فصل اول

بررسی منابع

مقدمه

امروزه روش‌های کاملاً پیشرفته، آنالیز مخلوط‌های پیچیده از نمونه‌های گازی گرفته تا ماکرومولکول‌های بیولوژیکی را با قدرت جداسازی بالا و حد تشخیص‌های در حد فمتوگرم یا پائین‌تر فراهم کرده است، با این وجود اگر یک روش آماده‌سازی نامناسب قبل از رسیدن نمونه به دستگاه های تجزیه‌ای بکار رود، کل فرایند تجزیه بی اعتبار شده و نتایج با ارزشی حاصل نخواهد شد. اساس یک روش آماده سازی نمونه تبدیل بافت نمونه به صورتی است که قابل آنالیز با یک روش تجزیه‌ای باشد. بنابراین انجام مرحله آماده‌سازی نمونه از اهمیت خاصی برخودار است. استخراج آنالیت، تخلیص و تغلیظ آن یکی از مراحل مهم در فرایند آماده سازی نمونه می‌باشد. یک روش ایده‌آل در آماده‌سازی نمونه، روشی است که ساده و کم هزینه بوده و حلال آلی کمی مصرف کند. در ضمن از راندمان، انتخابگری و تکرارپذیری بالا برخوردار بوده و با انواع دستگاههای تجزیه‌ای سازگار باشد.

در روش های تجزیه ای اندازه گیری مقادیر بسیار کم از یک آنالیت عمدتاً با دو مشکل اساسی همراه می باشد که این مشکلات عبارت است: دقت و تکرار پذیری در اندازه گیری ماده مورد تجزیه و اندازه گیری آنالیت مورد نظر در حضور مواد سازنده نمونه که این مواد به عنوان ماتریکس نمونه اغلب در اندازه گیری مزاحمت ایجاد می کنند. برای رفع این مشکلات راه کارهای مختلفی وجود دارد که مرسوم ترین این راه کارها شامل دو روش کلی است: روش اول این است که از روش های تجزیه ای بسیار اختصاصی استفاده گردد که فقط به ماده مورد تجزیه پاسخ دهد و روش دوم این است که از تکنیک های قوی جداسازی برای جداسازی فیزیکی ترکیبات نمونه و آماده سازی آنها استفاده شود که در این صورت قادر خواهیم بود که هر یک از مواد سازنده نمونه مورد آنالیز را با آشکار سازهای غیر انتخابی اندازه گیری نماییم. تجزیه عنصری در یک ماتریکس پیچیده مثل آلیاژ های فلزی یا سنگ معدن توسط اسپکتروسکوپی جذبی اتمی نمونه بارزی از روش اول می باشد[1]. تلفیق لامپ کاتد تو

خالی با تکفام ساز ها باعث انتخاب گری بالا شده، به طوریکه روش فقط به عنصر مورد نظر پاسخ می دهد. اگر چه از این روش می توان به طور وسیعی در نمونه های معدنی مختلف استفاده کرد اما بسیاری از ترکیبات آلی با استفاده از این روش قابل تجزیه نمی باشند. که در این موارد باید از تکنیک های قوی جداسازی قبل از اندازه گیری استفاده کرد.

۱-۱- روش های جداسازی

برای جداسازی مخلوطی از ترکیبات از تکنیک های مختلفی می توان استفاده کرد اما آنچه که در همه این تکنیک ها مشترک است این است که برای انجام یک جداسازی موفق باید اجسام جدا شونده دارای خواص فیزیکی و شیمیایی متفاوتی از یکدیگر باشند. بر این اساس می توان از چندین روش جداسازی با کارایی و قدرت جداکنندگی مختلف استفاده نمود. در روش های صاف کردن یا کریستالیزاسیون بخشی یا کل ماده به صورت جامد از بقیه ترکیبات موجود در نمونه جداسازی می شود. ترکیباتی که دارای فشار بخار های متفاوتی از یکدیگر هستند در اثر تقطیر از یکدیگر جداسازی می شوند.

اما روش بسیار رایج جداسازی بر اساس اختلاف در میزان توزیع یک ماده در دو فاز غیر قابل اختلاط در یکدیگر صورت می گیرد. این روش متکی بر توزیع نسبتاً گزینشی یک ماده بین دو فاز غیر قابل اختلاط مانند دو مایع غیر قابل امتزاج با یکدیگر و یا بین یک جامد و به یک مایع دیگر است که این پدیده را توزیع یا تقسیم می نامندکه با توجه به نسبت توزیع گونه ها از یکی از روش های زیر استفاده می شود:

۱- استخراج ناپیوسته: این روش که برای اولین بار برای جداسازی اورانیوم از محلول نیتریک اسید به وسیله اتر صورت گرفت و با سنتز دی تیزون در سال ۱۹۲۵ به عنوان یک روش جداسازی مهم مطرح شد، بر اساس جداسازی فازها از یکدیگر با استفاده از قیف جدا کننده بنا شده است و موادی با این

روش قابل استخراج هستند که ضرایب توزیع بزرگ داشته باشند. اگر طی استخراج، گونه مورد نظر خارج نشود باید استخراج را چندین بار تکرار کرد.

۲- استخراج پیوسته: در این روش، استخراج به گونه ای طراحی می شود که امکان ادامه یافتن استخراج تا زمانی طولانی فراهم گردد.

۳- استخراج با جریان مخالف: اگر نسبت توزیع گونه های از هم جداشونده با یکدیگر اختلاف چندانی نداشته باشند در این صورت امکان استخراج با روش های بالا وجود ندارد. از این رو از استخراج با جریان مخالف استفاده می شود. این روش به دو صورت پیوسته و ناپیوسته انجام می شود. در روش پیوسته دو فاز غیر قابل اختلاط در دو جهت مخالف هم حرکت می کنند و جداسازی به صورت پیوسته ادامه می یابد. در روش استخراج با جریان مخالف ناپیوسته دو سری ظرف وجود دارد که به طور ویژه ای ساخته شده اند و در خلاف جهت هم حرکت داده می شوند. ایجاد تعادل پس از هر مرحله از حرکت ظرف منجر به جداسازی می شود.

۴- روش های کروماتوگرافی: پس از انجام روش استخراج با جریان مخالف معلوم شد که چنانچه دو فاز غیر قابل اختلاط در یکدیگر، در سیستم توزیع نسبت به هم ساکن نباشند و نسبت به یکدیگر در داخل ستون حرکت نمایند بسته به میزان برکنش مواد با هر یک از فازها، مواد با اختلاف ناچیز در ضرایب توزیع از یکدیگر جداسازی می شوند و با تغییر دادن شرایط آزمایش و ماهیت فازها، جداسازی با انتخابگری بالا صورت می گیرد که از این رو کروماتوگرافی به یکی از روش های جداسازی و تشخیص در شیمی تجزیه در تبدیل شده است. این روش از اهمیت بسیار ویژه ای در تهیه مواد طبیعی خالص و جداسازی ترکیبات سنتز شده برخوردار می باشد. کاربرد کروماتوگرافی در صنعت نیز بسیار گسترده می باشد و در مقیاس وسیعی در کنترل و آنالیز مواد اولیه و فرآورده های صنعتی شیمیایی بکار می رود. رشته های داروسازی، پزشکی و کشاورزی هم از این روش بی بهره نبوده و تعداد کاربرد ها در این زمینه بسیار زیاد می باشد.

۱-۱- کروماتوگرافی

۱-۲-۱ تاریخچه کروماتوگرفی

عبارت کروماتوگرافی که از دو کلمه یونانی کروماتو (رنگ) و گرافی (نوشتن) بوجود آمده است توسط یک گیاه شناس روسی بنام Teswett ابداع شده است[2]. وی در سال ۱۹۰۶ یک روش جداسازی را گزارش کرد که در این روش عصاره گیاهان استخراج شده به ستون پر شده از یک ماده جاذب (کربنات کلسیم) وارد شد و سپس با شستشوی آن بوسیله اتر نفت، نوار های مختلف رنگی که وابسته به انواع مختلف کلروفیل ها بودند، حاصل گردیدند. تسوت در این اثر خود دلیل جداشدن گونه های مختلف کلروفیل را اختلاف تمایل آنها به جذب بر روی کربنات کلسیم دانسته و متذکر شده است که چنین پدیده ای اختصاص به کلروفیل ندارد بلکه تمام ترکیبات رنگی دیگر نیز از این حالت تبعیت می کنند.کارهای Teswett تا سال ۱۹۳۱ میلادی مورد توجه قرار نگرفت تا اینکه Lederer کروماتوگرافی جذب سطحی را برای جداسازی و تهیه رنگ های پلی انی بکار برده و بعنوان اولین بار موفق به جداسازی کاروتن های α وβ از یکدیگر شد[2]. این امر صحت پیشگویی Teswett را درباره امکان جداسازی مواد رنگی دیگر با استفاده از کرو ماتوگرافی جذب سطحی اثبات نمود و از آن به بعد کارهای زیادی در زمینه جداسازی مواد طبیعی و سپس فرآورده های بیرنگ صورت گرفت. پس از آن در سال ۱۹۴۱ تحول عظیمی در زمینه کروماتوگرافی با ارائه کروماتوگرافی تقسیمی بین دو فاز مایع توسط Martin و Synge به وقوع پیوست[3]. در ارائه این روش از اصول عملی و تئوری حاکم بر استخراج با جریان مخالف کمک گرفتند. بدنبال این ابداع روش کروماتوگرافی تقسیمی جایگاه بسیار ارزنده ای در زمینه بیو شیمی و شیمی آلی برای خود بدست آورد و تعداد جداسازی ها به روش کروماتوگرافی به صورت تصاعدی افزایش یافت. در سال ۱۹۴۳ Tezlius روش های تجزیه جبهه ای و گسترش با جابه جایی را در کروماتوگرافی جذب سطحی به تفضیل مورد مطالعه قرار داد و بدین ترتیب شیوه های جدیدی از کروماتوگرافی ستونی را ابداع نمود. و بالاخره در سال ۱۹۵۲ Martin وJames با ابداع روش جدیدی از کروماتوگرافی بنام کروماتوگرافی تقسیمی

گاز – مایع، جایزه نوبل در شیمی را به خود اختصاص دادند[4,5]. این روش که به جداسازی ترکیبات فرار اختصاص داشت میدان کاربرد بسیار وسیعی را در زمینه مختلف شیمی و حل مشکلات پژوهشی و صنعتی پیدا نمود.

به طور کلی کروماتوگرافی یکی از مهم ترین روش های جداسازی و تشخیص در شیمی و شیمی تجزیه در قرن اخیر می باشد. این روش اهمیت بسیار ویژه ای در تهیه مواد طبیعی خالص و جداسازی ترکیبات سنتز شده برخوردار است[6,7]. کاربرد کروماتوگرافی در صنعت نیز دارای اهمیت زیادی است و در مقیاس وسیعی در کنترل و تجزیه مواد اولیه و فراورده های صنعتی شیمیایی بکار می رود.

۱-۲-۲- اصول کلی کروماتوگرافی

۱-۲-۲-۱ تعاریف و کلیات در کروماتوگرافی

کروماتوگرافی روشی است که می توان به کمک آن مواد تشکیل دهنده یک مخلوط را بر اساس مهاجرت متفاوت آنها در طول بستر مهاجرت از یکدیگر جدا ساخت. از نظر تئوری بستر مهاجرت را در کروماتوگرافی ستونی بنام ستون کروماتوگرافی تشکیل می دهد. این ستون می تواند به شکل استوانه یا متوازی السطوح باشد که از مواد جامدی به صورت پودر یا الیاف درست شده است و یک ماده سیال مناسب به صورت گاز یا مایع، این مواد را احاطه یا آغشته می کند. در مواردی که بستر کروماتوگرافی دارای شکل استوانه ای است روش را کروماتوگرافی ستونی می نامند و چنانچه بستر کروماتوگرافی به صورت متوازی السطوح باشد روش را کروماتوگرافی کاغذی یا لایهٔ نازک می نامند. در تمام موارد، بستر جداکننده را دو فاز متفاوت بوجود می آورد. یکی از این دو فاز بر روی ستون کروماتوگرافی تثبیت شده و بنام فاز ساکن نامیده می شود، فاز دیگر مایع یا گازی است که در طول ستون و در حالی که فاز ساکن را کاملاً احاطه کرده است در جهت معینی در حرکت است که آن را فاز متحرک می نامند.

در حالت کلی، روش اجرای کروماتوگرافی بدین ترتیب است که ابتدا نمونه ای از مواد مورد جداسازی را در مبداء بستر جداکننده به صورت نوار باریک (در کروماتوگرافی ستونی) یا به صورت لکه کوچک (در کروماتوگرافی مسطح) قرار می دهند. این مبداء در کروماتوگرافی ستونی راس ستون می باشد در صورتیکه در کروماتوگرافی مسطح در نزدیکی یکی از دو انتهای صفحه می باشد. پس از عبور دادن مقدار معینی از فاز متحرک مناسب، مواد موجود در نوار یا لکه اولیه، به صورت نوار های متوالی (در طول ستون) و یا بصورت لکه های پی در پی (در جهتی از صفحه) از یکدیگر جداسازی می شوندکه در این مرحله یک کروماتوگرام رسم می شود. در کروماتوگرافی ستونی، عبور فاز متحرک از خلال دانه های فاز ساکن، تحت تاثیر نیروی جاذبه و یا اختلاف فشار (با استفاده از پمپ) و در مورد کروماتوگرافی مسطح حرکت فاز متحرک بر اساس خاصیت موئینگی بستر انجام می گیرد.

مفهوم اساسی در تمام روش های کروماتوگرافی، توزیع نمونه بین دو فاز در هنگام عبور از داخل ستون می باشد. مواد مختلف مورد تجزیه برهم کنش های متفاوتی با فاز ساکن داشته و در نتیجه باعث بازداری های مختلف می شود که در نتیجه آن جداسازی صورت می گیرد. جداسازی ماده مورد تجزیه در داخل ستون بر اساس میزان توزیع بین دو فاز غیر قابل اختلاط صورت می گیرد. در این صورت برای هریک از گونه های جداشونده یک ثابت توزیع (K) تعلق می گیرد که به صورت زیر قابل نمایش است:

$$k = \frac{\text{غلظت در واحد حجم فاز ساکن}}{\text{غلظت در واحد حجم فاز متحرک}} \quad (1)$$

این پارامتر مشخصه خواص فیزیکی ماده مورد تجزیه است و به ساختمان ماده مورد تجزیه، ماهیت دو فاز و دما دارد. ترکیباتی که دارای ثابت توزیع خیلی بالا باشند به مدت طولانی در ستون بازداری می شوند و ترکیباتی که دارای ثابت توزیع بسیار کم باشند به سرعت از ستون شسته شده و همراه ترکیبات بازداری نشده از ستون خارج

می شوند. برای جداسازی دو ترکیب توسط یک سیستم بخصوص کروماتوگرافی بایستی ضرایب توزیع دو ماده متفاوت از هم باشند و چنانچه بخواهند دو ترکیب با بازداری یکسان را از یکدیگر جداسازی کنند بایستی فاز متحرک، فاز ساکن و یا دما را تغییر دهند که در این صورت باعث تغییر در ثابت های توزیع دو ترکیب می گردد و متعاقباً زمان های بازداری با یکدیگر متفاوت می شوند و پیک های تیز بدست می آیند. از این رو انجام جداسازی با استفاده از کروماتوگرافی باید در شرایط بهینه صورت بگیرد که برای برقراری شرایط بهینه بایستی عوامل زیر در نظر گرفته شوند:

الف- قدرت تفکیک: توانایی ترکیب مورد نظر برای جداسازی از سایر ترکیبات.

ب- حساسیت لازم برای نمونه مورد نظر بهینه گردد.

ج- زمان آنالیز: زمان برای انجام یک جداسازی باید مناسب باشد.

۱-۲-۲-۲- دسته بندی روش های کروماتوگرافی

روش های کروماتوگرافی را می توان بر اساس عوامل مختلفی طبقه بندی کرد که در زیر به آن ها اشاره می کنیم:

الف- دسته بندی بر اساس پدیده های فیزیکو شیمیایی حاکم بر کروماتوگرافی

۱- کروماتوگرافی تقسیمی: در این روش جداسازی بر اساس تقسیم نابرابر اجسام بین دو فاز مایع و یا بین دو فاز مایع و گاز انجام می گیرد و قانون توزیع بر فرایند کروماتوگرافی حاکم می باشد.
۲- کروماتوگرافی جذب سطحی: جداسازی در این روش از کروماتوگرافی بر اساس توزیع متفاوت اجسام بین یک فاز سیال و یک فاز جامد صورت می گیرد که توزیع اجسام از قوانین جذب سطحی تبعیت می کنند.

۳- کروماتوگرافی مبادله یون: این روش از کروماتوگرافی نوعی کروماتوگرافی تقسیمی می باشد که برای جداسازی و تشخیص گونه های یونی به کار می رود. در این روش مبادله کننده یون فاز ساکن می باشد که به صورت مایع یا جامد است فاز متحرک حاوی یک یون مخالف آنالیت است که با یون آنالیت ترکیب شده و زوج یون تشکیل می دهد.

۴- کروماتوگرافی طردی: در این روش از کروماتوگرافی جنس و ترکیب فاز ساکن از جنس و ترکیب فاز متحرک بوده و آن را در داخل حفره های موجود در داخل دانه های مواد تکیه گاه نگهداری می کنند. در این روش تکیه گاه فاز ساکن نقش اساسی در فرآیند کروماتوگرافی ایفا می کند. تکیه گاه های به کار رفته به دو دسته تقسیم می شوند. دسته اول آن هایی هستند که در تماس با فاز مایع (ساکن یا متحرک) آماس می کنند (ژل ها) در صورتیکه دسته دوم شامل تکیه گاه هایی هستند که دارای حفرات و منافذی با اندازه ثابت بوده و معمولاً آماس نمی کنند.

ب- دسته بندی بر اساس شکل و ساختمان بستر مهاجرت

۱- کروماتوگرافی مسطح: در این حالت فاز ساکن بر روی یک صفحه مسطح و یا در لابه لای یک صفحه کاغذ قرار داده می شود که در اینجا فاز متحرک از لابه لای فاز ساکن تحت تاثیر نیروی جاذبه یا اثر مویینگی حرکت می کند.

۲- کروماتوگرافی ستونی: در این حالت فاز ساکن در داخل یک ستون باریک قرار دارد که از داخل آن فاز متحرک تحت تاثیر نیروی فشار عبور داده می شود.

ج- دسته بندی بر اساس نوع فاز متحرک و فاز ساکن

یک دسته بندی اساسی تر روش های کروماتوگرافی بر پایه انواع فاز های متحرک و ساکن و انواع تعادل های درگیر در انتقال مواد حل شده بین فاز ها بنا شده است. سه گروه عمومی کروماتوگرافی

مایع، کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی سیال فوق بحرانی بر پایه نوع فاز های متحرک وجود دارد.

۱-۳- کروماتوگرافی گازی

کروماتوگرافی گازی یکی از روش های جداسازی است که برای آنالیز نمونه های فرار استفاده می شود در این روش نمونه ها تبخیر و به ابتدای ستون کروماتوگرافی تزریق می شوند و شویش توسط جریانی از گاز بی اثر از داخل ستون کروماتوگرافی انجام می گیرد. در این روش بر عکس سایر روش های کروماتوگرافی، فاز متحرک با مولکول های آنالیت بر همکنش ندارد و فقط به عنوان وسیله ای برای حمل مولکول ها از داخل ستون عمل می کند و نگهداری آنالیت ها در داخل ستون وابسته به میزان برهم کنش ماده مورد تجزیه با فاز ساکن و فراریت آن می باشد. بر اساس نوع فاز ساکن دو نوع کروماتوگرافی گازی وجود دارد: کروماتوگرافی گاز – جامد[۱] (GSC) وکروماتوگرافی گاز – مایع[۲](GLC).

۱-۳-۱-کروماتوگرافی گاز – جامد

کروماتوگرافی گاز – جامد بر پایه ی فاز ساکن جامدی بیان شده است که در آن بازداری آنالیت ها نتیجه جذب سطحی فیزیکی می باشد و به دلیل بازداری نسبتاً شدید مولکول های قطبی یا فعال و دنباله دار شدن پیک های شویشی (مشخصه غیر خطی بودن فرآیند جذب سطحی)، کاربرد محدودی دارد. از این رو این روش بجز در جداسازی برخی مولکول های گازی با جرم مولکولی کم، کاربرد زیادی ندارد.

۱-۳-۲-کروماتوگرافی گاز – مایع

[1] Gas-solid chromatography
2 Gas- liquid chromatography

مفهوم کروماتوگرافی گاز – مایع که اولین بار در سال ۱۹۴۱ توسط Martin و Synge که مبتکر کروماتوگرافی تقسیمی مایع – مایع نیز بودند، پیشنهاد شد[3] و بر پایه تقسیم آنالیت بین یک فاز متحرک گازی و یک فاز مایع ثبیت شده بر سطح یک جامد بی اثر بنا شده است. این روش در دامنه وسیعی از تجزیه های شیمیایی کاربرد داشته و می توان مقدار زیادی از ترکیبات را توسط این روش مورد مطالعه قرار داد. از محدودیت های تجزیه ای در این روش این است که ماده مورد تجزیه بایستی دارای فشار بخار مناسب بوده و در دامنه دمای مورد استفاده از لحاظ حرارتی پایدار باشد. از این رو از این روش می توان برای تمام گازها، بیشتر مولکول های آلی با اندازه های کوچک و متوسط غیر قابل یونش استفاده کرد لیکن این روش برای نمک های آلی و معدنی و یا ماکرو مولکول ها کاربرد ندارد. این روش یک روش تجزیه ای ساده و با قدرت تفکیک، انتخاب گری و حساسیت بالایی برخوردار است و تا قبل از روش HPLC[۳] به عنوان تنها روش جداسازی دستگاهی قلمداد می شد. در این مطالعه تنها روش کروماتوگرافی گاز – مایع که بر آن پدیده تقسیم حاکم است مورد مطالعه قرار می گیرد.

۱-۳-۲-۱- اصول نظری کروماتوگرافی گاز – مایع

کروماتوگرافی گاز – مایع که بر پایه ی تقسیم آنالیت بین دو فاز ساکن و متحرک می باشد. تعیین ضریب تقسیم از لحاظ نظری اهمیت ویژه ای دارد. ضریب تقسیم در GLC از تقسیم غلظت کل آنالیت در فاز مایع (فاز ساکن) بر غلظت کل آن در فاز گازی (فاز متحرک) بدست می آید:

[3] High-performance liquid chromatography

نظر بر اینکه مقدار مایع در کروماتوگرافی گازی بسیار کم است از این رو مقدار نمونه آزمایشی در این فاز بسیار محدود می باشد و می توان بجای ضریب تقسیم از فاکتور ظرفیت که با k نمایش داده می شود در محاسبات کمی استفاده کرد:

در این روش نیز همانند سایر روش های کروماتوگرافی در روی ستون مقدار کوچکی از نمونه آزمایشی را در ابتدای ستون کروماتوگرافی تزریق می کنندکه بلافاصله در دمای داخل ستون به صورت گاز در می آید. پس از تزریق، نمونه توسط فاز متحرک حمل شده و در نهایت یک کروماتوگرام رسم می شود. توزیع هر یک از اجزای نمونه جداسازی شده در ستون به صورت توزیع طبیعی بوده و شکل منحنی شویش به صورت توزیع گوسی می باشد. در این روش علاوه بر حجم بازداری[۴] (V_R)، کمیت دیگری بنام زمان بازداری[۵] (t_R) مطرح می باشد که این کمیت از نظر عملی از ارزش بیشتری برخوردار است. زمان بازداری در مورد یک آنالیت فاصله بین لحظه تزریق آن آنالیت در ابتدای ستون و لحظه ظهور پیک منحنی شویش می باشد. روابط زیر ارتباط حجم و زمان بازداری را بیان می کنند:

که در رابطه بالا، v سرعت گاز بر حسب سانتی متر بر ثانیه و S سطح مقطع ستون بر حسب سانتی متر مربع می باشد. سرعت گاز در ستون قابل اندازه گیری نیست بنابراین در روابط به جای آن معمولاً سرعت جریان گاز خارج شده از ستون به صورت تجربی اندازه گیری می شود.

[4] Retention volume
[5] Retention time

۱-۴- کاربرد روش های آماده سازی قبل از GLC

در سالهای اخیر توسعه ی روشهای تجزیه ای سریع، دقیق، صحیح و حساس از مباحث حائز اهمیت می باشند. علیرغم پیشرفتهای تکنولوژیکی زیاد، اغلب دستگاه های تجزیه ای نمی توانند ماتریکس نمونه ها را بطور تحمل نمایند و در نتیجه مرحله آماده سازی نمونه معمولاً وجود دارد و یک مرحله ی ضروری در فرایند تجزیه ای است. بسته به نوع نمونه روشهای مختلفی برای آماده سازی آن وجود دارد. برای آنالیز مقادیر ناچیز ترکیبات آلی، این مرحله عمدتاً شامل استخراج است که برای جدا کردن ترکیبات مورد نظر از ماتریکس نمونه و تغلیظ ترکیبات مورد نظر بکار گرفته می شود. عمومی ترین روش آماده سازی نمونه عبارت است از استخراج مایع - مایع[۶] (LLE)[8]. استخراج مایع- مایع به طور گسترده‌ای به عنوان یک تکنیک پیش‌تیمار برای جداسازی و پیش‌تغلیظ آنالیت در نمونه‌های آبی برای ترکیبات آلی و معدنی استفاده می‌شود. با این وجود این تکنیک دارای چندین نقطه‌ضعف از جمله تشکیل امولوسیون، استفاده از حجم زیاد حلال، گرانی روش و دشواری در اجرای روش می‌باشد. با توجه به مشکلات و معایب این روش از جمله وقت گیر و خسته کننده بودن رویکردهای دیگری مورد بررسی قرار گرفته و روش های میکرو استخراج با فاز جامد[۷] (SPME) و سپس میکرو استخراج با تک قطره[۸] (SDME) و همچنین میکرو استخراج مایع - مایع پخشی[۹] (DLLME) توسعه پیدا کرد.

۱-۵- کلیاتی در مورد روش های میکرو استخراج

علی رغم پیشرفت های چشم گیر در زمینه تکنولوژی دستگاه های تجزیه ای، اما هنوز هم اکثر دستگاه ها قادر به آنالیز نمونه هایی با ماتریکس پیچیده نمی باشند. از این رو قبل از آنالیز نمونه ها یک مرحله پیش تیمار جهت تمیز سازی و تغلیظ آنالیت ها و تبدیل آنالیت ها به فرمی که با دستگاه تجزیه ای قابل انطباق باشد، لازم است. استخراج مایع – مایع اولین روش بوده که جهت آماده سازی استفاده می شد. این روش شامل انتقال

[6] Liquid-liquid microextraction
[7] Solid-phase microextraction
[8] Single drop microextraction
[9] Dispersive liquid liquid microextraction

آنالیت از محیط آبی به یک حلال غیر قابل اختلاط با آب می باشد. اما این روش به دلیل مصرف زیاد حلال های آلی و تشکیل امولسیون در حین استخراج از روش های گران، زمان بر و آلوده کننده محیط زیست قلمداد می شود. کاهش مصرف حلال جهت کاستن هزینه های آنالیز و کاهش مضرات آن ها در طبیعت با ابداع روش استخراج فاز جامد[10] (SPE) تا حدودی تعدیل شد [9-10]. در روش استخراج با فاز جامد یک محلول را از میان لوله کوچک پر شده دارای ذرات جامد متخلخل از قبیل استایرن - دی وینیل بنزن و یا ذرات سیلیکای پیوندی عبور می‌دهند. معمولاً آنالیت‌ها با برهم‌کنشی که با فاز جامد دارند، استخراج می گردند. پس از شستشوی مختصر کارتریج، آنالیت‌ها با حجم کوچکی از یک محلول و یا یک حلال مناسب واجذب شده و بخشی از این محلول واجذبی جهت آنالیز با سایر روشهای تجزیه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. از مزایای این روش می توان به مصرف کم حلال های آلی نسبت به استخراج مایع – مایع، استفاده از فاز جامد جاذب، فاکتور های تغلیظ بالا، امکان تغلیظ نمونه های رقیق شده، امکان استفاده آسان و امکان استفاده از حلال های بیشتر برای شستشو آنالیت های جذب شده به کارتریج می باشد. با اینکه این روش تا حدودی مشکلات مربوط به استخراج مایع – مایع را جبران کرده است اما این روش هم نیاز به مراحل متعدد دارد که این امر باعث شد پژوهشگران به دنبال انجام روش های میکرو استخراج باشند. اولین روش میکرو استخراج تحت عنوان میکرو استخراج فاز جامد توسط Pawlizyn و همکارانش صورت گرفت[11]. بر اساس این روش آنالیت های نیمه قطبی یا غیر قطبی از داخل یک نمونه مایع یا نمونه گازی به سطح یک فایبر پوشیده شده با یک لایه نازک از پلیمر جذب می شوند. مزیتی که این روش دارد عبارت است از اینکه آنالیت‌ها در فاز جامد جمع شده و می‌توان آنها را درون یک دستگاه کروماتوگرافی برای آنالیز تزریق کرد. این روش استخراج با استفاده از مقدار خیلی کم آنالیت طی جذب به داخل فایبر پوشانده شده با سیلیکا انجام می‌شود سپس فایبر را می‌توان به کوره‌ی گرم یک کروماتوگرافی تزریق کرد که آنالیت در اثر حرارت واجذب می‌شود. اساس میکرواستخراج فاز جامد سرنگ اصلاح شده می‌باشد، یک فایبر سیلیکای گداخته شده به وسیله‌ی یک فازی از پلی‌سیلیکان یا برخی پلیمرهای دیگر

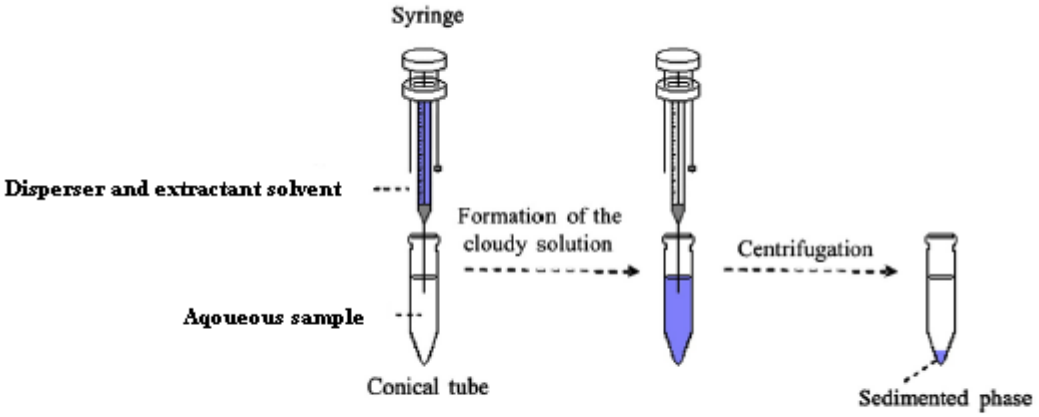
10 Solid phase extraction

پوشانده شده است. در میکرواستخراج با فاز جامد فایبر حجم کوچک و ویژه‌ای از فاز استخراجی می‌باشد که با چسب‌های با تحمل دمایی بالا درون لوله زنگ نزن کوچک که انتهای آن به سوزن سرنگ امتداد می‌یابد، چسبیده می‌شود. فایبر شکننده ابتدا درون سوزن سرنگ خودبند محافظت می‌شود سپس در مورد نمونه‌های مایع، فایبر پوشش داده شده درون محلول برای یک دروه‌ی زمانی حدود ۱۵-۲ دقیقه فرو برده می‌شود. نمونه به داخل فایبر جذب سطحی شده سپس فایبر به درون سوزن برگردانده و سوزن از ظرف نمونه خارج می‌گردد. و در این مرحله سوزن حاوی آنالیت استخراج شده به درون ورودی کروماتوگرافی تزریق می‌شود. فایبر در محفظه‌ی تزریق از درون محافظش خارج شده و سپس گرما باعث واجذب نمونه از فایبر گردد و آنالیت در راه ورودی ستون باریک کروماتوگرافی متمرکز می‌شود. این روش نسبت به روش های قبلی از مزایایی چون مصرف بسیار کم حلال و فاکتور های تغلیظ بالا برخوردار می باشد اما با این حال گران بودن فایبرها، ظریف بودن فایبرها و اثر حافظه در مورد فایبرها از معایب این روش به شمار می رود. کم کردن حجم حلال‌های آلی در روش استخراج مایع - مایع سبب به وجود آمدن تکنیک‌های جدیدی شد. از جمله این روش ها استخراج با تک قطره است که توسط Dasgupta و همکارانش به عنوان یک روش جدید میکرو استخراج معرفی شد[12]. در این روش از یک حلال به صورت تک قطره آویزان از انتهای یک سوزن به منظور استخراج آنالیت ها استفاده می شود. در این روش تک قطره آویزان شده در تماس به داخل محلول حاوی آنالیت در تماس با فضای فوقانی محلول قرار می گیرد. در این صورت آنالیت ها به داخل حلال استخراج کننده قطره استخراج می شوند. از مزایای این روش می توان به استفاده از حلال های مختلف جهت استخراج و مصرف بسیار کم حلال آلی اشاره کرد. اما این روش هم مانند سایر روش ها دارای معایبی چون ناپایداری قطره استخراج کننده در انتهای سوزن و زمان استخراج طولانی است. از طرف دیگر در این روش استخراج کامل صورت نمی گیرد مگر اینکه حجم نمونه کم باشد که این امر یک ایراد بزرگ قلمداد می شود. تا اینکه در سال ۲۰۰۶ Assadi و همکارانش با ابداع یک روش جدید میکرو استخراج بنام میکرو استخراج مایع – مایع پخشی (DLLME) بسیاری از مشکلات مربوط به روش های قبلی میکرو استخراج را جبران کردند[13]. اساس این روش بر پخش شدن یک حلال استخراج

کننده غیر قابل اختلاط با محلول آبی توسط یک حلال آلی قابل اختلاط با آب مانند متانول، استونیتریل، استون و اتانول استوار می باشد. از مزایای این روش به سریع بودن، ارزان بودن، مصرف کم حلال آلی و فاکتور های تغلیظ بالا می توان اشاره کرد.

۱-۶- اصول کلی روش میکرو استخراج مایع – مایع پخشی

روش میکرو استخراج مایع – مایع پخشی در حالت کلی از دو مرحله تشکیل می شود. در مرحله اول یک حلال آلی غیر قابل اختلاط با آب با دانسیته بیشتر یا کمتر از آب به عنوان حلال استخراج کننده با یک حلال آلی قابل اختلاط با آب مانند متانول مخلوط می شود. سپس این مخلوط به داخل محلول حاوی آنالیت ها به سرعت تزریق می شود. هنگامی که فاز استخراج‌کننده و پخش‌کننده مخلوط می‌شوند و با سرعت در نمونه تزریق شوند یک آشفتگی ایجاد می‌شود که باعث ایجاد قطره‌های امولوسیونی ابر مانند می‌شود. ویژگی امولوسیون کننده می‌تواند روی اندازه قطره‌ها تأثیر داشته باشد. مایع پخشی یک نقش قوی در جداسازی سیستم‌های استخراج بر اساس انجام واکنش شیمیایی بازی می‌کند که به خاطر ناحیه‌ی حد واسط بزرگ منجر به انتقال جرم خطی و سریع و افزایش سرعت واکنش می‌شود. آشفتگی که در فاز آبی به وجود می آید منجر به پخش خوب حلال استخراج‌کننده در نمونه‌ی آبی می شود. بعد از تشکیل نقطه‌ی ابری ناحیه‌ی سطح بین حلال استخراج کننده و نمونه‌ی آبی بسیار بزرگ شده و بنابراین تعادل سریع حاصل شده و زمان جداسازی بسیار کوتاه می‌شود. در اصل این یک توسعه اصلی در روش میکرواستخراج مایع – مایع پخشی است. بعد از سانتریفوژ محلول ابر مانند در ته لوله‌ی مخروطی ظاهر می‌شود و برای تکنیک‌های تجزیه‌ای مناسب استفاده می‌شود. در شکل۱-۲ شمای کلی استخراج مایع – مایع پخشی نشان داده شده است:



شکل(۲-۱): نمایش مراحل میکرو استخراج مایع – مایع پخشی

دراین روش عواملی که بر کارایی استخراج موثر می باشند، عبارت اند از:

- نوع حلال استخراج کننده
- نوع حلال پخش کننده
- حجم حلال استخراج کننده
- حجم حلال پخش کننده
- تاثیر نیروی یونی
- حجم نمونه اولیه
- دمای استخراج
- زمان استخراج

در این بین انتخاب نوع حلال استخراج کننده از اهمیت بسیار ویژه ای برخوردار می باشد و انتخاب نوع حلال استخراج کننده بر اساس قابلیت استخراج آنالیت ها، دانسیته متفاوت نسبت به آب، قابلیت پخش شدن توسط

حلال پخش کننده، حلالیت پایین در داخل محلول آبی و شرایط مناسب کروماتوگرافیکی صورت می گیرد. معمول ترین نوع از حلال استخراج کننده شامل حلال های کلره مانند کلروفرم، تترا کلرید کربن، تترا کلرواتان تولوئن، هگزان و ... می باشد. در مورد حلال پخش کننده هم پارامتر مهم قابلیت انحلال آن درمحلول آبی حاوی آنالیت و حلال استخراج کننده می باشد که از معمول ترین نوع این حلال ها می توان به متانول، اتانول، استون، استونیتریل و تتراهیدروفوران اشاره کرد. حجم حلال پخش کننده بر کیفیت پخش شدن حلال استخراج کننده در داخل محلول آبی تاثیر دارد. از این رو هر چه حلال استخراج کننده بهتر پخش شود در این صورت کارایی استخراج نیز بیشتر می شود. از طرف دیگر حجم حلال پخش کننده بر میزان قطبیت فاز آبی نیز موثر است و با افزایش حجم حلال پخش کننده از قطبیت فاز آبی کاسته می شود از این رو حلالیت آنالیت ها در داخل فاز آبی بیشتر می شود. از این رو در این روش باید حجم حلال استخراج کننده و حلال پخش کننده بهینه شوند.

در این روش زمان استخراج عبارت است از مدت زمان ما بین تزریق مخلوط حلال های استخراج کننده و پخش کننده تا قبل از انجام سانتریفیوژ می باشد و چون در این روش حلال استخراج کننده به صورت قطرات بسیار ریزی در داخل محلول آبی پخش می شود از این رو سطح تماس بسیار بزرگ است و این سطح تماس بزرگ باعث می شود که انتقال آنالیت ها به داخل حلال استخراج کننده بسیار سریع صورت بگیرد و زمان استخراج بسیار کوتاه باشد.

۱-۶-۱- مزایای روش DLLME

از مزایای این روش می توان به موارد زیر اشاره کرد:

۱- کار با این روش آسان است
۲- زمان استخراج کوتاه می‌باشد.
۳- ارزان قیمت است.
۴- راندمان استخراج این روش نسبتاً بالا است.

۵- فاکتورهای غنی‌سازی بالا می‌باشند.

جدول (۱-۲) مقایسه‌ی سرعت استخراج آنالیت ها از نمونه‌ها برای سه روش میکرواستخراج مایع- مایع پخشی میکرواستخراج با فاز جامد و میکرواستخراج با فاز مایع را نشان می‌دهد که زمان استخراج مربوط به میکرواستخراج مایع- مایع پخشی نسبت به سایر روش‌ها بسیار کمتر می‌باشد.

جدول(۱-۲): مقایسه زمان استخراج روش های مختلف میکرو استخراج

روش استخراج	زمان استخراج	منابع
SPME	۶۰ دقیقه	[14-16]
LPME	۲۰ دقیقه	[17-19]
DLLME	در حد چند ثانیه	[20-24]

۱-۷- پارامتر های کمی در روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی

۱-۷-۱- فاکتور تغلیظ: در این روش فاکتور تغلیظ به صورت نسبت غلظت آنالیت ها در فاز ته نشین شده به غلظت آنالیت ها در نمونه اولیه تعریف می شود که به صورت زیر نشان داده می شود:

که در این رابطه C_{Sed} غلظت آنالیتدر فاز ته نشین شده و C_0 غلظت آنالیت در نمونه اولیه می باشد.

۱-۷-۲- راندمان استخراج : راندمان استخراج با استفاده از رابطه

زیر بدست می آید:

$$ER = \frac{n_{sed}}{n_0} \times 100 = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_0 \times V_{aq}} \times 100$$

(6)

$$ER = \frac{n_{sed}}{n_0} \times 100 = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_0 \times V_{aq}} \times 100 \qquad (7)$$

n_0: مقدار کلی آنالیت

n_{sed} : مقدار آنالیت در فاز ته‌نشین شده استخراجی

۱-۸- قارچ کش ها[11]

قارچ کش ها در اصطلاح به ترکیباتی اطلاق می گردند که سبب مرگ یا از بین رفتن پرگنه[12] قارچ می شوند. مواد fungistatic ترکیباتی شبه قارچ کش می باشند که بدون از بین بردن قارچ سبب توقف رشد و یا مانع بیماری زایی آن می شوند. در برخی از موارد این ترکیبات سبب افزایش توان دفاعی گیاه در مقابل قارچ بیماری زا نیز شده اند. از اوایل قرن نوزدهم به طور عملی از قارچ کش ها استفاده شده است. در سال ۱۸۰۵ Prevost محلول کات کبود را برای کنترل سیاهک پنهان گندم بکار برده است. در سال ۱۸۰۷ Forsyth گوگرد را برای بیماری سفیدک پودری هلو مورد استفاده قرار داده است. در سال ۱۸۸۲ مخلوط Bordeaux جهت کنترل سفیدک کرکی درخت مو مورد استفاده قرار گرفت. در سال ۱۹۱۴ ترکیبات آلی جیوه وارد بازار شدند. در سال ۱۹۳۲ به خواص قارچ کشی دی تیوکاربامات ها پی برده شد. در سال ۱۹۶۵ ترکیبات سیستمیک وارد بازار شدند. طرز تاثیر یک ماده ارتباط مستقیم با کاربرد آن دارد. واژه های LD_{50}[13] و LC_{50}[14] در مورد میزان کارایی ترکیبات سمی بر قارچ های مولد بیماری بکار می رود. کمیت LD_{50} به مقدار دوز[15] از یک ترکیب شیمیایی اطلاق می شودکه پنجاه درصد جمعیت زنده از یک قارچ را بکشد. ولی LC_{50} به غلظتی از ترکیب شیمیایی

[11] Fungicides
[12] colony
[13] Lethal dose 50%
[14] Lethal concentration 50 %
[15] Dose