نویسندگان
مهشید رحیمی‌فرد[۱و۴*]
رقیه حجی‌پور[۲و۴]
محمود نادری[۳و۴]
*m_rahimifard@yahoo.com

روش‌های آماده‌سازی نمونه برای کروماتوگرافی گازی

واژه‌های کلیدی
کروماتوگرافی گازی، آماده‌سازی نمونه، استخراج فاز جامد، میکرواستخراج، فضای فوقانی، استخراج غشایی.

چکیده
مفهوم اصلی روش آماده‌سازی نمونه، تبدیل یک ماتریس واقعی به نمونه‌ای است که برای آنالیز مناسب باشد. برخی نمونه‌های گازی، مایع و یا جامد فرار، به‌صورت مستقیم به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق می‌شوند ولی بیشتر نمونه‌ها برای تزریق مستقیم به دستگاه مناسب نیستند. روش‌های بسیاری به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها قبل از آنالیز دستگاهی وجود دارند. هدف این روش‌ها، حذف مداخلات جدی از نمونه، افزایش غلظت آنالیت، تبدیل آنالیت به فرم مناسب‌تر برای تشخیص و آنالیز، توانایی استفاده از مقادیر کمتری از نمونه و در نهایت دستیابی به گزینش‌پذیری بالاتر است. در این مقاله به انواع روش‌های استخراج، تغلیظ و پاک‌سازی نمونه اشاره شده‌است. از جمله روش‌های استخراج می‌توان به روش‌های قدیمی نظیر پالایش و به دام انداختن، استخراج فضای فوقانی ایستا تا روش‌های جدیدتر نظیر میکرو استخراج فاز جامد، استخراج غشایی، میکرواستخراج تک قطره و استخراج با آب فوق داغ اشاره کرد.

مقدمه

بیشتر نمونه‌ها برای تزریق مستقیم به ستون کروماتوگرافی گازی[۵] آماده نیستند؛ بنابراین، آماده‌سازی نمونه مهمترین مرحله قبل از تعیین میزان آنالیت با GC است. ممکن است فرآیندهای مختلفی در آماده‌سازی نمونه وجود داشته باشند که به پیچیدگی نمونه بستگی دارند. برای ترکیبات آلی و فرار، روش‌های آماده‌سازی نمونه می‌تواند شامل استخراج، پاکسازی، مشتق‌سازی و تغلیظ باشد [۱].

قبل از تجزیه یک نمونه با GC، روش تهیه نمونه باید با برخی از محدودیت‌های مهم مانند دقت، صحت، هزینه، فراوانی آزمایشگاه‌های مرتبط موجود، زمان صرف شده برای آنالیز و احتمال خودکار شدن بررسی شود. از آنجا که ابزارهای تحلیلی، مانند GC، بسیار پیشرفته شده‌اند و سطح بالایی از دقت و صحت را ارائه می‌دهند، مرحله آماده‌سازی نمونه نیز باید براساس این تغییرات اصلاح شوند. به حداقل رساندن تعداد مراحل آماده‌سازی نمونه و استفاده از روش مناسب، از رویکردهای مهم برای کاهش عدم اطمینان در هنگام تهیه نمونه هستند [۲].

مرحله آماده‌سازی نمونه می‌تواند بر برخی عوامل کمی آماری مانند انحراف استاندارد نسبی[۶]، حد تشخیص[۷]، حد کمی[۸]، حد خطی[۹] و محدوده دینامیکی خطی[۱۰] تأثیر بگذارد. همچنین از دیگر عوامل مهم در انتخاب یک روش آماده‌سازی نمونه مناسب شامل سرعت بالا، استفاده از روش‌های آنلاین، کم هزینه و کم مصرف یا استفاده از روش‌های تهیه نمونه سبزتر است.

روش ای استخراج

اولین روش تهیه نمونه، استخراج است که در آن آنالیت مورد نظر از یک ماتریس نمونه با بیشترین گزینش‌پذیری و بهره جدا می‌شود. دو نوع عمده استخراج، شامل استخراج فاز جامد[11] و استخراج مایع - مایع[12] است. در SPE، آنالیت از یک نمونه جا می‌شود و در LLE، آنالیت از محلول نمونه استخراج می‌شود [۳]. حلالی که آنالیت با آن استخراج می‌شود، می‌تواند مایع آلی، سیال فوق بحرانی و مایع فوق گرم باشد [۱]. با بهینه‌سازی شرایط استخراج مانند دما، فشار، pH محلول و همچنین با استفاده مناسب از مواد افزودنی و معرف‌ها، انتخاب و عملکرد فرآیند استخراج بهبود خواهد یافت.

هدف اصلی کلیه روش‌های استخراج، وارد کردن انتخابی آنالیت درون یک فاز است و هر آنالیت با توجه به ثابت توزیع، دما و حجم نسبی فازها بین دو فاز توزیع می‌شود [۱].

استخراج فاز جامد (SPE)

به‌طور کلی، استخراج فاز جامد شامل چهار مرحله است:

۱- مرحله آماده‌سازی ستون یا مرحله پیش از شستشو؛

۲- بارگیری نمونه یا بازداری آنالیت مورد نظر روی کارتریج و یا جاذب؛

۳- شستشوی ستون برای از بین بردن آلاینده‌های نامطلوب (در واقع، آنالیت مورد نظر روی جاذب حفظ می‌شود، در حالی که تداخلات از بین می‌روند)؛

۴- واجذب آنالیت مورد نظر از روی کارتریج (آنالیت‌های جذب شده با یک حلال شستشوی مناسب بازیابی می‌شوند).

به‌صورت تجاری، جاذب‌های SPE به شکل کارتریج و یا دیسک موجود هستند. همچنین، می‌توان فازهای جاذب را خریداری و ستون‌های معمولی (پلی پروپیلنی یا شیشه‌ای) را با آن‌ها پر کرد.

میکرو استخراج فاز جامد[13]

میکرو استخراج فاز جامد روشی مدرن است که از فیبرهای کم قطر سیلیس جوش خورده[14] که با یک فاز ثابت پلیمری پوشیده شده‌اند، برای استخراج مستقیم آنالیت استفاده می‌شود [۴]. دو نوع SPME موجود است که در اولی، یک لایه نازک از جاذب روی سطح خارجی فیبر (طراحی فیبر) پوشانده شده‌است و در دومی سطح داخلی یک لوله مویینه (طراحی درون‌لوله‌ای) با استفاده از جاذب پوشانده شده‌است. طراحی فیبر می‌تواند به‌عنوان رابط در GC و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد استفاده قرار گیرد، اما طراحی درون‌لوله‌ای فقط به‌عنوان یک رابط برای HPLC کاربرد دارد. در طراحی فیبر، یک فیلم نازک از پلیمر مایع یا مخلوطی از یک جاذب جامد با یک پلیمر مایع، روی سطح فیبرهای سیلیکا را پوشانده است.

روش SPME از طریق دو مرحله جداگانه انجام می‌شود. در ابتدا، ماده جاذب جامد برای مدت زمانی مشخص در محیط نمونه غوطه‌ور می‌شود. سپس، جاذب جامد به درون دستگاه‌های GC و HPLC (یا الکتروفورز مویین) وارد شده و به ترتیب توسط فرآیندهای واجذب حرارتی و حلالی، آنالیت را رها می‌کند. SPME را می‌توان در سه حالت انجام داد [۲]:

- استخراج مستقیم، که در آن فیبر روکش شده در نمونه آبی فرو می‌رود؛
- پیکربندی فضای فوقانی[16]، برای نمونه‌برداری از هوا یا ترکیبات فرار از فضای فوقانی یک نمونه آبی. باید در نظر داشت که پیکربندی فضای فوقانی برای ترکیبات آلی فرار نسبت به ترکیبات آلی نیمه فرار کاربرد بیشتری دارد؛
- پیکربندی محافظت غشایی، که در آن فیبر پوشش داده شده با غشایی محافظت می‌شود و برای آنالیز آنالیت در نمونه‌های خیلی آلوده کاربرد دارد.

ویژگی‌های فرآیند استخراج SPME به شرح زیر است:

- نمونه‌ها پس از رسیدن به تعادل یا در زمان مشخص قبل از دستیابی به تعادل، تجزیه و تحلیل می‌شوند؛
- در این روش، استخراج کامل آنالیت از ماتریس نمونه حاصل نمی‌شود؛
- این روش به‌طور مستقیم برای کاربردهای میدانی در نمونه‌برداری از هوا و آب کاربرد دارد؛
- با کنترل دقیق زمان و دما می‌توان استخراج را به‌صورت کمی انجام داد؛
- یک روش بدون حلال برای آماده‌سازی نمونه است؛
- با سیستم‌های آنالیز کروماتوگرافی سازگار است و فرآیند به راحتی خودکار می‌شود [۵]؛
- در SPE معمولی، آنالیت می‌تواند به‌صورت جامع (> ۹۰ درصد) با فاز جامد از یک محیط نمونه استخراج شود، در حالی که مقدار کمی از نمونه (۱ تا ۲ درصد) وارد تجهیزات آنالیزی می‌شود؛ اما در SPME، اگر چه استخراج آنالیت کامل نیست و بخش کوچکی از آن در فاز جامد (حدود ۲ تا ۲۰ درصد) استخراج شده‌است، اما می‌توان تمام نمونه استخراجی را به ابزار آنالیزی تزریق کرد. بنابراین، علاوه‌بر گزینش‌پذیری و غلظت بالا، SPME در آنالیز مقادیر بسیار کم، موفق است [۶]؛
- تا زمانی که نمونه به نسبت تمیز باشد، SPME می‌تواند برای استخراج ترکیبات آلی نیمه فرار از آب‌های محیطی و ماتریس‌های زیستی مورد استفاده قرار گیرد. از آنجا که استخراج ترکیبات آلی نیمه فرار با SPME از ماتریس‌های آلوده دشوار است، یک روش برای حذف آلاینده‌ها، گرم کردن نمونه برای هدایت آنالیت به فضای فوقانی نمونه برای نمونه‌گیری SPME است؛
- از معایب SPME، می‌توان به تغییر در نتایج آنالیز با تغییر در ماتریس نمونه اشاره کرد.

فیبرهای SPME پوشش‌های مختلفی دارند و هیچ پوشش واحدی برای استخراج و جداسازی همه ترکیبات فرار آلی از یک نمونه وجود ندارد. بنابراین، انواع مختلفی از پوشش‌ها با قطبیت‌های مختلف روی فیبرهای SPME اعمال می‌شود. در

حال حاضر، سه نوع پوشش فیبر به‌صورت تجاری در دسترس است: (۱) غیرقطبی، (۲) نیمه قطبی و (۳) قطبی.

تعداد بسیار زیادی پوشش فیبر SPME به‌صورت تجاری در دسترس است. این طیف قطبیت از پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان[۱۷] که غیرقطبی است، تا کربوواکس دی‌وینیل‌بنزن[۱۸] که قطبی است را پوشش می‌دهد. فیبرهای غیرقطبی به‌طور معمول برای SPME فضای فوقانی استفاده می‌شوند؛ زیرا بیشتر آنالیت‌های فرار، غیرقطبی یا کمی قطبی هستند. مزیت استفاده از فیبرهای با قطبیت‌های مختلف این است که استفاده از فیبری با قطبیت همسان با آنالیت، سبب افزایش گزینش‌پذیری استخراج می‌شود [۷].

ضخامت پوشش فیبر عامل دوم است که باید در انتخاب فیبر برای SPME در نظر گرفته شود. روکش پلی‌دی‌متیل سیلوکسان به‌صورت تجاری در سه ضخامت ۱۰۰، ۳۰ و ۷ میکرومتر موجود است. فیبرهای با ضخامت ۱۰۰ میکرومتر به‌طور کلی برای ترکیبات بسیار فرار یا هنگامی که از یک حجم ماتریس آلی بزرگتر استفاده می‌شود، کاربرد دارد. فیبرهای با ضخامت ۷ میکرومتر برای ترکیبات کم فرار استفاده می‌شود.

پس از انتخاب فیبر، شرایط استخراج باید بهینه شود. متغیرهای زیادی از جمله: ۱- زمان استخراج، ۲- حجم نمونه، ۳- هم‌زدن، ۴- درجه حرارت و ۵- ماتریس نمونه وجود دارد که هر یک باید جداگانه بهینه شوند.

جاذب پلیمر قالب مولکولی[۱۹] در استخراج فاز جامد و میکرو استخراج فاز جامد

پلیمر قالب مولکولی نوعی جاذب است که می‌تواند برای استخراج‌های فاز جامد و میکرو استخراج فاز جامد کاربرد داشته باشد. MIP یک جاذب پلیمری است که با حضور یک آنالیت هدف، به‌عنوان یک الگوی مولکولی تولید می‌شود. هنگامی که پلیمر شسته و قالب خارج می‌شود، سایت‌هایی روی پلیمر باقی می‌مانند که به استخراج انتخابی آنالیت هدف کمک می‌کنند. با استفاده از MIP به‌عنوان ماده جاذب، سطح تماس بین جاذب و نمونه نسبت به فیبرهای معمول SPME که پیشتر توضیح داده شد، بیشتر می‌شود [۲]. مزایای ذاتی MIP، شامل قابلیت استفاده مجدد، سادگی، هزینه کم، میل و انتخاب زیاد برای مولکول هدف و پایداری فیزیکی و شیمیایی در طیف گسترده‌ای از شرایط آزمایشگاهی و حلال‌ها است [۸].

استخراج جذبی با لوله چرخان[۲۰]

استخراج جذبی با لوله چرخان، برای استخراج مقادیر بسیار کم ترکیبات آلی از مواد غذایی، محیطی و زیستی آبی استفاده می‌شود. لوله چرخان با یک فاز جاذب پوشانده شده‌است و در محلول نمونه قرار می‌گیرد تا آنالیت مورد نظر را جدا کند. اگر چه روش‌های SBSE جامع و کامل نیست، اما نسبت به روش‌های SPME برای آنالیزهای کمی، استخراج‌های بهتری را انجام می‌دهد. SBSE نقطه ضعف روش غوطه‌وری SPME که فقط در غلظت‌های پایین کاربرد داشت را نیز برطرف می‌کند.

لوله چرخان حاوی فاز جاذب، به‌طور معمول برای هم زدن محلول نمونه برای یک دوره زمانی خاص، بسته به حجم نمونه و سرعت هم‌زدن، تا نزدیک شدن به تعادل استفاده می‌شود [۲].

استخراج با سوکسله

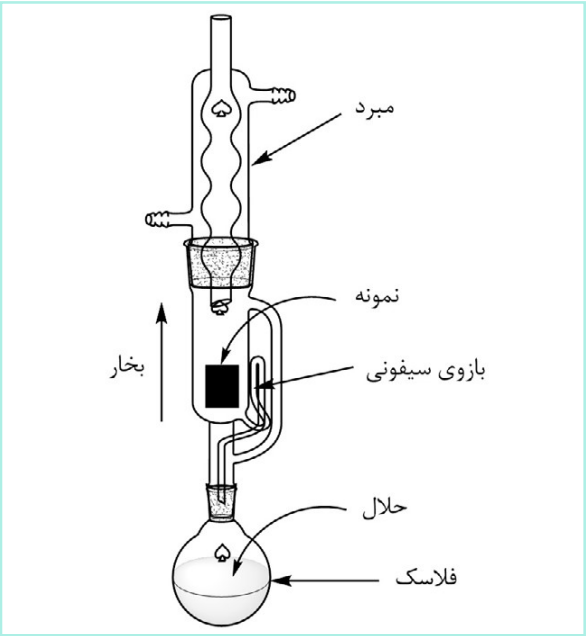
استخراج با سوکسله به‌عنوان روشی استاندارد برای استخراج مواد آلی نیمه فرار و غیرفرار توسط آژانس حفاظت از محیط زیست ایالات متحده (EPA ۳۵۴۰C) و همچنین استخراج چربی در محصولات کاکائو توسط انجمن شیمی‌دانان تجزیه‌ای رسمی (AOAC ۹۶۳,۱۵) پذیرفته شد. استخراج با سوکسله توسط فرانز ریتر وان سوکسله[۲۱] در سال ۱۸۷۹ معرفی شده‌است. تا زمانی که دیگر روش‌های استخراج مدرن در دهه ۱۹۸۰ توسعه یابند، این روش یکی از پرکاربردترین روش‌های استخراج بود. در حال حاضر، سوکسله هنوز هم برای استخراج ترکیبات آلی نیمه فرار از نمونه‌های جامد استفاده می‌شود. استخراج با سوکسله یک روش قدیمی است که در معرض فشار جوی و در دمای بالا انجام می‌شود. در این روش به‌طور معمول، از مقادیر به نسبت زیاد حلال‌های آلی استفاده می‌شود و روشی وقت‌گیر است [۲].

دستگاه سوکسله دارای سه بخش است و نمایی از آن در شکل (۱) نشان داده شده‌است:

۱. قسمت بالا، یک مبرد برگشتی بخار حلال است؛

۲. قسمت میانی، یک استوانه با انتهای بسته است که مجهز به یک بازوی سیفونی و یک لوله جانبی است؛

۳. قسمت پایینی، یک فلاسک با کف گرد است که به استوانه میانی متصل می‌شود.



شکل (۱): نمای دستگاه سوکسله [۷].

در این روش، نمونه درون یک استوانه سلولزی متخلخل قرار می‌گیرد و در استوانه میانی دستگاه سوکسله جا می‌گیرد. به‌طور معمول ۳۰۰ میلی‌لیتر حلال برای ۱۰ گرم از نمونه به داخل فلاسک وارد می‌شود. فلاسک به آرامی گرم می‌شود و بخار حلال به سمت مبرد برگشتی پیش می‌رود و پس از خنک شدن، دوباره به استوانه میانی می‌ریزد. هنگامی که مخلوط حلال و آنالیت به قسمت فوقانی استوانه میانی برسد، از طریق دستگاه سیفون به داخل فلاسک پایینی منتقل می‌شود. این چرخه بارها و بارها تکرار می‌شود. از آنجایی که نقاط جوش آنالیت‌ها به‌طور معمول بالاتر از حلال است، آنالیت‌ها در فلاسک جمع می‌شوند و حلال‌ها دوباره چرخه را از سر می‌گیرند. یعنی در هر چرخه، آنالیت با حلال‌های تازه استخراج می‌شود.

استخراج با اولتراسونیک[۲۲]

در استخراج با اولتراسونیک یا فراصوت، از لرزش اولتراسونیک برای اطمینان از تماس کامل بین نمونه و حلال استفاده می‌شود. استخراج با اولتراسونیک به نسبت سریع است، اما بازده استخراج به اندازه بعضی روش‌های دیگر زیاد نیست. همچنین، تابش فراصوت ممکن است برخی از ترکیبات آلی فسفر را تجزیه کند.

یک دستگاه فراصوت معمولی به یک پروب تیتانیومی مجهز است. نمونه به‌طور معمول با سولفات سدیم بی‌آب خشک و با حجم مشخصی از حلال انتخاب شده مخلوط می‌شود. نوک پروب به‌صورت دقیق زیر سطح حلال و در عین حال بالاتر از نمونه قرار می‌گیرد. استخراج با این روش را می‌توان در مدت زمان حداقل ۳ دقیقه انجام داد. پس از استخراج، عصاره به‌دست آمده، فیلتر یا سانتریفیوژ می‌شود. به دلیل امکان انتخاب نوع حلال یا مخلوط حلال‌ها در استخراج با اولتراسونیک، امکان افزایش بهره استخراج و گزینش‌پذیری وجود دارد [۷].

استخراج با سیال فوق بحرانی[۲۴]

سیالات فوق بحرانی دارای ویژگی‌های خاصی هستند که باعث می‌شود استخراج مواد آلی از نمونه‌های جامد تسهیل شود. عملیات استخراج با سیال فوق بحرانی دارای دو حالت آنلاین و آفلاین است. در عملیات آنلاین، این سیستم به‌طور مستقیم به یک دستگاه آنالیز مانند GC، کروماتوگرافی سیال فوق بحرانی و HPLC متصل است. در سیستم آفلاین، همان‌طور که از نام آن پیداست، روش استخراج، مستقل از روش آنالیزی است که استفاده می‌شود. روش آفلاین نسبت به روش آنلاین انعطاف‌پذیر و آسان‌تر است. این روش اجازه می‌دهد تا عصاره با روش‌های مختلفی آنالیز شود [۲].

یک مایع فوق بحرانی، ماده‌ای با دما و فشار بالاتر از بحرانی است. همچنین، این مایع حدواسط بین گاز و مایع است. دی‌اکسید کربن دارای دما (۳۱ درجه سانتیگراد) و فشار (۷۳ اتمسفر) فوق بحرانی پایین است. این ماده غیرسمی و غیرقابل اشتعال و همچنین با خلوص بالا در دسترس است. بنابراین، دی‌اکسید کربن به حلالی مناسب برای بیشتر کاربردهای SFE تبدیل شده‌است. دی‌اکسید کربن فوق بحرانی غیرقطبی و بدون ممان دو قطبی دائمی است. بنابراین، می‌توان از آن برای استخراج ترکیبات غیرقطبی و کمی قطبی از ماتریس نمونه استفاده کرد. برای استخراج ترکیبات قطبی، نیتروز اکسید و کلرودی فلوئورومتان فوق بحرانی کارایی بیشتری دارند. اما این سیال‌ها با محیط‌زیست سازگار نیستند و در آنالیزهای معمولی استفاده نمی‌شوند [۲].

استخراج با سیال فوق بحرانی، جایگزین مناسبی برای روش‌های استخراج با حلال معمولی است، این امر به‌طور عمده به دلیل ویژگی قابل توجه سیالات فوق بحرانی مانند نفوذ زیاد و ویسکوزیته پایین آن‌هاست که باعث می‌شود بدون نیاز به مراحل پاک‌سازی، مواد شیمیایی مختلفی را به‌صورت گزینشی استخراج کنند و بنابراین به مقادیر کمتری از نمونه نیاز خواهد بود [۹].

استخراج با حلال شتاب‌یافته[۲۴]

در این روش از حلال‌های معمولی در دما (۱۸۰-۱۰۰ درجه سانتیگراد) و فشار (۱۵۰۰-۱۰۰۰ psi) بالا استفاده می‌شود تا درصد استخراج ترکیبات آلی از نمونه‌های جامد را افزایش دهد.

با توجه به اینکه استخراج سیال فوق بحرانی وابسته به ماتریس نمونه است به‌طور معمول به افزودن اصلاح کننده‌های آلی نیاز دارد. استخراج با حلال شتاب‌یافته، برای غلبه بر این محدودیت‌ها توسعه داده شد. اگر چه انتظار می‌رود که حلال‌های معمولی از سیال فوق بحرانی کارایی کمتری داشته باشند، اما نتایج کاملاً برعکس است و در بسیاری از موارد، استخراج با حلال‌های آلی در دما و فشار بالا نسبت به سیال فوق بحرانی سریعتر و کاملتر خواهد بود [۲].

فشار و دمای بالای استفاده شده در استخراج با حلال شتاب‌یافته بر ویژگی حلال و نمونه و همچنین بر برهم‌کنش آن‌ها نیز تأثیر دارد. ویژگی استخراج با حلال شتاب‌یافته به شرح زیر است:

- در فشار بالاتر، به دلیل افزایش نقطه جوش حلال، استخراج در دمای بالاتر انجام می‌شود؛
- در فشارهای بالاتر، نفوذ حلال به محیط نمونه افزایش می‌یابد؛ بنابراین، استخراج آنالیت مورد نظر از ماتریس تسهیل می‌شود؛
- در دماهای بالاتر، انتقال جرم و حلالیت آنالیت افزایش می‌یابد؛
- درجه حرارت بالا، می‌تواند قدرت پیوندهای نمونه و آنالیت مانند پیوندهای دو قطبی، هیدروژنی و واندروالس را کاهش دهد؛
- درجه حرارت بالا، ویسکوزیته حلال و کشش سطحی آن را کاهش می‌دهد و بنابراین نفوذ حلال را در محیط ماتریس تقویت می‌کند.

فصلنامه تخصصی دانش آزمایشگاهی ایران
سال هشتم ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۹ ■ شماره پیاپی ۳۰

استخراج با کمک مایکروویو[۲۵]

به‌منظور استخراج ترکیبات فرار و شبه فرار از نمونه‌های جامد، از روش استخراج با کمک مایکروویو استفاده می‌شود. دو نوع مایکروویو آزمایشگاهی وجود دارد:

۱) مایکروویو با مخزن استخراج سربسته در معرض فشار بالا؛

۲) مایکروویو با مخزن سرباز تحت فشار اتمسفر.

در حالت مایع و جامد، مولکول‌ها نمی‌توانند در میدان مایکروویو همانند مولکول‌های گازی به‌صورت آزادانه بچرخند. مولکول‌ها در حالت مایع و جامد به شکل‌های مختلفی به امواج مایکروویو پاسخ می‌دهند و این عمل باعث گرم شدن آن‌ها می‌شود. در طول فرآیند گرم شدن، انرژی الکترومغناطیسی به گرمایی تبدیل می‌شود. این عمل به دلیل هدایت یونی و چرخش دوقطبی مولکول‌هایی است که مورد تابش قرار گرفته‌اند. هدایت یونی به توانایی حرکت یون در محلولی که تحت میدان الکترومغناطیسی است گفته می‌شود که طی آن گرما تولید می‌شود. چرخش دوقطبی نیز به این معنی است که جهت ممان دو قطبی تحت فرکانس مایکروویو خیلی سریع جابجا می‌شود. هنگامی که یک مولکول قطبی در میدان الکترومغناطیس قرار می‌گیرد با سرعت ۴/۹ میلیارد دور بر ثانیه حول محور خودش می‌چرخد. بنابراین، مولکول‌هایی با ممان دوقطبی بزرگ‌تر، نوسانات خیلی قوی‌تری تحت میدان مایکروویو، ایجاد می‌کنند.

در استخراج به کمک مایکروویو، انتخاب حلال مناسب یکی از کلیدهای موفقیت است. به‌طور کلی سه نوع حلال در این روش مورد استفاده قرار می‌گیرد:

۱) حلال یا حلال‌هایی با ضریب دی‌الکتریک بالا؛

۲) مخلوط حلال‌هایی با ضرایب دی‌الکتریک بالا و پایین؛

۳) یک حلال فاقد جذب مایکروویو به همراه نمونه‌ای با ضریب دی‌الکتریک بالا [۷].

استخراج فضای فوقانی

ترکیبات آلی فرار، ترکیباتی هستند که در دمای ۲۰ °C فشار بخاری برابر یا بیشتر از ۰/۱ mmHg دارند. بسیاری از ترکیبات فرار، آلودگی‌های زیست محیطی محسوب می‌شوند و در بیشتر موارد، آنالیز آن‌ها با انتقال آن‌ها به فاز گاز - بخار و سپس تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی انجام می‌شود.

به‌طور معمول آنالیز مواد فرار خالص، ساده است و مواد فرار به‌صورت مستقیم به داخل ستون دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق می‌شوند ولی چالش اصلی زمانی است که آنالیت از نمونه‌های جامد، غذا، پلیمر و مواد اولیه دارویی انتخاب شود. استخراج فضای فوقانی به دو دسته تقسیم می‌شود:

۱) استخراج فضای فوقانی ایستا[۲۶]؛

۲) استخراج فضای فوقانی پویا (پالایش و به دام انداختن)[۲۷].

استخراج فضای فوقانی ایستا

استخراج فضای فوقانی ایستا به‌عنوان فضای فوقانی تعادلی و یا به‌طور ساده، فضای فوقانی شناخته می‌شود. این روش بیشتر از سی سال است که در دسترس است. در این روش، استخراج شامل موارد زیر است:

- نمونه (چه جامد و چه مایع) درون یک ظرف قرار داده می‌شود؛
- ظرف نمونه به یک دما و فشار پایدار رسانده می‌شود و آنالیت‌های فرار به داخل فضای فوقانی ظرف کشیده می‌شوند؛
- هنگامی که غلظت آنالیت‌ها در فضای فوقانی به غلظت تعادلی رسید، ظرف به ابتدای ستون کروماتوگرافی گازی وصل می‌شود و سپس قسمتی از گاز فضای فوقانی برای شناسایی به کروماتوگرافی گازی انتقال داده می‌شود.

مزیت روش استخراج فضای فوقانی ایستا، سادگی اولیه آماده‌سازی نمونه‌هاست. به‌طور معمول در آنالیزهای کیفی، نمونه به‌صورت مستقیم داخل ظرف فضای فوقانی قرار داده می‌شود و آنالیز بدون هیچ آماده‌سازی اولیه‌ای انجام می‌شود ولی برای آنالیزهای کمی، لازم است که اثرات ماتریس نمونه بررسی شود تا حساسیت بالا و صحت خوبی در نتایج حاصل شود.

برای نمونه‌های جامد بزرگ ممکن است لازم باشد تا حالت فیزیکی نمونه تغییر یابد. این تغییر حالت به دو صورت امکان‌پذیر است. یکی اینکه نمونه به حالت پودری تغییر شکل دهد و دیگری اینکه نمونه در داخل مایعی غوطه‌ور شود. با خرد کردن نمونه جامد، مساحت سطح قابل دسترس جسم حل شده به‌منظور انتشار به داخل فضای فوقانی افزایش می‌یابد. از این رو، آنالیت بین فاز جامد و فضای فوقانی پخش می‌شود. ولی روش دوم، یعنی پخش کردن نمونه جامد به داخل مایع ارجح است زیرا فرآیند تقسیم آنالیت به فضای فوقانی سریع‌تر به حالت تعادل می‌رسد.

استخراج فضای فوقانی پویا (دمش و به دام انداختن)

به‌منظور آنالیز مقادیر کم یا زمانی که لازم است که استخراج آنالیت به‌طورکامل انجام شود، استفاده از روش استخراج فضای فوقانی پویا نسبت به ایستا ارجح‌تر است. این روش برای هر دو حالت نمونه جامد و مایع مورد استفاده قرار می‌گیرد و نمونه‌ها می‌توانند نمونه‌های زیستی، زیست محیطی، صنعتی، دارویی و کشاورزی باشند. در استخراج فضای فوقانی پویا، هیچ تعادلی بین غلظت آنالیت در فاز گازی و ماتریس وجود ندارد. در عوض، آنالیت‌ها با جریان گاز به‌طور مداوم از نمونه خارج می‌شوند. این عمل منجر به یک گرادیان غلظت بین دو فاز گازی و ماتریس نمونه و در نتیجه، سبب استخراج کامل آنالیت‌های فرار از ماتریس نمونه می‌شود.

مراحل اصلی در فرآیند دمش و به دام انداختن شامل موارد زیر است:

۱) نمونه به داخل ظرف دمش هدایت می‌شود؛

۲) دریچه دستگاه در حالت دمش تنظیم می‌شود و گاز

دمش (معمولا گاز هلیم) به‌طور متناوب (با سرعت حدود ۴۰ میلی‌لیتر بر دقیقه) از روی نمونه عبور می‌کند و ترکیبات آلی فرار را به داخل محفظه نگه‌دارنده که حاوی جاذب‌ها است، انتقال می‌دهد و در نهایت، گاز از دریچه دیگری تخلیه می‌شود. این مرحله تقریبا ۱۰ تا ۱۵ دقیقه طول می‌کشد؛

۳) بعد از مرحله دمش، در حالی که دمای محفظه در درجه حرارت محیط است، گاز هلیم به‌طور مستقیم و بدون عبور از میان نمونه از محفظه نگه‌دارنده عبور می‌کند. این مرحله که دمش خشک نامیده می‌شود و بیشتر بین ۱ یا ۲ دقیقه طول می‌کشد منجر به حذف آب متراکم شده در محفظه نگهدارنده می‌شود. سپس جریان گاز دمش قطع می‌شود و محفظه تا دمای ۵ الی ۱۰ درجه سانتی‌گراد پایین‌تر از دمای واجذب حرارت داده می‌شود. مرحله پیش گرمایی باعث می‌شود که عمل واجذب سریعتر انجام شود؛

۴) در مرحله بعد، محفظه نگهدارنده بین ۲۵۰ – ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد گرم می‌شود تا واجذب آنالیت به داخل ستون کروماتوگرافی گازی انجام شود. در این مرحله دریچه دستگاه در حالت واجذب تنظیم می‌شود. زمان واجذب بین ۱ تا ۴ دقیقه طول می‌کشد که این زمان وابسته به جریان گاز حامل در دستگاه کروماتوگرافی گازی است؛

۵) در مرحله پاک‌سازی محفظه نگهدارنده، بعد از مرحله واجذب، دریچه دوباره در موقعیت دمش قرار می‌گیرد و دمای محفظه نگهدارنده، در درجه حرارت واجذب یا ۱۵ درجه سانتی‌گراد بالاتر از آن برای ۷ تا ۱۰ دقیقه تنظیم می‌شود. هدف از این مرحله حذف آلاینده‌های ممکن است؛

۶) بعد از مرحله پاک‌سازی محفظه نگهدارنده، درجه حرارت محفظه نگهدارنده کاهش پیدا می‌کند و دستگاه برای نمونه بعدی آماده می‌شود. بدیهی است که در هر مرحله، عوامل و شرایط از جمله حرارت، زمان و شدت جریان گازها باید برای تمامی نمونه‌ها و استانداردهای کالیبراسیون یکسان باشد.

محفظه نگهدارنده یک تیوب فولادی زنگ‌نزن با قطر داخلی ۳ میلی‌متر و طول ۲۵ میلی‌متر است که با چندین لایه ماده جاذب پر شده‌است که توانایی انجام مراحل زیر را دارد:

۱. نمونه‌های آنالیت را جذب می‌کند و ناخالصی‌های ناشناخته را عبور می‌دهد؛

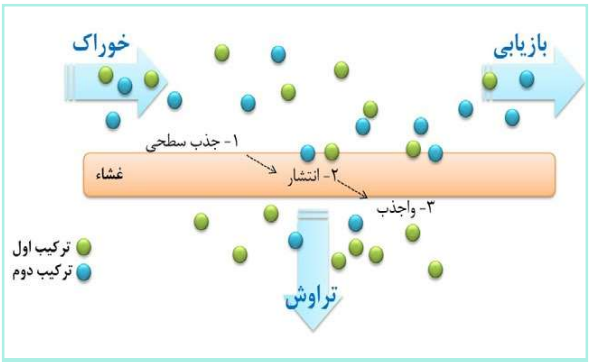
۲. امکان تزریق سریع آنالیت‌ها را به داخل ستون کروماتوگرافی گازی ایجاد می‌کند.

مواد جاذب به‌منظور افزایش ظرفیت جذب و نگهداری آنالیت‌ها، بیشتر به‌صورت لایه لایه تنظیم می‌شوند. در طول فرآیند دمش و به دام انداختن، گاز حامل در ابتدا جذب ضعیف‌تری انجام می‌دهد و مواد آلی فرار کمی را جذب می‌کند، اما بیشتر نمونه‌های فرار از این لایه‌ها عبور داده می‌شوند و با استفاده از این لایه‌ها که جاذب قوی‌تری هستند، جذب و تغلیظ می‌شوند.

خط انتقال بین محفظه نگهدارنده (جاذب) و ستون کروماتوگرافی گازی بیشتر از نیکل، سیلیکا و تیوب‌های فولاد ضد زنگ ساخته می‌شود. با استفاده از این مواد بی‌اثر سایت‌های فعالی که می‌توانند با آنالیت‌ها واکنش دهند، حذف می‌شوند. از طرف دیگر، خطوط انتقال برای جلوگیری از میعان آب و ترکیبات آلی فرار، در درجه حرارت بالاتر از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته می‌شوند [۷].

استخراج غشایی

در میان تنوع وسیع روش‌های جداسازی، استخراج غشایی یا عبور آنالیت‌ها از میان غشا روشی قوی برای تغلیظ، جداسازی و بازیابی آنالیت‌ها است. در این روش، مراحل جذب و واجذب با یکدیگر ترکیب شده و فرآیندی یک مرحله‌ای را تشکیل می‌دهند و به دلیل سادگی، ارزان بودن و بازده بالا، این روش نقش مهمی را در علم زیست‌شناسی، شیمی و جداسازی دارد. در استخراج غشایی، نمونه با یک طرف از غشا که به‌عنوان فاز خوراک (دهنده) شناخته می‌شود، در تماس است. سپس فاز غشایی به‌عنوان سدی انتخابی عمل می‌کند. آنالیت‌ها از میان فاز غشایی به سمت دیگرش که به‌عنوان فاز تراوش (نفوذی یا پذیرنده) شناخته می‌شود، عبور می‌کنند. تصویر استخراج غشایی در شکل (۲) نشان داده شده‌است.



شکل (۲): نمای استخراج غشایی [۷].

از مزایای استخراج غشایی این است که برای آنالیز آنلاین، یک غشا می‌تواند با یک دستگاه آنالیز نظیر کروماتوگرافی گازی یا طیف‌سنج جرمی کوپل شود. به‌طور مثال، یه غشا کوپل شده به طیف‌سنجی جرمی در محفظه خلا این دستگاه قرار داده می‌شود و آ لیت‌های نفوذ به‌طور مستقیم به داخل اتاق یونیزاسیون دستگاه طیف‌سنجی جرمی هدایت می‌شوند. در غشا کوپل شده با کروماتوگرافی گازی، یک جاذب بین غشا و کروماتوگرافی گازی قرار می‌گیرد، سپس آنالیت‌هایی که به داخل غشا نفوذ کرده‌اند با جریان گاز به سمت جاذب (جهت پیش تغلیظ) حمل می‌شوند. بعد از کامل شدن مرحله پیش تغلیظ، جاذب خیلی سریع گرم می‌شود و

آنالیت‌ها در اثر واجذب به داخل ستون کروماتوگرافی گازی تزریق می‌شوند.

تراوش تبخیری (تبخیر انتخابی مولکول‌های مایع) اصطلاحی است که به استخراج ترکیبات آلی فرار از یک ماتریس آبی به یک فاز گازی از طریق غشای نیمه تراوا، اتلاق می‌شود. به عبارت دیگر، تراوش تبخیری یک فرآیند غشایی است که نفوذ اجزا در غشای پلیمری با یک تغییر فاز از مایع به بخار همراه است. خوراک این فرآیند به‌صورت مایع بوده و هنگامی که در تماس با سطح غشا قرار می‌گیرد، به علت فشارهای پایین در سمت دیگر، اجزا در غشا نفوذ می‌کنند و با توجه به متفاوت بودن سرعت نفوذ، جداسازی مخلوط خوراک صورت می‌گیرد.

انواع مدل‌های غشا

غشاها براساس ساختارشان به دو نوع متخلخل و غیرمتخلخل و براساس شکل هندسی خود به دو نوع ورق مسطح و الیاف توخالی تقسیم می‌شوند. غشاهایی که در روش جداسازی تراوش تبخیری (یا جذب به وسیله گازها) به کار می‌روند بیشتر غشاهای آب‌گریز و سیلیکونی غیرمتخلخل (پلی‌دی‌متیل سیلوکسان) هستند. آنالیت‌های آلی، داخل غشا حل و استخراج می‌شوند در حالی که آلاینده‌های آبی از طریق غشا غیرقابل استخراج هستند. غشاهایی با منافذ میکرو در تراوش تبخیری به‌طور معمول از پلی‌پروپیلن، سلولز یا تفلون ساخته می‌شوند. مشکل این غشاها این است که اجازه عبور مقادیر زیاد آب را می‌دهند که باید قبل از ورود به داخل دستگاه آنالیز حذف شود.

غشاهای ورقه‌ای شبیه برگه‌های کاغذ صاف و هموار هستند و ضخامتی کمتر از ۱ میلی‌متر دارند. در غشاهایی که به‌صورت الیاف توخالی هستند قطر داخلی ۵۰۰-۲۰۰ میلی‌متر است. مزیت برتر الیاف توخالی، مساحت سطح بزرگتر در واحد حجم و تراکم بالای بسته‌بندی آن‌هاست یعنی شمار زیادی از الیاف می‌توانند داخل یک حجم کوچکی متراکم و بسته‌بندی شوند.

بهبود استخراج غشایی

چندین عامل بر عملکرد و حساسیت استخراج از طریق غشا تاثیرگذار است. از جمله دما، مساحت سطح غشا، ضخامت غشا، شکل هندسی، حجم نمونه و شدت جریان نمونه که در شرایط خاصی باید بهینه شوند. درجه حرارت بالا دو اثر متضاد و برعکس روی عملکرد استخراج دارد. از یک طرف دمای بالا با افزایش ضریب انتشار، انتقال جرم را آسان می‌کند ولی از طرف دیگر، ضریب تقسیم آنالیت در غشا را کاهش می‌دهد. بنابراین، درجه حرارت غشا باید کنترل شده باشد تا از نوسان بازده و حساسیت استخراج جلوگیری شود. از دیگر عوامل موثر، ضخامت غشا است. انتقال سریع جرم با استفاده از غشاهای نازک بدست می‌آید و در مورد فیبرهای توخالی، استفاده از فیبرهای طویل و تعداد زیاد، بهتر است. همچنین استفاده از حجم بالای نمونه منجر به حساسیت بالای استخراج می‌شود. اگر چه حجم زیاد نمونه، استخراج لانی‌تری را در پی دارد اما شدت جریان کم نمونه عملکرد استخراج را افزایش می‌دهد.

استخراج با آب فوق داغ

هنگامی که حرارت آب مایع بین ۱۰۰ تا ۳۷۴ درجه سانتی‌گراد در معرض فشار افزایش می‌یابد، قطبیت آن به‌طور چشمگیری کاهش پیدا می‌کند و بنابراین به‌عنوان یک حلال استخراج برای دامنه وسیعی از آنالیت‌ها به کار برده می‌شود. از کاربردهای جذاب این حلال می‌توان به آنالیز هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای[۲۸]، بی‌فنیل‌های چند کلره[۲۹] و سموم دفع آفات از نمونه‌های زیست محیطی اشاره کرد. اگر چه این روش نتایج قابل مقایسه‌ای با استخراج سوکسله می‌دهد اما در این روش، هم مصرف حلال‌های آلی کاهش چشمگیری دارد و هم زمان استخراج خیلی کوتاه‌تر می‌شود. از دیگر کاربردهای آب فوق داغ، استخراج اسانس‌ها از مواد گیاهی است، به طوری که با این روش، ترکیبات اکسیژن‌دار طبیعی بسیار مهم، بیشتر از روش تقطیر با بخار استخراج می‌شوند. در بسیاری موارد، استخراج آب فوق داغ تمیزتر، سریع‌تر و ارزان‌تر از روش‌های استخراج مرسوم است [۱۰].

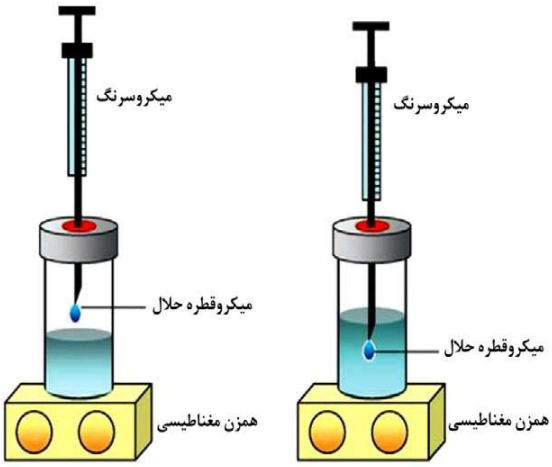
فشاری که برای نگه‌داری حالت متراکم آب مورد نیاز است در حالت تعادل در ۲۰۰ °C، ۱۵ بار و در ۳۰۰ °C، ۸۵ بار است. در هر فشاری، اگر فشار به پایین‌تر از نقطه جوش آب مایع برسد، بخار فوق داغ تولید می‌شود. این حالت فوق داغ، ثابت دی‌الکتریک پایین‌تری از حالت مایع دارد و همچنین خواص ویسکوزیته و سرعت انتشاری شبیه به گاز دارد. در نتیجه آب فوق داغ رفتار کاملا متفاوتی از یک حلال مایع استخراج دارد.

میکرواستخراج تک قطره

میکرواستخراج تک قطره، به‌منظور اندازه‌گیری مقادیر بسیار کم نمونه‌های آلی و معدنی، رشد چشمگیری داشته است. در این روش، یک میله تفلونی (یا میله یک سرنگ) با یک شکاف کروی در انتهای آن، با ۸ میکرولیتر از یک حلال آلی (n-اکتان) که حاوی استاندارد داخلی (n-دودکان) است، پر می‌شود و در نمونه آبی که در یک ظرف ۱ میلی‌لیتری به مدت زمان مشخصی هم‌زده شده، غوطه‌ور می‌شود. سپس لوله تفلون از محلول خارج و با یک سرنگ کروماتوگرافی گازی، یک میکرولیتر از ماده استخراجی از انتهای لوله تفلون به‌منظور آنالیز به داخل ستون کروماتوگرافی گازی تزریق می‌شود [۱۱]. سرعت هم‌زدن فاز آبی حاوی آنالیت بر سرعت استخراج و یکنواختی محلول استخراجی تاثیر دارد. روش میکرواستخراج تک قطره با روش میکرواستخراج فاز جامد، از نظر سرعت، دقت و حساسیت قابل مقایسه

است. اما روش میکرواستخراج تک قطره هم ارزان‌تر است و هم پیک‌های باریک‌تری نسبت به میکرواستخراج فاز جامد به‌دست می‌دهد؛ زیرا در میکرواستخراج تک قطره، تبخیر حلال نسبت به واجذب آنالیت از فیبر موجود در میکرواستخراج فاز جامد سریع‌تر انجام می‌شود. استفاده از یک سرنگ کروماتوگرافی گازی (هامیلتون) به جای میله تفلونی، می‌توانند مشکلات مربوط به پر کردن میله تفلونی را نیز حذف کند. بنابراین، بعد از فرآیند استخراج، می‌توان ۱ میکرولیتر از ماده استخراجی را دوباره به داخل سرنگ کشید و به ستون کروماتوگرافی گازی تزریق کرد.

دو نوع میکرواستخراج تک قطره وجود دارد: میکرواستخراج تک قطره غوطه‌وری مستقیم[۳۱] و میکرواستخراج تک قطره فضای فوقانی[۳۲] که نمای آن‌ها در شکل (۳) نشان داده شده‌است.



شکل (۳): نمای دو نوع میکرو استخراج تک قطره [۷].

میکرواستخراج تک قطره غوطه‌وری مستقیم فقط برای نمونه‌های مایع حاوی آنالیت‌های غیرقطبی و کم قطبی به کار می‌رود. برای ثابت نگه داشتن قطره حلال در طول فرآیند استخراج، هر گونه مواد نامحلول در نمونه باید حذف شود و یک حلال مناسب آلی با کمتر حلالیت در آب، نقطه جوش بالا و شباهت ساختاری نزدیک به آنالیت، انتخاب شود. گرچه در یک سرعت همزدن متعادل نباید قطره خارج شود، با این حال روش فضای فوقانی به دلیل همخوانی بیشتر با روش کروماتوگرافی گازی و همچنین استفاده از حلال غیرقابل امتزاج با آب بیشتر محبوب است. تحقیقات نشان می‌دهد n-اکتان و تولوئن بهترین عملکرد استخراج برای ترکیبات غیرقطبی را دارند در حالی که کلروفرم بیشتر برای استخراج آلکالوئیدهای قطبی به کار می‌رود [۱۱].

تحقیقات نشان داده‌اند که مایعات یونی به دلیل نقطه جوش و ویسکوزیته بالا، نسبت به حلال‌های آلی پایداری بیشتری دارند که باعث می‌شود قطره بزرگتر و پایدارتری تولید شود. به دلیل غیرفرار بودن مایعات یونی، کروماتوگرافی گازی روش مناسبی برای آنالیز نمونه‌های این چنینی نیست و به‌طور معمول از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به‌منظور آنالیز استفاده می‌شود.

میکرواستخراج تک قطره فضای فوقانی دو مزیت ویژه نسبت به میکرواستخراج فاز جامد فضای فوقانی دارد. اول اینکه تنوع انتخاب حلال‌ها بیشتر و دوم، ارزان بودن حلال‌ها است (به‌طور تقریبی چند میکرولیتر که در مقایسه با فیبرهای مرسوم در میکرواستخراج فاز جامد فضای فوقانی خیلی ناچیز است). با این حال، استفاده از میکرواستخراج تک قطره فضای فوقانی برای آنالیز مشکل است؛ زیرا به حلال‌هایی با نقطه جوش بالا نیاز است و چون حلال‌های مناسب برای کروماتوگرافی گازی باید فشار بخار بالا و نقطه جوش پایین داشته باشند محدودیت استفاده از این حلال‌ها وجود دارد. بنابراین، انتخاب حلال مناسب اولین تصمیم در روش میکرواستخراج تک قطره فضای فوقانی است.

روش‌های تغلیظ نمونه برا کاهش حجم حلال

از آنجایی که آنالیت‌ها در طول فرآیند استخراج با استفاده از حجم زیادی از حلال‌ها ر یق می‌شوند، برای آنالیز با دستگاه‌هایی نظیر کروماتوگرافی گازی باید تغلیظ صورت گیرد. اگر مقدار حلالی که باید حذف شود زیاد نباشد و آنالیت‌ها غیرفرار باشند، حلال می‌توانند با عبور جریان آرام گاز نیتروژن تبخیر شود. اگر مقدار حلال حذفی زیاد باشد از یک تبخیر کننده چرخان و در خلا استفاده می‌شود. باید دقت شود که تبخیر حلال تا قبل از خشک شدن کامل نمونه متوقف شود.

روش‌های پاک‌سازی

پاک‌سازی نمونه به ویژه برای آنالیز با دستگاه‌هایی مانند GC، HPLC و الکتروفورز اهمیت ویژه‌ای دارد. بیشتر مخلوط‌های جامد مثل خاک، مواد زیست محیطی و محصولات طبیعی شامل صدها ماده مزاحم با غلظتی بالاتر از غلظت آنالیت‌ها هستند. بنابراین، مرحله پاک‌سازی مرحله‌ای حیاتی برای جداسازی مقادیر خیلی کم آنالیت‌ها از این مواد مزاحم است. از طرف دیگر، بسیاری از موادی که نقطه جوش بالایی دارند مشکلات متنوعی از جمله جذب آنالیت در قسمت تزریق و یا در قسمت ابتدایی ستون‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی مایع را باعث می‌شوند که سبب مشاهده خطاهای منفی و مثبت در زمان بازداری آنالیت می‌شود.

کروماتوگرافی ژل تراوشی[۳۳] یک روش جداسازی براساس

فصلنامه تخصصی دانش آزمایشگاهی ایران
سال هشتم ■ شماره ۲ ■ تابستان ۱۳۹۹ ■ شماره پیاپی ۳۰

اندازه است که با استفاده از حلال‌های آلی (یا بافرها) و ژل‌های متخلخل، ماکرومولکول‌های بزرگ‌تر از آنالیت مورد نظر را جداسازی می‌کند. کروماتوگرافی ژل تراوشی برای حذف لیپیدها، پروتئین‌ها، پلیمرها، کوپلیمرها، رزین‌های طبیعی، اجزاء سلولی، ویروس‌ها و استروئیدها از نمونه به کار می‌رود. این روش هم برای آنالیت‌های قطبی و هم برای آنالیت‌های غیرقطبی به کار می‌رود [۲]. از طرف دیگر، کروماتوگرافی ژل تراوشی به‌طور معمول برای حذف مواد با نقطه جوش بالا که در محفظه تزریق یا ابتدای ستون کروماتوگرافی گازی میعان می‌کنند نیز استفاده می‌شود [۱۲].

پاک‌سازی تقسیمی اسید - باز[۳۴]، یک روش استخراج مایع - مایع است که به‌منظور جداسازی اسیدهایی نظیر اسیدهای آلی و فنول‌ها از آنالیت‌های خنثی یا بازی مثل آمین‌ها، هیدروکربن‌های آروماتیک و ترکیبات آلی هالوژن‌دار با استفاده از تنظیم pH صورت می‌گیرد. همچنین این روش برای پاک‌سازی پسماندهای نفتی پیش از آنالیز نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲].

کارتریج استخراج فاز جامد (SPE) نیز یک کروماتوگرافی ستونی سنتی است که برای جداسازی نمونه‌های زیستی، بالینی و محیطی به کار می‌رود که یکی از نمونه‌های کاربردی استخراج فاز جامد، جداسازی باقیمانده سموم دفع آفات و هیدروکربن‌های کلردار از مواد غذایی است.

مشتق‌سازی ترکیبات مورد آنالیز

کروماتوگرافی گازی ترکیبات فرار یا غیرقطبی به‌طور معمول بدون مشتق‌سازی نمونه انجام شود. در واقع مشتق‌سازی ترکیباتی نظیر هیدروکربن‌ها یا هیدروکربن‌های هالوژن‌دار به آسانی انجام نمی‌شود. هر چند برخی از ترکیبات قطبی مانند کربوکسیلیک اسیدها یا آمین‌ها را می‌توان بدون ستون‌سازی و با استفاده از ستون‌های قطبی کروماتوگرافی گازی که بر پایه پلی‌اتیلن گلیکول هستند، انجام داد ولی مشتق‌سازی در بسیاری از موارد بسیار سودمند است. از جمله مزایای مشتق‌سازی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- افزایش فراریت و کاهش قطبیت ترکیبات قطبی؛
- پایدار کردن ترکیباتی که در درجه حرارت‌های کروماتوگرافی گازی، ناپایدار هستند؛
- ناشناخته با توجه به تعداد و نوع گروه‌های مشتق شده؛
- بهبود رفتار ترکیبات نسبت به آشکارسازهای انتخابی نظیر آشکارساز رباییش الکترون، آشکارساز انتخابی نیتروژن و آشکارساز طیف‌سنجی جرمی.

با این حال موانع زیادی در استفاده از فرآیند مشتق‌سازی قبل از آنالیز با کروماتوگرافی گازی وجود دارد که عبارتند از:

- عامل مشتق‌ساز ممکن است به راحتی از محیط واکنش جدا نشود و در آنالیز نمونه به‌خصوص زمانی که خلوص ترکیبات با کروماتوگرافی گازی مورد بررسی قرار می‌گیرد، اخلال ایجاد کند؛
- شرایط مشتق‌سازی ممکن است تغییرات شیمیایی غیرعمدی را در ترکیبات باعث شود مانند آب‌زدایی؛
- مرحله مشتق‌سازی زمان مورد نظر برای آنالیز را افزایش می‌دهد.

براساس دلایل ذکر شده، کروماتوگرافی گازی بهمراه مشتق‌سازی در کاربردهای تعیین کیفیت کمتر به کار می‌رود؛ به‌خصوص زمانی که قرار است خلوص یک ماده یا یک جزء در یک فرمولاسیون تعیین شود.

واکنش‌های مشتق‌سازی بیشتر واکنش‌های ساده شیمیایی هستند که تقریبا بازده کامل دارند مانند آسیل‌دار شدن، آلکیل‌دار شدن و سیلیل‌دار شدن. در واکنش سیلیل‌دار شدن خیلی از مشتقات مانند تری‌متیل سیلیل[۳۵] و ترشیوبوتیل دی‌متیل سیلیل[۳۶] می‌توانند از گروه‌های عاملی متنوعی نظیر هیدروکسیل، کربوکسیلیک، آمین، آمید، تیول، فسفات، هیدروکسید و سولفونیک تهیه شوند. در فرآیند آسیل‌دار شدن، تشکیل استات آنالیت‌ها از معرف‌های مشتق‌ساز متنوعی مانند استیک انیدرید، تری فلوئوروستیک انیدرید[۳۷]، پنتافلوئورو پروپیونیک انیدرید[۳۸] و هپتافلوئورو بوتیل انیدرید[۳۹] تهیه می‌شود. واکنش‌های آلکیل‌دار شدن به‌منظور مشتق‌سازی کربوکسیلیک اسیدها، آمین‌ها، سولفونیک اسیدها، فسفونیک اسیدها، فسفات‌ها، باربیتورات‌ها، یوراسیل‌ها، پورین‌ها، پنی‌سیلین‌ها، تیول‌ها و آنیون‌های معدنی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱۳].

نتیجه‌گیری

روش‌های بسیاری برای آماده‌سازی نمونه‌های فرار قبل از آنالیز دستگاهی وجود دارند. امروزه هنوز روش‌های قدیمی نظیر دمش و به دام انداختن، استخراج فضای فوقانی ایستا و استخراج مایع - مایع مهم‌ترین نقش را در آنالیز شیمیایی انواع نمونه‌ها دارند. روش‌های جدید مانند میکرواستخراج فضای فاز جامد و استخراج غشایی، مزایای زیادی از جمله قابلیت خودکار شدن، تنوع نمونه‌ها و کاهش مصرف حلال دارند. بنابراین، مهمترین و اولین اقدام در آنالیز یک نمونه، انتخاب بهترین روش آماده‌سازی نمونه است.

پی‌نوشت

۱. دکتری شیمی آلی، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
۲. کارشناس ارشد شیمی آلی، پژوهشگاه شیمی و مهندسی شیمی ایران
۳. کارشناس ارشد شیمی آلی، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
۴. عضو کارگروه تخصصی کروماتوگرافی

5. Gas chromatography (GC)
6. Relative standard deviation (RSD)
7. Limit of detection (LOD)
8. Limit of quantitation (LOQ)
9. Limit of Linearity LOL)
10. Light Dependent Resistor (LDR)
11. Solid-phase extraction (SPE)
12. Liquid–liquid extraction (LLE)
13. Solid-phase microextraction (SPME)
14. Small-diameter fused silica fiber
15. High Performance Liquid Chromatography HPLC)
16. Headspace
17. Polydimethylsiloxane (PDMS)
18. Carbowax-divinylbenzene (CW-DVB)
19. Molecularly imprinted polymer (MIP)
20. Stir bar sorptive extaction (SBSE)
21. Franz Ritter von Soxhlet
22. Ultra-sonic extraction (USE)
23. Supercritical fluid extraction (SFE)
24. Accelerated solvent extraction (SE)
25. Microwave-assisted extraction (MAE)
26. Static headspace extraction (SHE)
27. Dynamic headspace extraction (purge and trap)
28. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)
29. Polychlorinated biphenyls (PCBs)
30. Single drop micro extraction (SDME)
31. Direct immersion single drop micro extraction (DI-SDME)
32. Headspace single drop micro extraction (HS-SD-ME)
33. Gel permeation chromatography (GPC)
34. Acid-base partition cleanup
35. Trimethylsilyl (TMS)
36. tert-Butyldimethylsilyl (TBDMS)
37. Trifluoroacetic anhydride (TFAA)
38. Pentafluoropropionic anhydride (PFPA)
39. Heptafluorobutyl anhydride (HFBA)

مراجع

[1] Smith, R.M., Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. Journal of chromatography A, 2003. 1000(1-2): p. 3-27.

[2] Mitra, S., Sample preparation techniques in analytical chemistry. Vol. 237. 2004: John Wiley & Sons.

[3] Handley, A.J., Extraction methods in organic analysis. 1999: Sheffield Academic Press UK.

[4] Pawliszyn, J., Solid phase microextraction: theory and practice. 1997: John Wiley & Sons.

[5] Snow, N.H., Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. Journal of chromatography A, 2000. 885(1-2): p. 445-455.

[6] Fritz, J.S. and M. Macka, Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis. Journal of Chromatography A, 2000. p. 137-166.

[7] Falaki, F., Sample Preparation Techniques for Gas Chromatography, in Gas Chromatography-Derivatization, Sample Preparation, Application. 2019, IntechOpen.

[8] Djozan, D. and T. Baheri, Preparation and evaluation of solid-phase microextraction fibers based on monolithic molecularly imprinted polymers for selective extraction of diacetylmorphine and analogous compounds. Journal of chromatography A, 2007. 1166(1-2): p. 16-23.

[9] Rissato, S.R., et al., Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. Journal of Chromatography A, 2004. 1048(2): p. 153-159.

[10] Smith, R.M., Extractions with superheated water. Journal of Chromatography A, 2002. 975(1): p. 31-46.

[11] Jain, A. and K.K. Verma, Recent advances in applications of single-drop microextraction: a review. Analytica chimica acta, 2011. 706(1): p. 37-65.

[12] Pang, G.-F., et al., Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 2006. 1125(1): p. 1-30.

[13] Drozd, J., Chemical derivatization in gas chromatography. 1986: Elsevier.