NAISL
Quarterly, 2018
Volume 2, Number 2
Pages 35 – 53
Print Print ISSN: 2588-6401
Online ISSN: 2588-641X

Recent Advances in Analysis of Pesticides in Food and Drink Samples Using LPME Techniques Coupled to GC-MS and LC-MS: a Review

Marjan Moeinfar *

Abstract

Study Foodstuffs quality and food safety are major challenges affecting agricultural and industrial aspects of production. Many contaminants from different sources contaminate foods and drinks, leading to disastrous health problems like gene mutations and diseases like cancer. Previously, many different methods have been used for the analysis of these contaminants. One of these methods Liquid–liquid extraction (LLE) has been the most well-known conventional technique used, but its limitations are its tediousness, time required, and the use of large quantities of toxic and dangerous for the environment organic solvents. These limitations have led to the search for other, efficient techniques that are more environmentally friendly. Hence, this review highlights recent advances in liquid-phase (single-drop, hollow fiber, and dispersive liquid–liquid) microextraction procedures for foodstuffs and drink analyses. Such modifications can be justified for solving limitations associated with the traditional Liquid–liquid extraction (LLE) method. The objective of this review is to serve as a reference platform for providing effective management tools for solving problems of pollution, clean-up, and control of Foodstuffs quality and safety globally.

Key Words

Contaminants,
Gene mutations and cancer,
Liquid–liquid extraction,
Liquid-phase microextraction,
Control of foodstuffs quality

(*) Coressponding Author.
Expert on chromatography, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
E-mail: moeinfar.m@scu.ac.ir
Tel: 06133360016

نشریه رویکردهای نوین در
آزمایشگاه‌های علمی ایران
سال دوم، شماره ۲
صفحات ۳۵ – ۵۳، ۱۳۹۷
شاپای چاپی: ۶۴۰۱-۲۵۸۸
شاپای الکترونیکی: ۶۴۱X-۲۵۸۸

پیشرفت‌های اخیر آنالیز آفت‌کش‌ها در نمونه‌های غذایی و نوشیدنی با استفاده از تکنیک LPME جفت شده با GC-MS و LC-MS

مرجان معین‌فر*

چکیده

بررسی کیفیت و سلامت مواد غذایی از چالش‌های اصلی موثر بر وضعیت صنعتی و کشاورزی تولید این مواد است. آلاینده‌های بسیاری از منابع مختلف، غذا و نوشیدنی را آلوده ساخته و موجب بروز مشکلات خطرناکی در سلامتی انسان ها نظیر جهش‌های ژنی و بیماری‌هایی مانند سرطان می‌شوند. در گذشته، روش‌های مختلفی برای آنالیز این آلاینده‌ها استفاده شده است. یکی از این روش ها استخراج مایع-مایع (LLE)، شناخته شده‌ترین تکنیک مورد استفاده بوده است اما محدودیت آن، مدت زمان طولانی استخراج و آنالیز و مصرف مقادیر زیاد حلال‌های آلی سمّی و خطرناک برای محیط زیست و انسان می‌باشد. این محدودیت‌ها موجب تلاش برای جستجو و یافتن روش‌های موثر دیگری که بیشتر دوستدار محیط زیست باشند، شده است. بنابراین، این مقاله، پیشرفت‌های اخیر در فرآیندهای میکرواستخراج فاز مایع (تک قطره‌ای (SD-LPME)، فیبر توخالی (HF-LPME) و مایع-مایع پراکنده یا پخشی (DLLPME)) در آنالیزهای مواد غذایی و نوشیدنی‌ها را نشان می‌دهد. چنین اصلاحاتی برای برطرف کردن محدودیت‌های روش میکرو استخراج مایع-مایع (LLE) سنتی می‌تواند استفاده شود. هدف از این مقاله، فراهم کردن مرجعی برای تهیه ابزارهای مدیریتی مفید و موثر در جهت رفع مشکلات مربوط به آلاینده‌ها و کنترل کیفیت و سلامت مواد غذایی در سطح جهانی خواهد بود.

مرجان معین‌فر

واژگان کلیدی

آلاینده‌ها،
جهش‌های ژنی و سرطانی،
استخراج مایع-مایع،
میکرواستخراج فاز مایع،
کنترل کیفیت مواد غذایی

(*) مسئول مکاتبات.
کارشناس کروماتوگرافی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
ایمیل: moeinfar.m@scu.ac.ir
تلفن: ۰۶۱۳۳۳۶۰۰۱۶

۱ مقدمه

محصولات غذایی کشاورزی شامل مخلوط پیچیده شیمیایی متنوعی است که باعث ایجاد چالش‌هایی در زمینه سلامت محتوای تغذیه‌ای و کیفیت پایداری غذا شده است. آلاینده‌های غذایی می‌تواند ناشی از منابع مختلفی نظیر آفت‌کش‌ها، مواد دارویی، آلاینده‌های محلی، صنعتی و … باشد و وارد زنجیره غذایی شده و موجب نتایج خطرناک حاد و مزمن برای انسان و سایر ارگانیسم‌های زنده در اکوسیستم گردد. آلاینده‌هایی که وارد زنجیره غذایی می‌شوند شامل فلزات سنگین، بی‌فنیل پلی‌کلرینیت‌ها (PCBs)، دی‌اکسین‌ها، مهار کننده‌های آتش بُرُم‌دار، ترکیبات پلی‌فلوئوردار، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs)، پرکلرات و سایر آلاینده‌ها هستند. اثرات سرطان‌زایی PCBها و PAHها در مواد غذایی نظیر تخم‌مرغ‌های پرورشی اخیراً به چاپ رسیده است. بعلاوه، شناسایی و تعیین فلزات سنگین و مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی و به همان میزان اثرات آنها بر سلامتی (نظیر عوامل سرطانی) گزارش شده است. علاوه بر آلاینده‌های شیمیایی سنتزی، سم‌های طبیعی (بیوتوکسین‌ها) نیز به عنوان یکی از دغدغه‌های اصلی در سلامتی غذا گزارش شده‌اند. در بین آنها سم‌های مختلفی با منابع بیولوژیک وجود دارند نظیر سم‌های قارچی (مایکوتوکسین‌ها)، سم‌های باکتریایی (استافیلوکوک) و بیوتوکسین‌های دریایی. همچنین، پیشرفت‌های اخیر در صنعتی‌سازی و سوء مدیریت پسماندهای صنعتی موجب شناسایی مقادیر ناچیز آلاینده‌های آلی در مواد غذایی شده است که این شامل رنگ‌های سودان سرطان‌زا بوده و در متابولیسم موش‌ها موجب سیروز کبدی و سرطان شده است.

اثرات سلامتی مواد غذایی حاوی فلزات سنگین، اکستروژن‌ها در محصولات لبنی، ترکیبات نیتروزآمین، مایکوتوکسین‌ها و PAHها به اندازه آفت‌کش‌ها به خصوص قارچ‌کش‌های تریازول، کاربامات‌ها، پیرتیروئیدها و آفت‌کش‌های ارگانوکلره (OCPs) بر روی انواع زیادی از مواد غذایی نظیر سبزیجات و میوه‌ها، یکی از دغدغه‌های اصلی دولت به خاطر امکان ماندن باقی‌مانده آن‌ها در مواد غایی شده است.

تاکنون روش‌های استخراج متفاوتی برای آنالیز آلاینده‌های غذایی و بیولوژیک ناشی از محیط، توسعه یافته است نظیر استخراج مایع تحت فشار، استخراج فاز جامد داخل مولکولی، دیسپرس کردن فاز جامد ماتریس و استخراج با کمک اولتراسونیک. روش‌های گفته شده در بالا و بسیاری روش‌های دیگر نظیر استخراج سیال فوق بحرانی (Supercritical Fluid Extraction)، استخراج فاز جامد (Solid Phase Extraction)، استخراج جنبی با میله چرخان، استخراج مایع-مایع (Liquid-Liquid Extraction) و میکرواستخراج فاز جامد (Solid Phase Microextraction) برای آنالیز آفت‌کش‌ها در نمونه‌های محیطی زیادی استفاده شده‌اند. در مجموع، اهمیت این روش‌ها باعث انعطاف عملکردی و هزینه پائین همراه با فاکتورهای غنی‌سازی بالا (Enrichment Factors) در یک درجه متوسط شده است. علی‌رغم پیچیدگی‌های تکنولوژی این روش‌ها، برخی محدودیت‌ها را نیز دارند که شامل وقت‌گیر بودن، صرف هزینه زیاد و داشتن انتخاب‌گری صفر یا در حدکم، مصرف زیاد حلال‌های آلی سمّی و کاهش سریع عملکرد دستگاه و بنابراین محدودیت کاربردهای بالقوه آن‌ها است.

بنابراین برای برطرف کردن معایب ذکر شده، روش‌های مناسب‌تری مورد نیاز است. در بین گزینه‌های موفق در آنالیز مواد غذایی، میکرواستخراج فاز مایع (Liquid Phase Microextraction) به عنوان یک روش قوی است به دلیل سادگی، سرعت، اقتصادی بودن و فاکتور غنی‌سازی (EF) و بازیابی نسبی (Relative Recovery) خوبی که دارد.

هرچند LPME به عنوان یک روش جدید در استخراج مواد غذایی است، اصلاحات زیادی روی آن انجام شده و در مقالات [۲۹–۳۳] به عنوان تلاشی برای اطمینان از عملکرد بهتر و افزایش کارایی استخراج (به عنوان مثال کاهش LODs (Limit of Determination) و RSDs (Relative Standard Deviation) و افزایش RR و EF) گزارش شده است. مطالعات روی چندین روش در حال حاضر به منظور بهبود قدرت این متدها در حال انجام است. بعد از استخراج آلاینده‌ها، ارزیابی مقادیر آنها و سطح مجاز محیطی و کیفی تغذیه‌ای در محصولات غذایی حائز اهمیت می‌باشد.

بیش از یک قرن، روش‌های آنالیز مواد غذایی رشد بی‌نظیری داشته‌اند. از روش‌های ساده آزمایشگاهی در اواسط قرن بیستم تا روش‌های دستگاهی پیشرفته شامل تجهیزاتی که از pH [۳۴]، اسپکتروفتومتری [۳۶] و کروماتوگرافی [۳۷] استفاده می‌کنند. انواع مختلفی از روش‌ها برای بهبود صحت LOD، RSD و دقت آنالیزهای

مختلف به کار گرفته شده‌اند تا گستره تکنیک‌های آنالیز نمونه‌های مواد غذایی را افزایش دهند. در نتیجه، آنالیز مواد غذایی ابزاری است به منظور ترویج مدیریت موثر (تغییر حل مسئله، اعزام آیین‌نامه‌ها و قوانین، کنترل کیفیت و توسعه محصولات جدید) که در سطح جهانی موجب توزیع مدرن و نوین مواد غذایی استاندارد می‌گردد [۳۸]. این مقاله، تکنیک‌های LPME (شکل ۱) را مرور کرده و به دسته‌های زیر طبقه‌بندی می‌کند: میکرواستخراج تک قطره‌ای (Single Drop Microextraction)، میکرواستخراج فاز مایع با فیبر توخالی (Hollow Fiber- Liquid Phase Microextraction) و میکرواستخراج مایع–مایع پخشی (Dispersive Liquid – Liquid Microextraction) که در آنالیزهای مختلف نمونه‌های غذایی استفاده می‌شوند.

بعلاوه در مورد تکنیک‌های دستگاهی تجزیه‌ای نظیر GC-MS، LC-MS و الکتروفورز موییته بحث می‌شود. این مقاله به عنوان مرجعی است برای دانشجویان و محققان تا مراحل ساده‌تر، کوچک شده و ترکیب شده برای بهبود و افزایش توان این فرآیندها را مشاهده نمایند.

Pena-Pereira و همکارانش [۳۹] روش‌های توسعه‌ای که در LPME استفاده شده‌اند را به ترتیب زمانی منتشر و مکتوب کرده‌اند که به این شرح می‌باشد: استخراج تک قطره‌ای (۱۹۹۵)، استخراج قطره در قطره (۱۹۹۶)، میکرواستخراج فاز مایع دینامیک (۱۹۹۷)، قطره میکرو سرنگ پشتیبان سیستم دینامیک (۱۹۹۷)، استفاده از فیبر در LPME (۱۹۹۹)، میکرواستخراج فاز جامد در فضای فوقانی (Head Space Solid Microextraction) (۲۰۰۱)، مایع یونی به عنوان عامل استخراج کننده (۲۰۰۳)، استاندارد آب به عنوان حلال در LPME (۲۰۰۵)، اولتراسونیک به عنوان عامل پشتیبان LPME (۲۰۰۶)، تابش مایکروویو به عنوان عامل پشتیبان LPME (۲۰۰۷)، اتوماسیون یا خودکار کردن LPME (۲۰۰۷)، ترکیب LPME با اسپکتروسکوپی جذب اتمی شعله (Flame Absorption Atomic Spectrometry) (۲۰۰۸) و استفاده از مایع یونی LPME و دیسپرس کردن آنالیت‌ها با استفاده از دستگاه واجذب گرمایی (۲۰۰۹).

۲ میکرواستخراج تک قطره‌ای/میکرواستخراج تک قطره‌ای فضای فوقانی (SDME / HS-SDME)

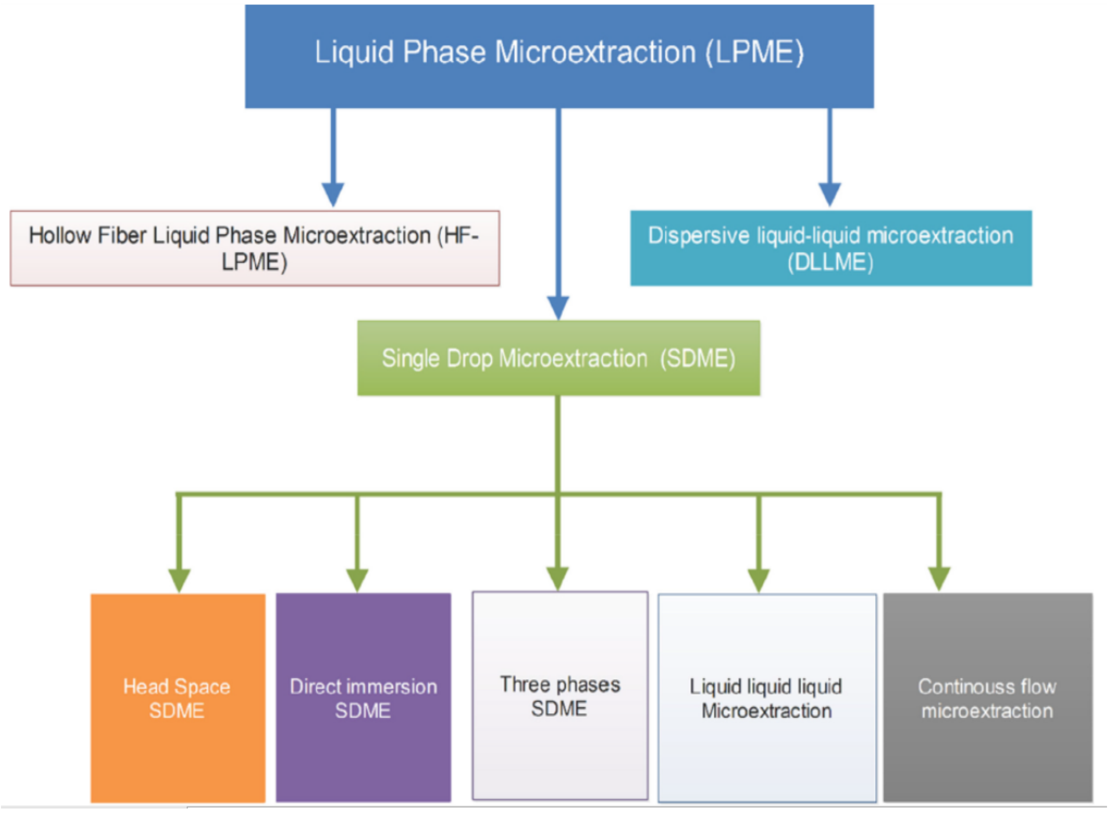
Jeannot و Cantwell، اخیراً **SDME** را معرفی کردند که بر اساس اصول توزیع آنالیت بین یک تک میکروقطره مایع استخراج کننده قرار گرفته در نوک سوزن به سمت فاز آبی (محلول آنالیت) متمایل شده و کشیده می‌شود که پس از فشردن میکرو سرنگ یا با قرار گرفتن در بالای محلول (Headspace) این اتفاق می‌افتد. بلافاصله پس از پایان استخراج، میکرو قطره داخل سرنگ کشیده شده و سپس بر روی یک الکتروفورز پیشرفته یا کروماتوگرافی روی آن انجام می‌شود [۴۰]. عموماً استخراج آنالیت با استفاده از روش LPME بستگی به چند فاکتور بسیار مهم دارد که لازم است بهینه‌سازی روی آنها انجام گیرد. سرعت نفوذ آنالیت از محلول نمونه به محلول استخراج LPME شکل ۲ و HS-SDME شکل ۳ بستگی به ثابت توزیع تعادلی، زمان، حجم محلول آنالیت، حجم مایع استخراج، دما و همچنین به پایداری میکرو قطره استخراج کننده (ویسکوزیته) در میزان معینی از تحریک و تلاطم دارد.

اگرچه حالت‌های غیرتعادلی استخراج در SDME تحت کنترل سینتیکی هستند، اغلب به نحوی تقویت می‌شوند که باعث جلوگیری از افزایش زمان استخراج شوند. علی‌رغم این موضوع، استخراج پس از رسیدن به تعادل، کامل نیست چون مقدار قابل ملاحظه‌ای از آنالیت همیشه در فاز محلول باقی می‌ماند. کالیبراسیون، وابسته به غلظت استاندارد آنالیت معلوم است که می‌تواند با استفاده از شرایط یکسان مانند آنالیت مجهول استخراج شود [۴۳].

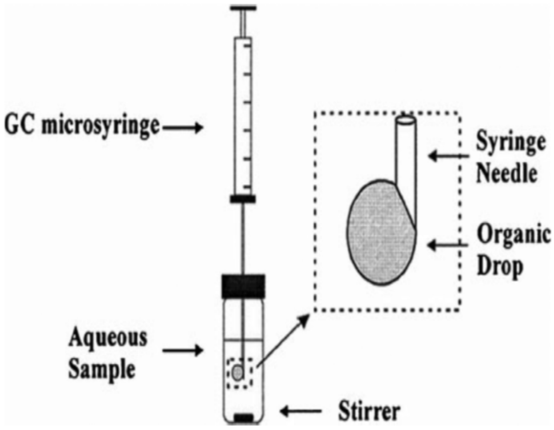
۳ ویژگی‌های میکرواستخراج تک قطره‌ای در حالت دو فازی

Jeannot و Cantwell [۴۴،۴۵] مدلی پیشنهاد کردند که عموماً برای حالت تعادلی و انتقال مواد دو فاز در میکرواستخراج مایع–مایع (LLME) و داخل یک قطره درون سیستم بکار می‌رود. بنابراین، غلظت آنالیت حاضر در تعادل یک میکرو قطره آلی توسط معادله (۱) نشان داده می‌شود:

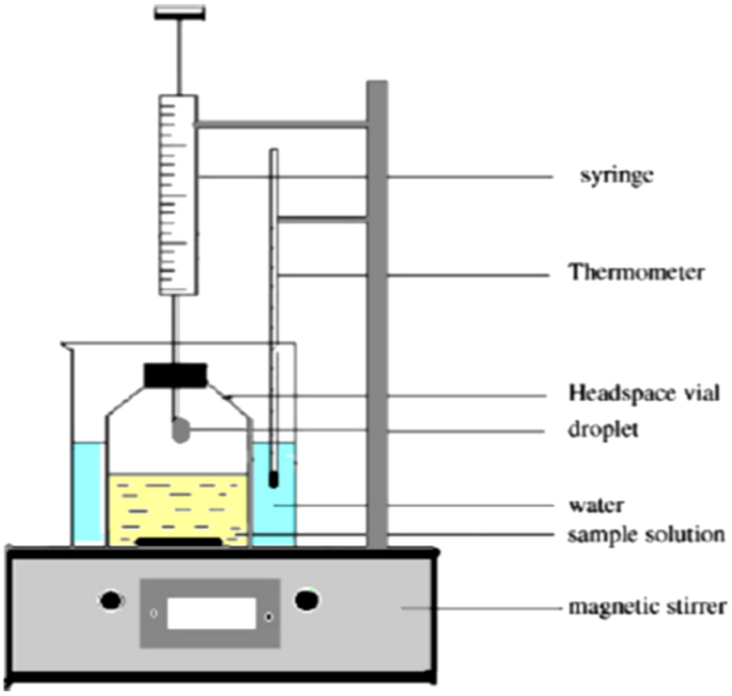
$$Co.eq. = KCw_{eq.} = \frac{KCow}{۱ + \frac{KVo}{Vw}}, \qquad (۱)$$



شکل ۱: طبقه‌بندی شماتیک تکنیک‌های LPME



شکل ۲: دیاگرام میکرواستخراج تک قطره‌ای Han و Row [۴۱]



شکل ۳: دیاگرام HS-SDME هاشمی و همکارانش [۴۲]

که در آن $Co.eq$ تعادل فاز آلی، K ثابت توزیع تعادلی، $Cweq$ غلظت فاز آبی در تعادل، Cow غلظت اولیه فاز آبی و Vo و Vw به ترتیب حجم فازهای آلی و آبی هستند. داده‌های تجربی یا شرایط، مدل سینتیکی عمومی را تهیه می‌کند که غلظت (Co) را به زمان (t) در واکنش مرتبط می‌سازد. این معادله درجه اول بوده و توسط معادله (۲) نشان داده می‌شود:

$$Co = Co.eq.(۱ - e^{-kt}). \qquad (۲)$$

برای این منظور، غلظت یک قطره آلی HS-SDME در تعادل با یک جزء فاز هوا از معادله (۳) به دست می‌آید:

$$Co.eq = \frac{KowCow}{۱ + \frac{KawVa}{Vw} + \frac{KowVo}{Vw}}, \qquad (۳)$$

Kow، ثابت توزیع تعادل فاز آبی؛ Kaw، ثابت توزیع تعادل فاز جزئی که وارد هوا شده است (توسط فاز هوا جدا شده است)؛ Va، حجم جزئی که وارد فاز هوا شده است.

۴ استفاده از روش‌های SDME / HS-SDME در آنالیز نمونه‌های غذایی و نوشیدنی

در سال‌های اخیر، روش‌های مختلفی از SDME برای شناسایی آنالیت‌های بسیاری مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۴۶–۵۲]. روش جفت شده SDME با GC-MS توسط Pinheiro و همکارانش [۵۳] برای تعیین برخی آفت‌کش‌های ارگانوفسفات پیرتروئید در نمونه‌های مختلفی که از رودخانه سانفرانسیسکو در منطقه Sergipe برزیل گرفته شد، استفاده گردید. در این روش، ۱۰ میلی‌لیتر محلول آنالیت را داخل ویال استخراج می‌ریزند. یک سرنگ ۱۰ میکرولیتری حاوی حلال استخراج کننده بالای ویال بسته شده و سوزن آن با عبور از سپتوم وارد محلول آنالیت می‌شود. میکرو سرنگ فشرده شده و ۱۰ میکرولیتر تولوئن وارد محلول می‌شود و محلول با سرعت 300 rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. میکرو قطره به داخل سرنگ کشیده شده و به دستگاه GC-MS تزریق می‌شود.

در تحقیق مشابهی، رجبی [۴۶] با استفاده از ۱۰ میکرولیتر حلال (۱-دودکانول) برای تعیین OCP در نمونه‌های آب آشامیدنی ایلام در ایران را گزارش کرده است. استخراج با سرعت 800 rpm و به مدت ۲۰ دقیقه به طول می‌انجامد و ماده استخراج شده به دستگاه GC

با دتکتور ECD (Electrical Capture Detector) برای آنالیز کمّی تزریق می‌شود.

علاوه بر آلایندگی تدریجی آب آشامیدنی توسط آفتکش‌ها، آب میوه نارگیل هم می‌تواند توسط فرآیندهای شیمیایی- کشاورزی آلوده گردد [۵۵، ۵۶]. با آگاهی بر این موضوع، Anjos و Andrade [۵۶] روش Pinheiro را استفاده کردند تا باقی‌مانده ۱۹ آفتکش ارگانوفسفات، پیرتروئیدها، کاربامات‌ها، ارگانوکلرها و تیوکاربامات‌ها در آب نارگیل را با استفاده از SDME تعیین نمایند. نمونه‌های طبیعی آب نارگیل از مناطق صنعتی و فروشگاه‌های محلی ایالت باهیا و سالوادور (برزیل) آنالیز شدند. در این روش، یک میکرولیتر تولوئن (حلال استخراج کننده) برای استخراج استفاده شد که با سرعت 200 rpm به مدت ۳۰ دقیقه به طول انجامید. قطره استخراج شده برای آنالیزهای بیشتر به دستگاه GC-MS داده شد.

در این ضمن، اصلاحات روی SDME موجب افزایش نیروی چسبندگی بین آنالیت و حلال‌های استخراج کننده و در نتیجه، افزایش پایداری، حساسیت، سادگی و سرعت روش می‌شود [۴۸]. فرنانذر و همکارانش [۴۸] کاربرد این روش SDME اصلاح شده جفت شده با GC-MS را نشان دادند که از این طریق افزایش حجم قطره با استفاده از یک قطعه سیلیکون حلقه‌ای به طول ۲ میلی‌متر که در لبه‌های نوک سرنگ قرار گرفته، انجام شد. این روش برای استخراج ۱۴ تا از آفتکش ارگانوکلره (OCP) در خاک، توت‌فرنگی و خرما از کشور پرتغال به کار گرفته شد. یک شیشه ۲۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محلول آنالیت، محلول ۰/۵ درصد نمک طعام (قدرت یونی) و ۱۰ میکروگرم در لیتر برای هرکدام از استانداردهای OCP تهیه شده، استفاده گردید. سانتریفیوژ به صورت جداگانه روی هر کدام از نمونه‌ها در سرعت 10000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه تا زمانی که محلول نیمه‌شفاف شود، ادامه یافت. محلول، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق همگن می‌شود. یک سرنگ ۱۰ میکرولیتری با حلقه سیلیکونی در نوک سوزن برای تزریق ۵ میکرولیتر n-هگزان در ویال SDME و با سرعت چرخش 200 rpm به کار می‌رود. استخراج به مدت ۴۵ دقیقه ادامه یافته و میکرو قطره به دستگاه GC-MS تزریق گردید.

تعیین متالوئیدها و فلزات می‌تواند توسط روش‌های مختلف LPME انجام گردد [۵۸]. Lemos و Vieira [۴۹] استفاده از اسپکترومتری جذب اتمی الکترومال کوره گرافیتی (ETAAS) در تعیین و شناسایی منگنز در نمونه‌های آبی و غذاهای دریایی را گزارش کرده‌اند که به این صورت می‌باشد: ۰/۱ گرم غذای دریایی پودر شده (ماهی و حلزون) و نیز استانداردهای مرجع بافت صدف، جگر گاو، اسفناج و برگ‌های سیب به صورت جداگانه، با یک میلی‌لیتر اسید نیتریک غلیظ، ۰/۵ میلی‌لیتر H2O2 غلیظ و یک میلی‌لیتر آب فوق خالص در یک لوله آزمایش مخلوط می‌شوند. مخلوط اسیدی شده و در آون مایکروویو قرار می‌گیرد تا فرآیند هضم انجام شود. محلول NaOH ۱۰ درصد برای تعدیل و رساندن pH محلول آنالیت به ۹ استفاده می‌شود و سپس به یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل می‌گردد. محلول بافر آمونیوم 9/2 =Ph به میزان ۲۰ میلی‌لیتر افزوده شده و آب فوق خالص برای رقیق‌سازی و به حجم رساندن بالن استفاده می‌شود. سپس نمونه آب به یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری خالی منتقل می‌گردد. ۲۰ سی‌سی بافر آمونیوم (9/2 =pH) و ۱۵۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۱ درصد w/v ۱-(۲-پیریدیلازو) - ۲-نفتول به محتوای بالن افزوده می‌شود. بالن با آب فوق خالص به حجم رسانده می‌شود. در نهایت، آنالیز SDME بر روی محلول آنالیتی که در بالا گفته شد، انجام می‌شود. یک میکروسرنگ ۲۵ میکرولیتری برای انتقال ۲۰ میکرولیتر کلروفرم به ویال شیشه‌ای حاوی محلول آنالیت استفاده شده و در بالای ویال بسته می‌شود و ۱۵ میکرولیتر کلروفرم (استخراج کننده) را به آرامی به محلول ویال اضافه میکند. استخراج پس از ۷ دقیقه و با سرعت چرخش 200 rpm به پایان می‌رسد. در نهایت، حلال استخراج به کوره الکتریکی دستگاه طیف سنجی جذب اتمی داده می‌شود.

علاوه بر این، Almeida و همکارانش [۵۰] پیشرفت‌های اخیر این روش در شناسایی کادمیم در روغن‌های گیاهی با استفاده از تکنیک SDME تقویت شده با اولتراسونیک را گزارش کرده‌اند. آنالیت‌های استخراج شده با کوره الکتریکی دستگاه طیف سنجی جذب اتمی با منبع تابش پیوسته با قدرت بالا شناسایی شده‌اند. هرکدام از آنالیت‌های نمونه، اسیدی و هضم شده تا یک محلول شفاف به دست آمده و در دمای اتاق سرد شده و سپس به یک بالن حجمی ۱۰ میلی‌لیتری منتقل گردیده و با آب مقطر به حجم می‌رسد. یک بشر شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری داخل حمام آب اولتراسونیک که دمای آن به آرامی از ۴۶ درجه سانتی‌گراد بالاتر می‌رود، قرار داده شده و بشر با ۵۰ میلی‌لیتر از نمونه هضم شده پر می‌شود. میکرو سرنگ حاوی مایع

استخراج کننده که اسید نیتریک ۰/۱ مولار است، بالای بشر بسته می‌شود و ۵ میکرولیتر از محلول استخراج کننده به آرامی به داخل بشر ریخته می‌شود. سپس سیستم به مدت ۱۵ دقیقه سونیکیت شده و آنالیت برای شناسایی به کوره الکتریکی دستگاه طیف سنجی جذب اتمی با منبع تابش پیوسته با قدرت بالا داده می‌شود.

علاوه بر آنالیز فلزات، تکنیک‌های SDME می‌تواند برای شناسایی آنالیت‌های غیر فلزی نظیر فلوراید استفاده شود [۵۹]. در واقع، Gomez-Otero و همکارانش [۵۱] استفاده کمّی HS-SDME در کنار طیف سنجی UV-Vis برای شناسایی SO_2 در میوه و سبزیجات نظیر نارنگی، پرتقال، لیمو، کاهو، فلفل سبز، چغندر، پودر سیر، مربای بادام گزارش کرده‌اند. هر نمونه، به صورت جداگانه و به شرح زیر تهیه می‌شود: ۰/۵ گرم غذای خرد شده یا نمونه‌های مایع، داخل لوله سانتریفوژ حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب فوق خالص ریخته می‌شود. لوله آزمایش به مدت ۵ دقیقه داخل سانتریفوژ با سرعت 200 rpm قرار می‌گیرد. سپس، ۸ میلی‌لیتر از محلول بالایی سانتریفوژ داخل یک ویال شیشه‌ای میکرواستخراج که یک مگنت میله‌ای و یک میلی‌لیتر از محلول HCL ۲/۵ مولار داخل آن است، ریخته می‌شود. ویال شیشه‌ای با درپوش به خوبی پوشیده می‌شود. یک قطره ۲/۵ میکرولیتری از محلول ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ۵، ۵′-دیتیوبیس- (۲-نیتروبنزوئیک اسید) که معرف المان نیز نامیده می‌شود با استفاده از میکرو سرنگ، به مخلوط نمونه داخل ویال افزوده می‌شود. فرآیند استخراج در سرعت 1600 rpm به مدت ۳/۵ دقیقه به طور می‌انجامد. میکرو قطره حاصل به طیف سنج UV-Vis در طول موج ۴۱۰ نانومتر برای آنالیز داده می‌شود.

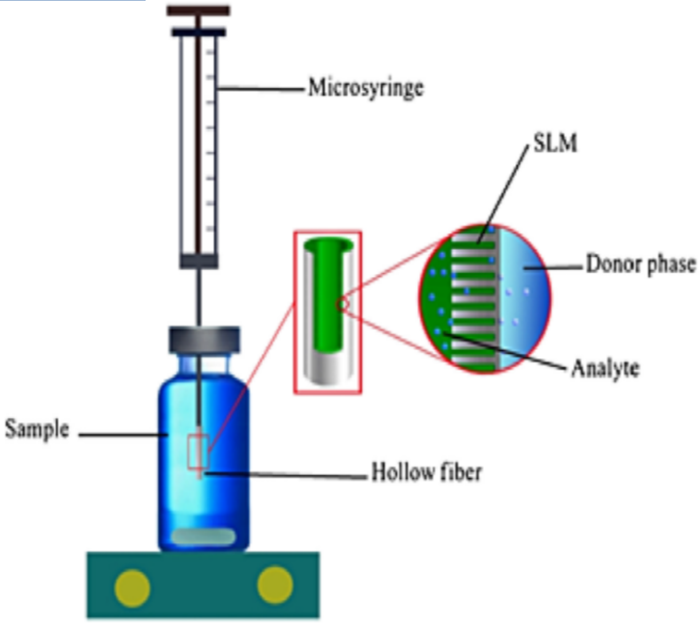
در مطالعه‌ای که اخیراً انجام شده است، نشان دادند که تکنیک LPME می‌تواند برای شناسایی متابولیت‌های ثانویه گیاهان نظیر فلاونوئیدها و ترپنوئیدها [۶۰] استفاده شود. Tang و همکارانش [۵۲] استفاده از HS-SDME جفت شده با GC-FID (Gas Chromatography - Flame Ionization Detector) برای تعیین ۵ ترپنوئید در برگ گونه Chamaecyparis obtuse را گزارش کرده‌اند. این گیاه به عنوان یک منبع صنعتی مقادیر زیادی از ترکیبات بیولوژیک فعال است که معمولاً در کشورهای آسیایی مثل ژاپن، کره و چین [۵۲] پرورش می‌یابد. در روش استخراج HS-SDME، ۰/۵ گرم برگ پودر شده داخل یک ویال نمونه ۲۰ میلی‌لیتری حاوی آب فوق خالص ریخته شده و تا دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده می‌شود. یک همزن مغناطیسی و میکرو سرنگ حاوی ۸ میکرولیتر اولئیل الکل (حلال استخراج) داخل ویال ریخته می‌شود. قبل از تزریق، میکرو سرنگ بالای ویال بسته شده و ۳ میکرولیتر از حلال استخراج را در موقعیت فضای فوقانی نمونه (Headspace) تزریق می‌کند. استخراج، پس از ۲۰ دقیقه تمام شده و میکرو قطره به دستگاه GC-FID داده می‌شود.

میکرواستخراج فاز مایع با فیبر تو خالی (HF-LPME)) فیبرهای توخالی (Hollow Fiber) از پلیمرهای آلی (پلی‌استرها، پلی‌اتر سولوفون و پلی‌پروپیلن) و مواد معدنی (زیرکونیوم و تیتانیوم) ساخته می‌شوند. هر دو دسته به شکل ساختار میله‌ای قرار گرفته که باعث افزایش سرعت استخراج آنالیت‌های نمونه می‌شوند [۶۱،۶۰]. سرعت استخراج با بهینه‌سازی سرعت چرخش (rpm) همزن مغناطیسی افزایش یافته و بهترین حلال آلی برای نفوذ به داخل حفره فیبر توخالی و یک استخراج موفق انتخاب می‌شود [۶۳]. بعلاوه، روش HF-LPME (شکل ۴) نه تنها برای پیش تغلیظ استفاده می‌شود (میکروفیلتراسیون در آزمایشگاه‌ها) بلکه برای تمیز کردن همزمان آنالیت‌های نمونه از قبیل پاک‌سازی فاضلاب مراکز صنعتی و ماتریس نمونه‌های پیچیده به کار می‌رود [۶۳].

فاکتور غنی‌سازی بالا یکی از مزایای استفاده از تکنیک HF-LPME در پیش تغلیظ آنالیت‌ها در نمونه است. این فاکتور می‌تواند با استفاده از نسبت و رابطه بین حجم نمونه (Vs) ، بازیابی استخراج (R) و محلول‌های پذیرنده Va [۶۵،۲۹] همان‌طورکه در معادلات (۴) و (۵) نشان داده شده است، محاسبه می‌شود: که Ca غلظت نهایی آنالیت در فاز آلی (پذیرنده)، CS غلظت ابتدایی آنالیت در نمونه، na مقدار نهایی آنالیت در فاز آلی (پذیرنده) و ns مقدار اولیه آنالیت در نمونه است.

$$R = \frac{na, final}{ns, initial} \times ۱۰۰\% \qquad (۴)$$

$$E = \frac{ca, final}{ca.initial} = R\left(\frac{Vs}{Va}\right) \times ۱۰۰\% \qquad (۵)$$



شکل ۴: تنظیمات HF-LPME، فخرایی و همکارانش [۴۶]

۵ استفاده از تکنیک HF-LPME در آنالیز نمونه‌های مواد غذایی و نوشیدنی

تکنیک‌های اخیر HF-LPME در شناسایی انواع مختلف آنالیت‌ها همانطور که در جدول ۱ نشان داده شده است [۱۴، ۶۶–۷۲] نتایج علمی به همراه داشته است. اخیراً González-Curbelo و همکارانش [۶۶] استفاده از تکنیک HF-LPME برای میکرواستخراج ۱۳ آفت‌کش که عموماً در پرورش حبوبات (که منبع غذایی اصلی کودکان است) استفاده می‌شوند، پیشنهاد کرده‌اند.

در این مطالعه، آرد گندم و دو نوع غذای کودک تجاری از فروشگاه‌های اسپانیا خریداری شده است. دو نمونه با منشاء حبوبات حاوی ذرت، گندم، چاودار و جودوسر آنالیز شده‌اند و نمونه دوم، حاوی ارزن برنج و ذرت است. هر ۱/۵ گرم از نمونه ریز خرد شده با چند قطره از محلول استاندارد تازه تهیه شده آنالیت‌های آفت‌کش‌های مورد نظر، مخلوط شده و به داخل یک لوله مخروطی ۵۰ میلی‌لیتری منتقل می‌شوند. ۲۰ میلی‌لیتر از مخلوط استونیتریل و فرمیک اسید (۱/۲۵ درصد حجمی- حجمی) به لوله اضافه شده و به مدت ۲دقیقه به شدت به هم زده می‌زنند. مخلوط نهایی ابتدا سونیکیت شده و فاز بالایی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و فشار 250 mba با کمک روتاری تبخیر می‌شود. باقی‌مانده در ۱۰ میلی‌لیتر آب خالص حل شده و محلول فیلتر می‌گردد. HF-LPME بر روی ۳ نمونه انجام می‌شود. ۱۰ میلی‌لیتر از هر کدام از محصول فیلتر شده به یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری منتقل شده و ۰/۵ درصد نمک طعام (w/v) و سدیم هیدروکسید ۱/۰ مولار برای افزایش قدرت یونی و تعدیل pH افزوده می‌شوند. فیبر توخالی به طول ۲ سانتی‌متر بریده شده و بر روی سوزن متصل به میکرو سرنگ ۱۰۰ میلی‌لیتری کاملا فیکس و ثابت می‌شود. سپس ۲۰ میکرولیتر ۱-اکتانول تزریق می‌شود تا منافذ و حفره‌های فیبر توخالی، اشباع شوند. بعد از چند ثانیه، فیبر توخالی اشباع شده وارد محلول آنالیت ویال می‌شود. استخراج در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه و در سرعت 960 rpm انجام می‌شود. فیبر توخالی برداشته شده و داخل میکرو ویال ۴۰۰ میکرولیتری دستگاه GC قرار می‌گیرد. سپس، ۳۵۰ میکرولیتر حلال استونیتریل به ویال اضافه شده و برای ۱۰ دقیقه اولتراسونیک می‌شود. سرانجام، حلال به آرامی با استفاده از گاز نیتروژن، تبخیر می‌گردد. باقی‌مانده به دستگاه *GC* با دتکتور NPD (Nitrogen- Phosphorus Detector) تزریق شده و با ۵۰ میکرولیتر حلال سیکلوهگزان مجدداً بازیابی می‌شود به طور مشابهی، Arvand و همکارانش [۶۷] با استفاده از روش HF-LPME دوفازی توسعه یافته همراه با GC برای غربال باقی‌مانده آفتکش پیرتروئید (سی‌هالوترین، دلتامترین و فنپروپاترین) در چهار نوع نمونه سبزیجات و میوه از منطقه کشاورزی گیلان در ایران را مورد استفاده قرار داد. هر کدام

جدول ۱: استفاده از تکنیک‌های HS-SDME برای آنالیز نمونه‌های غذا و نوشیدنی

نمونه غذا/ نوشیدنی	نمونه آنالیت	حلال استخراج	حجم میکرو قطره، میکرولیتر	زمان استخراج، دقیقه	سرعت تکان دادن، rpm	LOD	RR, %	LOQ	RSD, %	EF	روش شناسایی	منبع
آب نارگیل	۱۹ باقی‌مانده آفت‌کش	تولوئن	۱	۳۰	۲۰۰	۰/۱ –۰/۸۸ میکروگرم بر لیتر	–۱٦۰ ۰/۲۷ میکروگرم بر لیتر	٦/٦۹ –۱/۲۱ میکروگرم بر لیتر	٤/۹۹ –۲۱/٤	NR	GC-MS	[٤٦]
خاک، توت‌فرنگی‌ها، مرباها	۱٤ OCPs	n– هگزان	۵	٤۵	۲۰۰	۰/۰۰۱–۰/۱۱ میکروگرم بر کیلوگرم	NR	NR	۰/۳ –۱٤/۸	NR	GC-MS	[٤۸]
آب و غذای دریایی	منگنز	کلروفرم	۱۵	۷	۲۰۰	<۳۰ نانوگرم بر لیتر	NR	۱۰۰ <نانوگرم بر لیتر	NR	۱٦	GF-ETAAS [c,d]	[٤۹]
روغن‌های گیاهی	کادمیم	HNO_3	۵	۱۵	NR[b]	NR	۱۱۵– ۹۰ نانوگرم بر کیلوگرم	۷ > نانوگرم بر کیلوگرم	NR	NR	HR-CS ETAAS [e]	[۵۰]
میوه‌ها و سبزیجات	اکسید سولفور (IV)	DTNB[a]	۲/۵	۳/۵	۱٦۰۰	<۰/۰٦ میکروگرم بر گرم	NR	<۰/۲۰ میکروگرم بر گرم	<۵	۳۸۰	UV-Vis	[۵۱]
برگ‌های *Chamae-cyparis obtusa*	ترپنوئید	اولئیل الکل	۳	۲۰	NR	NR	NR	۰/۱۱ –۲۲/۳۵ میکروگرم بر گرم	NR	NR	GC-FID	[۵۲]

[a] DTNB = ۵، ۵´ -۵- دیتیوبیس– (۲- نیتروبنزوئیک اسید)؛ [b] NR=گزارش نشده؛ [c] GF=کوره گرافیت؛ [d] ETAAS = اسپکترومتری جذب اتمی الکتروترمال؛ [e] HR-CS= منبع پیوسته با وضوح بالا

از نمونه‌ها، هموژنیزه، فیلتر و با استانداردهای آفتکش ترکیب شد. یک ویال ۱۲ میلی‌لیتری حاوی ۳ درصد وزنی نمک طعام، ۵ سی‌سی محلول بافر استات/ استیک اسید ۰/۱ مولار و یک میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر استفاده شده و یک مخزن مغناطیسی و محلول آنالیت افزوده شد. بعلاوه، یک قطعه ۸/۸ سانتی‌متری فیبر توخالی (HF) پلی‌پروپیلن Accurel Q3/2 با ۲۴ میکرولیتر ۱- اکتانول خیسانده شده و درون ویال سانتریفیوژ U شکل قرار می‌گیرد. استخراج بعد از ۴۱ دقیقه و با سرعت چرخش 480 rpm تمام می‌شود. فیبر توخالی جدا شده و داخل ویال دیگری حاوی فاز استخراج کننده می‌شود به نحوی که مواد استخراج شونده (عصاره) خارج شوند. پس از آن، فرآیند شناسایی با تزریق ۲ میکرولیتر از استخراج کننده به دستگاه GC-MS انجام می‌شود. اصلاح تکنیک HF-LPME ادامه یافت تا به محبوبیتی در تلاش برای رسیدن به موثرترین روش برسد. غشاء میکرومتخلخل فیبر توخالی استخراج مایع-مایع (Hollow Fiber-Microporous Membrane Liquid- Liquid Extraction) یکی از تکنیک‌های جدید LPME است که غشاء میکرومتخلخل پلی‌پروپیلن به عنوان کمک ثابت در طول تشکیل و تجدید غشاء مایع عمل می‌کند.

اخیراً Bedendo و همکارانش [۶۸] استفاده از HF-MMLLE برای شناسایی باقی‌مانده ۱۸ آفتکش متعلق به دسته کاربامات‌ها، پیریمیدین‌ها، تریازول‌ها، ارگانوفسفات‌ها، نئونیکوتینوئیدها، نیتریمیدازول‌ها و آمیدها در نمونه‌های تازه و فرآوری شده آب پرتقال را گزارش کرده‌اند. نمونه‌های آب پرتقال طبیعی و فرآوری شده صنعتی از برزیل خریداری شد. در این روش، ۹ میلی‌لیتر از هر نمونه برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و به داخل یک ویال ۲۰ میلی‌لیتری منتقل می‌شود که در داخل آن، ۴۰۰ میکرولیتر تولوئن-اتیل استات (۸۵ + ۱۵ حجمی/ حجمی) و ۴ گرم آمونیوم سولفات افزوده شده است. سپس، ۱ میلی‌لیتر سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار برای تنظیم pH تا ۷ و یک قطعه فیبر توخالی ۱/۵ سانتی‌متری که ابتدا با استون تمیز شده وارد دسیکاتور می‌شود. زمان استخراج، ۳۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش، متوسط بود. آنالیت‌های استخراج شده روی غشاء فیبر توخالی از داخل ویال برداشته شده و در حمام اولتراسونیک حاوی ۵۰ میکرولیتر متانول-استون (۵۰ + ۵۰ حجمی/ حجمی) برای ۲ دقیقه قرار می‌گیرد. در پایان، ۲۰ میکرولیتر از عصاره به دست آمده با استفاده از LC-MS شناسایی می‌شود. Wang و همکارانش [۶۹] استفاده از PVDF متخلخل به جای پلی‌پروپیلن که معمولاً استفاده می‌شود، در آنالیز ۷ آفتکش در خیارهای خریداری شده از فروشگاه‌های پکن چین گزارش نموده است. ۲ گرم خیار خرد شده داخل ویال ۱۰ سی‌سی ریخته شده و با ۵ سی‌سی آب خالص مخلوط می‌گردد. مخلوط به مدت ۵ دقیقه اولتراسونیک شده و به مدت ۳ دقیقه با سرعت 12000 rpm بهم زده می‌شوند. ماده جمع شده روی سطح (محلول آنالیت) وارد یک ویال ۱۰ سی‌سی شده، سپس ۵ سی‌سی کلروفرم به داخل یک غشاء HF 8 سانتی‌متری تزریق می‌گردد و داخل محلول آنالیت غوطه‌ور می‌شود. استخراج به مدت ۲۰ دقیقه و در سرعت 300 rpm انجام می‌شود. HF جدا شده، خشک شده و در محلول متانول- آب (۱ + ۱ حجمی/ حجمی) قرارگرفته و به مدت ۱ دقیقه اولتراسونیک می‌شود. مخلوط، فیلتر شده و در نهایت ۵ میکرولیتر از آن با HPLC-MS/MS آنالیز می‌شود.

گرافن که در یک دهه قبل [۷۳] کشف شده، یک لایه نازک آلوتروپ کربن خالص است. گرافن، محکم، بی‌اثر و قادر به جذب نور و هدایت گرما / الکتریسیته است. بررسی‌ها به سمت استفاده از گرافن در مطالعات زیادی از جمله استفاده به عنوان یک ماده استخراج کننده سوق داده شده است [۷۵،۷۴].

Ma و همکارانش، باقی‌مانده متعلق به آفتکش‌های کاربامات در نمونه‌های میوه را با استفاده از HF-LPME تقویت شده با گرافن آنالیز نمودند. یک نمونه ۲۰ گرمی از میوه تازه همگن شده (سیب و گلابی) را داخل یک لوله آزمایش ۵۰ میلی‌لیتری منتقل کرده و برای ۵ دقیقه با سرعت 4000 rpm سانتریفیوژ می‌شود. فاز بالایی وارد ویال استخراج می‌شود. رسوب، شسته شده و دوباره در ۱ میلی‌لیتر استونیتریل حل شده و به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود و سپس فاز رویی جمع‌آوری می‌شود. فرآیند شستشو سه بار انجام می‌شود و فاز بالایی جمع‌آوری شده و به داخل ویال ریخته شده و تا ۱۵ میلی‌لیتر با آب دو بار تقطیر رقیق می‌شود (محلول آنالیت). محلول آنالیت را داخل ویال اسخراج ۲۵ میلی‌لیتری که قبلاً ۲/۲۵ گرم نمک طعام و همزن مغناطیسی در آن قرار دارد، منتقل می‌کنند. سپس، حلال ۱-اوکتانل، به میزان ۱۰ میکرولیتر داخل حفره‌های خالی یک HF پلی‌پروپیلن ضدعفونی شده، در یک بشر می‌ریزند. پس از آن، ۲ میکروگرم بر لیتر گرافن با ۱۵ میکرولیتر ۱-اوکتانل (استخراج کننده) رقیق شده و یک اکی‌والان

از آن داخل حفره‌های HF تزریق می‌شود. سرانجام، فیبر توخالی داخل ویال استخراج غوطه‌ور شده و استخراج به مدت ۳۰ دقیقه و با سرعت 800 rpm انجام می‌شود. در پایان، آنالیت‌ها به داخل ویال ۱۰۰ میکرولیتری واجذب شده (که قبلاً حاوی ۵۰ میکرولیتر متانول است) و در یک میکرو ورتکس به مدت ۲ دقیقه مخلوط شده و برای آنالیزهای بیشتر به دستگاه HPLC با دتکتور دیود اری (DAD) داده می‌شود. علاوه بر تعیین آنالیت آفت‌کش با استفاده از تکنیک HF-LPME، سایر نمونه‌های غیرشیمیایی (بیولوژیک) می‌توانند با این روش تعیین شوند. تحقیق اخیر توسط Socas-Rodríguez و همکارانش [۷۱] کاربرد HF-LPME برای آنالیز آنالیت‌های استروژن متابولیک و سنتزی در ۳ نمونه انتخاب شده شیر گاو (سرشیر گرفته شده، کمی سرشیر گرفته شده و کامل) نشان داده است. هر نمونه شیر، به صورت جداگانه با محلول استوک تهیه شده مخلوط شد و به مدت ۲۴ ساعت همگن می‌شوند. یک نمونه ۳ میلی‌لیتری مخلوط شده به داخل لوله سانتریفیوژ ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد و ۶ میلی‌لیتر متیل سیانید و ۱۵۰ میکرولیتر اتانوئیک اسید به آن افزوده می‌شود. مخلوط در یک مخزن ورتکس با سرعت 2800 rpm به مدت ۱ دقیقه مخلوط می‌شود تا مولکول‌های پروتئین تهنشین شوند. فاز بالایی به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت 4400 rpm سانتریفیوژ شده و در فشار 180 mbar و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد آب‌زدایی می‌شود تا حلال‌های اضافی جدا شوند. پس از آن، ۳ میلی‌لیتر از آنچه باقی‌مانده تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر با محلول نمک طعام ۱۰ درصد وزنی-حجمی رقیق می‌شود. محلول به دست آمده از طریق غشای ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شده و وارد یک ویال استخراج ۲۰ میلی‌لیتری می‌شود و با افزودن سدیم هیدروکسید ۸ مولار، pH به ۶ می‌رسد. یک غشاء فیبری ۲ سانتی‌متری، ۱- اکتانل اشباع شده و قبل از اینکه روی نوک سرنگ ۲۵ میکرولیتری قرار بگیرد، خشک می‌شود. فیبر و نوک سوزن، وارد محلول استخراج شده و پوشیده می‌شوند. سپس، ۲۵ میکرولیتر ۱-اوکتانل به داخل حفره‌های HF از طریق نوک سوزن میکرو سرنگ تزریق می‌شود. استخراج به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و سرعت 1250 rpm انجام می‌شود. قطعه HF، جدا شده و در یک ویال ۵۰۰ میکرولیتری حاوی استونیتریل شسته می‌شود و قبل از اینکه فیبر جدا شود، محتوی آن به مدت ۷ دقیقه اولتراسونیک می‌شود. آنالیت استخراج شده به آرامی تبخیر شده و مجدداً فاز متحرک کروماتوگرافی رقیق می‌شود. در نهایت، ۲۰ میکرولیتر از عصاره به دست آمده با استفاده از HPLC-DAD و دتکتور فلورسانس آنالیز می‌شود. Xu و همکارانش [۷۲] آنالیز ۹ هورمون استروئیدی در نمونه‌های شیر با استفاده از یک روش اصلاح شده LLME میکرواستخراج چرخان بر پایه فیبر توخالی همراه با تکنیک میکروویو کوپل شده با GC-MS نشان دادند. نمونه‌های شیر پاستوریزه شده، کم‌چربی، سرشیر گرفته و کامل از سوپرمارکتی در شهر چانگ چین خریداری شد. ویسکوزیته نمونه‌ها با رقیق کردن با آب خالص (۵۰ : ۵۰) کاهش یافته و از این مخلوط، ۱۰ سی‌سی فیلتر شده و به ویال استخراج ۲۰ میلی‌لیتری منتقل می‌شود. سپس، سیم فولادی و غشاء HF با سونیک شدن به مدت ۱۰ دقیقه در متانول و استون ضدعفونی می‌شود. سیم فولادی به طول ۱/۲ سانتی‌متر داخل هسته فیبر توخالی شده تا به عنوان همزن مغناطیسی استخراج عمل کند. حلال استخراج با استفاده از روش اولتراسونیک، حفره‌های HF را اشباع می‌کند و سپس داخل ویال استخراج می‌شود. استخراج به مدت ۲۰ دقیقه در سرعت 500 rpm انجام می‌شود. پس از آن، میله چرخان با استفاده از یک آهنربای قوی‌تر از محلول استخراج بیرون آورده می‌شود. با ۱ میلی‌لیتر آب خالص شسته شده و آنالیت توسط ۴۰۰ میکرولیتر متانول و با اولتراسونیک شدن شسته می‌شوند. یک استخراج اضافی با همزن مغناطیسی برای جداسازی، فیلتر و تبخیر محلول شوینده در یک ظرف انجام می‌شود. باقی‌مانده حاصل، مجدداً رقیق شده و به GC-MS داده می‌شود.

به صورت مشابهی، Raharjo و همکارانش [۱۴] آنالیز ترکیبات نیتروزامین (نیتروزو دی‌اتیل‌آمین و نیتروزو پروپیل‌آمین) در ماهی نمک زده، سوسیس، گوشت خوک و گوشت گاو نمک زده با استفاده از HF-LPME همراه با GC-FID گزارش نموده است. نمونه‌ها به صورت محلی از یک مغازه در سورابایا اندونزی خریداری شد. نمونه‌ها، هموژنیزه شده و با محلول‌های استاندارد آنالیت مخلوط شده و به داخل ویال استخراج ریخته می‌شود. سپس، ۱۰ میکرولیتر تولوئن به داخل یک غشاء هالوفیبر ۱/۵ سانتی‌متری تزریق شده و داخل ویال استخراج قرار داده می‌شود. بعلاوه، حلال استخراج ۳ میکرولیتر در بخش هالوفیبر از طریق میکرو سرنگ تزریق می‌شود. میکرواستخراج بعد از ۱۵ دقیقه و با سرعت 300 rpm پایان می‌یابد. GC-FID برای جداسازی و شناسایی آنالیت‌های استخراج شده از روش HF-LPME استفاده می‌شود.

۶ میکرواستخراج فاز مایع پخشی (DLLME)

در مطالعات اخیر، اسدی و همکارانش استفاده از DLLME برای تعیین آنالیت‌ها در یک نمونه را معرفی کرده‌اند [۷۶]. هر چند، رضائی و همکارانش [۷۷] DLLME را بیشتر به عنوان یک روش که بستگی به سیستم سه جزئی حلال‌ها، نظیر آنچه که در استخراج نقطه ابری و LLE هموژن است، معرفی نموده‌اند. روش، بستگی به انتخاب و استفاده از حلال مناسب (استخراج کننده) که سرعت و سهولت میکرواستخراج را فراهم می‌کند، دارد. به عنوان مثال، نیاز به یک حلال آلی با دانسیته بالا نظیر کلروفرم، دی‌سولفید کربن یا کلروبنزن می‌باشد و به همان میزان یک حلال پخش کننده (نظیر استون، استونیتریل یا متانول) نیاز است که به شدت قابل استخراج با هر دو فاز آلی و استخراج کننده باشد. نمونه داخل یک لوله آزمایش مخروطی درپیچ‌دار ریخته شده و حلال پخش کننده و فاز استخراج کننده به سرعت به آن اضافه می‌شود و لوله سانتریفیوژ می‌شود. هرچند این امر باعث تولید یک آشفتگی زیاد می‌گردد همچنین موجب تشکیل قطره‌های کوچک‌تر که در فاز آبی پخش شده‌اند، می‌شود. یک محلول کدر به صورت کوتاه‌مدت تشکیل شده و مساحت سطح بزرگی بین محلول آنالیت و استخراج کننده ایجاد می‌نماید که نشانگر رسیدن به حالت تعادل است. بعلاوه، یک فاز جامد در ته لوله ظاهر می‌شود. مزایای تکنیک DLLME شامل هزینه کم آن، دوستدار محیط زیست و RR و EF های بالاست. شکل ۵ مراحل روش DLLME که توسط Zhang طراحی شده را نشان می‌دهد [۷۹].

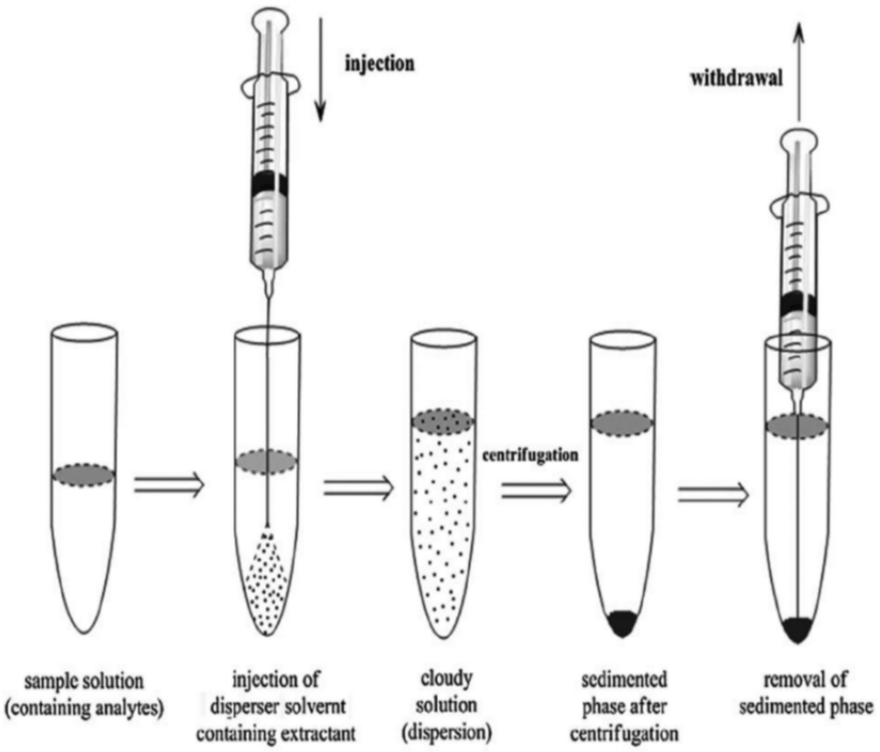
۷ استفاده از تکنیک‌های DLLME در آنالیز نمونه‌های مواد غذایی و نوشیدنی‌ها

انواع مختلفی از آنالیت‌ها با استفاده از تکنیک DLLME شناسایی شده‌اند (جدول ۲). مطالعات انتخاب شده آفت‌کش‌های ارگانوفسفات (OPPs) در داروهای گیاهی، سبزیجات و میوه‌ها با استاندارد DLLME توسط HO و همکارانش انجام و گزارش شده است [۸۰].

هر نمونه تازه خریداری شده میوه و سبزیجات از بازار محلی چینی‌ها هموژنیزه شده و در دمای ۲۰− درجه سانتی‌گراد سرد می‌شود. به صورت مشابهی، گیاهان خشک شده از یک کلینیک داروهای سنتی چینی خریداری شد. نمونه‌ها به صورت مجزا فرآوری شده، خرد و الک شده (با فیلتر مش ۰/۸۵ میلی‌متری) و با استانداردهای OPP تهیه شده مخلوط می‌شوند. سپس، هر ۰/۱ گرم آنالیت نمونه با ۱/۲ میلی‌لیتر استونیتریل در یک لوله آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط شده و در یک همزن ورتکس به مدت ۳۰ ثانیه میکس شده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت 3300 rpm سانتریفیوژ می‌شود. سپس ۱ میکرولیتر عصاره (فاز جامد ته‌نشین شده) به دستگاه GC-MS زده می‌شود. نشان داده‌اند که قارچ‌کش تریازول دارای خواص چربی‌دوستی [۱۹] نیز می‌تواند با استفاده از تکنیک DLLME شناسایی شود.

فرجزاده و همکارانش [۸۱] کاربرد یک روش تازه توسعه یافته بر اساس افزایش دما در DLLME کوپل شده با GC-NPD برای تعیین آفتکش تریازول در عسل را گزارش کرده‌اند. چهار نمونه عسل از یک فروشگاه محلی در آذربایجان شرقی ایران خریداری شد. پنجمین نمونه عسل از یک ناحیه کوهستانی غیر کشاورزی (کلیبر آذربایجان شرقی ایران) به دست آمد. یک قسمت ۱۵ گرمی از هر نمونه به یک بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شده، همگن شده و با آب دوبار تقطیر به حجم می‌رسد. محلول آنالیت به مدت ۱۵ دقیقه در تعادل نگه‌داشته شد و به یک لوله استخراج مخروطی ۷۰ میلی‌لیتری منتقل شده، با ۲۵ نانوگرم بر گرم استاندارد آفتکش تهیه شده مخلوط گردیده و در حمام آب ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه قرار می‌گیرد. پس از آن، ۱/۵ سی‌سی دی‌متیل‌فرمالدهید (دیسپرس یا پخش کننده) و ۱۳۰ میکرولیتر ۱،۲-دی‌برومو اتان (استخراج کننده) به سرعت به لوله استخراج افزوده شده و به مدت ۳ دقیقه زیر یک شیر آب باز، سرد می‌شود. سانتریفیوژ در سرعت 4000 rpm به مدت ۵ دقیقه انجام می‌شود. در نهایت، یک میکرولیتر فاز استخراج شده (در انتهای لوله) جمع‌آوری شده و به یک GC داده می‌شود.

کمان‌کش و همکارانش [۸۲] کاربرد DLLME تقویت شده با ماکروویو و جفت شده با GC-MS در تعیین 16 تا از PAH در گندم آسیاب شده را نشان دادند. یک کیلوگرم از نمونه خرد شده با ۲ درصد چربی از طریق چربی از طریق اختلاط همگن با مقدار مناسبی از عوامل طعم دهنده شامل نمک و پیاز رنده شده تهیه می‌گردد و به مدت ۱ ساعت در یخچال نگهداری می‌شود. سپس، مقادیر مشخصی از استانداردهای آنالیت برای اضافه شدن (spike) با یک نمونه ۱۵۰ گرمی تهیه شده که خرد شده و روی زغال داغ به مدت ۱ دقیقه سرخ



شکل ۵: نمایش تصویری فرآیند DLLME، Zhang و همکارانش [۷۹]

شده است استفاده می‌شود.

پس از آن، ۱۰ سی‌سی اتانول- KOH (با نسبت ۵۰ : ۵۰ حجمی) برای هیدرولیز ۱ گرم نمونه کوبیده شده در لوله آزمایش استفاده می‌شود که سپس، به مدت ۱۵ دقیقه مایکروویو می‌شود. نمونه مایکروویو شده ۵ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود (2683 rpm). فاز بالایی وارد یک لوله آزمایش دیگر که حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول‌های Carrez I و II برای رسوب دادن پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌های محلول است، می‌شود. لوله آزمایش مجدداً به مدت ۵ دقیقه و با سرعت 2683 rpm سانتریفیوژ می‌شود. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر فاز بالایی سانتریفیوژ شده داخل لوله آزمایش دکانته شده و با محلول ۱۵ درصد نمک طعام، ۸۰ میکرولیتر اتیلن تتراکلرید (استخراج کننده)، ۳۰۰ میکرولیتر استون (دیسپرس کننده) و ۲ میکرولیتر بی‌فنیل ۴۰ میکروگرم بر لیتر (استاندارد داخلی) مخلوط می‌شود. محتوای لوله آزمایش به مدت ۵ دقیقه با سرعت 2683 rpm سانتریفیوژ می‌شود. سرانجام، یک قسمت ۲ میکرولیتری فاز تهنشین شده، جدا شده و به دستگاه GC-MS تزریق می‌شود. مایکوتوکسین‌هایی نظیر آفلاتوکسین و اکراتوکسین A نیز توسط تکنیک DLLME آنالیز شده‌اند. یک تکنیک نوین که اخیراً توسعه یافته و مورد استفاده قرار گرفته است برای شناسایی آفلاتوکسین‌های B1، B2، G1 و G2 در مغز پسته با استفاده از DLLME پس از SPE [۸۳] است. پسته‌ها از فروشگاه محلی در رفسنجان ایران خریداری شد. برای هر نمونه، ۵ گرم همگن شده و به یک لوله آزمایش سانتریفیوژ ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس، ۱ گرم نمک طعام، ۱۰ سی‌سی n- هگزان و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم استاندارد افلاتوکسین تهیه شده (عامل فشرده‌سازی) و مخلوط متانول- آب با نسبت ۱ + ۴ حجمی به ترتیب به لوله آزمایش اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه سونیکیت شد. سپس ۴ دقیقه با سرعت 5000 rpm سانتریفیوژ شد و فاز بالایی فیلتر شده و مجدداً به مدت ۶ دقیقه با سرعت 5000 rpm سانتریفیوژ شد. فاز بالایی دکانته شده و فاز رسوب کرده با ۶۰ سی‌سی آب مقطر رقیق شده و وارد سیستم SPE گردید. بعلاوه، ۵ میلی‌لیتر از آنالیت استخراج شده که در آون کمی خشک شد به داخل یک لوله مخروطی ۱۰ میلی‌لیتری که حاوی ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (استخراج کننده) و ۱/۵ میلی‌لیتر متانول (دیسپرس کننده) است، منتقل شد. محلول آنالیت به مدت ۳ دقیقه با سرعت 5000 rpm سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل، در حمام آب تحت تبخیر قرار

جدول ۲: استفاده از تکنیک‌های HF-LPME جهت آنالیز نمونه‌های غذا و نوشیدنی

نمونه غذا/ نوشیدنی	نمونه آنالیت	حلال استخراج	حجم حلال استخراج	زمان استخراج، دقیقه	سرعت تکان دادن، rpm	LOD	RR, %	LOQ	RSD, %	EF	روش شناسایی	منبع
آرد گندم و غذاهای مبتنی بر غلات	۱۳ OPPs [a]	۱- اوکتانول	۲۰ میکرولیتر	۴۵	۹۶۰	۰/۰۱ -۰/۰۴ میکروگرم بر لیتر	NR[e]	۰/۱۳- ۰/۰۳ میکروگرم بر لیتر	NR	NR	GC–NPD[f]	[۶۶]
آب میوه و سبزیجات	آفت‌کش‌های پیرتروئید	۱- اوکتانول	۲۴ میکرولیتر	۴۱	۴۸۰	۰/۰۲-۰/۰۷ نانوگرم بر میلی‌گرم	۸۰/۳ -۱۰۱/۶	۰/۱۰-۰/۰۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر	۳/۴ -۵/۹	۵۱۹ -۵۲۸	GC–MS	[۶۷]
آب پرتقال تازه و فرآوری شده	۱۸ باقی‌مانده آفت‌کش	متانول / استون	۵۰ میکرولیتر	۳۵	NR	۰/۰۳-۰/۳۵ میلی‌گرم بر لیتر	-۱۱۱ ۷۷	۱/۶۰-۰/۰۳ میلی‌گرم بر لیتر	۰/۰۱ -۰/۲۰	NR	LC–MS	[۶۸]
خیار	۷ آفت‌کش	کلروفرم	۵ میلی‌لیتر	۲۰	۳۰۰	۰/۰۱ -۰/۳۱ میکروگرم بر کیلوگرم	-۱۱۹ ۶۳	۱- ۰/۰۵ میکروگرم بر کیلوگرم	<۲۰	۱۰۰ -۱۴۷	–UHPLC MS/MS [g]	[۶۹]
میوه	۴ CPs [b]	۱- اوکتانول	۱۵ میکرولیتر	۳۰	۸۰۰	۱-۰/۲ نانوگرم بر گرم	۸۹/۲ -۱۰۶/۸	NR	-۷/۸ ۶/۲	۶۰-۷۰	HPLC–DAD	[۷۰]
شیر	۹ استروژن	۱- اوکتانول	۲۵ میکرولیتر	۶۰	۱۲۵۰	۰/۲۸ -۳۵/۲ میکروگرم بر لیتر	-۱۱۹ ۶۳	NR	NR	NR	–HPLC DAD/FD [h]	[۷۱]
شیر	۹ SHs [c]	متانول	۴۰۰ میکرولیتر	۲۰	۵۰۰	۰/۰۲-۰/۰۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر	-۱۰۴/۶ ۹۳/۶	۰/۱۹-۰/۰۷ نانوگرم بر لیتر	-۶/۲ ۱/۶	NR	GC–MS	[۷۲]
ماهی نمک زده، سوسیس، گوشت خوک و گوشت گاو نمک زده	NPs [d]	تولوئن	۳ میکرولیتر	۱۵	۳۰۰	۲۰ -۳۳۰ میکروگرم بر لیتر	-۱۰۱ ۱۰۰	NR	۰/۰۶ -۰/۸۱	<۲۰۰۰۰	GC–FID	[۱۴]

[a] OPPs = آفت‌کش‌های ارگانوفسفات؛ [b] CPs= آفت‌کش‌های کاربامات؛ [c] SHs= هورمون‌های استروئیدی؛ [d] NPs = آفت‌کش‌های نیتروزامین؛ [e] NR= گزارش نشده؛ [f] NPD = دتکتور فسفر نیتروژن ؛ UHPLC [g] LC= با کارایی فوق بالا ؛ [h] DAD/FD = دتکتور دیود اری و دتکتور فلورسانس

گرفت. باقی‌مانده در ۳۰ میکرولیتر متانول حل شده و به HPLC تزریق شد.

بعلاوه، فلزات سنگین نظیر مس با استفاده از روش DLLME می‌تواند شناسایی شود. Shrivas و Jaiswal [۱۲] آنالیز مس در نمونه‌های غذایی سبزیجات و حبوبات با استفاده از FAAS پس از DLLME را پیش بردند. نمونه‌های سبزیجات و حبوبات از فروشگاه محلی در هند خریداری شده و در آون با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ساعت خشک شده و خرد شده تا به پودر ریز تبدیل شود. برای هر نمونه، ۲/۵ گرم تبدیل به خاکستر شده و به یک بشر ۵۰ سی‌سی حاوی ۳ سی‌سی آب اکسیژنه و ۷ سی‌سی اسید نیتریک منتقل شد. مخلوط گرما داده شد تا خشک شود و باقی‌مانده در ۱۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۱ مولار جمع‌آوری شد. سپس، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول نمک طعام ۱ درصد، آسکوربیک اسید و $۰/۶ \times ۱۰^{-۱۳}$ مولار ۲، ۹- دی‌متیل- ۱، ۱۰- فنانترونیل، محلول بافر و ۱۳ میلی‌لیتر از محلول آبی استاندارد ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر مس (II) به داخل یک لوله آزمایش استخراج مخروطی منتقل می‌شود. پس از این مرحله، تزریق ۰/۵ سی‌سی کلروفرم و ۰/۲ سی‌سی از N- فنیل بنزیمیدازول تیو اوره به عنوان حلال دیسپرس کننده و یک حلال استخراج کننده به ترتیب به داخل لوله استخراج تزریق می‌شوند. سانتریفیوژ (755 rpm) به مدت ۲ دقیقه انجام شده و فاز آبی به دقت به داخل یک لوله آزمایش منتقل شده و با ۴۰۰ میکرولیتر اتانول قبل از ورود به FAAS مخلوط می‌شود.

۸ جمع‌بندی، محدودیت‌ها و توصیه‌ها

علی‌رغم این که LPME یک تکنیک نوین در استخراج مواد غذایی است، این روش مورد اصلاحات اساسی و مهمی قرار گرفته تا از مناسب بودن آن اطمینان حاصل شده و کارایی استخراج افزایش یابد (به عنوان مثال، کاهش نسبت LOD/RSD ها و افزایش RR/EF ها). این مقاله، متدهای اخیر LPME (SDME، HF-LPME و DLLME) را که می‌تواند در مورد نمونه‌های غذا و نوشیدنی مختلفی کاربرد داشته باشد را شرح می‌دهد. به طور خلاصه، نتایج به دست آمده اشاره به سرعت SDME دارد که کمترین زمان استخراج را داشته و از حلال کمی استفاده می‌شود، در حالی که HF-LPME در بین سه روش گفته شده، کندترین روش است.

LPME و اصلاحات مختلف آن به صورت قابل اطمینان و توجیه‌پذیری به عنوان روش‌های پیش تغلیظ برای آنالیز نمونه‌های مختلف می‌باشد. این روش‌ها مقادیر کمی حلال آلی مصرف می‌نمایند، پتانسیل بالایی برای سادگی، حساسیت، سرعت، دقت، صحت و کارایی، LOD پائین، HF بالا و RR بالایی دارند.

این مقاله به عنوان رفرنسی برای تهیه ابزارهای مدیریت کارآمد به منظور حل مشکلات آلایندگی، تمیز کردن و کنترل کیفیت مواد غذایی و سلامت آن در سطح جهانی می‌باشد. برخی محدودیت‌های تکنیک‌های LPME اینها هستند: اغلب حلال‌های آلی مورد استفاده در این تکنیک‌ها، سمّی هستند، به عنوان مثال، به صورت کامل و ۱۰۰ درصد مطابق با شیمی سبز نیستند و مشکلاتی در انتخاب بهترین حلال و حجم‌های مورد استفاده برای آنالیز وجود دارد چون این موضوع، به ماهیت آنالیت وابسته است. بعلاوه، الزامات مهم اضافی برای مرحل ابتدایی قبل از انجام استخراج اصلی شامل تعیین بهترین سرعت تلاطم، قدرت یونی محلول واسطه، زمان استخراج و دما می‌باشد. همچنین ناپایداری میکرو قطره استخراج در طول تحریک می‌تواند بر روش SDME اثر بگذارد و HF-LPME در استخراج آنالیت‌های بسیار قطبی از نمونه، ناکارآمد هستند.

استفاده از حلال‌های بر پایه مایع یونی غیرسمّی برای میکرواستخراج آنالیت‌ها توصیه می‌شود چون نتایج گزارش شده نشان داده‌اند که این حلال نسبت به حلال‌های آلی، کارایی بهتر داشته و دوست‌دار محیط زیست هستند. همچنین، سایر حلال‌های سبز غیرسمّی می‌توانند در تکنیک‌های LPME مورد استفاده قرار گیرند، نظیر CO_2 مایع و فوق بحرانی و مخلوط‌های با دمای پائین که تجدیدپذیر و طبیعی بوده و اخیراً توسعه یافته‌اند.

مراجع

[1] AndraščÍková, M., Matisová, E., & Hrouzková, S. (2015). Separation & Purification Reviews, 44, 1–18.

[2] Farajzadeh, M.A., Sorouraddin, S.M., & Mogaddam, M.R.A. (2014). Microchima Acta, 181, 829–851.

[3] Asensio-Ramos, M., Ravelo-Pérez, L.M., González-Curbelo, M.Á., & Hernández-Borges, J. (2011). Journal of Chromatography A , 1218, 7415–7437.

[4] Luzardo, O.P., Rodríguez-Hernández, Á., Quesada-Tacoronte, Y., Ruiz-Suárez, N., Almeida-González, M., Henríquez-Hernández, L.A., Zumbado, M., & Boada,

[20] Liu, M., Yuki, H., Song, Y., & Lin, J. (2006). Determination of Carbamate and Organophosphorus Pesticides in Fruits and Vegetables Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry with Dispersive Solid Phase Extraction. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 34, 941–945.

[21] Radišić, M., Grujić, S., Vasiljević, T., & Laušević, M. (2009). Food Chemistry, 113, 712–719.

[22] Romero-González, R., Frenich, A.G., & Vidal, J.M. (2008). Talanta, 76, 211–225.

[23] Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., & Hernández-Méndez, J. (2005). Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. Journal of Chromatography A, 1089, 1–17.

[24] Baggiani, C., Anfossi, L., & Giovannoli, C. (2007). Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers. Analytica Chimica Acta, 591, 29–39.

[25] Bogialli, S., & Di Corcia, A. (2007). Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 70, 163–179.

[26] Picó, Y. (2013). TrAC-Trend. Analytical Chemistry, 43, 84–99.

[27] Zhang, J., Gao, H., Peng, B., Li, S., & Zhou, Z. (2011). Comparison of the performance of conventional, temperature-controlled, and ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography in analyzing pyrethroid pesticides in honey samples. Journal of Chromatography A, 1218, 6621–6629.

[28] Abdulra'uf, L.B., Sirhan, A.Y., & Huat Tan, G. (2012). Recent developments and applications of liquid phase microextraction in fruits and vegetables analysis. Journal of Separation Science, 35, 3540–3553. doi:10.1002/jssc.201200427

[29] Abolhasani, J., Hassanpour, A., Ghorbani-kalhor, E., & Jafariyan, H.R. (2015). Hollow fiber supported liquid phase microextraction combined with maltodextrin-modified capillary electrophoresis for determination of citalopram enantiomers in urine samples. Analytical Methods. 7, 2012–2019.

[30] Goudarzi, N., Farsimadan, S., Chamjangali, M.A., & Bagherian, G.A. (2015). Optimization of modified dispersive liquid–liquid microextraction coupled with high□performance liquid chromatography for the simultaneous preconcentration and determination of nitrazepam and midazolam drugs: An experimental design. Journal of Separation Science, 38, 1673–1679.

[31] Kailasa, S.K., & Wu, H.-F. (2010). Surface modified silver selinide nanoparticles as extracting probes to improve peptide/protein detection via nanoparticles-based liquid phase microextraction coupled with MALDI mass spectrometry. Talanta, 83, 527–534.

L.D. (2013). Food and Chemical Toxicology, 60, 455–462.

[5] Dadfarnia, S., & Shabani, A.M.H. (2010). Analytica Chimica Acta, 658, 107–119.

[6] Reddy, K., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H., Abel, C., & Shier, W. (2010). Toxin Reviews, 29, 3–26.

[7] Zhuang, P., McBride, M.B., Xia, H., Li, N., & Li, Z. (2009). Science of the Total Environment, 407, 1551–1561.

[8] Mastovska, K. (2013). Food Safety Magazine, 19, 12, 14, 65.

[9] Ridgway, K., Lalljie, S.P., & Smith, R.M. (2007). Journal of Chromatography A. 1153, 36–53.

[10] Wang, L., Zheng, J., Zhang, Z., Wang, T., & Che, B. (2013). Engineering 5, 154–157.

[11] López-García, I., Vicente-Martínez, Y., & Hernández-Córdoba, M. (2014). Determination of cadmium and lead in edible oils by electrothermal atomic absorption spectrometry after reverse dispersive liquid-liquid microextraction. Talanta 124, 106–110.

[12] Shrivas, K., & Jaiswal, N.K. (2013). Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of copper in cereals and vegetable food samples using flame atomic absorption spectrometry. Food Chemistry, 141, 2263–2268.

[13] Fuh, M.-R., Huang, S.-Y., & Lin, T. Y. (2004). Talanta, 64, 408–414.

[14] Raharjo, Y., Handajani, U.S., & Khasanah, M. (2014). Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 6, 1274 1280.

[15] Barkai-Golan, R., & Paster, N. (2008). Mycotoxins in Fruits and Vegetables. Academic Press of Elsevier, San Diego, CA

[16] IARC.(1993). Some Naturally Occurring Substances: Items and Constituents Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

[17] Aaslyng, M.D., Duedahl-Olesen, L., Jensen, K., & Meinert, L. (2013). Content of heterocyclic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons in pork, beef and chicken barbecued at home by Danish consumers. Meat Science, 93, 85 91.

[18] Kendirci, P., Icier, F., Kor, G., & Onogur, T.A. (2014). Influence of infrared final cooking on polycyclic aromatic hydrocarbon formation in comically pre-cooked beef meatballs. Meat Science, 97, 123–129.

[19] Kmellár, B., Abrankó, L., Fodor, P., & Lehotay, S.J. (2010). Routine approach to qualitatively screening 300 pesticides and quantification of those frequently detected in fruit and vegetables using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Food Additives & Contaminants, 27, 1415–1430.

[32] Liu, L., Zhou, X., Wang, C., Wu, Q., & Wang, Z. (2015). Extraction and enrichment of polycyclic aromatic hydrocarbons by ordered mesoporous carbon reinforced hollow fiber liquid□phase microextraction. Journal of Separation Science, 38, 683–689.

[33] Yang, Y., Chen, J., & Shi, Y.-P. (2015). TrAC-Trend. Analytical Chemistr, 64, 109–117.

[34] Anema, S., & Li, Y. (2000). LWT- Food Science and Technology, 33, 335–343

[35] Wen, X., Yang, Q., Yan, Z., & Deng, Q. (2011). Determination of cadmium and copper in water and food samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with UV–vis spectrophotometry. Microchemical Journal, 97, 249–254.

[36] Citak, D., & Tuzen, M. (2010). A novel preconcentration procedure using cloud point extraction for determination of lead, cobalt and copper in water and food samples using flame atomic absorption spectrometry. Food and Chemical Toxicology, 48, 1399–1404.

[37] Yoshioka, N., & Ichihashi, K. (2008). Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection. Talanta, 74, 1408–1413.

[38] McGorrin, R.J. (2009). One hundred years of progress in food analysis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 8076–8088.

[39] Pena-Pereira, F., Lavilla, I., & Bendicho, C. (2010). Liquid-phase microextraction techniques within the framework of green chemistry. Trends in Analytical Chemistry, 29, 617–628.

[40] Socas-Rodríguez, B., Asensio-Ramos, M., Hernández-Borges, J., & Rodríguez-Delgado, M.Á. (2014). Analysis of oestrogenic compounds in dairy products by hollow-fibre liquid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. Food Chemistry, 149, 319–325.

[41] Han, D., & Row, K.H. (2012). Trends in liquid-phase microextraction, and its application to environmental and biological samples. Microchimica Acta, 176, 1–22.

[42] Hashemi, M., Habibi, A., & Jahanshahi, N. (2011). Determination of cyclamate in artificial sweeteners and beverages using headspace single-drop microextraction and gas chromatography flame-ionisation detection. Food Chemistry, 124, 1258–1263.

[43] Jeannot, M.A., Przyjazny, A., & Kokosa, J.M. (2010). Single drop microextraction–development, applications and future trends. Journal of Chromatography A, 1217, 2326 2336.

[44] Jeannot, M.A., & Cantwell, F.F. (1996). Solvent microextraction into a single drop. Analytical Chemistry, 68, 2236–2240.

[45] Jeannot, M.A., & Cantwell, F.F. (1997). Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle. Analytical Chemistry, 69, 235–239.

[46] Dos Anjos, J.P., & de Andrade, J.B. (2014). Determination of nineteen pesticides residues (organophosphates, organochlorine, pyrethroids, carbamate, thiocarbamate and strobilurin) in coconut water by SDME/GC–MS. Microchemical Journal, 112, 119–126.

[47] Dos Anjos, J.P., & de Andrade, J.B. (2015). Simultaneous determination of pesticide multiresidues in white wine and rosé wine by SDME/GC-MS. Microchemical Journal, 120, 69–76.

[48] Fernandes, V.C., Subramanian, V., Mateus, N., Domingues, V.F., & Delerue-Matos, C. (2012). The Development and Optimization of a Modified Single-Drop Microextraction Method for Organochlorine Pesticides Determination by Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Microchimica Acta , 178, 195–202.

[49] Lemos, V.A., & Vieira, U.S. (2013). Single-drop microextraction for the determination of manganese in seafood and water samples. Microchimica Acta , 180, 501–507.

[50] Almeida, J.S., Anunciação, T.A., Brandão, G.C., Dantas, A.F., Lemos, V.A., & Teixeira, L.S. (2015). Ultrasound-assisted single-drop microextraction for the determination of cadmium in vegetable oils using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 107, 159–163.

[51] Gómez-Otero, E., Costas, M., Lavilla, I., & Bendicho, C. (2013). Ultrasensitive, simple and solvent-free micro-assay for determining sulphite preservatives (E220–228) in foods by HS-SDME and UV–vis micro-spectrophotometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406, 2133–2140.

[52] Tang, B., Tian, M., & Row, K.H. (2014). Determination of Terpenoids in Chamaecyparis obtusa Leaves by Headspace Single-Drop Microextraction with Gas Chromatography Detection. Analytical Letters, 47, 48–57.

[53] Pinheiro, A.S., Rocha, G.O., & Andrade, J.B. (2011). A SDME/GC–MS methodology for determination of organophosphate and pyrethroid pesticides in water. Microchemical Journal, 99, 303–308.

[54] Rajabi, S.K. (2015). Journal of Chemical Health Risks, 5, 1–5.

[55] Awua, A.K., Doe, E.D., & Agyare, R. (2011). BMC Research Notes, 4, 451–459

[56] Deme, P., Azmeera, T., Kanjilal, S., Jonnalagadda, P., & Upadhyayula, V.S. (2013). LC-MS/MS Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Coconut Water. Food Analytical Methods, 6, 1162–1169.

[57] Martins, J., Esteves, C., Limpo-Faria, A., Barros, P., Ribeiro, N., Simões, T., Correia, M., & Delerue-Matos, C. (2012). Analysis of six fungicides and one acaricide in still and fortified wines using solid-phase microextraction-gas chromatography/tandem mass spectrometry. Food Chemistry, 132, 630–636.

[58] Anthemidis, A., & Mitani, C. (2013). Current Analytical Chemistry, 9, 250–278

[59] Zhang, B., Wang, M., & Wang, L. (2012). Fabrication and Characterization of LaF 3 /Titania Nanotube Array Electrode for Determination of Fluoride Using a Headspace Single-Drop Microextraction SystemAnalytical Letters, 45, 2455–2466.

[60] Yang, C., Wang, J., & Li, D. (2013). Microextraction techniques for the determination of volatile and semivolatile organic compounds from plants: a review. Analytica Chimica Acta , 799, 8–22.

[61] Kobayashi, S., Hanabusa, K., Hamasaki, N., Kimura, M., Shirai, H., & Shinkai, S. (2000). Preparation of TiO2 Hollow-Fibers Using Supramolecular Assemblies. Chemistry of Materials, 12, 1523–1525.

[62] Tan, X., Liu, S., & Li, K. (2001). Preparation and Characterisation of Inorganic Hollow Fibre Membranes. Journal of Membrane Science, 188, 87–95.

[63] Limian, Z., Hian, K.L., & Majors, R.E. (2010). LCGC North America, 28, 580–590

[64] Fakhari, A.R., Tabani, H., & Nojavan, S. (2013). Miniaturized hollow fibre assisted liquid-phase microextraction and gas chromatography for determination of trace concentration of sufentanil and alfentanil in biological samples. Drug Testing and Analysis, 5, 589–595.

[65] Gjelstad, A., & Pedersen-Bjergaard, S. (2013). Journal of Chromatographic Science,5, 181–189

[66] González-Curbelo, M.A., Hernández-Borges, J., & Borges-Miq Rodríguez-Delgado, M.Á. (2013). Determination of organophosphorus pesticides and metabolites in cereal-based baby foods and wheat flour by means of ultrasound-assisted extraction and hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. Journal of Chromatography A , 1313, 166–174.

[67] Arvand, M., Bozorgzadeh, E., & Shariati, S. (2013). Two-phase hollow fiber liquid phase microextraction for preconcentration of pyrethroid pesticides residues in some fruits and vegetable juices prior to gas chromatography/mass spectrometry. Journal of Food Composition and Analysis, 31, 275–83.

[68] Bedendo, G.C., Jardim, I.C.S.F., & Carasek, E. (2012). Multiresidue determination of pesticides in industrial and fresh orange juice by hollow fiber microporous membrane liquid-liquid extraction and detection by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. Talanta, 88, 573–580.

[69] Wang, J., Du, Z., Yu, W., & Qu, S. (2012). Detection of seven pesticides in cucumbers using hollow fibre-based liquid-phase microextraction and ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1247, 10–17.

[70] Ma, X., Wang, J., Wu, Q., Wang, C., & Wang, Z. (2014). Extraction of carbamate pesticides in fruit samples by graphene reinforced hollow fibre liquid microextraction followed by high performance liquid chromatographic detection. Food Chemistry, 157, 119–124.

[71] Socas-Rodríguez, B., Asensio-Ramos, M., Hernández-Borges, J., & Rodríguez-Delgado, M.Á. (2013). Hollow-fiber liquid-phase microextraction for the determination of natural and synthetic estrogens in milk samples. Journal of Chromatography A, 1313, 175–184.

[72] Xu, X., Liang, F., Shi, J., Zhao, X., Liu, Z., Wu, L., Song, Y., Zhang, H., & Wang, Z. (2013). Determination of hormones in milk by hollow fiber-based stirring extraction bar liquid-liquid microextraction gas chromatography mass spectrometry.Analytica Chimica Acta , 790, 39–46.

[73] Novoselov, K., Geim, A., Morozov, S., Jiang, D., Zhang, Y., & Dubonos, S. (2004). Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. Journal of Science. 306, 666–669.

[74] Fuente, J.L. (2015). Cambridge Coworking Center, http://www.graphenea.com

[75] Novoselov, K.S., Fal'ko, V.I., Colombo, L., Gellert, P.R., Schwab, M.G., & Kim, K. (2012). A roadmap for graphene. Nature, 490, 192–200.

[76] Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M.-R.M., Aghaee, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. Journal of Chromatography A, 1116, 1–9.

[77] Rezaee, M., Yamini, Y., & Faraji, M. (2010). Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. Journal of Chromatography A, 1217, 2342–2357.

[78] Berijani, S., Assadi, Y., Anbia, M., Hosseini, M.-R.M., & Aghaee, E. (2006). 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. Journal of Chromatography A, 1123, 1–9.

[79] Zhang, P., Hu, L., Lu, R., Zhou, W., & Gao, H. (2013). Application of ionic liquids for liquid–liquid microextraction. Analytical Methods, 5, 5376–5385.

[80] Ho, Y.-M., Tsoi, Y.-K., & Leung, K.S.-Y. (2013). Highly sensitive and selective organophosphate screening in twelve commodities of fruits, vegetables and herbal medicines by dispersive liquid-liquid microextraction. Analytica Chimica Acta, 775, 58–66.

[81] Farajzadeh, M.A., Mogaddam, M.R.A., & Ghorbanpour, H. (2014). Development of a new microextraction method based on elevated temperature dispersive liquid-liquid microextraction for determination of triazole pesticides residues in honey by gas chromatography-nitrogen phosphorus detection. Journal of Chromatography A, 1347, 8–16.

[82] Kamankesh, M., Mohammadi, A., Hosseini, H., & Tehrani, Z.M. (2015). Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. Meat Science, 103, 61–67.

[83] Rezaee, M., Khalilian, F., Mashayekhi, H.A., & Fattahi, N. (2014). A novel method for the high preconcentration of trace amounts of the aflatoxins in pistachios by dispersive liquid–liquid microextraction after solid-phase extraction Analytical Methods, 6, 3456–3461.