مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال شانزدهم، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰، صفحات ۶۷-۵۷

توسعه روش استخراج مایع-مایع همگن تلفیق شده با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی بر پایه حلال‌های اتکتیک عمیق به منظور استخراج فیتواستیرول‌ها از نمونه‌های خامه حیوانی و اندازه‌گیری آن‌ها با کروماتوگرافی گازی مجهز به دتکتور یونیزاسیون شعله‌ای

کبری مشکینی[۱]، محمدرضا افشارمقدم[۲و۳]، جلیل خندقی[۴]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی ، سراب، ایران
۲- استادیار مرکز ایمنی غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۳- استادیار مرکز تحقیقات آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۴- نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی ، سراب، ایران. پست الکترونیکی: khandaghi@iausa.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۹/۸/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۱۵

چکیده

سابقه و هدف: کنترل کیفیت و ایمنی مواد غذایی از بخش‌های مهم سلامت یک جامعه می‌باشد و در این بین، ارزیابی تقلب در محصولات غذایی در سال‌های اخیر موضوعی اساسی بوده است. خامه فرآورده‌ی حاوی چربی شیر و یکی از گران‌ترین و پرمصرف‌ترین چربی‌های خوراکی است که اغلب هدف تقلب به‌صورت اختلاط چربی‌های گیاهی مختلف با چربی طبیعی شیر قرار می‌گیرد. یکی از راه‌های کشف این نوع تقلب پایش استرول‌های گیاهی در این محصول لبنی است.

مواد و روش‌ها: در این کار پژوهشی از تلفیق روش استخراج مایع-مایع همگن با روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی برای استخراج فیتواستیرول‌های استیگماستیرول، براسیکااستیرول، کمپستیرول و بتا-سیتستیرول از نمونه‌های خامه حیوانی و آنالیز آن‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای استفاده‌شد. برای رسیدن به کارایی استخراج بالا، اثر فاکتورهای مختلف در هر یک از مراحل استخراج شامل نوع و حجم حلال استخراج‌کننده، حجم عامل جداکننده، سرعت و مدت‌زمان سانتریفوژ در مرحله استخراج مایع-مایع هموژن و نوع و حجم حلال استخراج‌کننده و اثر نمک‌زنی در مرحله میکرواستخراج مایع-مایع پخشی بررسی و بهینه شدند.

یافته‌ها: روش مذکور به‌طور موفقیت‌آمیزی بر روی نمونه‌های خامه انجام گرفت به طوری که حد تشخیص و حد اندازه‌گیری این روش به ترتیب ۲/۱-۰/۹۲ و ۶/۴-۲/۱ نانوگرم در گرم به دست آمد. روش پیشنهادی از دقت بالایی برخوردار بود به طوریکه درصد انحراف استاندارد نسبی در یک روز و در بین روزها کمتر از ۸/۸ گزارش‌شد. همچنین نتایج نشان‌داد مجموع فیتواستیرول‌ها در ۲۱ نمونه (۷۰ درصد) بیش‌از ۳ درصد و مغایر با موازین موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران بود.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش ثابت کرد که روش پیشنهادی ساده و قابل اعتماد بوده و دارای زمان آنالیز کوتاه می‌باشد و توانایی بالایی در استخراج و اندازه‌گیری استرول‌های گیاهی از نمونه‌های خامه حیوانی دارد.

واژگان کلیدی: خامه، فیتواستیرول، کروماتوگرافی گازی، استخراج مایع-مایع همگن، میکرواستخراج مایع-مایع پخشی

• مقدمه

ایمنی مواد غذایی از بخش‌های مهم سلامت یک جامعه می‌باشد و نهادهای نظارتی در هر کشوری در تلاش برای ارتقا ایمنی مواد غذایی هستند. در این بین ارزیابی انواع تقلبات در موادغذایی موضوعی اساسی بوده است زیرا این امر به طور چشمگیری بر سلامت عمومی تأثیر می‌گذارد بنابراین تدوین روش‌های دقیق تجزیه‌ای برای کنترل ایمنی موادغذایی و تشخیص تقلب در آن امری ضروری‌است (۱).

شیر و فرآورده‌های آن غنی از کلسیم، فسفر و انواع ویتامین‌ها و پروتئین‌های مورد نیاز بدن بوده و از مهمترین اجزای تشکیل دهنده سبدغذایی خانواده‌ها می‌باشند. خامه و کره، فرآورده‌ی حاوی مقدار زیادی چربی شیر و یکی از

گران‌ترین و پرمصرف‌ترین چربی‌های خوراکی هستند که اغلب هدف تقلب به‌شکل جایگزینی با چربی‌های ارزان‌تر یا روغن‌های گیاهی می‌باشد (۲).

روغن‌ها دارای دو بخش ترکیبات عمده شامل تری‌آسیل گلیسرول‌ها و ترکیبات جزئی مانند استرول‌ها، توکوفرول‌ها، هیدروکربن‌ها، رنگدانه‌ها، لیگنان و فنول‌ها و مقادیری از ترکیبات فرار می‌باشند. شناخت این ترکیبات و یا مقادیر آن‌ها در روغن‌های مختلف، تشخیص تقلبات را امکان‌پذیر می‌سازد (۳). استرول‌ها عمدتاً مخلوطی از استرول‌های آزاد و استراسترول‌ها می‌باشند. این ترکیبات بر اساس ساختار شیمیایی به دسته‌جات بدون متیل، منومتیل و دی‌متیل طبقه‌بندی می‌شوند. فیتواسترول‌ها (Phytosterols) یا استرول‌های گیاهی عمده مواد غیرصابونی‌شونده روغن‌های گیاهی را تشکیل می‌دهند و در اکثر روغن‌ها تا یک درصد آن را شامل می‌شوند لذا غنی‌ترین منابع فیتواسترول‌ها، روغن‌های گیاهی می‌باشد (۴). روغن‌های گیاهی حاوی مخلوطی از فیتواسترول‌ها شامل کمپسترول، استیگما استرول، بتا سیتواسترول، ارگوسترول، براسیکااسترول و اوناسترول می‌باشند (۳). روش استاندارد برای آنالیز فیتواسترول‌ها شامل صابونی‌کردن (Saponification) نمونه روغن، استخراج مواد غیرصابونی، مشخص‌کردن با کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، مشتق‌سازی به اترهای تری‌متیل‌سیلیل (Trimethylsilyl) و آنالیز با کروماتوگرافی گازی می‌باشد (۵).

علیرغم توسعه‌ی چشم‌گیر روش‌های تجزیه‌ای، امکان اندازه‌گیری مستقیم ترکیبات با غلظت‌های بسیار کم به‌ویژه در نمونه‌های دارای بافت پیچیده به‌طور کامل مقدور نمی‌باشد. این امر لزوم استفاده از مراحل آماده‌سازی نمونه جهت پیش‌تغلیظ آنالیت‌ها و حذف مزاحمت‌های بافت نمونه و همچنین تبدیل آنالیت‌ها به فرم منطبق با روش آنالیز و سیستم تجزیه‌ای را نشان‌می‌دهد (۶). از آنجا که قسمت عمده زمان تجزیه نمونه صرف آماده‌سازی آن می‌شود و این مرحله بر روی همه‌ی مراحل بعدی آنالیز تأثیرگذار است از این رو نقش شاخصی در شناسایی، تأیید و اندازه‌گیری آنالیت‌ها دارد. از ویژگی‌های یک روش استخراج ایده‌آل می‌توان به سریع، ساده، تکرارپذیر بودن و مصرف پایین حلال‌های آلی در آن اشاره کرد ضمن اینکه چنین روشی باید از قابلیت خودکار کردن و استفاده به صورت پیوسته با سیستم‌های تجزیه‌ای برخوردار باشد (۷).

تاکنون روش‌های گوناگونی برای آماده‌سازی و استخراج آنالیت‌های مختلف از مواد غذایی ارائه شده‌است که روش‌های استخراج مایع-مایع یا Liquid Liquid Extraction (۸، ۵) و روش ریزاستخراج مایع-مایع یا Liquid-Liquid Microextraction (۱۱-۹) از روش‌های اصلی و متداول استخراج به‌شمار می‌رود. استخراج مایع– مایع هموژن (Homogeneous Liquid-Liquid Extraction) براساس فرایند جداسازی فاز در یک محلول هموژن و استخراج آنالیت مورد نظر به درون فاز جدا شده می‌باشد. در واقع در این روش برخلاف روش LLE به دلیل اختلاط کامل فاز آلی با فاز آبی، استخراج آنالیت‌ها در یک محیط هموژن انجام می‌گیرد. شرط اولیه این تکنیک، تشکیل محلول هموژن می‌باشد طوری که در این نوع استخراج مرزی بین فاز آبی و فاز آلی وجود ندارد و در نتیجه به دلیل فصل مشترک بسیار بزرگ بین این دو فاز، نیازی به هم‌زدن نیست بنابراین حالت تعادل به‌سرعت حاصل می‌شود و زمان استخراج کوتاه است (۱۲). ریزاستخراج فاز مایع هم که به‌منظور مینیاتوریزه کردن روش استخراج مایع-مایع از طریق کاهش نسبت حلال آلی به فاز آبی ابداع شد به شیوه‌های مختلفی انجام می‌گیرد که یکی از مهم‌ترین آنها ریزاستخراج مایع-مایع پخشی (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) است که در سال ۲۰۰۶ ابداع و معرفی شد. این روش بر پایه‌ی سیستم سه جزئی شامل فاز آبی دارای آنالیت، حلال استخراج‌کننده و حلال پخش‌کننده استوار است. حلال پخش‌کننده بایستی هم با فاز آبی و هم با فاز آلی قابل امتزاج باشد و قابلیت پخش حلال استخراج‌کننده بصورت قطرات ریز را در فاز آبی داشته باشد (۱۳).

هدف از این کار پژوهشی توسعه یک روش مؤثر و کارامد در کشف تقلبات در خامه، بر پایه استخراج فیتواسترول‌ها از نمونه‌های خامه و اندازه‌گیری آن‌ها به‌روش کروماتوگرافی گازی است. در این راستا از یک روش جدید مبتنی بر استخراج مایع-مایع هموژن القاءشده با آب و ترکیب آن با روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی (DLLME) جهت استخراج استفاده شده‌است. در این شیوه از حلال‌های اتکتیک عمیق به عنوان حلال استخراج کننده/ پخش کننده در روش پیشنهادی استفاده می شود. این مواد یکی از مهم‌ترین حلال‌هایی هستند که به علت سمیت نسبتاً پایین آنها بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. این حلال‌ها مخلوط حاصل از اختلاط اسیدها و بازهای لوییس و برونستد هستند که مخلوط آن‌ها دارای دمای ذوب پسیار پایینی نسبت به هر یک از اجزاء سازنده خود می‌باشند (۱۴). ترکیبات استخراج شده با دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای (Flame Ionization Detector) اندازه‌گیری شدند.

• مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و مواد شیمیایی: نمونه‌های مختلف خامه حیوانی شامل ۱۰ نمونه از هریک از خامه‌های سنتی (سرشیر)، بسته‌بندی شده پاستوریزه و غیرپاستوریزه در بهار و تابستان سال ۱۳۹۹ از محل‌های عرضه در سطح استان آذربایجان‌شرقی به‌صورت تصادفی انتخاب و خریداری شدند. همه نمونه‌ها بدون رقیق‌سازی توسط شیوه پیشنهادی و تحت شرایط بهینه، استخراج و آنالیز شدند. کلیه آزمایش‌ها در دانشکده‌شیمی دانشگاه‌تبریز انجام‌گرفت. تری‌بوتیل آمونیوم‌کلرید، کولین‌کلرید، اتیلن‌گلیکول، استیک‌اسید، پروپانوئیک اسید، دی کلرواستیک اسید، هگزانوئیک اسید، اوکتانوئیک اسید، دکانوئیک اسید، هگزان، سدیم‌کلرید، اتانول با درجه خلوص تجزیه‌ای از شرکت مرک (Merck, Germany) و استاندارد استرول‌های مورد بررسی شامل استیگمااسترول (Stigmasterol)، براسیکااسترول (Brasicasterol)، کمپسترول (Campesterol) و بتا-سیتسترول (beta-Sitesterol) از شرکت سیگما (Sigma, USA) تهیه شد. به‌منظور کنترل کیفی سیستم کروماتوگرافی و تکرارپذیری، محلول استاندارد استرول‌ها (۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) هر روز سه‌بار به دستگاه کروماتوگرافی گازی (DANI1000, FID system, Italy) تزریق شد و مساحت زیر پیک هریک از آنالیت‌ها برای محاسبه‌ی فاکتور تغلیظ و راندمان استخراج مورد استفاده قرارگرفت.

بهینه‌سازی شرایط استخراج: برای دستیابی به کارایی استخراج بالا، تاثیر پارامترهای مختلف در هر یک از مراحل استخراج بررسی شد. عوامل موثر در مرحله استخراج مایع-مایع هموژن شامل نوع حلال استخراج‌کننده (از بین حلال‌های اتکتیک عمیق کولین‌کلرید-اتیلن‌گلیکول، کولین‌کلرید-استیک اسید و کولین‌کلرید-پروپانوئیک اسید)، حجم حلال (در محدوده ۲ تا ۴ میلی لیتر)، حجم عامل جداکننده (با اضافه کردن مقادیر ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۳۰، ۱۴۰ و ۱۵۰ میکرولیتر از آب دیونیزه)، سرعت سانتریفوژ (در سرعت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ دور بر دقیقه) و مدت‌زمان سانتریفوژ (در زمان‌های ۲، ۵، ۷ و ۱۰ دقیقه) و عوامل موثر در مرحله‌ی ریزاستخراج مایع-مایع پخشی شامل نوع حلال استخراج‌کننده (از بین حلال‌های تری‌بوتیل آمونیوم‌کلرید-دی‌کلرو استیک‌اسید-هگزانوئیک‌اسید، تری‌بوتیل آمونیوم‌کلرید-دی‌کلرو استیک‌اسید-اکتانوئیک‌اسید و تری‌بوتیل آمونیوم‌کلرید-دی‌کلرو استیک‌اسید-دکانوئیک‌اسید)، حجم حلال (با انتخاب حجم‌های ۳۸، ۴۵، ۵۵، ۶۵ و ۸۰ میکرولیتر) و اثر نمک‌زنی (با افزودن مقادیر متفاوتی از نمک در محدوده ۲-۱۰ درصد وزن-حجمی) بهینه‌سازی گردید. برای بررسی پارامترهای موثر در روش پیشنهادی از روش "یک پارامتر در یک زمان" استفاده شد. تأثیر این عوامل با مقایسه سطح زیر پیک حاصل از آنالیت‌ها در شرایط مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (۱۵).

روش استخراج: در این مطالعه روش استخراج مایع-مایع هموژن القاءشده با آب و ترکیب آن با روش میکرواستخراج مایع– مایع پخشی به‌منظور استخراج و پیش‌تغلیظ استرول‌های گیاهی از نمونه‌های خامه توسعه داده‌شده و اندازه‌گیری آن‌ها با روش کروماتوگرافی گازی مجهز به دتکتور یونیزاسیون شعله‌ای صورت گرفته‌است. برای این‌منظور ۲ گرم از هرنمونه خامه آلوده شده با آنالیت‌های مورد مطالعه (به غلظت ۲۵۰ نانوگرم در میلی‌لیترنسبت به هر یک از آنالیت‌ها) به‌داخل یک لوله آزمایش منتقل گردید و بر روی آن یک میلی‌لیتر هگزان اضافه‌شد و به‌مدت ۲ دقیقه ورتکس شد تا محلول یکنواختی حاصل شود. سپس ۲ میلی‌لیتر از حلال اتکتیک عمیق کولین‌کلرید-اتیلن‌گلیکول اضافه شده و مخلوط یکنواختی حاصل شد. سپس ۱۲۵ میکرولیتر آب دیونیزه به عنوان عامل جدا کننده فازها به داخل محلول اضافه شد و به‌مدت ۳۰ ثانیه به‌هم زده شد. مخلوط حاصله به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ ۱/۱ میلی‌لیتر از مخلوط آب و حلال کولین‌کلرید-اتیلن‌گلیکول که حاوی آنالیت‌های استخراج شده از خامه می‌باشد در زیر نمونه جمع شده و یک سیستم دو فازی حاصل شد. سپس به داخل یک میلی‌لیتر از مخلوط آب و کولین‌کلرید-اتیلن‌گلیکول حاصل از مرحله قبل، ۳۸ میکرولیتر حلال اتکتیک عمیق تری‌بوتیل آمونیوم‌کلرید-دی کلرواستیک اسید-دکانوئیک اسید اضافه و مخلوط حاصل توسط سرنگ به‌داخل ۵ میلی‌لیتر آب HPLC–grade خالص پخش گردید. در این‌صورت یک مخلوط کدر از پخش شدن حلال استخراج‌کننده به‌صورت قطرات ریز در آب ایجاد شده و این محلول به داخل حمام یخ منتقل شد و پس از ۵ دقیقه فاز جمع‌شده در سطح محلول برداشته و به یک ویال مخروطی شکل منتقل شد. پس از ذوب‌شدن، یک میکرولیتر از حلال استخراج‌کننده به سیستم تجزیه‌ای تزریق شد.

شرایط آنالیز با دستگاه کروماتوگرافی گازی: برای دستیابی به حداکثر تفکیک در سیستم کروماتوگرافی، جداسازی آنالیت‌ها در شرایط بهینه صورت گرفت. بعد از مطالعات صورت‌گرفته، شرایط کاری بهینه‌شده‌ی GC-FID برای جداسازی استرول‌های مورد مطالعه از نمونه‌های خامه

بصورت زیر انتخاب شد. برنامه دمایی ستون شامل اعمال ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و ۲۰ درجه افزایش دما در دقیقه تا ۳۰۰ درجه و سپس تثبیت دما به مدت ۱۵ دقیقه بوده و نوع ستون بکار رفته DB_5.1 بطول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با ضخامت فازساکن ۰/۵ میکرومتر و دمای آشکارساز FID، ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد بود. تزریق کننده از نوع Split/Splitless با دمای ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد انتخاب گردید. گازهای حامل و میک‌آپ، هلیوم (به ترتیب با جریان خطی ۳۰ سانتی‌متر در ثانیه و ۳۰ میلی‌لیتر در دقیقه)، سوخت، هیدروژن (با جریان ۴۰ میلی‌لیتر در دقیقه) و اکسیدان، هوا (با جریان ۳۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه) انتخاب شدند.

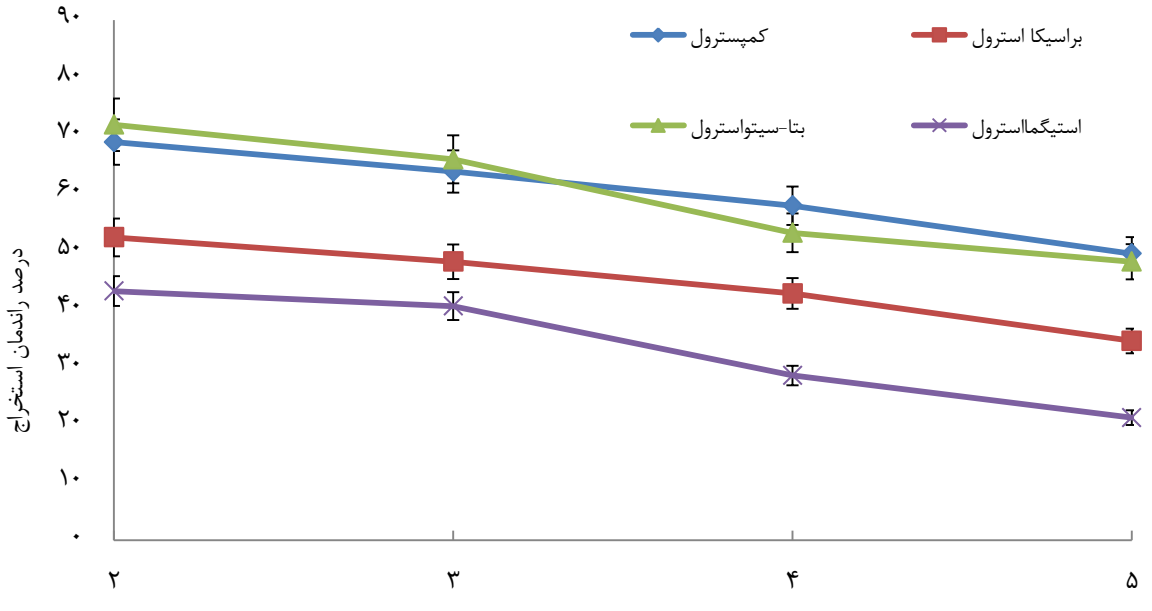
بررسی مشخصات تجزیه‌ای: به‌منظور اعتبارسنجی روش بکار رفته برای آنالیز فیتواسترول‌ها در این تحقیق، پس از ترسیم نمودار معیارگیری یا منحنی کالیبراسیون، فاکتورهایی از قبیل حد تشخیص (Limit of detection)، حد اندازه‌گیری (Limit of quantitation)، تکرارپذیری (RSD%)، فاکتور تغلیظ و راندمان استخراج بررسی و محاسبه شدند (۱۶).

• یافته‌ها

نتایج بهینه‌سازی پارامترهای مؤثر در مرحله استخراج مایع–مایع هموژن

نوع حلال استخراج‌کننده/پخش کننده: نتایج به‌دست آمده نشان داد که در بین حلال‌های انتخاب‌شده فقط کولین‌کلرید–اتیلن‌گلیکول قابلیت تشکیل سیستم دو فازی در حضور آب به عنوان عامل جدا کننده فازها را دارد و در مورد سایر حلال‌ها سیستم دوفازی تشکیل نمی‌شود. از این رو این حلال به‌عنوان حلال استخراج‌کننده مناسب در مرحله اول انتخاب شد. با توجه به نحوه اجرای روش، حلال استفاده شده به عنوان استخراج کننده در این مرحله به عنوان حلال پخش کننده در مرحله DLLME استفاده می‌شود.

حجم حلال استخراج‌کننده/پخش کننده: بررسی اثر این پارامتر با افزودن حجم‌های مختلفی از حلال اتکتیک عمیق کولین‌کلرید–اتیلن گلیکول در محدوده ۲ تا ۵ میلی‌لیتر به داخل نمونه خامه به‌صورت جداگانه صورت گرفت. نتایج به دست آمده در شکل ۱ نشان داده شده‌است. با افزایش حجم حلال استخراج‌کننده از ۲ به ۵ میلی‌لیتر، سیگنال‌های تجزیه‌ای کاهش می‌یابد که این کاهش در سیگنال‌ها مربوط به افزایش فاز آلی جدا شده با افزایش حجم حلال استخراج‌کننده و رقیق شدن آنالیت‌ها در این فاز می‌باشد. از این رو ۲ mL به عنوان حجم بهینه برای حلال استخراج کننده انتخاب گردید.



شکل ۱. بررسی حجم حلال کولین کلرید–اتیلن گلیکول در کارایی روش پیشنهادی

حجم عامل جداکننده: نتایج حاصل از تغییر راندمان استخراج با تغییر حجم آب دیونیزه نشان داد با افزایش حجم آب تا ۱۲۰ µL سیگنال‌های تجزیه‌ای افزایش یافته ولی پس از آن کاهش می‌یابد. همچنین نتایج نشان دادند که با به‌کار-گیری حجم‌های ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۳۰، ۱۴۰ و ۱۵۰ میکرولیتر از آب دیونیزه به ترتیب حجم‌های ۰/۴، ۰/۸، ۱/۱، ۱/۲، ۱/۳ و ۱/۷ میلی‌لیتر از مخلوط آب و حلال اکتیک عمیق کولین‌کلرید-اتیلن‌گلیکول از مخلوط خامه جداگردید. تغییرات مساحت زیر پیک آنالیت‌ها با روش پیشنهادی، مرتبط با تغییر حجم حلال اکتیک عمیق کولین‌کلرید-اتیلن‌گلیکول جداشده از خامه و تغلیظ بیشتر آنالیت‌ها می‌باشد. از این رو ۱۲۰ µL به عنوان حجم بهینه برای آب انتخاب شد.

بهینه سازی سرعت و مدت زمان سانتریفوژ:نتایج به‌دست آمده نشان داد که تغییر سرعت و مدت‌زمان سانتریفوژ تأثیر محسوسی در سیگنال‌های تجزیه‌ای مربوط به آنالیت‌ها ندارد ولی در سرعت بالای ۳۰۰۰ دور بر دقیقه و زمان بالاتر از ۵ دقیقه فازها به خوبی از هم جدا می‌شوند، از این رو سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه و زمان ۷ دقیقه برای دستیابی به حالت مطلوب در تشکیل سیستم دو فازی انتخاب شدند.

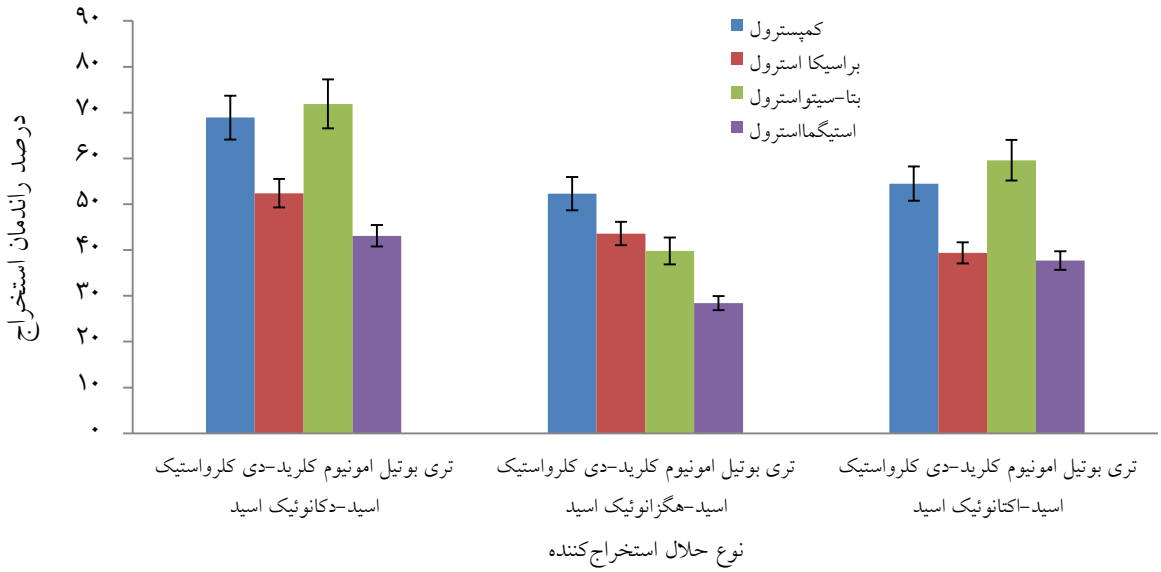
نتایج بهینه‌سازی پارامترهای موثر در مرحله DLLME

نوع حلال استخراج‌کننده: در این راستا ۳حلال مختلف با یک میلی‌لیتر از فاز کولین‌کلرید-اتیلن‌کلرید به‌دست آمده از مرحله قبل به طور جداگانه مخلوط شدند و مخلوط حاصل به داخل ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه پخش گردید. نتایج به‌دست آمده در شکل ۲ نشان داد که در بین حلال‌های انتخاب شده تری‌بوتیل آمونیوم‌کلرید-دی کلرواستیک اسید-دکانوئیک اسید دارای بیشترین کارایی در استخراج آنالیت‌های مورد نظر می‌باشد. از این‌رو این حلال برای آزمایشات بعدی انتخاب شد.

حجم حلال استخراج‌کننده: بررسی سیگنال‌های تجزیه‌ای بر اساس حجم حلال استخراج‌کننده نشان داد که با افزایش حجم حلال استخراج‌کننده از ۳۸ به ۸۰ میکرولیتر راندمان استخراج برای آنالیت‌های مورد مطالعه تقریباً ثابت می‌باشد. از این‌رو به دلیل مصرف کم حلال آلی، ۳۸ µL به‌عنوان حجم بهینه برای حلال استخراج‌کننده انتخاب گردید. لازم به‌ذکر است که با افزایش حجم حلال استخراج‌کننده از ۳۸ به ۸۰ میکرولیتر حجم فاز جمع شده سطح محلول آزمایشی نیز از ۱۰ به ۲۶ میکرولیتر تغییر می‌کند.

اثر نمک زنی: نتایج افزودن نمک حاکی از این بود که افزایش نیروی یونی محیط منجر به کاهش کارایی استخراج می شود. که این امر می‌تواند مربوط به افزایش ویسکوزیته محلول و کاهش ضرایب انتشار آنالیت‌ها شود. بنابراین در ادامه مطالعات از افزایش نمک صرف‌نظر شد.

نتایج مشخصات تجزیه‌ای روش: پارامترهای تجزیه‌ای روش حاضر تحت شرایط بهینه محاسبه و ارائه گردیدند. برای این‌منظور نمونه خامه با غلظت‌های متفاوتی از آنالیت‌های مورد مطالعه اسپایک شده و مطابق روش پیشنهادی استخراج و آماده سازی شد. محلول حاصله تحت شرایط بهینه مورد استخراج و آنالیز قرار داده شد. نمودار معیارگیری از رسم نسبت سیگنال تجزیه‌ای آنالیت‌های استخراج شده در غلظت-های ۰/۵، ۱/۰، ۱/۵، ۳/۰، ۶/۰، ۱۰/۰، ۲۵/۰، ۵۰/۰، ۲۵۰/۰، ۵۰۰/۰ میکروگرم بر لیتر از آنالیت‌ها به دست آمد. از منحنی کالیبراسیون مقدار مجذور ضریب همبستگی (r^2) و محدوده خطی روش برای هر یک از آنالیت‌ها به دست آمد. حد تشخیص و حد اندازه‌گیری روش به ترتیب برابر غلظت‌هایی که در آن‌ها نسبت سیگنال به نویز به‌ترتیب ۳ و ۱۰ می‌باشد درنظر گرفته شد. به‌منظور بررسی تکرارپذیری و دقت روش از انحراف استاندارد نسبی (RSD %) استفاده شد. برای این‌منظور ۶ محلول حاوی ۲۵ نانوگرم در میلی‌لیتر از آنالیت‌ها با شرایط یکسان و در حالت بهینه استخراج شدند. درصد RSD بر اساس مساحت پیک در محدوده ۵/۹ تا ۸/۸ به دست آمد که نشان از تکرارپذیری بالای روش ارائه شده دارد. نتایج حاصل از مشخصات تجزیه‌ای روش در جدول ۱ ارائه شده است.



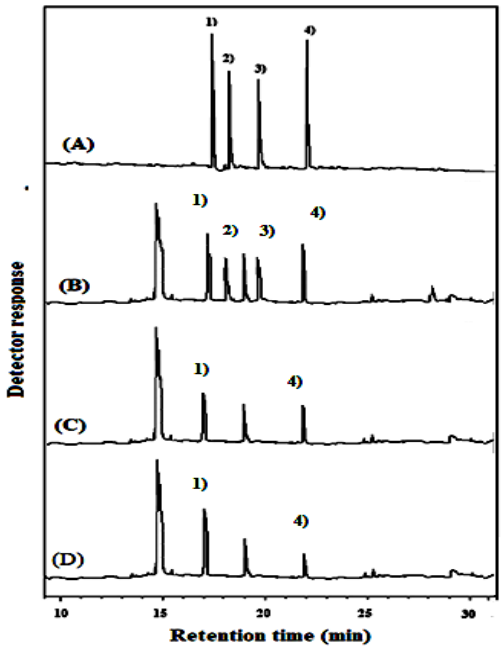
شکل ۲. بررسی نوع حلال استخراج کننده در کارایی روش پیشنهادی

جدول ۱. مشخصات تجزیه‌ای روش پیشنهادی در استخراج فیتواسترول‌ها از نمونه‌های خامه

آنالیت	محدوده خطی روش (نانوگرم در گرم)	حد تشخیص (نانوگرم در گرم)	حد اندازه‌گیری (نانوگرم در گرم)	مجذور ضریب همبستگی	انحراف استاندارد نسبی (٪) (n= ۶)		فاکتور تغلیظ ± انحراف استاندارد (n= ۳)	راندمان ± انحراف استاندارد (n= ۳)
					در یک روز	بین روزها		
براسیکااسترول	$۶/۳۲-۲\times۱۰^{۸}$	۲/۱	۶/۳۲	۰/۹۹۳	۵/۸۶	۷/۷۳	۱۳۸ ± ۸	۶۹± ۴
کمپسترول	$۵/۸۶-۲\times۱۰^{۸}$	۱/۷۴	۵/۸۶	۰/۹۹۲	۶/۱۷	۸/۱۲	۱۰۶ ± ۱۲	۵۳ ± ۶
استیگمااسترول	$۲/۱۴-۲\times۱۰^{۸}$	۰/۹۲۳	۲/۱۴	۰/۹۹۲	۷/۳۲	۸/۷۲	۱۴۸ ± ۱۰	۷۴ ± ۵
بتا–سیتواسترول	$۴/۳۴-۲\times۱۰^{۸}$	۱/۳۲	۴/۳۴	۰/۹۹۰	۷/۲۳	۷/۱۳	۱۰۴ ± ۱۲	۵۲ ± ۶

نتایج آنالیز نمونه‌های حقیقی: برای بررسی قابلیت روش پیشنهادی در استخراج آنالیت‌های مورد مطالعه در نمونه‌های حقیقی مختلف و همچنین بررسی اثر ماتریکس، اقدام به اندازه‌گیری آن‌ها در نمونه‌های مختلف تحت شرایط بهینه نمودیم. کروماتوگرام‌های GC-FID به دست آمده نشان می‌دهند که در همه نمونه‌ها فیتواسترول وجود دارد که مقادیر آن‌ها با شیوه افزایش استاندارد اندازه‌گیری شد. شکل ۳ کروماتوگرام محلول استاندارد فیتواسترول‌ها را همراه با دو نمونه حقیقی خامه نشان می‌دهد.

نتایج به‌دست آمده نشان داد که در ۲۱ مورد (۷۰ درصد) از نمونه‌های مورد مطالعه (۱۰ نمونه خامه سنتی، ۴ نمونه خامه پاستوریزه بسته‌بندی شده و ۷ نمونه خامه بسته‌بندی شده غیرپاستوریزه) میزان فیتواسترول‌ها بیش از حد مجاز آن‌ها مطابق دستورالعمل استاندارد ملی ایران می‌باشد (۱۷). بر اساس این دستورالعمل در نمونه‌هایی که در آن مقدار مجموع فیتواسترول‌ها بیشتر از ۳ درصد باشند، تقلب صورت گرفته‌است. مجموع مقادیر فیتواسترول‌ها در نمونه‌های مورد مطالعه در جدول ۲ گزارش شده است.



شکل ۳. کروماتوگرام‌های GC-FID محلول استاندارد فیتواسترول‌ها به غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در استون (نسبت به هریک از آنالیت ها) (A)، نمونه خامه اسپایک شده با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر از هر یک از آنالیت‌ها

(B) و دونمونه خامه (C,D) پس از اجرای روش پیشنهادی. (۱): براسیکااسترول، (۲): کمپسترول، (۳): استیگمااسترول و (۴): بتا-سیتواسترول

به دلیل اینکه مواد مختلفی از جمله پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌های موجود در ماتریکس نمونه ممکن است در اندازه‌گیری آنالیت‌ها تداخل ایجاد نماید، صحت روش پیشنهادی و اثر ماتریکس نمونه‌های حقیقی در کارایی روش پیشنهادی از طریق استخراج آنالیت‌های مورد نظر از نمونه‌های حقیقی اسپایک شده با محلول‌های استاندارد فیتواسترول‌های مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف تعیین گردید (۱۵). مقادیر بازیابی نسبی به دست آمده در جدول۳ نشان دهنده تاثیر بسیار ناچیز ماتریکس نمونه‌ها در کارایی روش پیشنهادی می‌باشد. با توجه به اینکه این مقادیر در بازه ۷۰ الی ۱۲۰ درصد قرار دارند، اثر ماتریس نا محسوس می‌باشد.

جدول ۲. مجموع مقادیر (نانوگرم در گرم) فیتواسترول‌های مورد مطالعه در خامه‌های حیوانی در استان آذربایجان‌شرقی

مجموع فیتواسترول‌ها	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ۴	نمونه ۵	نمونه ۶	نمونه ۷	نمونه ۸	نمونه ۹	نمونه۱۰
خامه سنتی (سرشیر)	$۱/۲\times۱۰^{۸}$	$۴/۷\times۱۰^{۷}$	$۱/۰۲\times۱۰^{۸}$	$۱/۰۸\times۱۰^{۸}$	$۱/۱۸\times۱۰^{۸}$	$۱/۳۱\times۱۰^{۸}$	$۱/۱۲\times۱۰^{۸}$	$۱/۲۱\times۱۰^{۸}$	$۸/۹۵\times۱۰^{۷}$	$۹/۱\times۱۰^{۷}$
خامه سته‌بندی‌شده پاستوریزه	$۷/۶\times۱۰^{۷}$	۲×۱۰^{۷}	$۲/۱۵\times۱۰^{۷}$	$۶/۷\times۱۰^{۷}$	$۲/۱\times۱۰^{۷}$	$۲/۷۵\times۱۰^{۷}$	$۱/۵۲\times۱۰^{۸}$	$۴/۶\times۱۰^{۷}$	$۲/۲\times۱۰^{۷}$	$۲/۹\times۱۰^{۷}$
خامه سته‌بندی‌شده غیرپاستوریزه	$۱/۲\times۱۰^{۸}$	۷×۱۰^{۷}	$۲/۵\times۱۰^{۷}$	۲×۱۰^{۷}	$۲/۸\times۱۰^{۷}$	$۲/۶۲\times۱۰^{۸}$	$۱/۲\times۱۰^{۸}$	$۱/۵۷\times۱۰^{۸}$	$۱/۵\times۱۰^{۸}$	$۱/۳۴\times۱۰^{۸}$

جدول۳. مطالعه اثر ماتریکس در کارایی روش استخراج فیتواسترول‌های از نمونه‌های خامه

آنالیت	انحراف استاندارد ± مقادیر بازیابی نسبی					
	خامه ۱	خامه ۲	خامه ۳	خامه ۴	خامه ۵	خامه ۶
	همه نمونه با مخلوط آنالیت ها به غلظت ۱۰۰ نانوگرم در گرم اسپایک شدند					
براسیکا استرول	۹۲±۵	۹۹±۵	۹۶±۶	۹۶±۴	۹۶±۶	۹۶±۵
کمپسترول	۹۸±۶	۱۰۲±۶	۹۵±۵	۹۵±۴	۹۳±۵	۹۶±۶
استیگمااسترول	۹۰±۴	۹۹±۵	۹۴±۶	۹۷±۸	۹۴±۷	۹۷±۵
بتا-سیتواسترول	۹۸±۵	۹۸±۶	۹۷±۵	۹۶±۷	۹۵±۶	۹۸±۳
	همه نمونه با مخلوط آنالیت ها به غلظت ۲۵۰ نانوگرم در گرم اسپایک شدند					
براسیکا استرول	۹۶ ±۵	۹۷ ±۵	۹۴ ±۴	۹۹ ±۵	۹۷ ±۵	۹۶ ±۵
کمپسترول	۸۹ ±۷	۹۶ ±۷	۹۶ ±۵	۹۸ ±۶	۹۵ ±۶	۹۵ ±۶
استیگمااسترول	۹۴ ±۶	۹۴ ±۵	۹۶ ±۶	۹۶ ±۶	۹۸ ±۵	۱۰۳ ±۵
بتا-سیتواسترول	۹۳ ±۵	۹۸ ±۶	۹۸ ±۷	۹۵ ±۷	۹۶ ±۶	۹۸ ±۸
	همه نمونه با مخلوط آنالیت ها به غلظت ۵۰۰ نانوگرم در گرم اسپایک شدند					
براسیکا استرول	۹۲ ±۶	۹۵ ±۵	۹۷ ±۵	۹۶ ±۸	۹۹ ±۵	۹۴ ±۶
کمپسترول	۹۴ ±۵	۹۶ ±۶	۹۲ ±۶	۹۷ ±۸	۹۷ ±۵	۹۰ ±۵
استیگمااسترول	۹۵ ±۶	۸۹ ±۷	۹۳ ±۵	۹۵ ±۵	۹۸ ±۶	۹۲ ±۹
بتا-سیتواسترول	۹۶ ±۵	۹۴ ±۵	۹۱ ±۵	۹۴ ±۷	۹۶ ±۵	۹۰ ±۴

نمونه‌های ۱و۲ خامه سنتی (سرشیر)، نمونه‌های ۳و۴ خامه پاستوریزه و نمونه‌های ۵و۶ خامه غیرپاستوریزه می‌باشد

• بحث

یکی از پارامترهای مهم در اجرای روش استخراج مایع–مایع هموژن انتخاب نوع حلال استخراج کننده است. این حلال بایستی قابل اختلاط با نمونه بوده و در حضور یک عامل سوم قابلیت تشکیل سیستم دوفازی را داشته باشد. همچنین این حلال باید قابلیت استخراج آنالیت‌ها را از نمونه داشته باشد (۱۸). با توجه به‌اینکه حلال استخراج‌کننده در روش پیشنهادی به‌عنوان حلال پخش‌کننده در مرحله DLLME استفاده می‌شود، در این تحقیق از حلال‌های اتکتیک عمیق که هم قابلیت اختلاط با نمونه و فاز آبی را داشته و هم قدرت استخراج بالا و سمیت کمتری دارند (۲۰، ۱۹) به‌عنوان حلال استخراج کننده استفاده شد. حلال اتکتیک مورد استفاده در این روش از برقرار پیوند هیدروژنی ما بین کولین کلرید و اتیلن گلیکول حاصل می شود.

حجم حلال استخراج‌کننده در مرحله HLLE بازده استخراج و تکرارپذیری نتایج را تحت تأثیر قرار می‌دهد به‌طوریکه هر چه حجم حلال اولیه بیشتر باشد در این‌صورت حجم فاز جمع‌شده پس از استخراج نیز بیشتر می‌شود و فاکتور تغلیظ کاهش یافته و سیگنال‌های تجزیه‌ای نیز کاهش خواهندیافت (۱۲). ازطرفی با کاهش حجم حلال، کارایی استخراج و تکرارپذیری کاهش می‌یابد لذا حجم حلال استخراج‌کننده باید بهینه‌سازی شود (۲۱). در این مطالعه نیز با افزایش حجم حلال استخراج‌کننده و رقیق شدن آنالیت‌ها در فاز آلی جدا شده، سیگنال‌های تجزیه‌ای کاهش یافت. لازم به ذکر است در حجم‌های پایین‌تر از ۲ mL سیستم دو فازی تشکیل نشد.

در روش HLLE از یک عامل سوم به‌منظور تشکیل سیستم دوفازی استفاده می‌شود. در کار پژوهشی حاضر از آب دیونیزه به‌عنوان این عامل بهره گرفته شد. آب به دلیل داشتن ساختمان دوقطبی غیرقابل اختلاط با نمونه روغن بوده در حالیکه به هر نسبتی در استون حل می‌شود. اختلاط آب با استون باعث می‌شود که قطبیت مخلوط حاصله به نحوی تغییر کند که بخشی از حلال اتکتیک عمیق کولین‌کلرید-اتیلن‌گلیکول به‌همراه آب از مخلوط خامه جدا شده و یک سیستم دو فازی تشکیل گردد. هرچه حجم آب بیشتر باشد مقدار حلال اتکتیک عمیق جدا شده از مخلوط خامه نیز بیشتر می‌گردد. از این‌رو حجم آب بایستی مورد بررسی قرارگیرد (۲۲).

انتخاب نوع حلال استخراج‌کننده در روش DLLME مهم‌ترین پارامتر می‌باشد. حلال استخراج‌کننده بایستی قابلیت پخش در فاز آبی و حلالیت کمی در فاز آبی را داشته باشد. از طرف دیگر این حلال باید دارای دانسیته متفاوت از آب باشد تا جمع‌آوری آن ممکن باشد (۲۳). در این کار پژوهشی حلال‌های با دانسیته کمتر از آب به دلیل امکان جمع‌آوری آن‌ها بدون سانتریفوژ انتخاب شدند (۲۴).

در اکثر موارد افزایش قدرت یونی محلول آزمایشی سبب کاهش میزان دسترسی مولکول‌های آنالیت به حلال (آب) می‌شود که به دلیل تشکیل کره‌های هیدراته در اطراف یون‌های حاصل از انحلال نمک می‌باشد (۷) در نتیجه افزایش کارایی استخراج دور از انتظار نیست. از طرفی افزودن نمک می‌تواند باعث افزایش ویسکوزیته فاز آبی شده و ضریب‌انتشار آنالیت را در فازآبی تحت تأثیر قرار داده و منجربه کاهش راندمان استخراج گردد لذا یکی از پارامترهای مهم در اکثر روش‌های استخراج که نیاز به بررسی و بهینه‌سازی دارد، مقدار نمک می‌باشد (۲۵).

به‌منظور ارزیابی کارایی روش پیشنهادی در استخراج استرول‌های گیاهی، برخی پارامترهای تجزیه‌ای روش حاضر از قبیل محدوده خطی اندازه‌گیری، حد تشخیص، تکرارپذیری (بصورت درصد انحراف‌استاندارد)، درصد بازیابی و مدت زمان استخراج با چند روش به‌کار رفته برای استخراج این آنالیت‌ها از نمونه‌های مختلف مشابه مقایسه شد که در جدول۴ به آن اشاره شده است. تکرارپذیری روش حاضر ایده‌ال و قابل مقایسه با سایر روش‌های ذکر شده در جدول است. مقادیر حداندازه‌گیری و حد تشخیص به دست آمده در این مطالعه پایین‌تر و قابل مقایسه با سایر روش‌ها حتی روش‌های انجام شده با GC–MS می‌باشد. کارایی نسبتا پایین روش خصوصاً در استخراج دو آنالیت کمپسترول و بتا سیتواسترول مشهود است که به دو مرحله‌ای بودن استخراج مربوط می‌شود. از ویژه‌گی‌های بارز روش حاضر می‌توان به کوتاه بودن زمان استخراج اشاره کرد.

جدول۴. مقایسه کارایی روش پیشنهادی در استخراج فیتواسترول‌ها از نمونه‌های خامه حیوانی با روش‌های مشابه

روش استخراج	نمونه	محدوده خطی (نانوگرم در گرم)	حد تشخیص (نانوگرم در گرم)	انحراف استاندارد نسبی (٪)	راندمان استخراج	زمان استخراج (دقیقه)	منبع
الف	روغن خوراکی	۱۲-۸۰۰۰	۰/۵۲-۳/۶	۳/۹-۶/۲	۷۵-۹۰	~۲۵	۲۶
ب	روغن گیاهی	$۲۰۰۰-۲\times۱۰^{۶}$	۳۰۰	۲/۲-۹/۶	۷۵-۹۰	~۵۰	۲۷
ج	روغن تخم کدو	۱۶۰۰۰-۲۵۶۰۰	۱۲۰-۲۹۰	۲/۲-۳/۳	۹۷/۴۱	~۱۳۰	۲۸
د	خامه حیوانی	۲/۱-۵۰۰	۰/۹۲-۲/۱	۵/۹-۸/۸	۵۲-۷۴	~۱۰	روش‌حاضر

الف: استخراج فاز جامد پخشی تلفیق‌شده با ریز استخراج مایع-مایع جفت‌شده با کروماتوگرافی گازی مجهز به اسپکترومتر جرمی

ب: استخراج فاز جامد جفت‌شده به کروماتوگرافی گازی مجهز به مجهز به دتکتور یونیزاسیون شعله‌ای

ج: استخراج مایع-مایع جفت‌شده به کروماتوگرافی گازی مجهز به دتکتور یونیزاسیون شعله‌ای

د: استخراج مایع-مایع تلفیق‌شده با ریزاستخراج مایع-مایع پخشی جفت‌شده با کروماتوگرافی‌گازی مجهزبه دتکتور یونیزاسیون شعله‌ای

نتیجه‌گیری

این کار پژوهشی ترکیب روش‌های استخراج مایع-مایع هموژن و میکرواستخراج مایع-مایع پخشی برای استخراج و پیش‌تغلیظ فیتواسترول‌های استیگمااسترول، براسیکااسترول، کمپسترول و بتا-سیتسترول از نمونه‌های خامه حیوانی استفاده شد. در اجرای این روش، در مرحله HLLE از آب به عنوان عامل تشکیل‌دهنده سیستم دوفازی استفاده شد.

روش مذکور به‌طور موفقیت‌آمیزی بر روی انواع نمونه‌های خامه انجام گرفت و نتایج به‌دست آمده نشان دهنده پارامترهای تجزیه‌ای مطلوب می‌باشند به طوریکه حدتشخیص و حد اندازه‌گیری در این روش به ترتیب ۲/۱-۰/۹۲ و ۶/۴-۲/۱ نانوگرم در گرم به دست آمدند. دقت روش بر اساس درصد انحراف استاندارد نسبی در محدوده ۵/۹ تا ۸/۸ گزارش‌شد که نشان از تکرارپذیری بالای روش مذکور دارد.

آنالیز نمونه‌های حقیقی نیز نشان‌داد که مقدار مجموع فیتواسترول‌ها در ۷۰ درصد نمونه‌های مورد مطالعه بیش از ۳ درصد بوده و مغایر با استاندارد ملی ایران است که حاکی از اختلاط چربی حیوانی و طبیعی موجود در شیر با روغن‌های گیاهی می‌باشد.

• References

1. Hamed AM, Aborass M, El-Kafrawy I, Safwat G. Comparative study for the detection of Egyptian buffalo butter adulteration with vegetable oils using conventional and advanced methods. J Food Saf 2019; 39(4): 1-9.
2. Tomaszewska-Gras J. Rapid quantitative determination of butter adulteration with palm oil using the DSC technique. Food Control 2016; 60: 629-35.
3. Azadmard-Damirchi S. Review of the use of phytosterols as a detection tool for adulteration of olive oil with hazelnut oil. Food Addit. Contam 2010; 27(1): 1-10.
4. Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM. Plantsterols: biosynthesis , biological function and their importance to human nutrition. J. Sci. Food Agric 2000; 80(7): 939-66.
5. Jeddy M. Khandaghi J. Detection and quantification of phytosterols in yogurt using gas chromatography. J. food hyg. 2019; 9(1): 59-71[in Persian].
6. Mitra S. Sample preparation techniques in analytical chemistry, John Wiley pub. New Jersey, 2003. p. 12-35.
7. Farajzadeh MA, Mohebbi A, Pazhohan A, Nemati M, Afshar Mogaddam MR. Air–assisted liquid–liquid microextraction; principles and applications with analytical instruments. Trends Anal. Chem. 2020; 122: 115734.
8. Garicia C, Ruano A, Gomes JA. Evaluation of the liquid–liquid extraction technique and application to the determination of volatile halo organic compounds in chlorinated water. J. Chromatogr. A. 1992; 605: 251–9.
9. Saraji M. Dynamic headspace liquid–phase microextraction of alcohols. J. Chromatogr. A. 2005; 1062: 15–21.
10. Amini R, Khandaghi J, Afshar mogaddam MR. 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: 3267–75.
11. Psillakis E, Kalogerakis N. Developments in liquid–phase microextraction. Trends Anal. Chem. 2003; 22: 565–74.
12. 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.
13. Berijani S, Assadi Y, Anbia M, Milani Hosseini MR, Aghaee E. Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–flame photometric detection: Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. J. Chromatogr. A 2006; 1123: 1–9.

14. Zhang Q, Vigier KD, Royer S, Jerome F. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. Chem. Soc. Rev. 2012; 41(21): 7108-46.

15. European Commission Decision. Concerning the performance of analytical methods. Implementing Council Directive 657/EC, 2002.

16. Chandran S, Singh R. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. Int. J. Pharm. Sci. 2007; 62(1): 4-14.

17. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Butter and Butter oil- Determination of cholesterol and phytosterols by gas chromatography. ISIRI no 22560. 1st revision, Karaj: ISIRI; 2017 [in Persian].

18. Sheikhzadeh F, Afshar Mogaddam MR, 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; In press.

19. 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; In press.

20. Zahiri E, Khandaghi J, Farajzadeh MA, Afshar Mogaddam MR. Combination of dispersive solid phase extraction with solidification organic drop–dispersive liquid–liquid microextraction based on deep eutectic solvent for extraction of organophosphorous pesticides from edible oil samples. J. Chromatogr. A 2020; 1627: 461390.

21. Fakhim Rasoolzadeh R, Afshar Moghaddam MR, Khandaghi J. Application of a novel microextraction method for determination of organophosphorous pesticides from fruit juice using high performance liquid chromatography. J. food hyg. 2020; 10 (2): 31-43 [in Persian].

22. Torbati M, Farajzadeh MA, Afshar Mogaddam MR, Torbati M. Deep eutectic solvent based homogeneous liquid–liquid extraction coupled with in-syringe dispersive liquid–liquid microextraction performed in narrow tube; application in extraction and preconcentration of some herbicides from tea. J. Sep. Sci. 2019; 42: 1768-76.

23. Pil-Bala B, Khandaghi J, Afshar Mogaddam MR. Analysis of endocrine-disrupting compounds from cheese samples using pressurized liquid extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. Food Anal. Methods 2019; 12: 1604–11.

24. Zeiadi S, Afshar Mogaddam MR, 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; In press.

25. Farajzadeh MA, AfsharMogaddam MR, Alizadeh Nabil AA. Polyol-enhanced dispersive liquid–liquid microextraction coupled with gas chromatography and nitrogen phosphorous detection for the determination of organophosphorus pesticides from aqueous samples, fruit juices, and vegetables. J. Sep. Sci. 2015; 38: 4086–94.

26. Afshar Mogaddam MR, Farajzadeh MA, Azadmard Damirchi S, Nemati M. Dispersive solid phase extraction combined with solidification of floating organic drop–liquid–liquid microextraction using in situ formation of deep eutectic solvent for extraction of phytosterols from edible oil samples. J. Chromatogr. A 2020; 1630:461523.

27. Xu B, You S, Zhou L, Kang H, Luo D, Ma H, Han S. Simultaneous Determination of Free Phytosterols and Tocopherols in Vegetable Oils by an Improved SPE–GC–FID Method. Food Anal. Methods. 2020; 13(2): 358-69.

28. Hrabovski N, Sinadinovic–Fiser S, Nikolovski B, Sovilj M, Borota O. Phytosterols in pumpkin seed oil extracted by organic solvents and supercritical CO_2 . Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2012; 114: 1204–11.

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

Meshkini K[1], Afshar Moghaddam MR[2,3], Khandaghi J[4]*

1- M.Sc Graduate of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran

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

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

*4- -*Corresponding author: Assistant Professor of Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran. Email: khandaghi@iausa.ac.ir*

Received 31 Oct, 2020 **Accepted 3 Feb, 2021**

Background and Objectives: Food quality and safety control is an important part of the public health assessment of food adulteration has been a key issue in recent years. Cream is a product containing milk fat and is one of the most expensive and widely consumed edible fats, which is often targeted for cheating by mixing various vegetable oils with natural milk fats. A way to detect this type of fraud is to assess phytosterols in this dairy product.

Materials & Methods: In this study, homogeneous liquid-liquid extraction method combined with dispersive liquid-liquid microextraction method was used for the extraction of stigmasterol, brassicaestrol, compesterol and β-sitestrol from animal cream samples. Samples were analyzed using gas chromatography-flame ionization detection method. To achieve high efficiency, effects of various factors in each extraction step, including type and volume of the extraction solvent, volume of the separating agent, speed and duration of centrifugation in the homogeneous liquid-liquid extraction step were investigated and optimized. Moreover, type and volume of the extraction solvent and salting effects in the dispersive liquid-liquid microextraction step were investigated and optimized as well.

Results: The suggested method was successfully carried on on cream samples. Limit of detection and limit of quantification of the method were in ranges of 0.92–2.1 and 2.1–6.4 ng/g, respectively. Method included a proper precision with relative standard deviation of less than ≤ 8.8 for intra and inter-day precisions. Results showed that the total phytosterol content in 21 samples (70%) was more than 3%, contrary to the legal limits by the Institute of Standards and Industrial Research of Iran.

Conclusion: Results of this study have verified that the suggested method is simple and reliable, including short analysis time and high ability to extract and measure phytosterols from animal cream samples.

Keywords: Cream, Phytosterol, Gas chromatography, HLLE, DLLME