

24. Wetzels M, Odekerken-Schröder G, Van Open C. Using PLS path modeling for assessing hierarchical construct models: Guidelines and empirical illustration. *MIS quarterly*. 2009;177-95.
- Causing Organizational Inertia Using Delphi Fuzzy Method. *Modern Research in Decision Making*. 2017;12(1)95-118. [Persian]
12. Shahrezaei m. Investigation of laziness in organizations. *Payam Darya*. 2014;52((222)). [Persian]
13. Hipp L, Anderson CJ. Laziness or liberation? Labor market policies and workers' attitudes toward employment flexibility. *International journal of social welfare*. 2015;24(4):335-47.
14. Simms A, Nichols T. Social loafing: A review of the literature. *Journal of Management*. 2014;15(1):58-67.
15. Boyer M, Robert J. Organizational inertia and dynamic incentives. *Journal of Economic Behavior & Organization*. 59(3):45-324.
16. Ebrahimi SA. An introduction to organizational inertia and effective factors on it in organizations of public sector of Iran. *Quarterly Journal of Public Organizations Management*. 2016;4(1):91-108 (Persian). [Persian]
17. Suppiah V, Sandhu MS. Organisational culture's influence on tacit knowledge sharing behaviour. *Journal of knowledge management*. 2011.
18. MacIntosh E, Doherty A. Leader intentions and employee perceptions of organizational culture in a private fitness corporation. *European Sport Management Quartely*. 2005;5(1):1-22.
19. Vieira AL. *Interactive LISREL in practice*. 2011.
20. Liao S-h, Fei W-C, Liu C-T. Relationships between knowledge inertia, organizational learning and organization innovation. *Technovation*. 2008;28(4):183-95.
21. Godkin L, Allcorn S. Overcoming organizational inertia: A tripartite model for achieving strategic organizational change. *The Journal of Applied Business and Economics*. 2008;8(1):82.
22. Carvalho DM, Guarido Filho E, de Almeida VE. Organizational performance and strategic inertia: The case of a Brazilian heavy construction company. *Revista de Gestão*. 2018.
23. Hung D-F. Sustained competitive advantage and organizational inertia: the cost perspective of knowledge management. *Journal of the knowledge economy*. 2015;6(4):769-89.



Validation of the analysis method of 25 pesticide residues in rice using LC-MS/MS device (liquid chromatography-mass spectrometry).

Abstract

Article Info

Introduction: In recent years, due to the increase in the use of pesticides in agricultural products and their entry into the human food chain, there has been an increase in concerns about food health among people, researchers, and international organizations. Therefore, this research aims to validate the analysis method of 25 pesticide residues in rice using LC-MS/MS device.

Methodology: In this research, a simultaneous analysis method was set up to determine the amount of 25 types of commonly used pesticides in rice using liquid chromatography with sequential mass spectrometry (LC-MS/MS). Sample preparation steps were performed based on QuEChERS optimized method, using buffer extraction and purification based on the d-SPE method. LC-MS/MS technique with electrospray ionization (ESI) in positive mode was used for the simultaneous determination of 25 types of pesticides in a 20-minute run and in the MRM program.

Results: The limit of quantification (LOQ) and limit of detection (LOD) for all pesticides were 25 and 8 ng/g, respectively. 30 samples of rice imported from Tehran were collected and analyzed. Out of the total number of 30 samples, 9 samples, i.e. 30% of the samples, were contaminated with Triazophos, Phoratesulfoxide, Fosthiazate, Formetanate, Fonofos, and Cyphenothrin toxins; Of these, 4 samples were higher than the MRL determined by the National Governor's Organization of Iran.

Conclusion: The results of the present study show that pesticides were found in all the samples examined in this research, and considering the permissible limit of these toxins according to the standard and the consumption of rice in the food basket of most people in the region, it is a threat to consumers.

Keywords: pesticide, liquid chromatography with mass spectrometry, rice, QuEChERS

Authors:

Maryam Amir Ahmadi ¹

Hamed Hassanvand ^{*2}

Vahid Hadi ³

Affiliations

1 PhD of toxicology, Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Organization, MOH-ME, Tehran, Iran.

2 *MS.C of Toxicology Pharmaceutical Sciences Branch, University (IAUPS) Tehran, Iran)Corresponding Author(.

3 Department of Biochemistry and Nutrition, Faculty of Medicine. AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran.



معتبرسازی روش آنالیز باقی مانده ۲۵ آفت کش در برنج با استفاده از

دستگاه LC-MS/MS

(کروماتوگرافی مایع - طیف سنجی جرمی)

چکیده

اطلاعات مقاله

مریم امیر احمدی^۱
حامد حسونند*^۲
وحید هادی^۳

مقدمه: آدر سال های اخیر به دلیل افزایش مصرف آفتکش ها در محصولات کشاورزی و به طبع ورود آن به زنجیره غذایی انسان موجب افزایش نگرانی هایی در مورد سلامت غذا، در بین مردم، محققین و مجامع بین المللی شده است. از این رو، هدف از انجام این پژوهش معتبرسازی روش آنالیز باقی مانده ۲۵ آفت کش در برنج با استفاده از دستگاه LC-MS/MS است.

روش کار: در این پژوهش یک روش آنالیز همزمان برای تعیین مقدار ۲۵ نوع آفتکش پر مصرف در برنج با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با طیف سنج جرمی متوالی (LC-MS/MS) راه اندازی شد. مراحل آماده سازی نمونه ها بر اساس روش بهینه شده QuEChERS، با استفاده از استخراج بافوری و پاکسازی بر اساس متد d-SPE انجام شد. تکنیک LC-MS/MS با یونیزاسیون الکترواسپری (ESI) در مد مثبت برای تعیین همزمان ۲۵ نوع آفتکش در یک اجرای ۲۰ دقیقه ای و در برنامه MRM بکار گرفته شد.

نتایج: حد تعیین مقدار (LOQ) و حد تشخیص (LOD) برای تمامی آفتکش ها به ترتیب، ۲۵ و ۸ نانوگرم/گرم بدست آمد. ۳۰ نمونه جمع آوری شده برنج وارداتی از سطح شهر تهران جمع آوری و آنالیز شدند. از تعداد کل ۳۰ نمونه، ۹ نمونه یعنی ۳۰٪ نمونه ها به سموم Triazophos, Phoratesulfoxide, Fosthiazate, Formetanate, Fonofos, Cyphenothrin آلودگی داشتند؛ که از این تعداد ۴ نمونه بالاتر از MRL تعیین شده توسط سازمان استاندارد ملی ایران بود.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر بیان می کند که آفت کش ها در تمامی نمونه های مورد بررسی در این تحقیق یافت شده است و با توجه به حد مجاز این سموم طبق استاندارد و مصرف برنج در سبد غذایی اغلب مردم منطقه تهدیدی برای مصرف کننده ها باشد.

کلمات کلیدی: آفت کش، کروماتوگرافی مایع با طیف سنج جرمی، برنج، QuEChERS.

وابستگی سازمانی نویسندگان

۱. دکتری سم شناسی، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران .

۲. کارشناسی ارشد سم شناسی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی (IAUPS)، تهران، ایران. نویسنده مسئول: حامد حسونند - hamedhasan-

vand70@yahoo.com

مقدمه

افزایش نیاز به مواد غذایی در کشورهای دنیا به دلیل افزایش جمعیت آنها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده، به همین منظور وجود آفات در محصولات کشاورزی به عنوان معضلی بزرگ مطرح می‌گردد. و مبارزه با آنها در راستای این هدف امری اجتنابناپذیر است. اگر چه روش‌های مختلفی جهت مبارزه با آفات وجود دارد ولی در حال حاضر عمده‌ترین و عملی‌ترین روش مبارزه با حشرات ناقل بیماری و آفات و بیماری‌های گیاهی در کشورهای جهان و همچنین ایران، مبارزه شیمیایی است که این روش نسبت به سایر روش‌ها برتری دارد زیرا سریعاً مؤثر واقع می‌گردد ولی مشکلات عدیده و خاص خود را به دنبال دارد (۱). استفاده وسیع و بی‌رویه آفت‌کش‌ها در امور بهداشتی و کشاورزی و عدم توجه به مسایل زیست‌محیطی علاوه بر آلودگی محیط زیست، سبب ورود آنها به طرق مختلف به آب، جو و خاک شده و از این طریق وارد زنجیره غذایی می‌شود و تأثیر قابل توجهی در اکوسیستم‌های کشاورزی، منابع آبهای زیرزمینی، محصولات باغی و زراعی به وجود می‌آورد. علاوه بر این‌ها این مواد در اثر تماس ضمن کار، تهیه، انبارسازی و آلوده شدن مواد غذایی مختلف وارد بدن انسان و سایر موجودات زنده می‌شود که ممکن است خطرات و زیان‌های غیر قابل جبرانی را ایجاد نماید (۱).

برنج^۱ دومین محصول کشاورزی پرتولید در جهان پس از ذرت است (۲) و اختصاصاً به منظور مصرف انسان کشت می‌شود. این گیاه، قوت غالب بیش از ۴/۵ میلیارد نفر در جهان بوده که حدود نیمی از جمعیت کنونی دنیا را تشکیل می‌دهد و در بیش از یکصد کشور دنیا مصرف می‌شود. حدود ۲۴٪ از سرانه جهانی انرژی مورد نیاز جوامع انسانی از برنج تأمین می‌شود که این ارقام در کشورهای در حال توسعه بالاتر است (۱). در کشور ایران نیز برنج دارای جایگاه ویژه‌ای در سبد خانوار می‌باشد و بخش عمده‌ای از مراتع شمال کشور به این محصول اختصاص داده شده است. اما یکی از عمده‌ترین مشکلات در تولید آن هجوم حشرات می‌باشد که عامل کاهش عملکرد و کیفیت این محصول بوده و صدمات زیادی را بر محیط زیست و سلامت انسان بر جای می‌گذارد (۲). کرم ساقه خوار نواری از جمله مهم‌ترین حشره‌ای است که به برنج خسارت می‌زند (۳). و به طور اختصاصی از گیاه برنج تغذیه کرده و در مرحله رویشی باعث مرگ جوانه مرکزی و در مرحله زایشی موجب سفید شدن خوشه‌های برنج می‌شود. خسارت کرم ساقه خوار نواری در مزارع برنج در کشورهای برنج خیز متفاوت می‌باشد. نتایج بررسی‌های فرناندو (۱۹۶۴)

1-Oryza sativa L.

نشان داده است که میزان کاهش محصول بر اثر آلودگی ساقه خوار نواری برنج در آسیا ممکن است ۱ الی ۲۰ درصد باشد و در شرایط طغیانی از ۳۰ تا ۱۰۰ درصد هم امکانپذیر است. جهت کنترل این آفت در جهان و همچنین ایران، از آفت‌کش‌های شیمیایی استفاده می‌شود، به طوری که به منظور کنترل این آفت سالانه بین ۴۰۰۰ تا ۸۰۰۰ تن حشره‌کش وارد اکوسیستم زراعی برنج می‌شود (۴). تعریفی که آژانس حفاظت محیط زیست (EPA) آمریکا (۵) از آفت‌کش ارائه داده بدین صورت است. «آفت‌کش ماده یا مخلوطی از مواد است که بمنظور پیشگیری، نابودی، دفع یا کاهش هر گونه آفت بکار می‌رود. «تعریف دیگر «آفت‌کش هر عامل فیزیکی شیمیایی یا بیولوژیکی است که بتواند یک آفت گیاهی یا جانوری را از بین ببرد. «واژه «آفت» شامل حیوانات، گیاهان یا میکروارگانیسم‌های مضر، مخرب یا مشکل‌آفرین می‌شود. شاید بتوان گفت که حشره‌کش‌ها بخصوص ارگانوفسفرها سردسته سموم مورد نظر از لحاظ ایجاد مسمومیت در انسان هستند. امروزه تقریباً تمام حشره‌کش‌های شیمیایی مصرفی سموم عصبی بوده و موجب مسمومیت در سیستم عصبی موجودات هدف می‌گردد. حشره‌کش‌ها انتخابی عمل نمی‌کنند و می‌توانند روی موجودات غیر هدف اثر بگذارند. به عبارت دیگر این مواد علاوه بر تأثیر بر اعصاب حشرات می‌توانند اثرات مشابهی بر سلامت انسان داشته باشند. در این رابطه تنها میزان دوز اثر، سطح آلودگی و مدت آن است که اثرات بیولوژیکی را تعیین می‌کند. بر اساس گزارشات آماری از سراسر جهان تعداد مسمومیت‌ها با عوامل آفت‌کش به بیش از پانصد هزار مورد در سال با بیست هزار مورد مرگ و میر می‌رسد (۶)

آفت‌کش‌های آلی فسفره در حال حاضر در زمره پر مصرف‌ترین آفت‌کش‌ها در جهان هستند. این ترکیب‌ها با وجود آنکه در قیاس با آفت‌کش‌های آلی کلره ماندگاری کمتری در محیط زیست دارند، اما از سمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار بوده و حتی می‌توانند در زنجیره‌های غذایی نیز حضور یابند. با شناسایی آفت‌کش‌های آلی فسفره در یخ-های قطب شمال، تصور اینکه آفت‌کش‌های آلی فسفره به سرعت در محیط تجزیه می‌شوند از بین رفت و در بسیاری از موارد باید آنها را در زمره مواد پایدار محسوب نمود (۷). آفت‌کش‌های آلی فسفره از متداول‌ترین و پر مصرف‌ترین آفت‌کش‌های کشاورزی در کشور می‌باشند، مهم‌ترین اثر این دسته سم‌ها، جلوگیری از فعالیت آنزیم کولین استراز در حشرات و توقف هیدرولیز استیل کولین و تبدیل آن به استیل و کولین می‌باشد

شود. ۴) شیک با ورتکس به مدت یک دقیقه (۵) بر روی نمونه، g۴ سولفات منیزیم خشک و g۱ نمک طعام و همچنین بافر شامل g۱ تری سدیم سیترات دهیدرات و g۰,۵ سدیم هیدروژن سیترات سیس کویی دهیدرات اضافه شده و به مدت ۲ دقیقه با Shaker مخلوط می شود. ۶) بر روی نمونه، g۴ سولفات منیزیم خشک و g۱ نمک طعام و همچنین بافر شامل g۱ تری سدیم سیترات دهیدرات و g۰,۵ سدیم هیدروژن سیترات سیس کویی دهیدرات اضافه شده و به مدت ۲ دقیقه با Shaker مخلوط می شود. ۷) بر روی نمونه، g۴ سولفات منیزیم خشک و g۱ نمک طعام و همچنین بافر شامل g۱ تری سدیم سیترات دهیدرات و g۰,۵ سدیم هیدروژن سیترات سیس کویی دهیدرات اضافه شده و به مدت ۲ دقیقه با Shaker مخلوط شد. ۸) شیک با ورتکس به مدت یک دقیقه (۹) یک لوله فالكون ml ۱۵ به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۴۵۰۰ در دمای °C ۵- سانتیفریوژ گردید. ۱۰) ml۴ از محلول رویی را برداشته و به ویال کهربایی بزرگ منتقل شد. ۱۱) $\mu\text{l} ۱۰$ به ازای هر میلی لیتر محلول استونیتریل و اسید فرمیک ۰,۵ اضافه شد. ۱۲) $\mu\text{l} ۵۰۰$ از نمونه با $\mu\text{l} ۱۵۰۰$ متانول (۱۰٪) آب (۹۰٪) و mM ۵ آمونیوم فرمات مخلوط شد. ۱۳) ورتکس به مدت یک دقیقه به منظور اختلاط و همگن شدن محلول. ۱۴) تزریق $\mu\text{l} ۲۰$ از عصاره رقیق شده به دستگاه LC/MS/MS.

تهیه محلول های استاندارد، پس از انتخاب حلال، محلول استاندارد ذخیره از سموم خالص پودری اولیه خریداری شده از شرکت Ehrenstorfer آمریکا، بصورت جداگانه و استاندارد مخلوط ذخیره تهیه گردید. استاندارد ذخیره (stock)، استاندارد سموم در غلظت های mg/ml ۱ و در حلال های استونیتریل، متانول، استون و اتیل استات تهیه گردید. تمامی استانداردها در دمای °C ۲۰- نگهداری شدند. استاندارد جهت بهینه سازی mass، استانداردهای سموم مورد نظر که با غلظت های $\mu\text{g/ml} ۵$ در محلول متانول (۵۰٪): آب (۵۰٪) + آمونیوم فرمات mM ۵ تهیه شده اند، به منظور شناسایی یون های والد مستقیماً به دستگاه طیف سنج جرمی تزریق شد. در ابتدا از ترکیبات مختلف یک Full scan گرفته شد. بعد از مشخص کردن یون های دختر و پارامترهای Mass برای هر یون دختر، برنامه MRM نوشته شد. استاندارد حد واسط، این استاندارد در غلظت های $\mu\text{g/m} ۱۵$ یا ۱۰ از استاندارد ذخیره ساخته شدند. در این مرحله برای تهیه استانداردها از مخلوط متانول (۵۰٪): آب (۵۰٪) + آمونیوم فرمات mM ۵ استفاده گردید و استانداردهای مورد نظر برای تعیین و بهینه سازی

که به این دلیل به آن ها، سم های آنتی کولین استراز می گویند. عدم هیدرولیز استیل کولین توسط آنزیم کولین استراز، سبب تجمع آن شده و افزایش استیل کولین موجب تحریک دستگاه عصبی مرکزی و پاراسمپاتیک می شود (۸). مالاتیون، فنتیون، دیازینون و پاراتیون انواع متداول حشره کش های آلی فسفره می باشند. دیازینون از حشره کش های ارگانوفسفری است که در چند دهه اخیر در دنیا به طور گسترده ای مورد استفاده قرار گرفته است. قابل توجه است که طبق آمارهای مستند میزان وقوع مسمومیت در کشورهای در حال توسعه ۱۳ برابر بیشتر از مورد کشورهای کاملاً صنعتی می باشد که خود ۸۵ درصد از تولید جهانی آفت کش ها را مصرف می کند (۱۱). بر طبق مطالعه ای که بیماران بستری شده در یکی از ایالت های آمریکا را در یک دوره زمانی ۵ ساله بررسی کرد مشخص شده ۷۳ موارد مسمومیت با عوامل آفت کش بعلت خودکشی ۱۷ درصد بعلت تماس های شغلی و ۸ درصد بصورت تصادفی رخ داده بود (۹). از این رو مطالعه حاضر با هدف معتبر سازی روش آنالیز باقی مانده ۲۵ آفت کش در برنج با استفاده از دستگاه LC-MS/MS (کروماتوگرافی مایع - طیف سنجی جرمی) طراحی شده است.

مواد و روش کار:

در این مطالعه تجربی، که نمونه گیری در مناطق جغرافیایی شمال، جنوب، شرق و غرب سطح شهر تهران صورت پذیرفته در مجموع، ۳۰ نمونه مرکب انتخاب گردید که ۲۱ نمونه مرکب مربوط به برنج هندو ۸ نمونه مرکب مربوط به برنج پاکستانی ۱ نمونه مرکب مربوط به برنج اروگوئه بوده است. مکان انجام آزمایش اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو وزارت بهداشت و درمان آموزش پزشکی بوده است زمان نمونه برداری تقریباً از بهمن ۹۴ شروع و تا بهمن سال ۹۵ به طول انجامید.

مراحل آماده سازی نمونه ها (استخراج و پاکسازی)، در این تحقیق استخراج سموم، روش بهینه شده QuEChERS مورد استفاده قرار گرفت. روش QuEChERS برپایه استخراج استونیتریلی و آبیگری با سولفات منیزیم است که پس از آن یک مرحله خالص سازی (clean up) وجود دارد. در این روش جهت استخراج سموم از محلول استونیتریل استفاده گردید. مراحل استخراج عبارتند است از: ۱) همگن سازی و انتقال ۱۰ g نمونه آرد شده به داخل یک لوله فالكون ml ۵۰ (۲) اضافه کردن استاندارد داخلی در سطح ۳ ng/g ۵۰ ml از حلال استخراج (استونیتریل) به روی نمونه ها افزوده می

پارامترهای طیف سنج جرمی مثل یون والد، یون های تولیدی و سایر پارامترها مورد استفاده قرار گرفتند. استاندارد مخلوط، محلول استاندارد مخلوط از سموم مورد نظر در غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ در استونیتریل و ۱٪ استیک اسید از حلال تهیه گردید. از این استاندارد برای تهیه استانداردهای کاری جهت رسم منحنی کالیبراسیون و اسپایک نمونه ها استفاده گردید. تعیین استاندارد داخلی، استاندارد داخلی یک ترکیب شیمیایی مرتبط و شبیه آنالیت است که بطور طبیعی در نمونه واقعی وجود ندارد و بعنوان نزدیکترین ماده ممکنه به رفتار کروماتوگرافی و طیف سنجی جرمی استفاده گردید از آنجائیکه اثرات ماتریکس در طیف سنجی جرمی عملاً اجتناب ناپذیر است. بنابراین نیاز به کاهش اثرات ماتریکس بر روی دقت، صحت نتایج می باشد. استاندارد داخلی ممکن است برای جبران از دست دادن آنالیت و هم اثرات ماتریکس در طی زمان آماده سازی نمونه مورد استفاده قرار بگیرد. که راهی برای بهبود کیفیت نتایج آنالیز می باشد. پارامترهای تعیین شده در LC، ستون: ستون HPLC با مشخصات RP-C₁₈-Chromolith $100 \times 4.6 \text{ mm}$ ، یا ستون با مشخصات مشابه در طول ۵ یا ۱۰ cm، فاز متحرک: Solvent A=MeOH (10%) + Water (90%) + Am-Solvent B=MeOH + (moniumformate(10Mm (90%) + Water (10%) + Ammonium formate(10Mm

بهینه سازی شرایط دتکتور mass، در ابتدا برای تعیین متد آنالیز بایستی شرایط بهینه سازی mass انتخاب و یون های مناسب با تزریق استاندارد منفرد از آفت کش های مورد نظر با غلظت های مختلف پیوست (۱) بطور جداگانه اجرا گردید برای اینکار حجم تزریق ۲۰ در نظر گرفته شد. انتخاب حالت یونیزاسیون (mode)، با بررسی ساختمان آفت کش های مورد نظر و مقالات منتشر شده در این زمینه دیده شد که تمام سموم قابلیت ایجاد کاتیون را دارا می باشند، بنابراین دستگاه به منظور پایش و اندازه گیری تنظیم گردید. پایش سموم به روش Full scan، هنگامی که دتکتور در حالت Full scan عمل میکند محدوده وسیعی از یون ها مورد پایش قرار می گیرند. در این حالت تمامی مواد که دارای جرم ملکولی در محدوده انتخاب شده باشند، برای آنالیزر جرمی قابل رویت هستند در این حالت آنالیزر جرمی به صورت یک فیلتر عمل نموده و باعث جداسازی یونها بر مبنای جرم به بار (m/z) و عبور تفکیکی آن ها می شود. به ازای عبور هر یک از آن ها و سپس برخوردشان به دتکتور،

جریانی الکتریکی در دتکتور ایجاد می شود. هر قدر تعداد این یونها بیشتر باشد سیگنال قوی تری ایجاد شده و در واقع سطح زیر منحنی پیک ایجاد شده با تعداد یون های عبور کرده از دتکتور ارتباط مستقیم دارد. در این مرحله پس از شناسایی تمامی یون های حاصل از سموم مورد آنالیز، برای هر سم یونی که بیشترین فراوانی را داشت به عنوان یون والد انتخاب شد. پایش یون های محصول (Product Ion) (Scanning)، پس از تشخیص یون های والد، این یون ها توسط گاز آرگون و تحت خلا در داخل کوادروپل دوم مورد هدف قرار گرفت تا به یون های دختری شکسته شوند. یک یون ممکن است به چندین یون دختر شکسته شود ولی برای مراحل بعدی تحقیق، فقط یونی که بیشترین شدت و سنگین ترین m/z را دارند انتخاب شدند. در مرحله بعد جرم های یون های دختر هر ترکیب بطور جداگانه بهینه سازی گردید و بهترین collision energy (انرژی که در آن تبدیل های حاصل (Transision) منجر به ایجاد یون های محصول با بیشترین فراوانی می شوند) برای آن ها تعیین گردید. از بین دو یون بهینه شده برای هر ترکیب که بیشترین شدت را دارد و در نتیجه بیشترین مساحت زیر منحنی را تولید می کند به عنوان یون Quantitative در نظر گرفته می شود و یون دیگر به عنوان یون confirmative خواهد بود. رسم منحنی کالیبراسیون به روش اسپایک، به منظور غلبه بر اثر ماتریکس منحنی کالیبراسیون با استفاده از نمونه های اسپایک در حضور استاندارد داخلی رسم شده است. بدین منظور در ۵ سطح به غلظت های ۲۵، ۵۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ اسپایک و طبق روش استخراجی که در بند داده شده مراحل استخراج و خالص سازی، صورت می گیرد. این کار در سه روز کاری مختلف تکرار شده و در نهایت منحنی کالیبراسیون با میانگین ۳ نقطه و توسط نرم افزار اختصاصی دستگاه LC / MS / MS و با نام Analyst محاسبه و رسم می گردد. تعیین درصد بازیافت و مطالعات صحت و دقت روش، برای بررسی درصد بازیافت و مطالعات صحت و دقت روش، نمونه های بلانک در ۲ سطح $100, 300 \text{ ng/g}$ و برای هر سطح سه نمونه (جمعاً ۹ نمونه) اسپایک شده سپس با استفاده از روش گفته شده در بند بر روی آنها استخراج صورت می گیرد. این نمونه ها آنالیز شده و درصد بازیافت با استفاده از منحنی کالیبراسیون تعیین گردیده است. این کار در سه روز کاری انجام شده و میانگین درصد بازیافت و میزان CV٪ جهت مطالعات صحت و دقت تعیین شده است. حد تعیین مقدار (LOQ) و تعیین حد تشخیص (LOD)، بدین

در طول ۵ یا ۱۰ cm، فاز متحرک: Solvent A=MeOH (10%) + Water (90%) + Am-Solvent B=MeOH + (moniumformate(10Mm (90%) + Water (10%) + Ammonium formate(10Mm

بهینه سازی شرایط دتکتور mass، در ابتدا برای تعیین متد آنالیز بایستی شرایط بهینه سازی mass انتخاب و یون های مناسب با تزریق استاندارد منفرد از آفت کش های مورد نظر با غلظت های مختلف پیوست (۱) بطور جداگانه اجرا گردید برای اینکار حجم تزریق ۲۰ در نظر گرفته شد. انتخاب حالت یونیزاسیون (mode)، با بررسی ساختمان آفت کش های مورد نظر و مقالات منتشر شده در این زمینه دیده شد که تمام سموم قابلیت ایجاد کاتیون را دارا می باشند، بنابراین دستگاه به منظور پایش و اندازه گیری تنظیم گردید. پایش سموم به روش Full scan، هنگامی که دتکتور در حالت Full scan عمل میکند محدوده وسیعی از یون ها مورد پایش قرار می گیرند. در این حالت تمامی مواد که دارای جرم ملکولی در محدوده انتخاب شده باشند، برای آنالیزر جرمی قابل رویت هستند در این حالت آنالیزر جرمی به صورت یک فیلتر عمل نموده و باعث جداسازی یونها بر مبنای جرم به بار (m/z) و عبور تفکیکی آن ها می شود. به ازای عبور هر یک از آن ها و سپس برخوردشان به دتکتور،

را تهدید می کند. سمیت آفت کش ها منجر به تنظیم قوانین و مقرراتی در بسیاری کشورها، در امر کنترل مواد غذایی از نظر تغذیه انسان مورد توجه می باشد. اتحادیه اروپا و ارگانهای دیگر، تصویب مقرراتی برای آنالیز دقیق و قابل اطمینان آفت کش ها را ضروری می دانند که اجازه شناسایی دقیق و تعیین کمی آفت کش ها را در غلظت پایین می دهد. در این مطالعه دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC) مدل Dionex ۳۰۰۰ و طیف سنجی جرمی متوالی (LC/MS-MS) مدل Applied Bio system API ۳۲۰۰، حاوی یونساز با تکنیک ESI و آنالیزور جرمی کوادریپل سه گانه (QqQ) با اتوسمپلر مدل ۳۰۰۰ Ultimate استفاده گردید. اساس این تکنیک، تولید یون قبل از رسیدن آنالیت به الکترواسپری جرمی می باشد.

متد راه اندازی شده به طور موفقیت آمیزی جهت آنالیز ۳۰ نمونه برنج جمع آوری شده از سطح شهر تهران در سال ۱۳۹۵ استفاده گردید؛ که در همین ارتباط طی مطالعه ای که در سال ۲۰۱۴ در دانشگاه شهید بهشتی، میزان باقی مانده ۴۱ آفت کش در ۶۰ نمونه برنج جمع آوری شده از بازار تهران بررسی شد در این بررسی که با استفاده از یونیزاسیون الکترواسپری مثبت و با روش QuEChERS انجام شد باقیمانده آفت کش ها را با استفاده از دستگاه lc/ms/ms تعیین کردند. منحنی کالیبراسیون برای هر آنالیت در محدوده غلظت ۰/۰۲-۰/۱ میکروگرم/گرم با ضریب همبستگی بین ۰/۹۹۹ و ۰/۹۹۳ بود. LOD و LOQ به ترتیب ۰/۰۲۵-۰/۰۰۸ میکروگرم/گرم می باشد برای همه ۴۱ آفت کش متوسط بهبود در سه سطح (۰/۰۲۵-۰/۰۰۸ و ۰/۲۵۰ میکروگرم/گرم) ۷۱-۱۱۹ درصد و با دقت $RSD < 20\%$ به دست آمده در این تحقیق به غیر از دو آفت کش ممنوع (TCMTB, Phosphamidon) ، سه آفت کش مجاز دیگر (-Cinosulfuron, triadi-) (menol tricyclazole) هم در برنج یافت شدند که زیر MRLs بودند (۱۰). نتایج یک پژوهش که در سال ۲۰۱۲ در کشور اروگوئه به منظور بررسی و توزیع باقیمانده آفت کش ها در طول کشت برنج انجام شد از ۴ نوع علف کش و ۹ نوع قارچ کش و دو نوع حشره کش (azoxystrobin, byspiribac-sodium, carbendazim, clomazone, difenoconazole, epoxiconazole, isoprothiolane, kresoxim-methyl, propanil, quinclorac, tebuconazole, thiamethoxam, tricyclazole, trifloxystrobin, λ -cyhalotrin) در کشت برنج استفاده کردند پس از کشت، برنج خام را برداشت می کنند و در صنعت به

منظور در نمونه های اسپایک در سطوح پایین با نسبت سیگنال به نویز ۳/۱ جهت LOD و سیگنال به نویز ۹،۱، حدود تشخیص و حدود تعیین مقدار، تعیین گردیده است. با این شرط که در سطح LOQ تعیین شده صحت و دقت آزمون تامین شده باشد. جهت ارائه نتایج، از نرم افزار خود دستگاه به نام Analyst ۱.۵.۱ و جهت تحلیل داده ها از نرم افزار آفیس ۲۰۰۷ excel استفاده شد.

نتایج:

در این پژوهش ۲۵ آفت کش در ۳۰ نمونه مختلف برنج از برند های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. برای از بین بردن اثر ماتریکس، منحنی کالیبراسیون با استفاده از نمونه های اسپایک و با محاسبه نسبت سطح زیر منحنی استاندارد داخلی در دو خط مجزا رسم شده است. نتایج اعتبارسنجی نشان می دهد منحنی های کالیبراسیون آفت کش ها در محدوده ۲۵-۵۰۰ (ng/ml) خطی بوده و ضریب همبستگی تمام آفت کش ها بیشتر از ۰/۹۹۰ می باشد. میانگین درصد بازیافت آفت کش ها در محدوده ۸۳،۹۶٪-۱۰۵،۶۲٪ می باشد. از نظر تکرار پذیری تمام آفت کش ها عمدتاً CV کمتر از ۲۵٪ داشته اند. درصد بازیافت و تکرار پذیری با شرایط اعلام شده توسط اتحادیه اروپا مطابقت دارد. حد تعیین مقدار و حد تعیین تشخیص آفت کش ها به ترتیب ۲۵ ng/g و ۸ ng/g است. از ۳۰ نمونه برنج جمع آوری شده از بازار تهران، ۹ نمونه یعنی ۳۰٪ نمونه ها به سموم Triazophos, Phorate, sulfoxide, Fosthiazate, Formetanate, Fonofos, Cyphenothrin آلودگی داشتند؛ که از این تعداد ۲ (pho-nofos, cyphonethrin) مورد بالاتر از MRL تعیین شده توسط سازمان استاندارد ملی ایران بود. از ۹ نمونه برنج آلوده، ۵ نمونه آلودگی مجاز و ۴ نمونه آلودگی غیر مجاز داشتند. نتایج حاصل از آزمایش نمونه های برنج آسیاب شده از منطقه تهران در پیوست ۲ آورده شده است.

بحث و نتیجه گیری

یکی از مهمترین دغدغه های جامعه بشری سلامت و امنیت مواد غذایی مورد مصرف است که تاثیر به سزایی به روی کیفیت زندگی او دارد. یکی از مواردی که می تواند در تعیین سالم بودن مواد غذایی نقش داشته باشد ترکیبات سمی از جمله آفت کش ها هستند، استفاده از آفت کش ها اگرچه سبب افزایش تولید در واحد سطح گردیده است اما باقیمانده این مواد در محصولات و فرآورده های گوناگون سلامت بشر

منابع

1. Bhullar NK, Gruissem W. Nutritional enhancement of rice for human health: the contribution of biotechnology. *Biotechnology advances*. 2013;31(1):50-7.
2. Choi H, Moon J-K, Park B-S, Park H-W, Park S-Y, Kim T-S, et al. Comparative nutritional analysis for genetically modified rice, Iksan483 and Milyang204, and nontransgenic counterparts. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 2012;55:19-26.
3. Keifer M, McConnell R, Pacheco AF, Daniel W, Rosenstock L. Estimating underreported pesticide poisonings in Nicaragua. *American Journal of Industrial Medicine*. 1996;30(2):195-201.
4. Amouoghlibari M, Majidi Shilsar F. Investigation on efficiency of Fipronil as granular and concentrated suspension formulations against *Chilo suppressalis* W. in Mazandaran Province in the North of Iran. 2011.
5. iPiBkÿ oôyùBÿ GvÿBo GÚ. Gpouþ oAGÇú iyBó ìç pÙ uíðì@ ÖQ Þ {ð ASpAR@ ó Gp uçl ìQ ÞzBôoqAó ko AuPBðùBÿ ihPéØ Þzðo.
6. Mowbray DL. Pesticide use in the South Pacific. *UNEP Regional Seas Reports and Studies (UNEP)*. 1988.
7. Zhang Z, Hong H, Cheng W, Wang X, Lin J, Yu G. Contents of organochlorine pesticides in water, pore water and sediment in Minjiang River Estuary of China. *Huan Jing ke Xue= Huanjing Kexue*. 2003;24(1):117-20.
8. EBRAHIMIZADEH M, Shokrzadeh M, Bioukabadi M. Effect of organophosphorous pesticides on acetyl cholinesterase activity in agricultural workers. 2005.
9. Srinivasan B, Tung S. Development and applications of portable biosensors. *Journal of laboratory automation*. 2015;20(4):365-89.
10. Shakouri A, Yazdanpanah H, Shojaee MH, Kobarfard F. Method development for simultaneous determination of 41 pesticides in rice us-

برنج قهوه‌ای و برنج سفید و سبوس برنج تبدیل می‌شود و پس از آن باقیمانده آفت کش را با روش QuEChERS و با متد LS-MS/MS و GC-MS مورد بررسی قرار گرفت. و از باقیمانده آفت کش ها، هفت آفت کش در برنج قهوه‌ای و هشت آفت کش در سبوس برنج یافت شد و بالاترین غلظت در برنج را محاسبه کردند. این نتایج اطلاعات مربوط به سرنوشت آفت کش ها در زنجیره غذایی برنج و ایمنی آن برای مصرف کنندگان را فراهم می‌کند (۱۱). در این تحقیق منحنی کالیبراسیون خطی و در محدوده ۰/۱-۲ mg/kg بود و میزان بهبود در دو سطح غنی سازی ۰/۱ kg/mg و ۰/۵ بین ۸۸،۱-۱۰۰،۶ درصد و با انحراف استاندارد نسبی $RSD < 8\%$ حد سنجش ۰/۳ mg/kg پایین تر از حد ماکزیمم باقیمانده ۰/۵ mg/kg تعیین شده توسط وزارت غذا و داروی کشور کره بود (۱۲). نتایج پژوهش فوق الذکر همراستا با نتایج پژوهش حاضر می‌باشد.

نتیجه گیری نهایی

برنج یکی از پرمصرف ترین غذاهای دنیا از جمله در ایران می‌باشد. با افزایش مصرف برنج در دهه های اخیر در نتیجه استفاده از آفت کش ها برای بهبود عملکرد تولید آن در طول مراحل کشت افزایش یافته است استفاده از این آفت کش ها کل سیستم برنج (آب و خاک و دانه برنج) را تحت تاثیر قرار می‌دهد. به دلیل اینکه تقاضا و عرضه برنج در ایران متعادل نمی‌باشد سالانه در حدود ۴۰۰۰۰۰-۵۰۰۰۰۰ تن برنج برای مصرف داخلی وارد کشور می‌شود. به این دلایل ما نیاز به توسعه روشهای سریع برای تجزیه و تحلیل باقی مانده آفت کش ها در محصولات برنج داریم. بدین منظور در تحقیق حاضر تلاش شده است روشی کاربردی جهت پایش آفت کش ها در برنج در سطح شهر ارائه شود تا شرایط آنالیز آفت کش ها در تمامی آزمایشگاه های مربوطه فراهم شود.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر حاصل طرح تحقیقاتی مصوب در معاونت تحقیقات واحد علوم دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه آزاد اسلامی تهران می‌باشد. لذا از تمامی عزیزانی که در اجراء این پروژه با همکاری داشته اند کمال تشکر را داریم.

ing LC-MS/MS technique and its application for the analysis of 60 rice samples collected from Tehran market. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR. 2014;13(3):927.

11. Pareja L, Colazzo M, Pérez-Parada As, Besil N, Heinzen H, Böcking B, et al. Occurrence and distribution study of residues from pesticides applied under controlled conditions in the field during rice processing. Journal of agricultural and food chemistry. 2012;60(18):4440-8.

12. Lee Y-J, Choi J-H, Abd El-Aty A, Im SJ, Rahman MM, Kim S-W, et al. Residue analysis of orthosulfamuron herbicide in fatty rice using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Advanced Research. 2015;6(3):511-6.