

ORIGINAL RESEARCH PAPER

A Novel Magnetized Imine-linked Covalent Organic Framework Sorbent ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TFPA-Bd) for Microextraction of BTEX Biomarkers in Urinary Samples

Nematullah Kurd¹, Abdulrahman Bahrami^{2*}, Abbas Afkhami³, Farshid Ghorbani Shahna², Mohammad Javad Assari², Maryam Farhadian⁴

¹ Department of Occupational Health and Safety, School of Public Health, Behbahan Faculty of Medical Sciences, Behbahan, Iran

² Center of Excellence for Occupational Health, Occupational Health and Safety Research Center, School of Public Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

³ Faculty of Chemistry, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran

⁴ Department of Biostatistics, School of Public Health and Research Center for Health Sciences, Hamadan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

Received: 21-2-2023

Accepted: 23-7-2023

ABSTRACT

Introduction: Toluene, benzene, xylene, and ethylbenzene (BTEX) belong to the class of monocyclic aromatic hydrocarbons and are identified as toxic volatile compounds due to their harmful properties. The reliable biomarkers for occupational exposure to these toxic compounds are hippuric acid (HA), trans,trans-muconic acid (tt-MA), mandelic acid (MA), and methylhippuric acid (MHA), which correlate with toluene, benzene, ethylbenzene, and xylene, respectively.

Material and Methods: A novel magnetized imine-linked covalent organic framework ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TFPA-Bd) was synthesized, marking its inaugural use as a sorbent in microextraction by packed sorbent (MEPS). The synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TFPA-Bd was executed in a straightforward and efficient manner, using Fe_3O_4 nanoparticles as the magnetic core and benzidine (Bd) and Tris (4-formyl phenyl) amine (TFPA) as the structural building blocks. This newly produced sorbent was tested for the microextraction of hippuric acid (HA), mandelic acid (MA), trans, trans-muconic acid (tt-MA), and m-methyl hippuric acid (m-MHA) from urine samples, which were then analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC). In order to optimize the extraction performance, parameters like sample volume, elution volume, extraction cycles, pH, and sample solution temperature were thoroughly adjusted. The synthesized adsorbent underwent thorough characterization via scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM), Fourier transforms infrared spectrometer (FTIR), and X-ray diffraction (XRD).

Results: The developed method showcased promising attributes: low detection limits (0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for tt-MA, $S/N=3$), low quantification limits (0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for tt-MA, $S/N=10$), a solid linear range (0.5-320 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for MA, $R > 0.99$), and commendable intra- and inter-day precision (2.4%-4.3% and 3.1%-7.8%, respectively) for volatile organic compound (VOC) biomarkers. Furthermore, the method demonstrated recoveries in the 81-87.5% range for spiked samples, indicating its practicality and effectiveness.

Conclusion: The developed procedure was suitable for the determination of BTEX biomarkers from urine samples and can be an alternative to previous methods.

Keywords: BTEX biomarkers, Microextraction by packed sorbent, Covalent organic framework, HPLC-UV, Urine samples

HOW TO CITE THIS ARTICLE

Kurd N, Bahrami A, Afkhami A, Ghorbani Shahna F, Assari MJ, Farhadian M. A Novel Magnetized Imine-linked Covalent Organic Framework Sorbent ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TFPA-Bd) for Microextraction of BTEX Biomarkers in Urinary Samples. *J Health Saf Work.* 2023; 13(3): 474-495.

1. INTRODUCTION

Toluene, benzene, xylene, and ethylbenzene, collectively known as BTEX, are classified as toxic volatile compounds and monocyclic aromatic hydrocarbons. Chronic exposure to these compounds can lead to severe health

issues, including acute myeloid leukemia, blood disorders, generational defects, bladder cancer, and neurocognitive deficiencies. After exposure, metabolic pathways produce Hippuric acid (HA), trans,trans-muconic acid (tt-MA), mandelic acid (MA), and methylhippuric acid (MHA) as biomarkers for toluene, benzene, ethylbenzene,

* Corresponding Author Email: Bahrami@umsha.ac.ir

and xylene, respectively. These biomarkers are ultimately excreted in the urine.

Microextraction by packed sorbent (MEPS) is a modern procedure designed to miniaturize solid phase extraction (SPE), providing a sensitive, simple, rapid, and solvent-free method for determining BTEX biomarkers, as outlined in several articles. Covalent organic frameworks (COFs), a new class of crystalline porous materials, are formed through the self-assembly of light elements linked via strong covalent bonds. Given their superior selectivity, low density, structural stability, extensive surface area, and adjustable pore size, COFs have seen extensive application in a variety of fields.

This study presents a rapid and straightforward synthesis procedure for $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TFPA-Bd-COF}$ nanobeads. The extraction performance of these adsorbents was investigated for the first time and the MEPS parameters for target analytes were studied. The findings were then compared with other HPLC methods for determining BTEX biomarkers in human urine.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Preparation of the Fe_3O_4 nanoparticles

6g of sodium acetate, 3.4g of ferric chloride hexahydrate, and 1g of sodium citrate dihydrate were dissolved in 100mL ethylene glycol while stirring at 25°C. The homogenous solution was transferred to a Teflon autoclave and heated for 10 hours at 200°C. The final products were isolated with a magnet and washed with deionized water

and pure ethanol (three times) before drying at 25°C.

2.2. Synthesis of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TFPA-Bd}$ nanobeads

Initially, 75mg of Fe_3O_4 nanoparticles, 41.5mg of Bd, and 24.3mg of TFPA were combined with 50 mL of DMSO and sonicated until a uniform solution was achieved. Then, 2mL of acetic acid glacial was added to the mixture under sonication before being transferred to a Teflon autoclave and heated for 72 hours at 120°C. The products were collected using a magnet, washed with methanol and tetrahydrofuran (three times), and dried at 25°C.

2.3. Adsorption mechanism in MEPS procedure

In this study, the solid sorbent was activated using a suitable solvent. This activation allowed the tangled alkyl chains of the sorbent to unwind. The solid phase was then introduced to a solution that was akin to the sample solution. When the sample solution was passed through the solid phase, the analytes adhered to its surface, facilitated by strong hydrophobic interactions such as van der Waals forces and $\pi-\pi$ stacking interactions. Subsequently, any substances interfering with the analytes were flushed from the solid phase using an appropriate solution. In the final step, the adsorbed analytes were eluted from the solid phase by passing a suitable solution through it (Fig 1), after which they were ready to be injected into an HPLC-UV device.

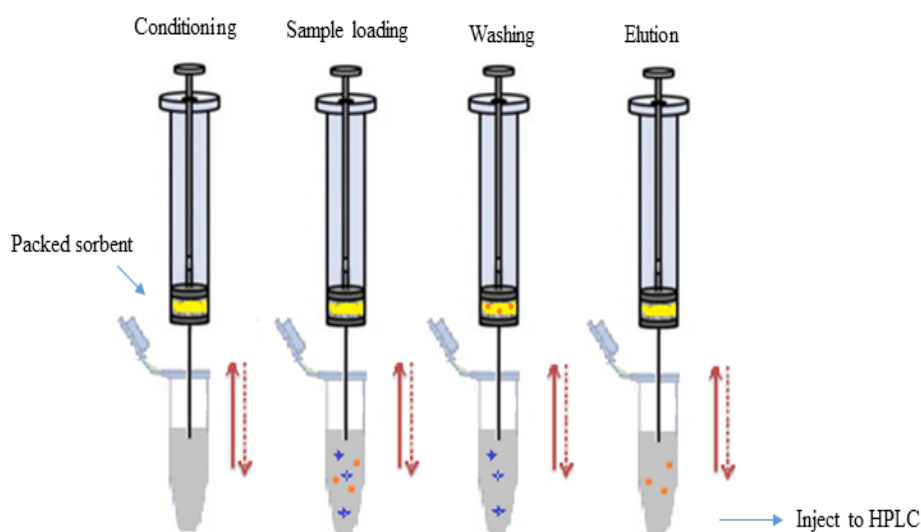


Fig. 1: Diagram of the MEPS procedure.

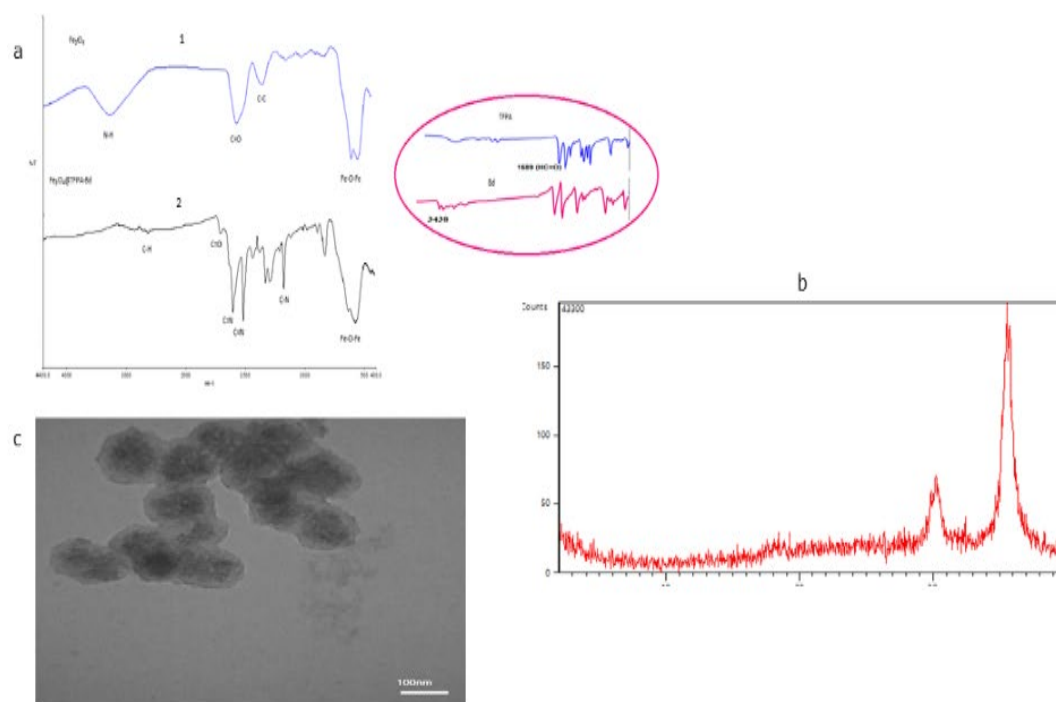


Fig. 2: (a) FTIR spectra, (b) XRD pattern, and (c) TEM image of Fe_3O_4 @TFPA-Bd nanobeads.

2.4. COF-MEPS development

In this study, 50 mg of the solid sorbent was activated using methanol solvent ($3 \times 100 \mu\text{L}$) before being conditioned with deionized water ($3 \times 100 \mu\text{L}$). Different solvent mixtures were tested as washing solvents, including deionized water-methanol (80:20 v/v), deionized water-acetonitrile (80:20 v/v), deionized water-propanol (80:20 v/v) and deionized water-acetic acid (90:10 v/v). The elution performance of several solvents was also evaluated, including acetonitrile-acetic acid (80:20 v/v), methanol-acetic acid (80:20 v/v), ethanol-acetic acid (80:20 v/v), deionized water-acetic acid (50:50 v/v), and deionized water-hydrochloric acid (50:50 v/v). Further exploration was done on 5 sample volumes (30, 60, 90, 120, and 150 μL) and 5 extraction cycles (2, 4, 6, 8, and 10 times) at the speed of $10 \pm 2 \mu\text{L/s}$ in charging and discharging mode. Finally, the influence of sample pH and temperature on the percentage recovery of the analytes from urine samples was investigated within the range of 2-10 for pH and within the range of 10-50°C.

2.5. Validation of the method

The validation of the developed method was conducted following the guidelines of the Food and

Drug Administration.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Characterization of Fe_3O_4 @TFPA-Bd sorbent

The successful synthesis of Fe_3O_4 @TFPA-Bd was confirmed through FT-IR spectra (Fig 2). The appearance of strong absorption peaks around 1412, 1618, and 3384 cm^{-1} suggests the presence of the carboxyl groups on the surface of Fe_3O_4 (Curve a1). Moreover, new absorption bands of C=N vibrations at 1598 cm^{-1} and 1621 cm^{-1} , which correspond to the Imine-link and Schiff-link C with N, are visible in the spectrum of Fe_3O_4 @TFPA-Bd. The stretching vibration of C=N at 1621 cm^{-1} confirms the formation of the COF shell on the surface of Fe_3O_4 nanoparticles (Curve a2). The crystal structure of Fe_3O_4 @TFPA-Bd was assessed via an X-ray diffraction (XRD) pattern. Characteristic peaks of Fe_3O_4 @TFPA-Bd at 30° and 35° in the sample, as shown in Fig. 2b, verify that Fe_3O_4 @TFPA-Bd was crystallized. The morphology of the COF nanobeads was characterized by a TEM image, as depicted in Fig 2c. TEM observations reveal a distinct core-shell structure of Fe_3O_4 @TFPA-Bd nanobeads with a dark core of Fe_3O_4 nanoparticles and a gray COF layer.

3.2 COF-MEPS development

Factors affecting the extraction performance of the MEPS procedure were evaluated.

3.2.1. Washing solvents

The examination was made on 100 µL of different solutions. It was found that higher extraction efficiency and cleaner extract were obtained using a deionized water solution compared to other solutions.

3.2.2. Elution solvents

The maximum extraction recovery was observed when a 50 µL methanol-acetic acid solution at an 80:20 ratio (v/v) was utilized as the elution solvent.

3.2.3. Sample volume and extraction cycles

The study's results highlighted that an increase in sample volume enhanced the extraction efficiency of HA, MA, tt-MA, and m-MHA from spiked urine samples. An optimal condition was identified at 8×150 µL and utilized for subsequent experiments.

3.2.4. Temperature and pH of sample solution

The maximum extraction of MA, tt-MA, HA, and m-MHA occurred at a pH level of 4. Notably, a

significant recovery percentage increase for MA and tt-MA was recorded at 30°C. Furthermore, 40°C was selected as the ideal temperature for extracting HA and m-MHA from spiked urine samples.

3.3. Method validation:

The validated parameters of the developed methods are summarized in Table 1. Under the optimized COF-MEPS conditions, a strong correlation ($r^2 > 0.99$) was found between the concentration of analytes and the peak area ratio across a concentration range of 0.06-6.4 µg/mL for tt-MA, 0.5-320 µg/mL for MA, and 0.1-25 µg/mL for HA and m-MHA. After each extraction, the packed adsorbent was cleansed twice with 100 µL of the eluting solution, followed by another two times with 100 µL of acetone solution. Following the clean-up process, the carry-over remained at 0.1% or less between the two extractions.

3.4. Comparison of the extraction methods

The ability to extract MA, tt-MA, HA, and m-MHA from urine samples using only a single adsorbent and a minimal final elution volume was demonstrated through the COF-MEPS procedure, surpassing earlier methods using HPLC-UV (as shown in Table 2).

Table 1: Method validation results for spiked urine samples under optimized conditions.

Analytes	LDR (µg/mL)	Precision (%) Intra-day	Precision (%) Inter-day	Accuracy (%)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)	Recovery (%)
MA	0.5-320	3.7	3.1	19	0.05	0.16	81.0
HA	0.16-25	2.4	6.5	16.2	0.05	0.16	83.8
tt-MA	0.06- 6.4	4.3	7.8	18.4	0.02	0.06	81.6
m-MHA	0.16- 25	4.1	5.4	12.5	0.05	0.16	87.5

Table 2: Comparison of the COF-MEPS procedure with other HPLC-UV methods for the extraction and determination of target biomarkers.

Method	Target analyte	Linear range (µg/mL)	LOD (µg/mL)	EE (%)	RSD (%)
Derivation	MA	1-16	1	78.1- 83.8	2.4- 18.9
MIP- MEPS	MA	0.2-20	0.06	> 88.8	3.5- 6.1
SAX-SPE	tt-MA	0.1-10	0.1	72-101	2.7- 10
DLME	tt-MA	0.12-2	0.037	83.4- 94.8	<6
D-µSPE	HA	5-200	0.02	> 97	0.4-4.6
Ultrasonic	HA	0.005-4	0.001	96-103.3	3.2-7.1
LLE	MHA	100-500	15	> 93.1	4.3- 6.9
MOF-MEPS	MHA	1-1500	0.005	> 96	3.5-11.1

3.5. Real sample analysis

Five real urine samples were procured from male gas station workers in Hamadan (western Iran) for testing with the developed method under optimized conditions. Each sample was analyzed in triplicate, and the relative standard deviations (RSDs) were calculated for each. The RSD values, falling within an accepted range, varied between 4.8-9.7 % for tt-MA, 4.1-7.9 % for MA, 3.9-8.2 % for HA, and 4.7-11 % for m-MHA.

4. CONCLUSIONS

The procedure's many advantages are evidenced by the experimental results, such

as clean extraction, the capability to extract all analytes using a single adsorbent, limited elution volume requirements, rapid preparation of the adsorbent for subsequent extractions, high extraction recoveries, notably low LODs, excellent repeatability and reproducibility, and shorter extraction time. Given its performance, this procedure can be deemed a highly efficient method for extracting and determining VOC biomarkers in urine samples, providing an alternative to previously established methods using HPLC-UV. The implementation of this procedure is crucial for the management of high-heat-stress environments.

جاذب جدید چارچوب آلی کووالانسی مغناطیسی با پیوند ایمین (TFPA-Bd@Fe₃O₄) برای میکرواستخراج بیومارکرهای BTEX از نمونه‌های ادرار

نعمت اله کرد^۱، عبدالرحمن بهرامی^{۲*}، عباس افخمی^۳، فرشید قربانی شهنا^۴، محمدجواد عصار^۱، مریم فرهادیان^۴

^۱گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای و ایمنی کار، دانشکده علوم پزشکی بهبهان، بهبهان، ایران
^۲گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای و ایمنی کار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
^۳گروه شیمی تجزیه، دانشکده شیمی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران
^۴گروه آمار زیستی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۱

مکیده

مقدمه: بنزن، تولوئن، اتیل بنزن و زایلین (BTEX) دسته‌ای از هیدروکربن‌های آروماتیک تک حلقه‌ای هستند که به دلیل ویژگی‌های خطرناک آنها به عنوان ترکیبات فرار سمی طبقه‌بندی می‌شوند. ترانس، ترانس-موکونیک اسید (tt-MA)، ماندلیک اسید (MA)، هیپوریک اسید (HA)، و متیل هیپوریک اسید (MHA) به ترتیب می‌توانند به عنوان شاخص‌های بیولوژیکی قابل اعتماد در ارزیابی مواجهه شغلی با BTEX استفاده شوند.

روش کار: در مطالعه حاضر، یک چارچوب آلی کووالانسی مغناطیسی با پیوند ایمین (Fe₃O₄@TFPA-Bd)، برای اولین بار سنتز گردید و به عنوان جاذب جدید در روش میکرواستخراج با جاذب انباشته (MEPS) استفاده شد. از بنزیدین (Bd) و تریس (۴-فرمیل فنیل) آمین (TFPA) به عنوان بلوک‌های ساختاری اصلی همراه با نانوذرات Fe₃O₄ به عنوان هسته مغناطیسی برای سنتز جاذب استفاده گردید. جاذب سنتز شده جهت استخراج میکرونی هیپوریک اسید، مندلیک اسید، ترانس، ترانس-موکونیک اسید و ۳-متیل اسید هیپوریک (m-MHA) از نمونه‌های ادرار و سپس تجزیه توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد استفاده قرار گرفت. برخی از پارامترهای موثر بر عملکرد استخراج همچون: حجم نمونه، حجم حلال استخراج کننده، تعداد سیکل‌های استخراج، pH و دمای محلول نمونه، بهینه‌سازی شدند. جاذب سنتز شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی و عبوری (SEM و TEM)، طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) و پراش اشعه ایکس (XRD) بررسی کیفی شد.

یافته‌ها: روش توسعه یافته دارای حد آشکارسازی پایین (برای مثال ۰/۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای tt-MA، S/N=۳)، حد تشخیص خوب (۰/۰۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای tt-MA، S/N=۱۰)، حدود دینامیکی خطی (۰/۵-۳۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای MA، MA، و دقت درون-روز و بین-روز قابل قبول (به ترتیب ۲/۴-۴/۳ و ۳/۱-۷/۸) بوده که در محدوده مناسب برای تعیین شاخص‌های بیولوژیکی موردنظر می‌باشد. بازیافت نمونه‌های اسپایک شده در محدوده ۸۱-۸۷٪ تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: این روش جدید برای تعیین بیومارکرهای BTEX از نمونه‌های ادرار قابل کاربرد و پیشنهاد می‌گردد و می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های متداول آماده‌سازی باشد.

کلمات کلیدی: بیومارکرهای BTEX، میکرواستخراج با جاذب انباشته شده، چارچوب آلی کووالانسی، HPLC-UV، نمونه‌های ادرار

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول مکاتبه: Bahrami@umsha.ac.ir

مقدمه

تولوئن، بنزن، اتیل بنزن و ایزومرهای زایلین (BTEX) از هیدروکربن‌های آروماتیک تک حلقه‌ای هستند که به دلیل ویژگی‌های متنوع و خطرناک، جزء ترکیبات فرار سمی طبقه‌بندی می‌شوند (۱). آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (IARC)، اتیل بنزن را به عنوان سرطان‌زای احتمالی انسانی (گروه 2B) و بنزن را به عنوان سرطان‌زای قطعی انسانی (گروه ۱) طبقه‌بندی کرده است (۲). آژانس حفاظت از محیط زیست آمریکا (EPA)، BTEX را به عنوان آلاینده‌های دارای اولویت معرفی نموده است (۳). این ترکیبات دارای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد و بسیار فرار هستند که مواجهه افراد با آنها را افزایش می‌دهد (۴). طبق مطالعات صورت گرفته مواجهه طولانی مدت با BTEX موجب لوسمی حاد میلوئیدی، اثرات خونی، نقص سیستم تولید مثلی، اختلالات قاعدگی، تحریک گلو و بینی، تشدید آسم، آسیب به سیستم ایمنی، سرطان مثانه، نقص عصبی شناختی، و کاهش اندازه تخمدان‌ها می‌شود (۵-۸).

ترانس، ترانس-موکونیک اسید (tt-MA)، ماندلیک اسید (MA)، هیپوریک اسید (HA)، و متیل هیپوریک اسید (MHA) به ترتیب می‌توانند به عنوان شاخص‌های بیولوژیکی قابل اعتماد در مواجهه شغلی و محیطی با بنزن، اتیل بنزن، تولوئن، و زایلین استفاده شوند (۹-۱۱). این شاخص‌ها پس از مواجهه افراد با BTEX در مسیرهای متابولیکی ایجاد شده و در نهایت از طریق مایعات بیولوژیکی مانند ادرار و خون از بدن دفع می‌شوند (۱۲). متابولیت‌های ادراری BTEX به طور گسترده‌ای برای ارزیابی مواجهه شغلی کارگران در مکان‌های مختلف صنعتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۱۳).

فرآیند استخراج گام مهمی برای تعیین شاخص‌های زیستی BTEX در ماتریس‌های مختلف بیولوژیکی است. برخی از روش‌ها در مقالات برای رسیدن به این هدف گزارش شده که عبارتند از: میکرواستخراج فاز مایع (LPME) (۱۴)، میکرواستخراج مایع-مایع پخشی (DLLME) (۱۰)، میکرواستخراج فاز جامد پخشی

(D- μ SPE) (۱۵) و میکرواستخراج با جاذب انباشته شده (MEPS) (۱۶، ۱۷). میکرواستخراج با جاذب انباشته شده یک روش جدید برای کوچک سازی استخراج فاز جامد (SPE) است و ثابت شده که روشی حساس، ساده، سریع و بدون حلال است (۱۸، ۱۹). میکرواستخراج با جاذب انباشته با موفقیت برای استخراج آنالیت‌های مختلف در ماتریس‌های آبی و بیولوژیکی استفاده شده است. روش MEPS نسبت به سایر تکنیک‌های معمول آماده سازی نمونه سریع تر است زیرا مراحل استخراج نمونه‌ها در این روش کوتاهتر و ترکیبات هدف در حجم کمی از حلال پاکسازی استخراج می‌شوند (۲۰، ۲۱). این روش همچنین دارای برخی معایب است از جمله اینکه استفاده مکرر از جاذب‌های معمول MEPS مطلوب نیست و جاذب پس از چندین سیکل استخراج باید تعویض شود (۲۲). از اینرو، جستجوی جاذب‌های جدید و ایجاد جاذب‌های قابل استفاده مجدد برای کاربرد در MEPS یک حوزه تحقیقاتی جدید در علم آماده‌سازی نمونه است (۲۳).

چارچوب‌های آلی کووالانسی (COFs)، دسته جدیدی از مواد متخلخل کریستالی هستند که از خودآرایی عناصر سبک مانند کربن، بور، اکسیژن و غیره تشکیل شده و از طریق پیوندهای کووالانسی قوی به هم متصل می‌شوند (۲۴-۲۶). این مواد با ویژگی‌های برجسته‌ای از جمله گزینش پذیری خوب، چگالی کم، پایداری ساختاری بالا، مساحت سطح زیاد و اندازه منافذ قابل تنظیم (۲۷)، برای طیف وسیعی از کاربردها، مانند ذخیره سازی گاز (۲۸)، کاتالیست (۲۹) و به عنوان حامل برای رساندن دارو به نقاط هدف (۳۰) مورد بررسی قرار گرفته‌اند. همچنین COFs به عنوان جاذب پتانسیل بالایی جهت آماده سازی نمونه در میکرواستخراج فاز جامد (SPME) (۳۱)، استخراج فاز جامد (SPE) (۳۲) و استخراج فاز جامد مغناطیسی (M-SPE) (۳۳) از خود نشان داده‌اند. با این حال، تا به امروز، استفاده از COFs به عنوان جاذب در روش MEPS برای استخراج شاخص‌های زیستی BTEX تنها در مقاله منتشر شده توسط محققان این پژوهش گزارش شده است (۱۷).

تجهیزات

طیف‌سنجی با استفاده از دستگاه طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) ساخت شرکت پرکین المر (ایالات متحده آمریکا) انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی- نشر میدانی (FE-SEM) ساخت شرکت TESCAN (جمهوری چک) برای مشخص کردن مورفولوژی نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TFPA-Bd}$ استفاده شد. همچنین، تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) با استفاده از سیستم H-800 ساخت شرکت هیتاچی (ژاپن) ثبت شد. آزمایش پراش اشعه ایکس (XRD) با استفاده از پراش سنج مدل Ultima IV محصول شرکت Rigaku کشور ژاپن انجام شد. دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (مدل 1260 Infinity، کشور آلمان)، مجهز به آشکارساز، UV-Vis پمپ، Binary Infinity II 1260، گاز زدا مدل G7122-A و سمپل لوپ ۱۰۰ میکرولیتری شرکت شیمادزو ژاپن برای آنالیز نمونه‌ها استفاده شد. آنالیت‌ها با استفاده از یک ستون فاز معکوس (C_{18})، با اندازه ذرات ۳/۵ میکرومتر، و قطر داخلی ۱۰۰×۴/۶ میلی‌متر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد جدا شدند. از فاز متحرک آب/ استونیتریل/ استیک اسید (۸۴:۱۶:۰/۰۲۵ V/V/V) با سرعت جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه برای استخراج HA و m-MHA استفاده شد. همچنین مخلوطی از آب/ متانول/ استیک اسید (۶۹:۳۰:۱ V/V/V) با سرعت جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان فاز متحرک ایزوکراتیک برای استخراج MA و tt-MA تهیه شد. طول موج آشکارساز برای جداسازی HA و m-MHA روی ۲۵۴ نانومتر تنظیم شده و حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر استفاده شد. با این حال، طول موج ۲۵۹ نانومتر برای جداسازی MA و tt-MA در نظر گرفته شد. یک سرنگ دستی ۵۰۰ میکرولیتری با نیدل قابل تعویض ساخت شرکت همیلتون (نوادا، ایالات متحده آمریکا) بعنوان سرنگ MEPS استفاده شد. آب دیونیزه نیز از طریق دستگاه تصفیه کننده محصول شرکت TKA کشور آلمان فراهم شد.

در مطالعه حاضر، یک روش سریع و آسان برای سنتز جاذب $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TFPA-Bd}$ با استفاده از نانوذرات Fe_3O_4 به عنوان هسته مغناطیسی و ترکیبات بنزیدین (Bd) و تریس-۴ فرمیل فنیل آمین (TFPA) بعنوان بلوک‌های ساختاری جهت تشکیل پوسته COF در حضور دی‌متیل سولفوکسید (DMSO)، نشان داده شده است. جاذب سنتز شده با تکنیک‌های FTIR، SEM، TEM و XRD بررسی کیفی شد. سپس، عملکرد استخراج جاذب مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت پارامترهای MEPS برای آنالیت‌های هدف با دقت مطالعه شد. در این مطالعه، با استفاده از مزایای نانوذرات $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TFPA-Bd}$ بعنوان یک جاذب مغناطیسی، روشی سریع، ساده و حساس مبتنی بر HPLC-UV توسعه داده شد و برای تجزیه و تحلیل شاخص‌های زیستی BTEX در نمونه‌های ادرار کارگران شاغل در جایگاه‌های سوخت شهر همدان بکار گرفته شد. در نهایت، روش توسعه داده شده با سایر روش‌های قبلی مبتنی بر HPLC جهت تعیین بیومارکرهای ادراری BTEX مقایسه شد.

روش کار

مواد شیمیایی

مواد شیمیایی موردنیاز شامل تری سدیم سیترات بدون آب ($\text{Na}_3\text{Cit}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)، کلرید آهن (III) هگزا هیدرات ($\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$)، تریس-۴ (فرمیل فنیل) آمین (TFPA) و بنزیدین (Bd) ساخت شرکت سیگما آلدریج (لوئیس، ایالات متحده آمریکا) خریداری شدند. ماندلیک اسید (MA)، ترانس، ترانس- موکونیک اسید (tt-MA)، هیپوریک اسید (HA) و ۳-متیل هیپوریک اسید (m-MHA) ساخت شرکت مرک (شوچارد، آلمان) تهیه شدند. همچنین، حلال‌های اتانول، متانول، استون، استیک اسید گلاسیال، استونیتریل، تتراهیدروفوران، استات سدیم، هیدروکلریک اسید، دی‌متیل سولفوکسید (DMSO)، و اتیلن گلیکول (EG)، ساخت شرکت مرک (دارمشتات، آلمان) فراهم شدند.

تهیه نانوذرات Fe_3O_4

نانوذرات اکسید آهن مطابق با روش استفاده شده در مطالعه چن^۱ و همکاران تهیه شدند (۳۳). ابتدا، ۶ گرم سدیم استات، ۳/۴ گرم کلرید آهن (III) هگزا هیدرات و ۱ گرم تری سدیم سیترات بدون آب از طریق هم زدن مکانیکی در ۱۰۰ میلی لیتر اتیلن گلیکول در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد حل شدند. سپس همگن به دست آمده به اتوکلاو تفلونی منتقل شد و به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۲۰۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. رسوبات بدست آمده از طریق آهنربا جمع آوری شده و با آب دیونیزه و اتانول خالص ۳ بار شستشو داده شده و سپس در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد خشک شدند.

سنتر نانوذرات $Fe_3O_4@TFPA-Bd$

نانوذرات $Fe_3O_4@TFPA-Bd$ از طریق پوشش پوسته‌های COF روی نانوذرات Fe_3O_4 به کمک پلیمریزاسیون رسوبی (قالب- کنترل) تریس (۴- فرمیل فنیل) آمین (TFPA) و بنزیدین (Bd) سنتر شدند. ابتدا ۷۵ میلی گرم از Fe_3O_4 ، ۴۱/۵ میلی گرم از Bd و ۲۴/۳ میلی گرم از TFPA به ۵۰ میلی لیتر DMSO تحت سونیکیشن اضافه شدند و تا زمان تشکیل محلول یکنواخت حفظ شدند. سپس، ۲ میلی لیتر استیک اسید به محلول فوق تحت اولتراسوند اضافه شد و برای چند دقیقه نگهداری شد. در مرحله بعد، محلول زرد رنگ بدست آمده به اتوکلاو تفلونی منتقل و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد. در نهایت رسوبات بدست آمده که همان نانوذرات سنتر شده هستند توسط آهنربا جمع آوری و با متانول و تتراهیدروفوران (سه بار) شستشو داده شده و سپس در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد خشک شدند. استفاده از نانوذرات Fe_3O_4 حاوی گروه‌های عاملی کربوکسیل به صورت هسته-پوسته می تواند به پایداری جاذب COF در برابر رطوبت کمک کرده و منجر افزایش سطح آن شود. تهیه محلول‌های استاندارد و کاربردی

محلول‌های استوک با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر از طریق وزن کردن دقیق مقدار مورد نیاز از هر آنالیت و حل کردن آن در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه تهیه شدند. همچنین، محلول‌های کالیبراسیون با رقیق کردن متوالی محلول‌های استوک در محدوده خطی ۰/۵ تا ۳۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای MA، ۰/۰۶ تا ۶/۴ میکروگرم بر میلی لیتر برای tt-MA و ۰/۱ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر برای HA و m-MHA تهیه شدند. نمونه‌های کنترل کیفی^۲ (QCs) در غلظت‌های کم، متوسط و زیاد طی فرایند آزمایشگاهی ساخته شدند. علاوه بر این، نمونه‌های واقعی از ۵ کارگر سالم بالغ که در پمپ بنزین‌های شهر همدان در معرض ترکیبات BTEX قرار داشتند، جمع‌آوری شده و تا زمان آنالیز در لوله‌های پلی پروپیلن در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در زمان استخراج، نمونه‌های جمع‌آوری شده به دمای اتاق منتقل شدند و مقدار مشخصی از هر نمونه (۱ میلی لیتر) با سانتریفیوژ همگن شد و سپس نمونه همگن شده با آب دیونیزه به نسبت ۱:۲ رقیق و جهت ادامه آنالیز مورد استفاده قرار گرفت. کارگران در جریان مطالعه قرار گرفتند و رضایتمانه کتبی از آنها اخذ شد. در زمان آنالیز، نمونه‌ها به دمای اتاق رسیده و سانتریفیوژ شدند. در نهایت، آنالیت‌های هدف با استفاده از روش COF-MEPS استخراج شده و از طریق دستگاه HPLC-UV آنالیز شدند (سه بار تکرار برای هر نمونه).

انباشته کردن جاذب در سرنگ MEPS

سرنگ MEPS دارای این مزیت است که می توان نیدل را از سیلندر شیشه ای جدا کرد، و بنابراین امکان انباشته کردن جاذب جامد در داخل سرنگ فراهم می شود. برای این کار، ابتدا دو قطعه فیلتر از جنس پلی تترا فلئورواتیلن (PTFE) با ابعادی برابر با قطر داخلی سیلندر سرنگ ایجاد شد. سپس یکی از قطعات آماده

2. Quality control samples (QCs)

1. Chen

واندروالسی و پیوندهای $\pi-\pi$ جذب شدند. هرگونه تداخل همراه آنالیت ها با عبور دادن محلول مناسب از فاز جامد شسته شد. در نهایت با عبور محلول پاکسازی مناسب، آنالیت های جذب شده روی سطح جاذب جداسازی شده و به دستگاه HPLC-UV تزریق شدند. تصویر شماتیک مکانیسم فوق در ۱ نشان داده شده است.

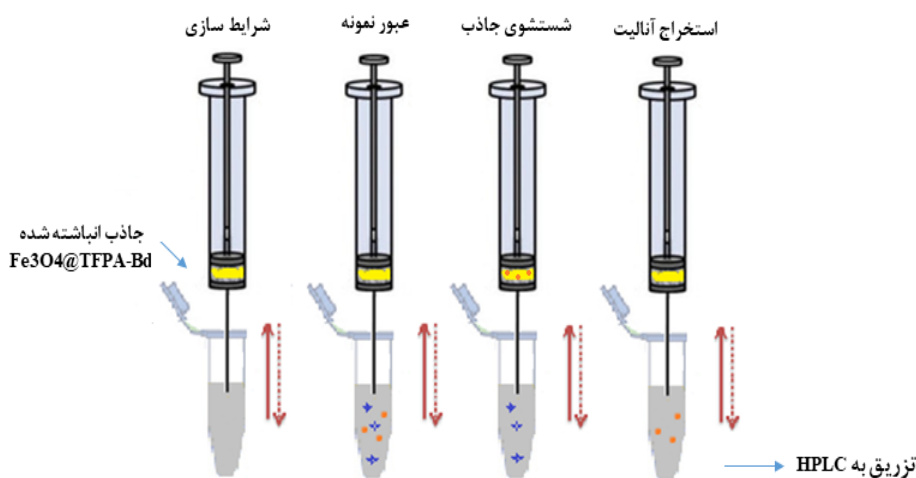
توسعه روش COF-MEPS

در مطالعه حاضر، ابتدا جاذب جامد با حلال متانول (3×100 میکرولیتر) فعال سازی و سپس با آب دیونیزه (3×100 میکرولیتر) شرایط سازی شد. در گام بعد، تاثیر حلال های مختلف شستشو و پاکسازی بر راندمان استخراج جاذب مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که برای حذف تداخل های همراه آنالیت ها باید از حلال شستشوی مناسب استفاده شود، مخلوطی از حلال های مختلف شامل آب دیونیزه- متانول ($20:80$ V/V)، آب دیونیزه- استونیتریل ($20:80$ V/V)، آب دیونیزه- پروپانول ($10:90$ V/V) به عنوان حلال شستشو مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که خواص فیزیکی و شیمیایی حلال های مورد استفاده جهت پاکسازی به طور قابل توجهی بر جداسازی آنالیت ها از ماتریس های بیولوژیکی تأثیر می گذارد. از اینرو، عملکرد

شده به داخل سیلندر منتقل و توسط پیستون سرنگ در انتهای سیلندر قرار گرفت. در گام بعدی، 50 میلی گرم از جاذب $Fe_3O_4@TFPA-Bd$ به داخل سیلندر منتقل شده و قطعه دیگر در داخل سیلندر جاگذاری شد و توسط پیستون سرنگ تا جایی حرکت داده شد که جاذب جامد در حد فاصل دو قطعه داخل سیلندر قرار گیرد. لازم به ذکر است که از فشرده کردن بیش از حد جاذب بین دو قطعه فیلتر باید جلوگیری شود، زیرا این امر، مانع از عبور نمونه و حلال از بستر جاذب می شود.

مکانیسم جذب در روش COF-MEPS

در پژوهش حاضر به منظور توسعه یک روش آماده سازی نوین و انتخاب جاذب مناسب، خواص آنالیت، نمونه و جاذب (جاذب قطبی، نمونه قطبی و آنالیت قطبی) مورد بررسی قرار گرفت. برای استفاده از جاذب جامد ابتدا جاذب با یک حلال مناسب فعال سازی شد تا زنجیره های آلکیل آن توسط مولکول های حلال از حالت درهم تنیده باز شوند. سپس بستر جاذب در معرض محلولی مشابه محلول نمونه قرار گرفت. به این ترتیب امکان تماس بین آنالیت ها و سطح جاذب در مراحل بعدی فراهم شد. با عبور محلول نمونه از فاز جامد، آنالیت ها بر روی سطح جامد توسط فعل و انفعالات آبریز قوی شامل برهمکنش های



شکل ۱: شماتیک روش COF-MEPS

(۱) صحت (%) = میزان بازیافت (%) - ۱۰۰

اثر انتقالی (Carry-over)

اثر انتقالی یا اثر حافظه (مقدار آنالیت باقی مانده روی بستر جاذب پس از هر بار تزریق توسط سرنگ (MEPS) با آنالیز یک نمونه ادرار شاهد پس از تزریق بالاترین استاندارد (۶/۴ میکروگرم بر میلی لیتر برای tt-MA، ۳۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای MA، و ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر برای HA و m-MHA) مورد بررسی قرار گرفت. سیکل های استخراج ۱، ۲، ۳، ۱۰۰×۱، ۱۰۰×۲، ۱۰۰×۳، و ۱۰۰×۴ میکرولیتر از محلول پاکسازی برای هر آنالیت و سپس محلول استون به صورت مکش - تخلیه برای به حداقل رساندن اثر انتقالی استفاده شد.

حد آشکارسازی^۲ (LOD)، حد تشخیص کمی^۳ (LOQ) و راندمان استخراج

حد آشکارسازی و حد تشخیص کمی براساس نسبت سیگنال به نویز ۳:۱ و ۱۰:۱ مورد محاسبه قرار گرفتند. راندمان استخراج (میزان بازیافت) با آزمایش سیکل های استخراج متعدد بروی یک نمونه ادرار اسپایک شده در سه سطح غلظت (کم، متوسط، و زیاد) و از طریق معادله ۲ محاسبه شد.

(۲) راندمان استخراج (%) = سطح زیر پیک نمونه اسپایک شده / سطح زیر پیک نمونه استاندارد × ۱۰۰

یافته ها

خصوصیات جاذب $Fe_3O_4@TFPA-Bd$

طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)، به منظور تایید سنتز موفق جاذب استفاده شد (۲ الف). ظهور یک نوار جذبی قوی در ۵۶۵ بر سانتی متر cm^{-1} نشان دهنده وجود پیوندهای Fe-O-Fe است و پیک های جذبی قوی در حدود ۱۴۱۲، ۱۶۱۸، و ۳۳۸۴ بر سانتی متر نشان دهنده وجود گروه های کربوکسیل در

استخراج چندین حلال شامل استونیتریل - استیک اسید (۲۰:۸۰ V/V)، متانول - استیک اسید (۲۰:۸۰ V/V) اتانول - استیک اسید (۲۰:۸۰ V/V)، آب دیونیزه - استیک اسید (۵۰:۵۰ V/V)، و آب دیونیزه - هیدروکلریدریک اسید (۵۰:۵۰ V/V) مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است که حجم حلال مورد نیاز جهت پاکسازی و استخراج آنالیت ها از جاذب جامد باید تا حد امکان کوچک باشد. بنابراین، عملکرد استخراج ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر از هر کدام از حلال ها جهت پاکسازی مورد مطالعه قرار گرفت. در ادامه، حجم های نمونه ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میکرولیتر و سیکل های استخراج ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ بار با سرعت عبور نمونه و حلال 10 ± 2 میکرولیتر بر ثانیه به مکش - تخلیه ارزیابی شد. تأثیر pH و دمای محلول نمونه بر درصد بازیابی آنالیت ها در محدوده pH ۲ تا ۱۰ و دمای ۱۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد با فواصل ۱۰ درجه بررسی شد. از محلول های NaOH و استیک اسید برای تنظیم pH در مقادیر دلخواه استفاده شد.

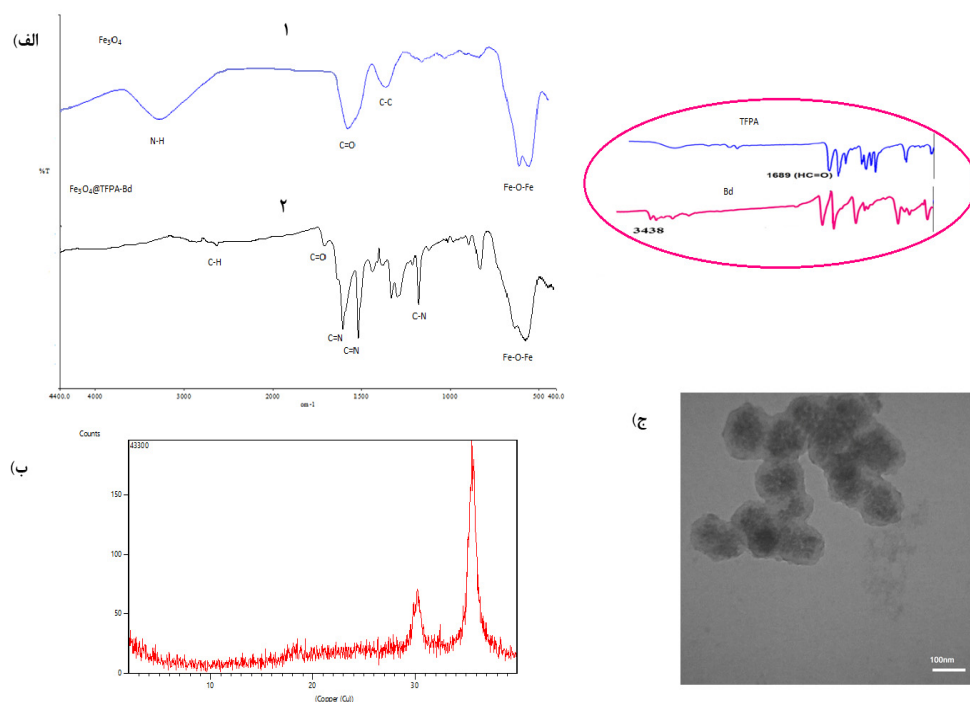
اعتبار سنجی روش COF-MEPS

کالیبراسیون، دقت و صحت

منحنی های کالیبراسیون در پنج غلظت استاندارد و در محدوده ۰/۰۵ تا ۶/۴ میکروگرم بر میلی لیتر برای tt-MA، ۱ تا ۳۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای MA و ۰/۱ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر برای HA و m-MHA از نمونه های ادرار اسپایک شده ترسیم شدند. پاسخ های سطح زیر پیک در برابر غلظت های استاندارد آنالیت ها اندازه گیری شدند. مقادیر ضریب همبستگی (r^2) برای همه آنالیت ها به دست آمد. دقت درون - روز و بین - روز آنالیزها در سه غلظت از نمونه های کنترل کیفی (کم، متوسط و زیاد) با پنج بار تکرار در یک روز و در سه روز متوالی بصورت انحراف معیار نسبی^۱ (RSD) محاسبه شد. صحت نتایج نیز با استفاده از معادله ۱ اندازه گیری شد.

1. Relative standard deviation

2. Limit of detection
3. Limit of quantification



شکل ۲: الف (۱) طیف FTIR نانوذرات Fe_3O_4 ، الف (۲) طیف FTIR نانوذرات COF، ب) الگوی XRD نانوذرات COF، و ج) تصویر TEM نانوذرات COF

۱ تا ۴۰ درجه انجام شد. همانطور که در ۲ ب نشان داده شده است، دو پیک جذبی مشخص از جاذب در نمونه در ۳۰ و ۳۵ درجه مشاهده می شود که تأیید می کند جاذب سنتز شده کریستالی بوده و تبلور خوبی دارد (۳۳). علاوه بر این، مورفولوژی نانوذرات سنتز شده از طریق دریافت تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری مشخص شد (۲ ج). مشاهدات TEM ساختار متمایز هسته-پوسته نانوذرات $Fe_3O_4@TFPA-Bd$ با هسته‌ای تیره از نانوذرات Fe_3O_4 و یک لایه خاکستری COF را نشان می دهد.

توسعه روش COF-MEPS

عوامل موثر بر عملکرد استخراج روش توسعه داده شده مورد ارزیابی قرار گرفت. فاکتورهای موثر در هنگام استفاده از ۵۰ میلی گرم جاذب $Fe_3O_4@TFPA-Bd$ به منظور استخراج و تعیین مقدار MA، HA، m-MHA و tt-MA از نمونه‌های ادرار اسپایک شده با بالاترین غلظت و هرکدام با ۳ بار تکرار آنالیز بررسی شدند.

سطح Fe_3O_4 است (منحنی ۱). علاوه بر این، در مقایسه با اسپکتروم $Fe_3O_4@TFPA-Bd$ ، طیف Fe_3O_4 جذبی مشخصه جدیدی از ارتعاشات C=N در ۱۵۹۸ بر سانتی متر و ارتعاشات C=N در ۱۶۲۱ بر سانتی متر را نشان می دهد که با پیوند ایمین و پیوند شیف C با N متناظر است. همچنین، پیک ارتعاشی در ۱۱۶۸ بر سانتی متر، با پیوند چهار ضلعی C-N متناظر است. ارتعاشات کششی C=N در ۱۶۲۱ بر سانتی متر، تشکیل پوسته COF روی سطح نانوذرات Fe_3O_4 را تأیید می کند (منحنی ۲). علاوه بر این، تضعیف بیش از حد ارتعاشات C=O در ۱۶۸۹ بر سانتی متر از طیف TFPA و ناپدید شدن ارتعاشات N-H در ۳۴۳۸ بر سانتی متر از طیف Bd در منحنی ۲ مشاهده می شود که بیانگر واکنش کامل تریس (-۴ فرمیل فنیل) آمین و بنزدین جهت گیری پوسته COF است (۳۳، ۳۴). ساختار کریستالی جاذب از طریق الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) ارزیابی شد. ارزیابی در 2θ و در محدوده

مقدار جاذب

اثر مقدار جاذب بر بازیابی آنالیت های هدف در محدوده ۱۰ تا ۵۰ میلی گرم ارزیابی شد. بیشترین بازیابی زمانی حاصل شد که مقدار جاذب تا ۵۰ میلی گرم افزایش یافت. نتیجه به دست آمده به سبب افزایش ناحیه سطحی فعال است که منجر به ایجاد مکان های موجود بیشتر برای آنالیت های هدف محصور شده می شود. راندمان استخراج پایین تر در بالاتر از نقطه بهینه به دلیل پاکسازی ضعیف آنالیت های جذب شده توسط حجم مشخصی از محلول شستشو در مقادیر جاذب بالاتر از ۵۰ میلی گرم است.

حلال شستشو

همانطور که قبلا اشاره شد، جاذب سنتز شده با ۱۰۰ میکرولیتر حلال متانول فعال شد و سپس با ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه (سه بار مکش- تخلیه) شرایط سازی شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از حلال های مختلف شامل آب دیونیزه، آب دیونیزه- متانول (۲۰: ۸۰ V/V)، آب دیونیزه- استونیتریل (۲۰: ۸۰ V/V) و آب دیونیزه- استیک اسید (۱۰: ۹۰ V/V) به عنوان حلال شستشو مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از حلال آب دیونیزه، هم راندمان استخراج بالاتر و هم پیک های جذبی با تداخل کمتر نسبت به سایر حلال ها به دست آمد و بنابراین از آب دیونیزه به عنوان حلال بهینه جهت شستشوی بستر جاذب در ادامه کار استفاده شد (۱).

حلال پاکسازی (استخراج)

حلال های مختلف شامل متانول- استیک اسید (۲۰: ۸۰ V/V)، اتانول- استیک اسید (۲۰: ۸۰ V/V)، استونیتریل- استیک اسید (۲۰: ۸۰ V/V)، آب دیونیزه- هیدروکلریدریک اسید (۵۰: ۵۰ V/V)، آب دیونیزه- استیک اسید (۵۰: ۵۰ V/V) در حجم های مختلف (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرولیتر) به عنوان حلال های پاکسازی ارزیابی شدند (۱). هنگامی که مخلوط متانول- استیک اسید (۲۰: ۸۰ V/V) به عنوان حلال استخراج استفاده شد، بازیابی استخراج برای آنالیت های هدف بین ۷۵/۸۶٪ و ۷۸/۲۱٪ بود که بیانگر حداکثر میزان بازیابی در میان حلال های مورد آزمایش می باشد. همچنین، با افزایش حجم حلال استخراج کننده از ۱۰ به ۵۰ میکرولیتر، راندمان استخراج آنالیت های هدف افزایش یافت.

حجم نمونه و تعداد سیکل استخراج

اثرات حجم نمونه بر میزان بازیافت آنالیت ها در محدوده ۳۰ تا ۱۵۰ میکرولیتر مورد بررسی قرار گرفت (۳ الف). نتایج نشان داد که افزایش حجم نمونه باعث افزایش راندمان استخراج MA، HA، MA، tt-MA و m-MHA از نمونه های ادرار می شود. با اینحال، همانطور که در ۳ ب نشان داده شده است زمانی که تعداد سیکل های استخراج از ۸ به ۱۰ بار افزایش می یابد، تفاوت قابل توجهی در میزان بازیافت آنالیت ها مشاهده نمی شود. از اینرو، تعداد

جدول ۱: عوامل مؤثر بر راندمان استخراج روش COF-MEPS. نوع حلال شستشو^۱، نوع حلال پاکسازی^۲ (حجم نمونه=۱۵۰ میکرولیتر، حجم حلال پاکسازی= ۵۰ میکرولیتر، تعداد سیکل استخراج= ۱۰ بار، pH=۶، دما= ۳۰ درجه سانتی گراد).

حلال پاکسازی ^۲					حلال شستشو ^۱					نوع حلال آنالیت ها
DW-HA	DW-AA	A-AA	M-AA	E-AA	DW-AA	DW-A	DW-P	DW-M	DW	
۴۷/۵۵	۵۵/۱۹	۶۱/۱۶	۷۶/۱۵°	۷۳/۹۱	۵۱/۹۹	۵۹/۸۴	۶۱/۳۰	۶۹/۸۱	۷۳/۹۵°	tt-MA
۴۸/۱۹	۵۴/۲۰	۶۰/۱۸	۷۷/۳۰°	۷۵/۱۴	۵۷/۵۰	۶۳/۸۰	۶۰/۸۳	۶۷/۶۱	۷۱/۳۰°	MA
۵۴/۲۳	۶۱/۴۱	۶۸/۰۰	۷۵/۸۶°	۷۱/۸۰	۶۱/۶۵	۶۰/۲۳	۵۵/۵۸	۷۰/۴۴	۷۲/۸۰°	HA
۵۳/۷۶	۶۷/۴۲	۸۰/۵۷	۷۸/۲۱°	۷۸/۰۰	۶۰/۶۲	۶۰/۱۰	۶۳/۰۰	۶۹/۳۶	۷۴/۱۱°	m-MHA

^۱ بیشترین استخراج: DW= آب دیونیزه، DW-M= آب دیونیزه- متانول، DW-P= آب دیونیزه- پروپانول، DW-A= آب دیونیزه- استونیتریل، DW-AA= آب دیونیزه- استیک اسید، E-AA= اتانول- استیک اسید، M-AA= متانول- استیک اسید، A-AA= استونیتریل- استیک اسید، DW-HA= آب دیونیزه- هیدروکلریدریک اسید

سیکل استخراج ۸ بار و حجم نمونه ۱۵۰ میکرولیتر بعنوان شرایط بهینه استخراج انتخاب شدند و در بهینه سازی سایر پارامترها مورد استفاده قرار گرفتند.

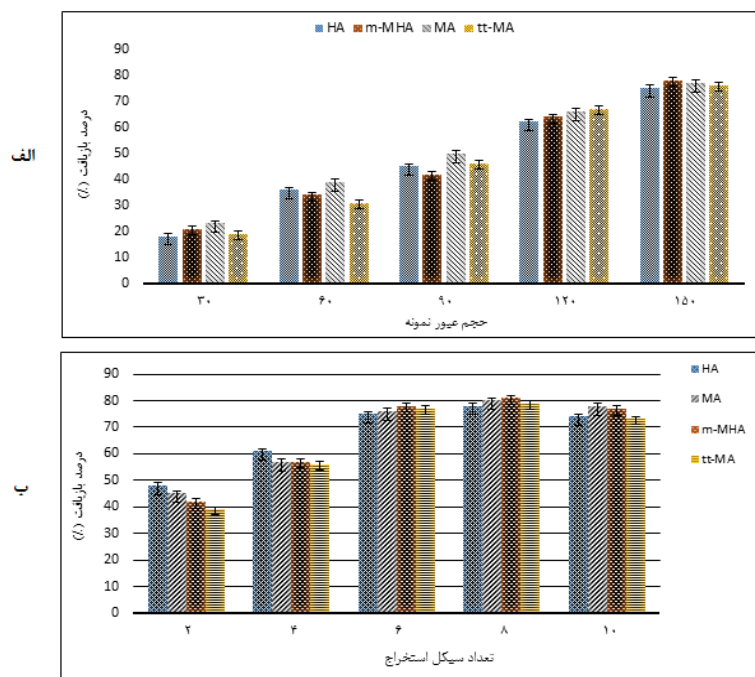
اسید در نمونه های ادرار مشخص شد.

اعتبارسنجی روش COF-MEPS

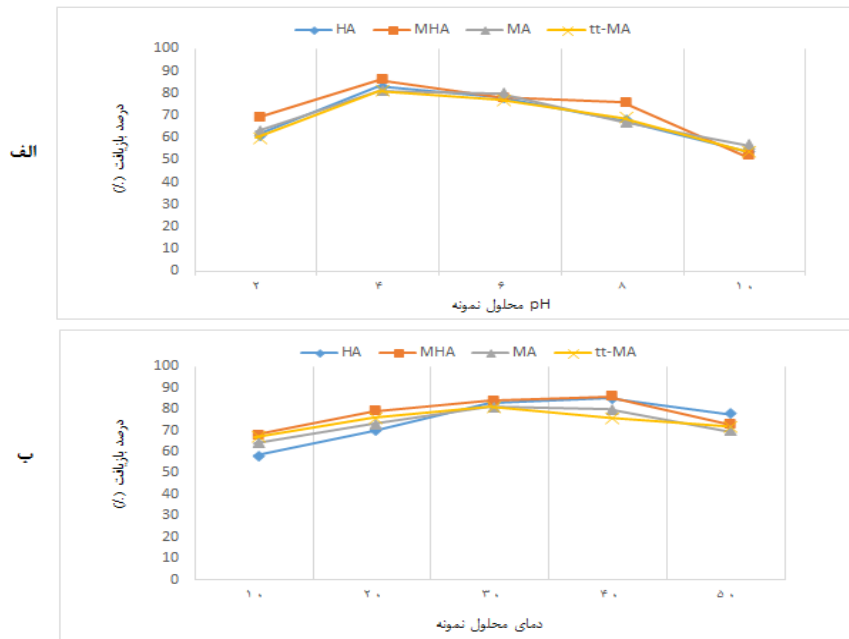
نتایج اعتبارسنجی پارامترهای روش توسعه یافته در ۲ خلاصه شده اند. تحت شرایط بهینه، یک رابطه خطی بین نسبت غلظت آنالیتها و سطح زیر پیک آن ها در محدوده غلظت ۰/۰۶ تا ۶/۴ میکروگرم بر میلی لیتر برای tt-MA، ۰/۵ تا ۳۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای MA، و ۰/۱ تا ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر برای HA و m-MHA مشاهده شد. مقادیر ضریب همبستگی برای آنالیت های هدف بسیار مطلوب گزارش شد ($r^2 > 0/99$) (۵ بار تکرار). دقت درون-روز و بین-روز نمونه های کنترل کیفی (QCs) به ترتیب در محدوده ۲/۴-۳/۴٪ و ۳/۱-۷/۸٪ متغیر و در بازه قابل قبول بدست آمد. همچنین، صحت نتایج بدست آمده برای نمونه های QCs بین ۱۲/۵ تا ۱۹ درصد مشخص شد.

دما و pH محلول نمونه

اثر pH محلول نمونه در مقادیر ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ برای آنالیت های هدف مورد مطالعه قرار گرفت. همانطور که در ۴ الف مشاهده می شود در pH = ۴ حداکثر مقدار بازیافت شده بدست آمد. علاوه بر این، پنج مقدار از دما برای محلول نمونه مورد بررسی قرار گرفت: مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ درجه سانتی گراد. نتایج به دست آمده در ۴ ب نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود ماندلیک اسید و ترانس، ترانس-موکونیک اسید افزایش قابل توجهی از میزان بازیافت را در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نشان دادند. با این حال، دمای ۴۰ درجه سانتی گراد بعنوان دمای بهینه برای استخراج هیپوریک اسید و ۳-متیل هیپوریک



شکل ۳: عوامل مؤثر بر راندمان استخراج روش COF-MEPS: الف) اثر حجم نمونه، ب) تعداد سیکل های استخراج (pH = ۶ و دما: ۳۰ درجه سانتی گراد).



شکل ۴: الف) اثر pH، و ب) اثر دما بر میزان استخراج آنالیت های هدف در روش COF-MEPS

جدول ۲: نتایج اعتبارسنجی روش COF-MEPS برای نمونه های ادرار اسپایک شده تحت شرایط بهینه

آنالیت های مورد بررسی				پارامترهای اعتبارسنجی
m-MHA	HA	MA	tt-MA	رنج خطی دینامیکی ^۱ (LDR) (µg/mL)
۲۵ - ۰/۱۶	۲۵ - ۰/۱۶	۳۲۰ - ۰/۵	۶/۴ - ۰/۰۶	دقت درون-روز ^۲ (%RSD)
۴/۱	۲/۴	۳/۷	۴/۳	دقت بین-روز ^۳ (%RSD)
۵/۴	۶/۵	۳/۱	۷/۸	صحت ^۴ (%)
۱۲/۵	۱۶/۲	۱۹/۰	۱۸/۴	حد آشکارسازی (LOD) (µg/mL)
۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۲	حد تشخیص کمی (LOQ) (µg/mL)
۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۰۶	میزان بازیافت (%)
۸۷/۵	۸۳/۸	۸۱/۰	۸۱/۶	

1. Linear dynamic range
2. Intra-day precision
3. Inter-day precision
4. Accuracy

بعدی آماده سازی کرد. در مقایسه با سایر روش های جدید توسعه یافته با MEPS، روش پیشنهادی امکان استخراج آنالیت های هدف تنها با یک جاذب، کروماتوگرام های تمیز با حداقل پیک های تداخلی، حجم کم نمونه عبوری و حجم کم حلال پاکسازی را ارائه می کند. در روش MIP-MEPS، هر جاذب مخصوص یک نوع آنالیت است و با هر جاذب، تنها یک ترکیب قابل استخراج است. در روش MOF-MEPS، شستشوی نهایی آنالیت های هدف از

مقایسه روش توسعه داده شده با سایر روش ها با استفاده از روش COF-MEPS قابلیت استخراج آنالیت های هدف (HA، MA، tt-MA و m-MHA) از نمونه های ادرار تنها با یک جاذب و با حداقل حجم از حلال پاکسازی در مقایسه با سایر روش های قبلی توسعه یافته با HPLC-UV حاصل شد. علاوه بر این، جاذب به کار رفته در مطالعه حاضر قابل استفاده مجدد است (بیش از ۶۰ بار) و به راحتی می توان آن را شستشو و برای استخراج های

جدول ۳: مقایسه روش COF-MEPS با سایر روش های قبلی توسعه یافته با HPLC-UV جهت استخراج و تعیین مقدار بیومارکرهای ادراری BTEX

روش	آنالیت هدف	LDR (µg/mL)	LOD (µg/mL)	EE (%)	RSD (%)
مشتق سازی (۳۵)	MA	۱۶-۱	۱	۸۳/۸ - ۷۸/۱	۱۸/۹ - ۲/۴
MIP- MEPS (۱۱)	MA	۲۰ - ۰/۲	۰/۰۶	> ۸۸/۸	۶/۱ - ۳/۵
SAX-SPE (۳۶)	tt-MA	۱۰ - ۰/۱	۰/۱	۱۰۱ - ۷۲	۱۰ - ۲/۷
DLME (۱۰)	tt-MA	۲ - ۰/۱۲	۰/۰۳۷	۹۴/۸ - ۸۳/۴	< ۶
D-MSPE (۱۵)	HA	۲۰۰ - ۵	۰/۰۲	> ۹۷	۴/۶ - ۰/۴
اولتراسونیک (۳۷)	HA	۴ - ۰/۰۰۵	۰/۰۰۱	۱۰۳/۳ - ۹۶	۷/۱ - ۳/۲
LLE (۳۸)	MHA	۵۰۰ - ۱۰۰	۱۵	> ۹۳/۱	۶/۹ - ۴/۳
MOF-MEPS (۳۹)	MHA	۱۵۰۰ - ۱	۰/۰۰۵	> ۹۶	۱۱/۱ - ۳/۵
مطالعه حاضر	MA	۳۲۰ - ۰/۵	۰/۰۵	۸۱/۰	۳/۷ - ۳/۱
مطالعه حاضر	tt-MA	۶/۴ - ۰/۰۶	۰/۰۲	۸۱/۶	۷/۸ - ۳/۴
مطالعه حاضر	HA	۲۵ - ۰/۱۶	۰/۰۵	۸۳/۸	۶/۵ - ۲/۴
مطالعه حاضر	MHA	۲۵ - ۰/۱۶	۰/۰۵	۸۷/۵	۵/۴ - ۴/۱

* LDR: رنج خطی دینامیکی، LOD: حد تشخیص کیفی، EE: راندمان استخراج، RSD: انحراف استاندارد نسبی

جدول ۴: مقایسه عملکرد جاذب توسعه داده شده $Fe_3O_4@TFPA-Bd$ با جاذب $Fe_3O_4@TbBd$ جهت استخراج آنالیت های HA، MA، tt-MA و m-MHA از نمونه های ادرار

جاذب $Fe_3O_4@TFPA-Bd$				جاذب $Fe_3O_4@TbBd$				آنالیت ها پارامترها
m-MHA	HA	MA	tt-MA	m-MHA	HA	MA	tt-MA	
۲۵ - ۰/۱	۲۵ - ۰/۱	۳۲۰ - ۰/۵	۶/۴ - ۰/۰۶	۲۵ - ۰/۱	۵۰ - ۰/۱	۳۰۰ - ۰/۱	۵ - ۰/۰۵	رنج خطی دینامیکی (µg/mL)
۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۵	۰/۰۲	حد آشکارسازی (µg/mL)
۴/۱	۲/۴	۳/۷	۴/۳	۳/۴	۵/۳	۵/۵	۳/۱	دقت درون روز (%RSD)
۵/۴	۶/۵	۳/۱	۷/۸	۴/۶	۷/۹	۹/۸	۵/۲	دقت بین روز (%RSD)
۸۷/۵	۸۳/۸	۸۱/۰	۸۱/۶	۸۷/۰	۷۰/۱	۷۳/۳	۷۱/۶	راندمان استخراج (%)

و اندازه ماده جاذب نیز در عملکرد جذب بسیار مهم است. علاوه بر این، فعل و انفعالات هترواتم ها نیز به تشکیل پیوند بین آلاینده ها و COFs کمک می کند که کارایی جذب COFs را افزایش می دهد. در ۴ عملکرد جذب جاذب سنتز شده $Fe_3O_4@TFPA-Bd$ برای استخراج آنالیت های HA، MA، tt-MA و m-MHA از نمونه های ادرار با جاذب $Fe_3O_4@TbBd$ که پیش از این توسط محققین این مطالعه (۱۷) برای استخراج و تعیین مقدار BTEXs از نمونه های ادرار بکار گرفته شده، مقایسه شده است. نتایج بیانگر بهبود عملکرد جاذب برای استخراج آنالیت های مورد نظر با تغییر آلدئید به کار رفته از ۵، ۳، ۱ تری فرمیل بنزین به تریس (۴- فرمیل فنیل) آمین می باشد.

بستر جاذب در غلظت های پایین دشوار است و مقادیر کمی از آنالیت همواره روی بستر جاذب باقی می ماند که می تواند در استخراج های بعدی تداخل ایجاد کند. علاوه بر این، فرآیند بهینه سازی شده دارای مزایایی مشابه سایر روش های توسعه یافته با MEPS است، از جمله: تکرارپذیری خوب، مصرف حلال کم، و زمان استخراج کوتاه. ۳، نتایج مقایسه روش COF-MEPS با سایر روش های منتشر شده قبلی جهت استخراج و تعیین مقدار آنالیت های هدف را نشان می دهد.

فرآیندهای جذب از نظر برهمکنش های الکترو استاتیک، برهمکنش های آبگریز، پیوندهای هیدروژنی و انتخاب گروه عاملی قابل توضیح هستند. اما درک این نکته نیز مهم است که اندازه منافذ طراحی شده COFs

تجزیه و تحلیل نمونه های واقعی

برای استفاده عملی از روش استخراج توسعه داده شده، ۵ نمونه ادرار از کارگران مرد شاغل در جایگاه های سوخت شهر همدان (غرب ایران) گرفته شد و با روش COF-MEPS در شرایط بهینه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. هرکدام از نمونه ها سه بار آنالیز شدند و درصد انحراف استاندارد نسبی (RSD) نیز برای آنها محاسبه شد. مقادیر RSD در محدوده ۴/۸ - ۹/۷٪ برای tt-MA، ۴/۱ - ۷/۹٪ برای MA، ۳/۹ - ۸/۲٪ برای HA و ۴/۷ - ۱۱٪ برای m-MHA متغییر و در بازه قابل قبول بدست آمد (۵). همانطور که قابل مشاهده است نتایج حاکی از قابلیت کاربرد روش پیشنهادی جهت استخراج بیومارکرهای ادراری BTEX در نمونه های واقعی است.

کروماتوگرام های خروجی از دستگاه HPLC برای نمونه های ادرار اسپایک شده HA، MA، m-MHA و tt-MA و همچنین کروماتوگرام نمونه ادرار کارگر غیرسیگاری در معرض BTEXs در الف) ۵ تا ج) نشان داده شده است. نتایج نشان داد که روش پیشنهادی از عملکرد استخراج قابل قبولی برخوردار بوده و تمامی آنالیت های هدف بدون هیچ گونه تداخلی قابل جداسازی می باشند.

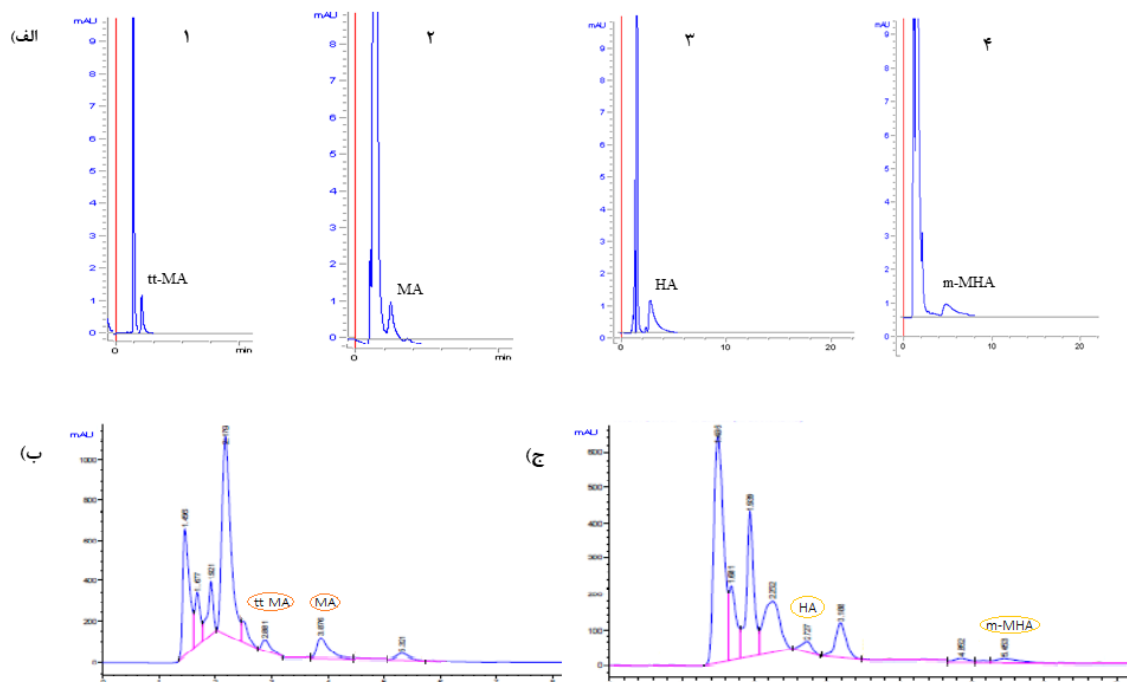
بحث

روش COF-MEPS به همراه جاذب $Fe_3O_4@$ TFPA-Bd با موفقیت برای استخراج و تعیین مقدار MA، HA، m-MHA و tt-MA در نمونه های ادرار مورد استفاده قرار گرفت و توسط راهنمای سازمان غذا و

دارو (FDA) اعتبارسنجی شد (۴۰). منحنی کالیبراسیون روش در رنج غلظت ۰/۵ - ۳۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر برای MA، ۰/۰۶ - ۶/۴ میکروگرم بر میلی لیتر برای tt-MA و ۰/۱ - ۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر برای HA و m-MHA خطی بود. در مطالعه سلیمانی و همکاران بر روی تعیین مقدار ماندلیک اسید در نمونه های ادرار با استفاده از روش MIP-MEPS یک رابطه خطی بین غلظت آنالیت ها و سطح زیر پیک آن ها در محدوده ۰/۲ - ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش شده است (۱۱). در مطالعات دیگری که بروی استخراج هیپوریک اسید و متیل هیپوریک اسید توسط روش های-PSM MEPS و MOF-MEPS انجام شده است، مقادیر LDR در محدوده ۰/۰۵ - ۵/۸ میکروگرم بر میلی لیتر و ۱ - ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب برای HA و MHA گزارش شده است (۳۹، ۲۲). همچنین، در این مطالعات مقادیر دقت درون-روز و بین-روز برای آنالیت های هدف کمتر از ۴/۳٪ و ۷/۸٪ گزارش شده است که در محدوده قابل قبول است و با نتایج مطالعه حاضر نیز همخوانی دارد. صحت روش COF-MEPS در محدوده ۱۲/۵ - ۱۹٪ بدست آمد. پیرمحمدی و همکاران (۳۹) از روش MEPS با جاذب MOF برای تعیین مقدار m-MHA در نمونه های ادرار استفاده کردند و نتایج آن ها نشان داد که مقادیر صحت روش توسعه داده شده بین ۳/۵ - ۱۱/۱٪ می باشد. همچنین، حد آشکارسازی و حد تشخیص کمی MA، tt-MA، HA و m-MHA در مطالعه حاضر قابل قبول و نزدیک به مطالعات قبلی بود (۴) (۴۱، ۲۲). نتایج بدست آمده حاکی از آن است

جدول ۵: نتایج استخراج و تعیین مقدار MA، HA، m-MHA و tt-MA در نمونه های ادرار کارکنان شاغل در جایگاه های سوخت شهر همدان

نمونه های ادرار	آنالیت ها	tt-MA	MA	HA	m-MHA
نمونه ۱	۱/۵ (۴/۸)	۰/۲ (۵/۸)	۴/۴ (۶/۶)	۸/۸ (۹/۳)	
نمونه ۲	۰/۹ (۵/۱)	۰/۳ (۷/۴)	۵/۹ (۸/۲)	۲/۲ (۴/۹)	
نمونه ۳	۰/۶ (۸/۵)	۰/۲ (۴/۱)	۳۰/۵ (۵/۹)	۵/۰ (۱۱/۲)	
نمونه ۴	۳/۴ (۶/۳)	۰/۱ (۷/۹)	۳۲/۰ (۴/۸)	۷/۳ (۹/۶)	
نمونه ۵	۰/۸ (۹/۷)	۰/۱ (۵/۱)	۴۳/۳ (۳/۹)	۱/۵ (۴/۷)	



شکل ۵: کروماتوگرام های HPLC. الف) ۱. نمونه ادرار اسپایک شده حاوی tt-MA در غلظت LOQ، ۲. نمونه ادرار اسپایک شده حاوی MA در غلظت LOQ، ۳. نمونه ادرار اسپایک شده حاوی HA در غلظت LOQ، ۴. نمونه ادرار اسپایک شده حاوی m-MHA در غلظت LOQ، ب) نمونه ادرار کارگر غیرسیگاری حاوی tt-MA و MA (ج) نمونه ادرار کارگر غیرسیگاری حاوی HA و m-MHA بعد از بکارگیری روش COF-MEPS.

شده اند. نتایج مطالعه فوق نشان داده است که استفاده از محلول متانول- آب (۶۰:۴۰ V/V) حاوی ۲۵٪ هیدروکسید آمونیوم، بیشترین کارایی را در استخراج آنالیت های موردنظر از نمونه های ادرار دارد (۴۱). در مطالعه حاضر برای دستیابی به حداکثر بازده استخراج آنالیت های هدف تعداد ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ سیکل استخراج همراه با ۵ حجم از نمونه (۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میکرولیتر) مورد ارزیابی قرار گرفت. بیشترین راندمان استخراج آنالیت های هدف در ۸ سیکل استخراج و با حجم نمونه ۱۵۰ میکرولیتر حاصل شد. در مطالعات دیگری (۱۶، ۱۷، ۳۹، ۴۳)، که از روش میکرواستخراج با جاذب انباشته برای استخراج BTEX در ماتریس ادرار استفاده کرده اند، سیکل های استخراج و حجم نمونه ۲×۱۰ تا ۱۰×۱۰ میکرولیتر را به عنوان مقادیر بهینه گزارش شده است. همچنین، نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر نشان داد که افزایش دمای محلول نمونه اثرات

که روش پیشنهادی حساسیت کافی برای تعیین مقدار آنالیت های موردنظر در نمونه های ادرار را دارد. در روش های میکرواستخراج نوع و حجم حلال پاکسازی حائز اهمیت است زیرا باید بتوان آنالیت های موردنظر را با حداقل حجم از حلال استخراج کرد. در این مطالعه، نتایج نشان داد که ۵۰ میکرولیتر از مخلوط متانول- استیک اسید (۲۰:۸۰ V/V) بهترین کارایی را برای جداسازی آنالیت های هدف از بستر جاذب دارد. مطالعات قبلی نشان داده است که استفاده از حلال های آلی مانند متانول و اتانول در جداسازی ترکیبات از هم به واسطه پیوندهای هیدروژنی، جذب سطحی و پیوندهای غیرکووالانسی موثر است (۴۱، ۴۲). در مطالعه دریاورد و همکاران برای استخراج همزمان بی حس کننده های موضعی در نمونه های ادرار با روش MIP-MEPS، ترکیبات متانول، آب، فرمیک اسید و محلول هیدروکسید آمونیوم به عنوان حلال های استخراج کننده استفاده

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، یک چارچوب آلی کووالانسی مغناطیسی با پیوند ایمین ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TFPA-Bd}$)، برای نخستین بار سنتز گردید و به عنوان جاذب جدید در میکرواستخراج با جاذب انباشته (MEPS) همراه با HPLC-UV به منظور استخراج و تعیین مقدار آنالیت های HA، MA، tt-MA و m-MHA استفاده شد. نتایج آزمایشات تجربی نشان داد که این روش دارای مزایای بسیاری از جمله استخراج آنالیت های هدف تنها با یک جاذب، کروماتوگرام های تمیز و بدون پیک های تداخلی با نمونه، استفاده از حجم کم حلال استخراج کننده، آماده سازی سریع جاذب برای استخراج های بعدی، میزان بازیافت عالی، حد تشخیص بسیار پایین، صحت و تکرارپذیری خوب و زمان استخراج کوتاه می باشد. با توجه به این مزایا، روش توسعه یافته را می توان به عنوان روشی با کارایی بالا برای استخراج و تعیین مقدار متابولیت های BTEX در نمونه های ادرار پیشنهاد کرد و از آن بعنوان جایگزینی مناسب برای سایر روش های توسعه یافته با HPLC-UV جهت استخراج آنالیت های هدف از نمونه های ادرار یاد کرد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافی وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر توسط مرکز تحقیقات علوم بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی همدان پشتیبانی مالی شده است (۹۹۱۱۱۴۸۰۱۶).

اختصارات

BTEX: بنزن، تولوئن، اتیل بنزن، زایلن، tt-MA: ترانس، ترانس-موکونیک اسید، HA: هیپوریک اسید، m-MHA: ۳-متیل هیپوریک اسید، MA: ماندلیک اسید، IRAC: آژانس بین المللی تحقیقات سرطان، EPA:

متغیری بر استخراج آنالیت ها در نمونه های اسپایک شده دارد و لذا مقدار بهینه دمای محلول نمونه برای استخراج هر آنالیت مشخص شد و در استخراج های بعدی مورد استفاده قرار گرفت. از سوی دیگر، بررسی اثر pH محلول نمونه نشان داد که بیشترین راندمان استخراج برای آنالیت های هدف در $\text{pH} = 4$ بدست می آید. بسته به نوع آنالیت و جاذب، بالاترین راندمان استخراج را می توان در pHs مختلف به دست آورد. به عنوان مثال، در مطالعه معین و همکاران (۲۲) برای آنالیز هیپوریک اسید در ادرار با استفاده از روش MIMPEPS، بیشترین راندمان استخراج در $\text{pH} = 2$ گزارش شده است و در مطالعه دیگری که توسط این محقق انجام شده است، بیشترین بازیابی سارکوزین در $\text{pH} = 4$ بدست آمده است (۴۳).

اثر انتقالی (Carry-over) یک محدودیت معمول در اکثر روش های ریزاستخراج است که می تواند با کاهش مقادیر دقت و صحت بر نتایج به دست آمده تأثیر بگذارد. این محدودیت معمولاً با انتخاب حلال پاکسازی مناسب و افزایش تعداد سیکل های شستشو پس از هر بار تزریق قابل رفع است. در مطالعه حاضر، براساس نتایج بدست آمده مشخص شد حداقل دو چرخه شستشو با حجم ۱۰۰ میکرولیتر از حلال استخراج کننده و به دنبال آن حلال استون برای به حداقل رساندن اثرات انتقالی لازم است. در مطالعات قبلی مشخص شده است که استفاده از حلال متانول عملکرد خوبی در کاهش اثر حافظه به کمتر از ۱٪ به دنبال استفاده از جاذب های MIP (22) و MOF (۳۹) در روش MEPS دارد.

در آخر باید عنوان کرد که در مقایسه با سایر روش های توسعه یافته با MEPS، روش پیشنهادی می تواند تمام متابولیت های مورد نظر را تنها با استفاده از یک جاذب، حجم حلال پاکسازی کم، فرآیند خالص سازی آسان و آماده سازی سریع جاذب برای استخراج های بعدی مشخص کند. علاوه بر این، فرآیند بهینه سازی شده دارای مزایایی مشابه سایر روش های توسعه یافته با MEPS است، از جمله: تکرارپذیری خوب، مصرف حلال کم، و زمان استخراج کوتاه.

نشر میدانی، FTIR: طیفسنج مادون قرمز تبدیل فوریه، TEM: میکروسکوپ الکترونی عبوری، XRD: پراش اشعه ایکس، TFPA: تریس (۴- فرمیل فنیل) آمین، Bd: بنزیدین، DMSO: دی متیل سولفوکساید، EG: اتیلن گلیکول.

آژانس حفاظت از محیط زیست، SPE: استخراج فاز جامد، LLE: استخراج مایع- مایع، MEPS: میکرو استخراج با جاذب انباشته شده، COFs: چارچوب‌های آلی کووالانسی، HPLC-UV: کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا- ماوراءبنفش، FE-SEM: میکروسکوپ الکترونی روبشی-

REFERENCES

1. Hazrati S, Rostami R, Fazlzadeh M. BTEX in indoor air of waterpipe cafés: levels and factors influencing their concentrations. *Sci Total Environ*. 2015;524:347-53.
2. Newton R. Report of the Advisory Group to Recommend Priorities for the IARC Monographs during 2020–2024. 2019.
3. Yan J, Wang L, Fu PP, Yu H. Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2004;557(1):99-108.
4. Saldarriaga JF, Aguado R, Morales GE. Assessment of VOC emissions from municipal solid waste composting. *Environ Eng Sci*. 2014;31(6):300-7.
5. Alwis KU, Blount BC, Britt AS, Patel D, Ashley DL. Simultaneous analysis of 28 urinary VOC metabolites using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (UPLC-ESI/MSMS). *Anal Chim Acta*. 2012;750:152-60.
6. Reid D, McDonald B, Khalid T, Vo T, Schenck L, Surette M, et al. Unique microbial-derived volatile organic compounds in portal venous circulation in murine non-alcoholic fatty liver disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2016;1862(7):1337-44.
7. Rumchev K, Spickett J, Bulsara M, Phillips M, Stick S. Association of domestic exposure to volatile organic compounds with asthma in young children. *Thorax*. 2004;59(9):746-51.
8. Xiong F, Li Q, Zhou B, Huang J, Liang G, Zhang Le, et al. Oxidative stress and genotoxicity of long-term occupational exposure to low levels of BTEX in gas station workers. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(12):1212.
9. Kongtip P, Vararussami J, Pruktharathikul V. Modified method for determination of hippuric acid and methylhippuric acid in urine by gas chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001;751(1):199-203.
10. Mudiam MKR, Chauhan A, Singh KP, Gupta SK, Jain R, Ch R, et al. Determination of t, t-muconic acid in urine samples using a molecular imprinted polymer combined with simultaneous ethyl chloroformate derivatization and pre-concentration by dispersive liquid-liquid microextraction. *Anal Bioanal Chem*. 2013;405:341-9.
11. 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.
12. Rafiee A, Delgado-Saborit JM, Gordi E, Quémerais B, Moghadam VK, Lu W, et al. Use of urinary biomarkers to characterize occupational exposure to BTEX in healthcare waste autoclave operators. *Sci Total Environ*. 2018;631:857-65.
13. Weisel CP. Benzene exposure: an overview of monitoring methods and their findings. *Chem Biol Interact*. 2010;184(1-2):58-66.
14. Bahrami A, Ghamari F, Yamini Y, Ghorbani Shahna F, Koolivand A. Ion-pair-based hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of urinary benzene, toluene, and styrene metabolites. *J Sep Sci* 2018;41(2):501-8.
15. Behbahani M, Bagheri S, Omid F, Amini MM. An amino-functionalized mesoporous silica (KIT-6) as a sorbent for dispersive and ultrasonication-assisted micro solid phase extraction of hippuric acid and methylhippuric acid, two biomarkers for toluene and xylene exposure. *Mikrochim Acta*. 2018;185:1-8.
16. Kurd N, Bahrami A, Afkhami A, Shahna FG, Assari MJ, Farhadian M. Hollow polymer nanospheres (HPs) as the adsorbent in microextraction by packed sorbent (MEPS) for determining BTEXs chief metabolites in urine samples. *J Iran Chem Soc*. 2022;19(10):4117-28.

17. Kurd N, Bahrami A, Afkhami A, Shahna FG, Assari MJ, Farhadian M. Application of Fe₃O₄@ TbBd nanobeads in microextraction by packed sorbent (MEPS) for determination of BTEXs biomarkers by HPLC–UV in urine samples. *J Chromatogr B*. 2022;1197:123-197.
18. Abdel-Rehim M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): a tutorial. *Anal Chim Acta*. 2011;701(2):119-28.
19. Prieto A, Schrader S, Bauer C, Möder M. Synthesis of a molecularly imprinted polymer and its application for microextraction by packed sorbent for the determination of fluoroquinolone related compounds in water. *Anal Chim Acta*. 2011;685(2):146-52.
20. Yang L, Said R, Abdel-Rehim M. Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): a review. *J Chromatogr B*. 2017;1043:33-43.
21. Florez DHÁ, de Oliveira HL, Borges KB. Polythiophene as highly efficient sorbent for microextraction in packed sorbent for determination of steroids from bovine milk samples. *Microchem J*. 2020;153:1045-21.
22. Moein MM, El-Beqqali A, Javanbakht M, Karimi M, Akbari-Adergani B, Abdel-Rehim M. On-line detection of hippuric acid by microextraction with a molecularly-imprinted polysulfone membrane sorbent and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2014;1372:55-62.
23. Hernández-Borges J, González-Sálamo J, González-Curbelo MÁ, Cairós C, Varela-Martínez DA. Nanomaterials have come to stay: An overview of their use as sorbents in sample preparation. *LCGC Suppl*. 2019;37(4):22–7.
24. Liu X, Pang H, Liu X, Li Q, Zhang N, Mao L, et al. Orderly porous covalent organic frameworks-based materials: superior adsorbents for pollutants removal from aqueous solutions. *Innovation (Camb)*. 2021;2(1):1000-76.
25. Wang M, Gao M, Zhang K, Wang L, Wang W, Fu Q, et al. Magnetic covalent organic frameworks with core-shell structure as sorbents for solid phase extraction of fluoroquinolones, and their quantitation by HPLC. *Mikrochim Acta*. 2019;186:1-13.
26. Mellah A, Fernandes SP, Rodríguez R, Otero J, Paz J, Cruces J, et al. Adsorption of pharmaceutical pollutants from water using covalent organic frameworks. *Chemistry–A European Journal*. 2018;24(42):1060-5.
27. Li N, Du J, Wu D, Liu J, Li N, Sun Z, et al. Recent advances in facile synthesis and applications of covalent organic framework materials as superior adsorbents in sample pretreatment. *Trends Analyt Chem*. 2018;108:154-66.
28. Zhu L, Zhang Y-B. Crystallization of covalent organic frameworks for gas storage applications. *Molecules*. 2017;22(7):1149.
29. Stegbauer L, Schwinghammer K, Lotsch BV. A hydrazone-based covalent organic framework for photocatalytic hydrogen production. *Chem Sci*. 2014;5(7):2789-93.
30. Fang Q, Wang J, Gu S, Kaspar RB, Zhuang Z, Zheng J, et al. 3D porous crystalline polyimide covalent organic frameworks for drug delivery. *J Am Chem Soc*. 2015;137(26):8352-5.
31. Peng Y, Wong WK, Hu Z, Cheng Y, Yuan D, Khan SA, et al. Room temperature batch and continuous flow synthesis of water-stable covalent organic frameworks (COFs). *Chem Mater*. 2016;28(14):5095-101.
32. Liu J, Zong E, Fu H, Zheng S, Xu Z, Zhu D. Adsorption of aromatic compounds on porous covalent triazine-based framework. *J Colloid Interface Sci*. 2012;372(1):99-107.
33. Chen L, Zhang M, Fu F, Li J, Lin Z. Facile synthesis of magnetic covalent organic framework nanobeads and application to magnetic solid-phase extraction of trace estrogens from human urine. *J Chromatogr A*. 2018;1567:136-46.
34. Mullangi D, Shalini S, Nandi S, Choksi B, Vaidhyanathan R. Super-hydrophobic covalent organic frameworks for chemical resistant coatings and hydrophobic paper and textile composites. *J Mater Chem A Mater*. 2017;5(18):8376-84.
35. Szűcs S, Toth L, Legoza J, Sárváry A, Adany R. Simultaneous determination of styrene, toluene, and xylene metabolites in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *Arch Toxicol*. 2002;76:560-9.
36. Jamaledin Shahtaheri S, Ghamari F, Golbabaei F, Rahimi-Froushani A, Abdollahi M. Sample preparation followed by high performance liquid chromatographic (HPLC) analysis for monitoring muconic acid as a biomarker of occupational exposure to benzene. *Int J Occup Saf Ergon*. 2005;11(4):377-88.
37. Omid F, Behbahani M, Khadem M, Golbabaei F, Shahtaheri SJ. Application of ultrasonication for facilitating the extraction of hippuric acid and

- methyl hippuric acid in real samples using Fe₃O₄@ SiO₂@ sodium dodecyl sulfate: experimental design methodology. *Anal Methods*. 2018;10(37):4588-95.
38. Ohashi Y, Mamiya T, Mitani K, Wang B, Takigawa T, Kira S, et al. Simultaneous determination of urinary hippuric acid, o-, m- and p-methylhippuric acids, mandelic acid and phenylglyoxylic acid for biomonitoring of volatile organic compounds by gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2006;566(2):167-71.
39. Pirmohammadi Z, Bahrami A, Nematollahi D, Alizadeh S, Ghorbani Shahna F, Rahimpour R. Determination of urinary methylhippuric acids using MIL-53-NH₂ (Al) metal–organic framework in microextraction by packed sorbent followed by HPLC–UV analysis. *Biomed Chromatogr*. 2020;34(1): 4725.
40. FDA. Guidance for industry: bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CV). 2001.
41. Daryanavard SM, Jeppsson-Dadoun A, Andersson LI, Hashemi M, Colmsjö A, Abdel-Rehim M. Molecularly imprinted polymer in microextraction by packed sorbent for the simultaneous determination of local anesthetics: lidocaine, ropivacaine, mepivacaine and bupivacaine in plasma and urine samples. *Biomed Chromatogr*. 2013;27(11):1481-8.
42. Wu C-M, Rathi M, Ahrenkiel SP, Koodali RT, Wang Z. Facile synthesis of MOF-5 confined in SBA-15 hybrid material with enhanced hydrostability. *Chem Commun (Camb)*. 2013;49(12):1223-5.
43. Moein MM, Abdel-Rehim A, Abdel-Rehim M. On-line determination of sarcosine in biological fluids utilizing dummy molecularly imprinted polymers in microextraction by packed sorbent. *J Sep Sci*. 2015;38(5):788-95.