثر خواهد بود.

۳-۱-۳ مدت زمان سونیکاسیون

در روش حاضر از امواج اولتراسونیک به منظور افزایش انحلال کامل و افزایش سطح تماس آنالیت‌های مورد بررسی

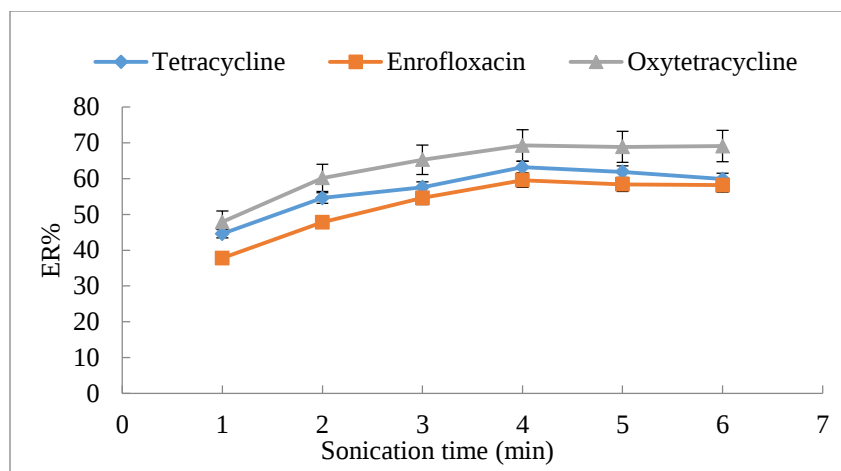


Fig3: Optimization of sonication time.

حجم حلال نیز پارامتر موثر در روش پیشنهادی می باشد چرا که با افزایش حجم، آنالیت ها رقیق بوده و فاکتور تغلیظ کم می شود [۱۰] لذا حجم حلال بایستی مورد بهینه سازی قرار گیرد. در این مطالعه حداقل حجم حلال اتکتیک که بتوان در پایان عملیات DLLME حجم ۱۰ میکرولیتر از آن را به سیستم کروماتوگرافی تزریق نمود (یعنی ۵۴ میکرولیتر) مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۳ نتایج بهینه سازی عوامل موثر در مرحله دوم استخراج

۲-۳-۱ نوع و حجم حلال استخراج کننده اتکتیک عمیق مغناطیسی

انتخاب نوع حلال استخراج کننده در مرحله DLLME یکی از پارامترهای مهم می باشد. حلال استخراج کننده باید قابلیت پخش در فاز آبی را داشته باشند تا بتوانند آنالیت را به خوبی استخراج و جذب کنند. همچنین در فاز آلی نیز حل شده و قابل تزریق به سیستم HPLC باشند [۱۷]. به علاوه باید بتوان این حلال ها را به نحوی جمع آوری نمود [۱۱]. در این کار پژوهشی حلال های یونی مغناطیسی (MILs) بر پایه حلال های اتکتیک عمیق (DES)^۲ برای این منظور انتخاب گردید که هم سمیت آن کم تر از حلال های دیگر است و کاربرد ویژه ای در شیمی سبز^۳ دارد [۱۸] و هم می توان جداسازی حلال و آنالیت محلول در آن را توسط یک آهنربا در پایان عملیات استخراج به راحتی انجام داد [۱۱].

1 -Magnetic ionic liquid solvent

2 -Deep eutectic solvent

3 -Green chemistry

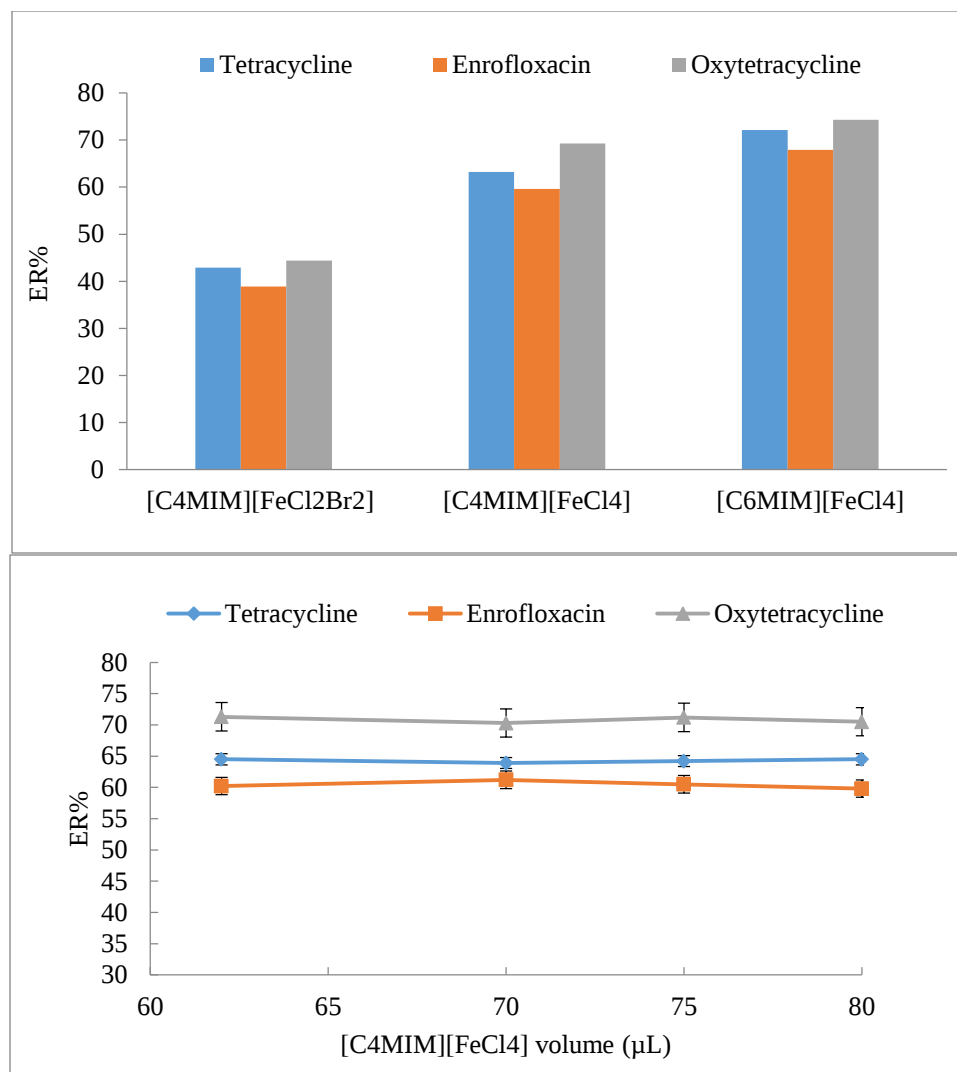


Fig4: Selection of elution solvent type and volume in DLLME step.

۲-۳-۲ اثر نمک زنی

غالب خواهد بود. در این مرحله از آزمایش راندمان استخراج با افزایش NaCl تا ۲/۵ درصد افزایش یافته و سپس ثابت ماند لذا در ادامه کار از افزودن ۲/۵ درصد کلرید سدیم برای استخراج بالاتر استفاده شد.

همانگونه که در بند ۳-۱-۲ توضیح داده شد، افزایش نمک به محلول‌های آبی دو اثر متقابل دارد و هرکدام از اثرات بر دیگری برتری داشته باشد در این صورت تأثیر آن عامل

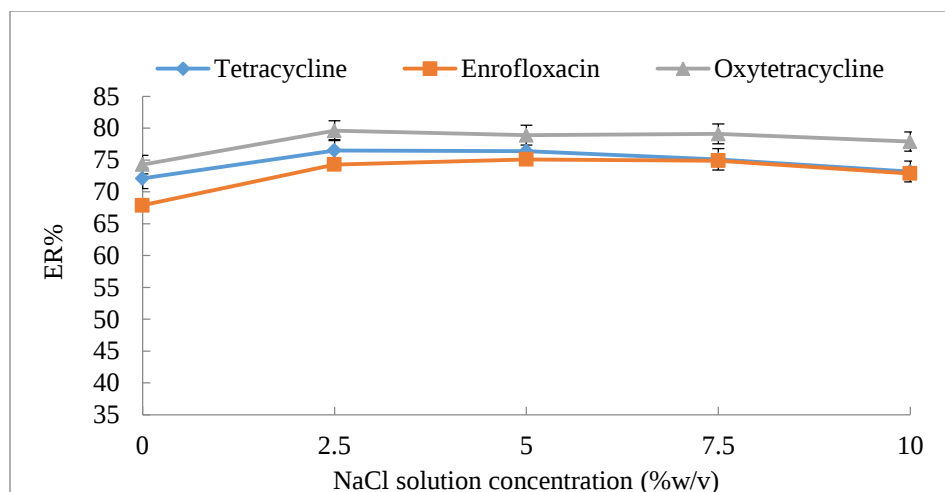


Fig5: Selection of ionic strength effect in DLLME step.

برابر با ۳ و ۱۰ می‌باشند در نظر گرفته شد. تکرارپذیری و دقت روش با محاسبه انحراف استاندارد نسبی (RSD %) تعیین گردید. فاکتور تغلیظ با استفاده از مقایسه مساحت زیر پیک آنالیت‌های محلول استاندارد و آنالیت‌های موجود در شیر پس اجرای روش پیشنهادی محاسبه گردید. نتایج حاصل از ارقام شایستگی روش در جدول ۲ ارائه شده است.

۲-۳ نتایج ویژگی‌های کمی روش توسعه یافته

پارامترهای تجزیه‌ای روش حاضر تحت شرایط بهینه بدست آمده و برای داده‌ها یک معادله رگرسیون (با استفاده از محلول‌های استاندارد با غلظت‌های مختلفی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه) ترسیم شد. محدوده خطی (برای هر یک از آنالیت‌ها) از منحنی کالیبراسیون بدست آمد. حد تشخیص و حد اندازه‌گیری روش برای غلظت‌هایی که در آن‌ها نسبت سیگنال به نویز به ترتیب

Table 2: Quantitative features of the developed method for the selected antibiotics

Analyte	LR ^a	LOD ^b	LOQ ^c	r ^{2d}	RSD% ^e	ER ± SD ^f	EF ± SD ^g	MRLs ^h
Tetracycline	6.0-500	1.8	6.0	0.996	4.9	72 ± 5	72 ± 5	100
Enrofloxacin	4.0-500	1.2	4.0	0.995	5.9	76 ± 4	76 ± 4	100
Oxytetracycline	2.3-500	0.7	2.3	0.999	8.3	79 ± 2	79 ± 2	100

a) Linear range (ng g⁻¹), b) Limit of detection (S/N = 3) (ng g⁻¹), c) Limit of quantification (S/N = 10) (ng g⁻¹), d) Coefficient of determination, e) Relative standard deviation (n = 6), f) Extraction recovery ± standard deviation (n = 3), g) Enrichment factor ± standard deviation (n = 3), h) Maximum residue limits set by the European Committee

نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می‌شود ارقام شایستگی روش حاضر قابل مقایسه و یا حتی بهتر از روش‌های اشاره شده است.

در جدول ۳ مقایسه برخی پارامترهای تجزیه‌ای روش توسعه داده شده از قبیل محدوده حد تشخیص، حد اندازه‌گیری، تکرارپذیری و راندمان استخراج آنالیت‌ها، با چند روش به‌کار رفته برای استخراج تتراسایکلین‌ها از نمونه‌های لبنی

Table 3: Comparison of the developed method with other methods in the extraction of drug residues in dairy products by HPLC.

Method	Sample	LOD ^a (ng g ⁻¹)	LOQ ^b (ng g ⁻¹)	RSD ^c (%)	ER ^d (%)	Reference
A	Cheese	10-200	50-600	≤7	≥69	[19]
B	Milk	1.5-8.5	5.1-28.4	≤8.4	≥70	[20]
C	Milk	4.53-9.06	-	≤10.12	≥51.3	[21]
D	Milk	17.2-21	51.5-63.7	≤6.2	≥86	[22]
E	Cheese	07-1.8	2.3-6.0	≤8.3	≥72	This study

A) QuEChERS method coupled with HPLC-DAD, B) DLLME based on hydrophobic deep eutectic solvents coupled with HPLC-UV, C) Ionic Liquid Assisted DLLME coupled with HPLC-DAD, D) Liquid extraction method coupled with HPLC-DAD, E) Deep eutectic solvent-based DLLME method coupled with HPLC-DAD.

a) Limit of detection. b) Limit of quantification. c) Relative standard deviation. d) Extraction recovery.

مربوط به تزریق مستقیم استاندارد آنتی‌بیوتیک‌های مورد

مطالعه (هر کدام به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)،

نمونه شیر اسپایک شده با غلظت ۵۰ نانوگرم در گرم و

یک نمونه‌ی شیر اسپایک نشده را نشان می‌دهد.

۳-۳ نتایج آنالیز نمونه‌های حقیقی

تعداد ۳۰ نمونه پنیر طبق شرایط بهینه با روش

پیشنهادی تغلیظ و تخلیص شدند و سپس با HPLC-

DAD مورد آنالیز قرار گرفتند. شکل ۳ کروماتوگرام‌های

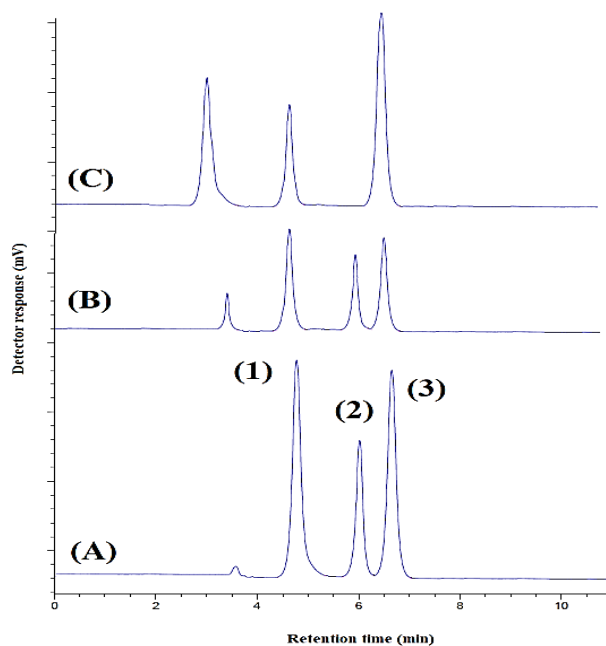


Fig 3: Typical HPLC-DAD chromatograms of direct injection of standard solution of the target analytes (A), spiked milk (B) and unspiked milk sample (C) after performing the developed method. Peak identification: (1) Tetracycline, (2) Enrofloxacin, (3) Oxytetracycline.

شده است. به‌منظور اندازه‌گیری غلظت آنالیت‌ها از

روش افزایش استاندارد استفاده شد.

مقایسه کروماتوگرام‌های حاصل از نمونه‌ها با

کروماتوگرام حاصل از نمونه استاندارد وجود برخی از

آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان داد که در جدول ۳ به آن اشاره

Table 3: Residual amounts of target antibiotics in cheese samples

sample	OXT	ENRO	TET	sample	OXT	ENRO	TET
Cheese # 1	ND	ND	13 ± 0.5	Cheese # 16	119 ± 4	ND	15 ± 0.6
Cheese # 2	ND	ND	7 ± 0.13	Cheese # 17	ND	ND	ND
Cheese # 3	126 ± 5	ND	45 ± 2	Cheese # 18	ND	ND	ND
Cheese # 4	ND	ND	116 ± 11	Cheese # 19	ND	ND	ND
Cheese # 5	ND	ND	ND	Cheese # 20	ND	ND	17 ± 0.3
Cheese # 6	ND	ND	ND	Cheese # 21	ND	ND	55 ± 1
Cheese # 7	ND	ND	ND	Cheese # 22	116 ± 5	ND	116 ± 13
Cheese # 8	117 ± 12	ND	59 ± 3	Cheese # 23	97 ± 8	ND	52 ± 3
Cheese # 9	ND	ND	21 ± 0.5	Cheese # 24	ND	ND	31 ± 0.4
Cheese # 10	ND	ND	128 ± 2	Cheese # 25	ND	ND	118 ± 5
Cheese # 11	ND	ND	26 ± 0.1	Cheese # 26	ND	ND	26 ± 0.3
Cheese # 12	ND	ND	11 ± 0.09	Cheese # 27	ND	ND	ND
Cheese # 13	ND	ND	119 ± 4	Cheese # 28	ND	ND	99 ± 5
Cheese # 14	ND	ND	26 ± 0.3	Cheese # 29	ND	ND	46 ± 0.7
Cheese # 15	ND	ND	ND	Cheese # 30	ND	ND	ND

OXT: Oxytetracycline, ENRO: Enrofloxacin, TET: Tetracycline, ND: not detected.

دیونیزه ارزیابی شد که نتایج نشان داد که بافت نمونه‌ها تأثیر

محسوسی در کارایی روش پیشنهادی ندارند.

۴-۳ نتایج بررسی اثر بافت نمونه‌های پنیر

تأثیر بافت در استخراج آنتی بیوتیک‌ها با مقایسه سیگنال‌های

تجزیه‌ای بدست آمده برای تعداد شش نمونه پنیر و آب

Table 4: Results of assays to check the cheese matrices effect for the selected antibiotics.

Mean relative recovery ± standard deviation (n = 3)						
Analyte	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
All samples were spiked with each analyte at a concentration of 10 ng g ⁻¹						
Tetracycline	94 ± 3	90 ± 5	96 ± 2	90 ± 1	98 ± 2	95 ± 4
Enrofloxacin	96 ± 5	95 ± 4	92 ± 2	91 ± 4	92 ± 5	89 ± 4
Oxytetracycline	93 ± 4	94 ± 3	92 ± 5	91 ± 2	99 ± 1	94 ± 4
All samples were spiked with each analyte at a concentration of 25 ng g ⁻¹						
Tetracycline	89 ± 4	95 ± 5	91 ± 4	90 ± 4	88 ± 2	87 ± 5
Enrofloxacin	92 ± 4	94 ± 3	95 ± 2	91 ± 2	99 ± 5	99 ± 1
Oxytetracycline	95 ± 2	94 ± 5	101 ± 3	99 ± 5	90 ± 4	97 ± 5

مطلوب روش ارائه شده مانند راندمان‌های استخراج بیش از

۷۲ درصد و حدود تشخیص در محدوده‌ی ۱/۸-۱/۷۰

نانوگرم در میلی‌لیتر و تکرارپذیری ایده‌ال، بر کارایی مناسب

روش حاضر در استخراج و آنالیز آنتی‌بیوتیک‌های هدف در

نمونه‌های پنیر تأکید دارد. به‌علاوه روش مذکور به‌طور

موفقیت‌آمیزی بر روی آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در

نمونه‌های پنیر انجام‌گرفت و آنالیز نمونه‌های حقیقی

نشان‌داد که مقادیر باقیمانده اکسی‌تراسایکلین و

۵-۳ نتیجه‌گیری کلی

در اجرای روش پیشنهادی در مطالعه حاضر از تلفیق دو

روش استخراج فاز مایع و میکرواستخراج مایع-مایع پخشی

بر پایه حلال‌های اتکتیک عمیق مغناطیسی برای استخراج

باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، اکسی‌تراسایکلین و

انروفلوکساسین از نمونه پنیر استفاده شد. از مزیت‌های

روش توسعه داده شده می‌توان به سادگی و زمان آنالیز

کوتاه و سبز بودن روش اشاره کرد. ویژگی‌های کمی

نویسندگان هیچگونه تعارض منافع ندارند.

تتراسایکلین به ترتیب در ۴ و ۵ نمونه از پنیرهای آزمایش شده بیش از حد مجاز تعیین شده بود. باقیمانده انروفلوکساسین نیز در هیچ یک از نمونه‌ها یافت نشد.

۵- منابع

۴- تعارض منافع

- [1] Landers, T.F., Cohen, B., Wittum, T.E. and Larson, E.L. 2012. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public health reports*, 127(1), 4-22.
- [2] Rasi, H., Afshar Mogaddam, M. and Khandaghi, J. 2021. Application of a new extraction method coupled to high performance liquid chromatography for tetracyclines monitoring in cow milk. *Journal of food science and technology (Iran)*, 8(113), 339-349. [In Persian]
- [3] Bacanlı, M. and Başaran, N. 2019. Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology*, 125:462-466.
- [4] Zarean Baniasadi, F., Ahmadi, M., Rokni, N., Golestan, L. and Shahidi, S.A. 2019. Evaluation of four common antibiotic classes in the muscle and liver of chickens slaughtered tehran by LC-MS/MS. *Veterinary Researches & Biological Products*, 32(3):55-63.
- [5] Ghasemi, R., Mirzaei, H., Afshar Mogaddam, M.R., Khandaghi, J. and Javadi, A. 2022. Application of magnetic ionic liquid-based air-assisted liquid-liquid microextraction followed by back-extraction optimized with centroid composite design for the extraction of antibiotics from milk samples prior to their determination by HPLC-DAD. *Microchemical Journal*, 181:107764.
- [6] 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.
- [7] 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*, 157:104988.
- [8] Amini, R., Khandaghi, J. and Afshar Mogaddam, M.R. 2018. Combination of vortex-assisted liquid-liquid extraction and air-assisted liquid-liquid microextraction for the extraction of bisphenol A and bisphenol B in canned doogh samples. *Food Analytical Methods*, 11(11):3267-3275.
- [9] Meshkini, K., Afshar Mogaddam, M. and Khandaghi, J. 2021. Development of Homogeneous Liquid-Liquid Extraction in Combination with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Deep Eutectic Solvents for the Extraction and Assessment of Phytosterols in Animal Cream Samples using Gas Chromatography Equipped with Flame Ionization Detector. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 16(2):57-67. [In Persian]
- [10] Rastpour, N., Khandaghi, J., Farajzadeh, M.A. and Afshar Mogaddam, M.A. 2022. 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*, 102(12):2778-2791.
- [11] Gholizadeh, S., Mirzaei, H., Khandaghi, J., Afshar Mogaddam, M.R. and Javadi, A. 2022. Ultrasound-assisted solvent extraction combined with magnetic ionic liquid based-dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of mycotoxins from tea samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 114:104831.
- [12] Chandran, S. and Singh, R. 2007. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62, 4-14.
- [13] <https://www.idbs.com/blog/2019/07/ich-m10-bioanalytical-method-validation-guideline-what-the-new-draft-means-for-bioanalysis>. Access date: 11/24/2022.

- [14] Jalili, V., Barkhordari, A. and Ghiasvand, A. 2020. New extraction media in microextraction techniques. A review of reviews. *Microchemical Journal*, 153:104386.
- [15] 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]
- [16] Farajzadeh, M.A., Afshar Mogaddam, M.R. and Alizadeh Nabil A.A. 2015. Polyol-enhanced dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography and nitrogen phosphorous detection for the determination of organophosphorus pesticides from aqueous samples, fruit juices, and vegetables. *Journal of separation science*, 38(23):4086-4094.
- [17] Khani, F., Khandaghi, J., Farajzadeh, M.A. and Afshar Mogaddam, M.R. 2021. Cold-induced Homogenous Liquid-Liquid Extraction Performed in a Refrigerated Centrifuge Combined with Deep Eutectic Solvent-based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Extraction of Some Endocrine Disrupting Compounds and Hydroxymethylfurfural from Honey Samples. *Food Analytical Methods*, 14(10):2063-2075.
- [18] Santos, L.B., Assis, R.S., Barreto, J.A., Bezerra, M.A., Novaes, C.G. and Lemos, V.A. 2022. Deep eutectic solvents in liquid-phase microextraction: Contribution to green chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 146:116478.
- [19] Amelin, V., Volkova, N., Timofeev, A. and Tret'yakov, A. 2015. QuEChERS sample preparation in the simultaneous determination of residual amounts of quinolones, sulfanilamides, and amphenicols in food using HPLC with a diode-array detector. *Journal of analytical chemistry*, 70(9):1076-84.
- [20] 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.
- [21] Antep, M., Kaynaker, M. and Merdivan, M. 2018. Determination of Tetracycline Residues After Ionic Liquid Assisted Dispersive Liquid Liquid Microextraction in Dairy Foods. *Journal of Science and Engineering*, 20(59):645-662.
- [22] Moudgil, P., Bedi, J.S., Aulakh, R.S., Gill, J.P.S. and Kumar, A. 2019. Validation of HPLC multi-residue method for determination of fluoroquinolones, tetracycline, sulphonamides and chloramphenicol residues in bovine milk. *Food Analytical Methods*, 12(2):338-346.



Scientific Research

Development of a magnetic ionic solvent based extraction method for determination of tetracycline, Oxytetracycline and Enrofloxacin residues in cheese sample by high performance liquid chromatography

Jalil Khandaghi^{1,2}, Mohammad Reza Afshar Mogaddam^{3,4} And Samad Vajdi Hokmabad^{5*}

1. Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.
2. Department of food Biotechnology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3. Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
4. Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
5. Department of Animal Science, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.

ABSTRACT

ARTICLE INFO

Antibiotics are used for treatment of infectious diseases in animals and also as growth promoters in animal husbandry. Therefore, especially in cases of excessive use, their residual amounts can be present in foods of animal origin such as dairy products. Since the consumption of food containing antibiotic residues has a negative effect on the human health, authorized organizations such as the European Union have set maximum residue limits (MRLs) for antibiotics in food of animal origin. This research aimed to present a deep eutectic solvent-based extraction procedure for preparation and preconcentration of tetracycline, oxytetracycline and enrofloxacin residues in cheese samples and their determination by high-performance liquid chromatography equipped with a diode array detector. For this purpose, the effect of various parameters on the extraction efficiency was investigated and optimized, and the effect of the cheese matrix on the extraction of analytes was also evaluated. The results showed that the residual amounts of oxytetracycline and tetracycline in 4 and 5 samples of the tested cheeses, respectively, were determined above the permissible limits. Enrofloxacin residue was not found in any of the samples. From the advantages of the proposed extraction method, we can point out the high separation power and the possibility of highly sensitive analyzing of mixed analytes, so that under optimized conditions, the recovery percentage ranges were 80-91 and the limits of detection and quantification were respectively less than 1.8 and 6 ng/g, which is much lower than MRLs set for target antibiotics in cheese (100 ng/g).

Article History:

Received: 2022/12/29

Accepted: 2023/6/17

Keywords:

Antibiotic residues,
Cheese,
Magnetic ionic solvent,
HPLC

DOI: 10.22034/FSCT.20.139.79

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.139.5.9

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