بهینه‌سازی روش ریز استخراج مایع مایع پخشی برای تعیین مقادیر جزئی ملاتونین بزاقی به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با عملکرد عالی

مهران پورحسین[۱]، سید جمال الدین شاه طاهری*[۲]، هما ملک خانی[۳]، عباس رحیمی فروشانی[۴]، میرغنی سید صومعه[۵]، راضیه دیوانی[۶]

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۴/۲۶ تاریخ ویرایش: ۹۵/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۱/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: تعیین مقدار ملاتونین به علت غلظت پایین آن و بعلاوه وجود سایر ترکیبات مشابه در مایعات بدن، یک چالش جدی برای آنالیست‌ها بوده است. آماده‌سازی نمونه قبل از انجام آنالیز دستگاهی برای تعیین مقدار ملاتونین در نمونه‌های مختلف یک امر اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. این مطالعه به دنبال روشی جدید با صحت و دقت بالا بود که بتواند با استفاده از تجهیزات موجود در آزمایشگاه‌های معمولی برای تعیین سطوح جزئی ملاتونین در بزاق به‌عنوان شاخص ریتم سیرکادین در انسان مورد استفاده قرار گیرد. به همین منظور به بهینه‌سازی روش ریز استخراج مایع–مایع پخشی (Disspersive Liquid-Liquid Microextraction) که تاکنون برای ملاتونین بزاقی استفاده نشده بود پرداخته شد.

روش بررسی: مطالعه حاضر یک مطالعه کاربردی می‌باشد. مرحله بهینه‌سازی شامل بررسی هشت عامل مؤثر بر روش DLLME بود. از این میان هفت مورد آن‌ها در چهار سطح و صرفاً pH در پنج سطح موردبررسی قرار گرفت و مقادیر بهینه تعیین شدند. همچنین اعتبار سنجی روش بهینه‌سازی شده به‌صورت روز به روز به مدت شش روز متوالی و شش بار در یک روز با محاسبه ضریب تغییرات برای سه غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر انجام گردید.

یافته‌ها: مقادیر بهینه برای هرکدام از عوامل موردبررسی بدست آمد. صحت و دقت روش بهینه‌سازی شده با محاسبه مقادیر ضریب تغییرات سه غلظت نام برده بررسی شد. ضریب تغییرات برای تکرارپذیری روز به روز به ترتیب ۶/۲۹، ۲/۳۹ و ۱/۸۲ و برای تکرارپذیری در یک روز به ترتیب ۴/۴۹، ۲/۶۸ و ۱/۸۳ بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به مقادیر ضریب تغییرات بدست آمده، روش بهینه‌سازی شده از صحت و دقت مناسبی برخوردار بوده است. باوجود اینکه بهینه‌سازی عوامل مؤثر در استخراج باید به‌تناسب آنالیت مدنظر صورت گیرد، اما این متغیرها را می‌توان برای ترکیبات شیمیایی مشابه با اندکی تغییرات استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: ملاتونین، ریز استخراج مایع–مایع پخشی، بزاق، ریتم سیرکادین، کروماتوگرافی مایع با عملکرد عالی.

مقدمه

هورمون ملاتونین (N-acetyl-methoxy–triptamine) از قسمتی از مغز به نام هسته‌های فوق کیاسمایی ترشح می‌شود و آزاد شدن آن در اثر تاریکی افزایش و در اثر نور روز سرکوب می‌شود [۱]. ساعت زیستی بدن یا همان ریتم سیرکادین از طریق ترشح هورمون‌هایی از قبیل ملاتونین و کورتیزول تنظیم می‌گردد[۲]. اختلال در ریتم سیرکادین به‌طور خاص با کار شبانه یا کار بدون نور روز رابطه دارد. ملاتونین به‌عنوان یک بیومارکر خوب برای نمایش بی‌نظمی ریتم سیرکادین شناخته شده است و بنابراین در اغلب مطالعات برای تعیین میزان اختلال سیرکادین ناشی از شب‌کاری یا نوبت‌کاری استفاده شده است[۳]. شکل شماره ۱ ساختار شیمیایی هورمون ملاتونین را نشان می‌دهد[۴].

به علت غلظت پایین و بعلاوه وجود سایر ترکیبات در مایعات بدن، تعیین مقدار ملاتونین یک چالش جدی برای آنالیست‌ها بوده است[۵]. این هورمون را می‌توان در خون [۶، ۷]، ادرار [۸، ۹] و بزاق [۱۰، ۱۱] اندازه‌گیری کرد. بااین‌حال نمونه‌گیری از بزاق به دلیل داشتن مزایایی از قبیل غیرتهاجمی بودن، بدون درد بودن و آسان بودن به روش‌های دیگر ترجیح داده می‌شود[۱۲]. چندین مطالعه نشان داده‌اند که همبستگی خوبی میان ملاتونین بزاق و سطح این

۱- دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۲- (نویسنده مسئول) استاد، گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، پژوهشکده محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
shahtaheri@tums.ac.ir

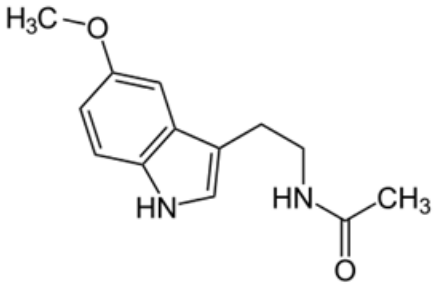
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۴- استاد، گروه آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۵- کارشناسی ارشد، گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۶- کارشناس، گروه مهندسی بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

[Downloaded from ioh.iums.ac.ir on 2024-03-29]



شکل ۱- ساختار شیمیایی مولکول ملاتونین

هورمون در پلاسما وجود دارد[۱۰، ۱۳].

مهم‌ترین بخش در بسیاری از آنالیزهای کروماتوگرافی نمونه‌های بیولوژیکی، حذف عوامل مزاحم موجود در نمونه می‌باشد. اگر آنالیت در مقادیر جزئی در نمونه موجود باشد، حذف مقادیر زیاد مواد مداخله‌گر بدون اختلال در بازیابی آنالیت مدنظر یک مشکل جدی می‌باشد. بعلاوه برای تزریق نمونه به دستگاه HPLC، افزایش غلظت آنالیت در واحد حجم نمونه از ضرورت‌های فرایند آنالیز می‌باشد[۱۴-۱۸].

آماده‌سازی نمونه قبل از انجام آنالیز دستگاهی برای تعیین مقدار ملاتونین در نمونه‌های مختلف یک امر اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. در مطالعات قبلی از استخراج مایع-مایع (LLE[1]) [۱۹]و استخراج فاز جامد (SPE[2])[۱، ۲۰، ۲۱] برای آماده‌سازی ملاتونین در نمونه‌های مختلف استفاده شده است. باوجود استفاده متداول از SPE و LLE، هرکدام این روش‌ها معایبی دارند. معایب LLE وقت‌گیر بودن، هزینه بالا و نیاز به حجم بالای نمونه و حلال‌های آلی سمی می‌باشد. SPE علیرغم مصرف کم حلال‌های آلی، کسل‌کننده و نسبتاً گران است، بعلاوه استفاده از SPE برای نمونه‌های با حجم زیاد منجر خواهد شد مقادیری از ترکیب شیمیایی موردنظر بدون اینکه جذب گردند، از سطح جاذب عبور نمایند. علت این امر اشباع شدن سطح جاذب می‌باشد [۷].

به‌عنوان یک روش جایگزین می‌توان از روش ریز استخراج مایع-مایع پخشی (DLLME[3]) که در سال‌های اخیر توسعه‌یافته است استفاده کرد. طی این روش حلالی نامحلول در آب به‌عنوان استخراج‌کننده توسط سرنگ به داخل محیط آبی حاوی نمونه با فشار تزریق می‌گردد که به‌صورت قطرات ریز درمی‌آید. این عمل موجب استخراج آنالیت از محیط آبی نمونه و انتقال آن به محیط آلی حلال استخراج‌کننده می‌گردد. سادگی و در دسترس بودن تجهیزات، سرعت و سهولت انجام روش، هزینه پایین و مصرف بسیار کم حلال‌ها مزیت این روش می‌باشند [۲۲].

روش مذکور تاکنون برای استخراج ملاتونین بزاقی استفاده نشده است و برای اولین بار در مطالعه حاضر روش ریز استخراج مایع-مایع پخشی برای استخراج هورمون ملاتونین از نمونه‌های بزاق بهینه‌سازی گردید. در تنها مطالعه مشابه داخلی طالبیان پور و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بهینه‌سازی روش ریز استخراج مایع-مایع پخشی برای سطوح هورمون ملاتونین موجود در پلاسما با روش طراحی مرکب مرکزی (Central Composite design) و دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به شناساگر UV پرداختند[۷].

این مطالعه به دنبال بهینه‌سازی روشی برای تعیین مقادیر جزئی ملاتونین در بزاق بود که ضمن جدید بودن و داشتن صحت و دقت بالا، بتوان آن را با استفاده از تجهیزات موجود در آزمایشگاه‌های معمولی انجام داد. برای این منظور روش ریز استخراج مایع-مایع پخشی موردبررسی قرار گرفت، زیرا تمامی مزایای نامبرده را دارا می‌باشد. در این کار از طراحی آزمایشگاهی " یک عامل در هر مرحله" (One-factor-at-a-time) و دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مجهز به شناساگر فلورسانس استفاده شد.

روش بررسی

مواد شیمیایی: ملاتونین با درجه خلوص ٪۹۹+ از

[1] Liquid-liquid extraction
[2] Solid phase extraction
[3] Dispersive liquid-liquid microextraction

[Downloaded from ioh.iums.ac.ir on 2024-03-29]

جدول ۱- متغیرها، کد ها و سطوح مورد آزمایش برای هر متغیر

عوامل موثر در بهینه سازی	کد بندی	سطوح مورد آزمایش برای هر عامل				
		۱	۲	۳	۴	۵
نوع حلال پخش کننده	A	استونیتریل*	متانول	اتانول	استون	–
حجم حلال پخش کننده(ml)	B	۰/۵	۱	۱/۵	۲	–
نوع حلال استخراج کننده	C	تتراکلرید کربن	کلروفرم	دی کلرومتان	۱و۲دیکلروبنزن	–
حجم حلال استخراج کننده(µl)	D	۵۰	۱۰۰	۱۵۰	۲۰۰	–
مدت زمان تکان دادن(min)	E	۱	۳	۵	۷	–
مدت زمان سانتریفیوژ کردن(min)	F	۲	۴	۶	۸	–
میزان نمک افزوده شده(NaCl%, w/v)	G	۰	۲/۵	۵/۰	۷/۵	–
اسیدیته	H	۳	۵	۷	۹	۱۱

*مثال: کد A1 نشان می دهد که حلال پخش کننده مدنظر استونیتریل می باشد.

شرکت آلفا ایسر آلمان (Karlsruhe, Germany Alfa Aesaer,) خریداری شد. برای انجام آزمایش‌ها محلول استوک ملاتونین با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در متانول آماده گردید. متانول، اتانول، استون، استونیتریل و فرمیک اسید (همگی با درجه خلوص HPLC grade) برای تعیین حلال پخش‌کننده بهینه و دی کلرومتان، کلروفرم، تتراکلریدکربن، ۱ و ۲-دی کلروبنزن (همگی با درجه خلوص ٪ ۹۹) برای تعیین نوع حلال استخراج‌کننده بهینه و سدیم کلراید (با درجه خلوص ٪ ۹۹) برای ایجاد تغییرات در میزان نمک محلول نمونه و گاز نیتروژن برای خشک کردن حلال‌ها، همگی از شرکت مرک آلمان,Merck) Darmstadt, Germany) خریداری شدند.

تجهیزات: از دستگاه HPLC مجهز به پمپ تک پیستونه Knauer (Socorex, Germany) و ستون C18 و آشکارساز فلئورسانس RF_10AXL Knauer برای آنالیز نمونه‌ها استفاده شد. مقدار pH محلول‌ها با استفاده از pH متر دیجیتالی Metrhom744(Metrhom,USA) اندازه‌گیری گردید. مواد و معرف‌ها نیز به‌وسیله ترازوی دیجیتالی Startorius CP225D (Sartorius, Germany) با دقت ۰/۰۰۰۰۱ گرم توزین شدند.

تعیین تعداد نمونه‌ها: به‌منظور انتخاب عوامل بهینه مؤثر در استخراج ملاتونین، هشت عامل مؤثر انتخاب شدند که عبارت‌اند از: نوع حلال پخش‌کننده، حجم حلال پخش‌کننده، نوع حلال استخراج‌کننده، حجم حلال استخراج‌کننده، مدت‌زمان تکان دادن، مدت‌زمان سانتریفیوژ کردن، میزان نمک افزوده‌شده و در نهایت pH. جدول شماره (۱) متغیرها، سطوح مورد آزمایش برای هر متغیر و همچنین کدگذاری انجام شده برای سهولت کار را نشان می‌دهد.

این مطالعه بر اساس روش One-factor-at-a-time (OFAT) انجام شد. بر اساس این روش، در هر مرحله هفت عامل مؤثر ثابت در نظر گرفته شد و یک عامل برای تعیین مقدار بهینه در سطوح مختلف مورد آزمایش قرار گرفت. موارد انتخاب شده بهینه در هر مرحله در مراحل بعدی به‌عنوان مقادیر ثابت مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد ۹۹ آزمایش برای مرحله بهینه‌سازی انجام شد که شامل بررسی هشت عامل مؤثر بر روش DLLME بود. از این میان هفت مورد آن‌ها در چهار سطح و صرفاً pH در پنج سطح موردبررسی قرار گرفت. تمام مراحل بهینه‌سازی با سه بار تکرار انجام شدند. همچنین برای اعتبار سنجی روش بهینه‌سازی شده به‌صورت روز به روز در شش روز متوالی و شش بار در یک روز، ۶۶ آزمایش انجام گردید؛ بنابراین مجموع آزمایش‌های انجام شده برای مطالعه حاضر ۱۶۵ مرحله بود.

در تمامی مراحل آزمایش، استخراج ملاتونین با غلظت ۱۰۰ پیکو گرم بر میلی‌لیتر (pg/ml) از ۱۰ میلی‌لیتر محلول آبی نمونه انجام شد.

[Downloaded from ioh.iums.ac.ir on 2024-03-29]

آماده‌سازی و آنالیز نمونه‌ها: مراحل کلی انجام آماده‌سازی نمونه به روش DLLME به شرح زیر است. در هر مرحله از آزمایش، هر یک از هشت متغیر نام برده بر روی سطوح معینی از نوع و مقدار که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است، تنظیم شدند. حجم معینی از حلال پخش‌کننده که حاوی حجم معینی از حلال استخراج‌کننده است توسط سرنگ با سرعت و فشار به داخل لوله آزمایش حاوی نمونه تزریق شد. برای برقراری سرعت و فشار یکسان در تمام مراحل و تکرارها مدت‌زمان ثابت (یک ثانیه) برای تمام تزریق‌ها در نظر گرفته شد. بعد از انجام مرحله فوق، محلول به‌صورت ابری و کدر درآمد. سپس برای انجام فرآیند استخراج ملاتونین از نمونه به حلال استخراج‌کننده، این محلول مدتی به آرامی تکان داده شد. سپس با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول به دو فاز جدا شده و حلال حاوی ملاتونین در پایین و فاز آبی نمونه در بالا لوله آزمایش قرار گرفت. فاز حاوی ملاتونین توسط سرنگ جدا شده و در لوله آزمایش جدید ریخته شد و توسط جریان ملایم گاز بی‌اثر نیتروژن حلال آن خشک شد.

سپس ملاتونین باقیمانده در متانول حل و برای تعیین مقدار به دستگاه HPLC با دتکتور فلئورسانس تزریق شد. تنظیمات مربوط به دستگاه به شرح زیر بود: حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر، ستون C_{18}، فاز متحرک ۶۰:۴۰ متاتول-آب دوبار تقطیر، دبی فاز متحرک ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه، دتکتور فلورسانس با طول موج تحریک و نشر به ترتیب ۲۸۶ و ۳۵۲ نانومتر، دمای ستون ۲۲ درجه سانتی‌گراد.

برای آنالیز نمونه‌ها با استفاده از دستگاه HPLC، سطح زیر پیک به‌عنوان پاسخ آشکارساز مدنظر قرار گرفت. میزان بازیافت (ER%) با مقایسه سطح زیر پیک نمونه‌های استخراج شده و سطح زیر پیک نمونه‌های استاندارد قابل محاسبه می‌باشد[۲۳].

$$\text{بازیافت } (\%) = \frac{\text{سطح زیر پیک نمونه}}{\text{سطح زیر پیک استاندارد}} \times 100$$

معادله شماره ۱. محاسبه راندمان بازیافت

یافته‌ها

بهینه‌سازی عوامل مؤثر

تأثیر نوع حلال پخش‌کننده: برای این منظور چهار حلال استونیتریل، متانول، اتانول و استون موردبررسی قرار گرفتند. برای هفت عامل دیگر مقادیر ثابت انتخاب شد. در نهایت استونیتریل بیشترین مقدار بازیافت (ER%=۹۰/۳۰) را درمیان سایر حلال‌ها از خود نشان داد؛ بنابراین استونیتریل به‌عنوان حلال پخش‌کننده مناسب برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شد.

تأثیر حجم حلال پخش‌کننده: برای بررسی تأثیر حجم حلال پخش‌کننده، چهار حجم ۰٫۵، ۱، ۱٫۵، ۲ میلی‌لیتر برای حلال پخش‌کننده بهینه یعنی استونیتریل که در مرحله قبل تعیین شد، موردبررسی قرار گرفتند. در نهایت بیشترین مقدار بازیافت (ER%= ۹۰/۷۰) در حجم ۲ میلی‌لیتر بدست آمد؛ بنابراین حجم ۲ میلی‌لیتر به‌عنوان حجم بهینه حلال پخش‌کننده برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شد.

تأثیر نوع حلال استخراج‌کننده: برای تعیین حلال استخراج‌کننده بهینه چهار حلال تتراکلریدکربن (CCL_4)، کلرفرم ($CHCl_3$)، دی کلرومتان (CH_2Cl_2) و ۱ و ۲-دیکلروبنزن ($C_6H_4Cl_2$) برای تعیین حلال استخراج‌کننده بهینه انتخاب شدند. در نهایت حلال استخراج‌کننده‌ای که بیشترین میزان استخراج (ER%=۹۱/۵۰) را داشت تتراکلریدکربن بود که به‌عنوان حلال استخراج‌کننده بهینه برای ادامه مطالعه انتخاب شد.

تأثیر حجم حلال استخراج‌کننده: برای بررسی تأثیر حجم حلال استخراج‌کننده، چهار حجم ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکرولیتر برای حلال استخراج‌کننده بهینه یعنی تتراکلریدکربن که در مرحله قبل تعیین شد، موردبررسی قرار گرفتند. در نهایت بیشترین مقدار بازیافت (ER%= ۹۲/۲۰) در حجم ۲۰۰ میکرولیتر بدست آمد؛ بنابراین حجم ۲۰۰ میکرولیتر به‌عنوان حجم بهینه حلال استخراج‌کننده برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شد.

[Downloaded from ioh.iums.ac.ir on 2024-03-29]

جدول ۲- تعیین پارامترهای بهینه برای آماده سازی نمونه ملاتونین، با محاسبه راندمان بازیافت، با استفاده از متد OFAT

عنوان مرحله	عوامل ثابت در نظر گرفته شده در هر مرحله	راندمان بازیافت در هر سطح (٪)				
		۱	۲	۳	۴	۵
انتخاب حلال پخش کننده بهینه(A)	B4, C1, D4, E2, F1, G1, H3	۹۰/۳۰*	۳۴/۵۰	۲۶/۸۰	۳۳/۲۰	–
انتخاب حجم بهینه حلال پخش کننده(B)	A1*, C1, D4, E2, F1, G1, H3	۲۸/۸۰	۵۱/۱۰	۴۷/۷۰	۹۰/۷۰*	–
انتخاب حلال استخراج کننده بهینه(C)	A1*, B4*, D4, E2, F1, G1, H3	۹۱/۵۰*	۲۰/۲۰	۱۵/۶۰	–	–
انتخاب حجم بهینه حلال استخراج کننده(D)	A1*, B4*, C1*, E2, F1, G1, H3	۳۸/۱۰	۵۲/۴۰	۷۷/۹۰	۹۲/۲۰*	–
انتخاب مدت زمان بهینه برای تکان دادن(E)	A1*, B4*, C1*, D4*, F1, G1, H3	۵۴/۳۴	۹۲/۸۰*	۶۱/۱۰	۸۰/۱۰	–
انتخاب مدت زمان بهینه سانتریفیوژ کردن(F)	A1*, B4*, C1*, D4*, E2*, G1, H3	۷۹/۹۲	۷۸/۹۶	۹۳/۹۸*	۶۷/۰۰	–
انتخاب میزان بهینه نمک افزوده شده(G)	A1*, B4*, C1*, D4*, E2*, F3*, H3	۷۷/۱۰	۸۸/۲۰	۹۵/۲۷*	۸۹/۶۰	
انتخاب اسیدیته بهینه(H)	A1*, B4*, C1*, D4*, E2*, F3*, G3*	۶۵/۲۷	۶۹/۶۰	۹۵/۸۰*	۸۹/۷۷	۶۹/۱۰

*راندمان بازیافت بهینه ، پارامتری که در هر مرحله بعنوان بهینه انتخاب گردید، در مرحله بعد بعنوان عامل ثابت در نظر گرفته شد.

تأثیر مدت‌زمان تکان دادن: برای بررسی تأثیر مدت‌زمان تکان دادن، این فرایند در چهار بازه زمانی ۱، ۳، ۵ و ۷ دقیقه‌ای مورد آزمایش قرار گرفت. در نهایت بیشترین مقدار بازیافت (ER%= ۹۲/۸۰) در بازه زمانی ۳ دقیقه‌ای بدست آمد (جدول شماره ۳)؛ بنابراین مدت‌زمان ۳ دقیقه Extraction time بهینه برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شد.

تأثیر مدت‌زمان سانتریفیوژ: برای بررسی تأثیر مدت سانتریفیوژ کردن، این فرایند در چهار بازه زمانی چهار ۲، ۴، ۶ و ۸ دقیقه‌ای و سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه مورد آزمایش قرار گرفت. در نهایت بیشترین مقدار بازیافت (ER%= ۹۳/۹۸) در بازه زمانی ۶ دقیقه‌ای بدست آمد؛ بنابراین مدت‌زمان ۶ دقیقه به‌عنوان زمان بهینه برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شد.

تأثیر نمک افزوده‌شده: برای بررسی تأثیر میزان نمک افزوده‌شده، به ماتریکس نمونه در ۴ مرحله مقادیر ۰، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ درصد وزنی حجمی (٪ W/V) نمک NaCl افزوده شد و مراحل استخراج و تعیین مقدار انجام گردید. در نهایت بیشترین مقدار بازیافت (ER%= ۹۵/۲۷) هنگامی حاصل شد که میزان نمک اضافه شده به ماتریکس نمونه ۵ درصد بود؛ بنابراین این مقدار به‌عنوان میزان بهینه نمک اضافه شده برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شد.

تأثیر pH نمونه: برای بررسی تأثیر pH نمونه، مراحل استخراج و تعیین مقدار بر روی محلول‌های نمونه که pH آن‌ها در پنج مقدار ۳ و ۵ و ۷ و ۹ و ۱۱ تنظیم شده بود، انجام گردید. در نهایت بیشترین مقدار بازیافت (ER%= ۹۵/۸۰) در pH=۷ حاصل شد؛ بنابراین این مقدار به‌عنوان میزان بهینه pH برای مراحل بعدی مطالعه انتخاب شد. جدول شماره (۲)، نتایج آزمایش‌ها با استفاده از متد OFAT را برای هر متغیر در تمامی سطوح مورد مطالعه نشان می‌دهد.

اعتباربخشی

به‌منظور نشان دادن قابلیت استفاده از روش ریز استخراج پخشی مایع-مایع برای نمونه‌های واقعی، لازم است که روش بهینه‌سازی شده اعتباربخشی گردد. برای این منظور تکرارپذیری روز به روز (Day–to–day reproducibility) در شش روز متوالی و

[Downloaded from ioh.iums.ac.ir on 2024-03-29]

جدول ۳- تکرارپذیری روز به روز ملاتونین افزوده شده به بزاق، حجم نمونه: ۱۰ میلی لیتر

روز	غلظت (pg/ml)		
	۵۰	۱۰۰	۲۵۰
۱	۱۰۹/۴۵	۹۰/۱۰	۹۸/۷۸
۲	۹۶/۹۲	۹۱/۶۰	۱۰۰/۵۰
۳	۱۰۳/۰۰	۹۵/۳۵	۱۰۲/۱۰
۴	۱۰۳/۹۰	۹۴/۲۵	۹۸/۶۰
۵	۹۳/۹۰	۹۶/۶۰	۹۹/۹۶
۶	۱۰۹/۳۰	۹۴/۵۸	۹۶/۸۵
میانگین	۱۰۲/۸۶	۹۳/۹۱	۹۹/۶۴۵
SD	۶/۴۷	۲/۱۵	۱/۸۱
CV (%)	۶/۲۹	۲/۳۹	۱/۸۲

جدول ۴- تکرارپذیری در یک روز ملاتونین افزوده شده به بزاق، حجم نمونه: ۱۰ میلی لیتر

آزمایش	غلظت (pg/ml)		
	۵۰	۱۰۰	۲۵۰
۱	۹۰/۸۰	۱۰۲/۶۴	۹۷/۵۵
۲	۸۴/۲	۱۰۳/۲۶	۹۸/۶۵
۳	۹۲/۱۰	۱۰۷/۳۰	۱۰۲/۵۰
۴	۹۳/۵۰	۱۰۳/۴۴	۹۹/۷۳
۵	۹۱/۹۰	۱۰۱/۴۰	۹۷/۹۰
۶	۹۶/۶۰	۹۸/۹۰	۱۰۰/۱۷
میانگین	۹۱/۵۲	۱۰۲/۸۲	۹۹/۴۲
SD	۴/۱۱	۲/۷۶	۱/۸۲
CV (%)	۴/۴۹	۲/۶۸	۱/۸۳

شش بار در یک روز (Within–day reproducibility) با استفاده از سه غلظت ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ pg/ml مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج در جداول شماره (۴ و ۳) قابل مشاهده می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

برای تعیین مقادیر بهینه مؤثر بر تغلیظ و تخلیص هورمون ملاتونین در روش آماده‌سازی DLLME، هشت متغیر شامل نوع حلال پخش‌کننده، حجم حلال پخش‌کننده، نوع حلال استخراج‌کننده، حجم حلال استخراج‌کننده، مدت‌زمان تکان دادن، مدت‌زمان سانتریفیوژ کردن، میزان نمک اضافه شده و pH محلول، در سطوح مختلف و با سه بار تکرار در هر سطح موردبررسی قرار گرفتند.

نوع حلال پخش‌کننده در ایجاد فاز کدر (ابری) در محلول بسیار مؤثر می‌باشد. انحلال حلال پخش‌کننده در محلول آبی نمونه (قطبی) و انحلال حلال استخراج‌کننده (غیرقطبی) در حلال پخش‌کننده، نکته اصلی در انتخاب حلال پخش‌کننده می‌باشد. از این رو ۴ حلال موردبررسی یعنی استون (CH_3-CO-CH_3)، متانول (CH_3OH)، اتانول (C_2H_5OH)، استونیتریل (C_2H_3N) طوری انتخاب شدند که به لحاظ ساختار مولکولی دارای یک سر قطبی و یک سر غیر قطبی باشند. با توجه به نتایج، مشاهده شد که وقتی که از استونیتریل به‌عنوان حلال پخش‌کننده استفاده گردید، میزان بازیافت هورمون ملاتونین از محلول آبی بیشتر از سایر حلال‌ها بود.

حجم حلال پخش‌کننده نیز از عوامل مؤثر بر میران

[Downloaded from ioh.iums.ac.ir on 2024-03-29]

بازیافت آنالیت می‌باشد. برای تعیین حجم بهینه حلال پخش‌کننده چهار حجم ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر موردبررسی قرار گرفتند. مقادیر کمتر از ۰/۵ میلی‌لیتر به علت ایجاد نکردن فاز کدر (ابری) مناسب و مقادیر بیشتر از ۲ میلی‌متر به علت زیاد شدن نسبت حلال پخش‌کننده به حلال استخراج‌کننده و ممانعت از ته‌نشین شدن حلال استخراج‌کننده، برای بررسی انتخاب نشدند. با توجه به نتایج، بیشترین بازیافت هنگامی حاصل شد که از حجم ۲ میلی‌لیتر استونیتریل به‌عنوان حلال پخش‌کننده استفاده شد.

ساختار شیمیایی ملاتونین به گونه‌ای است که دارای قطبیت کمی است. از سوی دیگر فاز آبی نمونه‌ی بزاق دارای قطبیت بالا می‌باشد. با توجه به موارد ذکر شده، معیارها برای انتخاب حلال استخراج‌کننده، غیرقطبی بودن، سنگین‌تر بودن از آب و عملکرد مناسب کروماتوگرافی می‌باشد. علت تعیین چنین معیارهایی برای حلال استخراج‌کننده‌ای می‌باشد که از یک طرف ملاتونین تمایل بیشتری به حل شدن در یک حلال غیر قطبی دارد و از سوی دیگر اگر حلال استخراج‌کننده غیرقطبی و سنگین باشد در اثر سانتریفیوژ کردن به آسانی از محلول جدا شده و ته‌نشین می‌گردد. براین اساس چهار حلال تتراکلریدکربن (CCL_4)، کلرفرم ($CHCl_3$)، دیکلرومتان (CH_2Cl_2) و ۱ و ۲-دیکلروبنزن ($C_6H_4Cl_2$) به ترتیب با چگالی نسبی ۱/۵۹، ۱/۴۸، ۱/۳۳ و ۱/۳۰ گرم بر میلی‌لیتر برای تعیین حلال استخراج‌کننده بهینه انتخاب شدند. در نهایت بیشترین بازیافت هنگامی حاصل شد که از تتراکلرید کربن برای این منظور استفاده شد.

حجم حلال استخراج‌کننده نیز در میزان بازیافت مؤثر می‌باشد. مقادیر کمتر از ۵۰ میکرولیتر به علت عدم ایجاد حالت کدر (ابری) مناسب و مقادیر بیشتر از ۲۰۰ میکرولیتر به علت زیاد شدن حلال استخراج‌کننده و ته‌نشین شدن قسمت اضافی حلال استخراج‌کننده، برای بررسی انتخاب نشدند. بیشترین مقدار بازیافت هنگامی حاصل شد که حجم ۲۰۰ میکرولیتر از تتراکلریدکربن به‌عنوان حلال استخراج‌کننده استفاده شد. علت این امر می‌تواند وجود مقدار بیشتر حلال استخراج‌کننده نسبت به سایر مقادیر باشد.

در بررسی تأثیر مدت‌زمان تکان دادن، بیشترین مقدار بازیافت هنگامی حاصل شد که محلول نمونه کدر یا ابری به مدت ۳ دقیقه تکان داده شد و هنگامی که مدت تکان دادن افزایش یافت مقدار بازیافت کاهش یافت. در فرآیند آماده‌سازی نمونه به روش DLLME فقط مقادیری از آنالیت که در حلال استخراج‌کننده حل شده باشند قابلیت آنالیز و تعیین مقدار دارند؛ بنابراین دلیل کاهش بازیافت درصورت افزایش طول مدت‌زمان استخراج این است که مقداری از آنالیت حل شده در حلال استخراج‌کننده می‌تواند از آن جدا شده و در حلال پخش‌کننده حل شود.

مدت‌زمان سانتریفیوژ کردن به‌عنوان نیروی ته‌نشین کننده حلال استخراج‌کننده حاوی آنالیت از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد. با توجه به سنگین‌تر بودن حلال استخراج‌کننده و تمایل آن به ته‌نشینی، مشاهده می‌شود که بیشترین بازیافت هنگامی صورت گرفته که محلول موردنظر به مدت ۶ دقیقه و با ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد.

با توجه قابلیت انحلال بسیار بالای نمک طعام در محلول آبی، افزودن NaCl به محلول نمونه موجب ایجاد رقابت با سایر مواد برای انحلال در آب و در نتیجه تسریع و تقویت فرایند استخراج ملاتونین از فاز آبی نمونه به فاز آلی حلال استخراج‌کننده می‌شود. به همین منظور تأثیر افزودن مقادیر مختلفی از نمک طعام (NaCl) به محلول نمونه بر روی میزان استخراج ملاتونین بررسی شد. حداکثر بازیافت آنالیت با افزودن ۵ درصد وزنی-حجمی از این ماده به نمونه حاصل شد.

برای انتخاب pH بهینه مقدار اسیدیته محلول را در مقادیر معینی مورد آزمایش قرار گرفت. از آنجایی که حلال استخراج‌کننده یک حلال غیرقطبی می‌باشد برای بدست آمدن بازیافت حداکثر، باید نقطه ایزوالکتریک برای مولکول ملاتونین که نوعی پروتئین می‌باشد، بدست آید. نقطه ایزوالکتریک برای هر

[Downloaded from ioh.iums.ac.ir on 2024-03-29]

مولکول پروتئین عبارت است از یک pH خاص که در آن میزان آنیون‌ها و کاتیون‌ها برابر با صفر باشد. با تغییر دادن pH محلول نمونه و انجام مراحل آزمایش، بیشترین میزان استخراج در pH= ۷ بدست آمد. علت این امر به حداقل رسیدن آنیون‌ها و کاتیون‌های ملاتونین در pH= ۷ می‌باشد.

اعتبار روش بهینه‌سازی شده به‌صورت روز به روز در شش روز متوالی و شش بار در یک روز موردبررسی قرار گرفت. برای تعیین مقدار هورمون ملاتونین بزاقی منحنی استاندارد برای هر روز و به مدت ۶ روز متوالی ترسیم گردید. نمونه‌های با حجم ۱۰ ml بزاق اسپایک با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ pg/ml تهیه گردید. ضریب تغییرات برای غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر در تکرار پذیری روز به روز به ترتیب ۴/۴۹، ۲/۶۸ و ۱/۸۳ و برای تکرارپذیری شش بار در یک روز به ترتیب ۶/۲۹، ۲/۲۹ و ۱/۸۲ بدست آمدند که بیانگر صحت و دقت بالای روش بهینه شده می‌باشد.

در مطالعه مشابهی که روش DLLME برای استخراج ملاتونین از نمونه‌های پلاسما مورد بهینه‌سازی قرار گرفته است، نشان داده شده است که استونیتریل (ACN) و تتراکلرید کربن به ترتیب مناسب‌ترین حلال پخش‌کننده و حلال استخراج‌کننده می‌باشند[۷]، که نتایج آن با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. در مطالعاتی که اخیراً انجام شده است از روش استخراج فاز جامد (SPE) برای استخراج ملاتونین استفاده شده است[۱، ۵، ۲۱]. روش SPE علیرغم مصرف کم حلال‌های آلی، به علت نیاز به زمان طولانی برای انجام آن کسل‌کننده می‌باشد و همچنین در آن نیاز به تجهیزات و مواد گران‌قیمتی هست. از سایر ایرادات روش SPE این می‌باشد که وقتی حجم زیادی از نمونه از روی سطح جاذب موجود در لوله‌ی SPE عبور داده شود امکان دارد مقداری از آنالیت جذب شده از آن جدا شده و از دست برود[۲۳]. درحالی که در روش مورد استفاده در مطالعه حاضر مشکلات نامبرده وجود ندارند.

مطالعاتی که قبلاً بهینه‌سازی روش DLLME را برای مواد شیمیایی دیگر انجام داده‌اند[۷، ۲۴، ۲۵]، هر یک از متغیرهای مؤثر در استخراج آنالیت موردنظر در دو یا سه سطح موردبررسی قرار گرفته است، بنابراین حالات کمتری از کل حالات ممکن برای انتخاب هر عامل بهینه مورد آزمایش قرار داده‌اند، درحالی‌که در مطالعه حاضر، هشت متغیر مؤثر در استخراج ملاتونین از نمونه در ۴ و یا ۵ سطح موردبررسی قرار گرفتند. به‌عنوان‌مثال مطالعات نامبرده در مرحله انتخاب pH بهینه، اسیدیته محلول نمونه را در سه سطح و در مقادیر ۴، ۸ و ۱۲ بررسی نموده‌اند اما در مطالعه حاضر pH در پنج سطح با مقادیر ۳، ۵، ۷، ۹، و ۱۱ تنظیم و در هر pH میزان بازیافت هورمون ملاتونین بررسی گردید. این امر موجب افزایش تعداد آزمایشات و به طبع آن افزایش دقت مطالعه شد.

ماحصل این تحقیق منجر به دستیابی به روشی دقیق و با صحت بالا شد که امروزه می‌توان از آن در آزمایشگاه‌های معمولی برای اندازه‌گیری ملاتونین به‌عنوان شاخصی برای عملکرد ریتم سیرکادین انسان مورد استفاده قرار گیرد.

روش ریز استخراج پخشی مایع-مایع که در سال‌های اخیر ابداع شده است و یکی از روش‌های جدید آماده‌سازی نمونه به شمار می‌آید، تاکنون برای آماده‌سازی ملاتونین بزاقی قبل از آنالیز دستگاهی مورد استفاده قرار نگرفته بود. نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که آماده‌سازی نمونه به روش نامبرده می‌تواند با صحت و دقت بالایی برای تغلیظ و تخلیص هورمون ملاتونین در نمونه‌ای بزاق مورد استفاده قرار گیرد. بدیهی است که بهینه‌سازی عوامل مؤثر در استخراج باید به‌تناسب آنالیت مدنظر صورت گیرد. البته این عوامل برای ترکیبات شیمیایی مشابه می‌توانند با تغییرات اندکی قابل استفاده باشد. آماده‌سازی نمونه به روش DLLME دارای مزیت‌های فراوانی از قبیل سادگی و قابل انجام بودن در آزمایشگاه‌های معمولی، استفاده از حجم کم حلال‌ها، نیاز به زمان کم، سازگاری با سایر تکنیک‌های

[Downloaded from ioh.iums.ac.ir on 2024-03-29]

آماده‌سازی نمونه، سازگاری با روش‌های تجزیه مختلف و در نهایت ارزان قیمت بودن می‌باشد.

منابع

1. Rocío-Bautista P, PinoV, Ayala JA , Jorge Pasán J, Ruiz-Pérez C, Afonsoe AM. A magnetic-based dispersive micro-solid-phase extraction method using the metal-organic framework HKUST-1 and ultra-high-performance liquid chromatography with fluorescence detection for determining polycyclic aromatic hydrocarbons in waters and fruit tea infusions. Journal of Chromatography. 2016;A 1436: 42-50.

2. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. Frontiers in neuroendocrinology. 2004;25(3):177-95.

3. Jensen MA, Hansen ÅM, Abrahamsson P, Nørgaard AW. Development and evaluation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of salivary melatonin, cortisol and testosterone. Journal of Chromatography B. 2011;879(25):2527-32.

4. Setyaningsih W, Saputro IE, Barbero GFn, Palma M, García Barroso C. Determination of Melatonin in Rice (Oryza sativa) Grains by Pressurized Liquid Extraction. Journal of agricultural and food chemistry. 2015;63(4):1107-15.

5. de Almeida EA, Di Mascio P, Harumi T, Spence DW, Moscovitch A, Hardeland R, et al. Measurement of melatonin in body fluids: standards, protocols and procedures. Child's Nervous System. 2011;27(6):879-91.

6. Rizzo V, Porta C, Moroni M, Scoglio E, Moratti R. Determination of free and total (free plus protein-bound) melatonin in plasma and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography B. 2002;774(1):17-24.

7. Talebianpoor M, Khodadoust S, Rozbehi A, Akbartabar Toori M, Zoladl M, Ghaedi M, et al. Application of optimized dispersive liquid–liquid microextraction for determination of melatonin by HPLC–UV in plasma samples. Journal of Chromatography B. 2014;960:1-7.

8. Kovacs J, Brodner W, Kirchlechner V, Arif T, Waldhauser F. Measurement of urinary melatonin: a useful tool for monitoring serum melatonin after its oral administration. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2000;85(2):666-70.

9. Grundy A, Tranmer J, Richardson H, Graham CH, Aronson KJ. The influence of light at night exposure on melatonin levels among Canadian rotating shift nurses. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2011;20(11):2404-12.

10. Bagci S, Mueller A, Reinsberg J, Heep A, Bartmann P, Franz AR. Saliva as a valid alternative in monitoring melatonin concentrations in newborn infants. Early human development. 2009;85(9):595.

11. Kakuei H, Zamanian Ardakani Z, Karimian S. Twenty Four-Hour Circadian Melatonin Profile Among Women Shift Work Nurses. ZUMS Journal. 2009;17(68):75-84.

12. Benloucif S, Burgess HJ, Klerman EB, Lewy AJ, Middleton B, Murphy PJ, et al. Measuring melatonin in humans. Journal of clinical sleep medicine: JCSM: official publication of the American Academy of Sleep Medicine. 2008;4(1):66.

13. Faassen, Martijn van, Rainer Bischoff, and Ido P. Kema. "Relationship between plasma and salivary melatonin and cortisol investigated by LC-MS/MS." Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM). 2016.

14. Omidi F, Behbahani M, Bojdi MK, Shahtaheri SJ. Solid phase extraction and trace monitoring of cadmium ions in environmental water and food samples based on modified magnetic nanoporous silica. Journal of Magnetism and Magnetic Materials. 2015;395:213-20.

15. Omidi F, Behbahani M, Samadi S, Sedighi A, Shahtaheri SJ. Coupling of Molecular Imprinted Polymer Nanoparticles by High Performance Liquid Chromatography as an Efficient Tech¬ nique for Sensitive and Selective Trace Determination of 4-Chloro-2-Methylphenoxy Acetic Acid in Complex Matrices. Iranian Journal of Public Health. 2014;43(5):645-57.

16. Hamidzadeh S, Torabbeigi M, Shahtaheri SJ .Removal of crystal violet from water by magnetically modified activated carbon and nanomagnetic iron oxide. Journal of Environmental Health Science and Engineering. 2015;13(1):8.

17. Ghavidel F, Shahtaheri SJ, Jazani RK, Torabbeigi M, Froushani AR, Khadem M. Optimization of Solid Phase Microextraction Procedure Followed by Gas Chromatography with Electron Capture Detector for Pesticides

[Downloaded from ioh.iums.ac.ir on 2024-03-29]

Butachlor and Chlorpyrifos. American Journal of Analytical Chemistry. 2014;5(09):535.

18. Ghavidel F, Shahtaheri SJ, Torabbeigi M, Rahimi Froushani A. Microwave Assisted Head Space Solid Phase Microextraction for Analysis of Butachlor and Chlorpyrifos Pesticides in Urine. Analytical Chemistry Letters. 2014;4(4):224-31.

19. Pothinuch P, Tongchitpakdee S. Melatonin contents in mulberry leaves: Effects of sample preparation, cultivar, leaf age and tea processing. Food Chemistry. 2011;128(2):415-9.

20. Sastre Toraño J, Rijn-Bikker Pv, Merkus P, Guchelaar HJ. Quantitative determination of melatonin in human plasma and cerebrospinal fluid with high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. Biomedical Chromatography. 2000;14(5):306-10.

21. Mercolini L, Addolorata Saracino M, Bugamelli F, Ferranti A, Malaguti M, Hrelia S, et al. HPLC-F analysis of melatonin and resveratrol isomers in wine using an SPE procedure. Journal of separation science. 2008;31(6-7):1007-14.

22. Sobhi HR, Henry H, Bruce SJ, Esrafili A, Rochat B. Simple Measurment of testostrone in male saliva samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by liquid chromatography–tandem mass specrometry detection. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 2014;37(9):1278-86.

23. Shahtaheri S, Abdollahi M, Golbabaei F, Rahimi-Froushani A, Ghamari F. Optimization of SPE for Analysis of Mandelic Acid as a Biomarker of Exposure to Ethyl Benzene. Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering. 2004;1(2):70-80.

24. Ebrahimzadeh H, Yamini Y, Kamarei F. Optimization of dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography for the analysis of nitroaromatic compounds in water. Talanta. 2009;79(5):1472-7.

25. Khodadoust S, Hadjmohammadi M. Determination of N-methylcarbamate insecticides in water samples using dispersive liquid–liquid microextraction and HPLC with the aid of experimental design and desirability function. Analytica chimica acta. 2011;699(1):113-9.

[Downloaded from ioh.iums.ac.ir on 2024-03-29]

Optimization of dispersive liquid-liquid for determination of trace salivary melatonin using high performance liquid chromatography

Mehran Pourhossein[1], Seyed Jamaledin Shahtaheri[2]*, Homa Maleck khani[3], Abbas Rahimi-foroushani[4], Mirghani Seyed Someah[5], Razieh Divani[6]

Received: 2016/07/16 Revised: 2017/01/07 Accepted: 2017/04/19

Abstract

Background and aims: Due to low concentration of melatonin and also the existence of other compounds in body fluids, measuring the amount of melatonin is a serious challenge for the analysts. Before measurement of melatonin amounts using chromatographic method, sample preparation is unavoidable. The aim of current study is develop a new sample preparation method that not only have high accuracy and validity, but also can using by conventional equipment available in the laboratory to determine trace levels of salivary melatonin. For this purpose, the dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) method, that has not been used so far to preparation of salivary melatonin samples, were optimized.

Methods: Optimization procedure involved evaluation of eight factors affecting DLLME method. From these factors, seven were examined in four levels, and just pH was done in five levels. Accuracy and precision of the optimized method was evaluated at three concentrations of 50, 100, 250 pg.ml-1 by achieving CV% for day-to-day and within-day reproducibility.

Results: Optimum values were determined. Accuracy and precision of the optimized method was investigated at three concentrations of 50, 100, and 250pg/ml by achieving CV% of 6.29, 2.39, and 1.82 for the "day-to-day" and 4.49, 2.68, and 1.83 for "within-day" reproducibility.

Conclusion: Due to the results of this study for Coefficient of variations, the optimized method was provided with proper accuracy and precision. Although optimized extraction factors must be fit analyte, but these factors can be used for similar chemical compounds with a slight modification.

Keywords: Melatonin, Dispersive liquid–liquid microextraction, Saliva, Circadian rhythm, HPLC.

1. PhD student, Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2. (**Corresponding author**) Professor, Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Institute for Environmental Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. shahtaheri@tums.ac.ir

3. MS student, Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Mazandaran University of Medical Sciences, sari, Iran.

4. Professor, Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

5. MS in HSE, Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

6. BS in Occupational Health Engineering, Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

[Downloaded from ioh.iums.ac.ir on 2024-03-29]