

تعیین میزان باقیمانده آفت کشتهای کلره در برخی از صیفی جات به روش کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی

زهرا هادیان^{۱*}، محمد حسین عزیزی^۲، روح الله فردوسی^۱

۱- پژوهشیار، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۲- دانشیار، گروه علوم صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

نظر به کاربرد گسترده سموم دفع آفات نباتی در انواع محصولات کشاورزی و افزایش نگرانیهای مربوط به مخاطرات بهداشتی ناشی از سموم، میزان باقیمانده آفت کشتهای کلره در صیفی جات به روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی در انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور در سال ۱۳۸۴ بررسی شد. تحقیق به روش توصیفی به منظور اندازه گیری انواع سموم Endosulfan(I)، Quintozene، Endosulfan(II)، DDT، HCH- γ ، endosulfan-sulphate، tecnazene و hexachlorobenzen در ۳۰ نمونه طالبی، خربزه و هندوانه انجام گرفت. پس از استخراج نمونه‌ها با حلال اتیل استات و تخلیص عصاره با ستون ژل تراوا با کارایی بالا (HPGPC)، شناسایی و تعیین میزان باقیمانده سموم با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی مجهز به آشکارساز تله یونی (GC/ITMS) صورت گرفت.

درصد بازیابی و حد تشخیص سموم این روش به ترتیب ۹۵-۱۷۸٪ و ۰/۰۱-۰/۰۵ mgkg-1 بود. داده‌ها نشان داد که نمونه‌های خربزه دارای سم endosulfan(II) به میزان ۰/۰۳-۰/۰۴ mgkg-1 و نمونه های خربزه و طالبی دارای سم endosulfan-sulphate به ترتیب در مقادیر ۰/۰۳-۰/۰۴ mgkg-1 و ۰/۰۵-۰/۰۷ mgkg-1 بودند. هیچیک از نمونه‌ها دارای باقیمانده سموم کلره بیشتر از حداکثر مجاز باقیمانده (MRLs) تعیین شده به وسیله Codex Alimentarius FAO/WHO نبودند. کاربرد این روش در تعیین باقیمانده سموم صیفی جات موفقیت آمیز بوده و نتایج قابل اعتماد و دقیقی را در برداشته است.

کلیدواژگان: باقیمانده سموم کلره، صیفی جات، کروماتوگرافی گازی، طیف سنجی جرمی

۱- مقدمه

شده و در این راستا از حدود ۸۰۰ ترکیب مورد مصرف در دنیا، ۲۱۱ ترکیب شیمیایی با فرمولاسیونهای مختلف و کاربردهای متفاوت تو سط هیات نظارت بر سموم به ثبت رسیده است [۳،۴].

در سالهای اخیر افزایش نگرانیهای عمومی در رابطه با مخاطرات بهداشتی باقیمانده سموم در رژیم غذایی، استراتژی محافظت از محصولات کشاورزی با تکیه بر

سموم شیمیایی دفع آفات نباتی به عنوان یکی از دستاوردهای فن آوری حاضر یکی از آلاینده‌های مهم به شمار می آیند. سالانه بیش از ۴ بلیون پوند سموم دفع آفات نباتی در دنیا مصرف می شود [۱،۲]. در ایران میزان خریداری این سموم سالیانه حدود ۲۴۰۰۰ تن برآورد

* مسول مکاتبات: E-mail: el_ma20@stu.um.ac.ir

سنجی جرمی^{۱۰} (MSD) مورد بررسی قرار داده اند [۵-۸، ۱۳ و ۱۴].

در حال حاضر^{۱۱} GC/MS به عنوان یک روش بسیار مناسب و متداول برای اندازه گیری باقیمانده سموم در انواع سبزی و میوه توصیه شده، زیرا علاوه بر حساسیت بالا و عملکرد اختصاصی آشکارسازهای طیف سنجی جرمی مانند Ion Trap، این تکنیک قادر است به طور همزمان تعداد زیادی از ترکیبات مختلف نامعلوم موجود در یک نمونه را با حد تشخیص کم توام با قابلیت جداسازی بالا شناسایی و میزان آن را تعیین نماید [۱۰، ۱۵، ۱۶ و ۱۷].

با توجه به مصرف انواع سموم دفع آفات نباتی در محصولات کشاورزی و مخاطرات بهداشتی باقیمانده سموم بر سلامت انسان، به منظور تعیین میزان باقیمانده آفت کشتهای کلره در صیفی جات به روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی، این تحقیق برای اولین بار در کشور با همکاری آزمایشگاه CSL انگلیس در سال ۱۳۸۴ انجام گرفت.

۲- مواد و روشها

تحقیق به روش توصیفی به منظور تعیین باقیمانده آفت کشتهای کلره در ۳۰ نمونه صیفیجات (۱۰ نمونه طالبی منطقه ساوه، ۱۰ نمونه هندوانه مناطق دزفول و اهواز، ۱۰ نمونه خربزه مناطق پل دختر و تربت جام) انجام گرفت.

۲-۱- نحوه نمونه گیری

نمونه برداری مطابق دستورالعمل کمیته باقیمانده آفت کشتهای کدکس (Codex Alimentarius 2000/1/24) انجام شد [۱۸].

نمونه برداری از صیفی جات عرضه شده در میدان اصلی میوه و تره بار شهر تهران در فصل تابستان انجام

ایمنی و کیفیت مواد غذایی و توجه به وضعیت بهداشت جامعه، منجر به تعیین حداکثر مجاز باقیمانده^۱ (MRL) و مشخص نمودن میزان کل مصرف باقیمانده سموم از طریق رژیم غذایی شده است.

بررسیهای اپیدمیولوژی اخیر نشان می دهد که بیش از ۸۰ درصد از باقیمانده سموم دفع آفات نباتی در انسان مخاطرات جدی در بردارد. این عواقب بهداشتی بسته به نوع و میزان سم به دو صورت حاد و مزمن بروز می نماید. مسمومیت، سقط جنین، عوارض پوستی و عصبی، اختلالات رفتاری و سرطان متداولترین اثرات سوء مربوط به سموم ارگانوکلره می باشد [۵].

به دلیل طیف وسیع خواص فیزیکوشیمیایی مواد غذایی و آفت کشتهای محققین روشهای متعددی را جهت تخلیص عصاره استخراجی مانند استخراج مایع- مایع^۲ (LLE) و فوق بحرانی^۳ (SFE)، فاز جامد^۴ (SPE)، ژل تراوا کروماتوگرافی^۵ (HPGPC) بکار برده اند [۶-۱۱].

روشهای مبتنی بر استخراج با استن و جداسازی با پترولیم سبک و دی کلرومتان در تخلیص نمونه به عنوان روش رسمی AOAC آمریکا پذیرفته شده است. در کشورهای اروپایی روش Luke با روش تخلیص

HPGPC دغام گردیده است [۱۲]. همچنین به منظور شناسایی و تعیین مقدار سموم، روشهایی مانند کروماتوگرافی مایع با آشکارساز فلورسانس، کروماتوگرافی گازی با آشکارسازهای ربایش الکترونی^۶ (ECD)، نیتروژن-فسفر^۷ (NPD)، حساس به نیتروژن^۸ (NSD)، یونیزاسیون شعله ای^۹ (FID) و طیف

1. Maximum Residue Limit
2. Liquid-Liquid Extraction
3. Solid Phase Extraction
4. Super Critical Fluid Extraction
5. High Performance Gel Permeation Chromatography
6. Electron Capture Detector
7. Nitrogen Phosphor Detector
8. Nitrogen Sensitive Detector
9. Flame Ionization Detector

10. Mass Spectrometry Detector

11. Gas Chromatography Mass Spectrometry

خارج شده از ستون به وسیله تبخیر کننده چرخان تحت خلاء خشک شد. باقیمانده حلال با جریان گاز ازت حذف گردید. نمونه جمع آوری شده قبل از تزریق به دستگاه در تولون حل شد. نمونه شاهد (۵ گرم نمونه استاندارد، ۲ میلی لیتر اتیل استات و ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط سم) در سه تکرار بدون انجام این مرحله برای تزریق آماده شدند.

۵-۲- جداسازی و اندازه گیری سموم

تزریق نمونه به ستون DB-5 (J&W Scientific) (Film) $0.1 \mu\text{m}$ و $25 \text{ mm id} \times 0.25 \text{ mm}$ کروماتوگرافی گازی (GC Varian 3800) در دمای 100°C انجام شد. از آنجایی که درجه حرارت موثرترین پارامتر در بهبود جداسازی به روش کروماتوگرافی گازی است، لذا از برنامه ریزی دمایی زیر استفاده گردید:

پس از ۱ دقیقه درجه حرارت ستون به 100°C رسید و سپس با شیب "دقیقه/ 10°C " دمای این قسمت به 200°C و متعاقباً با افزایش دما به میزان "دقیقه/ 4°C " درجه حرارت نهایی ستون به 300°C رسید. از گاز هلیوم با خلوص بالا (۹۹/۸۹٪) به عنوان گاز حامل استفاده شد، به طوری که فشار آن به تدریج از 70 kpa به 174 kpa به تدریج افزایش یافت.

شناسایی سموم و تعیین مقدار آنها با استفاده از طیف سنج جرمی (Varian Saturn 2200) مجهز به تله یونی (Ion Trap) انجام شد. در این روش میزان بازیابی سموم در نمونه‌ها با ۵ تکرار تعیین شد.

۳- نتایج و بحث

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود $73/3$ درصد صیفی جات فاقد باقیمانده آفت کشهای کلره بوده، در حالی که endosulfan-sulphate، endosulfan(II) سموم شناسایی شده در ۶ نمونه خرپزه مربوط به مناطق تربت جام و ورامین و ۲ نمونه طالبی ساوه بوده اند.

گرفت. متعاقب انتقال نمونه‌ها در شرایط مناسب، ۱-۲ کیلوگرم از هر یک آنها را پس از بسته بندی، کدگذاری و منجمد کردن در تونل انجماد با برودت 30°C - به مدت ۲۴ ساعت، در سردخانه با برودت 18°C - قرار داده شدند. نمونه‌ها را در زمان ارسال در جعبه‌های حاوی یخ خشک قرارداده و پس از لاک کردن و چسباندن بار کد بر روی هر یک جعبه‌ها، از طریق خط هوایی به آزمایشگاه CSL (York) انگلیس منتقل شدند.

۲-۲- حلالها و مواد شیمیایی

اتیل استات، استن، سیکلوهگزان، n-هگزان، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، دی هیدروژن پتاسیم فسفات، کلروسدیم، سولفات سدیم، بی کربنات سدیم (Scientific,UK) استانداردهای سموم کلره مورد استفاده عبارت بودند از: DDT-op, DDT-pp, HCH- γ , endosulfan (I), endosulfan (II), endosulfan-sulphate, tecnazenehexachlorobenzen, quintozone. (Thames,UK)

۳-۲- آماده سازی نمونه

پس از توزین ۳۰ گرم نمونه، ۵ گرم بی کربنات سدیم و ۴۰ گرم سولفات سدیم بدون آب به آن افزوده و آنها را به مخلوط کن با دور بالا منتقل کرده و با ۲۰۰ میلی لیتر حلال اتیل استات به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط شدند. پس از صاف کردن، عصاره استخراجی به وسیله دستگاه تبخیر کننده چرخان تحت خلاء خشک شد. در این مرحله به منظور بازیابی به نمونه‌ها سموم کلره استاندارد به میزان $0.05-0.08 \text{ mg/kg}$ (Spiking) اضافه گردید.

۴-۲- تخلیص

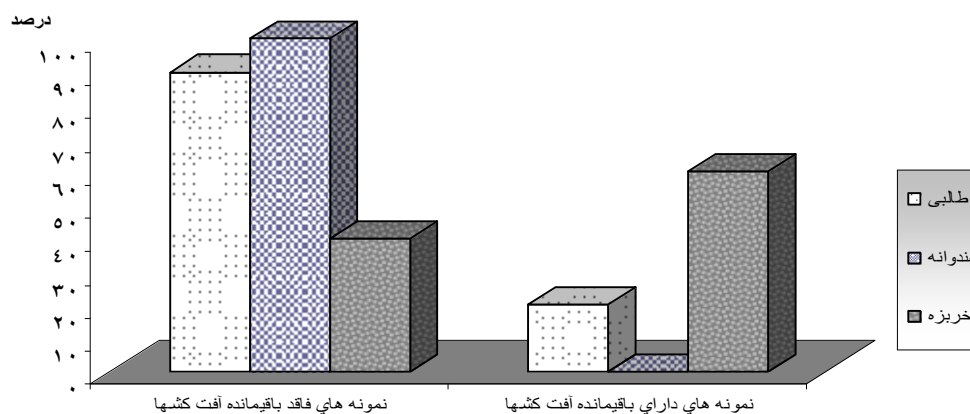
تخلیص نمونه‌ها با روش کروماتوگرافی ژل تراوا با کارایی بالا انجام گرفت. عمل تفکیک با ستونهای Envirosep-ABC (Phenomenex J2, USA) با ابعاد $60 \times 22 \text{ mm}$ انجام شد. در این تکنیک سرعت فاز متحرک سیکلوهگزان-اتیل استات (۱:۱) ۵ میلی لیتر در دقیقه بود و زمان عبور نمونه در ستون ۱۶ دقیقه به طول انجامید. ۱۴ میلی لیتر از نمونه حاوی سم

جدول ۱ میزان باقیمانده آفت کشتهای کلره در برخی از صیفیجات به روش کروماتوگرافی گازی- طیفسنجی جرمی

Endosulfan sulphate		Endosulfan (II)		سم	نمونه شماره
Residue (mgkg-1)	MRL (mgkg-1)	Residue (mgkg-1)	MRL (mgkg-1)		
خریزه تربت جام					
۰/۰۲	۰/۵	-	-	۱	
۰/۰۲	۰/۵	-	-	۲	
۰/۰۲	۰/۵	-	-	۵	
خریزه ورامین					
-	-	۰/۰۳	۰/۵	۲	
-	-	۰/۰۳	۰/۵	۳	
-	-	۰/۰۴	۰/۵	۵	
طالبی					
۰/۰۵	۰/۵	-	-	۵	
۰/۰۷	۰/۵	-	-	۸	

باقیمانده مجاز پذیرفته شده توسط Codex Alimentarius و FAO/WHO، نشان می‌دهد که میزان سم در نمونه‌های مثبت بسیار کمتر از حد تعیین شده است (شکل ۱).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در نمونه‌های مورد بررسی سموم غیرمجاز مانند انواع DDT و γ -HCH (با حد تشخیص ۰/۰۱ mgkg-1) وجود نداشت. از سوی دیگر مقایسه نتایج به دست آمده با بیشینه میزان

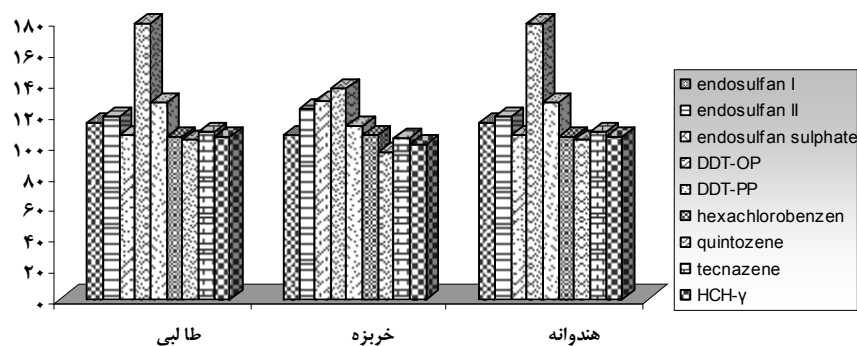


شکل ۱ نتایج بررسی میزان باقیمانده سموم کلره در برخی صیفیجات به روش GC/ITMS

برای هر یک از سموم کلره مورد بررسی در محدوده ۱۷۸-۹۵ درصد بوده است.

همانطور که از شکل ۲ بر می‌آید نتایج ۵ تکرار تجزیه بازیابی سموم پس از افزودن مقادیر گوناگون استاندارد در نمونه‌ها در مرحله استخراج براساس روش به کار رفته

میزان بازیابی (%)



شکل ۲ درصد بازیابی سموم کلره مورد بررسی در برخی صیفی جات به روش GC/ITMS

زمان کاهش می یابد) می باشد [۱۹].
 بررسی پانگ نشان داد که روش GC/MS در مقایسه با روش GC-ECD، تکنیکی با کارایی بالا در تجزیه باقیمانده سموم است و دارای حساسیت کافی در تعیین میزان باقیمانده سموم می باشد [۲۳].
 نتایج بسیاری از پژوهشها نشان می دهد که با استفاده از روش GC/ITMS می توان باقیمانده آفت کشها را در ترکیباتی مانند میوه و سبزی در مقادیر زیاد با حد تشخیص پایین به طور همزمان شناسایی و مقدار آن را تعیین نمود.
 بنابراین با توجه به حد تشخیص و میزان بازیابی به دست آمده، کاربرد این روش در تجزیه باقیمانده سموم در سبزیجات موفقیت آمیز بوده و نتایج قابل اعتماد و دقیقی را در برداشته است.

حد تشخیص و درصد بازیابی آفت کشهای کلره در برخی از صیفی جات به روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی در جدول ۲ آمده است. بدین ترتیب در این تحقیق میزان بازیابی برخی از سموم بالاتر از حد قابل قبول آزمون روتین استاندارد اروپا (۶۰-۱۴۰ درصد) بود، که ناشی از عوامل مداخله گر می باشد.

یافته های محققین نشان داده است که اثرات مداخله گر ناشی از ماتریکس و محدوده اثر آنها به طور همزمان منتج از عوامل دیگری مانند خصوصیات سموم آفت کش (بویژه آنهایی که قطبیت بیشتر دارند)، نوع ماتریکس (مومها و اسانسهای روغنی گیاهی)، غلظت ماتریکس به سموم و وضعیت دستگاه GC (پاسخ استاندارد در حلال خالص ۱۰۰٪ است و برای اکثر سموم به تدریج در طول

جدول ۲ حد تشخیص و میزان بازیابی آفت کشهای کلره در برخی از صیفی جات به روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی

سم	طالبی		خربزه		نمونه
	Recovery (mgkg-1)	LOD (mgkg-1)	Recovery (mgkg-1)	LOD (mgkg-1)	
DDT-op	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۰۱	
DDT-pp	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۰۱	
HCH-γ	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۰۱	
endosulfan (I)	۰/۰۵	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۵	
endosulfan (II)	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۲	
endosulfan-sulphate	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۲	
hexachlorobenzen	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۰۱	
quintozene	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۰۱	
tecnazene	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۵	۰/۰۱	

۴- سپاسگزاری

از حمایت‌های مالی انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع

غذایی کشور در انجام این تحقیق و همکاری پرسنل

آزمایشگاههای CSL و خاتم تشکر و قدردانی می شود.

۵- منابع

- [1] O'keefe, M. Residue.(2000). Analysis in Food Principles and Application. Harwood academic publisher .The Netherlands . 2000; P:229.
- [2] Helferich, W., winter, C. (2001). Food Toxicology. CRC. USA. P:163-185.
- [۳] گزارش موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی و سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی. ص: ۸۲-۱۳۸۱.
- [۴] آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۸۰-۱۳۷۹. معاونت برنامه ریزی و بودجه اداره کل آمار و اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی.
- [5] <http://Pesticide Org.> (2001). Windhom B. The health effects of pesticides.
- [6] Motohashi, N., Nagashima, H., Parkanyi C., Subrahmanyam, B., Zhang, G. W. (1996). Official multiresidue methods of pesticide analysis in vegetables, fruits and soil. J. Chromatography A. 754 : 333-346.
- [7] Lehotay, S.J., Valverde- Garcia, A. (1997). Evaluation of different solid- phase traps for automated collection and clean- up in the analysis of multiple pesticides in fruits and vegetabes after supercritical fluid extraction. J. Chromatography A. 765: 69- 84.
- [8] Perret, D. Gentili, A., Marchess, S., Sergi, M., Dascenzo, G. (2002). Validation of a method for the determination of multiclass pesticide residues in fruit juices by liquid chromatography –tandem mass spectrometry after extraction by matrix solid- phase dispersion. J. of AOAC International . 85(3).724-730.
- [9] Blasco, C., Font, G., pico, y. (2002). Comparison of micro extraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography– mass spectrometry. J. Chromatography. A . 97 (1/2) : 201-212.
- [10] Stajnbaher, D., Zupancic,-Kralj L. (2000). Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatography A.;1015 : 185-198.
- [11] Rodriguez, R., Pico, y., Font, G., Manes, J. (2002). Analysis of thiabendazole and procymidone in fruits and vegetable by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. J. Chromatography A. 949: 159-166.
- [12] Sojo, L.E., Brocke, A., Fillion, J., Price S.M. (1997). Application of activated carbon membranes for on- line clean up of vegetable and fruit extracts in the determination of pesticide multiresidues by gas chromatography with mass selective detection. J. Chromatography A. 788: 141-154.
- [13] Hajslova, J., Holadova, K., Kocourek, V., Poustka, J., Godula, M., Cuhra, P., Kempny, M. (1998). Matrix-induced effects: A critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. J. Chromatography A . 800:283-295.
- [14] Gelsomino, A., B.Petrovicova, B., Tiburini, S., Magnani, E., Felici, M. (1997). Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gel permeation chromatography followed by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. J. Chromatography A . 782:105-122.
- [15] Torres, C.M., Pico, Y., Manes, J. (1977). Comparison of octadecylsilica and graphitized carbon black as materials for solid-phase extraction

- of fungicide and insecticide residues from fruits and vegetables. *J. Chromatography A*. 778 : 127-137.
- [16] Ueno, E., Oshima, H., Saito, I., Matsumoto, H. (2004). Multiresidue analysis of pesticides in vegetables and fruits by gas chromatography/mass spectrometry after gel permeation chromatography and graphitized carbon column cleanup. *Journal of AOAC International*. 87(4):1003-1015
- [17] Vidal, J.L., Arrebola, F.J., French, A.G., Randez, J.M. (2004). Validation of gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for analysis of pesticide residue in six food commodities. Selection of a reference matrix for calibration. *J. Chromatography A*. 59(5/6): 321-327.
- [18] Codex Alimentarius. (2000). pesticide residues in food methods of analysis and sampling. 24: part .
- [19] Dogheim, S.M., Gad Alla, S.A., EL-Marsafy, A.M. (2001). Monitoring of pesticide residues in Egyptian fruits and vegetables during 1996. *Journal of AOAC International*. 84 :519-531.

Determination of Chlorinated Pesticide Residues in Vegetables by Gas Chromatography/Mass Spectrometry

Hadian Z^{*1}, Azizi M.H², Ferdosi R¹

1- Faculty Member, of National Nutrition & Food Industry Research Institute of Shaheed Beheshti University of Medical Sciences.

2-Associate Professor, Department of Food Science & Technology Tarbiat Modares University.

Regarding the increasing usage of pesticides to a broad variety of crops in Iran, and the importance of public concerns about possible health risks from pesticide residues, chlorinated pesticide residues in vegetables were determined in National Nutrition & Food Technology Research Institute in 2005.

Thirty samples (melon, maskmelon, watermelon) were evaluated by an descriptive method. Sample extraction was carried out with ethyl acetate, and the extracts were cleaned up by high performance gel permeation chromatography. Pesticide residues were identified and quantified using gas chromatography ion trap mass spectrometry detector. Recoveries of chlorinated pesticides were within a range from 95-178%.

Detection limit of pesticide residues were from 0.01 to 0.05 mgkg⁻¹. The data demonstrated that the samples analysed did not contain residues of the monitored pesticides above the accepted maximum residue limit (MRL) as adapted by the FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. This method proves to be successful in analyzing pesticides in vegetables and provides reliable and accurate results.

Keywords: Chlorinated pesticide, Vegetable, Analysis, GC/MS

* Corresponding author Email address: hadian_z2004@yahoo.com