# دانشگاه الزهرا (س)

دانشکده علوم پایه

## پایان نامه

**جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد**

رشته شیمی - گرایش تجزیه

## عنوان پایان نامه:

# استفاده از روش استخراج جذبی روی میله آهنی جفت شده با اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی هسته فسفر به منظور اندازه گیری برخی حشره کش های آلی فسفردار در محیط های آبی

**استاد راهنما**: دکتر زهرا طالب پور

**دانشجو**: شادی انصاری

مهر ۱۳۸۹

## چکیده

آفت‌کش ها یکی از مهم ترین آلوده‌کننده های محیط زیست و به خصوص آب هستند که حدود ۹۰٪ آن ها ترکیبات آلی می‌باشند. متاسفانه استفاده نادرست از این ترکیبات منجر به حضور باقیمانده های این مواد در محصولات کشاورزی شده است که نهایتا به مصرف کننده می رسند. بنابراین اندازه‌گیری مقادیر کم این ترکیبات در محیط‌های حقیقی، از اهمیت خاصی برخوردار است. استفاده از پروب فسفر در اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی هسته به عنوان روشی بسیار ساده و گزینش پذیر برای تعیین غلظت هم زمان آفت کش‌های آلی فسفردار در مقایسه با کروماتوگرافی گازی وکروماتوگرافی مایع مطرح است.

در این تحقیق، چهار آفت کش آلی فسفردار شامل پروتیوفوس، لپتوفوس، ایزوفنفوس و پروفنفوس با استفاده از روش $^{31}$P NMR به طور هم زمان مورد آنالیز قرار گرفتند. در این راستا از متامیدوفوس به عنوان استاندارد داخلی استفاده گردید. مسئله دیگر مورد بحث در این پژوهش، توسعه و به کارگیری روش استخراج جذبی با میله چرخان (SBSE) جفت شده با روش $^{31}$P NMR به منظور بهبود حد تشخیص روش برای اندازه گیری هم زمان ۴ آفت‌کش آلی فسفردار است.

بهینه سازی روش استخراج جذبی با میله چرخان با استفاده از روش های طراحی آزمایش انجام گرفت. بدین منظور درمرحله استخراج ۴ فاکتور حجم نمونه، زمان استخراج، دمای استخراج، و زمان واجذب انتخاب گردید و توسط طراحی مختلط کوچک دراپر-لین مورد بررسی قرار گرفت و سطوح آن ها بهینه شد. حجم نمونه ۴/۲ mL، زمان استخراج ۹۶ دقیقه، دمای استخراج ۴۲ $^{\circ}$C و زمان واجذب ۱۱ دقیقه به عنوان شرایط بهینه به دست آمدند.

پس از به دست آوردن شرایط بهینه، روش از نقطه نظر معیارهایی چون خطی بودن، تکرار پذیری، بازیافت و حد تشخیص، اعتبارسنجی شد. نتایج نشان داد که روش در گستره بین حد کمی تا ۷۰ mg L$^{-1}$ خطی است. مقادیر حد تشخیص ها برای آفت‌کش ها در محدوده غلظتی ۰/۷۹ mg L$^{-1}$ – ۰/۰۳ و دقت درون روز روش با ضریب تغییر کمتر از ۷٪ به دست آمد. درصد بازیابی در نمونه‌ی حقیقی آب رودخانه چالوس برای ۴ آفت‌کش‌آلی فسفردار استفاده شده در این تحقیق به دست آمد. براساس این پارامترها و ضریب تغلیظ به دست آمده می‌توان گفت روش SBSE - $^{31}$P NMR روشی مناسب برای تعیین هم زمان مقادیر کم این دسته از آفت‌کش‌های آلی فسفردار در نمونه های آبی زیست محیطی است.

فهرست عناوین

عنوان صفحه


**فصل تئوری**

**۱- مقدمه** ۲

۱-۱ آفت کش ها ۲

۱-۱-۱ آفت کش های آلی فسفردار ۳

۱-۱-۲ اثرات ناشی از باقیمانده های آفت کش های آلی فسفر دار ۴

۱-۱-۳ تخریب آفت کش های آلی فسفردار ۸

۱-۱-۴ روش های اندازه گیری آفت کش های آلی فسفردار ۹

۱-۲ اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) ۱۲

۱-۲-۱ چگونگی انجام کار کمی با NMR ۱۳

۱-۲-۲ هسته های استفاده شده در NMR ۱۴

۱-۲-۳ کاربرد $^{31}$P NMR درآنالیز آفت کش های آلی فسفردار ۱۶

۱-۳ روش های استخراج جذبی ۱۷

۱-۳-۱ استخراج جذبی میله چرخان (SBSE) ۱۹

۱-۳-۱-۱ تئوری استخراج در SBSE ۲۰

۱-۳-۱-۲ فرآیند استخراج در SBSE ۲۱

۱-۳-۱-۳ پوشش میله چرخان در SBSE ۲۳

۱-۳-۱-۴ مزیت های SBSE ۲۴

۱-۳-۱-۵ کاربردهای SBSE در تعیین آفت کش ها ۲۴

۱-۳-۱-۶ محدودیت های SBSE ۲۸

۱-۴ استفاده از طراحی آزمایش در روش SBSE ۲۸

۱-۴-۱ طراحی مختلط کوچک دراپر- لین ( SCD ) ۳۳

۱-۴-۲ تابع شرایط مطلوب ۳۳

۱-۴-۳ ارزیابی مناسب بودن مدل ۳۵

۱-۴-۴ تعیین شرایط بهینه ۳۶

**فصل تجربی**

**۲- بخش تجربی** ۳۸

۲-۱ مواد مصرفی ۳۸

۲-۲ دستگاه ۳۸
۲-۲-۱ دستگاه اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) ۳۸
۲-۲-۲ سایر دستگاه ها ۴۰

۲-۳ استخراج آفت کش های آلی فسفر دار با روش SBSE ۴۰
۲-۳-۱ آماده سازی اولیه میله چرخان ۴۰
۲-۳-۲ مراحل انجام شده در فرایند استخراج بر روی میله چرخان ۴۰
۲-۳-۲-۱ مرحله جذب ۴۰
۲-۳-۲-۲ مرحله واجذب ۴۱
۲-۳-۳ فاکتورهای ابتدایی بهینه شده در فرایند SBSE ۴۱
۲-۳-۳-۱ بررسی اثر قدرت یونی نمونه درفرایند SBSE ۴۱
۲-۳-۳-۲ بررسی اثر نوع حلال واجذب در فرایند SBSE ۴۲

۲-۴ بهینه سازی سطوح فاکتورهای مؤثر بر فرآیند SBSE توسط طراحی دراپر- لین ۴۲

۲-۵ اعتبار سنجی روش SBSE-$^{31}$P NMR ۴۳
۲-۵-۱ رسم منحنی درجه بندی ۴۳
۲-۵-۲ بررسی دقت و صحت روش ۴۵
۲-۵-۳ کاربرد روش در نمونه ی حقیقی ۴۵

**فصل نتایج و بحث**

**۳- بخش نتایج** ۴۷
۳-۱ امکان سنجی اندازه گیری مخلوط حشره کش های آلی فسفردار پروتیوفوس، لپتوفوس، ایزو فنفوس و پروفنفوس با استفاده از روش $^{31}$P NMR ۴۷

۳-۲ استخراج آفت کش های آلی فسفردار پروتیوفوس، لپتوفوس، ایزوفنفوس و پروفنفوس از محیط آبی با استفاده از روش استخراج جذبی با میله چرخان (SBSE) ۴۸
۳-۲-۱ فاکتورهای ابتدایی بهینه شده در فرایند SBSE ۴۸
۳-۲-۱-۱ قدرت یونی نمونه ۴۸
۳-۲-۱-۲ حلال واجذب ۴۹

۳-۳ بررسی فاکتورهای مؤثر بر فرآیند استخراج و بهینه کردن سطح آن ها با استفاده از روش طراحی آزمایش دراپر- لین ۵۲
۳-۳-۱ تعیین فاکتور های موثر بر کارایی استخراج در روش SBSE ۵۴
۳-۳-۲ بهینه سازی سطوح فاکتورهای موثر ۶۰

۳-۳-۲-۱ ساخت مدل و ارزیابی آن ۶۰
۳-۳-۲-۲ به دست آوردن سطوح بهینه فاکتورها ۶۵

۳-۴ اعتبار سنجی روش SBSE - $^{31}$P NMR برای آنالیز ۴ آفت کش آلی فسفردار ۶۶
۳-۴-۱ شرایط استفاده شده برای ثبت طیف NMR به منظور آنالیز کمی ۶۶
۳-۴-۲ رسم منحنی درجه بندی ۶۷
۳-۴-۳ دقت و صحت روش ۷۰
۳-۴-۴ کاربرد روش روی نمونه ی حقیقی ۷۱

نتیجه گیری ۷۲

مراجع ۷۳

## فهرست اشکال

صفحه


شکل ۱-۱ فرمول کلی آفت کش های آلی فسفردار. ۳

شکل ۱-۲ مسیر پخش آفت کش ها در محیط زیست. ۶

شکل ۱-۳ مسیرهای ورود آفت کش ها به بدن. ۷

شکل ۱-۴ ساختار پلی دی متیل سیلوکسان (PDMS). ۱۸

شکل ۱-۵ میله چرخان استفاده شده در روش SBSE شامل ۱- میله مغناطیسی، ۲- پوشش شیشه ای، ۳- لایه PDMS. ۲۲

شکل ۳-۱ طیف NMR مخلوط ۴ آفت کش آلی فسفردار در غلظت $200 mg L^{-1}$. ۴۸

شکل ۳-۲ طیف های NMR مربوط به ۴ آفت کش الف) در غیاب NaCl و ب) در حضور ۱۵٪ NaCl. ۵۰

شکل ۳-۳ طیف های NMR مربوط به ۴ آفت کش آلی فسفردار با غلظت $50 mg L^{-1}$ در حلال های استخراج شده با الف) متانول و ب) استونیتریل. ۵۱

شکل ۳-۴ نمودار پارتو مربوط به پروتیوفوس. ۵۸

شکل ۳-۵ نمودار پارتو مربوط به لپتوفوس. ۵۸

شکل ۳-۶ نمودار پارتو مربوط به ایزوفنفوس. ۵۹

شکل ۳-۷ نمودار پارتو برای پروفنفوس. ۵۹

شکل ۳-۸ نمودار سطح پاسخ از طراحی دراپر لین برای شرایط مطلوب ۴ آفت کش آلی فسفردار. ۶۲

شکل ۳-۹ منحنی باقیمانده برای پروتیوفوس. ۶۳

شکل ۳-۱۰ منحنی باقیمانده برای لپتوفوس. ۶۴

شکل ۳-۱۱ منحنی باقیمانده برای ایزوفنفوس. ۶۴

شکل ۳-۱۲ منحنی باقیمانده برای پروفنفوس. ۶۵

شکل ۳-۱۳ جا به جایی شیمیایی آفت کش های پروتیوفوس، لپتوفوس، ایزوفنفوس و پروفنفوس و استاندارد داخلی متامیدوفوس. ۶۷

شکل ۳-۱۴طیف های استخراج شده در شرایط بهینه در غلظت های الف)۶، ب)۱۰، ج)۳۰ و د)$70 mg L^{-1}$. ۶۸

شکل ۳-۱۵ منحنی درجه بندی ایزوفنفوس استخراج شده با روش SBSE. ۶۹

## فهرست جداول

صفحه


جدول ۱-۱ خصوصیات آفت کش های مورد بررسی در این تحقیق ۵

جدول ۱-۲ حضور باقیمانده های آفت کش های آلی فسفردار در محیط های مختلف ۶

جدول ۱-۳ روش های اندازه گیری برای برای پروتیوفوس، لپتوفوس، ایزوفنفوس و پروفنفوس ۱۱

جدول ۱-۴ کاربرد روش SBSE در تعیین آفت کش ها در محیط های مختلف ۲۶ و ۲۷

جدول ۱-۵ استفاده از روش های طراحی ازمایش در بهینه سازی روشSBSE ۳۰

جدول ۲-۱ زمان آسایش آفت کش های آلی فسفردار بررسی شده در این تحقیق ۳۹

جدول ۲-۲ سطوح انتخابی فاکتورها در طراحی دراپر- لین ۴۳

جدول ۲-۳ ماتریس طراحی دراپر- لین برای ۴ فاکتور با ۷ تکرار در نقطه مرکزی ۴۴

جدول ۳-۱ سطح زیر پیک ۴ آفت کش آلی فسفردار استخراج شده در شرایط آزمایش پیشنهاد شده توسط طراحی دراپر- لین که نسبت به استاندارد داخلی سنجیده شده است ۵۳

جدول ۳-۲ آنالیز واریانس داده های به دست آمده از طراحی دراپر– لین برای پروتیوفوس ۵۴

جدول ۳-۳ آنالیز واریانس داده های به دست آمده از طراحی دراپر– لین برای لپتوفوس ۵۵

جدول ۳-۴ آنالیز واریانس داده های به دست آمده از طراحی دراپر– لین برای ایزوفنفوس ۵۶

جدول ۳-۵ آنالیز واریانس داده های به دست آمده از طراحی دراپر– لین برای پروفنفوس ۵۷

جدول ۳-۶ تخمین ضرایب رگرسیون به دست آمده در معادلات سطح پاسخ برای پروتیوفوس، لپتوفوس، ایزوفنفوس و پروفنفوس ۶۱

جدول ۳-۷ مربع ضریب همبستگی($R^2$ ) مدل های ساخته شده برای پروتیفوس، لپتوفوس، ایزوفنفوس و پروفنفوس ۶۲

جدول ۳-۸ سطوح بهینه شده برای ۴ آفت کش آلی فسفردار به دست آمده برای فاکتور ها با استفاده از روش تابع شرایط مطلوب ۶۶

جدول ۳-۹ نتایج ارزیابی روش SBSE-$^{31}$P NMR برای استخراج ۴ آفت کش آلی فسفردار ۶۹

جدول ۳-۱۰ دقت و صحت روش SBSE-$^{31}$P NMR به کار رفته برای استخراج آفت کش های الی فسفردار با سه بار تکرار ۷۰

جدول ۳-۱۱ بررسی فاکتور پیش تغلیظ برای ۴ آفت کش آلی فسفردار با غلظت$^{-1}$ ۸۰ mg L ۷۱

جدول ۳- ۱۲ نتایج ارزیابی روش SBSE-$^{31}$P NMR برای استخراج آفت کش های آلی فسفردار در نمونه آب رودخانه چالوس در غلظت $^{-1}$ mg L ۹/۳ با سه بار تکرار ۷۱

**۱- مقدمه**

بشر به راحتی نمی تواند از منابع غذایی موجود استفاده کند و باید برای به دست آوردن آن ها، با علف های هرزه، انگل های گیاهان، حشرات و ارگانیسم های دیگر مبارزه کند. در حدود ۱۰۰۰۰ حشره وجود دارد که به صورت آفت به محصولات کشاورزی و معیشت آسیب می زنند و بیماری ها را منتقل می کنند. برای مقابله با آفت ها و دستیابی به محصولات بیشتر و بهتر، استفاده از آفت کش ها غیر قابل اجتناب است.

**۱-۱ آفت کش ها**

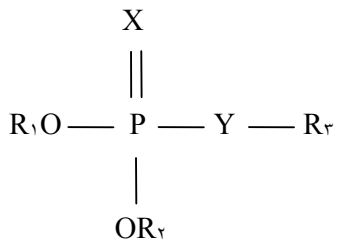
آفت کش[۱] به طور کلی به ماده و یا مواد شیمیایی گفته می شود که برای تخریب یک ارگانیسم مضر فرض شده برای انسان به کار می رود. این کلمه به طور واقع معنای بسیار گسترده ای دارد و شامل تعدادی دیگر از اصطلاحات مانند حشره کش ها[۲]، قارچ کش ها[۳]، علف کش ها[۴]، دارو یا عامل های کشنده جانوران جونده[۵]، باکتری کش ها[۶] و موش کش ها[۷] و موارد دیگر می شود. برای مثال حشره کش ها شامل ترکیبات آلی کلر دار[۸]($OCl_s$)، ترکیبات آلی فسفردار[۹] ($OPP_s$)، کاربامات ها[۱۰] و ترکیبات طبیعی نظیر پیرترین ها[۱۱] هستند.

[۱] Pesticide
[۲] Insecticides
[۳] Fungicides
[۴] Herbicides
[۵] Rodenticides
[۶] Bactericides
[۷] Miticides
[۸] Organochlorine
[۹] Organophosphorus
[۱۰] Carbamates
[۱۱] Pyrethrins

### ۱-۱-۱ آفت کش های آلی فسفردار

آفت کش های آلی فسفردار عمدتاً شامل استرهای فسفات یا تیوفسفات هستند که فرمول کلی آن ها در شکل ۱-۱ نشان داده شده است. در این فرمول $R_1$ و $R_2$ در بیشتر اوقات گروه های متیل یا اتیل و $R_3$ یک گروه آلی بزرگ است. در این ترکیبات X، اکسیژن یا سولفورو، Y، اکسیژن، سولفور و یا نیتروژن است. براساس ساختارهای مولکولی، آفت کش های آلی فسفردار به ۴ زیر گروه فسفات ها[1]، فسفر و تیوآت ها[2]، فسفرو دی تیوآت ها[3] و فسفرو تیولات ها[4] تقسیم می شوند [۱]. آفت کش های آلی فسفردار به دلیل گستردگی محدوده ی عمل و ماندگاری کم به طور گسترده تری نسبت به ترکیبات آلی کلردار در کشاورزی و محافظت گیاهان خانگی استفاده می شوند. بر اساس گزارش اتحادیه اروپا در مورد تجارت ۲۵٪ از این آفت کش ها در کل جهان، فروش این مواد به ۳۲۰۰۰۰ تن در سال رسیده است [۲].

سمیت حاد به وسیله $LD_{50}$ اندازه گیری می شود که یک تخمین آماری از مقدار میلی گرم ماده شیمیایی در هر کیلوگرم از وزن بدن است که باعث کشتن ۵۰ درصد از جمعیت بزرگ حیوانات آزمایشی که معمولا" موش است، می شود. سازمان سلامت جهانی محصولات را بر حسب داشتن خطر حاد برای سلامتی انسان به دسته های بسیار پرخطر، خطر بالا، خطر متوسط و کم خطر تقسیم کرده است، که در جدول ۱-۱ این تقسیم بندی برای آفت کش های آلی فسفردار مورد بررسی در این کار تحقیقاتی نشان داده شده است[۳].




**شکل ۱-۱** فرمول کلی آفت کش های آلی فسفردار.

[1] Phosphates
[2] Phosphorothioates
[3] Phosphorodithioates
[4] Phosphorothiolates

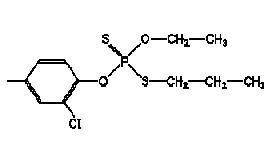
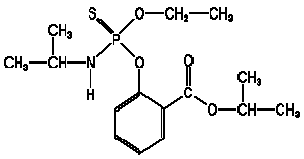
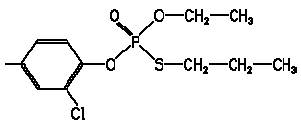
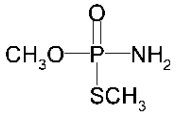
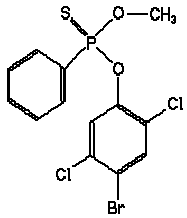
آفت کش های مورد مطالعه در این تحقیق عبارتند از: پروتیوفوس[۱]، ایزوفنفوس[۲]، پروفنفوس[۳]، متامیدوفوس[۴] و لپتوفوس[۵] که خواص و ویژگی های آن ها در جدول ۱-۱ مشاهده می شود.

### ۱-۱-۲ اثرات ناشی از باقیمانده های آفت کش های آلی فسفر دار

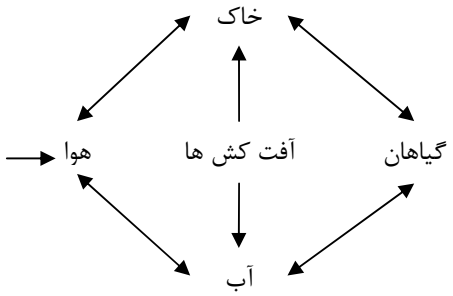
از آن جایی که آفت کش های آلی فسفردار بیشتر بر روی محصولات اسپری می شوند و یا در خاک به کار می روند، پتانسیل بالقوه ای برای حرکت در محیط از طریق هوا، آب های زیرزمینی و سطحی دارند[۴ و ۵]. در شکل ۱-۲ توزیع آفت کش ها در محیط نشان داده شده است. باقیمانده های آفت کش ها در آب های زیرزمینی، آب های سطحی، مرداب ها، آب آشامیدنی در غلظت های مختلفی از $ng\ L^{-1}$ ۲۰ تا $\mu g\ L^{-1}$ ۱۲۷ یافت شده اند[۳]. استفاده نادرست از ترکیبات آلی فسفردار منجر به حضور باقیمانده های این مواد در محصولات کشاورزی مثل میوه ها، آب میوه ها، سبزیجات و غیره می شود. هم چنین بیوانباشتگی[۶] آن ها در زنجیره غذایی می تواند اتفاق بیفتد و سرانجام آفت کش ها خطر یا تهدیدی هم برای حیوانات و هم انسان ها باشند. بر اساس آمارهای جهانی، سمیت مربوط به این آفت کش ها سالانه به بیش از ۳ میلیون مورد سمیت حاد و شدید می رسد و با این که حتی موردهای بسیاری هم گزارش نشده، این سمیت ها به ۲۲۰۰۰۰ مرگ و میر منجر شده است[۶]. در جدول ۱-۲ به تعدادی از محصولات غذایی که آلوده به این آفت کش ها شده اند اشاره شده است.

[۱] Prothiofos
[۲] Isofenphos
[۳] Profenofos
[۴] Methamidofos
[۵] Leptophos
[۶] Bioaccumulation

**جدول ۱-۱** خصوصیات آفت کش های مورد بررسی در این تحقیق

| آفت‌کش مورد مطالعه | پروتیوفوس | ایزوفنفوس | پروفنفوس | متامیدوفوس | لپتوفوس |
|---|---|---|---|---|---|
| نام شیمیایی | (RS) – (۰-۲، ۴ – دی کلرو فنیل O – اتیل S – پروپیل فسفر و دی تیوآت) | (RS) – O – اتیل – ۲ – O ایزوپروپوکسی کربونیل فنیل ایزو پروپیل فسفر آمیدوتیوآت | (RS) – O – ۴ – برمو – ۲ – کلروفنیل O – اتیل S – پروپیل فسفر و تیوآت | O و S - دی متیل فسفر و آمیدوتیوآت | (RS) – O – (۴ – برمو – ۲، ۵ – دی کلروفنیل) O – متیل فنیل فسفونوتیوآت |
| فرمول مولکولی | $C_{11}H_{15}Cl_2O_3PS_2$ | $C_{15}H_{24}NO_4PS$ | $C_{11}H_{15}BrClO_3PS$ | $C_2H_8NO_3PS$ | $C_{13}H_{10}BrCl_2O_2PS$ |
| فرمول ساختاری |  |  |  |  |  |
| انحلال پذیری در آب | ۰/۰۷ mg $L^{-1}$ | ۱۸ mg $L^{-1}$ | ۲۸ mg $L^{-1}$ | ۲۰۰g $L^{-1}$ < | ۲/۴ mg $L^{-1}$ |
| $LD_{50}$ (mg $kg^{-1}$) | ۹۲۵ (خطر متوسط) | ۲۸ (خطر بالا) | ۳۵۸ (خطر متوسط) | ۳۰ (خطر بالا) | ۵۰ (بسیار پر خطر) |
| ضریب تقسیم اکتانول-آب ($Log K_{o/w}$) | ۵/۶۷ | ۴/۰۴ | ۴/۴۴ | ۰/۸ | ۶/۳۱ |

آلودگی غیر مستقیم




استفاده از آفت کش ها در کشاورزی

توزیع آفت کش ها در محیط

**شکل ۱-۲** مسیر پخش آفت کش ها در محیط زیست.

**جدول ۱-۲** حضور باقیمانده های آفت کش های آلی فسفردار در محیط های مختلف

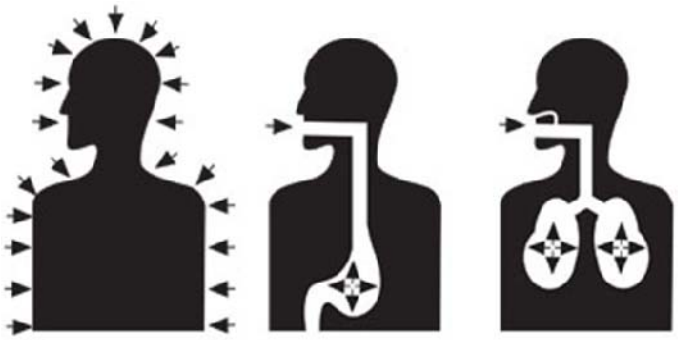
| محیط | توضیح |
|---|---|
| عسل | باقیمانده آفت کش آلی فسفردار بر روی محصولات که زنبورها را درهنگام گرده افشانی آلوده می کند[۷ و ۸]. |
| پنبه و کنف | خطر یا تهدیدی برای سلامتی انسان به وسیله تماس پوستی است[۹]. |
| گندم | باقیمانده ها شامل کلروپیریفوس[۱] و مالاتیون[۲] است [۱۰]. |
| شیرگاو | بر هم کنش آفت کش آلی فسفردار با چربی و پروتئین و تأثیر آن به صورت فصلی است [۲]. |
| گیاهان | از طریق زنجیره غذایی به گیاهان ضرر می رسد[۱۱]. |
| آب | آب مهم ترین منبع آلودگی به خاطر ماندگاری و انحلال پذیری در آن است[۱۲]. |

[۱] Chlorpyrifos
[۲] Malathion

با توجه به جدول ۱-۲ مهم ترین منبع برای حضور باقیمانده های آفت کش های آلی فسفردار، آب است. آب اولین مسیلی است که آفت کش ها در آن منتقل می شوند و در نتیجه نیاز به ردیابی آن ها در این نمونه ها برای رسیدن به کیفیت خوب آب ضروری است [۴]. اتحادیه اروپا[۱] حداکثر غلظت $\mu gL^{-1}$ ۰/۱ را برای هر آفت کش و در مجموع $\mu g\ L^{-1}$ ۰/۵ از کلیه آفت کش ها در آب نوشیدنی را مجاز دانسته است [۱۳].

آفت کش های آلی فسفر دار از طرق مختلف وارد بدن می شوند. زمانی که این آفت کش ها استشمام می شوند منجر به ظاهر شدن سریع علایم مسمومیت می شود. به علاوه این مواد می توانند از طریق مصرف کردن مواد غذایی آلوده و یا پوست نیز وارد بدن شوند [۱۴]. شکل ۱-۳ مسیرهای ورود آفت کش ها به بدن را نشان می دهد.

آفت کش های آلی فسفردار زمانی که به وسیله ارگانیسم های انسان جذب می شوند، موجب بازداری از کارایی آنزیم استیل کلین استراز[۲] می شوند و در نتیجه بسیار سمی اند. آنزیم استیل کلین استراز سیستم انتقال عصبی را کنترل می کند که در بخش مرکزی سیستم عصبی مهره هاست. عمل فیزیولوژی نرمال اش هیدرولیز است. بازداری از آنزیم استیل کلین استراز نتیجه اش انباشتگی استیل کلین می باشد که منجر به سمیت کلینرژیک[۳] می‌شود [۳].




**شکل ۱-۳** مسیرهای ورود آفت کش ها به بدن.

[۱] European Union
[۲] Acetylcholinesterase
[۳] Cholinergic

علایم مسمومیت حاد آفت کش های آلی فسفردار با توجه به روش تماس و مدت در معرض قرار گرفتن در عرض چند دقیقه یا چند ساعت دیده می شود. از علائم خفیف مسمومیت می توان به مواردی همچون بی اشتهایی، سردرد، خواب آلودگی، ضعف، لرزش زبان و پلک چشم ها اشاره کرد. علائم با شدت متوسط شامل تهوع، ازدیاد ترشح بزاق، ریزش اشک، استفراغ، عرق، نبض کند و لرزش های عضلانی است و از علایم شدید آن اسهال و تنگ شدن مردمک چشم، اختلال در تنفس و نهایتاً توقف قلب است [۱۵ و ۱۶].

به هر حال در سال های اخیر چندین آژانس سلامتی دولتی مختلف شامل USEPA[۱] به دلیل نگرانی درباره اثرهای آن ها بر روی سیستم های عصبی مرکزی انسان ها و به خصوص کودکان شروع به دوباره بررسی کردن استفاده گسترده از آفت کش های آلی فسفردار کرده اند [۱].

### ۱-۱-۳ تخریب آفت کش های آلی فسفردار

آنالیز آفت کش های آلی فسفردار و سنجش اثرهای آن ها در محیط آبی پیچیده است زیرا این ترکیبات می توانند از طریق هیدرولیز، تخریب نوری[۲] و یا تخریب باکتریایی[۳] شکسته شوند. در بسیاری از موارد، محصولات تخریب شده سمیت بیشتری را نسبت به ترکیبات مادر نشان می دهند. بنابراین تشخیص و تعیین مقدار محصولات تخریبی آفت کش ها بعد از آزادسازی آن ها در محیط برای ارزیابی سمیت آفت کش های آلی فسفردار ضروری است [۱۷].

هیدرولیز ترکیب آلی فسفردار در آب مهم ترین فرآیند مطالعه شده است که می تواند به وسیله مکانیسم هموژن جایی که $H_2O$ و $OH^-$ (کاتالیزور $H^+$ کمتر معمول است) به عنوان نوکلئوفیل در مکانیسم $SN_2$ عمل می کند، اتفاق بیفتد و یا زمانی که یون های فلزی حل شده سرعت هیدرولیز را تسریع می کنند [۱]. اکسیداسیون آفت کش های آلی فسفردار به اکسون ها[۴]، سولفون ها[۵]، سولفوکسیدها[۶] نیز بسیار گزارش شده است [۱]. اکسیداسیون می تواند به صورت زنده از طریق آنزیم های ویژه یا غیر زنده

[۱] United States Environmental protection Agency
[۲] Photodegradation
[۳] Bacterial degradation
[۴] Oxons
[۵] Sulfones
[۶] Solfoxides

از طریق مکانیسم های رادیکالی، اوزن[۱]، اکسیژن حل شده، یا کلر محلول انجام گیرد. شکست آفت کش های آلی فسفردار به وسیله نور می تواند از طریق فوتولیز مستقیم ترکیب آلی فسفردار که طیف جذبی آن با طیف خورشیدی هم پوشانی دارد، اتفاق بیفتد. هم چنین شکست می تواند از طریق تخریب نوری غیر مستقیم باشد که یا از اسیدهای هیومیک[۲] و فولویک[۳] حل شده که می توانند به عنوان حساس کننده عمل کنند صورت می گیرد و یا از ذراتی که سبب شکست نوری نیمه رساناهای ارتقا یافته می شود انجام می گیرد [۱]. پهکونن[۴] و ژنگ[۵] تحقیقاتی را در تعیین لیست جامعی از محصولات تخریب نوری آفت کش های آلی فسفردار انجام داده اند [۱ و ۱۷].

### ۱-۱-۴ روش های اندازه گیری آفت کش های آلی فسفردار

بیشتر روش های تجزیه ای برای آنالیز آفت کش ها بر اساس کروماتو گرافی گازی (GC)[۶] و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)[۷] است. در مورد استفاده از GC، ردیابی به طور معمول با آشکارساز نیتروژن- فسفر[۸] (NPD)، آشکارساز گیرنده الکترون[۹] (ECD)، طیف سنجی جرمی[۱۰](MS) یا آشکارساز فوتو متریک شعله ای[۱۱] (FPD) انجام شده است [۱۸].

برای تعدادی از آفت کش های آلی فسفردار که از نظر گرمایی ناپایدار یا بسیار قطبی اند و آنالیز آن ها با روش های کروماتوگرافی گازی مناسب نیست، روش های بر پایه HPLC با استفاده از آشکارساز های امواج فرا بنفش[۱۲] (UV)، آرایه دیود خطی[۱۳]UV (DAD)، سنجش فلوئورسانس[۱۴]، یا آشکارساز الکتروشیمیایی[۱۵] به کار رفته است [۱۱]. هم چنین از اتصال این سیستم ها به MS یا MS/MS به

---

۱ Ozone
۲ Humic Acid
۳ Fulvic Acid
٤ Pehkonen
٥ Zhang
٦ Gas Chromatography
۷ High Performance Liquid Chromatography
۸ Nitrogen-Phosphorus Detector
۹ Electron Capture Detector
۱۰ Mass Spectroscopy
۱۱ Flame Photometric Detector
۱۲ Ultraviolet Detector
۱۳ Diode Array Detector
۱٤ Fluorescence Detector
۱٥ Electrochemical Detector

شناسایی و اندازه گیری این ترکیبات و محصولات تخریبی آن ها در محیط های مختلف استفاده شده است [۱۹].

صرف نظر از جداسازی و روش تشخیص، مشاهده آفت کش های آلی در غلظت پایین $\mu g\ L^{-1}$ ۰/۱ نیاز به مرحله غنی سازی دارد که برای پیش تغلیظ[۱] آنالیت و تمیز کردن[۲]، استفاده از روش های استخراج مختلف برای رسیدن به حساسیت و انتخاب پذیری مناسب لازم است. نوع روش استخراج بستگی به پیچیدگی ماتریکس و خصوصیات ترکیب هدف دارد [۱۱].

متداولترین روش ها برای استخراج آفت کش ها، استخراج مایع- مایع (LLE)[۳] و استخراج فاز جامد ( SPE)[۴] است [۲۰]. روش های مختلفی بر اساس SPE و LC-UV در تعیین کربامات ها و آفت کش های آلی فسفردار در محلول های آبی استفاده شده [۲۰] و هم چنین LLE یا SPE جفت شده با GC یا HPLC برای تعیین مقادیر کم آلاینده های زیر $\mu g\ L^{-1}$ ۰/۱ برای اطمینان قابلیت شرب نمونه های آب مطابق با قانون گذاری اروپایی گزارش شده است [۲۰]. جوز[۵] و همکارانش، اخیراً برروی آماده سازی نمونه و سیستم های جداسازی کروماتوگرافی و روش های تشخیص برای تعیین باقیمانده های آفت کش ها در آب شرب تحقیق کرده اند [۲۳-۲۱]. هم چنین گزارشی از توسعه روش HPLC با استفاده از روش های غنی سازی کروماتوگرافی مایع به صورت on-line برای تعیین کرباریل[۶] و هفت آفت کش آلی فسفردار در نمونه های آب آشامیدنی وجود دارد [۲۴].

تاداشی[۷] و همکارانش هم از ترکیب برهم کنش آب دوست[۸] کروماتوگرافی مایع (HILIC)[۹] با MS/MS و پیش تغلیظ با کارتریج[۱۰] کربن فعال شده برای آنالیز آفت کش های آلی فسفردار از جمله متامیدوفوس در نمونه های آب استفاده کردند [۱۹]. بر هم کنش آب دوست کروماتوگرافی مایع برای

[۱] Preconcentration
[۲] Clean up
[۳] Liquid – Liquid Extraction
[۴] Solid- Phase Extraction
[۵] Joze
[۶] Carbaryl
[۷] Tadashi
[۸] Hydrophilic
[۹] Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography
[۱۰] Cartridge

جداسازی ترکیبات آب دوست مثل آمینواسیدها[۱]، پپتیدها[۲] و اسیدهای آلی توسعه پیدا کرده است. ستون HILIC فاز قطبی جامد مثل سیلانول[۳] یا باقیمانده آمینوپروپیل[۴] دارد و می تواند ترکیبات آب دوست را با استفاده از فاز متحرک قطبی مثل استونیتریل، متانول، آب و مخلوط آن ها جدا کند. یکی از مزیت های HILIC نسبت به فاز معکوس کروماتوگرافی مایع برای آنالیز ترکیبات قطبی این است که بودن غلظت زیادی از حلال آلی در فاز متحرک می تواند پاسخ MS را افزایش دهد[۱۹]. در جدول ۱-۳ روش های اندازه گیری برای آفت کش های پروتیوفوس، لپتوفوس، ایزوفنفوس و پروفنفوس آورده شده است.

همان طور که گفته شد تا به امروز بیشتر روش های آنالیز باقیمانده های آفت کش های آلی فسفردار در نمونه های محیطی و گیاهی براساس استفاده از روش های کروماتوگرافی مختلف بوده است. در اکثر موارد آنالیز به وسیله GC نیاز به مرحله اضافی مشتق سازی و آنالیز به وسیله HPLC، حلال آلی زیادی را مصرف می کند. در مقایسه با دیگر روش های کروماتوگرافی، الکتروفورز مویینه[۵] (CE) به کارایی جدا سازی بالاتر و جداسازی سریع تر منجر می شود.

**جدول ۱-۳** روش های اندازه گیری برای پروتیوفوس، لپتوفوس، ایزوفنفوس و پروفنفوس

| ماده آنالیز شده | روش اندازه گیری | نوع استخراج | محیط عمل | بازیابی | انحراف استاندارد نسبی (CV%) | مرجع |
|---|---|---|---|---|---|---|
| پروتیوفوس | GC-MS | SBSE | آب | ۹۸/۹ | ۶/۷ | ۲۵ |
| | GC-MS | SBSE | آب | ۶۰ | ۵ | ۲۶ |
| لپتوفوس | GC-MS | MSPD[۱] | آب سیب | ۹۰/۵ | ۵/۹ | ۲۷ |
| | GC-NPD | SPE | آب شیر | ۲۳ | ۱۸ | ۲۸ |
| | GC-NPD | SPE | آب رودخانه | ۷۵ | ۱۰ | ۲۸ |
| ایزوفنفوس | GC-MS | SBSE | آب | ۸۲ | ۲/۷ | ۲۶ |
| پروفنفوس | GC-MS | MSPD | آب سیب | ۹۵/۹ | ۷/۷ | ۲۷ |
| | GC-MS | SPME | پارچه | ۸۹/۹ | ۷/۴ | ۹ |

[۱] Matrix Solid-Phase Dispersion

[۱] Amino acides
[۲] Peptides
[۳] Silanol
[۴] Aminopropvl
[۵] Capillary Electrophoresis

این روش ها را می توان در ترکیب با اسپکتروسکوپی UV و آشکارسازالکتروشیمیایی به کار برد. اما روش های CE هم دارای معایبی هستند. این روش ها برای ناحیه محدودی از آفت کش های آلی فسفردار که جذب بالایی درUV یا فعالیت الکتروشیمیایی دارند، قابل استفاده هستند که آن هم نیاز به یک مرحله اضافی مشتق سازی دارد و حد تشخیص و پایداری مناسبی هم ندارد. به همین دلیل محققین از جفت شدن CE با ICP-MS برای تعیین آفت کش های آلی فسفردار استفاده کرده اند و تعدادی گزارش هم مبنی بر آنالیز تعدادی آفت کش آلی فسفردار در نمونه آبی با CE-ICP-MS وجود دارد [۱۵، ۲۹ و ۳۰]. اما آن چه که مشخص است این است که ICP-MS حساسیت کمی نسبت به فسفر دارد.

در نتیجه با توجه به معایب گفته شده برای کروماتوگرافی گازی، مایع و الکتروفورز مویینه در این کار تحقیقاتی از اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیس هسته فسفر ($^{31}$P NMR)[۱] برای تعیین آفت کش های آلی فسفردار استفاده شده است.

## ۱-۲ اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی هسته (NMR)[۲]

اسپکتروسکوپی رزونانس مغناطیسی هسته یکی از مهم ترین و گسترده ترین روش های تجزیه ای در تحقیقات آموزشی و صنعتی است. در این روش طیف وسیعی از نمونه ها در فازهای جامد، مایع و گاز مورد بررسی قرار می گیرند و اطلاعات گسترده ای به منظور تعیین ساختار، رفتار سینتیکی و اندازه گیری کمی حاصل می شود. در واقع در روش های دیگر اسپکتروسکوپی، امکان دست یابی به جزئیات ساختاری هم زمان با کسب اطلاعات دینامیکی درباره سیستم های شیمیایی تحت بررسی وجود ندارد.

اسپکتروسکوپی NMR از زمان اختراعش به عنوان یک روش آنالیز کیفی قدرتمند معرفی شده است اما از اواخر دهه ۱۹۷۰ به طور جدی برای آنالیز کمی نیز مورد استفاده قرار گرفته است [۳۱]. اولین اندازه گیری های کمی[۳] (qNMR ) در سال ۱۹۶۳ به وسیله ی جانگنیکل[۴] و هولیس[۵] گزارش شده است [۳۲-۳۴]. در اولین مورد نسبت پروتون های درون مولکولی در ۲۶ ماده آلی خالص تعیین شد. هولیس نیز

[۱] Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance
[۲] Nuclear Magnetic Resonance
[۳] Quantitative Nuclear Magnetic Resonance
[۴] Jungnickel
[۵] Hollis

مقدار جزئی از آسپرین[۱]، فناستین[۲] و کافئین[۳] در مخلوط ها را آنالیز کرد. از آن سال تاکنون علی رغم هزینه ی بالای طیف گیری با این سیستم، استفاده از qNMR به عنوان یک روش آنالیز کمی در صنایع دارویی، غذایی و نفتی رشد گسترده ای نشان داده است که می توان آن را به دلیل مزایای ویژه ی این روش از قبیل تعیین هم زمان ساختارهای مولکولی، زمان آنالیز نسبتا کوتاه، غیر مخرب بودن روش دانست. هم چنین در این روش امکان اندازه گیری ترکیباتی که استاندارد آن ها موجود نیست نیز وجود دارد. به علاوه آماده سازی نمونه قبل از آنالیز در این روش به حداقل رسیده و بررسی مخلوط ها بدون جداسازی جدی به راحتی امکان پذیر است [۳۴]. با پیشرفت تکنولوژی و استفاده از سیستم های داده پردازی جدید، صحت و دقت شدت سیگنال NMR اندازه گیری شده است. اخیراً هندرسون[۴] و گریوت[۵] صحت و دقت انتگرال گیری در qNMR را بررسی کرده اند [۳۵ و ۳۶] و مانیارا[۶] و همکارانش نیز اعتبار سازی[۷] سیستماتیکی از روش NMR کمی را گزارش داده اند [۳۵ و ۳۷].

### ۱-۲-۱ چگونگی انجام کار کمی با NMR

مهم ترین اصل مربوط به qNMR این است که پاسخ سیگنال (مساحت انتگرالی سیگنال) $I_x$ در طیف به طور مستقیم متناسب با تعداد هسته $N_x$ ایجاد کننده ی خط رزونانسی مورد نظراست (معادله ۱-۱).

$$I_x = K_s N_x \qquad \text{معادله ۱-۱}$$

در این معادله، $K_s$ ثابت طیفی[۸] است. به منظور اندازه گیری کمی یک ترکیب کافی است که سیگنالی انتخاب شود که دارای خط زرونانسی ویژه برای نمونه ی مورد نظر باشد. در این مورد $N_x$ تعداد اسپین هاست که این رزونانس را سبب شده است و در یک ترکیب، متناسب با غلظت می باشد. تعیین نسبت مساحت های سیگنال های ایجاد شده از ترکیب مورد نظر به سیگنال ایجاد شده از یک مرجع

[۱] Aspirin
[۲] Phenacetine
[۳] Caffeine
[۴] Henderson
[۵] Grivet
[۶] Maniara
[۷] Validation
[۸] Spectrometer Constant

داخلی ($\frac{I_x}{I_y}$) که در آن $I_y$ سیگنال ایجاد شده از مرجع داخلی است، ساده ترین راه برای به دست آوردن نتایج کمی است [۳۴].

آزمایش NMR مشاهده مستقیمی را از اتم ها ممکن می سازد. انتگرال سیگنال NMR دقیقاً با تناسب بر مقدار اتم ها در حجم پروب رابطه خطی دارد. سیگنال ها نسبت مولی از مولکول ها را مستقل از وزن مولکولی اندازه می گیرند [۳۸].

### ۱-۲-۲ هسته های استفاده شده در NMR

ترکیبات آلی اساساً از عناصر هیدروژن، کربن، فسفر، نیتروژن و اکسیژن تشکیل شده اند. به علاوه، هالوژن ها مثل فلوئور، کلر، برم، ید و بعضی اوقات یون های فلزی نیز در آن ها وجود دارند. هر کدام از این عناصر دارای هسته های ایزوتوپی اند که می توانند به وسیله NMR تعیین شوند. $^{1}H$ NMR، $^{13}C$، $^{19}F$، $^{31}P$ کاربرد گسترده ای در اندازه گیری کمی ترکیباتی که شامل این عناصر هستند، دارند. تعدادی از دستگاه های NMR به پروب هسته ای کواترو[1] برای آنالیز ترتیبی هسته های $^{1}H$، $^{13}C$، $^{19}F$، $^{31}P$ مجهز هستند. بر اساس نوع آزمایش و فرکانس دستگاه مورد استفاده، امکان ردیابی غلظت به طور عادی در محدوده ی ۱-۱۰۰ $mg\ L^{-1}$ وجود دارد که با افزایش تعداد اسکن و بالا بردن کیفیت داده پردازی می تواند به حد $\mu g\ L^{-1}$ نیز برسد [۳۸].

هسته هیدروژن به دلیل حساسیت بالا و حضور گسترده ی آن در مولکول های آلی در میان تمام هسته های فعال دیگری که از آن ها در NMR استفاده می شود، بیشترین استفاده را در روش qNMR دارد. اما از آن جایی که هر نوع اتم هیدروژن منجر به ایجاد حداقل یک سیگنال می شود که در گستره ی جابجایی شیمیایی[2] باریکی (۱۲+ ppm تا ۴-) نمایان می شوند و بیشتر مولکول ها نیز دارای انواع مختلف مختلف اتم های هیدروژن هستند، طیف $^{1}H$ NMR ایجاد شده از ترکیبات نسبتا بزرگ و یا مخلوط ها، بسیار پیچیده خواهد شد. در واقع دامنه کوچک توزیع سیگنال در $^{1}H$ NMR سبب این پیچیدگی طیفی می شود. شکافتگی سیگنال ها که ناشی از جفت شدن اسپین هم هسته ای از پروتون ها است نیز بر این

[1] Quattro
[2] Chemical Shift