

اندازه گیری باقیمانده آفت کش های آلی فسفره در خیار با استفاده از ریزاستخراج مایع - مایع پخشی جفت شده با کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی

علی اسحاقی^{۱*}، حمیده حمیدی^۱، سارا زالی^۱ و وانیک قلی پور^۲

۱. بخش فیزیکوشیمی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، استان البرز، ایران. ۲. دانشکده شیمی کاربردی، دانشگاه خوارزمی، استان البرز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۲

چکیده:

به دلیل مصرف زیاد آفت کش های آلی فسفره جهت کنترل آفات کشاورزی، اندازه گیری باقیمانده آنها دارای اهمیت بالایی می باشد. در این تحقیق روشی جهت استخراج و اندازه گیری باقیمانده آفت کش های دیکلروس، دیازینون، اتریملوس، متیل پاراتیون، فیتروتیون، مالاتیون، بروموفوس و اتیون در خیار با کمک تکنیک ریز استخراج مایع - مایع همراه با کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی توسعه داده شد. استون به عنوان حلال استخراج کننده برای استخراج آفت کش های آلی از نمونه گیاهی استفاده شد. پس از اتمام فرایند استخراج، مخلوط اتیلن تتراکلرید (حلال استخراج کننده) و استون استخراجی به دست آمده در مرحله قبل (حلال پخش کننده) به سرعت به آب خالص اضافه شدند. پس از سانتریفیوژ، فاز ته نشین شده جمع آوری و به دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی برای جداسازی و تشخیص آفت کش های آلی فسفره تزریق شد. پارامترهای مهم مانند نوع و حجم حلال استخراج کننده و پخش کننده، اثر نمک و pH که بر فرایند ریز استخراج مایع - مایع پخشی مؤثر هستند، مورد مطالعه قرار گرفتند. تحت شرایط بهینه، فاکتور تغلیظ و راندمان استخراج به ترتیب در گستره ۱۱۹ - ۱/۱۰۱ و ۲۵/۸۹ - ۱/۷۷ درصد برای اکثر آنالیت ها ارزیابی شد. محدوده خطی در گستره $500 - 20 \mu\text{gkg}^{-1}$ و حد تشخیص برای آنالیت های متفاوت در محدوده $0.006 \mu\text{gkg}^{-1}$ تا $13/78$ حاصل شد. انحراف استاندارد نسبی آفت کش های متفاوت در گستره ۲ - ۳/۲۳٪ به دست آمد. در نهایت روش توسعه داده شده برای آنالیز نمونه خیار تهیه شده از فروشگاه به کار گرفته شد.

واژه های کلیدی: استخراج مایع - مایع پخشی، باقیمانده سموم، آفت کش های آلی فسفره، کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی.

مقدمه:

بنیادین برای جداسازی آفت‌کش‌ها از ماتریکس‌های غذایی است. امروزه با توجه به مصرف بالای حلال‌های آلی در روش‌های استخراج مایع-مایع، که اغلب سمی هستند، روش‌های جدیدی مانند ریز استخراج مایع-مایع پخشی جایگزین شده‌اند. تکنیک ریزاستخراج مایع-مایع پخشی (Zgoła-Grzes'kowiak and Grzes'kowiak, 2011) نوعی از ریز استخراج مایع-مایع می‌باشد که در آن با استفاده از حلالی که قابلیت امتزاج با هر دو فاز آبی و آلی را دارد، امکان معلق شدن فاز آلی بصورت قطرات فوق‌العاده ریز در فاز آبی فراهم می‌شود. بدین ترتیب سطح تماس بین حلال استخراج‌کننده و نمونه افزایش یافته، سرعت استخراج نیز افزایش می‌یابد. همچنین این روش بسیار سریع، ساده، ارزان و کارآمد بوده، نیاز به ابزار و مهارت خاصی ندارد و بنابراین به راحتی قابل اجرا است. مزیت دیگر این روش سازگاری آن با دستگاه‌های تجزیه‌ای است و از آنجا که مقدار بسیار کمی از حلال آلی در این روش مصرف می‌شود، سازگار با محیط زیست نیز می‌باشد. در این مطالعه از تکنیک ریزاستخراج مایع-مایع پخشی جهت جداسازی آفت‌کش‌ها از خیار استفاده شده است و آنالیز آفت‌کش‌ها بوسیله دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها:

مواد: استاندارد آفت‌کش‌های آلی فسفره از شرکت سیگما-آلدریج^۱ خریداری شدند. محلول استاندارد اولیه شامل هشت آفت‌کش آلی فسفردار، با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر با توجه به درصد خلوص آنها، در متانول خالص تهیه گردید. سدیم کلرید با درجه

استفاده از آفت‌کش‌ها موجب افزایش تولیدات کشاورزی می‌گردد. با این وجود آفت‌کش‌ها به دلیل پایداری و سمیت بالا، تهدیدی برای سلامتی انسان و حیوانات محسوب می‌شوند و اثر بسزایی در آلودگی محیط‌زیست و منابع غذایی بشر و موجودات زنده دارند. آفت‌کش‌های آلی فسفره به سهولت در طبیعت تجزیه می‌شوند و امروزه در بسیاری از کشورهای توسعه یافته به جای برخی از آفت‌کش‌های آلی حاوی کلر، به کار می‌روند (Wei-Yao *et al.*, 2001). همچنین آفت‌کش‌های آلی فسفردار، علی‌رغم پایداری کمتر نسبت به سموم دیگر، از سمیت بالاتری برخوردار هستند (Lambropoulou and Albanis, 2003) اما در مصرف پایین، از مزیت آنها می‌باشد. استفاده گسترده از این گونه ترکیبات برای مقاصد کشاورزی و غیر کشاورزی موجب حضور مقادیری از آنها در نمونه‌های زیست محیطی مثل آب‌های سطحی، خاک و محصولات کشاورزی می‌گردد (Zambonin, *et al.*, 2004). بنابراین، اندازه‌گیری ترکیبات آفت‌کش در نمونه‌های زیست محیطی و محصولات کشاورزی اهمیت زیادی دارد. جهت استخراج و آنالیز باقیمانده سموم روش‌های مختلفی مانند استخراج فاز جامد (Lanzone *et al.*, 2015)، ریز استخراج مایع-مایع (Xuet *et al.*, 2013)، ریز استخراج فاز جامد (Rodrigue *et al.*, 2011) (Menezes *et al.*, 2010) و ریز استخراج فاز مایع-مایع پخشی (Chen *et al.*, 2016) (Šandrejová *et al.*, 2016) (Dos Anjos and Andrade, 2015) گزارش شده است. در این میان روش‌های تجزیه‌ای بر پایه کروماتوگرافی گازی یا کروماتوگرافی مایع، به دلیل توانایی آنها در جداسازی گونه‌های متفاوتی که در نمونه وجود دارند، تکنیک‌های مفید و مؤثری برای آنالیز ترکیبات آلی فسفردار می‌باشند. استخراج با فاز مایع یک روش

¹ Sigma- Aldrich

WORKSTATION 6/9 استفاده شد. ستون موئینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر با فاز ساکن CP5860 و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر بود. نوع تزریق غیرانشعابی و زمان باز شدن شیر انشعاب ۳/۵ دقیقه تنظیم شد. ولتاژ الکترون مالتی‌پلایر ۱۷۰۰ ولت، دمای آنالایزر ۱۷۰ درجه سانتی‌گراد، دمای مانیفولد (Manifold) ۸۰ درجه سانتی‌گراد و دمای خط اتصال ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. گاز حامل هلیوم با درجه خلوص ۹۹/۹۹۹ درصد، با سرعت ۱ میلی‌متر بر دقیقه جریان داشت. برنامه دمایی ستون به صورت جدول ۱ تنظیم گردید.

خلوص ۹۹/۵٪، منیزیم سولفات با درجه خلوص ۷۰٪، حلال‌های پخش‌کننده استون، استونیتریل و حلال‌های استخراج‌کننده شامل کلروبنزن، دی‌کلرومتان، کلروفرم، کربن‌تتراکلرید، اتیلن‌تتراکلرید، کربن دی‌سولفید، زایلن و تولوئن با درجه خلوص گاز کروماتوگرافی از شرکت مرک خریداری شدند.

تجهیزات: برای جداسازی از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل CP3800 ساخت شرکت ورین مجهز به آشکارساز طیف‌سنجی جرمی و محفظه تزریق انشعابی/ بدون انشعاب و پردازش‌کننده اطلاعات MS

جدول ۱- برنامه دمایی آون ستون کروماتوگرافی گازی.

Table 1. Gas chromatography column temperature program.

Temperature increment rate (°C/min)	Column temperature (°C)	Retention time (min)
-	70	3.5
25	150	2
1	180	4
3	183	4
50	250	2

مراحل بعدی به عنوان حلال پخش‌کننده به کار برده شد.

استخراج مایع - مایع پخشی: برای انجام استخراج مایع-مایع پخشی، ۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حاوی ۰/۱ گرم سدیم کلرید، با $\text{pH} \pm 0.5/4$ در یک لوله سانتریفیوژ ۱۰ میلی‌لیتری ریخته شد. به ۱ میلی‌لیتر از محلول استخراجی حاصل از مرحله قبل، ۱۰ میکرولیتر حلال استخراج‌کننده (C_2Cl_4) افزوده شد. مخلوط حاصله به سرعت به داخل لوله سانتریفیوژ تزریق گشت و با سرعت ۴۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. ۲ میکرولیتر از فاز استخراج‌کننده (C_2Cl_4) ته‌نشین شده توسط سرنگ ۱۰ میکرولیتری برداشته به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد. در

جهت آنالیز با کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی از روش پایش یون‌های انتخاب‌شده^۱ (SIM) استفاده شد. جدول ۲ برنامه SIM به کار رفته برای تجزیه آنالیت‌ها و زمان بازداری را نشان می‌دهد.

آماده‌سازی نمونه: جهت استخراج آفت‌کش‌های آلی فسفره از نمونه خیار، یک گرم نمونه خیار خرد و همگن شده در یک لوله سانتریفیوژ پانزده میلی‌لیتری ریخته، سپس یک میلی‌لیتر استون، ۰/۴ گرم منیزیم سولفات و ۰/۱ گرم سدیم کلرید به آن اضافه شد. پس از تکان دادن برای چند دقیقه، مخلوط حاصل با سرعت ۳۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گشت. ۱ میلی‌لیتر از محلول استخراجی حاصل، در

¹ Selected Ion Monitoring (SIM)

برای بررسی اثر نوع حلال پخش کننده نیز این آزمایش‌ها با ۱ میلی‌لیتر محلول استون استخراجی حاوی ۱۴ میکرولیتر C_2Cl_4 و بار دیگر محلول استونیتریل استخراجی حاوی ۱۴ میکرولیتر C_2Cl_4 انجام گرفت. با این تفاوت که این بار ۱۲/۵ میکرولیتر از مخلوط شش آفت کش آلی فسفره با غلظت mgL^{-1} ۲ به محلول استخراجی حاصل افزوده شد.

بهینه‌سازی حجم حلال استخراج: فرایند استخراج و اندازه‌گیری با بکارگیری ۱۸، ۱۴، ۱۲، ۱۰، ۸، ۱ میکرولیتر اتیلن تتراکلرید انجام و مساحت زیر پیک‌های حاصل ثبت گردید.

اثر حجم حلال پخش کننده: فرایند استخراج و اندازه‌گیری بوسیله ۵/۰، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر محلول استون به عنوان حلال پخش کننده انجام گردید.

اثر تغییر pH: مراحل استخراج با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر با pH تنظیم شده در مقادیر ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ انجام و نتایج حاصل ثبت گردید.

اثر افزایش نمک: در مراحل استخراج از سدیم کلرید با مقادیر ۰/۰، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲، ۰/۲۵ گرم استفاده و نتایج حاصل ثبت گردید.

منحنی کالیبراسیون تزریق مستقیم: برای ترسیم منحنی کالیبراسیون تزریق مستقیم غلظت‌های متفاوتی از هشت آفت کش (mgL^{-1} ۲/۵، ۴، ۴/۵، ۵ و ۶ برای اتیون و دیازینون و mgL^{-1} ۵، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۲ برای دیگر آفت کش‌ها)، در اتیلن تتراکلرید تهیه شد. سپس ۲ میکرولیتر از هر یک، به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گشت. راندمان استخراج (R%) و فاکتور تغلیظ (EF) به صورت مقابل محاسبه گردید.

$$EF = C_{sed}/C_0 \text{ و } R\% = C_{sed}V_{sed}/C_0V_0$$

که C_{sed} غلظت در فاز ته نشین شده، C_0 غلظت اولیه آنالیت،

نهایت حجم فاز ته نشین شده توسط سرنگ ۱۰ میکرولیتری، اندازه‌گیری شد (حجم فاز ته نشین شده حدود ۶ میکرولیتر می‌باشد).

بهینه‌سازی شرایط استخراج:

اثر نوع فاز استخراج کننده: پنج حلال مختلف شامل کربن‌دی‌سولفید ($40 \mu l$)، کربن تتراکلرید ($19 \mu l$)، کلروفرم ($39 \mu l$)، اتیلن تتراکلرید ($14 \mu l$) و کلروبنزن ($20 \mu l$) به عنوان حلال استخراج کننده مورد آزمایش قرار گرفت. بدین منظور ۱ میلی‌لیتر محلول استون استخراجی حاوی مخلوط آفت کش‌ها با غلظت mgL^{-1} ۲ و حلال استخراج کننده به میزان اشاره شده، داخل لوله سانتریفیوژ اضافه شدند. تغییر در حجم فازهای استخراج کننده به منظور حصول حجم‌های ثابت (در حدود ۶ میکرولیتر) از فاز ته نشین شده می‌باشد، که این تفاوت به دلیل اختلاف در حلالیت این حلال‌ها در آب است. پس از سانتریفیوژ کردن، ۲ میکرولیتر از فاز ته نشین شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد.

انتخاب حلال مناسب: برای انتخاب حلال مناسب به عنوان حلال آلی استخراج کننده آفت کش‌های آلی فسفره از نمونه خیار در مرحله اول و حلال پخش کننده در مرحله ریزاستخراج مایع-مایع پخش، از استونیتریل (روش QuEChERS) و استون خالص و استونیتریل بافری (استیک اسید ۱٪ در استونیتریل (روش QuEChERS بافری) و استون بافری (استیک اسید ۱٪ در استون) استفاده شد. مخلوط آفت کش‌های آلی فسفره با غلظت mgL^{-1} ۰/۲ به ۱ گرم نمونه خیار همورن شده افزوده شد. سپس مراحل استخراج به صورت مذکور انجام گردید. در مورد حلال‌های بافری به جای نمک سدیم کلرید، از ۰/۱ گرم سدیم استات استفاده شد.

تتراکلرید به آن تزریق شد. در نهایت ۲ میکرولیتر از فاز ته نشین شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گشت.

منحنی کالیبراسیون در ریزاستخراج مایع - مایع پخشی: برای تهیه منحنی کالیبراسیون، ابتدا غلظت های متفاوتی از مخلوط هشت آفت کش آلی فسفره به ۱ گرم نمونه خیار هموژن شده اضافه شد. سپس ۱ میلی لیتر از هر یک از محلول های استخراجی حاصل حاوی ۱۰ میکرولیتر اتیلن تتراکلرید به ۵ میلی لیتر آب مقطر حاوی ۰/۱ گرم سدیم کلرید با ۰/۰۵ ± pH ۴ تزریق شد. پس از سانتریفوژ کردن ۲ میکرولیتر از فاز ته نشین شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گشت.

V_{sed} حجم فاز ته نشین شده و V_0 حجم اولیه آنالیت می باشد.

بررسی تکرارپذیری استخراج: مراحل استخراج مخلوط آفت کش های آلی فسفره (با غلظت نهایی $50 \mu\text{gkg}^{-1}$ برای اتیون و دیازینون و $100 \mu\text{gkg}^{-1}$ برای ۶ آفت کش دیگر) ۳ بار تکرار شد. همچنین برای پاسخ به این سوال که آیا استخراج آنالیت ها از مخلوط استون استخراجی در مقایسه با استخراج آنها از محیط آبی از کارایی بالا برخوردار است یا نه (Zhao *et al.*, 2007) آزمایشات مشابهی ترتیب داده شد با این تفاوت که محلول استاندارد آفت کش های آلی فسفره این بار به ۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر اضافه گشت و محلول استون استخراجی حاصل از نمونه خیار به همراه اتیلن -

جدول ۲- جرم یون های انتخابی و زمان شروع برنامه به کار رفته در آنالیز آفت کش.

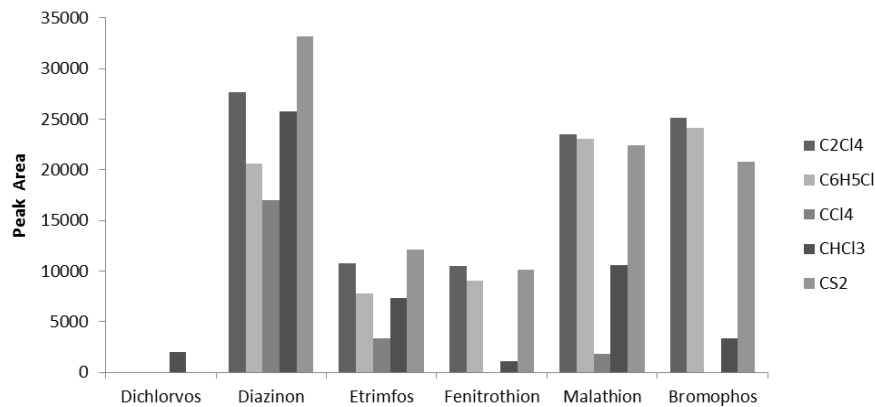
Table 2. The selected ions and the start times of program in pesticide analysis.

Pesticides	Selected ions (m/z)	Start time (min)
Dichlorvos	79-109-185	10.789
Diazinon	137-179-199-304	23.382
Etrimfos	153-181-292	24.51
Methyl parathion	109-125-263	27.912
Fenitrothion	109-125-277	30.022
Malathion	93-126-173	30.503
Bromophos	125-329-331	32.524
Ethion	97-199-231	37.644

نتایج:
آنالیت استخراج شده توسط اتیلن تتراکلرید، کربن دی-سولفید و کلروبنزن بیشتر از سایر حلال ها می باشد که با توجه به ساختار آنالیت ها، می توان آن را به دلیل برهم کنش حلقه بنزنی و یا پیوندهای دوگانه رزونانسی

بهینه سازی شرایط استخراج:
اثر نوع فاز استخراج کننده: نتایج این بررسی در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج میزان

حلال و آنالیت دانست (Berijani *et al.*, 2006). در بالاتر، به عنوان حلال استخراج کننده انتخاب گردید. این میان اتیلن تتراکلرید به دلیل راندمان استخراج

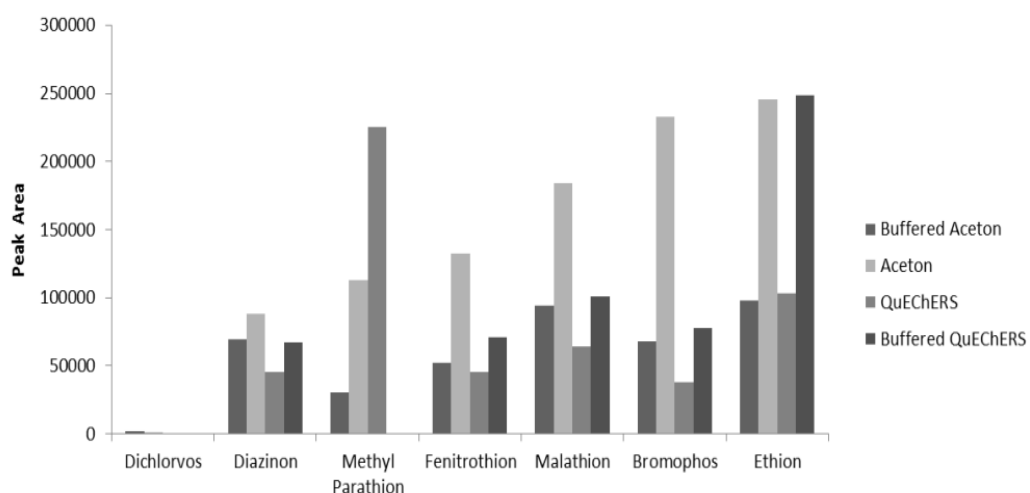


شکل ۱- نمودار اثر نوع فاز استخراج کننده بر کارایی استخراج

Figure 1. Effect of type of extraction phase on extraction efficiency.

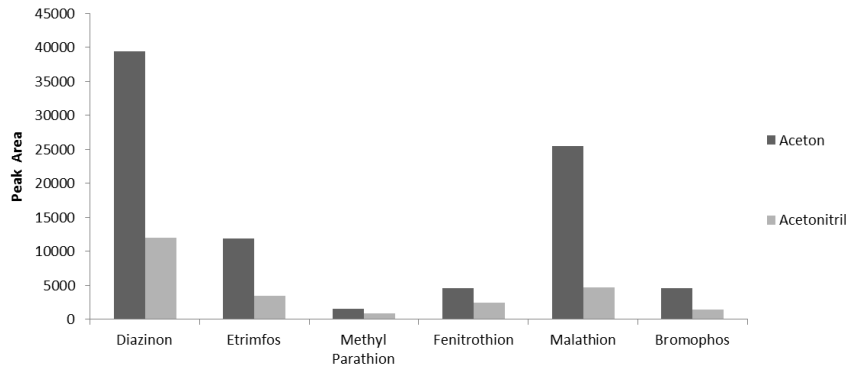
سلول‌های گیاهی (Hercegová *et al.*, 2007) و در نتیجه افزایش کارایی استخراج آفت کش‌های آلی فسفره از بافت‌های گیاهی می‌گردد. بنابراین استون به عنوان حلال استخراج کننده اولیه و نیز حلال پخش کننده به کار گرفته شد.

انتخاب حلال مناسب: همانطور که در شکل ۲ و ۳ مشاهده می‌شود درصد استخراج آنالیت‌ها در استون به عنوان حلال استخراج کننده اولیه و همچنین حلال پخش کننده بالاتر می‌باشد. از آنجا که استون کاملاً امتزاج پذیر در آب است این پدیده منجر به نفوذ آن در



شکل ۲- نمودار اثر نوع حلال آلی بر کارایی استخراج .

Figure 2. Effect of extraction solvent type on extraction efficiency.



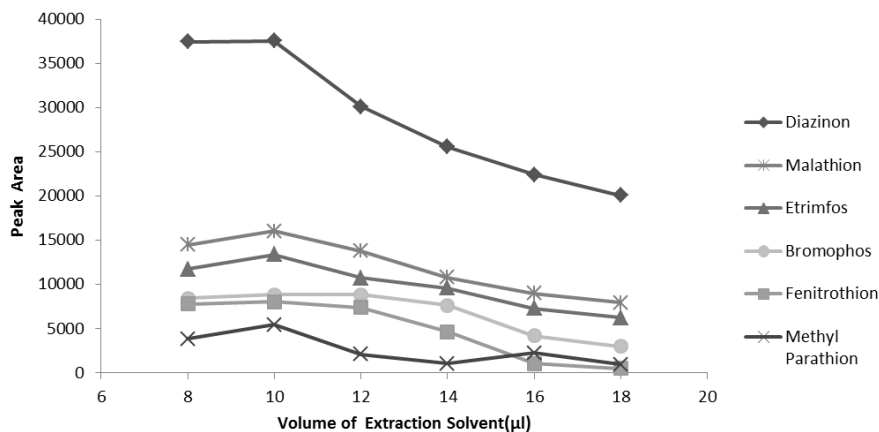
شکل ۳- نمودار اثر نوع فاز پخش کننده بر کارایی استخراج.

Figure 3. Effect of disperser solvent type on extraction efficiency.

قطرات حلال استخراج کننده می باشد (Nagaraju and Huang, 2007). همچنین با افزایش حجم حلال استخراج کننده، حجم فاز ته نشین شده نیز افزایش می یابد که منجر به کاهش غلظت آنالیت ها در فاز ته نشین شده می گردد (Berijani *et al.*, 2006). بنابراین حجم حلال استخراج کننده ۱۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد.

بهینه سازی حجم حلال استخراج کننده:

همان طور که در شکل ۴ مشاهده می شود با افزایش حجم اتیلن تتراکلرید سطح زیر پیک آنالیت ها ابتدا افزایش و سپس کاهش می یابد، کاهش سطح زیر پیک آنالیت ها در مقادیر بیشتر اتیلن تتراکلرید، احتمالاً به دلیل افزایش قطر ذرات حلال استخراج کننده و کاهش سطح تماس میان دو فاز و همچنین ته نشین شدن سریع



شکل ۴- نمودار اثر حجم فاز استخراج کننده بر کارایی استخراج.

Figure 4. Effect of extraction solvent volume on extraction efficiency.

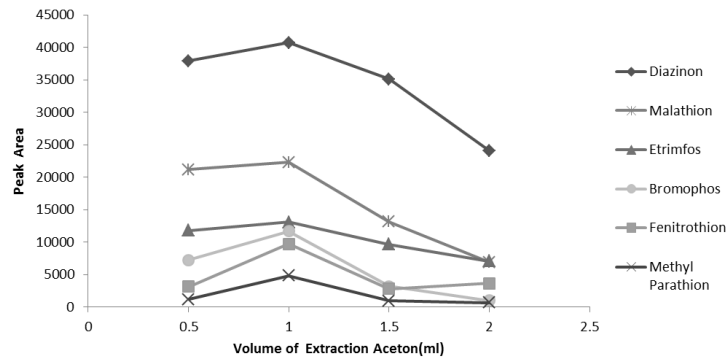
در نظر داشت که در این بررسی سعی شده است تا حجم فاز ته نشین شده ثابت نگه داشته شود. افزایش سطح زیر پیک با افزایش حجم استون را می توان به دلیل کاهش احتمالی قطر ذرات حلال استخراج کننده

اثر حجم حلال پخش کننده:

همان طور که در شکل ۵ مشاهده می شود با افزایش حجم استون از ۰/۵ تا ۱ میلی لیتر کارایی استخراج برای اکثر آنالیت ها افزایش یافته و از ۱ تا ۲ میلی لیتر کاهش می یابد (باید

آب و کاهش ضریب توزیع آفت کش‌های آلی فسفره بین آب و اتیلن تتراکلرید دانست (Berijani *et al.*, 2006). بنابراین حجم حلال پخش کننده ۱ میلی لیتر انتخاب شد.

(C_2Cl_4) و افزایش سطح تماس آن در داخل محلول آبی دانست (Berijani *et al.*, 2006). همچنین کاهش راندمان استخراج در مقادیر بالای استون را نیز می توان به دلیل افزایش حلالیت آفت کش‌های آلی فسفره در

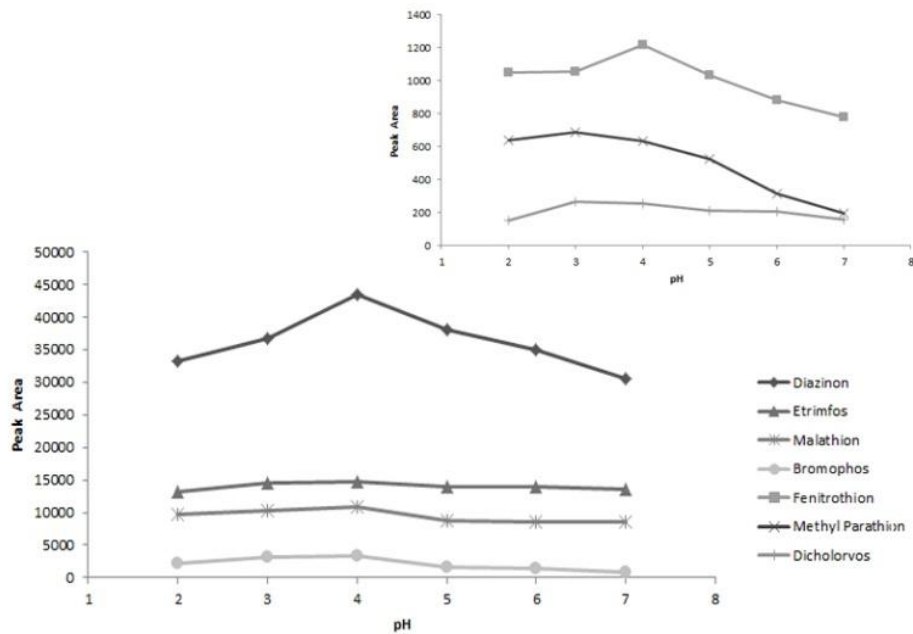


شکل ۵- نمودار اثر حجم حلال پخش کننده بر کارایی استخراج.

Figure 5. Effect of disperser solvent volume on extraction efficiency.

بررسی شد. شکل ۶ اثر pH را بر کارایی استخراج این آفت کش‌ها نشان می دهد. کارایی استخراج در pH ۴ بیشترین مقدار را نشان می دهد. بنابراین این مقدار به عنوان مقدار بهینه انتخاب شد.

اثر تغییر pH: برای ترکیباتی که قابلیت یونیزه شدن دارند، pH یک متغیر قابل کنترل می باشد. آفت کش‌های آلی فسفره در محیط‌های بازی ناپایدار بوده و در pH های اسیدی استخراج آنها بهتر صورت می گیرد. به همین دلیل اثر pH در مقادیر پایین تر از ۷

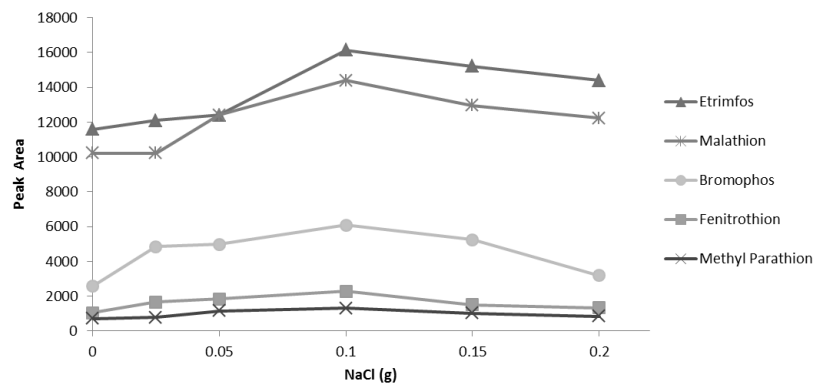


شکل ۶- نمودار اثر تغییر pH بر کارایی استخراج.

Figure 6. pH effect on extraction efficiency.

حجم فاز ته نشین شده نیز افزایش پیدا می کند که این به دلیل کاهش حلالیت اتیلن تتراکلرید در آب در حضور نمک است. افزایش در حجم فاز ته نشین شده خود موجب کاهش غلظت آنالیت ها می گردد که می توان آن را دلیلی بر کاهش کارایی استخراج در مقادیر بالای نمک دانست. همانطور که مشاهده می شود بازدهی استخراج در ۰/۱ گرم سدیم کلرید بیشترین مقدار را دارا می باشد. بنابراین این مقدار به عنوان مقدار بهینه انتخاب شد.

اثر افزایش نمک: همان طور که در شکل ۷ نشان داده شده است، افزایش نمک باعث افزایش کارایی استخراج شده است. با افزایش نمک، مولکول های آب، فضاهای هیدراته اطراف مولکول های یونیزه شده نمک تشکیل می دهند که موجب کاهش مقدار آب در دسترس و کاهش حلالیت ترکیبات آلی در آب می گردد و این خود سبب افزایش ثابت توزیع ترکیبات آلی بین فاز آبی و حلال استخراج کننده و افزایش کارایی استخراج می شود. همچنین با افزایش نمک



شکل ۷- نمودار اثر افزایش نمک بر کارایی استخراج.

Figure 7. Salting effect on extraction efficiency.

استخراج آفت کش‌ها از نمونه خیار و آب وجود ندارد که بیانگر استخراج کارآمد آنالیت‌ها از استون به داخل اتیلن تتراکلرید است. تفاوت مشاهده شده نیز می‌تواند به دلیل اتلاف آنالیت‌ها در مراحل اولیه استخراج و یا جذب سطحی آن‌ها توسط مواد موجود در ماتریکس نمونه باشد. البته با توجه به میزان راندمان استخراج برای آفت‌کش‌های دیکلروس و متیل پاراتیون کاربرد این روش برای این آفت‌کش‌ها در غلظت $100 \mu\text{gkg}^{-1}$ همراه با بازدهی مناسب نمی‌باشد و بایستی در غلظت‌های بالاتر این روش را برای این آفت‌کش‌ها استفاده نمود. شکل ۸ کروماتوگرام حاصل از استخراج آفت‌کش‌های آلی فسفره به غلظت $100 \mu\text{gkg}^{-1}$ را در شرایط بهینه، نشان می‌دهد.

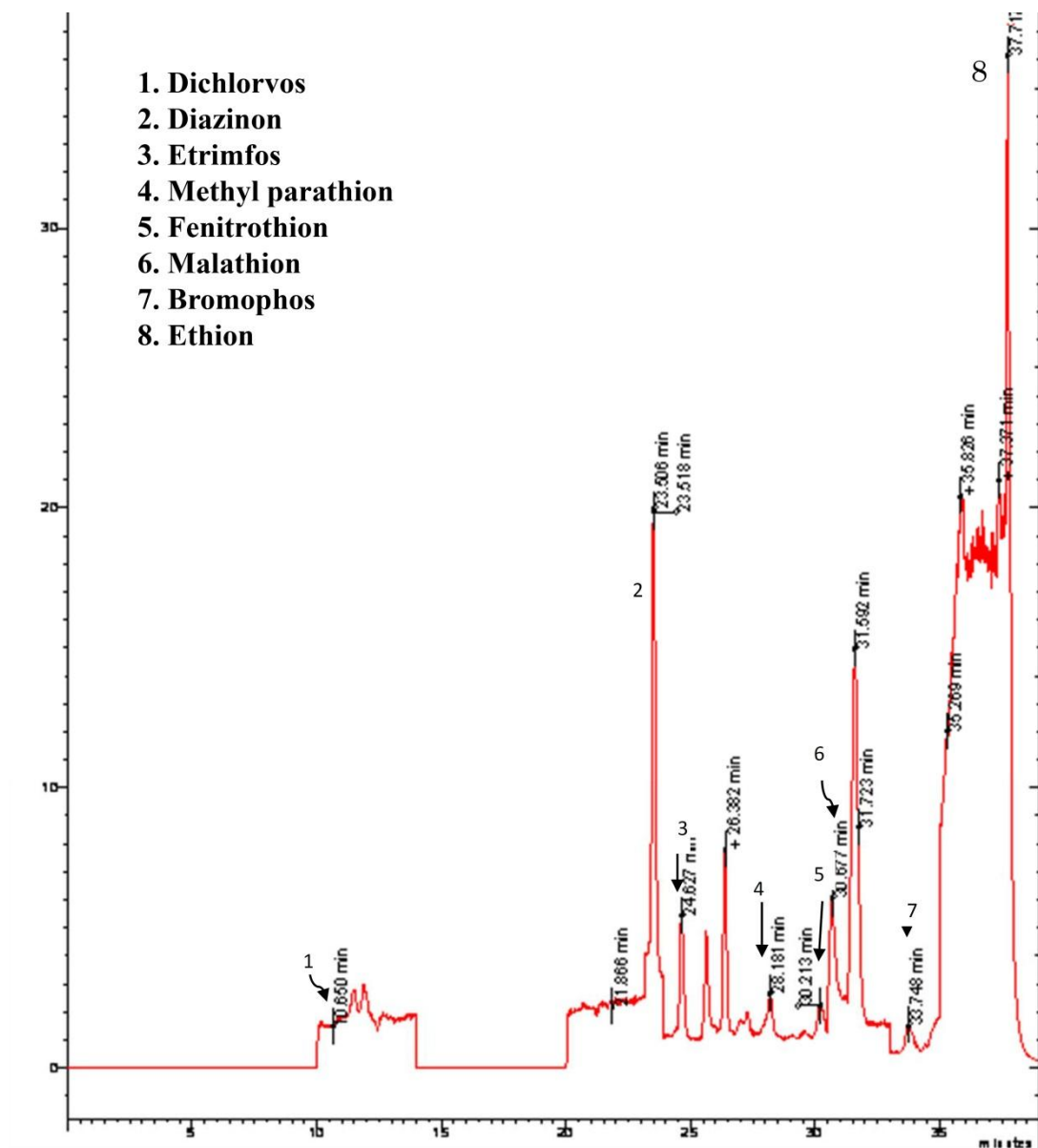
تکرارپذیری، راندمان استخراج و فاکتور

تغلیظ: تکرارپذیری در پاسخ پیک، با سه بار تکرار استخراج در شرایط بهینه بر حسب درصد انحراف استاندارد نسبی (Relative Standard Deviation) گزارش گردید. همان گونه که در جدول ۳ ملاحظه می‌شود به جز برای دیکلروس، متیل پاراتیون و اتیون درصد انحراف استاندارد نسبی برای سایر ترکیبات کمتر از ۱۰ بدست آمده است. همچنین راندمان استخراج و فاکتور تغلیظ محاسبه شد. راندمان استخراج ترکیبات مورد مطالعه در گستره $89/25 - 6/3$ درصد بوده و فاکتور تغلیظ در گستره $119 - 8/4$ می‌باشد. درصد راندمان استخراج و فاکتور تغلیظ برای حالت استخراج آفت‌کش‌ها از آب نیز محاسبه شد. همان‌طور که در جدول ۳ آورده شده است، تفاوت زیادی میان

جدول ۳ - انحراف استاندارد نسبی، راندمان استخراج و فاکتور تغلیظ حاصل از استخراج آفت کش های آلی فسفره الف) از آب در غلظت $100 \mu\text{gkg}^{-1}$ ب) از نمونه خیار در غلظت $100 \mu\text{gkg}^{-1}$

Table 3. Relative Standard Deviation, Relative recovery and Enrichment Factors of organophosphorus pesticides extraction from a. $100 \mu\text{gkg}^{-1}$ in water b. $100 \mu\text{gkg}^{-1}$ in cucumber

Pesticides	RSD (%) ^a	Relative recovery ^a	Enrichment factors ^a	RSD (%) ^b	Relative recovery ^b	Enrichment factors ^b
Dichlorvos	19.2	16.80	70.0	23.3	6.30	8.4
Diazinon	0.35	104.00	868.0	2	81.00	108.0
Etrimfos	2.5	88.94	635.3	7.8	75.82	101.1
Methyl parathion	6	87.18	726.5	19.0	36.45	48.6
Fenitrothion	1.6	80.36	574.0	18.7	85.20	113.6
Malathion	12	90.00	750.0	10.7	77.60	102.8
Bromophos	6.4	94.44	787.0	8.7	89.25	119.0
Ethion	12.9	88.08	734.0	8.6	81.30	108.4



شکل ۸ - کروماتوگرام جرمی مربوط به ریز استخراج آفت‌کش‌های آلی فسفره از نمونه خیار در غلظت $100 \mu\text{gkg}^{-1}$ تحت شرایط بهینه.

Figure 8. GC-MS chromatogram of cucumber sample spiked with organophosphorus pesticides at $100 \mu\text{gkg}^{-1}$.

تشخیص روش برای اندازه‌گیری آفت‌کش‌های آلی فسفره $13/78 \mu\text{gkg}^{-1}$ - $0/006$ و محدوده خطی منحنی کالیبراسیون برای اکثر ترکیبات 20 - $500 \mu\text{gkg}^{-1}$ می‌باشد. ضرایب همبستگی نیز در گستره $0/999$ - $0/996$ قرار دارند.

پارامترهای آماری: پارامترهای آماری روش شامل گستره خطی^۱ (LR)، مقدار ضریب همبستگی (r^2)، حد تشخیص^۲ (LOD) و معادله خط برای هر کدام از آفت‌کش‌ها در شرایط بهینه مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در جدول ۴ گزارش شده است، حد

1 Linearity range

2 Limit Of Detection

جدول ۴- ارقام شایستگی تجزیه ای حاصل از استخراج آفت‌کش‌های آلی فسفره به روش ریزاستخراج مایع- مایع پخشی

Table 4. Analytical figure of merits.

Pesticides	Regression equation	R ²	LOD (μgL^{-1})	Linearity range (μgL^{-1})
Dichlorvos	Y=5.04x-630.4	0.996	13.78	200- 2000
Diazinon	Y=935.6x+7719	0.997	0.006	10- 250
Etrimfos	Y=122.5x+343.5	0.998	0.19	20- 700
Methyl parathion	Y=8.90x+506.6	0.997	6.4	50- 700
Fenitrothion	Y=13.8x+109.1	0.999	4.1	20- 500
Malathion	Y=111.6x-1300	0.998	0.34	20- 500
Bromophos	Y=3102x-1664	0.996	0.84	50- 700
Ethion	Y=263.2x+4255	0.998	0.098	10- 350

نمونه خیار استخراج شدند، سپس مخلوطی از استون استخراج شده به عنوان حلال پخش‌کننده و اتیلن کلراید به عنوان حلال استخراج‌کننده در تکنیک ریزاستخراج مایع پخشی به آب خالص اضافه شدند. از سانتریفیوژ جهت جمع‌آوری اتیلن کلراید استفاده شد و حلال حاصل جهت جداسازی و آنالیز آفت‌کش‌ها به دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی تزریق شد. نتایج به دست آمده نشان داد استفاده از تکنیک ریزاستخراج مایع- مایع پخشی در اندازه‌گیری آفت‌کش‌های آلی فسفره در خیار مقادیر فاکتور تغلیظ و تکرارپذیری قابل قبولی را نشان می‌دهد. به طوری که مقدار فاکتور تغلیظ به بیش از ۱۰۰ نیز می‌رسد و در نتیجه مقدار حد تشخیص کمی به مقادیر خیلی کم کاهش می‌یابد. بنابراین ریز استخراج مایع- مایع پخشی، می‌تواند یک روش پیش‌تغلیظ با فاکتور تغلیظ بالا جهت اندازه‌گیری مقادیر بسیار کم باقیمانده آفت‌کش‌ها از خیار باشد. همچنین به دلیل سطح تماس زیاد حلال استخراج‌کننده با نمونه استخراج در مدت زمان کوتاهی صورت می‌گیرد.

آنالیز نمونه حقیقی: برای بررسی کارایی روش جهت اندازه‌گیری آفت‌کش‌های آلی فسفره، یک نمونه خیار تحت شرایط بهینه مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که تنها آفت‌کش اتیون در این نمونه خیار به میزان (μgkg^{-1}) ۵/۸۶ موجود بود.

بحث:

در تکنیک ریزاستخراج مایع- مایع پخشی امکان معلق شدن فاز آلی بصورت قطرات فوق‌العاده ریز در فاز آبی فراهم می‌شود. بدین ترتیب سطح تماس بین حلال استخراج‌کننده و نمونه افزایش یافته، سرعت استخراج نیز افزایش می‌یابد. همچنین این روش بسیار سریع، ساده، ارزان و کارآمد بوده، نیاز به ابزار و مهارت خاصی ندارد و بنابراین به راحتی قابل اجرا است. مزیت دیگر این روش سازگاری آن با دستگاه‌های تجزیه‌ای است و از آنجا که مقدار بسیار کمی از حلال آلی در این روش مصرف می‌شود، سازگار با محیط زیست نیز می‌باشد. در این مطالعه تکنیک ریزاستخراج مایع پخشی جهت استخراج و جداسازی باقیمانده ۸ آفت‌کش از خیار استفاده گردید. ابتدا آفت‌کش‌ها به کمک حلال استون از

References:

- Wei-Yao, Z., Jiang, G., Liu, J. and Cheng, W. 2001.** Application of solid-phase microextraction for the determination of organophosphorous pesticides in aqueous samples by gas chromatography with flame photometric detector. *Talanta*. (55): 807-814.
- Lambropoulou, D. A. and Albanis, T. A. 2003.** Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography–mass spectrometry for the rapid screening of organophosphorus insecticide residues in strawberries and cherries. *Journal of Chromatography A*. (993): 197-203.
- Zambonin, C. G., Quinto, M., Devietro, N. and Palmisano, F. 2004.** Solid-phase microextraction – gas chromatography mass spectrometry: A fast and simple screening method for the assessment of organophosphorus pesticides residues in wine and fruit juices. *Food Chemistry*. (86): 269-274.
- Lanzone, V., Sergi, M., Mascini, M., Scarpone, R., Della Pelle, F., Del Carlo, M., Scortichini, G. and Compagnone, D. 2015.** Solid-Phase Extraction of Pesticides by Using Bioinspired Peptide Receptors. *Journal of Chemistry*. (2015): 1-7
- Xu, X. Y., Ye, J. Q., Nie, J., Li, Z. G., and Lee, M. R. 2015.** A new liquid–liquid microextraction method by ultrasound assisted salting-out for determination of triazole pesticides in water samples coupled by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Methods*. 7(3): 1194-1199.
- Brito, N., Navickiene, S., Polese, L., Jardim, E., Abakerli, R. and Ribeiro, M. 2002.** Determination of pesticide residues in coconut water by liquid–liquid extraction and gas chromatography with electron-capture plus thermionic specific detection and solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *Journal of Chromatography A*. (957): 201–209.
- Menezes Filho, A., Dos Santos, F. N. and Pereira, P. A. D. P. 2010.** Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC–MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples. *Microchemical Journal*. (96): 139–145.
- Rodrigues, F. D. M., Mesquita, P. R., De Oliveira, L. S., de Oliveira, F.S., Menezes Filho, A., Pereira, P. A. D. P. and de Andrade, J. B. 2011.** Development of a headspace solid-phase microextraction/ gas chromatography–mass spectrometry method for determination of organophosphorus pesticide residues in cow milk. *Microchemical Journal*. (98): 56–61.
- Chen, B., Wu, F. Q., Wu, W. D., Jin, B.-h., Xie, L. Q., Feng, W. and Ouyang, G. 2016.** Determination of 27 pesticides in wine by dispersive liquid–liquid microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Microchemical Journal*. (126): 415–422.
- Dos Anjos, J. P. and de Andrade, J. B. 2015.** Simultaneous determination of pesticide multiresidues in white wine and rosé wine by SDME/GC–MS, *Microchemical Journal*. (120): 69–76.
- Šandrejová, J., Campillo, N., Viñas, P. and Andruch, V. 2016.** Classification and terminology in dispersive liquid–liquid microextraction, *Microchemical Journal*. (127): 184–186.
- Zgola-Grzes'kowiak, A. and Grzes'kowiak, T. 2011.** Dispersive liquid-liquid microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*. (30): 1382-1399.
- Zhao, E., Zhao, W., Han, L., Jiang, Sh. and Zhou, Z. 2007.** Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in watermelon and cucumber. *Journal of Chromatography A*. (1175): 137–140.
- Berijani, S., Assadi, Y. Anbia, M., Milani Hosseini, M. R. and Aghaee, E. 2006.** Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection: Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. *Journal of Chromatography A*. (1123): 1–9.
- Hercegov'a, A., D'om'ot'orov'a, M. and Matisov'a, E. 2007.** Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. *Journal of Chromatography A*. (1153): 54-73.
- Nagaraju, D. and Huang, S. 2007.** Determination of triazine herbicides in aqueous samples by dispersive liquid–liquid microextraction with gas chromatography–ion traps mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. (1161): 89–97.

Determination of Organophosphorus Pesticides in Cucumber Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled to Gas Chromatography–Mass Spectrometry

Eshaghi, A.^{*1}, Hamidi, H.¹, Zali, S.¹ and Gholi pour, V.²

1. Department of Physico Chemistry, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Alborz Province, Iran. 2. Department of Applied Chemistry, Kharazmi University, Alborz Province, Iran.

Received: Aug, 6, 2017

Accepted: Mar, 13, 2018

Abstract:

High amount of organophosphorus pesticides (OPs) are used to control of pest on various crops and therefore measurement of their residue in the crops is very important. In this study dispersive liquid–liquid microextraction technique (DLLME) coupled with gas chromatography–mass spectrometric detection (GC–MS) was developed for the extraction and determination of OPs, Dichlorvos, Diazinon, Etrifos, Methyl parathion, Fenitrothion, Malathion, Bromophos, Ethion in cucumber. Acetone was used as the extracting solvent for the extraction of OPs from plant samples. When the extraction process was completed, a mixture of Tetrachloroethylene (extraction solvent) and acetone extract (disperser solvent) were rapidly added to pure water. After centrifugation, the sedimented phase of Tetrachloroethylene was collected and injected into the GC–MS for separation and determination of OPs.

Influential parameters, such as, type and volume of extraction solvent, disperser solvent, salt and pH effects were studied and optimized. Under optimum conditions the enrichment factors and extraction recoveries ranged between 101.1- 119 and 77.1- 89.25% for most of the analytes. The linear range was wide (20–500 μgkg^{-1}) and the limits of detection were between 0.006 and 13.78 μgkg^{-1} . The relative standard deviations (RSDs) were obtained in the range of 2- 23.3%. The developed method was successfully applied for determination of OPs residues in cucumber samples purchased from the local store.

Key Words: Dispersive liquid–liquid microextraction; Organophosphorus pesticides; Pesticides residues; Cucumber; GC–MS.

* Corresponding author: Hossein Farazmand, Email: a.eshaghi@rvsri.ac.ir

