

## توسعه روش میکرو استخراج مایع - مایع پخش شونده با استفاده از حلال آلی نجمد شده شناور (DLLME-SFOD) برای اندازه گیری کادمیوم در نمونه های ادرار

سمیه کم گو<sup>۱</sup>، خسرو م-عبدی<sup>۲</sup>، منیره خادم<sup>۳</sup>، محمود حیدری<sup>۴</sup>، امید هروی زاده<sup>۵</sup>، علی دانیالی<sup>۶</sup>، سید جمال الدین شاه طاهری<sup>۷\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه داروسازی هسته ای، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

<sup>۴</sup> گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

<sup>۵</sup> گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

<sup>۶</sup> گروه پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

<sup>۷</sup> گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۷، تاریخ پذیرش: ۹۷/۳/۱۸

### مکیده

**مقدمه:** امروزه افزایش مواجهه زیست محیطی و شغلی با فلزات سنگین نظیر کادمیوم و ترکیبات آن، ضرورت ارزیابی محیطی و بیولوژیکی این دسته از آلاینده ها را ایجاب می کند. کاربرد کادمیوم در صنعت باطری سازی، آبکاری، در ساخت رنگدانه ها و همچنین صنایع پلاستیک و سرامیک سازی می باشد. سمیت مزمن این فلز سنگین تلاش فزاینده ای در جهت کاهش حد آشکارسازی و بالا بردن حساسیت روش های تجزیه ای جهت ارزیابی کادمیوم در نمونه های بیولوژیکی را باعث شده است.

**روش کار:** محلول استاندارد حاوی غلظت های معین یون فلزی کادمیوم ساخته شد پس از تنظیم pH مشخص و اضافه شدن دی تیزون کمپلکس بین فلز و کلیت کننده ایجاد شد. سپس جهت انجام فرایند استخراج از مخلوط حلال های استخراج کننده و پخش کننده استفاده شد. با تکمیل فرایند اختلاط از طریق ورتکس و انجام جداسازی توسط سانتریفوژ، محلول وارد حمام آب سرد گردید و حلال آلی شناور بر روی حلال آبی منجمد شد. حلال آلی و آبی جدا شده و بخش آلی که حاوی آنالیت بود به دستگاه تزریق گردید. متغیرهای مورد بررسی جهت دستیابی به بالاترین راندمان جذب و بازیافت کادمیوم از نمونه بیولوژیکی مورد ارزیابی و بهینه سازی قرار گرفتند.

**یافته ها:** نتایج حاصل در این فرایند نقش متغیرهای مورد بررسی شامل pH نمونه، حلال کمپلکس کننده، حلال استخراج کننده، اثر سانتریفوژ و زمان استخراج را به اثبات رساند و در نهایت روش بهینه سازی شده با کمترین حد تشخیص (LOD) برابر با ۲ میکروگرم برلیتر و فاکتور تغلیظ (EF) برابر با ۵۰ و همچنین بازیافت نسبی (RR) برابر با ۲۶،۱۰۱ به طور موفقیت آمیزی جهت استخراج فلز کادمیوم از نمونه ادرار مورد استفاده قرار گرفت.

**نتیجه گیری:** بررسی های بعمل آمده نشان داد روش میکرو استخراج مایع-مایع پخش شونده با استفاده از حلال آلی منجمد شده شناور در تعیین مقادیر جزئی کادمیوم در نمونه ادرار کارگران در مواجهه شغلی روشی ارزشمند است و pH نمونه و حجم حلال استخراج کننده از متغیر های مهم در استخراج کادمیوم از نمونه می باشد.

**کلمات کلیدی:** میکرو استخراج مایع-مایع پخش شونده با استفاده از حلال آلی منجمد شده شناور، کادمیوم، نمونه بیولوژیکی.

### مقدمه

کاربرد اصلی کادمیوم در صنعت آبکاری است و از آلیاژهای کادمیوم در ساخت بلب‌رینگ، لچیم کاری، جواهر سازی استفاده می شود. -مهمترین راه مواجهه شغلی با کادمیوم سیستم تنفسی می باشد. غلظت کادمیوم تولید شده بین صنایع مختلف مانند ذغال سنگ، تولیدرنگدانه ها و کارخانه های باتری بسیار متفاوت است (۱). میزان جذب کادمیوم محیطی در بدن ۵۰-۱۰ درصد است که به اندازه سائز ذره کادمیوم و خواص شیمی ماده حاوی کادمیوم بستگی دارد (۲). جذب کادمیوم از طریق مواجهه خوراکی کمترین درصد را به خود اختصاص می دهد (۳-۲). مطالعات نشان می دهد که پس از مواجهه با غلظت های بالای کادمیوم، کادمیوم جذب شده در بدنه پروتئین هایی با وزن مولکولی بالا در خون متصل می شود و به کبد منتقل می گردد، درحالیکه به (MT) Metallothionein متصل است و در بافت ها و اندام های مختلف تقسیم می شود (۴). ترکیب  $Cd-MT^1$  در مقایسه با کادمیوم متصل به آلبومین در گلوبولینوس فیلتر شده و در لوله های کلیه دوباره باز جذب می شود. پس از جذب دوباره، کادمیوم در کورتکس کلیه با نیمه عمر ۳۰-۱۰ سال انباشته می شود (۵). غذا منبع اصلی جذب کادمیوم در عموم افراد می باشد. طبق اسناد سازمان بهداشت جهانی، متوسط جذب روزانه کادمیوم به میزان قابل توجهی از ۱۰ تا  $40 \mu g$  در مناطق غیر آلوده تا چندصد میکروگرم در مناطق آلوده به کادمیوم متفاوت است. بنابر اعلام WHO تخمین زده شده است که علائم آسیب مجاری کلیوی در انسان با جذب روزانه حدوداً  $260-140 \mu g$  از کادمیوم یا جذب تجمعی تقریبی  $2000 \text{ mg}$  اتفاق می افتد. غلظت کادمیوم در ادرار عمدتاً تحت تاثیر میزان مواجهه با این فلز قرار می گیرد و میزان غلظت Cd موجود در ادرار متناسب با غلظت آن در کلیه ها است. به طور کلی، در افراد غیر سیگاری غلظت کادمیوم ادرار ۰,۷-۰,۲ میکروگرم بر گرم کراتینین می باشد و

2 International Agency For Research On Cancer

۱ Cadmium- Metallothionein

1 Cadmium- Metallothionein

ریز استخراج مایع-مایع پخشی<sup>۳</sup> (Dispersive liquid-liquid microextraction) (۳۳-۳۰)، ریز استخراج مایع-مایع با مایعات یونی و فاز ساکن (۳۴ و ۳۵) و ریز استخراج قطره آلی امولسیون منجمد شناور به کمک اولتراسوند (Ultrasound-assisted Emulsification Solidification of Floating Organic Drop Microextraction) (۳۶) از جمله این روش ها می باشد. تمامی این روش های ریز استخراج فاز مایع ساده و سریع بوده و قابلیت انطباق با روش های مختلف تجزیه دستگاهی را دارند. در عین حال این روش ها دارای معایب ذاتی می باشند که شامل ناپایداری قطره حلال در روش ریز استخراج تک قطره (Single Drop microextraction) (۳۷) ایجاد شدن حباب هوا در سطح فیبر توخالی در روش (Hollow fiber-based liquid phase microextraction) HF-LPME (۳۸) در نرخ های بالای سرعت همزن و بکارگیری حلال های ارگانوهالوژن بعنوان مثال روش (DLLME) (۳۹) می باشد. برای غلبه بر مشکلات اشاره شده، Khalili و همکاران روشی جدید از ریز استخراج فاز مایع (LPME) را ارائه دادند که تحت عنوان روش ریز استخراج با استفاده از حلال آلی منجمد شده شناور (Solidified floating organic drop microextraction) نام گذاری شد و بطور موفقیت آمیزی برای استخراج و تعیین مقدار ترکیبات آلی چند حلقه ای (PAHs) در ماتریکس های مایع مورد استفاده قرار گرفته است (۴۲-۴۰)، ابتدا یون فلز در نمونه توسط یک معرف (دی تیزون) بعنوان لیگاند تشکیل یک کمپلکس داده که تشکیل این کمپلکس استخراج فلز را از داخل ماتریکس نمونه به حلال استخراج کننده تسهیل می نماید. بنابراین در این تکنیک یک میکرو قطره از یک حلال آلی بر روی سطح نمونه مایع ریخته شده که قطره بر روی سطح نمونه مساحت جذبی زیادی را ایجاد نماید و در نتیجه اختلاط با نمونه، انتقال جرم صورت می گیرد. سپس ظرف نمونه به یک حمام یخ منتقل شده و پس از

کارگران در معرض می گردد. لذا در سال ۱۹۹۰ به منظور کاهش ۹۵ تا ۹۹ درصدی مواجهه کارکنان استاندارد ۱ تا ۵ میکرو گرم بر متر مکعب هوا برای هشت ساعت مواجهه در روز را اعلام نمود (۱۸)، بنابراین کادمیوم از عناصری به شمار می آید که سم شناسان به دنبال تعیین مقدار و شناسایی آن در نمونه های بیولوژیکی و محیطی می باشند (۱۹). از جمله روش های متداول برای استخراج فلزات دو تکنیک استخراج و آماده سازی استخراج مایع-مایع (Liquid Liquid Extraction) و جداسازی با استفاده از فاز جامد (Solid Phase Extraction and Solid Phase Microextraction) (۲۴-۲۰) می باشد. روش (LLE) وقت گیر و همراه با مصرف مقادیر زیاد حلال های گران قیمت و بسیار سمی می باشد. روش (LLE) نسبت به روش جداسازی با استفاده از فاز جامد (SPE)، مراحل استخراج را ساده تر کرده است و از قابلیت اتوماسیون برخوردار است اما همچنان به مصرف زیاد حلال سمی و گران قیمت وابسته است (۲۵). در روش های آماده سازی جهت کاهش مصرف حلال آلی و پیشگیری از مواجهات زیست محیطی و مخاطرات جسمانی، روشی جهت شناسایی مقادیر اندک و دوستدار محیط زیست که مصرف حلال مضر و گران قیمت را حذف و به حداقل می رساند توسعه یافته است. از بین روش های متنوع ارائه شده تکنیک ریز استخراج با استفاده از فاز مایع (Liquid Phase Micro Extraction) که توسط Jean not و همکاران و همچنین Desgupta و همکاران در سال ۱۹۹۰ ارائه شد مورد توجه بسیاری قرار گرفته است (۲۶، ۲۷). در تکنیک LPME استخراج و تعیین مقدار نمونه با استفاده از مصرف مقادیر میکرو لیتری حلال های آلی امکانپذیر می باشد و روش های متنوعی برای آن ارائه شد است که ریز استخراج تک قطره (single Drop Micro Extraction) (۲۶)، ریز استخراج فاز مایع فیبر تو خالی (Hollow Fiber-liquid phase microextraction) (۲۸)، روش میکرو استخراج مایع-مایع با تغییر قطبیت حلال استخراج کننده (۲۹)،

مدل (WA-2017 SD) مجهز به الکتروود شیشه ای تنظیم شد. جهت وزن مقادیر دی تیزون از ترازوی دیجیتال (Sartorius AG (603S-OCE) ساخت آلمان)، برای جداسازی فاز آبی و آلی از سانتیفریوژ (Hettich مدل EBA ساخت آلمان) و برای ایجاد جریان گردابی در ترکیب کردن محلول ها از دستگاه ورتکس (ساخت شرکت Heidolph آلمان) استفاده گردید. نمونه ها به صورت یک سیستم تزریقی میکرو که این سیستم به شکل دست ساز تهیه شده بود با استفاده از نبولایزر FAAS به دستگاه جذب اتمی تزریق شدند. ۱۰۰ میکرو لیتر فاز استخراج بوسیله میکرو پی پت Eppendorf، به دستگاه جذب اتمی تزریق شد و اندازه گیری ها در حالت جذب یکپارچه (در منطقه پیک) انجام گردید. برای تنظیم دمای نمونه ها از هات پلیت مگنت (Hedolph) و برای اندازه گیری دمای نمونه ها از دماسنج دیجیتال (TP3001، چین) استفاده گردید.

#### مواد و حلال ها

ترکیبات لازم شامل محلول استوک کادمیوم با غلظت ۱۰۰۰ ppm، دی تیزون، HCl، اسید نیتریک، ۱-آن دکانول، ۲-دو دکانول، نرمال هگزا دکان، سرب II نیترات، سدیم کلراید، سود سوز آور بود که از شرکت مرک آلمان خریداری شدند.

#### آماده سازی محلول ها

محلول استاندارد مادر کادمیوم با غلظت ۱۰۰۰ ppm تهیه و در یخچال نگهداری شد. همچنین جهت تهیه محلول های استاندارد مورد نیاز روزانه مقادیر مختلفی از محلول استوک با آب دی یونیزه رقیق سازی گردید. برای ساخت محلول کمپلکس کننده از انحلال دی تیزون در اتانول استفاده شد. محلولی از ترکیب استخراج کننده و پخش کننده نیز تهیه گردید. جهت ارزیابی توانایی استخراج کادمیوم از نمونه بیولوژیکی، مقدار ۱۰ میلی لیتر

گذشت زمان کمی، حلال ریخته شده روی سطح نمونه، جامد و توسط اسپاتول برداشته شده و پس از جداسازی، حلال در دمای اتاق ذوب شده و مقدار مشخصی از آن به دستگاه جذب اتمی-شعله ای برای اندازه گیری تزریق میگردد (۴۷-۴۳). روش DLLME-SFOD<sup>3</sup> به وسیله ی متغیر های یکسانی در استخراج متداول مایع-مایع کنترل میشود حلال آلی بعنوان استخراج کننده در DLLME-SFOD استفاده می شود این حلال نباید قابل امتزاج با آب باشد و دارای چگالی پایین، دانسیته پایین، ضریب نفوذ پذیری بالا، نقطه ذوب و نقطه انجماد پایینی باشد. از روش مذکور جهت استخراج فلزات استفاده می گردد (۴۸ و ۴۹). در مطالعه حاضر به بررسی نمونه های شغلی افراد در معرض مواجهه با فلز کادمیوم از کارگران شاغل در صنایع فلزی پرداخته شده است. آماده سازی و استخراج آنالیت مورد نظر با استفاده از تکنیک DLLME-SFOD و آنالیز نمونه ها با استفاده از روش تجزیه دستگاهی جذب اتمی- شعله ای به انجام رسید. هدف اصلی این مطالعه ارائه روشی سریع، ارزان و ساده جهت تخمین مواجهات شغلی با فلز کادمیوم می باشد.

#### روش - اجرا

#### تجهیزات

در این مطالعه از دستگاه جذب اتمی (ساخت کشور آمریکا Varian AA 220 Atomic Absorption-FAAS) برای آنالیز نمونه ها استفاده گردید. از شعله هوا-استیلن برای اتمایزه کردن کادمیوم استفاده شد. از جمله مزایای استفاده از این تجهیز این است که می توان فلزات را با دقت و حساسیت بالا و استفاده از تجهیز در دسترس و عدم استفاده از تجهیزات پیشرفته و گران قیمت در نمونه های بیولوژیک ردیابی و تعیین مقدار کرد. تمام اندازه گیری جذب برای آنالیز کادمیوم با استفاده از لاین اصلی آنالیز کادمیوم انجام شده است. مقدار pH با استفاده از دستگاه دیجیتال (لوترون تایوان

3 Dispersive liquid-liquid microextraction solidified floating organic drop

جدول ۱. حد پایین و بالای گستره انتخابی برای بهینه سازی فاکتورهای موثر در استخراج کادمیوم از نمونه های آبی به روش DLLME-SFOD

متغیر	حد پایین	حد بالا
Ph	۲	۱۱
مقدار نمک (g)	۰	۵
حجم حلال استخراج کننده (μL)	۱۰	۱۰۰

از نمونه ادرار افراد غیر سیگاری مواجهه نیافته با کادمیوم تهیه شده و پس از تنظیم pH بهینه تعیین شده برای نمونه، غلظت های متفاوت کادمیوم به آنها اضافه گردید.

### آزمون آماری

در ابتدا با توجه به نتایج مطالعات پیشین و همچنین پیش آزمون های صورت گرفته سه فاکتور pH نمونه، غلظت نمک و حجم حلال استخراج کننده که نقش موثرتری در استخراج کادمیوم به روش DLLME-SFOD ایفا می کنند، جهت بررسی در فرآیند بهینه سازی انتخاب گردید به گونه ای که باید متوسط میزان جذب آنالیت مورد نظر با فاصله اطمینان آن برای حالتی ایده آل از ترکیب ۳ فاکتور مذکور به عنوان مقدار بهینه تعیین می شد. پس از آن گستره هر یک از متغیرهای ذکر شده در قالب حد بالا و پایین مطابق با جدول ۱ مشخص و با بهره گیری از روش طراحی مرکب مرکزی (Central Composite Design (CCD))، ۲۹ مرحله آزمایش بوسیله نرم افزار آماری R نسخه ۱.۴.۳ به عنوان تعداد نمونه مورد نیاز تعیین گردید.

### روش کار

با توجه به شرایط تعیین شده در هر یک از ۲۹ مرحله آزمایش طراحی شده جهت بهینه سازی فرآیند استخراج کادمیوم به روش ریز استخراج DLLME-SFOD، ۱۰ میلی لیتر از محلول آبی دارای غلظت های معلوم یون فلزی محلول کادمیوم نیاز بود. برای تنظیم pH نمونه از محلول HCl و سود سوزآور با غلظت ۱ درصد استفاده

شد. دی تیزون ۸۰ ppm محلول در اتانول جهت ایجاد کمپلکس به محلول اضافه شد. سپس محلول استخراج کننده با ترکیب حلال استخراج کننده و حلال پخش کننده تهیه گردید. از ۱-دودکانول، ۲-دودکانول و نرمال هگزا دکان به عنوان حلال استخراج کننده و از متانول، استون و استونیتریل به عنوان محلول پخش کننده استفاده گردید. ترکیب این دو نوع حلال به صورت پخشی به محلول نمونه تزریق شد. از هات پلیت مگنت نیز جهت بررسی نقش دما استفاده گردید و نرخ جریان گردابی محلول همزمان در راندمان استخراج به روش DLLME-SFOD مورد بررسی قرار گرفت. در این فرایند کمپلکس آبگریز فلز-دی تیزون شکل گرفت و سرانجام باعث ورود یون فلزی داخل نمونه به حلال استخراج کننده گردید. ترکیب حاصل توسط ورتکس تحت جریان گردابی قرارداده و جهت جداسازی بهتر فاز آلی و آبی در داخل سانتریفوژ گذاشته شد. پس از تکمیل فرایند استخراج و انتقال جرم، محلول حاصل در داخل ظرف یخ وارد گردید تا حلال آلی منجمد شود و توسط یک سرنگ فاز مایع تحتانی از فاز منجمد حاوی نمونه جدا گردید. پس از جداسازی حلال آلی حاوی یون فلزی در دمای اتاق ذوب شد. برای کاهش چسبندگی قطره آلی به دیواره داخلی فالكون، تا دمای ۳۵ درجه سانتی گراد در معرض گرما قرار گرفت. با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر اسید و متانول با نسبت ۱ به ۲ رقیق گردید و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن به دستگاه جذب اتمی-شعله ای برای اندازه گیری فلز کادمیوم تزریق گردید. با تعیین مقدار غلظت فلز کادمیوم استخراج شده توسط دستگاه جذب اتمی- شعله ای و داشتن غلظت معلوم نمونه راندمان استخراج محاسبه گردید. در این فرایند نقش pH نمونه (۱۱-۲)، حجم حلال استخراج کننده (۱۰۰-۰ μL) و نوع حلال استخراج کننده (ان هگزانرمال، دودکانول و ان دکانول)، حجم حلال پخش کننده (۳۰۰-۶۰۰ μL) و نوع حلال پخش کننده (استونیتریل، استون و متانول)، اثر سرعت سانتریفوژ (۲۰۰۰-۶۰۰۰ rpm) و زمان سانتریفوژ (۳-۱۰ min) بر

جدول ۲. نتایج آنالیز واریانس سه آزمون مورد بررسی جهت انتخاب مدل مناسب برای بهینه سازی در استخراج کادمیوم از نمونه های آبی به روش DLLME-SFOD

P- value	F-value Cd	Mean square	Sum of squares	Df	نوع آزمون مدل سطح پاسخ
۰/۲۸۴۳	۱/۳۳۸۷	۸۶۱/۰۰	۰/۲۵۸۳	۳	پاسخ درجه یک
۰/۳۲۴۲	۱/۱۲۲۷	۵۷/۷۱۱	۷/۲۱۳۴	۳	تعامل متقابل دو طرفه
$9/10 \times 10^{-29}$	۴۱/۸۸۶۳	۵/۴۰۳۷	۴/۱۲۱۱۲	۳	پاسخ درجه دوم
—	—	۴/۹۶	۴/۱۸۳۱	۱۹	Residuals
۰/۶۷۲۶	۰/۶۴۰۹	۲/۶۸	۱/۳۴۱	۵	Lack of fit

Multiple R2 = ۰/۹۰; Adjusted R2 = ۰/۸۵۵۴

می باشد. از سوی دیگر، فاصله اندک فاکتور R-Adjusted (درصد کاهش واریانس) و ضریب همبستگی پیرسون گزینش صحیح فاکتور های مورد بررسی جهت فرآیند استخراج کادمیوم و همچنین همبستگی بالای مقادیر پیش بینی شده و نتایج حاصل را نشان می دهد (۲). در نهایت مقدار Lack-of-fit ارائه شده ( $\leq 0/05$ ) تناسب موثر و توانایی مدل درجه دوم در پیش بینی شرایط مختلف را تایید نمود.

در ادامه پس از تایید مدل های مورد آزمون، ضرایب رگرسیونی هر یک از پارامتر ها با استفاده از رگرسیون چند متغیره محاسبه شد و در نهایت مقادیر بهینه فاکتور های موثر در استخراج کادمیوم از نمونه های آبی به روش DLLME-SFOD با در نظر گرفتن معادله رگرسیونی حاصل، از طریق افزونه Solver در نرم افزار Excel محاسبه گردید (جدول ۳).

#### اثر pH نمونه

آماده سازی نمونه های حاوی یون فلز کادمیوم بوسیله روش DLLME-SFOD شامل تشکیل کمپلکس های آبدوست است. pH نقش مهمی بر کلیت کننده فلزی بین دی تیزون و یون کادمیوم دارد (۵۰). و همچنین آب دوستی ترکیبات به pH وابسته است. بنابراین تاثیر pH در گستره بین ۱۱-۲ مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بدست آمده با استفاده از روش طراحی مرکب مرکزی

راندمان استخراج، قدرت یونی ( $0-\Delta gr$ ) و pH نمونه بر راندمان استخراج بررسی شد.

### یافته ها و بحث

با استفاده از نتایج حاصل از مطالعات پیشین سایر فاکتورهای موثر بر استخراج فلز کادمیوم شامل اثر غلظت و حجم دی تیزون، اثر نوع و حجم حلال پخش کننده، اثر زمان و سرعت سانتریفوژ، اثر مدت زمان استخراج و اثر تداخل یون ها مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به گستره تعیین شده در ۲۹ مرحله آزمایش طراحی شده جهت بهینه سازی فرآیند استخراج میزان استخراج کادمیوم محاسبه گردید.

ارتباط متغیر های مستقل عملیاتی با متغیر وابسته (میزان جذب) با آزمون رابطه خطی، متقابل و درجه دوم مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس سه مدل آزمون شده و بررسی برآوردگر های آماری حاصل نشان داد که مدل درجه دوم با مقدار F برابر ۴۱/۸۸ و سطح معناداری صفر تا ۰/۰۰۱ ( $P\text{-value} = 9/029 \times 10^{-8}$ ) قادر است به گونه ای موثر ارتباط میان متغیر های مستقل و متغیر وابسته را نشان دهد. علاوه بر این مقدار بدست آمده برای ضریب همبستگی پیرسون ( $R^2$ ) بیانگر این است که بیش از ۹۰ درصد تغییرات داده های تجربی در رابطه با استخراج کادمیوم (جدول ۲) به لحاظ آماری قابل تفسیر

جدول ۳. مقادیر بهینه تعیین شده برای پارامترهای موثر در استخراج کادمیوم از نمونه های آبی به روش DLLME-SFOD

مقدار بهینه تعیین شده کادمیوم	متغیر	راندمان (%)
۶	PH	۹۴
۰/۰۰۲۱	مقدار نمک (g)	
۷۶	حجم استخراج کننده (μL)	

جدول ۴. اثر حجم دی تیزون بر راندمان استخراج کادمیوم از نمونه های آبی به روش DLLME-SFOD

مقدار حجمی از دی تیزون (با غلظت ۱ mg/mL)	غلظت ppm	باز یافت (%) (SD میانگین)
۲۵۰	۰.۴۲	۸۴.۰۶ ± ۳.۹۰
۵۰۰	۰.۴۷	۹۴.۱۲ ± ۳.۵۳
۷۵۰	۰.۴۶	۹۲.۰۳ ± ۵.۰۴

جدول ۵. اثر نوع حلال استخراج کننده بر راندمان استخراج کادمیوم از نمونه های آبی به روش DLLME-SFOD (غلظت کادمیوم ۳۰ میکروگرم بر لیتر)

نوع حلال استخراج کننده	* باز یافت (%) (SD میانگین)
ان هگزان نرمال	۶۰.۶ ± ۳.۹
دودکانول	۹۹.۲ ± ۴.۲
آن دکانول	۱۰۴.۲ ± ۴.۷

تیزون ۱ mg/mL مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل (جدول ۴) نشان داد وقتی حجم دی تیزون ۵۰۰ μL است، جذب نیز به حداکثر می رسد و نسبت به این مقدار جذب نسبت به مقادیر بیشتر ثابت باقی ماند. با این وجود، ۵۰۰ μL از محلول دی تیزون با ۱ mg/mL غلظت در آزمایشات بعنوان عامل کلیت کننده مورد استفاده قرار گرفت.

اثر حلال پخش کننده

آنچه در مورد حلال پخش کننده مهم است عدم امتزاج حلال آلی و نمونه آبی است. حلالی مانند متانول،

(CCD) که شامل ۲۹ مرحله بودند بدست آمدند و مقدار بهینه pH برابر با ۶ تعیین گردید. نتایج آزمایشات نشان داد در مقادیر pH کمتر از ۴/۳۶ مقدار استخراج کادمیوم با توجه به تمایل کم ایجاد کمپلکس بین یون فلزی کادمیوم و دی تیزون کاهش می یابد. در pH بالاتر از ۹ کاهش استخراج بعلت هیدرولیز شدن یون کادمیوم است. براساس نتایج آزمایشات Yamini گستره pH نمونه ۶-۸ تعیین شده و بر اساس نتایج ANOVA و اثر pH بر روی پاسخ دستگاهی فلزات سنگین، مقدار بهینه ۶ حاصل گردید (۳). همسو بودن نتایج نشان داد در مقادیر pH < ۶ با توجه به تمایل کم ایجاد کمپلکس بین یون فلزی کادمیوم و دی تیزون راندمان استخراج نیز کاهش می یابد. در pH > ۶ کاهش راندمان استخراج بعلت هیدرولیز شدن یون کادمیوم فلزی است. با این وجود در آزمایشات شکرالهی و ازودین (Ezoddin and Shokrollahi مقدار بهینه pH نمونه ۳/۵ و ۳ بدست آمده است (۴۸-۴۶ و ۳۰ و ۲۹).

اثر غلظت و حجم دی تیزون

اثر غلظت دی تیزون علاوه بر اینکه بازده استخراج یون های فلزی را بهبود می دهد، تمایل برای ایجاد فاز مایع یونی را افزایش می بخشد. دی تیزون به صورت محلول با حلالی مانند اتانول برای کمپلکس مناسب ترکیب می شود. در این مطالعه از دی تیزون به عنوان عامل کلیت کننده استفاده گردید. بنابراین، حجم های مختلف (۲۵۰ تا ۷۵۰ میکرو لیتر) محلول و غلظت دی

جدول ۶. اثر نوع و حجم حلال پخش کننده بر راندمان استخراج کادمیوم از نمونه های آبی به روش DLLME-SFOD (غلظت کادمیوم ۳۰ میکروگرم بر لیتر)

نوع حلال پخش کننده	بازیافت (%) (SD ± میانگین)	حجم حلال پخش کننده استون (μL)	بازیافت (%) (SD ± میانگین)
استونیتریل	۹۴,۳۱ ± ۳,۸۵	۳۰۰	۷۵,۱۱ ± ۲,۱۴
استون	۹۶,۸۸ ± ۴,۷۲	۴۰۰	۸۱,۸۷ ± ۳,۱۱
متانول	۹۳,۱۲ ± ۵,۰۶	۵۰۰	۹۶,۶۲ ± ۳,۷۳
اتانول	۹۵,۰۴ ± ۴,۳۳	۶۰۰	۹۶,۷۳ ± ۳,۷۶

#### قدرت یونی

قدرت یونی یکی از پارامترهای کلیدی است که باید در فرآیند استخراج مد نظر قرار گیرد. بسته به ترکیبات هدف، حضور نمک در نمونه های آب می تواند به طور بالقوه فرایند استخراج را بهبود دهد (۵۲) و یا در فرایند استخراج بی اثر باشد (۵۳) و یا اینکه فرایند استخراج را کاهش دهد (۵۴، ۵۵). در کنار افزایش اثرات بهبود راندمان استخراج، غلظت زیاد نمک باعث افزایش ویسکوزیته و تشکیل کریستالهای یون های نمک در سطح محلول می شود در نتیجه حلالیت حلال استخراج کننده در آب افزایش یافته و راندمان استخراج را کاهش می دهد (۵۶، ۵۷). جهت بررسی تاثیر قدرت یونی مقادیر نمک در گستره بین ۵-۰ گرم مورد بررسی قرار گرفت و نتایج مقدار بهینه ۰,۰۲۱ گرم تعیین گردید.

#### اثر زمان و سرعت سانتریفوژ

سانتریفوژ یک گام مهم در جهت سهولت تفکیک فاز است. برای به دست آوردن بهترین بهره وری استخراج، زمان سانتریفوژ شدن در محدوده ۱۰-۱ دقیقه در سرعت های مختلف بهینه سازی شد. میزان جذب اندازه گیری شده با افزایش زمان سانتریفوژ شدن از ۳ تا ۶ دقیقه افزایش یافت و پس از آن در نسبت ثابتی باقی ماند. علاوه بر این، بهترین نتیجه در سرعت سانتریفوژ ۴۰۰۰ دور در دقیقه حاصل شد. بنابراین براساس جدول ۷ سانتریفوژ

اتانول، استون و استونیتریل به صورت متداول به عنوان پخش کننده استفاده می شوند. تغییر پخش کننده آلی بعنوان عامل موثر در راندمان استخراج شناخته شد. اهمیت پخش کننده در طول مراحل بهینه سازی در نظر گرفته شد، بنابراین نه تنها نوع پخش کننده بلکه حجم پخش کننده هم بررسی گردید. حجم حلال پخش کننده آلی بین ۳۰۰-۶۰۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. در حجم کم پخش کننده، ممکن است مقدار پخش کننده به اندازه ای نباشد که منجر به تشکیل قطره شود و یا ممکن است قطره تشکیل شده کوچک باشد. از طرف دیگر حجم زیاد پخش کننده می تواند پایداری آنالیت در نمونه آبی را بهبود بخشد. حجم حلال پخش کننده معمولا بین ۵۰-۵۰۰ μL می باشد. (۵۱) علاوه بر حجم حلال پخش کننده نوع حلال پخش کننده در فرایند استخراج نقش مهمی دارد. در بین حلال های پخش کننده استون بعنوان حلال بهینه مشخص گردید. حجم حلال پخش کننده بهینه شده، مقدار بازیافت را بوسیله ایجاد محیط ابری در محلول آبی بدون تغییر حلالیت پذیری آنالیت افزایش داد. در حجم های بالاتر از ۵۰۰ μL جداسازی قطره منجمد شده شناور به سختی انجام می پذیرفت و مقادیری از حلال استخراج کننده و دی تیزون در بخش آبی نمونه باقی مانده و راندمان را کاهش می داد بنابراین مقدار باتوجه به نتایج جدول ۶ برابر با ۵۰۰ μL بعنوان حجم بهینه انتخاب گردید.

جدول ۱.۷. اثر زمان و سرعت سانتریفوژ بر راندمان استخراج کادمیوم از نمونه های آبی به روش DLLME-SFOD (غلظت کادمیوم ۳۰ میکروگرم بر لیتر)

زمان سانتریفوژ (Min)	بازیافت (%) ( $\pm$ میانگین SD)	سرعت سانتریفوژ (rpm)	بازیافت (%) ( $\pm$ میانگین SD)
۳	۸۰.۳ $\pm$ ۲.۷	۲۰۰۰	۷۷.۲ $\pm$ ۱.۷
۶	۹۷.۲ $\pm$ ۳.۱	۴۰۰۰	۹۴.۴ $\pm$ ۳.۲
۱۰	۹۶.۹ $\pm$ ۴.۶	۶۰۰۰	۹۱.۲ $\pm$ ۳.۴

نیکل و سرب زمان استخراج در ۵ دقیقه تنظیم شد. این مدت زمان در مطالعه شکرالهی (۴۸) به ترتیب برابر با ۱۰ و ۳ دقیقه و در مطالعه یمینی (۲۸) راندمان استخراج بدون تاثیر از زمان استخراج بوده است. این زمان برای فلزات سنگین در مطالعات دیگر بین ۳ تا ۸ دقیقه بدست آمده است (۶۰-۶۳)

#### اثر حلال استخراج کننده

انتخاب یک حلال مناسب پارامتری مهم در روش DLLME-SFOD محسوب می شود. طیف حلالهای مناسب برای استفاده در روش DLLME-SFOD محدود است زیرا حلال باید دارای ویژگی هایی مانند پایداری و حلالیت کم در آب باشد تا امکان مخلوط شدن آن با آب وجود نداشته باشد. همچنین حلالیت آنالیت مورد نظر باید در حلال انتخابی بالا بوده و نقطه ذوب حلال باید نزدیک به دمای اتاق باشد (۶ و ۶۴). از آنجا که از حلال با نقطه ذوب، فشار بخار، و حلالیت کم در آب استفاده می شود، ان دکانول و دو دکانول گزینه های مناسبی برای استفاده در این مطالعه هستند. حجم حلال استخراج کننده بهینه برای استخراج ۱۰ میلی لیتر نمونه حاوی ۳۰ میکروگرم بر لیتر کادمیوم مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس پارامترهای موثر در انتقال جرم در روش میکرو استخراج مایع-مایع، میزان مهاجرت آنالیت از فاز آبی به قطره کوچک آلی به شکل مستقیم از طریق سطح بین دو فاز مایع مربوط می شود (۶۵). بنابراین، با افزایش حجم قطره، سطح بین دو فاز تغییر چندانی

در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۶ دقیقه به انجام رسید. بهترین نتیجه در سرعت سانتریفوژ ۴۰۰۰ دور در دقیقه و حداکثر راندمان در مدت زمان ۶ دقیقه سانتریفوژ حاصل شد. این نتیجه از نظر مدت زمان انجام سانتریفوژ با مطالعه صادقی (Sadeghi) بر روی فلز جیوه همخوانی داشته است. با توجه به دو فازی شدن محلول نمونه به صورت آبی و آلی، سانتریفوژ یک گام مهم در جهت سهولت تفکیک فاز است. با این وجود مدت زمان منجمد شدن فاز آلی و انجام سانتریفوژ از جمله مراحل وقت گیر این روش استخراج می باشد.

#### مدت زمان استخراج

در DLLME-SFOD، زمان استخراج به عنوان فاصله زمانی بین زمان پخش شدن حلال پخش کننده و زمان سانتریفوژ تعریف می شود (۵۸، ۵۹). در مطالعه حاضر اثر زمان انجام واکنش در محدوده ۲ تا ۱۵ دقیقه تحت شرایط آزمایشی ثابت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که سیگنال جذب زمانی افزایش می یابد که زمان استخراج از ۲ تا ۵ دقیقه تغییر می یابد و هنگامیکه زمان استخراج بیش از ۵ دقیقه طول می کشد، تغییری قابل ملاحظه ای ندارد. از این رو، در بقیه آزمایشات، زمان استخراج در ۵ دقیقه تنظیم شد. زمان استخراج مطالعه بین ۱۵-۲ دقیقه بررسی شد. با توجه به اینکه زمان استخراج در مدتی بیش از ۵ دقیقه تغییری قابل ملاحظه ای در راندمان استخراج کادمیوم ایجاد نکرد. از این رو، در بقیه آزمایشات کادمیوم و همچنین

جدول ۸. اثر حضور غلظت های مختلف یون های مداخله گر بر راندمان استخراج کادمیوم از نمونه های ادرار به روش-DLLME-SFOD (غلظت کادمیوم ۳۰ میکروگرم بر لیتر)

یون	(کادمیوم)/(یون)	* باز یافت (%)
Na <sup>+</sup>	۵۰۰	۹۸.۸۰ ± ۳.۲۴
No <sub>3</sub> <sup>-</sup>	۵۰۰	۹۹.۸۷ ± ۳.۳۵
So <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	۵۰۰	۹۷.۰۹ ± ۵.۳۲
Cl <sup>-</sup>	۵۰۰	۹۹.۶۲ ± ۶.۱۴
So <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	۵۰۰	۹۲.۲۳ ± ۴.۰۹

(SD ± میانگین)\*

Co<sub>3</sub><sup>2-</sup>، No<sub>3</sub><sup>-</sup> و So<sub>4</sub><sup>2-</sup> در تعیین Cd<sup>2+</sup> در غلظت ۵۰۰۰ برابر تداخلی ایجاد نکردند.

#### معتبر سازی روش

پس از بهینه سازی پارامتر های موثر در مراحل استخراج و اثبات موفقیت روش، به منظور تعیین مقادیر جزئی کادمیوم در نمونه های مختلف و همچنین برآورد حد تشخیص و محدوده خطی روش، رسم منحنی کالیبراسیون استاندارد کادمیوم با غلظت ۶۰-۴ میکروگرم بر لیتر و تزریق مستقیم تحت شرایط بهینه انجام گرفت و رابطه ای خطی با R<sup>2</sup> = ۰,۹۹۶۳ مشاهده شد. همچنین کمترین حد تشخیص (LOD) با استفاده از رابطه زیر برای کادمیوم ۲ میکروگرم بر لیتر و کمترین مقدار قابل تعیین (LOQ) ۶ میکروگرم بر لیتر محاسبه شد.

$$LOQ = (10 Sb)/m$$

$$LOD = (3 Sb)/m$$

در رابطه فوق Sb انحراف استاندارد شاهد و m شیب منحنی کالیبراسیون می باشد.

#### آنالیز نمونه بیولوژیک اضافه شده

جهت بررسی کارایی روش برای استخراج نمونه های بیولوژیک، نمونه های ادرار یک بار بدون افزایش استاندارد و دوبار با کمک افزودن استاندارد شرایط بهینه استخراج

نخواهد داشت و چون هدف تعیین مقادیر جزئی می باشد حجم کم حلال آلی پاسخ دستگاه را افزایش می دهد. با این حال، هر گونه افزایش بیشتر در حجم قطرات کوچک منجر به کاهش جذب می شود (۶۶). در ابتدا اثر حجم حلال استخراج کننده در محدوده ۱۰۰ تا ۱۰ μL در نظر گرفته شد و با استفاده از روش طراحی مرکب مرکزی (CCD) و پس از ۲۹ مرحله انجام آزمایشات مقدار بهینه حجم حلال استخراج کننده ۷۶ Lμ تعیین گردید. نوع حلال استخراج کننده نیز می بایست غیر قابل امتزاج با آب باشد و قابلیت ایجاد دو فاز مجزا برای جداسازی آنالیت را داشته باشد. حلال آلی قطبی مانند متانول، استونیتریل و استون به این علت حذف می شوند. علاوه بر این، چگالی حلال استخراج باید از آب کمتر باشد تا بر روی سطح آب شناور شود و قطره جامد مجزایی را ایجاد کند. فراریت کم و ضریب تفکیک بالا از ویژگی های دیگر حلال استخراج در روش DLLME-SFOD است. بنابراین اثر نوع حلال استخراج کننده بر راندمان مطابق جدول ۵ بررسی گردید. براساس نتایج حاصل از این بررسی مقادیر بهینه حلال استخراج کننده ۷۶ میکرولیتر تعیین گردید. این مقدار بهینه شده نزدیک به حجم کار شده در مطالعه ازودین (Ezoddin) بوده است (۴۶،۴۷).

#### اثر تداخل یون ها

به منظور بررسی راندمان استخراج کادمیوم، اثر یون های مزاحم به طور همزمان مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، ۱۰ میلی لیتر محلول های کادمیوم (۳۰ نانوگرم بر میلی لیتر) و مقادیر مختلف یون های مورد آزمایش با توجه به روش DLLME-SFOD مورد آزمایش قرار گرفتند. جدول ۸ اثر حضور غلظت های مختلف یون های مداخله گر بر راندمان استخراج کادمیوم در نمونه های ادرار را نشان می دهد. نتایج نشان داد که راندمان استخراج کادمیوم در حضور پنج یونهای مداخله گر بیش از ۰.۹۷٪ است. یون های Na<sup>+</sup>، Cl<sup>-</sup>،

جدول ۹. بررسی نتایج میزان کادمیوم در نمونه های بیولوژیکی

کادمیوم اضافه شده در آب و نمونه بیولوژیک				ماتریکس
باز یافت نسبی %	انحراف استاندارد نسبی %	یافت شده ( $\mu\text{g/l}$ )	اضافه شده ( $\mu\text{g/l}$ )	
-----	۰.۰۰۲	-----	-----	آب بدون یون
۹۹	۰.۰۵	۰.۹۹	۱	
۱۰۱	۰.۰۹	۲.۰۲	۲	
-----	۰.۰۷	۸.۴۲	-----	ادرار شماره ۱
۹۸.۳	۱.۱۲	۱۸.۲۵	۱۰	
۱۰۰.۷	۱.۵۴	۲۸.۵۵	۲۰	
-----	۴/۸	۴.۶۴	-----	ادرار شماره ۲
۹۵.۴	۲/۳	۹.۴۱	۵	
۹۷.۷	۵/۴	۱۴.۴۸	۱۰	

توجه به لزوم تعیین مقادیر جزئی آلاینده های مختلف در نمونه های محیطی و بیولوژیکی، مقایسه این مقادیر با استاندارد های موجود و در نهایت کنترل این آلاینده ها روش های جدید آماده سازی نمونه امروزه توسعه گسترده ای در صنعت یافته است. در آینده انتظار می رود، کار بیشتر در زمینه انجام خودکار مراحل مختلف DLLME-SFOD و بر روی نمونه های پلاسما و ادرار افراد شاغل در صنعت انجام شود. این روش تطابق خوبی با روش های تجزیه دستگاهی دارد. توانایی استفاده از دستگاه جذب اتمی از دیگر محاسن انجام این کار برای تعیین مقدار فلز کادمیوم در نمونه های بیولوژیکی است، چراکه با استفاده از این دستگاه که قدرت تشخیص آن در حد ppm است مقادیر در حد ppb قابل تشخیص می باشد. تاکنون از این روش برای مطالعات سم شناسی و پایش میزان مواجهه افراد در معرض کادمیوم و شاغل در صنایع مربوطه استفاده نشده است. معرفی روشی با قابلیت های اشاره شده برای تخمین مواجهات شغلی با مقاصد بهداشت حرفه ای و سم شناسی شغلی حائز اهمیت می باشد. بنابراین نیاز است کاربردهای شغلی روش به منظور بررسی نمونه های بیولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد.

شدند. نتایج بررسی میزان کادمیوم در نمونه های بیولوژیکی در جدول ۹ قرار گرفته است. جدول مذکور نتایج حاصل از این بررسی پارامترهای صحت و دقت، بر روی داده های فلز کادمیوم را نیز نشان می دهد.

### نتیجه گیری

در این مطالعه، روش میکرو استخراج مایع مایع پخش شونده با استفاده از حلال آلی منجمد شده شناور (DLLME SFOD) برای اندازه گیری فلز کادمیوم در نمونه های ادرار مورد استفاده قرار گرفت. در مطالعه حاضر مهم ترین فاکتورها و عوامل مورد بررسی و بهینه سازی قرار گرفت. نتایج حاصل مطابق با جدول ۹ توانایی روش در استخراج کادمیوم از محیط های آبی در شرایط بهینه را نشان داد و همچنین در مورد نمونه بیولوژیکی نیز نتایج موفقیت آمیزی را به دنبال داشت. تکنیک DLLME-SFOD ساده، ارزان، با مصرف بسیار کم حلال و با مشکلات زیست محیطی و بهداشتی کمتر در مقایسه با دیگر روشهای مرسوم می باشد. همچنین این روش تطابق خوبی با روش های تجزیه دستگاهی دارد. تلاش های قابل توجهی برای غلبه بر زمانبر بودن مدت زمان رسیدن به تعادل صورت گرفته است. با

## REFERENCES

- 1- Nordberg G. Cadmium. Nordiska expertgruppen for grans- vardesdokumentation. Criteria documents from the Nordic Expert Group. Stockholm: Arbetskyddsverket, 1992:60 pp. Arbeta och Hals, 26.
- 2- World Health Organization (WHO). Cadmium. Geneva: WHO, 1992. Environmental health criteria, vol 134.
- 3- Berglund M, Wkesson A, Nermell B, Vahter M. Intestinal absorption of dietary cadmium in women is dependent on body iron stores and fiber intake. *Environ Health Perspect* 1994;102:1058-66.
- 4- Nordberg, GF, Kjellstrom T, Nordberg M. Genetics and metabolism. In: Friberg L, Elinder C-G, Kjellstrom T, Nordberg GF, editors. *Cadmium and health: a toxicological and epidemiological appraisal*; vol I (Exposure, dose, and metabolism). Boca Raton (FL): CRC Press, 1985:103-78.
- 5- Järup L, Berglund M, Elinder CG, et al. Health effect of cadmium exposure: a review of the literature and risk estimate. *Scand J Work Environ Health* 1998;24(suppl1):1-51.
- 6- Vahter M, Berglund M, Nermell B, Wkesson A. Bioavailability of cadmium from shellfish and mixed diet in women. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;136:332-41.
- 7- Elinder, C-G. Cadmium: use, occurrence, and intake. In: Friberg L, Elinder, C-G, Kjellstrom T, Nordberg G, editors. *Cadmium and health: a toxicological and epidemiological appraisal*, vol (Exposure, dose, and metabolism). Boca Raton (FL): CRC Press, 1985:23-63.
- 8- Friberg L, Piscator M, Nordberg G, Kjellstrom T. *Cadmium in the environment*, 2nd ed. Cleveland (OH): CRC Press, 1974.
- 9- Elinder C-G, Kjellstrom T, Lind B, Linnman L, Piscator M, Sundstedt K. Cadmium exposure from smoking cigarettes: variations with time and country where purchased. *Environ Res* 1983;32:220-7.
- 10- Brzóska M, Moniuszko-Jakoniuk J, Jurczuk M, Gałążyn-Sidorczuk M. Cadmium turnover and changes of zinc and copper body status of rats continuously exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol and Alcoholism*. 2002;37(3):213-21.
- 11- Klaassen CD, Liu J. Role of metallothionein in cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity. *Drug metabolism reviews*. 1997;29(1-2):79-102.
- 12- Goering PL, Klaassen CD. Altered subcellular distribution of cadmium following cadmium pretreatment: possible mechanism of tolerance to cadmium-induced lethality. *Toxicology and applied pharmacology*. 1983;70(2):195-203.
- 13- Goering PL, Klaassen CD. Tolerance to cadmium-induced hepatotoxicity following cadmium pretreatment. *Toxicology and applied pharmacology*. 1984;74(3):308-13.
- 14- Kjellstrom T. Kinetic model of cadmium metabolism. *Cadmium and health, a toxicological and epidemiological appraisal* Vol I Exposure, dose and metabolism. 1986;183.
- 15- Itokawa Y, Abe T, Tabei R, Tanaka S. Renal and skeletal lesions in experimental cadmium poisoning. *Archives of Environmental Health: An International Journal*. 1974;28(3):149-54.
- 16- Friberg L. Health Hazards in the Manufacture of Alkaline Accumulators with special reference to Chronic Cadmium Poisoning. A Clinical and Experimental Study. *Acta medica scandinavica*. (138:1950 Suppl.240).
- 17- Vainio H, Heseltine E, Partensky C, Wilbourn J. Meeting of the IARC working group on beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*. 1993:360-3.
- 18- This discussion is not a substitute for requirements of the rule. The complete regulatory text of the cadmium rule and appendices are published in the Federal Register 57, 178: 42102-42463.
- 19- Panjali Z, Asgharinezhad AA, Ebrahimzadeh H, Karami S, Loni M, Rezvani M, et al. Development of a selective sorbent based on a magnetic ion imprinted polymer for the preconcentration and FAAS determination of urinary cadmium. *Analytical Methods*. 2015; 24-3618: (8)7.
- 20- Kargar F, Shahtaheri J, Golbabaei F, Barkhordari A, Rahimi-Froushani A. Measurement of Urinary Cadmium in Glaziers Using Solid Phase Extraction Followed by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy. *Iranian Occupational Health Association (IOHA)*. 2008-5435/12/42-11-16.
- 21- Zolfonoun E. Solid phase extraction and determination of indium using multiwalled carbon nanotubes modified with magnetic nanoparticles. *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal*. 2018; 1(1) : 5-10.
- 22- Arjomandi M. A Review: Analytical methods for

- heavy metals determination in Environment and human samples. *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal*. 2019; 2(3) 97-126.
- 23- Gou M, Bahrami Yarahmadi B. Separation and determination of lead in human urine and water samples based on thiol functionalized mesoporous silica nanoparticles packed on cartridges by micro column fast micro solid-phase extraction, *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal*. 2019; 2(3) : 39-50.
- 24- Fahimirad B, Asghari A. A magnetic graphitic carbon nitride as a new adsorbent for simple separation of Ni (II) ion from foodstuff by ultrasound-assisted magnetic dispersive micro solid-phase extraction method, *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal*. 2018; 1(1): 47-56.
- 25- Dadfarnia S, Salmanzadeh AM, Shabani AMH. A novel separation/preconcentration system based on solidification of floating organic drop microextraction for determination of lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2008;623(2):163-7.
- 26- Şahin ÇA, Tokgöz İ. A novel solidified floating organic drop microextraction method for preconcentration and determination of copper ions by flow injection flame atomic absorption spectrometry. *Analytica chimica acta*7,-83: (2-1)667:2010.
- 27- Vera-Avila LE, Rojo-Portillo T, Covarrubias-Herrera R, Peña-Alvarez A. Capabilities and limitations of dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic drop for the extraction of organic pollutants from water samples. *Analytica chimica acta*. 2013;805:60-9.
- 28- Moradi M, Yamini Y. Application of vesicular coacervate phase for microextraction based on solidification of floating drop. *Journal of Chromatography A*. 2012;1229:30-7.
- 29- Habibiyani A, Ezoddin M, Lamei N, Abdi K, Amini M, Ghazi-khansari M. Ultrasonic assisted switchable solvent based on liquid phase microextraction combined with micro sample injection flame atomic absorption spectrometry for determination of some heavy metals in water, urine and tea infusion samples. *Journal of Molecular Liquids*. 2017;242:492-6.
- 30- Lamei N, Ezoddin M, Abdi K. Air assisted emulsification liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for preconcentration of methadone in water and biological samples. *Talanta*. 2017;165:176-81.
- 31- Dadfarnia S, Shabani AMH, Kamranzadeh E. Separation/preconcentration and determination of cadmium ions by solidification of floating organic drop microextraction and FI-AAS. *Talanta*. 2009;79(4):1061-5.
- 32- Ramin Sabet M, Pourhossein M, Khadem M, Omidi F, Golbabaei F, Shahtaheri J. Development of dispersive liquid-liquid micro-extraction procedure for trace determination of pesticide diazinon in urine samples. *Journal of Health and Safety at Work*. Vol. 8; No. 4; Winter 2019.
- 33- Khaligh A. Food Analysis: Task specific ionic liquids for separation of nickel and cadmium from olive oil samples by thermal ultrasound-assisted dispersive multiphasic microextraction. *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal*. 2019; 2(2): 55-64.
- 34- Davari S, Hosseini F. Dispersive solid phase microextraction based on aminofunctionalized bimodal mesoporous silica nanoparticles for separation and determination of calcium ions in chronic kidney disease. *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal* 2018; 1(1): 57-66.
- 35- Motakef Kazemi N. A novel sorbent based on metal-organic framework for mercury separation from human serum samples by ultrasound assisted-ionic liquid-solid phase microextraction, *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal* 2019; 2 (03): 67-78
- 36- Karimi Zevardeh S, Shabab M, Rismanchian M, Alirangkooy H. Application of Ultrasound-assisted Emulsification Solidification of Floating Organic Drop Microextraction for Preconcentration and Trace Detection of Iron(III) in Water and Human Urine Samples. *Iranian Occupational Health Association (IOHA)*. 2008-5435/14/63-207-214.
- 37- Mohamadi M, Mostafavi A. A novel solidified floating organic drop microextraction based on ultrasound-dispersion for separation and preconcentration of palladium in aqueous samples. *Talanta*. 2010;81(1-2):309-13.
- 38- Şahin ÇA, Durukan I. Ligandless-solidified floating organic drop microextraction method for the preconcentration of trace amount of cadmium in water samples. *Talanta*. 2011;85(1):657-61.
- 39- Fathirad F, Afzali D, Mostafavi A, Ghanbarian M.

- Ultrasound-assisted emulsification solidified floating organic drops microextraction of ultra trace amount of Te (IV) prior to graphite furnace atomic absorption spectrometry determination. *Talanta*. 2012;88:759-64.
- 40- Zanjani MRK, Yamini Y, Shariati S, Jönsson JÅ. A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. *Analytica Chimica Acta*. 2007;585(2):286-93.
- 41- Khalili-Zanjani MR, Yamini Y, Yazdanfar N, Shariati S. Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction-gas chromatography-flame photometric detection. *Analytica chimica acta*. 2008;606(2):202-8.
- 42- Farahani H, Yamini Y, Shariati S, Khalili-Zanjani MR, Mansour-Baghahi S. Development of liquid phase microextraction method based on solidification of floated organic drop for extraction and preconcentration of organochlorine pesticides in water samples. *Analytica chimica acta*. 2008;626(2):166-73.
- 43- Guo X, He M, Chen B, Hu B. Solidified floating organic drop microextraction combined with ETV-ICP-MS for the determination of trace heavy metals in environmental water samples. *Talanta*. 2012;94:70-6.
- 44- Wen S, Zhu X. Speciation of antimony (III) and antimony (V) by electrothermal atomic absorption spectrometry after ultrasound-assisted emulsification of solidified floating organic drop microextraction. *Talanta*. 2013;115:814-8.
- 45- Bidabadi MS, Dadfarnia S, Shabani AMH. Solidified floating organic drop microextraction (SFODME) for simultaneous separation/preconcentration and determination of cobalt and nickel by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). *Journal of Hazardous Materials*. 2009;166(1):291-6.
- 46- Ezoddin M, Majidi B, Abdi K. Ultrasound-assisted supramolecular dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drops for preconcentration of palladium in water and road dust samples. *Journal of Molecular Liquids*. 2015;209:515-9.
- 47- Ezoddin M, Abdi K, Lamei N. Development of air assisted liquid phase microextraction based on switchable-hydrophilicity solvent for the determination of palladium in environmental samples. *Talanta*. 2016;153:247-52.
- 48- Shokrollahi A, Ebrahimi F. Supramolecular-Based Ultrasonic-Assisted Dispersion Solidification Liquid-Liquid Microextraction of Copper and Cobalt Prior to Their Flame Atomic Absorption Spectrometry Determination. *Journal of AOAC International*. 2017;100(6):1861-8.
- 49- Rezaee M, Khalilian F. A novel method for the determination of trace thorium by dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop. *Química Nova*. 2016;39(2):167-71.
- 50- Andrade FP, Nascentes CC, Costa LM. Cadmium and lead cloud point preconcentration and determination in tobacco samples by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2009;20(8):1460-6.
- 51- Mansour FR, Danielson ND. Solidification of floating organic droplet in dispersive liquid-liquid microextraction as a green analytical tool. *Talanta*. 2017;170:22-35.
- 52- Kramer KE, Andrews AR. Screening method for 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using hollow fiber membrane solvent microextraction with in-tube derivatization. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2001;760(1):27-36.
- 53- Ugland HG, Krogh M, Rasmussen KE. Liquid-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic-determination of benzodiazepines in biological matrices. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000;749(1):85-92.
- 54- Shen G, Lee HK. Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides. *Analytical Chemistry*. 2002;74(3):648-54.
- 55- Psillakis E, Kalogerakis N. Hollow-fibre liquid-phase microextraction of phthalate esters from water. *Journal of Chromatography A*. 2003;999(1-2):145-53.
- 56- Bagheri H, Saber A, Mousavi SR. Immersed solvent microextraction of phenol and chlorophenols from water samples followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2004;1046(1-2):27-33.
- 57- Lambropoulou DA, Albanis TA. Application of hollow fiber liquid phase microextraction for the determination of insecticides in water. *Journal of Chromatography A*. 2005;1072(1):55-61.
- 58- Zhou Q, Bai H, Xie G, Xiao J. Trace determination of

- organophosphorus pesticides in environmental samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2008;1188(2):148-53.
- 59- Bai H, Zhou Q, Xie G, Xiao J. Temperature-controlled ionic liquid-liquid-phase microextraction for the pre-concentration of lead from environmental samples prior to flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*. 2010;80(5):1638-42.
- 60- Ghozatloo A, Enayatollahi A. Enhancing the effect of zinc oxide on the absorption of heavy metals from wastewater by using Silica in graphene bed. *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal*. 2019; 2(4): 27-38.
- 61- Riahi A, Mosafayian Jahromy E, Fahimirad B. Speciation of arsenic (III,V) based on methyltrioctylammonium mercaptobenzoate and centrifuging dispersive liquid-liquid microextraction in water and blood. *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal*. 2019; 2(4): 39-48.
- 62- Mostafavi S M, Ebrahimi A. Mercury determination in work place air and human biological samples based on dispersive liquid-liquid micro-extraction coupled with cold vapor atomic absorption spectrometry. *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal*. 2019; 2(4): 49-58.
- 63- Azami K, Aliomrani M, Dehghani Mobarake M. Cadmium separation in human biological samples based on captopril-ionic liquid paste on graphite rod before determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytical Methods in Environmental Chemistry Journal*. 2019; 2(4): 71-81.
- 64- Leong M-I, Huang S-D. Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*. 2008;1211(1-2):8-12.
- 65- Zhao L, Lee HK. Application of static liquid-phase microextraction to the analysis of organochlorine pesticides in water. *Journal of Chromatography A*. 2001;919(2):381-8.
- 66- Bagheri H, Khalilian F. Immersed solvent microextraction and gas chromatography-mass spectrometric detection of s-triazine herbicides in aquatic media. *Analytica chimica acta*. 2005;537(1-2):81-7.