بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده شیمی

اندازه‌گیری قارچ‌کش متالاکسیل در سبزیجات با به‌کارگیری ریزاستخراج فاز جامد در سرنگ پرشده و دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی با منبع یونیزاسیون الکترواسپری

پایان نامه کارشناسی ارشد

راضیه پرچمی

اساتید راهنما

دکتر محمد سراجی

دکتر محمد تقی جعفری

۱۳۹۱

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده شیمی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه خانم راضیه پرچمی

تحت عنوان

اندازه‌گیری قارچ‌کش متالاکسیل در سبزیجات با به‌کارگیری ریزاستخراج فاز جامد در سرنگ پرشده و دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی با منبع یونیزاسیون الکترواسپری

در تاریخ۱۳۹۱/۹/۲۷ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر محمد سراجی
۲- استاد راهنمای پایان نامه	دکتر محمد تقی جعفری
۳- استاد داور	پروفسور تقی خیامیان
٤- استاد داور	پروفسور بهزاد رضایی
سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده	دکتر توکل

بهترین سپاس‌ها نثار تک‌تک یاورانی که هر یک به نوعی در شکل‌گیری این پژوهش نقش داشتند. نخست از استاد راهنمای گرامی، جناب آقای دکتر سیامک مهرآیین، که با راهنمایی‌های ارزشمند و صبر بی‌دریغ خود مسیر این تحقیق را هموار ساختند، صمیمانه سپاسگزارم. همچنین از داوران محترم، سرکار خانم دکتر نسرین فلاح و جناب آقای مهندس کامران ایزدی، که با نقدهای سازنده و پیشنهادهای ارزشمند خود موجب غنای علمی این رساله شدند، کمال تشکر را دارم.

از همکاران و دوستان عزیز در آزمایشگاه تحقیقات کاربردی فیزیک ماده چگال، به‌ویژه آقای مهندس رضا کاویانی و خانم مهندس سمیرا دلاوری، که در مراحل ساخت نمونه‌ها و انجام آزمون‌های میدانی یاری‌رسان بودند، قدردانی می‌کنم. بدون همکاری صمیمانه و روحیه‌ی تیمی آنان، گردآوری داده‌های این پژوهش در بازه‌ی زمانی محدود ممکن نبود.

از مسئولان و کارکنان کتابخانه‌ی مرکزی دانشگاه شهید بهشتی، به‌ویژه سرکار خانم فاطمه رستگار، که در دسترسی به منابع کمیاب و مقالات قدیمی مساعدت فراوان نمودند، سپاسگزارم. همچنین از بنیاد ملی پژوهش‌های علمی نیما، که بخشی از هزینه‌های این تحقیق را از طریق اعطای بورس تأمین کرد، تشکر می‌کنم.

در پایان، از خانواده‌ی عزیزم، به‌ویژه همسر مهربانم، که در تمام دوران تحصیل و نگارش این رساله با صبر و شکیبایی پشتیبان من بودند، قدردانی می‌کنم. این اثر را به ایشان تقدیم می‌کنم.

کـلیه حـقوق مـادی مترتـب بر نتـایج مطالـعات،

ابـتکارات و نوآوریـهای ناشـی از تحقـیق موضـوع

ایـن پـایـان نـامه مـتعلق بـه دانـشگاه صـنعـتی

اصفهان است.

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

و

چشمان انسان‌های حقیقت‌بین

فهرست مطالب

عنوان ..... صفحه
فهرست مطالب ..... هشت
فهرست شکل‌ها ..... دوازده
فهرست جدول‌ها ..... سیزده
چکیده ۱
فصل اول: مقدمه ۲
۱-۱- قارچ‌کش‌ها ۳
۱-۱-۱-معایب استفاده از قارچ‌کش‌ها ۳
۱-۱-۲- طبقه‌بندی قارچ‌کش‌ها ۴
۱-۱-۳- متالاکسیل ۴
۱-۱-۴- سمیت متالاکسیل ۶
۱-۲- اندازه‌گیری آفت‌کش‌ها در میوه‌ها و سبزیجات ۶
۱-۳- روش‌های متداول استخراج ۶
۱-۳-۱- استخراج مایع- مایع (LLE) ۷
۱-۳-۱- استخراج با فاز جامد (SPE) ۷
۱-۳-۳- ریزاستخراج با فاز جامد ۸
۱-۳-۳- الف- ریز استخراج با فیبر(SPME) ۹
۱-۳-۳- ب- ریزاستخراج جامد با میله جاذب همزن(SBSE) ۹
۱-۳-۳- ج- ریزاستخراج با فیلم نازک (TFME) ۱۰
۱-۳-۳- د- ریزاستخراج فاز جامد در سوزن ۱۰
۱-۴- ریزاستخراج فاز جامد در سرنگ پر شده(MEPS) ۱۰
۱-۴-۱- مراحل استخراج در روش MEPS ۱۱
۱-۴-۲- مقایسه روش MEPS با دیگر روش‌های استخراج ۱۳
۱-۴-۳- کاربردهای MEPS ۱۳
۱-۴-۴- انواع جاذب در MEPS ۱۳
۱-۴-۴- الف- کربن ۱۴
۱-۴-۴- ب- جاذب‌های سیلیکا ۱۴
۱-۴-۴- ج- تبادل‌گرهای کاتیونی-آنیونی ۱۴
۱-۴-۴- د - ذرات جاذب با دسترسی محدود بافت(RAM) ۱۵
۱-۴-۴- ه- ذرات پلیمری قالب مولکولی(MIP) ۱۵
۱-۴-۴- و- جاذب‌های پلیمری ۱۵
۱-۴-۵- عوامل مؤثر بر استخراج به روش MEPS ۱۶

۱-۴-۵-الف- ویسکوزیته نمونه ۱۶
۱-۴-۵- ب- pH و قدرت یونی نمونه ۱۶
۱-۴-۵- ج- نوع و مقدار جاذب ۱۶
۱-۴-۵- د- سرعت و تعداد سیکل‌های بارگذاری نمونه روی جاذب ۱۷
۱-۴-۵- ه- حجم و نوع محلول شستشوی مزاحم‌ها ۱۷
۱-۴-۵- و- حجم و نوع محلول شویش آنالیت‌ها ۱۷
۱-۵- مروری بر تحقیقات انجام شده در زمینه اندازه‌گیری متالاکسیل ۱۷
۱-۶- هدف پروژه ۲۰
۱-۷- طیف‌سنج تحرک یونی ۲۰
۱-۷-۱- اصول دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی ۲۰
۱-۷-۲- منابع یونیزاسیون IMS ۲۲
فصل دوم: بخش تجربی ۲٤
۲-۱- دستگاه‌ها و وسایل مورد نیاز ۲۴
۲-۲- اجزای مختلف سیستم IMS ۲۶
۲-۲-۱- مخازن گاز نیتروژن ۲۶
۲-۲-۲- منابع تغذیه ۲۶
۲-۲-۳- آون حرارتی ۲۶
۲-۲-۴- منبع یونیزاسیون الکترواسپری ۲۷
۲-۲-۵- ناحیه حلال‌زدایی ۲۸
۲-۲-۶- شبکه الکتریکی و دستگاه مولد پالس ۲۸
۲-۲-۷- ناحیه رانش ۲۸
۲-۲-۸- شبکه محافظ ۲۹
۲-۲-۹- آشکارساز ۲۹
۲-۲-۱۰-تقویت‌کننده پاسخ ۲۹
۲-۲-۱۱- مبدل آنالوگ به دیجیتال ۲۹
۲-۲-۱۲- نحوه محاسبه پاسخ دستگاه IMS ۲۹
۲-۳- مواد شیمیایی و محلول‌های مورد نیاز ۳۳
۲-۴- تهیه محلول‌های استاندارد ۳۳
۲-۵- تهیه سرنگ پر شده با جاذب ۳۳
۲-۶- روش کلی استخراج ۳۳
۲-۶-۱- آماده‌سازی جاذب ۳۴
۲-۶-۲- بارگذاری نمونه روی جاذب ۳۴

۲-۶-۳- شستشوی مزاحم‌ها ۳۴
۲-۶-۴- خشک‌کردن جاذب ۳۴
۲-۶-۵- شویش آنالیت ۳۴
۲-۶-۶- تزریق به دستگاه IMS ۳۵
۲-۶-۷- پاک‌سازی جاذب و سرنگ ۳۵
۲-۷- بهینه‌سازی شرایط استخراج ۳۵
۲-۷-۱- زمان خشک شدن جاذب ۳۶
۲-۷-۲- حجم محلول شستشوی مزاحم‌ها ۳۶
۲-۷-۳- اثر افزایش نمک ۳۶
۲-۷-۴- اثر حجم حلال شویشی ۳۶
۲-۷-۵- اثر سرعت بارگذاری نمونه روی جاذب ۳۷
۳-۷-۶- تعداد سیکل‌های بارگذاری نمونه روی جاذب ۳۷
۲-۸- پارامترهای تجزیه‌ای روش ۳۷
۲-۸-۱- فاکتور غنی‌سازی ۳۷
۲-۸-۲- تکرارپذیری روش ۳۷
۲-۸-۳- بررسی خطی‌بودن ۳۸
۲-۸-۴- حدتشخیص روش ۳۸
۲-۹- آنالیز نمونه‌های حقیقی ۳۸
۲-۹-۱- بررسی میزان رقیق‌سازی در آنالیز نمونه حقیقی ۳۸
۲-۹-۲- آنالیز قارچ‌کش متالاکسیل در خیار ۳۹
۲-۹-۳- آنالیز قارچ‌کش متالاکسیل در کاهو ۳۹
۲-۹-۴- آنالیز قارچ‌کش متالاکسیل در کلم ۴۰
فصل سوم: بحث و نتیجه‌گیری ۴۱
۳-۱- طیف تحرک یونی قارچ‌کش متالاکسیل در مد مثبت ۴۱
۳-۲- پارامترهای تجزیه‌ای بدون استخراج و تغلیظ‌سازی ۴۳
۳-۳- آماده‌سازی سرنگ پرشده با جاذب ۴۴
۳-۴- شرایط موثر بر استخراج ۴۴
۳-۴-۱- انتخاب نوع و مقدار جاذب ۴۴
۳-۴-۲- مرحله آماده‌سازی جاذب ۴۴
۳-۴-۳- بررسی زمان خشک‌شدن جاذب ۴۵
۳-۴-۴- تعیین نوع و حجم محلول شستشوی مزاحم‌ها ۴۵
۳-۴-۵- بررسی اثر نمک ۴۶

۳-۴-۶- تعیین نوع و حجم حلال شویشی ۴۶
۳-۴-۷- بررسی سرعت بارگذاری نمونه روی جاذب ۴۷
۳-۴-۸- بررسی تعداد سیکل‌های بارگذاری نمونه روی جاذب ۴۸
۳-۴-۹- سرعت عبور حلال شویشی ۴۸
۳-۴-۱۰- پاک‌سازی جاذب و سرنگ ۴۹
۳-۵- طیف تحرک یونی قارچ‌کش متالاکسیل در شرایط استخراجی بهینه ۴۹
۳-۶- پارامترهای تجزیه‌ای روش MEPS-ESI/IMS ۵۰
۳-۶-۱- فاکتور غنی‌سازی ۵۰
۳-۶-۲- تکرارپذیری روش ۵۰
۳-۶-۳- خطی بودن روش ۵۰
۳-۶-۴- حد تشخیص روش ۵۱
۳-۷- آنالیز نمونه‌های حقیقی ۵۱
۳-۷-۱- بررسی میزان رقیق‌سازی در آنالیز نمونه حقیقی ۵۲
۳-۷-۲- طیف تحرک یونی قارچ‌کش متالاکسیل در خیار ۵۲
۳-۷-۳- طیف تحرک یونی قارچ‌کش متالاکسیل در کاهو ۵۳
۳-۷-۴- طیف تحرک یونی قارچ‌کش متالاکسیل در کلم ۵۴
۳-۸- نتیجه‌گیری نهایی ۵۵

فهرست شکل‌ها

عنوان ..... **صفحه**

شکل ۱-۱- مراحل استخراج با فاز جامد ۷

شکل ۱-۲- انواع روش‌های ریز استخراج فاز جامد ۹

شکل ۱-۳- دو نحوه قرارگیری فاز جامد در در روش MEPS ۱۱

شکل ۱-۴- نحوه‌ی قرارگیری بستر جاذب فشرده شده بین دو فیلتر در روش MEPS ۱۱

شکل ۱-۵- مراحل استخراج در MEPS ۱۳

شکل ۱-۶- مونومرهای سازنده Oasis HLB ۱۶

شکل ۱-۷- شمایی از دستگاه طیف-سنج تحرک یونی ۲۱

شکل۲-۱- سیستم استخراجی استفاده شده در کار تحقیقاتی ۲۵

شکل ۲-۲- شمایی از دستگاه IMS به‌کار رفته در این کار تحقیقاتی ۲۵

شکل ۲-۳- صفحه اصلی نرم‌افزار استفاده شده در این تحقیق ۳۰

شکل ۲-۴- نحوه محاسبه سطح زیر پیک با استفاده از نرم‌افزار ۳۱

شکل ۲-۵- نمودار سه‌بعدی رسم شده در نرم‌افزار ۳۲

شکل ۲-۶- مراحل استخراج و آنالیز در کار تحقیقاتی ۳۵

شکل۳-۱- طیف تحرک یونی حلال الکترواسپری و محلول متالاکسیل با غلظت ۵ میلی‌گرم بر لیتر ۴۲

شکل ۳-۲- منحنی درجه‌بندی متالاکسیل ۴۳

شکل ۳-۳- بررسی اثر حجم محلول شستشوی مزاحم‌ها بر میزان هدر رفت آنالیت ۴۵

شکل ۳-۴- بررسی حجم شویشی بر میزان استخراج آنالیت ۴۷

شکل ۳-۵- بررسی سرعت بارگذاری نمونه بر میزان استخراج آنالیت ۴۷

شکل ۳-۶- بررسی اثر حجم نمونه بر میزان استخراج ۴۸

شکل ۳-۷- طیف تحرک یونی قارچ‌کش متالاکسیل با غلظت ۰/۸ mg/L بعد از استخراج ۴۹

شکل ۳-۸- نمودار درجه‌بندی متالاکسیل پس از استخراج در شرایط بهینه ۵۱

شکل ۳-۹- طیف تحرک یونی مربوط به نمونه خیار با غلظت ۲/۰ mg/kg نسبت به متالاکسیل در مقایسه با نمونه شاهد ۵۳

شکل ۳-۱۰- طیف تحرک یونی مربوط به نمونه کاهو با غلظت ۱۰/۰ mg/kg نسبت به متالاکسیل در مقایسه با نمونه شاهد ۵۴

شکل ۳-۱۱- طیف تحرک یونی مربوط به نمونه کلم با غلظت ۵/۰ mg/kg نسبت به متالاکسیل در مقایسه با نمونه شاهد ۵۵

فهرست جدول‌ها

عنوان ..... **صفحه**
جدول ۱-۱- خواص فیزیکی و شیمیایی متالاکسیل ۵
جدول ۲-۱- شرایط اعمالی دستگاه ESI/IMS ۳۲
جدول ۳-۱- مقادیر زمان رانش و تحرک کاهش یافته گونه‌های متالاکسیل حاصل از دستگاه ESI-IMS ٤۲
جدول ۳-۲- مربع ضریب همبستگی، معادله خط نمودار درجه‌بندی، دامنه خطی، حد تشخیص و انحراف استاندارد نسبی ESI/IMS ٤۳
جدول ۳-۳- پاسخ‌های IMS مربوط به اثر حجم محلول شستشو بر هدر رفت آنالیت ٤٦
جدول ۳-۴- پاسخ‌های IMS مربوط به اثر حجم متانول به عنوان حلال شویشی بر میزان استخراج ٤٦
جدول ۳-۵- پاسخ‌های IMS مربوط به اثر سرعت بارگذاری نمونه بر میزان استخراج ٤۸
جدول ۳-۶- پاسخ‌های IMS مربوط به اثر تعداد سیکل‌های عبور نمونه بر میزان استخراج ٤۸
جدول ۳-۷- فاکتور غنی‌سازی، انحراف استاندارد نسبی و حد تشخیص روش ۵۰
جدول ۳-۸- مربع ضریب همبستگی، معادله خط نمودار درجه‌بندی و دامنه خطی روش ۵۱
جدول ۳-۹- بررسی میزان رقیق‌سازی در آنالیز نمونه حقیقی ۵۲
جدول ۳-۱۰- معادله خط، مربع ضریب همبستگی، تکرارپذیری و درصدبازیابی نسبی برای افزایش استاندارد در نمونه خیار. ۵۲
جدول ۳-۱۱- معادله خط، مربع ضریب همبستگی، تکرارپذیری و درصدبازیابی نسبی برای افزایش استاندارد در نمونه کاهو ۵۳
جدول ۳-۱۲- معادله خط، مربع ضریب همبستگی، تکرارپذیری و درصدبازیابی نسبی برای افزایش استاندارد در نمونه کلم. ٥٤
جدول ۳-۱۳- مقایسه ویژگی‌های تجزیه‌ای روش MEPS-ESI-IMS با روش‌های دیگر ۵۷

چکیده

در این تحقیق از روش ریزاستخراج فاز جامد در سرنگ پرشده (MEPS) و دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی با منبع یونیزاسیون الکترواسپری (ESI/IMS) برای تغلیظ و تعیین میزان باقیمانده قارچ‌کش متالاکسیل در نمونه‌های خیار، کاهو وکلم استفاده شده است. دستگاه حساس و سریع ESI/IMS در مد مثبت برای اندازه‌گیری ترکیب مورد نظر در این تحقیق به‌کار برده شد. ابتدا با استفاده از روش استخراج با آب گرم، سم موجود در نمونه‌ها خارج و فیبر و رنگدانه موجود در نمونه‌ها لخته‌سازی و بافت نمونه‌ها به محلول بدون ذرات کلوییدی که قابل استخراج به روش MEPS بود، تبدیل شد. برای آماده کردن سرنگ، ۱/۶ میلی‌گرم از ذرات جامد (جاذب کوپلیمری Oasis HLB) بین دو فیلتر در انتهای یک سرنگ گازبندی شده (با حجم ۲۵۰ میکرولیتر) قرار داده شد. در این تحقیق، پارامترهای مؤثر بر کارایی ریزاستخراج فاز جامد با سرنگ پرشده، مورد بررسی قرار گرفتند. این پارامترها عبارتند از: حجم شویش، تعداد و سرعت سیکل‌های عبور نمونه از روی جاذب، حجم محلول شستشوی مزاحم‌ها و اثر نمک. در این تکنیک برای آماده‌سازی جاذب، ابتدا ۲۰۰×۲ میکرولیتر متانول و سپس ۲۰۰×۲ میکرولیتر آب از جاذب عبور داده شد. در مرحله بارگذاری نمونه،۲۰۰×۴ میکرولیتر از محلول به کمک یک موتور چرخشی و با سرعت عبور۲/۴ میکرولیتر بر ثانیه، از روی جاذب عبور داده شد. هنگام تخلیه، نمونه برگشتی وارد ظرف نمونه نمی‌شد و هر بار نمونه تازه از جاذب عبور می‌کرد. جهت حذف مزاحم‌های جذب شده در مرحله آنالیز نمونه حقیقی ، جاذب با ۱۰۰ میکرولیتر آب بسیار خالص شستشو داده شد. جهت تبخیر و حذف آب باقیمانده، جاذب به مدت ۱۰ دقیقه در معرض جریان ملایم گاز نیتروژن قرار گرفت. برای واجذب آنالیت از جاذب در مرحله شویش، ۲۰ میکرولیتر متانول با سرعت ۱/۰ میکرولیتر بر ثانیه از جاذب عبور داده شد. محلول شویشی به مدت ۵ دقیقه در سرنگ باقی می‌ماند تا واجذب شدن بهتر صورت گیرد. سپس محلول شویشی با همان سرنگ استخراجی به لوپ تزریق دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی با منبع یونیزاسیون الکترواسپری تزریق شد. نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌های انتخاب شده در این تحقیق نشان داد که نمونه‌ها عاری از باقیمانده متالاکسیل بوده‌اند. پارامترهای تجزیه‌ای به‌دست آمده با افزودن متالاکسیل به نمونه‌ها به‌دست آمده است. حد تشخیص آنالیت در این روش۲/۳ میکروگرم بر لیتر و انحراف استانداردهای نسبی ۳/۶ تا ۸/۵ درصد، به‌دست آمد. درصد بازیابی قارچ‌کش متالاکسیل در نمونه‌های آنالیز شده در این تحقیق، بین ۶۴ تا ۷۸ درصد به‌دست آمد.

کلمات کلیدی: ریزاستخراج فاز جامد در سرنگ پرشده، طیف‌سنج تحرک یونی، منبع یونیزاسیون الکترواسپری، قارچ‌کش متالاکسیل

فصل اول

مقدمه

مقدمه

ورود آلاینده‌های گوناگون به محیط‌زیست، از جمله معایب تکنولوژی می‌باشد که در میان آن‌ها مجموعه سموم شیمیایی ضدآفات نباتی از اهمیت خاصی برخوردار است. این ترکیبات در خلال نیم قرن گذشته نقش موثری در حفظ گیاهان از گزند آفات، امراض و علف‌های هرز داشته‌اند ولی از طرف دیگر مشکلات و معضلات فراوانی را به‌وجود آورده‌اند. استفاده ناآگاهانه، بی‌مورد و بیش از حد این سموم باعث ایجاد ناهنجاری‌ها و نابسامانی‌هایی در چرخه زیست موجودات و کنش طبیعی طبیعت شده است [۱].

امروزه استفاده بیش از حد آفت‌کش‌ها علاوه‌بر تاثیرات مخرب زیست‌محیطی به‌عنوان عامل خطر جدی برای سلامت انسان مطرح می‌باشد. محصولات کشاورزی و به‌خصوص صیفی‌جات و میوه‌ها، بدون اطلاع از تأثیر نهایی سم‌پاشی‌ها مکرراً سم‌باران می‌شوند و کشاورزان برای حصول اطمینان از مؤثر بودن سم‌پاشی و گریز از هزینه اضافی دز مصرفی سم را گاه تا چندین برابر حد مجاز بالا می‌برند و بین زمان آخرین نوبت سم‌پاشی و برداشت محصول فاصله زمانی مجاز را رعایت نمی‌کنند و گاه بلافاصله پس از سم‌پاشی (به‌ویژه سموم قارچ‌کش) محصول را جمع‌آوری کرده و پس از روانه‌کردن در بازار، مورد مصرف عموم قرار می‌دهند [۲].

اثرات ناخواسته سموم شیمیایی دفع آفات محدود به مسمومیت‌های کوتاه مدت نمی‌شود بلکه این ترکیبات که روز به روز فرمولی پیچیده‌تر پیدا می‌کنند، قادر خواهند بود در دراز مدت باعث انواع سرطان‌ها و اختلالات دیگر در انسان شوند [۱]. سازمان بهداشت جهانی در مورد بقایای آفت‌کش‌ها یک حد مجاز از باقیمانده سموم را به‌عنوان

معیار ارائه کرده است. این معیار به‌صورت غلظت سم برحسب میلی‌گرم بر کیلوگرم در وزن میوه و سبزیجات تازه بیان می‌شود و محصولاتی که غلظت سم آن‌ها بالاتر از این حد باشد غیر قابل مصرف می‌باشند. با توجه به اهمیت غذا در حیات انسان‌ها و ارزش غذایی سبزیجات و میوه‌ها در رژیم غذایی روزانه بررسی غلظت باقیمانده‌ی آفت‌کش‌ها در محصولات کشاورزی و مقایسه آن با حداکثر میزان باقیمانده مجاز[1] آن‌ها به‌عنوان یک اولویت مهم امنیت غذایی مصرف‌کننده مطرح می‌باشد.

امروزه روش‌های متعددی جهت آنالیز باقیمانده‌ی سموم در محصولات کشاورزی وجود دارد که استخراج و اندازه‌گیری مقادیر ناچیز آفت‌کش‌ها را در بافت پیچیده‌ی میوه‌ها و سبزیجات امکان‌پذیر کرده‌اند. در این بین روش‌های تجزیه‌ای سریع، حساس و منطبق با اصول شیمی سبز از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند [۳]. با توجه به اینکه سم اندازه‌گیری شده در این تحقیق از دسته ترکیبات قارچ‌کش می‌باشد، در ادامه به‌معرفی قارچ‌کش‌ها، سمیت آن‌ها و اهمیت آنالیز این دسته از آفت‌کش‌ها پرداخته می‌شود.

۱-۱- قارچ‌کش‌ها

قارچ‌کش[2] در اصطلاح به ترکیباتی اتلاق می‌گردد که سبب مرگ یا از بین رفتن پرگنه[3] قارچ می‌شوند. اغلب قارچ‌کش‌ها حفاظتی بوده و باید قبل از فعالیت بیمارگر در سطح گیاه موجود باشند تا مؤثر واقع شوند و از آلودگی جلوگیری کنند. وجود آن‌ها معمولا از جوانه‌زدن هاگ[4]های قارچ‌ها جلوگیری می‌کند و یا هاگ‌ها را بعد از جوانه‌زدن می‌کشد. اغلب اوقات موادی مانند پاک کننده‌ها به قارچ‌کش‌ها اضافه می‌شوند تا با از بین بردن کشش سطحی آب موجب تماس بیشتر قارچ‌کش با سطح گیاه شوند [٤].

۱-۱-۱- معایب استفاده از قارچ‌کش‌ها

اکثر آفت‌کش‌ها ثبات زیادی دارند و با داشتن ترکیبات شیمیایی پیچیده به‌آسانی در طبیعت تجزیه نمی‌شوند. بنابراین ضمن تأثیر روی آفات گیاهی، آلودگی محیط زیست و تولیدات کشاورزی را نیز در پی دارند. باقیمانده سموم در میوه‌ها، سبزیجات، گوشت، شیر، آب و...در مدت طولانی موجب مسمومیت در اثر مصرف مقادیر جزئی، اما متوالی پس‌ماندهای آفت‌کش‌ها در مواد غذایی می‌شود. اکثر مواد شیمیایی آفت‌زدا سرطان‌زا بوده و وجود انواع سرطان‌ها در جوامع امروز زنگ خطر را برای کاهش پسماندهای سموم در مواد غذایی به‌صدا درآورده است. برخلاف آفت‌کش‌های مورد استفاده در مزارع که تا حدی توسط باد و باران شسته شده و هنگام برداشت محصول و نیز شستشوی پس از برداشت زدوده می‌شوند، قارچ‌کش‌های به‌کار رفته در انبارها و سردخانه‌ها عمدا طوری طراحی شده‌اند که به‌راحتی زدوده نشوند و اغلب به‌وسیله پوشش موم‌اندود محافظت می‌شوند [۵].

تقریباً ۹۰ درصد کلیه قارچ‌کش‌های مورد مصرف در کشاورزی در مدل‌های حیوانی سرطان‌زا می‌باشند. هر چند این مواد تنها ۱۰ درصد از مواد شیمیائی مورد استفاده به‌عنوان آفت‌کش را در سال تشکیل می‌دهند ولی درمجموع عامل ۶۰ درصد از سرطان‌های شایع دستگاه گوارش هستند [۶].

1-Maximum residue limit (MRL)
2-Fungicide
3-Colony
4-Spore

۱-۱-۲- طبقه‌بندی قارچ‌کش‌ها

طبقه‌بندی یا گروه‌بندی قارچ‌کش‌ها بسیار متنوع است. قارچ‌کش‌ها از نظر نوع ترکیب به دو دسته کلی به اسامی ترکیبات معدنی و ترکیبات آلی (سیستمیک و غیرسیستمیک) طبقه‌بندی می‌شوند. ترکیبات معدنی مانند گوگرد، ترکیبات مس و ترکیبات قلع؛ ترکیبات آلی غیرسیستمیک مانند ترکیبات آلی جیوه، ترکیبات بنزنی، دی‌تیوکاربامات‌ها[1]، فتالیمیدها[2]، فنل‌ها و دیگر ترکیبات آلی و از ترکیبات آلی سیستمیک کربوکسیمیدها[3] (اکساتئین‌ها)، ضد سنتز ملانین و ضداامیست[4]ها (نوعی قارچ بیماری‌زا) قابل ذکر می‌باشند [٤].

سم‌های تماسی یا غیرسیستمیک با شستشو از بین می‌روند چون روی سطح گیاه پاشیده می‌شوند و روی برگ‌ها و ساقه قرار می‌گیرند، طوری که آفت‌ها با تماس با آن‌ها از بین می‌روند. اما سموم سیستمیک جذب گیاه شده و وارد شیره نباتی گیاه می‌شوند و در کل گیاه انتشار پیدا می‌کنند. سموم سیستمیک با شستشو از بین نمی‌روند. اکثر سمومی که اکنون استفاده می‌شود سیستمیک هستند چون پخش بهتری داخل گیاه دارند و آفت هر قسمتی از گیاه را از بین می‌برند [۷].

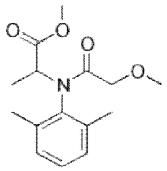
همچنین می‌توان قارچ‌کش‌ها را براساس طرز تاثیر به چهار گروه به نام‌های ترکیبات حفاظتی، ترکیبات تماسی، ترکیبات حذف‌کننده (ریشه‌کن کننده) و ترکیبات معالجه‌کننده تقسیم کرد. قارچ‌کش‌ها بر اساس نحوه تاثیر روی سلول قارچ به پنج گروه شامل ترکیبات مؤثر بر تنفس (آنزیم‌های مولد انرژی)، ترکیبات مؤثر بر سنتز اسیدنوکلئیک، ترکیبات مؤثر بر سنتز پروتئین و ترکیبات مؤثر بر سنتز ملانین طبقه‌بندی می‌شوند. طبقه‌بندی قارچ‌کش‌ها براساس نحوه کاربرد، ترکیبات ضدعفونی کننده بذر (بیماری‌های بذرزاد[5])، ترکیبات ضدعفونی کننده خاک (بیماری‌های خاک‌زاد[6])، ترکیبات به کار رفته در سمپاشی‌های هوایی (برای بیماری‌های هوازاد[7]) و ضدعفونی ضدعفونی زخم را شامل می‌شود [٤].

۱-۱-۳- متالاکسیل

N-(۲, ۶-دی‌متیل‌فنیل)-N-(متوکسی‌استیل)آلانین‌متیل‌استر (متالاکسیل[8]) ترکیبی کایرال است که متشکل از یک جفت آنانتیومر با فعالیت قارچ‌کشی می‌باشد. فعالیت قارچ‌کشی آنانتیومر R بیشتر از آنانتیومر S می‌باشد. در بسیاری از کشورها به جای مخلوط راسمیک متالاکسیل از محصول غنی از آنانتیومر R، با نام M-متالاکسیل استفاده می‌شود. متالاکسیل یک قارچ‌کش فنیل‌آمیدی[9] و سیستمیک می‌باشد که فعالیت حفاظتی و معالجه‌ای دارد و به‌طور وسیع در کنترل بیماری‌های گیاهی خاک‌زاد و هوازاد مورد استفاده قرار می‌گیرد. متالاکسیل از طریق ریشه، ساقه و برگ قابل جذب بوده و مانع از سنتز پروتئین در اندام‌های قارچی می‌شود. نیمه‌عمر متالاکسیل در خاک به‌طور متوسط حدود ۷۰ روز است و در شرایط عادی محیط زیست یک ترکیب نسبتا پایدار به‌شمار می‌آید [۸-۱۲،۱۰]. خواص شیمیایی و فیزیکی متالاکسیل در جدول (۱-۱) نشان داده شده است.

1-Dithiocarbamate
2-Phthalimide
3-Carboximide
4-Antioomycete
5-Seed borne
6-Soil borne
7-Air borne
8-Metalaxyl
9-Phenylamide

جدول ۱-۱ خواص فیزیکی وشیمیایی متالاکسیل [۱۱]

نام شیمیایی	methyl N-(methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-DL-alaninate
شماره ثبت	۵۷۸۳۷-۱۹-۱
فرمول شیمیایی	$C_{15}H_{21}NO_4$
ساختار مولکولی	
نام‌های دیگر	Metalaxyl
جرم مولکولی	۲۷۹/۳۳ g/mol
رنگ و ظاهر	پودر سفیدرنگ
نقطه ذوب	۷۱-۷۲ °C
حلالیت در آب	۸۴۰۰mg/L (۲۲ °C)
$p^{`}K_{OW}$	۱/۶۵
چگالی	۱/۲ g/cm^3 (۲۰°C)

1-Octanol water partition coefficient

۱-۱-٤- سمیت متالاکسیل

متالاکسیل یک آفت‌کش با سمیت پایین می‌باشد و طبق دسته‌بندی انجام شده توسط سازمان بهداشت جهانی[1] در درجه‌ی سوم سمیت[2] قرار گرفته است [۱۲]. تحقیقات انجام شده بر روی حیوانات آزمایشگاهی نشان داده است که اثرات سمی متالاکسیل بیشتر متوجه بافت کبد و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان آن می‌باشد [۱۳]. آنزیم‌های سیتوکروم P450[3]،آنزیم‌های مونواکسیژناز[4] واسترازها[5] از آنزیم‌های موجود در کبد می‌باشند که در متابولیسم انواع مختلف آفت‌کش‌ها نقش اساسی دارند [۱۲]. تحقیقات نشان داده است که متالاکسیل با ایجاد تغییرات بیماری‌زا در بافت کبد سبب متراکم شدن رگ‌ها، تهی شدن سیتوپلاسم سلول‌های کبدی و کاهش فعالیت آنزیم‌های آن می‌شود [١٤]. LD_{50}[6] به مقدار دز از یک ترکیب شیمیایی اتلاق می شود که پنجاه درصد جمعیت زنده مورد آزمایش را بکشد. هرچه LD_{50} یک ترکیب کوچکتر باشد دز کمتری از آن ترکیب برای کشتن جمعیت زنده موردنیاز است یا به‌عبارت دیگر ترکیب سمی‌تر و خطرناک‌تر است [٤]. LD_{50} برای سم متالاکسیل ۵۰۰۰-۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن حیوان آزمایشگاهی گزارش شده است [۱۵].

۱-۲- اندازه‌گیری آفت‌کش‌ها در میوه‌ها و سبزیجات

به‌طور کلی هر روش اندازه‌گیری شامل دو مرحله است. مرحله‌ی استخراج و پاک‌سازی[7] و مرحله‌ی اندازه‌گیری کمی. سموم باقیمانده در میوه‌ها و سبزیجات نیز ابتدا با به‌کارگیری یک روش استخراج مناسب از بافت نمونه خارج می‌شوند و سپس مورد شناسایی و اندازه‌گیری کمی قرار می‌گیرند. اغلب پس از استخراج سموم نیاز به مرحله‌ی پاک‌سازی نیز وجود دارد. مرحله‌ی پاک‌سازی به‌منظور حذف مزاحم‌های موجود در بافت نمونه مانند کلروفیل ،چربی و قندها انجام می‌شود. اندازه‌گیری کمی سموم باقیمانده معمولا با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی گازی و مایع و آشکارسازهای منطبق با خصوصیات ترکیبات مورد نظر انجام می‌شود. برای اندازه‌گیری مجموعه ای از سموم با ویژگی های متفاوت معمولا از آشکارساز طیف سنج جرمی متوالی[8] استفاده می‌شود [۳].

۱-۳- روش‌های متداول استخراج

روش‌های استخراج گوناگونی برای آماده‌سازی نمونه قبل از جداسازی و اندازه‌گیری توسعه یافته‌اند. از جمله مهمترین این روش‌ها می‌توان به استخراج مایع-مایع[9]، استخراج با فاز جامد[10] و انواع روش‌های ریزاستخراج که در سال‌های اخیر توسعه یافته‌اند اشاره نمود. هدف اصلی این روش‌ها عموماً پیش‌تغلیظ و پاک‌سازی نمونه است.

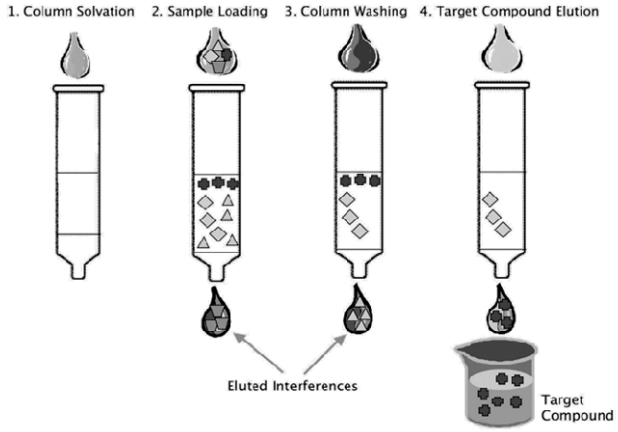
1-World health organization
2-Toxicity class III
3- Cytochrome P450
4-Monooxygenase
5-Esterases
6-Lethal dose
7-Clean up
8-Tandem mass spectrometry
9-Liquid-liquid extraction
10-Solis phase extraction

۱-۳-۱- استخراج مایع-مایع(LLE)

استخراج مایع-مایع یا استخراج با حلال روشی است که در آن ترکیبات مورد نظر از یک محلول آبی به درون یک حلال آلی استخراج می‌شوند. در این نوع استخراج ترکیبات بر اساس حلالیت نسبی خود بین دو مایع با امتزاج‌پذیری متفاوت توزیع می‌شوند. کارایی این روش به میزان حلالیت ترکیب در حلال استخراج کننده، حجم استخراجی و دفعات استخراج وابسته است. روش استخراج مایع-مایع به‌دلیل سادگی و عدم نیاز به دستگاه‌های گران‌قیمت و پیچیده، کاربرد فراوانی در پیش‌تغلیظ و استخراج و آنالیزهای زیست محیطی دارد. البته، با وجود کاربردهای فراوان دارای معایبی نیز می‌باشد. استخراج همزمان چند آنالیت با قطبیت‌های متفاوت از یک نمونه طی یک مرحله استخراج مایع-مایع به خوبی انجام نمی‌شود و اغلب نیاز به مراحل اضافی و استفاده از روش استخراج با فاز جامد پس از استخراج مایع-مایع جهت خالص سازی و آماده‌سازی بهتر نمونه وجود دارد. همچنین در برخی موارد تشکیل امولسیون باعث کاهش کارایی استخراج می‌گردد. مصرف زیاد حلال‌های سمی و ناسازگار با محیط‌زیست از یک‌سو و طولانی بودن مراحل استخراج و وقت‌گیر بودن آن از سوی دیگر سبب محدودیت در استفاده از این روش شده است [۱].

۱-۳-۲- استخراج با فاز جامد(SPE)

در استخراج با فاز جامد، آنالیت‌ها از یک فاز سیال وارد یک فاز جامد استخراج کننده می‌شوند. معمولا فاز جامد شامل ذرات کوچک و متخلخلی از سیلیکا می‌باشد که به یک فاز آلی یا یک پلیمر آلی مثل پلی‌استیرن دارای پیوند عرضی[1] پیوند داده شده‌اند. ذرات جامد استخراج کننده که به‌طور متوسط قطری در حدود ٤٠ تا ٥٠ میکرومتر دارند در یک ستون کوچک انباشته می‌شوند. ماده‌ی جاذب درون ستون توسط فیلترهای پلی‌اتیلنی متخلخل در محل خود ثابت نگه داشته می‌شود. استخراج فاز جامد تنها به استخراج مواد حل شده از نمونه‌های مایع محدود نمی‌شود. هوا یا دیگر نمونه‌های گازی را نیز می‌توان از ستون SPE عبور داد. ترکیباتی که بوسیله‌ی ذرات فاز جامد استخراج می‌شوند را می‌توان توسط یک حلال مناسب جدا نمود. حجم حلال مورد نیاز برای شویش آنالیت‌ها بسیار کمتر از حجم نمونه اصلی می‌باشد [۱۷]. فرآیند استخراج با فاز جامد شامل چهار مرحله‌ی اصلی (۱-آماده‌سازی ستون جاذب، ۲-عبور محلول نمونه، ۳-شستشوی گونه‌های مزاحم و ٤-شویش آنالیت) می‌باشد. مراحل استخراج با فاز جامد در شکل (۱-۱) نشان داده شده است.



شکل ۱-۱- مراحل استخراج با فاز جامد [۱۸]

1-Crosslinked

کارایی استخراج با فاز جامد به نوع جاذب پرکننده‌ی ستون، حجم نمونه عبور داده شده، نوع آنالیت‌ها و حلال شویشی وابسته می‌باشد. استخراج با فاز جامد بر اساس نوع ماده‌ی جاذب پرکننده‌ی ستون به سه دسته تقسیم‌بندی می‌شود:

استخراج به روش فاز معکوس[1]: هدف از به‌کارگیری این روش جداسازی ترکیبات نسبتا غیرقطبی از نمونه‌های قطبی مانند آب است. در این روش از ذرات جاذب نسبتا آب‌گریز مانند سیلیکا با گروه‌های پیوندی اکتادسیل‌سیلان[2] یا یک پلیمر آلی با حلقه‌های بنزنی استفاده می‌شود.

استخراج به روش فاز نرمال[3]: این روش برای تفکیک ترکیبات قطبی از ماتریس نمونه‌های غیرقطبی به‌کار می‌رود. در این روش از ذرات جامد قطبی برای استخراج آنالیت‌های قطبی از نمونه استفاده می‌شود.

استخراج به روش تبادل یونی[4]: در این روش از ذرات حاوی گروه‌های مبادله‌کننده کاتیون و آنیون برای استخراج آنالیت‌های یونی یا آنالیت‌هایی که با تنظیم pH قابل تبدیل به فرم یونی باشند، استفاده می‌شود. بعد از مرحله SPE مواد استخراج شده به فرم مولکولی تبدیل و سپس با یک حلال آلی شویش می‌شوند [۱۷].

در روش SPE مقدار مصرف حلال نسبت به LLE کاهش یافته است و مشکل ایجاد امولسیون وجود ندارد. کار کردن با روش SPE ساده‌تر از LLE می‌باشد. نمونه را می‌توان با یک مکش ملایم سریعا از ستون یا کارتریج SPE عبور داد و سپس در حجم کم حلال تغلیظ کرد. روش SPE برخلاف روش LLE قابلیت خودکار شدن را داراست. با وجود مزیت‌های استخراج فاز جامد نسبت به استخراج مایع-مایع، این روش نیز محدودیت‌هایی دارد. وجود جامدات بسیار ریز، مواد روغنی یا مولکول‌های زیستی بزرگی که در بافت نمونه وجود دارند می‌توانند منافذ مواد جاذب را مسدود نمایند و فرایند استخراج را دچار مشکل کنند. همچنین از آنجایی که حداقل مقدار حلال آلی برای شویش آنالیت‌ها ۱۰۰ میکرولیتر می‌باشد کاهش حجم محلول شویشی حاوی آنالیت‌ها قبل از آنالیزهای بعدی سبب طولانی شدن زمان آنالیز می‌گردد [۱۷].

۱-۳-۳- ریزاستخراج با فاز جامد

روش‌های ریزاستخراج بر پایه‌ی فاز جامد از دیگر روش‌های آماده‌سازی نمونه هستند که در آنالیز مواد غذایی و نمونه‌های بیولوژیکی و زیست‌محیطی کاربرد گسترده‌ای دارند. در ریزاستخراج فاز جامد آنالیت‌ها وارد فاز جامد می‌شوند و استخراج و تغلیظ آنالیت‌ها بدون حلال یا در حجم کمی از حلال صورت می‌گیرد. روش‌های ریزاستخراج فاز جامد به دو دسته ایستا[5] و پویا[6] تقسیم می‌شوند. روش‌های فیبر SPME، ریزاستخراج با میله جاذب همزن[7] و ریزاستخراج با فیلم نازک[8] در دسته ایستا و روش‌های ریزاستخراج فاز جامد در لوله[9]، ریزاستخراج فاز جامد در سوزن[10] و ریزاستخراج فاز جامد در نوک پیپت[11] در دسته پویا جای می‌گیرند [۱۹]. انواع روش‌های ریز ریز استخراج در شکل (۱-۲) نشان داده شده است.

1-Reversed phase
2-Octadecyl silane
3-Normal phase
4-Ion exchange
5-Static
6-Dynamic
7-Stir bar sorptive extraction
8-Thin film microextraction
9-In-tube SPME
10-In-needle SPME
11-In-tip SPME