

کاربرد روش میکرواستخراج فاز جامد پخشی با کارایی بالا برای اندازه گیری مقادیر

ناچیز تیمول در نمونه های غذایی و بهداشتی

روح اله خانی*، حسین دادرس مقدم

گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۷/۲۶

تاریخ تصحیح: ۹۸/۱۲/۱۰

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۱/۲۹

چکیده

در این پژوهش، روش میکرواستخراج فاز جامد پخشی بر پایه ی جاذب گرافن اکسید بعنوان یک روش سبز، دقیق و کارآمد برای استخراج/پیش تغلیظ و اندازه گیری تیمول به کار گرفته شد. ابتدا گرافن اکسید سنتز و ویژگی های آن توسط تکنیک های اسپکتروفوتومتری (UV-Vis)، تبدیل فوری (FT-IR) و پراش پرتو X (XRD) شناسایی شد. تاثیر پارامترهای مختلف از جمله pH محلول، مدت زمان همزدن، مقدار جاذب و غلظت تیمول توسط روش طراحی باکس بنکن (BBD) جهت تعیین پارامترها و برهمکنش های مؤثر و بهینه سازی این پارامترها در عملکرد جاذب سنتز شده برای اندازه گیری تیمول بررسی شد. بالاترین مقدار جذب تیمول در شرایط بهینه $pH=4$ ، غلظت ۳۲۰ نانو گرم بر میلی لیتر تیمول، مقدار جاذب برابر با ۲۰ میلی گرم و مدت زمان تماس ۲۸ دقیقه به دست آمد. تحت شرایط بهینه محدودی دینامیکی خطی، حد تشخیص و حد کمی سازی به ترتیب ۶۰۰-۴/۱۵،۵۰ و ۱۴/۸۵ نانو گرم بر میلی لیتر به دست آمد. همچنین انحراف استاندارد نسبی روش با غلظت ۳۰۰ نانو گرم بر میلی لیتر تیمول، ۴/۶٪ (با پنج بار تکرار) به دست آمد. در نهایت روش پیشنهادی به طور موفقیت آمیزی برای استخراج و اندازه گیری تیمول در نمونه های عسل و دهان شویه به کار گرفته شد.

کلمات کلیدی: تیمول، میکرواستخراج فاز جامد پخشی، گرافن اکسید، طراحی باکس بنکن، نمونه های غذایی و بهداشتی.

۱- مقدمه

تیمول (۲- ایزوپروپیل ۵- متیل فنول)، خواص آنتی باکتریال دارد و در محصولات غذایی، عطرها و داروها به دلیل خواص ضد درد، ضد باکتری، ضد قارچ، آنتی اکسیدان و ضد سرطان استفاده می شود [۱-۳]. تیمول همچنین در غلظت های پایین به عنوان عوامل طعم دهنده در محصولات غذایی استفاده می شود. امروزه ترکیبات حاوی تیمول در مواد بسته بندی برای افزایش طول عمر محصولات غذایی استفاده می شوند که این به خاطر فعالیت قوی آنها در برابر طیف گسترده ای از باکتری های عامل فساد طبیعی، قارچ ها و عوامل بیماری زا و نیز اثر آنتی اکسیدانی آنها می باشد لذا در اجتناب از بیماری های مختلف نقش مهمی دارند [۴-۶]. در نتیجه ارائه یک روش دقیق، سریع و با بازدهی بالا برای استخراج و اندازه گیری تیمول از نمونه های طبیعی و گیاهی ضروری است.

تا کنون روشهای مختلفی برای استخراج و اندازه‌گیری تیمول از نمونه‌های مختلف بکار گرفته شده است. از جمله این روش‌ها می‌توان به روشهای آماده سازی نمونه از جمله استخراج مایع-مایع، استخراج فاز جامد^۱ و روشهای دستگاهی از قبیل کروماتوگرافی گازی^۲، کروماتوگرافی لایه نازک^۳ و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا^۴ با آشکارسازهای فلورسانس، UV-Vis و آرایه دیودی اشاره کرد [۷-۱۰]. با توجه به اینکه اکثر روشهای ذکر شده وقت گیر، گران و پیچیده هستند و مصرف حلال‌های آلی در آنها بالا است، در این پژوهش از روش میکرواستخراج فاز جامد پخشی^۵ (D μ -SPE) بعنوان یک روش گزینش پذیر، سریع، ارزان، موثر و همچنین با مصرف حلال‌های آلی بسیار کم برای جداسازی و استخراج تیمول استفاده شد. D μ -SPE برای از بین بردن محدودیت‌های ذاتی در میکرواستخراج فاز جامد (μ -SPE) معرفی شده است [۱۲ و ۱۱]. در این روش جاذب بر روی فیبر قرار نمی‌گیرد و مستقیماً در محلول نمونه ریخته می‌شود تا آنالیت را استخراج کند. سپس جاذب پراکنده می‌شود تا سطح تماس جاذب را با محلول نمونه افزایش داده و جاذب را قادر می‌سازد به سرعت با تمام ذرات آنالیت برهم کنش یکنواختی داشته باشد که این امر منجر به افزایش دقت روش و کاهش زمان استخراج می‌شود [۱۳]. از جمله مهمترین مزیت‌های این روش در مقایسه با μ -SPE عدم نیاز به فیبر، حذف محدودیت‌ها و دشواری قرارگیری جاذب روی فیبر، کاهش زمان استخراج و واجذب است [۱۱]. چندین نانو مواد تجاری یا سنتزی از جمله نانو لوله‌های کربنی، گرافن، جاذب‌های پلیمری و چارچوب‌های آلی-فلزی^۶ به عنوان جاذب در روش D μ -SPE استفاده شده‌اند [۱۴-۱۶]. بسیاری از نانو مواد ذکر شده دارای محدودیت‌هایی از جمله هزینه بر بودن، سنتز وقتگیر و یا نیاز به عامل دار کردن جهت افزایش گزینش پذیری می‌باشند. در میان نانو مواد کربن، گرافن و گرافن اکسید بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. گرافن، ورقه تک لایه‌ای متشکل از اتم‌های کربن می‌باشد که بصورت یک شبکه دو بعدی لانه زنبوری قرار گرفته و دارای سطح ویژه است [۱۷]. گرافن اکسید ماده‌ای دو بعدی است که به صورت تک لایه، با ساختار شش ضلعی و کریستالی ساخته شده است که بر روی صفحاتش گروه‌های فعال اکسیژنی وجود دارد. گرافن اکسید یکی از جذابترین نانومواد کربنی است که به دلیل داشتن نسبت بالای سطح به جرم به واسطه ابعاد نانومتری ظرفیت استخراج و راندمان خیلی بزرگتری را فراهم می‌کند و به علت گروه‌های عاملی اپوکسی و هیدروکسیل بر صفحه، کربونیل و کربوکسیل بر لبه‌ها به راحتی در آب پخش شده و از موثرترین مواد جاذب سطحی است [۱۸ و ۱۹]. سهولت سنتز، هزینه‌های عمومی پایین، امکان استخراج ساده و سریع گونه‌های مختلف از دیگر مزایای بسیار مهم گرافن اکسید بعنوان جاذب در روشهای استخراجی می‌باشد [۲۰ و ۲۱].

¹Solid phase extraction (SPE)

² Gas chromatography(GC)

³ Thin-layer chromatography (TLC)

⁴ High performance liquid chromatography (HPLC)

⁵ Dispersive micro- solid phase extraction (D μ -SPE)

⁶ Metal organic frameworks (MOFs)

طراحی آزمایش مجموعه روش هایی می باشد که آزمایش هایی را برای بررسی پارامترها و متغیرهای موثر در آزمایش طراحی می کند. این طراحی به منظور شناسایی برهمکنش های بین پارامترها، مدل سازی یا ایجاد رابطه ریاضی بین پارامترها و پاسخ و بهینه سازی مورد استفاده قرار می گیرد [۲۲]. طراحی باکس بنکن^۱ یکی از اصلی ترین و پرکاربردترین طرح های سطح پاسخ مورد استفاده برای مدل سازی است که در این طراحی هر فاکتور در سه سطح مورد بررسی قرار می گیرد [۱۳].

در این پژوهش ابتدا گرافن اکسید به روش هامر اصلاح شده [۲۳] سنتز شد و بعد از شناسایی و تایید ساختار به عنوان جاذب در روش میکرواستخراج فاز جامد پخشی برای استخراج و اندازه گیری تیمول از نمونه های حقیقی عسل و دهان شویه به کار گرفته شد. روش طراحی باکس بنکن نیز برای تعیین شرایط و بهینه سازی پارامترهای مورد مطالعه در آزمایش از قبیل زمان همزدن، مقدار جاذب، غلظت آنالیت و pH استفاده شد.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی و دستگاه ها

تیمول و پودر گرافیت با درجه خلوص تجزیه ای از شرکت مرک آلمان و پتاسیم پرمنگنات، آب اکسیژنه، سولفوریک اسید، نیتریک اسید، اتانول، متانول، استون، نمک سدیم هیدروکسید (NaOH) و هیدروکلریک اسید (HCl)، از شرکت سیگما آلدریج آمریکا تهیه گردید. محلول سدیم هیدروکسید و هیدروکلریک اسید به همراه بافرهای pH=۴ و pH=۷ برای تنظیم pH محلول ها و کالیبره کردن دستگاه pH متر مورد استفاده قرار گرفتند. محلول های استاندارد اولیه (استوک) تیمول با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در حلال استونیتریل تهیه شدند. همچنین محلول های استاندارد کاری بطور روزانه، با رقیق سازی مناسب محلول های استاندارد با آب مقطر تا غلظت مورد نظر تهیه شدند. همه ی محلول های استاندارد در یخچال نگهداری و هر ماه یکبار مجدداً تهیه شدند.

طیف های فروسرخ تبدیل فوریه (FT-IR)، نمونه ها با بکارگیری دستگاه طیف سنجی مدل ۳۷۰ AVATAR ساخت شرکت نیکولت آمریکا، تهیه شدند. الگوهای پراش پرتو ایکس (XRD) جاذب سنتز شده با دستگاه مدل Bruker Axs-D8 Advanced و در ۹۰-۵=θ انجام پذیرفت. مطالعه جذب تیمول با کمک دستگاه طیف سنجی UV-Vis مدل ۲۱۰ Specord ساخت کشور آلمان در طول موج ماکزیمم ۲۷۴ نانومتر انجام شد. برای تنظیم pH محلول ها از دستگاه pH متر مدل HI ۲۲۱۱ شرکت HANNA آمریکا استفاده شد. جهت تسریع فرایند جداسازی دوفاز در مراحل سنتز جاذب و استخراج تیمول از دستگاه سانتریفیوژ Hettich مدل EBA۲۰۰ ساخت کشور آلمان استفاده شد.

^۱ Box-Behnken designs (BBD)

۲-۲- سنتز نانوذرات گرافن اکسید

برای تهیه گرافن اکسید از روش هامر اصلاح شده استفاده شد [۲۳]. به این صورت که ابتدا در یک بالن ۲۵۰ میلی لیتر، ۱ گرم پودر گرافیت به ۲۳ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد در حمام یخ افزوده و همزده شد. سپس ۳ گرم پتاسیم پرمنگنات همزمان با سرد شدن و همزدن محلول، به آرامی اضافه و دمای مخلوط واکنش، زیر ۲۰ درجه سانتیگراد نگه داشته شد. سپس دمای مخلوط تا دمای ۳۰ درجه سانتیگراد افزایش یافته و به مدت ۳۰ دقیقه ثابت نگه داشته شد و یک رسوب قهوه‌ای روشن تشکیل شد. سپس ۴۶ میلی لیتر آب مقطر به آهستگی به رسوب حاصل افزوده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۸ درجه سانتیگراد همزده شد. در مرحله بعد، ۱۴۰ میلی لیتر آب مقطر و ۳۰ میلی لیتر محلول آب اکسیژنه ۳۰ درصد اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید (با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه). در پایان رسوب حاصل با محلول اسید کلریدریک سه بار شستشو داده تا زمانیکه یونهای سولفات حذف شوند و آنگاه مجدداً رسوب را پنج مرتبه با آب مقطر (حدود ۳۰۰ میلی لیتر) شسته تا یونهای کلرید آزاد شوند. آنگاه محلول را صاف و سه تا چهار مرتبه توسط استون جهت حذف رطوبت باقیمانده شسته و رسوب های حاصل را در آن در ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار دادیم تا خشک شد و در این حالت پودر سیاه رنگ گرافن اکسید به دست آمد.

۲-۳- روش کار میکرواستخراج فاز جامد پخشی بر پایه چاذب گرافن اکسید برای استخراج تیمول

ابتدا غلظت های مختلفی از تیمول مطابق جدول طراحی آزمایش به لوله های آزمایش ته مخروطی ۳۰ میلی لیتری منتقل شدند. pH این نمونه ها با استفاده از محلول های رقیق شده HCl و NaOH بر روی عدد ۴ تنظیم شد، سپس ۲۰ میلی گرم جاذب (گرافن اکسید) اضافه شد و به منظور تسهیل فرایند جذب تیمول روی گرافن اکسید، محلول به مدت ۲۸ دقیقه توسط دستگاه تکاننده با سرعت ۳۰۰ دور بر دقیقه همزده شد. پس از پایان فرایند جذب، جاذب از محلول بوسیله سانتریفیوژ جدا شد. در نهایت غلظت تیمول واجذب شده توسط یک میلی لیتر HNO₃ یک مولار از جاذب گرافن اکسید توسط دستگاه طیف سنجی UV-Vis در طول موج ماکزیمم ۲۷۴ نانومتر اندازه گیری شد و میزان بازده استخراج (ER%) بعنوان پاسخ بر اساس فرمول زیر محاسبه و در آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت:

$$ER\% = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_o \times V_{aq}} \times 100 \quad (1)$$

و C_o به ترتیب بیانگر غلظت تیمول در فاز استخراجی و غلظت اولیه تیمول و همچنین V_{sed} و V_{aq} به ترتیب حجم فاز استخراجی و حجم نمونه آبی است.

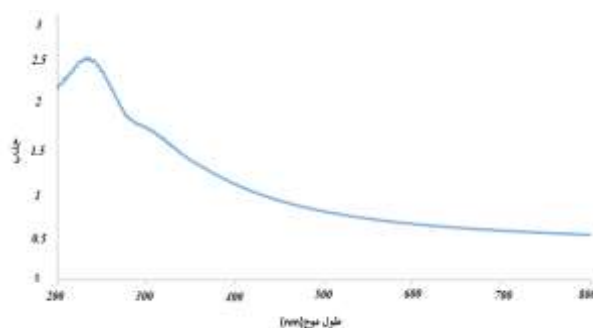
۴-۲- آماده سازی نمونه های حقیقی غذایی و بهداشتی

به منظور بررسی کاربردپذیری روش پیشنهادی، مقدار تیمول در عسل و دهان شویه به عنوان نمونه های حقیقی مورد اندازه گیری قرار گرفت. برای آماده سازی محلول عسل ابتدا ۰/۵ گرم عسل طبیعی به یک بالن ۲۵ میلی لیتری منتقل و با آب مقطر به حجم رسانده شد. نمونه دهان شویه بعنوان نمونه بهداشتی (دهان شویه بنسر) از یک داروخانه خریداری و بدون آماده سازی خاصی در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. در نهایت پس از آماده سازی محلول نمونه های حقیقی ذکر شده، مراحل پیش تغلیظ و استخراج تیمول در شرایط بهینه و براساس روش میکرواستخراج فاز جامد پخشی بر پایه گرافن اکسید انجام گردید.

۳- بحث و نتیجه گیری

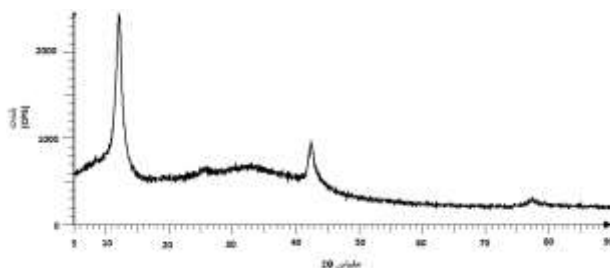
۳-۱- شناسایی ساختار گرافن اکسید سنتز شده

با استفاده از روشهای XRD ، FT-IR و UV-Vis، ساختار گرافن اکسید به عنوان جاذب مورد استفاده در روش پیشنهادی، شناسایی و مورد تایید قرار گرفت. طیف UV-Vis گرافن اکسید در شکل ۱ نشان داده شده است. همان طور که دیده می شود پیک جذبی در ۲۳۲ نانومتر به همراه یک شانه در محدوده ۳۱۰ نانومتر به ترتیب از انتقالات $\pi \rightarrow \pi^*$ پیوندهای C=C آروماتیک و $n \rightarrow \pi^*$ پیوندهای C=O ناشی می شود که مربوط به گرافن اکسید بوده و در تطابق خوبی با منابع می باشد [۲۴].



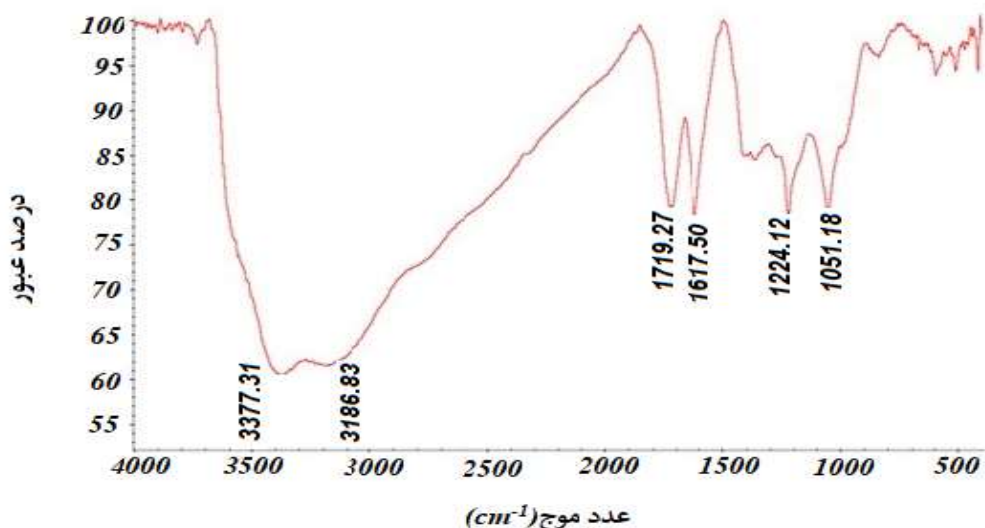
شکل ۱- طیف UV-Vis گرافن اکسید سنتز شده.

الگوی پراش پرتو ایکس مربوط به گرافن اکسید سنتز شده (شکل ۲) یک پیک تیز با شدت بسیار بالا در ناحیه $2\theta = 12^\circ$ نشان داد که ناشی از افزایش ضخامت صفحات کربنی و افزایش فاصله بین صفحه ای به علت قرار گرفتن گروه های عاملی اکسیژن دار و انجام فرآیند اکسایش است [۲۵] و تاییدی بر صحت سنتز گرافن اکسید می باشد.



شکل ۲- الگوی XRD گرافن اکسید

طیف FT-IR گرافن اکسید در شکل ۳ نشان داده شده است. با انجام فرآیند اکسایش، ارتعاش پیوندهای کربن-اکسیژن شامل هیدروکسیل، اپوکسی، کربونیل و کربوکسیل ظاهر شده است. دو نوار ارتعاش کششی مربوط به پیوند C-O به ترتیب در ناحیه‌های ۱۰۵۱/۱۸ و ۱۲۲۴/۱۲ بر سانتیمتر مشاهده شد [۲۶ و ۲۷]. یک نوار ارتعاش کششی مربوط به پیوند C=C متعلق به کربن‌های اکسید نشده حلقه بنزن در ساختار گرافن اکسید در ناحیه ۱۶۱۷/۵۰ و یک نوار ارتعاش کششی مربوط به پیوند C=O گروه کربوکسیل واقع در لبه‌های ورق گرافن اکسید در ناحیه ۱۷۱۹/۲۲ بر سانتیمتر ملاحظه گردید [۲۶ و ۲۷]. همچنین یک ارتعاش قوی در ناحیه ۳۳۷۷/۳۱ بر سانتیمتر متعلق به ارتعاش کششی پیوند O-H نیز دیده شد که بیانگر تشکیل مقدار زیادی از گروه‌های عاملی اکسیژن دار در صفحات گرافن اکسید می‌باشد [۲۶ و ۲۷].



شکل ۳- طیف FT-IR گرافن اکسید.

۳-۲- بررسی تاثیر حجم نمونه بر اندازه گیری تیمول

حجم نمونه یکی از پارامترهای مهم و تاثیرگذار بر فاکتور غنی سازی، کارایی استخراج، هزینه و زمان استخراج می باشد. برای این منظور حجم‌های مختلفی از محلول نمونه (۱۰، ۲۵، ۳۰، ۵۰ میلی لیتر) در شرایط یکسان و با روش یک فاکتور در یک زمان مورد بررسی و بهینه سازی قرار گرفتند. بالاترین مقدار پیش تغلیظ و متعاقباً کارایی استخراج در حجم ۵۰ میلی لیتر بدست آمد. در حجم‌های بالاتر از ۳۰ میلی لیتر کارایی استخراج بطور جزئی افزایش یافت که برای سادگی و راحتی و همچنین مصرف کمتر جاذب حجم ۳۰ میلی لیتر بعنوان حجم بهینه انتخاب گردید.

۳-۳- بررسی تاثیر نوع و حجم معرف شستشو بر واجذبی تیمول

یکی از عوامل تاثیرگذار بر کارایی روش پیشنهادی، نوع و حجم معرف شستشو برای مرحله واجذبی می باشد. برای بررسی اثر نوع معرف شستشو بر بهره واجذبی با روش یک فاکتور در یک زمان، پس از همزدن و جذب نمونه توسط جاذب، با استفاده از سانتریفیوژ فاز آبی از فاز جامد جدا و جاذب حاوی آنالیت توسط متانول، اتانول، نیتریک اسید (۰/۵، ۱ و ۲ مولار) با حجم های ۱، ۲ و ۳ میلی لیتر شستشوداده شد تا نمونه از فاز جامد به فاز آلی منتقل شود. بر اساس نتایج بدست آمده مناسبترین معرف برای شستشو که منجر به بیشترین واجذبی شد یک میلی لیتر نیتریک اسید (HNO₃) یک مولار بود.

۳-۴- بهینه سازی پارامترهای موثر در روش Dμ-SPE در اندازه گیری تیمول به کمک روش های سطح پاسخ

پارامترهای موثر بر فرایند استخراج شامل غلظت تیمول، pH، مقدار جاذب و زمان جذب (مدت زمان همزدن) توسط مطالعات گزارش شده و برخی آزمایشات اولیه انجام شده انتخاب و با استفاده از طرح باکس بنکن بعنوان یکی از روشهای بهینه سازی چند متغیره سطح پاسخ، در سه سطح مطابق جدول (۱) مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱ - فاکتورهای موثر و سطوح آنها در اندازه گیری تیمول با طرح باکس بنکن.

سطح فاکتور		نماد	واحد	فاکتور
سطح بالا	نقطه مرکزی	سطح پایین		
۰/۴	۰/۳	۰/۲	A	غلظت تیمول mg L ⁻¹
۸	۶	۴	B	pH
۲۰	۱۵	۱۰	C	مقدار جاذب mg
۳۵	۳۰	۲۵	D	زمان جذب min

بر اساس تعداد فاکتورهای موثر و نوع طراحی انتخاب شده (طراحی باکس بنکن)، تعداد ۳۰ آزمایش طراحی شد و در سه بلوک (سه روز) برای کاهش عوامل غیر قابل کنترل طبقه بندی و مورد آزمایش قرار گرفتند [۲۸]. آزمایشات در شرایط تعیین شده بر اساس طراحی انجام و سپس جذب آنها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۷۴ نانومتر خوانده شد. میزان جذب تیمول بعنوان پاسخ در نرم افزار طراحی آزمایش ثبت و جهت حصول شرایط بهینه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

۱-۴-۳- آنالیز واریانس و بررسی مدل

به منظور تعیین معنی دار بودن پارامترها و در نتیجه مدل پیشنهادی از آنالیز واریانس^۱ (ANOVA)، جدول ۲ استفاده شد. با بکارگیری آزمون F، نسبت واریانس‌ها با مقدار F بحرانی مقایسه می شود [۲۹ و ۳]. مقدار F برای مدل برابر است با ۴۲/۲۰ که این بدان معنی است که مدل معنی دار و مهم می باشد و احتمال اینکه مقدار F مدل ناشی از نویز باشد تنها ۰/۰۱٪ است. اگر مقدار p (احتمال خطا) کمتر از ۰/۰۵ باشد نشان دهنده معنی دار بودن مدل یا تاثیر فاکتور می باشد. بنابراین در این مطالعه تاثیر ترم های A، B، C و B² مهم و معنی دار به شمار می روند. همچنین مقدار p مدل کوچکتر از ۰/۰۰۰۱ نمایانگر معنی دار بودن مدل درجه دوم به کار برده شده می باشد و از آنجا که مقدار p مربوط به عدم برازش مدل (LOF) برابر است با ۰/۲۴۳۲ که دلالت بر این دارد که جملات صرفنظر شده در بسط تیلور نسبت به خطای راندم معنی دار نمی باشد، صحت مدل به دست آمده تایید می گردد. بر اساس معادله بدست آمده بین پارامترها و پاسخ، پارامترهای مثبت اثر افزایشی و پارامترهای منفی اثر کاهش بر سیگنال را نشان می دهند. این معادله برای شناسایی تاثیر نسبی عوامل از طریق مقایسه ضرایب عوامل مفید است [۳۰].

$$\begin{aligned} \text{میزان جذب تیمول} = & +0/4 + 0/15 * A - 0/32 * B + 0/057 * C + 0/016 * D + 0/023 * AB + 0/03 * AC + \\ & 0/005 * AD - 0/033 * BC - 0/02 * BD - 0/0075 * CD - 0/005167 * A^2 + 0/086 * B^2 - 0/021 * C^2 - 0/022 * D^2 \end{aligned}$$

(۲)

¹ Analysis of variance

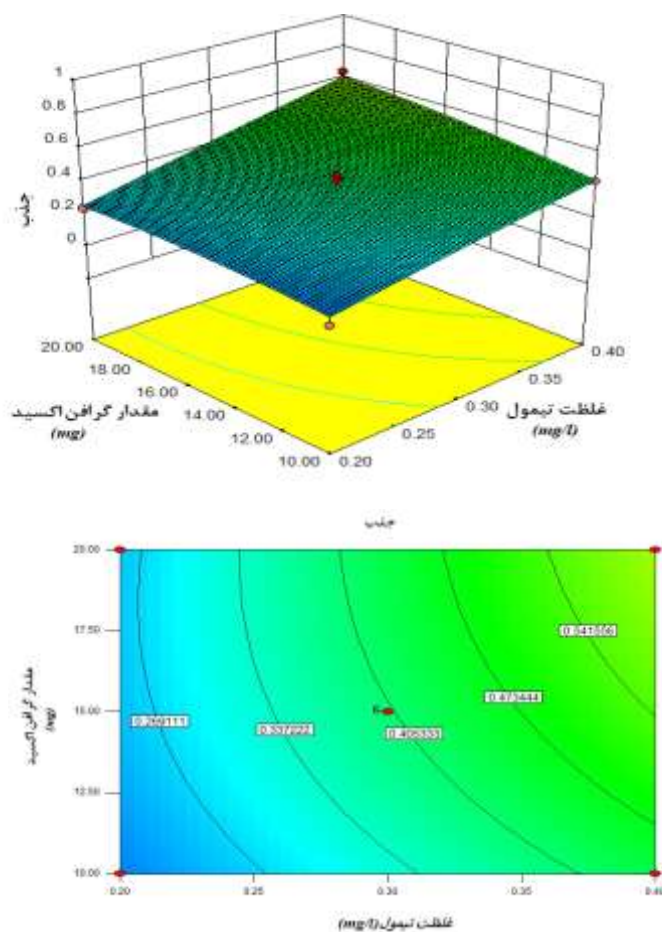
جدول ۲- نتایج تحلیل واریانس برای معادله درجه دوم سطح پاسخ در اندازه‌گیری تیمول.

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	Prob>F مقدار P	اهمیت آماری پارامتر
مدل	۱/۶۴	۱۴	۰/۱۲	۴۲/۲۰	<۰/۰۰۰۱	معنی دار
A	۰/۲۶	۱	۰/۲۶	۹۴/۴۴	<۰/۰۰۰۱	معنی دار
B	۱/۲۶	۱	۱/۲۶	۴۵۳/۲۷	<۰/۰۰۰۱	معنی دار
C	۰/۰۳۹	۱	۰/۰۳۹	۱۳/۹۱	۰/۰۰۲۵	معنی دار
D	۰/۰۰۳۰۰۸	۱	۰/۰۰۳۰۰۸	۱/۰۹	۰/۳۱۶۴	
AB	۰/۰۰۲۱۱۶	۱	۰/۰۰۲۱۱۶	۰/۷۶	۰/۳۹۸۰	
AC	۰/۰۰۳۶	۱	۰/۰۰۳۶	۱/۳۰	۰/۲۷۴۹	
AD	۰/۰۰۰۱	۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۳۶	۰/۸۵۲۳	
BC	۰/۰۰۴۲۲۵	۱	۰/۰۰۴۲۲۵	۱/۵۲	۰/۲۳۸۷	
BD	۰/۰۰۱۶	۱	۰/۰۰۱۶	۰/۰۵۸	۰/۴۶۰۹	
CD	۰/۰۰۰۲۲۵	۱	۰/۰۰۰۲۲۵	۰/۰۸۱	۰/۷۸۰۲	
A ²	۰/۰۰۰۱۸۳	۱	۰/۰۰۰۱۸۳	۰/۰۶۶	۰/۸۰۱۲	
B ²	۰/۰۵۱	۱	۰/۰۵۱	۱۸/۳۴	۰/۰۰۰۹	معنی دار
C ²	۰/۰۰۳۰۷۲	۱	۰/۰۰۳۰۷۲	۱/۱۱	۰/۳۱۱۵	
D ²	۰/۰۰۳۴۴۶	۱	۰/۰۰۳۴۴۶	۱/۲۴	۰/۲۸۵۰	
باقیمانده	۰/۰۳۶	۱۳	۰/۰۰۲۷۷۱			
عدم برازش	۰/۰۳۲	۱۰	۰/۰۰۳۲۱۷	۲/۵۱	۰/۲۴۳۲	بی معنی
خطای مطلق	۰/۰۰۰۳۸۵	۳	۰/۰۰۱۲۸۳			
جمع کل	۱/۶۸	۲۹				

۲-۴-۳- بررسی همزمان پارامترهای موثر بر فرایند استخراج و اندازه‌گیری تیمول با روش سطح

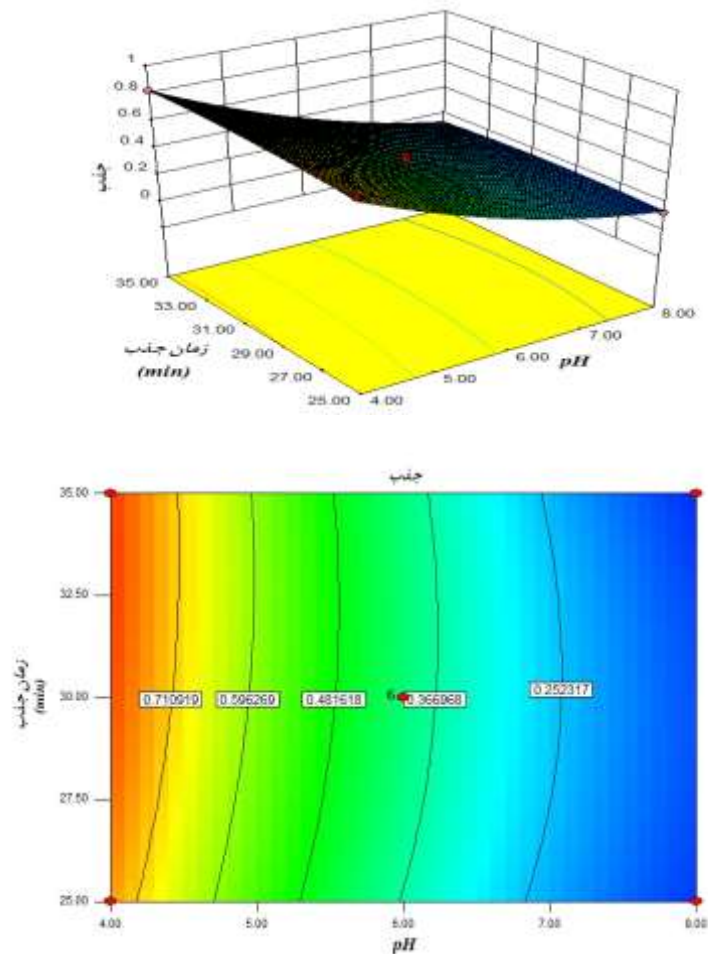
پاسخ

برای تشخیص بهتر برهم کنش‌ها و تاثیر متقابل پارامترها بر میزان جذب تیمول می‌توان از نمودارهای دو بعدی (نمودارهای کانتر) و سه بعدی استفاده کرد [۲۲]. شکل ۴ (الف)، تاثیر متقابل مقدار گرافن اکسید به عنوان جاذب و غلظت تیمول را نشان می‌دهد. با افزایش مقدار جاذب، مقدار جذب و در نتیجه راندمان استخراج افزایش می‌یابد. زیرا با افزایش مقدار جاذب، جایگاه‌های فعال خالی و به تبع آن سطح بیشتری در اختیار مولکول‌های تیمول قرار گرفته و در نتیجه مقدار جذب تیمول افزایش می‌یابد. با توجه به شکل ۴ (الف) با افزایش غلظت رنگ مقدار جذب تیمول افزایش می‌یابد زیرا با افزایش غلظت تا یک مقدار معین و بر اساس رابطه بیر-لامبرت، سایت‌های فعال در سطح جاذب به سرعت اشغال شده و بنابراین میزان پاسخ (مقدار جذب) افزایش می‌یابد.



شکل ۴ (الف) - تاثیر متقابل مقدار گرافن اکسید و غلظت تیمول بر میزان جذب تیمول.

شکل ۴ (ب)، تاثیر pH و زمان جذب را بر میزان جذب تیمول نشان می‌دهد. با افزایش زمان همزدن (زمان جذب)، نفوذ و انتقال تیمول به داخل جایگاه‌های فعال گرافن اکسید افزایش می‌یابد و لذا فرصت کافی برای انتقال کامل تیمول فراهم شده و در نتیجه میزان جذب تیمول افزایش می‌یابد. با توجه به شکل واضح است که مقدار جذب تیمول با افزایش مقدار pH از ۵ تا ۸ کاهش می‌یابد. نتایج بدست آمده نشان داد که حداکثر جذب تیمول در $\text{pH} = 4$ اتفاق می‌افتد. تاثیر pH بر عملکرد استخراج گونه مورد نظر به نوع گروه‌های عاملی و خواص فیزیکوشیمیایی جاذب و آنالیت بستگی دارد. با افزایش pH ($\text{pH} > 7$) به دلیل یونیزاسیون گروه‌های فنولی (هیدروکسیل) گرافن اکسید، آنیون فنولات ($\text{C}-\text{O}^-$) تشکیل شده و منجر به منفی شدن سطح گرافن اکسید می‌شود [۳۱] و همچنین به دلیل دپروتونه شدن تیمول، فرم تیمول دارای بار منفی غالب شده که به واسطه نیروی الکترواستاتیک دافعه، منجر به کاهش برهمکنش‌های جاذب و جذب شونده و در نتیجه کاهش راندمان استخراج می‌شود. علاوه بر این، با توجه به ساختار گرافن اکسید (دارای گروه‌های عاملی اپوکسی و هیدروکسیل بر صفحه، کربونیل و کربوکسیل بر لبه‌ها) و ساختار شیمیایی تیمول، تشکیل پیوند هیدروژنی و برهمکنش‌های $\pi-\pi$ نقش بسیار مهمی در استخراج تیمول دارند.



شکل ۴ (ب) - تاثیر متقابل pH و زمان جذب بر میزان جذب تیمول.

۳-۴-۳- نقاط بهینه برای فرآیند میکرواستخراج فاز جامد پخشی تیمول با استفاده از تابع مطلوبیت

هدف از انجام طراحی آزمایش، تعیین شرایط بهینه برای فاکتورهای مؤثر در رسیدن به پاسخ مطلوب و مورد نظر است. روش مفید و کارآمد برای تعیین مقادیر بهینه، استفاده از تابع مطلوبیت می‌باشد که مقدار آن از صفر تا یک متغیر است. هر چه این تابع به یک نزدیک‌تر باشد، نشان‌دهنده‌ی احتمال بیشتر مقدار پیش‌بینی به عنوان نقطه بهینه است. طبق پیش‌بینی نرم افزار، غلظت تیمول ۳۲۰ نانو گرم بر میلی لیتر، $pH=4$ ، زمان جذب ۲۸ دقیقه و مقدار جاذب ۲۰ میلی گرم بعنوان نقاط بهینه برای فرآیند استخراج تیمول تعیین شد. بر این اساس، مقدار مطلوبیت ۰/۹۹۸ برای روش فوق به دست آمد. نقاط بهینه که توسط نرم افزار پیشنهاد گردید، در شرایط یکسان با پنج بار تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند و میانگین نتایج حاصل نزدیکی بسیار خوبی با مقادیر پیش‌بینی شده توسط نرم افزار داشت.

۵-۳- بررسی گونه‌های مزاحم

با بررسی مزاحمت‌ها می‌توان به میزان گزینش‌پذیری یک روش پی‌برد. بدین منظور مزاحمت احتمالی تعدادی از گونه‌های شیمیایی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی این پارامتر، مزاحمت گونه‌های متفاوت بر استخراج ۳۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر تیمول در حجم ۳۰ میلی‌لیتر تحت شرایط بهینه مورد بررسی قرار گرفت. در صورتی که گونه مورد نظر بیش از $\pm 5\%$ خطا در اندازه‌گیری تیمول ایجاد نماید، مزاحم تلقی می‌گردد. نتایج حاصل از بررسی مزاحمت‌ها در جدول ۳ آورده شده است. نتایج به دست آمده نشان داد که اکثر گونه‌های بررسی شده در گستره‌ی خطی مورد مطالعه مزاحمتی در استخراج و بازیابی تیمول ندارند.

جدول ۳- بررسی اثر گونه‌های مزاحم بر بازیابی تیمول.

حد مزاحمت (نسبت غلظت یون مزاحم به غلظت تیمول)	یون مزاحم
۵۰	$\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}, \text{Fe}^{3+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Al}^{3+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Zn}^{2+}$
۵۰	$\text{NO}_3^-, \text{SO}_4^{2-}, \text{Cl}^-$
۳۰	گلوکز و ویتامین C
۱۰	رنگدانه‌های سان ست یلو و تارترازین

۶-۳- ارقام شایستگی روش

در شرایط بهینه منحنی کالیبراسیون بر حسب میزان جذب تیمول در نمونه تغلیظ شده نسبت به تغییر غلظت تیمول رسم گردید. مقادیر حد تشخیص و حد کمی سازی نیز به ترتیب بر اساس سه و ده برابر انحراف استاندارد سیگنال بلانک تقسیم بر شیب منحنی کالیبراسون محاسبه شدند. همچنین انحراف استاندارد نسبی با آنالیز ۵ نمونه با غلظت ۳۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر و فاکتور پیش تغلیظ روش پیشنهادی بر اساس نسبت شیب منحنی کالیبراسیون بعد از پیش تغلیظ به قبل از پیش تغلیظ به دست آمد. خلاصه ارقام شایستگی روش پیشنهادی در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴- ارقام شایستگی روش پیشنهادی در اندازه‌گیری تیمول.

تیمول	پارامتر تجزیه ای
۶۰۰-۱۵	محدوده خطی (نانوگرم بر میلی لیتر)
۰/۹۹۵	ضریب همبستگی منحنی کالیبراسیون
۴/۵۰	حد تشخیص (نانوگرم بر میلی لیتر)
۱۴/۸۵	حد کمی سازی (نانوگرم بر میلی لیتر)
٪ ۴/۶	دقت داخل روز (Intraday, RSD%)
۵/۱۸	دقت بین روز (Interday, RSD%)
۱۹/۶	فاکتور پیش تغلیظ

۷-۳- آنالیز نمونه های حقیقی

برای اطمینان از کاربردی بودن و صحت روش میکرواستخراج فاز جامد پختی، آنالیزهایی بر روی نمونه‌های حقیقی انجام شد. عسل و دهان شویه به عنوان نمونه‌های حقیقی برای اندازه‌گیری تیمول انتخاب شدند. برای بررسی اثر بافت بر روش پیشنهادی، مقداری معین از تیمول (۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر) به نمونه‌های حقیقی اضافه شد و بعد از عمل استخراج و پیش تغلیظ در شرایط بهینه، میزان درصد بازیابی محاسبه شد. علاوه بر این، برای اطمینان و اعتبارسنجی نتایج به دست آمده نمونه‌های حقیقی با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا-ماوراءبنفش^۱ (HPLC-UV) نیز مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند و نتایج حاصل نزدیکی بسیار خوبی با مقادیر به دست آمده با روش پیشنهادی داشت. نتایج اندازه‌گیری تیمول در نمونه‌های ذکر شده در جدول ۵ گزارش شده است. مقادیر بالای درصد بازیابی در تمام نمونه‌ها (بالتر از ۹۴٪) نشان دهنده کاربرد موفقیت آمیز روش میکرواستخراج فاز جامد پختی در استخراج و اندازه‌گیری تیمول در نمونه‌های حقیقی می باشد.

جدول ۵- نتایج اندازه‌گیری تیمول در نمونه‌های حقیقی با روش میکرواستخراج فاز جامد پختی.

مقدار نمونه حقیقی	مقدار اضافه شده (ng mL ⁻¹)	مقدار اندازه‌گیری شده با روش پیشنهادی (ng mL ⁻¹)	درصد بازیابی (%)	مقدار اندازه‌گیری شده با HPLC -UV (ng mL ⁻¹)
عسل	-	۴۵	-	۵۰
	۵۰	۹۶/۲	۱۰۲/۴	۱۰۳
دهان شویه	-	۱۷۵	-	۱۷۲
	۵۰	۲۲۲	۹۴	۲۲۰

۸-۳- مقایسه روش Dμ-SPE با دیگر روشهای تجزیه‌ای در اندازه‌گیری تیمول

جدول ۶ برخی ارقام شایستگی تجزیه‌ای روش پیشنهادی و دیگر روشهای گزارش داده شده در مراجع، برای اندازه‌گیری تیمول را نشان می‌دهد. همانطور که در جدول مشاهده می‌شود روش ارائه شده دارای مقدار حد تشخیص کمتر و گستره خطی قابل مقایسه با روشهای گزارش شده می‌باشد. نتایج بدست آمده حاکی از آن است که روش پیشنهادی یک روش سریع، ارزان و دقیق بوده که می‌تواند برای جداسازی/پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیمول در نمونه‌های حقیقی مختلف با بافت‌های پیچیده بکار گرفته شود.

^۱ High performance liquid chromatography-Ultra violet

جدول ۶- مقایسه روش پیشنهادی با روش‌های دیگر در اندازه‌گیری تیمول.

ردیف	روش	حد تشخیص (ng mL ⁻¹)	گستره خطی (ng mL ⁻¹)	مرجع
۱	HD-HSME ^a	۱۸۷۰	۶۲۰۴/۸۰۲۱۷-۱/۵	[۳]
۲	HD-HPLC ^b	۲۸۰۰	۹۰۰۰۰-۱۵۰۰۰	[۳۲]
۳	SWCNT/SPE ^c	۶۰۰	۱۳۵۱۹-۷۵۱	[۳۳]
۴	CeO ₂ /GN/GCE ^d	۷/۵	۲۷۰۳-۱۵	[۳۴]
۵	D μ -SPE	۴/۵	۶۰۰-۱۵	این مطالعه

aHydro Distillatin-Headspace Solvent Microextraction

bHigh Performance Liquid Chromatography

cSingle-Walle Carbon Nanotube /Solid Phase Extraction

dGraphene/ Glassy Carbon Electrode

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش اکسید گرافن سنتز و ساختار حاصل با تکنیک‌های UV-Vis، FT-IR و XRD شناسایی و مورد تایید قرار گرفت. سپس گرافن اکسید سنتز شده در یک روش دقیق، با رویکرد شیمی سبز و کارآمد بنام میکرواستخراج فاز جامد پخشی بعنوان جاذب برای استخراج/پیش تغلیظ و اندازه‌گیری تیمول به کار گرفته شد. ویژگی‌هایی از قبیل داشتن نسبت بالای سطح به جرم و گروه‌های عاملی اپوکسی و هیدروکسیل بر صفحه، کربونیل و کربوکسیل بر لبه‌ها استفاده از اکسید گرافن را به عنوان جاذب متمایز کرده است. بالاترین کارایی استخراج و در نتیجه میزان جذب تیمول در شرایط بهینه $pH = 4$ ، غلظت ۳۲۰ نانو گرم بر میلی لیتر تیمول، مقدار ۲۰ میلی گرم گرافن اکسید به عنوان جاذب و مدت زمان جذب ۲۸ دقیقه توسط روش طراحی آزمایش (طراحی باکس بنکن) جهت حصول بالاترین عملکرد جاذب سنتز شده تحت شرایط آزمایشی به دست آمد. در نهایت روش پیشنهادی به طور موفقیت آمیزی (با درصدهای بازیابی بالاتر از ۹۴٪) برای استخراج و اندازه‌گیری مقادیر ناچیز تیمول از نمونه‌های حقیقی عسل و دهان شویه به کار گرفته شد. نتایج به دست آمده نشان داد که گرافن اکسید می‌تواند به عنوان یک جاذب بسیار عالی، ارزان و قابل دسترس برای جداسازی و اندازه‌گیری مقادیر ناچیز تیمول از نمونه‌های با بافت‌های پیچیده مورد استفاده قرار گیرد.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه بیرجند به دلیل حمایت های مالی در انجام این پروژه تقدیر و تشکر می نمایند.

۶- مراجع

- [1] L. Rivas, M. J. McDonnell, C.M. Burgess, M. O'Brien, A. N. Villa, S. Fanning, G. Duffy, *Int. J. Food Microbiol.* **139** (2010) 70.
- [2] W.X. Du, C.E. Olsen, R.J. Avena Bustillos, T.H. McHugh, C.E. Levin and M. Friedman, *J. Agric. Food Chem.* **56** (2008) 3082.
- [3] V. Kiyanpoura, A.R. Fakharia, R. Alizadeh, B. Asghari and M. Jalali-Heravi, *Talanta* **79** (2009) 695.
- [4] C.F. Bagamboula, M. Uyttendaele and J. Debevere, *Food Microbiol.* **21** (2004) 33.
- [5] H. Sereshti, Y. Izadmanesh and S. Samadi, *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) 4593.
- [6] M. Kfoury, D. Landy, S. Ruellan, L. Auezova, H. Greige-Gerges and S. Fourmentin, *J. Org. Chem.* **12** (2016) 29.
- [7] M. Roosta, M. Ghaedi, A. Daneshfar and R. Sahraei, *J. Chromatogr. B* **975** (2015) 34.
- [8] P. Viñas, M. J. Soler-Romera and M. Hernández-Córdoba, *Talanta* **69** (2006) 1063.
- [9] I. A. Al-Saleh, G. Billedo and I. I. El-Doush, *J. Food Compos. Anal.* **19** (2006) 167.
- [10] B. Shah, S. Ikeda, P.M. Davidson and Q. Zhong, *J. Food Eng.* **113** (2012) 79.
- [11] A. Chisvert, S. Cárdenas, R. Lucena, *TrAC Trends Anal. Chem.* **112** (2019) 226.
- [12] M. Nazpari, V. Vida, A. Behzad, *J. Of Applied Chemistry*, **51** (1398) 21, in Persian.
- [13] R. Khani, S. Sobhani and T. Yari, *Microchem. J.* **146** (2019) 471.
- [14] R. Sitko, B. Zawisza and E. Malicka, *TrAC Trends Anal. Chem.* **51** (2013) 33.
- [15] P. Rocío-Bautista, C. Martínez-Benito, V. Pino, J. Pasán, J.H. Ayala, C. Ruiz-Pérez and A.M. Afonso, *Talanta* **139** (2015) 13.
- [16] B. Chen, S. Wang, Q. Zhang and Y. Huang, *Analyst* **137** (2012) 1232.
- [17] Q. Liu, J. Shi and G. Jiang, *TrAC Trends Anal. Chem.* **37** (2012) 1.
- [18] F. Maral, N. Leila, J. Mehran, *J. Of Applied Chemistry*, **54** (1399) 257, in Persian.
- [19] A. Khaligh, H. Z. Mousavi and A. Rashidi, *J. of Applied Chemistry* **11** (2016) 49, in Persian.
- [20] A. K. Geim, *Rev. Mod. Phys.* **8** (2011) 851.
- [21] I. W. Frank, D. M. Tanenbaum, A. M. van der Zande and P. L. McEuen, *J. Vac. Sci. Technol.* **25**: (2007) 2558.
- [22] R. Khani, R. Sheykhi and Gh. Bagherzade, *Food Chem.* **293** (2019) 220.
- [23] J. Chen, B. Yao, C. Li and G. Shi, *Carbon.* **64** (2013) 225.

- [24] A. Al-Nafiey, A. Added, B. Sieber, G. Chastanet, A. Barras, S. Szunerits and R. Boukherroub, *Chem. Eng. J.* **322**: (2017) 375.
- [25] D.C. Marcano, D. V. Kosynkin, J.M. Berlin, A. Sinitskii, Z. Sun, A. Slesarev, L.B. Alemany, W. Lu, and J.M. Tour, *ACS Nano*. **4** (2010) 4806.
- [26] K. Awasthi, D.P. Singh, K.S. Singh, D. Dash, O.N. Srivastava, *New Carbon Mater.* **24** (2009) 301.
- [27] Y. Zhang, H. Ma, K. Zhang, S. Zhang, J. Wang, *Electrochim. Acta* **54** (2009) 2385.
- [28] R. Khani, S. Sobhani, M. H. Beyki and S. Miri, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **150** (2018) 54.
- [29] Z. Lotfi, H. Zavvar Mousavi, S. M. Sajjadi, *J. Of Applied Chemistry*, **14** (1398) 67 in Persian.
- [30] R. Khani, S. Sobhani and M. H. Beyki, *J. Colloid Interface Sci.* **466** (2016) 198.
- [31] B. Konkana, S. Vasudevan, *J. Phys. Chem. Lett.* **3** (2012) 867.
- [32] H. Hajimehdipor, M. Shekarchi, M. Khanavi, N. Adib and M. Amiri, *Pharmacogn. Mag.* **6** (2010) 154.
- [33] F. G. Fuentes, M. A. L. Gil, S. Mendoza and A. Escarpa, *Electroanalysis* **23** (2011) 2212.
- [34] X. Zhao, Y. Du, W. Ye, D. Lu, X. Xia and C. Wang, *New J. Chem.* **37** (2013) 4045.