



سنتز جاذب پلیمری قالب ملکولی به منظور استخراج انتخابی یک علف کش تریازینی از نمونه بیولوژیک

امیدرضا هروی زاده: کارشناسی ارشد بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

منیره خادم: دکترای بهداشت حرفه‌ای، استادیار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

رامین نبی زاده: دکترای بهداشت محیط، استاد، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

سید جمال‌الدین شاه طاهری: (*نویسنده مسئول) دکترای بهداشت حرفه‌ای، استاد، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. shahtaheri@tums.ac.ir

چکیده

کلیدواژه‌ها

علف کش تریازینی،
متری بوزین،
پلیمر قالب ملکولی،
استخراج فاز جامد،
نمونه بیولوژیک،
کروماتوگرافی مایع با کارکرد
بالا

زمینه و هدف: افزایش تولید و استفاده از آفت‌کش‌ها برای اهداف کشاورزی سبب بروز ریسک‌های فراوان برای سلامتی انسان و محیط زیست می‌گردد لذا ارزیابی تراکم آن‌ها در نمونه‌های شغلی و محیطی به منظور برآورد میزان مواجهه ضروری به نظر می‌رسد. مطالعه حاضر با هدف سنتز پلیمر قالب ملکولی به عنوان یک جاذب نوین و اختصاصی در آنالیز مقادیر پایین علف‌کش متری بوزین از نمونه بیولوژیک به انجام رسید.

روش بررسی: پلیمر قالب ملکولی از طریق کوپلیمریزاسیون آفت‌کش مورد نظر به عنوان ملکول الگو در حضور متاکریلیک اسید و اتیلن گلیکول دی متاکریلات به ترتیب به عنوان مونومر عاملی و پیوند دهنده عرضی سنتز شد. پس از آن به منظور اثبات توانایی پلیمر قالب ملکولی سنتز شده در تشخیص انتخابی آنالیت مورد نظر از نمونه بیولوژیک، پارامترهای مؤثر در جذب و بازیافت متری بوزین توسط جاذب پلیمری سنتز شده از طریق استخراج فاز جامد بهینه‌سازی گردید. تعیین مقدار علف‌کش توسط کروماتوگرافی مایع با راندمان بالا صورت گرفت.

یافته‌ها: براساس نتایج حاصل، سنجش ریز مقدار علف‌کش مورد نظر با استفاده از پلیمر قالب ملکولی به‌طور موفقیت‌آمیزی به انجام رسید و مقادیر بهینه متغیرهای مؤثر در کارایی فرآیند استخراج به این شرح تعیین گردید: مقدار بهینه جاذب پلیمری ۱۳/۵۱ میلی‌گرم، pH نمونه برابر ۳، فلوی عبوری نمونه ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، حجم حلال شویش ۱/۳۳ میلی‌لیتر، دبی شویش ۳ میلی‌لیتر بر دقیقه و مقدار اسید موجود در ترکیب حلال شویش ۱۰ درصد. حد تشخیص و کمی سازی روش به ترتیب ۵/۷ ppb و ۱۹/۸ محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: روش طراحی شده می‌تواند برای آماده‌سازی نمونه با استفاده از جاذب پلیمری سنتز شده و تحت شرایط بهینه‌سازی شده برای استخراج و تعیین مقدار انتخابی و دقیق مقادیر اندک علف‌کش مورد نظر از نمونه بیولوژیک استفاده گردد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: گزارش نشده است.

شیوه استناد به این مقاله:

Heravizadeh OR, Khadem M, Nabizadeh R, Shahtaheri SJ. Synthesis of a molecular imprinted polymer as an absorbent for selective extraction of a triazine herbicide from biological samples. Iran Occupational Health. 2018 (Oct-Nov);15(5):10-20.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با [CC BY-NC-SA 1.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/) صورت گرفته است.



Synthesis of a molecular imprinted polymer as an absorbent for selective extraction of a triazine herbicide from biological samples

Omid Reza Heravizadeh, Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Monireh Khadem, Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Ramin Nabizadeh, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

✉ **Seyed Jamaledin Shahtaheri**, (*Corresponding Author) Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences Tehran, Iran. shahtaheri@tums.ac.ir

Abstract

Background: Increasing production and the use of pesticides for agricultural purposes can lead to many environmental and human health risks. Therefore, assessment of their concentration in occupational and environmental samples is necessary to estimate exposure levels. This study was aimed to use a synthesized molecular imprinted polymer (MIP) as a novel and specific absorbent for residue analysis of metribuzin herbicide in biological sample.

Methods: The MIP was synthesized by copolymerizing the pesticide as the template molecule in presence of methacrylic acid and ethylene glycol dimethacrylate as functional and crosslinking monomers, respectively. Afterwards, parameters affecting the adsorption and recycling of metribuzin by synthesized absorbent were optimized using solid phase extraction (SPE) method to demonstrate the ability of the MIP for selective recognition of analyte from biological sample. All samples were analyzed by High Performance Liquid Chromatography.

Results: According to the obtained results, trace amount of herbicide was successfully determined using MIP. The optimum amounts of effective parameters on extraction yield were determined as follow: adsorbent amount: 13.15 mg, sample pH: 3, sample flow rate: 1 mL /min, volume of extraction solvent: 1.33 mL, flow rate of extraction solvent: 3 ml/min, and the amount of acid in the solvent composition: 10%. Detection and quantification limits of the method were 5.7 and 19.8 ppb, respectively.

Conclusion: The developed method can be used as an optimum sample preparation procedure for selective and sensitive extraction and determination of desired herbicide from biological sample.

Conflicts of interest: None

Funding: None.

Keywords

Triazine Herbicide,
Metribuzin,
Molecular Imprinted
Polymer,
Solid Phase Extraction,
Biological Sample,
High Performance Liquid
Chromatography

Received: 27/09/2017

Accepted: 27/01/2018

How to cite this article:

Heravizadeh OR, Khadem M, Nabizadeh R, Shahtaheri SJ. Synthesis of a molecular imprinted polymer as an absorbent for selective extraction of a triazine herbicide from biological samples. *Iran Occupational Health*. 2018 (Oct-Nov);15(5):10-20.

مقدمه

آفت‌کش‌ها از جمله ترکیبات سمی هستند که به دنبال رشد جمعیت جهان و محدودیت‌های موجود در تولید محصولات غذایی به‌طور گسترده جهت کنترل و دفع آفات نباتی در کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این ترکیبات از نظر بیولوژیک موادی فعال به شمار می‌روند و استفاده از آن‌ها می‌تواند برای انواع متنوعی از موجودات غیر هدف (از جمله انسان) مضر باشد (۱) و افزایش تولید و استفاده از این مواد برای اهداف کشاورزی سبب بروز ریسک‌های فراوان برای سلامتی انسان و محیط زیست از راه تماس مستقیم و یا باقی‌مانده این مواد در آب و غذا می‌گردد (۲).

تماس مستقیم با آفت‌کش‌ها در موارد مختلفی در کشاورزی در طول فرآیند اختلاط و کاربرد، مصرف خانگی و عمومی و همچنین در صنایع تولیدکننده این مواد در طول پروسه تولید، انبار و حمل این مواد اتفاق می‌افتد (۳).

تماس با آفت‌کش‌ها می‌تواند سبب بروز اثرات حاد و مزمن در انسان شود. اثرات حاد شامل سمیت عصبی، آسیب به ارگان‌های مختلف بدن، تحریک و مسمومیت شیمیایی در افرادی که با گروه‌های مختلف آفت‌کش‌ها کار می‌کنند به ثبت رسیده است. همچنین تماس طولانی مدت با آفت‌کش‌ها می‌تواند عملکرد ارگان‌های مختلف بدن شامل سیستم اعصاب، غدد درون ریز، ایمنی، تولید مثل، کلیوی، قلبی و عروقی و تنفسی را دچار اختلال نماید و در این رابطه شواهد محکمی مبنی بر ارتباط بین تماس با این مواد و بیماری‌های مزمن شامل سرطان، پارکینسون، آلزایمر، مالتیپل اسکلروزیس (Multiple sclerosis (MS)، دیابت، پیری زودرس و بیماری‌های قلبی و عروقی و مزمن کلیه وجود دارد (۴).

متری بوزین (۴-آمینو-۶-ترت-بوتیل-۳-متیل سولفانیل-۲،۴-تریازین-۵-اون) از جمله علف‌کش‌های گروه تریازین است که جهت حفاظت تعدادی از محصولات کشاورزی در برابر علف‌های پهن‌برگ از آن استفاده می‌شود (۵). این علف‌کش علاوه بر ماندگاری در خاک به علت حلالیت بالا در محیط آبی در آب‌های سطحی و زیرزمینی نیز مشاهده می‌شود. مطالعات انسانی و حیوانی صورت گرفته

شواهدی مبنی بر ارتباط تماس با این علف‌کش و ایجاد اثرات ژنوتوکسیک، تغییرات سلولی و بروز اختلالاتی در عملکرد سیستم ایمنی و کبد و کلیه و تیروئید را نشان داده است (۶-۱۰).

با توجه به خطرات ذکر شده در رابطه با استفاده از آفت‌کش‌ها و افزایش نگرانی‌ها در رابطه با این مواد سمی ارزیابی تراکم آن‌ها در محیط‌های شغلی، محیط زیست و یا در نمونه‌های بیولوژیکی به منظور برآورد میزان مواجهه و مقایسه این مقادیر با استانداردهای توصیه شده ضرورت می‌یابد.

در طول دو دهه اخیر پیشرفت وسیعی در حوزه تجهیزات آنالیز اتفاق افتاده که در نهایت امکان تشخیص هر ماده‌ای در محیط زیست، غذا و یا نمونه‌های بیولوژیکی را فراهم آورده است. به‌طور معمول آنالیز هدف با روش‌های کروماتوگرافی به همراه دتکتورهای معمول (UV یا فلورسانس) و یا اخیراً به کمک کروماتوگرافی طیف‌سنج جرمی (GC-MS) و کروماتوگرافی گازی طیف‌سنج جرمی متناوب، تشخیص داده می‌شود (۱۱). روش‌های کروماتوگرافی گازی کلاسیک به دلیل ناپایداری حرارتی ترکیبات آفت‌کش‌ها در کل روش‌های رضایت بخشی نبوده‌اند و دتکتورهای گوگرد (S) و فسفر (P) در آن‌ها مورد نیاز می‌باشند. در کروماتوگرافی مایع با راندمان بالا (HPLC) دتکتورهای فرابنفش یا الکتروشیمیایی در آنالیز نمونه‌های محیطی مانند نمونه‌های آب و خاک استفاده می‌شوند. اگرچه زمانی که تشخیص انتخابی و دقیق با استفاده از این روش‌ها مد نظر است تزریق مستقیم نمونه‌های خام به علت وجود سایر ترکیبات مزاحم در ماتریکس نمونه می‌تواند سبب جلوگیری از تعیین مقدار دقیق مواد مورد نظر گردد. علاوه بر این دتکتورهای معمول نمی‌توانند حساسیت کافی برای آنالیز برخی آفت‌کش‌ها فراهم نمایند و یک مرحله‌ی پیش‌تغلیظ برای تعیین مقدار آنالیز در سطوح ppb برای تکنیک‌های دستگاهی نامبرده مورد نیاز می‌باشد. لذا با توجه به موارد ذکر شده و همچنین عدم وجود دستگاه‌ها و تجهیزات گران‌قیمت آنالیز در بسیاری از آزمایشگاه‌ها فرآیندهای آماده‌سازی نمونه که قابلیت انجام در هر آزمایشگاهی را دارند به منظور ساده‌سازی روش‌های آنالیز و کاهش قیمت توسعه یافته‌اند (۱۲).

ترکیبات در برابر اثرات حلال‌های آلی سبب قابلیت کاربرد آن‌ها در آنالیز مواد مختلف با چربی‌دوستی بالا مانند بی‌فنیل‌های پلی‌کلرینه (PCBs) و یا آفت‌کش‌ها شده است (۱۵، ۱۶).

هدف از مطالعه حاضر سنتز و تعیین ساختار پلیمر قالب ملکولی به عنوان یک جاذب نوین و اختصاصی در فرآیند آماده‌سازی، آنالیز گزینشی و سریع علف‌کش متری بوزین در نمونه بیولوژیک (ادارار) است که براساس تقسیم‌بندی سازمان جهانی بهداشت (WHO) در رابطه با درجه خطر آفت‌کش‌ها در گروه سمیت متوسط (II) و به عنوان آلاینده‌های شغلی و محیطی محسوب می‌شود (۱۷).

روش بررسی

مواد و تجهیزات: استاندارد علف‌کش متری بوزین (CAS No. 21087-64-9) از شرکت سیگما آلدْرِیچ آلمان، حلال‌های آلی تولوئن (CAS No. 108-88-3)، متانول (CAS No. 67-56-1) و استیک اسید (CAS No. 64-19-7) با درجه خلوص بالا از شرکت مرک آلمان، متاکریلیک اسید (CAS No. 79-41-4) به عنوان مونومر عاملی، اتیلن گلیکول دی‌متاکریلات (CAS No. 97-90-5) به عنوان اتصال دهنده جانبی و ۲-آزوبیس‌ایزوبوتیرونیتریل (CAS No. 78-67-1) به عنوان آغازگر واکنش رادیکالی و همچنین هیدروژن کلراید (CAS No. 7647-01-0)، سدیم هیدروکسید (CAS No. 1310-73-2) و محلول‌های بافر با pH مختلف از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

جهت آنالیز نمونه‌ها از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا ساخت شرکت Knauer آلمان، مجهز به پمپ فشار بالا (K-1001)، آشکارساز ماورای بنفش (K-2006) و ستون C18 فاز معکوس (-Prontosil 120-5) استفاده شد. همچنین آب دیونیزه مورد نیاز به عنوان یکی از فازهای برنده دستگاه کروماتوگرافی مایع توسط دستگاه (Select) PURITE ساخت کشور آمریکا فراهم گردید. علاوه بر این در مطالعه حاضر از تجهیزات و وسایلی شامل: میکروسمپلر (Socorex، آلمان)، ترازوی دیجیتال (Sartorius، آلمان)، حمام اولتراسونیک (Sono، سوئیس)، همزن مغناطیسی هیترا (Chiltern، آمریکا)، کپسول نیتروژن، دماسنج

هدف اصلی از آماده‌سازی نمونه حذف عوامل مداخله‌گر بالقوه، پیش تغلیظ آنالیت مورد نظر و تبدیل آنالیت (در صورت نیاز) به یک فرم مناسب‌تر به منظور جداسازی، تشخیص و نهایتاً فراهم آوری یک متد قوی با قابلیت تجدید پذیری و مستقل از متغیرهای ماتریکس نمونه است. علاوه بر این اخیراً اهداف دیگری همچون استفاده از نمونه‌های آغازین کوچکتر، توسعه و بهبود خاصیت انتخابی در فرآیند جداسازی، اتوماسیون و کاهش استفاده از حلال‌های مختلف و ظروف آزمایشگاهی مطرح شده است (۱۱).

در سالیان اخیر روش استخراج با استفاده از فاز جامد (SPE) به عنوان یک روش جایگزین برای روش سنتی جداسازی مایع-مایع (Liquid-Liquid Extraction) مطرح شد. روش SPE روشی سریع، ارزان و با نیاز کم‌تر به حلال‌های آلی گران و خطرناک و با پتانسیل بازیابی نسبتاً مناسب و امکان اتوماسیون است (۱۳). همچنین تغییرات و بهبودهایی نیز که به منظور توسعه روش SPE به انجام رسیده سبب ایجاد روش‌هایی جدیدتر مانند جداسازی با استفاده از فاز جامد میکرو (SPME) گردیده است. گرچه مشکل اصلی روش SPE ضعف بالا در خاصیت انتخابی جاذب‌ها و در نتیجه نیاز به بهینه‌سازی گسترده مراحل معمول در طول جداسازی و استخراج آنالیت مورد نظر برای دستیابی به حد تشخیص مورد نظر است (۱۱).

امروزه به علت پایین بودن خاصیت گزینشگری جاذب‌های مورد استفاده گرایش به سمت روش‌های ویژه و جدید از جمله جاذب‌هایی بر پایه مکانیزم ایمنی موجودات زنده (Immunoaffinity sorbents (IASs)) و همچنین پلیمرهای قالب ملکولی (MIPs) ایجاد شده است (۱۴).

پلیمرهای قالب ملکولی جاذب‌هایی با خاصیت انتخابی هستند که ظرفیت بالایی در جذب ملکول هدف (الگو) که به صورت عمدی در پروسه‌ی ساخت آن‌ها وارد شده است از خود نشان می‌دهند. این ترکیبات پایداری و مقاومت بالایی در رنج وسیعی از pH، دما و حلال‌ها را داشته و بنابراین می‌توانند تعاملات گیرنده‌های طبیعی آنتی‌ژن - آنتی‌بادی در انتخاب و حفظ ملکول هدف مورد نظر را بدون هیچ‌گونه محدودیت تقلید نمایند. مقاومت و پایداری این

علف‌کش مورد نظر: در فاز بهینه‌سازی روش جداسازی فاز جامد با استفاده از پلیمرهای قالب ملکولی (MISPE) مجموعاً تعداد ۶ فاکتور مؤثر (۳ فاکتور در مرحله جذب و ۳ فاکتور در مرحله بازیافت) با در نظر گرفتن مطالعات پیشین شامل مقدار جاذب، pH و دبی نمونه، حجم و دبی حلال استخراج و همچنین درصد اسید مورد استفاده در ترکیب حلال استخراج، جهت بررسی مورد نظر قرار گرفت که باید متوسط میزان جذب و بازیافت با فاصله اطمینان آن برای ترکیبی از ۶ فاکتور مذکور به عنوان مقدار بهینه تعیین شود. لذا برای هر یک از پارامترهای فوق در مرحله جذب و بازیافت حد بالا و پایین مطابق با جدول ۱ مشخص شد و تعیین تعداد نمونه مورد نیاز با استفاده از روش طراحی مرکب مرکزی (Central Composite Design (CCD)) و به کمک نرم‌افزار آماری R صورت گرفت و تعداد ۵۸ مرحله آزمایش با شرایط طراحی شده جهت بهینه‌سازی مراحل جذب و بازیافت نمونه به انجام رسید.

با توجه به مقادیر تعیین شده برای پارامترهای تأثیرگذار در فرآیند جذب متری بوزین، در هر مرحله از آزمایشات طراحی شده ابتدا مقدار مشخصی از پلیمر قالب ملکولی در داخل ستون استخراج فاز جامد قرار گرفت و با عبور ۱ mL متانول و به دنبال آن ۱ mL آب دی‌یونیزه با فلوی ۱ mL/min از ستون جداسازی فاز جامد مرحله مستعد سازی به انجام رسید. پس از آن محلولی به غلظت ۵ ppm و حجم ۳۰ mL از متری بوزین با pH و فلوی مشخص از ستون جداسازی فاز جامد عبور داده شد و سپس از طریق مقایسه سطح زیر کروماتوگرام مربوط به نمونه استاندارد با غلظت ۵ ppm و همچنین نمونه جمع‌آوری شده پس از عبور از جاذب پلیمری، توانایی جذب آفت‌کش مورد نظر توسط پلیمر قالب ملکولی تحت شرایط تعیین شده مشخص و به صورت درصد جذب گزارش شد.

در فاز بهینه‌سازی بازیافت علف‌کش متری بوزین از ستون جداسازی فاز جامد پس از طی مراحل جذب با در نظر گرفتن مقادیر بهینه تعیین شده، مرحله شستشو با استفاده از ۲ mL آب دیونیزه به انجام رسید. سپس در هر مرحله از آزمایش حجم مشخصی از ترکیب متانول و استیک اسید به عنوان حلال شویش و با دبی

دیجیتال (TP3001، چین)، آون (Memmert، آلمان)، دستگاه سوکسله (Duran، آلمان)، pH متر (Metrohm، سوئیس) و وکیوم منیفلد به همراه پمپ خلأ (تجهیز طب، ایران) نیز استفاده شد.

تهیه محلول‌های استوک و استاندارد کاربردی: محلول استوک با غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد. محلول‌های استاندارد با غلظت‌های مختلف به صورت روزانه از محلول استوک تهیه شدند.

فرآیند ساخت پلیمر قالب ملکولی به عنوان جاذب علف‌کش متری بوزین: در این مطالعه از روش پلیمریزاسیون رسوبی برای سنتز پلیمر قالب ملکولی استفاده شد. ابتدا ۱ میلی‌مول از استاندارد علف‌کش متری بوزین به عنوان ملکول الگو به همراه ۴ میلی‌مول متاکریلیک اسید و ۲۰ میلی‌مول اتیلن گلیکول دی‌متاکریلات در ۷۰ میلی‌لیتر تولوئن وارد واکنش شدند. پس از آن مقدار ۴۰ میلی‌گرم ۲،۲-آزوبیس‌ایزوبوتیرونیتریل به عنوان آغازگر واکنش رادیکالی به ظرف واکنش اضافه شد. فرآیند حذف اکسیژن از ظرف واکنش به مدت ۱۰ دقیقه تحت اتمسفر نیتروژن به انجام رسید و پس از درز بندی کامل، پلیمریزاسیون با قرار دادن ظرف واکنش در حمام روغن با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و هم زدن با سرعت ۸ rpm به مدت ۱۸ ساعت صورت گرفت. پس از اتمام فرآیند پلیمریزاسیون به منظور حذف ملکول الگو از ساختار پلیمر فرآیند شستشو با استفاده از ۳۰۰ میلی‌لیتر ترکیب متانول/استیک اسید به نسبت ۱:۱۰ درون دستگاه سوکسله در سه روز متوالی و هر روز به مدت ۱۲ ساعت به انجام رسید و حذف ملکول الگو پس از اتمام پروسه شستشو از طریق آنالیز محلول زیر سوکسله توسط دستگاه HPLC تحت شرایط بهینه‌سازی شده به اثبات رسید و در نهایت پلیمر حاصله در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. همچنین به منظور اثبات جذب اختصاصی سم مورد نظر با استفاده از پلیمر قالب ملکولی یک پلیمر شاهد تحت عنوان پلیمر غیر قالب ملکولی (None-imprinted polymer (NIP)) با روش مشابه و بدون اضافه نمودن ملکول الگو سنتز شد.

بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر در جذب و بازیافت

جدول ۱- حد پایین و بالای گستره انتخابی برای بهینه سازی فاکتور های موثر در مرحله جذب و بازیافت علف کش متری بوزین

متغیر	حد پایین	حد بالا
مقدار جاذب (میلی گرم)	۵	۲۵
pH نمونه	۳	۱۱
سرعت عبور نمونه (میلی لیتر / دقیقه)	۱	۳
حجم حلال استخراج (میلی لیتر)	۱	۵
سرعت عبور حلال استخراج (میلی لیتر / دقیقه)	۱	۳
مرحله بازیافت	۱	۱۰
درصد اسید مورد استفاده در ترکیب حلال شویش	۱	۱۰

جدول ۲- نتایج بهینه سازی دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا جهت آنالیز متری بوزین

فاز متحرک (%)	طول موج	فلو	حجم تزریق
آب	۲۹۰ (nm)	۱ (mL/min)	۲۰ (μL)
متانول			
آنالیت			
متری بوزین			

و بازیافت متری بوزین ابتدا محلولی به غلظت ۵۰ ppb و حجم ۳۰ mL از علف کش متری بوزین تهیه شد و آفت کش های پرمترین، دیازینون و مالاتیون به عنوان عوامل مزاحم در جذب و بازیافت متری بوزین در دو نوبت و با غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ برابر غلظت آنالیت مورد نظر (متری بوزین) به محلول تهیه شده اضافه گردید. پس از آن مراحل جذب و بازیافت هر کدام از نمونه های حاوی عوامل مزاحم ذکر شده با در نظر گرفتن شرایط بهینه به انجام رسید و آنالیز محلول شویش استخراجی از ستون جداسازی فاز جامد با استفاده از دستگاه HPLC انجام و میزان بازیافت علف کش متری بوزین در حضور عوامل مزاحم محاسبه شد.

تعیین مقدار علف کش مورد نظر در نمونه بیولوژیکی: پس از بهینه سازی شرایط جذب و بازیافت علف کش انتخابی، به منظور سنجش توانایی روش طراحی شده در تعیین مقدار آنالیت مورد نظر در نمونه بیولوژیکی با ترکیب پیچیده و حاوی عوامل مزاحم، نمونه هایی در محدوده غلظتی منحنی کالیبراسیون استخراجی (ppb) ۷۰، ۹۰، ۱۱۰ و ۵۰ از آفت کش مورد نظر در ادرار رقیق شده با آب دیونیزه به نسبت ۱:۱۰ اسپایک و پس از انجام مراحل آماده سازی بهینه سازی شده، حلال شویش به وسیله دستگاه HPLC آنالیز و میزان بازیافت متری بوزین از نمونه واقعی مشخص شد. لازم به ذکر است که همه نمونه های ادرار مورد استفاده جهت اسپایک کردن

تعیین شده از ستون عبور داده شد؛ و محلول خروجی از ستون جداسازی فاز جامد که حاوی آنالیت تغلیظ شده مورد نظر است جمع آوری و توسط دستگاه HPLC تحت شرایط بهینه سازی شده (جدول ۲) مورد سنجش قرار گرفت. محاسبه میزان آنالیت بازیافتی از طریق مقایسه سطح زیر منحنی با منحنی کالیبراسیون تهیه شده به انجام رسید و به صورت درصد بازیافت گزارش گردید.

رسم منحنی کالیبراسیون: پس از اتمام مراحل بهینه سازی در دو فاز جذب و بازیافت و آنالیز داده های به دست آمده، بهترین میزان هر یک از متغیرهای انتخابی جهت دستیابی به بالاترین راندمان جذب و بازیافت آنالیت مورد نظر تعیین شد و سپس منحنی کالیبراسیون استخراجی در گستره غلظتی ۱۲۰-۲۰ (شامل غلظت های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و یک نمونه شاهد) که محدوده بالا و پایین غلظت پیشنهادی برای متری بوزین در استاندارد کیفیت آب آشامیدنی ارائه شده توسط سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا (۱۸) را پوشش می دهد رسم گردید و با استفاده از آن گستره خطی عملکرد پلیمر قالب ملکولی در جذب آنالیت مورد نظر و حد تشخیص و کمی سازی روش نیز محاسبه شد.

بررسی اثر عوامل مداخله گر در عملکرد پلیمر قالب ملکولی سنتز شده: به منظور بررسی و اثبات عملکرد اختصاصی جاذب پلیمری سنتز شده در رابطه با جذب

از افرادی که با آفت کش مورد نظر مواجهه نداشته‌اند تهیه شد.

یافته‌ها

نتایج مربوط به بهینه‌سازی آنالیز علف‌کش متری بوزین: پس از تهیه محلول‌هایی با غلظت مشخص به منظور آنالیز مقادیر پایین آفت‌کش مورد نظر، شرایط مختلف دستگاه HPLC از لحاظ نوع ستون مورد استفاده، نوع و ترکیب فاز متحرک، طول موج تشخیص و دبی فاز متحرک مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت شرایط ذکر شده در جدول ۲ به عنوان بهینه‌ترین حالت برای آنالیز ریز مقدار علف‌کش متری بوزین مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر در مرحله جذب و بازیافت متری بوزین: به منظور تعیین مقادیر بهینه فاکتورهای مؤثر در مرحله جذب و بازیافت علف‌کش متری بوزین توسط پلیمر قالب ملکولی، تلفیق داده‌های مربوط به میانگین و انحراف معیار جذب و بازیافت با استفاده از نرم‌افزار R صورت گرفت و براساس نتایج حاصل از آزمون بررسی رابطه خطی (درجه دو) متغیرهای مستقل شامل میزان جاذب، pH و فلوی نمونه، حجم و فلوی حلال شویش و درصد اسید موجود در آن با متغیر وابسته (راندمان جذب و بازیافت) از

داده‌ها رگرسیون گرفته شد. در نهایت با در نظر گرفتن حداکثر راندمان جذب و بازیافت به عنوان متغیر مستقل (راندمان ۱۰۰ درصد) مقادیر بهینه فاکتورهای مؤثر با استفاده از رابطه رگرسیونی تعیین شد که به ترتیب در جدول ۳ و ۴ قابل مشاهده است.

مقایسه‌ی راندمان جذب MIP و NIP در شرایط بهینه: پس از اتمام مراحل بهینه‌سازی جذب و بازیافت علف‌کش متری بوزین به منظور اثبات گزینش پذیری پلیمر قالب مولکولی در جذب آنالیت مربوطه، راندمان MIP و NIP تحت شرایط بهینه تعیین شده و کاملاً به صورت مشابه اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده که در جدول ۵ نشان داده شده است، ظرفیت جذب و بازده استخراج برای پلیمر قالب مولکولی به علت وجود سایت‌های اختصاصی تشکیل شده برای ملکول علف‌کش انتخابی به میزان چشمگیری بیشتر از پلیمر قالب مولکولی نشده می‌باشد که این نتایج تأییدی بر سنتز موفق پلیمرهای مورد نظر می‌باشد.

نتایج بررسی اثر عوامل مداخله‌گر در گزینش پذیری و راندمان استخراج پلیمر قالب ملکولی سنتز شده: همان‌طور که اشاره شد به منظور بررسی و اثبات عملکرد اختصاصی جاذب پلیمری سنتز شده در رابطه با جذب و بازیافت علف‌کش مورد نظر، سه مورد از

جدول ۳- مقادیر بهینه تعیین شده برای پارامترهای مؤثر در مرحله جذب علف‌کش متری بوزین توسط پلیمر قالب ملکولی

مقدار بهینه تعیین شده	متغیر	حداکثر راندمان جذب (%)
۳	pH	۱۰۰
۱۲/۵۱	مقدار جاذب (میلی گرم)	
۱	سرعت عبور نمونه (میلی لیتر بر دقیقه)	

جدول ۴- مقادیر بهینه تعیین شده برای پارامترهای مؤثر در مرحله بازیافت علف‌کش متری بوزین از پلیمر قالب ملکولی

مقدار بهینه تعیین شده	متغیر	حداکثر راندمان بازیافت (%)
۱/۳۳	حجم حلال شویش (میلی لیتر)	۱۰۰
۱۰	میزان اسید موجود در حلال شویش (%)	
۳	دبی شویش (میلی لیتر بر دقیقه)	

جدول ۵- مقایسه راندمان و ظرفیت جذب متری بوزین توسط پلیمر قالب ملکولی در برابر پلیمر غیرقالب ملکولی

جاذب	درصد بازیافت (SD ± میانگین)	ظرفیت جذب (mg.g ⁻¹)
پلیمر قالب ملکولی (MIP)	۹۳/۳۴ ± ۰/۲۹	۱۰/۳۶
پلیمر غیر قالب ملکولی (NIP)	۳۲/۲۳ ± ۳/۱۲	۳/۶۶

جدول ۶- راندمان استخراج متری بوزین توسط MIP در حضور غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ برابر عوامل مزاحم

غلظت عوامل مزاحم	بازیافت متری بوزین (%) (SD ± میانگین)
۵۰ برابر (مالاتیون، دیازینون، پرمترین)	۹۴/۶۰ ± ۱/۸۴
۱۰۰ برابر (مالاتیون، دیازینون، پرمترین)	۹۲/۹۹ ± ۱/۹۰

جدول ۷- نتایج مربوط به راندمان استخراج علف کش متری بوزین از نمونه بیولوژیک با استفاده از پلیمر قالب ملکولی

نمونه واقعی	غلظت (ppb)	بازیافت (%) (SD ± میانگین)
ادار	۵۰	۹۳/۸۲ ± ۴/۰۸
	۷۰	۹۷/۱۸ ± ۴/۱۸
	۹۰	۹۴/۳۵ ± ۴/۵۳
	۱۰۰	۹۷/۸۴ ± ۲/۶۸

بوزین از نمونه واقعی با استفاده از جاذب پلیمری سنتز شده، غلظت‌های مختلف از علف کش مورد نظر در ادرار رقیق شده افرادی که مواجهه قبلی با این آفت کش نداشته‌اند، اسپایک و پس از انجام مراحل آماده‌سازی بهینه‌سازی شده، حلال شویس استخراجی به وسیله دستگاه HPLC آنالیز و میزان بازیافت علف کش مورد نظر از نمونه واقعی مشخص شد. بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۷ مشاهده شد که پلیمر قالب ملکولی سنتز شده به طور موفقیت آمیز و بدون تأثیرپذیری از سایر عوامل موجود در ماتریکس نمونه بیولوژیکی قادر به استخراج انتخابی آنالیت مورد نظر با راندمان بالا است.

بحث و نتیجه گیری

سنتر ذرات پلیمری با روش پلیمریزاسیون رسوبی باعث افزایش نسبت تماس سطحی آنالیت مورد نظر با جاذب، تسهیل دسترسی آن به سایت‌های جذب اختصاصی پلیمر و بهبود کارایی جذب می‌گردد؛ بنابراین برای دستیابی به راندمان مورد نظر جذب و بازیافت در مقایسه با پلیمرهای سنتز شده با روش‌های معمول مقدار جاذب مورد نیاز به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. بررسی‌های صورت گرفته بر روی مطالعاتی که از سایر روش‌های پلیمریزاسیون برای سنتز پلیمرهای قالب ملکولی بهره برده‌اند، استفاده از مقادیر بسیار بالاتر جاذب در فرآیند آماده‌سازی نمونه آفت کش‌ها در مقایسه با مطالعه حاضر را نشان می‌دهد (۱۹).

آفت‌کش‌های رایج به عنوان عوامل مداخله‌گر با غلظت‌های مختلف به محلول‌های حاوی آنالیت اصلی اضافه شد و پس از انجام مراحل جذب و بازیافت نمونه، محلول استخراجی به وسیله دستگاه HPLC مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج ذکر شده در جدول ۶ نشان داد که حضور عوامل مداخله‌گر تا غلظت ۱۰۰ برابر علف کش متری بوزین نتوانسته بر درصد بازیافت این سم تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای داشته باشد.

رسم منحنی کالیبراسیون و محاسبه حد تشخیص و کمی سازی روش: پس از بهینه‌سازی پارامترهای تأثیرگذار بر کارایی پلیمر قالب ملکولی در جذب و بازیافت آنالیت مورد نظر، رسم منحنی کالیبراسیون به منظور آنالیز و تعیین مقادیر جزئی متری بوزین در نمونه‌ی واقعی و همچنین برآورد حد تشخیص و محدوده خطی روش ضروری است لذا مراحل جذب و استخراج علف کش متری بوزین در محدوده غلظتی ppb ۱۲۰-۲۰ تحت شرایط بهینه از پیش تعیین شده انجام گرفت و منحنی کالیبراسیون با $R^2=0/99$ برای علف کش متری بوزین رسم گردید. حد تشخیص (LOD) و حد کمی سازی (LOQ) روش با استفاده از داده‌های مربوط به شیب منحنی کالیبراسیون و انحراف استاندارد نمونه شاهد به ترتیب ۵/۷ و ۱۹/۸ ppb محاسبه شد.

نتایج حاصل از تعیین مقدار متری بوزین در نمونه بیولوژیکی به‌وسیله پلیمر قالب ملکولی سنتز شده: به منظور سنجش توانایی روش طراحی شده جهت استخراج و تعیین مقدار انتخابی و دقیق علف کش متری

از حجم‌های کمتر حلال شویش فراهم می‌گردد. از سوی دیگر کاهش راندمان استخراج با افزایش حجم حلال شویش مورد استفاده را می‌توان به کاهش غلظت نمونه استخراجی در حجم‌های بالاتر حلال شویش مورد استفاده و امکان از دست رفتن بخشی از نمونه در طی فرآیند آنالیز نسبت داد.

دبی حلال شویش انتخابی جهت بازیافت آنالیت از دیگر پارامترهای مورد بررسی در فرآیند بهینه‌سازی در این مطالعه بود. نتایج حاصل از بهینه‌سازی این فاکتور نشان داد که حداکثر راندمان استخراج در دبی 3 mL/min حلال شویش به دست می‌آید. این بهبود راندمان استخراج به دنبال افزایش دبی حلال شویش را می‌توان به دلیل افزایش توان دسترسی مؤثر حلال شویش به سایت‌های قالب‌گیری شده ذرات پلیمری و همچنین افزایش قدرت تخریب پیوندهای هیدروژنی ضعیف در سرعت‌های بالاتر عبور حلال دانست. در دو مطالعه مجزا که جداسازی و تشخیص کلرامفنیکل و بیسفنول A با استفاده از پلیمرهای قالب ملکولی صورت گرفت (۲۱، ۲۲) بر خلاف مطالعه حاضر افزایش میزان بازیافت در فلوی پایین حلال شویش مشاهده شد که عدم استفاده از اسید به عنوان عامل تسهیل‌کننده در ترکیب حلال شویش و به دنبال آن کاهش توان حلال مورد استفاده در جداسازی پیوندهای هیدروژنی میان آنالیت و جاذب پلیمری و نیاز به صرف زمان بیشتر برای این منظور را می‌توان به عنوان دلایل اصلی آن ذکر کرد.

در مطالعه حاضر درصد استیک اسید مورد استفاده در ترکیب حلال شویش (متانول) به عنوان یکی از عوامل تأثیرگذار بر میزان بازیافت نمونه آفت‌کش مورد نظر در فرآیند بهینه‌سازی مورد توجه قرار گرفت و حد بالا و پایین برابر ۱۰-۱ درصد حجمی حلال شویش برای آن در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از بهینه‌سازی استخراج علف‌کش متری بوزین مقدار بهینه اسید موجود در ترکیب حلال شویش را ۱۰ درصد حجمی تعیین کرد؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش درصد استیک اسید، پیوندهای هیدروژنی موجود به‌طور مؤثری از بین رفته و امکان خروج کامل آنالیت مورد نظر از ساختار جاذب فراهم می‌شود. نتایج حاصل از سایر مطالعات انجام شده بر روی جداسازی و استخراج

مقادیر بهینه به‌دست‌آمده برای فاکتورهای مؤثر در مرحله جذب علف‌کش متری بوزین نشان داد که جاذب پلیمری سنتز شده در گستره pH اسیدی نمونه متری بوزین عملکرد بهتری را از خود نشان می‌دهد که این امر می‌تواند به دلیل افزایش تمایل به برقراری پیوندهای هیدروژنی ملکول هدف با جایگاه اختصاصی جاذب باشد علاوه بر این در گستره قلیایی به دلیل بروز فرآیند هیدرولیز، گروه‌های عاملی جاذب سنتز شده توانایی خود در برهم‌کنش و برقراری مؤثر پیوند با ملکول الگو را از دست می‌دهند.

مقدار بهینه پلیمر استفاده شده در مرحله جذب $13/51 \text{ mg}$ تعیین شد که این مقدار نزدیک به میانگین حد بالا و پایین در نظر گرفته شده برای فرآیند بهینه‌سازی و به‌طور قابل توجهی کمتر از میزان مورد استفاده‌ی جاذب‌های سنتز شده با سایر روش‌های پلیمریزاسیون جهت آماده‌سازی نمونه آفت‌کش‌ها می‌باشد. به نظر می‌رسد کاهش ظرفیت جذب جاذب به دنبال کاهش تعداد سایت‌های قالب‌گیری شده در مقادیر پایین پلیمر استفاده شده و همچنین مشکلات مربوط به عبور و تماس مؤثر نمونه و افزایش میزان جذب غیراختصاصی در مقادیر بالای پلیمر مورد استفاده باعث افت کارایی جذب MIP در مقادیر بالاتر و پایین‌تر از میانگین باشد.

از دیگر پارامترهای مؤثر در راندمان جذب آنالیت، سرعت عبور نمونه از روی جاذب می‌باشد. نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه نشان‌دهنده افزایش راندمان جذب علف‌کش متری بوزین در مقادیر پایین دبی عبور نمونه بود که این امر را می‌توان به فرصت بیشتر آنالیت مورد نظر برای برقراری پیوند مؤثر با جایگاه‌های اختصاصی جاذب پلیمری نسبت داد. بررسی‌های انجام شده در مطالعات مشابه نیز اثر کاهش دبی نمونه بر افزایش راندمان جذب را به خوبی نشان داده است (۲۰).

همچنین بر اساس نتایج بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر در مرحله بازیافت علف‌کش متری بوزین، حجم حلال شویش برای استخراج این علف‌کش $1/33 \text{ mL}$ تعیین شد. با توجه به استفاده از مقادیر پایین جاذب پلیمری در مرحله جذب آنالیت، به نظر می‌رسد امکان دستیابی به حداکثر راندمان استخراج و فاکتور تغلیظ با استفاده

استخراج انتخابی و تعیین مقدار آفت‌کش مورد نظر از نمونه بیولوژیک استفاده کرد.

در این مطالعه سنتز و تعیین ساختار پلیمر قالب ملکولی به عنوان یک جاذب نوین و اختصاصی برای تعیین مقدار علف‌کش متری بوزین از نمونه‌های بیولوژیکی به انجام رسید. پارامترهای مختلفی بر عملکرد این جاذب‌های پلیمری در دو مرحله جذب و بازیافت تأثیرگذار است که با توجه به مطالعات انجام شده مهم‌ترین این عوامل مورد بررسی و بهینه‌سازی قرار گرفت. نتایج حاصل توانایی بسیار بالای MIP سنتز شده در جداسازی انتخابی و تعیین مقدار علف‌کش مورد نظر در شرایط بهینه را نشان داد و در نهایت آزمایشات انجام شده جهت مطالعه عملکرد این جاذب برای جداسازی مقادیر جزئی آنالیت مورد نظر از نمونه بیولوژیک نیز نتایج موفقیت‌آمیزی را به دنبال داشت. از مزایای استفاده از پلیمرهای قالب ملکولی به عنوان جاذب اختصاصی فاز جامد می‌توان به هزینه پایین، پایداری و مقاومت بالای این جاذب‌ها در شرایط مختلف، عدم نیاز به مقادیر بالای حلال و عملکرد اختصاصی با راندمان و سرعت بالا اشاره کرد و با توجه به لزوم تعیین مقادیر جزئی آلاینده‌های مختلف در نمونه‌های محیطی و بیولوژیکی، مقایسه این مقادیر با استانداردهای موجود و در نهایت کنترل این آلاینده‌ها امروزه توسعه گسترده‌ای در ساخت و استفاده از این نوع جاذب‌ها برای ترکیبات مختلف صورت گرفته است. در پایان بررسی قابلیت استفاده از پلیمرهای قالب ملکولی در تعیین مقدار سموم شغلی و محیطی در سایر واسطه‌های بیولوژیکی مانند خون یا پلاسما و همچنین امکان‌سنجی استفاده از پلیمرهای قالب ملکولی جهت تعیین مقدار آلاینده‌ها در نمونه‌های جمع‌آوری شده از هوای محیط کار که می‌توان آن‌ها را از واسطه‌ی نمونه‌برداری در یک محلول استخراج نمود جهت بررسی در مطالعات آتی پیشنهاد می‌گردد.

References

1. Matsumura F. Metabolism of insecticides by animals and plants. Toxicology of Insecticides: Springer; 1985. p. 203-98.
2. Simões M, Martins N, Cabrita MJ, Burke AJ,

آفت‌کش‌ها با استفاده از پلیمرهای قالب ملکولی نیز تأثیر افزایش مقدار عامل تسهیل‌کننده (تا حدود ۱۰ درصد) در افزایش توانایی و راندمان استخراج آنالیت‌های مورد نظر را به اثبات می‌رساند (۲۳).

براساس اختلاف قابل‌ملاحظه‌ای که عملکرد پلیمر قالب ملکولی سنتز شده در مقایسه با پلیمر غیر قالب ملکولی در جذب متری بوزین از خود نشان داد می‌توان خاصیت انتخابی MIP در جذب متری بوزین و سنتز صحیح آن را به اثبات رساند. علاوه بر این، بررسی عملکرد پلیمر قالب ملکولی سنتز شده در حضور ترکیبات مداخله‌گر یکی دیگر از راه‌های اثبات جذب اختصاصی آنالیت مورد نظر توسط این جاذب می‌باشد. ترکیباتی که علاوه بر آنالیت اصلی در ماتریکس نمونه وجود دارند می‌توانند به عنوان عوامل مزاحم در هر روش آنالیز مداخله ایجاد نموده و بر پاسخ نهایی تأثیر منفی داشته باشند. با توجه به کاربرد نهایی پلیمر قالب ملکولی سنتز شده در این مطالعه برای آماده‌سازی نمونه‌های محیطی و بیولوژیکی و وجود عوامل مداخله‌گر بسیار در نمونه‌های مذکور، بررسی عملکرد این جاذب‌ها در حضور عوامل مزاحم از طریق اضافه نمودن سه مورد از آفت‌کش‌های رایج به عنوان ترکیبات مداخله‌گر با غلظت‌های مختلف به محلول‌های حاوی آنالیت اصلی و آنالیز نمونه استخراجی به وسیله دستگاه HPLC پس از انجام مراحل جذب و بازیافت، به انجام رسید. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده حضور عوامل مداخله‌گر تا غلظت ۱۰۰ برابر علف‌کش متری بوزین نتوانست بر درصد بازیافت این علف‌کش تأثیر قابل‌ملاحظه‌ای داشته باشد و لذا خاصیت انتخابی پلیمر قالب ملکولی سنتز شده و توانایی عملکرد مناسب این جاذب برای آماده‌سازی نمونه و استخراج ترکیب مورد مطالعه از ماتریکس‌های پیچیده به اثبات رسید.

در نهایت با توجه به اهداف پژوهش و به منظور سنجش توانایی روش طراحی شده در تعیین مقدار آنالیت مورد نظر در نمونه بیولوژیکی، عملکرد MIP سنتز شده در جذب و بازیافت علف‌کش متری بوزین از نمونه ادرار نیز مورد بررسی قرار گرفت که براساس نتایج حاصل، راندمان بازیافت آنالیت از نمونه‌های اسپایک در تمامی غلظت‌های انتخابی مطلوب بود و لذا از روش طراحی شده می‌توان با اطمینان بالا جهت

- Garcia R. Tailor-made molecularly imprinted polymers for dimethoate and deltamethrin recognition: synthesis, characterization and chromatographic evaluation. *J Polymer Res.* 2014;21(3):368.
3. Zuskin E, Mustajbegovic J, Schachter EN, Kern J, Deckovic-Vukres V, Trosic I, et al. Respiratory function in pesticide workers. *J Occup Environ Med.* 2008;50(11):1299-305.
4. Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaiee A. Pesticides and oxidative stress: a review. *Med Sci Monitor.* 2004;10(6):RA141-RA7.
5. Janíková L, Šeššovská R, Rogozinská M, Tomášková M, Chýlková J. Sensitive voltammetric method for determination of herbicide metribuzin using silver solid amalgam electrode. *Monatshefte Chemie-Chem Month.* 2016;147(1):219-29.
6. Calderón-Segura ME, Gómez-Arroyo S, Molina-Alvarez B, Villalobos-Pietrini R, Calderón-Ezquerro C, Cortés-Eslava J, et al. Metabolic activation of herbicide products by *Vicia faba* detected in human peripheral lymphocytes using alkaline single cell gel electrophoresis. *Toxicol In Vitro.* 2007;21(6):1143-54.
7. Medjdoub A, Merzouk S, Merzouk H, Chiali F, Narce M. Effects of Mancozeb and Metribuzin on in vitro proliferative responses and oxidative stress of human and rat spleen lymphocytes stimulated by mitogens. *Pesticide Biochem Physiol.* 2011;101(1):27-33.
8. Delancey JOL, Alavanja MC, Coble J, Blair A, Hoppin JA, Austin HD, et al. Occupational exposure to metribuzin and the incidence of cancer in the Agricultural Health Study. *Ann Epidemiol.* 2009;19(6):388-95.
9. Porter W, Green S, Debbink N, Carlson I. Groundwater pesticides: interactive effects of low concentrations of carbamates aldicarb and methomyl and the triazine metribuzin on thyroxine and somatotropin levels in white rats. *J Toxicol Environ Health.* 1993;40(1):15-34.
10. Bleeke MS, Smith MT, Casida JE. Metabolism and toxicity of metribuzin in mouse liver. *Pesticide Biochem Physiol.* 1985;23(1):123-30.
11. Turiel E, Martín-Esteban A. Molecularly imprinted polymers for sample preparation: a review. *Analy Chim Acta.* 2010;668(2):87-99.
12. Shahtaheri S, Stevenson D. Evaluation of factors influencing recovery of herbicide MCPA from drinking water. *Iran J Pub Health.* 2001;30(1-2):15-20.
13. Rahiminejad M, Shahtaheri S, Ganjali M, Forushani A, Golbabaei F. Molecularly imprinted solid phase extraction for trace analysis of diazinon in drinking water. *J Environ Health Sci Engin.* 2009;6(2):97-106.
14. Hennion MC, Pichon V. Immuno-based sample preparation for trace analysis. *J Chromat.* 2003;1000(1):29-52.
15. Omid F, Behbahani M, Samadi S, Sedighi A, Shahtaheri SJ. Coupling of molecularly imprinted polymer nanoparticles by high performance liquid chromatography as an efficient technique for sensitive and selective trace determination of 4-chloro-2-methylphenoxy Acetic Acid In Complex Matrices. *Iran J Pub Health.* 2014;43(5):645.
16. Zhang M, Zeng J, Wang Y, Chen X. Developments and trends of molecularly imprinted solid-phase microextraction. *J Chromat Sci.* 2013;51(7):577-86.
17. World Health Organization. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification. 2009;30. Available at: http://www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard_2009.pdf. 12 26, 2017.
18. United States Environmental Protection Agency. Drinking Water Standards and Health Advisories. 2012;6. Available at: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/dwstandards2012.pdf>. 12 26, 2017.
19. Pereira LA, Rath S. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of fenitrothion in tomatoes. *Analy Bioanal Chem.* 2009;393(3):1063-72.
20. Zarejousheghani M, Fiedler P, Möder M, Borsdorf H. Selective mixed-bed solid phase extraction of atrazine herbicide from environmental water samples using molecularly imprinted polymer. *Talanta.* 2014;129:132-8.
21. Mena M, Agüí L, Martínez-Ruiz P, Yanez-Sedeno P, Reviejo A, Pingarrón J. Molecularly imprinted polymers for on-line clean up and preconcentration of chloramphenicol prior to its voltammetric determination. *Analy Bioanal Chem.* 2003;376(1):18-25.
22. Wei F, Liu X, Zhai M, Cai Z, Xu G, Yang J, et al. Molecularly imprinted nanosilica solid-phase extraction for bisphenol A in fish samples. *Food Anal Methods.* 2013;6(2):415-20.
23. Omid F, Behbahani M, Abandansari HS, Sedighi A, Shahtaheri SJ. Application of molecularly imprinted polymer nanoparticles as a selective solid phase extraction for preconcentration and trace determination of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in the human urine and different water samples. *J Environ Health Sci Engin.* 2014;12(1):137.