

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه صنعتی شاهرود

دانشکده شیمی

پایان نامه ارشد تجزیه

ارائه روشی معتبر در استخراج و آنالیز حشره کش اسپیروترامات و مهمترین متابولیت آن

اسپیروترامات-انول در پسته

نگارنده:

رحمان غلامی

اساتید راهنما:

خانم دکتر فاطمه مصدرالامور

خانم دکتر وحیده مهدوی

بهمن ۹۷

شماره: ۱۹۵۲ ر.س  
تاریخ: ۹۷/۳/۱۱

باسمه تعالی



مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای رحمان غلامی درگاه با شماره دانشجویی ۹۵۱۰۹۱۴ رشته شیمی گرایش تجزیه تحت عنوان ارائه روشی معتبر در استخراج و آنالیز حشره کش اسپروترامات و مهمترین متابولیت آن اسپروترامات-اتول در پسته که در تاریخ ۹۷/۱۱/۱۰ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

<input type="checkbox"/> مردود <input type="checkbox"/> قبول (با درجه: <u>جالبی</u> ..جنوبی)			
نوع تحقیق: <input type="checkbox"/> نظری <input checked="" type="checkbox"/> عملی			
عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	دکتر فاطمه مصدرالامور	استادیار	
۲- استاد راهنمای دوم	دکتر وحیده مهدوی	استادیار	
۳- استاد مشاور			
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر محمد باخرد	استاد	
۵- استاد ممتحن اول	دکتر قدمعلی باقریان دهقی	دانشیار	
۶- استاد ممتحن دوم	دکتر ناصر گودرزی	دانشیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر مهدی هجرزایی

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

تیسره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

ماحصل آموخته هایم را با کمال افتخار تقدیم می کنم به:

خانواده عزیز و بزرگوایم

که همیشه پشتیبان و حامی من بودند.

## تشکر و قدردانی:

نخست خداوندی را می‌ستایم که علمش همچون دریای بی‌کران بر همه‌ی هستی سیطره افکنده و بزرگترین اندیشمندان جهان را قدرت فهم این اسرار نیست. تو را سپاس گویم که به من به عنوان جزء کوچکی از این هستی بزرگت قدرت تفکر عطا کردی و به عنوان اشرف مخلوقات اجازه کشف این جهان پهناور را دادی و امید است که بتوانم در این عالم با فهم امراز پنهانت خدمتی هر چند کوچک به هم نوعانم و دیگر مخلوقات کنم و به شایستگی قدردان نعماتت باشم. سپاسی بس فراتر بابت خانواده ایست که به من بخشیدی تا بتوانم در آغوش پر مهرشان پرورش یابم و با حمایت‌های بی‌دریغشان مسیر ناهموار موفقیت را هموار سازم.

از اساتید گرامتقدردم سرکار خانم دکتر فاطمه مصدر الامور و سرکار خانم دکتر وحیده مهدوی که زحمت راهنمایی این پایان‌نامه را بر عهده داشتند، کمال تشکر و قدردانی را دارم. از اساتید بزرگوار، جناب آقای دکتر ناصر گودرزی و جناب آقای دکتر قدمعلی باقریان دهقی که زحمت داوری این پایان‌نامه را متقبل شدند، کمال سپاس را دارم.

در خاتمه از تمامی مسئولین و پرسنل محترم موسسه تحقیقاتی گیاه پزشکی تهران و دانشگاه صنعتی شاهرود که کمال همکاری را با اینجانب داشتند و همچنین از دوستان و عزیزان گرامتقدردم سرکار خانم ریحانه غلامی، خانم گودرزی و جناب آقای مسعود سیوری که مرا در انجام این پایان‌نامه یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم. امید است که بتوانم قدردان زحمات این عزیزان دلسوز باشم و با کسب علم و دانش بیشتر، باعث آبادانی و سرفرازی کشور عزیزم شوم.

## تعهد نامه

اینجانب **رحمان غلامی** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه دانشکده شیمی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه ارائه روشی معتبر در استخراج و آنالیز حشره کش اسپیروتترامات و مهمترین متابولیت آن اسپیروتترامات-انول در پسته تحت راهنمایی **دکتر فاطمه مصدرا لامور** و **دکتر وحیده مهدوی** متعهد می شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام «دانشگاه صنعتی شاهرود» و یا «**Shahrood University of Technology**» به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت های آن ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

### تاریخ

### امضای دانشجو

### مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

## چکیده

پسته به عنوان یک محصول مهم و استراتژیک، نقش مهمی را در صادرات غیر نفتی کشور ایفا می‌کند، لذا تولید بیشتر و با کیفیت‌تر این محصول حائز اهمیت می‌باشد. باقیماندن آفت‌کش‌ها در بافت پسته علاوه بر خطر ساز بودن برای سلامت انسان و محیط زیست، صادرات این محصول را دچار مشکل می‌کند. در این پایان‌نامه باقیمانده آفت‌کش اسپیروترامات و مهم‌ترین متابولیت آن، اسپیروتترامات-انول با استفاده از روش کپرز که روشی سریع، آسان، ارزان، ایمن و قابل اطمینان برای بافت‌های پیچیده است، مورد ارزیابی قرار گرفت. برای جداسازی و اندازه‌گیری این آفت‌کش از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با آشکارساز UV/Vis استفاده گردید. برخی از شرایط دستگاه کروماتوگرافی نظیر طول موج ماکزیمم و تهیه‌ی محلول‌های استاندارد با حلال‌های مختلف بهینه شدند. روش کپرز شامل دو مرحله است: ۱- استخراج کلی که توسط استونیتریل انجام می‌گیرد، ۲- مرحله پاکسازی که با استفاده از نمک‌ها و جاذب‌ها انجام می‌شود. میزان جاذب‌های کربن سیاه گرافیتی و آمین نوع اول و دوم در مرحله پاکسازی و همچنین مقدار آب در مرحله استخراج بهینه شدند. در انتها، روش از نظر حد تشخیص با توجه به حداکثر مقدار باقیمانده آفت‌کش در ایران، بازیابی و تکرارپذیری مورد ارزیابی قرار گرفت. در شرایط بهینه، منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی برای اسپیروتترامات در محدوده‌ی غلظتی  $0.40-1.0 \text{ mg/L}$  با ضریب هم‌بستگی  $0.9978$  رفتار خطی مناسبی را نشان داد. همچنین انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۱۰ درصد و درصد بازیابی  $103-91$  به دست آمد. علاوه بر این، منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی برای اسپیروتترامات-انول با گستره‌ی خطی  $0.50-1.0 \text{ mg/L}$  و ضریب هم‌بستگی  $0.9936$  به دست آمد. حد تشخیص این روش  $2/2 \text{ } \mu\text{g/kg}$  می‌باشد و حد کمی آن  $0.53 \text{ mg/L}$  است که با توجه به MRL این سم ( $50 \text{ } \mu\text{g/kg}$ ) قابل قبول می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** باقیمانده‌ی آفت‌کش، متابولیت، حداکثر مقدار باقیمانده آفت‌کش (MRL)، روش

کپرز، اسپیروتترامات، اسپیروتترامات-انول، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

## فهرست مطالب

### فصل اول (مقدمه)

۱-۱	مقدمه	۲
۲-۱	پسته	۳
۱-۲-۱	تاریخچه پسته	۴
۲-۲-۱	اهمیت پسته	۴
۳-۲-۱	ترکیبات پسته	۵
۴-۲-۱	آفات پسته	۶
۵-۲-۱	آفت‌کش‌های مرسوم باغات پسته	۷
۶-۲-۱	تولید جهانی و صادرات پسته	۹
۳-۱	آفت‌کش‌ها	۱۱
۱-۳-۱	مزایا و مضرات استفاده از آفت‌کش‌ها	۱۲
۲-۳-۱	باقیمانده آفت‌کش‌ها	۱۳
۳-۳-۱	مروری بر روش‌های اندازه‌گیری باقیمانده آفت‌کش‌ها	۱۵
۴-۱	روش کچرز	۱۹
۱-۴-۱	مراحل انجام روش کچرز	۲۴
۲-۴-۱	دستورالعمل‌های اصلی کچرز	۲۸
۳-۴-۱	مقایسه روش کچرز با سایر روش‌ها	۳۰
۵-۱	اسپیروترامات و متابولیت‌های آن	۳۱
۶-۱	هدف از این مطالعه	۳۵



## فصل دوم (بخش تجربی)

- ۳۸..... ۱-۲ مواد استفاده شده
- ۳۹..... ۲-۲ دستگاه ها
- ۴۰..... ۳-۲ شرایط کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا
- ۴۰..... ۴-۲ تهیهی محلول‌های استاندارد
- ۴۱..... ۱-۴-۲ تهیهی محلول‌ها برای رسم منحنی درجه‌بندی مستقیم (استانداردها)
- ۴۱..... ۲-۴-۲ تهیه محلول‌ها برای رسم منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی
- ۴۱..... ۳-۴-۲ تهیهی محلول‌ها برای محاسبه بازیابی
- ۴۲..... ۴-۴-۲ تهیه محلول‌ها برای بررسی دقت و صحت روش
- ۴۲..... ۵-۲ روش آماده سازی و تهیهی نمونه‌های پسته
- ۴۳..... ۱-۵-۲ تهیهی نمونه‌های غنی شده پسته با آنالیت
- ۴۳..... ۲-۵-۲ تهیهی نمونه‌های همسان سازی شدهی بافتی
- ۴۳..... ۶-۲ روش‌های کچرز عمومی به کار رفته بر روی بافت پسته
- ۴۳..... ۱-۶-۲ کچرز اصلی
- ۴۴..... ۲-۶-۲ کچرز بافری
- ۴۵..... ۳-۶-۲ کچرز اصلاح شده
- ۴۶..... ۷-۲ محاسبه بازیابی

## فصل سوم (بحث و نتیجه‌گیری)

- ۱-۳ بهینه‌سازی شرایط دستگاه HPLC ..... ۴۸
- ۱-۱-۳ تعیین طول موج ماکزیمم ..... ۴۸
- ۲-۱-۳ تعیین نوع و درصد فاز متحرک ..... ۵۰
- ۳-۱-۳ افزودن تری اتیل آمین و فرمیک اسید برای کاهش پهنای پیک ..... ۵۲
- ۴-۱-۳ تهیه‌ی محلول‌های استاندارد با حلال‌های متفاوت ..... ۵۳
- ۲-۳ نتایج روش‌های کچرز عمومی به کار رفته بر روی پسته غنی شده با آفت‌کش ..... ۵۵
- ۳-۳ بهینه‌سازی روش استخراج کچرز اصلی ..... ۵۷
- ۱-۳-۳ بهینه‌سازی مقدار آب ..... ۵۸
- ۲-۳-۳ بهینه‌سازی جاذب‌های مرحله پاکسازی ..... ۶۰
- ۴-۳ اعتبار سنجی روش ..... ۶۳
- ۱-۴-۳ رسم منحنی درجه بندی مستقیم ..... ۶۳
- ۲-۴-۳ رسم منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی ..... ۶۶
- ۳-۴-۳ نمودار بازیابی در غلظت‌های مختلف ..... ۶۸
- ۴-۴-۳ اثر بافت ..... ۶۹
- ۵-۴-۳ تعیین حد تشخیص و حد کمی روش پیشنهادی ..... ۷۰
- ۶-۴-۳ بررسی دقت و صحت درون روز و بین روز روش پیشنهادی ..... ۷۰
- ۵-۳ آنالیز نمونه‌های واقعی ..... ۷۱
- ۶-۳ مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های به کار گرفته شده برای اندازه‌گیری آفت‌کش اسپیروترامات ..... ۷۲
- ۷-۳ نتیجه‌گیری ..... ۷۳
- ۸-۳ آینده نگری ..... ۷۴
- منابع ..... ۷۵

## فهرست اشکال

- شکل ۱-۱ باغات پسته و محصول پسته ..... ۳
- شکل ۲-۱ پسپیل پسته، آفت مرسوم باغات پسته در ایران ..... ۷
- شکل ۳-۱ نمودار تولید جهانی پسته در جهان از سال ۱۹۹۴ تا ۲۰۱۶ ..... ۹
- شکل ۴-۱ تعداد مقالات منتشر شده در به کارگیری روش کچرز از سال ۲۰۰۴ تا ۲۰۱۸ ..... ۲۱
- شکل ۵-۱ مراحل انجام روش کچرز ..... ۲۷
- شکل ۶-۱ دستورالعمل‌های اصلی روش کچرز ..... ۲۹
- شکل ۷-۱ ساختار شیمیایی اسپیروتترامات و متابولیت‌های آن ..... ۳۳
- شکل ۱-۲ مراحل آماده سازی و همگن کردن پسته ..... ۴۲
- شکل ۱-۳ طیف UV/Vis ثبت شده برای اسپیروتترامات ..... ۴۸
- شکل ۲-۳ کروماتوگرام ثبت شده در طول موج ۲۵۰nm و سرعت جریان ۱ mL/min با نسبت آب : استونیتریل ۳۵:۶۵ در غلظت ۵/۰ mg/L اسپیروتترامات الف)  $\lambda_{max} = 196 \text{ nm}$  (ب)  $\lambda_{max} = 220 \text{ nm}$  (ج)  $\lambda_{max} = 250 \text{ nm}$  ..... ۴۹
- شکل ۳-۳ کروماتوگرام‌های ثبت شده‌ی اسپیروتترامات با غلظت ۵/۰ mg/L در طول موج ۲۵۰nm و سرعت جریان ۱ mL/min در فاز متحرک با نسبت‌های متفاوت آب : استونیتریل الف) ۶۰ : ۴۰ ، ب) ۵۵ : ۴۵ ، ج) ۵۰ : ۵۰ ، د) ۴۵ : ۵۵ ، ه) ۴۰ : ۶۰ ..... ۵۱
- شکل ۴-۳ کروماتوگرام ثبت شده‌ی اسپیروتترامات و انول-اسپیروتترامات با غلظت ۵/۰ mg/L در فاز متحرک آب : استونیتریل با نسبت ۴۵ : ۵۵ در طول موج ۲۵۰nm و سرعت جریان ۱ mL/min ..... ۵۱
- شکل ۵-۳ کروماتوگرام ثبت شده‌ی اسپیروتترامات و اسپیروتترامات-انول با غلظت ۵/۰ mg/L در فاز متحرک آب : استونیتریل با نسبت ۵۰ : ۵۰ در طول موج ۲۵۰ nm و سرعت جریان ۱ mL/min ..... ۵۱
- شکل ۶-۳ کروماتوگرام ثبت شده در طول موج ۲۵۰nm با غلظت ۵/۰ mg/L اسپیروتترامات در سرعت جریان ۱ mL/min با نسبت آب : استونیتریل ۵۰ : ۵۰ الف) شامل ۱/۱ در صد فرمیک اسید در فاز متحرک ب) فاقد فرمیک اسید ..... ۵۲
- شکل ۷-۳ کروماتوگرام ثبت شده در طول موج ۲۵۰nm با غلظت ۵/۰ mg/L اسپیروتترامات در سرعت جریان ۱ mL/min با نسبت آب : استونیتریل ۵۰ : ۵۰ الف) فاز متحرک شامل ۱ درصد تری اتیل آمین ب) فاز متحرک فاقد تری اتیل آمین ..... ۵۳

شکل ۳-۸ کروماتوگرام ثبت شده برای اسپیروترامات با غلظت ۵/۰ mg/L تهیه شده در مخلوط ۵۰ : ۵۰ آب : استونیتریل با سرعت جریان ۱ mL/min در فاز متحرک آب : استونیتریل با نسبت ۵۰ : ۵۰ (الف) تزریق در همان روز (ب) پس از گذشت ۲۴ ساعت (ج) پس از گذشت ۷۲ ساعت ۵۴.....

شکل ۳-۹ کروماتوگرام ثبت شده برای اسپیروترامات با غلظت ۵/۰ mg/L تهیه شده در آب خالص با سرعت جریان ۱ mL/min در فاز متحرک آب : استونیتریل با نسبت ۵۰ : ۵۰ (الف) تزریق در همان روز (ب) پس از ۲۴ ساعت (ج) پس از ۷۲ ساعت ۵۴.....

شکل ۳-۱۰ کروماتوگرام ثبت شده برای اسپیروترامات با غلظت ۵/۰ mg/L تهیه شده در استونیتریل خالص با سرعت جریان ۱ mL/min در فاز متحرک آب : استونیتریل با نسبت ۵۰ : ۵۰ (الف) تزریق در همان روز (ب) پس از ۲۴ ساعت (ج) پس از ۷۲ ساعت ۵۴.....

شکل ۳-۱۱ فازهای جدا شده در روش کچرز (الف) پس از استخراج (ب) پس از مرحله پاکسازی ۵۵.....  
.... شکل ۳-۱۲ کروماتوگرام ثبت شده برای مخلوط اسپیروترامات و اسپیروترامات-انول با غلظت ۱/۰ mg/L از نمونه استخراج شده با کچرز اصلی در سرعت جریان ۱ mL/min و فاز متحرک آب : استونیتریل با نسبت ۵۰ : ۵۰ (الف) برای نمونه حاوی اسپیروترامات و اسپیروترامات-انول (ب) نمونه شاهد ۵۶.....

شکل ۳-۱۳ کروماتوگرام‌های ثبت شده برای نمونه استخراج شده در طول موج ۲۵۰ nm و سرعت جریان ۱ mL/min با فاز متحرک آب : استونیتریل ۵۰ : ۵۰ (الف) برای کچرز بافری حاوی اسپیروترامات و اسپیروترامات-انول با غلظت ۱/۰ mg/L (ب) برای روش اصلی کچرز حاوی اسپیروترامات-انول با غلظت ۱/۰ mg/L ۵۷.....

شکل ۳-۱۴ کروماتوگرام‌های مربوط به استخراج اسپیروترامات با روش اصلی کچرز از نمونه پسته (الف) صفر (ب) ۱/۵ (ج) ۳/۵ (د) ۵/۰ میلی لیتر آب در مرحله استخراج ۵۹.....

شکل ۳-۱۵ تاثیر مقدار آب بر سیگنال اسپیروترامات استخراج شده از بافت پسته غنی شده با غلظت ۱/۰ mg/L ۵۹.....

شکل ۳-۱۶ تاثیر میزان جاذب PSA بر میزان سیگنال اسپیروترامات استخراج شده از بافت پسته غنی شده با غلظت ۱/۰ mg/L ۶۲.....

شکل ۳-۱۷ تاثیر میزان جاذب GCB بر میزان سیگنال اسپیروترامات استخراج شده از بافت پسته غنی شده با غلظت ۱/۰ mg/L ۶۲.....

شکل ۳-۱۸ منحنی درجه بندی مستقیم اسپیروترامات ۶۴.....

- شکل ۳-۱۹ منحنی درجه بندی مستقیم اسپروترامات-انول ..... ۶۵
- شکل ۳-۲۰ منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی برای اسپروترامات ..... ۶۷
- شکل ۳-۲۱ منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی برای اسپروترامات-انول ..... ۶۷
- شکل ۳-۲۲ نمودار بازیابی در غلظت‌های مختلف ..... ۶۸
- شکل ۳-۲۳ کروماتوگرام حاصل از نمونه‌های حقیقی در طول موج ۲۵۰ nm با سرعت جریان mL/min ۱ و فاز متحرک آب : استونیتریل با نسبت ۵۰ : ۵۰ ..... ۷۲

## فهرست جداول

- جدول ۱-۱ آفت‌کش‌های مرسوم برای کنترل آفات پسته ..... ۸
- جدول ۲-۱ رتبه بندی کشورها بر اساس میزان تولید پسته در سال ۲۰۱۶ ..... ۱۰
- جدول ۳-۱ برخی از MRL های تصویب شده توسط کدکس ..... ۱۴
- جدول ۴-۱ استفاده از روش کچرز برای آماده سازی نمونه‌ها ..... ۲۲
- جدول ۵-۱ جاذب‌های مورد استفاده در مرحله پاکسازی روش کچرز ..... ۲۶
- جدول ۶-۱ برخی از ویژگی‌های اسپیروترامات ..... ۳۲
- جدول ۷-۱ نتایج و اندازه‌گیری اسپیروترامات به صورت جداگانه یا همزمان با برخی آفت‌کش‌ها در گونه‌های مختلف ..... ۳۴
- جدول ۱-۲ مواد شیمیایی استفاده شده ..... ۳۸
- جدول ۱-۳ مقادیر به دست آمده برای مقایسه کچرز اصلی و بافری ..... ۵۶
- جدول ۲-۳ مقادیر مختلف دو جاذب PSA و GCB جهت بهینه‌سازی در مرحله پاکسازی ..... ۶۱
- جدول ۳-۳ نتایج حاصل از بررسی منحنی درجه بندی مستقیم اسپیروترامات در محدوده غلظتی ۰/۰۴-۱/۰ mg/L ..... ۶۴
- جدول ۴-۳ نتایج حاصل از بررسی منحنی درجه بندی مستقیم اسپیروترامات-انول در محدوده‌ی غلظتی ۰/۰۵-۱/۰ mg/L ..... ۶۵
- جدول ۵-۳ نتایج حاصل از بررسی منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی اسپیروترامات در محدوده غلظتی ۰/۰۴-۱/۰ mg/L ..... ۶۶
- جدول ۶-۳ نتایج حاصل از بررسی منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی اسپیروترامات-انول در محدوده غلظتی ۰/۰۵-۱/۰ mg/L ..... ۶۷
- جدول ۷-۳ معادله خط و ضریب همبستگی منحنی‌های درجه بندی رسم شده ..... ۶۸
- جدول ۸-۳ مقادیر محاسبه شده برای دقت و صحت روش کچرز اصلاح شده در پسته ..... ۷۱
- جدول ۹-۳ مقایسه روش پیشنهادی با سایر روش‌ها ..... ۷۳

# فصل اول

## مقدمه

## ۱-۱ مقدمه

امنیت<sup>۱</sup> و ایمنی<sup>۲</sup> غذایی از واژه‌هایی مهم و کاربردی است که امروزه در کشورهای مختلف به آن پرداخته می‌شود. امنیت غذایی به دسترسی همه‌ی افراد جامعه به غذای کافی در تمام عمر گفته می‌شود. ایمنی غذایی یعنی اطمینان از سلامت غذایی که مردم جامعه استفاده می‌کنند. این واژه بدین معنی است که مقدار آلودگی محصولات نباید به گونه‌ای باشد که خطر جدی را برای سلامت انسان و محیط‌زیست ایجاد کند. طبق ایمنی غذایی، بهینه‌سازی مصرف آفت‌کش‌ها برای تولید غذای سالم و کاهش خطرات زیست محیطی بسیار با اهمیت می‌باشد. بدون شک آفت‌کش‌ها نقش بسیار پررنگی در مدیریت آفات، کنترل برخی بیماری‌ها و در نتیجه تولید محصول بیشتر دارند که این امر امنیت غذایی را فراهم می‌کند. کشاورزان در تمامی کشورها، برای مبارزه با آفات کشاورزی از انواع آفت‌کش‌ها استفاده می‌کنند، این در حالی است که این سموم نه تنها روی سطح محصولات باقی می‌مانند، بلکه به داخل بافت میوه‌ها، سبزیجات و یا حتی آب‌های زیرزمینی نفوذ کرده و باعث آلودگی و مسمومیت آنها می‌شوند و ایمنی غذایی را به خطر می‌اندازند. امروزه استفاده گسترده از آفت‌کش‌ها و باقی ماندن آنها در بافت گیاهان خطرات جدی برای سلامت انسان‌ها، حیوانات و حتی خود گیاه به وجود آورده است. البته مقدار سموم و کودهای شیمیایی باقیمانده در بافت گیاهان بسیار کم می‌باشند، اما اگر مدت زمان زیادی در معرض این سموم قرار گیرند، اثرات مخرب بسیاری را بر سلامت انسان به‌جای می‌گذارند. بنابراین پی بردن به مقدار سمومی که در گیاهان و محیط اطراف آنان باقی می‌ماند حائز اهمیت می‌باشد [۱].

---

<sup>1</sup> Food Security

<sup>2</sup> Food Safety



## ۱-۲ پسته

پسته یک آجیل تولید شده توسط ۲۰ گونه از درختچه‌هایی مانند ورا<sup>۱</sup>، آتلانتیکا<sup>۲</sup>، تری باین تس<sup>۳</sup>، خینجاک<sup>۴</sup>، لن تیس کس<sup>۵</sup> و غیره می‌باشد. هر کدام از این نوع درختچه‌ها با توجه به شرایط آب و هوایی منطقه خود پدید می‌آیند. پسته ورا یک محصول بومی خاورمیانه می‌باشد و در مناطقی که دارای آب و هوای گرم و خشک است به سرعت رشد می‌کند. درخت ورا تا حدود ۱۰ متر می‌تواند رشد کند، همچنین تحمل نور خورشید و خاک شور را نیز دارد. درختان ورا در مناطق خاورمیانه، ایالات متحده آمریکا و کشورهای مدیترانه به تعداد زیادی وجود دارند. میوه پسته در اواخر تابستان و یا اوایل پاییز به ثمر می‌نشیند و مغز پسته اغلب به عنوان میان وعده، بو داده و شور می‌شود همچنین اضافه کردن این آجیل به محصولات غذایی مانند بستنی، سوهان، سالاد، نان و غیره طعم لذیذی به این محصولات می‌دهد [۲-۴].



شکل ۱-۱ باغات پسته و محصول پسته

<sup>1</sup> Vera

<sup>2</sup> Atlantica

<sup>3</sup> Terebinthus

<sup>4</sup> Khinjuk

<sup>5</sup> Lentiscus

## ۱-۲-۱ تاریخچه پسته

از زمان قدیم پسته به عنوان بخشی از رژیم غذایی انسان‌ها مورد توجه بوده است و درخت پسته یکی از درختان بومی منطقه خاورمیانه می‌باشد. طبق سوابق باستانی قدمت این درخت به ۷۰۰ سال پیش از میلاد در ترکیه باز می‌گردد. در سال ۱۸۸۰ میلادی پسته به عنوان یک آجیل مخصوص، از خاورمیانه وارد کالیفرنیا آمریکا شد. در بین سال‌های ۱۹۷۰-۱۹۴۰ میلادی کشت تجاری پسته در خاورمیانه و کالیفرنیا گسترش یافت و به عنوان یک آجیل مفید و مغذی به بازار جهانی راه یافت [۲].

## ۱-۲-۲ اهمیت پسته

ایران با توجه به شرایط آب و هوایی مساعد، یکی از کشورهای پیشرو در تولید و صادرات این محصول می‌باشد. در سال ۲۰۰۳ اداره غذا و دارویی آمریکا<sup>۱</sup> (FDA) مصرف ۴۳ گرم پسته در روز را به عنوان بخشی از رژیم غذایی کم چرب توسعه کرد. پسته در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های قلبی عروقی، چاقی، دیابت نوع دوم و سندروم متابولیک<sup>۲</sup> موثر می‌باشد و با اضافه کردن آن به رژیم غذایی نتایج مثبت و قطعی در مورد کاهش چربی خون حاصل شده است [۵]. از روغن پسته در صنایع غذایی و لوازم آرایشی استفاده می‌شود، که این محصول دارای رنگدانه‌های کلروفیل<sup>۳</sup> و کاروتنوئید<sup>۴</sup> می‌باشد [۶]. از ضایعات پسته برای سوخت‌های زیست توده<sup>۵</sup> به عنوان یک منبع تجدیدپذیر و سوختی پاک استفاده می‌شود. زیست توده به صورت مستقیم و غیر مستقیم به عنوان انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به صورت مستقیم به عنوان سوخت و مواد شیمیایی و به صورت غیر مستقیم با تبدیل به سوخت‌های بیودیزل، بیواتانول، بیوگاز و بیوروغن استفاده می‌شود [۷].

---

<sup>1</sup> Food and Drug Administration

<sup>2</sup> Metabolic Syndrome

<sup>3</sup> Chlorophyll

<sup>4</sup> Carotenoid

<sup>5</sup> Biomass

## ۱-۲-۳ ترکیبات پسته

آجیل پسته حاوی منابع معدنی بسیاری مانند پتاسیم، منیزیم، کلسیم، فسفر، روی، آهن، مس، سدیم و سلنیم می‌باشد. وجود آهن در پسته به خون‌سازی و در نتیجه حمل اکسیژن کمک می‌کند. کلسیم باعث جلوگیری از پوکی استخوان و بیماری‌های سیستم عصبی می‌شود. فسفر نیز کمک می‌کند تا گوشت و پروتئین‌های دیگر به آمینو اسید تجزیه شوند و منیزیم فشار خون بالا را کاهش می‌دهد [۳].

پسته سرشار از فیبرهای محلول و غیر محلول است که فیبر باعث می‌شود تا احساس سیری زودرسی حاصل شود و به کاهش وزن کمک می‌کند. در بسیاری از مطالعات مصرف ۳۰-۸۰ گرم پسته در روز باعث کاهش لیپوپروتئین-کلسترول با چگالی بالا<sup>۱</sup> (HDL) به میزان ۱۰/۱ درصد و لیپوپروتئین-کلسترول با چگالی کم<sup>۲</sup> (LDL) به میزان ۸/۶ درصد می‌شود. همچنین پسته حاوی مقادیر زیادی از اسیدهای چرب اشباع نشده، مانند اسید لینولئیک‌ها<sup>۳</sup>، اسید لینولنیک<sup>۴</sup> و اسید اولئیک<sup>۵</sup> می‌باشد که اسیدهای چرب غیر اشباع با پیوند دوگانه موجود در ترکیبات خود کمک می‌کنند تا کلسترول و چربی خون کاهش یابد و در نتیجه فشار خون و وزن بدن را پایین می‌آورد [۳، ۸].

از دیگر مواد مغذی و مهم موجود در این آجیل می‌توان به توکوفرول‌ها، پروتئین‌های گیاهی، ویتامین K، ویتامین B<sub>6</sub>، ترکیبات فنولی و مواد فیتوشیمیایی (گیاهی) مانند: فیتواسترول، لوتئین، رسوراتول، کامپسترول، ایزوفلاونوئیدها، کاروتنوئیدها، اسیدهای فنولیک (آنتی‌اکسیدان)، آنتوسیانین و پلی‌فنول ها اشاره کرد [۹].

---

<sup>1</sup> High Density Lipoprotein-Cholesterol

<sup>2</sup> Low Density Lipoprotein-Cholesterol

<sup>3</sup> Linoleic acid

<sup>4</sup> Linolenic acid

<sup>5</sup> Oleic acid

## ۱-۲-۴ آفات پسته

درختان پسته همواره مورد حمله تعداد زیادی (بیش از ۵۰ نوع) آفات، بخصوص حشرات قرار می‌گیرند. خسارات آفات و عدم آگاهی از جلوگیری و کنترل آنها همواره یکی از بزرگترین مشکلات باغداران بوده است. این آفات بر اساس خساراتی که وارد می‌کنند به سه دسته تقسیم می‌شوند:

**الف) آفات درجه اول:** آفاتی که همه ساله در باغات پسته دیده می‌شوند و به علت وارد آوردن خسارت شدید مبارزه با آنها الزامی می‌باشد. پسپیل پسته، زنجیره چوبخوار پسته و سن‌های زیان‌آور پسته از جمله مهمترین آفات درجه اول می‌باشند.

**ب) آفات درجه دوم:** معمولاً جمعیت آنها زیر سطح زیان اقتصادی می‌باشد ولی در بعضی از سال‌ها به حالت طغیانی و خسارت‌زا درآمده و مبارزه با آنها لازم است. مهمترین آفات درجه دوم، پروانه میوه خوار پسته، شپشک‌های پسته و پروانه پوست‌خوار پسته می‌باشند.

**ج) آفات درجه سوم:** جمعیت این آفات در باغات پسته بسیار پایین می‌باشد. از جمله این آفات سوسک شاخک بلند پسته، سوسک طوقه‌خوار پسته، زنبورهای مغزخوار پسته، شب‌پره خرنوب و شب‌پره هندی می‌باشند.

در میان تمامی آفات، پسپیل پسته<sup>۱</sup> مهمترین آفت پسته در سراسر مناطق تولید کننده این آجیل، در ایران می‌باشد. پسپیل پسته از اوایل بهار تا اواخر پاییز فعال است و در طول سال پنج الی شش مرتبه تولید مثل انجام می‌دهد. این حشره تولید شهدی غلیظ می‌کند که وقتی این شهد در معرض هوا قرار گیرد بلافاصله خشک می‌شود و بر روی برگ‌ها و زیر درختان می‌ریزد. پسپیل پسته پس از گذراندن زمستان در زیر خاک و در اوایل اردیبهشت ماه شروع به تخم‌ریزی می‌کند و نوزادهای آن از شیره نباتی تغذیه می‌نمایند [۱۰].

---

<sup>1</sup> Pistachio Psylla

در اثر مکیدن شیره گیاهی توسط پسیل پسته، وزن مغز محصول کاهش، درصد پوکی آن افزایش و میزان خندانی هم کم می‌شود. از خسارت‌های دیگر این آفت ریزش برگ‌ها و جوانه‌های میوه دهنده در سال بعد و همچنین بسته شدن روزنه‌های هوایی در اثر ترشح شیره می‌باشد.



۱-۲ پسیل پسته، آفت مرسوم باغات پسته در ایران

### ۱-۲-۵ آفت‌کش‌های مرسوم باغات پسته

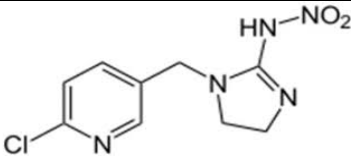
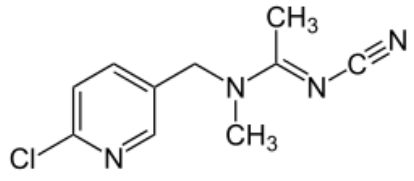
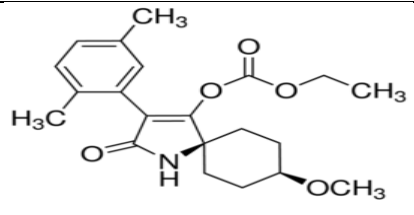
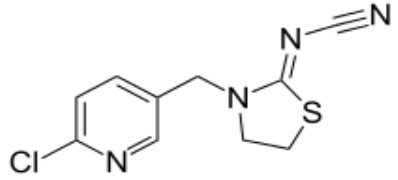
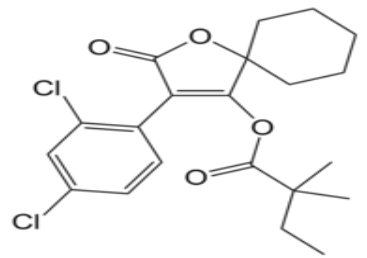
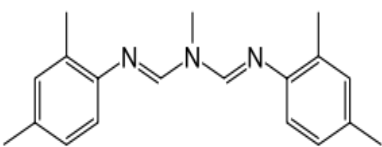
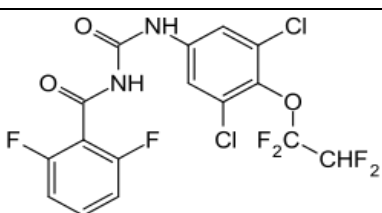
چندین آفت‌کش از قبیل استامی‌پراید<sup>۱</sup> و ایمیدا‌کلوپراید<sup>۲</sup> علیه پسیل پسته به کار برده شده‌اند. استفاده مداوم از این آفت‌کش‌ها در طول چندین سال باعث مقاوم شدن این حشرات در برابر این آفت‌کش‌ها شده بود که همین امر منجر به وجود آمدن آفت‌کش‌های جدیدتر و کارآمدتر مانند اسپیروتترامات<sup>۳</sup> در برابر پسیل پسته شده است. با گذشت زمان آفت‌کش‌های متعددی در جهان علیه پسیل پسته به کار گرفته شد و در حال حاضر برخی از این آفت‌کش‌ها به صورت گسترده در ایران استفاده می‌شوند. در جدول (۱-۱) بخشی از آفت‌کش‌های مرسوم باغات پسته به خصوص پسیل پسته آورده شده است.

<sup>۱</sup> Acetamiprid

<sup>۲</sup> Imidacloprid

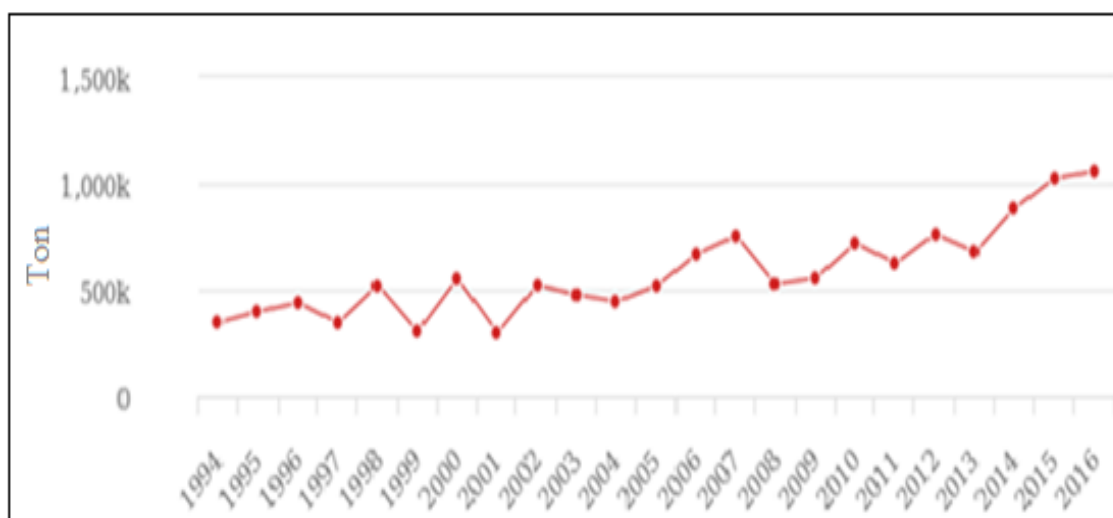
<sup>۳</sup> Spirotetramat

جدول ۱-۱ آفت‌کش‌های مرسوم برای کنترل آفات پسته بر اساس مرجع ۱۱

نام آفت‌کش	نام تجاری	فرمول شیمیایی	فرمول ساختاری
ایمیداکلوپراید	Confidor	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	
استامی پراید	Mospilan	$C_{10}H_{11}ClN_4$	
اسپیروتترامات	Movento	$C_{21}H_{27}NO_5$	
تیاکلوپراید	CaLypso	$C_{10}H_9ClN_4S$	
اسپیرودایکلوفن	Envidor	$C_{21}H_{24}Cl_2O_4$	
آمیتراز	Mitac	$C_{19}H_{23}N_3$	
هگزافلوموران	Consult	$C_{16}H_8Cl_2F_6N_2O_3$	

## ۱-۲-۶ تولید جهانی و صادرات پسته

سه کشور ایران، ایالات متحده و ترکیه بزرگترین کشورهای تولید کننده پسته در جهان می‌باشند. بر طبق آمار منتشر شده از سوی سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد<sup>۱</sup> (FAO) تولید پسته در جهان، از سال ۱۹۹۴ تا ۲۰۱۶ با رشد بیش از ۳ برابری مواجه شد و از ۳۴۸,۴۱۰ تن به ۱,۰۵۷,۵۶۶ تن در سال افزایش یافت [۱۲].



شکل ۱-۳ نمودار تولید جهانی پسته در جهان از سال ۱۹۹۴ تا ۲۰۱۶ بر اساس مرجع ۱۲

در سال ۲۰۱۶ آمریکا با تولید ۴۰۶,۶۴۶ تن در رتبه نخست تولید پسته، ایران با تولید ۳۱۵,۱۵۱ تن و ترکیه با ۱۷۰,۰۰۰ تن به ترتیب جایگاه‌های دوم و سوم را به خود اختصاص دادند. در سالهای اخیر کشور ایالات متحده توانست جای ایران را در رتبه نخست تولید کنندگان پسته بگیرد و کشور چین توانست با رشد ۴ برابری در تولید پسته جایگاه خوبی در بین کشورهای تولید کننده این محصول با ارزش به دست آورد. رتبه‌بندی کشورهای تولید کننده پسته به اختصار در جدول (۱-۲) آورده شده است.

<sup>۱</sup> Food and Agriculture Organization of the United Nations

جدول ۱-۲ رتبه بندی کشورها بر اساس میزان تولید پسته در سال ۲۰۱۶

رتبه	کشور	وزن (تن)
۱	ایالات متحده	۴۰۶,۶۴۶
۲	ایران	۳۱۵,۱۵۱
۳	ترکیه	۱۷۰,۰۰۰
۴	چین	۸۳,۳۱۰
۵	سوریه	۵۶,۸۳۳
۶	یونان	۶,۳۳۸
۷	ایتالیا	۳,۶۴۹
۸	تونس	۳,۴۰۰
۹	افغانستان	۲,۸۱۴
۱۰	اسپانیا	۲,۴۱۸

در ایران استان کرمان بیشترین سهم را در تولید و صادرات پسته دارد. استان کرمان (شهرستان‌های رفسنجان، زرنند، سیرجان و انار) رتبه نخست و استان خراسان رضوی (شهرستان‌های مه ولایت، بردسکن، خوشاب، گناباد و خلیل آباد) در رتبه دوم قرار دارد. استان یزد (شهرستان‌های خاتم، اردکان، مهریز و تفت) در سال‌های اخیر با پیشرفت چشم‌گیری توانست رتبه سوم تولیدکنندگان پسته در ایران را به دست آورد که بیش از ۸۰ درصد مناطق تولید کننده پسته متعلق به این سه استان می‌باشد. متأسفانه در سال‌های اخیر اتفاقاتی مانند کاهش کمیت و کیفیت منابع آبی، اختلالات جوی، نوسانات دمایی، استفاده از سموم وارداتی غیر مجاز و بالا رفتن نرخ ارز تولید پسته را در ایران دچار مشکلاتی کرده است به طوری که استان کرمان که به قطب تولید پسته مشهور است، با کاهش ۸۵ درصدی تولید این محصول مواجه شده است که همین امر سبب شده صادرات پسته تا ۹۰ درصد کاهش پیدا کند. در سال‌های اخیر باغات پسته در استان مرکزی کمتر از سایر باغات پسته در ایران آسیب دیدند و توانست رتبه نخست تولید پسته ایران را به خود اختصاص بدهد [۱۳].



## ۱-۳ آفت‌کش‌ها

آفت‌کش به یک ماده یا مخلوط چند ماده با همدیگر گویند که برای از بین بردن آفات استفاده می‌شوند [۱۴]. این عبارت گستره وسیعی از ترکیبات شامل حشره‌کش‌ها، قارچ‌کش‌ها، علف‌کش‌ها، نماتدکش‌ها، کشنده جانوران جوانه، نرم تنان و غیره را پوشش می‌دهد.

اولین آفت‌کش شناخته شده گوگرد می‌باشد که حدود ۴۵۰۰ سال پیش سومریان باستان در بین‌النهرین از آن استفاده می‌کردند. پس از جنگ جهانی دوم، آفت‌کش‌های شیمیایی به عنوان مهمترین روش برای کنترل آفات معرفی شدند. دو نسل از آفت‌کش‌ها وجود دارند: اولین نسل به قبل از سال ۱۹۴۰ میلادی باز می‌گردد که شامل ترکیباتی مانند آرسنیک، جیوه و سرب بودند و به دلیل سمیت بسیار بالا کنار گذاشته شدند. دومین نسل، از ترکیبات آلی سنتزی تشکیل شده بودند و هنوز هم مورد استفاده قرار می‌گیرند. مصرف آفت‌کش‌های نسل دوم بعد از آنکه پل مولر<sup>۱</sup> سم DDT<sup>۲</sup> را در سال ۱۹۳۹ کشف کرد، شتاب گرفت [۱۵]. در میان تمام آفت‌کش‌ها، حشره‌کش‌های آلی کلردار<sup>۳</sup> (OC) به طور موفقیت آمیزی در کنترل تعدادی از بیماری‌ها مانند تیفوس و مالاریا موثر واقع شدند. معرفی سایر حشره‌کش‌های مصنوعی مانند ترکیبات آلی فسفره<sup>۴</sup> (OP) (۱۹۶۰ میلادی)، کربامات‌ها<sup>۵</sup> (۱۹۷۰ میلادی)، پیرتروئیدها<sup>۶</sup> (۱۹۸۰ میلادی) و معرفی علف‌کش‌ها و قارچ‌کش‌ها (در بین سال‌های ۱۹۷۰ تا ۱۹۸۰) به میزان زیادی در کنترل آفات و ازدیاد محصولات کشاورزی نقش داشتند. در حالت ایده‌آل، آفت‌کش باید به آفات هدف حمله کند و برای گونه‌های غیر هدف از جمله انسان مضر نباشد [۱۶].

---

<sup>1</sup> Paul Muller

<sup>2</sup> Dichlorodiphenyltrichloroethane

<sup>3</sup> Organo Chlorine

<sup>4</sup> Organo Phosphate

<sup>5</sup> Carbamate

<sup>6</sup> Pyrethroid

### ۱-۳-۱ مزایا و مضرات استفاده از آفت‌کش‌ها

با توجه به افزایش جمعیت و تغییر رژیم غذایی مردم در کشورهای در حال توسعه، تقاضا برای تولید مواد غذایی بیشتر و با کیفیت‌تر ۷۰ درصد افزایش یافته است. افزایش زمین‌های کشاورزی موجب از بین رفتن زیست‌گاه‌های حیات وحش، کمبود آب و افزایش هزینه‌ها می‌شود. طبق تحقیقات انجام گرفته ۳۵ درصد محصولات قبل از برداشت توسط آفات از بین می‌روند، لذا به کار بردن آفت‌کش می‌تواند توان تولیدی و کیفیت محصولات را افزایش دهد. تولید محصولات بیشتر مزایای زیادی مانند کاهش گرسنگی، کاهش قیمت محصولات، ایجاد فرصت‌های شغلی و افزایش رونق اقتصادی کشورها را به همراه دارد [۱۷]. فروش عمومی آفت‌کش‌ها به ویژه در کشورهای کم درآمد نظیر کشورهای آفریقایی و همچنین عدم وجود یک چهارچوب نظارتی کافی، این مواد را تبدیل به یک آلوده کننده عمومی کرده است. حدود ۳۰ درصد از آفت‌کش‌های موجود در بازار استانداردهای بین‌المللی را ندارند و تهدیدی برای سلامت انسان و محیط زیست به شمار می‌آیند. برای مثال آفت‌کش DDT در دهه‌های ۱۹۴۰ تا ۱۹۶۰ برای کنترل مالاریا و تیفوس مورد استفاده قرار گرفت و به دلیل پایداری زیاد و اثرات مضر بر حیات وحش ممنوع شد. دی‌ان‌های حلقوی<sup>۱</sup> برای کنترل موربانه‌ها و مورچه‌ها به کار برده شدند، ولی این آفت‌کش‌ها به گلبول قرمز می‌چسبند و در کبد ذخیره می‌شوند. همچنین دی‌کلرووس<sup>۲</sup> برای کنترل کک در گربه‌ها و سگ‌ها به کار برده شد، اما این آفت‌کش باعث فساد و زوال سلول می‌شود و روی DNA نیز تاثیر می‌گذارد. به‌طور کلی بسیاری از داده‌های آزمایشگاهی و مطالعه بر روی انسان‌ها، حیوانات و محیط زیست نشان می‌دهد که بسیاری از آفت‌کش‌ها می‌توانند برای سلامتی مضر باشند و حیوانات وحشی و آبی نیز از این قاعده مستثنی نیستند. بسیاری از دولت‌ها مدیریت و نظارت بر استفاده از نوع و مقدار آفت‌کش‌ها را بسیار جدی می‌دانند تا سلامت انسان و محیط زیست را تضمین کنند [۱۷، ۱۸].

<sup>۱</sup>Cyclodienes

<sup>۲</sup>Dichlorvos

## ۱-۳-۲ باقیمانده آفت‌کش‌ها

به مقداری از آفت‌کش‌ها که بر روی محصولات یا درون آنها پس از عرضه به بازار، باقی می‌مانند باقیمانده آفت‌کش می‌گویند.

سازمان جهانی بهداشت<sup>۱</sup> (WHO) بر پایه‌ی اطلاعات آماری ۱۹ کشور، تخمین زده است سالانه ۵۰۰۰ مورد مرگ بر اثر مسمومیت با آفت‌کش‌ها رخ می‌دهد. تخمین زده می‌شود که شمار واقعی مسمومیت‌ها در جهان به میزان قابل توجه دو میلیون نفر در سال باشد که حدود چهل هزار نفر از این تعداد منجر به مرگ می‌شوند. نکته جالب در خصوص آمارهای ارائه شده این است که به دلیل عدم نظارت کافی ۷۰ درصد این مسمومیت‌ها در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد [۱۹].

میزان باقیمانده آفت‌کش‌ها به پارامترهایی مانند دوز مصرفی، شرایط محیطی و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مولکول‌های آفت‌کش بستگی دارد. برای پی بردن به میزان مقاومت آفت‌کش‌ها در شرایط مختلف میزان نیمه عمر آن را اندازه می‌گیرند و این نیمه عمر با توجه به جنس خاک، شرایط آب و هوایی، دوز مصرفی، pH خاک و غیره ممکن است روزها، ماه‌ها و یا سال‌ها طول بکشد. برخی از راه‌کارهای ارائه شده (برای مثال شستن میوه و سبزیجات با آب نمک، سدیم بی‌کربنات، زردچوبه، سرکه و یا الکل) باعث حذف و یا کم شدن این مقدار باقیمانده سموم شده است. فرآیند پوست‌گیری نیز گامی موثر برای از بین بردن آفت‌کش‌هایی است که قدرت نفوذ کمی دارند و روی پوست محصولات باقی می‌مانند. همچنین فرآیند پختن، حرارت یا جوشاندن با توجه به زمان حرارت دادن و نوع آفت‌کش بسیار موثر واقع می‌شود. خشک کردن برای برخی خواربارها مانند کشمش، شستن با آب گرم برای مواد روغنی مانند زیتون نیز راه‌حل‌های مفیدی برای از بین بردن باقیمانده آفت‌کش‌ها می‌باشد. سرد کردن، منجمد کردن، تخمیر کردن، عصاره‌گیری، آب میوه‌گیری و آسیاب کردن نیز از جمله راه‌کارهای موثر برای کاهش یا حذف باقیمانده آفت‌کش‌ها هستند [۲۰، ۲۱].

---

<sup>1</sup> World Health Organization

هر کشوری طبق شرایط محیطی و سیاست‌های خود حداکثر مقدار باقیمانده<sup>۱</sup> (MRL) و مصرف روزانه قابل قبول<sup>۲</sup> (ADI) را برای هر آفت کش تصویب می‌کند. برخی از کشورها از MRL های بین‌المللی که توسط کدکس<sup>۳</sup> معرفی می‌شود، برای تعریف حدود باقیمانده‌ها استفاده می‌کنند. این MRL ها توسط سازمان غذا و کشاورزی ملل متحد (FAO) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) در سال ۱۹۶۳ برای توسعه استانداردهای غذایی منتشر شد. در حال حاضر کدکس ۱۸۵ عضو کشوری و ۱ عضو سازمانی دارد. در جدول (۳-۱) لیستی از برخی از MRL های تصویب شده آمده است.

جدول ۳-۱ برخی از MRL های تصویب شده توسط کدکس

MRL (mg/kg)	نام محصول آزمایش شده	آفت کش
۴ ۲ ۵۰	گیلاس زیتون (برای تولید روغن) چای (سیز، سیاه و خشک شده)	ایمیداکلوپراید (Imidacloprid)
۰/۱ ۰/۳ ۰/۱	هل خیار لفل سیاه و سفید	استامی پراید (Acetamiprid)
۰/۱۵ ۰/۰۲ ۰/۰۴	نخود خشک تخم مرغ سیب زمینی	استوکلر (Acetochlor)
۳ ۰/۳ ۰/۰۵	بلوبری انگور نخود فرنگی	بای فنتراین (Bifenthrin)
۰/۸ ۰/۵ ۱/۵	سیب گندم آناناس	ادفون (Ethephon)
۱۰ ۰/۵ ۰/۸	بادام آجیل سیب زمینی	اسپیروتترامات (Spirotetramat)

<sup>1</sup> Maximum Residue Limits

<sup>2</sup> Acceptable Daily Intake

<sup>3</sup> CODEX

### ۱-۳-۳ مروری بر روش‌های اندازه‌گیری باقیمانده آفت‌کش‌ها

اندازه‌گیری باقیمانده آفت‌کش‌ها برای سلامت انسان و محیط زیست بسیار مهم و ضروری می‌باشد. جوامع مختلف با توجه به سلامت مردمان خود و بهداشت محیط اطراف آنان می‌توانند برای آینده و پیشرفت کشورشان برنامه‌ریزی کنند. از حدود ۶۰ سال قبل، اندازه‌گیری باقیمانده‌ی آفت‌کش‌ها در نمونه‌های زیست محیطی و تغذیه‌ای توسط مراکز دولتی و خصوصی، در سراسر جهان انجام می‌شود. ولی در آن زمان توقعات کمتری از نظر مصرف حلال‌ها، زمانبر بودن آنالیز و اتوماتیک نبودن برای اندازه‌گیری نمونه‌های تجزیه‌ای وجود داشت. در حال حاضر با توجه به پیشرفت تجهیزات آزمایشگاهی و روی کار آمدن دستگاه‌های مدرن، روش‌های تجزیه‌ای موثرتر، سریع‌تر و دقیق‌تری برای آنالیز باقیمانده آفت‌کش‌ها استفاده می‌شود که باعث بهبود کیفیت و کارایی آزمایشگاه‌های تجزیه‌ای و تضمین سلامت جوامع می‌گردد.

بی‌شک موثرترین شیوه آنالیز آفت‌کش‌ها، روش چند منظوره<sup>۱</sup> (MRM) می‌باشد که با استفاده از آن با یک بار آنالیز می‌توان چند آنالیت را اندازه‌گیری کرد. اولین MRM قابل توجه روش میلز<sup>۲</sup> بود که در سال ۱۹۶۰ توسط شخصی با همین نام در سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا<sup>۳</sup> (FDA) توسعه یافت [۲۲]. در آن زمان تمرکز اصلی اندازه‌گیری آفت‌کش‌ها بر روی حشره‌کش‌های آلی کلردار (OCs) غیرقطبی بود. در روش میلز آفت‌کش‌های آلی کلردار و سایر آفت‌کش‌های غیرقطبی در غذاهای کم چرب و پرچرب با استونیتریل و اضافه کردن آب به آن، سپس توسط یک حلال غیر قطبی مانند پترولیوم اتر<sup>۴</sup> یا هگزان استخراج می‌شود. در نتیجه آفت‌کش‌های تقریباً قطبی مانند برخی از حشره‌کش‌های آلی فسفره (OPs) تا حدی در این روش از دست می‌رفتند.

---

<sup>1</sup> Multi Residual Method

<sup>2</sup> Mills

<sup>3</sup> U.S Food & Drug Administration

<sup>4</sup> Petroleum ether

نیاز به اندازه‌گیری حشره‌کش‌های آلی فسفره‌ی قطبی‌تر و سایر آفت‌کش‌ها در کشاورزی، سرآغاز توسعه‌ی روش‌های جایگزین برای اندازه‌گیری ترکیبات استخراج نشده با روش میلز بود. در سال ۱۹۶۴ استورهر<sup>۱</sup> و همکارانش یک روش برای تعیین آفت‌کش‌های آلی فسفره ارائه کردند. این روش، اصلاح شده روش میلز بود که استخراج اولیه با استونیتریل انجام و سپس مرحله تقسیم و پاکسازی با حلال دیگری انجام شد و دستگاه اندازه‌گیری نیز تغییر می‌کرد [۲۳،۲۲].

در دهه‌ی ۱۹۷۰ روش لوک<sup>۲</sup> و همکارانش باعث گسترش محدوده قطبیت آفت‌کش‌های مورد اندازه‌گیری شد و این روش موجب گشت تا حشره‌کش‌های OCs، OPs و آلی نیتروژن‌دار<sup>۳</sup> (ONs) در یک آنالیز استخراج شوند. MRM ها در این روش با روش میلز تفاوت کمی داشتند و در آن‌ها به جای استونیتریل از استون برای استخراج استفاده شد ولی همچنان از حلال‌های غیرقطبی (دی‌کلرومتان یا پترولیوم اتر) استفاده می‌شد. همچنین افزودن نمک سدیم کلرید در طول استخراج مایع-مایع در تمام روش‌ها باعث بهتر شدن کارایی استخراج می‌شود زیرا این نمک روی قطبیت نمونه‌ها اثر مستقیم می‌گذارد [۲۴]. نمک جامد باعث اشباع شدن فاز آبی می‌شود که همین امر باعث می‌شود استون بیشتری به فاز آلی وارد شود در نتیجه قطبیت را افزایش می‌دهد و باعث افزایش بازیابی ترکیبات قطبی می‌شود. پس از مدت کوتاهی روش لوک به عنوان روش رسمی در انجمن رسمی کشاورزی و شیمی<sup>۴</sup> (AOAC) تحت عنوان 985.22 به عنوان روش رسمی منتشر شد [۲۵]. این MRM ها و مدل‌های اصلاح شده آنها به طور گسترده توسط آزمایشگاه‌های نظارتی باقیمانده‌ی آفت‌کش‌ها در سراسر جهان استفاده می‌شدند. پس از گذشت حدود یک دهه، استفاده از حلال‌های کلردار به دلیل سمی بودن آنها خطرناک محسوب می‌شدند که همین امر موجب شد محققان به سمت روش‌های جدید استخراج حلال سوق داده شوند.

---

<sup>1</sup> Storherr

<sup>2</sup> Luck

<sup>3</sup> Organonitrogen

<sup>4</sup> Association of Official Agricultural Chemists

اسپچت<sup>۱</sup> و همکارانش از مخلوط سیکلوهاگزان- اتیل استات (۷/۷:۱) به جای دی کلرومتان یا پترولیوم اتر استفاده کردند [۲۶]. کاسانوا<sup>۲</sup> و نوردن میر<sup>۳</sup> از فاز جامد (SPE) برای استخراج آفت کش ها از عصاره‌ی استخراجی استون رقیق شده، استفاده نمودند و به این ترتیب از استخراج مایع-مایع اجتناب شد [۲۷]. لوک و همکارانش برای جدا کردن آب از استون در عصاره استخراجی اولیه، از مخلوط فروکتوز، منیزیم سولفات و سدیم کلرید استفاده کردند بدین ترتیب حلال‌های غیر قطبی حذف شدند [۲۸]. پارفیت<sup>۴</sup> با استفاده از همان روش لوک استخراج را انجام داد و عصاره‌های استخراجی را در دمای پایین قرار داد که با این عمل فاز آبی منجمد و از محلول حذف می‌شود. همه‌ی این روش‌های جداسازی یک اشکال اساسی داشتند و آن امتزاج پذیری بالای آب و استون با یکدیگر در جریان حذف حلال‌های غیر قطبی از روش لوک بود. برای حل این مشکل مجدداً استونیتریل به جای استون به کار برده شد و با افزودن نمک‌ها (روش Salting out)، استونیتریل راحت‌تر از آب جدا می‌شود [۲۹، ۳۰]. برای حذف حلال‌های غیر قطبی، لی<sup>۵</sup> و همکارانش از سدیم کلرید استفاده کردند که با وجود نمک‌هایی مانند سدیم کلرید جداسازی استونیتریل از آب بسیار رضایت بخش بود [۳۱]. چندین MRM دیگر نیز منتشر شد که استونیتریل به همراه نمک‌ها برای استخراج استفاده شدند [۳۲، ۳۳]. حلال دیگری که در MRM ها استفاده شد اتیل استات بود. اتیل استات مزیت‌هایی مانند امتزاج پذیری جزئی با آب دارد که افزودن سایر حلال‌های غیرقطبی برای جداسازی آب از عصاره‌ی استخراجی را غیرضروری می‌کند، همچنین محدوده‌ی قطبیت وسیع‌تری برای آنالیز انواع آفت کش‌ها فراهم می‌کند. مشکل اتیل استات این است که برخی از آفت‌کش‌ها با قطبیت بالا وارد فاز اتیل استات نمی‌شوند که برای حل این مشکل مقدار زیادی

---

<sup>1</sup> Specht

<sup>2</sup> Casanova

<sup>3</sup> Nordenmir

<sup>4</sup> Parfitt

<sup>5</sup> Lee

از سدیم سولفات ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) به مرحله استخراج افزوده می‌شود. حلال‌های قطبی مانند متانول و اتانول نیز برای افزایش قطبیت فاز آلی استفاده شدند [۳۴-۳۶]. مصرف حلال اتیل استات یک مشکل دیگر نیز به همراه داشت و آن استخراج بیش از اندازه ترکیبات غیرقطبی مانند لیپیدها و مواد موم (epicuticular) می‌باشد که قبل از اندازه‌گیری توسط دستگاه‌ها باید حذف شوند. برای رفع این مشکل از یک مرحله پاکسازی وقت‌گیر کروماتوگرافی ژل تراوا (GPC)<sup>۱</sup> استفاده می‌شود. در دهه‌های اخیر، کاهش مصرف حلال‌ها و کارهای دستی اهمیت پیدا کرد که همین عوامل منجر به معرفی روش‌های استخراجی جایگزین از جمله استخراج با سیال فوق بحرانی (SFE)<sup>۲</sup> در سال‌های ۱۹۹۴-۱۹۹۷ [۳۹-۳۷]، استخراج مایع تحت فشار (PLE)<sup>۳</sup> در سال‌های ۱۹۹۶-۱۹۹۷ [۴۱،۴۰]، ماتریس پخشی فاز جامد (MSPD)<sup>۴</sup> در سال‌های ۱۹۹۵-۲۰۰۰ [۴۲-۴۴]، استخراج میکرو فاز جامد (SPME)<sup>۵</sup> در سال‌های ۱۹۹۷-۲۰۰۰ [۴۵-۴۷] و استخراج با امواج مایکروویو (MAE)<sup>۶</sup> در سال ۱۹۹۷ [۴۸] شد. روش‌های ارائه شده مزایای زیادی دارند ولی تاکنون هیچ‌کدام از این تکنیک‌ها نتوانستند بر تمامی نقایص غلبه کنند تا بتوان یک روش مفید چند منظوره را برای آنالیز تمامی آفت‌کش‌ها به کار برد. برای مثال روش MAE دارای مزایایی مانند مصرف حلال کمتر، راندمان استخراج بالاتر، سادگی و هزینه کمتر می‌باشد ولی دارای نقایصی مانند کارایی پایین استخراج برای حلال‌های غیرقطبی و حلال‌هایی با فراریت بالا، همچنین ایزومریزاسیون یا تخریب نمونه در اثر استفاده از انرژی بالای میکروویو می‌باشد [۴۹].

---

<sup>1</sup>Gel Permeation Chromatography

<sup>2</sup>Supercritical Fluid Extraction

<sup>3</sup>Pressurized Liquid Extraction

<sup>4</sup>Matrix Solid-Phase Dispersion

<sup>5</sup>Solid-Phase Micro Extraction

<sup>6</sup>Microwave-Assisted Extraction



دو روش PLE و SFE دارای تکنیک‌هایی بر پایه‌ی دستگاه هستند که استخراج‌ها در مدهای پی‌درپی و نیمه خودکار انجام می‌شوند ولی به مراحل دستی زمان‌بر و مواد تخصصی برای تمیز کردن دستگاه و هزینه‌ی بالای نگهداری دستگاه نیاز است. روش‌های MSPD و SPME گستردگی زیادی برای یک روش تجزیه‌ای فراهم نمی‌کند.

در پایان باید عنوان کرد با وجود MRM های بسیار زیاد که توصیف شده اند، هیچ یک به درستی موثر نبوده‌اند و نمی‌توانند تمامی ویژگی‌های لازم مانند سرعت بالای آنالیز، آسان بودن، بازیابی بالا، کم بودن مراحل (جهت افزایش دقت)، کم بودن دخالت فردی، مصرف کم واکنشگرهای شیمیایی، انتخاب‌پذیری بالا و تکرار پذیری را برای گستره‌ی وسیعی از آنالیت‌ها فراهم کنند. از این رو گسترش و معرفی MRM های جدید مورد توجه تجزیه‌دانان می‌باشد [۵۰].

## ۱-۴ روش کچرز

آنالیز باقیمانده آفت‌کش‌ها در نمونه‌های غذایی و محیطی، در تعداد زیادی از کشورها و آزمایشگاه‌های اختصاصی در سراسر جهان انجام می‌شود. با در نظر گرفتن تحولات و پیشرفت‌های جدید در بخش کشاورزی، معرفی یک روش جدید، سریع‌تر و موثرتر ضروری به نظر می‌رسد. در سال‌های اخیر روش نوین با کارایی بالا برای آماده‌سازی نمونه‌ها با بافت پیچیده معرفی شد که در حال حاضر یک روش عمومی محسوب می‌شود. این روش می‌تواند ترکیباتی با خواص فیزیکی و شیمیایی متفاوت را هم‌زمان اندازه‌گیری کند. این روش برای اولین بار در سال ۲۰۰۳ توسط آناستاسیادس<sup>۱</sup> و همکارانش برای آنالیز باقیمانده چندین آفت‌کش در میوه‌ها و سبزیجات معرفی شد. کچرز (QuEChERS) مخفف کلمات سریع (Quick)، آسان (Easy)، ارزان (Cheap)، موثر (Effective)، نیرومند (Rugged) و ایمن (Safe) می‌باشد و کچرز تلفظ می‌شود که به خوبی ویژگی‌های این روش را بیان می‌کند. این ویژگی‌ها به اختصار در بندهای (الف) تا (و) توضیح داده می‌شود [۵۰].

---

<sup>1</sup> M.Anastassisdes

**الف) سریع:** بدین معنی که دارای سرعت تهیه نمونه بالایی است و در مدت زمان ۳۰-۱۵ دقیقه می‌توان ۱۲-۶ نمونه را آماده‌سازی کرد.

**ب) آسان:** نیاز کمتری به دستکاری نمونه<sup>۱</sup> دارد و مراحل آماده‌سازی در آن کم است.

**ج) ارزان:** حلال‌ها و مواد جاذب بسیار کمی نیاز دارد و همچنین نیاز به تجهیزات پیچیده آزمایشگاهی ندارد. اگر امکانات ساده آزمایشگاهی برای هم‌زدن و سانتریفیوژ موجود باشد، می‌توان نمونه‌های مختلفی را آماده‌سازی و آنالیز کرد.

**د) موثر:** بازیابی بالایی برای طیف وسیعی از گونه‌های غذایی ارائه می‌دهد.

**ه) نیرومند:** این روش، برای تعداد زیادی از آفت‌کش‌ها با محدوده‌ی گسترده‌ای از قطبیت و فراریت به کار برده شده است. بررسی مقالات نشان می‌دهد که بیش از ۳۰۰ آلاینده‌ی آلی با استفاده از روش کچرز آماده‌سازی شده‌اند که این ویژگی سبب شده، روش کچرز به طور گسترده مورد توجه قرار گیرد به طوری که به عنوان یک روش مدرن در لیست روش‌های آزمایشگاهی قرار گرفته است.

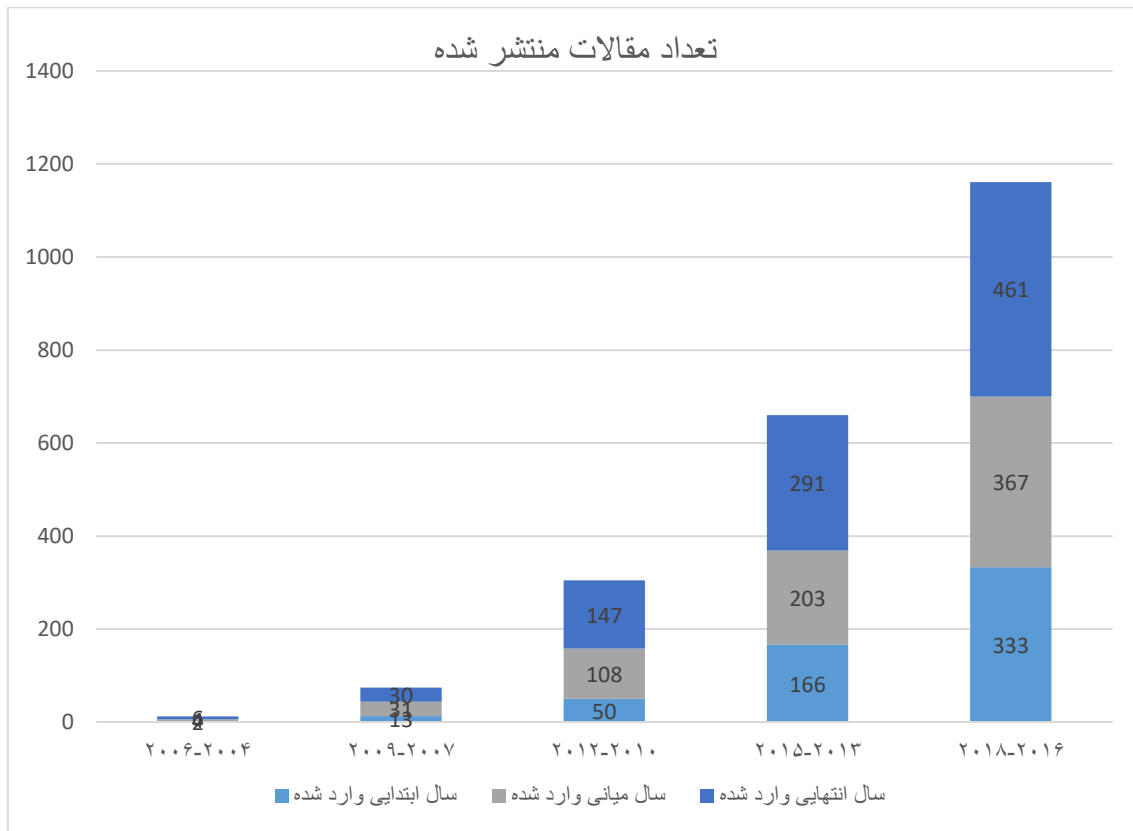
**و) ایمن:** استفاده از حلال‌ها و مواد زائد خطرناک را به شدت کاهش می‌دهد به طوری که استفاده از حلال‌های کلردار در این روش غیر ضروری است.

کچرز نتایج مطلوبی را برای اندازه‌گیری باقیمانده آفت‌کش‌ها در میوه‌ها و سبزیجات داشته است و برای نمونه‌هایی با بافت چرب (۲۰-۲ درصد چربی) نیز به کار برده می‌شود. بافت‌های چرب شامل ترکیبات آبدوست و آب‌گریز هستند و روش کچرز به عنوان روشی که هم‌زمان آنالیت‌هایی با قطبیت متفاوت را تعیین می‌کند در این بافت‌ها استفاده می‌شود. از جمله این بافت‌ها می‌توان به شیر، عسل، میوه‌ها، تخم‌مرغ، مرغ، غذاهای دریایی، گوشت و صنایع آرایشی و بهداشتی اشاره کرد [۶۱-۵۱].

---

<sup>1</sup> Sample treatment

شکل (۴-۱) نمودار استفاده از روش کچرز را در سال‌های اخیر نشان می‌دهد.



شکل ۴-۱ تعداد مقالات منتشر شده در به‌کارگیری روش کچرز در بین سال‌های ۲۰۰۴-۲۰۱۸ (استخراج شده از Science direct)

جدول (۴-۱) نیز کاربرد روش آماده‌سازی کچرز را برای گونه‌های متفاوت نشان می‌دهد، این روش انعطاف‌پذیری بالایی دارد و با توجه به خصوصیات آنالیت مورد نظر، بافت نمونه و تجهیزات موجود، قابل تغییر است [۶۱].

مخترعان روش کچرز ادعا کرده‌اند که کاهش مقدار نمونه باعث بهبود کارایی استخراج می‌شود و از طرف دیگر هزینه و مصرف حلال‌ها را کاهش می‌دهد. در آزمایش‌های انجام شده نسبت نمونه به حلال در کارایی استخراج بسیار موثر است و بهترین نتیجه در نسبت ۱ : ۱ به دست آمده است [۵۰].

جدول ۴-۱ استفاده از روش کچرز برای آماده‌سازی نمونه‌ها

منابع	روش آنالیز	بازیابی	LOQ (µg/kg)	ویژگی‌های مدل کچرز	محیط نمونه	آنالیت
[۶۲]	LC-MS/MS	۷۱-۱۱۸	۰/۵	مقایسه پاکسازی کچرز با D-SPE	دارچین	۶۰ آفت کش
[۶۳]	LC-MS/MS	۷۱-۱۲۰	۰/۰۲۸-۳۱	استخراج توسط استایرن-دیوینیل بنزن کوپلیمر	محصولات آبی	۱۳ نوع از ترکیبات پرفورورین
[۶۴]	GC-MS	۷۲-۱۲۰	< ۱۰	بهینه‌سازی با طرح باکس- بهنکن	شیر و محصولات لبنی	۲۵ نوع از آفت کش
[۶۵]	IC-FLD/UV	۷۶/۳-۱۱۲	۰/۰۰۲۲-۰/۰۲	روش کچرز یون اصلاح و کوچک شده	میوه‌ها و شیر	دو تنظیم‌کننده رشد گیاهان
[۶۶]	LC-MS/MS	۸۵-۱۱۷	۶/۱-۶/۶	روش کچرز اصلاح شده با تنظیم pH توسط HCl	خاک	ایمیدازولینون و ایمازاپیک
[۶۷]	UHPLC-MS/MS	۹۴-۱۰۴	۰/۰۱	مقایسه چهار روش استخراج	ژامبون گوشت	سیکلوپیازونیک اسید
[۶۸]	UHPLC-MS/MS	۷۳-۱۱۰	۱۰-۲۵	روش رسمی AOAC	کاهو، چغندر، عسل، سویا	پروپوکسیکاربازون و متابولیت‌های آن
[۶۹]	HPLC-FLD	۷۵/۸-۹۳/۸	۳/۵-۹/۸	مقایسه کچرز با DLLE <sup>۱</sup> و مقایسه پاکسازی کچرز با SPME	شیر	۹ آفت‌کش بیسفنول‌ها
[۷۰]	LC-MS/MS	۷۰-۱۲۰	<MRLs ۱۰٪	روش بافری سیترات	لفل شیرین	۱۳ آفت‌کش
[۷۱]	GC-MS/MS	۷۵-۱۲۲	<MRLs ۱۰٪	پاکسازی با MgSO <sub>4</sub> و C <sub>18</sub> و GCB	لجن‌های فاضلاب	فیلترهای فرابنفش

<sup>1</sup> Dispersive Liquid-Liquid Extraction

ادامه جدول ۱-۴ استفاده از روش کچرز برای آماده‌سازی نمونه‌ها

منابع	روش آنالیز	بازیابی	LOQ ( $\mu\text{g/kg}$ )	ویژگی‌های مدل کچرز	محیط نمونه	آنالیت
[۷۲]	HPLC-MS/MS	۸۷-۱۱۲	۰/۴۶-۱/۱۵	پاکسازی با $\text{C}_{18}$ ، PSA و $\text{MgSO}_4$	خون و ادرار انسان	۶ آفت کش
[۷۳]	LC-MS/MS	۸۰-۱۱۳/۷	<۰/۳	پاکسازی با آلومینیوم نیتريد و $\text{C}_{18}$	ماهی، میگو، لاک پشت و مار ماهی	مبندازول، آلبندازول، لوامیسول و متابولیت‌های آنان
[۷۴]	Lp-GC-MS/MS	۷۰-۱۲۰	۰/۰۵	استخراج با استونیتریل و پاکسازی با جاذب‌هایی بر پایه زیرکونیوم	گره ماهی	۱۴۰ آفت کش
[۷۵]	UHPLC-MS/MS	-۱۱۴/۶ ۶۰/۵	۰/۱-۱۷/۳	کچرز اصلاح شده بر اساس نانو لوله‌های کربنی چند منظوره	تخم مرغ	تعیین همزمان داروهای دامپزشکی، سموم دفع آفات و میکو کوتوکسین‌ها
[۷۶]	GC-MS	۷۰-۱۱۲	۰/۰۰۳	روش بافری سیترات، بدون نیاز به پاکسازی	لفل، خیار، گوجه‌فرنگی، پرتغال و توت فرنگی	۱۴ آفت کش بیوشیمیایی
[۷۷]	LC-MS/MS	۷۴-۱۱۵	۰/۲-۵	پاکسازی با یک فیلتر چند کاره	تخم مرغ	۵۸ آفت کش
[۷۸]	GC-MS/MS	۷۹-۸۷/۹	۰/۴-۱/۳	استخراج با منیزیم سولفات، سدیم کربنات و سدیم کلرید	آب سیب	اندازه‌گیری پاتولین
[۷۹]	HPLC-MS/MS	۹۰-۱۰۳	۲	استخراج با استونیتریل قلیایی شده با یک درصد آمونیاک	سیب‌زمینی و خیار	اندازه‌گیری سریع ethylenethiourea (ETU)

## ۱-۴-۱ مراحل انجام روش کچرز

روش کچرز از دو مرحله تشکیل شده است:

**الف) مرحله استخراج:** پایه‌ی این مرحله بر اساس توزیع ترکیب یا ترکیبات مورد نظر بین فاز آبی و فاز آلی انجام می‌گیرد. مکانیسم این مرحله شبیه به استخراج مایع-مایع معمولی است و از حلال‌های آلی به عنوان فاز استخراج کننده استفاده می‌شود. این حلال‌ها باید دارای ویژگی‌هایی مانند استخراج کمترین میزان بافت نمونه، حلالیت بالا برای طیف وسیعی از ترکیبات با قطبیت متفاوت، قابلیت جداسازی آسان از فاز آبی، گزینش‌پذیری بالا با آنالیت یا آنالیت‌های مورد نظر، متناسب با تکنیک آنالیزی مورد استفاده (به‌خصوص در تکنیک‌های کروماتوگرافی) و سازگار با محیط‌زیست باشند. از جمله این حلال‌ها می‌توان به استون، اتیل استات، متانول، اتانول و استونیتریل اشاره کرد [۷۹-۸۳].

متداول‌ترین حلال استونیتریل می‌باشد زیرا دارای گزینش‌پذیری بالا، سازگار با سیستم کروماتوگرافی، حلالیت محدود لیپیدها و دامنه وسیعی از آفت‌کش‌ها را پوشش می‌دهد. همچنین پس از افزودن نمک‌ها جدایی فاز در استونیتریل بهتر از استون می‌باشد که همین امر منجر به افزایش درصد بازیابی آفت‌کش‌ها با قطبیت زیاد می‌شود [۵۰]. مشکل استفاده از اتیل استات این است که اکثر ترکیبات قطبی در آن به راحتی استخراج نمی‌شوند و می‌بایست مقدار نمک زیادی برای استخراج به فاز آلی افزوده شود. همچنین احتمال استخراج چربی‌ها و واکس‌ها در آن بیشتر از استونیتریل است که همین امر موجب کاهش بازیابی در آفت‌کش‌های اسیدی و بازی می‌شود. [۸۲, ۸۱, ۵۰]. استفاده از نمک‌های معدنی در مخلوط فاز آبی و فاز آلی قابل امتزاج با هم، باعث جدایی حلال آلی از مخلوط و تشکیل دو فاز می‌شود که این جدایی فاز به پدیده Salting-Out نسبت داده می‌شود. این اثر باعث کاهش حلالیت آنالیت‌ها در فاز آبی و افزایش انتقال آن‌ها به فاز آلی و در نتیجه افزایش بازدهی استخراج می‌شود. و از نمک‌های به کار برده شده در این مرحله منیزیم سولفات ( $MgSO_4$ )، سدیم استات ( $CH_3COONa$ )، منیزیم دی کلرید ( $MgCl_2$ )، لیتیم کلرید ( $LiCl$ )، سدیم نترات ( $NaNO_3$ ) و سدیم کلرید ( $NaCl$ ) می‌باشند. درصد

بازیابی آنالیت به نوع و مقدار نمک‌های به کار برده شده در مرحله Salting-Out بستگی دارد. زیرا غلظت و نوع نمک می‌تواند روی درصد آب موجود در استونیتریل تاثیر بگذارد و قطبیت آن را تنظیم کند. آناستاسیادس و همکارانش با استفاده از حلال دوتره  $(CD_3CN)^1$  و رزونانس مغناطیسی هسته<sup>۲</sup> (NMR) اثر نمک‌های مختلف و درصد بازیابی آن‌ها را بررسی کردند که در میان این نمک‌ها منیزیم سولفات بدون آب بهترین اثر (به‌خصوص برای ترکیبات قطبی) و بازیابی را روی استونیتریل دارد [۵۰]. منیزیم سولفات بدون آب علاوه بر Salting out، با جذب آب موجب کاهش حجم فاز آبی شده که همین امر باعث بهبود بازیابی می‌شود. برای اینکه این نمک بالاترین میزان آب را به خود جذب کند مقدار بیش‌تر از حد اشباع به نمونه اضافه می‌گردد. استفاده بیش از حد از این نمک باعث می‌شود که ظرفیت استونیتریل برای توزیع ترکیب‌های قطبی کمتر شود و پدیده لخته شدن<sup>۳</sup> به وجود می‌آید و هم‌زدن را با مشکل مواجه می‌کند [۸۳]. افزودن سدیم کلرید سبب افزایش قدرت یونی محلول و کاهش حلالیت آنالیت در آب می‌گردد و این امر موجب تمایل آنالیت به فاز آلی می‌شود. بنابر آزمایش‌ها بهترین نسبت (منیزیم سولفات : سدیم کلرید) ۱:۴ گزارش شده است [۵۰].

**ب) مرحله پاکسازی:** با توجه به اینکه مرحله‌ی استخراج انتخابی نیست، بنابراین همراه با انتقال آنالیت از فاز آبی به فاز آلی اجزای دیگر بافت نمونه وارد فاز آلی می‌شوند. برای رفع این مشکل مرحله پاکسازی ضروری است. در مرحله‌ی پاکسازی معمولاً از منیزیم سولفات بدون آب به همراه جاذب‌هایی که در استخراج فاز جامد<sup>۴</sup> (SPE) به کار گرفته می‌شوند، استفاده می‌گردد. با این تفاوت که برخلاف SPE معمولی که این جاذب‌ها درون یک کاتریج پر شده‌اند، در روش کچرز به شکل پودر مورد استفاده

---

<sup>1</sup> Acetonitrile-d3

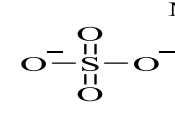
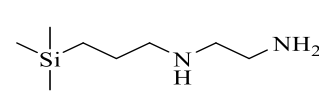
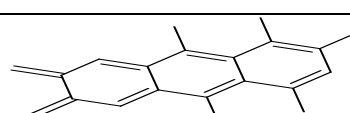
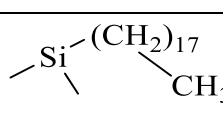
<sup>2</sup> Nuclear Magnetic Resonance

<sup>3</sup> Coagulation

<sup>4</sup> Solid-Phase Extraction

قرار می‌گیرند. به طور معمول به این مرحله، پاکسازی با فاز جامد پخشی<sup>۱</sup> (D-SPE) گفته می‌شود [۸۴،۸۳]. جاذب‌هایی که به طور متداول در این مرحله استفاده می‌شوند عبارتند از: منیزیم سولفات بدون آب، کربن سیاه گرافیتی<sup>۲</sup> (GCB)، آمین نوع اول و دوم<sup>۳</sup> (PSA) و اکتا دسیل پیوند خورده به سیلیکا<sup>۴</sup> (C<sub>18</sub>) که نقش هر کدام از جاذب‌ها به اختصار در جدول (۷-۱) آورده شده است [۸۳-۸۶].

جدول ۱-۵ جاذب‌های مورد استفاده در مرحله پاکسازی روش کچرز

جاذب	کاربرد	شکل مولکولی
منیزیم سولفات (MgSO <sub>4</sub> )	حذف آب از فاز استونیتریلی	$Mg^{2+}$ 
آمین نوع اول و دوم (PSA)	حذف اسیدهای آلی قطبی، پیگمنت‌های قطبی، برخی از قندها و اسیدهای چرب	
کربن سیاه گرافیتی (GCB)	حذف استرول و پیگمنت‌هایی مانند کلروفیل	
اکتا دسیل (C <sub>18</sub> )	حذف مواد متداخل غیر قطبی مانند لیپیدها	

برخی از ماتریس‌های پیچیده جاذب‌های ویژه‌ای دارند. برای مثال جاذب سیلیکای اصلاح شده با زیرکونیا (Z-Sep) و اکتا دسیل پیوند خورده به سیلیکا (Z-SepPlus) که رنگدانه‌ها و چربی‌ها را بهتر حذف می‌کنند [۸۷،۷۴]. آلومینا، فلورسیل، نانو لوله‌های کربنی، نانو ذرات مغناطیسی، گرافن اصلاح شده با آمین و کیتین سایر جاذب‌هایی هستند که می‌توان در این مرحله از آنها استفاده کرد و یا موازی با جاذب‌های دیگر به کار برد [۸۸-۹۳].

<sup>1</sup> Dispersive-Solid Phase Extraction

<sup>2</sup> Graphitized Carbon Black

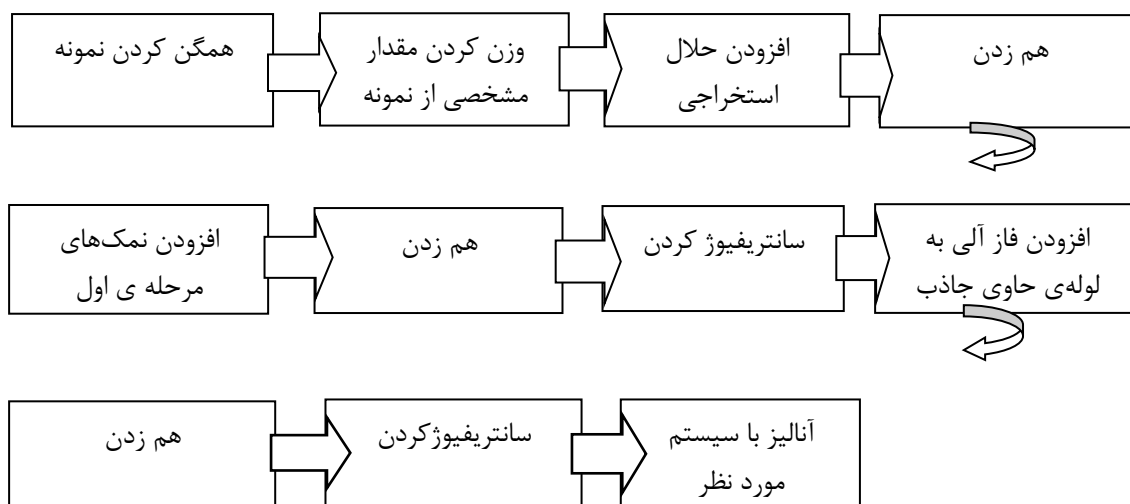
<sup>3</sup> Primary Secondary Amine

<sup>4</sup> Octadecylsilane



همان طور که در شکل (۱-۵) دیده می‌شود روش کچرز با توزین مقدار مشخصی از نمونه همگن شده آغاز می‌شود. پس از توزین، نمونه به داخل لوله سانتریفیوژ منتقل و به دنبال آن حلال‌های استخراج کننده و نمک‌های توزیع کننده افزوده می‌شوند. پس از مدتی هم‌زدن، لوله را درون سانتریفیوژ گذاشته تا جدایی فازها صورت گیرد. تعداد فازهای تشکیل شده به نوع بافت بستگی دارد ولی به طور معمول شامل چهار فاز می‌باشد که به ترتیب از بالا به پایین شامل فاز آلی (حاوی ترکیبات استخراج شده)، بافت نمونه که بسته به نوع نمونه می‌تواند شامل چربی‌ها، رنگدانه‌ها و ترکیبات دیگر موجود در محیط نمونه باشد، لایه‌ی فاز آبی و لایه‌ی نمک‌های حل نشده می‌باشد.

در مرحله‌ی پاکسازی فاز آلی (محلول رویی) به یک لوله‌ی سانتریفیوژ دیگر که حاوی پودرهای جاذب است انتقال داده می‌شود. پس از چند دقیقه هم‌زدن و عمل سانتریفیوژ، محلول حاصل را می‌توان به طور مستقیم، یا با حلال پرانی، رقیق کردن و یا حل کردن مجدد در یک حلال مناسب به دستگاه آنالیز کننده تزریق نمود.



شکل ۱-۵ مراحل انجام روش کچرز [۸۳]

## ۱-۴-۲ دستورالعمل‌های اصلی کچرز

پس از ارائه‌ی روش اصلی، برخی از محققین با انجام تغییرات اندک، روش‌های اصلاح شده کچرز را ارائه کردند. به طور کلی کچرز در سه نسخه معرفی شد:

(۱) روش اصلی غیر بافری<sup>۱</sup>

(۲) روش بافری سیتراستی (CEN 15662)<sup>۲</sup>

(۳) روش بافری استاتی (AOAC official 2007.01)<sup>۳</sup>

روش اصلی غیر بافری، ساده‌ترین و کاراترین نوع روش کچرز می‌باشد که همان نسخه اصلی این روش است و از نمک سدیم کلرید در مرحله استخراج استفاده می‌شود. این روش بازیابی بالایی برای صدها آفت‌کش نشان داده است اما برای آفت‌کش‌هایی که پایداری کمی دارند و وابسته به pH هستند بازیابی کمی را نشان می‌دهد.

لئوتای<sup>۴</sup> و همکارانش تغییراتی را در روش کچرز اصلی ایجاد کردند. در مرحله‌ی اول از سدیم استات برای ایجاد شرایط بافری استفاده شد. آناستادیاتس و همکارانش نیز از شرایط بافری سدیم سیترات استفاده کردند. نسخه با بافر استاتی به یک روش اصلی در کمیته AOAC تبدیل و با نام AOAC official 2007.01 انتشار یافت. نسخه بافر سیتراستی نیز در کمیته استاندارد اروپا با نام CEN 15662 ثبت گردید [۹۵,۹۴,۸۰]. اضافه شدن این دو نسخه سبب شد کچرز طیف بسیار گسترده‌تری از آفت‌کش‌ها را پوشش دهد به طوری که ۱۰۰۰۰-۵۰۰۰ داده برای انواع مختلفی از آفت‌کش‌ها با سطوح غلظتی مختلف، محیط نمونه متفاوت و همچنین استفاده از دستگاه‌های مختلفی نظیر GC-MS و LC-MS/MS به دست آمد.

---

<sup>1</sup> Original Unbuffered Method

<sup>2</sup> European Committee for Standardization (Comite Europeen de normalization)

<sup>3</sup> Association of Official Analytical Chemists

<sup>4</sup> Lehotay

شکل (۱-۶) خلاصه ای از سه نسخه کچرز را نشان می‌دهد.



شکل ۱-۶ دستوالعمل‌های اصلی روش کچرز بر اساس مراجع ۵۰، ۸۰ و ۹۴

برخی از آفت‌کش‌ها در pH های بالا یا پایین به صورت یون درمی‌آیند و فرم یونی تمایل دارد که در فاز آبی باقی بماند. با توجه به این اینکه pH نمونه‌های زراعی بین ۲/۵ تا ۷ است یونیزاسیون تعدادی از آفت‌کش‌ها مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که برای آفت‌کش‌های بازی تاثیر pH بر روی ریکآوری ناچیز است [۹۶].

در مورد آفت‌کش‌های اسیدی تاثیر pH روی بازیابی قابل توجه است و روش باید اصلاح شود. نتایج نشان داده است برای ترکیبات حساس به pH، روش کچرز بافری استات (pH=4/8) نسبت به روش کچرز بافری سیترات (pH=5) بازیابی بالاتری را نشان می‌دهد [۸۳]. همچنین بازیابی آنالیت‌های اسیدی به دلیل ایجاد پیوند کوالانسی با ماتریس نمونه کمتر می‌شود که برای کاهش پیوندهای کوالانسی از هیدرولیز قلیایی استفاده می‌شود و با استفاده از سدیم هیدروکسید و سپس خنثی سازی محلول با استفاده از اسید سولفوریک انجام می‌شود.

مساله دیگر در آنالیز اسیدها کاهش قابل توجه ترکیبات اسیدی پس از پاکسازی در اثر واکنش با جاذب PSA می‌باشد، بنابراین باید از مرحله پاکسازی پرهیز کرد و عصاره خام را پس از استخراج به مدت یک شب در فریزر گذاشت تا بافت‌های چرب راحت‌تر جدا شوند. ترکیبات خیلی قطبی به مقدار کمی به فاز آلی می‌روند و یا اصلاً نمی‌روند در نتیجه با روش کچرز قابل آنالیز نیستند [۸۳].

### ۱-۴-۳ مقایسه روش کچرز با سایر روش‌ها

روش کچرز همانند روش‌های فاز جامد پخشی می‌باشد. در مقایسه کچرز با روش فاز جامد پخشی نکاتی وجود دارد که موجب برتری روش کچرز شده است از جمله مشکلات روش SPE می‌توان به مقدار زیاد جاذب ( ۱۰۰۰-۲۵۰ میلی‌گرم در هر کاتریج) اشاره کرد همچنین مقدار زیادی نمونه مصرف می‌شود. از دیگر نکات منفی این روش در مقایسه با کچرز نیاز به محفظه‌ی خلاء، آماده سازی اولیه‌ی ستون، چندین حلال به مقدار زیاد، مراحل تبخیر حلال، عملیات دستی، نیاز به دانش تجربی و دقت بالا در حین اجرای عملیات و همچنین گران بودن ابزار اتوماسیون می‌باشد [۹۷]. با وجود تشابه زیاد روش فاز جامد پخشی با روش کچرز (در مرحله‌ی پاکسازی) تفاوت‌هایی نیز بین این دو روش وجود دارد و این تفاوت باعث برتری روش کچرز شده است. در روش فاز جامد پخشی جاذب به نمونه افزوده می‌شود ولی در روش کچرز جاذب به نمونه‌ی استخراجی اضافه می‌شود. در فاز جامد پخشی، هزینه‌ی بالای مواد جاذب منجر به انتخاب بخشی از نمونه می‌شود که در این صورت مقدار نمونه‌ای که مورد استفاده قرار

می‌گیرد ممکن است نماینده کل نمونه نباشد [۹۸]. استخراج به وسیله سیال فوق بحرانی<sup>۱</sup> (SFE) برای بافت‌های چرب بسیار موثر است و دارای گزینش‌پذیری بالایی می‌باشد ولی قیمت بالا، وابستگی شرایط استخراج به نمونه‌های قطبی و پیچیده بودن فرآیند بهینه‌سازی سبب شده استفاده از این روش روتین و مورد علاقه نباشد [۹۹].

یک روش استخراج اتوماتیک نسبتاً جدید، استخراج به وسیله مایع تحت فشار<sup>۲</sup> است که به آن استخراج توسط حلال تسریع شده<sup>۳</sup> (ASE) نیز گفته می‌شود که بر پایه استخراج تحت شرایط دمایی بالا بین ۵۰ تا ۲۰۰°C و فشار ۳۰۰ تا ۵۰۰ psi در مدت زمان کوتاه ۵ الی ۱۰ دقیقه است. کار با این سیستم و بهینه‌سازی آن دشوار است و در نمونه‌هایی با درصد آب زیاد بازدهی به شدت کاهش می‌یابد ولی روش کچرز بسیار ساده و بازدهی بالایی برای نمونه‌هایی با درصد آب زیاد از خود نشان داده است [۱۰۰].

## ۱-۵ اسپیروتترامات و متابولیت‌های آن

اسپیروتترامات متعلق به گروه شیمیایی کتوانول‌هاست که به منظور حفاظت از گیاهان و محصولات در برابر حشرات مکنده به خصوص پسیل وارد بازار شد. نام آیوپاک<sup>۴</sup> (IUPAC) این آفت‌کش به صورت سیس-۳-(۲، ۵ اکسیلیل)-۴- (اتوکسی کربونیل اکسی)-۸-متوکسی-۱-آزا اسپیرو[۴/۵]-دک-۳-ان-۲-آن<sup>۵</sup> می‌باشد. در سال ۲۰۱۳ اتحادیه اروپا<sup>۶</sup> طبق مقررات حفاظت از گیاهان این آفت‌کش را تصویب کرد و این آفت‌کش توانست به بازار جهانی راه بیابد.

در جدول (۱-۶) برخی از خصوصیات اسپیروتترامات آمده است.

<sup>1</sup> Supercritical Fluid Extraction

<sup>2</sup> Pressurized Liquid Extraction

<sup>3</sup> Accelerated Solvent Extraction

<sup>4</sup> International Union of Pure and Applied Chemistry

<sup>5</sup> *cis*-3-(2,5-Xylyl)-4-(ethoxycarbonyloxy)-8-methoxy-1-azaspiro[4.5]dec-3-en-2-one

<sup>6</sup> Union Europeenne

جدول ۱-۶ برخی از ویژگی‌های اسپیروتترامات مطابق مرجع ۱۰۱

pKa	حلالیت در آب (mg/L) (۲۰°C)	نقطه جوش (°C)	نقطه ذوب (°C)	چگالی (g/mL)
۱۰/۷	۰/۰۳	۲۳۵	۱۴۲	۱/۲۳

با ورود اسپیروتترامات به بدن حشرات این آفت‌کش به چندین متابولیت تبدیل می‌شود که این متابولیت‌ها عبارتند از: اسپیروتترامات انول گلوکوساید<sup>۱</sup>، اسپیروتترامات کتوهیدروکسی<sup>۲</sup>، اسپیروتترامات مونوهیدروکسی<sup>۳</sup> [۱۰۱، ۱۰۲]. شکل (۱-۴) ساختار شیمیایی اسپیروتترامات و برخی از این متابولیت‌ها را نشان می‌دهد.

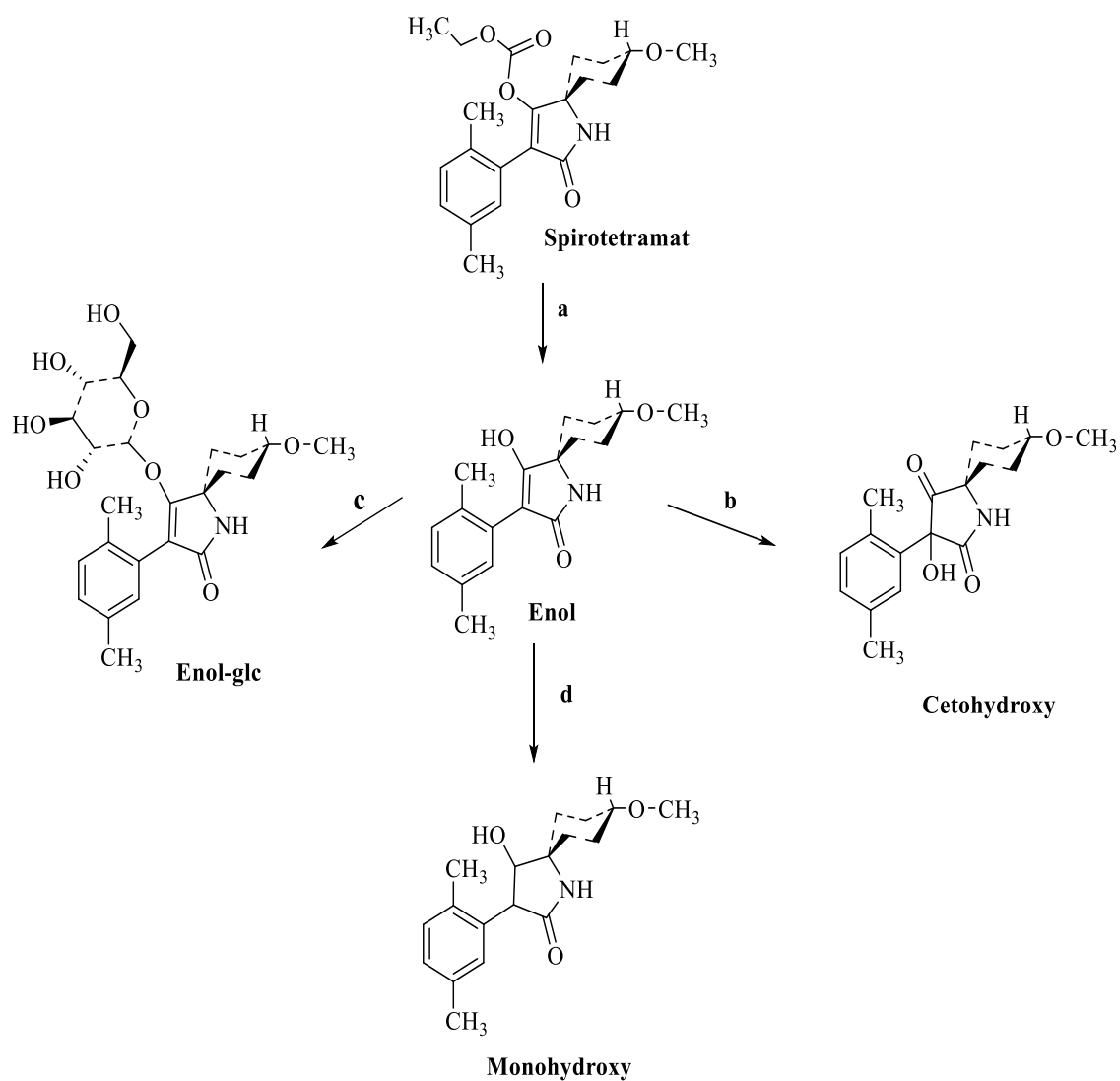
متابولیت ماده یا ترکیبی است که در طول متابولیسم (سوخت و ساز) تشکیل می‌شود. اجزا و مواد تشکیل دهنده‌ی فعال برخی از آفت‌کش‌ها می‌توانند در اثر برهم‌کنش توسط حشرات یا گیاهان به مواد دیگری تبدیل و یا به مولکول‌های کوچک‌تری شکسته شوند. برخی از متابولیت‌ها بسیار سمی‌تر از خود آفت‌کش می‌باشند و در برخی موارد کاملاً غیر سمی هستند [۸۳].

تمامی سموم برای سلامت انسان مضر می‌باشند به همین دلیل سازمان‌های جهانی و یا هر کشوری حداقل مقداری برای هر سم تعیین می‌کنند. به بالاترین مقدار از آفت‌کش‌ها که به طور قانونی در مواد غذایی یا خوراکی می‌تواند وجود داشته باشد و به سلامت موجودات آسیب وارد نکند حداکثر باقیمانده (MRL) گویند. MRL برای این سم ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم (طبق سازمان ملی استاندارد ایران) می‌باشد [۱۰۳].

<sup>1</sup> Enol-glucoside

<sup>2</sup> Ceto-hydroxy

<sup>3</sup> Mono-hydroxy



شکل ۷-۱ ساختار شیمیایی اسپیروتترامات و متابولیت‌های آن مطابق مرجع ۱۰۱

اسپیروتترامات در بافت‌های گیاهی به روش‌های مختلفی استخراج و اندازه‌گیری شده است. از این روش‌ها می‌توان به استخراج مایع-مایع، فاز جامد پخشی و کچرز به همراه روش‌های کروماتوگرافی با آشکارسازهای مختلف مانند UV/Vis و MS/MS اشاره کرد [۱۰۴-۱۰۶]. در جدول (۷-۱) برخی از نتایج حاصل از اندازه‌گیری اسپیروتترامات و متابولیت‌های آن در گونه‌های مختلف آورده شده است.

جدول ۱-۷ نتایج و اندازه‌گیری اسپیروترامات به صورت جداگانه یا همزمان با برخی آفت‌کش‌ها در گونه‌های مختلف

منابع	دستگاه آنالیز	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	درصد بازیابی	گونه مورد آزمایش	نمونه مورد بررسی
[۱۰۴]	UHPLC- MS/MS	۲	۹۱-۱۱۰	پسته	استامی پراید، ایمیداکلوپراید، اسپیروترامات همراه با متابولیت‌ها
[۱۰۵]	UPLC- MS/MS	۵	۸۲-۹۹	—	اسپیروترامات و سه متابولیت آن
[۱۰۶]	HPLC	۳۰	۸۲-۹۷	میوه و سبزیجات	اسپیروترامات و متابولیت سیس انول
[۱۰۷]	UHPLC- MS/MS	-	۸۲-۱۱۰	میوه و سبزیجات	اسپیروترامات و متابولیت‌های آن
[۱۰۸]	HPLC- MS/MS	۱	۹۲-۱۰۳	انگور	اسپیروترامات و اسپیروترامات-انول
[۱۰۹]	LC-MS/MS	۶ و ۳	۷۰-۱۲۰	خاک، ریشه	اسپیروترامات و متابولیت‌های آن
[۱۱۰]	UHPLC- MS/MS	۰/۲-۳	۷۱-۱۲۰	فلفل	تیاکلوپراید، اسپیروترامات و چهار متابولیت آن
[۱۱۱]	HPLC MS/MS	-	۶۵-۱۰۵	خاک و انبه	اسپیروترامات و ایمیداکلوپراید
[۱۱۲]	HPLC MS/MS	۰/۵-۳/۸	۷۷-۱۰۳	اسفناج	اسپیروترامات و متابولیت‌های آن
[۱۱۳]	HPLC	۱۶	۷۲-۸۷	انبه و کاهو	اسپیروترامات و اسپیروترامات-انول



## ۱-۶ هدف از این مطالعه

با توجه به اهمیت پسته به عنوان محصول صادراتی غیر نفتی و فواید این محصول برای داشتن زندگی سالم‌تر، ازدیاد این محصول حائز اهمیت می‌باشد و این امر با استفاده از آفت‌کش‌ها محقق می‌شود. بافت پسته برای بررسی باقیمانده آفت‌کش‌ها، در مطالعات محدودی به کار رفته است و همچنین اندازه‌گیری آفت‌کش‌ها با روش‌های ارزان و قابل دسترس در آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت نسبت به روش‌های پرهزینه در اولویت می‌باشند. آنالیز باقیمانده‌ی آفت‌کش‌ها با استفاده از یک روش سریع، آسان، موثر، ارزان، ایمن و نیرومند برای سلامتی و بهداشت انسان‌ها و محیط زیست ضروری است. دستگاه‌های آنالیز در روش کچرز معمولاً دستگاه‌های پرهزینه‌ی HPLC-MS یا GC-MS می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی باقیمانده آفت‌کش اسپیروتترامات و متابولیت اسپیروتترامات-انول در بافت پسته با استفاده از روش کچرز و آنالیز آن با دستگاه HPLC می‌باشد. با توجه به بررسی‌های انجام شده این روش برای اولین بار برای آنالیز اسپیروتترامات در بافت پسته با استفاده از دستگاه HPLC با آشکارساز UV/Vis به کار برده شده است.



# فصل دوم

## بخش

### تجربی

## مواد و دستگاه ها

### ۱-۲ مواد استفاده شده

جدول ۱-۲ مواد شیمیایی استفاده شده در این مطالعه

نام ماده شیمیایی	فرمول شیمیایی	شرکت سازنده
اسپیروترامات با درجه خلوص ۹۹/۲٪	$C_{21}H_{27}NO_5$	Bayer Crop Science آلمان
اسپیروترامات-انول با درجه خلوص ۹۹/۱٪	$C_{24}H_{33}NO_8$	Bayer Crop Science آلمان
سدیم استات	$CH_3COONa$	Chem-Lab NV بلژیک
منیزیم سولفات بدون آب	$MgSO_4$	Carlo Erba Reagenti SPA فرانسه
سدیم کلرید	$NaCl$	Merk آلمان
آمین نوع اول و دوم	$C_8H_{22}SiN_2$	Agilent Technologies آمریکا
کربن سیاه گرافیتی	—	Agilent Technologies آمریکا
اکتادسیل پیوند خورده به سیلیکا	$C_{18}H_{37}Si$	Agilent Technologies آمریکا
استونیتریل با درجه خلوص HPLC	$CH_3CN$	Biochem Chemopharma فرانسه
آب با درجه خلوص HPLC	$H_2O$	Biochem Chemopharma فرانسه
استیک اسید گلاسیال	$CH_3COOH$	Merk آلمان
فرمیک اسید	$HCOOH$	Merk آلمان
تری اتیل آمین	$C_6H_{15}N$	Merk آلمان

## ۲-۲ دستگاه‌ها

سیستم کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) ساخت شرکت ( Shimadzu (Kyoto, Japan) با پمپ مدل LC-10AD vp، گاز زدای مدل DGU-14A، مخلوط کن مدل FCV-10AL vp، آشکارساز UV/Vis مدل SPD-10A vp، گرم‌کن ستون مدل CTO-10AC vp، شیر تزریق با حجم ۲۰ میکرولیتر و ستون C<sub>18</sub> به کار گرفته شده برای فاز ساکن به طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر داخلی ۴/۶ با اندازه‌ی ذرات پرکننده ۵ میکرومتر، ساخت شرکت Agilent Technologies(U.S.A) به منظور آنالیز کمی و کیفی مورد استفاده قرار گرفت. برای انتگرال‌گیری از سطح زیر پیک‌ها از نرم افزار YL-Clarity استفاده شد. سایر دستگاه‌های به کار برده شده عبارتند از ورتکس ساخت شرکت (Schwabach, Germany) Heidolph، دستگاه سانتریفیوژ از شرکت Vision Scientific CO.LTD (Korea) مدل VS-4000N، دستگاه سانتریفیوژ از شرکت Vision Scientific CO.LTD (Korea) مدل VS-5000N، دستگاه فراصوت<sup>۱</sup> CF2 1YY ( Cardiff, United Kingdom) ، یخچال پارس (ایران، تهران)، فریزر Bosch (Stuttgart,Germany)، مخلوط کن PHILIPS (Amsterdam, Netherlands)، ترازوی تجزیه‌ای با دقت ۰/۱ میلی‌گرم Sartorius A2005 (Gottingen, Germany)، دستگاه گرم‌کن خلاء<sup>۲</sup> مدل EYELA CVE-2000 (Japan)، میکروسرنج با حجم ۲۵۰ میکرولیتر Hamilton (U.S.A)، فیلتر سرسرنجی از جنس PTFE<sup>۳</sup> با اندازه حفرات ۰/۴۵ میکرومتر از شرکت Teknokroma (Barcelona,Spain) و فالكون ۱۵ و ۵۰ میلی‌لیتری پلی‌اتیلنی کف مخروطی در این تحقیق به کار برده شدند.

---

<sup>1</sup> Sonicate

<sup>2</sup> Vacuum Gauge

<sup>3</sup> Polytetra fluoroethylene

## ۲-۳ شرایط کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

بر اساس مطالعات انجام گرفته و با توجه به حلال‌های مورد استفاده در مرحله استخراج روش کچرز، آب و استونیتریل به عنوان فاز متحرک برای دستگاه HPLC انتخاب گردید [۱۰۴، ۱۱۴، ۱۱۵]. درصد آب از ۶۰ تا ۴۰ تغییر داده شد که با توجه به معادله (۲-۱) زمان بازداری، شکل پیک‌ها، پهنای پیک و جداسازی اسپیروترامات-انول از پیک فاز متحرک، درصد فاز متحرک بهینه انتخاب شد. طول موج‌های ۱۹۶، ۲۲۰ و ۲۵۰ نانومتر نیز بررسی و بهینه شدند. همچنین تهیه‌ی محلول‌های استاندارد با آب یا استونیتریل (با درجه خلوص HPLC) و یا ترکیب این دو حلال بررسی و نتایج ثبت شد. در مرحله‌ی آخر برای کاهش عرض پیک‌ها از تری اتیل آمین (TEA) و یا فرمیک اسید در فاز متحرک استفاده گردید.

$$N = \frac{41.7 (t_R / W_{0.5})}{\frac{B}{A} + 1.25} \quad \text{معادله (۲-۱)}$$

$t_R$  زمان بازداری،  $W_{0.5}$  نصف عرض پیک و  $N$  نیز  $(t_R / W_{0.5})^2$  ۵/۵۴ می‌باشد.

## ۲-۴ تهیه‌ی محلول‌های استاندارد

برای تهیه‌ی محلول مادر (استاندارد ۱۰۰۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر اسپیروترامات) ۰/۰۱۰۰ گرم از استاندارد جامد این ماده را وزن کرده و به بالن حجمی ۱۰/۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس با استونیتریل (با درجه خلوص HPLC) به حجم رسانده شد. بقیه محلول‌های مورد استفاده با رقیق‌سازی مناسب از این محلول مادر تهیه شدند. استاندارد اسپیروترامات-انول با غلظت ۳۹۰/۰ میلی‌گرم بر لیتر در استونیتریل به عنوان محلول مادر (تهیه شده از دانشکده شیمی دانشگاه شهید بهشتی) در نظر گرفته شد و محلول‌های رقیق‌تر با رقیق‌سازی مناسب از این محلول ساخته شدند. در تمامی آزمایش‌های بهینه‌سازی کروماتوگرافی و بهینه‌سازی روش کچرز از این محلول‌های استاندارد استفاده گردید. تمامی محلول‌های ساخته شده در یخچال نگهداری شدند.

## ۲-۴-۱ تهیه‌ی محلول‌ها برای رسم منحنی درجه بندی مستقیم (استانداردها)

برای رسم منحنی‌های درجه بندی مستقیم، محلول‌های استاندارد با رقیق سازی محلول مادر mg/L ۱۰۰۰/۰ اسپیروترامات و محلول مادر اسپیروترامات-انول mg/L ۳۹۰/۰ در استونیتریل تهیه شدند. با توجه به مقدار حداکثر مجاز (MRL) برای اسپیروترامات می‌بایست حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری اطراف این مقدار باشد. به همین منظور با رقیق سازی مناسب، محلول‌های ۱/۰-۰/۰۴۰ میلی‌گرم بر لیتر اسپیروترامات و محلول‌های ۱/۰-۰/۰۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسپیروترامات-انول تهیه و به دستگاه HPLC تزریق شدند.

## ۲-۴-۲ تهیه محلول‌ها برای رسم منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی<sup>۱</sup>

برای رسم منحنی درجه بندی بافت همسان سازی شده، ابتدا تمامی مراحل کچرز با مقدار بهینه‌ی تمامی حلال‌ها و نمک‌ها در هر دو مرحله‌ی استخراج و پاکسازی روی ۱۰ نمونه ۳/۵۰۰۰ گرمی پسته انجام شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد اسپیروترامات در محدوده غلظتی ۱/۰-۰/۰۴۰ میلی‌گرم بر لیتر به هر یک از ده عصاره افزوده شد و نمونه‌ها به دستگاه HPLC تزریق و کروماتوگرام‌ها ثبت شدند. این روند برای رسم منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی اسپیروترامات-انول، برای ۷ نمونه در محدوده غلظتی ۱/۰-۰/۰۵۰ تکرار شد.

## ۲-۴-۳ تهیه‌ی محلول‌ها برای محاسبه‌ی بازیابی<sup>۲</sup>

در این آماده سازی، محلول‌های استاندارد قبل از انجام عملیات آماده سازی نمونه و به صورت مستقیم به نمونه‌های پسته افزوده شد. بدین ترتیب برای تهیه عصاره‌های استخراجی، به ۷ فالکن جداگانه که هر کدام حاوی ۳/۵ گرم نمونه پسته بودند، ۱/۰ میلی‌لیتر از محلول استاندارد اسپیروترامات با غلظت‌های ۰/۰۴۰، ۰/۰۶۰، ۰/۱۰۰، ۰/۲۰۰، ۰/۳۰۰، ۰/۵۰۰ و ۰/۷۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اضافه گردید.

<sup>۱</sup> Matrix Matched

<sup>۲</sup> Recovery

سپس یک ساعت زمان داده شد تا آفت کش به بافت پسته نفوذ کند. مراحل استخراج و پاکسازی مشابه کچرز اصلاح شده انجام شد و عصاره‌های حاصل در ۲۵۰ میکرولیتر استونیتریل حل و به دستگاه HPLC تزریق گردید و کروماتوگرام‌ها ثبت شدند.

## ۲-۴-۴ تهیه محلول‌ها برای بررسی دقت و صحت روش

برای محاسبه‌ی دقت و صحت روش، سه نمونه با غلظت‌های ۰/۷۵۰، ۰/۵۰۰، ۰/۲۵۰ میلی گرم بر لیتر اسپیروترامات در بافت پسته تهیه شدند. سپس هر کدام از غلظت‌ها در شرایط بهینه ۳ مرتبه در یک روز و یک مرتبه در سه روز متوالی استخراج شدند. دقت درون روز<sup>۱</sup> و بین روز<sup>۲</sup> روش از طریق محاسبه‌ی انحراف استاندارد نسبی<sup>۳</sup> (%RSD) و t تست بررسی شد. صحت روش با محاسبه‌ی بازیابی غلظت افزوده شده در استخراج نمونه‌های غنی‌سازی و غلظت تعیین شده توسط منحنی درجه بندی غنی‌سازی ارزیابی شد.

## ۲-۵ روش آماده‌سازی و تهیه‌ی نمونه‌های پسته

پسته مورد آزمایش از نوع اکبری تهیه و پوست کنده شد و برای همگن شدن، مقدار ۲۱۱/۰۰۰ گرم از نمونه پسته آسیاب گردید. سپس نمونه درون ظرف یک بار مصرف و داخل فریزر (در دمای ۲۰°C-) نگهداری شد.



شکل ۱-۲ مراحل آماده‌سازی و همگن کردن پسته

<sup>1</sup> Intra-Day Precision

<sup>2</sup> Inter-Day Precision

<sup>3</sup> Relative Standard Deviation



## ۲-۵-۱ تهیهی نمونه‌های غنی شده پسته با آنالیت

برای تهیهی نمونه‌های غنی شدهی پسته با آنالیت، مقدار مشخصی از آنالیت به فالكون‌هایی حاوی ۳/۵۰۰۰ گرم نمونه پسته‌ی همگن شده (پودر شده) اضافه گردید و پس از گذشت یک ساعت مراحل آماده سازی روی نمونه انجام شد.

## ۲-۵-۲ تهیهی نمونه‌های همسان سازی شدهی بافتی

به منظور تهیهی نمونه‌های همسان سازی بافتی، ابتدا روی نمونه ۳/۵۰۰۰ گرمی پسته همگن شده که حاوی آنالیت نمی‌باشد، مراحل استخراج و پاکسازی به صورت کامل انجام شد و در مرحله آخر مقدار مشخصی از محلول استاندارد آنالیت اسپیروترامات و یا اسپیروترامات-انول به بافت نمونه اضافه شدند.

## ۲-۶ روش‌های کچرز عمومی به کار رفته بر روی بافت پسته

در آزمایش‌های انجام شده برای بررسی روش آماده سازی کچرز بر روی بافت پسته، نمونه‌هایی که طبق دستورالعمل ۲-۵ تهیه شده بود مورد استفاده قرار گرفت. در تمامی آزمایش‌ها از شرایط بهینه شده HPLC که در بخش ۲-۳ توضیح داده شد استفاده گردید. دو روش کچرز به شرح زیر استفاده شد:

## ۲-۶-۱ کچرز اصلی

در ابتدا نمونه از فریزر خارج شد تا به دمای محیط برسد. سپس ۳/۵۰۰۰ گرم از نمونه همگن شده توزین و به درون فالكون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس به نمونه ۱/۰ میلی‌لیتر آفت‌کش اسپیروترامات با غلظت ۱/۰ mg/L تزریق شد و پس از هم‌زدن یک ساعت زمان داده شد تا آفت‌کش به داخل بافت پسته نفوذ کند. سپس ۳/۵ میلی‌لیتر استونیتریل (بهترین نسبت نمونه و حلال استخراج کننده که ۱:۱ می‌باشد [۵۰]) به نمونه اضافه شد و به مدت ۲۰ ثانیه به شدت با دست تکان داده شد. سپس ۱/۴۰۰۰ گرم منیزیم سولفات بدون آب به همراه ۰/۳۵۰۰ گرم سدیم کلرید به مخلوط اضافه گردید (بهترین نسبت ۴:۱ می‌باشد [۵۰]). نمونه به همراه نمک‌های افزوده شده به مدت ۳۰ ثانیه به

شدت با دست هم‌زده شد تا از کلوخه شدن منیزیم سولفات جلوگیری شود. سپس به منظور افزایش سطح تماس، نمونه به مدت یک دقیقه با دستگاه ورتکس با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه هم‌زده شد. در مرحله‌ی بعد، عمل سانتریفیوژ با سرعت ۳۴۵۰ دور بر دقیقه به مدت ۳ دقیقه انجام گرفت. ۲/۵ میلی‌لیتر از فاز رویی (آلی) به فالكون دیگری که حاوی ۰/۰۷۰۰ گرم منیزیم سولفات بدون آب، ۰/۱۰۰۰ گرم PSA، ۰/۰۲۰۰ گرم GCB و ۰/۱۰۰۰ گرم C<sub>18</sub> بود منتقل گردید. در این مرحله مخلوط به مدت یک دقیقه با دستگاه ورتکس با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه هم‌زده شد و سپس به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۳۴۵۰ دور بر دقیقه عمل سانتریفیوژ انجام گرفت (شرایط سانتریفیوژ و ورتکس از قبیل دور و زمان با استفاده از مرجع [۸۳] انتخاب گردید). ۱/۵۰ میلی‌لیتر از فاز رویی برداشته و از فیلتر سرسنگی PTFE با اندازه حفرات ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. محلول درون گرم‌کن خلاء به مدت ۱ ساعت با دمای ۳۸ °C قرار داده شد و پس از تبخیر کامل حلال، ۲۵۰ میکرولیتر استونیتریل (با درجه خلوص HPLC) به آن اضافه گردید و برای تزریق به دستگاه HPLC آماده شد.

## ۲-۶-۲ کچرز بافری

همان‌طور که در بخش ۱-۴-۲ عنوان شد دو نوع روش بافری استاتی و بافری سیتراتی و به عنوان روش بافری کچرز معرفی شده‌اند. تجربیات نشان داده روش بافری استاتی نسبت به روش بافری سیتراتی، درصد بازیابی بالاتری دارد و در این مطالعه نیز تنها روش کچرز بافری استاتی بررسی شد. بدین منظور ابتدا نمونه‌ی پسته همگن شده را از فریزر بیرون آورده و اجازه داده شد تا به دمای محیط برسد. سپس ۳/۵۰۰۰ گرم از نمونه همگن شده توزین و به درون فالكون ۵۰ میلی‌لیتری انتقال یافت. به نمونه ۱/۰ میلی‌لیتر آفت‌کش اسپیروترامات با غلظت ۱/۰ mg/L تزریق شد و پس از هم‌زدن ۱ ساعت زمان داده شد تا آفت‌کش به داخل بافت پسته نفوذ کند. سپس ۳/۵۰ میلی‌لیتر استونیتریل اسیدی شده با یک درصد حجمی/حجمی استیک اسید گلاسیال، به نمونه افزوده گردید و به مدت ۲۰ ثانیه به شدت با دست هم‌زده شد. ۱/۴۰۰۰ گرم منیزیم سولفات بدون آب به همراه ۰/۳۵۰۰ گرم سدیم استات به مخلوط اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه با دست و یک دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه ورتکس شد. سپس

عمل سانتریفیوژ با سرعت ۳۴۵۰ دور بر دقیقه به مدت ۳ دقیقه انجام شد. در این مرحله چهار فاز ایجاد گردید و ۲/۵ میلی لیتر از فاز رویی حاصل از استخراج برداشته شد و به فالكون دیگری که حاوی ۰/۱۰۰۰ گرم PSA، ۰/۱۰۰۰ گرم C<sub>18</sub>، ۰/۰۲۰۰ گرم GCB و ۰/۰۷۰۰ گرم منیزیم سولفات بدون آب بود، اضافه شد. سپس مخلوط با ورتکس به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه همزده و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۳۴۵۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ یک مخلوط دو فازی ایجاد گردید که ۱/۵ میلی لیتر از فاز رویی برداشته شد و پس از عبور از فیلتر سرسرنگی PTFE با اندازه حفرات ۰/۴۵ میکرومتر به ویال انتقال یافت و درون گرم کن خلاء با دمای ۳۸°C و در مدت یک ساعت تمام حلال آن تبخیر گردید. پس از تبخیر حلال، ۲۵۰ میکرولیتر استونیتریل با درجه خلوص HPLC به عصاره اضافه و برای تزریق به دستگاه HPLC آماده شد.

## ۲-۶-۳ کچرز اصلاح شده

ابتدا ۳/۵۰۰۰ گرم نمونه توزین و به فالكون ۵۰ میلی لیتری منتقل گردید سپس به نمونه ۱/۰ میلی لیتر آفت کش اسپیروترامات با غلظت ۱/۰ mg/L تزریق شد و پس از همزدن ۱ ساعت زمان داده شد تا آفت کش به داخل بافت نفوذ کند. سپس ۱/۵۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه و ۲۰ دقیقه زمان داده شد تا آب به درون بافت نمونه نفوذ کند. ۳/۵ میلی لیتر استونیتریل (با درجه خلوص HPLC) افزوده و به مدت ۲۰ ثانیه به شدت با دست همزده شد. ۱/۴۰۰۰ گرم منیزیم سولفات به همراه ۰/۳۵۰۰ گرم سدیم کلرید توزین و به فالكون حاوی نمونه افزوده شد. نمونه به مدت ۳۰ ثانیه با دست و ۱ دقیقه توسط ورتکس با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه همزده شد و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۳۴۵۰ دور بر دقیقه عمل سانتریفیوژ انجام گردید. نمونه به مدت ۱۲ ساعت در فریزر با دمای ۲۰°C- گذاشته شد. با این کار چربی و فاز آبی موجود در بافت پسته یخ می زند و به راحتی می توان فاز آلی را جدا نمود و همچنین در مصرف جاذب C<sub>18</sub> صرفه جویی می شود. پس از گذشت ۱۲ ساعت نمونه از فریزر خارج شد و برای مرحله پاکسازی مقادیر ۰/۰۲۵۰ گرم C<sub>18</sub>، ۰/۰۵۰۰ گرم PSA، ۰/۰۳۰۰ گرم GCB و ۰/۰۷۰۰ گرم منیزیم سولفات بدون آب به درون فالكون ۱۵ میلی لیتری منتقل شد. سپس ۲/۵ میلی لیتر از فاز آلی

روی، حاوی آنالیت استخراج شده در مرحله قبل به آن اضافه گردید. فالكون ۱۵ میلی لیتری به مدت یک دقیقه توسط ورتکس با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه هم زده و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۳۴۵۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ یک محلول دو فازي تشکیل شد که از فاز رویی شفاف، ۱/۵ میلی لیتر برداشته و از فیلتر سرسرنگی PTFE با اندازه حفرات ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده و به ویال منتقل گردید. ویال درون دستگاه گرم کن خلاء به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۸°C قرار داده شد. پس از تبخیر کامل حلال، ویال از دستگاه خارج و ۲۵۰ میکرولیتر استونیتریل به آن اضافه شد و برای تزریق به دستگاه HPLC آماده گردید.

## ۲-۷ محاسبه بازیابی<sup>۱</sup>

برای محاسبه غلظت واقعی با توجه به حجم حلال های استفاده شده در روش کچرز اصلاح شده (بخش ۲-۶-۳) غلظت واقعی آفت کش از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{معادله (۲-۲)} \quad \text{غلظت واقعی} = \frac{1}{0.25 \text{ mL}} \times \frac{1/5 \text{ mL}}{4/5 \text{ mL}} \times \frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{ غلظت افزوده شده} \times 1 \text{ mL}$$

برای محاسبه غلظت اندازه گیری شده، عصاره استخراج شده در ۲۵۰ میکرولیتر استونیتریل حل شده و به HPLC تزریق گردید. سطح زیر پیک حاصل در معادله منحنی همسان سازی بافتی قرار داده شد و مقدار به دست آمده با جای گذاری در معادله زیر مقدار بازیابی محاسبه شد.

$$\text{معادله (۲-۳)} \quad \%R = \frac{\text{غلظت اندازه گیری شده}}{\text{غلظت واقعی}} \times 100$$

<sup>1</sup> Recovery

# فصل سوم

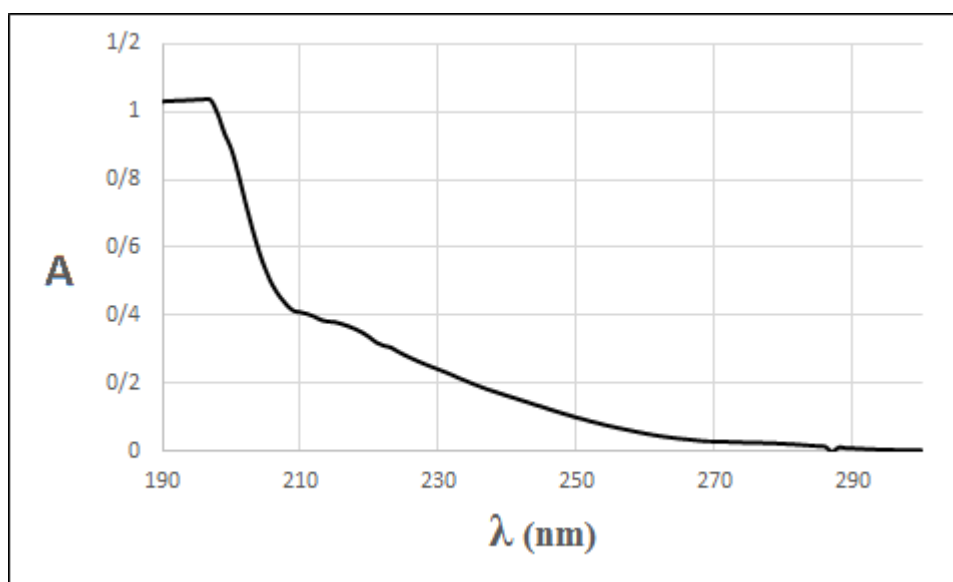
## بحث و نتیجه‌گیری

### ۱-۳ بهینه‌سازی شرایط دستگاه HPLC

به منظور تعیین بهترین شرایط کروماتوگرافی برای کاهش پهنای پیک آنالیت اسپیروترامات و جداسازی اسپیروترامات-انول از پیک فاز متحرک، ۲۰ میکرولیتر از محلول استاندارد با غلظت ۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر از آنالیت اسپیروترامات و متابولیت اسپیروترامات-انول که از محلول مادر تهیه شده بودند به صورت مستقیم به دستگاه HPLC تزریق شدند. طبق توضیحات داده شده در بخش ۲-۳ مخلوط آب : استونیتریل به عنوان فاز متحرک و ستون C<sub>18</sub> به عنوان فاز ساکن برای آنالیز این آفت‌کش و متابولیت آن انتخاب شد. در این مطالعه علاوه بر تغییر ترکیب فاز متحرک، طول موج ماکزیمم و حلال مورد استفاده برای به حجم رساندن استاندارد نیز بررسی شدند. تمامی آزمایش‌ها برای بررسی و اطمینان از تکرارپذیری نتایج با بیش از سه مرتبه تزریق انجام گرفت.

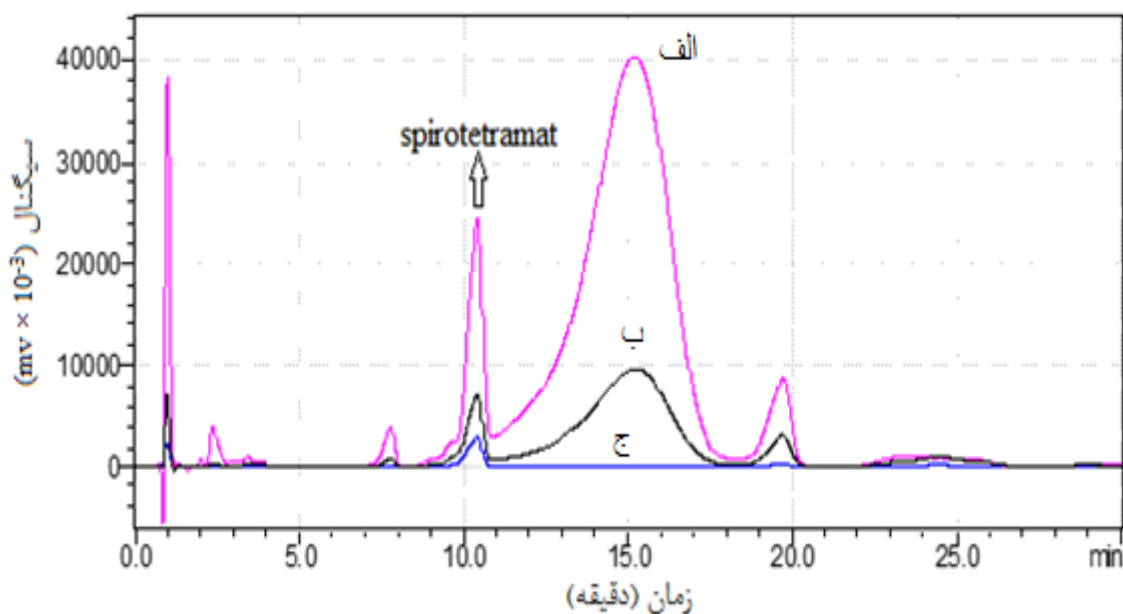
### ۱-۱-۳ تعیین طول موج ماکزیمم

شکل (۱-۳) طیف جذبی UV/Vis اسپیروترامات یک نوار جذبی با طول موج ماکزیمم ۱۹۶ nm را نشان می‌دهد.



شکل ۱-۳ طیف UV/Vis ثبت شده برای اسپیروترامات

برای انتخاب طول موج اندازه‌گیری جذب اسپیروتترامات، کروماتوگرام محلول استاندارد ۵/۰ mg/L اسپیروتترامات در طول موج ۲۵۰ nm به دست آمد. با توجه به شکل (۲-۳) پیک مشاهده شده در ۱۰ min مربوط به اسپیروتترامات می‌باشد. یک پیک مزاحم با شروع در ۱۱ min در تعیین مساحت سطح زیر پیک اسپیروتترامات مزاحمت ایجاد می‌کند. این پیک مزاحم در طول موج ۲۵۰ nm از بین می‌رود و به همین دلیل طول موج ۲۵۰ nm برای اندازه‌گیری اسپیروتترامات انتخاب شد. به دلیل مزاحمت سایر پیک‌ها با پیک آنالیت، اندازه‌گیری معمولاً در طول موج‌هایی غیر از  $\lambda_{max}$  صورت می‌گیرد.



شکل ۲-۳ کروماتوگرام ثبت شده در طول موج ۲۵۰ nm و سرعت جریان ۱ mL/min با نسبت آب : استونیتریل ۶۵ :

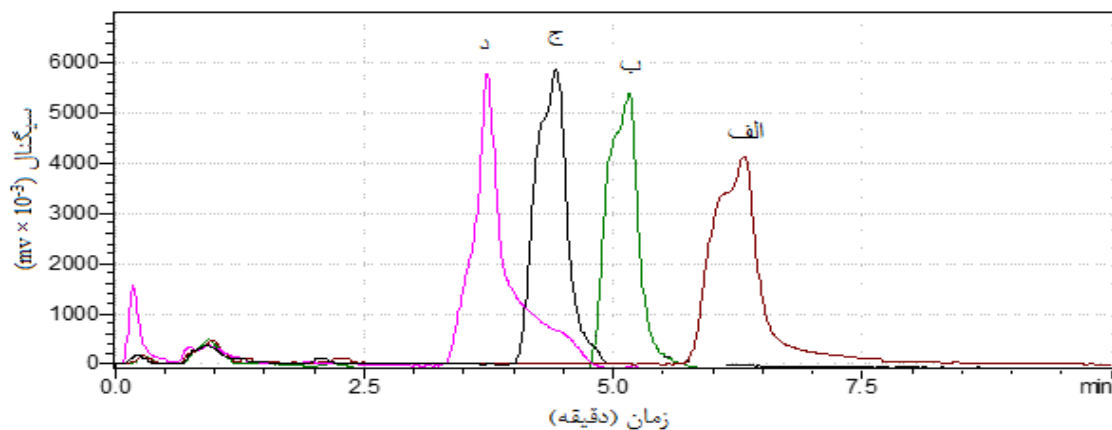
۳۵ در غلظت ۵/۰ mg/L اسپیروتترامات (الف)  $\lambda_{max} = 196$  nm (ب)  $\lambda_{max} = 220$  nm (ج)  $\lambda_{max} = 250$  nm

### ۳-۱-۲ تعیین نوع و درصد فاز متحرک

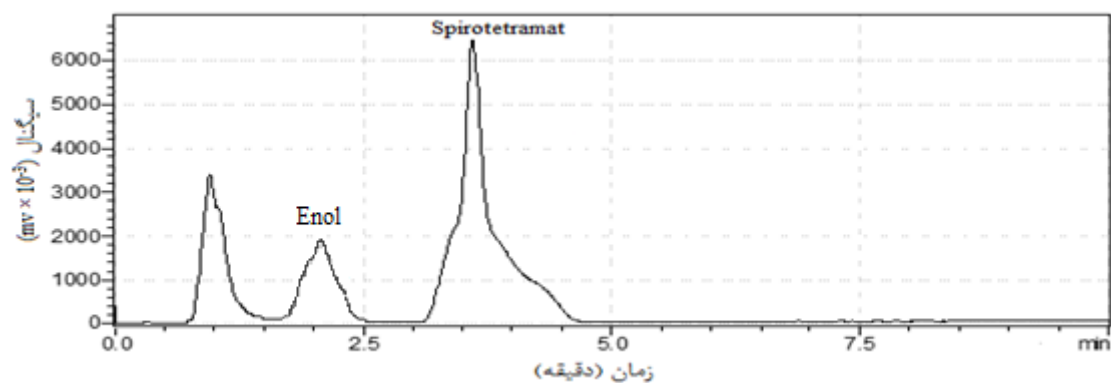
بر اساس مطالعات انجام شده، استونیتریل و آب به عنوان فاز متحرک انتخاب شدند [۱۰۴، ۱۱۴، ۱۱۵]. در ابتدا آنالیت اسپیروترامات به تنهایی مورد ارزیابی قرار گرفت و با تغییر درصدهای مختلفی از استونیتریل (۶۰، ۵۵، ۵۰ و ۴۵ درصد) بالاترین شدت و بهترین شکل پیک مطابق مشخصات بیان شده در بخش ۳-۲ شناسایی شد.

مطابق شکل (۳-۳) مشخص شد با افزایش درصد استونیتریل در فاز متحرک زمان بازداری کم می‌شود ولی شدت پیک‌ها افزایش می‌یابد. برای پی بردن به محل پیک اسپیروترامات-انول، استانداردهای اسپیروترامات و اسپیروترامات-انول (هر دو با غلظت ۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر) با یکدیگر مخلوط شدند و کروماتوگرام‌ها با نسبت متفاوت در دو فاز متحرک با درصدهای ۵۵ و ۵۰ از استونیتریل بررسی شدند. شکل (۴-۳) نشان می‌دهد که در نسبت آب/ استونیتریل ۴۵ : ۵۵ پیک متابولیت اسپیروترامات-انول از پیک مربوط به فاز متحرک به طور کامل جداسازی نمی‌شود. همان طور که در شکل (۳-۵) ملاحظه می‌شود در نسبت ۵۰ : ۵۰ آب/ استونیتریل جداسازی اسپیروترامات-انول از فاز متحرک به طور کامل انجام شده است. در حالت ۵۰ : ۵۰ آب/ استونیتریل قطبیت فاز متحرک بیشتر است از طرفی قطبیت اسپیروترامات-انول نیز از اسپیروترامات بیشتر است که همین امر سبب می‌شود اسپیروترامات-انول بیشتر تحت تاثیر فاز متحرک قطبی‌تر قرار بگیرد و با پهن شدگی کمتری ظاهر می‌گردد. بنابراین درصد ۵۰ : ۵۰ آب/ استونیتریل به عنوان فاز متحرک بهینه انتخاب شد.

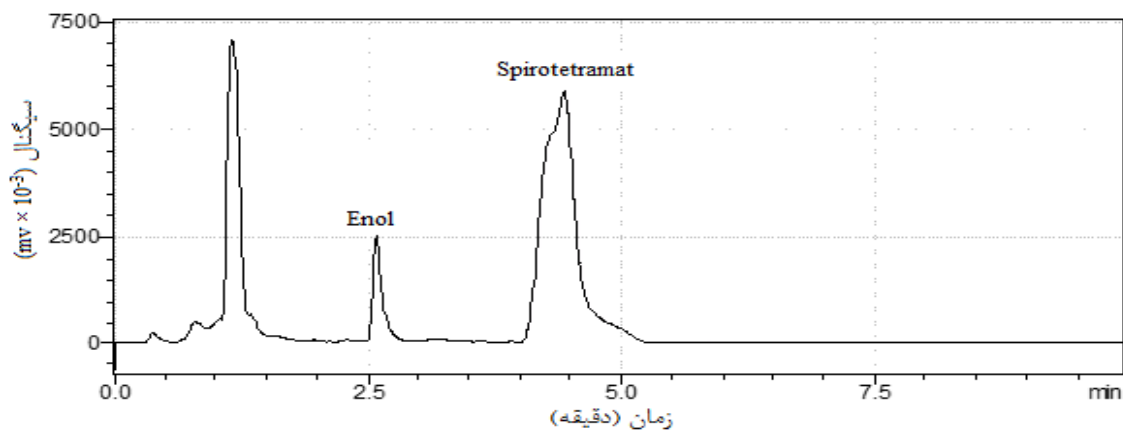




شکل ۳-۳ کروماتوگرام‌های ثبت شده‌ی اسپیروتترامات با غلظت ۵/۰ mg/L در طول موج ۲۵۰nm و سرعت جریان ۱ mL/min در فاز متحرک با نسبت‌های متفاوت آب: استونیتریل (الف: ۶۰ : ۴۰ ، ب: ۵۵ : ۴۵ ، ج: ۵۰ : ۵۰ ، د: ۴۵ : ۵۵



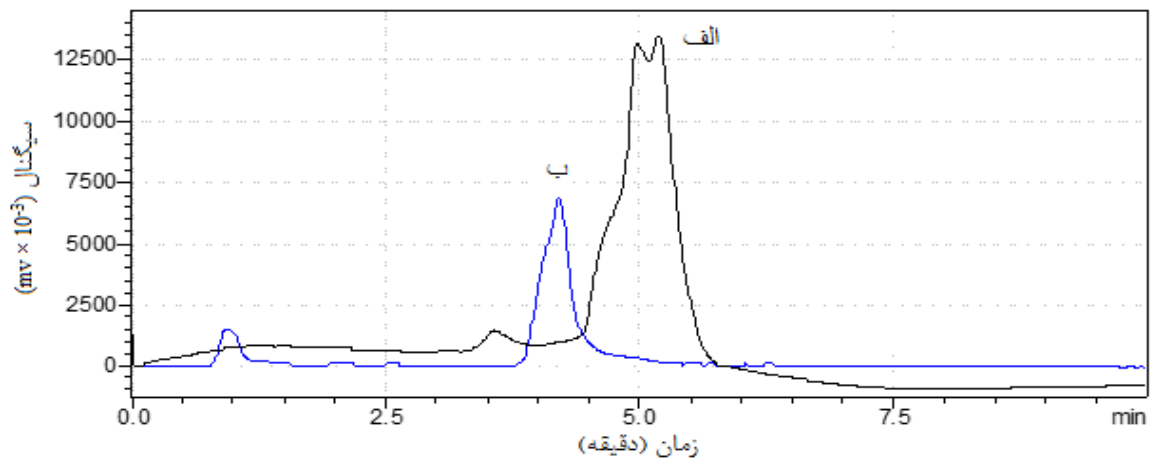
شکل ۳-۴ کروماتوگرام ثبت شده‌ی اسپیروتترامات و اسپیروتترامات-انول با غلظت ۵/۰ mg/L در فاز متحرک آب: استونیتریل با نسبت ۴۵ : ۵۵ در طول موج ۲۵۰nm و سرعت جریان ۱ mL/min



شکل ۳-۵ کروماتوگرام ثبت شده‌ی اسپیروتترامات و اسپیروتترامات-انول با غلظت ۵/۰ mg/L در فاز متحرک آب: استونیتریل با نسبت ۵۰ : ۵۰ در طول موج ۲۵۰ nm و سرعت جریان ۱ mL/min

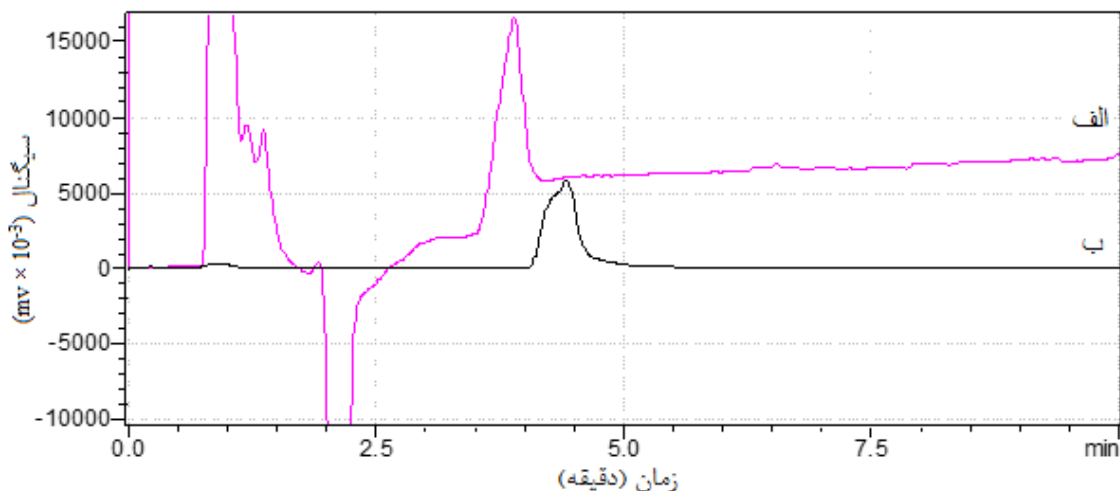
### ۳-۱-۳ افزودن تری اتیل آمین و فرمیک اسید برای کاهش پهنای پیک

یکی از راهکارهای توصیه شده برای کاهش پهنای پیک، استفاده از فرمیک اسید و تری اتیل آمین (TEA) می باشد [ ۱۰۴، ۱۱۴، ۱۱۵]. مطابق شکل (۳-۶) افزودن ۰/۱ درصد فرمیک اسید به فاز متحرک موجب شد خط پایه به شدت دچار نوسان و پیک استاندارد اسپیروترامات پهن و دو شاخه گردد. با توجه به شکل مولکولی اسپیروترامات، این ترکیب مستعد گرفتن پروتون است و با گرفتن پروتون درگیر رزونانس شده و وجود دو حالت رزونانسی مانند تداخل دو پیک عمل می کند. بنابراین فرمیک اسید از فاز متحرک حذف گردید.



شکل ۳-۶ کروماتوگرام ثبت شده در طول موج ۲۵۰ nm با غلظت ۵/۰ mg/L اسپیروترامات در سرعت جریان ۱ mL/min با نسبت آب : استونیتریل ۵۰ : ۵۰ (الف) شامل ۰/۱ درصد فرمیک اسید در فاز متحرک (ب) فاقد فرمیک اسید

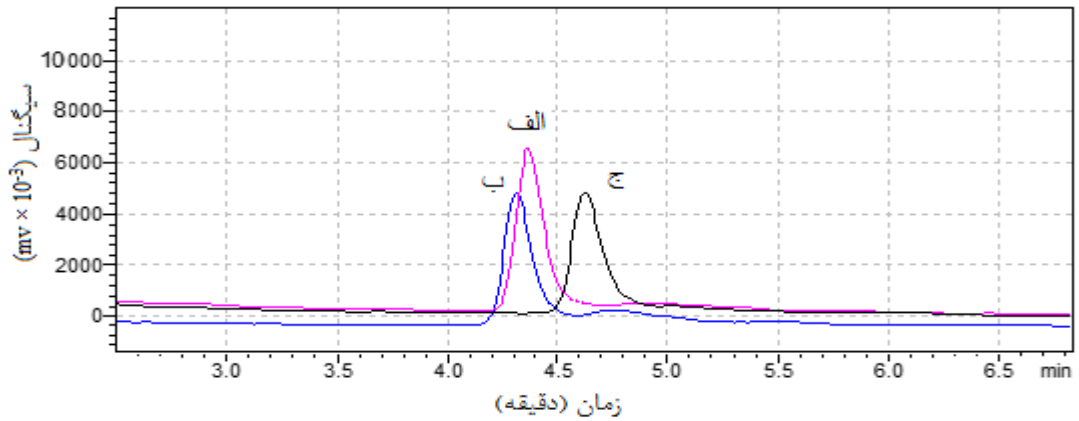
شکل (۳-۷) کروماتوگرام حاصل از افزودن تری اتیل آمین به فاز متحرک را نشان می دهد. با افزودن تری اتیل آمین به مقدار ۱ درصد به فاز متحرک، خط پایه شیب صعودی گرفت که همین امر موجب می شود در آنالیز پیک های همسان سازی بافتی مشکلات جدی به وجود می آید. بنابراین آزمایش های بعدی در عدم حضور مواد ذکر شده در فاز متحرک انجام گرفت.



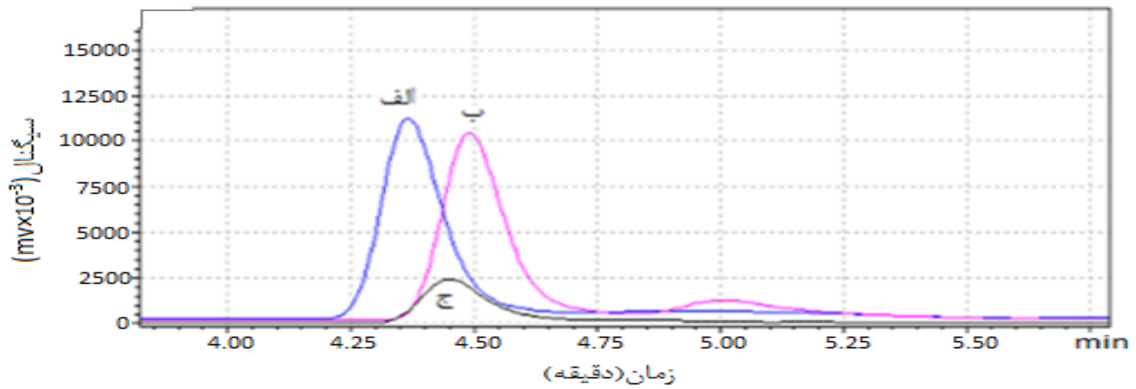
شکل ۳-۷ کروماتوگرام ثبت شده در طول موج ۲۵۰ nm با غلظت ۵/۰ mg/L اسپیروترامات در سرعت جریان ۱ mL/min با نسبت آب : استونیتریل ۵۰ : ۵۰ (الف) فاز متحرک شامل ۱ درصد تری اتیل آمین (ب) فاز متحرک فاقد تری اتیل آمین

### ۳-۱-۴ تهیه‌ی محلول‌های استاندارد با حلال‌های متفاوت

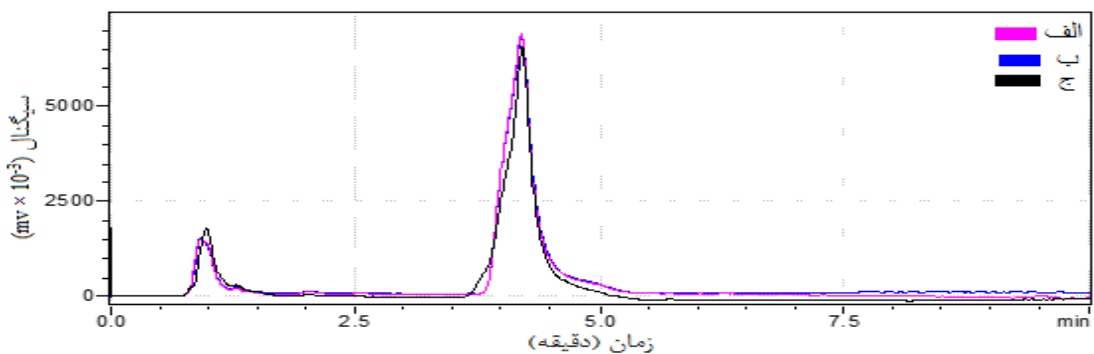
به منظور کاهش هزینه در مصرف حلال و بررسی اثر حلال بر روی کروماتوگرام، محلول استاندارد مادر اسپیروترامات یک مرتبه در آب خالص و یک مرتبه با آب/ استونیتریل ۵۰ : ۵۰ و بار دیگر با استونیتریل خالص تهیه شدند. بررسی کروماتوگرام‌های به دست آمده در زمان‌های مختلف پس از تهیه‌ی محلول استاندارد نشان داد که حضور آب باعث جابجایی و ناپایداری پیک می‌شود. این عدم ناپایداری می‌تواند به دلیل هیدرولیز اسپیروترامات و ناپایداری آن در محلول آبی باشد. این اثر در شکل (۳-۸) مربوط به تهیه محلول استاندارد در نسبت ۵۰ : ۵۰ آب/ استونیتریل و در شکل (۳-۹) مربوط به تهیه محلول استاندارد در آب خالص به خوبی قابل مشاهده است. شکل (۳-۱۰) کروماتوگرام‌های مربوط به اسپیروترامات تهیه شده با استونیتریل خالص در روزهای مختلف را نشان می‌دهد به دلیل پایداری اسپیروترامات در استونیتریل، تمامی محلول‌های استاندارد، عصاره‌های غنی‌سازی شده و عصاره‌های همسان‌سازی شده با استونیتریل به حجم رسانده شدند.



شکل ۳-۸ کروماتوگرام ثبت شده برای اسپیروترامات با غلظت ۵/۰ mg/L تهیه شده در مخلوط ۵۰ : ۵۰ آب / استونیتریل با سرعت جریان ۱ mL/min و فاز متحرک آب / استونیتریل با نسبت ۵۰ : ۵۰ (الف) تزریق در همان روز (ب) پس از گذشت ۲۴ ساعت (ج) پس از گذشت ۷۲ ساعت



شکل ۳-۹ کروماتوگرام ثبت شده برای اسپیروترامات با غلظت ۵/۰ mg/L تهیه شده در آب خالص با سرعت جریان ۱ mL/min در فاز متحرک آب / استونیتریل با نسبت ۵۰ : ۵۰ (الف) تزریق در همان روز (ب) پس از ۲۴ ساعت (ج) پس از ۷۲ ساعت



شکل ۳-۱۰ کروماتوگرام ثبت شده برای اسپیروترامات با غلظت ۵/۰ mg/L تهیه شده در استونیتریل خالص با سرعت جریان ۱ mL/min در فاز متحرک آب / استونیتریل با نسبت ۵۰ : ۵۰ (الف) تزریق در همان روز (ب) پس از ۲۴ ساعت (ج) پس از ۷۲ ساعت

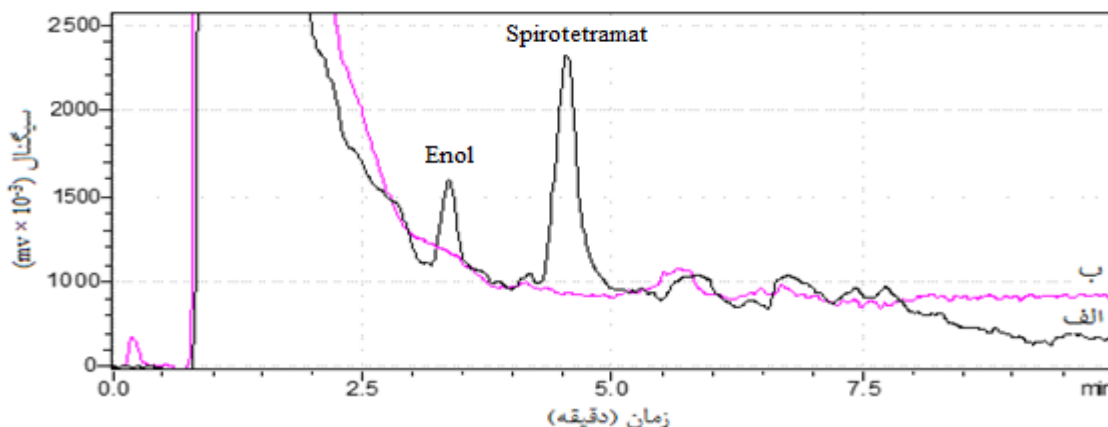
## ۲-۳ نتایج روش‌های کچرز عمومی به کار رفته بر روی پسته غنی شده با آفت کش

به منظور مقایسه روش‌های کچرز عمومی بر استخراج، ابتدا دو آفت‌کش اسپیروتترامات و انول- اسپیروتترامات به نمونه پسته اضافه شد. سپس روش اصلی کچرز و هم زمان روش بافری استاتی طبق مراحل عنوان شده در بخش‌های ۲-۶-۱ و ۲-۶-۲ بر روی بافت پسته انجام گرفت. شکل (۳-۱۱) قسمت الف تصویر چهار فاز تشکیل شده از مرحله استخراج که با استفاده از روش اصلی کچرز به دست آمده نشان می‌دهد. این چهار فاز به ترتیب از بالا به پایین شامل فاز آلی، بافت پسته، فاز آبی و فاز جامد شامل نمک‌های افزوده شده می‌باشند. پس از جداسازی فاز آلی، مرحله پاکسازی از طریق فاز جامد پختی بر روی فاز آلی با استفاده از جاذب‌های PSA، GCB،  $C_{18}$  و منیزیم سولفات بدون آب انجام شد. شکل (۳-۱۱) قسمت ب دو فاز حاصل شده در مرحله پاکسازی را نشان می‌دهد. این دو فاز به ترتیب از بالا به پایین شامل فاز آلی شفاف و جاذب‌های استفاده شده می‌باشند. پس از جداسازی فاز رویی و عبور دادن این فاز از فیلتر سرسرنگی، حلال موجود تبخیر و باقیمانده با استونیتریل به حجم (۲۵/۰) رسانده شد، سپس برای آنالیز به دستگاه HPLC تزریق و کروماتوگرام‌ها ثبت شدند. یک نمونه‌ی شاهد نیز برای روش اصلی تهیه شد. بدین ترتیب که تمامی مراحل مانند روش کچرز اصلی و بافری انجام شد ولی آفت‌کش به نمونه تزریق نشد.



شکل ۳-۱۱ فازهای جدا شده در روش کچرز الف) پس از استخراج ب) پس از مرحله پاکسازی

در شکل (۳-۱۲) کروماتوگرام حاصل از روش اصلی کچرز به همراه شاهد را نشان می‌دهد. در این روش آفت کش اسپیروتترامات به همراه اسپیروتترامات-انول به نمونه پسته افزوده شد، سپس مراحل استخراج و پاک سازی انجام شد. برای نمونه شاهد نیز تمامی مراحل مطابق روش اصلی انجام شد ولی آنالیت‌ها به بافت پسته اضافه نشد.

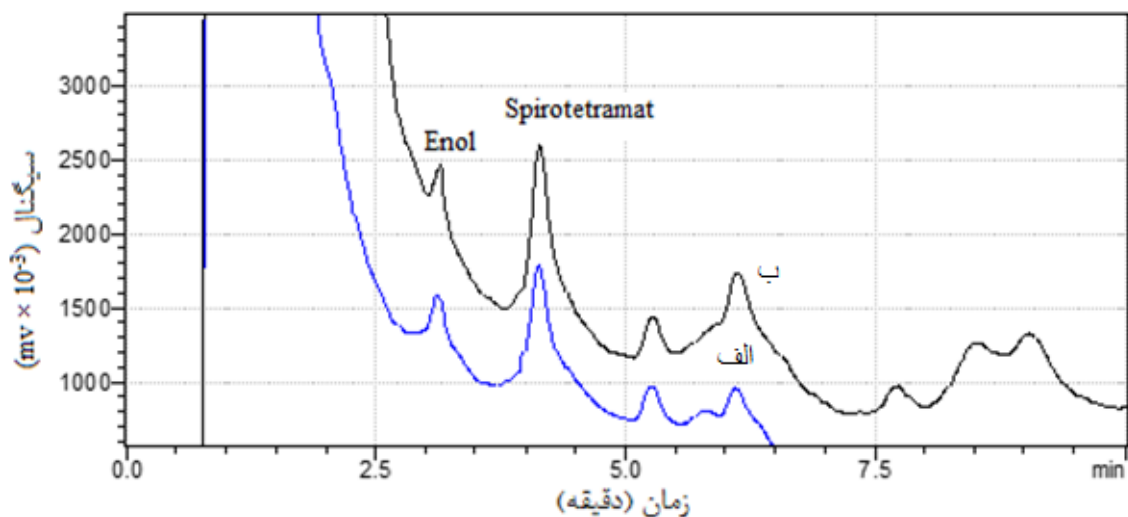


شکل ۳-۱۲ کروماتوگرام ثبت شده برای مخلوط اسپیروتترامات و اسپیروتترامات-انول با غلظت ۱/۰ mg/L از نمونه استخراج شده با کچرز اصلی در سرعت جریان ۱ mL/min و فاز متحرک آب : استونیتریل با نسبت ۵۰ : ۵۰ الف) برای نمونه حاوی اسپیروتترامات و اسپیروتترامات-انول ب) نمونه شاهد

در روش بافری استاتی مقدار سیگنال به دست آمده کمتر از روش اصلی می‌باشد. بنابراین روش اصلی کچرز به عنوان روش اصلی انتخاب شد. شکل (۳-۱۳) کروماتوگرام‌های حاصل از روش بافری استاتی و کچرز اصلی با یکدیگر مقایسه شدند. در جدول (۳-۱) نیز مقادیر سیگنال و انحراف استاندارد نسبی حاصل از دو روش را نشان می‌دهد.

جدول ۳-۱ مقادیر به دست آمده برای مقایسه کچرز اصلی و بافری

%RSD	سطح زیر پیک مربوط به اسپیروتترامات با غلظت ۱ mg/L	روش کچرز به کار رفته
۴/۹۳۹	۲۰/۲۸۲	روش اصلی
۷/۶۴۸	۱۷/۹۶۷	روش بافری استاتی



شکل ۳-۱۳ کروماتوگرام‌های ثبت شده برای نمونه استخراج شده در طول موج ۲۵۰ nm و سرعت جریان ۱ mL/min با فاز متحرک آب : استونیتریل ۵۰ : ۵۰ (الف) برای روش کچرز بافری حاوی اسپیروتترامات و اسپیروتترامات-انول با غلظت ۱/۰ mg/L (ب) برای روش اصلی کچرز حاوی اسپیروتترامات و اسپیروتترامات-انول با غلظت ۱/۰ mg/L

### ۳-۳ بهینه‌سازی روش استخراج کچرز اصلی

از آنجایی که کاهش مقدار نمونه باعث کاهش مصرف حلال‌ها، نمک‌ها و جاذب‌های مورد استفاده در مراحل استخراج و پاکسازی و در نتیجه کاهش هزینه‌ها می‌شود، با توجه به امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی مقدار ۳/۵۰۰۰ گرم نمونه برای انجام مراحل استخراج و پاکسازی و اندازه‌گیری با HPLC انتخاب گردید. میزان حلال، نمک‌ها و جاذب‌های مورد نیاز با حفظ نسبت‌ها در روش اصلی کچرز انتخاب و یا مورد بهینه‌سازی قرار گرفت.

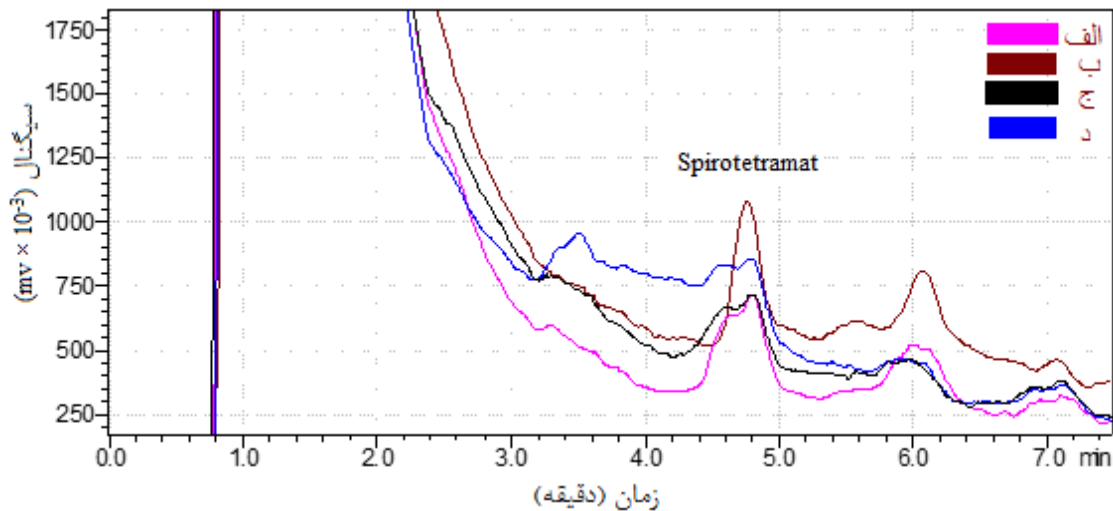
در روش کچرز پارامترهای متعددی وجود دارد که هر کدام نقش ویژه‌ای را در بازیابی و پاکسازی بافت نمونه ایفا می‌کنند. در این مطالعه چندین پارامتر بررسی شد و سایر پارامترها با توجه به مقالات انتخاب و ثابت در نظر گرفته شدند [۸۳،۵۰]. با توجه به این‌که آفت‌کش اصلی و مهم اسپیروتترامات می‌باشد بهینه‌سازی‌ها بر روی این آفت‌کش انجام شد و بهینه‌سازی بر روی متابولیت اسپیروتترامات-انول در این مطالعه صورت نگرفت.

### ۳-۳-۱ بهینه‌سازی مقدار آب

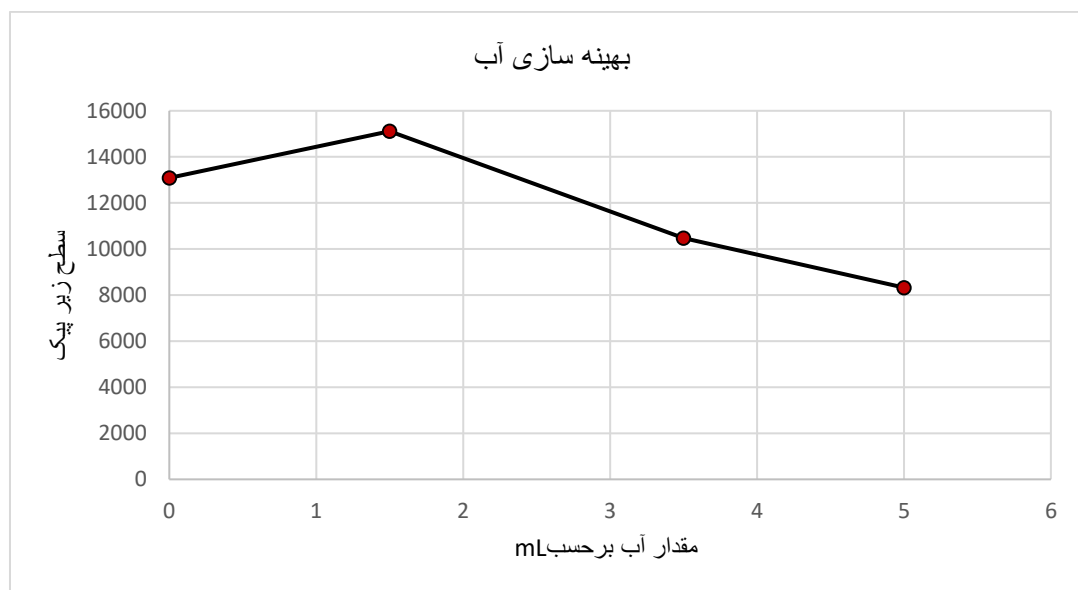
افزودن آب به بافت پسته موجب نفوذ بهتر حلال آلی قابل امتزاج به بافت نمونه و استخراج بیشتر آنالیت می‌شود و با بهینه‌سازی نسبت نمونه به مقدار آب افزوده شده می‌توان درصد بازیابی را بهبود بخشید [۸۳]. به ازای ۳/۵۰۰۰ گرم نمونه مقادیر صفر، ۱/۵، ۳/۵ و ۵/۰ میلی‌لیتر آب (با نسبت‌های ۱:۰، ۱:۰/۵، ۱:۱ و ۱:۱/۵ نمونه: آب) به نمونه‌ها اضافه و مراحل استخراج و پاکسازی انجام گرفت. روش به کار برده به این صورت است که ابتدا ۳/۵۰۰۰ گرم نمونه توزین و به فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردید و به نمونه ۱/۰ میلی‌لیتر آفت‌کش اسپیروترامات با غلظت ۱/۰ mg/L اضافه گردید. پس از هم‌زدن ۱ ساعت زمان داده شد تا آفت‌کش به داخل بافت پسته نفوذ کند. سپس مقادیر مختلفی از آب مقطر اضافه و ۲۰ دقیقه زمان داده شد تا آب به درون بافت نمونه نفوذ کند. در ادامه ۳/۵۰ میلی‌لیتر استونیتریل افزوده و به مدت ۲۰ ثانیه به شدت با دست هم‌زده شد. ۱/۴۰۰۰ گرم منیزیم سولفات به همراه ۰/۳۵۰۰ گرم سدیم کلرید توزین و به فالکن حاوی نمونه افزوده شد. نمونه به مدت ۳۰ ثانیه با دست و ۱ دقیقه توسط ورتکس با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه هم‌زده شد و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۳۴۵۰ دور بر دقیقه عمل سانتریفیوژ انجام گردید. سپس نمونه به مدت ۱۲ ساعت در فریزر با دمای  $20^{\circ}\text{C}$ - گذاشته شد. پس از گذشت ۱۲ ساعت نمونه از فریزر خارج گردید. برای مرحله پاکسازی مقادیر ۰/۲۵۰ گرم  $\text{C}_{18}$ ، ۰/۱۰۰۰ گرم PSA، ۰/۰۲۰۰ گرم GCB و ۰/۰۷۰۰ گرم منیزیم سولفات بدون آب به درون فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از فاز آلی رویی، حاوی آنالیت استخراج شده در مرحله قبل به فالکون ۱۵ میلی‌لیتری اضافه گردید. فالکون ۱۵ میلی‌لیتری به مدت یک دقیقه توسط ورتکس با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه هم‌زده و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۳۴۵۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ یک محلول دو فازي تشکیل شد که از فاز رویی شفاف، ۱/۵ میلی‌لیتر برداشته و از فیلتر سرسرنگی PTFE با اندازه حفرات ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده و به ویال منتقل گردید. ویال درون دستگاه گرمکن خلاء به مدت ۱۰۰ دقیقه در دمای  $38^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد. پس از تبخیر کامل حلال، ۲۵۰ میکرولیتر استونیتریل به آن اضافه و به دستگاه HPLC تزریق شد. نتایج شکل‌های (۳-۳-



۱۴) و (۳-۱۵) نشان داد که با افزایش ۱/۵ میلی لیتر آب به بافت نمونه سطح زیر پیک اسپیروتترامات در کروماتوگرام حاصل کمی افزایش می یابد. از آنجایی که افزایش آب به نمونه جامد پسته باعث نفوذ بیشتر حلال آلی (استونیتریل) به بافت نمونه می شود و ایجاد یک محیط همگن می کند، آزمایش های بعدی در حضور ۱/۵ میلی لیتر آب انجام گرفت.



شکل ۳-۱۴ کروماتوگرام های مربوط به استخراج اسپیروتترامات با روش اصلی کچرز از نمونه پسته الف) صفر ب) ۱/۵ ج) ۳/۵ د) ۵/۰ میلی لیتر آب در مرحله استخراج



شکل ۳-۱۵ تاثیر مقدار آب بر میزان سطح زیر پیک اسپیروتترامات استخراج شده از بافت پسته غنی شده با غلظت ۱/۰ mg/L

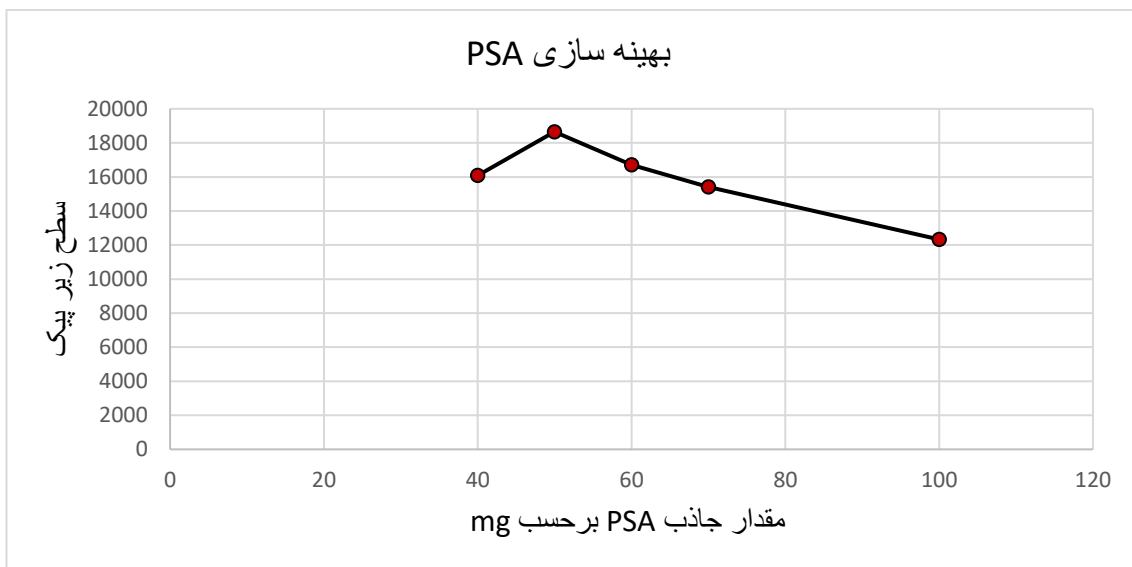
### ۳-۳-۲ بهینه‌سازی جاذب‌های مرحله پاکسازی

آزمایش‌های استخراج نشان داد که امکان حذف مرحله پاکسازی بر روی بافت‌های پسته وجود ندارد، زیرا فاز آلی حاصل از مرحله اول بسیار کدر، غیرشفاف و دارای ناخالصی زیادی می‌باشد که همین امر موجب می‌شود عصاره حاصل شده، قابلیت تزریق به دستگاه HPLC را نداشته باشد. بدین منظور چهار جاذب PSA، GCB، C<sub>18</sub> و MgSO<sub>4</sub> در این مرحله به کارگرفته شد. نقش منیزیم سولفات در این مرحله جذب آب اضافی موجود در لایه استونیتریلی (فاز آلی) و افزایش بازیابی می‌باشد. PSA برای حذف ترکیباتی مانند اسیدهای چرب، اسیدهای آلی و قندها به کار می‌رود. GCB برای حذف رنگدانه‌ها استفاده می‌شود. C<sub>18</sub> نیز موجب حذف ترکیبات غیر قطبی مثل لیپیدها، استرول‌ها، کلروفیل‌ها و کارتنوئیدها می‌شود. با توجه به مطالعات قبلی، تغییر میزان MgSO<sub>4</sub> اثر چندانی بر استخراج ندارد ولی اضافه کردن بیش از حد آن موجب کلوخه شدن نمونه می‌شود و هم‌زدن را با مشکل مواجه می‌کند [۷۸]. علاوه بر این با قرار دادن نمونه در دمای ۲۰°C- چربی‌ها به راحتی جدا می‌شوند و میزان C<sub>18</sub> مورد نیاز تا حد چشم‌گیری کاهش می‌یابد [۸۳]. بنابراین با توجه به مطالعات قبلی در به کارگیری روش کچرز، مقدار منیزیم سولفات بدون آب و C<sub>18</sub> به ترتیب ۰/۰۷۰ و ۰/۰۲۵ انتخاب شدند. در این مطالعه دو جاذب PSA و GCB بهینه شدند. روش به کار برده شده به این صورت است که، ابتدا ۳/۵۰۰ گرم نمونه توزین و به فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردید و به نمونه، ۱/۰ میلی‌لیتر آفت‌کش اسپروترامات با غلظت ۱/۰ mg/L اضافه گردید و پس از هم‌زدن ۱ ساعت زمان داده شد تا آفت‌کش به داخل بافت پسته نفوذ کند. سپس ۱/۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و ۲۰ دقیقه زمان داده شد تا آب به درون بافت نمونه نفوذ کند. در ادامه ۳/۵۰ میلی‌لیتر استونیتریل افزوده و به مدت ۲۰ ثانیه به شدت با دست تکان داده شد. ۱/۴۰۰ گرم منیزیم سولفات به همراه ۰/۳۵۰ گرم سدیم کلرید توزین و به فالکن حاوی نمونه افزوده شد. نمونه به مدت ۲۰ ثانیه با دست و ۱ دقیقه توسط ورتکس با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه هم‌زده و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۳۴۵۰ دور بر دقیقه عمل سانتریفیوژ انجام گردید. نمونه سپس به مدت ۱۲ ساعت در فریزر با دمای ۲۰°C- گذاشته شد. پس از گذشت ۱۲ ساعت نمونه از فریزر خارج

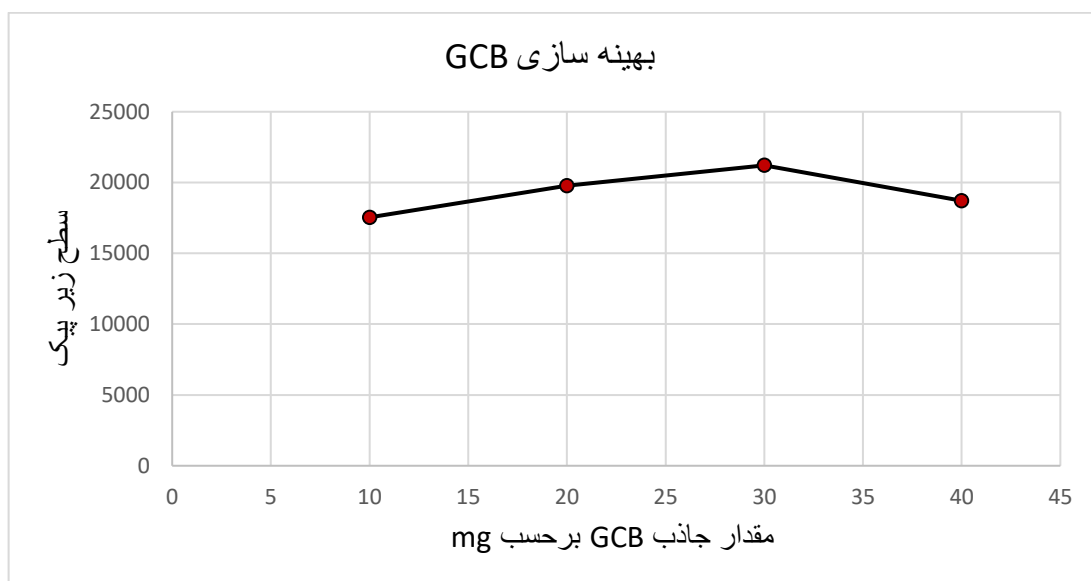
گردید. برای مرحله پاکسازی مقدار ۰/۰۲۵۰ گرم C<sub>18</sub>، مقدار ۰/۰۷۰۰ گرم منیزیم سولفات بدون آب و مقادیر مختلفی از PSA و نیز مقادیر مختلفی از GCB مطابق جدول (۲-۳) به فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر فاز آلی رویی، حاوی آنالیت از مرحله استخراج به هریک از فالكون‌ها اضافه گردید. فالكون‌های ۱۵ میلی‌لیتری به مدت یک دقیقه توسط ورتکس با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه هم‌زده و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۳۴۵۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، یک محلول دو فازي تشکیل شد. از فاز رویی شفاف، ۱/۵ میلی‌لیتر با سرنگ برداشته و پس از عبور از فیلتر سرسرنگی PTFE با اندازه حفرات ۰/۴۵ میکرومتر به ویال منتقل گردید. ویال درون دستگاه گرم کن خلاء به مدت ۱۰۰ دقیقه در دمای ۳۸°C قرار داده شد. پس از تبخیر کامل حلال، ۲۵۰ میکرولیتر استونیتریل به آن اضافه و به دستگاه HPLC تزریق گردید. مطابق شکل‌های (۳-۱۶) و (۳-۱۷) بالاترین سیگنال مربوط به مقدار ۰/۰۵۰۰ mg جاذب PSA و ۰/۰۳۰۰ mg GCB می‌باشد. بنابراین مقدار ۰/۰۵۰۰ mg از PSA و ۰/۰۳۰۰ mg از GCB برای آزمایش‌های بعدی انتخاب گردید.

جدول ۲-۳ مقادیر مختلف دو جاذب PSA و GCB جهت بهینه‌سازی در مرحله پاکسازی روش کچرز

شماره آزمایش	PSA (mg)	GCB (mg)	MgSO <sub>4</sub> (mg)	C <sub>18</sub> (mg)
۱	۴۰	۲۰	۷۰	۲۵
۲	۵۰	۲۰	۷۰	۲۵
۳	۶۰	۲۰	۷۰	۲۵
۴	۷۰	۲۰	۷۰	۲۵
۵	۱۰۰	۲۰	۷۰	۲۵
۶	۵۰	۱۰	۷۰	۲۵
۷	۵۰	۲۰	۷۰	۲۵
۸	۵۰	۳۰	۷۰	۲۵
۹	۵۰	۴۰	۷۰	۲۵



شکل ۳-۱۶ تاثیر میزان جاذب PSA بر میزان سطح زیر پیک اسپیروتترامات استخراج شده از بافت پسته غنی شده با غلظت ۱/۰ mg/L



شکل ۳-۱۷ تاثیر میزان جاذب GCB بر میزان سطح زیر پیک اسپیروتترامات استخراج شده از بافت پسته غنی شده با غلظت ۱/۰ mg/L

### ۳-۴ اعتبار سنجی روش

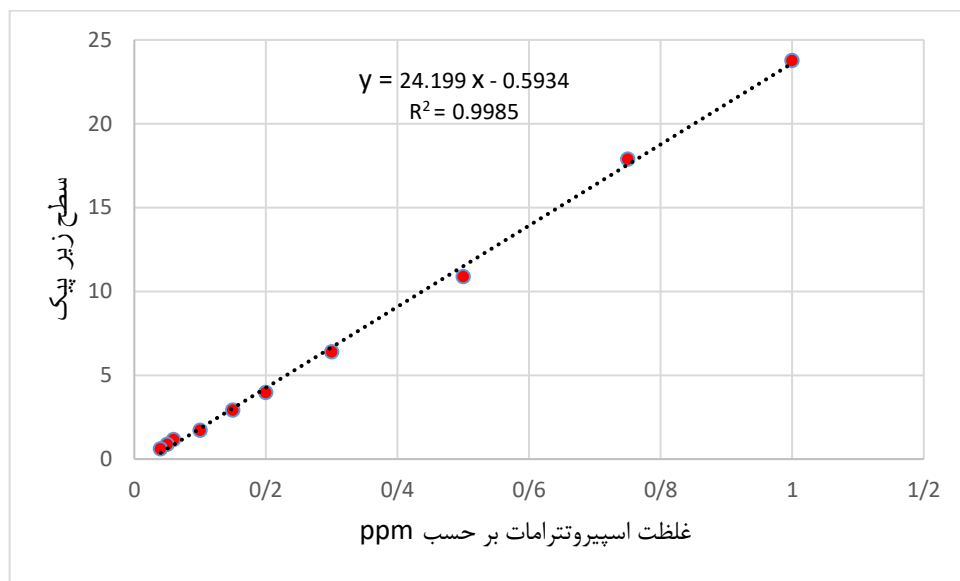
برای پی بردن به مقدار سموم در نمونه مجهول، رسم منحنی درجه بندی (کالیبراسیون) الزامی می باشد. با استفاده از غلظت‌های مختلف و به دست آوردن سطح زیر پیک آنها تعدادی نقاط بدست می آید. اگر نقاط به دست آمده را با روش حداقل مربعات به یکدیگر وصل کنیم منحنی درجه بندی پدید می آید. با به دست آوردن سیگنال نمونه مجهول و قرار دادن آن در منحنی درجه بندی به غلظت ماده مجهول پی می بریم.

### ۳-۴-۱ رسم منحنی درجه بندی مستقیم

به منظور ارزیابی اثر بافت موجود در عصاره استخراجی بر نتایج کمی، دو نوع منحنی درجه بندی رسم شد. در تمامی این منحنی‌ها محلول‌های استاندارد آفت کش اسپیروترامات که با استونیتریل به حجم رسیده بودند در ده نقطه و با دامنه غلظتی ۰/۰۴۰ تا ۱/۰ میلی گرم بر لیتر و با شرایط کروماتوگرافی ذکر شده در بخش ۳-۱ یک بار تهیه و سه مرتبه به دستگاه HPLC تزریق شد. رسم منحنی درجه بندی مستقیم برای اسپیروترامات-انول در هفت نقطه با دامنه غلظتی ۰/۰۵۰ تا ۱/۰ میلی گرم بر لیتر انجام شد. مطابق شکل (۳-۱۸) و (۳-۱۹) و پس از تزریق محلول‌های استاندارد، مساحت سطح زیر هر پیک ثبت و با روش حداقل مربعات بهترین خط رسم شد. داده‌های حاصل از غلظت و سطح زیر پیک حاصل در جدول (۳-۳) و (۳-۴) آورده شده است. همچنین شیب و ضریب همبستگی محاسبه شده برای این منحنی‌ها در جدول (۳-۷) آورده شده است.

جدول ۳-۳ نتایج حاصل از بررسی منحنی درجه بندی مستقیم اسپروترامات در محدوده غلظتی ۰/۰۴-۱/۰ mg/L

غلظت (mg/L)	سطح زیر پیک (mv/s)
۰/۰۴	۰/۶۲
۰/۰۵	۰/۸۹
۰/۰۶	۱/۱۷
۰/۱۰	۱/۷۳
۰/۱۵	۲/۹۳
۰/۲۰	۳/۹۷
۰/۳۰	۶/۴۱
۰/۵۰	۱۰/۸۹
۰/۷۵	۱۷/۸۹
۱/۰۰	۲۳/۷۶

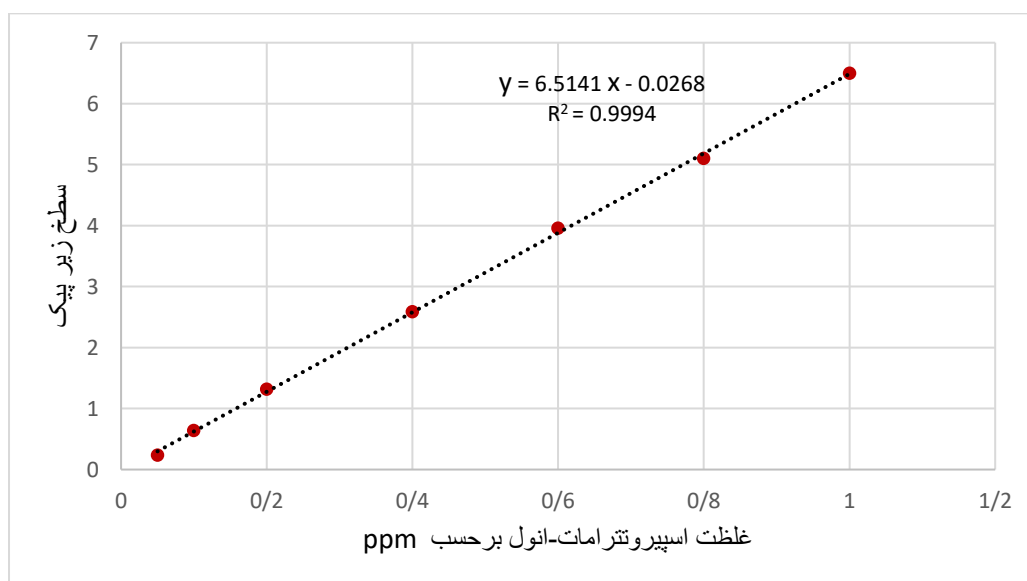


شکل ۳-۱۸ منحنی درجه بندی مستقیم اسپروترامات

جدول ۳-۴ نتایج حاصل از بررسی منحنی درجه بندی مستقیم اسپیروتترامات-انول در محدوده غلظتی ۰/۰۵-۱/۰

۰/۰۵

غلظت (mg/L)	سطح زیر پیک (mv/s)
۰/۰۵	۰/۲۳
۰/۱۰	۰/۶۴
۰/۲۰	۱/۳۱
۰/۴۰	۲/۵۹
۰/۶۰	۳/۹۶
۰/۸۰	۵/۱۰
۱/۰۰	۶/۵۵



شکل ۳-۱۹ منحنی درجه بندی مستقیم اسپیروتترامات-انول

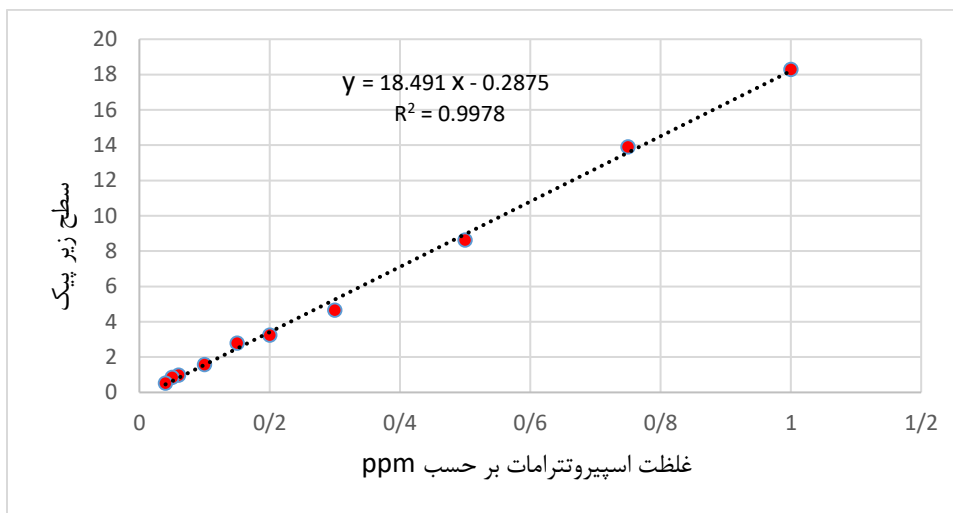
### ۳-۴-۲ رسم منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی

برای رسم منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی، ابتدا تمامی مراحل روش کچرز اصلاح شده روی ده نمونه ۳/۵ گرمی پسته خالص (بدون آنالیت) انجام شد. پس از به دست آمدن عصاره استخراجی آفت کش اسپیروترامات استاندارد با غلظت های مختلف ۰/۰۴، ۰/۰۵، ۰/۰۶، ۰/۱۰، ۰/۱۵، ۰/۲۰، ۰/۳۰، ۰/۵۰، ۰/۷۵ و ۱/۰۰ میلی گرم بر لیتر ساخته و هرکدام سه مرتبه به دستگاه HPLC تزریق شدند. منحنی درجه بندی در شکل (۳-۲۰) نشان داده شد و مشخصات بهترین خط رسم شده در جدول (۳-۵) آورده شده است. همین روند برای متابولیت اسپیروترامات-انول در هفت فاکون جداگانه و با غلظت های ۰/۰۵، ۰/۱۰، ۰/۲۰، ۰/۴۰، ۰/۶۰، ۰/۸۰ و ۱/۰۰ میلی گرم بر لیتر ساخته و به دستگاه HPLC تزریق شد. منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی برای اسپیروترامات-انول در شکل (۳-۲۱) و جدول (۳-۶) نشان داده شد و مشخصات بهترین خط آن در جدول (۳-۷) آورده شده است.

جدول ۳-۵ نتایج حاصل از بررسی منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی اسپیروترامات در محدوده غلظتی mg/L ۰/۰۴-۱/۰

غلظت (mg/L)	سطح زیر پیک (mv/s)
۰/۰۴	۰/۵۱
۰/۰۵	۰/۸۴
۰/۰۶	۰/۹۷
۰/۱	۱/۵۷
۰/۱۵	۲/۷۸
۰/۲	۳/۲۵
۰/۳	۴/۶۶
۰/۵	۸/۶۲
۰/۷۵	۱۳/۸۹
۱/۰۰	۱۸/۲۸

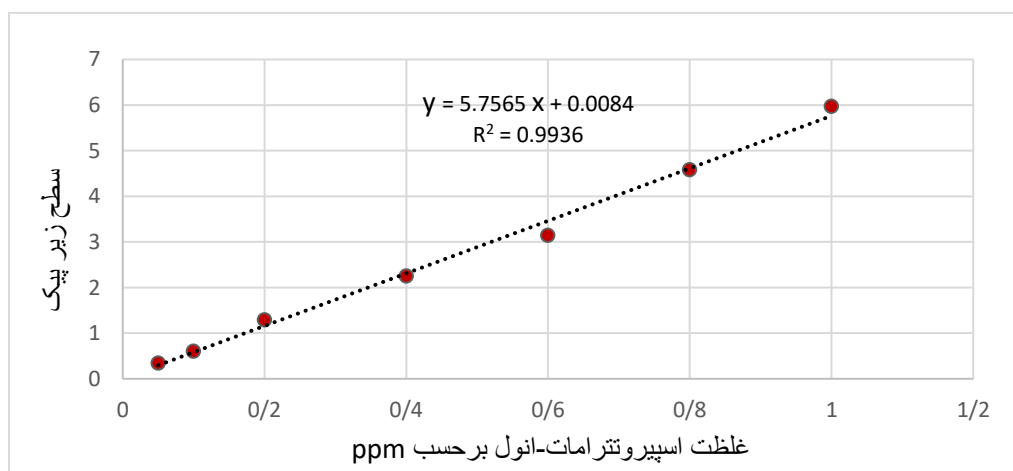




شکل ۳-۲۰ منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی برای اسپروتترامات

جدول ۳-۶ نتایج حاصل از بررسی منحنی درجه بندی همسان بافتی اسپروتترامات-انول در محدوده غلظتی mg/L ۰/۰۵ - ۱/۰۰

سطح زیر پیک (mv/s)	غلظت (mg/L)
۰/۳۴	۰/۰۵
۰/۶۰	۰/۱۰
۱/۲۹	۰/۲۰
۲/۲۵	۰/۴۰
۳/۱۴	۰/۶۰
۴/۵۸	۰/۸۰
۵/۹۷	۱/۰۰



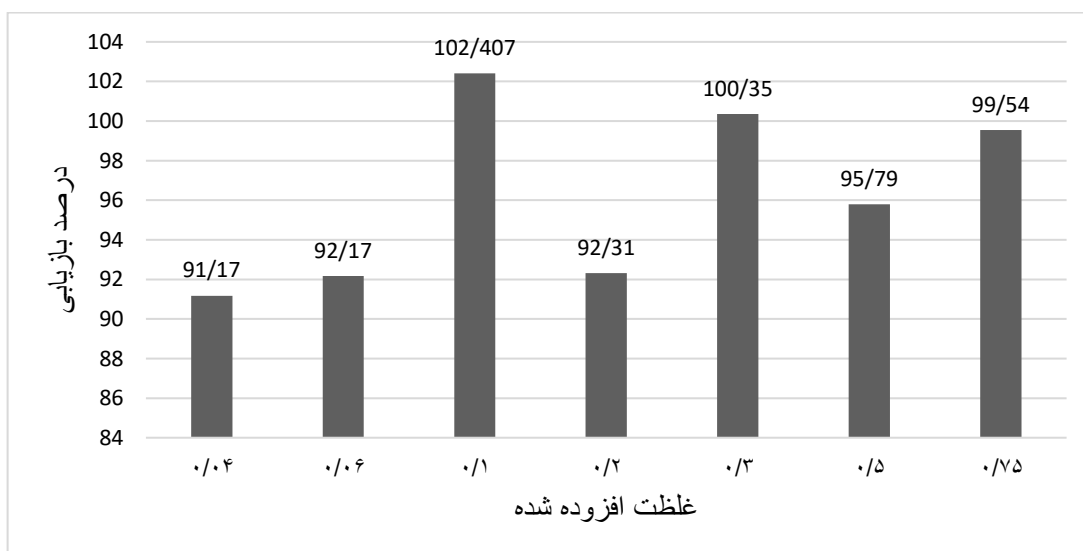
شکل ۳-۲۱ منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی برای اسپروتترامات-انول

جدول ۳-۷ معادله خط و ضریب همبستگی منحنی‌های درجه بندی رسم شده

R <sup>2</sup>	معادله خط	نوع منحنی درجه بندی
۰/۹۹۸۵	$y = ۲۴/۱۹۹ x - ۰/۵۹۳۴$	مستقیم اسپیروترامات
۰/۹۹۹۴	$y = ۶/۵۱۴۱ x - ۰/۰۲۶۸$	مستقیم اسپیروترامات-انول
۰/۹۹۷۸	$y = ۱۸/۴۹۱ x - ۰/۲۸۷۵$	همسان سازی بافتی اسپیروترامات
۰/۹۹۳۶	$y = ۵/۷۵۶۵ x + ۰/۰۰۸۴$	همسان سازی بافتی اسپیروترامات-انول

### ۳-۴-۳ نمودار بازیابی در غلظت‌های مختلف

برای پی بردن به مقادیر بازیابی، ابتدا غلظت‌های ۰/۷۵، ۰/۵۰، ۰/۲۰، ۰/۱۰، ۰/۰۶ و ۰/۰۴ میلی‌گرم بر لیتر از آفت کش اسپیروترامات به نمونه‌های پسته افزوده شد. سپس مراحل استخراج و پاکسازی بر روی نمونه‌ها انجام گرفت و به دستگاه تزریق و کروماتوگرام‌ها ثبت شدند. با استفاده از معادله (۲-۱) درصد بازیابی محاسبه شد و مقادیر به دست آمده طبق شکل (۳-۲۲) نشان داده شد.



شکل ۳-۲۲ نمودار بازیابی در غلظت‌های مختلف

### ۳-۴-۴ اثر بافت

طبق استاندارد سانکو (SANCO) اثر بافت با رسم منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی و یا روش افزایش استاندارد بررسی می‌شود. با مقایسه شیب‌های به‌دست آمده از دو منحنی درجه‌بندی مستقیم و همسان سازی بافتی می‌توان اطلاعاتی در مورد اثر بافت نمونه بر اندازه‌گیری کمی و همچنین کارایی مراحل آماده‌سازی نمونه به‌دست آورد. تفاوت دو منحنی در حضور بافت پسته در عصاره استخراجی و مقایسه شیب این دو منحنی، اثر بافت را نشان می‌دهد.

مکانیسم اثر بافت ناشناخته است، که احتمالاً شامل رقابت بین آنالیت و ترکیبات نامعلوم استخراج شده از بافت نمونه حاصل می‌شود. مقدار این اثر با استفاده از معادله (۳-۱) به‌دست می‌آید.

$$\% ME = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad \text{معادله (۳-۱)}$$

ME بیان کننده اثر بافت، A شیب منحنی استاندارد، B شیب منحنی همسان سازی بافتی می‌باشد.

طبق مراجع عنوان شده مقادیر  $\pm 15$  درصد برای ME نشان می‌دهد اثر بافت نمونه بر روی آنالیز کم است. در صورتی که اگر این مقدار بین  $\pm 15$  تا  $\pm 40$  درصد باشد اثر بافت متوسط عنوان می‌شود و در غیر این صورت مشخص می‌گردد که روش آماده سازی به کار رفته نمی‌تواند اثر بافت را به صورت قابل توجهی کم کند.

در این مطالعه اثر بافت بر روی نتایج کمی با استفاده از روش کچرز اصلاح شده برابر است با:

$$\% ME = \frac{24.199-18.491}{24.199} \times 100 = 23.59 \%$$

عدد محاسبه شده نشان می‌دهد روش پیشنهادی دارای مقداری اثر بافت می‌باشد ولی با توجه به اینکه

عدد به‌دست آمده زیر ۴۰ درصد می‌باشد این مقدار قابل قبول است [۱۱۶, ۱۱۷].

### ۳-۴-۵ تعیین حد تشخیص و حد کمی روش پیشنهادی

جهت به دست آوردن حد تشخیص<sup>۱</sup> (LOD) روش، ابتدا نمونه همسان سازی بافتی را تا حد ممکن رقیق کردیم، تا جایی که پیک حاصل از آنالیت اسپیروترامات از نویز قابل شناسایی نبود و کمترین مقدار قابل شناسایی برای این آفت کش ۲/۲ میکروگرم بر کیلوگرم به دست آمد. برای محاسبه حد کمی<sup>۲</sup> (LOQ) روش از استاندارد سانکو استفاده می شود. طبق این روش مقدار حد کمی می بایست کمترین غلظتی که دارای ریکاوری بین ۷۰ تا ۱۲۰ درصد و همچنین دارای انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۲۰ درصد باشد [۱۱۷]. در این مطالعه مقدار ۰/۰۵۳ میلی گرم بر لیتر دارای ویژگی های بیان شده طبق استاندارد سانکو می باشد.

### ۳-۴-۶ بررسی دقت و صحت درون روز و بین روز روش پیشنهادی

دقت روش با استفاده از محاسبه انحراف استاندارد نسبی نتایج به دست آمده در یک روز (سه مرتبه) و سه روز متوالی (یک مرتبه) از نمونه شاهد پسته در شرایط بهینه با سه غلظت ۱/۰، ۰/۶۶، ۰/۳۳ میلی گرم بر لیتر محاسبه شد. صحت روش با استفاده از t تست و محاسبه بازیابی توسط مقایسه ی غلظت اضافه شده در استخراج نمونه های غنی سازی و غلظت تعیین شده توسط منحنی درجه بندی همسان سازی بافتی ارزیابی شد. مقادیر به دست آمده از بررسی صحت و دقت درون روز و بین روز در جدول (۳-۸) نشان دهنده دقت و صحت خوب برای این روش می باشد (در سطح اطمینان ۹۵٪ مقدار t بحرانی برای ۲ درجه آزادی برابر ۴/۳۰ است).

<sup>1</sup> Limit Of Detection

<sup>2</sup> Limit Of Quantification

جدول ۳-۸ مقادیر محاسبه شده برای دقت و صحت روش کچرز اصلاح شده در پسته

غلظت اسپیروترامات (mg/L)	غلظت اندازه‌گیری شده (mg/L ± SD *)	%RSD	مقدار t	درصد بازیابی
۱	۱/۰۰۵ ± ۰/۰۰۳۲	۰/۳۲	۲/۲۱	۱۰۰/۴۷
۰/۶۶	۰/۶۳۹ ± ۰/۰۰۹۶	۱/۰۳	۳/۸۲	۹۷/۸۹
۰/۳۳	۰/۳۲۴ ± ۰/۰۰۸۹	۲/۴۷	۱/۵۹	۹۷/۲۱

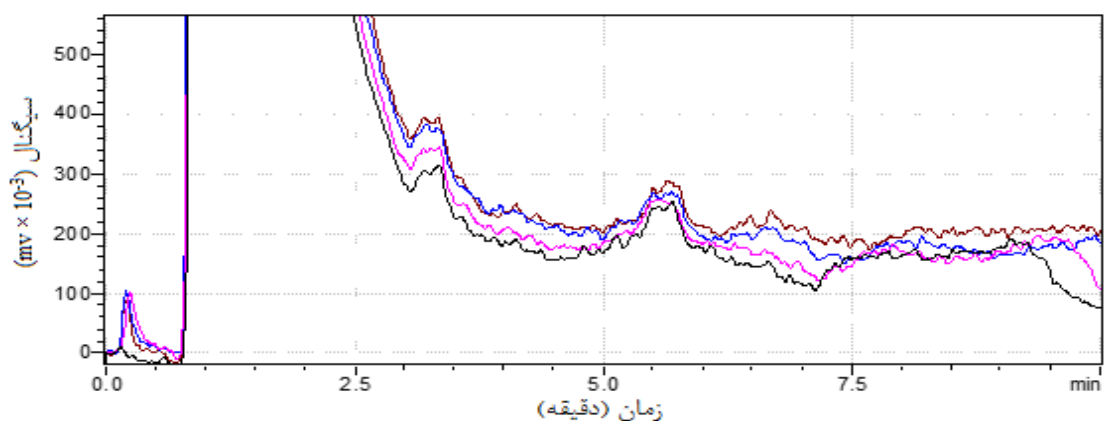
\* Standard deviation (سه اندازه‌گیری)

t critical = 4.30 (0.95 of confidence limit)

### ۳-۵ آنالیز نمونه‌های واقعی

نمونه پسته سمپاشی شده با آفت‌کش اسپیروترامات (نمونه واقعی) در سال جاری یافت نشد. برای بررسی کارایی روش در نمونه‌های مختلف پسته، چند نمونه جمع‌آوری شده از باغات پسته کرمان بعد از همگن‌سازی با روش کچرز اصلاح شده مورد آنالیز قرار گرفت. ۳/۵۰۰۰ گرم از این نمونه همگن شده را توزین و به فالكون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردید. سپس ۱/۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و ۲۰ دقیقه زمان داده شد تا آب به درون بافت نمونه نفوذ کند. ۳/۵ میلی‌لیتر استونیتریل افزوده و به مدت ۲۰ ثانیه به شدت با دست هم‌زده شد. ۱/۴۰۰۰ گرم منیزیم سولفات به همراه ۰/۳۵۰۰ گرم سدیم کلرید توزین و به فالكون حاوی نمونه افزوده شد. نمونه به مدت ۳۰ ثانیه با دست و ۱ دقیقه توسط ورتکس با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه هم‌زده شد و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۳۴۵۰ دور بر دقیقه عمل سانتریفیوژ انجام گردید. نمونه به مدت ۱۲ ساعت در فریزر با دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - گذاشته شد. پس از گذشت ۱۲ ساعت نمونه از فریزر خارج شد و برای مرحله پاکسازی مقادیر ۰/۰۲۵۰ گرم  $C_{18}$ ، ۰/۰۵۰۰ گرم PSA، ۰/۰۳۰۰ گرم GCB و ۰/۰۷۰۰ گرم منیزیم سولفات بدون آب به درون فالكون ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از فاز آلی رویی، حاوی آنالیت استخراج شده در مرحله قبل به آن اضافه گردید. فالكون

۱۵ میلی‌لیتری به مدت یک دقیقه توسط ورتکس با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه هم‌زده و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۳۴۵۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ یک محلول دو فازی تشکیل شد که از فاز رویی شفاف، ۱/۵ میلی‌لیتر برداشته و از فیلتر سرسرنگی PTFA با اندازه حفرات ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده و به ویال منتقل گردید. ویال درون دستگاه گرم‌کن خلاء به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۸°C قرار داده شد. پس از تبخیر کامل حلال، ویال از دستگاه خارج و ۲۵۰ میکرولیتر استونیتریل به آن اضافه شد و برای تزریق به دستگاه HPLC آماده گردید. در آنالیز این نمونه‌ها و با توجه به شکل ۳-۳ معلوم شد غلظت اسپیروتترامات موجود در این نمونه‌ها کمتر از حد تشخیص می‌باشد. برای اطمینان بیشتر، این نمونه‌ها پس از استخراج و پاکسازی با روش اصلاح شده کچرز به دستگاه LC-MS نیز تزریق شد. طبق نتایج حاصل شده از این دستگاه نیز آفت‌کش اسپیروتترامات مشاهده نشد.



شکل ۳-۲۳ کروماتوگرام حاصل از نمونه‌های واقعی در طول موج ۲۵۰ nm با سرعت جریان ۱ mL/min و فاز متحرک آب: استونیتریل با نسبت ۵۰:۵۰

### ۳-۶ مقایسه روش پیشنهادی با برخی روش‌های به‌کار گرفته شده برای اندازه‌گیری آفت‌کش اسپیروتترامات

این آفت‌کش به همراه آفت‌کش‌های دیگر در سال ۲۰۱۸ با استفاده از روش کچرز با دتکتور MS/MS اندازه‌گیری شد. در روش پیشنهادی از HPLC با دتکتور UV استفاده شده است که روش کم هزینه و قابل دسترس برای آزمایشگاه‌های عمومی می‌باشد. با تطبیق دو روش ذکر شده متوجه می‌شویم حد تشخیص روش پیشنهادی قابل مقایسه می‌باشد. آفت‌کش اسپیروتترامات در مراجع [۱۱۳، ۱۰۶] با

استفاده از روش کچرز و آنالیز نمونه‌ها با تکنیک HPLC در بافت انبه و سبزیجات اندازه‌گیری شده است. با توجه به جدول (۳-۹) مقادیر LOD و درصد بازیابی قابل مقایسه است.

جدول ۳-۹ مقایسه روش پیشنهادی با سایر روش‌ها

مرجع	درصد بازیابی	LOD( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	روش	ماتریس	آنالیت
[۱۰۴]	۹۱-۱۱۰	۲	کچرز	پسته	اسپیروترامات، استامی‌پراید، ایمیداکلوپراید و متابولیت‌ها
[۱۰۶]	۸۲-۹۷	۳۰	کچرز	میوه و سبزیجات	اسپیروترامات و متابولیت سیس انول-اسپیروترامات
[۱۱۳]	۷۲-۸۷	۱۶	کچرز	کاهو و انبه	اسپیروترامات و متابولیت انول-اسپیروترامات
	۹۱-۱۰۳	۲/۲	کچرز	پسته	اسپیروترامات و مهمترین متابولیت آن اسپیروترامات-انول

### ۳-۶ نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت صادرات محصولات غیر نفتی از جمله پسته، سلامت این محصولات نیز می‌بایست تضمین شوند. در این پایان‌نامه با استفاده از روش کچرز آفت‌کش اسپیروترامات به عنوان یکی از آفت‌کش‌های مرسوم باغات پسته، از بافت پسته استخراج شد. تاکنون اکثر آنالیز این آفت‌کش توسط HPLC با دتکتور MS انجام گرفته ولی به دلیل گران بودن این دستگاه و عمومی نبودن آن، در این مطالعه آنالیزها با دستگاه HPLC و با دتکتور UV/Vis صورت گرفت. در این مطالعه مقدار آب در مرحله استخراج و مقدار دو جاذب PSA و GCB در مرحله پاکسازی بهینه شدند و برای کاهش هزینه‌ها تغییراتی در روش اصلی حاصل گردید. نتایج حاصل شده گواه این موضوع است که روش به کار برده بسیار ارزان و ساده می‌باشد و به کارگیری دستگاه HPLC-UV برای آنالیزها گواهی برای ارزان و عمومی بودن این روش می‌باشد.

### ۳-۷ آینده نگری

با توجه به ورود آفت‌کش‌های جدید آنالیز این آفت‌کش‌ها نیز حائز اهمیت می‌باشد. آنالیز همزمان این آفت‌کش‌ها به همراه آفت‌کش‌های قدیمی توسط دستگاه‌های قدرتمندی مانند LC-MS و یا GC-MS به راحتی صورت می‌گیرد ولی با دستگاه HPLC همراه با دتکتور UV کمی دشوار به نظر می‌رسد. از آنجایی که HPLC بسیار عمومی‌تر و ارزان‌تر است اهمیت این اندازه‌گیری‌ها بیشتر می‌شود. با توجه به مشکلات اقتصادی کشور و گران شدن برخی از جاذب‌ها مانند آمین نوع اول و دوم، پیدا کردن جایگزین مناسب برای آنها می‌تواند به ارزان‌تر شدن هرچه بیشتر روش کچرز کمک کند.



# منابع

- [1] Yildiztekin M, Kaya C, Tuna AL, Ashraf M. Oxidative stress and antioxidative mechanisms in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants sprayed with different pesticides. *Pak J Bot.* (2015); 47 (2):717-21.
- [2] Dreher ML. Pistachio nuts: composition and potential health benefits. *Nutrition reviews.* (2012); 70 (4):234-40.
- [3] GHASEMINASAB PM, AHMADI A, MAZLOOMI SM. A review on pistachio: Its composition and benefits regarding the prevention or treatment of diseases. (2015).
- [4] Rabadán A, Álvarez-Ortí M, Gómez R, Pardo-Giménez A, Pardo JE. Characterization of pistachio oils and defatted flours regarding cultivar and geographic origin. *Journal of Food Composition and Analysis.* (2018).
- [5] SALEM Z. Pistachio and metabolic syndrome: A review article. (2014).
- [6] Bajwa U, Sandhu KS. Effect of handling and processing on pesticide residues in food-a review. *Journal of food science and technology.* (2014); 51 (2):201-20.
- [7] Taghizadeh-Alisaraei A, Assar HA, Ghobadian B, Motevali A. Potential of biofuel production from pistachio waste in Iran. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* (2017); 72: 510-22.
- [8] Aldemir M, Okulu E, Neşelioğlu S, Erel O, Kayıgil Ö. Pistachio diet improves erectile function parameters and serum lipid profiles in patients with erectile dysfunction. *International journal of impotence research.* (2011); 23 (1):32.
- [9] Kris-Etherton PM, Hu FB, Ros E, Sabaté J. The role of tree nuts and peanuts in the prevention of coronary heart disease: multiple potential mechanisms. *The Journal of nutrition.* (2008); 138(9):1746S-51S.
- [10] Mehrnejad MR, Copland MJ. Behavioral responses of the parasitoid *Psyllaephagus pistaciae* (Hymenoptera:Encyrtidae) to host plant volatiles and honeydew. *Entomological science.* (2006);9(1):31-7.
- [11] Salehi F, Samih M. Susceptibility of the common pistachio psyllid (*Agonoscena pistaciae* Burkhardt and Lauterer) to several plant extracts in laboratory. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants.* (2016); 32 (1).
- [12] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- [13] Arzani K, Mansouri-Ardakan H, Vezvaei A, Roozban MR. Morphological variation among Persian walnut (*Juglans regia*) genotypes from central Iran. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science.* (2008); 36 (3):159-68.
- [14] IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the Gold Book) (1997). Online Corrected Version: (2006) Pesticide residue.
- [15] A history of pesticide use, Patricia Muir at Oregon State University. Last updated Oct. 22, (2012), <http://people.oregonstate.edu/~muirp/pesthist.htm>
- [16] Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology.* (2009); 2 (1):1-12.
- [17] Popp J, Petö K, Nagy J. Pesticide productivity and food security. A review. *Agronomy for sustainable development.* (2013); 33 (1):243-55.
- [18] Blakley B, Brousseau P, Fournier M, Voccia I. Immunotoxicity of pesticides: a review. *Toxicology and industrial health.* (1999); 15 (1-2):119-32.
- [19] El-Saeid MH, AL-Dosari SA. Monitoring of pesticide residues in Riyadh dates by SFE, MSE, SFC, and GC techniques. *Arabian Journal of chemistry.* (2010); 3 (3):179-86.
- [20] Bajwa U, Sandhu KS. Effect of handling and processing on pesticide residues in food-a review. *Journal of food science and technology.* (2014); 51 (2):201-20.
- [21] Mazloomi S, Sefidkar R. A Review of the Effects of Different Types of Food Processing Methods on the Amount of Pesticides Residues in Raw and Processed Plant-based Food. *Scientific journal of ilamuniversity of medical sciences.* (2015); 22 (6):24-33.
- [22] Mills PA, Onley J, Gaither R. Rapid method for chlorinated pesticide residues in nonfatty foods. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists.* (1963); 46 (2):186-&.
- [23] Storherr RW, Ott P, Watts RR. A general method for organophosphorus pesticide residues in nonfatty foods. *Journal-Association of Official Analytical Chemists.* (1971); 54: 513.

- [24] Luke MA, Froberg JE, Masumoto HT. Extraction and cleanup of organochlorine, organophosphate, organonitrogen, and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*. (1975); 58 (5):1020-6.
- [25] Official Methods of Analysis (2000) 17th Ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- [26] Specht W, Pelz S, Gilsbach W. Gas-chromatographic determination of pesticide residues after clean-up by gel-permeation chromatography and mini-silica gel-column chromatography. *Fresenius' journal of analytical chemistry*. (1995); 353 (2):183-90.
- [27] Casanova JA. Use of solid-phase extraction disks for analysis of moderately polar and nonpolar pesticides in high-moisture foods. *Journal of aoac international*. (1996); 79 (4):936-40.
- [28] M. Luke, L. Cassias, S. Yee. Lab Inform Bull No 4178. Office of Regulatory Affairs, US Food and Drug Administration, Rockville, MD. (1999).
- [29] Jr Parfitt, (1991) Lab. Inform. Bull. No. 3616, Office of Regulatory Affairs, U.S. Food and Drug Administration, Rockville, MD
- [30] Schenck FJ, Callery P, Gannett PM, Daft JR, Lehotay SJ. Comparison of magnesium sulfate and sodium sulfate for removal of water from pesticide extracts of foods. *Journal of aoac international*. (2002); 85 (5):1177-80.
- [31] Lee SM, Papatkakis ML, Feng H-MC, Hunter GF, Carr JE. Multipesticide residue method for fruits and vegetables: California Department of Food and Agriculture. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. (1991); 339 (6):376-83.
- [32] Lehotay SJ, Lightfield AR, Harman-Fetcho JA, Donoghue DJ. Analysis of pesticide residues in eggs by direct sample introduction/gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry*. (2001); 49 (10):4589-96.
- [33] Cook J, Beckett MP, Reliford B, Hammock W, Engel M. Multiresidue analysis of pesticides in fresh fruits and vegetables using procedures developed by the Florida Department of Agriculture and Consumer Services. *Journal-aoac International*. (1999); 82:1419-35.
- [34] Hatje V, Magalhães W, Barros Junior F, Riatto VB, Cirano M, Spanó S, et al. Trace metals and benthic macrofauna distributions in Camamu Bay, Brazil: sediment quality prior oil and gas exploration. (2008).
- [35] Andersson A, Pålsheden H. Comparison of the efficiency of different GLC multi-residue methods on crops containing pesticide residues. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. (1991); 339 (6):365-7.
- [36] Fernandez-Alba AR, Valverde A, Agüera A, Contreras M. Gas chromatographic determination of organochlorine and pyrethroid pesticides of horticultural concern. *Journal of Chromatography A*. (1994); 686 (2):263-74.
- [37] Valverde-Garcia A, Fernandez-Alba AR, Contreras M, Agüera A. Supercritical fluid extraction of pesticides from vegetables using anhydrous magnesium sulfate for sample preparation. *Journal of agricultural and food chemistry*. (1996); 44 (7):1780-4.
- [38] Eller KI, Lehotay SJ. Evaluation of hydromatrix and magnesium sulfate drying agents for supercritical fluid extraction of multiple pesticides in produce. *Analyst*. (1997); 122 (5):429-35.
- [39] Lehotay SJ. Supercritical fluid extraction of pesticides in foods. *Journal of chromatography A*. (1997); 785 (1-2):289-312.
- [40] Richter BE, Jones BA, Ezzell JL, Porter NL, Avdalovic N, Pohl C. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*. (1996); 68 (6):1033-9.
- [41] Lehotay SJ, Lee C-H. Evaluation of a fibrous cellulose drying agent in supercritical fluid extraction and pressurized liquid extraction of diverse pesticides. *Journal of chromatography a*.(1997);785(1):313-27.
- [42] Schenck FJ, Wagner R. Screening procedure for organochlorine and organophosphorus pesticide residues in milk using matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic determination. *Food Additives & Contaminants*. (1995); 12 (4):535-41.
- [43] Barker SA. Matrix solid-phase dispersion. *Journal of chromatography A*. (2000); 885 (1-2):115-27.
- [44] Barker SA. Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis. *Journal of Chromatography A*. (2000); 880 (1-2):63-8.
- [45] Pawliszyn J. Solid phase microextraction: theory and practice: John Wiley & Sons; (1997).
- [46] Kataoka H, Lord HL, Pawliszyn J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of chromatography A*. (2000); 880 (1-2):35-62.

- [47] Mills GA, Walker V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *Journal of Chromatography A*. (2000); 902 (1):267-87.
- [48] Pylypiw HM, Arsenault TL, Thetford CM, Incorvia Mattina MJ. Suitability of microwave-assisted extraction for multiresidue pesticide analysis of produce. *Journal of agricultural and food chemistry*. (1997); 45 (9):3522-8.
- [49] Halim N, Kuntom A. Determination of glufosinate ammonium in crude palm oil: use of the modified quechers method and LC-MS/MS detection. *Journal of Oil Palm Research*. (2013); 25 (1):84-91.
- [50] Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*. (2003); 86 (2):412-31.
- [51] Manav ÖG, Dinç-Zor Ş, Alpdoğan G. Optimization of a modified QuEChERS method by means of experimental design for multiresidue determination of pesticides in milk and dairy products by GC–MS. *Microchemical Journal*. (2019);144:124-129.
- [52] Wang P-C, Lee R-J, Chen C-Y, Chou C-C, Lee M-R. Determination of cyromazine and melamine in chicken eggs using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) extraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. (2012); 752:78-86.
- [53] Oduntan AO, Tavengwa NT, Cukrowska E, Mhlanga SD, Chimuka L. QuEChERS Method Development for Bio-monitoring of low molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in South African carp fish using hplc-fluorescence: an initial assessment. *South African Journal of Chemistry*. (2016); 69:98-104.
- [54] Carneiro RP, Oliveira FA, Madureira FD, Silva G, de Souza WR, Lopes RP. Development and method validation for determination of 128 pesticides in bananas by modified QuEChERS and UHPLC–MS/MS analysis. *Food Control*. (2013); 33(2):413-23.
- [55] Zhou L, Liu X, Kang S, Zhang F, Pan C. A rapid determination method for ethylenethiourea in potato and cucumber by modified QuEChERS–High performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food chemistry*. (2013); 138(2-3):1355-9.
- [56] Garcia CV, Gotah A. Application of QuEChERS for Determining Xenobiotics in Foods of Animal Origin. *Journal of analytical methods in chemistry*. (2017).
- [57] Capriotti AL, Cavaliere C, Piovesana S, Samperi R, Laganà A. Multiclass screening method based on solvent extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of antimicrobials and mycotoxins in egg. *Journal of Chromatography A*. (2012); 1268:84-90.
- [58] Lopes RP, Augusti DV, Santos FA, Vargas EA, Augusti R. Development and validation of an efficient and innovative method for the quantification of multiclass veterinary drugs in milk by using LC–MS/MS analysis. *Analytical Methods*. (2013); 5(19):5121-7.
- [59] Lombardo-Agüí M, García-Campaña AM, Gámiz-Gracia L, Cruces-Blanco C. Determination of quinolones of veterinary use in bee products by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a QuEChERS extraction procedure. *Talanta*. (2012); 93:193-9.
- [60] Correia P, Cruz A, Santos L, Alves A. Human dermal exposure to galaxolide from personal care products. *International journal of cosmetic science*. (2013); 35(3):299-309.
- [61] Rawn DF, Judge J, Roscoe V. Application of the QuEChERS method for the analysis of pyrethrins and pyrethroids in fish tissues. *Analytical and bioanalytical chemistry*. (2010); 397(6):2525-31.
- [62] Zhang Z, Dong M, Hao X, Han L, Song S, Yao W. Evaluation of cleanup procedures in pesticide multi-residue analysis with QuEChERS in cinnamon bark. *Food chemistry*. (2019); 276:140-6.
- [63] Yin Y, Zhao C, Zheng G, Li L, Liu S, Shan Q, et al. Development of styrene-divinylbenzene copolymer beads using QuEChERS for simultaneous detection and quantification of 13 perfluorinated compounds in aquatic samples. *Microchemical Journal*. (2019); 144:166-71.
- [64] Manav ÖG, Dinç-Zor Ş, Alpdoğan G. Optimization of a modified QuEChERS method by means of experimental design for multiresidue determination of pesticides in milk and dairy products by GC–MS. *Microchemical Journal*. (2019); 144:124-9.
- [65] Muhammad N, Subhani Q, Wang F, Lou C, Liu J, Zhu Y. Simultaneous determination of two plant growth regulators in ten food samples using ion chromatography combined with QuEChERS extraction method (IC-QuEChERS) and coupled with fluorescence detector. *Food Chemistry*. (2018); 241:308-16.

- [66] da Costa Marinho MI, Costa AIG, Vieira NM, Paiva MCG, de Freitas FCL, da Silva AA. Validation and application of a QuEChERS based method for estimation of half-life of imidazolinone herbicides in soils by LC-ESI-MS/MS. *Ecotoxicology and environmental safety*. (2019); 167:212-7.
- [67] Peromingo B, Rodríguez M, Núñez F, Silva A, Rodríguez A. Sensitive determination of cyclopiazonic acid in dry-cured ham using a QuEChERS method and UHPLC-MS/MS. *Food chemistry*. (2018); 263:275-82.
- [68] Vargas-Pérez M, Marín-Sáez J, González FJE, Frenich AG. Optimization and establishment of QuEChERS based method for determination of propoxycarbazone and its metabolite in food commodities by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food chemistry*. (2019); 274:429-33.
- [69] Xiong L, Yan P, Chu M, Gao Y-Q, Li W-H, Yang X-L. A rapid and simple HPLC-FLD screening method with QuEChERS as the sample treatment for the simultaneous monitoring of nine bisphenols in milk. *Food chemistry*. (2018); 244:371-7.
- [70] da Costa Morais EH, Collins CH, Jardim ICSF. Pesticide determination in sweet peppers using QuEChERS and LC-MS/MS. *Food chemistry*. (2018); 249:77-83.
- [71] Ramos S, Homem V, Santos L. Development and optimization of a QuEChERS-GC-MS/MS methodology to analyse ultraviolet-filters and synthetic musks in sewage sludge. *Science of Total Environment*. (2019); 651:2606-14.
- [72] Usui K, Hayashizaki Y, Minagawa T, Hashiyada M, Nakano A, Funayama M. Rapid determination of disulfoton and its oxidative metabolites in human whole blood and urine using QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Legal Medicine*. (2012); 14(6):309-16.
- [73] Xu N, Dong J, Yang Y, Liu Y, Yang Q, Ai X. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method with modified QuEChERS extraction for the quantification of mebendazole and its metabolites, albendazole and its metabolites, and levamisole in edible tissues of aquatic animals. *Food chemistry*. (2018); 269:442-9.
- [74] Sapozhnikova Y. Evaluation of low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of > 140 pesticides in fish. *Journal of agricultural and food chemistry*. (2014); 62 (17):3684-9.
- [75] Xu X, Xu X, Han M, Qiu S, Hou X. Development of a modified QuEChERS method based on magnetic multiwalled carbon nanotubes for the simultaneous determination of veterinary drugs, pesticides and mycotoxins in eggs by UPLC-MS/MS. *Food chemistry*. (2019); 276:419-26.
- [76] Romero-González R, Plaza-Bolaños P, Limón-Garduza RI, Martínez-Vidal JL, Frenich AG. QuEChERS approach for the determination of biopesticides in organic and nonorganic vegetables and fruits by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*. (2014); 97(4):1027-33.
- [77] Zhang X, Song Y, Jia Q, Zhang L, Zhang W, Mu P, et al. Simultaneous determination of 58 pesticides and relevant metabolites in eggs with a multi-functional filter by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. (2019).
- [78] Kharandi N, Babri M, Azad J. A novel method for determination of patulin in apple juices by GC-MS. *Food chemistry*. (2013); 141(3):1619-23.
- [79] Zhou L, Liu X, Kang S, Zhang F, Pan C. A rapid determination method for ethylenethiourea in potato and cucumber by modified QuEChERS-High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food chemistry*. (2013); 138(2-3):1355-9.
- [80] Pareja L, Cesio V, Heinzen H, Fernández-Alba AR. Evaluation of various QuEChERS based methods for the analysis of herbicides and other commonly used pesticides in polished rice by LC-MS/MS. *Talanta*. (2011); 83(5):1613-22.
- [81] Peysson W, Vulliet E. Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. (2013); 1290:46-61.
- [82] Gilbert-López B, García-Reyes JF, Molina-Díaz A. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. *Talanta*. (2009); 79(2):109-28.

[۸۳] زهره گرشاسبی (۱۳۹۴)، پایان‌نامه ارشد، اندازه‌گیری آفت‌کش‌های استامی‌پراید به همراه ایمیداکلوپراید با روش کپرز در بافت پیسته، دانشگاه شهید بهشتی

- [84] Cunha S, Fernandes J. Assessment of bisphenol A and bisphenol B in canned vegetables and fruits by gas chromatography–mass spectrometry after QuEChERS and dispersive liquid–liquid microextraction. *Food Control*. (2013); 33(2):549-55.
- [85] Bruzzone MC, Checchini L, De Carlo RM, Orlandini S, Rivoira L, Del Bubba M. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: a critical review. *Analytical and bioanalytical chemistry*. (2014); 406(17):4089-116.
- [86] González-Curbelo M, Socas-Rodríguez B, Herrera-Herrera A, González-Sálamo J, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado M. Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. (2015); 71:169-85.
- [87] Rajski Ł, Lozano A, Uclés A, Ferrer C, Fernández-Alba AR. Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. (2013); 1304:109-20.
- [88] Hou X, Lei S, Qiu S, Guo L, Yi S, Liu W. A multi-residue method for the determination of pesticides in tea using multi-walled carbon nanotubes as a dispersive solid phase extraction absorbent. *Food chemistry*. (2014); 153:121-9.
- [89] Li Y-F, Qiao L-Q, Li F-W, Ding Y, Yang Z-J, Wang M-L. Determination of multiple pesticides in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method with magnetic nanoparticles and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. (2014); 1361:77-87.
- [90] Koesukwiwat U, Sanguankaew K, Leepipatpiboon N. Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. (2008); 626(1):10-20.
- [91] Nguyen TD, Lee MH, Lee GH. Rapid determination of 95 pesticides in soybean oil using liquid–liquid extraction followed by centrifugation, freezing and dispersive solid phase extraction as cleanup steps and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Microchemical Journal*. (2010); 95(1):113-9.
- [92] Cerqueira MB, Caldas SS, Primel EG. New sorbent in the dispersive solid phase extraction step of quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe for the extraction of organic contaminants in drinking water treatment sludge. *Journal of Chromatography A*. (2014); 1336:10-22.
- [93] Guan W, Li Z, Zhang H, Hong H, Rebeyev N, Ye Y, et al. Amine modified graphene as reversed-dispersive solid phase extraction materials combined with liquid chromatography–tandem mass spectrometry for pesticide multi-residue analysis in oil crops. *Journal of Chromatography A*. (2013); 1286:1-8.
- [94] Lehotay SJ, Son KA, Kwon H, Koesukwiwat U, Fu W, Mastovska K, et al. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*. (2010); 1217(16):2548-60.
- [95] Tomasini D, Sampaio MR, Caldas SS, Buffon JG, Duarte FA, Primel EG. Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*. (2012); 99:380-6.
- [96] Lehotay SJ, Maštovská K, Lightfield AR. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*. (2005); 88(2):615-29.
- [97] Jeong I-S, Kwak B-M, Ahn J-H, Jeong S-H. Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology. *Food chemistry*. (2012); 133(2):473-81.
- [98] Berendsen BJ, Nielen MW. Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. (2013); 43:229-39.
- [99] شریفی نژاد، سعید؛ سیدمصطفی نوعی باغبانی و نوید رمضانیان، (۱۳۹۵)، مروری بر زمینه فرایند استخراج سیال فوق بحرانی، سومین کنفرانس جهان بین المللی دستاوردهای نوین پژوهشی در شیمی و مهندسی شیمی، تهران، کنفدراسیون بین المللی مخترعان
- [100] Hussien, A., Westbom, R., Megersa, N., Mathiasson, L. and Björklund, E. Development of a pressurized liquid extraction and clean-up procedure for the determination of  $\alpha$ -endosulfan,  $\beta$ endosulfan and endosulfan sulfate in aged contaminated Ethiopian soils. *Journal of Chromatography A*. (2006);1103(2): 202-210.

- [101] Ramón E. Cevallos C, Consuelo Agulló, Antonio Abad-Somovilla, Antonio Abad-Fuentes, Josep V. Hapten Design and Antibody Generation for Immunoanalysis of Spirotetramat and Spirotetramat-enol. *ACS Omega*, (2018), 3 (9), 11950–11957.
- [102] Ting-Ting Yao, Jing-Li Cheng, Bing-Rong Xu, Min-Zhe Zhang, Yong-Zhou Hu, Jin-Hao Zhao, Xiao-Wu Dong. Support vector machine (SVM) classification model based rational design of novel tetrionic acid derivatives as potent insecticidal and acaricidal agents. *RSC Advances*. (2015);5: 49195-49203
- [103] Iranian National Standardization Organization. <http://www.isiri.gov.org>.
- [104] Faraji M, Noorbakhsh R, Shafieyan H, Ramezani M. Determination of acetamiprid, imidacloprid, and spirotetramat and their relevant metabolites in pistachio using modified QuEChERS combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food chemistry*. (2018); 240:634-41.
- [105] Hou X, Lei S, Qiu S, Guo L, Yi S, Liu W. A multi-residue method for the determination of pesticides in tea using multi-walled carbon nanotubes as a dispersive solid phase extraction absorbent. *Food chemistry*. (2014); 153:121-9.
- [106] Singh B, Mandal K, Sahoo SK, Bhardwaj U, Battu RS. Development and validation of an HPLC method for determination of spirotetramat and spirotetramat cis enol in various vegetables and soil. *Journal of AOAC International*. (2013); 96(3):670-5.
- [107] Zhu Y, Liu X, Xu J, Dong F, Liang X, Li M, et al. Simultaneous determination of spirotetramat and its four metabolites in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. (2013); 1299:71-7.
- [108] Aldana-Madrid ML. Dissipation of Spirotetramat and Spirotetramat-Enol in Leaf and Fruit of Grape Variety Red Globe (*Vitis Vinifera L.*). *Journal of Progressive Research in Biology*. (2015); 2(1):60-5.
- [109] Łozowicka B, Mojsak P, Kaczyński P, Konecki R, Borusiewicz A. The fate of spirotetramat and dissipation metabolites in Apiaceae and Brassicaceae leaf-root and soil system under greenhouse conditions estimated by modified QuEChERS/LC–MS/MS. *Science of The Total Environment*. (2017); 603:178-84.
- [110] Li S, Liu X, Dong F, Xu J, Xu H, Hu M, et al. Chemometric-assisted QuEChERS extraction method for the residual analysis of thiacloprid, spirotetramat and spirotetramat's four metabolites in pepper: application of their dissipation patterns. *Food chemistry*. (2016); 192:893-9.
- [111] Mohapatra S, Deepa M, Lekha S, Nethravathi B, Radhika B, Gourishanker S. Residue dynamics of spirotetramat and imidacloprid in/on mango and soil. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. (2012); 89(4):862-7.
- [112] Chen X, Meng Z, Zhang Y, Gu H, Ren Y, Lu C. Degradation kinetics and pathways of spirotetramat in different parts of spinach plant and in the soil. *Environmental Science and Pollution Research*. (2016); 23(15):15053-62.
- [113] Mohapatra S, Deepa M, Jagadish G. An efficient analytical method for analysis of spirotetramat and its metabolite spirotetramat-enol by HPLC. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. (2012); 88(2):124-8.
- [114] Yulong Zhu, Xingang Liu, Jun Xu, Fengshou Dong, Xuyang Liang, Minmin Li, Lifang Duan, Yongquan Zheng. Simultaneous determination of spirotetramat and its four metabolites in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1299 (2013) 71–77.
- [115] R. Schöning. J. Willmes. Analytical method 01084 for the determination of residues of spirotetramat (BYI 08330), BYI08330-enol, BYI08330-ketohydroxy, BYI08330-mono-hydroxy and BYI08330-enol-glucoside metabolites in/on plant material by HPLC-MS/MS. Bayer CropScience AG. (2008):1-140.
- [116] W Zhou, S Yang, PG Wang. Matrix effects and application of matrix effect factor. *Future Science*. (2017): 9 (23): 0214.
- [117] Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. European commission directorate general for health and food safety. (2017); sante 11813.

## **Abstract**

Pistachio as an important and strategic product plays an important role in non-oil export of the country. Hence, increasing the amount and quality of this product is important. Pesticide residues in pistachio treat human and environment health and also cause serious problems in exporting of this product. In this dissertation, the spirotetramat pesticide residue and its most important metabolite, spirotetramat-enol, were evaluated using the QuChERS method, which is a fast, easy, inexpensive, safe and reliable method for complex tissues. To isolate and measure this pesticide, high performance liquid chromatography with UV/Vis detector was used. HPLC instrumental such as wavelength of analysis and solvent for preparation of standards were evaluated and optimized. The QuChERS method consists of two steps: 1) extraction by acetonitrile. 2) a cleaning step using salts and sorbents. The amount of graphene carbon black and the primary and secondary amines at the purification step as well as the amount of water at the extraction stage were optimized. Finally, the method was evaluated for linearity range, detection limit according to the maximum residual value of pesticide in Iran, and also recovery and repeatability. The matrix-match calibration curve for spirotetramat showed a linear relation in the range 0.040-1.0 mg/L with correlation coefficient of 0.9978. The RSD was less than 10% and the recovery range was 91-103%. In addition, the matrix-match calibration curve for spirotetramate-enol exhibited a dynamic range of 0.050-1.0 mg/L with correlation coefficient of 0.9936. The LOD and LOQ for spirotetramate was 2.2  $\mu\text{g/kg}$  and 0.053 mg/L, respectively which is acceptable according to the MRL of this pesticide (50  $\mu\text{g/kg}$ ).

**Key words:** Pesticide residue, Metabolite, MRL, QuChERS method, Spirotetramat, Spirotetramat-enol, HPLC





Shahrood University of Technology

Faculty of Chemistry

MSc thesis in Analytical Chemistry

Providing method for extraction and analysis of Spirotetramat pectiside and its most important metabolite Spirotetramar-Enol in pistachio

By: **Rahman Gholami**

Sopervisers:

**Dr. Fatemeh Masdarolomoor**

**Dr. Vahideh Mahdavi**

Februry 2019