

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

علیرضا ندرتی^۱، آذر حقیقت آسیابر^۲، محمدرضا افشارمقدم^۳ و جلیل خندقی^۴

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

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

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

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

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۲۷

چکیده

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

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

یافته‌ها: پس از اجرای روش تجزیه‌ای بهینه‌شده، ویژگی‌های تجزیه‌ای مطلوب مانند حد تشخیص در محدوده ۰/۱۳ تا ۰/۲۷ نانوگرم در گرم، تکرارپذیری در محدوده ۲/۹ تا ۶/۲ و بازده استخراج ایده‌ال در محدوده ۷۴ تا ۸۲ درصد به‌دست آمد. به‌علاوه صحت بالای روش مذکور با انجام روش استخراج توسعه داده شده و عدم تأثیر منفی بافت نمونه‌ها در استخراج آنالیت‌های هدف مشخص گردید. آنالیز نمونه‌های حقیقی وجود پیرن در ۲ نمونه عسل در مقادیر $11/3 \pm 0/2$ و $12/3 \pm 0/5$ را نشان داد.

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

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

• مقدمه

هورمون‌هایی از مشتقات استروژن، این محصول به‌طور گسترده‌ای در سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱). عسل نیز مانند سایر مواد غذایی ممکن است به آلاینده‌هایی

ایمنی ماده غذایی یکی از مهم‌ترین اولویت‌های مصرف‌کنندگان و به تبع آن تولیدکنندگان و سازمان‌های ناظر بر بهداشت هر جامعه‌ای می‌باشد. با توجه به ارزش غذایی و خواص درمانی عسل (عوامل قوی ضد میکروب و نیز

استخراج کننده که چگالی متفاوتی نسبت به آب دارد، جدا می شود (۱۳).

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

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

• مواد و روش ها

نمونه برداری و مواد شیمیایی

تعداد ۲۰ نمونه عسل شهد کارخانجات مختلف در زمستان سال ۱۴۰۱ از فروشگاه های شهر تبریز تهیه و در آزمایشگاه مرکز ایمنی غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت شرایط بهینه شده استخراج و آنالیز شدند. استون، استونیتریل، سدیم کلرید، ۱-بوتیل ۳-متیل ایمیدازولیوم دی برومو دی کلرو فرات $[C4MIM][FeCl_2Br_2]$ ، ۱-بوتیل ۳-متیل ایمیدازولیوم تترا کلرو فرات $[C4MIM][FeCl_4]$ و ۱-هگزیل ۳-متیل ایمیدازولیوم تترا کلرو فرات $[C6MIM][FeCl_4]$ با درجه خلوص تجزیه ای از شرکت سیگما (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) و استاندارد اسنافتن (Acenaphthene)، فنانترن (Phenanthrene)، آنتراسن (Anthracene) و پایرن (Pyrene) از شرکت مرک (Merck, Darmstadt, Germany) تهیه شد.

روش استخراج

برای انجام فرایند تجزیه ای پیشنهادی، ابتدا مقدار ۲ گرم از نمونه عسل با یک گرم آب نمک ۸ درصد وزنی/حجمی به داخل یک لوله آزمایش منتقل شده و سپس مقدار ۱/۵ میلی لیتر از حلال استونیتریل به داخل نمونه اضافه و مخلوط حاصل به هم زده شد. این مخلوط به مدت ۵ دقیقه ورتکس شده و پس از آن در دمای منفی ۱۰ درجه سانتی گراد (به منظور جامد شدن عسل و سهولت جداسازی حلال) به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، فاز رویی (استونیتریل حاوی آنالیت ها) به دقت برداشته و به داخل یک لوله آزمایش دیگر منتقل شد. بر روی

مانند آنتی بیوتیک ها و هیدروکربن های آروماتیک حلقوی آلوده بوده و اثرات منفی بر روی سلامت مصرف کننده بگذارد (۲).

هیدروکربن های آروماتیک حلقوی یا PAHs (Polycyclic aromatic hydrocarbons) از جمله آلاینده های شیمیایی رایج در مواد غذایی هستند. در ساختار این مواد دو یا چند حلقه ی بنزن وجود دارد که از اتم های هیدروژن و کربن تشکیل شده اند. PAHها جزو مهم ترین آلاینده های محیط زیست نیز به شمار می روند و از منابع گوناگون مانند سوخت های فسیلی، آتش سوزی در جنگل ها، دود خودروها و بعضی از فعالیت های صنعتی به وجود می آیند (۳). با توجه به اینکه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای آب گریز بوده و خیلی کم در آب حل می شوند، بنابراین در طبیعت ماندگار بوده و به عنوان مثال به مدت طولانی بر روی گرده و شهد گل ها باقی خواهند ماند و طبیعتاً عسل به دست آمده از چنین منابعی می تواند حاوی PAHها باشد (۴). با توجه به اینکه هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای تهدید جدی برای سلامت انسان بوده و اثرات سرطان زایی دارند، سازمان های نظارتی مقادیر حد مجازی از باقیمانده آن ها را در غذاهای گوناگون مانند عسل تعیین نمودند (۵).

با توجه به حساسیت بالای مورد نیاز برای شناسایی باقیمانده این ترکیبات، در اکثر موارد از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا یا High-performance liquid chromatography (۶) و کروماتوگرافی گازی (۷) به عنوان ابزار تجزیه ای برای آنالیز آن ها استفاده می شود. با وجود به کارگیری تکنیک های تجزیه ای پیشرفته و حساس، آنالیز بسیاری از نمونه ها مانند عسل اولاً به دلیل ماتریکس پیچیده ی نمونه ها و در ثانی به دلیل مقادیر غلظتی پایین آلاینده ها، بدون مراحل مقدماتی پیش غنی سازی آنالیت ها غیر ممکن است (۸). بنابراین، توسعه و استفاده از روش های آماده سازی آسان و کارا قبل از آنالیز نمونه ها بسیار حائز اهمیت می باشد.

میکرواستخراج مایع-مایع پخشی یا DLLME (Dispersive liquid-liquid micro-extraction) یکی از روش هایی است که در پیش تغلیظ، آماده سازی و استخراج آلاینده های مختلف استفاده شده است (۹-۱۲). بطور ساده طی دو مرحله DLLME، حلال استخراج کننده ی غیر قابل اختلاط با آب با یک حلال آلی قابل اختلاط با آب یا حلال پخش کننده مخلوط شده و به وسیله ی سرنگ به داخل محلول آبی حاوی آنالیت ها تزریق می شود و آنالیت های آب گریز و یا آب گریز شده به داخل قطرات بسیار ریز حلال استخراج کننده وارد می شوند. در پایان محلول ابری حاصل، سانتریفیوژ شده و حلال

این آزمون‌ها و آزمون‌های اعتبار بخشی روش در سه تکرار انجام و نتایج به صورت میانگین داده‌ها $\pm$ انحراف استاندارد بیان شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

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

• یافته‌ها

عوامل بهینه شده مؤثر در مرحله اول استخراج

نوع و حجم حلال استخراج کننده

برای این منظور دو حلال مورد استفاده قرار گرفت و همان طوریکه در شکل ۱ دیده می‌شود، استونیتریل دارای بیشترین کارایی در استخراج آنالیت‌های مورد نظر بود و برای آزمایشات بعدی انتخاب شد. همچنین بررسی سیگنال‌های تجزیه‌ای بر اساس حجم حلال استخراج کننده نشان داد که افزایش حجم حلال تا ۱/۵ میلی لیتر سبب افزایش بازده استخراج آنالیت‌های مورد مطالعه شد (شکل ۱).

ورتکس کردن نمونه

برای بررسی اثر هم زدن نمونه‌ها در کارایی استخراج، دو روش ورتکس کردن و سونیکاسیون با هم مقایسه شدند که نتیجه مطلوب تر از ورتکس کردن نمونه حاصل شد. همچنین یافته‌ها نشان داد، پنج دقیقه ورتکس نمودن نمونه‌ها سبب افزایش سیگنال‌های تجزیه‌ای گردید (شکل ۱).

اثر نمک زنی

با توجه به افزایش سیگنال‌های تجزیه‌ای استخراج آنالیت‌های هدف با افزایش قدرت یونی محیط و افزودن کلرید سدیم تا مقدار ۸ درصد وزنی/حجمی (شکل ۱)، ادامه مطالعه با افزودن ۸ درصد نمک به داخل فاز آبی انجام شد.

شکل ۱. بهینه سازی عوامل مؤثر در کارایی مرحله اول

استخراج ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای از نمونه عسل

عوامل بهینه شده مؤثر در مرحله دوم استخراج

نوع و حجم مایع یونی مغناطیسی

در این راستا سه نوع مایع یونی مغناطیسی مختلف مورد استفاده قرار گرفت. چنان که در نمودار ۲ دیده می‌شود، حلال ۱-هگزیل-۳-متیل ایمیدازولیوم ۴-کلرو فرات بیشترین کارایی استخراج آنالیت‌های مورد نظر را نشان داده و برای آزمایشات بعدی انتخاب شد. ثبت سیگنال‌های تجزیه‌ای ناشی از حجم‌های مختلف این حلال نیز نشان داد که افزایش حجم حلال تا مقدار ۶۵ میکرولیتر سبب تغییر بهبود بازده استخراج شده و پس از آن تقریباً ثابت ماند.

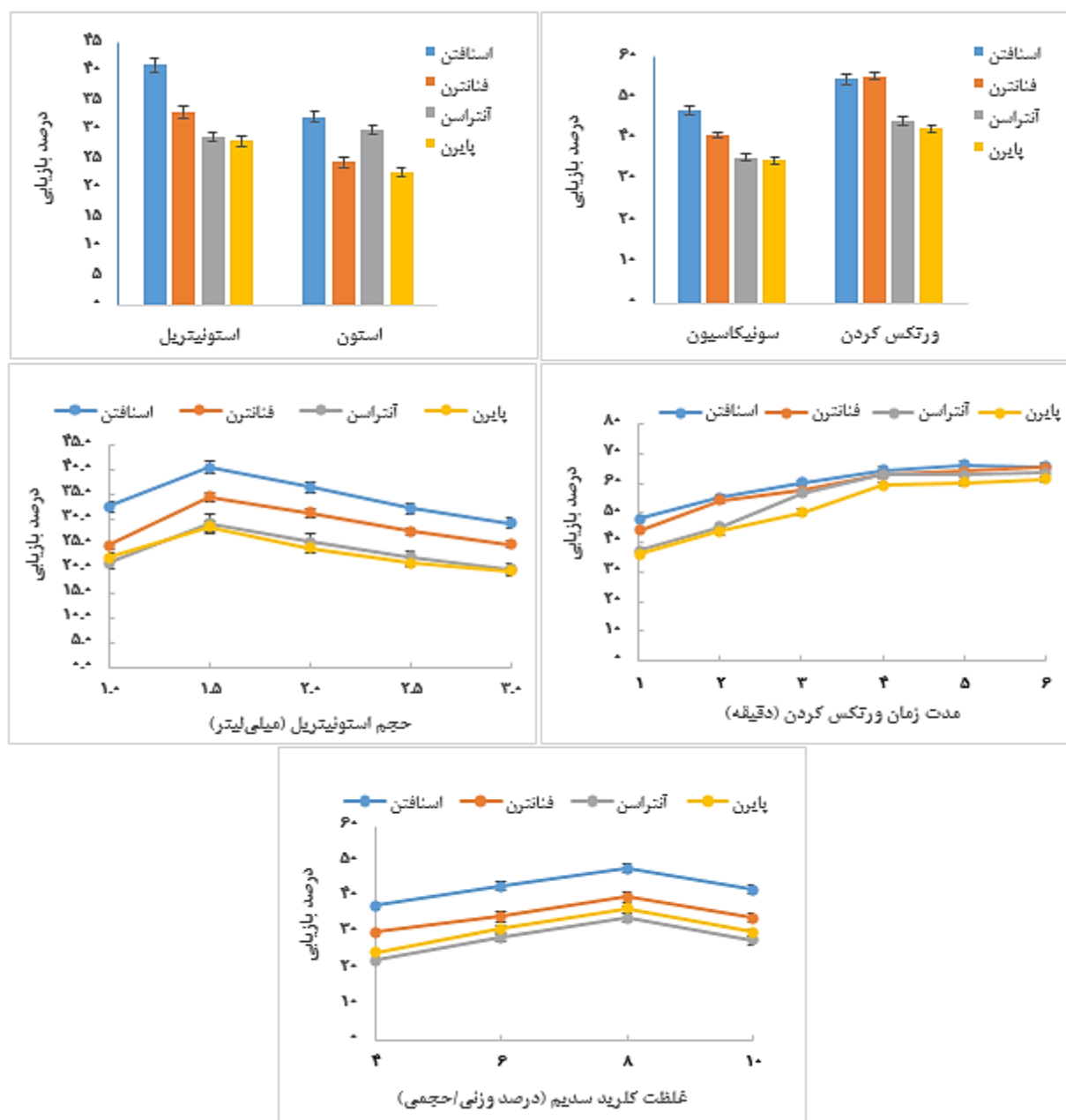
این فاز مقدار ۶۵ میکرولیتر از مایع یونی مغناطیسی ۱-هگزیل-۳-متیل ایمیدازولیوم تترا کلرو فرات اضافه و متعاقباً این مخلوط با سرنگ شیشه‌ای به داخل ۵ میلی لیتر آب دیونیزه پخش گردید. در اثر این عمل آنالیت‌ها به داخل قطرات مایع یونی استخراج می‌شود که در نهایت قطرات حلال استخراج کننده با آهن ربا جمع آوری و به سیستم تجزیه‌ای تزریق شدند.

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

بهینه سازی شرایط استخراج و اعتبارسنجی روش

پارامترهای مؤثر در دو مرحله استخراج توسعه داده شده، ارزیابی و بهینه سازی شدند. به طوریکه نوع حلال استخراج کننده (از بین حلال‌های استون و استونیتریل) و حجم حلال (از بین مقادیر ۱ تا ۲ میلی لیتر)، نیروی یونی (با افزودن مقادیر متفاوتی از کلرید سدیم در محدوده ۴ تا ۱۰ درصد وزنی/حجمی) و مدت زمان ورتکس کردن نمونه (در زمان‌های ۱ تا ۶ دقیقه) در مرحله اول (استخراج فاز مایع) مورد بررسی و انتخاب قرار گرفتند. پارامترهای مؤثر در میکرواستخراج مایع-مایع پخشی (مرحله دوم) که شامل انتخاب نوع مایع یونی مغناطیسی (از میان سه حلال $[C_4MIM][FeCl_2Br_2]$ ، $[C_4MIM][FeCl_4]$ و $[C_6MIM][FeCl_4]$) و حجم آن (با اضافه کردن مقادیر ۶۰ تا ۸۰ میکرولیتر) و بررسی نیروی یونی (با افزودن مقادیر متفاوتی از کلرید سدیم در محدوده صفر تا ۴ درصد وزنی/حجمی) بود نیز بهینه سازی شدند.

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



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

اثر نمک زنی

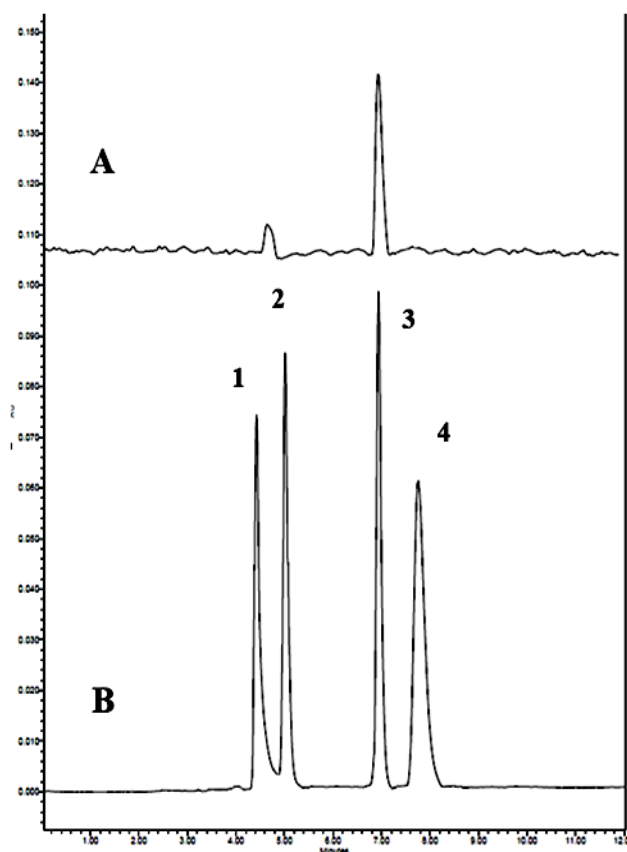
برای بررسی اثر نمک‌زنی در مرحله استخراج مایع-مایع پخشی، مقادیر مختلفی از کلرید سدیم به داخل نمونه اضافه و روش پیشنهادی ادامه یافت. مطابق شکل ۲ با افزایش مقدار کلرید سدیم کارایی روش پیشنهادی کاهش یافت لذا کلیه آزمون‌ها بدون افزایش نمک در این مرحله از استخراج انجام گرفت.

نتایج مشخصات تجزیه‌ای

ارقام شایستگی روش حاضر تحت شرایط بهینه محاسبه و ارائه گردیدند. منحنی‌های کالیبراسیون با تزریق کردن غلظت‌های مختلف از آنالیت‌های مورد مطالعه (۱، ۲، ۵، ۱۰،

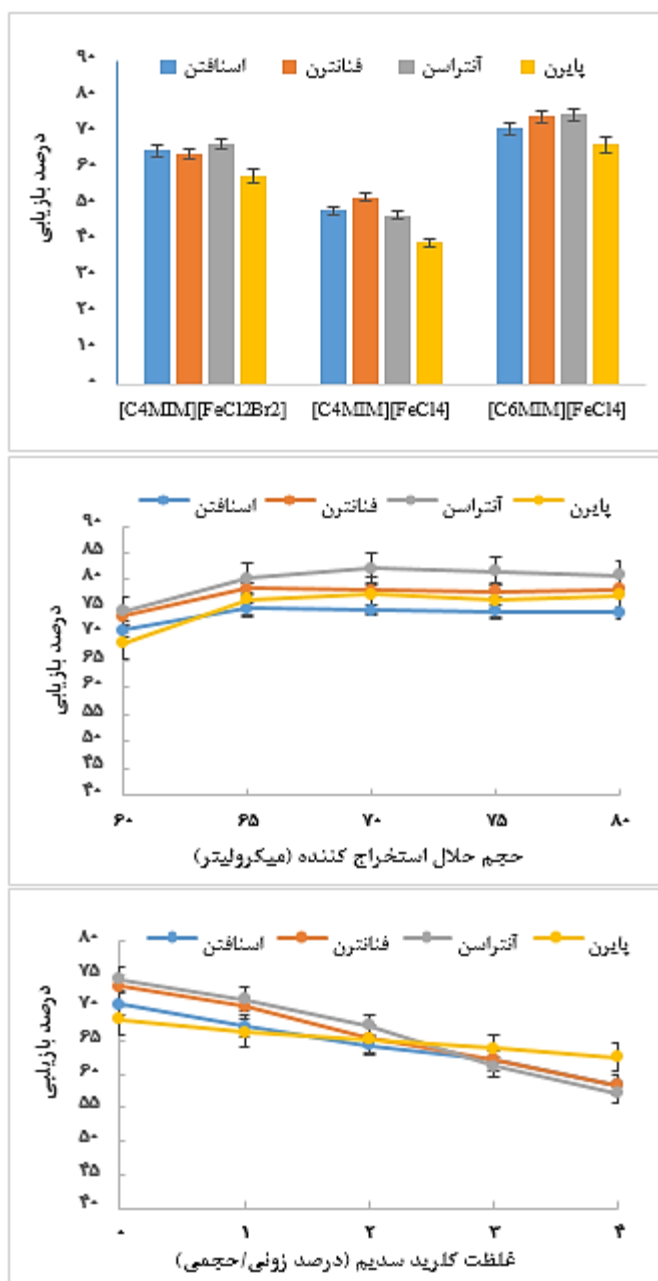
۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ نانوگرم در گرم) پس از اجرای روش توسعه یافته ترسیم شده و محدوده خطی بدست آمد. برای غلظت‌هایی که در آن‌ها نسبت سیگنال به نویز ۳ بود، حد تشخیص و برای غلظت‌های با نسبت سیگنال به نویز ۱۰، حد اندازه‌گیری در نظر گرفته شد. دقت روش با استفاده از انحراف استاندارد نسبی (% RSD) محاسبه شد. برای این منظور ۶ محلول حاوی یک نانوگرم در گرم از آنالیت‌ها با شرایط یکسان و در حالت بهینه استخراج شدند. درصد RSD بر اساس مساحت زیر پیک‌ها نشان از تکرارپذیری و دقت بالای روش ارائه شده دارد. نتایج اعتبارسنجی روش پیشنهادی در جدول ۱ ارائه شده است.

باقیمانده پیرن در مقادیر $11/3 \pm 0/2$ و $12/3 \pm 0/5$ بود و دیگر ترکیبات مورد مطالعه در نمونه‌ها یافت نشد. شکل ۳ کروماتوگرام HPLC-DAD محلول استاندارد آنالیت‌ها و یک نمونه حقیقی عسل را نشان می‌دهد.



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

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



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

آنالیز و بررسی اثر بافت نمونه‌های حقیقی

در تحقیق حاضر برای ارزیابی قابلیت روش توسعه داده شده در استخراج ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای، تعداد ۲۰ نمونه حقیقی تحت شرایط بهینه‌سازی شده آنالیز شد و کروماتوگرام‌های حاصل نشان داد که تعداد دو نمونه عسل دارای

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

آنالیت	محدوده خطی (نانوگرم در میلی‌لیتر)	ضریب تعیین (R^2)	حد تشخیص (نانوگرم در میلی‌لیتر)	حد اندازه‌گیری (نانوگرم در میلی‌لیتر)	درصد انحراف استاندارد نسبی ($n=6$)	بازده استخراج $\pm$ انحراف استاندارد
					در یک روز	بین روزها
اسنافتن	۰/۹۳-۱۵۰	۰/۹۹۴	۰/۲۷	۰/۹۳	۴/۱	۵/۸
فنانترن	۰/۷۴-۱۵۰	۰/۹۹۶	۰/۲۲	۰/۷۴	۳/۲	۵/۴
آنتراسن	۰/۶۹-۱۰۰	۰/۹۹۹	۰/۲۰	۰/۶۹	۲/۹	۴/۹
پایرن	۰/۴۶-۱۰۰	۰/۹۹۸	۰/۱۳	۰/۴۶	۳/۶	۶/۲

جدول ۲. مطالعه اثر بافت عسل در کارایی روش استخراج ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای در نمونه عسل

آنالیت	انحراف استاندارد $\pm$ مقادیر بازیابی نسبی			
	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ۴
نمونه‌ها با مخلوط آنالیت‌ها به غلظت ۲ نانوگرم در گرم تزریق شدند				
اسنافتن	۸۸ $\pm$ ۴	۸۲ $\pm$ ۷	۹۵ $\pm$ ۲	۹۵ $\pm$ ۳
فنانترن	۹۴ $\pm$ ۲	۸۹ $\pm$ ۴	۹۲ $\pm$ ۵	۹۷ $\pm$ ۵
آنتراسن	۹۲ $\pm$ ۴	۹۶ $\pm$ ۲	۹۶ $\pm$ ۲	۱۰۲ $\pm$ ۴
پایرن	۹۶ $\pm$ ۳	۱۰۲ $\pm$ ۷	۹۵ $\pm$ ۴	۱۰۶ $\pm$ ۶
نمونه‌ها با مخلوط آنالیت‌ها به غلظت ۵۰ نانوگرم در گرم تزریق شدند				
اسنافتن	۹۵ $\pm$ ۴	۱۰۳ $\pm$ ۷	۹۳ $\pm$ ۲	۹۴ $\pm$ ۲
فنانترن	۹۰ $\pm$ ۲	۱۰۴ $\pm$ ۴	۹۸ $\pm$ ۵	۹۳ $\pm$ ۵
آنتراسن	۸۵ $\pm$ ۴	۹۶ $\pm$ ۲	۹۱ $\pm$ ۲	۹۴ $\pm$ ۲
پایرن	۸۸ $\pm$ ۳	۹۳ $\pm$ ۷	۹۶ $\pm$ ۴	۹۵ $\pm$ ۳

• بحث

حلال تا مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر موجب افزایش سیگنال‌های تجزیه‌ای شد.

افزودن کلرید سدیم و ایجاد قدرت یونی محلول آزمایشی اثر دوگانه دارد یعنی ضمن اینکه می‌تواند باعث افزایش نیروی یونی و کاهش حلالیت آنالیت‌ها در فاز آبی شده و در نتیجه راندمان استخراج را افزایش دهد، از سوی دیگر می‌تواند باعث افزایش ویسکوزیته فاز آبی و کاهش ضریب انتشار آنالیت در فاز آبی شده و منجر به کاهش راندمان استخراج گردد (۱۹). لذا یکی از پارامترهای مؤثر در اکثر روش‌های استخراج است که نیاز به ارزیابی و بهینه‌سازی دارد. در مرحله اول روش استخراج توسعه داده شده در تحقیق حاضر، نمک‌زنی (تا مقدار ۸ درصد وزنی/حجمی) سبب افزایش کارایی روش شد.

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

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

به کارگیری طولانی مدت این فرایندها می تواند سبب تغییر شکل و یا تخریب ترکیبات هدف شده و منجر به کاهش راندمان استخراج گردد (۲۱) لذا چگونگی استفاده از این روش ها نیز باید مورد ارزیابی و بهینه سازی قرار گیرد.

انتخاب نوع حلال استخراج کننده در مرحله DLLME نیز از دیگر پارامترهای تأثیرگذار در کارایی روش استخراج می باشد. این حلال ها باید قابلیت پخش در هر دو فاز آبی و آلی را داشته باشند تا بتوانند آنالیت را به خوبی استخراج و جذب کرده و همچنین قابل تزریق به سیستم HPLC باشند (۲۲). عموماً حلال های آلی (بخصوص حلال های کلره) سمی بوده و به محیط زیست نیز آسیب می رساند لذا در این مطالعه از مایعات یونی که به عنوان حلال های بی ضرر و سبز شناخته می شوند (۲۳) استفاده شد. همچنین خاصیت مغناطیسی مایعات یونی انتخاب شده منجر به حذف مرحله سانتریفیوژ کردن (به منظور

جداسازی حلال از فاز آبی) شده و سبب سهولت کار و کوتاه تر شدن زمان آنالیز گردید. در این رابطه، حداقل حجم محلول یونی مغناطیسی که بالاترین درصد بازیابی آنالیت ها را داشته و در عین حال در پایان عملیات DLLME می توانستیم حجم ۱۰ میکرولیتر از آن را برداشت و به سیستم کروماتوگرافی تزریق کنیم (یعنی ۶۵ میکرولیتر) مورد استفاده قرار گرفت.

مقایسه پارامترهای تجزیه ای روش توسعه داده شده در این تحقیق با چند روش به کار رفته توسط دیگر دانشمندان برای استخراج هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای از نمونه های عسل نشان داد مقادیر شایستگی روش ارائه شده بهتر و حتی قابل مقایسه با روش های آنالیز حساس تری مانند به کارگیری کروماتوگراف مجهز به آشکارساز اسپکترومتر جرمی برای شناسایی این آنالیت ها در نمونه های عسل می باشد. نتایج این مقایسه در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳. مقایسه ویژگی های تجزیه ای روش پیشنهادی با چند روش دیگر در استخراج ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای از نمونه عسل

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

نتیجه گیری

در این تحقیق، تلفیق روش استخراج فاز مایع با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی مبتنی بر مایعات یونی مغناطیسی برای اندازه گیری اسنافتن، فنانتین، آنتراسن و پایرن در نمونه عسل به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا توسعه داده شد. پس از بهینه سازی عوامل مؤثر در کارایی هر دو مرحله استخراج پیشنهادی پارامترهای تجزیه ای آن مورد ارزیابی قرار

گرفت. ویژگی های تجزیه ای مطلوب مانند حساسیت بالا (حد تشخیص در محدوده ۰/۱۳ تا ۰/۲۷ نانوگرم در گرم)، دقت بالا (تکرارپذیری بر اساس درصد انحراف استاندارد نسبی در محدوده ۲/۹ تا ۶/۲) و بازده استخراج ایده آل در محدوده ۷۴ تا ۸۲ درصد، نشان از معتبر و قابل اعتماد بودن روش پیشنهادی دارد. همچنین مصرف حلال های سبز و با سمیت کمتر را می توان از جمله مزایای دیگر روش توسعه داده شده بر شمرد.

پایرن در ۲ نمونه عسل در مقادیر $۱۱/۳ \pm ۰/۲$ و $۱۲/۳ \pm ۰/۵$ را نشان داد و دیگر ترکیبات مورد مطالعه در نمونه‌ها یافت نشد.

به‌علاوه صحت روش مذکور با انجام روش بهینه شده استخراج در نمونه‌های عسل و عدم تأثیر منفی بافت نمونه‌ها در استخراج آنالیت‌های هدف مشخص گردید. آنالیز نمونه‌های حقیقی وجود

• References

- Erejuwa OO, Sulaiman SA, Ab Wahab MS. Honey: a novel antioxidant. *Molecules*. 2012;17(4):4400-23.
- Orso D, Floriano L, Ribeiro LC, Bandeira NM, Prestes OD, Zanella R. Simultaneous determination of multiclass pesticides and antibiotics in honey samples based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Anal. Methods*. 2016;9:1638-53.
- Plaza-Bolaños P, Frenich AG, Vidal JLM. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and beverages. *Analytical methods and trends. J. Chromatogr. A*. 2010;1217(41):6303-26.
- Yang X, Zhang S, Wang J, Wang W, Li J, Chen J, et al. Modulated construction of imine-based covalent organic frameworks for efficient adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from honey samples. *Anal. Chim. Acta*. 2020;1134:50-7.
- Fazaieli F, Afshar Mogaddam MR, Farajzadeh MA, Feriduni B, Mohebbi A. Development of organic solvents-free mode of solidification of floating organic droplet-based dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from honey samples before their determination by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Sep. Sci*. 2020;43(12):2393-400.
- Arena K, Mandolino F, Cacciola F, Dugo P, Mondello L. Multidimensional liquid chromatography approaches for analysis of food contaminants. *J. Sep. Sci*. 2021;44(1):17-34.
- Pirsa S, Alizadeh N. Nanoporous conducting polypyrrole gas sensor coupled to a gas chromatograph for determination of aromatic hydrocarbons using dispersive liquid-liquid microextraction method. *IEEE Sens. J*. 2011;11(12):3400-5.
- Buldini PL, Ricci L, Sharma JL. Recent applications of sample preparation techniques in food analysis. *J. Chromatogr. A*. 2002;975(1):47-70.
- 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. *Iran. J. Nutr. Sci*. 2021;16(2):57-67 [in Persian].
- 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.
- Pirsa S, Alizadeh N. Rapid determination of pyridine derivatives by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography/gas sensor based on nanostructured conducting polypyrrole. *Talanta*. 2011; 87:249-54.
- Zeidi S, Mogaddam MRA, Farajzadeh MA, Khandaghi J. Combination of dispersive solid phase extraction with lighter than water dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of organophosphorous pesticides from milk. *Int. J. Environ. Anal. Chem*. 2020:1-14.
- Rezaee M, Assadi Y, Hosseini M-RM, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A*. 2006;1116(1-2):1-9.
- Afshar Mogaddam M, Khandaghi J, Vajdi HokmAbad S. Use of Temperature-controlled Ionic Liquid-assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for the Detection of Amoxicillin, Cloxacillin and Erythromycin Residues in Cow Milk using High Performance Liquid Chromatography. *Iran. J. Nutr. Sci*. 2023;18(1):119-26 [in Persian].
- Gholizadeh S, Mirzaei H, Khandaghi J, Mogaddam MRA, Javadi A. Ultrasound-assisted solvent extraction combined with magnetic ionic liquid based-dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of mycotoxins from tea samples. *Food Compos. Anal*. 2022;114:104831.
- <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.
- Chandran S, Singh R. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Die Pharmazie*. 2007;62(1):4-14.
- Jeddy M, Khandaghi J. Detection and quantification of phytosterols in yogurt using gas chromatography. *Food Hygiene*. 2019;9(1 (33)):59-70 [in Persian].
- Limoei Khosrowshahi B, Marzi Khosrowshahi E, Afshar Mogaddam M, Khandaghi J. Use of Dispersive Solid-Phase Extraction in Combination with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Assessment of Organophosphorus Pesticides in Fruit Juice Samples Using Gas Chromatography-Nitrogen-Phosphorus Detector. *Iran. J. Nutr. Sci*. 2022:87-98 [in Persian].
- Amini R, Khandaghi J, Mogaddam MRA. Combination of Vortex-Assisted Liquid-Liquid Extraction and Air-Assisted Liquid-Liquid Microextraction for the Extraction of Bisphenol A and Bisphenol B in Canned Dough Samples. *Food Anal. Methods*. 2018;11(11):3267-75.
- Sheikhzadeh F, Mogaddam MRA, Farajzadeh MA, Khandaghi J. Development of microwave radiations-induced homogeneous liquid-liquid microextraction method for extraction of pyrethroid pesticides in fruit and vegetable samples. *Int. J. Environ. Anal. Chem*. 2020:1-12.
- 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].
23. Ghasemi R, Mirzaei H, Mogaddam MRA, Khandaghi J, Javadi A. Application of magnetic ionic liquid-based air-assisted liquid-liquid microextraction followed by back-extraction optimized with centroid composite design for the extraction of antibiotics from milk samples prior to their determination by HPLC-DAD. *Microchem. J.* 2022;181:107764.
24. Afshar Mogaddam MR, Jouyban A, Nemati M, Farajzadeh MA, Marzi Khosrowshahi E. Application of curcumin as a green and new sorbent in deep eutectic solvent-based dispersive micro-solid phase extraction of several polycyclic aromatic hydrocarbons from honey samples prior to gas chromatography-mass spectrometry determination. *J. Sep. Sci.* 2021;44(21):4037-47.
25. Sun M, Han S, Loussala HM, Feng J, Li C, Ji X, et al . Graphene oxide-functionalized mesoporous silica for online in-tube solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from honey and detection by high performance liquid chromatography-diode array detector. *Microchem. J.* 2021;166:106263.

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

Nodrati A.R¹, Haghighat Asiabar A², Afshar Mogaddam M.R^{3,4}, Khandaghi J^{*2,5}

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

2- Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran

3- Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

4- Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

5- *Corresponding author: Department of food Biotechnology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran. E.mail: khandaghi@iausa.ac.ir

Received 17 Jun, 2023

Accepted 26 Sep, 2023

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

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

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

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

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