

ORIGINAL RESEARCH PAPER

Development of A Sample Preparation Method for evaluating Trace Residue of Bentazon Pesticide in Biological Matrices Using Dispersive Solid Phase Extraction (SPE) Method Based on Molecular Imprinted Polymer (MIP)

Seyedeh Maryam Taheri¹, Monireh Khadem¹, Fariborz Omid², Alireza Sedighi¹, Mohadeseh Delaram¹, Seyed Jamaledin Shahtaheri^{3,*}

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

² Research Center for Environmental Determinants of Health, Health Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

³ Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Received: 2018-10-05

Accepted: 2019-10-12

ABSTRACT

Introduction: Pesticides are among the broadest chemical compounds used in the world and are also considered as the most dangerous compounds for living organisms. Although pesticides have significant impact on improving agricultural and food products, the processes of their production, formulation, storage, transportation, and marketing as well as the extensive use of these materials lead to occupational exposure, environmental pollution, and the presence of their residues in foodstuffs. Bentazon as a herbicide is considered as one of the most common pesticides used in agriculture and horticulture. Its effects on human health are widespread and of concern. Occupational and environmental exposure assessment of this compound is, therefore, considered necessary by conducting accurate and valid methods. The purpose of the present study was to synthesize a molecular imprinted polymer (MIP) as a specific adsorbent in the preparation process of bentazon for its selective analysis in biological matrices.

Material and Methods: For synthesis, a precipitation polymerization method was used. This method has been used to prepare particle size distribution and shape appropriately. By applying the aforementioned method, nano particle size is obtained within the sub-micron and nano range. So, crushing and sieving of the sorbent is not necessary. The MIP was synthesized with 1: 4: 30 ratio of template molecule (bentazone): functional monomer (methacrylic acid): cross-linking monomer (ethylene glycol di methacrylate), respectively. Due to particle size and high porosity, the sorption and recovery of template compound was performed faster and with higher efficiency. Some variables affecting the efficiency of MIP for sorption and desorption of analyte were investigated and optimized. They included pH of solution, MIP amount (mg), and sonication time (min) in the sorption step and volume of eluent (ml), sonication time (s), and acid percentage in the desorption step.

Results: The optimum levels of factors for the proposed method were pH of solution: 2; sonication time for sorption 7.3 min, polymer amount of 30.814 mg, acid percentage 1.1, and sonication time for desorption 165 s. According to the obtained results, the interfering factors in the matrix have no significant effect on the determination of analyte. The limit of detection (LOD) and relative standard deviation (RSD) of the optimized method were 0.79.ppb and 2.8931 %, respectively.

Conclusion: The results of this study indicated that the proposed method can be used to extract the bentazon herbicide from complex matrices such as urine samples with high efficiency and selectivity.

Keywords: Molecular imprinted polymer, Bentazon herbicide, Dispersive solid phase extraction

* Corresponding Author Email: fgolbabaie@tums.ac.ir



1. INTRODUCTION

Pesticides are among the broadest chemical compounds used in the world and are also considered as the most dangerous compounds for living organisms. Although pesticides have significant impact on improving agricultural and food products, the processes of production, formulation, storage, transportation, and marketing of them in addition to their extensive use lead to occupational exposure, environmental pollution, and the presence of their residues in foodstuffs. Bentazon herbicide is one of the most common pesticides used in agriculture and horticulture. Various concentrations of Bentazon are used by farmers, depending on the types of plants and weeds, but the approximate Bentazon concentration in aqueous solution is reported 0.0025-0.0065 (% v / v). It is a selective herbicide for control of broad leaf weeds and sedges in beans, rice, corn, peanuts and mint. It has been found that Bentazon is one of the most important contaminants in terms of frequency of detection and maximum concentration in groundwater in 15 European countries. Its effects on human health are also widespread and of concern. Occupational and environmental exposure assessment of this compound is, therefore, considered to be necessary by applying accurate and valid methods. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) is one of these effective methods. This methodology combines the aspects of several analytical techniques in which extraction and clean-up are performed at the same time. MSPD has achieved extensive applications. The C18 is used as a common sorbent in MSPD. Attapulgit clay (ATP) has also been studied for its sorbent properties and has been used for one application. The commonly dispersants in MSPD (C18, C8, silica, florisil, etc.) do not have high efficiency in extracting complex matrices and structural analogs. Therefore, MIPs (9) with high molecular detection, high stability, and low cost were suggested. In this study, the MIPs were synthesized and characterized as a novel and specific sorbent in the process of sample preparation. In this regard, the ultrasonic assisted-dispersive solid phase extraction procedure based on the MIPs was proposed for the selective extraction of Bentazone from urine samples. Ultrasound as a robust technique was applied to facilitate the extraction of the target analyte in the sorption and desorption steps to yield a much higher efficiency.

2. MATERIAL AND METHODS

For synthesis, a precipitation polymerization method was used. This method has been used to prepare particle size distribution and shape appropriately. By applying the aforementioned method, nano particle size is obtained within the sub-micron and nano range. So, crushing and sieving of the sorbent is not necessary. The MIP was synthesized with 1: 4: 30 ratio of template molecule (Bentazone): functional monomer (methacrylic acid): cross-linking monomer (ethylene glycol di methacrylate), respectively. Due to the particle size and high porosity, the sorption and recovery of template compound was performed faster and with higher efficiency. Briefly, the mixtures of 1mmol Bentazone, 0.34mmol MAA, 5.66ml EGDMA, and 100ml AIBN was dissolved in 120mL porogenic solvent (acetonitril). The solution was then sonicated for 10min and purged with nitrogen gas for 15min before being sealed under nitrogen protection. Polymerization was performed under 65°C in oil bath for 18h. In order to remove the template molecule from the polymer structure, an elution was performed using a methanol-acetic acid mixture at a ratio of 80: 20 by ultrasonic in 12 steps of 20 min. A non-imprinted blank polymer (NIP, in the absence of template) was prepared and treated in an identical manner.

Some variables affecting the efficiency of molecular imprinted polymers for sorption and desorption of analyte were investigated and optimized. They included pH of solution, MIP amount (mg), and sonication time (min) in the sorption step and volume of eluent (ml), sonication time (s), and acid percentage in the desorption step.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of variables using Box–Behnken design (BBD) revealed that the best optimal values for pH: 2.95, amount polymer: 30.814 mg and for ultrasound sorption time is 7.361 min.

The interactions between pH, MIP value, and constant ultrasound sorption time of 7.361 min with the rate of sorption of Bentazone polymer are shown in Figure 1. The horizontal axis of the diagram shows the amount of polymer. As it approaches the 30 mg range and pH in the vertical axis approaches 2, the rate of sorption of Bentazone polymer increases. By elevating pH value, the extraction of target molecules was decreased. The effective extraction of target molecules was

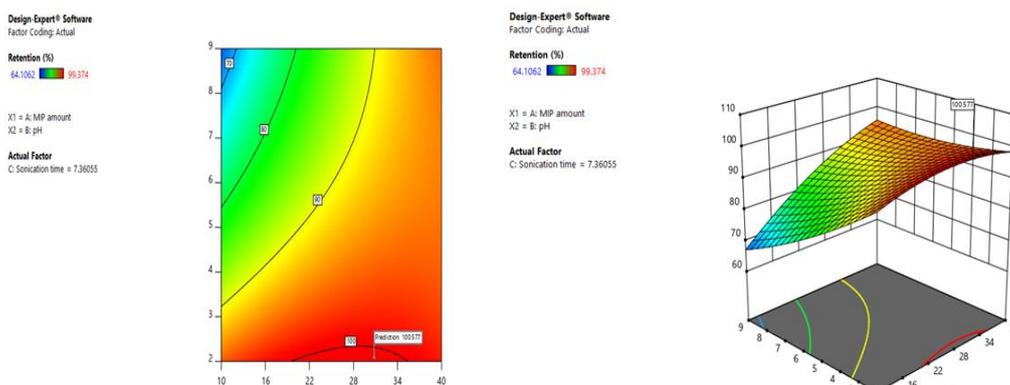


Fig. 1. Interaction of pH, amount polymer, constant ultrasound sorption time of 7.361 min with bentazone polymer sorption

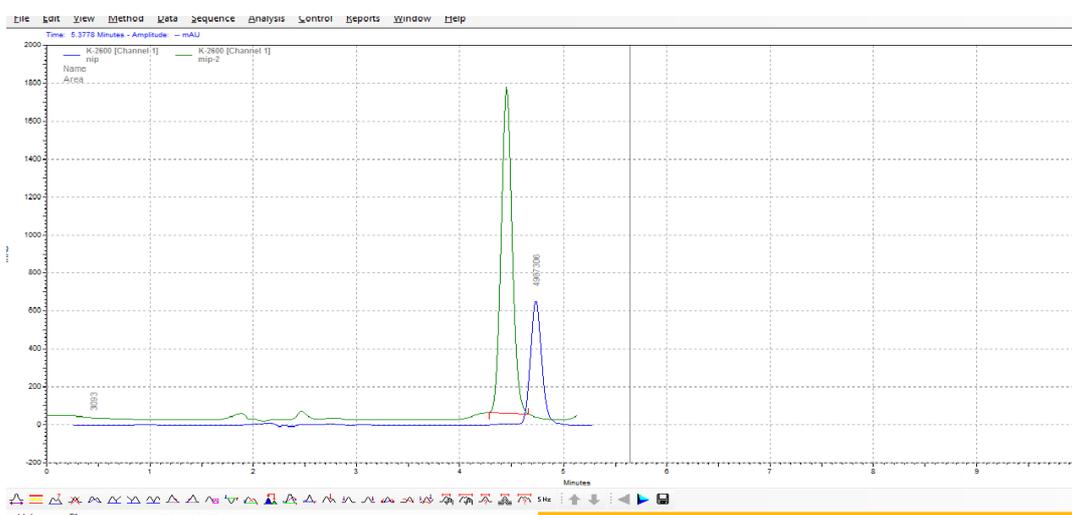


Fig. 2. Extraction chromatogram of MIP compared to NIP

Table 1. Comparison of Bentazone Recovery Rate by Molecular imprinted polymer and Non-Molecular imprinted Polymer

Sorbent	Recovery (%)
(MIP)	100.5172
(NIP)	22.06966

carried out in the lower pH. The observation can be attributed to the fact that at lower pHs, the target toxin is molecular, thus, the desired hydrogen bond is formed between the target molecule and the functional monomer. According to the above-mentioned interpretation and obtained data from BBD, pH 2.095 was used for the next experiments. Results for the selectivity of MIP were shown in Figure 2 and Table 1.

The efficiency of Bentazon bound to the MIP was higher than that of NIP. It indicated that the MIP provided high selectivity for Bentazon. The

high selectivity is mainly due to the molecular size recognition of MIP to template molecule, the hydrogen bonding interactions between the carboxylic group in the MIP, and hydroxyl and carbonyl groups in Bentazon at identical positions.

4. CONCLUSIONS

This work proposed a novel MIP-MSPD method using MIP as selective MSPD sorbent to selectively extract and determine the bentzone pesticide. The new MIP was applied as a

specific sorbent to improve the selectivity. The MIP-MSPD method provides some advantages including higher selectivity, lower cost, easier preparation, and higher extraction efficiency compared to the traditional methods. The current method can potentially applied to determine the bentazone pesticide in real samples with no special sample pretreatment steps. In addition, the Box-

Behnken design (BBD) provided the estimation of any interaction between the factors and obtaining more satisfactory results compared to the one-at-a-time approach.

5. ACKNOWLEDGMENT

The study was founded by Tehran University of Medical Sciences (TUMS).

توسعه یک روش آماده سازی مبتنی بر استخراج فاز جامد پخشی با پلیمر های قالب ملکولی جهت تعیین مقدار علف کش بنتازون در ادرار

سیده مریم طاهری^۱، منیره خادم^۱، فریبرز امیدی^۲، علیرضا صدیقی^۱، محدثه دل آرام^۱،
سید جمال الدین شاه طاهری^{*۱}

^۱ گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۲ مرکز تحقیقات عوامل محیطی موثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۱۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۲۰

چکیده

مقدمه: آفت کش ها جزء وسیع ترین ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در دنیا بوده و همچنین در میان خطرناک ترین ترکیبات برای موجودات زنده جای می گیرند. اگرچه آفت کش ها تاثیرات بسزایی در بهبود بهره وری در کشاورزی و افزایش تولید غذا دارند، فرآیند های تولید، فرمولاسیون، ذخیره، انتقال و بازاریابی محصولات کشاورزی و استفاده وسیع از این مواد منجر به بروز مواجهه های شغلی و آلودگی زیست محیطی و حضور باقی مانده آن ها در مواد غذایی می شود. علف کش بنتازون از جمله سموم رایج مورد استفاده در کشاورزی و باغبانی می باشد که اثرات مهم آن بر سلامتی انسان مورد نگرانی و مطالعه گسترده می باشد لذا ارزیابی مواجهه های شغلی و محیطی توسط روش های دقیق و معتبر ضروری به نظر می رسد. هدف از مطالعه حاضر سنتز و تعیین ساختار پلیمر قالب ملکولی به عنوان یک جاذب نوین و اختصاصی در فرآیند آماده سازی، آنالیز انتخابی و سریع علف کش بنتازون به عنوان آلاینده شغلی و محیطی در نمونه بیولوژیکی بود.

روش کار: برای سنتز پلیمر قالب ملکولی از روش پلیمریزاسیون ترسیبی استفاده شد این روش برای تهیه ذرات با توزیع اندازه و شکل مناسب به کار برده شده است بدین شکل اندازه ذرات به حد زیر میکرون و نانو رسیده و نیازی به خرد کردن و غربال نمودن در اکثر موارد وجود نخواهد داشت. به دلیل کاهش اندازه ذرات و تخلخل پذیری زیاد، جذب و بازیافت ترکیبات الگو سریعتر و با کارایی بالاتر انجام می گردد. جهت سنتز پلیمر از نسبت ۱:۴:۳۰ مولکول الگو (بنتازون): مونومر عاملی (متاکریلیک اسید): اتصال دهنده عرضی (اتیلن گلیکول دی متا کریلات) استفاده گردید. عوامل بسیاری در قابلیت جذب و بازیافت و کارایی پلیمرهای قالب ملکولی تاثیر دارند که عواملی مانند pH نمونه، مقدار پلیمر قالب ملکولی، مدت زمان جذب بوسیله امواج فراصوت، درصد اسید، حجم حلال شویش و مدت زمان بازیافت بوسیله امواج فراصوت را می توان نام برد.

یافته ها: عوامل مؤثر در جذب و بازیافت بنتازون بهینه سازی شدند و نتایج حاصل از بهینه سازی نشان داد که بالاترین جذب در pH=۲، مقدار پلیمر ۳۰/۸۱۴ میلی گرم، مدت زمان جذب ۷/۳ دقیقه، درصد اسید ۱/۱ حجم حلال شویش ۲/۷ میلی لیتر و مدت زمان واجذب ۱۶۵ ثانیه بدست می آید. جهت استخراج نمونه های بیولوژیکی، روش ارائه شده بر روی نمونه های ادرار بررسی گردید و میزان باز یافت ۱۰۰٪ محاسبه شد.

نتیجه گیری: نتایج بررسی ها برای نمونه بیولوژیک نشان داد که آنالیت بدون تاثیر پذیری از عوامل موجود در بستر با راندمان بالا اندازه گیری شده است. و این نشان از گزینش پذیری بالای این پلیمر سنتز شده برای مولکول هدف دارد.

کلمات کلیدی: پلیمر قالب ملکولی، علف کش بنتازون، فاز جامد پخشی

موش نشان داده است که حدود ۹۱٪ از بنتازون تجویز شده از طریق خوراکی به صورت فرم اصلی و بدون تغییر در عرض ۲۴ ساعت پس از مصرف دفع می شود (۵). طبق مقالات و متون موجود، روش های آنالیز متعددی برای اندازه گیری آفت کشها وجود دارد. تکنیک های سنتی مورد استفاده، کروماتوگرافی مایع و کروماتوگرافی گازی با دتکتور ربایش الکترون^۲ (ECD) می باشد که اگرچه حد تشخیص آنها پایین می باشد اما به دلیل نیاز به آماده سازی نمونه در طول استخراج و روش های خالص سازی، این روش ها گرانبه و اغلب نیاز به وسایل خیلی مجهز و تیم آنالیز ماهر و آموزش دیده دارند (۶) و از طرفی تعیین مستقیم بنتازون توسط تکنیک های تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی به دلیل خواص اسیدی-بازی نسبتا دشوار است (۷). استخراج مایع-مایع (LLE)^۳ و استخراج فاز جامد (SPE)^۴ از جمله روشهای پیش تغلیظ هستند که به طور گسترده مورد قبول واقع شده اند (۸) . LLE وقت گیر و خسته کننده است و نیاز به مقادیر زیاد حلال های آلی گران قیمت و به طور عمده سمی دارد از طرفی SPE نسبت به LLE مقدار بسیار کمتری حلال استفاده می کند اما نیاز به آماده سازی ستون دارد و یک روش به نسبت گران قیمت است. راهکار دیگر استفاده از پلیمرهای قالب مولکولی^۵ است که یک تکنیک به سرعت در حال توسعه است و برای آماده سازی نمونه ها از پلیمرهای با خواص تشخیص مولکولی بالا استفاده می کند که در انواع مختلفی از تکنیک های استخراج موثر واقع شده است مانند استخراج فاز جامد پلیمرهای قالب مولکولی MI-SPE^۶ (۹)، میکرو استخراج فاز جامد پلیمرهای قالب مولکولی MI-SPME^۷ (۱۰)، استخراج جذب سطحی قالب مولکولی MI-SBSE^۸ و ماتریکس فاز جامد پخشی قالب مولکولی MI-MSPD^۹ (۱۱).

2 Electron capture detector

3 Liquid-liquid extraction

4 Solid phase extraction

5 Molecularly imprinted polymer

6 Molecularly imprinted - Solid phase extraction

7 Molecularly imprinted - Solid phase micro extraction

8 Molecular Imprinted Stir-bar sorptive extraction

9 Molecular Imprinted Matrix Solid phase dispersion

هر ماده یا مخلوطی از مواد که جهت از بین بردن، دور کردن و یا حذف هر گونه حشره، جونده، قارچ و یا دیگر شکل های موجود زنده مزاحم استفاده می گردد، آفت کش نامیده می شود. استفاده بی رویه از آفت کش ها باعث خطرات قابل توجهی در سلامت و محیط زیست انسان ها می شوند با توجه به تاثیر آفت کش ها بر بدن انسان، دامنه وسیعی از مشکلات بهداشتی ناشی از آن ها مانند: مرگ نوزادان، نقایص مادرزادی، فلج، تنگی نفس، اختلالات قلبی-عروقی، سرطان، تومور و غیره ممکن است ایجاد شود که این قبیل مشکلات معمولا در کشورهای در حال توسعه بیشتر می باشد (۱). طبق آمارهای مستند، میزان وقوع مسمومیت در کشورهای در حال توسعه ۱۳ برابر بیشتر از کشورهای کاملاً صنعتی، که خود ۸۵ درصد از تولید جهانی آفت کش ها را مصرف می کنند، می باشد (۲). علف کش مورد مطالعه علف کش بنتازون^۱ نام دارد که دارای فرمول شیمیایی C₁₀H₁₂N₂O₃S با وزن مولکولی ۲۴۰/۳ می باشد بنتازون به صورت خوراکی سمی است. از جمله سموم رایج مورد استفاده در کشاورزی و باغبانی می باشد (۳) که اثرات مهم آن بر سلامتی انسان و سایر موجودات غیر هدف و همچنین اثرات ماندگاری در محیط های بیولوژیک (انسان و سایر موجودات) مورد نگرانی و مطالعه گسترده می باشد. همچنین مصرف انسانی این علف کش موجب استفراغ، اسهال، لرزش و تنفس نامنظم و یا دشوار شده است همچنین به طور متوسط تحریک کننده پوست، چشم ها و دستگاه تنفسی است (۴) از طرفی به دلیل پایداری و آبدوستی نسبی این آفت کش می تواند نشانگر آلاینده های زیست محیطی در آب باشد. لذا با توجه به خطرات ذکر شده در رابطه با استفاده از آفت کش ها ارزیابی تراکم آن ها در محیط های شغلی، محیط زیست و یا در نمونه های بیولوژیکی به منظور برآورد میزان مواجهه و مقایسه این مقادیر با استانداردهای توصیه شده ضرورت می یابد. متابولیسم بنتازون در حیوانات به طور کامل درک نمی شود اما نتایج تحقیقات انجام شده در رابطه با متابولیسم بنتازون در

حلال های استونیتریل، متانول، استیک اسید و استون با درجه خلوص بالا از شرکت مرک آلمان، استاندارد علف کش بنتازون از شرکت Dr Ehrenstorfer آلمان، مونومر عاملی متاکریلیک اسید از شرکت مرک آلمان، آغازگر (آزوبیس ایزو بوتیرونیتریل) از شرکت مرک آلمان، اتصال دهنده جانبی (اتیلن گلیکول دی متا کریلات) از شرکت مرک آلمان، مالاتیون و دیازینون از شرکت مرک آلمان تهیه شد. برای انجام این تحقیق از دستگاه HPLC ساخت شرکت Knauer آلمان شامل پمپ فشار بالا K-1001 و دکتور UV K-2006، حمام اولتراسونیک، سیستم تامین اتمسفر نیتروژن، ترازوی دیجیتال و فور استفاده شد.

سنتز پلیمر قالب مولکولی

برای سنتز پلیمر قالب مولکولی از روش پلیمریزاسیون ترسیبی استفاده شد این روش برای تهیه ذرات با توزیع اندازه و شکل مناسب به کار برده شده است در این روش اندازه ذرات به حد زیر میکرون و نانو رسیده و نیازی به خرد کردن و غربال نمودن در اکثر موارد وجود نخواهد داشت. به دلیل کاهش اندازه ذرات و تخلخل پذیری زیاد، جذب و بازیافت ترکیبات الگو سریعتر و با کارایی بالاتر انجام می گردد. جهت سنتز پلیمر از نسبت ۱:۴:۳۰ مولکول الگو (بنتازون) : مونومر عاملی (متاکریلیک اسید): اتصال دهنده عرضی (اتیلن گلیکول دی متا کریلات) استفاده گردید. چندین حلال پروژن برای انجام پلیمریزاسیون تست گردید که در نهایت بهترین آن ها یعنی استونیتریل انتخاب شد.

استخراج فاز جامد پخشی با استفاده از پلیمر های قالب مولکولی

به این منظور غلظت مشخصی از نمونه بنتازون با pH معین تهیه شد و مقدار مناسبی از ذرات پلیمر قالب مولکولی به آن اضافه گردید تا یک مخلوط همگنی از نمونه و ذرات MIP حاصل شود. در مرحله بعدی پخش کنندگی از طریق انرژی خارجی (حمام اولتراسونیک)

بگیانی و همکارانش در سال ۱۹۹۹ برای تعیین بنتازون در نمونه های آبی از روش استخراج فاز جامد با پلیمرهای قالب مولکولی استفاده کردند که راندمانی حدود ۹۶-۹۱٪ بدست آوردند (۷) اما با توجه به اینکه تحقیق پیش رو در نمونه های ادرار انجام شده است و پیچیدگی ماتریکس ادرار بالاست از این رو برای تعیین بنتازون از روش استخراج فاز جامد پخشی با پلیمر قالب مولکولی استفاده شد که راندمانی به مراتب بالاتر از راندمان تحقیق بگیانی و همکارانش بدست آمد.

اخیراً استفاده از پلیمرهای قالب ملکولی به عنوان یک جاذب کاملاً اختصاصی در روش MSPD مورد توجه قرار گرفته که سبب پیدایش روش جدیدی تحت عنوان فاز جامد پخشی با استفاده از پلیمرهای قالب ملکولی MI-MSPD شده است و از این طریق می توان به طور همزمان از مزایای دو روش MSPD و MIP به منظور جداسازی و تغلیظ و تخلیص آنالیت هایی مانند آفت کش ها که در مقادیر اندک و یا در ماتریکس های پیچیده وجود دارند استفاده نمود. هدف از مطالعه حاضر سنتز و تعیین ساختار پلیمر قالب مولکولی به عنوان یک جاذب نوین و اختصاصی در فرآیند آماده سازی، آنالیز انتخابی و سریع علف کش بنتازون به عنوان آلاینده شغلی و محیطی و متعاقباً بررسی پارامترهای تاثیر گذار بر نحوه عملکرد این جاذب ها در استخراج آنالیت مورد نظر بود.

امکان مواجه با بنتازون به عنوان آلاینده شغلی از طریق تماس مستقیم و غیر مستقیم انسان با این آفت کش صورت می گیرد. افرادی که در تماس مستقیم با این مواد شیمیایی قرار می گیرند بیشتر در معرض خطر قرار دارند این افراد شامل کشاورزان و خانواده آنها و کارگرانی هستند که در بخش کشاورزی یا در کارخانه تولید سم کار می کنند، تماس غیر مستقیم با سموم شیمیایی ناشی از خوردن غذاهایی است که سموم آفت کش در آن نفوذ کرده اند.

روش کار

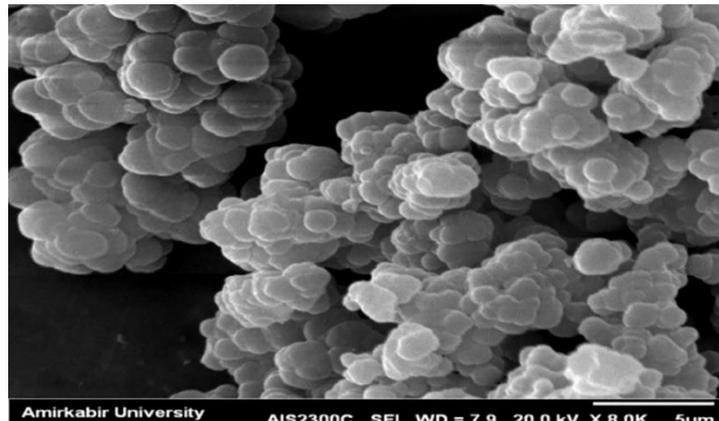
مواد و تجهیزات مورد استفاده

شد و به هر کدام از ظرف ها اضافه شد در انتها، آخرین فاکتور یعنی زمان اولتراسونیک بررسی شد به اینصورت که هر کدام از ظروف را بر اساس زمان مشخص شده، در اولتراسونیک گذاشته ، فرصت لازم برای جذب بنتازون به پلیمر داده شد. محلول رویی هر کدام از ۲۰ مرحله با فیلتر سرسرنگی μ ۰/۲۲ صاف شد و به دستگاه HPLC تزریق شد بدین وسیله سطح زیر کروماتوگرام هر ۲۰ مرحله محاسبه شد و توانایی جذب پلیمر در هر مرحله از آزمایشات مشخص و به صورت درصد گزارش شد. پس از اینکه شرایط بهینه ی جذب بدست آورده شد ۲۰ مرحله به ترتیب با شرایط بهینه ی جذب انجام شد محلول رویی آن ها دور ریخته شد سپس هر کدام از ۲۰ ظرف مطابق با شرایط طراحی شده با میزان مشخصی از اسید استیک و متانول شستشو گردید و هر مرحله به مدت مشخص در اولتراسونیک قرار گرفت تا بازیافت صورت گیرد وقتی که بازیافت انجام شد محلول رویی هر کدام از مراحل به طور کامل جدا شد و با فیلترهای سرسرنگی صاف گردید و توسط گاز نیتروژن خشک شدند در آخر به ظرف خشک شده ی تمام مراحل ۲۰۰ μ استونیتریل و آب دی یونیزه به نسبت ۲:۱ افزوده گردید و به دستگاه HPLC تزریق شد. سطح زیر کروماتوگرام تمام مراحل اندازه گیری شد و میزان بازیافت به صورت درصد گزارش گردید. به منظور ارزیابی گزینش پذیری پلیمر قالب مولکولی سنتز شده، ۵۰ برابر غلظت بنتازون، سم مالاتیون، دیازینون به محلول بنتازون افزوده شد و سپس تمامی مراحل جذب و بازیافت که به صورت بهینه محاسبه شده بود بر روی محلول حاوی مداخله گر انجام شد و در نهایت به دستگاه HPLC تزریق شد. جهت بررسی کارایی پلیمر قالب مولکولی جهت استخراج نمونه های بیولوژیکی، روش ارائه شده بر روی نمونه ی ادرار بررسی گردید. برای اثبات نتایج به دست آمده در نمونه ی حقیقی از روش اضافه کردن غلظت مشخص و معین از سم مورد نظر (Spike) استفاده شد. نتایج حاصل از استخراج به کمک دستگاه HPLC مورد بررسی قرار گرفت. نمونه ی ادرار مورد آنالیز در ظرف پلی پروپیلنی که با اسید شستشو داده

انجام شد سپس از طریق سانتریفوژ دو فاز مایع و رسوب از هم جدا شدند فاز مایع را دور ریخته و به رسوب بدست آمده جهت جدا کردن آنالیت حلال اضافه گردید که بر پیوند آنالیت- جاذب اثر کند و به طور انتخابی آنالیت را شستشو دهد. حلال خارج کننده (eluent) حلالی است که آنالیت در آن حل می شود. در نهایت این حلال برای تجزیه بیشتر به HPLC تزریق گردید. پلیمر غیر قالب مولکولی نیز به طور مشابه ولی بدون حضور الگو (آفت کش) آماده سازی شد. استخراج مولکول الگو از پلیمر (MIP) با کمک اولتراسونیک انجام شد. این روش چندین بار برای حذف ترکیبات واکنش نداده و مولکول الگو تکرار گردید.

بهینه سازی فاکتورهای موثر در جذب و بازیافت آفت کش بنتازون

عوامل بسیاری در قابلیت جذب و بازیافت و کارایی پلیمرهای قالب مولکولی تاثیر دارند عواملی مانند pH نمونه، مقدار پلیمر قالب مولکولی، مدت زمان جذب بوسیله امواج فراصوت، درصد اسید، حجم حلال شویش و مدت زمان بازیافت بوسیله امواج فراصوت. به منظور دستیابی به پلیمری با بالاترین میزان جذب و بازیافت بایستی عوامل موثر بهینه گردند تا بهترین شرایط انتخاب گردد. در این مطالعه برای محاسبه حجم نمونه از روش طراحی آزمایش با استفاده از نرم افزار expert design و روش پاسخ سطح box behnken design استفاده شد. تعداد نمونه طراحی شده در هر کدام از مراحل جذب و بازیافت، ۲۰ نمونه است. برای بهینه سازی ابتدا محلولی با غلظت ۵ ppm و حجم ۲۰۰ ml از آفت کش مورد نظر تهیه شد، از آنجایی که سه مقدار pH در شرایط آزمایش وارد شده بود محلول به سه قسمت تقسیم شد و با استفاده از محلول های هیدروکلریک اسید ، سدیم هیدروکسید و دستگاه pH سنج، pH های ۹، ۵/۵ و ۲ تنظیم شد. آنگاه محلول با pH های مختلف در ۲۰ ظرف ۱۰ ml منتقل شد. فاکتور موثر بعدی وزن پلیمر بود که مطابق با شرایط آزمایش هر مرحله، مقدار پلیمر توزین



شکل ۱. تصویر میکروسکوپی (SEM) مربوط به ساختار و اندازه سطوح پلیمر قالب مولکولی سنتز شده برای بنتازون

مدت زمان جذب در این تحقیق بررسی شدند که پس از تعیین شرایط توسط نرم افزار، این شرایط آزمایش شدند. و در نهایت محلول صاف شده بدون ذره هر کدام از مراحل به دستگاه HPLC تزریق شد. نتایج بدست آمده یعنی سطح زیر پیک کروماتوگرام ابتدا در منحنی کالیبراسیون قرار داده شدند تا مقدار غلظت سم بنتازون بدست آید و در نهایت با توجه به غلظت اولیه هنگام جذب که ۵ ppm بود توسط فرمول زیر درصد جذب هر مرحله بدست آمد

$$\text{درصد جذب} = \frac{c_i - c_f}{c_i} * 100 (\%)$$

C_i : غلظت بنتازون اولیه هنگام جذب

C_f : غلظت بنتازون باقی مانده در محلول صاف شده

پس از انجام مرحله جذب

نتایج حاصل از ۲۰ مرحله آزمایش طراحی شده جهت بهینه سازی فرآیند جذب بنتازون در جدول شماره ۱ آورده شده است این نتایج نشان داد بیشترین میزان جذب بنتازون مربوط به آزمایش با شرایط آزمایش: ۵/۵ pH، مدت زمان جذب ۵ دقیقه و مقدار پلیمر ۴۰ میلی گرم می باشد.

به منظور بررسی اثر تعاملی پارامترهای موثر از جمله pH، مدت زمان جذب و مقدار پلیمر بر روی متغیر میزان جذب بنتازون و تعیین روابط بین این متغیرها از روش تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) و برازش مدل

شده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. در هنگام آنالیز نمونه ی ادرار به نسبت ۴:۱ با آب دو بار تقطیر تا حجم ۱۰ سی سی رقیق سازی شد. و غلظت های ۱۰-۲۰-۴۰-۶۰-۸۰ از علف کش بنتازون به طور جداگانه در هر ظرف به محلول آب و ادرار افزوده شد و سپس ۳۰/۸۱۴ میلی گرم پلیمر به هر ظرف افزوده شد و در نهایت تمامی مراحل جذب و بازیافت به صورت بهینه برای هر کدام از محلول ها با غلظت های مشخص انجام شد و نمونه ها برای بدست آوردن میزان بازیافت به HPLC تزریق شدند.

یافته ها

بررسی مورفولوژی سطح ذرات پلیمر سنتز شده ریخت شناسی پلیمر قالب مولکولی سنتز شده با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت. که مدل دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی به شرح زیر بود: AIS2100(Scanning Electron Microscope) و از شرکت سازنده SERON TECHNOLOGIES تهیه شده بود. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود ذرات MIP سنتز شده کروی بوده و دارای ابعادی در حد نانومتر می باشد.

بهینه سازی مرحله جذب پلیمر قالب مولکولی همانطور که گفته شد سه متغیر pH، مقدار پلیمر و

جدول ۱. نتایج حاصل از ۲۰ مرحله آزمایش طراحی شده جهت بهینه سازی فرآیند جذب بنتازون

مرحله آزمایش	pH نمونه	مدت زمان جذب (min)	مقدار پلیمر قالب مولکولی (mg)	درصد جذب بنتازون
۱	۹	۵	۴۰	۸۲/۶۳۲۹۱
۲	۵/۵	۵	۲۵	۸۲/۷۵۷۴۴
۳	۲	۵	۲۵	۸۰/۹۷۸۸۷
۴	۵/۵	۱	۲۵	۹۷/۸۱۷۷۳
۵	۵/۵	۱	۴۰	۹۰/۳۴۰۴۶
۶	۹	۵	۲۵	۸۰/۹۶۷۹۶
۷	۹	۵	۱۰	۱۳/۴۹۱۸۹
۸	۵/۵	۹	۲۵	۷۷/۹۸۶۲
۹	۲	۵	۲۵	۸۰/۶۴۰۷۳
۱۰	۵/۵	۵	۱۰	۹۳/۴۳۷۹۶
۱۱	۲	۹	۱۰	۵۲/۲۶۱۷۴
۱۲	۵/۵	۵	۴۰	۹۸/۶۸۰۰۵
۱۳	۵/۵	۵	۲۵	۸۰/۳۱۳۱۹
۱۴	۵/۵	۱	۱۰	۵۰/۳۶۴۴
۱۵	۹	۹	۴۰	۸۷/۴۱۲۰۳
۱۶	۲	۱	۲۵	۵۹/۷۳۹۳۲
۱۷	۵/۵	۹	۲۵	۹۷/۵۲۲۹۲
۱۸	۵/۵	۵	۲۵	۸۱/۲۵۰۹۵
۱۹	۵/۵	۵	۲۵	۸۰/۴۰۳۷۸
۲۰	۵/۵	۵	۲۵	۷۹/۸۶۲۹۴

حداکثر و یا خاصی از متغیرهای پاسخ مورد استفاده قرار گیرد. بر این اساس بهترین مقادیر بهینه برای متغیر pH: ۲/۰۹۵، برای متغیر میزان پلیمر: ۳۰/۸۱۴ میلی گرم و مدت زمان جذب ۷/۳۶۱ دقیقه بدست آمد. روابط متقابل بین pH، مقدار MIP و مدت زمان جذب ثابت ۷/۳۶۰۵۵ دقیقه با میزان جذب پلیمر بنتازون در شکل ۲ نشان داده شده است.

استفاده شد. در این روش بر اساس طراحی آزمایشات انجام شده برای پلیمر مورد نظر، مدل مناسب تعیین می شود و ضرایب پارامترها در این مدل پیش بینی می شوند از میان مدل های مختلف، مدل مربعی با پیشنهاد نرم افزار برای پیش بینی متغیر پاسخ استفاده گردید نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مدل درجه دوم بهینه سازی جذب پلیمر بنتازون در جدول ۲ آورده شده است

نتایج حاصل از بهینه سازی مرحله بازیافت علف کش بنتازون در اینجا هم سه فاکتور، حجم حلال شویش، درصد اسید و مدت زمان بازیافت توسط اولتراسونیک مورد بررسی قرار گرفتند. حجم حلال شویش ۳-۱ ml، درصد

تعیین شرایط بهینه برای جذب پلیمر بنتازون نرم افزار Design Expert علاوه بر ارائه مدل مناسب برای پیش بینی متغیر پاسخ بر اساس متغیرهای ورودی می تواند در پیش بینی ترکیبات بهینه از متغیر های ورودی به منظور دست یابی به مقادیر حداقل،

جدول ۲. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مدل درجه دوم بهینه سازی جذب پلیمر بنتازون

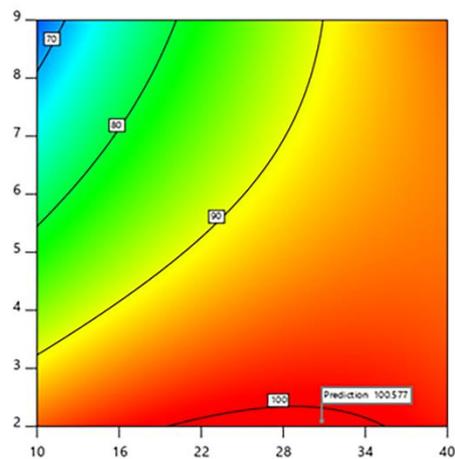
منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F-value	p-value	
Model	۱۲۲۸/۹۹	۶	۲۰۴/۸۳	۳۰/۳۶	<۰/۰۰۰۱	Significant
A-MIP amount	۴۷۴/۶۲	۱	۴۷۴/۶۲	۷۰/۳۶	<۰/۰۰۰۱	
B-Ph	۵۰۹/۹۴	۱	۵۰۹/۹۴	۷۵/۶۰	<۰/۰۰۰۱	
C-Sonication time	۶/۱۳	۱	۶/۱۳	۰/۹۰۹۴	۰/۳۵۷۵	
AB	۱۷۱/۳۰	۱	۱۷۱/۳۰	۲۵/۳۹	۰/۰۰۰۲	
A²	۵۸/۶۸	۱	۵۸/۶۸	۸/۷۰	۰/۰۱۱۳	
B²	۱۶/۹۸	۱	۱۶/۹۸	۲/۵۲	۰/۱۳۶۷	
Residual	۸۷/۶۹	۱۳	۶/۷۵			
Lack of Fit	۶۰/۸۹	۶	۱۰/۱۵	۲/۶۵	۰/۱۱۴۱	not significant
Pure Error	۲۶/۸۰	۷	۳/۸۳			
Cor Total	۱۳۱۶/۶۸	۱۹				

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

Retention (%)
64.1062 99.374

X1 = A: MIP amount
X2 = B: pH

Actual Factor
C: Sonication time = 7.36055



شکل ۲. رابطه متقابل pH، مقدار پلیمر، مدت زمان جذب ثابت ۷/۳۶۰۵۵ دقیقه با میزان جذب پلیمر بنتازون

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{cf}{ci} * 100$$

بیشترین میزان بازیافت بنتازون مربوط به شرایط آزمایش: حجم حلال شویش ۲ میلی لیتر، مدت زمان بازیافت ۱۸۰ ثانیه و مقدار اسید ۱ درصد می باشد. همچنین کمترین میزان بازیافت بنتازون مربوط به آزمایش با شرایط آزمایش: حجم حلال شویش ۱ میلی

اسید. ۱۰-۱ و مدت زمان بازیافت در محدوده ۳۰ تا ۱۸۰ ثانیه بر اساس مقالات گزارش شده انتخاب شد. این فاکتورها در نرم افزار Design Expert و روش سطح پاسخ Box behnken قرار گرفتند و همانند مرحله جذب ۲۰ مرحله آزمایش توسط نرم افزار طراحی شد. سپس با استفاده از فرمول زیر درصد بازیافت بدست آمد.

جدول ۳. نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مدل درجه دوم بهینه سازی بازیافت پلیمر بنتازون

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	۴۱۷۷/۳۸	۹	۴۶۴/۱۵	۷۵/۶۴	< .۰۰۰۱	Significant
A-Eluent solvent volume	۲۲۵۸/۵۹	۱	۲۲۵۸/۵۹	۳۶۸/۰۸	< .۰۰۰۱	
B-Percent of acid in eluent solvent	۴۴۱/۵۷	۱	۴۴۱/۵۷	۱۷/۹۶	< .۰۰۰۱	
C-Sonication time	۲۶۴/۸۶	۱	۲۶۴/۸۶	۴۳/۱۶	< .۰۰۰۱	
AB	۰/۱۸۲۶	۱	۰/۱۸۲۶	۰/۰۲۹۸	۰/۸۶۶۵	
AC	۳/۵۷	۱	۳/۵۷	۰/۵۸۲۱	۰/۴۶۳۱	
BC	۱۱۰/۶۰	۱	۱۱۰/۶۰	۱۸/۰۲	۰/۰۰۱۷	
A ²	۷۶۶/۲۷	۱	۷۶۶/۲۷	۱۲۴/۸۸	< .۰۰۰۱	
B ²	۲/۳۳	۱	۲/۳۳	۰/۳۷۹۱	۰/۵۵۱۸	
C ²	۱۷۵/۶۴	۱	۱۷۵/۶۴	۲۸/۶۲	۰/۰۰۰۳	
Residual	۶۱/۳۶	۱۰	۶/۱۴			
Lack of Fit	۱۸/۷۸	۳	۶/۲۶	۱/۰۳	۰/۴۳۶۰	not significant
Pure Error	۴۲/۵۸	۷	۶/۰۸			
Cor Total	۴۲۳۸/۷۵	۱۹				

حجم حلال شویش، مقدار اسید و مدت زمان بازیافت ثابت ۱۶۴/۱۳۱ ثانیه با میزان بازیافت بنتازون در شکل ۳ نشان داده شده است.

مقایسه ی راندمان جذب *MIP* و *NIP* در شرایط بهینه نتایج نشان داد که میزان بازیافت در پلیمر قالب مولکولی (۱۰۰٪) نسبت به بازیافت در پلیمر غیر قالب مولکولی (۲۲٪) به مراتب بیشتر است.

ارزیابی روش برای نمونه های حقیقی

جهت بررسی کارایی پلیمر قالب مولکولی جهت استخراج نمونه های بیولوژیکی، روش ارائه شده بر روی نمونه ی ادرار بررسی گردید. و منحنی کالیبراسیون آن برای غلظت های ۱۰۰-۱۰ ppb با ضریب همبستگی بالای ۹۹٪ رسم شد.

بحث

لیتر، مدت زمان بازیافت ۳۰ ثانیه و مقدار اسید ۵/۵ درصد می باشد. به منظور بررسی اثر تعاملی پارامترهای موثر از جمله حجم حلال شویش، مدت زمان بازیافت بوسیله اولتراسونیک و مقدار اسید بر روی متغیر میزان بازیافت بنتازون و تعیین روابط بین این متغیرها از روش تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) و برازش مدل استفاده شد و از میان مدل های مختلف، مدل مربعی با پیشنهاد نرم افزار برای پیش بینی متغیر پاسخ استفاده گردید. جدول ۳ نتایج تجزیه و تحلیل واریانس مدل درجه دوم بهینه سازی پارامترهای بازیافت برای متغیر پاسخ پلیمر بنتازون را نشان می دهد.

تعیین شرایط بهینه برای بازیافت بنتازون:

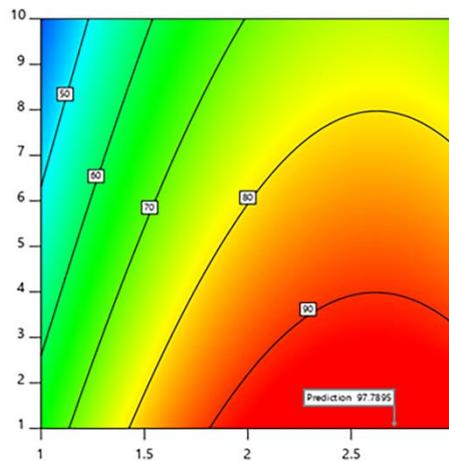
مقادیر بهینه هر یک از متغیرهای حجم حلال شویش، میزان اسید و مدت زمان بازیافت توسط اولتراسونیک به ترتیب ۲/۷۰۹ میلی لیتر، ۱/۱۱۲٪ و ۱۶۴/۱۳۱ ثانیه توسط نرم افزار پیش بینی گردید. روابط متقابل بین

Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual

R1 (Recovery %)
36.4861 92.636

X1 = A: Eluent solvent volume
X2 = B: Percent of acid in eluent solvent

Actual Factor
C: Sonication time = 164.131



شکل ۳. رابطه متقابل حجم حلال شویش، مقدار اسید و مدت زمان بازیافت ثابت ۱۶۴/۱۳۱ ثانیه با میزان بازیافت بنتازون

بنابراین برای رسیدن به زمان جذب بهینه، جذب در زمان های مختلف انجام شد که بهترین زمان ۷/۳ دقیقه بدست آمد. این نتیجه در تحقیقی که توسط ابراهیم شریف پور و همکارانش صورت گرفت مشاهده شد و مدت زمان جذب ۶ دقیقه بدست آمد (۱۵). حجم حلال شویش فاکتور مهمی در میزان راندمان استخراج آنالیت مورد نظر در مرحله بازیافت می باشد و بیشترین میزان بازیافت مربوط به حجم ۲/۷ میلی لیتر می باشد. در تحقیق گرمای زادگان حجم حلال شویش نیز ۲ میلی لیتر بدست آمده بود که این نتیجه با نتیجه تحقیق پیش رو مطابقت دارد (۱۳). پارامتر تاثیر گذار دیگر بر فرایند بازیافت مدت زمان بازیافت بود. نتایج بدست آمده نشان داد که بعد از ۱۶۵ ثانیه بنتازون تقریباً به طور کامل از پلیمر جدا می شود. در تحقیقی که توسط آقای علی مطهریان و همکارش برای بررسی حسگر الکتروشیمیایی مبتنی بر پلیمرهای قالب مولکولی برای تعیین داروی دیازپام انجام شده است مدت زمان استخراج توسط استیرر ۱۵ دقیقه محاسبه شده است (۱۶). در نهایت آخرین فاکتور مؤثر درصد اسید موجود در حلال شویش بود که نتایج نشان دادند حداکثر میزان بازیافت علف کش بنتازون در میزان ۱/۱ درصد حجمی استیک اسید موجود در حلال شویش

بررسی نتایج حاصل از بهینه سازی پارامترهای مؤثر در مرحله جذب

اولین پارامتر مؤثر در جذب بنتازون میزان pH بود. بهترین pH با بالاترین میزان جذب مربوط به pH=۲ می باشد. بدست آوردن این نتیجه شاید به این دلیل باشد که در pH های پایین، ترکیب سم هدف مورد نظر به صورت مولکولی می باشد، لذا پیوند هیدروژنی مورد نظر بین مولکول هدف و مونومر عاملی ایجاد می گردد. نتایج گزارش شده از دیگر مطالعات نشان دهنده جذب بالاتر آفت کش ها توسط پلیمر های قالب مولکولی در گستره اسیدی بود که با نتایج این تحقیق همخوانی دارد (۱۲، ۱۳). متغیر بعدی مقدار پلیمر بود که بیشترین میزان جذب در مقدار جاذب ۳۰/۸۱۴ میلی گرم رخ داده است همچنین این نتیجه بدست آمده را می توان اینطور توضیح داد که این مقدار طور قابل توجهی کمتر از میزان مورد استفاده ی جاذب های سنتز شده به روش فاز جامد پختی برای علف کش بنتازون بوده است به طوری که در تحقیق انجام شده در سال ۲۰۱۵ توسط علیرضا گرمای زادگان مقدار بهینه پلیمر بنتازون ۱۰۰ میلی گرم محاسبه شده است (۱۴). از دیگر فاکتورهای مهم در مرحله جذب، زمان مورد نیاز برای این مرحله می باشد.

نتیجه گیری

این مطالعه با هدف سنتز پلیمر قالب مولکولی بوسیله فاز جامد پخشی جهت اندازه گیری علف کش بنتازون طراحی شد و نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده ی جذب اختصاصی و باز یافت بالای بنتازون توسط پلیمر قالب مولکولی سنتز شده است. این پلیمر دارای ویژگی هایی از قبیل تهیه ی آسان، انتخاب پذیری و تکرار پذیری بالا، حد تشخیص پایین بوده و به طور موفقیت آمیزی جهت تعیین مقدار بنتازون در نمونه ی ادرار انسان مورد استفاده قرار گرفت.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان نامه نویسنده اول و همچنین طرح تحقیقاتی به شماره ۳۵۹۷۹-۲۷-۰۳-۹۶ می باشد که به تصویب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تهران رسیده است. لذا نویسندگان از مساعدت مالی و همکاری دانشگاه علوم پزشکی تهران در اجرای این پروژه کمال تشکر و سپاس گزاری را به عمل می آورند.

REFERENCES

1. Ahmadi Zadeh Occupational Toxicology.: Teymurzadeh Publishers; 1391.
2. Aghilinezhad MA , AA^o F, M^o N, HR. H. Relationship between pesticide use and its effects on the health of farmers in different provinces of the country. Iran Occupational Health. 2006;3(1):81-5.
3. Salman J, Hameed B. Effect of preparation conditions of oil palm fronds activated carbon on adsorption of bentazon from aqueous solutions. Journal of hazardous materials. 2010;175(1-3):133-7.

حاصل می شود. نتایج مشابهی در تحقیق Baggiani و همکارش که از فاز جامد پخشی بوسیله پلیمر قالب مولکولی استفاده شده بود مشاهده شد به طوریکه در این تحقیق بالاترین میزان باز یافت در درصد حجمی متانول-استیک اسید (۱:۹۹ v/v) مشاهده شد(۷).

بررسی نتایج حاصل از مقایسه میزان کارایی جذب آنالیت مورد نظر توسط MIP و NIP

اختلاف قابل ملاحظه ای در میزان جذب بنتازون توسط MIP در مقایسه با NIP مشاهده می شد که این نتیجه خود دلیلی بر جذب اختصاصی و کارایی بالای پلیمر قالب مولکولی سنتز شده است.

بررسی تاثیر عوامل مداخله گر بر کارایی پلیمر قالب مولکولی

در این مطالعه چندین مواد با غلظت های متفاوت برای بررسی این اثر به محلول حاوی آنالیت اضافه شدند و پس از انجام مراحل جذب و باز یافت نمونه، محلول استخراجی به وسیله دستگاه HPLC آنالیز شد. نتایج بدست آمده نشان داد که وجود عوامل مداخله گر تا غلظت حدود ۵۰ برابر علف کش بنتازون نتوانسته بر درصد باز یافت این ترکیب تاثیر قابل ملاحظه ای داشته باشد و این نشان از خاصیت انتخابی پلیمر قالب مولکولی سنتز شده برای آنالیت مورد نظر دارد.

4. Morgan DP. Recognition and management of pesticide poisonings: DIANE Publishing; 1989.
5. EPA U. Guidance for the reregistration of pesticide products containing ethephon as the active ingredient. Washington, DC. 1988.
6. Massaroppi MR, Machado SA, Avaca LA. Electroanalytical determination of the herbicide picloram in natural waters by square wave voltammetry. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2003;14(1):113-9.
7. Baggiani C, Giraudi G, Giovannoli C, Vanni A, Trotta F. A molecularly imprinted polymer for the pesticide bentazone.

- Analytical Communications. 1999;36(7):263-6.
8. Ramin Sabet M, Pourhossein M, Khadem M, Omidi F, Golbabaei F, Shahtaheri SJ. Development of dispersive liquid-liquid micro-extraction procedure for trace determination of pesticide diazinon in urine samples. *Health and Safety at Work*. 2019;8(4):359-70.
 9. Rahiminezhad M, Shahtaheri SJ, Ganjali MR, Koohpaei A-R, Foroushani AR, Golbabaei F. Synthesis of molecularly imprinted polymer as a solid phase sorbent for pesticide Dursban. *International journal of occupational hygiene*. 2010:51-6.
 10. Heravizadeh OR, Khadem M, Nabizadeh R, Shahtaheri SJ. Synthesis and optimization of application of a molecular imprinted sorbent for selective determination of two pyrethroid isomers from biological sample. *Health and Safety at Work*. 2019;9(3):168-78.
 11. Totti S, Fernández M, Ghini S, Picó Y, Fini F, Mañes J, et al. Application of matrix solid phase dispersion to the determination of imidacloprid, carbaryl, aldicarb, and their main metabolites in honeybees by liquid chromatography–mass spectrometry detection. *Talanta*. 2006;69(3):724-9.
 12. Guan WS, Lei JR, Wang X, Zhou Y, Lu CC, Sun SF. Selective recognition of beta-cypermethrin by molecularly imprinted polymers based on magnetite yeast composites. *Journal of Applied Polymer Science*. 2013;129(4):1952-8.
 13. Khadem M, Faridbod F, Norouzi P, Foroushani AR, Ganjali MR, Shahtaheri SJ. Biomimetic electrochemical sensor based on molecularly imprinted polymer for dicloran pesticide determination in biological and environmental samples. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 2016;13(11):2077-84.
 14. Geramizadegan A, Amiri A, Ghazanfari D. Molecularly imprinted solid phase extraction for trace analysis of bentazon herbicide in surface water. *Ludus Vitalis XI* (2). 2015:9-14.
 15. Sharifpour E, Khafri HZ, Ghaedi M, Asfaram A, Jannesar R. Isotherms and kinetic study of ultrasound-assisted adsorption of malachite green and Pb²⁺ ions from aqueous samples by copper sulfide nanorods loaded on activated carbon: experimental design optimization. *Ultrasonics sonochemistry*. 2018;40:373-82.
 16. Motaharian A, Hosseini MRM. Electrochemical sensor based on a carbon paste electrode modified by graphene nanosheets and molecularly imprinted polymer nanoparticles for determination of a chlordiazepoxide drug. *Analytical Methods*. 2016;8(33):6305-12.