Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 9, No. 2, Summer 2013, p. 190-194

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، ص. ۱۹۴-۱۹۰

مقاله کوتاه پژوهشی

استخراج و اندازه گیری آفت کش ها در نمونه های عسل با استفاده از استخراج مایع – مایع هموژن و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

عباس ابراهیمی[1*] – سارا واعظ زاده[2]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۴/۸
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۱/۱۹

چکیده

برای استخراج ترکیب مورد نظر در نمونه عسل روش استخراج مایع- مایع هموژن به کار گرفته شد. پارامترهای موثر در راندمان استخراج به صورت یک متغییر در زمان بهینه سازی گردید که به صورت زیر می‌باشد: حجم متانول ۵ میلی لیتر، حجم کلروفرم ۱/۵ میلی لیتر، مقدار نمک NaCl ۱۴گرم و حجم نمونه آب : ۵۰ میلی لیتر در این روش مقدار دامنه خطی دینامیکی ppm ۲۰-۰۰۱/ با ضریب همبستگی۰/۹۹۸۷ برای این ترکیب بدست آمد .دقت روش برای ۱۲ استخراج و اندازه گیری در غلظتppm ۱۹این ترکیب بر حسب انحراف استاندارد نسبی (RSD%) بین ۶/۵ و حدود تشخیص تا زیر۰/۰۰۱ بدست آمد. میزان بازیافت نیز در گستره ٪ ۸۶/۲ تا % ۹۵/۴ تغییر می کند که نشان دهنده صحت خوب روش می باشد. روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در فاز معکوس که مجهز به آشکارساز UV-Vis بود برای جداسازی و اندازه گیری ترکیب سم مورد نظر به کار رفت. جداسازی در دمای اتاق با استفاده از ستونC۱۸ -ZORBAX Eclipse XDB و فاز متحرک آب – متانول(v/v% ۴۰-۶۰)در مد ایزوکراتیک انجام شد.

واژه های کلیدی : عسل، افت کش ها، استخراج مایع – مایع هموژن، کروماتو گرافی مایع با کارایی بالا

مقدمه

امروزه شناسایی و ارزیابی آفت کش ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و ابعاد گسترده‌ای پیدا کرده است. باقی مانده ترکیبات موجود در مواد غذایی طیف وسیعی را در بر می گیرند که عبارتند از سموم طبیعی، مواد شیمیایی مورد استفاده در کشاورزی، آلاینده های صنعتی، زیستی و مواد شیمیایی حاصل از فراوری مواد غذایی و بسته بندی. تولید محصولات کشاورزی با بازده بالانیز مستلزم کاربرد سموم دفع آفات نباتی است (هادیان،۱۳۸۵). بیش از ۸۰ درصد باقیمانده آفت کش‌ها در انسان و بویژه در کودکان مخاطرات جدی در بر دارد(خانبانی،۱۳۸۶). در نتیجه کنترل باقیمانده سموم درمواد غذایی به دلایل پیامدهای بهداشتی و اقتصادی ضرورت دارد. به همین دلیل، برنامه های پایش وجود باقیمانده سموم در مواد غذایی در راستای اطمینان از حداکثر مجاز باقیمانده سموم و میزان دریافت از طریق رژیم غذایی در بسیاری از کشورها به طور مستمر انجام می شود (خانبانی،۱۳۸۶). در کشور ما از حدود ۸۰۰ آفت کش مورد استفاده در دنیا ۲۱۱ نوع ترکیب شیمیایی با فرمولاسیون مختلف و کاربردهای متفاوت به ثبت رسیده است (خانبانی،۱۳۸۶). تولید محصولات گلخانه‌ای نیز مستلزم کاربرد سموم دفع آفات نباتی است. بررسی‌ها نشان داده است که این نوع تولید می تواند منجر به باقی ماندن سموم در مقادیر بالاتر از حد قانونی قابل قبول توصیه شده (MRL_S)[3] توسط FAO/codex[4] و اتحادیه اروپا شود (هادیان،۱۳۸۵). میزان مصرف سموم تحت شرایط مختلف کشاورزی، آب و هوایی در هر کشور و بین نواحی مختلف یک کشور متفاوت است (هلفریچ،۱۳۷۲). چندین نوع سم شیمیایی مانند حشره کش ها، علف کش ها و آنتی بیوتیک ها در عسل دیده شده است سموم در کشاورزی کاربرد زیادی دارند و در بررسی ها نشان داده شده که عسل توسط این سموم می تواند آلوده شود سایر آلوده کننده های مهم عسل قارچ کش ها هستند (سالاری ،۱۳۷۳) (خانبانی،۱۳۸۶)(Hernandez, 2002). معمولا در تحقیقات گذشته از روشهای استخراج مایع – مایع معمولی و روش

۱ و ۲- کارشناسان ارشد شیمی تجزیه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فیروزآباد، فارس
(*- نویسنده مسئول: Email: abbasebrahimi64@gmail.com)

3- MRLS : Maximum Residue Limit
4- Food and Agriculture organization

استخراج فاز جامد با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی و روشهای الکتروشیمیایی استفاده شده که این روشها از دقت کمتر و زمان آنالیز طولانی تر و مصرف زیادتر حلالهای آلی و در نتیجه هزینه زیادتر برخوردار بوده اند .در این تحقیق روش جدید استخراج مایع – مایع هموژن به همراه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جهت اندازه گیری آفت کش ها در نمونه های عسل بررسی شدکه نسبت به روشهای قبلی از دقت بالاتر و زمان آنالیز کوتاهتر و همچنین مصرف کمتر حلالهای آلی و در نتیجه هزینه کمتر و همچنین بدلیل استفاده از حلال متانول از سمیت کمتری برخوردار بود .

مواد و تجهیزات

دستگاه HPLC مدل Series۱۲۰۰ از شرکت Agilent آلمان که مجهز به یک پمپ Quarternary مدل Series۱۲۰۰ و یک آشکارساز UV/VIS مدل Series۱۲۰۰ و یک شیر تزریق شش قسمتی مدل Rheododyne با لوپ ۲۰ میکرولیتر مورد استفاده قرارگرفت. دیگر دستگاه های مورد استفاده ترازوی دیجیتال (شرکت Mettler آلمان با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم)، از سانتریفوژ KOKUSAN مدل H-108SERIES ساخت کشور آلمان (ماکزیمم سرعت دوران یا چرخش ۵۰۰۰ rpm) جهت سانتریفوژ کردن نمونه ها استفاده گردید

سم flam prop-m-isopropyl با درجه خلوص ۹۹٪ از شرکت Sigma آلمان، حلال های متانول و استونیتریل با درجه خلوص HPLC-grade نیز از شرکت Scharlau تهیه شدند. و دیگر حلال‌ها و مواد مورد استفاده مثل دی کلرو متان، کلروفرم، استون، n–هگزان و نمک NaCl که دارای خلوص تجزیه ای می باشند از شرکت مرک خریداری شدند ، در تمام آزمایش ها از آب دیونیزه استفاده شد.نمونه های عسل مورد استفاده نیز از نمونه های موجود در سوپر مارکت ها و بویژه نمونه های عسل خمین به صورت تصادفی انتخاب شدند.

برای تهیه محلول استاندارد با غلظت ۵۰ppm دقیقاً ۰/۰۲۵ گرم از نمونه سم توزین شده و با استونیتریل به حجم ml ۵ مخلوط شد و با آب مقطر به حجم رسانیده شد و با رقیق سازی پی در پی محلول های استاندارد کاری در دامنه مورد نظر به طور روزانه تهیه گردید. برای راحتی کار با نمونه های حقیقی نمونه ها در مقادیر مشخصی آب حل شدند تا کار کردن با آن راحت تر صورت گیرد (Aleksandra,2007).

استخراج مایع-مایع هموژن

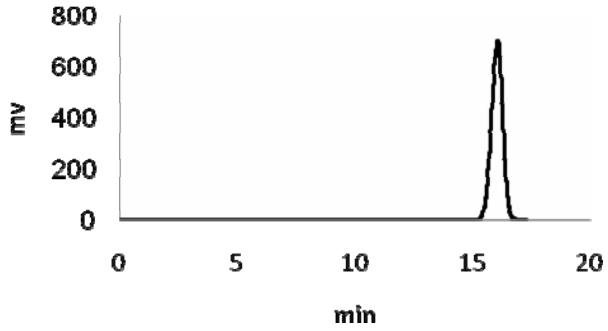
از یک سیستم سه جزیی آب – متانول - کلروفرم جهت ایجاد یک مخلوط هموژن و از الکترولیت سدیم کلرید جهت جداسازی فازها استفاده شد ml ۸۰ نمونه سم به لوله آزمایش ته مخروطی مخصوص سانتریفوژ منتقل شد. سپس ml ۸ متانول (به عنوان حلال هموژن کننده) که حاوی ml ۲ کلروفرم (به عنوان حلال استخراج کننده) می‌باشد به نمونه اضافه گردید تا یک محلول هموژن و یکنواخت بدست آید سپس به مدت min ۵ به آرامی تکان داده شد و به آن ۹ گرم NaCl اضافه شد. با تکان دادن محلول یک مخلوط ابری شکل ایجاد می‌شود که برای جدا کردن فازها به مدتmin ۲۰ با دور ۱۸۰۰ rpm سانتریفوژ شد. فاز استخراجی به صورت قطرات ریز ویسکوز با حجم حدود ml/۳ در انتهای لوله آزمایش جمع می‌شود که با سرنگ تزریقی این فاز برداشته شده و بعد از عبور از فیلترهای سرنگی µm /۴۵ به HPLC تزریق می شود.

انتخاب ستون مناسب HPLC

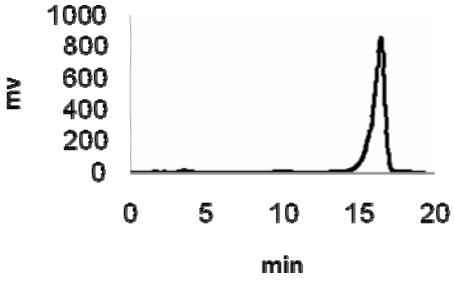
بعضی از ستونهای فاز معکوس C_{18} چون به خوبی end cap نشده‌اند یا دارای ناخالصی کاتیون فلزی در ماده پر کننده ستون می‌باشند باعث می‌شوند به علت برهمکنش گونه با گروههای سیلانول فعال فاز ساکن یا ناخالصی‌ها، پیکهای گونه مورد نظر دنباله‌دار شده و به خوبی از دیگر پیکها تفکیک نشوند به ویژه زمانیکه گونه مورد نظر در ساختار خود دارای گروه عاملی آمینی، کربوکسیلیکی یا هیدروکسیل باشد. به همین منظور ستون های مختلفی مورد آزمایش قرار گرفتند تا ستون مناسب جهت دستیابی به بهترین شرایط جداسازی مشخص شود. هر یک از ستون ها جداگانه به دستگاه HPLC متصل و محلول استاندارد سم مورد نظر با غلظت ۵۰ppm به کمک شیر تزریق ۲۰µL به دستگاه تزریق گردید. کروماتوگرام حاصله در شکل ۱ نشان می دهد که ستون C_{18} پیک متقارن تری ایجاد می کند. به همین جهت از این ستون برای تمام آنالیز هااستفاده گردید (Hamlton, 2004&olkowski,1998).

انتخاب فاز متحرک

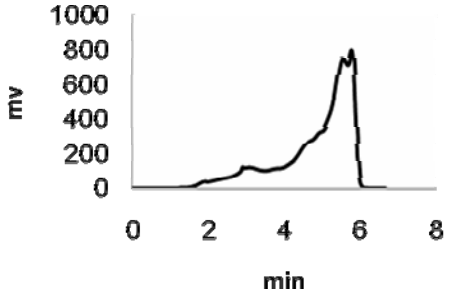
به منظور بهینه سازی فرایند جداسازی و افزایش زمان بازداری سم مورد نظر، علاوه بر نوع ستون و ابعاد آن، نوع فاز متحرک و سرعت جریان آن نیز باید بهینه سازی گردد. بنابراین انواع مختلفی از فازهای متحرک رایج در فاز معکوس مطالعه شد و معیار انتخاب نهایی آنها براساس رفتار بازداری و شکل پیک سم که جداسازی کامل پیک آنالیت را از بقیه ناخالصی امکان پذیر کند قرار گرفت. فازهای متحرک متانول– آب، استونیتریل– آب، متانول– بافر فسفات، متانول– بافراستات، استونیتریل– بافر فسفات و استونیتریل–بافر استات در کسر حجمی‌های متفاوت مورد بررسی قرار گرفت. هر دو فازهای متحرک متانول– آب و استونیتریل– آب نسبت به بقیه فازهای متحرک نتایج رضایت بخشی نشان دادند که به علت ارزان بودن حلال متانول نسبت به استونیتریل، که مزیت مهمی در انجام کارهای روتین و روزمره می‌باشد، فاز متحرک متانول– آب با درصد حجمی ۲۰–۸۰ ٪ v/v به عنوان فاز متحرک مناسب انتخاب شد که کروماتوگرام ان را در شکل ۲ مشاهده می کنید و شکل ۳ نا مناسب بودن نسبت فاز متحرک ۲۵ به ۷۵ آب و متانول را نشان می‌دهد.



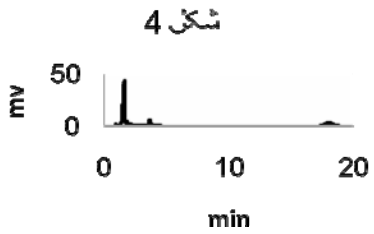
شکل۱- کروماتوگرام مربوط به نمونه سم مورد نظر بروی ستون C_{18}

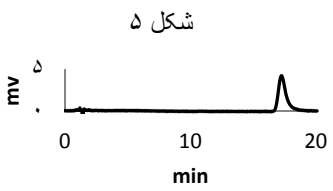


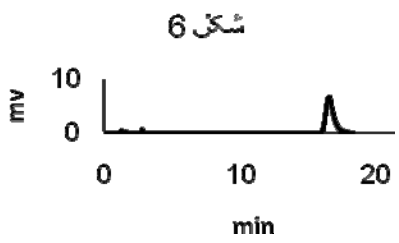
شکل۲- کروماتوگرام سم مورد نظر با نسبت ۲۰-۸۰ آب- متانول

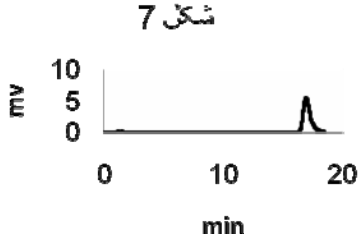


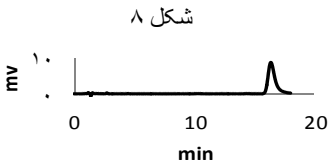
شکل۳- کروماتوگرام سم مورد نظر با نسبت ۲۵-۷۵ آب-متانول



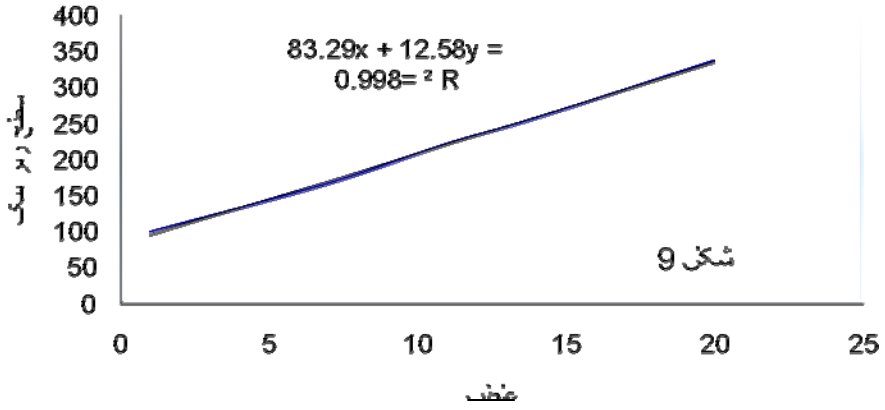








شکل٤،٥ ،٦ ،٧و٨- کروماتوگرام های سم مورد نظر در غلظت های ۰/۰۰۲، ۷، ۱۱، ۱٤ و۳۰ppmدر شرایط بهینه جداسازی



شکل ۹- منحنی کالیبراسیون برای سم مورد نظر بر اساس غلظت و سطح زیر پیک

جدول۱-کالیبراسیون و داده های آماری مربوط به آن

Compound	Calibration curve	Linear range (ppm)	Correlation coefficient	Detection limit (µg ml^{-1})
سم	y =12.584x + 83.296	/۰۰۱-۲۰	/۹۹۸۷	/۰۰۱

بنابراین همان درصد حجمی ۸۰-۲۰ درصد انتخاب گردید به منظور دستیابی به زمان بازداری تکرارپذیرتر زمان به تعادل رسیدن بعد از هر آنالیز ثابت و در حد ۲۰min انتخاب گردید. سرعت فاز متحرک نیز در مقادیر ۰/۸، ۱/۱،۱/۹ و $mLmin^{-1}$ ۱/۲مورد ارزیابی قرار گرفت و سرعت جریان $mLmin^{-1}$۱ که در اکثر آنالیز های HPLC به کار می رود به عنوان سرعت جریان بهینه انتخاب گردید و سرعت جریان $mLmin^{-1}$۱زمان بازداری سم را از ۱۷ دقیقه برای سرعت جریان $mLmin^{-1}$۱ به ۸ دقیقه کاهش می دهد که باعث هم پوشانی با دیگر پیک های نمونه می گردد و سرعت جریان $mLmin^{-1}$۰/۸ این زمان را به ۳۵ دقیقه افزایش می دهد که باعث طولانی تر شدن زمان آنالیز می گردد.

منحنی کالیبراسیون

برای تعیین دامنه دینامیکی خطی غلظت سم مورد نظر در روش پیشنهادی یک سری محلولهای استاندارد سم در دامنه غلظتی ۲۰-۰۰۲ppm/ با رقیق‌سازی مکرر از محلول استاندارد سم تهیه می‌شود و تحت شرایط بهینه جداسازی و اندازه‌گیری به دستگاه HPLC تزریق می‌گردد. هر نمونه دو مرتبه آنالیز می‌شود و جهت ترسیم منحنی کالیبراسیون، میانگین سطح زیر پیک بدست آمده در هر غلظت برحسب غلظت سم رسم می‌گردد. شکل ۴و ۵ و۶و۷ و ۸ و۹ نمودار منحنی کالیبراسیون حاصله و کروماتوگرام های حاصله در غلظت‌های ۰/۰۰۲، ۷، ۱۱، ۱۴و۲۰ppmسم را نشان می دهند. جدول ۱ نیز داده های آماری منحنی به دست آمده را ارایه می دهد. برای محاسبه حدتشخیص نیز محلول هایی با غلظت هایppm ۲۰-۰/۰۰۲ به دستگاه تزریق شده استفاده گردید.

نتیجه گیری

در این تحقیق یک روش ساده و سریع کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکارساز عمومی UV-Vis جهت آنالیز سم مورد نظر در نمونه‌های حقیقی ارایه شده است. این روش فقط یک مرحله ساده خالص‌سازی با استخراج مایع- مایع هموژن دارد و نیاز به مشتق‌سازی آنالیت ندارد. تحت شرایط بهینه جداسازی و اندازه‌گیری دامنه خطی غلظت سم مورد نظر ppm ۲۰-۰۰۱/ با ضریب همبستگی ۹۹۸۷/ و حد تشخیص ppm ۰۰۱/ بدست آمد.در مورد نمونه های عسل مورد آزمایش نشان داده شد که سم مورد نظر در بعضی از این نمونه ها وجود دارد و شناسایی سم مورد نظر در این نمونه ها بر اساس مقایسه سطح زیر پیک نمونه استاندارد این سم با سطح زیر پیک نمونه های مورد آزمایش مشخص شد که نتایج زیر برای راندمان بازیافت سم مورد نظر بدست آمد .

جدول ۲ - داده های مربوط به راندمان بازیافت

نمونه	سم موجود در نمونه عسل	نمونه سم spike شده			
		سطح ۱ ($\mu g g^{-1}$ ۱۵)		سطح ۲ ($\mu g g^{-1}$ ۲۰)	
	مقدار میانگین	مقدار میانگین	میانگین بازه (٪)	مقدار میانگین	میانگین بازه (٪)
سم	۱۹/۵۶	۲۳/۸۷	۸۶/۲	۳۷/۳۴	۸۸/۹

منابع

ثنائی، غ.، ۱۳۶۵، سم شناسی صنعتی، انتشارات دانشگاه تهران،۲۵-۱۶ .

خانبانی، م. و پورمیرزا، ع. ا.، ۱۳۸۶، سم شناسی، انتشارات دانشگاه بو علی سینا ،۷۰-۵۰.

رخشانی زابل، ا.، ۱۳۸۵، اصول سم شناسی و آفت شناسی ،انتشارات فرهنگ جامع،۳۶-۲۳.

سازمان حفظ نباتات، ۱۳۸۷ ، فهرست سموم مجاز کشور.

سالاری، ج.، ۱۳۷۳ ، کلیات سم شناسی قانونی، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۱۰-۹۰.

هادیان، ز. و عزیزی، م. ح.، ۱۳۸۵، ارزیابی میزان باقیمانده انواع سموم آفت کش به روش کروماتوگرافی گازی –طیف سنجی جرمی در برخی از سبزیهای عرضه شده در میدان اصلی میوه و تره بار شهر تهران ۱۳۸۴، فصلنامه علوم و صنایع غذایی ایران، ۲، ۲۰-۱۳.

هلفریچ، و.، ۱۳۷۲، سم شناسی مواد غذایی، انتشارات سپهر، ۱۵-۱۰.

Aleksandra, wikezynska, pittrpr, zybylowski., 2007, Journal of Apimondia,42,16 – 24.

Ertel, N.H., Mittler, J.C., Aktun, S. Wallace, S.L., 1976, Journal of Food Science, 30(2) ,193-195.

Food and drug administration of the united states, 2003, pesticide tolerances ,available fram [http://.cfcan.fda.gov].

Hamlton, D., Acrossley, D.,2004, pesticide residues in food and derinkingwatter Human exposure.and risks .australia Journal of Agricultural & Food Chemistry, 20(3)71-73.

Hernandez, T., MEgea, G., Castr, F.J., Cana, M.L., 2002, Journal of Agricultural & Food Chemistry, 50(5)1172-1177.

Olkowski, W., 1991, Inc.timmons(Ed),cammon sense pest control,newtown ,cT, taunton press.

Scherrman, J.M., Boudet, L., Pontikis R., Niguyen H.N., Fournier E., Pharmacol, J., 1980, Journal of Food Science, 32(6)78-93.