مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال نوزدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، صفحات ۹۱-۷۹

آنالیز همزمان لاکتون‌های ماکروسیکلیک در فلفل دلمه‌ای با استفاده از دستگاه‌کروماتوگرافی مایع همراه با طیف سنجی جرمی متوالی (LC-MS/MS)

مهدی علمی[۱]، سعید رضا پاکزاد[۲و۴]، مریم امیر احمدی [۳و۴]

۱- کارشناس ارشد اداره کل آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا، دارو و تجهیزات پزشکی، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

۲- عضو هیات علمی، اداره کل آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا، دارو و تجهیزات پزشکی، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

۳- نویسنده مسئول: دانشیار اداره کل آزمایشگاه های مرجع کنترل غذا، دارو و تجهیزات پزشکی، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
پست الکترونیکی: Maryamamir2001@yahoo.com

۴- مرکز تحقیقات آزمایشگاه غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۲۳

چکیده

سابقه و هدف: لاکتون‌های ماکروسیکلیک شامل دو گروه از آفت‌کش‌های پرمصرف دارای طیف ضد انگلی گسترده هستند که جهت کنترل بسیاری از نماتدهای نابالغ و بندپایان استفاده می‌شوند. با توجه به خطرات بالقوه وجود باقیمانده این ترکیبات در محصولات کشاورزی، هدف از این مطالعه ارائه روشی معتبر جهت آنالیز همزمان آفت‌کش‌های نامبرده در فلفل دلمه‌ای به عنوان نماینده گروه ماتریکس‌های دارای محتوای آب بالا، با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع و طـیف‌سنجی جرمی متوالی است.

مواد و روش‌ها: آماده‌سازی بر اساس روش۱۵۶۶۲ اتحادیه اروپا با برخی تغییرات، بر پایه استخراج استونیتریلی در محیط بافری و پاکسازی با استفاده ازجاذب‌های PSA وGCB انجام شده است. جهت غلبه بر اثر ماتریکس، منحنی کالیبراسیون بر پایه ماتریکس و در حضور استاندارد داخلی رسم شده است. اعتبار روش با ارزیابی خطی بودن، مطالعات صحت و دقت و همچنین حد تشخیص(Limit of Detection) و حد اندازه‌گیری(Limit of Quantitation)مورد بررسی قرار گرفته است.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد روش در محدوده ۱۵۰ -۱۰ نانوگرم برمیلی لیتر با ضریب همبستگی > ۰/۹۹۵ خطی است. همچنین میانگین درصد بازیافت ۱۲۸/۲-۷۵/۶ درصد و محدوده ضریب تغییرات برای مطالعات تکرارپذیری ۲۲/۸-۲/۸ درصد بوده است. حد تشخیص آزمون (بجز آفت‌کش‌های آورمکتین ب ۱ ب و موکسیدکتین) سه نانوگرم برگرم و حد اندازه‌گیری (بجز دو آفت کش مذکور) ۱۰ نانوگرم برگرم بدست آمده است.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان می‌دهد روش ارائه شده از اعتبار لازم جهت آزمون آفت‌کش‌های نامبرده از گروه لاکتون‌های ماکروسیکلیک برخوردار است.

واژگان کلیدی: لاکتون‌های ماکروسیکلیک، باقیمانده آفت‌کش‌ها، کچرز، کروماتوگرافی مایع همراه با طیف سنجی‌جرمی متوالی

پیام‌های اصلی:

- تعداد ۱۰ آفت‌کش از گروه لاکتون‌های ماکروسیکلیک با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع-طیف سنجی جرمی متوالی آنالیز شدند.
- با توجه به تجهیزات موجود، روش آزمون جهت دست‌یابی به حساسیت لازم بهینه‌سازی شده است.
- روش ارائه‌شده از اعتبار، صحت و دقت قابل قبول جهت فعالیت‌های کنترلی برخوردار است.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-10-31]

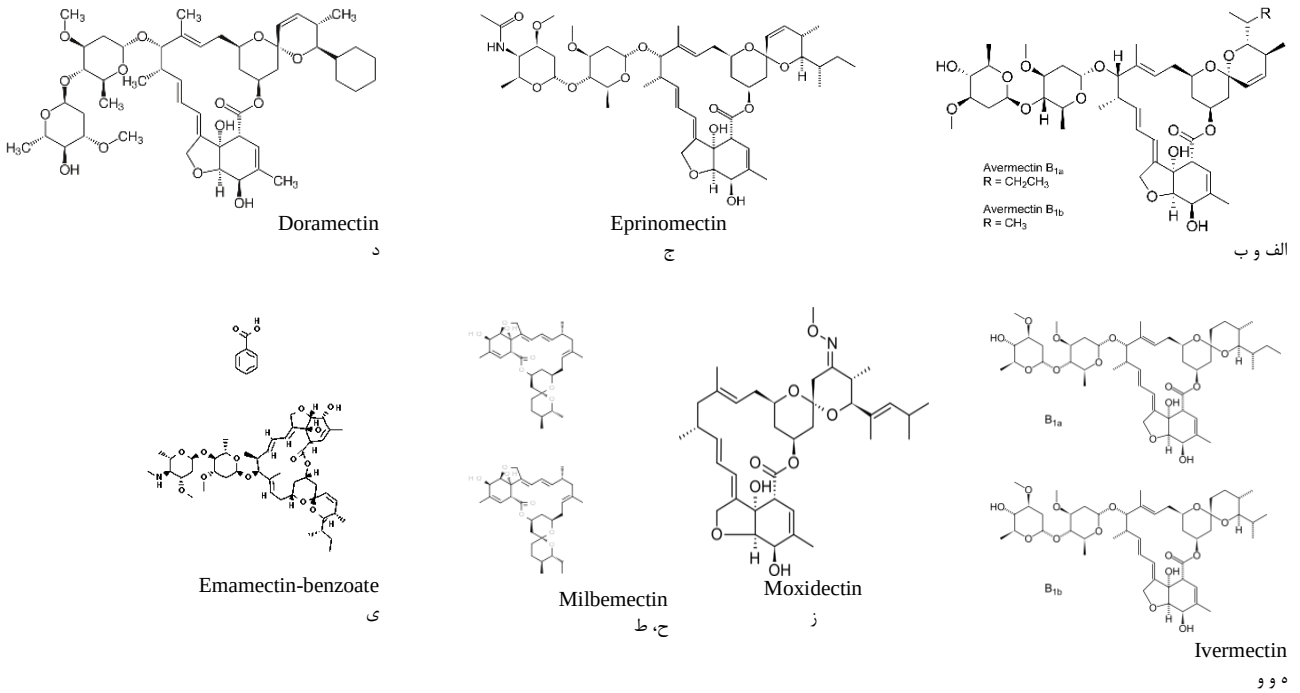
[DOI: 10.61186/nsft.19.3.79]

• مقدمه

لاکتون‌های ماکروسیکلیک از دو زیر گروه عمده تشکیل شده‌اند: اورمکتین‌ها، که شامل آبامکتین، دورامکتین، ایورمکتین، امامکتین، اپرینومکتین و سلامکتین بوده و دارای استخلاف ساکارید در موقعیت کربن۱۳ هستند و گروه میلبمایسین‌ها (همچنین به نام نمودکتین‌ها شناخته می‌شوند) که موکسیدکتین نماینده آنهاست و استخلاف ساکارید ندارند (۱). آبامکتین و میلبی‌مکتین از میکروارگانیسم‌های خاک جدا شده‌اند (۲). امامکتین و ایورمکتین ترکیبات مشابهی هستند که از آبامکتین به دست می‌آیند (۳). این چهار ماده شیمیایی به عنوان کنه‌کش یا ضد انگل برای حیوانات یا گیاهان استفاده می‌شوند. میلبی‌مکتین یک مخلوط میلبی‌مکتین آ۳ (A_3) و میلبی‌مکتین آ۴ (A_4) است. امامکتین مخلوطی با تقریب ۹۰درصد امامکتین ب۱ آ (B_{1a}) و۱۰ درصد امامکتین ب۱ ب (B_{1b})است (۲). شکل یک ساختار شیمیایی ۱۰آفت‌کش (با احتساب ایزومرها) از گروه لاکتون‌های ماکروسیکلیک را نشان می‌دهد (۴).

حداکثر حدقابل قبول باقیمانده MRL (Maximum Residue Level) برای امامکتین بنزوات، آبامکتین و ملبی-مکتین توسط اتحادیه اروپا در محصولات کشاورزی تعیین شده است. موکسی دکتین، اپرینومکتین، ایورمکتین و دکسامکتین در فرآورده‌های دامی دارای حد مجاز هستند (۵). کدکس (Codex) مواد غذایی نیز برای امامکتین بنزوات و آبامکتین بیشینه حد باقیمانده را در محصولات کشاورزی مختلف تعیین کرده است (۶). در ایران مطابق ضابطه سازمان غذا و دارو برای آفت‌کش آبامکتین در محصولات زراعی و دامی مختلف حد مجاز باقیمانده تعیین شده است (۷).

چندین روش برای تعیین باقیمانده لاکتون‌های ماکروسیکلیک در محصولات کشاورزی گزارش شده است (۱۱-۸). تکنیک کروماتوگرافی مایع (LC) با آشکارساز فرای بنفش (UV) جهت تعیین باقیمانده آبامکتین در سبزیجات تدوین و ارائه شده است اما این روش از حساسیت کافی برخوردار نیست (۸). استفاده از مشتق‌سازی و آشکارساز فلورسانس برای آزمون باقیمانده لاکتون‌های ماکروسیکلیک نیز تکوین و ارائه شده است (۱۲).



شکل ۱. الف و ب- اورمکتین B1b، اورمکتین B1a ج- اپرینومکتین، د- دورامکتین، ه و و - ایورمکتین ز -موکسیدکتین – ح و ط میلبی مکتین A3، میلبی مکتین A4 ی: امامکتین بنزوات

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-10-31]

[DOI: 10.61186/nsft.19.3.79]

در این تکنیک عمدتا مشتق‌سازی‌ها با انیدرید تری فلورواستیک و ۱-متیل ایمیدازول انجام می‌شود و از حساسیت بالایی برخوردار هستند. مطالعاتی در زمینه تعیین همزمان لاکتون‌های ماکروسیکلیک نیز انجام و گزارش شده است(۱۳). دراکثر تکنیک‌های کروماتوگرافی ارائه شده فاز متحرک بصورت ایزوکراتیک استفاده شده است که به طور کامل انواع مختلف آفت‌کش‌ها را از هم جدا نمی‌کند (۱۴). مطالعات مختلفی جهت ارائه روش آزمون این ترکیبات با دستگاه کروماتوگرافی مایع به همراه طیف‌سنجی جرمی متوالی نیز انجام شده است (۱).

با توجه به محدودیت‌های آزمون لاکتون‌های ماکروسیکلیک با روش‌های آنالیز همزمان متداول در آزمایشگاه‌های کنترل، درایران چندان به آنالیز باقیمانده این آفت‌کش‌های پرمصرف پرداخته نشده است. هدف از این مطالعه ارائه روش صحیح و دقیق آنالیز همزمان ۱۰ آفت‌کش (با در نظر گرفتن ایزومرها) از گروه لاکتون‌های ماکروسیکلیک؛ آورمکتین ب ۱ آ، آورمکتین ب ۱ ب، دورامکتین، امامکتین بنزوات ب ۱ آ، امامکتین بنزوات ب ۱ب، اپرینومکتین، ایورمکتین، میلبی‌مکتین آ۴، میلبی-مکتین آ۳ و موکسیدکتین با استفاده از دستگاه‌کروماتوگرافی-مایع و طیف‌سنجی جرمی متوالی (LC/MS-MS) است. این روش با توجه به تفاوت حساسیت دستگاه‌های موجود در آزمایشگاه‌های کنترل کشور با دستگاه‌های دارای حساسیت بالای اعلام شده در روش اصلی، جهت دست یابی به کارایی و اعتبار لازم با تغییراتی در روش اتحادیه اروپا (۱۵) اجرا شده است. در روش ارائه شده، بهینه‌سازی در قسمت آماده‌سازی نمونه و شرایط دستگاهی نسبت به روش پایه انجام شده است تا روشی معتبر با حد تعیین مقدار مناسب (متناسب با حدود مجاز مقرر) و با صحت و دقت لازم جهت انجام فعالیت‌های کنترلی ارائه گردد. لازم بذکر است که در روش مرجع تنها آبامکتین و متابولیت‌های آن آزمون شده‌اند، لذا با توجه به این که در این مطالعه همزمان ۱۰ آفت‌کش ازگروه لاکتون‌های ماکروسیکلیک آنالیز شده است تغییراتی جهت امکان آزمون همزمان این ترکیبات اعمال شده است.

• مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و حلال‌ها: استانداردهای آبامکتین، ایورمکتین، دورامکتین، موکسیدکتین، اپرینو مکتین، امامکتین بنزوات ومیلبی‌مکتین از شرکت LGC (LGC, Augsburg, Germany) خریداری شده‌اند. تری‌فنیل‌فسفات به عنوان استاندارد داخلی، سولفات منیزیوم بی‌آب، سدیم هیدروژن سیترات سیس‌کویی هیدرات، تری سدیم سیترات دی هیدرات و حلال‌های مورد استفاده شامل متانول با خلوص بالای ۹۹/۸ درصد و استونیتریل با خلوص بالای ۹۹درصد، اسید فرمیک با خلوص بالای ۹۸ درصد، اسید سولفوریک با خلوص ۹۹ درصد و هیپوکلریدسدیم از شرکت مرک (Merck, Darmstadt, Germany) تهیه شده اند. آمونیوم فرمات با خلوص بالای ۹۹ درصد از شرکت سیگما و کربن گرافیت (GCB) از شرکت ساپلکو (Supelco, Bellfonte, PA, USA) خریداری شده است. آب دیونیزه با استفاده از دستگاه آب خالص ساز از شرکت مرک (Merck, Darmstadt, Germany) تامین شده است.

اطلاعات دستگاهی: دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی همراه با طیف سنجی جرمی متوالی مورد استفاده در این مطالعه شامل کروماتوگرافی مایع (Dionex, Massachusetts, USA) و طیف‌سنجی‌جرمی متوالی، حاوی یونساز مدل Applied Bio system, API 3200 آنالایزر جرمی کوادروپل سه گانه همراه با اتوسمپلر مدل Ultimate 3000 (AB Sciex Framingham, MA,USA،) است. منبع تامین‌کننده گاز نیتروژن، دستگاه نیتروژن ژنراتور از شرکت PEAK مدل ABN2ZA (Peak Scientific, Scotland, UK) است. فاز ساکن مورد استفاده در کروماتوگرافی، ستون HPLC با مشخصات Phenomenex Kinetex XB-C18 (100 mm × 2.1 mm i.d, 2.6 µm) است. فازمتحرک متشکل از حلال A شامل آمونیوم فرمات ۱۰ میلی‌مولار در آب دیونیزه و حلال B شامل آمونیوم فرمات ۱۰ میلی‌مولار در متانول است. سرعت جریان فاز متحرک ۰/۴ میلی لیتر در دقیقه، حجم تزریق ۲۰میکرولیتر و دمای ستون ۴۰ درجه سلیسوس در نظر گرفته شده است. برنامه تغییرات فاز متحرک مطابق جدول ۱تعیین شده است.

جدول ۱. برنامه تغییرات فاز متحرک در سیستم کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی

حلال B (درصد)	حلال A (درصد)	جریان فاز متحرک (میلی لیتر بر دقیقه)	زمان (دقیقه)
۲	۹۸	۰/۴	۰/۰۰
۲	۹۸	۰/۴	۰/۲۵
۹۹	۱	۰/۴	۱۲/۲۵
۹۹	۱	۰/۴	۱۳/۰۰
۲	۹۸	۰/۴	۱۳/۰۱
۲	۹۸	۰/۴	۲۰

آنالیز دستگاهی استانداردها

تهیه محلول‌های استاندارد

استاندارد ذخیره: استاندارد سموم در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در حلال‌های استونیتریل و متانول (میلبی مکتین) تهیه گردید. تمامی استانداردها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-10-31]

[DOI: 10.61186/nsft.19.3.79]

نگهداری شده‌اند. استاندارد مخلوط حد واسط در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از استاندارد ذخیره در حلال استونیتریل ساخته شده است. استاندارد مخلوط کاری در غلظت یک میکروگرم بر میلی لیتر در حلال استونیتریل از استاندارد مخلوط حدواسط بصورت روزانه ساخته شده است، از این مخلوط جهت تهیه محلول استانداردکاری کالیبراسیون استفاده می‌شود. محلول‌های استوک، واسط وکاری استاندارد داخلی نیز بصورت منفرد به ترتیب در غلظت‌های یک میلی‌گرم بر میلی-لیتر،۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حلال اتیل‌استات تهیه و در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید. دراین مطالعه جهت غلبه بر اثر ماتریکس، محلول‌های استاندارد کالیبراسیون برپایه ماتریکس تهیه شده است. روش تهیه‌ی محلول استاندارد برپایه ماتریکس مشابه با استاندارد برپایه‌ی حلال است با این تفاوت که بجای حلال خالص، عصاره-ی نمونه‌ی بلانک استخراج شده (که در مراحل استخراج استاندارد داخلی به آن اضافه نشده‌است) به عنوان عامل رقیق کننده استفاده شده است. این محلول استانداردکاری از استاندارد مخلوط‌کاری (یک میکروگرم بر میلی‌لیتر) بصورت روزانه تهیه گردید. لازم به توضیح است که در تهیه‌ی این دسته از محلول‌های استاندارد، رقیق‌سازی عصاره‌ی نمونه بلانک با حلال، نباید بیش از ۲۰ درصد باشد. مقادیر مورد استفاده جهت تهیه منحنی کالیبراسیون بر پایه ماتریکس در جدول ۲ اعلام شده است.

برای تعیین و بهینه سازی پارامترهای طیف‌سنج جرمی مثل یون والد، یون‌های تولیدی و سایر پارامترهای وابسته به آنالیت، استانداردکاری منفرد در غلظت یک میکروگرم برمیلی لیتر، در محلول آب و متانول، آمونیوم فرمات پنج میلی مولار بهمراه ۰/۱ درصد اسید فرمیک ساخته شده و مورد استفاده قرارگرفته است.

تعیین پارامترهای مناسب طیف‌سنجی‌جرمی متوالی

استانداردهای سموم مورد نظر که با غلظت یک میکروگرم بر میلی‌لیتر در محلول متانول (۵۰ درصد):آب (۵۰درصد) + آمونیوم فرمات پنج میلی‌مولار و فرمیک اسید ۰/۱درصد تهیه شده‌اند، به منظور شناسایی یون‌های والد و بهینه‌سازی پارامترهای مرتبط با تولید یون‌های والد و دختر، بصورت مستقیم به دستگاه طیف‌سنج‌جرمی متوالی تزریق شده‌اند. در این مطالعه ابتدا یون مادر انتخاب و سپس یون‌های دختر مرتبط هر آفت‌کش بصورت مجزا تعیین شده است. مقادیر یون‌های والد و دختر و پارامترهای وابسته به آنالیت در طیف‌سنجی‌جرمی متوالی در جدول ۳ اعلام شده است. برنامه پایش همزمان چندگانه MRM (Multi reaction monitoring)جهت آزمون همزمان این ترکیبات بعد از مشخص شدن یون‌های دختر و پارامترهای طیف‌سنجی‌جرمی متوالی برای هر یون، نوشته شده است. در این برنامه پارامترهای وابسته به منبع یونی شامل کرتین گاز (Curtain Gas) برابر ۱۵psi،گازتصادم (Collision Gas)psi ۶، ولتاژاسپری یون (Ion spray Voltage) برابر ۵۵۰۰، دما ۴۰۰ درجه سلسیوس (Temperature) ، گاز منبع یونی یک(Ion source Gas1)برابرpsi ۴۰ وگاز منبع یونی دو (Ion source Gas2) برابرpsi ۴۵ تنظیم شده است.

آنالیز همزمان استانداردآفت‌کش‌ها با دستگاه LC-MS/MS با برقراری متد مناسب کروماتوگرافی مایع و طیف‌سنجی‌جرمی متوالی ابتدا آفت‌کش‌ها بصورت مجزا وسپس بصورت مخلوط در حجم۲۰ میکرولیتر به دستگاه LC-MS/MS تزریق شده‌اند.

جدول ۲. تهیه محلول استانداردهای منحنی کالیبراسیون بر پایه بافت

	بلانک	۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر	۲۰نانوگرم بر میلی لیتر	۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر	۱۰۰نانوگرم بر میلی لیتر	۱۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر
عصاره بلانک (میکرولیتر)	۸۰۰	۸۰۰	۸۰۰	۸۰۰	۸۰۰	۸۰۰
استاندارد مخلوط (میکرولیتر)	۰	۱۰	۲۰	۵۰	۱۰۰	۱۵۰
استاندارد داخلی (میکرولیتر)	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
حلال استونیتریل(میکرولیتر)	۱۸۰	۱۷۰	۱۶۰	۱۳۰	۸۰	۳۰
حجم نهایی (میکرولیتر)	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-10-31]

[DOI: 10.61186/nsft.19.3.79]

جدول ۳. مشخصات یون های والد (پیشرو)، دختر(تولیدی) و پارامترهای بهینه شده جهت تهیه برنامه MRM در مد مثبت

	یون والد (جرم بر بار)	یون دختر (جرم بر بار)	مدت زمان پایش[f] DW (میلی ثانیه)	نام آنالیت	DP (Declustering potential)	EP (Entrance potential)	CEP (Collision Cell Entrance Potential)	CE (Collision energies)	CXP (Collision Cell Exit Potential)
۱	۵۲۵/۰۳	۱۰۹/۱	۳۰	میلبمکتین آ۴	۵۱	۵	۲۶	۳۵	۲
۲	۵۲۵/۰۳	۵۵/۱	۳۰	میلبمکتین آ۴	۵۱	۵	۲۶	۸۷	۲
۳	۸۹۰/۰۳	۳۰۵/۲	۶۰	آورمکتین ب ۱ آ	۲۱	۷	۴۴	۳۹	۱۴
۴	۸۹۰/۰۳	۱۴۵/۲	۶۰	آورمکتین ب ۱ آ	۲۱	۷	۴۴	۴۹	۲
۵	۸۷۶/۵۴	۱۴۵/۱	۶۰	آورمکتین ب ۱ ب	۲۱	۵/۵	۴۸	۴۷	۶
۶	۸۷۶/۵۴	۶۹/۱	۶۰	آورمکتین ب ۱ ب	۲۱	۵/۵	۴۸	۸۷	۲
۷	۶۴۰/۱۱۳	۵۲۸/۲	۶۰	موکسی دکتین	۲۱	۵/۵	۳۶	۱۷	۸
۸	۶۴۰/۱۱۳	۴۹۸/۲	۶۰	موکسی دکتین	۲۱	۵/۵	۳۶	۲۱	۸
۹	۸۸۶/۶۱	۱۵۸/۳	۱۰	امامکتین بنزوات ب ۱ آ	۷۱	۸	۵۲	۴۹	۴
۱۰	۸۸۶/۶۱	۸۲/۲	۱۰	امامکتین بنزوات ب ۱ آ	۷۱	۸	۵۲	۱۰۷	۲
۱۱	۸۸۶/۲۹	۱۵۸/۲	۱۰	امامکتین بنزوات ب ۱ب	۷۱	۱۰	۵۲	۵۱	۴
۱۲	۸۸۶/۲۹	۸۲	۱۰	امامکتین بنزوات ب ۱ب	۷۱	۱۰	۵۲	۱۱۷	۴
۱۳	۹۱۴/۳۱۲	۱۸۶/۱	۳۰	اپرینومکتین	۲۶	۶/۵	۶۰	۴۵	۴
۱۴	۹۱۴/۳۱۲	۱۵۴/۱	۳۰	اپرینومکتین	۲۶	۶/۵	۶۰	۵۱	۴
۱۵	۵۴۶/۳۱۹	۵۱۱/۳	۶۰	میلبمکتین آ۳	۲۱	۳	۳۰	۱۹	۸
۱۶	۵۴۶/۳۱۹	۴۹۳/۲	۶۰	میلبمکتین آ۳	۲۱	۳	۳۰	۲۱	۸
۱۷	۸۹۲/۴۹۷	۳۰۷/۳	۶۰	ایورمکتین	۳۶	۶/۵	۴۶	۳۳	۶
۱۸	۸۹۲/۴۹۷	۵۶۹/۲	۶۰	ایورمکتین	۳۶	۶/۵	۴۶	۲۵	۸
۱۹	۹۱۶/۴۸۳	۳۳۱/۳	۶۰	دورامکتین	۳۶	۷	۴۴	۳۷	۶
۲۰	۹۱۶/۴۸۳	۵۹۳/۲	۶۰	دورامکتین	۳۶	۷	۴۴	۲۵	۸
۲۱	۳۲۶/۹۸۳	۷۷/۱	۱۰	تری فنیل فسفات	۷۶	۹	۲۴	۵۱	۲
۲۲	۳۲۶/۹۸۳	۱۵۲/۱	۱۰	تری فنیل فسفات	۷۶	۹	۲۴	۴۷	۲

a. Entrance potential, **b**. Collision Cell Exit Potential, **c**. Collision energies , d. Collision Cell Entrance Potential, e. Declustering potential, f. Dwell time

استخراج و خالص‌سازی نمونه‌ها

آماده‌سازی و استخراج: همگن‌سازی نمونه فلفل‌دلمه‌ای به عنوان نماینده گروه دارای محتوای آب بالا از جمله صیفی‌جات و میوه‌ها (۱۶) درحالت کرایوژنیک و با استفاده از CO_2 مایع انجام شده و۱۰گرم نمونه در داخل یک لوله فالکون ۵۰ میلی-لیتری وزن‌گردید. پس از افزودن۲۰۰ میکرولیتر استاندارد داخلی به نمونه‌ها، ۱۰ میلی‌لیتر استونیتریل به روی نمونه‌ها اضافه و سپس به مدت یک دقیقه توسط ورتکس مخلوط گردید. در ادامه چهارگرم سولفات منیزیم بدون آب، یک گرم نمک طعام و نمک‌های بافر شامل یک گرم‌تری‌سدیم سیترات دهیدرات و نیم گرم سدیم هیدروژن سیترات سیس‌کویی-هیدرات بر روی نمونه‌ها اضافه و سپس به مدت یک دقیقه با تکان دادن دستی مخلوط گردیدند. سانتریفیوژ نمونه‌ها بمدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۵۰۰rpm در دمای منهای پنج درجه سلسیوس انجام شد. هشت میلی‌لیتر ازمحلول رویی به یک لوله فالکون ۱۵میلی‌لیتری، حاوی۰/۰۴ گرم GCB ، ۰/۴ گرم PSA و ۱/۲ گرم سولفات‌منیزیوم منتقل‌گردید. همگن‌سازی با ورتکس به مدت یک دقیقه و سانتریفیوژ نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۵۰۰ rpm در دمای منفی پنج درجه سلسیوس انجام شد. دو میلی لیتر از محلول رویی به یک لوله فالکون ۱۵میلی‌لیتری منتقل و پاک‌سازی نهائی نمونه‌ها با استفاده از فیلتر سرسرنگی ۰/۲میکرون (Polytetrafluoroethylene) انجام شد. ۲۰ میکرولیتر از محلول استخراج شده به دستگاه LC-MS/MS تزریق گردید.

اعتبارسنجی روش: جهت بررسی اعتبار روش آزمون پارامترهای تعیین محدوده و بررسی خطی بودن، صحت و دقت روش، اختصاصیت، تعیین حد تشخیص(LOD) و حد اندازه-گیری(LOQ) مورد بررسی قرار گرفته است. به منظور غلبه بر اثر ماتریکس و بررسی خطی بودن روش آزمون جهت رسم منحنی‌کالیبراسیون از روش رسم منحنی بر پایه ماتریکس

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-10-31]
[DOI: 10.61186/nsft.19.3.79]

استفاد شده است. بدین منظور با استفاده از عصاره استخراج شده نهایی نمونه بلانک استانداردهای منحنی کالیبراسیون طبق جدول ۲ در پنج سطح به غلظت‌های ۱۵۰، ۵۰،۱۰۰، ۱۰،۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر بر پایه ماتریکس تهیه گردید. این کار در چهار روز کاری مختلف تکرار شده و در نهایت منحنی کالیبراسیون بر پایه ماتریکس با میانگین چهار نقطه و توسط نرم‌افزار اکسل رسم گردیده است. صحت و دقت روش با استفاده از نمونه‌های اسپایک در سطوح ۷۰ و۳۰ نانوگرم برگرم بررسی شده است. همچنین شیفت زمان بازداری و نسبت یونی مورد بررسی قرارگرفته و در نهایت یافته‌ها با مقررات اتحادیه اروپا (۱۶) مقایسه گردیده است.

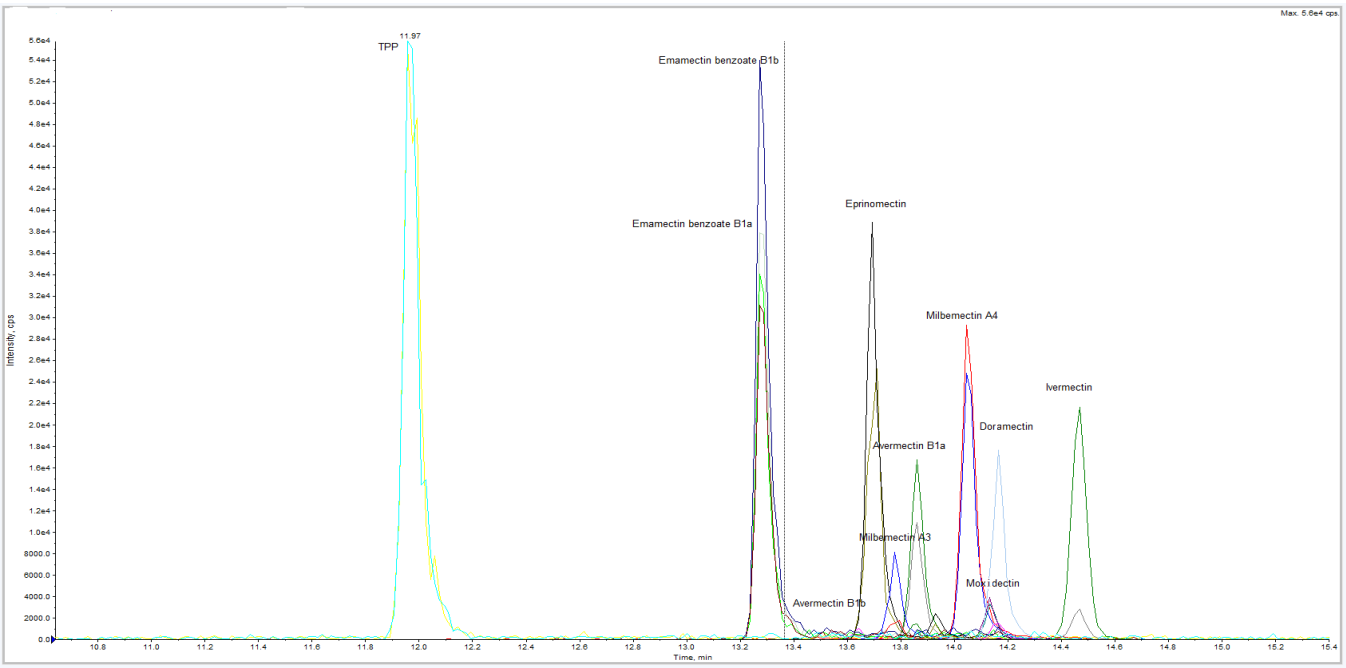
• یافته‌ها

آنالیز دستگاهی استانداردها: در این روش آزمون، عمده آفت‌کش‌های مورد مطالعه در یونساز الکترواسپری با دریافت یک یون هیدروژن مثبت بصورت یون جرم ملکولی بعلاوه یک واحد مثبت $[M+H]^+$ در آمده و تنها آفت کش آورمکتین ب۱ ب با آمونیوم یون تشکیل داده است و بصورت $[M+NH_4]^+$ پایش شده است. کروماتوگرام حاصل از تزریق همزمان آفت‌کش‌ها و استاندارد داخلی در شکل ۲ نشان داده شده است.

یافته‌ها نشان داد با افزایش دمای منبع یونیزاسیون برای کلیه ترکیبات مورد آزمون تا ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد، حساسیت و حد اندازه‌گیری بهتری بدست می‌آید. همچنین حذف اسید فرمیک در فاز متحرک نیز باعث بهبود حساسیت روش آزمون همزمان آفت‌کش‌های مورد مطالعه شده است. بررسی‌ها نشان داد که اکثر آفت‌کش‌های موردنظرشامل؛ آبامکتین، امامکتین بنزوات، اپرینومکتین، مکسیدکتین و میلبمکتین در شرایط عدم حضور اسید در فاز متحرک، حساسیت بهتری دارند در مقابل ایورمکتین در شرایط اسیدی پاسخ بهتری نشان داده است. در مجموع برای آنالیز همزمان ۱۰ آفت‌کش مورد نظر حذف اسیدفرمیک باعث بهینه شدن نتایج آزمون شده است.

اعتبارسنجی

بررسی خطی بودن و محدوده رسم منحنی کالیبراسیون: نتایج نشان می‌دهد منحنی کالیبراسیون رسم شده بر پایه ماتریکس در پنج سطح به غلظت‌های ۱۵۰، ۵۰،۱۰۰، ۱۰،۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر در چهار روز کاری مختلف خطی است و نقاط از صحت و تکرارپذیری قابل قبول برخوردارند (جدول ۴).



شکل ۲. نمونه ای از کروماتوگرام شناسایی همزمان استاندارد داخلی و آفت کش ها در غلظت ۱۰۰ نانوگرم برمیلی لیتر (از نقاط منحنی کالیبراسیون) ؛۱-تری فنیل فسفات(استاندارد داخلی) ۲و۳- امامکتین بنزوات B1a, B1b ۴- اورمکتین B1b، ۵- اپرینومکتین، ۶- میلبی مکتین A3، ۷- اورمکتین B1a ، ۸- میلبی مکتین A4 ۹- موکسیدکتین، ۱۰- دورامکتین، ۱۱- ایورمکتین

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-10-31]

[DOI: 10.61186/nsft.19.3.79]

جدول ۴. منحنی کالیبراسیون بر پایه ماتریکس از غلظت ۱۰ الی ۱۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر

ردیف	آفت کش	محدوده ضریب تغییرات	درصد بازیافت	ضریب همبستگی	شیب خط	عرض از مبدا
۱	آورمکتین ب ۱ آ	۹/۲-۱۹/۸	۹۶/۹۶	۰/۹۹۶	۰/۰۰۲۸	-۰/۰۰۱۳
۲	آورمکتین ب ۱ ب	۱۲/۴-۱۷/۸	۹۹/۷	۰/۹۹۹	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۲
۳	دورا مکتین	۵/۲-۱۴/۷	۹۳/۳	۰/۹۹۵	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۸۹
۴	امامکتین بنزوات ب ۱ آ	۱۷/۰-۲۰/۹	۹۶/۴	۰/۹۹۵	۰/۰۰۴۲	۰/۰۰۲۹
۵	امامکتین بنزوات ب ۱ب	۸/۵-۱۸/۵	۱۰۰/۱	۰/۹۹۹	۰/۰۱۰۷	۰/۰۲۲۱
۶	اپرینومکتین	۵/۰-۱۸/۱	۹۹/۶	۰/۹۹۹	۰/۰۰۶۰	-۰/۰۱۶
۷	ایورمکتین	۵/۹-۲۰/۴	۹۵/۹	۰/۹۹۹	۰/۰۰۳۸	-۰/۰۰۷۹
۸	میلبمکتین آ۴	۵/۲-۱۴/۲	۹۹/۳	۰/۹۹۸	۰/۰۰۳۴	-۰/۰۰۰۹
۹	میلبمکتین آ۳	۳/۷-۱۹/۲۱	۹۷/۰	۰/۹۹۹	۰/۰۰۱	-۰/۰۰۰۱
۱۰	موکسیدکتین	۱۰/۳-۱۷/۳	۹۸/۳	۰ /۹۹۵	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۷

تعیین درصد بازیافت و مطالعات صحت و دقت روش: برای بررسی درصد بازیافت و دقت وصحت روش، نمونه‌های بلانک در دو سطح ۳۰ و ۷۰ نانوگرم بر گرم و برای هر سطح چهار نمونه (جمعا هشت نمونه) اسپایک شده سپس با استفاده از روش گفته شده بر روی آنها استخراج صورت گرفته است. این نمونه‌ها آنالیز شده و درصد بازیافت با استفاده از منحنی کالیبراسیون بر پایه ماتریکس تعیین گردیده است. این کار در سه روز کاری انجام شده و میانگین درصد بازیافت و میزان درصد ضریب تغییرات جهت مطالعات صحت و دقت میانی تعیین شده است (جدول ۵).

حد شناسایی و حد اندازه‌گیری: حدود شناسایی و حدود اندازه‌گیری در نمونه‌های اسپایک در سطوح پایین با نسبت سیگنال به نویز ۳/۱ جهت حد شناسایی و سیگنال به نویز ۹/۱ جهت حد اندازه‌گیری، مشخص‌گردیده است. با این شرط که در سطح حد اندازه‌گیری آزمون از صحت و دقت مناسب برخوردار باشد. در واقع حد اندازه‌گیری کمترین حد اسپایک که از صحت و دقت لازم برخوردار باشد در نظر گرفته شده است. در روش ارائه شده حد تشخیص روش (بجز آفت‌کش‌های آورمکتین ب ۱ ب و موکسیدکتین) سه نانوگرم برگرم و حد اندازه‌گیری (بجز دو آفت کش مذکور) ۱۰ نانوگرم برگرم بدست آمده است. حدود تشخیص و اندازه گیری آفت‌کش آورمکتین ب ۱ ب به ترتیب ۱۳ و۵۰ نانوگرم برگرم و برای آفت‌کش موکسیدکتین ۶ و۲۰ نانوگرم برگرم بدست آمده است.

زمان بازداری (Retention time): مطابق با استاندارد SANTE 11312/2021 شیفت زمان بازداری در مطالعات اعتبارسنجی برای دستگاه طیف‌سنجی‌جرمی متوالی۰/۱± دقیقه ذکر شده است. اختلاف یا خطای نسبی میانگین زمان بازداری در منحنی کالیبراسیون برپایه ماتریکس و نمونه کنترل‌کیفی در جدول ۶ نشان داده شده است.

جدول ۵. مطالعات صحت و دقت روش در دو سطح ۳۰و ۷۰ نانوگرم برگرم

ردیف	آفت کش	درصد بازیافت		درصد ضریب تغییرات	
		۷۰ نانوگرم بر گرم	۳۰ نانوگرم بر گرم	۷۰ نانوگرم بر گرم	۳۰ نانوگرم بر گرم
۱	آورمکتین ب ۱ آ	۱۱۳/۵	۹۴/۷	۲۲/۸	۱۸/۰
۲	آورمکتین ب ۱ ب	۱۰۷/۱	-	۱۵/۶	-
۳	دورا مکتین	۱۲۸/۲	۱۰۹/۵	۱۵/۹	۱۷/۹
۴	امامکتین بنزوات ب ۱ آ	۱۲۰/۱	۱۱۸/۹	۱۸/۰	۶/۴
۵	امامکتین بنزوات ب ۱ب	۱۰۵/۳	۱۰۲/۹	۲/۸	۱۱/۱
۶	اپرینومکتین	۹۲/۱	۸۹/۹	۱۹/۰	۱۳/۲
۷	ایورمکتین	۱۰۱/۱	۱۰۳/۰	۱۸/۱	۱۴/۳
۸	میلبمکتین آ۴	۱۱۳/۸	۱۰۹/۸	۱۲/۴	۱۶/۶
۹	میلبمکتین آ۳	۷۵/۶	۸۹/۲	۸/۴	۱۷/۴
۱۰	موکسیدکتین	۱۱۱/۳	۱۰۴/۷	۴/۰	۱۷/۵

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-10-31]

[DOI: 10.61186/nsft.19.3.79]

جدول ۶. شیفت زمان بازداری

ردیف	آفت کش	میانگین زمان بازداری در منحنی کالیبراسیون	میانگین زمان بازداری درنمونه‌های کنترل کیفی	اختلاف	وضعیت (شیفت زمان بازداری ±۰/۱)
۱	آورمکتین ب ۱ آ	۱۳/۸۷۵	۱۳/۸۵۰	۰/۰۲۵	تایید
۲	آورمکتین ب ۱ ب	۱۳/۸۷۵	۱۳/۶۳۳	۰/۰۴۲	تایید
۳	دورا مکتین	۱۴/۱۷۴	۱۴/۱۳۳	۰/۰۴۲	تایید
۴	امامکتین بنزوات ب ۱ آ	۱۳/۳۷۰	۱۳/۳۳۳	۰/۰۳۷	تایید
۵	امامکتین بنزوات ب ۱ب	۱۳/۳۷۰	۱۳/۳۳۳	۰/۰۳۷	تایید
۶	اپرینومکتین	۱۳/۶۷۵	۱۳/۶۸۳	-۰/۰۰۸	تایید
۷	ایورمکتین	۱۴/۴۶۵	۱۴/۴۳۳	۰/۰۳۲	تایید
۸	میلبی مکتین آ۴	۱۴/۰۷۰	۱۴/۰۳۳	۰/۰۳۷	تایید
۹	میلبی مکتین آ۳	۱۳/۷۷۵	۱۳/۶۷۶	۰/۰۰۸	تایید
۱۰	موکسیدکتین	۱۴/۱۶۵	۱۴/۱۳۳	۰/۰۳۲	تایید

نسبت یونی: خطای نسبی نسبت یونی مورد قبول در مطالعات اعتبارسنجی برای دستگاه طیف سنجی متوالی مطابق با مقررات SANTE 11312/2021 برابر با ۳۰± درصد اعلام شده است. اختلاف یا خطای نسبت یونی براساس میانگین ارتفاع یا مساحت پیک سطوح منحنی کالیبراسیون آنالیت با میانگین ارتفاع یا مساحت پیک در نمونه طبق معادله ۱ محاسبه گردیده و میزان خطای نسبی در جدول ۷ اعلام شده است.

معادله۱: محاسبه اختلاف یا خطای نسبی نسبت یونی

$$\text{درصد } 100 \times \frac{\text{نسبت یونی در استاندارد} - \text{نسبت یونی درنمونه}}{\text{نسبت یونی دراستاندارد}} = \text{اختلاف نسبی نسبت یونی}$$

• بحث

هدف از تحقیق انجام شده تدوین یک روش معتبر و قابل اجرا درآزمایشگاه‌های کنترل کیفی جهت آنالیز همزمان ۱۰ آفت‌کش از گروه لاکتون‌های ماکروسیکلیک شامل آورمکتین ب ۱ آ، آورمکتین ب ۱ ب، دورا مکتین، امامکتین بنزوات ب ۱ آ، امامکتین بنزوات ب ۱ب، اپرینومکتین، ایورمکتین، میلبمکتین آ۴، میلبمکتین آ۳ و موکسیدکتین در ماتریکس فلفل‌دلمه‌ای به عنوان نماینده گروه مواد با منشاء گیاهی و محتوای آب بالا با استفاده روش استخراج و خالص‌سازی کچرز (QuEChERS) بهینه‌شده با استفاده ازدستگاه کروماتوگرافی مایع و طیف‌سنجی‌جرمی متوالی با یونیزاسیون الکترواسپری در مد مثبت است.

جدول ۷. میزان خطا یا اختلاف نسبی یون ها

ردیف	آفت کش	نسبت یونی	استاندارد در حلال (بر اساس ارتفاع پیک(cps))	نقاط منحنی کالیبراسیون بر پایه ماتریکس (بر اساس ارتفاع پیک(cps))	خطای نسبی یونی نقاط منحنی کالیبراسیون نسبت به استاندارد در حلال	خطای نسبی یونی در نمونه کنترل کیفی نسبت به استاندارد در حلال
۱	آورمکتین ب ۱ آ	Q2/ Q1	۰/۶۲	۰/۵۵	-۱۰/۴۶	-۱۸/۰
۲	آورمکتین ب ۱ ب	Q2/ Q1	۰/۹۲	۱/۰۲	۱۰/۸۳	۲۳/۸
۳	دورا مکتین	Q2/ Q1	۰/۱۱	۰/۱۳	۱۵/۸۶	۸/۹
۴	امامکتین بنزوات ب ۱ آ	Q2/ Q1	۰/۸۲	۰/۷۲	-۱۲/۶۳	-۵/۱
۵	امامکتین بنزوات ب ۱ب	Q2/ Q1	۰/۶۶	۰/۵۸	۱۱/۵۲	-۱/۱
۶	اپرینومکتین	Q2/ Q1	۱/۳۳	۱/۰۲	-۱۲/۶۵	-۱۸/۴
۷	ایورمکتین	Q2/ Q1	۰/۱۱	۰/۱۵	۳۱/۵۰	۱۱/۸
۸	میلبی مکتین آ۴	Q2/ Q1	۱/۲۴	۱/۱۴	-۷/۹۰	-۵/۹
۹	میلبی مکتین آ۳	Q2/ Q1	۰/۲۹	۰/۲۸	-۱/۵۸	-۵/۱
۱۰	موکسیدکتین	Q2/ Q1	۱/۱۵	۱/۲۳	-۱۲/۶۳	۱۳/۴۸

یون دختر:**Quantitative Q1** , یون والد: **Qualitative ion=Q2**

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-10-31]

[DOI: 10.61186/nsft.19.3.79]

تکنیک‌های مختلفی جهت استخراج و خالص‌سازی لاکتون-های ماکروسیکلیک از ماتریکس‌های غذایی بکار گرفته و معرفی شده‌اند. متداول‌ترین روش‌های مورد استفاده برای پاک‌سازی نمونه شامل استخراج فاز جامد (SPE) با Florisil کارتریج های Aminopropyl-Bond Elut-C8 و SepPack-C18 است. سایر تکنیک‌ها از جمله SPE آنلاین وکروماتوگرافی مایع با تعویض‌ستون، استفاده از SPE ایمونوافینیتی با استفاده از آنتی بادی‌های مونوکلونال و SPE آلومینا- N است (۱۷).

مطالعات متعددی در زمینه آزمون آفت‌کش‌های نامبرده با کروماتوگرافی مایع و دتکتورهای مختلف از جمله دتکتورهای فلورسانس و طیف‌سنجی‌جرمی انجام شده است. در مطالعه‌ای توسط Yoshiiو همکاران روشی با استفاده از کروماتوگرافی مایع و دتکتور فلورسانس برای آزمون ۹ آفت‌کش از گروه لاکتون‌های ماکروسیکلیک در نمونه‌های چای و سبزیجات تدوین و اعتبارسنجی شده است. در این مطالعه که از ترکیب انیدرید تری فلورواستیک و ۱-متیل ایمیدازول برای مشتق‌سازی استفاده شده است نتایج از همبستگی خوبی با آزمون توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع و طیف‌سنجی جرمی برخوردار بوده است (۲).

به دلیل هزینه کم و حساسیت قابل قبول، دتکتور فلورسانس روش انتخابی خوبی برای تعیین باقیمانده لاکتون-های ماکروسیکلیک خواهد بود. چالشی که تعدادی از محققین در این تکنیک مواجه شده اند ناپایداری مشتقات فلورسنت در حین آزمون بوده است به ویژه، حساسیت استر مشتقات اورمکتین به هیدرولیز و پایداری ضعیف مشتق فلورسنت اپرینومکتین گزارش شده است. این مشکل ممکن است با استفاده از مشتق‌سازی آنلاین یا با استفاده از روش‌های مشتق‌سازی جایگزین که پایداری بیشتری دارند برطرف شود (۱۴).

اخیراً روش‌های LC-MS مختلفی تدوین و معرفی شده‌اند که اطلاعات کمی و تاییدی در مورد باقیمانده لاکتون‌های ماکروسیکلیک ارائه می‌دهند (۲۱-۱۸). در روش‌های ارائه شده از منابع مختلف یونیزاسیون طیف سنج جرمی برای آزمون این باقیمانده‌ها استفاده‌شده است، از جمله پرتو ذرات (۲۲)، ترمواسپری (۲۳)، الکترواسپری (۲۴)، یونیزاسیون شیمیایی فشار اتمسفر (APCI) (۲۵) و فتویونیزاسیون تحت فشار اتمسفر (APPI) (۲۵، ۲۴). مطالعات نشان داده است که روش‌های یونیزاسیون ترمواسپری و الکترواسپری در حالت یون مثبت بهترین عملکرد را دارند. با این حال، APCI می تواند در حالت-های یونی منفی (۲۶) یا مثبت با اصلاح فاز متحرک خوب عمل کند (۲۵، ۲۴).

آنالایزرهای مختلف جرمی شامل چهار قطبی (Quadrupole)، چهارقطبی سه گانه (Triple quadrupole)، زمان پرواز (Time of flight) و تله یونی (Ion trap) برای تعیین باقیمانده لاکتون‌های ماکروسیکلیک استفاده شده‌اند.

Turnipseed و همکاران یک روش آنالیز همزمان برای تأیید باقیمانده‌های لاکتون‌های ماکروسیکلیک در بافت حیوانی و شیر با استفاده ازکروماتوگرافی مایع و طیف‌سنج‌جرمی و یونیزاسیون APCI و در مد منفی ارائه کردند. با روش معرفی شده باقیمانده لاکتون‌های ماکروسیکلیک را می‌توان در محدوده ۲۰ و۴۰ میکروگرم بر کیلوگرم آزمون‌کرد. نتایج نشان داده است که پاسخ موکسیدکتین به اندازه اپرینومکتین دورامکتین و ایورمکتین شدید نبوده و آنها به این نتیجه رسیدند که جهت حساسیت بیشتر لازم است از جرم سنجی جرمی متوالی (LC-MS/MS) استفاده شود (۲۱).

در مطالعه‌ای توسط Durden در سال ۲۰۰۶ آزمون همزمان آبامکتین، دورامکتین، ایورمکتین، ایمامکتین، اپرینومکتین و موکسیدکتین در شیرخام با استفاده از LC-MS/MS در حضور بافر تری اتیلامین-استونیتریل در دو مد یونیزاسیون مثبت و منفی بررسی و مقایسه شده است. در این مطالعه Selamectin به عنوان استاندارد داخلی استفاده شده است. نتایج نشان داده است که حداکثر حساسیت با یونیزاسیون مثبت به دست آمده است در حالی که در مد منفی پاسخ‌ها خطی‌تر بوده است. با آزمون نمونه‌های اسپایک در محدوده ۵۰- ۲ نانوگرم برگرم نتایج نشانگر همبستگی مناسب بین هر دو مد آزمون است (۱).

تعیین باقیمانده لاکتون‌های ماکروسیکلیک با استفاده از LC-MS/MS و یونیزاسیون الکترواسپری در مد مثبت با پایش یون‌های $[M+H]^+$ یا $[M+Na]^+$ نیز از متدهای معرفی شده و مورد تأیید است. در این روش اثر ماتریکس نمونه ممکن است مشکلاتی ایجاد کند که ضروریست برای رفع و غلبه بر آن اقداماتی صورت‌گیرد (۱۸). وجود ترکیبات ناخواسته همراه آنالیت در آزمون‌های کروماتوگرافی همراه با طیف‌سنجی‌جرمی می تواند باعث افزایش یا سرکوب یون سازی شود که به اثرماتریکس شناخته می شود. نوع آنالیت، نوع ماتریکس، حالت یونیزاسیون و نوع منبع یونی بر میزان این اثرات تاثیر دارد. علاوه برپاکسازی نمونه و اضافه‌کردن ترکیبات محافظ به فاز متحرک جهت غلبه براثرماتریکس رسم منحنی‌های کالیبراسیون با روش‌های مبتنی بر حضور ماتریکس از جمله روش کالیبراسیون بر پایه ماتریکس، استفاده از نمونه‌های اسپایک شده، استفاده از روش افزایش استاندارد و استفاده از استاندارد داخلی ایزوتوپ نشاندار آنالیت‌ها توصیه شده است (۲۷، ۱۵). در روش ارائه شده جهت کاهش اثر ماتریکس منحنی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-10-31]

[DOI: 10.61186/nsft.19.3.79]

کالیبراسیون بر پایه ماتریکس با استفاده از افزودن استاندارد به عصاره استخراج شده از نمونه شاهد و در حضور استاندارد داخلی رسم شده است. استفاده از استاندارد داخلی می تواند قسمتی از خطاهای آزمون از جمله خطای دستگاهی و تزریق را کاهش دهد علاوه بر این که نسبت به روش‌های دیگر سریع و آسانتر است (۱۶).

در این مطالعه با توجه به تفاوت در حساسیت دستگاه‌های موجود در کشور با دستگاه معرفی شده در روش اتحادیه اروپا برای دست‌یابی به حد تعیین مقدار مناسب با صحت و دقت لازم تغییراتی در روش اصلی اتحادیه اروپا (۱۵) اعمال شده است. در روش رسمی اتحادیه اروپا که آنالیت‌های مورد آزمون آبامکتین و متابولیت‌های آن هستند با توجه به حساسیت آبامکتین به دمای بالا، درجه دمای منبع یونیزاسیون در ۳۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده است در حالی که در مطالعه حاضر به علت مولتی آنالیز بودن روش، جهت بدست آوردن پیک‌های مناسب سایر ترکیبات، دمای بهینه شده برای کلیه ترکیبات مورد آزمون ۴۰۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردیده است. از دیگر تغییرات که به منظور افزایش حساسیت روش انجام شده است حذف اسید فرمیک در فاز متحرک است که نتایج نشانگر بهبود آنالیز همزمان آنالیت‌ها در روش ارائه شده است. در روش پایه جهت سانتریفیوز نمونه‌ها در مراحل استخراج و خالص-سازی، از سانتریفیوژ معمولی در دمای محیط استفاده شده است اما در مطالعه حاضر از سانتریفیوژ یخچال دار و در دمای منفی استفاده شده است که به علت رسوب بهتر محتوای ماتریکس، استخراج و خالص‌سازی بهتری انجام شده است. یکی دیگر از تفاوت های متد ارائه شده استفاده از ستون کروماتوگرافی موجود با مشخصات Kinetex XB-C18 (100 mm × 2.1 mm i.d., 2.6 µm) است که طول و قطر و نوع ذرات پک شده متمایز از ستون معرفی شده در روش رسمی اتحادیه اروپا (Zorbax XDB Eclipse 150 x 2.1 mm; 3.5) است. لازم به ذکر است که روش رسمی اتحادیه اورپا تنها در خصوص آنالیزآبامکتین و متاوبولیت‌هایش ارائه شده است در حالی که در مطالعه حاضر سایر ترکیبات شیمیایی از این گروه که دارای اهمیت بالایی در محصولات کشاورزی و دامی هستد آنالیز و روش آزمون جهت آنالیز همزمان آنها بهینه سازی و اعتبارسنجی شده است.

نتایج نشان داده است که منحنی‌های کالیبراسیون هر ۱۰ آفت‌کش آورمکتین ب ۱ آ، آورمکتین ب ۱ ب، دورا مکتین، امامکتین بنزوات ب ۱ آ، امامکتین بنزوات ب ۱ب، اپرینومکتین، ایورمکتین، میلبمکتین آ۴، میلبمکتین آ۳و موکسیدکتین در محدوده ۱۰ -۱۵۰ نانوگرم‌برمیلی لیترخطی است. از دیگر پارامترهای اصلی صحه‌گذاری روش‌های آزمون بررسی صحت و دقت آزمون است که با استفاده از مطالعه درصد بازیافت تعیین می‌شود. در این مطالعه میانگین درصد بازیافت ۱۲۸/۲-۷۵/۶ درصد و محدوده ضریب تغییرات برای مطالعات تکرارپذیری ۲/۸-۲۲/۸ درصد بیانگر آن است که صحت و دقت روش آزمون متعلق به همه آنالیت‌های مورد بررسی با الزامات مقررات اتحادیه اروپا مطابقت داشته و مورد تایید است. مطابق با مقررات اتحادیه اروپا میانگین درصد بازیافت از اعتبارسنجی اولیه باید در محدوده ۱۲۰-۷۰ درصد، با تکرارپذیری کمتر از ۲۰ درصد باشد. در موارد استثنایی، میانگین مقادیر درصد بازیابی خارج از محدوده ۱۲۰-۷۰ درصد را می‌توان در صورتی پذیرفت که آزمون تکرار پذیر باشد(با انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۲۰ درصد) اما میانگین بازیابی نباید کمتر از ۳۰درصد یا بالاتر از ۱۴۰ درصد باشد (۱۶).

حد شناسایی و حد تعیین مقدار از مشخصات بسیار مهم روش‌های آزمون است که می‌بایست با توجه به حدود مجاز باقیمانده‌ها از مقادیر مناسب برخوردار باشد. معمولاً پایین‌تر بودن کمترین حد تعیین مقدار نشانگر حساسیت بیش‌تر روش آزمون است (۲۸). ضروری است روش آزمون در کمترین حد تعیین مقدار از صحت و دقت لازم برخوردار باشد. روش‌های مختلفی برای تعیین کمترین حد شناسایی و کمترین حد تعیین مقدار اعلام شده است و در این مطالعه پایین‌ترین سطح نمونه اسپایک شده که درصد بازیافت آنالیت‌ها در آن از صحت و دقت لازم برخوردار بوده است، به عنوان حد تعیین مقدار در نظر گرفته شده است. حد تعیین مقدار برای آفت‌کش‌های مورد مطالعه بجز مکسیدکتین (۲۰ نانوگرم برگرم)و ایزومر آورمکتین ب۱ (۵۰ نانو برگرم)که فراوانی بسیار کمی دارد، ۱۰ نانوگرم بر گرم بوده است. شیفت زمان بازداری، انحراف معیار و ضریب تغییرات زمان بازداری کلیه آنالیت‌ها آبامکتین، ایورمکتین، دورامکتین، موکسیدکتین، امامکتین بنزوات، میلبی مکتین و اپرینومکتین در نمونه‌های کنترل کیفیت نسبت به میانگین زمان بازداری در منحنی کالیبراسیون با راهنمای SANTE/11312/2021 مطابقت داشته است. قابل توجه است- که همه آفت‌کش‌های مورد مطالعه به همراه ایزومرهای آنها در بازه زمانی کمتر از دو دقیقه در کروماتوگرام نمایان شده‌اند و توانایی دستگاه طیف سنجی‌جرمی متوالی در شناسایی یون‌های مادر و دختر در افتراق این ترکیبات از یکدیگر بسیار مهم است. در مجموع اطلاعات اعتبارسنجی روش آزمون ارائه شده، نشان می‌دهد که پارامترهای مورد مطالعه با مقررات اتحادیه اروپا مطابقت دارد و روش از اعتبار لازم جهت استفاده در آزمون‌های کنترلی توسط مراجع ذی‌صلاح برخوردار است. بررسی مطالعات و اقدامات کنترلی انجام شده در زمینه آزمون باقیمانده

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-10-31]

[DOI: 10.61186/nsft.19.3.79]

لاکتون‌های ماکروسیکلیک در ایران نشان می‌دهد تحقیقات کاربردی قابل توجهی در این خصوص انجام نشده و اطلاعات زیادی در زمینه وضعیت باقیمانده آفت‌کش‌های نامبرده در محصولات کشاورزی و لبنی مختلف وجود ندارد. از طرفی آنالیز این ترکیبات به دلایل حساسیت به دمای بالای منبع یونی (Ion source)، حساسیت به تغییرات pH و بافر آمونیوم فاز متحرک و تاثیر دمای خشک کردن نمونه‌ها (ایورمکتین) با روش‌های آزمون همزمان متداول با چالش روبروست (۲۹). از طرف دیگر با توجه به حساسیت دستگاه های موجود در کشور نیاز به ارائه روش معتبر مناسب با امکانات برای آزمون این آفت‌کش‌ها مشهود است، لذا نظربه اهمیت آگاهی از میزان تماس جهت مطالعات ارزیابی ریسک و لزوم وجود روش‌های اجرایی معتبر به منظور پایش باقیمانده آفت‌کش‌های مذکور در محصولات کشاورزی و دامی مختلف، مطالعه انجام شده پیش نیاز موارد ذکر شده است.

سپاسگزاری: مطالعه حاضر در جهت راه اندازی و صحت سنجی روش‌های نوین آزمون به منظور کنترل و پایش محصولات کشاورزی در اداره کل آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا، دارو و تجهیزات پزشکی، سازمان غذا و دارو انجام شده است. بدین وسیله از آن سازمان تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع: نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی در قبال مطالعه انجام شده ندارند.

• References

1. Durden D. Positive and negative electrospray LC–MS–MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. J. Chromatogr. B 2007; 850: 134–146.

2. Yoshii K, Kaihara A, Tsumura Y, Ishimitsu S, and Tonogal Y. Simultaneous Determination of Residues of Emamectin and Its Metabolites, and Milbemectin, Ivermectin, and Abamectin in Crops by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. J. AOAC Int 2001; 84(3): 910-7.

3. Prabhu SV, Wehner TA, Egan RS & Tway PC. Determination of 4"-Deoxy-4"-(Epimethylamino) Avermectin B1 benzoate (MK-0244) and its delta 8, 9-Isomer in celery and lettuce by HPLC with fluorescence detection. J. Agric Food Chem 1991; 39:2226–2230.

4. Vardanyan R, Hruby V. Anthelmintics, Synthesis of Best-Seller Drugs. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-411492-0.00036-5, 2016; 36: 749-764. Accessed November 12, 2023.

5. European Commision. Pesticides database. Retrieved from https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/mrls. Accessed November 15, 2023.

6. Codex alimmentarious. Codex online databases. Retrieved from https://www.fao.org/fao-who- Codexalimentarius /codex-texts/dbs/pestres/pesticides/en/. Accessed November 15, 2023.

7. Iranian Food and Drug Administration. National MRLs. Retrieved from https: //www.fda.gov.ir/getattachment/05138e7e-cc64-48a2-ab5e-628e9c1fcf12/MRLs. Accessed November 16, 2023.

8. Vuik J. Rapid determination of abamectin in lettuce and cucumber by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr 1991; 553: 299–304.

9. Chamkasem N, Papathakis ML & Lee SM. Liquid chromatographic determination of abamectin in fruits and vegetables. J.AOAC Int 1993; 76: 691–696.

10. Cobin JA & Johnson NE. Liquid chromatographic method for rapid determination of total avermectin B1 and 8,9-Z-avermectin B1 residues in apples. J. AOAC Int 1995; 78: 419–423.

11. Cobin JA & Johnson NE. Liquid chromatographic method for determination of total avermectin B1 and 8,9-Z-avermectin B1 residues in hops. J. AOAC Int 1996; 79: 503–507.

12. Montigny P, Shim JK & Pivnichny JV. Liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and N-methylimidazole as the derivatization reagent. J.Pharm. Biomed. Anal 1990; 8: 507–511.

13. Ishii R, Horie M, Hoshino Y& Nakazawa H. J. Analysis of Moxidectin by LC/MS and Determination of Residues in Adipose and Muscle Tissues in Commercial Beef. Food Hyg. Soc. Jpn 1998; 39: 42–45.

14. Danaher M, Howells LC, Crooks S RH, Cerkvenik-Flajs V, Keeffe MO . Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. J. Chromatogr. B 2006; 84: 4175–203.

15. Europian Standards, Analysis of Abamectin via QuEChERS and LC-MS/MS, Single Residue Methods Version: Abamectin-V1. (4) CSN EN 15662.,Foods of plant origin - Multimethod for the determination of pesticide residues using GC- and LC-based analysis following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - Modular QuEChERS-method,560680 2018.

16. Europian commission. Analytical quality control and method validation procedures pesticide residues analysis in food and feed SANTE 11312/2021.Supersedes Document No. SANTE/2019/12682. Implemented by 01/01/2022.

17. Rudik I, Cummings MR, Poppenga RH. Isolation and multiresidue detection of macrolide endectocides present in animal matrices. J Vet Diagn Invest 2002; 14(4): 295-302.

18. Valenzuela A I, Redondo M J, Pico Y, Font G. Determination of abamectin in citrus fruits by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. J Chromatogr A 2000; 871(1-2):57-65.

19. Howells L, Sauer MJ. Multi-residue analysis of avermectins and moxidectin by ion-trap LC-MS^{n}Analyst 2001; 126: 155.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-10-31]

[DOI: 10.61186/nsft.19.3.79]

20. Yoshii K, Kaihara A, Tsumura Y, Ishimitsu S, Tonogai Y. Liquid chromatographic determination of emamectin, milbemectin, ivermectin and abamectin in crops and confirmation by liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A2000; 896(1-2):75-85

21. Turnipseed SB, Roybal JE, Andersen WC, Kuck LR. Analysis of avermectin and moxidectin residues in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization/atmospheric pressure photoionization source. Anal. Chim. Acta 2005; 529: 159.

22. Heller DN, Schenck FJ. Particle beam liquid chromatography/mass spectrometry with negative ion chemical ionization for the confirmation of ivermectin residue in bovine milk and liver. Biol. Mass Spectrom 1993; 22 :184.

23. Khunachak A, da Cunha AR, Stout SJ. Liquid chromatographic determination of moxidectin residues in cattle tissues and confirmation in cattle fat by liquid chromatography/mass spectrometry J. AOAC Int 1993; 76 :1230.

24. Stout SJ, Wickremesine E, Cunha AR, Khunachak A. Comfirmation of moxidectin residues in cattle fat by liquid chromatography/ mass spectrometery.J. AOAC Int 2000; 83: 1446.

25. Ali MS, Sun T, McLeroy GE, Phillippo ET. Confirmation of eprinomectin, moxidectin, abamectin, doramectin, and ivermectin in beef liver by liquid chromatography/positive ion atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. J. AOAC Int 2000; 83:39-52.

26. Wu Z, Li J, Zhu L, Luo H, Xu X. Multi-residue analysis of avermectins in swine liver by immunoaffinity extraction and liquid chromatography-mass spectrometry J. Chromatogr. B 2001;755 :361.

27. Elmi M, Eskandari S, Amirahmadi M. Simultaneous Analysis of Metabolite Residues from Degradation of Dithiocarbamates in Cereals Using Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry. Iran. J. Nutr. Sci. Food Technol 2023;18: 1.

28. Massart DL, Dijkstra A, Kaufman L, Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Elsevier Scientific Publishing Company 1978; 1: 143-156.

29. Community Reference Laboratories for Residues of Pesticides. Analysis of Abamectin via QuEChERS and LC-MS/MS.,Single Residue Methods Version: Abamectin-V1. Retrieved from https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_Abamectin_CrlSrm.PDF. Accessed November 20, 2023.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-10-31]

[DOI: 10.61186/nsft.19.3.79]

Simultaneous Analysis of Macrocyclic Lactones in Bell Pepper Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

*Elmi M[1], Pakzad S.R [2,4], Amirahmadi M *[3,4]*

1- Master of Science, Food and Drug Control Reference Labs, Food and Drug Organization, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

2- Academic staff, Food and Drug Control Reference Labs, Food and Drug Organization, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

*3- *Corresponding author: Associate Professor, Food and Drug Control Reference Labs, Food and Drug Organization, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran. Email: Maryamamir2001@yahoo.com*

4-Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Administration, MOH&MOE, Tehran, Iran.

Received 2 Apr, 2024 **Accepted 24 Jun, 2024**

Background and Objectives: Macrocyclic lactones include two groups of common pesticides with a wide anti-parasitic spectrum, which are used to control immature nematodes and arthropods. Due to the potential adverse effects of the residues of these compounds in agricultural products, the aim of this study was to provide a reliable method for the simultaneous analysis of the pesticides in bell peppers as representative of high water content commodity groups using liquid chromatography tandem mass spectrometry.

Materials & Methods: Sample preparation was based on EN 15662 method with minor modifications using acetonitrile extraction in a buffer solution and PSA and GCB adsorbents. To overcome the matrix effect, calibration curves were plotted based on the matrix match approach in presence of the internal standard. Validation of the method included linearity, accuracy and precision studies, as well as calculation of the limits of detection and quantitation.

Results: Results showed that the method was linear in the range of 10–150 ng ml^{-1} with a correlation coefficient greater than 0.995. In addition, extraction recovery was 75.6–128% and precision of method based on RSD% was 2.8–22.8%. Detection limit of the method (except for Avermectin B1b and Moxidectin) was 3 ng g^{-1} and the limit of quantification (except for the two pesticides) was 10 ng g^{-1}.

Conclusion: Results showed that the present method included the necessary validity for analyzing the addressed pesticides of macrocyclic lactones.

Keywords: Macrocyclic lactones, Pesticide residues, QuEChERS, Liquid chromatography tandem mass spectrometry

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2024-10-31]

[DOI: 10.61186/nsft.19.3.79]