دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهر
فصلنامه‌ی کاربرد شیمی در محیط زیست

سال پنجم، شماره‌ی ۱۷
زمستان ۱۳۹۲، صفحات ۳۰-۲۵

اندازه‌گیری اسپکتوفوتومتری نیتریت در آب‌های خلیج چابهار بعد از مشتق‌سازی و پیش تغلیظ 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. نیتریت 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 نیتریت در آب دریا مورد بررسی قرار گرفت. به منظور ایجاد بیش‌ترین هم‌خوانی در روش پیش تغلیظ پیشنهادی، پارامترهای مورد نظر در محیط آب دریای مصنوعی بهینه‌سازی شدند. در مرحله مشتق سازی، از معرف ۲ و ۳- دی آمینو نفتالن استفاده شد که در محیط اسیدی با نیتریت واکنش داده و تشکیل ۱- نفتوتری آزول می‌دهد که در طول موج ۳۶۵ نامومتر 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 به‌کارگیری روش مذکور مقدار نیتریت 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، نیتریت، خلیج چابهار

مقدمه

نیتریت 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 نیترات، آمونیاک، آمونیوم، اوره و آمین‌ها تشکیل می‌دهند که در نهایت به بدنه آبی وارد می‌شوند. در محیط‌های دریایی، نیتریت 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 این‌گونه 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 نیتریت در محیط محصور آب، گرایش به جذب نیتریت پیدا کرده و سبب انباشته شدن آن در آب‌شش‌ها می‌شوند (Jensen, 2003). نیتریت 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 ظاهریش 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 نیتریت به واسطه اثراتی که غلظت بالای این یون برروی سلامتی دارد از اهمیت بالایی در آنالیز نمونه‌های بیولوژیکی برخوردار می‌باشد. در حال حاضر، روش‌های تجزیه‌ای زیادی در آنالیز نیتریت نمونه‌های بیولوژیکی در دسترس است که می‌توان به روش‌های کروماتوگرافی (Jobgen et al., 2007)، الکترومتری (Perez-Olmos et al. 1998) وکمیلومینسانس (Garside, 1982) اشاره کرد. در این تحقیق، از روش اسپکتوفتومتری با معرف ۲ و۳- دی آمینو نفتالن استفاده شد که از مزایای آن حساسیت بالا، گزینش پذیری بالا، سادگی در انجام مراحل مشتق‌سازی و آماده سازی نمونه، تشکیل مشتق پایدار، پایین بودن اثرات تداخلی، محدوده خطی بالا در غلظت‌های متفاوت نیتریت و

هزینه کم می‌باشد که با تلفیق آن با تکنیک DLLME-SFO سبب استخراج بالا و پیش تغلیظ نیتریت از ماتریکس پیچیده آب دریا می‌شود.

مواد و روش

ابزارآلات و دستگاه‌های به‌کار رفته در این روش شامل دستگاه اسپکتوفوتومتر UV2100PC یونیکو برای اندازه‌گیری جذب نیتریت در طول موج ۳۶۵ نانومتر استفاده شد. محلول استاندارد نیتریت (۱۰۰ppm) با حل کردن ۱۵۰ میلی‌گرم نمک سدیم نیتریت (خشک‌شده به مدت ۴ ساعت در دمای $110^{\circ}c$) در یک لیتر آب دو بار تقطیر انجام شد. محلول نیتریت روزانه (۱۰ppm) با رقیق‌سازی حجم کافی از محلول استاندارد نیتریت تهیه گردید.

محلول معرف ۲ و ۳- دی آمینو نفتالن (DAN) به صورت روزانه با حل کردن ۵/۰ میلی‌گرم DAN در ۱۰۰ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید ۰/۶۲ مولار تهیه‌شده و در بطری شیشه‌ای خاکستری رنگ در دمای $18^{\circ}c$- نگهداری شد.

آب مصنوعی دریا با حل کردن مقادیر کافی از نمک‌های مربوطه در یک لیتر آب دو بار تقطیر تهیه گردید. ۲۳/۵۰۰ گرم نمک NaCl، ۱۰/۷۸۰ گرم نمک $MgCl_2 . 6H_2O$، ۱/۴۷۰ گرم نمک $CaCl_2 . 2H_2O$، ۲۰۰ میلی‌گرم نمک $NaHCO_3$، ۱۰۰ میلی‌گرم نمک KBr، ۳۰ میلی‌گرم نمک H_3BO_3، ۲۰ میلی‌گرم نمک $SrCl_2 . H_2O$، ۲۰ میلی‌گرم نمک $Na_2SiO_3 . 9H2O$، ۳/۰ میلی‌گرم نمک NaF، ۳ میلی‌گرم نمک KCl. به منظور بهینه‌سازی پارامتر های موثر بر میکرو استخراج، محلول نیتریت روزانه با غلظت ۱۰ ppm در آب مصنوعی دریا تهیه‌کرده و سپس ۱۰ میلی‌لیتر از آن را برداشته و در ظرف آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری درب‌دار که مناسب استخراج و سانتری‌فیوژ می‌باشد می‌ریزیم. با اضافه کردن مقدار کافی از هیدروکلریک اسید به آن pH محلول را به ۱/۵ رسانده و سپس یک میلی‌لیتر از معرف DAN به محلول اضافه کرده و آن را به مدت ۵ دقیقه به هم می‌زنیم تا واکنش مشتق‌سازی کامل شود. پس از حصول اطمینان از تشکیل مشتق با اضافه کردن سود به نمونه pH محلول را به ۹/۵ می‌رسانیم که این افزایش pH سبب افزایش شدت جذب مشتق می‌شود. مخلوطی از حلال استخراجی و پخشی را توسط سرنگ با فشار به نمونه تزریق کرده که منجر به تشکیل حالت ابری و انتقال سریع مشتق از فاز آبی به فاز آلی می‌شود. بعد از آن نمونه را به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتری‌فیوژ می‌کنیم و پس از آن در حمام آب یخ قرار می‌دهیم که سبب انجماد سریع قطره آلی بر روی سطح محلول شده و در برداشت آن سهولت ایجاد می‌کند. در نهایت قطره را در میکرو ویال حل کرده درون میکروسل ریخته و در طول موج ۳۶۵ نانومتر مورد سنجش قرار می‌دهیم.

یافته‌ها

تاثیر غلظت مشتق‌ساز ۲و۳- دی آمینو نفتالن یکی از پارامترهای مهم در اندازه‌گیری اسپکتوفتومتری نیتریت به روش مشتق‌سازی، بهینه‌سازی غلظت مشتق‌ساز ۲و۳- دی آمینو نفتالن می‌باشد. بدین منظور غلظت‌های ۸۰ µgr/ml تا ۱۰ از مشتق ساز در هیدروکلریک اسید ۰/۶۲ تهیه‌کرده و

مقدار ۱/۰ میلی‌لیتر از هر غلظت را به ۱۰ میلی‌لیتر محلول روزانه نیتریت سدیم (۱۰ppm) 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 ۵۰ µgr/ml بهترین نتیجه را در تشکیل مشتق می‌دهد.

تاثیر pH

در اندازه‌گیری اسپکتوفتومتری نیتریت، pH از دو جهت اثرگذار است یکی در فرآیند تشکیل مشتق و دیگری در فرآیند استخراج. یون نیتریت در محیط اسیدی با حلقه ۲و 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 ۱/۰ میلی‌لیتر مشتق ساز ۲و۳- دی آمینو نفتالن (۵۰ µgr/ml) به ۱۰ میلی‌لیتر محلول نیتریت سدیم روزانه (۱۰ ppm)، مشتق را در محدوده pH=۱-۳ تشکیل داده و به دنبال آن با اضافه کردن سود، pH نمونه را به ۹/۵ رسانده و شدت جذب را اندازه‌گیری می‌کنیم که با توجه به نتایج به‌دست آمده حدود pH=۱/۵ به عنوان pH اولیه بهینه برای تشکیل مشتق انتخاب شد.

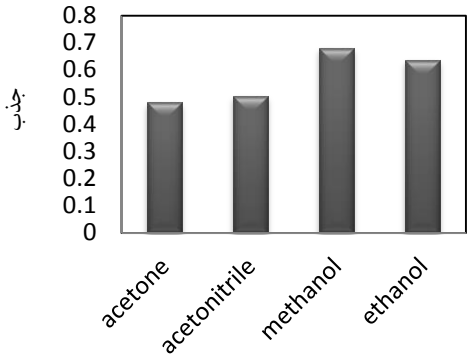
در بررسی pH بهینه استخراج، در ابتدا مشتق‌سازی را طبق شرایط بهینه‌شده از قبل انجام داده و سپس عملیات استخراج را با تغییر pH ماتریکس نمونه از اسیدی تا بازی انجام دادیم که نتایج حاصله مبنی بر بی‌تاثیر بودن pH در روند استخراج می‌باشد. لذا نتیجه‌گیری شد که pH ماتریکس نمونه را تا قبل از کلوئیدی شدن آن توسط سود بالابرده و به همان pH=۹/۵ به عنوان pH بهینه استخراج برسانیم.

تاثیر نوع حلال استخراجی و پخشی

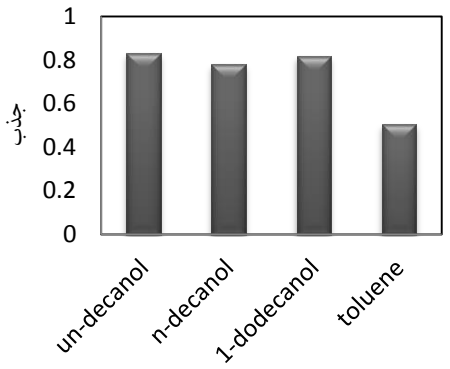
یکی از پارامترهای تاثیر گذار در روش DLLME-SFO انتخاب نوع حلال استخراجی می‌باشد چون‌که انتخاب صحیح حلال استخراجی سبب حصول برگشت‌پذیری بالای استخراج و در نتیجه فاکتور غنی سازی بالا می‌شود. حلال استخراجی باید خصوصیاتی از جمله چگالی کم‌تر از آب، حلالیت بسیار کم در آب و محلول در حلال پخشی، سمیت کم، نقطه ذوب 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 (۵۲۶ mg/L) منجر به پایین بودن بازدهی استخراج آن شد. هم‌چنین استون در مقایسه با سایر حلال‌های پخشی انتخاب‌شده، تشکیل حالت ابری در مورد آن ضعیف مشاهده شد. بهترین نتایج در انتخاب ۱- دو دکانول (نقطه ذوب: ۲۴°C-۲۲) و ۱- آندکانول (نقطه ذوب: ۱۵°C-۱۳) به عنوان حلال استخراجی در ترکیب با متانول به عنوان حلال پخشی به دست آمد. در نهایت ۱- دودکانول

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: تاثیر نوع حلال استخراجی بر شدت جذب



نمودار ۲: تاثیر نوع حلال پخشی بر شدت جذب



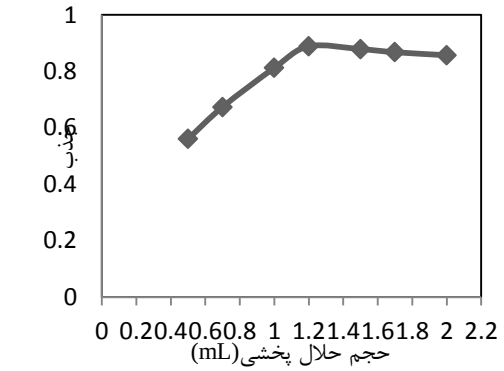
تاثیر حجم حلال استخراجی

بدین منظور تعیین حجم بهینه حلال استخراجی، چندین نمونه از محلول نیتریت روزانه را تحت شرایط بهینه‌شده مشتق‌سازی کرده و با حجم‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰،۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰ و ۳۵۰ میکرولیتر از ۱- دودکانول و یک میلی‌لیتر متانول مورد استخراج و سنجش قرار گرفتند. همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده می‌شود با افزایش حجم ۱- دودکانول حجم فاز استخراج‌شده پس از سانتری‌فیوژ 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 غلطت 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.

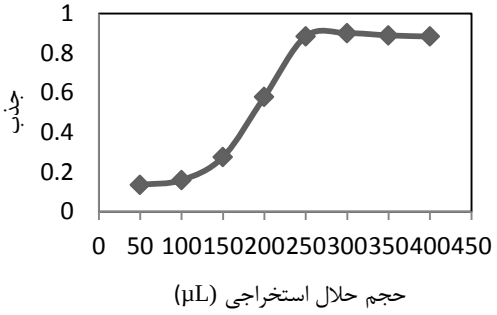
تاثیر حجم حلال پخشی

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

نمودار ۳: تاثیر حجم حلال پخشی بر شدت جذب



نمودار ۴: تاثیر حجم حلال استخراجی بر شدت جذب



نتیجه‌گیری

در این مطالعه یک روش نوین در میکرو استخراج و اندازه‌گیری اسپکتوفتومتری نیتریت 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 می‌باشد و ۱- دودکانول به عنوان حلال استخراجی به‌کار رفته شده در این روش در مقایسه با سایر حلال‌های استفاده شده در دیگر روش‌ها، از سمیت کم‌تر و سهولت بیش‌تر در روند میکرو استخراج برخوردار است. هم‌چنین نتایج به‌دست آمده از غلظت نیتریت در آب‌های خلیج چابهار دامنه غلظتی ppm ۱/۷۶- ۰/۷۷ از هشت ایستگاه نمونه‌برداری شده به دست آمد.

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.