



جداسازی، شناسائی و اندازه‌گیری سموم فنیتروتیون و بوتاکلر در مرداب انزلی به روش GC/MS Ion Trap

• پرویز سلیمانی پژوهشگاه صنعت نفت، واحد آنالیز، بخش اسپکتروسکوپی ملکولی،
• غلامرضا امینی رنجبر، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال.

تاریخ دریافت: شهریور ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: اسفند ماه ۱۳۸۲

چکیده

ترکیبات فنیتروتیون ($C_9H_{12}NO_5PS$) و بوتاکلر ($C_{17}H_{26}ClNO_2$) به‌عنوان سموم علف کش و حشره‌کش به‌طور گسترده و وسیعی در کشاورزی (مناطق برنج‌کاری شمال ایران) استفاده می‌گردد. سه روش عمده استخراج یعنی استخراج مایع-مایع (دی‌کلرومتان)، استخراج میکرو-مایع-مایع و استخراج بکمک فاز جامد (C_{18}) جهت جداسازی این‌گونه ترکیبات از آبهای دریا استفاده و نتایج آنها مقایسه گردید. نمونه‌ها پس از مراحل استخراج به کمک دستگاه $GC/MS-EI$ ، $GC/MS-Cl$ و مشاهده یون انتخابی (SIM) اندازه‌گیری کیفی و کمی قرار گرفتند. حد تشخیص دستگاه GC/MS از نوع تله یونی به کمک مشاهده یون انتخابی ۱۲۵ فنیتروتیون، ۱۰PPb و برای بوتاکلر با یون ۱۷۶، ۱۵ PPb می‌باشد. انحراف استاندارد نسبی برای فنیتروتیون و بوتاکلر به ترتیب ۳/۵ و ۸/۵ درصد گزارش گردید (تعداد آزمایش ۵ می‌باشد). غلظت فنیتروتیون و بوتاکلر در شهریور ماه به مراتب بیشتر از ماه‌های بهمن و خرداد ماه می‌باشد.

کلمات کلیدی: فنیتروتیون، سموم، بوتاکلر، ترکیبات کلره، استخراج، GC/MS

Pajouhesh & Sazandegi No:65 pp: 8-15

GC/MS analysis of fenitrothion and butachlor in Anzali wetland water

By: P. Soleimani (Msc). Research Institute of Petroleum Industry Analytical Dept. Molecular Spectroscopy Lab Head, Tehran, Iran., Gh.R. Amini Ranjbar. Research Dept. Ministry of Agricultural Jihad, Tehran, Iran

Fenitrothion ($C_9H_{12}NO_5PS$) and butachlor ($C_{17}H_{26}ClNO_2$) are widely used in agricultural fields as pesticides. Liquid-liquid extraction (L.L.E) with dichloromethane, liquid liquid microextraction and C18 solid phase extraction (SPE) techniques are used for extractin of liquid samples. The samples are analyzed by $GC/MS-EI$, $GC/MS-Cl$ and selected ion monitoring (SIM) mode for quantitation. The limit of detection (LOD) is 10 ng/l with sim mode at m/z 125 fenitrothion and 15 ng/l at m/z 176 butachlor. The relative standard deviation for fenitrothion and butachlor is 3.5 and 8.5 % respectively (n=5). The concentration of fenitrothion and butachlor in September was higher compared to December and April 2001.

Keywords : Fenitrothion, Pesticide, Butachlor Extraction, GC/MS analysis

مقدمه

مرداب انزلی یکی از مهمترین مردابهای بین‌المللی در سطح جهان شناخته شده است. به علت تنوع زیستی و وجود انواع پرندگان و جانوران و همچنین سرازیر شدن تعداد زیادی از رودخانه‌ها و آلوده نمودن آن توسط سموم کشاورزی و فاضلاب کارخانجات، حفاظت، بررسی و کنترل کیفیت آب مرداب از وظایف مهم سازمان‌های ذیربط به‌شمار می‌آید. در این راستا آنالیز کیفی و کمی دو ترکیب مهم که در کشاورزی به‌عنوان سموم و علف‌کش به‌کار می‌روند صورت پذیرفت. شکل-۱ تالاب انزلی و مناطق نمونه برداری شده را نشان می‌دهد.

آنالیز آفت‌کش‌ها در ماتریس‌های مختلف آب، خاک و هوا به‌علت مسائل زیست‌محیطی یک وظیفه اولیه محسوب می‌شود. فشار بخار هوا، نحوه توزیع آنها و شرایط محیطی باعث شده که این گونه ترکیبات پایدار و مقاوم وارد محیط زیست و زنجیره غذایی انسان گردند (۱۶). روش‌های مختلفی برای جداسازی و شناسایی سموم و آفت‌کشها مورد استفاده و توسعه یافته‌اند. روش استخراج میکرو با فاز جامد (SPME) استخراج با فاز جامد (۱۶،۱۲،۱۱) استخراج مایع-مایع (۱۸،۷،۶) و استخراج میکرو مایع-مایع (۱۷) مشهورترین و کاربردی‌ترین روش‌های استخراج سموم و آفت‌کشها در ماتریس‌های آبی می‌باشند. بدیهی است که روش Trap و Purge (۴) و روش Static Headspace (۳) غالباً تکنیک‌هایی هستند که برای ترکیبات آلی فرار و نیمه فرار به‌کار می‌روند. برای تشخیص سموم ارگانوکلره و ارگانوفسفره دستگاه کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی مجهز به یونی‌زاسیون بمباران الکترونی و یونی‌زاسیون شیمیایی با ستون‌های با قدرت تفکیک بالا مورد استفاده قرار گرفته است (۱۵،۱۳،۱). روش‌های دیگر استخراج و تکنیک‌های آنالیزی نظیر استخراج با مافوق صوت (۲) و تکنیک طیف‌سنج جرمی دو قلو (MS/MS) (۹) نیز جهت جداسازی و شناسایی به‌کار گرفته شده است. هدف از این مقاله مقایسه روش استخراج مایع-مایع، استخراج میکرو مایع-مایع و استخراج به‌کمک فاز جامد و همچنین کارآئی دستگاه کروماتوگرافی گازی و طیف‌سنج جرمی برای جداسازی و شناسایی سموم ارگانو کلره و ارگانو فسفره مورد بحث قرار می‌دهد.

آزمایش**مواد و معرف‌ها**

مواد شیمیایی متانول، استون، نرمال هگزان و دی‌کلرو متان (۹۹٪) از شرکت شیمیایی آلد ریچ خریداری گردید. ترکیبات فنیترونیون و بوتاکلر به‌عنوان استاندارد در آزمایشگاه مورد استفاده قرار گرفتند. ستون فاز جامد (Bond Elut) از نوع C₁₈ از شرکت واریان خریداری گردید. گاز هلیوم با درجه خلوص ۹۹/۹۹٪ به‌عنوان گاز حامل از شرکت Air Product تهیه گردید.

نمونه برداری

سه ایستگاه به‌نام آب‌بندان (شرق تالاب)، پاشاگرو (مرکز تالاب) و آبکنار (شرق تالاب) جهت نمونه برداری انتخاب گردید. یک لیتر از هر

ایستگاه (یک لیتر از سطح آب، یک لیتر از وسط و یک لیتر از کف مرداب انزلی) مخلوط کرده و یک لیتر به‌عنوان نمونه آن ایستگاه در نظر گرفته می‌شود. لازم به ذکر است که نمونه بردار از نوع نسکین بوده و از سوی مرکز تحقیقات شیلات در اختیار گذاشته شد. برای تثبیت نمودن و جلوگیری از تخریب نمونه‌ها کافی است که چند میلی لیتر اسید کلریدریک به نمونه اضافه گردد.

بدیهی است که ظروف شیشه‌ای دودی برای نمونه برداری مناسب و توصیه می‌گردد. نمونه برداری در سه ماه خرداد، شهریور و بهمن صورت گرفت.

استخراج مایع-مایع

در این روش ۱۰۰۰ میلی لیتر نمونه آبی را با ۶۰ میلی لیتر دی‌کلرومتان به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شد. اضافه کردن نمک طعام به مقدار ۱۰ گرم باعث افزایش قطبیت و بهتر جداسازدن ترکیبات آلی می‌گردد. بعد از عمل استخراج نمونه استخراجی را به‌کمک جریان ملایم گاز نیتروژن تغلیظ نموده به‌طوری که حجم نمونه استخراج شده به ۵/۵ میلی لیتر برسد.

استخراج میکرو مایع-مایع

این روش نیز مشابه روش استخراج مایع-مایع می‌باشد. در این روش مقدار ۳۵ میلی لیتر از نمونه آبی را با ۲ میلی لیتر دی‌کلرومتان مخلوط نموده و به مدت ۳۰ دقیقه آنرا تکان می‌دهیم، سپس نمونه استخراج شده را نیز با جریان ملایم گاز نیتروژن تغلیظ نموده و حجم آن را به ۵/۵ میلی لیتر می‌رسانیم.

استخراج با فاز جامد

در ابتدا ستون‌های مخصوص فاز جامد (Bond Elut) را طبق دستورالعمل شرکت سازنده تعیین شرایط و بهینه نموده یعنی اینکه در ابتدا با یک حجم متانول و آب یون زدائی شده شستشو داده، سپس نمونه استخراج شده را روی ستون‌های (C₁₈) ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم (شرکت واریان شماره کاتالوگ ۲۰۰۱-۱۲۱۰ و ۲۰۲۸-۱۲۱۰) قرار داده می‌شود. سیستم خلاء آزمایشگاهی می‌تواند جهت سرعت بخشیدن به این عمل کمک کند. بعد از قرار دادن نمونه روی ستون با ۵/۲ میلی لیتر دی‌کلرومتان شستشو داده و ماده استخراج شده را نیز به‌کمک جریان ملایم گاز نیتروژن به حجم کمتر از ۱ میلی لیتر رسانده می‌شود. بعد از عمل استخراج، ستون مورد نظر را مجدداً با آب و متانول شستشو داده جهت مراحل بعدی آماده‌سازی می‌نمایند.

آنالیز مواد به‌کمک دستگاه GC/MS

نمونه‌ها پس از مراحل استخراج و تغلیظ شدن، با دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل ۳۴۰۰ شرکت واریان که متصل به دستگاه طیف‌سنج جرمی از نوع تله یونی مدل Saturn II بوده مورد آنالیز قرار گرفته‌اند. دستگاه طیف‌سنج جرمی با ماده شیمیایی پرفلوروتری بوتیل آمین کالیبره مورد استفاده قرار گرفت. سرعت طیف‌نگاری ۱ ثانیه و محدوده جرمی طیف‌نگاری ۴۵۰-۳۳ واحد جرم اتمی تنظیم گردید. گاز حامل هلیوم با درجه خلوص بالای ۹۹/۹۹٪ از ستون‌های جاذب رطوبت و اکسیژن عبور داده شده سپس وارد سیستم کروماتوگرافی گازی می‌شوند. ستون موئین به‌طول

مایع به مراتب کمتر از روش استخراج مایع-مایع می باشد و به علت مسائل زیست محیطی دارای بر تری می باشد. همچنین جدول ۲ و ۳ سطوح غلظتی نمونه‌ها را در ماه‌های مختلف خرداد، شهریور و بهمن ماه نشان می دهد. برای اندازه گیری کمی و افزایش حساسیت دستگاه طیف سنج جرمی-کروماتوگرافی گازی از تکنیک مشاهده یون انتخابی (SIM) که برای فنیتروتیون یون ۱۲۳ و برای بوتاکلر ۲۳۸ در نظر گرفته شده است. بدیهی است که تکنیک فوق در دستگاه تله یونی به علت ویژگیهای خاص خود در بعضی مواقع یون مادر با یک واحد جرمی را بیشتر ظاهر می کند که این پدیده با دستگاه‌های چهارقطبی و مغناطیسی بسیار متفاوت می باشد. شکل ۱: کروماتوگرام کلی نمونه ایستگاه آب بندان را بعد از مراحل استخراج نشان می دهد. با یک نگاه اجمالی به کروماتوگرام فوق میتوان استنتاج کرد که الگوی پیکهای ظاهر شده نشان دهنده الگوی هیدروکربنهای نرمال (پارافینی) می باشد. به عبارت دیگر آن منطقه به مواد نفتی مخصوصا هیدروکربنهای پارافینی آلوده گشته و مقدار آنها نیز قابل ملاحظه می باشد. دو پیک دو تایی در زمان ۱۶:۰۱ دقیقه و ۱۷:۱۰ دقیقه مربوط به پرستان (C۱۹) و فیتان (C۲۰) می باشد. این دو هیدروکربن به عنوان نشانه زیستی (Biomarker) جهت شناسایی نفت‌های خام و منابع آنها و چگونگی تشکیل نفت خام به کار می روند. طیف جرمی فنیتروتیون و بوتاکلر در شکل ۳ نشان داده شده است. برای اطمینان و تاییدیه دیگر از جستجوی کتابخانه‌ای دستگاه استفاده گردید که نتیجه آن در شکل a: ۲ نشان داده شده است. برای صحت و اطمینان کامل استاندارد دو ماده فوق تزریق و زمان بازداری و همچنین طیف جرمی مقایسه گردید. یکی از راههایی که اکنون جهت تاییدیه جرم ملکولی ترکیبات استفاده می شود روش یونیزاسیون شیمیایی خواهد بود که معمولا علاوه بر پیک مادر (M) یک واحد جرمی بیشتر (M+۱) با شدت و فراوانی نسبی بیشتری نسبت به جرم ملکولی ظاهر خواهد نمود. این روش امروزه به عنوان یک

۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۳۲ میلی متر و ضخامت ۲۵ میکرومتر از نوع DB-۵ مورد استفاده قرار گرفت. سرعت جریان گاز حامل ۱ میلی لیتر در دقیقه و نحوه تقسیم ۱:۳۰ با زمان تأخیری ۴ دقیقه به کار گرفته شده است. دمای محل تزریق ۲۸۰ درجه سانتیگراد و دمای اتصال مشترک دستگاه طیف سنج جرمی و کروماتوگرافی گازی نیز ۲۸۰ درجه سانتیگراد تنظیم گردید. انرژی الکترونها ۷۰ الکترون ولت و ولتاژ شتاب دهنده حدود ۲۰۰۰ ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۰۰ درجه سانتیگراد اعمال گردید. شرایط دما برنامه ای با دمای اولیه ۴۰ درجه (۱ دقیقه) تا ۲۸۰ درجه سانتیگراد (۵ دقیقه) با سرعت ۱۰ درجه بر دقیقه تنظیم گردیده است. آنالیز یونیزاسیون شیمیایی توسط گاز آیزوبوتان در محدوده جرمی ۴۵۰-۶۰ واحد جرم اتمی انجام گرفت

بحث و نتیجه گیری

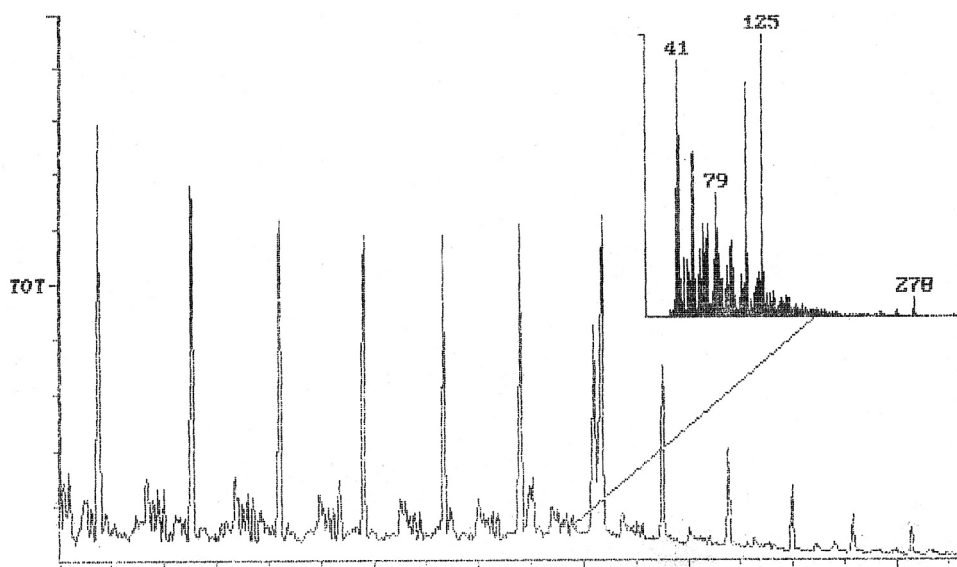
مرداب انزلی به علت اهمیت و تنوع زیستی در آن به عنوان یکی از مردابهای بین المللی و مهم در جهان شناخته شده است. به علت سرازیر شدن و وارد شدن آبهای سطحی، فاضلاب کارخانجات و سموم کشاورزی جداسازی و شناسایی ترکیبات آلی و معدنی از اهمیت خاصی برخوردار است. ترکیب فنیتروتیون و بوتاکلر معمولا در مزارع برنج مناطق شمال ایران به عنوان آفت کش و علف کش مورد استفاده قرار می گیرند. درصد باز یافت فنیتروتیون و بوتاکلر در آب با سه روش استخراجی ذکر شده مورد اندازه گیری و مقایسه گردید (جدول شماره ۱). جدول فوق نشان می دهد که میانگین درصد باز یافت با روش فاز جامد نسبتا بیشتر از دو روش دیگر می باشد. از طرفی زمان استخراج با فاز جامد کوتاهتر از دو روش استخراج مایع-مایع و استخراج میکرومایع-مایع می باشد. درصد باز یافت روش استخراج مایع-مایع تقریبا نظیر استخراج میکرو مایع-مایع می باشد با این تفاوت که حلال بکار رفته در روش استخراج میکرو مایع-

جدول ۱- درصد باز یافت نمونه فنیتروتیون و بوتاکلر (غلظت هر نمونه ۵ نانوگرم در لیتر و تکرار آزمایش ۵ مرتبه)

Pesticide	C۱۸	LLE	LL microextraction
fenitrothion	۹۳	۸۸	۸۹
butachlor	۹۰	۸۶	۸۶

جدول ۲- میزان غلظت فنیتروتیون و بوتاکلر (شهریور ماه، ۱: آب بندان، ۲: پاشاکارو، ۳: آب کنار)

Sample	Pesticide	LLE(ng/ml)	LL Microextraction (ng/ml)	SPE(ng/ml)
۱	fenitrothion	۷۶	۸۱	۸۵
۱	butachlor	۱۷	۱۷	۱۷
۲	fenitrothion	۳۹	۴۱	۴۳
۲	butachlor	۸	۸	۱۱
۳	fenitrothion	—	—	—
۳	butachlor	—	—	—



شکل ۱- کروماتوگرام کلی نمونه آب بندان

جدول ۳- میزان غلظت فنیتروتیون و بوتاکلر (بهمن ماه)

Sample	Pesticide	LLE(ng/ml)	LL Microextraction (ng/ml)	SPE(ng/ml)
۱	fenitrothion	۴۰	۴۵	۴۳
۱	butachlor	۱۰	۱۲	۱۲
۲	fenitrothion	۳۳	۳۴	۳۵
۲	butachlor	۸	۸	۱۰
۳	fenitrothion	—	—	—
۳	butachlor	—	—	—

جدول ۴- میزان غلظت فنیتروتیون و بوتاکلر خرداد ماه)

Sample	Pesticide	LLE(ng/ml)	LL Microextraction (ng/ml)	SPE(ng/ml)
۱	fenitrothion	۲۳	۲۷	۲۷
۱	butachlor	۸	۱۱	۱۳
۲	fenitrothion	۱۵	۱۲	۱۷
۳	butachlor	۷	۵	۹
۳	fenitrothion	—	—	—
۳	butachlor	—	—	—

میکرو-مایع-مایع توصیه می‌شود. به عبارت دیگر روش استخراج با فاز جامد امروزه به عنوان یک روش مناسب، ساده و کارآمد پیشنهاد می‌گردد. اگرچه دستگاه‌های طیف سنج جرمی از نوع تله یونی دستگاه بسیار حساس و دارای دقت بالایی می‌باشد و عمدتاً برای اندازه‌گیری‌های مقادیر ناچیز در ماتریس‌های مختلف (آب، خاک و آب) به کار می‌روند لذا پیشنهاد می‌گردد که از دستگاه‌های چهارقطبی و مقناطیسی استفاده گردد. نتایج و داده‌های بدست آمده نشان می‌دهد که قسمت مرکزی و بویژه قسمت شرق تالاب از آلودگی بیشتری برخوردار است.

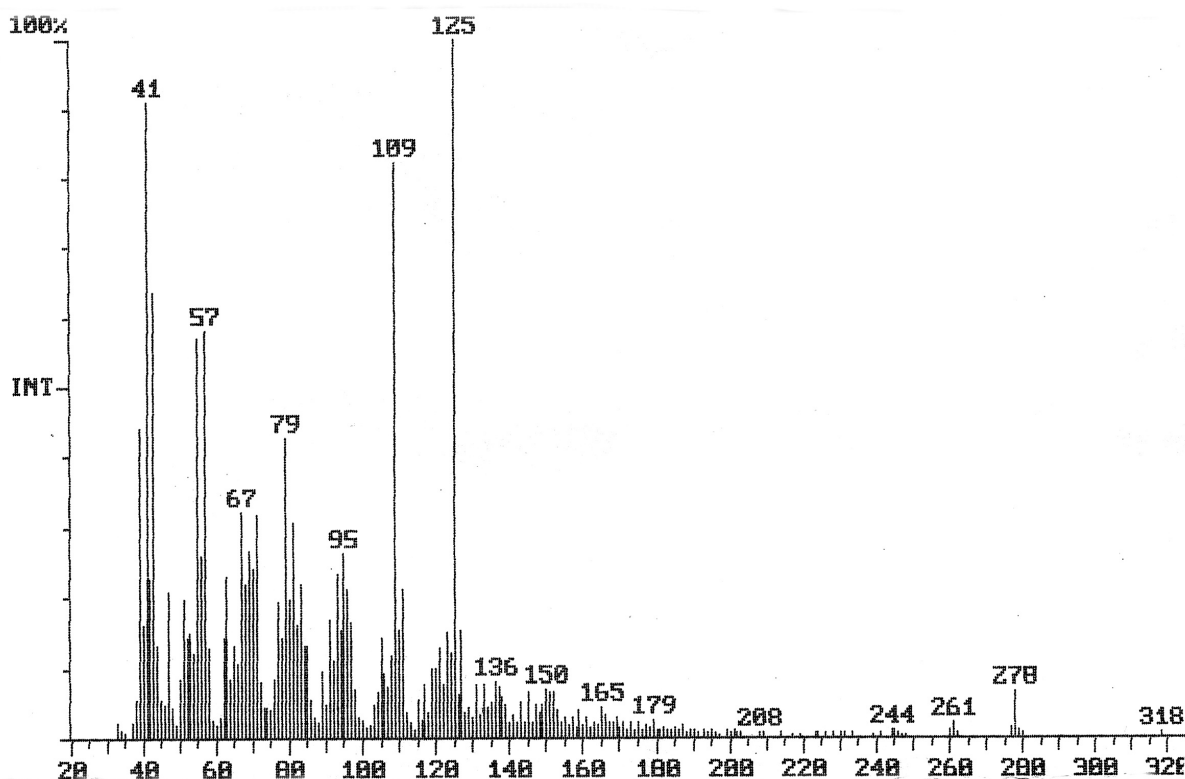
به علت اینکه سموم کلره در مناطق شمال مورد استفاده گسترده کشاورزان قرار می‌گیرد توصیه می‌گردد که جهت استفاده سموم کشاورزی از علوم و فنون پیشرفته استفاده و تحت نظارت وزارت کشاورزی و سازمان حفاظت محیط زیست قرار گیرد. همچنین نظارت و کنترل دقیق بر پروژه‌ها و نحوه استفاده سموم و کمک‌های مالی به کشاورزان جهت استفاده بهینه از سموم و آفت کشها پیشنهاد می‌گردد. جلوگیری از انتشار مواد آلاینده و خطر ناک در محیط یک امر ضروری است و نهایتاً ممانعت از تخلیه فاضلاب‌های بهداشتی، شهری، صنعتی در حاشیه رودها و سواحل دریا توصیه می‌گردد.

تکنیک اسپکتروسکوپی جهت شناسایی ترکیبات به کار می‌رود. لازم بذکر است که همانطور که قبلاً ذکر شد، دستگاه تله یونی به علت ویژگی‌های خاص خود بعضی مواقع یک واحد جرمی بیشتر از خود نشان می‌دهد که این مساله یک عیب محسوب می‌شود. این پدیده را می‌توان در طیف جرمی فنیتروتیون که قاعدتاً بایستی جرم ۲۷۷ را نشان دهد ولی همانطور که مشاهده می‌شود جرم ۲۷۸ ظاهر نموده است.

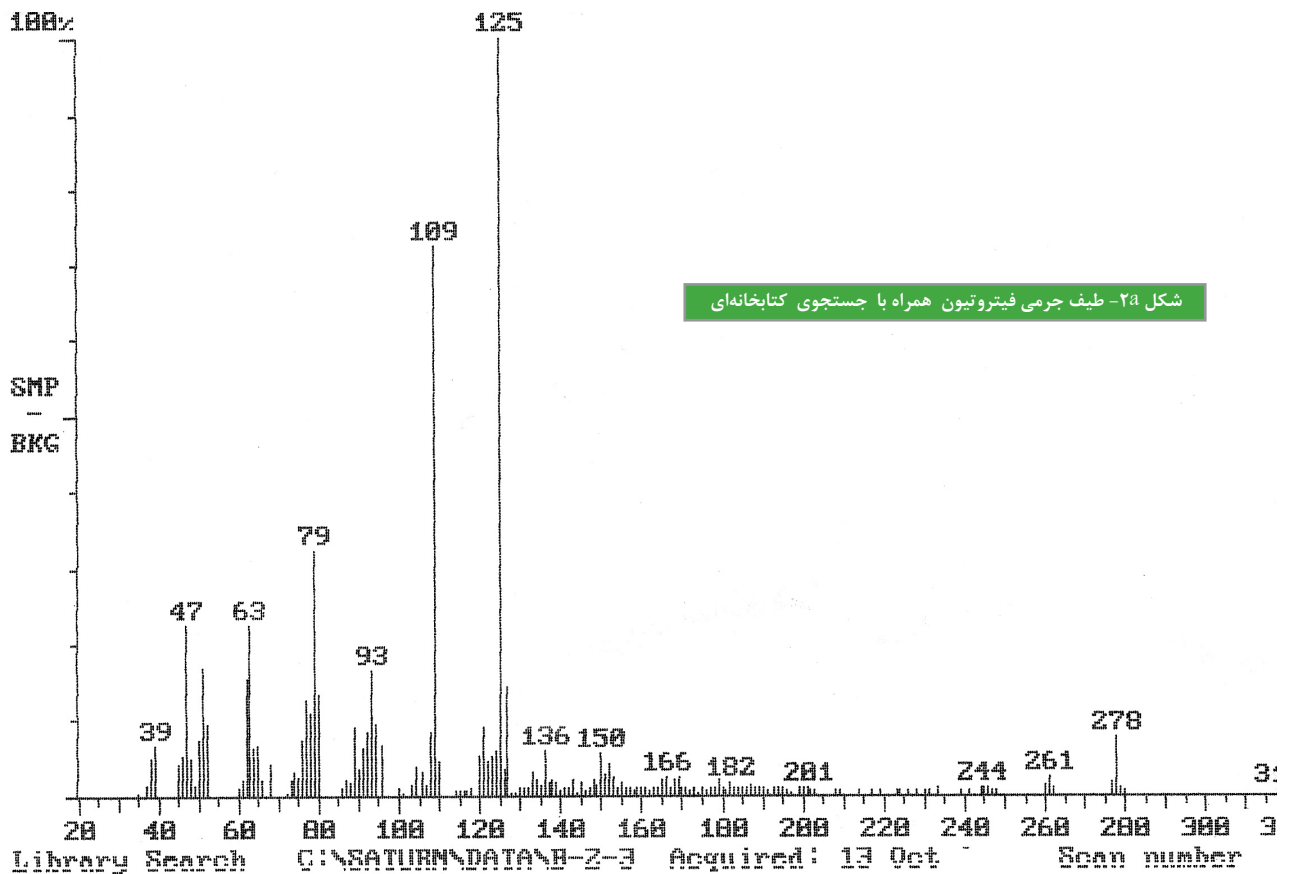
همه روش‌های ذکر شده بر روی دو نمونه دیگر انجام گرفت ولی فقط کروماتوگرام و طیف‌های جرمی مربوط به نمونه آب‌بندان گزارش گردید.

نتیجه

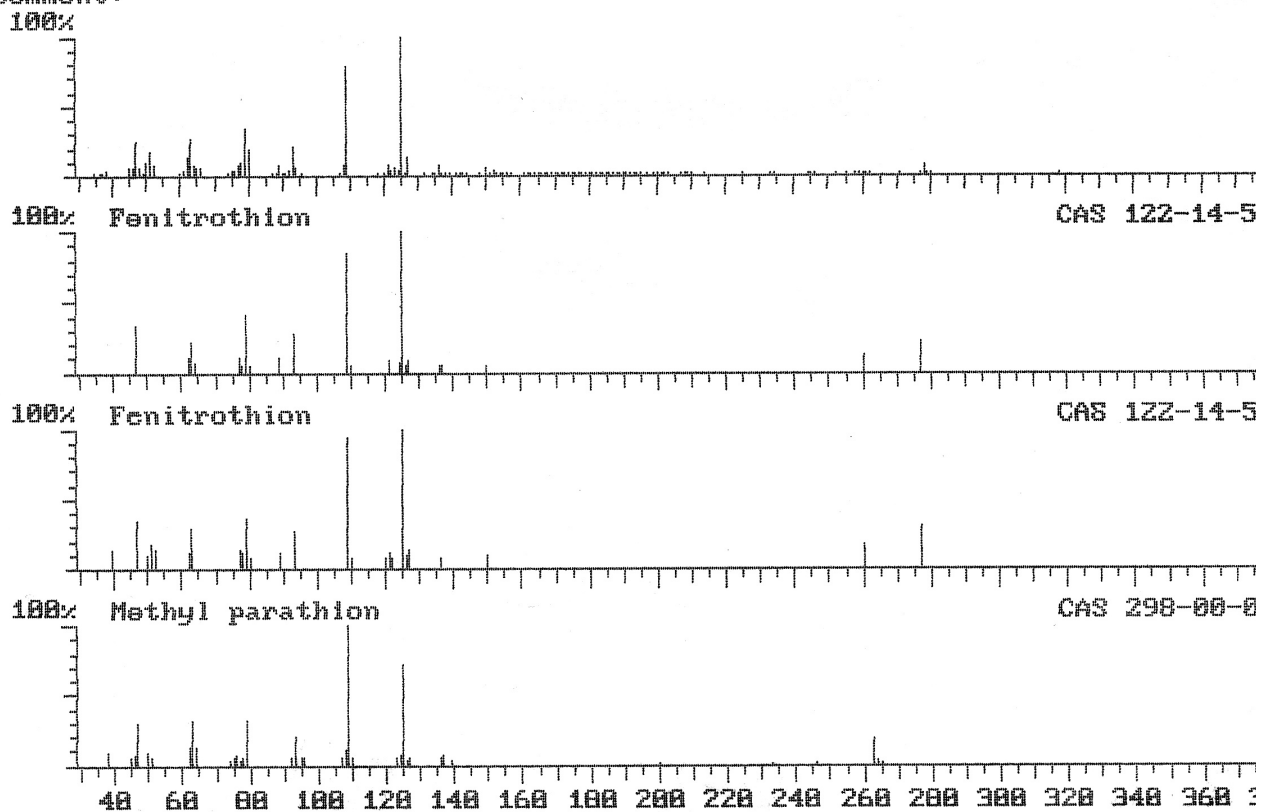
به علت مصرف حجم کم حلال و مسائلی زیست محیطی، استفاده از روش استخراج میکرو-مایع-مایع یک روش مناسب و ساده برای استخراج سموم در نمونه‌های آبی پیشنهاد می‌گردد. درصد بازیافت، حمل ساده، صرفه جویی در زمان و همچنین بعثت کاهش مصرف حلال‌های سمی و کلر دار (۹۰ درصد کمتر مصرف می‌شود) تکنیک استخراج با فاز جامد (SPE-C18) در مقایسه با روش‌های استخراج مایع-مایع و استخراج



شکل ۲- طیف جرمی بمباران الکترونی (EI) فنیتروتیون



شکل ۲۵- طیف جرمی فیتروتیون همراه با جستجوی کتابخانه‌ای



Spectrum Plot

Comment: 40(1)-280, 10/MIN

Scan No: Retention Time: 2:25

Pks: 70

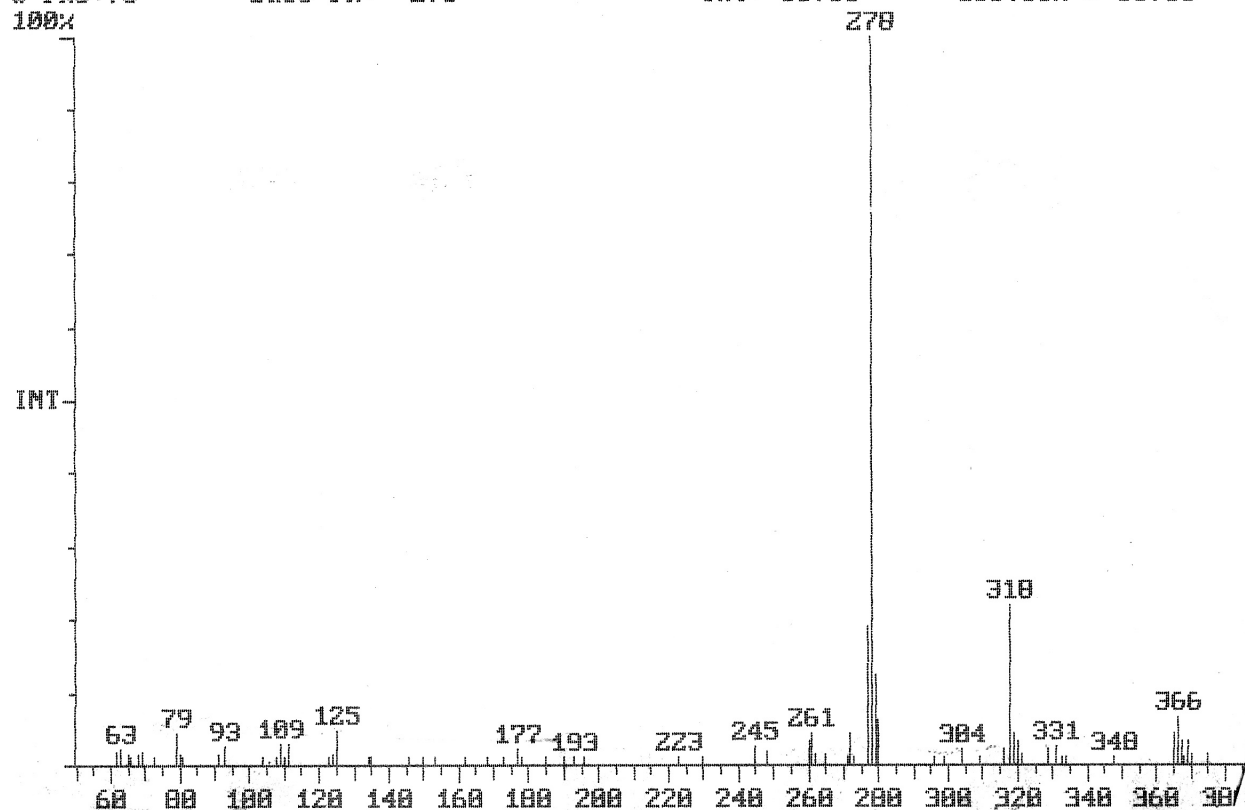
Base Pk: 278

RIC: 147846

Mass Range: 62 - 375

Int: 55780

100.00% = 55780



شکل ۳- طیف جرمی یونیزاسیون شیمیایی فیترونیون

8-D.Louch,S.Mortlaugh and J.Pawliszyn,Anal.Chem.,64.1992
.,1187.

9-Do-Gyun Kim,Ki"Jung Paeng, Chaejoon Cheong, Jongki
Hong, Systematic Approach to Determination of Pesticides In
Water With Solid Phase Micro extract! on combined GC/Ion
Trap Ms.Analytical Sci.17.2001.,a53.

10-D.W.Potter and J.Pawliszyn,J.Chromatogr.A,625.1992.,2
47.

11-FJ.Onmuska,T.HighResomt.Chromatogr.,12.1989.,4.

12-J.LiskaJ.Chromatogr.A,665.1993.,163.

13-H-J.Stan and Th.Herber,in;HJ.Stan(Ed.),Analysis of
Pesticides in Ground and Surface Water,Springer,Bei"lin,19
95,p.143.

14-Klecka,G.M.;Mackay,D .;Jones,k.C.; Evaluation of
persistence and long transport of organic chemicals in the

منابع مورد استفاده

1-A.G.Harrison, Chemical Ionization Mass Spectrometry,CRC
Press,Boca , Raton,FL,1986,PP.1-156.

2-Alireza Ghassempour,Ali Mohammadkhah,Fazel Najafi,and
Mohammad Rajabzadeh,Monitoring of the Pesticide Diazinon
In Soil,Stem and Surface Water of I Rice Fields ^Analytical
Sci.. 18.2002.,779.

3- B.KoIb and L.S.Ettre,Static Headspace Gas Chromatography
Theory and Practice,Wiley-VCH,USA, 1997;PP 117-147

4-B.V.Ioffe and A.G.Vitenberg.Headspace Analysis and
Related Methods in Gas Chromatography,Wiley"Interscience
,New York, 1984;xv+276pp.

5-C.L.Arthur and J.Pawliszan,Anal.Chem,62.1990.,2145.

6-D.BarceloJ.Chromatogr,643.1993.,117.

7-D.Barcelo,Analyst(London),116.1991.,681.

environment; Society of Environmental Toxicology and Chemistry; 1999.

15- K. Leven, Org. Mass Spectrom., 23. 1988., 406.

16- M.C. Hennion, Trends Anbal. Chem, JO. 1991., 317.

17- R. Hites and W.L. Buddle, Environ. Sci. Technol, 1991, 25, 6.

18- T.A. Bellar and W.L. Budde, Anal. Chem, 60. 1986., 169.



شکل ۴- نقشه مرداب انزلی همراه با مکانهای نمونه برداری (۱: پاشاگارو ۲: آب کنار ۳: آب بندان)