

توسعه روش استخراج کچرز ترکیب شده با میکرواستخراج مایع - مایع پخشی و کروماتوگرافی گازی به منظور اندازه‌گیری آفت‌کش‌های ارگانوفسفره و تری‌آزینی در نمونه‌های روغن کانولا

منا ارونقی^a، افشین جوادی^{bc*}، محمدرضا افشار مقدم^d

^aگروه علوم و صنایع غذایی، واحد ممقان، دانشگاه آزاد اسلامی، ممقان، ایران
^bگروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
^cمرکز تحقیقات ارتقاء سلامت، علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
^dمرکز تحقیقات ایمنی غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۱۰/۱۳

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۲/۰۷

چکیده

مقدمه: امروزه از آفت‌کش‌ها به منظور بهبود کیفیت و مقدار محصولات کشاورزی استفاده می‌شود. اما استفاده بیش از حد از آنها منجر به تجمع آنها در مواد غذایی شده و می‌تواند سلامت انسان را تهدید نماید. هدف از این مطالعه، ارائه روش آماده‌سازی جدید مبتنی بر ترکیب روش کچرز و میکرواستخراج مایع-مایع پخشی برای استخراج برخی از آفت‌کش‌های ارگانوفسفره و تری‌آزینی از نمونه‌های مختلف روغن کانولا می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بدین منظور اثر پارامترهای مختلف مانند نوع جاذب، مقدار جاذب (در محدوده ۲۵ تا ۲۰۰ میلی گرم)، نوع حلال اتکتیک عمیق (کولین کلرید: اتیلن گلیکول و کولین کلرید فنول) و حجم حلال استخراج کننده (در محدوده ۰/۷۵ تا ۲/۵ میلی لیتر)، مدت زمان ورتکس (در محدوده ۱ تا ۶ دقیقه)، نوع (هگزان، تولوئن و اکتانول) و حجم حلال استخراج کننده (در محدوده ۸۰ تا ۱۳۰ میکرولیتر) در مرحله میکرواستخراج مایع-مایع پخشی و نیروی یونی (با افزودن نمک سدیم کلرید در محدوده ۰ تا ۱۰ درصد وزنی/حجمی) مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه، آنالیت‌های استخراج شده با کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی آنالیز شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که جاذب‌های اتیلن دی‌آمین-نرمال پروپیل، سیلیکا پوشش یافته با زیرکونیوم دی‌اکسید و ماتریس حذف کننده ترфіع یافته لیپید با نسبت درصدهای وزنی ۲۵:۵۰:۲۵ و مقدار ۱۵۰ میلی گرم و حلال اتکتیک کولین کلرید: اتیلن گلیکول با حجم ۱/۵ میلی لیتر و زمان ورتکس ۳ دقیقه و تولوئن به مقدار ۸۰ میکرولیتر به عنوان حلال استخراج کننده بالاترین کارایی استخراج را نشان داد. **نتیجه‌گیری:** تحت شرایط بهینه، حدود تشخیص و اندازه‌گیری به ترتیب در محدوده‌های ۰/۴۲-۰/۲۹ و ۰/۹۷-۱/۴۰ نانوگرم بر گرم و راندمان استخراج در محدوده ۶۹-۸۵٪ نشان دهنده کارایی بالای روش ارائه شده می‌باشند. با توجه به نتایج، در تعدادی از نمونه‌ها آفت‌کش اندوسولفان (در ۲ نمونه از ۲۹ نمونه آزمایش شده) یافت شد.

واژه‌های کلیدی: آفت‌کش‌های ارگانوفسفره کچرز، روغن کانولا، کروماتوگرافی گازی، میکرواستخراج مایع - مایع پخشی

مقدمه

رشد روزافزون جمعیت و به دنبال آن کمبود منابع غذایی، متولیان تغذیه در کشورهای مختلف را مجبور کرده است که به دنبال روش‌هایی برای افزایش میزان تولید، بهبود کیفیت ظاهری و بالا بردن ارزش غذایی محصولات تولیدی باشند. به طور کلی، وجود آفات در محصولات کشاورزی به عنوان معضلی بزرگ در کشورهای مختلف شناخته شده و مبارزه با آنها ضروری است. مبارزه شیمیایی با استفاده از آفت‌کش‌ها قدیمی‌ترین و شناخته شده‌ترین روش برای مبارزه با آفات و بیماری‌های گیاهی است (Poulsen *et al.*, 2007). آفت‌کش‌ها مواد سمی سنتزی یا طبیعی می‌باشند که اکثراً سرطان‌زا و جهش‌زا هستند که بیش‌تر آن‌ها دارای پایداری بالایی در محیط می‌باشند بنابراین سال‌ها در خاک‌های کشاورزی و بافت‌های گیاهی باقی می‌مانند (Belmonte *et al.*, 2005). استفاده گسترده از آفت‌کش‌ها در امور کشاورزی و عدم توجه به مسأله‌ی زیست محیطی علاوه بر آلودگی محیط زیست، سبب ورود آن‌ها به طرق مختلف به آب، جو و خاک شده و از این طریق وارد زنجیره غذایی می‌شود. مصرف محصولات مختلف کشاورزی به مرور زمان به دلیل تغلیظ آفت‌کش‌ها در بدن انسان، باعث ایجاد آسیب‌های بزرگی بر سلامت انسان می‌شود.

آفت‌کش‌های ارگانوفسفره (Organophosphorus pesticides)، دسته‌ای از آفت‌کش‌های آلی می‌باشند که در سال‌های ۱۹۴۵ تا ۱۹۵۵ وارد بازار شدند. با توجه به اینکه، این سموم خاصیت سیستماتیک داشته و توسط ریشه و برگ گیاه جذب شده و به سرتاسر گیاه منتقل می‌شوند، به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند (Khodadadi *et al.*, 2010). این آفت‌کش‌ها از عملکرد آنزیم استیل‌کولین‌استراز (استیل‌کولین در حضور این آنزیم به کولین و اسات تبدیل می‌گردد) و انتقال پیام‌های جمعی جلوگیری کرده و منجر به مرگ آفت می‌شود. عوارض کوتاه مدت مانند درد در ناحیه شکمی، سرگیجه، سردرد، دوبینی، حالت تهوع، مشکلات چشمی و پوستی و عوارض دراز مدت مانند مشکلات تنفسی، اختلالات حافظه، افسردگی، نواقص عصبی، سرطان و عقیمی از جمله مشکلات حضور

توسعه روش استخراج کپرز ترکیب شده با میکرواستخراج مایع - مایع پخشی و کروماتوگرافی گازی به منظور اندازه‌گیری آفت‌کش‌ها

آفت‌کش‌ها در بدن انسان به شمار می‌روند. بنابراین اندازه‌گیری و پایش میزان باقیمانده آفت‌کش‌ها در مواد غذایی مختلف مانند روغن‌های گیاهی خوراکی مانند روغن کانولا (یک روغن که از خرد کردن دانه‌های گیاه کلزا به دست می‌آید) که در طول کشت و فراوری می‌توانند توسط آلاینده‌های شیمیایی آلوده شوند بسیار حائز اهمیت است (Cha *et al.*, 2016).

در اکثر موارد از کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی (GC-MS)^۱ برای آنالیز آفت‌کش‌های ارگانوفسفره تری‌آزینی در نمونه‌های روغن استفاده می‌شود (Su *et al.*, 2011). علیرغم حساسیت بالای این دستگاه، متأسفانه آنالیز مستقیم آفت‌کش‌ها بدون استفاده از روش‌های آماده‌سازی به دلیل پیچیدگی ماتریکس نمونه‌های روغن و مقادیر غلظتی پایین در آن‌ها امکان‌پذیر نیست (Garcés-García *et al.*, 2006). با توجه به این نکات، توسعه و استفاده از روش‌های آماده‌سازی کارا قبل از آنالیز نمونه‌ها از اهمیت فراوانی برخوردار است. از جمله روش‌های آماده‌سازی نمونه کارآمد می‌توان به روش کپرز (QuEChERS)^۲ یا اشاره کرد (Mao *et al.*, 2019). اساس این روش، استخراج آنالیت‌ها از نمونه با استفاده از حلالی مانند استونیتریل و انجام خالص‌سازی با به‌کارگیری استخراج فاز جامد پخش شده و با استفاده از جاذب‌هایی مانند آمین‌های اولیه و ثانویه و کربن سیاه گرافیتی است. علی‌رغم اینکه این روش ساده و آسان بوده و قابلیت استخراج آنالیت‌ها به صورت مستقیم از بافت نمونه‌های حقیقی را دارد ولی عدم امکان تغلیظ و دستیابی به آنالیزهای حساس از معایب این روش می‌باشد (González-Curbelo *et al.*, 2015). از این رو در سال‌های اخیر تلفیق این روش با روش‌های میکرواستخراج به ویژه میکرواستخراج مایع - مایع پخشی (DLLME)^۳ مورد توجه قرار گرفته است (Xie *et al.*, 2014).

هدف از این کار پژوهشی، ارائه روش آماده‌سازی جدید مبتنی بر ترکیب روش QuEChERS و DLLME برای استخراج برخی از آفت‌کش‌های ارگانوفسفره و تری‌آزینی از نمونه‌های مختلف روغن کانولا می‌باشد. آنالیت‌ها پس از استخراج با روش پیشنهادی با GC-MS آنالیز شدند.

¹ Gas Chromatography-Mass Spectrometry

³ Dispersive Liquid-Liquid Microextraction

² Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe

مواد و روش‌ها

- نمونه برداری و مواد شیمیایی

۳۰ نمونه روغن کانولا تولید شده در داخل از ۵ برند مختلف از سوپرمارکت‌های سطح شهر تبریز (استان آذربایجان شرقی، ایران) تهیه شدند. مراحل بهینه‌سازی یا اعتبارسنجی روش روی یک روغن کانولا که فاقد آنالیت بود انجام شد. عدم وجود آنالیت در نمونه اشاره شده با روش ارائه شده در منابع تأیید شد (Zahiri et al., 2020).

- مواد شیمیایی

استاندارد آفت‌کش‌های مورد مطالعه شامل پرمیکارب، دیازینون، متاسیستوکس، فوزالون، اندوسولفان و آترازین از شرکت سیگما (Sigma, USA) تهیه شدند. انواع مختلف جاذب‌ها شامل اتیلن دی آمین - نرمال پروپیل (PSA)^۱، سیلیکا پوشش یافته با زیرکونیوم دی اکسید (Z-Sep⁺) و ماتریس حذف کننده ترغیب یافته لیپید (EMR-lipid) نیز از شرکت سیگما تهیه شدند. سدیم کلرید، کولین کلرید (ChCl)^۲، اتیلن گلیکول (EG)^۳، استونیتریل، هگزان، تولوئن، اکتانول و فنول از شرکت مرک (Merck, Germany) خریداری شدند.

- شرایط آنالیز با GC-MS

به منظور افزایش قابلیت جداسازی سیستم کروماتوگرافی، پارامترهای دخیل در فرآیند جداسازی با دستگاه GC مورد بهینه‌سازی قرار گرفت. شرایط بهینه دستگاه برای آنالیز آفت‌کش‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ذکر گردیده است.

- سنتز حلال اتکتیک عمیق

جهت تهیه حلال‌های اتکتیک قابل امتزاج با آب، ChCl با EG و فنول با نسبت مولی ۲:۱ در دو لوله شیشه‌ای جداگانه مخلوط شدند. در ادامه لوله‌ها در حمام آب با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. لازم به ذکر است که در فواصل ۵ دقیقه لوله‌ها برداشته شده و پس از ورتکس به مدت دو دقیقه دوباره به حمام آب برگردانده می‌شوند. این چرخه سه بار تکرار گردید تا یک مایع شفاف و یکنواخت حاصل شود.

(Jouyban et al., 2019).

- بهینه‌سازی شرایط استخراج

در مرحله حاضر، از روش "یک پارامتر در یک زمان" برای بررسی پارامترهای موثر در فرایند استخراج استفاده شد. بدین منظور اثر پارامترهای مختلف مانند نوع (PSA، Z-Sep⁺ و EMR-lipid) و ترکیب جاذب، مقدار جاذب (در محدوده ۲۵ تا ۲۰۰ میلی گرم)، نوع (حلال‌های اتکتیک ChCl:EG و ChCl: فنول) و حجم حلال استخراج کننده (در محدوده ۰/۷۵ تا ۲/۵ میلی لیتر)، مدت زمان ورتکس (در محدوده ۱ تا ۶ دقیقه)، نوع (هگزان، تولوئن و اکتانول) و حجم حلال استخراج کننده (در محدوده ۸۰ تا ۱۳۰ میکرولیتر) در مرحله DLLME و نیروی یونی (با افزودن نمک سدیم کلرید در محدوده ۰ تا ۱۰ درصد وزنی/حجمی) مورد بررسی قرار گرفت.

- مشخصات تجزیه‌ای

جهت اعتبار سنجی روش ارائه شده، پس از رسم منحنی کالیبراسیون برای هر کدام از آنالیت‌ها، محدوده خطی روش (LR)^۴، حد تشخیص (LOD)^۵، حد اندازه‌گیری (LOQ)^۶، مجذور ضریب همبستگی، انحراف استاندارد نسبی (RSD%)^۷، راندمان استخراج (ER)^۸ و فاکتور تغلیظ (EF)^۹ بررسی و محاسبه شدند.

- روش استخراج

۳ گرم روغن کانولا آلوده شده با آفت‌کش‌های مورد مطالعه (به غلظت ۱۰ نانوگرم در گرم، هر آنالیت) به یک لوله آزمایش شیشه‌ای ۱۰ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از حلال اتکتیک ChCl:EG به محلول نمونه اضافه شده و مخلوط بدست آمده پس از اختلاط با ۱۵۰ میلی‌گرم جاذب (EMR-lipid) به مدت ۳ دقیقه ورتکس شد. در ادامه لوله به مدت ۵ دقیقه در داخل حمام آب یخ و سدیم کلرید قرار داده شد. با این عمل آنالیت‌ها به داخل حلال اتکتیک استخراج شده و جاذب در پایین لوله جمع شد. در ادامه کار، فاز رویی برداشته شده و پس از اختلاط با ۱۰۰ میکرولیتر تولوئن به داخل ۵ میلی لیتر آب

¹ Primary secondary amine

² Choline chloride

³ Ethylene glycol ⁴ Linear range

⁵ Limit of detection

⁶ Limit of quantitation ⁷ Relative standard deviation

⁸ Extraction recovery

⁹ Enrichment factor

توسعه روش استخراج کچرز ترکیب شده با میکرواستخراج مایع - مایع پخشی و کروماتوگرافی گازی به منظور اندازه‌گیری آفت‌کش‌ها

جدول ۱- شرایط بهینه دستگاه GC-MS

Table 1- Optimum conditions of GC-MS

Column	Type: DP-5-MS, Length: 30 m, id: 0.25 mm, Film thickness, 0.25 μ m
Injection port	Injection mode: Split-less/split, sampleing time: 1 min, Injection port temperature: 300 °C, Split ratio, 1:10
Carrier gas	Type, He (99.999%), Flow rate, 1 mL/min
Column oven temperature programming	80 °C (3 min), ramped to 300 °C at a rate of 20 °C/min, stopped at 300 °C for 5 min

آنالیت‌ها از سطح جاذب و قدرت پخش مناسب آنالیت‌ها در طی مرحله DLLME می‌باشد.

- حجم حلال شوینده/پخشی کننده

با توجه به نتایج بدست آمده در شکل ۴، با افزایش حجم حلال اتکتیک تا ۱/۵ میلی لیتر، راندمان استخراج آفت‌کش‌های مورد مطالعه افزایش یافته و بعد از آن با افزایش بیشتر حجم، کاهش می‌یابند. افزایش کارایی تا ۱/۵ میلی لیتر مربوط به پخش بهتر حلال استخراج کننده و افزایش سطح تماس مرتبط می‌باشد. این در حالی است که کاهش کارایی استخراج به کاهش قطبیت محلول آزمایشی در اثر افزایش حجم حلال پخش کننده و تمایل آنالیت‌ها به انحلال بیشتر مرتبط باشد. در نتیجه ۱/۵ میلی لیتر به عنوان حجم بهینه حلال استخراج کننده انتخاب شد.

- مدت زمان ورتکس

با توجه به نتایج، با افزایش مدت زمان ورتکس مخلوط نمونه، جاذب و حلال استخراج کننده تا ۳ دقیقه راندمان استخراج آفت‌کش‌های مورد مطالعه افزایش یافته و پس از آن ثابت می‌ماند. افزایش کارایی تا سه دقیقه می‌تواند مربوط به افزایش سطح تماس محلول آزمایشی با فاز استخراج کننده مربوط باشد. بنابراین ۳ دقیقه به عنوان مدت زمان بهینه برای مطالعات بعدی انتخاب شد.

- نوع حلال استخراج کننده در مرحله DLLME

همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، تولوئن کارایی استخراج بالاتری نسبت به سایر حلال‌های مورد استفاده داشته و به عنوان حلال بهینه برای انجام آزمایشات بعدی انتخاب شد. این امر احتمالاً به محلولیت زیاد آنالیت‌ها در داخل این حلال و پخش مناسب آن و افزایش سطح تماس با آنالیت‌ها مربوط باشد.

دیونیزه قرار گرفته در بدنه سرنگ شیشه‌ای پیستون دار تزریق شد. با فشار دادن پیستون، تولوئن حاوی آنالیت‌های استخراج شده در نوک سرنگ جمع آوری شده و ۱ میکرولیتر از آن جهت آنالیز کمی به GC-MS تزریق شد.

یافته‌ها

- نتایج بهینه‌سازی عوامل موثر در استخراج

- نوع جاذب

با توجه نتایج بدست آمده در شکل ۱، استفاده از جاذب EMR-lipid منجر به راندمان‌های بالایی می‌شود. برهمکنش‌های مناسب آنالیت‌ها با جاذب EMR-lipid و حذف موثر تداخلات ماتریس منجر به کارایی مناسب آن جاذب گردد. در نتیجه در مطالعات بعدی از EMR-lipid استفاده شد.

- مقدار جاذب

همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است، راندمان استخراج آفت‌کش‌های مورد مطالعه تا ۱۵۰ میلی گرم بیشترین افزایش یافته و پس از آن ثابت می‌ماند. افزایش کارایی روش می‌تواند به افزایش سایت‌های جذبی در دسترس برای جذب آنالیت‌ها می‌باشد. از این رو ۱۵۰ میلی گرم به عنوان مقدار بهینه انتخاب و در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت.

- نوع حلال شوینده/پخشی کننده

نتایج بدست آمده در شکل ۳ نشان می‌دهد که حلال اتکتیک ChCl:EG قابلیت بالایی برای استخراج آفت‌کش‌های مورد مطالعه از نمونه‌های روغن داشته و به عنوان حلال استخراج کننده مناسب در مرحله QuEChERS برای مطالعات بعدی انتخاب شد. کارایی مناسب این حلال می‌تواند به توانایی موثر آن در واجدبی

- حجم حلال استخراج کننده

با انجام آزمایشات متعدد مشخص شد که افزایش حجم حلال استخراج کننده تاثیر چندانی در راندمان استخراج آنالیت‌های مورد مطالعه ندارد. این امر نشان دهنده کافی بودن استخراج آنالیت‌ها با این حجم از حلال می‌باشد. بنابراین، ۸۰ میکرولیتر به عنوان حجم بهینه انتخاب شد.

- اثر نمک

با توجه به نتایج بدست آمده در شکل ۶، اضافه نمودن نمک منجر به کاهش راندمان استخراج آفت‌کش‌های مورد مطالعه می‌شود. این امر مربوط به افزایش ویسکوزیته محلول و کاهش ضریب انتشار آنالیت‌ها و سرعت انتشار آن‌ها به فاز استخراج کننده مربوط می‌باشد. بنابراین مطالعات بعدی در غیاب نمک صورت گرفت.

- نتایج مشخصات تجزیه‌ای

مقادیر مجذور ضریب همبستگی (R^2) و محدوده خطی روش (LR) از رسم نمودار کالیبراسیون برای هر یک از آفت‌کش‌های مورد مطالعه بدست آمد. همچنین غلظت‌هایی که در آن‌ها نسبت سیگنال به نویز به ترتیب ۳

۱۰ می‌باشند به عنوان حد تشخیص (LOD) و حد اندازه‌گیری (LOQ) در نظر گرفته شدند. برای ارزیابی تکرارپذیری و دقت روش، از انحراف استاندارد نسبی (RSD%) استفاده شد. ارقام شایستگی روش معرفی شده در جدول ۲ اشاره شده است.

- بررسی اثر ماتریکس و آنالیز نمونه‌های حقیقی

در این مرحله، ۵ نمونه از ۲۹ نمونه روغن بررسی شده به طور تصادفی انتخاب شده و همراه با نمونه بلانک با غلظت‌های ۵ و ۲۵ نانوگرم در گرم از آفت‌کش‌های مورد مطالعه آلوده شدند. با توجه به نتایج در جدول ۳، مقادیر بازیابی‌های نسبی در محدوده ۸۸ تا ۹۹ درصد می‌باشند که نشان می‌دهد ماتریکس نمونه‌های بررسی شده تاثیر چندانی در کارایی روش پیشنهادی ندارند. در ادامه کار، به منظور بررسی غلظت باقیمانده آفت‌کش‌های مورد مطالعه در نمونه‌های روغن کانولا روش بهینه سازی شده بر روی این نمونه‌ها اجرا شده و سپس با GC-MS آنالیز شدند. با توجه به نتایج، آفت‌کش اندوسولفان در ۲ نمونه از ۲۹ نمونه بررسی شده در غلظت‌های ۵۸ و ۶۳ نانوگرم در گرم یافت شد.

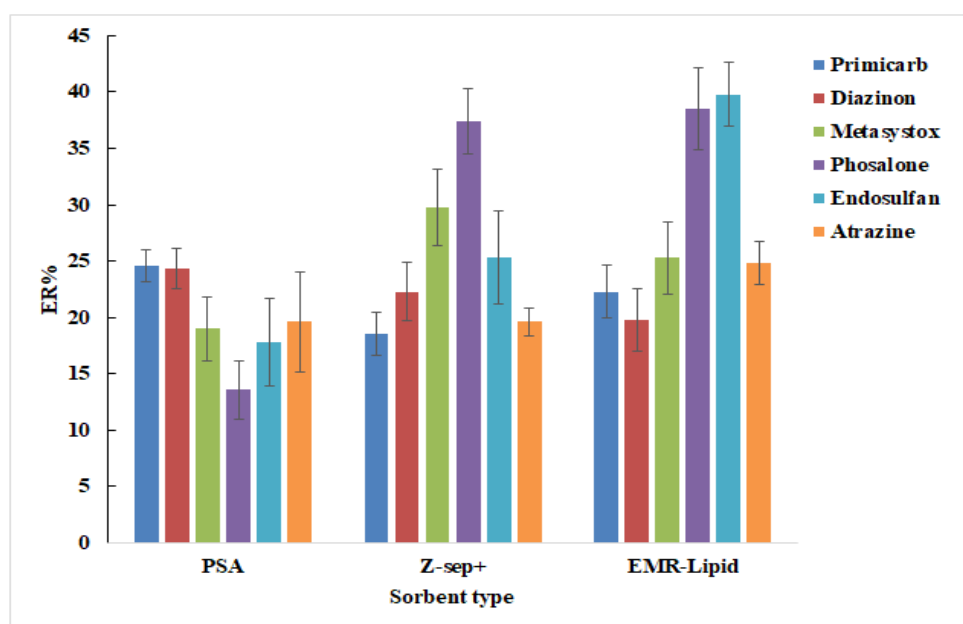


Figure 1- Selection of sorbent type

شکل ۱- انتخاب نوع جاذب

شرایط استخراج: ۳ گرم نمونه روغن کانولا بلانک حاوی ۱۰ نانوگرم در گرم نسبت به هر کدام از آفت‌کش‌ها، مقدار جاذب: ۱۵۰ میلی گرم؛ نوع حلال شوینده/پخش کننده (حجم): کولین کلرید؛ اتیلن گلیکول (۲ میلی لیتر)، زمان جذب، ۲ دقیقه؛ نوع (حجم) حلال استخراج کننده در مرحله DLLME: هگزان (۱۰۰ میکرولیتر).

توسعه روش استخراج کپرز ترکیب شده با میکرواستخراج مایع - مایع پخشی و کروماتوگرافی گازی به منظور اندازه گیری آفت کش ها

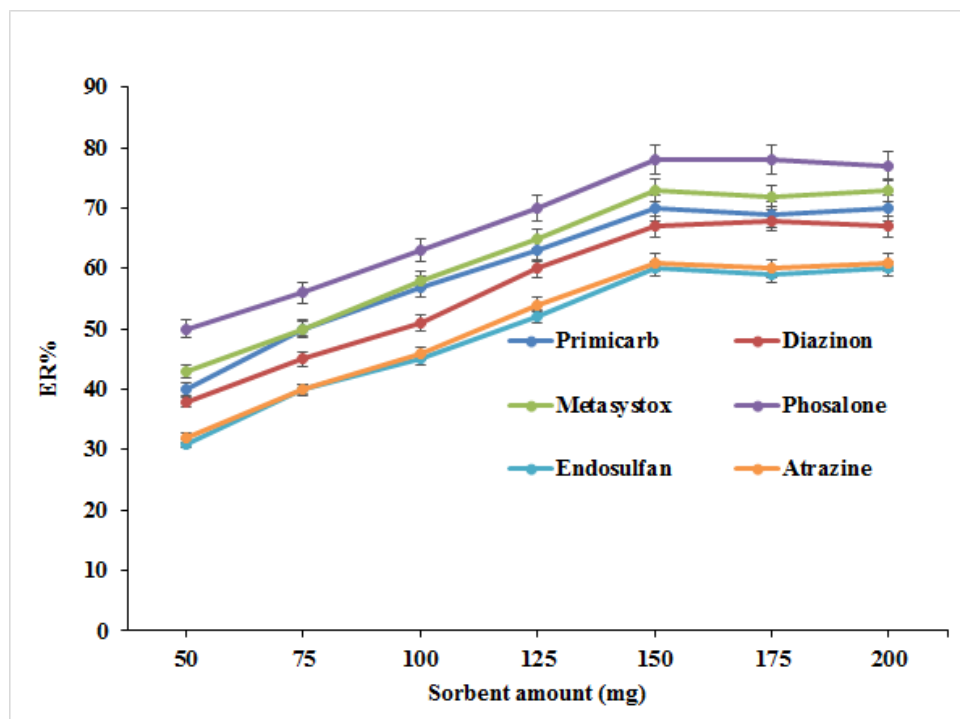


Figure 2- Optimization of sorbent amount.

شکل ۲- بهینه سازی مقدار جاذب

۳ گرم نمونه روغن کانولا بالانک حاوی ۱۰ نانوگرم در گرم نسبت به هر کدام از آفتکش ها، نوع جاذب، EMR-Lipid؛ نوع حلال شوینده/پخش کننده (حجم): کولین کلرید؛ اتیلن گلیکول (۲ میلی لیتر)، زمان جذب، ۲ دقیقه؛ نوع (حجم) حلال استخراج کننده در مرحله DLLME: هگزان (۱۰۰ میکرولیتر).

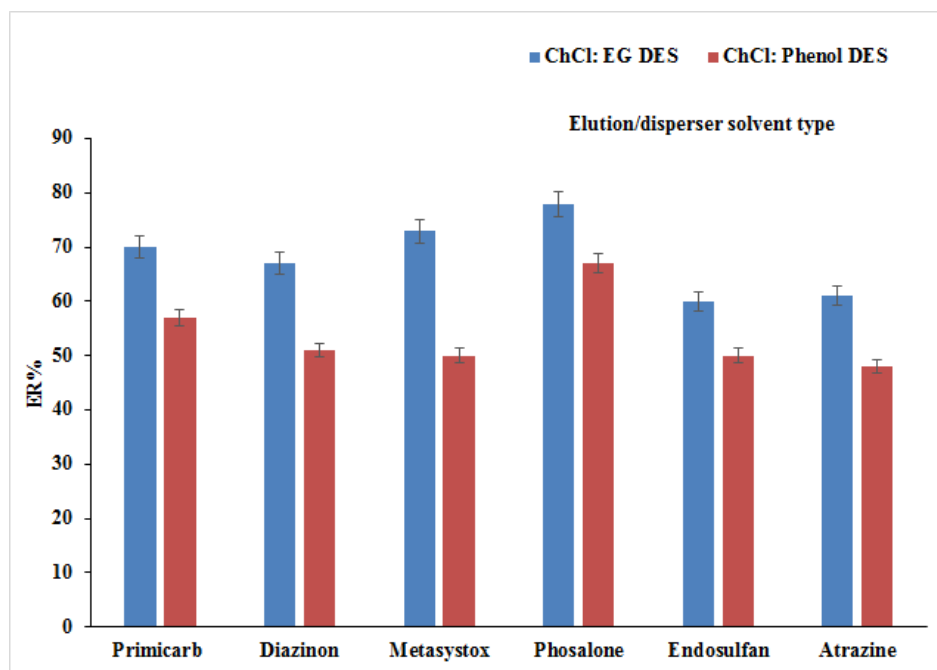


Figure 3- Selection of extraction/disperser solvent type

شکل ۳- انتخاب نوع حلال استخراج کننده/پخش کننده

شرایط استخراج: ۳ گرم نمونه روغن کانولا بالانک حاوی ۱۰ نانوگرم در گرم نسبت به هر کدام از آفتکش ها، نوع جاذب، EMR-lipid، مقدار جاذب: ۱۵۰ میلی گرم؛ حجم حلال شوینده/پخش کننده: ۲ میلی لیتر، زمان جذب، ۲ دقیقه؛ نوع (حجم) حلال استخراج کننده در مرحله DLLME: هگزان (۱۰۰ میکرولیتر).

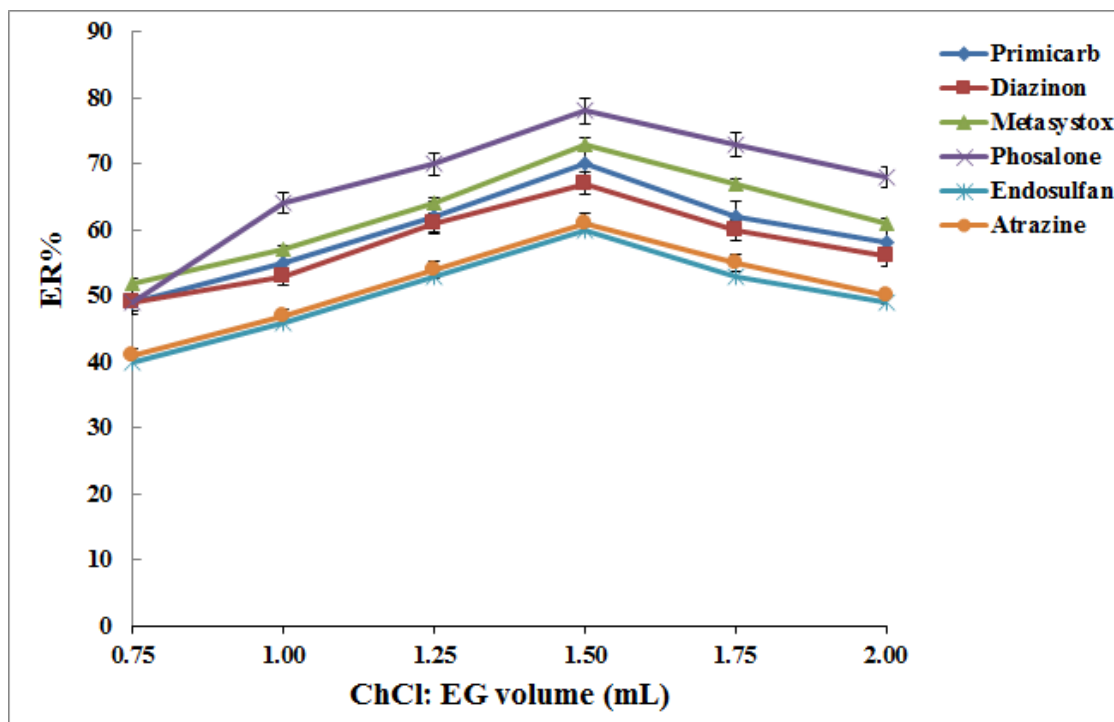


Figure 4- Optimization of elution/disperser solvent volume

شکل ۴- بهینه سازی حجم حلال شوینده/پخش کننده

شرایط استخراج: ۳ گرم نمونه روغن کانولا بلانک حاوی ۱۰ نانوگرم در گرم نسبت به هر کدام از آفتکش ها، نوع جاذب، EMR-lipid، مقدار جاذب: ۱۵۰ میلی گرم؛ نوع حلال شوینده/پخش کننده: ChCl:EG، زمان جذب، ۲ دقیقه؛ نوع (حجم) حلال استخراج کننده در مرحله DLLME: هگزان (۱۰۰ میکرولیتر).

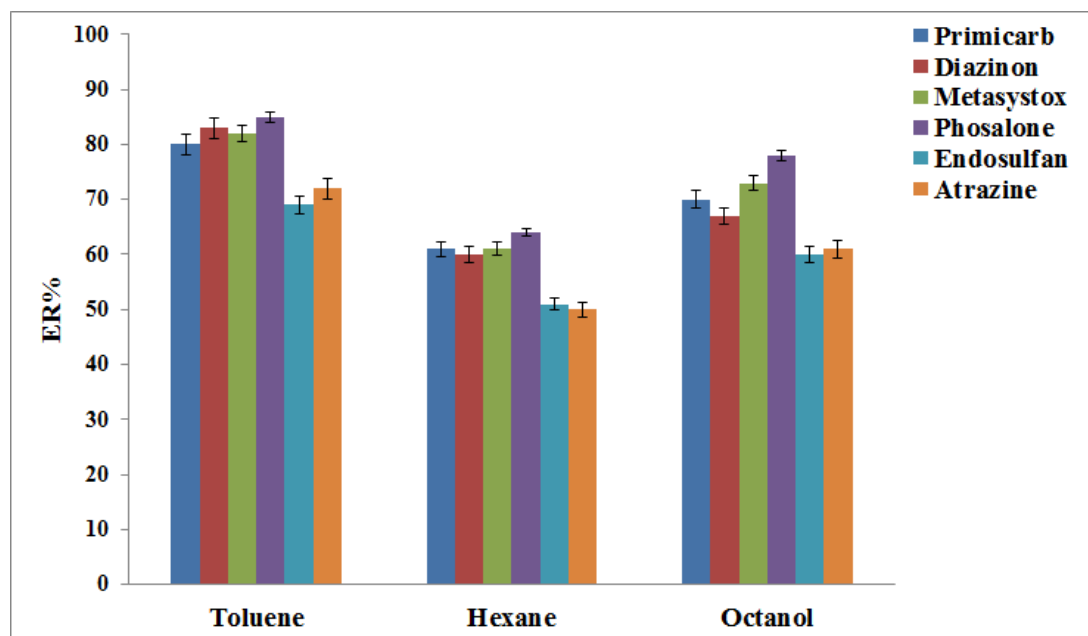


Figure 5- Selection of extraction solvent in DLLME step

شکل ۵- انتخاب حلال استخراج کننده در مرحله DLLME

شرایط استخراج: ۳ گرم نمونه روغن کانولا بلانک حاوی ۱۰ نانوگرم در گرم نسبت به هر کدام از آفتکش ها، نوع جاذب، EMR-lipid، مقدار جاذب: ۱۵۰ میلی گرم؛ نوع (حجم) حلال شوینده/پخش کننده: ChCl:EG (۲ میلی لیتر)، زمان جذب، ۲ دقیقه؛ حجم حلال استخراج کننده در مرحله DLLME: ۱۰۰ میکرولیتر.

توسعه روش استخراج کپرز ترکیب شده با میکرواستخراج مایع - مایع پخشی و کروماتوگرافی گازی به منظور اندازه گیری آفت کش ها

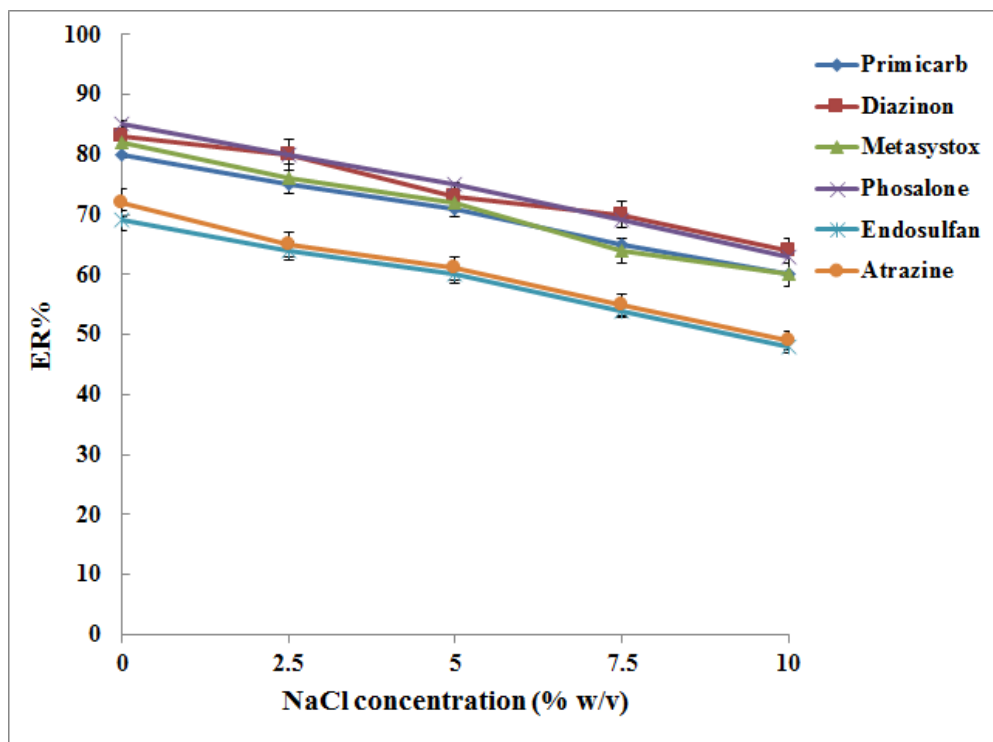


Figure 6- Salt addition effect

شکل ۶- تاثیر اثر نمک

شرایط استخراج: ۳ گرم نمونه روغن کانولا بلانک حاوی ۱۰ نانوگرم در گرم نسبت به هر کدام از آفت کش ها، نوع جاذب، EMR-lipid، مقدار جاذب: ۱۵۰ میلی گرم؛ نوع (حجم) حلال شوینده/پخش کننده: ChCl:EG (۲ میلی لیتر)، زمان جذب، ۲ دقیقه؛ نوع (حجم) حلال استخراج کننده) در مرحله DLLME: ۱۰۰:۱ (تولون (میکرولیتر)).

جدول ۲- ارقام شایستگی بدست آمده با روش پیشنهادی

Table 2- Figure of merits of the developed method

Analyte	LR (ng/g)	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	r ²	RSD (%, n=6)	ER ± SD (n=3)
Pirimicarb	1.33-500	0.40	1.33	0.998	4.5	80 ± 2
Diazinon	1.07-500	0.32	1.07	0.992	5.3	83 ± 3
Metasystox	1.20-500	0.36	1.20	0.994	4.5	82 ± 3
Phosalone	0.97-500	0.29	0.97	0.995	4.3	85 ± 4
Endosulfan	0.32-500	0.32	1.07	0.994	4.2	69 ± 4
Atrazine	0.42-500	0.42	1.40	0.996	5.1	72 ± 2

جدول ۳- بررسی اثر ماتریکس

Table 3- Matrix effect

Analyte	Canola #1	Canola #2	Canola #3	Canola #4	Canola #5
All samples spiked with the analytes at a concentration of 5 ng/g.					
Pirimicarb	99 ± 4	97 ± 3	90 ± 2	93 ± 3	94 ± 1
Diazinon	88 ± 1	90 ± 3	92 ± 4	90 ± 4	96 ± 2
Metasystox	96 ± 3	97 ± 4	94 ± 3	97 ± 2	98 ± 4
Phosalone	98 ± 4	95 ± 4	89 ± 2	93 ± 2	96 ± 3
Endosulfan	95 ± 2	95 ± 4	93 ± 2	95 ± 4	92 ± 4
Atrazine	90 ± 1	99 ± 3	95 ± 4	92 ± 2	94 ± 2
All samples spiked with the analytes at a concentration of 25 ng/g.					
Pirimicarb	99 ± 1	95 ± 2	92 ± 1	95 ± 4	97 ± 4
Diazinon	91 ± 3	93 ± 3	94 ± 2	94 ± 2	96 ± 3
Metasystox	98 ± 2	99 ± 5	98 ± 4	99 ± 3	99 ± 5
Phosalone	99 ± 4	98 ± 4	93 ± 2	96 ± 3	98 ± 2
Endosulfan	96 ± 2	93 ± 2	96 ± 4	98 ± 2	95 ± 2
Atrazine	92 ± 3	97 ± 3	97 ± 3	95 ± 3	97 ± 3

بحث

در این کار پژوهشی، از روش QuEChERS ترکیب شده با DLLME به منظور استخراج آفت‌کش‌های مورد مطالعه از نمونه‌های مختلف روغن کانولا قبل از آنالیز آنها با GC-MS استفاده شد.

نوع جاذب مورد استفاده در روش QuEChERS می‌تواند میزان حذف مزاحمت‌های ترکیبات بافت نمونه و در نتیجه راندمان استخراج روش پیشنهادی را تحت تاثیر قرار دهد (Perestrelo *et al.*, 2019). به طور کلی هر کدام از جاذب‌ها در روش QuEChERS تنها می‌توانند دسته‌ای از مزاحمت‌ها را کاهش داده یا حذف نمایند. بنابراین انتخاب جاذب صحیح و مناسب در این روش بسیار ضروری است.

مقدار جاذب استفاده شده و به تبع آن نسبت فاز جامد جاذب به حجم محلول نمونه می‌تواند راندمان استخراج را تحت تاثیر قرار دهد. در مقادیر کم از جامد نسبت فاز کم بوده و حذف مزاحمت‌ها و راندمان استخراج پایین می‌باشد ولی با افزایش مقدار جاذب نسبت فازها افزایش یافته و راندمان استخراج افزایش می‌یابد (Zhang *et al.*, 2019). از این رو مقدار جاذب باید بهینه گردد.

در روش ارائه شده، حلال استخراج کننده مورد استفاده برای استخراج آنالیت‌های مورد مطالعه از بافت نمونه در مرحله‌ی QuEChERS به عنوان حلال پخش کننده در مرحله‌ی DLLME استفاده می‌شود. با در نظر گرفتن این موضوع، حلال انتخابی باید دارای ویژگی‌هایی زیر مانند قابل امتزاج بودن با فاز آبی و حلال استخراج کننده استفاده شده در DLLME، سمیت پایین ویسکوزیته پایین باشد (Ma *et al.*, 2020). با در نظر گرفتن این ویژگی‌ها، دو نوع حلال اتکتیک عمیق که به طور کلی به عنوان حلال‌های سبز شناخته می‌شوند سنتز شده و مورد استفاده قرار گرفتند.

حجم حلال استخراج کننده/ پخش کننده پارامتر مهم دیگری است که می‌تواند راندمان استخراج آنالیت‌های مورد نظر را تحت تاثیر قرار دهد. به طور کلی با افزایش حجم استخراج کننده/ پخش کننده تا یک حجم معین، اکثر سیگنال‌های تجزیه‌ای افزایش یافته و سپس با افزایش بیشتر حجم حلال استخراج/ پخش کننده، کاهش می‌یابد (Szarka *et al.*, 2020). در واقع این مسئله به این

واقعیت می‌تواند نسبت داده شود که در حجم‌های کم از حلال استخراج آنالیت‌ها از بافت نمونه کامل نبوده یا حالت ابری شکل به خوبی در مرحله‌ی DLLME تشکیل نمی‌شود که این مسئله منجر به سیگنال‌های پایین می‌شود. در حالی که در حجم‌های بالای حلال علی‌رغم استخراج با راندمان بالا، قطبیت فاز آبی کاهش یافته و محلولیت آنالیت‌ها در فاز آبی در مرحله‌ی DLLME افزایش می‌یابد که این امر منجر به کاهش سیگنال‌های تجزیه‌ای می‌شود. بنابراین حجم حلال استخراج کننده/ پخش کننده نیاز به بهینه سازی دارد.

مدت زمان ورتکس مخلوط نمونه، جاذب و حلال استخراج کننده می‌تواند سطح تماس بین جاذب و حلال استخراج کننده را تحت تاثیر قرار داده و در نتیجه میزان حذف مزاحمت‌های بافت نمونه و همچنین استخراج آنالیت‌ها به داخل حلال استخراج کننده را تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین بهینه سازی مدت زمان ورتکس باید مد نظر قرار گیرد.

انتخاب حلال استخراج کننده‌ی مناسب یکی از پارامترهای مهم برای داشتن روش DLLME کارا می‌باشد (Han *et al.*, 2010). در روش‌های مبتنی بر DLLME، حلال استخراج کننده باید دارای ویژگی‌هایی مانند قابلیت بالای استخراج آنالیت‌ها، سمیت پایین، چگالی بالا نسبت به آب و رفتار کروماتوگرافیکی مناسب برخوردار باشد (عدم تداخل با پیک‌های آنالیت‌های هدف و سازگار با سیستم کروماتوگرافی).

در طول فرآیند DLLME، حجم حلال استخراج کننده عامل مهمی است که می‌تواند عملکرد استخراج را به وسیله‌ی تغییر نسبت حجم فازها، تحت تاثیر قرار دهد (Galuch *et al.*, 2019). لازم به ذکر است که حجم‌های کم حلال استخراج کننده باعث افزایش فاکتورهای تغلیظ و سیگنال‌های تجزیه‌ای به وسیله‌ی کاهش حجم فاز زبری جمع شده می‌شوند. بنابراین در روش ارائه شده، حجم حلال استخراج کننده در مرحله DLLME نیاز به بهینه سازی دارد.

تغییر نیروی یونی محلول نمونه با افزودن نمک یکی از راه‌های افزایش بازده استخراج در روش‌های تجزیه‌ای است. افزودن نمک دو اثر دارد: (۱) افزودن نمک می‌تواند باعث کاهش حلالیت آنالیت‌ها در فاز آبی شده و در نتیجه

توسعه روش استخراج کپچرز ترکیب شده با میکرواستخراج مایع - مایع پخشی و کروماتوگرافی گازی به منظور اندازه‌گیری آفت‌کش‌ها

phytosterols present in animal-based butter and oil samples. *Journal of Chromatography A*, 1642, 462025. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462025>.

Galuch, M.B., Magon, T.F.S., Silveira, R., Nicácio, A.E., Pizzo, J.S., Bonafe, E.G., Maldaner, L., Santos, O.O. & Visentainer, J.V. (2019). Determination of acrylamide in brewed coffee by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Food Chemistry*, 282, 120-126. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.114>

Garcés-García, M., Brun, E.M., Puchades, R. & Maquieira, Á. (2006). Immunochemical determination of four organophosphorus insecticide residues in olive oil using a rapid extraction process. *Analytica Chimica Acta*, 556, 347-354. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.046>

González-Curbelo, M.Á., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A.V., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J. & Rodríguez-Delgado, M.Á. (2015). Evolution and applications of the QuEChERS method. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 169-185. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.012>

Han, Y., Jia, X., Liu, X., Duan, T. & Chen, H. (2010). DLLME combined with GC-MS for the determination of methylparaben, ethylparaben, propylparaben and butylparaben in beverage samples. *Chromatographia*, 72, 351-355. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1646-2>.

Jouyban, A., Farajzadeh, M.A. & Afshar Mogaddam, M.R. (2019). Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of deep eutectic solvent droplets for analysis of pesticides in farmer urine and plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1124, 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.06.004>

Khodadadi, M., Samadi, M. T., Rahmani, A. R., Maleki, R., Resani, A. A. & Shahidi, R. (2010). Determination of organophosphorous and carbamate pesticides residue in drinking water resources of Hamadan in 2007. *International Journal of Environmental Research*, 2, 250-257.

Ma, L., Wang, Y., Li, H., Peng, F., Qiu, B. & Yang, Z. (2020). Development of QuEChERS-DLLME method for

سبب افزایش انتقال آن‌ها به داخل حلال استخراج کننده و افزایش راندمان استخراج گردد، (۲) افزایش نمک ویسکوزیته‌ی محلول آبی را افزایش داده و با کاهش ضریب انتشار آنالیت‌های مورد نظر می‌تواند تاثیر منفی بر روی کارایی استخراج داشته باشد. بنابراین اثر افزودن نمک در روش ارائه شده نیاز به بهینه سازی دارد.

نتیجه‌گیری

در کار پژوهشی حاضر، یک روش آماده‌سازی کارآمد مبتنی بر تلفیق روش QuEChERS با DLLME به منظور استخراج و اندازه‌گیری تعدادی از آفتکش‌های پرکاربرد از ماتریس نمونه‌های روغن کانولا قبل از اندازه‌گیری آن‌ها با روش GC-MS توسعه داده شد. در این راستا، ابتدا به سطح یک جاذب کارا و تجاری جذب شده و پس از واجدبی آن‌ها با حلال اتکتیک عمیق قابل اختلاط با آب به داخل چند میکرولیتر حلال سبکتر از آب منتقل و تغلیظ شدند. در این روش نیازی به استفاده از حلال‌های سمی هالوژن دار نبوده و تداخل سایر گونه‌ها بر کارایی روش بسیار ناچیز می‌باشد. جاذب مورد استفاده در این روش سنتزی نبوده و نیازی به مراحل وقتگیر سنتز نمی‌باشد. راندمان استخراج بالا، حدود تشخیص و اندازه‌گیری پایین و تکرار پذیری مناسب از سایر مزیت‌های این روش می‌باشد.

منابع

Belmonte Vega, A., Garrido Frenich, A. & Martínez Vidal, J. L. (2005). Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta*, 538, 117-127. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.02.003>

Cha, K. M., Lee, E. S., Kim, I. W., Cho, H.K., Ryu, J.H. & Kim, S.K. (2016). Canola oil is an excellent vehicle for eliminating pesticide residues in aqueous ginseng extract. *Journal of Ginseng Research*, 40, 292-299. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2015.09.007>.

Ebadnezhad, H., Afshar Mogaddam, M.R., Farajzadeh, M. A., Mohebbi, A., Nemati, M. & Torbati, M. (2021). Combining a liquid-liquid extraction with successive air assisted liquid-liquid microextraction for the analysis of

determination of neonicotinoid pesticide residues in grains by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 331, 127190. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127190>

Mao, X., Yan, A., Wan, Y., Luo, D. & Yang, H. (2019). Dispersive solid-phase extraction using microporous sorbent UiO-66 coupled to gas chromatography-tandem mass spectrometry: a QuEChERS-type method for the determination of organophosphorus pesticide residues in edible vegetable oils without matrix interference. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 1760-1770. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04980>

Perestrelo, R., Silva, P., Porto-Figueira, P., Pereira, J.A., Silva, C., Medina, S. & Câmara, J.S. (2019). QuEChERS-Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Analytica Chimica Acta*, 1070, 1-28. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.036>

Poulsen, M.E., Hansen, H.K., Sloth, J.J., Christensen, H.B. & Andersen, J.H. (2007). Survey of pesticide residues in table grapes: Determination of processing factors, intake and risk assessment. *Food Additives & Contaminants*, 24, 886-895. <https://doi.org/10.1080/02652030701245320>

Su, R., Xu, X., Wang, X., Li, D., Li, X., Zhang, H. & Yu, A. (2011). Determination of organophosphorus pesticides in peanut oil by dispersive solid phase extraction gas chromatography-mass spectrometry. *Journal*

of Chromatography B, 879, 3423-3428. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.09.016>

Szarka, A., Búčiková, K., Kostić, I. & Hrouzková, S. (2020). Development of a multiresidue QuEChERS-DLLME-fast GC-MS method for determination of selected pesticides in yogurt samples. *Food Analytical Methods*, 13, 1829-1841. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01809-0>

Xie, Q., Liu, S., Fan, Y., Sun, J. & Zhang, X. (2014). Determination of phthalate esters in edible oils by use of QuEChERS coupled with ionic-liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction before high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 4563-4569. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7814-8>

Zahiri, E., Khandaghi, J., Farajzadeh, M.A. & Afshar Mogaddam, M.R. (2020). 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. *Journal of Chromatography A*, 1627, 461390. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461390>

Zhang, C., Deng, Y., Zheng, J., Zhang, Y., Yang, L., Liao, C., Su, L., Zhou, Y., Gong, D., Chen, L. & Luo, A. (2019). The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review. *Trends in Analytical Chemistry*, 118, 517-537. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.012>

Development of QuEChERS Extraction Method Combined with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Gas Chromatography for the Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Canola Oil Samples

M. Arvanaghi^a, A. Javadi^{b C*}, M. R. Afshar Mogaddam^d

^a Department of Food Science and Technology, Mamaghan Branch, Islamic Azad University, Mamaghan, Iran.

^b Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

^c Health Promotion Research Center, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

^d Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Received: 25 February 2025

Accepted: 3 January 2026

Abstract

Introduction: Nowadays, pesticides are used to improve the quality and quantity of agricultural products. However, their excessive use leads to their accumulation in food and can threaten human health. The aim of this study is to present a new preparation method based on the combination of QuEChERS and DLLME methods for the extraction of some organophosphate and triazine pesticides from different canola oil samples.

Materials and Methods: For this purpose, the effect of various parameters such as type (PSA, Z-Sep+ and EMR-lipid) and composition of the adsorbent, amount of adsorbent (in the range of 25 to 200 mg), type (eutectic solvents ChCl:EG and ChCl:phenol) and volume of the extracting solvent (in the range of 0.75 to 2.5 ml), vortex time (in the range of 1 to 6 minutes), type (hexane, toluene and octanol) and volume of the extracting solvent (in the range of 80 to 130 µl) in the DLLME step and ionic strength (with the addition of sodium chloride salt in the range of 0 to 10% w/v) was investigated. Subsequently, the extracted analytes were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry.

Results: The results indicated that PSA, Z-Sep+ and EMR-lipid adsorbents with a weight percentage ratio of 25:50:25 and an amount of 150 mg and eutectic solvent ChCl:EG with a volume of 1.5 ml and a vortex time of 3 minutes and toluene in an amount of 80 µl as the extraction solvent showed the highest extraction efficiency.

Conclusion: Under optimal conditions, the detection and measurement limits were in the ranges of 0.29-0.42 and 0.97-1.40 ng/g, respectively, and the extraction efficiency was in the range of 85-69%, indicating the high efficiency of the presented method. According to the results, endosulfan pesticide was found in a number of samples (in 2 samples out of 29 samples tested).

Keywords: Canola Oil, DLLME, GC, Organophosphorus Pesticides QuEChERS.

* Corresponding Author: Javadi@iaut.ac.ir