

## میکرواستخراج مایع-مایع پخشی براساس مایع‌های یونی / استخراج برگشتی همراه با سوانگاری مایع با کارایی بالا برای پیش‌تغلیظ و تعیین مقدار ۳- ایندول بوتیریک اسید در نمونه‌های گیاه نخود

لیلا شیخیان<sup>۱\*</sup>، سیده یاسمین کاظمینی<sup>۲</sup>

- ۱- استادیار شیمی تجزیه، گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران
- ۲- کارشناسی ارشد فیتوشیمی، گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران

دریافت: شهریور ۱۳۹۶، بازنگری: اسفند ۱۳۹۶، پذیرش: فروردین ۱۳۹۷

**چکیده:** میکرواستخراج مایع-مایع پخشی براساس مایع‌های یونی همراه با سوانگاری مایع با کارایی بالا برای استخراج، پیش‌تغلیظ و تعیین ۳- ایندول بوتیریک اسید در نمونه‌های گیاه نخود به‌کاربرده شد. اثر بعضی از عامل‌ها مانند ساختار شیمیایی مایع یونی، قدرت اسیدی محلول نمونه، دما، مدت استخراج، مدت جداسازی با گریزانه، حجم مایع یونی و حجم محلول آبی نمونه حاوی ۳- ایندول بوتیریک اسید بر مقدار استخراج موردبررسی قرار گرفتند. همچنین، استخراج برگشتی ۳- ایندول بوتیریک اسید از فاز مایع یونی به محلول آبی بازی موردبررسی قرار گرفت. عامل پیش‌تغلیظ به‌دست آمده در این روش ۴۰ بود. گستره خطی منحنی واسنجی از  $10^{-2}$  تا  $30/4 \times 38/6$  میلی‌گرم بر لیتر ۳- ایندول بوتیریک اسید به‌دست آمد. حد تشخیص این روش  $10^{-2} \times 29/3$  میلی‌گرم بر لیتر بود. انحراف استاندارد نسبی روش پیشنهادی موردنظر برای استخراج ۳- ایندول بوتیریک اسید با غلظت  $20/3$  میلی‌گرم بر لیتر برابر با ۱/۸٪ محاسبه شد. هر فاز مایع یونی به‌کاربرده شده برای استخراج ۳- ایندول بوتیریک اسید حداقل برای سه مرتبه از فرایند استخراج و استخراج برگشتی قابل استفاده بود. روش پیشنهادشده در این پژوهش برای استخراج ۳- ایندول بوتیریک اسید موجود در گیاه نخود به‌کاربرده شد.

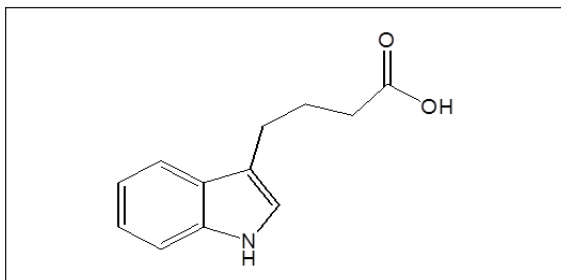
**واژه‌های کلیدی:** ۳- ایندول بوتیریک اسید، مایع یونی، میکرواستخراج مایع-مایع پخشی، سوانگاری مایع با کارایی بالا، گیاه نخود

### مقدمه

تهیه‌شده به‌نام ۳- ایندول بوتیریک اسید (IBA) توانایی تحریک ریشه‌زایی را داشته و حتی مؤثرتر از IAA عمل می‌کند [۴ و ۵]. افزون بر این، می‌توان از طریق به‌کاربردن IBA در خاک، قلمه‌ها یا برگ گیاهان تزئینی و خوراکی، رشد آن‌ها را بهبود بخشید. این کاربردها باعث افزایش استفاده از IBA به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد

آکسین‌ها هورمون‌های رشد گیاهی هستند که در بسیاری از فعالیت‌های گیاهان نقش اساسی دارند [۱ و ۲]. نخستین آکسین شناخته‌شده که توانایی تحریک کردن ریشه‌زایی طبیعی گیاهان را دارد، ۳- ایندول استیک اسید (IAA) است [۳]. همچنین، هورمون

با قابلیت استفاده دوباره در روش‌های استخراج و جداسازی [۲۳ تا ۲۶] مانند استخراج مایع-مایع بخشی براساس مایع‌های یونی به کار برده می‌شوند [۲۷ تا ۳۱]. در این پژوهش، مایع‌های یونی به‌عنوان حلال استخراج‌کننده برای استخراج IBA (شکل ۱) از گیاه نخود و پیش‌تغلیظ آن با استفاده از روش میکرواستخراج مایع-مایع بخشی برپایه مایع‌های یونی به کار گرفته شده‌اند.



شکل ۱ ساختار شیمیایی ۳-ایندول بوتیریک اسید

### بخش تجربی

واکنشگرها و مواد شیمیایی مورد استفاده

۱- بوتیل - ۳- متیل ایمیدازولیم هگزافلوروسفات، ۱- هگزیل - ۳- متیل ایمیدازولیم هگزافلوروسفات، ۱- اکتیل - ۳- متیل ایمیدازولیم هگزافلوروسفات، ۳- ایندول بوتیریک اسید، متانول و استیک اسید (برای استفاده در دستگاه سوانگاری مایع با کارایی بالا)، آب یون زوده و سایر ترکیب‌های شیمیایی از شرکت‌های شیمیایی مرک (Merck) یا فلوکا (Fluka) تهیه شده و بدون خالص‌سازی بیشتر به کار برده شدند.

دستگاه‌های مورد استفاده

ثبت طیف‌های جذبی فرابنفش - مرئی در حضور حلال شاهد در دمای اتاق با دستگاه Perkin Elmer Precisely lambda 25 UV/Vis spectrometer و اندازه‌گیری‌های pH با pH سنج مدل SCHOTT lab 850 انجام شد. آزمون‌های مربوط به سوانگاری مایع با کارایی بالا با دستگاه Agilent technologies 1200 series با

گیاه در سراسر دنیا شد [۶]. همچنین، IBA به‌صورت طبیعی در بعضی از گیاهان مانند آرابیدوپسیس، گیاه نخود، ذرت و توتون وجود دارد [۷ تا ۹]. ۳-ایندول بوتیریک اسید با روش‌هایی مانند الکتروفورز موئینه، سوانگاری گازی-طیف‌سنجی جرمی<sup>۱</sup> و سوانگاری مایع با کارایی بالا در نمونه‌های گیاهی متفاوت شناسایی شده است [۱۰ تا ۱۳]. از مشکلات بعضی از این روش‌ها می‌توان به ضرورت مراحل متفاوت خالص‌سازی نمونه اشاره کرد. در مورد سوانگاری گازی-طیف‌سنجی جرمی، چندین مرحله آماده‌سازی مورد نیاز برای مشتق‌سازی باعث ایجاد خطاهایی در آزمون نمونه شده و آزمون را بسیار وقت‌گیر می‌کند. به‌تازگی میکرواستخراج مایع-مایع بخشی به دلیل دارا بودن بعضی از مزایا مانند سادگی، سرعت، حجم کم نمونه، هزینه ناچیز، بازدهی خوب و عامل پیش‌تغلیظ بالا به‌عنوان یک روش میکرواستخراج جدید برای کاربردهای زیست-محیطی و تجزیه‌ای معرفی شده است. اما به کارگیری حلال‌های آلی سمی مانند کربن تتراکلرید، کلروبنزن، تولوئن، سیکلوهاگزان و کلروفرم در این روش از معایب آن شمرده می‌شود [۱۴ تا ۱۶]. چندین روش میکرواستخراج مایع-مایع بخشی معرفی شده است که در آن‌ها انرژی جنبشی جایگزین حلال پاشنده شده است. به کارگیری جریان هوا [۱۷]، تزریق شدید حلال [۱۸]، امواج فراصوتی [۱۹] و هم‌زدن مغناطیسی [۲۰ و ۲۱] در این روش‌ها موجب عدم به کارگیری حلال‌های آلی به‌عنوان حلال پاشنده شده است. با این وجود حذف حلال پاشنده آلی، فاز استخراج‌کننده همچنان یک حلال آلی است. مایع‌های یونی به دلیل ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بی‌ماندشان مانند پایداری گرمایی و شیمیایی خوب، فراریت قابل چشم‌پوشی، غیرقابل اشتعال بودن، پنجره پتانسیل الکتروشیمیایی گسترده، گرانروی قابل تنظیم، محدوده گسترده دمایی که می‌توانند به حالت مایع باشند، قابلیت حلال پوشی زیاد برای ترکیب‌های آلی و معدنی، کاربردهای قابل توجهی به‌عنوان حلال‌های مناسب از نظر محیط زیستی دارند [۲۲]. مایع‌های یونی جایگزین مناسبی برای حلال‌های آلی هستند و به‌عنوان حلال‌های استخراج‌کننده

1. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

میکروالیاف شیشه‌ای صاف شده و پس از تنظیم pH و قدرت یونی، مراحل استخراج، استخراج برگشتی، HPLC و تعیین IBA در شرایط بهینه آزمایشگاهی انجام شد.

### نتیجه‌ها و بحث

#### آزمایش‌های اولیه

بر پایه آزمایش‌های اولیه مشخص شد که میکرواستخراج مایع-مایع پخشی براساس مایع‌های یونی یک روش مناسب برای استخراج IBA به مایع‌های یونی ایمیدازولیمی  $[C_n \text{mim}][PF_6]$  به عنوان حلال‌های استخراج‌کننده است. از آنجاکه مولکول‌های IBA دارای جذب قوی در ناحیه فرابنفش هستند ( $\lambda_{\max} = 280 \text{ nm}$ )، مراحل بهینه‌سازی با استفاده از روش طیف‌سنجی فرابنفش-مرئی انجام شد.

#### اثر ساختار شیمیایی مایع‌های یونی بر مقدار استخراج IBA

به منظور بررسی کارایی مایع‌های یونی برای استخراج IBA با روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی بر پایه مایع‌های یونی، سه مایع یونی ایمیدازولومی  $[C_6 \text{mim}][PF_6]$ ،  $[C_4 \text{mim}][PF_6]$  و  $[C_8 \text{mim}][PF_6]$  به کار گرفته شد. از آنجاکه  $[C_6 \text{mim}][PF_6]$  طی گرمادهی و تکان دادن شدید، به راحتی حل شد و طی سرد کردن به خوبی به صورت قطره‌های ریزی در فاز آبی پخش می‌شد، بهترین بازدهی برای استخراج IBA از محلول‌های آبی را داشت. مایع یونی  $[C_4 \text{mim}][PF_6]$  به راحتی در مرحله گرمادهی/تکان دادن شدید در فاز آبی حل می‌شد اما پخش شدن آن به صورت قطره‌های بسیار ریز طی مرحله سرد کردن به خوبی انجام نمی‌شد. مایع یونی  $[C_8 \text{mim}][PF_6]$  هم برای استخراج IBA مناسب نبود زیرا در مرحله گرمادهی/تکان دادن شدید، حلالیت بسیار ناچیزی در فاز آبی داشت [۲۸]. لازم به یادآوری است بررسی‌های پیشین نشان داده‌اند که حلالیت مایع‌های یونی مورد بررسی در آب به ترتیب به صورت  $[C_4 \text{mim}][PF_6] < [C_6 \text{mim}][PF_6] < [C_8 \text{mim}][PF_6]$  است که با مشاهده‌های بالا همخوانی دارد [۲۹].

ستون XDB C18 ( $4.6 \times 150$  میلی‌متر، ۵ میکرومتر) انجام گرفت.

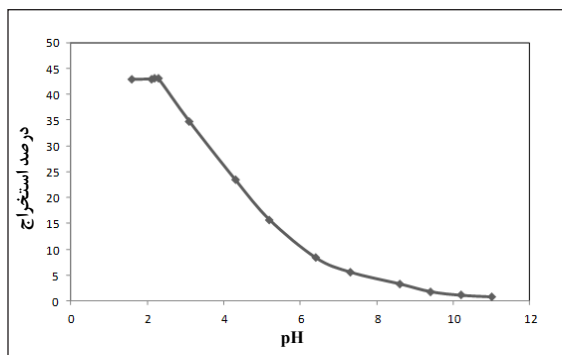
#### چگونگی انجام فرایند میکرواستخراج مایع-مایع پخشی بر پایه مایع‌های یونی و استخراج برگشتی IBA

در یک لوله آزمایش شیشه‌ای مخروطی شکل ۱۰ میلی‌لیتری، محلول‌های آبی حاوی IBA در تماس با ۱۵۰ میکرولیتر از مایع یونی به عنوان فاز استخراج‌کننده قرار گرفتند. به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۷ درجه سانتی‌گراد گرمادهی و به مدت ۱ دقیقه به شدت تکان داده شدند. پس از این مرحله، لوله آزمایش به مدت ۱۵ دقیقه در حمام یخ سرد شد تا یک محلول کدر به دست آید. این محلول به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه گریزانده<sup>۱</sup> قرار داده شد. فاز آبی (فاز بالا) خارج شد و فاز مایع یونی (فاز پایین) برای استخراج برگشتی در تماس با ۰.۵ میلی‌لیتر از محلول بافر فسفات  $10^{-2} \times 5.0$  مولار با pH برابر با ۱۰ قرار گرفت و با همزن مغناطیسی با شدت (۵۰۰ rpm) به مدت ۱۲۰ دقیقه هم‌زده شد. پس از این مرحله، با دستگاه گریزانده، دو فاز با دقت از هم جدا شدند و فاز آبی حاوی IBA، بدون هیچ مرحله آماده‌سازی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آن خلأ خشک و در ۵۰ میکرولیتر متانول حل شد. سپس، به ستون دستگاه سوانگاری مایع با کارایی بالا تزریق شد و با فاز متحرک ۱٪ آب-استیک اسید / متانول (۵۰:۵۰، V/V) با سرعت جریان ۰.۵ میلی‌لیتر بر دقیقه شسته می‌شد.

#### آماده سازی نمونه

برای استخراج IBA از گیاه نخود، دانه‌های نخود (*pisum sativum*) به مدت ۲۴ ساعت در آب شهر خیسانده شده و سپس، در یک گلدان حاوی خاک باغچه کاشته شدند. پس از ۱۰ روز جوانه‌های تازه گیاه نخود چیده شدند و به قسمت‌های خیلی کوچک خرد شده و به منظور استخراج عصاره در محلول بافر فسفات  $10^{-2} \times 5.0$  مولار (pH=7) به مدت ۱ ساعت در تاریکی قرار داده شدند [۱]. عصاره به دست آمده با استفاده از یک صافی

1. Centrifuge



شکل ۲ اثر pH محلول آبی نمونه (محلول‌های آبی نمونه: قسمت‌های ۶،۰ میلی‌لیتری از محلول IBA با غلظت ۲۰،۳ میلی‌گرم بر لیتر حاوی بافر فسفات ۰،۰۲ مول بر لیتر، حجم مایع یونی: ۵۰ میکرولیتر، دما: ۷۵ درجه سانتی‌گراد، مدت گرمادهی، سرد کردن و جداسازی با گریزانه به ترتیب ۵، ۱۵ و ۱۵ دقیقه)

#### اثر قدرت یونی

به منظور بررسی اثر قدرت یونی، قسمت‌های ۶،۰ میلی‌لیتری از محلول ۲۰،۳ میلی‌گرم بر لیتر IBA با pH برابر با ۲،۲ و حاوی بافر فسفات با غلظت‌های متفاوتی در گستره ۰،۰۰۵ تا ۰،۱ مول بر لیتر، به‌طور جداگانه به ۵۰ میکرولیتر از مایع یونی در لوله آزمایش افزوده، در حمام آب گرم ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه گرم و به مدت ۱ دقیقه به‌شدت تکان داده شدند. پس از مرحله سرد شدن و جداسازی با گریزانه، فاز آبی جدا و مقدار IBA باقی‌مانده در آن اندازه گرفته شد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، با افزایش قدرت یونی مقدار IBA استخراج شده به درون فاز مایع یونی افزایش می‌یابد. این افزایش به دلیل اثر اخراج با نمک است. هنگامی که غلظت یون‌ها در فاز آبی حاوی IBA زیاد می‌شود، مولکول‌های آب به سمت یون‌ها حرکت کرده و آن‌ها را آبپوشی می‌کنند. بنابراین، بیشتر مولکول‌های IBA از مولکول‌های آب رها یافته و به سمت فاز مایع یونی مهاجرت می‌کنند [۳۲]. بیش‌ترین مقدار استخراج IBA مربوط به محلول‌های آبی IBA حاوی بافر فسفات با گستره غلظتی  $2 \times 10^{-2}$  تا  $6 \times 10^{-2}$  مول بر لیتر بود. با افزایش بیشتر غلظت بافر فسفات، مقدار استخراج IBA به فاز مایع یونی کاهش می‌یابد که می‌توان آن را به افزایش برهم‌کنش یون‌های محلول بافر با

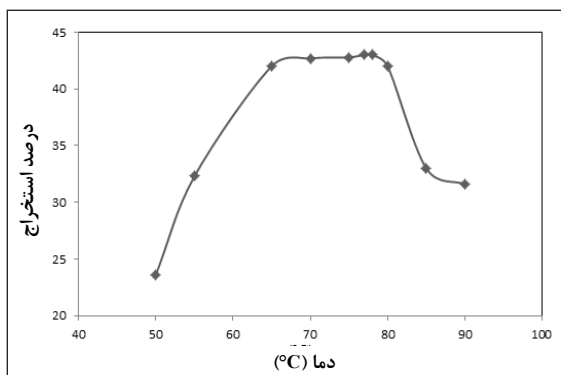
#### اثر pH محلول آبی نمونه

اثر pH محلول آبی نمونه بر مقدار استخراج IBA با فاز مایع یونی  $[PF_6^-][C_6mim]$  در گستره pH از ۱،۶ تا ۱۱،۰ مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). قسمت‌های ۶،۰ میلی‌لیتری از محلول ۲۰،۳ میلی‌گرم بر لیتر IBA با pH‌های متفاوت در تماس با ۵۰ میکرولیتر از مایع یونی قرار گرفته، در حمام آب گرم ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه گرم و به مدت ۱ دقیقه به‌شدت تکان داده شدند. مخلوط در حمام یخ به مدت ۱۵ دقیقه سرد و سپس در دستگاه گریزانه قرار داده شد، به منظور اندازه‌گیری مقدار IBA باقی‌مانده، فاز آبی از لوله آزمایش خارج شد. مشخص شد که بیش‌ترین مقدار استخراج IBA مربوط به pH‌های کمتر از  $pK_a$  آن ( $pK_a=4.79$ ) است. در pH‌های بیشتر از  $pK_a$  مربوط به IBA مقدار استخراج آن به فاز مایع یونی روند کاهشی داشت. رفتار مشاهده شده را می‌توان به برهم‌کنش‌های آب‌گریزی، الکتروستاتیک و همچنین، تشکیل پیوند هیدروژنی بین IBA و مایع یونی مربوط دانست. از آنجاکه در pH‌های کمتر از  $pK_a$  مربوط به IBA، گروه NH مولکول‌های IBA قادر به پروتونه و تبدیل شدن به  $-NH_2^+$  نیست، بیشتر مولکول‌های IBA به‌صورت خنثی هستند [۱۰]. بنابراین، تمایل مولکول‌های خنثی IBA به فاز مایع یونی در این pH‌ها بیشتر است زیرا این مولکول‌های خنثی نسبت به گونه یونی خود ویژگی آب‌گریزی بیشتری دارند. عامل مؤثر دیگر برای تمایل بیشتر مولکول‌های IBA به فاز مایع یونی در این pH‌ها، تشکیل پیوند هیدروژنی گروه  $-COOH$  مولکول‌های IBA با قسمت آنیونی مایع یونی  $(PF_6^-)$  است. در pH‌های بیشتر از  $pK_a$  مربوط به IBA، گروه  $-COOH$  آن آبکافت می‌شود. بنابراین، در این pH‌ها بیشتر مولکول‌های IBA بار منفی دارند. دافعه بین IBA آنیونی و قسمت آنیونی مایع یونی  $(PF_6^-)$ ، باعث کاهش استخراج مولکول‌های IBA به درون فاز مایع یونی می‌شود. بنابراین، برای به‌دست آوردن نتایج قابل اطمینان، pH برابر با ۲،۲ به‌عنوان pH بهینه انتخاب شد.

عنوان دمای بهینه انتخاب شد.

#### اثر مدت گرمادهی

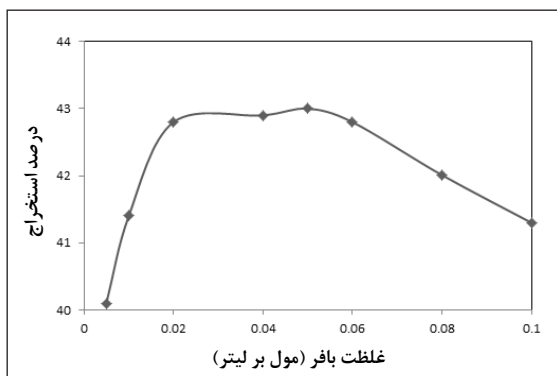
برای بررسی اثر مدت گرمادهی مخلوط فاز آبی حاوی IBA و مایع یونی، قسمت‌های ۶۰ میلی‌لیتری از محلول ۲۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر IBA با pH برابر با ۲/۲ و حاوی بافر فسفات  $5.0 \times 10^{-2}$  مول بر لیتر به‌طور جداگانه به ۵۰ میکرولیتر از مایع یونی در لوله آزمایش افزوده، در حمام آب گرم با دمای ۷۷ درجه سانتی‌گراد در مدت‌های متفاوت گرم و پس از تکان دادن و سرد شدن جداسازی با گریزانه، فاز آبی جدا و مقدار IBA باقی‌مانده در آن اندازه گرفته شد.



شکل ۴ اثر دما (محلول‌های آبی نمونه: قسمت‌های ۶۰ میلی‌لیتری از محلول IBA با غلظت ۲۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر با pH برابر با ۲/۲ و حاوی بافر فسفات با غلظت  $5.0 \times 10^{-2}$  مول بر لیتر، حجم مایع یونی: ۵۰ میکرولیتر، مدت گرمادهی، سردکردن و جداسازی با گریزانه به ترتیب ۵، ۱۵ و ۱۵ دقیقه)

همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، بیش‌ترین مقدار استخراج IBA به فاز مایع یونی مربوط به مدت گرمادهی ۱۰ دقیقه است. در مدت زمان‌های کوتاه‌تر، حلالیت کمتر مایع یونی در فاز آبی، پاشندگی کمتر و در نتیجه مهاجرت کمتر IBA به فاز مایع یونی باعث کاهش بازدهی استخراج شد. به دلیل ناپایداری مولکول‌های IBA، گرمادهی در مدت زمان‌های طولانی‌تر از ۱۰ دقیقه منجر به کاهش بازدهی استخراج شد. براساس نتایج به‌دست آمده، مدت ۱۰ دقیقه، مدت بهینه برای مرحله گرمادهی است.

مایع یونی نسبت داد. بنابراین، برای تنظیم قدرت یونی محلول آبی IBA، محلول  $5.0 \times 10^{-2}$  مول بر لیتر بافر فسفات انتخاب شد.

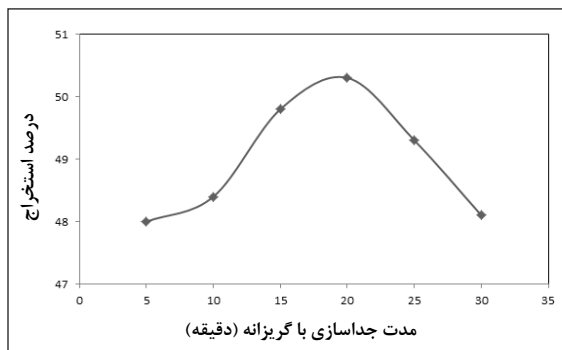


شکل ۳ اثر قدرت یونی (محلول‌های آبی نمونه: قسمت‌های ۶۰ میلی‌لیتری از محلول IBA با غلظت ۲۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر با pH برابر با ۲/۲ و حاوی بافر فسفات با غلظت‌های متفاوت، حجم مایع یونی: ۵۰ میکرولیتر، دما: ۷۵ درجه سانتی‌گراد، مدت گرمادهی، سردکردن و جداسازی با گریزانه به ترتیب ۵، ۱۵ و ۱۵ دقیقه)

#### اثر دما

برای بررسی اثر دما بر مقدار استخراج IBA به فاز مایع یونی، قسمت‌های ۶۰ میلی‌لیتری از محلول ۲۰/۳ میلی‌گرم بر لیتر IBA با pH برابر با ۲/۲ و حاوی بافر فسفات  $5.0 \times 10^{-2}$  مول بر لیتر به‌طور جداگانه به ۵۰ میکرولیتر از مایع یونی در لوله آزمایش افزوده، در حمام آب گرم با دماهای ۵۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه گرم و به مدت ۱ دقیقه به‌شدت تکان داده شدند. پس از مرحله سردشدن، جداسازی با گریزانه، فاز آبی جدا و مقدار IBA باقی‌مانده در آن اندازه گرفته شد. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، بیش‌ترین مقدار استخراج مربوط به گستره دمایی ۷۰ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد بود. حلالیت و در نتیجه پاشندگی بسیار کم فاز مایع یونی در محلول آبی و کاهش مقدار مهاجرت مولکول‌های IBA به فاز مایع یونی در دماهای کمتر از ۷۰ درجه سانتی‌گراد باعث کاهش بازدهی استخراج در این دماها شد. ناپایداری مولکول‌های IBA در دماهای بالاتر را می‌توان دلیلی برای کاهش استخراج آن‌ها به فاز مایع یونی در این دماها دانست. براساس نتایج به‌دست آمده دمای ۷۷ درجه سانتی‌گراد به

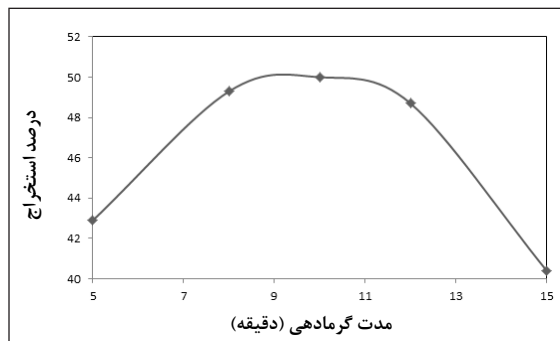
مدت زمان‌های طولانی انجام شد، تولید گرمای به‌دست آمده از چرخیدن گریزانه باعث حل شدن قسمتی از مایع یونی به درون فاز آبی شده و بازدهی استخراج را کاهش داد. بنابراین، هم مدت‌های کوتاه و هم مدت‌های طولانی، باعث کاهش بازدهی استخراج شدند که این موضوع توسط پژوهشگران دیگر هم گزارش شده است [۲۸]. بنابراین، بهینه‌سازی مدت جداسازی با گریزانه برای استخراج IBA به‌طور کامل ضروری است. همان‌طور که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، مدت ۲۰ دقیقه، بهترین زمان برای مرحله جداسازی با گریزانه است.



شکل ۶ اثر مدت جداسازی با گریزانه (محلول‌های آبی نمونه: قسمت‌های ۶۰ میلی‌لیتری از محلول IBA با غلظت ۲۰۳ میلی‌گرم بر لیتر با pH برابر با ۲٫۲ و حاوی بافر فسفات با غلظت  $5.0 \times 10^{-2}$  مول بر لیتر، حجم مایع یونی: ۵۰ میکرولیتر، دما: ۷۷٫۰ درجه سانتی‌گراد، مدت گرمادهی و سردکردن به ترتیب ۱۰ و ۱۵ دقیقه)

#### اثر حجم فاز مایع یونی

برای بررسی اثر حجم فاز مایع یونی بر مقدار استخراج IBA، قسمت‌های ۶۰ میلی‌لیتری از محلول ۲۰۳ میلی‌گرم بر لیتر IBA با pH برابر با ۲٫۲ و حاوی بافر فسفات  $5.0 \times 10^{-2}$  مول بر لیتر به‌طور جداگانه به حجم‌های متفاوتی از مایع یونی در لوله آزمایش افزوده شدند. سپس، مراحل گرمادهی، تکان دادن، سرد شدن و جداسازی با گریزانه مخلوط‌های مایع یونی و فاز آبی در شرایط بهینه آزمایشگاهی انجام شد. نتایج به‌دست آمده نشان دادند که بیش‌ترین مقدار استخراج مولکول‌های IBA مربوط به حجم‌های بیشتر از ۱۴۰ میکرولیتر از مایع یونی است (شکل ۷). به منظور به‌دست آوردن نتایج قابل اطمینان، حجم ۱۵۰ میکرولیتر به‌عنوان



شکل ۵ اثر مدت گرمادهی (محلول‌های آبی نمونه: قسمت‌های ۶۰ میلی‌لیتری از محلول IBA با غلظت ۲۰۳ میلی‌گرم بر لیتر با pH برابر با ۲٫۲ و حاوی بافر فسفات با غلظت  $5.0 \times 10^{-2}$  مول بر لیتر، حجم مایع یونی: ۵۰ میکرولیتر، دما: ۷۷٫۰ درجه سانتی‌گراد، مدت سردکردن و جداسازی با گریزانه ۱۵ و ۱۵ دقیقه)

#### اثر مدت سرد کردن

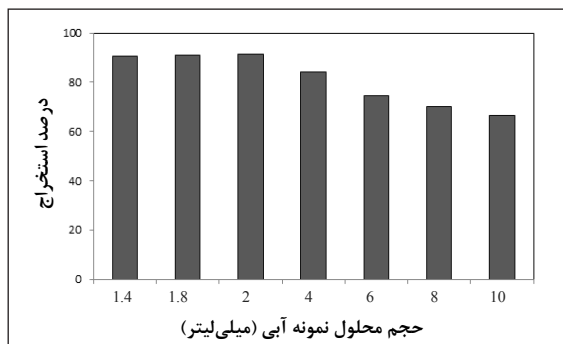
پس از مراحل گرمادهی و تکان دادن در شرایط بهینه، مخلوط‌های مایع یونی و محلول آبی نمونه در مدت‌های متفاوت در حمام آب یخ قرار داده شدند تا یک فاز مایع یونی پاشیده شده، تشکیل شود و مولکول‌های IBA به درون این فاز مهاجرت کنند. بیش‌ترین مقدار استخراج مربوط به مدت‌های طولانی‌تر از ۱۲ دقیقه بود. از آنجا که تغییرات قابل توجهی در مدت‌های بیشتر مشاهده نشد، مدت ۱۵ دقیقه برای مرحله سرد شدن انتخاب شد.

#### اثر مدت جداسازی با گریزانه

به منظور بررسی اثر مدت جداسازی با گریزانه، قسمت‌های ۶۰ میلی‌لیتری از محلول ۲۰۳ میلی‌گرم بر لیتر IBA با pH برابر با ۲٫۲ و حاوی بافر فسفات  $5.0 \times 10^{-2}$  مول بر لیتر به‌طور جداگانه به ۵۰ میکرولیتر از مایع یونی در لوله آزمایش افزوده شد. پس از مراحل گرم کردن، تکان دادن و سرد شدن در شرایط بهینه، در مدت‌های متفاوت در گریزانه قرار داده شدند. سپس، فاز آبی جدا و مقدار IBA باقی‌مانده در آن اندازه گرفته شد. هنگامی که مرحله جداسازی با گریزانه در مدت زمان‌های کوتاه انجام شد، قطره‌های ریز پراکنده شده مایع یونی حاوی IBA به‌خوبی جمع نشده و در نتیجه جداسازی فاز آبی از فاز مایع یونی بازدهی خوبی نداشت. هنگامی که جداسازی با گریزانه در

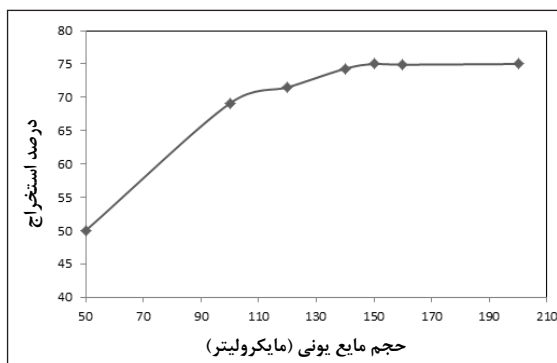
بهینه آزمایشگاهی برای هر یک از آنها انجام شد. همان طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، بازدهی استخراج IBA برای محلول‌هایی با حجم کمتر از ۲٫۰ میلی‌لیتر بیش‌ترین است. کاهش بازدهی استخراج برای حجم‌های بیشتر از ۲٫۰ میلی‌لیتر به دلیل حل شدن بخشی از مایع یونی در فاز آبی است. بنابراین، حجم بازدارنده برای روش میکرواستخراج IBA برابر با ۲٫۰ میلی‌لیتر است.

عامل پیش‌تغلیظ از طریق تقسیم کردن حجم بازدارنده بر کمترین حجم از محلولی که توانایی استخراج برگشتی کامل IBA از فاز مایع یونی را دارد، محاسبه می‌شود. برای تعیین عامل پیش‌تغلیظ، مرحله استخراج برگشتی با استفاده از حجم‌های متفاوت محلول بافر فسفات  $5.0 \times 10^{-2}$  مول بر لیتر و با pH برابر با ۱۰ انجام شد. برپایه نتایج به‌دست آمده، کمترین حجم محلول بافر که در مرحله استخراج برگشتی بیش‌ترین بازدهی را دارد، ۰٫۵ میلی‌لیتر است. بنابراین، عامل پیش‌تغلیظ ۴ برای روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی براساس مایع یونی برای مولکول‌های IBA محاسبه شد. لازم به یادآوری است که برای تعیین مولکول‌های IBA با دستگاه HPLC، محلول‌های آبی که از استخراج برگشتی به‌دست آمده‌اند، تحت خلأ خشک و در ۵۰ میکرولیتر متانول حل شدند. سپس، به ستون HPLC تزریق و در نهایت عامل پیش‌تغلیظ ۴ به‌دست آمد.



شکل ۸ حجم بازدارنده (محلول‌های آبی نمونه: قسمت‌های ۰٫۶ میلی‌لیتری از محلول IBA با غلظت  $2.324 \times 10^{-2}$  میلی‌گرم بر لیتر که با حجم‌های متفاوتی از بافر فسفات با pH برابر با ۲٫۲ و غلظت  $5.0 \times 10^{-2}$  مول بر لیتر رقیق شدند، حجم مایع یونی: ۱۵۰ میکرولیتر، دما: ۷۷٫۰ درجه سانتی‌گراد، مدت گرمادهی و سردکردن و جداسازی با گریزانه به ترتیب ۱۰، ۱۵، ۲۰ دقیقه)

حجم بهینه مایع یونی انتخاب شد.



شکل ۷ اثر حجم فاز مایع یونی (محلول‌های آبی نمونه: قسمت‌های ۰٫۶ میلی‌لیتری از محلول IBA با غلظت  $2.324 \times 10^{-2}$  میلی‌گرم بر لیتر با pH برابر با ۲٫۲ و حاوی بافر فسفات با غلظت  $5.0 \times 10^{-2}$  مول بر لیتر، دما: ۷۷٫۰ درجه سانتی‌گراد، مدت گرمادهی و سردکردن و جداسازی با گریزانه به ترتیب ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دقیقه)

#### استخراج برگشتی مولکول‌های IBA از فاز مایع یونی

از آنجاکه مولکول‌های IBA در محلول‌های بازی به صورت آنیونی هستند، بنابراین، هنگامی که فاز مایع یونی حاوی مولکول‌های IBA در تماس با محلول‌های بازی قرار گیرد مولکول‌های IBA می‌توانند از فاز مایع یونی وارد آبی شوند. برای استخراج برگشتی، پس از مرحله استخراج، ۰٫۵ میلی‌لیتر از محلول‌های بافر فسفات با pHها و غلظت‌های متفاوت به فاز مایع یونی حاوی مولکول‌های IBA افزوده و مخلوط با همزن مغناطیسی هم‌زده شد. مشاهده شد که پس از ۱۲۰ دقیقه، مولکول‌های IBA می‌توانند به‌طور کامل به محلول بافر فسفات  $5.0 \times 10^{-2}$  مول بر لیتر و با pH برابر با ۱۰٫۰ وارد شوند.

#### حجم بازدارنده و عامل پیش‌تغلیظ

برای تعیین حجم بازدارنده (بیش‌ترین حجم محلول آبی حاوی IBA که استخراج IBA از این محلول بیش‌ترین مقدار باشد) و عامل پیش‌تغلیظ، قسمت‌های ۰٫۶ میلی‌لیتری از محلول IBA  $2.324 \times 10^{-2}$  میلی‌گرم بر لیتر با بافر فسفات تا حجم‌های متفاوت رقیق شدند. روش میکرواستخراج آورده شده در شرایط

ارقام شایستگی

استخراج/استخراج برگشتی IBA به کارگرفت. قابل توجه است که امکان استفاده دوباره از فاز مایع یونی بیانگر این است که روش پیشنهادی روشی است که از نظر زیست‌محیطی مناسب بوده و هزینه کمتری برای آزمون نمونه‌ها موردنیاز است.

تجزیه نمونه‌های واقعی

به منظور بررسی روش داده‌شده برای آزمون نمونه‌های واقعی، روش استخراج/استخراج برگشتی برای IBA موجود در نمونه‌های گیاه نخود در شرایط بهینه آزمایشگاهی انجام شد که در جدول ۱ آورده شده است. نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده قابلیت روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی برپایه مایع‌های یونی برای استخراج و تعیین مولکول‌های IBA در نمونه‌های گیاه نخود است. مشخص شد که امکان استخراج  $11.8 \times 10^{-2}$  میکروگرم IBA در یک گرم از جوانه‌های تازه گیاه نخود موردبررسی، وجود دارد.

برای بررسی مقدار تکرارپذیری روش میکرواستخراج داده‌شده، پنج حجم شش میلی‌لیتری از محلول IBA  $20.3$  میلی‌گرم بر لیتر با pH  $2.2$  به‌طور جداگانه هریک در تماس با  $150$  میکرولیتر از مایع یونی قرار گرفتند و فرایند استخراج/استخراج برگشتی IBA تحت شرایط آزمایشگاهی بهینه انجام شد. انحراف استاندارد به‌دست آمده برابر با  $1.8\%$  بود. منحنی واسنجی در گستره غلظتی  $10^{-2} \times 30.4$  تا  $38.6$  میلی‌گرم بر لیتر از IBA بود. حد تشخیص روش پیشنهادی برابر با  $29.3 \times 10^{-2}$  میلی‌گرم بر لیتر IBA به‌دست آمد. برای بررسی امکان استفاده دوباره از فاز مایع یونی در فرایند استخراج/استخراج برگشتی IBA، روش داده‌شده در پژوهش چندین مرتبه با استفاده از یک حجم  $150$  میکرولیتری از مایع یونی انجام شد. مشخص شد که می‌توان هر فاز مایع یونی  $150$  میکرولیتری را برای  $3$  مرتبه از فرایند

جدول ۱ آزمون IBA در نمونه‌های گیاه نخود

بازدهی %	مجموع IBA به‌دست آمده (مایکروگرم) <sup>۱</sup>	IBA افزوده شده (مایکروگرم)	IBA اندازه‌گیری شده اولیه در نمونه آبی (مایکروگرم) <sup>۱</sup>
$10.63 (\pm 4.4)$	$1.8 (\pm 0.98)$	$1.016$	$0.6775 (\pm 0.27)$
$94.3 (\pm 5.32)$	$77.35 (\pm 4.33)$	$81.3$	$0.6775 (\pm 0.27)$

شرایط آزمایش:

مقدار  $2.0$  میلی‌لیتر از محلول نمونه حاوی بافر  $5.0 \times 10^{-2}$  مول بر لیتر با pH برابر با  $2.2$ ، حجم مایع یونی:  $150$  میکرولیتر، دما:  $77.0$  درجه سانتی‌گراد، مدت گرمادهی، سردکردن و جداسازی با گریزانه: به‌ترتیب  $10$ ،  $15$  و  $20$  دقیقه. مرحله استخراج برگشتی:  $0.5$  میلی‌لیتر بافر فسفات  $5.0 \times 10^{-2}$  مول بر لیتر با pH برابر با  $10.0$  و مدت زمان استخراج برگشتی:  $120$  دقیقه.

1: Mean  $\pm$  (1.96 s /  $\sqrt{n}$ ) (n=3)

نتیجه‌گیری

دما، مدت گرمادهی و سرد کردن، مدت جداسازی با گریزانه و حجم مایع یونی بر مقدار استخراج IBA موردبررسی قرار گرفت. قدرت یونی و pH محلول آبی حاوی IBA، ساختار شیمیایی مایع یونی و دما بر مقدار استخراج IBA مؤثر بودند. همچنین، استخراج برگشتی IBA از فاز مایع یونی موردبررسی قرار گرفت. هر فاز

در این پژوهش، مایع یونی  $[PF_6][C_6mim]$  به‌عنوان حلال استخراج‌کننده برای استخراج و پیش‌تغلیظ IBA از طریق روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی به‌کاربرده شد. اثر بعضی از عامل‌ها مانند نوع مایع یونی، pH محلول نمونه، قدرت یونی،



### سیاسگزاری

نویسندگان مقاله از حمایت‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون تشکر می‌کنند.

مابع یونی سه مرتبه فرایند استخراج/استخراج برگشتی قابل استفاده بود. مزایای این روش عبارت‌اند از: سادگی، هزینه کم و پیش تغلیظ IBA پیش از تجزیه HPLC.

### مراجع

- [1] Olsson, J.; Claeson, K.; Karlberg, B.; Nordström, A.C.; J. Chromatogr. A 824, 231–239, 1998.
- [2] Kukreja, K.; Suneja, S.; Goyal, S.; Narula, N.; Agric. Rev. 25, 2004, 70–75.
- [3] Cooper, W.C.; Plant physiol. 10, (1935) 789–794.
- [4] Riov, J.; Yang, S.F.; J. Plant Growth Regul. 8, 131–141, 1989.
- [5] Epstein, E.; Ludwig-Müller J.; Physiol. Plantarum 88, 382–389, 1993.
- [6] Hartmann H.T.; Kester, D.E.; Davies, F.T.; Plant propagation: principles and practices. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall, 1990.
- [7] Bayer, M.H.; Plant Physiology 44(2), 267–271, 1969.
- [8] Ludwig-Muller, J.; Epstein, E.; J. Plant Growth Regul. 14, 7–14, 1994.
- [9] Ludwig-Muller, J.; J. Plant Growth Regul. 32, 219–230, 2000.
- [10] Sheikhan, L.; Bina, S.; J. Chromatogr. B 1008, 34–43, 2016.
- [11] Barkawi, L. S.; Tam, Y.; Tillman, J.A.; Pederson, B.; Calio, J.; Al-Amier, H.; Emerick, M.; Normanly, J.; Cohen, J.D.; Anal. Biochem. 372, 177–188, 2008.
- [12] Yin, X. B.; Guo, J.M.; Wei, W.; J. Chromatogr. A 1217, 1399–1406, 2010.
- [13] Wang, Z.H.; Xia, J.F.; Han, Q.; Shi, H.N.; Guo, X.M.; Wang, H.; Ding, M.Y.; Chinese Chem. Lett. 24, 588–592, 2013.
- [14] Gupta, M.K.; Jain, R.; Singh, P.; Ch, R.; Mudiam, M.K.R.; J. Anal. Toxicol. 39, 365–373, 2015.
- [15] Meng, L.; Zhang, W.; Ming, P.; Zhu, B.; Zhang, K.; J. Chromatogr. B 989, 46–53, 2015.
- [16] Chu, S. P.; Tseng, W. C.; Kong, P. H.; Huang, C. K.; Chen, J.H.; Chen, P. S.; Huanga, S.D.; Food Chem. 185, 377–382, 2015.
- [17] Farajzadeh, M.A.; Afshar Mogaddam, M.R.; Anal. Chim. Acta 728, 31–38, 2012.
- [18] Alexovic, M.; Wiczorek, M.; Kozak, J.; Koscielniak, P.; Balogh, I.S.; Andruch, V.; Talanta 133, 127–133, 2015.
- [19] Daneshvand, B.; Raofie, F.; J. Iran. Chem. Soc. 12, 1287–1292, 2015.
- [20] Horstkotte, B.; Suárez, R.; Solich, P.; Cerda, V.; Anal. Chim. Acta 788, 52–60, 2013.
- [21] Horstkotte, B.; Suárez, R.; Solich, P.; Cerda, V.; Anal. Methods 6, 9601–9609, 2014.
- [22] Sun, P.; Armstrong, D. W.; Anal. Chim. Acta 661, 1–16, 2010.
- [23] Sheikhan, L.; Akhond, M.; Absalan, G.; J. Environ. Chem. Eng. 2, 137–142, 2014.
- [24] Sheikhan, L.; Desalination Water Treat. 57, 8447–8453, 2016.
- [25] Liu, C.; Liao, Y.; Huang, X.; Talanta 172, 23–30, 2017.
- [26] Yang, X.; Qiao, K.; Liu, F.; Wu, X.; Yang, M.; Li, J.; Gao, H.; Zhang, S.; Zhou, W.; Lu, R.; Talanta 166, 93–100, 2017.
- [27] Zhang, C.; Cagliero, C.; Pierson, S.A.; Anderson, J.L.; J. Chromatogr. A 1481,

- 1-11, 2017.
- [28] Absalan, G.; Akhond, M.; Sheikhian, L.; Goltz, D.M.; Anal. Methods 3, 2354-2359, 2011.
- [29] Freire, M.G.; Santos, L.M.N.B.F.; Fernandes, A.M.; Coutinho, J.A.P.; Marrucho, I.M.; Fluid Phase Equilibria 26, 449-454, 2007.
- [30] Bağda, E.; Tüzen, M.; Food Chem. 232, 98-104, 2017.
- [31] Yang, M.; Xi, X.; Wu, X.; Lu, R.; Zhou, W.; Zhang, S.; Gao, H.; J. Chromatogr. A 1381, 37-47, 2015.
- [32] Sheikhian, L.; Akhound, M.; Absalan, G.; Goltz, D.M.; Separ. Sci. Technol. 48, 2372-2380, 2013.

## Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction/back-extraction coupled with HPLC for preconcentration and determination of 3-indole butyric acid in pea plant samples

Leila Sheikhan<sup>1,\*</sup>, Yasamin Kazemeini<sup>2</sup>

1. Assistant prof. of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
2. MSc in Phytochemistry, Department of Chemistry, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Received: August 2017, Revised: February 2018, Accepted: March 2018

**Abstract:** Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC were applied for extraction, preconcentration, and determination of 3-indole butyric acid in pea plant samples. The effect of some factors such as chemical structure of ionic liquid, pH of the sample solution, temperature, extraction time, centrifugation time, volume of ionic liquid, and volume of aqueous sample solution were studied. Percent extraction of 3-indole butyric acid was strongly affected by pH of the sample solution, chemical structure of the ionic liquid, ionic strength of sample solution, and temperature. Back-extraction of 3-indole butyric acid from ionic liquid phase to basic aqueous solution were also studied. Preconcentration factor of 40 was obtained before HPLC analysis of real samples. The calibration plot ranged from  $30.4 \times 10^{-2}$  to  $38.6 \text{ mg L}^{-1}$  of 3-indole butyric acid. The LOD (based on 3s) was  $29.3 \times 10^{-2} \text{ mg.l}^{-1}$ . The RSD for suggested method was calculated as 1.8% at  $20.3 \text{ mg.l}^{-1}$  of 3-indole butyric acid. It was found that each IL phase was reusable for at least four microextraction/back-extraction cycles. This method was successfully applied for extraction of 3-indole butyric acid in pea plant samples.

**Keywords:** 3-Indole butyric acid, Ionic liquid, Dispersive liquid-liquid microextraction, HPLC, Pea plant