



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه شهید بهشتی  
پژوهشکده‌ی علوم محیطی  
گروه فناوری های محیط زیست

پایان نامه برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد  
رشته‌ی مهندسی منابع طبیعی - محیط زیست، گرایش آلودگی های محیط زیست

## عنوان

توسعه و بهینه سازی میکرواستخراج فاز جامد همراه با کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی  
جرمی برای تعیین مقدار پارابن ها در محیط های آبی

نگارش

رهام عسکری

استاد راهنما

دکتر امیر سالمی

اسفند ماه

۱۴۰۰

تقدیر و سپاس

تختین سپاس و ستایش از آن خداوندیست که بنده می کوچکش را در دریای سیکران اندیشه، قطره ای ساخت تا وسعت آن را از دریچه اندیشه های ناب آموزگارانی بزرگ به تماشا شنیدم.

بر خود لازم میدانم تا مراتب سپاس را از بزرگوارانی به جا آورم که اگر دست یاریکشان نبود این پایان نامه به انجام نمیرسید؛ از استاد فریخته وار جنم جناب آقای دکتر امیر سالمی که در کمال حسن خلق و فروتنی بایاری ها و راهنمایی های ارزشمند و بی دریغ شان بهواره راحکشی من بودند، نهایت سپاس و قدردانی را دارم و از خداوند منان، سلامت و سعادت ایشان را خواستارم. از سرکار خانم دکتر ناز امیری کرم که زحمت مشاوره این پایان نامه را بر عهده داشتند، سپاس فراوان دارم. از اساتید کرامی سرکار خانم دکتر مریم وثوق و جناب آقای دکتر یوسف رشیدی که زحمت داوری این پایان نامه را قبول کردند کمال تشکر را دارم.

و در آخر از تمامی کسانی که بود نشان در کنارم باعث حرکت و تقاضا و امید به آینده می گردید، سپاسگزارم.

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات

و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه

متعلق به **دانشگاه شهید بهشتی** می باشد.

تعهدنامه اصالت رساله يا پايان نامه

به نام خدا

نام و نام خانوادگی: رهام عسکری

عنوان پایان‌نامه: توسعه و بهینه سازی میکرواستخراج فاز جامد همراه با کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی برای تعیین مقدار پارابن‌ها در محیط‌های آبی

استاد راهنما: دکتر امیر سالمی

اینجانب رهام عسکری تهیه کننده پایان نامه کارشناسی ارشد حاضر، خود را ملزم به حفظ امانت‌داری و قدردانی از زحمات سایر محققان و نویسندگان بنا بر قانون Copyright می‌دانم. بدین وسیله اعلام می‌نمایم که مسئولیت کلیه مطالب درج شده در این پایان نامه با اینجانب می‌باشد و در صورت استفاده از اشکال، جداول و مطالب سایر منابع، بلافاصله مرجع آن ذکر شده و سایر مطالب از کار تحقیقاتی اینجانب استخراج گردیده است و امانت‌داری را به صورت کامل رعایت نموده‌ام. در صورتی که خلاف این مطلب ثابت شود، مسئولیت کلیه عواقب قانونی با شخص اینجانب می‌باشد.

## فهرست مطالب

صفحه	عنوان
	فصل یک
۱-۱-۱-۱	مقدمه ..... ۲
۱-۲-۱	بیان مسئله و اهمیت موضوع ..... ۳
۱-۳-۱	وجوه تمایز ..... ۳
۱-۴-۱	اهداف طرح ..... ۴
۱-۵-۱	فرضیه های طرح ..... ۴
۱-۶-۱	روش اجرای طرح ..... ۴
	فصل دوم
۱-۲-۱	پارابن ها ..... ۷
۲-۲-۱	تولید پارابن ها ..... ۹
۳-۲-۱	در معرض قرار گیری انسان ..... ۹
۴-۲-۱	تاثیر بر سلامت انسان ..... ۱۱
۱-۴-۲-۱	اثرات پارابن بر روی پوست ..... ۱۱
۲-۴-۲-۱	اختلال در عملکرد غدد درون ریز ..... ۱۲
۵-۲-۱	تاثیر بر محیط زیست ..... ۱۳
۶-۲-۱	جایگزین پارابن ها ..... ۱۴
۲-۲-۱	انواع روش های متداول استخراج ..... ۱۵
۱-۱-۲-۲-۱	ریز استخراج فاز جامد SPME ..... ۱۵
۲-۱-۲-۲-۱	ویژگی های فیبر ..... ۱۷
۲-۲-۲-۱	استخراج فاز جامد SPE ..... ۱۹
۳-۲-۲-۱	ریز استخراج مایع- مایع پخشی DLLME ..... ۲۰
۴-۲-۲-۱	استخراج مگنت چرخان SBSE ..... ۲۱
۵-۲-۲-۱	استخراج با مایع پر فشار PLE ..... ۲۱
۶-۲-۲-۱	میکرو استخراج فاز مایع LPME ..... ۲۲



۲۲	..... کروماتوگرافی گازی- طیف سنج جرمی
۲۳	..... ۱-۳-۲- انواع روش های مشتق سازی برای تعیین پارابن ها
۲۳	..... ۱-۱-۳-۲- روش های مبتنی بر مشتق سازی با استیلاسیون
۲۳	..... ۲-۱-۳-۲- روش های مبتنی بر مشتق سازی با واکنشگر سیلیله کننده
۲۳	..... ۳-۱-۳-۲- روش های بدون مشتق سازی
۲۴	..... ۲-۳-۲- کروماتوگراف گازی
۲۶	..... ۲-۳-۲- طیف سنج جرمی
۲۷	..... ۱-۲-۳-۲- یونیزاسیون
۲۸	..... ۲-۲-۳-۲- تجزیه گر چهارقطبی یا کوادرپل
۲۸	..... ۴-۲- طراحی آزمایش و طرح مرکب مرکزی
	فصل سوم
۳۲	..... ۱-۳- مقدمه
۳۲	..... ۲-۳- مواد شیمیایی مورد استفاده
۳۲	..... ۳-۳- وسایل مورد استفاده
۳۳	..... ۴-۳- تجهیزات مورد استفاده
۳۳	..... ۵-۳- نرم افزار های مورد استفاده
۳۳	..... ۶-۳- شرایط جداسازی کروماتوگرافی گازی
۳۴	..... ۷-۳- تهیهی نمونه اسپاسک و محلول استاندارد ذخیره
۳۴	..... ۸-۳- روش استخراج
	فصل چهارم
۳۷	..... ۱-۴- مقدمه
۳۷	..... ۲-۴- بهینه سازی استخراج
۳۷	..... ۱-۲-۴- انتخاب فیبر
۴۰	..... ۲-۲-۴- بهینه سازی میکرواستخراج فاز جامد
۴۰	..... ۳-۲-۴- طراحی آزمایش و بهینه سازی سایر عوامل
۴۵	..... ۳-۴- مشخصات کارایی تجزیه ای

فصل پنجم

۴۸ ..... ۵-۱- نتیجه گیری نهایی

۴۸ ..... ۵-۲- پیشنهادها

فصل ششم

۴۹ ..... منابع

## فهرست شکل ها

- شکل ۱-۲- ساختار شیمیایی پارابن ..... ۷
- شکل ۲-۲- سنتز پارابن ها از اسید p-هیدروکسیل بنزوئیک ..... ۹
- شکل ۳-۲- منابع و مسیرهای قرار گرفتن در معرض انسان و سرنوشت پارابن ها در محیط ..... ۱۰
- شکل ۴-۲- روش نمونه برداری HS-SPME ..... ۱۶
- شکل ۵-۲- انواع ستون لوله موئین ..... ۲۵
- شکل ۶-۲- نمای کلی دستگاه GC-MS ..... ۲۶
- شکل ۷-۲- نمونه طراحی مرکب مرکزی (با ۲ فاکتور) ..... ۲۹
- شکل ۱-۴- راندمان استخراج نسبی فیبر های SPME ..... ۳۸
- شکل ۲-۴- تاثیر زمان استخراج بر میانگین هندسی سطح پیک آنالیت ها ..... ۴۰
- شکل ۳-۴- سطح پاسخ نشان دهنده ی تاثیر دما و زمان بر میانگین هندسی ..... ۴۱
- شکل ۴-۴- تاثیر دمای استخراج بر میانگین هندسی سطح پیک آنالیت ها ..... ۴۲
- شکل ۵-۴- سطح پاسخ نشان دهنده ی تاثیر دما و غلظت نمک بر میانگین هندسی ..... ۴۳
- شکل ۶-۴- تاثیر قدرت یونی (غلظت نمک) نمونه بر میانگین هندسی سطح پیک آنالیت ها ..... ۴۴
- شکل ۷-۴- سطح پاسخ نشان دهنده ی تاثیر زمان و غلظت نمک بر میانگین هندسی ..... ۴۴

## فهرست جدول ها

- جدول ۱-۲- ساختار، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پارابنها ..... ۸
- جدول ۲-۲- متدهای مختلف استخراج به همراه معایب آنها ..... ۲۲
- جدول ۱-۳- برنامه دمایی کروماتوگراف گازی ..... ۳۴
- جدول ۱-۴- آزمایش های طراحی شده در روش مرکب مرکزی و پاسخ های حاصل از آن ..... ۳۹
- جدول ۲-۴- مشخصات تجزیه ای روش میکرواستخراج فازجامد فضای فوقانی با فیبر DVB-PDMS ..... ۴۶

## چکیده

استفاده گسترده از محصولات مراقبت شخصی و دارویی منجر به انتشار پارابن در محیط می شود و بر سلامت انسان و محیط زیست و آبریان تأثیر می گذارد. بنابراین شناسایی و تعیین مقدار این ترکیبات حتی در غلظت های کم از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

آنالیت ها (متیل - پارابن، اتیل - پارابن، پروپیل - پارابن و بوتیل - پارابن) با استفاده از ابزار میکرواستخراج فاز جامد جدید موسوم به Arrow حامل جاذب دی وینیل بنزن/ پلی دی متیل سیلوکسان، از فضای فوقانی نمونه ها استخراج شده و با دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی آنالیز شدند. برای دستیابی به عملکرد مطلوب برای آنالیز همزمان آنالیت های انتخاب شده، عوامل موثر بر بازده استخراج، مطالعه شدند و در نتیجه زمان استخراج ۷۸ دقیقه، دمای استخراج ۷۰ درجه سلسیوس و غلظت نمک افزوده ۳۰ درصد (w/v)، به عنوان مقادیر بهینه انتخاب شدند. همچنین به منظور بهینه سازی عملکرد روش میکرواستخراج فاز جامد از طراحی مرکب مرکزی، استفاده شد. حد تشخیص و حد تعیین مقدار روش بهینه شده به ترتیب در محدوده ۰.۰۹ تا ۰.۲۰۲ و ۰.۱۶۴ تا ۰.۸۷۵ نانوگرم بر لیتر قرار داشت. منحنی کالیبراسیون در محدوده ۱-۱۰۰۰۰ نانوگرم بر لیتر رسم شد و پاسخ خطی با کمترین مقدار ضریب تعیین ( $R^2$ ) برابر با ۰.۹۹۸ بود. انحراف استاندارد نسبی روش به عنوان معیار تکرارپذیری نیز کمتر از ۱۸.۵۹ درصد به دست آمد که نشان دهنده دقت روش است. بازیابی نسبی استخراج در نمونه های آب رودخانه در غلظت ۱۰۰-۵۰۰ نانوگرم بر لیتر در محدوده ۶۳ تا ۱۲۴ درصد بدست آمد.

کلیدواژه ها: آب سطحی، پارابن، بهینه سازی، طراحی مرکب مرکزی، کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی، میکرواستخراج فاز جامد

فصل اول:

محتوای پژوهش

## ۱-۱- مقدمه

پارابن‌ها نام کلی دسته‌ای از ترکیبات نگهدارنده است که غالباً در محصولات بهداشتی و مراقبت شخصی، مانند شامپوها، مرطوب کننده‌ها، ژل‌های شستشو، خمیر دندان‌ها، محصولات آرایشی، کرم‌های ضد آفتاب، خوشبو کننده‌ها، صابون‌ها و همچنین در انواع محصولات دارویی موضعی و تزریقی و گاهی محصولات غذایی به کار می‌روند.

واژه پارابن (paraben) مخفف پارا هیدروکسی بنزوئیک اسید (para Hydroxybenzoic Acid) است. از رایج‌ترین پارابن‌ها می‌توان به متیل پارابن (Methyl paraben, MeP)، اتیل پارابن (Ethyl paraben, EtP) و پروپیل پارابن (Propyl paraben, PrP) اشاره کرد. بوتیل پارابن (Butyl paraben, BuP) و بنزیل پارابن (Benzyl paraben, BzP) نیز در این دسته قرار دارند که کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. انتخاب نوع پارابن در یک محصول بستگی به عوامل مختلفی دارد و جایگزینی گروه‌های شیمیایی مختلف سبب تغییر در حلالیت و تغییر در طیف اثر میکروبی پارابن‌ها می‌شود.

پارابن‌ها به دلیل خواص فیزیکوشیمیایی مطلوب، شایع‌ترین ترکیبات پس از آب در لوازم آرایشی و محصولات مراقبت شخصی هستند. در دهه ۱۹۹۰، میزان تولید سالانه ۵۰۰۰ تن برای MeP در ایالات متحده توسط آژانس حفاظت از محیط زیست گزارش شد. تخمین زده می‌شود که از دهه ۱۹۲۰، پارابن‌ها به تدریج به فراوان‌ترین افزودنی در لوازم آرایشی و دارویی تبدیل شدند (Andersen., 2008) و امروزه طبق مطالعات انجام گرفته پارابن‌ها در بیش از ۹۰ درصد محصولات آرایشی و بهداشتی وجود دارند (Yegane et al., 2016).

در مطالعه‌ای که در ایالات متحده آمریکا صورت گرفته میزان تماس هر فرد با پارابن‌ها در هر روز ۷۶ میلی گرم است که ۵۰ میلی گرم آن مربوط به محصولات آرایشی بهداشتی، ۲۵ میلی گرم داروها و ۱ میلی گرم مربوط به مواد غذایی است (Soni et al., 2001). علت این گستردگی مصرف، قیمت کم و موثر بودن آن است و طولانی بودن تاریخچه مصرف، به نوعی تایید کننده ایمن بودن پارابن است اما در سال‌های اخیر نگرانی‌هایی درباره استفاده از این ماده و تاثیر آن روی بدن شکل گرفته. بطور کلی امروزه استفاده گسترده از پارابن‌ها در جهان موجب توزیع و گسترش آنها در تمام عرصه‌های محیط زیست نظیر آب، خاک، هوا و موجود زنده شده است.

علیرغم ضرورت کاربرد این ترکیبات در فرمولاسیون محصولات ذکر شده، حضور این ترکیبات در منابع آب می‌تواند سبب مخاطراتی مانند افزایش ریسک سرطان، ایجاد اختلالات هورمونی، انواع آلرژی و اختلال در فرایندهای تولید مثل (بویژه در مورد آبزیان) شود. مقدار قابل مشاهده‌ی این ترکیبات و آلودگی ناشی از آن‌ها در منابع آب بستگی به عوامل متعددی دارد که از آن جمله می‌توان به جغرافیای منطقه (شهری، روستایی و صنعتی)، نزدیکی به نقاط تخلیه پساب (تصفیه خانه‌ها یا تخلیه مستقیم) و همچنین، کارایی فناوری‌های تصفیه پساب، اشاره کرد. براساس مطالعات انجام و

گزارش شده، غلظت های مشاهده شده پارابن ها در منابع آب و بویژه در رودخانه ها در محدوده ی نانوگرم بر لیتر تا میکروگرم بر لیتر است، و هم چنین، مشخص شده است که این مقادیر به شدت تحت تاثیر عوامل جوی، بویژه میزان بارش در هر منطقه دارد.

## ۱-۲- بیان مسئله و اهمیت موضوع

مشخص شده است که تاثیرات ناخواسته پارابن ها حتی در غلظت های بسیار کم نیز قابل مشاهده است و در نتیجه ضروری است تا روش های بسیار حساس و گزینش پذیر برای آشکارسازی و تعیین مقدار پارابن ها در منابع آب توسعه داده شود. مهم ترین مرحله در این مطالعه، بهینه سازی استخراج، مطالعه ی عوامل موثر بر کیفیت نتایج و در نهایت کارایی کلی روش برای تعیین مقدار پارابن ها در نمونه های آب است. بر این اساس، در این مطالعه به طور خلاصه به روش های آماده سازی نمونه و استخراج پارابن ها از آب پرداخته می شود. روش هایی که امروزه در دسترس هستند، عموماً برای دستیابی به حساسیت کافی، نیاز به مقدار زیادی از نمونه، زمان طولانی و هم چنین مصرف حجم زیادی از حلال ها و جاذب های شیمیایی دارند. بنابراین، این روش ها معمولاً پرهزینه، همراه با نمونه برداری دشوار (به دلیل حجم زیاد نمونه ها) و زمانبر هستند. در نتیجه معرفی روش های استخراج که به مقدار کمی از نمونه نیاز داشته باشند و باتوجه به حضور مقادیر زیاد و متنوعی از ترکیبات مزاحم بافت نمونه، توانایی حذف مزاحمت ها و حساسیت و دقت کافی برای آنالیز مقادیر بسیار کم (نانوگرم بر لیتر) را داشته باشند، از اهمیت و ضرورت بسیاری برخوردار است (Piao., 2014). چنین روش هایی، در عین حال، باید توانایی آنالیز مقادیر بسیار کم پارابن ها (نانوگرم بر لیتر) در نمونه هایی با بافت نسبتاً پیچیده، از جمله رودخانه ها و خروجی تصفیه خانه های فاضلاب شهری را داشته باشند.

## ۱-۳- وجوه تمایز

در مطالعه ی حاضر برای شناسایی و تعیین مقدار چهار پارابن در نمونه های آب از روش میکرو استخراج فاز جامد فضای فوقانی (Headspace-solid phase-micro extraction) استفاده شده است.

مهم ترین وجه تمایز این پژوهش، بهینه سازی و اعتباربخشی نوع جدیدی از استخراج فاز جامد (PAL SPME Arrow) است که انتظار می رود حساسیت و کارایی بالاتری نسبت به روش های قدیمی تر فراهم کند. روش تحلیلی مبتنی بر مشتق آنالیت ها با استیک انیدرید است. مهمترین پارامترهای آزمایشی که می توانند تأثیرات قابل توجهی بر ویژگی های عملکرد کل روش داشته باشند (یعنی نوع فیبر، زمان، دما و غلظت نمک اضافه شده) با استفاده از روش سطح پاسخ بهینه شده اند تا بهترین مجموعه شرایط را برای همزمان پیدا کنند.



## ۱-۴- اهداف طرح

### ۱-۴-۱- هدف اصلی

- در این پژوهش روش نوینی با عنوان میکرواستخراج فاز جامد Arrow همراه با کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی برای تعیین مقدار پارابن ها در محیط آب توسعه خواهد یافت و اعتباربخشی خواهد شد.

### ۱-۴-۲- اهداف فرعی

- بهینه سازی و مطالعه‌ی مهم‌ترین عوامل موثر بر کارایی روش و حساسیت آنالیز.
- سنجش کارایی روش و مطالعه تاثیر بافت نمونه بر کیفیت نتایج آنالیز.
- تعیین مقدار پارابن های منتخب در نمونه های آب سطحی.

## ۱-۵- فرضیه های طرح:

- میکرواستخراج فاز جامد Arrow قادر به فراهم ساختن حساسیت آنالیز برابر یا بهتر از روش های کلاسیک و مدرن دیگر است.
- دمای استخراج، زمان استخراج، قدرت یونی و نوع جاذب مهم‌ترین عوامل دارای تاثیر معنی دار بر کارایی روش استخراج و حساسیت آن هستند.
- این ترکیبات در آب های سطحی پذیرنده فاضلاب تصفیه شده حضور دارند.
- نوع جاذب مورد استفاده جهت استخراج، تاثیر معنی داری بر کارایی استخراج فاز جامد میکرو دارد.

## ۱-۶- روش اجرای طرح:

- مراحل انجام این طرح را می توان به صورت زیر خلاصه کرد:
- مرور منابع و جمع آوری اطلاعات در مورد ویژگی های فیزیکی-شیمیایی پارابن ها، انتخاب مهم ترین ترکیبات.
- بررسی روش های استخراج منتشر شده و تعیین مهم ترین موارد مورد بررسی در طول طرح.
- تهیه مواد شیمیایی و تجهیزات مورد نیاز.
- شروع مراحل آزمایشگاهی طرح، شامل مطالعه مهم ترین عوامل موثر بر کارایی استخراج و بهینه سازی آن ها

با استفاده از روش های طراحی آزمایش.

- اعتبار بخشی روش آنالیز بر اساس نتایج آنالیز نمونه های استاندارد و نمونه های واقعی.

- جمع آوری و آنالیز نمونه های آب های سطحی و تعیین مقدار آلاینده ها.

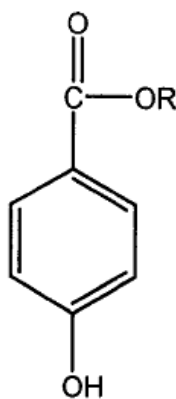
فصل دوم:

ادبیات پژوهش

## ۱-۲- پارابن ها

با توجه به فرهنگ لغت و کتابچه راهنمای مواد آرایشی که توسط انجمن لوازم آرایشی، بهداشتی و عطری<sup>1</sup> (CTFA) منتشر شده است، پارابن ها استرهای پارا-هیدروکسی بنزویک هستند و بر اساس گروه آلکیل موجود در گروه استری شان نام گذاری می شوند و مطابق با ساختار نشان داده شده در شکل ۱-۲ هستند (Andersen., 2008).

متیل، اتیل، پروپیل، بوتیل و بنزیل پارابن (به ترتیب MeP, EtP, PrP, BuP و BzP) متداول ترین پارابن ها (جدول ۱-۲) هستند (Nowak et al., 2018). پارابن ها به دلیل ویژگی های مطلوب مانند فعالیت ضد میکروبی، ثبات در محدوده وسیع pH، حلالیت در آب، بدون بو و طعم، پایداری خوب پس از مخلوط شدن با محصول و... معمولاً به عنوان نگهدارنده برای جلوگیری از تغییر و تخریب لوازم آرایشی، دارویی و غذاها در برابر آلودگی میکروبی و قارچی و محافظت از مصرف کنندگان استفاده می شوند (Lee et al., 2018; Janjua et al., 2007). پارابن ها در لوازم آرایشی، بیشتر برای آماده سازی موضعی استفاده میشوند درحالی که در داروها بخشی از فرمولاسیون هستند. (Sheskey et al., 2017)



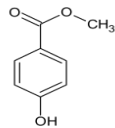
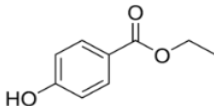
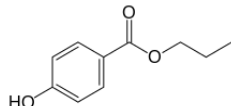
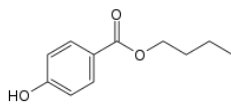
شکل ۱-۲- ساختار شیمیایی پارابن (Andersen., 2008)

R = زنجیره های آلکیل که متیل (CH<sub>3</sub>) برای متیل پارابن، اتیل (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) برای اتیل پارابن، پروپیل (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>) برای

پروپیل پارابن، ایزوپروپیل (C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>) برای ایزوپروپیل پارابن و بوتیل (C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>) برای بوتیل پارابن

<sup>1</sup> Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association

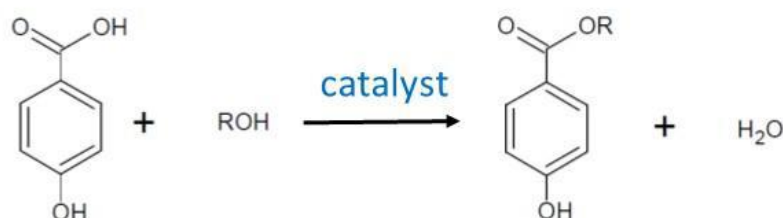
جدول ۱-۲- ساختار، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پارابن‌ها

نام ترکیب	فرمول مولکولی	وزن مولکولی (گرم بر مول)	حلالیت در آب (میلی گرم بر لیتر)	Log k <sub>ow</sub>	نسبت جرم به بار	ساختار
متیل پارابن	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	۱۵۲.۱۴۹	۲.۵۰×۱۰ <sup>۳</sup>	۱.۹۶	۱۲۱, ۱۴۹, ۱۸۰	
اتیل پارابن	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	۱۶۶.۱۷	۸.۸۵×۱۰ <sup>۲</sup>	۲.۴۷	۱۲۱, ۱۳۸, ۱۶۶	
پروپیل پارابن	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	۱۸۰.۲۰۳	۵.۰۰×۱۰ <sup>۲</sup>	۳.۰۴	۱۲۱, ۱۳۸, ۱۸۰	
بوتیل پارابن	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	۱۹۴.۲۳۰	۲.۰۷×۱۰ <sup>۲</sup>	۳.۵۷	۱۲۱, ۱۳۸, ۱۹۴	

در پارابن‌ها، افزایش طول زنجیره آلکیل اثر ضد میکروبی را بهبود می‌بخشد، اما حلالیت در آب کاهش می‌یابد (Soni et al., 2002)، همچنین گروه‌های استری طولانی‌تر دارای سمیت بیشتری هستند در حالی که زنجیره‌های کوتاه آلکیل، دارای سرعت تخریب نسبتاً سریع‌تری نسبت به طولانی‌ترها هستند (Kang et al., 2019). پارابن‌ها به عنوان مواد نگهدارنده در برابر قارچ‌ها کارآمدتر از باکتری‌ها هستند. هنگامی که به عنوان ترکیبی از پارابن‌های مختلف استفاده شود، دامنه اثربخشی آنها ممکن است وسیع‌تر باشد (Soni et al., 2002).

## ۲-۱-۱- توليد پارابن ها

فرآیند سنتز پارابن ها در مقیاس آزمایشگاهی یا صنعتی صدها سال است که شناخته شده است. این یک واکنش ساده "اسیدی-باز" با استفاده از اسید هیدروکسی بنزوئیک و الکل (R-OH) در حضور یک کاتالیزور مناسب مانند تیونیل کلرید است. نتایج این واکنش پارابن به عنوان محصول اصلی و آب به عنوان محصول جانبی است (شکل ۲-۲). پارابن ها همچنین در برخی از میوه ها بطور طبیعی یافت میشوند مثل هویج، زغال اخته، زیتون، توت فرنگی و انبه که دارای خواص حفاظتی مشابه پارابن های مصنوعی هستند و برای دفاع از خود در برابر میکروارگانیسم های مختلف استفاده میشود (Yang et al., 2018).



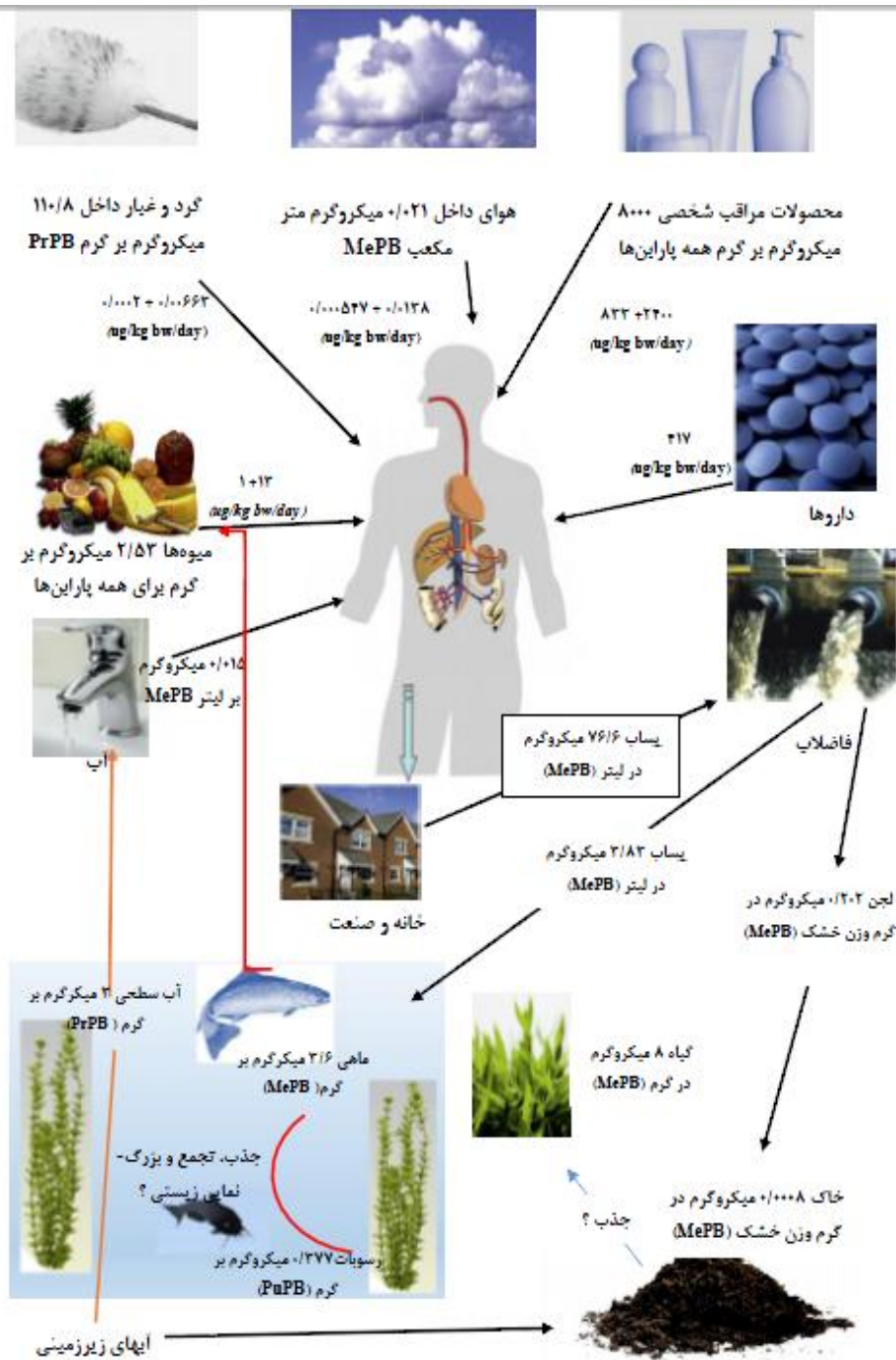
شکل ۲-۲- سنتز پارابن ها از اسید p-هیدروکسیل بنزوئیک. R نشان دهنده CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>, C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> است

(Yang et al., 2018).

## ۲-۱-۲- در معرض قرار گیری انسان

تخمین زده می شود که از دهه ۱۹۲۰، پارابن ها به تدریج به فراوان ترین افزودنی در لوازم آرایشی و دارویی تبدیل شدند (Andersen., 2008). در دهه ۱۹۹۰، میزان تولید سالانه ۵۰۰۰ تن برای MeP در ایالات متحده توسط آژانس حفاظت از محیط زیست گزارش شد (Liao et al., 2013) و از سال ۲۰۱۳، تقریباً همه انواع کنسرو یا بسته بندی مواد غذایی دارای پارابن در ترکیبات خود هستند. منابع اصلی قرار گرفتن انسان در معرض پارابن ها، محصولات مراقبت شخصی<sup>۲</sup> (PCPs) و داروها هستند. پارابن های موجود در لوازم آرایشی، دارویی و محصولات مراقبت شخصی از طریق فاضلاب خانگی و صنعتی به طور گسترده ای در محیط آزاد میشوند (Darbre et al., 2008). سرنوشت پارابن ها در محیط و همچنین منابع و مسیرهای قرار گرفتن در معرض انسان در شکل ۲-۳ جمع آوری شده است.

<sup>2</sup> Personal Care Products



شکل ۲-۳- منابع و مسیرهای قرار گرفتن در معرض انسان و سرنوشت پارابن ها در محیط (مقادیر حداکثر غلظت نشان داده شده است؛ bw - وزن بدن، dw - وزن خشک، fw - وزن تازه) (Błędzka et al., 2014).

۱. پارابن ها به محصولات مراقبت روزانه، داروها، مواد غذایی بسته بندی شده و لوازم آرایشی اضافه می شوند که مستقیماً توسط انسان به صورت خوراکی یا از طریق تماس با پوست مصرف می شوند.
۲. برخی از لوازم آرایشی حتی پارابن ها را به صورت گرد و غبار یا هوا به اتمسفر می رسانند که منجر به تماس بیشتر با انسان ها می شود.
۳. محصولات آرایشی و مراقبت های روزانه که توسط انسان مصرف می شود ممکن است در رودخانه ها، دریاچه ها، آبهای زیرزمینی، استخر شنا و دیگر منابع آب سطحی رها شوند. برخی ممکن است با محیط آبی به داخل پوست بروند به عنوان مثال هنگام شنا.
- اکثر پارابنهای موجود در آبهای سطحی، آبهای خانگی و فاضلاب را می توان در حین تصفیه آب در مخازن تجزیه کرد.
۴. برخی از آبهای حاوی پارابن برای آبیاری استفاده می شوند، به این معنی که خاک مقداری پارابن در خود نگه می دارد. این پارابن ها ممکن است توسط سبزیجات، گیاهان و میوه جذب می شوند و یا توسط گاو، ماهی، مرغ و سایر حیوانات مصرف شوند. در نتیجه، توسط یک مسیر غیر مستقیم به عنوان غذا در نهایت توسط انسان مصرف می شود.
۵. آب لوله کشی ممکن است حاوی سطوح پایینی از متیل پارابن باشد که منبع بالقوه دیگری برای مصرف انسان است. در نتیجه، کنترل افزایش پارابن در زندگی روزمره ما به سختی کنترل می شود (Yang et al., 2018).

## ۲-۱-۳- تاثیر بر سلامت انسان

### ۲-۱-۳-۱- اثرات پارابن بر روی پوست

بسیاری از مطالعات وجود پارابن ها را در افرادی که از لوازم آرایشی حاوی پارابن استفاده می کنند در ادرار ثابت کرده است که این نشان می دهد پارابن ها به راحتی توسط پوست انسان جذب می شوند. افزایش توانایی پارابن ها برای نفوذ به پوست به ساختار آنها، طول زنجیره های جانبی استر و نوع حلال های فرار مانند استون و اتانول بستگی دارد (Emmanouil et al., 2019; Farajzadeh et al., 2010). پارابن هایی که به صورت موضعی استفاده می شوند، توسط کربوکسی استراز پوست به پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید و آلکیل مربوطه متابولیزه می گردد (Soni et al., 2005). پارابن های جذب شده در پوست که تجزیه کامل نمی شوند، در پلاسما پایدار میمانند اما به سرعت توسط آنزیم های کبد تجزیه می شوند و متعاقباً در ادرار دفع می شوند. سرعت این تجزیه گروهی از محققین را به این نتیجه رسانده است که پارابن ها به میزان قابل توجهی در بافت انسان جمع نمی شوند. اگرچه اطلاعات زیادی در مورد نفوذ پارابن ها از طریق پوست انسان و متابولیسم پارابن های جذب شده وجود دارد اما اثرات پارابن ها بر روی پوست بسیار کمتر شناخته شده است (Fransway et al., 2019). با اینکه فرآورده های حاوی پارابن میتوانند روی پوست



های بسیار حساس و آسیب دیده واکنش های حساسیتی مثل کهیر ایجاد کنند (Aldrete et al., 1969) اما در حال حاضر پارابن ها به طور رسمی توسط انجمن درماتیت تماسی آمریکا<sup>۳</sup> (غیر آلرژی زا) سال معرفی شده اند، نگرانی های آلرژولوژیک در مورد پارابن های مطرح شده در قرن گذشته دیگر موضوع مهمی نیست (Fransway et al., 2019). در بررسی (Ishiwatari et al., 2007) در مورد اثر اشعه ماوراء بنفش در ترکیب با پارابن ها بر روی کراتینوسیت ها (سلول اصلی سازنده روی پوست) انجام گرفت گزارش شده که پتانسیل ایجاد سرطان کراتینوسیت را در بیماران که از لوازم آرایشی حاوی پارابن استفاده می کنند، افزایش میابد.

## ۲-۱-۳-۲- اختلال در عملکرد غدد درون ریز

امروزه پارابن ها به عنوان گروهی از مواد شیمیایی مختل کننده غدد درون ریز<sup>۴</sup> (EDCs) محسوب میشوند. غدد درون ریز مجموعه ای از غدد مانند هیپوفیز، پانکراس، تیروئید، غدد پاراتیروئید، غدد فوق کلیوی و... است که برای تنظیم تمام فعالیت های متابولیکی بدن مانند رشد، تولید مثل و... هورمون تولید می کند (Alkafajy et al., 2020). اکثر مطالعات از مدل های حیوانی برای ارزیابی اثرات پارابن ها بر عملکرد اندام های داخلی استفاده کرده اند. هرچند که اثرات پارابن هایی که در آزمایش های حیوانی مشاهده شده ممکن است با مطالعات انسانی مطابقت نداشته باشد (Nowak et al., 2018). در مطالعه (Vo et al., 2010)، قرار گرفتن در معرض EtP، MeP، PrP و BuP (۶۲.۵، ۲۵۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در ۲۴ ساعت) دلیل افزایش وزن غدد فوق کلیوی و کاهش وزن غده تیروئید بود. وزن و ساختار غیر طبیعی غدد فوق کلیوی می تواند منجر به پیامدهای جدی در حفظ تعادل هورمونی شود. غدد فوق کلیوی اندام هایی هستند که هورمون های استروئیدی مانند گلوکوکورتیکواستروئیدها (از جمله کورتیزول)، مینرالوکورتیکواستروئیدها (مانند آلدوسترون) و هورمون های جنسی استروئیدی از جمله پروژسترون، آندروژن ها و استروژن را سنتز می کنند (Nowak et al., 2018). در سایر مطالعات انجام شده (Boberg et al., 2016) بر روی موش های بارداری در معرض BuP، تغییرات هیستوپاتولوژیک در مورفولوژی غده پروستات و بیضه ها و همچنین کاهش وزن اندام های تولید مثل فرزندان مشاهده شد (کاهش وزن بیضه و تخمدان). طی مطالعاتی (Soni et al., 2002) روی موش های صحرایی نر نشان داده است که پارابن ها با کاهش غلظت اسپرم، کاهش سطح ترشح تستوسترون در سرم و عملکرد جامع مایع منی در مردان بر عملکرد سیستم تولید مثل مردان تأثیر منفی می گذارد. پارابن ها فعالیتی شبیه استروژن از خود نشان میدهند که می تواند با تشکیل لیگاندهای پروتئین های پلازما بر گیرنده های استروژن تأثیر بگذارد و باعث اختلال در فعالیت محیطی هورمون های در گردش شود (Bronowicka-

<sup>3</sup> American Contact Dermatitis

<sup>4</sup> Endocrine disrupting chemicals

Kfys et al., 2016). همچنین مطالعه روی نمونه های خون قاعدگی زنان (Saraji et al., 2009) نشان داد که غلظت چهار نوع پارابن (متیل، اتیل، پروپیل و بوتیل پارابن) وجود دارد و بیشترین ترکیبات شناسایی شده متیل پارابن است. مطالعات دانشگاهی همچنین وجود این ترکیبات شیمیایی را در بافت پستان بیماران مبتلا به سرطان سینه ثابت کرده است، زیرا خواص استروژنیک پارابن ها می تواند در ایجاد سرطان سینه نقش داشته باشد که نگرانی عمومی را در مورد استفاده از آنها افزایش داده است. تحقیقات (Pedrouzo et al., 2009) وجود پارابن ها را در بافت پستان به دلیل استفاده از محصولات خوشبو کننده در زیر بغل ها که نزدیک سینه هستند نشان می دهد که باعث ایجاد سرطان پستان می شود. مقررات فعلی در مورد استفاده از پارابن ها در کشور های مختلف، متفاوت است. دستورالعمل اتحادیه اقتصادی اروپا (EEC)<sup>۵</sup> مقرر می کند که درصد مجاز پارابن ها، ۰.۸ درصد برای ترکیب پارابن ها و ۰.۴ درصد برای محصولاتی که از یک نوع پارابن استفاده میکنند (Mincea et al., 2009). با این حال، در سال ۲۰۱۱، دولت دانمارک تصمیم گرفت با اعمال محدودیت های اضافی، استفاده از برخی پارابن ها (پروپیل، ایزوپروپیل، بوتیل و ایزوبوتیل پارابن) را در محصولات مراقبت شخصی برای کودکان زیر ۳ سال ممنوع کند. در ایالات متحده، استفاده از پارابن ها بدون محدودیت در لوازم آرایشی مجاز است اما برخی از تولیدکنندگان لوازم آرایشی شروع به استفاده از سایر مواد نگهدارنده جایگزین کرده یا استفاده از پارابن ها را به دلیل افزایش نگرانی ها کاهش دادند. با این حال، سازمان بازرگری مواد آرایشی و بهداشتی قبلاً توصیه کرده بود که برای استفاده از پارابن ها در ایالات متحده و کانادا همان محدودیت های اتحادیه اروپا را اتخاذ شود (Lincho et al., 2021).

## ۲-۱-۴-تأثیر بر محیط زیست

پارابن ها در بسیاری از قسمت های مختلف در سراسر جهان در سطح  $\mu\text{g L}^{-1}$  -  $\text{ng L}^{-1}$  یافت شده اند، از جمله آب های سطحی، فاضلاب، آبهای زیرزمینی، آب آشامیدنی، هوا و گرد و غبار که شواهد نشان می دهد که پارابن های آزاد شده در محیط، حتی در غلظت های پایین، می تواند تأثیرات نامطلوبی بر سلامت انسان داشته باشد، که به طور مستقیم یا غیرمستقیم است (Lee et al., 2005). تأثیر روی حیوانات، به ویژه در آبزیان، می تواند نگران کننده باشد زیرا چندین گونه می توانند از تأثیرات منفی پارابن ها رنج ببرند که عمدتاً مربوط به اختلال در عملکرد غدد درون ریز است. در مطالعه ای (Kang et al., 2019) گزارش شده است که پارابن ها احتمال بقای برخی گونه ها مثل *Daphnia magna* که بعنوان منابع غذایی سایر آبزیان، نقش مهمی در اکوسیستم های آبی ایفا می کنند را کاهش

می دهد. اندازه گیری میزان تأثیرگذاری پارابن بر اکوسیستم ها دشوار است اما متیل پارابن، اتیل پارابن و پروپیل پارابن بیشترین فراوانی را در محیط آبی داشتند، زیرا آنها از ترکیبات اصلی محصولات حاوی پارابن تشکیل شده و دارای زنجیره های آلکیل کوتاه تری هستند.

از دلایلی که می تواند عامل اصلی تشخیص مستمر پارابن ها در انواع مختلف منابع آب باشد میتوان به استفاده بیشتر از پارابن ها در صنایع، افزایش جمعیت و ناکارآمدی راه حل ها اشاره کرد. تخلیه پساب عامل اصلی ظهور پارابن ها است. فرآیند تصفیه در تصفیه خانه فاضلاب می تواند ۹۰ درصد پارابن ها را به دنبال روش های بیولوژیکی به طور موثر حذف کند. با وجود تلاش های زیادی برای حذف کامل پارابن ها از طبیعت و محصولات تجاری، همیشه مقدار کمی پارابن در محیط یا بدن انسان باقی می ماند. کما اینکه پارابن ها هنوز پس از تصفیه در آبهای سطحی وجود دارند. وجود بقایای پارابن ها در یک منبع را می توان بسیار ناچیز دانست، اما تجمع بقایا از منابع مختلف بسیار زیاد است و باید با دقت مورد توجه قرار گیرد (Yang et al., 2018).

در مطالعه ای (YeganeBadi et al., 2016) که بین متیل و اتیل پارابن در ورودی و خروجی تصفیه خانه های شهرک غرب و جنوب تهران قرار گرفت. غلظت به دست آمده نمایانگر میانگین حذف 84 درصدی این ترکیبات در تصفیه خانه شهرک غرب و 86/5 درصدی آن ها در تصفیه خانه جنوب می باشد.

## ۲-۱-۵- جایگزین پارابن ها

به دنبال خطرات محیط زیستی و انسانی پارابن ها نظیر ورود به زنجیره غذایی، پتاسیل سرطانزایی و فعالیت های استروژنی آنها بسیاری از محققان و تولیدکنندگان محصولات مختلف آرایشی، بهداشتی، دارویی و غیره سعی در تولید و بکارگیری ترکیبات جایگزین آنها نموده اند. از جمله این ترکیبات میتوان به فنوکسی اتانول (Phenoxyethanol)، بنزوات سدیم یا اسید بنزوئیک اسید (Sodium Benzoate) و بنزیل الکل (Benzyl Alcohol) اشاره نمود (Fransway et al., 2019). از مهمترین مزایای استفاده از فنوکسی اتانول، خواص ضد باکتریایی بالا، ارزان بودن و پایداری زیاد در محدوده وسیعی از pH ها (pH بهینه در محدوده ۴ تا ۹) اشاره نمود.

بنزوات سدیم در ترکیب با پتاسیم سوربات (Potassium Sorbate) به دلیل ارزان بودن، قابلیت تولید از مواد طبیعی (دارای منشا طبیعی) و در نتیجه سازگار بودن با محیط زیست پتانسیل خوبی به عنوان جایگزین مناسب پارابن ها دارند، اما با این حال یکی از بزرگترین مشکل بکارگیری آنها به عنوان نگهدارنده محدود بودن pH ایده آل آنها است (عمدتا در pH بین 3 تا 5 پایدار و فعال هستند)، زیرا بسیاری از محصولات خارج از این محدوده pH فرموله شده اند و امکان بکارگیری بنزوات سدیم در خارج از این محدوده وجود ندارد.

بنزیل الکل یکی دیگر از ترکیبات جایگزین پارابن ها با منشأ طبیعی و سنتزی است که در غلظت های بالاتر از 25 میلیگرم در کیلوگرم در برابر باکتری های گرم مثبت فعال هستند و در ترکیب با اسید دهیدروآکتیک (Dehydroacetic Acid) فعالیت ضد مخمری آنها بیشتر میشود (Hatami-manesh et al., 2020).

## ۲-۲- انواع روش های متداول استخراج

بدون شک، آماده سازی نمونه یکی از مهمترین مراحل در فرآیند تجزیه و تحلیل است. تخمین زده می شود که تقریباً ۶۰ درصد حجم کار، زمان و هزینه به آماده سازی نمونه اختصاص می یابد (Zacharis et al., 2020).

### ۲-۲-۱-۱- ریز استخراج فاز جامد<sup>۶</sup> SPME

از تکنیک های آماده سازی نمونه مدرن، ریز استخراج فاز جامد (SPME) است که توسط گروه تحقیقاتی پاولیسین<sup>۷</sup> در سال ۱۹۸۹ توسعه یافته است (Arthur et al., 1990). در این روش آنالیت توسط فیبر پوشیده شده با لایه ی نازک پلیمری جذب میگردد. اساس این روش سرنگ اصلاح شده است و یک فیبر سیلیکای گداخته<sup>۸</sup> به وسیله ی فازی از پلی سیلیکان یا برخی از پلیمرهای دیگر پوشانده شده است. فیبر حجم کوچک و ویژه ای از فاز استخراج است که با چسب هایی با تحمل دمایی بالا، داخل لوله ای ضد زنگ و کوچک که انتهای آن به یک سرنگ منتهی میشود چسبانده شده است. این فیبر که در داخل سوزن سرنگ به خوبی محافظت میگردد، طی یک دوره ی زمانی معین داخل محلول حاوی آنالیت ها فرو برده شده تا آنالیت جذب سطحی فیبر گردد. در مرحله ی بعد سوزن حاوی آنالیت های استخراج شده به داخل دستگاه کروماتوگرافی وارد میشوند تا با استفاده از دمای تزریق، آنالیت ها واجذب و جداسازی صورت پذیرد (Sajid et al., 2019).

سهولت اتوماسیون، مراحل کمتر آماده سازی نمونه (استخراج، غلیظ سازی و ورود نمونه به دستگاه کروماتوگرافی را در یک مرحله انجام میدهد)، ویژگی عاری از حلال و حساسیت خوب از جمله مزایای SPME هستند. همچنین، SPME به اندازه کافی انعطاف پذیر است که می تواند در هر دو حالت غوطه وری مستقیم (Direct Immersion-SPME) و فضای فوقانی (Head Space-SPME) کار کند. با این حال، این تکنیک از دو اشکال اصلی رنج می برد: شکنندگی فیبرها و حجم پایین جاذب های تجاری موجود (Kaziur et al., 2019).

عملیات استخراج آنالیت از محیط آبی یا از روش غوطه وری مستقیم (Direct Immersion-SPME) فیبرها در نمونه یا از روش فضای فوقانی (Head Space-SPME) و استفاده از بخارات بالای نمونه برای استخراج استفاده می-

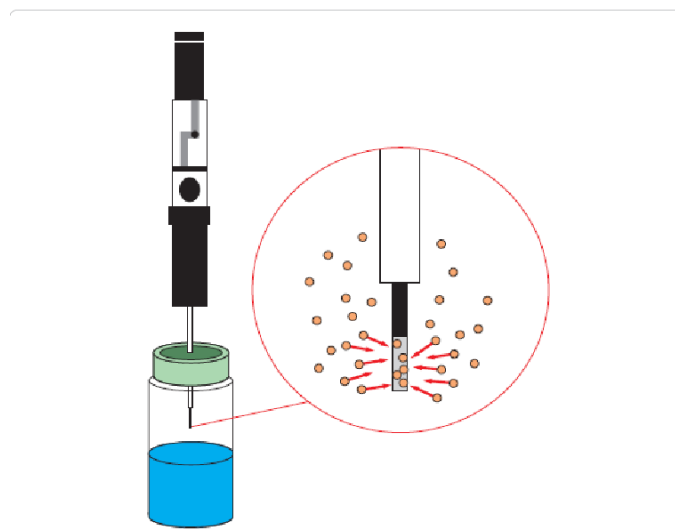
<sup>6</sup> Solid phase microextraction

<sup>7</sup> Janusz Pawliszyn

<sup>8</sup> Fused Silica

شود. DI-SPME کاربرد بیشتر و عملکرد بهتری نسبت به HS-SPME دارد؛ چراکه اگر مواد فرار باشند قابلیت استفاده از فضای فوقانی، ممکن می‌باشد ولی این متد در هر دو حالت توانمندی بالایی را دارد. بعد از ورود به تزریق‌کننده کروماتوگرافی گازی (در کروماتوگرافی مایع، آنالیت‌ها با حلال‌های مرتبط در محفظه خاصی از فیبر جدا می‌شوند) توسط حرارت موجود، آنالیت‌ها کنده شده و وارد لاینر کروماتوگرافی می‌شوند.

HS-SPME اولین بار در سال ۱۹۹۰ معرفی شده و در آن زمان در استخراج آنالیت‌های فرار و پیچیده مانند نمونه‌های بیولوژیکی (ادرار، خون، پلاسما و مو) ارجحیت داشت (Souza-Silva et al., 2015). استخراج فضای فوقانی برای آنالیت‌های با جرم بالا سازگاری بیشتری داشته و اساساً به دلیل بخارشدن در فضای بالای نمونه در حین تعادل مولکول‌های خاصی بروی فیبر به دام می‌افتند؛ به همین دلیل استخراج خالص‌تر، انتخابی‌تر و با کیفیت‌تری نسبت به بقیه متدها رخ می‌دهد. به علاوه به دلیل عدم تماس فیبر با ماتریس نمونه، عمر فیبر بسیار بیشتر می‌شود (Sajid et al., 2019).



شکل ۲-۴- روش نمونه برداری HS-SPME

روند تکاملی نوین در شیمی تجزیه به سمت ساده‌سازی، کم هزینه و مینیاتوری کردن روش استخراج در حداقل زمان با مصرف پایین‌تر حلال آلی پیش می‌رود. به همین منظور تاکنون چندین روش میکرو استخراج جهت کاهش مراحل آنالیز، افزایش حساسیت و مقدار نمونه‌ی ورودی معرفی شده‌اند. انواع فرم‌های این جاذب عبارتند از میله (Rod)، میله محافظت شده (arrow)، ذرات نانو مغناطیسی (magnetic nano particles)، مگنت (stir bar)، نوک پوشیده شده (coated tip)، فیلم نازک (Thin Film)، محافظ‌های تیغه‌ای یا پارچه‌ای که فیلم نازک روی تیغه قرار می‌گیرند

(Blade Configuration)؛ که معمولاً میله محافظت شده و در مراحل بعد مگنت چرخان و فیلم نازک حساسیت بالایی دارند. در پژوهش (SPME (Canosa et al., 2006)، برای آنالیز ۵ پارابن MP, EP, PP, BP, BeP در نمونه آب تصفیه خانه فاضلاب با نتایج حدود تشخیص برابر با ۰.۰۰۱ الی ۰.۰۲۵ نانوگرم بر لیتر و انحراف معیار ۶.۶ تا ۱۱.۹ درصد توسط کروماتوگرافی گازی در ترکیب با طیف سنجی جرمی پشت سر هم (GC-MS/MS) بدست آمده است. نتایج اولیه حضور چهار مورد از پنج آنالیت را در نمونه‌های فاضلاب تصفیه‌نشده تأیید کرد. با این حال، وجود غلظت قابل توجهی از این ترکیبات در آب رودخانه نسبتاً بعید به نظر می‌رسد، مگر اینکه تخلیه مستقیم فاضلاب تصفیه نشده را دریافت کنند و تجزیه و تحلیل تعداد محدودی از نمونه‌های واقعی وجود پارابن در آب خام فاضلاب را در غلظت‌های ۳ تا ۳ نانوگرم در میلی لیتر نشان داد. در پژوهش (González-Mariño et al., 2011) از این روش برای تعیین تریکلوزان (TCS)، مشتق متیل تریکلوزان (MeTCS) و شش پارابن (MeP, EtP, PrP, IPP, BuP, ) در نمونه‌های آب فاضلاب با نتایج حدود تشخیص ۰.۰۲ تا ۰.۵۹ نانوگرم بر میلی لیتر و انحراف استاندارد نسبی (% RSD) بین ۲ تا ۷.۱ درصد استفاده شده است. در پژوهش López-Darias و همکاران (López-Darias et al., 2010) حد تشخیص برای گروهی از چهار ماده شیمیایی مختل‌کننده غدد درون ریز (ECDs)، از جمله BP و BeP، ۹۰ نانوگرم بر لیتر و میزان ریکاوری بالاتر از ۷۶.۷ درصد و تکرارپذیری کمتر از ۱۴ درصد بوده است. در پژوهش Regueiro و همکاران (Regueiro et al., 2009) استفاده از روش استخراج فضای فوقانی برای تعیین پارابن‌ها در آب با ریکاوری بیشتر از ۸۲ درصد و دقت رضایت بخش ( $RSD \leq 12\%$ ) به دست می‌آید. محدودیت‌های تشخیص در سطح پایین پیکوگرام در میلی لیتر (۴۰ تا ۲۱۰) برای همه ترکیبات هدف به دست آمده است. همچنین این روش برای تشخیص پارابن‌ها در لوسیون‌ها و کرم‌ها (Fei et al., 2011)، تونیک‌ها (Čiuvašovaitė et al., 2007)، محلول دهان شویه (Abbasghorbani et al., 2013) قابل استفاده بوده و همچنین این روش برای تجزیه و تحلیل مواد غذایی (Jeleń et al., 2012)، محیطی (Ribeiro et al., 2014)، دارو (Moein et al., 2014) عملکرد مطلوبی داشته است.

## ۲-۱-۲-۲- ویژگی‌های فیبر

یکی از عوامل مؤثر بر کارایی و حساسیت یک روش SPME، ترکیب شیمیایی فاز استخراجی است. بنابراین انتخاب پوشش فیبر معمولاً اولین مرحله در بهینه‌سازی روش SPME است. انتخاب فیبر مناسب بستگی به آنالیت هدف دارد. رایج‌ترین جاذب‌های فیبر SPME و مقاومت حرارتی آن‌ها:

- پلی‌دی‌متیل‌سیلوکسان (PDMS) (۳۴۰ درجه سلسیوس)
- پلی‌آکریلات (PA) (۲۸۰ درجه سلسیوس)

- کربوکسن (CAR) (۳۳۰ درجه سلسیوس)
- پلی اتیلن گلیکول (PEG) (۲۵۰ درجه سلسیوس)
- دی ونیل بنزن، (DVB) (۲۶۰ درجه سلسیوس)

برای گزینش پذیری بهتر، فیبرهای تجاری با پوشش های مخلوط در دسترس هستند:

- کربوکسن و پلی دی متیل سیلوکسان (CAR/PDMS) (۳۲۰ درجه سلسیوس)
- کوپلمری از پلی دی متیل سیلوکسان و دی ونیل بنزن (PDMS/DVB) (۲۷۰ درجه سلسیوس)
- دی ونیل بنزن، کربوکسن، پلی دی متیل سیلوکسان (DVB/CAR/PDMS) (۳۴۰ درجه سلسیوس)

قیمت بالا و طول عمر محدود از جمله معایب فیبرهای تجاری میباشد. علاوه بر این فیبرهای تجاری بسیار شکننده هستند و از نظر خواص استخراجی تنوع محدودی دارند. همچنین پوشش جاذب این فیبرها در اثر استفاده مداوم تجزیه شده و خواص خود را از دست میدهد که منجر به ایجاد پیک های مزاحم می گردد.

ابزار نوین میکرواستخراج فاز جامد **SPME Arrow (Prep And Load solution) PAL** اخیراً برای غلبه بر معایب SPME کلاسیک ارائه شده است. در مقایسه با SPME معمولی، **PAL SPME Arrow**، با حجم جاذب بزرگتر (۱۰.۲ میکرولیتر در مقابل ۰.۶ میکرولیتر)، حساسیت بهتر را ارائه می دهد و همچنین از نظر مکانیکی بسیار قوی تر است (Kaziur et al., 2019). فیبر PAL-SPME میله ای از جنس استیل<sup>۹</sup> بوده که جاذب دور آن قرار گرفته و از استحکام میله بهره برده و غلافی هم به همراه نوک استیل از کل آن محافظت می کند و یک فناوری جدید ثبت شده برای استخراج میکرو است که حساسیت سطح کمی را با استحکام مکانیکی بالا ترکیب می کند. فیبرهای کلاسیک تولید شده در سال ۱۹۹۰ به دلیل هسته از جنس سیلیکای باردار<sup>۱۰</sup> بسیار شکننده بوده و بعد از ۱۰۰ الی ۲۰۰ تزریق به دلیل خم شدن فیبر، نیاز به جایگزینی داشتند. PAL-SPME به دلیل داشتن محافظ و میله داخلی در تمام طول خود، قطر یکسان و یکدستی دارد و مانند مدل کلاسیک در حین معرفی و یا ورود به داخل سپتوم زخم یا شکسته نمی شود. فیبر قدیمی دارای قطر خارجی ۰.۷ میلی متر بود در حالی که فیبر PAL SPME دارای قطر خارجی ۱.۱ یا ۱.۵ میلی متر است که منجر به سطوح و حجم فاز جذب زیادی می شود. مدل قدیمی به دلیل روباز بودن جاذب در فیبر در حین فرایند تزریق باعث کثیف کردن سپتوم شده و تقریباً باید بعد از ۱۰۰ تزریق برای جلوگیری از نشت آنالیت از سپتوم به لاینر، نسبت به تعویض آن اقدام نمود که این امر هزینه ها و اتلاف وقت خود را دارد؛ ولی در PAL-SPME این

<sup>۹</sup> یا میله های تیتانیوم و آلیاژ نیکل-تیتانیوم

<sup>۱۰</sup> Fused silica

مشکل رفع شده و تا ۲۰۰ تزریق بدون نیاز به تعویض سپتوم، انجام می‌شود. طبق پژوهشی (Kremser et al., 2016)، مقدار استخراج بیشتری با نرخ ۱۲.۲ نسبت به فیبر کلاسیک داشته است و در مقایسه با فیبر کلاسیک تقریباً تمامی آنالیت‌های موجود در نمونه را جذب خود کرده است.

## ۲-۲-۲- استخراج فاز جامد<sup>۱۱</sup> SPE

این روش برای اولین بار در سال ۱۹۵۰ جهت آنالیز آنالیت‌های آلی در آب ایجاد شد. در این روش از کربن به عنوان جاذب و از حلال‌های آلی به عنوان حلال واجذب استفاده گردید. اصول این نوع استخراج، مشابه استخراج مایع-مایع میباشد، با این تفاوت که به جای دو مایع امتزاج ناپذیر، از یک فاز مایع و یک فاز جامد استفاده می‌شود (Poole, 2003). نمونه (مایع یا گاز) از روی بستر جاذب عبور می‌کند و آنالیت‌های موجود در بافت نمونه روی جاذب باقی می‌ماند. در مرحله بعد با استفاده از حلال شست و شو، ترکیبات مزاحم و آلودگی‌ها بصورت انتخابی از بستر جاذب حذف میشوند. در نهایت، آنالیت مورد نظر توسط یک حلال مناسب واجذب شده و برای اندازه‌گیری به دستگاه تجزیه ای تزریق میشود. مزایا: از مهم ترین خصوصیات استخراج فاز جامد می‌توان به سادگی انجام، هزینه پایین و مصرف کم حلال‌های سمی و امکان انجام به صورت خودکار (اتوماتیک) اشاره نمود.

معایب: افزودن مراحل انجام استخراج فاز جامد به کل فرایند استخراج، به طور بالقوه باعث افزایش ریسک از دست رفتن نمونه و کاهش تکرار پذیری روش می‌شود. بنابراین و با توجه به این که استخراج فاز جامد به منظور تخلیص و تغلیظ نمونه‌ی استخراج شده به کار می‌رود، در صورت امکان استفاده از روش‌های تجزیه ای حساس و گزینش پذیر، مزیت به دست آمده از کاربرد مراحل اضافی مربوط به آن چندان قابل توجه و توجیه نخواهد بود. در پژوهش (Chen et al., 2012) MeP-EtP-PrP-BuP با طیف حدود تشخیص 0.01-7.48 نانوگرم بر لیتر و انحراف استاندارد نسبی (RSD%) 0.6-3.6 درصد بررسی شده است. در پژوهش (Benijts et al., 2003) ۴ پارابن مختل کننده غدد درون ریز در نمونه‌های آب سطحی مورد بررسی قرار گرفته که ریکاوری ۹۰.۰ الی ۱۰۴.۴ درصد و تکرارپذیری در سه سطح مورد بررسی قرار گرفت که از 3.3 – 9.2 متغیر بود و حد تشخیص ۳.۰ الی ۱۱.۵ نانوگرم بر لیتر به دست آمده است. در پژوهش (González-Mariño et al., 2009) در مورد MeP, EtP, PrP, IPP, BuP, IBP, BzP بحث شد و نتایج ریکاوری ۸۷.۹ الی ۹۹.۲ درصد و حدود تشخیص ۰.۸ تا ۰.۴۴ نانوگرم بر لیتر و حداکثر انحراف معیار ۱۸.۹ درصد به دست آمد. همچنین روش استخراج فاز جامد میکرو ( $\mu$ -SPE) برای استخراج پارابن کاربرد دارد برای مثال در پژوهش (Wang et al., 2014) از روش  $\mu$ -SPE با جاذب graphene oxide برای استخراج چهار

<sup>11</sup> Solid phase extraction



پارابن از نمونه‌های آبی و حدود تشخیص ۰.۰۰۵ الی ۰.۰۱۰ نانوگرم بر میلی لیتر و تکرارپذیری ۸۹.۸ الی ۱۰۶.۴ استفاده شده است.

## ۲-۳- ریز استخراج مایع-مایع پخشی<sup>۱۲</sup> DLLME

یکی از تکنیک های استخراج است که اولین بار در سال ۲۰۰۶ توسط اسدی و همکاران معرفی شد (Rezaee et al., 2006). این روش از زمان معرفی، به منظور شناسایی مقادیر بسیار کم آلاینده های آلی و یون های فلزی در محلول های مایع زیست محیطی مورد استفاده قرار گرفته است. سادگی اجرا، سرعت، هزینه پایین، بازیابی زیاد و فاکتور غنی سازی از مهم ترین مزیت های استفاده از این روش به حساب می آید. شیوه انجام این روش به صورتی است که ابتدا محلول نمونه در یک لوله آزمایش در پیچ دار و ته مخروطی قرار می گیرد. سپس با تزریق مخلوط حلال پراکنده ساز و حلال استخراج کننده به درون محلول نمونه با یک سرنگ یا پمپ، مخلوط به سرعت تکان داده میشود و یک محلول ابری ( آب، حلال پراکنده ساز، حلال استخراج کننده) در لوله تشکیل می شود. با توجه به مساحت بالای سطح مشترک بین حلال استخراج کننده و فاز آبی ( نمونه)، انتقال آنالیت ها از فاز آبی به فاز استخراج کننده سریع اتفاق می افتد. نتیجه اینکه در زمان کم تعادل به سرعت ایجاد شده و منجر به کوتاه شدن زمان استخراج می شود که خود از مزیت های اصلی این روش است. در نهایت قطره های ریز پراکنده شده فاز استخراجی در محلول به وسیله سانتریفیوژ در ته لوله جمع شده و سپس حجم مشخصی از فاز ته نشین شده با استفاده از یک میکروسرنگ، جهت آنالیز به سیستم کروماتوگرافی تزریق می گردد (Xiao-Huan et al., 2009). در پژوهش (Ebrahimpour et al., 2012) برای MeP, EtP, PrP از این روش با تکرارپذیری بین ۷.۲ تا ۸.۱ درصد و حدود تشخیص بین ۰.۰۵ الی ۰.۲ میکروگرم برلیتر برای آب رودخانه ای در نیاسر استفاده کرده است. در پژوهش (Prichodko et al., 2012) برای آنالیز پارابن ها از این روش استفاده شده و محدودیت های تشخیص به ترتیب ۲۲، ۴.۲، ۳.۳ و ۲.۵ میکروگرم در لیتر برای متیل پارابن، اتیل پارابن، پروپیل پارابن و بوتیل پارابن بود و تکرارپذیری ۸.۳ تا ۱۱.۰ درصد، گزارش شده است. در پژوهش (Farajzadeh et al., 2010) از این روش استفاده شد که مقادیر LOQ و RSD به ترتیب برای آنالیت های MeP (50 ng ml<sup>-1</sup> - ۲%)، EtP (۲۰ - ۲) و PrP (۲۰ - ۳) در حجم محلول 10ml بدست آمد.

<sup>12</sup> Dispersive Liquid-Liquid Microextraction

## ۲-۴- استخراج با جاذب همزن مغناطیسی<sup>۱۳</sup> SBSE

در سال ۱۹۹۹ بالتوسن و همکاران روش جدیدی برای استخراج مواد نیمه فرار و فرار به نام استخراج با لوله جاذب متحرک ارائه کردند (Baltussen et al., 1999). این تکنیک مبتنی بر جذب مواد غیر قطبی در محلول‌ها به سطح مگنت پلی‌دی‌متیل سیلوکسان بر اساس قوانین میکرواستخراج فاز جامد (ایجاد تعادل آنالیت‌های بین محلول و فیبر) می‌باشد. در این روش، مگنت فقط با روکش PDMS به نمونه معرفی شده و بعد از گذراندن زمان مورد نیاز خودش، خارج شده وارد محفظه واجذب حرارتی و دستگاه مخصوص تزریق به کروماتوگرافی و آنالیز می‌شود. در پژوهش (Casas Ferreira et al., 2011) ۴ پارابن (MP, PP, BP, BeP) توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی (GC-MS) بررسی شده که برای همه آنالیت‌ها به جز متیل پارابن (۲۲ درصد) بازیابی بالاتر از ۷۹ درصد حاصل شده و حدود تشخیص نیز برابر با ۰.۶۴ الی ۴.۱۲ نانوگرم بر لیتر برآورد شده است. در پژوهش (Ramírez et al., 2012) محصولات مراقبت شخصی در طیف گسترده‌ای از قطبیت‌ها (۵ مدل پارابن) در نمونه‌های آب بررسی شده و حد تشخیص در سطوح پایین نانوگرم بر لیتر (بین ۰.۰۲ و ۰.۳)، انحراف معیار زیر ۲۰٪ و ریکاوری (در غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر لیتر) بیش از ۵۰٪ از نتایج این پژوهش هستند.

## ۲-۵- استخراج با مایع پرفشار<sup>۱۴</sup> PLE

این روش در سال ۱۹۹۵ توسط ریچر معرفی شد و یکی از روش‌های کارآمد آماده‌سازی نمونه‌های زیست محیطی جامد و نیمه جامد به شمار می‌رود (Richter et al., 1995). این روش مبتنی بر استفاده از حلال آلی در دما و فشارهای بالا برای دستیابی به استخراج نسبتاً کامل آنالیت‌ها از نمونه‌های جامد است. روش استخراج با مایع پرفشار، در دمایی بالاتر از نقطه جوش حلال‌های آلی انجام می‌شود و دلیل استفاده از فشار بسیار زیاد مایع، نگهداشتن حلال استخراج در طول فرایند است. استفاده از دمای بالا باعث کاهش ویسکوزیته‌ی حلال‌های مایع، افزایش قدرت حلال در حل آنالیت‌ها و همچنین نفوذ بهتر حلال به داخل بافت نمونه می‌شود (Péres et al., 2006). در مطالعه (Nieto et al., 2009) حد تشخیص برای گروهی از محصولات مراقبت شخصی شامل ۴ پارابن در لجن فاضلاب، از جمله BuP و PrP-EtP-MeP، 1.75-3 میکروگرم بر لیتر و میزان ریکاوری بالاتر از ۷۲ درصد و RSD کمتر از ۷ درصد بوده است.

<sup>13</sup> Stir- bar Sorptive Extraction

<sup>14</sup> Pressurized liquid extraction

## ۲-۲-۶- میکرواستخراج فازمایع<sup>۱۵</sup> LPME

در این روش حجم بسیار کمی از حلال در نوک سوزن یک میکروسرنج و یا درون یک لوله پلیمری متخلخل برای یک مدت زمان مشخصی با نمونه یا فضای فوقانی آن در تماس قرار می‌گیرد. سپس قسمتی و یا کل حلال به کروماتوگراف گازی منتقل می‌شود. تنها چندین میکرولیتر از نمونه (با رعایت اصول فشاربخار چه برای نمونه و چه برای حلال) برای انجام آنالیز کافی بوده و با روشی آسان قابل اجرا است. (Díaz-Álvarez et al., 2013) روش LPME را برای شناسایی MeP, EtP, PrP, BuP, BzP در نمونه های آبی توصیف کردند. آنالیزها در غلظت های ۰.۱ الی ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر انجام شده با حدود تشخیص ۰.۰۲ الی ۰.۵۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر صورت گرفتند.

جدول ۲-۲- متدهای مختلف استخراج به همراه معایب آنها

معایب روش	روش استخراج
محدود بودن به نمونه های گازی و مایع، شکنندگی و قیمت نسبتاً زیاد فیبرها، قیمت نسبتاً زیاد فیبرها، حجم پایین جاذب های تجاری موجود	SPME
وقت گیر بودن، هزینه بالا، مصرف زیاد حلال آلی	SPE
محدود بودن تعداد حلال های استخراج کننده، نامناسب برای ماتریکس های پیچیده بیولوژیکی	DLLME
محدود بودن جاذب، غیر قابل تمام اتوماتیک شدن متد به دلیل محدودیت در واجذب آنالیت از مگنت	SBSE
هزینه بالای خرید و نگهداری دستگاه، گزینش پذیری کم استخراج	PLE
زمان بر بودن روش، هزینه بر بودن، محدود بودن تعداد حلال های مناسب (به لحاظ خلوص و نقطه جوش)	LPME

## ۲-۳- کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی

دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنج جرمی، یکی از پیشرفته ترین دستگاه ها در زمینه آنالیز دستگاهی است که از دو قسمت کروماتوگراف گازی و طیف سنج جرمی تشکیل شده است. در این روش، اجزای یک مخلوط، پس از جداسازی با کروماتوگرافی گازی، در طیف سنج جرمی شناسایی می شوند. از آنجایی که ورود نمونه به دستگاه از طریق کروماتوگرافی گازی است، لذا نمونه هایی قابل آنالیز با دستگاه کروماتوگرافی گازی -طیف سنج جرمی هستند که فرار بوده، فشار بخار قابل توجهی داشته و در اثر حرارت، تخریب و یا تجزیه نشوند. اجزاء یک مخلوط پس از

<sup>15</sup> Liquid-phase microextraction

جداسازی با ستون کروماتوگرافی، وارد محفظه یونیزاسیون طیف سنج جرمی شده و در آنجا یونیزه میشوند و پس از آن با استفاده از تجزیه گر جرمی براساس نسبت جرم به بارشان ( $m/z$ ) جداسازی می شوند (Bouchonnet., 2013).

### ۲-۳-۱- انواع روش های مشتق سازی برای تعیین پارابن ها

GC-MS معمولاً به مشتق سازی آنالیت ها برای به دست آوردن مشتقات فرار مربوطه (پارابن) نیاز دارد. به این ترتیب، روش GC-MS برای تعیین پارابن ها را می توان به سه گروه تقسیم کرد: آنهایی که مبتنی بر مشتق سازی با استیلاسیون، آنهایی که مبتنی بر سیلیله کردن و آنهایی که بدون مشتق سازی هستند.

### ۲-۳-۱-۱- روش های مبتنی بر مشتق سازی با استیلاسیون

در GC-MS، بیشترین استفاده از واکنش مشتق سازی برای تعیین پارابن ها بر اساس استیلاسیون با انیدرید استیک است. استیلاسیون برای تعیین پارابن ها در نمونه های محیطی استفاده شده است. در پژوهش (Ferreira et al., 2011) در مورد تعیین پارابن ها در نمونه خاک با روش استخراج SBSE بحث میکند. این معرف در پژوهش (Ramírez et al., 2011) برای تعیین پارابن ها در گرد و غبار استفاده شده است.

### ۲-۳-۱-۲- روش های مبتنی بر مشتق سازی با واکنشگر سیلیله کننده

سیلیلاسیون، علیرغم اینکه یکی از پرکاربردترین واکنش های مشتق سازی در GC-MS است، برای تعیین پارابن ها کمتر استفاده شده است. این واکنش معمولاً مشتقات پایدار و فرار تولید می کند، اما دو عیب اصلی دارد، معمولاً به دمای بالا و محیط های غیرآبی نیاز دارد. سیلیلاسیون با N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamide (N-و-O بیس (تری متیل سیلیل) استامید) برای تعیین پارابن ها در آب و محصولات آرایشی و بهداشتی استفاده شده است (Terasaki et al., 2008)، همچنین، این معرف برای تعیین پارابن در خاک با GC-MS/MS استفاده شده است (Albero et al., 2012). همچنین از N-methyl-N-(tert-butyl)dimethylsilyl trifluoroacetamide (N-متیل-N- (ترت-بوتیل دی متیل سیلیل) تری فلورواستامید) برای مشتق سازی پارابن ها در آب ها و گرد و غبار استفاده شده است (Canosa et al., 2006 ; Canosa et al., 2007).

### ۲-۳-۱-۳- روش های بدون مشتق سازی

از GC-MS بدون مشتق سازی برای تعیین پارابن ها در لوازم آرایشی (Shen et al., 2007) و فاضلاب (González-Mariño et al., 2011) استفاده شده است. در این موارد، کاهش قدرت تفکیک پذیری با توانایی آنالیزور جرمی برای اندازه گیری جداگانه آنالیت ها جبران می شود. همچنین از GC-MS/MS بدون مشتق سازی برای تعیین MP، EP، PP و BP در لوازم آرایشی استفاده شده است (Wang et al., 2013).

## ۲-۳-۲- کروماتوگرافی گازی

کروماتوگرافی گازی یک تکنیک تحلیلی پرکاربرد است که برای جداسازی و تجزیه و تحلیل ترکیبات گازی و فرار استفاده می شود. اولین بار در اوایل دهه ۱۹۰۰ توسط گیاه شناس روسی، تسوت<sup>۱۶</sup> توسعه یافت. او جداسازی رنگدانه های رنگی گیاهی را نشان داد و این روش را "کروماتوگرافی" نامید. اگرچه اصطلاح "کروماتوگرافی" برای اولین بار توسط تسوت در سال ۱۹۰۶ معرفی شد، تاریخچه جداسازی های کروماتوگرافی بسیار قدیمی است و به دوران باستان باز می گردد. استخراج رنگ های طبیعی، فرآوری مواد غذایی و استخراج فلزات از سنین اولیه تاریخ بشر انجام شده است. اگرچه مارتین<sup>۱۷</sup> و ساینگ<sup>۱۸</sup> کار خود را در مورد کروماتوگرافی مایع گازی در سال ۱۹۴۱ شرح دادند اما اولین مقاله در مورد کروماتوگرافی گاز-مایع توسط مارتین و جیمز<sup>۱۹</sup> در سال ۱۹۵۲ منتشر شد و اولین انتشار در مورد کروماتوگرافی گاز-جامد توسط هسه<sup>۲۰</sup> و همکاران انجام شد (Shah et al., 2020).

اساس جداسازی با کروماتوگرافی گازی بر پایه توزیع نمونه بین دو فاز استوار است: فاز ساکن و فاز متحرک. فاز متحرک یک گاز بی اثر شیمیایی مانند هلیوم، نیتروژن و غیره است (Falaki, F. 2019). GC تنها شکل کروماتوگرافی است که از فاز متحرک برای برهمکنش با آنالیت استفاده نمی کند. هنگامی که فاز ساکن یک مایع روی یک تکیه گاه بی اثر باشد، فرآیند کروماتوگرافی گاز-مایع<sup>۲۱</sup> (GLC) نامیده می شود و زمانی که فاز ساکن یک جاذب جامد است که در آن بازداری آنالیت ها نتیجه جذب سطحی فیزیکی است، فرآیند کروماتوگرافی گاز-جامد<sup>۲۲</sup> (GSC) نامیده می شود، اساس روش GLC، که کاربرد بسیار گسترده تری دارد، تقسیم آنالیت بین فاز متحرک گازی و یک فاز مایع تثبیت شده بر سطح یک جامد بی اثر است. روش GSC بر پایه فاز ساکن جامدی بنا شده است. به علت بازداری نیمه دائمی ترکیبات فعال یا قطبی که سبب دنباله دار شدن پیک ها می شود، روش GSC کاربرد محدودی دارد. بنابراین، اصطلاح "کروماتوگرافی گازی مایع" به طور معمول به نام مختصر "کروماتوگرافی گازی" خلاصه می شود (Rahman et al., 2015).

ستون جداسازی (Separation column) قلب یک سیستم کروماتوگرافی گازی است زیرا مراحل تفکیک و جداسازی در ستون اتفاق می افتد. به طور کلی دو نوع ستون در آنالیزور GC داریم. ستون پر شده (Packed Column) و ستون لوله موئین (Capillary Column). ستون پر شده از ذرات ریزی پر شده که کاملاً بی اثر می

<sup>16</sup> Mikhail S. Tswett

<sup>17</sup> Archer John Porter Martin

<sup>18</sup> Richard Laurence Millington Synge

<sup>19</sup> Anthony Trafford James

<sup>20</sup> gerhard hesse

<sup>21</sup> gas-liquid chromatography

<sup>22</sup> gas-solid chromatography

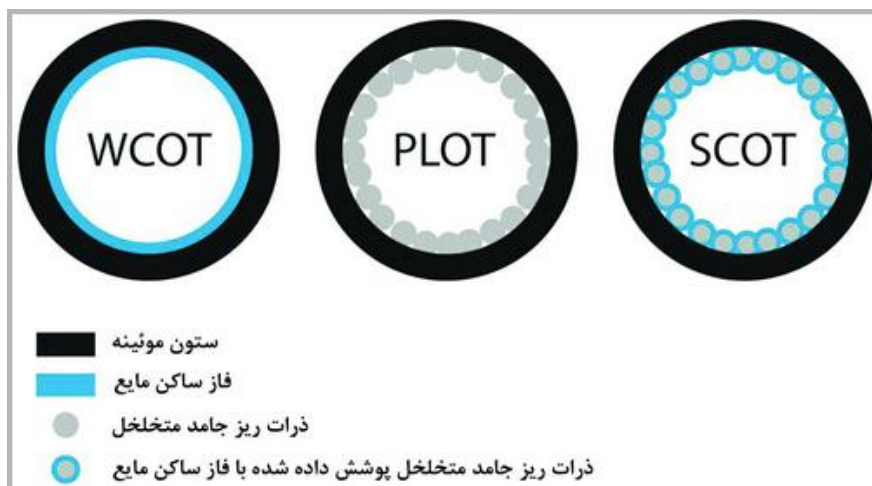
باشند و توسط فاز مایع پوشیده شده و فاز ساکن را تشکیل می دهند. بیشتر این ستون ها ۱۰-۲ متر می باشند و قطری حدود ۴-۲ میلیمتر دارند. در ستون لوله موئین برخلاف ستون های پر شده فقط یک لایه نازک از فاز ساکن بر روی دیواره آن متصل شده و به ستون های لوله ای باز نیز معروف هستند. با توجه به نوع ساختار این ستون ها، فشار آنها کمتر شده و در نتیجه طول آنها نسبت به ستون های پر شده می تواند بیشتر باشد. در این ستون ها جداسازی بهتر از ستون های پر شده صورت می گیرد. این ستون ها دارای قطر بین ۱/۰ تا ۵۵/۰ میلی متر، طول بین ۱۵ تا ۱۲۰ متر و ضخامت فاز ساکن بین ۱/۰ تا ۵ میکرومتر می باشند. دارای سه نوع می باشند:

ستون لوله باز دیواره پوششی WCOT<sup>۲۳</sup> که در آن دیواره توسط فاز مایع ساکن پوشیده شده.

ستون لوله باز روکش پشتیبانی SCOT<sup>۲۴</sup> که دیواره توسط یک پایه جامد پوشیده شده و فاز مایع روی آن جذب شده است. این لایه بر روی یک ستون از جنس شیشه و یا فلز با قابلیت انعطاف پذیری قرار میگیرد.

ستون لوله باز لایه متخلخل PLOT<sup>۲۵</sup> که شامل لایه متخلخلی از جامد در سطح ستون می باشند.

در کل ستون موئین در دستگاه GC بیشتر از ستون پر شده کاربرد دارد و از بین ستون های موئین مدل SCOT<sup>۲۴</sup> بیشتر مورد استفاده قرار میگیرد.



شکل ۲-۵- انواع ستون لوله موئین

<sup>23</sup> wall-coated open tubular

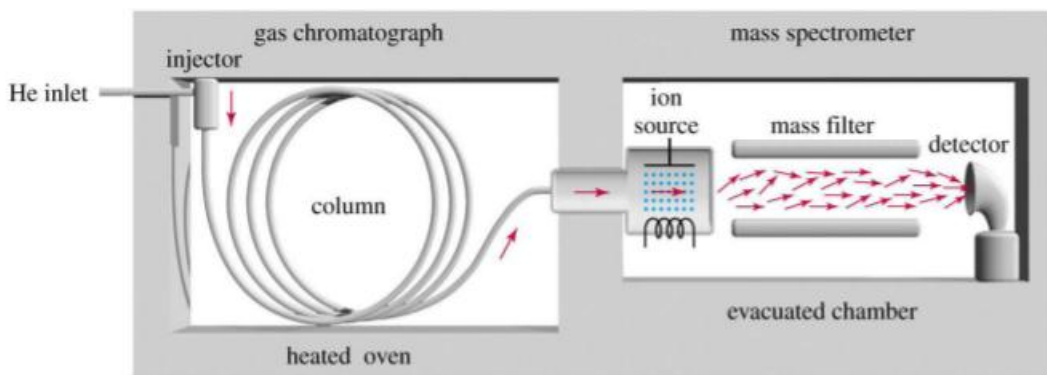
<sup>24</sup> support-coated open tubular

<sup>25</sup> Porous-layer open tubular

## ۲-۳-۳- طیف سنج جرمی

حد واسط بین طیف سنج جرمی و کروماتوگرافی گازی (interface)، نمونه را از ستون کروماتوگراف گازی به طیف سنج جرمی منتقل میکند. بعد از ورود، نمونه در محفظه یونیزاسیون یونیزه می شود. سپس گونه های یونیزه شده به آنالیزور استخراج می شوند که یون ها را بر اساس نسبت جرم به بار آنها تجزیه می کند. در نهایت این یون ها توسط آشکارسازها شناسایی شده و فراوانی نسبی هر گونه یونی تفکیک شده در قالب طیف جرمی ثبت می شود. آشکارساز و چشمه یونی در خلاء نگه داشته می شوند تا یون های تولید شده با مولکول های هوا برخورد نکنند و مسیر یون ها با سرعت خاصی حفظ شود (Rajawat et al., 2019 ; Medhe et al., 2018).

معمولا آنالیز به دو صورت می تواند انجام شود: اسکن کامل<sup>۲۶</sup> یا نظارت یون انتخابی<sup>۲۷</sup>. در اسکن کامل یک محدوده  $m/z$  مورد آنالیز آنالیزور، قرار می گیرد مثلا محدوده ۵۰-۵۰۰. هر چه محدوده اسکن بزرگ تر باشد حساسیت دستگاه کمتر خواهد بود. این روش برای تعیین ترکیبات ناشناخته و مجهول به کار می رود. معمولا در ابتدای هر آنالیز ابتدا یک اسکن کامل انجام می شود تا زمان بازداری و طیف جرمی نمونه به دست آید. در روش SIM یک قطعه مشخصی انتخاب شده و فقط همان یون مورد آنالیز جرمی قرار می گیرد. چون دستگاه فقط بر روی یک یا چند یون متمرکز شده است حساسیت افزایش می یابد (Bouchonnet., 2013).



شکل ۲-۶- نمای کلی دستگاه GC-MS

<sup>26</sup> full scan

<sup>27</sup> selected ion monitoring, SIM

## ۲-۳-۳-۱- یونیزاسیون

روش های یونش به مکانیسم های متفاوتی اطلاق می شود که برای یونی کردن ترکیبات در نمونه به کار می رود. منابع یونش<sup>۲۸</sup> به دو دسته گازی و واجدبی تقسیم می شوند: در نوع گازی ابتدا مولکول های نمونه به حالت گازی در آمده و سپس به یون تبدیل می شوند و در نوع واجدبی مستقیماً از حالت مایع یا جامد به یون های گاز تبدیل می شوند. تا سال ۱۹۸۰ تنها منبع یونش یونش الکترونی (EI) بود که فقط محدود به مولکول های کوچک بود و برای بیومولکول ها کارایی نداشت. اما ابداع تکنیک های بمباران سریع اتمی (FAB) و... انقلابی در آنالیز بیومولکول ها به وجود آورد. در جدول شماره ۱۵-۲ چند منبع یونش پر کاربرد به طور مختصر ذکر شده است. یونش الکترونی<sup>۲۹</sup> از قرار دادن مولکول ها در معرض پرتوهای الکترونی پر قدرت تشکیل می شود. اصطلاح برخورد الکترونی<sup>۳۰</sup> توصیف فیزیکی مناسبی برای این موضوع می باشد؛ مولکول های نمونه ضمن عبور از کروماتوگرافی و تفکیک شدن و ورود به محفظه یونیزاسیون موجود در بخش شناساگر با برخورد به الکترون ها دچار یونیزاسیون می شوند. الکترون ها ضعیف تر از آن هستند که بتوانند مولکولها را خرد کنند ولی عموماً باعث کنده شدن یک الکترون و ایجاد یون مثبت مولکولی می شوند. جدا از این یون مولکولی، فرگمنت های دختری بسیاری نیز تشکیل می شوند. یونش الکترونی از مهم ترین منابع یونش برای آنالیزهای معمول مولکول های کوچک، آب گریز و از نظر حرارتی پایدار است و به طور گسترده ای در طیف سنج های جرمی استفاده می شود. در این روش قطعات یونی زیادی تولید می شود. البته، با وجود پایگاه داده<sup>۳۱</sup> یا کتابخانه های جرمی بسیار قوی از طیف های جرمی ترکیبات، قطعه قطعه شدن یونی در بدست آوردن اطلاعات ساختاری می تواند بسیار مفید واقع شود. این منبع یونش طراحی ساده ای دارد. نمونه گازی با گذر از یک لوله مویی<sup>۳۲</sup> توسط پرتوی از الکترون های پرانرژی<sup>۳۳</sup> (70eV) بمباران<sup>۳۴</sup> می شود. این روش مناسب جفت شدن با کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی (GC/MS) است. کارایی این روش برای ترکیبات با وزن مولکولی بالای ۴۰۰ دالتون کم است چون مولکول های بزرگ و ناپایدار حرارتی، قبل از تبخیر در اثر حرارت تجزیه می شوند. از مشکلات اصلی واجدبی حرارتی نمونه ها در یونش الکترونی، غیرفرار بودن مولکول های بزرگ، تجزیه حرارتی، قطعه قطعه شدن زیاد مولکول ها و احتمال کم تولید یون مولکول است (Bouchonnet., 2013).

<sup>28</sup> ionization source

<sup>29</sup> electron ionization

<sup>30</sup> Electron impact

<sup>31</sup> database

<sup>32</sup> capillary

<sup>۳۳</sup> اگر ۱ ولت انرژی الکتریکی به یک الکترون داده شود انرژی سینتیک حاصله ۱ الکترون ولت می شود و ۷۰ الکترون ولت مقدار انرژی

استاندارد جهانی برای یونیزاسیون الکترونی بوده و در مولکول های آلی عملکرد بسیار خوبی را دارا می باشد.

<sup>۳۴</sup> عموماً از طریق گرم کردن یک ورق فلزی (عموماً تنگستن یا رینیوم) تشکیل می شوند.



## ۲-۳-۳-۲- تجزیه گر چهارقطبی یا کوادروپل

کوادروپل رایج ترین شناساگر طیف سنج جرمی بوده و در ۹۰٪ دستگاه‌های به فروش رفته جهان نصب می‌شود. در یک تجزیه گر چهارقطبی یا کوادروپل<sup>۳۵</sup>، یون‌ها بر اساس پایداری در مسیرهای خود در یک میدان الکتریکی نوسان کننده جداسازی می‌شوند. چهار قطبی یا کوادروپل از چهارمیله استوانه‌ای موازی با قطر حدود ۶ میلی‌متر و طولی تقریبی ۲۰ سانتی‌متر که در نقش الکتروود عمل می‌کنند، تشکیل شده است. میله‌ها به صورت الکتریکی به هم متصل-اند. از یک منبع جریان مستقیم<sup>۳۶</sup> برای اتصال یک جفت از میله‌های استوانه‌ای به قطب منفی و جفت دیگر به قطب مثبت استفاده می‌شود. بین هر جفت از میله‌ها یک ولتاژ جریان متناوب<sup>۳۷</sup> به صورت ۱۸۰ درجه خارج از فاز نیز اعمال می‌شود. پتانسیل جریان مستقیم، دامنه و فرکانس جریان متناوب، فاصله میله‌ها و مقدار جرم به بار<sup>۳۸</sup> از عوامل تاثیرگذار در جداسازی یون‌ها هستند. اسکن کردن همزمان پتانسیل DC و AC، به طوری که نسبت آنها در کل زمان آنالیز ثابت بماند، سبب تغییر در مسیر یون‌ها می‌شود و در نتیجه جز یون‌های با  $m/z$  مشخص، بقیه به میله‌ها برخورد کرده، خنثی و حذف شوند. بنابراین از محدوده وسیعی از یون‌ها، یون‌های با  $m/z$  مشخص به آشکارساز می‌رسند. تجزیه گر چهارقطبی (کوادروپل) یکی از متداول ترین تجزیه گرهای جرمی است که می‌تواند فشارهای نسبتاً بالا را تحمل کند، سرعت اسکن (پویش) در حد میلی‌ثانیه و در نتیجه زمان آنالیز کوتاهی دارد. قیمت نسبتاً مناسبی دارد و محدوده  $m/z$  تا ۴۰۰۰ با قدرت جداسازی یک واحد را داراست.

## ۲-۴- طراحی آزمایش<sup>۳۹</sup> و طرح مرکب مرکزی<sup>۴۰</sup>

طراحی آزمایش، روشی نظام‌مند جهت انجام مجموعه‌ای از آزمایش‌ها، برای بدست آوردن نتایجی قابل اطمینان در مورد اهمیت و نحوه‌ی تاثیر متغیرهای تجربی بر پاسخ مورد مطالعه است. یکی از نقش‌های اصلی طراحی آزمایش در شیمی تجزیه، فرآیند بهینه‌سازی است که هدف اصلی آن پیدا کردن بهترین شرایط آزمایش برای دست یافتن به بهترین نتیجه‌ی تجزیه‌ای می‌باشد. از مهمترین مزیت‌های استفاده از طراحی آزمایش‌ها می‌توان به مواردی همچون کاهش زمان، کاهش هزینه‌ها، برقراری ارتباط کمی یا قطعیت معین بین فاکتورها و پاسخ، بررسی برهمکنش‌های احتمالی بین فاکتورها و تعیین نقطه‌ی بهینه‌ی آزمایش اشاره کرد. طراحی مرکب مرکزی یکی از پرکاربردترین

<sup>35</sup> Quadrupoles

<sup>36</sup> Direct current: DC

<sup>37</sup> Alternating current: AC

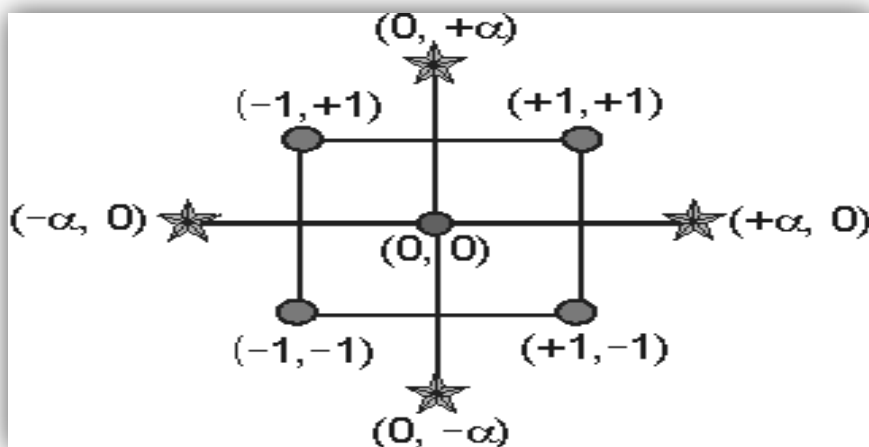
<sup>38</sup>  $m/z$

<sup>39</sup> Design expert software

<sup>40</sup> Central composite design

روشهای سطح پاسخ<sup>41</sup> در طراحی آزمایش است که برای مطالعه‌ی اثر تغییرات عوامل مستقل اثرگذار، بر پایه‌ی مدل درجه‌ی دوم استفاده می‌شود. این روش شامل سه گروه از نقاط آزمایش (ترکیب سطوح مختلف متغیرهای مورد بررسی) است:

- یک طراحی فاکتوریل دوسطحی که در آن همه‌ی ترکیب‌های ممکن (+1 و -1) بین سطوح بالا و پایین متغیرها در نظر گرفته می‌شود.
- نقاط محوری یا نقاط ستاره‌ای که مطابق با شکل ۷-۲، خارج از محدوده‌ی نقاط فاکتوریل قرار می‌گیرند و نقش مهمی در تعیین انحنای سطح پاسخ (مدل درجه دوم) دارند. فاصله‌ی این نقاط از مرکز با  $+\alpha$  و  $-\alpha$  نشان داده می‌شود. مقدار عددی  $\alpha$  معمولاً برابر با ریشه چهارم تعداد آزمایش‌های طراحی فاکتوریل موجود در طراحی در نظر گرفته می‌شود.
- نقطه مرکزی که در آن تمامی فاکتورها در سطح میانی (سطح صفر) یا متوسط قرار دارند.



شکل ۷-۲- نمونه طراحی مرکب مرکزی (با ۲ فاکتور)

<sup>41</sup> Response surface methodology

طراحی باکس بنکن<sup>۴۲</sup> از دیگر روش های طراحی سطح پاسخ است که در ادامه این مطلب به مقایسه و بررسی کاربردهای متفاوت این روش با CCD می پردازیم:

- تعداد آزمایش ها در روش CDD به طور معمول از روش BDD بیشتر است.
- روش CCD قابل گردش است ولی روش BDD همیشه قابلیت گردش ندارد.
- در روش CCD هر فاکتور پنج سطح متفاوت دارد (شامل سه نقطه در داخل حدود مشخص شده برای هر عامل و دو نقطه خارج از حدود مشخص شده برای هر عامل است) در حالی که در روش BDD هر فاکتور سه سطح متفاوت دارد (شامل سه نقطه در داخل حدود مشخص شده برای هر عامل است و هیچ نقطه ای خارج از حدود مشخص شده بالا و پایین برای هر عامل را ارائه نمی کند. به عبارت دیگر تمام نقاط آزمایش شده در محدوده ای از پیش تعیین شده قرار دارند. در نتیجه نقاط ابتدا و انتهای بازه دقت کمتری از سایر نقاط دارند).
- وقتی به دلیل محدودیت های فیزیکی یا مفهومی، آزمایش ها خارج از بازه مورد نظر ممکن نیست، روش BDD توصیه می شود. (مثلاً غلظت از صفر شروع می شود و حد منفی آن مفهوم ندارد).

---

<sup>42</sup> Box-Behnken design

فصل سوم:

بخش تجربی

### ۳-۱- مقدمه

در این فصل به معرفی مواد، وسایل و تجهیزات مورد استفاده در بخش آزمایشگاهی و نرم افزارهای کاربردی در طی اجرای پژوهش پرداخته شده است. روش اجرای پژوهش به تفکیک مراحل صورت گرفته و مراحل عملی میکرواستخراج فازجامد فضای فوقانی با فیبر **DVB/PDMS-PAL-SPME Arrow** شرح داده شده است.

### ۳-۲- مواد شیمیایی مورد استفاده

- محلول استاندارد شامل ۴ نوع آنالیت پارابن شامل متیل پارابن (MeP)، اتیل پارابن (EtP)، پروپیل پارابن (PrP) و بوتیل پارابن (BuP) با غلظت ۱۰۰۰ ppm محصول شرکت سیگما - آلد ریچ آمریکا  
- انیدرید استیک محصول شرکت Merck آلمان

- کربنات سدیم و NaCl محصول شرکت Chemlab بلژیک که برای مشتق سازی آنالیت استفاده شد

- استون مخصوص شستشو ساخت ایران

- گاز حامل هلیم با خلوص ۹۹.۹۹۹ درصد

- آب مورد استفاده در این مطالعه با استفاده از سیستم تصفیه Milli-Q (ساخت کمپانی Millipore آمریکا) تصفیه شد و برای تهیه محلول استاندارد spike در طول روش بهینه سازی و کالیبراسیون استفاده شد

### ۳-۳- وسایل مورد استفاده

- ظرف های شیشه‌ای به حجم ۵ و ۵۰ میلی لیتر

- بالن های حجمی ۵۰ و ۲۵۰ میلی لیتری

- سرنگ ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتری کروماتوگرافی گازی ساخت شرکت همیلتون آمریکا

- سایر تجهیزات عمومی آزمایشگاه

### ۳-۴- تجهیزات مورد استفاده

- دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) ساخت شرکت Agilent technologies آمریکا مدل 7890 A مجهز به محفظه‌ی تزریق انشعابی و غیر انشعابی و ستون موئینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰.۳۲ میلی‌متر با فاز ساکن HP-5 به ضخامت ۰.۲۵ میکرومتر و شناساگر طیف سنج جرمی (MS) 5973.

- ترازوی دیجیتال مدل TE 153 S با دقت اندازه‌گیری ۰.۰۰۰۰۱ گرم محصول شرکت سارتوریوس آلمان.

- مگنت با روکش تفلون و همزن مغناطیسی.

- کیت فیبرهای PAL-SPME ARROW ساخت شرکت CTC Analytics سوئیس.

- دستگاه حمام آب‌گرم.

### ۳-۵- نرم‌افزارهای مورد استفاده

- Agilent chemstation Rev.B.03.01 شامل ۲ بخش آنالین و آفلاین. بخش آنالین برای کنترل ابزار و بخش آفلاین جهت تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آنالیز نمونه به کار برده شده است

- Microsoft office-Excel 2016 جهت رسم جداول و نمودارها

- Design-Expert 7.1.5 جهت طراحی آزمایش و تحلیل اطلاعات و بهینه سازی

### ۳-۶- شرایط جداسازی کروماتوگرافی گازی

جزئیات شرایط تنظیم شده شامل موارد زیر میباشد:

- دمای منبع یون ۲۵۰ درجه ی سلسیوس

- جریان گاز حامل هلیوم ۱ میلی لیتر در دقیقه

- تزریق در حالت غیر انشعابی

- دمای محفظه ی تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس

برنامه دمایی محفظه‌ی ستون کروماتوگراف گازی در جدول ۳-۱ آورده شده است.

جدول ۳-۱- برنامه دمایی کروماتوگراف گازی

زمان ماند (دقیقه)	دما (درجه سلسیوس)	سرعت افزایش دما (درجه سلسیوس بر دقیقه)
۲	۱۰۰	-
۰	۲۰۰	۳
۴۳	۲۸۰	۳۰

### ۳-۷- تهیه ی نمونه ی اسپایک<sup>۴۳</sup> و محلول استاندارد ذخیره

در ابتدای کار از استاندارد اصلی حاوی متیل پارابن، اتیل پارابن، پروپیل پارابن و بوتیل پارابن، محلول استاندارد ذخیره با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در استون تهیه شد. برای تهیه ی نمونه های آب اسپایک شده در غلظتهای متفاوت، بسته به حجم مورد نیاز از محلول استاندارد ذخیره استفاده شد و نمونه ها تا زمان استفاده جهت استخراج آنالیت ها داخل یخچال در دمای 4 درجه ی سلسیوس نگهداری شدند.

### ۳-۸- روش استخراج

به منظور سهولت در استخراج و تفکیک پذیری بهتر آنالیت ها در کروماتوگرافی گازی، آنها باید قبلاً مشتق شوند. مشتق سازی باعث بهبود تعامل گروه های هیدروکسیل، در پارابن های کم تفکیک شده با سیستم کروماتوگرافی می شود و مشتق گیری درجا (یعنی همزمان با استخراج آنالیت) یک سری مزایا از جمله کاهش دستکاری نمونه، حذف آسان معرف مازاد و توانایی انجام واکنش در محیط آبی را به همراه دارد (Ocaña-González et al., 2015).

برای این منظور، ۱۰ میلی لیتر از استاندارد آبی یا نمونه حاوی پارابن های انتخاب شده در ظرف ۵۰ میلی لیتر قرار داده شده و ۲۰۰ میلی گرم  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  و ۰.۲ میلی لیتر استیک انیدرید (معرف مشتق) اضافه می شود. پس از مرحله مشتق، برای شروع روش استخراج، ویالهای نمونه به مدت ۲ دقیقه قبل از شروع استخراج، هم زده شدند تا انحلال کامل نمک اضافه شده (%  $\text{NaCl}$ )، بر اساس طرح) انجام شود. با توجه به طراحی بهینه سازی، دماهای از پیش تعیین شده

<sup>43</sup> Spike

برای استخراج آنالیت‌ها بین ۳۰ تا ۸۵ درجه سلسیوس تنظیم شد. پس از آن، فیبر (DVB/PDMS) در نمونه قرار داده شد تا فرآیند جذب برای زمان‌های استخراج از پیش تعیین شده (۱۰-۸۰ دقیقه) آغاز شود. پس از دفع (۲ دقیقه در دمای ۲۶۰ درجه سلسیوس)، دستگاه SPME مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفت تا جاذب برای استخراج بعدی آماده شود.



فصل چهارم:

نتایج و بحث

## ۴-۱-مقدمه

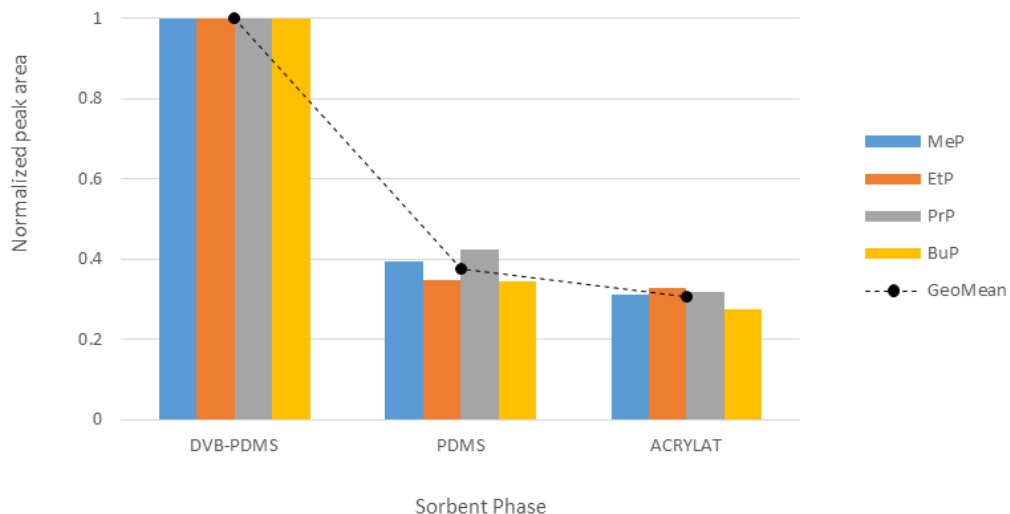
در این فصل نتایج حاصل از مطالعه‌ی عوامل تاثیرگذار بر کارایی استخراج و نتایج بهینه سازی و اعتبار بخشی روش میکرواستخراج فاز جامد ارائه شده است. در ابتدا، فیبرهای (Arrow) موجود مقایسه و بهترین آن‌ها برگزیده شد. سپس، فاکتورهای زمان استخراج، دمای استخراج و قدرت یونی محلول نمونه با استفاده از روش طراحی مرکب مرکزی مطالعه و بهینه شدند. در مرحله‌ی بعد مشخصات تجزیه‌ای روش، از جمله خطی بودن پاسخ، حساسیت و دقت روش مورد ارزیابی قرار گرفتند. در نهایت، صحت روش و اعتبار بخشی آن با استفاده از آنالیز نمونه‌ی آب سطحی به انجام رسید. لازم به ذکر است که با توجه به فرار بودن ترکیبات پارابن (Hajizadeh et al., 2021) و به منظور حفاظت از فیبر در برابر آلودگی، روش فضای فوقانی برای استخراج انتخاب شد و فیبر مستقیماً در نمونه قرار نگرفت.

## ۴-۲- بهینه سازی استخراج

### ۴-۲-۱- انتخاب فیبر

اولین مرحله در بهینه سازی SPME، انتخاب نوع فیبر مناسب است به طوری که حداکثر بازده استخراج برای آنالیت های مورد نظر به دست آید (Risticvic et al., 2009). شکل ۴-۱، کارایی نسبی فیبر های آزمایش شده شامل PDMS، Acrylate و DVB-PDMS را برای استخراج پارابن ها نشان می‌دهد. در میان فیبرها، Acrylate ضعیف ترین قابلیت را داشت و PDMS عملکردی نزدیک با Acrylate نشان داد. در نهایت DVB-PDMS نتایج بهتری نسبت به سایر جاذب ها نشان داد. عملکردهای مختلف فیبرها را می توان به ویژگی های مختلف فیزیکوشیمیایی آنالیت ها و پوشش فیبرها نسبت داد. در مواردی که تصمیم گیری از روی تصویر دشوار یا غیر دقیق باشد، مقدار عددی میانگین هندسی نتیجه‌ی دقیق تری به دست خواهد داد ( نقاط سیاه در شکل ۴-۱). لازم به ذکر است که محور عمودی نمودار، سطح پیک نرمال شده ی آنالیت های استخراج و آنالیز شده است. به عبارت دیگر، مقدار واقعی سطح پیک هر یک از ترکیبات، نسبت به بیشینه ی آن در بین جاذب های مختلف نرمال شده است تا مقایسه ی فیبرها دقیق تر صورت پذیرد. مقادیر میانگین هندسی نیز بر اساس سطح پیک های نرمال شده محاسبه شده است.

از آنجا که افزودن نوع فیبر، به عنوان یک عامل کیفی در طراحی آزمایش، تعداد آزمایش ها را دو برابر می‌کرد و همچنین به دلیل اینکه فقط ۳ فیبر وجود داشت، امکان افزودن این متغیر به طراحی مرکب مرکزی وجود نداشت. در نتیجه، این عامل به طور مستقل و بدون طراحی آزمایش بهینه شد.



شکل ۴-۱-راندمان استخراج نسبی فیبر های SPME مورد مطالعه برای پارابن های منفرد و میانگین هندسی ناحیه پیک نرمال شده

#### ۴-۲-۲- بهینه‌سازی میکرواستخراج فاز جامد

در این پژوهش از طراحی مرکب مرکزی (CCD) جهت بهینه‌سازی عوامل موثر بر استخراج پارابن ها از نمونه‌های آبی استفاده شد. فاکتورهای اثر گذار بر کارایی استخراج پارابن ها از نمونه‌های آبی در این پژوهش شامل زمان استخراج، اثر نمک و دمای استخراج بود. با توجه به هدف این پژوهش مبنی بر دستیابی به بهترین کارایی استخراج همزمان آنالیت ها، فاکتورهای اثر گذار در پنج سطح با بیست آزمایش و شش تکرار در نقطه‌ی مرکزی مطالعه شدند. جدول ۴-۱، ترتیب آزمایش ها و مقادیر فاکتورها را نشان می دهد.

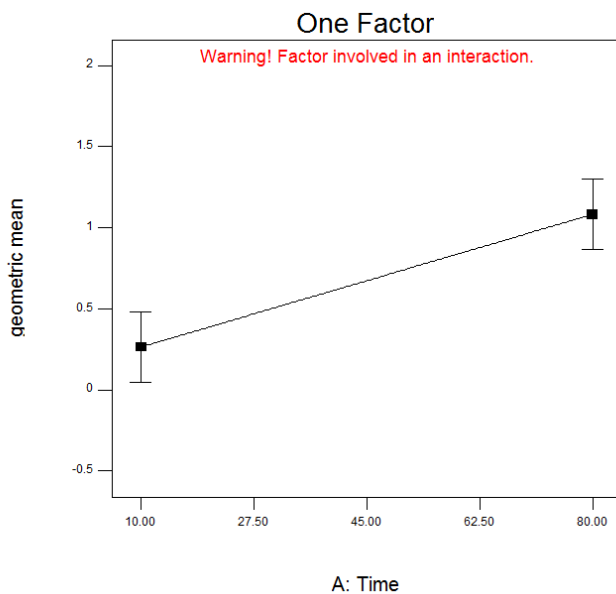
جدول ۴-۱- آزمایش های طراحی شده در روش مرکب مرکزی و پاسخ های حاصل از آن

اجرا	فاکتور			پاسخ				
	الف	ب	س	متیل پارابن	اتیل پارابن	پروپیل پارابن	بوتیل پارابن	میانگین هندسی
	زمان (دقیقه)	دما (سلسیوس)	نمک %					
۱	۲۴	۴۱	۶	۰.۰۴۳	۰.۰۲۰	۰.۰۱۵	۰.۰۱۲	۰.۰۲۰
۲	۴۵	۸۵	۱۵	۰.۶۱۴	۰.۴۰۹	۰.۵۲۶	۰.۶۹۷	۰.۵۵۱
۳	۸۰	۵۸	۱۵	۰.۳۸۰	۰.۵۰۸	۰.۴۰۵	۰.۳۸۳	۰.۴۱۶
۴	۴۵	۵۸	۱۵	۰.۴۰۹	۰.۳۸۷	۰.۲۸۷	۰.۲۶۵	۰.۳۳۱
۵	۱۰	۵۸	۱۵	۰.۱۲۹	۰.۰۸۵	۰.۰۵۹	۰.۰۵۴	۰.۰۷۷
۶	۶۶	۷۴	۲۴	۱.۰۰۰	۱.۰۰۰	۱.۰۰۰	۱.۰۰۰	۱.۰۰۰
۷	۲۴	۷۴	۲۴	۰.۵۰۹	۰.۵۵۶	۰.۴۶۹	۰.۴۱۷	۰.۴۸۵
۸	۶۶	۴۱	۲۴	۰.۲۶۵	۰.۳۷۷	۰.۲۳۷	۰.۱۶۰	۰.۲۴۸
۹	۴۵	۵۸	۱۵	۰.۲۷۵	۰.۳۲۴	۰.۲۳۸	۰.۲۰۸	۰.۲۵۸
۱۰	۶۶	۷۴	۶	۰.۶۹۸	۰.۲۷۵	۰.۲۸۸	۰.۳۴۰	۰.۳۷۰
۱۱	۴۵	۳۰	۱۵	۰.۰۸۰	۰.۰۴۴	۰.۰۲۳	۰.۰۱۷	۰.۰۳۴
۱۲	۴۵	۵۸	۰	۰.۱۲۱	۰.۰۶۱	۰.۰۴۸	۰.۰۴۸	۰.۰۶۴
۱۳	۴۵	۵۸	۱۵	۰.۲۴۲	۰.۳۳۷	۰.۲۳۹	۰.۲۱۵	۰.۲۵۵
۱۴	۴۵	۵۸	۳۰	۰.۱۹۴	۰.۲۳۹	۰.۱۳۳	۰.۰۷۴	۰.۱۴۶
۱۵	۶۶	۴۱	۶	۰.۱۰۴	۰.۰۷۴	۰.۰۵۳	۰.۰۵۰	۰.۰۶۷
۱۶	۲۴	۴۱	۲۴	۰.۱۲۲	۰.۱۲۲	۰.۰۷۷	۰.۰۵۱	۰.۰۸۸
۱۷	۴۵	۵۸	۱۵	۰.۲۸۸	۰.۳۲۹	۰.۲۳۹	۰.۲۱۲	۰.۲۶۳
۱۸	۴۵	۵۸	۱۵	۰.۲۸۲	۰.۲۸۱	۰.۲۰۴	۰.۱۸۰	۰.۲۳۲
۱۹	۲۴	۷۴	۶	۰.۱۷۹	۰.۱۶۱	۰.۱۳۹	۰.۱۴۸	۰.۱۵۶
۲۰	۴۵	۵۸	۱۵	۰.۲۹۰	۰.۳۲۸	۰.۲۴۳	۰.۲۱۱	۰.۲۶۴

## ۴-۲-۳- طراحی آزمایش و بهینه سازی سایر عوامل

نتایج و راه حل های حاصل از طراحی مرکب مرکزی، نقطه ی بهینه ی استخراج را به صورت زمان ۷۸ دقیقه، دمای ۷۰ درجه سلسیوس و غلظت نمک ۳۰٪ مشخص کرد. در ادامه ی متن، به تحلیل نحوه ی تاثیر این سه فاکتور بر کارایی استخراج و نقاط منتخب، با توجه به نکات عملی آنالیز، پرداخته می شود.

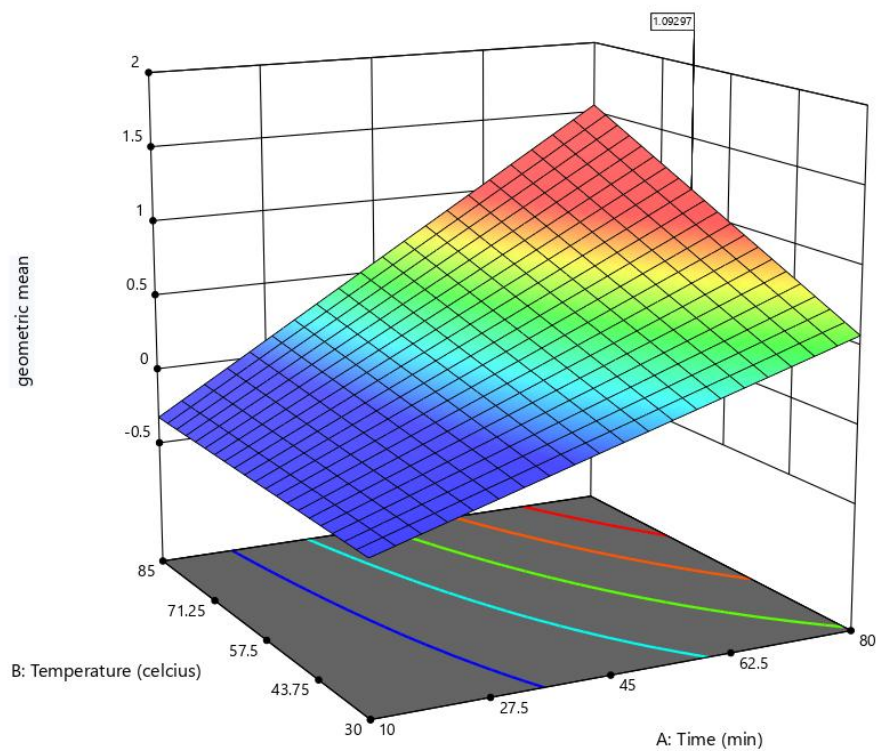
زمان استخراج. فرایند انتقال آلاینده ها از محلول نمونه به سطح فیبر، شامل سه فرایند عمده ی الف) انتقال در توده ی نمونه ب) انتقال در حد واسط نمونه و فضای فوقانی (انتقال از فاز آبی به فاز گازی) و پ) حرکت مولکول ها به سمت سطح فیبر جاذب است. عموماً نفوذ و انتقال در توده ی محلول نمونه، کندترین مرحله است و از این رو افزایش زمان اجازه ی انتقال مقدار بیشتری از آنالیت ها به جاذب را فراهم می کند. در نتیجه انتظار می رود که زمان استخراج تاثیر مثبتی بر مقدار آنالیت استخراج شده و حساسیت کلی روش داشته باشد. این موضوع البته تا جایی صادق است که تعادل بین جاذب و محلول نمونه برقرار شود و یا به اصطلاح، جاذب اشباع شود. شکل های ۴-۲ تا ۴-۳ تاثیر همزمان زمان با دمای استخراج بر سطح پیک ترکیبات مورد بررسی و هم چنین میانگین هندسی آن ها، به عنوان معیاری از استخراج همزمان آنالیت ها را نشان می دهد.



شکل ۴-۲- تاثیر زمان استخراج بر میانگین هندسی سطح پیک آنالیت ها

در شکل ۴-۲، مشخص است که زمان استخراج به صورت خطی و مثبت بر مقدار آنالیت های استخراج شده تاثیر می گذارد. نکته‌ی قابل ملاحظه در این شکل این است که هیچ گونه کاهشی در شیب خط مشاهده نمی شود و در نتیجه، نقطه‌ی اشباع فیبر یا به عبارت دیگر، نقطه‌ی تعادل استخراج نیازمند زمان طولانی تری است.

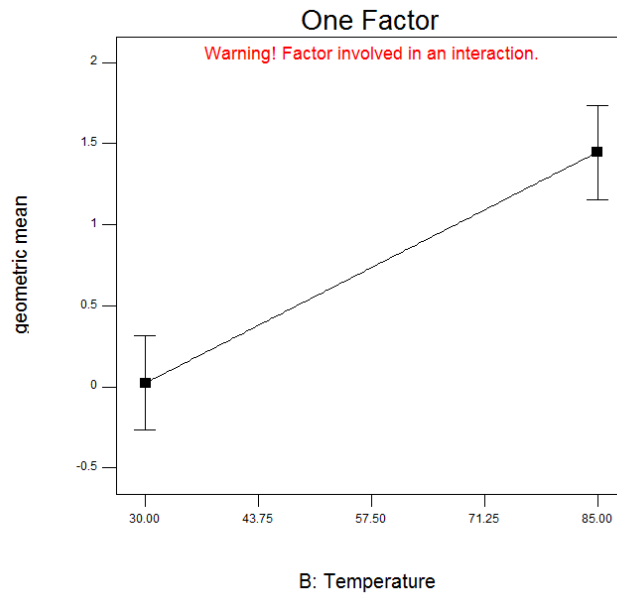
از سوی دیگر با توجه به شکل ۴-۳ همانطور که مشخص است، با افزایش زمان، میانگین هندسی افزایش پیدا کرده و زمان استخراج روند افزایشی را در سراسر محدوده نشان میدهد و در زمان های مختلف، دما اثر مثبت بر کارایی استخراج دارد.



شکل ۴-۳- سطح پاسخ نشان دهنده‌ی تاثیر دما و زمان بر میانگین هندسی

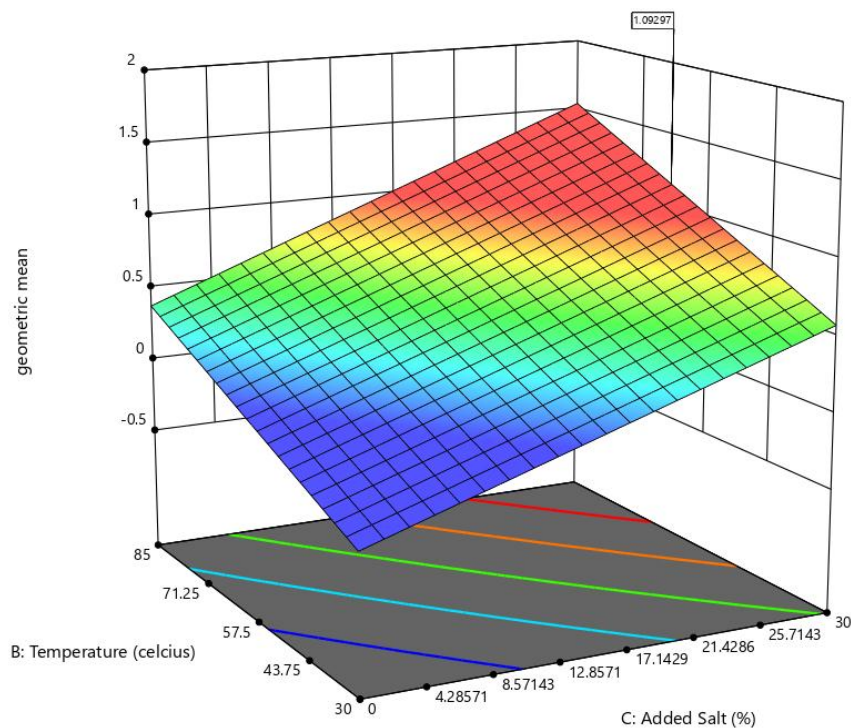
دمای استخراج، عامل مهم و تاثیرگذار دیگر بر کارایی فرایند استخراج، دمای محیط آبی، فضای فوقانی و سطح فیبر جاذب است. این عامل از دو طریق می تواند بر کارایی استخراج تاثیر بگذارد. از یک سو افزایش دما باعث تسهیل و افزایش انتقال آنالیت ها از فاز محلول (آبی) به فضای فوقانی و در نتیجه افزایش کارایی استخراج می شود. از سوی دیگر، با توجه به گرمازا بودن فرایند جذب آنالیت ها روی جاذب، افزایش دما می تواند تاثیر منفی بر مقدار آنالیت استخراج شده داشته باشد. با این حال، در آزمایش های صورت گرفته در این پژوهش، تاثیر منفی افزایش دما مشاهده

شکل ۴-۴ تاثیر مثبت افزایش دمای استخراج بر میانگین هندسی سطح پیک آنالیت ها را نشان می دهد. واضح است که این تاثیر بر آنالیت های جداگانه می تواند متفاوت باشد، ولی در نهایت با توجه به هدف این پژوهش در بهینه سازی آنالیز همزمان پارابن ها، میانگین هندسی مناسب ترین نتیجه ی بهینه را به دست می دهد.



شکل ۴-۴- تاثیر دمای استخراج بر میانگین هندسی سطح پیک آنالیت ها

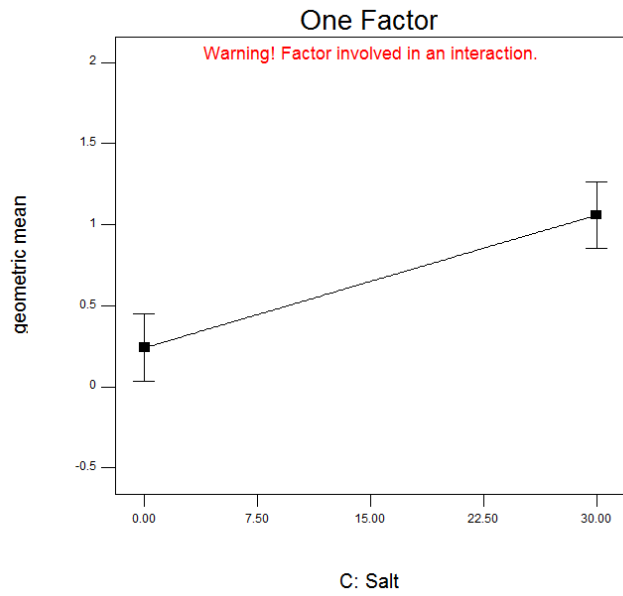
شکل ۴-۵، نحوه ی اثر دما (همراه با تغییر قدرت یونی محلول نمونه) را نشان می دهد که با افزایش دما در طول منطقه ی مورد بررسی، کارایی استخراج افزایش پیدا میکند. ذکر این نکته حائز اهمیت است که علیرغم مثبت بودن تاثیر دما، این عامل باعث می شود تا احتمال فرار آنالیت ها از ظرف نمونه و ایجاد خطا در نتایج افزایش یابد. به همین دلیل در این پژوهش دمای ۷۰ درجه سلسیوس به عنوان دمای بهینه انتخاب شد.



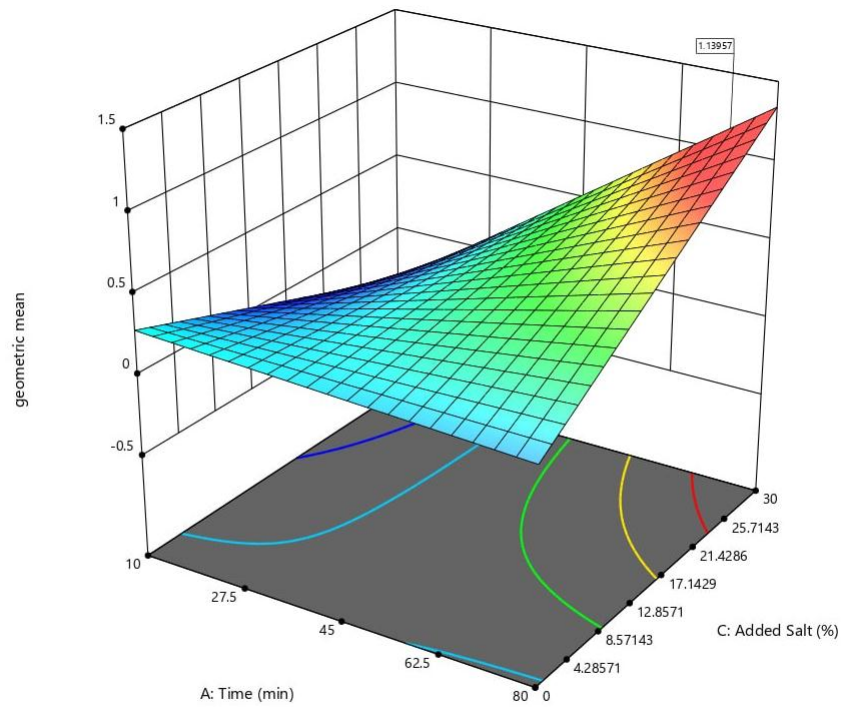
شکل ۴-۵- سطح پاسخ نشان دهنده ی تاثیر دما و غلظت نمک بر میانگین هندسی

قدرت یونی محلول نمونه. قدرت یونی محلول نمونه عامل رایجی است که از طریق تغییر دادن آن می توان کارایی استخراج را بهبود بخشید. معمولاً افزودن نمک معدنی به نمونه ی آبی و افزایش قدرت یونی محلول باعث کاهش انحلال پذیری ترکیبات (بویژه غیرقطبی) شده به استخراج آن ها از محیط آبی کمک می کند. شکل های ۴-۶ و ۴-۷ تاثیر مثبت این متغیر را به وضوح نشان می دهند. در نتیجه، غلظت ۳۰٪ از نمک سدیم کلراید در محلول نمونه، به عنوان شرایط بهینه انتخاب شد.





شکل ۴-۶- تاثیر قدرت یونی (غلظت نمک) نمونه بر میانگین هندسی سطح پیک آنالیت ها



شکل ۴-۷- سطح پاسخ نشان دهنده ی تاثیر زمان و غلظت نمک بر میانگین هندسی

برهمکنش بین فاکتورها. علاوه بر تاثیر جداگانه ی هریک از فاکتورها، در شکل های ۳-۴ و ۷-۴ برهمکنش بین فاکتورهای بررسی شده نیز قابل توجه هستند. در شکل ۳-۴ مشاهده می شود که در زمان های استخراج کوتاه، دمای نمونه تاثیر بر کارایی استخراج ندارد. در حالی که با افزایش زمان، تاثیر مثبت دما نیز قابل ملاحظه می شود. هم چنین، شکل ۷-۴ نشان دهنده ی برهمکنش بسیار شدید بین غلظت نمک و زمان استخراج است. به عبارت دیگر، عامل زمان استخراج، با هر دو عامل دیگر برهمکنش معنی دار و بر آن ها تاثیر مثبت دارد. نکته ی قابل ذکر در این قسمت این است که چنین پدیده هایی، که تاثیر بسیار زیادی نیز بر شرایط بهینه دارند، تنها از راه طراحی آزمایش آشکار می شوند. در غیر این صورت و از راه مطالعه ی فاکتورها به صورت منفرد و مستقل، این برهمکنش ها مغفول باقی می ماند و شرایط بهینه ی واقعی به دست نمی آید.

#### ۳-۴- مشخصات کارایی تجزیه ای

پس از تعیین نوع و مقدار بهینه هر کدام از فاکتورهای موثر بر کارایی استخراج، آزمایش های لازم جهت رسم منحنی کالیبراسیون برای هر یک از آنالیت ها انجام شد. نمودار کالیبراسیون از افزودن (اسپایک) آنالیت ها در محلول آب خالص در محدوده غلظت ۱ تا ۱۰۰۰۰ نانوگرم بر لیتر برای همه آنالیت ها و انجام فرایند کامل مشتق سازی، استخراج و آنالیز در شرایط بهینه به دست آمد. منحنی های کالیبراسیون برای تمام آنالیت های منفرد رسم شده و نتایج آن در جدول ۲-۴ آورده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده، منحنی کالیبراسیون برای کلیه آنالیت های بررسی شده در این مطالعه، در محدوده غلظت های بیان شده، کاملاً خطی بوده و حداقل مقدار ضریب تعیین کالیبراسیون ( $R^2$ ) برابر با ۰.۹۹۸ بود. تکرارپذیری نیز برای برآورد دقت روش مورد استفاده قرار گرفت که کمتر از ۱۸/۵۹ درصد (RSD) نشان داده شد. حد تشخیص<sup>۴۴</sup>، LOD، در اصطلاح کلی به مفهوم غلظتی است که در آن سیگنال مشاهده شده دارای قابلیت تفکیک معنی داری از نویز باشد. حد تشخیص مقدار روش بهینه شده در محدوده ی ۰.۰۹ تا ۰.۲۰۲ نانوگرم بر لیتر قرار داشت. هم چنین، حد تعیین مقدار<sup>۴۵</sup>، LOQ، کمترین مقدار غلظت یک آنالیت است که سیگنال حاصل از آن با قطعیتی معین، قابلیت استفاده در تعیین مقدار آن آنالیت را داراست و اغلب مقدار آن را ۱۰ برابر نسبت سیگنال به نویز در نظر گرفته می شود. حد تعیین مقدار روش بهینه شده در محدوده ی ۰.۱۶۴ تا ۰.۸۷۵ نانوگرم بر لیتر قرار داشت. در این پژوهش، حد تشخیص و حد تعیین مقدار به ترتیب با ۳ و ۱۰ برابر کردن میانگین ارتفاع نویز در خط زمینه نزدیک به پیک آنالیت ها و سپس در مقایسه با ارتفاع پیک آنالیت به دست آمد (جدول ۲-۴).

<sup>44</sup> Limit of detection=LOD

<sup>45</sup> Limit of quantification= LOQ

در نهایت، به منظور بررسی صحت روش، یک نمونه آب سطحی در زمستان ۱۳۹۹ از رود کرج گرفته شد و مورد استفاده قرار گرفت. برای به دست آوردن بازیابی، این نمونه با آنالیت ها، در ۱۰۰-۵۰۰ نانوگرم بر لیتر در شرایط بهینه استخراج و آنالیز شد. لازم به ذکر است که در این مطالعه، نمونه جمع آوری شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و اثری از آلودگی آنالیت مشاهده نشد. محدوده‌ی مقادیر بازیابی، بین ۶۳٪ (بوتیل پارابن) تا ۱۲۴٪ (متیل پارابن) را نشان داد.

جدول ۴-۲- مشخصات تجزیه ای روش میکرواستخراج فازجامد فضای فوقانی با فیبر DVB-PDMS

ریکاوری(%)	ضریب تعیین	تکرار پذیری(%)		حد تعیین مقدار		حد تشخیص	
		۱۰۰۰	۱۰	(نانوگرم بر لیتر)	(نانوگرم بر لیتر)	ترکیبات	۱۰
رود کرج*	آب مقطر	کالیبراسیون	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	
۹۶	۱۲۴	۰.۹۹۸	۸.۷۷۲	۷.۶۶۹	۲.۸۸۷	۰.۶۶۶	متیل پارابن
۱۰۴	۱۲۳	۰.۹۹۹	۹.۵۴۹	۸.۷۵۰	۱.۴۹۱	۰.۲۹۷	اتیل پارابن
۷۰	۸۵	۰.۹۹۹	۷.۷۳۹	۱۶.۱۸۴	۰.۶۶۹	۰.۱۵۸	پروپیل پارابن
۶۳	۸۴	۰.۹۹۹	۹.۹۸۰	۱۸.۵۹۱	۰.۵۴۱	۰.۱۲۸	بوتیل پارابن

\*برای نمونه واقعی، غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر لیتر استفاده شد.

فصل پنجم:

نتیجه گیری

## ۵-۱- نتیجه گیری نهایی

استفاده گسترده از پارابن ها در جهان موجب رهاسازی، توزیع و گسترش آنها در سراسر محیط زیست مانند آب، خاک، هوا و موجود زنده شده است. مهمترین منبع پارابنها محصولات مراقبت شخصی و پساب تصفیه خانه های فاضلاب هستند که به دلیل نبود و ناکارآمدی فناوری های متداول تصفیه وارد محیط زیست بخصوص محیط های آبی میشوند. امروزه پارابن ها در منابع آبی، خاکی، رسوبات، هوا، گرد و غبار و حتی موجودات زنده گیاهی و جانوری آشکارسازی و اندازه گیری شده اند. اگرچه، براساس شواهد موجود به نظر میرسد مقادیر غلظت های موجود در محیط زیست طبیعی برای تولید اثرات نامطلوب آنها کم یا ناچیز میباشد اما تولید و گسترش روزافزون این ترکیبات در محصولات دارویی، آرایشی و بهداشتی، مواد غذایی و غیره در کنار پتانسیل ایجاد اثرات منفی مختلف بر موجودات زنده بخصوص انسان ها لزوم شناسایی، پایش، تصفیه و حذف آنها را از محیط های مختلف آشکار میکند. تکنیکی برای تعیین مقدار پارابن در نمونه های آب بر اساس پیوند PAL SPME Arrow با GC-MS در محیط آب معرفی شد. پاسخ خطی و نتایج دقیق در سراسر محدوده کالیبراسیون به دست آمد. تکنیک PAL SPME Arrow بهینه و معتبر از یک ساختار مکانیکی قوی جاذب با حجم جاذب بیشتر در مقایسه با فیبر SPME معمولی که منجر به حساسیت عالی تجزیه و تحلیل می شود، بهره مند است. کل فرآیند مشتق سازی، استخراج و آنالیز با GC-MS ۱۲۰ دقیقه به طول انجامید. حجم نمونه بسیار کم و عدم نیاز به حلال از مزیت های عمده روش معرفی شده بود و می تواند جمع آوری، ذخیره و حمل نمونه را در حین برنامه های پایش به میزان قابل توجهی تسهیل کند و هم چنین روشی سازگار با محیط زیست در اختیار بگذارد. مقادیر بازیابی معقول نیز نشان داد که به دلیل حساسیت و گزینش پذیری روش، می توان از آن برای تعیین غلظت کمی از آنالیت ها در نمونه های آب سطحی با ماتریکس پیچیده استفاده کرد.

## ۵-۲- پیشنهادها

از جمله موارد پیشنهادی که میتوان در مطالعات آتی به آنها پرداخت:

- ۱- توسعه روش برای استخراج و آنالیز همزمان پارابن ها همراه با سایر آلاینده های نوظهور
- ۲- بهینه سازی و کاربرد روش با استفاده از جاذب های مختلف برای سایر ماتریکس ها

# فصل ششم

## منابع

Abbasghorbani, M., Attaran, A., Payehghadr, M. (2013). Solvent-assisted dispersive micro-SPE by using aminopropyl-functionalized magnetite nanoparticle followed by GC-PID for quantification of parabens in aqueous matrices. *Journal of Separation Science*, 36(2), 311–319.

Albero, B., Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., Pérez, R. A., & Tadeo, J. L. (2012). Determination of selected organic contaminants in soil by pressurized liquid extraction and gas chromatography tandem mass spectrometry with in situ derivatization. *Journal of Chromatography A*, 1248, 9-17.

Aldrete, J. A., & Johnson, D. A. (1969). Allergy to local anesthetics. *Jama*, 207(2), 356-357.

Alkafajy, S. A., & Abdul-Jabbar, R. A. (2020). Comprehensive effects of parabens in human physiology. *Ann Trop Med Public Health*, 23, 23.

Andersen, F. A. (2008). Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. *Int J Toxicol*, 27(Suppl 4), 1-82.

Arthur, C. L., & Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical chemistry*, 62(19), 2145-2148.

Baltussen, E., Sandra, P., David, F., & Cramers, C. (1999). Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*, 11(10), 737-747.

Benijts, T., Günther, W., Lambert, W., & Leenheer, A. D. (2003). Sonic spray ionization applied to liquid chromatography/mass spectrometry analysis of endocrine-disrupting chemicals in environmental water samples. *Rapid communications in mass spectrometry*, 17(16), 1866-1872.

Błądzka, D., Gromadzińska, J., & Wąsowicz, W. (2014). Parabens. From environmental studies to human health. *Environment international*, 67, 27-42.

Boberg, J., Axelstad, M., Svingen, T., Mandrup, K., Christiansen, S., Vinggaard, A. M., & Hass, U. (2016). Multiple endocrine disrupting effects in rats perinatally exposed to butylparaben. *Toxicological Sciences*, *152*(1), 244-256.

Bouchonnet, S. (2013). *Introduction to GC-MS coupling*. CRC Press.

Bronowicka-Kłys, D. E., Lianeri, M., & Jagodziński, P. P. (2016). The role and impact of estrogens and xenoestrogen on the development of cervical cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *84*, 1945-1953.

Canosa, P., Pérez-Palacios, D., Garrido-López, A., Tena, M. T., Rodríguez, I., Rubí, E., & Cela, R. (2007). Pressurized liquid extraction with in-cell clean-up followed by gas chromatography–tandem mass spectrometry for the selective determination of parabens and triclosan in indoor dust. *Journal of Chromatography A*, *1161*(1-2), 105-112.

Canosa, P., Rodríguez, I., Rubí, E., Bollain, M. H., & Cela, R. (2006). Optimisation of a solid-phase microextraction method for the determination of parabens in water samples at the low ng per litre level. *Journal of Chromatography A*, *1124*(1-2), 3-10.

Casas Ferreira, A. M., Möder, M., & Fernandez Laespada, M. E. (2011). GC-MS determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in water by in situ derivatisation and stir-bar sorptive extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *399*(2), 945-953.

Chen, Z. F., Ying, G. G., Lai, H. J., Chen, F., Su, H. C., Liu, Y. S., ... & Zhao, J. L. (2012). Determination of biocides in different environmental matrices by use of ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *404*(10), 3175-3188

Čiuvašovaitė, V., Adomavičiūtė, E., & Vičkačkaitė, V. (2007). Solid-phase microextraction of parabens by polyaniline--polypyrrole coating. *Chemija*, *18*(3).

Darbre, P. D., & Harvey, P. W. (2008). Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of applied toxicology*, *28*(5), 561-578.



Díaz-Álvarez, M., Turiel, E., & Martín-Esteban, A. (2013). Hollow fibre liquid-phase microextraction of parabens from environmental waters. *International journal of environmental analytical chemistry*, 93(7), 727-738.

Ebrahimpour, B., Yamini, Y., & Esrafil, A. (2012). Emulsification liquid phase microextraction followed by on-line phase separation coupled to high performance liquid chromatography. *Analytica chimica acta*, 751, 79-85.

Emmanouil, C., Bekyrou, M., Psomopoulos, C., & Kungolos, A. (2019). An insight into ingredients of toxicological interest in personal care products and a small-scale sampling survey of the Greek market: delineating a potential contamination source for water resources. *Water*, 11(12), 2501.

Falaki, F. (2019). Sample preparation techniques for gas chromatography. In *Gas chromatography-derivatization, sample preparation, application*. IntechOpen.

Farajzadeh, M. A., Djozan, D., & Bakhtiyari, R. F. (2010). Use of a capillary tube for collecting an extraction solvent lighter than water after dispersive liquid-liquid microextraction and its application in the determination of parabens in different samples by gas chromatography—Flame ionization detection. *Talanta*, 81(4-5), 1360-1367Fransway,

Fei, T., Li, H., Ding, M., Ito, M., & Lin, J. M. (2011). Determination of parabens in cosmetic products by solid-phase microextraction of poly (ethylene glycol) diacrylate thin film on fibers and ultra high-speed liquid chromatography with diode array detector. *Journal of separation science*, 34(13), 1599-1606.

Ferreira, A. M. C., Möder, M., & Laespada, M. F. (2011). Stir bar sorptive extraction of parabens, triclosan and methyl triclosan from soil, sediment and sludge with in situ derivatization and determination by gas chromatography—mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(25), 3837-3844.

Fransway, A. F., Fransway, P. J., Belsito, D. V., Warshaw, E. M., Sasseville, D., Fowler Jr, J. F., ... & Reeder, M. J. (2019). Parabens. *Dermatitis*, 30(1), 3-31.

Fransway, A. F., Fransway, P. J., Belsito, D. V., & Yiannias, J. A. (2019). Paraben toxicology. *Dermatitis*, 30(1), 32-45.

González-Mariño, I., Quintana, J. B., Rodríguez, I., & Cela, R. (2009). Simultaneous determination of parabens, triclosan and triclocarban in water by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 23(12), 1756-1766.

González-Mariño, I., Quintana, J. B., Rodríguez, I., Schrader, S., & Moeder, M. (2011). Fully automated determination of parabens, triclosan and methyl triclosan in wastewater by microextraction by packed sorbents and gas chromatography–mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 684(1-2), 59-66.

Hajizadeh, Y., Pourzamani, H., Ebrahimpour, K., Chavoshani, A., & Rahimi, B. (2021). Monitoring of paraben compounds in indoor and outdoor air of a populated city. *Atmospheric Pollution Research*, 12(4), 43-49.

Hatami-manesh, M., Mortazavi, S., & Mahmoodi-mahpash, N. (2020). Parabens, Risk and Their Fate in the Environment. *Journal of Environmental Science Studies*, 5(2), 2619-2627.

Ishiwatari, S., Suzuki, T., Hitomi, T., Yoshino, T., Matsukuma, S., & Tsuji, T. (2007). Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 27(1), 1-9.

Janjua, N. R., Mortensen, G. K., Andersson, A. M., Kongshoj, B., Skakkebaek, N. E., & Wulf, H. C. (2007). Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. *Environmental science & technology*, 41(15), 5564-5570.

Jeleń, H. H., Majcher, M., & Dziadas, M. (2012). Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. *Analytica chimica acta*, 738, 13-26.

Kang, H. M., Kim, M. S., Hwang, U. K., Jeong, C. B., & Lee, J. S. (2019). Effects of methylparaben, ethylparaben, and propylparaben on life parameters and sex ratio in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. *Chemosphere*, 226, 388-394

Kaziur, W., Salemi, A., Jochmann, M. A., & Schmidt, T. C. (2019). Automated determination of picogram-per-liter level of water taste and odor compounds using solid-phase microextraction arrow coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 411(12), 2653-2662.

Kremser, A., Jochmann, M. A., & Schmidt, T. C. (2016). PAL SPME Arrow—Evaluation of a novel solid-phase microextraction device for freely dissolved PAHs in water. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(3), 943-952.

Lee, J., Bang, S. H., Kim, Y. H., & Min, J. (2018). Toxicities of four parabens and their mixtures to *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. *Environmental Health and Toxicology*, 33(4).

Lee, H. B., Peart, T. E., & Svoboda, M. L. (2005). Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1094(1-2), 122-129.

Liao, C., Lee, S., Moon, H. B., Yamashita, N., & Kannan, K. (2013). Parabens in sediment and sewage sludge from the United States, Japan, and Korea: spatial distribution and temporal trends. *Environmental science & technology*, 47(19), 10895-10902.

Lincho, J., Martins, R. C., & Gomes, J. (2021). Paraben compounds—Part I: An overview of their characteristics, detection, and impacts. *Applied Sciences*, 11(5), 2307.

López-Darias, J., Pino, V., Meng, Y., Anderson, J. L., & Afonso, A. M. (2010). Utilization of a benzyl functionalized polymeric ionic liquid for the sensitive determination of polycyclic aromatic hydrocarbons; parabens and alkylphenols in waters using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 1217(46), 7189-7197.

Pawliszyn, J. (1997). *Solid phase microextraction: theory and practice*. John Wiley & Sons.

Medhe, S. (2018). Ionization techniques in mass spectrometry: a review. *Mass Spectrom Purif Tech*, 4(126), 2.

Mincea, M. M., Lupşa, I. R., Cinghiţă, D. F., Radovan, C. V., & Talpos, I. (2009). Determination of methylparaben from cosmetic products by ultra performance liquid chromatography. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74(6), 669-676.

Moein, M. M., Said, R., Bassyouni, F., & Abdel-Rehim, M. (2014). Solid phase microextraction and related techniques for drugs in biological samples. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2014.

Nieto, A., Borrull, F., Marcé, R. M., & Pocurull, E. (2009). Determination of personal care products in sewage sludge by pressurized liquid extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(30), 5619-5625.

Nowak, K., Ratajczak–Wrona, W., Górska, M., & Jabłońska, E. (2018). Parabens and their effects on the endocrine system. *Molecular and cellular endocrinology*, 474, 238-251

Ocaña-González, J. A., Villar-Navarro, M., Ramos-Payán, M., Fernández-Torres, R., & Bello-López, M. A. (2015). New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples. A review. *Analytica Chimica Acta*, 858, 1-15.

Pedrouzo, M., Borrull, F., Marcé, R. M., & Pocurull, E. (2009). Ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determining the presence of eleven personal care products in surface and wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 1216(42), 6994-7000.

Péres, V. F., Saffi, J., Melecchi, M. I. S., Abad, F. C., de Assis Jacques, R., Martinez, M. M., ... & Caramão, E. B. (2006). Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. *Journal of chromatography A*, 1105(1-2), 115-118

Piao, C., Chen, L., & Wang, Y. (2014). A review of the extraction and chromatographic determination methods for the analysis of parabens. *Journal of Chromatography B*, 969, 139-148.

Poole, C. F. (2003). New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(6), 362-373.

Prichodko, A., Janenaite, E., Smitiene, V., & Vickackaite, V. (2012). Gas chromatographic determination of parabens after in-situ derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction. *Acta Chromatographica*, 24(4), 589-601.

Rahman, M. M., Abd El-Aty, A. M., Choi, J. H., Shin, H. C., Shin, S. C., & Shim, J. H. (2015). Basic overview on gas chromatography columns. *Analytical Separation Science*, 823-834.

Rajawat, J., & Jhingan, G. (2019). Mass spectroscopy. In *Data processing handbook for complex biological data sources* (pp. 1-20). Academic Press.

Ramírez, N., Borrull, F., & Marcé, R. M. (2012). Simultaneous determination of parabens and synthetic musks in water by stir-bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of separation science*, 35(4), 580-588.

Ramírez, N., Marcé, R. M., & Borrull, F. (2011). Determination of parabens in house dust by pressurised hot water extraction followed by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6226-6231.

Regueiro, J., Becerril, E., Garcia-Jares, C., & Llompарт, M. (2009). Trace analysis of parabens, triclosan and related chlorophenols in water by headspace solid-phase microextraction with in situ derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(23), 4693-4702.

Rezaee, M., Assadi, Y., Hosseini, M. R. M., Aghaee, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography a*, 1116(1-2), 1-9.

Ribeiro, C., Ribeiro, A. R., Maia, A. S., Goncalves, V. M., & Tiritan, M. E. (2014). New trends in sample preparation techniques for environmental analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 44(2), 142-185.

Richter, B. E., Ezzell, J. L., Felix, D., Roberts, K. A., & Later, D. W. (1995). An accelerated solvent extraction system for the rapid preparation of environmental organic compounds in soil. *American Laboratory*, 27(4), 24-28.

Risticovic, S., Niri, V. H., Vuckovic, D., & Pawliszyn, J. (2009). Recent developments in solid-phase microextraction. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 393(3), 781-795.

Sajid, M., Khaled Nazal, M., Rutkowska, M., Szczepańska, N., Namieśnik, J., & Płotka-Wasyłka, J. (2019). Solid phase microextraction: apparatus, sorbent materials, and application. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 49(3), 271-288.

Saraji, M., & Mirmahdieh, S. (2009). Single-drop microextraction followed by in-syringe derivatization and GC-MS detection for the determination of parabens in water and cosmetic products. *Journal of Separation Science*, 32(7), 988-995.

Shah, N., Arain, M. B., & Soylak, M. (2020). Historical background: milestones in the field of development of analytical instrumentation. In *New Generation Green Solvents for Separation and Preconcentration of Organic and Inorganic Species* (pp. 45-73). Elsevier.

Shen, H., Ying, L., Cao, Y., Pan, G., & Zhou, L. (2007). Simultaneous determination of phthalates and parabens in cosmetic products by gas chromatography/mass spectrometry coupled with solid phase extraction. *Se pu= Chinese Journal of Chromatography*, 25(2), 272-275.

Sheskey, P. J., Cook, W. G., & Cable, C. G. (Eds.). (2017). *Handbook of pharmaceutical excipients*. Pharmaceutical Press.

Soni, M. G., Burdock, G. A., Taylor, S. L., & Greenberg, N. A. (2001). Safety assessment of propyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*, 39(6), 513-532.

Soni, M. G., Carabin, I. G., & Burdock, G. A. (2005). Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and chemical toxicology*, 43(7), 985-1015.

Soni, M. G., Taylor, S. L., Greenberg, N. A., & Burdock, G. A. (2002). Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food and chemical Toxicology*, 40(10), 1335-1373.

Souza-Silva, É. A., Reyes-Garcés, N., Gómez-Ríos, G. A., Boyacı, E., Bojko, B., & Pawliszyn, J. (2015). A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices III. Bioanalytical and clinical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 249-264.

Terasaki, M., & Makino, M. (2008). Determination of chlorinated by-products of parabens in swimming pool water. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 88(13), 911-922.

Vo, T. T., Yoo, Y. M., Choi, K. C., & Jeung, E. B. (2010). Potential estrogenic effect (s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model. *Reproductive toxicology*, 29(3), 306-316

Wang, L., Zang, X., Wang, C., & Wang, Z. (2014). Graphene oxide as a micro-solid-phase extraction sorbent for the enrichment of parabens from water and vinegar samples. *Journal of separation science*, 37(13), 1656-1662.

Wang, P. G., & Zhou, W. (2013). Rapid determination of parabens in personal care products by stable isotope GC-MS/MS with dynamic selected reaction monitoring. *Journal of separation science*, 36(11), 1781-1787.

Xiao-Huan, Z., Qiu-Hua, W. U., ZHANG, M. Y., Guo-Hong, X. I., & Zhi, W. (2009). Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37(2), 161-168.

YeganeBadi, M., FallahJokandan, S., RezaeiNia, S., Esrafil, A., FarzadKia, M., & Gholami, M. (2016). Monitoring of para-hydroxy benzoic acid esters (antimicrobial and preservative) in Tehran wastewater treatment plants and performance evaluation of various wastewater treatment method in the removal of these compounds. *Journal of Environmental Health Engineering*, 3(4), 259-269.

Yang, H., Zhang, F., & Wu, H. (2018). Review on life cycle of parabens: synthesis, degradation, characterization and safety analysis. *Current Organic Chemistry*, 22(8), 769-779.

Zacharis, C. K., & Tzanavaras, P. D. (2020). Solid-phase microextraction. *Molecules*, 25(2), 379.

performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404(10), 3175-3188.

## **Development and optimization of solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry for determination of parabens in water media**

The extensive use of personal care products and pharmaceutical leads to the release of parabens into the environment and affects the health of humans and the environment and aquatic animals. Therefore, the identification and determination of these compounds, even in small concentrations, is of particular importance. In the present work, a very sensitive and PAL SPME Arrow procedure, coupled with GC-MS, has been developed and validated for determination of four parabens (Methyl-paraben, Ethyl-paraben, Propyl-paraben, and Butyl-paraben) in water samples. PDMS/DVB was selected among three commercially available SPME Arrows (PDMS/DVB, PDMS and polyacrylate), since it resulted in the best sensitivity. The important experimental parameters were optimized via a central composite design response surface methodology and as result, extraction time of 75 min, extraction temperature of 70 °C and added salt concentration of 30% (w/v), were selected as the optimum values. The optimized method showed linear response over the calibration range (1–10000 ng L<sup>-1</sup>), with R<sup>2</sup> values higher than 0.998. The precision (RSD%) measured by replicate analyses (n = 5) was estimated at 10 and 1000 ng L<sup>-1</sup> and was less than 18.59% and 9.98%, respectively. The LOQ of PAL SPME Arrow, calculated as S/N=10, was between 0.164 and 0.875 ng L<sup>-1</sup>.

**Keywords:** Surface water, Parabens, SPME, GC-MS, Central composite design, optimization





Shahid Beheshti University  
Environmental Science Research Institute (ESRI)  
Department of Environmental Technologies

Thesis Submitted for the Degree of Master of Science (M, Se) In  
Environmental Science and Engineering-  
Environmental Pollutions

title

**Development and optimization of solid-phase microextraction coupled  
with gas chromatography-mass spectrometry for determination  
of parabens in water media**

By

Roham Askari

Supervisor

Dr. Amir Salemi

March 2022