

تلفیق روش کچرز با میکرواستخراج مایع - مایع پخشی مبتنی بر مایعات یونی مغناطیسی برای استخراج آفت‌کش‌های کارباماتی از نمونه‌های سیب و اندازه‌گیری آن‌ها با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

سجاد فرج‌پور^a، محمدرضا افشارمقدم^{b,c}، جلیل خندقی^{d,e*}

^a دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران

^b استادیار مرکز ایمنی غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^c استادیار مرکز آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^d استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران

^e استادیار گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۲/۰۷

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۰۲

DOI:10.30495/jftn.2023.72129.11241

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1402.20.3.1.3>

چکیده

مقدمه: امروزه استفاده از آفت‌کش‌ها به بخشی ضروری از فعالیتهای کشاورزی تبدیل شده است. در این بین کاربامات‌ها به علت طول عمر نسبتاً کوتاه، اثرگذاری قوی و طیف گسترده فعالیت‌های بیولوژیکی، کاربردهای گسترده‌ای به‌عنوان حشره‌کش دارند. به دلیل اینکه باقیمانده این ترکیبات در محصولات غذایی تهدید جدی برای سلامت مصرف‌کنندگان است، لزوم پایش باقیمانده‌های این آفت‌کش در مواد غذایی به‌خوبی احساس می‌شود.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر تلفیقی از روش کچرز و میکرواستخراج مایع-مایع پخشی برای استخراج آفت‌کش‌های آلدی‌کارب، کاربایل و پیریمی‌کارب از نمونه‌های سیب توسعه داده شده و اندازه‌گیری آن‌ها با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز ماورای بنفش انجام گرفت. برای این منظور تاثیر عوامل موثر در دو مرحله روش استخراج پیشنهادی بررسی و بهینه‌سازی شد. همچنین اعتبارسنجی روش توسعه داده شده با محاسبه ارقام شایستگی مانند محدوده خطی، حدود تشخیص و اندازه‌گیری، تکرارپذیری، فاکتور تغلیظ و راندمان استخراج ارزیابی گردید.

یافته‌ها: روش پیشنهادی از قابلیت بالایی در استخراج باقیمانده آفت‌کش‌های هدف از نمونه‌های سیب برخوردار بود به‌طوری‌که از محدوده خطی وسیعی برخوردار بوده (۲۰۰-۱۰/۷ نانوگرم در گرم) و تکرارپذیری روش بر اساس درصد انحراف استاندارد نسبی ۲/۶ تا ۴/۸ بود. تحت شرایط بهینه، کارایی روش پیشنهادی در استخراج آنالیت‌ها ۶۷-۷۵ درصد، فاکتور تغلیظ بیش از ۳۳۵ و حدود تشخیص و اندازه‌گیری به ترتیب کمتر از ۴/۲ و ۱۴ نانوگرم در گرم بدست آمدند که کمتر از حد مجاز باقیمانده تعیین شده برای این آفت‌کش‌ها در میوه و سبزیجات می‌باشد. همچنین روش مذکور به‌طور موفقیت‌آمیزی بر روی نمونه‌های حقیقی سیب انجام و نتایج نشان داد که هیچکدام از آفت‌کش‌های کارباماتی مورد نظر در نمونه‌های سیب مورد بررسی وجود ندارد.

نتیجه‌گیری: در مجموع روش توسعه داده شده از قابلیت لازم برای تشخیص آفت‌کش‌های کارباماتی در نمونه‌های سیب برخوردار است. از مزایای این روش می‌توان ساده و قابل اعتماد بودن، مصرف حلال‌های سبز و زمان آنالیز کوتاه را نام برد.

واژه‌های کلیدی: آفت‌کش‌های کارباماتی، کچرز، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، میکرواستخراج مایع - مایع پخشی

مقدمه

حفاظت از تولیدات کشاورزی در برابر نابودی آنها بر اثر آفات از اهمیت بسیاری برخوردار است چرا که سالانه چیزی در حدود ۴۶ درصد از محصولات کشاورزی در کل دنیا توسط آفات مختلف از بین می‌رود لذا استفاده از سموم مختلف به منظور حفاظت از محصولات کشاورزی در برابر آفات اجتناب ناپذیر است و در طول دهه‌های گذشته، آفت‌کش‌ها به بخشی ضروری از فعالیت‌های کشاورزی در سراسر جهان تبدیل شده‌اند (Baig *et al.*, 2009). قسمتی از این مواد در محصولات باقی می‌ماند به طوری که اغلب محصولاتی که در معرض آفت‌کش‌ها قرار گرفته‌اند حاوی مقادیری از باقیمانده آفت‌کش‌ها می‌باشند (Bhanti & Taneja, 2007). آفت‌کش‌ها عمدتاً با در نظر گرفتن ساختار و گروه‌های عملکردی آنها طبقه‌بندی می‌شوند (Tudi *et al.*, 2021) و عموماً از نظر فیزیوشیمیایی پایدار بوده و قادر به حضور طولانی مدت در اکوسیستم هستند (van der Hoff & van Zoonen, 1999). برخی از آفت‌کش‌ها مانند کاربامات‌ها به دلایلی مانند طول عمر نسبتاً کوتاه، اثرگذاری قوی و طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی، کاربردهای گسترده‌ای در برابر حشرات دارند (Msagati & Mamba, 2012). به دلیل سمیت کاربامات‌ها برای مصرف‌کنندگان (Dias *et al.*, 2015)، بالاترین حد باقیمانده یا MRLs (Maximum residue levels) این آفت‌کش در محصولات کشاورزی توسط بسیاری از سازمان‌های نظارتی و بهداشتی در محدوده ۰/۱ تا ۰/۲ میلی‌گرم در کیلوگرم تعیین شده است (EU Pesticides database, 2005).

با توجه به لزوم تشخیص مقادیر بسیار پایین آفت‌کش‌ها، طبیعتاً روش‌های با حساسیت بالا برای تعیین باقیمانده‌های این آنالیت‌ها در نمونه‌های غذایی مورد نیاز است. تکنیک‌های مبتنی بر کروماتوگرافی به دلیل ظرفیت جداسازی در حذف یا کاهش اثرات تداخلی، توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند و تا کنون کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا همراه با آشکارسازهای مختلفی مانند آرایه دیودی (Rastpour *et al.*, 2022)، آشکارساز نور مرئی/فرابنفش (Fakhim Rasoolzadeh *et al.*, 2020) و یا کروماتوگرافی گازی همراه با شناساگرهای اسپکترومتر جرمی (Sheikhzadeh *et al.*, 2020) و آشکارساز

نیترژن - فسفر (Limoei Khosrowshahi *et al.*, 2022) در شناسایی آفت‌کش‌های گوناگون استفاده شده‌اند. اگرچه این روش‌ها برای تعیین سموم به اندازه کافی حساس و قابل اطمینان هستند، عواملی مانند ماتریکس پیچیده و غلظت کم آنالیت‌ها مانع از استفاده مستقیم آنها در آنالیز نمونه می‌شود اغلب یک مرحله پیش تغلیظ و آماده‌سازی برای جداسازی اجتناب ناپذیر است (Mitra & Brukh, 2003). در بین این روش‌های آماده‌سازی روش کچرز (QuEChERS) موسوم به سریع، آسان، ارزان، موثر، سخت و ایمن (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) در آنالیز آفت‌کش‌ها مقبولیت زیادی پیدا کرده است و می‌تواند به طور مستقیم در نمونه‌های جامد یا نیمه جامد استفاده شود. با این حال، روش QuEChERS کلاسیک دارای معایبی از جمله فاکتور تغلیظ پایین در مقایسه با تکنیک‌های ریز استخراج دیگر و راندمان پایین در نمونه‌های جامد است (Lehotay *et al.*, 2003).

برای جبران این کمبودها، ترکیب روش QuEChERS با میکرواستخراج مایع - مایع پخشی یا DLLME (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) می‌تواند مشکل گشا باشد (Ahmadzadeh Anvar *et al.*, 2020). روش DLLME که اولین بار در سال ۲۰۰۶ معرفی شد آنالیت‌ها را با استفاده از یک سیستم سه فازی شامل یک محلول آبی، یک حلال آلی قابل اختلاط با آب و یک حلال آلی غیر قابل اختلاط آب استخراج می‌کند. در این روش حلال آلی قابل امتزاج با آب (حلال پخش‌کننده) حلال آلی غیر قابل امتزاج با آب (حلال استخراج‌کننده) را به صورت قطرات ریز در محلول آبی پخش کرده و این پراکندگی، سطح تماس بین محلول آبی و حلال استخراج را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد (Rezaee *et al.*, 2006). در سال‌های اخیر، توجه بیشتری به استفاده از مایعات یونی مغناطیسی یا MILs (Magnetic Ionic Liquids) و جایگزینی آنها با حلال‌های استخراج‌کننده آلی معطوف شده است (Daghi *et al.*, 2022; Gholizadeh *et al.*, 2022) که موجب سادگی روش استخراج و حذف مرحله سانتریفیوژ کردن برای جداسازی آنالیت می‌شود.

آهنربا جمع آوری شده و پس از جدا کردن فاز رویی، جهت آنالیز با HPLC-UV مورد استفاده قرار گرفت.

- بهینه‌سازی شرایط استخراج در مرحله کچرز

این کار با انتخاب حلال استخراج کننده از بین سه نوع حلال آلی مختلف شامل استونیتریل، دی متیل فرم‌آمید و تتراهیدروفوران و سه حلال اتکتیک عمیق شامل کولین کلرید: اوره، کولین کلرید: اتیلن گلیکول و کولین کلرید: استیک اسید و بررسی اثر حجم‌های مختلفی (۱/۵، ۲/۱۰، ۲/۵ و ۳ میلی‌لیتر) از حلال انتخاب شده و همچنین بهینه‌سازی تاثیر مدت زمان‌های متفاوت اعمال امواج مایکروویو شامل ۵ تا ۳۰ ثانیه با توان‌های مختلف (۱۰۰، ۱۸۰، ۳۶۰ و ۶۰۰ وات) به صورت جداگانه، انجام گرفت.

- بهینه‌سازی شرایط مرحله میکرواستخراج مایع - مایع پخشی

در کار پژوهشی حاضر از مایعات یونی مغناطیسی به عنوان حلال استخراج کننده استفاده شد که هم جزو حلال‌های سبز محسوب می‌شوند و هم به کمک آن‌ها مرحله سانتریفیوژ حذف می‌شود. حلال استخراج کننده در این مرحله از بین مایعات یونی مغناطیسی ۱- بوتیل ۳- متیل ایمیدازولیوم دی‌برومو دی‌کلرو فرات $[(C4MIM)[FeCl2Br2]]$ ، ۱- بوتیل ۳- متیل ایمیدازولیوم تترا کلرو فرات $[(C4MIM)[FeCl4]]$ و ۱- هگزیل ۳- متیل ایمیدازولیوم تترا کلرو فرات $[(C6MIM)[FeCl4]]$ و در حجم‌های مختلف (۶۵، ۷۰ و ۷۵ میکرولیتر) انتخاب شد. به‌علاوه برای بررسی اثر مقدار نمک‌زنی در کارایی استخراج در مرحله دوم، مقادیر مختلفی از سدیم کلرید (۰/۰، ۱/۰، ۲/۰ و ۳/۰ درصد وزنی/حجمی) به داخل آب سیب اضافه و روش پیشنهادی اجرا شد.

- بررسی مشخصات تجزیه‌ای روش

برای اعتبارسنجی روش توسعه داده شده، ابتدا نمودار معیارگیری با آنالیز محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم در گرم از آفت‌کش‌های کارباماتی با استفاده از روش پیشنهادی و تحت شرایط بهینه ترسیم شد. سپس ارقام شایستگی از قبیل حد تشخیص یا LOD (Limit of detection)، حد

در این کار پژوهشی از تلفیق روش کچرز با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی بر اساس مایعات یونی مغناطیسی به منظور استخراج آفت‌کش‌های آلدی‌کارب (Aldicarb)، کارباریل (Carbaryl) و پریمی‌کارب (Pirimicarb) از نمونه‌های سیب و سپس اندازه‌گیری آن‌ها با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز ماورای بنفش یا HPLC-UV استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌ها و محلول‌ها

در این کار پژوهشی، ۳۰ نمونه سیب تازه از باغات اطراف تبریز خریداری شده و همه نمونه‌ها با آب دیونیزه شسته شده و به قطعات کوچک خرد شده و در روش پیشنهادی در آزمایشگاه کنترل غذا و داروی مرکز تحقیقات ایمنی غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی تبریز آنالیز شدند. محلول مادر از آفت‌کش‌های کارباماتی آلدی‌کارب، کارباریل و پریمی‌کارب به‌صورت مخلوط به غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از هر کدام، با حل کردن ۰/۵ میلی‌گرم از هر یک از این ترکیبات در ۱۰ میلی‌لیتر استونیتریل تهیه شد.

- روش استخراج آفت‌کش‌ها

برای این منظور مقدار ۱۰ گرم نمونه سیب خرد شده به داخل یک لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و با یک میله شیشه‌ای له شد. سپس این مخلوط به مدت پنج دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی به‌دست آمده به داخل یک لوله دیگر منتقل و بر روی تفاله باقی‌مانده از مرحله قبل دو میلی‌لیتر حلال اتکتیک عمیق تشکیل شده از استیک اسید و کولین کلرید اضافه شد. پس از ۱۵ ثانیه مایکروویو کردن مخلوط با توان ۱۸۰ وات، این مخلوط به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شده و فاز رویی شامل حلال اتکتیک حاوی آفت‌کش‌های مورد مطالعه برداشته شد. این فاز با ۶۵ میکرولیتر حلال یونی مغناطیسی ۱- بوتیل ۳- متیل ایمیدازولیوم تتراکلوروفرات مخلوط شده و با یک سرنگ شیشه‌ای به داخل آب سیب رقیق شده (به نسبت ۱ به ۲) حاصل از مرحله قبل پخش شد. حلال پخش شده با یک

اسپایک شده با مقادیر متفاوت (۱۵ و ۵۰ نانوگرم در گرم از هر کدام از آنالیت‌ها) انجام و ۱۰ میکرولیتر از فاز آلی جمع شده توسط HPLC مورد آنالیز قرار گرفت. سپس کولین کلرید: استیک اسید خالص حاوی آنالیت‌ها با همان غلظت‌ها از آنالیت‌ها اسپایک شده و با روش مذکور مورد استخراج و آنالیز قرار گرفتند. با مقایسه سیگنال‌های تجزیه‌ای بدست آمده برای هر یک از نمونه‌های حقیقی و کولین کلرید: استیک اسید خالص، اثر ماتریکس ارزیابی شد.

یافته‌ها

- بهینه‌سازی مرحله استخراج کچرز - نوع حلال استخراج/ پخش کننده

نتایج بدست آمده (شکل ۱) نشان می‌دهد که در بین حلال‌های استفاده شده، حلال اتکتیک عمیق حاصل از کولین کلرید: استیک اسید قابلیت بیشتری در استخراج آنالیت‌های مذکور دارد که این امر می‌تواند مربوط به حلالیت بیشتر آنالیت‌ها در داخل این حلال و یا کارایی بهتر آن در پخش حلال استخراج کننده در مرحله DLLME مربوط باشد. از این رو این ترکیب به عنوان مناسب‌ترین حلال برای مراحل بعدی انتخاب گردید.

اندازه‌گیری یا LOQ (Limit of quantification)، تعیین محدوده خطی یا LR (Linear range)، تکرارپذیری در یک روز و در بین روزها براساس انحراف استاندارد نسبی یا RSD% (Relative standard deviation)، فاکتور تغلیظ یا EF (Enrichment factor) و راندمان استخراج یا ER (Extraction recovery) محاسبه شدند.

- شرایط بهینه HPLC

به منظور دستیابی به نتایج قابل اعتماد سیستم کروماتوگرافی، جداسازی آنالیت‌ها در شرایط بهینه و تحت شرایط دستگاه HPLC (Agilent, 1100 VWD System) به صورت زیر انجام گرفت.

- آنالیز نمونه‌های حقیقی

برای بررسی قابلیت روش توسعه داده شده در اندازه‌گیری آفت‌کش‌ها، اقدام به اندازه‌گیری آفت‌کش‌ها در نمونه‌های مختلف سیب شد. نمونه‌های سیب طبق شرایط بهینه با روش پیشنهادی تغلیظ و آماده‌سازی شدند و سپس با HPLC-DAD مورد آنالیز قرار گرفتند. با توجه به اینکه ماتریکس نمونه سیب ممکن است در اندازه‌گیری آفت‌کش‌ها تداخل ایجاد نماید، ابتدا استخراج روی هفت نمونه سیب

جدول ۱ - شرایط بهینه HPLC-DAD به منظور آنالیز حشره‌کش‌های کارباماتی در نمونه‌های سیب

Table 1- Optimized condition of the HPLC-DAD for analysis of carbamate insecticides in apple samples

Column	Zorbax SB-Aq C18 column, L=15 cm, ID= 4.6 mm, Particle size= 5 μm
Mobile phase	A gradient elution composed of methanol:water (35:56 (v/v)), 0.7 ml/min
Injector	Temperature: 40 °C, Loop= 10 μL
Detection wavelength	205 nm for Carbaryl, 223 nm for Pirimicarb, and 228 nm for Aldicarb

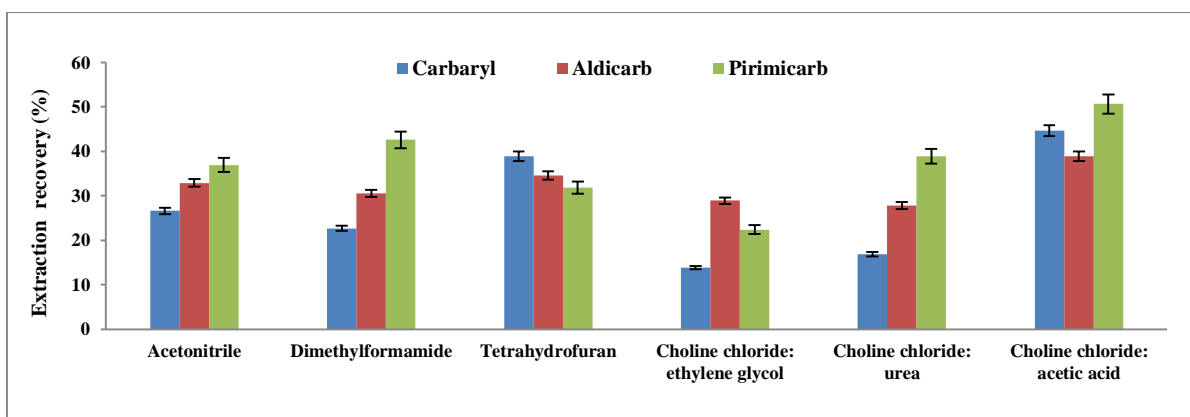


Figure 1- Selecting the type of extracting solvent in QuEChERS stage for the extraction of carbamate pesticide residues from apple samples.

شکل ۱ - انتخاب نوع حلال استخراج کننده در مرحله کچرز برای استخراج باقیمانده آفت‌کش‌های کارباماتی از نمونه‌های سیب.

یافته‌های این بخش (شکل ۳) نشان داد که با افزایش مدت زمان امواج مایکروویو تا ۱۰ ثانیه راندمان استخراج افزایش می‌یابد که می‌تواند مربوط به افزایش سطح تماس حلال استخراج کننده/پخش کننده با نمونه‌ی آزمایشی باشد. پس از این افزایش راندمان استخراج کاهش یافت. بنابراین ۱۰ ثانیه به عنوان مدت زمان بهینه برای قرار گرفتن در امواج مایکروویو انتخاب شد. همچنین مشاهده شد که با افزایش توان امواج مایکروویو، راندمان روش کاهش می‌یابد. لذا آزمایشات بعدی با توان ۱۰۰ وات صورت گرفت.

– حجم حلال استخراج/پخش کننده

در این کار پژوهشی، برای بررسی اثر حجم حلال استخراج/پخش کننده آزمایشاتی با حجم‌های مختلفی از کولین کلرید: استیک اسید انجام و مشاهده شد (شکل ۲) که با افزایش حجم حلال استخراج/پخش کننده تا ۲/۰ میلی‌لیتر، راندمان استخراج آنالیت‌ها افزایش و بعد از آن کاهش می‌یابد. حجم فاز جمع شده رویی در این شرایط حدود ۱/۰ میلی‌لیتر بود.

– بهینه‌سازی اثر امواج مایکروویو

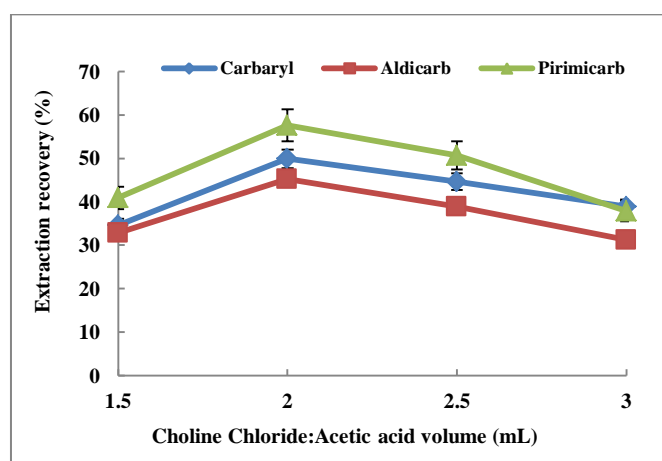


Figure 2- Selecting the volume of extracting solvent in QuEChERS stage for the extraction of carbamate pesticide residues from apple samples.

شکل ۲- انتخاب حجم حلال استخراج کننده در مرحله کچرز برای استخراج باقیمانده آفت‌کش‌های کارباماتی از نمونه‌های سیب.

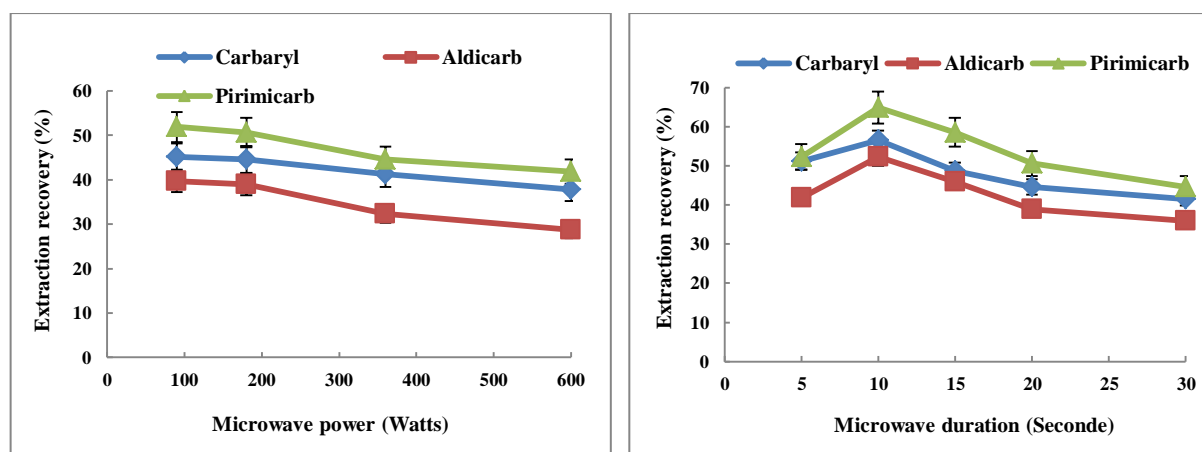


Figure 3- Optimization of the microwave effect in QuEChERS stage for the extraction of carbamate pesticide residues from apple samples.

شکل ۳- بهینه‌سازی اثر امواج مایکروویو در مرحله کچرز برای استخراج باقیمانده آفت‌کش‌های کارباماتی از نمونه‌های سیب.

تلفیق روش کچرز با میکرواستخراج مایع - مایع پخشی برای استخراج آفت کش های کارباماتی

حجم حلال استخراج کننده از دیگر پارامترهایی است که در روش میکرو استخراج مایع - مایع پخشی نیاز به بهینه سازی دارد. همانطور که در شکل ۵ دیده می شود با افزایش حجم مایع یونی تترابوتیل متیل ایمیدازولیوم تترا کلرو فرات راندمان استخراج آنالیت های مورد بررسی تغییر چندانی نمی کند. از این رو جهت صرفه جویی در حلال مصرفی ۶۵ میکرو لیتر از مایع یونی به عنوان حجم بهینه برای مراحل بعدی انتخاب شد.

- بهینه سازی شرایط استخراج مایع - مایع پخشی
- نوع حلال استخراج کننده
همانطور که در شکل ۴ دیده می شود در بین حلال های مورد بررسی در مرحله دوم استخراج، راندمان استخراج با مایع یونی تترابوتیل متیل ایمیدازولیوم تترا کلرو فرات بیشتر بوده و این حلال برای مراحل بعدی انتخاب شد.
- حجم حلال استخراج کننده

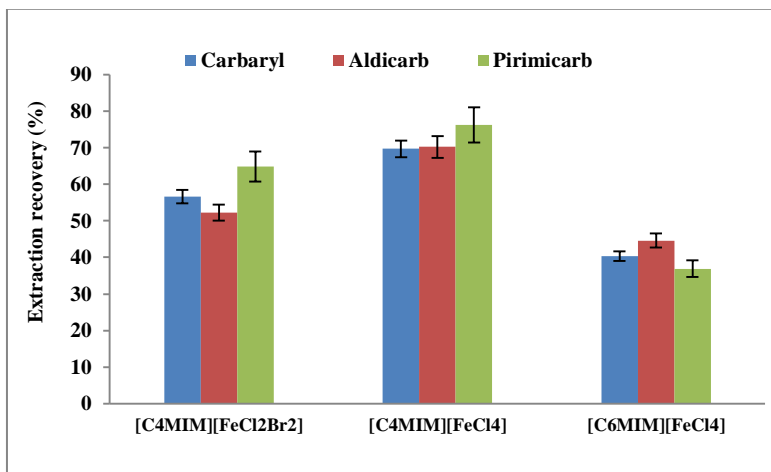


Figure 4- Selecting the type of solvent in DLLME stage for the extraction of carbamate pesticide residues from apple samples

شکل ۴- انتخاب نوع حلال در مرحله میکرواستخراج مایع - مایع پخشی برای استخراج باقیمانده آفت کش های کارباماتی از نمونه های سیب

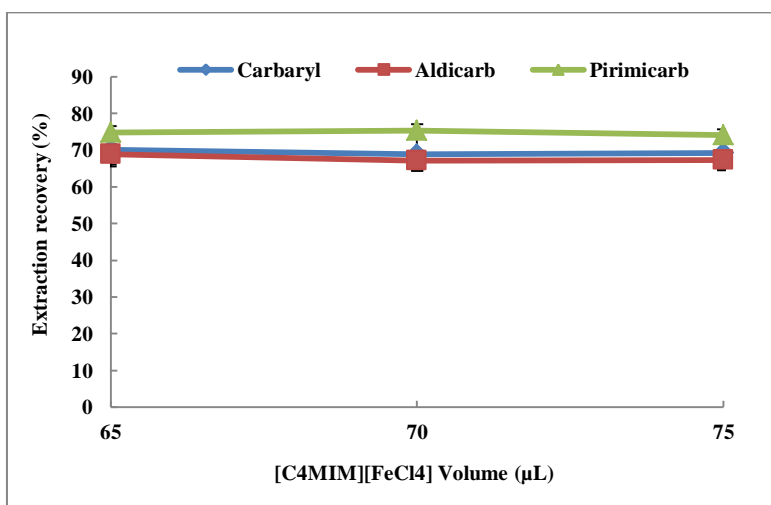


Figure 5- Selecting the volume of solvent in DLLME stage for the extraction of carbamate pesticide residues from apple samples

شکل ۵- انتخاب حجم حلال در مرحله میکرواستخراج مایع - مایع پخشی برای استخراج باقیمانده آفت کش های کارباماتی از نمونه های سیب

- اثر نمک‌زنی

برای بررسی اثر مقدار نمک بر روی کارایی استخراج در مرحله دوم، مقادیر مختلفی از کلرید سدیم به داخل آب سیب به دست آمده از مرحله قبلی اضافه شد و روش پیشنهادی ادامه یافت. مطابق شکل ۶ با افزایش مقدار کلرید سدیم تغییر محسوسی در کارایی روش پیشنهادی ایجاد نمی‌شود. این امر احتمالاً مربوط به عدم وابستگی استخراج به نیروی یونی محیط باشد. لذا کلیه آزمون‌ها بدون افزایش نمک انجام شد.

- مشخصات تجزیه‌ای روش پیشنهادی

پس از رسم معادله رگرسیون برای داده‌های حاصله، محدوده خطی روش توسعه داده شده برای هر یک از آنالیت‌ها بدست آمد. حد تشخیص و حد اندازه‌گیری نیز برابر غلظت‌هایی که در آن‌ها نسبت سیگنال به نویز به ترتیب برابر با ۳ و ۱۰ باشد در نظر گرفته شد. برای ارزیابی دقت روش، تکرارپذیری بر اساس انحراف استاندارد نسبی محاسبه گردید. فاکتور تعلیظ از مقایسه مساحت پیک آنالیت‌های محلول استاندارد و آنالیت‌های موجود در نمونه سیب پس اجرای روش استخراج پیشنهادی به دست آمد. نتایج ارقام شایستگی روش توسعه داده شده در جدول ۲ آورده شده است.

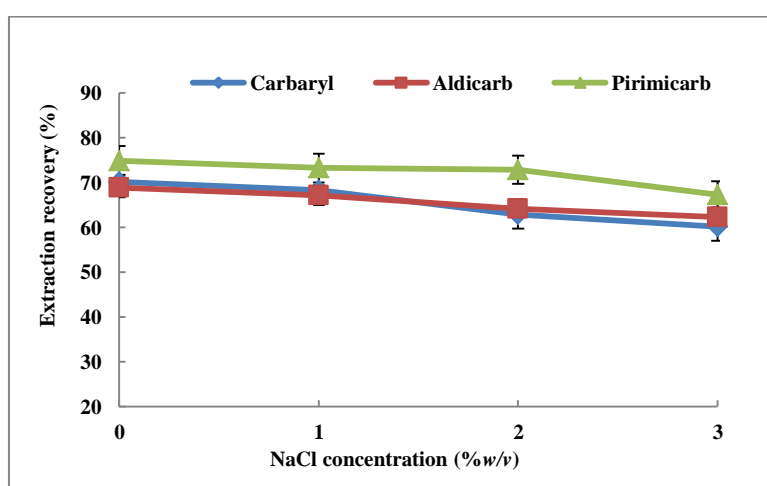


Figure 6- Optimization of salt addition in DLLME stage for the extraction of carbamate pesticide residues from apple samples

شکل ۶- بهینه‌سازی اثر نمک‌زنی در مرحله میکرواستخراج مایع- مایع پخشی برای استخراج باقیمانده آفت‌کش‌های کارباماتی از نمونه‌های سیب.

جدول ۲- ارقام شایستگی روش توسعه داده شده برای استخراج آفت‌کش‌های کارباماتی از نمونه‌های سیب

Table 2- Quantitative features of the developed method for carbamate pesticides extraction from apple samples

Analyte	LR ^a	LOD ^b	LOQ ^c	r ² ^d	precision (RSD%) ^e		ER ± SD ^f	EF ± SD ^g
					Intra-day	Inter-day		
Carbaryl	14.0-2000	4.2	14.0	0.995	3.2	3.9	2 ± 70	10 ± 350
Aldicarb	12.0-2000	3.6	12.0	0.999	4.1	4.8	3 ± 67	15 ± 335
Pirimicarb	10.7-2000	3.2	10.7	0.998	2.6	2.9	4 ± 75	15 ± 375

a) Linear range (ng g⁻¹)

b) Limit of detection (S/N = 3) (ng g⁻¹)

c) Limit of quantification (S/N = 10) (ng g⁻¹)

d) Coefficient of determination

e) Relative standard deviation (n = 5)

f) Extraction recovery ± standard deviation (n = 3)

g) Enrichment factor ± standard deviation (n = 3)

- آنالیز نمونه‌های حقیقی

آفت‌کش‌های مورد نظر در نمونه‌های سیب مورد بررسی وجود ندارد.

همچنین مقایسه سیگنال‌های تجزیه‌ای بدست آمده برای هر یک از نمونه‌های سیب و کولین کلرید: استیک اسید خالص اسپایک شده با غلظت‌های یکسانی از آنالیت‌ها (جدول ۳)، نشان داد که ماتریکس نمونه‌های سیب تأثیر محسوسی در کارایی روش استخراج سموم کارباماتی ندارند.

آفت‌کش‌های مورد مطالعه در ۳۰ نمونه سیب تحت شرایط بهینه اندازه‌گیری شدند. شکل ۷ کروماتوگرام‌های HPLC-DAD مربوط به تزریق مستقیم استاندارد آفت‌کش‌های مورد مطالعه (هر کدام به غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در استونیتریل) و یک نمونه‌ی سیب اسپایک نشده را نشان می‌دهد. مقایسه کروماتوگرام‌های حاصل از نمونه‌های حقیقی و نمونه استاندارد نشان داد که هیچ‌کدام از

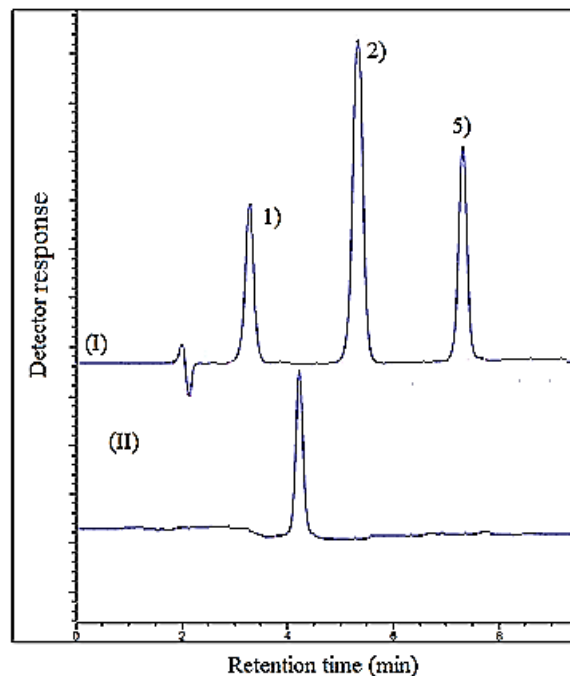


Figure 7- Typical HPLC-DAD chromatograms of direct injection of standard solution of the target analytes at a concentration of 10 mg L^{-1} (I) and unspiked apple sample (II) after performing the developed method. Peak identification: (1) Carbaryl, (2) Aldicarb, (3) Pirimicarb.

شکل ۷- کروماتوگرام HPLC-DAD حاصل از (I) تزریق مستقیم محلول استاندارد آفت‌کش‌های مورد مطالعه به غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر و (II) نمونه سیب اسپایک نشده پس از اجرای روش توسعه داده شده. شماره پیک‌ها: (۱) کارباریل، (۲) آلدی‌کارب، (۳) پیریمی‌کارب

جدول ۳- نتایج بررسی اثر ماتریکس سیب در استخراج آفت‌کش‌های کارباماتی

Table 3- Results of assays to check the apple sample matrix effect for carbamate pesticides extraction

Analyte	Mean relative recovery \pm standard deviation (n = 3)						
	Sample1	Sample2	Sample3	Sample4	Sample5	Sample6	Sample7
All samples were spiked with each analyte at a concentration of 15 ng g^{-1}							
Carbaryl	84 ± 1	89 ± 4	92 ± 3	96 ± 5	87 ± 3	93 ± 4	95 ± 4
Aldicarb	98 ± 4	92 ± 5	92 ± 3	95 ± 2	92 ± 3	84 ± 3	89 ± 2
Pirimicarb	89 ± 5	86 ± 2	91 ± 4	97 ± 3	98 ± 4	96 ± 2	91 ± 2
All samples were spiked with each analyte at a concentration of 50 ng g^{-1}							
Carbaryl	98 ± 2	91 ± 5	96 ± 4	97 ± 3	93 ± 4	97 ± 3	95 ± 4
Aldicarb	93 ± 4	94 ± 2	92 ± 4	90 ± 5	95 ± 2	91 ± 4	96 ± 3
Pirimicarb	96 ± 4	95 ± 3	85 ± 5	83 ± 4	91 ± 2	90 ± 3	92 ± 4

انتخاب حلال استخراج/ پخش کننده مناسب یکی از مهم‌ترین مراحل در روش استخراج کچرز می‌باشد. در این روش حلال استخراج کننده آنالیت‌ها از نمونه سبب به عنوان حلال پخش کننده در مرحله میکرواستخراج مایع-مایع پخشی استفاده می‌شود. از این رو حلال مورد استفاده در این مرحله باید قابلیت انحلال در فاز آلی و فاز آبی داشته باشد تا به عنوان حلال پخش کننده در مرحله میکرو استخراج مایع - مایع پخشی مورد استفاده قرار بگیرد (Zahiri et al., 2020).

حجم حلال استخراج کننده از دیگر پارامترهایی است که هم در مرحله کچرز و هم در روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی نیاز به بهینه‌سازی دارد. به طوریکه اگر حجم حلال جمع شده کمتر از حجم حلال اولیه باشد در این صورت حلال استخراج کننده در فاز آبی حل شده که میزان کاهش در حجم بسته به حلالیت حلال استخراج کننده در آب خواهد داشت (Fakhim Rasoolzadeh et al., 2020; Rastpour et al., 2022). همچنین هر چه حجم حلال استخراج کننده اولیه بیشتر باشد در این صورت حجم حلال جمع شده نیز بیشتر خواهد بود و فاکتور تغلیظ کاهش یافته و سیگنال تجزیه‌ای کمتر خواهد بود. از طرفی با کاهش حجم حلال، کارایی استخراج و تکرارپذیری کاهش می‌یابد (Jalili et al., 2020).

امواج مایکروویو می‌تواند تحرکات مولکولی و ضرایب توزیع آنالیت‌ها را افزایش داده و سبب تسریع فرایند استخراج به داخل حلال استخراج کننده شود. علاوه بر این امواج مایکروویو سبب گرم شدن محلول آزمایشی و بالا رفتن سرعت واکنش‌ها شده و راندمان استخراج را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Llompert et al., 2019). از طرف دیگر افزایش مدت زمان یا توان امواج مایکروویو می‌تواند بر تخریب و تغییر شکل ترکیبات هدف موثر باشد و منجر به کاهش راندمان استخراج شود (Sheikhzadeh et al., 2020). از این رو اثر امواج مایکروویو باید مورد ارزیابی و بهینه‌سازی قرار گیرد.

در روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی از حلال‌های آلی به منظور جمع آوری آنالیت‌ها استفاده می‌شود که این حلال با استفاده از حلال پخش کننده به صورت قطرات بسیار ریز در فاز آبی پخش می‌شود

(Rezaee et al., 2006). با توجه به اینکه که اکثر حلال‌های آلی (بخصوص حلال‌های کلره) دارای سمیت بالایی می‌باشند از این رو در کار پژوهشی حاضر از مایعات یونی که به عنوان حلال‌های سبز شناخته می‌شوند به عنوان حلال استخراج کننده استفاده شده است (Ghasemi et al., 2022). همچنین در این مطالعه به منظور حذف مرحله سانتریفیوژ کردن برای جداسازی حلال از فاز آبی از مایعات یونی که خاصیت مغناطیسی دارند استفاده شد که سبب سهولت و کوتاه‌تر شدن زمان آنالیز گردید.

عموماً در روش‌های استخراج، افزایش نمک به محلول‌های آبی می‌تواند سبب افزایش نیروی یونی فاز آبی شده و باعث کاهش حلالیت آنالیت‌ها در فاز آبی و انتقال آن‌ها به داخل حلال استخراج کننده شود که در نتیجه راندمان استخراج افزایش خواهد یافت (Farajzadeh et al., 2015). از سوی دیگر افزایش نمک به محیط استخراج می‌تواند حلالیت حلال استخراج کننده را نیز کاهش داده و منجر به افزایش حجم فاز آبی جمع شده شود که این امر می‌تواند باعث کاهش سیگنال تجزیه‌ای در اثر رقیق سازی شود (Meshkini et al., 2021). همچنین امکان دارد افزایش نمک باعث افزایش ویسکوزیته فاز آبی شده و ضریب انتشار آنالیت در فاز آبی را تحت تاثیر قرار دهد که به نوبه خود منجر به کاهش راندمان استخراج می‌شود (Zare Sani et al., 2021). لذا نمک‌زنی می‌تواند دو اثر متقابل داشته باشد، هرکدام از اثرات بر دیگری برتری داشته باشد در این صورت تاثیر آن عامل غالب خواهد بود. به همین دلیل در فرایندهای استخراج بررسی اثر نمک‌زنی از اهمیت زیادی برخوردار است.

مقایسه پارامترهای تجزیه‌ای روش حاضر با دیگر تحقیقات مشابه برای اندازه‌گیری آفت‌کش‌های مورد مطالعه نشان دهنده قابلیت قیاس یا حتی برتری برخی پارامترهای روش حاضر می‌باشد. از جمله این موارد می‌توان به محدوده قابل تشخیص ۲۰۰۰-۱۰/۷ و ۲۰۰۰-۱۲ نانوگرم در گرم در گرم به ترتیب برای پرمی‌کارب و آلدی‌کارب در روش حاضر اشاره کرد که دارای گستره وسیع‌تری در مقایسه با محدوده خطی ۲۵۰-۷/۷ و ۲۵۰-۱۳/۲ نانوگرم در گرم برای همین آنالیت‌ها در تحقیق دیگری است (Ahmadzadeh Anvar et al., 2020). همچنین حدتشخیص بدست آمده برای پرمی‌کارب (۳/۲) نانوگرم در

موفقیت‌آمیزی بر روی نمونه‌های شیر اجرا و نتایج نشان داد که هیچ‌یک از آنالیت‌ها در نمونه‌های سیب یافت نشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از همکاری‌های آزمایشگاه کنترل غذا و داروی مرکز تحقیقات ایمنی غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی تبریز برای انجام این پژوهش صمیمانه قدردانی می‌نمایند.

منابع

Ahmadzadeh Anvar, S., Torbati, M., Farajzadeh, M. A. & Afshar Mogaddam, M. R. (2020). Elevated temperature homogeneous liquid phase extraction coupled to ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography: application of water-miscible ionic liquids as extraction solvent in determination of carbamate pesticides. *Food Analytical Methods*, 13(6), 1282-1291.

Baig, S. A., Akhtera, N. A., Ashfaq, M. & Asi, M. R. (2009). Determination of the organophosphorus pesticide in vegetables by high-performance liquid chromatography. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science*, 6(5), 513-519.

Bhanti, M. & Taneja, A. (2007). Contamination of vegetables of different seasons with organophosphorous pesticides and related health risk assessment in northern India. *Chemosphere*, 69(1), 63-68.

Daghi, M. M., Nemati, M., Abbasalizadeh, A., Farajzadeh, M. A., Mogaddam, M. R. A. & Mohebbi, A. (2022). Combination of dispersive solid phase extraction using MIL-88A as a sorbent and deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of some pesticides from fruit juices before their determination by GC-MS. *Microchemical Journal*, 183, 107984.

Dias, E., e Costa, F. G., Morais, S. & de Lourdes Pereira, M. (2015). A review on the assessment of the potential adverse health impacts of carbamate pesticides. *Topics in public health*, 197-212.

EU Pesticides database (2005). Part A of Annex I to Reg. 396/2005, <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database>.

گرم) و آلدی‌کارب (۳/۶ نانوگرم در گرم) قابل مقایسه با حدود تشخیص حاصل شده برای پرمی‌کارب (۲/۳ نانوگرم در گرم) و آلدی‌کارب (۳/۹ نانوگرم در گرم) در تحقیق Ahmadzadeh Anvar و همکاران (۲۰۲۰) می‌باشد. در همین حال فاکتور تغلیظ بالاتر برای پرمی‌کارب (۳۷۵) و آلدی‌کارب (۳۳۵) در مقایسه با فاکتور تغلیظ ۱۶۰ و ۱۴۷ به ترتیب برای پرمی‌کارب و آلدی‌کارب و همچنین درصد بازیافت بیشتر برای پرمی‌کارب (۷۵) و آلدی‌کارب (۶۷) در مقایسه با درصد بازیافت ۶۴ و ۵۹ به ترتیب برای پرمی‌کارب و آلدی‌کارب در پژوهش Ahmadzadeh Anvar و همکاران (۲۰۲۰)، از نقاط قوت مطالعه ما محسوب می‌شود. به‌علاوه حدتشخیص کارباریل در این تحقیق (۴/۲ نانوگرم در گرم) بالاتر از حدود تشخیص این آنالیت در مطالعه Ahmadzadeh Anvar و همکاران (۲۰۲۰) (۰/۶ نانوگرم در میلی‌لیتر) و مطالعه Salvatierra-stamp و همکاران (۲۰۱۸) (یک نانوگرم در میلی‌لیتر) است، گرچه باز هم کمتر از حد مجاز باقیمانده این آنالیت در میوه‌های تازه (۰/۰۱ میلی‌گرم در کیلوگرم) می‌باشد (EU Pesticides database, 2005). در این مورد نیز فاکتور تغلیظ بالاتر روش پیشنهادی (۳۵۰) در مقایسه با فاکتور تغلیظ ۲۵۰ در مطالعه Ahmadzadeh Anvar و همکاران (۲۰۲۰) و فاکتور تغلیظ ۶۳ در مطالعه Salvatierra-stamp و همکاران (۲۰۱۸) از برتری‌های روش حاضر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در این کار پژوهشی ترکیب روش‌های استخراج کچرز و میکرواستخراج مایع-مایع پخشی مبتنی مایعات یونی مغناطیسی برای استخراج و پیش‌تغلیظ آفت‌کش‌های آلدی‌کارب، کارباریل و پرمی‌کارب از نمونه‌های سیب و سپس اندازه‌گیری کمی آن‌ها به روش HPLC-DAD به کار گرفته شد. این روش ساده، قابل اعتماد، ارزان، با مصرف حلال‌های سبز و دارای زمان آنالیز کوتاه می‌باشد. اعتبار بخشی روش نشانگر پارامترهای تجزیه‌ای ایده‌آل بود به‌گونه‌ای که راندمان استخراج بالای ۶۷ درصد و فاکتور تغلیظ بیش از ۳۳۵ حاصل شد. همچنین حد تشخیص روش توسعه داده شده کمتر از حداکثر مجاز تعیین شده برای باقیمانده این آفت‌کش‌ها بود. روش مذکور به‌طور

Fakhim Rasoolzadeh, R., Afshar Moghaddam, M. & Khandaghi, J. (2020). Application of a novel microextraction method for determination of organophosphorous pesticides from fruit juice using high performance liquid chromatography. *Food Hygiene*, 10(2 (38)), 31-43. [In Persian]

Farajzadeh, M. A., Afshar Mogaddam, M. R. & Alizadeh Nabil, A. A. (2015). Polyol-enhanced dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography and nitrogen phosphorous detection for the determination of organophosphorus pesticides from aqueous samples, fruit juices, and vegetables. *Journal of separation science*, 38(23), 4086-4094.

Ghasemi, R., Mirzaei, H., Mogaddam, M. R. A., Khandaghi, J. & Javadi, A. (2022). 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. *Microchemical Journal*, 181, 107764.

Gholizadeh, S., Mirzaei, H., Khandaghi, J., Mogaddam, M. R. A. & Javadi, A. (2022). Ultrasound-assisted solvent extraction combined with magnetic ionic liquid based-dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of mycotoxins from tea samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 114, 104831.

Jalili, V., Barkhordari, A. & Ghiasvand, A. (2020). New extraction media in microextraction techniques. A review of reviews. *Microchemical Journal*, 153, 104386.

Lehotay, S., Stajnbaher, D., Schenck, F. & Anastassiades, M. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86, 412-431.

Limoei Khosrowshahi, B., Marzi Khosrowshahi, E., Afshar Mogaddam, M. & KHandaghi, J. (2022). Use of Dispersive Solid-Phase Extraction in Combination with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Assessment of Organophosphorus Pesticides in Fruit Juice Samples Using Gas Chromatography-Nitrogen-Phosphorus Detector. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 87-98. [In Persian]

Llompert, M., Celeiro, M. & Dagnac, T. (2019). Microwave-assisted extraction of pharmaceuticals, personal care products and industrial contaminants in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116, 136-150.

Meshkini, K., AfsharMogaddam, M. & Khandaghi, J. (2021). Development of Homogeneous Liquid-Liquid Extraction in Combination with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Deep Eutectic Solvents for the Extraction and Assessment of Phytosterols in Animal Cream Samples using Gas Chromatography Equipped with Flame Ionization Detector. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 16(2), 57-67. [In Persian]

Mitra, S. & Brukh, R. (2003). Sample preparation: an analytical perspective. John Wiley pub. New Jersey, pp. 12-35.

Msagati, T. A. & Mamba, B. B. (2012). Monitoring of N-methyl carbamate pesticide residues in water using hollow fibre supported liquid membrane and solid phase extraction. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C*, 50, 149-156.

Rastpour, N., Khandaghi, J., Farajzadeh, M. A. & Mogaddam, M. R. A. (2022). Deep eutectic solvent-based QuEChERS method combined with dispersive liquid-liquid microextraction for extraction of benzoylurea insecticides in cabbage leaves samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 102(12), 2778-2791.

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(1-2), 1-9.

Salvatierra-stamp, V., Muñoz-Valencia, R., Jurado, J. M. & Ceballos-Magaña, S. G. (2018). Hollow fiber liquid phase microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of emerging contaminants in water samples. *Microchemical Journal*, 140, 87-95.

Sheikhzadeh, F., Mogaddam, M. R. A., Farajzadeh, M. A. & Khandaghi, J. (2020). Development of microwave radiations-induced homogeneous liquid-liquid microextraction method for extraction of pyrethroid pesticides in fruit and vegetable samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-12.

Tudi, M., Daniel Ruan, H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D. & Phung, D. T. (2021). Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International journal of environmental research and public health*, 18(3), 1112.

van der Hoff, G. R. & van Zoonen, P. (1999). Trace analysis of pesticides by gas chromatography. *Journal of Chromatography a*, 843(1-2), 301-322.

Zahiri, E., Khandaghi, J., Farajzadeh, M. A. & Mogaddam, M. R. A. (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.

Zare Sani, M., Mogaddam, M. R. A. & Khandaghi, J. (2021). 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. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-16.

Combination of QuEChERS Dispersive Liquid-Liquid Microextraction based on Magnetic Ionic Liquids for extraction of Carbamate Pesticides from Apple Samples prior to their analysis by High Performance Liquid Chromatography

S. Farajpour^a, M. R. Afshar Mogaddam^{b,c}, J. Khandaghi^{d,e*}

^a MSc Graduated of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.

^b Assistant Professor of Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

^c Assistant Professor of Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

^d Assistant Professor of the Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.

^e Assistant Professor of the Department of Food Biotechnology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

Received: 21 February 2023

Accepted: 27 April 2023

Abstract

Introduction: Today, the use of pesticides has become an essential part of agricultural activities. Due to their relatively short lifespan, strong effect, and extensive variety of biological activities, carbamates are one of those that are frequently utilized as insecticides. The need to monitor the presence of pesticides in food products is a major concern because of their major risk on consumers' health.

Materials and Methods: In the current research, Aldicarb, Carbaryl, and Primicarb insecticides were extracted from apple samples using a combination of QuEChERS technique with dispersive liquid-liquid microextraction, and their determination was carried out using HPLC-DAD. For this purpose, the effect of the effective factors in the two stages of the proposed extraction process was investigated and optimized. Also, merit figures including linear range, limits of detection and quantification, repeatability, enrichment factor, and extraction recovery were calculated in order to validate the developed method.

Results: Concerned with the broad linear range (10.7-2000 ng/g) and the repeatability based on RSD% of 2.6 to 4.8, the proposed method proved highly capable of extracting the desired pesticide residues from apple samples. Under optimal conditions, the suggested approach had an extraction efficiency of 67–75%, an enrichment factor of greater than 335, and limits of detection and quantification of less than 4.2 and 14 ng/ml, respectively, which were less than the MRLs set for these pesticides in fruits and vegetables. The mentioned method was successfully performed on real apple samples and the results revealed that the samples did not contain any of the expected carbamates.

Conclusion: In general, the developed method has the necessary ability to detect carbamate insecticides in apple samples. This method offers several advantages of being simple and reliable, employing green solvents, and short analysis time.

Keywords: Carbamate Insecticides, Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, High Performance Liquid Chromatography, QuEChERS.

* Corresponding Author: Khandaghi@iausa.ac.ir