

بهینه سازی روش تغلیظ و تخلیص ترانس، ترانس - موکونیک اسید به عنوان شاخص بیولوژیکی بنزن در مواجهه های شغلی

دکتر سیدجمال الدین شاه طاهری*^۱، فرهاد قمری^۱، دکتر فریده گل‌بابایی^۱، دکتر عباس رحیمی^۲ و محسن عبداللهی^۱.

چکیده:

در این مطالعه با استفاده از مواد جاذب جامد، عوامل موثر بر تغلیظ و تخلیص ترانس، ترانس - موکونیک اسید مشتمل بر pH نمونه، غلظت نمونه، حجم و سرعت عبور نمونه از روی جاذب، نوع حلال شستشو (Washing solvent) و شویس (Elution solvent) و نوع جاذب مورد ارزیابی قرار گرفت. اسید مذکور به عنوان متابولیت بنزن می باشد که بعد از آماده سازی نمونه های آزمایشگاهی (Sample preparation)، با استفاده از دستگاه HPLC مجهز به ستون C₁₈ (μm) ۰/۵ و آشکارساز UV در طول موج ۲۵۹ نانومتر و با به کارگیری فاز برنده (حامل): آب، متانول، اسید استیک (۷/۷/۷؛ ۱: ۳۰: ۶۹) در سرعت جریان فاز برنده ۱ ml / min، تعیین گردید و راندمان بازیافت آن از فاز جامد به دست آمد. در این ارزیابی آزمایشگاهی، فاز جامد تبادل آنیونی قوی (SAX) در آماده سازی نمونه با جاذبهای غیر قطبی C₈ و C₁₈، مقایسه شد. راندمان بازیافت موکونیک اسید با نوع جاذب، نوع حلال شستشو، حجم نمونه، pH نمونه و سرعت عبور نمونه دارای ارتباط معنی داری بود (p < ۰/۰۰۱). بهترین بازیافت در pH = ۷ و سرعت عبور ۱ ml / min و اسید استیک ۱٪ به عنوان حلال شستشو و اسید استیک ۱۰٪ به عنوان حلال شویس با استفاده از جاذب SAX به دست آمد. در این مطالعه بین غلظت نمونه و میزان بازیافت موکونیک اسید رابطه معنی داری وجود نداشت (p > ۰/۰۰۵). بازیافت موکونیک اسید از نمونه های اداری Spiked در غلظت ۱۰-۱۰۰ μg/ml بیش از ۹۵٪ به دست آمد. حد تعیین (Limit of detection) این ماده با شرایط کروماتوگرافی ذکر شده فوق ۰/۰۱ μg/ml (هفتاد مرتبه کمتر از استاندارد مواجهه بیولوژیکی) تعیین گردید. همچنین روش بهینه شده با استفاده از نمونه های Spiked در سه غلظت ۰/۸ μg/ml و ۱ μg/ml و ۱۰ μg/ml معتبر سازی شد که قابلیت تکرار پذیری مناسب آن در شش روز متوالی (Day-to-day reproducibility) و در طول یک روز (Within-day reproducibility) مورد تایید قرار گرفت.

واژگان کلیدی: آماده سازی نمونه، استخراج فاز جامد، بهینه سازی، اعتباربخشی، ترانس، ترانس - موکونیک اسید، HPLC، بنزن

* (عهده دار مکاتبات)

۱. گروه بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران.
۲. گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران.

مقدمه:

یکی از اساسی ترین علمی که امروزه می تواند نقش به سزایی در علم سم شناسی به طور اعم و در سم شناسی شغلی به معنای اخص ایفا نماید، شیمی تجزیه است. دلایل اصلی این نقش، تاثیر شیمی تجزیه در مباحث نمونه برداری (Sampling)، جداسازی (Separation)، شناسایی (Identification)، آشکارسازی (Detection) و اندازه گیری (Quantization) است. به منظور ارزیابی تراکم آلاینده های موجود در محیطهای شغلی و یا در نمونه های بیولوژیکی نظیر ادرار، خون، مدفوع و بافتهای بدن، ضرورت دارد که سموم به طور دقیق شناسایی و اندازه گیری شوند تا از این طریق بتوان با مقایسه مقادیر محاسبه شده با استانداردهای توصیه شده، نسبت به برآورد میزان مواجهه و یا تراکم آلاینده ها در محیط کار اظهار نظر نمود و نسبت به کنترل آنها چاره اندیشی نمود.

نمونه های بیولوژیکی یا نمونه هایی که از منابع محیطی گرفته می شوند، اغلب یا حاوی ترکیبات بسیار پیچیده دیگری هستند که به عنوان عوامل مزاحم در فرآیند تجزیه و اندازه گیری دخالت می نمایند و یا مقادیر سم مورد نظر به قدری ناچیز است که ممکن است با قویترین دستگاههای آشکار ساز نیز قابل اندازه گیری نبوده و یا با فرآیندهای تجزیه و سیستم های آشکار ساز ناسازگار باشند (McDowal R.D. 1989, Poole S.K. et al. 1990)

نکته قابل توجه این است که بعضی از سموم خطرناک در همان مقادیر کم دارای آثار زیانبار فیزیولوژیکی می باشند لذا ضرورت دارد که روشهای بسیار حساس و اختصاصی را بررسی و تدوین نمود تا بتوان چنین مقادیری از سموم را در نمونه به طور دقیق و واقعی اندازه گرفت. اگرچه امروزه دستگاههای تجزیه و اندازه گیری دقیق و حساس وجود دارد که قادرند به این مهم دست یابند لیکن چنین دستگاههایی به قدری گران قیمت هستند که اساساً

آزمایشگاههای معمولی فاقد آنها بوده و حتی ممکن است در آزمایشگاههای مجهز تحقیقاتی نیز یافت نشوند (شفیعی ۱۳۷۳). مضافاً به این که حفظ و نگهداری و جلوگیری از کاهش عمر چنین دستگاههای ارزشمندی اقتضا می نماید که از معرفی نمونه های پیچیده به آنها جداً خودداری شود. بنابراین فرآیند آماده سازی نمونه که اغلب در آزمایشگاههای معمولی، آموزشی و تحقیقاتی قابل انجام است، ضرورت پیدا می کند (شفیعی ۱۳۷۳). بنزن یکی از ترکیبات شیمیایی فرار و خطرناک در صنایع شیمیایی است که امروزه کارگران زیادی در معرض مواجهه با آن قرار دارند. این ترکیب در صنایع مختلف به طور گسترده مصرف و یا تولید می شود و مقدار حداکثر مجاز (TLV) بنزن در محیط کار، در اکثر کشورهای صنعتی، به علت اثرات خونی و سرطانزایی آن، رو به کاهش بوده است. به عنوان مثال انجمن دولتی متخصصین بهداشت صنعتی آمریکا در سال ۱۹۹۰، حداکثر مجاز این ماده را از $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ به $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ کاهش داد و در سال ۱۹۹۴ این مقدار به $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ تقلیل پیدا کرد. به تبع آن محققین مجبورند مقادیر بسیار کم متابولیت بنزن را در نمونه های بیولوژیکی اندازه گیری نمایند. لذا آماده سازی نمونه بیولوژیکی متابولیت بنزن به منظور تغلیظ و تخلیص مقادیر کم از ضرورتهای ارزشیابی مواجهه افراد با بنزن می باشد (Boogard P.J. and Nan N.J. 1995).

بنزن در فرآیند های احتراقی ایجاد می شود و آلودگیهای محیطی صنعتی گسترده ای را ایجاد می کند که اثرات زیان آور زیادی از جمله بیماریهای خونی، آسیب سیستم ایمنی، اختلالات قاعدگی و اندازه تخمدان ها و سرطانزایی انسانی را به دنبال دارد (Boogard P.J., and Nan N.J. 1995). اخیراً ترانس، ترانس - موکونیک اسید به عنوان متابولیت ادراری مواجهه با غلظتهای کمتر از $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ بنزن مورد ارزیابی قرار گرفته است (Thurman E.M., and Mills M.S. 1998). هدف از انجام این مطالعه بهینه

بر اساس دامنه تغییرات راندمان جاذب که بین ۵۰ تا ۱۰۰ می باشد و سطح اطمینان ۹۵٪ و خطای برآورد کمتر از ۲/۹٪ در هر گروه حدود ۳۰ آزمایش برآورد گردیده است. چون طرح آزمایش این مطالعه براساس فاکتورهای pH، غلظت نمونه، سرعت نمونه، حجم نمونه، میزان جاذب، نوع حلال شویش، نوع حلال شستشو در سطوح مختلف اجرا شده است، حجم کل نمونه ۳۷۲ آزمایش برآورد گردید.

در این پژوهش برای آنالیز نمونه های تهیه شده، از دستگاه HPLC استفاده شده و سطح زیر پیک به عنوان پاسخ آشکار ساز مدنظر قرار گرفته است و میزان بازیافت استخراج با استفاده از مقایسه سطح زیر پیک نمونه های استخراج شده و نمونه های استاندارد محاسبه شده است (جوزن ۱۳۷۵).

بازیافت (%) = سطح زیر پیک (نمونه) / سطح زیر پیک (استاندارد) $\times 100$

در این مطالعه جاذبهای C₁₈ (اکتادسیل)، C₈ (اکتیل) و SAX (تبادل کننده آنیونی قوی) برای استخراج نمونه های موردنظر مورد استفاده قرار گرفتند. برای تسهیل در عبور حلالها و نمونه ها از روی جاذبها از جعبه خلأ حاوی ۱۰ محل برای استقرار لوله های جاذب استفاده شد. برای برداشتن حجمهای دقیق از پیستهای با حجمهای ۵۰، ۲۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۱۰۰۰۰ میکرولیتر و برای توزین مقادیر استانداردها از ترازو با دقت ۰/۰۰۰۱ میلی گرم استفاده شد. برای تنظیم غلظت یون هیدروژن از pH متر دیجیتال استفاده گردید و برای اندازه گیری مقادیر از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC) مجهز به سیستم آشکارساز ماوراء بنفش (UV) استفاده شد.

تهیه محلول مادر استاندارد:

۱۰ میلی گرم ماده جامد ترانس، ترانس - موکونیک اسید در ۱۵-۱۰ میلی لیتر متانول حل و با آب مقطر HPLC grade - به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. در این صورت

کردن روش آماده سازی نمونه برای تعیین مقدار ترانس، ترانس - موکونیک اسید در ادرار در مواجهه های شغلی و محیطی با مقدار کم بنزن (مقدار استاندارد مواجهه با بنزن به علت اثرات مخرب آن هر ساله رو به کاهش است) می باشد.

برای آماده سازی نمونه، استخراج با استفاده از فاز جامد (Solid Phase Extraction) (SPE) جایگزین روشهای قبلی (استخراج مایع - مایع Liquid-Liquid Extraction (LLE) و سوکسله Soxhlet Extraction) (Colin F.D. et al. 2000, Shahtaheri S.J. et al. 1998, 2001) شده است. روش استخراج با استفاده از فاز جامد، راندمان بازیافت قابل قبولی را فراهم می کند (اکبری ۱۳۸۱، Scherer G. et al. 1998) در این مطالعه با استفاده از مواد جاذب متصل به سیلیکا عوامل موثر بر تغلیظ و تخلیص موکونیک اسید مشتمل بر pH نمونه، غلظت نمونه، حجم نمونه، سرعت عبور نمونه، نوع جاذب، نوع حلال شستشو و نوع حلال شویش مورد ارزیابی قرار گرفته و شرایط بهینه آنها تعیین گردیده است (Tormo M. and Izco J.M. 2004, Shui G. and Leong P.L. 2002). منظور اندازه گیری و تجزیه نمونه ها از روش HPLC استفاده گردید این تحقیق نشان داد که SPE یک روش بسیار مطلوب در مقایسه با LLE و سوکسله در آماده سازی نمونه های بیولوژیکی است و به طور غیرمستقیم باعث افزایش قدرت آشکارسازی دستگاه HPLC می گردد (جوزن ۱۳۷۵).

روش کار:

این مطالعه بر اساس طرح آزمایشها (Experimental design) انجام شده است. و جامعه آماری جاذبهای سیلیکای پیوندی نوع SAX، C₈ و C₁₈ و حجم نمونه

فاصله اطمینان ۹۵٪ با استفاده از آزمون آماری واریانس یک طرفه در نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل و برای رسم نمودار از نرم افزار EXCLE استفاده شده است.

در آزمایشگاه نیز تدابیر لازم در خصوص کار کردن با حلالها و مواد شیمیایی اندیشیده شد به طوری که در موارد ضروری فعل و انفعالات و حمل و نقل مواد شیمیایی در زیر هود حفاظتی مستقر در آزمایشگاه انجام می گرفت.

نتایج:

برای دریافت یک حد آشکار سازی ایده آل و قابل قبول، شرایط مختلف از لحاظ نوع و ترکیب فاز برنده، سرعت جریان عبور فاز برنده، طول موج آشکارساز بررسی و شرایط بهینه معین گردید.

به منظور دستیابی به یک پروتکل فرآیند استخراج بهینه، هفت متغیر شامل: نوع فاز جامد، pH نمونه، حجم نمونه، غلظت نمونه، نوع حلال شستشو، نوع حلال شویس و سرعت عبور نمونه از روی فاز جامد مورد آزمایش قرار گرفتند.

ابتدا فازهای جامد C₈ و C₁₈ و SAX به وسیله ۳ میلی لیتر متانول و ۳ میلی لیتر آب مقطر فعال شده سپس ۱ میلی لیتر نمونه با غلظت ۱ μg/ml از روی هر یک از فازهای جامد در pH طبیعی نمونه عبور داده شد آنگاه با ۳ میلی لیتر اسیداستیک ۱٪ عمل شستشو انجام شد و در ادامه، عمل شویس با ۴ میلی لیتر اسیداستیک ۱۰٪ صورت گرفت. در آنالیز کروماتوگرافی مایع، فاز برنده: متانول، آب، اسید استیک (۱v/v: ۱v/v: ۶۹.۳۰) - میزان سرعت عبور نمونه: ۱ ml/min ستون تجزیه ای: C₁₈ طول موج (آشکارساز) UV, ۲۵۹ نانومتر. حجم تزریق ۱۰۰ میکرو لیتر می باشد. جدول (۱) اثر نوع جاذب را بر روی میزان بازیافت نمونه ترانس، ترانس - موکونیک اسید نشان می دهد.

به منظور ارزیابی تاثیر pH نمونه بر روی راندمان بازیافت موکونیک اسید، pH های ۳ و ۵ و ۷ و ۹ و ۱۱ در

محلول به دست آمده ۱۰۰ μg/ml خواهد بود که به عنوان محلول مادر در طول آزمایشات مورد استفاده قرار می گرفت. روش آماده سازی نمونه:

الف) ابتدا لوله های حاوی جاذب سیلیکا (C₈ و C₁₈ و SAX) در مقادیر ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی گرمی با استفاده از ۳ میلی لیتر متانول و ۳ میلی لیتر آب مقطر فعال شدند. در این مرحله لازم بود از خشک شدن ستون جدا مراقبت گردد.

ب) نمونه ها با غلظت های مختلف (۱۰۰-۱۰ μg/ml) و در حجم های مختلف (۱-۱۰۰۰ ml) از روی فاز جامد با سرعت ۱-۲ ml/min عبور داده شدند.

ج) سپس به منظور انتخاب حلال شستشوی مناسب و حذف عوامل مداخله کننده، ستونهای حاوی جاذب توسط ۳ میلی لیتر حلالهای مختلف (اتانول، متانول، استونیتریل، فاز برنده (حامل)، اسید استیک ۱٪ و ۲٪ و ۳٪) به طور مجزا شستشو داده شدند.

د) سپس به منظور شویس و جداسازی آنالیت جذب شده از روی ستون، ۴ میلی لیتر از حلالهای مختلف (استونیتریل، اتانول، متانول، اسید استیک ۱۰٪ - ۵٪) به طور مجزا استفاده شد.

ه) آنگاه ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول تغلیظ و تخلیص شده به دستگاه HPLC برای اندازه گیری تزریق شد.

در این دستگاه ستون:

C₁₈ (۵ μm, id ۴/۶ mm × ۲۵۰) ، فازبرنده: آب متانول، اسید استیک با در صد حجمی به ترتیب (۱v/v: ۱v/v: ۳۰، ۶۹) با سرعت جریان ۱ ml/min، آشکارساز: ماوراء بنفش در طول موج ۲۵۹ نانومتر، حجم نمونه تزریقی: ۱۰۰ میکرو لیتر و درجه حرارت دمای محیط در نظر گرفته شد.

حد آشکار سازی (Limit of detection) نیز با توجه به نسبت ارتفاع ۳ به ۱ (signal-to-noise) مقدار ۰/۰۱ μg/ml به دست آمد.

نتایج راندمان بازیافت با توجه به متغیرهای ذکر شده با

جاذبه‌های نوع SAX و C₈ و C₁₈ مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این بررسی در شکل (۱) نشان داده شده است. در این پژوهش به منظور برآورد تاثیر غلظت نمونه روی عملکرد فاز جامد، غلظتهای متفاوت ۰/۰۱ میکروگرم بر میلی لیتر تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از آنالیت ترانس، ترانس-موکونیک اسید مورد استفاده قرار گرفت و بر اساس روش مورد نظر عمل بازیافت نمونه انجام پذیرفت. جدول (۲) بیانگر این نکته است که عمل استخراج آنالیت با استفاده از فاز جامد نوع SAX در غلظتهای متفاوت از راندمان بالایی برخوردار بوده است، حال آنکه در C₈ نسبت به نوع SAX دارای راندمان پایینی است.

پس از آن که نمونه از روی جاذب عبور داده می شود لازم است عمل شستشوی بستر جاذب به منظور حذف ترکیبات اضافی مداخله کننده انجام شود. لذا از یک حلال مناسب شستشو به منظور حذف مواد اضافی، بدون آن که ترکیب مورد نظر از بستر جاذب جدا گردد، استفاده می شود (Colin F.D. et al. 2000). در این مطالعه تعدادی از حلالهای غیر قطبی و یونی شامل اتانول، متانول، استونیتریل، اسید استیک ۱٪ و ۲٪ و ۳٪ استفاده شد همان طور که در جدول (۳) مشاهده می شود اسید استیک ۱٪ حلال شستشوی مناسبی برای آنالیت ترانس، ترانس-موکونیک اسید از روی بستر جاذب SAX می باشد. در ادامه مطالعه، به منظور ارزیابی قدرت جداسازی حلالها در استخراج ترانس، ترانس-موکونیک اسید از روی فاز جامد و انتخاب یک حلال مطلوب، هفت حلال مشتمل بر متانول، اتانول، استونیتریل، اسید استیک ۵٪ و ۷٪ و ۹٪ و ۱۰٪ مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفتند که میزان بازیافت به هنگام استفاده از اسید استیک ۱۰٪ در SAX و در C₈ از راندمان بالایی برخوردار بوده است.

برای ارزیابی اثر حجم نمونه بر روی راندمان بازیافت، حجمهای مختلف ۱ تا ۱۰۰ میلی لیتر نمونه از روی جاذبه‌های

SAX و C₈ عبور داده شد.

نتایج مندرج در شکل (۲) نشان می دهد که با افزایش حجم نمونه راندمان بازیافت کاهش یافته است ولی تا حجم ۵۰۰ میلی لیتر راندمان بازیافت در حد قابل قبولی (بیش از ۹۰٪) می باشد. لذا نمونه های حاوی موکونیک اسید از روی جاذبه‌های SAX و C₈ با سرعتهای متفاوت ۱ تا ۲ میلی لیتر در دقیقه عبور داده شد که با افزایش سرعت عبور نمونه از روی جاذب میزان راندمان کاهش یافته است. ($p < 0/001$) و بهترین راندمان در سرعت ۱ ml/min به دست آمده است.

به منظور تعیین قابلیت استفاده از روش ارزیابی مواجهه با بنزن در غلظتهای محیطی کمتر از ۵ µg/ml، با استفاده از روش استخراج فاز جامد و تعیین عوامل موثر بر آن، لازم است روش ارائه شده اعتباربخشی شود (Schener G. et al. 1998). لذا جهت معتبر سازی روش بهینه شده تکرار پذیری روز به روز (reproducibility Day-to-day) و تکرار پذیری در طول یک روز (Within-day reproducibility) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این بررسی در جدول (۴) نشان داده شده است. کروماتوگرام نمونه در سه غلظت ۰/۱ µg/ml، ۱ µg/ml و ۱۰ µg/ml با اعمال شرایط روش بهینه شده در شکل (۳-الف، ب، ج) نشان داده شده است. حد آشکارسازی روش با استفاده از حجم ۵۰ میلی لیتر ۱ µg/ml و با استفاده از حجم ۵۰۰ میلی لیتر ۰/۰۱ µg/ml به دست آمد و این در شرایطی بود که ارتفاع پیک نمونه سه برابر ارتفاع پیک زمینه در کروماتوگرام در نظر گرفته شد.

بحث و نتیجه گیری :

آماده سازی نمونه، بخش اصلی اندازه گیری نمونه های محیطی و بیولوژیکی را تشکیل می دهد. این عمل به دلایل متعدد نظیر تغلیظ نمونه های کم غلظت، تخلیص

نتایج نشان می دهد که بین pH نمونه و میزان بازیافت نمونه موکونیک اسید رابطه معنی داری ($p < 0/001$) وجود دارد و مناسب ترین pH برای ارزیابی میزان موکونیک اسید در ادرار با استفاده از استخراج فاز جامد $pH = 7$ می باشد. موکونیک اسید در شرایط نرمال در فاز آبی، یک ترکیب یونیزه شده است و استفاده از فازهای جامد آنیونی (SAX) در استخراج ترکیبات یونی (با توجه به این که میزان یونیزه شدن آن ارتباط مستقیم با راندمان بازیافت دارد) بسیار مناسب می باشد. براساس معادله هندرسن هسل باخ زمانی که pH یک اسید دو واحد زیر pK_a آن باشد فعالیت یونی نداشته و چون pK_a موکونیک اسید برابر 4 می باشد در $pH = 2$ جاذب SAX جذبی را نخواهد داشت و هر قدر pH نمونه افزایش پیدا می کند به علت افزایش تولید یون، میزان راندمان افزایش یافته و تقریباً در $pH = 7$ و بالاتر راندمان بازیافت در حد مطلوبی به دست آمده است.

در یک روش ایده آل، راندمان استخراج نباید به غلظت نمونه بستگی داشته باشد و همچنین بر اساس آزمون آماری واریانس رابطه معنی داری بین راندمان بازیافت و غلظت های مختلف موکونیک اسید دیده نشد ($p > 0/05$). جدول (2) بیانگر این واقعیت است که در غلظت های متفاوت نمونه موکونیک اسید، جاذب نوع SAX، جهت انجام فرآیند بازیافت مناسب می باشد که می تواند از مزیت های قابل ملاحظه در روش های استخراج باشد.

مناسب ترین حلال شستشو برای ارزیابی میزان موکونیک اسید در ادرار با استفاده از استخراج فاز جامد اسید استیک 0/1 می باشد. حلال شستشو باید تا جایی که ممکن است از نظر ساختار شیمیایی به حلال شویش نزدیک باشد به نحوی که بتواند ترکیبات مزاحم مشابه را از روی فاز جامد حذف ولی

نمونه هایی که ماتریکس آن مرکب و مملو از ترکیبات مزاحم است و عدم سازگاری نمونه با سازوکار دستگاه اندازه گیری صورت می گیرد. به منظور فراهم نمودن یک روش ارزیابی سریع، اختصاصی، دقیق، انتخابی و قابل تکرار در مواجهه شغلی با بنزن، ترانس، ترانس - موکونیک اسید به عنوان یک شاخص حیاتی اختصاصی در مواجهه های شغلی کمتر از $5 \mu g/ml$ مورد بررسی قرار گرفت و شرایط آماده سازی نمونه های ادرار حاوی موکونیک اسید بهینه سازی شد.

عوامل موثر بر تغلیظ و تخلیص نمونه (pH نمونه، غلظت نمونه، حجم نمونه، سرعت عبور نمونه، نوع حلال شستشو، نوع حلال شویش و نوع جاذب) مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به این که ترانس، ترانس - موکونیک اسید به طور نسبی یک ترکیب هیدروفوب است و از طرفی در شرایط مائی می تواند یونیزه شود، میزان راندمان بازیافت آن در فاز جامد SAX که یک فاز یونی است به مراتب بالاتر از انواع دیگر فاز جامد بود. هر قدر مقدار فاز جامد در ستون بیشتر باشد ظرفیت جذب ستون بالا رفته و امکان افزایش حجم نمونه و به دنبال آن، تغلیظ بیشتر نمونه وجود خواهد داشت و در مقابل نیز حجم حلال شویش برای جدا سازی موکونیک اسید از فاز جامد بالا خواهد رفت که اثر منفی روی میزان تغلیظ نمونه خواهد گذاشت. در این زمینه لازم است تعادلی بین دو متغیر وجود داشته باشد (Marie C.H. 1999). همچنین بین نوع جاذب و میزان بازیافت رابطه معنی داری وجود داشت ($p < 0/001$) و مناسب ترین جاذب برای ارزیابی موکونیک اسید در ادرار با استفاده از استخراج فاز جامد، جاذب آنیونی قوی نوع SAX می باشد.

زمان محدود آنالیز نمود (Frits J.S. 1998). این مطالعه نشان داد در سرعت‌های عبوری ۱ ml/min و ۲ ml/min روش از راندمان مناسبی برخوردار می‌باشد.

در این مطالعه اعتبار روش بهینه‌سازی شده در خصوص اندازه‌گیری متابولیت بنزن (ترانس، ترانس - موکونیک اسید) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این ارزیابی متابولیت بنزن در یک میلی لیتر متانول حل و در ۱۰ میلی لیتر ادرار وارد و سپس با آب آشامیدنی به حجم ۵۰ میلی رسید. منحنی استاندارد در غلظت‌های ۰/۱ µg/ml، ۱ µg/ml و µg/ml ۱۰ برای هر روز و به مدت ۶ روز ترسیم گردید. ضریب تغییرات (CV%) در تکرارپذیری روزبه روز به مدت ۶ روز در حجم ۵۰ میلی لیتر و در غلظت‌های ۰/۱ µg/ml، ۱ µg/ml و ۱۰ µg/ml به ترتیب ۷/۲، ۲/۵ و ۳ بود. همچنین rsd در تکرارپذیری داخل یک روز به تعداد ۶ مرتبه در غلظت‌های فوق به ترتیب ۱۰، ۳/۰۶ و ۲/۷۴ بود که بیانگر دقت قابل ملاحظه روش بهینه شده می‌باشد.

باتوجه به نتایج به دست آمده، در این مطالعه، فاز جامد (SPE) به جای روش استخراج فاز مایع (LLE) می‌تواند در تغلیظ و تخلیص نمونه‌های بیولوژیکی توصیه گردد. بدیهی است بهینه‌سازی عوامل موثر در استخراج به تناسب نوع فازهای جامدی که استفاده خواهد شد باید مدنظر محققین قرار گیرد. البته این عوامل برای ترکیبات شیمیایی مشابه می‌تواند با تغییرات کوچکی قابل استفاده باشد. فوایدی که می‌توان برای روش SPE برشمرده شامل موارد ذیل می‌باشد:

الف) سرعت در عمل تغلیظ و تخلیص

ب) تنوع در فازهای جامد

ج) افزایش حجم نمونه به دلیل سطح وسیع جاذب جامد و بازیافت آن در مقادیر کم حلال مناسب

ترکیب مورد نظر (در این تحقیق موکونیک اسید) را استخراج ننماید. در این مطالعه باتوجه به نتایج مندرج در جدول (۳) اسید استیک ۰/۱ و ۰/۲ می‌تواند برای شستشوی عوامل مزاحم استفاده شود که باتوجه به راندمان به دست آمده ترجیحاً اسیداستیک ۰/۱ برای این منظور استفاده شد.

قدرت جداسازی و شویس حلال در جاذبه‌های غیر قطبی با کاهش قطبیت حلال افزایش می‌یابد و برعکس در جاذبه‌های قطبی و یونی (SAX) قدرت جداسازی حلال، با افزایش قطبیت آن افزایش می‌یابد (Dean J.R. 1998). بنابراین اسید استیک ۰/۱۰ باتوجه به این خصلت شیمیایی است که قادر است با راندمان بالایی موکونیک اسید را از جاذب SAX جدا نماید.

راندمان جذب و به تبع آن راندمان بازیافت با افزایش حجم مصرفی نمونه به دلیل محدود بودن ظرفیت جذب فاز جامد و یا فرار آنالیت مورد نظر به هنگام اشباع فاز جامد از ترکیب شیمیایی مورد نظر کاهش می‌یابد (Thurman E.M. and Mills M.S. 1998). در این مطالعه در حجم‌های نمونه حداکثر تا ۵۰۰ میلی لیتر نمونه را می‌توان از جاذب عبور داد بدون اینکه کاهشی در راندمان ملاحظه شود. این حجم نیز به نوبه خود می‌تواند تاثیر بسیار معنی داری در تغلیظ نمونه‌های رقیق داشته باشد. در بیش از ۵۰۰ میلی لیتر افت راندمان استخراج که ناشی از شویس موکونیک اسید در هنگام عبور از جاذب است دیده می‌شود.

در ارتباط با سرعت عبور نمونه از روی فاز جامد، اگر بتوان سرعت را بالا برد، بدون آن که میزان راندمان کاهش یابد، می‌توان عمل آماده‌سازی نمونه را سریعتر انجام داده و مدت زمانی که برای آنالیز یک نمونه منظور می‌شود، کاسته خواهد شد لذا تعداد نمونه بیشتری را می‌توان در یک

د) اتوماتیک نمودن فرآیند تغلیظ و تخلیص به دلیل

حالت جامد فاز

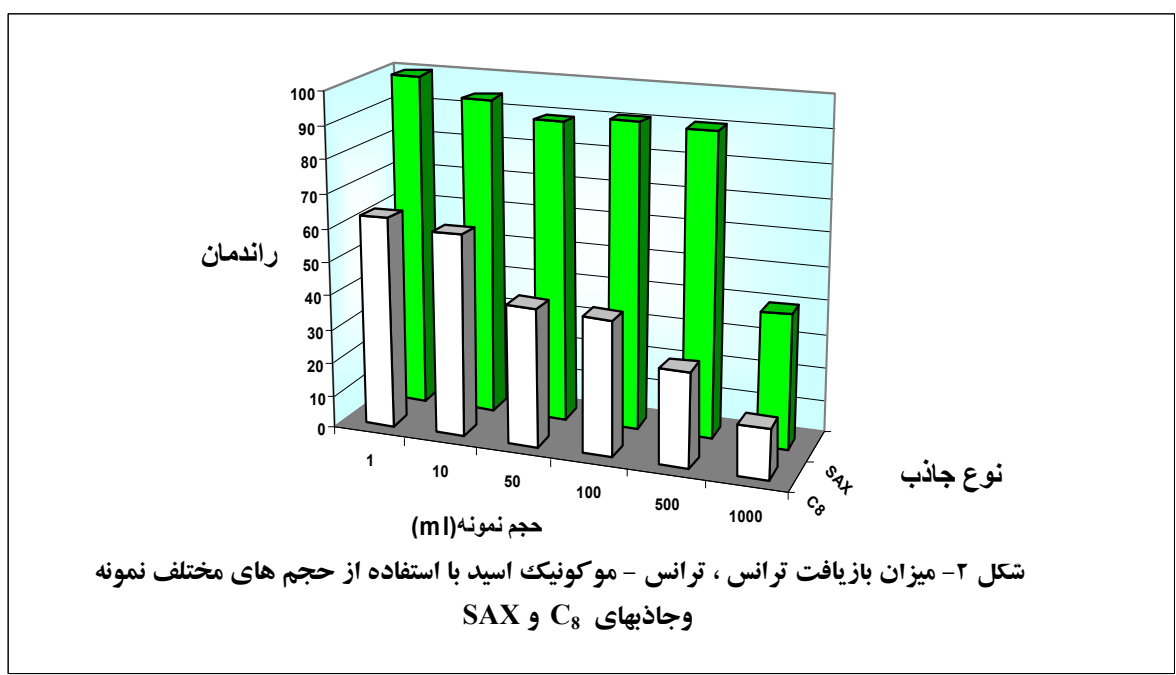
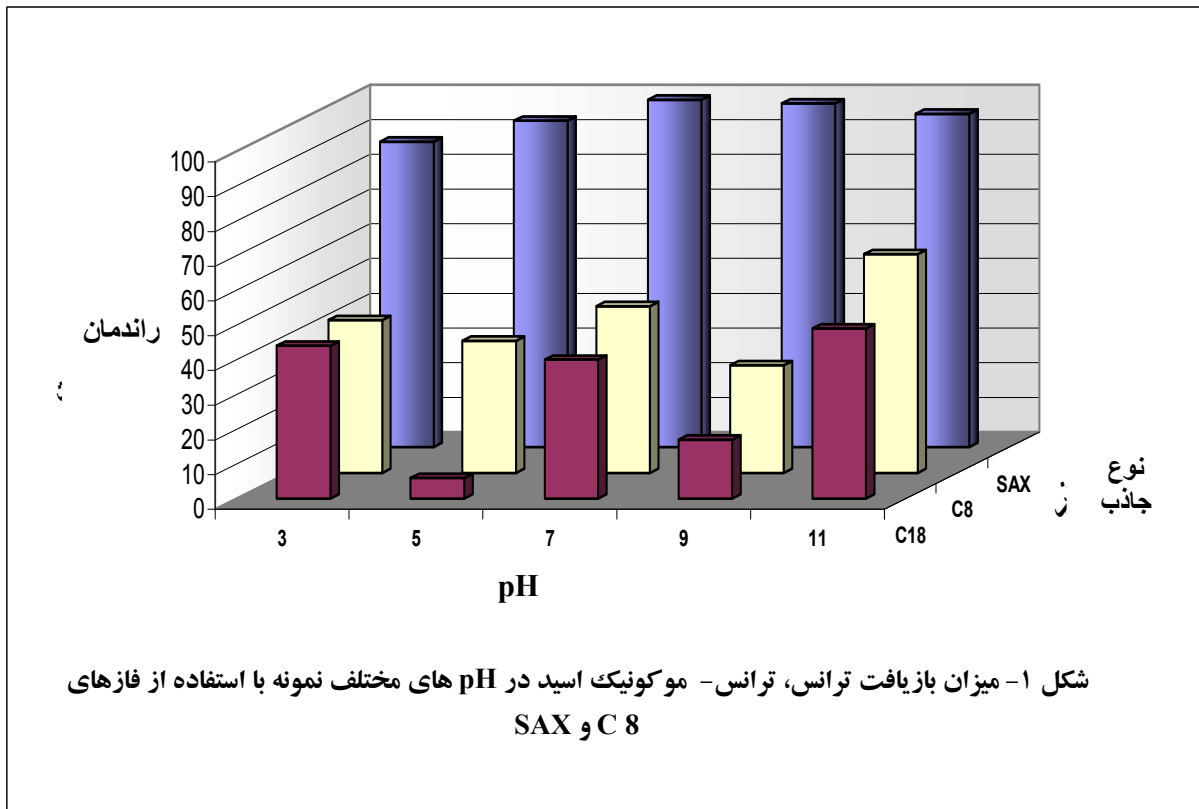
ه) امکان پذیر بودن انجام فرآیند در محل نمونه برداری

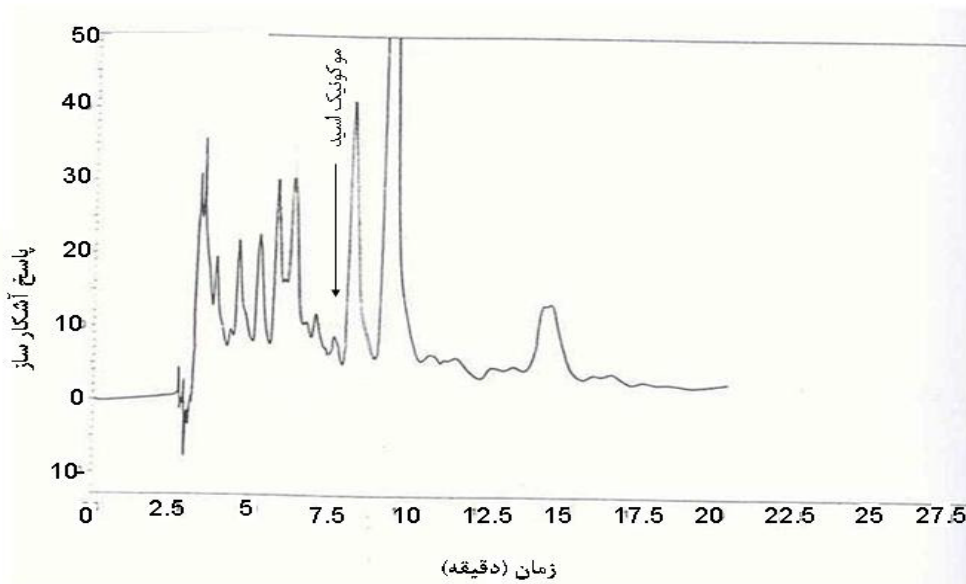
و در نتیجه کاهش هزینه های حمل و نقل و مشکلاتی که

احتمالاً ممکن است در حفظ و نگه داری نمونه پیش آید .

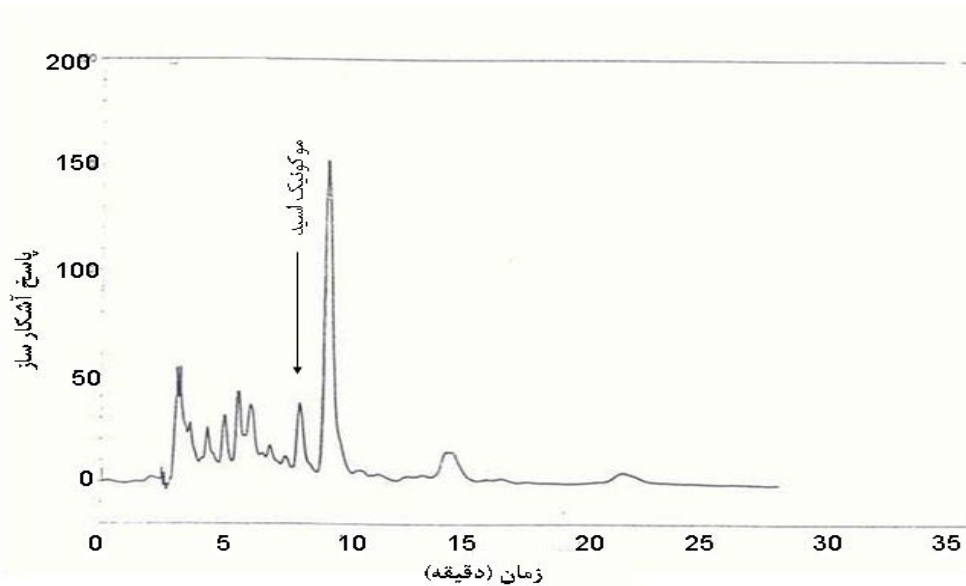
و) کاهش استفاده از حلالهای خطرناک به لحاظ

بهداشتی

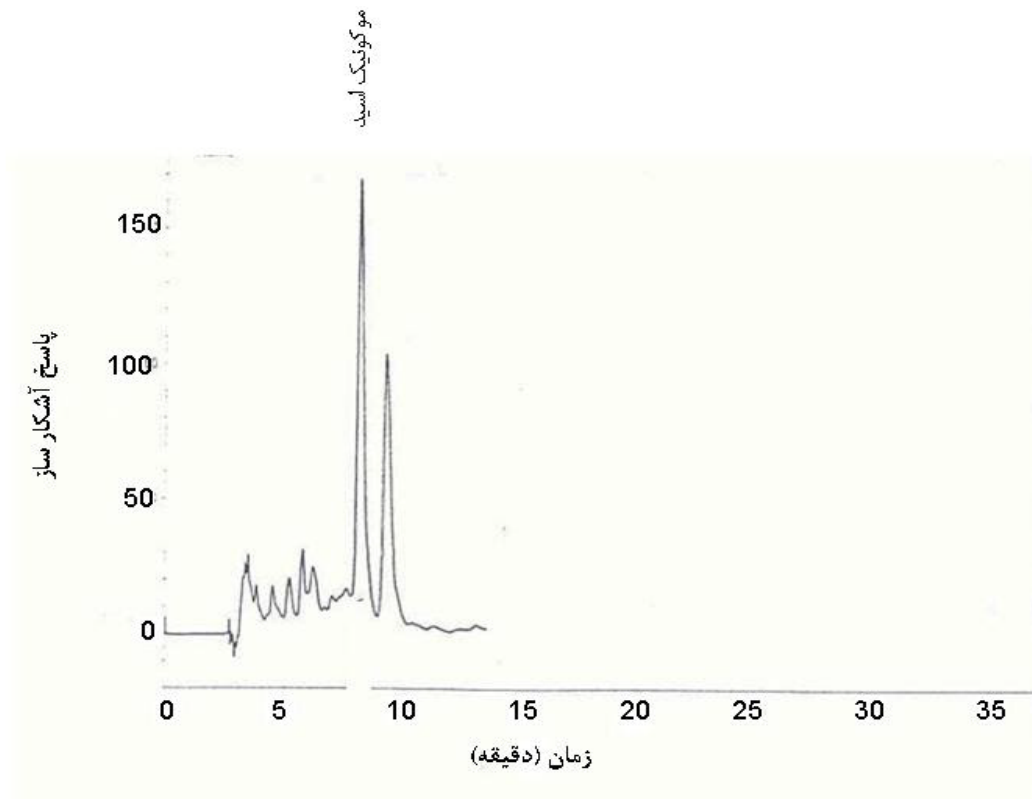




شکل ۳ (الف) - کروماتوگرام نمونه Spiked شده ترانس ، ترانس - موکونیک اسید در غلظت $0.1 \mu\text{g/ml}$ فاز برنده: آب ، متانول ، اسید استیک (۶۹ : ۳۰ : ۱ v/v/v) سرعت عبور فاز برنده : 1 ml/min ، نوع ستون تجزیه : C18 - طول موج آشکار ساز : UV ، نانومتر ۲۵۹ ، حجم تزریق : $100 \mu\text{l}$



شکل ۳ (ب) - با غلظت $1 \mu\text{g/ml}$



شکل ۳ (ج) - با غلظت $10 \mu\text{g/ml}$

جدول ۱- میزان بازیافت ترانس، ترانس - موکونیک اسید با استفاده از جاذبهای مختلف $\text{SAX}, \text{C}_8, \text{C}_{18}$

Mean \pm SD, N =5	نوع جاذب
$47/80 \pm 2/00$	C_8
$40/80 \pm 0/75$	C_{18}
$99/80 \pm 0/87$	SAX

جدول ۲- میزان بازیافت ترانس، ترانس موکونیک اسید در غلظت های مختلف با

استفاده از جاذب های SAX و C₈

۱۰۰	۰	۱	۰/۱	۰/۰۱	غلظت µg/ml
Mean±SD N = 5	Mean±SD N = 5	Mean±SD N = 5	Mean±SD N = 5	Mean±SD N = 5	شاخص آماری
۲۸±۴/۹	۶۳±۱/۷	۶۳±۳/۵	۴۳±۱/۷	۳۶ ± ۰/۶	C ₈
۹۲ ± ۶/۲	۱۰۰ ± ۳	۱۰۰ ± ۷/۸	۹۷±۶/۷	۷۲±۶/۷	SAX

جدول ۳ - میزان بازیافت ترانس، ترانس - موکونیک اسید هنگامی که از حلالهای مختلف برای شستشو فاز جامد SAX و C₈ استفاده شده است.

جدول ۴ - بازیافت نمونه های Spiked شده جهت معتبرسازی روش ارزیابی ترانس، ترانس - موکونیک

سید در ادرا به دو رو ش تکرار	اسیداستیک ۱	اسیداستیک ۲	اسیداستیک ۳	استونیتربیل	متانول	اتانول	نوع حلال
	%	%	%				شاخص آماری جاذب
	Mean±SD N = 5	Mean±SD N = 5	Mean±SD N = 5	Mean±SD N = 5	Mean±SD N = 5	Mean±SD N = 5	
	۶۳ ± ۳/۵	۴۷ ± ۱/۵	۳۱ ± ۰/۸	۴۹ ± ۱/۱	۵۴ ± ۱/۱	۵۲ ± ۱/۹	C ₈
	۱۰۰ ± ۱/۳	۹۰ ± ۰/۵	۵۶ ± ۱/۸	۹۶ ± ۰/۸	۹۵ ± ۰	۹۲ ± ۱/۲	SAX

پذیری روزه روز و در طول یک روز (N = ۶)

۱۰		۱		۰/۱		غلظت µg/ml شاخص آماری
w.d.r	D.t.d.r	w.d.r	D.t.d.r	w.d.r	D. t.d.r	
۹/۸۷ ± ۰/۲۷	۹/۹ ± ۰/۳	۰/۹۸ ± ۰/۰۳	۰/۹۹ ± ۰/۰۲۵	۰/۱ ± ۰/۰۱	۰/۰۹۷ ± ۰/۰۰۷	Mean±SD
۲/۷۴	۳	۳/۰۶	۲/۵	۱۰	۷/۲	CV%

D.t.d.r.: Day – to – day reproducibility .

W.d.r : Within – day reproducibility

- Scherer G., Remner T.H. and Meger M. (1998) Analysis and evaluation of t,t-muconic acid as a biomarker for benzene exposure. *J. chromatogr.* **717**: 179-199.
- Shahtaheri S.J. and Stevenson D. (2001) Evaluation of factors influencing recovery of herbicide MCPA from drinking water. *Iranian Journal of Public Health.* **30**: 15-20.
- Shahtaheri, S.J., Katmeh M.F., Kwasowski P. and Stevenson D. (1995) Development and optimization of an immunoaffinity-based solid phase extraction for chlortoluron. *Journal of Chromatography A.* **697**: 131-136.
- Shui, G. and Leong P.L. (2002) Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.* **977**: 89-96.
- Thurman E.M. and Mills M.S. (1998) Solid phase extraction, principles and practice. *J. chromatogr A.* **885**: 40-60.
- Tormo M. and Izco J.M. (2004) Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyze organic acids in dairy products. *Journal of Chromatography A.* **1033**: 305-310.

منابع :

- اکبری ، بهروز. (۱۳۸۱) ترجمه کتاب استخراج فاز جامد تجزیه ای ، جان فریتز ، اصفهان ، جهاد دانشگاهی ، ص ۱۴۰-۱.
- جوزن، جوانشیر. (۱۳۷۵) کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، تبریز، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی ، ص ۲۵-۱.
- شفیعی، عباس. (۱۳۷۳) کروماتوگرافی و طیف سنجی، تهران، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۲۸۰-۱.
- Boogard P.J., Nan N.J. (1995) Biological monitoring of exposure to benzene. *J. occup. En. Med.* **52**: 611-620.
- Colin F.D., Ajith D.G. and Pevathy S. (2000) Contributions of theory to method development in solid phase extraction. *J. Chromatogr A.* **885**: 17-39.
- Colin, F.D., Ajith D.G. and Revathy S. (2000) Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A,* **885**: 17-39.
- Dean J.R. (1998) Extraction methods for environmental analysis. *G. chromatogr B.* **722**: 138-149.
- Frits J.S. (1998) Analytical solid phase extraction. *J. Anal. Chem.* **59**: 146-156.
- Marie C.H. (1999) Solid Phase xtraction, method development, sorbents and coupling with HPLC. *J. Chromatogr A.* **983**: 43-54.
- McDowall, R.D. (1989) Sample preparation for biomedical analysis. *Journal of Chromatography.* **492**: 3-53.
- McDowall. R.D. (1989) Sample preparation for HPLC analysis of drugs in biological fluids. *J Phrm Biomed Anal.* **7**: 1087-1069.
- Poole S.K. and Dean T.A., Oudsema J.W. and Poole C.F. (1990) Sample preparation for chromatographic separation: An overview. *Analytica Chimica Acta.* **236**: 3-42.

OPTIMIZATION OF SPE METHOD FOR TRACE LEVEL DETERMINATION OF T,T-MUCONIC ACID AS A BIOLOGICAL INDICATOR OF OCCUPATIONAL EXPOSURE TO BENZENE

Shahtaheri S.J.^{1*} Ph.D; Ghamari F.,¹ MSPH; Golbabaei F., Ph.D; Rahimi² Froushani A., Ph.D; Abdollahli M. MSPH²

In this study, parameters affecting on SPE of trace trace muconic acid (t,t-MA), including sample pH, sample concentration, sample volume, sample flow rate, washing solvent, elution solvent, and type of sorbent were evaluated. After sample preparation of muconic acid as urinary metabolite of benzene, it was determined by HPLC-UV. In chromatographic analysis, column was C18 (250 cm × 4.6 mm id, 0.5 μm), UV wave length was 259 nm, mobile phase was H₂O/methanol/acetic acid (69:30:1 v/v/v) was run at flow rate of 1 ml/min. Through experimental evaluation, a strong anion exchange silica cartridge (SAX) has been found successful in simplifying sample preparation compare to C8 and C18. There were significant difference between recoverie of muconic acid when different washing solvent, sample volume, and sample flow rate were used (p< 0.001). An optimum recovery was obtained when sample pH was adjusted at seven. Other optimum conditions were: sample flow rate 1 ml/min; washing solvent acetic acid 1% , and acetic acid 10% as elution solvent. In this study, there was no significant difference when different sample concentrations were used (p>0.05). Recovery of spiked urine sample at concentrations of 0.1, 1, 10 μg/ml were more than 95%. The limit of detection of the optimized method was 0.01 μg/ml, showing 20 times less than biological exposure index (BEI). The optimized method was then validated with three different pools of samples at above mentioned concentrations and showed a good reproducibility over six consecutive days as well as six within-days experiments.

Keywords: *Sample preparation, solid phase extraction, chromatography, muconic acid, optimization, validation.*

* . (Author to whom all correspondence should be addressed)

1. Department of Occupational Health, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran 14155-6446m Tehran, Iran.

2. Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran 14155-6446m Tehran, Iran.