

بهینه‌سازی روش میکرواستخراج اتیل‌بنزن موجود در نمونه‌های ادرار با استفاده از فاز جامد در ارزیابی مواجهه‌های شغلی

حمیدرضا حیدری*، دکتر سید جمال‌الدین شاه طاهری**، دکتر محمود علی‌محمدی***، دکتر عباس رحیمی
فروشانی****، دکتر فریده گل‌بابایی****

* مربی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران.
** استاد بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
*** استادیار بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
**** استادیار اپیدمیولوژی و آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
***** استاد بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: روش‌های تعیین آلاینده‌های آلی در نمونه‌های آب و ادرار نیازمند استخراج آلاینده‌ها با استفاده از حلال‌های سمی و خطرناک می‌باشد. روش میکرواستخراج با استفاده از فاز جامد (Solid Phase Microextraction) SPME یک روش استخراج تعادلی است که در آن با کالیبراسیون مناسب می‌توان آلاینده‌ها را در غلظت‌های پایین و با حساسیت بسیار بالا و بدون استفاده از حلال انجام داد. از آنجا که ترکیبات آلی فرار (VOCs) در ادرار معمولاً در مقادیر بسیار اندک وجود دارند، بنابراین توسعه روش‌های تعیین مقدار آلاینده‌ها با حساسیت بالا ضروری به نظر می‌رسد.

روش بررسی: در این مطالعه استخراج اتیل‌بنزن در مقادیر بسیار کم با استفاده از فاز جامد از فضای فوقانی (Head Space-Solid) HS-SPME (Phase Microextraction) در نمونه‌های آب و ادرار و سپس آنالیز آن با روش کروماتوگرافی گازی (Gas Chromatography) GC انجام گردید. فاکتورهای تأثیرگذار در استخراج و تعیین مقدار اتیل‌بنزن شامل: زمان استخراج، دمای استخراج، دمای بازیافت، زمان بازیافت، میزان نمک افزوده برای اشباع نمونه، pH نمونه، حجم نمونه و سرعت اختلاط نمونه در سطوح مختلف؛ مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: پس از بهینه‌سازی روش، استخراج از فضای فوقانی محلول اتیل‌بنزن در شرایط بهینه شده به خوبی و با حد تشخیص بسیار بالایی در حد ppb انجام گرفت. نتایج نشان داد که اعمال دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه در حضور 0.2 gml^{-1} نمک NaCl و هم‌چنین حجم نمونه ۵ میلی‌لیتر و pH نمونه برابر ۷ (pH خنثی) بهترین شرایط را برای جذب ترکیب اتیل‌بنزن بر روی فیبر SPME در این آزمایش فراهم می‌کند. از سوی دیگر بازیافت آلاینده در مدت ۶۰ ثانیه در درجه حرارت ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد به طور کامل انجام می‌گیرد. بدین ترتیب بازیافت اتیل‌بنزن ۶۰ ثانیه در ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سرانجام روش بهینه شده با سه غلظت بالا، متوسط و پایین نمونه ادرار اسپایک شده، معتبرسازی گردید و نتایج به دست آمده تکرارپذیری بسیار خوبی را در طول ۶ روز متوالی و هم‌چنین ۶ بار آزمایش در هر روز نشان داد. در این مطالعه صحت، خطی بودن و حد تشخیص روش نیز تعیین شد. در نهایت جهت اطمینان از صحت و دقت روش بهینه شده، معتبرسازی و تکرارپذیری آن مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: روش HS-SPME، روشی نسبتاً آسان و کاربردی تشخیص داده شده است که می‌تواند به طور موفقیت‌آمیزی برای تعیین مقادیر ریز، مقدار اتیل‌بنزن در نمونه‌های ادرار و متعاقباً در ارزیابی مواجهه شغلی مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: میکرو استخراج فاز جامد؛ فضای فوقانی؛ کروماتوگرافی گازی؛ اتیل‌بنزن.

نویسنده مسئول مکاتبات: دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی: shahtaheri@tums.ac.ir

تلفن: ۰۲۱-۸۸۹۵۱۳۹۰

تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۵

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۰/۲۲

مقدمه

با توجه به خطرات زیست محیطی و مواجهه‌های شغلی با مواد سمی نظیر حلال‌های آلی، پایش چنین آلاینده‌هایی به منظور ارزیابی خطرات و مشکلات بالقوه‌ای که در اثر مواجهه ایجاد می‌شوند، اهمیت ویژه‌ای یافته است (۱). آماده‌سازی نمونه برای جداسازی ترکیبات آلی از محلول‌های آبی یکی از مراحل وقت‌گیر و بحث‌برانگیز در روش‌های تجزیه نمونه است (۲). روش‌های استخراج مایع - مایع (Liquid-Liquid Extraction) LLE (۳) و استخراج فاز جامد (Solid-Phase Extraction) SPE (۴)، معمولاً برای استخراج ترکیبات از محیط‌های آبی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به وابستگی روش‌های فوق‌الذکر به حلال و نیز با توجه به سمی بودن و مخاطره‌آمیز بودن اغلب حلال‌های آلی و لزوم کاهش مواجهه افراد با این ترکیبات در زمان تجزیه نمونه‌ها و هم‌چنین نیاز به روش‌های حساس‌تر و دقیق‌تر برای تجزیه نمونه‌ها در مقادیر بسیار اندک، در این مطالعه روش میکرواستخراج با استفاده از فاز جامد از فضای فوقانی نمونه (Headspace Solid Phase Micro-Extraction) HS-SPME مورد استفاده قرار گرفت؛ تا با اعمال شرایطی بر روی فاکتورهای تأثیرگذار در استخراج با این روش، این فاکتورها بهینه گردیده و از روش بهینه شده برای استخراج مقادیر ریز اتیل‌بنزن از نمونه‌های ادرار مورد استفاده قرار گیرد. روش SPME در سال ۱۹۹۷ توسط Pawliszyne (۵) ابداع و به طور موفقیت‌آمیزی برای استخراج ترکیبات آلی فرار VOCs و دیگر ترکیبات حلال از نمونه‌های آب، خاک و هوا به کار برده شد. پایه و اساس این روش، جداسازی آنالیت‌ها از محیط نمونه و ورود آن به فاز استخراج که یک پوشش پلیمری بسیار نازک میکروبی بر روی یک فیبر سیلیکا است، می‌باشد. کارایی جذب سطحی اساساً به مشخصات فیزیکی و شیمیایی ماده جاذب و ترکیبات سمی بستگی دارد. در این روش از یک فیلم پلیمری پوشش داده شده، نازک به عنوان جاذب برای استخراج آنالیت‌ها از نمونه‌های آبی و گازی استفاده می‌شود، سپس فیبر به طور مستقیم وارد محل تزریق دستگاه کروماتوگرافی گازی گردیده و آنالیت‌های جذب شده با انجام فرآیند بازیافت حرارتی و توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی تجزیه و تعیین مقدار می‌شوند. روش SPME می‌تواند مراحل نمونه‌برداری،

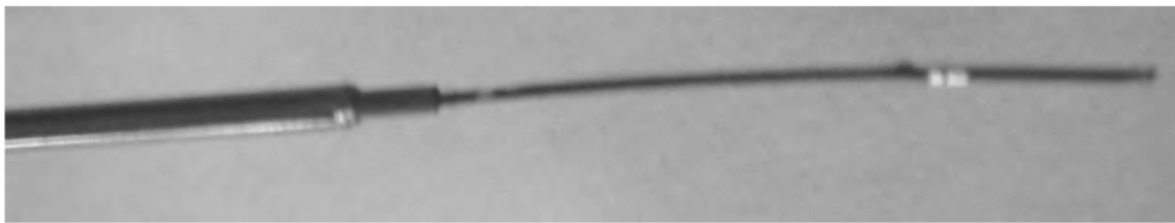
استخراج، پیش تغلیظ و وارد کردن نمونه به دستگاه آنالیز را با هم‌دیگر، در یک مرحله و بر روی تنها یک وسیله انجام دهد. این روش بسیار ساده، سریع، بی‌نیاز از حلال، ارزان، به سادگی قابل خودکارسازی و معتبر است. در این روش، نمونه‌برداری از فضای فوقانی نمونه Headspace و یا به صورت مستقیم Immerse از نمونه مایع انجام می‌گیرد و حساسیت و قابلیت انتخابی بسیار خوبی دارد (۵). امروزه در بین اکثر روش‌های پیشنهاد شده، SPME برای استخراج و تغلیظ ترکیبات فرار و نیمه‌فرار در مقادیر بسیار اندک در محیط‌های نمونه مختلف به کار می‌رود (۶). Aguinaga و همکاران در سال ۲۰۰۷ شانزده ترکیب از هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای آروماتیک را در شیر و محصولات وابسته به آن مطالعه نمودند و کلیه فاکتورهای اثرگذار بر استخراج توسط فیبر DVB/PDMS (پلی‌دیمتیل سلوکسان/دی‌وینیل بنزن) را مورد بررسی قرار دادند (۷). هم‌چنین Poon و همکاران در سال ۱۹۹۹ در مطالعه خود با روشی مشابه، ترکیبات هیدروکربن‌های چند هسته‌ای آروماتیک را در سرم خون انسان ارزیابی کردند (۸). افراد دیگری نیز از این قبیل مطالعات بر روی نمونه‌های آب و هوا انجام داده‌اند، از جمله مطالعه Demeestere و همکاران در سال ۲۰۰۷، که روشی را برای استخراج ترکیبات آلی فرار (VOCs) از نمونه‌های آب و هوا بهینه کردند (۹). هدف از مطالعه حاضر، ایجاد یک روش انتخابی، ارزان، کاربردی و سریع برای اندازه‌گیری اتیل‌بنزن در نمونه‌های ادرار با استفاده از روش SPME برای ارزیابی مواجهه‌های شغلی و محیطی می‌باشد.

روش بررسی

اتیل‌بنزن به عنوان محلول استاندارد از شرکت Aldrich خریداری شد. محلول مادر Stock اتیل‌بنزن در غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ در متانول تهیه گردید. محلول کاری Working Solution حاوی مقدار مورد نیاز از اتیل‌بنزن 1 ng/ml به صورت روزانه با رقیق‌سازی محلول استاندارد به وسیله آب ۲ بار تقطیر تهیه شد و عملکرد فرآیند استخراج تحت شرایط مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. محلول‌های مادر و استاندارد کاری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. متانول GC grade، سدیم کلرید، و

در ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه ثابت نگه داشته شد. استخراج از ۵ میلی‌لیتر محلول آبی اسپایک شده اتیل‌بنزن با استفاده از فیبر پلی‌پیرولی به روش HS-SPME انجام شد. فیبر مذکور در داخل هولدر SPME قرار گرفت (شکل شماره ۱). (قبل از انجام نمونه‌برداری، لازم است به منظور برآورد پایداری حرارتی، فیبر در دماهای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب به مدت یک ساعت قرار داده شود). ۵ میلی‌لیتر محلول حاوی آنالیت در ویال‌های شیشه‌ای ۱۰ میلی‌لیتری با درپوش‌هایی از جنس پلی‌تترافلوئورواتن (PTFE) ریخته شد. پس از اضافه کردن سدیم کلرید و قرار دادن هم‌زن مغناطیسی در داخل ویال، درپوش ویال کاملاً بسته شده و ویال بر روی Hot Plate قرار گرفت. برای این‌که دمای نمونه داخل ویال را بتوان به صورت یکنواخت تغییر داد، ویال‌ها را ابتدا در داخل یک بشر کوچک حاوی آب قرار داده و سپس مجموعه بشر و ویال داخل آن، بر روی Hot Plate گذاشته شد، و برای کنترل دما از یک دماسنج در داخل بشر استفاده گردید. به این ترتیب نمونه‌ها به صورت غیرمستقیم و به طور یکنواخت حرارت می‌دیدند. در هنگام نمونه‌برداری، فیبر پلی‌پیرولی در فضای فوقانی نمونه؛ در حالی‌که هم‌زن مغناطیسی نمونه را هم می‌زد و نمونه حرارت می‌دید، قرار گرفت. به این ترتیب که با فشردن پلانجر SPME، فیبر از غلاف خود خارج شده و در فضای فوقانی نمونه مستقر و بدین وسیله آنالیت موجود (اتیل‌بنزن) را جذب و استخراج نمود. سپس به سرعت فیبر داخل غلاف خود قرار گرفته، از ویال خارج شد و سریعاً به محل تزریق GC وارد و در آن‌جا آنالیت بازیافت حرارتی شده و تعیین مقدار گردید (شکل شماره ۱). در این مطالعه، شرایط استخراج شامل: زمان استخراج، میزان نمک افزوده برای اشباع نمونه، دما، pH نمونه، غلظت نمونه، حجم نمونه و سرعت اختلاط آن بهینه شده و در نهایت تکرارپذیری و خطی بودن منحنی کالیبراسیون تعیین گردید.

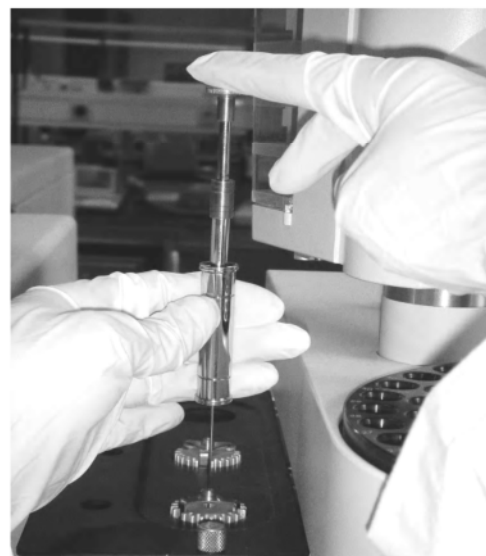
بافرهای استاندارد در سه pH مختلف (۰/۰۲، ۴±۰/۰۲، ۷±۰/۰۲ و ۹±۰/۰۲) از شرکت Merck آلمان تهیه گردید. برای تعیین اثر محیط‌های واقعی (ماتریکس) بر عملکرد فرآیند استخراج، نمونه‌های اسپایک شده ادرار به وسیله ۵ میلی‌لیتر ادرار افرادی که با اتیل‌بنزن مواجهه‌ای نداشتند، ۵ میلی‌لیتر محلول متانولی استاندارد اتیل‌بنزن در غلظت‌های مختلف و ۴۰ میلی‌لیتر آب ۲ بار تقطیر، در مجموع ۵۰ میلی‌لیتر محلول با غلظت‌های مشخص تهیه شد. فیبر پلی‌پیرولی با ضخامت ۱۶ میکرومتر بر روی یک سیم پلاتینی پوشش داده و در آزمایشگاه ساخته شد (۶). هولدر فیبر SPME برای نمونه‌برداری از شرکت آذر الکتروارومیه خریداری گردید، ویال‌های ویژه نمونه‌برداری از فضای فوقانی نمونه مورد استفاده در این پژوهش ۱۰ میلی‌لیتری انتخاب شده و از شرکت Supelco خریداری شد. برای اختلاط نمونه‌های آبی از یک هم‌زن مغناطیسی به ابعاد ۸×۳/۴ میلی‌متر به همراه یک Hot Plate Stirrer مدل RH-B-KT/CS2 ساخت کشور آلمان استفاده گردید. دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) مورد استفاده در این پژوهش Varian مدل 3800/USA بود که مشخصات آن به شرح زیر می‌باشد: ستون تجزیه آن: CP Sil8 I.D ۵۳ mm × ۰/۵۳ mm، ضخامت فیلم (Film thickness)، دکتور: FID، گاز حامل: He (99.999%)، میزان فلوی ۱۰ mlmin⁻¹، گاز N₂: Make up، با میزان فلوی: ۲۵ mlmin⁻¹ و دریچه تزریق در حالت Splitless قرار داشت. دمای محل تزریق و دمای دکتور به ترتیب ۲۵۰ و ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد اعمال شدند. دریچه Split دستگاه هنگامی که فیبر به محل تزریق وارد شد، به مدت ۵ دقیقه بسته شده و تزریق در حالت Splitless انجام گرفت. میزان فلوی گازهای دکتور عبارت بودند از: ۳۰۰ mlmin⁻¹ هوا و ۳۰ mlmin⁻¹ هیدروژن، جداسازی اتیل‌بنزن بر روی GC-FID توسط یک برنامه‌ریزی دمایی به شرح زیر انجام گردید: ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و افزایش دما تا ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و سپس دما



(الف)



(ب)



(ج)

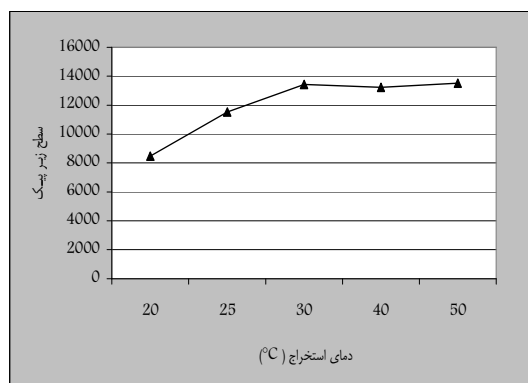
شکل شماره ۱: (الف) فیبرولی پیرولی قرار گرفته در هولدر SPME. (ب) انجام عمل استخراج توسط SPME. (ج) انجام عمل بازیافت آنالیت از فیبر SPME توسط دستگاه GC.

سانتی‌گراد پیک‌های متقارن و مناسبی ظاهر گردید. بنابراین این دما به عنوان دمای بهینه بازیافت در این مطالعه انتخاب شد. **بهینه‌سازی روش میکرواستخراج با استفاده از فاز جامد، اثر pH نمونه:** به لحاظ تئوری، تنظیم میزان pH محیط نمونه می‌تواند باعث کاهش حلالیت آنالیت‌ها در آب و افزایش بازده استخراج آن‌ها گردد. بنابراین در این آزمایش، ۵ میلی‌لیتر نمونه در مقادیر مختلف pH (۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱) مورد آزمایش قرار گرفت. شکل شماره ۲ اثر pH نمونه بر روی بازده استخراج اتیل‌بنزن را نشان می‌دهد. افزایش pH نمونه تا $pH=7$ ، بازده استخراج را افزایش داده، اما پس از آن افزایش محسوسی در میزان استخراج آنالیت مشاهده نمی‌گردد. بنابراین pH خنثی ($pH=7$) به عنوان pH بهینه شده در این پژوهش انتخاب گردید.

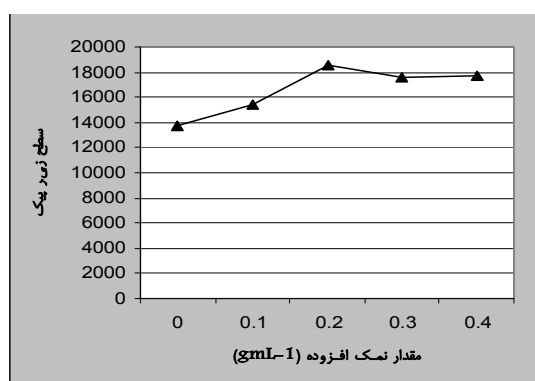
یافته‌ها

بهینه‌سازی روش آنالیز کروماتوگرافی گازی (بهینه‌سازی دمای بازیافت): افزایش دما می‌تواند باعث کاهش زمان بازیافت و نیز کاهش مقدار آنالیت باقی‌مانده بر روی فیبر، پس از اتمام مرحله بازیافت حرارتی (Carry Over) گردد، ولی احتمال تجزیه فیبر در بازیافت حرارتی ارزیابی دمای بازیافت را محدود می‌سازد. فیبرهای پلی‌پیرولی با پایداری دمایی بالا، امکان چنین ارزیابی را فراهم نموده و باعث بهبود بازیافت حرارتی می‌شود. در این روش، بازیافت کامل ترکیباتی که از لحاظ دمایی پایدارند نظیر اتیل‌بنزن دست‌یافتنی است. میزان بازیافت در محل تزریق GC در گستره دمایی ۲۰۰ تا ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. با مقایسه پیک‌های به دست آمده از کروماتوگرافی، در دمای ۲۵۰ درجه

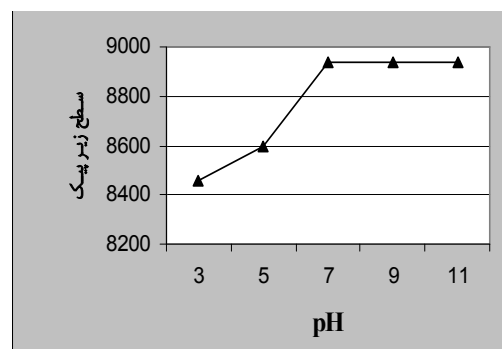
اثر دمای استخراج: با افزایش دمای محلول نمونه، فشار بخار آنالیت افزایش می‌یابد. بنابراین غلظت آنالیت در فضای فوقانی نمونه می‌تواند زیاد شود و تفکیک آنالیت بین نمونه و فضای فوقانی آن و رسیدن به نقطه تعادل تسریع گردد. از طرف دیگر، ثابت توزیع آنالیت بین فضای فوقانی نمونه و پوشش فیبر نیز وابسته به دما می‌باشد. با افزایش دما، به ویژه در دماهای بالا، پیوستگی آنالیت با پوشش فیبر کاهش می‌یابد. برای تحقیق این اثر در بازده استخراج اتیل‌بنزن، اثر پنج دمای متفاوت (۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد) مورد بررسی قرار گرفت. همان‌گونه که شکل شماره ۴ نشان می‌دهد، بالاترین میزان بازده استخراج اتیل‌بنزن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمده است و پس از آن، افزایش دما اساساً اثر قابل ملاحظه‌ای را نشان نمی‌دهد. در نتیجه این دما به عنوان دمای بهینه استخراج اتیل‌بنزن با روش HS-SPME تعیین گردید.



شکل شماره ۴: اثر دمای استخراج بر بازده استخراج اتیل‌بنزن

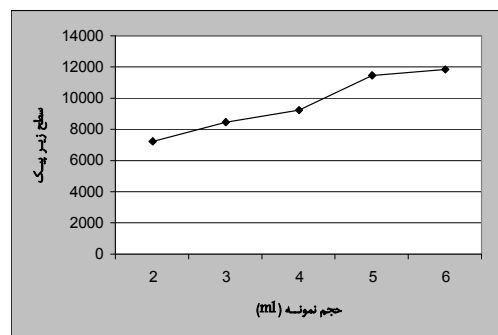


شکل شماره ۵: اثر افزایش مقادیر متفاوت نمک به نمونه در بازده استخراج **اثر افزودن NaCl:** به منظور بررسی تأثیر نمک بر بازده استخراج اتیل‌بنزن، گستره‌ای از صفر تا 0.4 gml^{-1} از سدیم کلرید (NaCl) به نمونه‌ها افزوده شد و پس از اختلاط کامل، عمل استخراج به روش HS-SPME انجام گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که افزودن



شکل شماره ۲: اثر pH نمونه بر روی بازده استخراج

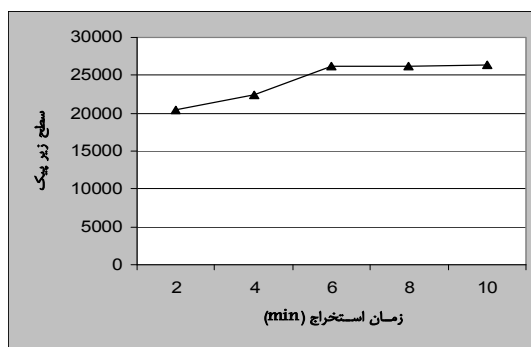
اثر حجم نمونه: در روش HS-SPME سه فاز کندانه شده، فاز گازی و پوشش فیبر در تعامل قرار دارند. اثر حجم فازهای مختلف بر کینتیک و ترمودینامیک روش HS-SPME بسیار پیچیده است؛ حتی در لحظه رسیدن به تعادل نیز چنین است و به شکل بسیار زیادی به ثابت‌های تفکیک آن‌ها بستگی دارد. از آن‌جا که حساسیت روش‌های SPME متناسب با مقدار آنالیت در نمونه است، بنابراین انتظار می‌رود که با افزایش حجم نمونه، میزان استخراج آنالیت نیز بیشتر شود. اما با توجه به تئوری SPME اگر حجم نمونه به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر از ظرفیت‌های فیبر و فضای فوقانی نمونه باشد، افزایشی در میزان استخراج اتیل‌بنزن با افزایش حجم نمونه دیده نخواهد شد. بنابراین به منظور ارزیابی اثر حجم نمونه بر بازده استخراج و تعیین حجم نمونه، آزمایشاتی صورت پذیرفت. کل حجم نمونه ویال‌های مورد استفاده در این پژوهش (حجم نمونه به علاوه حجم فضای فوقانی نمونه)، ۱۰ میلی‌لیتر بود و گستره حجم‌های نمونه مورد آزمایش، ۲ تا ۶ میلی‌لیتر انتخاب شدند. نمونه‌ها در pH بهینه شده به مدت ۱۰ دقیقه استخراج گردیدند (شکل شماره ۳).



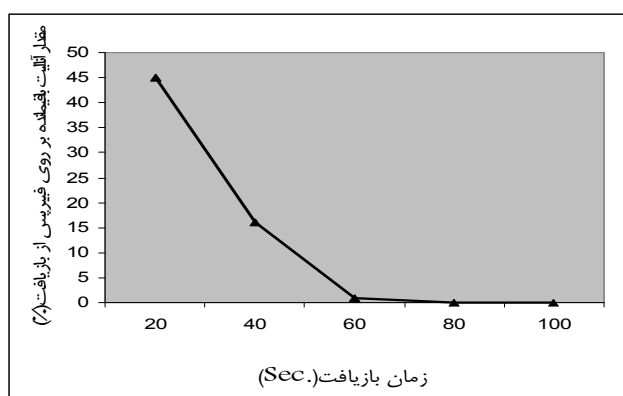
شکل شماره ۳: اثر حجم نمونه بر میزان استخراج

نتایج نشان دادند که افزایش حجم نمونه تا ۵ میلی‌لیتر می‌تواند باعث افزایش بازده استخراج اتیل‌بنزن گردد؛ اما پس از آن اساساً افزایشی در بازده استخراج آنالیت دیده نمی‌شود.

با اعمال دمای بهینه شده بازیافت ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. شکل شماره ۸ وابستگی مقدار آنالیت باقی‌مانده بر روی فیبر پس از بازیافت (Carry Over) اتیل‌بنزن را با گذشت زمان نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌گردد، بازیافت کامل اتیل‌بنزن در دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد پس از گذشت یک دقیقه حاصل می‌شود.



شکل شماره ۷: اثر زمان استخراج بر میزان آنالیت استخراج شده توسط فیبر SPME

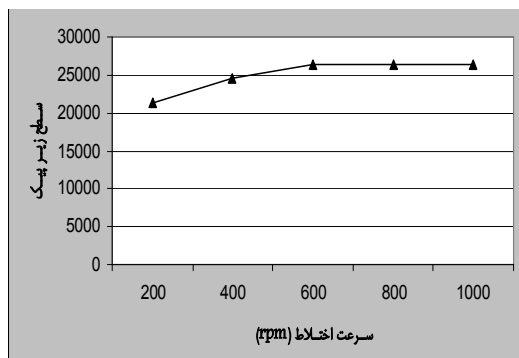


شکل شماره ۸: اثر زمان بازیافت بر درصد باقی‌مانده اتیل‌بنزن بر روی فیبر پس از بازیافت (Carry over) اتیل‌بنزن در دمای بهینه شده (۲۵۰ درجه سانتی‌گراد)

اثر غلظت نمونه: پس از بهینه‌سازی فاکتورهای تأثیرگذار بر بازده استخراج اتیل‌بنزن، گستره غلظتی آنالیت از ۵۰ تا ۴۰۰ ppb تهیه گردید، تا تأثیر غلظت نمونه بر بازده استخراج نیز بررسی شود. همان‌گونه که شکل شماره ۹ نشان می‌دهد با تغییر غلظت، سطح زیر پیک نیز افزایش یافته است که خطی بودن روش ($R^2=0.9996$) حاکی از حساسیت مطلوب روش می‌باشد.

نمک به محلول نمونه تا میزان 0.2 gml^{-1} می‌تواند به بهبود و افزایش میزان استخراج اتیل‌بنزن کمک کند، ولی پس از آن همان‌طور که در نمودار مشخص است میزان استخراج ثابت می‌ماند (شکل شماره ۵). لذا این میزان به عنوان مقدار بهینه نمک افزوده به محلول برای استخراج اتیل‌بنزن تعیین گردید.

اثر سرعت اختلاط نمونه: بازده استخراج از ۵ میلی‌لیتر محلول مادر حاوی ۱۰۰ ppb اتیل‌بنزن با آزمایش در سرعت‌های مختلف اختلاط نمونه که به وسیله هم‌زن مغناطیسی و بر روی دستگاه Hot Plate Stirring ایجاد می‌شد؛ مورد بررسی قرار گرفت. سرعت‌های ایجاد شده در گستره ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ دور در ثانیه (Ramp Per rpm) Minute, انتخاب گردیدند. همان‌طور که در شکل شماره ۶ نشان داده شده است، سرعت ۶۰۰ rpm، متناسب با افزایش سرعت، بازده استخراج نیز افزایش یافته است؛ در صورتی که در سرعت‌های بالاتر این افزایش مشاهده نگردید. لذا سرعت اختلاط ۶۰۰ rpm به عنوان سرعت بهینه برای استخراج اتیل‌بنزن در این روش تعیین شد.

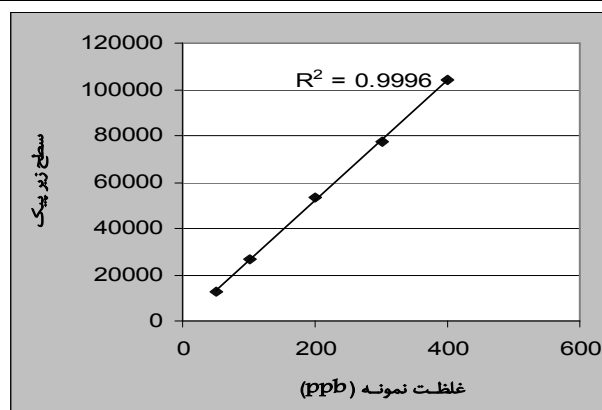


شکل شماره ۶: اثر سرعت‌های مختلف اختلاط نمونه در بازده استخراج اتیل‌بنزن

اثر مدت زمان استخراج: به منظور بهینه‌سازی مدت زمان استخراج اتیل‌بنزن، فیبر در مدت زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ دقیقه در قسمت فاز گازی فضای فوقانی نمونه قرار و سپس به داخل غلاف خود کشیده شد و به سرعت به محل تزریق دستگاه کروماتوگرافی گازی منتقل و اتیل‌بنزن پس از بازیافت حرارتی تعیین مقدار گردید. همان‌گونه که در شکل شماره ۷ نشان داده شده است، پس از گذشت ۶ دقیقه تعادل برقرار و میزان استخراج اتیل‌بنزن به حداکثر خود رسید. بنابراین این زمان به عنوان زمان بهینه استخراج اتیل‌بنزن در ادامه مراحل بهینه‌سازی شرایط HS-SPME تعیین و مورد استفاده قرار گرفت.

بهینه‌سازی مدت زمان بازیافت: زمان بازیافت در محل تزریق GC در گستره زمانی ۲۰ تا ۱۰۰ ثانیه و در ۵ زمان متفاوت

مناسب، و ترجیحاً بهتر از نمونه آبی برای معتبرسازی روش بهینه شده مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین مطالعه بر روی نمونه‌های ادرار اسپایک شده انجام گردید. نمونه‌ها در سه غلظت: پایین؛ ۵۰ ppb، متوسط؛ ۲۰۰ ppb و بالا؛ ۴۰۰ ppb با حجم‌های یکسان ۵۰ میلی‌لیتر برای استخراج مورد استفاده قرار گرفتند. منحنی‌های استاندارد (از نمونه‌های استخراج شده) در غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، و ۵۰۰ ppb در هر روز (n=۶) با ضریب همبستگی ۰/۹۹۵ و بیشتر به دست آمد. تکرارپذیری روز به روز و تکرارپذیری در داخل یک‌روز برای روش بهینه شده با استفاده از نمونه ادرار اسپایک شده با اتیل‌بنزن مورد بررسی قرار گرفت. جدول نتایج به دست آمده از این مطالعه را نشان می‌دهد.



شکل شماره ۹: اثر غلظت‌های مختلف بر بازده استخراج اتیل‌بنزن

اعتبار بخشی روش بهینه شده: از آن‌جا که نمونه‌های اسپایک شده ادرار ممکن است حاوی برخی ترکیبات مداخله‌کننده مشابه با نمونه واقعی باشد، لذا ادرار حاوی اتیل‌بنزن (ادرار اسپایک شده) Spiked Urine می‌تواند به عنوان یک نمونه

جدول: تکرارپذیری روز به روز (Day-to-day) و داخل یک‌روز (Within-day) اتیل‌بنزن در نمونه‌های اسپایک شده ادرار، حجم نمونه ۵۰ ml و n=۶

داده‌های آماری						
۴۰۰		۲۰۰		۵۰		
D-day	W-day	D-day	W-day	D-day	W-day	
۳۹۹/۰۱	۳۹۶/۲۵	۱۹۶/۹۱	۱۹۷/۸۳	۴۷/۴۱	۴۶/۱۶	میانگین (Mean)
۳/۶۵	۱/۸۹	۵/۹۸	۱/۷۲	۲/۴۱	۲/۴۸	انحراف معیار (SD)
۰/۹۱	۰/۴۷	۳/۰۳	۰/۸۷	۵/۰۸	۵/۳۷	ضریب تغییرات (CV)

بحث

آنالیت از فیبر SPME در عملیات انتقال سرنگ SPME به دستگاه GC از بین برود (هنگام انتقال فیبر از ویال به محل تزریق GC ممکن است، آنالیت تبخیر شود). البته با به کارگیری سیستم خودکار برای تزریق، مقدار آنالیت از دست رفته را می‌توان کاهش و حتی به صفر رساند و لذا بازده استخراج را بهبود بخشید. بر اساس روش‌های گزارش شده برای بهینه‌سازی SPME (۱۰) نویسندگان معمولاً از فیبرهای SPME تجاری نظیر پلی‌دی‌متیل سولفوکسان (PDMS) برای ارزیابی بازده استخراج آنالیت استفاده نموده‌اند (۱۱، ۱۲)؛ در حالی که در این مطالعه از یک فیبر ساخته شده در آزمایشگاه در داخل کشور (۲) که قابل دسترس‌تر و با هزینه بسیار کمتر قابلیت تولید دارد، استفاده گردید. در مطالعه Geerdink و همکاران که در سال ۲۰۰۷ برای بهینه‌سازی شرایط استخراج منومیتیل‌جیوه انجام شد، از دو فیبر دی‌ونیل‌بنزن

هدف این تحقیق توسعه روش برای تعیین مقادیر کم اتیل‌بنزن ادرار (Trace Analysis) در ارزشیابی مواجهه‌های محیطی و شغلی با استفاده از روش HS-SPME بود. بنابراین بهینه‌سازی پارامترهای اثرگذار بر استخراج آنالیت به وسیله آزمایش هریک از پارامترها در گستره‌های مختلف انجام گرفت. به نظر می‌رسد که روش بهینه شده برای غلظت‌های متوسط و بالا نسبت به غلظت‌های پایین بسیار حساس‌تر باشد، اما برای غلظت‌های بسیار پایین نیز بر حسب ppb از حساسیت خوبی برخوردار است و همبستگی بسیار خوبی (بزرگ‌تر از ۰/۹۹۹) بین همه غلظت‌ها دیده می‌شود (شکل شماره ۹). اما در غلظت‌های بسیار پایین مثلاً ۵۰ ppb که بسیار نزدیک به حد تشخیص دستگاه GC در این پژوهش (۳۰ ppb) می‌باشد، ممکن است، باعث گردد مقداری

برای اندازه‌گیری میزان اتیل‌بنزن در مواجهه‌های شغلی و محیطی استفاده گردید که در مقایسه با سایر مطالعات که بر روی نمونه‌های استاندارد انجام گرفته بود (۱۴) می‌تواند یک مزیت تلقی شود.

پلی‌دی‌متیل سیلوکسان و کریوکسن پلی‌دی‌متیل سیلوکسان استفاده گردید و فاکتورهای pH نمونه، زمان استخراج و بازیافت نمونه و درجه حرارت نمونه بهینه شد (۱۱). در مطالعه‌ای که توسط شاه طاهری و همکاران در سال ۱۳۸۵ جهت ارزیابی میزان مواجهات شغلی و محیطی با آلاینده بنزن انجام گردید، فاکتورهای مشابهی نظیر فاکتورهای بررسی شده در مطالعه حاضر مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج تقریباً مشابهی در بهینه‌سازی شرایط استخراج و بازیافت نمونه حاصل شد که این امر به علت مشابهت ترکیب شیمیایی بنزن و اتیل‌بنزن که هر دو از ترکیبات آلی فرار محسوب می‌شوند، می‌باشد (۱۳). در این پژوهش هم‌چنین برای معتبرسازی روش از نمونه‌های ادرار اسپایک شده

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که روش HS-SPME به عنوان روشی بسیار مناسب، ساده، سریع، انتخابی و معتبر برای تعیین مقدار و ارزیابی اتیل‌بنزن موجود در ادرار برای ارزیابی مواجهه‌های شغلی و محیطی قابل استفاده است.

References:

1. Barcelo D. Occurrence, Handling, and Chromatographic Determination of Pesticides in Aquatic Environment. *Analyst* 1991;116:681-689.
2. Mohammadi A, Alizadeh N. Automated Dynamic Headspace Organic Solvent Film Microextraction for BTEX Renewable Liquid Film as a Sampler by a Programmable Motor. *J Chromatogr A* 2006;1107:19-28.
3. Thurman EM, Mills MS. *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. New York: Wiley; 1998.
4. Keith LH. *Compilation of EPA's Sampling and Analysis Methods*. 2th ed. CRC/Lewis: Boca Raton, FL; 1996.
5. Pawliszyn J. *Solid-Phase Microextraction: Theory and Practice*. New York: Wiley-VCH Inc; 1997.
6. Mohammadi A, Yamini Y, Alizadeh N. Dodecylsulfate-Doped Polypyrrole Film Prepared by Electrochemical Fiber Coating Technique for Headspace Solid-Phase Microextraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J Chromatogr A* 2005;1063:1-8.
7. Nerea Aguinaga, Natalia Campillo, Pilar Vi Nas, Manuel Hern Andez-C 'Ordoba. Determination of 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Milk and Related Products Using Solid-Phase Microextraction Coupled to Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2007;596;285–290.
8. Ka-Fai Poon, Paul KS Lam, Michael HW Lam. Determination of Polynuclear Hydrocarbons in Human Blood Serum by Proteolytic Digestion-Direct Immersion SPME. *Analytica Chimica Acta* 1999;396:303-308.
9. Kristof Demeestere, Jo Dewulf, Bavo De Witte, Herman Van Langenhove. Sample Preparation for the Analysis of Volatile Organic Compounds in Air and Water Matrices. *Journal of Chromatography A* 2007;1153:130–144.
10. Asakawa F, Jitsunari J, Choi S, Suna N, Takeda T, Kitamado. Method for Analyzing Urinary Toluene and Xylene by Solid-Phase Microextraction (SPME), and its Application to Workers Using Organic Solvents, *Environ. Contam Toxicol* 1999;62:109-116.
11. Ren'e Bernard Geerdink, Rembert Breidenbach, Onno Jacob Epema. Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography-Atomic Emission Detection Analysis of Monomethylmercury. *J of Chromatography A* 2007;1174:7–12.
12. Hanneke Van Doorn, Carol B Grabanski, David J Miller, Steven B Hawthorne. Solid-Phase Microextraction With pH Adjustment for the Determination of Aromatic Acids and Bases in Water. *J of Chromatography A* 1998;829:223-233.
13. Shahtaheri SJ, Heidari HR, Golbabaie F, Alimohamadi M, Rahimi-Forushani A. Solid Phase Microextraction for Trace Analysis of Urinary Benzene in Environmental Monitoring. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering* 2006;3(3):169-176.
14. Hong-Wen (CHEN). Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water by Solid-Phase Microextraction and Liquid. *Chromatography Analytical Sciences* 2004;20:2005-2009.