مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هشتم، شماره 4، زمستان 1392، صفحات 154-145

تعیین میزان پاتولین آب سیب با تکنیک ریزاستخراج مایع-مایع پخشی به همراه دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و بهینه‌سازی به کمک روش سطح پاسخ

مصطفی دلاور[1]، مرضیه کمانکش[2]، رویا توکلی[3]، عاطفه نوابی[4]، عبدالرضا محمدی[5]

1- استادیار دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران
2-دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده شیمی، دانشگاه الزهراء تهران، ایران
3- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده شیمی، دانشگاه پیام نور دلیجان، ایران
4- کارشناس آزمایشگاه کنترل غذا و نوشیدنی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، ایران
5- نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: ab.mohammadi@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: 92/8/15 تاریخ پذیرش: 92/11/7

چکیده

سابقه و هدف: پاتولین در سال 1970 توسط آژانس بین المللی تحقیقات سرطان به عنوان یک "ماده‌ی سرطان‌زای احتمالی برای انسان" طبقه بندی شد. براساس گزارشات کمیته‌ی مشترک متخصصان FAO/WHO (JECFA) بیشترین مقدار مجاز مصرف پاتولین در آب سیب 0/4 میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز اعلام شده است. در این مطالعه کارایی روش جهت تعیین میزان پاتولین در چند نمونه از آب سیب‌های موجود در مناطق مختلف شهر اراک بررسی شد.

مواد و روش‌ها: بهینه‌سازی متغیرهای مؤثر در استخراج پاتولین به کمک شیوه‌ی سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی انجام پذیرفت که شامل 30 آزمایش طراحی شده برای 4 متغیر در 5 سطح بود. به منظور معتبرسازی روش پیشنهادی ارقام شایستگی روش محاسبه گردید. مقدار پاتولین موجود در چند نمونه از آب سیب‌های تهیه شده از سوپرمارکت‌های مختلف شهر اراک با استفاده از روش IL-DLLME-HPLC تعیین گردید.

یافته‌ها: مقدار بهینه‌ی متغیرهای مؤثر بر کارایی روش پیشنهادی تعیین شد. ارقام شایستگی روش پیشنهادی از جمله حد تشخیص 0/15 نانوگرم بر گرم و انحراف استاندارد نسبی 7/5 درصد، قابل مقایسه و یا در مواردی بهتر از روش‌های دیگر می‌باشند. کارایی روش پیشنهادی در نمونه‌های حقیقی به خوبی اثبات گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج به دست آمده به خوبی ثابت کرد که تکنیک IL-DLLME-HPLC توانایی بسیار بالایی جهت تعیین مقادیر بسیار کم پاتولین در نمونه‌های آب سیب را دارا می‌باشد.

واژگان کلیدی: پاتولین، آب سیب، ریزاستخراج مایع-مایع پخشی، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، رویه سطح پاسخ

• مقدمه

سلامت جسم و روان افراد رابطه‌ی تنگاتنگی با نوع و کیفیت مواد مصرفی روزانه‌ی آن‌ها دارد. استفاده از میوه‌های با کیفیت پایین که دارای قسمت‌های کپک‌زده و فاسد شده هستند در تهیه‌ی آب‌میوه‌ها به دلیل ایجاد ترکیبات خطرزا همچون پاتولین سبب بروز ناراحتی‌هایی در بدن مصرف کننده می‌شوند. پاتولین مایکوتوکسینی است که به وسیله‌ی گونه‌های مختلف از کپک‌ها تولید می‌شود. اکثر این قارچ‌ها بر روی انواع میوه‌های فاسد شده به ویژه سیب، رشد می‌کنند. محققان بر این باورند که ورود بیش از حد از این ترکیب به بدن می‌تواند آثار سویی همچون خونریزی شش و ضایعات مویرگی و نیز آسیب به کبد، طحال و کلیه را سبب شود. همچنین ایجاد جهش و اثرات سوء بر جنین را می‌توان از

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-22]

دیگر عوارض این ترکیب ذکر کرد (2، 1). طبق قوانین کدکس و همچنین سازمان غذا و دارو (FDA) حداکثر غلظت مجاز پاتولین در آب میوه‌ها 50 میکروگرم بر لیتر اعلام شده است که این مقدار در سال 2003 در اروپا براساس قانون 1425، 25 میکروگرم بر لیتر کاهش یافت (3). تعیین میزان پاتولین درآب میوه به دلیل اثرات سویی که این ترکیب می‌تواند در پی داشته باشد، بسیار مهم و ضروری به نظر می‌رسد. از جمله روش‌های دستگاهی که بدین منظور مورد استفاده قرار گرفته است می‌توان به کروماتوگرافی لایه‌ی نازک (TLC) (6-4)، اسپکترومتری جرمی (7)، کولومتری (8)، کروماتوگرافی الکتریکی غشایی (MEKC) (9)، کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتری جرمی (GC-MS) (۱۱،۱۰)، کروماتوگرافی مایع-اسپکترومتری جرمی (LC-MS) (15-12) و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا همراه با آشکارساز فرابنفش (HPLC-UV) (19-16) اشاره نمود. از بین روش‌های ذکر شده، HPLC-UV در مقایسه با دیگر روش‌ها بیشتر مورد استفاده قرار گرفته است. با توجه به بافت جامد و پیچیده‌ی سیب و حضور کربوهیدرات‌های محلول و همچنین پروتئین‌ها در بافت آن، که مزاحمت‌های متعددی را در فرآیند تشخیص پاتولین توسط دستگاه تجزیه‌ای سبب می‌شوند، به کارگیری روش‌های استخراجی مناسب با هدف کم کردن اثر مزاحمت‌های بافت نمونه، ضروری به نظر می‌رسد. در اکثر آزمایشگاه‌ها از اتیل استات و سدیم کربنات جهت استخراج پاتولین از آب سیب استفاده می‌شود. مصرف زیاد حلال آلی، گزینش پذیری پایین، هزینه‌ی بالای روش و نیز طولانی بودن مراحل استخراج از جمله معایب این روش می‌باشند (20). همچنین روش استخراج فاز جامد (Solid phase extraction) نیز در گزارشات متعددی جهت تعیین پاتولین از آب سیب استفاده شده است (23-21). امروزه استفاده از روش‌های ریزاستخراج به منظور استخراج و پیش تغلیظ مناسب آنالیت‌ها از بافت‌های مختلف، توجه محققین را به خود جلب کرده است. از جمله روش‌های ریزاستخراجی که جهت شناسایی پاتولین از آب سیب مورد استفاده قرار گرفته است می‌توان به روش ریزاستخراج فاز جامد (Solid phase microextraction) اشاره کرد (24). روش ریزاستخراج مایع-مایع پخشی (DLLME) روش استخراجی جدید دیگری است که در سال 2006 توسط اسدی و همکارانش ابداع شد (25). این روش بر پایه‌ی سیستم سه فازی محلول نمونه، حلال استخراجی و حلال پخشی در استخراج گونه‌ی مورد هدف بنا نهاده شده است. از مزیت‌های روش ریزاستخراج مایع-مایع پخشی می‌توان به سادگی، سرعت بسیار زیاد، راندمان بالای استخراج، قابلیت اجرای روش در نمونه‌های مختلف، تکرارپذیری بالای روش و... اشاره کرد. اخیراً در چندین تحقیق از مایعات یونی (Ionic liquid) به عنوان حلال استخراج کننده و جایگزینی برای حلال‌های خطرناک هالوژن‌دار در روش ریزاستخراج استفاده شده است (26). بازیابی و فاکتور تغلیظ بالای روش و همچنین غیرسمی بودن مایعات یونی (شیمی سبز) از مزایای استفاده از این ترکیبات به عنوان فاز استخراجی در تکنیک ریزاستخراج مایع-مایع پخشی است.

در این تحقیق، روش ساده، سریع و حساس ریزاستخراج مایع-مایع پخشی بر پایه‌ی حلال یونی به همراه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا جهت تعیین میزان پاتولین موجود در آب سیب، ابداع و معتبر شد. پارامترهای مؤثر بر ریزاستخراج پاتولین انتخاب و به روش سطح پاسخ با استفاده از طرح مرکب مرکزی بهینه‌سازی شدند. استفاده از روش پیشنهادی، منجر به دستیابی فاکتور تغلیظ بالا و حد تشخیص‌های بسیار عالی در تعیین میزان پاتولین موجود در انواع نمونه‌های آب سیب گردید.

• مواد و روش‌ها

نمونه‌ها: آب سیب‌های مختلف از مناطق مختلف شهر اراک خریداری و به آزمایشگاه منتقل و تا زمان آنالیز در دمای 4°C نگهداری شدند. آنالیز همه نمونه‌ها دو بار تکرار شد.

مواد شیمیایی و استانداردها: پاتولین با خلوص بیش از 99 درصد از شرکت سیگما (Sigma, Steinheim, Germany) خریداری شد و محلول استاندارد آن در غلظت 1500 میلی‌گرم در لیتر از حل کردن 15 میلی‌گرم پاتولین در 10 میلی‌لیتر آب اسیدی (PH=4) تهیه شد. متانول و آب مقطر HPLC-grade از شرکت مرک (Merk, Darmstadt, Germany) فراهم شدند. دیگر مواد شیمیایی با خلوص بالاتر از 99 درصد شامل استیک اسید، سدیم هیدروکسید، سدیم کلرید، پتاسیم هگزا فروسیانید و استات روی، همگی از شرکت مرک خریداری شدند. سه مایع یونی 1-هگزیل 3-متیل ایمیدازولیوم هگزا فلورو فسفات، 1-بوتیل 3-متیل ایمیدازولیوم هگزا فلورو فسفات و 1-اکتیل 3-متیل ایمیدازولیوم هگزا فلورو فسفات از شرکت Acros Organics آمریکا تهیه گردید. مقدار 10/6 گرم از پتاسیم

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-22]

هگزافروسیانید (معرفی شده به عنوان محلول کارز 1) در بالن ژوژه‌ی 100 میلی‌لیتری ریخته شد و با آب مقطر دو بار تقطیر به حجم رسانده شد. محلول کارز 2 نیز از حل کردن 22 گرم استات روی و 32 میلی‌لیتر استیک اسید در بالن ژوژه‌ی 100 میلی‌لیتری و به حجم رساندن آن با آب مقطر تهیه گردید. همه مواد شیمیایی و استانداردها در دمای یخچال نگهداری شدند.

طراحی آزمایش و بهینه‌سازی عوامل مؤثر در روش استخراجی IL-DLLME-HPLC به کمک رویه سطح پاسخ: بهینه‌سازی متغیرهای مورد نظر شامل حجم حلال استخراجی در گستره‌ی 120-40 میکرولیتر، حجم حلال پخشی در محدوده‌ی 1000-300 میکرولیتر، مقدار نمک (کلرید سدیم) از 0 تا 30 درصد و pH در گستره‌ی 10-3، به کمک رویه سطح پاسخ (Response surface methodology) و با استفاده از طرح مرکب مرکزی (Central composite design) انجام گرفت. جدول 1 این داده‌ها را به نمایش می‌گذارد. پس از انتخاب سطوح مختلف برای هر کدام از پارامترها، برنامه‌ی Design expert v. 8.0.5 جهت طراحی تعداد آزمایش‌های مورد نیاز به کار گرفته شد و در نهایت مجموع 30 آزمایش توسط برنامه‌ی مذکور آماده گردید که 6 نقطه‌ی مرکزی را شامل می‌شود. آزمایش‌ها با تعداد تکرار 2 بار انجام گرفت و در نهایت نیز سطح زیر پیک پاتولین به عنوان پاسخ نهایی گزارش شد. داده های مربوط به اندازه‌گیری پاتولین با استفاده از نرم افزار Excell تجزیه و تحلیل شدند.

جدول 1. متغیرها و سطوح آن‌ها در طرح مختلط مرکزی

متغیر		سطوح متغیر				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
X_1	pH	3	4/75	6/5	8/25	10
X_2	حجم حلال استخراجی (میکرولیتر)	40	60	80	100	120
X_3	حجم حلال پخشی (میکرولیتر)	300	475	650	825	1000
X_4	نمک (درصد)	0	7/5	15	22/5	30

معتبرسازی و تعیین ارقام شایستگی روش اندازه‌گیری IL-DLLME-HPLC جهت استخراج پاتولین: به منظور تعیین گستره‌ی خطی روش از محلول‌های آبی استاندارد پاتولین در غلظت‌های 1، 2، 5، 10، 20، 50، 100 و200 نانو گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. برای به دست آوردن انحراف استاندارد نسبی، 7 آزمایش تکراری با استفاده از نمونه‌ی آب سیبی با غلظت $100\ ng\ mL^{-1}$ از پاتولین در شرایط بهینه محاسبه گردید. درصد بازیافت با استفاده از نمونه‌ی آب سیبی که غلظت $50\ ng\ mL^{-1}$ پاتولین به صورت دستی به آن افزوده شده و پس از استخراج و تزریق به دستگاه تجزیه‌ای، محاسبه گردید. برای محاسبه‌ی فاکتور تغلیظ از نمونه‌ی آبی با غلظت 5 نانو گرم در میلی‌لیتر از پاتولین استخراج و سطح زیر پیک استخراجی با سطح زیر پیک منحنی کالیبراسیون حاصل از تزریق مستقیم مورد مقایسه قرار گرفت. حد تشخیص (LOD) براساس S/N 3 و حد اندازه‌گیری (LOQ) بر پایه‌ی S/N 10 محاسبه شد. به منظور ارزیابی کارایی روش پیشنهادی 4 نمونه آب سیب با برندهای مختلف تهیه و تحت فرآیند IL-DLLME-HPLC قرار گرفت و مقادیر یافت شده از پاتولین در آن گزارش گردید.

آزمون اندازه‌گیری پاتولین در نمونه‌های آب سیب توسط فرآیند IL-DLLME-HPLC: استخراج پاتولین از نمونه‌های آب سیب در نقاط بهینه (حجم حلال استخراجی 80 میکرولیتر، حجم حلال پخشی 600 میکرولیتر، مقدار 28 درصد نمک و pH=6/5) انجام گرفت. برای اندازه‌گیری پاتولین، 50 میلی‌لیتر از آب سیب درون یک فالکون ریخته شد، سپس 25 میکرولیتر از آنزیم آمیلاز و 100 میکرولیتر از آنزیم پکتیناز به آن اضافه و با استفاده از دستگاه هم‌زن به خوبی مخلوط شد و این محلول به مدت 120 دقیقه در آون $45^{\circ}C$ قرار گرفت. سپس محلول حاصل به مدت 5 دقیقه و با سرعت 6000 دور در دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی آن جدا شد. جهت ته‌نشینی پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌های محلول در آب، به 10 میلی‌لیتر از محلول آماده شده در مرحله‌ی قبل، 1 میلی‌لیتر محلول کارز 1 (پتاسیم هگزا فروسیانید) و 1 میلی‌لیتر محلول کارز 2 (استات روی) اضافه شد. محلول حاصل به خوبی هم زده شد و به مدت 5 دقیقه تحت عمل سانتریفوژ (6000 rpm) قرار گرفت. پس از جدا شدن رسوبات ته‌نشین شده در ته فالکون از محلول شفاف رویی، این محلول جهت انجام فرآیند ریزاستخراج به فالکون 15 میلی‌لیتری انتقال داده شد. به منظور فرآیند ریزاستخراج مایع مایع پخشی، ابتدا 10 میلی‌لیتر از محلول آماده شده به روش بالا فیلتر شد. سپس 28 درصد نمک سدیم کلرید به آن اضافه گردید و با استفاده از هم‌زن به خوبی مخلوط شد و بعد از تنظیم pH در 6/5، مخلوط 80 میکرولیتر 1-هگزیل 3-متیل ایمیدازولیوم هگزا فلورو فسفات (حلال استخراجی) و 600 میکرولیتر متانول (حلال پخشی) با استفاده از سرنگ به سرعت به محلول تزریق شد. محلول حاصل ابری گردید و

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-22]

استخراج پاتولین به درون فاز آلی انجام پذیرفت. جهت جداسازی فازها، نمونه به مدت 1 دقیقه و تحت سرعت 4000rpm سانتریفوژ شد. سپس 50 میکرولیتر فاز آلی جمع آوری شده، شامل آنالیت مورد هدف با استفاده از سرنگ از فاز آبی جدا و 20 میکرولیتر از آن با استفاده از سرنگ 100 میکرولیتری، مستقیم به دستگاه HPLC معرفی گردید. ثبت کروماتوگرام‌ها و نیز محاسبه‌ی سطح زیر پیک پاتولین برای هر آزمایش توسط نرم افزار Power Stream دستگاه HPLC محاسبه گردید.

• یافته‌ها

از جمله پارامترهای مؤثر بر فرآیند ریزاستخراج پاتولین در نمونه‌ی آب سیب می‌توان به نوع و حجم حلال استخراجی، نوع و حجم حلال پخش کننده، pH محلول نمونه و اثر نمک اشاره نمود.

نتایج انتخاب حلال استخراجی و حلال پخشی مناسب برای روش IL-DLLME-HPLC جهت استخراج پاتولین از نمونه‌ها: یکی از مهم‌ترین پارامترهای مؤثر در تکنیک ریزاستخراج مایع-مایع پخشی، نوع حلال استخراج کننده و نوع حلال پخشی می‌باشد. به منظور انتخاب نوع حلال استخراجی مناسب، سه نوع مایع یونی 1-هگزیل 3-متیل ایمیدازولیوم هگزا فلورو فسفات، 1-بوتیل 3-متیل ایمیدازولیوم هگزا فلورو فسفات و 1-اکتیل 3-متیل ایمیدازولیوم هگزا فلورو فسفات تحت شرایط یکسان مورد مقایسه قرار گرفتند. مقایسه سطح زیر پیک پاتولین برای سه حلال استخراجی مذکور نشان داد که 1-هگزیل 3-متیل ایمیدازولیوم هگزا فلورو فسفات بیشترین کارایی استخراج و رفتار کروماتوگرافی بهتری را در استخراج پاتولین نسبت به حلال‌های دیگر دارد. با هدف انتخاب بهترین نوع حلال پخشی نیز، سه نوع حلال استون، متانول و اتانول مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج، بالا بودن درصد استخراج را با به کارگیری حلال متانول نشان داد.

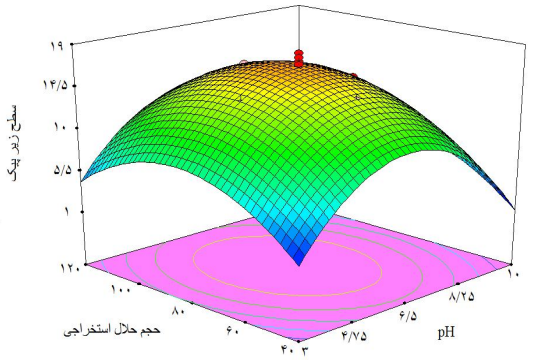
نتایج بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر استخراج با استفاده از رویه سطح پاسخ (RSM): پس از انجام 30 آزمایش طراحی شده، پاسخ‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Design Expert تجزیه و تحلیل شد و معادله درجه دوم زیر برای ارزیابی پاسخ کل بر حسب مقادیر کد شده به دست آمد:

$$R = +16.86 - 0.89X_1 + 0.69X_2 + 0.22X_3 + 1.59X_4 - 0.12X_1X_2 + 0.15X_1X_3 + 0.000X_1X_4 + 0.075X_2X_3 + 0.075X_2X_4 - 0.075X_3X_4 - 8.80\ X_1^2 - 5.40\ X_2^2 - 2.60\ X_3^2 + 5.20\ X_4^2$$

R: مجموع سطح زیر پیک پاتولین، X_1 : pH، X_2: حجم حلال استخراجی، X_3: حجم حلال پخشی و X_4: مقدار نمک

با در نظر گرفتن این معادله و نیز با توجه به علامت و ضرایب به دست آمده برای هر متغیر می‌توان چنین نتیجه گرفت که نمک و pH به ترتیب اثر مثبت و منفی قابل توجهی در راندمان استخراج دارند.

در به کارگیری طراحی آزمایش علاوه بر امکان پیش‌گویی مقدار بهینه‌ی متغیرها و نیز بررسی جداگانه‌ی اثر هر کدام از آن‌ها در راندمان استخراج، همچنین می‌توان برهم‌کنش‌های موجود بین متغیرها را در قالب نمودار سه بعدی مشاهده کرد. در شکل1 برهم کنش بین pH و حجم حلال استخراجی به تصویر کشیده شده است. براساس این شکل pH برابر با 6/5 به عنوان بهترین مقدار جهت کسب بالاترین بازده استخراجی مشهود است. در مورد حجم حلال استخراجی نیز مقدار 80 میکرولیتر از مایع یونی $[HMIM]PF_6$ بیشترین درصد استخراج را به خود اختصاص داده است.

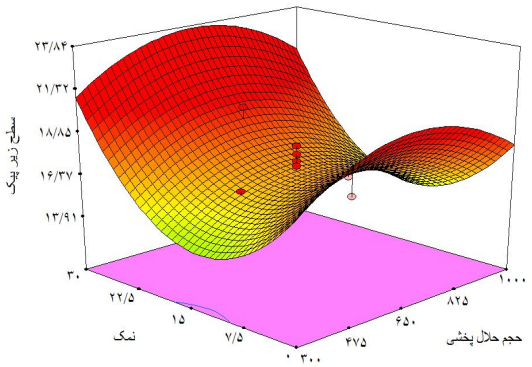


شکل 1. نمودار سه بعدی برهم کنش بین متغیرهای مؤثر بر فرآیند ریزاستخراج پاتولین

pH بر حسب حجم حلال استخراجی در شرایط حجم حلال پخشی ثابت 600 میکرولیتر و مقدار نمک 28 درصد

شکل 2 نمودار سه بعدی برهم کنش میان نمک و حجم حلال پخشی را در استخراج پاتولین در شرایط حجم حلال استخراجی ثابت 80 میکرولیتر و pH=6/5 نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود برهم کنش بین این دو متغیر، معنی‌دار بوده و با افزایش میزان نمک تا 28 درصد (بیشترین مقدار نمک) و افزایش حجم حلال استخراجی تا 80 میکرولیتر، مقدار پاسخ افزایش می‌یابد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-22]

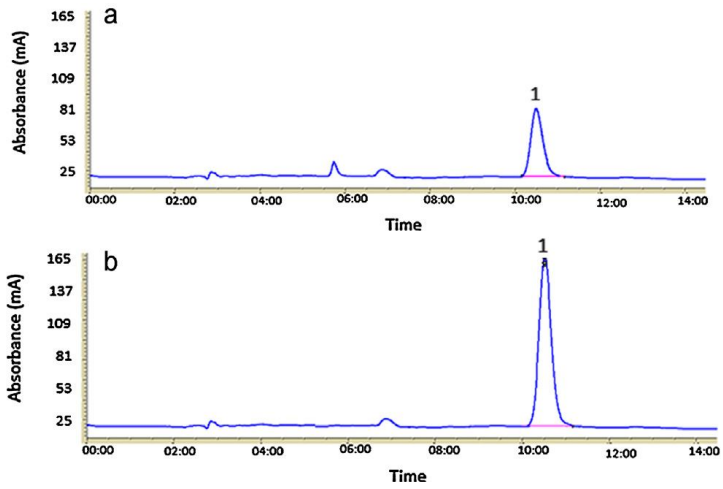


شکل 2. نمودار سه بعدی برهم کنش بین متغیرهای مؤثر بر فرآیند ریزاستخراج پاتولین
نمک بر حسب حجم حلال پخشی در شرایط حجم حلال استخراجی ثابت 80 میکرولیتر و pH=6/5

نتایج به دست آمده از RSM و CCD نشان داد که شرایط بهینه برای حجم حلال استخراجی: 80 میکرولیتر، حجم حلال پخشی: 600 میکرولیتر، مقدار 28 درصد نمک و pH=6/5 می‌باشد.

نتایج معتبرسازی روش IL-DLLME-HPLC جهت تعیین پاتولین: نتایج حاصل از معتبرسازی و مقایسه ارقام شایستگی روش IL-DLLME-HPLC با سایر روش‌ها جهت استخراج پاتولین از آب سیب در جدول 2 نشان داده شده است.

نتایج اندازه‌گیری غلظت پاتولین در انواع نمونه‌های آب سیب: به منظور ارزیابی کارایی روش پیشنهادی 4 نمونه آب سیب با برندهای مختلف تهیه و تحت فرآیند IL-DLLME-HPLC قرار گرفت و مقادیر یافت شده از پاتولین در آن گزارش گردید. نتایج حاصل از این بررسی‌ها در جدول 4 آورده شده است. همچنین صحت روش با استفاده از مقدار مشخص اضافه شده به نمونه‌های انتخابی مورد بررسی قرار گرفت. شکل 3 کروماتوگرام به دست آمده از تکنیک IL-DLLME-HPLC تحت شرایط spiked (a و non-spiked (b در غلظت $50\ ng\ mL^{-1}$ برای پاتولین می‌باشد.



شکل 3. کروماتوگرام حاصل از استخراج توسط روش IL-DLLME-HPLC
non-spiked (a) و spiked (b) از غلظت $50\ ng\ mL^{-1}$ پاتولین. 1: پیک پاتولین

جدول 2. ارقام شایستگی روش پیشنهادی

آنالیت	ضریب همبستگی	انحراف استاندارد نسبی (%)	بازیابی نسبی (%)	حد تشخیص ($ng\ g^{-1}$)	حد تعیین ($ng\ g^{-1}$)	فاکتور تغلیظ
پاتولین	0/998	7/5	89	0/15	0/5	162

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-22]

جدول 3. مقایسه روش پیشنهادی با سایر روش‌ها

روش	میزان نمونه (میلی‌لیتر)	گستره‌ی خطی ($ng\ mL^{-1}$)	انحراف استاندارد نسبی(%)	بازیابی نسبی	حد تشخیص ($ng\ mL^{-1}$)	منابع
استخراج فاز جامد-کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا	7	25-1000	11	63-87	25	22
ریزاستخراج فاز جامد-کروماتوگرافی مایع-اسپکترومتری جرمی	1	0/5-20	0/76-4/97	92/5	0/023	24
استخراج فاز جامد-کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا	10	10-400	-	89-100	6	23
روش پیشنهادی	2	1-200	7/5	89	0/15	-

جدول 4. نتایج حاصل از استخراج پاتولین از آب سیب‌های مختلف با استفاده از روش پیشنهادی

نمونه	غلظت پاتولین ($ng\ mL^{-1}$)	مقدار اضافه شده ($ng\ mL^{-1}$)	مقدار یافت شده ($ng\ mL^{-1}$)
نمونه 1	-	20	0/30±19/51
نمونه 2	0/15±[1]2/00	20	0/47±21/72
نمونه 3	0/78±10/55	20	0/23±29/82
نمونه 4	0/09±1/26	20	0/27±20/98

1: انحراف استاندارد ± میانگین (n=3)

• بحث

انتخاب حلال آلی و پخشی مناسب برای روش IL-DLLME-HPLC جهت استخراج پاتولین از آب سیب: یکی از مهم‌ترین پارامترهای مؤثر در تکنیک ریزاستخراج مایع-مایع پخشی، نوع حلال استخراج کننده می‌باشد. به منظور انتخاب نوع حلال استخراجی، با در نظر گرفتن ناسازگاری حلال‌های هالوژن‌دار سنگین با کروماتوگرافی مایع فاز برگشتی، و نیز با توجه به کارهای انجام گرفته‌ی پیشین با استفاده از مایعات یونی در به کارگیری تکنیک ریزاستخراج مایع-مایع پخشی به منظور آنالیز نمونه‌هایی که ماهیتی مشابه با پاتولین داشتند و با در نظر گرفتن حصول نتایج قابل اطمینان از به کارگیری مایعات یونی در تکنیک ریزاستخراج، در این تحقیق، 1-هگزیل 3-متیل ایمیدازولیوم هگزا فلورو فسفات (با دانسیته‌ی 1/31-1/29) به عنوان حلال استخراجی مناسب انتخاب گردید (26).

از مهم‌ترین ویژگی‌های مورد نظر در انتخاب حلال پخشی در روش ریزاستخراج، امتزاج پذیری مناسب این حلال با فاز آبی و نیز با حلال استخراج کننده می‌باشد. لازم به ذکر است که حلال پخش کننده با توجه به اثرگذاری مستقیمی که بر روی ویسکوزیته‌ی محیط آبی و حلال استخراجی ایفا می‌کند، لذا می‌تواند در چگونگی و کیفیت تولید قطرات و در نتیجه در درصد بازده‌ی استخراج نقش به‌سزایی داشته باشد (25). در این تحقیق از بین سه نوع حلال پخشی استون، متانول و اتانول، نتایج به دست آمده از به کارگیری حلال متانول موید سازگاری بهتر و بیشتر این حلال با شرایط آزمایش و نیز استخراج بیشتر گونه‌ها با این حلال بود. بنابراین متانول به عنوان مناسب‌ترین حلال پخشی انتخاب و در مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر استخراج با استفاده از رویه سطح پاسخ (RSM): یکی از زیر گروه های اصلی طراحی آزمایش رویه سطح پاسخ، طرح مرکب مرکزی (CCD) می‌باشد. در این طرح متغیرها در 5 سطح مختلف بررسی می‌شوند. در این شیوه علاوه بر توصیف اثر خطی متغیرها بر روی پاسخ، اثر متقابل و درجه دوم متغیرها نیز به تصویر کشیده می‌شود. همان‌گونه که در بخش یافته‌ها مشاهده شد مدل درجه دومی بر روی داده‌ها منطبق شد که اثر هر کدام از پارامترها را بر راندمان استخراج به خوبی نشان می‌دهد. میزان انطباق مدل روی داده‌های واقعی توسط ضریب تعیین

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-22]

R^2 و R^2 تعدیل شده نشان داده می‌شود. در اینجا مقادیر R^2 و R^2 تعدیل شده به ترتیب 0/9923 و 0/9852 می‌باشد. کسب این اعداد توانایی بالای مدل در توصیف داده‌های تجربی را نشان می‌دهد. براساس نتایج به دست آمده از این جدول، می‌توان دریافت که مدل انتخابی با مقدار P-value کمتر از 0/0001 و F-value مساوی با 138/46 مدل انتخابی مناسبی بوده و کمترین میزان عدم تطابق را با کسب lack-of-fit برابر با 0/2960 به دست می‌دهد.

نمودارهای سه بعدی اثرات متقابل متغیرها را بر پاسخ به خوبی نشان می‌دهند. بر اساس شکل pH =1 برابر با 6/5 به عنوان بهترین مقدار جهت کسب بالاترین بازده استخراجی مشهود است. در توجیه عدد به دست آمده برای pH می‌توان گفت که پاتولین در این pH به فرم خنثی خود ظاهر گشته، لذا با تنظیم pH در 6/5، تمایل آنالیت‌های مورد نظر به فاز آلی بیشتر شده و راندمان استخراج افزایش می‌یابد. در مورد حجم بهینه‌ی 80 میکرولیتری از حلال استخراجی نیز می‌توان گفت که هر چه حجم حلال استخراجی کمتر باشد، فاکتور تغلیظ افزایش خواهد یافت.

همان طور که در شکل 2 مشاهده می‌شود با افزایش مقدار نمک، راندمان استخراج افزایش می‌یابد. افزایش مقدار معینی از نمک سبب ایجاد اثر salting out می‌گردد. در این اثر با اضافه نمودن مقدار معینی از نمک، تمایل مولکول‌های فاز آبی به یون‌های نمک موجود در آن فاز بیشتر شده و همین امر سبب کاهش حلالیت آنالیت در فاز آبی گشته و نیز بهبود ثابت توزیع آنالیت بین دو فاز آبی و آلی را سبب می‌شود. این بهبود نیز سبب افزایش راندمان استخراجی می‌گردد. بنابراین بیشترین مقدار NaCl (28 درصد) به عنوان مقدار گرم نمک بهینه انتخاب شد. در مورد حلال پخشی نیز همان طور که در شکل مشاهده می‌گردد، با افزایش حجم این حلال تا 600 میکرولیتر، کارایی استخراج افزایش یافته که این امر به سبب ایجاد امتزاج‌پذیری بیشتر بین دو حلال آبی و آلی در یکدیگر در نتیجه‌ی افزایش حجم حلال پخشی و نیز تشکیل قطرات ریزتر در این حجم از حلال می‌باشد. همچنین یک کاهش در راندمان استخراج از حجم600 تا 1000 میکرولیتر مشاهده می‌شود که این اثر احتمالاً مربوط به افزایش انحلال پذیری پاتولین در فاز آبی در اثر افزایش حجم حلال پخشی می‌باشد. بنابراین حجم 600 میکرولیتر از متانول به عنوان حجم بهینه انتخاب شد.

معتبر سازی روش اندازه‌گیری IL-DLLME-HPLC جهت تعیین پاتولین در آب سیب: جهت بررسی ارقام شایستگی روش ریزاستخراج مایع-مایع پخشی، شامل تکرارپذیری، گستره‌ی خطی، فاکتور تغلیظ، حد تشخیص و حد تعیین، نمونه‌های آب سیب حاوی غلظت‌های متفاوتی از پاتولین مورد آنالیز قرار گرفتند.

بررسی منحنی کالیبراسیون پاتولین در آب نشان داد که این منحنی با ضریب همبستگی بالا (r^2>0/99) در محدوده غلظتی 1-200 ng mL^{-1} خطی می‌باشد. بررسی نتایج مربوط به انحراف استاندارد نسبی نشان دهنده دقت بالای روش پیشنهادی جهت استخراج پاتولین می‌باشد (<8%). میزان بازیافت به دست آمده برای پاتولین 89 درصد به دست آمد که این اعداد بیانگر عدم تأثیرپذیری تکنیک حاضر از بافت نمونه در استخراج پاتولین است. مقدار فاکتور تغلیظ برای پاتولین 162 بوده که برای این روش در حد قابل قبول است. حد تشخیص و حد تعیین روش پیشنهادی برای پاتولین به ترتیب 0/15 و 0/5 نانوگرم بر گرم به دست آمد. مقایسه تکنیک حاضر با تعدادی از تکنیک‌های ذکر شده در جدول 3 نشان داد که تکنیک به کار گرفته شده در این تحقیق، حد تشخیص‌های بسیار کمتری را برای هر دو ترکیب فراهم می‌آورد. همچنین این مقایسه نشان می‌دهد که تکنیک پیشنهادی، از توانایی بالایی جهت آنالیز پاتولین در انواع آب سیب برخوردار است.

مقدار پاتولین در انواع نمونه‌های آب سیب: همان طور که در بخش نتایج مشاهده شد در نمونه‌ی 1 هیچ گونه پاتولینی تشکیل نشده بود. همچنین بیشترین مقدار پاتولین در نمونه‌ی 3 مشاهده گردید.

در تحقیق حاضر، استخراج سریع و ساده‌ی مقادیر بسیار کم پاتولین با به کارگیری روش ریزاستخراج مایع-مایع پخشی (DLLME) حاصل شد. به کارگیری این روش سبب افزایش دقت و حساسیت و نیز آسانی عمل و کاهش زمان استخراج آنالیت مورد نظر گردید. همچنین همراه شدن این تکنیک با دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا به همراه آشکارساز مرئی-فرابنفش (HPLC-UV) جهت آنالیز نمونه‌ها، منجر به کسب حد تشخیص‌های بسیار عالی در استخراج ترکیبات مذکور شد. در این مطالعه، بهینه‌سازی پارامترهای تأثیرگذار بر فرآیند ریزاستخراج با استفاده از شیوه‌ی سطح پاسخ (RSM) بر پایه‌ی مدل مختلط مرکزی (CCD) به کار گرفته شد. روش پیشنهادی قابلیت کاربرد جهت شناسایی و

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-22]

تعیین غلظت‌های کم پاتولین را در نمونه‌های حقیقی دارا می‌باشد. همچنین در مقایسه با سایر روش‌های استخراجی، روش مذکور استخراج بسیار مؤثرتری برای مقادیر بسیار کم پاتولین دارد.

سپاسگزاری

در پایان از معاونت محترم پژوهشی انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، به خاطر حمایت‌های مالی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Mayer VW, Legator MS. Production of petite mutants of Saccharomyces cerevisiae by patulin. J Agric Food Chem 1969;17(3):454-6.
2. Lai C-L, Fuh Y, Shih DY-C. Detection of mycotoxin patulin in apple juice. J Food Drug Anal 2000;8(2):85-96.
3. Sant'Ana AdS, Rosenthal A, de Massaguer PR. The fate of patulin in apple juice processing: A review. Food Res Int 2008;41(5):441-53.
4. Harwig J, Chen Y, Kennedy B, Scott P. Occurrence of patulin and patulin-producing strains of Penicillium expansum in natural rots of apple in Canada. Can Inst Food Sci Technol J 1973;6(1):22-5.
5. Majid Cheraghali A, Reza Mohammadi H, Amirahmadi M, Yazdanpanah H, Abouhossain G, Zamanian F, et al. Incidence of patulin contamination in apple juice produced in Iran. Food Control 2005;16(2):165-7.
6. Abramson D, Thorsteinson T, Forest D. Chromatography of mycotoxins on precoated reverse-phase thin-layer plates. Arch Environ Contam Toxicol1989;18(3):327-30.
7. Sheu F, Shyu YT. Analysis of patulin in apple juice by diphasic dialysis extraction with in situ acylation and mass spectrometric determination. J Agric Food Chem 1999;47(7):2711-4.
8. Subramanian T. Colorimetric determination of patulin produced by Penicillium patulum. J.- Assoc. Off. Anal Chem 1982;65(1):5.
9. Murillo-Arbizu M, González-Peñas E, Hansen SH, Amézqueta S, Østergaard J. Development and validation of a microemulsion electrokinetic chromatography method for patulin quantification in commercial apple juice. Food Chem Toxicol 2008;46(6):2251-7.
10. Roach JA, White KD, Trucksess MW, Thomas FS. Capillary gas chromatography/mass spectrometry with chemical ionization and negative ion detection for confirmation of identity of patulin in apple juice. J AOAC Int 2000;83(1):104-12.
11. Rodríguez-Carrasco Y, Berrada H, Font G, Mañes J. Multi-mycotoxin analysis in wheat semolina using an acetonitrile-based extraction procedure and gas chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A 2012;1270(28):28-40.
12. Sewram V, Nair J, Nieuwoudt T, Leggott N, Shephard G. Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. J Chromatogr A 2000;897(1):365-74.
13. Zöllner P, Mayer-Helm B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. J Chromatogr A 2006;1136(2):123-69.
14. Ito R, Yamazaki H, Inoue K, Yoshimura Y, Kawaguchi M, Nakazawa H. Development of liquid chromatography-electrospray mass spectrometry for the determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination levels in Japan. J Agric Food Chem 2004;52(25):7464-8.
15. Malysheva S, Mavungu JDD, Boonen J, De Spiegeleer B, Goryacheva I, Vanhaecke L, et al. Improved positive electrospray ionization of patulin by adduct formation: Usefulness in liquid chromatography–tandem mass spectrometry multi-mycotoxin analysis. J Chromatogr A. 2012; 28;1270:334-9
16. Baert K, Meulenaer BD, Kasase C, Huyghebaert A, Ooghe W, Devlieghere F. Free and bound patulin in cloudy apple juice. Food Chem 2007;100(3):1278-82.
17. Turner NW, Subrahmanyam S, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review Anal Chim Acta 2009;632(2):168-80.
18. Moukas A, Panagiotopoulou V, Markaki P. Determination of patulin in fruit juices using HPLC- DAD and GC-MSD techniques. Food Chem 2008;109(4):860-7.
19. Katerere DR, Stockenström S, Shephard GS. HPLC-DAD method for the determination of patulin in dried apple rings. Food Control 2008;19(4):389-92.
20. Valle-Algarra FM, Mateo EM, Gimeno-Adelantado JV, Mateo-Castro R, Jiménez M. Optimization of

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-22]

clean-up procedure for patulin determination in apple juice and apple purees by liquid chromatography. Talanta 2009;80(2):636-42.

21. Li J-k, Wu R-n, Hu Q-h, Wang J-h. Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. Food Control 2007;18(5):530-4.

22. Boonzaaijer G, Bobeldijk I, Van Osenbruggen W. Analysis of patulin in Dutch food, an evaluation of a SPE based method. Food Control 2005;16(7):587-91.

23. Wu R-N, Dang Y-L, Niu L, Hu H. Application of matrix solid-phase dispersion–HPLC method to determine patulin in apple and apple juice concentrate. J Food Comp Anal 2008;21(7):582-6.

24. Kataoka H, Itano M, Ishizaki A, Saito K. Determination of patulin in fruit juice and dried fruit samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. J Chromatogr A 2009;1216(18):3746-50.

25. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini M-R, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. J Chromatogr A 2006;1116(1):1-9.

26. Vázquez M, Vázquez PP, Galera MM, García M. Determination of eight fluoroquinolones in groundwater samples with ultrasound-assisted Ionic Liquid Dispersive Liquid-liquid microextraction prior to high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. Anal Chim Acta 2012;748(20):20-27.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-22]

Determination of patulin in apple juice samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography and method optimization using response surface methodology

*Delavar M[1], Kamankesh M[2], Tavakoli R[3], Navabi A[4], Mohammadi A[5]**

1- Assistant Prof, Dept. of pharmacology, Arak University of Medical Science, Arak, Iran

2- M.Sc in Chemistry, Faculty of Science, Alzahra University, Tehran, Iran

3- M.Sc in Chemistry, Payame Noor University, Delijan, Iran

4- Expert of Food and Beverage Control Laboratory, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

*5- *Corresponding author: Assistant Prof, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences,Tehran, Iran. Email: ab.mohammadi@sbmu.ac.ir*

Received 6 Nov, 2013 **Accepted 27 Jan, 2014**

Background and Objective: Patulin was classified as a possible human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer in 1970. Owing to its toxicity, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives has established a provisional maximum tolerable daily intake for patulin in apple juice of 0.4 µg kg^{-1} body weight per day. The present study examined efficient methods for the determination of the amount of patulin in different brands of apple juice purchased in different districts of the city of Arak.

Materials and Methods: Optimization of effective parameters for extraction of patulin was carried out using response surface methodology based on a central composite design that included 30 treatments at 5 levels for 4 factors with 6 replicates for the center point. The proposed method was validated using figures of merit. The amount of patulin was determined by the proposed IL-DLLME-HPLC method in apple juice samples available at different supermarkets in Arak.

Results: Optimum amounts for effective parameters were determined using the proposed method. The figures of merit for the proposed method were comparable to or better than other methods. The performance of the proposed method was well-demonstrated by analysis of real samples.

Conclusion: The results of the present study demonstrated that IL-DLLME-HPLC is a powerful method for monitoring the presence of patulin, even at very low concentrations, in apple juice samples.

Keywords: Patulin, Apple juice, Dispersive liquid-liquid microextraction, HPLC, Response surface methodology

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-07-22]