DOI: 10.22122/jhsr.v14i3.3232 Published by Vesnu Publications

آیا روش ساده، سریع و مقرون به صرفه‌تری برای استخراج ترانس– ترانس موکونیک اسید به عنوان متابولیت بنزن وجود دارد؟

زهرا اردودری[۱]، مسعود ریسمانچیان[۲]، کریم ابراهیم‌پور[۳]

مقاله مروری

چکیده

مقدمه: در بین هیدروکربن‌های آروماتیک، بنزن به عنوان ماده سرطان‌زایی که بیشترین خطر را برای سلامتی دارد، شناخته شده است. ترانس، ترانس موکونیک اسید (trans,trans-muconic acid یا t,t-MA) محصول غیر سمی متابولیسم بنزن می‌باشد. هدف از انجام مطالعه حاضر، انتخاب روشی ساده، سریع و مقرون به صرفه برای تشخیص و استخراج t,t-MA بود.

روش‌ها: در این مطالعه مروری، روش‌های موجود برای استخراج t,t-MA در ادرار بررسی و در نهایت، روش دقیق و مقرون به صرفه‌تری پیشنهاد گردید.

یافته‌ها: با مرور متون مربوط، چهار روش Solid-phase extraction (SPE)، Liquid-liquid extraction (LLE)، Molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) و Dispersive liquid-liquid micro-extraction (DLLME) برای استخراج t,t-MA یافت گردید.

نتیجه‌گیری: با مرور مزایا و معایب روش‌های مذکور، می‌توان به این نتیجه رسید که روش DLLME با ریکاوری بالا و کاربرد آسان، روش بهتری برای تشخیص t,t-MA در ادرار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: پایش بیولوژیکی، ترانس، ترانس موکونیک اسید، ادرار، روش‌های استخراجی

ارجاع: زهرا اردودری، مسعود ریسمانچیان، کریم ابراهیم‌پور. **آیا روش ساده، سریع و مقرون به صرفه‌تری برای استخراج ترانس- ترانس موکونیک اسید به عنوان متابولیت بنزن وجود دارد؟** مجله تحقیقات نظام سلامت ۱۳۹۷؛ ۱۴ (۳): ۲۸۴-۲۷۹

دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۵/۳۰ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۸/۷ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۷/۱۵

مقدمه

در بین هیدروکربن‌های آروماتیک، مواجهه با بنزن بیشترین خطر را برای سلامتی به همراه دارد و به عنوان گروه یک مواد سرطان‌زا شناخته شده است. منبع عمده تماس با بنزن، احتراق سوخت‌ها، تبخیر حلال‌ها و دود تنباکو می‌باشد (۱). مواجهات شغلی با بنزن در صنایع پتروشیمی، رنگ‌سازی، نیروگاه‌ها، صنایع تولید حشره‌کش‌ها، خشک‌شویی‌ها، جایگاه‌های سوخت، صنایع چاپ، تولید کفش، تولید چسب صنعتی، تولید مواد لاستیکی و تولید سایر موادی که نیازمند استفاده از حلال‌های آلی و یا چسب‌های حاوی بنزن باشد، رخ می‌دهد. مواجهه محیطی با بنزن در عموم افراد به طور عمده ناشی از استنشاق بخارات بنزن است (۲).

اداره بهداشت و ایمنی ایالت متحده آمریکا، حد مجاز مواجهه با بنزن را ۱ ppm و غلظت متوسط وزنی- زمانی را ۰/۱ ppm اعلام کرده است (۳). شاخص مواجهه بیولوژیکی بنزن نیز ۰/۵ میلی‌گرم بر گرم کراتینین می‌باشد (۴). استنشاق زیاد بنزن به سرعت موجب سردرد، خستگی، گیجی و حالت تهوع می‌شود. تحقیقات نشان داده است که مواجهه با بنزن می‌تواند بر روی اعصاب، ژن‌ها و خون آثار سمی داشته باشد (۵). ارایه روش تجزیه‌ای مناسب برای اندازه‌گیری مقدار ترانس، ترانس موکونیک اسید (trans,trans-Muconic Acid یا t,t-MA) در ادرار به جهت ارزیابی‌های پزشکی و کلینیکی اهمیت زیادی دارد (۶).

در تلاش برای رسیدن به روش‌های استخراجی مناسب، چندین تکنیک معرفی شده است که از آن جمله می‌توان به روش‌های Molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE)، Dispersive liquid-liquid micro-extraction (DLLME)، Solid-phase extraction (SPE) و Liquid–liquid extraction (LLE) اشاره کرد (۹-۷، ۳).

هدف از انجام پژوهش حاضر، مرور روش‌های استخراج t,t-MA و در نهایت، انتخاب روشی ساده، سریع و ارزان بود.

روش‌ها

با مرور متونی که به استخراج t,t-MA پرداخته‌اند، چهار روش عمده برای استخراج آن یافت گردید که در ادامه به مرور هر یک پرداخته شد.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، کمیته تحقیقات دانشجویی و گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده مسؤول: مسعود ریسمانچیان
Email: rismanchian@hlth.mui.ac.ir

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2026-11-16]
[DOR: 20.1001.1.17352363.1397.14.3.2.6]
[DOI: 10.22122/jhsr.v14i3.3232]

Scherer و همکاران t,t-MA را با استفاده از روش LLE (۱ میلی‌لیتر ادرار با pH = ۳ و ۲ × ۲۰ میلی‌لیتر دی‌اتیل اتر) استخراج نمودند (۹).

Lee و همکاران در تحقیق خود، کسری از ادرار اسیدی شده را با وانیلیک اسید و هیدروژن کلرید مخلوط کردند. پس از سانتریفوژ، نمونه از میان جاذب MAX عبور داده شد و جاذب با ۱ میلی‌لیتر متانول و ۱ میلی‌لیتر آب آماده شد. سپس با آمونیاک- متانول و اتیل استات خالص شستشو گردید. کارتریج تحت شرایط خلأ خشک شد. آنالیت با فرمیک اسید- اتیل استات جمع‌آوری و نمونه با کمک نیتروژن خشک شد. باقی‌مانده خشک شده در اورتوفسفریک اسید و متانول بازسازی شد. ماده استخراج شده به میکرو ویال ۲۰ میکرولیتری انتقال داده شد و تزریق گردید (۸).

Mudiam و همکاران از ترکیب Molecular-imprinted polymer (MIP) و Ethyl chloroformate برای استخراج و از DLLME برای پیش تغلیظ استفاده نمودند. آن‌ها از ۱ میلی‌لیتر اتانول و ۸۰ میکرولیتر تری‌کلرواتیلن جهت استخراج استفاده کردند (۷).

Chauhan و همکاران از روش MISPE برای استخراج t,t-MA استفاده کردند. در روش مذکور ابتدا کارتریج خالی SPE با ۱۵۰ میلی‌گرم پلیمر پر شد و سپس بستر جاذب با آب و استیک اسید آماده گردید. ادرار از پلیمر جاذب عبور داده و سپس با آب و استون شسته شد. متابولیت‌های باقی‌مانده در جاذب MIP با مخلوط اتانول و متانول رقیق و کسری از نمونه تحت خلأ خشک گردید و باقی‌مانده با استونیتریل ترکیب شد و به گاز کروماتوگرافی (Gas chromatography یا GC) تزریق گردید (۳).

یافته‌ها

از جمله روش‌های موجود برای استخراج t,t-MA می‌توان به LLE، micro-extraction liquid-liquid Dispersive (DLLME)، MISPE و SPE اشاره کرد (۱۵-۱۰، ۸، ۷، ۵، ۳). زمان استخراج SPE در مطالعات قبلی بیش از ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه (۱۸-۱۶) گزارش شده است؛ در حالی که زمان استخراج در روش DLLME، کوتاه‌تر می‌باشد. مقایسه روش‌های مذکور با روش پیشنهاد شده در جدول ۱ ارایه شده است.

بحث

مطالعه حاضر به مرور روش‌های موجود برای استخراج t,t-MA پرداخت. روش استخراج LLE از جمله قدیمیترین و زمان‌برترین روش‌های آماده‌سازی نمونه‌ها می‌باشد (۲۰، ۱۹) و به مقدار زیادی حلال آلی سمی و خطرناک نیاز دارد (۲۱). روش استخراج SPE نسبت به LLE به مقدار خیلی کمتری حلال نیاز دارد، اما تا حدودی پرهزینه است (۲۰) و مصرف بالای حلال و مسدود شدن لوله در حین استفاده، زمان‌بر بودن (۲۲) و استخراج هم‌زمان مداخله‌گرها (۲۱) از معایب آن محسوب می‌گردد. در نتیجه، روش SPME توسعه یافت. هرچند این روش نیز پرهزینه است، فیبر آن عمر محدودی دارد (۲۰) و نیازمند تبخیر حلال (۱۹) و لوازم مخصوص گرانی می‌باشد (۶)، اما یکی از روش‌های آماده‌سازی بدون حلال محسوب می‌شود.

با توجه به معایب روش‌های موجود، در سال‌های اخیر روش DLLME مطرح گردید. این روش شامل دو مرحله «تزریق سریع ترکیب مناسبی از حلال‌های استخراج‌کننده و پخش‌کننده به نمونه حاوی آنالیت و فرایند گریز از مرکز محلول ابری شکل» می‌باشد (۲۳). ماهیت حلال استخراج‌کننده و پخش‌کننده، حجم استخراج‌کننده و پخش‌کننده و زمان استخراج، پنج متغیری است که در روش DLLME دخالت دارند (۱۹). حلال‌ها بر اساس چگالی بالاتر نسبت به آب، قابلیت در استخراج ترکیب‌های مورد نظر و رفتار کروماتوگرافیک مناسب انتخاب می‌شوند. یکی از ویژگی‌های مهم در انتخاب پراکنده‌کننده این است که بدون از دست دادن خواص خود، قابلیت ترکیب و اختلاط داشته باشد. زمان استخراج در فرایند DLLME به زمان بین تزریق مخلوط حلال استخراج‌کننده و پخش‌کننده تا قبل از شروع سانتریفوژ گفته می‌شود. روش مذکور به زمان بستگی ندارد و این امر مهم‌ترین مزیت این تکنیک به شمار می‌رود (۲۰). ضمن این که از pH نمونه، زمان و سرعت سانتریفوژ هم می‌توان به عنوان عوامل تأثیرگذار روی راندمان نام برد (۶).

از جمله مزایای روش DLLME می‌توان به سادگی کاربرد، سرعت بالا، زمان استخراج کم، هزینه کم، بازدهی بالا و فاکتور تغلیظ اشاره نمود (۲۰). از معایب آن هم محدودیت در انتخاب حلال استخراج‌کننده مناسب و لزوم استفاده از سانتریفوژ، انجماد و یا حلال کمکی می‌باشد (۲۴).

نتیجه‌گیری

پژوهش حاضر با مرور روش‌های موجود برای استخراج t,t-MA، به این نتیجه دست یافت که روش جدید DLLME با داشتن حد تشخیص (LOD یا Limit of detection)، حد سنجش (Limit of quantitation یا LOQ) و ریکاوری نسبی بالاتر نسبت به سایر تکنیک‌ها، کارایی بالاتری دارد. مصرف مواد سمی در این روش نسبت به سایر روش‌ها خیلی کم می‌باشد و به دنبال آن، فاضلاب کمتری نیز تولید می‌گردد. ضمن این که تشخیص مقادیر ناچیز، کاربرد آسان‌تر، زمان استخراج کوتاه‌تر، هزینه پایین‌تر، سرعت بالاتر و دوستدار محیط زیست بودن، از دیگر مزایای این روش به شمار می‌رود.

دقت درون روزی و بین روزی، تکرارپذیری و ریکاوری نسبی مناسب و طیف خطی گسترده روش DLLME نشان داد که نسبت به سایر روش‌ها ارزان‌تر، ساده‌تر و سریع‌تر و برای استخراج t,t-MA به راحتی قابل کاربرد است. همچنین، می‌تواند برای آنالیزهای کلینیکی معمول و مقاصد سم‌شناسی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی با شماره ۳۹۴۱۰۴۱، مصوب دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. بدین وسیله نویسندگان از تمام کسانی که در انجام این مطالعه همکاری نمودند، تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2026-11-16]
[DOR: 20.1001.1.17352363.1397.14.3.2.6]
[DOI: 10.22122/jhsr.v14i3.3232]

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2026-11-16]

[DOR: 20.1001.1.17352363.1397.14.3.2.6]

[DOI: 10.22122/jhsr.v14i3.3232]

جدول ۱. مقایسه روش‌های پیشنهاد شده برای استخراج trans,trans-Muconic Acid (t,t-MA)

روش	دستگاه تجزیه‌کننده	مواد مورد نیاز برای استخراج	طیف خطی	ریکاوری نسبی (درصد)	LOD	LOQ	انحراف استاندارد نسبی		منابع
							دقت درون روزی (تعداد = ۳)	دقت بین روزی (تعداد = ۳)	
MISPE	GC-MS/MS	حلال، کارتریج SPE و آماده‌سازی MIP	۵–۱۰۰۰۰ (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	۸۶/۲۱–۸۸/۷۳	۱/۲ (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	۳/۶ (نانوگرم بر میلی‌لیتر)	۵/۵–۶/۳	۳/۵–۴/۱	۳
DLLME	GC-MS	حلال	۰/۱۲۵–۲ (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۸۳/۴–۹۴/۸	۰/۰۳۷ (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۰/۱۰۹ (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	۵/۱	۳/۶	۷
SPE	HPLC-UV	جاذب و حلال	۵–۵۰۰ (میکروگرم بر لیتر)	۸۴–۹۹	۵ (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	–	۲/۰–۷/۱	۳/۹–۹/۷	۸
SPE	HPLC-UV	جاذب و حلال	۰/۰۵–۰/۱ (میلی‌گرم بر لیتر)	۹۱/۱۲–۹۳/۳۶	۰/۰۲۵ (میلی‌گرم بر لیتر)	–		۳/۲	۵
LLE	HPLC-UV	مقدار حلال زیاد	–	۳۷	–	–			۹
LLE	HPLC-UV	مقدار حلال زیاد	–	۹۰	–	–			۹

LOD: Limit of detection; LOQ: Limit of quantitation; MISPE: Molecularly imprinted solid-phase extraction; DLLME: Dispersive liquid-liquid micro-extraction; SPE: Solid-phase extraction; LLE: Liquid-liquid extraction; HPLC-UV: High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet; GC-MS: Gas chromatography–mass spectrometry

References

1. Brocco D, Fratarcangeli R, Lepore L, Petricca M, Ventrone I. Determination of aromatic hydrocarbons in urban air of Rome. Atmos Environ 1997; 31(4): 557-66.
2. Weisel CP. Benzene exposure: An overview of monitoring methods and their findings. Chem Biol Interact 2010; 184(1-2): 58-66.
3. Chauhan A, Bhatia T, Gupta MK, Pandey P, Pandey V, Saxena PN, et al. Imprinted nanospheres based on precipitation polymerization for the simultaneous extraction of six urinary benzene metabolites from urine followed by injector port silylation and gas chromatography-tandem mass spectrometric analysis. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2015; 1001: 66-74.
4. Lin LC, Chiung YM, Shih JF, Shih TS, Liao PC. Validation of an online dual-loop cleanup device with an electrospray ionization tandem mass spectrometry-based system for simultaneous quantitative analysis of urinary benzene exposure biomarkers trans, trans-muconic acid and S-phenylmercapturic acid. Anal Chim Acta 2006; 555(1): 34-40.
5. Wiwanitkit V, Suwansaksri J, Soogarun S. Monitoring of urine trans, trans-muconic acid level among smokers and non-smokers. Respir Med 2005; 99(6): 788-91.
6. Sun JN, Shi YP, Chen J. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography for sensitive determination of trace celastrol in urine. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2011; 879(30): 3429-33.
7. Mudiam MK, 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(1): 341-9.
8. Lee BL, Ong HY, Ong YB, Ong CN. A sensitive liquid chromatographic method for the spectrophotometric determination of urinary trans, trans-muconic acid. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2005; 818(2): 277-83.
9. Scherer G, Renner T, Meger M. Analysis and evaluation of trans,trans-muconic acid as a biomarker for benzene exposure. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1998; 717(1-2): 179-99.
10. Lee BL, New AL, Kok PW, Ong HY, Shi CY, Ong CN. Urinary trans,trans-muconic acid determined by liquid chromatography: Application in biological monitoring of benzene exposure. Clin Chem 1993; 39(9): 1788-92.
11. Ducos P, Gaudin R, Robert A, Francin JM, Maire C. Improvement in HPLC analysis of urinary trans,trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. Int Arch Occup Environ Health 1990; 62(7): 529-34.
12. Boogaard PJ, van Sittert NJ. Biological monitoring of exposure to benzene: A comparison between S-phenylmercapturic acid, trans,trans-muconic acid, and phenol. Occup Environ Med 1995; 52(9): 611-20.
13. Ong CN, Kok PW, Ong HY, Shi CY, Lee BL, Phoon WH, et al. Biomarkers of exposure to low concentrations of benzene: A field assessment. Occup Environ Med 1996; 53(5): 328-33.
14. Buratti M, Fustinoni S, Colombi A. Fast liquid chromatographic determination of urinary trans,trans-muconic acid. J Chromatogr B Biomed Appl 1996; 677(2): 257-63.
15. Gobba F, Rovesti S, Borella P, Vivoli R, Caselgrandi E, Vivoli G. Inter-individual variability of benzene metabolism to trans,trans-muconic acid and its implications in the biological monitoring of occupational exposure. Sci Total Environ 1997; 199(1-2): 41-8.
16. Carabias-Martinez R, Rodriguez-Gonzalo E, Herrero-Hernandez E, Hernendez-Mendez J. Simultaneous determination of phenyl-and sulfonylurea herbicides in water by solid-phase extraction and liquid chromatography with UV diode array or mass spectrometric detection. Anal Chim Acta 2004; 517(1): 71-9.
17. Dams R, Benijts T, Lambert WE, De Leenheer AP. Simultaneous determination of in total 17 opium alkaloids and opioids in blood and urine by fast liquid chromatography-diode-array detection-fluorescence detection, after solid-phase extraction. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002; 773(1): 53-61.
18. Rezaei B, Damiri S. Development of a voltammetric procedure for assay of thebaine at a multi-walled carbon nanotubes electrode: Quantification and electrochemical studies. J Solid State Electrochem 2010; 14(6): 1079-88.
19. Zuloaga O, Olivares M, Navarro P, Vallejo A, Prieto A. Dispersive liquid-liquid microextraction: Trends in the analysis of biological samples. Bioanalysis 2015; 7(17): 2211-25.
20. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini MR, Aghaee 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.
21. Chou TY, Lin SL, Fuh MR. Determination of phenylurea herbicides in aqueous samples using partitioned dispersive liquid-liquid microextraction. Talanta 2009; 80(2): 493-8.
22. Moradi M, Yamini Y, Baheri T. Analysis of abuse drugs in urine using surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction. J Sep Sci 2011; 34(14): 1722-9.

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2026-11-16]

[DOR: 20.1001.1.17352363.1397.14.3.2.6]

[DOI: 10.22122/jhsr.v14i3.3232]

23. Rezaee M, Yamini Y, Faraji M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. J Chromatogr A 2010; 1217(16): 2342-57.
24. Spietelun A, Marcinkowski L, de la Guardia M, Namiesnik J. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. Talanta 2014; 119: 34-45.

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2026-11-16]
[DOR: 20.1001.1.17352363.1397.14.3.2.6]
[DOI: 10.22122/jhsr.v14i3.3232]

DOI: *10.22122/jhsr.v14i3.3232* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Health System Research **Vol. 14, No. 3, Autumn**

Received: 21.08.2017 Accepted: 26.09.2017 Published: 07.10.2018

Is There a Simpler, Rapider, and More Economical Method for Extracting trans,trans-Muconic Acid (T,T-MA) as Benzene Metabolite?

Zahra Ordudari[1], Masoud Rismanchian[2], Karim Ebrahimpour[3]

Review Article

Abstract

Background: Among aromatic hydrocarbons, exposure to benzene, as a known carcinogen, has the highest health risk. trans,trans-muconic acid (tt-MA) is a non-toxic product of benzene metabolism. This study aimed to select a simple, rapid, and more economical method for determination of t,t-MA.

Methods: This study reviewed some reported methods for extraction of t,t-MA from urine samples in order to propose the most cost-effective one.

Findings: After reviewing some related literatures, four methods solid-phase extraction (SPE), liquid-liquid extraction (LLE), molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE), and dispersive liquid-liquid micro-extraction (DLLME) were found for extraction of t,t-MA.

Conclusion: After surveying the advantages and disadvantages of the mentioned methods, it was found that the DLLME method can be considered as one of the most appropriate methods for detecting t,t-MA in the urine samples, due to its high recovery and easy application.

Keywords: Bio Monitoring, Trans,trans-muconic acid, Urine, Extraction methods

Citation: Ordudari Z, Rismanchian M, Ebrahimpour K. **Is There a Simpler, Rapider, and More Economical Method for Extracting trans,trans-Muconic Acid (T,T-MA) as Benzene Metabolite?** J Health Syst Res 2018; 14(3): 279-84.

1- MSc Student, Student Research Committee AND Department of Occupational Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Assistant Professor, Department of Occupational Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Masoud Rismanchian, Email: rismanchian@hlth.mui.ac.ir

[Downloaded from hsr.mui.ac.ir on 2026-11-16]
[DOR: 20.1001.1.17352363.1397.14.3.2.6]
[DOI: 10.22122/jhsr.v14i3.3232]