

بهینه سازی روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی برای تعیین مقادیر جزئی سم دیازینون در نمونه های ادرار

۳۵۹

مریم رامین ثابت^۱- مهران پور حسین^۱- منیره خادم^۲- فریبرز امید^۳- فریده گلبابایی^۴- سید جمال الدین شاه طاهری^{۴*}
shahataheri@tums.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۲۱

چکیده

مقدمه: تعیین مقدار سموم در مایعات زیستی به خاطر غلظت ناچیز سموم و پیچیدگی ترکیب نمونه، یک مشکل جدی برای محققان می باشد. هدف مطالعه حاضر توسعه یک روش جدید آماده سازی نمونه با صحت و دقت بالا و مدت زمان کوتاه برای تعیین مقدار سم دیازینون می باشد.

روش کار: برای استخراج و تعیین مقادیر سم دیازینون در نمونه های ادرار، از روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی و دستگاه کروماتوگرافی مایع با عمل کرد بالا مجهز به شناساگر ماورا بنفش استفاده شد. برای بهینه سازی عوامل موثر بر استخراج دیازینون از روش یک عامل در یک زمان بهره برداری گردید. عوامل مختلف مانند نوع و حجم حلال استخراج کننده، نوع و حجم حلال پخش کننده، مدت زمان و سرعت سانتریفیوژ کردن، افزودن نمک و تاثیر pH، مورد مطالعه و بهینه سازی قرار گرفت.

یافته ها: بر اساس نتایج بهینه سازی به دست آمده، سطوح بهینه متغیرهای نامبرده برای آفت کش دیازینون شامل ۱۵۰ میکرولیتر تتراکلرید کربن به عنوان حلال استخراج کننده، ۱/۵ میلی لیتر متانول به عنوان حلال پخش کننده، pH برابر ۵٫۶ دقیقه زمان سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه و ۰٪ وزنی-حجمی نمک افزوده شده به دست آمد. ضریب هم بستگی معادل ۰/۹۹۶۵ حاصل شد که نشان دهنده خطی بودن در محدوده وسیعی از غلظت سم می باشد. LOD و LOQ به ترتیب کم تر از ۰/۷ و ۵ میکروگرم بر لیتر محاسبه شد. مقادیر انحراف معیار برای تکرار پذیری روز به روز و هم چنین تکرار پذیری در یک روز برای سه غلظت انتخاب شده (۵۰، ۲۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر)، کم تر از ۴ درصد بود که نشان دهنده صحت و دقت بالای روش بهینه سازی است. مقادیر غنی سازی و راندمان استخراج برای دیازینون به ترتیب به طور میانگین معادل ۲۴۵ و ۹۹٪ می باشد.

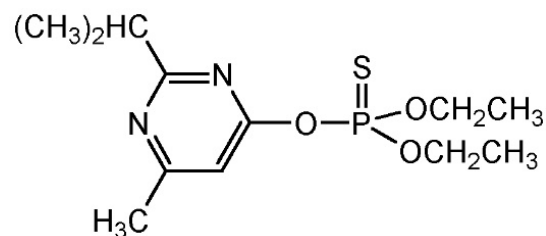
نتیجه گیری: مطابق نتایج به دست آمده، روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی با موفقیت برای استخراج دیازینون از نمونه های ادرار توسعه یافته است. هم چنین در مقایسه با سایر روش های استخراج، روش ارایه شده در مطالعه حاضر دارای مزایایی از قبیل زمان استخراج کوتاه تر، تکرار پذیری بهتر و عامل غنی سازی بالاتر می باشد.

کلمات کلیدی: دیازینون، میکرو استخراج مایع مایع پخشی، ادرار، کروماتوگرافی مایع با عمل کرد بالا

۱- دکتری مهندسی بهداشت حرفه ای، گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳- دکتری مهندسی بهداشت حرفه ای، مرکز تحقیقات عوامل محیطی موثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۴- استادیار، گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

مقدمه

حشره کش‌ها سمومی هستند که در صنعت کشاورزی برای از بین بردن و کنترل آفات مضر برای محصولات استفاده می‌شوند. آن‌ها نقش مهمی در تامین محصولات کشاورزی با کیفیت ایفا می‌کنند. از سویی دیگر، مقادیر باقی مانده سموم در محصولات زراعی می‌تواند سلامت انسان را تهدید نماید و یا اثرات ناخواسته ای بر روی محیط زیست داشته باشد (۱-۳). وجود باقی مانده سموم ارگانوفسفره در مواد غذایی و سبزیجات، برای سلامت انسان زیان آور می‌باشد. برخی از ارگانوفسفره‌ها دارای سمیت زیاد برای انسان می‌باشند. آن‌ها با مهار فعالیت آنزیم کولین استراز موجب سرکوب انتقال پیام‌های عصبی می‌گردند (۴-۶). دیازینون با مقدار کشنده (LD50) ۵۰-۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، جزء سموم فسفره و یک حشره‌کش نسبتاً فزّار است و برای از بین بردن مگس و کنه، به مقدار زیاد استفاده می‌شود. مواجهه با دیازینون از راه‌های گوارشی، پوستی، تنفسی و چشم می‌باشد. مواجهه تنفسی در سمپاشی‌های کشاورزی یا محیط‌هایی که تهویه مناسب ندارند رخ می‌دهد (۷-۱۱). دیازینون در بدن به دیازوکسون اکسید می‌گردد که در مقایسه با ترکیب اولیه از سمیت بالاتری برخوردار می‌باشد (۱۲-۱۵). ساختار شیمیایی دیازینون در شکل (۱)



شکل (۱) - ساختار شیمیایی دیازینون

قابل مشاهده است.

با توجه به استفاده گسترده از سموم، محققان به روش‌های سریع و قابل اعتمادی برای تعیین مقدار آن‌ها در نمونه‌های مختلف، اعم از نمونه‌های شغلی، محیط زیستی، مواد غذایی و میوه‌ها و سبزیجات، نیاز دارند. کروماتوگرافی مایع با عمل کرد بالا، یک گزینه مناسب برای آنالیز مقادیر ناچیز سموم فسفره در نمونه‌های مختلف مانند نمونه آب (۱۶، ۱۷)، ادرار و میوه‌ها (۱۸-۲۰) می‌باشد.

آماده سازی نمونه یکی از مراحل مهم در فرآیند تجزیه است. این مرحله به عنوان یک فرآیند استخراج، موجب جداسازی و تغلیظ و تخلیص ترکیب مورد نظر از محیط نمونه می‌گردد. روش‌های آماده سازی متنوعی از نظر قدرت انتخاب، سرعت و راحتی وجود دارند. انتخاب هر کدام با توجه به شرایط و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نمونه و آنالیت صورت می‌گیرد (۲۱).

در گذشته، اغلب دو روش استخراج مایع-مایع (۲۲) و استخراج فاز جامد (۲۳، ۲۴) برای استخراج و پیش تغلیظ آنالیت‌ها از محیط نمونه مورد استفاده قرار می‌گرفتند. اخیراً روش‌های مینیاتوری و با ابعاد کوچکتر توسعه یافته‌اند که مزیت آن‌ها مصرف کم حلال‌های آلی می‌باشد. برای مثال، در روش ریز استخراج فاز مایع (Liquid-phase micro-extraction-LPME) (۲۵) استخراج آنالیت از داخل نمونه‌ای که دارای فاز آبی هست، به وسیله مقدار ناچیزی حلال نامحلول در آب (فاز پذیرنده) صورت می‌گیرد (۲۶-۲۸). روش LPME به سه دسته اصلی تقسیم می‌گردد:

ریز استخراج تک قطره‌ای (Single-drop micro-extraction-SDME)، ریز استخراج فاز

تهیه شد. حلال های آلی شامل تتراکلرید کربن (CAS number: 56-23-5)، کربن دی سولفاید (CAS number: 75-15-0)، کلروفرم (number: 67-66-3)، متانول (CAS number: 67-56-1)، استونیتریل (CAS number: 75-05-8) و استون (CAS number: 67-64-1) از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. هم چنین سدیم کلرید، هیدروکلریک اسید و سدیم هیدروکسید از شرکت مرک آلمان تهیه گردیدند. آب دی یونیزه از شرکت بهان (ایران-تهران) خریداری شد. محلول استوک دیازینون در استونیتریل با غلظت ۱۰۰۰ ppm آماده گردید. محلول های استاندارد مورد استفاده طی آزمایش، به صورت روزانه با رقیق سازی محلول استوک توسط آب دی یونیزه تهیه شدند.

تجهیزات

برای جداسازی و تعیین مقدار دیازینون از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عمل کرد بالا مجهز به پمپ k-1001 و دتکتور ماوراء بنفش k-2600 (ساخت شرکت Knauer آلمان) استفاده شد. شرایط کروماتوگرافی به ترتیب عبارتند از ستون C_{18} (L=250 mm, ID=4.6 mm)، فاز متحرک استونیتریل-آب (۴۰/۶۰)، دبی پمپ ۱/۵ میلی لیتر بر دقیقه و دمای ستون ۲۵ درجه سانتی گراد. طول موج مناسب برای پاسخ کروماتوگرافیک آنالیت ۲۳۰ نانومتر بود. برای سانتریفیوژ کردن نمونه از دستگاه Hettich zentrifugen Rotofix 32 (چین) استفاده گردید. حمام التراسونیک (SonoSwiss SW 6 H) برای آماده سازی نمونه ها به کار گرفته شد. همه وسایل شیشه ای مورد استفاده با استون و آب دی یونیزه شستشو شده و در آون در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد خشک شدند.

مایع با فیبر تو خالی (Hollow-fiber liquid-phase micro-extraction-HFLPME) و ریز استخراج مایع مایع پخشی (Dispersive liquid-liquid micro-extraction-DLLME) (۲۹).

روش ریز استخراج مایع مایع پخشی توسط رضایی و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۲)، در پاسخ به نیاز برای یک روش آماده سازی نمونه سریع، مقرون به صرفه و دوست دار محیط زیست معرفی شد. DLLME امکان استفاده برای انواع نمونه ها مانند خاک، ادرار و مواد غذایی را دارد. فرآیند استخراج در این روش مبتنی بر تمایل آنالیت به فاز آبی نمونه و فاز آلی حلال استخراج کننده می باشد. مزیت اصلی این روش سادگی، استفاده حداقلی از حلال های خطرناک، استخراج سریع و مقرون به صرفه بودن آن می باشد.

هدف مطالعه حاضر بهینه سازی روش DLLME به عنوان یک روش آماده سازی نمونه سریع، آسان، کم هزینه، موثر و ایمن برای تعیین مقادیر ناچیز دیازینون در نمونه های ادرار بود. برای این منظور پارامتر های مهم موثر در راندمان روش، برای دست یابی به حداکثر عامل غنی سازی استخراج و پیش تغلیظ مقادیر ناچیز دیازینون موجود در نمونه مدنظر، بهینه سازی شدند. بنابراین این روش بهینه سازی شده را می توان به عنوان یک روش جدید آماده سازی نمونه با حداقل معایب و حداکثر راندمان برای استخراج مقادیر بسیار کم آفت کش دیازینون در نمونه ادرار معرفی کرد.

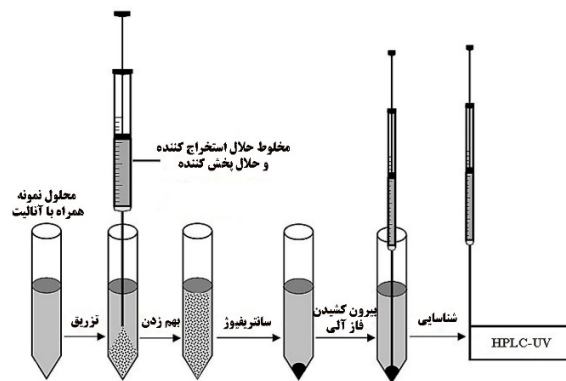
روش کار

حلال ها و مواد شیمیایی

دیازینون (با خلوص >98% و CAS number: 333-41-5) از شرکت Dr. Ehrenstorfer (آلمان)

ته نشین گردید. (۴) حلال ته نشین شده ی حاوی دیازینون توسط یک سرنگ جدا و به لوله آزمایش دیگری منتقل و حلال توسط جریان ملایم گاز نیتروژن خشک شد. (۵) در نهایت ماده خشک باقی مانده در متانول حل شد و برای تعیین مقدار توسط میکروسرنگ به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عمل کرد بالا تزریق گردید (۲۱-۱۷). مراحل ذکر شده در شکل (۲) نمایش داده شده است. به منظور تعیین مقادیر بهینه عوامل موثر در استخراج دیازینون، به ترتیب هشت عامل موثر مهم نوع حلال استخراج کننده، نوع حلال پخش کننده، حجم حلال استخراج کننده، حجم حلال پخش کننده، مدت زمان و سرعت سانتریفیوژ، میزان نمک

روش ریز استخراج مایع-مایع پخشی آماده سازی نمونه به ترتیب زیر انجام شد: (۱) ۱۰ میلی لیتر نمونه ادرار که با غلظت مشخصی از سم مورد نظر (۱ ppm) تهیه شده بود درون یک لوله آزمایش ۱۵ میلی لیتری مخصوص سانتریفیوژ ریخته شد، (۲) سپس مقدار ۱/۵ میلی لیتر متانول حاوی ۱۵۰ میکرولیتر تتراکلرید کربن با سرعت و فشار به داخل آن تزریق گردید. (۳) پس از آن محلول ابری شکل به وجود می آید که حاصل پراکندگی فاز آلی در فاز آبی می باشد. سپس محلول به دست آمده به مدت ۵ دقیقه و سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و حلال استخراج کننده در انتهای لوله آزمایش



شکل (۲) - مراحل اجرای روش ریز استخراج مایع مایع پخشی

جدول (۱) - متغیرها و سطوح مورد آزمایش در بهینه سازی روش ریز استخراج مایع مایع پخشی

سطوح متغیرها					متغیرها
-	استون	اتانول	متانول	استونیتریل	حلال های پخش کننده
۲/۵	۲	۱/۵	۱	۰/۵	حجم حلال پخش کننده (ml)
-	-	CS ₂	CHCl ₃	CCl ₄	حلال استخراج کننده
-	۲۰۰	۱۵۰	۱۰۰	۵۰	حجم حلال استخراج کننده (Lμ)
-	۲۰	۱۵	۱۰	۵	مدت زمان سانتریفیوژ (min)
-	۴۰۰۰	۳۵۰۰	۳۰۰۰	۲۵۰۰	سرعت سانتریفیوژ (rpm)
-	۶	۴	۲	۰	قدرت یونی (NaCl%, w/v)
۱۰	۸	۶	۴	۲	pH نمونه

یافته ها و بحث

انتخاب حلال استخراج کننده

در فرآیند ریز استخراج مایع مایع پخشی، حلال استخراج کننده از میان حلال هایی که علاوه بر نامحلول بودن در آب و داشتن چگالی بالاتر از آب، دارای توانایی استخراج ترکیب مورد نظر و هم چنین رفتار کروماتوگرافیک مناسبی بودند، انتخاب شد. به این منظور سه حلال تتراکلرید کربن (CCl_4)، دی سولفید کربن (CS_2) و کلروفرم ($CHCl_3$) مورد آزمایش قرار گرفتند. در این مرحله برای بهینه سازی، از نمونه های دیازینون دارای حجم ۱۰ با غلظت ۱ ppm استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده، محلول ابری شکل واضحی حین استفاده از دی سولفید کربن و کلروفرم به عنوان حلال استخراج کننده، به دست نیامد که نشان می دهد این حلال ها توانایی پخش شدن مناسبی در فاز آبی نمونه ندارند و باعث می شود توانایی استخراج خوبی نداشته باشند. اما با حلال تتراکلرید کربن راندمان استخراج بالایی برای دیازینون به دست آمد. بنابراین تتراکلرید کربن به عنوان حلال استخراج کننده بهینه برای استفاده در مراحل بعدی انتخاب شد.

انتخاب حلال پخش کننده

با توجه به فرآیند آماده سازی نمونه در روش معرفی شده حاضر، نوع حلال پخش کننده برای پیش تغلیظ ماده مورد نظر از اهمیت بالایی برخوردار می باشد. مبنای انتخاب حلال پخش کننده، قابلیت حل شدن آن هم در فاز آبی نمونه و هم در فاز آلی حلال استخراج کننده می باشد. برای این منظور با توجه به خواص فیزیکی و شیمیایی حلال ها، چهار حلال متانول، اتانول، استونیتریل و استون برای انتخاب حلال بهینه انتخاب

افزوده شده و pH نمونه انتخاب شدند. بهینه سازی به روش یک عامل در هر مرحله (One factor at a time) انجام شد بدین ترتیب که در هر مرحله از بهینه سازی، هفت عامل موثر مقدار ثابت دارند و فقط عامل مورد نظر در سطوح مختلف تغییر داده می شود تا مقدار بهینه آن مشخص گردد. جدول (۱) متغیرها و سطوح هر یک از متغیرها را در مراحل بهینه سازی نشان می دهد. در تمامی مراحل از نمونه های استاندارد با غلظت ۱ ppm و حجم ۱۰ میلی لیتر استفاده شد.

محاسبات

برای توسعه روش ریز استخراج مایع مایع پخشی برای تغلیظ و تخلیص دیازینون، چند عامل برای کنترل بازده روش مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور عامل غنی سازی (Enrichment factor-EF) و راندمان استخراج (Extraction recovery-ER) برای سم مورد نظر به ترتیب با استفاده از معادله های (۱) و (۲) محاسبه شد (۳۰).

$$EF = C_{sed} / C_0 \quad (1)$$

که در آن C_{sed} و C_0 به ترتیب غلظت آنالیت در فاز ته نشین شده و غلظت آنالیت در نمونه قبل از استخراج می باشند.

$$ER = C_{sed} V_{sed} / C_0 V_{aq} \times 100\% = EF \times (V_{sed} / V_{aq}) \times 100\% \quad (2)$$

V_{aq} و V_{sed} به ترتیب معادل حجم فاز ته نشین شده و حجم کل نمونه می باشند. تمام مراحل با ۳ بار تکرار انجام و میانگین مقادیر ۳ آزمایش برای همه مراحل ارایه شد. بقیه محاسبات و پارامترهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ انجام شد.

شدند. طبق نتایج حاصل شده، حین استفاده از متانول به عنوان حلال پخش کننده بالاترین میزان بازیافت حاصل گردید. بنابراین متانول به عنوان حلال پخش کننده بهینه برای استفاده در مراحل بعدی آزمایش انتخاب شد.

تأثیر حجم حلال استخراج کننده

در این مرحله به منظور بررسی اثر حجم حلال استخراج کننده بر عامل غنی سازی و راندمان استخراج آنالیت، آزمایش ها با استفاده از ۲ میلی لیتر متانول به عنوان حلال پخش کننده حاوی مقادیر مختلفی از CCl_4 (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر) انجام شد. راندمان بازیافت دیازینون با افزایش حجم CCl_4 افزایش یافت. هم چنین میزان فاز ته نشین شده نیز با افزایش مقدار حلال استخراج کننده اضافه گردید. بیش ترین میزان بازیافت هنگامی حاصل شد که از ۱۵۰ میکرولیتر CCl_4 به عنوان حلال استخراج کننده استفاده شد و در مقادیر بالاتر حلال، میزان بازیافت ثابت ماند. بنابراین حجم ۱۵۰ میکرولیتر به عنوان حجم بهینه حلال استخراج کننده انتخاب شد.

تأثیر حجم حلال پخش کننده

حجم حلال پخش کننده نیز از اهمیت خاصی برخوردار است. برای تعیین حجم بهینه حلال پخش کننده، حجم های مختلف متانول (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی لیتر) حاوی ۱۵۰ میکرولیتر CCl_4 مورد آزمایش قرار گرفتند. در ابتدا با افزایش حجم حلال پخش کننده، راندمان بازیافت نیز افزایش یافت اما در حجم های بالاتر از ۱/۵ میلی لیتر راندمان بازیافت رو به کاهش رفت. مطابق نتایج به دست آمده، در حجم ۱/۵ میلی لیتر بیش ترین راندمان بازیافت مشاهده شد و به عنوان حجم بهینه متانول انتخاب شد.

بهینه سازی سرعت و زمان سانتریفیوژ

سانتریفیوژ کردن یک مرحله اساسی در DLLME برای جدا کردن فاز استخراج کننده می باشد. طی این مرحله، فاز ابری از بین می رود و به ته نشین شدن حلال استخراج کننده کمک می گردد. اثر مدت زمان و سرعت سانتریفیوژ بر روی بازده استخراج در بازه زمانی ۲۰-۵ دقیقه و سرعت ۴۰۰۰-۲۵۰۰ دور در دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج این مرحله، مدت زمان ۵ دقیقه و سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه که بیش ترین راندمان بازیافت را داشتند، به عنوان مقادیر بهینه برای مراحل بعدی آزمایش انتخاب شدند.

اثر افزودن نمک

افزودن نمک به نمونه به دلیل حلالیت بالای آن در آب، به خارج شدن آنالیت از فاز آبی نمونه کمک می کند. از این متغیر تحت عنوان قدرت یونی یاد می شود. برای بررسی اثر افزودن نمک، از مقادیر مختلفی از کلرید سدیم (۰، ۲، ۴ و ۶ درصد وزنی-حجمی) استفاده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که با افزودن غلظت های مختلف نمک به محلول نمونه، میزان استخراج با کاهش مواجه می شود. دلیل این امر افزایش ویسکوزیته نمونه می باشد که موجب کاهش ضریب نفوذ آنالیت می شود. بنابراین مراحل بعد بدون افزودن نمک انجام شد.

تأثیر pH نمونه

این متغیر از این جنبه دارای اهمیت می باشد که باعث ایجاد تغییر در یونی یا مولکولی بودن مولکول می گردد که در میزان استخراج موثر است. با افزودن مقدار مناسبی از محلول های هیدروکلریک اسید یا سدیم

هیدروکسید به نمونه، پایداری دیازینون در محدوده اسیدیته ۲ الی ۱۰ بررسی شد. طبق نتایج بیشترین میزان استخراج در اسیدیته ۶ به دست آمد.

اعتباربخشی روش بهینه سازی شده

امکان استفاده از روش مدنظر برای پیش تغلیظ و تعیین مقدار دیازینون از نمونه های اسپایک شده ادرار مورد بررسی قرار گرفت. به منظور اعتباربخشی روش DLLME، نمونه های ادرار حاوی غلظت های استاندارد ۵۰، ۲۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر لیتر همراه با یک نمونه شاهد آماده شد. سپس به صورت ۶ بار تکرار با استفاده از روش بهینه سازی شده

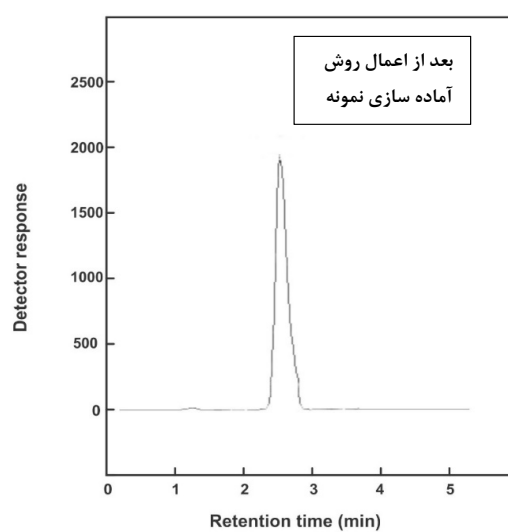
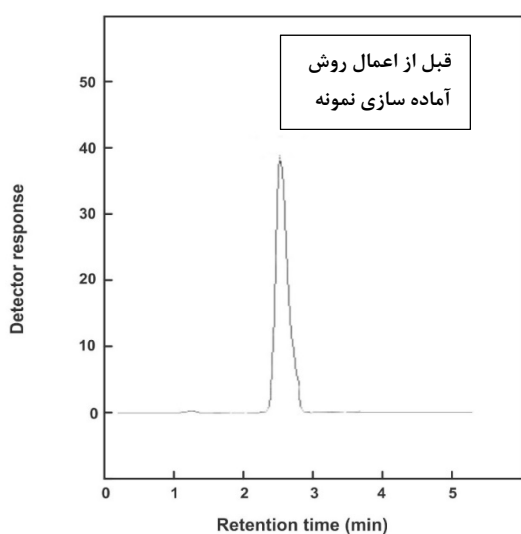
تجزیه شدند. ویژگی های تجزیه ای شامل محدوده خطی شدن (Linear range-LR)، حد تشخیص (Limit of detection-LOD)، حد تعیین مقدار (Limit of quantification-LOQ)، ضریب هم بستگی (Correlation coefficient- r^2)، انحراف معیار نسبی (%Relative standard deviation-RSD)، عامل غنی سازی (EF) و راندمان استخراج (ER)، با استفاده از متغیرهای بهینه شده برای ارزیابی عمل کرد روش استخراج محاسبه شدند. نتایج در جدول (۲) قابل مشاهده می باشد.

نتایج نشان می دهد راندمان استخراج در محدوده ۹۹/۳ الی ۱۰۱ درصد می باشد که تفاوت

جدول (۲) - اعتبارسنجی روش بهینه شده در استخراج دیازینون در نمونه ادرار

LR ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	عامل غنی سازی	RSD (%) (n=6)		راندمان استخراج (%) (n=6)		مقدار استخراج شده ($\mu\text{g L}^{-1}$)	غلظت اولیه ($\mu\text{g L}^{-1}$)
				روز به روز	در یک روز	روز به روز	در یک روز		
-	-	-	-	-	-	-	-	N.D	۰
۱-۵۰۰	۱	۰/۵	۲۱۱	۲/۳	۱/۷	۹۸±۲/۳	۱۰۰±۱/۷	۴۹	۵۰
۱-۵۰۰	۱	۰/۳	۲۳۶	۲	۱/۵	۹۹±۲	۹۹/۳±۱/۵	۱۹۸	۲۰۰
۵-۵۰۰	۵	۰/۷	۲۸۹	۴/۱	۳/۸	۹۹/۹±۴/۱	۱۰۱±۳/۸	۹۹۹	۱۰۰۰

* میانگین سه بار تکرار ± انحراف معیار



شکل (۳) - مقایسه کروماتوگرام های به دست آمده قبل و بعد از پیش تغلیظ نمونه مورد نظر

معنی داری با غلظت های استاندارد نمونه ها ندارند. مقادیر بازیافت اعتبار روش را تایید می کنند. انحراف معیارهای به دست آمده برای نمونه های واقعی در غلظت های مختلف بسیار کم می باشد. این نتایج نشان داد که عوامل مزاحم موجود در نمونه واقعی، تاثیر کمی بر روش ارایه شده برای پیش تغلیظ دیازینون از نمونه های ادرار دارد. ضریب هم بستگی معادل ۰/۹۹۶۵ به دست آمد که نشان دهنده خطی بودن در محدوده وسیعی از غلظت سم می باشد. LOD و LOQ به ترتیب کم تر از ۰/۷ و ۵ میکروگرم بر لیتر محاسبه شد. مقادیر انحراف معیار برای تکرار پذیری روز به روز و هم چنین تکرار پذیری در یک روز، کم تر از ۴ درصد بود که نشان دهنده صحت و دقت بالای روش بهینه سازی شده است. مقادیر EF و ER برای دیازینون به ترتیب به طور میانگین معادل ۲۴۵ و ۹۹% بود. تکرار پذیری قابل قبول، مقادیر بالای EF و ER و پایین بودن LOD و LOQ مزیت های اصلی روش مدنظر می باشد.

شکل (۳) کروماتوگرام نمونه های حاوی دیازینون با غلظت ۱ ppm را قبل و بعد از آماده سازی نمونه توسط روش ریز استخراج مایع پخشی نشان می دهد. همان گونه که مشخص است سطح زیر پیک بعد از اعمال روش DLLME بیش از ۲۰۰ برابر نسبت به سطح زیر پیک تزریق مستقیم محلول آنالیت، تغلیظ شده است که نشان دهنده موثر بودن روش ارایه شده برای استخراج مقادیر ریز مقدار آنالیت می باشد.

نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با روش های گزارش شده برای تجزیه دیازینون در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعاتی که فرج زاده و همکارانش در سال ۲۰۰۹ و ۲۰۱۶ انجام دادند (۳۰،۳۲) از حلال های یونی که سبک تر از آب هستند به عنوان حلال استخراج کننده استفاده نمودند که به

نتایج مطلوبی دست پیدا کردند ولی کم ترین میزان LOD گزارش شده در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم بر لیتر، ۰/۶۵ بود، درحالی که میزان LOD در مطالعه حاضر با همین غلظت و با استفاده از حلال هالوژنه به عنوان حلال استخراج کننده ۰/۳ میکروگرم بر لیتر به دست آمده است.

هم چنین، مقادیر RSD روش ارایه شده در مقایسه با روش های دیگر پایین تر می باشد بنابراین دارای دقت بالاتری است. مقادیر RSD کم تر از ۴ درصد گزارش شده است در صورتی که در مطالعات مشابه (۳۵-۳۰) انحراف معیار نسبی اعلام شده بالاتر از ۵ درصد می باشد. یکی دیگر از پارامترهای مهم و مورد بررسی مدت زمان استخراج می باشد که در مطالعات قبلی انجام شده بر روی این آفت کش (۳۰،۳۲)، زمان استخراج بیش از ۱۵ دقیقه و دستگاه آنالیز مجهز به دتکتور خاصی هستند ولی در مطالعه حاضر بدون استفاده از هیچ دتکتور ویژه ای، سموم مورد نظر در زمان کم تر از ۵ دقیقه با راندمان بالا استخراج شدند.

بدین ترتیب، مقادیر به دست آمده برای LOD و LOQ در این مطالعه در مقایسه با همه روش های دیگر کم تر یا معادل آن هاست، حتی روش هایی که از شناساگرهای اسپکترومتری جرمی (Mass spectrometry-MS) استفاده کرده اند (۳۳-۳۰). شایان ذکر است که اکثر روش های نامبرده از دستگاه های تجزیه با حساسیت و گزینش بالا مانند شناساگر های یونیزان، شعله ای و یا جرمی استفاده کرده اند. کاربرد این تجهیزات همراه با دستگاه گاز کروماتوگرافی گران قیمت می باشد و استفاده گسترده از آن ها برای تجزیه سموم ارگانوفسفره در کشورهای در حال توسعه امکان پذیر نیست. بنابراین، روش توسعه یافته حاضر که از حساسیت، سادگی، سرعت و تکرارپذیری بالایی برخوردار می باشد، روش

مناسبتی برای استخراج و پیش تغلیظ مقادیر ناچیز دیازینون از نمونه های زیستی و آبی می باشد. هم چنین لازم به ذکر است که روش های دستگاهی رایج جهت تعیین مقدار آفت کش ها، پیچیده بوده و نیاز به زمان و مهارت بالایی دارد. بنابراین استفاده از روش های ساده، کم هزینه و سریع می تواند مشکلات بسیاری را در زمینه پایش محیطی و شغلی سموم مرتفع نماید. براساس نتایج حاصل شده، راندمان استخراج آنالیت از نمونه های واقعی در تمامی غلظت های انتخابی به بیش از ۹۸ درصد رسید. لذا می توان با اطمینان بالا جهت استخراج انتخابی و تعیین مقدار آفت کش مورد نظر از نمونه های ادرار استفاده کرد.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، روش DLLME برای استخراج دیازینون از نمونه های بیولوژیک (ادرار) با موفقیت توسعه یافت. متغیرهای مختلف موثر در فرآیند استخراج این ماده مورد بررسی و بهینه سازی قرار گرفتند. روش ارایه شده در مقایسه با روش های دیگر آماده سازی نمونه دارای مزایای زیادی مانند زمان استخراج کوتاه تر، تکرارپذیری بالاتر و عامل غنی سازی بالاتر بود. شاخص های تحلیلی بسیار مناسبی، مانند صحت بالا و عامل غنی سازی، راندمان بازیافت بسیار خوب، محدوده خطی وسیع و حد تشخیص پایین برای روش DLLME به دست آمد. هم چنین با توجه به بررسی اثر عوامل مداخله گر بر روی راندمان استخراج دیازینون در حضور آفت کش های دیگر مانند آترازین، مالاتیون و کلرپیرفوس، با به دست آمدن راندمان استخراج دیازینون بیش از ۹۵% در حضور عوامل مزاحم، می توان نتیجه گرفت که این روش قابلیت گزینش پذیری سم مورد نظر را در حضور آفت کش ها دیگر دارد.

در نتیجه، روش بهینه سازی شده در این مطالعه می تواند یک روش بسیار پرکاربرد با راندمان استخراج بالا برای سم دیازینون از نمونه ادرار محسوب شود.

پیشنهادها

با توجه به نتایج و هم چنین نکاتی که در طول انجام مطالعه با آن برخورد شد و با در نظر گرفتن سایر تحقیقات صورت گرفته، پیشنهادهای مطرح می گردد که می تواند جهت بررسی در مطالعات دیگر مد نظر قرار گیرد:

- بررسی به کارگیری روش توسعه یافته در این مطالعه در استخراج آفت کش های دیگر
- بررسی قابلیت استفاده از روش آماده سازی نمونه بهینه سازی شده در استخراج آفت کش ها در سایر نمونه های بیولوژیکی مانند خون یا پلاسما
- روش بهینه سازی شده حاضر قابلیت این امر را دارد که به عنوان مرحله پیش آماده سازی برای روش های دیگر آماده سازی نمونه استفاده شود. بنابراین برای نمونه هایی که عوامل مزاحم زیادی دارند می توان قبل از انجام روش های گران قیمت، از این روش آماده سازی به عنوان مرحله پیش آماده سازی استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با شماره ۹۲۲۳۴۹۱۰۰۱ به تصویب معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران رسیده که بدین وسیله تقدیر و تشکر می گردد. هم چنین از گروه محترم مهندسی بهداشت حرفه ای دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران که تمامی امکانات آزمایشگاه علوم شیمیایی را در اختیار این طرح گذاشتند، تشکر و قدردانی می گردد.

☰ REFERENCES

1. Barata C, Solayan A, Porte C. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*. 2004; 66 (2): 125-139.
2. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini MR, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2006; 1116 (1): 1-9.
3. Wang X, Shu B, Li Sh, Yang Zh, Qiu B. QuEChERS followed by dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for organochlorine pesticides analysis in fish. *Talanta*. 2017; 162: 90-97.
4. Omid F, Behbahani M, Bojdi MK, Shahtaheri SJ. Solid phase extraction and trace monitoring of cadmium ions in environmental water and food samples based on modified magnetic nanoporous silica. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2015; 395 (1): 213-220.
5. Saraji M, Boroujeni MK. Recent developments in dispersive liquid-liquid microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014; 406 (8): 2027-2066.
6. Behbahani M, Najafi F, Bagheri S, Bojdi MK, Salarian M, Bagheri A. Application of surfactant assisted dispersive liquid-liquid microextraction as an efficient sample treatment technique for pre-concentration and trace detection of zonisamide and carbamazepine in urine and plasma samples. *Journal of Chromatography A*. 2013; 1308: 25-31.
7. Mohammadzadeh A, Ramezani M, Niazi A. Magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction in narrow neck glass tube for determination of cadmium in water, fruit and vegetable samples using response surface methodology. *Desalination and Water Treatment*. 2016; 57(21): 9745-55.
8. El-Shahawi M, Al-Saidi H. Dispersive liquid-liquid microextraction for chemical speciation and determination of ultra-trace concentrations of metal ions. *Trends in Analytical Chemistry*. 2013; 44 (1): 12-24.
9. Fang Y, Tian W, Pei F, Li P, Shao X, Fan Y, et al. Simultaneous determination of pesticide residues and antioxidants in blended oil using a liquid-liquid extraction combined with dispersive solid phase extraction method. *Food Chemistry*. 2017; 229: 347-353.
10. Behbahani M, Najafi F, Bagheri S, Bojdi MK, Hassanlou PG, Bagheri A. Coupling of solvent-based de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction with high performance liquid chromatography for simultaneous simple and rapid trace monitoring of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2014; 186 (4): 2609-18.
11. Spietelun A, Marcinkowski L, Guardia M, Namienik J. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta*. 2014; 119 (3): 34-45.
12. Cinelli G, Avino P, Notardonato I, Russo MV. Ultrasound-vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography with a nitrogen-phosphorus detector for simultaneous and rapid determination of organophosphorus pesticides and triazines in wine. *Analytical Methods*. 2014; 6 (3): 782-790.
13. Pourhossein M, Shahtaheri SJ, Maleck Khani H, Rahimi Foroushani A, Seyed Someah M, Divani R. Optimization of dispersive liquid liquid microextraction method for determination of trace salivary melatonin using high performance liquid chromatography. *Iran Occupational Health Journal*. 2017; 14 (4): 85-94.
14. Wang K, Xie X, Zhang Y, Huang Y, Zhou Sh, Zhang W, et al. Combination of microwave-assisted extraction and ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for separation and enrichment

- ment of pyrethroids residues in Litchi fruit prior to HPLC determination. *Food Chemistry*. 2018; 240: 1233-1242.
15. Ho YM, Tsoi YK, Leung KSY. Highly sensitive and selective organophosphate screening in twelve commodities of fruits, vegetables and herbal medicines by dispersive liquid-liquid microextraction. *Analytica Chimica Acta*. 2013; 775 (2): 58-66.
 16. Baykedagn B, Merdassa Y, Gure A. Vortex-assisted low density based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of three pesticides residues from water samples. *Iranian Journal of Analytical Chemistry*. 2017; 4 (1): 25-33.
 17. Sousa R, Homem V, Moreira JL, Madeira LM, Alves A. Optimisation and application of dispersive liquid-liquid microextraction for simultaneous determination of carbamates and organophosphorus pesticides in waters. *Analytical Methods*. 2013; 5 (11): 2736-2745.
 18. Leong MI, Fuh MR, Huang SD. Beyond dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2014; 1335 (1): 2-14.
 19. Vinas P, Campillo N, Lopez-Garcia I, Hernandez-Cordoba M. Dispersive liquid-liquid microextraction in food analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014; 406 (8): 2067-2099.
 20. Ma J, Lu W, Chen L. Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction for organic compounds analysis in environmental water. *Current Analytical Chemistry*. 2012; 8 (1): 78-90.
 21. Pinto MI, Sontag G, Bernardino RJ, Noronha JP. Pesticides in water and the performance of the liquid-phase microextraction based techniques. *Microchemical Journal*. 2010; 96 (2): 225-237.
 22. Farajzadeh MA, Sorouraddin SM, Mogaddam MRA. Liquid phase microextraction of pesticides: a review on current methods. *Microchimica Acta*. 2014; 181 (9): 829-851.
 23. Asfaram A, Ghaedi M, Goudarzi A, Soylak M. Comparison between dispersive liquid-liquid microextraction and ultrasound-assisted nanoparticles-dispersive solid-phase microextraction combined with microvolume spectrophotometry method for the determination of Auramine-O in water samples. *RSC Advances*. 2015; 5 (49): 39084-39096.
 24. Yan H, Du J, Zhang X, Yang G, Row KH, Lv Y. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with capillary gas chromatography for simultaneous analysis of nine pyrethroids in domestic wastewaters. *Journal of Separation Science*. 2010; 33 (12): 1829-1835.
 25. Wu C, Liu H, Liu W, Wu Q, Wang C, Wang Z. Determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples by dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic droplet followed by high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010; 397 (6): 2543-2549.
 26. Amelin V, Lavrukhin D, Tret yakov A. Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of herbicides of urea derivatives family in natural waters by HPLC. *Journal of Analytical Chemistry*. 2013; 68 (9): 822-830.
 27. Mukdasai S, Thomas C, Srijaranai S. Two-step microextraction combined with high performance liquid chromatographic analysis of pyrethroids in water and vegetable samples. *Talanta*. 2014; 120 (1): 289-296.
 28. Boonchiangma S, Ngeontae W, Srijaranai S. Determination of six pyrethroid insecticides in fruit juice samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. *Talanta*. 2012; 88 (1): 209-215.
 29. Shan H. Simultaneous determination of six neonicotinoid residues in soil using DLLME-HPLC and UV. *Spectroscopy and Spectral Analysis*. 2013; 33 (9): 2553-2557.
 30. Farajzadeh MA, Seyedi SE, Safi Shalamzari M, Bamorowat M. Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvent lighter than wa-

- ter. *Journal of Separation Science*. 2009; 32 (18): 3191-3200.
31. Wang Y, Wang Z, Zhang H, Shi Y, Ren R, Zhang H, Yu Y. Application of pneumatic nebulization single-drop microextraction for the determination of Organophosphorous pesticides by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 2011; 34 (15): 1880-1885.
32. Farajzadeh MA, Asghari A, Feriduni B. An efficient, rapid and microwave-accelerated dispersive liquid–liquid microextraction method for extraction and pre-concentration of some organophosphorus pesticide residues from aqueous samples. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2016; 48 (1): 73-80.
33. Xiangwei Y, Zhuokan X, Fengmao L, Naiwen J. Air-assisted liquid–liquid microextraction used for the rapid determination of organophosphorous pesticides in fruit juice samples. *Journal of Chromatography A*. 2013; 1311: 41-47.
34. Khadem M, Faridbod F, Norouzi P, Rahimi Froushani A F, Ganjali M R, Shahtaheri S J et al . Development of a specific electrochemical sensor for occupational and environmental monitoring of diazinon. *JHSW*. 2017; 7 (1):9-22.
35. Khadem M, Golbabaei F, Rahimi-Froushani A, Shahtaheri SJ. Optimization of Solid Phase Extraction for Trace Determination of Cobalt (II) Using Chromosorb 102 in Biological Monitoring. *ijoh*. 2010; 2(1):6-10.

Development of dispersive liquid-liquid micro-extraction procedure for trace determination of pesticide diazinon in urine samples

Maryam Ramin Sabet¹, Mehran Pourhossein¹, Monireh Khadem², Fariborz Omid³, Farideh Golbabaei⁴, Seyed Jamaledin Shahtaheri^{4*}

¹ Ph.D., Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Ph.D., Research Center for Environmental Determinants of Health (RCEDH), Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

⁴ Professor, Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: Measurement of pesticides in biological matrices is become a serious challenge for researchers due to their very low concentration in different matrices. The aim of this study was to develop a new sample preparation method with high accuracy and validity and short retention time for determination of diazinon.

Material and Method: Dispersive liquid-liquid micro-extraction technique coupled with high performance liquid chromatography equipped with ultra violet detector was developed for trace extraction and determination of diazinon pesticide in human urine samples. One variable at a time method was used to optimize parameters affecting the diazinon extraction. Different parameters such as extraction solvent, disperser solvent, and volume of the extraction solvent, volume of the disperser solvent, centrifugation time and speed, salt addition, and sample pH were studied and optimized.

Result: Findings showed that optimal levels of these variables for diazinon pesticide were 150 μ l of carbon tetrachloride as extraction solvent, 1.5 ml of methanol as dispersive solvent, pH of 6, 5 minutes centrifuge time at speed of 4000 rpm, 0% (w/v) salt addition. Correlation coefficient was 0.9965 indicating the linearity of a wide range of concentrations of the toxin. LOD and LOQ was calculated less than 0.7 and 5 μ g L⁻¹ respectively. The relative standard deviation for six replicate experiments in intra-day and inter-day at three selected concentrations (50, 200 and 1000 μ g L⁻¹) was less than 4% that indicates the accuracy and precision of the optimized method. Enrichment factor and extraction recovery for diazinon were 245 and 99% respectively.

Conclusion: According to the results, dispersive liquid-liquid micro-extraction procedure was successfully developed for the extraction of diazinon from human urine samples. Compared to other extraction techniques, the proposed procedure had some advantages such as shorter extraction time, better reproducibility, and higher enrichment factor.

Key words: Diazinon, Dispersive Liquid-Liquid Micro-Extraction, Urine, HPLC

* Corresponding Author Email: shahtaheri@tums.ac.ir