

## Extraction and determination of Benzoyl-urea insecticides in some fresh fruits using dispersive liquid phase micro-extraction and HPLC method

Khandaghi, J.<sup>1</sup>, Afshar Mogaddam, M.R.<sup>2\*</sup>

1. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.
2. Assistant Professor, Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran; Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

\*Corresponding author: mr.afsharmogaddam@yahoo.com

(Received: 2020/10/16 Accepted: 2021/1/20)

### Abstract

To improve the quality and increase the shelf life of agricultural products, many pesticides are widely used. Although the use of pesticides in agricultural applications provides a wide range of beneficial effects, overuse of these substances results in their accumulation in soil, surface water, and foods. The analysis of pesticide residues is thus very important for the health of consumers. In this study, a combined extraction method of QuEChERS based on deep eutectic solvents and DLLME method for the extraction of Hexaflumuron, Chlorfluazuron, Flufenoxuron, Diafenthiuron, and Diflubenzuron benzoylurea pesticides from fruit samples of grape, apple, cherry, apricot, and orange and then analyzing them using high-performance liquid chromatography with diode array detector is presented. According to the results, the proposed method is simple, reliable, and inexpensive with low organic solvent consumption and has a short analysis time, and indicates good values extraction efficiency, so that under optimal conditions, limits of detection and quantification were obtained in the range of 3.3-6.5 and 11.2-22.2 ng/ml, respectively. Recovery rates and enhancement factors ranged from 52% to 88%. In actual samples, only Flufenoxuron insecticide present in one grape sample was detected at 17 0.5 ng/ml.

**Conflict of interest:** None declared.

**Keywords:** Benzoylurea, QuEChERS, DLLME, HPLC, Fruit

## استخراج و اندازه‌گیری حشره‌کش‌های بنزوئیل‌اوره در برخی میوه‌ها به روش میکرواستخراج فاز مایع پخشی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

جلیل خندقی<sup>۱</sup>، محمدرضا افشارمقدم<sup>۲\*</sup>

۱. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران

۲. استادیار مرکز ایمنی غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران؛ استادیار مرکز تحقیقات آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز،

ایران

\*نویسنده مسئول مکاتبات: mr.afsharmogaddam@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۹/۷/۲۵ پذیرش نهایی: ۹۹/۱۱/۱)

### چکیده

به‌منظور بهبود کیفیت و افزایش زمان ماندگاری محصولات کشاورزی از آفت‌کش‌های مختلف به‌طور گسترده‌ای در آن‌ها استفاده می‌شود. اگرچه استفاده از این سموم دارای فواید زیادی هستند ولی استفاده بیش از حد این مواد منجر به تجمع آن‌ها در خاک، آب‌های سطحی و مواد غذایی می‌شود. بنابراین آنالیز باقی‌مانده این سموم در مواد غذایی برای حفظ سلامت مصرف‌کنندگان از اهمیت بالایی برخوردار است. در این کار پژوهشی روش تلفیق‌شده کچرز بر اساس مایعات انتکتیک عمیق و میکرواستخراج مایع-مایع پخشی برای استخراج برخی از حشره‌کش‌های بنزوئیل‌اوره شامل هگزافلومرون، کلرفلوازرون، فلوفنوکسرون، دیافنتیورون و دی‌فلوبنزرون از نمونه‌های میوه انگور، سیب، آلبالو، زردآلو و پرتقال و سپس آنالیز آن‌ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به شناساگر آرایه دیودی ارائه شده است. طبق نتایج حاصله روش پیشنهادی ساده، قابل‌اعتماد، ارزان، با مصرف حلال‌های آلی کم و دارای زمان آنالیز کوتاه است و مقادیر مطلوبی برای راندمان استخراج به‌دست می‌دهد به‌طوری‌که تحت شرایط بهینه حد تشخیص و کمی بودن در بازه ۳/۳-۶/۵ و ۱۱/۲-۲۲/۲ نانوگرم در میلی‌لیتر به‌دست آمد. همچنین راندمان استخراج و فاکتورهای تغلیظ در بازه ۵۲-۸۸ درصد به‌دست آمد. در نمونه‌های حقیقی فقط آفت‌کش فلوفنوکسرون در یک نمونه انگور در غلظت  $17 \pm 0/5$  نانوگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد.

**واژه‌های کلیدی:** بنزوئیل‌اوره، کچرز، میکرواستخراج مایع-مایع پخشی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، میوه

## مقدمه

با توجه به رشد جمعیت جهان و کمبود منابع غذایی در دهه‌های اخیر، حفاظت از تولیدات کشاورزی در برابر نابودی آن‌ها بر اثر آفات و بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است. تخمین زده می‌شود که نزدیک به ۴۵ درصد از محصولات کشاورزی در دنیا توسط آفات و بیماری‌های مختلف از بین می‌روند. لذا تولیدکنندگان محصولات کشاورزی برای مبارزه با عوامل مخرب و کاهش دهنده تولید، به استفاده از مواد شیمیایی تحت عنوان آفت‌کش‌ها روی آورده‌اند (Bhanti and Taneja, 2007). قسمتی از این مواد نه تنها در سطح محصولات باقی می‌ماند بلکه به داخل بافت میوه‌ها، سبزی‌ها و حتی دانه‌های غلات نفوذ می‌کند. به طوری که اغلب محصولات کشاورزی که در معرض آفت‌کش‌ها قرار گرفته‌اند حاوی مقادیری از باقیمانده آفت‌کش‌ها می‌باشند (Baig, et al., 2009). از آنجایی که این محصولات با سلامتی انسان در ارتباط هستند، اندازه‌گیری و بررسی میزان باقیمانده آفت‌کش‌ها در محصولات کشاورزی از اهمیت بسیاری برخوردار است و حداکثر مقدار باقیمانده (Maximum residue limits) آفت‌کش‌ها به عنوان یک معیار در این مورد ارائه می‌شود (Gilden, et al., 2010). این معیار به صورت غلظت آفت‌کش بر حسب میلی‌گرم در کیلوگرم وزن میوه و سبزیجات تازه بیان می‌شود و محصولاتی که غلظتی بیش از این مقدار را دارا باشند غیرقابل مصرف می‌باشند (EC, 396/2005).

آفت‌کش‌ها بر اساس ساختار شیمیایی به آفت‌کش‌های معدنی و آلی تقسیم می‌شوند و عموماً از نظر فیزیکی شیمیایی پایدار بوده و به همین علت قادر به حضور طولانی‌مدت در اکوسیستم می‌باشند.

آفت‌کش‌های آلی که طیف وسیعی از آفت‌کش‌ها را در برمی‌گیرند و دارای فعالیت فیزیولوژیکی بسیار مؤثری هستند خود به دسته‌های متعددی مانند تری‌آزول‌ها، ارگانوفسفره‌ها، سموم بنزوئیل‌اوره، سموم پیرتروئید و غیره تقسیم می‌شود (Vanderhoff and VanZoonen, 1999). سموم بنزوئیل‌اوره دسته نسبتاً جدید و پرکاربردی از حشره‌کش‌ها هستند که از تشکیل کیتین در پوسته بیرونی حشرات جلوگیری کرده و منجر به مرگ آن‌ها می‌شوند. مهم‌ترین ترکیبات از این دسته حشره‌کش‌ها شامل هگزافلورون (Hexaflumuron)، فلوفنوکسرون (Flufenoxuron)، لوفنورون (Lufenuron) و کلرفلوزرون (Chlorfluazuron) می‌باشند. از لحاظ زیست‌محیطی آثار مخرب آن‌ها کم می‌باشند گرچه این مواد اثرات حشره‌کشی پایداری داشته و ماندگاری بالایی در محیط زیست دارند (Umesh, et al., 2012). به دلیل این که این مواد در داخل بافت گیاهان تجمع می‌یابند، تعیین مقدار این مواد در سبزیجات و میوه‌ها بایستی کنترل گردد. اثرات بیولوژیکی این حشره‌کش‌ها بر روی انسان‌ها به طور جامع ارزیابی نشده است. ولی ثابت شده است که استفاده از این مواد باعث ایجاد اختلال در سیستم عصبی، قوای جنسی و عروق کرونری انسان‌ها مؤثر می‌باشند (Ledirac, et al., 2000).

یکی از مراحل مؤثر در همه آنالیزهای آماده‌سازی نمونه است. معمولاً اندازه‌گیری مستقیم ترکیبات در نمونه‌های مختلف توسط دستگاه‌های تجزیه‌ای، به دلایلی مانند غلظت پایین آن‌ها در نمونه و یا وجود بافت پیچیده نمونه که ممکن است در اندازه‌گیری آنالیت‌های مورد نظر مزاحمت داشته باشند، امکان‌پذیر

مدت زمان کوتاهی برقرار شده و در نتیجه زمان استخراج به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد (Pil-Bala, et al., 2019; Saad Louy and Khandaghi, 2018).

در این کار پژوهشی یک روش تلفیق شده کچرز بر اساس مایعات اتکتیک عمیق و میکرواستخراج مایع-مایع پخشی برای استخراج آفت‌کش‌های بنزوئیل‌اوره هگزافلومرون، کلرفلوازرون، فلوفنوکسرون، دیافتتیورون (Diflubenzuron) و دی‌فلوبنزورون (Diafenthion) از نمونه‌های میوه انگور، سیب، آلبالو، زردآلو و پرتقال و سپس آنالیز این ترکیبات به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance Liquid Chromatography) مجهز به دکتور آرایه دیودی (Diode Array Detector) ارائه شده است.

### مواد و روش‌ها

#### - نمونه برداری و مواد شیمیایی

نمونه‌های انگور، سیب، آلبالو، زردآلو و پرتقال در تابستان سال ۱۳۹۷ از مراکز عرضه در شهر تبریز خریداری و سپس خردشده و آب‌گیری شدند. آب حاصل از هر میوه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و بدون رقیق‌سازی مورد استفاده قرار گرفت. آزمایش‌ها در آزمایشگاه‌های کنترل غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام گرفت. آفت‌کش‌های بنزوئیل‌اوره شامل هگزافلومرون، کلرفلوازرون، فلوفنوکسرون، دیافتتیورون و دی‌فلوبنزورون از شرکت سیگما (Sigma, USA)، سدیم کلرید، اسید هیدروکلریک، آمونیاک، تولوئن، هگزانول، زایلن، هگزان، کولین کلرید، اتیلن گلیکول

نیست. لذا اهداف اصلی آماده‌سازی نمونه عبارت‌اند از حذف مزاحمت‌های ماتریکس، تغلیظ آنالیت‌های مورد نظر و تبدیل آنالیت‌ها به فرمی که منطبق با روش آنالیز و سیستم تجزیه‌ای باشند (Mitra, 2003). از آنجایی که قسمت عمده زمان تجزیه نمونه صرف آماده‌سازی آن می‌شود و این مرحله بر روی همه مراحل بعدی آنالیز تأثیرگذار است، از این رو نقش شاخصی در شناسایی، تأیید و اندازه‌گیری آنالیت‌ها دارد (Bidari, et al., 2012). تاکنون روش‌های گوناگونی برای آماده‌سازی و استخراج آنالیت‌های مختلف از مواد غذایی ارائه شده است. از جمله روش استخراج مایع-مایع یا Liquid Extraction (Jeddy and Khandaghi, 2019; Amini, et al., 2018)، روش میکرواستخراج فاز مایع یا Liquid phase Micro-Extraction (Saraji, 2005; Psillakis and Kalogerakis, 2003) و روش کچرز یا Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (Emami, et al., 2015). میکرواستخراج فاز مایع که به منظور مینیاتوریزه کردن روش استخراج مایع-مایع از طریق کاهش نسبت حلال آلی به فاز آبی ابداع شد به شیوه‌های مختلفی انجام می‌گیرد که یکی از مهم‌ترین آن‌ها میکرواستخراج مایع-مایع پخشی (Dispersive liquid-liquid microextraction) است. اصول این روش به این صورت است که مخلوطی از حلال‌های استخراج‌کننده و پخش‌کننده با نسبت معین تهیه و توسط سرنگ به سرعت به داخل فاز آبی حاوی آنالیت‌ها تزریق می‌شود. پخش شدن قطرات بسیار ریز حلال استخراج‌کننده در محلول آزمایشی سبب ایجاد سطح تماس بسیار بالایی بین حلال استخراج‌کننده و نمونه آبی می‌شود. با تسهیل فرایند انتقال جرم، حالت تعادل در

فنونل و دی‌کلرواستیک اسید از شرکت (Merck, Germany) و متانول، استونیتریل و آب با درجه HPLC-grade از شرکت کم‌لب (ChemLab, Belgium) خریداری شدند.

**- بهینه‌سازی شرایط استخراج**

برای دستیابی به کارایی استخراج بالا، تأثیر پارامترهای مختلف در هر یک از مراحل استخراج بررسی و بهینه شده‌اند. به‌عنوان مثال پارامترهایی مانند نوع حلال استخراج‌کننده/پخش‌کننده (از بین سه نوع حلال اتکتیک کولین کلراید: اتیلن‌گلیکول (ChCl:EG)، کولین کلراید: دی‌کلرو استیک‌اسید (ChCl:DCA) و کولین کلراید: فنول (ChCl: Phenol)، حجم حلال (از بین حجم‌های ۰/۵، ۰/۷۵، ۱/۰، ۱/۵ و ۲/۰ میلی‌لیتر) و مدت استفاده از امواج ماکروویو (از بین زمان‌های ۰/۵ تا ۵ دقیقه) در مرحله اول مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مرحله دوم نوع حلال (از بین حلال‌های هگزان، هگزانول، تولوئن و زایلن)، حجم حلال (از بین حجم‌های ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرولیتر) و اثر نمک زنی (با افزودن محدوده ۰/۰ تا ۱۰ درصد وزنی/حجمی از نمک کلرید سدیم) بهینه‌سازی شدند. برای بررسی پارامترهای مؤثر در روش پیشنهادی از روش «یک پارامتر در یک‌زمان» استفاده شد. تأثیر این عوامل با مقایسه سطح زیر پیک حاصل از آنالیت‌ها در شرایط مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (ECD 657, 2002).

#### - روش استخراج

هدف از این کار پژوهشی توسعه یک روش آماده‌سازی کارآمد مبتنی بر ترکیب روش‌های

#### - شرایط آنالیز با دستگاه کروماتوگرافی

به‌منظور دستیابی به نتایج قابل‌اعتماد سیستم کروماتوگرافی، جداسازی آنالیت‌ها در شرایط بهینه صورت گرفت. شرایط بهینه HPLC (Agilent, 1200) (DAD System, USA) برای آنالیز حشره‌کش‌ها در جدول (۱) ذکر گردیده است.

جدول (۱) - شرایط بهینه‌ی HPLC-DAD به منظور آنالیز حشره‌کش‌های بنزوئیل‌اوره از نمونه‌های میوه	
نوع ستون	Zorbax SB-Aq، طول: ۱۵۰ میلی‌متر، ID: ۴/۶ میلی‌متر، اندازه ذرات: ۵ میکرومتر
فاز متحرک	استونیتریل: متانول: آب (۴۱: ۲۱: ۳۸ v/v)، میزان جریان: ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه
تزریق کننده	دما: ۳۵ درجه سلسیوس، لوپ: ۱۰ میکرولیتر
طول موج	۲۷۱ نانومتر برای هگزافلومرون و ۲۶۴ نانومتر برای سایر ترکیبات

### - مشخصات تجزیه‌ای

به منظور اعتبارسنجی روش به کار رفته برای آنالیز سموم بنزوئیل‌اوره در این تحقیق، پس از ترسیم نمودار معیارگیری یا منحنی کالیبراسیون، محدوده خطی روش (linear detection range)، حد تشخیص (Limit of detection)، حد اندازه‌گیری (Limit of quantitation)، مجذور ضریب همبستگی، تکرارپذیری (RSD%)، راندمان و فاکتور تغلیظ بررسی و محاسبه شدند (Chandran and Singh, 2007).

### یافته‌ها

- نتایج بهینه‌سازی عوامل مؤثر در مرحله اول استخراج -

#### نوع حلال

نتایج به دست آمده نشان داد که در بین حلال‌های مورد بررسی ChCl: EG دارای بیشترین کارایی در استخراج حشره‌کش‌های مورد مطالعه است که می‌تواند به پایین بودن ویسکوزیته آن و قابلیت انحلال بیشتر آنالیت‌ها در آن مربوط باشد.

#### حجم حلال

با توجه به نتایج به دست آمده نمودار (۱) با افزایش حجم ChCl:EG تا ۱/۵ میلی‌لیتر، سیگنال‌های تجزیه‌ای افزایش یافته و سپس با افزایش بیشتر حجم، کاهش

می‌یابد. در نتیجه ۱/۵ میلی‌لیتر ChCl:EG به عنوان حجم بهینه انتخاب شد.

- مدت زمان قرار گرفتن تحت امواج ماکروویو

مطابق نمودار (۱) با افزایش مدت زمان امواج ماکروویو تا ۱/۵ دقیقه راندمان استخراج افزایش و سپس کاهش می‌یابد.

- نتایج بهینه‌سازی عوامل مؤثر در مرحله دوم استخراج

- نوع حلال استخراج کننده

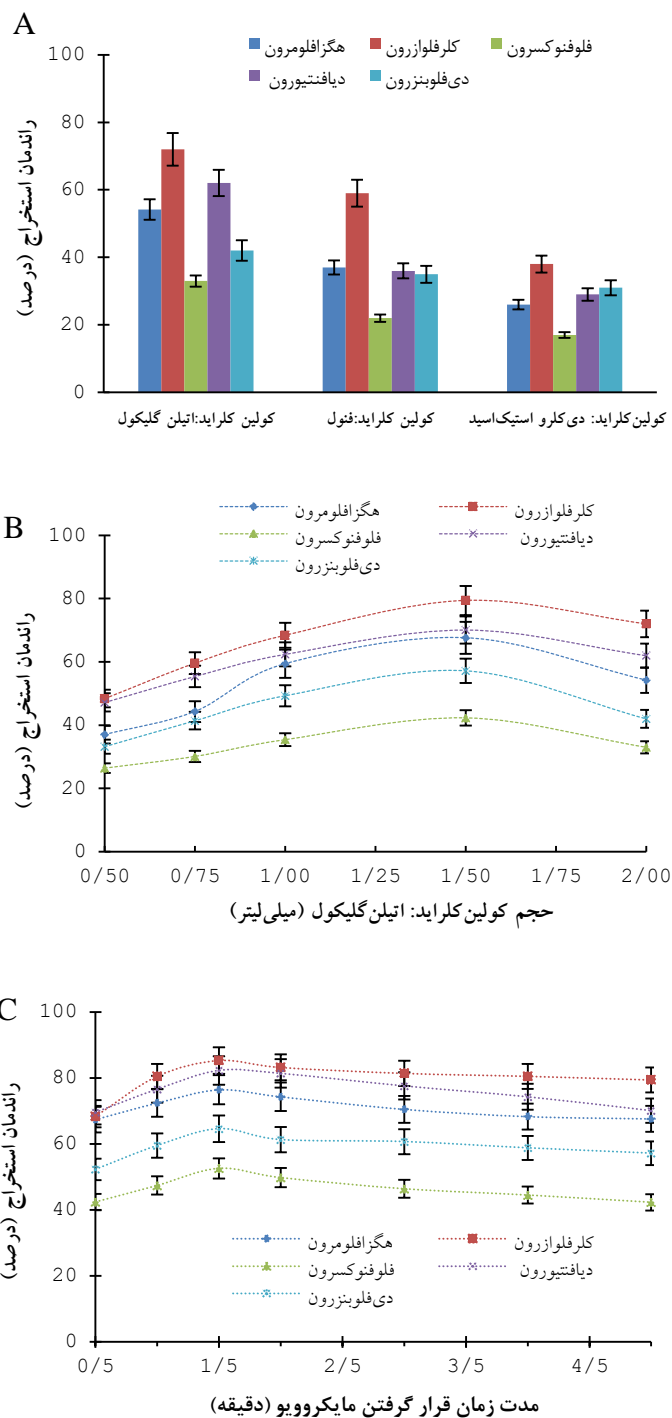
همان‌طور که در نمودار (۲) مشاهده می‌شود تولوئن کارایی استخراج بالاتری نسبت به سایر حلال‌های مورد استفاده دارد.

- حجم حلال استخراج کننده

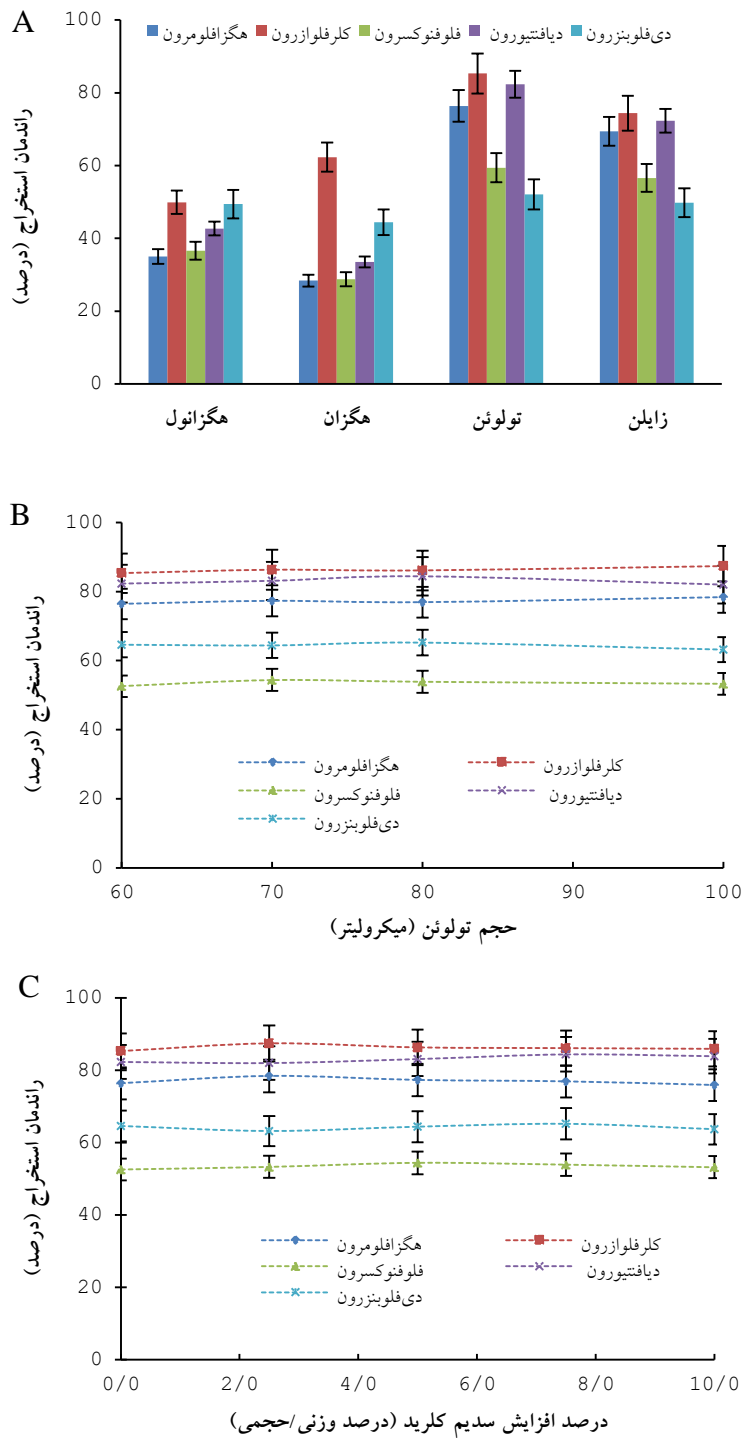
نتایج نشان داد که در طول فرآیند DLLME افزایش حجم حلال استخراج کننده، تأثیر محسوسی در کارایی روش پیشنهادی نداشته و به دلیل این که با افزایش حجم حلال استخراج کننده، حجم فاز رویی افزایش یافته و تبخیر این حلال در مرحله بعد زمان بر خواهد بود، ۶۰ میکرولیتر به عنوان حجم بهینه انتخاب شد.

- اثر نمک زنی

نتایج به دست آمده در نمودار (۲) نشان می‌دهد که افزایش نمک تأثیر محسوسی در کارایی استخراج نداشته و لذا مراحل بعدی بدون افزایش نمک صورت گرفت.



نمودار (۱) - انتخاب نوع حلال استخراج‌کننده/پخش‌کننده (A)، حجم حلال استخراج‌کننده/پخش‌کننده (B) و تأثیر مدت زمان قرارگرفته تحت امواج ماکروویو در مرحله کچرز از استخراج حشره‌کش‌های بنزوئیل‌اوره در نمونه‌های میوه



نمودار (۲) - انتخاب نوع حلال استخراج کننده (A)، حجم حلال استخراج کننده (B) و اثر نمک‌زنی (C) در کارایی مرحله DLLME از استخراج حشره‌کش‌های بنزوئیل‌اوره در نمونه‌های میوه



## - نتایج مشخصات تجزیه‌ای

پارامترهای تجزیه‌ای روش حاضر تحت شرایط بهینه به دست آمدند. معادله رگرسیون برای داده‌های حاصله در محدوده مورد بررسی در جدول (۲) بیان شده است. از منحنی کالیبراسیون مقدار مجذور ضریب همبستگی ( $r^2$ ) و محدوده خطی روش (LDR) برای هر یک از آنالیت‌ها به دست آمد. حد تشخیص (LOD) و حد اندازه‌گیری (LOQ) به ترتیب برابر غلظت‌هایی در نظر گرفته شدند

که در آن‌ها نسبت سیگنال به نویز ۳ و ۱۰ می‌باشد. به منظور بررسی تکرارپذیری و دقت روش از انحراف استاندارد نسبی (RSD%) استفاده شد. محاسبه فاکتور تغلیظ از مقایسه مساحت زیرپیک آنالیت‌های محلول استاندارد با مساحت پیک آنالیت‌های موجود در میوه‌ها پس از اجرای روش پیشنهادی و استخراج صورت گرفت. نتایج حاصل از مشخصات تجزیه‌ای روش در جدول (۲) ارائه شده است.

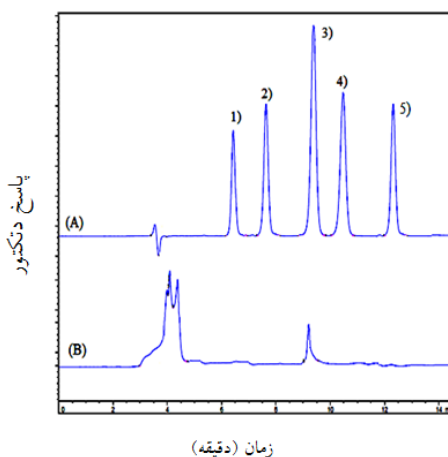
جدول (۲)- ارقام شایستگی روش پیشنهادی در استخراج حشره‌کش‌های بنزوئیل‌اوره از نمونه‌های میوه

آنالیت	محدوده خطی (mg/lit)	حد تشخیص (mg/lit)	حد اندازه‌گیری (mg/lit)	مجدور ضریب همبستگی	انحراف استاندارد نسبی (%) (n=۵)	راندمان استخراج $\pm$ (n=۳)	فاکتور تغلیظ $\pm$ (n=۳)
هگزافلومرون	۱۳/۳-۴۰۰۰	۳/۸	۱۳/۳	۰/۹۹۹۴	۶/۲	۷۷ $\pm$ ۴	۷۷ $\pm$ ۴
کلرفلوازرون	۱۱/۲-۴۰۰۰	۳/۳	۱۱/۲	۰/۹۹۸۹	۵/۹	۸۵ $\pm$ ۷	۸۵ $\pm$ ۷
فلوفنوکسرون	۲۲/۲-۴۰۰۰	۶/۵	۲۲/۲	۰/۹۹۹۶	۶/۳	۵۲ $\pm$ ۵	۵۲ $\pm$ ۵
دیافتیورون	۱۳/۲-۴۰۰۰	۳/۸	۱۳/۲	۰/۹۹۹۷	۷/۱	۸۲ $\pm$ ۶	۸۲ $\pm$ ۶
دی‌فلوبنزرون	۱۹/۹-۴۰۰۰	۵/۹	۱۹/۹	۰/۹۹۹۴	۴/۹	۶۴ $\pm$ ۵	۶۴ $\pm$ ۵

## - نتایج آنالیز نمونه‌های حقیقی

برای بررسی قابلیت روش پیشنهادی در اندازه‌گیری حشره‌کش‌های مورد مطالعه در نمونه‌های حقیقی، اقدام به اندازه‌گیری آن‌ها در نمونه‌های میوه تحت شرایط بهینه نمودیم. این نمونه‌ها طبق شرایط بهینه با روش پیشنهادی تغلیظ و تلخیص شده و سپس با HPLC-DAD مورد آنالیز قرار گرفتند. نمودار (۳)، کروماتوگرام‌های مربوط به تزریق مستقیم استاندارد سموم مورد مطالعه (هرکدام

به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر در استونیتریل) و نمونه انگور بدون اسپایک را نشان می‌دهد. مقایسه کروماتوگرام‌های حاصل از نمونه‌ها با کروماتوگرام حاصل از نمونه استاندارد نشان داد در نمونه انگور تازه حشره‌کش فلوفنوکسرون (n=۳) به غلظت  $۱۷ \pm ۰/۵$  میکروگرم در لیتر وجود دارد. در سایر نمونه‌ها هیچ پیکی در موقعیت حشره‌کش‌های مورد مطالعه مشاهده نشد.



نمودار (۳)- کروماتوگرام‌های HPLC-DAD مربوط به محلول استاندارد (۱۰ میلی گرم در لیتر) آفت‌کش‌های ۱- کلرفلوازرون ۲- دیافنتیورون ۳- فلوفنوکسرون ۴- هگزافلومرون و ۵- دی‌فلوبنزرون (A) و نمونه انگور اسپایک نشده (B).

اسپایک شد و مقادیر بازیابی نسبی نسبت به آب دیونیزه محاسبه شد (Chandran and Singh, 2007). نتایج به‌دست آمده که جدول (۳) آورده شده است نشان می‌دهد که ماتریکس نمونه‌ها تأثیر محسوسی در کارایی روش پیشنهادی ندارد.

#### - بررسی اثر ماتریکس در نمونه‌های حقیقی

به‌منظور بررسی اثر ماتریکس در نمونه‌های حقیقی، همه نمونه‌ها با آفت‌کش‌های مورد مطالعه به غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ نانوگرم در میلی‌لیتر آلوده شدند و هم‌راستا با این نمونه‌ها، نمونه آب دیونیزه با غلظت یکسان هم

جدول (۳)- بررسی اثر ماتریکس نمونه‌های میوه در استخراج حشره‌کش‌های بنزوئیل‌اوره

بازیابی نسبی $\pm$ انحراف استاندارد (n=۳)					
آتالیت	پرتقال	زردآلو	سیب	آلبالو	انگور
نمونه‌های اسپایک‌شده با هریک از آنالیت‌ها به غلظت ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر					
هگزافلومرون	۹۴ $\pm$ ۴	۹۵ $\pm$ ۵	۹۰ $\pm$ ۶	۸۹ $\pm$ ۴	۹۴ $\pm$ ۴
کلرفلوازرون	۹۶ $\pm$ ۵	۹۵ $\pm$ ۴	۹۹ $\pm$ ۵	۹۴ $\pm$ ۳	۹۰ $\pm$ ۵
فلوفنوکسرون	۹۰ $\pm$ ۴	۹۳ $\pm$ ۷	۹۸ $\pm$ ۴	۹۳ $\pm$ ۴	۹۲ $\pm$ ۶
دیافنتیورون	۹۳ $\pm$ ۴	۹۲ $\pm$ ۶	۹۷ $\pm$ ۶	۹۵ $\pm$ ۵	۹۹ $\pm$ ۵
دی‌فلوبنزرون	۹۲ $\pm$ ۲	۹۱ $\pm$ ۵	۹۵ $\pm$ ۵	۹۶ $\pm$ ۵	۹۴ $\pm$ ۷
نمونه‌های اسپایک‌شده با هریک از آنالیت‌ها به غلظت ۱۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر					
هگزافلومرون	۹۶ $\pm$ ۴	۹۰ $\pm$ ۶	۹۳ $\pm$ ۶	۹۵ $\pm$ ۶	۹۵ $\pm$ ۴
کلرفلوازرون	۹۷ $\pm$ ۳	۹۴ $\pm$ ۷	۹۴ $\pm$ ۴	۹۵ $\pm$ ۷	۹۶ $\pm$ ۳
فلوفنوکسرون	۹۵ $\pm$ ۵	۹۳ $\pm$ ۳	۹۲ $\pm$ ۷	۹۷ $\pm$ ۵	۹۷ $\pm$ ۴
دیافنتیورون	۹۶ $\pm$ ۸	۹۶ $\pm$ ۴	۸۹ $\pm$ ۴	۹۴ $\pm$ ۶	۹۴ $\pm$ ۴
دی‌فلوبنزرون	۹۶ $\pm$ ۵	۹۲ $\pm$ ۵	۹۸ $\pm$ ۶	۹۵ $\pm$ ۵	۹۲ $\pm$ ۵

## بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، حلال استخراج‌کننده برای استخراج آنالیت‌های انتخاب‌شده در مرحله QuEChERS به‌عنوان حلال پخش‌کننده در مرحله DLLME استفاده شد. با در نظر گرفتن این موضوع و به‌دلیل قابلیت استخراج بالای حلال‌های اتکتیک، از حلال‌های اتکتیک قابل اختلاط با آب استفاده شد (Xinya, et al., 2020).

حجم حلال استخراج‌کننده/پخش‌کننده پارامتر دیگری است که می‌تواند راندمان استخراج آنالیت‌های مورد نظر را تحت تأثیر قرار دهد. در حجم‌های کم ChCl:EG استخراج آنالیت‌ها از نمونه کامل نبوده یا حالت ابری شکل به‌خوبی در مرحله DLLME تشکیل نمی‌شود. اما در حجم‌های بالای حلال استخراج‌کننده به‌رغم استخراج باراندمان بالا، قطبیت فاز آبی کاهش یافته و محلولیت آنالیت‌ها در این فاز در مرحله DLLME افزایش می‌یابد و موجب کاهش سیگنال‌های تجزیه‌ای می‌شود (Mousavi, et al., 2018).

زمان در معرض قرارگیری امواج ماکروویو نیز باید مورد بهینه‌سازی قرار گیرد چراکه امواج ماکروویو می‌تواند سطح تماس حلال استخراج‌کننده/پخش‌کننده را با نمونه‌ی آزمایشی افزایش داده و منجر به افزایش کارایی استخراج آنالیت‌ها گردد. از طرف دیگر افزایش زمان امواج ماکروویو می‌تواند بر تخریب و تغییر شکل ترکیبات هدف مؤثر باشد و منجر به کاهش راندمان استخراج شود (Zhong, et al., 2019).

در طول فرآیند DLLME، نوع و حجم حلال استخراج‌کننده عوامل مهمی هستند که می‌توانند عملکرد استخراج را تحت تأثیر قرار دهند. برای بهینه‌سازی این پارامتر، حلال‌های استخراج‌کننده سبک‌تر از آب به‌دلیل

سمیت کمتر آن‌ها انتخاب شدند (Sajid and Alhooshani, 2018). هرچه حجم حلال استخراج‌کننده اولیه بیشتر باشد در این صورت حجم فاز جمع شده پس از استخراج نیز بیشتر می‌شود و فاکتور تغلیظ کاهش یافته و سیگنال‌های تجزیه‌ای نیز کاهش خواهند یافت. از طرفی با کاهش حجم حلال، کارایی استخراج و تکرارپذیری کاهش می‌یابد (Jalili, et al., 2019).

عموماً در روش‌های استخراج، افزایش نمک بر محلول‌های آبی دو اثر متقابل دارد. اول این‌که باعث افزایش نیروی یونی فاز آبی شده و باعث کاهش حلالیت آنالیت‌ها در فاز آبی و انتقال بیشتر آن‌ها به‌داخل حلال استخراج‌کننده شده و در نتیجه راندمان استخراج افزایش می‌یابد. از طرف دیگر افزایش نمک باعث افزایش ویسکوزیته فاز آبی شده و ضریب انتشار آنالیت را در فاز آبی تحت تأثیر قرار داده و منجر به کاهش راندمان استخراج می‌شود (Farajzadeh, et al., 2015). لذا از پارامترهای مهم در اکثر روش‌های استخراج که نیاز به بررسی و بهینه‌سازی دارد مقدار نمک می‌باشد.

تاکنون روش‌های استخراج مختلفی برای اندازه‌گیری آفت‌کش‌های بنزوئیل‌اوره در نمونه‌های گوناگون مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مقایسه پارامترهای تجزیه‌ای روش حاضر نشان داد ارقام شایستگی روش پیشنهادی نسبت به سایر روش‌ها قابل مقایسه یا مطلوب‌تر می‌باشد به‌طوری‌که در میکرواستخراج مایع-مایع پخش‌ی با استفاده از مایعات یونی مغناطیسی که برای استخراج هگزافلومرون، فلوفنوکسرون و کلرفلوازرون از نمونه آب انجام شد، حد تشخیص ۰/۱۵-۰/۰۵ میکروگرم در لیتر، حد اندازه‌گیری ۳۰۰-۱ میکروگرم در لیتر، انحراف استاندارد نسبی ۴/۹-۲/۷ درصد و فاکتور تغلیظ ۳۰۲-

از نمونه‌های میوه انگور، سیب، آلبالو و زردآلو و پرتقال و اندازه‌گیری کمی آن‌ها به روش HPLC-DAD استفاده شد. محدوده خطی روش حاضر قابل مقایسه یا وسیع‌تر از روش‌های مقایسه شده است و مقادیر حد تشخیص به دست آمده در این مطالعه پایین‌تر از سایر روش‌ها می‌باشد. طوری که تحت شرایط بهینه حد تشخیص و کمی بودن در بازه ۳/۳-۶/۵ و ۱۱-۲۲/۲ نانوگرم در میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین راندمان استخراج و فاکتورهای تغلیظ در بازه ۵۲-۸۸ درصد و ۵۲-۸۸ به دست آمد که نشان می‌دهد فاکتور تغلیظ این روش بسیار بزرگ‌تر از سایر روش‌های مقایسه شده می‌باشد. علاوه بر این درصد RSD بر اساس مساحت زیرپیک، ۴/۹ تا ۷/۱ به دست آمد که نشان از تکرارپذیری بالای روش ارائه شده دارد. با توجه به نتایج، روش پیشنهادی در این پژوهش را می‌توان به عنوان روشی سریع، حساس، ارزان و تکرارپذیر برای استخراج آفت‌کش‌های بنزوئیل‌اوره از نمونه‌های میوه معرفی نمود.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از مدیریت آزمایشگاه‌های کنترل غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی تبریز برای مساعدت‌های بی‌دریغ‌شان در انجام مراحل عملی پژوهش حاضر قدردانی می‌شود.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

۲۶۱ گزارش شد (Zhang, et al., 2012) و همین مقادیر در تحقیق دیگری با استفاده از روش میکرواستخراج فاز جامد کوپل شده به کروماتوگرافی مایع مجهز به دکتور اسپکترومتر جرمی برای نمونه آب‌میوه به ترتیب ۰/۲۸-۰/۰۵ میکروگرم در لیتر، ۰/۵-۵۰۰ میکروگرم در لیتر، ۳/۱-۶ درصد و ۱۶۰-۲۴۶ بوده است (Yang, et al., 2014). همچنین مقادیر شایستگی شامل حد تشخیص، حد اندازه‌گیری و درصد انحراف استاندارد نسبی در اندازه‌گیری سموم اوره از نمونه آب به وسیله کروماتوگرافی مایع مجهز به دکتور اسپکترومتر جرمی و روش میکرواستخراج فاز جامد به ترتیب ۰/۰۴-۰/۱ میکروگرم در لیتر، ۱-۲۵۰ میکروگرم در لیتر و ۱۴/۵-۱۰/۱ بود (Berrada, et al., 2000). در تحقیق دیگری که به منظور اندازه‌گیری کلرفلوازرون و دیافتتیورون به روش میکرواستخراج فاز جامد کوپل شده به کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در نمونه آب‌میوه استفاده شد. حد تشخیص ۰/۰۷-۰/۲۹ میکروگرم در لیتر، حد اندازه‌گیری ۰/۵-۲۰۰ میکروگرم در لیتر و انحراف استاندارد نسبی ۳-۸/۴ درصد حاصل شد (Mei, et al., 2015). با توجه به نتایج، محدوده خطی روش پیشنهادی در این پژوهش قابل مقایسه یا وسیع‌تر از روش‌های مقایسه شده است. همچنین فاکتور تغلیظ این روش بسیار بزرگ‌تر از سایر روش‌های مقایسه شده می‌باشد. دارا بودن مقادیر حد تشخیص به طور قابل توجه پایین‌تر از سایر روش‌ها، مزیت این روش می‌باشد. در این پژوهش از ترکیب روش‌های کپرز و میکرو استخراج مایع-مایع پخشی برای استخراج و پیش تغلیظ برخی از حشره‌کش‌های بنزوئیل‌اوره پرکاربرد در ایران

## منابع

- Amini, R., Khandaghi, J. and Afshar mogaddam, M.R. (2018). Combination of vortex-assisted liquid–liquid extraction and air-assisted liquid–liquid microextraction for the extraction of bisphenol A and bisphenol B in canned doogh samples. *Food Analytical Methods*, 11(11): 3267–3275.
- Baig, S.A., Akhtera, N.A., Ashfaq, M. and 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.
- Berrada, H., Font, G. and Moltó, J.C. (2000). Indirect analysis of urea herbicides from environmental water using solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 890(2): 303-312.
- Bhanti, M., and 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.
- Bidari, A., Ganjali, M.R., Norouzi, P., Hosseini, M.R.M. and Assadi, Y. (2011). Sample Preparation method for the analysis of some organophosphorus pesticides residues in tomato by ultrasound-assisted solvent extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction. *Food Chemistry*, 126(4): 1840-1844.
- Chandran, S. and Singh, R. (2007). Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(1): 4-14.
- ECD (European Commission Decision), implementing Council Directive 657/EC. 2002. Concerning the performance of analytical methods.
- Emami, A., Rastegar, H., Amirahmadi, M., Shoeibi, S. and Mousavi, Z. (2015). Multi-residue analysis of pesticides in pistachio using gas chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS). *Iranian Journal of Toxicology*, 8(2): 1174-1181.
- EU Pesticides database. Pesticide EU-MRLs/Regulation EC No.396. 2005. <http://ec.europa.eu/sanco-pesticides>.
- Farajzadeh, M.A., AfsharMogaddam, M.R. and 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.
- Gildea, R.C., Huffling, K. and Sattler, B. (2010). Pesticides and health risks. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 39(1): 103–110.
- Jalili, V., Barkhordari, A. and Ghiasvand, A. (2020). New extraction media in microextraction techniques, A review of reviews. *Microchemical Journal*, 153: 104386.
- Jeddy, M. and Khandaghi, J. (2019). Detection and quantification of phytosterols in yogurt using gas chromatography. *Journal of Food Hygiene*, 9(1): 59-71. [In persian]
- Ledirac, N., Delescluse, C., Lesca, P., Piechocki, M. P. and Rahmani, R. (2000). Benzoyl-urea insecticide is a potent inhibitor of TCDD-induced CYP1A1 expression in hepG2 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 164(3): 273-279.
- Mei, M., Huang, X., Liao, K. and Yu, D. (2015). Sensitive monitoring of benzoylurea insecticides in water and juice samples treated with multiple monolithic fiber solid-phase microextraction and liquid chromatographic analysis, *Analytica Chimica Acta*, 860: 29-36.
- Mitra, S. (2003). *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, New Jersey, John Wiley.
- Mousavi, L., Tamiji, Z. and Khoshayand, M.R. (2018). Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid–liquid microextraction method – A review. *Talanta*, 190: 335-356.
- Pil-Bala, B., Khandaghi J. and Afshar Mogaddam, M.R. (2019). Analysis of endocrine-disrupting compounds from cheese samples using pressurized liquid extraction combined with dispersive

- liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. *Food Analytical Methods*, 12(7): 1604–1611.
- Psillakis, E. and Kalogerakis, N. (2003). Developments in liquid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(9): 565–574.
  - Saad Louy, F. and Khandaghi, J. (2018). Identification and quantification of fatty acids in edible and confectionary oils in Tabriz by gas chromatography. *Journal of Food Hygiene*, 8(2): 45-54. [In Persian]
  - Sajid, M. and Alhooshani K. (2018). Dispersive liquid-liquid microextraction based binary extraction techniques prior to chromatographic analysis: A review. *Trends in Analytical Chemistry*, 108: 167-182.
  - Saraji, M. (2005). Dynamic headspace liquid-phase microextraction of alcohols. *Journal of Chromatography A*, 1062(1): 15–21.
  - Umesh, D.P., Chetan, M.Z., Jitendra, D.B., Santosh, G.T. and Ratnamala, S.B. (2012). Hybrid molecules of carvacrol and benzoyl urea/thiourea with potential applications in agriculture and medicine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 22(17): 5550-5554.
  - Vanderhoff, G.R. and Van Zoonen, P. (1999). Trace analysis of pesticides by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 843(1-2): 301–322.
  - Xinya, L., Mengyuan, C., Zilin, M., Heng, Q. and Wenfeng, Z. (2020). Extraction of benzoylurea pesticides from tea and fruit juices using deep eutectic solvents. *Journal of Chromatography B*, 1140: 121995.
  - Yang, M., Zhang, P., Hu, L. and Runhua, C. (2014). Ionic liquid-assisted liquid-phase microextraction based on the solidification of floating organic droplets combined with high performance liquid chromatography for the determination of benzoylurea insecticide in fruit juice. *Journal of Chromatography A*, 1360: 47-56.
  - Zhang, J., Li, M., Yang, M., Peng, B., Li, Y., Zhou, W., et al., (2012). Magnetic retrieval of ionic liquids: Fast dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of benzoylurea insecticides in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 1254: 23-29.
  - Zhong, Z., Li, G., Luo, Z. and Zhu, B. (2019). Microwave-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupling to solidification of floating organic droplet for colorants analysis in selected cosmetics by liquid chromatography. *Talanta*, 1941: 46-54.