

تعیین هم‌زمان باقی‌مانده اسپیروترامات و مهم‌ترین متابولیت آن در پسته به روش استخراج کچرز بهبودیافته و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

وحیده مهدوی^{۱*}، رحمان غلامی^۲ و فاطمه مصدرا لامور^۲

۱. بخش تحقیقات آفت‌کش‌ها، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. ۲. دانشکده شیمی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲

چکیده

ایران به عنوان نخستین کشور تولیدکننده پسته در دنیا است. با توجه به اهمیت استراتژیک و تسهیل صادرات این محصول، بررسی و تعیین میزان باقی‌مانده آفت‌کش‌ها در این محصول جهت اطمینان از سلامت محصول، بر اساس شرایط و روش‌های اعتبارسنجی شده اهمیت بسزایی دارد. اسپیروترامات یکی از آفت‌کش‌های جدیدی است که اخیراً به مقدار فراوان در باغات پسته جهت کنترل پسیل پسته بکار می‌رود. جهت استخراج این حشره‌کش از بافت پسته از روش بهبود یافته کچرز استفاده شد، به منظور صرفه‌جویی در هزینه‌ها همه مراحل بهینه‌سازی روش استخراج با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و آشکارساز UV (HPLC-UV) انجام شد. نتایج حاصل از این بهینه‌سازی منجر به حذف جاذب‌های گران قیمت C₁₈ و GCB شد که کاهش حداقل ۶۰٪ هزینه استخراج را در پی داشت. کلیه مراحل اعتبارسنجی با استفاده از نمونه‌های پسته عاری از سم انجام شد، نمونه‌ها بطور مصنوعی در آزمایشگاه با غلظت‌های مختلف تیمار شدند. برای تأیید روش بهینه‌شده نهایی و استفاده از این روش در آنالیز نمونه‌های واقعی از HPLC با آشکارساز جرمی (LC-MS/MS) استفاده شد. در شرایط بهینه، منحنی درجه‌بندی همسان‌سازی بافتی برای اسپیروترامات در محدوده‌ی غلظتی ۰/۱۰-۰/۰۴ mg/L با ضریب هم‌بستگی ۰/۹۹۵۰ رفتار خطی مناسبی را نشان داد. همچنین انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۷٪ و درصد بازیابی ۱۰۳-۸۵ به دست آمد. علاوه بر این، منحنی درجه‌بندی همسان‌سازی بافتی برای اسپیروترامات-انول در محدوده غلظتی فوق، با ضریب هم‌بستگی ۰/۹۹۳۶ به دست آمد. حد کمی‌سازی آنالیت‌ها طبق دستورالعمل SANCO، ۰/۰۴ mg/L محاسبه شد که با توجه به MRL این ترکیب در پسته که برابر ۰/۰۵ mg/L می‌باشد در محدوده قابل قبول می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اسپیروترامات، اسپیروترامات-انول، پسته، کچرز، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC).

مقدمه

پسیل یک آفت قدیمی در کشور است، به گونه‌ای که این آفت در سال‌های ۱۳۴۰ تا ۱۳۵۰ در کشور گزارش شده؛ ولی امروزه به آفت درجه اول در باغات پسته تبدیل شده است. پسیل پسته که در اصطلاح به آن «شیره خشک» می‌گویند، در حال حاضر آفت کلیدی باغ‌های پسته کشور است. حشره پسیل معمولاً در اواخر اسفند و با گرم شدن هوا از پناهگاه‌های زمستان‌گذران خارج شده و بلافاصله پس از متورم شدن و باز شدن جوانه‌های پسته شروع به فعالیت، تغذیه و تخم‌گذاری می‌کنند. طغیان جمعیت این حشرات همزمان با شروع مغزپستن پسته و یا پس از آن است که موجب اختلال در روند پرشدن مغز پسته می‌شوند و در صورت خسارت شدید، این آفت علاوه بر خسارت به کیفیت و کمیت محصول، موجب ریزش برگ‌ها و حتی جوانه‌های گل و برگ سال آینده درختان پسته نیز می‌شود. اسپروتترامات با نام تجاری موونتو^۱ علیه آفت پسیل پسته بکار می‌رود. در حال حاضر سطح زیر کشت پسته ایران بیش از ۴۷۸۰۰۰ هکتار می‌باشد، یکی از عوامل مهم کاهش عملکرد پسته در ایران خسارت آفات و بیماری‌ها و علف‌های هرز است که با کنترل خسارت آن‌ها میزان تولید افزایش می‌یابد (FAO, 2016).

از آنجایی که این محصول یکی از اقلام مهم و استراتژیک در بخش صادرات غیرنفتی به شمار می‌رود، برای تداوم صادرات این محصول و حفظ بازار و کسب درآمد ارزی بیشتر، تولید پسته سالم و عاری از باقی مانده سموم و عدم استفاده از سموم پرخطر ضروری است. سموم جدید دارای باقی مانده کمتری بوده و خطرات بسیار کمتری برای محیط زیست و سلامتی انسان‌ها دارند. یکی از این سموم که با این رویکرد اخیراً مصرف زیادی را در باغ‌های پسته کشور به خود اختصاص داده، اسپروتترامات است. اسپروتترامات متعلق به گروه

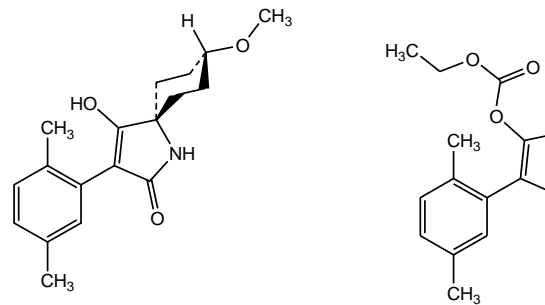
شیمیایی کتونول‌هاست که به عنوان یک حشره‌کش سیستماتیک برای کنترل دامنه وسیعی از حشرات مکنده کاربرد دارد. این ترکیب با حرکت در آوند آبکش گیاه می‌تواند آفات پنهانی را نیز نابود کند. اسپروتترامات در مقایسه با حشره‌کش‌های مشابه ترکیب ایمن‌تری بخصوص برای آفات غیر هدف می‌باشد و پس از نفوذ به گیاه به فرم انولی هیدرولیز می‌شود که اسپروتترامات-انول مهم‌ترین متابولیت اسپروتترامات در گیاهان می‌باشد. آفت‌کش‌ها در اثر برهم‌کنش با محیط اطراف، آب و هوا، محصولات کشاورزی، گیاهان، حیوانات و انسان‌ها به موادی تبدیل می‌شوند که محصولات انتقالی، متابولیت یا «مشتقات»^۲ آفت‌کش‌ها نامیده می‌شوند. امروزه به علت این‌که مشخص شده است متابولیت‌های آفت‌کش‌ها می‌توانند سمی تر (Belfroid et al., 1998) یا مقاوم‌تر از آفت‌کش اولیه (Aga and Thurman, 2001) باشند، تمایل به مطالعه متابولیت‌ها در حال افزایش است. علاوه بر این، بر خلاف آفت‌کش اولیه، برخی متابولیت‌ها به علت داشتن خواص ویژه، واکنش‌های متفاوتی در محیط‌زیست از خود بروز می‌دهند یا به جاهایی از محیط‌زیست خود را می‌رسانند که هرگز برای آفت‌کش اولیه دیده نشده است. به عنوان مثال به علت تحرک و پویایی‌شان در محیط آب-خاک، متابولیت‌ها خیلی آسان‌تر از ترکیبات اولیه‌شان می‌توانند به آب‌های زیرزمینی برسند (Dagnac et al., 2002). لذا متابولیت‌ها در گروه آلاینده‌های در حال ظهور^۳ قرار گرفته‌اند (Hernández et al., 2008). این ترکیبات تاکنون در پایش مورد توجه نبوده‌اند اما به علت مشکوک بودن آن‌ها در انتقال به محیط‌زیست و تهدیدات سلامتی (Martínez Vidal et al., 2009)، باید در دستور کار ارزیابی ریسک لحاظ شوند (Karabelas et al., 2009).

² Derivatives³ Emerging Contaminants¹ Movento

در نتیجه، توسعه روش‌های تجزیه‌ای جهت پایش متابولیت‌ها در محیط‌های مختلف اعم از محیط‌زیست تا ماتریکس‌های غذایی ضروری می‌باشد. طیف سنجی جرمی به عنوان یک سیستم تشخیصی قوی به علت توانایی شناسایی مقادیر ناچیز^۱ همراه با گزینش‌پذیری، حساسیت و قابلیت بالای تشخیصی-تأییدی^۲ در بین روش‌های ارائه شده، پیشرو می‌باشد (Antignac *et al.*, 2003). از طرفی به علت در دسترس نبودن استانداردهای تجاری، ناشناخته بودن یا مورد هدف نبودن^۳ آن‌ها، نیاز به روش آنالیز توانمند را چندین برابر می‌کند، یکی از روش‌هایی که دارای توانایی بالای ردیابی در موارد گفته شده است، کروماتوگرافی مایع با آشکارساز جرمی (LC/MS) می‌باشد.

جمله در سال ۲۰۱۰ با استفاده از HPLC/MS این حشره‌کش را آنالیز کردند (Kay and Herron, 2010). در سال ۲۰۱۲ مهپاترا اسپیروتترامات و متابولیت انولی آن را با استفاده از HPLC در بافت انبه و کلم و خاک اندازه‌گیری کردند (Mohapatra *et al.*, 2012). در سال ۲۰۱۳، ژو و همکارانش اسپیروتترامات و چهار متابولیت آن را در انواع میوه و سبزی با استفاده از روش استخراج کپرز و LC/MS بررسی کردند (Zhu *et al.*, 2013). در سال ۲۰۱۳ سینگ و همکارانش این ترکیب را با استفاده از HPLC در خاک و سبزیجات ردیابی کردند (Singh *et al.*, 2013). در سال ۲۰۱۶ لی و تیم تحقیقاتی‌اش این حشره‌کش و متابولیت‌های آن را در فلفل با استفاده از LC/MS با روش تلفیقی با کمومتریکس آنالیز کردند (Li *et al.*, 2016). در بررسی بافت‌های چرب از چهار روش عمومی برای استخراج سموم استفاده می‌شود که این روش‌ها شامل فناوری‌های براساس جذب^۴، کروماتوگرافی نفوذ ژلی^۵، استخراج حلال فوق بحرانی^۶ و استخراج بر پایه حلال و روش‌های پاک‌سازی^۷ است که بیشتر روش‌ها براساس آخرین روش بنا شده‌اند. به طور معمول بیشترین پژوهش‌ها برای استخراج سموم در مواد غذایی بهره‌بردار از توزیع آنالیت‌ها بین فاز جامد یا نیمه جامد و یک حلال غیر قابل امتزاج با آب در روش‌های بر پایه حلال یا مواد جذب در روش‌های بر پایه جذب هستند. کروماتوگرافی نفوذ ژلی (GPC)^۸ روشی است که برای جزء‌کردن و پاک‌سازی بافت چرب ابداع شده است. این روش به‌طور روزمره برای بررسی باقی‌مانده سم در روغن سبزیجات و معمولاً بعد از یک جداسازی مایع-مایع (LLE)^۹ با استونیتریل استفاده می‌شود. البته مثال‌هایی از جداسازی مستقیم

spirotetramat-enol spirotetramat



شکل ۱- ساختار مولکولی اسپیروتترامات و مهم‌ترین متابولیت آن، اسپیروتترامات سیس انول

Fig 1. molecular structure of spirotetramat and its main metabolite, spirotetramat-enol.

حشره‌کش اسپیروتترامات در بسیاری از کشورها برای کنترل آفات سبزی‌ها و میوه‌ها ثبت شده است. روش‌های ارائه شده برای آنالیز این ترکیب محدود می‌باشد. از

^۴Sorbent-Based (Extraction and Clean-up) Techniques

^۵Gel-Permeation Chromatography

^۶Supercritical Fluid Extraction (SFE)

^۷Solvent-Based Extraction and Clean-up Methodologies

^۸Gel-Permeation Chromatography

^۹Liquid-Liquid Extraction

^۱ Trace

^۲ Identification-Confirmation Capability

^۳ Non-Targeted

(ASE)^۴ نیز گفته می‌شود که برپایه استخراج تحت شرایط دمای بالا بین ۵۰ تا ۲۰۰°C و فشار ۳۰۰ تا ۵۰۰ psi در مدت زمان کوتاه ۵ تا ۱۰ دقیقه است. کار با این سیستم و بهینه‌سازی آن دشوار است و ضعف دیگر روش، استفاده از حلال‌های آلی آب‌گریز است. حضور درصد بالای آب در نمونه به دلیل مانع شدن آب از تماس حلال و آنالیت بازده را کاهش می‌دهد (Mezcua *et al.*, 2007). امروزه روشی نوین با نام کچرز^۵ برای آماده‌سازی نمونه از بافت‌های پیچیده معرفی شده است که دارای ویژگی‌هایی از جمله عمومی بودن می‌باشد. به این معنا که اندازه‌گیری هم‌زمان ترکیبات با خواص فیزیکی و شیمیایی متفاوت را دربر می‌گیرد. این روش می‌تواند گاهی ۱۵۰ ترکیب را هم‌زمان آنالیز کند و به دلیل کاهش در هزینه‌ها مورد توجه آزمایشگاه‌های تجزیه قرار گرفته است (Jiao *et al.*, 2016).

در این مطالعه حشره‌کش اسپروترامات و مهم‌ترین متابولیت آن که فرم انولی حشره‌کش اولیه است با استفاده از دستگاه HPLC آنالیز شده است. این مطالعه در بافت پیچیده پسته انجام شده و بهینه‌سازی روش استخراج به منظور دستیابی به بهترین شرایط بازیابی با حفظ تکرارپذیری با کاهش هزینه‌های استخراج مورد بررسی قرار گرفته است. برای تایید نتایج از دستگاه LC-MS/MS و نمونه‌های واقعی استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

مواد:

استانداردهای اسپروترامات و اسپروترامات-انول از شرکت سیگما خریداری شد. محلول‌های استاندارد اولیه با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در استونیتریل خالص تهیه گردید. نمک‌های مورد نیاز برای استخراج به روش کچرز، شامل سدیم کلرید، منیزیم سولفات بدون آب،

سموم از روغن زیتون بدون نیاز به جداسازی مایع-مایع با استفاده از کروماتوگرافی نفوذ ژلی وجود دارد اما برای افزایش طول عمر ستون‌ها و سیستم کروماتوگرافی یک جداسازی مایع-مایع پیش از کروماتوگرافی نفوذ ژلی توصیه می‌شود. استخراج با استفاده از حلال فوق بحرانی (SFE) دیگر روش مورد استفاده در استخراج از بافت‌های چرب است که با وجود گزینش‌پذیری و اتوماسیون علاقه به آن به علت قیمت بالا و بستگی زیاد شرایط استخراج به نمونه، زمان مصرف و فرآیند پیچیده بهینه‌سازی این روش برای استفاده‌های روزمره مورد علاقه نیست (Borges *et al.*, 2008). جداسازی با استفاده از حلال، احتمالاً مهم‌ترین استراتژی مورد استفاده برای آماده‌سازی نمونه در بافت چرب است. همگن کردن نمونه در یک هموژنایزر به همراه حلال، با سرعت بالا باعث خرد شدن و استخراج بهتر آنالیت می‌شود. این فناوری استخراج فاز مایع (LPE)^۱ یا استخراج جامد مایع (LSE)^۲ نام دارد. امروزه روش‌های استخراج عمومی معرفی برپایه استونیتریل، اتیل استات یا استن وجود دارد که برای استخراج ترکیبات قطبی و غیرقطبی کارایی دارند که به طور معمول سریع و مقرون به صرفه هستند. مهم‌ترین حسن این روش، سادگی و کارایی آن است که به حلال بستگی دارد. استفاده از حجم زیاد حلال، و عدم توانایی برای خودکار شدن از مشکلات این روش است (Bogialli *et al.*, 2003).

استخراج به کمک امواج مایکروویو برای آنالیزهای روزمره بسیار مناسب است و کاهش قابل توجهی در زمان، مصرف حلال و افزایش توان عملیاتی نمونه ایجاد می‌کند (Fuentes *et al.*, 2009). یک روش استخراج خودکار شده نسبتاً جدید، استخراج با استفاده از مایع تحت فشار^۳ است که به آن استخراج حلال تسریع شده

¹Liquid Phase Extraction

²Liquid Solid Extraction

³Pressurized Liquid Extraction

⁴Accelerated Solvent Extraction

⁵QuEChERS

استونیتریل، از دقیقه ۵ تا ۳۰، درصد استونیتریل به ۱۰۰ رسید و از دقیقه ۳۰ تا ۳۵ مجدداً به ۱۰٪ اولیه بازگشت.

نتایج

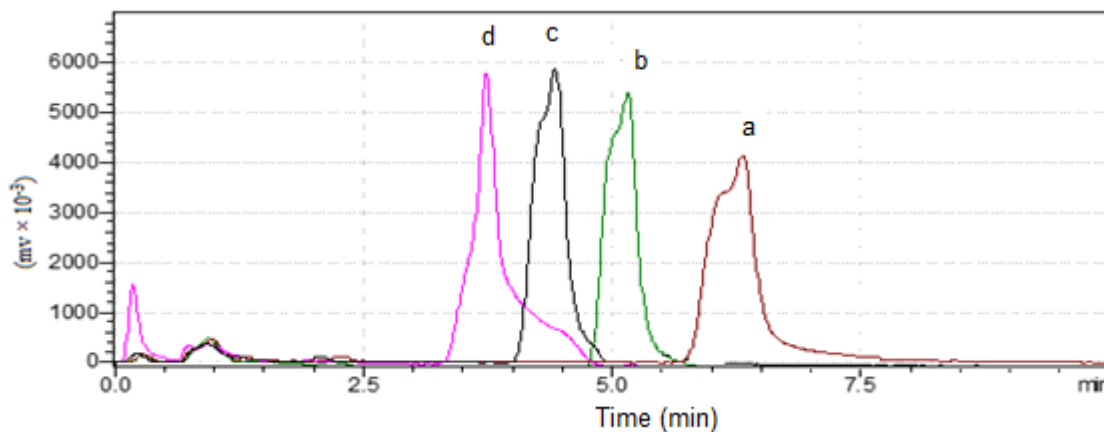
بهینه‌سازی شرایط دستگاه HPLC: تعیین نوع و درصد فاز متحرک

بر اساس مطالعات انجام شده، استونیتریل و آب به عنوان فاز متحرک انتخاب شدند. در ابتدا آنالیز اسپیروترامات به تنهایی مورد ارزیابی قرار گرفت و با تغییر درصدهای ۶۰، ۵۵، ۵۰ و ۴۵ از استونیتریل بالاترین شدت و بهترین شکل پیک شناسایی شد. مطابق شکل (۲) مشخص شد با افزایش درصد استونیتریل در فاز متحرک زمان بازداری کم می‌شود ولی شدت پیک‌ها افزایش می‌یابد. برای پی‌بردن به محل پیک اسپیروترامات-انول، استانداردهای اسپیروترامات و اسپیروترامات-انول (هر دو با غلظت ۵/۰ میلی‌گرم بر لیتر) با یکدیگر مخلوط شدند و کروماتوگرام‌ها با نسبت متفاوت در دو فاز متحرک با درصدهای ۵۵ و ۵۰ استونیتریل بررسی شدند. شکل (۳) نشان می‌دهد که در نسبت آب/ استونیتریل ۴۵ : ۵۵ پیک متابولیت اسپیروترامات-انول از پیک مربوط به فاز متحرک به طور کامل جداسازی نمی‌شود. همان‌طور که در شکل (۴) ملاحظه می‌شود در نسبت ۵۰ : ۵۰ آب/ استونیتریل جداسازی اسپیروترامات-انول از فاز متحرک به طور کامل انجام شده است. بنابراین درصد ۵۰ : ۵۰ از آب و استونیتریل به عنوان فاز متحرک بهینه انتخاب شد.

سدیم استات و پلی آمین ثانویه (PSA) از شرکت Agilent آمریکا سفارش داده شدند. سایر حلال‌های مورد نیاز برای آنالیز دستگاهی از درجه HPLC و یا LC/MS بودند. آب فوق خالص مورد نیاز با استفاده از دستگاه آب خالص‌ساز با هدایت کمتر از $0.05 \mu\text{s/cm}$ بصورت تازه و روزانه تهیه می‌شد.

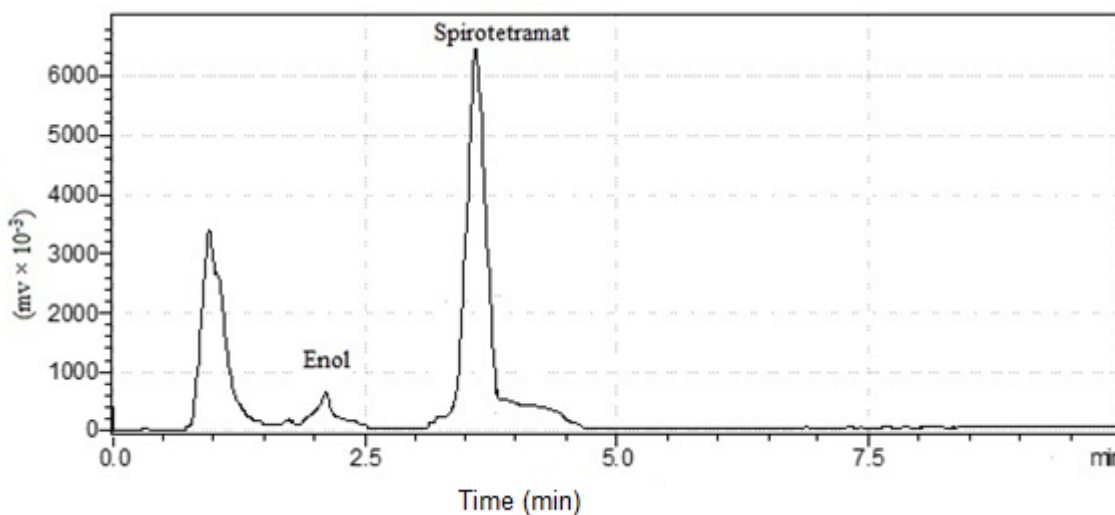
تجهیزات:

برای بهینه‌سازی روش استخراج فرایند بهبود روش با استفاده از دستگاه HPLC سری 10A ساخت شرکت Shimadzu ژاپن انجام شد. از ستون SB-C18, Zorbax Eclipse (mm) $250 \times 3.0 \times 5$ که در محفظه مجهز به ترموستات، در دمای 25°C ثابت تنظیم شده بود، استفاده شد و از آشکارساز UV از سری SPD-10 AV استفاده شد فاز متحرک با نسبت ۷۰:۳۰ از استونیتریل: آب تحت شرایط ایزوکراتیک استفاده شد. به منظور تایید نهایی روش و استفاده از روش استخراج بهینه شده در آنالیز نمونه‌های حقیقی، از دستگاه LC-MS از کمپانی Agilent مدل ۶۴۱۰ مجهز به آنالیزر triple quadrupole استفاده شد. جداسازی در LC مدل ۱۲۰۰ شرکت Agilent انجام شد. از ستون SB-C18, Zorbax Eclipse با مشخصات (mm) $50/0 \times 3.0$ و قطر ذرات فاز ساکن $1/8 \mu\text{m}$ که در محفظه مجهز به ترموستات، در دمای 25°C تنظیم شده بود، استفاده شد. برای جداسازی از فازهای متحرک استونیتریل و آب حاوی ۰/۱٪ فرمیک اسید استفاده شد که درصد فازهای آلی به طور خطی به این صورت تغییر می‌کرد: در ۵ دقیقه اول ۱۰٪



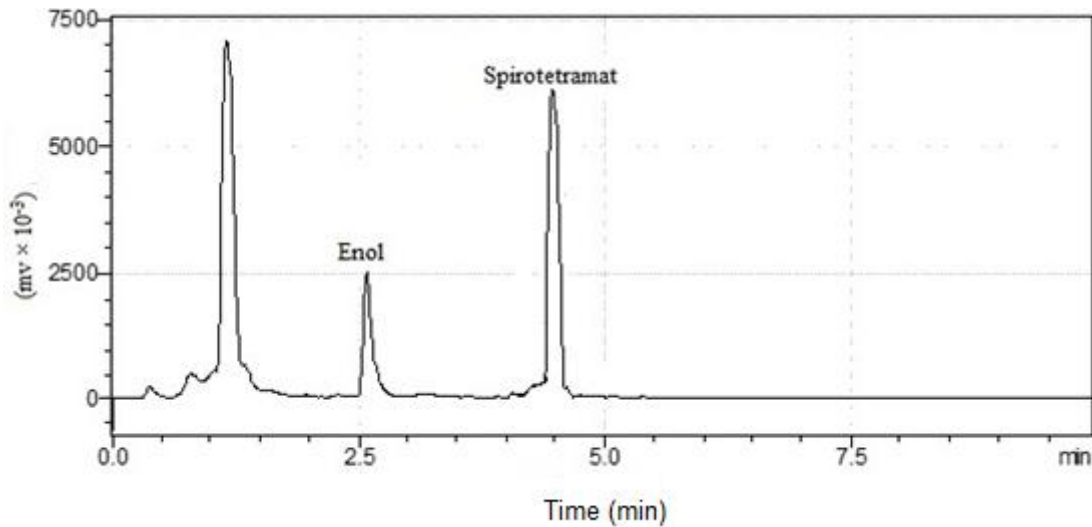
شکل ۲- کروماتوگرام‌های اسپیروتترامات با غلظت ۵/۰ mg/L در طول موج ۲۵۰nm و سرعت جریان ۱ mL/min در فاز متحرک با نسبت‌های متفاوت آب/ استونیتریل الف) ۴۰ : ۶۰، ب) ۴۵ : ۵۵، ج) ۵۰ : ۵۰، د) ۵۵ : ۴۵

Fig 2. Chromatograms of 5.0 mg/ L Spirotetramat at $\lambda=250$ nm and flow rate of 1 ml/min with different ratio of ACN/Water: a) 40:60, b) 45:55, c) 50:50 and d)55:45 v/v as mobile phase.



شکل ۳- کروماتوگرام اسپیروتترامات و اسپیروتترامات-انول با غلظت ۵/۰ mg/L در فاز متحرک آب/ استونیتریل با نسبت ۵۵ : ۴۵ در طول موج ۲۵۰nm و سرعت جریان ۱ mL/min

Fig 3. Chromatogram of 5.0 mg/ L Spirotetramat and spirotetramat-enol at $\lambda=250$ nm and flow rate of 1 ml/min in 55:45 v/v ratio of ACN/Water as mobile phase.



شکل ۴- کروماتوگرام ثبت شده اسپیروتترامات و اسپیروتترامات-انول با غلظت ۵/۰ mg/L در فاز متحرک آب/ استونیتریل با نسبت ۵۰ : ۵۰ در طول موج ۲۵۰ nm و سرعت جریان ۱ mL/min

Fig 4. Chromatogram of 5.0 mg/ L Spirotetramat and spirotetramat-enol at $\lambda=250$ nm and flow rate of 1 ml/min in 50:50 v/v ratio of ACN/Water as mobile phase.

نمونه توزین و به فالکن ۵۰ میلی لیتری منتقل گردید و به نمونه ۱/۰ میلی لیتر آفت کش اسپیروتترامات با غلظت ۱/۰ mg/L افزوده شد. پس از هم زدن ۱ ساعت زمان داده شد تا آفت کش به داخل بافت پسته نفوذ کند. سپس مقادیر مختلفی از آب مقطر اضافه و ۲۰ دقیقه زمان داده شد تا آب به درون بافت نمونه نفوذ کند. در ادامه ۳/۵ میلی لیتر استونیتریل افزوده و به مدت ۲۰ ثانیه به شدت با دست هم زده شد. ۱/۴ گرم منیزیم سولفات به همراه ۰/۳۵ گرم سدیم کلرید توزین و به فالکن حاوی نمونه افزوده شد. نمونه به مدت ۳۰ ثانیه با دست و ۱ دقیقه توسط ورتکس با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه هم زده شد و به مدت ۳ دقیقه با دور ۳۴۵۰ عمل سانتریفیوژ انجام گردید. سپس نمونه به مدت ۱۲ ساعت در فریزر با دمای 20°C - گذاشته شد. پس از گذشت ۱۲ ساعت نمونه از فریزر خارج گردید. برای مرحله پاکسازی مقادیر ۰/۰۲۵ گرم C_{18} ، ۰/۱ گرم PSA، ۰/۰۲ گرم GCB و ۰/۰۷ گرم منیزیم سولفات بدون آب به درون فالکن ۱۵ میلی لیتری ریخته شد. سپس ۲/۵ میلی لیتر از فاز آلی رویی، حاوی

بهینه سازی روش استخراج کچرز

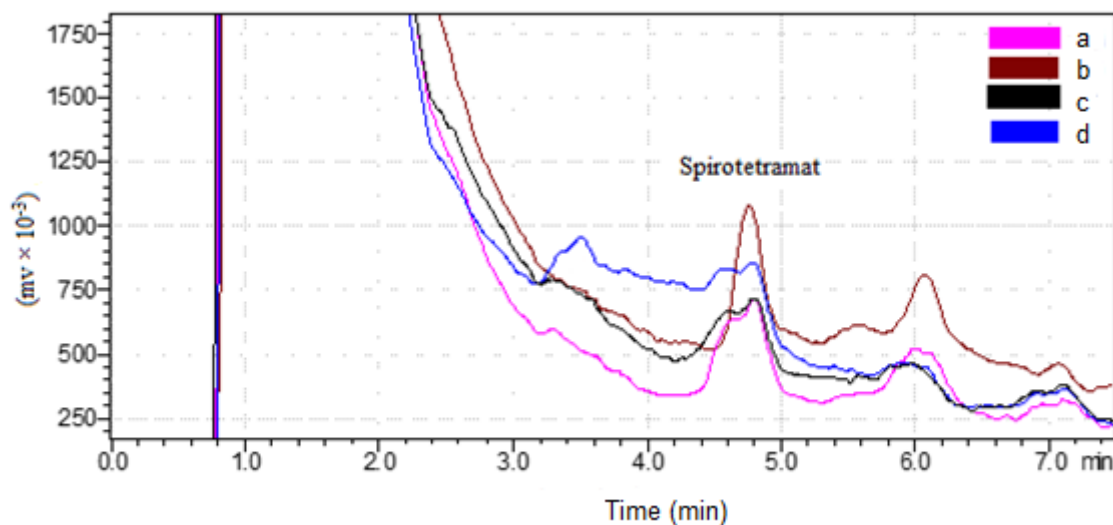
از آنجایی که کاهش مقدار نمونه باعث کاهش مصرف حلال ها، نمک ها و جاذب های مورد استفاده در مراحل استخراج و پاکسازی و در نتیجه کاهش هزینه می شود، با توجه به امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی مقدار ۳/۵ گرم نمونه برای انجام مراحل استخراج و پاکسازی و اندازه گیری با HPLC انتخاب گردید. میزان حلال، نمک ها و جاذب های مورد نیاز با حفظ نسبت ها در روش اصلی کچرز انتخاب و مورد بهینه سازی قرار گرفت.

بهینه سازی مقدار آب

افزودن آب به بافت پسته موجب نفوذ بهتر حلال آلی قابل امتزاج به بافت نمونه و استخراج بیشتر آنالیت می شود و با بهینه سازی نسبت نمونه به مقدار آب افزوده شده می توان درصد بازیابی را بهبود بخشید. به ازای ۳/۵ گرم نمونه مقادیر ۰، ۱/۵، ۳/۵ و ۵/۰ میلی لیتر آب به نمونه ها اضافه و مراحل استخراج و پاکسازی انجام شد. روش به کار برده به این صورت است که ابتدا ۳/۵ گرم

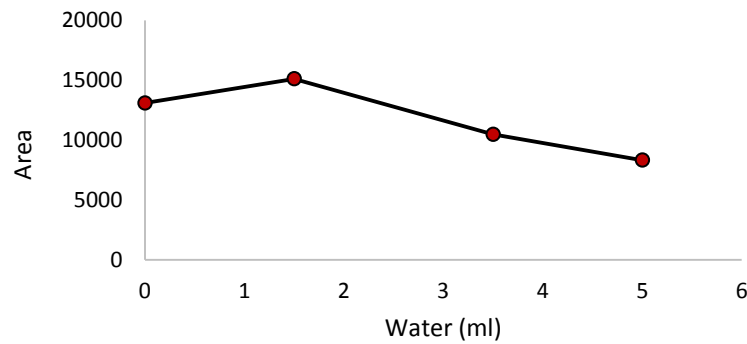
نتایج شکل‌های (۵) و (۶) نشان داد که با افزایش ۱/۵ میلی‌لیتر آب به بافت نمونه سطح زیر پیک اسپیروتترامات در کروماتوگرام حاصل کمی افزایش می‌یابد. از آنجایی که افزایش آب به نمونه جامد پسته باعث نفوذ بیشتر حلال آلی (استونیتریل) به بافت نمونه می‌شود و ایجاد یک محیط همگن می‌کند، آزمایش‌های بعدی در حضور ۱/۵ میلی‌لیتر آب انجام گرفت. تأثیر حضور آب بر تشکیل سیستم ۴ فازي که منجر به جداسازی کامل فازهای درگیر می‌شود در شکل (۷) نشان داده شده است.

آنالیت استخراج شده در مرحله قبل به فالکن ۱۵ میلی‌لیتری اضافه گردید. فالکن ۱۵ میلی‌لیتری به مدت یک دقیقه توسط ورتکس با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه هم‌زده و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۳۴۵۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ یک محلول دو فازي تشکیل شد که از فاز رویی شفاف، ۱/۵ میلی‌لیتر برداشته و از فیلتر سرسرنگی PTFA با اندازه حفرات ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده و به ویال منتقل گردید. ویال درون دستگاه گرمکن خلاء به مدت ۱۰۰ دقیقه در دمای ۳۸°C قرار داده شد. پس از تبخیر کامل حلال، ۲۵۰ میکرولیتر استونیتریل به آن اضافه و به دستگاه HPLC تزریق شد.

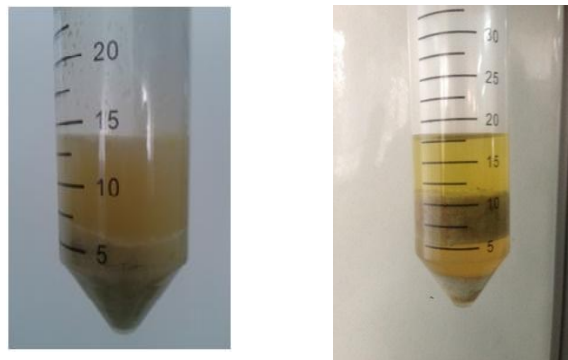


شکل ۵- کروماتوگرام‌های مربوط به استخراج اسپیروتترامات با روش اصلی کچرز از نمونه پسته (الف) صفر ب) ۱/۵ ج) ۳/۵ د) ۵/۰ میلی‌لیتر آب در مرحله استخراج.

Fig 5. Chromatograms of spirotetramat extracted with original QuEChERS method from pistachio with different amount of water a) 0, b) 1.5, c) 3.5 and d) 5 ml in extraction procedure.



شکل ۶- تاثیر مقدار آب بر سیگنال اسپروتترامات استخراج شده از بافت پسته غنی شده با غلظت ۱/۰ mg/L
Fig 6. Effect of water amount on the signal of spirotetramate extracted from 1.0 ml/L enriched pistachio.



شکل ۷- تاثیر حضور آب بر ایجاد ساختار چهار فازی در مرحله استخراج (شکل سمت راست در حضور آب و شکل سمت چپ بدون آب)
Fig 7. Effect of water addition on obtaining the 4-phase system at extraction step (right: with water left: without water).

PSA برای حذف ترکیباتی مانند رنگ‌های قطبی، اسیدهای چرب، اسیدهای آلی و قندها به کار می‌رود. GCB برای حذف رنگدانه‌ها و ترکیبات استرولی استفاده می‌شود. C₁₈ نیز موجب حذف ترکیبات غیر قطبی مثل لپیدها، استرول‌ها، کلروفیل‌ها و کارتنوئیدها می‌شود. با توجه به مطالعات قبلی، تغییر میزان MgSO₄ اثر چندانی بر استخراج ندارد ولی اضافه کردن بیش از حد آن موجب کلوخه شدن نمونه می‌شود و هم‌زدن را با مشکل مواجه می‌کند. علاوه بر این با قراردادن نمونه در دمای C ۲۰°- چربی‌ها به راحتی جدا می‌شوند و میزان C₁₈ مورد

بهبودسازی جاذب‌های مرحله پاکسازی

آزمایش‌های استخراج نشان داد که امکان حذف مرحله پاکسازی بر روی بافت‌های پسته وجود ندارد، زیرا فاز آلی حاصل از مرحله اول بسیار کدر، غیرشفاف و دارای ناخالصی زیادی می‌باشد که همین امر موجب می‌شود عصاره حاصل شده، قابلیت تزریق به دستگاه HPLC را نداشته باشد. بدین منظور چهار جاذب PSA، GCB، C₁₈ و MgSO₄ در این مرحله به کار گرفته شد. نقش منیزیم سولفات در این مرحله جذب آب اضافی موجود در لایه استونیتریل و افزایش بازیابی می‌باشد.

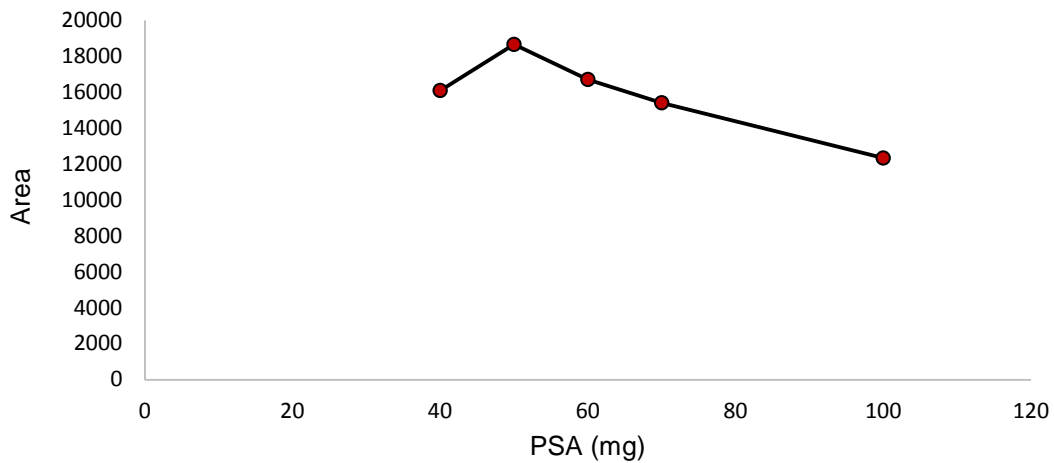
مرحله پاکسازی مقدار ۰/۰۲۵ گرم C₁₈، مقدار ۰/۰۷ گرم منیزیم سولفات بدون آب و مقادیر مختلفی از PSA و نیز مقادیر مختلفی از GCB مطابق جدول (۱) به فالکن‌های ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر فاز آلی رویی، حاوی آنالیت از مرحله استخراج به هریک از فالکن‌ها اضافه گردید. فالکن‌های ۱۵ میلی‌لیتری به مدت یک دقیقه توسط ورتکس با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه هم‌زده و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۳۴۵۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، یک محلول دو فازی تشکیل شد. از فاز رویی شفاف، ۱/۵ میلی‌لیتر با سرنگ برداشته و پس از عبور از فیلتر سرسرنگی PTFE با اندازه حفرات ۰/۴۵ میکرومتر به ویال منتقل گردید. ویال درون دستگاه گرم‌کن خلاء به مدت ۱۰۰ دقیقه در دمای ۳۸°C قرار داده شد. پس از تبخیر کامل حلال، ۲۵۰ میکرولیتر استونیتریل به آن اضافه و به دستگاه HPLC تزریق گردید. مطابق شکل‌های (۱۶) و (۱۷) بالاترین سیگنال مربوط به مقدار ۰/۰۵ mg جاذب PSA و ۰/۰۳ mg GCB می‌باشد. بنابراین مقدار ۰/۰۵ mg از PSA و ۰/۰۳ mg از GCB برای آزمایش‌های بعدی انتخاب گردید.

نیاز تا حد چشم‌گیری کاهش می‌یابد. بنابراین با توجه به مطالعات قبلی در به‌کارگیری روش کچرز، مقدار منیزیم سولفات بدون آب و C₁₈ به ترتیب ۰/۰۷ و ۰/۰۲۵ گرم انتخاب شدند. در این مطالعه دو جاذب PSA و GCB بهینه شدند. روش به‌کار برده شده به این صورت است که، ابتدا ۳/۵ گرم نمونه توزین و به فالکن ۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردید و به نمونه، ۱/۰ میلی‌لیتر آفت‌کش اسپروترامات با غلظت ۱/۰ mg/L اضافه گردید و پس از هم‌زدن ۱ ساعت زمان داده شد تا آفت‌کش به داخل بافت نفوذ کند. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و ۲۰ دقیقه زمان داده شد تا آب به درون بافت نمونه نفوذ کند. در ادامه ۳/۵ میلی‌لیتر استونیتریل افزوده و به مدت ۲۰ ثانیه به‌شدت با دست هم‌زده شد. ۱/۴ گرم منیزیم سولفات به همراه ۰/۳۵ گرم سدیم کلرید توزین و به فالکن حاوی نمونه افزوده شد. نمونه به مدت ۲۰ ثانیه با دست و ۱ دقیقه توسط ورتکس با سرعت ۱۰۰۰ دور بر دقیقه هم‌زده و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۳۴۵۰ دور بر دقیقه عمل سانتریفیوژ انجام گردید. نمونه سپس به مدت ۱۲ ساعت در فریزر با دمای ۲۰°C- گذاشته شد. پس از گذشت ۱۲ ساعت نمونه از فریزر خارج گردید. برای

جدول ۱- مقادیر مختلف دو جاذب PSA و GCB جهت بهینه‌سازی در مرحله پاکسازی

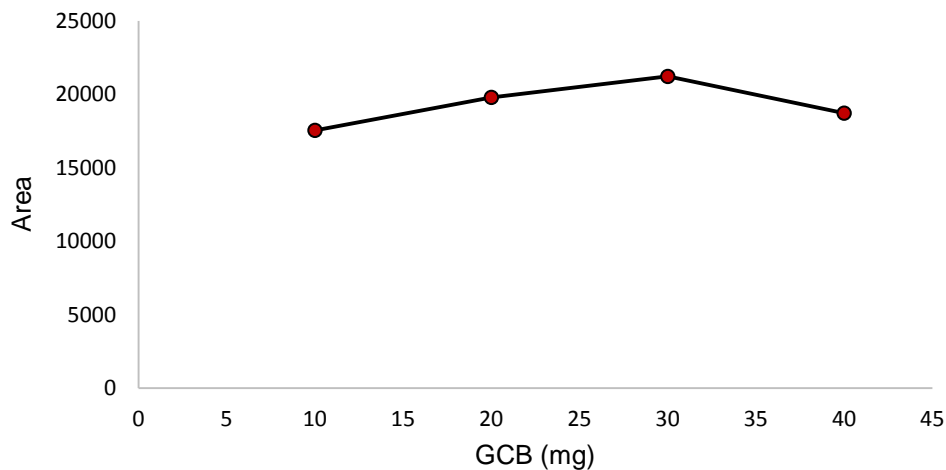
Table 1. Different amount of PSA and GCB used for optimization during clean-up.

Test Number	PSA (mg)	GCB (mg)	MgSO ₄ (mg)	C18 (mg)
1	40	20	70	25
2	50	20	70	25
3	60	20	70	25
4	70	20	70	25
5	100	20	70	25
6	50	10	70	25
7	50	20	70	25
8	50	30	70	25
9	50	40	70	25



شکل ۸- تأثیر میزان جاذب PSA بر سیگنال اسپیروتترامات استخراج شده از بافت غنی شده با غلظت ۱/۰ mg/L

Fig 8. Effect of PSA on the signal of spirotetramat extracted from 1.0 ml/L enriched pistachio.



شکل ۹- تأثیر میزان جاذب GCB بر میزان سیگنال اسپیروتترامات استخراج شده از بافت پسته غنی شده با غلظت ۱/۰ mg/L

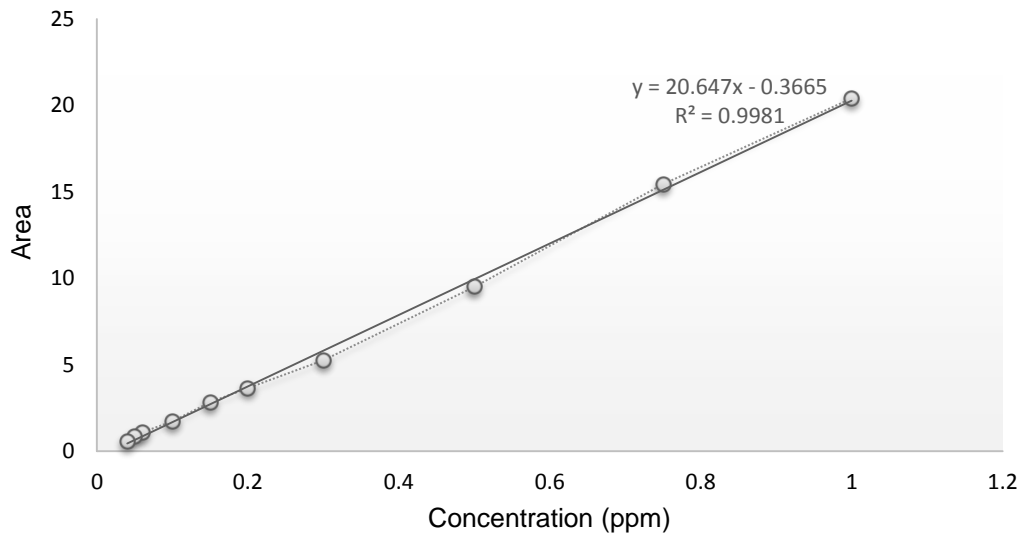
Fig. 9. Effect of GCB on the signal of spirotetramat extracted from 1.0 ml/L enriched pistachio.

رسم منحنی درجه بندی مستقیم

رسم منحنی درجه بندی مستقیم برای اسپیروتترامات و اسپیروتترامات-انول در هفت نقطه انجام گرفت. مطابق شکل (۱۰) و (۱۱) و پس از تزریق محلول‌های استاندارد، مساحت سطح زیر هر پیک ثبت و با روش حداقل مربعات بهترین خط رسم شد.

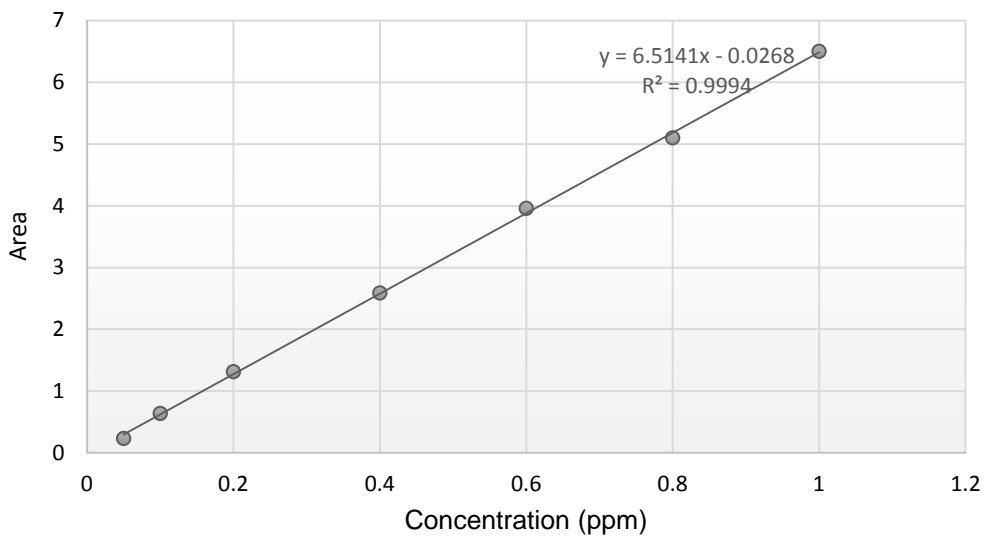
اعتبارسنجی روش

رسم منحنی درجه بندی (کالیبراسیون) برای محاسبات کمی و بررسی اثرات بافت لازم می‌باشد بدین منظور در محیط حلال و بافت این اثر بررسی شد. در تمامی این منحنی‌ها محلول‌های استاندارد آفت کش‌ها، در دامنه غلظتی ۰/۰۴۰ تا ۱/۰ میلی گرم بر لیتر به دستگاه HPLC تزریق شد.



شکل ۱۰- منحنی درجه بندی مستقیم اسپیروترا مات

Fig 10. Spiroteramat calibration curve in solvent



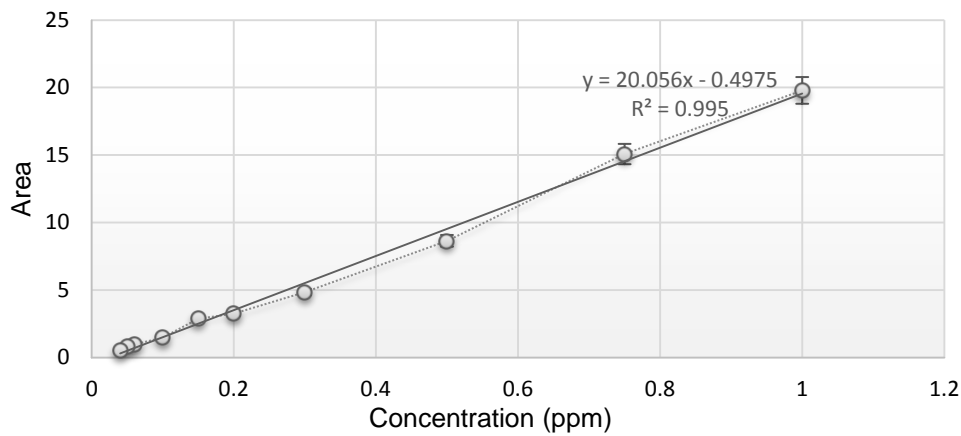
شکل ۱۱- منحنی درجه بندی مستقیم اسپیروترا مات-انول

Fig 11. Spiroteramat-enol calibration curve in solvent.

رسم منحنی درجه‌بندی همسان‌سازی بافتی

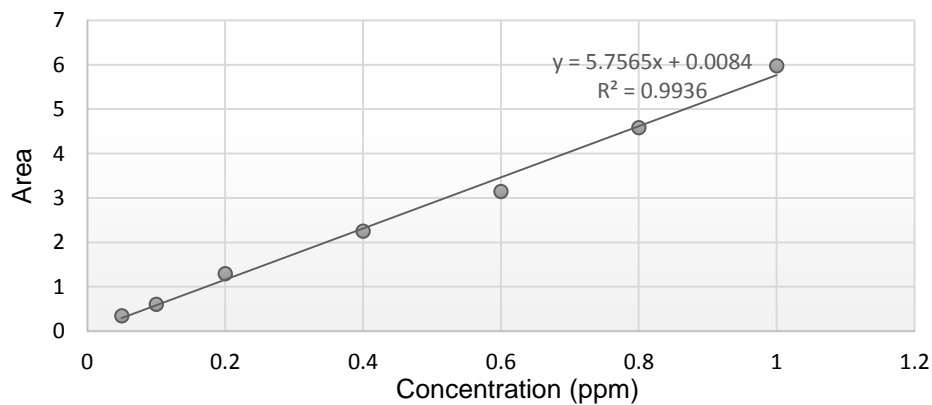
برای رسم منحنی درجه‌بندی همسان‌سازی بافتی، ابتدا تمامی مراحل روش کچرز بهینه شده روی ده نمونه انجام شد. پس از به دست آمدن عصاره استخراجی آفت‌کش اسپیروتترامات استاندارد با غلظت‌های مختلف ۰/۰۴۰، ۰/۰۵۰، ۰/۰۳۰، ۰/۰۲۰، ۰/۰۱۵، ۰/۰۱۰، ۰/۰۰۶۰، ۰/۰۰۵۰ و ۱/۰ میلی‌گرم بر لیتر ساخته و هرکدام سه مرتبه به

دستگاه HPLC تزریق شدند. منحنی درجه‌بندی در شکل (۱۲) مشخصات بهترین خط رسم شده نشان داده شده است. همین روند برای متابولیت اسپیروتترامات-انول بررسی شد. منحنی درجه‌بندی همسان‌سازی بافتی برای اسپیروتترامات-انول در شکل (۱۳) نشان داده شده است.



شکل ۱۲- منحنی درجه‌بندی همسان‌سازی بافتی برای اسپیروتترامات.

Fig 12. Matrix match calibration curve for spirotetramat.



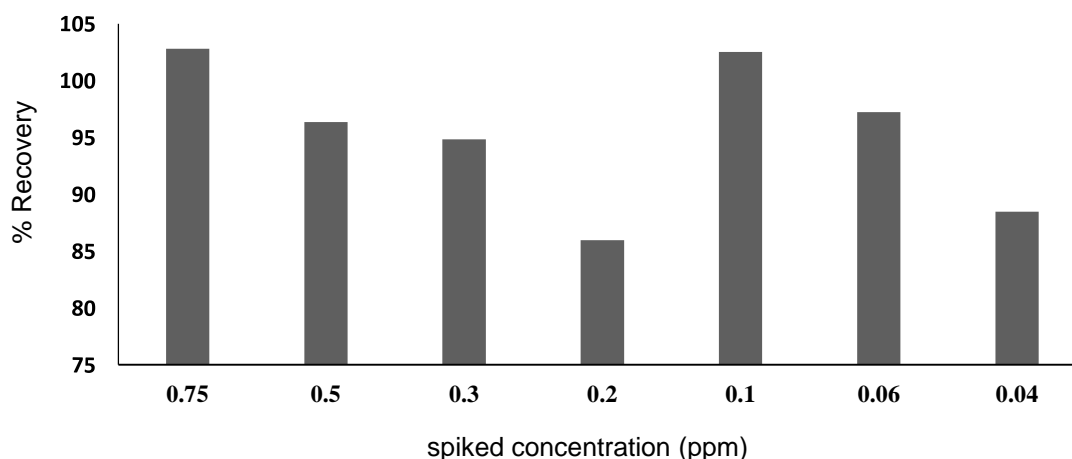
شکل ۱۳- منحنی درجه‌بندی همسان‌سازی بافتی برای اسپیروتترامات-انول.

Fig 13. Matrix match calibration curve for spirotetramat-enol.

بررسی رابطه غلظت و بازیابی

دستگاه تزریق و کروماتوگرامها ثبت شدند. مقادیر بدست آمده برای بازیابی در شکل (۱۴) نشان داده شد.

برای پی بردن به مقادیر بازیابی، ابتدا غلظت‌های مذکور به نمونه‌های پسته افزوده شد. سپس مراحل استخراج و پاکسازی بر روی نمونه‌ها انجام گرفت و به



شکل ۱۴- رابطه درصد بازیابی با غلظت.

Fig 14. Relationship of % recovery and concentration.

گرفته می‌شود که برای این آنالیت 0.04 mg/L بدست آمد.

آنالیز اسپیروترامات و فرم انولی آن با دستگاه LC-MS/MS

ابتدا با تزریق مستقیم 1 ppm از استاندارد اسپیروترامات و فرم انولی آن به MS یا اصطلاحاً Infuse کردن شرایط بهینه برای تشخیص این دو آفت کش را در دستگاه پیدا می‌کنیم یا اصطلاحاً دستگاه را برای تشخیص این دو آنالیت کالیبره می‌کنیم. بدین ترتیب که برای تأمین حداکثر حساسیت دستگاه بهترین ولتاژ قطعه قطعه کردن یون مادر و بهترین انرژی برخورد برای یون های تولیدی از یون‌های مادر هر یک از آنالیت‌ها بدست می‌آیند این مقادیر برای حداکثر پاسخ دستگاه نسبت به این دو آنالیت بهینه می‌شوند. اطلاعات مربوط به این دو آنالیت در جدول شماره ۲ آمده است.

ارقام شایستگی

جهت به‌دست آوردن حد تشخیص^۱ (LOD) و حد کمی^۲ (LOQ) روش، نمونه هم‌سان‌سازی بافتی را تا حد ممکن رقیق کردیم، تا مقداری که پیک حاصل از آنالیت اسپیروترامات از نویز قابل شناسایی نبود و کمترین مقدار قابل شناسایی برای این آفت کش 0.013 میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. برای محاسبه‌ی حد کمی روش از استاندارد سانکو (SANCO) استفاده می‌شود که مقدار حد کمی با روش استفاده شده برای آنالیت‌های مدنظر برابر با 0.040 میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد و این در شرایطی بود که مقادیر RSD کمتر از 7% بود. طبق استاندارد سانکو کمترین سطح غلظتی غنی‌سازی که در محدوده بازیابی 70 تا 120 درصد قرار گیرد و RSD کمتر از 20 درصد را رعایت کنند به عنوان LOQ در نظر

مولکولی و یون های کیفی و کمی و همچنین نسبت شدت این دو یون به یکدیگر عملیات شناسایی انجام گرفت. برای افزایش دقت و حساسیت دستگاه از حالت Multiple Reaction Monitoring (MRM) استفاده شد.

در مرحله بعد با تزریق استاندارد ۱ ppm به دستگاه LC-MS/MS زمان بازداری برای این دو آنالیت مشخص شد. مرحله بعد تزریق مخلوط این دو سم با لحاظ کردن اثرات ماتریس پسته بود تا تأثیر بافت بر سطح زیر پیک و زمان بازداری نیز در نظر گرفته شود. با تزریق نمونه های پسته به دستگاه با توجه به پارامترهایی نظیر زمان بازداری، جرم

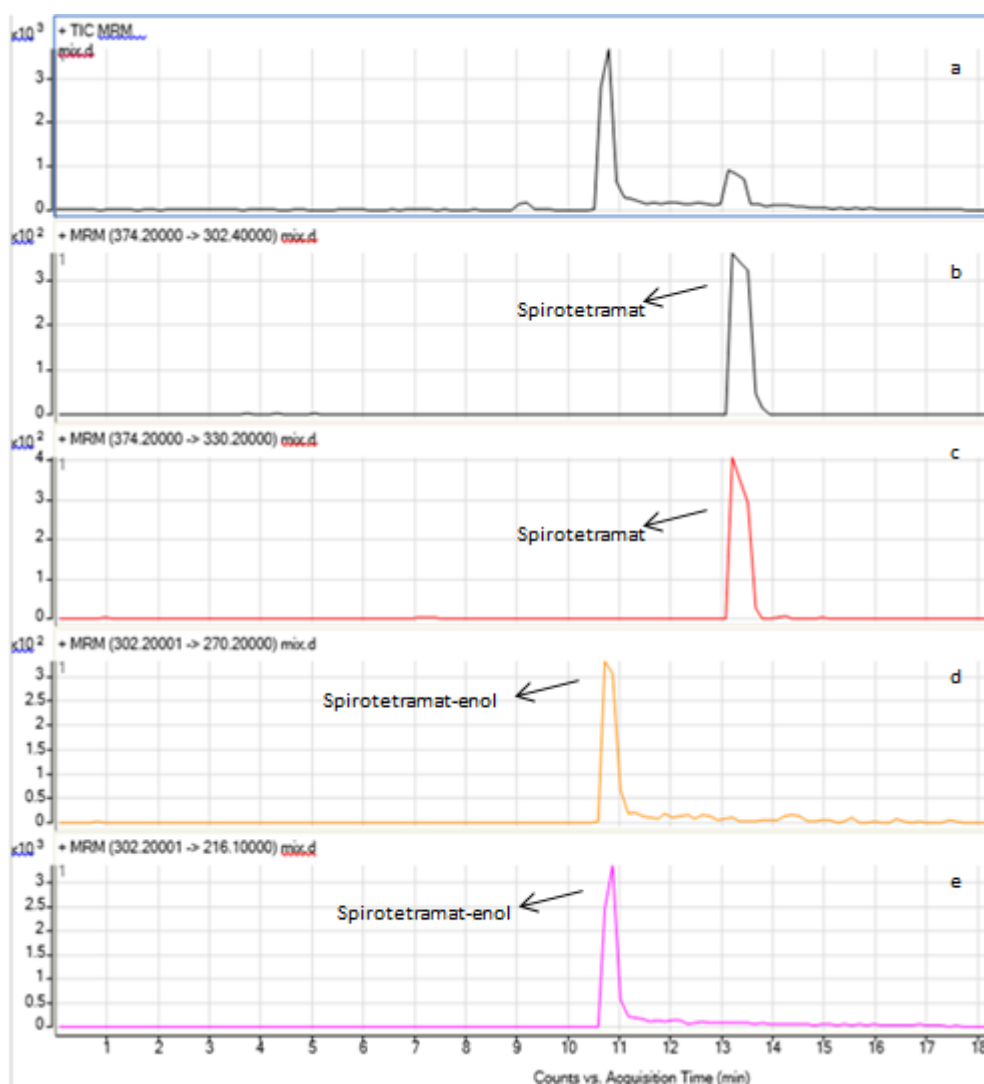
جدول ۲- شرایط بهینه به دست آمده برای داشتن حداکثر حساسیت نسبت به اسپیروتترامات و متابولیت آن.

Table 2. Optimized parameters for maximum intensity of spirotetramat and its metabolite.

Molecular formula	Quantification ion (m/z) (collision energy)	Qualification ion (m/z) (collision energy)	Parent ion [M+H] ⁺ (fragmentation voltage)	Retention time (min)	Compound
C ₂₁ H ₂₇ NO ₅	302.2 (20)	330.2 (10)	374.2 (190)	13.5	spirotetramat
C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	216.1 (20)	270.2 (15)	302.2 (150)	10.9	Spirotetramat-enol

دستگاه را چندین برابر در شناسایی و تشخیص محصولات تخریب شده از ماده اولیه، افزایش می دهد. LC-MS/MS برای آنالیز مستقیم اسپیروتترامات و محصولات جانبی آن بسیار توانمند است، چرا که این ترکیب فشار بخار کافی ندارد.

روش های کروماتوگرافی متعارف برای اندازه گیری و شناسایی اسپیروتترامات شامل روش های کروماتوگرافی مایع می باشد. با توجه به اطلاعات ساختاری که LC-MS/MS می دهد، برای تشخیص آنالیت اصلی و متابولیت ها بسیار کارا و مؤثر است. این فناوری به روش های مختلفی شکست ها را دنبال می کند که توانایی



شکل ۱۵- الف) کروماتوگرام کل یونها، ب) یون کمی سازی، پ) یون تاییدی یا کیفی اسپیروتترامات و ت) یون کیفی و ث) کمی سازی اسپیروتترامات-انول در ماتریس پسته.

Fig. 15. a) total ion chromatogram, b) quantification ion, c) qualification or confirmation ion of spirotetramat and d) quantification ion and e) qualification or confirmation ion of spirotetramat-enol

واقعی احتمالاً مربوط به پسته‌های کشت شده در سال جاری یا حداکثر سال گذشته است که مقدار مصرف اسپیروتترامات به علت مقاوم شدن پسیل پسته در برابر این حشره کش محدودتر شده است.

بحث

با توجه به ورود آفت کش‌های جدید، آنالیز این آفت کش‌ها نیز حائز اهمیت می‌باشد. آنالیز هم‌زمان این

آنالیز نمونه‌های حقیقی

به منظور بررسی کارایی روش پیشنهادی، اندازه‌گیری باقی‌مانده آفت کش‌های مورد مطالعه در ۵ نمونه پسته که بصورت کاملاً تصادفی از سوپرمارکت‌های بزرگ سطح شهر تهران خریداری شده بود، انجام شد. لازم به ذکر است در هیچ‌یک از نمونه‌ها باقی‌مانده سموم مورد بررسی مشاهده نشد که نتایج با دستگاه LC-MS/MS تایید شد؛ یکی از دلایل می‌تواند این باشد که نمونه‌های

در این مطالعه تلاش شد تا در روش کچرز از طریق بهینه‌سازی نسبت آب و استونیتریل در مرحله اول و مقدار جاذب‌های مورد استفاده در مرحله پاک‌سازی، بازیابی در محدوده قابل قبول استاندارد سانکو به دست آید. این امر از طریق حذف هر یک از نمک‌ها به صورت جداگانه و سپس انتخاب مقداری که در آن بهترین پاک‌سازی بدست آمد، صورت گرفت. این مرحله با حذف جاذب‌های C_{18} و GCB بیش از ۶۰٪ در هزینه‌های استخراج کاهش صورت گرفت. این مسئله گام با ارزشی در کاربردی کردن این روش و استفاده از آن در آزمایشگاه‌های کنترل کیفیت مواد غذایی می‌باشد. با توجه به نتایج بدست آمده با توجه به وجود ماتریس پیچیده و بسیار شلوغ پسته که ناشی از چربی زیاد و هم استخراج‌های فراوان آن است، روش آنالیز HPLC با استفاده از آشکارساز عمومی مانند آشکارساز UV برای اندازه‌گیری اسپیروترامات و متابولیت انولی آن، که بسیار شبیه به آنالیت اولیه است با موفقیت انجام شد.

آفت‌کش‌ها به همراه آفت‌کش‌های قدیمی توسط دستگاه‌های قدرتمندی مانند LC-MS و یا GC-MS به راحتی صورت می‌گیرد ولی با دستگاه HPLC همراه با آشکارساز UV کمی دشوار به نظر می‌رسد. از آنجایی که HPLC بسیار عمومی‌تر و ارزان‌تر است، اهمیت این اندازه‌گیری‌ها بیشتر می‌شود. با توجه به مشکلات اقتصادی کشور و افزایش قیمت تمام شده استخراج، بهینه‌سازی مقادیر لازم برای استخراج یا پیدا کردن جایگزین مناسب برای آن‌ها می‌تواند به ارزان‌تر شدن هرچه بیشتر روش کمک کند. در بررسی بافت‌های چرب از چهار روش عمومی برای استخراج سموم استفاده می‌شود که این روش‌ها شامل فناوری‌های براساس جاذب، کروماتوگرافی نفوذ زلی، استخراج حلال فوق بحرانی و استخراج بر پایه حلال و روش‌های پاک‌سازی است که بیشتر روش‌ها براساس آخرین روش بنا شده‌اند. تاکنون بهینه‌سازی روشی مانند کچرز برای بافت چرب پسته بدین صورت انجام نگرفته است.

References:

- Aga, D. S. and E. M. Thurman. 2001.** Formation and Transport of the Sulfonic Acid Metabolites of Alachlor and Metolachlor in Soil. *Environmental Science & Technology*. 35(12): 2455–60.
- Antignac, J-Ph., Bizec, B. L., Monteau, F. and Andre, F. 2003.** Validation of Analytical Methods Based on Mass Spectrometric Detection According to the '2002/657/EC' European Decision: Guideline and Application. *Analytica Chimica Acta*. 483(1–2): 325–334.
- Belfroid, C., Drunen, M., Van, Beek, M., Schrap, S. M., Gestel, C. M. and VanHattum, B. Van. 1998.** Relative Risks of Transformation Products for Aquatic Ecosystems. *The Science of the total environment*. 222: 167–83.
- Berton, T., Mayhoub F., Chardon K., Duca R., Corneliu L., Francois B. and Véronique T. 2014.** Development of an Analytical Strategy Based on LC-MS/MS for the Measurement of Different Classes of Pesticides and Theirs Metabolites in Meconium: Application and Characterisation of Foetal Exposure in France. *Environmental Research*. 132: 311–20.
- Bogialli, S. Curini, R., Di Corcia A., Nazzari, M. and Samperi, R. 2003.** A Liquid Chromatography– Mass Spectrometry Assay for Analyzing Sulfonamide Antibacterials in Cattle and Fish Muscle Tissues. *Analytical chemistry*. 75(8): 1798–1804.
- Borges, J. H., Ravelo-Pérez, L., Hernández S., Estrella, M. C., Aurelio, R. D. and Miguel Á. 2008.** Determination of Abamectin Residues in Avocados by Microwave-Assisted Extraction and HPLC with

Fluorescence Detection. *Chromatographia*. 67(1–2): 69–75.

- Cunha, S. C., Fernandes, J. O. and Oliveira, M. B. P. P. 2009.** Fast Analysis of Multiple Pesticide Residues in Apple Juice Using Dispersive Liquid–liquid Microextraction and Multidimensional Gas Chromatography–mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1216(51): 8835–44.
- Dagnac, T., Jeannot, R., Mouvet, C. and Baran, N. 2002.** Determination of Oxanilic and Sulfonic Acid Metabolites of Acetochlor in Soils by Liquid Chromatography–electrospray Ionisation Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 957(1): 69–77.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).** [Accessed on: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/thematic-areas/contaminants/e>.].
- Fuentes, E., Báez, M. E. and Díaz, J. 2009.** Microwave-Assisted Extraction at Atmospheric Pressure Coupled to Different Clean-up Methods for the Determination of Organophosphorus Pesticides in Olive and Avocado Oil. *Journal of Chromatography A*. 1216(51): 8859–66.
- Hernández, F., Ibáñez, M., Pozo, O. J. and Sancho, J. V. 2008.** Investigating the Presence of Pesticide Transformation Products in Water by Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry with Different Mass Analyzers. *Journal of mass spectrometry: JMS*. 43(2): 173–184.
- Weiting, J., Xiao, Y., Qian, X., Tong, M., Hu, Y., Hou, R. and Hua, R. 2016.** Optimized Combination of Dilution and Refined QuEChERS to Overcome Matrix Effects of Six Types of Tea for Determination Eight Neonicotinoid Insecticides by Ultra Performance Liquid Chromatography–electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Food chemistry* 210: 26–34.
- Karavelas, A. J., Plakas, K. V., Solomou, E. S., Drossou, V. and Sarigiannis, D. A. 2009.** Impact of European Legislation on Marketed Pesticides--a View from the Standpoint of Health Impact Assessment Studies. *Environment international*. 35(7): 1096–1107.
- Kay Iain R. and Grant A. 2010.** Evaluation of Existing and New Insecticides Including Spirotetramat and Pyridalyl to Control *Frankliniella Occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) on Peppers in Queensland. *Australian Journal of Entomology*. 49(2): 175–81.
- Lambropoulou D., Dimitra, A., Ioannis., Konstantinou, K. and Triantafyllos, A. 2007.** Recent Developments in Headspace Microextraction Techniques for the Analysis of Environmental Contaminants in Different Matrices. *Journal of chromatography A*. 1152(1–2): 70–96.
- Li, S., Liu, X., Dong, F., Xu, J., Xu, H., Hu, M. and Zheng, Y. 2016.** Chemometric-Assisted QuEChERS Extraction Method for the Residual Analysis of Thiacloprid, Spirotetramat and Spirotetramat's Four Metabolites in Pepper: Application of Their Dissipation Patterns. *Food Chemistry*. 192: 893–99.
- Martínez-Domínguez, G., Patricia, P-B., Roberto, R-G. and Garrido Frenich, A. 2014.** Multiresidue Method for the Fast Determination of Pesticides in Nutraceutical Products (*Camellia Sinensis*) by GC Coupled to Triple Quadrupole MS. *Journal of Separation Science*. 37(6): 665–74.
- Martínez Vidal, J. L., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R. and Garrido Frenich, A. 2009.** Determination of Pesticide Transformation Products: A Review of Extraction and Detection Methods. *Journal of Chromatography A*. 1216(40): 6767–88.
- Mezcua, M., Repetti, M. R., Agüera, A., Ferrer, C., García-Reyes, J. F. and Fernández-Alba, A. R. 2007.** Determination of Pesticides in Milk-Based Infant Formulas by Pressurized Liquid Extraction Followed by Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 389(6): 1833–40.
- Mohapatra, S., Deepa, M., Lekha, S., Nethravathi, B. Radhika, B. and Gourishanker, S. 2012.** Residue Dynamics of Spirotetramat and Imidacloprid in/on Mango and Soil. *Bulletin of Environmental*

Contamination and Toxicology. 89(4): 862–67.

Singh, B., Mandal, K., Sahoo, S. K., Bhardwaj, U. and Battu, R. S. 2013. Development and Validation of an HPLC Method for Determination of Spirotetramat and Spirotetramat Cis Enol in Various Vegetables and Soil. *Journal of AOAC International*. 96(3): 670–75.

Zhu, Y. and Mandal, K. 2013. Simultaneous Determination of Spirotetramat and Its Four Metabolites in Fruits and Vegetables Using a Modified Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Method and Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1299: 71–77.

Simultaneous Determination of Spirotetramate and its Main Metabolite in Pistachio Using an Optimized QuEChERS Method and High Performance Liquid Chromatography

Mahdavi, V.*¹, Gholami, R.² and Masdarolomoor, F.³

1. Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. 2. Faculty of Chemistry, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran.

Received: Sep, 24, 2018

Accepted: Oct, 2, 2019

Abstract

Iran is the in the first rank for pistachio production in the world. Considering the strategic importance and facilitating the export of this product, evaluation and determination of pesticide residues to ensure the safety of the product, based on the optimized and validated methods is very important. Spirotetramate is one of the newest and widely used pesticides in most of the pistachio gardens to control *Agonoscena pistaciae*. In order to extract this insecticide from the pistachio matrix, the optimized QuEChERS method was used. In order to save costs, all the stages of optimization of the method were performed using high performance liquid chromatography with UV detector (HPLC-UV). The optimization resulted in removal of expensive compounds like C18 and GCB, which in turn resulted in a reduction of at least 60% of the cost of extraction. All validation steps were carried out using blank pistachio samples. The samples were artificially contaminated in the laboratory with different concentrations of the insecticide. In order to confirm the final optimized method to use this method for real samples, HPLC with mass detector (LC-MS / MS) was used. At optimized conditions calibration curve of matrix effect for spirotetramate shows a good linearity in the range of 0.04- 0.10 mg/Kg (r^2 of 0.995) and RSD less than 7% with the extraction recovery ranged from 85 to 100.3%. In addition, the matrix matched calibration curve for spirotetramate-enol in the above concentration range was found to have a correlation coefficient of 0.9936. The limit of quantification of the analytes was calculated to be 0.04 mg/Kg according to the SANCO guidelines, which is within the acceptable range with respect to the MRL of pistachio which is 0.05 mg/Kg.

Keywords: spirotetramate, spirotetramate-enol, pistachio, High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

* **Corresponding author:** Vahideh Mahdavi, Email: vahideh.mahdavi@yahoo.com