

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

زهرا اردودری^۱، مسعود رسماچیان^۲، کریم ابراهیمپور^۳

مقاله موردنی

چکیده

مقدمه: در بین هیدروکربن‌های آروماتیک، بنزن به عنوان ماده سرطان‌زا برای سلامتی دارد، شناخته شده است. ترانس، ترانس موکونیک اسید (trans,trans-muconic acid) یا t,t-MA محصول غیر سمتی 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 مروط، 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 SPE (Solid-phase extraction)، LLE (Liquid-liquid extraction)، DLLME (Dispersive liquid-liquid micro-extraction) و MISPE (Molecularly imprinted solid-phase extraction) 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 رسماچیان، 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 ۱۴؛ ۱۳۹۷: ۲۸۴-۲۷۹.

تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۷/۱۵

پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۸/۷

دربافت مقاله: ۱۳۹۶/۵/۳۰

و خون آثار سمتی داشته باشد (۵). ارایه روش تجزیه‌ای مناسب برای اندازه‌گیری مقدار ترانس، ترانس موکونیک اسید (trans,trans-Muconic Acid) 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 (MISPE) Molecularly imprinted solid-phase extraction، (DLLME) Dispersive liquid-liquid micro-extraction، (LLE) Liquid-liquid extraction و (SPE) Solid-phase extraction اشاره کرد (۳، ۷-۹). هدف از انجام پژوهش حاضر، مروج 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 عمدۀ برای استخراج آن یافت گردید که در ادامه به مرور هر یک پرداخته شد.

مقدمه

در بین هیدروکربن‌های آروماتیک، مواجهه با بنزن بیشترین خطر را برای سلامتی به همراه دارد و به عنوان گروه یک ماده سرطان‌زا شناخته شده است. منع عمدۀ تماس با بنزن، احتراق سوخت‌ها، تبخیر حلال‌ها و دود تباکو می‌باشد (۱). مواجهات شغلی با بنزن در صنایع پتروشیمی، رنگ‌سازی، نیروگاه‌ها، صنایع تولید حشره‌کش‌ها، خشک‌شوی‌ها، 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، رخداد می‌دهد. مواجهه محیطی با بنزن در عموم افراد به طور عمدۀ 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 میلی گرم 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

- دانشجویی کارشناسی ارشد، کمیته تحقیقات دانشجویی و گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- استادیار، گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: rismanchian@hlth.mui.ac.ir

نویسنده مسؤول: مسعود رسماچیان

و لوازم مخصوص گرانی می‌باشد (۶)، اما یکی از روش‌های آماده‌سازی بدون حلال محسوب می‌شود.

DLLME با توجه به معایب روش‌های موجود، در سال‌های اخیر روش DLLME مطرح گردید. این روش شامل دو مرحله «تزریق سریع ترکیب مناسبی از حلال‌های استخراج کننده و پخش کننده به نمونه حاوی آنالیت و فرایند گریز از مرکز محلول ابری شکل» می‌باشد (۲۳). ماهیت حلال استخراج کننده و پخش کننده، حجم استخراج کننده و پخش کننده 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 پراکنده کننده 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 استخراج کننده و پخش کننده تا قبل از شروع سانتریفیوژ گفته می‌شود. روش مذکور به زمان سستگی ندارد و این امر مهم‌ترین مزیت این تکنیک به شمار می‌رود (۲۰). ضمن این که از pH نمونه، زمان و سرعت سانتریفیوژ 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 تقلیل اشاره نمود (۲۰). از معایب آن هم محدودیت در انتخاب حلال استخراج کننده مناسب و لزوم استفاده از سانتریفیوژ، 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 Limit of quantitation (LOQ) یا (LOD)، حد سنجش (SPE) با این ترتیب (LOQ) و ریکاوری نسبی بالاتر نسبت به سایر تکنیک‌ها، کارایی بالاتر دارد. مصرف مواد سرمی 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 گستره 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 سه‌شناختی استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

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

LLE و همکاران Scherer t,t-MA را با استفاده از روش (۱) میلی‌لیتر ادرار با $3 = \text{pH}$ و 20×2 میلی‌لیتر دی‌ایتل 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 سانتریفیوژ، 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. کارتريج تحت شرایط خلاً خشک شد. آنالیت با فرمیک اسید- اتیل استات جمع آوری 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).

Molecular-imprinted polymer Mudiam (MIP) برای استخراج و از DLLME تغليظ استفاده نمودند. آن‌ها از ۱ میلی‌لیتر اتانول و ۸۰ میکرولیتر تری‌کلرواتیلن جهت استخراج استفاده کردند (۷).

t,t-MA Chauhan و همکاران از روش MISPE برای استخراج استفاده کردند. در روش مذکور ابتدا کارتريج 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. متابولیتهاي باقی‌مانده در جاذب MIP با مخلوط اتانول و متانول رقیق و کسری از نمونه تحت خلاً خشک گردید و باقی‌مانده با استونیتریبل ترکیب شد و به گاز کروماتوگرافی (GC) یا Gas chromatography (GC) تزریق گردید (۳).

یافته‌ها

از جمله روش‌های موجود برای استخراج t,t-MA می‌توان به LLE، DLLME (Dispersive liquid-liquid micro-extraction SPE و MISPE اشاره کرد (۱۰-۱۵)، زمان استخراج در مطالعات قبلی بیش از ۲۰، ۲۵، ۳۵، ۴۰ و ۶۰ دقیقه (۱۶-۱۸) 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 زمان برترین روش‌های آماده‌سازی نمونه‌ها می‌باشد (۱۹، ۲۰) و به مقدار زیادی حلال آبی سمی و خط‌نمای نیاز دارد (۲۱). روش استخراج SPE به مقادیر خیلی کمتری حلال نیاز دارد، اما تا حدودی پرهزینه است (۲۰) و مصرف بالای حلال و مسدود شدن لوله در حین استفاده، زمان بر بودن (۲۲) و استخراج همزمان مداخله گرها (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)

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

منابع	انحراف استاندارد نسبی			LOQ	LOD	ریکاوری نسبی (درصد)	طیف خطی	مواد مورد نیاز برای استخراج	دستگاه تجزیه کننده	روش
	دقت درون روزی (تعداد = ۳)	دقت بین روزی (تعداد = ۳)	دقت درون روزی (تعداد = ۳)							
۳	۲/۵-۴/۱	۵/۵-۶/۳	۲/۶	۱/۲	۸۶/۲۱-۸۸/۷۳	۵-۱۰۰۰	حلال، کارتیج SPE و MIP آماده‌سازی	GC-MS/MS	MISPE	
۷	۲/۶	۵/۱	۰/۱۰	۰/۰۳۷	۸۳/۴-۹۴/۸	۰/۱۲۵-۲	حلال	GC-MS	DLLME	
۸	۳/۹-۹/۷	۲/۰-۷/۱	-	۵	۸۴-۹۹	۵-۵۰۰	جادب و حلال	HPLC-UV	SPE	
۵	۳/۲	-	-	۰/۰۲۵	۹۱/۱۲-۹۳/۳۶	۰/۰۵-۰/۱	جادب و حلال	HPLC-UV	SPE	
۹	-	-	-	-	۳۷	-	مقدار حلال زیاد	HPLC-UV	LLE	
۹	-	-	-	-	۹۰	-	مقدار حلال زیاد	HPLC-UV	LLE	

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

- 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.
- Weisel CP. Benzene exposure: An overview of monitoring methods and their findings. *Chem Biol Interact* 2010; 184(1-2): 58-66.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Carabias-Martinez R, Rodriguez-Gonzalo E, Herrero-Hernandez E, Hernandez-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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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

Zahra Ordudari¹, Masoud Rismanchian², Karim Ebrahimpour³

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