

اندازه گیری بعضی از آفت کشهای آلی کلردار در آب رودخانه کارون توسط یک روش جدید از کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا

دکتر احمد زند مقدم^{*}، دکتر هیبت ا... کلانتری^{**}
دکتر هوشنگ محمد پور^{***}، دکتر نعمت ا... جعفرزاده^{****}

خلاصه:

آفت کشهای آلی کلردار دسته مهمی از ترکیبات آلی کلردار را تشکیل می دهند که از آغاز قرن بیستم به منظورهای مختلف بکار رفته اند. پایداری شیمیایی و حلالیت بالا در چربی، بهمراه مصارف گوناگون و دراز مدت آنها، باعث تجمع این سموم در محیط زیست و همچنین ورود به چرخه مواد غذایی شده است. علیرغم اعلام ممنوعیت مصرف این سموم توسط سازمان بهداشت جهانی و سازمانهای ذیربط در ایران، به نظر میرسد که برخی از این سموم هنوز در ایران مصرف می شوند هدف از این تحقیق شناسائی و تعیین مقدار سموم ذکر شده در آب رودخانه کارون با استفاده از یک روش جدید از کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا می باشد. وجود بقایای سموم در آب رودخانه کارون می تواند بیانگر حضور این سموم در بدن موجودات زنده در منطقه باشد.

این تحقیق در سال ۷۸-۱۳۷۷ با نمونه گیری از آب ۱۶ ایستگاه در طول رودخانه کارون و نیز آب لوله کشی شهر اهواز در دو فصل پائیز و زمستان انجام گردید. استخراج سموم از نمونه ها توسط هگزان نرمال به روش مایع-مایع و خالص سازی آنها از طریق کروماتوگرافی ستونی با فلورسیل صورت گرفت. شناسائی و تعیین مقدار هر یک از سموم توسط یک روش جدید فاز معکوس کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (HPLC)^۱ انجام شد.

ستون مورد استفاده از نوع Spherisorb ODS به ابعاد 25×0.46 سانتیمتر و اندازه ذره ای ۵ میکرون بود. فاز متحرک یک سیستم حلال سه جزئی شامل استونیتریل، متانول، آب، به ترتیب به نسبت ۴:۴۰:۱۶ طی تجربیات متعدد بدست آمد و از شویس ایزوکراتیک به میزان ۰/۷ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. آشکارسازی در طول موج ۲۱۸ نانومتر با دکتور ماوراء بنفش انجام گردید. این روش بنحو مقتضی مورد ارزیابی قرار گرفت که مشروح آن در متن مقاله آمده است.

نتایج حاصل نشان دادند که میزان سموم مورد مطالعه (مشتقات DDT^۲، دیلدترین و آلدترین) در آب لوله کشی اهواز بسیار ناچیز و در سطح رودخانه کارون در حدود ۰/۱۳ تا ۹/۲ میکروگرم در لیتر می باشد.

واژه های کلیدی: آفت کشهای آلی کلردار، رودخانه کارون، HPLC

^{*} استاد گروه تغذیه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز

^{**} دانشیار گروه سم شناسی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز

^{***} دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز

^{****} استادیار دانشکده بهداشت، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اهواز

1 - High Performance Liquid Chromatography

2 - 1,1-bis (p-Chlorophenyl) - 2, 2, 2 - Trichloroethane

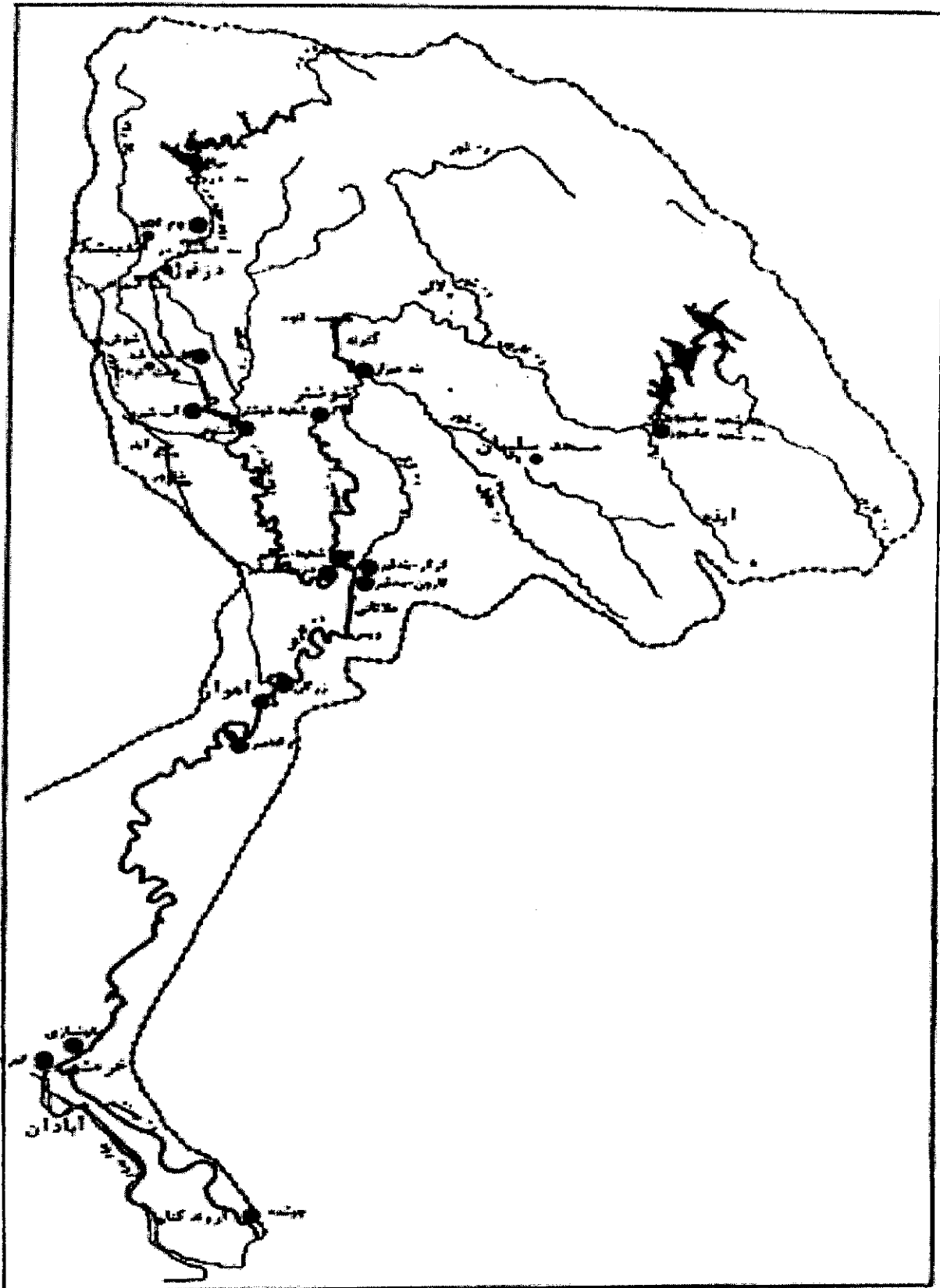
مقدمه:

مسأله محافظت محیط زیست از مواد آلاینده شیمیایی امروزه بسیار مورد توجه می‌باشد. در مدتی که از مصرف سموم شیمیایی برای مبارزه با آفات و حشرات می‌گذرد، این مواد به اندازه‌ای در سراسر طبیعت پخش شده‌اند که کمتر جانی را میتوان یافت که اثری از آنها نباشد. در اکثر رودخانه‌ها، جریان آبهای زیرزمینی، خاک، بدن ماهیها، حیوانات اهلی و وحشی، جنین و شیر در انسان و دام و غیره این ترکیبات ردیابی شده‌اند (۱). علت این امر رشد ناگهانی صنایع تولید کننده سموم و مکانیزه شدن کشاورزی در سطح جهانی بوده است. در این میان سموم آلی کلردار بیشتر از بقیه مورد توجه قرار گرفته‌اند زیرا در مقابل برخی عوامل نظیر حرارت، رطوبت، اشعه و تجزیه بیولوژیک بسیار مقاوم بوده و پس از ورود به چرخه مواد غذایی بعلت دارا بودن خاصیت چربی دوستی، در بدن موجودات زنده تجمع یافته و تغلیظ میشوند. بعنوان مثال در یک بررسی مشخص گردید موقعی که غلظت سموم آلی کلردار در آب دریاچه ای $1/5 \text{ppm}^2$ باشد، در پلانکتونهای موجود در دریاچه به 50ppm و در بدن ماهیهای موجود در دریاچه به $30-40 \text{ppm}$ و در بافت چربی بدن پرندگان ماهیخوار به 1600ppm میرسد (۳۰۲). علیرغم اعلام ممنوعیت مصرف این سموم توسط سازمان بهداشت جهانی و سازمانهای ذیربط در ایران، به نظر میرسد که بعضی از این سموم هنوز در ایران مصرف میشوند. (بررسی های اساتید دانشکده

کشاورزی و کارشناسان در خوزستان که هنوز به چاپ نرسیده است) هدف از این تحقیق اندازه گیری سموم ذکر شده در آب رودخانه کارون می باشد. وجود بقایای این سموم در آب رودخانه کارون میتواند گویای حضور این سموم در بدن موجودات زنده استان خوزستان باشد.

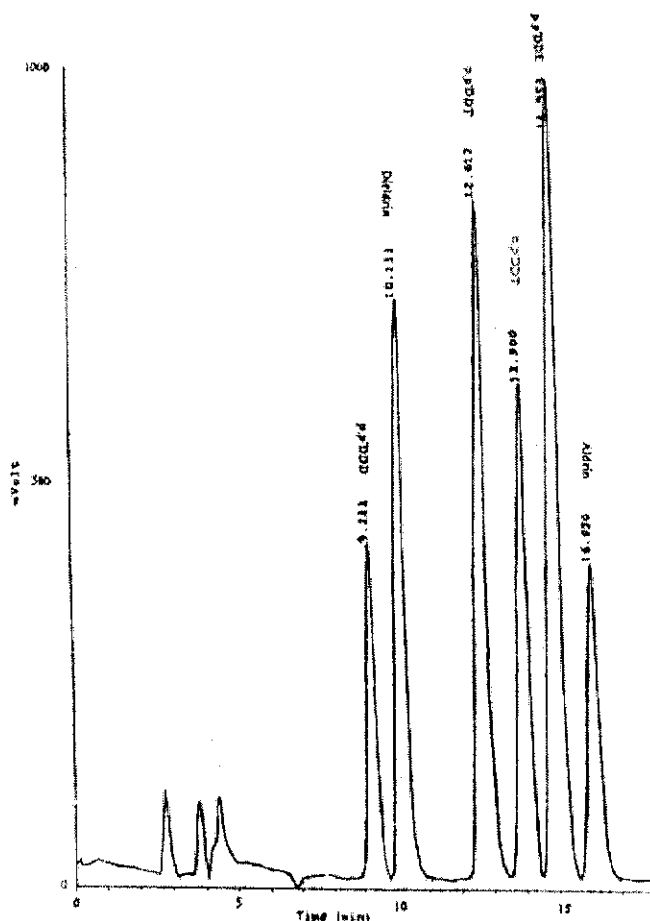
روش کار:

آنالیز آفت کشتهای آلی کلردار مبتنی بر چهار جزء نمونه برداری، استخراج، پاکسازی و شناسایی و تعیین مقدار می باشد. جهت نمونه برداری در طول رودخانه کارون و دز ۱۶ ایستگاه نمونه برداری انتخاب شد (شکل ۱). نمونه برداری از این ۱۶ ایستگاه در دو فصل پائیز و زمستان ۷۸-۱۳۷۷ بعمل آمد. همچنین از آب لوله کشی شهر اهواز نیز در فصول ذکر شده در هر فصل سه بار نمونه برداری گردید روش نمونه برداری براساس رفرانس و بوسیله دستگاه Van dorm انجام شد (۴). توسط این دستگاه نمونه‌های آب در هر عمقی از رودخانه که مورد نظر باشد برداشت می گردد. در هر ایستگاه از سه منطقه در عرض رودخانه کارون یکی در وسط و دو تا در طرفین عرض رودخانه نمونه برداری صورت گرفت. این سه نمونه با یکدیگر مخلوط گردیده و به عنوان یک نمونه آب از ایستگاه مربوطه مورد آنالیز واقع شد. نمونه های آب در ظروف تیره و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید همچنین جهت نگهداری نمونه های آب باید آنها را در محیط اسیدی (pH2-3) قرار داد (۵).



شکل ۱ - مسیر رودخانه کارون و ایستگاههای انتخاب شده جهت نمونه برداری آب (ایستگاهها با علامت

بازداری استاندارد سموم و در موارد مشکوک با عمل *spiking* (اضافه نمودن استاندارد سموم) انجام گردید. تعیین مقدار سموم از روی منحنی های استاندارد مربوطه انجام شد (۷). همچنین جهت ارزشیابی روش^۲ ارائه شده تکرار پذیری، میزان استحصال، حد آشکارسازی و تعیین مقدار اندازه گیری گردید.



شکل ۲- کروماتوگرام مربوط به مخلوط استاندارد سموم
جداسازی بعضی از سموم ارگانوکلره توسط ستون C18 به ابعاد ۲۵×۰/۴۶ سانتیمتر، حلال شامل استونیتریل، متانول، آب به نسبت ۱۶،۴۰:۴۴ و سرعت ثابت ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه، آشکارسازی در ۲۱۸ نانومتر

روش استخراج بکار رفته، استخراج مایع-مایع می‌باشد مقدار آب استفاده شده در این روش ۵۰۰ میلی لیتر بود و عمل استخراج بوسیله ۱۰۰ میلی لیتر هگزان در طی سه مرحله، در مرحله اول با ۵۰ میلی لیتر و در دو مرحله دیگر با ۲۵ میلی لیتر هگزان بر روی نمونه های آب که قبلاً NaCl به غلظت ۱۰٪ در آن حل شده بود، انجام شد لازم به ذکر است که عمل استخراج یکبار فقط با هگزان به تنهایی و بار دیگر با افزودن غلظت های ۱۰٪ و ۲۰٪ NaCl به آب قبل از استخراج با هگزان انجام شد و میزان استحصال سموم محاسبه گردید و با مقایسه نتایج بدست آمده روش بالا جهت استخراج پیشنهاد شد (۶ و ۸). پاکسازی بوسیله کروماتوگرافی ستون با فلورسیل انجام گردید. تشخیص و اندازه گیری با HPLC و به روش فاز معکوس^۱ انجام شد. شرایط کروماتوگرافی بدین صورت بود که : فاز متحرک شامل استونیتریل، متانول، آب به ترتیب با نسبت های ۴۴:۴۰:۱۶ بود. این نسبت ها با توجه به قطبیت حلالها و نوع ستون و همراه با تجربیات لازم بدست آمد و تحت این شرایط استاندارد سموم بطور کامل تا حد رسیدن به خط زمینه از یکدیگر جدا شده و هیچ همپوشانی نداشتند (شکل ۲).

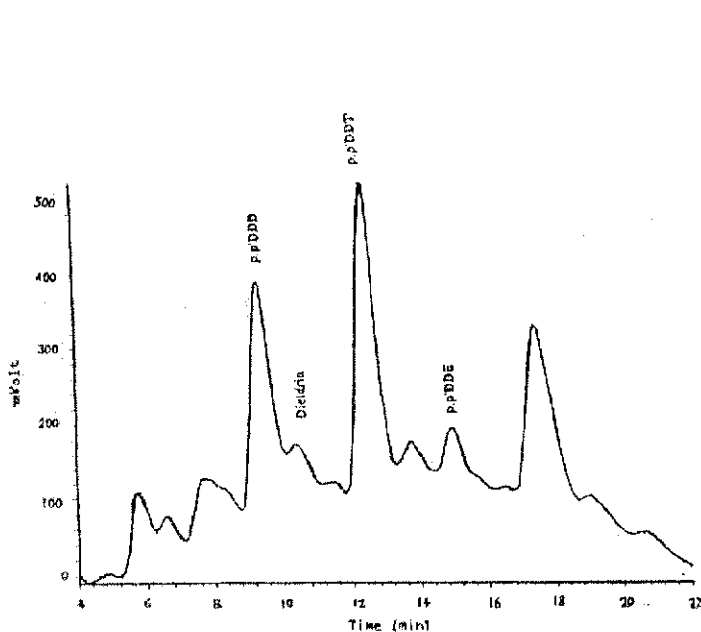
ستون مورد استفاده Spherisorb ODS به ابعاد ۲۵×۰/۴۶ سانتیمتر و اندازه ذره ای ۵ میکرون بود آشکارسازی با دکتور UV و در طول موج ۲۱۸nm انجام شد. سرعت جریان فاز متحرک ۰/۷mL/min انتخاب گردید. شناسایی پیکهای نمونه با مقایسه زمانهای بازداری آنها با زمان

نتایج:

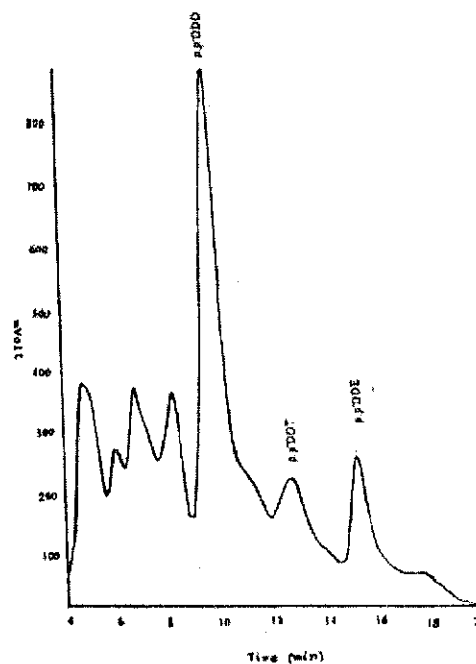
تحت شرایط کروماتوگرافی ذکر شده، کروماتوگرام مربوط به مخلوط استاندارد سموم و همچنین کروماتوگرام مربوط به دو ایستگاه نمونه برداری در شکل‌های ۲ و ۳ و نشان داده شده‌اند و همانطور که مشاهده میشود جداسازی پیک‌ها در حد مطلوب صورت گرفته است.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری مقادیر تکرارپذیری، صحت نتایج، حد آشکارسازی و تعیین مقدار و همچنین رابطه بین سطح پیک و مقدار هر سم در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج بدست آمده در مورد غلظت سموم در ۱۶ ایستگاه نمونه

برداری در طول رودخانه کارون و دز و در آب لوله کشی شهر اهواز در فصول پاییز و زمستان در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده‌اند. چنانچه در این جداول مشخص است غلظت سموم در ایستگاههای نمونه برداری در دو فصل پاییز و زمستان در محدوده ۹/۲-۱۳/۰ میکروگرم در لیتر بدست آمد و در آب لوله کشی شهر در فصل زمستان هیچکدام از سموم ذکر شده قابل اندازه‌گیری نبودند و در فصل پاییز تنها دو سم $pp'DDT$ و دیلدین با غلظت‌های در حد نانوگرم در لیتر اندازه‌گیری شدند.



(ب)



(الف)

شکل ۳- جداسازی بعضی از سموم ارگانوکلره توسط ستون C18 به ابعاد ۲۵×۰/۴۶ سانتیمتر، حلال شامل استونیتریل، متانول، آب به نسبت ۱۶،۴۰،۴۴ و سرعت ثابت ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه، آشکارسازی در ۲۱۸ نانومتر

الف: کروماتوگرام مربوط به مخلوط استاندارد سموم

ب: کروماتوگرام مربوط به آب ایستگاه چوئیده

جدول ۲- غلظت سموم یافت شده در ایستگاههای نمونه برداری و آب لوله کشی شهر در فصل پاییز

منطقه	ایستگاه	غلظت ($\mu\text{g/L}$)				
		pp'DDE	op'DDT	pp'DDT	دی‌دترین	pp'DDD
۱	سد شهید عباسپور	-	-	-	۰/۳۲	-
۱	بند میزان	-	۳/۴	۴/۵	۲/۳	-
۱	شطیط	۱/۹	۲/۴	-	۳/۱	۱/۲
۱	گرگر - بند قیر	-	-	-	-	۰/۶۷
۲	چم گلک	-	-	-	۰/۳۲	-
۲	قند دزفول	۰/۲۱	۱/۱	-	-	۲/۷
۲	آب شیرین	۳/۹	۱/۳	-	۴/۴	-
۲	مستوفی	۸/۴	۹/۲	-	-	۹/۱
۲	دز- بند قیر	-	۵/۴	۳/۶	۶/۱	۱/۵
۳	کارون بند قیر	۶/۴	-	۲/۳	-	۴/۵
۳	زرگان	-	۲/۳	۴/۵	۳/۴	-
۳	ام الطمیر	-	-	۲/۱	۹/۸	۳
۳	دارخوین	۰/۳۴	-	-	-	-
۳	صابون سازی	۳/۴	-	۲/۷	-	-
۳	گمرک خرمشهر	-	-	-	۳/۷	۲/۳
۳	چونبده	-	۲/۶	۴/۷	-	۴/۷
آب لوله کشی	-	-	-	-	۰/۰۰۳	۰/۰۰۱۲
آب لوله کشی	-	-	-	-	-	۰/۰۰۱۸
آب لوله کشی	-	-	-	-	۰/۰۰۵۴	۰/۰۰۱۵

جدول ۳- غلظت سموم یافت شده در ایستگاههای نمونه برداری و آب لوله کشی شهر در فصل زمستان

منطقه	ایستگاه	غلظت ($\mu\text{g/L}$)				
		pp'DDE	op'DDT	pp'DDT	دی‌دترین	pp'DDD
۱	سد شهید عباسپور	-	-	-	-	-
۱	بند میزان	۰/۳۱	-	-	۰/۰۱۳	۰/۰۱۵
۱	شطیط	۰/۱۲	-	-	۰/۳۲	-
۱	گرگر - بند قیر	-	-	۰/۰۲	۰/۰۲۳	-
۲	چم گلک	-	-	-	-	-
۲	قند دزفول	۰/۱۱	-	-	-	۰/۲۱
۲	آب شیرین	۰/۳۲	۰/۲۱	-	۰/۳۷	-
۲	مستوفی	۰/۴۳	۴/۷	۰/۲۴	-	-
۲	دز- بند قیر	-	-	-	-	۱/۵۷
۳	کارون بند قیر	-	۰/۳۵	۰/۱۱	-	-
۳	زرگان	۰/۵۱	-	-	۵/۵	۵/۶
۳	ام الطمیر	-	-	-	-	۰/۳۸
۳	دارخوین	-	-	-	-	۰/۱۱
۳	صابون سازی	-	-	۰/۶۷	۰/۱۵۳	-
۳	گمرک خرمشهر	۰/۹۹	-	-	۶/۲	۸/۴
۳	چونبده	۰/۱۹	-	۰/۳۹	-	-
آب لوله کشی	-	-	-	-	-	-
آب لوله کشی	-	-	-	-	-	-
آب لوله کشی	-	-	-	-	-	-

جدول (۱): نتایج حاصل از اندازه گیری مقادیر تکرارپذیری، صحت نتایج، حد آشکارسازی و تعیین مقدار و رابطه خطی بین سطح پیک و مقدار هر سم و ضریب همبستگی برای ارزیابی روش پیشنهادی HPLC

ضریب همبستگی (r)	رابطه خطی سطح پیک و مقدار سم	استحصالی (صحت نتایج)	حد اندازه گیری (g) X (۱۰)	حد آشکار ساری (g) X (۱۰)	ضریب تغییرات نتایج در روزهای مختلف (۵ روز) اندازه گیری (٪)	ضریب تغییرات نتایج بر یک روز (۵ اندازه گیری) اندازه گیری (٪)	مقدار سم تزریق شده (g) (۱۱)	نام سم
۰/۹۹۹	$Y = ۱۴/۹۷X + ۰/۵$	۸۴/۷	۳۲۰	۹۶	۶/۸۱	۰/۷۹	۱۴/۸	آلدترین
۰/۹۹۹	$Y = ۴۷/۹۳X + ۱/۵$	۹۱/۲	۱۲۳	۳۷	۵/۲۹	۲/۰۰	۱۷/۶	دیلدترین
۰/۹۹۸	$Y = ۱۶۵/۹۵X - ۷$	۹۰/۳	۱۱	۳/۳	۶/۵۸	۱/۰۲	۱۶/۴	pp'DDT
۰/۹۹۷	$Y = ۲۴۲/۹۵X + ۳/۵$	۸۲/۵	۴۷	۲۵۲	۶/۰۳	۱/۵۵	۲۷/۲	op'DDT
۰/۹۹۷	$Y = ۲۴۲/۹۵X + ۲/۵$	۹۳/۴	۱۷	۵/۱	۶/۱۷	۱/۵۶	۴	pp'DDE
۰/۹۹۷	$Y = ۷۵/۴X + ۰/۲$	۹۵/۲	۱۸	۵/۴	۹/۰۶	۰/۶۷	۴	pp'DDD

بحث:

نتایج حاصل از آنالیز نمونه های مختلف آب در طول رودخانه کارون که در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده اند نشان می‌دهد که برخی از سموم مورد نظر در بعضی از ایستگاهها در حد قابل توجه اندازه گیری شده اند. گرچه در آزمون آماری t-Student و در سطح $P < 0/05$ اختلاف معنی داری با حداکثر مقدار مجاز آنها (۱۰) نشان داده نشده است. سازمان بهداشت جهانی حداکثر میزان آلدربین، دیلدربین، ددت و مشتقات آنرا بترتیب $0/002$ ، $0/005$ - $0/001$ و $0/003$ میلی گرم در لیتر تعیین نموده است (۱۰).

پایداری این سموم و خطرات زیست محیطی ناشی از مصرف و تجمع آنها، لزوم نظارت و کنترل مراجع ذیصلاح را در این امر روشن می‌سازد.

References:

- 1- Newsome WH, Davies DJ. PCB, and organochlorine pesticides in Canadian human milk. *Chemosphere* 1995. 30; 2143-53.
- 2- Munsan PL. Principles of Pharmacology: Basic Concepts and Clinical Application, Chapman and Hall: New York. 1994: 1563-67.
- 3- Mitchell D, Erickson M. Analytical Chemistry of PCB, 2nd ed. CRC Press. New York 1997: 65-70, 122-200.
- 4- Krajca M. Water Sampling, John Willey, UK 1992: 378-80.
- 5- Hernandez F, Beltran J, Sancho JV. Study of multi-residue methods for the determination of selected pesticides in ground water. *Sci Total Environ* 1993, 132: 297-312.

همانطوریکه از عنوان مقاله میتوان استنباط نمود در این تحقیق دو نکته مد توجه بوده است که عبارتند از معرفی یک روش جدید برای اندازه گیری ترکیبات ذکر شده و میزان این سموم در آب رودخانه کارون. روش مرسوم در اندازه گیری سموم آلی کلردار، کروماتوگرافی گازی با دتکتوربایش الکترون (GC-ECD) میباشد که از حساسیت و دقت کافی برخوردار است. استفاده از HPLC بدلیل مزایای آن که شامل سهولت اجرا، زمان بری کمتر، هزینه کمتر و عدم نیاز به مشتق سازی و تخریب نمونه میباشد، این روش را مورد توجه بیشتر محققین قرار داده است.

در این مقاله یک روش HPLC نوع فاز معکوس برای اندازه گیری بعضی از سموم آلی کلردار در آب معرفی شده است که از لحاظ حساسیت با روش GC-ECD میتواند برابری کند. میلیادیس (۹) با استفاده از روش استخراج فاز جامد^۱ و روش GC-ECD حد اندازه گیری برای آلدربین را 1×10^{-9} g و برای دیلدربین 1×10^{-9} g به دست آورد که با مقادیر ذکر شده در جدول (۱) قابل مقایسه میباشد. از طرف دیگر زمان لازم برای بدست آوردن یک کروماتوگرام از مخلوط سموم مورد نظر حدوداً ۱۶ دقیقه می باشد (شکل ۲). که از نظر صرفه جوئی در وقت و همچنین حلالهای بکار رفته در آزمایشات روزمره بسیار مناسب است. در ارزیابی روش پیشنهادی همانطوریکه در جدول (۱) نشان داده شده است، این روش از صحت و دقت کافی برخوردار میباشد.

- 6- Williams S. Official Methods of Analysis (AOAC), Cltyed. Virginia, USA 1984: 1141.
- 7- Podowski AA, Feriz M, Mertens P. HPLC analysis of organochlorines with using UV and radio activity flow detectors. Bull Environ Contam Toxicol. 1984; 32: 301-2.
- 8- Mukherjec I, Gopal M. Review: Chromatographic techniques in the analysis of organochlorine pesticide residues. J chrom, 1996. 745: 33-42.
- 9- Miliadis GE. Determination of pesticide residues in natural water of Greece by solid phase extraction and gas chromatography. Bull Environ Contam Toxicol 1994. 52: 25-30.
- 10- World Health Organization, Aldrin & Dieldrin Health & Safety Guide WHO. Geneva. 1989: 34-39.