

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

مهدی علمی^۱، سعید رضا پاکزاد^۲، مریم امیر احمدی^۳

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 آزمایشگاه‌های 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 پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱/۲۸

چکیده

سابقه و هدف: لاکتون‌های ماکروسیکلک 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 طیف‌سنجی جرمی متوالی است.

مواد و روش‌ها: آماده‌سازی بر اساس روش ۱۵۶۶۲ اتحادیه اروپا با برخی تغییرات، بر پایه استخراج استونیتریلی در محیط بافری و پاکسازی با استفاده از جاذب‌های PSA و GCB 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 بر میلی لیتر با ضریب همبستگی > 0.995 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 و موکسیدکتین) سه نانوگرم برگرم و حد اندازه‌گیری (بجز دو آفت‌کش مذکور) ۱۰ نانوگرم برگرم بدست آمده است.

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

واژگان کلیدی: لاکتون‌های ماکروسیکلک، باقیمانده آفت‌کش‌ها، کپرز، کروماتوگرافی مایع همراه با طیف سنجی جرمی متوالی

پیام‌های اصلی:

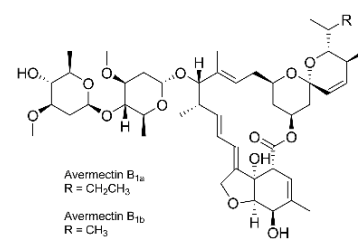
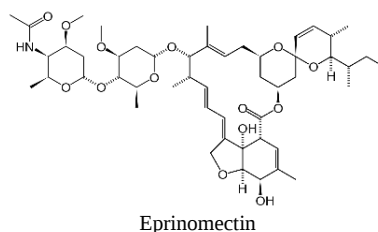
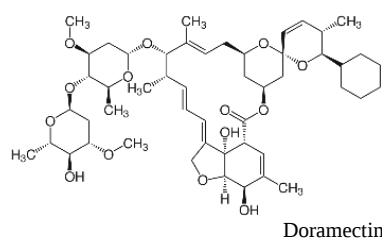
- تعداد ۱۰ آفت‌کش از گروه لاکتون‌های ماکروسیکلک با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع-طیف سنجی جرمی متوالی آنالیز شدند.
- با توجه به تجهیزات موجود، روش آزمون جهت دستیابی به حساسیت لازم بهینه‌سازی شده است.
- روش ارائه‌شده از اعتبار، صحت و دقت قابل قبول جهت فعالیت‌های کنترلی برخوردار است.

● مقدمه

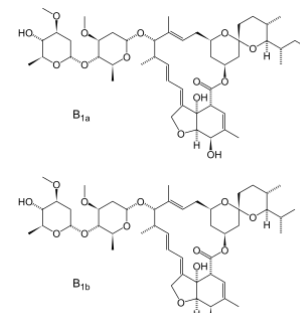
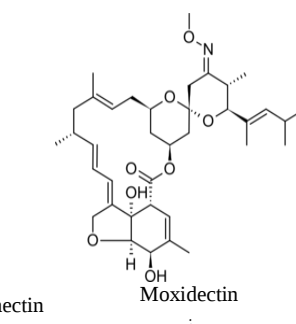
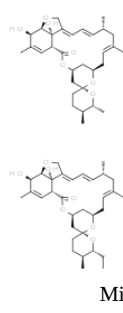
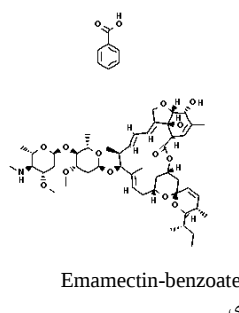
حداکثر حدقابل قبول باقیمانده MRL (Maximum Residue Level) برای امامکتین بنزوات، آبامکتین و ملیبی-مکتین توسط اتحادیه اروپا در محصولات کشاورزی تعیین شده است. موکسی دکتین، اپرینومکتین، ایورمکتین و دکسامکتین در فرآورده‌های دامی دارای حد مجاز هستند (۵). کدکس (Codex) مواد غذایی نیز برای امامکتین بنزوات و آبامکتین بیشینه حد باقیمانده را در محصولات کشاورزی مختلف تعیین کرده است (۶). در ایران مطابق ضابطه سازمان غذا و دارو برای آفت کش 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 مشتق سازی و آشکارساز فلورسانس برای آزمون باقیمانده لاکتون‌های ماکروسیکلیک نیز تکوین و ارائه شده است (۱۲).

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 کربن ۱۳ هستند و گروه میلیمایسین‌ها (همچنین به نام نمودکتین‌ها شناخته می‌شوند) که موکسیدکتین نماینده آنهاست و استخلاف ساکارید ندارند (۱). آبامکتین و ملیبی مکتین از میکروارگانسیم‌های خاک جدا شده‌اند (۲). امامکتین و ایورمکتین ترکیبات مشابهی هستند که از آبامکتین به دست می‌آیند (۳). این چهار ماده شیمیایی به عنوان کنه کش یا ضد انگل برای حیوانات یا گیاهان استفاده می‌شوند. ملیبی مکتین یک مخلوط ملیبی مکتین ۳ (A₃) و ملیبی مکتین ۴ (A₄) است. امامکتین مخلوطی با تقریب ۹۰ درصد امامکتین ب ۱ آ (B_{1a}) و ۱۰ درصد امامکتین ب ۱ ب (B_{1b}) است (۲). شکل یک ساختار شیمیایی ۱۰ آفت کش (با احتساب ایزومرها) از گروه لاکتون‌های ماکروسیکلیک را نشان می‌دهد (۴).



الف و ب



Ivermectin

و و و

شکل ۱. الف و ب- اورمکتین B_{1b}، اورمکتین B_{1a} - ج- اپرینومکتین، د- دورامکتین، ه و و - ایورمکتین ز - موکسیدکتین - ح و ط ملیبی مکتین A₃، ملیبی مکتین A₄ ی: امامکتین بنزوات

با خلوص بالای ۹۹ درصد، اسید فرمیک با خلوص بالای ۹۸ درصد، اسید سولفوریک با خلوص ۹۹ درصد و هیپوکلرید سدیم 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 طیف سنجی جرمی 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 تامین کننده 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. فاز متحرک متشکل از حلال A شامل آمونیوم فرمات ۱۰ میلی مولار در آب دیونیزه و حلال B شامل آمونیوم فرمات ۱۰ میلی مولار در متانول است. سرعت جریان فاز متحرک ۰/۴ میلی لیتر در دقیقه، حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و دمای ستون ۴۰ درجه سلسیوس در نظر گرفته شده است. برنامه تغییرات فاز متحرک مطابق جدول ۱ تعیین 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 محلول های استاندارد

استاندارد ذخیره: استاندارد سموم در غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر در حلال های استونیتریل و متانول (میلی مکتین) تهیه گردید. تمامی استانداردها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس

در این تکنیک عمدتاً مشتق سازی ها با انیدرید تری فلورواستیک و ۱-متیل ایمیدازول انجام می شود و از حساسیت بالایی برخوردار هستند. مطالعاتی در زمینه تعیین همزمان لاکتون های ماکروسیکلیک نیز انجام و گزارش شده است (۱۳). در اکثر تکنیک های کروماتوگرافی ارائه شده فاز متحرک بصورت ایزوکراتیک استفاده شده است که به طور کامل انواع مختلف آفت کش ها را از هم جدا نمی کند (۱۴). مطالعات مختلفی جهت ارائه روش آزمون این ترکیبات با دستگاه کروماتوگرافی مایع به همراه طیف سنجی جرمی متوالی نیز انجام شده است (۱).

با توجه به محدودیت های آزمون لاکتون های ماکروسیکلیک با روش های آنالیز همزمان متداول در آزمایشگاه های کنترل، در ایران چندان به آنالیز باقیمانده این آفت کش های پرمصرف پرداخته نشده است. هدف از این مطالعه ارائه روش صحیح و دقیق آنالیز همزمان ۱۰ آفت کش (با در نظر گرفتن ایزومرها) از گروه لاکتون های ماکروسیکلیک؛ اورمکتین ب ۱ آ، اورمکتین ب ۱ ب، دورامکتین، امامکتین بنزوات ب ۱ آ، امامکتین بنزوات ب ۱ ب، اپرینومکتین، ایورمکتین، میلی مکتین آ ۴، میلی مکتین آ ۳ و موکسیدکتین با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی-مایع و طیف سنجی جرمی متوالی (LC/MS-MS) است. این روش با توجه به تفاوت حساسیت دستگاه های موجود در آزمایشگاه های کنترل کشور با دستگاه های 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، بهینه سازی در قسمت آماده سازی 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 فعالیت های کنترلی ارائه گردد. لازم بذکر است که در روش مرجع تنها آبامکتین و متابولیت های آن آزمون شده اند، لذا با توجه به این که در این مطالعه همزمان ۱۰ آفت کش از گروه لاکتون های ماکروسیکلیک آنالیز شده است تغییراتی جهت امکان آزمون همزمان این ترکیبات اعمال شده است.

• مواد و روش ها

مواد شیمیایی و حلال ها: استانداردهای آبامکتین، ایورمکتین، دورامکتین، موکسیدکتین، اپرینو مکتین، امامکتین بنزوات و میلی مکتین از شرکت LGC (LGC, Augsburg, Germany) خریداری شده اند. تری فنیل فسفات به عنوان استاندارد داخلی، سولفات منیزیوم بی آب، سدیم هیدروژن سترات سیس کویی هیدرات، تری سدیم سترات دی هیدرات و حلال های مورد استفاده شامل متانول با خلوص بالای ۹۹/۸ درصد و استونیتریل

محلول آب و متانول، آمونیوم فرمات پنج میلی مولار به‌همراه ۰/۱ درصد اسید فرمیک ساخته شده و مورد استفاده قرار گرفته است.

تعیین پارامترهای مناسب طیف‌سنجی جرمی متوالی

استانداردهای سموم مورد نظر که با غلظت یک میکروگرم بر میلی‌لیتر در محلول متانول (۵۰ درصد): آب (۵۰ درصد) + آمونیوم فرمات پنج میلی‌مولار و فرمیک اسید ۰/۱ درصد تهیه شده‌اند، به منظور شناسایی یون‌های والد و بهینه‌سازی پارامترهای مرتبط با تولید یون‌های والد و دختر، بصورت مستقیم به دستگاه طیف‌سنج جرمی 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 طیف‌سنجی جرمی 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 طیف‌سنجی جرمی متوالی برای هر یون، نوشته شده است. در این برنامه پارامترهای وابسته به منبع یونی شامل کترین گاز (Curtain Gas) برابر ۱۵psi، گاز تصادم (Collision) ۶psi، ولتاژ اسپری یون (Ion spray Voltage) برابر ۵۵۰۰، دما ۴۰۰ درجه سلسیوس (Temperature)، گاز منبع یونی یک (Ion source Gas1) برابر ۴۰ psi و گاز منبع یونی دو (Ion source Gas2) برابر ۴۵ psi تنظیم شده است.

آنالیز همزمان استاندارد آفت‌کش‌ها با دستگاه LC-MS/MS با برقراری متد مناسب کروماتوگرافی مایع و طیف‌سنجی جرمی متوالی ابتدا آفت‌کش‌ها بصورت مجزا و سپس بصورت مخلوط در حجم ۲۰ میکرولیتر به دستگاه LC-MS/MS تزریق شده‌اند.

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 میلی‌لیتر در حلال استونیتریل از استاندارد مخلوط حدواسط بصورت روزانه ساخته شده است، از این مخلوط جهت تهیه محلول استاندارد کاری کالیبراسیون استفاده می‌شود. محلول‌های استوک، واسط و کاری استاندارد داخلی نیز بصورت منفرد به ترتیب در غلظت‌های یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر در حلال اتیل‌استات تهیه و در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید. در این مطالعه جهت غلبه بر اثر ماتریکس، محلول‌های استاندارد کالیبراسیون برپایه ماتریکس تهیه شده است. روش تهیه محلول استاندارد برپایه ماتریکس مشابه با استاندارد برپایه حلال است با این تفاوت که بجای حلال خالص، عصاره-ی نمونه‌ی بلانک استخراج شده (که در مراحل استخراج استاندارد داخلی به آن اضافه نشده است) به عنوان عامل رقیق کننده استفاده شده است. این محلول استاندارد کاری از استاندارد مخلوط کاری (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 بهینه‌سازی پارامترهای طیف‌سنج جرمی مثل یون والد، یون‌های تولیدی و سایر پارامترهای وابسته به آنالیت، استاندارد کاری منفرد در غلظت یک میکروگرم بر میلی‌لیتر، در

جدول ۲. تهیه محلول استانداردهای منحنی کالیبراسیون بر پایه بافت

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

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 DW ^f (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	میلیمکتین آ	۵۱	۵	۳۵	۲
۲	۵۲۵/۰۳	۵۵/۱	۳۰	میلیمکتین آ	۵۱	۵	۸۷	۲
۳	۸۹۰/۰۳	۳۰۵/۲	۶۰	آورمکتین ب ۱	۲۱	۷	۳۹	۱۴
۴	۸۹۰/۰۳	۱۴۵/۲	۶۰	آورمکتین ب ۱	۲۱	۷	۴۹	۲
۵	۸۷۶/۵۴	۱۴۵/۱	۶۰	آورمکتین ب ۱	۲۱	۵/۵	۴۷	۶
۶	۸۷۶/۵۴	۶۹/۱	۶۰	آورمکتین ب ۱	۲۱	۵/۵	۸۷	۲
۷	۶۴۰/۱۱۳	۵۲۸/۲	۶۰	موکسی دکتین	۲۱	۵/۵	۱۷	۸
۸	۶۴۰/۱۱۳	۴۹۸/۲	۶۰	موکسی دکتین	۲۱	۵/۵	۲۱	۸
۹	۸۸۶/۶۱	۱۵۸/۳	۱۰	امامکتین بنزوات ب ۱	۷۱	۸	۴۹	۴
۱۰	۸۸۶/۶۱	۸۲/۲	۱۰	امامکتین بنزوات ب ۱	۷۱	۸	۱۰۷	۲
۱۱	۸۸۶/۲۹	۱۵۸/۲	۱۰	امامکتین بنزوات ب ۱	۷۱	۱۰	۵۱	۴
۱۲	۸۸۶/۲۹	۸۲	۱۰	امامکتین بنزوات ب ۱	۷۱	۱۰	۱۱۷	۴
۱۳	۹۱۴/۳۱۲	۱۸۶/۱	۳۰	اپرینومکتین	۲۶	۶/۵	۴۵	۴
۱۴	۹۱۴/۳۱۲	۱۵۴/۱	۳۰	اپرینومکتین	۲۶	۶/۵	۵۱	۴
۱۵	۵۴۶/۳۱۹	۵۱۱/۳	۶۰	میلیمکتین آ	۲۱	۳	۱۹	۸
۱۶	۵۴۶/۳۱۹	۴۹۳/۲	۶۰	میلیمکتین آ	۲۱	۳	۲۱	۸
۱۷	۸۹۲/۴۹۷	۳۰۷/۳	۶۰	ایورمکتین	۳۶	۶/۵	۳۳	۶
۱۸	۸۹۲/۴۹۷	۵۶۹/۲	۶۰	ایورمکتین	۳۶	۶/۵	۲۵	۸
۱۹	۹۱۶/۴۸۳	۳۳۱/۳	۶۰	دورامکتین	۳۶	۷	۳۷	۶
۲۰	۹۱۶/۴۸۳	۵۹۳/۲	۶۰	دورامکتین	۳۶	۷	۲۵	۸
۲۱	۳۲۶/۹۸۳	۷۷/۱	۱۰	تری فنیل فسفات	۷۶	۹	۵۱	۲
۲۲	۳۲۶/۹۸۳	۱۵۲/۱	۱۰	تری فنیل فسفات	۷۶	۹	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 خالص سازی نمونه ها

آماده سازی و استخراج: همگن سازی نمونه فلفل دلمه ای به عنوان نماینده گروه دارای محتوای آب بالا از جمله صیفی جات و میوه ها (۱۶) در حالت کرایوژنیک و با استفاده از CO₂ مایع انجام شده و ۱۰ گرم نمونه در داخل یک لوله فالكون ۵۰ میلی-لیتری وزن گردید. پس از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر استاندارد داخلی به نمونه ها، ۱۰ میلی لیتر استونیتریل به روی نمونه ها اضافه و سپس به مدت یک دقیقه توسط ورتکس مخلوط گردید. در ادامه چهار گرم سولفات منیزیم بدون آب، یک گرم نمک طعام و نمک های بافر شامل یک گرم تری سدیم سیترات دهیدرات و نیم گرم سدیم هیدروژن سیترات سیس کویی-دهیدرات بر روی نمونه ها اضافه و سپس به مدت یک دقیقه با تکان دادن دستی مخلوط گردیدند. سانتریفیوژ نمونه ها بمدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۵۰۰rpm در دمای منهای پنج درجه سلسیوس انجام شد. هشت میلی لیتر از محلول رویی به یک لوله

فالكون ۱۵ میلی لیتری، حاوی ۰/۰۴ گرم GCB، ۰/۰۴ گرم PSA و ۱/۲ گرم سولفات منیزیم منتقل گردید. همگن سازی با ورتکس به مدت یک دقیقه و سانتریفیوژ نمونه ها 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 فالكون ۱۵ میلی لیتری منتقل و پاک سازی نهائی نمونه ها با استفاده از فیلتر سرسنگی ۰/۲ میکرون (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 منحنی کالیبراسیون از روش رسم منحنی بر پایه ماتریکس

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 موردنظر شامل؛ آبامکتین، امامکتین بنزوات، اپرینومکتین، مکسیدکتین و میلیمکتین 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.

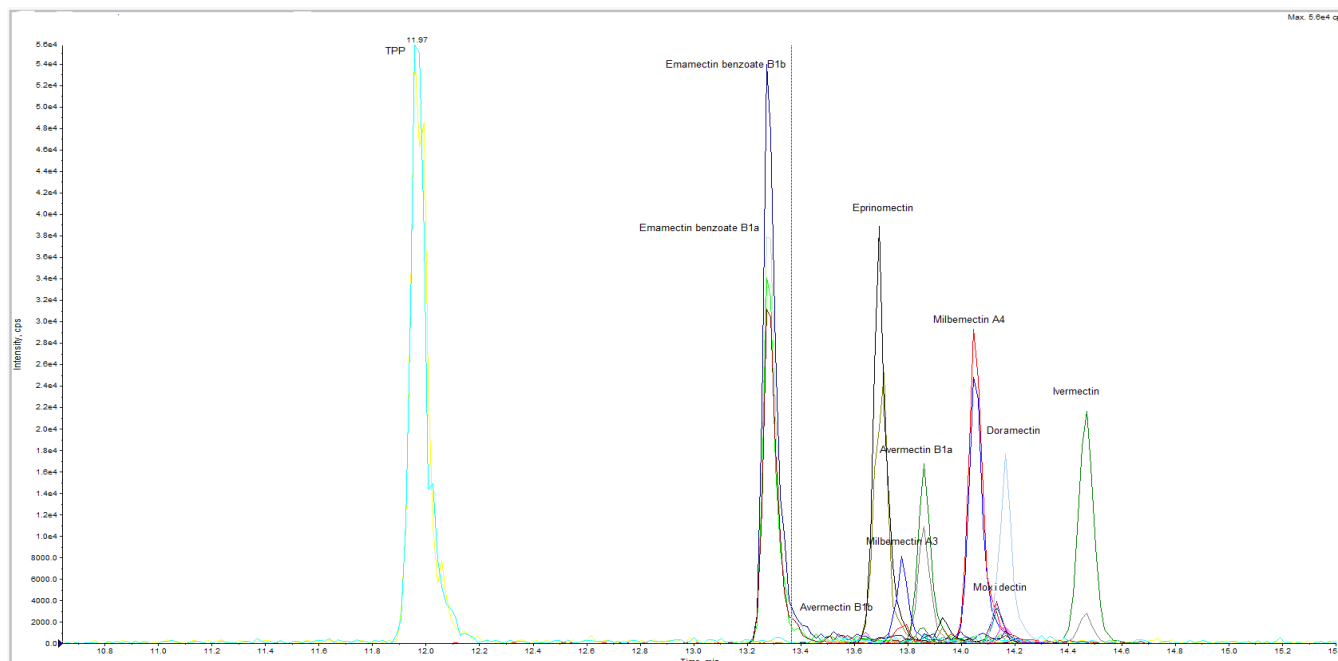
اعتبارسنجی

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

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، ۱۰۰، ۵۰، ۲۰، ۱۰ 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 و ۳۰ نانوگرم بر گرم بررسی شده است. همچنین شیفت زمان بازداری و نسبت یونی مورد بررسی قرار گرفته 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 آفت‌کش اورمکتین ب ۱ 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.



شکل ۲. نمونه ای از کروماتوگرام شناسایی همزمان استاندارد داخلی و آفت‌کش‌ها در غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر (از نقاط منحنی کالیبراسیون)؛ ۱-تری فنیل فسفات (استاندارد داخلی) ۲ و ۳-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

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 ۱ ب	۸/۵-۱۸/۵	۱۰۰/۱	۰/۹۹۹	۰/۰۱۰۷	۰/۰۲۲۱
۶	اپرینومکتین	۵/۰-۱۸/۱	۹۹/۶	۰/۹۹۹	۰/۰۰۶۰	-۰/۰۰۱۶
۷	ایورمکتین	۵/۹-۲۰/۴	۹۵/۹	۰/۹۹۹	۰/۰۰۳۸	-۰/۰۰۷۹
۸	میلیمکتین ۴	۵/۲-۱۴/۲	۹۹/۳	۰/۹۹۸	۰/۰۰۳۴	-۰/۰۰۰۹
۹	میلیمکتین ۳	۳/۷-۱۹/۲۱	۹۷/۰	۰/۹۹۹	۰/۰۰۰۱	-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 و صحت 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، مشخص گردیده 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 بر گرم و حد اندازه‌گیری (بجز دو آفت کش مذکور) ۱۰ نانوگرم بر گرم بدست آمده است. حدود تشخیص و اندازه‌گیری آفت‌کش آورمکتین ب ۱ ب به ترتیب ۱۳ و ۵۰ نانوگرم بر گرم و برای آفت‌کش موکسیدکتین ۶ و ۲۰ نانوگرم بر گرم بدست آمده است.

زمان بازداری (Retention time): مطابق با استاندارد SANTE 11312/2021 شیفت زمان بازداری در مطالعات اعتبارسنجی برای دستگاه طیف‌سنجی جرمی متوالی ± 0.1 دقیقه ذکر شده است. اختلاف یا خطای نسبی میانگین زمان بازداری در منحنی کالیبراسیون برپایه ماتریکس و نمونه کنترل کیفی در جدول ۶ نشان داده شده است.

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

ردیف	آفت کش	درصد بازیافت	درصد ضریب تغییرات	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 ۱ ب	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	میلیمکتین ۴	۱۱۳/۸	۱۰۹/۸	۱۲/۴	۱۶/۶
۹	میلیمکتین ۳	۷۵/۶	۸۹/۲	۸/۴	۱۷/۴
۱۰	موکسیدکتین	۱۱۱/۳	۱۰۴/۷	۴/۰	۱۷/۵

جدول ۶. شیفیت زمان بازداری

ردیف	آفت کش	میانگین زمان بازداری در منحنی کالیبراسیون	میانگین زمان بازداری در نمونه‌های کنترل کیفی	اختلاف	وضعیت (شیفیت زمان بازداری ± 0.1)
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 ۱ ب	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	میلیبی مکتین ۴ آ	۱۴/۰۷۰	۱۴/۰۳۳	۰/۰۳۷	تایید
۹	میلیبی مکتین ۳ آ	۱۳/۷۷۵	۱۳/۶۷۶	۰/۰۰۸	تایید
۱۰	موکسیدکتین	۱۴/۱۶۵	۱۴/۱۳۳	۰/۰۳۲	تایید

• بحث

هدف از تحقیق انجام شده تدوین یک روش معتبر و قابل اجرا در آزمایشگاه‌های 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 ۱ ب، اپرینومکتین، ایورمکتین، میلیمکتین ۴ آ، میلیمکتین ۳ آ و موکسیدکتین در ماتریکس فلفل‌دلمه‌ای به عنوان نماینده گروه مواد با منشاء گیاهی و محتوای آب بالا با استفاده روش استخراج و خالص‌سازی کپرز (QuEChERS) بهینه‌شده با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع و طیف‌سنجی جرمی متوالی با یونیزاسیون الکترواسپری در مد مثبت است.

نسبت یونی: خطای نسبی نسبت یونی مورد قبول در مطالعات اعتبارسنجی برای دستگاه طیف‌سنجی متوالی مطابق با مقررات SANTE 11312/2021 برابر با $\pm 30\%$ 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.

معادله ۱: محاسبه اختلاف یا خطای نسبی نسبت یونی

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

جدول ۷. میزان خطا یا اختلاف نسبی یون‌ها

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 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 ۱ ب	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	میلیبی مکتین ۴ آ	Q2/ Q1	۱/۲۴	۱/۱۴	-۷/۹۰	-۵/۹
۹	میلیبی مکتین ۳ آ	Q2/ Q1	۰/۲۹	۰/۲۸	-۱/۵۸	-۵/۱
۱۰	موکسیدکتین	Q2/ Q1	۱/۱۵	۱/۲۳	-۱۲/۶۳	۱۳/۴۸

آنالایزهای 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 ماکروسیکلک استفاده شده‌اند.

Turnipseed و همکاران یک روش آنالیز همزمان برای تأیید باقیمانده‌های لاکتون‌های ماکروسیکلک در بافت حیوانی و شیر با استفاده از کروماتوگرافی مایع و طیف‌سنج جرمی و یونیزاسیون APCI و در مد منفی ارائه کردند. با روش معرفی شده باقیمانده لاکتون‌های ماکروسیکلک را می‌توان در محدوده ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر کیلوگرم آزمون کرد. 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 شیر خام با استفاده از LC-MS/MS در حضور بافر تری اتیل‌آمین-استونیتیل 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 ماکروسیکلک 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 صورت گیرد (۱۸). وجود ترکیبات ناخواسته همراه آنالیت در آزمون‌های کروماتوگرافی همراه با طیف‌سنجی جرمی می‌تواند باعث افزایش یا سرکوب یون سازی شود که به اثرماتریکس شناخته می‌شود. نوع آنالیت، نوع ماتریکس، حالت یونیزاسیون و نوع منبع یونی بر میزان این اثرات تأثیر دارد. علاوه بر پاکسازی نمونه و اضافه کردن ترکیبات محافظ به فاز متحرک جهت غلبه بر اثرماتریکس 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

تکنیک‌های مختلفی جهت استخراج و خالص‌سازی لاکتون-های ماکروسیکلک از ماتریکس‌های غذایی بکار گرفته و معرفی شده‌اند. متداول‌ترین روش‌های مورد استفاده برای پاک‌سازی نمونه شامل استخراج فاز جامد (SPE) با Florisil کارتریج‌های Aminopropyl-Bond Elut-C8 و SepPack-C18 است. سایر تکنیک‌ها از جمله SPE آنالین و کروماتوگرافی مایع با تعویض‌ستون، استفاده از SPE ایمونوآفینیته 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 طیف‌سنجی جرمی انجام شده است. در مطالعه‌ای توسط Yoshii و همکاران روشی با استفاده از کروماتوگرافی مایع و دتکتور فلورسانس برای آزمون ۹ آفت‌کش از گروه لاکتون‌های ماکروسیکلک 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 ماکروسیکلک خواهد بود. چالشی که تعدادی از محققین در این تکنیک مواجه شده‌اند 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 آنالین 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 ماکروسیکلک ارائه می‌دهند (۲۱-۱۸). در روش‌های ارائه شده از منابع مختلف یونیزاسیون طیف سنج جرمی برای آزمون این باقیمانده‌ها استفاده شده است، از جمله پرتو ذرات (۲۲)، ترمواسپری (۲۳)، الکترواسپری (۲۴)، یونیزاسیون شیمیایی فشار اتمسفر (APCI) (۲۵) و فتوئونیونیزاسیون تحت فشار اتمسفر (APPI) (۲۴، ۲۵). مطالعات نشان داده است که روش‌های یونیزاسیون ترمواسپری و الکترواسپری در حالت یون مثبت بهترین عملکرد را دارند. با این حال، APCI می‌تواند در حالت-های یونی منفی (۲۶) یا مثبت با اصلاح فاز متحرک خوب عمل کند (۲۴، ۲۵).

دقت آزمون است که با استفاده از مطالعه درصد بازیافت تعیین می‌شود. در این مطالعه میانگین درصد بازیافت $128/2-75/6$ درصد و محدوده ضریب تغییرات برای مطالعات تکرارپذیری $22/8-2/8$ 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 $70-120$ درصد، با تکرارپذیری کمتر از 20 درصد باشد. در موارد استثنایی، میانگین مقادیر درصد بازیابی خارج از محدوده $70-120$ درصد را می‌توان در صورتی پذیرفت که آزمون تکرار پذیر باشد (با انحراف استاندارد نسبی کمتر از 20 درصد) اما میانگین بازیابی نباید کمتر از 30 درصد یا بالاتر از 140 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 (20 نانوگرم بر گرم) و ایزومر آورمکتین ب (50 نانو بر گرم) که فراوانی بسیار کمی دارد، 10 نانوگرم بر گرم بوده است. شیفت زمان بازداری، انحراف معیار و ضریب تغییرات زمان بازداری کلیه آنالیت‌ها آدامکتین، ایورمکتین، دورامکتین، موکسیدکتین، امامکتین بنزوات، میلیب 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 سنجی جرمی 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

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 می‌تواند 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 آدامکتین و متابولیت‌های آن هستند با توجه به حساسیت آدامکتین به دمای بالا، درجه دمای منبع یونیزاسیون در 350 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 400 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 سانتیفریوز نمونه‌ها در مراحل استخراج و خالص‌سازی، از سانتیفریوز معمولی در دمای محیط استفاده شده است اما در مطالعه حاضر از سانتیفریوز 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 تفاوت‌های متد ارائه شده استفاده از ستون کروماتوگرافی موجود با مشخصات Kinetex XB-C18 ($100\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$ i.d., $2.6\text{ }\mu\text{m}$) از ستون معرفی شده در روش رسمی اتحادیه اروپا (Zorbax XDB Eclipse $150 \times 2.1\text{ mm}$; 3.5) است. لازم به ذکر است که روش رسمی اتحادیه اروپا تنها در خصوص آنالیزآدامکتین و متابولیت‌هایش ارائه شده است در حالی که در مطالعه حاضر سایر ترکیبات شیمیایی از این گروه که دارای اهمیت بالایی در محصولات کشاورزی و دامی هستند آنالیز و روش آزمون جهت آنالیز همزمان آنها بهینه سازی و اعتبارسنجی شده است.

نتایج نشان داده است که منحنی‌های کالیبراسیون هر 10 آفت‌کش آورمکتین ب ۱، آ، آورمکتین ب ۱، ب، دورا مکتین، امامکتین بنزوات ب ۱، آ، امامکتین بنزوات ب ۱، اپرینومکتین، ایورمکتین، میلیبمکتین آ، میلیبمکتین آ۳ و موکسیدکتین در محدوده $10-150$ نانوگرم بر میلی لیتر خطی است. از دیگر پارامترهای اصلی صحت‌گذاری روش‌های آزمون بررسی صحت و

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 منافی 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 Tonogai Y. Simultaneous Determination of Residues of Emamectin and Its Metabolites, and Milbemection, 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 Commission. Pesticides database. Retrieved from <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/mrls>. Accessed November 15, 2023.
6. Codex alimentarius. 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.

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 (ایزومرکتن) با روش‌های آزمون همزمان متداول با چالش روبروست (۲۹). از طرف دیگر با توجه به حساسیت دستگاه‌های موجود در کشور نیاز به ارائه روش معتبر مناسب با امکانات برای آزمون این آفت‌کش‌ها مشهود است، لذا نظریه اهمیت آگاهی از میزان تماس جهت مطالعات ارزیابی ریسک و لزوم وجود روش‌های اجرایی معتبر

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, Keefe MO. Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *J. Chromatogr. B* 2006; 84: 4175-203.
15. European 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. European 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-MSⁿ Analyst 2001; 126: 155.

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 A* 2000; 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. Confirmation of moxidectin residues in cattle fat by liquid chromatography/ mass spectrometry. *J. AOAC Int* 2000; 83: 1446.
25. Ali MS, Sun T, McLeroy GE, Phillipppo 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_CrISrm. PDF. Accessed November 20, 2023.

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

Elmi M¹, 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