

کاربرد روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی کنترل شده با دما با استفاده از مایعات یونی در اندازه‌گیری باقیمانده‌های آموکسی‌سیلین، کلوزاسیلین و اریترومايسين در نمونه‌های شیر گاو با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

محمد رضا افشارمقدم^۱، جلیل خندقی^۳، صمد وجدی حکم‌آباد^۵

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

۲- استادیار مرکز آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

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

۴- استادیار گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

۵- نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم دامی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران. پست الکترونیکی: Samad.Vajdi@iausa.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۶

چکیده

سابقه و هدف: انواع مختلفی از آنتی بیوتیک‌ها در صنعت پرورش دام و به طور بی رویه برای رشد و درمان دام مورد استفاده قرار می‌گیرد که سبب تجمع باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در محصولات دامی مانند شیر خواهد شد. مصرف شیر آلوده به بقایای آنتی‌بیوتیک بالاتر از حد مجاز باعث ایجاد سمیت برای انسان و معضل بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌شود. به همین دلیل پایش باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها در شیر و لبنیات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی کنترل شده با دما با استفاده از مایعات یونی برای استخراج آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، کلوزاسیلین و اریترومايسين از شیر گاو توسعه داده شده و اندازه‌گیری کمی آنها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به شناساگر آرایه دیودی صورت گرفت. به علاوه اثر پارامترهای مختلف موثر در کارایی استخراج مانند حجم عامل رسوب دهنده و زمان ورتکس کردن و همچنین نوع و مقدار حلال استخراج‌کننده، اثر نمک‌زنی و دمای محلول آبی بهینه‌سازی شدند.

یافته‌ها: آنالیز نمونه‌های شیر وجود آموکسی‌سیلین در ۸ نمونه شیر را نشان داد که همگی بالاتر از حد مجاز بودند. دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها در نمونه‌های شیر یافت نشد. روش پیشنهادی از کارایی بالایی در استخراج باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌های هدف از نمونه‌های شیر برخوردار بود به‌طوری‌که تکرارپذیری روش بر اساس درصد انحراف استاندارد نسبی ۳ تا ۴/۵ بوده و تحت شرایط بهینه، کارایی روش پیشنهادی در استخراج آنالیت‌ها ۸۷-۷۸ درصد و حدود تشخیص و اندازه‌گیری به ترتیب کمتر از ۱/۱ و ۳/۷ نانوگرم در میلی‌لیتر بدست آمدند.

نتیجه‌گیری: روش توسعه داده شده برای اندازه‌گیری آنالیت‌های انتخابی در شیر گاو مناسب بوده و حد تشخیص آن کمتر از حداکثر مجاز تعیین شده برای باقیمانده این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد.

واژگان کلیدی: آنتی‌بیوتیک، شیر، میکرواستخراج مایع-مایع پخشی، توسعه روش، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

• مقدمه

خوراک دام افزوده شده و سبب بهبود کارایی خوراک می‌گردد (۱).

گرچه سلامت گله حیوانات در نهایت موجب دسترسی مصرف کنندگان به محصولات غذایی سالم و با کیفیت بالا و قیمت مناسب مانند گوشت و شیر می‌شود ولی از طرفی استفاده

آنتی‌بیوتیک‌ها موادی هستند که قادر به کشتن یا مهار رشد میکروارگانیسم‌ها بوده و بخش عمده‌ای از آن‌ها در صنعت دامپروری و برای درمان و پیشگیری از بیماری‌ها استفاده می‌شود. همچنین برخی آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان محرک رشد به

مجهاز به شناساگر آرایه دیودی (HPLC-diode array detector) انجام گرفت.

• مواد و روش‌ها

نمونه برداری و مواد شیمیایی

تعداد ۳۰ نمونه شیر پاستوریزه در پاییز سال ۱۴۰۱ به صورت تصادفی از محل‌های عرضه در شهر تبریز تهیه و در آزمایشگاه مرکز ایمنی غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت شرایط بهینه شده استخراج و آنالیز شدند. تری کلرواستیک اسید، ۱-هگزیل-۳-متیل ایمیدازولیوم تترا فلئورو فسفات ([C6MIM][PF6])، ۱-بوتیل-۳-متیل ایمیدازولیوم تترا فلئورو فسفات ([C4MIM][PF6]) و سدیم کلرید با درجه خلوص تجزیه ۷۰٪ از شرکت مرک (Darmstadt, Merck, Germany) و استاندارد آنتی بیوتیک‌های مورد بررسی از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) تهیه شد. همچنین به منظور کنترل کیفی سیستم کروماتوگرافی، محلول استاندارد آنتی بیوتیک‌ها (۲۵۰ میلی گرم در لیتر) هر روز سه بار به دستگاه HPLC (Model 1200, DAD system, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) تزریق و فاکتور تغلیظ و راندمان استخراج مورد ارزیابی قرار گرفت.

بهینه سازی شرایط استخراج

برای این منظور مقدار اسید تری کلرواستیک به عنوان عامل رسوب دهنده (از بین مقادیر ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی گرم) و همچنین زمان ورتکس کردن (یک تا ۵ دقیقه) قبل از سانتریفیوژ شیر برای جداسازی رسوب پروتئین‌های شیر بهینه سازی شد. همچنین عوامل موثر در مرحله استخراج مایع-مایع پخشی شامل نوع حلال استخراج کننده (از بین مایعات یونی [C6MIM][PF6] و [C4MIM][PF6])، حجم حلال (با اضافه کردن مقادیر ۵۰، ۶۰ و ۱۵۰ میکرولیتر)، اثر نمک زنی (با افزودن مقادیر متفاوتی از نمک در محدوده صفر تا ۵ درصد وزنی-حجمی) و تنظیم دمای محلول آبی در دماهای ۵۰ تا ۹۰ درجه سلسیوس بهینه سازی گردید. برای بررسی عوامل مؤثر در روش توسعه داده شده از روش "یک پارامتر در یک زمان" استفاده و تاثیر این عوامل با مقایسه سطح زیر پیک حاصل از آنالیت‌ها در شرایط مختلف بررسی شد (۱۳). این آزمون‌ها و آزمون‌های اعتبار بخشی روش در ۳ تکرار انجام و نتایج به صورت میانگین داده‌ها $\pm$ انحراف استاندارد بیان شدند.

روش استخراج

این مطالعه بر پایه روش استخراج مایع-مایع پخشی کنترل شده با دما با استفاده از مایعات یونی به منظور استخراج باقیمانده‌های آنتی بیوتیکی از نمونه‌های شیر گاو توسعه داده شده و اندازه گیری آن‌ها به کمک کروماتوگرافی مایع با

بی رویه از آنتی بیوتیک‌ها نیز مشکلات بهداشتی دیگری مانند معضل افزایش مقاومت‌های آنتی بیوتیکی و یا ایجاد واکنش‌های آلرژی، سمیت و سرطان زایی را به دنبال خواهد داشت. در حال حاضر میانگین جهانی مصرف سالانه مواد ضد میکروبی به ازای هر کیلوگرم وزن حیوان تولید شده بیش از ۱۰۰ میلی گرم است (۲).

به طور کلی، روش‌های تجزیه‌ای برای پایش باقیمانده آنتی بیوتیک‌ها را می‌توان در دو گروه روش‌های غربالگری و تاییدی طبقه بندی کرد. روش‌های مهار میکروبی مانند روش چهار پلیتی به دلیل اینکه آسان و مقرون به صرفه بوده و قادرند آنتی بیوتیک‌های مختلف را در یک آزمایش واحد پوشش دهد، پرکاربردترین روش برای تشخیص و بخصوص غربالگری باقیمانده‌های آنتی بیوتیکی در مواد غذایی با منشاء دامی هستند اما دقت پایینی داشته و احتمال نمونه‌های مثبت کاذب در این روش زیاد است (۳). از طرفی، با توجه به حدود مجاز (Maximum residue limits) توصیه شده برای باقیمانده آنتی بیوتیک‌ها در محصولات غذایی توسط سازمان‌های نظارتی مانند اتحادیه اروپا (معمولاً ppb)، برای تشخیص مقادیر پایین روش‌های تجزیه‌ای حساس و کارآمد مورد نیاز است. که کروماتوگرافی مایع یکی از آن‌ها است (۴، ۵).

عموماً قبل از تجزیه دستگاهی نمونه‌ها، یک مرحله آماده سازی برای حذف ترکیبات مزاحم و پیش تغلیظ آنالیت‌ها مورد نیاز است (۶). تاکنون روش‌های گوناگونی برای استخراج آنالیت‌های مختلف از مواد غذایی ارائه شده است که روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی یا DLLME (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) یکی از انواع متداول آن به شمار می‌رود (۷-۱۰). در این روش یک حلال پخش کننده قطبی و یک حلال استخراج کننده غیرقطبی به محلول آبی تزریق و مخلوط نهایی برای جداسازی فازها سانتریفیوژ می شود. اخیراً مایعات یونی (Ionic liquids) دارای نقطه ذوب پایین، سمیت کمتر و همچنین سازگار با محیط زیست هستند، به عنوان یک استخراج کننده جایگزین برای روش DLLME پیشنهاد شده‌اند (۱۱، ۱۲).

هدف کار پژوهشی حاضر توسعه و معرفی یک روش کارآمد برای استخراج آنتی بیوتیک‌های آموکسی سیلین (Amoxicillin)، کلوزاکسیلین (Cloxacillin) و اریترومايسين (Erythromycin) از نمونه‌های شیر گاو بود. برای این منظور از روش میکرو استخراج مایع مایع پخشی کمک شده بوسیله مایعات یونی استفاده شده و سپس اندازه گیری باقیمانده‌های آنتی بیوتیکی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

داشت. از این رو در ادامه مطالعه از این مقدار عامل رسوب دهنده استفاده شد.

مدت زمان ورتکس کردن نمونه: بررسی اثر این پارامتر با مخلوط نمودن نمونه های شیر پس از افزودن اسید و در زمان های مختلف صورت گرفت. نتایج نشان داد سه دقیقه ورتکس نمودن نمونه ها سبب افزایش سیگنال های تجزیه ای شده و پس از آن بازده استخراج کاهش یافت.

اثر نمک زنی: افزودن نمک و افزایش قدرت یونی محیط تا مقدار ۲ درصد وزنی/حجمی از کلرید سدیم منجر به افزایش کارایی استخراج شد. همانا صورت که در نمودار ۱ قابل مشاهده است، در استفاده از مقادیر بیشتر نمک سیگنال های تجزیه ای مربوط به آنالیت ها کاهش یافت لذا در ادامه مطالعه از افزودن ۲ درصد نمک استفاده شد.

نوع حلال استخراج کننده: در این راستا دو مایع یونی مختلف مورد استفاده قرار گرفت. چنان که در نمودار ۱ دیده می شود، حلال ۱-هگزیل-۳-متیل ایمیدازولیوم تترا فلوئورو فسفات دارای بیشترین کارایی در استخراج آنالیت های مورد نظر بود و برای آزمایشات بعدی انتخاب شد.

حجم حلال: بررسی سیگنال های تجزیه ای بر اساس حجم حلال استخراج کننده نشان داد که افزایش حجم حلال از ۵۰ به ۷۰ میکرولیتر سبب تغییر راندمان استخراج آنالیت های مورد مطالعه نشد. از این رو به دلیل مصرف کم حلال آلی، ۵۰ میکرولیتر به عنوان حجم بهینه حلال انتخاب گردید.

دمای فاز آبی: دمای محلول حاوی نمونه نقش موثری در کارایی روش دارد و می تواند کارایی روش را بهبود بخشد. برای به دست آوردن دمای بهینه، آنالیزها در دماهای مختلف در محدوده ۵۰ تا ۹۰ درجه سلسیوس انجام شد. نتایج به دست آمده (شکل ۱) نشان داد که بازده استخراج آنالیت ها تا ۸۰ درجه سلسیوس افزایش و سپس ثابت می ماند. لازم به توضیح است که در دماهای کمتر از ۵۰ درجه سانتی گراد مایع یونی استفاده شده به عنوان حلال استخراج کننده در محلول نمونه حل نشد.

کارایی بالا مجهز به شناساگر آرایه دیودی صورت گرفته است. برای این منظور، ابتدا مقدار ۵ میلی لیتر نمونه شیر حاوی آنتی بیوتیک های مورد مطالعه به داخل یک لوله آزمایش منتقل و بر روی آن ۱۵۰ میلی گرم تری کلرواستیک اسید اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳ دقیقه ورتکس شده و سپس با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس ۲ میلی لیتر از فاز رویی (حاوی آنتی بیوتیک های مورد مطالعه) برداشته شده و با ۴ میلی لیتر محلول سدیم کلرید به غلظت ۳ درصد وزنی-حجمی مخلوط شد. پس از آن، ۵۰ میکرولیتر از مایع یونی ۱-هگزیل-۳-متیل ایمیدازولیوم تترا فلوئورو فسفات به داخل محلول آزمایشی اضافه و محلول در داخل حمام آب در دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده شد تا مایع یونی کاملاً حل شود. سپس محلول در داخل حمام آب یخ قرار گرفت. در این مرحله حلالیت مایع یونی در محلول آزمایشی کاسته شده و این حلال به صورت قطرات ریزی در داخل محلول پخش می شود. محلول ابری شکل حاصله سانتریفوژ شده و فاز ته نشین شده به سیستم HPLC-DAD تزریق شد. برای دستیابی به حداکثر تفکیک در سیستم کروماتوگرافی، شرایط کارکرد HPLC-DAD برای جداسازی آنتی بیوتیک ها مطابق جدول ۱ انتخاب شد.

اعتبارسنجی روش

پس از ترسیم نمودار معیارگیری یا منحنی کالیبراسیون، مشخصات تجزیه ای روش به کار رفته برای آنالیز آنتی بیوتیک ها، شامل فاکتورهای از قبیل حد تشخیص (Limit of detection)، حد اندازه گیری (Limit of quantification)، تکرارپذیری (%RSD)، فاکتور تغلیظ و راندمان استخراج، ارزیابی و محاسبه شدند (۱۴).

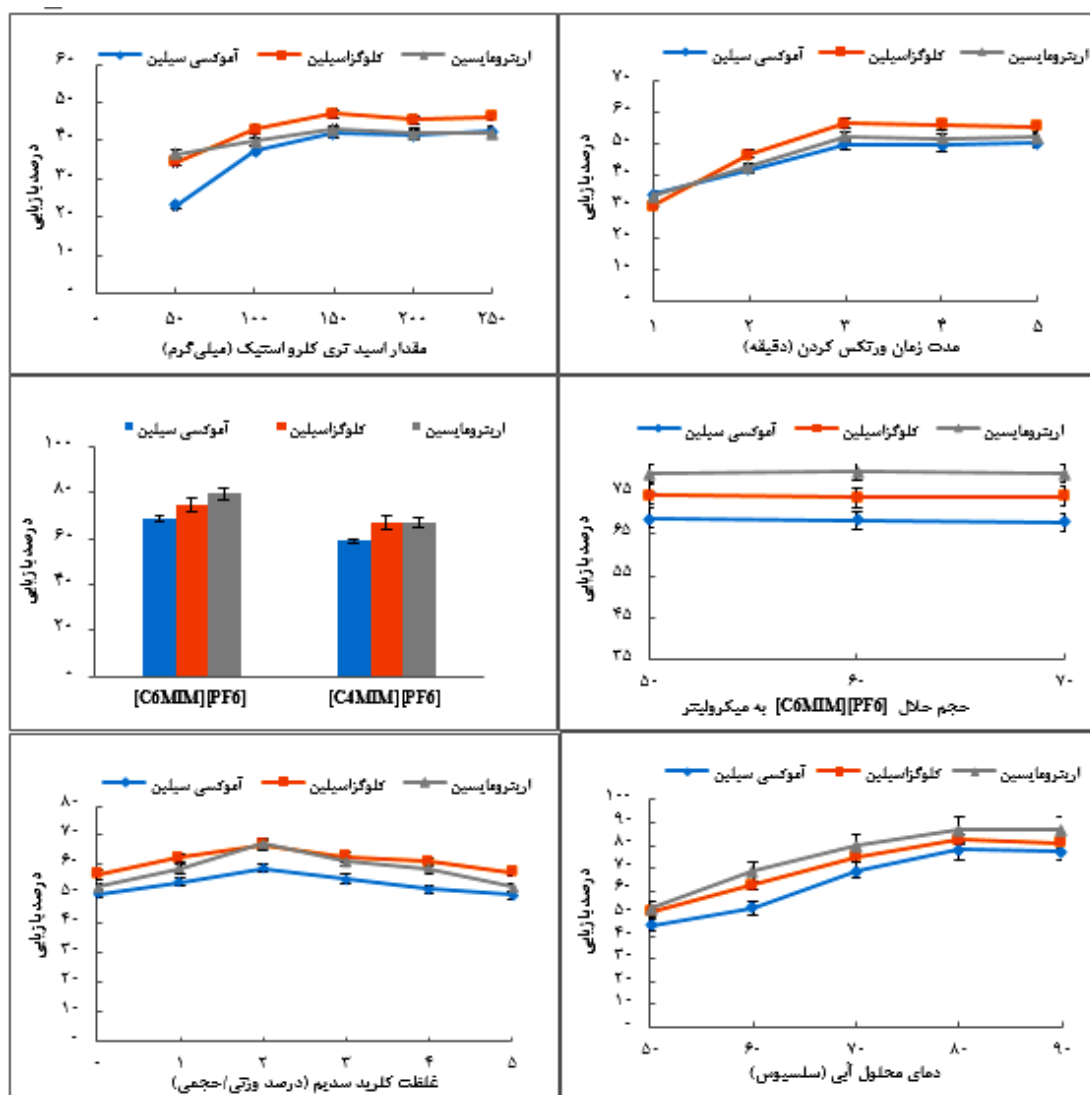
• یافته ها

نتایج بهینه سازی پارامترهای موثر در استخراج

حجم عامل رسوب دهنده: نتایج به دست آمده نشان داد که افزودن مقدار ۱۵۰ میلی گرم از اسید تری کلرو استیک بهترین نتیجه را از نظر افزایش بازده استخراج سه آنالیت مورد مطالعه

جدول ۱. شرایط بهینه ی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به منظور آنالیز باقیمانده آنتی بیوتیک ها در نمونه های شیر گاو

نوع ستون	ستون Xbridge C18 به طول ۵ سانتی متر، قطر خارجی: ۴/۶ میلی متر و قطر ذرات: ۳/۵ میکرومتر
نوع شستشو	شوش گرادایانی
ترکیب فاز متحرک	حلال A: فرمیک اسید ۰/۲ درصد HPLC گرید، حلال B: مخلوط استونیتریل و متانول با نسبت حجمی ۷۰ به ۳۰ درصد با سرعت جریان ۰/۲ میلی لیتر در دقیقه
نحوه اعمال گرادایان	۳ تا ۶ دقیقه: گرادایان خطی از ۲۰ تا ۸۰ درصد حلال B ۶ تا ۸ دقیقه: گرادایان خطی از ۲۰ تا ۸۰ درصد حلال A ۲ دقیقه: حلال A=۸۰ درصد، حلال B=۲۰ درصد
تزریق کننده	لوپ: ۵۰ میکرولیتر و دمای ستون در ۴۰ درجه سانتیگراد
طول موج آشکارسازی	آموکسی سیلین در ۳۳۵ نانومتر، کلواکسایلین در ۲۹۶ نانومتر و اریترمایسین در ۲۷۵ نانومتر



شکل ۱. بهینه سازی عوامل موثر در کارایی روش پیشنهادی برای استخراج باقیمانده های آنتی بیوتیکی از شیر گاو

نتایج مشخصات تجزیه ای

پارامترهای تجزیه ای روش حاضر تحت شرایط بهینه محاسبه و ارائه گردیدند (۱۴). منحنی های کالیبراسیون با اسپایک کردن هشت غلظت از آنالیت های مورد مطالعه و رسم سیگنال تجزیه ای آنالیت ها پس از اجرای روش توسعه یافته ترسیم شد و محدوده خطی روش برای هر یک از آنالیت ها از منحنی کالیبراسیون بدست آمد. حد تشخیص و حد اندازه گیری

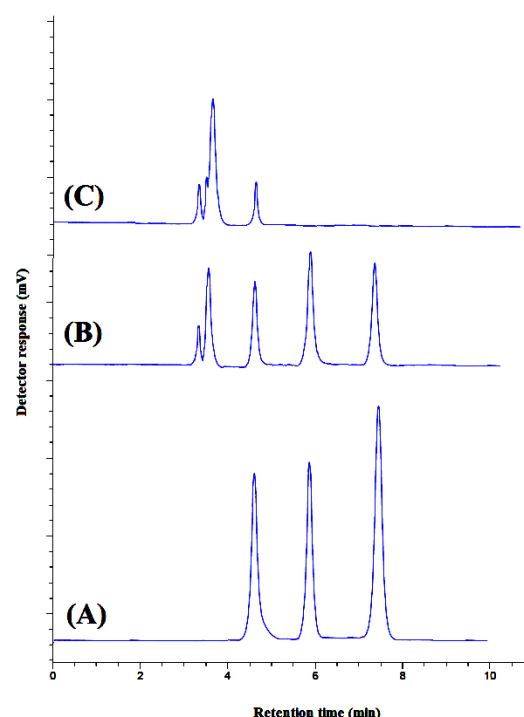
روش به ترتیب برابر غلظت هایی که در آن ها نسبت سیگنال به نویز به ترتیب ۳ و ۱۰ می باشد در نظر گرفته شد. تکرارپذیری و دقت روش با استفاده از انحراف استاندارد نسبی (RSD %) حاصل شد. برای این منظور ۶ محلول حاوی ۲۵ نانوگرم در میلی لیتر از آنالیت ها با شرایط یکسان و در حالت بهینه استخراج شدند. درصد RSD بر اساس مساحت زیر پیک ها نشان از تکرارپذیری بالای روش ارائه شده دارد. نتایج اعتبارسنجی روش پیشنهادی در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲. مشخصات تجزیه ای روش پیشنهادی در استخراج باقیمانده آنتی بیوتیک ها از نمونه های شیر گاو

آنالیت	حد مجاز (نانوگرم در میلی لیتر)	محدوده خطی (نانوگرم در میلی لیتر)	ضریب تعیین (r^2)	حد تشخیص (نانوگرم در میلی لیتر)	حد اندازه گیری (نانوگرم در میلی لیتر)	درصد انحراف استاندارد نسبی ($n=6$)	فاکتور تغلیظ	راندمان
آموکسی سیلین	۴	۳/۷-۵۰۰	۰/۹۹۸	۱/۱	۳/۷	۳/۰	۳/۶	۷۸ ± ۲
کلوگزاسیلین	۳۰	۳/۰-۵۰۰	۰/۹۹۴	۰/۹	۳/۰	۳/۲	۴/۱	۸۲ ± ۴
اریترومایسین	۴۰	۲/۰-۵۰۰	۰/۹۹۹	۰/۶	۲/۰	۳/۷	۴/۵	۸۷ ± ۵

آنالیز نمونه‌های حقیقی

قابلیت روش پیشنهادی در استخراج آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه و بررسی اثر بافت (Matrix) شیر در استخراج آنالیت‌ها با اندازه‌گیری آن‌ها در تعداد ۳۰ نمونه شیر گاو تحت شرایط بهینه‌سازی شده انجام شد. کروماتوگرام‌های HPLC-DAD حاصل نشان می‌دهند که تعداد ۸ نمونه شیر دارای باقیمانده آموکسی‌سیلین بوده و همگی آن‌ها بالاتر از حد مجاز باقیمانده یعنی ۴ نانوگرم در میلی‌لیتر بود. دیگر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در نمونه‌ها یافت نشد. شکل ۱ کروماتوگرام محلول استاندارد آنتی‌بیوتیک‌ها (هر کدام به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر)، نمونه‌های شیر آلوده شده به آنالیت‌های انتخابی (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و یک نمونه حقیقی شیر نشان می‌دهد.



شکل ۲. کروماتوگرام‌های HPLC-DAD محلول استاندارد (A)، نمونه شیر اسپایک شده با آنالیت‌های هدف (B) و نمونه شیر بدون اسپایک (C) پس از اجرای روش پیشنهادی. (۱): آموکسی‌سیلین، (۲): کلوزاسیلین، (۳): اریترومایسین.

به دلیل اینکه مواد مختلفی مانند پروتئین‌ها و لاکتوز موجود در بافت شیر ممکن است در اندازه‌گیری آنالیت‌ها تداخل ایجاد نماید، صحت روش و اثر بافت در کارایی روش ارائه شده از طریق استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها از نمونه‌های شیر اسپایک شده با غلظت‌های مختلفی از محلول‌های استاندارد تعیین گردید (۱۴). مقادیر بازیابی نسبی بدست آمده نشان داد ماتریکس نمونه‌ها در کارایی روش پیشنهادی تاثیر ناچیزی دارد.

جدول ۳. مطالعه اثر بافت شیر در کارایی روش استخراج باقیمانده آنتی‌بیوتیک‌ها از نمونه‌های شیر گاو

انحراف استاندارد $\pm$ مقادیر بازیابی نسبی					آنالیت
نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ۴	نمونه ۵	
همه نمونه با مخلوط آنالیت‌ها به غلظت ۵ نانوگرم در میلی‌لیتر اسپایک شدند					
۹۵ $\pm$ ۴	۹۳ $\pm$ ۷	۹۱ $\pm$ ۲	۹۵ $\pm$ ۷	۹۷ $\pm$ ۵	آموکسی‌سیلین
۹۴ $\pm$ ۲	۹۰ $\pm$ ۴	۹۴ $\pm$ ۵	۹۶ $\pm$ ۵	۹۷ $\pm$ ۴	کلوزاسیلین
۹۹ $\pm$ ۴	۹۷ $\pm$ ۲	۹۸ $\pm$ ۲	۹۳ $\pm$ ۵	۹۲ $\pm$ ۶	اریترومایسین
همه نمونه با مخلوط آنالیت‌ها به غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر اسپایک شدند					
۹۲ $\pm$ ۴	۱۰۰ $\pm$ ۳	۹۶ $\pm$ ۲	۹۵ $\pm$ ۳	۹۰ $\pm$ ۴	آموکسی‌سیلین
۹۰ $\pm$ ۵	۹۳ $\pm$ ۴	۹۴ $\pm$ ۵	۹۵ $\pm$ ۳	۹۳ $\pm$ ۳	کلوزاسیلین
۹۴ $\pm$ ۳	۹۲ $\pm$ ۷	۹۴ $\pm$ ۴	۹۵ $\pm$ ۶	۹۷ $\pm$ ۳	اریترومایسین

• بحث

عوامل رسوب‌دهنده می‌توانند مزاحمت موادی از قبیل پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، رنگدانه‌ها و غیره را در استخراج آنالیت‌های فاز آبی شیر حذف کنند و یکی از روش‌های متداول این کار در نمونه‌های شیر استفاده از اسید تری کلرو استیک است (۵). مقدار کم اسید تری کلرواستیک قادر به رسوب‌دهی کامل پروتئین‌ها نخواهد بود و از طرفی، مقدار زیاد آن نیز می‌تواند سبب تغییر ماهیت نمونه شود لذا بهینه‌سازی مقدار آن لازم است (۱۵).

یکی از پارامترهای مهم در اجرای روش استخراج توسعه داده شده، انتخاب نوع حلال استخراج‌کننده می‌باشد. حلال استخراج‌کننده بایستی حلالیت کمی در فاز آبی داشته و قابلیت پخش شدن در آن را داشته باشد. از طرف دیگر این حلال یا باید دارای دانسیته متفاوت از آب باشد تا جمع‌آوری آن با سانتریفیوژ ممکن باشد (۶).

حجم این حلال نیز بازده استخراج و تکرارپذیری نتایج را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد یعنی حجم بالای حلال سبب افزایش حجم فاز جمع‌شده پس از استخراج، کاهش فاکتور تغلیظ و بنابراین کاهش سیگنال‌های تجزیه‌ای خواهد شد. ضمناً کاهش حجم حلال نیز موجب کاهش کارایی استخراج و تکرارپذیری می‌گردد لذا حجم حلال استخراج‌کننده باید بهینه‌سازی شود (۱۶). در این مطالعه افزایش حجم حلال استخراج‌کننده در مقادیر بالاتر از ۵۰ میکرولیتر تاثیری در افزایش سیگنال‌های تجزیه‌ای نداشت. لازم به ذکر است که در حجم‌های کمتر از ۵۰ میکرولیتر حجم فاز ته نشین شده کم بوده و نتایج تکرارپذیر نبود.

ایجاد قدرت یونی محلول آزمایشی به وسیله افزایش کلرید سدیم ضمن اینکه می‌تواند سبب کاهش میزان دسترسی

نانوگرم در میلی لیتر) پایین تر از مقادیر این پارامتر در بکارگیری روش LC-MS/MS در مطالعات دیگر یعنی ۲ نانوگرم در میلی لیتر است (۱۹). به علاوه حدود تشخیص اریترومایسین در دو تحقیق انجام شده بوسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر (۲۱) و ۲۵ نانوگرم در میلی لیتر (۲۲) گزارش شده است که بسیار بالاتر از حد تشخیص بدست آمده در این کار (۰/۶ نانوگرم در میلی لیتر) می باشد. همچنین در مقایسه با سایر روش ها، روش توسعه داده شده مقادیر قابل قبولی برای راندمان استخراج (۲۱، ۱۹) و تکرارپذیری (۲۲، ۲۰) آنالیت های هدف ارائه کرده است.

نتیجه گیری

این کار پژوهشی روش میکرو استخراج مایع مایع پخشی کنترل شده با دما با استفاده از مایعات یونی برای استخراج و پیش تغلیظ باقیمانده آنتی بیوتیک های آموکسی سیلین، کلوزاسیلین و اریترومایسین در نمونه های شیر گاو با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. سادگی روش، قابل اعتماد بودن، مصرف حلال های سبز و با سمیت کمتر را می توان از جمله مزایای روش توسعه داده شده بر شمرد. اعتبار بخشی روش نشان دهنده پارامترهای تجزیه ای مطلوب بود به گونه ای که راندمان استخراج بالای ۷۸ درصد و فاکتور تغلیظ بیش از ۱۹۵ حاصل شد. همچنین حد تشخیص روش پیشنهادی کمتر از حداکثر مجاز تعیین شده برای باقیمانده این آنتی بیوتیک ها بود. روش مذکور به طور موفقیت آمیزی بر روی نمونه های شیر انجام گرفت و آنالیز نمونه های حقیقی فقط وجود آموکسی سیلین در ۸ نمونه شیر را نشان داد که همگی بالاتر از حد مجاز بودند.

مولکول های آنالیت به آب و بنابراین انتقال آن ها به داخل حلال استخراج کننده و در نتیجه افزایش کارایی استخراج شود، از طرفی نیز ممکن است حل شدن حلال استخراج کننده در فاز آبی را کاهش داده و منجر به افزایش حجم فاز آلی جمع شده و کاهش سیگنال تجزیه ای در اثر رقیق سازی شود (۱۷). لذا یکی از پارامترهای موثر در اکثر روش های استخراج است که نیاز به ارزیابی و بهینه سازی دارد.

دمای فاز آبی از دیگر عوامل مؤثر در فرآیند پیشنهادی است به طوریکه گرم شدن محلول آبی می تواند موجب پخش بهتر حلال استخراج کننده در محلول آبی شده و با تغییر ضرایب انتشار سرعت استخراج را تحت تأثیر قرار دهد و در نتیجه، سطح تماس بین حلال و نمونه افزایش یافته و سرعت انتقال و استخراج آنالیت ها بهبود پیدا میکند. البته افزایش دما می تواند با انتشار بیشتر آنالیت ها به داخل فاز آبی سبب کاهش راندمان استخراج شود. بنابراین مقادیر سیگنال های تجزیه ای در دماهای مختلف تغییر خواهد کرد (۱۸).

به منظور ارزیابی کارایی روش پیشنهادی در استخراج آنتی بیوتیک های انتخابی، برخی پارامترهای تجزیه ای روش حاضر با چند روش به کار رفته برای استخراج این آنالیت ها از نمونه های شیر مقایسه شد. این بررسی نشان داد مقادیر شایستگی روش ارائه شده قابل قبول می باشد به طوریکه حد تشخیص بدست برای آموکسی سیلین در تحقیق حاضر (۱/۱) نانوگرم در میلی لیتر)، قابل مقایسه با روش های انجام شده با کروماتوگرافی مایع مجهز به شناساگرهای بسیار حساس تر (LC-MS/MS) بود که در آن ها حد تشخیص این آنالیت یک نانوگرم در میلی لیتر (۱۹) و ۰/۹ نانوگرم در میلی لیتر (۲۰) بوده است. همچنین حد تشخیص کلوزاسیلین بدست آمده (۰/۹)

References

1. Sachi S, Ferdous J, Sikder MH, Hussani SAK. Antibiotic residues in milk: Past, present, and future. J. Adv. Vet. Anim. Res. 2019;6(3):315.
2. Jayalakshmi K, Paramasivam M, Sasikala M, Tamilam T, Sumithra A. Review on antibiotic residues in animal products and its impact on environments and human health. J Entomol Zool Stud. 2017;5(3):1446-51.
3. Vishnuraj M, Kandeepan G, Rao K, Chand S, Kumbhar V. Occurrence, public health hazards and detection methods of antibiotic residues in foods of animal origin: A comprehensive review. Cogent Food & Agriculture. 2016;2(1):1235458.
4. 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.
5. Rasi H, Afshar Mogaddam M, Khandaghi J. Application of a new extraction method coupled to high performance liquid chromatography for tetracyclines monitoring in cow milk. Journal of food science and technology (Iran). 2021;18(113):339-49 [in Persian].
6. Meshkini K, Afshar Mogaddam 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. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2021;16(2):57-67 [in Persian].
7. Rastpour N, Khandaghi J, Farajzadeh MA, Afshar Mogaddam MR. Deep eutectic solvent-based QuEChERS method combined with dispersive liquid-liquid microextraction for extraction of benzoylurea insecticides in cabbage leaves samples. Int. J. Environ. Anal. Chem. 2020; 102(12):2778-91.

8. 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. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 2022;87-98 [in Persian].
9. Pirsā 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.
10. Pirsā 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.
11. 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. *J. Food Compos. Anal.* 2022;114:104831.
12. Nie L, Cai C, Guo R, Yao S, Zhu Z, Hong Y, et al. Ionic Liquid-Assisted DLLME and SPME for the Determination of Contaminants in Food Samples. *Separations*. 2022;9(7):170.
13. Chandran S, Singh R. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Die Pharmazie-An Int. J. Pharm. Sci.* 2007;62(1):4-14.
14. <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.
15. Mogaddam MRA, Nemati M, Farajzadeh MA, Lotfipour F, Nabil AAA, Mohebbi A, et al. Application of natural deep eutectic solvents-based in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of five acaricides in egg samples. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 2020:1-16.
16. Khani F, Khandaghi J, Farajzadeh MA, Afshar Mogaddam MR. Cold-induced Homogenous Liquid-Liquid Extraction Performed in a Refrigerated Centrifuge Combined with Deep Eutectic Solvent-based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Extraction of Some Endocrine Disrupting Compounds and Hydroxymethylfurfural from Honey Samples. *Food Anal. Methods*. 2021;14(10):2063-75.
17. 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.
18. Lemos VA, Oliveira LA. Ultrasound-assisted temperature-controlled ionic liquid microextraction for the preconcentration and determination of cadmium content in mussel samples. *Food Control*. 2015;50:901-6.
19. Holstege D, Puschner B, Whitehead G, Galey F. Screening and mass spectral confirmation of β -lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50(2):406-11.
20. Martins-Júnior HA, Kussumi TA, Wang AY, Lebre DT. A rapid method to determine antibiotic residues in milk using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* 2007;18:397-405.
21. Xie Y, Hu Q, Zhao M, Cheng Y, Guo Y, Qian H, et al. Simultaneous determination of erythromycin, tetracycline, and chloramphenicol residue in raw milk by molecularly imprinted polymer mixed with solid-phase extraction. *Food Anal. Methods*. 2018;11(2):374-81.
22. Edler P, Coppex L, Cominoli A, Corvi C. Analysis of erythromycin and oleandomycin residues in food by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Food Addit. Contam.* 2002;19(3):232-40.

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

Afshar Mogaddam MR^{1,2}, Khandaghi J^{3,4}, Vajdi Hokmabad S^{5*}

1- Assistant Professor of Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

2- Assistant Professor of Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

3- Assistant Professor of Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran

4- Assistant Professor of Department of food Biotechnology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

5- *Corresponding author: Assistant Professor of Department of Animal Science, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran
Email: Samad.Vajdi@iausa.ac.ir

Received 27 Dec, 2022

Accepted 6 Mar, 2023

Background and Objectives: Different types of antibiotics are used indiscriminately in animal husbandry for the growth and treatment of livestock, which cause accumulation of antibiotic residues in livestock products such as milk. Long-term consumption of milk contaminated with antibiotic residues above the permissible limits is harmful to human health, causing antibiotic resistance problems. Therefore, monitoring of antibiotic residues in milk and dairy products is particularly important.

Materials and Methods: In this study, temperature-controlled ionic liquid-assisted dispersive liquid-liquid microextraction method was developed for the extraction of amoxicillin, cloxacillin and erythromycin residues from cow milk and their assessment were carried out using high-performance liquid chromatography equipped with a diode array detector. Furthermore, effects of various parameters on the extraction efficiency such as volume of precipitating agent and vortexing time, type and quantity of extracting solvent, effects of salt addition and temperature of aqueous solution were optimized.

Results: Analysis of milk samples showed presence of amoxicillin in eight milk samples, all of which included values greater the permissible limits. No other antibiotics were detected in the milk samples. The suggested method included high efficiencies in extracting the target antibiotic residues from milk samples. Therefore, repeatability of the method based on relative standard deviation proportion included 3–4.5. Under optimal conditions, extraction recoveries were in range of 78–87% and the limits of detection and quantification less than 1.1 and 3.7 ng/ml were reported, respectively.

Conclusion: The developed method is appropriate for the determination of selected analytcs in cow milk and its detection limit is lower than the maximum residue limits for the residues of these antibiotics.

Keywords: Antibiotic, Milk, DLLME, Method development, HPLC