

ORIGINAL RESEARCH PAPER

## Application of The Headspace - Needle Trap Device Based on Molecularly Imprinted Polymer for Co-Extraction of Two Volatile Biomarkers in Urine

Masomeh Vahabi Shekarloo<sup>1</sup>, Siamak Ashrafi Barzideh<sup>2</sup>, Rezvan Zendehei<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Occupational Health Engineering, School of Health, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

<sup>2</sup>Department of Occupational Health Engineering, School of Public health and Safety, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 2023-5-20

Accepted: 2023-07-23

### ABSTRACT

**Introduction:** Several extraction techniques have been developed in recent years to determine the concentration of volatile metabolites in a biological sample. This study conducted with the aim of using the needle trap device- molecularly imprinted polymer (NTD-MIP) for the co-extraction of n-hexane and methyl ethyl ketone (MEK) in the urine matrix.

**Material and Methods:** Characterization of MIP was investigated by fourier-transfer infrared spectroscopy (FT-IR), field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), and brunauer-emmett-teller (BET). The response surface methodology - central composite design (RSM-CCD) was used to optimize the extraction conditions of n-hexane and MEK with the input variables of absorption temperature, absorption time, salt percent, and stirring speed. Method validation was performed with determination of the precision, accuracy, the limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and dynamic linear range.

**Results:** The optimum conditions were an extraction time of 60 min, an absorption temperature of 65 °C, 22% of salt, and a stirring speed of 250 rpm. The linear ranges of n-hexane and MEK were determined in ranges of 30-500 and 30-4000 µg/L, respectively. The intra-day and enter-day relative standard deviation were evaluated in the range of 3 to 10 and 1 to 7, respectively. The average recovery of n-hexane and MEK were estimated 99.3 ± 0.8 and 99 ± 0.9, respectively.

**Conclusion:** The HS-NTD method is suggested as a suitable method for determining very low amounts of MEK in urine along with n-hexane.

**Keywords:** Needle trap device, Headspace, n-Hexane, Methyl ethyl ketone

### HOW TO CITE THIS ARTICLE

Vahabi Shekarloo M, Ashrafi Barzideh S, Zendehei R. Application of The Headspace - Needle Trap Device Based on Molecularly Imprinted Polymer for Co-Extraction of Two Volatile Biomarkers in Urine. *J Health Saf Work.* 2023; 13(3): 581-600.

## 1. INTRODUCTION

Workers are often exposed to solvents mixture in the workplace; however, single exposure to solvents is addressed in the risk assessment. n-Hexane is a common solvent used in a variety of industries. This solvent is used to extract

vegetable oils, adhesives, paint, and varnish, and as a diluent in the production of plastic and rubber. Methyl ethyl ketone (MEK) is also commonly and abundantly used as an ingredient of solvents and glue mixed with n-hexane. n-hexane and MEK have been demonstrated to interact with each other. MEK is not neurotoxic, however, it potentiated

\* Corresponding Author Email: [zendehei76@yahoo.com](mailto:zendehei76@yahoo.com)

the neurotoxicity induced by prolonged *n*-hexane exposure.

NIOSH 8319 and NIOSH 8318 methods have been independently offered for *n*-hexane and MEK in biological monitoring. The adoption of two methods increases the sampling and analysis cost and the risk assessment time in the co-exposure of *n*-hexane and MEK. As a result, the development of methods that can concurrently analyze *n*-hexane and MEK in biological samples, saves time and cost while also simplifying the preparation process.

In recent years, there has been a growing awareness of the importance of extraction methods, especially for analytes in complex samples. Solid phase extraction and liquid-liquid extraction have been traditionally widely used in environmental applications. But, due to disadvantages such as high organic solvent consumption and complicated preparation steps, new techniques, such as magnetic dispersive solid phase extraction, and the needle trap device (NTD), were introduced, resulting in the simplification and miniaturization of preparation methods and use the small amounts or the elimination of solvents.

In our previous study, we used a dispersive solid phase extraction (DSPE) - magnetic molecularly imprinted polymers (MMIP) technique to direct extraction of unchanged *n*-hexane and MEK in urine. The aim of this study is to use the headspace-needle trap technique (HS-NTD) for the co-extraction of unchanged *n*-hexane and MEK in the urine matrix. In addition, the comparison of the performance of DSPE-MMIP and HS-NTD method was considered.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Preparation of the NTD

In summary, 5 g of polar silica aerogel was treated with 20 ml of VTES in toluene. Following that, 50 ml of acetonitrile was mixed with 0.5 mmol of 2-octanone and 2 mmol of MAA. Then, 250 mg of VTES-silica aerogel, 10 mmol of EGDMA, and 60 mg of AIBN were added to the mixture, and a polymerization reaction was performed at 60 °C for 6 h. NIP was synthesized in the same ways, but the template was not added to the solution. To eliminate the 2-octanone, the MIP was washed with methanol/acetic acid (90:10 V/V) and methanol alone and dried at room temperature. The NTD was prepared using a 21-gauge medical spinal needle. The NTD was filled with 3 mg of MIP. Glass wool was placed at the beginning and end of the MIP, all using a plunger.

### 2.2. Optimizing extraction conditions

The response surface methodology - the central composite design (RSM-CCD) was used to optimize the extraction conditions of *n*-hexane and MEK in urine headspace. The input variables of absorption temperature, absorption time, salt percent, and stirring speed were chosen using experiment design software version 12 at five levels. Designed experiments were conducted with spiking concentrations of 50 µg/L *n*-hexane and 500 µg/L MEK in the urine.

Optimization was performed using 20 urine samples collected from healthy adults who had not been exposed to contaminants. The concentrations were generated in a 20 ml vial with an aluminum cap and a PTFE septum containing 10 ml of urine. Analytes were dynamically sampled from the headspace using a personnel sampling pump (SKC-USA) with a flow rate of 1 ml/min. The NTD was disconnected from the pump and attached to a gastight syringe containing 0.5 ml of nitrogen gas at the end of the sampling. The analytes were desorbed and analyzed by GC-FID under desorption conditions with temperature of 190 °C and duration of 120 seconds.

### 2.3. Breakthrough volume

To determine the breakthrough volume, two identical NTDs were connected in series, and sampling was done at a concentration of 5 ppm. The needles were separated and injected into the GC-FID after sampling at a flow rate of 1 ml/min and in 120, 240, 360, and 480 mL volumes. Breakthrough volume occurs when the mass of penetrated analyte into needle 2 exceeds 10% of needle 1.

### 2.4. Method validation

Spiked standard concentrations in urine were prepared in the range of 50-500 and 100-4000 ppb of *n*-hexane and MEK, respectively. Sampling and determination of the analytes were performed in optimal conditions.

Accuracy was calculated based on recovery (Eq. 1):

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{\text{Determined value}}{\text{Experimental value}} \times 100 \quad (1)$$

The precision was determined by the relative standard deviation (RSD) for six *n*-hexane and MEK concentrations using three intra-day and inter-day repetitions.

Table 1: ANOVA analysis for *n*-hexane and MEK extraction in quadratic model

	Lack of Fit F-value	p-value	R <sup>2</sup>	Adjusted R <sup>2</sup>	Predicted R <sup>2</sup>
<b><i>n</i>-Hexane</b>	0.64	<0.0001	0.83	0.75	0.53
<b>MEK</b>	24.43	<0.0001	0.92	0.87	0.67

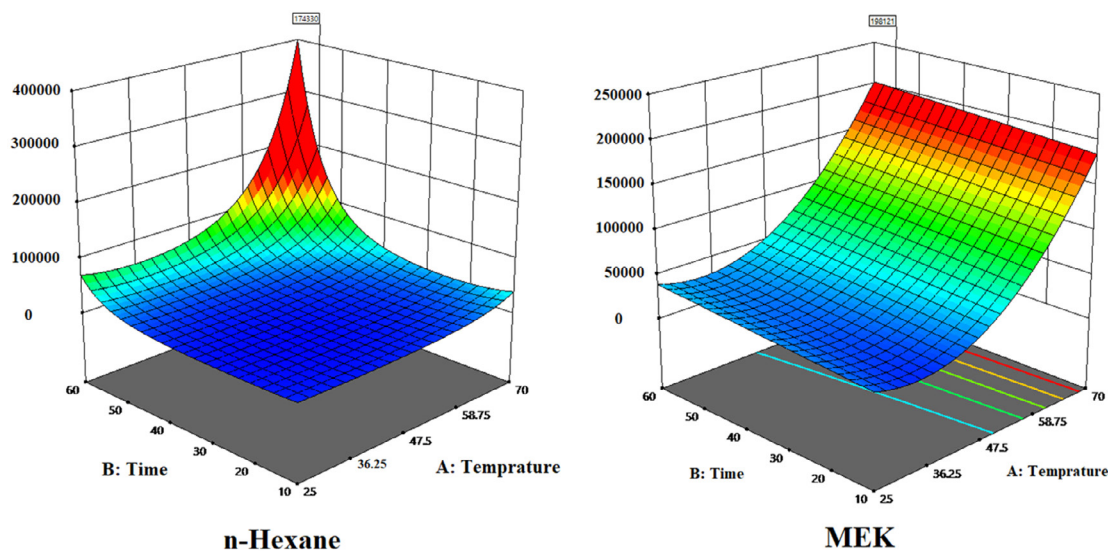


Fig. 1: Response surface curves NTD–MIP (temperature (A), time (B))

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Optimization of extraction conditions

RSM-CCD was used to assess the influence of temperature, time, salt percent, and stirring speed on the extraction efficiency of *n*-hexane and MEK in urine. According to the ANOVA analysis (Table 1), the quadratic model offers the best prediction of the extraction parameters.

In the quadratic model, the extraction time, salt percent, and temperature-stirring speed interaction were significant ( $p < 0.0001$ ) for *n*-hexane. Temperature, extraction time, salt percent, and the interaction of these factors were statistically significant ( $p < 0.0001$ ) for MEK. The extraction efficiency is significantly affected by extraction temperature. A higher temperature improves the diffusion coefficient and the concentration of chemicals in the headspace, hence enhancing mass transfer and extraction. In the experimental design, the extraction efficiency of *n*-hexane was independent of temperature, however, the extraction efficiency of MEK increased with increasing temperature. The extraction time is also a significant factor, which depends on the NTD flow

rate and sample volume. The extraction efficiency improved with increasing time up to 60 min, and the dependency was statistically significant ( $p < 0.0001$ ) in *n*-hexane and MEK.

The salt addition increases the ionic strength of the aqueous solution. This effect was significant ( $p < 0.0001$ ) in *n*-hexane and MEK, but increasing the salt decreased *n*-hexane's efficiency. It improved the extraction efficiency of MEK. The extraction efficiency of the compounds was diminished when the NaCl exceeded 20%. In the study by Bagheri et al., efficiency was enhanced by increasing the NaCl up to 20%. Increasing the stirring speed decreased the analytes peak area. Increasing turbulence in liquid samples decreases the concentration of *n*-hexane and MEK in the headspace, hence decreasing analyte extraction.

Based on the desirability values provided in the experimental design, the optimum conditions were an extraction time of 60 min, an absorption temperature of 65 °C, 22% of salt, and a stirring speed of 250 rpm. Three-dimensional response surface curve (Figure 1) was presented for *n*-hexane and MEK in optimum conditions

Table 2: Precision and accuracy in the NTD-MIP method

Analyte	Concentration (ppb)	50	100	200	300	400	500
	<i>n</i> -Hexane	Intraday RSD (%)	7	4	10	4	6
	Interday RSD (%)	5	6	3	2	6	2
	Recovery%	98±0.7	100±0.6	99±2	99±1	100±0.5	100±0.4
MEK	Concentration (ppb)	100	350	700	1000	2000	4000
	Intraday RSD (%)	6	3	6	7	5	5
	Interday RSD (%)	7	4	2	5	1	3
	Recovery%	98±1.5	99±2	98±0.6	99±0.8	100±1.1	100±1.6

Table 3: Comparative performance of NTD and DSPE

Analyte	Linear dynamic range (µg/L)	R <sup>2</sup>	Calibration curve equation	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	
NTD	<i>n</i> -Hexane	30-500	0.9964	y = 7.0016x + 715.58	6.60	22.0
	MEK	30-4000	0.9995	y = 11.072x + 3101.6	8.20	27.4
DSPE	<i>n</i> -Hexane	1.5 - 100	0.990	y = 0.0996x + 0.1876	0.45	1.5
	MEK	128 - 3000	0.999	y = 0.0036x + 0.0839	38.43	128

### 3.2. Breakthrough volume

The results showed that the amount of *n*-hexane and MEK penetrated into NTD2 were 1.6 and 1.1 percent in the volume of 480 ml, respectively, showing that sampling is achievable at low concentrations for 8 h.

### 3.3. Method validation

The NTD-MIP technique was validated under optimal conditions (Table 2). The intra-day and inter-day relative standard deviation (RSD) were less than 10 percent, indicating acceptable repeatability. According to our knowledge, MIP has not been validated for the simultaneous determination of *n*-hexane and MEK in headspace urine. Approaches using commercial adsorbents have disadvantages, such as a lack of selectivity. This work validated a technique based on the use of selective MIP for the pre-concentration of *n*-hexane and MEK, which could detect analytes with an appropriate selectivity and LOD.

The linear dynamic range, the LOD and the LOQ, linear equation with R<sup>2</sup> regression in two techniques are presented in the comparative table 3. The linear range, LOD, and LOQ of *n*-hexane in the DSPE-MMIP technique were less than those of the NTD-MIP and DSPE-MMIP approach was more applicable than NTD-SMIP. However, NTD had a lower LOD for MEK and could detect lower MEK concentrations in the urine. The enhancement of NTD performance in the detection of MEK is attributed to the modification of interactions caused

by the functional monomer substitution. AGCIH's recommended occupational exposure limit is 50 ppm for *n*-hexane in the air, which results in 13 ppm of this component being excreted in urine. MEK's biological exposure index is 2 ppm in urine. Due to the excreted small quantities of unaltered *n*-hexane in urine, it is required that a reliable technique for quantifying *n*-hexane be developed. As a result, the DSPE-MMIP technique is advocated based on the validation outcomes of the two approaches. Compared to the MIP, the MMIP has a much larger surface area, with 291 m<sup>2</sup>/g. The increased surface area of the MMIP owing to incorporating magnetic nanoparticles is the key to the technique's superior efficacy. On the other hand, the measurement of a lower concentration of *n*-hexane was possible because of the solid phase extraction approach, whereby more adsorbent was employed than in the NTD (6 times).

## 4. CONCLUSIONS

This study validated a technique for simultaneous sampling of *n*-hexane and MEK using a molecularly imprinted polymer adsorbent capable of extracting analytes from the headspace of urine with adequate selectivity and LOD. To enhance the extraction conditions, the central composition design was utilized effectively to analyze variables such as extraction temperature, extraction duration, salt percentage, and stirring speed. Under optimal laboratory conditions, the proposed method demonstrated excellent repeatability and could

sample for a long period without break through volume. The method possessed outstanding characteristics such as simple separation, the absence of organic solvents and derivatization procedure, and the capacity to selectively extract

metabolites. Comparing the validation parameters of this technique to those of the DSPE-MMIP method revealed that the HS-NTD method's use of molecularly imprinted polymer is appropriate for *n*-hexane and MEK in urine samples.

## بکارگیری روش فضای فوقانی - ابزار تله سوزنی مبتنی بر جاذب اختصاصی پلیمر قالب مولکولی در ریزاستخراج همزمان دو نشانگر زیستی فرار در ادرار

معصومه وهابی شکرلو<sup>۱</sup>، سیامک اشرفی برزیده<sup>۲</sup>، رضوان زنده دل<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران  
<sup>۲</sup> گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت و ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۳۰، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۱

### چکیده

**مقدمه:** در سال‌های اخیر چندین تکنیک استخراج جهت تعیین غلظت متابولیت‌های فرار در نمونه‌های بیولوژیک توسعه یافته است. این مطالعه با هدف بکارگیری روش فضای فوقانی-ابزار تله سوزنی (HS-NTD) و با استفاده از جاذب اختصاصی پلیمر قالب مولکولی برای ریزاستخراج همزمان هگزان نرمال و متیل اتیل کتن در ماتریکس ادرار انجام گردید.

**روش کار:** در آماده‌سازی ابزار تله سوزنی از جاذب اختصاصی برای هگزان نرمال و متیل اتیل کتن استفاده گردید. خصوصیات پلیمر قالب مولکولی توسط طیفسنجی مادون قرمز تبدیل فوریه، میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی و آزمون جذب - واجذب گاز نیتروژن (BET) مورد بررسی قرار گرفت. روش سطح پاسخ - طراحی ترکیب مرکزی برای بهینه‌سازی شرایط استخراج هگزان نرمال و متیل اتیل کتن در روش HS-NTD با متغیرهای ورودی دمای استخراج، زمان استخراج، درصد نمک و سرعت هم زدن استفاده شد. پس از بهینه‌سازی شرایط جذب، پارامترهای دقت، صحت، حد تشخیص و حد کمی‌سازی و رنج خطی مدنظر قرار گرفت.

**یافته‌ها:** بهترین کارایی استخراج در زمان استخراج ۶۰ دقیقه، دمای استخراج ۶۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۲ درصد نمک و سرعت هم‌زدن ۲۵۰ دور بر دقیقه تعیین گردید. محدوده‌ی خطی هگزان نرمال ۳۰-۵۰۰ µg/L و متیل اتیل کتن ۳۰-۴۰۰ µg/L تعیین شد. مقادیر ضریب تغییرات درون روز ۱-۷ درصد و برون روز در محدوده ۱۰-۳ درصد ارزیابی گردید. میانگین بازیافت نرمال هگزان ۰/۸ ± ۹۹/۳ و برای متیل اتیل کتن ۰/۹ ± ۹۹ تخمین زده شد.

**نتیجه‌گیری:** در یک نتیجه‌گیری کلی روش HS-NTD به عنوان یک روش مناسب برای تعیین مقادیر بسیار پایین متیل اتیل کتن در ادرار و در حضور هگزان نرمال پیشنهاد می‌شود.

**کلمات کلیدی:** ابزار تله سوزنی، فضای فوقانی، هگزان نرمال، متیل اتیل کتن

\* پست الکترونیکی نویسنده مسئول مکاتبه: [zendehtdel76@yahoo.com](mailto:zendehtdel76@yahoo.com)



هگزان نرمال با مشکلاتی همراه است استراتژی‌هایی برای پایش بیولوژیکی هگزان نرمال می‌تواند مطرح گردد (۱۱). اندازه‌گیری سطح هگزان نرمال تغییر نیافته در ادرار یک روش اختصاصی برای ارزیابی مواجهه با این ترکیبات به‌ویژه در محیط‌های شغلی است که می‌تواند در پایش بیولوژیکی این ترکیب مورد استفاده قرار گیرد و نشانگر زیستی اختصاصی را برای این حلال‌ها فراهم نماید. با این حال مطالعات کمی آنالیز این ترکیب را بررسی کرده‌اند (۱۲، ۱۱).

در ارزیابی مواجهه هگزان نرمال و متیل اتیل کتن دو روش موسسه ملی ایمنی و بهداشت شغلی<sup>۱</sup> NIOSH ۸۳۱۸ و ۸۳۱۹ به ترتیب در پایش بیولوژیک این دو حلال به صورت جداگانه ارائه شده است (۱۳). در جایی که نیاز به پایش بیولوژیک هم‌زمان هگزان نرمال و متیل اتیل کتن باشد، کاربرد این دو روش باعث افزایش هزینه‌های نمونه برداری و آنالیز و زمانبر شدن فرآیند ارزیابی مواجهه می‌شود. بنابراین توسعه روش‌های جدید در پایش بیولوژیک که قادر به اندازه‌گیری هم‌زمان دو ترکیب در نمونه‌های بیولوژیک باشند، می‌تواند باعث صرفه جویی در زمان و هزینه‌ها و ساده‌تر شدن مراحل آماده‌سازی گردد. در سال‌های اخیر آگاهی روزافزونی از اهمیت تکنیک‌های استخراج جهت آنالیز ترکیبات در نمونه‌های پیچیده ایجاد شده است (۱۴). به طور سنتی استخراج فاز جامد و استخراج مایع - مایع پرکاربردترین تکنیک‌های استخراج در کاربردهای زیست محیطی هستند (۱۵) اما به دلیل معایب فراوانی مانند مصرف زیاد حلال‌های آلی و مراحل آماده‌سازی پیچیده (۱۶) در سال‌های اخیر تکنیک‌های جدید مانند استخراج فاز جامد پراکنده مغناطیسی (۱۷) و ابزار تله سوزنی (۱۸) ارائه گردیده که منجر به ساده‌سازی کوچک‌سازی روش‌های آماده‌سازی و استفاده از حلال‌های آلی در حد کم یا حذف این حلال‌ها شده است (۱۹). نمونه برداری از فضای فوقانی به همراه گاز کروماتوگرافی در آنالیز ترکیبات آلی فرار در نمونه‌های شغلی و محیطی استفاده می‌شود. آنالیز فضای فوقانی عموماً به عنوان استخراج فاز

در محیط‌های شغلی معمولاً کارگران با مخلوطی از حلال‌ها مواجهه دارند، با این حال در ارزیابی مخلوط حلال‌ها مواجهه با یک حلال منفرد در نظر گرفته می‌شود (۱). هگزان نرمال یکی از حلال‌های رایج در صنایع مختلف است. این حلال در مواردی مانند استخراج روغن‌های گیاهی، به عنوان حلال در چسب‌ها، رنگ، لاک و به عنوان ماده‌ی رقیق‌کننده در تولید پلاستیک و لاستیک مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲). متیل اتیل کتن نیز به طور گسترده و فراوان به عنوان جزئی از مخلوط حلال‌ها و چسب همراه با نرمال هگزان استفاده می‌شود (۳). هگزان نرمال و متیل اتیل کتن می‌توانند با یکدیگر برهمکنش کنند (۴). هگزان نرمال باعث ایجاد پلی‌نروپاتی محیطی و مرکزی بعد از مواجهه‌ی مزمن می‌شود (۲). متیل اتیل کتن می‌تواند نروتوکسیستی ایجاد شده بعد از مواجهه‌ی هم‌زمان مزمن با هگزان نرمال را تقویت کند (۵، ۴).

به‌منظور پایش بیولوژیکی هگزان نرمال، سطح ۵۰۲- هگزان دی‌ان در ادرار اندازه‌گیری می‌شود (۶). ۵۰۲- هگزان دی‌ان علاوه بر هگزان نرمال متابولیت متیل‌ان- بوتیل کتن نیز می‌باشد در نتیجه یک متابولیت اختصاصی نیست (۷). علاوه بر این منابع خارجی مانند غذا، میوه‌ها و سبزی‌ها نیز می‌توانند حاوی این ترکیب باشند که منجر به مقدار زمینه‌ی ۰/۱۵۹ mg/L در ادرار می‌شوند. بنابراین در مقادیر کم مواجهه با هگزان نرمال، ۵۰۲- هگزان دی‌ان نشانگر زیستی مناسبی نمی‌باشد. همچنین دفع ادراری این ترکیب توسط فاکتورهای مانند سن، جنس، مصرف سیگار تحت تأثیر قرار می‌گیرد (۸). در اکثر مطالعات جهت تعیین ۵۰۲- هگزان دی‌ان از هیدرولیز اسیدی قبل از آنالیز استفاده می‌شود (۹). از جمله معایب روش هیدرولیز اسیدی زمان‌بر بودن روش است، علاوه بر این هیدرولیز اسیدی مواجهه با ترکیبات خطرناک را برای کاربر آزمایشگاه ایجاد می‌نماید (۱۰). هیدرولیز اسیدی باعث تبدیل متابولیت‌های دیگر به ۵۰۲- هگزان دی‌ان می‌شود و تغییرات میزان این متابولیت در ادرار به بیش از ده برابر می‌رسد. با توجه به اینکه ارزیابی متابولیت‌های

1. National institute for occupational safety and health

نرمال هگزان و متیل اتیل کتن در نمونه‌های ادرار وجود ندارد. در مطالعه قبلی از تکنیک استخراج فازجامد پراکنده - پلیمر قالب مولکولی مغناطیسی جهت استخراج همزمان هگزان نرمال و متیل اتیل کتن در ادرار استفاده گردید (۲۷). هدف از این مطالعه بکارگیری تکنیک فضای فوقانی - ابزار تله سوزنی<sup>۲</sup> (HS-NTD) مبتنی بر جاذب پلیمر قالب مولکولی جهت ریزاستخراج همزمان متابولیت‌های تغییر نیافته هگزان نرمال و متیل اتیل کتن در ماتریکس ادرار می‌باشد. همچنین مقایسه عملکرد پلیمر قالب مولکولی در روش استخراج فازجامد پراکنده مغناطیسی و روش HS-NTD مدنظر قرار گرفت.

### روش کار

مواد شیمیایی

۲-۲ آزو بیس ایزوبوتیرونیتریل (AIBN)، اتیلن گلاکول دی متاکریلات (EGDMA)، متاکریلیک اسید (MAA)، ۲-اکتانول، وینیل تری اتوکسی سیلان (VTES)، هگزان نرمال، متیل اتیل کتن، تولوئن، متانول و استیک اسید با خلوص بالا از شرکت مرک خریداری شدند.

دستگاه‌ها و شرایط آزمایشگاهی

دستگاه اسپکتروفتومتر مادون قرمز تبدیل فوریه (مدل Bruker IFS-66 ساخت آمریکا) جهت بررسی طیف FTIR استفاده گردید. مورفولوژی سطح پلیمر قالب مولکولی با میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی مدل TESCAN MIRA3 ساخت جمهوری چک بررسی شد. ایزوترم جذب - واجذب گاز نیتروژن توسط دستگاه میکرومتریک مدل tristar ii 3020 در دمای ۷۷ درجه کلوین بدست آمد. آنالیز هگزان نرمال و متیل اتیل کتن با دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Shimadzu 17A مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای و ستون موینه BP20 انجام گردید. پمپ نمونه برداری فردی ساخت شرکت SKC آمریکا همراه با سوزن اسپاینال پزشکی با سایز ۲۱ جهت نمونه برداری مورد استفاده قرار گرفت.

2. Headspace-needle trap device

بخار تعریف می‌شود که شامل توزیع آنالیت‌ها بین فاز مایع غیر فرار و فاز بخار بالای مایع می‌باشد. انتظار می‌رود که فاز بخار حاوی اجزای کمتری نسبت به نمونه‌ی مایع پیچیده باشد (۲۰). تاکنون تعیین جداگانه متابولیت‌های تغییر نیافته هگزان نرمال و متیل اتیل کتن در ادرار با استفاده از روش‌هایی مانند ابزار تله سوزنی و میکرواستخراج فازجامد در چندین مطالعه گزارش شده است (۲۱،۱۱). اما اندازه‌گیری همزمان دو ترکیب با استفاده از جاذب‌های انتخابی در هیچ مطالعه‌ای گزارش نگردیده است.

با وجود مزایای ذکر شده در تکنیک‌های میکرواستخراج، جداسازی مناسب آنالیت‌های هدف از ماتریکس پیچیده متکی به استفاده از جاذب‌های استخراج خیلی کارآمد است که قادرند این ترکیبات را بصورت انتخابی پیش تغلیظ نمایند (۲۲). تاکنون جاذب‌های مختلفی مانند نانولوله‌های کربنی (۲۱)، کربن آنروژل و جاذب‌های تجاری (۲۳) در این مرحله برای این دو ترکیب بکار رفته‌اند، با این حال این جاذب‌ها فاقد انتخاب پذیری هستند. پلیمرهای قالب مولکولی<sup>۱</sup> (MIP)، پلیمرهای مصنوعی با انتخاب پذیری از پیش تعیین شده برای مولکول‌های مهمان هستند (۲۴). از ویژگی‌های جاذب‌های MIP می‌توان به قابلیت شناسایی اختصاصی برای مولکول هدف، هزینه کم تولید، قابلیت استفاده مجدد، مقاومت مکانیکی بالا و پایداری خوب اشاره کرد (۲۵،۲۶).

در محیط‌های شغلی کارگران اغلب با مخلوطی از حلال‌ها مواجهه دارند. با توجه به اثرات تقویت‌کننده متیل اتیل کتن بر روی سمیت عصبی هگزان نرمال و نبود روش‌های آنالیز با حساسیت مناسب، تعیین و بررسی همزمان دو ترکیب متیل اتیل کتن و هگزان نرمال در نمونه‌های بیولوژیکی اهمیت بالایی دارد. لذا این مطالعه باهدف توسعه یک روش معتبر با قابلیت تعیین همزمان دو ترکیب متیل اتیل کتن و هگزان نرمال در نمونه‌های ادرار طراحی شده است. بررسی‌ها نشان می‌دهد به جز مطالعه‌ی قبلی محققین این مطالعه، گزارشی مبنی بر ارزیابی روشی برای تعیین مقدار همزمان دو آلاینده‌ی

1. molecularly-imprinted polymer



## آماده‌سازی ابزار تله سوزنی

در آماده‌سازی ابزار تله سوزنی از پلیمر قالب مولکولی به عنوان جاذب استفاده گردید. ۵ گرم سیلیکا آیروژل قطبی شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر تولونن توسط ۲۰ میلی‌لیتر وینیل‌تری اتوکسی سیلان عاملی گردید. تهیه پلیمر قالب مولکولی جهت بکارگیری در روش HS-NTD با الگو برداری از سنتز پلیمر قالب مولکولی در روش استخراج فاز جامد پراکنده مغناطیسی انجام یافت (۲۷). لیکن از مونومر عاملی متاکریلیک اسید به جای ۲-وینیل پیریدین استفاده شد تا جایگاه‌های پیوندی مناسب‌تری برای جذب مولکول تمپلت فراهم گردد. از آنجایی که در روش HS-NTD مرحله‌ی پراکنده‌سازی جاذب در محیط مایبی حذف می‌گردد، مرحله‌ی مغناطیسی شدن سیلیکا آیروژل و اضافه شدن  $Fe_3O_4$  به ساختار سیلیکا آیروژل حذف گردید. به طور خلاصه ۰/۵ میلی مول ۲-اکتانون و ۲ میلی مول متاکریلیک اسید با ۵۰ میلی‌لیتر استونیتریل مخلوط و به مدت یک شب در تاریکی نگه‌داشته شد. سپس ۲۵۰ میلی‌گرم سیلیکا آیروژل وینیل‌دار شده، ۱۰ میلی مول اتیلن گلیکول دی متاکریلات و ۶۰ میلی‌گرم AIBN به مخلوط اضافه و واکنش پلیمریزاسیون به مدت ۶ ساعت در حمام روغن با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام یافت (۲۸).

سنتز پلیمر قالب مولکولی شاهد<sup>۱</sup> (NIP) همانند MIP انجام شد، با این تفاوت که به محلول واکنش مولکول الگو اضافه نشد. بعد از اتمام واکنش، جهت حذف مولکول الگوی ۲-اکتانون، پلیمر بوسیله‌ی استخراج سوکسله با متانول/استیک اسید به نسبت (۹۰:۱۰ V/V) و سپس با متانول شسته شد و در دمای محیط خشک گردید. جهت تهیه ابزار تله سوزنی از سوزن اسپاینال پزشکی سایز ۲۱ استفاده شد. ابتدا ۳ میلی‌متر پشم شیشه توسط پلانگر در ۴ سانتی‌متری نوک سوزن قرار گرفت، سپس ۳ سانتی‌متر از سوزن با ۳ میلی‌گرم MIP پر گردید و مجدداً ۳ میلی‌متر پشم شیشه در نوک سوزن قرار داده شد (۲۹).

## بهینه‌سازی شرایط استخراج در ابزار تله سوزنی

به منظور بهینه کردن شرایط استخراج آنالیت‌ها از فضای فوقانی ادرار از روش سطح پاسخ- طراحی ترکیب مرکزی<sup>۲</sup> (RSM-CCD) استفاده گردید. کلاس کامل RSM-CCD با متغیرهای ورودی دمای استخراج، زمان استخراج، درصد نمک و سرعت هم زدن در ۵ سطح (۳۰) با استفاده از نرم‌افزار طراحی آزمایش نسخه ۱۲ انتخاب شد. آزمایش‌های طراحی شده توسط CCD با غلظت‌های اسپایک شده ۵۰ میکروگرم بر لیتر از هگزان نرمال و ۵۰۰ میکروگرم بر لیتر از متیل اتیل کتن در محیط ادرار انجام یافت. فاکتورهای مورد استفاده و آزمایش‌های طراحی شده در جدول ۱ و ۲ فایل‌های تکمیلی ارائه شده است. بهینه‌سازی با کمک ۲۰ نمونه‌ی ادرار تهیه‌شده از افراد سالم و بدون مواجهه شغلی با آلاینده‌های خاص مدنظر قرار داده شد. بدین منظور غلظت‌های موردنظر در ویال ۲۰ میلی‌لیتری سپتوم‌دار با درپوش آلومینیومی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر ادرار تهیه شد و در شرایط طراحی‌شده نمونه‌برداری با ابزار تله سوزنی از فضای فوقانی ویال صورت گرفت. نمونه‌برداری آنالیت‌ها از فضای فوقانی نمونه ادرار به صورت دینامیکی با کمک پمپ نمونه‌بردار فردی با دبی ۱ ml/min انجام شد. به منظور افزایش راندمان جذب و جلوگیری از ایجاد فشار منفی در داخل ویال، سوزن خالی با اندازه ۲۰ از طریق سپتوم ویال وارد مایع و از طرف دیگر در هوای آزاد قرار داده شد. با روشن شدن پمپ نمونه‌برداری هوای موجود در فضای فوقانی ویال از بستر جاذب عبور یافته و آنالیت در بستر جذب گردید. پس از خاتمه نمونه‌برداری تله سوزنی از پمپ جدا و به سرنگ عایق هوا حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر گاز نیتروژن متصل گردید. پس از قرارگیری ابزار تله سوزنی در قسمت انجکتور دستگاه گاز کروماتوگرافی با دتکتور FID تحت شرایط واجذب دمای ۱۹۰ درجه سلسیوس و زمان ۱۲۰ ثانیه (۲۹) با عبور گاز نیتروژن از نیدل هگزان نرمال و متیل اتیل کتن تعیین مقدار شد.

2. Response surface methodology- Central Composite design

1. Non-imprinted polymer

## حجم گذر شکست

برای تعیین حجم گذر شکست، دو ابزار تله سوزنی همسان به صورت سری به هم متصل شدند و نمونه برداری در غلظت ۵ پی پی ام انجام گردید. حجمی از نمونه برداری که در آن جرمی از ترکیب هدف از تله سوزنی اول فرار کرده و در تله سوزنی دوم به دام افتاده است به عنوان حجم گذر شکست در نظر گرفته شد. در تله سوزنی این حجم به مقدار جاذب پر شده درون سوزن، توانایی جذب آنالیت توسط جاذب، غلظت آنالیت در نمونه و میزان هوای عبور یافته از سوزن وابسته است (۳۱). پس از نمونه برداری با دبی ۱ ml/min در حجم‌های ۱۲۰، ۲۴۰، ۳۶۰ و ۴۸۰ میلی‌لیتر، هگزان نرمال و متیل اتیل کتن در هر دو سوزن تعیین گردید و درصد آنالیت جذب شده در سوزن ۲ با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد (۳۲). حجم گذر شکست زمانی اتفاق می‌افتد که مقدار آنالیت نفوذ کرده به سوزن ۲ شماره بالاتر از ۱۰ درصد سوزن شماره ۱ باشد.

$$\%P = \frac{PA(2)}{PA(2) + PA(1)} \times 100 \quad \text{فرمول (۱)}$$

(۱) PA = مساحت پیک آنالیت در سوزن ۱

(۲) PA = مساحت پیک آنالیت در سوزن ۲

## اثر حافظه

یکی از مشکلات رایج در آنالیز ترکیباتی که با مکانیسم جذب جمع‌آوری می‌شوند اثر حافظه است که ارتباط نزدیکی با ویژگی‌های آنالیت مانند فراریت آن و اتصال آنالیت به محیط جاذب دارد. از آنجاکه تله سوزنی به دفعات مورداستفاده قرار می‌گیرد، این اثر می‌تواند در نمونه برداری و آنالیزهای بعدی تداخل ایجاد نماید، بنابراین تعیین این اثر بسیار مهم است. در این پژوهش اثر حافظه بعد از واجذب حرارتی ترکیبات مدنظر در شرایط بهینه دما و زمان واجذب بررسی شد. بدین منظور میزان درصد هگزان نرمال و متیل اتیل کتن باقی‌مانده از ابزار تله سوزنی واجذب شده در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ و ۱۵۰ ثانیه بررسی گردید.

## بررسی انتخاب پذیری

بررسی انتخاب پذیری جاذب پلیمر قالب مولکولی با استفاده از ترکیبات هپتان نرمال، استن، بنزن، تولوئن و زایلن انجام گردید. این پنج ترکیب عموماً در مخلوط حلال‌ها حضور دارند و کارگران در محیط کاری می‌توانند به‌طور همزمان همراه با هگزان نرمال و متیل اتیل کتن با آن‌ها نیز مواجهه داشته باشند. مخلوط‌های سه‌تایی از هگزان نرمال، متیل اتیل کتن همراه با ترکیبات مداخله‌گر در غلظت‌های ۵۰ ppm تهیه گردید. نمونه برداری و آنالیز با استفاده از ابزار تله سوزنی حاوی MIP و NIP انجام شد. سپس فاکتور قالب‌گیری<sup>۱</sup> (IF) و ضریب انتخاب پذیری<sup>۲</sup> (SC) طبق روابط ۲ و ۳ محاسبه گردید (۳۳):

$$\text{فرمول (۲)} \quad IF = Ee(MIP) / Ee(NIP)$$

Ee (MIP) = سطح زیر پیک آنالیت در MIP

Ee (NIP) = سطح زیر پیک آنالیت در NIP

$$\text{فرمول (۳)} \quad SC = IFt / IFc$$

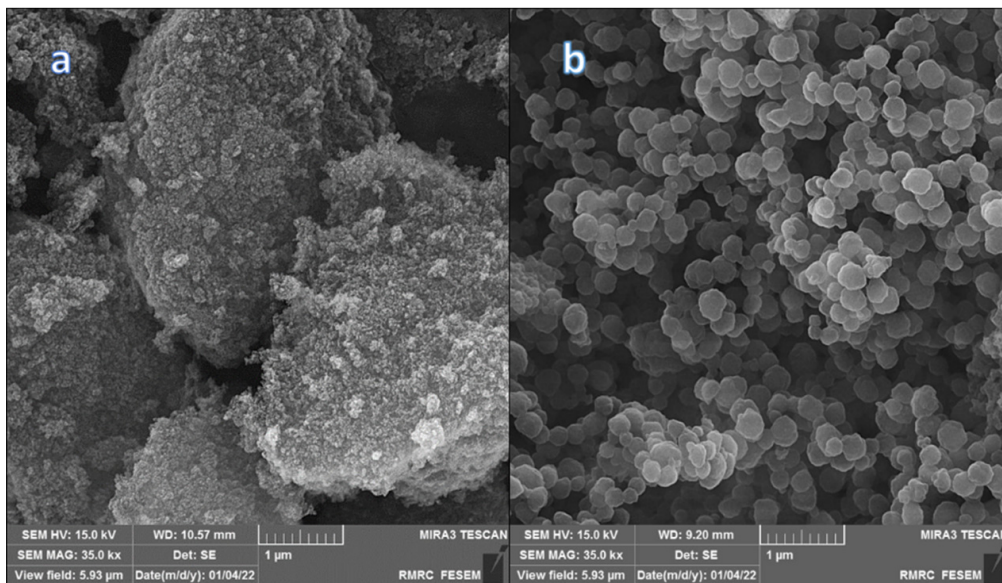
IFt = فاکتور قالب‌گیری مولکول هدف (هگزان نرمال یا متیل اتیل کتن)

IFc = فاکتور قالب‌گیری مولکول مداخله‌کننده (هپتان نرمال، استن، بنزن، تولوئن، زایلن)

## اعتبار بخشی روش ابزار تله سوزنی

۱۰ میلی‌لیتر از غلظت‌های استاندارد کاربردی (اسپایک شده در ادرار) هگزان نرمال در محدوده‌ی ۵۰۰ - ۵۰ ppb و متیل اتیل کتن در محدوده‌ی ۴۰۰۰ - ۱۰۰ ppb در ویال ۲۰ میلی‌لیتری با درپوش آلومینیومی و سپتوم PTFE تهیه گردید. پس از افزودن مقدار بهینه نمک، درپوش ویال محکم گردید و با ابزار تله سوزنی در شرایط بهینه دما، زمان و سرعت هم زدن، نمونه برداری و تعیین مقدار آنالیت‌ها طبق روش بهینه شده انجام گردید.

1. Imprinting factor
2. Selectivity coefficient



شکل ۱: تصاویر MES-EF سیلیکا آبروژل (a) وینیل دار، (b) PIM

### یافته ها

مشخصات فیزیکی و شیمیایی پلیمر قالب مولکولی شکل ظاهری و ساختار سطحی سیلیکا آبروژل وینیل دار شده و MIP توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی FE-SEM بررسی گردید. در شکل ۱ b پلیمرهای قالب مولکولی تهیه شده کروی شکل می‌باشند. در این تصاویر ساختارهای سطحی در هر مرحله به وضوح تغییر کرده‌اند که می‌تواند دلیلی بر تهیه موفقیت‌آمیز پلیمر باشد.

بررسی میزان سطح ویژه MIP با دستگاه BET انجام گردید. سطح پلیمر قالب مولکولی  $58/5 \text{ m}^2/\text{g}$  و متوسط قطر منافذ  $87$  آنگستروم تعیین گردید. سطح پلیمر قالب مولکولی مغناطیسی مورد استفاده در روش استخراج فاز جامد پراکنده مغناطیسی  $90/2 \text{ m}^2/\text{g}$  تعیین شده بود که در مقایسه با سطح MIP سنتز شده در این مطالعه بیشتر می‌باشد (۲۷).

به منظور بررسی اجزای تشکیل‌دهنده‌ی MIP و NIP آنالیز طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه انجام پذیرفت (شکل ۲). در MIP طیف جذبی در ناحیه  $1056 \text{ cm}^{-1}$  مرتبط با ارتعاشات کششی گروه Si-O-Si

پارامترهای دقت، صحت، حد تشخیص ( $LOD^1$ )، حد کمی سازی ( $LOQ^2$ ) و گستره‌ی پاسخ خطی دینامیکی تعیین مقدار شد (۳۴). حد تشخیص و حد کمی‌سازی با استفاده از روابط زیر محاسبه شدند.

$$LOD = \frac{3S_b}{m} \quad (4)$$

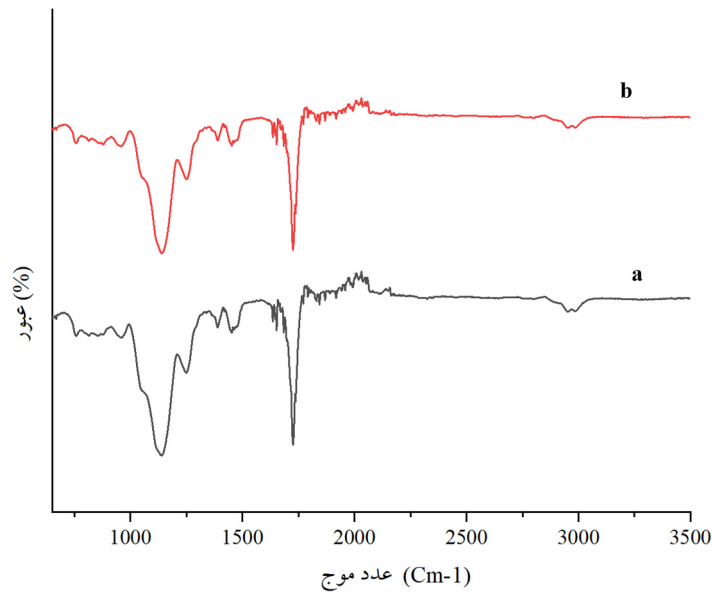
$S_b$  = انحراف استاندارد سیگنال شاهد  
 $m$  = شیب منحنی کالیبراسیون

$$LOQ = \frac{10S_b}{m} \quad (5)$$

صحت براساس میزان بازیافت طبق معادله ۶ محاسبه گردید. دقت نیز بر حسب انحراف معیار نسبی درون روز و برون روز برای هگزان نرمال و متیل اتیل کتن محاسبه گردید.

(۶) مقدار واقعی آنالیت / مقدار محاسبه شده آنالیت = درصد بازیافت

1. Limit of detection  
 2. Limit of quantitation



شکل ۲: طیف FT-IR پلیمر قالب مولکولی (a) و پلیمر قالب مولکولی شاهد (b)

نمونه ادرار و سرعت بهم خوردن بر بازده استخراج هگزان نرمال و متیل اتیل کتن در نمونه‌های ادرار در روش HS-NTD ارزیابی شد. نتایج آنالیز ANOVA نشان داد که مدل دوجمله‌ای بهترین پیش‌بینی پارامترهای استخراج از فضای فوقانی ادرار را داراست (جدول ۱).  
معادله‌های زیر برای پیش‌بینی شرایط بهینه استخراج هگزان نرمال و متیل اتیل کتن در نمونه‌های فضای فوقانی ادرار ارائه گردید.

$$\begin{aligned} \text{Ln (هگزان نرمال)} = & + 8/73 + (0/017 \times \text{دمای جذب}) + \\ & + (\text{درصد نمک} \times 0/2545) - (\text{زمان جذب} \times 0/5508) \\ & - (\text{سرعت هم زدن} \times 0/0597) \\ & + (\text{دمای جذب سرعت هم زدن} \times 0/5267) \\ & + (\text{زمان جذب} \times 0/2945) + (\text{دمای جذب} \times 0/1864) \\ & + (\text{سرعت هم زدن} \times 0/157) \end{aligned}$$

و در ناحیه ۸۰۶ مرتبط با ارتعاشات گروه Si-O سیلیس می باشد (۳۵). این پیک‌ها در NIP نیز ظاهر شده است که نشان دهنده ی حضور سیلیکاآیروژل در پلیمر قالب مولکولی شاهد نیز می باشد. همچنین ارتعاشات C-H در ناحیه ۲۹۸۷ و ۲۹۵۱ نشان می دهد سطح سیلیکاآیروژل به خوبی وینیل دار گردیده است (۳۶). ظهور پیک C=O در MIP و NIP نشان می دهد که مونومر عاملی متاکریلیک اسید بر سطح سیلیکاآیروژل متصل شده است. زیرا متاکریلیک اسید دارای گروه عاملی کربونیل می باشد. علاوه براین ظهور این پیک در MIP و NIP نماینده تشکیل پلیمر قالب مولکولی می باشد. بر اساس نتایج آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه می توان گفت که فرآیند سنتز با موفقیت انجام شده است.

بهینه‌سازی شرایط استخراج هگزان نرمال و متیل اتیل کتن در فضای فوقانی نمونه‌های ادرار اثر پارامترهای دما، زمان، درصد نمک اضافه شده به

منحنی سه بعدی سطح پاسخ هگزان نرمال و متیل اتیل کتن نمایش داده شده است.

### حجم گذرشکست

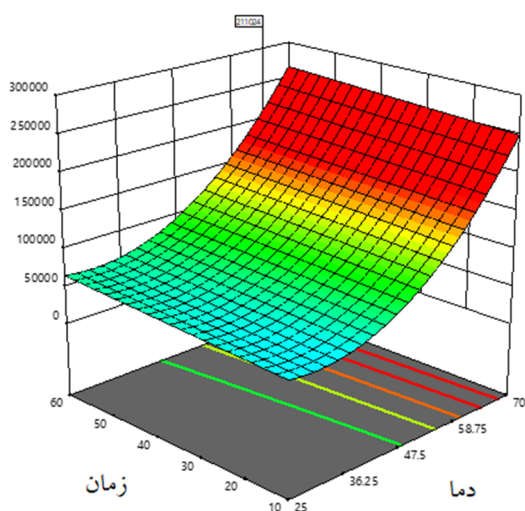
در ابزار تله سوزنی حجم گذرشکست ظرفیت جاذب را مشخص می‌کند. تا زمانی که حجم گذر شکست رخ ندهد نمونه برداری می‌تواند ادامه پیدا کند. بنابراین در نمونه برداری فعال با ابزار تله سوزنی بررسی حجم گذرشکست اهمیت ویژه‌ای داراست (۳۷). نتایج بررسی‌ها نشان داد که در حجم ۴۸۰ میلی‌لیتر، مقدار هگزان نرمال و متیل اتیل کتن نفوذ کرده به بخش عقبی ابزار تله سوزنی به ترتیب ۱/۶ و ۱/۱ درصد می‌باشد. بر اساس نتایج حجم ۴۸۰ میلی‌لیتر به عنوان حجم گذر شکست مدنظر قرار داده شد.

$$\begin{aligned}
 &+ (\text{دمای جذب} \times 21149/26) + 20127/67 = \text{متیل اتیل کتن} \\
 &- (\text{درصد نمک} \times 25573/66) + (\text{زمان جذب} \times 11727/46) \\
 &+ (\text{سرعت هم زدن} \times 4187/36) \\
 &- (\text{دمای جذب درصد نمک} \times 12667/82) \\
 &+ (\text{دمای جذب سرعت هم زدن} \times 16229/36) \\
 &- (\text{زمان جذب سرعت هم زدن} \times 10133/81) \\
 &+ (\text{درصد نمک سرعت هم زدن} \times 16635/62) \\
 &+ (\text{درصد نمک} \times 18363/29) + (\text{دمای جذب} \times 14543/5) \\
 &+ (\text{سرعت هم زدن} \times 8524/63)
 \end{aligned}$$

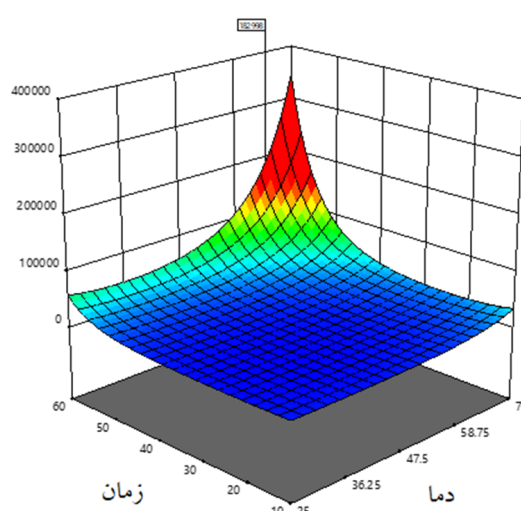
مقدار بهینه‌ی زمان استخراج ۶۰ دقیقه، دمای استخراج ۶۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۲ درصد نمک و سرعت هم دور ۲۵۰ دور بر دقیقه انتخاب گردید. در شکل ۳

جدول ۱: نتایج آنالیز رگرسیون در مدل درجه دوم

ترکیب	Lack of Fit F-value	p-value	R <sup>2</sup>	adjusted R <sup>2</sup>	predicted R <sup>2</sup>
هگزان نرمال	۰/۶۴	< ۰/۰۰۰۱	۰/۸۳	۰/۷۵	۰/۵۳
متیل اتیل کتن	۲۲/۴۳	< ۰/۰۰۰۱	۰/۹۲	۰/۸۷	۰/۶۷



متیل اتیل کتن



هگزان نرمال

شکل ۳: منحنی سطح پاسخی سه بعدی هگزان نرمال و متیل اتیل کتن در HS-NTD از ادرار



شکل ۴: فاکتور قالب‌گیری MIP در روش ابزار تله سوزنی

جدول ۲: ضریب انتخاب پذیری MIP

مولکول‌های هدف		مداخله‌گرها
ضریب انتخاب پذیری (متیل اتیل کتن)	ضریب انتخاب پذیری (هگزان نرمال)	
۱/۷	۱/۹	هیپتان نرمال
۱/۸	۲/۰	استن
۳/۳	۳/۶	بنزن
۳/۴	۳/۷	تولوئن
۳/۷	۴/۱	زایلن

#### انتخاب پذیری

مقادیر فاکتور قالب‌گیری ترکیبات هدف و مداخله کننده در شکل ۴ ارائه شده است. در جدول ۲ ضرایب انتخاب پذیری ترکیبات مداخله کننده نسبت به هگزان نرمال و متیل اتیل کتن نشان داده شده است.

#### اعتباربخشی روش ابزار تله سوزنی

در این مطالعه محدوده‌ی خطی هگزان نرمال  $30-500 \mu\text{g/L}$  و متیل اتیل کتن  $30-4000 \mu\text{g/L}$  به

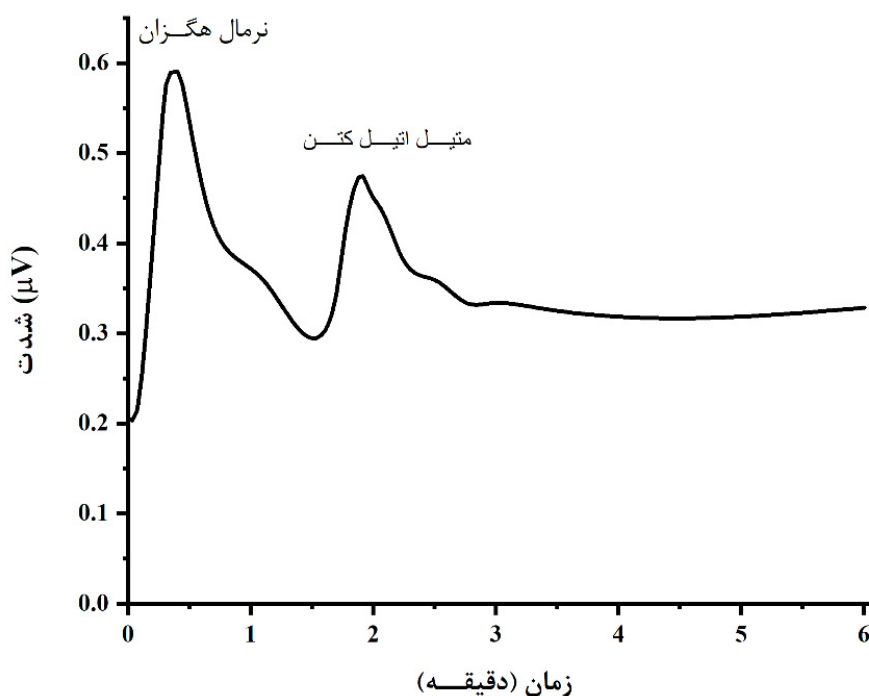
#### اثر حافظه

اتصال آنالیت‌ها به جاذب استفاده شده می‌تواند بر کارایی استخراج اثر بگذارد و منجر به اثر حافظه شود. درصد اثر حافظه وابسته به زمان و دمای واجذب است و باید به‌گونه‌ای انتخاب شود که واجذب کمی با حداقل مقدار اثر حافظه رخ دهد. در ابزار تله سوزنی تهیه‌شده اثر حافظه در دمای  $190^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد و زمان  $120$  ثانیه بررسی گردید. در زمان  $30$  ثانیه بعد از واجذب اول تنها کمتر از  $0.1$  درصد آنالیت بر بستر جاذب باقی‌مانده بود.



جدول ۳: پارامترهای اعتباربخشی روش ابزار تله سوزنی در نمونه برداری از فضای فوقانی ادرار

غلظت متیل اتیل کتن (ppb)						غلظت هگزان نرمال (ppb)						معیار
۴۰۰۰	۲۰۰۰	۱۰۰۰	۷۰۰	۳۵۰	۱۰۰	۵۰۰	۴۰۰	۳۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	
۳	۱	۵	۲	۴	۷	۲	۶	۲	۳	۶	۵	ضریب تغییرات درون روز (%)
۵	۵	۷	۶	۳	۶	۳	۶	۴	۱۰	۴	۷	ضریب تغییرات برون روز (%)
۶۱۰۰۱	۱۱۰۰۱	۷۰۰۶۵	۶۰۰۶۷	۱۰۰۶۵	۵۰۰۶۷	۱۰۰۰۱	۵۰۰۰۱	۱۰۰۰۶	۱۰۰۰۶	۶۰۰۰۶	۸۰۰۰۶	میانگین میزان بازیافت



شکل ۵: کروماتوگرام فضای فوقانی- ابزارتله سوزنی نمونه ادرار اسپایک شده با هگزان نرمال و متیل اتیل کتن

جدول ۴: مقایسه ای پارامترهای اعتباربخشی در روش ابزار تله سوزنی و استخراج فاز جامد پراکنده مغناطیسی

روش	آنالیت	محدوده ی خطی (µg/L)	R <sup>۲</sup>	معادله ی منحنی خط	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
NTD	هگزان نرمال	۳۰-۵۰۰	۰/۹۹۶۴	$y = 7,0016x + 715,58$	۶/۶۰	۲۲/۰
	متیل اتیل کتن	۳۰-۴۰۰۰	۰/۹۹۹۵	$y = 11,072x + 3101,6$	۸/۲۰	۲۷/۴
MDSPE	هگزان نرمال	۱/۵-۱۰۰	۰/۹۹۰	$y = 0,0996x + 0,1876$	۰/۴۵	۱/۵
	متیل اتیل کتن	۱۲۸-۳۰۰۰	۰/۹۹۹	$y = 0,0036x + 0,0839$	۳۸/۴۳	۱۲۸

دست آمد. مقادیر ضریب تغییرات درون روز و برون روز و میزان بازیافت روش بهینه شده در جدول ۳ ارائه گردیده است. کروماتوگرام یک نمونه ادرار اسپایک شده با هگزان نرمال و متیل اتیل کتن در شکل ۵ ارائه شده است. محدوده‌ی خطی، معادله‌ی خط، حد تشخیص و حد کمی سازی روش ابزار تله سوزنی و استخراج فاز جامد پراکنده مغناطیسی MDSPE<sup>۱</sup> در جدول ۴ مشخص گردیده است.

### بحث

در ابزار تله سوزنی یکی از مهم‌ترین نکات، مرحله انتخاب بستر استخراج می‌باشد. بر اساس جستجوی محققین این مطالعه، تاکنون روشی برای تعیین همزمان هگزان نرمال و متیل اتیل کتن در نمونه‌های ادرار با استفاده از این ابزار بهینه نگردیده است. در مطالعه‌ی Gomes و همکاران در سال ۲۰۱۰ یک روش ریزاستخراج فاز جامد جهت تعیین همزمان بنزن، تولوئن و هگزان نرمال در ادرار اعتباربخشی شده است. در مطالعه آنان هگزان نرمال در رنج خطی  $10-10000 \mu\text{g/L}$  با استفاده از پلی دی متیل سیلوکسان و  $1-540 \mu\text{g/L}$  توسط کربوکسن- پلی دی متیل سیلوکسان قابل شناسایی بوده است که نزدیک به رنج غلظتی بهینه شده در مطالعه‌ی حاضر می‌باشد. با این حال روش‌های مبتنی بر جاذب‌های تجاری دارای معایبی مانند عدم انتخاب پذیری می‌باشند. امروزه جداسازی مناسب آنالیت‌های هدف از نمونه‌های پیچیده متکی به استفاده از جاذب‌های استخراج خیلی کارآمد می‌باشد که قادر هستند با این ترکیبات به صورت انتخابی عمل نمایند. تاکنون جاذب‌هایی با ساختار نانو در این مرحله بکار گرفته شده‌اند. با این حال اکثر آن‌ها فاقد انتخاب پذیری می‌باشند، به‌ویژه زمانی که نمونه‌های پیچیده مدنظر می‌باشد که منجر به استخراج همزمان مداخلات مختلف می‌شوند (۱۷). در این مطالعه روشی مبتنی بر استفاده همزمان از فضای فوقانی و ابزار تله سوزنی برای پیش تغلیظ هگزان نرمال و متیل اتیل کتن

1. Magnetic dispersive solid phase extraction

اعتباربخشی گردید که توانست با انتخاب پذیری و حد تشخیص و تکرارپذیری مناسب آنالیت‌ها را از نمونه‌های ادرار استخراج نماید. بررسی انتخاب پذیری جاذب تهیه شده در این مطالعه نشان داد که هگزان نرمال و متیل اتیل کتن بالاترین فاکتور قالب‌گیری را در مقایسه با ترکیبات مداخله‌کننده داشتند که نشان می‌دهد توانایی جذب این ترکیبات در MIP بالاتر از میزان جذب این ترکیبات در NIP می‌باشد. ضرایب بالاتر از یک نشان دهنده‌ی انتخاب پذیری بالاتر هگزان نرمال و متیل اتیل کتن در مقایسه با ترکیبات مداخله‌کننده در MIP است. از سوی دیگر استفاده از مونومر عاملی متاکریلیک اسید به دلیل داشتن گروه کربونیل و امکان تشکیل پیوندهای واندروالسی قویتر، باعث افزایش فاکتور قالب‌گیری هگزان نرمال و متیل اتیل کتن و بالطبع ارتقای انتخاب پذیری پلیمر در مقایسه با پلیمر قالب مولکولی مغناطیسی شده است که از مونومر عاملی ۲-وینیل پیریدین استفاده شده بود (۲۷). پیوند بین مولکولی متاکریلیک اسید با متیل اتیل کتن از نوع هیدروژنی می‌باشد در حالی که ۲-وینیل پیریدین با پیوند ضعیف  $\pi-\pi$  به متیل اتیل کتن متصل می‌شود. بنابراین در این مطالعه تغییر نوع پیوند باعث ارتقا قالب‌گیری شده است.

در بخش بهینه‌سازی، در مدل درجه دوم حاصل برای هگزان نرمال پارامترهای زمان استخراج، درصد نمک و اثر متقابل پارامترهای دما و سرعت بهم خوردن معنادار بود ( $p < 0/0001$ ). پارامترهای معنادار در متیل اتیل کتن دما و زمان استخراج، درصد نمک و اثر متقابل همه‌ی پارامترها بر همدیگر بود ( $p < 0/0001$ ). دمای استخراج تأثیر قابل‌توجهی بر راندمان استخراج دارد. افزایش دما می‌تواند ضریب انتشار و تعداد ترکیبات را در فضای فوقانی افزایش دهد که به نوبه‌ی خود می‌تواند منجر به افزایش نرخ انتقال جرم و استخراج شود. از طرفی دمای بالا می‌تواند منجر تغییر شکل محیط نمونه شود. به‌طور کلی افزایش دمای نمونه مؤثرترین روش برای بهبود استخراج مواد فرار از فضای فوقانی نمونه‌های مایع می‌باشد (۳۷). در طراحی ترکیب مرکزی راندمان استخراج هگزان

که منجر به کاهش استخراج آنالیت‌ها می‌شود. مقایسه نتایج حاصل از استخراج هگزان نرمال و متیل اتیل کتن توسط جاذب پلیمر قالب مولکولی مغناطیسی و استخراج این ترکیبات از فضای فوقانی با استفاده از ابزار تله سوزنی نشان می‌دهد محدوده‌ی خطی، حد تشخیص و حد کمی‌سازی هگزان نرمال در روش استخراج فاز جامد پراکنده مغناطیسی (MDSPE) بالاتر از ابزار تله‌سازی می‌باشد. به عبارتی روش MDSPE عملکرد بهتری از HS-NTD در استخراج هگزان نرمال در ادرار از خود نشان داده است. از سوی دیگر روش ابزار تله سوزنی قادر به تعیین غلظت‌های پایین تری از متیل اتیل کتن در ادرار بود و حد تشخیص بهتری برای این آنالیت داشت. بهبود عملکرد این روش در شناسایی متیل اتیل کتن بدلیل تغییر نوع اتصالات بین مولکولی می‌باشد که در نتیجه ارتقا مونومر عاملی ایجاد گردید است. کارایی بیشتر روش استخراج فازجامد پراکنده مغناطیسی برای نرمال هگزان به دلیل بالاتر بودن سطح جاذب مغناطیسی به دلیل وجود نانو ذرات مغناطیسی وابسته باشد. چراکه سطح پلیمر قالب مولکولی مغناطیسی  $90/2 \text{ m}^2/\text{g}$  و سطح پلیمر قالب مولکولی غیر مغناطیسی  $58/5 \text{ m}^2/\text{g}$  می‌باشد.

حد مجاز شغلی ۵۰ پی پی ام هگزان نرمال در هوا که توسط AGCIH تعیین شده منجر به دفع غلظت ۱۳ ppb این ترکیب در ادرار می‌گردد (۱۱). حد مجاز متیل اتیل کتن در ادرار ۲ پی پی ام می‌باشد. با توجه به حد تشخیص تعیین شده در روش MDSEP و HS-NTD هر دو روش برای اندازه‌گیری هگزان نرمال و متیل اتیل کتن مناسب هستند. تعیین هگزان نرمال در ادرار برای مواجهه در مقادیر پایین‌تر از حد مجاز توسط روش استخراج فازجامد پراکنده مغناطیسی امکان پذیر می‌باشد. از آنجاییکه متیل اتیل کتن در مواجهه‌ی همزمان با هگزان نرمال سبب ایجاد اثرات سینرژیستی نامناسب بر سیستم اعصاب محیطی می‌باشد تعیین مقادیر بسیار کم از متیل اتیل کتن در مواجهه شغلی اهمیت ویژه‌ای دارد. لذا HS-NTD به عنوان یک روش مناسب برای تعیین مقادیر بسیار کم متیل اتیل کتن در ادرار پیشنهاد می‌شود.

نرمال وابسته به دما نبود اما در متیل اتیل کتن افزایش دما باعث افزایش کارایی استخراج شد. زمان استخراج نیز یک پارامتر تأثیرگذار است که وابسته به دبی ابزار تله سوزنی و حجم نمونه‌برداری می‌باشد. در این مطالعه زمان‌های استخراج ۱۰ تا ۶۰ دقیقه بررسی گردید. در هگزان نرمال و متیل اتیل کتن کارایی استخراج با افزایش زمان تا ۶۰ دقیقه افزایش یافت و وابستگی معنادار بود ( $p < 0/0001$ ).

تأثیر افزودن نمک و سرعت بهم خوردن نیز بر راندمان استخراج موردبررسی قرار گرفت. وجود نمک قدرت یونی محلول آبی را افزایش می‌دهد و بر حلالیت املاح آلی تأثیر می‌گذارد. این اثر باعث تغییر ضریب توزیع آنالیت‌ها بین جاذب و محلول می‌شود و به این ترتیب کارایی استخراج تغییر می‌کند (۳۷). در بهینه‌سازی شرایط استخراج تأثیر ۳۰ درصد نمک NaCl بررسی گردید و تأثیر آن بر کارایی استخراج هگزان نرمال و متیل اتیل کتن معنادار بود ( $p < 0/0001$ ). با این حال در هگزان نرمال افزایش درصد نمک باعث کاهش راندمان استخراج شد اما در متیل اتیل کتن افزایش کارایی استخراج مشاهده شد. در مطالعه‌ی برخورداری افزایش NaCl به محلول در مقادیر بیشتر از ۲۰ درصد، سبب کاهش راندمان استخراج ترکیبات گردید (۳۸). باقری و همکاران در مطالعه خود از NTD حاوی نانولوله‌های کربنی برای استخراج PAHs استفاده کردند. در تعیین شرایط بهینه استخراج، مشخص شد که با افزایش NaCl تا سطح ۱۵ درصد، راندمان استخراج ترکیبات افزایش می‌یابد و در مقادیر بیشتر از ۲۵ درصد بدلیل افزایش ویسکوزیته راندمان استخراج کاهش یافت (۳۰). در مطالعه دیگر از NTD حاوی نانوکامپوزیت نقره- پلی-تیوفن برای استخراج هیدروکربن‌های آروماتیک پلی سیکلیک استفاده گردید و نتایج نشان داد که افزایش NaCl تا سطح ۲۰ درصد باعث افزایش راندمان و در مقادیر بیشتر سبب کاهش راندمان استخراج می‌گردد (۳۹). در خصوص سرعت بهم خوردن نیز کاهش سطح پیک با افزایش سرعت در هر دو آنالیت مشاهده شد. به عبارتی آشفتگی زیاد در نمونه‌های مایع باعث کاهش هگزان نرمال و متیل اتیل کتن در فضای فوقانی می‌گردد.

## نتیجه گیری

پیشنهاد شده دارای تکرارپذیری مناسب بود و قادر بود در زمان‌های طولانی بدون گذر شکست نمونه برداری را انجام دهد. علاوه بر این مدت توسعه یافته دارای ویژگی‌های برجسته‌ای مانند جداسازی ساده، عدم نیاز به حلال‌های آلی، عدم نیاز به فرآیند مشتق‌سازی بود و توانست متابولیت‌های تغییر نیافته را به صورت اختصاصی استخراج و تعیین نماید. مقایسه پارامترهای اعتبار بخشی این روش با روش DSPE-SMMIP نشان داد که به کارگیری پلیمر قالب مولکولی در روش HS-NTD برای هگزان نرمال و متیل اتیل کتن در نمونه‌های ادرار مناسب می‌باشد.

در این مطالعه روشی مبتنی بر استفاده از جاذب پلیمر قالب مولکولی برای نمونه برداری همزمان هگزان نرمال و متیل اتیل کتن اعتبار بخشی گردید که توانست با انتخاب پذیری و حد تشخیص مناسب آنالیت‌ها را از فضای فوقانی ادرار استخراج نماید. جهت بهینه‌سازی شرایط استخراج، طراحی ترکیب مرکزی به طور موفقیت آمیزی برای ارزیابی متغیرهایی مانند دمای استخراج، زمان استخراج، درصد نمک و سرعت هم زدن استفاده گردید. در شرایط آزمایشگاهی بهینه شده، مدت

## REFERENCES

- van Engelen JG, Rebel-de Haan W, Opdam JJ, Mulder GJ. Effect of coexposure to methyl ethyl ketone (MEK) on n-hexane toxicokinetics in human volunteers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997;144(2):385-95.
- Wang Q-S, Hou L-Y, Zhang C-L, Song F-Y, Xie K-Q. Changes of cytoskeletal proteins in nerve tissues and serum of rats treated with 2, 5-hexanedione. *Toxicol.* 2008;244(2-3):166-78.
- Karakaya A, Yücesoy B, Yücel A, Erdem N, Ateş İ, Sabir HU, et al. Proliferative response of peripheral blood lymphocytes and lymphocyte subpopulations in n-Hexane, toluen, and methyl ethyl ketone co-exposed workers. *Environ Toxicol Pharmacol.* 1999;8(1):53-8.
- Ichihara G, Saito I, Kamijima M, Yu X, Shibata E, Toida M, et al. Urinary 2, 5-hexanedione increases with potentiation of neurotoxicity in chronic coexposure to n-hexane and methyl ethyl ketone. *Int Arch Occup Environ Health.* 1998;71(2):100-4.
- Cosnier F, Grossmann S, Nunge H, Brochard C, Muller S, Lambert-Xolin A-M, et al. Metabolism of inhaled methylethylketone in rats. *Drug Chem Toxicol.* 2018;41(1):42-50.
- Mayan O, Teixeira JP, Pires AF. Biological monitoring of n-hexane exposure in Portuguese shoe manufacturing workers. *Appl Occup Environ Hyg.* 2001;16(7):736-41.
- dos Santos CR, Passarelli MM, de Souza Nascimento E. Evaluation of 2, 5-hexanedione in urine of workers exposed to n-hexane in Brazilian shoe factories. *J Chromatogr B.* 2002;778(1-2):237-44.
- Xing-Fu P, Ya-Ling Q, Wei Z, Hong-Fang T, Zheng R, Bang-Hua W, et al. Determination of total urinary 2, 5-hexanedione in the Chinese general population. *Environ Res.* 2016;150:645-50.
- Nolasco DM, Gusmão A, Siqueira MEP. Urinary 2, 5-hexanedione in workers exposed to n-hexane: influence of the sample treatment. *Quím Nova.* 2007;30(4):805-8.
- Konidari C, Stalikas C, Karayannis M. Gas chromatographic method for the sensitive determination of 2, 5-hexanedione using electron capture and mass-selective detection. *Anal Chim Acta.* 2001;442(2):231-9.
- Gomes PC, D'Andrea ÉD, Mendes CB, de Siqueira MEP. Determination of benzene, toluene and n-hexane in urine and blood by headspace solid-phase microextraction/gas-chromatography for the biomonitoring of occupational exposure. *J Braz Chem Soc.* 2010;21(1):119-26.
- Hamelin G, Truchon G, Tardif R. Comparison of unchanged n-hexane in alveolar air and 2, 5-hexanedione in urine for the biological monitoring of n-hexane exposure in human volunteers. *Int Arch Occup Environ Health.* 2004;77(4):264-70.
- Ashley K, O'Connor PF. NIOSH manual of analytical methods (NMAM). 2017.
- Li G, Row KH. Recent applications of molecularly imprinted polymers (MIPs) on micro-extraction techniques. *Sep Purif Rev.* 2018;47(1):1-18.
- Sarafraz-Yazdi A, Razavi N. Application of molecularly-imprinted polymers in solid-phase microextraction techniques. *Trends Analyt Chem.* 2015;73:81-90.
- Zhang M, Zeng J, Wang Y, Chen X. Developments

- and trends of molecularly imprinted solid-phase microextraction. *J Chromatogr Sci.* 2013;51(7):577-86.
17. Ansari S. Application of magnetic molecularly imprinted polymer as a versatile and highly selective tool in food and environmental analysis: recent developments and trends. *Trends Analyt Chem.* 2017;90:89-106.
  18. Firoozichahak A, Bahrami A, Ghorbani Shahna F, Alizadeh S, Nematollahi D, Farhadian M. Development of a needle trap device packed with titanium-based metal-organic framework sorbent for extraction of phenolic derivatives in air. *J Sep Sci.* 2020;43(5):1011-8.
  19. Kędziora-Koch K, Wasiak W. Needle-based extraction techniques with protected sorbent as powerful sample preparation tools to gas chromatographic analysis: trends in application. *J Chromatogr A.* 2018.
  20. Snow NH, Slack GC. Head-space analysis in modern gas chromatography. *Trends Analyt Chem.* 2002;21(9-10):608-17.
  21. Zeverdegani S, Bahrami A, Rismanchian M, Shahna F. Extraction of toluene and methyl ethyl ketone from aquatic samples with NTD technique and nano sorb. *Iran Occup Health.* 2016;13(2):10-6.
  22. Soleimani E, Bahrami A, Afkhami A, Shahna FG. Selective determination of mandelic acid in urine using molecularly imprinted polymer in microextraction by packed sorbent. *Arch Toxicol.* 2018;92:213-22.
  23. Alonso M, Castellanos M, Besalú E, Sanchez JM. A headspace needle-trap method for the analysis of volatile organic compounds in whole blood. *J Chromatogr A.* 2012;1252:23-30.
  24. Heravizadeh OR, Khadem M, Nabizadeh R, Shahtaheri SJ. Synthesis and optimization of application of a molecular imprinted sorbent for selective determination of two pyrethroid isomers from biological sample. *J Health Saf Work.* 2019;9(3):168-78.
  25. Speltini A, Scalabrini A, Maraschi F, Sturini M, Profumo A. Newest applications of molecularly imprinted polymers for extraction of contaminants from environmental and food matrices: A review. *Anal Chim Acta.* 2017;974:1-26.
  26. Taheri SM, Khadem M, Omid E, Sedighi A, Shahtaheri SJ. Development of A Sample Preparation Method for evaluating Trace Residue of Bentazon Pesticide in Biological Matrices Using Dispersive Solid Phase Extraction (SPE) Method Based on Molecular Imprinted Polymer (MIP). *J Health Saf Work.* 2021;11(1):40-54.
  27. Vahabi M, Ebrahimzadeh H, Zende del R, Jalilian N, Khodakarim S. Selective determination of n-hexane and methyl ethyl ketone (MEK) in urine by magnetic-silica aerogel-based molecularly imprinted polymers (MIPs) with gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID). *Anal Lett.* 2022:1-20.
  28. Fernandes RS, Dinc M, Raimundo Jr IM, Mizaikoff B. Synthesis and characterization of porous surface molecularly imprinted silica microsphere for selective extraction of ascorbic acid. *Microporous Mesoporous Mate.* 2018;264:28-34.
  29. Jalili V, Zende del R, Bahramian A, Barkhordari A. Application of needle trap device based on the carbon aerogel for trace analysis of n-hexane in air samples. *Chromatogr.* 2019:1-7.
  30. Bagheri H, Ayazi Z, Aghakhani A. A novel needle trap sorbent based on carbon nanotube-sol-gel for microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from aquatic media. *Anal Chim Acta.* 2011;683(2):212-20.
  31. Poormohammadi A, Bahrami A, Farhadian M, Shahna FG, Ghiasvand A. Development of Carbotrap B-packed needle trap device for determination of volatile organic compounds in air. *J Chromatogr A.* 2017;1527:33-42.
  32. Soury S, Bahrami A, Alizadeh S, Shahna FG, Nematollahi D. Development of a needle trap device packed with zinc based metal-organic framework sorbent for the sampling and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in the air. *Microchem J.* 2019;148:346-54.
  33. Hu C, Yang Z, Yan F, Sun B. Extraction of the toluene exposure biomarkers hippuric acid and methylhippuric acid using a magnetic molecularly imprinted polymer, and their quantitation by LC-MS/MS. *Microchim Acta.* 2019;186(3):135.
  34. Mitra S. Sample preparation techniques in analytical chemistry: John Wiley & Sons; 2004.
  35. Long Z, Xu W, Lu Y, Qiu H. Nanosilica-based molecularly imprinted polymer nanoshell for specific recognition and determination of rhodamine B in red wine and beverages. *J Chromatogr B.* 2016;1029:230-8.
  36. Landarani M, Asgharinezhad AA, Ebrahimzadeh H. A magnetic ion-imprinted polymer composed of silica-coated magnetic nanoparticles and polymerized 4-vinyl pyridine and 2, 6-diaminopyridine for selective

- extraction and determination of lead ions. *New J Chem.* 2020;44(18):7561-8.
37. Zeinali S, Pawliszyn J. Protocol for a needle-trap device coupled to GC for the analysis of volatile and semi-volatile compounds in solid and liquid samples. *Green Anal Chem.* 2022;2:100015.
38. Barkhordari A, Azari MR, Zendehtel R, Heidari M. Analysis of formaldehyde and acrolein in the aqueous samples using a novel needle trap device containing nanoporous silica aerogel sorbent. *Environ Monit Assess.* 2017;189(4):1-9.
39. Bagheri H, Banihashemi S, Jelvani S. A polythiophene-silver nanocomposite for headspace needle trap extraction. *J Chromatogr A.* 2016;1460:1-8.