مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هجدهم، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۲، صفحات ۱۰۲-۹۳

تلفیق روش استخراج فاز مایع با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی برای اندازه‌گیری ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای در نمونه‌های عسل و اندازه‌گیری آنها به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا

علیرضا ندرتی[۱] ، آذر حقیقت آسیابر[۲]، محمدرضا افشارمقدم[۳و۴] و جلیل خندقی[۲و۵]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی ، سراب، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران

۳- مرکز آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۴- مرکز ایمنی غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۵- نویسنده مسئول: گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
پست الکترونیکی: khandaghi@iausa.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۴

چکیده

سابقه و هدف: هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای از جمله آلاینده‌های شیمیایی رایج عسل به‌شمار می‌روند که می‌توانند اثرات منفی بر روی سلامت مصرف کننده بگذارند. در مطالعه حاضر، تلفیق روش استخراج فاز مایع با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی بر پایه حلال‌های یونی مغناطیسی به منظور استخراج برخی از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای از نمونه‌های عسل توسعه داده شده و آنالیت های مورد مطالعه با روش کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا آنالیز شده‌اند.

مواد و روش‌ها: پس از استخراج دو مرحله‌ای اسنافتن، فنانترن، آنتراسن و پایرن از نمونه‌های عسل، پارامترهای مؤثر در روش استخراج مانند نوع و حجم حلال استخراج‌کننده، نیروی یونی و مدت زمان ورتکس کردن نمونه بهینه‌سازی شدند. به‌علاوه به منظور اعتباربخشی روش پیشنهادی پارامترهای تجزیه‌ای از قبیل محدوده خطی روش، حد تشخیص، حد اندازه‌گیری، تکرارپذیری و راندمان استخراج ترکیبات هدف محاسبه شدند.

یافته‌ها: پس از اجرای روش تجزیه‌ای بهینه‌شده، ویژگی‌های تجزیه‌ای مطلوب مانند حد تشخیص در محدوده ۰/۱۳ تا ۰/۲۷ نانوگرم در گرم، تکرارپذیری در محدوده ۲/۹ تا ۶/۲ و بازده استخراج ایده‌ال در محدوده ۷۴ تا ۸۲ درصد به‌دست آمد. به‌علاوه صحت بالای روش مذکور با انجام روش استخراج توسعه داده شده و عدم تأثیر منفی بافت نمونه‌ها در استخراج آنالیت‌های هدف مشخص گردید. آنالیز نمونه‌های حقیقی وجود پایرن در ۲ نمونه عسل در مقادیر ۱۱/۳±۰/۲ و ۱۲/۳±۰/۵ را نشان داد.

نتیجه‌گیری: ویژگی‌های تجزیه‌ای مطلوب مانند حساسیت و دقت بالا و همچنین بازده استخراج ایده‌ال، نشان از معتبر بودن روش پیشنهادی دارد. همچنین مصرف حلال‌های سبز را می‌توان از جمله مزایای دیگر روش توسعه داده شده بر شمرد.

واژگان کلیدی: ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای، میکرواستخراج مایع-مایع پخشی، مایعات یونی مغناطیسی، کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا، عسل

• مقدمه

ایمنی ماده غذایی یکی از مهم‌ترین اولویت‌های مصرف‌کنندگان و به تبع آن تولیدکنندگان و سازمان‌های ناظر بر بهداشت هر جامعه‌ای می‌باشد. با توجه به ارزش غذایی و خواص درمانی عسل (عوامل قوی ضد میکروب و نیز هورمون‌هایی از مشتقات استروژن)، این محصول به‌طور گسترده‌ای در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱). عسل نیز مانند سایر مواد غذایی ممکن است به آلاینده‌هایی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-09]

مانند آنتی بیوتیک‌ها و هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی آلوده بوده و اثرات منفی بر روی سلامت مصرف کننده بگذارد (۲).

هیدروکربن‌های آروماتیک حلقوی یا PAHs (Polycyclic aromatic hydrocarbons) از جمله آلاینده‌های شیمیایی رایج در مواد غذایی هستند. در ساختار این مواد دو یا چند حلقه‌ی بنزن وجود دارد که از اتم‌های هیدروژن و کربن تشکیل شده اند. PAHها جزو مهم‌ترین آلاینده‌های محیط زیست نیز به شمار می‌روند و از منابع گوناگون مانند سوخت‌های فسیلی، آتش‌سوزی در جنگل‌ها، دود خودروها و بعضی از فعالیت‌های صنعتی به‌وجود می‌آیند (۳). با توجه به اینکه هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای آب‌گریز بوده و خیلی کم در آب حل می‌شوند، بنابراین در طبیعت ماندگار بوده و به عنوان مثال به مدت طولانی بر روی گرده و شهد گل‌ها باقی خواهند ماند و طبیعتا عسل به‌دست آمده از چنین منابعی می‌تواند حاوی PAHها باشد (۴). با توجه به اینکه هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای تهدید جدی برای سلامت انسان بوده و اثرات سرطان‌زایی دارند، سازمان های نظارتی مقادیر حد مجازی از باقیمانده آن‌ها را در غذاهای گوناگون مانند عسل تعیین نمودند (۵).

با توجه به حساسیت بالای مورد نیاز برای شناسایی باقیمانده این ترکیبات، در اکثر موارد از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا یا High-performance liquid chromatography (۶) و کروماتوگرافی گازی (۷) به عنوان ابزار تجزیه‌ای برای آنالیز آن‌ها استفاده می‌شود. با وجود به‌کارگیری تکنیک‌های تجزیه‌ای پیشرفته و حساس، آنالیز بسیاری از نمونه‌ها مانند عسل اولا به دلیل ماتریکس پیچیده‌ی نمونه‌ها و در ثانی به دلیل مقادیر غلظتی پایین آلاینده‌ها، بدون مراحل مقدماتی پیش غنی‌سازی آنالیت‌ها غیر ممکن است (۸). بنابراین، توسعه و استفاده از روش‌های آماده سازی آسان و کارا قبل از آنالیز نمونه‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

میکرواستخراج مایع-مایع پخشی یا DLLME (Dispersive liquid-liquid micro-extraction) یکی از روش هایی است که در پیش‌تغلیظ، آماده‌سازی و استخراج آلاینده‌های مختلف استفاده شده است (۱۲-۹). بطور ساده طی دو مرحله DLLME، حلال استخراج‌کننده‌ی غیر قابل اختلاط با آب با یک حلال آلی قابل اختلاط با آب یا حلال پخش‌کننده مخلوط شده و به وسیله‌ی سرنگ به داخل محلول آبی حاوی آنالیت‌ها تزریق می‌شود و آنالیت‌های آب‌گریز و یا آب‌گریز شده به داخل قطرات بسیار ریز حلال استخراج‌کننده وارد می‌شوند. در پایان محلول ابری حاصل، سانتریفوژ شده و حلال استخراج‌کننده که چگالی متفاوتی نسبت به آب دارد، جدا می‌شود (۱۳).

اخیراً استفاده و جایگزینی حلال‌های ایمن موسوم به حلال‌های سبز مانند مایعات یونی یا ILs (Ionic liquids) با حلال‌های آلی سمی متداول شده است (۱۴). مایعات یونی مغناطیسی یا MILs (Magnetic ionic liquids) هم شاخه جدیدی از مایعات یونی هستند که با جداسازی حلال بدون فرآیند سانتریفیوژ منجر به کاهش زمان استخراج می‌شوند (۱۵).

در این کار پژوهشی یک شیوه استخراج مؤثر و کارا به منظور استخراج برخی از PAHها از نمونه‌های عسل توسعه داده شده است. برای این منظور از تلفیق روش استخراج فاز مایع با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی استفاده خواهد شد و آنالیت های مورد مطالعه با روش کروماتوگرافی مایع-دتکتور آرایه دیودی (HPLC-DAD) آنالیز خواهند شد.

• مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و مواد شیمیایی

تعداد ۲۰ نمونه عسل شهد کارخانجات مختلف در زمستان سال ۱۴۰۱ از فروشگاه‌های شهر تبریز تهیه و در آزمایشگاه مرکز ایمنی غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی‌تبریز تحت شرایط بهینه‌شده استخراج و آنالیز شدند. استون، استونیتریل، سدیم‌کلرید، ۱-بوتیل ۳-متیل ایمیدازولیوم دی‌برومو دی‌کلرو فرات ([C4MIM][FeCl2Br2])، ۱-بوتیل ۳-متیل ایمیدازولیوم تترا کلرو فرات ([C4MIM][FeCl4]) و ۱-هگزیل ۳-متیل ایمیدازولیوم تترا کلرو فرات ([C6MIM][FeCl4]) با درجه خلوص تجزیه‌ای از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) و استاندارد اسنافتن (Acenaphthene)، فنانترن (Phenanthrene)، آنتراسن (Anthracene) و پایرن (Pyrene) از شرکت مرک (Merck, Darmstadt, Germany) تهیه شد.

روش استخراج

برای انجام فرایند تجزیه‌ای پیشنهادی، ابتدا مقدار ۲ گرم از نمونه عسل با یک گرم آب نمک ۸ درصد وزنی/حجمی به داخل یک لوله آزمایش منتقل شده و سپس مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از حلال استونیتریل به داخل نمونه اضافه و مخلوط حاصل به هم زده شد. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه ورتکس شده و پس از آن در دمای منفی ۱۰ درجه سانتی‌گراد (به‌منظور جامد شدن عسل و سهولت جداسازی حلال) به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ، فاز رویی (استونیتریل حاوی آنالیت‌ها) به‌دقت برداشته و به داخل یک لوله آزمایش دیگر منتقل شد. بر روی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-09]

این فاز مقدار ۶۵ میکرولیتر از مایع یونی مغناطیسی ۱-هگزیل ۳-متیل ایمیدازولیوم تترا کلرو فرات اضافه و متعاقبا این مخلوط با سرنگ شیشه‌ای به داخل ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه پخش گردید. در اثر این عمل آنالیت‌ها به داخل قطرات مایع یونی استخراج می شود که در نهایت قطرات حلال استخراج کننده با آهن‌ربا جمع‌آوری و به سیستم تجزیه‌ای تزریق شدند.

به‌منظور کنترل کیفی سیستم کروماتوگرافی، محلول استاندارد آنالیت‌ها (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) هر روز سه‌بار به دستگاه HPLC (Waters 1525, DAD system, Milford, Massachusetts, USA) تزریق و فاکتور تغلیظ و راندمان استخراج مورد ارزیابی قرارگرفت. دستگاه دارای ستون C18 (۱۵۰ میلی‌متر × ۴/۶ میلی‌متر؛ اندازه ذرات ۵ میکرومتر) و شرایط کارکرد زیر بود: سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و فاز متحرک متشکل از استونیتریل: آب به نسبت ۴۵ به ۵۵ حجمی/حجمی. تعیین هر چهار آنالیت در طول موج ۲۵۴ نانومتر انجام شد.

بهینه‌سازی شرایط استخراج و اعتبارسنجی روش

پارامترهای مؤثر در دو مرحله استخراج توسعه داده شده، ارزیابی و بهینه‌سازی شدند. به‌طوریکه نوع حلال استخراج‌کننده (از بین حلال‌های استون و استونیتریل) و حجم حلال (از بین مقادیر ۱ تا ۲ میلی‌لیتر)، نیروی یونی (با افزودن مقادیر متفاوتی از کلرید سدیم در محدوده ۴ تا ۱۰ درصد وزنی/حجمی) و مدت زمان ورتکس کردن نمونه (در زمان‌های ۱ تا ۶ دقیقه) در مرحله اول (استخراج فاز مایع) مورد بررسی و انتخاب قرار گرفتند. پارامترهای مؤثر در میکرواستخراج مایع- مایع پخشی (مرحله دوم) که شامل انتخاب نوع مایع یونی مغناطیسی (از میان سه حلال [C4MIM][FeCl2Br2]، [C4MIM][FeCl4] و [C6MIM][FeCl4]) و حجم آن (با اضافه کردن مقادیر ۶۰ تا ۸۰ میکرولیتر) و بررسی نیروی یونی (با افزودن مقادیر متفاوتی از کلرید سدیم در محدوده صفر تا ۴ درصد وزنی/حجمی) بود نیز بهینه‌سازی شدند.

به‌علاوه پارامترهای تجزیه‌ای مختلف از قبیل محدوده خطی روش (Linearity range)، حد تشخیص (Limit of detection)، حد اندازه‌گیری (Limit of quantification)، تکرارپذیری (بر اساس درصد انحراف استاندارد نسبی) و راندمان استخراج (Extraction recovery) ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای بررسی و محاسبه شدند. برای بررسی این عوامل از روش "یک پارامتر در یک زمان" استفاده و تأثیر این عوامل با مقایسه سطح زیر پیک حاصل از آنالیت‌ها در شرایط مختلف بررسی شد (۱۶).

این آزمون‌ها و آزمون‌های اعتبار بخشی روش در سه تکرار انجام و نتایج به‌صورت میانگین داده‌ها ± انحراف استاندارد بیان شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایشات در این کار پژوهشی در سه تکرار صورت گرفته است و میانگین نتایج به همراه انحراف استاندارد گزارش شده است. به منظور رسم نمودارها از نرم افزار Excel, 2013 استفاده شده است.

• یافته‌ها

عوامل بهینه شده مؤثر در مرحله اول استخراج

نوع و حجم حلال استخراج‌کننده

برای این‌منظور دو حلال مورد استفاده قرار گرفت و همان‌طوریکه در شکل۱ دیده می‌شود، استونیتریل دارای بیشترین کارایی در استخراج آنالیت‌های مورد نظر بود و برای آزمایشات بعدی انتخاب شد. همچنین بررسی سیگنال‌های تجزیه‌ای بر اساس حجم حلال استخراج‌کننده نشان داد که افزایش حجم حلال تا ۱/۵ میلی‌لیتر سبب افزایش بازده استخراج آنالیت‌های مورد مطالعه شد (شکل۱).

ورتکس کردن نمونه

برای بررسی اثر هم زدن نمونه‌ها در کارائی استخراج، دو روش ورتکس کردن و سونیکاسیون با هم مقایسه شدند که نتیجه مطلوب‌تر از ورتکس کردن نمونه حاصل شد. همچنین یافته‌ها نشان داد، پنج دقیقه ورتکس نمودن نمونه‌ها سبب افزایش سیگنال‌های تجزیه‌ای گردید (شکل۱).

اثر نمک زنی

با توجه به افزایش سیگنال‌های تجزیه‌ای استخراج آنالیت‌های هدف با افزایش قدرت یونی محیط و افزودن کلرید سدیم تا مقدار ۸ درصد وزنی/حجمی (شکل۱)، ادامه مطالعه با افزودن ۸ درصد نمک به‌داخل فاز آبی انجام شد.

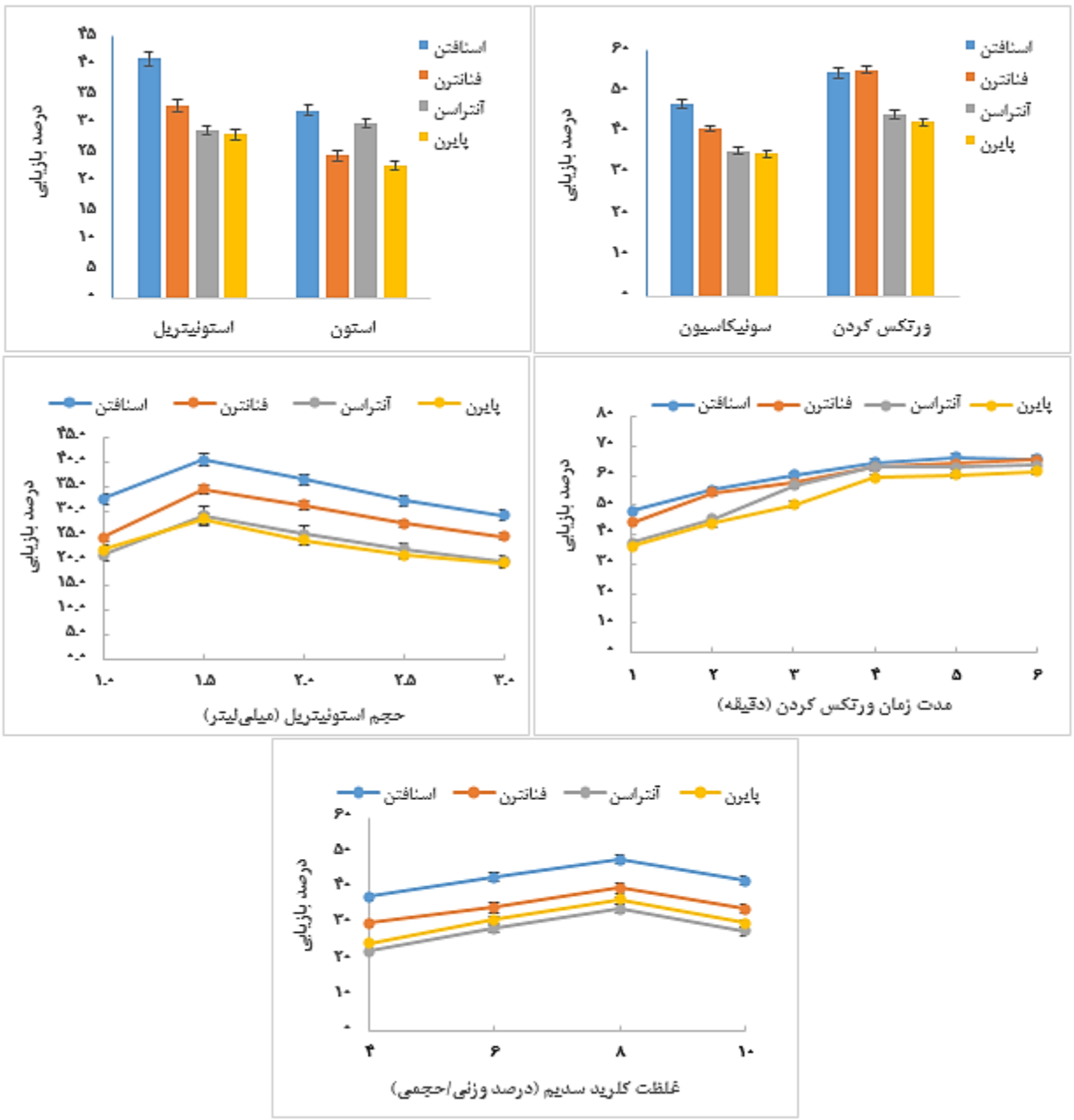
شکل ۱. بهینه‌سازی عوامل مؤثر در کارایی مرحله اول استخراج ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای از نمونه عسل

عوامل بهینه شده مؤثر در مرحله دوم استخراج

نوع و حجم مایع یونی مغناطیسی

در این راستا سه نوع مایع یونی مغناطیسی مختلف مورد استفاده قرار گرفت. چنان‌که در نمودار۲ دیده می‌شود، حلال ۱-هگزیل-۳-متیل ایمیدازولیوم ۴-کلرو فرات بیشترین کارایی استخراج آنالیت‌های مورد نظر را نشان داده و برای آزمایشات بعدی انتخاب شد. ثبت سیگنال‌های تجزیه‌ای ناشی از حجم‌های مختلف این حلال نیز نشان داد که افزایش حجم حلال تا مقدار ۶۵ میکرولیتر سبب تغییر بهبود بازده استخراج شده و پس از آن تقریبا ثابت ماند.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-09]



شکل ۱. بهینه‌سازی عوامل مؤثر در کارایی مرحله اول استخراج ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای از نمونه عسل

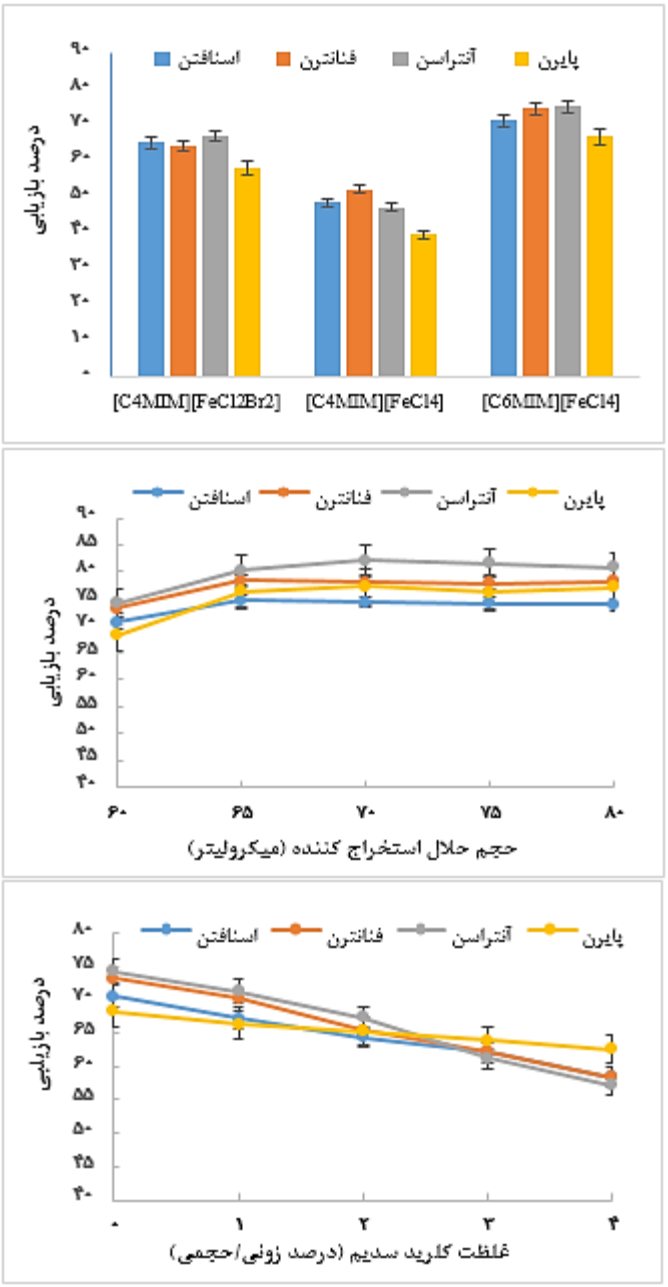
اثر نمک زنی

برای بررسی اثر نمک‌زنی در مرحله استخراج مایع-مایع پخشی، مقادیر مختلفی از کلرید سدیم به داخل نمونه اضافه و روش پیشنهادی ادامه یافت. مطابق شکل۲ با افزایش مقدار کلرید سدیم کارایی روش پیشنهادی کاهش یافت لذا کلیه آزمون‌ها بدون افزایش نمک در این مرحله از استخراج انجام گرفت.

نتایج مشخصات تجزیه‌ای

ارقام شایستگی روش حاضر تحت شرایط بهینه محاسبه و ارائه گردیدند. منحنی‌های کالیبراسیون با تزریق کردن غلظت‌های مختلف از آنالیت‌های مورد مطالعه (۱، ۲، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ نانوگرم در گرم) پس از اجرای روش توسعه یافته ترسیم شده و محدوده خطی بدست آمد. برای غلظت‌هایی که در آن‌ها نسبت سیگنال به نویز ۳ بود، حد تشخیص و برای غلظت‌های با نسبت سیگنال به نویز ۱۰، حد اندازه‌گیری درنظر گرفته شد. دقت روش با استفاده از انحراف استاندارد نسبی (RSD %) محاسبه شد. برای این‌منظور ۶ محلول حاوی یک نانوگرم در گرم از آنالیت‌ها با شرایط یکسان و در حالت بهینه استخراج شدند. درصد RSD بر اساس مساحت زیر پیک‌ها نشان از تکرارپذیری و دقت بالای روش ارائه شده دارد. نتایج اعتبارسنجی روش پیشنهادی در جدول۱ ارائه شده است.

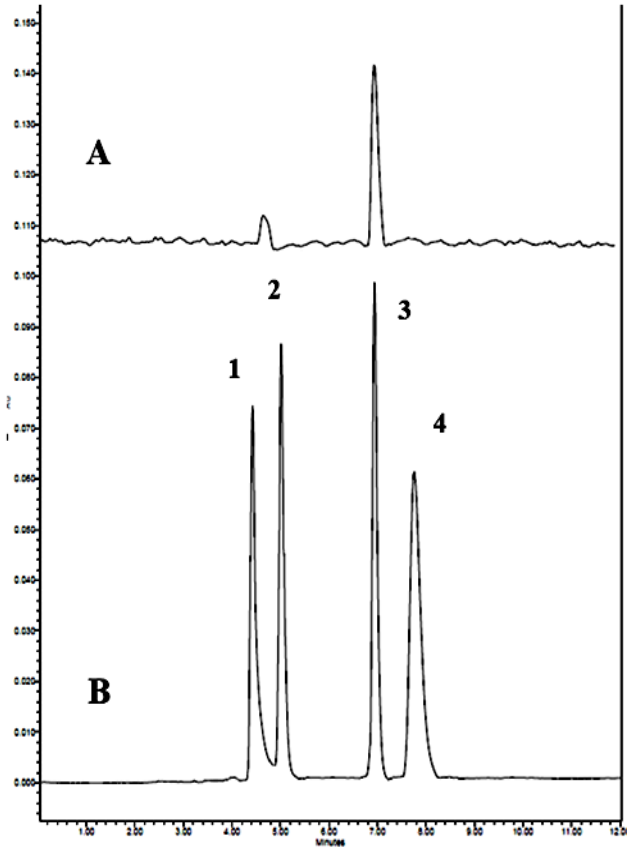
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-09]



شکل ۲. بهینه‌سازی عوامل مؤثر در کارایی مرحله دوم استخراج ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای از نمونه عسل

آنالیز و بررسی اثر بافت نمونه‌های حقیقی

در تحقیق حاضر برای ارزیابی قابلیت روش توسعه داده شده در استخراج ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای، تعداد ۲۰ نمونه حقیقی تحت شرایط بهینه‌سازی شده آنالیز شد و کروماتوگرام‌های حاصل نشان داد که تعداد دو نمونه عسل دارای باقیمانده پایرن در مقادیر ۱۱/۳±۰/۲ و ۱۲/۳±۰/۵ بود و دیگر ترکیبات مورد مطالعه در نمونه‌ها یافت نشد. شکل۳ کروماتوگرام HPLC-DAD محلول استاندارد آنالیت‌ها و یک نمونه حقیقی عسل را نشان می‌دهد.



شکل ۳. کروماتوگرام‌های HPLC-DAD یک نمونه عسل حقیقی (تزریق نشده با آنالیت) (A) و محلول استاندارد ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای به غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر (B) پس از اجرای روش پیشنهادی. (۱): اسنافتن، (۲): فنانترن، (۳): پایرن، (۴): آنتراسن.

بررسی اثر بافت (Matrix) نمونه‌های عسل در استخراج این آنالیت‌ها و ارزیابی صحت روش ارائه شده با استخراج ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای از چهار نمونه عسل تزریق شده با غلظت‌های مختلفی از محلول‌های استاندارد آن‌ها تعیین شد (۱۷). مقادیر بازیافت این آنالیت‌ها نشان داد ماتریکس نمونه‌ها تداخلی در کارایی روش استخراج توسعه داده شده ندارد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-09]

جدول ۱. مشخصات تجزیه‌ای روش پیشنهادی در استخراج ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای در نمونه عسل

آنالیت	محدوده خطی (نانوگرم در میلی‌لیتر)	ضریب تعیین (r^2)	حد تشخیص (نانوگرم در میلی‌لیتر)	حد اندازه‌گیری (نانوگرم در میلی‌لیتر)	درصد انحراف استاندارد نسبی (n= ۶)		بازده استخراج ± انحراف استاندارد
					در یک روز	بین روزها	
اسنافتن	۰/۹۳-۱۵۰	۰/۹۹۴	۰/۲۷	۰/۹۳	۴/۱	۵/۸	۷۴ ± ۵
فنانترن	۰/۷۴-۱۵۰	۰/۹۹۶	۰/۲۲	۰/۷۴	۳/۲	۵/۴	۷۷ ± ۳
آنتراسن	۰/۶۹-۱۰۰	۰/۹۹۹	۰/۲۰	۰/۶۹	۲/۹	۴/۹	۸۲ ± ۴
پایرن	۰/۴۶-۱۰۰	۰/۹۹۸	۰/۱۳	۰/۴۶	۳/۶	۶/۲	۷۷ ± ۳

جدول۲. مطالعه اثر بافت عسل در کارایی روش استخراج ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای در نمونه عسل

آنالیت	انحراف استاندارد ± مقادیر بازیابی نسبی			
	نمونه۱	نمونه۲	نمونه۳	نمونه۴
	نمونه‌ها با مخلوط آنالیت‌ها به غلظت ۲ نانوگرم در گرم تزریق شدند			
اسنافتن	۸۸±۴	۸۲±۷	۹۵±۲	۹۵±۳
فنانترن	۹۴±۲	۸۹±۴	۹۲±۵	۹۷±۵
آنتراسن	۹۲±۴	۹۶ ±۲	۹۶±۲	۱۰۲±۴
پایرن	۹۶ ±۳	۱۰۲ ±۷	۹۵ ±۴	۱۰۶ ±۶
	نمونه‌ها با مخلوط آنالیت‌ها به غلظت ۵۰ نانوگرم در گرم تزریق شدند			
اسنافتن	۹۵±۴	۱۰۳±۷	۹۳±۲	۹۴±۲
فنانترن	۹۰±۲	۱۰۴±۴	۹۸±۵	۹۳±۵
آنتراسن	۸۵ ±۴	۹۶±۲	۹۱±۲	۹۴±۲
پایرن	۸۸ ±۳	۹۳ ±۷	۹۶ ±۴	۹۵ ±۳

• بحث

یکی از پارامترهای مهم در اجرای مرحله استخراج فاز مایع در کار حاضر، انتخاب نوع حلال استخراج‌کننده می‌باشد. این حلال ضمن قابلیت پخش شدن بالا در فاز آبی باید حلالیت کمی در آن داشته باشد. رفتار کروماتوگرافیکی مطلوب و حتی الامکان سازگاری با محیط زیست از دیگر ویژگی‌های یک حلال ایده‌ال محسوب می‌گردد. ضمنا باید بتوان این حلال را با روش‌هایی مانند سانتریفیوژ (به دلیل دانسیته متفاوت) از آب جدا و جمع‌آوری کرد (۹). حجم این حلال نیز بازده استخراج و تکرارپذیری نتایج را تحت تأثیر قرار می‌دهد به‌طوری که افزایش آن سبب افزایش حجم فاز جمع‌شده پس از استخراج شده و فاکتور تغلیظ و بنابراین سیگنال‌های تجزیه‌ای نیز کاهش خواهند یافت. ازطرفی کاهش حجم حلال، کارایی استخراج و تکرارپذیری را کم می‌کند لذا بهینه‌سازی حجم حلال‌های استخراج‌کننده ضروری است (۱۸). در این مطالعه افزایش حجم حلال تا مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر موجب افزایش سیگنال‌های تجزیه‌ای شد.

افزودن کلرید سدیم و ایجاد قدرت یونی محلول آزمایشی اثر دوگانه دارد یعنی ضمن اینکه می‌تواند باعث افزایش نیروی یونی و کاهش 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 (۱۹). لذا یکی از پارامترهای مؤثر در اکثر روش‌های استخراج است که نیاز به ارزیابی و بهینه‌سازی دارد. در مرحله اول روش استخراج توسعه داده شده در تحقیق حاضر، نمک‌زنی (تا مقدار ۸ درصد وزنی/حجمی) سبب افزایش کارایی روش شد.

افزایش تحرکات مولکولی و به‌دنبال آن بالا رفتن ضرایب توزیع آنالیت‌ها با روش‌هایی مانند استفاده از امواج مایکروویو، امواج فراصوت و یا ورتکس کردن نمونه، می‌تواند موجب تسریع فرایند استخراج آنالیت به داخل حلال شود (۲۰). از طرفی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-09]

به‌کارگیری طولانی مدت این فرایندها می‌تواند سبب تغییر شکل و یا تخریب ترکیبات هدف شده و منجر به کاهش راندمان استخراج گردد (۲۱) لذا چگونگی استفاده از این روش‌ها نیز باید مورد ارزیابی و بهینه‌سازی قرار گیرد.

انتخاب نوع حلال استخراج‌کننده در مرحله DLLME نیز از دیگر پارامترهای تأثیرگذار در کارایی روش استخراج می‌باشد. این حلال‌ها باید قابلیت پخش در هر دو فاز آبی و آلی را داشته باشند تا بتوانند آنالیت را به‌خوبی استخراج و جذب کرده و همچنین قابل تزریق به سیستم HPLC باشند (۲۲). عموما حلال‌های آلی (بخصوص حلال‌های کلره) سمی بوده و به محیط زیست نیز آسیب می‌رساند لذا در این مطالعه از مایعات یونی که به‌عنوان حلال‌های بی ضرر و سبز شناخته می‌شوند (۲۳) استفاده شد. همچنین خاصیت مغناطیسی مایعات یونی انتخاب شده منجر به حذف مرحله سانتریفیوژ کردن (به‌منظور جداسازی حلال از فاز آبی) شده و سبب سهولت کار و کوتاه‌تر شدن زمان آنالیز گردید. در این رابطه، حداقل حجم محلول یونی مغناطیسی که بالاترین درصد بازیابی آنالیت‌ها را داشته و در عین حال در پایان عملیات DLLME می‌توانستیم حجم ۱۰ میکرولیتر از آن‌را برداشت و به سیستم کروماتوگرافی تزریق کنیم (یعنی ۶۵ میکرولیتر) مورد استفاده قرار گرفت.

مقایسه پارامترهای تجزیه‌ای روش توسعه داده شده در این تحقیق با چند روش به‌کار رفته توسط دیگر دانشمندان برای استخراج هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای از نمونه‌های عسل نشان داد مقادیر شایستگی روش ارائه شده بهتر و حتی قابل مقایسه با روش‌های آنالیز حساس‌تری مانند به‌کارگیری کروماتوگراف مجهز به آشکارساز اسپکترومتر جرمی برای شناسایی این آنالیت‌ها در نمونه‌های عسل می‌باشد. نتایج این مقایسه در جدول۳ نشان داده شده است.

جدول۳. مقایسه ویژگی‌های تجزیه‌ای روش پیشنهادی با چند روش دیگر در استخراج ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای از نمونه عسل

روش استخراج	آنالیت	محدوده خطی	حد تشخیص	تکرارپذیری	بازده استخراج	منبع
میکرواستخراج فاز جامد پخشی	اسنافتن	۰/۸۲-۵۰۰	۰/۲۴	۴/۳-۶/۲	۷۴	(۵)
کوپل شده به کروماتوگراف گازی	فنانترن	۱/۳۰-۵۰۰	۰/۳۷	۴/۸-۵/۵	۸۱	
با آشکارساز اسپکترومتر جرمی	آنتراسن	۰/۷۹-۵۰۰	۰/۲۱	۶/۲-۷/۵	۷۶	
	پایرن	۰/۴۹-۵۰۰	۰/۱۴	۳/۹-۵/۹	۷۳	
استخراج فاز جامد پخشی مغناطیسی	اسنافتن	۱/۲۰-۵۰۰	۰/۳۶	۲-۵	۷۲	(۲۴)
کوپل شده به کروماتوگراف گازی	فنانترن	۱/۲۲-۵۰۰	۰/۳۶	۴-۶	۸۴	
با آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای	آنتراسن	۰/۷۸-۵۰۰	۰/۲۴	۵-۴	۶۷	
	پایرن	۰/۹۸-۵۰۰	۰/۳۰	۵-۵	۵۹	
استخراج فاز جامد در لوله کوپل شده به	اسنافتن	۰/۸۰-۲۵۰	۰/۲۵	۳/۵-۵/۱	۳۵	(۲۵)
کروماتوگراف مایع با کارایی بالا	فنانترن	۳/۳۰-۲۵۰	۱/۰۰	۴/۲-۴/۳	۵۸	
با آشکارساز ماوراء بنفش	آنتراسن	۱/۶۰-۲۵۰	۰/۵۰	۲/۱-۴/۰	۵۹	
	پایرن	۳/۳۰-۲۵۰	۱/۰۰	۳/۶-۳/۹	۷۸	
استخراج فاز مایع تلفیق‌شده با میکرو	اسنافتن	۰/۹۳-۱۵۰	۰/۲۷	۴/۱-۵/۸	۷۴	
استخراج مایع-مایع پخشی کوپل‌شده به	فنانترن	۰/۷۴-۱۵۰	۰/۲۲	۳/۲-۵/۴	۷۷	مطالعه
کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا	آنتراسن	۰/۶۹-۱۰۰	۰/۲۰	۲/۹-۴/۹	۸۲	حاضر
با آشکارساز آرایه دیودی	پایرن	۰/۴۶-۱۰۰	۰/۱۳	۳/۶-۶/۲	۷۷	

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، تلفیق روش استخراج فاز مایع با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی مبتنی بر مایعات یونی مغناطیسی برای اندازه‌گیری اسنافتن، فنانترن، آنتراسن و پایرن در نمونه عسل به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا توسعه داده شد. پس از بهینه سازی عوامل مؤثر در کارائی هر دو مرحله استخراج پیشنهادی پارامترهای تجزیه‌ای آن مورد ارزیابی قرار گرفت. ویژگی‌های تجزیه‌ای مطلوب مانند حساسیت بالا (حد تشخیص در محدوده ۰/۱۳ تا ۰/۲۷ نانوگرم در گرم)، دقت بالا (تکرارپذیری بر اساس درصد انحراف استاندارد نسبی در محدوده ۲/۹ تا ۶/۲) و بازده استخراج ایده‌ال در محدوده ۷۴ تا ۸۲ درصد، نشان از معتبر و قابل اعتماد بودن روش پیشنهادی دارد. همچنین مصرف حلال‌های سبز و با سمیت کمتر را می‌توان از جمله مزایای دیگر روش توسعه داده شده بر شمرد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-09]

به‌علاوه صحت روش مذکور با انجام روش بهینه شده استخراج در نمونه‌های عسل و عدم تأثیر منفی بافت نمونه‌ها در استخراج آنالیت‌های هدف مشخص گردید. آنالیز نمونه‌های حقیقی وجود پایرن در ۲ نمونه عسل در مقادیر ۰/۲±۱۱/۳ و ۰/۵±۱۲/۳ را نشان داد و دیگر ترکیبات مورد مطالعه در نمونه‌ها یافت نشد.

• References

1. Erejuwa OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS. Honey: a novel antioxidant. Molecules. 2012;17(4):4400-23.

2. Orso D, Floriano L, Ribeiro LC, Bandeira NM, Prestes OD, Zanella R. Simultaneous determination of multiclass pesticides and antibiotics in honey samples based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Anal. Methods. 2016;9:1638-53.

3. Plaza-Bolaños P, Frenich AG, Vidal JLM. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. Analytical methods and trends. J. Chromatogr. A. 2010;1217(41):6303-26.

4. Yang X, Zhang S, Wang J, Wang W, Li J, Chen J, et al. Modulated construction of imine-based covalent organic frameworks for efficient adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from honey samples. Anal. Chim. Acta. 2020;1134:50-7.

5. Fazaieli F, Afshar Mogaddam MR, Farajzadeh MA, Feriduni B, Mohebbi A. Development of organic solvents-free mode of solidification of floating organic droplet–based dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from honey samples before their determination by gas chromatography–mass spectrometry. J. Sep. Sci. 2020;43(12):2393-400.

6. Arena K, Mandolfino F, Cacciola F, Dugo P, Mondello L. Multidimensional liquid chromatography approaches for analysis of food contaminants. J. Sep. Sci. 2021;44(1):17-34.

7. Pirsa S, Alizadeh N. Nanoporous conducting polypyrrole gas sensor coupled to a gas chromatograph for determination of aromatic hydrocarbons using dispersive liquid–liquid microextraction method. IEEE Sens. J. 2011;11(12):3400-5.

8. Buldini PL, Ricci L, Sharma JL. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. J. Chromatogr. A. 2002;975(1):47-70.

9. Meshkini K, AfsharMogaddam M, Khandaghi J. 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. Iran. J. Nutr. Sci. 2021;16(2):57-67 [in Persian].

10. Zare Sani M, Mogaddam MRA, Khandaghi J. Combination of cold induced HLLME with an effervescence-assisted DLLME based on deep eutectic solvent decomposition; application in extraction of some pyrethroid and carbamate pesticides from edible oils. Int. J. Environ. Anal. Chem. 2021:1-16.

11. Pirsa S, Alizadeh N. Rapid determination of pyridine derivatives by dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography/gas sensor based on nanostructured conducting polypyrrole. Talanta. 2011; 87:249-54.

12. Zeiadi S, Mogaddam MRA, Farajzadeh MA, Khandaghi J. Combination of dispersive solid phase extraction with lighter than water dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of organophosphorous pesticides from milk. Int. J. Environ. Anal. Chem. 2020:1-14.

13. Rezaee M, Assadi Y, Hosseini M-RM, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. J. Chromatogr. A. 2006;1116(1-2):1-9.

14. Afshar Mogaddam M, Khandaghi J, Vajdi HokmAbad S. Use of Temperature-controlled Ionic Liquid-assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for the Detection of Amoxicillin, Cloxacillin and Erythromycin Residues in Cow Milk using High Performance Liquid Chromatography. Iran. J. Nutr. Sci. 2023;18(1):119-26 [in Persian].

15. Gholizadeh S, Mirzaei H, Khandaghi J, Mogaddam MRA, Javadi A. Ultrasound–assisted solvent extraction combined with magnetic ionic liquid based-dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of mycotoxins from tea samples. Food Compost. Anal. 2022;114:104831.

16. https://www.idbs.com/blog/2019/07/ich-m10-bioanalytical-method-validation-guideline-what-the-new-draft-means-for-bioanalysis. Access date: 11/14/2022.

17. Chandran S, Singh R. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. Die Pharmazie. 2007;62(1):4-14.

18. Jeddy M, Khandaghi J. Detection and quantification of phytosterols in yogurt using gas chromatography. Food Hygiene. 2019;9(1 (33)):59-70 [in Persian].

19. Limoei Khosrowshahi B, Marzi Khosrowshahi E, Afshar Mogaddam M, KHandaghi J. Use of Dispersive Solid-Phase Extraction in Combination with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Assessment of Organophosphorus Pesticides in Fruit Juice Samples Using Gas Chromatography-Nitrogen-Phosphorus Detector. Iran. J. Nutr. Sci. 2022:87-98 [in Persian].

20. Amini R, Khandaghi J, Mogaddam MRA. 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 Anal. Methods. 2018;11(11):3267-75.

21. Sheikhzadeh F, Mogaddam MRA, Farajzadeh MA, Khandaghi J. Development of microwave radiations-induced homogeneous liquid-liquid microextraction method for extraction of pyrethroid pesticides in fruit and vegetable samples. Int. J. Environ. Anal. Chem. 2020:1-12.

22. Rasi H, AfsharMogaddam M, Khandaghi J. Application of a new extraction method coupled to high performance

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-09]

liquid chromatography for tetracyclines monitoring in cow milk. Journal of food science and technology (Iran). 2021;18(113):339-49 [in Persian].

23. Ghasemi R, Mirzaei H, Mogaddam MRA, Khandaghi J, Javadi A. 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. Microchem. J. 2022;181:107764.

24. Afshar Mogaddam MR, Jouyban A, Nemati M, Farajzadeh MA, Marzi Khosrowshahi E. Application of curcumin as a green and new sorbent in deep eutectic solvent-based dispersive micro-solid phase extraction of several polycyclic aromatic hydrocarbons from honey samples prior to gas chromatography–mass spectrometry determination. J. Sep. Sci. 2021;44(21):4037-47.

25. Sun M, Han S, Loussala HM, Feng J, Li C, Ji X, et al . Graphene oxide-functionalized mesoporous silica for online in-tube solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from honey and detection by high performance liquid chromatography-diode array detector. Microchem. J. 2021;166:106263.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-09]

Combination of Liquid-phase Extraction with Dispersive Liquid-liquid Micro-extraction for the Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Honey Sample Using High-performance Liquid Chromatography

*Nodrati A.R[1], Haghighat Asiabar A[2], Afshar Mogaddam M.R[3,4], Khandaghi J [*2,5]*

1- MSc Graduate of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran

2- Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, 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- *Corresponding author: Department of food Biotechnology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran. E.mail: khandaghi@iausa.ac.ir*

Received 17 Jun, 2023 **Accepted 26 Sep, 2023**

Background and Objective: One of the frequent chemical contaminants in honey that can harm consumers' health is the group of polycyclic aromatic hydrocarbons. In the present study, combination of liquid-phase extraction method with magnetic ionic liquids based dispersive liquid–liquid microextraction was developed to analyze polycyclic aromatic hydrocarbons in honey samples using high-performance liquid chromatography.

Materials and Methods: Following two-step extraction of acenaphthene, phenanthrene, anthracene and pyrene from honey samples, effective extraction parameters such as the type and volume of extracting solvent, ionic strength and vortexing time of the sample were optimized. To validate the proposed method, analytical parameters such as the linear range, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), reproducibility (RSD%) and extraction recovery percent (ER%) of the target compounds were calculated.

Results: After using the optimized analytical method, optimal analytical characteristics such as LOD in the range of 0.13 to 0.27 ng/g, RSD% in the range of 2.9 to 6.2 and ideal ER% in the range of 74 to 82% were achieved. In addition, high accuracy of the developed method was supported by the fact that sample matrices included no detrimental effects on the extraction of the target analytics. Analysis of the real samples showed the presence of pyrene in two honey samples with quantities of 11.3 ±0.2 and 12.3 ±0.5.

Conclusion: The suggested approach is valid, as indicated by favorable analytical parameters such as high sensitivity and accuracy as well as an ideal ER%. Moreover, use of green solvents can be addressed as one of the advantages of the developed method.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons, Dispersive liquid-liquid microextraction, Magnetic ionic liquids, High performance liquid chromatography, Honey

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-09]