ششمین کنگره سراسری عناصر کمیاب ایران
تهران، دانشگاه تهران، ۶ الی ۸ اسفند ۱۳۹۸
انجمن عناصر کمیاب ایران

اندازه‌گیری و مقایسه سرب در گلبول‌های قرمز و سرم خون بیماران MS براساس میکرواستخراج فاز جامد-مایع یونی پخشی با استفاده از طیف‌سنجی جذب اتمی الکتروترمال

فربد نصیری[۱،۲]، نگار معتکف کاظمی[۱]، حمید شیرخانلو[۳]

1. *گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.*
2. *باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.*
3. *مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران.*

چکیده

در این تحقیق، از نانوذرات گرافن به عنوان یک فاز جامد برای جداسازی سرب نمونه خون افراد سالم و بیماران مولتیپل اسکلروزیس (MS) با استفاده از تکنیک میکرو استخراج فاز جامد-مایع یونی پخشی به کمک التراسونیک (US-D-IL-µ-SPE) مورد استفاده قرار گرفت. اثر پارامترهای موثر در استخراج مانند pH، مقدار جاذب و مایع یونی، حجم نمونه، سایز نانو جاذب، حجم وغلظت مایع در استخراج برگشتی، زمان اولتراسونیک و سانتریفوژ، و تاثیریون‌های مزاحم در استخراج مورد بررسی و بهینه قرار گرفت. سرب از نمونه خون کامل به وسیله نانوجاذب گرافن‌اکساید در pH=۴/۵ استخراج شد. مایع یونی آبگریز [OMIM][PF_6] جهت جداسازی جاذب و آنالیت مورد استفاده قرار گرفت. جاذب و آنالیت با ۲۵۰میکرولیتر اسیدنیتریک ۱مولار مورد استخراج برگشتی قرار گرفته، و در نهایت غلظت سرب با استفاده از طیف‌سنجی جذب اتمی با کوره گرافیتی تعیین شد.

تحت شرایط بهینه، حد تشخیص روش (LOD=3sb/m) و حد کمی روش (LOQ=10sb/m) برای سرب به ترتیب ۰.۰۵میکروگرم‌برلیتر و ۰.۱۵ میکروگرم‌برلیتر بود. ظرفیت جذب نانوجاذب گرافن برای سرب ۱۴۸.۸ میلی گرم‌برگرم بود. فاکتور پیش‌تغلیظ برای سرب ۱۹.۷ محاسبه شد. برای ۱۰ میلی لیتر از استاندارد سرب در شرایط بهینه، محدوده خطی ۷.۳-۰.۱۵ میکروگرم‌برلیتر بدست آمد. این روش با موفقیت به شناسایی و تعیین سرب در نمونه‌های سرم و ادرار بیماران مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم با دقت نتایج مناسب (RSD= ٪۵) و بازیابی ٪۹۵ انجام شد. اعتبارسنجی روش نیز با مواد مرجع استاندارد در خون (SRM) انجام شد. میانگین سرب خون در بیماران و افراد سالم به ترتیب ۸۷/۵۴±۸/۴۳ و ۷/۲۳±۱/۱۲ برای سنین ۲۵-۵۰ سال بدست آمد. نتایج این مطالعه نشان داد که روش به کار رفته بر اساس نانو گرافن و میکرواستخراج فاز جامد مایع یونی پخشی ،روشی ساده، دقیق و کارآمد برای اندازه گیری سرب در سلول‌های خون و سرم بیماران است و فقط به مقدار کمی از نمونه (۱mL) نیاز دارد. بعنوان جایگزینی در سنجش سرب در مایعات بیولوژیک انسانی پیشنهاد می‌شود. همچنین می‌توان از این نانوذره در حذف سمیت سرب در بدن انسان بصورت بستر ثابت استفاده نمود.

کلمات کلیدی: سرب، نانوجاذب گرافن، مایع یونی، میکرو استخراج فاز جامد، طیف‌سنجی جذب اتمی الکتروترمال، مولتیپل اسکلروزیس

* نویسنده مسئول: حمید شیرخانلو، مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران. hamidshirkhanloo@gmail.com

مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس یک بیماری التهابی ناشی حمله سیستم ایمنی به سیستم عصبی مرکزی با نشانه‌هایی نظیر ناتوانی‌های، ضعف و خستگی عضلانی است (۱،۲). مطالعات مختصصان حوزه سلامت از جمله پزشکان عوامل متعددی را در بروز بیماری MS موثر دانسته‌اندکه از جمله آن‌ها می‌توان به موارد ذیل اشاره کرد:

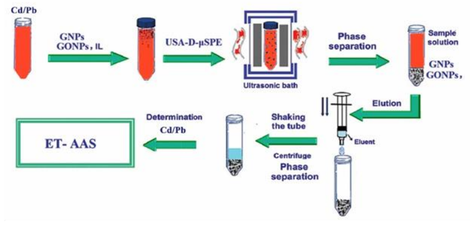
- نوع تغذیه بخصوص مصرف بیش از اندازه چربی‌های اشباع و استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها
- سبک زندگی و استعدادهای ژنتیکی و ...
- مواجه و یا مسمویت با فلزات سنگین مانند سرب، جیوه، کادمیم، آرسنیک و نیکل(۴،۳،۶)

در این میان مواجهه با فلزات سنگین که کاربرد فراوانی در صنایع دارند نگرانی‌ها و توجهات را در این زمینه به خود جلب کرده‌اند. از جمله فلزات سنگینی که مقادیر اندک آن نیز بر بروز MS و سایر بیماری‌های دستگاه اعصاب، تنفسی، تولید مثل، اختلالات رشد، اختلالات غدد درون‌ریز و ... موثر است، فلز سرب می‌باشد (۴). سرب باعث خستگی، آنمی، رسوب در بافت استخوانی شده واز سد مایع مغزی نخاعی عبور کرده به سمت قشر مخ حرکت نموده باعث پلاک می‌شود که با MRI قابل ردیابی است (۲). لذا در این مطالعه اندازه‌گیری و مقایسه مقدار سرب در نمونه خون کامل بیماران MS و افراد سالم با استفاده از روشی کارآمد و نوین مبتنی بر نانوذرات گرافن در تکنیک میکرو استخراج فاز جامد-مایع یونی پخشی به کمک التراسونیک (US-D-IL-µ-SPE) و طیف‌سنجی جذب اتمی الکتروترمال مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، سنجش و اندازه‌گیری مقادیر سرب از نمونه خونی افراد سالم و بیماران MS به وسیله نانوجاذب گرافن مورد بررسی قرار گرفته است. که طی مراحلی شامل سنتز نانوجاذب گرافن (۵) و مشخصه‌یابی آن در پژوهشکده نانو شرکت نفت، انجام تکنیک میکرو استخراج فاز جامد-مایع یونی پخشی و تعیین میزان راندمان و بررسی پارامترهای موثر بر استخراج، بدست آوردن ظرفیت جذب جاذب و تعیین دقت و صحت نتایج، اعتبارسنجی و در نهایت مقایسه و ارزیابی روش با سایر پژوهش‌ها انجام گرفته است. همه معرف‌های مورد استفاده بالاترین خلوص را داشتند و از شرکت مرک آلمان بودند.

در این مطالعه پس از سنتز نانوجاذب گرافن و مشخصه‌یابی آن، برای تعیین و پیش‌تغلیظ سرب در نمونه سرم خون و گلبول های قرمز بیماران MS و افراد سالم از روش میکرواستخراج فاز جامد مایع یونی پخشی (D-IL-µ-SPE) بر اساس طیف‌سنجی جذب اتمی الکتروترمال استفاده شد (شکل۱). از یک میلی‌لیتر از نمونه خون و سرم بعد از رقیق‌سازی با ۹ میلی‌لیتر آب دوبار یونیزه به عنوان نمونه خون استفاده شد. پارامترهای موثر در استخراج مانند pH، مقدار جاذب و مایع یونی، حجم نمونه، سایز نانو جاذب، حجم وغلظت مایع در استخراج برگشتی، زمان اولتراسونیک و سانتریفوژ، و تاثیریون‌های مزاحم در استخراج مورد بررسی و بهینه قرار گرفت.



شکل۱- میکرو- استخراج فاز جامد مایع یونی-پخشی با التراسوند (USA-D-IL-µ-SPE)

نتایج

گرافن در pH =۴-۵ ، جذب سرب را انجام می‌دهد و توسط مایع یونی ۱-متیل-۳-اکتیل-ایمیدازولیوم-هگزافلروفسفات از نمونه خون یا سرم بعد از سانتری فیوژ جدا سازی می‌گردد. سرانجام، با استفاده از اسید نیتریک یک مولار استخراج برگشتی (back extraction) سرب از ترکیب گرافن- مایع یونی انجام شده و غلظت سرب در مایع بدست آمده توسط طیف‌سنجی جذب اتمی با تکنیک کوره گرافیتی تعیین می‌شود.

آمار پارامترهای بهینه شده مختصرا در جدول ۱ آماده است.

تحت شرایط بهینه، حد تشخیص روش و حد کمی روش برای سرب به ترتیب ۰.۰۵میکروگرم‌برلیتر و۰.۱۵ میکروگرم‌برلیتر بود. ظرفیت جذب نانوجاذب گرافن برای سرب ۱۴۸.۸ میلی گرم‌برگرم بود. فاکتور پیش‌تغلیظ برای سرب ۱۹.۷ محاسبه شد. برای ۱۰ میلی‌لیتر از استاندارد سرب در شرایط بهینه، محدوده خطی ۷.۳-۰.۱۵ میکروگرم‌برلیتر بدست آمد. (جدول ۲) این روش با موفقیت به شناسایی و تعیین سرب در نمونه‌های خون و سرم بیماران مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم با دقت نتایج مناسب (RSD= ٪۵) و بازیابی ٪۹۵ انجام شد. اعتبارسنجی روش نیز با مواد مرجع استاندارد در خون (CRM) انجام شد. میانگین سرب خون در بیماران وافراد سالم به ترتیب ۸۷.۵۴±۸.۴۳ و ۷.۲۳±۱.۱۲ برای سنین ۲۵-۵۰ سال بدست آمد (برای ارقام شایستگی به جدول ۲ مراجعه شود).

جدول ۱- آمار بهینه‌سازی پارامترها و نتایج در یک نگاه

pH	۴ تا ۵
مقدار نانوجاب گرافن	۲۰ میلی‌گرم
مقدار مایع یونی	۰.۱۵میلی‌گرم
حجم نمونه	۱۰ میلی‌لیتر
مقدار محلول شست و شو	۲۵۰میکرولیتر
چرخش محلول	۵ دقیقه
دما	دمای اتاق

جدول ۲- ارقام شایستگی

پارامتر	مقدار تجزیه‌ای
محدوده خطی	۰.۱۵-۷.۳ µg/L
حد تشخیص	۰.۰۵ میکروگرم بر لیتر
دقت	RSD≤ 5%
فاکتور پیش تغلیظ	۱۹.۷ میکروگرم بر لیتر
بازیابی	٪۹۵

در نتایج بررسی میزان فلز با روش میکرواستخراج فاز جامد-مایع یونی با موارد مرجع استاندارد نشان از ریکاوری بالای ٪۹۵ دارد.

پس جداسازی فلز از خون و سرم با US-D-IL-µ-SPEو سنجش با طیف‌سنجی جذب اتمی الکتروترمال، این سنجش با MicroWave انجام شد که تفاوت قابل‌توجهی بین نتایج روش‌های سنجش مشاهده نشد. همچنین میزان سرب در بیماران MS نسبت به افراد سالم بیشتر گزارش شد.

ریکاوری نمونه‌های اسپایک شده با موارد مرجع استاندارد رضایت بخش بوده است.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه از روشی ساده، سریع، قابل اعتماد، حساس، دقیق و ارزان برای استخراج، سنجش و تعیین سرب نمونه خون بیماران Mنمونه و کاهش زمان جداسازی (بدون فیلترینگ) و بدون از د Sو افراد سالم، استفاده شده است. این روش مبتنی بر تکنیک استخراج روش میکرواستخراج فاز جامد مایع یونی پخشی به کمک التراسوند صورت گرفت. برای اندازه‌گیری سرب از دستگاه‌های اسپکتروسکوپی جذب اتمی الکتروترمال با کوره گرافیتی استفاده شد. از مایع یونی به عنوان عامل عامل جداکننده جاذب گرافنی .استفاده شد. این روش باعث تسریع در آماده‌سازی ست دادن جاذب می‌شود.

نتیجه گیری کلی

نتایج این مطالعه نشان داد که روش به کار رفته بر اساس نانو گرافن و میکرواستخراج فاز جامد مایع یونی پخشی ،روشی ساده، دقیق و کارآمد برای اندازه‌گیری سرب در سلول‌های خون و سرم بیماران است و فقط به مقدار کمی از نمونه (1ml) نیاز دارد. بعنوان جایگزینی در سنجش سرب در مایعات بیولوژیک انسانی پیشنهاد می‌شود.

همچنین می‌توان از این نانو ذره در حذف سمیت سرب در بدن انسان بصورت بستر ثابت استفاده نمود.

منابع

1. Pratush A, Kumar A, Hu ZJIM. Adverse effect of heavy metals (As, Pb, Hg, and Cr) on health and their bioremediation strategies: a review. 2018;21(3):97-106.
2. Hänninen H, Aitio A, Kovala T, Luukkonen R, Matikainen E, Mannelin T, et al. Occupational exposure to lead and neuropsychological dysfunction. 1998;55(3):202-9.
3. Tsai C-P, Lee CT-CJPO. Multiple sclerosis incidence associated with the soil lead and arsenic concentrations in Taiwan. 2013;8(6):e65911.
4. Johnson SJMh. The possible role of gradual accumulation of copper, cadmium, lead and iron and gradual depletion of zinc, magnesium, selenium, vitamins B2, B6, D, and E and essential fatty acids in multiple sclerosis. 2000;55(3):239-41.
5. Adetayo A, Runsewe DJOJoCM. Synthesis and Fabrication of Graphene and Graphene Oxide: A Review. 2019;9(02):207.
Dehghanifiroozabadi M, Noferesti P, Amirabadizadeh A, Nakhaee S, Aaseth
6. J, Noorbakhsh F, et al. Blood lead levels and multiple sclerosis: A case-control study. 2019;27:151-5.
7. Buser MC, Ingber SZ, Raines N, Fowler DA, Scinicariello F. Urinary and blood cadmium and lead and kidney function: NHANES 2007-2012. International journal of hygiene and environmental health. 2016;219(3):261-7.