تعیین اسپکتروفتومتری لیتیم درسرم خون ماهی کفال طلایی (*Lizza aurata*) و ساردین دم سیاه (*Sardinella Melanura*) در خلیج چابهار با استفاده از معرف تورین

- **مرتضی ضیاءالدینی***: گروه شیمی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی، چابهار
- **میرمهدی زاهدی**: گروه شیمی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی، چابهار
- **آزاده دهقان‌رحیمی**: گروه شیمی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی، چابهار

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹٦ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۹٦

چکیده

در این مطالعه واکنش‌گر تورین، در یک محیط قلیایی آب و استون با لیتیم تولید رنگ کرده و به‌طور مستقیم، با استفاده از روش ساده، ایمن و ارزان اسپکتروفتومتری برای اندازه‌گیری لیتیم در سرم خون دو گونه از ماهیان خلیج چابهار (ماهی کفال طلایی و ساردین دم سیاه) به‌کار رفته است. در زمستان سال ۱۳۹۵ از هر گونه ماهی ۱۵ عدد صید و خون‌گیری به‌عمل آمد و سرم خون جدا گردید. عوامل موثر بر واکنش تشکیل کمپلکس لیتیم-تورین مانند زمان واکنش، غلظت تورین، میزان پتاسیم هیدروکسید و استون بهینه‌سازی شدند و تحت شرایط بهینه، ضریب همبستگی، محدوده خطی و انحراف استاندارد (n=۷) روش به‌ترتیب ۰/۹۹٤، ۳-۰/۰۵ میلی‌اکی والان بر لیتر و ۰/۸۲درصد به‌دست آمدند. نتایج نشان دادند معرف تورین واکنش‌گری موثر و واکنش پذیر با لیتیم در سرم خون ماهی بوده و بر این اساس میانگین غلظت لیتیم در دو گونه ماهی مورد مطالعه در خلیج چابهار ۰/۲۲ میلی‌اکی والان بر لیتر اندازه‌گیری شد. داده‌های حاصل از این تحقیق با استفاده از روش t-test ناجور یا مستقل با استفاده از نرم‌افزار SPSS در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت که نشان داد مقدار لیتیم موجود در سرم خون این دو گونه ماهی اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

کلمات کلیدی: لیتیم، سرم خون ماهی، تورین، طیف‌سنجی فرابنفش، خلیج چابهار

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: M.Ziyaadini@cmu.ac.ir

مقدمه

لیتیم یک عنصر اساسی است که درک اجتماعی از آن در ۱۰۰ سال گذشته منحصراً به‌وسیله کاربرد آن در دوزهای بالا (۳۶۰-۱۵۰ میلی‌گرم) برای درمان اختلال دوقطبی و اشکال مختلف ناراحتی‌های ذهنی تعریف شده است (Leonard و همکاران، ۱۹۹۵). لیتیم در ابتدا به‌عنوان یک عنصر شیمیایی در سال ۱۸۱۷ کشف و اولین کاربرد درمانی آن در سال ۱۸۷۱ برای درمان افسردگی بود. در سال ۱۸۸۶ یک شکل به‌شدت قابل یونیزاسیون از لیتیم غیرارگانیک (کربنات) که در حال حاضر نیز به‌همین شکل برای درمان افسردگی مورد استفاده قرار می‌گیرد معرفی شد (Pérez، ۲۰۰۲). لیتیم هم‌چنین به‌طور قابل توجهی موجب حفاظت از نورون‌ها در مقابل گلوتامات، تشنج‌ها و آلوپتوز به‌دلیل انواع وسیعی از نوروتوکسین‌ها از طریق تنظیم ممانعت از گیرنده N-متیل-D-اسپارات (NMDA) می‌شود (Young، ۲۰۰۹).

غلظت یون لیتیم در خون انسان تقریباً بین ۰/۵ تا ۱ میلی‌اکی والان بر لیتر نگه داشته می‌شود و اثر درمانی لیتیم به‌طور مستقیم به غلظت آن در سرم خون بستگی دارد. سطوح درمانی لیتیم در خون انسان بین ۱/۲-۰/۶ میلی‌اکی والان بر لیتر بوده و غلظت بالای ۱/۵ میلی‌اکی والان بر لیتر سمی درنظر گرفته می‌شود (Elielton و همکاران، ۲۰۱۴). تاثیرات جانبی ناخوشایندی در غلظت‌های بین ۲ تا ۲/۵ میلی‌اکی والان بر لیتر ظاهر می‌شوند و غلظت این فلز قلیایی در این سطوح می‌تواند مرگبار باشد (Marczenk و همکاران، ۲۰۰۰). نیاز جانداران به مقادیر کمی از لیتیم برای سلامت تکثیر و حفظ سلامت عمومی بر کسی پوشیده نیست (Schrauzer، ۲۰۰۲). لیتیم برجنبه‌های مختلف رفتاری ماهی به‌ویژه بر حس تجمع‌گرایی، رفتار تهاجمی، ادراک حسی و بصری و حافظه آن اثر می‌گذارد. بالا بودن بیش از حد مجاز میزان لیتیم در خون ماهی نظم رفتاری جانور را دچار اختلال می‌کند و یا ممکن است باعث تخریب سیستم مرکزی تجزیه و تحلیل ورودی‌های حسی شده و درنتیجه اختلال در توانایی ماهی برای شناسایی و پاسخ به نشانه‌های محیطی را دربرداشته‌باشد (Johnson، ۱۹۸۱).

اندازه‌گیری لیتیم معمولاً به‌روش طیف‌سنجی شعله یا اسپکتروفتومتری جذب اتمی صورت می‌گیرد اما استفاده از گازهای قابل اشتعال و فشرده شده، به‌دلایل امنیتی، باعث می‌شود موسسات درمانی از آن اجتناب کنند یا از روشی جایگزین استفاده نمایند (Marczenko و همکاران، ۲۰۰۰). اخیراً مقایسه‌ای بین‌روش طیف‌سنجی جذب‌اتمی شعله و طیف‌سنجی نشر اتمی شعله در اندازه‌گیری لیتیم سرم خون انسان صورت گرفته است که نتایج از صحت و دقت هر دو تکنیک و عدم تفاوت معنی‌دار بین آن‌ها حکایت دارد(Elielton و همکاران، ۲۰۱۴).

در این تحقیق از روش طیف‌سنجی فرابنفش که روشی ساده، ارزان، ایمن و در دسترس است و می‌تواند جایگزینی مناسب برای روش‌های معمول باشد برای اندازه‌گیری لیتیم سرم خون‌ماهی برای نخستین‌بار استفاده‌شده است. بیش‌تر روش‌های طیف‌سنجی فرابنفش بر پایه واکنش‌گرهای آلی می‌باشندو واکنش‌گرهای آزو گروه‌بزرگی از واکنشگرهای طیف‌سنجی فرابنفش را تشکیل می‌دهند. لیتیم تنها فلز قلیایی است که با برخی از رنگ‌های آزو، واکنش‌های رنگ‌زا داشته و اولین واکنش‌گری که در اندازه‌گیری مستقیم لیتیم مورد استفاده قرار گرفته، تورین (Thorin) است. این ترکیب در واکنش با لیتیم در ۴۲۰ تا ۴۸۰ نانومتر دارای جذب بوده و می‌توان از آن در اندازه‌گیری لیتیم به‌روش طیف‌سنجی استفاده نمود (Uesugi، ۱۹۶۶؛ Marczenko و همکاران، ۲۰۰۰).

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده: استون با خلوص بالا، پتاسیم هیدروکسید، نمک‌های به‌کار رفته در آزمایش و هیدروکلریک اسید از شرکت مرک و تورین به‌عنوان شناساگر از شرکت سیگماآلدریچ خریداری شد. محلول استاندارد تورین به‌صورت ۰/۰۲۷ درصدوزنی-حجمی ومحلول استاندارد پتاسیم هیدروکسید به‌صورت ۱مولار تهیه شد. محلول شناساگر به صورت روزانه از ترکیب ۶۰ درصد استون، ۲۰ درصد محلول پتاسیم هیدروکسید، ۱۰ در صد آب دو بار تقطیر و ۱۰ درصد محلول ۰/۰۲۷ درصد وزنی- حجمی تورین ساخته شد.

وسایل و دستگاه‌های مورداستفاده: در این آزمون از دستگاه‌ها و تجهیزات طیف‌سنجی فرابنفش ۲۱۰۰PCUV یونیکو مدل uvs S۲۱۰۰، سل کوارتز مدل Q/۱۰/۱۸ برای اندازه‌گیری و خواندن جذب کمپلکس لیتیم-تورین در طول موج ۴۸۰ نانومتر، میکروسرنگ ۱۰۰ میکرولیتری هامیلتون برای برداشت مقادیر میکرولیتر لیتیم و شناساگر، ترازوی ADAM مدل PW۲۴۵ با دقّت اندازه‌گیری ۰/۱ میلی‌گرم برای توزین مواد شیمیایی مورد نیاز استفاده شد.

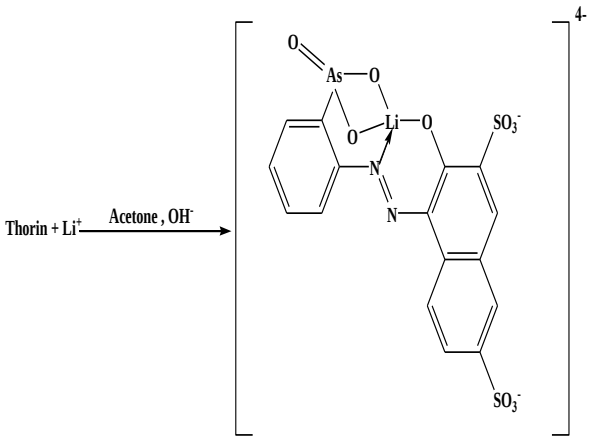
نمونه‌برداری و آماده‌سازی نمونه: نمونه‌های ماهی کفال طلایی (*Lizza aurata*) و ساردین دم‌سیاه (*Sardinella Melanura*) در زمستان ۱۳۹۵ از خلیج چابهار صید گردید. خونگیری از ناحیه ساقه دمی انجام شد. پس از خونگیری نمونه‌های خون ماهیان را درون ظرف حاوی یخ قرار داده و به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در آزمایشگاه نمونه‌ها تا شروع آنالیز در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. نمونه‌های خون بدون کاربرد مواد ضدانعقاد، بلافاصله در دور

۳۰۰۰ و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و گلبول‌های قرمز خون ترسیب و از سرم تفکیک گردید. نمونه‌های سرم (فاز رویی)، به‌آرامی توسط سمپلر کشیده و به میکروتیوب‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتر جدید منتقل شدند.

روش انجام آزمایش: به ۱۰۰ میکرولیتر از سرم خون، ۱۰۰ میکرو لیتر محلول تری کلرواستیک اسید (TCA) اضافه شد تا پروتئین‌های آن‌ها کاملاً جدا شده و رنگ آن کاملاً شفاف شود. سپس ۳ میلی‌لیتر از معرف تورین را درون سل منتقل و جذب آن توسط دستگاه طیف‌سنج فرابنفش در طول موج ۴۸۰ نانومتر قرائت گردید. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه سرم خون ماهی به آن افزوده و محلول جهت تشکیل کمپلکس لیتیم-تورین به‌مدت ۲ تا ۳ دقیقه هم زده شد و جذب آن در طول موج ۴۸۰ نانومتر مشاهده گردید که اختلاف بین جذب شناساگر و محلول ثانویه مربوط به مقدار جذب لیتیم در محلول نمونه می‌باشد (Marczenko و همکاران، ۲۰۰۰).

بهینه‌سازی فاکتورهای موثر بر تشکیل کمپلکس لیتیم- تورین

بررسی اثر درصد حضور استون و پتاسیم هیدروکسید در محلول شناساگر: معرف تورین در حضور استون و محیطی قلیایی با لیتیم طبق شکل ۱ واکنش داده و تشکیل کمپلکس تورین-لیتیم را می‌دهد (Uesugi، ۱۹۶۶). میزان استون بر شدت واکنش تکمیل کمپلکس لیتیم- تورین تأثیرگذار است و هنگامی‌که این واکنش انجام می‌شود تغییر رنگ محلول محسوس است و از سوی دیگر با کاهش میزان قلیاییت محلول از شدت رنگ محلول نیز کم شده و به‌تبع آن میزان جذب نیز کم می‌شود بنابراین مقدار استون و پتاسیم هیدروکسید به‌عنوان عامل قلیایی در محیط واکنش، در پیش‌روی واکنش از اهمیت والایی برخوردار است.



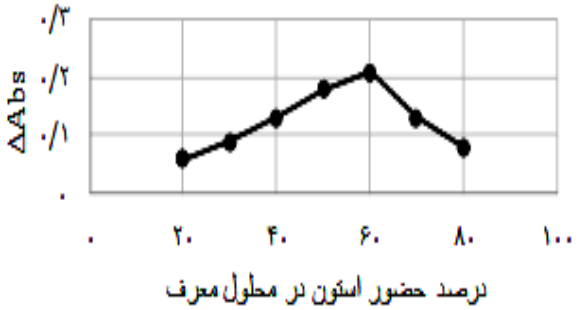
شکل ۱: واکنش بین لیتیم و تورین و تشکیل کمپلکس لیتیم- تورین

بررسی اثر زمان واکنش و تشکیل کمپلکس لیتیم- تورین: عامل زمان در تشکیل کمپلکس لیتیم-تورین بسیار موثر است. به علت حضور استون در محیط واکنش و خاصیت فراریت این ماده، در زمان‌های بالا کاهش حضور استون در محیط واکنش، کاهش میزان اختلاف جذب را به‌همراه دارد و در زمان‌های کوتاه واکنش به‌طور کامل پیش نمی‌رود. از سویی دیگر شناساگر تورین در طول زمان ناپایدار بوده و با گذشت زمان با کاهش شدت رنگ آن از تأثیر واکنش گر نسبت به لیتیم کاسته می‌شود.

در ادامه با استفاده از آزمون Independent Samples Test نتایج مورد آنالیز و بررسی قرار گرفت که نتایج آزمون t با استفاده از نرم‌افزار SPSS در سطح اطمینان ۹۵٪ نشان داد اختلاف آماری معنی‌داری در سطح P<۰/۰۵ بین غلظت لیتیم در سرم خونی ماهیان کفال و ساردین وجود ندارد.

نتایج

بررسی اثر درصد حضور استون و پتاسیم هیدروکسید در محلول شناساگر: در این مطالعه مقدار استون در محدوده ۸۰-۲۰ درصد حجمی-حجمی و مقدار محلول پتاسیم هیدروکسید به‌عنوان عامل قلیایی در محدوده ۳۰-۵ درصد حجمی-حجمی مورد بررسی قرار گرفتند که با توجه به نتایج به‌دست آمده (شکل‌های ۲ و ۳) استون با ۶۰ و پتاسیم هیدروکسید با ۲۰ درصد حجمی-حجمی بیش‌ترین جذب را در محلول شناساگر به‌خود اختصاص دادند و در نهایت این مقادیر به‌عنوان مقادیر بهینه در تشکیل کمپلکس تورین-لیتیم انتخاب شدند.



شکل ۲: نمودار بررسی اثر درصد حضور استون در محلول شناساگر

شکل ۳: نمودار بررسی اثر درصد حضور پتاسیم هیدروکسید در محلول شناساگر

بررسی اثر زمان واکنش و تشکیل کمپلکس لیتیم- تورین: در این مطالعه زمان‌های ۰ تا ۲۰۰ ثانیه مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۴) که از زمان ۰ تا ۲/۵ دقیقه افزایش اختلاف جذب و پس از آن کاهش اختلاف جذب مشاهده شد. از این‌رو زمان ۲ دقیقه و ۳۰ ثانیه به عنوان زمان بهینه انتخاب گردید.

بررسی اثر عوامل مزاحم: در این مطالعه عوامل تداخل‌زا مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به‌دست آمده در جدول ۱ بیانگر همین واقعیت یعنی عدم تداخل یون‌های سدیم، کلسیم، منیزیم، آلومینیوم، آهن و روی در تشکیل کمپلکس لیتیم-تورین در محیط واکنش می‌باشد.

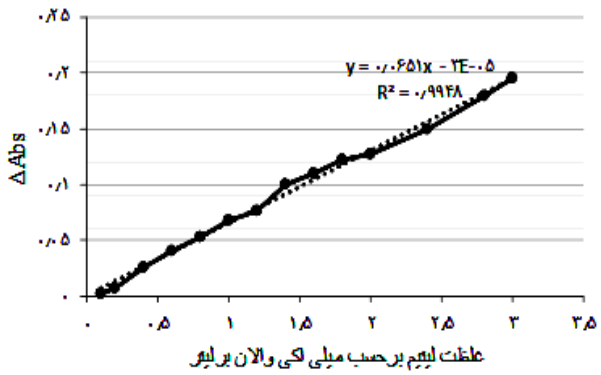
شکل ۴: نمودار بررسی اثر زمان واکنش لیتیم-تورین

بررسی اثر عوامل مزاحم: در این مطالعه عوامل تداخل‌زا مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به‌دست آمده در جدول ۱ بیانگر همین واقعیت یعنی عدم تداخل یون‌های سدیم، کلسیم، منیزیم، آلومینیوم، آهن و روی در تشکیل کمپلکس لیتیم-تورین در محیط واکنش می‌باشد.

جدول ۱: بررسی حضور عوامل تداخل‌زا در محیط واکنش در حضور ۱۰۰میکرو گرم بر لیتر لیتیم

یون	مقدار اضافه شده	نمک	لیتیم مشاهده شده
Na^{+}	۱۰۰	NaCl	۱۰۳
	۵۰۰		۱۰۷
	۱۰۰۰		۱۱۱
	۲۰۰۰		۱۱۵
Ca^{2+}	۱۰۰	$CaCl_2$	۹۹
	۲۰۰		۹۸
Mg^{2+}	۱۰۰	$MgCl_2$	۸۵
Al^{3+}	۵	$AlCl_3$	۹۹
	۱۰		۸۰
Fe^{3+}	۵	$FeCl_3$	۱۰۵
	۱۰		۱۲۵
Zn^{2+}	۲	$ZnCl_2$	۹۸
	۵		۸۵

رسم نمودار کالیبراسیون تحت شرایط بهینه: رسم منحنی کالیبراسیون برای تعیین غلظت نمونه‌های مجهول به‌کار می‌رود و باعث کاهش انواع خطاها هم‌چون خطای دستگاهی می‌شود. محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از لیتیم در محدوده غلظتی ۳-۰/۰۵ میلی‌اکی والان بر لیتر، از رقیق‌سازی محلول استانداردا‌ولیه لیتیم تهیّه گردید و منحنی کالیبراسیون با اعمال تمام شرایط بهینه‌شده از قبیل درصد حضور استون و محلول پتاسیم هیدروکسید در محلول شناساگر و زمان واکنش در تشکیل کمپلکس لیتیم-تورین رسم گردید (شکل ۵).



شکل ۵: نمودار کالیبراسیون تحت شرایط بهینه ۶۰ درصد حجمی-حجمی استون و ۲۰ درصد حجمی-حجمی پتاسیم هیدروکسید در محلول شناساگر و زمان واکنش ۲/۵ دقیقه

بحث

در بررسی عوامل مزاحم در واکنش تورین- لیتیم، نتایج به‌دست آمده از دیگر مطالعات نشان‌دهنده عدم تداخل حضور سدیم تا ۵۰ برابر و منیزیم تا ۱۰ برابر در محیط واکنش بوده است (Marczenko و همکاران، ۲۰۰۰) از این‌رو استفاده از این معرف را برای اندازه‌گیری لیتیم در سرم خون ماهی که حاوی غلظت ناچیزی از سدیم می‌باشد را مناسب می‌کند.

ازسویی‌دیگر،تحت‌شرایط بهینه، فاکتورهای ضریب همبستگی، دامنه خطی و انحراف استاندارد به‌ترتیب برابر ۰/۹۹۴، ۳-۰/۰۵ میلی‌اکی والان بر لیتر و ۰/۸۲درصد به‌دست آمدند. دامنه خطی ۳-۰/۰۵ میلی‌اکی والان بر لیتر نشان‌دهنده اعتبار روش می‌باشد. حد تعیین (LOQ) که یکی از پارامترهای سنجش شایستگی روش‌های اندازه‌گیری می‌باشد، در اینجا ۰/۰۵ میلی‌اکی والان بر لیتر به‌دست آمد که در مقایسه با حد تعیین روش طیف‌سنج جذب اتمی که روشی نسبتاً گران بوده و برای اندازه‌گیری لیتیم در نمونه‌های سرم خون انسانی به‌کار رفته است (Elielton و همکاران، ۲۰۱۴) تفاوتی نداشت.

به‌منظور تعیین غلظت واقعی لیتیم در نمونه‌های سرم خون ماهیان صید شده از آب‌های ساحلی خلیج چابهار از منحنی کالیبراسیون استفاده گردید. تمام نمونه‌ها تحت شرایط بهینه با شناساگر تورین واکنش داده و اختلاف جذب شناساگر و کمپلکس تشکیل‌شده در طول‌موج ۴۸۰ نانومتر خوانده شد و نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد میانگین غلظت این فلز قلیایی در هر دو گونه ماهی (کفال طلایی و ساردین دم سیاه) ۰/۲۲ میلی‌اکی والان بر لیتر است.

در ادامه برای بررسی تفاوت غلظت لیتیم در سرم خون این دو گونه ماهی، غلظت لیتیم در سرم خونی با استفاده از آزمون Independent Samples Test مورد آنالیز و بررسی قرارگرفت که نتایج آزمون t با استفاده از نرم‌افزار SPSS در سطح اطمینان ۹۵ درصد نشان داد اختلاف آماری معنی‌داری در سطح P<۰/۰۵ بین غلظت لیتیم در سرم خونی ماهیان کفال و ساردین وجود ندارد.

در این تحقیق واکنشگر تورین به‌عنوان شناساگر طیف‌سنجی فرابنفش در یک محیط قلیایی آب و استون با لیتیم تولید رنگ کرده و به‌طور مستقیم، با استفاده از روش اسپکتروفتومتری که روشی ساده، ایمن، در دسترس و ارزان می‌باشد برای اندازه‌گیری این فلز قلیایی در سرم خون دو گونه از ماهیان خلیج چابهار (کفال طلایی و ساردین دم سیاه) به‌کار گرفته شد. در بهبود شرایط واکنش فلز لیتیم با لیگاند تورین، میزان استون و پتاسیم هیدروکسید به‌عنوان عوامل موثر در محیط واکنش و زمان به‌عنوان عامل موثر در تکمیل واکنش، بهینه سازی شدند.

تحت شرایط بهینه، فاکتورهای ضریب همبستگی، محدوده خطی و انحراف استاندارد به‌ترتیب برابر ۰/۹۹۴، ۳-۰/۰۵ میلی‌اکی والان بر لیتر و ۰/۸۲درصد به‌دست آمدند که این نشان می‌دهد معرف تورین واکنش‌گری موثر و واکنش‌پذیر با فلز لیتیم در سرم خون ماهی بوده و می‌تواند روشی ساده، ارزان و مطمئن در تعیین غلظت این فلز در سرم خون ماهی باشد.

بر این اساس میانگین غلظت لیتیم در ماهی کفال طلایی خلیج چابهار با این تکنیک در محدوده ۰/۲۲ میلی‌اکی‌والان بر لیتر اندازه‌گیری شد که در مقایسه با غلظت لیتیم در ماهی ساردین دم سیاه تفاوتی نداشت. آنالیز نتایج به‌دست آمده تحت شرایط بهینه با استفاده از نرم‌افزار SPSS، هم‌چنین نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار در غلظت لیتیم در سرم خون این دو گونه ماهی درخلیج چابهار می‌باشد.

تشکر وقدردانی

از سرکار خانم دکتر پریا اکبری و جناب آقای دکتر جواد قاسم‌زاده اعضای هیات‌علمی گروه شیلات دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار که در انجام این تحقیق یاری رساندند کمال تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

۱. **Elielton, C.; Espírito, S.; Teresa, M. and Carvalho, J., 2014.** Determination of serum lithium: comparison between atomic emission and absorption spectrometry methods. Journal of Bras Patol Med Lab. Vol. 50, No. 1, pp: 12-19.

۲. **Johnson, F.N., 1981.** The Use 01 Fish in Studying the Behavioral Effects of Lithium. Phannacopsychiat. Vol. 14, pp: 208-212.

۳. **Leonard, A.; Hantson, Ph. and Gerber, G.B., 1995.** Mutagenicity, carcinogenicity teratogenicity of lithium compounds. Mutat. Res./Rev. Genet. Toxicol. Vol. 339, No. 3, pp: 131-137.

۴. **Marczenko, Z.; Balcerzak, M. and Kloczko, E., 2000.** Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis: Elsevier Scienc.

۵. **Pérez-Granados, A.M. and Vaquero, M.P., 2002.** Silicon, aluminium, arsenic and lithium: essentiality and human health implications. Journal of Nutr Health Aging. Vol. 6, pp: 154-162.

۶. **Schrauzer, G.N., 2002.** Lithium: occurrence, dietary intakes, nutritional essentiality. Journal of Amreican Coll Nutrition. Vol. 21, No. 1, pp: 14-21.

۷. **Uesugi, K. and Murakami, T., 1966.** Spectrophotometric determination of lithium in sea water using thorin. Bunseki kagaku. Vol. 15, No. 5, pp: 482-487.

۸. **Young, W., 2009**. Review of lithium effects on brain and blood. Cell Transplant. Vol. 18, pp: 951-975.