

## ساخت و بهینه سازی عمل کرد جاذب پلیمری قالب مولکولی به منظور تشخیص انتخابی دو ایزومر پیرتروپیدی در نمونه بیولوژیکی

امیدرضا هروی زاده<sup>۱</sup>، منیره خادم<sup>۱</sup>، رامین نبی زاده<sup>۲</sup>، سید جمال الدین شاه طاهری<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه مهندسی بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۴/۲۹، تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۹

### پکیدا

مقدمه: هم زمان با تولید و استفاده گستره‌های آفت کش ها جهت کنترل انواع آفات و افزایش بهره وری در تولید محصولات کشاورزی، نگرانی رو به رشدی در رابطه با اثرات مضر این ترکیبات بر سلامتی انسان وجود دارد. لذا توسعه روش‌های حساس و دقیق جهت ارزیابی مداوم غلظت آفت کش ها در سطوح شغلی و محیطی و مقایسه مقادیر موجود با استاندارد های ملی و بین‌المللی از اهمیت بالایی برخوردار است. مطالعه حاضر با هدف سنتز و استفاده از پلیمر قالب مولکولی به عنوان یک جاذب‌نوین و اختصاصی در تشخیص مقادیر اندک دو نوع از ایزومر های پیرتروپیدی در نمونه بیولوژیکی به انجام رسید.

**روش کار:** پلیمر قالب مولکولی به روش غیر کووالنسی و با استفاده از پرمترین به عنوان ملکول الگو، کلروفرم به عنوان حلal پلیمریزاسیون، متاکریلیک اسید به عنوان مونومر عاملی و اتیلن گلیکول دی متاکریلات به عنوان پیوند دهنده عرضی و تحت دمای ۵۵ درجه سانتی گراد در حمام روغن آماده سازی شد. جهت بررسی ساختار و اندازه ذرات پلیمری حاصل از میکروسکوپ الکترونی روشنی استفاده گردید. پس از آن فاکتورهای حیاتی تاثیر گذار بر ویژگی های تشخیصی پلیمر سنتز شده با در نظر گرفتن یک بازه عملیاتی مشخص جهت دست یابی به بالاترین راندمان جذب و بازیافت پرمترین از نمونه بیولوژیکی مورد ارزیابی و بهینه سازی قرار گرفتند.

**یافته ها:** با استفاده از روش پلیمریزاسیون رسوی ذرات پلیمر قالب مولکولی یکنواخت با ساختار کروی و در محدوده ابعادی نانو (کمتر از ۲۱/۲ نانومتر) حاصل شد. تحت شرایط بهینه سازی شده روش جداسازی از طریق فاز جامد به کمک پلیمر قالب مولکولی توانایی بالایی برای جذب و بازیافت ایزومر های آفت کش مورد نظر از نمونه بیولوژیکی از خود نشان داد و بیش از ۹۳ درصد بازیافت از نمونه اسپایک حاصل گردید. هم چنین منحنی کالیبراسیون خطی در بازه غلظتی ۲۰ تا ۱۲۰ میکروگرم بر لیتر به دست آمد و حد تشخیص روش برای هر دو ایزومر مورد بررسی کم تراز ۶ میکروگرم بر لیتر محاسبه شد. در نهایت وجود ترکیبات مزاحم تا میزان ۱۰۰ برابر آنالیت اصلی تاثیر معناداری در ویژگی انتخابی روش نداشت.

**نتیجه گیری:** کاربرد پلیمر قالب مولکولی به عنوان فاز استخراج کننده جامد به همراه روش آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا مزایایی از جمله حساسیت و انتخاب پذیری بالا را نشان داد که این مساله روش مذکور را به انتخابی قابل اعتماد جهت ارزیابی کمی و دقیق آفت کش مورد نظر در نمونه بیولوژیکی پیچیده تبدیل می کند.

**کلمات کلیدی:** حشره کش پیرتروپیدی، پلیمر قالب مولکولی، استخراج فاز جامد، نمونه بیولوژیکی،

کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا

## ■ مقدمه ■

موجود ضروری به نظر می رسد و در این راستا امروزه آنالیز انواع آفت کش ها از جمله پرمترين با روش هایی نظیر کروماتوگرافی مایع و گازی، الکترو کروماتوگرافی، اسپکتروفوتومتری، الکتروفورز و کروماتوگرافی مایع و گازی طیف سنج جرمی صورت می گيرد [۱۱، ۱۲]. اما حتی با وجود تجهیزات پیشرفته آنالیز، وجود مشکلاتی نظیر ترکیبات مزاحم موجود در ماتریكس نمونه، عدم تامین حساسیت کافی جهت تشخیص ریز مقدار برخی از آنالیت ها توسط دتکتور های رایج و یا نبود چنین تجهیزاتی در آزمایش گاه های معمول، ضرورت توسعه روش های انتخابی و دقیق آماده سازی نمونه جهت تغليظ و تخلیص نمونه ای انواع ترکیبات احساس می شود [۱۳-۱۵]. امروزه با توجه به معایب روش های سنتی آماده سازی نمونه گرایش ها به سمت توسعه روش های سریع و ارزان با قابلیت بازیابی و امکان اتوماسیون مانند Solid Phase (SPE) (Extraction) و جداسازی با استفاده از فاز جامد (Solid Phase Microextraction (SPME)) افزایش یافته است [۱۶، ۱۷]. هم چنین تلاش های صورت گرفته به منظور بهبود خاصیت انتخابی در روش های ذکر شده سبب پیدايش جاذب هایی نوين با عمل کرد اختصاصي بر پایه مکانیزم ايمنی موجودات زنده و پلیمر های قالب مولکولی (Molecular Imprinted Polymers (MIPs) گردیده است.

پلیمر های قالب مولکولی جاذب های نوين و اختصاصي هستند که با راندمان قابل توجه و پايداري و مقاومت بالايی که در شرايط مختلف از خود نشان می دهند يكی از گزینه های مناسب جهت آماده سازی نمونه ترکيباتی با چربی دوستی بالا نظير بی فنيل های پلی كلرينه (PCB) و آفت کش ها به شمار می روند [۱۸]. اين جاذب ها با بهره گيری از يك شبکه سه بعدی پلیمری که در طول فرآيند سنتز مطابق با شکل و اندازه ملکول الگو (آنالیت هدف) قالب گيری شده است، امكان جذب و بازیافت اختصاصي ترکیبات مورد نظر از انواع نمونه ها را به وجود آورده است [۱۹، ۲۰].

آفت کش ها از جمله مواد سمي هستند که به منظور جلوگيري از نابودی محصولات کشاورزی به طور گسترده در جهان مورد استفاده قرار می گيرند. توانايی اين ترکيبات برای فعالیت در محیط های بیولوژيکی، موجودات غیر هدف را به صورت مستقیم و غير مستقیم با ريسک های فراوانی روبه رو می سازد. تماس با اين ترکيبات در طی فرآيند تولید، حمل و نقل، آماده سازی و مصرف آن ها در بخش کشاورزی و خانگی یا به صورت غير مستقیم از طریق باقی مانده آن ها در آب و غذا اتفاق می افتد که باعث بروز اختلالات حاد و مزمن در ارگان های مختلف بدن و بروز بیماری های مختلف می گردد [۱، ۲]. پرمترين از جمله حشره کش های پرصرف پيرتروبيدي است که به منظور نابودی حشرات مضر برای محصولات کشاورزی و انسان مورد استفاده قرار می گيرد. مکانیزم ايجاد مسموميت اين حشره کش در سیستم عصبی و از طریق قطع نفوذ پذیری غشای سلول های عصبی نسبت به یون سدیم است [۲، ۴]. حشره کش های پيرتروبيدي از جمله پرمترين ترکيباتی چربی دوست هستند و بدین سبب در غلظت های پايان در محیط های آبی قابل تشخيص می باشنند. مواجهه مستقیم و غير مستقیم با ترکيبات پيرتروبيدي در زمان اختلاط و کاربرد و یا از طریق باقی مانده آن ها در آب و مواد غذایي اتفاق می افتد که تجمع اين ترکيبات در ارگان های مختلف بدن را به دنبال خواهد داشت [۴، ۵]. طبقه بندي اريه شده از سوي سازمان حفاظت از محیط زیست آمريكا پرمترين را در ميان ترکيباتی با امكان ايجاد سرطان برای انسان قرار داده است [۷]. علاوه براین، مطالعات سم شناسی بسياری وجود رابطه ميان تماس با پرمترين و بروز اثرات ژنوتوكسيک، آسيب DNA، سركوب سيسitem ايمنی، اختلال در سيسitem اندوكرين و سرطان را نشان داده است [۸-۱۰].

با توجه به خطرات موجود، توسعه روش های آنالیز و تعیین مقدار آفت کش ها در نمونه های بیولوژيکی و محیطي و مقایسه نتایج حاصل با استاندارد های

حشره کش پرمترين از تجهيزاتي شامل ميكروسمايلر (Socorex، آلمان)، ترازوی ديجيتال (Sartorius، آلمان)، حمام اولتراسونيك (Sono، سويس)، همزن مغناطيسي هيت دار (Chiltern، آمريكا)، كپسول نيتروژن، دماستج ديجيتال (TP3001، چين)، آون (Memmert، آلمان)، دستگاه سوكسله (Duran، آلمان)، pH متر (Metrohm)، دستگاه سوكسله (Duran، آلمان)، طب، ايران) نيز استفاده شد.

#### فرآيند سنتز پلیمر قالب مولکولی

سنتز ذرات پلیمر قالب مولکولی به روش رسوبی و با استفاده از نسبت ۱:۴:۲۰ ملکول الگو، منومر عاملی و اتصال دهنده جانبی به ترتیب زیر به انجام رسید: ابتدا واکنش میان ملکول الگو و منومر عاملی از طریق ترکیب ۱ میلی مول از استاندارد پرمترين با ۸۰ میلی لیتر كلروفرم حاوی ۴ میلی مول متاکریلیک اسید در مدت ۴۰ دقیقه به انجام رسید. پس از آن مقدار ۲۰ میلی مول اتیلن گلیکول دی متاکریلات و ۴۰ میلی گرم ۲،۲-آزوبيس ايزوبوتيرونيترييل به ظرف واکنش اضافه گردید. به منظور حذف اکسیژن، ظرف واکنش به مدت ۱۰ دقیقه تحت اتمسفر نيتروژن قرار گرفت و در نهايیت در اين شرایط درز بندی شد. فرآيند پلیمريزاسيون با قرار دادن ظرف واکنش در حمام روغن با دمای ۵۵ درجه سانتي گراد و هم زدن با سرعت ۸۰ دور در دقیقه به مدت ۱۸ ساعت صورت گرفت. پس از اتمام فرآيند پلیمريزاسيون به منظور حذف ملکول الگو از ساختار پلیمر فرآيند شست شو با استفاده از ۳۰۰ میلی لیتر ترکیب مтанول/استيک اسید به نسبت ۱۰:۱ درون دستگاه سوكسله در سه روز متوالی و هر روز به مدت ۱۲ ساعت به انجام رسید. در نهايیت پلیمر حاصله در دمای ۴۰ درجه سانتي گراد خشک شد. هم چنین به منظور اثبات جذب اختصاصي سه مورد نظر با استفاده از پلیمر قالب مولکولی يك پلیمر شاهد تحت عنوان پلیمر غير قالب مولکولی (NIP) (None-imprinted polymer) با روش مشابه و بدون اضافه نمودن ملکول الگو سنتز شد.

مطالعه حاضر با هدف سنتز نانو ذرات پلیمر قالب مولکولی به عنوان جاذب اختصاصي مورد استفاده در فرآيند آماده سازی نمونه حشره کش پرمترين به عنوان يك آلينه شغلی و محيطی و هم چنین تركيب ويژگی های منحصر به فرد اين نانو جاذب با روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology) به عنوان يك روش مدل سازی قدرت مند جهت بهينه سازی فرآيند استخراج انتخابی و حساس ايزومر های حشره کش پرمترين از نمونه بیولوژیک (ادرار) به انجام رسید.

#### روش کار

##### مواد و تجهيزات

استاندارد حشره کش پرمترين (ترکيبي از دو ايزومر Cis و Trans) از شركت سيگما آلدريچ، متاكريليك اسيد به عنوان منومر عاملی، اتيلن گلیکول دی متاکریلات به عنوان اتصال دهنده جانبی و ۲،۲-آزوبيس ايزوبوتيرونيترييل به عنوان آغازگر واکنش راديکالي از شركت مرک آلمان، حلal های تولوئن، مтанول، استيک اسید، هيدروژن گلراید با خلوص ۳۷ درصد و هم چنین سديم هيدروكسيد و محلول های بافر (pH= 4,7,11) با درجه خلوص بالا از شركت مرک آلمان تهيه شد. از طرفی آب ديونيزه مورد نياز به عنوان يكى از فاز های برنده دستگاه كروماتوگرافی مایع توسط دستگاه PURITE (Select) ساخت کشور آمرika فراهم گردید.

آناليز تمامی نمونه ها با استفاده از دستگاه كروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا ساخت شركت Knauer آلمان مجهز به پمپ فشار بالا (K-1001)، آشكار ساز ماوري بنفش (K-2006) و ستون C18 فاز معکوس (Prontosil 120-5-C18) تحت شرایط بهينه سازی شده شامل تركيب يكتواخت استونيترييل و آب به نسبت ۸۰:۲۰ به عنوان فاز متحرک، سرعت عبور ۱/۵ ميلی لیتر بر دقیقه و طول موج ۲۰۰ نانومتر به انجام رسید. در فرآيند سنتز پلیمر قالب مولکولی و استفاده از آن به عنوان جاذب در فرآيند جداسازی فاز جامد جهت استخراج ايزومر های

pH و فلوئی تعیین شده از ستون جداسازی فاز جامد عبور داده شد و در نهایت توانایی جذب آفت کش مورد نظر توسط پلیمر قالب مولکولی تحت شرایط تعیین شده از طریق مقایسه موجود در نمونه عبوری از MIP با استاندارد اولیه تعیین و به صورت درصد جذب گزارش شد. در آزمایشات مربوط به بهینه سازی فرآیند بازیافت حشره کش پرمترين از ستون جداسازی فاز جامد، پس از بارگذاری نمونه با در نظر گرفتن شرایط بهینه پارامتر های موثر در مرحله جذب، حذف عوامل مداخله گر از طریق یک مرحله شست شو با استفاده از ۲ mL آب یونیزه به انجام رسید. در مرحله شویش حجم مشخصی از متانول حاوی ۱-۱۰ درصد استیک اسید به عنوان حلal استخراج با دبی تعیین شده از ستون عبور داده شد و پس از تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع، میزان استخراج از طریق مقایسه غلظت پرمترين موجود در نمونه قبل و بعد از عبور از ستون، جداسازی فاز جامد محاسبه و به صورت درصد بازیافت گزارش شد.

#### آماده سازی محلول ها

محلول مادر با غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر در متانول تهیه و در یخچال نگه داری شد. هم چنین جهت تهیه محلول های استاندارد مورد نیاز روزانه مقداری مختلفی از محلول مادر با آب دی یونیزه رقیق سازی شد. برای ارزیابی توانایی پلیمر قالب مولکولی سنتز شده در استخراج پرمترين از نمونه بیولوژیکی، مقدار ۲ میلی

بهینه سازی فرآیند جداسازی با استفاده از فاز جامد پلیمری

در ابتدا با توجه به نتایج حاصل از مطالعات پیشین و آزمایشات صورت گرفته مجموعاً ۶ فاکتور موثر در جذب و بازیافت حشره کش پرمترين توسط پلیمر قالب مولکولی شامل میزان جاذب مورد استفاده، pH و دبی نمونه، حجم حلal استخراج و درصد اسید موجود در آن جهت بررسی در فرآیند بهینه سازی انتخاب گردید که باید متوسط میزان جذب و بازیافت آنالیت مورد نظر با فاصله اطمینان آن برای ترکیبی از ۶ فاکتور مذکور به عنوان مقدار بهینه تعیین شود. بنابراین پس از تعیین حد بالا و پایین برای هریک از متغیر های مورد بررسی مطابق با جدول (۱)، تعداد نمونه مورد نیاز با استفاده از روش طراحی مرکب مرکزی (Central Composite Design (CCD)) و به کمک نرم افزار آماری R 3.4.1 دو دسته آزمایش ۲۹ مرحله ای به طور جداگانه برای دو فاز جذب و بازیافت طراحی شد.

با توجه به شرایط تعیین شده در هر یک از ۲۹ مرحله آزمایش طراحی شده جهت بهینه سازی فرآیند جذب پرمترين، در هر مرحله ابتدا مقدار مشخصی از پلیمر قالب مولکولی در داخل یک ستون خالی جداسازی فاز جامد قرار داده شد و با عبور ۱ mL متانول و به دنبال آن ۱ آب دی یونیزه با فلوئی ۱ mL/min از ستون، مرحله مستعد سازی (Conditioning) به انجام رسید. پس از آن محلولی به غلظت ۵ ppm و حجم ۳۰ mL از پرمترين با

جدول (۱)- حد پایین و بالای گستره انتخابی برای بهینه سازی فاکتور های موثر در مرحله جذب و بازیافت حشره کش پرمترين

مرحله	متغیر	حد بالا	حد پایین
	مقدار جاذب (میلی گرم)	۱۰	۱
	pH نمونه	۱۱	۳
	سرعت عبور نمونه (میلی لیتر/ دقیقه)	۲	۰/۵
	حجم حلal استخراج (میلی لیتر)	۵	۱
	سرعت عبور حلal استخراج (میلی لیتر/ دقیقه)	۲	۰/۵
	درصد اسید مورد استفاده	۱۰	۱
	در ترکیب حلal شویش		

یابی به ذرات پلیمر قالب مولکولی یکنواخت با ساختار کروی در محدوده ابعاد نانو (۱۲/۴ تا ۲۱/۲ نانومتر) را به اثبات رساند.

### نتایج حاصل از بهینه سازی مرحله جذب و بازیافت پرمترين

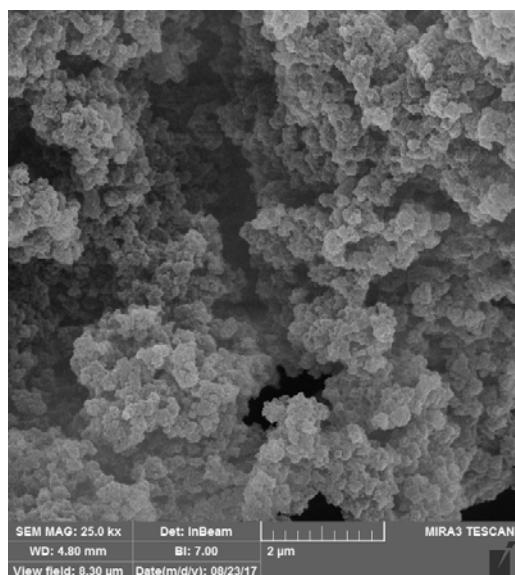
پس از انجام ۵۸ مرحله آزمایش با توجه به شرایط از پیش تعیین شده، عمل کرد جاذب پلیمری سنتز شده از طریق مقایسه غلظت آنالیت موجود در محلول، قبل و بعد از هریک از مراحل جذب و بازیافت محاسبه گردید و پس از دست یابی به میانگین جذب و بازیافت حشره کش پرمترين تحت شرایط تعیین شده، ارتباط متغیرهای مستقل عملیاتی با متغیر وابسته (میزان جذب و بازیافت) با آزمون رابطه خطی، متقابل و درجه دوم مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج آنالیز واریانس و بررسی برآوردهای آماری حاصل در مراحل جذب و بازیافت ایزو مر های حشره کش پرمترين (جدول ۲ و ۳) فاکتور f-value ارایه شده به طور ایده آل مقادير بالايی را نشان می دهد که اين امر ببيان گر پيش بيني قابل اطمینان مدل آماري از داده های تجربی است. از طرفي مقادير پايان p-value حاصل در هر دو مرحله، اعتبار آماري مدل های ارایه شده در پيش بيني پاسخ مورد نظر را نشان می دهد.

کيفيت پيش بيني مدل های سطح پاسخ از طریق ضرایب آنالیز واریانس ( $R^2$  و  $R^2\text{-Adjusted}$ ) نشان داده می شود. نتایج ارایه شده در جدول (۲ و ۳) برای مقدار ضریب تعیین  $R^2$  نشان می دهد که بیش از ۹۷ و ۹۱ درصد از

لیتر از نمونه ادرار افراد مواجهه نیافته با پرمترين با ۸ میلی لیتر آب دی یونیزه رقيق سازی شد و پس از تنظیم pH بهینه تعیین شده برای نمونه، غلظت های مختلف پرمترين به آن اضافه گردید.

### یافته ها

بررسی ساختار نانوذرات پلیمر قالب مولکولی سنتز شده به منظور بررسی ساختار سطحی و اندازه هی ذرات پلیمر قالب مولکولی سنتز شده، از روش اسکن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روشنی Scanning(SEM) از میکروسکوپ الکترونی روشنی Electron Microscopy (شکل ۱) موفقیت روش پلیمریزاسیون رسوبی در دست



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

جدول (۲)- نتایج آنالیز واریانس سه آزمون مورد بررسی جهت انتخاب مدل مناسب برای بهینه سازی فرآیند جذب دو ایزمر حشره کش پرمترين بر روی پلیمر قالب مولکولی

Trans - پرمترين				Cis - پرمترين				Df	نوع آزمون مدل سطح پاسخ
P- value	F-value	Mean square	Sum of squares	P- value	F-value	Mean square	Sum of squares		
۷/۳۷×۱۰ <sup>-۱۵</sup>	۲۱۶/۱۹	۲۲۵۷/۸	۶۷۷۳/۴	۱/۹۱×۱۰ <sup>-۱۵</sup>	۲۵۰/۱۵	۲۰۸۱/۳۰	۶۲۴۳/۹	۳	پاسخ درجه يك
۰/۰۰۲	۷/۱۵	۷۴/۷۴	۲۲۴/۲	۵/۰۴×۱۰ <sup>-۴</sup>	۹/۴۰	۷۸/۲۸	۲۳۴/۸	۳	عامل متقابل دو طرفه
۲/۰۹×۱۰ <sup>-۹</sup>	۵۲/۷۷	۵۵۱/۱۱	۱۶۵۳/۳	۵/۰۶×۱۰ <sup>-۱۰</sup>	۶۲/۳۴	۵۱۸/۷۲	۱۵۵۶/۲	۳	پاسخ درجه دوم
-	-	۱۰	۱۹۸	-	-	۸	۱۵۸	۱۹	Residuals
۰/۱۰۹۸۷	۲/۲۲۲	۱۷/۵۶	۸۷/۸	۰/۰۵۶۹	۲/۸۳	۱۵/۹	۷۹/۵	۵	Lack of fit
Multiple R <sup>2</sup> = 0.97; Adjusted R <sup>2</sup> = 0.96				Multiple R <sup>2</sup> = 0.98; Adjusted R <sup>2</sup> = 0.97					

جهت طراحی آزمایشات بهینه سازی مشاهده گردید که از لحاظ تئوریک می‌توان این مساله را به افزایش تعداد سایت‌های جذب اختصاصی و در نتیجه افزایش ظرفیت جذب در مقادیر بالای جاذب مورد استفاده نسبت داد. pH نمونه از دیگر پارامترهای مهم و تاثیرگذار در فرآیند جذب ترکیبات مختلف توسط پلیمر قالب مولکولی است که مقدار بهینه آن به ساختار شیمیایی جاذب و آنالیت مورد نظر بستگی دارد. براساس نتایج حاصل از میان گستره انتخابی جهت بررسی تاثیر pH نمونه در فرآیند استخراج، در نهایت pH برابر ۵/۵۸ و ۵/۶۸ به ترتیب به عنوان مقادیر بهینه جهت دست یابی به حدکثر راندمان جذب ایزومر Cis و Trans تعیین شد. به طور کلی با توجه به ماهیت پیوند های هیدروژنی بهبود کارایی فرآیند جذب در یک گستره خنثی و مایل به اسیدی مورد انتظار است، در صورتی که در نقطه مقابل بروز فرآیند هیدرولیز در pH قلیایی کاهش توانایی گروههای عاملی

تغییرات داده‌های تجربی به ترتیب برای مراحل جذب و بازیافت دو ایزومر حشره کش پرمترين به لحاظ آماری قابل تفسیر می‌باشد. علاوه بر این تفاوت جزیی مقدار  $R^2$  و  $R^2\text{-Adjusted}$ ، انتخاب صحیح فاکتورهای موثر در عمل گرد پلیمر قالب مولکولی سنتز شده را تایید می‌نماید.

در ادامه پس از تایید مدل‌های مورد آزمون، ضرایب رگرسیونی هریک از پارامترها با استفاده از رگرسیون چند متغیره محاسبه شد و در نهایت مقادیر بهینه فاکتورهای موثر در مرحله جذب و بازیافت حشره کش پرمترين توسط پلیمر قالب مولکولی با در نظر گرفتن معادله رگرسیونی حاصل، از طریق افزونه Solver در نرم افزار Excel محاسبه گردید (جدول ۴).

در رابطه با تعیین مقدار جذب مورد استفاده در فرآیند آماده سازی نمونه براساس نتایج ارایه شده در جدول (۴) حدکثر راندمان جذب اختصاصی حشره کش پرمترين نزدیک به حد بالای گستره انتخابی این پارامتر

جدول (۳)- نتایج آنالیز واریانس سه آزمون مورد بررسی جهت انتخاب مدل مناسب برای بهینه سازی فرآیند بازیافت دو ایزومر حشره کش پرمترين از پلیمر قالب مولکولی

Trans - پرمترين						Cis - پرمترين						نوع آزمون	مدل	سطح	پاسخ	
P-value	F-value	Mean square	Sum of squares	P-value	F-value	Mean square	Sum of squares	Df								
۱/۷۹×۱۰ <sup>-۱۳</sup>	۱۵۲/۵۸	۹۸۸/۶۸	۲۹۶۶/۰۳	۴/۲۹×۱۰ <sup>-۱۰</sup>	۶۳/۵۶	۴۷۵/۰۱	۱۴۲۵/۰۳	۳	پاسخ درجه یک							
۰/۰۳۲	۲/۵۸	۲۳/۲۵	۶۹/۷۶	۰/۷۸۵	۰/۳۹۹	۲/۹۸	۸/۹۵	۳	تعامل متقابل دو طرفه							
۰/۰۵۲	۳/۰۷	۱۹/۹۴	۵۹/۸۳	۰/۰۰۱	۸/۱۲	۶۰/۶۹	۱۸۲/۰۶	۳	پاسخ درجه دوم							
-	-	۶/۴۸	۱۲۳/۱۱	-	-	۷/۴۷	۱۴۱/۹۹	۱۹	Residuals							
۰/۰۲۱	۲/۶۱	۱۱/۸۸	۵۹/۴۱	۰/۳۲۸۷	۱/۲۴	۸/۷۶	۴۳/۷۹	۵	Lack of fit							
Multiple R <sup>2</sup> = 0.96; Adjusted R <sup>2</sup> = 0.94						Multiple R <sup>2</sup> = 0.91; Adjusted R <sup>2</sup> = 0.88										

جدول (۴)- مقادیر بهینه تعیین شده برای پارامترهای موثر در مرحله جذب و بازیافت ایزومر های حشره کش پرمترين توسط پلیمر قالب مولکولی

حداکثر راندمان (%)	متغیر	مقدار بهینه تعیین شده		مرحله
		ایزومر Trans	ایزومر Cis	
۱۰۰	pH	۵/۶۸	۵/۵۸	۱.
	مقدار جاذب (میلی گرم)	۷/۷۱	۷/۷۱	
	سرعت عبور نمونه (میلی لیتر بر دقیقه)	۰/۶	۰/۶	
	حجم حلال شویش (میلی لیتر)	۳/۹۴	۵	۲.
	میزان اسید موجود در حلال شویش (%)	۱۰	۹	
	دبي شویش (میلی لیتر بر دقیقه)	۲	۲	

قالب مولکولی در جذب آنالیت مربوطه، راندمان MIP و NIP تحت شرایط بهینه تعیین شده و کاملاً به صورت مشابه اندازه گیری شد. بر اساس نتایج به دست آمده که در جدول (۵) نشان داده شده است، بازده استخراج برای پلیمر قالب مولکولی به علت وجود سایت های اختصاصی تشکیل شده برای مولکول آفت کش انتخابی به میزان چشم گیری بیش تراز پلیمر قالب مولکولی نشده بوده که این نتایج تاییدی بر سنتز موفق جاذب مورد نظر می باشد.

بررسی اثر عوامل مداخله گر در عمل کرد پلیمر قالب مولکولی سنتز شده به منظور بررسی و اثبات عمل کرد اختصاصی جاذب پلیمری سنتز شده در جذب و بازیافت پرمترين، محلولی با غلظت  $50 \text{ ppb}$  و حجم  $30 \text{ mL}$  از اين آفت کش تهيه شد و آفت کش های متري بوzin، Diazinon و Malation به عنوان عوامل مزاحم در دو نوبت و با غلظت های  $50$  و  $100$  برابر غلظت آنالیت مورد نظر (پرمترين) به محلول تهيه شده اضافه گردید. پس از آن مراحل جذب و بازیافت هر کدام از نمونه های حاوی عوامل مزاحم تحت شرایط بهینه به انجام رسید و آنالیز محلول استخراجی از ستون جداسازی فاز جامد با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع انجام و میزان بازیافت آنالیت در حضور عوامل مزاحم محاسبه شد. بر اساس نتایج ذکر شده در جدول (۶) حضور عوامل مداخله گر تا غلظت  $100$  برابر حشره کش پرمترين نتوانست بر درصد بازیافت این سم تاثير قابل ملاحظه ای داشته باشد.

جدول (۵)- مقایسه راندمان و ظرفیت جذب ایزومرهاي پرمترين توسط پلیمر قالب مولکولی در برابر پلیمر غير قالب مولکولی

جاذب	نوع ایزومر	بازیافت (%)	$\pm \text{SD}$ میانگین (SD)
پلیمر قالب مولکولی (MIP)	Cis	$96/7 \pm 0/24$	
پلیمر غیر قالب مولکولی (NIP)	Trans	$96/88 \pm 0/57$	
	Cis	$37/29 \pm 5/18$	
	Trans	$37/45 \pm 6/67$	

جادب در برقراری پیوند موثر با ترکیب مورد نظر را به دنبال خواهد داشت.

جهت بررسی تاثیر سرعت عبور نمونه بر راندمان جذب پرمترين توسط MIP با توجه به نتایج مطالعات مشابه آزمایشات بهینه سازی مرحله جذب در گستره  $0/5$  تا  $2$  میلی لیتر بر دقیقه برای بارگذاری نمونه به انجام رسید و در نهایت نتایج حاصل از مدل سازی داده های تجربی حاصل جذب موثر ایزومر های پرمترين در سرعت  $0/6$  میلی لیتر بر دقیقه را نشان داد. لذا به نظر می رسد در راستای نتایج حاصل از برخی مطالعات مشابه [۲۱، ۲۲]، کاهش سرعت عبور نمونه تا یک مقدار معین می تواند راندمان جذب آنالیت توسط جاذب را بهبود بخشد. در مرحله بازیافت با انجام  $29$  مرحله آزمایش که در هر یک شرایط بهینه تعیین شده در مرحله جذب به طور جداگانه اعمال گردید، تاثیر ترکیبی سه فاكتور حجم و فلوئی حلal شویش و هم چنین میزان اسید موجود در ترکیب حلal شویش بر میزان استخراج پرمترين مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج ارایه شده در جدول (۴) مقادیر  $5$  و  $3/94$  میلی لیتر متنالول در ترکیب با استیک اسید به عنوان عامل تسهیل کننده به نسبت  $91:9$  و  $90:10$  به ترتیب قادر است پیوند های ایجاد شده دزرات پلیمری و تامین مدت زمان لازم برای استخراج آنالیت مورد نظر، سرعت عبور حلal شویش در بازه تعیین شده و در ترکیب با دو فاكتور دیگر مورد بررسی قرار گرفت که در نهایت براساس نتایج مدل سازی صورت گرفته دبی  $2$  میلی لیتر بر دقیقه به عنوان سرعت بهینه عبور حلal شویش تعیین شد.

مقایسه راندمان جذب MIP و NIP در شرایط بهینه پس از اتمام مراحل بهینه سازی جذب و بازیافت حشره کش پرمترين به منظور اثبات گرینش پذیری پلیمر

جدول (۶)- راندمان استخراج دو ایزومر پرمترین توسط MIP در حضور غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ برابر عوامل مزاحم

غلظت عوامل مزاحم	Cis	پرمترین (٪ بازیافت)	Trans	پرمترین (٪ بازیافت)
۵۰ برابر (مالاتيون، دیازينون، متري بو زين)	۹۴/۶۰ ± ۱/۸۴	۹۹/۳۲ ± ۰/۷	۹۹/۰۷ ± ۰/۶۲	۹۲/۶۹ ± ۲/۹۸
۱۰۰ برابر (مالاتيون، دیازينون، متري بو زين)				

جدول (۷)- نتایج مربوط به راندمان استخراج دو ایزومر حشره کش پرمترین از نمونه بیولوژیکی با استفاده از پلیمر قالب مولکولی

نمونه واقعی	غلظت (ppb)	بازیافت (٪ ± میانگین)	پرمترین (٪)
ادرار	۵۰	۹۴/۰۵ ± ۳/۹۰	۷۰
	۷۰	۹۳/۰۱ ± ۰/۸۶	۹۰
	۹۰	۹۴/۶۴ ± ۲/۷۴	۱۱۰
	۱۱۰	۹۷/۱۴ ± ۳/۹۰	۵۰
	۵۰	۹۴/۵۸ ± ۴/۲۷	۷۰
	۷۰	۹۳/۱۰ ± ۰/۰۷	۹۰
	۹۰	۹۴/۱۰ ± ۳/۱۱	۱۱۰
	۱۱۰	۹۶/۲۶ ± ۲/۷۳	

و دقیق پلیمر قالب مولکولی سنتز شده در مواجهه با نمونه های پیچیده، امکان استفاده از روش طراحی شده در ارزیابی بیولوژیکی تماس با آفت کش مورد نظر را نشان داد. کروماتوگرام استخراج دو ایزومر حشره کش پرمترین از نمونه ادرار تحت شرایط بهینه سازی شده در شکل (۲) نمایش داده شده است.

### نتیجه گیری

در این مطالعه سنتز پلیمر قالب مولکولی به عنوان یک جاذب نوین و اختصاصی برای تعیین مقدار حشره کش پرمترین از نمونه بیولوژیکی به انجام رسید. پارامترهای مختلفی بر عمل کرد این جاذب های پلیمری در دو مرحله جذب و بازیافت تاثیر گذار است که با توجه به مطالعات انجام شده مهم ترین این عوامل مورد بررسی و بهینه سازی قرار گرفت. نتایج حاصل توانایی سیار بالای MIP سنتز شده در جداسازی انتخابی و تعیین مقدار علف کش مورد نظر در شرایط بهینه را نشان داد و در نهایت آزمایشات انجام

### معتبر سازی روش

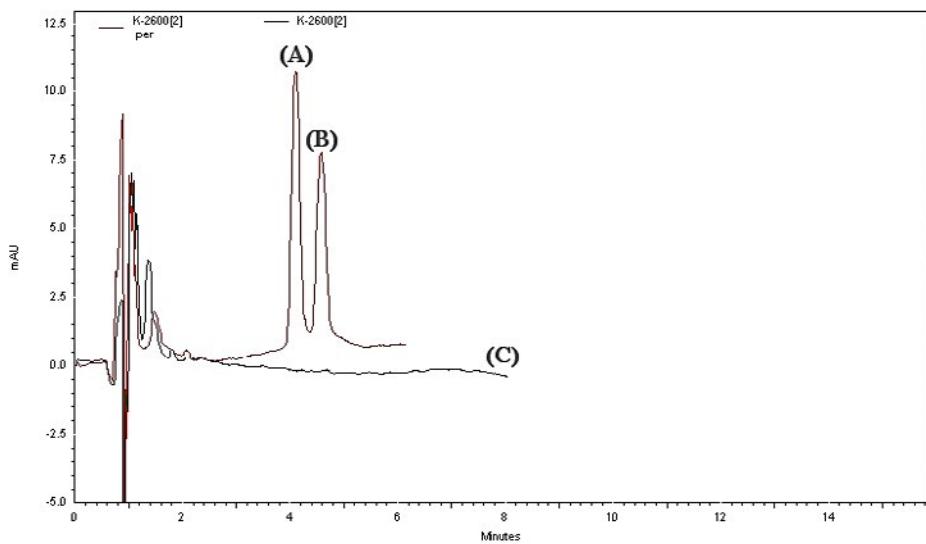
پس از بهینه سازی پارامترهای موثر در مراحل جذب و بازیافت و اثبات موفقیت روش، به منظور تعیین مقدار جزئی ایزومرهای پرمترین در نمونه های مختلف و هم چنین برآورد حد تشخیص و محدوده خطی روش، رسم منحنی کالیبراسیون در بازه غلظتی ppb ۲۰-۱۲۰ تحت شرایط بهینه انجام گرفت و رابطه ای خطی با  $R^2=0.99$  میان غلظت دو ایزومر پرمترین و سطح زیر کروماتوگرام در این محدوده مشاهده شد. از طرفی حد تشخیص روش با استفاده از رابطه زیر برای دو ایزومر Cis و Trans به ترتیب ۵/۵۱ و ۵/۷۲ میکروگرم بر لیتر محاسبه شد.

$$\text{LOD} = \frac{3 \text{ Sb}}{\text{m}}$$

در رابطه فوق Sb انحراف استاندارد شاهد و m شبیه منحنی کالیبراسیون می باشد.

تعیین مقدار آفت کش مورد نظر در نمونه بیولوژیکی 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 با غلظت های مختلف (۱۱۰، ۹۰، ۷۰ ppb) از آفت کش مورد نظر در mL ۱۰ رقیق شده اسپایک و پس از انجام مراحل آماده سازی بهینه، حلal استخراجی به وسیله دستگاه کروماتوگرافی مایع آنالیز و میزان بازیافت پرمترین از نمونه واقعی مشخص شد. براساس نتایج ارایه شده در جدول (۷) راندمان بازیافت پرمترین از نمونه های بیولوژیکی در تمامی غلظت های انتخابی مطلوب بوده که این امر علاوه بر اثبات عمل قابل اطمینان، انتخابی

شکل (۲) - کروماتوگرام استخراج نمونه اسپایک پرمترین در ادرار با غلظت  $100 \mu\text{g/L}$  تحت شرایط بهینه سازی شده (A و B: به ترتیب ایزومر پرمترین و C: نمونه شاهد)



در نمونه های محیطی و بیولوژیکی، مقایسه این مقادیر با استانداردهای موجود و در نهایت کنترل این آلاینده ها، امروزه توسعه گستردگی در ساخت و استفاده از این نوع جاذب ها برای ترکیبات مختلف صورت گرفته است. در نهایت بررسی قابلیت کاربرد پلیمرهای قالب مولکولی جهت آماده سازی نمونه سموم و آلاینده های شغلی و محیطی در دیگر واسطه های بیولوژیکی مانند خون و پلاسمای جهت مطالعات آتی پیشنهاد می گردد.

شده جهت مطالعه عمل کرد این جاذب برای جداسازی مقادیر جزئی آنالیت مورد نظر از نمونه بیولوژیکی نیز نتایج موفقیت آمیزی را به دنبال داشت. از مزایای استفاده از پلیمرهای قالب مولکولی به عنوان جاذب اختصاصی فاز جامد می توان به هزینه پایین، پایداری و مقاومت بالای این جاذب ها در شرایط مختلف، عدم نیاز به مقادیر بالای حلal و عمل کرد اختصاصی با راندمان و سرعت بالا اشاره کرد. با توجه به لزوم تعیین مقادیر جزئی آلاینده های مختلف

### REFERENCES

1. Khadem M, Faribod F, Norouzi P, Rahimi Foroushani A, Ganjali MR, Shahtaheri SJ, et al. Modification of Carbon Paste Electrode Based on Molecularly Imprinted Polymer for Electrochemical Determination of Diazinon in Biological and Environmental Samples. *Electroanalysis*. 2017;29(3):708-15.
2. Rahiminezhad M, SHAHTAHERI S, Ganjali M, RAHIMI FA, GOLBABAEI F. MOLECULARLY IMPRINTED SOLID PHASE EXTRACTION FOR TRACE ANALYSIS OF DIAZINON IN DRINK-ING WATER. 2009.
3. Chocholouš P, Šatínský D, Sládkovský R, Pospíšilová M, Solich P. Determination of pesticides fenoxycarb and permethrin by sequential injection chromatography using miniaturized monolithic column. *Talanta*. 2008;77(2):566-70.
4. Shishovska M, Trajkovska V. HPLC-method for determination of permethrin enantiomers using chiral  $\beta$ -cyclodextrin-based stationary phase. *Chirality*. 2010;22(5):527-33.
5. Tornero-Velez R, Davis J, Scollon EJ, Starr JM, Setzer RW, Goldsmith M-R, et al. A pharmacokinetic model of cis-and trans-permethrin disposition in rats and humans with aggregate exposure application. *Toxicological Sciences*. 2012;130(1):33-47.
6. Du J, Yan H, She D, Liu B, Yang G. Simultaneous determination of cypermethrin and permethrin in pear juice by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography. *Talanta*. 2010;82(2):698-703.
7. Feo M, Eljarrat E, Barceló D. A rapid and sensitive analytical method for the determination of 14 pyrethroids in water samples. *Journal of Chromatography A*. 2010;1217(15):2248-53.
8. Gabbianelli R, Nasuti C, Falcioni G, Cantalamessa F. Lymphocyte DNA damage in rats exposed to pyrethroids: effect of supplementation with Vitamins E and C. *Toxicology*. 2004;203(1-3):17-26.
9. Park E-K, Kim J-H, Gee SJ, Watanabe T, Ahn KC, Hammock BD. Determination of pyrethroid residues in agricultural products by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(18):5572-6.
10. Tisch M, Schmezer P, Faulde M, Groh A, Maier H. Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosal cells. *European Archives of Oto-rhino-laryngology*. 2002;259(3):150-3.
11. Pico Y, Rodriguez R, Manes J. Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2003;22(3):133-51.
12. Shen C-y, Cao X-w, Shen W-j, Jiang Y, Zhao Z-y, Wu B, et al. Determination of 17 pyrethroid residues in troublesome matrices by gas chromatography/mass spectrometry with negative chemical ionization. *Talanta*. 2011;84(1):141-7.
13. 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.
14. Sosa-Ferrera Z, Mahugo-Santana C, Santana-Rodríguez JJ. Analytical methodologies for the determination of endocrine disrupting compounds in biological and environmental samples. *BioMed research international*. 2013;2013.
15. Omidi F, Behbahani M, Abandansari HS, Sedighi A, Shahtaheri SJ. Application of molecular 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. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 2014;12(1):137.
16. Liu R, Zhou J, Wilding A. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2004;1022(1):179-89.
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 butachlor and chlorpyrifos. *American Journal of Analytical Chemistry*. 2014;5(09):535.
18. Koohpaei A, Shahtaheri S, Ganjali M, Foroushani AR, Golbabaei F. Application of multivariate analysis to the screening of molecularly imprinted polymers (MIPs) for ametryn. *Talanta*. 2008;75(4):978-86.
19. Khadem M, Faribod 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.
- 20.Omidi F, Behbahani M, Samadi S, Sedighi A, Shahtaheri SJ. Coupling of molecular 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. Iranian journal of public health. 2014;43(5):645.
21. 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.
22. Wang Q, Zhang X, Xu Z, Gao H. Simultaneous determination of three trace organophosphorus pesticide residues in vegetables using molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. Food analytical methods. 2015;8(8):2044-51.

## Synthesis and optimization of application of a molecular imprinted sorbent for selective determination of two pyrethroid isomers from biological sample

Omid Reza Heravizadeh<sup>1</sup>, Monireh Khadem<sup>1</sup>, Ramin Nabizadeh<sup>2</sup>,  
Seyed Jamaleddin Shahtaheri<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Occupational Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

<sup>2</sup> Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

\*Corresponding Author Email: [shahtaheri@tums.ac.ir](mailto:shahtaheri@tums.ac.ir)

Received: 2019-02-18,

accepted: 2019-07-07

### ABSTRACT

**Introduction:** Along with the extensive production and use of various pesticides for controlling pests and enhancing the production of agricultural crops, there is a growing concern about the adverse effects of these toxic materials on human health. Therefore, the development of sensitive, selective, and accurate methods for continuous assessment of pesticides concentration in occupational and environmental fields and comparing them with national and international standards is of great importance. This study was aimed at synthesis and application of molecularly imprinted polymer as a selective sorbent for residue determination of two pyrethroid isomers in biological samples.

**Material and Methods:** The MIP particles were prepared by a non-covalent approach using permethrin as a template, chloroform as progen solvent, methacrylic acid as functional monomer and ethyleneglycol dimethacrylate as cross-linker, at 55 °C for 18 hours in an oil bath. Field emission scanning electron microscopy was used to investigate the morphology and size of polymer particles. Afterward, the critical parameters, which could affect the recognition properties of synthesized MIP, were investigated and optimized under the selected operational ranges for the highest adsorption and recycling yield in solid-phase extraction of permethrin in biological samples

**Results:** using precipitation polymerization technique, uniform and spherical particles with the nano-ranged diameter (less than 21.2 nanometers) were obtained. Under the optimized condition, the designed molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) technique exhibited great potential for the extraction of pesticide isomers in the real sample. More than 93 % of the recovery obtained from spiked urine samples. The linear calibration curve was obtained from 20-120 µg.L-1 ( $R^2=0.99$ ) and the detection limit was less than 6 ppb for both isomers. The presence of interferences had no effect on the selectivity of the method up to 100-fold.

**Conclusion:** employing the molecular imprinted solid-phase extraction method along with the high-performance liquid chromatography technique resulted in a selective and sensitive approach, suitable for quantitative monitoring of the desired pesticide in complex biological samples.

**Keywords:** Pyrethroid Insecticide, Molecular Imprinted Polymer, Solid Phase Extraction, High Performance Liquid Chromatography

### HOW TO CITE THIS ARTICLE

Heravizadeh OA, Khadem M, Nabizadeh R, Shahtaheri SJ. (2019). Synthesis and optimization of application of a molecular imprinted sorbent for selective determination of two pyrethroid isomers from biological sample. Journal of Health and Safety at Work, 9(3): 168-178.

### COPYRIGHTS

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted to the Journal of Health and Safety at Work. This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

