

“Research article”

DOI: 10.30495/JFH.2023.1988512.1404

## Development of QuEChERS method Combined with dispersive liquid-liquid microextraction for determination of some pesticides in cucumber samples using High-performance liquid chromatography

Nasiri, F.<sup>1</sup>, Haghghat Asiabar, A.<sup>2</sup>, Afshar Mogaddam, M.R.<sup>3,4</sup>, Khandaghi, J.<sup>2,5</sup> \*

1. M.Sc Graduate of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran

2. Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran

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

4. Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

5. Department of Food Biotechnology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

\*Corresponding author: khandaghi@iausa.ac.ir

(Received: 2023/6/11 Accepted: 2023/8/6)

### Abstract

Due to the widespread use of pesticides to protect agricultural products around the world and the accumulation of residues of these substances in plant tissue, most of the products that have been exposed to pesticides contain amounts of pesticide residues. The most popular and sensitive method for determining low amounts of pesticide residues in order to find out their maximum residue levels (MRLs) in food products is the chromatographic assay. In the present study, the diazinon, chlorpyrifos, imidacloprid, acetamiprid, thiacloprid and fenvalerate insecticides were extracted from cucumber samples by using QuEChERS method in combination with liquid-liquid microextraction and were determined by HPLC-DAD. For this purpose, the effective factors in the developed extraction method were optimized and the mentioned method was validated. Based on the results, the target analytes were successfully extracted simultaneously using 2 ml of a mixture of acetonitrile, methanol, and acetone (in the QuEChERS step). Further, the highest efficiency in the second extraction step was obtained using 65 µl of hexanol and 15% NaCl. The LOD between 0.36 and 0.57 ng/g, high repeatability in the range of 3.6 to 6.8 (based on the RSD%), and extraction recovery of analytes in the range of 76 to 84% of the developed method's merit figures indicate the method's high capability in extracting particular pesticides. Overall, the procedure described in this study is a simple and cheap method and has a good ability to extract the desired pesticides from cucumber samples.

**Conflict of interest:** None declared.

**Keywords:** Insecticide, QuEChERS, Microextraction, High-performance liquid chromatography, Cucumber

## توسعه روش کچرز تلفیق شده با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی برای شناسایی برخی از آفت‌کش‌ها در نمونه‌های خیار به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

شناسایی آفت‌کش‌های نمونه‌های خیار با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

فاطمه نصیری<sup>۱</sup>، آذر حقیقت آسیابری<sup>۲</sup>، محمدرضا افشارمقدم<sup>۳</sup> و<sup>۴</sup>، جلیل خندقی<sup>۵\*</sup>

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران

۲- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران

۳- مرکز ایمنی غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۴- مرکز تحقیقات آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۵- گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران

\*نویسنده مسئول مکاتبات: khandaghi@iausa.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۳/۲۱ پذیرش نهایی: ۱۴۰۲/۵/۱۵)

### چکیده

با توجه به استفاده گسترده از سموم آفت‌کش به منظور حفاظت از محصولات کشاورزی در سراسر جهان و تجمع باقیمانده این مواد در داخل بافت گیاهان، بیشتر محصولاتی که در معرض آفت‌کش‌ها قرار گرفته‌اند حاوی مقادیری از باقیمانده آفت‌کش‌ها هستند. روش‌های کروماتوگرافی که از حساسیت بالایی برخوردارند، رایج‌ترین راه تشخیص مقادیر پایین باقیمانده آفت‌کش‌ها برای پی بردن به بیشینه مقدار مجاز آن‌ها در محصولات غذایی هستند. در تحقیق حاضر حشره‌کش‌های دی‌آزینون، کلرپیریفوس، ایمیداکلوپراید، استامپی‌پراید، تیاکلوپراید و فن‌ورات با استفاده از تلفیق روش کچرز با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی از نمونه‌های خیار استخراج شده و با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز آرایه دیودی شناسایی شده‌اند. برای این منظور، عوامل موثر در روش استخراج توسعه داده شده بهینه‌سازی شده و روش مذکور اعتباربخشی شد. بر اساس نتایج حاصله، استخراج موثر هم‌زمان آنالیت‌های هدف با استفاده از ۲ میلی‌لیتر از مخلوط سه حلال استونیتریل، متانول و استون (در مرحله استخراج کچرز) صورت گرفت. به‌علاوه بالاترین کارایی در مرحله دوم استخراج با استفاده از ۶۵ میکرولیتر حلال هگزانول و ۱۵ درصد کلرید سدیم به‌دست آمد. ارقام شایستگی روش توسعه داده شده مانند حدود تشخیص ۰/۳۶ تا ۰/۵۷ نانوگرم در گرم و تکرارپذیری بالا در محدوده ۳/۶ تا ۶/۸ (بر اساس درصد انحراف استاندارد نسبی) و همچنین درصد بازیابی آنالیت‌ها در محدوده ۷۶ تا ۸۴ درصد نشان از قابلیت بالای روش در استخراج آفت‌کش‌های منتخب دارد. در مجموع روش ارائه شده در این مطالعه، روشی ساده و ارزان بوده و از قابلیت خوبی برای استخراج آفت‌کش‌های هدف از نمونه‌های خیار برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: حشره‌کش، کچرز، میکرواستخراج، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، خیار

## مقدمه

با توجه به اینکه سالانه درصد قابل توجه‌ای از محصولات کشاورزی توسط آفات مختلف از بین می‌رود لذا استفاده از سموم آفت‌کش مختلف به منظور حفاظت از تولیدات کشاورزی به امری اجتناب‌ناپذیر در سراسر جهان تبدیل شده‌اند (Baig *et al.*, 2009). این در حالی است که این مواد در داخل بافت گیاهان تجمع می‌یابند و بیشتر محصولاتی که در معرض آفت‌کش‌ها قرار گرفته‌اند حاوی مقادیری از باقیمانده آفت‌کش‌ها خواهند بود (Zare Sani *et al.*, 2021). به‌طور کلی آفت‌کش به ترکیباتی اطلاق می‌شود که سبب توقف رشد و یا مانع اثرات زیان‌بار عامل ایجاد کننده آفت می‌شوند و عموماً ترکیباتی با ماندگاری بالا و بنابراین پایدار در اکوسیستم هستند (Van der Hoff and Van Zoonen, 1999). اولین آفت‌کش‌های به‌کار گرفته شده مواد ساده‌ای نظیر ترکیبات آرسنیک‌دار، روغن‌های نفتی و حشره‌کش‌های گیاهی مانند نیکوتین بودند. از آفت‌کش‌های امروزی که اثربخشی و دامنه عملکرد گسترده‌ای دارند می‌توان ترکیبات ارگانوفسفره، پایرتروئیدها و سموم نئونیکوتینوئیدی را نام برد (Cheng, 1990).

نئونیکوتینوئیدها (NEOs) دسته‌ای از حشره‌کش‌های وسیع‌الطیف و رایج در بازار جهانی هستند که با آسیب برگشت‌ناپذیر گیرنده‌های استیل کولین حشرات آن‌ها را هدف قرار می‌دهند. گرچه اتحادیه اروپا مصرف بسیاری از انواع این آفت‌کش‌ها را به‌دلیل مضرات آن ممنوع کرده است با این حال در اکثر کشورها استفاده از حشره‌کش‌های نئونیکوتینوئیدی به دلیل ارزان بودن و اثربخشی قوی آن هنوز ترجیح داده

می‌شود. از اثرات بالقوه تهدید کننده سلامتی این سموم می‌توان به سمیت عصبی و خواص سرطان‌زایی برای پستانداران اشاره کرد. (Zhang and Lu, 2022). گروه دیگری از آفت‌کش‌های مورد استفاده در صنعت کشاورزی، سموم ارگانوفسفره هستند. این ترکیبات برای انسان بسیار سمی بوده و علی‌رغم وضع قوانین محدود و ممنوع کننده کاربرد آن‌ها، فراوانی موارد وقوع مسمومیت‌های انسان با این سموم نشان دهنده در دسترس بودن و استفاده رایج از آن‌ها در کشورمان است (Fakhim Rasoolzadeh *et al.*, 2020). سموم پایرتروئیدی نیز دسته دیگری از حشره‌کش‌های سنتزی پرمصرف در کشاورزی هستند که دارای حلالیت بسیار پایین در آب بوده و حاوی یک بنیان استری و یک حلقه بنزنی هستند. علائم مسمومیت انسان با این آفت‌کش‌ها شباهت زیادی با مسمومیت با ارگانوفسفره‌ها دارد (Sheikhzadeh *et al.*, 2020).

به‌دلیل اثرات زیان‌بار اغلب سموم کشاورزی برای مصرف کنندگان، حد مجاز باقیمانده‌ی آن‌ها (MRLs) در محصولات غذایی در مقادیر ppm تعیین شده است (Mostafalou and Abdollahi, 2013). این مسئله، لزوم تشخیص مقادیر بسیار پایین آفت‌کش‌ها در محصولات غذایی با روش‌های با حساسیت بالا را به‌خوبی آشکار می‌سازد. در این زمینه، روش‌های کروماتوگرافی به دلیل ظرفیت جداسازی بالا بسیار مورد توجه محققین بوده است به‌طوری‌که تاکنون کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای جداسازی و تشخیص سموم بنزوئیل اوره (Rastpour *et al.*, 2022)، آفت‌کش‌های ارگانوفسفره (Zeidi *et al.*, 2020) و حشره‌کش‌های

(Acetamiprid)، تیاکلوپراید (Thiacloprid) و فن‌والرات (Fenvalerate) از نمونه‌های خیار توسعه یافته است. برای این منظور از تلفیق روش کچرز با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی استفاده شده و آفت‌کش‌های مورد مطالعه با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز آرایه دیودی شناسایی شده‌اند.

### مواد و روش‌ها

#### - نمونه‌ها و محلول‌ها

در این مطالعه، ۲۵ نمونه خیار (یک کیلو از هر نمونه) در بهار سال ۱۴۰۲ از میوه فروشی‌های سطح شهر خریداری شده و با آب دیونیزه شسته و به قطعات کوچک خرد شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه کنترل غذا و داروی مرکز تحقیقات ایمنی غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی تبریز آنالیز شدند. محلول مادر آفت‌کش‌های دی‌آزینون، کلرپیریفوس، ایمیداکلوپراید، استامی‌پراید، تیاکلوپراید و فن‌والرات (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) به صورت مخلوط و با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از هر یک از سموم در استونیتریل تهیه شد.

#### - روش استخراج آفت‌کش‌ها

پس از خرد و مخلوط کردن ۴ تا ۵ عدد خیار از هر نمونه اخذ شده، مقدار ۵ گرم از مخلوط نمونه خرد شده به داخل یک لوله آزمایش منتقل و سپس مقدار ۲ میلی‌لیتر از مخلوط حلال‌های استونیتریل، متانول و استون (به نسبت ۴۱/۶ : ۴۱/۶ : ۱۶/۶) به داخل نمونه اضافه شد. پس از ۳ دقیقه ورتکس کردن و سانتریفوژ کردن مخلوط حاصل (۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در

نئونیکوتینوئیدی (Afshar Mogaddam *et al.*, 2020) مورد استفاده قرار گرفته است.

با وجود توسعه بسیار خوب تکنیک‌های مبتنی بر کروماتوگرافی در تعیین آفت‌کش‌ها، برخی از عوامل از جمله ماتریکس پیچیده و غلظت کم ترکیبات هدف، استفاده مستقیم این تکنیک‌ها در آنالیز نمونه را محدود کرده است و بنابراین انجام برخی مراحل مقدماتی (مرحله پیش تغلیظ و آماده‌سازی) برای جداسازی ضروری است (Mitra and Brukh, 2003). روش کچرز (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) یکی از متداول‌ترین روش‌های آماده‌سازی در آنالیز آفت‌کش‌ها است. نقاط ضعف روش QuEChERS کلاسیک مانند فاکتور تغلیظ پایین و بازده پایین در نمونه‌های جامد (Lehotay *et al.*, 2003) سبب شده است تا محققان این روش را توام با روش‌های دیگر استخراج از جمله میکرواستخراج مایع-مایع پخشی یا DLLME (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) به کار ببرند (Rastpour *et al.*, 2022). در روش DLLME پخش شدن یک حلال آلی غیر قابل اختلاط با آب (حلال استخراج‌کننده) توسط یک حلال پخش‌کننده (قابل اختلاط با آب) در محلول آبی، موجب افزایش سطح تماس بین محلول آبی و حلال استخراج‌کننده شده و راندمان استخراج به طور قابل توجه‌ای افزایش می‌یابد (Gholizadeh *et al.*, 2022).

در این کار پژوهشی یک شیوه استخراج موثر و کارا به منظور استخراج آفت‌کش‌های دی‌آزینون (Diazinon)، کلرپیریفوس (Chlorpyrifos)، ایمیداکلوپراید (Imidacloprid)، استامی‌پراید

استاندارد سموم هدف (با غلظت‌های ۳، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰ نانوگرم در گرم) به روش بهینه سازی شده، پارامترهای تجزیه‌ای مانند حد تشخیص (Limit of detection)، حد اندازه‌گیری (Limit of quantification)، محدوده خطی (Linear range)، تکرارپذیری (براساس انحراف استاندارد نسبی یا RSD%) و راندمان استخراج (Extraction recovery) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

#### - شرایط بهینه‌ی HPLC

سیستم کروماتوگرافی (HPLC, Model 1525; Waters Milford, MA, USA) مجهز به آشکارساز DAD در شرایط بهینه‌شده به شکل زیر به کار گرفته شد. نوع ستون مورد استفاده C18 (۱۵۰ میلی‌متر × ۴/۶ میلی‌متر؛ اندازه ذرات ۵ میکرومتر) بوده و فاز متحرک مخلوط استونیتریل: آب به نسبت ۳۰ به ۷۰ (حجمی/حجمی) با جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه و شویش ایزوکراتیک اسفاده شد. دمای ستون ۳۵ درجه سلسیوس و حجم تزریق نمونه ۱۰ میکرولیتر بود. طول موج به کار رفته برای تشخیص آفت‌کش‌های دیازینون، کلرپیریفوس، ایمیداکلوپراید، استامی‌پراید، تیاکلوپراید و فن‌والرات به ترتیب ۲۴۷، ۲۸۰، ۲۷۰، ۲۴۵، ۲۷۰ و ۲۸۰ نانومتر بوده است.

#### - آنالیز نمونه‌های حقیقی

قابلیت روش پیشنهادی در آنالیز آفت‌کش‌های انتخابی، با اندازه‌گیری آن‌ها در نمونه‌های مختلف خیار بررسی شد. برای این منظور پس از آماده‌سازی نمونه‌ها با روش پیشنهادی، اندازه‌گیری محتوی سموم آن‌ها با HPLC-DAD انجام شد. برای مطالعه اثر احتمالی ماتریکس نمونه‌های خیار در استخراج آنالیت‌ها نیز،

دقیقه)، فاز رویی حاوی آنالیت‌ها برداشته شده و به حجم ۶۵ میکرولیتر از یک حلال غیر قابل اختلاط با آب (هگزانول) اضافه شد. در پایان، مخلوط حاصل به داخل ۵ میلی‌لیتر آب دیویز پخش شد تا در اثر این عمل حلال استخراج کننده به صورت قطرات ریزی آزاد شده و آنالیت‌ها به داخل این حلال، استخراج شوند. حلال جمع شده در سطح لوله آزمایش با یک لوله موئین برداشته شده و به دستگاه کروماتوگرافی فاز مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز آرایه دیودی تزریق شد.

#### - بهینه‌سازی شرایط استخراج در مرحله کچرز

این کار با انتخاب مخلوطی از سه حلال استخراج کننده استونیتریل، متانول و استون با استفاده از طرح آزمایشی مرکب مرکزی ساده و سپس بررسی اثر حجم‌های مختلفی (۱/۵، ۱/۷۵، ۲/۰۰، ۲/۲۵ و ۳ میلی‌لیتر) از مخلوط حلال‌ها و همچنین بهینه‌سازی اثر زمان‌های متفاوت ورتکس کردن شامل ۱ تا ۵ دقیقه انجام شد.

#### - بهینه‌سازی شرایط در مرحله میکرواستخراج مایع

##### مایع پخشی

حلال استخراج کننده در این مرحله از کار پژوهشی حاضر، از بین حلال‌های ان-هگزان، هگزانول و اکتانول در حجم‌های ۶۵ تا ۸۵ میکرولیتر انتخاب شد. به‌علاوه ارزیابی اثر نم‌ک‌زنی در کارایی استخراج در مرحله دوم، با افزودن مقادیر ۱۰ تا ۲۰ درصد وزنی/حجمی از سدیم کلرید به داخل محلول نمونه انجام شد.

#### - ارزیابی مشخصات تجزیه‌ای روش

برای اعتباربخشی به روش توسعه یافته، پس از رسم نمودار معیارگیری به‌وسیله آنالیز محلول‌های

**یافته‌ها**

- نتایج بهینه‌سازی مرحله استخراج کچرز

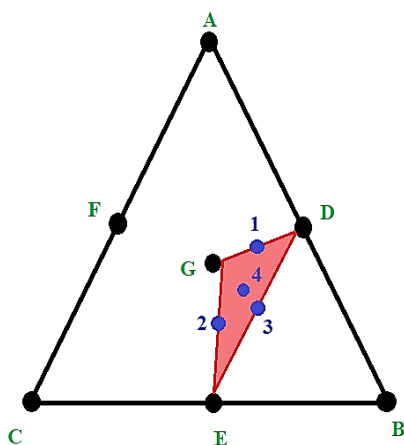
- نوع حلال استخراج / پخش کننده

نتایج بدست آمده (جدول ۱ و شکل ۱) نشان می‌دهد که نسبت اختلاط ۴۱/۶، ۴۱/۶، ۱۶/۶ از سه حلال استونیتریل، متانول و استون (نقطه ۱)، قابلیت بیشتری در استخراج آنالیت‌های هدف دارد. از این رو این ترکیب برای ادامه کار مورد استفاده قرار گرفت.

ابتدا عملیات استخراج روی پنج نمونه خیار اسپایک - شده با مقادیر ۵ و ۵۰ نانوگرم در گرم از هر کدام از آنالیت‌ها انجام شد. سپس مخلوط حلال‌های مورد استفاده در مرحله کچرز حاوی همان غلظت‌ها از سموم با روش مذکور استخراج و آنالیز شده و در پایان تاثیر ماتریکس نمونه‌ها با مقایسه سیگنال‌های تجزیه‌ای به دست آمده برای دو گروه تیمار اشاره شده تعیین شد.

جدول (۱) - مقادیر درصد بازیابی آفت‌کش‌های مورد مطالعه با اختلاط حلال‌های بکار رفته برای استخراج که با استفاده از طرح آزمایشی مرکزی سیمپلکس (شکل ۱) بهینه‌سازی شده است

فرمولاسیون	درصد اختلاط حلال			درصد بازیابی		
	استون	متانول	استونیتریل	تیاکلورپراید	استامی‌پراید	ایمیداکلوپراید
A	۰	۰	۱۰۰	۵۷/۲	۵۴/۳	۴۶/۹
B	۰	۱۰۰	۰	۴۸/۹	۴۲/۹	۵۴/۳
C	۱۰۰	۰	۰	۴۳/۹	۳۹/۸	۴۰/۹
D	۰	۵۰	۵۰	۵۸/۲	۵۱/۳	۵۲/۱
E	۵۰	۵۰	۰	۳۹/۵	۳۶/۶	۴۴/۲
F	۵۰	۰	۵۰	۴۷/۸	۴۵/۹	۳۴/۸
G	۳۳/۳	۳۳/۳	۳۳/۳	۴۱/۹	۴۰/۱	۴۹/۸
۱	۱۶/۶	۴۱/۶	۴۱/۶	۵۴/۹	۵۹/۶	۵۸/۴
۲	۴۱/۶	۴۱/۶	۲۶/۶	۴۹/۲	۵۰/۳	۴۷/۶
۳	۲۵	۵۰	۲۵	۵۴/۶	۵۴/۳	۳۸/۹
۴	۲۷/۷	۴۴/۴	۲۷/۷	۴۰/۱	۵۰/۱	۴۲/۴

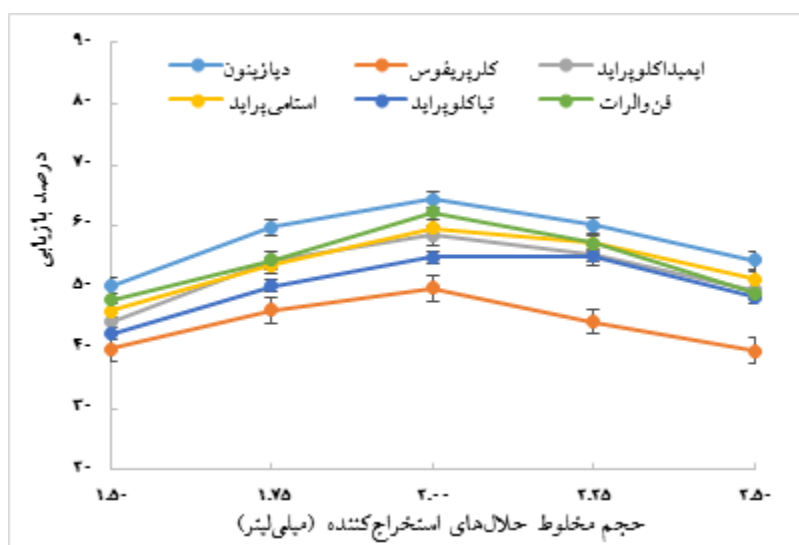


شکل (۱) - طرح آزمایشی مرکب مرکزی ساده برای انتخاب مخلوط بهینه حلال‌ها در استخراج آفت‌کش‌های مورد مطالعه از نمونه‌های خیار

**حجم حلال استخراج / پخش‌کننده**

افزایش حجم حلال تا ۲/۰ میلی‌لیتر، راندمان استخراج آنالیت‌ها افزایش و بعد از آن کاهش می‌یابد. حجم فاز جمع شده رویی در این شرایط حدود ۱/۳ میلی‌لیتر بود.

برای انتخاب حجم مناسب از ترکیب حلال‌های به‌کار گرفته شده در مرحله کچرز، آزمایشاتی با حجم‌های مختلف انجام و مشاهده شد (شکل ۲) که با

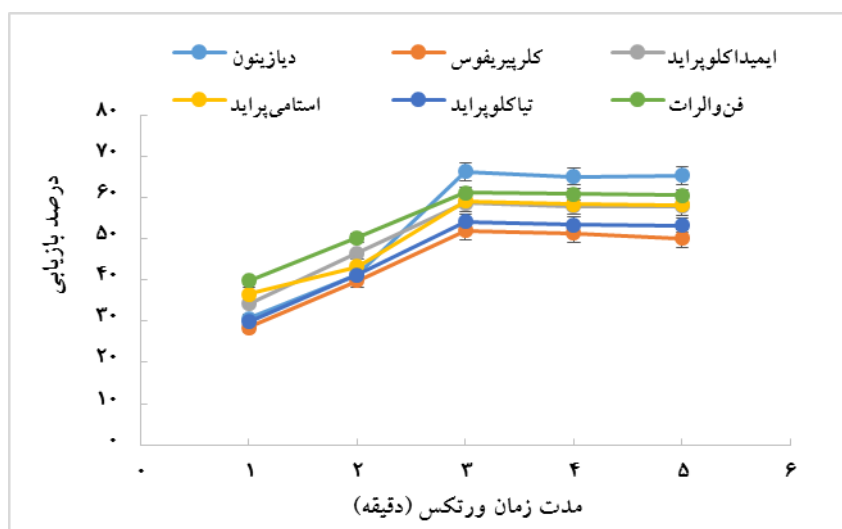


شکل (۲) - اثر حجم حلال استخراج‌کننده در بازده استخراج آفت‌کش‌های مورد مطالعه از نمونه‌های خیار

**مدت زمان ورتکس کردن**

در مدت زمان‌های مختلف انجام و بالاترین راندمان استخراج آنالیت‌ها در مدت زمان ۳ دقیقه ثبت گردید.

همان‌طور که در شکل ۳ دیده می‌شود، برای انتخاب مناسب‌ترین زمان مخلوط شدن نمونه، ورتکس کردن

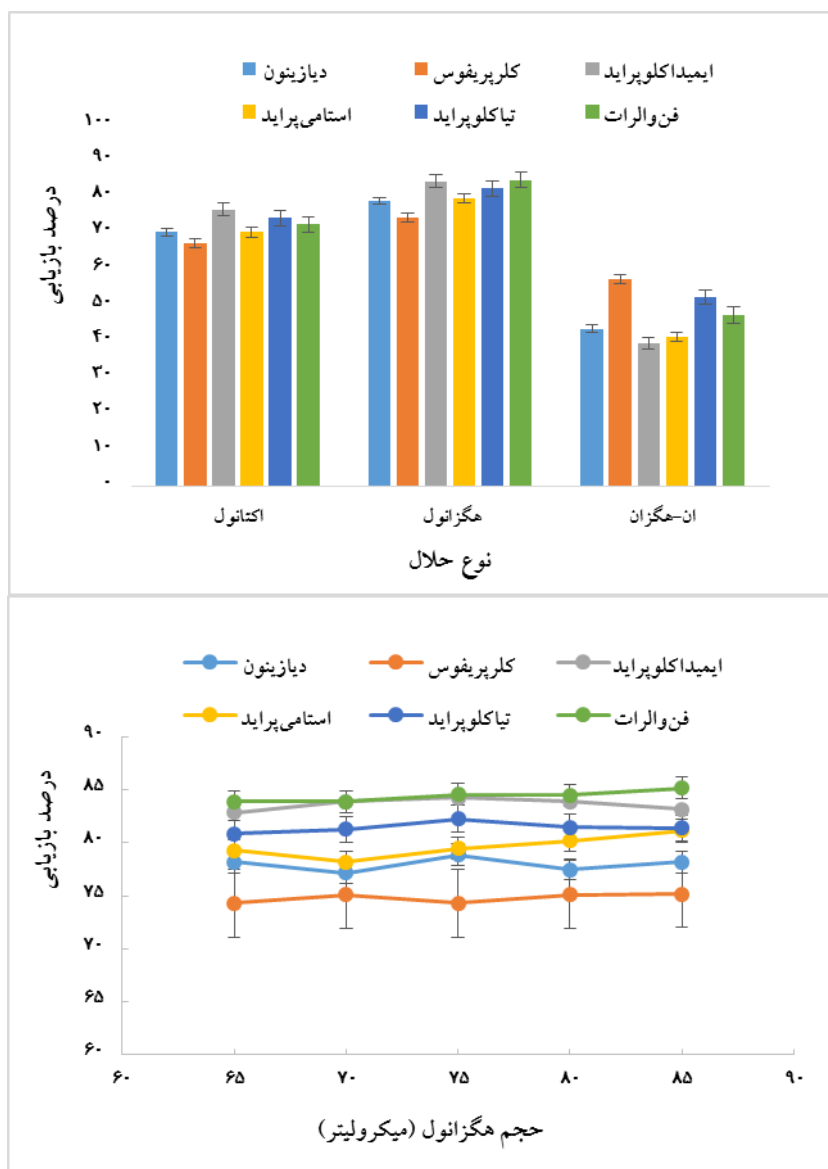


شکل (۳) - اثر ورتکس کردن در بازده استخراج آفت‌کش‌های مورد مطالعه از نمونه‌های خیار

۶۵ تا ۸۵ میکرولیتر تاثیر محسوسی در راندمان استخراج آفت‌کش‌های مورد بررسی ندارد. لذا جهت صرفه جویی در حلال مصرفی، ۶۵ میکرولیتر از هگزانول به عنوان حجم بهینه برای ادامه مطالعه انتخاب شد.

- نتایج بهینه‌سازی شرایط استخراج مایع-مایع پخش  
 - نوع و حجم حلال استخراج‌کننده  
 همانطور که در شکل ۴ دیده می‌شود در بین حلال‌های مورد بررسی در مرحله DLLME، راندمان استخراج با هگزانول بیشتر بوده و افزایش حجم آن از



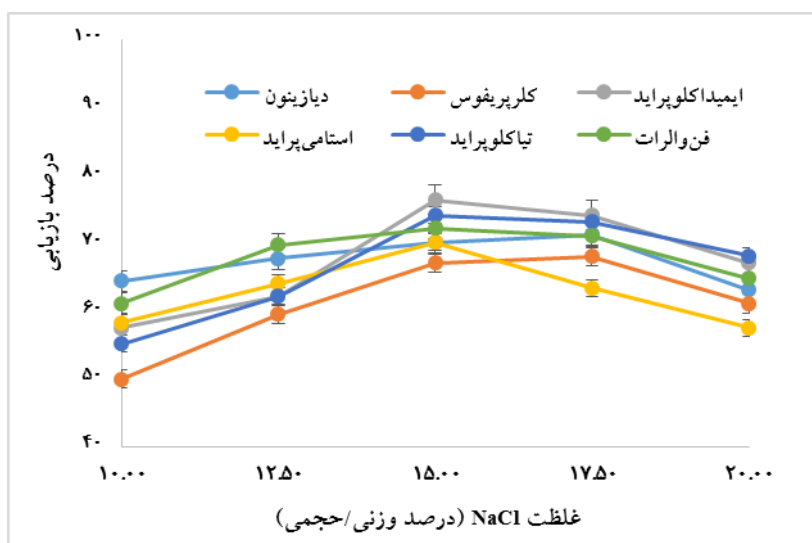


شکل (۴) - اثر نوع و حجم حلال استخراج‌کننده در مرحله DLLME در بازده استخراج آفت‌کش‌های مورد مطالعه از نمونه‌های خیار

#### - اثر نمک‌زنی

کلرید سدیم سبب افزایش کارایی روش پیشنهادی و سپس راندمان استخراج کاهش یافت (شکل ۵).

مطالعه اثر مقدار نمک بر روی کارایی استخراج در مرحله دوم، با افزودن مقادیر مختلفی از کلرید سدیم به داخل نمونه انجام و مشاهده شد که افزودن ۱۵ درصد



شکل (۵) - اثر نمک‌زنی در بازده استخراج آفت‌کش‌های مورد مطالعه از نمونه‌های خیار

#### مشخصات تجزیه‌ای روش پیشنهادی

پس از تعیین معادله رگرسیون خطی و رسم نمودار آن 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. همچنین برای ارزیابی دقت

روش، تکرارپذیری روش در یک روز و بین روزها بر اساس درصد انحراف استاندارد نسبی محاسبه شده و بازده استخراج هر یک از آنالیت‌های موجود در نمونه خیار پس اجرای روش استخراج پیشنهادی به دست آمد. نتایج ارقام شایستگی روش توسعه داده شده در جدول ۲ آورده شده است.

جدول (۲) - پارامترهای تجزیه‌ای روش توسعه یافته برای استخراج آفت‌کش‌ها از نمونه‌های خیار

آنالیت	محدوده خطی <sup>a</sup>	ضریب تعیین	حد تشخیص <sup>a</sup>	حد اندازه‌گیری <sup>a</sup>	تکرارپذیری <sup>b</sup>		بازده استخراج <sup>c</sup>	حد مجاز <sup>a,d</sup>
					در یک روز	بین روزها		
دیازینون	۱/۹۲-۵۰	۰/۹۹۷	۰/۵۷	۱/۹۲	۴/۲	۳/۶	۷۸±۳	۵۰
کلرپریفوس	۱/۸۰-۲۵۰	۰/۹۹۶	۰/۵۱	۱/۸۰	۵/۹	۴/۵	۷۶±۳	۵۰
ایمیداکلوپراید	۱/۵۰-۲۵۰	۰/۹۹۹	۰/۴۵	۱/۵۰	۶/۸	۵/۲	۸۴±۲	۵۰
استامی پراید	۱/۴۰-۲۵۰	۰/۹۹۸	۰/۴۲	۱/۴۰	۵/۸	۴/۱	۷۹±۲	۵۰
تیاکلوپراید	۱/۲۰-۲۵۰	۰/۹۹۶	۰/۳۶	۱/۲۰	۴/۵	۲/۹	۸۲±۴	۵۰
فن والرات	۱/۶۰-۲۵۰	۰/۹۹۵	۰/۴۸	۱/۶۰	۵/۳	۳/۸	۸۴±۴	۵۰

(a) بر حسب نانوگرم در گرم

(b) بر اساس انحراف استاندارد نسبی (با پنج تکرار)

(c) بازده ± انحراف استاندارد (با سه تکرار)

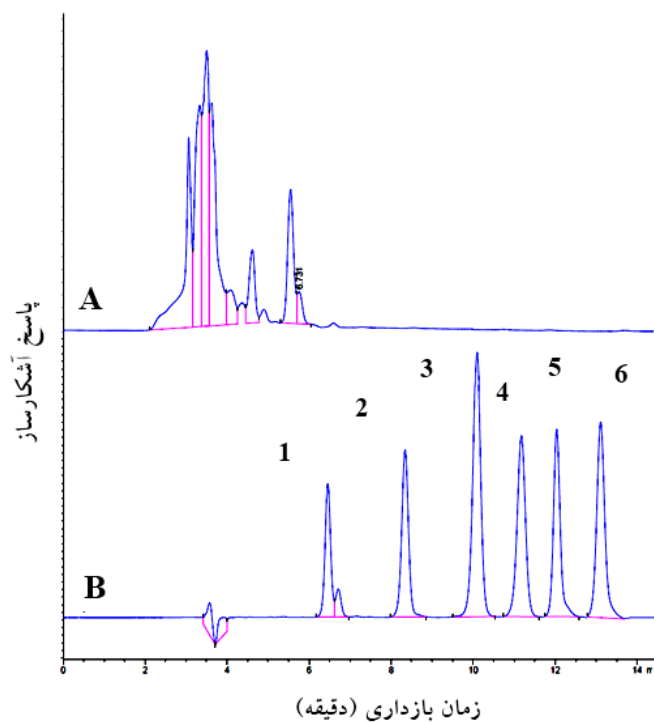
(d) حد مجاز باقیمانده آفت‌کش‌ها بر اساس مقادیر تعیین شده در استاندارد اتحادیه اروپا می‌باشد.

## - آنالیز نمونه‌های حقیقی

آفت‌کش‌های مورد مطالعه در ۲۵ نمونه خیار در شرایط بهینه اندازه‌گیری شدند. شکل ۶ کروماتوگرام‌های HPLC-DAD مربوط به تزریق مستقیم استاندارد آفت‌کش‌های مورد مطالعه (هر کدام به غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر) و یک نمونه‌ی خیار اسپایک نشده را نشان می‌دهد. مقایسه کروماتوگرام‌های حاصل از نمونه‌های حقیقی و نمونه استاندارد نشان داد که هیچکدام از

آفت‌کش‌های مورد نظر در نمونه‌های خیار مورد بررسی وجود ندارد.

همچنین مقایسه سیگنال‌های تجزیه‌ای بدست آمده برای هر یک از نمونه‌های خیار و مخلوط حلال‌های استونیتریل، متانول و استون خالص اسپایک شده با همان غلظت از آنالیت‌ها (جدول ۳)، نشان داد که ماتریکس نمونه‌های خیار تأثیر محسوسی در کارایی روش استخراج سموم کارباماتی ندارند.



شکل (۳) - کروماتوگرام‌های HPLC-DAD نمونه خیار حقیقی (اسپایک نشده) (A) و محلول استاندارد آفت‌کش‌ها به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر (B) پس از اجرای روش پیشنهادی. (۱): دیازینون، (۲): کلرپیرفوس، (۳): ایمیداکلوپراید، (۴): استامی‌پراید، (۵): تیاکلوپراید، (۶): فن‌والرات.

جدول (۳) - ارزیابی اثر بافت نمونه‌های خیار در کارایی روش استخراج باقیمانده آفت‌کش‌ها

آنالیت	انحراف استاندارد $\pm$ مقادیر بازیابی نسبی				
	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ۴	نمونه ۵
همه نمونه با غلظت ۵ نانوگرم در گرم از مخلوط آفت‌کش‌ها اسپایک شدند					
دیازینون	۹۴±۴	۹۵±۴	۹۶±۳	۹۵±۴	۸۹±۵
کلرپیریفوس	۹۷±۲	۸۹±۴	۹۳±۴	۹۸±۵	۹۲±۳
ایمیداکلوپراید	۹۶±۴	۹۴±۵	۹۳±۳	۹۵±۴	۹۰±۱
استامی‌پراید	۹۱±۴	۹۳±۷	۸۸±۴	۹۳±۳	۹۱±۶
تیاکلوپراید	۹۶±۴	۸۶±۴	۱۰۶±۵	۱۰۵±۶	۹۳±۴
فن‌والرات	۱۰۴±۳	۹۴±۵	۹۸±۳	۹۷±۴	۹۵±۴
همه نمونه با غلظت ۵۰ نانوگرم در گرم از مخلوط آفت‌کش‌ها اسپایک شدند					
دیازینون	۱۰۱±۳	۹۸±۴	۹۲±۳	۹۲±۲	۹۷±۳
کلرپیریفوس	۹۸±۴	۹۲±۱	۹۶±۵	۹۶±۴	۹۷±۳
ایمیداکلوپراید	۹۹±۳	۹۰±۲	۹۹±۳	۹۸±۵	۹۳±۳
استامی‌پراید	۹۸±۵	۹۵±۳	۹۷±۴	۱۰۳±۵	۹۶±۳
تیاکلوپراید	۹۲±۴	۹۶±۴	۱۰۰±۳	۹۷±۴	۹۶±۴
فن‌والرات	۹۹±۱	۹۳±۴	۹۲±۳	۹۵±۳	۹۴±۲

## بحث و نتیجه‌گیری

انتخاب حلال استخراج کننده مناسب یکی از مهم‌ترین مراحل در روش استخراج کچرز می‌باشد. حلال استخراج کننده آنالیت‌ها در این مرحله به عنوان حلال پخش کننده در مرحله میکرواستخراج مایع-مایع پخش‌شده استفاده خواهد شد. لذا این حلال ضمن اینکه باید قابلیت استخراج بالایی داشته باشد، باید با فاز آبی و حلال استخراج کننده مورد استفاده در مرحله دوم قابل اختلاط باشد تا به عنوان حلال پخش کننده در مرحله میکرو استخراج مایع-مایع پخش‌شده مورد استفاده قرار بگیرد (Zahiri et al., 2020). با در نظر گرفتن این نکات، سه حلال آلی استونیتریل، متانول و استون به صورت تک تک و مخلوط شده با نسبت‌های مختلف برای استخراج مورد بررسی قرار گرفته و مناسب‌ترین

ترکیب این حلال‌ها با استفاده از طرح آزمایشی سیمپلکس مرکزی (جدول ۱) و دیگرام مثلثی (شکل ۱) برای ادامه کار انتخاب شدند. این مدل بهینه‌سازی در تحقیقات دیگر نیز مورد استفاده قرار گرفته است (Ghasemi et al., 2022; Gholizadeh et al., 2022).

حجم حلال استخراج کننده در مرحله کچرز می‌تواند با استخراج آنالیت‌های انتخابی در مرحله اول یا با تشکیل محلول ابری در مرحله دوم، بر راندمان استخراج تأثیر بگذارد. لازم به ذکر است که حجم این حلال بر حلالیت حلال استخراج کننده مرحله DLLME و حجم فاز ته نشین شده نیز تأثیر خواهد داشت پس نیاز به بهینه‌سازی دارد. نتایج حاصله نشان دادند که با افزایش حجم تا ۲ میلی‌لیتر، سیگنال‌های تجزیه‌ای افزایش یافته و سپس به آرامی کاهش می‌یابند.

به‌طور کلی افزایش قدرت یونی با افزودن نمک به محلول‌های آبی در روش‌های استخراج، اثرات متعددی بر فرآیند استخراج دارد. اول اینکه می‌تواند با کاهش حلالیت آنالیت‌ها در فاز آبی و افزایش تقسیم آنها به فاز آلی، کارایی استخراج را بهبود بخشد. از طرفی افزایش نمک ممکن است حلالیت حلال استخراج‌کننده را نیز کاهش داده و منجر به افزایش حجم فاز آلی نباشد. پس از استخراج شده و سبب کاهش سیگنال تجزیه‌ای در اثر رقیق‌سازی شود (Farajzadeh *et al.*, 2015). به‌علاوه امکان دارد افزایش نمک باعث افزایش ویسکوزیته فاز آبی شده و ضریب انتشار آنالیت در فاز آبی را تحت تأثیر قرار دهد که به نوبه خود منجر به کاهش راندمان استخراج می‌شود (Rasi *et al.*, 2021). لذا نمک‌زنی می‌تواند دو اثر متقابل داشته باشد و به همین دلیل باید در فرایندهای استخراج مورد ارزیابی و بهینه‌سازی قرار گیرد.

اعتباربخشی روش استخراج توسعه داده شده در این مطالعه و مقایسه آن 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 ۲۵۰-۱/۵، ۲۵۰-۱/۴ و ۲۵۰-۱/۲ نانوگرم در گرم به ترتیب برای ایمیداکلوپراید، استامی‌پراید و تیاکلوپراید در روش حاضر اشاره کرد که دارای گستره وسیع‌تری در مقایسه با محدوده خطی ۵-۲/۱۰۰، ۵-۱۲/۵۰ و ۵۰-۲/۵ نانوگرم در گرم به ترتیب برای همین آنالیت‌ها در نمونه خیار در تحقیق دیگری است (Abdel-Ghany *et al.*, 2016). همچنین حدتشخیص بدست آمده برای دیازینون (۰/۵۷ نانوگرم

این مسئله را می‌توان به این واقعیت نسبت داد که در حجم‌های کمتر از ۲ میلی‌لیتر، استخراج آنالیت‌ها به‌طور کامل انجام نشده و یا حالت ابری در مرحله بعدی به خوبی شکل نگرفت که متعاقباً منجر به سیگنال‌های تجزیه‌ای پایین شد (Fakhim *et al.*, 2020; Rasoolzadeh *et al.*, 2022). در همین حال، در حجم‌های بالاتر از ۲ میلی‌لیتر با وجود استخراج موثر آنالیت‌ها، حجم حلال جمع شده نیز بیشتر خواهد بود و فاکتور تغلیظ کاهش یافته و سیگنال تجزیه‌ای کمتر خواهد بود (Afshar *et al.*, 2023). لازم به توضیح است که افزایش حجم حلال منجر به کاهش کارایی استخراج و تکرارپذیری روش خواهد شد (Zare Sani *et al.*, 2021).

در روش میکرو استخراج مایع-مایع پخش‌ی از دسته‌ای از حلال‌های آلی که به‌وسیله حلال پخش‌کننده به صورت قطرات بسیار ریز در فاز آبی پخش می‌شوند، استفاده می‌شود (Rezaee *et al.*, 2006). ضمناً حلال‌های مذکور باید سبک‌تر از آب بوده و ترجیحاً سمیت کمتری داشته باشند لذا در تحقیق حاضر، این حلال از بین ترکیبات غیرقابل اختلاط با آب (ان-هگزان، هگزانول و اکتانول) انتخاب شد. یافته‌های به‌دست آمده در این بخش نشانگر تأثیر نامحسوس افزایش حجم هگزانول در افزایش راندمان استخراج آنالیت‌ها بود و از طرفی نیز استفاده از مقادیر کمتر از ۶۵ میکرولیتر از حلال سبب عدم تشکیل فاز رسوبی یا حجم بسیار کم آن شد به‌طوری‌که برداشت و انتقال آن بسیار مشکل بود.

2020) به ترتیب ۰/۹۲ و ۰/۷۲ میلی گرم در لیتر محاسبه شده است و همچنین حدود اندازه گیری سموم ایمیداکلوپراید، استامی پراید، تیاکلوپراید که در مطالعه ۴ به ترتیب ۰/۲۶، ۱/۱۹ و ۰/۶۶ نانوگرم در گرم به دست آمده است، از مقادیر LOQ بدست آمده در مطالعه ما کمتر می باشد. با این وجود حدود تعیین و تشخیص مطالعه حاضر باز هم کمتر از حد مجاز باقیمانده این آنالیت ها در نمونه های خیار می باشد ( EU Pesticides database, 2005).

در مجموع ترکیب روش های استخراج کچرز و میکرواستخراج مایع-مایع پخشی ارائه شده در تحقیق حاضر برای استخراج آفت کش های هدف از نمونه های خیار، روشی ساده، قابل اعتماد و ارزان می باشد. اعتبار بخشی روش نشانگر پارامترهای تجزیه ای ایده آل بود به گونه ای که راندمان استخراج بالای ۷۶ درصد حاصل شده و حد تشخیص روش توسعه داده شده کمتر از حداکثر مجاز تعیین شده برای باقیمانده این آفت کش ها بود. روش مذکور به طور موفقیت آمیزی بر روی نمونه های خیار اجرا و نتایج نشان داد که هیچ یک از آنالیت ها در نمونه های مورد مطالعه یافت نشد.

### تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافع برای اعلام وجود ندارد.

در گرم)، ایمیداکلوپراید (۰/۴۵ نانوگرم در گرم)، استامی پراید (۰/۴۲ نانوگرم در گرم) و تیاکلوپراید (۰/۳۶ نانوگرم در گرم) پایین تر از حدود تشخیص به دست آمده برای دیازینون (۳/۷۳ نانوگرم در گرم)، ایمیداکلوپراید (۹/۳۸ نانوگرم در گرم)، استامی پراید (۳/۹۵ نانوگرم در گرم) در یک مطالعه ( Dashtbozorgi et al., 2013) و تیاکلوپراید (۰/۶۶ نانوگرم در گرم) در تحقیق دیگری می باشد (Abdel-Ghany et al., 2016). همچنین دقت بالاتر (تکرارپذیری) روش توسعه داده شده برای استخراج دیازینون (۴/۲ درصد)، ایمیداکلوپراید (۶/۸ درصد) و استامی پراید (۵/۸ درصد) در مقایسه با درصد RSD ۱۵/۹۶، ۱۷/۶۷ و ۱۶/۹۷ به ترتیب برای دیازینون، ایمیداکلوپراید و استامی پراید در پژوهش مشابه ای (Dashtbozorgi et al., 2013)، از نقاط قوت مطالعه حاضر محسوب می شود. به علاوه، راندمان استخراج سموم ایمیداکلوپراید، استامی پراید، تیاکلوپراید و فنوالرات در این تحقیق (به ترتیب برابر با ۸۴، ۷۹، ۸۲ و ۸۴ درصد) قابل مقایسه با راندمان استخراج ایمیداکلوپراید (۹۹/۴ درصد)، استامی پراید (۹۸/۴ درصد) و تیاکلوپراید (۹۹/۲ درصد) در یک مطالعه (Abdel-Ghany et al., 2016) و حد تشخیص فنوالرات (۹۴ درصد) در مطالعه دیگری است (Vázquez et al., 2008).

در همین حال، حدود قابل اندازه گیری دیازینون و کلرپیریفوس که در مطالعه ۵ ( Darvishnejad et al.,

## منابع

- Abdel-Ghany, M.F., Hussein, L.A., El Azab, N.F., El-Khatib, A.H., and Linscheid, M.W. (2016). Simultaneous determination of eight neonicotinoid insecticide residues and two primary metabolites in cucumbers and soil by liquid chromatography–tandem mass spectrometry coupled with QuEChERS. *Journal of Chromatography B*, 1031: 15-28.
- Afshar Mogaddam, M., Khandaghi, J., and Vajdi HokmAbad, S. (2023). Use of Temperature-controlled Ionic Liquid-assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for the Detection of Amoxicillin, Cloxacillin and Erythromycin Residues in Cow Milk using High Performance Liquid Chromatography. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 18(1): 119-126. [In Persian]
- Afshar Mogaddam, M.R., Khandaghi, J., Farajzadeh, M.A., and Najafzadeh, D. (2020). Development of in-situ synthesis of lighter than water deep eutectic solvents under ultrasonic energy in a narrow tube and application in liquid–phase microextraction. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-14.
- 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.
- Cheng, H. (1990). Pesticides in the soil environment—an overview. *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modeling*, 2: 1-5.
- Darvishnejad, F., Raouf, J.B., and Ghani, M. (2020). MIL-101 (Cr)@ graphene oxide-reinforced hollow fiber solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography to determine diazinon and chlorpyrifos in tomato, cucumber and agricultural water. *Analytica Chimica Acta*, 1140: 99-110.
- Dashtbozorgi, Z., Ramezani, M.K., and Waqif-Husain, S. (2013). Optimization and validation of a new pesticide residue method for cucumber and tomato using acetonitrile-based extraction-dispersive liquid–liquid microextraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *analytical methods*, 5(5): 1192-1198.
- EU Pesticides database. (2005). Pesticide EU-MRLs. Regulation EC No. 396, Available at: <http://ec.europa.eu/sanco-pesticides>.
- Fakhim Rasoolzadeh, R., Afshar Moghaddam, M., and Khandaghi, J. (2020). Application of a novel microextraction method for determination of organophosphorous pesticides from fruit juice using high performance liquid chromatography. *Food Hygiene*, 38 (2): 31-43. [In Persian]
- Farajzadeh, M.A., Afshar Mogaddam, 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.
- Ghasemi, R., Mirzaei, H., Afshar Mogaddam, M.R., Khandaghi, J., and 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., Afshar Mogaddam, M.R., and 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.
- Lehotay, S., Stajnbaher, D., Schenck, F., and 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.
- Mitra, S., and Brukh, R. (2003). *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, John Wiley pub. New Jersey, pp. 12-35., 1-36.

- Mostafalou, S., and Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and applied pharmacology*, 268(2), 157-177 .
- Rasi, H., AfsharMogaddam, M., & Khandaghi, J. (2021). Application of a new extraction method coupled to high performance liquid chromatography for tetracyclines monitoring in cow milk. *Journal of food science and technology (Iran)*, 18(113): 339-349. [In Persian]
- Rastpour, N., Khandaghi, J., Farajzadeh, M.A., and Afshar Mogaddam, M.R. (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., and Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography a*, 1116(1-2): 1-9.
- Sheikhzadeh, F., Afshar Mogaddam, M.R., Farajzadeh, M.A., and 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.
- Van der Hoff, G. R., and Van Zoonen, P. (1999). Trace analysis of pesticides by gas chromatography. *Journal of Chromatography a*, 843(1-2): 301-322.
- Vázquez, P.P., Mughari, A.R., and Galera, M.M. (2008). Solid-phase microextraction (SPME) for the determination of pyrethroids in cucumber and watermelon using liquid chromatography combined with post-column photochemically induced fluorimetry derivatization and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 607(1): 74-82.
- Zahiri, E., Khandaghi, J., Farajzadeh, M.A., & Afshar Mogaddam, M.R. (2020). Combination of dispersive solid phase extraction with solidification organic drop-dispersive liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for extraction of organophosphorous pesticides from edible oil samples. *Journal of Chromatography a*, 1627: 461390.
- Zare Sani, M., Afshar Mogaddam, M.R., and 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.
- Zeiadi, S., Afshar Mogaddam, M.R., Farajzadeh, M.A., and Khandaghi, J. (2020). Combination of dispersive solid phase extraction with lighter than water dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of organophosphorous pesticides from milk. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 1-14.
- Zhang, D., and Lu, S. (2022). Human exposure to neonicotinoids and the associated health risks: A review. *Environment International*, 163: 107201.