

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۷، شماره ۱، شهریور ۱۳۸۸

اندازه‌گیری باقیمانده سم کاربندازیم در خیار به روش

اسپکتروفتومتری و مقایسه آن با HPLC

Spectrophotometric Measurement of Carbendazim Residue

Levels in Cucumber and its Comparison with HPLC

وحیده مهدوی*

مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران

(تاریخ دریافت: آبان ۱۳۸۶، تاریخ پذیرش: دی ۱۳۸۷)

چکیده

روشی جدید، ساده و دقیق در اندازه‌گیری میزان باقیمانده سموم ارائه شده است. تکنیک تفکیک منحنی چند متغیره با حداقل کردن مربعات به روش متناوب Multivariate Curve Resolution-Alternative Least Squares (MCR-ALS) یکی از روش‌های متداول در تفکیک پاسخ چند گونه در مخلوط‌های ناشناخته در کمومتریکس است. کمومتریکس مجموعه‌ای از یکسری قواعد شیمیایی است که با استفاده از شیمی، آمار و رایانه در عرصه‌های ارزیابی و تفسیر اطلاعات، بهینه‌کردن و مدل‌سازی فرایندها و آزمایشات و استخراج حداکثر اطلاعات شیمیایی از داده‌های تجربی به ما کمک می‌کند. در این کار روش MCR-ALS برای آنالیز داده‌های اسپکتروفتومتری UV-Vis کاربندازیم در محلول آبی پیشنهاد شده است. نتیجه این روش ایجاد دو ماتریس پروفایل‌های غلظتی و پروفایل‌های طیفی خالص هر یک از اجزای موجود در مخلوط می‌باشد.

این تکنیک از جمله تکنیک‌های مدل نرم است که قادر است بدون نیاز به اطلاعات زیادی از سیستم مورد بررسی، پروفایل‌های غلظتی و طیفی مورد نظر را از ماتریس داده استخراج

* Corresponding author: v_mahdavi2000@yahoo.com

مهدوی: اندازه‌گیری باقیمانده سم کاربندازیم در خیار به روش اسپکتروفتومتری ...

کند. باقیمانده سم کاربندازیم در نمونه خیار با غلظت‌های مختلف از سم کاربندازیم که بطور مصنوعی آلوده شدند، اندازه‌گیری شد. به منظور بیان توانایی روش، تحت شرایط یکسان، نمونه‌سازی برای کار با HPLC انجام شد. نتایج بدست آمده از HPLC توانایی روش پیشنهادی علیرغم سادگی آن را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: تفکیک منحنی چند متغیره با حداقل کردن مربعات به روش متناوب (MCR-ALS)، باقیمانده سم، کاربندازیم، فرابنفش - مرئی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC).

Abstract

A new, simple and accurate method is used for measuring pesticides residue. Multivariate Curve Resolution- Alternating Least Squares (MCR-ALS) has become a popular chemometric method used for the resolution of multiple component responses in unknown unresolved mixtures.

The chemical discipline that uses mathematical and statistical methods to design or select optimal procedures and experiments and to provide maximum chemical information by analyzing chemical data.

In this research, MCR-ALS method is proposed for spectrophotometric UV-Vis data analysis of carbendazim in aqueous solution. This method decomposes the composite signal in a data matrix into the product of concentration profiles and spectra of each pure species contributing to mixture signal. Soft modeling MCR-ALS is a much more analytical way to model experimental data using only very weak and soft assumptions.

Pesticide residue of carbendazim in cucumber with different concentrations was measured. To show the ability of MCR-ALS, same samples were analyzed by HPLC. Results showed the ability of proposed method as compared with HPLC.

Key words: MCR-ALS, Carbendazim, HPLC, pesticide residue

مقدمه

امروزه فرایندهای شیمیایی پیچیده زیادی جهت بررسی وجود دارند که تعداد آنها سریعاً در حال افزایش می‌باشد. از طرف دیگر کاربردها و دامنه شاخه‌هایی از شیمی خصوصاً شیمی تجزیه به سرعت در حال توسعه بوده و جمع‌آوری و پردازش داده‌ها همواره یکی از

آفات و بیماری‌های گیاهی: جلد ۷۷، شماره ۱، شهریور ۱۳۸۸

مراحل محدود کننده این قبیل اطلاعات می‌باشد. همچنین با رشد و تکامل سریع دستگاه‌های مورد استفاده در شیمی همه روزه حجم وسیعی از اطلاعات تولید می‌شود. این مقدار از داده‌ها احتیاج به روش‌هایی جهت کاهش بیشتر، نمایش شفاف‌تر و استخراج اطلاعات مفیدتر را افزایش داده است (Vandeginste, 1987).

همزمان با پیشرفت سریع روش‌های تجزیه دستگاهی، علوم و تکنولوژی رایانه نیز رشد فراوانی داشته و بصورت ابزاری بسیار قوی جهت حل بسیاری از مشکلات مورد استفاده قرار گرفته و امروزه شیمی دانان با سهولت بیشتری از رایانه و روش‌های پیشرفته آماری و ریاضی در زمینه‌های مختلف استفاده می‌کنند. این دو پیشرفت انقلابی منجر به ایجاد شاخه جدیدی در شیمی به نام کمومتریکس شده است.

شرح دو روش کمومتریکس بکار برده شده در این کار جهت آنالیز داده‌ها آمده است:
تفکیک منحنی چند متغیره با حداقل کردن مربعات به روش متناوب (MCR-ALS): این تکنیک که از جمله تکنیک‌های مدل نرم است که قادر است بدون نیاز به اطلاعات زیاد از سیستم مورد بررسی، پروفایل‌های غلظتی C و طیفی S مورد نیاز را از ماتریس داده بیرون بکشد. ماتریس داده D از حاصلضرب دو ماتریس که شامل پروفایل‌های غلظتی C و پروفایل‌های طیفی S است، حاصل شده است و هدف از این روش بدست آوردن این دو ماتریس از ماتریس داده D است (Vives et al., 1999; Tauler & Smidle, 1994).

$$D = CS^T + E = C^*S^{*T} + E$$

تفکیک ریاضی یک ماتریس داده، ذاتاً با دو نوع منبع ایجاد ابهام روبرو است که سبب می‌شوند تعداد زیادی جفت ماتریس C* و S* از تفکیک ماتریس داده D بوجود آید که C و S مدنظر نیستند، لذا باید از این تعداد زیاد زوج‌های C* و S*، بتوان C و S واقعی را جدا کرد.

این ابهامات عبارتند از:

۱- **ابهام چرخشی:** این ابهام از چرخیده شدن ماتریس‌های C و S توسط ماتریس تبدیل

T ایجاد می‌شود که همان ترکیب خطی ماتریس‌های C و S است.

$$D = CTT^{-1}S = C^*S^{*T} \Rightarrow C^* = CT, \quad S^{*T} = T^{-1}S$$

این ابهام سبب ایجاد بردارهایی با شکل‌هایی متفاوت از حالت‌های مورد انتظار می‌شود

مهدوی: اندازه‌گیری باقیمانده سم کاربندازیم در خیار به روش اسپکتروفوتومتری ...

لذا، تشخیص این ابهام آسانتر است.

۲- **ابهام شدتی:** این ابهام در اثر ضرب شدن یک اسکالر در ماتریس‌ها بوجود می‌آید. در نتیجه این ابهام، ممکن است بردارهایی با شکل‌هایی دقیقاً یکسان با حالت‌های مورد انتظار ایجاد شود بدون اینکه بردارهای واقعی باشند، لذا تشخیص این ابهام، با ظرافت بیشتری همراه است.

برای پیشگیری از بوجود آمدن اینگونه ابهامات، در مراحل مختلف تفکیک ماتریس داده، محدودیت‌هایی اعمال می‌شود که برخی از آن‌ها عبارتند از:

۱- **منفی نبودن:** این محدودیت بر اساس این واقعیت است که غلظت منفی معنی ندارد و جذب منفی نیز به استثنای برخی تکنیک‌ها نامفهوم است. بنابراین مقادیر منفی را به صفر یا بزرگتر از صفر تبدیل می‌کند.

۲- **بسته بودن:** این محدودیت در سیستم‌های بسته بر اساس قانون موازنه جرم اعمال می‌شود که در آن‌ها مجموع غلظت‌های همه گونه‌های موجود در واکنش در هر مرحله مقدار ثابتی است.

معمول‌ترین الگوریتم اجرای تکنیک تفکیک منحنی چند متغیره استفاده از روش حداقل کردن مربعات به روش متناوب (MCR-ALS) است که شامل مراحل کلی زیر است:

۱- تشخیص تعداد گونه‌های موجود در ماتریس داده

۲- محاسبه تخمین اولیه: این تخمین اولیه می‌تواند غلظت یا طیف باشد که در اکثر کارهای انجام شده، تخمین اولیه غلظت بوده و از آنالیز فاکتوری تکاملی EFA بدست می‌آید.

۳- محاسبه ماتریس طیف و اعمال محدودیت روی آن $S=DC^+$

۴- محاسبه ماتریس غلظت و اعمال محدودیت روی آن $C=DS^+$

۵- بازگشت به مرحله ۳ و تکرار مراحل بعدی تا زمانیکه در طی فرایند تکرار سیستم به همگرایی برسد. محدودیت‌های اشاره شده، تا حد زیادی ابهام حاصل از چرخش ماتریس‌ها را کاهش می‌دهند.

آنالیز فاکتوری تکاملی (EFA): آنالیز فاکتوری تکاملی در سیستم‌هایی که روندی منطقی در آن‌ها وجود دارد بکار می‌رود. برای مثال سیستم‌های تیتراسیون اسپکتروفوتومتری،

واکنش‌های سینتیکی و کروماتوگرافی از جمله این‌ها هستند که می‌توان تغییرات واقعی مربوط به ردیف‌های ماتریس داده این سیستم‌ها را با استفاده از آنالیز فاکتوری تکاملی (EFA)، به علت روند منطقی موجود در آن‌ها بیرون کشید.

این روش بر اساس آنالیز رنک به عنوان تابعی از شماره ردیف‌های ماتریس است. آنالیز رنک بوسیله روش تفکیک مقدار منفرد (SVD) در دو حالت «به سمت جلو» و «به سمت عقب» صورت می‌گیرد و لگاریتم مقادیر ویژه این دو مرحله به عنوان تابعی از متغیر تکاملی رسم می‌شوند. به این ترتیب می‌توان با حرکت روی ماتریس داده به سمت جلو، بوجود آمدن گونه‌ها و با حرکت روی ماتریس داده به سمت عقب، از بین رفتن گونه‌ها را تشخیص داد. در نتیجه آنالیز فاکتوری تکاملی می‌تواند علاوه بر تشخیص تعداد گونه‌های اصلی، ظهور و زوال آن‌ها را نیز نشان دهد (Maeder & Zuberbuehler, 1986). مروری بر تحقیقات انجام گرفته در اندازه‌گیری میزان باقیمانده قارچ‌کش کاربندازیم نشان می‌دهد که معمول‌ترین روش‌ها استفاده از HPLC با آشکارساز MS، فلورسانس یا UV می‌باشد. کار با دستگاه HPLC به علت زیاد بودن تعداد متغیرها و پارامترهای مؤثر بر جداسازی نیاز به تجربه و تخصص دارد حلال‌های مورد استفاده در این دستگاه باید از خلوص تجزی‌های بالایی برخوردار بوده و از درجه خلوص HPLC باشد، از طرفی به دلیل اینکه گازهای حل شده در حلال که اغلب اکسیژن و نیتروژن می‌باشد با تشکیل حباب در ستون و سیستم‌های آشکارساز باعث گسترده‌گی نوار و ایجاد تداخل در عملکرد آشکارساز می‌شوند باید قبل از ورود به ستون هوا زدایی شوند همچنین ماهیت فاز متحرک و ساکن، فشار، شار، شار فاز متحرک و ... از جمله متغیرهایی هستند که باید در دستگاه برای ایجاد جداسازی، بهینه شوند که این خود نیاز به تجربه اپراتور در کار با دستگاه و نحوه کنترل پارامترها دارد. در این کار در کنار HPLC استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis توصیه شده است کار با این دستگاه بسیار ساده‌تر و جمع‌آوری اطلاعات سریع‌تر می‌باشد به علاوه به علت ارزان بودن این دستگاه، بیشتر در دسترس است. لذا با استفاده از روش پیشنهادی علاوه بر اینکه مقدار هزینه‌ها بسیار کاهش می‌یابد دستیابی به نتایج دقیق در مدت زمان کم فراهم می‌شود.

ضرورت آشنایی با این روش در کنار ابزارهای قدرتمندی مانند HPLC در جایی

مهدوی: اندازه‌گیری باقیمانده سم کاربندازیم در خیار به روش اسپکتروفتومتری ...

محسوس‌تر است که به علت وجود نقصی در دستگاه یا نرم‌افزار یا نبود حلال‌های با درجه خلوص HPLC که قیمت آن‌ها بالاست، امکان اندازه‌گیری سموم فراهم نمی‌باشد. لازم به ذکر است روش ارائه شده محدود به دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Vis و سم یا محصول خاصی نمی‌باشد، مثلاً در ناحیه طول موجی UV-Vis همه سمومی که دارای جذب در این ناحیه هستند، بدیهی است که امکان بسط این روش به دیگر نواحی طول موجی وجود دارد.

در سیستم‌های مجهولی که چند ترکیب ناشناخته با همپوشانی شدید طیفی موجود باشد ممکن است توانایی روش محدودتر شود.

روش بررسی

با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر پرکین المر از نوع Lambda 25، طیف جذبی ماوراءبنفش- مرئی بدست آمد. سل استفاده شده از جنس کوارتز، با طول مسیر ۱ سانتی‌متر بود. سرعت جاروب ۲۴۰ nm/min، پهنای شکاف ۱ nm و محدوده طول موجی بین ۷۰۰-۱۹۰ nm پایش شد، طیف‌گیری با فواصل طول موجی ۱ nm صورت گرفت. طیف‌ها با نرم‌افزار Lambda 25 گردآوری شدند.

اندازه‌گیری‌های pH با دستگاه CONSORT C830 و الکتروود شیشه ترکیبی انجام گرفت که قادر به نشان دادن pH تا دو رقم اعشار بود. دمای طیف‌گیری ثابت و برابر با دمای محیط بود. در این روش از نرم‌افزار MCR-ALS که توسط روما تالر در سال ۱۹۹۹ بصورت lm-file به نام als 99 نوشته شده، جهت تحلیل داده‌ها استفاده شد. این نرم‌افزار در سال ۲۰۰۵ به شکل کاربری آسانتری (user friendly) در آمد (Jaumot *et al.*, 2005) و در تحلیل داده‌های این کار از این نرم‌افزار که در MATLAB 6.5 قابل اجرا است، استفاده شد.

پردازش نهایی داده‌ها در Excel صورت گرفت. برای تهیه غلظت‌های موردنظر از استاندارد کاربندازیم محلول مادر ۱۰۰ ppm تهیه شد. ماده موردنظر ابتدا به کمک حمام آب و اولتراسونیک در مقدار کمی آب حل شد و سپس با آب مقطر به حجم رسید. برای تنظیم و تغییر pH از هیدروکلریک اسید (HCl) غلیظ و سدیم هیدروکسید (NaOH) غلیظ استفاده شد.

مواد مورد استفاده ساخت شرکت مرک و با درجه خلوص تجزیه‌ای بودند. برای تهیه محلول‌ها از آب مقطر استفاده شده و همواره محلول‌های کار تازه و روزانه تهیه می‌شدند. طیف‌گیری در دمای محیط در pHهای مختلف انجام شد، شایان ذکر است برای گرفتن طیف در این مرحله باید دقت می‌شد که ایجاد تغییر در pH منجر به تغییر حجم و در نتیجه تغییر غلظت محلول نشود لذا از محلول‌های غلیظ HCl و NaOH جهت تنظیم pH استفاده شد دو سرنگ مجزا برای HCl و NaOH بکار برده شد و با اسیدی یا بازی کردن نوک سرنگ و فرو بردن آن در محلول مورد مطالعه بدون تغییر حجم، pH محلول تغییر می‌کرد. از آنجائیکه در این کار هدف مقایسه کارایی دو روش متفاوت است باید شرایطی ایجاد می‌شد که همه متغیرهای مؤثر در اندازه‌گیری میزان باقیمانده سم حذف شده یا سهم یکسانی در نمونه‌های مختلف داشته باشند لذا بهترین روش برای تحقق این هدف ایجاد آلودگی مصنوعی در نمونه همگنی از خیار بود، لذا ۱ Kg از نمونه خیار که به عنوان شاهد سمپاشی نشده بود، استفاده شد. حدود ۳۰۰ گرم از نمونه بطور تصادفی انتخاب و با پوست خرد شده و به مدت ۲ دقیقه خرد و همگن شد. در طول کار از این نمونه خرد شده خیار به عنوان نمونه اصلی جهت تهیه محلول‌های شاهد و اصلی استفاده شد.

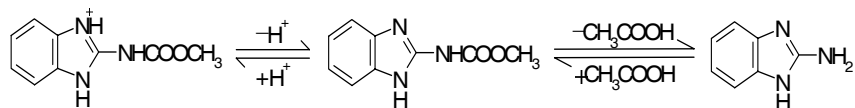
روش استخراج: ابتدا ۱۰ گرم از نمونه خرد شده در یک بشر ۱۵۰ میلی لیتری توزین و ۶۰ میلی لیتر استن به آن افزوده شد نمونه‌های آلوده با افزودن حجم مشخصی از محلول استاندارد مادر به نمونه‌های شاهد خیار تهیه می‌شدند. مخلوط به مدت ۲ دقیقه هموژن شد و مجدداً ۶۰ میلی لیتر استن به مخلوط افزوده شد و به مدت ۲ دقیقه با استفاده از هموژنایزر، همزده شد. محلول بدست آمده با استفاده از پمپ خلأ و کاغذ صافی، صاف شده و به دکانتور منتقل شد. به محلول صاف شده در دکانتور در مرحله اول ۱۵۰ میلی لیتر محلول سدیم سولفات ۲٪ و ۴۰ میلی لیتر دی‌کلرومتان افزوده شد و به مدت چند دقیقه به شدت همزده شد. سپس فاز پایینی را پس از دو فاز شدن کامل در یک بشر جدا کرده و به محلول باقیمانده در دکانتور ۲۰ میلی لیتر دی‌کلرومتان افزوده شد و پس از همزدن و دو فاز شدن، فاز پایینی به بشر قبلی منتقل شده و سپس مجدداً ۲۰ میلی لیتر دی‌کلرومتان به دکانتور افزوده و دوباره پس از همزدن و دو فاز شدن فاز پایینی به بشر حاوی محلول‌های دو مرحله قبلی منتقل شد.

مهدوی: اندازه‌گیری باقیمانده سم کاربندازیم در خیار به روش اسپکتروفتومتری ...

محللول موجود در بشر از بستری از سولفات سدیم عبور داده شد و محللول شفاف شده در دمای 50°C تا حدود 1 ml با استفاده از روتاری تبخیر شد.

اندازه‌گیری میزان باقیمانده کاربندازیم به روش HPLC: دستگاه HPLC مورد استفاده ساخت شرکت Shimadzu ژاپن و دارای سیستم کنترل از نوع SCL-10A VP، پمپ LC-10AD، سیستم گاززدایی از نوع DGU-14A، سیستم توزیع کننده حلال FCV-10AL VP، دتکتور UV-Vis از نوع SPD-10A VP و محفظه کنترل دمای ستون از نوع CTO-10AC VP بود. فاز متحرک بکار برده شده شامل 35٪ متانول در آب بود. لامپ UV، دوتریم با پلاریته مثبت و پاسخ‌دهی در هر یک ثانیه بود. طول موج انتخابی بنا بر پیشنهاد مقالات 282nm تنظیم شد. ستون بکار رفته ساخت شرکت YMC ژاپن با فاز ساکن C_{18} به طول 250mm و قطر داخلی 4/6mm و دمای ستون 40°C تنظیم شد. حلال‌های بکاررفته ساخت شرکت مرک و از درجه خلوص HPLC برخوردار بودند.

نتایج بدست آمده از محللول‌های استاندارد، نمونه‌های شاهد و آلوده خیار به روش اسپکتروفتومتری UV-Vis: از آنجائیکه قرار است در این کار از روش MCR-ALS استفاده شود، این روش برای شروع نیاز به یک تخمین اولیه دارد، این تخمین اولیه می‌تواند غلظت یا طیف باشد که در این کار از تخمین اولیه غلظت استفاده شد. برای بدست آوردن این تخمین برنامه آنالیز فاکتور تکاملی Evolving Factor Analysis (EFA) بکار برده شد. مبنای اصلی روش همانطور که از نامش پیداست وجود یک تغییر منظم در سیستم است این تغییر منظم در این کار همان تیتراسیون pH متری در محیط آبی است. پس در درجه اول باید به این نکته توجه شود که ترکیب مورد بررسی باید خاصیت اسیدی یا بازی داشته و بتواند تیتراژ شود یعنی در برابر تغییر pH محیط تغییر کند که با توجه به شکل کاربندازیم این ترکیب به راحتی تیتراژ پذیر است و این ویژگی را دارد. در تشخیص نحوه رفتار کاربندازیم در pH‌های مختلف مبنای کار بر اساس یکی از مقالات منتشره (Panades & Ibars, 1999) که سه گونه زیر را برای کاربندازیم پیشنهاد کرده است دنبال شد.



به عبارتی وجود سه گونه مختلف در محیط در pHهای مختلف متصور است. در ادامه مطلب در شکل‌هایی که خواهد آمد خط ممتد پر رنگ برای فرم پروتونه، خط چین برای فرم خنثی و خط ممتد معمولی برای فرم فاقد آسیدل بکار می‌رود. شکل A-۱ طیف‌های جذبی مربوط به تیتراسیون محلول ۱۰ ppm از کاربندازیم در دامنه pH بین ۱/۷ تا ۸/۸۲ را نشان می‌دهد. برای حذف اثرات نویز هر طیف‌گیری سه بار تکرار شد و نتیجه حاصله که میانگین سه بار طیف‌گیری است در شکل‌ها آمده است.

یکی از مزیت‌های این روش این است که برای آنالیز گونه‌های مجهول تنها به یک نمونه استاندارد نیاز داریم. در تحلیل داده‌ها از سر هم زدن داده‌ها به روش ستونی استفاده خواهد شد یعنی تنها ماتریس داده استاندارد و ماتریس داده گونه مجهول سر هم زده شده و ماتریس حاصله که ماتریس بزرگتری است به عنوان ماتریس داده اصلی در نظر گرفته می‌شود. در این ماتریس سه گونه مجهول وجود دارد، فرم پروتونه شده، خنثی و فاقد گروه آسیدلی کاربندازیم. این کار به دنبال استخراج پروفایل‌های غلظتی و طیفی هر یک از این سه گونه می‌باشد. برای حصول بیشترین اطلاعات از سیستم مورد بررسی مراحل زیر دنبال شد: با توجه به ثابت اسیدی پیشنهاد شده برای کاربندازیم (Alford *et al.*, 1997) در محیط کاملاً اسیدی $\text{pH} < 1$ تنها یک گونه، فرم پروتونه کاربندازیم وجود دارد لذا محلول استاندارد ۱۰ ppm را کاملاً اسیدی کرده و در $\text{pH} = 0.9$ چندین طیف UV-Vis از آن تهیه شد که میانگین آن‌ها در شکل ۲ آمده است. نتایج تفکیک مقدار منفرد SVD نیز تنها وجود یک گونه در محیط را تأیید می‌کند. SVD به عنوان معیاری برای تعیین تعداد گونه‌های اصلی محیط بکار می‌رود.

این ماتریس داده شامل حاصلضرب پروفایل غلظتی در طیفی فرم پروتونه است که چون تنها یک گونه وجود دارد و در رابطه بیر-لامبرت $A = \epsilon bc$ ، $b = 1 \text{ cm}$ ، $A = \epsilon bc$ و $C = 10^{-5} \text{ M}$ و $A = 10 \text{ ppm}$ نیز معلوم است با قرار دادن مقادیر معلوم در رابطه بالا ϵ که همان طیف جذبی خالص گونه

مهدوی: اندازه‌گیری باقیمانده سم کاربندازیم در خیار به روش اسپکتروفتومتری ...

پروتونه است بدست می‌آید که در شکل ۳ نشان داده شده است.

همانند فرم پروتونه مراحل فوق را می‌توان برای استخراج طیف خالص فرم فاقد آسپیل در محیط کاملاً بازی اجرا کرد. نتایج SVD نیز وجود تنها یک گونه را در $pH=12/7$ تأیید می‌کنند، فرم گونه بازی با استفاده از رابطه بالا قابل محاسبه است. شکل ۴ طیف جذبی خالص گونه فاقد پروتون را نشان می‌دهد.

بنابراین در پروفایل‌های طیفی سیستم مورد بررسی تنها طیف گونه خنثی مجهول است و طیف دو گونه از سیستم شناخته شده است. از طرفی می‌دانیم ϵ تحت تأثیر pH محیط نبوده و مستقل از pH است به عبارتی تفاوت ماتریس داده‌ها ناشی از تفاوت در پروفایل‌های غلظتی اجزا است و پروفایل‌های طیفی سه گونه در سیستم‌های مختلف یکسان است و تغییر نمی‌کند. پس از تهیه ماتریس داده استاندارد، با استفاده از EFA تخمین اولیه پروفایل‌های غلظتی (شکل E-5) آن بدست آمد.

از آنجائیکه دستگاه اسپکتروفتومتری مورد استفاده دو پرتویی بوده و نیاز به محلول رفرنس دارد می‌توان از آب مقطر استفاده کرد اما برای بالا بردن صحت کار از نمونه‌های خیار شاهد استفاده شد.

برای تهیه نمونه‌های آلوده حجم مشخصی از استاندارد کاربندازیم به $10g$ نمونه شاهد خیار افزوده شده و مراحل استخراج ذکر شده در قسمت قبل روی آن انجام شد و به عنوان نمونه مجهول برای بدست آوردن میزان ریکاوروی روش و توانایی تکنیک در تشخیص و تفکیک گونه‌ها بکار برده شد.

نمونه آلوده $100ppb$ کاربندازیم: شکل B-1 طیف‌های جذبی حاصل از تیتراسیون pH متری محلول را نشان می‌دهد. برای آنالیز ماتریس داده مجهول پس از سرهم زدن با ماتریس داده استاندارد، محدودیت‌های منفی نبودن برای دو ماتریس و بسته بودن برای ماتریس استاندارد اعمال شده است. منفی نبودن به این علت که می‌دانیم غلظت‌های منفی معنا ندارند و طیف‌های جذبی منفی در ناحیه UV-Vis بی‌معناست و بسته بودن به علت قانون بقای جرم اعمال می‌شود که مجموع غلظت همه گونه‌ها در محیط در ماتریس داده استاندارد برابر با $10ppm$ می‌باشد.

همچنین طیف‌های دو گونه اسیدی و بازی در ماتریسی بنام ssel برای افزایش گزینش‌پذیری در سیستم ثابت در نظر گرفته شدند. پس از تهیه ماتریس داده مجهول، با استفاده از EFA تخمین اولیه پروفایل‌های غلظتی (شکل F-۵) آن بدست آمد.

با سرهم قرار دادن این ماتریس داده و غلظت تخمینی این نمونه با ماتریس داده و غلظت محلول استاندارد، برنامه MCR-ALS اجرا شد. شکل‌های I-۶ و L-۷ پروفایل‌های طیفی و غلظتی حاصله از اجرای برنامه فوق را نشان می‌دهند.

نمونه آلوده ۱۰ppb کاربندازیم: نمونه آلوده شده به مقدار ۱۰ppb استخراج شد و در دمای محیط تیتر شد. شکل C-۱ طیف‌های جذبی حاصل از تیتراسیون pH متری را نشان می‌دهد.

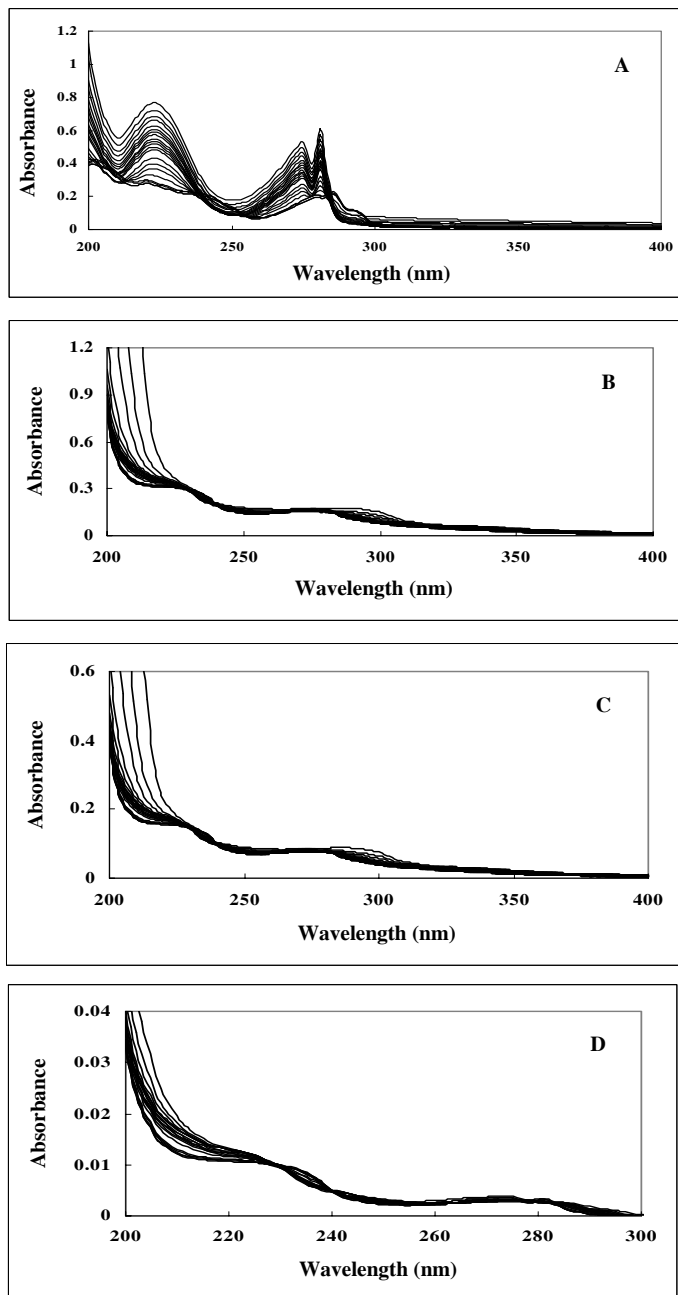
با استفاده از برنامه EFA پروفایل غلظتی تخمینی بدست آمد که در شکل G-۵ نشان داده شده است.

با ترکیب این ماتریس داده با ماتریس داده محلول استاندارد و با استفاده از پروفایل‌های تخمینی و با اعمال محدودیت‌های ذکر شده در اجرای برنامه پروفایل‌های غلظتی و طیفی نمونه مجهول استخراج گردید که در شکل J-۶ و M-۷ نشان داده شده‌اند.

نمونه آلوده ۱ppb کاربندازیم: به ۱۰ گرم نمونه خیار شاهد محلول استاندارد کاربندازیم برای حصول آلودگی ۱ppb افزوده شد. نتایج این تیتراسیون pH متری در شکل H-۵ آمده است. با استفاده از برنامه EFA تخمین اولیه پروفایل‌های غلظتی بدست آمد که در شکل K-۶ نشان داده شده است. با استفاده از این تخمین و تخمین اولیه غلظت برای ماتریس داده استاندارد و با اعمال محدودیت‌های مختلف برای هر دو ماتریس در حین اجرای برنامه MCR-ALS پروفایل‌های غلظتی و طیفی موردنظر استخراج گردید که در شکل N-۷ آمده است.

نتایج بدست آمده از محلول‌های استاندارد و آلوده خیار با غلظت‌های مختلف به روش HPLC: پس از تنظیم پارامترهای دستگاه و ایجاد یک کروماتوگرام مناسب به کمک محلول‌های استاندارد، پارامترهای دستگاه برای تشخیص کاربندازیم تنظیم شد و در نمونه‌های مختلف یکسان بکار رفتند. محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۱ppb، ۱۰ppb و ۱۰۰ppb هر

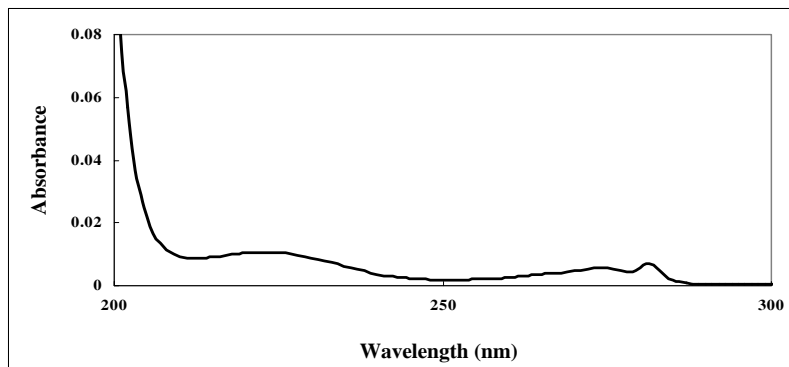
مهدوی: اندازه‌گیری باقیمانده سم کاربندازیم در خیار به روش اسپکتروفوتومتری ...



شکل ۱- طیف‌های جذبی مربوط به محلول استاندارد کاربندازیم در سیستم تیتراسیون pH متری

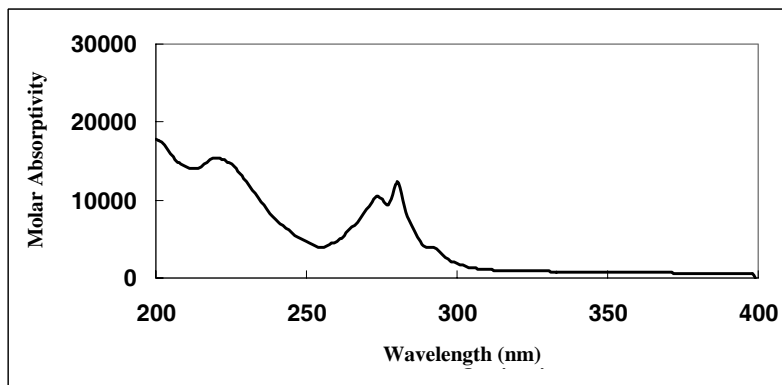
Fig. 1- Absorptive spectra of carbendazim standard solution in pH-metric titration system

A=10ppm,standard, B=100ppb,sample, C=10ppb,sample, D=1ppb,sample



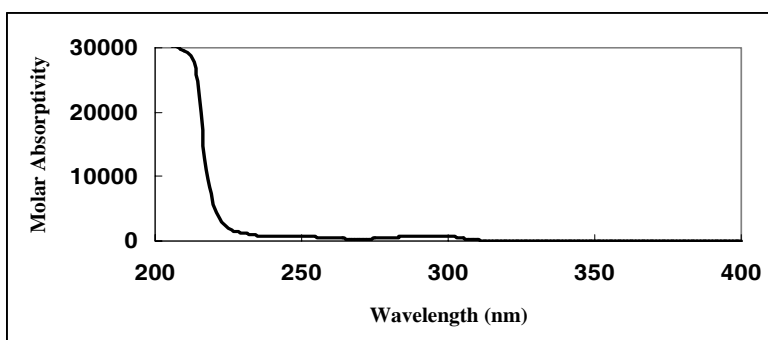
شکل ۲- طیف جذبی فرم پروتونه کاربندازیم

Fig. 2- Absorptive spectrum of protonate carbendazim form



شکل ۳- طیف خالص فرم پروتونه کاربندازیم

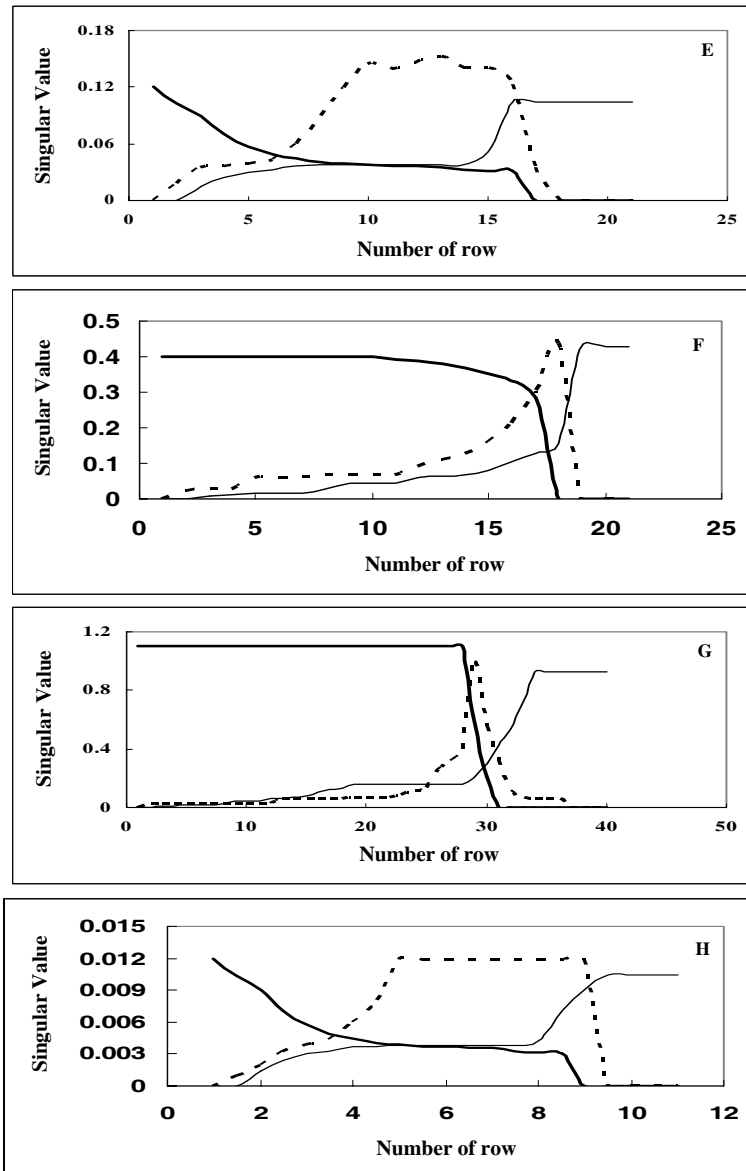
Fig. 3- Pure spectrum of protonate carbendazim form



شکل ۴- طیف جذبی خالص فرم بدون آسیل کاربندازیم

Fig. 4- Pure absorptive spectrum of carbendazim without acyl

مهدوی: اندازه‌گیری باقیمانده سم کاربندازیم در خیار به روش اسپکتروفتومتری ...

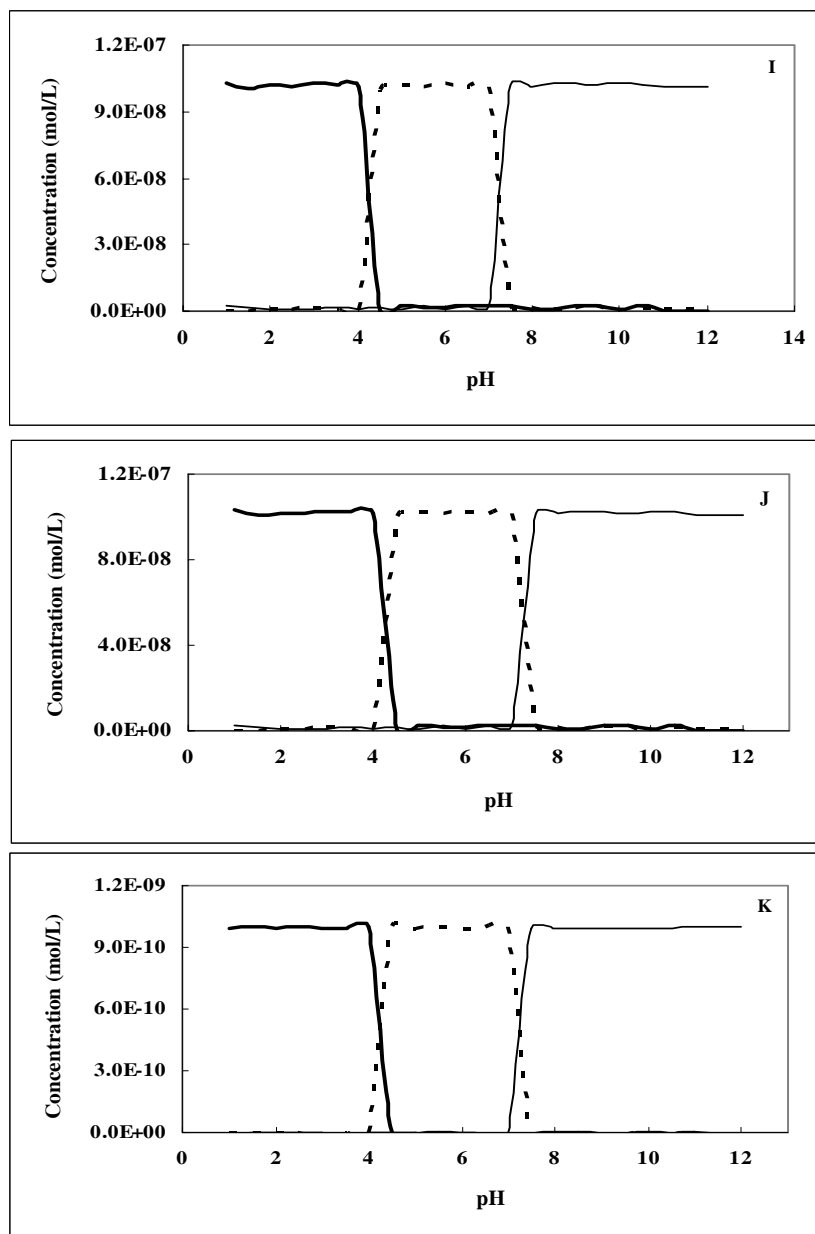


شکل ۵- منحنی‌های غلظتی تخمینی محاسبه شده از طریق اعمال EFA روی داده‌های بدست آمده در سیستم تیتراسیون pH متری: خط ممتد پر رنگ: فرم پروتونه، خط چین: فرم خنثی، خط ممتد معمولی: فرم فاقد آسیل

Fig. 5- Estimated concentration profile from EFA in pH-metric titration: bold continuous line:

protonic form, dotted line: neutral form, regular continues line: deacyl form

E=10ppm,standard, F=100ppb,sample, G=10ppb,sample, H=1ppb,sample

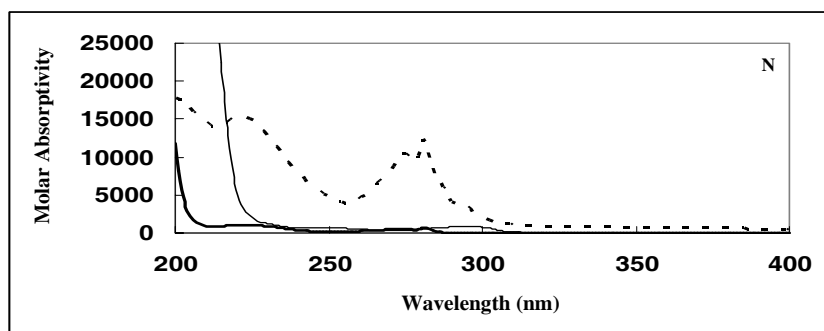
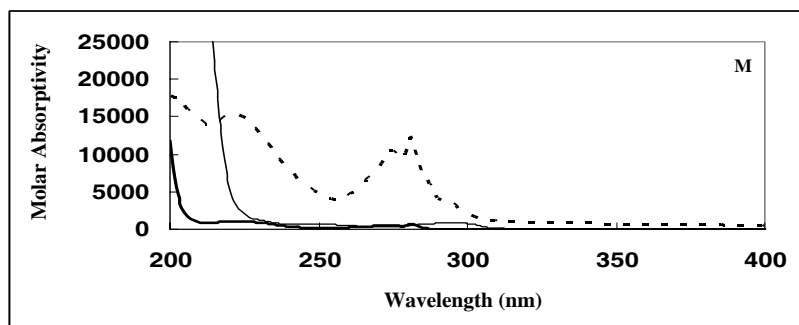
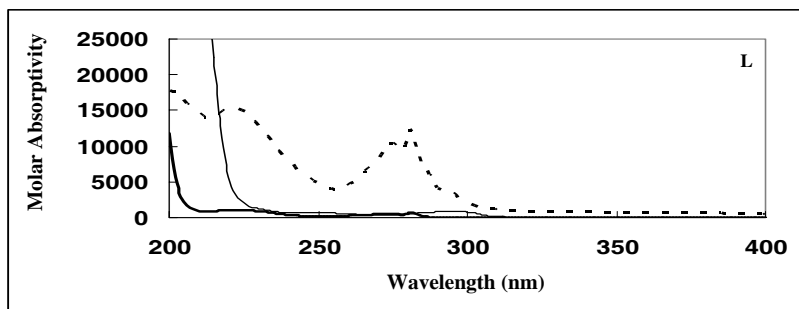


شکل ۶- منحنی‌های غلظتی واقعی محاسبه شده از طریق اعمال MCR-ALS خط ممتد پر رنگ:

فرم پروتونه، خط چین: فرم خنثی، خط ممتد معمولی: فرم فاقد آسیل

Fig. 6- Real concentration profile from MCR-ALS. bold continue line: protonic form, dotted line: neutral form, regular continues line: deacyl form. I=100ppb,sample, J=10ppb,sample, K=1ppb,sample

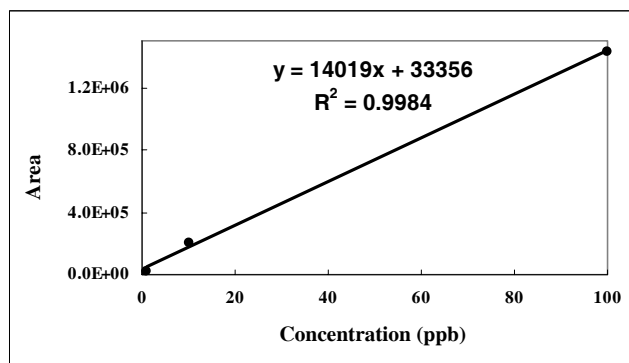
مهدوی: اندازه‌گیری باقیمانده سم کاربندازیم در خیار به روش اسپکتروفتومتری ...



شکل ۷- منحنی‌های طیفی واقعی محاسبه شده از طریق اعمال MCR-ALS. خط ممتد پر رنگ:

فرم پروتونه، خط چین: فرم خنثی، خط ممتد معمولی: فرم فاقد آسیل

Fig. 7 -Real spectrum profile from MCR-ALS, bold continues line: protonic form, dotted line: neutral form, regular continues line: deacyl form. L=100ppb,sample, M=10ppb,sample, N=1ppb.sample



شکل ۸- منحنی کالیبراسیون نمونه‌های اندازه‌گیری شده به روش HPLC

Fig. 8- Calibratin curve of measured samples from HPLC method

جدول ۱- نتایج بدست آمده از روش اسپکتروفتومتری UV-Vis

Table 1- Results from UV-Vis spectrophotometry

غلظت واقعی Real Concentration	غلظت محاسبه شده Calculated Concentration	٪ بازیابی %Recovery
100 ppb	100.28	100%
10 ppb	10.35	103%
1 ppb	0.93	93%

جدول ۲- نتایج بدست آمده از روش HPLC

Table 2- Results from HPLC method

غلظت واقعی Real Concentration	غلظت محاسبه شده Calculated Concentration	٪ بازیابی %Recovery
100 ppb	99.06	99%
10 ppb	9.90	99%
1 ppb	0.99	99%

مهدوی: اندازه‌گیری باقیمانده سم کاربندازیم در خیار به روش اسپکتروفتومتری ...

یک سه بار به دستگاه تزریق و پس از گرفتن کروماتوگرام و رسم منحنی سطح زیر پیک میانگین کروماتوگرام‌ها بر حسب غلظت محلول‌های استاندارد، منحنی کالیبراسیون بدست آمد که در شکل ۸ نشان داده شده است.

در بررسی میزان ریکواری آلودگی‌های ۱ppb، ۱۰ppb و ۱۰۰ppb ایجاد شد سپس کار استخراج و تزریق به دستگاه انجام گرفت و با استفاده از منحنی کالیبراسیون غلظت هر یک از نمونه‌ها مشخص گردید.

نتیجه و بحث

جداول ۱ و ۲ نتایج بدست آمده از دو روش اسپکتروفتومتری UV-Vis و HPLC را نشان می‌دهند. همانطور که در جداول آمده است روش پیشنهادی قابل مقایسه با تکنیک قدرتمند HPLC می‌باشد. حسن دیگر روش ارائه شده این است که نشان می‌دهد در هر pH چه گونه یا گونه‌هایی وجود دارد. اهمیت این مطلب جایی مشخص می‌شود که بدانیم میزان فعالیت شیمیایی و اثر بخشی ترکیباتی که به عنوان سم مورد استفاده قرار می‌گیرند وابستگی زیادی به pH دارد به نحویکه ممکن است سمی به فرم پروتونه یا فاقد پروتون خواصی دقیقاً عکس فرم خنثی خود را داشته باشند، لذا آگاهی از گونه‌های تشکیل شده در هر pH کاری ضروری است که با استفاده از این روش کاملاً مشخص می‌شود. حسن دیگر این روش هزینه کمتر آن در برابر HPLC است، کار با HPLC نیاز به حلال‌هایی با درجه خلوص بالای تجزیه‌ای دارد، این حلال‌ها گران و دسترسی به آن‌ها آسان نیست.

روش پیشنهادی نیاز به هیچگونه پیش فرضی در مورد مدل شیمیایی سیستم ندارد. کاربرد MCR-ALS در این کار منجر به تفکیک کامل منحنی‌های غلظتی و طیفی سیستم مورد مطالعه گردید. روش پیشنهادی همچنین توانایی تعمیم یافتن جهت مطالعه همه تعادل‌های میکروسکوپی با اجزای فعال طیف‌سنجی را دارا می‌باشد*.

*نشانی نگارنده: مهندس وحیده مهدوی، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، بخش تحقیقات آفت‌کش‌ها، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران ۱۹۳۹۵، ایران.

منابع

- ALFORD, D., D. BATTY, G. BRIGGS, R. BROMILOW, D. CARTWRIGHT and *et al.*, 1997. The Pesticide Manual, CDS Tomlin, British Crop Protection Council, UK, 182.
- JAUMOT, J., R. GARGALLO and R. TAULER, 2005. A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemometr. and Intell. Lab. Sys.* 76:101-110.
- MAEDER, M. and A. D. ZUBERBUEHLER, 1986. New methods in chemistry. *Anal. Chim. Acta.* 181: 287-290.
- PANADES, R. and A. IBARS, 1999. Photodecomposition of carbendazim in aqueous solutions. *Water research.* 34:2951-2954.
- TAULER, R. and A. K. SMIDLE, 1994. *Chemometrics. Anal. Chem. Vol. 66:* 3337-3350.
- VANDEGINSTE, B. G. M. 1987. *Chemometrics, General introduction and historical development, Topics in current chemistry.* 1411-1440.
- VIVES, M., R. GARGALLO and R. TAULER, 1999. *Chemometrics. Anal. Chem.* 71: 4328-4334.

Address of the author: Eng. V. MAHDAVI, Iranian Research Institute of Plant Protection, P. O. Box 1454, Tehran 19395, Iran.