مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال دهم، شماره 2، تابستان 1394، صفحات 76-67

پایش باقیمانده سم آمیتراز در برخی از نمونه‌های عسل به روش ریز استخراج و بهینه سازی به روش طراحی آزمایش

محمد فرجی[1]، پریسا امینی کادیجانی[2]

1. نویسنده مسئول: استادیار گروه پژوهشی مواد غذایی، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران، پست الکترونیکی: mfaraji@standard.ac.ir
2. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی گرایش شیمی مواد غذایی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 93/7/24 تاریخ پذیرش: 93/10/5

چکیده

سابقه و هدف: آمیتراز آفت‌کش و حشره‌کشی است که به دلیل فعالیت کرم‌کشیِ فوق‌العاده قوی به صورت گسترده برای کنترل آلودگی‌های بیولوژیک استفاده می‌شود. هدف از این تحقیق تلاش جهت توسعه و معتبرسازی تکنیک استخراج فاز مایع با فیبرهای تو خالی (HF-LPME) به منظور تعیین مقدار باقیمانده آمیتراز در نمونه‌های عسل می‌باشد.

مواد و روش‌ها: روش میکرو استخراج فاز مایع با فیبرهای تو خالی (HF-LPME) به عنوان روشی ساده، سریع، کم هزینه و حساس برای اندازه‌گیری آفت‌کش آمیتراز در نمونه‌های عسل به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکار ساز یونیزاسیون شعله‌ای به کار برده شد. اثر پنج فاکتور تجربی: نوع حلال استخراج کننده، pH محلول، سرعت همزدن، زمان استخراج و درصد نمک کلرید سدیم مطالعه و بهینه شدند.

یافته‌ها: آنالیز واریانس نشان داد که درصد نمک و سرعت هم زدن بیشترین تأثیر را روی میزان استخراج دارند (p=0/05). گستره خطی روش در محیط عسل بین 20 تا 1000 نانوگرم بر میلی‌لیتر با ضریب همبستگی برابر با 0/9901 و انحراف استاندارد نسبی کمتر از 14% در آب به دست آمد. فاکتور تغلیظ 75 و همچنین بر پایه S/N = 3 حد تشخیص 10 نانوگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

نتیجه‌گیری: با توجه به درصد بازیابی بالا (بالاتر از 90%) با استفاده از روش HF-LPME برای اندازه‌گیری آمیتراز در نمونه عسل، این روش به عنوان روشی ساده، سریع و حساس پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: آمیتراز، میکرو استخراج فاز مایع با فیبرهای تو خالی، طراحی آرایه اورتوگونال، نمونه عسل

• مقدمه

آمیتراز (Amitraz) ، آفت‌کشی از خانواده فرمامید، حشره‌کشی است که فعالیت کرم‌کشی فوق العاده‌ای دارد و به صورت گسترده برای کنترل آلودگی‌های تولید شده به وسیله کرم *Jacobsoni Varroa* در کندوهای عسل به کار برده می‌شود. آمیتراز حشره‌کش و کنه‌کشی است که برای کنترل کنه قرمز تار عنکبوتی، مینوز برگ و سپرداران به کار می‌رود. این سم در پنبه علیه کرم پنبه، مگس سفید و کرم‌های برگ خوار و در حیوانات برای کنترل ساس، کنه، شپش و دیگر آفات حیوانی به کار برده می‌شود.

آمیتراز در ایران با نام تجاری میتاک به فروش می‌رسد. این سم خاصیت خورندگی ندارد و نسبت به گرما مقاوم است. به نظر می‌رسد اشعه ماوراء بنفش تأثیر اندکی بر پایداری آن داشته باشد. در صورتی که آمیتراز به مدت طولانی در شرایط مرطوب نگهداری شود به آرامی تجزیه خواهد شد. از آمیتراز برای کرم درختان خزان‌دار و مرکبات نیز استفاده شده است. همچنین از آن به عنوان جایگزینی برای آفت‌کش coumaphos، آفت‌کش ارگانو فسفاته، برای از بین بردن کنه روی حیوانات به کار برده شده است. آمیتراز و محصول هیدرولیز آن 2-4 دی متیل آنیلین (DMA) به عنوان مواد سمی شناخته می‌شوند (2، 1). به علت استفاده از آمیتراز در کندوهای عسل، این امر منجر به حضور مقادیر باقیمانده در عسل می‌شود. مطابق با استاندارد آژانس اروپایی برای ارزیابی محصولات پزشکی حداکثر میزان باقیمانده مجاز (MRL) برای آمیتراز و تمام متابولیت‌های آن شامل DMA در عسل 200

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]

میکرو گرم بر کیلو گرم عسل می‌باشد (3). به همین دلیل آنالیز باقیمانده آمیتراز در عسل مورد توجه ویژه قرار گرفته است (18-4). آلودگی رودخانه‌ها و جویبارها با آمیتراز زمانی اتفاق می‌افتد که حیواناتی که تازه تحت تأثیر آمیتراز قرار گرفته‌اند برای نوشیدن آب و یا عبور از رودخانه یا جویبار وارد آب می شوند. منبع دیگر برای آلودگی آب‌ها، خالی کردن خمره‌های حاوی آمیتراز در محیط زیست است که برای تحت تأثیر قرار دادن حیوانات با این سم به کار برده شده بودند (12).

استخراج و جداسازی آمیتراز از بافت‌های مختلف عموماً با استخراج آن به صورت استخراج مایع- مایع (17، 9)، استخراج با فازهای جامد (18، 10)، میکرو استخراج با فاز جامد (11، 8، 5) صورت می‌گیرد ، همچنین اخیراً به روش میکرو استخراج با حلال از فضای فوقانی (6) انجام شده است.

اندازه‌گیری آمیتراز استخراج شده معمولاً به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی با دتکتورهای ویژه‌ای همچون TSD (Thermionic specific detector) (11، 6)، اسپکترومتری جرمی (8، 5) و یا با دتکتور ربایش الکترونی (9) صورت گرفته است. همچنین با دستگاه کروماتوگرافی مایع با دتکتور آرایه دیودی (10) نیز اندازه‌گیری آمیتراز انجام شده است.

هدف از انجام این تحقیق، تلاش برای توسعه و معتبرسازی تکنیک میکرو استخراج فازمایع با فیبرهای تو خالی HF-LPME (Hollow Fiber-Liquid Phase Microextraction) که کاربرد گسترده ای به دلیل مزایای ویژه آن همچون پاکسازی بالا در میکرواستخراج داشته است (29-19)، برای کمّی سازی و تعیین مقدار آمیتراز در نمونه‌های عسل و آب انجام شده است. روش تاگوشی نیز به عنوان روش بهینه‌سازی در استخراج آمیتراز مورد ارزیابی قرار گرفته است.

به علت سادگی و قیمت کم تجهیزات مورد نیاز برای استخراج، فیبر تو خالی بعد هر استخراج به منظور حذف اثر حافظه و آلودگی می‌تواند دور انداخته شود. این امر موجب بهبود فوق العاده تکرارپذیری و تکثیرپذیری روش می‌شود. بنابراین، بدون استفاده از استاندارد داخلی در این روش می‌توان به تکرارپذیری‌های خوبی دست یافت. همچنین، در این تکنیک استخراج فیبرها می‌توانند نقش صافی را نیز داشته باشند و منجر به حذف اثرات بافت نمونه و به دست آوردن کروماتوگرام‌های بسیار تمیز شوند. روش تاگوشی به عنوان روش بهینه سازی مزایایی از قبیل کاهش تعداد آزمایش‌های لازم برای رسیدن به شرایط بهینه و مطالعه برهم کنش میان فاکتورها را نسبت به روش یک متغیر در یک زمان معرفی می‌کند

• مواد و روش‌ها

معرف‌ها و مواد: آمیتراز با درجه خلوص بیشتر از 98% و حلال‌های 1- اکتانول، 1- آندکانول، دی هگزیل اتر و دودکان از شرکت Merck خریداری شد. استو نیتریل با درجه خلوص HPLC-grade از شرکت Aldrich خریداری شد. محلول پایه آمیتراز با غلظت 1000 میلی‌گرم بر لیتر در استو نیتریل تهیه شد و در دمای 4°C نگهداری شد. دیگر محلول‌های پایه از آمیتراز با غلظت‌های 100 و 10 میلی‌گرم بر لیتر با رقیق‌سازی محلول اولیه در استونیتریل تهیه شد. محلول‌های استانداردی که استخراج از آنها انجام می‌شد قبل از استخراج با رقیق سازی محلول‌های پایه در آب دو بار تقطیر، تهیه شدند. فیبرهای توخالی پلی پروپیلنی Q 3/2 (مشخصات فیبر: قطر داخلی 600 میکرومتر، ضخامت دیواره فیبر 200 میکرومتر و اندازه منافذ 0/2 میکرومتر) از شرکت Membrana خریداری شد. فیبر توخالی به قطعات 1/5 سانتیمتری بریده شد. با قرار دادن این قطعات در استون فیبرها تمیز شده و قبل از استفاده خشک شدند.

دستگاه‌ها: آنالیز آمیتراز با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل 7890 شرکت Agilent مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای انجام شد. داده‌های کروماتوگرافی با نرم‌افزار Chem station ثبت و آنالیز شد. جداسازی‌های کروماتوگرافی با ستون مویین سیلیکای ذوب شده‌ی HP5 (30 متر طول، 0/32 میکرومتر قطر داخلی و 0/25 میکرومتر ضخامت فلیم مایع) خریداری شده از شرکت Agilent انجام شد. دمای آون به این صورت برنامه ریزی شد: آون 2 دقیقه در دمای 120°C نگه داشته می‌شد سپس دمای آون با شیب 40°C بر دقیقه تا دمای 280°C رسانده می‌شد و به مدت 6 دقیقه در این دما نگه داشته می‌شد. دمای محفظه تزریق و آشکارساز به ترتیب 260 و 280 درجه سانتی‌گراد بود. محفظه تزریق انشعابی/ غیر انشعابی در مد انشعابی با نسبت 5:1 به کار رفت. جریان ثابتی از هلیم (2 میلی‌لیتر بر دقیقه) به عنوان گاز حامل به کار برده شد. با استفاده از یک سیستم ژنراتور چند منظوره (ژنراتور نیتروژن- هوا مدل 2381، ژنراتور هیدروژن مدل 2200، ساخت شرکت Claind، ایتالیا) برای تولید جریان‌های ثابتی از هیدروژن، هوا و نیتروژن برای سیستم آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای استفاده شد. همزن مغناطیسی چند جایگاهه (IKA, Germany) برای همزدن

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]

همزمان چند محلول نمونه استفاده شد. اندازه‌گیری‌های pH با دستگاه WTW Inolab (Weilhen, Germany) انجام شد.

طراحی آزمایش: بهینه‌سازی متغیرهای مؤثر در استخراج آمیتراز از جمله زمان استخراج، سرعت همزدن، pH و درصد نمک به منظور کسب شرایط بهینه، به کمک روش آرایه اورتوگونال طراحی شده در 4 سطح مختلف برای هر متغیر انجام پذیرفت (جدول 1).

آزمون‌های معتبرسازی روش اندازه‌گیری HF-LPME برای اندازه‌گیری آمیتراز: به منظور رسم منحنی کالیبراسیون و تعیین گستره‌ی خطی روش، محلول آبی آمیتراز در گستره‌ی غلظتی 20 تا 1000 نانوگرم بر گرم مورد استفاده قرار گرفتند. انحراف استاندارد نسبی روش، با انجام 6 آزمایش تکراری با استفاده از نمونه‌ی عسل که میزان آمیتراز در آن $ng\ g^{-1}$ 100 بود، تحت شرایط بهینه انجام پذیرفت. محاسبه درصد بازیافت روش با استفاده از نمونه‌ی عسل که غلظت $ng\ g^{-1}$ 100 و 50 از آمیتراز به آن به صورت دستی اضافه شده بود محاسبه گردید. حد تشخیص (Limit of detection) بر اساس S/N 3 و حد اندازه‌گیری (Limit of quantification) بر پایه S/N 10 محاسبه شد.

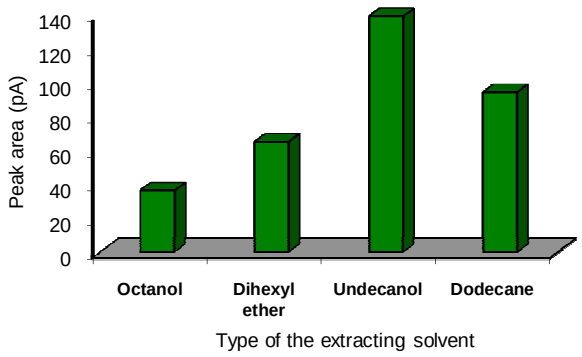
روش استخراج و آنالیز آمیتراز در نمونه‌های عسل: یک گرم از نمونه عسل با بافر 0/01 مول بر لیتر سدیم استات با pH برابر با 6 به حجم 10 میلی‌لیتر رسانده شد و مقادیر مشخصی از آمیتراز به آنها spike شد. به یک ظرف نمونه 12 میلی‌لیتری که داخل آن یک مگنت (4 mm × 14 mm) قرار داشت منتقل شد. حلال آلی (1-آندکانول) به داخل سرنگ کشیده شد و نوک سرنگ وارد کانال فیبر شد. فیبر توخالی به مدت 10 ثانیه داخل آندکانول قرار گرفت تا منافذ فیبر کاملا با حلال آلی پر شود. سپس، با 5 بار فرو کردن فیبر در آب مقطر، اضافی حلال آلی از سطح فیبر شسته شد. سپس با فشار دادن آرام پلانگر سرنگ فاز آلی داخل سرنگ به فیبر منتقل شد و اضافی آن از انتهای فیبر خارج شد. ته فیبر با استفاده از یک تکه فویل آلومینیوم مسدود شد و بعد آن فیبر داخل محلول نمونه قرار گرفت و سر ظرف نمونه نیز با پارافیلم پوشانده شد و همزن روشن شد. بعد از یک زمان مشخص، همزن خاموش شده و میکرو سرنگ حاوی فیبر از ظرف نمونه برداشته شد. سرانجام، فیبر از ته سرنگ HPLC جدا شد و با استفاده از یک سرنگ 10 میکرولیتری GC، 2 میکرولیتر از فاز استخراجی که حجم آن 0/2 ± 3/0 بود برداشته و به محفظه تزریق GC، تزریق شد.

• یافته‌ها

متغیرها شناسایی شده برای ارزیابی روش HF-LPME دو فازی توصیف شده برای استخراج آمیتراز از نمونه‌های عسل و آب عبارت بودند از: نوع حلال استخراج کننده، اثر غلظت NaCl ، اثر سرعت همزدن، pH محلول نمونه، اثر زمان استخراج

از آنجا که نوع حلال استخراج کننده اثر زیادی روی میزان استخراج دارد و احتمالاً اثر سایر متغیرها را می‌پوشاند، این عامل به صورت جداگانه و به روش یکی در یک زمان بهینه شد. سایر پارامترها با استفاده از روش طراحی آزمایش تاگوشی بهینه شدند. محلول 0/2 میلی‌گرم بر لیتر از آمیتراز در مراحل بهینه سازی به کار برده شد و بهینه‌سازی‌ها در آب مقطر صورت گرفت. تمام کمی سازی‌ها در این کار بر پایه سطح زیر پیک آمیتراز انجام شد.

انتخاب نوع حلال استخراج کننده: انتخاب حلال آلی مناسب برای روش HF-LPME بسیار تأثیر گذار خواهد بود. معیار انتخاب برای یک حلال آلی که گزینه مناسبی باشد این است که (1) باید سازگار با فیبر باشد و به آسانی در منافذ فیبر پلی‌پروپیلنی نگه داشته شود، (2) حلال آلی باید غیر قابل امتزاج با آب باشد تا میزان هدر رفتن حلال به حداقل برسد و (3) حلال آلی باید رفتار کروماتوگرافی خوبی داشته باشد. با ارزیابی این فاکتورها، حلال‌های 1- اکتانول، 1- آندکانول، دی‌هگزیل اتر و دودکان برای بررسی مفید بودن آنها آزمایش شدند. نتایج مربوط به بررسی نوع حلال استخراج کننده بر راندمان استخراج در شکل 1 نشان داده شده است. بیشترین راندمان استخراج زمانی به دست آمد که از 1- آندکانول به عنوان حلال استخراج کننده استفاده شد.



شکل 1. بهینه‌سازی نوع حلال استخراج کننده

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]

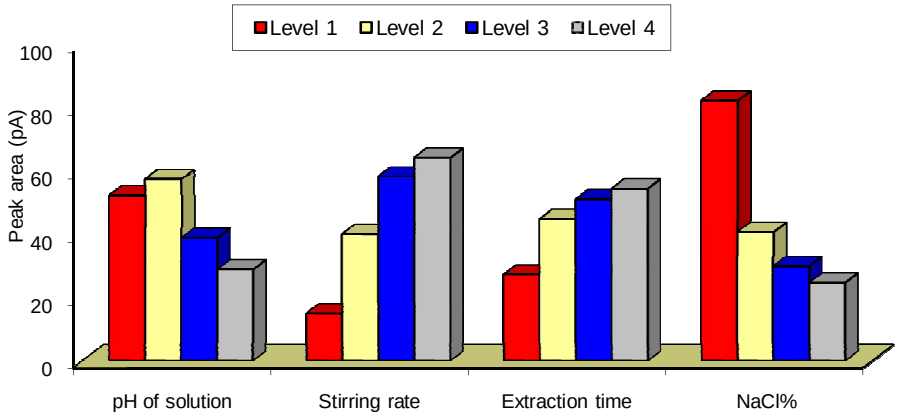
نتایج بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر استخراج آمیتراز با استفاده از روش طراحی آرایه اورتوگونال: در این مطالعه روش تاگوشی برای بهینه سازی روش HF-LPME آمیتراز به کار برده شد. این روش طراحی آزمایش از روش‌های طراحی فاکتوریال جزئی است که در آن از آرایه‌های اورتوگونال برای دنبال کردن فاکتورها در یک سری از ترکیبات آزمایشی به کار برده می‌شود و نتایج به دست آمده با استفاده از روش‌های ریاضی رایج می‌توانند آنالیز شوند. اخیراً، چندین کاربرد از این روش گزارش شده است (32-30). توصیف با جزییات کامل طراحی آرایه اورتوگونال در مرجع آورده شده است (33). برای طراحی دو یا سه سطحی، توجه زیادی در انتخاب سطح‌های هر فاکتور نیاز است (سطح هر فاکتور، به عنوان مقداری تجربی که هر فاکتور برای انجام آزمایش می‌تواند به خود اختصاص دهد، تعریف می‌شود). برای طراحی چهار سطحی، فرآیند انتخاب سطوح بسیار ساده‌تر است و کمتر منجر به نتایج گمراه کننده می‌شود. بنابراین یک طرح چهار سطحی منجر به نمایش با جزئیات بیشتری می‌شود و نشان می‌دهد که چگونه تابع پاسخ با تغییر در سطوح متغیرها تحت تأثیر قرار می‌گیرد. نتایج آزمایش‌های طراحی آرایه اورتوگونال (OAD) با روش آنالیز واریانس (ANOVA) و یا آنالیز مشاهده مستقیم (که آنالیز گستره نیز نامیده می‌شود) صورت می‌گیرد (35، 34). در ANOVA، اثرات فاکتورهای مختلف روی تابع پاسخ و برهمکنش میان فاکتورهای مختلف با محاسبه مقادیر F-ratio (نسبت واریانس‌ها) و درصد مشارکت هر فاکتور PC (Percentage contribution) ارزیابی می‌شود. در آنالیز مشاهده مستقیم، پاسخ‌ها در مقابل سطح‌های فاکتورهای مختلف به صورت مستقیم و از روی منحنی خط شکسته (Broken line plot) می‌توانند مشاهده شوند. فاکتورهایی که به طور معنی‌داری خروجی را تحت تأثیر قرار می‌دهند، می‌توانند با استفاده از هر دو روش ANOVA و آنالیز مشاهده مستقیم داده‌های تجربی به دست آیند. لازم است که به این نکته توجه شود که با انتخاب دقیق فاکتورها، استفاده از OAD بدون این که کیفیت نتایج را تحت تأثیر قرار دهد می‌تواند روش آزمایشی را ساده‌تر کند. معادلات به کار برده شده برای محاسبه مربع حاصل جمع ها، میانگین مربعات، درجه آزادی و مقادیر F در روش ANOVA قبلاً در مراجع ذکر شده است (34).

طراحی چهار متغیره‌ی چهار سطحی (4^4) به منظور ارزیابی متغیرهای زیر که روی HF-LPME آمیتراز تأثیر دارند، به کار برده شد: pH محلول نمونه، سرعت همزدن، زمان استخراج و درصد NaCl. به منظور تخمین بهترین شرایط برای استخراج آمیتراز، مطابق با طراحی صورت گرفته (OA_{16}) 16 آزمایش برای رسیدن به شرایط بهینه صورت گرفت. فاکتورها به همراه سطوح آنها در جدول 1 گزارش شده است. برای افزایش دقت و تکرار پذیری فرآیند بهینه سازی، هر آزمایش دو بار تکرار شد. بنابراین برای به دست آوردن شرایط بهینه در مجموع 32 آزمایش انجام شد. مقادیر میانگین سطح زیر پیک‌ها برای فاکتورها در هر سطح مطابق با آزمایش‌های صورت گرفته محاسبه شد. برای مثال، سطح زیر پیک‌ها برای 4 آزمایش که در آن pH محلول برابر 4 بود به عنوان مقادیر میانگین 8 آزمایش (هر آزمایش یک تکرار داشت) بررسی شد. مقادیر میانگین چهار سطح هر فاکتور (مثل pH) آشکار می‌کنند که چگونه راندمان استخراج وقتی که سطح هر فاکتور تغییر می‌کند، تغییر خواهد کرد. شکل 3 میانگین سطح زیر پیک‌ها را به عنوان تابعی از سطوح فاکتورهای مطالعه شده نشان می‌دهد.

جدول 1. آرایه اورتوگونال طراحی شده برای بهینه سازی روش HF-LPME

شماره آزمون	pH	سرعت همزدن (rpm)	زمان استخراج (دقیقه)	%نمک (w/v)
1	4	200	10	0
2	4	500	20	5
3	4	800	30	10
4	4	1000	45	15
5	6	200	20	10
6	6	500	10	15
7	6	800	45	0
8	6	1000	30	5
9	8	200	30	15
10	8	500	45	10
11	8	800	10	5
12	8	1000	20	0
13	10	200	45	5
14	10	500	30	0
15	10	800	20	15
16	10	1000	10	10

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]



شکل 2. اثر سطوح مختلف پارامترهای ارزیابی شده روی تابع پاسخ

مطابق با نتایج به دست آمده (شکل 3)، مقادیر بهینه متغیرهای انتخاب شده برای روش HF-LPME آمیتراز به این صورت است که pH نمونه باید روی 6 تنظیم شود، سرعت همزدن 1000 دور بر دقیقه باشد، زمان استخراج 45 دقیقه و نمک نباید به محلول اضافه شود.

نتایج ANOVA برای مدل انتخاب شده در جدول 2 نشان داده شده است این جدول پس از به اشتراک گذاشتن سهم pH و زمان استخراج با خطا به دست آمده است. جزئیات کامل نحوه محاسبه مقادیر میانگین و آنالیز واریانس نتایج در کارهای قبلی به طور کامل گزارش شده است (34).

اثر قدرت یونی: اثر قدرت یونی محلول نمونه در گستره‌ی صفر تا 15 درصد وزنی حجمی سدیم کلراید بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که یک رابطه‌ی معکوس میان مقدار آمیتراز استخراج شده و غلظت نمک وجود دارد (شکل 2).

اثر سرعت همزدن: همزدن محلول نقش مهمی در افزایش انتقال جرم و افزایش راندمان استخراج دارد. از این رو اثر این عامل در گستره 200 تا 1000 rpm مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در شکل 2 نمایش داده شده است.

اثر pH محلول: آمیتراز در کل بازه pH محلول‌های آبی ناپایدار است ولی سرعت هیدرولیز آن در محلول‌های اسیدی (در pH < 2) هیدرولیز آن بسیار سریعتر است. برای بررسی اثر pH روی استخراج آمیتراز، مطابق با سطوح انتخاب شده در طراحی آزمایش، محلول‌هایی با pHهای 4، 6، 8 و 10 با اضافه کردن محلول‌های سود یا اسید کلریدریک تنظیم شد.

جدول 2. جدول ANOVA برای بهینه سازی روش HF-LPME

فاکتور	DOF[a]	Sum of squares	واریانس	F-ratio[b]	Pure sum of squares	PC%[c]
pH نمونه حلال	-	3256/74	-	pooled	-	-
سرعت همزدن	3	14595/35	4865/12	267/117	11/69	30/04
زمان استخراج	-	3128/53	-	pooled	-	
درصد نمک	3	19435/67	6478/56	930/533	15/57	40/93
خطا	25	10400/44	416/02			29/03
کل	31	44431/46				100

[a] Degrees of freedom
[b] $F_{critical\ (3,\ 25;\ 0.05)} = 2.99$
[c] Percent contribution

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]

اثر زمان استخراج: اثر زمان استخراج در شکل 2 نشان داده شده است. همان گونه که می‌توان دید با افزایش زمان استخراج از 10 تا 45 دقیقه راندمان‌های استخراج افزایش می‌یابد. بر پایه نتایج به دست آمده، زمان استخراج 45 دقیقه به عنوان زمان استخراج بهینه برای ادامه کار انتخاب شد.

ارقام شایستگی روش HF-LPME: نتایج حاصل از معتبر-سازی روش HF-LPME در جدول 3 و همچنین مقایسه این نتایج با سایر روش‌ها در جدول 4 نشان داده شده است.

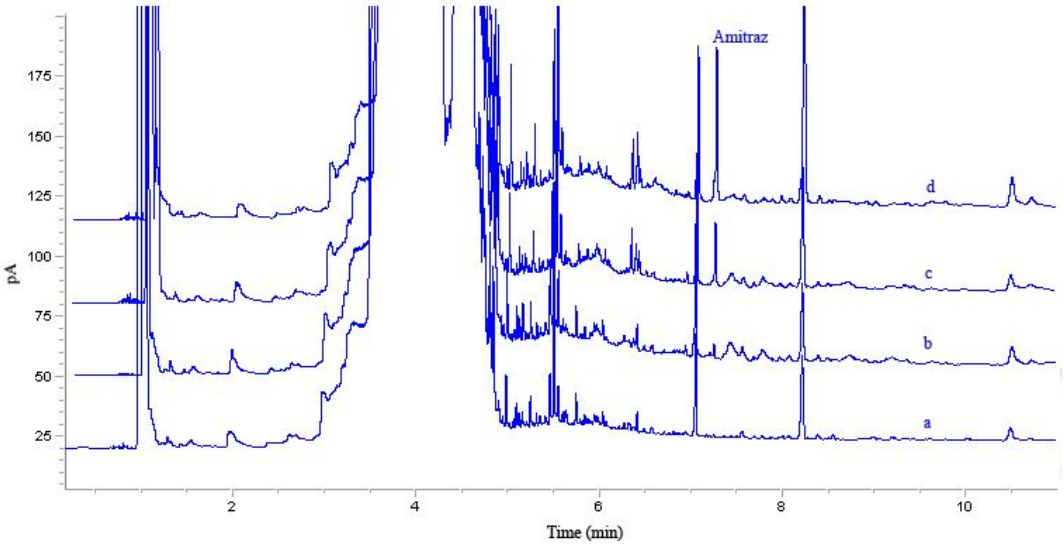
غلظت آمیتراز در انواع نمونه‌های عسل: به منظور ارزیابی کارایی روش پیشنهادی، 10 نمونه‌ی مختلف از سوپر مارکت‌های شهر تهران تهیه گردید و تحت فرآیند HF-LPME با 3 بار تکرار قرار گرفتند. مقادیر میانگین یافت شده از آمیتراز موجود در نمونه‌ها گزارش شد. نتایج حاصل از این بررسی در جدول 5 آورده شده است. همچنین صحت روش با استفاده از مقدار مشخص اضافه شده آمیتراز به نمونه‌های انتخابی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت (شکل 3).

جدول3. ارقام شایستگی روش پیشنهاد شده برای بافت عسل

ماتریکس	حدتشخیص ($\mu g\ mL^{-1}$)	تکرارپذیری%	فاکتور تغلیظ	رنج خطی ($\mu g\ mL^{-1}$)	درصد استخراج%	R^2
عسل	0/01	14>	75	1-0/02	3	0/9906

جدول 4. مقایسه روش پیشنهاد شده با سایر روش‌های بکار رفته برای اندازه‌گیری آمیتراز

ماتریکس	روش استخراج	سیستم شناسایی	سراسر زمان آنالیز (دقیقه)	مرحله هیدرولیز	حدتشخیص ($ng\ mL^{-1}$)	رنج خطی ($\mu g\ mL^{-1}$)	تکرارپذیری %	منبع
عسل	HSME	GC-TSD	60>	دارد	10	10-0/03	10	6
موم	LLE	GC-ECD	60>	دارد	8	-	15<	9
پلاسما	SPME	GC-TSD	60>	ندارد	-	0/4-0/02	15<	11
عسل	SPME	GC-MS	60<	ندارد	6	-	11<	5
موم	SPME	GC-ITD	60<	دارد	1	50-0/001	12<	8
عسل	LLE	HPLC-DAD	60>	ندارد	1.5	-	5<	10
عسل	HF-LPME	GC-FID	60<	ندارد	10	1-0/02.	14<	کار فعلی



شکل 3. کروماتوگرام GC برای نمونه عسل 1، a) بدون spike، b) 20، c) 100 و d) 250 نانوگرم بر میلی‌لیتر آمیتراز.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]

• بحث

بیشترین راندمان استخراج زمانی به دست آمد که از 1- آندکانول به عنوان حلال استخراج کننده استفاده شد. دلیل این که این حلال کارایی استخراج بهتری را نشان می‌دهد، می‌تواند به علت امتزاج پذیری بسیار کمتر این حلال با آب باشد. بنابراین در سرعت‌های چرخش بالا و زمان‌های استخراج طولانی میزان هدر رفتن حلال کمتر می‌شود. از طرف دیگر، این حلال به علت داشتن گروه هیدروکسیل توانایی تشکیل پیوند هیدروژنی با آمیتراز را دارد که این امر نیز به افزایش راندمان استخراج با این حلال می‌افزاید.

بر پایه نتایج به دست آمده در آنالیز واریانس اولیه، مشاهده شد که درصد مشارکت pH و زمان استخراج کمتر از درصد مشارکت خطا می‌باشد به عبارت دیگر تغییر ایجاد شده در سطوح مختلف این فاکتورها تاثیر معناداری بر روی پاسخ ندارد. بنابراین، درصد مشارکت این فاکتورها می‌توانند با خطا به اشتراک گذاشته شود (34). مقایسه مقادیر F محاسبه شده برای هر فاکتور با مقدار بحرانی آن با درجه آزادی 3 (برای هر فاکتور) و 19 (برای خطا) در سطح اطمینان 95% نشان می‌دهد که درصد نمک، سرعت همزدن، pH محلول و زمان استخراج اثر معنی‌داری روی استخراج آمیتراز دارند ($F_{calculated}>F_{critical}$). درصد نمک و سرعت همزدن بیشترین تأثیر را روی میزان استخراج دارند. بعد از به اشتراک گذاری فاکتورهای pH محلول و زمان استخراج با خطا، درصد مشارکت NaCl و سرعت همزدن به ترتیب 40/9 و 30 درصد به دست آمد.

این موضوع که درصد نمک بیشترین تاثیر را بر روی راندمان استخراج دارد، پدیده ای است که قبلاً نیز در استخراج آمیتراز با روش مستقیم SPME مشاهده شده است (11). آنها اظهار داشته‌اند که نمک ممکن است در محلول با آنالیت از طریق برهمکنش‌های الکتروستاتیکی یا تشکیل زوج- یون بر همکنش کند که این پدیده توانایی آمیتراز را برای حرکت به فاز آلی کاهش می‌دهد. از طرف دیگر با افزایش غلظت نمک، ویسکوزیته محلول افزایش می‌یابد و سنتیک انتقال جرم در فاز مشترک فیبر با محلول آبی کاهش می‌یابد که این عامل باعث کاهش آنالیت استخراج شده می‌شود. بنابراین آزمایش‌های بعدی بدون اضافه کردن نمک انجام شد.

HF-LPME دو فازی بر پایه توزیع آنالیت میان دو فاز آبی و آلی می‌باشد. نظریه بازداری جرم حل شونده (Penetration theory of mass of solute) نشان می‌دهد که ضریب انتقال جرم از فاز آبی به آلی با افزایش سرعت همزدن افزایش می‌یابد. بنابراین آشفتگی در محلول نمونه، انتقال جرم حل شونده از فاز آبی به آلی را بهبود می‌بخشد و در نتیجه تعادل میان فازهای آبی و آلی می‌تواند سریع‌تر حاصل شود. راندمان استخراج با افزایش سرعت همزدن افزایش می‌یابد. بنابراین، سرعت همزدن 1000 دور بر دقیقه، ماکزیمم سرعت همزدن قابل دسترس برای همزن، برای آزمایش‌های بعدی به کار برده شد.

نتایج نشان می‌دهد که در pH=6 راندمان استخراج برای آمیتراز بیشترین مقدار را دارد. در pHهای بالا و پایین، راندمان استخراج به علت هیدرولیز آمیتراز در محلول‌های اسیدی و قلیایی کاهش می‌یابد. این نتایج تطابق خوبی با نتایج به دست آمده از کارهای قبلی می‌باشد (15-13). در این کارها با بررسی اثر pH روی پایداری آمیتراز به این نتیجه رسیده‌اند که اندازه‌گیری آمیتراز به تنهایی زمانی امکان پذیر است که نمونه با آبی با pH خنثی یا اسیدی ضعیف رقیق شود که آمیتراز بیشترین پایداری را در این حالت دارد. بنابراین، برای کارهای بعدی pH نمونه با محلول 0/01 مول بر لیتر سدیم استات در pH=6 تنظیم شد.

با افزایش زمان استخراج، میزان انتقال جرم افزایش یافته و در نتیجه میزان راندمان استخراج افزایش می‌یابد که این امر منجر به افزایش سیگنال آمیتراز می‌گردد. لازم به ذکر است که در زمان‌های بالاتر از 45 دقیقه به علت هدر رفت حلال استخراجی میزان سیگنال آمیتراز کاهش می‌یابد.

آزمایش‌های بعدی تحت شرایط بهینه انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که تحت شرایط بهینه‌ی به دست آمده از ماتریس (4^4) OA_{16}، بازیابی‌ها مشابه کارایی بهینه محاسبه شده‌ای هستند که با استفاده از عبارت زیر به دست می‌آید:

$$A_{opt}=\frac{T}{N}+(\bar{s}-\frac{T}{N})+(\bar{p}-\frac{T}{N})+(\bar{r}-\frac{T}{N})+(\bar{t}-\frac{T}{N}) \quad (1)$$

T جمع کل نتایج، N تعداد کل نتایج و A_{opt} کارایی تحت شرایط بهینه است. $\bar{s}$، $\bar{p}$، $\bar{r}$ و $\bar{t}$ کارایی‌های متوسط درصد نمک، pH، سرعت همزدن و زمان استخراج در سطوح بهینه آنها می‌باشد. بر پایه معادلات بالا در شرایط بهینه، کارایی تنها با به کار بردن فاکتورهای مهم (تمام فاکتورها در این مطالعه) حدس زده می‌شوند (34). در شرایط بهینه، بازه اطمینان (C.I.) کارایی با استفاده از عبارت زیر حساب می‌شود:

$$C.I.=\pm\sqrt{\frac{F(1,n_2)\times V_e}{N_e}} \quad (2)$$

$F(1, n_2)$ مقدار F حاصل از جدول F در سطح اطمینان مورد نیاز در درجه آزادی 1 و درجه آزادی n_2 برای خطا می‌باشد، V_e، واریانس خطا که از ANOVA به دست آمده و

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]

N_e تعداد تکرارهای مؤثر است. روش تاگوشی پیش بینی می‌کند که نتایج در شرایط بهینه در گستره‌ی 112/5 تا 138/1 (بر پایه سطح زیر پیک) خواهد بود. میانگین نتایج آزمایش‌ها در شرایط بهینه برای سه بار تکرار 11/2 ± 112/3 بود. این نتایج نشان می‌دهد که روش تاگوشی می‌تواند به عنوان روشی سریع و قابل اعتماد برای بهینه‌سازی متغیرهای کنترل کننده استخراج در روش HF-LPME به کار برده شود.

برخی ویژگی‌های روش پیشنهاد شده از قبیل گستره‌ی خطی، حد تشخیص، فاکتور تغلیظ، ضریب همبستگی و تکرار پذیری روش تماماً با پیش تغلیظ 10 میلی لیتر محلول استاندارد آمیتراز و نمونه‌های عسل spike شده مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به دست آمده در جدول 3 آورده شده است. آمیتراز گستره‌ی خطی خوبی را با ضریب همبستگی بیشتر از 0/99 در گستره‌ی مطالعه شده در نمونه عسل نشان می‌دهد. حد تشخیص روش بر پایه S/N=3 ارزیابی شد و مقدار آن برای نمونه عسل 10/0 نانوگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. تکرار پذیری روش برای پنج آزمایش تکراری در غلظت 50/0 نانوگرم بر میلی‌لیتر محلول استاندارد آمیتراز و نمونه‌های spike شده عسل مطالعه شد و انحراف استاندارد نسبی کمتر از 14% به دست آمد. فاکتورهای تغلیظ بر پایه تقسیم شیب منحنی کالیبراسیون بر شیب منحنی تزریق مستقیم در نمونه‌های عسل spike شده 75 به دست آمد. روش افزایش استاندارد برای اندازه‌گیری آمیتراز در نمونه‌های عسل به کار برده شد.

مقایسه روش پیشنهاد شده با روش‌های دیگری که برای اندازه‌گیری آمیتراز به کار برده شده‌اند صورت گرفت و نتایج این مقایسه در جدول 5 نشان داده شده است. نتایج گزارش شده نشان می‌دهد که روش HF-LPME دو فازی روشی ساده، سریع، اقتصادی و حساس می‌باشد. زمان کلی آنالیز کوتاه و حذف مرحله هیدرولیز در اندازه‌گیری آمیتراز برای آنالیز سریع این گونه مفید و مطلوب می‌باشد. روش پیشنهاد شده رنج خطی وسیعی دارد که غلظت‌های پایین را نیز پوشش می‌دهد که از این نظر قابل مقایسه با روش‌های SPME GC-MS (5) و SPME GC-ITD (8) می‌باشد. این روش‌ها حساس ولی از نظر هزینه گران می‌باشند. همچنین تکرار پذیری این روش بدون استفاده از استاندارد داخلی پایین و مشابه دیگر روش‌ها می‌باشد.

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که روش HF-LPME به عنوان یک مرحله آماده سازی نمونه قبل از اندازه گیری آمیتراز با دستگاه GC، فاکتورهای تغلیظ بالا و حد تشخیص‌های پایینی را در هر دو بافت آب و عسل ارائه می‌کند. در مقایسه با مقالات چاپ شده (11-5) ، نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که روش پیشنهادی جفت شده با سیستم GC-FID تکنیک ساده، سریع، اقتصادی، حساس و قابل کاربرد برای آنالیز کمی آمیتراز در نمونه‌های آبی و عسل می‌باشد. به علت سادگی و قیمت کم تجهیزات مورد نیاز برای استخراج، فیبر تو خالی بعد هر استخراج به منظور حذف اثر حافظه و آلودگی می‌تواند دور انداخته شود. این امر موجب بهبود فوق العاده تکرارپذیری و تکثیرپذیری روش می‌شود. بنابراین، بدون استفاده از استاندارد داخلی در این روش ما تکرارپذیری‌های خوبی در نمونه عسل داشتیم. روش تاگوشی به عنوان روش بهینه سازی مزایایی از قبیل کاهش تعداد آزمایش‌های لازم برای رسیدن به شرایط بهینه و مطالعه برهمکنش میان فاکتورها را نسبت به روش یک در یک زمان معرفی می‌کند. همچنین کاربرد روش با آنالیز تعدادی نمونه آبی و عسل آزمایش شد و درصد بازیابی‌های خوبی به دست آمد.

• References

1. Jones RD. Xylene/amitraz: A pharmacologic review and profile Vet. Hum. Toxicol.1990; 32: 446-448.
2. Aziz SA, Knowles CO. Inhibition of monoamine oxidase by the pesticide chlordimeform and related compounds. Nature.1973; 242: 417-418.
3. Annex I of Council Regulation (EEC) No. 2377/90. Official Journal of the ~uroiean Communities; No L 224/P; 1990.
4. Brimecombe R, Limson J. Voltammetric Analysis of the Acaricide amitraz and its Degradant, 2,4-dimethylaniline. Talanta. 2007;71: 1298-1303.
5. Rial-Otero R, Gaspar EM, MouraI, Capelo JL. Gas chromatography mass spectrometry determination of acaricides from honey after a new fast ultrasonic-based solid phase micro-extraction sample treatment. Talanta. 2007;71: 1906-14.
6. Shamsipur M, Hassan J, Salar-Amoli J, Yamini Y. Headspace solventmicroextraction-gas chromatographic thermionic specific detector determination of amitraz in honey after hydrolysis to 2,4-dimethylaniline. J. Food Compos. Anal. 2008;21:264-270.
7. Korta E, Bakkali A, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F, Bogdanov S. Determination of amitraz and other acaricide residues in beeswax. Anal. Chim. Acta. 2003;475:97-103.
8. Lenicek J, Sekyra M, Novotna AR, Vasova E, Titera D, Vesel V. Solid phase microextraction and gas chromatography with ion trap detector (GC-ITD) analysis of amitraz residues in beeswax after hydrolysis to 2,4-dimethylaniline. Anal. Chim. Acta. 2006;571:40-44.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]

9. Jiménez JJ, Bernal JL, DelNozal MJ, Alonso C. Extraction and clean-up methods for the determination of amitraz total residues in beeswax by gas chromatography with electron capture detection. Anal. Chim. Acta. 2004;524:271-78.

10. Martel AC, Zeggane S. Determination of acaricides in honey by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. J. Chromatogr. A. 2002; 975: 173-80.

11. QueirozMEC, ValadaoCAA, Farias A, Carvalho D, Lancas FM. Determination of amitraz in canine plasma by solid-phase microextraction-gas chromatography with thermionic specific detection. J. Chromatogr. B. 2003;794:337-42.

12. Ahrens EH, Davey RB, George JE, Cooksey LM. Efficacy and stability of wettable powder amitraz in field and in south Texas. J. Econ Entomol.1989;82: 850-53.

13. Jiménez JJ, Nozal MJ, Bernal JL, Santos M, Mayorga AL. Factors affecting the extraction, hydrolysis and derivatization steps for the quantitation of total residues of amitraz in honey by gas chromatography with electron capture detection Anal. J. Bioanal. Chem. 2002;374: 300-304.

14. Brimecombe RD, Limson JL. Electrochemical investigation of the effect of pH and solvent on amitraz stability. J. Agric. Food Chem. 2006;54: 8139-43.

15. Pierpoint AC, Hapeman CJ, Torrents A. Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis. J. Agric. Food Chem. 1997;45: 1937-39.

16. Korta E, Bakkali A, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F, Kilchenmann V, Bogdanov S. Study of acaricide stability in honey.Characterization of amitraz degradation products in honey and beeswax. J. Agric. Food Chem. 2001;49: 5835-42.

17. Stan HJ. Pesticide residue analysis in foodstuffs applying capillary gas chromatography with mass spectrometric detection: State-of-the-art use of modified DFG-multi method S19 and automated data evaluation. J. Chromatogr. A. 2000;892: 347-77.

18. Muino MAF, Lozano JS. Simplified method for the determination of organochlorine pesticides in honey. Analyst.1991; 116: 269-71.

19. Rasmussen KE, Pedersen- Bjergaard S, Krogh M, Ugland HG, Gronhaug T. Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. J.Chromatogr. A. 2000;873: 3-11.

20. Rasmussen KE, Pedersen- Bjergaard S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. Trends Anal. Chem. 2004;23: 1-10.

21. Halvorsen TG, Pedersen- Bjergaard S, Rasmussen KE. Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction. J. Chromatogr. B. 2001;760: 219-26.

22. Romero-Gonzalez R, Pastor-Montoro E, Martinez-Vidal JL, Garrido-Frenich A. Application of hollow fiber supported liquid membrane extraction to the simultaneous determination of pesticide residues in vegetables by liquid chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun. J. Mass Sp. 2006;20: 2701-2708.

23. Pedersen- Bjergaard S, Rasmussen KE. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids. J. Chromatogr. A. 2006;1109: 183-90.

24. Gjelstad A, Andersen TM, Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S. Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields. J. Chromatogr. A. 2007; 1157: 38-45.

25. HoTS, Halvorsen TG, Rasmussen KE, Pedersen- Bjergaard S. Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport. J. Chromatogr. A .2003;998: 61-72.

26. Ho TS, Reubsaet JLE, Anthonsen HS, Pedersen- Bjergaard S, Rasmussen KE. Liquid-phase microextractionbased on carrier mediated transport combined with liquid chromatography–mass spectrometry: New concept for the determination of polar drugs in a single drop of human plasma. J. Chromatogr A. 2005;1072: 29-36.

27. Yamini Y, Reimann CT, Vatanara A, Jonsson JA. Extraction and preconcentration of salbutamol and terbutaline from aqueous samples using hollow fibersupported liquid membrane containing anionic carrier. J. Chromatogr. A. 2006;1124: 57-67.

28. Zhang J, Su T, Lee HK. Development and application of microporous hollow fiber protected liquid-phase microextraction via gaseous diffusion to the determination of phenols in water. J. Chromatogr. A. 2006; 1121: 10-15.

29. Pedersen- Bjergaard S, Rasmussen KE. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction. J. Chromatogr. A. 2008;1184: 132-142.

30. Billot P, Pitard B. Taguchi design experiments for optimizing the gas-chromatographic analysis of residual solvents in bulk pharmaceuticals. J. Chromatogr. A. 1992;623: 305-313.

31. Yamini Y, Saleh A, Khajeh M. Orthogonal array design for the optimization of supercritical carbon dioxide extraction of platinum(IV) and rhenium(VII) from a solid matrix using cyanex 301. J. Sep. Purif. Tecnol. 2008;61: 109-114.

32. Sobhi HR, Yamini Y, Esrafili A, Haji Hosseini Baghdad Abadi R. Suitable conditions for liquid-phase microextraction using solidification of a floating drop for extraction of fat-soluble vitamins established using an orthogonal array experimental design. J. Chromatogr. A. 2008;1196-1197: 28-32.

33. Wan HB, Lan WG, Wong MK, Mok CY. Orthogonal array designs for the optimization of liquid chromatographic analysis of pesticides. Anal. Chim. Acta.1994;289: 371-80.

34. Roy RK. A Primer on Taguchi Method, Chapter 5, Van Nostrand Reinhold, NY, 1990.

35. Zhu G, Ju H. Determination of naproxen with solid substrate room temperature phosphorimetry based on an orthogonal array design. Anal. Chim. Acta. 2004;506: 177-81.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]

Survey of Amitraz Residue in Some Honey Samples by Microextraction Method and Optimization Using an Experimental Design

Faraji M[1], Amini Kadijani P[2]*

*1- *Corresponding author: Assistant Prof, Food Research Group, Dept. of Food and Agricultural Research, Standard Research Institute, Karaj, Iran, Email: mfaraji@standard.ac.ir*

2. Masters Student of Food science and Technology, Food chemistry field, Islamic Azad University Pharmaceutical Branch Advanced Science & Technology Faculty

Received 16 Oct, 2014 **Accepted 26 Dec, 2014**

Background and Objectives: Amitraz is an insecticide and pesticide that, due to exceptionally strong parasiticide activities, is widely used for biological pollution monitoring. The purpose of this research was to develop and validate a liquid phase extraction technique with hollow fibers (HF-LPME) in order to determine amitraz residue in honey samples.

Materials and Methods: Method of Hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) was used as simple, fast, low cost and sensitive method for determination of the amitraz from honey samples by gas chromatography flame ionization detection. Effects of five experimental factors: type of the extracting solvent, pH of the sample, stirring rate, extraction time and percent of NaCl were studied and optimized.

Results: Analysis of variance showed that percent of salt and stirring rate have major effect on the extraction of amitraz ($p = 0.05$). Method in honey matrix was linear in the range from 20 to 1000 ng/mL with RSD lower than 14% and $r^2 > 0.9901$. Enrichment factor was 75; also the limit of detection (LOD) based on S/N = 3 was 10 ng/mL.

Conclusion: According to obtained high recovery (>90%) of Amitraz by applying HF-LPME method in honey samples, this method is suggested as simple, rapid and sensitive technique.

Keywords: Amitraz, Hollow fiber liquid phase microextraction, Orthogonal array design, Honey sample

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-10-05]