اندازه‌گیری باقیمانده گلیفوزیت در برنج با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و جفت‌شده با آشکارساز آرایه دیودی

محسن باقری[۱]، وحیده مهدوی*[۲]

۱.پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. ۲. بخش تحقیقات آفت‌کش‌ها، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۲۵

چکیده

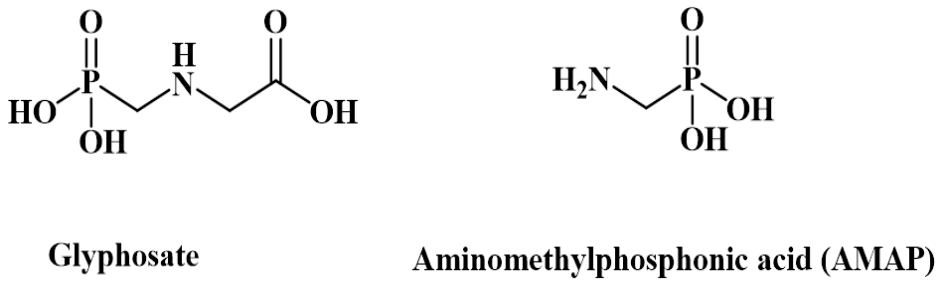
گلیفوزیت علف‌کشی است که به صورت گسترده پس از کاشت برای کنترل علف‌های‌هرز یا قبل از برداشت انواع مختلف محصولات کشاورزی در ایران و سراسر جهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. وزن مولکولی پایین، خصلت آمفوتری، قطبیت بالا و عدم حلالیت در حلال‌های آلی مانع از استفاده از این حلال‌ها برای استخراج آسان گلیفوزیت از بافت نمونه می‌شود و از سوی دیگر عدم وجود گروه‌های کروموفور یا فلوروفور در این ترکیبات امکان بکارگیری سیستم‌های متداول اندازه‌گیری به همراه آشکارسازهای رایج از قبیل فلوئورسانس و یا فرابنفش را محدود می‌سازد. این مطالعه یک روش تجزیه‌ای با حساسیت بالا و مبتنی بر کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و با آشکارساز عمومی آرایه دیودی را برای تعیین باقیمانده گلیفوزیت در برنج که مبتنی بر مشتق‌سازی پیش از ستون با استفاده از معرف فنیل ایزوتیوسیانات می‌باشد، ارائه می‌دهد. برای استخراج گلیفوزیت، مشتق‌سازی با فنیل ایزوتیوسیانات انجام و جداسازی مشتق تیوفنیل کرباموئیل گلیفوزیت بر روی ستون با فاز معکوس $C_{۱۸}$، طول موج آشکارساز ۲۵۴ nm و سرعت جریان ۱ ml/min از فاز متحرک شامل ٪۷۰ آب (حاوی ۰/۱ درصد فرمیک اسید) و ٪ ۳۰ استونیتریل (حاوی ۰/۱ درصد فرمیک اسید) طی یک شویش گرادیانی بهینه‌سازی شد. بررسی پاسخ‌های آشکارساز در محدوده µg/mL ۵- ۰/۰۵ و ضریب همبستگی ۰/۹۸۶۹ خطی بودن مطلوب را برای روش پیشنهادی اثبات نمود مقدار LOQ بدست آمده برابر با µg/mL ۰/۰۵ است که با توجه به مقادیر MRL های ملی برای محصولات دیگر در محدوده قابل قبول قرار دارد. روش پیشنهادی فرایند مشتق‌سازی ساده‌ای را ارائه می‌دهد که وابسته به بافت نبوده و برای سایر بافت‌ها قابل تعمیم و کاربرد می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: برنج، فنیل ایزوتیوسیانات، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)، گلیفوزیت، مشتق‌سازی.

* **مسئول مکاتبات:** وحیده مهدوی، vahideh.mahdavi@yahoo.com

مقدمه

کاربرد علف‌کش‌ها برای بهبود عملکرد و کیفیت محصولات کشاورزی از طریق کاهش یا مهار رشد علف‌های‌هرز و همچنین به عنوان خشک‌کننده علف‌های‌هرز برای محصولات مختلف از قبیل غلاتی مانند گندم، جو و ذرت بسیار متداول می‌باشد (Xu *et al*., 2019). در میان طیف وسیع علف‌کش‌ها، علف‌کش‌های مبتنی بر گلیفوزیت در سراسر جهان به طور گسترده‌ای برای کنترل علف‌های‌هرز چندساله و یک عامل کمک برداشت برای تسریع خشک شدن غلات مورد استفاده قرار می‌گیرند.



شکل ۱- ساختار گلیفوزیت و آمینو متیل فسفونیک اسید.

Fig 1. molecular structure of glyphosate and its main metabolite, AMPA.

گلیفوزیت[1] یک علف‌کش آمینوفسفات غیر انتخابی، سیستمیک و پس‌رویشی است که با نام تجاری رانداپ به فروش می‌رسد (Wang *et al*., 2016). گلیفوزیت تنها علف‌کش با ساختار خطی است که معمولا به فرم استر یا نمک ایزوپروپیل آمین فرموله می‌شود و مهم‌ترین متابولیت آن آمینومتیل فسفونیک اسید (AMPA) می‌باشد. شکل (۱) نشان‌دهنده ساختار گلیفوزیت و AMPA می‌باشد. در باغات و زمین‌های زراعی و غیر زراعی این علف‌کش برای کنترل دامنه وسیعی از علف‌های‌هرز (نازک‌برگ و پهن‌برگ) یکساله و چندساله کاربرد دارد. به علت سمیت نسبتاً پایین برای پستانداران به وفور در جهان بکار می‌رود، لذا این مصرف گسترده منجر به ایجاد معضل باقیمانده این علف‌کش در محیط‌زیست شده و اهمیت تعیین روش‌هایی برای اندازه‌گیری این علف‌کش را در محصولات کشاورزی و فراورده‌های غذایی موجب شده است (Olivo *et al*., 2015). گلیفوزیت اگرچه در کشور جزء سموم مجاز برای مصرف در مزارع برنج نمی‌باشد اما به علت غیر انتخابی‌بودن آن و سمیت پایین و از بین‌بردن دامنه وسیعی از علف‌های‌هرز در مزارع استفاده زیادی دارد. گلایفوزیت و نمک‌های آن غیر قابل تبخیر (فشار بخار گلایفوسیت عملاً صفر است) و در مقابل نور و هوا پایدار می‌باشند. این ترکیب شدیداً جذب سطحی خاک شده و شسته نمی‌شود، همچنین در خاک نیز خاصیت جابجایی ندارد. گلیفوزیت در مقایسه با مواد فعال بیولوژیک موجود در سایر علف‌کش‌ها یک مولکول کوچک با وزن مولکولی ۱۶۹ مول بر گرم و سه گروه عاملی کربوکسیل، آمینو و فسفونات می‌باشد.

[1] [N-(phosphonomethyl) glycine; GLYP]

ماده فعال بیولوژیک در علف‌کش گلیفوزیت از کوچکترین اسید آمینه موجود در ساختار پروتئین‌ها یعنی گلایسین مشتق شده است به‌نحوی که در گلیفوزیت یکی از اتم‌های هیدروژن در مولکول گلایسین با یک گروه فسفونومتیل جایگزین شده است. گیاهان به‌راحتی گلیفوزیت را تجزیه نمی‌کنند و این علف‌کش تماسی در مسیرهای آنزیمی مسئول بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک مانند تایروزین، فنیل آلانین و تریپتوفان، مسیر شیکمات، با مهار آنزیم ۵- انول پیرویل شیکیمات ۳- فسفات سینتاز اخلال ایجاد می‌کند و باعث آسیب یا مرگ فیزیولوژیکی گیاه می‌شود (Perez *et al*., 2019). مطالعات مختلف تاثیر گلیفوزیت بر روی فرایندهای فیتوشیمیایی یا فیزیولوژیکی گیاه را اثبات نموده است که منجر به کاهش نرخ فتوسنتز، تخریب کلروفیل، مهار یا اکسیداسیون هورمون تنظیم کننده گیاهی اکسین که مسئول رشد گیاه است، می‌شود (Xu *et al*., 2019). تجزیه گلیفوزیت در خاک توسط میکروارگانیسم‌ها صورت می‌گیرد. حلالیت بالای گلیفوزیت در آب (۱۲ لیتر/میلی‌گرم) در انتقال آن از خاک به محیط‌های آبی کمک می‌کند به نحوی که غلظت‌های پایین‌تر علف‌کش در سفره‌های کم‌عمق پیدا شده که نظریه محدود بودن تحرک در خاک را به چالش کشیده است. محدوده مجاز غلظت گلیفوزیت در آب‌های زیر زمینی µg/L ۱۸/۴۳- ۰/۱۳ و در آب رودخانه µg/L ۱۸/۴۳- ۰/۱۳ می‌باشد (EU, 1998) و غلظت بالاتر از حدود مجاز بسیار خطرناک بوده و باعث مرگ و یا سقط جنین می‌شود، بنابراین پایش میزان باقیمانده و سپس حذف این آلاینده بسیار مهم است (Olivo *et al*., 2015). در حال حاضر این علف‌کش ۱۰ تا ۱۲ درصد مصرف علف‌کش‌های کشور را به خود اختصاص داده است که می‌تواند عامل آثار جبران ناپذیر زیست‌محیطی باشد. نیمه عمر متوسط این علف‌کش در خاک ۴۷ روز گزارش شده است، این ترکیب نسبتا در محیط‌های شیمیایی و شرایط تخریب نوری در خاک، پایدار است. نیمه عمر متوسط گلیفوزیت در آب تا ۹۱ روز متغیر است. تخریب نوری آن در آب تقریبا بی‌معنی است و به علت فشار پایین میزان تبخیر این ترکیب بسیار ناچیز است (Npic, 2011). به گفته آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان که در سال ۲۰۰۵ منتشر شده گلیفوزیت متعلق به گروه ۲A و احتمالا برای انسان سرطان‌زا است. برخی عناصر موجود در رانداپ احتمال بروز بیماری‌هایی همچون درخود ماندگی، نقص‌های مادرزادی بیماری سلیاک و سندرم التهابی روده را بالا می برد (Khademi *et al*., 2019). این علف‌کش خطرناک علاوه بر مخاطراتی که برای سلامت انسان‌ها دارد به محیط‌زیست آسیب رسانده و خاک را به شدت آلوده می‌کند.

بدون خاک کشاورزی مناسب، در آینده، امنیت غذایی با چالش‌های فراوانی رو به رو خواهد شد. استفاده از علف‌کش رانداپ به دلیل مقاوم‌شدن علف‌های‌هرز روز به روز بیشتر می‌شود که برای سلامت انسان و خاک خطرناک است. برای مقابله با اثر علف‌کش باید از محصولات تراریخته دستکاری ژنتیکی شده استفاده کرد تا بتوانند در برابر این علف‌کش مقاومت کنند. بنابراین با گسترش مصرف علف‌کش گلیفوزیت به اجبار استفاده از محصولات تراریخته نیز افزایش خواهد یافت (EPA, 2009; WHO, 2005). اندازه‌گیری باقیمانده گلیفوزیت و مهم‌ترین متابولیت حاصل از تجزیه آن با چالش‌هایی مواجه می‌باشد. از یک سو وزن مولکولی پایین، خصلت آمفوتری، قطبیت بالا و عدم حلالیت در حلال‌های آلی مانع از استفاده از این حلال‌ها برای استخراج آسان از بافت نمونه می‌شود و از سوی دیگر عدم وجود گروه‌های کروموفور یا فلوروفور در این ترکیبات امکان بکارگیری سیستم‌های متداول اندازه‌گیری به همراه آشکارسازهای رایج از قبیل فلوئورسانس یا فرابنفش را محدود می‌سازد. بر اساس

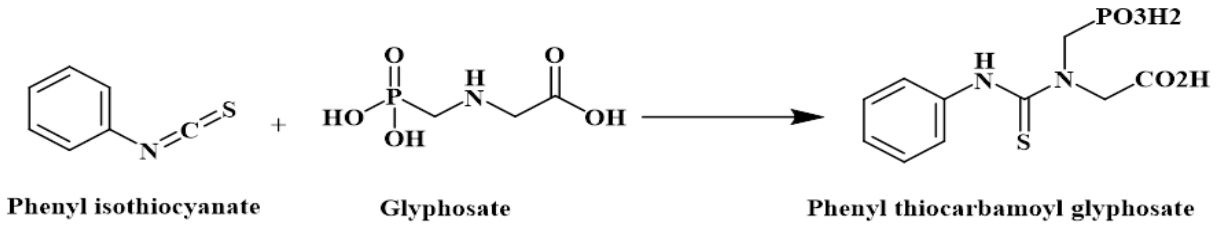
مقدار این ترکیبات در نمونه‌های مختلف استراتژی‌های مختلف برای آشکارسازی آن‌ها بکار می‌رود. برای غلظت‌های در محدوده میلی‌گرم، تعیین مقدار با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و آشکارساز فرابنفش انجام می‌شود. برای مقادیر جزئی این ترکیبات انجام فرایندهای مشتق‌سازی برای افزایش حساسیت این روش‌ها ضروری می‌باشد. از بین واکنش‌گرهای مشتق‌ساز که به صورت معمول بکارگرفته می‌شوند می‌توان به ۹- فلوئورومتیل کلروفرمات (FMOC-Cl) و اورتوفتال آلدهید (OPA) اشاره نمود که محصول تشکیل شده استفاده از آشکارساز فلوئورسانس را اجتناب ناپذیر می‌سازد. کروماتوگرافی مایع با آشکارساز اسپکترومتری جرمی(LC-MS) علیرغم حداقل مقدار قابل آشکارسازی پایین (LOD) و عدم نیاز به فرایندهای مشتق‌سازی به دلیل گران‌قیمت بودن و در دسترس‌نبودن برای عموم، آنالیز این ترکیب را محدود می‌سازد. لذا توسعه روش‌های اندازه‌گیری مبتنی بر آشکارسازهای جهان شمول مانند آرایه دیودی و استفاده از واکنش‌گرهای مشتق‌سازی که با این دسته از آشکارسازها سازگار باشد می‌تواند در تسهیل آنالیزهای کمی بسیار کمک‌کننده باشند. هدف از این پژوهش ارائه روشی بهینه برای تعیین باقیمانده گلیفوزیت در محصولات مختلف کشاورزی از جمله برنج است.

مواد و روش‌ها

مواد: استونیتریل به عنوان جزء آلی فاز متحرک با درجه خلوص HPLC از شرکت Merck (Darmstadt, Germany) خریداری شد. حلال‌های مورد نیاز مانند اتانول و استاندارد گلیفوزیت از شرکت Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) خریداری گردید. معرف مشتق‌ساز فنیل ایزوتیوسیانات و تری اتیل آمین مورد نیاز برای فرایند مشتق‌سازی از شرکت Merck (schuchardt OHG, Germany) تهیه شد. همچنین در تمام مراحل از آب با خلوص HPLC تهیه شده از سیستم Mili-Q HPLC استفاده شد.

استخراج: آلودگی بطور مصنوعی در نمونه‌های شاهد برنج ایجاد گردید. ابتدا ۱۰ گرم از نمونه برنج آسیاب شده، در یک فالکون ۵۰ میلی‌لیتری توزین و با ۱۰cc محلول ۱:۱ دی کلرومتان: آب مخلوط گردید و به مدت یک ساعت همزده شد. سپس با سرعت rpm ۲۵۱۱ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و فاز آبی محلول دو فازی ایجاد شده برای مشتق‌سازی مورد استفاده قرار گرفت.

فرایند مشتق سازی: ۱ میلی‌لیتر از فاز آبی بدست آمده در مرحله استخراج به ویال ۲ میلی‌لیتری منتقل و با استفاده از آون خلا خشک گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول مشتق‌ساز شامل اتانول، آب، تری اتیل آمین و فنیل ایزوتیوسیانات با نسبت‌های ۷:۱:۱:۱ به آن اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. شکل (۲) نشان دهنده واکنش گلیفوزیت با معرف مشتق‌ساز فنیل ایزوتیوسیانات می‌باشد.



شکل ۲. واکنش مشتق سازی گلیفوزیت

Figure 2- Derivatization reaction of glyphosate

محلول حاصل به آون خلا منتقل و پس از خشک شدن، محتویات درون ویال با افزودن ۱ میلی‌لیتر محلول ۷۰:۳۰ استونیتریل: آب حل گردید و برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی HPLC آماده شد.

محلول استاندارد: محلول استاندارد مرجع گلیفوزیت در استونیتریل در غلظت ۱۰۰۰ µg/mL تهیه و در فریزر ۲۱- °C نگهداری شد. محلول‌های کار با غلظت‌های مناسب از محلول استاندارد مرجع، در محدوده µg/mL ۵- ۰/۰۵ بلافاصله قبل از آماده‌سازی نمونه‌ها تهیه می‌شد.

تجهیزات: تمامی آنالیزها با استفاده از سیستم کروماتوگرافی Knauer ساخت کشور آلمان مجهز به پمپ HPLC مدل k-1001 به همراه شیر تزریق Rheodyne مدل(I) ۷۷۲۵ با لوپ ۲۰µl و آشکار ساز PDA مدل K-2800 انجام گرفت. برای ثبت داده‌ها و پردازش آنها نرم افزار EZ Chrom در طی این مطالعه مورد استفاده قرارگرفت.

بهینه‌سازی پارامترهای کروماتوگرافی برای فرایند جداسازی: برای بهینه‌سازی شرایط جداسازی گلیفوزیت در نمونه‌های مختلف از ستون Phenomenex (۲۵۰×۴ mm، ۵ µm) با فاز معکوس $C_{۱۸}$ استفاده شد. در تمام روش‌ها حجم تزریق ۲۰µl، طول موج آشکارساز بر روی ۲۵۴ nm و سرعت جریان فاز متحرک در ۱ ml/min تنظیم گردید.

نتایج

مشتق‌سازی و بهینه سازی جداسازی گلایفوزیت بر روی ستون با فاز ساکن $C_{۱۸}$

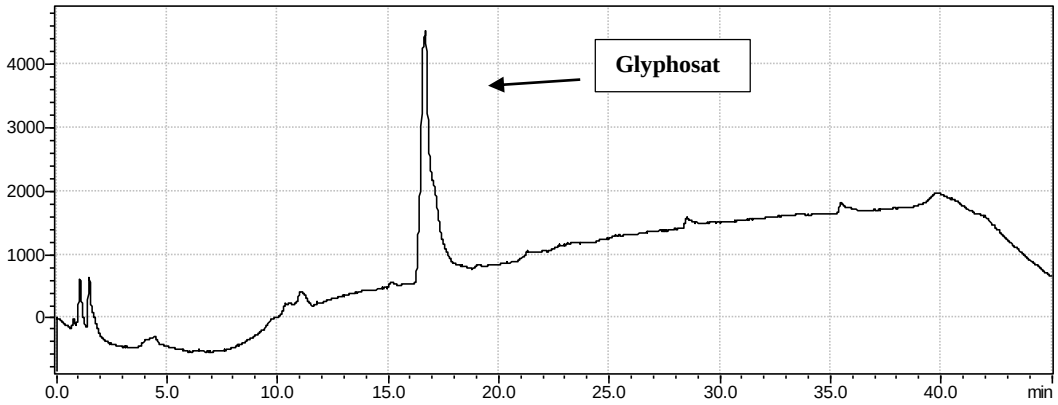
در این مطالعه به دلیل حساسیت بالای روش تجزیه‌ای مبتنی بر یک فرایند مشتق‌سازی آسان با استفاده از فنیل ایزوتیوسیانات و سازگاری آن با آشکارساز متداول آرایه دیودی از این معرف استفاده گردید. بهینه‌سازی جداسازی باقیمانده گلیفوزیت از سایر ناخالصی‌های موجود در بافت نمونه با بررسی پروفایل شویشی فاز آبی و آلی به منظور دست‌یابی جداسازی مطلوب و در کمترین زمان ممکن بر روی ستون با فاز معکوس $C_{۱۸}$ انجام گرفت. نتایج بررسی روش‌های شویشی مختلف نشان داد که بهترین الگوی جداسازی با استفاده از فاز متحرک شامل ۷۰ درصد آب (A: حاوی ۰/۱ درصد فرمیک اسید) و ۳۰ درصد استونیتریل (B: حاوی ۰/۱ درصد فرمیک اسید) طی یک شویش گرادیانی که در جدول (۱) خلاصه شده است بدست آمد.

شرایط شویش گرادیانی بهینه بهترین امکان جداسازی را در کمترین زمان ممکن بدست داد به نحوی که امکان جداسازی مشتق تایوکرباموئیل گلیفوزیت را در زمان ۱۶/۸ min، با تکرارپذیری و تفکیک‌پذیری مطلوب فراهم نمود.

جدول ۱- شرایط شویش بهینه شده برای جداسازی گلیفوزیت بر روی فاز ساکن C۱۸.

Table 1- Optimized gradient elution for separation of glyphosate on C18 stationary phase.

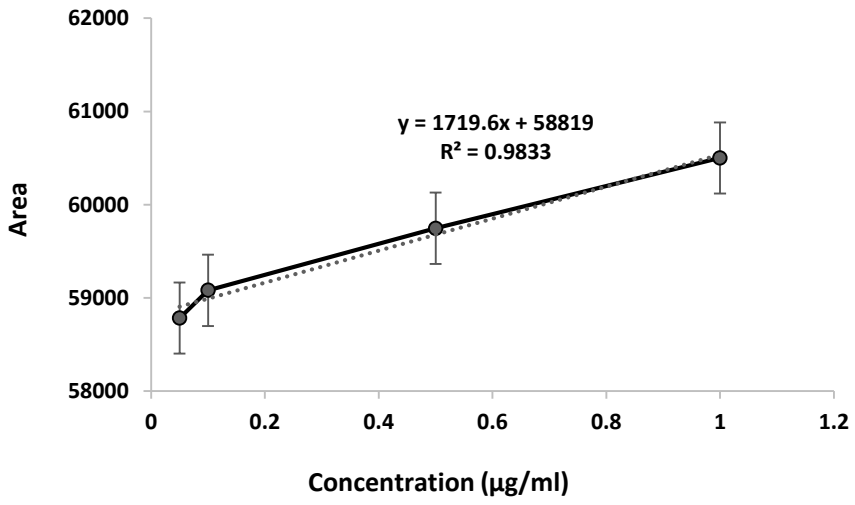
Time (min)	**ACN (0.1% FA)**	Water (0.1% FA)	
0-12	0	100	
12-40	10	90	
40-50		100	0



شکل ۳- کروماتوگرام گلیفوزیت با غلظت ۵/۰ µg/ml در طول موج ۲۵۴nm و سرعت جریان ۱ ml/min در فاز متحرک با نسبت تقریبی آب/ استونیتریل ۷۰:۳۰.

Figure 3. Chromatograms of 5.0 µg/ml glyphosate at λ=254 nm and flow rate of 1 ml/min with ratio of ACN/Water 30:70 v/v as mobile phase.

با افزودن مقادیر یکسان از استانداردهای ساخته شده و انجام فرایند مشتق‌سازی، محلول نهایی بدست‌آمده با حجم‌های یکسان به دستگاه HPLC تزریق و با احتساب سطح زیر پیک برای غلظت‌های مختلف گلیفوزیت، منحنی کالیبراسیون به منظور محاسبه معادله رگرسیون خطی (Linear regression equation) و ضریب همبستگی (correlation coefficient) متناظر با آن استفاده گردید. شکل (۴) نمودار کالیبراسیون بدست آمده برای غلظت‌های مختلف گلیفوزیت برحسب سطح زیر پیک به همراه معادله رگرسیون و ضریب همبستگی نشان می‌دهد.



شکل ۴- نمودار کالیبراسیون بدست آمده در غلظت‌های مختلف گلیفوزیت.

Figure 4. Obtained glyphosate calibration curve in different concentration.

برای محاسبه مقادیر ارقام شایستگی روش پیشنهادی از دستورالعمل SANCO استفاده شد بدین‌ترتیب که مقادیر اسپایک شده از گلیفوزیت به تدریج در نمونه‌ها کاهش داده شد تا جایی‌که با احتساب RSD کمتر از ۲۰ درصد دستگاه بتواند سیگنال را از نویز تشخیص دهد در این روش با توجه به این‌که با فرایند مشتق‌سازی و بافت شلوغی روبرو هستیم سیگنال مقادیر کمتر از µg/mL ۰/۰۵ قابل تفکیک از نویز نبودند لذا این مقدار به عنوان LOQ روش در نظر گرفته شد. از طرفی مقادیر MRL در نمونه‌های دیگر که گلیفوزیت در آنها ثبت شده و بکار می‌رود از جمله انواع دانه‌داران و هسته‌داران برابر با µg/mL ۰/۲ می‌باشد که روش پیشنهادی به خوبی می‌تواند مقادیر باقیمانده از گلیفوزیت را ارزیابی نماید.

بحث

سه روش مختلف به صورت متداول برای تعیین مقدار گلیفوزیت توسط کروماتوگرافی مایع به کار گرفته می‌شود: (۱)- مشتق‌سازی بعد از ستون (Post-column derivatization) با استفاده از معرف نین‌هیدرین و آشکارساز فرابنفش، (۲)- مشتق‌سازی بعد از ستون با استفاده از معرف فلوروفوردارکننده اورتوفتال آلدهید (OPA) و مرکاپتواتانول بعد از اکسیداسیون گلیفوزیت به گلایسین، (۳)- مشتق‌سازی پیش از ستون (Pre-column derivatization) ستون با استفاده از معرف فلوروفور دارکننده ۹- فلئورومتیل کلروفرمات (FMOC-Cl) و آشکارساز فلوئورسانس (Kuang *et al.*, 2011). به طورکلی فرایند مشتق‌سازی پیش از ستون نسبت به فرایند مشابه بعد از ستون به دلیل عدم نیاز به امکانات پیچیده و کنترل آسان شرایط واکنش ارجحیت دارد (Zhang *et al.*, 2013). مشتق‌سازی با اورتوفتال آلدهید علی‌رغم حساسیت بسیار بالا تنها قادر به واکنش با گروهای آمین نوع اول می‌باشد و با توجه به اینکه گلیفوزیت یک آمین نوع دوم است لذا تبدیل آن به آمین نوع اول در اکسیداسیون با واکنش‌گرهایی مانند مرکاپتواتانول ضروری می‌باشد (Shi *et al.*, 2009). یکی از معایب مشتق‌سازی با استفاده از معرف ۹- فلوئورومتیل کلروفرمات علی‌رغم سهولت استفاده، واکنش‌پذیری بالای آن با آب است که منجر به تشکیل محصول جانبی FMOC-OH در مخلوط واکنش

می‌شود. سیگنال مربوط به این محصول جانبی به صورت یک پیک بزرگ که با پیک مربوط به گلیفوزیت همپوشانی دارد و آشکارسازی مقادیر ناچیز از این ترکیب را دشوار می‌سازد ظاهر می‌گردد (Tadeo *et al.*, 2000). فنیل ایزوتیوسیانات واکنش‌گری است که به صورت متداول برای تعیین مقدار اسیدهای آمینه در نمونه‌های مختلف یا در فرایندهایی مانند تخریب ادمن[1] برای تعیین توالی اسیدهای آمینه در نمونه‌های پپتیدی یا پروتئینی بکار می‌رود. به علت ساختار شبه آمینواسیدی گلیفوزیت استفاده از این عامل مشتق‌ساز برای تعیین آن در نمونه‌هایی مانند سیانوباکتری‌ها نیز گزارش شده است (powell *et al.*, 1991).

امروزه استفاده از علف‌کش‌ها برای به حداقل‌رسیدن خسارات ناشی از علف‌های‌هرز و تولید بیشتر امری اجتناب‌ناپذیر است. با توجه به اهمیت سلامت جامع بشری و همچنین موفقیت در تجارت، کنترل وضعیت باقیمانده این ترکیبات در محصولات کشاورزی و غذایی بسیار مهم و ضروری می‌باشد.

به دلیل قطبیت بسیار بالا و در اکثر موارد خصلت یونی گلیفوزیت، روش‌های تجزیه‌ای مانند کروماتوگرافی لایه نازک[2] (TLC)، کروماتوگرافی گازی[3] (GC)، الکتروفورز موئینه[4] (CE) و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) برای اندازه‌گیری این ترکیبات شامل یک مرحله مشتق‌سازی می‌باشند. در دسترس‌بودن تکنیک‌های مشتق‌سازی سازگار با نمونه‌ها یا محلول‌های آبی کروماتوگرافی مایع با فاز معکوس $C_{۱۸}$ را به یک روش جذاب برای جداسازی و اندازه‌گیری کمی گلیفوزیت بدل می‌نماید.

در این مطالعه یک روش سریع، آسان و حساس تجزیه‌ای برای اندازه‌گیری گلیفوزیت در برنج که مبتنی بر مشتق‌سازی پیش از ستون با معرف فنیل ایزوتیوسیانات و اندازه‌گیری با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا که با آشکارساز عمومی آرایه دیودی جفت شده است توسعه داده شد. با توجه به محدودیت‌های روش‌های استخراج یا آنالیز علف‌کش‌ها اندازه‌گیری و بررسی وضعیت باقیمانده این ترکیبات در کشور ما در وضعیت بسیار ضعیفی است. روش‌های استخراج اغلب علف‌کش‌ها قابل توسعه در آزمایشگاه‌ها برای آنالیزهای روزمره نیستند و یا آنالیز آنها نیاز به امکانات پیشرفته‌ای دارد که در دسترس همه‌ی آزمایشگاه‌ها نبوده یا کار با آنها نیاز به تخصص ویژه‌ای دارد لذا ارزش روش پیشنهادی در این است که علاوه بر این که نخستین بار در کشور گزارش شده و بکار رفته است فرایند مشتق‌سازی ساده و آنالیزها با دستگاه HPLC انجام شده است که در مجموع اهمیت روش پیشنهادی را افزایش می‌دهد. این روش با توجه به روش مشتق‌سازی شرح داده شده وابسته به بافت نبوده و برای سایر بافت‌ها قابل تعمیم و کاربرد می‌باشد.

[1] Edman degradation
[2] Thin Layer Chromatography
[3] Gas Chromatography
[4] Capillary Electrophoresis

References:

EPA. 2009. National Primary Drinking Water Regulations, "Contaminants table", Office of groundwater and drinking water, May. EPA 816-F-09-004.

Khademi, S. M., Telgheder S. M. S., Valadbeigi U., Ilbeigi Y. and Tabrizchi V. 2019. Direct detection of glyphosate in drinking water using corona-discharge ion mobility spectrometry: A theoretical and experimental study. International Journal of Mass Spectrometry. (442): 29-34.

Kuang, H., Wang, L. and Xu, C. 2011. Overview of analytical techniques for herbicides in foods, in Herbicides, Theory and Applications. IntechOpen.

Olivo, V. E., Carasek T. A., Cordenuzzi F., Fernandes D., Fiori S., Fragoso M. A., Magro A. and Dal J. 2015. Rapid method for determination of glyphosate in groundwater using high performance liquid chromatography and solid-phase extraction after derivatization. Revista Ambiente & Água.10(2): p. 286-297.

Pérez, A. L., Tibaldo G., Sanchez G. H., Siano G. G., Marsili N. R. and Schenone A. V. 2019. A novel fluorimetric method for glyphosate and AMPA determination with NBD-Cl and MCR-ALS. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. (214): 119-128.

Powell, H., Kerbby, N. and Rowell, P. 1991. Natural tolerance of cyanobacteria to the herbicide glyphosate. New Phytologist. 119(3): 421-426.

Shi, T., Tang, T., Qian, K., Wang F., Li, J. and Cao, Y. 2009. High-performance liquid chromatographic method for determination of amino acids by precolumn derivatization with 4-chloro-3, 5-dinitrobenzotrifluoride. Analytica chimica acta. 654(2): 154-161.

Tadeo, J. and R. A. Perez. 2000. Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. Journal of chromatography A. 882(1-2): 175-191.

Wang, S., Baomin L., Dongxing Y. and Jian M. 2016. A simple method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in seawater matrix with high performance liquid chromatography and fluorescence detection. Talanta. (161): 700-706.

World Health Organization. 2005. Glyphosate and AMPA in drinking-water, background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. WHO/SDE/WSH/03.04/97.

Xu, J., Shayna, S., Wang G., Li, W. and Yonghui, S. 2019. Glyphosate Contamination in Grains and Foods: An Overview. Food Control. 106-710.

Zhang, Y., Hu, X., Luo, J., Wu, Z., Wang, L., Li, B., Wang, Y. and Sun, G. 2013. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soybean samples by high performance liquid chromatography using a novel fluorescent labeling reagent. Analytical Methods. 5(22): 6465-6472.

The Council of the European Union. 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the Quality of Water Intended for Human Consumption. Off. J. Eur. Communities, L. (330): 32–54. http://npic.orst.edu/factsheets/archive/glyphotech.html

Determination of glyphosate Residue in Rice using High Performance Liquid Chromatography coupled with Diode Array Detector

Bagheri, M.[1] and Mahdavi, V.*[2]

1. Department of Phytochemistry, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. 2. Department of Pesticide Reaserch, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Received: Jul, 10, 2019 Accepted: Apr, 13, 2020

Abstract

Glyphosate is a post-emergence herbicide utilized broadly after planting and before harvesting to control weeds of different types of crops in Iran and globally. Low molecular weight, amphoteric character, high polarity, and insolubility in organic solvents preclude the use of these solvents for easy extraction of glyphosate from the sample matrix and, on the other hand, the absence of chromophore or fluorophore groups in these compounds limits the ability to use conventional measurement systems with common detectors such as fluorescence or ultraviolet.

This study presents a highly sensitive pre-column derivatization by phenyl isothiocyanate and HPLC method coupled with universal diode array detector for determination of glyphosate residue in rice. After extraction of glyphosate and derivatization with phenyl isothiocyanate, separation of derivatized thiophenyl carbamoyl glyphosate was optimized on reversed phase stationary phase C18 by applying a gradient elution of a mobile phase containing 70% water (0.1% Formic Acid) and 30% ACN in 254 nm and flow rate of 1 ml/min. Investigating the detector response whitch is in the range of 0.05-5 µg/mL and correlation coefficient whitch is equal to 0.9869 proved as an ideal linearity for the proposed method. The LOQ was determined as 0.05 µg/ml which is in the range of MRLs for various crops. The proposed method provides a simple derivation process that is not matrix-dependent and is applicable to other matrices, too.

Keywords: Derivatization, Glyphosate, High performance Liquid Chromatography, Phenyl isothiocyanate, Rice.

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