



اندازه‌گیری اسپکتوفوتومتری نیتريت در آب‌های خلیج چابهار بعد از مشتق‌سازی و پیش‌تغلیظ آن به روش میکرو استخراج مایع - مایع پخشی مبتنی بر قطره جامد آلی شناور (DLLME-SFO)

امیرحسین امیری

گروه شیمی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

amirhoseinamiri64@gmail.com

میرمهدی زاهدی

گروه شیمی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

محمود نصیری

گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

جواد قاسم‌زاده

گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار

چکیده

با توجه به اهمیت و حساسیت اندازه‌گیری‌های انجام شده در نمونه‌های آب دریا و پیچیدگی بافت مربوطه، استفاده از روش‌های آماده‌سازی نمونه امری اجتناب‌ناپذیر است. نیتريت از جمله مواد مغذی در آب دریا محسوب می‌شود که در مقادیر بالاتر نقش یک آلودگی بالقوه را بازی کرده و چرخه‌های زیستی دریا را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در این تحقیق پارامترهای موثر بر میکرو استخراج مایع - مایع پخشی مبتنی بر قطره جامد آلی شناور به منظور استخراج و اندازه‌گیری اسپکتوفوتومتری نیتريت در آب دریا مورد بررسی قرار گرفت. به منظور ایجاد بیش‌ترین هم‌خوانی در روش پیش‌تغلیظ پیشنهادی، پارامترهای مورد نظر در محیط آب دریای مصنوعی بهینه‌سازی شدند. در مرحله مشتق‌سازی، از معرف ۲ و ۳-دی آمینو نفتالن استفاده شد که در محیط اسیدی با نیتريت واکنش داده و تشکیل ۱- نفتوتتری آزول می‌دهد که در طول موج ۳۶۵ نانومتر نور مرئی را جذب می‌کند. سپس مشتق تشکیل شده را به روش DLLME-SFO استخراج کرده که مهم‌ترین پارامترهای موثر بر آن از جمله نوع و حجم حلال استخراجی (۲۵۰ میکرولیتر ۱- دودکانول)، نوع و حجم حلال پخشی (۱،۲ میلی‌لیتر

متانول)، pH (۹/۵) به دست آمدند. تحت شرایط بهینه استخراج، دامنه خطی به دست آمده از جذب مشتق ۵۰۰۰-۲۵۰ میکروگرم بر لیتر با ضریب تعیین ۰/۹۹۶ به دست آمد. در پایان با به کارگیری روش مذکور مقدار نیتريت را در آب‌های خلیج چابهار مورد اندازه‌گیری قرار داده که دامنه غلظتی ppm ۱/۷۶-۰/۷۷ به دست آمد.

کلید واژه: DLLME-SFO، پیش تغلیظ، اسپکتو فوتومتری، نیتريت، خلیج چابهار

مقدمه

نیتريت یکی از ترکیباتی است که در آب‌های طبیعی یافت می‌شود و نقش مهمی در ارزیابی کیفیت آب ایفا می‌کند. مهم‌ترین عامل ورود ترکیبات نیتروژن به آب کودهای شیمیایی هستند که در کشاورزی از آن‌ها استفاده می‌شود که بخش عمده آن‌ها نترات، آمونیاک، آمونیوم، اوره و آمین‌ها تشکیل می‌دهند که در نهایت به بدنه آبی وارد می‌شوند. در محیط‌های دریایی، نیتريت به طور طبیعی به عنوان یک ترکیب حد واسط در فرآیندهای نیتریفیکاسیون و دنیتریفیکاسیون چرخه کربن عمل می‌کند (Zehr et al., 2011) و غلظت‌های بالای آن در محیط محصور دریا اثرات سمی بر روی جانوران دریایی داشته و همچنین در پرورش متراکم ماهیان تجاری تاثیرگذار است (Svobodova et al., 2005). ماهی‌ها عمدتاً از طریق مکانیسم‌های فعال جذب که در سلول‌های انتقال یونی آب شش‌ها وجود دارد این گونه یون‌ها را جذب می‌کنند. سلول‌های کلریدی از سلول‌های انتقال یون می‌باشند که یون کلراید را جذب کرده و یون بی‌کربنات دفع می‌کنند ولی به هنگام حضور غلظت‌های بالای نیتريت در محیط محصور آب، گرایش به جذب نیتريت پیدا کرده و سبب انباشته شدن آن در آب‌شش‌ها می‌شوند (Jensen, 2003). نیتريت

با نفوذ به درون سلول‌های خونی، آهن سه ظرفیتی هموگلوبین را اکسید کرده و تشکیل مت‌هموگلوبین می‌دهد که این ترکیب به دلیل کاهش ظرفیت پیوندی خود با اکسیژن، توانایی انتقال اکسیژن را از دست می‌دهد (Kiese, 1974). این بیماری به عنوان مت‌هموگلوبینمی شناخته شده است که یکی از نشانه‌های ظاهری در ماهی‌ها، قهوه‌ای شدن رنگ خون در آب‌شش‌ها می‌باشد که یک طیف نوری در طول موج ۶۳۵ نانومتر دارد (Kroupova et al., 2005)؛ بنابراین اندازه‌گیری و کنترل نیتريت به واسطه اثراتی که غلظت بالای این یون بر روی سلامتی دارد از اهمیت بالایی در آنالیز نمونه‌های بیولوژیکی برخوردار می‌باشد. در حال حاضر، روش‌های تجزیه‌ای زیادی در آنالیز نیتريت نمونه‌های بیولوژیکی در دسترس است که می‌توان به روش‌های کروماتوگرافی (Jobgen et al., 2007)، الکترومتری (Perez-Olmos et al., 1998) و کمیلومینسانس (Garside, 1982) اشاره کرد. در این تحقیق، از روش اسپکتوفتومتری با معرف ۲ و ۳-دی آمینو نفتالن استفاده شد که از مزایای آن حساسیت بالا، گرینش پذیری بالا، سادگی در انجام مراحل مشتق‌سازی و آماده سازی نمونه، تشکیل مشتق پایدار، پایین بودن اثرات تداخلی، محدوده خطی بالا در غلظت‌های متفاوت نیتريت و

در آب مصنوعي دريا تهيه کرده و سپس ۱۰ ميلي ليتر از آن را برداشته و در ظرف آزمايش ۱۵ ميلي ليتری درب دار که مناسب استخراج و سانتری فيوژ می باشد می ريزيم. با اضافه کردن مقدار کافی از هيدروکلریک اسيد به آن pH محلول را به ۱/۵ رسانده و سپس یک ميلي ليتر از معرف DAN به محلول اضافه کرده و آن را به مدت ۵ دقيقه به هم می زنيم تا واکنش مشتق سازی کامل شود. پس از حصول اطمینان از تشکیل مشتق با اضافه کردن سود به نمونه pH محلول را به ۹/۵ می رسانيم که اين افزایش pH سبب افزایش شدت جذب مشتق می شود. مخلوطی از حلال استخراجی و پخشی را توسط سرنگ با فشار به نمونه تزریق کرده که منجر به تشکیل حالت ابری و انتقال سريع مشتق از فاز آبی به فاز آلی می شود. بعد از آن نمونه را به مدت ۵ دقيقه با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتری فيوژ می کنيم و پس از آن در حمام آب یخ قرار می دهيم که سبب انجماد سريع قطره آلی بر روی سطح محلول شده و در برداشت آن سهولت ایجاد می کند. در نهایت قطره را در میکرو ویال حل کرده درون میکروسول ريخته و در طول موج ۳۶۵ نانومتر مورد سنجش قرار می دهيم.

یافته ها

تأثير غلظت مشتق ساز ۲ و ۳- دی آمینو نفتالن یکی از پارامترهای مهم در اندازه گیری اسپکتوفوتومتری نیتريت به روش مشتق سازی، بهینه سازی غلظت مشتق ساز ۲ و ۳- دی آمینو نفتالن می باشد. بدین منظور غلظت های ۸۰ $\mu\text{g}/\text{ml}$ تا ۱۰ از مشتق ساز در هيدروکلریک اسيد ۰/۶۲ تهيه کرده و

هزینه کم می باشد که با تلفیق آن با تکنیک DLLME-SFO سبب استخراج بالا و پيش تغليظ نیتريت از ماتریکس پیچیده آب دریا می شود.

مواد و روش

ابزارآلات و دستگاه های به کار رفته در این روش شامل دستگاه اسپکتوفوتومتر UV2100PC یونیکو برای اندازه گیری جذب نیتريت در طول موج ۳۶۵ نانومتر استفاده شد. محلول استاندارد نیتريت (۱۰۰ ppm) با حل کردن ۱۵۰ ميلي گرم نمک سدیم نیتريت (خشک شده به مدت ۴ ساعت در دمای 110°C) در یک لیتر آب دو بار تقطیر انجام شد. محلول نیتريت روزانه (۱۰ ppm) با رقیق سازی حجم کافی از محلول استاندارد نیتريت تهيه گردید.

محلول معرف ۲ و ۳- دی آمینو نفتالن (DAN) به صورت روزانه با حل کردن ۵/۰ ميلي گرم DAN در ۱۰۰ ميلي لیتر هيدروکلریک اسيد ۰/۶۲ مولار تهيه شده و در بطری شیشه ای خاکستری رنگ در دمای 18°C - نگهداری شد. آب مصنوعي دریا با حل کردن مقادیر کافی از نمک های مربوطه در یک لیتر آب دو بار تقطیر تهيه گردید. ۲۳/۵۰۰ گرم نمک NaCl، ۱۰/۷۸۰ گرم نمک $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ، ۱/۴۷۰ گرم نمک $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۲۰۰ ميلي گرم نمک NaHCO_3 ، ۱۰۰ ميلي گرم نمک KBr، ۳۰ ميلي گرم نمک H_3BO_3 ، ۲۰ ميلي گرم نمک $\text{SrCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، ۳ ميلي گرم نمک $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ، ۳ ميلي گرم نمک NaF، ۳ ميلي گرم نمک KCl. به منظور بهینه سازی پارامترهای موثر بر میکرو استخراج، محلول نیتريت روزانه با غلظت ۱۰ ppm

قبل از کلوئیدی شدن آن توسط سود بالابرده و به همان $pH=9/5$ به عنوان pH بهینه استخراج برسانیم.

تأثیر نوع حلال استخراجی و پخشی

یکی از پارامترهای تأثیر گذار در روش DLLME-SFO انتخاب نوع حلال استخراجی می‌باشد چون که انتخاب صحیح حلال استخراجی سبب حصول برگشت پذیری بالای استخراج و در نتیجه فاکتور غنی سازی بالا می‌شود. حلال استخراجی باید خصوصیتی از جمله چگالی کم تر از آب، حلالیت بسیار کم در آب و محلول در حلال پخشی، سمیت کم، نقطه ذوب نزدیک به دمای اتاق و بازدهی استخراج بالا داشته باشد. از طرفی حلال پخشی باید قابلیت انحلال در فاز آلی (حلال استخراجی) و فاز آبی (محلول نمونه) داشته باشد و زمانی که با حلال استخراجی ترکیب شده و به نمونه تزریق می‌شود تشکیل حالت ابری پایدار بدهد. بر اساس این معیارها، حلال‌های n-دکانول، un-دکانول، ۱-دودکانول و تولوئن به عنوان حلال‌های استخراجی در ترکیب با متانول، اتانول، استون و استونیتریل به عنوان حلال پخشی مورد سنجش قرار گرفتند. فشار بخار بالا و حلالیت بالای تولوئن در آب (526 mg/L) منجر به پایین بودن بازدهی استخراج آن شد. همچنین استون در مقایسه با سایر حلال‌های پخشی انتخاب شده، تشکیل حالت ابری در مورد آن ضعیف مشاهده شد. بهترین نتایج در انتخاب ۱-دودکانول (نقطه ذوب: 24°C - 22°C) و ۱-آندکانول (نقطه ذوب: 15°C - 13°C) به عنوان حلال استخراجی در ترکیب با متانول به عنوان حلال پخشی به دست آمد. در نهایت ۱-دودکانول

مقدار $1/0$ میلی‌لیتر از هر غلظت را به 10 میلی‌لیتر محلول روزانه نیتريت سدیم (10 ppm) اضافه کردیم و پس از گذشت مدت زمان معین و حصول اطمینان از تشکیل مشتق شدت جذب را در هر یک از نمونه‌ها اندازه‌گیری کرده و مشاهده گردید غلظت $50 \mu\text{gr/ml}$ بهترین نتیجه را در تشکیل مشتق می‌دهد.

تأثیر pH

در اندازه‌گیری اسپکتوفوتومتری نیتريت، pH از دو جهت اثرگذار است یکی در فرآیند تشکیل مشتق و دیگری در فرآیند استخراج. یون نیتريت در محیط اسیدی با حلقه ۲ و ۳-دی آمینو نفتالن (DAN) واکنش داده و تشکیل حلقه تری آزول (NAT) می‌دهد که یافتن pH بهینه سبب تشکیل هر چه بهتر مشتق می‌شود. به همین منظور با اضافه کردن $1/0$ میلی‌لیتر مشتق ساز ۲ و ۳-دی آمینو نفتالن ($50 \mu\text{gr/ml}$) به 10 میلی‌لیتر محلول نیتريت سدیم روزانه (10 ppm)، مشتق را در محدوده $pH=1-3$ تشکیل داده و به دنبال آن با اضافه کردن سود، pH نمونه را به $9/5$ رسانده و شدت جذب را اندازه‌گیری می‌کنیم که با توجه به نتایج به دست آمده حدود $pH=1/5$ به عنوان pH اولیه بهینه برای تشکیل مشتق انتخاب شد.

در بررسی pH بهینه استخراج، در ابتدا مشتق سازی را طبق شرایط بهینه شده از قبل انجام داده و سپس عملیات استخراج را با تغییر pH ماتریکس نمونه از اسیدی تا بازی انجام دادیم که نتایج حاصله مبنی بر بی‌تأثیر بودن pH در روند استخراج می‌باشد. لذا نتیجه‌گیری شد که pH ماتریکس نمونه را تا

در نمودار ۳ مشاهده می‌شود با افزایش حجم ۱- دودکانول حجم فاز استخراج شده پس از سانتری فیوژ افزایش می‌یابد که این افزایش حجم تا جایی که سبب کاهش غلظت آنالیت در فاز استخراجی نشود بازیابی استخراج را بالا برده و پس از آن سبب رقیق شدن آنالیت و کاهش غلظت آن در فاز استخراجی شده و بازیابی استخراج کاهش می‌یابد. با توجه به نتایج به دست آمده حجم ۲۵۰ میکرولیتر ۱- دودکانول به عنوان حجم بهینه انتخاب شد که نتایج آن در نمودار ۳ نشان داده شده است.

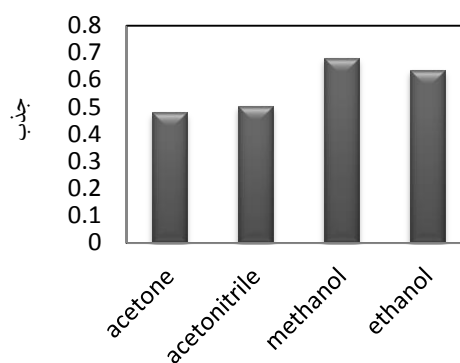
تأثیر حجم حلال پخشی

در این خصوص حجم‌های ۰/۵، ۰/۷، ۱/۰، ۱/۲، ۱/۵، ۱/۷، ۲/۰ میلی لیتر متانول همراه با ۲۵۰ میکرولیتر ۱- دودکانول به عنوان مخلوط استخراج کننده انتخاب و میکرو استخراج از نمونه آبی انجام شد. در ابتدا در حجم‌های پایین متانول، حالت ابری تشکیل شده ناپایدار بوده و استخراج ضعیف مشاهده شد و با افزایش حجم حلال پخش کننده به دلیل افزایش سطح تماس حلال با نمونه آبی به مراتب حالت ابری پایدارتر، استخراج کامل تر و شدت جذب افزایش پیدا کرد که این افزایش تا حجم ۱/۲ میلی لیتر ادامه داشته و پس از آن کاهش یافت که می‌توان دلیل آن را حل شدن نسبی ۱- دودکانول در فاز آبی دانست که نتایج این بررسی در نمودار ۴ نشان داده شده است.

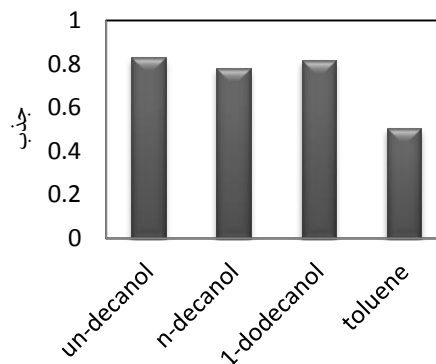
نمودار ۳: تأثیر حجم حلال پخشی بر شدت جذب

به دلیل داشتن نقطه ذوب نزدیک به دمای اتاق و سهولت در برداشت قطره منجمد شده به عنوان حلال استخراجی و متانول به عنوان حلال پخشی انتخاب شد. نتایج حاصل از این بررسی در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است.

نمودار ۱: تأثیر نوع حلال استخراجی بر شدت جذب



نمودار ۲: تأثیر نوع حلال پخشی بر شدت جذب

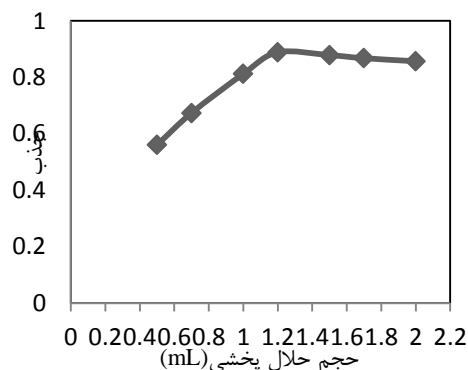


تأثیر حجم حلال استخراجی

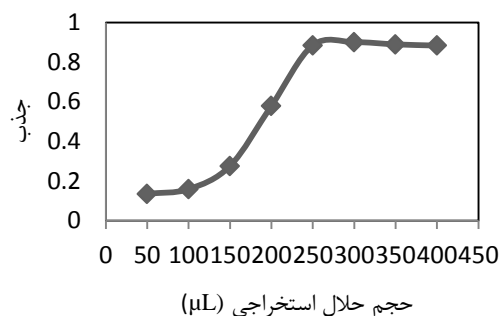
بدین منظور تعیین حجم بهینه حلال استخراجی، چندین نمونه از محلول نیتريت روزانه را تحت شرایط بهینه شده مشتق سازی کرده و با حجم‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و ۳۵۰ میکرولیتر از ۱- دودکانول و یک میلی لیتر متانول مورد استخراج و سنجش قرار گرفتند. همان طور که

منابع

- Garside, C., 1982. A chemiluminescent technique for the determination of nanomolar concentrations of nitrate and nitrite in seawater. *Marine Chemistry* 11, 159–167.
- Jensen F.B. (2003): Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 135, 9–24.
- Jobgen, W. S., Jobgen, S. C., Li, H., Meininger, C. J., & Wu, G. (2007). Analysis of nitrite and nitrate in biological samples using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications*, 851, 71–82.
- Kiese M. (1974): *Methaemoglobinaemia: A Comprehensive Treatise*. CRC Press, Cleveland, OH.
- Kroupova H., Machova J., Svobodova Z. (2005): Nitrite influence on fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 50, 461–471.
- Perez-Olmos R., Yoldi I., Ruiz M. P., Merino J. M., Potentiometric Determination of Nitrite in Meat Products Using a Nitrite-Selective Electrode, *Anal. Sci.*, 14 (1998) 1001-1003.
- Svobodova, Z., Machova, J., Drastichova, J., Groch, L., Luskova, V., Poleszczuk, G., Velisek, J., Kroupova, H. (2005): Haematological and biochemical profile of carp blood following nitrite exposure at different concentration of chloride. *Aquaculture Research*, 36, 1177–1184.
- Zehr, Jonathan P.; Kudela, Raphael M., 2011. Nitrogen cycle of the open ocean: from genes to ecosystems. *Annu. Rev. Mar Sci.* 3:197-225. doi: 10.1146/annurev-marine-120709-142819.



نمودار ۴: تاثیر حجم حلال استخراجی بر شدت جذب



نمودار ۵: تاثیر حجم حلال استخراجی بر شدت جذب

نتیجه گیری

در این مطالعه یک روش نوین در میکرو استخراج و اندازه گیری اسپکتوفتومتری نیتريت در آب دریا به کمک معرف ۲ و ۳- دی آمینونفتالن ارائه شد که روشی ساده، سریع، کم هزینه با بازدهی و فاکتور پیش تغلیظ بالا می باشد و ۱- دودکانول به عنوان حلال استخراجی به کار رفته شده در این روش در مقایسه با سایر حلال های استفاده شده در دیگر روش ها، از سمیت کم تر و سهولت بیش تر در روند میکرو استخراج برخوردار است. هم چنین نتایج به دست آمده از غلظت نیتريت در آب های خلیج چابهار دامنه غلظتی ۰/۷۶-۱/۷۶ ppm از هشت ایستگاه نمونه برداری شده به دست آمد.