Archive of SID

©2019 ASP Ins., Afarand Scholarly Publishing Institute, Iran

ISSN: 1027-1457; Iranian Journal of Forensic Medicine. 2019;25(3):121-129

Optimization of a Dispersive Liquid-Liquid Microextration Method for Analysis of Chlorpyrifos in Urine Using the Chemometrics Method

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Mohammadzaheri R.[1] *MSc,*
Ansari Dogaheh M.[2] *PhD,*
Kazemipour M.[1] *PhD,*
Soltaninejad K.*[3] *PhD*

How to cite this article
Mohammadzaheri R, Ansari Dogaheh M, Kazemipour M, Soltaninejad K. Optimization of a Dispersive Liquid-Liquid Microextration Method for Analysis of Chlorpyrifos in Urine Using the Chemometrics Method. Iranian Journal of Forensic Medicine. 2019;25(3):121-129.

ABSTRACT

Aims The use of simple, low cost, high-efficiency microextraction methods are considered for sample preparation in forensic toxicology. Nowadays, the chemometrics technique can be used to determine the important and influencing factors on the response, to optimize the extraction methods. The aim of this study was to design and optimize a dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) method for the extraction of chlorpyrifos from the urine using a chemometrics method.

Materials & Methods In this experimental study, at first, a DLLME method for the extraction of chlorpyrifos in the urine sample was designed. Then, the Taguchi model was used for screening and investigating the role of effective factors on the extraction of chlorpyrifos from the urine and a central composite design was used to examine the interaction of these factors. After validation of the extracted data, chlorpyrifos was extracted from the urine using an optimized DLLME method and it detected and quantified using the high-performance liquid chromatography with photodiode array detector (HPLC-PDA).

Findings The optimized DLLME-HPLC-PDA method was linear in the range of 0.5 to 4µg/ml, and the R2 coefficient was 0.9996. The minimum rates of detection and quantification were calculated by 0.08 and 0.25µg/ml, respectively. The profitability of the method in the optimal condition was calculated by %95.6.

Conclusion The optimized DLLME-HPLC-PDA method can be used as a simple, fast, inexpensive, sensitive and precise method for chlorpyrifos analyzing in urine specimens in clinical and forensic toxicology laboratories.

Keywords Chlorpyrifos; Chemometrics; Liquid-Liquid Microextraction; High Performance Liquid Chromatography

[1]Chemistry Department, Science Faculty, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
[2]Pharmaceutics Department, Pharmacy Faculty, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
[3]Forensic Toxicology Department, Legal Medicine Research Center, Legal Medicine Organization, Tehran, Iran

Correspondence
Address: Forensic Toxicology Department, Legal Medicine Research Center, Legal Medicine Organization, Behesht Street, Tehran, Iran. Postal Code: 1114795113
Phone: +98 (21) 55613731
Fax: +98 (21) 55613131
kamsoltaninejad@gmail.com

Article History
Received: June 10, 2019
Accepted: August 28, 2019
ePublished: September 21, 2019

CITATION LINKS

[1] Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human ... [2] Chlorpyrifos technical fact ... [3] Chlorpyrifos poisoning and its implications in human fatal cases: a ... [4] Attempted suicide by ingestion of chlorpyrifos: identification in serum ... [5] Non-accidental chlorpyrifos poisoning-an unusual cause of profound ... [6] Acute chlorpyrifos poisoning in pregnancy: a case ... [7] Objective testing: urine and other drug ... [8] Highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for ... [9] Comparative evaluation of ELISA kit and HPLC DAD for the ... [10] Selective determination of diazinon and chlorpyrifos in the ... [11] Determination of residues of diazinon and chlorpyrifos in ... [12] Methodology for trace analysis of 17 pyrethroids and ... [13] Simultaneous gas chromatographic determination of ... [14] Simultaneous analysis of endosulfan, chlorpyrifos, and ... [15] Liquid chromatography-tandem mass spectrometry ... [16] A case study of acute human chlorpyrifos poisoning: ... [17] Determination of chlorpyrifos metabolites in human urine ... [18] Direct determination of chlorpyrifos and its main metabolite ... [19] A modified extraction and clean-up procedure for the detection and ... [20] Headspace single-drop microextraction and ... [21] Simultaneous determination of chlorpyrifos and ... [22] Novel magnetic hollow zein nanoparticles for ... [23] Preparation and application of chlorpyrifos ... [24] Determination of organic compounds in water using ... [25] Chemometrics in pharmaceutical analysis: an ... [26] Optimization of processing conditions via response ... [27] Application of response surface method for ... [28] A comparison of central composite design and taguchi ... [29] Sodium dodecyl sulfate sensitized switchable ... [30] Optimization of modified dispersive ... [31] Postmortem blood concentrations of ... [32] Quantification of nicotine, chlorpyrifos and their ... [33] Determination of organophosphorus pesticides ... [34] General unknown screening for pesticides in whole ... [35] Determination of organophosphorous pesticides in blood ...

Copyright© 2019, ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

بهینه‌سازی روش میکرواستخراج مایع- مایع پخشی برای آنالیز کلرپیریفوس در ادرار با استفاده از روش کمومتریکس

رضا محمدظاهری MSc
گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران
مهدی انصاری‌دوگاهه PhD
گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران
مریم کاظمی‌پور PhD
گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران
کامبیز سلطانی‌نژاد* PhD
گروه سم‌شناسی قانونی، مرکز تحقیقات پزشکی قانونی، سازمان پزشکی قانونی کشور، تهران، ایران

چکیده

اهداف: استفاده از روش‌های میکرواستخراج ساده و ارزان‌قیمت با بهره‌دهی بالا برای آماده‌سازی نمونه‌ها در سم‌شناسی قانونی مورد توجه هستند. امروزه می‌توان از کمومتریکس با تعیین عوامل مهم و تاثیرگذار بر پاسخ، برای بهینه‌سازی روش‌های استخراج استفاده نمود. هدف از این مطالعه، طراحی و بهینه‌سازی یک روش میکرواستخراج مایع- مایع پخشی (DLLME) برای استخراج کلرپیریفوس از ادرار با استفاده از روش کمومتریکس بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا روش DLLME به‌منظور آماده‌سازی ادرار برای آنالیز کلرپیریفوس طراحی شد. سپس از مدل تاگوچی برای غربالگری و بررسی نقش عوامل تاثیرگذار بر استخراج کلرپیرفوس از ادرار استفاده شد و برای بررسی برهم‌کنش این عوامل، یک طرح مرکب مرکزی مورد استفاده قرار گرفت. پس از اعتبارسنجی داده‌های اخذشده، کلرپیریفوس با استفاده از روش بهینه‌شده DLLME از ادرار استخراج و توسط روش کروماتوگرافی بالا با ردیاب آرایه دیود نوری (HPLC-PDA) شناسایی و تعیین بهره‌دهی شد.

یافته‌ها: روش DLLME-HPLC-PDA بهینه‌شده در محدوده غلظتی ۰/۵ الی ۴میکروگرم بر میلی‌لیتر، خطی بود و ضریب R^2 برابر ۰/۹۹۹۶ محاسبه شد. حداقل مقادیر قابل تشخیص و قابل اندازه‌گیری به ترتیب برابر ۰/۰۸۲ و ۰/۲۵میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. بهره‌دهی روش در شرایط بهینه ۹۵/۶% محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: از روش بهینه‌شده DLLME-HPLC-PDA می‌توان به‌عنوان یک روش ساده، سریع، ارزان‌قیمت، حساس و دقیق برای آنالیز کلرپیریفوس در نمونه‌های ادرار در آزمایشگاه‌های سم‌شناسی بالینی و قانونی استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: کلروپیرفوس،کمومتریکس، میکرواستخراج مایع- مایع، کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۶

*نویسنده مسئول: kamsoltaninejad@gmail.com

مقدمه

کلرپیریفوس (Chlorpyrifos) با نام شیمیایی O,O-Diethyl O-3,5,6-trichloropyridin-2-yl phosphorothioate از دسته حشره‌کش‌های فسفردار آلی با طیف اثر گسترده است که در کشاورزی به‌عنوان حشره‌کش، کنه‌کش و نماتودکش دارای استفاده فراوانی است[1, 2]. مکانیزم اثر این سم، مهار آنزیم کولین‌استراز و افزایش غلظت استیل‌کولین در سیناپس‌های عصبی است[1]. این آفت‌کش دارای سمیت بالا برای انسان است و از این رو، مسمومیت‌های حاد عمدی و تصادفی در اثر مصرف این سم در موارد بالینی یا جنایی (خودکشی و دیگرکشی) گزارش شده است[1, 3-6]. این سم از راه دستگاه گوارش، تنفس و پوست جذب بدن می‌شود[1, 2]. علایم و نشانه‌های بالینی در مسمومیت حاد با این سم مشابه سایر عوامل فسفردار آلی شامل تهوع، استفراغ، اسهال، دردهای شکمی، آب‌ریزش از بینی، سیلان بزاق، تعریق، بی‌اختیاری در دفع ادرار و مدفوع، کاهش ضربان قلب، افت فشار خون، تنگی مردمک‌های چشم، تاری دید و سردرد است. در مسمومیت‌های شدید بی‌قراری، تشنج، گرفتگی عضلات، افزایش فشار خون، گشادی مردمک‌های چشم، کاهش سطح هوشیاری، کوما و مرگ بروز می‌کند. مرگ بیشتر به‌علت فلج عضلات دیافراگم و در نهایت نارسایی تنفسی رخ می‌دهد[1, 2]. کلرپیریفوس بعد از جذب، در کبد توسط سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 از طریق دسولفوراسیون اکسیداتیو به متابولیت فعال سمی خود یعنی کلرپیریفوس- اکسون تبدیل می‌شود[1, 2]. این متابولیت فعال در نهایت به متابولیت‌های غیرفعال مانند دی‌اتیل‌فسفات و دی‌اتیل‌تیوفسفات تبدیل شده و از طریق ادرار دفع می‌شود[1]. اگرچه بیشتر کلرپیریفوس جذب‌شده به‌صورت متابولیت‌های غیرفعال از ادرار دفع می‌شود، با این وجود در مسمومیت‌های حاد، مقادیر کمی از مولکول اولیه بدون تغییر در ادرار ترشح می‌شود[1]. با توجه به بروز مسمومیت‌های حاد در موارد بالینی و قانونی در اثر این سم، لزوم دستیابی به روش‌های شناسایی آن در انواع نمونه‌های زیستی در افراد مسموم یا متوفیان برای تشخیص و تایید مسمومیت اجتناب‌ناپذیر است.

نمونه ادرار در مسمومیت‌های حاد، با توجه به سهولت و غیرتهاجمی‌بودن روش نمونه‌برداری، ساده‌بودن ماتریس نمونه و تغلیظ آنالیت به‌عنوان یک نمونه مناسب در سم‌شناسی بالینی و قانونی مورد توجه است[7]. با توجه به غلظت کم کلرپیریفوس در نمونه ادرار، استفاده از روش‌های مناسب برای آماده‌سازی و تغلیظ آن در این نمونه مورد نیاز است.

روش‌های متعددی برای آنالیز کلرپیریفوس در انواع نمونه‌های زیستی و غیرزیستی گزارش شده است. به‌عنوان مثال از انواع روش‌های ایمنواسی[8, 9]، کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی (GC-MS)، کروماتوگرافی گازی با ردیاب یونش شعله (GC-FID)، کروماتوگرافی گازی با ردیاب ربایش الکترون (GC-ECD)، کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا با ردیاب آرایه فازی نوری (HPLC-PDA)، GC-MS-MS و کروماتوگرافی مایع- طیف‌سنجی جرمی (LC-MS) برای آنالیز کلرپیریفوس در انواع نمونه‌های غیرزیستی مانند نمونه‌های آب، خاک، غذا، گیاه و فرمولاسیون‌های آفت‌کش‌ها[10-14] و نمونه‌های زیستی مانند خون، سرم و ادرار در بیماران مسموم استفاده شده است[15-18].

برای استخراج، تغلیظ و آماده‌سازی نمونه‌ها نیز از انواع روش‌ها مانند ترسیب پروتئین[18]، استخراج مایع- مایع[19]، استخراج فاز جامد با ستون‌های تعویض یونی[17]، روش‌های میکرواستخراج

www.SID.ir

Archive of SID

تک‌قطره‌ای[20]، روش کچرز (QuEChERS) [21]، استخراج مایع- مایع تسهیل‌شده با امواج ماورای صوت[12]، استفاده از نانوذرات مغناطیسی از جنس زئین[22]، یا اخیراً از "پروب‌های میکرواستخراج فاز جامد تشکیل‌شده از مولکول‌های حکاکی‌شده"[23] برای استخراج و تغلیظ کلرپیریفوس در انواع نمونه‌های زیستی و غیرزیستی استفاده شده است.

اگرچه استفاده از روش‌های سنتی استخراج مایع- مایع با توجه به سهولت و ارزان‌قیمت‌بودن به‌عنوان یکی از روش‌های متداول در آماده‌سازی نمونه‌ها مورد توجه است، با این وجود معایبی نظیر نیاز به استفاده از حجم بالای حلال‌های آلی و در عین حال سمی و ناسازگار با محیط زیست، امکان ایجاد امولسیون طی فرآیند استخراج، زمان‌بربودن، نیاز به حجم بالای نمونه و بهره‌دهی کم سبب شده که امروزه استفاده از روش‌های میکرواستخراج مایع- مایع مورد توجه محققان قرار گیرد[24]. یکی از این روش‌ها، میکرواستخراج مایع- مایع پخشی (DLLME) است[24]. DLLME، یک روش استخراج مایع- مایع سریع، ساده و ارزان‌قیمت است که در آن از مقادیر کم (در مقیاس میکرولیتر) حلال‌ها استفاده می‌شود. اساس این روش استفاده از یک حلال آلی به‌عنوان حلال استخراج‌کننده و یک ماده پخش‌کننده است. هنگامی که مخلوط مناسبی از فازهای استخراج‌کننده آلی و پخش‌کننده سریع به درون فاز آبی نمونه تزریق شود، آشفتگی بالایی در نمونه ایجاد شده و سبب تشکیل قطرات بسیار کوچک و یک حالت ابری در نمونه می‌شود. این پدیده، موجب بالارفتن سطح تماس آب، آنالیت و حلال آلی شده و باعث افزایش سرعت و بهره‌دهی فرآیند استخراج می‌شود[24]. این روش از آنجا که از حجم بسیار کم حلال‌های آلی و سمی استفاده می‌شود از نظر زیست‌محیطی دارای مزیت بالایی نسبت به سایر روش‌های متداول استخراج مایع- مایع است. از این روش برای استخراج بسیاری از داروها و سموم از نمونه‌های زیستی و غیرزیستی استفاده شده است[24].

به‌منظور بهینه‌سازی روش استخراج و انتخاب بهترین شرایط از قبیل نوع و مقدار حلال‌ها، pH و قدرت یونی محیط و با هدف کاهش هزینه‌ها و افزایش سرعت در طراحی روش استخراج می‌توان از روش کمومتریکس استفاده نمود. کمومتریکس شاخه‌ای از دانش شیمی است که در آن با استفاده از معادلات ریاضی و روابط آماری اقدام به مدل‌سازی نموده و با استفاده از این مدل‌ها به بررسی متغیرها و در نهایت تعیین و انتخاب بهترین شرایط برای هر یک از عوامل دخیل در فرآیند اقدام می‌شود. امروزه از کمومتریکس در بسیاری از شاخه‌های شیمی، زیست‌شناسی، پزشکی، علوم دارویی و سم‌شناسی استفاده می‌شود[25]. به عبارتی، استفاده از مدل‌های آنالیزهای چندمتغیره یکی از روش‌های متداول در آنالیزهای کمومتریکس محسوب می‌شود. در این مدل‌ها، برای بررسی عوامل موثر در یک فرآیند، در هر مرحله با درنظرگرفتن چند عامل، یکی از آنها در سطوح مختلف تغییر داده می‌شود و سایر عوامل بدون تغییر باقی می‌مانند و سپس به بررسی پاسخ‌ها پرداخته می‌شود. یکی از اشکالات برخی از این مدل‌ها، این است که اثرات متقابل یا اثر همزمان دو یا چند عامل روی پاسخ، قابل اندازه‌گیری نیست[26]. یکی از مناسب‌ترین این مدل‌ها که امروزه به‌صورت کاربردی در میان محققان مطرح است، روش پاسخ- سطح است[26] که به‌منظور مطالعه اثر همزمان چند فاکتور بر یک پاسخ ابداع شده است. در این روش با ایجاد تغییرات هدفمند در عوامل موثر یک فرآیند، به بررسی تغییرات حاصله در اطلاعات خروجی در خصوص تاثیر این عوامل بر پاسخ پرداخته می‌شود[27].

با توجه به موارد ذکرشده، هدف از این مطالعه، طراحی و بهینه‌سازی یک روش مناسب میکرواستخراج مایع- مایع پخشی برای آنالیز کلرپیریفوس در ادرار با استفاده از روش کمومتریکس برای استفاده در آزمایشگاه‌های سم‌شناسی قانونی و بالینی بود.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: تولوئن،کلروفرم، دی‌کلرومتان، زایلن، n-هگزان، متانول، اتانول، استون و استونیتریل، سدیم‌لوریل‌سولفات (SLS)، سدیم‌کلراید (NaCl)، آب دوبار تقطیرشده، پتاسیم‌دی‌هیدروژن‌فسفات و اسیدفسفریک از شرکت مرک؛ آلمان تهیه شدند. استانداردهای کلرپیریفوس، دیازینون و پیریمیفوس‌اتیل (به‌عنوان استاندارد داخلی) نیز از شرکت Dr.Ehrenstofer GmbH؛ آلمان خریداری شد. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده دارای درجه خلوص HPLC grade بودند.

تهیه محلول‌های استاندارد: برای تهیه محلول‌های استاندارد کلرپیریفوس از محلول استوک ساخته‌شده با غلظت ۱۰۰۰میکروگرم در میلی‌لیتر، غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵، ۳ و ٤میکروگرم در میلی‌لیتر در ادرار بلانک (عاری از سم) تهیه شد. نمونه‌های ادرار بلانک از کارکنان داوطلب آزمایشگاه که فاقد سابقه مصرف هر گونه دارو یا تماس احتمالی با سموم ارگانوفسفره به مدت حداقل شش ماه قبل بودند، استفاده شد و با روش‌های متداول دستگاهی در آزمایشگاه سم‌شناسی قانونی از نظر داروها و سموم غربالگری شده و عدم وجود داروها و سموم در نمونه‌های ادراری تایید شد.

استخراج کلرپیریفوس از ادرار به روش DLLME: به ۳میلی‌لیتر نمونه ادرار در یک لوله آزمایش، کلرپیریفوس با غلظت‌های مشخص اضافه شده و ۱۰میکرولیتر پیریمیفوس‌اتیل با غلظت ۲/۵میکروگرم در میلی‌لیتر به‌عنوان استاندارد داخلی اضافه شد. نمونه بعد از مخلوط‌شدن به مدت ۳۰ثانیه ورتکس شد. سپس به نمونه، ۱۰۰میکرولیتر NaCl (۲/۱ درصد وزنی- حجمی) و ۱۰۰میکرولیتر SLS (۲/۵ درصد وزنی- حجمی) اضافه شده و مجدد ورتکس شد. سپس با استفاده از میکروسرنگ (هامیلتون)، ۳۵۵میکرولیتر تولوئن (به‌عنوان حلال استخراج‌کننده) و ۷۸۰میکرولیتر متانول (به‌عنوان حلال پخش‌کننده) به نمونه تزریق شد. بعد از تشکیل محلول ابری و کدر، نمونه به مدت ۱۰دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز آلی به‌صورت فاز فوقانی درآمده و با استفاده از میکروسرنگ جداسازی شد و در یک میکرولوله (اپندورف) جمع‌آوری

www.SID.ir

Archive of SID

شد. سپس نمونه با استفاده از جریان گاز نیتروژن خشک شد و بعد از حل‌کردن مجدد باقی‌مانده در ۳۰میکرولیتر استونیتریل، مقدار ۲۰میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق شد.

شرایط دستگاه HPLC: برای شناسایی و تعیین مقدار کلروپیریفوس از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)، مجهز به پمپ مدل ۱۰۵۰ و آشکارساز آرایه دیود نوری (PDA) مدل K-2800 و مجهز به نرم‌افزار Chrome Gate Version 3.3.2 (شرکت Knauer: آلمان) استفاده شد. شرایط کروماتوگرافی عبارت بود از: ستون از نوع فاز معکوس C_{18} analytical (250 mm×4.6mm, 5µm particle size, Perfectsil Target®)، فاز متحرک شامل مخلوط استونیتریل- بافر فسفات به نسبت ۶۳ به ۳۷ درصد حجمی- حجمی و با pH=۲/۳، سرعت جریان فاز متحرک یک‌میلی‌لیتر بر دقیقه و دمای ستون ۲۵°C.

بهینه‌سازی روش DLLME به روش کمومتریکس: برای بررسی تاثیر عوامل مستقل و برهم‌کنش‌های آنها، از طرح‌های آزمایشی فاکتوریل دوسطحی کامل یا کسری، طراحی تاگوچی یا پلاکت- بورمن استفاده می‌شود[26]. به‌وسیله این مدل‌ها می‌توان متغیرهای بی‌اثر را حذف و تعداد آزمایش‌های لازم برای بهینه‌سازی روش را کاهش داد. برای بهبود کارآیی روش و تعیین شرایط و مقدار بهینه عوامل مهم، استفاده از مدل‌های درجه دوم طرح‌های سطح- پاسخ (RSM) که در آنها بیش از دو سطح برای هر عامل در نظر گرفته می‌شود، متداول است. طرح مرکب مرکزی (CCD) یکی از پرکاربردترین طرح‌های سطح- پاسخ برای این منظور است[27].

در این تحقیق، از یک طرح تاگوچی برای شناسایی عوامل مهم و سپس از یک طرح مرکب مرکزی برای بهینه‌سازی روش استفاده شد[28]. در ابتدا با استفاده از روش "یک متغیر در یک زمان" از میان انواع حلال‌های استخراج‌کننده (تولوئن، کلروفرم، دی‌کلرومتان، زایلن، n-هگزان) و حلال‌های پخش‌کننده (اتانول، متانول، استون، استونیتریل)، آزمایش‌های اولیه انجام و چند حلال مناسب انتخاب شد. سپس حلال‌های منتخب به‌همراه سایر عوامل تاثیرگذار (اثر اولتراسونیکاسیون، غلظت SLS، غلظت و نوع نمک) در یک طرح تاگوچی برای غربالگری عوامل موثر نسبت به عوامل بی‌اثر مورد بررسی قرار گرفتند. در این تحقیق، از طرح تاگوچی L18(۶۸۳*۲۸۲) برای بررسی عوامل و ارزیابی مدل به‌دست‌آمده به‌وسیله نرم‌افزار Design-Expert 7.1.3 استفاده شد. همچنین برای بررسی تاثیرگذاربودن عوامل، آزمون تحلیل واریانس دوطرفه مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

غربالگری فاکتورهای تاثیرگذار به روش تاگوچی: عوامل مورد مطالعه شامل حجم و نوع حلال استخراج‌کننده، غلظت نمک، امواج فراصوت، سورفکتانت، حجم و نوع حلال پخش‌کننده و pH در مدل پیشنهادی تاثیرگذار بودند (F=۹/۴۰؛ p=۰/۰۰۲۲). از میان عوامل مطالعه‌شده در مدل، حجم (F=۹/۷۵؛ p=۰/۰۱۴۲) و نوع حلال استخراج‌کننده (F=۵/۱۶؛ p=۰/۰۳۶۲)، غلظت نمک (F=۱۳/۲۲؛ p=۰/۰۰۶۶)، نوع (F=۳۰/۸۷؛ p=۰/۰۰۰۵) و حجم (F=۶/۸۴؛ p=۰/۰۳۰۸) حلال پخش‌کننده و سورفکتانت (F=۱۲/۴۲؛ p=۰/۰۰۷۸) موثر تشخیص داده شد و دو عامل اولتراسونیکاسیون (F=۱/۰۴؛ p=۰/۳۳۶۰) و pH (F=۰/۱۰؛ p=۰/۷۵۰۸) بر بازده استخراج کم‌تاثیر بودند. از میان حلال‌های پخش‌کننده، متانول و از حلال‌های استخراج‌کننده، تولوئن مناسب تشخیص داده شد.

بهینه‌سازی روش DLLME به روش CCD: نتایج بهینه‌سازی روش DLLME به روش CCD برای بالابردن بهره‌دهی استخراج کلروپیریفوس از ادرار و عوامل مهم و سطوح آنها برای CCD در جدول ۱ نشان داده شده است.

برای کاهش تعداد آزمایش‌ها از یک CCD استفاده شد. تعداد کل آزمایش‌ها برای اجرای این طرح، با احتساب ۶ آزمایش تکرار در مرکز طرح، برابر با ۳۰ عدد بود (جدول ۲).

براساس نتایج به‌دست‌آمده، یک مدل سطح- پاسخ درجه دوم مبتنی بر مقدارهای F بالاتر و عدم تناسب (LOF) کوچک‌تر که با داده‌های تجربی متناسب باشد انتخاب شد. این مدل در فرم کدبندی‌شده معادله خط به‌صورت زیر حاصل شد:

$$Recovery=+89/28+10/75\times A+2/43\times B+3/28\times C+5/77\times D+4/63\times A\times B-3/08\times A\times D-7/16\times A^2-5/19\times B^2-4/41\times C^2-9/76\times D^2$$

A= متانول؛ B= تولوئن؛ C= SLS؛ D= NaCl

معادله فوق بازیابی استخراج را نشان می‌دهد. عرض از مبدا ۸۹/۲۸ بیانگر پاسخ و اعداد مثبت و منفی ضرایبی هستند که مقدار مطلق آنها میزان تاثیر جملات مدل را بر پاسخ نشان می‌دهند. ضرایب مثبت افزایش مقدار تاثیر مستقیم آن جمله بر پاسخ و ضرایب منفی کاهش مقدار تاثیر مستقیم بر پاسخ را نشان می‌دهند.

مدل‌های ارائه‌شده برای پاسخ‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و با درنظرگرفتن حق تقدم و با حذف فاکتورهای مهم اعم از فاکتورهای مستقل و برهم‌کنش‌ها، مقدار F=۴۲/۰۸ نشان‌دهنده اعتبار مدل بود (p<۰/۰۰۰۱).

با توجه به شاخص‌های به‌دست‌آمده برای ارزشیابی مدل، مدل انتخاب‌شده، بسیار مناسب بود (جدول ۳).

جدول ۱) نماد و سطوح طراحی آزمایش CCD برای استخراج کلرپیریفوس از ادرار به روش میکرواستخراج مایع- مایع پخشی

عوامل	+α	+۱	صفر	-۱	-α
متانول (میکرولیتر)	۱۰۰۰	۸۰۰	۶۰۰	۴۰۰	۲۰۰
نمک (درصد)	۴	۳	۲	۱	۰
سورفکتانت (درصد)	۴	۳	۲	۱	۰
تولوئن (میکرولیتر)	۵۲۵	۴۵۰	۳۷۵	۳۰۰	۲۲۵

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲) نتایج بهینه‌سازی روش میکرواستخراج مایع- مایع پخشی به روش CCD برای بالابردن بهره‌دهی استخراج کلرپیریفوس از ادرار

شماره آزمایش	حجم حلال پخشی (میکرولیتر)	حجم حلال استخراج (میکرولیتر)	غلظت سورفکتانت (%)	غلظت نمک (%)	بهره‌دهی کلروپیریفوس
۱	۸۰۰	۴۰۰	۳	۳	۹۰/۶۳
۲	۶۰۰	۳۰۰	۴	۲	۷۵/۹۱
۳	۶۰۰	۱۰۰	۲	۲	۶۳/۰۹
۴	۱۰۰۰	۳۰۰	۲	۲	۸۱/۰۵
۵	۴۰۰	۴۰۰	۱	۳	۵۶/۸۱
۶	۶۰۰	۳۰۰	۲	۲	۹۵/۶۴
۷	۸۰۰	۲۰۰	۳	۱	۷۰/۱۱
۸	۸۰۰	۴۰۰	۱	۳	۷۳/۳۰
۹	۶۰۰	۳۰۰	۲	۲	۸۸/۱۲
۱۰	۶۰۰	۳۰۰	۲	۲	۸۹/۹۴
۱۱	۶۰۰	۳۰۰	۲	۲	۸۶/۱۸
۱۲	۴۰۰	۴۰۰	۳	۱	۴۲/۴۰
۱۳	۴۰۰	۲۰۰	۱	۱	۴۵/۴۸
۱۴	۴۰۰	۴۰۰	۱	۱	۴۲/۵۲
۱۵	۸۰۰	۴۰۰	۱	۱	۸۰/۹۴
۱۶	۴۰۰	۲۰۰	۳	۱	۵۱/۸۱
۱۷	۶۰۰	۳۰۰	۲	۰	۳۱/۲۳
۱۸	۲۰۰	۳۰۰	۲	۲	۳۶/۹۹
۱۹	۴۰۰	۴۰۰	۳	۳	۶۲/۲۴
۲۰	۶۰۰	۳۰۰	۲	۴	۶۶/۰۰
۲۱	۸۰۰	۴۰۰	۳	۱	۸۱/۱۶
۲۲	۶۰۰	۳۰۰	۲	۲	۸۴/۷۰
۲۳	۶۰۰	۳۰۰	۰	۲	۶۴/۰۱
۲۴	۸۰۰	۲۰۰	۱	۳	۶۱/۹۰
۲۵	۴۰۰	۲۰۰	۱	۳	۶۰/۳۰
۲۶	۸۰۰	۲۰۰	۳	۳	۷۵/۸۱
۲۷	۶۰۰	۵۰۰	۲	۲	۷۰/۷۰
۲۸	۸۰۰	۲۰۰	۱	۱	۵۹/۶۲
۲۹	۶۰۰	۳۰۰	۲	۲	۹۰/۰۸
۳۰	۴۰۰	۲۰۰	۳	۳	۶۱/۹۰

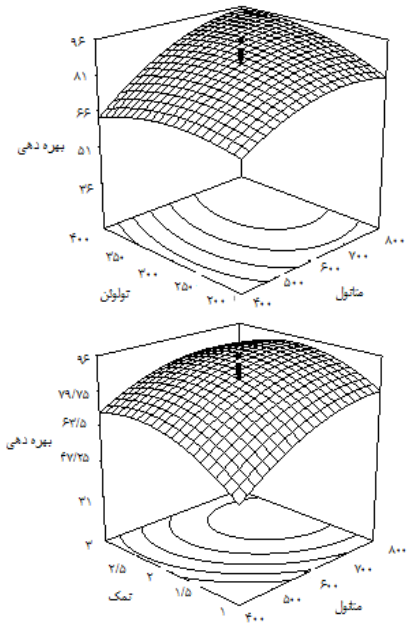
جدول ۳) فاکتورهای اولیه اعتباربخشی روش میکرواستخراج مایع- مایع پخشی

شاخص‌ها	مقادیر
ضریب تعیین R^2	۰/۹۵۶
ضریب تعیین تعدیل‌شده	۰/۹۳۴
انحراف استاندارد خطای تجربی	۳/۹۱
ضریب تغییر مدل	۶/۵۶
میانگین	۵۹/۷۰
[1]Pred R-Squared	۰/۸۷۲
[2]Adeq Precision	۱۹/۰۸۶
مجموع مربعات خطای باقی‌مانده پیش‌بینی‌شده (PRESS)	۸۵۹/۵۳۵

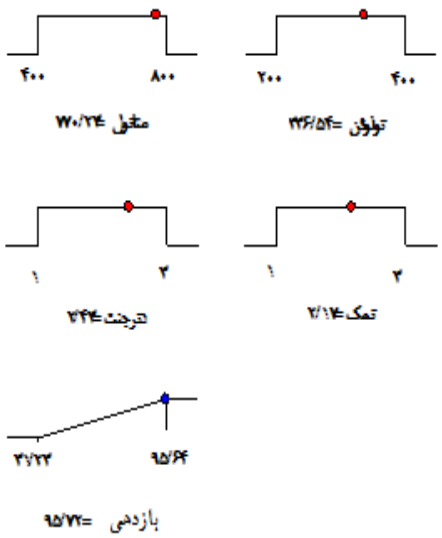
۱: بیانگر مطلوبیت مقادیر پیش‌بینی‌شده توسط مدل است.

۲: بیانگر نسبت سیگنال به نویز است که محدوده مقادیر پیش‌بینی‌شده در نقاط طراحی به خطای متوسط را پیش‌بینی و مقایسه می‌کند.

برای بیان تاثیر عوامل موثر بر روی هم، از نمودارهای سه بعدی سطح- پاسخ استفاده شد. در این نمودارها برهم‌کنش‌هایی که بزرگ‌ترین ضریب‌های مطلق را در معادله مدل دارند برای نمودار سطح- پاسخ انتخاب می‌شوند (شکل ۱). به عبارت دیگر، تغییر پاسخ (یا نتیجه نهایی روش) نسبت به تغیر دو عامل برهم‌کنش‌دهنده روی نمودار رسم می‌شود، در حالی که سایر عامل‌ها در یك سطح ویژه (به‌طور معمول نقطه مرکزی) ثابت نگاه داشته می‌شوند. شکل‌های زیر تاثیر هم‌زمان برهم‌کنش‌های مهم را نشان می‌دهند. در شکل ۲، نتایج اثرات فاکتورهای تاثیرگذار در افزایش بهره‌دهی نمایش داده شده است. نتیجه این که، نقطه بهینه عوامل شامل حجم حلال پخشی به میزان ۷۷۰میکرولیتر و غلظت‌های سدیم‌کلراید به میزان ۲/۱ درصد وزنی- حجمی، SLS به میزان ۲/۴۳ درصد وزنی- حجمی و تولوئن به میزان ۳۳۶میکرولیتر بود که بعد از بهینه‌نمودن شرایط، بهره‌دهی به میزان ۹۵/۶% رسید.



شکل ۱) نتایج نمودار سطح— پاسخ عوامل تاثیرگذار در افزایش بهره‌دهی استخراج کلرپیریفوس از نمونه ادرار



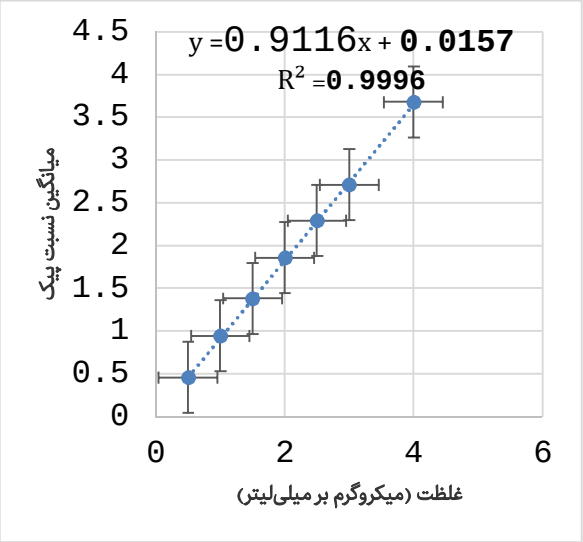
شکل ۲) نمایش شماتیک مقادیر بهینه عامل‌ها، پاسخ و سطوح مربوط

www.SID.ir

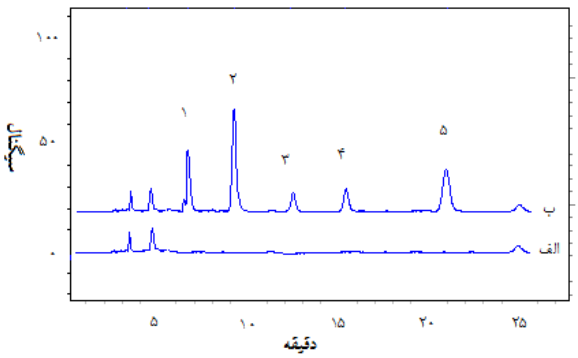
Archive of SID

معتبرسازی نتایج به‌دست‌آمده از استخراج کلرپیریفوس از ادرار:

ارقام شایستگی روش در حالت بهینه محاسبه شد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از شش غلظت محلول استاندارد کلروپیریفوس پس از استخراج از ادرار با غلظت‌هایی در گستره ۰/۵ الی ۴میکروگرم در میلی‌لیتر رسم شد و معادله خط به‌صورت y=۰/۰۹۱۱۶ x +۰/۰۱۵۷ به دست آمد. کمترین میزان قابل شناسایی (LOD) و حداقل میزان قابل اندازه‌گیری (LOQ) براساس دستور Linest نرم‌افزار اکسل از منحنی کالیبراسیون به ترتیب به میزان ۰/۰۸۲ و ۰/۲۵میکروگرم بر میلی‌لیتر و ضریب R^2 به میزان ۰/۹۹۹۶ محاسبه شد (شکل ۳). دقت روش بر مبنای انحراف استاندارد نسبی (RSD) برای ۵ تکرار در نقاط مرکزی برابر ۲/۸۱% و بهره‌دهی کل روش برابر ۹۲/۲۵% بود و در شرایط بهینه به ۹۵/۶% رسید. اختصاصی‌بودن روش با اضافه‌کردن استانداردهای داروها و سموم نشان می‌دهد هیچ گونه تداخلی با پیک کلروپیریفوس در کروماتوگرام در محدوده زمان بازداری پیک آن مشاهده نمی‌شود (شکل ۴).



شکل ۳) منحنی کالیبراسیون کلرپیریفوس در ادرار



شکل ۴) کروماتوگرام بررسی انتخابی‌بودن روش آنالیز کلرپیریفوس در نمونه ادرار
A: کروماتوگرام ادرار بدون نمونه؛ B:کروماتوگرام با نمونه تزریق‌شده ۱- ترامادول، ۲- آزینفوس‌اتیل، ۳- دیازینون، ۴- پیریمیفوس‌متیل، ۵- کلرپیریفوس

بحث

با وجود مطالعات زیاد در خصوص ابداع روش‌های متنوع برای آماده‌سازی و آنالیز کلرپیریفوس در انواع نمونه‌های زیستی و غیرزیستی[9-23]، بسیاری از روش‌های ذکرشده در کنار مزایایی مانند دقت، صحت، حساسیت و تکرارپذیری دارای معایبی از جمله گران‌بودن، زمان‌بربودن، نیاز به تجهیزات دستگاهی با فناوری بالا و کاربران باتجربه هستند. از این رو، بهینه‌سازی و طراحی روش‌های ساده، ارزان همراه با صحت و دقت و تکرارپذیری مناسب به‌ویژه برای آنالیز این سم در نمونه‌های زیستی در بیماران مسموم یا نمونه‌های اخذشده از متوفیان در اثر مسمومیت حاد با این سم به‌منظور انجام آزمایش‌های متداول در آزمایشگاه‌های سم‌شناسی بالینی و قانونی بسیار حایز اهمیت است.

در روش حاضر، حجم و نوع حلال استخراج‌کننده، غلظت نمک، نوع و حجم حلال پخش‌کننده و سورفکتانت بر بهره‌دهی روش، موثر و دو عامل اولتراسونیکاسیون و pH بر بازده استخراج کم‌تاثیر بودند. در این روش، تولوئن و متانول به ترتیب به‌عنوان بهترین حلال‌های استخراج‌کننده و پخش‌کننده برای استخراج کلروپیریفوس از نمونه‌های ادرار استفاده شد. از طرفی استفاده از SLS و کلریدسدیم به‌عنوان عوامل سورفکتانت و Salting-out سبب افزایش بهره‌دهی روش استخراج شد. SLS به‌عنوان یك عامل سورفکتانت آنیونی و دارای عوامل هیدروفیل و لیپوفیل در ساختار مولکولی خود سبب کاهش کشش سطحی و افزایش احتمال اختلال فازهای آبی و آلی در فرآیند استخراج مایع- مایع می‌شود. این نتایج با مطالعه اخیر انجام‌شده توسط هو و همکاران که نشان دادند استفاده از SLS از طریق تشکیل ابرمولکول‌ها با ساختار میسل‌های دولایه سبب افزایش سرعت تعویض فازهای آبی و آلی در روش میکرواستخراج فاز مایع و موجب تغلیظ و افزایش بهره‌دهی استخراج آلکالوئیدهای بربرین و اپی‌بربرین از نمونه‌های ریزوم گیاهی می‌شوند، مطابقت دارد[29].

در این مطالعه، غلظت ۲ درصد وزنی- حجمی NaCl به‌عنوان یك عامل موثر در افزایش بهره‌دهی روش DLLME در شرایط بهینه‌سازی‌شده شناخته شد. این یافته با نتایج مطالعه انجام‌شده قبلی که در آن از غلظت ۱/۳۶ درصد وزنی- حجمی NaCl برای تغلیظ و استخراج داروهای نیترازپام و میدازولام از نمونه‌های سرم انسان در شرایط بهینه‌شده به روش DLLME-HPLC استفاده شده بود، مطابقت دارد[30].

جدول ۴ مقایسه‌ای از روش‌های آماده‌سازی و آنالیز کلرپیریفوس از انواع نمونه‌های زیستی[31-35] را با روش حاضر از نظر حداقل مقادیر قابل شناسایی، ضریب همبستگی و میزان بهره‌دهی روش آنالیز با سایر روش‌های موجود نشان می‌دهد. همان گونه که از این مقایسه مشخص می‌شود، روش بهینه‌شده در این تحقیق از نظر عوامل و متغیرهای تجزیه‌ای، قابل مقایسه و دارای حساسیت و بهره‌دهی مناسبی برای آنالیز کلرپیریفوس در نمونه ادرار است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴) مقایسه حداقل مقادیر قابل شناسایی، ضریب تغییرات و میزان بهره‌دهی روش‌های آماده‌سازی مورد استفاده در آنالیز کلرپیریفوس در نمونه‌های زیستی با روش بهینه‌شده

روش آنالیز	نمونه (ها)	حداقل مقدار قابل شناسایی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	ضریب همبستگی (r^2)	بهره‌دهی (%)
SPE-GC/MS [31]	خون	۰/۰۸	۰/۹۹۶	۹۰-۹۲/۸
SPE-HPLC-DAD [32]	پلاسما	۰/۸	۰/۹۹۷	۸۰-۸۷
	ادرار	۱	۰/۹۹۹	۷۷-۸۷
HPLC-DAD [33]	ادرار	۰/۶۱	۰/۹۹۵	۷۳-۸۲
QuEChERS- GC/MS/MS [34]	خون	۰/۰۳	۰/۹۸۵	۸۵-۹۳
MEPS-GC/MS/MS [35]	خون	۰/۱۲	۰/۹۹۷	۶۱-۷۷
DLLME-HPLC-DAD (مطالعه حاضر)	ادرار	۰/۰۸۲	۰/۹۹۹	۹۱-۹۳

SPE-GC/MS: استخراج فاز جامد- کروماتوگرافی گازی/طیف‌سنجی جرمی؛ SPE-HPLC-DAD: استخراج فاز جامد- کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا و ردیاب آرایه دیودغ QuEChERS: سریع، آسان، ارزان، موثر، نیرومند و ایمن؛ MEPS: میکرواستخراج با استفاده از جاذب متراکم؛ DLLME: میکرواستخراج مایع- مایع پخشی

اگرچه عدم شناسایی و اندازه‌گیری متابولیت‌های این سم در ادرار به‌عنوان یکی از محدودیت‌های این مطالعه محسوب می‌شود و پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده با درنظرگرفتن این متابولیت‌های ادراری صورت پذیرد، ولی باید توجه داشت به‌علت غیراختصاصی‌بودن این متابولیت‌ها در اثر متابولیزم کلرپیرویفوس و شباهت نحوه متابولیزم و تولید این متابولیت‌ها با سایر سموم فسفردار آلی، در موارد مسمومیت‌های حاد، خللی در شناسایی این سم محسوب نمی‌شود.

در خاتمه روش بهینه‌سازی‌شده حاضر، به‌عنوان یک روش استخراج مایع- مایع ساده، ارزان‌قیمت، با بهره‌دهی بالا و سازگار با محیط زیست با استفاده از مدل‌های کمومتریکس برای استخراج کلروپیرفوس در نمونه ادرار است و می‌تواند به‌آسانی با دقت، صحت و حساسیت قابل قبول برای آنالیز کلرپیریفوس در نمونه ادرار در بیماران مسموم یا آنالیزهای سم‌شناسی قانونی مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

به‌کارگیری روش بهینه‌شده DLLME-HPLC-PDA به‌عنوان یک روش ساده، سریع، ارزان‌قیمت، حساس و دقیق برای آنالیز کلرپیریفوس در نمونه‌های ادرار در آزمایشگاه‌های سم‌شناسی بالینی و قانونی می‌تواند جایگزین مناسبی برای سایر روش‌های استخراج و آنالیز این سم محسوب شود.

تشکر و قدردانی: داده‌های این مقاله بخشی از نتایج پایان‌نامه دکترای تخصصی در رشته شیمی تجزیه آقای *رضا محمدظاهری* است که در قالب طرح پژوهشی مصوب معاونت آموزشی و پژوهشی سازمان پزشکی قانونی کشور به شماره ۱۲۵۷۷/پ صورت گرفته است، که از این سازمان به‌خاطر تامین بخشی از بودجه لازم برای اجرای پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از مدیر کل محترم پزشکی قانونی استان کردستان و کلیه کارکنان محترم آزمایشگاه سم‌شناسی پزشکی قانونی استان کردستان به‌خاطر همکاری آنها برای اجرای طرح قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: این پژوهش مصوب مرکز تحقیقات پزشکی قانونی (شماره طرح: ۱۲۵۷۷/پ) بوده و کلیه موازین اخلاقی مطابق با دستورالعمل‌های کمیته اخلاق معاونت آموزشی و پژوهشی سازمان پزشکی قانونی کشور و منطبق با بیانیه هلسینکی است.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: رضا محمدظاهری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۴۰%)؛ مهدی انصاری دوگاهه (نویسنده دوم)، روش‌شناس/تحلیگر آماری/نگارنده بحث (۲۰%)؛ مریم کاظمی‌پور (نویسنده سوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۰%)؛ کامبیز سلطانی‌نژاد (نویسنده چهارم)، نگارنده مقدمه/نگارنده بحث (۲۰%)

منابع مالی: بودجه لازم برای اجرای این پژوهش توسط معاونت آموزشی و پژوهشی سازمان پزشکی قانونی کشور تامین شده است.

منابع

1- Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Buffler P, Costa LG, et al. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment. Crit Rev Toxicol. 2008;38 Suppl 2:1-125.

2- Christensen, K, Harper B, Luukinen, B, Buhl K, Stone D. Chlorpyrifos technical fact sheet [Internet]. Oregon: National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services. 2009 [cited 2019 July 22]. Available from: http://npic.orst.edu/factsheets/archive/chlorptech.html .

3- Rathod AL, Garg RK. Chlorpyrifos poisoning and its implications in human fatal cases: a forensic perspective with reference to Indian scenario. J Forensic Leg Med. 2017;47:29-34.

4- Martínez MA, Ballesteros S, Sánchez de la Torre C, Sanchiz A, Almarza E, García-Aguilera A. Attempted suicide by ingestion of chlorpyrifos: identification in serum and gastric content by GC-FID/GC-MS. J Anal Toxicol. 2004;28(7):609-15.

5- Lee JC, Lin KL, Lin JJ, Hsia SH, Wu CT. Non-accidental chlorpyrifos poisoning-an unusual cause of profound unconsciousness. Eur J Pediatr. 2010;169(4):509-11.

6- Solomon GM, Moodley J. Acute chlorpyrifos poisoning

www.SID.ir

Archive of SID

in pregnancy: a case report. Clin Toxicol (Phila). 2007;45(4):416-9.
7- Hadland SE, Levy S. Objective testing: urine and other drug tests. Child Adolesc Psychiatr Clin N Am. 2016;25(3): 549-65.
8- Brun EM, Garcés-García M, Puchades R, Maquieira A. Highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for chlorpyrifos. Application to olive oil analysis. J Agric Food Chem. 2005;53(24):9352-60.
9- Otieno PO, Owuor PO, Lalah JO, Pfister G, Schramm KW. Comparative evaluation of ELISA kit and HPLC DAD for the determination of chlorpyrifos ethyl residues in water and sediments. Talanta. 2013;117:250-7.
10- Rezk MR, Abd El-Aleem AEB, Khalile SM, El-Naggar OK. Selective determination of diazinon and chlorpyrifos in the presence of their degradation products: Application to environmental samples. J AOAC Int. 2018;101(4):1191-7.
11- Rezk MR, Abd El-Aleem AEB, Khalile SM, El-Naggar OK. Determination of residues of diazinon and chlorpyrifos in lavender and rosemary leaves by gas chromatography. J AOAC Int. 2018;101(2):587-92.
12- Dallegrave A, Pizzolato TM, Barreto F, Eljarrat E, Barceló D. Methodology for trace analysis of 17 pyrethroids and chlorpyrifos in foodstuff by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 2016;408(27):7689-97.
13- Płonka M, Walorczyk S, Miszczyk M, Kronenbach-Dylong D. Simultaneous gas chromatographic determination of chlorpyrifos and its impurity sulfotep in liquid pesticide formulations. J Environ Sci Health B. 2016;51(11):736-41.
14- Tiwari MK, Guha S. Simultaneous analysis of endosulfan, chlorpyrifos, and their metabolites in natural soil and water samples using gas chromatography-tandem mass spectrometry. Environ Monit Assess. 2013;185(10):8451-63.
15- Salm P, Taylor PJ, Roberts D, de Silva J. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitative determination of the organophosphorus pesticides dimethoate, fenthion, diazinon and chlorpyrifos in human blood. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2009;877(5-6):568-74.
16- Bicker W, Lämmerhofer M, Genser D, Kiss H, Lindner W. A case study of acute human chlorpyrifos poisoning: novel aspects on metabolism and toxicokinetics derived from liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urine samples. Toxicol Lett. 2005;159(3):235-51.
17- Bicker W, Lämmerhofer M, Lindner W. Determination of chlorpyrifos metabolites in human urine by reversed-phase/weak anion exchange liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2005;822(1-2):160-9.
18- Sancho JV, Pozo OJ, Hernández F. Direct determination of chlorpyrifos and its main metabolite 3,5, 6-trichloro-2-pyridinol in human serum and urine by coupled-column liquid chromatography/electrospray-tandem mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2000;14(16):1485-90.
19- Shanker A, Sood C, Kumar V, Ravindranath SD. A modified extraction and clean-up procedure for the detection and determination of parathion-methyl and chlorpyrifos residues in tea. Pest Manag Sci. 2001;57(5):458-62.
20- Wielgomas B, Czarnowski W. Headspace single-drop microextraction and GC-ECD determination of chlorpyrifos-ethyl in rat liver. Anal Bioanal Chem. 2008;390(7):1933-41.
21- Li R, He L, Zhou T, Ji X, Qian M, Zhou Y, Wang Q. Simultaneous determination of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in duck muscle by modified QuEChERS coupled to gas chromatography tandem mass spectrometry (GC-MS/MS). Anal Bioanal Chem. 2014;406(12):2899-907.
22- Rahimi Moghadam M, Zargar B , Rastegarzadeh S . Novel magnetic hollow zein nanoparticles for preconcentration of chlorpyrifos from water and soil samples prior to analysis via high-performance liquid chromatography (HPLC). Analyst. 2018;143(9):2174-82.
23- Ma JK, Huang XC, Wei SL. Preparation and application of chlorpyrifos molecularly imprinted solid-phase microextraction probes for the residual determination of organophosphorous pesticides in fresh and dry foods. J Sep Sci. 2018;41(15):3152-62.
24- Rezaee M, Assadi Y, Hosseini MRM, Aghaee E, Ahmadia F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. J Chromatogr A. 2006;1116(1-2):1-9.
25- El-Gindy A, Hadad GM. Chemometrics in pharmaceutical analysis: an introduction, review, and future perspectives. J AOAC Int. 2012;95(3):609-23.
26- Rasyid MFA, Salim MS, Akil HM, Ishak ZAM. Optimization of processing conditions via response surface methodology (RSM) of nonwoven flax fibre reinforced acrodur biocomposites. Procedia Chem. 2016;19:469-76.
27- Sereshti, H, Karimi M, Samadi S. Application of response surface method for optimization of dispersive liquid–liquid microextraction of water-soluble components of Rosa damascena Mill. essential oil. J Chromatogr A. 2009;1216(2):198-204.
28- Asghar A, Abdul Raman AA, Ashri Wan Daud WM. A comparison of central composite design and taguchi method for optimizing Fenton process. Sci World J. 2014;2014:1-14.
29- Hu S, Xue J, Yang X, Chen X, Wang RQ, Bai XH. Sodium dodecyl sulfate sensitized switchable solvent liquid-phase microextractionfor the preconcentration of protoberberine alkaloids in Rhizoma coptidis. J Sep Sci. 2018;41(18):3614-21.
30- Goudarzi N, Farsimadan S, Chamjangali MA, Bagherian GA. Optimization of modified dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the simultaneous preconcentration and determination of nitrazepam and midazolam drugs: An experimental design. J Sep Sci. 2015;38(10):1673-9.
31- Park MJ, In SW, Lee SK, Choi WK, Park YS, Chung HS. Postmortem blood concentrations of organophosphorus pesticides. Forensic Sci Int. 2009;184(1-3):28-31.
32- Abu-Qare AW, Abou-Donia MB. Quantification of nicotine, chlorpyrifos and their metabolites in rat plasma and urine using high-performance liquid chromatography. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2001;757(2):295-300.
33- Cho Y, Matsuoka N, Kamiya A. Determination of organophosphorus pesticides in biological samples of acute poisoning by HPLC with diode-array detector. Chem Pharm Bull. 1997;45(4):737-40.

www.SID.ir

Archive of SID

34- Kim HS, Kim J, Suh JH, Han SB. General unknown screening for pesticides in whole blood and Korean gastric contents by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Arch Pharm Res. 2014;37(10):1317-24.

35- Santos C, Oppolzer D, Gonçalves A, Barroso M, Gallardo E. Determination of organophosphorous pesticides in blood using microextraction in packed sorbent and gas chromatography-tandem mass spectrometry. J Anal Toxicol. 2018;42(5):321-9.

www.SID.ir