مستخرج از پایان نامه

علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و چهارم، شماره ده، دی ماه ۱۴۰۱ (۴۴ -۳۳)

بررسی بقایای سم هپاتوتوکسین ناشی از سیانوباکترها در نمونه‌های آب با روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی

سهیلا رضائی تبار [*۱]

rezaitabar.soheila@gmail.com

عباس اسماعیلی ساری [۲]

نادر بهرامی‌فر [۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۴/۱ **تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۷**

چکیده

زمینه و هدف: سموم هپاتوتوکسین (سموم کبدی) که توسط سیانوباکترها تولید می‌شوند از سموم زیستی خطرناک هستند. با توجه به هزینه‌بر و زمان‌بر بودن فرآیند استخراج و اندازه‌گیری آن‌ها، هدف از تحقیق حاضر بررسی میزان کارائی شیوه استخراج سریع و جدید تحت عنوان میکرو استخراج مایع-مایع پخشی (DLLME) با استفاده از حلال‌های آلی کلره در استخراج یکی از سموم هپاتوتوکسین بنام Microcystin-LR از نمونه‌ی آب می‌باشد.

روش بررسی: در تحقیق حاضر ابتداء راندمان استخراج MC-LR با استفاده از روش رایج بکارگیری جاذب C18 بررسی شد. سپس راندمان استخراج با روش DLLME با بکارگیری نسبت‌های مختلفی از حلال‌های استخراج کننده‌ی کلره (کلروفرم، دی کلرومتان، تتراکلریدکربن و تترا کلرواتیلن) و حلال‌های پخش کننده (استون، متانول، اتانول و استونیتریل) مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که راندمان استخراج روش SPE با استفاده از جاذب C18، ۱۰۲ ٪ می‌باشد. لازمه دستیابی به حداکثر راندمان استخراج در روش DLLME، تشکیل محیط ابری در نمونه (نشان دهنده‌ی پخش‌شدگی حلال استخراج کننده در فاز آبی) می‌باشد که در این تحقیق، فقط در ترکیب استون و تتراکلرو اتیلن محیط ابری پایدار مشاهده شد. میزان بازیابی برای روش DLLME کمتر از ۳٪ بدست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که اگرچه استفاده از حلال‌های استخراج‌گر کلره از درصد بازیابی قابل قبولی برای استخراج سم MC-LR از نمونه‌های آبی برخوردار نمی‌باشد ولی نظر به اینکه DLLME، روشی دوستدار محیط زیست، با مصرف کم حلال و مستقل از زمان می‌باشد با بکارگیری حلال‌های دیگری مانند حلال‌های استخراج‌گر یونی می‌توان به نتایج دقیق و قابل قبول دست یافت.

واژه های کلیدی : سیانوباکتر، سموم هپاتوتوکسین، مایکروسیس‌تین ال.آر، روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی.

۱- دکتری آلودگی محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریائی، نور، مازندران، ایران. [*] (مسوول مکاتبات)

۲- استاد گروه محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریائی، نور، مازندران، ایران.

۳- استادیار گروه محیط زیست، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریائی، نور، مازندران، ایران.

J. Env. Sci. Tech., Vol 24, No.10, January, 2023

Investigation of residue content of cyanobacterial hepatotoxin in water samples using DLLME method

Soheila Rezaitabar [1*]
rezaitabar.soheila@gmail.com
Abbas Esmaili Sari [2]
Nader Bahramifar [3]

Admission Date:September 7, 2016 Date Received: June 21, 2016

Abstract

Background and Objective: Hepatotoxins are dangerous biological toxins produced by cyanobacteria. Because of the high consumption of cost and time in the extraction and detection procedure of these toxins, the main aim of the present study is to investigate the performance of a new extraction technique, termed dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) in the extraction of one hepatotoxin with the name Microcystin LR from water samples, using chlorinated organic extraction solvents.

Material and Methodology: In the first stage, the efficiency of the common method (solid phase extraction) was investigated. Then the mixture of disperser solvents (acetone, ethanol, methanol, and acetonitrile) and extraction solvents (chloroform, dichloromethane, carbon tetrachloride and tetrachloroethylene) were used to investigate the efficiency of DLLME.

Findings: The results showed that the efficiency of SPE using a C18 cartridge was 102 %. For high efficiency of DLLME, a cloudy solution should be formed (fine particles of extraction solvent which are dispersed entirely into the aqueous phase). In the present study, only in a mixture of acetone and tetrachloroethylene (with different ratios), a stable cloudy solution was found. The best-observed efficiency was 3 % for DLLME.

Discussion and Conclusion: The observations in this study suggest that although based on the obtained efficiency, the chlorinated organic solvents, could not be appropriate extraction solvents in MC-LR extraction, but the DLLME method using other solvents like Ionic liquid extraction solvents is a suitable technique for hepatotoxin extraction because of low consumption of cost, time and solvents in the extraction procedure.

Keywords: Cyanobacteria, Hepatotoxins, Microcystin LR, DLLME.

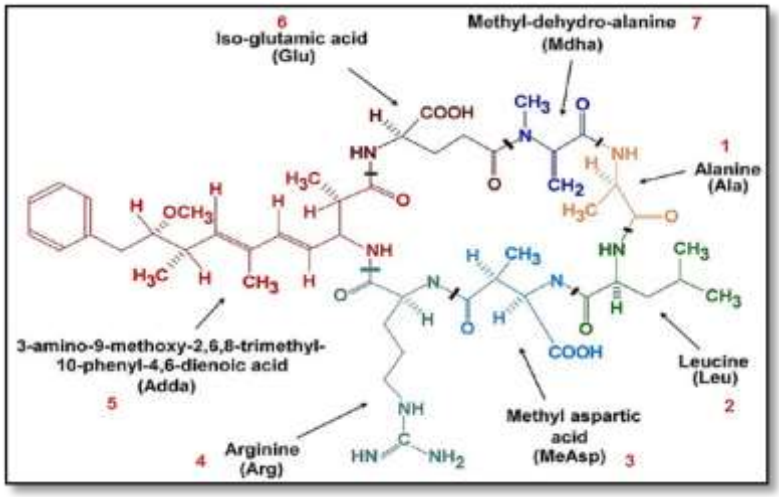
1- Ph. D in Environmental pollution, Faculty of Natural Resources and Marine Science, Tarbiat Modares University, Mazandaran, Iran. **(Corresponding Author)*
2- Professor, Faculty of Natural Resources and Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran.
3- Assistant Professor, Faculty of Natural Resources and Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, Iran.

مقدمه

برخی گونه‌های سیانوباکتر (جلبک‌های سبز آبی) مانند آنابنا، مایکروسیس‌تیس، اوسیلاتوریا، نوستوک، آنابنوپسیس و ... قادر به تولید سمومی تحت عنوان سیانوتوکسین[1] می‌باشند. وقتی دوره‌ی زندگی سیانوباکترها به پایان می‌رسد و یا در اثر استرس محیطی، غشاء آن‌ها نسبت به حمله‌ی میکروبی حساس شده؛ نهایتا سم موجود در سلول‌های سیانوباکتر آزاد می‌شود. همچنین استفاده از مواد شیمیایی جهت مبارزه با شکوفایی جلبکی (مانند سولفات مس) یا استفاده از مواد جهت هم‌آوری در مراحل تصفیه‌ی آب منجر به مرگ سیانوباکترها و افزایش سیانوتوکسین‌های درون آب می‌شود (۱). سیانوتوکسین‌ها از دیدگاه سم‌شناسی و شیمیایی، جزء سموم طبیعی محسوب می‌شوند (۲). سیانوتوکسین‌ها بر اساس ساختار شیمیائی به سه دسته‌ی پپتیدهای حلقوی، آلکالوئیدها و لیپوپلی‌ساکاریدها تقسیم‌بندی می‌شوند (۳). همچنین بر اساس تاثیر روی اندام هدف خود به سموم هپاتوتوکسین[2] (سموم کبدی)، نوروتوکسین[3](سموم عصبی)، سیتوتوکسین[4](سموم سلول‌های زنده) و درماتوتوکسین[5](سموم پوستی) تقسیم‌بندی می‌شوند (۴). بیشترین شکوفایی سیانوباکترها در سراسر دنیا مربوط به سیانوباکترهای تولید کننده‌ی سموم کبدی (هپاتوتوکسین‌ها) می‌باشد. سه دسته سموم کبدی بطور کلی عبارتند از: مایکروسیس‌تین[6] (پپتید حلقوی، حاوی ۷ آمینواسید)، نودولارین[7] (پپتید حلقوی، حاوی ۵ آمینو اسید) و سیلیندروسپرموپسین[8](آلکالوئید) (۱). از میان سموم کبدی، مایکروسیس‌تین (MC) و نودولارین (NOD) رایج‌تر هستند. بیشترین مشاهده و مطالعه نیز مربوط به مایکروسیس‌تین‌ها می‌باشد. MCs پپتیدهای حلقوی هستند که به آسانی از غشاء سلولی عبور نمی‌کنند (۳)؛ ولی بطور فعال توسط مکانیسم حامل‌های اسید صفرا منتقل می‌شوند و سلول‌های هپاتوسیت را مورد حمله قرار می‌دهند. این سموم بازدارنده پروتئین فسفاتاز 1 و 2A بوده و منجر به تومور کبد می‌شوند. نحوه اثر MCs در کبد بدین شرح است که با توجه به اینکه پروتئن فسفاتاز (PPs) در کبد وظیفه‌ی حذف فسفر از پروتئین؛ و پروتئین کینازس (PKs) وظیفه‌ی اضافه کردن فسفر به پروتئین را دارد، MCs با ورود به بدن و در کبد از فعالیت PPs جلوگیری کرده و در نتیجه، فعالیت PKs منجر به Hyperphosphorylation می‌شود. به دنبال این فرآیند، شبکه‌ی سیتواسکلتون شامل فیلامنت‌ها و میکروتوبول‌ها در کبد گسترش یافته و منجر به تجمع خون در بافت کبد و بدنبال آن تخریب سینوزوئیدی و شوک همودینامیک و مرگ می‌شود (۵). اثر MCs در بدن فقط منتهی به کبد نشده بلکه سیستم گوارشی و کلیه‌ها را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱).

بطور کلی ساختار MCs پپتید تک حلقه‌ای همراه با ۷ آمینو اسید است. تا کنون بیش از ۸۰ نوع ترکیب شاخه‌دار از MCs شناسایی شده است (۶). در میان MCs، Microcystin LR (MC-LR)، بیشترین مشاهده و گزارش را داشته است (۲). دلیل نامگذاری آن، حضور آمینو اسید Leucine در جایگاه ۲ و آمینو اسید Arginine در جایگاه ۴ است. وزن مولکولی MC-LR، ۹۹۵ گرم بر مول، میزان Lethal Dose 50 (در معرض‌گذاری حاد) برای ماهیان بیش از ۵۰۰ میکروگرم و برای پستاندارانی مانند موش ۵۰ میکروگرم در کیلوگرم و فرمول شیمیایی آن C49H74N10O12 می‌باشد (۱) و (۲). ساختار شیمیایی MC-LR در شکل ۱ آمده است (۷).

1- Cyanotoxin
2- Hepatotoxin
3- Neurotoxin
4- Cytotoxin
5- Dermatotoxin
6- Microcystin
7- Nodularin
8- Cylindrospermopsin



شکل ۱- ساختار مولکولی MC-LR

Figure 1. Molecular structure of MC-LR

راه‌های عمده قرار گیری انسان در مقابل MC-LR عبارتند از : ۱. آشامیدن آب آلوده، ۲. استنشاق قطرات یا تماس با موکوس بینی از طریق تماس تفریحی، ۳. تماس پوستی با توکسین‌ها از طریق استحمام یا فعالیت‌های تفریحی مانند شنا کردن در آب حاوی بلوم و ۴. مصرف ماهی و صدف آلوده و حتی گیاهانی که با آب آلوده آبیاری شده باشند (۴). بارزترین حادثه مربوط به مسمومیت از طریق MC-LR مربوط به سال ۱۹۹۶ در برزیل است. از میان ۱۳۱ بیمار دیالیزی، ۱۰۰ نفر دچار مشکل کبدی شدند که ۷۶ بیمار جان خود را از دست دادند. نتایج آزمایشات نشان داد که ۵۲ نفر از ۷۶ قربانی در معرض غلظت بالای MC-LR قرار گرفته و به همین دلیل جان خود را از دست دادند (۸).

با توجه به سمیت این توکسین‌ها، سازمان بهداشت جهانی حد مجازهائی را برای غلظت این توکسین‌ها تعیین کرده است. حد مجاز WHO برای MC-LR در آب آشامیدنی ۱ میکروگرم در لیتر و میزان جذب قابل تحمل روزانه (Tolerable Daily Intake) آن ۰/۰۴ میکرو گرم بر کیلوگرم وزن بدن می‌باشد (۳).

با توجه به اهمیت این سموم در سلامت عمومی، مطالعات فراوانی در سراسر دنیا به بررسی غلظت MC-LR در آب آشامیدنی و محدوده‌های آب طبیعی مثل رودخانه‌ها، تالاب‌ها و ... پرداخته‌اند که از آن جمله می‌توان به تحقیقات Lawton و همکاران (۹)، Lahti و همکاران (۱۰)، Hummert و همکاران (۱۱)، Ame و همکاران (۱۲)، Zhang و همکاران (۱۳)، Vieria و همکاران (۱۴)، Messineo و همکاران (۱۵)، Li و همکاران (۱۶)، Lawton و همکاران (۱۷)، Triantis و همکاران (۱۸)، Shan و همکاران (۱۹) اشاره کرد.

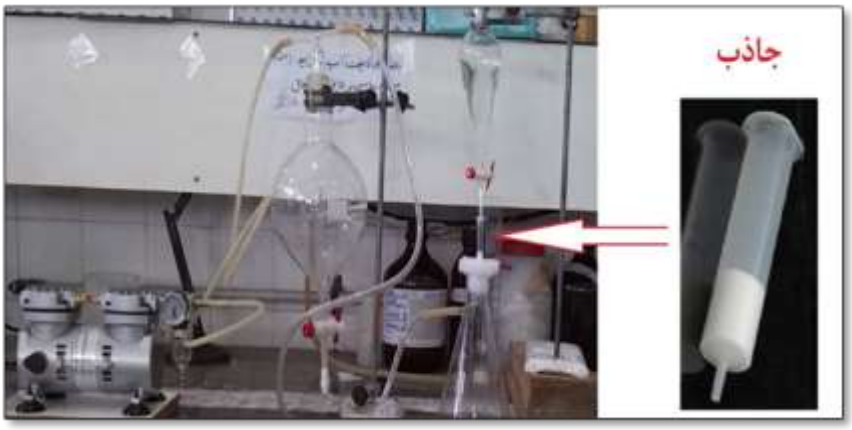
روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری این سموم در آب آشامیدنی وجود دارد. از جمله این روش‌ها می‌توان به روش کیت ارزیابی ایمنی (Immunoassay ELIZA kit) و روش ارزیابی پروتئین فسفاتاز اشاره کرد که حد تشخیص بالائی دارند و برای غربالگری مناسب هستند (۲). ولی روش-های کروماتوگرافی مانند دستگاه‌های LC/UV، LC/MS و همچنین GC/MS از حد تشخیص و دقت بسیار خوبی برخوردار هستند. پیش‌نیاز استفاده از دستگاه‌های کروماتوگرافی آماده‌سازی نمونه و استخراج توکسین مورد نظر با استفاده از جاذب می‌باشد. از رایج‌ترین جاذب‌ها می‌توان به جاذب C18 اشاره کرد (۲۰). انتخاب روش تعیین میزان سیانوتوکسین بستگی به پارامترهائی مانند در دسترس بودن امکانات، نیروی متخصص و میزان دقت داده‌های بدست آمده می‌باشد. اکثر روش‌های عنوان شده جهت استخراج سیانوتوکسین‌ها از آب، نیازمند حجم نمونه، زمان و هزینه‌ی بالا هستند.

روش Dispersive Liquid Liquid Micro Extraction که برای اولین بار در دنیا توسط Assadi و همکاران در سال ۲۰۰۶ ابداع شد (۲۱) بر اساس انتقال آنالیت مورد نظر از نمونه‌ی مایع به یک حلال امتزاج ناپذیر با آب استوار می‌باشد. رسیدن سریع به حالت تعادل و مستقل از زمان بودن، مهم‌ترین مزیت این روش می‌باشد. این روش شامل دو مرحله‌ی اصلی است: ۱. تزریق ترکیب مناسبی از حلال استخراج کننده و پخش کننده درون نمونه‌ی محلول حاوی آنالیت: در این مرحله حلال استخراج کننده بصورت قطره‌های کوچک بوسیله‌ی حلال پخش کننده وارد فاز حاوی آنالیت شده و آنالیت، درون حلال استخراج کننده تغلیظ می‌شود ۲. سانتریفیوژ کردن محلول ابری و سپس قرائت غلظت آنالیت مورد نظر موجود در فاز ته‌نشین شده با دستگاه مناسب. مهم-ترین پارامتر در کارایی روش DLLME استفاده از حلال استخراج کننده و پخش کننده‌ی مناسب با حجم مناسب می-باشد. حلال‌های استفاده شده بر اساس بالاتر بودن چگالی نسبت به آب، قابلیت استخراج‌گری آنالیت مورد نظر و رفتار کروماتوگرافی مناسب انتخاب می‌شوند (۲۲). DLLME تکنیکی محبوب و دوستدار محیط زیست محسوب می‌شود؛ زیرا روشی سریع، ارزان، ساده با فاکتور غنی‌سازی بالا و با حجم کم حلال مصرفی می‌باشد. تا کنون مطالعات زیادی در زمینه‌ی استخراج آنالیت‌های آلی از فاز مایع با استفاده از این روش انجام شده است (۲۳)، (۲۴)، (۲۵) و (۲۶). اما تنها یک تحقیق در دنیا در زمینه‌ی استخراج سموم سیانوتوکسین از نمونه‌های آبی با استفاده از روش DLLME به چاپ رسیده است که مربوط به مطالعه‌ی Yu و همکاران در سال ۲۰۱۵ می‌باشد (۲۷). در تحقیق مذکور از محلول‌های یونی بعنوان حلال استخراج کننده استفاده شده است. حلال‌هائی بعنوان حلال استخراج کننده استفاده می‌شوند که امتزاج ناپذیر (Immiscible) با آب هستند و معمولا از آب سنگین‌تر هستند. تحقیق حاضر اولین مطالعه روی سموم هپاتوتوکسین در ایران می‌باشد. تا کنون هیچ گزارشی از غلظت سیانوتوکسین‌ها در آب آشامیدنی یا محیط‌های طبیعی ثبت نشده است. لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی کارائی روش DLLME در استخراج سم MC-LR از نمونه‌های آب با استفاده از حلال‌های استخراج‌گر کلره می‌باشد.

۲- روش بررسی

۲-۱ روش SPE

در این روش از جاذب C18 برای جذب آنالیت مورد نظر و سپس واجذب آن با حلال مشخصی استفاده می‌شود. ابتداء کارتریج ۵۰۰ میلی‌گرمی C18 (Inopak)، با ۱۰ میلی‌لیتر متانول و ۱۰ میلی‌لیتر استیک اسید ۵ ٪ کاندیشن شده، سپس ۲۵۰ میلی‌لیتر نمونه‌ی آب دیونیزه که با سم MC-LR اسپایک شده بود با جریان آهسته با بکارگیری پمپ خلاء از جاذب عبور داده شد. پس از جذب آنالیت روی جاذب، با استفاده از ۳ میلی‌لیتر متانول خالص واجذب گردید. سپس با استفاده از گاز نیتروژن حلال پرانی شده و مجدد با ۵۰ میکرولیتر متانول به حجم رسانده شد و آماده تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (High Performance Liquid Chromatography) گردید. شکل ۲ نمایانگر نحوه‌ی استفاده از جاذب در استخراج MC-LR از نمونه‌ی آب دیونیزه اسپایک شده با سم می‌باشد.



شکل ۲- استفاده از جاذب اکتا دسیل سیلان (C18) در روش استخراج SPE

Figure 2. Using octadecil-silane cartridge (C18) in SPE method

۲-۲ روش DLLME

روش‌های رایج استخراج MC-LR از نمونه‌های آب، با اسیدی کردن نمونه‌ی آبی انجام می‌گیرد (۲۸) و (۲۹). در تحقیق حاضر نیز استخراج MC-LR هم در محیط آبی خنثی و هم محیط آبی اسیدی بررسی گردید. از استیک اسید بمنظور اسیدی کردن نمونه‌ی آب استفاده شد. ۵ میلی‌لیتر نمونه‌ی آب دیونیزه درون لوله‌های سانتریفیوژ ریخته شد. سپس حجم مشخصی از استاندارد MC-LR به آب اضافه شد. در مرحله‌ی بعد ترکیب حلال‌های مختلفی بعنوان حلال استخراج و پخش کننده به نمونه اضافه گردید (سرعت تزریق ترکیب حلال‌ها به نمونه در ابری شدن محیط بسیار تاثیر گذار است). در تست-های جداگانه از استون، متانول، اتانول و استونیتریل بعنوان حلال پخش کننده و از کلروفرم، دی کلرومتان، تتراکلریدکربن و تترا کلرواتیلن بعنوان حلال استخراج کننده استفاده شد. نسبت‌های بکار گرفته شده برای حلال‌های استخراج کننده از ۳۵ میکرولیتر تا ۱۰۰ میکرولیتر و نسبت حلال پخش کننده از ۴۰۰ میکرولیتر تا ۹۶۵ میکرولیتر تست گردید. تعیین این نسبت‌ها بر اساس تجربیات بدست آمده از مقالات مختلف انجام گرفت. برای مثال، ۳۵۰ میکرولیتر C2CL4 با استون به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسید. سپس یک میلی‌لیتر از این ترکیب به ۵ میلی‌لیتر استاندارد MC-LR ۵۰ ng L تزریق شد و بعد از تشکیل محیط ابری، لوله‌های سانتریفیوژ بمدت ۱۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰ rpm (دستگاه سانتریفیوژ Hermle مدل Z36HK) قرار گرفتند. در روش DLLME با توجه به اینکه حجم حلال استخراج کننده بسیار کم و معمولا در حد ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر می‌باشد، لذا لوله سانتریفیوژ بکار گرفته شده باید ته مخروطی نوک تیز باشد که بتوان حلال استخراج کننده را براحتی با سرنگ از انتهای لوله جمع کرد. سپس حلال استخراج کننده جمع شده در انتهای لوله‌ی سانتریفیوژ با سرنگ برداشته شد و با نیتروژن حلال پرانی شد و با متانول به حجم ۵۰ میکرولیتر رسید و سپس به دستگاه HPLC (ساخت شرکت Shimadzu) تزریق گردید. در برخی موارد محیط ابری تشکیل و در برخی نسبت‌ها تشکیل نشد. بمنظور بررسی راندمان استخراج، هر دو حالت به دستگاه تزریق شدند. همچنین حلال‌های استخراج کننده بدون حلال پخش کننده نیز امتحان شدند. بمنظور بررسی میزان کارائی استخراج، سطح زیر پیک بدست آمده از نمونه‌ی مورد نظر با سطح زیر پیک مورد انتظار مقایسه گردید و راندمان استخراج بصورت درصد محاسبه شد.

۲-۳ استاندارد سم MC-LR

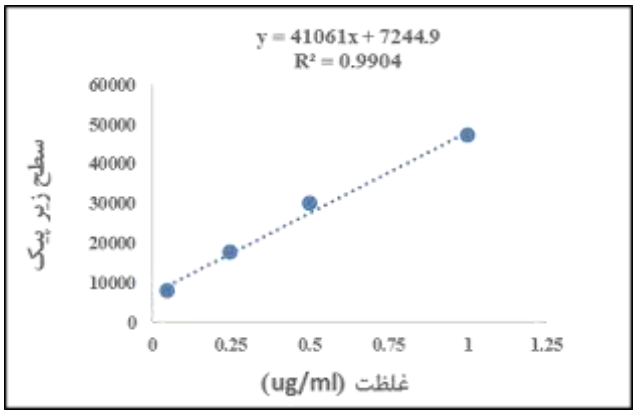
ماده استاندارد MC-LR با غلظت ۵۰ میکروگرم بمنظور کالیبراسیون دستگاه HPLC از شرکت Enzo life sciences آمریکا خریداری گردید. سپس در متانول خالص (HPLC grade) حل شده و غلظت‌های مختلفی از آن بمنظور کالیبراسیون دستگاه و اسپایک به نمونه‌های آب دیونیزه بمنظور بررسی کارائی روش SPE و DLLME تهیه شد.

۲-۴ تجزیه دستگاهی

بمنظور تعیین غلظت MC-LR در نمونه‌های استخراج شده، دستگاه HPLC ساخت شرکت Shimadzu با آون CTO-10 Ac VP (دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد) و مجهز به آشکار ساز ماوراء بنفش مرئی (UV-Vis) (SPD-10A vp)، سیستم گاز زدا، لوپ تزریق با حجم ۲۰ میکرولیتر و ستون تجزیه‌ای Nova-Pack C18 (با ابعاد ۱۵۰ * ۳/۹ میلی‌متر و قطر ذرات ۴ میکرومتر) استفاده شد. از مخلوط سه تائی متانول: استونیتریل: تری فلوئورو استیک اسید ۰/۰۵ ٪ به نسبت ۳۰: ۲۵: ۴۵ بعنوان فاز متحرک استفاده گردید. نرخ جریان فاز متحرک از ستون ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. بیشترین جذب MC-LR در طول موج ۲۳۹ نانومتر می‌باشد که دستگاه HPLC نیز در این طول موج تنظیم گردید.

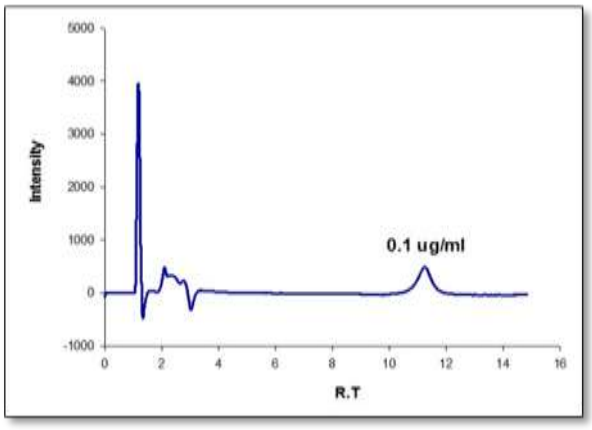
۳- یافته‌ها

بمنظور تعیین غلظت سم MC-LR در نمونه‌ها، ابتداء دستگاه HPLC با استفاده از غلظت‌های مختلف سم کالیبره گردید و منحنی و معادله‌ی کالیبراسیون آن بصورت شکل ۳ بدست آمد. همچنین حد تشخیص (Limit Of Detection) دستگاه در اندازه‌گیری این سم در نمونه‌های آب ۰/۱۸ میکرو گرم بر لیتر بدست آمد. نمونه‌ای از کروماتوگرام سم MC-LR حاصل از دستگاه HPLC در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۳- منحنی کالیبراسیون MC-LR

Figure 3. Calibration curve of MC-LR



شکل ۴- کروماتوگرام دستگاه HPLC، حاصل از شناسائی سم MC-LR

Figure 4. HPLC chromatogram of MC-LR standard

نتایج تحقیق حاضر نشان داد میزان راندمان استخراج MC-LR با استفاده از جاذب C18 ۱۰۲ ٪ می‌باشد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از نسبت‌های مختلف حلال‌های استخراج و پخش کننده نتایج متفاوتی را در تشکیل محیط ابری در بر دارد. بدان معنا که در برخی موارد محیط ابری پایدار، در برخی موارد محیط ابری نیمه پایدار و در برخی دیگر

محیط ابری ناپایدار تشکیل می‌شود. در جدول ۱ نتایج حاصل از بکارگیری نسبت‌های مختلف حلال‌های استخراج و پخش کننده و ایجاد یا عدم ایجاد محیط ابری ارائه شده است.

جدول ۱- نتایج حاصل از بکارگیری نسبت‌های مختلف حلال‌های استخراج‌کننده (از ۳۵ تا ۱۰۰ میکرولیتر) و پخش کننده (از ۴۰۰ تا ۹۰۰ میکرولتر) در تشکیل محیط ابری

Table 1. The results of using different ratio of extraction solvents (35 to 100 µl) and disperser solvents (400 to 900 µl) in formation of cloudy solution.

حلال پخش کننده / حلال استخراج کننده	استون	متانول	اتانول	استونیتریل
کلروفرم	±	-	#	#
دی‌کلرومتان	-	±	-	±
تتراکلرید کربن	±	±	-	-
تترا کلرواتیلن	+	-	#	-

- عدم تشکیل محیط ابری، ± تشکیل محیط ابری در برخی نسبت‌ها، # محیط ابری نیمه پایدار، + محیط ابری پایدار

بهترین حالت محیط ابری پایدار در ترکیب تترا کلرو اتیلن و استون با نسبت‌های ۳۵ به ۹۶۵ میکرولیتر، ۱۰۰ به ۷۵۰ میکرولیتر و ۵۰ به ۸۰۰ میکرولیتر مشاهده شد. نمونه‌ای از محیط ابری ایجاد شده در شکل ۵ آورده شده است.

شکل ۵- تشکیل محیط ابری در نمونه

Figure 5. Formation of sample cloudy solution

همچنین بمنظور بررسی تاثیر حلال پخش کننده بر میزان کارائی، استخراج بدون استفاده از حلال پخش کننده نیز انجام گرفت که در این مورد از حمام اولتراسونیک جهت کمک به پخش شدگی حلال استخراج کننده در نمونه استفاده شد. در تمامی موارد بررسی شده، اعم از محیط ابری ایجاد شده یا نشده، محیط اسیدی یا خنثی نمونه و همچنین استفاده از حلال پخش کننده یا عدم استفاده آن، در صد بازیابی سم MC-LR و راندمان استخراج کمترا از ۳٪ مشاهده شد. به بعبارتی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که حلال‌های کلره جهت استخراج سموم کبدی از نمونه‌های آبی با روش DLLME مناسب نیستند. این مطلب بیانگر آن است که حلال‌های کلره قادر به برقراری پیوند قوی با سم MC-LR و جداسازی آن از فاز آبی و ته نشست آن در فاز آلی نیستند.

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، استفاده از حلال‌های کلره برای استخراج سم MC-LR از نمونه‌های آب مناسب نمی‌باشد ولی این بدان معنا نیست که روش DLLME نیز برای استخراج سیانوتوکسین‌ها از نمونه‌های آب مناسب نباشد. برای مثال Yu و همکاران (۲۷)، بمنظور بررسی راندمان استخراج MC-LR و MC-RR از نمونه‌های آب آشامیدنی و آب رودخانه، از حلال-های استخراج‌گر یونی زیر استفاده کردند.

1: 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([BMIM][Cl])

2: 1-(6-hydroxyethyl)-3-methylimidazolium chloride ([HeOHMIM][Cl])

3: 1-benzyl-3-(2- hydroxyethyl) imidazolium bromide ([BeEOHIM][Br])

از میان حلال‌های استخراج‌گر بکار گرفته شده، [BeEOHIM][Br] به دلیل دارا بودن بخش آروماتیکی و گروه کربوکسیل بهترین راندمان استخراج را نشان داد. راندمان استخراج در آب آشامیدنی در دامنه‌ی ۴۵ تا ۱۰۹٪ و در آب رودخانه بین ۴۶ تا ۱۰۳٪ گزارش گردید. بنابراین با نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر و تحقیق Yu و همکاران (۲۷) می‌توان استنباط کرد که در استخراج سموم کبدی از نمونه‌های آبی با روش DLLME، استفاده از محلول‌های یونی بعنوان حلال استخراج‌گر راندمان استخراج بسیار بهتری را نسبت به حلال‌های کلره دارند. همانگونه که اشاره گردید روش رایج استخراج این سموم از آب روش SPE می‌باشد. اگرچه راندمان استخراج این روش قابل قبول است ولی برخی پارامترهائی که در مناسب بودن یک تکنیک دخیل هستند را دارا نمی‌باشد. برای مثال روش SPE، به حجم بیشتری از نمونه (حداقل ۲۵۰ میلی‌لیتر) نیازمند است و این در حالی است که در روش DLLME فقط با وجود ۵ میلی‌لیتر از نمونه می‌توان به نتیجه مورد انتظار دست یافت. از طرف دیگر در روش SPE، قبل از عبور نمونه از جاذب، باید جاذب را با سرعت کم و جریان کم حلال کاندیشن کرد و در هنگام عبور نمونه نیز نرخ جریان و عبور نمونه از جاذب باید بقدری کم باشد تا فرصت جذب شدن آنالیت بر روی جاذب و بعد از آن نیز فرصت واجذب فراهم گردد. بنابراین زمان‌بر بودن روش SPE نسبت به روش DLLME از دیگر معایب آن است. این در حالی است که در روش DLLME با تزریق سریع مخلوط حلال استخراج‌گر و پخش کننده به نمونه مورد نظر و تشکیل محیط ابری، و پس از سانتریفیوژ، می‌توان آنالیت مورد نظر را از نمونه جدا کرده و به دستگاه تزریق نمود. مزیت مهم دیگر روش DLLME نسبت به روش SPE آن است که به میزان کمی از حلال نیازمند است. یعنی با حجم یک میلی‌لیتر از مخلوط حلال استخراج‌گر و پخش کننده می‌توان آنالیت مورد نظر را استخراج کرد در صورتیکه در روش SPE علاوه بر کاندیشن کردن جاذب، بمنظور واجذب آنالیت مورد نظر نیز، حلال مورد نیاز است. با توجه به مزایای روش DLLME، مطالعات فراوانی در زمینه‌ی بررسی کارائی روش DLLME در استخراج آلاینده‌های آلی از ماتریس مایع صورت گرفته است. برای مثال Rezaei و همکاران (۲۶) به استخراج ده ترکیب Poly Chlorinate Biphenyls از نمونه‌های آب با استفاده از استون و کلروبنزن بعنوان حلال پخش کننده و استخراج کننده پرداختند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد درصد بازیابی این روش در استخراج ترکیبات PCB از نمونه‌های آب چاه، رودخانه و دریا بترتیب ۹۲ تا ۱۱۴٪، ۹۷ تا ۱۰۲٪ و ۹۶ تا ۱۰۳٪ می‌باشد. Liang و همکاران (۳۰) به بررسی میزان فتالات استرها (DMP، DEP و DnBP) در نمونه‌های آب دریاچه و آب آشامیدنی با استفاده از حلال پخش کننده استونیتریل و حلال استخراج کننده تترا کلرید کربن پرداختند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد میزان بازیابی برای این ترکیبات از ۸۴ تا ۱۱۳٪ بود. در تحقیقی دیگر Berijani و همکاران (۲۳) به استخراج حشره‌کش‌های ارگانوفسفره از نمونه‌های اب با استفاده از روش DLLME و بکارگیری استون و کلروبنزن بعنوان حلال پخش کننده و استخراج کننده پرداختند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد درصد بازیابی این حشره‌کش‌ها با استفاده از این روش ۷۸/۹ تا ۱۰۷ ٪ می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه‌ی دکتری با عنوان ارزیابی میزان پتانسیل تهدید سلامتی و انباشتگی زیستی Microcystin LR در آب و ماهی می‌باشد که با حمایت‌های مالی دانشگاه تربیت مدرس اجرا شده است.

References

1. Zurawell, R.W, Chen, H., Burke, J.M, Prepas, E.E. 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: A review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. Journal of Toxicology and Environmental Health.8(1), 1–37.

2. WHO. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. I. C. a. J. Bartram (Ed). 400 p.
3. WHO. Cyanobacterial toxins: Microcystin-LR in drinking-water. 1998;2(2):14p.
4. Kaushik, R., Balasubramanian, R. 2013. Methods and approaches used for detection of cyanotoxins in environmental samples: A Review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. 43(13), 1349-1383.5.
5. Ott, J.L., Carmichael, W.W. 2006. LC/ESI/MS method development for the analysis of hepatotoxic cyclic peptide microcystins in animal tissues. Toxicon. 47(7), 734-74.
6. Maske, S.S., Sangolkar, L.N., Chakrabarti, T. 2010. Temporal variation in density and diversity of cyanobacteria and cyanotoxins in lakes at Nagpur (Maharashtra state), India. Environmental Monitoring and Assessment.169(1-4):299–308S.
7. Merel, S., LeBot, b., Clement, M., Seux, R., Thomas, O. 2009. Ms Identification of microcystin-LR chlorination by-products. Chemosphere.74(6), 832-839.
8. Yuan, M., Carmichael, W.W., Hilborn, E.D. 2006. Microcystin analysis in human sera and liver from human fatalities in Caruaru, Brazil 1996. Toxicon. 48(6), 627-6409.
9. Lawton, L.A., Edwards, Ch., Codd, GA. 1994. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. Analyst. 119(7), 1525-1530.
10. Lahti, K., Rapala, J., Färdig, M., Niemelä, M., Sivonen, K. 1997. Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water. Water Research. 31(5), 1005-1012.
11. Hummert, C., Reichelt M, Weib, J., Liebert, H.P., Luckas, B. 2001. Identification of microcystins in cyanobacteria from the Bleiloch former drinking-water reservoir (Thuringia, Germany). Chemosphere.44(7), 1581-1588.
12. Ame, M.V., Pilar, Diaz, M.d., Wunderlin, D.A. 2003. Occurance of toxic cyanobacterial blooms in San Roque reservoir (Cordoba, Argentina): A field and chemometric study. Environmental Toxicology. 18(3), 192-201.
13. Zhang, L., Xie, P., Yang, Zh. 2004. Determination of microcystin-LR in surface water using high-performance liquid chromatography/tandem electrospray ionization mass detector. Talanta. 62(1), 193–200.
14. Vieira, J.M.d.S., Azevedo, M.T.d.P., Azevedo, S.M.F.d.O., Honda, R.Y., Corrêa, B. 2005. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. Toxicon. 45(7), 901-909.
15. Messineo, V., Bogialli, S., Melchiorre, S., Sechi, N., Lugliè, A., Casiddu, P., 2009. Cyanobacterial toxins in Italian freshwaters. Limnologica- Ecology and Management of Inland Waters. 39(2), 95-106.
16. Li, Z., Yu, J., Yang, M., Zhang, J., Burch, M.D., Han, W. 2010. Cyanobacterial population and harmful metabolites dynamics during a bloom

in Yanghe reservoir, North China. Harmful Algae. 9(5), 481-488.

17. Lawton, L.A., Chambers, H., Edwards, Ch., Nwaopara, A.A., Healy, M. 2010. Rapid detection of microcystins in cells and water. Toxin. 55(5), 973–978.
18. Triantis, T., Tsimeli, K., Kaloudis, T., Thanassoulias, N., Lytras, E., Hiskia, A. 2010. Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters. Toxicon. 5(5), 979-989.
19. Shan, Y., Shi, X., Dou, A., Zou, C., He, H., Yang, Q., Zhao, S., Lu, X., Xu, G. 2011. A fully automated system with on-line micro solid-phase extraction combined with capillary liquid chromatography–tandem mass spectrometry for high throughput analysis of microcystins and nodularin-R in tap water and lake water. Journal of Chromatography A. 1218(13), 1743-1748.
20. WHO. 2008. Guidelines for drinking water quality. 3rd ed. Vol 1. Geneva.
21. Rezaee, M., Assadi, Y., Milani. Hosseini, M.R., 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.
22. Rezaee, M., Yamini, Y., Faraji, M. 2010. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method, Journal of Chromatography A. 1217(16), 2342-2357.
23. Berijani, S., Assadi, Y., Anbia, M., Milani. Hosseini, M.R., 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), 1–9.
24. Farahani, H., Norouzi, P., Dinarvand, R., Ganjali, M.R. 2007. Development of dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry as a simple, rapid and highly sensitive method for the determination of phthalate esters in water samples. Journal of Chromatography A.1172(2), 105–112.
25. Nuhu, A.a., Basheer, C., Saad, B. 2011. Liquid-phase and dispersive liquid-liquid microextraction techniques with derivatization: Recent applications in bioanalysis. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 879(17-18), 1180–1188.
26. Rezaei, F., Bidari, A., Birjandi, A.P., Milani, Hosseini, M.R., Assadi, Y. 2008. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water. Journal of Hazardous Materials. 158(2-3), 621–627.
27. Yu, H., Clark, K.D., Anderson, J.L. 2015. Rapid and sensitive analysis of microcystins using ionic liquid-based in situ dispersive liquid – liquid microextraction. Journal of Chromatography A. 1406, 10–18.
28. Amé, M.V., Galanti, L.N., Menone, M.L., Gerpe, M.S., Moreno, V.J., Wunderlin, D.A. 2010. Microcystin–LR, –RR, –YR and –LA in water samples and fishes from a shallow lake

in Argentina. Harmful Algae. 9(1), 66-73.

29. Cazenave, J., Wunderlin, D.A., Bistoni, M.d.l.Á., Amé, M.V., Krause. E., Pflugmacher. S., Wiegand, C. 2005. Uptake, tissue distribution and accumulation of microcystin-RR in Corydoras paleatus, Jenynsia multidentata and Odontesthes bonariensis: A field and laboratory study, Aquatic Toxicology.;75(2):178-190.

30. Liang, P., Xu, J., Li, Q. 2008. Application of dispersive liquid liquid microextraction and high performance liquid chromatography for the determination of three phthalate esters in water samples. Analytica Chimica Acta. 609(1), 53-58.