

بررسی عوامل موثر بر آماده سازی نمونه های ترانس و ترانس- موکونیک اسید به عنوان یک شاخص بیولوژیکی در ارزیابی مواجهه شغلی با بنزن با استفاده از فازهای جامد

فرهاد قمزی^۱، دکتر جمال الدین شاه ماهر^۲، دکتر فریده گللبایی^۳، دکتر عباس رمیمی^۴

۱- کارشناس ارشد بهداشت حرفه ای معاونت بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی اراک

۲- دانشیار و مدیر گروه بهداشت حرفه ای دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳-۴- اعضای هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

در این مطالعه با استفاده از مواد جاذب جامد با پایه سیلیکا، عوامل موثر بر تغلیظ و تخلیص موکونیک اسید مشتمل بر PH نمونه، غلظت نمونه، حجم و دبی عبور نمونه، نوع حلال شستشو و شویشو نوع جاذب مورد ارزیابی قرار گرفت. ترانس، ترانس- موکونیک اسید که یک متابولیت کوچک مواجهه با بنزن می باشد، بعد از آماده سازی نمونه های آزمایشگاهی (Clean up) با فاز جامد نوع آنیونی قوی (SAX)، با استفاده از سیستم HPLC مجهز به ستون C_{18} ($5 \mu m$ و $4/6 IDmm \times 250$) و دتکتور UV در طول موج ۲۵۹ نانومتر و با بکارگیری فاز برنده: آب، متانول، اسید استیک (V/V و ۱، ۳۰، ۶۹) در دبی $1 ml/min$ ، تعیین کمی گردید و راندمان بازیافت بدست آمد. بازیافت موکونیک اسید از نمونه های ادراری Spiked شده در غلظت $10 \mu g/ml$ - 1 بیش از ۹۵٪ بدست آمد. حد تعیین این ماده با شرایط کروماتوگرافی ذکر شده فوق $0.1 \mu g/ml$ (هفتاد مرتبه کمتر از استاندارد مواجهه بیولوژیکی) تعیین گردید. در این ارزیابی آزمایشگاهی، کارتریج تبادل آنیونی قوی (SAX) در آماده سازی نمونه نسبت به جاذبهای غیر قطبی C_8 و C_{18} ، انتخاب و پذیرفته شد. میزان راندمان بازیافت موکونیک اسید با نوع جاذب، نوع حلال شستشو، حجم نمونه، pH نمونه و سرعت عبور نمونه با 0.01 / $P_v < 0$ ارتباط معنی داری دارد و بهترین بازیافت در $pH = 7$ نمونه و سرعت عبور $1 ml/min$ و اسید استیک ۱٪ به عنوان حلال شستشو و اسید استیک ۱۰٪ به عنوان حلال شویشو در جاذب نوع SAX بدست آمد. در این مطالعه بین غلظت نمونه با بازیافت موکونیک اسید رابطه معنی داری وجود نداشت ($P_v > 0.05$). همچنین روش بهینه شده با استفاده از نمونه های Spiked شده در سه غلظت 10 و 1 و $0.1 ppm$ معتبر سازی شد که قابلیت تکرار پذیری مناسب آن در شش روز متوالی و در طول یک روز مورد تأیید قرار گرفت.

کلمات کلیدی: آماده سازی نمونه - استخراج فاز جامد- ترانس، ترانس موکونیک اسید- HPLC - بنزن.

مقدمه

یکی از اساسی ترین علومی که می تواند نقش بسزایی در سم شناسی بطور اعم و در سم شناسی شغلی به معنای اخص ایفا نماید، شیمی تجزیه است. دلایل اصلی این نقش، دخالت شیمی تجزیه در مباحث نمونه برداری، جداسازی، شناسای، آشکارسازی و اندازه گیری است. 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. 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 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.

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. 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 جدا خودداری نمود. بنابراین آماده سازی نمونه که اغلب در آزمایشگاههای معمولی، آموزشی و تحقیقاتی قابل انجام است، ضرورت پیدا می کند. 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 می شوند، بایستی نمونه برداری و اندازه گیری گردند. از جمله این مواد می توان بنزن را نام برد که بطور وسیعی به عنوان حلال در صنایع مختلف استفاده می شود و اثرات سرطانزایی آن به اثبات رسیده است (۷). 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 ۵ ppm به ۱ ppm کاهش داد و در سال ۱۹۹۴ این مقدار به ۰/۳ ppm تقلیل پیدا کرد. لذا آماده سازی نمونه به منظور تغلیظ و تخلیص مقادیر کم سموم، یکی از عوامل مهم در بالا بردن قدرت آشکارسازی دستگاههای آنالیز بطور غیر مستقیم می باشد (۱۰).

در مرحله تعیین مقدار مواد شیمیایی و یا متابولیتهای ناشی از مواجهه با آنها در مقادیر کم و در ماتریکس های بیولوژیکی و محیطی پیچیده مشکلات عمده ای وجود دارد. بنزن یک ماده شیمیایی صنعتی است که در نفت و روغن های معدنی وجود دارد و در فرآیند های احتراقی ایجاد می شود و آلودگی های محیطی و صنعتی گسترده ای را ایجاد می کند که اثرات زیان آور زیادی از جمله بیماریهای خونی، آسیب سیستم ایمنی، اختلالات قاعدگی و کاهش اندازه تخمدان ها و سرطانی را بدنبال دارد (۱۱). اخیراً ترانس، ترانس - موکونیک اسید به عنوان متابولیت ادراری مواجهه با غلظتهای کمتر از ۵ ppm بنزن مورد ارزیابی قرار می گیرد (۴). هدف از انجام این مطالعه بهینه کردن روش آماده سازی نمونه برای تعیین مقدار ترانس، ترانس - موکونیک اسید در ادرار در مواجهه های شغلی و محیطی با مقدار کم بنزن (استانداردهای بنزن به علت اثرات مخرب آن هر ساله کاهش یافته است) می باشد.

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 تغلیظ و تخلیص ترکیبات شیمیایی که ماتریکس پیچیده داشته و یا مقدار آنالیت بسیار کم می باشد استفاده میگردد (۳). 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 وضعیت های بهینه آنها تعیین گردیده است.

مواد و روش کار

این مطالعه بر اساس طراحی آزمایشگاهی (Experimental design) انجام شده است . و جامعه آماری جاذب های سیلیکای پیوندی نوع SAX ، C₈ و C₁₈ و حجم نمونه بر اساس بر آورد نمونه آماری ، ۳۷۲ نمونه خالص کا ربردی 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 EXCLE 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 شده =٪ بازیافت / سطح پیک نمونه استخراج نشده

وسایل عمده استفاده شده عبارت بودند از :

- لوله های جاذب حاوی C₁₈ (اکتادسیل) ، C₈ (اکتیل) و SAX (تبادلی آنیونی قوی) .
- جعبه خلاء حاوی ۱۰ محل برای استقرار لوله های جاذب .
- پی پت های گیلسون در حجمهای ۵۰ ، ۲۰۰ ، ۱۰۰۰ ، ۵۰۰۰ ، ۱۰۰۰۰ میکرولیتر .
- ترازوی دقیق در حد ۰/۰۰۰۱ mg
- PH متر دیجیتال
- ویالهای ۵ و ۱۰ میلی متری
- سرنگ تزریق ۱۰۰ میکرولیتری
- دستگاه اندازه گیری در این پژوهش ، HPLC بود و نمونه های مورد استفاده عبارت بودند از نمونه های موکونیک اسید خالص و spiked شده با ادرار .
- استانداردها، معرف ها و حلال های مختلف مورد نیاز در این پژوهش .

تهیه مملول مادر استاندارد :

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

روش آماده سازی نمونه :

- ۱ . ابتدا لوله های جاذب سیلیکا (C₈ و 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 (۱۰۰ ppm - ۰/۰۱) و در حجم های مختلف (۱ - ۱۰۰۰ ml) از روی فاز جامد با سرعت ۲۰ - ۱ ml / min عبور داده شدند .
- ۳ . سپس ستون ها به توسط ۳ میلی لیتر حلال های مختلف (اتانول ، متانول ، استونیتریل ، فاز برنده ، اسید استیک ۱٪ و ۲٪ و ۳٪) بطور مجزا شستشو داده شدند تا عوامل و مواد مزاحم و مداخله کننده حذف گردند.

۴. آنالیت جذب شده (ترانس ، ترانس - موکونیک اسید) بر روی ستون بتوسط ۴ میلی لیتر از حلال های مختلف (استونیتریل ، اتانول ، متانول ، اسید استیک ۱۰٪ - ۵٪) 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 ترانس ، ترانس - موکونیک اسید :

ستون : C_{18} ($5 \mu m$ ، $4 / 6 IDmm$ ، $250 \times$)

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

نوع آشکار ساز : ماوراء بنفش در طول موج ۲۵۹ نانومتر

سرعت جریان فاز برنده : ۱ ml / min

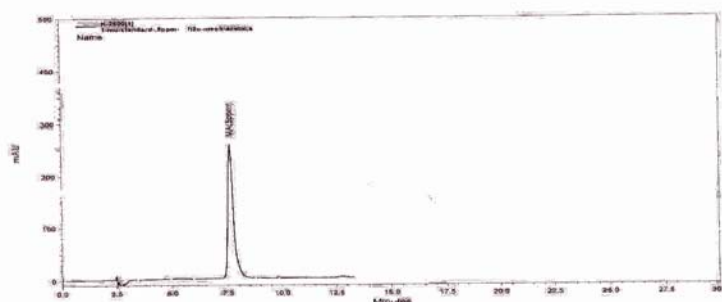
حجم نمونه تزریقی : ۱۰۰ میکرولیتر

درجه حرارت : دمای محیط

حد آشکار سازی (limit of detection) : حد آشکار سازی نیز با توجه به نسبت ارتفاع ۳ به ۱ (signal - to - noise) در نظر گرفته شد که مقدار ۰/۰۱ ppm بدست آمد .

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 موکونیک اسید یک ترکیب ناپایدار بوده و در اثر حرارت سریعاً تجزیه می گردد (۹) . لذا از روش HPLC برای آنالیز ترانس ، ترانس - موکونیک 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 $1 \mu g / ml$ در شرایط بهینه نشان داده شده است .



شکل ۳-۳ کروماتوگرام HPLC ترانس ، ترانس - موکونیک اسید.
شرایط کروماتوگرافی «فاز برنده» آب، متانول و اسید استیک (۶۹ و ۳۰ و ۱ ، V/V)
سرعت عبور فاز برنده : ۱ ml/min - نوع ستون تجزیه : C_{18} - طول موج uv ، ۲۵۹ نانومتر
حجم تزریق : ۱۰۰ میکرولیتر ، در دمای محیط

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 .

بستگی میزان بازیافت ترانس ، ترانس موکونیک اسید به نوع فاز جامد

به منظور انتخاب یک فاز جامد مناسب (جاذب) کارتریجهایی از نوع C₈ و C₁₈ و SAX مورد ارزیابی قرار گرفتند با توجه به خصوصیات هیدروفوبی بودن ترانس ، ترانس - موکونیک اسید و همچنین یونیزه شدن آن در حالت آبی ، میزان راندمان بازیافت آن در نوع SAX به مراتب بالاتر از انواع دیگر فاز جامد بود . بدیهی است هر چقدر فاز جامد در ستون بیشتر باشد ظرفیت جذب ستون بالا رفته و امکان افزایش حجم نمونه و بدنبال آن ، تغلیظ بیشتر نمونه وجود خواهد داشت و در مقابل نیز حجم حلال شویشی برای جدا سازی موکونیک اسید از فاز جامد بالا خواهد رفت که اثر منفی روی میزان تغلیظ نمونه خواهد گذاشت که در این زمینه لازم است تعادلی بین دو متغیر وجود داشته باشد .

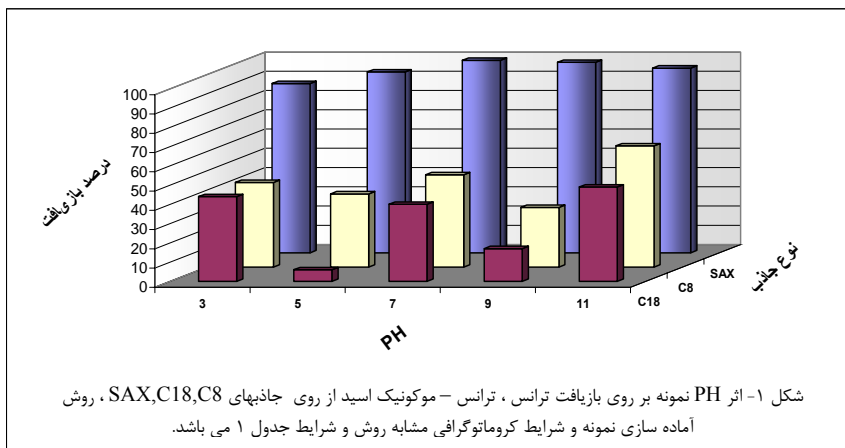
جدول (۱) اثر نوع جاذب بر روی راندمان بازیافت ترانس ، ترانس- موکونیک اسید (جاذبهای C₁₈, C₈, SAX)

نوع جاذب	C ₈	C ₁₈	SAX
آزمایش ۱	۴۴	۴۰	۱۰۱
آزمایش ۲	۴۸	۴۱	۱۰۱
آزمایش ۳	۴۹	۴۱	۹۹
آزمایش ۴	۴۸	۴۱	۹۹
آزمایش ۵	۵۰	۴۲	۹۹
میانگین	۴۷/۸	۴۰/۸	۹۹/۸
انحراف معیار	۲	۰/۷۵	۰/۸۷

۱ میلی لیتر نمونه با غلظت ۱ ppm از روی هریک از فازهای جامد در pH نرمال نمونه عبور داده شده است. قبل از عبور نمونه، فازهای جامد به وسیله ۳ میلی لیتر متانول و ۳ میلی لیتر آب مقطر شرایط سازی شده و پس از عبور نمونه با ۳ میلی لیتر اسیداستیک ۱٪ عمل شستشو انجام شده و عمل شویش با ۴ میلی لیتر اسیداستیک ۱۰٪ صورت گرفته و نهایتاً با ۱ میلی لیتر آب مقطر HPLC grade به حجم ۵ میلی لیتر رسیده است. فاز برنده : متانول ، آب ، اسید استیک (V/V, ۱:۶۹:۳۰) - میزان سرعت عبور نمونه: ۱ ml/min - ستون تجزیه ای: C₁₈ - طول موج UV , ۲۵۹ نانومتر. حجم تزریق ۱۰۰ میکرو لیتر می باشد.

اثر pH نمونه بر روی راندمان استخراج

به منظور ارزیابی تاثیر pH نمونه بر روی راندمان بازیافت موکونیک اسید ، pH های ۳ و ۵ و ۷ و ۹ و ۱۱ در جاذب های نوع SAX و C₈ و C₁₈ مورد بررسی قرار گرفتند. از آنجایی که 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 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 موکونیک اسید برابر ۴ می باشد در pH = 2 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 = 7 و بالاتر راندمان بازیافت مقدار ثابتی بدست آمده است نتایج این بررسی در شکل ذیل به تصویر کشیده شده است (۱۰) .



اثر غلظت نمونه بر روی عملکرد 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 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 ذیل بیانگر این نکته است که فاز جامد نوع SAX در غلظت های متفاوت از راندمان بالایی برخوردار بوده است ، حال آنکه در C8 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 موکونیک اسید ، بالای ۰/۰۱ ppm وجود ندارد ($P_v > 0/05$) . جدول زیر بیانگر این واقعیت است که در غلظت های متفاوت نمونه موکونیک اسید ، جاذب نوع SAX ، جهت بازیافت مناسب می باشد .

جدول (۲) اثر غلظت نمونه بر روی بازیافت ترانس ، ترانس - موکونیک اسید از جاذب های SAX و C8

۱۰۰		۱۰		۱		۰/۱		۰/۰۱		غلظت جاذب
SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	
۴/۹	۲۸	۱/۷	۳۸	۳/۵	۶۳	۱/۷	۴۳	۰/۶	۳۶	C8
۶/۲	۹۲	۱۰۰	۳	۱۰۰	۷/۸	۹۷	۶/۷	۶/۷	۷۲	SAX

Mean : میانگین SD : انحراف معیار

بستگی راندمان بازیافت به نوع ملال شستشو :

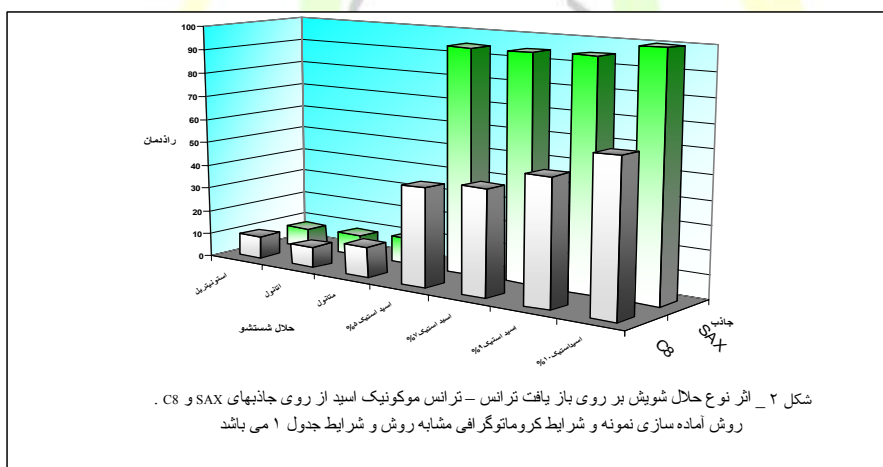
پس از آن که نمونه از روی جاذب عبور داده می شود عمل شستشوی بستر جاذب به منظور حذف ترکیبات اضافی مداخله کننده انجام می شود . لازم است از یک حلال مناسب شستشو به منظور حذف مواد اضافی ، بدون آنکه ترکیب مورد نظر از بستر جاذب جدا گردد ، استفاده شود . در این مطالعه طیفی از حلالهای غیر قطبی و یونی شامل اتانول ، متانول ، استونیتریل ، اسید استیک ۱٪ و ۲٪ و ۳٪ استفاده گردیده است همانطوری که 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 ملال شستشو در بازیافت موکونیک اسید از روی جاذبهای SAX و C₈

اسید استیک ۱٪		اسید استیک ۲٪		اسید استیک ۳٪		استو نیتریل		متانول		اتانول		نوع ملال جاذب
SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	
۳/۵	۶۳	۱/۵	۴۷	۰/۸	۳۱	۱/۱	۴۹	۱/۱	۵۴	۱/۹	۵۲	C ₈
۱/۳	۱۰۰	۰/۵	۹۰	۱/۸	۵۶	۰/۸	۹۶	۰	۹۵	۱/۲	۹۲	SAX

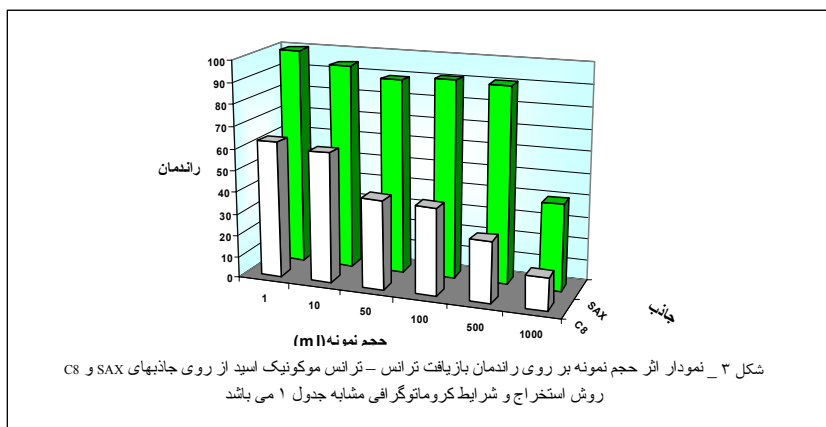
بستگی راندمان بازیافت به نوع ملال شویش

بر اساس تئوریهای 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 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 . همانطوری که در شکل ذیل نشان داده شده است میزان بازیافت به هنگام استفاده از اسید استیک ۱۰٪ هم در SAX و هم در C₈ از راندمان بالایی برخوردار بوده است.



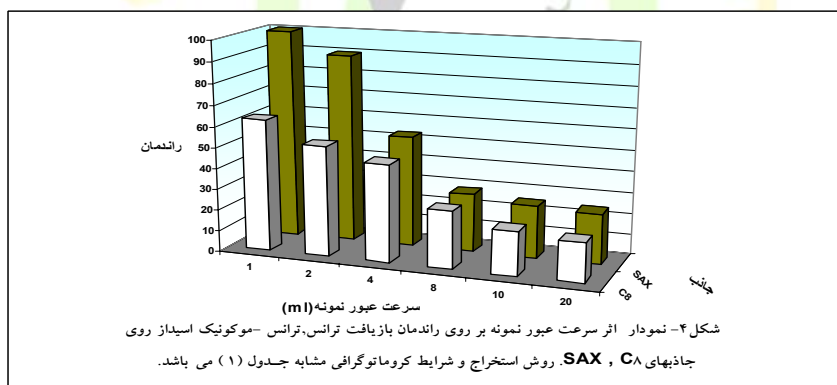
برآورد تأثیر حجم نمونه بر روی عملکرد فازهای جاذب سیلیکا :

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 C₈ عبور داده شد . نتایج شکل ذیل 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 .



تأثیر میزان سرعت عبور نمونه از روی جاذب ، بر روی راندمان بازیافت ترانس ، ترانس - موکونیک اسید :

در ارتباط با سرعت عبور نمونه از روی فاز جامد ، اگر بتوان سرعت را بالا برد ، بدون آنکه میزان راندمان کاهش یابد ، می توان عمل آماده سازی نمونه را سریعتر انجام داده و مدت زمانی که برای آنالیز یک نمونه منظور می گردد ، کاسته می شود و تعداد نمونه بیشتری را می توان در یک زمان محدود آنالیز نمود . لذا به منظور فوق نمونه های حاوی موکونیک اسید از روی جاذبهای SAX و C8 با سرعت های متفاوت ۱ تا ۲۰ میلی لیتر در دقیقه عبور داده شد . شکل ذیل نشان می دهد که با افزایش سرعت عبور نمونه از روی جاذب میزان راندمان کاهش یافته است . ($P_v > 0.01$) و بهترین راندمان در سرعت ۱ ml/min بدست آمده است .



معتبر سازی روش

به منظور تعیین قابلیت استفاده از روش ارزیابی مواجهه با بنزن در غلظت های محیطی کمتر از ۵ 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 (۱۰) . 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 (۱۴) راندمان بازیافت نمونه های spiked شده جهت معتبر سازی روش ارزیابی ترانس ، ترانس موکونیک اسید در ادرار به دو روش تکرار پذیری (روز به روز در طول یک روز).

۱۰		۱		٪۱		غلظت (PPm) 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	۹ / ۹	٪ ۹۸	٪ ۹۹	٪ ۱	٪ ۰۹۷	میانه
۰ / ۲۷	۰ / ۳	۰ / ۰۳	۰ / ۰۲۵	۰ / ۰۱	٪ ۰۰۷	انحراف معیار
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

بمات و نتیجه 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 ، ترانس ، ترانس - موکونیک اسید به عنوان یک شاخص حیاتی اختصاصی در مواجهات شغلی کمتر از ۵ PPM مورد بررسی قرار گرفت و شرایط آماده سازی نمونه های ادرار حاوی موکونیک اسید معین گردید .

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 . نتایج نشان می دهد که بین pH نمونه و میزان بازیافت نمونه موکونیک 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 $pH = 7$ می باشد . همچنین بین نوع جاذب و میزان بازیافت رابطه معنی داری ($P_v < 0.001$) وجود داشت و مناسب ترین جاذب برای ارزیابی موکونیک اسید در ادرار با استفاده از استخراج فاز جامد ، جاذب آنیونی قوی نوع SAX می باشد . بین حلال شستشو ، حلال شویش و میزان بازیافت MA رابطه معنی داری ($P_v < 0.007$) وجود دارد و مناسب ترین حلال شستشو برای ارزیابی میزان موکونیک اسید در ادرار با استفاده از استخراج فاز جامد اسید استیک ۱٪ می باشد و از اسید استیک ۱۰٪ به عنوان حلال شویش استفاده می گردد .

همچنین بین نوع حلال شویش ، حجم نمونه و سرعت عبور نمونه رابطه معنی دار آماری وجود دارد و استفاده از حجم ۵۰۰ - ۱ میلی لیتر نمونه با سرعت عبور ۱ ml / 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 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 .

