

بررسی عوامل موثر بر آماده سازی نمونه های مندلیک اسید بعنوان یک شاخص بیولوژیکی در ارزیابی مواجهه شغلی با استایرن با استفاده از فازهای جامد

ممسن عبدالله^۱، دکترسید جمال الدین شاه طاهری^۲، دکتر فریده گلبابی^۳، دکترعباس ریمی^۴

۱- کارشناس ارشد بهداشت حرفه ای

۲- مدیر گروه و عضو هیات علمی دانشکده بهداشت دانشکده دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳ و ۴- اعضای هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

در این مطالعه با استفاده از ستونهای فاز جامد سیلیکا، عوامل موثر بر تغلیظ و تخلیص مندلیک اسید مشتمل بر PH نمونه غلظت نمونه، حجم و دبی عبور نمونه، نوع حلال شستشو و شویش و نوع جاذب مورد ارزیابی قرار گرفت.

پس از آماده سازی نمونه های آزمایشگاهی با فاز جامد نوع آنیونی قوی (SAX)، با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مجهز به ستون C_{18} ($5 \mu m$ و $4/6 IDmm \times 250$) و دکتور UV در طول موج ۲۲۵ نانومتر و با بکارگیری فاز برنده: آب، متانول، اسید استیک (V/V و ۱، ۳۰، ۶۹) در دبی $0/85 ml/min$ ، تعیین کمی گردید. حد تعیین این ماده با شرایط کروماتوگرافی ذکر شده فوق $4 ppm$ (بسیار کمتر از استاندارد مواجهه بیولوژیکی) تعیین گردید. در این تحقیق آزمایشگاهی، کار تریجهای نوع تبادل آنیونی قوی (SAX) در آماده سازی نمونه نسبت به جاذبهای غیر قطبی اکتادسیل (C_{18})، انتخاب و پذیرفته شد. میزان راندمان بازیافت مندلیک اسید با نوع جاذب، نوع حلال شستشو، حجم نمونه، pH نمونه و سرعت عبور نمونه با $Pv < 0/001$ ارتباط معنی داری دارد و بهترین بازیافت در $pH = 6$ نمونه و سرعت عبور $1 ml/min$ و اسید استیک ۱٪ به عنوان حلال شستشو و اسید استیک ۵٪ به عنوان حلال شویش در جاذب نوع SAX بدست آمد. در این مطالعه بین غلظت نمونه با بازیافت مندلیک اسید رابطه معنی داری وجود نداشت ($Pv > 0/05$). همچنین روش بهینه شده با استفاده از نمونه های Spike شده در سه غلظت $1600 ppm$ و 400 ، 50 رواییسنجی شد که قابلیت تکرار پذیری مناسب آن در شش روز متوالی و در طول یک روز مورد تائید قرار گرفت.

کلمات کلیدی: آماده سازی نمونه، استخراج فاز جامد، مندلیک اسید - HPLC، استایرن.

مقدمه

شیمی تجزیه یکی از اساسی ترین علوم است که می تواند نقش بسزایی در سم شناسی بطور اعم و در سم شناسی شغلی به معنای اخص ایفا نماید. دخالت شیمی تجزیه در مباحث نمونه برداری، جداسازی، شناسایی، آشکارسازی و اندازه گیری دلایل اصلی این نقش است (۳ و ۴ و ۵). به منظور ارزیابی 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 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 اقدام کرد (۱ و ۲ و ۵).

نمونه های بیولوژیکی یا نمونه هایی که از منابع محیطی گرفته میشوند ، 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 نباشد و یا اینکه با فرآیندهای تجزیه ناسازگار باشند (۷۴ و ۳) .

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 (۲ و ۱) .

علاوه بر آن حفظ و نگهداری و جلوگیری از کاهش عمر چنین دستگاههای ارزشمندی اقتضا مینماید که از معرفی نمونه های پیچیده به آنها جدا خودداری نمود. بنابراین آماده سازی نمونه که اغلب در آزمایشگاههای معمولی ، آموزشی و تحقیقاتی قابل انجام است، ضرورت پیدا می کند (۴، ۱) . از طرف دیگر برخی مواد شیمیایی خطرناک همانند ترکیبات آلی فرار که در مقادیر کم دارای آثار زیانبار فیزیولوژیکی وسیع می باشند و به طور گسترده مصرف و یا تولید میشوند، بایستی نمونه برداری و اندازه گیری گردند. از جمله این مواد می توان استایرن را نام برد که بطور وسیعی به عنوان حلال در صنایع مختلف استفاده می شود و اثرات سرطانزایی آن به اثبات رسیده است (۱) . امروزه استفاده از استخراج فاز جامد (SPE) جایگزین روشهای قبلی (استخراج مایع - مایع و سوکسله) آماده سازی نمونه گردیده است . بکار بردن روش استخراج فاز جامد ، راندمان بازیافت قابل قبولی را فراهم می کند. از این روش به منظور تغلیط و تخلیص ترکیبات شیمیایی که ماتریکس پیچیده داشته و یا مقدار آنالیت بسیار کم می باشد.

مواد و روش کار

این مطالعه بر اساس طراحی آزمایشگاهی انجام شده است . و جامعه آماری جاذب های سیلیکای پیوندی نوع SAX و C18 و حجم نمونه بر اساس بر آورد نمونه آماری ، ۳۸۲ نمونه خالص کاربردی تعیین گردیده است و نتایج راندمان بازیافت با توجه به متغیرهای ذکر شده با فاصله اطمینان ۹۵٪ با استفاده از آزمون آماری واریانس یک طرفه در نرم افزار Spss تجزیه و تحلیل گردیده است . همچنین برای رسم نمودار از نرم افزار EXCEL استفاده شده است .

در این پژوهش جهت آنالیز نمونه های تهیه شده ، از دستگاه HPLC استفاده گردیده و سطح پیک به عنوان پاسخ آشکار ساز تعیین گردیده و بازیافت استخراج با استفاده از مقایسه سطح پیک نمونه های استخراج شده و نمونه های استاندارد مورد محاسبه قرار گرفته است :

سطح پیک نمونه استخراج نشده / سطح پیک نمونه استخراج شده = % بازیافت

تهیه محلول مادر استاندارد :

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

روش آماده سازی نمونه

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

۲. نمونه ها با غلظت های مختلف (۵۰ - ۱۶۰۰ ppm) و در حجم های مختلف (۱ - ۲۰۰ ml) از روی فاز جامد با سرعت های ۱۰ - ۱ عبور داده شدند .

۳. سپس ستون ها به توسط ۳ میلی لیتر حلال های مختلف (اتانول ، متانول ، استونیتریل ، آب ، اسید استیک ۱٪ و ۲٪) بطور مجزا شستشو داده شدند تا عوامل و مواد مزاحم و مداخله کننده حذف گردند .

۴. آنالیت جذب شده (مندلیک اسید) بر روی ستون بتوسط ۴ میلی لیتر از حلال های مختلف (اتانول ، متانول ، استونیتریل ، اسید استیک ۵٪ ، اسید استیک ۷٪ و اسید استیک ۱۰٪) به طور مجزا از روی ستون جدا گردیده و ۱۰۰ میکرو لیتر از آن به دستگاه HPLC جهت اندازه گیری تزریق گردیده شد .

شرایط مطلوب HPLC برای آنالیز مندلیک اسید :

ستون : C₁₈ (۵ μm ، ۴ / ۶ IDmm ، ۲۵۰ ×)

فاز برنده : آب متانول ، اسید استیک با در صد حجمی به ترتیب (۶۹ ، ۳۰ ، ۱ ، ۷ / ۷)

نوع آشکار ساز : ماوراء بنفش در طول موج ۲۲۵ نانومتر

سرعت جریان فاز برنده : ۰ / ۸۵ ml / min

حجم نمونه تزریقی : ۱۰۰ میکرولیتر

درجه حرارت : دمای محیط

نتایج

از آنجایی که روش گاز کروماتوگرافی از حد آشکار سازی قابل قبولی در تعیین ترکیبات با غلظت کم برخوردار نیست و انجام مشتق سازی خود قرین با مشکلات عدیده دیگری است و همچنین به علت این که مندلیک اسید یک ترکیب ناپایدار بوده و در اثر حرارت سریعاً تجزیه می گردد (۹) . لذا از روش HPLC برای آنالیز مندلیک اسید استفاده گردیده است . 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 آشکار سازی بررسی گردیده و شرایط بهینه معین گردید . کروماتوگرام زیر برای غلظت ۱۰۰ ppm در شرایط بهینه نشان داده شده است . به منظور دستیابی به یک پروتکل استخراج بهینه ، هفت متغیر نوع فاز جامد ، PH نمونه ، حجم نمونه ، غلظت نمونه ، نوع حلال شستشو، نوع حلال شویش و سرعت عبور نمونه از روی فاز جامد مورد آزمایش قرار گرفتند .

اثر pH نمونه بر روی راندمان استخراج فازهای جاذب سیلیکا

به منظور ارزیابی تأثیر pH نمونه بر روی راندمان بازیافت مندلیک اسید ، pH های ۲ ، ۴ ، ۶ ، ۷ ، ۸ و ۱۰ در جاذب های نوع SAX و C₁₈ مورد بررسی قرار گرفتند از آنجایی که مندلیک 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 اینکه میزان یونیزه شدن آن ارتباط مستقیم با راندمان بازیافت دارد) بسیار مناسب می باشد . به لحاظ تئوریک زمانی که pH یک اسید دو واحد زیر PK_a آن باشد فعالیت یونی نداشته و چون PK_a مندلیک اسید برابر ۳ / ۸۵ می باشد در pH = ۱ / ۸ جاذب SAX جذبی را نخواهد داشت و هر چقدر pH نمونه افزایش پیدا می کند به علت افزایش تولید یون ، میزان راندمان افزایش یافته و تقریباً در pH = ۶ و بالاتر راندمان بازیافت مقدار ثابتی بدست آمده است نتایج این بررسی در شکل ۲ به تصویر کشیده شده است (۲) .

جدول ۱- اثر PH نمونه بر روی بازیافت مندلیک اسید در جاذبهای SAX و C₁₈

۱۰		۸		۷		۶		۴		۲		pH نوع جاذب
انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	
4/07	105/76	2/76	102/08	6/39	104/88	4/90	110/85	4/86	62/45	3/98	61/33	SAX
1/94	23/91	2/42	29/48	1/21	30/96	1/81	32/96	1/31	33/31	5/29	37/65	C ₁₈

اثر غلظت نمونه بر روی راندمان بازیافت فازهای جاذب سیلیکا

در یک روش ایده آل راندمان نباید به غلظت نمونه بستگی داشته باشد. در این پژوهش به منظور برآورد تاثیر غلظت نمونه روی عملکرد فاز جامد، غلظت های متفاوت ۵۰ ppm تا ۱۶۰۰ ppm از آنالیت مندلیک اسید مورد استفاده قرار گرفت و بر اساس روش مورد نظر عمل بازیافت نمونه انجام پذیرفت. جدول ذیل بیانگر این نکته است که فاز جامد نوع SAX در غلظت های متفاوت از راندمان بالایی برخوردار بوده است، حال آنکه در C₁₈ نسبت به نوع SAX راندمان پایینی بدست آمده است و همچنین بر اساس آزمون آماری واریانس یک رابطه معنی داری ما بین راندمان بازیافت و غلظت مندلیک اسید، رابطه معنی داری وجود ندارد ($Pv > 0.05$). جدول زیر بیانگر این واقعیت است که در غلظت های متفاوت نمونه مندلیک اسید، جاذب نوع SAX، جهت بازیافت مناسب میباشد.

جدول ۲- اثر غلظت نمونه بر روی راندمان بازیافت مندلیک اسید در جاذبهای SAX و C₁₈

1600		800		400		200		100		50		غلظت نوع جاذب
انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	
1/09	113/76	1/75	109/96	1/20	107/45	2/06	99/48	1/11	99/84	1/55	99/41	SAX
2/23	51/53	1/85	47/73	2/41	43/36	0/99	35/51	2/13	31/95	2/34	25/51	C ₁₈

اثر حلال شستشو بر راندمان بازیافت فازهای جاذب سیلیکا

پس از آن که نمونه از روی جاذب عبور داده می شود عمل شستشوی بستر جاذب به منظور حذف ترکیبات اضافی مداخله کننده انجام می شود. لازم است از یک حلال مناسب شستشو به منظور حذف مواد اضافی، بدون آنکه ترکیب مورد نظر از بستر جاذب جدا گردد، استفاده شود. در این مطالعه تعدادی از حلالهای غیر قطبی و یونی شامل اتانول، متانول، آب، استونیتریل، اسید استیک ۱٪ و ۲٪ استفاده گردیده است همانطوری 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.

جدول ۳- اثر نوع حلال شستشو بر روی راندمان بازیافت مندلیک اسید در جاذبهای SAX و C₁₈

اسیداستیک ۲٪		متانول		اسیداستیک ۱٪		استونیتریل		اتانول		آب		حلال شستشو نوع جاذب
انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	
1/82	92/87	1/77	98/51	1/88	102/80	1/13	99/66	1/31	99/16	0/904	97/48	SAX
1/51	29/20	1/96	27/06	1/75	23/35	1/71	23/65	2/45	17/05	1/40	21/35	C ₁₈

اثر حلال شویش بر راندمان بازیافت فازهای جاذب سیلیکا

بر اساس نتایجهای موجود قدرت جداسازی حلال در جاذبهای غیر قطبی با کاهش قطبیت حلال افزایش می یابد و بر عکس در جاذب های قطبی و یونی (SAX) قدرت جداسازی حلال، با میزان افزایش قطبیت آن افزایش می یابد. با توجه به این تئوری، به منظور ارزیابی قدرت جداسازی حلال ها در استخراج مندلیک اسید از روی فاز جامد و انتخاب یک حلال مطلوب هفت حلال مشتمل بر متانول، اتانول، استونیتریل، اسید استیک ۵٪، ۷٪،

و ۱۰٪ مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفتند. همانطوری که در شکل ذیل نشان داده شده است میزان بازیافت به هنگام استفاده از اسید استیک ۵٪ هم در SAX و هم در C₁₈ از راندمان بالایی برخوردار بوده است.

جدول ۴- اثر نوع ملال شویش بر روی راندمان بازیافت مندلیک اسید در جاذبهای SAX و C₁₈

متانول		اسیداستیک ۱۰٪		اسیداستیک ۷٪		اسیداستیک ۵٪		استونیتریل		اتانول		حلال شویش نوع جاذب
انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	
۰	۰	2/21	102/23	2/28	105/21	2/67	106/81	۰	۰	۰	۰	SAX
1/78	10/76	1/50	20/65	2/29	18/93	2/12	19/80	1/53	10/01	2/04	9/95	C18

اثر حجم نمونه بر روی راندمان بازیافت فازهای جاذب سیلیکا

اصولا کاهش راندمان جذب و به تبع آن کاهش 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 رخ می دهد (۴). برای ارزیابی اثر حجم نمونه بر روی راندمان بازیافت، حجمهای مختلف ۱ تا ۱۰۰ میلی لیتر نمونه از روی جاذبهای SAX و C₁₈ عبور داده شد. شکل ذیل نشان می دهد که با افزایش سرعت عبور نمونه از روی جاذب میزان راندمان کاهش یافته است (Pv < 0/001) و بهترین راندمان در سرعت ۱ ml/min بدست آمده است.

جدول ۵- اثر دبی بر روی راندمان بازیافت مندلیک اسید در جاذبهای SAX و C₁₈

۱۰		۸		۴		۲		۱		دبی (ml/min) تکرار
انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	میانگین	
2/02	21/18	28/81	28/81	2/92	52/75	1/63	90/01	1/18	100/76	SAX
1/30	6/45	1/30	8/53	1/75	15/83	5/33	28/51	5/29	37/65	C18

معتبر سازی روش

به منظور تعیین قابلیت استفاده از روش ارزیابی مواجهه با استایرن در غلظت های محیطی کمتر از ۱۶۰۰ ppm، تکنیک آماده سازی نمونه شامل استفاده از روش استخراج فاز جامد و تعیین عوامل موثر بر آن، لازم است روش ارائه شده معتبر گردد. لذا جهت معتبر سازی متد از دو روش تکرار پذیری روز به روز و تکرار پذیری در طول یک روز استفاده شده است. نتایج این بررسی که در جدول ذیل آمده است نشان می دهد که در سه غلظت تعیین شده، ضریب تغییرات (CV٪) بسیار کم بوده و این نشان دهنده دقت بیشتر روش می باشد.

جدول ۶- راندمان بازیافت نمونه های Spike شده جهت ارزیابی مندلیک اسید در ادرار به دو روش

تکرار پذیری (روز به روز) و در طول یک روز

۱۶۰۰		۴۰۰		۵۰		غلظت (ppm) شفاف سازی آماری
W.d.r	D.t.d.r	W.d.r	D.t.d.r	W.d.r	D.t.d.r	
1633/16	1626/03	410/89	413/02	53/37	53/15	میانگین
29/67	43/39	12/15	15/71	6/28	4/68	انحراف معیار
1/81	2/66	2/95	3/80	11/76	8/80	CV%

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

W.d.r : with-in - day reproducibility

بمٹ و نتیجہ گیری

آماده سازی نمونه ، بخش اصلی آنالیز نمونه های محیطی و بیولوژیکی را تشکیل می دهد . این عمل به دلایل متعدد همچون تغلیظ نمونه های کم غلظت ، تخلیص نمونه هایی که ماتریکس آن مرکب و مملو از ترکیبات مزاحم است صورت می گیرد . به منظور فراهم نمودن یک روش ارزیابی سریع ، اختصاصی ، دقیق ، انتخابی و با قابلیت تکرار در مواجهه شغلی با بنزن ، مندلیک اسید به عنوان یک شاخص حیاتی اختصاصی در مواجهات شغلی کمتر از ۱۶۰۰ PPM مورد بررسی قرار گرفت و شرایط آماده سازی نمونه های ادرار حاوی مندلیک اسید معین گردید .

عوامل موثر بر تغلیظ و تخلیص نمونه (pH نمونه ، غلظت نمونه ، حجم نمونه ، سرعت عبور نمونه، نوع حلال شستشو ، نوع حلال شویس و نوع جاذب) مورد ارزیابی قرار گرفتند . نتایج نشان می دهد که بین pH نمونه و میزان بازیافت نمونه مندلیک اسید رابطه معنی داری ($P_v < 0.001$) وجود دارد و مناسب ترین pH برای ارزیابی میزان موکونیک اسید در ادرار با استفاده از استخراج فاز جامد $pH = 6$ می باشد . بین حلال شستشو ، حلال شویس و میزان بازیافت MA رابطه معنی داری ($P_v < 0.001$) وجود دارد و مناسب ترین حلال شستشو برای ارزیابی میزان مندلیک اسید در ادرار با استفاده از استخراج فاز جامد اسید استیک ۱٪ می باشد و از اسید استیک ۵٪ به عنوان حلال شویس استفاده می گردد .

همچنین بین نوع حلال شویس ، حجم نمونه و سرعت عبور نمونه رابطه معنی دار آماری وجود دارد و استفاده از حجم ۵۰۰ - ۱ میلی لیتر نمونه با سرعت عبور 1ml / min راندمان بالای ۹۵٪ را فراهم می کند . و در نهایت بین غلظت نمونه و راندمان بازیافت رابطه ای آماری ($P_v > 0.05$) وجود ندارد . و در نهایت این بررسی نشان داد روش استخراج فاز جامد (SPE) بجای روش استخراج فاز مایع می تواند در تغلیظ و تخلیص نمونه های بیولوژیکی توصیه گردد .

فوائد این روش می تواند شامل موارد ذیل باشد .

الف) سرعت در عمل تغلیظ و تخلیص

ب) تنوع در فازهای جامد

ج) کاهش استفاده از حلال های خطرناک به لحاظ بهداشتی

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

ه) اتوماتیک نمودن فرآیند تغلیظ و تخلیص به دلیل حالت جامد فاز

و) امکان پذیر بودن انجام فرآیند حل 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 .

منابع

- ۱- افشاری پور، مهین - روشهای نوین تجزیه دستگاهی، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تهران(۱۳۷۶)
- ۲- جوزن، جوانشیر- کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تبریز(۱۳۷۵)
- ۳- بهرامی، عبدالرحمان - نمونه برداری و تجزیه آلاینده ها در هوا، انتشارات باباطاهر(۱۳۷۸)

3-Shahtaheri S.J, Stevenson D(2001) : Evaluation of factors influencing recovery of herbicide....Iranian J.publ.Health,30:15-20

4-Bingham E, Cohrssen B(2001) : patty 's industrial hygiene and toxicology, 4th edition, volume2, partB

- 5- Shahtaheri S.J : trace pesticide analysis using immuno-based SPE tesis.golford Surrey
- 6- Fritz J.S(1998): Analytical solid phase extraction, Anal.chem,59:146-156
- 7- Frits J.S(1999):): Analytical solid phase extraction. jchromatogr,640:145-156
- 8- Marie, C.H(1999): solid phase extraction, method development, sorbent and coupling with HPLC.jchromatogram.985:43-54
- 9- Majors R.E(1998): solid phase extraction-principales, strategies and applications. Anal chem, 59:146-156



