

بهینه سازی روش تخلیص و تغلیظ سرب در ارزشیابی بیولوژیکی مواجهه های شغلی

دکتر سید جمال الدین شاه طاهری^۱، منیره خادم^۲، دکتر فریده گلپایایی^۳، دکتر عباس رحیمی فروشانی^۴

چکیده

زمینه و هدف: سرب یکی از فلزات مهمی است که به طور گسترده در فرآیندهای صنعتی مورد استفاده قرار گرفته، وارد محیط شغلی و زندگی می شود و متعاقباً باعث بروز مواجهه های مختلفی می گردد. برای ارزیابی مواجهه کارگران با مقادیر کم فلز سمی سرب (II)، پایش های بیولوژیکی و محیطی فرآیندهای مهمی هستند. در این راستا آماده سازی نمونه ها قبل از آنالیز دستگاهی فرآیندهایی وقت گیر و پر خطا می باشند که این خطاها می تواند روی دقت دستگاههای آنالیز نیز تأثیرگذار باشند. استخراج نمونه ها با استفاده از فاز جامد (SPE) به دلیل ایجاد نتایج بهتر نسبت به استخراج با استفاده از فاز مایع (LLE) رشد زیادی داشته و روشی مفید در آماده سازی نمونه می باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی فاکتورهای تأثیرگذار بر تعیین کمی فلزات سمی در ارزشیابی بیولوژیکی میزان مواجهه شغلی با سرب می باشد.

روش بررسی: استخراج فاز جامد با استفاده از ستون های کوچک پر شده با رزین XAD-4 و با در نظر گرفتن عوامل: pH نمونه، غلظت لیگاند، دبی نمونه، نوع حلال شویش، حجم نمونه (تا ۵۰۰ میلی لیتر)، حجم شویش، مقدار رزین و مواد مداخله کننده موجود در ماتریکس. یون فلزی کم مقدار روی جاذب جامد جذب شده و شویش بهینه گردید. به دنبال آن مقدار آنالیت در نمونه ها با استفاده از اسپکتروفتومتری جذب اتمی شعله ای (FAAS) تعیین مقدار شدند. یافته ها: مقادیر بازیافت های بدست آمده برای یون فلزی سرب بیشتر از ۹۲٪ بود. با استفاده از شرایط بهینه سازی، مقادیر آنالیت تشخیص داده شده بعد از آماده سازی نمونه ها، با مقادیر موجود در نمونه ها در توافق بود. همچنین روش بهینه سازی شده با استفاده از نمونه های ادرار حاوی سرب با سه مقدار مختلف، معتبرسازی گردید و تکرار پذیری مطلوبی در شش روز متوالی و نیز شش آزمایش در هر روز نشان داده شد. بنظر می رسد که روش بهینه شده برای ارزیابی سایر یون های فلزی موجود در نمونه های شغلی و محیطی نیز قابل استفاده باشد، همچنین نتایج مناسبی برای انحراف استاندارد نسبی بدست آمد (کمتر از ۱۰٪).

نتیجه گیری: بنابراین با توجه به نتایج کسب شده، روش بهینه سازی شده مذکور می تواند در آماده سازی نمونه برای آنالیز مقادیر کم سرب و احتمالاً دیگر فلزات سنگین موجود در ماتریکس های مختلف و متعاقباً در ارزیابی تماس های محیطی و شغلی افراد مورد توجه قرار گیرد.

کلید واژه ها: سرب، آماده سازی نمونه، استخراج با استفاده از فاز جامد، اسپکترومتری جذب اتمی، بهینه سازی

مقدمه

شناسایی شغلی به معنای اخص ایفا نماید، شیمی تجزیه است. دلایل اصلی این نقش، تأثیر شیمی تجزیه در مباحث نمونه برداری، جداسازی، شناسایی، آشکارسازی و اندازه گیری است. به منظور ارزیابی

یکی از اساسی ترین علوم که امروزه می تواند نقش بسزایی در علم سم شناسی به طور اعم و در سم

۱- نویسنده پاسخگو، دانشیار گروه بهداشت حرفه ای دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران (email:jamal15673@yahoo.com)

۲- کارشناس ارشد بهداشت

۳- استاد گروه بهداشت حرفه ای دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴- استادیار گروه اپیدمیولوژی و آمار حیاتی دانشگاه علوم پزشکی تهران



طیف سمیت وسیعی هستند و منجر به اثرات سمی روی کلیه، دستگاه تنفسی و سیستم عصبی می شوند. برخی از علایم مسمومیت با سرب شامل ضعف، کاهش وزن، بی خوابی، نقص عملکرد ماهیچه ای - عصبی، کولیک و آنمی هایپوکرومیک می باشد. نروپاتی به همراه مسمومیت مزمن با سرب دیده می شود. تغییرات نوروفیزیولوژیکی ملایم شامل کاهش در سرعت هدایت عصب حسی و حرکتی در کارگران مواجه با سرب به اثبات رسیده است (۳-۲). به دلیل غیرقابل اجتناب بودن استفاده از فلز سنگین سرب، مطالعه این ترکیب از نقطه نظر شغلی اهمیت بسزایی دارد.

یکی از مهمترین جنبه های مطالعه فلزات، تعیین مقدار آنها در نمونه های مختلف می باشد. در نمونه های محیطی و بیولوژیکی فلزات غالباً در سطوح کم مقدار وجود دارند که این مسئله باعث مشکلات بزرگی در مراحل تعیین مقدار آنها می گردد (۶-۴). بنابراین نیاز اساسی به روش اندازه گیری حساس، معتبر و دقیق برای تعیین فلزات در سطوح کم مقدار به وضوح احساس می گردد (۶-۹).

اگرچه استفاده از دستگاههای مجهز به آشکار سازی حساس و قوی، روش های اندازه گیری را بهبود بخشیده است، متأسفانه این روش های حساس و انتخابی به تجهیزات گرانبه ای نیاز دارند. به علاوه، ممکن است در اغلب آزمایشگاه ها چنین دستگاه هایی در دسترس نباشند؛ بنابراین به منظور ساده سازی روش های تجزیه و همچنین کاهش چشمگیر هزینه ها، روش های آماده سازی نمونه توسعه یافته اند که معمولاً در هر آزمایشگاهی قابل انجام می باشند (۱۱-۹، ۷).

بدین منظور روشهای متعددی برای آماده سازی نمونه مورد استفاده قرار می گیرند که استخراج سوکسله (۱۲)، استخراج با استفاده از فاز مایع (۱۵-۱۳)، استخراج سیال فوق بحرانی (SFE) (۱۶) و استخراج با استفاده از فاز جامد (۲۰-۱۷) را می توان ذکر نمود. در بین روشهای نامبرده، استخراج با استفاده از فاز مایع و سوکسله روش هایی بسیار وقت گیر بوده و بازیافت آنالیت بدست آمده نیز تکرار پذیر نبوده و از بازدهی بالایی نیز برخوردار نمی باشد. بنابراین روش های دقیق تر و حساس تری برای اندازه گیری فلزات سنگین کم مقدار در نمونه های

تراکم آلاینده های موجود در محیط های شغلی و یا در نمونه های بیولوژیکی نظیر ادرار، خون، مدفوع و بافتهای بدن، ضرورت دارد که سموم بطور 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 کرد. 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. 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. اگر چه 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 مضافاً به اینکه 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 میکند.

فلزات عنصری هستند که فلزات در طبیعت وجود دارند واکثر آنها به دلیل کاربرد وسیع در صنایع مختلف، کشاورزی و پزشکی برای انسان مفید هستند. علاوه بر اینکه فلزات ممکن است به دلیل وجود در آب، غذا و هوا برای عموم خطرات بهداشتی به همراه داشته باشند، کارگران شاغل در معادن، ذوب فلزات، ساخت آلیاژ، نقاشی، آبکاری، آفت کشها و بسیاری از فعالیتهای صنعتی نیز با چنین خطراتی مواجهند. برخی از فلزات سنگین مانند سرب دارای

۲- دستگاه‌ها

تعیین مقدار فلزات با اسپکتروفتومتر جذب اتمی شعله‌ای (FAAS) مدل Spectra AA/ plus 20 Varian، و توسط شعله هوا - استیلن انجام شد. پارامترهای عملیاتی برای فلز مورد نظر طبق توصیه سازنده دستگاه تنظیم گردید. مقدار pH محلول‌ها توسط pH متر دیجیتالی مدل Metrohm 744 اندازه‌گیری شد. مقدار مواد و معرف‌ها نیز بوسیله ترازوی دیجیتالی مدل CP225D Sartorius (Sartorius آلمان) اندازه‌گیری گردید.

۳- آماده سازی ستون‌های کوچک

ستون‌های کوچک شیشه‌ای (۱۰×۱۰۰) mm با ۵۰۰ میلی گرم رزین پر شدند. درون ستون شیشه‌ای در دو انتهای رزین قطعه کوچکی پشم شیشه قرار گرفت. قبل از استفاده از ستون، رزین XAD-4 به ترتیب توسط متانول، آب، اسید نیتریک ۱ مولار، آب، سود ۱ مولار و آب شسته شد. در نهایت، رزین توسط محلول بافر با pH مورد آزمایش آماده گردید.

۴- آماده سازی نمونه

در این مطالعه، روش استخراج با استفاده از رزین آمبرلیت XAD-4 و با در نظر گرفتن فاکتورهای pH نمونه، دبی عبور نمونه و دبی شویش، حلال شویش، حجم شوینده، غلظت لیگاند، مقدار رزین و حجم نمونه بهینه سازی گردید. در این روش ابتدا نمونه‌ها از ستون حاوی جاذب عبور داده شدند. بعد از عمل شستشو، یون‌های فلزی جذب شده روی جاذب از ستون جدا (شویش) گردید. در نهایت، غلظت فلز در محلول نمونه توسط دستگاه FAAS تعیین مقدار شد.

یافته‌ها

۱- اثر pH نمونه

اثر pH نمونه بر جذب سطحی یون سرب (II) روی رزین XAD-4 با استفاده از pH های مختلف ۲، ۴، ۷ و ۹ بررسی گردید. مقادیر pH نمونه توسط محلول‌های بافر تنظیم شدند. نمونه ۵۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میکروگرم سرب (II) و ۶ میلی لیتر محلول APDC از ستون عبور داده شد. سپس ستون شسته شده و آنالیت جذب شده با استفاده از اسید نیتریک ۲ مولار

محیطی و بیولوژیکی مورد نیاز می‌باشد. در مقابل، روش‌های استخراج با استفاده از فاز جامد در ساده کردن آماده‌سازی نمونه قبل از روش‌های آنالیز، مفید واقع شده است. روش استخراج با استفاده از فاز جامد به جذب سطحی ترکیبات شیمیایی موجود در نمونه مایع روی یک جاذب جامد و سپس بازیافت ترکیب جذب شده به وسیله شویش از جاذب اشاره می‌کند. در این روش، جداسازی و خالص‌سازی ترکیب مورد نظر در زمان کوتاهی انجام شده و تنها حجم کوچکی از حلال‌ها در خلال انجام این روش مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده از جعبه‌های خلأ که از نظر تجاری نیز در دسترس هستند، آماده‌سازی همزمان تعداد زیادی نمونه را میسر می‌نماید. علاوه بر این، هم‌اکنون با استفاده از وسایل تجاری موجود، اتوماسیون کامل روش‌های SPE امکان پذیر می‌باشد (۲۶-۲۱). همچنین گستره وسیعی از فازهای در دسترس هستند که در برگیرنده خصوصیت‌های شیمیایی مختلفی می‌باشد. این فازها می‌توانند، بسته به ماهیت شیمیایی آنالیت، انتخاب و مورد استفاده قرار گیرند (۲۷). بنابراین تنوع فازهای موجود می‌تواند قدرت انتخابی روش‌های آماده‌سازی نمونه را ارتقاء بخشد.

هدف از این مطالعه، بدست آوردن بهینه‌سازی فاکتورهای لازم به منظور توسعه یک روش مطلوب در آنالیز نمونه‌های حاوی سرب (II) و مآلاً تدوین یک دستورالعمل مفید و کاربردی در استفاده از روش SPE است.

روش بررسی

۱- مواد شیمیایی و معرف‌ها

محلول مادر سرب از مقدار مناسب نمک نترات این آنالیت (شرکت مرک، آلمان) و به غلظت ۱۰۰۰ mg/lit با استفاده از اسید نیتریک ۰/۰۱ مولار تهیه شد. محلول‌های استاندارد کاری به طور روزانه با رقیق کردن محلول مادر تهیه شدند. اسیدها و دیگر مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. محلول بافر استاندارد در مقادیر pH های مختلف، عامل کمپلکس‌کننده آمونیوم پیرولیدین دی‌تیوکاربامات (APDC) و رزین آمبرلیت XAD-4 (مش ۴۰-۲۰) نیز از شرکت مرک تهیه شدند.

جدول ۱- اثر pH نمونه غلظت لیگاند، نوع شوینده و حجم شوینده بر جذب سطحی سرب (II) روی رزین XAD-4 (شوینده: HNO₃ دو مولار)

pH	میانگین (%) ±SD (N=5)	غلظت لیگاند w/v(%)	میانگین (%) ±SD (N=5)	نوع شوینده	میانگین (%) ±SD (N=5)	حجم شویش (ml)	میانگین (%) ±SD (N=5)
۲	۸/۳۶±۷۲	۰/۰۱	۴/۴۷±۴۲	HCl	۴/۴۷±۱۸	۵	۱/۷۶±۱۲/۰۰
۴	۴/۴۷±۷۸	۰/۰۳	۵/۴۷±۵۶	Acetone (HNO ₃ in Acetone)	۴/۴۷±۱۲	۱۰	۷/۵۸±۶۲/۰۰
۷	۵/۴۷±۹۴	۰/۰۵	۴/۴۷±۹۸	1M HNO ₃	۴/۴۷±۹۲	۱۵	۴/۲۱±۹۵/۳۸
۹	۴/۴۷±۹۸	۰/۰۷	۵/۴۷±۹۴	2M HNO ₃	۵/۴۷±۹۶	۲۰	۵/۴۷±۹۸/۰۰

شویش گردید. جدول ۱، اثر pH نمونه روی بازیافت استخراج برای یون سرب (II) را نشان می‌دهد. در نهایت، pH=۹ به عنوان یک مقدار بهینه برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

۲- اثر غلظت APDC

غلظت آمونیوم پیرولیدین دی تیوکاربامات (APDC) یکی از پارامترهای مهم تأثیر گذار بر بازیافت بدست آمده از روش بهینه شده می‌باشد. در این بررسی، گستره ۰/۰۷ - ۰/۰۱ درصد از APDC مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بدست آمده از بررسی نشان داد که با افزایش غلظت APDC تا ۰/۰۵٪، بازیافت نمونه نیز افزایش می‌یابد و پس از آن مقادیر بازیافت ثابت هستند.

۳- اثر نوع شوینده

ارزیابی قدرت شوینده بر بازیافت سرب (II) آزمایش دیگری بود که در طول این مطالعه انجام شد. پنج حلال با توجه به توانایی آنها در ایجاد شویش بهینه سرب (II) جذب شده از سطح رزین XAD-4 مورد بررسی قرار گرفتند که شامل HCl یک مولار، استون، HNO₃ یک مولار در استون، HNO₃ یک مولار و HNO₃ دو مولار می‌باشند. توالی شرایط سازی، شستشو و شویش مشابه با بخش قبلی انجام شد. نتایج در جدول ۱، ارائه شده‌اند. بازیافت کمی (>۹۵٪) برای یون سرب (II) با استفاده از شوینده HNO₃ دو مولار بدست آمد و بنابراین HNO₃ دو مولار به عنوان حلال مناسب و کارآمد برای مطالعات بیشتر انتخاب گردید.

۴- اثر حجم شوینده

حجم شوینده یک پارامتر تأثیرگذار بر آماده‌سازی آنالیت‌ها با استفاده از SPE ã استفاده از SPE با شویش روش SPE با استفاده از حجم زیاد نمونه و شویش آنالیت توسط شوینده‌ای با حداقل حجم میسر می‌شود. حجم شوینده تنها باید برای شویش ترکیب مورد نظر از جاذب کافی باشد. بنابراین بازیافت یون فلزی با استفاده از حجم‌های شوینده مختلف ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی لیتر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج اخذ شده در جدول ۱ آمده است. حجم‌های ۱۵ و ۲۰ میلی لیتر، منجر به بازیافت مناسب آنالیت شدند. به منظور به دست آمدن فاکتور تغلیظ مناسب و مطمئن، پایین‌ترین حجم رضایت بخش (۱۵ میلی لیتر) برای آزمایشات بعدی انتخاب گردید.

۵- اثر دبی شوینده

به منظور ارزیابی تأثیر دبی شوینده روی بازیافت آنالیت‌ها، یون فلزی جذب شده با استفاده از شوینده در دبی‌های مختلف ۲، ۵، ۷ و ۱۰ میلی لیتر در دقیقه شویش شد. توالی آماده‌سازی، شستشو و شویش مشابه آزمایشات قبل انجام گردید. همانطور که در جدول ۲ دیده می‌شود، فلز مورد نظر در دبی شویش تا ۷ml/min به طور کمی بازیافت گردید. سرانجام دبی ۵ml/min به عنوان مقدار بهینه برای آزمایش‌های بعدی انتخاب گردید.

۶- اثر حجم نمونه

به منظور ارزیابی حجم نمونه، ۲۰ میکروگرم سرب (II) در حجم‌های مختلف ۵۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میلی لیتر رقیق شد. این نمونه‌ها از روی ستون‌های

جدول ۲- اثر دبی شوینده، حجم نمونه، دبی نمونه و مقدار جاذب بر جذب سطحی یون سرب (II) روی رزین XAD-4 (شوینده: HNO₃ دو مولار)

دبی شویش (ml/min)	میانگین (%) ±SD (N=5)	حجم نمونه (ml)	میانگین (%) ±SD (N=5)	دبی نمونه (ml/min)	میانگین (%) ±SD (N=5)	مقدار جاذب (mg)	میانگین (%) ±SD (N=5)
۲	۰/۰۰±۱۰۰	۵۰	۰/۰۰±۱۰۰	۲	۵/۴۷±۹۶	۱۰۰	۵/۴۷±۶۶
۵	۸/۳۶±۹۸	۱۵۰	۴/۴۷±۹۸	۵	۴/۴۷±۹۸		
۷	۵/۴۷±۹۶	۲۵۰	۵/۴۷±۹۶	۷	۵/۴۷±۹۶	۵۰۰	۴/۴۷±۹۸
۱۰	۴/۴۷±۹۲	۷۵۰	۴/۴۷±۴۸	۹	۰/۰۰±۹۰		

۹- اثر ماتریکس

اثر یون های مختلف ماتریکس شامل Na⁺، K⁺، Mg²⁺ و Ca²⁺ پارامتر دیگری است که میتواند بر راندمان بازیافت آنالیت مؤثر باشد. روش استخراج با استفاده از نمونه های ۵۰ میلی لیتری حاوی ۲۰

جدول ۲- اثر یون های ماتریکس بر جذب سطحی سرب (II) روی رزین XAD-4 (شوینده: HNO₃ دو مولار)

یون (اضافه شده)	غلظت (g/l)	بازیافت (%) ±SD, N=5
Na+(NaCl)	۲/۵	۴/۴۷±۹۸
	۱۰	۱۰۰±۵/۴۷
	۲۰	۴/۴۷±۹۴
K+(KCl)	۰/۳	۰/۰۰±۱۰۰
	۰/۵	۴/۴۷±۱۰۰
	۱	۴/۴۷±۹۴
Mg ₂ +(MgCl ₂)	۰/۳	۵/۴۷±۱۰۲
	۰/۵	۵/۴۷±۱۰۰
	۱	۴/۴۷±۹۶
Ca ₂ +(CaCl ₂)	۰/۳	۴/۴۷±۹۸
	۰/۵	۴/۴۷±۹۸
	۱	۴/۴۷±۹۴
SO ₄ ²⁻ [(NH ₄) ₂ SO ₄]	۰/۵	۴/۴۵±۹۸
	۱	۵/۴۷±۹۴
	۱/۵	۴/۴۷±۹۴

کوچک حاوی XAD-4 عبور داده شدند. سپس ستون ها شسته شده و آنالیت جذب شده مطابق روش بهینه شده شویش گردید. نتایج در جدول ۲ ارائه شده اند. همانطور که دیده می شود نمونه هایی تا حجم ۵۰۰ میلی لیتر می توانند بدون کاهش معنی دار بازیافت (۹۴٪) بکار روند. بنابراین بالاترین فاکتور تغلیظ با در نظر گرفتن حجم شوینده ۱۵ میلی لیتر برابر با ۳۳/۳ می باشد.

۷- اثر دبی نمونه

به دنبال اثبات عملی بودن استفاده از حجم های بالای نمونه، اثر دبی نمونه بر جذب سطحی یون فلزی روی XAD-4 در مقادیر مختلف ۲، ۵، ۷، ۹ و ۱۰ میلی لیتر در دقیقه مطالعه گردید. نمونه ۵۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میکروگرم یون فلزی و محلول APDC با pH بهینه آماده شد. سپس توالی آماده سازی، شستشو و شویش مشابه آزمایشات قبل انجام گردید. تا دبی ۹ ml/min، کاهش معنی داری در بازیافت مشاهده نشد. دبی ۵ ml/min به عنوان یک مقدار مناسب برای ادامه آزمایشات انتخاب گردید. جدول ۲ نتایج بدست آمده از این آزمایش را نشان می دهد.

۸- اثر مقدار جاذب XAD-4

اثر مقدار جاذب با استفاده از ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم جاذب پر شده در ستون کوچک بررسی گردید. توالی آماده سازی، شستشو و شویش مشابه قبل تکرار گردید. بازیافت بدست آمده برای یون فلزی هنگام کاربرد جاذب ۵۰۰ میلی گرمی بیشترین مقدار را داشت (جدول ۲).

جدول ۴- تکرار پذیری روز به روز (D-day) و در طول روز (W-day) یون سرب (II) اسپایک شده در ادرار (حجم نمونه: ۵۰ ml، ۶) N=

غلظت اضافه شده (µg/ml)						داده‌های آماری
۱		۱/۵		2		
D-day	W-day	D-day	W-day	D-day	W-day	
۰/۹۸	۹۸۶۰	۰/۹۶۸	۰/۹۶۸	۰/۹۷۲	۰/۹۷	میانگین
۲/۵۳	۱/۳۲	۰/۹۸۳	۰/۹۸۳	۱/۶۰۲	۱/۶۴	انحراف معیار (SD)
۱/۶۹	۱/۶۴	۱/۳۴	۱/۰۱	۰/۹۹	۲/۵۸	ضریب تغییرات (%CV)

نظر می‌رسد که این pH می‌تواند مطمئن‌ترین مقدار را داشته باشد. در این مطالعه یک جاذب غیرقطبی استفاده شد؛ از آنجا که تمایلی بین این نوع جاذب و آنالیت یونیزه شده وجود نداشت، نیاز به یک لیگاند یونی گنژوگه شده احساس می‌شد تا یک مکانیسم استخراج یونی شده را میسر نماید. ضمن مطالعه مشخص شد که APDC، لیگاند مناسبی برای بدام انداختن سرب (II) موجود در نمونه روی جاذب می‌باشد. هر چند از بین گستره مورد آزمایش، غلظت لیگاند ۰/۰۵ و ۰/۰۷ (%) برای جذب کارآمد آنالیت کافی بود، به منظور پیشگیری از اشباع جاذب با لیگاند و همچنین کاهش مصرف معرف‌های مورد استفاده در فرایند استخراج، از درصد کمتری که باز یافت مناسب و رضایت بخش را برای روش فراهم می‌نماید (۰/۰۵ %)، استفاده گردید.

درک خصوصیات شیمیایی مورد آنالیز مانند قابلیت یونیزه شدن و آب‌گریزی آن می‌تواند در طراحی شرایط مناسب برای حصول راندمان استخراج مناسب مفید واقع شود. ترکیباتی که به مقدار بالایی یونی هستند، می‌توانند منجر به جذب قوی آنالیت شوند و در نتیجه شویش را مشکل نموده و به دنبال آن باز یافت ضعیف از جاذب کنژوگه شده یونی را سبب شوند. از شوینده‌های مورد استفاده در این مطالعه، همانطور که جدول ۱ نشان می‌دهد، محلول‌هایی با پایه اسید نیتریک کارآتر بوده و لذا از بین آنها، اسید نیتریک ۲ مولار انتخاب گردید، به این دلیل که یک شوینده غیر آلی بوده و می‌تواند از شویش ترکیبات آلی احتمالی موجود در نمونه‌های واقعی همراه با آنالیت جلوگیری کرده و به علاوه تماس با ترکیبات خطرناک و تبخیر شونده را کاهش دهد. علاوه بر این با استفاده از این شوینده حداکثر راندمان بدست

میکروگرم آنالیت و غلظت‌های مختلف یون‌های ماتریکس انجام شد. نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است.

۱۰- تکرار پذیری

از آنجا که ادرار اسپایک شده نیز ممکن است حاوی برخی ترکیبات مداخله کننده مشابه با نمونه واقعی باشد، می‌تواند به عنوان یک نمونه مناسب برای معتبرسازی روش بهینه سازی شده مورد توجه قرار گیرد. عمل معتبرسازی با بکارگرفتن روش بهینه سازی شده برای یون سرب (II) در ادرار با استفاده از نمونه‌های اسپایک شده انجام شد. نمونه‌های ۵۰ میلی لیتری برای استخراج و تعیین مقدار با دستگاه FAAS مورد استفاده قرار گرفتند. منحنی‌های استاندارد خطی (استخراج شده) در گستره غلظت ۱، ۱/۵ و ۲ میکروگرم بر میلی لیتر، هر روز (۶=) با ضریب همبستگی ۰/۹۹۵ یا بزرگتر به دست آمدند. تکرار پذیری روز به روز و در طول روز برای روش مورد بررسی قرار گرفت. جدول ۴، نتایج بدست آمده از این آزمایشات را نشان می‌دهد.

بحث

نتایج نشان داد که باز یافت مناسب از رزین XAD-4 با pH نمونه ۹ بدست آمد. برای یون سرب (II)، مقدار آنالیت باز یافت شده از جاذب در pH برابر با ۷ نیز مناسب بود. از آنجا که pH نمونه باید مطابق با خصوصیات شیمیایی ترکیب مورد نظر تنظیم گردد، به نظر می‌رسد که در pH نمونه برابر با ۹، آنالیت مورد نظر بیشتر در حالت یونیزه قرار دارد و بنابراین به آسانی روی لیگاند که قبلاً با جاذب پیوند یافته است، جذب می‌گردد. در بین مقادیر pH آزمایش شده، pH نمونه ۹ برای مطالعات بعدی انتخاب گردید، زیرا به

اتفاق افتاده است، به طوری که ترکیب جذب شده با مقدار نامناسب ۶۶٪ بازیافت گردید که در روش بهینه سازی شده، حد مطلوبی تلقی نمی‌شود.

با استفاده از جرم جذب به بزرگی ۵۰۰ میلی‌گرم، امکان واکنش بیشتری بین نمونه و جاذب میسر شده و در نتیجه جذب مقدار معنی‌داری در سرب روی جاذب و به دنبال آن بازیافت ۹۸٪ اتفاق افتاد. اگرچه با استفاده از جرم بالای جاذب، نیاز به حجم حلال شستشو و حلال شوینده بیشتری خواهد بود تا با حذف مداخله‌کننده‌های احتمالی، بازیافت آنالیت به نحو مطلوبی صورت پذیرد.

به منظور درک اثر ترکیبات احتمالی ماتریکس بر روش بهینه شده، یون‌های مشابه نشان داده شده در جدول ۳، با سه سطح غلظت مختلف به نمونه اضافه شدند. نتایج به وضوح نشان می‌دهد که تمامی ترکیبات اضافه شده برای هر غلظت بر بازیافت بدست آمده از روش بهینه سازی شده بی‌تأثیر می‌باشد. همانطور که دیده می‌شود، بازیافت‌ها ۹۴٪ یا بیشتر هستند که ثابت می‌کند واکنش عرضی بین مواد مداخله‌کننده اضافه شده و جاذب XAD-4 رخ نداده است و یا اینکه ترکیبات مداخله‌کننده در شویشت آنالیت از جاذب با آن همراه نشده‌اند.

در نهایت، به منظور معتبر سازی روش، تکرارپذیری روش بهینه سازی شده برای آزمایشات روز به روز و در طول روز انجام شد. منحنی استاندارد خطی (برای نمونه‌های استخراج شده) در گستره غلظت ۱، ۱/۵ و ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر هر روز و برای شش روز متوالی (n=۶) با ضریب همبستگی ۰/۹۹۵ یا بزرگتر بدست آمد.

در ارزیابی آزمایشات در طول روز، شش آزمایش در یک روز و برای سه روز متوالی انجام شد. روش استخراج ناشی از روش روز به روز و در طول روز، معتبر و تکرارپذیر بود. ضریب تغییرات (CV%) برای روش روز به روز در غلظت‌های ۱، ۱/۵ و ۲ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به ترتیب ۲/۵۸، ۱/۰۱ و ۱/۶۴ و برای روش در طول روز در غلظت‌های مشابه به ترتیب ۱/۲۴، ۰/۹۹ و ۱/۶۹ بود که نشان دهنده وجود دقت و صحت مناسب در روش بهینه سازی شده می‌باشد (جدول ۴).

طبق یک مقایسه، روشی که اخیراً گزارش شده است (۱۵)، برای برخی از فلزات از استخراج با استفاده از

آمد. نتایج بدست آمده از ارزیابی حجم شوینده (جدول ۱) نشان داد که کوچکترین حجم رضایت بخش برای اسید نیتریک ۲ مولار برای جاذب XAD-4 ۱۵ میلی‌لیتر بود. حجم مورد نیاز برای شویشت آنالیت از جاذب، بستگی به دو پارامتر مهم دارد؛ اولین پارامتر قدرت جذب (نگهدارندگی) آن می‌باشد، یک حلال با قدرت شویشت بزرگتر می‌تواند در حجم کمتری برای شویشت یک آنالیت استفاده شود اما ممکن است آلودگی‌های نامطلوب موجود در بخش‌های شویشت شده را نیز با خود همراه کند. دومین پارامتر، حجم جاذب مورد استفاده در SPE می‌باشد، به این صورت که با استفاده از کارتریج‌های جاذب با جرم بزرگتر، حجم شویشت بالاتری مورد نیاز می‌باشد. همانطور که در جدول ۱ دیده می‌شود پایین‌ترین حجم شویشت رضایت بخش، ۱۵ میلی‌لیتر است که فاکتور تغلیظ مناسب ۳۲/۳ را سبب می‌شود. با استفاده از این حجم، بازیافت مناسب ۹۵/۲۸٪ بدست می‌آید.

اگرچه حجم شویشت پایین منجر به دریافت فاکتور تغلیظ مناسب می‌گردد، هنگامی که کاربرد نمونه‌های متعدد مدنظر است، شویشت سریعتر با ۱۵ میلی‌لیتر شوینده به خودی خود می‌تواند بر کل زمان آنالیز تأثیرگذار باشد. بنابراین، در این آزمایش دبی شوینده ۵ ml/min برای کاهش زمان آنالیز به یک سوم کافی بود. آزمایش در مورد حجم نمونه، اندازه‌گیری دقیق سرب تا مقدار پایین ۰/۰۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۰/۰۴ ppm) را هنگام کاربرد حجم بزرگ نمونه (۵۰۰ ml) میسر نمود و منجر به تغلیظ آنالیت تا حد ممکن گردید.

هنگامی که حجم بالای نمونه با بازیافت مناسب بدست می‌آید، دبی نمونه بالا نیز می‌تواند بسیار سودمند باشد. در این مطالعه دبی نمونه تا ۹ ml/min با بازیافت قابل قبول ۹۰٪ و بیشتر بکار گرفته شد (جدول ۲). بنابراین به منظور اطمینان بیشتر، دبی نمونه ۵ ml/min انتخاب شد و زمان استخراج کاهش یافته‌ای را برای حجم بزرگ نمونه (۵۰۰ میلی‌لیتر) مهیا نمود. البته همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد، افزایش دبی نمونه حتی بیشتر از ۹ ml/min بدون کاهش معنی‌دار در بازیافت آنالیت ممکن خواهد بود. در صورت توجه به جرم جاذب، همانطور که دیده می‌شود جاذب ۱۰۰ میلی‌گرم مقدار مناسبی نبوده و فرآیند عبور آنالیت (Breakthrough) در آزمایش

مزایای بیشتری نسبت به روش استخراج با استفاده از فاز مایع برخوردار است. بسته به خواص فیزیکی و شیمیایی آنالیت، فاکتورهای pH نمونه، غلظت لیگاند (APDC)، دبی عبور نمونه، نوع حلال شویش، حجم نمونه (تا ۵۰۰ میلی لیتر)، حجم شویش، مقدار رزین (XAD-4) و مواد مداخله کننده ماتریکس نمونه می‌توانند نقش اساسی در بهینه‌سازی روش، ایفا نمایند و روشی معتبر با کاربرد آسان و مؤثر در صرفه جویی هزینه‌ها ایجاد کنند به طوری که بتوان بر مشکلات دیگر تکنیک‌های آماده‌سازی نمونه فائق آمد. فاکتور تغلیظ در این روش ۳۳/۳ بوده و رزین می‌تواند چندین بار استفاده شود. روش بهینه‌سازی شده می‌تواند برای آماده‌سازی دیگر یون‌های فلزی هنگام آنالیز سطوح کم مقدار فلزی در نمونه‌های محیطی و بیولوژیکی مورد نظر به کار گرفته شود. نویسندگان اطمینان دارند که SPE یک روش بسیار مستعد برای آماده‌سازی نمونه می‌باشد و بر اساس نیازها و امکانات، می‌تواند در آینده‌ای نزدیک بیشتری یابد.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۱۳۲/۷۳۷۲ مورخ ۸۴/۹/۶ می‌باشد. بدینوسیله از حمایت‌های اجرائی و مالی دانشگاه تشکر می‌شود. همچنین از همکارهای آقایان میر غنی سید صومعه و شاهرخ نظم‌آرا و خانم دیوانی نیز قدردانی می‌شود.

منابع

1. Frank C. Lu . Toxicology of metals, In: Basic toxicology. Taylor & Francis, England 293-312. 1996
2. Hathway GJ., Proctor N, Hughes J. Chemical hazardous of the workplace, 4th Ed. Van Nostrand Reinhold, a division of International Thomson Publishing Inc. 1996
3. Bingham E, B. Cohrsen . Powell HC. Patty, s toxicology; 5th Ed. John Wiley & Sons. Inc. 2001
4. MC Dowall RD. Sample Preparation for biochemical analysis. J Chromatogr, 492: 3-53. 1989.

فاز مایع (LLE) استفاده کرده است. اگرچه تکنیک ممکن است در برخی شرایط مفید واقع شود، اما هنوز قوانین پایه‌ای برای انتخاب یک سیستم حلال به منظور استخراج آنالیت مورد نظر وجود ندارد، بنابراین انتخاب یک حلال هنوز عملی تجربی بوده و علاوه بر آن، مرحله‌ای زمان‌بر و خسته‌کننده می‌باشد. گاهی تشکیل امولسیون نمونه، استخراج آنالیت را نیز خیلی مشکل می‌کند، به نحوی که محلول هابسختی شکسته می‌شوند و اغلب نمی‌توان آنها را حتی توسط عمل سانتریفوژ یا با استفاده از روش اولتراسونیک جدا نمود. دیگر مشکلاتی که در استفاده از روش LLE وجود دارند، عبارتند از: استفاده از حجم‌های بالای حلال‌های سمی و گاه قابل اشتعال، آلوده شدن مواد استخراج شده با حلال‌ها و مواد ظروف شیشه‌ای، بازیافت پایین در اثر تجزیه توسط گرما و فراریت یا جذب سطحی بوسیله ظروف شیشه‌ای.

بنابراین با توجه به مشکلات نامبرده، امروزه تمایل گسترده‌ای به سمت جایگزین کردن LLE به جای SPE وجود دارد. بنابر روش‌های گزارش شده (۲۴ و ۲۶) (۲۰، ۲۲)، برای بهینه‌سازی SPE، محققان عموماً ۶-۵ فاکتور را برای این منظور استفاده نموده‌اند، در حالیکه در این مطالعه ۹ پارامتر به طور جداگانه بهینه‌سازی شد که شامل فاکتورهای مهمی چون جرم جذب، دبی شوینده، مواد مداخله کننده ماتریکس و نیز غلظت لیگاند می‌باشد، بدین ترتیب ایجاد روشی معتبر و مناسب‌تر را میسر می‌سازد. همچنین مزیت دیگر این مطالعه نسبت به سایر مطالعات (۲۴-۱۸)، انجام آزمایشات تکرار پذیری روش است که توسط نمونه‌های ادرار اسپایک شده صورت گرفت و هدف از آن هم معتبر ساختن روش بهینه شده SPE برای استفاده احتمالی در اندازه‌گیری سرب (II) در انجام مطالعات محیطی یا پایش‌های بیولوژیکی کارگران در مواجهه با این آلاینده می‌باشد. اگرچه فاکتور تغلیظ بدست آمده از این مطالعه بالا می‌باشد اما حساسیت نسبتاً پایین FAAS، در هر صورت دستیابی به فاکتور تغلیظ بالاتر را برای محققان میسر نکرد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، فاکتورهای تأثیرگذار بر SPE بررسی و بهینه‌سازی شدند در خلال این روش نشان داده شد که روش آماده‌سازی نمونه برای سرب (II) تحت عنوان روش استخراج با استفاده از فاز جامد، از

6. **Shahtaheri SJ, Ghamari F, Golbabaie F, Rahimi-Froushani A, Abdollahi M** . Sample preparation followed by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis for monitoring muconic acid as a biomarker of occupational exposure to benzene. *Journal of Occupational Safety and Ergonomics (JOSE)*, 11(4): 377-388.2005.
7. **Maria DF** . Solid phase microextraction. *J Chromatogr A*, 889: 3-14.2000.
8. **Hennion MC, Scribe P**. Sample handling strategies for the analysis of organic compounds from environmental water samples. In: D Barcelo, editor. *Environmental analysis, techniques, applications, and quality assurance*, Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science; P: 23-77.1993.
9. **Poole SK, Dean TA, Oudsema JW, Poole CF** . Sample preparation for chromatographic separation: an overview. *Analitica Chimica Acta*, 236: 3-42.1990.
10. **Mc Dowall RD**. Sample preparation for HPLC analysis of drugs in biological fluids. *J Pharm Biomed Anal*, 7: 1087-96.1989.
11. **Shahtaheri SJ, and Stevenson D** . Evaluation of factor influencing recovery of herbicide MCPA from drinking water. *Iran J Public Health*, 30: 15-20.2001.
12. **Mitra S**. Sample preparation techniques in analytical chemistry ,Hoboken, New Jersey, USA, John Wiley & Sons.2003.
13. **Tuzen M, Aydemir E, Sari H** . Investigation of some physical and chemical parameters in the river Yesilirmak in Tokat region, Turkey. *Fresen Environ Bull*, 11: 202-207.2002.
14. **Ibrahim AE, and Suffet HL** . Freon FC-113 an alternative to methylene chloride for liquid-liquid extraction of trace organics from chlorinated drinking water. *J Chromatogr A*, 454: 217-32.1988.
15. **Bouabdallah I, Zidane I, Hacht B, Touzani R, Ramdani A** . Liquid-liquid extraction of copper(II), cadmium (II), and lead (II) using tripodal N-donor pyrazole ligands. *ARKIVOK*, 11: 59-65.2006.
16. **Takeshita Y, Sato Y, Nishi S** . Super critical fluid extraction of toxic metals from woods containing preservatives. *Ecodesign*, Presented, in: First international symposium on environmentally conscious design and inverse manufacturing, February 1-3 1999, Tokyo, Japan, p: 906.1999.
17. **Ramesh A, Mohan KR, Seshasah K** . Preconcentration of rare earth quinolin-8-ol complexes onto activated carbon and determination by first order derivative X-ray. Tokmany fluorescence spectrometry. *Talanta*, 57: 243-252.2002.
18. **Akman S, Ozcan M, Demiral E** . preconcentration of trace metals on amberlite XAD-4 resin coated with dithio carbamates and determination by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry in saline matrices. *J Anal At Spectrom*, 17: 743-745.2002.
19. **Tuzen M, Narin I, Soylak M, Elci L** . XAD-4/PAN solid phase extraction system for atomic absorption spectrometric determination of some trace metals in environmental samples. *Anal Lett*, 37(3): 473-489.2004
20. **Tokman N, Akman S** . Determination of bismuth and cadmium after solid phase extraction with chromosorb 107 in a syringe. *Anal Chimica Acta*, 519: 87-91.2004.
21. **Sturgeon RE, Berman SS, Desaulniers A, Russell DS** . Preconcentration of trace metals from sea water for determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 27: 85-91.1980.
22. **Soylak M, Dogan M**. Column preconcentration /separation and atomic absorption spectrometric determinations of some heavy metals in table salt samples using amberlite XAD-1180. *Turk J Chem*, 27: 235-242.2003.
23. **Narin I, Soylak M, Elci L, Dogan M** . Separation and enrichment of chromium, copper, nickel, and lead in surface sea water samples on a column filled with amberlite XAD-2000. *Anal Lett*, 34(11): 1935-1947.
24. **Cesur C** . Determination of manganese, copper, cadmium, and lead by FAAS after solid phase extraction of their phenylpiperazine dithio carbamate complexes on activated carbon. *Turk J Chem*, 27: 307-314.2003.
25. **Focant JF, Pirar C, Pauw ED** . Automated sample preparation-gractionation for the measurement of dioxins and related compounds in biological matrices: a review. *Talanta*, 63: 1101-13.2004.
26. **Petterson J, Kloskowski A, Zanio C, Reoraade J** . Automated high-capacity sorption probe for extraction of organic compounds in aqueous sample followed by gas chromatographic analysis. *J Chromatogr A*, 1033: 339-47.2004.
27. **Hennion MC** . Solid-phase extraction method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 856: 3-54.1999.