

**Development of Salting Out Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for Measurement of Bisphenol A in Drinking Water and Urban Treated Wastewater Samples by High-Performance Liquid Chromatography: Optimization by the Response Surface Methodology Based on the Box-Behnken Design**

**Farideh Roustaei<sup>1</sup>, Majid Baghdadi<sup>2</sup>, Azam Marjani<sup>3</sup>, Mohammad Alimoradi<sup>4</sup>**

**Original Article**

**Abstract**

**Background:** Bisphenol A is known as one of the emerging micropollutants with harmful effects on human health. This pollutant enters the environment through the discharge of municipal wastewater treatment plants. In this research, the salting out dispersive liquid-liquid microextraction method was investigated for pre-concentration of bisphenol A in drinking water and urban sewage effluent samples. Due to the high enrichment factor, this method enables the measurement of small amounts of bisphenol A in the examined samples.

**Methods:** In this method, bisphenol A forms a colored hydrophobic derivative of antipyrine with 4-aminoantipyrine in the presence of potassium hexacyanoferrate. In order to extract the resulting derivative, 250 µl of 2-phenoxyethanol was dissolved in 10 ml of the sample. Then, by adding 0.7 g of sodium chloride to the sample, fine droplets of extracting solvent were formed in the sample and the solution became cloudy. After centrifugation, the extraction phase containing bisphenol A derivative settled at the bottom of the test tube, and then, 20 µl of methanol was added in order to reduce its viscosity. The measurement was performed by a high-performance liquid chromatography at a wavelength of 480 nm. To optimize the process, the effect of the amount of 4-aminoantipyrine, potassium hexacyanoferrate, and buffer was investigated. Then, the figures of merit of the method were obtained and the performance of the method was evaluated on drinking water and urban sewage effluent samples.

**Findings:** Under optimal conditions (2-phenoxyethanol: 250 µl, 4-aminoantipyrine 1%: 100 µl, potassium hexacyanoferrate 10%: 80 µl, buffer pH 10: 10 µl, and sodium chloride: 0.7 g per 10 ml of sample), the enrichment factor of 106, the detection limit of 0.1 ng ml<sup>-1</sup>, the limit of quantification of 0.3 ng ml<sup>-1</sup>, and the relative standard deviation (RSD) of 3.2% were obtained. Meanwhile, the correlation coefficient (CC) of the calibration curve was equal to 0.9985. Moreover, the results of the analysis of water and urban sewage effluent samples showed that the developed method had suitable performance for the measurement of bisphenol A in real matrix samples.

**Conclusion:** Considering the low detection limit, high enrichment factor, and proper performance in real samples, this method can be introduced as a sensitive and efficient method for the measurement of very low amounts of bisphenol A in water and wastewater samples.

**Keywords:** Water; Wastewater; Liquid phase microextraction; Bisphenol A; Measurement; Liquid chromatography

**Citation:** Roustaei F, Baghdadi M, Marjani A, Alimoradi M. **Development of Salting Out Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for Measurement of Bisphenol A in Drinking Water and Urban Treated Wastewater Samples by High-Performance Liquid Chromatography: Optimization by the Response Surface Methodology Based on the Box-Behnken Design.** J Health Syst Res 2023; 19(3): 183-91.

1- PhD Student, Department of Analytical Chemistry, School of Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

2- Associate Professor, Department of Analytical Chemistry, School of Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak AND Department of Environmental Engineering, School of Environment, University of Tehran, Tehran, Iran

3- Professor, Department of Inorganic Chemistry, School of Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

4- Professor, Department of Analytical Chemistry, School of Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran

**Corresponding Author:** Majid Baghdadi; Associate Professor, Department of Analytical Chemistry, School of Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak AND Department of Environmental Engineering, School of Environment, University of Tehran, Tehran, Iran

Email: m.baghdadi@ut.ac.ir



## توسعه ریزاستخراج مایع- مایع پخشی بر اساس اثر بیرون رانی نمک جهت اندازه گیری بیس فل آ در نمونه های آب شرب و پساب فاضلاب شهری با استفاده از کروماتوگرافی مایع با راندمان بالا: بهینه سازی توسط روشن سطح پاسخ بر مبنای طرح Box-Behnken

فریده روستائی<sup>۱</sup>, مجید بغدادی<sup>۲</sup>, اعظم مرجانی<sup>۳</sup>, محمد علیمرادی<sup>۴</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** بیس فل آ یکی از ریزآلایندهای نوظهور شناخته شده می باشد که اثرات محربی بر سلامت انسان دارد. این آلاینده از طریق تخلیه پساب تصفیه خانه های فاضلاب شهری به محیط زیست راه پیدا می کند. در پژوهش حاضر، روش ریزاستخراج مایع- مایع پخشی برای اثر بیرون رانی نمک (Salting out assisted liquid-liquid microextraction) یا SA-LLME (SA-LLME) چهت پیش تغییط بیس فل آ در نمونه های آب شرب و پساب فاضلاب شهری مورد بررسی قرار گرفت. این روش به دلیل فاکتور تغییط بالا، اندازه گیری مقدار ناجز بیس فل آ را در نمونه های مورد بررسی امکان پذیر می کند.

**روش ها:** در این روش، بیس فل آ با -۴-آمینو آنتی پیرین در حضور پتانسیم هگراسیانوفرات یک مشتق آب گریز رنگی آنتی پیرین تشکیل می دهد. چهت استخراج مشتق حاصل شده، ۲۵ میکرولیتر از -۲-فنوکسی اتانول در ۱۰ میلی لیتر نمونه حل گردید. سپس با اضافه کردن ۷/۰ گرم کلرید سدیم به نمونه، قطرات ریزحال استخراج کننده در نمونه تشکیل و محلول ابری شد. بعد از سانتریفوژ، فاز استخراج کننده حاوی مشتق بیس فل آ در ته لوله آزمایش تهشین و سپس به منظور کاهش ویسکوزیته، به آن ۲۰ میکرولیتر میانول اضافه گردید. اندازه گیری به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع با راندمان بالا (HPLC High-performance liquid chromatography) در طول موج ۴۸۰ نانومتر انجام شد. برای بهینه سازی فرایند، اثر مقدار -۴-آمینو آنتی پیرین، پتانسیم هگراسیانوفرات، سدیم کلرید و بافر مورد بررسی قرار گرفت. سپس ارقام شایستگی روش به دست آمد و عملکرد روش روی نمونه های آب شرب و پساب فاضلاب شهری ارزیابی گردید.

**پافته ها:** تحت شرایط بهینه (۲-فنوکسی اتانول: ۲۵۰ میکرولیتر، -۴-آمینو آنتی پیرین ۱ درصد: ۱۰۰ میکرولیتر، پتانسیم هگراسیانوفرات ۱۰ درصد: ۸۰ میکرولیتر و بافر ۱۰ pH): ۱۰ میکرولیتر و سدیم کلرید: ۷/۰ گرم بر ۱۰ میلی لیتر نمونه)، فاکتور تغییط ۱۰۶ و حد تشخیص (Limit of detection LOD) یا ۰/۰۱ نانوگرم بر میلی لیتر، حد کمی سازی ۰/۳ منحنی کالیبراسیون، ۹۹/۸۵٪ بود. نتایج آنالیز نمونه های آب و پساب نیز نشان داد که روش توسعه پافته عملکرد مناسب چهت اندازه گیری بیس فل آ در نمونه های با ماتریکس واقعی دارد.

**نتیجه گیری:** با توجه به حد تشخیص پایین، فاکتور تغییط بالا و عملکرد مناسب در نمونه های واقعی، این روش را می توان به عنوان یک روش حساس و کارآمد چهت اندازه گیری مقادیر بسیار پایین بیس فل آ در نمونه های آب و پساب معرفی نمود.

**واژه های کلیدی:** آب؛ پساب؛ ریزاستخراج فاز مایع؛ بیس فل آ؛ اندازه گیری؛ کروماتوگرافی مایع

**ارجاع:** روستائی فریده، بغدادی مجید، مرجانی اعظم، علیمرادی محمد. توسعه ریزاستخراج مایع- مایع پخشی بر اساس اثر بیرون رانی نمک جهت اندازه گیری بیس فل آ در نمونه های آب شرب و پساب فاضلاب شهری با استفاده از کروماتوگرافی مایع با راندمان بالا: بهینه سازی توسط روشن سطح پاسخ بر مبنای طرح Box-Behnken. مجله تحقیقات نظام سلامت ۱۹: ۱۴۰۲-۱۹۱؛ ۱۸۳-۱۹۱ (۳).

تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۷/۱۵

پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۵/۱

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۲۳

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه شیمی تجزیه، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران
  - ۲- دانشیار، گروه شیمی تجزیه، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک و گروه مهندسی محیط زیست، دانشگاه تهران، تهران، ایران
  - ۳- استاد، گروه شیمی کاربردی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران
  - ۴- استاد، گروه شیمی تجزیه، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران
- نویسنده مسؤول: مجید بغدادی؛ دانشیار، گروه شیمی تجزیه، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک و گروه مهندسی محیط زیست، دانشگاه تهران، تهران، ایران
- Email: m.baghdadi@ut.ac.ir

## مقدمه

در سال‌های اخیر، آلدگی ناشی از ریزاالایندها بسیار گسترده و نگران‌کننده شده است؛ به طوری که می‌توان گفت ریزاالایندها یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های ریست محیطی می‌باشد. استفاده گسترده از بیس‌فل آ در صنایع و تخلیه فاضلاب و پساب کارخانه‌های تولیدی به آب‌های سطحی و زیرزمینی، یکی از علل اصلی آلدگی منابع آب به بیس‌فل آ می‌باشد که می‌تواند سلامت انسان‌ها و موجودات زنده را تهدید کند (۱-۳). همچنین، به علت استفاده بیس‌فنول آ به عنوان نرم‌کننده در مواد پلاستیکی به ویژه در بطری‌های آب معدنی، مهاجرت بیس‌فل آ از بطری به آب داخل آن اتفاق می‌افتد (۴).

هدف اصلی آماده‌سازی نمونه، تقطیع و حذف عوامل مزاحم است. آماده‌سازی نمونه یکی از مراحل مهم در آنالیز کمی می‌باشد که آنالیز نمونه‌های پیچیده و اندازه‌گیری مقادیر ناچیز را معمول می‌سازد. روش‌های پیش‌تقطیع باعث کاهش عوامل مزاحم می‌شود. ضمن این که به دلیل فاکتور تقطیع بالا، منجر به کاهش قابل توجه حد تشخیص (Limit of detection) یا LOD می‌شود. به طور کلی، استفاده از یک روش پیش‌تقطیع مناسب، آنالیز نمونه‌های پیچیده و اندازه‌گیری مقادیر ناچیز را معمول می‌سازد. همچنین، با استفاده از یک روش استخراج مناسب، آلاینده از نمونه به فاز استخراج کننده قابل انتساب با دستگاه اندازه‌گیری منتقل می‌شود (۵).

امروزه روش‌های استخراج کلاسیک توسعه زیادی پیدا کرده‌اند که این امر منجر به ارایه تکنیک‌های ریز استخراج (میکرواستخراج) شده است. هدف از توسعه این روش‌ها، برطرف کردن معایب روش‌های کلاسیک می‌باشد. این تکنیک‌های مدرن، دارای مزیت‌هایی همچون راندمان استخراج بالا، سرعت زیاد و مصرف کم مواد شیمیایی با خطرات کمتر می‌باشند (۶، ۷). بنابراین، روش‌های استخراج به سمت روش‌های سریع‌تر، ارزان‌تر و دوستدار محیط زیست در حال حرکت هستند. در این راستا، روش‌های ریز استخراج از جمله روش‌های ریزاستخراج فاز مایع (Liquid-phase microextraction) یا LPME و فاز (SPME) توسعه پیدا کرده‌اند. جامد (Solid-phase microextraction) یا SPME روش‌های میکرواستخراج به کمک خال با هدف برطرف کردن نقايس اسخراج مایع-مایع کلاسیک مانند مصرف زیاد خال‌های آلی سی و خطرناک، گران و زمان‌بر بودن آن‌ها، در اوخر دهه ۱۹۹۰ توسعه پیدا کردند. در روش LPME استخراج در حجم خیلی کمی از یک خال آلی غیر قابل انتزاج با آب انجام می‌شود (۸).

ازین روش‌های ریزاستخراج، روش ریز استخراج مایع-مایع پخشی (Dispersive liquid-liquid microextraction) یا DLLME در سال ۲۰۰۶ به منظور اندازه‌گیری هیدروکربن‌های رضایی و همکاران در سال ۲۰۰۶ به منظور اندازه‌گیری هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای و آفت‌کش‌های ارگانوفسفره در نمونه‌های آبی با استفاده از کروماتوگرافی گازی (GC) یا Gas chromatography معرفی شد. مزایای این روش، سادگی و سهولت، حجم خیلی کم خال استخراج کننده و سرعت بالای آن است که در نهایت، منجر به فاکتور تقطیع خیلی بالا می‌گردد (۹). DLLME با استفاده از بیرون‌رانی نمک (SA-LLME) یا Salting out assisted liquid-liquid microextraction Homogeneous liquid-liquid microextraction همگن DLLME

## روش‌ها

**مواد:** بیس‌فل آ (Bisphenol A) (جهت تهیه ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر محلول استوک (شرکت Sigma-Aldrich، آمریکا) تهیه شد. پتاسیم هگزا‌سیانو فرات (Potassium hexacyanoferrate) (۴-آمینو-۱-پوتاسیوم-۶-هکسایانو-۲-فونکسی اتانول (4-Aminoantipyrine) (2-Phenoxyethanol) (NaCl) (جهت مشق‌سازی بیس‌فل آ، ۲-فونکسی اتانول (Methanol) (جهت افزایش قدرت یونی و متابولیز (Metabolism) (جهت تهیه گردید.

**دستگاه‌ها:** به منظور اندازه‌گیری مشتق بیس‌فل آ از HPLC (Agilent 1100) (مجهز به دتکتور UV/Vis) استفاده شد. اندازه‌گیری‌ها در طول موج ۴۸۰ نانومتر صورت گرفت. ۲۰ میکرولیتر از نمونه به صورت دستی به دستگاه

در جدول ۲ ارایه شده است.

**جدول ۱. سطوح متفاوت عامل‌های اصلی در طراحی Box-Behnken**

سطوح			متغیر
-۱	۰	+۱	
۱۰	۸۰	۱۵۰	بافر (میکرولیتر)
.۰/۲	.۰/۶	.۱/۰	کلرید سدیم (گرم)
۱۰	۵۵	۱۰۰	۴-آمینو آنتی پیرین (میکرولیتر)
۵	۵۲/۵	۱۰۰	پتاسیم هگزاسیانوفرات (میکرولیتر)

### یافته‌ها

با استفاده از طراحی آزمایش Box-Behnken، معادله درجه ۲ (رابطه ۲) به دست آمد. این معادله، رابطه پارامترهای مستقل مقدار بافر، آمینوآنتی پیرین، هگزاسیانوفرات و کلرید سدیم را با مقدار جذب نشان می‌دهد.

رابطه ۲

$$\begin{aligned} & 0.240 + 0.00253A + 0.61586B + 0.005111C \\ & - 0.003599D - 0.000071AD \\ & + 0.004111BC + 0.015934BD \\ & + 0.015934CD - 1.18505B^2 \\ & - 0.000032C^2 \end{aligned}$$

آزمون ANOVA به منظور بررسی اعتبار مدل و اهمیت متغیرها و برهم‌کشن آن‌ها استفاده شد و نتایج در جدول ۳ ارایه شده است. مقدار P برای عدم انطباق  $0.000071$  به دست آمد که نشان می‌دهد نتایج پیش‌بینی شده توسط مدل با داده‌های تجربی انطباق خوبی دارد. مقدار شاخص‌های F و P برای مدل به ترتیب  $31/7$  و  $0.05 <$  گزارش گردید که اهمیت مدل را نشان می‌دهد. اختلاف قابل قبولی بین  $R^2$  Predicted و  $R^2$  Adjusted مشاهده شد که تأیید کننده صحت مدل می‌باشد. بنابراین، مدل پیشنهادی را می‌توان برای پیش‌بینی مقدار جذب به کار برد.

مقدار P برای تمام شاخص‌ها کمتر از  $0.05$  می‌باشد که نشان می‌دهد تمام پارامترها از نظر آماری معنی دار می‌باشند. علاوه بر این، از بین برهم‌کشن‌ها، فقط برهم‌کشن بین بافر و هگزاسیانوفرات و برهم‌کشن بین کلرید سدیم و هگزاسیانوفرات معنی دار می‌باشد.

نمودار باقی‌مانده‌ها و نمودار مقادیر پیش‌بینی شده نسبت به مقادیر تجربی به ترتیب در شکل ۱ (قسمت‌های الف و ب) نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل ۱ (قسمت الف) مشاهده می‌شود، باقی‌مانده‌ها از توزیع نرمال پیروی می‌کند. همچنین در شکل ۱ (قسمت ب) مشاهده می‌شود، تمام نتایج توزیع  $45$  درجه توزیع شده‌اند که نشان می‌دهد تمام نتایج توسط مدل به خوبی قابل پیش‌بینی است.

### بحث

بررسی اثر شاخص‌های مؤثّر بر روی راندمان استخراج و بهینه‌سازی روش: نمودارهای سطح پاسخ متنج از رابطه ۲ در شکل ۲ ارایه شده است. اثر بافر و هگزاسیانوفرات روی میزان جذب در شکل ۲ (قسمت الف) نشان داده شده است.

تزریق شد. جداسازی با استفاده از ستون C18 (۵ میکرومتر،  $۴/۶$  میلی‌متر  $\times$  ۲۵۰ میلی‌متر) انجام گردید. شستشوی ستون توسط فاز متحرك متابول / آب با نسبت  $۲۰/۸۰$  حجمی - حجمی با دبی  $۰/۶$  میلی‌لیتر در دقیقه صورت گرفت. طول هر آنالیز  $۲۰$  دقیقه در نظر گرفته شد. جداسازی فار استخراج کننده به کمک ساتریفوژ مدل ۲-۷ (شرکت Sigma، آلمان) و اندازه‌گیری pH به کمک HMPmeter Adwa (مدل AD1000، رومانی- مجارستان) انجام شد.

**نمونه آب‌های مورد بررسی:** در مطالعه حاضر از آب لوله‌کشی شهری در دانشکده محیط زیست دانشگاه تهران و آب معدنی بزنده و آتا به عنوان نمونه حقیقی استفاده شد. همچنین، پساب فاضلاب شهری از پساب خروجی تصفیه‌خانه اکباتان تهران در ظروف شیشه‌ای نمونه‌برداری گردید. نمونه‌های فاضلاب ابتدا با صافی  $۰/۴۵$  میکرون فیلتر و سپس در یخچال نگهداری شد و قبل از آماده‌سازی به دمای محیط رسانده شدند.

**روش SA-LLME**:  $10$  میلی‌لیتر از نمونه آبی حاوی بیس فل آ به لوله‌های آزمایش شیشه‌ای مخروطی  $15$  میلی‌لیتری انتقال یافت و سپس به آن بافر با  $pH = 10$ ، عوامل مشق‌ساز و  $4\text{-آمینوآنتی پیرین}$  و پتاسیم هگزاسیانوفوکسی اتانول در آن حل گردید. در نهایت، نمک کلرید سدیم به ترتیب قدرت یونی و دو فاری شدن به محلول نمونه اضافه شد. پس از هم زدن، یک محلول ابری تشکیل شد. سپس لوله‌ها با سرعت  $4000$  دور در دقیقه ساتریفوژ گردید. بعد از آن، فاز استخراج کننده حاوی مشتق بیس فل آ در ته لوله آزمایش تهشیش و سپس به منظور کاهش ویسکوزیته، به آن  $20$  میکرولیتر متابول اضافه شد. اندازه‌گیری با استفاده از دستگاه HPLC و در طول موج  $480$  نانومتر صورت گرفت.

شاخص‌های تأثیرگذار و اثرات متقابل بین آن‌ها در فرایند ریزاستخراج Design Expert Box-Behnken در نرمافزار Box-Behnken طراحی بسیار کارآمدی است که اطلاعاتی را منحصرأ در مورد تأثیرگذاری آزمایش در حداقل تعداد اجزای مورد نیاز با حداقل اطلاعات ارایه می‌دهد. طراحی Box-Behnken به دلیل مزایای همچون پیدا کردن عوامل مؤثر بر آزمایش، بررسی اثر فاکتور بر فرایند، بررسی برهم‌کشن بین شاخص‌ها و به دست آوردن شرایط بهینه آزمایش، امروزه به طور گستره‌های استفاده می‌شود. تعداد کل آزمایش‌های انجام شده ( $N$ ) از طریق رابطه  $1$  محاسبه گردید که در آن،  $K$  تعداد شاخص‌های اصلی و  $C_0$  تعداد تکرار نقطه مرکزی می‌باشد. تعداد فاکتورها از  $3$  تا  $21$  عدد قابل استفاده می‌باشد ( $14, 15$ ).

$$N = 2K(K-1) + C_0 \quad \text{رابطه ۱}$$

در تحقیق حاضر، عوامل مشتق‌ساز (پتاسیم هگزاسیانوفرات و  $4\text{-آمینوآنتی پیرین}$ ، بافر و مقدار نمک کلرید سدیم به عنوان متغیرهای مستقل انتخاب گردید. سطوح شاخص‌های مستقل در جدول ۱ ارایه شده است. سیگنال تجزیه‌ای جذب نور به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که در قسمت بهینه‌سازی فرایند، از دستگاه اسپکتروفوتومتر HACH 2800 (آمریکا) و برای محاسبه ارقام شایستگی و آنالیز نمونه‌های حقیقی از دستگاه HPLC استفاده گردید.

تعداد تکرار نقطه مرکزی در طراحی آزمایش  $5$  در نظر گرفته شد. ماتریس طراحی آزمایش مشتمل بر  $31$  آزمایش و نتایج آزمایش و مقادیر پیش‌بینی شده

جدول ۲. ماتریس طراحی شده توسط Box-Behnken و پاسخ‌ها

آزمایش (میکرولیتر)	بافر	کلرید سدیم (کرم)	۴-آمینوآنتی‌پیرین (میکرولیتر)	پتاسیم هگزاسیانوفرات (میکرولیتر)	مقدار واقنی	مقدار پیش‌بینی شده
۱	۸۰	۰/۶	۱۰۰	۵/۰	۰/۸۴۷	۰/۸۴۲
۲	۸۰	۰/۲	۵۵	۱۰۰/۰	۰/۳۹۹	۰/۳۴۵
۳	۸۰	۰/۶	۵۵	۵۲/۵	۰/۸۵۰	۰/۸۲۸
۴	۱۵۰	۱/۰	۵۵	۵۲/۵	۰/۷۶۹	۰/۷۵۸
۵	۱۰	۰/۲	۵۵	۵۲/۵	۰/۵۲۷	۰/۷۱۹
۶	۸۰	۰/۲	۱۰	۵۲/۵	۰/۳۱۴	۰/۲۷۵
۷	۸۰	۱/۰	۱۰۰	۵۲/۵	۰/۹۵۵	۱/۰۲۰
۸	۸۰	۰/۲	۵۵	۵/۰	۰/۶۸۵	۰/۷۲۷
۹	۸۰	۰/۶	۵۵	۵۲/۵	۰/۷۷۷	۰/۸۲۸
۱۰	۱۵۰	۰/۶	۵۵	۱۰۰/۰	۰/۵۴۹	۰/۷۲۱
۱۱	۸۰	۰/۲	۱۰۰	۵۲/۵	۰/۶۰۰	۰/۷۶۷
۱۲	۸۰	۱/۰	۵۵	۱۰۰/۰	۱/۱۷۵	۱/۱۶۰
۱۳	۸۰	۰/۶	۵۵	۵۲/۵	۰/۸۷۰	۰/۸۲۸
۱۴	۸۰	۰/۶	۵۵	۵۲/۵	۰/۷۰۰	۰/۸۲۸
۱۵	۸۰	۰/۶	۱۰۰	۱۰۰/۰	۱/۲۷۰	۱/۲۲۰
۱۶	۱۰	۰/۶	۱۰۰	۵۲/۵	۱/۲۵۰	۱/۱۲۰
۱۷	۱۰	۰/۶	۱۰	۵۲/۵	۰/۵۴۰	۰/۵۷۶
۱۸	۸۰	۰/۶	۱۰	۱۰۰/۰	۰/۵۰۰	۰/۵۲۵
۱۹	۱۵۰	۰/۲	۵۵	۵۲/۵	۰/۵۶۳	۰/۴۵۳
۲۰	۱۵۰	۰/۶	۵۵	۵/۰	۰/۹۳۴	۰/۸۶۹
۲۱	۱۰	۰/۶	۵۵	۱۰۰/۰	۱/۱۵۶	۱/۲۶۰
۲۲	۱۵۰	۰/۶	۱۰۰	۵۲/۵	۰/۹۰۰	۰/۹۵۰
۲۳	۸۰	۱/۰	۱۰	۵۲/۵	۰/۳۷۳	۰/۳۳۲
۲۴	۸۰	۰/۶	۵۵	۵۲/۵	۰/۹۳۳	۰/۸۲۸
۲۵	۸۰	۱/۰	۵۵	۵/۰	۰/۲۵۰	۰/۳۲۷
۲۶	۸۰	۰/۶	۵۵	۵۲/۵	۰/۸۶۷	۰/۸۲۸
۲۷	۸۰	۰/۶	۱۰	۵/۰	۰/۴۴۵	۰/۴۶۱
۲۸	۱۰	۱/۰	۵۵	۵۲/۵	۰/۸۹۷	۰/۸۲۴
۲۹	۱۰	۰/۶	۵۵	۵/۰	۰/۶۰۰	۰/۵۶۷
۳۰	۱۵۰	۰/۶	۱۰	۵۲/۵	۰/۳۶۰	۰/۴۱۰
۳۱	۸۰	۰/۶	۵۵	۵۲/۵	۰/۷۹۴	۰/۸۲۸

در شکل ۲ (قسمت ب) نشان داده شده است. بر این اساس، با افزایش غلظت نمک، میزان جذب افزایش می‌یابد که دلیل این امر، افزایش حجم فاز استخراجی می‌باشد. در غلظت‌های زیاد نمک، راندمان استخراج به میزان کمی کاهش می‌یابد که دلیل آن، رقیق شدن فاز استخراجی به دلیل افزایش بیش از حد حجم آن می‌باشد. با افزایش ۴-آمینوآنتی‌پیرین، میزان جذب افزایش می‌یابد که دلیل آن، تشکیل بیشتر مشتق رنگی می‌باشد.

در غلظت‌های کم بافر، با افزایش مقدار هگزاسیانوفرات، مقدار جذب افزایش می‌یابد، اما در مقادیر زیاد بافر، با افزایش مقدار هگزاسیانوفرات، تغییر معنی‌داری در جذب مشاهده نشد که این امر شسان دهنده برهم کوش بین این دو شاخص می‌باشد. همچنین، با افزایش بافر، کاهش جذب مشاهده شد. این کاهش می‌تواند به دلیل افزایش pH در مقادیر زیاد بافر باشد؛ چرا که تشکیل مشتق رنگی حاصل شده به pH وابستگی زیادی دارد. اثر بافر و ۴-آمینوآنتی‌پیرین روی میزان جذب

جدول ۳. نتایج آزمون ANOVA

منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه‌های آزادی	میانگین مربعات	F مقدار	P مقدار
Model	۲/۱۵۰۰	۱۰	۰/۲۱۴۸	۲۱/۷۰	*<۰/۰۰۰۱
A- بافر	۰/۰۸۲۵	۱	۰/۰۸۲۵	۱۲/۱۸	.۰/۰۰۲۳
B-NaCl	۰/۱۲۶۳	۱	۰/۱۲۶۳	۱۸/۶۴	.۰/۰۰۰۳
C- آمینوآنتی پیرین	۰/۸۷۴۸	۱	۰/۸۷۴۸	۱۲۹/۱۳	<۰/۰۰۰۱
D- هگزاسیانوفرات	۰/۱۶۹۲	۱	۰/۱۶۹۲	۲۲/۰۲	.۰/۰۰۰۱
AD	۰/۲۲۱۴	۱	۰/۲۲۱۴	۲۲/۶۸	.۰/۰۰۰۱
BC	۰/۰۲۱۹	۱	۰/۰۲۱۹	۲/۲۳	.۰/۰۸۷۳
BD	۰/۳۶۶۶	۱	۰/۳۶۶۶	۵۴/۱۲	<۰/۰۰۰۱
CD	۰/۰۲۵۳	۱	۰/۰۲۵۳	۳/۷۳	.۰/۰۶۷۷
B <sup>2</sup>	۰/۲۶۲۴	۱	۰/۲۶۲۴	۳۸/۷۳	<۰/۰۰۰۱
C <sup>2</sup>	۰/۰۳۰۸	۱	۰/۰۳۰۸	۴/۵۵	.۰/۰۴۵۵
Residual	۰/۱۳۵۰	۲۰	۰/۰۰۶۸		
Lack of fit	۰/۰۹۷۴	۱۴	۰/۰۰۷۰	۱/۱۰	.۰/۴۸۵۹
Pure error	۰/۰۳۸۱	۶	۰/۰۰۶۳		
Cor total	۲/۲۸۰۰	۳۰			

= ۰/۷۳۰۰ CV = ۱۱/۷۸ R<sup>2</sup> = ۰/۹۴۰۷ Adjusted R<sup>2</sup> = ۰/۹۱۱ Predicted R<sup>2</sup> = ۰/۸۵۰۲ Adeq Precision = ۲۰/۰۴۶۱

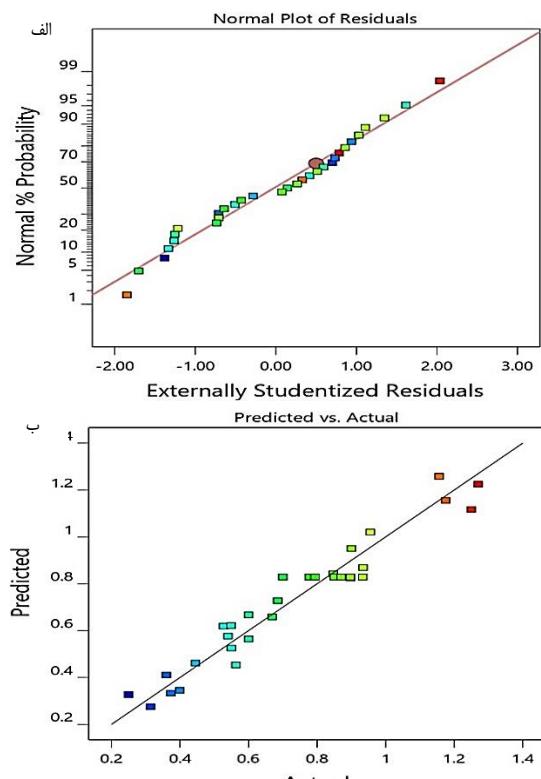
میانگین، = ۰/۰۸۲۳ انحراف معیار

طبق شکل ۲ (قسمت‌های ج و د)، با افزایش مقدار هگزاسیانوفرات، میزان جذب افزایش پیدا می‌کند که دلیل آن تشکیل بیشتر مشتق رنگی است. در شرایط بهینه، آزمایش تکرار گردید و میزان جذب در این شرایط، ۱/۲۸۵ بود که در محدود ۱/۳۹۵-۱/۱۹۷-۱/۱۹۷ درصد قرار گرفت. بنابراین، اعتبار مدل مورد تأیید قرار گرفت.

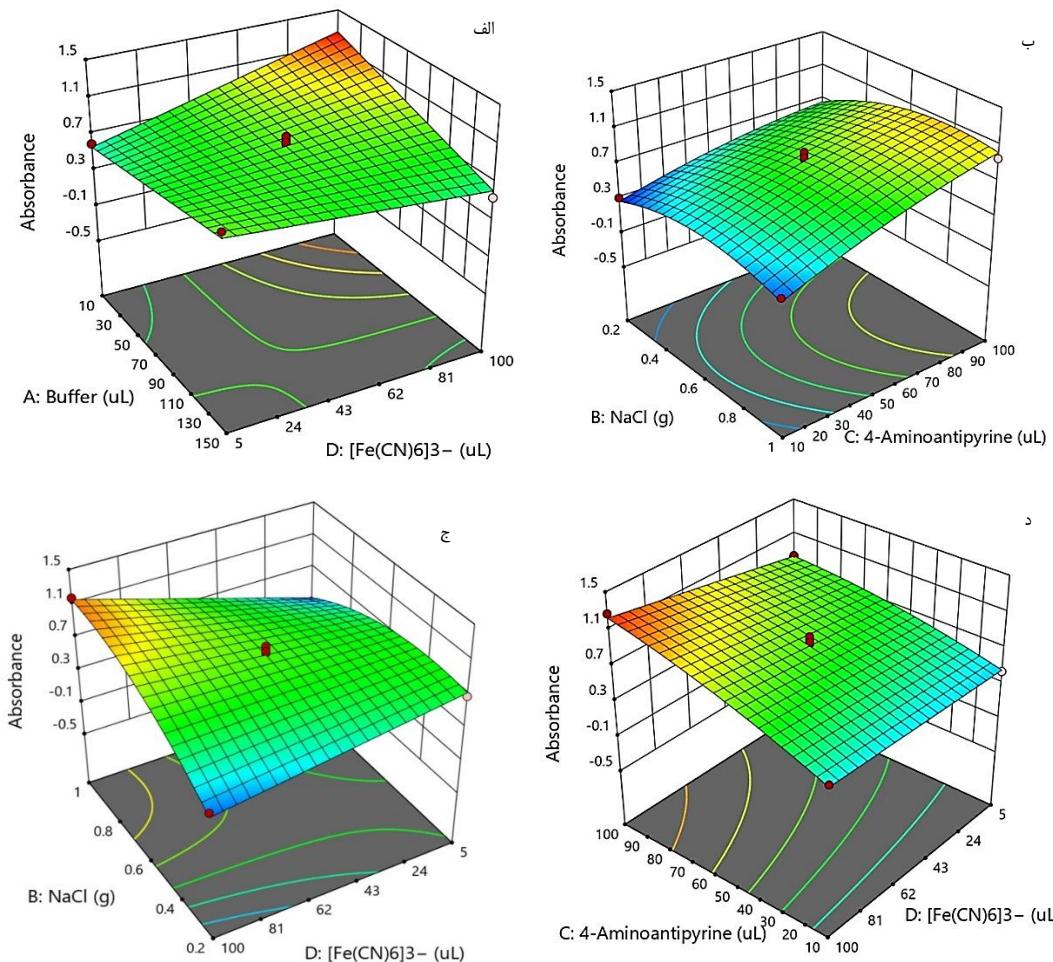
**ارقام شایستگی روش:** تحت شرایط بهینه (۲-فنوکسی اتانول: ۲۵۰ میکرولیتر، -۴-آمینوآنتی پیرین ۱ درصد: ۱۰۰ میکرولیتر، پناسیم هگزاسیانوفرات ۱۰ درصد: ۸۰ میکرولیتر و بافر H<sub>2</sub>O: ۱۰ میکرولیتر و سدیم کلرید ۰/۷ گرم بر ۱۰ میلی‌لتر نمونه)، فاکتور تقلیلی (EF) یا LOD = (Enrichment factor) = ۰/۰۶ = ۰/۰۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر، حد کمی‌سازی = ۰/۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر و انحراف معیار نسبی (RSD) یا

Relative standard deviation (RSD) درون‌روزی و برون‌روزی به ترتیب ۳/۲ و ۵/۱ درصد به دست آمد. برای محاسبه انحراف معیار برون‌روزی، آزمایش‌ها در روزهای مختلف تکرار گردید. ضمن این که ضربی همیستگی (CC) یا Correlation coefficient منحنی کالیبراسیون، ۰/۹۹۸۵ گزارش شد. تعداد تکرارها برای محاسبه انحراف معیار، ۱۰ بود. فاکتور تقلیلی از نسبت شیب منحنی کالیبراسیون بعد از پیش‌تقلیل به شیب منحنی کالیبراسیون بدون پیش‌تقلیل به دست آمد. برای به دست آوردن LOD سیگنال به نویز ۳ و برای حد کمی‌سازی سیگنال به نویز ۱۰ در نظر گرفته شد.

**آنالیز نمونه‌های حقیقی:** نمونه‌های آب لوله کشی شهری در دانشکده محیط زیست دانشگاه تهران و آب معدنی برند واتا به عنوان نمونه حقیقی استفاده شد. همچنین، پساب فاضلاب شهری از پساب خروجی تصفیه‌خانه اکباتان شهرک اکباتان تهران تهیه گردید.



شکل ۱. توزیع نرمال داده (الف) و نمودار مقادیر واقعی نسبت به مقدار پیش‌بینی شده توسط مدل (ب)



شکل ۲. سطوح پاسخ سه بعدی و اثرات تعاملی بافر با سیانو هگز افرات (الف)، نمک با آمینو آنتی پرین (ب)، نمک با

سیانو هگز افرات (ج)، آمینو آنتی پرین با سیانو هگز افرات (د)

نقاط بهینه گزارش شده توسط نرم افزار شامل ۴-آمینو آنتی پرین ۱ درصد: ۱۰۰ میکرو لیتر، پاتاسم هگراسیانوفرات ۱۰ درصد: ۸۰ میکرو لیتر، بافر pH = ۱۰ میکرو لیتر و سدیم کلرید ۷/۰۰ گرم بر ۱۰ میلی لیتر نمونه

نمونه های واقعی قابل استفاده می باشد.

**مقایسه روش تحقیق پیشنهادی با روش های دیگر:** برای مقایسه این روش با روش های دیگر، جدول ۵ تهیه گردید. در روش پیشنهادی در مقایسه با روش های SPME ذکر شده، نیاز به ساخت و سنتز جاذب نمی باشد.

نتایج آنالیز نمونه های حقیقی و نمونه های اسپایک شده در سطح غلظتی ۵۰ نانو گرم در میلی لیتر در جدول ۴ نشان داده شده است. بر این اساس، راندمان استخراج در تمام نمونه ها در محدوده  $100 \pm 5$  درصد قرار داشت. بنابراین، می توان نتیجه گیری کرد که روش پیشنهاد شده برای اندازه گیری بیس فل آ در

جدول ۴. اندازه گیری بیس فل آ در نمونه های حقیقی

نمونه	غلظت (نانو گرم در میلی لیتر)	مقدار اضافه شده میلی لیتر) (میانگین $\pm$ انحراف معیار)	مقدار اندازه گیری شده (نانو گرم در میلی لیتر) (میانگین $\pm$ انحراف معیار)	راندمان بازیافت (درصد)
آب معدنی	۹۶/۴	۴۹/۳ $\pm$ ۱/۷	۵۰/۰	۱/۱ $\pm$ ۰/۵
آب شبکه آبرسانی	۱۰۳/۸	۵۱/۹ $\pm$ ۱/۲	۵۰/۰	ND
پساب فاضلاب شهری	۱۰۴/۸	۵۶/۹ $\pm$ ۲/۲	۵۰/۰	۴/۵ $\pm$ ۰/۳

ND: Not detected

## جدول ۵. مقایسه روش تحقیق حاضر با روش‌های دیگر برای تشخیص بیس فنل آ

منبع	فاکتور تخلیط	LOD (نانوگرم در میلی‌لیتر)	روش
(۱۲)	-	.۰/۲۰	Air-assisted liquid-liquid microextraction (AALLME)
(۱۶)	۱۸۳	.۰/۲۳	microextraction (Bio-DLLME) Biosorption based dispersive liquid liquid
(۱۷)	۴۲۰۳	.۰/۰۳	Hollow-fiber-supported liquid-phase microextraction
(۱۸)	۸۹	.۰/۷۰	Dispersive liquid-liquid microextraction
(۱۹)	-	.۱/۱۰	Solid phase microextraction
پژوهش حاضر	۱۰۶	.۰/۱۰	Assisted Liquid-Liquid Microextraction Salting out

LOD: Limit of detection

معدنی و پساب فاصلاب مورد استفاده قرار گرفت. راندمان استخراج در تمام نمونه‌ها در محدوده  $۵ \pm ۱۰۰$  درصد بود. بنابراین، روش توسعه یافته عملکرد مناسبی جهت اندازه‌گیری بیس فنل آ در نمونه‌های با ماتریکس واقعی دارد. در مقایسه با دیگر روش‌های میکرواستخراج، این روش دارای LOD پایین و فاکتور تخلیط بالا می‌باشد. با توجه به عملکرد مناسب این روش در نمونه‌های واقعی، می‌توان از آن به عنوان یک روش حساس و کارآمد جهت اندازه‌گیری مقادیر بسیار پایین بیس فنل آ در نمونه‌های آب و پساب استفاده نمود.

## تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از پایان نامه مقطع دکتری تخصصی با شماره ۰۱۳۶۱۲۱۳۶۰۴۶۷۵۶۹۲۱۴۰۰۱۶۲۴۱۲۱۳۶ ارک می‌باشد. بدین وسیله از گروه شیمی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک و دانشکده محیط زیست دانشگاه تهران به جهت پشتیبانی از انجام این مطالعه، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

همچنین، سادگی روش در مقایسه با بعضی از روش‌های مندرج در جدول ۵ از دیگر مزایای این روش می‌باشد که نیاز به تجهیزات زیادی ندارد. ضمن این که LOD این روش در مقایسه با سایر روش‌ها به نسبت پایین‌تر می‌باشد.

## نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر روش SA-LLME برای اندازه‌گیری بیس فنل آ در نمونه‌های آب آشامیدنی لوله‌کشی، آب معدنی و پساب تصفیه‌خانه شهری بهینه گردید. در این روش، از فنوکسی اتانول به عنوان حلال استخراج کننده استفاده شد. با توجه به این که حلالیت فنوکسی اتانول خیلی تحت تأثیر قدرت یونی محیط می‌باشد، این ماده شرایط مناسبی برای استفاده در روش SA-LLME را دارد. در شرایط بهینه (۲-فنوکسی اتانول: ۲۵۰ میکرولیتر، ۴-آمینوآنتیپیرین: ۱۰۰ میکرولیتر، پتاسیم هگزا سیانوفرات: ۱۰ درصد: ۸۰ میکرولیتر و بافر pH: ۱۰ میکرولیتر و سدیم کلرید: ۰/۷ گرم بر ۱۰ میلی‌لیتر نمونه)، فاکتور تخلیط  $۱۰۶ = ۰/۱$  و LOD  $= ۰/۰۳$  نانوگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. این روش برای ریزاستخراج بیس فنل آ از آب آشامیدنی لوله‌کشی، آب

## References

1. Huelsmann RD, Will C, Carasek E. Determination of bisphenol A: Old problem, recent creative solutions based on novel materials. *J Sep Sci* 2021; 44(6): 1148-73.
2. Almeida S, Raposo A, Almeida-Gonzalez M, Carrascosa C. Bisphenol A: Food exposure and impact on human health. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2018; 17(6): 1503-17.
3. Bodur S, Erarpas S, Dalgıç Bozyigit G, Selali Chormey D, Oz E, Ozdogan N, et al. A sensitive determination method for trace bisphenol A in bottled water and wastewater samples: Binary solvent liquid phase microextraction-quadrupole isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry. *Microchem J* 2020; 159: 105532.
4. Parto M, Aazami J, Shamsi Z, Zamani A, Savabieasfahani M. Determination of bisphenol-A in plastic bottled water in markets of Zanjan, Iran. *Int J Environ Sci Technol* 2022; 19(4): 3337-44.
5. Yamini Y, Rezazadeh M, Seidi S. Liquid-phase microextraction - The different principles and configurations. *TrAC Trends Anal Chem* 2019; 112: 264-72.
6. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *J Chromatogr A* 2008; 1184(1-2): 132-42.
7. Sarafraz-Yazdi A, Amiri A. Liquid-phase microextraction. *TrAC Trends Anal Chem* 2010; 29(1): 1-14.
8. Dadfarnia S, Haji Shabani AM. Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals--a review. *Anal Chim Acta* 2010; 658(2): 107-19.
9. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini MR, Aghaei E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J Chromatogr A* 2006; 1116(1-2): 1-9.

10. Wang Dx, Wang Xc, Hu Qj, Zhang Cx, Li F, Wang Fl, et al. Salting-out assisted liquid-liquid extraction coupled to dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of bisphenol a and six analogs (B, E, F, S, BADGE, BFDGE) in canned coffee drinks by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Anal Methods* 2021; 14(3): 441-52.
11. Saini SS, Martini MF. A green hybrid microextraction for sensitive determination of bisphenol A in aqueous samples using three different sorbents: Analytical and computational studies. *Microchemical Journal* 2021; 160: 105612.
12. Zhou Q, Jin Z, Li J, Wang B, Wei X, Chen J. A novel air-assisted liquid-liquid microextraction based on in-situ phase separation for the HPLC determination of bisphenols migration from disposable lunch boxes to contacting water. *Talanta* 2018; 189: 116-21.
13. Rezaee M, Yamini Y, Shariati S, Esrafilii A, Shamsipur M. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-UV detection as a very simple, rapid and sensitive method for the determination of bisphenol A in water samples. *J Chromatogr A* 2009; 1216(9): 1511-4.
14. Czyrski A, Sznura J. The application of Box-Behnken-Design in the optimization of HPLC separation of fluoroquinolones. *Sci Rep* 2019; 9(1): 19458.
15. Latif A, Maqbool A, Zhou R, Arsalan M, Sun K, Si Y. Optimized degradation of bisphenol A by immobilized laccase from *Trametes versicolor* using Box-Behnken design (BBD) and artificial neural network (ANN). *J Environ Chem Eng* 2022; 10(2): 107331.
16. Haeri SA. Bio-sorption based dispersive liquid-liquid microextraction for the highly efficient enrichment of trace-level bisphenol A from water samples prior to its determination by HPLC. *J Chromatogr B Biomed Appl* 2016; 1028: 186-91.
17. Zou Y, Zhang Z, Shao X, Chen Y, Wu X, Yang L, et al. Hollow-fiber-supported liquid-phase microextraction using an ionic liquid as the extractant for the pre-concentration of bisphenol A, 17-beta-estradiol, estrone and diethylstilbestrol from water samples with HPLC detection. *Water Sci Technol* 2014; 69(5): 1028-35.
18. Lopez-Darias J, German-Hernandez M, Pino V, Afonso AM. Dispersive liquid-liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters. *Talanta* 2010; 80(5): 1611-8.
19. Nerin C, Philo MR, Salafranca J, Castle L. Determination of bisphenol-type contaminants from food packaging materials in aqueous foods by solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2002; 963(1-2): 375-80.

