

## Application of a novel microextraction method for determination of organophosphorous pesticides from fruit juice using high performance liquid chromatography

Fakhim Rasoolzadeh, R.<sup>1</sup>, Afshar Moghaddam, M.R.<sup>2</sup>, Khandaghi, J.<sup>3\*</sup>

1. M.Sc Graduate of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran
2. Assistant Professor of Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
3. Assistant Professor of Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran

\*Corresponding author: khandaghi@iausa.ac.ir  
(Received: 2020/2/10 Accepted: 2020/6/4)

### Abstract

Crops such as fruits as raw materials for the production of fruit juices are affected by different pests that are regularly used to combat these agents in agriculture activities. Some of these substances not only remain on the surface of crops but also penetrate their tissues, as most of the crops exposed to pesticides contain amounts of pesticide residues that enter the consumer's body along with foods. For this reason, the use of precise and efficient methods in evaluating the residuals amounts of these compounds in food products is of great value. In this research, a combination of air-assisted liquid-liquid microextraction and liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic drop methods has developed for extraction and preconcentration of some of the widely used organophosphorus pesticides used in Iran (Diazinon, Chlorpyrifos, Phosalone, Parathion- methyl and Azinphos-methyl) from juice samples before their analysis by high-performance liquid chromatography. Under optimal conditions, 32  $\mu$ l of menthol as the extraction solvent and 75  $\mu$ l acetonitrile as dispersive solvent at a temperature of 60 °C used to extract the analytes. The proposed method is simple, reliable, and inexpensive and yields optimal values for extraction efficiency so that under optimized conditions the recoveries ranging from 61 to 79%. RSD% was in range 4.6 to 6.9, indicating high reproducibility of the proposed method. Other advantages of this method include low organic solvents consumption and short analysis time.

**Conflict of interest:** None declared.

**Keywords:** Fruit juice, Organophosphorus pesticides, Air-assisted liquid-liquid microextraction, High-performance liquid chromatography

## کاربرد روش جدید میکرواستخراج برای اندازه‌گیری آفت‌کش‌های اورگانوفسفره در آب‌میوه به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

رزیتا فخیم رسول‌زاده<sup>۱</sup>، محمدرضا افشارمقدم<sup>۲</sup>، جلیل خندقی<sup>۳\*</sup>

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

۲. استادیار مرکز ایمنی غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

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

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

(دریافت مقاله: ۹۸/۱۱/۲۱ پذیرش نهایی: ۹۹/۳/۱۵)

### چکیده

محصولات کشاورزی از جمله میوه‌ها به‌عنوان مواد اولیه تهیه آب‌میوه‌ها تحت تأثیر آفات متفاوت قرار می‌گیرند و به‌منظور مبارزه با این عوامل در فعالیت‌های کشاورزی آفت‌کش‌ها به‌طور مرتب مورد استفاده قرار می‌گیرند. قسمتی از این مواد نه‌تنها در سطح محصولات باقی می‌ماند بلکه به‌داخل بافت آن‌ها نفوذ می‌کند؛ به‌طوری‌که اغلب محصولات کشاورزی که در معرض آفت‌کش‌ها قرار گرفته‌اند حاوی مقادیری از باقیمانده آفت‌کش‌ها می‌باشند که به‌همراه غذاها وارد بدن مصرف‌کنندگان می‌شوند. به‌همین دلیل استفاده از روش‌های دقیق و کارآمد در ارزیابی مقادیر باقی‌مانده این ترکیبات در محصولات غذایی از ارزش بالایی برخوردار است. در این کار پژوهشی ترکیبی از روش‌های میکرواستخراج مایع-مایع کمک شده با هوا و انجماد قطره شناور آلی برای استخراج و پیش‌تغلیظ و سپس اندازه‌گیری کمی برخی از آفت‌کش‌های ارگانوفسفره پرکاربرد در ایران (دیازینون، کلرپیرفوس، فوسالون، متیل‌پاراتیون و متیل‌آزینفوس) از نمونه‌های آب‌میوه بسته‌بندی‌شده به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا توسعه داده‌شده است. در شرایط بهینه، ۳۲ میکرو لیتر متول به‌عنوان حلال استخراج‌کننده، ۷۵ میکرو لیتر استونیتریل به‌عنوان حلال کمک پخش‌کننده در دمای ۶۰ درجه سلسیوس برای استخراج آنالیت‌ها مورد استفاده قرار گرفت. روش پیشنهادی ساده، قابل‌اعتماد و ارزان بوده و مقادیر مطلوبی برای راندمان استخراج به‌دست می‌دهد به‌طوری‌که تحت شرایط بهینه راندمان استخراج در محدوده‌ی ۷۹-۶۱ درصد به‌دست آمد. درصد انحراف استاندارد نسبی بر اساس مساحت زیر پیک، ۴/۶ و ۶/۹ به‌دست آمد که نشان از تکرارپذیری بالای روش ارائه شده دارد. از دیگر مزایای این روش می‌توان به مصرف کم حلال‌های آلی و زمان آنالیز کوتاه اشاره کرد.

**واژه‌های کلیدی:** آب‌میوه، ارگانوفسفره، میکرواستخراج مایع-مایع کمک شده با هوا، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

## 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 با استفاده از مواد شیمیایی تحت عنوان آفت‌کش‌ها مورد توجه قرار گرفته است. قسمتی از این مواد نه تنها در سطح محصولات باقی می‌ماند بلکه به‌داخل 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, 2009; Bhanti, and Taneja, 2007). چون این محصولات با سلامتی انسان در ارتباط هستند، اندازه‌گیری و بررسی میزان باقی‌مانده آفت‌کش‌ها در محصولات کشاورزی یا فراورده‌های آن‌ها از اهمیت بسیاری برخوردار است و حداکثر مقدار باقیمانده آفت‌کش‌ها به‌عنوان یک معیار در این مورد ارائه می‌شود (EC, 396/2005; Gilden, et al., 2010).

آفت‌کش‌ها بر اساس ساختار شیمیایی به سه دسته آفت‌کش‌های معدنی، آفت‌کش‌های با منشأ گیاهی و آفت‌کش‌های آلی مانند سموم ارگانوکلره و ارگانوفسفره تقسیم می‌شوند و عموماً از نظر فیزیکی شیمیایی پایدار بوده و به‌همین علت قادر به حضور طولانی‌مدت در اکوسیستم می‌باشند (Vanderhoff, and VanZoonen, 1999). سموم ارگانوفسفره مولکول‌های آلی حاوی فسفر می‌باشند و معمولاً استرها (R-COOR)، آمیدها (R-NH<sub>2</sub>) و یا تیول‌های (R-SH) اسید فسفریک هستند. این سموم عملکرد سیستماتیک دارند یعنی توسط ریشه و برگ جذب شده و به کل گیاه منتقل می‌شوند (Sharma, et al., 2010). مکانیسم عمل آن‌ها

بر اساس مهار عملکرد آنزیم استیل کولین استراز می‌باشد (Ojha, et al., 2011). به‌رغم انجام مطالعات متعدد روی عوارض سوء ناشی از سموم ارگانوفسفره در ایران (Balali Mood, et al., 2012; Khodadadi, et al., 2010; Razzaghi, et al., 2016; Safari and Zandian, 2013)، تحقیقات چندانی در مورد آلودگی مواد غذایی به این سموم انجام نشده است (Ganjezadeh, et al., 2017; Shakoori, et al., 2017).

معمولاً اندازه‌گیری مستقیم ترکیبات در نمونه‌های مختلف توسط دستگاه‌های تجزیه‌ای، به‌دلایلی مانند غلظت پایین آن‌ها در نمونه یا وجود بافت پیچیده نمونه که ممکن است در اندازه‌گیری آنالیت‌های مورد نظر مزاحمت داشته باشند، امکان‌پذیر نیست. بر همین اساس روشی مورد نیاز است که آنالیت‌ها را از ماتریکس نمونه جدا کرده و تا حد ممکن آن‌ها را تغلیظ کند. از آنجایی که قسمت عمده زمان تجزیه نمونه صرف آماده‌سازی آن می‌شود و این مرحله بر روی همه مراحل بعدی آنالیز تأثیرگذار است، از این‌رو نقش شاخصی در شناسایی، تأیید و اندازه‌گیری آنالیت‌ها دارد (Bidari et al., 2011). تاکنون روش‌های گوناگونی برای آماده‌سازی و استخراج سموم ارگانوفسفره از مواد غذایی ارائه شده است. از جمله روش استخراج مایع-مایع (Amini, et al., 2018)، روش میکرواستخراج فاز مایع (Psillakis and Kalogerakis, 2003; Saraji, 2005) و روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی (Pil-Bala, et al., 2019). میکرواستخراج فاز مایع که به‌منظور مینیاتوریزه کردن روش استخراج فاز مایع از طریق کاهش نسبت حلال آلی به فاز آبی ابداع شد به شیوه‌های مختلفی انجام می‌گیرد که یکی از آن‌ها

کارخانجات مختلف در تابستان سال ۱۳۹۸ از مراکز عرضه در شهر تبریز جمع‌آوری شد. مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از هر نمونه اخذ و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و به نسبت ۱ به ۳ با آب دیونیزه رقیق شد. آفت‌کش‌های دیازینون، کلرپیرفوس، فوسالون، متیل‌پاراتیون و متیل‌آزینفوس از شرکت Dr. Ernsthofe آلمان و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Merck آلمان تهیه شدند.

#### - بهینه‌سازی شرایط استخراج

به منظور دستیابی به راندمان استخراج و فاکتور تغلیظ بالا برای آنالیت‌های مورد بررسی، اثر پارامترهای مختلف مانند حجم حلال استخراج‌کننده (از بین حجم‌های ۳۲، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ میکرولیتر)، نوع حلال کمک پخش‌کننده (از بین حلال‌های استون، استونیتریل و ایزوپروپانول)، حجم حلال کمک پخش‌کننده (از بین حجم‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۲۵ میکرولیتر)، دمای فاز آبی (از بین دماهای ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰ و ۶۵ درجه سلسیوس)، pH محلول آبی (از بین مقادیر ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲) و قدرت یونی (با افزودن ۰/۱، ۲/۵، ۵/۱ و ۷/۵ و ۱۰/۰ درصد وزنی / حجمی از نمک کلرید سدیم) بر روی کارایی استخراج مورد بررسی قرار گرفتند. 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 گرفتند (Chandran and Singh, 2007).

#### - روش استخراج

از یک لوله شیشه‌ای باریک به طول ۸۰ سانتی‌متر و قطر داخلی ۵ میلی‌متر که هر دو انتهای آن با استفاده از

میکرواستخراج مایع-مایع کمک شده با هوا (Air-Assisted liquid-liquid microextraction: AALLME) است که در سال ۲۰۱۲ برای اولین بار ابداع و معرفی شد (Farajzadeh and Afshar, 2012). در این روش یک حلال استخراج‌کننده که غیرقابل اختلاط با آب بوده و چگالی متفاوتی دارد، به داخل نمونه آبی حاوی آنالیت‌ها اضافه می‌شود. سپس مخلوط حاصل چندین بار به داخل یک سرنگ شیشه‌ای کشیده و مجدداً به لوله حاوی محلول آنالیت برگردانده می‌شود تا حلال استخراج‌کننده به‌طور کامل در داخل محلول آبی پخش شود و آنالیت‌های موجود در نمونه آبی به داخل قطرات حلال استخراج‌کننده، استخراج شوند (You, et al., 2013).

در این مطالعه از ترکیب روش‌های میکرواستخراج AALLME و انجماد قطره آلی شناور در لوله باریک برای استخراج و پیش‌تغلیظ آفت‌کش‌های ارگانوفسفره دیازینون (Diazinon)، کلرپیرفوس (Chlorpyrifos)، فوسالون (Phosalone)، متیل‌پاراتیون (Parathion-methyl) و متیل‌آزینفوس (Azinphos-methyl) در نمونه‌های آب‌میوه صنعتی و سپس آنالیز این ترکیبات به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (High Performance Liquid Chromatography Variable Wavelength) دتکتور نور مرئی/فرابنفش (Detector) استفاده شده است.

#### مواد و روش‌ها

##### - نمونه‌برداری و مواد شیمیایی

تعداد ۵ نمونه از هر یک از آب‌میوه‌های آب‌انگور، آب‌سیب، آب‌انبه و آب‌آلبالو صنعتی تولیدی

سپس لوله به‌طور عمودی قرار گرفت تا قطرات حلال استخراج‌کننده محلول را طی نموده و در حین استخراج سرد شده و در بالای فاز آبی جمع شوند. در نهایت فاز آبی شناور جمع‌آوری و در ۱۰ میکرولیتر استونیتریل حل و به دستگاه HPLC تزریق گردید.

#### - شرایط آنالیز با دستگاه کروماتوگرافی

به‌منظور دستیابی به حداکثر تفکیک و نتایج قابل اعتماد در سیستم کروماتوگرافی، جداسازی آنالیت‌ها در شرایط بهینه انجام گرفت. شرایط بهینه HPLC (Agilent, 1100 VWD System) برای آنالیز آفت‌کش‌ها در جدول (۱) ذکر شده است.

سپتوم مسدود شده به‌عنوان ابزار استخراج استفاده شد. ابتدا ۲۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه اسپایک شده با آنالیت‌ها به غلظت ۲۵ میکروگرم بر لیتر (نسبت به هر یک از آفت‌کش‌های مورد مطالعه) که دمای آن در ۶۰ درجه سلسیوس تنظیم شده بود، به‌داخل لوله باریک اضافه شد. در ادامه ۳۲ میکرولیتر متول با ۷۵ میکرولیتر استونیتریل مخلوط و در حالی که لوله به‌صورت افقی قرار گرفته بود با سرنگ ۲۵۰ میکرولیتری از سپتوم عبور داده شد و به‌آرامی به فاز آبی اضافه گردید. کل محلول داخل لوله چندین بار در سرنگ ۵۰ میلی‌لیتری کشیده و برگردانده شد (تا حلال استخراج‌کننده به‌صورت قطرات ریزی داخل محلول پخش می‌شود).

جدول (۱) - شرایط بهینه HPLC-VWD به‌منظور آنالیز آفت‌کش‌های ارگانوفسفره

نوع ستون	Zorbax SB-Aq, طول: ۱۵۰ میلی‌متر، ID: ۴/۶ میلی‌متر، اندازه ذرات: ۵ میکرومتر
فاز متحرک	استونیتریل: متانول: آب (۱۶/۵ : ۱۶/۵ : ۶۷/۷)، میزان جریان: ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه
تزریق کننده	دما: ۴۰ درجه سلسیوس، لوپ: ۱۰ میکرولیتر
طول موج	۲۳۰ نانومتر

#### - مشخصات تجزیه‌ای

به‌منظور اعتبارسنجی روش به‌کار رفته برای آنالیز سموم ارگانوفسفره، پس از ترسیم نمودار معیارگیری یا منحنی کالیبراسیون، حد تشخیص (LOD)، حد اندازه‌گیری (LOQ)، مجذور ضریب همبستگی، تکرارپذیری و راندمان بررسی و محاسبه شدند ( Mitra, 2003).

#### یافته‌ها

- نتایج بهینه‌سازی عوامل مؤثر در استخراج  
- حجم حلال استخراج‌کننده  
با افزایش حجم حلال استخراج‌کننده، راندمان استخراج آنالیت‌های مورد بررسی تغییر چندانی نکردند، لذا ۳۲ میکرولیتر به‌عنوان حجم بهینه حلال استخراج‌کننده انتخاب شد. حجم فاز جمع شده در این شرایط  $1 \pm 10$  میکرولیتر بود (نمودار ۱).

**- نوع حلال کمک پخش کننده**

با توجه به این که با استفاده از استونیتریل بیشترین راندمان‌های استخراج به دست می‌آیند این حلال به عنوان حلال کمک پخش کننده برای مراحل بعدی انتخاب گردید (نمودار ۲).

**- حجم حلال کمک پخش کننده**

نتایج نشان داد با افزایش حجم استونیتریل تا ۷۵ میکرولیتر راندمان استخراج افزایش داشته و پس از آن کاهش می‌یابد (نمودار ۳). از این رو ۷۵ میکرولیتر از استونیتریل به عنوان حجم مناسب حلال کمک پخش کننده انتخاب شد.

**- دمای فاز آبی**

با توجه به نتایج به دست آمده در این مرحله دمای ۶۰ درجه سلسیوس به عنوان دمای بهینه فاز آبی انتخاب شد (نمودار ۴).

**- مقدار نمک**

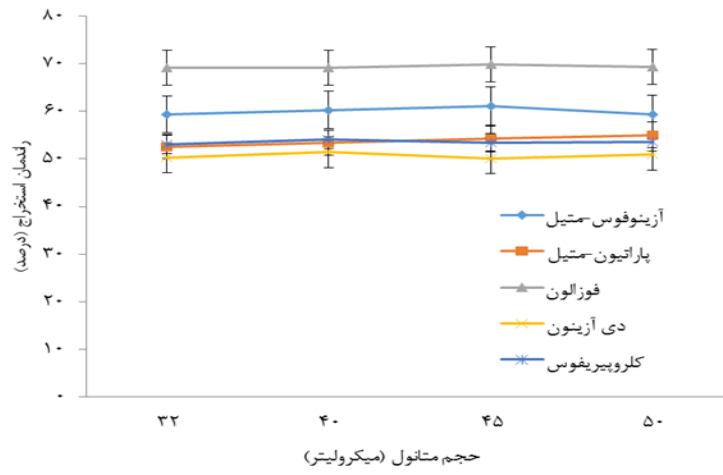
مطابق نمودار با افزودن NaCl کارایی استخراج کاهش می‌یابد (نمودار ۵). از این رو، آزمایشات بعدی بدون افزایش نمک صورت گرفت.

**- pH محلول آبی**

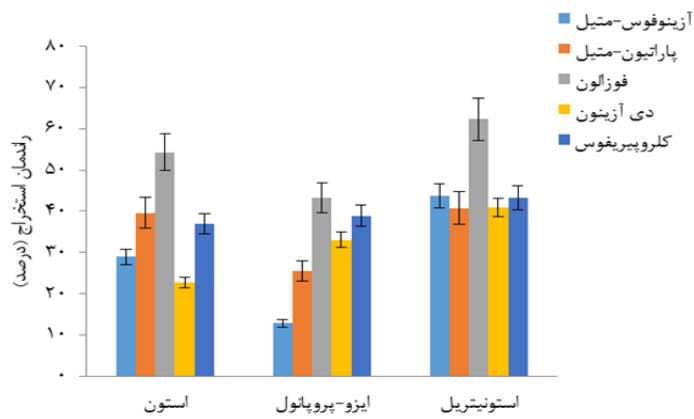
بر اساس یافته‌ها، بهترین نتایج استخراج در pH های، ۶-۸ به دست آمد (نمودار ۶). با توجه به این که pH نمونه‌های حقیقی مورد استفاده بعد از رقیق‌سازی در محدوده ۶-۸ بودند، بنابراین برای آنالیزهای بعدی تنظیم pH انجام نگرفت.

**- نتایج مشخصات تجزیه‌ای**

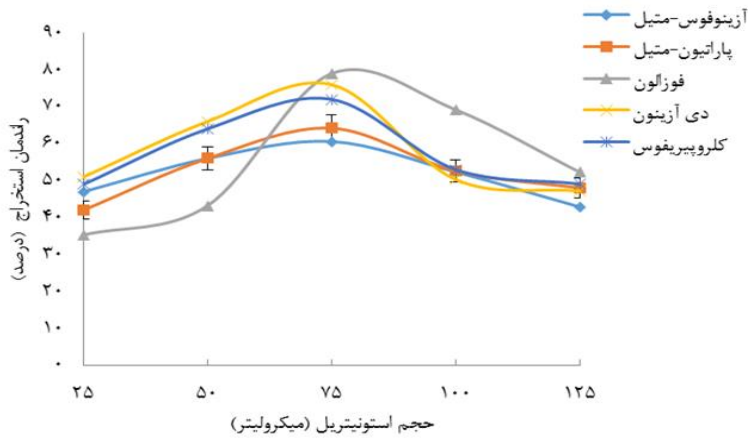
پارامترهای تجزیه‌ای روش حاضر تحت شرایط بهینه محاسبه و به دست آمدند. برای این منظور ۲۵ میلی‌لیتر نمونه‌ی آزمایشی حاوی آنالیت‌ها با غلظت‌های متفاوتی از آن‌ها اسپایک شده و تحت شرایط بهینه مورد استخراج و آنالیز قرار داده شدند. نمودار معیارگیری از رسم نسبت سیگنال تجزیه‌ای آنالیت‌های استخراج شده در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰، ۳۰، ۶۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر از آفت‌کش‌های ارگانوفسفره به دست آمد. معادله رگراسیونی برای داده‌های حاصله در محدوده مورد بررسی خطی و در جدول (۲) بیان شده‌اند. از منحنی کالیبراسیون مقدار مجذور ضریب همبستگی ( $r^2$ ) و محدوده خطی روش (LDR) برای هر یک از آنالیت‌ها به دست آمد. حد تشخیص و حد اندازه‌گیری روش به ترتیب برابر غلظت‌هایی در نظر گرفته شدند که در آن‌ها نسبت  $S/N=3$  و  $S/N=10$  می‌باشند. به منظور بررسی تکرارپذیری و دقت روش از انحراف استاندارد نسبی (% RSD) استفاده شد. برای این منظور ۶ محلول حاوی ۵ میکروگرم در لیتر از آنالیت‌ها با شرایط یکسان و در حالت بهینه استخراج شدند. درصد انحراف استاندارد نسبی بر اساس مساحت پیک در محدوده بین ۴/۶ و ۶/۹ درصد به دست آمد که نشان از تکرارپذیری بالای روش ارائه شده دارد. نتایج حاصل از مشخصات تجزیه‌ای روش در جدول (۲) ارائه شده است.



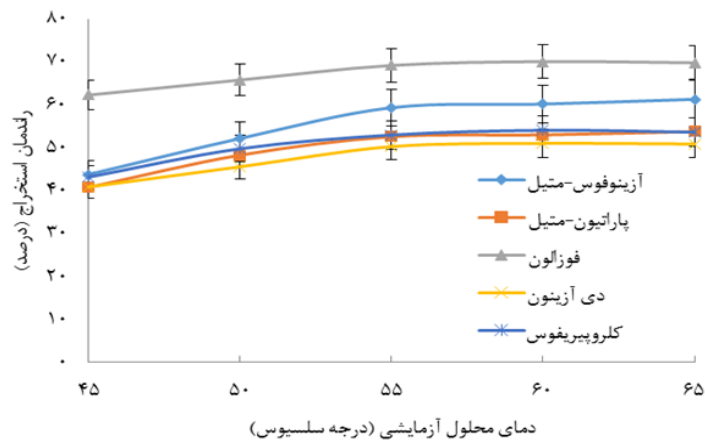
نمودار (۱)- تأثیر حجم حلال استخراج‌کننده در کارایی روش پیشنهادی



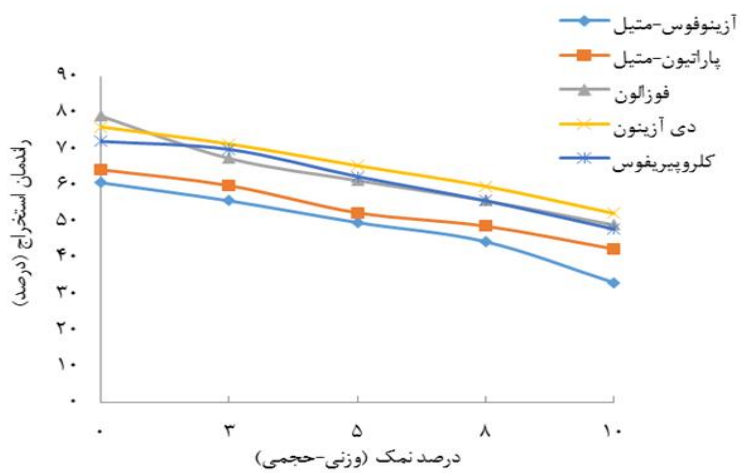
نمودار (۲)- تأثیر نوع حلال کمک پنخش‌کننده در کارایی روش پیشنهادی



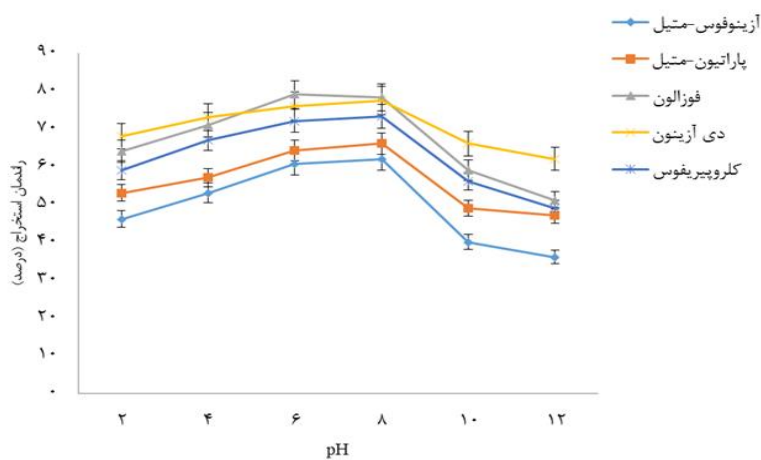
نمودار (۳)- تأثیر حجم حلال کمک پنخش‌کننده در کارایی روش پیشنهادی



نمودار (۴)- تأثیر دمای محلول آزمایشی در کارایی روش پیشنهادی



نمودار (۵)- تأثیر مقدار نمک در کارایی روش پیشنهادی



نمودار (۶)- تأثیر pH محلول آزمایشی در کارایی روش پیشنهادی



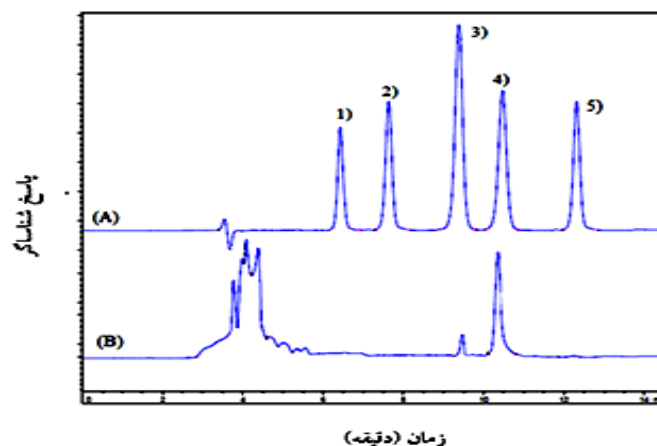
جدول (۲) - ارقام شایستگی روش پیشنهادی در استخراج آفت‌کش‌های ارگانوفسفردر نمونه‌های آب‌میوه

آنالیت	محدوده خطی روش (میکروگرم در لیتر)	حد تشخیص (میکروگرم در لیتر)	حد اندازه‌گیری (میکروگرم در لیتر)	مجذور ضریب همبستگی	انحراف استاندارد نسبی (%) (n=۶)	راندمان استخراج ± انحراف استاندارد (n=۳)
متیل آزینفوس	۴/۷ - ۱۰۰۰	۱/۴	۴/۷	۰/۹۹۹	۴/۶	۶۱ ± ۶
متیل پاراتیون	۵/۷ - ۱۰۰۰	۱/۶	۵/۷	۰/۹۹۸	۵/۲	۶۵ ± ۳
فوسالون	۰/۹۷ - ۱۰۰۰	۰/۲۶	۰/۹۷	۰/۹۹۹	۶/۹	۷۹ ± ۴
دیازینون	۱/۳ - ۱۰۰۰	۰/۳۶	۱/۳	۰/۹۹۵	۴/۹	۷۶ ± ۵
کلرپیریفوس	۰/۶۱ - ۱۰۰۰	۰/۱۸	۰/۶۱	۰/۹۹۶	۵/۱	۷۲ ± ۵

## - نتایج آنالیز نمونه‌های حقیقی

برای بررسی قابلیت روش پیشنهادی در اندازه‌گیری آفت‌کش‌های ارگانوفسفردر نمونه‌های حقیقی، نمونه‌های آب‌میوه تازه طبق شرایط بهینه با روش پیشنهادی تغلیظ و تخلیص شدند و سپس با HPLC-VWD مورد آنالیز قرار گرفتند. مقایسه کروماتوگرام‌های حاصل از نمونه‌ها با کروماتوگرام حاصل از نمونه استاندارد نشان می‌دهد که در دو نمونه آب‌سیب تازه آفت‌کش‌های دیازینون و متیل پاراتیون به ترتیب به غلظت‌های  $۱۷ \pm ۰/۵$  و  $۴۶ \pm ۸$  میکروگرم در لیتر وجود

دارد ( $n=۳$ ). مقادیر آنالیت‌ها با استفاده از منحنی کالیبراسیون و با شیوه افزایش استاندارد محاسبه شده است. در سایر نمونه‌ها هیچ پیکی در موقعیت آفت‌کش‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. شکل (۱)، کروماتوگرام‌های مربوط به تزریق مستقیم استاندارد آفت‌کش‌های مورد مطالعه (هرکدام به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، در متانول) و یک نمونه آب‌سیب بدون اسپایک را نشان می‌دهد.



شکل (۱) - کروماتوگرام‌های HPLC-VWD مربوط به (A) محلول استاندارد آفت‌کش‌ها به غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر (۱-دیازینون، ۲-کلرپیریفوس، ۳-فوسالون، ۴-متیل پاراتیون و ۵-متیل آزینفوس) و (B) آب‌سیب اسپایک نشده

## - بررسی اثر ماتریکس در نمونه‌های حقیقی

به دلیل این که نمونه آب میوه حاوی مواد مختلفی از جمله پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و غیره می‌باشد، ممکن است ماتریکس نمونه در اندازه‌گیری آفت‌کش‌ها تداخل ایجاد نماید. به منظور بررسی اثر ماتریکس در نمونه‌های حقیقی، ۲۵ میلی‌لیتر از نمونه‌های حقیقی و ۲۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه مطابق شرایط مذکور در قبل تهیه شدند و با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در لیتر نسبت به هر کدام از آفت‌کش‌های مورد مطالعه اسپایک شده و

تحت شرایط بهینه با روش پیشنهادی استخراج شده و توسط HPLC مورد آنالیز قرار گرفت. با مقایسه سیگنال‌های تجزیه‌ای به دست آمده برای هر یک از نمونه‌های حقیقی و آب دیونیزه، اثر ماتریکس مورد ارزیابی قرار گرفت (ECD, 657/2002). نتایج به دست آمده در جدول (۳) نشان می‌دهد که ماتریکس نمونه‌ها تأثیر محسوسی در کارایی روش پیشنهادی ندارند.

جدول (۳) - مقادیر بازیابی حاصل از آنالیز نمونه‌های آب میوه اسپایک شده در سه غلظت متفاوت

بازیابی $\pm$ انحراف استاندارد (n=۳)				آنالیت‌ها
آب انگور	آب سیب	آب انبه	آب آلبالو	
نمونه‌های اسپایک شده با هر یک از آنالیت‌ها هر کدام به غلظت ۱۰ میکروگرم در لیتر				
۹۶ $\pm$ ۲	۹۹ $\pm$ ۴	۹۰ $\pm$ ۲	۹۸ $\pm$ ۳	متیل آزینفوس
۹۱ $\pm$ ۴	۹۲ $\pm$ ۳	۹۲ $\pm$ ۳	۹۷ $\pm$ ۶	متیل پاراتیون
۹۴ $\pm$ ۵	۹۲ $\pm$ ۵	۹۰ $\pm$ ۴	۹۸ $\pm$ ۴	فوسالون
۹۵ $\pm$ ۴	۹۹ $\pm$ ۶	۹۷ $\pm$ ۳	۹۸ $\pm$ ۵	دiazینون
۹۷ $\pm$ ۴	۹۱ $\pm$ ۵	۹۱ $\pm$ ۲	۹۹ $\pm$ ۴	کلرپیریفوس
نمونه‌های اسپایک شده با هر یک از آنالیت‌ها هر کدام به غلظت ۲۰ میکروگرم در لیتر				
۹۰ $\pm$ ۵	۹۸ $\pm$ ۲	۹۷ $\pm$ ۴	۹۵ $\pm$ ۵	متیل آزینفوس
۹۵ $\pm$ ۷	۹۳ $\pm$ ۳	۹۵ $\pm$ ۲	۹۶ $\pm$ ۳	متیل پاراتیون
۹۸ $\pm$ ۶	۹۵ $\pm$ ۷	۹۶ $\pm$ ۵	۷۲ $\pm$ ۷	فوسالون
۸۹ $\pm$ ۲	۹۲ $\pm$ ۴	۹۳ $\pm$ ۳	۹۰ $\pm$ ۲	دiazینون
۹۲ $\pm$ ۵	۹۰ $\pm$ ۴	۹۲ $\pm$ ۲	۹۰ $\pm$ ۵	کلرپیریفوس
نمونه‌های اسپایک شده با هر یک از آنالیت‌ها هر کدام به غلظت ۵۰ میکروگرم در لیتر				
۹۷ $\pm$ ۳	۹۴ $\pm$ ۶	۹۷ $\pm$ ۴	۹۶ $\pm$ ۸	متیل آزینفوس
۹۰ $\pm$ ۴	۹۵ $\pm$ ۳	۸۸ $\pm$ ۲	۹۲ $\pm$ ۲	متیل پاراتیون
۹۸ $\pm$ ۶	۸۷ $\pm$ ۷	۹۶ $\pm$ ۵	۹۰ $\pm$ ۲	فوسالون
۹۱ $\pm$ ۵	۹۷ $\pm$ ۴	۹۹ $\pm$ ۳	۹۵ $\pm$ ۵	دiazینون
۸۹ $\pm$ ۴	۹۰ $\pm$ ۶	۹۵ $\pm$ ۵	۹۹ $\pm$ ۶	کلرپیریفوس

## بحث و نتیجه‌گیری

در این کار تحقیق از متول که دارای ویژگی منحصر به فرد مورد نظر برای این مطالعه است (یعنی به دلیل داشتن نقطه ذوب پایین ۳۱ درجه سلسیوس، در دمای اتاق به صورت جامد بوده و با افزایش دما به حالت مایع در می‌آید)، به عنوان حلال استخراج‌کننده استفاده شد. از طرفی به منظور جلوگیری از انجماد زودهنگام متول در مراحل اولیه استخراج در داخل لوله و هم‌چنین برای جلوگیری از چسبیدن قطرات آن به دیواره داخلی لوله و به‌طور کلی برای افزایش کارایی و سهولت استخراج، استفاده از یک حلال کمک پخش‌کننده ضروری می‌باشد. حلال کمک پخش‌کننده باید قابل اختلاط با متول و فاز آبی بوده و دارای دانسیته کمتری نسبت به آب باشد که سه نوع حلال آلی شامل استون، استونیتریل و ایزوپروپانول با مشخصات گفته‌شده انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند (Farajzadeh, et al., 2016).

حجم حلال استخراج‌کننده نقش مهمی در کارایی روش‌های میکرواستخراج دارد. هر چه 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 داشت. از طرفی با کاهش حجم حلال، کارایی استخراج و تکرارپذیری کاهش می‌یابد. حجم حلال کمک پخش‌کننده نیز که در تشکیل محلول ابری (کدر) تأثیر مستقیم دارد از دیگر عوامل تأثیرگذار در کارایی استخراج است. از این‌رو حجم حلال‌های استخراج‌کننده و کمک پخش‌کننده باید بهینه‌سازی شوند (Jalili, et al., 2019).

از عوامل مؤثر در فرآیند پیشنهادی، دمای فاز آبی است. تغییر دما از طریق تغییر ضرایب انتشار می‌تواند سرعت استخراج را تحت تأثیر قرار دهد. گرم شدن محلول آبی می‌تواند به‌عنوان نیروی محرک جهت پخش بهتر حلال استخراج‌کننده در محلول آبی باشد که در نتیجه آن سطح تماس بین حلال و نمونه افزایش یافته و سرعت انتقال جرم آنالیت‌ها بهبود پیدا می‌کند. با این وجود افزایش دما می‌تواند منجر به افزایش انتشار آنالیت‌ها به‌داخل فاز آبی و در نتیجه کاهش راندمان استخراج شود؛ بنابراین مقادیر سیگنال‌های تجزیه‌ای برای دماهای مختلف متفاوت خواهد بود. لذا لزوم بهینه‌سازی این فاکتور احساس می‌شود (Lemos and Oliveira, 2015).

عموماً در روش‌های استخراج، افزایش نمک بر محلول‌های آبی دو اثر متقابل دارد: ۱- حضور نمک باعث افزایش نیروی یونی فاز آبی شده و باعث کاهش حلالیت آنالیت‌ها در فاز آبی و انتقال آن‌ها به‌داخل حلال استخراج‌کننده شده و در نتیجه راندمان استخراج افزایش می‌یابد. ۲- افزایش نمک به محیط استخراج می‌تواند محلولیت حلال استخراج‌کننده در فاز آبی را نیز کاهش داده و منجر به افزایش حجم فاز آلی جمع شده شود و باعث کاهش سیگنال تجزیه‌ای در اثر رقیق‌سازی گردد. 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 لذا یکی از پارامترهای مهم در اکثر روش‌های استخراج که نیاز به بررسی و بهینه‌سازی دارد، مقدار نمک می‌باشد (Farajzadeh, et al., 2015).

مذکور به روش استخراج میکرواستخراج فاز جامد کوپل شده به کروماتوگرافی گازی مجهز به دکتور نیتروژن-فسفر از نمونه‌های آب انجام شد، حد تشخیص ۱۸-۴/۱ میکروگرم در لیتر، حد اندازه‌گیری ۱۰۰۰-۳/۱ میکروگرم در لیتر، زمان استخراج ۵ دقیقه و تکرارپذیری ۹/۶-۲/۵ گزارش گردید (Beltran, et al., 1998).

این پژوهش حاضر، از ترکیب روش‌های AALLME و انجماد قطره شناور آلی برای استخراج آفت‌کش‌های ارگانوفسفره پرکاربرد در ایران از نمونه‌های آب‌میوه و سپس اندازه‌گیری کمی آن‌ها به روش HPLC-VWD استفاده شد. در مجموع روش پیشنهادی ساده، قابل اعتماد و ارزان بوده و مقادیر مطلوبی برای راندمان استخراج به دست می‌دهد. تحت شرایط بهینه راندمان استخراج در محدوده ۷۹-۶۱ درصد به دست آمد.  $RSD\%$  بر اساس مساحت زیر پیک، ۴/۶ و ۶/۹ به دست آمد که نشان از تکرارپذیری بالای روش ارائه شده دارد. از دیگر مزایای این روش می‌توان به مصرف کم حلال‌های آلی و زمان آنالیز کوتاه یعنی ۷ دقیقه اشاره کرد.

### تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

تاکنون روش‌های استخراج مختلفی برای اندازه‌گیری سموم ارگانوفسفره از مواد غذایی مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند و مقایسه پارامترهای تجزیه‌ای روش حاضر نشان داد تکرارپذیری روش حاضر بسیار خوب یا قابل مقایسه است و مقادیر حد اندازه‌گیری به دست آمده در این مطالعه، خیلی پایین‌تر از سایر روش‌ها می‌باشند. هم‌چنین زمان استخراج روش پیشنهادی کمتر از سایر روش‌ها بوده است. به طوری که مقادیر حد تشخیص، حد اندازه‌گیری، زمان استخراج و درصد انحراف استاندارد در روش میکرواستخراج تعاونی کمک شده با اولتراسونیک برای اندازه‌گیری سموم ارگانوفسفره در عسل به ترتیب ۰/۴۷-۰/۰۳ میکروگرم در لیتر، ۱۰۰۰۰-۰/۳ میکروگرم در لیتر، ۱۷ دقیقه و ۹/۵-۲/۹ (Fontana, et al., 2010) و همین مقادیر در استفاده از روش میکرواستخراج فاز مایع داخل هالوفیر کمک شده با امواج اولتراسونیک کوپل شده به کروماتوگرافی گازی مجهز به دکتور نیتروژن-فسفر برای غذای کودک به ترتیب ۰/۰۳-۰/۰۱ میکروگرم در لیتر، ۱۰۰-۰/۵ میکروگرم در لیتر، ۲۴۰ دقیقه و ۲/۱ بوده است (Gonzalez, et al., 2013). هم‌چنین مقادیر شایستگی روش مذکور در استخراج سموم ارگانوفسفره از نمونه آب به وسیله کروماتوگرافی مایع مجهز به دکتور آرایه دیودی و روش میکرواستخراج فاز مایع به ترتیب ۱۰ میکروگرم در لیتر، ۵۰۰۰-۱۰ میکروگرم در لیتر، ۲۰ دقیقه و ۸/۴ بود (Liang, et al., 2005). در تحقیق دیگری که به منظور اندازه‌گیری آفت‌کش‌های

## 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: 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 chromatograph. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science*, 6(5): 513-519.
- Balali Mood, M., Balali Mood, K., Moodi, M. and Balali Mood, B. (2012). Review Article: Health aspects of organophosphorus pesticides in Asian countries. *Iranian Journal of Public Health*, 41(10): 1-14.
- Beltran, J., Lopez, F.J., Cepria, O. and Hernandez, F. (1998). Solid-phase microextraction for quantitative analysis of organophosphorus pesticides in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 808: 257–263.
- 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: 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: 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.
- EU Pesticides Database, (2005). Pesticide EU-MRLs. Regulation EC No. 396, Available at: <http://ec.europa.eu/sanco-pesticides>.
- European Commission Decision. (2002). Concerning the performance of analytical methods. Implementing Council Directive 657/EC.
- Farajzadeh, M.A., Khorram, P. and Pazhohan, A. (2016). Simultaneous determination of atorvastatin and valsartan in human plasma by solid-based disperser liquid–liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography–diode array detection. *Journal of Chromatography B*, 1017: 62-69.
- 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: 4086–4094.
- Chandran, S. and Singh, R. (2007). Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(1): 4-14.
- Farajzadeh, M.A. and Afshar Mogaddam, M.R. (2012). Air-assisted liquid–liquid microextraction method as a novel microextraction technique; Application in extraction and preconcentration of phthalate esters in aqueous sample followed by gas chromatography–flame ionization detection. *Analitica Chimica Acta*, 728: 31–38.
- Fontana, A.R., Camargob, A.B. and Altamirano, J.C. (2010). Coacervative microextraction ultrasound-assisted back-extraction technique for determination of organophosphates pesticides in honey samples by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(41): 6334–6341.
- Ganjeizadeh, F., Mahdavi, V. and Aminae, M.M. (2017). Evaluation of diazinon and oxydimeton-methyl residues by GC-NPD in tomatoes grown in Kerman greenhouse. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 19: 113-120.

- Gonzalez–Curbelo, M.A., Borges, J.H., Borges–Miquel, T.M. and Rodriguez–Delgado, M.A. (2013). Determination of organophosphorus pesticides and metabolites in cereal-based baby foods and wheat flour by means of ultrasound-assisted extraction and hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to gas chromatography with nitrogen phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*, 1313: 166–174.
- Gilden, R.C., Huffling, K. and Sattler, B. (2010). Pesticides and health risks. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 39: 103–110.
- Jalili, V., Barkhordari, A. and Ghiasvand A. (2019). New extraction media in microextraction techniques, A review of reviews. *Microchemical Journal*, DOI: 10.1016/ 104386.
- Khodadadi, M., Samadi, M.T., Rahmani, A.R., Maleki, R., Resani, A.A. and Shahidi, R. (2010). Determination of organophosphorous and carbamate pesticides residue in drinking water resources of Hamadan in 2007. *International Journal of Environmental Research*, 2: 250–257.
- Lemos, V.A. and Oliveira, L.A. (2015). Ultrasound-assisted temperature-controlled ionic liquid microextraction for the preconcentration and determination of cadmium content in mussel samples. *Food Control*, 50: 901-906.
- Liang, P., Guo, L., Liu, Y., Liu, S. and Zhang, T. (2005). Application of liquid-phase microextraction for the determination of phoxim in water samples by high performance liquid chromatography with diode array detector. *Microchemical Journal*, 80: 19–23.
- Mitra, S. (2003). *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, John Wiley. New Jersey, pp. 12-35.
- Ojha, A., Yaduvanshi, S.K. and Srivastava, N. (2011). Effect of combined exposure of commonly used organophosphate pesticides on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99: 148-156.
- 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: 1604–1611.
- Psillakis, E. and Kalogerakis, N. (2003). Developments in liquid–phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 22: 565–574.
- Razzaghi, M., Khanjani, N. and Daneshi, S. (2016). Contamination with organophosphate toxins in humans in Iran: A Systematic review. *Health and Development Journal*, 5(1): 90-97. [In Persian]
- Saraji, M. (2005). Dynamic headspace liquid–phase microextraction of alcohols. *Journal of Chromatography A*, 1062: 15–21.
- Safari M. and Zandian, A. (2013). A rare case of organophosphate poisoning by accidental injection of toxin. *Iranian Journal of Pediatrics*, 23(1): 4.
- Shakoori, A., Mahasti, P. and Moradi, V. (2017). Determination of twenty organophosphorus pesticides in wheat samples from different regions of Iran. *Iranian Journal of Toxicology*, 11(5): 37-44.
- Sharma, D., Nagpal, A., Pakade, Y.B. and Katnoria, J.K. (2010). Analytical methods for estimation of organophosphorus pesticide residues in fruits and vegetables: A review. *Talanta*, 82(4): 1077-1089.
- You, X., Xing, Z., Liu, F. and Jiang, N. (2013). Air-assisted liquid–liquid microextraction used for the rapid determination of organophosphorus pesticides in juice samples. *Journal of Chromatography A*, 1311: 41–47.
- Vanderhoff, G.R. and VanZoonen, P. (1999). Trace analysis of pesticides by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 843: 301–322.