مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هفدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۱، صفحات ۱۰۸-۹۹

توسعه روش استخراج مایع-مایع هموژن تلفیق شده با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی بر پایه حلال اتکتیک عمیق به منظور استخراج برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها از نمونه‌های تخم مرغ و اندازه‌گیری کمی آن‌ها با روش HPLC

مرتضی فتحی[۱]، حسین رستمی[۱]، محمد صمدی[۲]

۱- پژوهشگر مرکز تحقیقات بهداشت نظامی، پژوهشکده سبک زندگی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

۲- نویسنده مسئول: استادیار مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزشی، پژوهشکده سبک زندگی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
پست الکترونیکی: samadi.mohammad@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۶/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۴

چکیده

سابقه و هدف: آنتی‌بیوتیک‌ها ترکیبات شیمیایی هستند که امروزه به طور گسترده‌ای برای درمان بیماری‌ها در حیوانات در سراسر جهان استفاده می‌شوند. عدم رعایت زمان منع مصرف و نیز مصرف بیش از میزان توصیه شده، سبب وجود باقیمانده آنتی‌بیوتیک در مواد غذایی مانند تخم مرغ می‌شود که می‌تواند اثرات نامطلوبی بر روی سلامت مصرف کننده داشته باشد. هدف از این پژوهش توسعه روشی مناسب جهت اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک‌ها در تخم مرغ بود.

مواد و روش‌ها: در این کار پژوهشی یک روش کارآمد تحت عنوان استخراج مایع-مایع هموژن تلفیق شده با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی مبتنی بر حلال اتکتیک عمیق به منظور استخراج پنی سیلین جی، اکسی تتراسایکلین، کلرامفنیکل و داکسی سایکلین از نمونه‌های تخم مرغ و سپس اندازه‌گیری آن‌ها با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا توسعه داده شد.

یافته‌ها: تحت شرایط بهینه استخراج، راندمان‌های استخراج آنالیت‌ها در محدوده ۵۹ تا ۷۵٪ بودند. حد تشخیص‌های این روش برای آنالیت‌ها در محدوده ۴/۴-۳/۷ نانوگرم بر گرم بود. از مزیت دیگر روش پیشنهادی می‌توان به مصرف کم حلال‌های آلی اشاره کرد. نتایج بدست آمده نشان دادند که ۲۸/۵۸ درصد از نمونه‌های تخم مرغ بررسی شده حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه آلوده بودند.

نتیجه‌گیری: روش توسعه داده شده به خوبی قابلیت اندازه‌گیری آنتی‌بیوتیک‌های مذکور در تخم مرغ را دارا می‌باشد و بنابراین می‌توان این روش را با هدف افزایش ایمنی غذایی در صنایع مختلفی از جمله غذا و نیز طیور به کار گرفت.

واژگان کلیدی: باقیمانده آنتی‌بیوتیک، استخراج مایع-مایع هموژن، DLLME، حلال اتکتیک عمیق، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، تخم‌مرغ

• مقدمه

با توجه به وسعت استفاده از محصولات دامی، ایمنی محصولات یکی از مهم‌ترین اولویت‌های تولید کنندگان، مصرف کنندگان و سازمان‌های نظارتی می‌باشد. آلودگی محصولات دامی می‌تواند انواع آلودگی های میکروبی، شیمیایی و انگلی را در بر گیرد. بخش مهمی از آلودگی محصولات دامی به طریق شیمیایی در اثر استفاده از موادی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و هورمون‌ها در حین فرآیند تولید ایجاد می‌شود (۱). آنتی‌بیوتیک‌ها مواد ضد میکروبی هستند که محصول متابولیسم ثانویه میکروارگانیسم‌ها بوده و در غلظت‌های پایین قادر به تخریب باکتری‌ها یا ممانعت از رشد آنها از طریق تأثیر بر عناصر ساختمانی یا متابولیکی مورد نیاز برای زندگی آنها می‌باشند. آنتی بیوتیک‌ها براساس ساختار شیمیایی در دسته‌های مختلفی تقسیم بندی می‌شوند که از جمله مهمترین آن ها می‌توان به آمینوگلیکوزید ها، بتالاکتام ها، تتراسایکلین‌ها و آمفنیکول‌ها اشاره کرد. مشکلات بهداشتی گوناگون مانند ایجاد آلرژی، اختلالات متابولیکی، احتمال

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.1.5]

ایجاد سرطان، ایجاد میکروارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و کاهش حساسیت در برابر درمان آنتی‌بیوتیکی، نگرانی در مورد وجود باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در مواد غذایی را افزایش داده است (۲).

برای اندازه‌گیری آنالیت‌های مختلف در مواد غذایی اغلب از روش‌های کروماتوگرافی استفاده می شود. علیرغم توسعه‌ی دستگاهی این روش ها در سال های اخیر، هنوز امکان اندازه‌گیری مستقیم آنالیت‌های با غلظت‌های بسیار کم به‌ویژه در نمونه‌های دارای بافت پیچیده مانند محصولات دامی به‌طور کامل مقدور نبوده و یک مرحله‌ی اضافی تحت عنوان آماده‌سازی نمونه جهت پیش تغلیظ و حذف مزاحمت‌های بافت نمونه موردنیاز می‌باشد (۳). استخراج مایع–مایع هموژن HLLE (Homogenous liquid-liquid extraction) از جمله روش‌هایی است که می‌توان از آن برای استخراج آنالیت‌های مختلف از مواد غذایی استفاده کرد (۴). HLLE بر اساس فرآیند جداسازی فازها در یک محلول هموژن و استخراج آنالیت‌های مورد نظر به درون فاز جداشده می‌باشد. شرط اولیه این روش، تشکیل محلول هموژن می‌باشد. به دلیل فصل مشترک بسیار بزرگ بین نمونه و فاز آلی حالت تعادل به‌سرعت حاصل می شود و زمان استخراج کوتاه است (۵). به عبارتی در این سیستم‌ها جداسازی فاز بر اساس فرآیندهای استخراج با نمک، دما و pH می‌باشد (۶). HLLE یک روش آسان و کارآمد می‌باشد که هزینه آنالیز، زمان استخراج و تماس با حلال‌های آلی را کاهش می‌دهد (۷). مهم‌ترین مشکل این روش عدم امکان دستیابی به فاکتور تغلیظ (Enrichment factor) بالا می‌باشد که منجر به حدود تشخیص بالا می‌گردد (۸). برای رفع این مشکل از ترکیب این روش با روش‌های میکرواستخراج مانند میکرواستخراج مایع–مایع پخشی (Enrichment factor) استفاده می شود (۹). در این روش که برای اولین بار در سال ۲۰۰۶ (۱۰) معرفی شد، از یک سیستم سه گانه شامل حلال استخراج کننده (حلال غیرقابل امتزاج با آب)، حلال پخش کننده (حلال قابل امتزاج با آب) و فاز آبی حاوی آنالیت‌ها استفاده می‌شود. در DLLME، مخلوط حلال‌های استخراج کننده و پخش کننده به سرعت توسط سرنگ به داخل فاز آبی حاوی آنالیت ها تزریق می‌گردد. سرعت بالا، سادگی عمل، هزینه‌ی کم، حجم کم نمونه موردنیاز و فاکتور تغلیظ بالا از جمله مزایای این روش می‌باشند (۱۱). عدم قابلیت استفاده مستقیم در نمونه‌های جامد و نیاز به حلال‌های آلی سمی و گران قیمت به عنوان استخراج کننده (اغلب حلال‌های هالوژنه استفاده می شود) از محدودیت‌های این روش به شمار می‌روند (۱۲). هدف از این کار پژوهشی توسعه‌ی روش آماده‌سازی کارآمد مبتنی بر HLLE و DLLME برای استخراج و پیش تغلیظ آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین جی، اکسی تترا سایکلین، کلرامفنیکل و داکسی سایکلین در نمونه های تخم‌مرغ و اندازه‌گیری آن‌ها با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به دتکتور آرایه دیودی است. در این کار، از حلال اتکتیک عمیق DES (Deep eutectic solvent) به‌جای حلال‌های هالوژنه معمولی به‌عنوان حلال استخراج‌کننده در مرحله DLLME استفاده شد که از دیدگاه شیمی سبز از اهمیت زیادی برخوردار است. حلال‌های اتکتیک عمیق، حلال هایی هستند که از مخلوط کردن دو ماده (در بعضی موارد سه ترکیب) با نسبت مولی مشخص حاصل می شوند. یکی از دو ماده به کار رفته در ساختار این حلال‌ها به عنوان دهنده پیوند هیدروژنی و دیگری به عنوان پذیرنده پیوند هیدروژنی عمل می‌کند. برقراری پیوند هیدروژنی بین این دو منجر به ایجاد یک زوج یون با نقطه ذوب پایین‌تر از نقطه ذوب هر یک از مواد به کار رفته در تهیه آن‌ها می‌شود. حلال‌های اتکتیک عمیق قدرت استخراج کنندگی نسبتاً بالایی دارند و نسبت به حلال‌های آلی متداول دارای فشار بخار و سمیت کمتری هستند (۱۴، ۱۳).

• مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و مواد شیمیایی: تعداد ۳۵ نمونه تخم‌مرغ در زمستان سال ۱۳۹۸ به‌طور تصادفی از مراکز عرضه در سطح شهر تبریز تهیه شده و برای آنالیز میزان باقیمانده آنتی‌بیوتیک در آن‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. محتویات تخم‌مرغ در ظروف استریل جمع‌آوری، هموژن شده و در داخل فریزر در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین جی، اکسی تتراسایکلین، کلرامفنیکل و داکسی سایکلین از شرکت سیگما (Sigma, USA)، استونیتریل (ACN)، متانول و آب HPLC–grade از شرکت (ChemLab, Belgium) و سدیم کلرید، سدیم هیدروکسید، هیدروکلریک اسید، فسفوکولین کلرید (PChCl)، دی کلرو استیک اسید (DCA)، اکتانوئیک اسید، نونانوئیک اسید، دکانوئیک اسید و دودکانوئیک اسید از شرکت مرک خریداری شدند.

روش تهیه حلال اتکتیک عمیق: برای تهیه‌ی DES که در این کار به‌عنوان حلال استخراج کننده در مرحله DLLME استفاده می‌شود، مشابه کار قبلی گروه تحقیقاتی ما فسفوکولین‌کلراید به عنوان گیرنده پیوند هیدروژنی با دی کلرواستیک اسید و دودکانوئیک اسید به عنوان دهنده پیوند

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.1.5]

هیدروژنی به نسبت‌های مولی ۱:۱:۱ مخلوط شده و به داخل لوله‌ی آزمایش ۱۰ میلی‌لیتری منتقل شدند(۱۵). سپس لوله‌ی آزمایش به مدت ۲۰ دقیقه درون حمام آب با دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از اعمال حرارت، لوله‌ی آزمایش به مدت ۳ دقیقه ورتکس شده و مجدداً به حمام آب منتقل شد. چرخه‌ی اعمال حرارت و ورتکس کردن دو بار دیگر نیز تکرار شد و درنهایت مایع همگنی حاصل گردید که همان حلال اتکتیک موردنظر بود. شایان ذکر است که نسبت‌های مولی دیگر (۱:۱:۲، ۳:۱:۱، ۱:۱:۲، ۱:۲:۱، ۱:۲:۲، ۱:۱:۳ و ۱:۳:۱) نیز مورد بررسی قرار گرفتند ولی در هیچ‌کدام از آن‌ها حلال اتکتیک تشکیل نشد. تشکیل حلال اتکتیک عمیق تهیه شده از فسفوکولین‌کلراید: دی کلرواستیک اسید: دودکانوئیک اسید با استفاده از روش‌های FTIR و HNMR به طور کامل مورد تجزیه‌و تحلیل قرار گرفته است.

روش استخراج: ۳ گرم از نمونه تخم‌مرغ (مخلوط سفیده و زرده هموژن شده) اسپایک شده با آنالیت‌ها (۱۰۰ نانوگرم بر گرم)، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول ۲۵ درصد وزنی-حجمی استات روی و ۰/۷۵ گرم سدیم کلرید اضافه شده و مخلوط به‌دست‌آمده به صورت دستی هم زده شد. سپس ۲ میلی‌لیتر استونیتریل به مخلوط افزوده شده و مخلوط به‌دست آمده به مدت ۳ دقیقه ورتکس گردید. پس از سانتریفیوژ مخلوط به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه، فاز رویی (استونیتریل حاوی آنالیت های استخراج شده) برداشته شده و به یک ویال کوچک منتقل گردید. سپس به استونیتریل حاصل از مرحله قبل ۶۰ میکرولیتر از حلال اتکتیک سنتز شده (حلال تهیه شده از فسفوکولین کلراید: دی کلرواستیک اسید و دودکانوئیک اسید) اضافه شد. در ادامه کار، مخلوط حاصل با سرنگ به سرعت به داخل ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه تزریق شد. سپس محلول به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید که در اثر این عمل ۱۰ میکرولیتر از حلال اتکتیک در انتهای لوله آزمایش جمع شده و برای آنالیز کمی به HPLC تزریق گردید.

شرایط آنالیز با دستگاه کروماتوگرافی: به‌منظور دستیابی به نتایج قابل‌اعتماد سیستم کروماتوگرافی، جداسازی آنالیت‌ها در شرایط بهینه صورت گرفت. شرایط بهینه HPLC (Agilent, 1200 DAD System, USA) برای آنالیز آنتی‌بیوتیک‌ها در بخش زیر خلاصه شده است.

فاز متحرک مورد استفاده مخلوط آب دیونیزه حاوی ۰/۱ درصد فرمیک اسید و متانول می‌باشد. برنامه شویش آنالیت‌ها از ستون شامل استفاده از ۵ درصد متانول به مدت ۱ دقیقه و سپس تغییر آن به۹۵ درصد متانول در محدوده زمانی ۱۹ دقیقه و تثبیت به مدت ۵ دقیقه می‌با شد.نوع ستون ا ستفاده شده Poroshell 120 EC–C18 به طول ۱۵ سانتی‌متر، قطر داخلی ۳ میلی‌متر و قطر ذرات ۲/۷ میکرومتر بود.در طول آنالیز دمای ستون در ۳۵ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شده و هر بار ۱۰ میکرولیتر با استفاده از لوپ روداین ۱۰ میکرولیتری به سیستم گردید. طول موج‌های ۳۶۰، ۲۵۵ و ۲۷۵ به ترتیب برای آشکارسازی اکسی تتراسایکلین و داکسی سایکلین، پنی‌سیلین جی و کلرامفنیکل انتخاب شدند.

بهینه سازی شرایط استخراج: به منظور رسیدن به راندمان های بالا،اثر فاکتور های مختلف موثر در HLLE و DLLME مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور فاکتورهای غلظت (در محدوده ۱۵ تا ۳۰ درصد وزنی/حجمی) و حجم (در محدوده ۰,۵ تا ۲,۰ میلی‌لیتر) محلول استات روی، مقدار نمک (با افزودن مقادیر مختلفی از نمک در محدوده ۰,۷۵ تا ۱,۰ گرم)، نوع (استونیتریل و ایزوپروپانول) و حجم (در محدوده ۱ تا ۳ میلی‌لیتر) حلال استخراج/پخش کننده و مدت زمان ورتکس (۱، ۳، ۵ و ۷ دقیقه) در مرحله HLLE و نوع (حلال‌های اتکتیک شامل فسفوکولین کلراید: دی کلرواستیک اسید: اکتانوئیک اسید، فسفوکولین کلراید: دی کلروا ستیک اسید: نونانوئیک اسید، فسفوکولین کلراید: دی کلرواستیک اسید: دکانوئیک اسید و فسفوکولین کلراید: دی کلروا ستیک اسید: دودکانوئیک اسید) و حجم (در محدوده ۶۰ تا ۸۵ میکرولیتر) حلال استخراج کننده، اثر نمک (با افزودن نمک به آب دیونیزه در محدوده ۰ تا ۱۰ درصد وزنی/حجمی) و سرعت (۳۰۰۰، ۴۰۰۰، ۵۰۰۰، ۶۰۰۰ و ۷۰۰۰ دور بر دقیقه) و مدت زمان (۱، ۳، ۵ و ۷ دقیقه) سانتریفیوژ در مرحله DLLME بهینه‌سازی گردید.

مشخصات تجزیه‌ای: به‌منظور اعتبارسنجی روش به کار رفته برای آنالیز آنتی‌بیوتیک‌ها، پس از ترسیم نمودار معیارگیری یا منحنی کالیبراسیون، محدوده خطی روش (Linear range)، حد تشخیص (Limit of detection)، حد اندازه‌گیری (Limit of quantification)، مجذور ضریب همبستگی، تکرارپذیری (Relative standard deviation; RSD%)، راندمان استخراج (Extraction recovery; ER) و فاکتور تغلیظ در ماتریس تخم مرغ بررسی و محاسبه شدند (۱۶).

حد کمی بودن: پایین‌ترین غلظتی که با درجه اطمینان قابل قبولی در آزمایشگاه به صورت عملی بتوان اندازه‌گیری نمود. برای این منظور غلظتی از منحنی کالیبراسیون که در آن

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.1.5]

نسبت سیگنال به نویز برابر ۱۰ می باشد، برابر LOQ در نظر گرفته می‌شود.

حد تشخیص: پایین‌ترین غلظتی که سیگنال آنالیت سه برابر سیگنال های زمینه (نویز) می‌باشد. بر اساس این تعریف و مقایسه آن با LOQ، برای محاسبه LOD، عدد مربوط به حد کمی بودن به ۱/۳ ضرب خواهد شد.

محدوده خطی: برای این منظور محلول هایی با غلظت های مختلف ساخته خواهد شد این محلول‌ها با روش پیشنهادی استخراج شده و با کرماتوگرافی مایع انالیز خواهند شد. سیگنال‌های تجزیه‌ای به ازای غلظت‌های مختلف در اکسل رسم خواهد شد. در این نمودار فاصله بین LOQ تا جایی که منحنی ۵ درصد از حالت خطی انحراف نشان دهد به عنوان محدوده خطی در نظر گرفته خواهد شد.

تکرار پذیری: برای این منظور محلول هایی در یک غلظت مشخص با حداقل ۶ تکرار تهیه خواهند شد. این محلول‌ها با روش پیشنهادی استخراج شده و سیگنال‌های تجزیه‌ای برای تکرار هر غلظت ثبت می شود. سپس میزان انحراف استاندارد نسبی برای آنالیزهای تکراری محاسبه و به عنوان معیاری از تکرارپذیری گزارش خواهد شد.

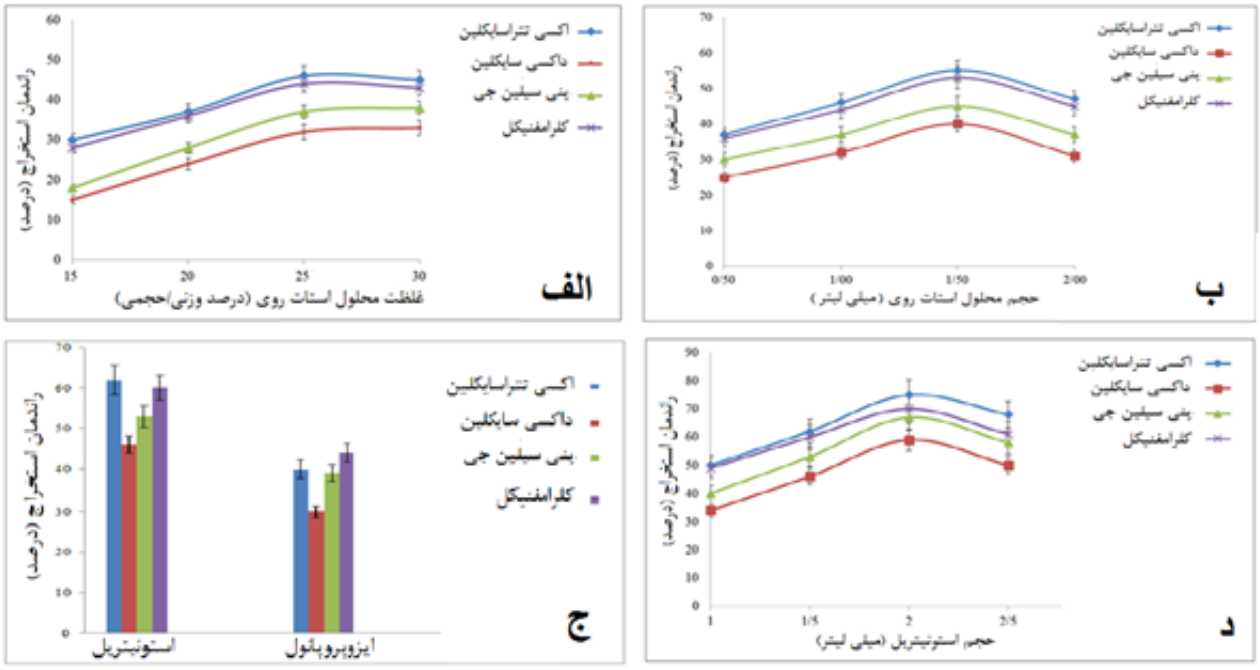
• یافته‌ها

بهینه‌سازی شرایط استخراج در مرحله HLLE

تأثیر غلظت محلول استات روی: نتایج استفاده از غلظت های مختلف (۱۵ تا ۳۰ درصد وزنی/حجمی) محلول استات روی در شکل ۱-الف نشان داده شده است. با توجه به نتایج، کارایی استخراج با افزایش غلظت محلول استات روی تا ۲۵ درصد وزنی/حجمی افزایش یافته و پس از ثابت می‌ماند. بنابراین در مطالعات بعدی ۲۵ درصد وزنی/حجمی به عنوان غلظت بهینه محلول استات روی انتخاب شد.

تأثیر حجم محلول استات روی: نتایج مربوط به استفاده از حجم های متفاوت (۰/۵ تا ۲/۰ میلی‌لیتر) از محلول استات روی به عنوان عامل رسوب‌دهنده پروتئین‌ها در شکل ۱-ب آورده شده‌اند. با توجه به نتایج کارایی استخراج با افزایش حجم محلول استات روی تا ۱/۵ میلی‌لیتر افزایش یافته و پس ازآن کاهش پیدا می‌کند.

تأثیر مقدار نمک: برای بررسی اثر افزایش نمک بر روی کارایی استخراج در مرحله‌ی HLLE، مقادیر مختلف نمک سدیم کلرید (۰/۷۵ تا ۱/۵ گرم) به نمونه‌ی آزمایشی اضافه شد. با توجه به نتایج با افزایش بیشتر مقدار نمک کارایی استخراج کاهش پیدا می‌کند. بنابراین ۰/۷۵ گرم به عنوان مقدار بهینه نمک انتخاب شد.



شکل ۱. بهینه‌سازی شرایط استخراج در مرحله HLLE: بهینه‌سازی غلظت محلول استات روی (الف)، بهینه‌سازی حجم محلول استات روی(ب)، بهینه‌سازی نوع حلال استخراج/پخش کننده (ج)، بهینه‌سازی حجم حلال استخراج/پخش کننده (د)

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.1.5]

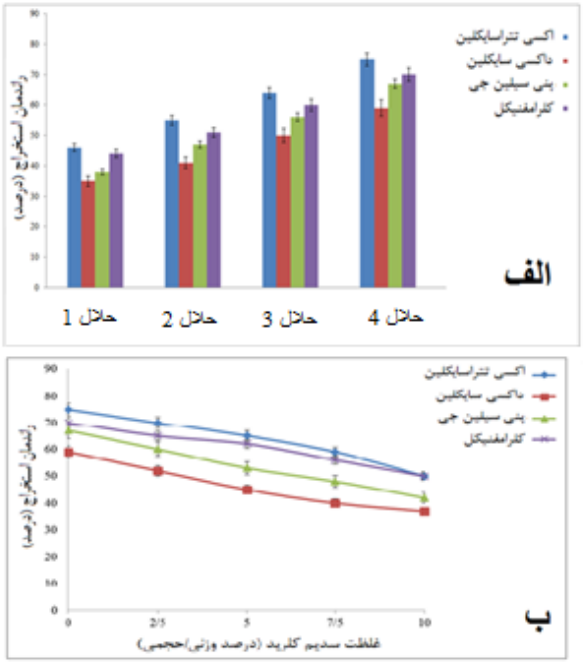
تأثیر نوع حلال استخراج/پخش کننده: برای انتخاب حلال مناسب در این مرحله حلال‌های ایزوپروپانول و استونیتریل مورد آزمایش قرار گرفتند. با توجه به نتایج حاصل (شکل ۱-ج)، استونیتریل به عنوان حلال بهینه انتخاب شد.

تأثیر حجم حلال استخراج/پخش کننده: بررسی این پارامتر در بازه‌ی ۱ تا ۳ میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل در شکل ۱-د نشان داده‌شده‌اند. با توجه به نتایج حاصل با افزایش حجم استونیتریل تا ۲ میلی‌لیتر راندمان استخراج افزایش یافته و پس ازآن کاهش می‌یابد.

تأثیر مدت زمان ورتکس: با توجه به نتایج به‌دست آمده ۳ دقیقه برای استخراج مؤثر آنالیت های مورد مطالعه کافی بوده و به عنوان مدت زمان بهینه ورتکس برای مراحل بعدی انتخاب گردید.

بهینه‌سازی شرایط استخراج در مرحله DLLME

تأثیر نوع حلال استخراج کننده: برای انتخاب حلال بهینه، حلال های مختلف مورد آزمایش قرار گرفتند. انتخاب حلال‌ها با توجه به کارایی بالای آنها می‌باشد که در پژوهش اخیر اثبات شده است (۱۵). با توجه به نتایج بدست آمده (شکل ۲-الف) حلال اتکتیک تشکیل شده از فسفوکولین کلراید: دی کلرواستیک اسید: دودکانوئیک اسید به عنوان حلال استخراج کننده بهینه برای مراحل بعدی انتخاب گردید.



شکل ۲. بهینه‌سازی شرایط استخراج در مرحله DLLME: انتخاب حلال استخراج کننده در مرحله DLLME (الف)، بررسی اثر نمک در مرحله‌ی DLLME (ب)

بررسی اثر نمک‌زنی: اثر افزایش نمک در مرحله DLLME نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده (شکل ۲-ب) نشان دادند که با افزایش مقدار نمک کارایی استخراج کاهش می‌یابد. شایان ذکر است که به منظور یکسان بودن حجم فاز تهنشین شده در مرحله‌ی دوم (۰/۵ ± ۱۰ میکرولیتر) و قابل مقایسه بودن نتایج با یکدیگر، با افزایش مقدار نمک از ۰ به ۱۰ درصد وزنی/حجمی حجم حلال استخراج کننده (حلال اتکتیک فسفوکولین کلراید: دی کلرواستیک اسید: دودکانوئیک اسید) مورداستفاده در روش پیشنهادی از ۶۰ به ۴۳ میکرولیتر کاهش یافت. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مطالعات بعدی بدون حضور نمک صورت گرفت.

تأثیر حجم حلال استخراج کننده: حجم حلال استخراج کننده (حلال اتکتیک فسفوکولین کلراید: دی کلرواستیک اسید: دودکانوئیک اسید) دیگر پارامتر مؤثر بر کارایی استخراج می‌باشد که نیاز به بهینه‌سازی دارد. در این مرحله با افزایش حجم حلال استخراج کننده از ۶۰ به ۸۵ میکرولیتر، حجم فاز تهنشین شده پس از اجرای روش پیشنهادی و سانتریفیوژ از ۱۰ به ۲۸ میکرولیتر افزایش یافت. بنابراین ۶۰ میکرو لیتر از حلال اتکتیک سنتز شده به عنوان حجم بهینه انتخاب شد.

پارامترهای سرعت و مدت‌زمان سانتریفیوژ در این مرحله بهینه‌سازی شده‌اند و طبق نتایج به‌دست‌آمده کارایی استخراج تا سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه و ۵ دقیقه افزایش یافته و پس ازآن ثابت می‌مانند. ازاین‌رو سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه و ۵ دقیقه به عنوان سرعت و مدت‌زمان بهینه سانتریفیوژ انتخاب شدند.

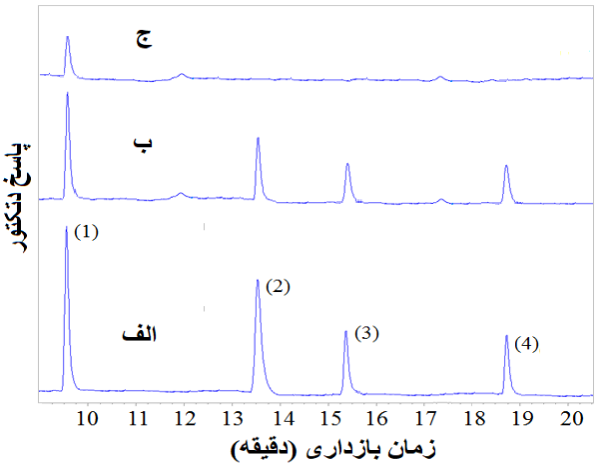
اعتباربخشی به روش پیشنهادی: پس از بهینه نمودن پارامترهای مؤثر در این روش، روش پیشنهادی تحت شرایط بهینه با دستورالعمل FDA (۱۶)اعتباربخشی شده و نتایج به‌دست‌آمده در جدول ۱ نشان داده شده‌اند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده روش ارائه شده در این کار پژوهشی دارای مقادیر LOD و LOQ به ترتیب در محدوده‌های ۴/۴–۳/۷ و ۱۴/۶–۱۲/۴ نانوگرم بر گرم می‌باشند که نشان‌دهنده‌ی کارایی بالای روش ارائه‌شده و قابلیت آن برای اندازه‌گیری مقادیر اندک از آنالیت های موردمطالعه می‌باشند. فاکتور تغلیظ مناسب (۲۲۵–۱۷۷)، راندمان استخراج بالا (٪۷۵–۵۹)، محدوده‌ی خطی وسیع (۵۰۰-۱۲/۴ نانوگرم بر گرم)، ضریب اندازه‌گیری مناسب (r^2 ≥ ۰/۹۹۸۷) و تکرارپذیری خوب (در یک روز به ترتیب بین ۵/۵ –۳/۳ درصد) از دیگر مزیت های روش پیشنهادی می‌باشند.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.1.5]

جدول ۱. ویژگی‌های تجزیه‌ای روش پیشنهادی برای آنتی‌بیوتیک‌های موردمطالعه در نمونه تخم مرغ

آنالیت	محدوده خطی (نانوگرم بر گرم)	حد تشخیص (نانوگرم بر گرم)	حد اندازه‌گیری (نانوگرم بر گرم)	مجذور ضریب همبستگی	انحراف استاندارد نسبی (٪) (n=۶)	راندمان استخراج ± انحراف استاندارد (n=۳)	فاکتور تغلیظ ± انحراف استاندارد (n=۳)
اکسی تتراسایکلین	۵۰۰-۱۲/۴	۳/۷	۱۲/۴	۰/۹۹۸۷	۳/۳	۴ ± ۷۵	۱۲ ± ۲۲۵
داکسی سایکلین	۵۰۰-۱۴/۶	۴/۴	۱۴/۶	۰/۹۹۹۰	۵/۵	۲ ± ۵۹	۶ ± ۱۷۷
پنی‌سیلین جی	۵۰۰-۱۴/۰	۴/۲	۱۴/۰	۰/۹۹۸۷	¼	۴ ± ۶۷	۱۲ ± ۲۰۱
کلرامفنیکل	۵۰۰-۱۳/۲	۴/۰	۱۳/۲	۰/۹۹۹۵	۴/۹	۳ ± ۷۰	۹ ± ۲۱۰

آنالیز نمونه‌های حقیقی: نتایج به‌دست‌آمده از آنالیز ۳۵ نمونه مختلف تخم‌مرغ عرضه شده در سطح شهر تبریز با استفاده از HPLC (زمان بازداری پیک موجود در نمونه با استاندارد مربوطه مطابقت دارد) نشان می‌دهند که در پنج نمونه از تخم‌مرغ‌های آزمایش شده (۱۴/۲۹ درصد) باقیمانده آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (در محدوده‌ی غلظتی ۲۱ تا ۳۶ نانوگرم بر گرم) وجود دارد. در چهار نمونه تخم‌مرغ (۱۱/۴۳ درصد) نیز آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین (محدوده‌ی غلظتی ۱۹ تا ۳۴ نانوگرم بر گرم) یافت شد. در یک نمونه (۲/۸۶ درصد) نیز هر دو آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۲۱ نانوگرم بر گرم) و اکسی تتراسایکلین (۱۷ نانوگرم بر گرم) پیدا شدند. اثر ماتریکس در نمونه‌های حقیقی نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور نمونه‌ها با غلظت‌های مختلف از آنتی‌بیوتیک‌ها اسپایک شده (۲۰ و ۵۰ نانوگرم بر گرم نسبت به هر کدام از آنالیت‌ها) و با آنتی‌بیوتیک‌های یافت شده مقایسه شد. نتایج نشان داد که مقادیر بازیابی نسبی در بازه‌ی ۸۴ تا ۱۰۸ درصد قرار دارد.



شکل ۳. کروماتوگرام‌های HPLC–DAD،(الف) تزریق مستقیم استاندارد آنتی بیوتیک های مورد مطالعه (هر کدام به غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر)، (ب) نمونه تخم مرغ اسپایک شده با آنالیت ها به غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر گرم و (ج) نمونه تخم مرغ اسپایک نشده پس از اجرای روش پیشنهادی. پیک شماره ۱: اکسی تتراسایکلین، پیک شماره ۲: داکسی سایکلین، پیک شماره ۳: پنی سیلین جی و پیک شماره ۴: کلرامفنیکل.

• بحث

در این کار پژوهشی از نمک استات روی برای رسوب‌دهی پروتئین‌های تخم‌مرغ استفاده شد (سایر ترکیبات موجود در تخم مرغ به داخل حلال استخراج کننده منتقل نشده و در فرآیند استخراج مشکلی ایجاد نمی‌کنند). به‌طورکلی با افزایش نمک، کاتیون‌های فلزی با پروتئین‌ها کمپلکس تشکیل داده و حلالیت آن‌ها در نمونه کاهش یافته و در نتیجه پروتئین‌ها رسوب می‌کنند (۱۷). به دلیل اینکه pH ایزو الکتریک اکثر پروتئین‌ها در محدوده ۴ تا ۶ می‌باشد استفاده از محلول استات روی بهترین انتخاب برای رسوب دادن پروتئین‌ها می‌باشد.

حجم محلول استات روی استفاده‌شده پارامتر دیگری است که می‌تواند کارایی استخراج را تحت تأثیر قرار دهد. یکی از راه‌های افزایش بازده استخراج در روش‌های استخراج مختلف افزایش قدرت یونی محلول با افزودن نمک به نمونه می‌باشد. عموماً در روش‌های استخراج، افزایش نمک دو اثر متقابل دارد. اول این که افزودن نمک می‌تواند باعث کاهش حلالیت آنالیت‌ها در نمونه شده و در نتیجه سبب افزایش انتقال آن‌ها به داخل فاز آلی و افزایش راندمان استخراج گردد. دوم این که افزایش نمک، ویسکوزیته‌ی نمونه را افزایش داده و با کاهش ضریب انتشار آنالیت‌های مورد نظر می‌تواند تأثیر منفی بر روی کارایی استخراج داشته باشد. هرکدام از اثرات بر دیگری برتری داشته باشد در این صورت تأثیر آن عامل غالب خواهد بود (۱۸، ۱۹). به همین خاطر اثر مقدار نمک باید بررسی شود. همچنین در این کار پژوهشی از نمک به عنوان عامل جدا کننده فازی و برای شکستن محلول هموژن تشکیل شده استفاده می‌شود. همانطور که در بالا اشاره شد، در مقادیر کمتر از ۰/۷۵ گرم پدیده‌ی جدایش فازی رخ نداده (سیستم دو فازی تشکیل نمی‌شود) و روش پیشنهادی قابل اجرا نیست.

درروش پیشنهادی حلال استخراج‌کننده در مرحله HLLE به عنوان حلال پخش‌کننده در مرحله DLLME استفاده می‌شود. بنابراین بهینه‌سازی حلال مورداستفاده ضروری بوده و

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]
[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.1.5]

علاوه بر قدرت کافی برای استخراج آنالیت های موردمطالعه از بافت نمونه و تشکیل سیستم دوفازی در حضور نمک باید قابلیت پخش مؤثر حلال استخراج‌کننده مورداستفاده در مرحله DLLME را نیز داشته باشد (۲۰).

حجم حلال پخش کننده پارامتر مهم دیگری است که می‌تواند استخراج آنالیت‌ها از بافت نمونه را در مرحله HLLE و تشکیل محلول ابری در مرحله DLLME را تحت تأثیر قرار دهد و باید بهینه‌سازی شود (۲۱).

در این کار پژوهشی، فرآیند ورتکس برای افزایش سطح تماس بین نمونه‌ی آزمایشی حاوی آنالیت‌ها و حلال استخراج کننده (استونیتریل) به کار رفته در مرحله HLLE و تسریع فرآیند استخراج (سرعت انتقال جرم آنالیت‌ها به داخل قطرات ریز حلال استخراج کننده افزایش می‌یابد) استفاده شده و مدت زمان آن می‌تواند کارایی استخراج را تحت تأثیر قرار دهد.

حلال استخراج کننده باید دارای ویژگی‌هایی نظیر داشتن دانسیته بیشتر یا کمتر نسبت به آب، محلولیت کم در آب و رفتار کروماتوگرافیکی مناسب باشد (۲۲). در این کار پژوهشی از حلال‌های اتکتیک عمیق به دلیل سمیت کم، سنتز آسان آن‌ها و ارزان بودن به‌جای حلال‌های آلی سمی و گران‌قیمت استفاده شد. در بین این حلال‌ها، حلال‌های با دانسیته بیشتر انتخاب گردیدند تا برداشتن آن‌ها پس از سانتریفیوژ آسان باشد (۲۳).

حجم حلال استخراج کننده از دیگر پارامترهای مؤثر در روش DLLME است که نیاز به بهینه سازی دارد. حجم حلال استخراج کننده می‌تواند حجم فاز آلی جمع‌آوری شده پس از استخراج، تکرارپذیری نتایج و کارآیی استخراج را تحت تاثیر قرار دهد. به طور کلی با افزایش حجم حلال استخراج کننده راندمان استخراج افزایش می‌یابد، از سوی دیگر این افزایش حجم سبب رقیق شدن آنالیت‌ها در فاز استخراجی و منجر به کاهش فاکتور تغلیظ و سیگنال‌های تجزیه‌ای می‌شود (۲۴).

افزایش قدرت یونی محلول آبی با افزودن نمک به آب دیونیزه در مرحله DLLME نیز می‌تواند اثرات مختلفی (در بخش بالا ذکر شد) بر روی کارایی استخراج داشته باشد و نیاز به بهینه‌سازی دارد.

انجام سانتریفیوژ درروش DLLME برای جدایش فازها و جمع‌آوری قطرات حلال استخراج کننده حاوی آنالیت‌های استخراج شده ضروری می‌باشد (۲۴). بنابراین پارامترهای مرتبط با آن شامل سرعت و مدت زمان سانتریفیوژ می‌توانند کارایی استخراج را تحت تأثیر قرار دهند.

برای بررسی کارایی روش پیشنهادی در استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها، برخی پارامترهای تجزیه‌ای روش پیشنهادی از جمله حد تشخیص، حد اندازه‌گیری، محدوده خطی و درصد انحراف نسبی با روش‌های قبلی گزارش شده (۲۷-۲۵) برای استخراج آنالیت‌ها از نمونه‌های مختلف مقایسه شد که در جدول ۲ به آن اشاره شده است. حد تشخیص و حد اندازه‌گیری روش پیشنهادی پایین‌تر و یا قابل مقایسه با سایر روش‌ها است. تکرارپذیری روش نیز بهتر و یا قابل مقایسه با کارهای قبلی می‌باشد. همچنین محدوده خطی روش پیشنهادی وسیع‌تر و یا قابل مقایسه با سایر روش‌ها است. نتایج به‌دست‌آمده در این بخش بیانگر این واقعیت است که روش پیشنهادی روشی کارآمد، حساس، تکرار پذیر و قابل‌اعتماد برای آنالیز آنتی‌بیوتیک های مذکور در نمونه‌های تخم‌مرغ می‌باشد.

جدول ۲. مقایسه کارایی روش پیشنهادی در استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها از نمونه‌های مختلف با روش های مشابه

روش	نمونه	محدوده خطی ($ng\ g^{-1}$)	حدتشخیص ($ng\ g^{-1}$)	حداندازه گیری ($ng\ g^{-1}$)	درصدانحراف استاندارد نسبی (٪)	منبع
الف	تخم مرغ	۵-۱۰۰۰	۰/۸-۱/۱	۲/۷-۳/۵	۳/۸-۴/۰	۲۵
ب	گوشت	-	۵/۸-۱۲/۰	۱۲-۲۸	۶/۸۵-۱۰/۴	۲۶
ج	عسل	۲۰/۴-۳۰۵/۴	۴/۲-۸/۲	۱۳/۸-۲۷/۴	۴/۶-۴/۸	۲۷
د	تخم مرغ	۱۲/۴-۵۰۰	۳/۷-۴/۴	۱۲/۴-۱۴/۶	۴/۱-۵/۵	روش حاضر

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.1.5]

با توجه به نتایج بدست آمده، آنتی‌بیوتیک‌های اکسی تترا سایکلین و کلرامفنیکل در نمونه‌های برر سی شده حضور دارند و آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین جی و داکسی سایکلین در هیچ‌کدام از نمونه‌ها وجود ندارد (دلیل این امر قیمت بالاتر آنتی‌بیوتیک‌های پنی سیلین جی و داکسی سایکلین و استفاده از آنها در پرورش دام‌های سنگین می‌باشد). مقایسه مقادیر یافت شده آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین با حد مجاز باقیمانده این آنتی‌بیوتیک (۲۸) در نمونه تخم‌مرغ (۴۰۰ نانوگرم بر گرم طبق استاندارد سازمان بهداشت جهانی) نشان می‌دهد که خوشبختانه مقدار باقیمانده این آنتی‌بیوتیک در نمونه‌های تخم‌مرغ بررسی شده کمتر از حد مجاز پیشنهاد شده است. این در حالی است که باقیمانده آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل در نمونه‌های تخم‌مرغ برر سی شده (در محدوده‌ی غلظتی ۲۱ تا ۳۶ نانوگرم بر گرم) یک مسئله جدی به شمار می‌رود زیرا مصرف این آنتی‌بیوتیک طبق دستورالعمل‌های بین‌المللی منع شده (حد مجاز باقیمانده این آنتی‌بیوتیک در فرآورده‌های دامی از جمله تخم‌مرغ صفر در نظر گرفته شده است) و باقیمانده آن نشان‌دهنده‌ی ریسک بالا برای مصرف‌کننده‌ها می‌باشد. وجود باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در تخم‌مرغ، ممکن است به دلیل فقدان در کنترل مصرف داروهای دامپزشکی، استفاده از دارو بدون در نظر گرفتن موارد ذکرشده در برچسب دارویی و عدم توجه به مدت زمان پرهیز از مصرف باشد (۲۹). همچنین با توجه نتایج اثر ماتریکس، ماتریکس نمونه‌های بررسی شده تأثیر محسوسی در کارایی روش پیشنهادی برای استخراج آنتی‌بیوتیک‌های موردمطالعه ندارند.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، باقیمانده چهار آنتی‌بیوتیک (پنی سیلین، اکسی تتراسایکلین، کلرامفنیکل و داکسی سایکلین) در نمونه‌های تخم‌مرغ با استفاده از دستگاه HPLC بررسی و تعیین مقدار شد. در این کار پژوهشی، قبل از آنالیز کمی نمونه‌های بررسی شده از روش جدید و کارآمد HLLE تلفیق شده با DLLME مبتنی بر حلال اتکتیک عمیق که به عنوان حلال‌های سبز شناخته می شوند برای استخراج و پیش تغلیظ آنتی‌بیوتیک‌های موردمطالعه استفاده شد. آنالیز نمونه‌های تخم‌مرغ موردمطالعه نشان داد که ۲۸/۵۸ درصد از آن‌ها به اکسی تتراسایکلین و کلرامفنیکل آلوده بود ند. غلظت کلرامفنیکل در نمونه‌ها بالاتر و غلظت اکسی تتراسایکلین پایین‌تر از حداکثر باقیمانده مجاز بود.

تعارض منافع: نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

References

1. Landers EF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. Public Health Rep. 2012; 127: 4-22.
2. Menkem ZE, Ngangom BL, Tamunjoh SSA, Boyom FF. Antibiotic residues in food animals: Public health concern. Acta Ecol. Sin. 2019; 39: 411-5.
3. Hyötyläinen T, Critical evaluation of sample pretreatment techniques. Anal. Bioanal. Chem. 2009; 394: 743-58.
4. Farajzadeh MA, Bahram M, Zorita S, GhorbaniMehr B. Optimization and application of homogeneous liquid–liquid extraction in preconcentration of copper (II) in a ternary solvent system. J. Hazard. Mater. 2009; 161: 1535-43.
5. Ghiasvand AR, Shadabi S, Mohagheghzadeh E, Hashemi P. Homogenous liquid–liquid extraction method for the selective separation and preconcentration of ultra–trace molybdenum. Talanta 2005; 66: 912–6.
6. Hoogerstraete TV, Onghena B, Binnemans K. Homogeneous liquid–liquid extraction of metal ions with a functionalized ionic liquid. J. Phys. Chem. Lett. 2013; 4, 10: 1659–63.
7. Ebrahimzadeh H, Yamini Y, Kamarei F, Shariati S. Homogeneous liquid–liquid extraction of trace amounts of mono nitrotoluenes from waste water samples. Anal. Chim. Acta 2007; 594: 93–100.
8. Sorouraddin SM, Farajzadeh MA, Hassanyani A, Afshar, Mogaddam MR. A combination of homogenous liquid-liquid extraction and dispersive liquid-liquid microextraction for extraction and preconcentration of amantadine from biological samples followed by its indirect determination by flame atomic absorption spectrometry. RSC Adv. 2016; 6: 108603-10.
9. Rashidipour M, Heydari R, Maleki A, Mohammadi E, Davari B. Salt–assisted liquid–liquid extraction coupled with reversed–phase dispersive liquid–liquid microextraction for sensitive HPLC determination of paraquat in environmental and food samples. J. Food Meas. Charact. 2019; 13: 269–76.
10. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini MR, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. J. Chromatogr. A 2006; 1116: 1–9.
11. Sajid M, Alhooshani K. Dispersive liquid−liquid microextraction based binary extraction techniques prior to chromatographic analysis: A review. Trends Anal. Chem. 2018; 108: 167−82.
12. Farajzadeh MA, Mohebbi A, Pazhohan A, Nemati M, Afshar Mogaddam MR. Air–assisted liquid–liquid microextraction; principles and applications with

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.1.5]

analytical instruments. Trends Anal. Chem. 2020; 122: 115734.

13. Afshar Mogaddam MR, Farajzadeh MA, Mohebbi A, Nemati M. Hollow fiber–liquid phase microextraction method based on a new deep eutectic solvent for extraction and derivatization of some phenolic compounds in beverage samples packed in plastics. Talanta 2020; 216: 120986.

14. 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. 2020; 43: 2393-400.

15. Mohebi A, Samadi M, Tavakoli HR, Parastouei K. Homogenous liquid–liquid extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of some antibiotics from milk samples before their determination by HPLC. Microchem. J. 2020; 157: 104988.

16. U.S. Food and Drug Administration, Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. http:// www.fda.gov/downloads/drugs/ guidance compliance regulatory information/guidances/ucm368107.pdf.

17. Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B 2003; 785: 263–75.

18. Mohebbi A, Farajzadeh MA, Yaripour S, Afshar Mogaddam MR. Determination of tricyclic antidepressants in human urine samples by the three-step sample pretreatment followed by HPLC-UV analysis: an efficient analytical method for further pharmacokinetic and forensic studies. Excli J. 2018; 17: 952-63.

19. Abbaspour M, Farajzadeh MA, Sorouraddin SM, Mohebbi A. Monitoring of nine pesticides in different cereal flour samples with high performance liquid chromatography-diode array detection. Anal. Methods 2019; 11: 4022-33.

20. Shi Z, Huai Q, Li X, Ma H, Zhou C, Chu X, Zhang H. Combination of counter current salting-out homogenous liquid–liquid extraction with dispersive liquid–liquid microextraction for the high-performance liquid chromatographic determination of environmental estrogens in water samples. J. Chromatogr. Sci. 2020; 58: 171-7.

21. Mardani A, Afshar Mogaddam MR, Farajzadeh MA, Mohebbi A, Nemati M, Torbati M. A three-phase solvent extraction system combined with deep eutectic solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of some organochlorine pesticides in cocoa samples prior to gas chromatography with electron capture detection. J. Sep. Sci. 2020; 43: 3674-82.

22. Mohebbi A, Farajzadeh MA, Mahmoudzadeh A, Etemady A. Combination of poly (ε–caprolactone) grafted graphene quantum dots–based dispersive solid phase extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of some pesticides from fruit juices prior to their quantification by gas chromatography. Microchem. J. 2020; 153: 104328.

23. Sixto A, Mollo A, Knochen M. Fast and simple method using DLLME and FAAS for the determination of trace cadmium in honey, J. Food. Compost. Anal. 2019; 82: 103229.

24. Farajzadeh MA, Mohebbi A Fouladvand H, Afshar Mogaddam MR. A new and facile method for preparation of amorphous carbon nanoparticles and their application as an efficient and cheap sorbent for the extraction of some pesticides from fruit juices. Microchem. J. 2020; 155: 104795.

25. Jing T, Niu J, Xia H, Dai Q, Zheng H, Hao Q, Mei S, Zhou Y. Online coupling of molecularly imprinted solid-phase extraction to HPLC for determination of trace tetracycline antibiotic residues in egg samples, J. Sep. Sci. 2011; 34: 1469-76.

26. Ahmadi F, Shahbazi Y, Karami N. Determination of tetracyclines in meat using two phases freezing extraction method and HPLC–DAD. Food Anal. Methods 2015; 8: 1883-91.

27. Yang X, Zhang S, Yu W, Liu Z, Lei L, Li N, Zhang H, Yu Y. Ionic liquid–anionic surfactant based aqueous two–phase extraction for determination of antibiotics in honey by high–performance liquid chromatography. Talanta 2014; 124: 1–6.

28. Codex Alimentarius Commission. FAO, WHO. Codex veterinary drug residue in food online database. Updated as at the35th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2012).

29. Jiménez V, Rubies A, Centrich F, Companyó R, Guiteras J. Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 2011; 1218: 1443–51.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.1.5]

Development of the Homogenous Liquid-Liquid Extraction in Combination with Deep Eutectic Solvent-based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Extraction of Antibiotics from Egg Samples and Their Quantitative Analysis Using High Performance Liquid Chromatography

Fathi M[1], Rostami H[1], Samadi M[2]*

1- Health Research Center, Life style Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*2- *Corresponding author: Exercise Physiology Research Center, Life style Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: samadi.mohammad@yahoo.com*

Received 6 Sept, 2021 **Accepted 25 Dec, 2021**

Background and Objectives: Antibiotics are chemical compounds, which are extensively used in the treatment of diseases in animals worldwide. Ignorance or negligence of the withdrawal time and use of antibiotics more than that prescribed have resulted in the presence of antibiotic residues in food products such as eggs that can include adverse effects on the consumer health. The aim of this study was to develop an appropriate method to assess antibiotics in eggs.

Materials & Methods: In the present study, an efficient method called homogeneous liquid-liquid extraction in combination with deep eutectic solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction was developed for the extraction of penicillin G, oxytetracycline, chloramphenicol and doxycycline from egg samples and then analyses were carried out using high performance liquid chromatography. To achieve high extraction recoveries, effects of various parameters including concentration and volume of the zinc acetate solution, salt quantity, type and volume of the extraction/dispersive solvent and vortexing time were investigated and optimized in HLLE step as well as type and volume of the extraction solvent, ionic strength and rate and time of the centrifuging procedure in DLLME step.

Results: Under the optimum extraction conditions, extraction recoveries were in the ranges of 59–75%. Detection limits of the method for analytes were in the range of 3.7–4.4 ng g^{-1}. Consumption of small volumes of the organic solvents has been addressed as another advantage of this method. Moreover, 35 egg samples were analyzed with the highlighted method and results indicated that 28.58% of the investigated egg samples were contaminated by at least one of the listed antibiotics.

Conclusion: The current developed method could effectively assess contents of the antibiotics in eggs.

Keywords: Antibiotic residue, Homogenous liquid-liquid extraction, Dispersive liquid-liquid microextraction, Deep eutectic solvent, High-performance liquid chromatography, Eggs

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

[DOR: 20.1001.1.17357756.1401.17.3.1.5]