

(مقاله پژوهشی)

کاربرد روش میکرواستخراج مایع- مایع پخشی کوپل شده با کروماتوگرافی گازی به منظور اندازه گیری تعدادی از آفت کش های ارگانوفسفره در نمونه های آبمیوه

محمد رضا افشارمقدم^۱، جلیل خندقی^{۲*}

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

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۳/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۰

چکیده

آبمیوه ها منبع غنی از ویتامین ها، آمینو اسیدها و املاح مختلف هستند و به عنوان نوشیدنی در سراسر جهان استفاده می شوند. میوه ها به عنوان مواد خام آب میوه ها به طور مرتب تحت تاثیر آفات، قارچ ها و حشرات متفاوت قرار می گیرند که منجر به کاهش کیفیت و کمیت آن ها می گردد لذا از آفت کش های گوناگون جهت جلوگیری از ضایعات وارده به محصولات کشاورزی بطور گسترده ای استفاده می شود. با توجه به این نکات و با توجه به مصرف این مواد توسط انسان ها، اندازه گیری باقی مانده آن ها در میوه ها و آب میوه ها بسیار حائز اهمیت می باشد. در این کار پژوهشی روش میکرواستخراج مایع- مایع پخشی مبتنی بر تمرکز سازی سرمایشی برای پیش تغلیظ و استخراج تعدادی از آفت کش های ارگانوفسفره از نمونه های آب میوه ارزیابی شده و سپس اندازه گیری کمی آن ها به روش کروماتوگرافی گازی انجام شده است. اثر عوامل موثر شامل نوع و حجم حلال استخراج کننده، دمای محلول آبی، حجم محلول هیدروکلریک اسید و قدرت یونی بر روی کارایی استخراج مورد بررسی قرار گرفته و بهینه سازی شد. تحت شرایط بهینه، کارایی روش پیشنهادی ۹۲/۴-۶۴/۹ درصد به دست آمد. حدود تشخیص در محدوده ی ۴/۳-۰/۶۷ میکروگرم بر لیتر و محدوده ی خطی در گستره ی ۲/۲۵-۴۰۰۰ میکروگرم بر لیتر به دست آمدند. روش پیشنهادی ساده، قابل اعتماد و ارزان بوده و مصرف کم حلال های آلی و زمان آنالیز کوتاه از دیگر مزایای آن می باشد.

واژه های کلیدی: آبمیوه، آفت کش های ارگانوفسفره، میکرواستخراج مایع- مایع پخشی مبتنی بر تمرکز سازی سرمایشی، کروماتوگرافی گازی.

۱-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 گرفته‌است. تولیدکنندگان محصولات کشاورزی برای مبارزه با عوامل مخرب و کاهش دهنده تولید، به استفاده از مواد شیمیایی تحت عنوان آفت‌کش‌ها روی آورده‌اند. قسمتی از این مواد نه تنها در سطح محصولات باقی می‌ماند بلکه به داخل بافت میوه‌ها، سبزی‌ها و حتی دانه‌های غلات نفوذ می‌کند. به‌طوریکه اغلب محصولات کشاورزی که در معرض آفت‌کش‌ها قرار گرفته‌اند حاوی مقادیری از باقیمانده آفت‌کش‌ها می‌باشند (۲،۴) و به دلیل اینکه این محصولات با سلامتی انسان در ارتباط هستند، اندازه‌گیری و بررسی میزان باقی‌مانده آفت‌کش‌ها در محصولات کشاورزی از اهمیت بسیاری برخوردار است به طوری که حداکثر مقدار باقی‌مانده آفت‌کش‌ها به عنوان یک معیار در این مورد ارائه می‌شود (۸،۱۳). آفت‌کش‌ها بر اساس ساختار شیمیایی به سه دسته آفت‌کش‌های معدنی، آفت‌کش‌های با منشأ گیاهی و آفت‌کش‌های آلی مانند سموم ارگانوکلره و ارگانوفسفره تقسیم می‌شوند، عموماً از نظر فیزیکی شیمیایی پایدار بوده و به همین علت قادر به حضور طولانی مدت در اکوسیستم می‌باشند (۲۸). سموم ارگانوفسفره^۲ مولکول‌های آلی حاوی فسفر می‌باشند و عملکرد سیستماتیک^۳ دارند یعنی توسط ریشه و برگ گیاه جذب شده و به سرتاسر گیاه منتقل می‌شوند (۲۷). به‌طور کلی مکانیسم عمل سموم ارگانوفسفره بر اساس جلوگیری از عملکرد آنزیم استیل‌کولین‌استراز می‌باشد (۱۹) و مطالعات فراوانی روی عوارض سوء سلامتی ناشی از آن‌ها در کشورمان انجام شده است (۳،۱۵،۲۲،۲۴) گرچه تحقیقات انجام گرفته در خصوص آلودگی مواد غذایی به این سموم در کشورمان زیاد نیست (۱۲،۲۶).

با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در دهه‌های اخیر، شیمیدانان هنوز هم اکثر نمونه‌ها را به دلایل گوناگون از قبیل ماهیت نمونه، ماتریکس پیچیده و غلظت کم نمی‌توانند به‌طور مستقیم توسط دستگاه‌های تجزیه‌ای آنالیز کنند و بایستی قبل از آنالیز روش‌هایی را جهت پیش‌تیمار و آماده‌سازی نمونه به کار گیرند که معمولاً این مراحل پیچیده و وقت‌گیر می‌باشند (۵). تا کنون روش‌های گوناگونی از جمله روش استخراج مایع-مایع^۴، روش میکرواستخراج فاز مایع^۵ (۲۱،۲۵) و روش کچرز^۶ (۷) برای جداسازی سموم ارگانوفسفره از مواد غذایی ارائه شده‌است. 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 مهم‌ترین آن‌ها میکرواستخراج مایع-مایع پخشی^۷ است که در سال ۲۰۰۶ برای اولین بار ابداع و معرفی شد. اساس این روش استفاده از سیستم سه گانه نمونه‌آبی، حلال استخراج‌کننده غیرقابل امتزاج با آب و حلال پخش‌کننده امتزاج‌پذیر با هردو فاز آبی و حلال استخراج‌کننده می‌باشد. 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. پخش‌شدن قطرات بسیار ریز حلال استخراج‌کننده در محلول آزمایشی سبب ایجاد سطح تماس بسیار بالایی بین حلال استخراج‌کننده و نمونه‌آبی می‌شود. با تسهیل فرایند انتقال جرم، حالت تعادل در مدت‌زمان کوتاهی برقرار شده و در نتیجه زمان استخراج به میزان قابل توجهی کاهش می‌یابد (۲۰،۲۳). در این پژوهش به‌منظور آماده‌سازی نمونه از روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی مبتنی بر تمرکزسازی سرمایشی در داخل سرنگ برای استخراج و پیش تغلیظ آفت‌کش‌های ارگانوفسفره

4- liquid-Liquid Extraction

5- Liquid Phase Microextraction

6- Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe method

7- Dispersive Liquid-Liquid Microextraction

1- Maximum Residue Limits

2- Organophosphorus Pesticides

3- liquid-Liquid Extraction

پستران^{۱۰} نسخه ۲/۳ برای پردازش داده‌های GC استفاده شدند. آفت‌کش‌های ارگانوفسفره فونوفوس، ایپروبنفوس، کلرتیون، اتیون و فوسالون از شرکت دکتر ارنست‌هوفر^{۱۱} آلمان تهیه و سپس محلول استاندارد ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر از آن‌ها به دست آمد. سدیم کلرید، هیدروکلریک اسید ۳۷ درصد، آمونیاک ۳۲ درصد، پیوالیک اسید، ۲-کلروفنول و آب با درجه HPLC از شرکت مرک^{۱۲} آلمان خریداری شدند. گاز هلیوم با درجه خلوص ۹۹/۹۹٪ از شرکت گلف کرایو^{۱۳} امارات متحده‌ی عربی تهیه شد.

۲-۳- روش استخراج

در این مطالعه از روش میکرواستخراج فاز مایع-مایع پخشی مبتنی بر انجماد قطره‌ی آلی شناور در داخل سرنگ برای استخراج آفت‌کش‌های ارگانوفسفره از نمونه‌های آب میوه استفاده شد. ابتدا ۵ میلی‌لیتر آب‌دیونیزه اسپایک شده با آنالیت‌ها به غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر (نسبت به هر یک از آفت‌کش‌های مورد مطالعه) که دمای آن در ۵۰ درجه‌ی سانتیگراد تنظیم شده برداشته شد. سپس با استفاده از ۰/۵ میلی‌لیتر محلول آمونیاک ۰/۵ مولار، pH محلول آبی در ۱۰ تنظیم شده، ۱۲۰ میکرولیتر پیوالیک اسید به آن اضافه گردید و به آرامی همزده شد تا محلول همگن به دست آید. سپس محلول همگن به داخل سرنگ منتقل و یک لوله موئین از سر سرنگ وارد شده، با استفاده از آن ۲۵۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۱/۵ مولار وارد محلول شد. در اثر این عمل پیوالات خنثی شده و به صورت قطرات ریز به سمت بالای محلول حرکت کرده و در حین استخراج سرد شده و پس از مدت کوتاهی به صورت جامد در بالای محلول داخل سرنگ جمع شد. همچنین با این عمل، به طور هم‌زمان نمک کلرید آمونیوم تولید می‌شود که می‌تواند حلالیت پیوالیک اسید را در فاز آبی کاهش دهد. سپس بیستون سرنگ فشرده شده و پیوالیک اسید باقی‌مانده در آن با ۱۰ میکرولیتر استونیتریل مخلوط شد. در نهایت یک

فونوفوس^۱، ایپروبنفوس^۲، کلرتیون^۳، اتیون^۴ و فوسالون^۵ در آب‌میوه‌های انگور، سیب، آلبالو، هلو، پرتقال و زردآلو استفاده شده و سپس آنالیز این ترکیبات به روش کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای^۶ (FID) انجام شده است. پارامترهای موثر بر استخراج از قبیل نوع و حجم حلال استخراج کننده، دمای محلول آبی، حجم محلول اسید کلریدریک و قدرت یونی مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت اعتبار روش میکرواستخراج از طریق تعیین حد تشخیص، حد اندازه‌گیری، تکرار پذیری، راندمان و فاکتور تغلیظ سنجیده شده است.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه برداری

نمونه‌های آب انگور، آب سیب، آب آلبالو، آب هلو، آب پرتقال و آب زردآلو بسته‌بندی شده در کارخانجات مختلف در تابستان سال ۱۳۹۸ از مراکز عرضه در شهر تبریز خریداری شده و آزمایش‌ها در دانشگاه تبریز انجام گرفت.

۲-۲- دستگاه‌ها و مواد شیمیایی مورد استفاده

آنالیزهای این مطالعه با دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل GC-2010 ساخت شرکت شیماتزو^۷ ژاپن، مجهز به دکتور یونیزاسیون شعله‌ای و دریچه تزریق از نوع Split/Splitless و ستون کاپیلاری HP-5 خریداری شده از شرکت ساپلکو^۸ آمریکا به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۵ میکرومتر انجام گرفت. دستگاه هیدروژن ژنراتور مدل OPGU-1500S ساخت کمپانی شیماتزو ژاپن، برای تولید هیدروژن مورد نیاز آشکارساز و نرم افزار لب سولوشن^۹ نسخه ۲/۳ برای جمع‌آوری داده‌های GC و همچنین نرم افزاری سی

- 1- Fonofos
- 2- Iprobenfos
- 3- Chlorthion
- 4-Ethion
- 5- Phosalone
- 6 -Flame Ionization Detector
- 7- Shimadzu
- 8- Supelco
- 9- Lab Solution

- 10- GC Postrun
- 11- Dr. Ehrenstoffer
- Merck
- 13- Gulf Cryo

شناساگر یونیزاسیون شعله‌ای انجام شد. به منظور دستیابی به حداکثر تفکیک و نتایج قابل اعتماد در سیستم کروماتوگرافی، جداسازی آنالیت‌ها در شرایط بهینه صورت گرفت. شرایط بهینه دستگاه برای آنالیز آفت‌کش‌های ارگانوفسفره مورد مطالعه در جدول ۱ ذکر شده است.

میکرولیتر از آن برداشته شده و به کروماتوگرافی گازی تزریق شد.

۲-۴- شرایط آنالیز با دستگاه کروماتوگرافی

شناسایی و اندازه‌گیری آفت‌کش‌های ارگانوفسفره در نمونه‌ها به وسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به

جدول ۱- شرایط بهینه ی کروماتوگرافی گازی به منظور آنالیز آفت‌کش‌های ارگانوفسفره در آبمیوه

برنامه دمایی ستون	۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۱۰ درجه سانتی‌گراد افزایش
نوع ستون	HP-5: به طول ۳۰ متر، قطر داخلی: ۲۵/۰ میکرومتر، ضخامت فاز ساکن: ۵/۰ میکرومتر
تزریق کننده	Split/Splitless، دما: ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد، نسبت اسپلیت: ۱:۱۰
آشکارساز	FID، دما: ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد
گاز حامل	هلیوم با جریان خطی ۳۰ سانتی‌متر در ثانیه
گاز میک آپ	هلیوم با جریان ۳۰ میلی‌لیتر در دقیقه
سوخت	هیدروژن با جریان ۴۰ میلی‌لیتر در دقیقه
اکسیدان	هوا با جریان ۳۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه

۲-۵- بهینه‌سازی شرایط استخراج

به منظور دستیابی به راندمان استخراج و فاکتور تغلیظ بالا برای آنالیت‌های مورد بررسی، اثر پارامترهای مختلف مانند نوع حلال استخراج کننده (از بین حلال‌های پیوالیک اسید و متاکلروفنول) و حجم حلال استخراج کننده (از بین حجم‌های ۱۱۵، ۱۲۰، ۱۳۰، ۱۴۰ و ۱۵۰ میکرولیتر)، دمای محلول‌آبی (از بین دماهای ۴۰، ۴۵، ۵۰، ۵۵، ۶۰ و ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد)، حجم محلول هیدروکلریک اسید (از بین حجم‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میکرولیتر) و قدرت یونی (با افزودن ۰/۰، ۲/۵، ۵/۰ و ۷/۵ و ۱۰/۰ درصد وزنی / حجمی از نمک کلرید سدیم) بر روی کارایی استخراج مورد بررسی قرار گرفتند. برای بررسی پارامترهای موثر در روش پیشنهادی از روش "یک پارامتر در یک زمان" استفاده شد. تاثیر این عوامل با مقایسه سطح زیر پیک حاصل از آنالیت‌ها در شرایط مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (۶).

۲-۶- بررسی مشخصات تجزیه‌ای

به منظور اعتبارسنجی روش بکار رفته برای آنالیز سموم ارگانوفسفره در این تحقیق، پس از ترسیم نمودار معیارگیری یا منحنی کالیبراسیون، حد تشخیص^۱ (LOD)، حداندازه‌گیری^۲ (LOQ)، مجذور ضریب همبستگی، تکرار پذیری، راندمان و فاکتور تغلیظ بررسی و محاسبه شدند (۱۸).

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج بهینه‌سازی عوامل موثر در استخراج

۳-۱-۱- نوع حلال

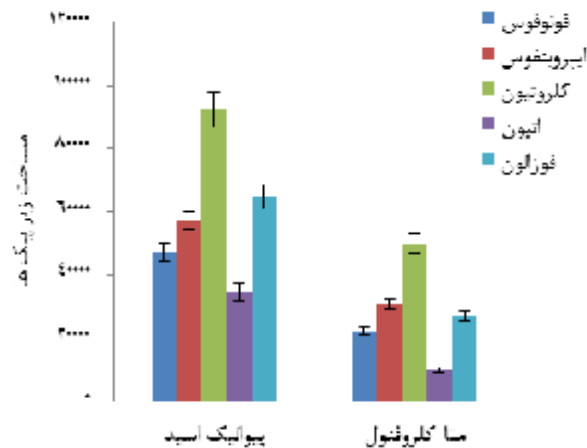
انتخاب حلال استخراج کننده مناسب یکی از مهم‌ترین مراحل در فرایند استخراج می‌باشد. در این کار پژوهشی حلال استخراج کننده مورد استفاده باید دارای ویژگی‌هایی از قبیل حلالیت پایین در آب، قابلیت اختلاط و تشکیل سیستم دو فازی با آب با افزودن عامل جداکننده فازی، نقطه

1- Limit Of Detection

2- Limit Of Quantitation

حلال‌های با خصلت اسیدی این بود که بین پروتون این حلال‌ها و اتم‌های الکترون‌گاتیو آنالیت‌ها می‌تواند پیوند هیدروژنی تشکیل یابد که منجر به افزایش حلالیت آنالیت‌ها در داخل حلال‌های مذکور می‌گردد (۲۹). نتایج بدست آمده نشان داد که پیوالیک اسید قابلیت بیشتری در استخراج آنالیت‌های مورد بررسی دارد لذا پیوالیک اسید به عنوان حلال برای مراحل بعدی انتخاب گردید.

ذوب نزدیک به دمای اتاق، خصلت اسیدی حلال، رفتار مطلوب کروماتوگرافیکی، سازگار با محیط زیست و ارزان قیمت باشد (۱۷). با در نظر گرفتن این ویژگی‌ها و با توجه به این که در این کار از محلول اسیدی به عنوان عامل جداکننده فازی استفاده شده‌است، حلال‌های اسیدی پیوالیک اسید و متاکلروفنول به‌عنوان حلال استخراج‌کننده انتخاب‌شده و مورد بررسی قرار گرفته‌اند. دلیل انتخاب

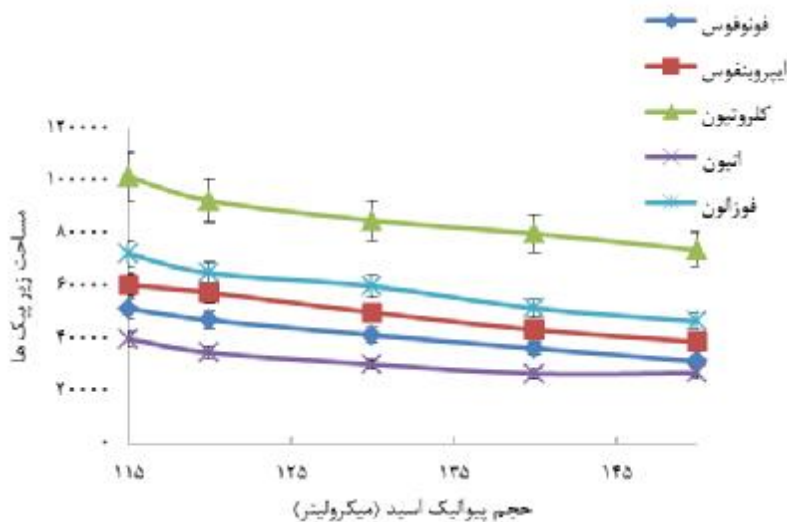


شکل ۱- تاثیر نوع حلال استخراج‌کننده در کارایی روش استخراج آفت‌کش‌های ارگانوفسفره با روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی مبتنی بر تمرکزسازی سرمایشی

استخراج و تکرارپذیری کاهش می‌یابد لذا حجم حلال‌های استخراج‌کننده و کمک پخش‌کننده باید بهینه‌سازی شوند (۱۴). با افزایش حجم پیوالیک اسید حجم فاز جمع شده رویی از ۷ به ۲۹ میکرولیتر افزایش یافت که این امر باعث کاهش سیگنال تجزیه‌ای و مساحت زیر پیک آنالیت‌ها به دلیل کاهش فاکتور تغلیظ شد. ولی چون در حجم‌های کمتر از ۱۲۰ میکرولیتر حجم فاز آلی جمع‌شده به قدری ناچیز بود که برداشتن آن مشکل بود و در نتیجه تکرارپذیری روش کاهش می‌یافت، ۱۲۰ میکرولیتر به عنوان حجم بهینه‌ی حلال استخراج‌کننده انتخاب شد. حجم فاز جمع شده در این شرایط 1 ± 10 میکرولیتر بود.

۳-۱-۲- حجم حلال

حجم حلال استخراج‌کننده نقش مهمی در کارایی روش‌های میکرواستخراج دارد. کاهش مقدار حجم حلال استخراج‌کننده پس از استخراج نسبت به مقدار اولیه اضافه شده، به حلالیت حلال استخراج‌کننده در آب و فشار بخار حلال بستگی دارد. حجم حلال استخراج‌کننده نقش مهمی در کارایی روش‌های میکرواستخراج دارد. هر چه حجم حلال استخراج‌کننده اولیه بیشتر باشد در این صورت حجم فاز جمع‌شده 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

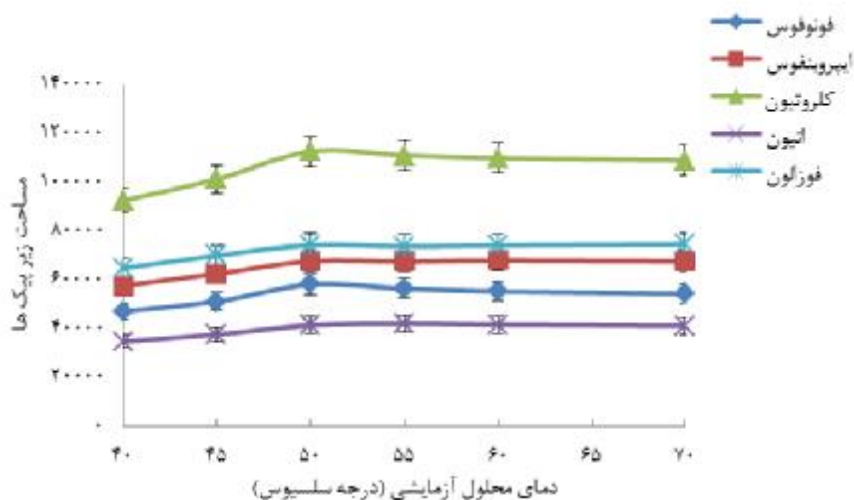


شکل ۲- تاثیر حجم حلال استخراج کننده در کارایی روش استخراج آفت کش های ارگانوفسفره با روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی مبتنی بر تمرکزسازی سرمایشی

می تواند منجر به افزایش انتشار آنالیت ها به داخل فاز آبی و در نتیجه کاهش راندمان استخراج شود. بنابراین مقادیر سیگنال های تجزیه ای برای دماهای مختلف متفاوت خواهد بود (۱۶). طبق شکل ۳، کارایی استخراج روش پیشنهادی تا دمای ۵۰ درجه سانتیگراد افزایش یافته و سپس ثابت می ماند. از این رو این دما به عنوان دمای بهینه انتخاب شد.

۳-۱-۳- دمای فاز آبی

یکی دیگر از عوامل موثر در فرآیند پیشنهادی دمای فاز آبی است. تغییر دما از طریق تغییر ضرایب انتشار می تواند سرعت استخراج را تحت تاثیر قرار دهد. گرم شدن محلول آبی می تواند به عنوان نیروی محرک جهت پخش بهتر حلال استخراج کننده در محلول آبی باشد که در نتیجه آن سطح تماس بین حلال و نمونه افزایش یافته و سرعت انتقال جرم آنالیت ها بهبود پیدا می کند. با این وجود افزایش دما

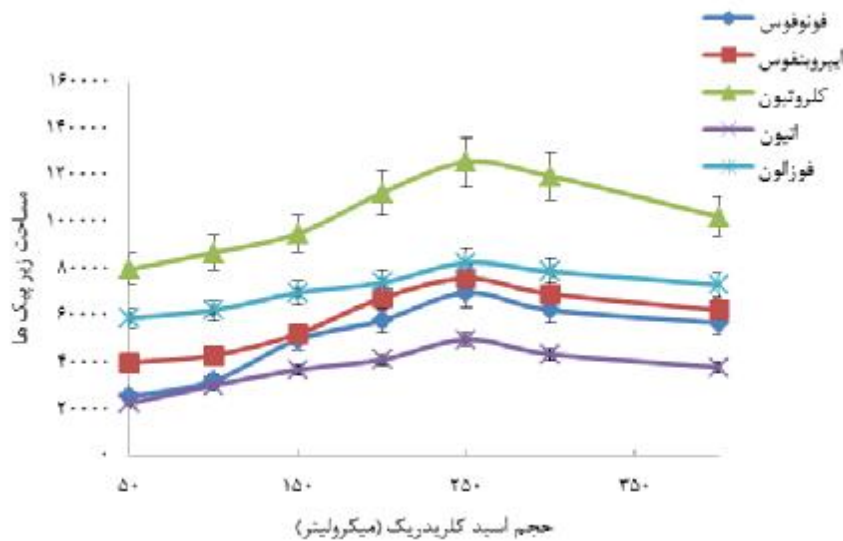


شکل ۳- تاثیر دمای فاز آبی در کارایی روش استخراج آفت کش های ارگانوفسفره با روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی مبتنی بر تمرکزسازی سرمایشی

۳-۱-۴- حجم محلول هیدروکلریک اسید

افزایش هیدروکلریک اسید به محلول آبی منجر به پروتونه شدن یون‌های پیوالات شده و باعث می‌شود تا محلول همگن بشکند. از سوی دیگر هیدروکلریک اسید با آمونیاک واکنش داده و آمونیوم کلرید تولید می‌شود که به جدایی حلال استخراج کننده از فاز آبی کمک می‌کند (۱۰). در اثر این عمل پیوالات خنثی شده و به صورت قطرات ریز به سمت بالای محلول حرکت کرده و در مسیر آنالیت‌ها را

استخراج کرده و پس از مدت اندکی به صورت جامد در بالای محلول جمع می‌گردد. سپس پیستون سرنگ فشار داده می‌شود تا پیوالیک اسید در قسمت باریک سرنگ قرار گیرد. کارایی روش استخراج پیشنهادی، با افزایش حجم هیدروکلریک اسید تا ۲۵۰ میکرولیتر افزایش یافته و سپس به دلیل افزایش حجم نهایی فاز آبی و در نتیجه حل شدن آنالیت‌ها در آن کاهش می‌یابد.

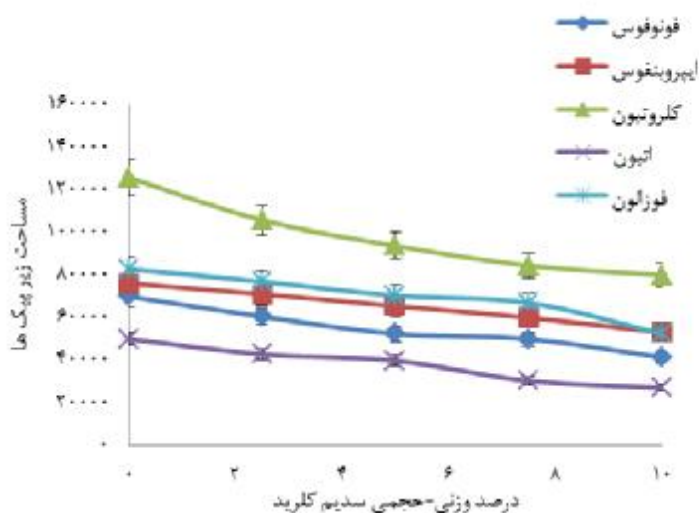


شکل ۴- تاثیر حجم محلول هیدروکلریک اسید در کارایی روش استخراج آفت کش‌های ارگانوفسفره با روش میکرواستخراج مایع- مایع پخشی مبتنی بر تمرکزسازی سرمایشی

۳-۱-۵- اثر نمک زنی

عموماً در روش‌های استخراج، افزایش نمک بر محلول‌های آبی دو اثر متقابل دارد. اول اینکه، حضور نمک باعث افزایش نیروی یونی فاز آبی شده و باعث کاهش حلالیت آنالیت‌ها در فاز آبی و انتقال آن‌ها به داخل حلال استخراج کننده شده و در نتیجه راندمان استخراج افزایش می‌یابد. دوم اینکه، افزایش نمک به محیط استخراج می‌تواند محلولیت حلال استخراج کننده 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 (۱۱). مطابق شکل ۵، کارایی استخراج با افزایش NaCl کاهش می‌یابد. به عبارتی افزایش نمک باعث افزایش ویسکوزیته فاز آبی شده و ضریب انتشار و سرعت انتقال آنالیت‌ها را از داخل فاز آبی به داخل فاز آلی کاهش داده در نتیجه سبب کاهش راندمان استخراج می‌گردد. از این رو استخراج آفت کش‌های ارگانوفسفره بدون افزایش نمک صورت گرفت.



شکل ۵- تاثیر مقدار نمک در کارایی روش استخراج آفت کش های ارگانوفسفره با روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی مبتنی بر تمرکزسازی سرمایشی

۳-۲- نتایج مشخصات تجزیه ای روش استخراج

پارامترهای تجزیه ای روش حاضر تحت شرایط بهینه بدست آمدند. معادله رگرسیون برای داده های حاصله در محدوده مورد بررسی در جدول ۲ بیان شده است. از منحنی کالیبراسیون مقدار مجذور ضریب همبستگی (r^2) و محدوده خطی روش^۱ (LDR) برای هر یک از آنالیت ها به دست آمد. حد تشخیص و حداندازه گیری به ترتیب برابر غلظت هایی در نظر گرفته شدند که در آن ها نسبت سیگنال

به نویز (S/N) ۳:۱ و ۱۰:۱ می باشند. به منظور بررسی تکرارپذیری و دقت روش از انحراف استاندارد نسبی^۲ (RSD%) استفاده گردید. محاسبه فاکتور تغلیظ از مقایسه مساحت زیرپیک آنالیت های محلول استاندارد با مساحت پیک آنالیت های موجود در آب میوه ها پس از اجرای روش پیشنهادی و استخراج صورت گرفت. نتایج حاصل از مشخصات تجزیه ای روش در جدول ۲ ارائه شده است.

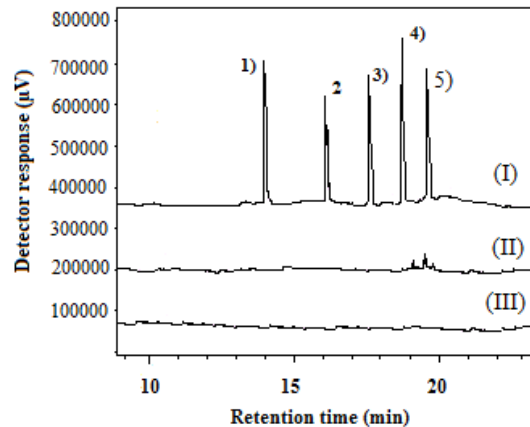
جدول ۲- ارقام شایستگی روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی مبتنی بر تمرکزسازی سرمایشی در استخراج آفت کش های ارگانوفسفره از نمونه های آبمیوه

آنالیت	محدوده خطی روش ($\mu\text{g L}^{-1}$)	حد تشخیص ($\mu\text{g L}^{-1}$)	حد اندازه گیری ($\mu\text{g L}^{-1}$)	مجدور ضریب همبستگی	انحراف استاندارد نسبی (%) (n= 5)	راندمان \pm (n= 3)	فاکتور تغلیظ (n= 3)
فونوفوس	۱۲/-۴ ۴۰۰۰	۳/۴۳	۱۲/۴	۰/۹۹۸۶	۴/۱	۷۸/۹ \pm ۳	۳۹۵ \pm ۱۵
ایپروبنفوس	-۸/۷ ۴۰۰۰	۲/۳	۷/۸	۰/۹۹۹۶	۴/۳	۷۴/۳ \pm ۳	۳۷۲ \pm ۱۵
کلرپتیون	-۲۵/۲ ۴۰۰۰	۰/۶۷	۲/۲۵	۰/۹۹۵۸	۶/۳	۹۲/۴ \pm ۳	۴۶۲ \pm ۲۰
اتیون	-۲/۱۳ ۴۰۰۰	۴/۳	۱۳/۲	۰/۹۹۹۷	۵/۱	۶۴/۹ \pm ۳	۳۴۷ \pm ۲۰
فوسالون	۱۳/۴ - ۴۰۰۰	۱/۲۸	۴/۳۷	۰/۹۹۸۹	۶/۱	۸۹/۶ \pm ۵	۴۴۸ \pm ۲۵

۳-۳- کاربرد روش میکرو استخراج پیشنهادی برای نمونه‌های حقیقی

برای بررسی قابلیت روش پیشنهادی در اندازه‌گیری آفت‌کش‌های ارگانوفسفره در نمونه‌های حقیقی، اقدام به اندازه‌گیری آفت‌کش‌ها در نمونه‌های آب‌میوه تحت شرایط بهینه نمودیم. یک نمونه از کروماتوگرام‌های مربوط به

تزریق استاندارد آفت‌کش‌های مورد مطالعه (هرکدام به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و نمونه‌ی آب‌سیب حقیقی (اسپایک نشده) در شکل ۶ نشان داده شده‌است. مقایسه کروماتوگرام‌های نمونه‌ها با کروماتوگرام حاصل از نمونه استاندارد نشان داد که هیچ‌کدام از آفت‌کش‌های مورد مطالعه در نمونه‌های حقیقی مورد بررسی وجود ندارد.



شکل ۶- کروماتوگرام GC-FID مربوط به (I) تزریق محلول استاندارد (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) از آفت‌کش‌های ۱- فونوفوس، ۲- ایلروبنفوس ۳- اتیون ۴- کلرتیون و ۵- فوسالون، (II) نمونه آب‌سیب اسپایک نشده و (III) آب دیونیزه اسپایک نشده پس از اجرای روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی مبتنی بر تمرکزسازی سرمایشی

۳-۴- بررسی اثر ماتریکس در نمونه‌های حقیقی

هدف از پژوهش حاضر معرفی یک روش برای اندازه‌گیری برخی از آفت‌کش‌های ارگانوفسفره در نمونه‌های آب‌میوه می‌باشد. به دلیل اینکه نمونه آب‌میوه 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، ۵ میلی‌لیتر از نمونه‌های حقیقی با غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر لیتر نسبت به هرکدام از آفت‌کش‌های

مورد مطالعه اسپایک گردیده و تحت شرایط بهینه با روش پیشنهادی استخراج شده و مورد آنالیز قرار گرفت. سپس ۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه با همان غلظت‌ها از آنالیت‌ها اسپایک شده و با روش مذکور مورد استخراج و آنالیز قرار گرفت (۹). با مقایسه سیگنال‌های تجزیه‌ای به‌دست‌آمده برای هر یک از نمونه‌های حقیقی و آب دیونیزه، اثر ماتریکس مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست‌آمده در جدول ۳ نشان می‌دهد که ماتریکس نمونه‌ها تأثیر محسوسی در کارایی روش پیشنهادی ندارند.

جدول ۳- مقادیر بازیابی حاصل از آنالیز نمونه‌های آبمیوه اسپایک شده در دو غلظت متفاوت

(n = ۳) انحراف استاندارد ± بازیابی
نمونه‌های آبمیوه بسته‌بندی شده

هلو	زردآلو	پرتقال	سیب	آلبالو	انگور	
نمونه های اسپایک شده با هر یک از آنالیت ها هر کدام به غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر						
فونوفوس	۹۲±۴	۹۶±۵	۵±۹۱	۴±۹۴	۵±۹۵	۴±۹۱
ایپروبنفوس	۹۸±۶	۹۷±۳	۴±۹۸	۶±۹۶	۵±۹۶	۳±۹۶
کلرتیون	۹۷±۳	۹۴±۵	۳±۹۴	۵±۹۸	۴±۹۷	۳±۹۰
اتیون	۹۸±۴	۸۹±۶	۴±۹۳	۵±۹۶	۵±۹۳	۴±۹۷
فوسالون	۹۹±۶	۹۳±۴	۴±۹۳	۴±۹۶	۴±۹۵	۵±۹۴
نمونه های اسپایک شده با هر یک از آنالیت ها هر کدام به غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر						
فونوفوس	۹۵±۳	۹۶±۵	۹۵±۳	۹۱±۴	۹۰±۳	۹۶±۵
ایپروبنفوس	۹۶±۳	۹۴±۳	۹۹±۳	۹۳±۵	۹۵±۵	۹۷±۴
کلرتیون	۹۲±۳	۹۸±۴	۹۹±۳	۹۸±۴	۹۱±۶	۹۰±۵
اتیون	۹۷±۶	۹۴±۵	۹۶±۴	۹۶±۴	۸۹±۷	۹۸±۵
فوسالون	۹۲±۵	۹۹±۶	۹۳±۳	۹۹±۳	۹۲±۵	۹۴±۴

۴- نتیجه گیری

در کار پژوهشی حاضر از روش میکرواستخراج مایع-مایع بخشی مبتنی بر تمرکزسازی سرمایشی برای استخراج و پیش‌تغلیظ برخی از آفت‌کش‌های ارگانوفسفره از نمونه‌های آبمیوه و سپس اندازه‌گیری کمی آن‌ها به وسیله دستگاه GC-FID استفاده شد. روش پیشنهادی ساده، قابل اعتماد و ارزان بوده و مقادیر مطلوبی برای فاکتورهای تغلیظ و حدود

تشخیص بدست می‌دهد. تحت شرایط بهینه، فاکتورهای - تغلیظ و راندمان‌های استخراج به ترتیب در محدوده‌ی ۴۶۲-۳۴۷ و ۶۴/۹-۹۲/۴ درصد بدست آمدند. RSD براساس مساحت زیر پیک ۴/۱ و ۳/۶ درصد بدست 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.

- ۵-منابع**
8. EU Pesticides database. Pesticide EU-MRLs. Regulation EC No. 396/2005. 2013; Available at: <http://ec.europa.eu/sanco-pesticides>.
 9. European Commission Decision 2002/657/EC, implementing Council Directive 96/23/EC. concerning the performance of analytical methods.
 10. Farajzadeh, M. A. and Afshar Mogaddam, M.R. 2016. Acid-base reaction-based dispersive liquid-liquid microextraction method for extraction of three classes of pesticides from fruit juice samples. *Journal of Chromatography A*, 143129: 8-16.
 11. 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.
 12. 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.
 13. Gilden, R.C., Huffling, K. and Sattler, B. 2010. Pesticides and health risks. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 39: 103-110.
 14. Jalili, V., Barkhordari, A. and Ghiasvand A. 2019. New extraction media in microextraction techniques, A review of reviews. *Microchemical Journal*, DOI: 10.1016/ 104386.
 15. 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.
 16. Lemos, V. A. and Oliveira, L. A. 2015. Ultrasound-assisted temperature-controlled ionic liquid microextraction for the
 1. 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.
 2. 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.
 3. 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.
 4. 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.
 5. 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.
 6. Chandran, S. and Singh, R. 2007. Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(1): 4-14.
 7. 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.

23. Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M. R., Aghaee, E., Ahmadi, F. and Berijani, S. 2006. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116: 1-9.
24. Safari, M. and Zandian, A. 2013. A rare case of organophosphate poisoning by accidental injection of toxin. *Iranian Journal of Pediatrics*, 23(1): 4.
25. Saraji, M. 2005. Dynamic headspace liquid-phase microextraction of alcohols. *Journal of Chromatography A*, 1062: 15-21.
26. 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.
27. 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.
28. Vanderhoff, G.R. and Van Zoonen, P. 1999. Trace analysis of pesticides by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 843: 301-322.
29. Viñas, p., Campillo, N. and Vasil Andruch, V. 2015. Recent achievements in solidified floating organic drop microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 68: 48-77.
- preconcentration and determination of cadmium content in mussel samples. *Food Control*, 50: 901-906.
17. Mansour, F.R. and Danielson, N.D. 2017. Solidification of floating organic droplet in dispersive liquid-liquid microextraction as a green analytical tool. *Talanta*, 1701: 22-35.
18. Mitra, S. 2003. Sample preparation techniques in analytical chemistry, John Wiley pub. New Jersey, pp. 12-35.
19. 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.
20. 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.
21. Psillakis, E. and Kalogerakis, N. 2003. Developments in liquid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 22: 565-574.
22. Razzaghi, M., Khanjani, N. and Daneshi, S. 2016. Contamination with organophosphate toxins in humans in Iran: A Systematic review. *Journal of Health and Development*, 5(1): 90-97.

(Original Research Paper)

Application of a Dispersive liquid-liquid Microextraction Coupled to Gas Chromatography for Determination of organophosphorous Pesticides in Fruit Juice

MohammadReza Afshar Moghaddam¹, Jalil Khandaghi^{2*}

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

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

Received:31/12/2019

Accepted:06/06/2020

Abstract

Fruit juices are rich source of vitamins, amino acids and various minerals and are served as a beverage all over the world. Fruits as the raw materials of fruit juices are regularly affected by different pests, fungi or insects, which result in a decrease in their quality and quantity. Therefore, various pesticides are widely used to prevent damage to crops. Considering this points and due to consume these products by human's, analysis and measurement of these substances in fruits and fruit juices has a great importance. In the present work, solidified floating organic droplets dispersive liquid-liquid microextraction was evaluated for pre-concentration and extraction of some organophosphorus pesticides in fruit juice samples and then quantitative analysis was performed by gas chromatography. The effect of parameters including extraction solvent type and volume, aqueous solution temperature, hydrochloric acid volume and NaCl concentration on the extraction efficiency were investigated and optimized. The optimized method was validated with recoveries ranging from 69.3 to 92.3%. The limits of detection were in the range of 0.67-4.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ and the linear range was in the range of 2.25-4000 $\mu\text{g L}^{-1}$. The proposed method is simple, reliable and cheap, and low consumption of organic solvents and short analysis time is the other advantages.

Keywords: Fruit Juices, Organophosphorous Pesticides, Dispersive liquid-liquid Microextraction, Gas Chromatography.

*Corresponding Author: khandaghi@iausa.ac.ir

