Applied Chemistry Today **19** (2024) 167-182

Semnan University

Applied Chemistry Today

Journal homepage: https://chemistry.semnan.ac.ir/

ISSN: 2981-2437

Research Article

Determination of trichlorophenols in water samples by online pre-concentration method based on head space in-tube microextraction-capillary electrophoresis

Maryam Karimi*

Physics and Accelerators Research School, Nuclear Science & Technology Research Institute, P.O.BOX: 11365-3486., Tehran, Iran

PAPER INFO

Article history:
Received: 16/Aug/2023
Revised: 14/Oct/2023
Accepted: 02/Dec/2023

Keywords:
headspace in-tube microextraction, trichlorophenol, online pre-concentration, capillary electrophoresis.

ABSTRACT

In this study, a simple and efficient online preconcentration method based on headspace in-tube microextraction was used to simultaneously extract and preconcentrate small amounts of six trichlorophenols in aqueous samples. After extraction, the analytes were quantified by capillary electrophoresis and using the calibration curve of standard solutions. The effect of effective factors on the extraction process such as the pH of the donor phase, the type of the acceptor phase, the temperature and time of extraction, and the addition of organic solvent to the donor phase were investigated and optimized. Under optimal conditions, the linear dynamic range for the proposed technique was 15 to 1000 nM with a correlation coefficient of 0.99 and relative standard deviations were obtained with seven repetitions of the experiment and a concentration of 500 nM of analytes in the range of 4.78-7.63%. The detection limit of the method was 5-6 nM. The preconcentration factor for six trichlorophenols was obtained in the range of 310 to 661 times. Finally, this method was used for the preconcentration and measurement of six trichlorophenols in environmental water samples. The relative recoveries for the spiked samples were within the 82-92% range, indicating good accuracies and the absence of matrix effects.

DOI: https://doi.org/10.22075/chem.2024.31520.2202

© 2024 Semnan University.
This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license.(https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

* **.Corresponding author:** Assistant Professor of Analytical Chemistry. *E-mail address: mrkarimi@aeoi.org.ir*

How to cite this article: Karimi, M. (2024). Determination of trichlorophenols in water samples by online pre-concentration method based on headspace in-tube microextraction-capillary electrophoresis. *Applied Chemistry Today*, 19(71), 167-182. (in Persian)

مقاله علمی پژوهشی

تعیین تری‌کلروفنل‌ها در نمونه‌های آب به روش پیش‌تغلیظ آنلاین بر اساس میکرواستخراج داخل لوله در فضای فوقانی الکتروفورز مویینه

مریم کریمی*

پژوهشکده فیزیک و شتابگرها، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، ۳۴۸۶-۱۱۳۶۵، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۵/۲۵
بازنگری مقاله: ۱۴۰۲/۰۷/۲۲
پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۹/۱۱

کلمات کلیدی:
میکرواستخراج داخل لوله در فضای فوقانی، تری‌کلروفنول، پیش‌تغلیظ آنلاین، الکتروفورز مویینه.

چکیده

در این مطالعه، از روش ساده و کارآمد پیش‌تغلیظ آنلاین بر اساس میکرواستخراج داخل لوله در فضای فوقانی به منظور استخراج و پیش‌تغلیظ همزمان مقدارهای جزئی شش تری‌کلروفنول در نمونه‌های آبی استفاده شد. آنالیت‌ها پس از استخراج، به‌وسیله دستگاه الکتروفورز مویینه و با استفاده از منحنی درجه‌بندی محلول‌های استاندارد، تعیین مقدار شدند. اثر فاکتورهای مؤثر بر فرآیند استخراج مانند pH فاز دهنده، نوع فاز پذیرنده، دما و زمان استخراج و افزودن حلال آلی به فاز دهنده مورد بررسی قرار گرفته و بهینه شدند. تحت شرایط بهینه، گستره خطی منحنی درجه‌بندی ۱۵ تا ۱۰۰۰ نانومولار با ضریب همبستگی ۰/۹۹ و مقدار انحراف استاندارد نسبی با هفت بار تکرار آزمایش و غلظت ۵۰۰ نانومولار آنالیت‌ها در محدوده ۴/۷-۷۸/۶۳ بدست آمدند. حد تشخیص روش، ۶-۵ نانومولار به‌دست آمد. فاکتور پیش‌تغلیظ برای شش تری‌کلروفنول در گستره ۳۱۰ تا ۶۶۱ مرتبه بدست آمد. در نهایت، این روش برای پیش تغلیظ و اندازه‌گیری شش تری‌کلروفنول در نمونه‌های آب زیست محیطی به‌کار برده شد. بازیابی نسبی برای نمونه‌های اسپایک‌شده در محدوده ٪۹۲-۸۲ قرار گرفت که صحت خوب و عدم تأثیر ماتریس نمونه را نشان داد.

DOI: https://doi.org/10.22075/chem.2024.31520.2202

This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license.(https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

۱- مقدمه

کلروفنول‌ها مولکول‌هایی سمی و سرطان‌زا هستند که عمدتاً به عنوان حشره‌کش یا آفت‌کش استفاده می شوند. همچنین به عنوان یک واسطه مصنوعی برای پلاستیک‌ها و رنگ‌ها نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱]. به دلیل حلالیت بالای این ترکیبات در آب و فشار بخار زیاد [۲]، غلظت نسبتاً بالای کلروفنل‌ها می‌تواند به آب‌های زیرزمینی یا جو وارد شود و مشکلات جدی ایجاد کند. کلروفنل‌ها به دلیل ماندگاری، سمیت و تحریک در بین فنل‌ها در آژانس حفاظت از محیط زیست ایالات متحده به عنوان آلاینده‌های درجه یک طبقه‌بندی می‌شوند [۳]. حداکثر غلظت کلروفنل‌ها در آب آشامیدنی، ۰/۵ میکروگرم بر لیتر است و هر فنل نباید غلظتی بیش از ۰/۱ میکروگرم بر لیتر داشته باشد [۱، ۳]. از این رو، توسعه یک روش تجزیه‌ای ساده، سریع، حساس و سازگار با محیط زیست به منظور تشخیص میزان کلروفنول‌ها در آب ضروری به نظر می‌رسد.

به منظور تعیین مقادیر جزئی تری‌کلروفنول‌ها در نمونه‌های آبی، معمولاً یک مرحله جدا سازی و پیش‌تغلیظ قبل از آنالیز مورد نیاز است. روش‌های تجزیه‌ای مانند استخراج مایع-مایع[1] [۴] و استخراج فاز جامد[2] [۵] برای تعیین کلروفنل‌ها در نمونه‌های آب تو سعه یافته‌اند. این تکنیک‌ها زمان‌بر و گران ه ستند، به علاوه، روش ا ستخراج مایع-مایع به مقادیر زیادی حلال آلی نیاز دارد که برای سلامت ان سان‌ها و محیط زی ست خطرناک ا ست [۹-۶]. روش‌های دیگر ا ستخراج کلروفنل‌ها در نمونه‌های آب عبارتند از: میکرو استخراج فاز جامد[3] [۱۰] و میکرواستخراج تک قطره[4] [۱۱]. میکرو استخراج فاز جامد نیز گران است، فیبر آن شکننده است و طول عمر محدودی دارد [۱۲]، همچنین در میکرواستخراج تک قطره، تکرارپذیری و پایداری قطره مشکل اصلی روش می‌باشد.

لی و همکاران در سال ۲۰۱۴، تکنیک پیش‌تغلیظ آنلاین را بر اساس میکرواستخراج داخل لوله در فضای فوقانی[5] معرفی نمودند [۱۳]. در این روش، بخشی از مایع در قسمت ورودی ستون مویین به عنوان فاز پذیرنده به جای قطره آویزان قرار می‌گیرد که می‌تواند کاستی‌های مربوط به روش میکرواستخراج تک قطره را برطرف نماید. در این تکنیک قسمت ورودی ستون مویین که حاوی فاز پذیرنده می‌با شد در ف ضای فوقانی محلول نمونه قرار می‌گیرد. آنالیت‌ها از محلول نمونه به ف ضای فوقانی تبخیر و به داخل فاز پذیرنده استخراج می‌شوند. از آنجایی که فاز پذیرنده به خوبی توسط ستون مویین محافظت می‌شود، استخراج به مدت طولانی در دمای بالا حدود ۹۰ درجه سانتی گراد را می‌توان به راحتی انجام داد. علاوه بر این، از آنجایی که بخ شی از فاز پذیرنده غنی شده از آنالیت از قبل در داخل ستون مویین قرار دارد، کل ماده ا ستخراج شده را می‌توان برای آنالیز الکتروفورز مویینه[6] بدون مرحله تزریق اضافی مورد استفاده قرار داد. در این تکنیک، با توجه به اینکه حجم فاز پذیرنده ن سبت به حجم تک قطره ب سیار کوچک‌تر ا ست، فاکتور پیش‌تغلیظ بالاتری برای آنالیت‌های فرار حا صل می شود. میکروا ستخراج داخل لوله در ف ضای فوقانی را می‌توان به عنوان روش پیش‌تغلیظ نمونه قبل و حین تزریق در نظر گرفت. نکته قابل توجه این است که کل مراحل میکرواستخراج داخل لوله در فضای فوقانی- الکتروفورز مویینه (HS-ITME-CE) به طور خودکار با استفاده از برنامه‌های داخلی یک دستگاه تجاری الکتروفورز مویینه انجام می‌شود.

سرعت بالا، فاکتور غنی‌سازی بالا، سادگی عملکرد و هزینه پایین از مزایای این روش است. به دلیل قرار گرفتن فاز پذیرنده در داخل ستون مویین، ستون مویین به عنوان محافظ فاز پذیرنده عمل می‌کند و مشکل ناپایداری قطره در دما و زمان بالای استخراج که در روش میکرواستخراج تک قطره وجود داشت، برطرف می‌شود. یکی دیگر از مزایای میکرواستخراج داخل لوله در

[1]. Liquid Liquid extraction (LLE)
[2]. Solid phase extraction (SPE)
[3]. Solid phase microextraction (SPME)
[4]. Single drop microextraction (SDME)
[5]. Head space in-tube microextraction (HS-ITME)
[6]. Capillary electrophoresis (CE)

فضای فوقانی این است که بر خلاف میکرواستخراج تک قطره، مراحل استخراج و تزریق نمونه به طور همزمان انجام می شود [۱۴-۱۶].

هدف از این مطالعه بررسی امکان استفاده از روش میکرواستخراج داخل لوله در فضای فوقانی در ترکیب با الکتروفورز مویینه برای آنالیز همزمان شش تری‌کلروفنول در نمونه های آب است. روش پیشنهادی با کنترل پارامترهای مختلف بهینه شد. نتایج نشان داد که میکرواستخراج داخل لوله در فضای فوقانی یک روش استخراج کارآمد برای آنالیز تری‌کلروفنول‌ها در نمونه‌های آب است.

۲- بخش تجربی

۲-۱-مواد و روش‌ها

۳، ۴، ۵-تری‌کلروفنول، ۲، ۳، ۴-تری‌کلروفنول،۲، ۴، ۵-تری‌کلروفنول، ۲، ۳، ۵-تری‌کلروفنول،۲، ۴، ۶-تری‌کلروفنول و ۲، ۳، ۶-تری‌کلروفنول از شرکت سیگما آلدریچ[1] خریداری شدند. هیدروکلریک اسید، سدیم هیدروکسید، آمونیوم‌استات و سدیم‌تترابورات از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شدند. متانول، دی‌کلرومتان و دی‌اتیل اتر از شرکت مرک خریداری شدند. محلول‌های استاندارد مادر ۱۰۰ میلی‌مولار از هر کدام از شش ترکیب تری‌کلروفنول در متانول آماده شد. بافر آمونیوم استات با غلظت ۲۰ میلی مولار تهیه شد و pH آن روی ۷/۷ تنظیم شد که در این مطالعه به عنوان بافر اجرا مورد استفاده قرار گرفت. محلول‌های استاندارد تری‌کلروفنول‌ها با رقیق کردن محلول های ذخیره مربوطه با بافر آمونیوم استات هر هفته به صورت تازه تهیه و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد. همه بافرها با فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرومتر (واتمن، کلیفن، امریکا) فیلتر شدند و قبل از استفاده به مدت ۲۰ دقیقه گاززدایی شدند. محلول نمونه که به عنوان فاز دهنده برای میکرواستخراج داخل لوله در فضای فوقانی می‌باشد با رقیق کردن محلول‌های استاندارد تری‌کلروفنول‌ها با محلول ۱ میلی‌مولار هیدروکلریک اسید تهیه شد.

۲-۲- دستگاه‌ها

دستگاه الکتروفورز مویینه (P/ACE MDQ CE) ساخت کشور امریکا مجهز به آشکارساز UV برای تعیین میزان تری‌کلروفنول‌ها، مورد استفاده قرار گرفت. ستون مویین سیلیس ذوب‌شده با طول ۵۰ سانتی‌متر (۴۰ سانتی‌متر تا دتکتور) با قطر داخلی ۵۰ میکرومتر و قطر خارجی ۳۶۰ میکرومتر مورد استفاده قرار گرفت. برای کنترل دمای ویال نمونه، یک بشر ژاکت‌دار به سینی نمونه متصل شد. بافر اجرا مورد استفاده برای CE بافر آمونیوم استات با pH ۷/۷ بود. قبل از هر اجرا شویش و آماده‌سازی ستون با محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار، آب دیونیزه و بافر اجرا، هر یک به مدت ۵ دقیقه در ۴۰ psi انجام

[1]. Sigma Aldrich.

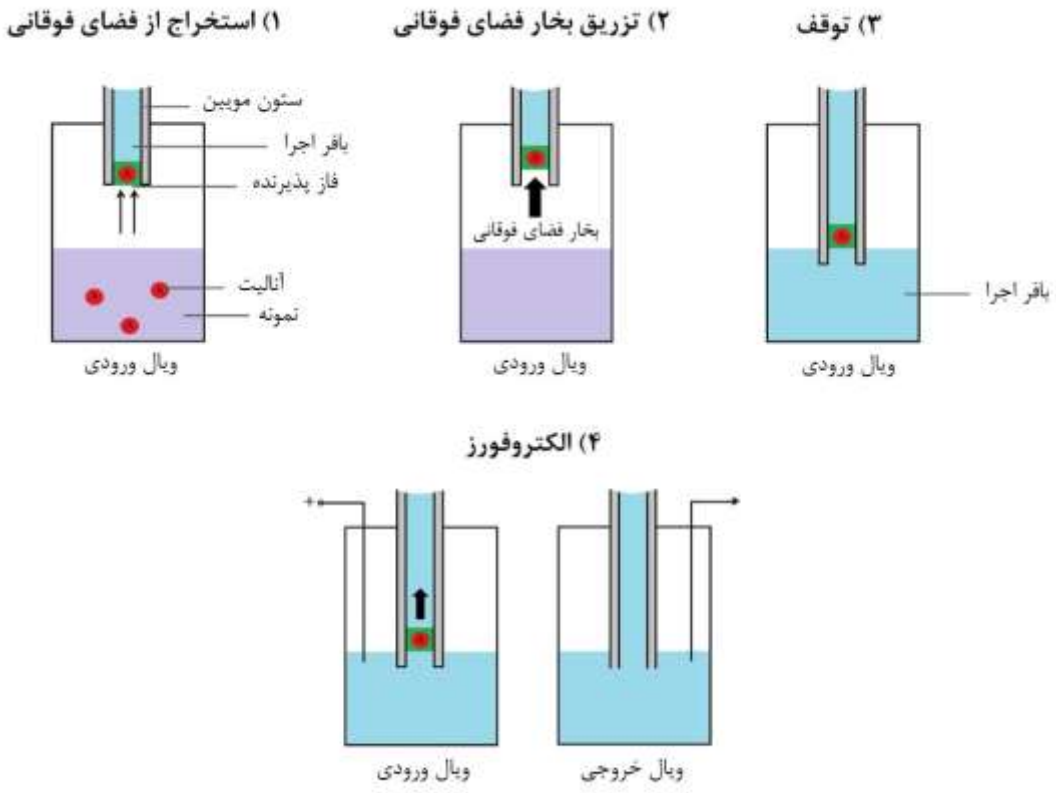
می شد. برای الکتروفورز، پتانسیل نرمال ۱۳/۲+ کیلوولت در سراسر ستون مویین اعمال شد و جذب در ۲۱۴ نانومتر بررسی شد. دستگاه pH متر متروم سوئیس مدل ۷۸۰ به منظور اندازه‌گیری pH مورد استفاده قرار گرفت. از حمام اولتراسونیک الما[1] مدل TI-H-10 (MF3 130/35kHz) ساخت کشور آلمان به منظور گاززدایی محلول‌های بافر استفاده شد. حمام آب (LAUDA، Lauda-Königshofen) ساخت کشور آلمان برای ایجاد شرایط دمایی ثابت مورد استفاده قرار گرفت.

۳-۲- چگونگی انجام فرایند میکرواستخراج

ابتدا ویال نمونه با یک میلی‌لیتر از فاز دهنده پر و سپس با یک درپوش سوراخ‌دار ویال (بکمن[2]) پوشیده می‌شود. سپس روی آن پوشش پلاستیکی (سلفون) قرار می‌گیرد. به منظور کنترل دما، ویال نمونه در داخل یک بشر ژاکت‌دار قرار می‌گیرد که به حمام آب برای ایجاد شرایط دمایی ثابت متصل است. شکل ۱ مراحل روش HS-ITME-CE را نشان می‌دهد. ۱) ابتدا ستون مویین جدا سازی با بافر اجرا پر می شود که بافر اجرا را می‌توان به عنوان فاز پذیرنده نیز استفاده کرد. اگر فاز پذیرنده متفاوت از بافر اجرا باشد، فاز پذیرنده به داخل ستون مویین در ۰/۳ psi و در مدت زمان مناسب تزریق می‌شود. قسمت ورودی ستون مویین پوشش سلفون را سوراخ کرده و در فضای فوقانی فاز دهنده در ویال نمونه قرار می‌گیرد. همچنین، قسمت خروجی ستون مویین در یک ویال خالی به‌گونه‌ای قرار می‌گیرد که دارای ارتفاع یکسانی با قسمت ورودی باشد تا از حرکت مایعات در داخل ستون مویین جلوگیری شود. سپس آنالیت‌ها از فضای فوقانی فاز دهنده به فاز پذیرنده که در داخل ستون مویین قرار دارد استخراج می شوند. ۲) پس از استخراج، ۲/۴ نانولیتر از هوای فضای فوقانی به داخل ستون مویین تزریق می شود تا از اتلاف نمونه هنگامی که در داخل بافر اجرا قرار می‌گیرد جلوگیری شود. ۳) سپس قسمت ورودی و خروجی ستون مویین در ویال‌های حاوی بافر اجرا قرار می‌گیرد، ۳۰ ثانیه زمان برای حل شدن بخار فضای فوقانی در داخل ستون مویین سپری می‌شود. ۴) پس از آن جداسازی انجام می‌شود.

پس از اینکه قسمت ورودی ستون مویین در ویال حاوی بافر اجرا قرار گرفت حدوداً ۵ ثانیه به منظور اعمال پتانسیل الکتریکی و شروع فرآیند الکتروفورز، زمان لازم است. آنالیت‌های غنی‌شده در فاز پذیرنده، نزدیک سطح ورودی در ستون مویین، در طی این مدت زمان از دست می‌روند. به منظور برطرف کردن این مشکل، بخشی از فاز پذیرنده حاوی آنالیت‌های غنی‌شده، با تزریق کردن بخار فضای فوقانی پس از استخراج، به داخل ستون مویین رانده می‌شوند. سپس قسمت ورودی ستون مویین در داخل ویال حاوی بافر اجرا قرار می‌گیرد و توقفی در حدود ۳۰ ثانیه بدون اعمال پتانسیل الکتریکی در نظر گرفته می شود که این به منظور حل شدن فاز گازی فضای فوقانی در داخل ستون مویین می‌باشد [۱۳].

[1]. Elma
[2]. Beckman



شکل ۱. شمایی از مراحل میکرواستخراج و تغلیظ نمونه در داخل ستون مویین دستگاه الکتروفورز مویینه.

۳-بحث و نتیجه گیری

در این روش ا ستخراجی، دو ا ستخراج برگشت‌پذیر وجود دارد. ابتدا آنالیت‌های ا سیدی از فاز دهنده ا سیدی به فضای فوقانی ا ستخراج می شوند. سپس آنالیت‌ها به داخل فاز پذیرنده بازی در داخل ستون مویین ا ستخراج می شوند. یکی از پارامترهای مهم در این سیستم، pH فاز پذیرنده می‌با شد. هنگامی‌که pH فاز پذیرنده، بسیار بیشتر از مقدار pka آنالیت ا سیدی (HA) با شد، مقدار ضریب توزیع (D) آنالیت‌ها بین فاز پذیرنده و فضای فوقانی تا مقدار ضریب تقسیم برای فرم خنثی HA افزایش می‌یابد. علاوه بر این آنالیت‌ها در فاز پذیرنده، یونیزه می‌شوندکه مانع برگشت مجدد آنها به فضای فوقانی می‌شود.

اگر زمان استخراج (t) کوتاه باشد، فاکتور غنی‌سازی در استخراج فضای فوقانی (HS) متناسب با نسبت سطح به حجم فاز پذیرنده است:

$$EF(t) \propto \left(\frac{A_a}{V_a}\right) t \qquad (1)$$

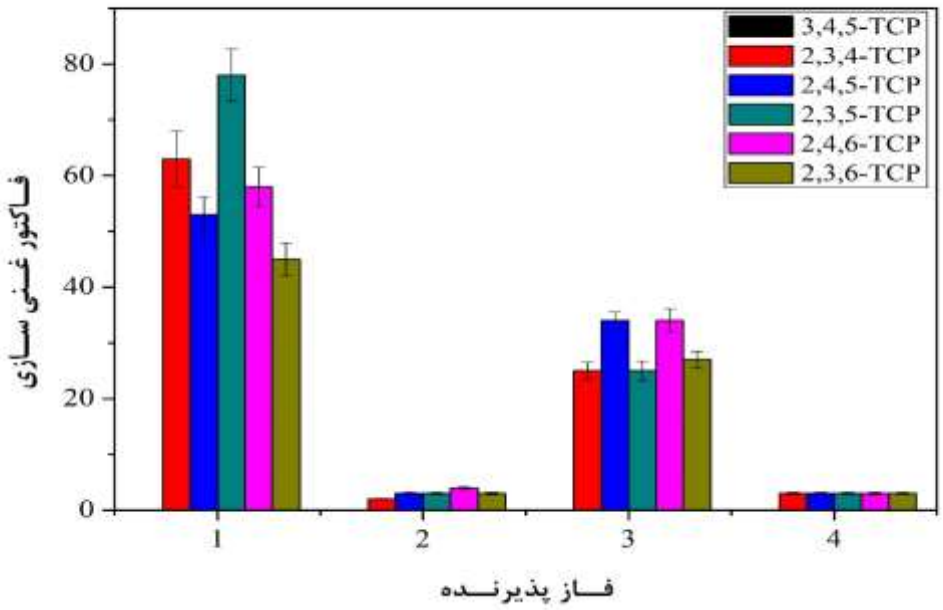
که در آن A_a و V_a به ترتیب مساحت سطح و حجم فاز پذیرنده می‌باشد [۱۷]. در میکرواستخراج داخل لوله در فضای فوقانی، A_a در معادله (۱) مقدار ثابتی دارد و برابر با مساحت سطح ناحیه باز ورودی ستون مویین می‌باشد. بنابراین با استفاده از V_a کوچک‌تر، مقادیر بالاتر فاکتور غنی‌سازی حاصل خواهد شد.

۳-۱- اثر فاز دهنده

به منظور استخراج تری‌کلروفنول‌ها از فاز دهنده به فضای فوقانی، pH فاز دهنده باید به اندازه کافی اسیدی باشد تا آنالیت‌ها به فرم مولکولی تبدیل شوند و به راحتی از سطح فاز دهنده تبخیر و وارد فضای فوقانی شوند [۱۸]. با توجه به اینکه مقادیر pka تری‌کلروفنول‌های مورد مطالعه در محدوده ۷/۸۴-۶/۰۶ قرار می‌گیرد، از نظر تئوری مقدار pH ۴ برای فاز دهنده به اندازه کافی برای این ترکیبات اسیدی می‌باشد. با توجه به آزمایش‌های انجام شده، کارآیی استخراج تری‌کلروفنول‌ها با تغییر غلظت هیدروکلریک اسید از ۰/۱-۰/۰۰۱ مولار بطور جزئی تغییر یافت. بنابراین محلول هیدروکلریک اسید با غلظت ۰/۰۰۱ مولار به عنوان فاز دهنده در این مطالعه انتخاب شد.

۳-۲- اثر فاز پذیرنده

کلروفنول‌ها اسیدهای ضعیفی هستند، بنابراین به منظور استخراج آنها از فضای فوقانی، فاز پذیرنده باید به اندازه کافی بازی باشد تا آنالیت‌ها به فرم یونی تبدیل شوند [۱۸]. در این آزمایش، انواع گوناگونی از محلول‌های بازی با pH های متفاوت در زمان استخراج ۵ دقیقه و دمای $^{\circ}C$ ۲۵ مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که مشخص است با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید با غلظت ۰/۱ مولار، فاکتورهای غنی‌سازی حاصل نسبت به سایر محلول‌ها بالاتر بود. بنابراین، محلول سدیم هیدروکسید با غلظت ۰/۱ مولار به عنوان فاز پذیرنده انتخاب شد.



شکل ۲. اثر فاز پذیرنده بر بازده استخراج تری‌کلروفنول‌ها. غلظت تری‌کلروفنول‌ها: ۲۳۰ نانومولار ، دما و زمان استخراج: ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه، بافر اجرا: آمونیوم استات ۲۰ میلی‌مولار با pH ۷/۷، تعداد دفعات تکرار: ۳، ۱: سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار، ۲: آمونیوم استات ۰/۴ مولار (pH ۱۱)، ۳: سدیم تترابورات ۲۵ میلی مولار (pH ۱۰)، ۴: آمونیوم استات ۲۰ میلی مولار (pH ۷/۷).

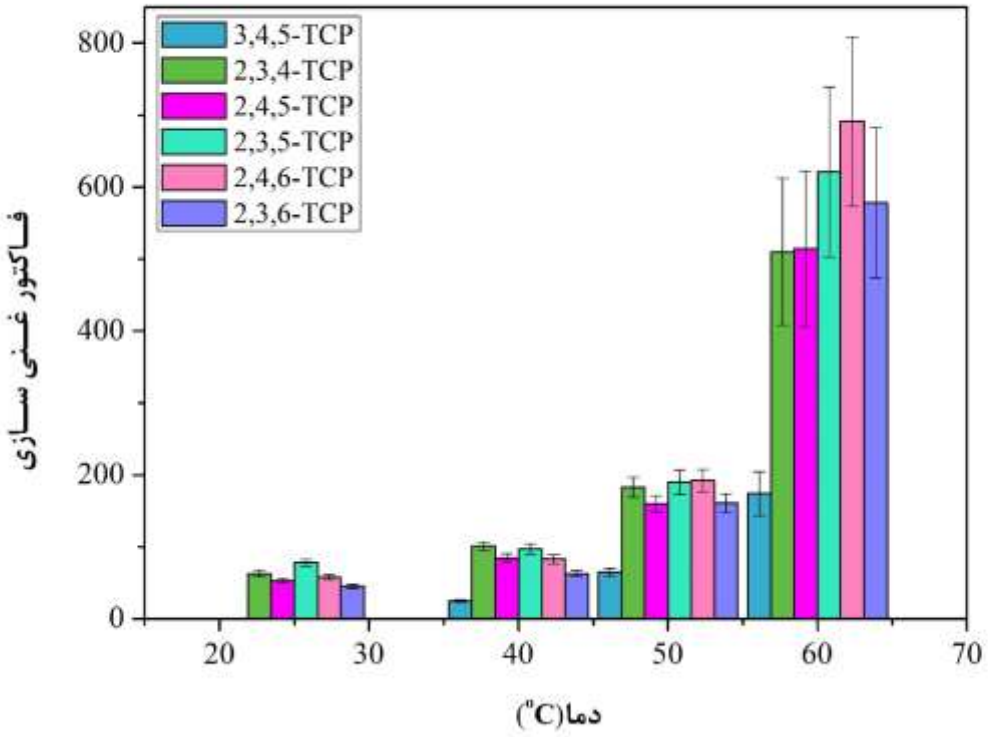
۳-۳- اثر دما و زمان

دما یکی از پارامترهای اساسی و تأثیرگذار بر فرآیند استخراج است. توزیع آنالیت بین فاز دهنده و فضای فوقانی در شرایط تعادل به کمک قانون هنری (معادله ۲) بیان می‌شود. در این معادله P_h فشار جزئی بخار آنالیت در فضای فوقانی، K_H ثابت هنری و C_d غلظت آنالیت در محلول می باشد.

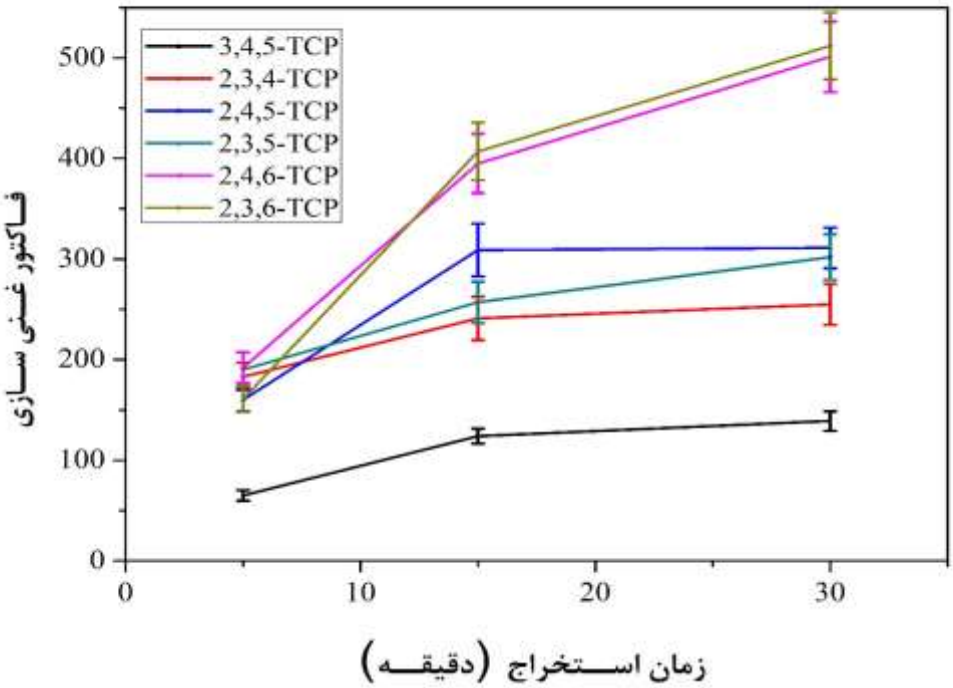
$$K_H = {P_h}/{C_d} \qquad (2)$$

برای آنالیت فرار، تبخیر از فاز دهنده به فضای فوقانی یک فرآیند گرماگیر است [۱۹]. بنابراین، هنگامی که دما افزایش می‌یابد، ثابت هنری بزرگتر می شود یعنی مقادیر بیشتری از آنالیت‌ها به داخل فضای فوقانی تبخیر خواهند شد. در مقابل، تراکم بخار آنالیت به داخل فاز پذیرنده یک فرآیند گرمازا اســـت و مقادیر کمتری از آنالیت در دماهای بالا به داخل فاز پذیرنده توزیع خواهند شد. بنابراین با افزایش دمای فاز دهنده و کاهش دمای فاز پذیرنده، فرآیند ا ستخراج، کارآمد خواهد بود. اما به منظور ساده‌سازی روش، یک دمای بهینه برای کل سیستم استخراج در نظر گرفته می‌شود [۲۰]. دمای بهینه با مقایسه مقادیر فاکتور غنی سازی و تکرارپذیری منا سب انتخاب می شود. در این مطالعه، دما در محدوده ۶۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد مورد برر سی قرار گرفت که نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش دما از ۲۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد، فاکتور غنی‌ســازی حدوداً ۳ برابر افزایش می‌یابد. در دمای ۶۰ درجه ســانتی‌گراد، مقادیر فاکتور غنی‌ســازی به میزان ۳/۵-۲/۵ برابر نسبت به دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. با این حال، تکرارپذیری روش کاهش یافت و درصد انحراف استاندارد نسبی برای آنالیت‌ها در محدوده ۲۱٪-۱۷ قرار گرفت. بنابراین دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به عنوان دمای بهینه روش استخراج درنظر گرفته شد.

همچنین، اثر زمان استخراج از ۵ تا ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در شکل ۴ نشان داده شده است. همان‌طور که مشخص است با افزایش زمان استخراج از ۵ تا ۱۵ دقیقه، فاکتور غنی سازی برای تمام ترکیبات تری‌کلروفنول افزایش یافته و در بازه ۱۵ تا ۳۰ دقیقه، برای چهار ترکیب تغییر محسوسی در فاکتور غنی‌سازی مشاهده نشد و فقط برای دو ترکیب ۲، ۴، ۶-تری‌کلروفنول و ۲، ۳، ۶-تری‌کلروفنول افزایش در فاکتور غنی‌ســازی مشــاهده شــد. بنابراین، با توجه به اینکه زمان‌های بسیار طولانی در دمای بالا باعث ایجاد مشکلاتی از جمله نشت در ویال ورودی و اتلاف نمونه می‌شود لذا زمان استخراج ۱۵ دقیقه به عنوان زمان بهینه روش استخراجی انتخاب شد.



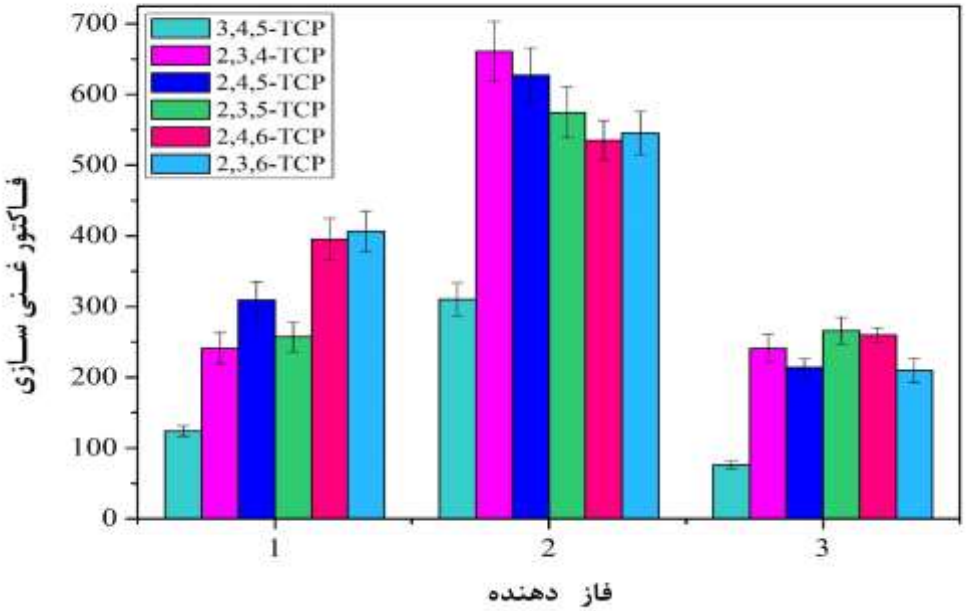
شکل ۳. اثر دما بر بازده استخراج تری‌کلروفنول‌ها. غلظت تری‌کلروفنول‌ها: ۲۳۰ نانومولار ، زمان استخراج: ۵ دقیقه، بافر اجرا: آمونیوم استات ۲۰ میلی‌مولار با pH ۷/۷، تعداد دفعات تکرار: ۳.



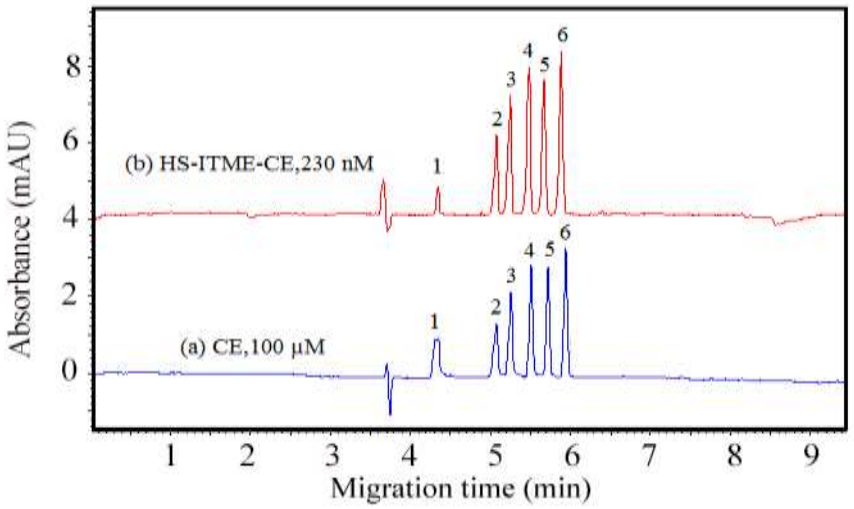
شکل ۴. اثر زمان استخراج بر بازده استخراج تری‌کلروفنول‌ها. غلظت تری‌کلروفنول‌ها: ۲۳۰ نانومولار، دما: ۵۰ درجه سانتی‌گراد، بافر اجرا: آمونیوم استات ۲۰ میلی‌مولار با pH ۷/۷، تعداد دفعات تکرار: ۳.

۴-۳- اثر افزودن حلال آلی به فاز دهنده

در این مطالعه، اثر افزودن حلال‌های آلی به محلول نمونه بر کارآیی استخراج با استفاده از حجم‌های متفاوتی (۲۵ و ۵۰ میکرولیتر) از دی اتیل اتر و دی‌کلرومتان در دمای ۲۵ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. ۱ میلی‌لیتر از محلول نمونه در ویال نمونه قرار داده شد. حجم مشخصی از حلال آلی با استفاده از میکرو سرنگ به محلول نمونه اضافه و نمونه به شدت هم زده شد. نمونه‌برداری از فضای فوقانی در مدت زمان ۱۵ دقیقه انجام شد. همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است با افزایش ۲۵ میکرولیتر از حلال آلی دی اتیل اتر در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، فاکتورهای پیش‌تغلیظ تری‌کلروفنول‌ها افزایش یافت. احتمالاً افزودن حلال‌های امتزاج ناپذیر به محلول نمونه در دمای بالا، باعث استخراج آنالیت‌ها به داخل حلال آلی و تبخیر فاز حلال غنی‌شده از آنالیت به فضای فوقانی می‌شود [۲۱]. در دمای پایین، استخراج آنالیت‌ها به حلال آلی انجام می شود اما به علت پایین بودن دما، آنالیت‌ها به سختی تبخیر شده و وارد فضای فوقانی می شوند. همچنین با استفاده از ۵۰ میکرولیتر دی اتیل اتر در دمای بالا پیک‌ها دچار همپوشانی شدند و جداسازی آنالیت‌ها به خوبی انجام نشد. بنابراین، استفاده از ۲۵ میکرولیتر دی اتیل اتر در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای بررسی‌های بعدی در نظر گرفته شد. شکل ۶ الکتروفروگرام HS-ITME-CE را تحت شرایط بهینه نشان می‌دهد. فاکتور پیش‌تغلیظ برای شش تری کلروفنول در محدوده ۶۶۱-۳۱۰ قرار گرفت.



شکل ۵. اثر افزودن حلال آلی به فاز دهنده بر بازده استخراج تری‌کلروفنول‌ها. غلظت تری‌کلروفنول‌ها: ۲۳۰ نانومولار، دما و زمان استخراج: ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ دقیقه، بافر اجرا: آمونیوم استات ۲۰ میلی‌مولار با pH ۷/۷، تعداد دفعات تکرار: ۳، ۱: هیدروکلریک اسید ۱ میلی مولار، ۲: هیدروکلریک اسید ۱ میلی مولار + ۲۵ میکرولیتر دی اتیل اتر، ۳ : هیدروکلریک اسید ۱ میلی مولار + ۲۵ میکرولیتر دی کلرومتان.



شکل ۶. الکتروفروگرام HS-ITME-CE در شرایط بهینه: غلظت آنالیت‌ها: (a) ۱۰۰ میکرومولار، (b) ۲۳۰ نانومولار، فاز دهنده: محلول هیدروکلریک اسید ۱ میلی‌مولار، فاز پذیرنده: محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱ مولار، دما و زمان استخراج: ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ دقیقه، بافر اجرا: آمونیوم استات ۲۰ میلی‌مولار با pH ۷/۷. ۱) ۳، ۴، ۵-تری‌کلروفنول، ۲) ۲، ۳، ۴-تری‌کلروفنول، ۳) ۲، ۴، ۵-تری‌کلروفنول، ۴) ۲، ۳، ۵-تری‌کلروفنول، ۵) ۲، ۴، ۶-تری‌کلروفنول، ۶) ۲، ۳، ۶-تری‌کلروفنول.

۵-۳-ارقام شایستگی روش

به منظور اعتبارسنجی روش میکرواستخراج پیشنهادی، پارامترهای تجزیه‌ای مانند حد تشخیص، تکرارپذیری، گستره دینامیکی و فاکتور غنی سازی مورد مطالعه قرار گرفتند. برای منحنی درجه‌بندی برای روش پیشنهادی، محلول‌های استاندارد تری کلروفنول‌ها در گستره غلظتی ۱۰۰۰-۱ نانومولار ساخته شد. سپس، در شرایط بهینه، عمل استخراج بر روی این محلول‌ها انجام شد. حد تشخیص روش برابر با غلظتی در نظر گرفته شد که در آن نسبت سیگنال به نویز برابر با ۳ باشد. محاسبه فاکتور غنی سازی از مقایسه ارتفاع پیک آنالیت‌های محلول استاندارد با ارتفاع پیک آنالیت‌های موجود در نمونه و در نظر گرفتن غلظت آنالیت‌ها پس از اجرای روش میکرواستخراج پیشنهادی انجام شد. برای محاسبه تکرارپذیری روش، عمل استخراج هفت بار بر روی نمونه‌های آبی اسپایک شده با غلظت ۵۰۰ نانومولار تری کلروفنول‌ها انجام شد. از ترکیب ۲، ۴، ۶ تری برموفنول با غلظت ۵۰۰ نانومولار به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. نتایج حاصل در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱ ارقام شایستگی روش HS-ITME-CE برای اندازه‌گیری تری‌کلروفنول‌ها در نمونه آبی.

آنالیت	فاکتور غنی-سازی	انحراف استاندارد نسبی (درصد)	گستره خطی منحنی درجه-بندی	ضریب همبستگی	حد تشخیص (نانومولار)
۳، ۴، ۵-تری‌کلروفنول	۳۱۰	۷/۶۳	۱۰۰۰-۲۰	۰/۹۹۸	۶
۲، ۳، ۴-تری‌کلروفنول	۶۶۱	۶/۴۲	۱۰۰۰-۱۵	۰/۹۹۴	۵
۲، ۴، ۵-تری‌کلروفنول	۶۲۷	۶/۲۲	۱۰۰۰-۱۵	۰/۹۹۵	۵
۲، ۳، ۵-تری‌کلروفنول	۵۷۵	۴/۷۸	۱۰۰۰-۱۵	۰/۹۹۹	۵
۲، ۴، ۶-تری‌کلروفنول	۵۳۵	۵/۲۴	۱۰۰۰-۱۵	۰/۹۹۴	۵
۲، ۳، ۶-تری‌کلروفنول	۵۴۵	۵/۶۰	۱۰۰۰-۱۵	۰/۹۹۲	۵

۶-۳- تجزیه نمونه‌های حقیقی

به منظور بررسی و اثبات کارآیی روش پیش‌تغلیظ ارائه شده در این تحقیق، نمونه حقیقی آب رودخانه با این روش مورد بررسی قرار گرفت. تحت شرایط بهینه، محلول تهیه شده برای تعیین شش ترکیب تری‌کلروفنول مورد آزمایش قرار گرفت. در هیچ کدام از نمونه‌ها ترکیبات تری‌کلروفنول یافت نشد. برای اطمینان از صحت پاسخ، نمونه‌های آب با مقدار مشخصی (۲۰۰ نانومولار) از شش ترکیب تری‌کلروفنول اسپایک شده و اندازه‌گیری‌ها مجدداً انجام شد. این آزمایش‌ها برای هر نمونه سه بار تکرار شد. نتایج حاصل از آزمایش‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. بطور کلی می‌توان مشاهده کرد که درصد بازیافت‌های بدست آمده برای شش ترکیب تری‌کلروفنول در نمونه‌های حقیقی آنالیز شده بین ۸۲ تا ۹۲٪ است. نتایج نشان دهنده این است که بازیابی‌ها در گستره قابل قبولی است و بافت نمونه‌ها هیچ اثری بر راندمان استخراج ندارد.

جدول۲ اندازه‌گیری بازیابی (٪) و انحراف استاندارد تری‌کلروفنول‌ها در نمونه آب‌های طبیعی.

آنالیت	آب رودخانه[1] (نانومولار)	افزوده شده (نانومولار)	تعیین شده (نانومولار)[2]	بازیابی (٪)
۳، ۴، ۵-تری‌کلروفنول	-	۲۰۰	۱۶۴± ۱۳	۸۲
۲، ۳، ۴-تری‌کلروفنول	-	۲۰۰	۱۸۴± ۱۰	۹۲
۲، ۴، ۵-تری‌کلروفنول	-	۲۰۰	۱۸۲± ۹	۹۱
۲، ۳، ۵-تری‌کلروفنول	-	۲۰۰	۱۸۰± ۱۲	۹۰
۲، ۴، ۶-تری‌کلروفنول	-	۲۰۰	۱۷۴± ۱۵	۸۷
۲، ۳، ۶-تری‌کلروفنول	-	۲۰۰	۱۷۶± ۱۱	۸۸

[1] آب رودخانه چالوس.

[2] میانگین ± انحراف استاندارد (تعداد اندازه‌گیری = ۳).

۷-۳- مقایسه کارآیی روش پیشنهادی با سایر روش‌های ارائه شده

مقایسه روش پیشنهادی با دیگر روش‌های گزارش شده برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری کلروفنول‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است. همان‌طور که مشخص است روش پیشنهادی دارای حد تشخیص پایینی است که بهتر و یا قابل مقایسه با سایر روش‌های ارائه شده است. همچنین زمان مورد نیاز برای استخراج کلروفنول‌ها در روش پیشنهادی پس از روش میکروا ستخراج مایع-مایع پخشی (۲/۵ دقیقه) نسبت به روش‌های دیگر کمتر است. علاوه بر این، در صد بازیابی و انحراف استاندارد نسبی روش پیشنهادی قابل مقایسه با روش‌های دیگر است. نتایج به روشنی نشان می‌دهد که روش ارائه شده سریع، ساده و تکرارپذیر است که می‌توان آن را برای پیش‌تغلیظ و اندازه‌گیری مقادیر ناچیز کلروفنول‌ها در نمونه‌های آبی به کار برد.

جدول ۳ مقایسه روش پیشنهادی HS-ITME-CE با دیگر روش‌های گزارش شده برای اندازه‌گیری کلروفنول‌ها در نمونه آبی.

روش	حد تشخیص (میکروگرم بر لیتر)	بازیابی (٪)	انحراف استاندارد نسبی (درصد)	زمان استخراج (دقیقه)	مرجع
DLLME-HPLC	۵۰	۹۰/۹۳-۸	۱/۳-۸/۱	۲/۵	[۲۲]
MN-HS-SDME-HPLC	۷-۴	۱۲۰-۸۸	۳/۶-۸/۵	۴۰	[۲۳]

MSPE-HPLC	۵۰	۸۳/۹۶-۰/۹	۱/۳-۰/۳	۲۰	[۲۴]
HS-SPME-GC-FID	۳۲-۱۴	۱۰۵-۹۴	۳/۴-۵/۸	۳۰	[۲۵]
LPME-HPLC	۰/۲-۵/۵	۸۱/۱۰۵-۶/۳	۵/۱۱-۶/۵	۳۰	[۲۶]
SPME-HPLC	۱۰-۱	۶/۱۵-۰	۰/۱۲-۸	۴۰	[۲۷]
HS-ITME-CE	۱-۱/۲	۹۲-۸۲	۴/۷-۷۸/۶۳	۱۵	روش پیشنهادی

DLLME: Dispersive liquid–liquid microextraction, MN-HS-SDME: magnetic needle headspace single-drop microextraction, MSPE: Magnetic solid-phase microextraction, HS-SPME: Headspace solid phase microextraction, LPME: Liquid phase microextraction.

۴-نتیجه‌گیری

در این مطالعه، روش پیش‌تغلیظ آنلاین میکروا ستخراج داخل لوله در فضای فوقانی جفت شده با الکتروفورز مویینه برای آنالیز تری‌کلروفنول‌ها در نمونه آبی مورد ا ستفاده قرار گرفت. در این روش مایع داخل ستون مویین جدا سازی به عنوان فاز پذیرنده عمل می‌کند و بنابراین از تمام مواد استخراج شده برای آنالیز الکتروفورز مویینه استفاده می‌شود که قبلاً به داخل ستون تزریق شده ا ست. با حذف قطره آویزان در روش میکروا ستخراج تک‌قطره، رویکرد جدیدی در روش‌های آماده سازی نمونه برای آنالیز با الکتروفورز مویینه ایجاد می‌شود. این یک روش ساده و کارآمد است که به محققان این امکان را می‌دهد که بدون نیاز به تجهیزات یا آموزش خاص، آنالیتهای مورد نظر را استخراج کنند.

۵- فهرست منابع و ماخذ

[1] Sharma N., Jain A., Singh V. K., Verma K. K. (2015) Solid-phase extraction combined with headspace single-drop microextraction of chlorophenols as their methyl ethers and analysis by high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Talanta*, 83(3), 994-9.

[2] Li D., Oh J. R., Park J. (2003) Direct extraction of alkylphenols, chlorophenols and bisphenol A from acid-digested sediment suspension for simultaneous gas chromatographic–mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A*, 1012(2), 207-214.

[3] Saraji M., Ghani M. (2015) Hollow fiber liquid–liquid–liquid microextraction followed by solid-phase microextraction and in situ derivatization for the determination of chlorophenols by gas chromatography-electron capture detection. *J. Chromatogr. A*, 1418, 45-53.

[4] Makuch B., Gazda K., Kamiski M. (1993) Determination of phenol and monochlorophenols in water by reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 284, 53-58.

[5] Crespin M. A., Gallego M., Valcarcel M. (2002) Solid-phase extraction method for the determination of free and conjugated phenol compounds in human urine. *J. Chromatogr. B*, 773(2), 89-96.

[6] Xiao Q., Hu B., Yu C., Xia L., Jiang Z. (2006) Optimization of a single-drop microextraction procedure for the determination of organophosphorus pesticides in water and fruit juice with gas chromatography-flame photometric detection. *Talanta*, 69 (4), 848-855.

[7] Mirzaei, N., Rezaei, V., Aibaghi, B. (2019). Preconcentration and determination of diazepam in pharmaceutical and biological samples by graphene oxide based on dispersive solid phase microextraction. *Applied Chemistry*, 14(51), 21-34. (in persion)

[8] Fathi, M., Rajabi, H. R., Khajehsharifi, H., Gorjizadeh Kohvadeh, A. Application of liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for preconcentration and spectrophotometric determination of purpurin. *Applied Chemistry*, (Articles in Press), (in persion), doi: 10.22075/CHEM.2023.28461.2107

[9] Sorouraddin, S. M., Asadpour-Zeynali, K., Fathollahi, I. (2019). Development of a green dispersive liquid-liquid microextraction method using a home-made tablet disperser for extraction and preconcentration of Co (II) and Ni(II) from high volume aqueous samples. *Applied Chemistry*, 14(50), 139-154. (in persion)

[10] Bagheri H., Mir A., Babanezhad E. (2005) An electropolymerized aniline-based fiber coating for solid phase microextraction of phenols from water. *Anal. Chim. Acta*, 532, 89-95.

[11] Psillakis E., Kalogerakis N. (2003) Developments in liquid-phase Microextraction. *Trends Anal. Chem*, 22(10), 565-574.

[12] Helena P., Locita I. K. (1999) Solid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem*, 18(4), 272-282.

[13] Lee H.R., Cho S.M., Kim J., Chung D.S. (2014) Novel and simple headspace in-tube microextraction coupled with capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1346, 117-122.

[14] Galan-Cano F., Lucena R., Cardenas S., Valcarcel M. (2012) Ionic liquid based in situ solvent formation microextraction coupled to thermal desorption for chlorophenols determination in waters by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1229, 48-54.

[15] Chien R.L., Burgi D. S. (1991) Field amplified sample injection in high-performance capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 559(1–2), 141-152.

[16] Křivánková L., Pantůčková P., Boček P. (1999) Isotachophoresis in zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 838(1–2), 55-70.

[17] Park S. T., Kim J., Choi K., Lee H. R., Chung D. S. (2012) Headspace-single drop microextraction with a commercial capillary electrophoresis instrument. *Electrophoresis*, 33, 2961-2968.

[18] Es'haghi Z. (2011) Extraction and Determination of Three Chlorophenols by Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction - Spectrophotometric Analysis, and Evaluation Procedures Using Mean Centering of Ratio Spectra Method. *Am. J. Analyt. Chem*, 2, 1-8.

[19] Lou D.-W., Lee X., Pawliszyn J. (2008) Extraction of formic and acetic acids from aqueous solution by dynamic headspace-needle trap extraction: Temperature and pH optimization. *J. Chromatogr. A*, 1201(2), 228-234.

[20] Cho S.M., Park B.S., Jung W.S., Lee S.W., Jung Y., Chung D.S. (2016) Headspace in-tube microextraction coupled with micellar electrokinetic chromatography of neutral aromatic compounds. *Talanta*, 148, 729–733.

[21] George M. J., Marjanovic L., Williams D. B. G. (2015) Solvent-Assisted Headspace Sampling Using Solid Phase Microextraction for the Analysis of Phenols in Water. *Anal. Chem*, 87, 9559-9562.

[22] An Y., Ma W., Row K.H. (2020) Preconcentration and determination of chlorophenols in wastewater with dispersive liquid–liquid microextraction using hydrophobic deep eutectic solvents. *Anal. Lett*. 53, 262–272.

[23] Firouzy M., Hashemi P. (2023) Ionic Liquid-Based Magnetic Needle Headspace Single-Drop Microextraction Combined with HPLC/UV for the Determination of Chlorophenols in Wastewater. *J. Chromatogr. Sci.* 61, 743-749.

[24] Ma W., Row K.H. (2018) Solid-phase extraction of chlorophenols in seawater using a magnetic ionic liquid molecularly imprinted polymer with incorporated silicon dioxide as a sorbent. *J. Chromatogr. A* 1559, 78–85.

[25] Portillo M., Prohibas N., Salvadó V., Simonet B. (2006) Vial position in the determination of chlorophenols in water by solid phase microextraction. *J. Chromatogr. A* 1103, 29–34.

[26] Zhao L., Lee H.K. (2001) Determination of phenols in water using liquid phase microextraction with back extraction combined with high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 931, 95–105.

[27] Gonzalez-Toledo E., Prat M., Alpendurada M. (2001) Solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography for the analysis of phenolic compounds in water. *J. Chromatogr. A* 923, 45–52.