

اندازه گیری اسپکتروفتومتری سلیوم در جلبک اسپیرولینا با استفاده از معرف دی آمینوتولون

مسعود محمدی، محمد هادی گیویان*

گروه شیمی، واحد علوم تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۰۰/۰۳/۱۲

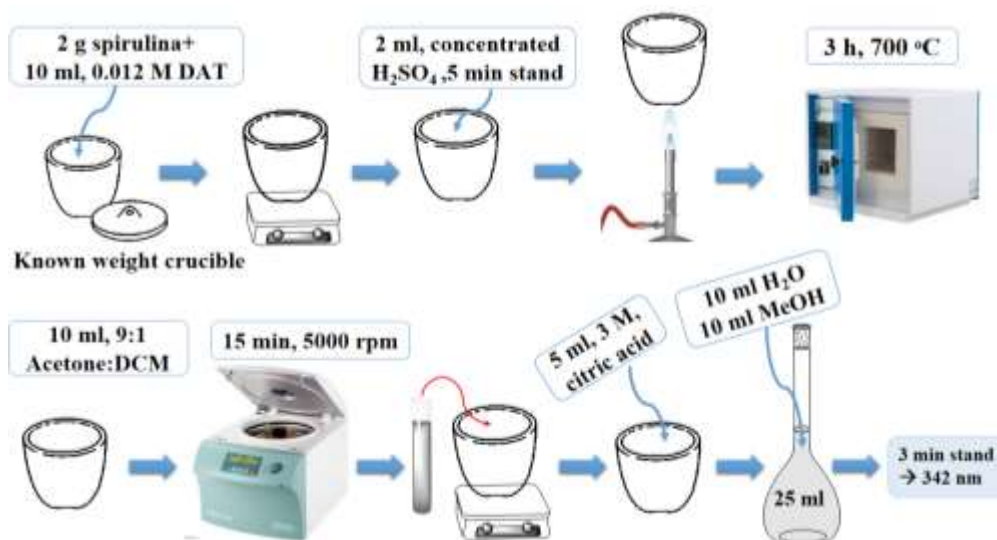
تاریخ تصحیح: ۰۰/۰۷/۱۷

تاریخ پذیرش: ۰۰/۰۸/۲۲

چکیده

با توجه به پیشرفت علم و تکنولوژی در حوزه سلامت و پزشکی از سلیوم به عنوان یک آنتی اکسیدان بسیار عالی در جلوگیری از رشد سرطانها و حتی کمک در فرآیند رشد سلولی یاد می شود. در بیشتر کشورها، غذاهای گیاهی به عنوان منبع اصلی سلیوم می باشد. از بین این منابع گیاهی می توان به نوعی جلبک سبز-آبی از شاخه سیانوباکترها اشاره کرد که به جلبک اسپیرولینا معروف می باشد. اسپیرولینا می تواند علاوه بر تامین سلیوم مورد نیاز بدن، یک منبع عالی پروتئین، مواد معدنی، ویتامین ها، اسیدهای آمینه ضروری و ... باشد. مقدار مورد نیاز بدن از سلیوم مشخص می باشد و افزایش بیش از حد آن در بدن ایجاد سمیت می کند، این امر لزوم توجه به اندازه گیری دقیق سلیوم را دوچندان می کند. معمولا این اندازه گیری ها با روش های پرهزینه و طولانی مدتی مانند ICP-AES انجام می شود. لذا در این مطالعه از یک لیگاند اختصاصی بسیار مناسب (Diaminotoluene) برای سلیوم با هزینه تامین پایین و دسترسی بالا و با استفاده از تکنیک دستگاهی ساده، کم هزینه و سریع طیف سنجی نوری فرابنفش - مرئی استفاده نمودیم. نتایج حاصل از اعتبار سنجی روش تجزیه ای حکایت از آن داشت که این روش از کارایی مناسب برای جایگزینی با روش های پرهزینه مانند ICP-AES را دارا می باشد. همچنین روش بکار گرفته شده کلیه پارامترهای لازم برای اعتبار سنجی روش را تامین می کند.

کلمات کلیدی: سلیوم (IV)، دی آمینو تولون، اسپیرولینا، طیف سنجی نوری فرابنفش مرئی، اعتبار سنجی روش.



شکل ۱- چکیده تصویری اندازه گیری اسپکتروفتومتری سلیوم در جلبک اسپیرولینا با استفاده از معرف دی آمینوتولون.

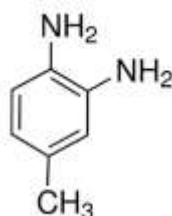
۱- مقدمه

سلیوم به عنوان یک عنصر کمیاب ضروری می باشد. این عنصر دارای خواص دارویی متعددی (آنتی اکسیدان، فعالیت های ضد توموری و افزایش ایمنی) است که در بیولوژی، سلامت و پیشگیری از انواع بیماری ها اهمیت دارد [۱ و ۲]. محتوای سلیوم موجود در بدن انسان با اتصال به بافت های پروتئینی به طور گسترده ای پخش می شود. کمبود سلیوم باعث چندین عارضه باروری و زایمانی از جمله ناباروری زنان و مردان، سقط جنین، محدودیت رشد جنین، زایمان زودرس، دیابت بارداری و ... می شود [۳-۵]. مطالعات اخیر نشان می دهد که مکمل سلیوم در رژیم های غذایی ممکن است خطر ابتلا به سرطان را کاهش دهد. مکمل سلیوم برای بیمارانی که تحت پاتولوژی های مختلف قرار دارند ضروری است زیرا سلیوم یک جز ساختاری در مرکز فعال آنزیم گلوکوتایون پراکسیداز (GSH-Px) است که با فعالیت محافظتی در برابر رادیکال های آزاد مرتبط است [۶ و ۷]. اگرچه سلیوم برای زندگی ضروری است، اما مقدار اضافی آن که از طریق مواد غذایی یا دارویی تامین می شود سمی است و برای سلامتی انسان خطرناک است. اثرات پوستی، مانند ریزش ناخن و مو پس از قرار گرفتن در معرض سطوح بالای سلیوم رخ می دهد [۸-۱۰]. مکمل سلیوم با استفاده از میکروارگانیزم ها در دهه گذشته بسیار مورد توجه قرار گرفته است. انواع محصولات بیولوژیکی غنی شده با سلیوم مانند سیر، مخمر و باکتری های اسید لاکتیک به عنوان مکمل های غذایی تولید و تجاری شده اند [۱۱].

اسپیرولینا یک ریز جلبک سبز آبی از خانواده سیانوباکتريا به شکل یک سیم ماریچ است که در دریا و در آب شیرین زندگی می کند. اسپیرولینا به دلیل دارا بودن مقدار زیادی پروتئین و سایر عناصر غذایی به عنوان محصول غذایی کاربردی مورد استفاده گسترده قرار گرفته است [۱۲ و ۱۳]. مطالعات درون و برون تن نشان می دهد که اسپیرولینا منبع مهمی از فایکوسیانین (PC)، یک رنگدانه فتوسنتزی آبی با فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی قوی است که از آن برای درمان آزمایشی بیماری آلزایمر، پارکینسون و پیشگیری از سرطان های دهان و پوست استفاده شده است [۱۴]. با توجه به مزیت های اسپیرولینا امروزه غنی سازی اسپیرولینا با سلیوم به عنوان مکمل غذایی برای انسان و به عنوان افزودنی خوراک در بسیاری از حیوانات بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از طرفی سمیت سلیوم و لزوم اندازه گیری کمی دقیق و صحیح آن دانشمندان را به ارائه روش آنالیز سریع و آسان سوق می دهد [۱۵ و ۱۶].

روش های مختلفی برای تعیین سلیوم IV در دسترس است از جمله طیف سنجی جذب اتمی [۱۷]، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا [۱۰]، الکتروفورز مویین [۱۸] و ... این روش ها محدودیت هایی دارند، از جمله: زمان زیاد آماده سازی نمونه، اپراتور ماهر، دستگاهوری گران، تنظیم ابزار سخت، تعمیر و نگهداری پر هزینه و ... [۱۹-۲۲].

در این تحقیق با استفاده از لیگاند دی آمینو تولوئن (شکل ۲) روشی برای آنالیز کمی سلیوم با دستگاه طیف سنج نوری فرابنفش-مرئی ارائه شده است. پارامترهای آنالیز بهینه‌سازی شده و روش آنالیز معتبرسازی شده است. روش ارائه شده مزیت-های زیادی را نسبت به روش‌های گزارش شده نشان می‌دهد از جمله این مزیت‌ها به ارزان و ساده بودن روش آنالیز، اندازه-گیری در دمای اتاق، استفاده از حجم حلال آلی کم می‌توان اشاره کرد.



شکل ۲- ساختار شیمیایی دی آمینو تولوئن

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی و معرف‌های مورد استفاده

۴۲-دی آمینوتولوئن، سیتریک اسید، سولفوریک اسید ۹۶٪، نیتریک اسید ۶۵٪، هیدروکلریک اسید با درجه خلوص "معرف تجزیه‌ای" از شرکت مرک آلمان خریداری و بدون خالص سازی بیشتر استفاده شد. محلول استاندارد سدیم سولنیت، محلول استاندارد سدیم سانات با غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر تهیه و سایر محلول‌های استاندارد مورد نیاز از آن تهیه گردید.

۲-۲- نمونه دارویی

جلبک اسپرولینا از شرکت تحقیقاتی آراین گستر تهیه گردید.

۲-۳- حلال‌های مورد استفاده

حلال‌های متانول، استون و دی کلرو متان بکار رفته، از شرکت مرک خریداری شدند. برای تهیه محلول‌ها از آب فیلتر شده و یون زدایی شده توسط دستگاه Milli-Q مربوط به شرکت Millipore استفاده گردید.

۲-۴- دستگاه‌های مورد استفاده

کلیه مطالعات کمی با دستگاه طیف‌سنجی نوری فرابنفش مرئی دو پرتوی (SHIMADZU -UV 1800) با سل کوارتز انجام شد. برای آماده سازی محلول‌های مورد نیاز از دستگاه‌های: ترازوی دیجیتال با خوانش ۰/۱ میلی گرم (Mettler Toledo ME204)، دستگاه pH متر (Mettler Toledo)، همزن و رتکس (HEIDOLPH)، سانتیفریوژ (Sigma) استفاده شد. در تمام فرآیند نمونه سازی از شیشه آلات دارای مدارک کالیبراسیون استفاده گردید.

۲-۵- بررسی مزاحمت‌های طیفی و حداکثر طول موج جذبی واکنشگر DAT و کمپلکس آن با سلنیوم (IV)

قبل از شروع به بهینه سازی شرایط آزمایش تست‌های اولیه انجام گردید که به شرح ذیل می‌باشد.

۲-۵-۱- تعیین طول موج جذبی DAT: به یک بالن حجمی ۲۵ میلی‌لیتری، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول DAT، ۰/۰۱۲ مولار منتقل شد و با آب به حجم رسانده شد.

۲-۵-۲- تعیین طول موج جذبی DAT در محیط اسیدی: به یک بالن حجمی ۲۵ میلی‌لیتری، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول DAT، ۰/۰۱۲ مولار و ۵ میلی‌لیتر محلول سیتریک اسید ۳ مولار منتقل شد و با آب به حجم رسانده شد.

۲-۵-۳- بررسی تداخل اسید با سلنیوم (IV): به یک بالن حجمی ۲۵ میلی‌لیتری، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر محلول سلنیوم (IV) ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۵ میلی‌لیتر محلول سیتریک اسید ۳ مولار منتقل شد و با آب به حجم رسانده شد.

۲-۵-۴- تعیین تشکیل کمپلکس در محیط خنثی: به یک بالن حجمی ۲۵ میلی‌لیتری، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول DAT ۰/۰۱۲ مولار و ۱۰ میلی‌لیتر محلول سلنیوم (IV) ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر منتقل شد و با آب به حجم رسانده شد.

۲-۵-۵- تعیین تشکیل کمپلکس در محیط اسیدی: به یک بالن حجمی ۲۵ میلی‌لیتری، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول DAT ۰/۰۱۲ مولار، ۱۰ میلی‌لیتر محلول سلنیوم (IV) ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۵ میلی‌لیتر محلول سیتریک اسید ۳ مولار منتقل شد.

۲-۵-۶- بررسی مزاحمت پیک جذبی سلنیوم (VI): به یک بالن حجمی ۲۵ میلی‌لیتری، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول DAT ۰/۰۱۲ مولار و ۱۰ میلی‌لیتر محلول سلنیوم (VI) ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۵ میلی‌لیتر محلول سیتریک اسید ۳ مولار منتقل شد.

هر کدام از محلول‌های مندرج فوق پس از تهیه شدن به مدت ۳ دقیقه در شرایط محیط آزمایشگاه نگهداری شدند، سپس دامنه طیفی هر کدام از آنها با استفاده از دستگاه طیف سنجی نوری فرابنفش- مرئی و یک سل کوارتزی در گستره ۲۰۰-۴۰۰ nm گرفته شد. از آب فیلتر شده و یون زدایی شده به عنوان شاهد استفاده گردید.

۲-۶- پارامترهای اساسی روش و بهینه سازی آن‌ها

۲-۶-۱- بهینه سازی نوع محیط اسیدی

به منظور بررسی چگونگی اثر pH بر روی میزان جذب روش ارائه شده، به بالن‌های ۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر DAT، ۰/۰۱۲ مولار و ۱۰ میلی‌لیتر محلول سلنیوم (IV) ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۵ میلی‌لیتر از اسیدهای مختلف (سیتریک اسید، هیدروکلریک اسید، فسفریک اسید، اسید سولفوریک و استیک اسید) با غلظت ۵ مولار اضافه گردید. بعد از گذشت ۳ دقیقه جذب هر کدام از محلول‌های تهیه شده در طول موج بیشینه ۳۴۲ nm نسبت به شاهد خوانده شد.

۲-۶-۲- بهینه سازی غلظت اسید

در این مرحله بهینه سازی، غلظت اسید سیتریک (که در مرحله اول بهینه شده)، مطابق روش ارائه شده در زیر بررسی گردید. به بالن‌های ۲۵ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر DAT ۰/۰۱۲ مولار و ۱۰ میلی‌لیتر محلول سلیوم (IV) ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۵ میلی‌لیتر از سیتریک اسید با غلظت ۱ تا ۵ مولار اضافه گردید. جذب هر کدام از محلول‌های تهیه شده بعد از گذشت ۳ دقیقه در طول موج بیشینه ۳۴۲ nm نسبت به شاهد خوانده شد.

۲-۶-۳- بهینه سازی مقدار واکنشگر DAT

به بالن‌های حجمی ۲۵ میلی‌لیتری ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر محلول سلیوم ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۵ میلی‌لیتر محلول سیتریک اسید ۳ مولار انتقال داده شد و سپس ۵ میلی‌لیتر از محلول DAT با غلظت‌های ۰/۰۰۱ تا ۰/۰۲ مول بر لیتر اضافه شد. پس از ۳ دقیقه (حداقل مدت زمان لازم برای تکمیل فرآیند) جذب هر یک از محلول‌های فوق در طول موج ۳۴۲ nm نسبت به شاهد خوانده شد.

۲-۶-۴- بهینه سازی اثر زمان بر تشکیل و پایداری کمپلکس

در یک بالن حجمی ۲۵ میلی‌لیتری مقدار ۱۰ میلی‌لیتر محلول سلیوم (IV) ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۵ میلی‌لیتر محلول سیتریک اسید ۳ مولار و ۱۰ میلی‌لیتر از محلول DAT ۰/۰۱۲ مولار منتقل شد. جذب این محلول در طول موج ۳۴۲ nm نسبت به شاهد در زمان‌های ۳۰ ثانیه تا ۱۵ دقیقه خوانده شد. برای اطمینان از پایداری محلول پس از ۷۲ ساعت نیز جذب محلول قرائت گردید.

۲-۷-۱- اعتبارسنجی روش

۲-۷-۱-۱- خطی بودن روش

به منظور رسم منحنی کالیبراسیون از استاندارد سلیوم (IV) با غلظت‌های متفاوت (۵ تا ۶۰ ppm) تهیه و جذب هر یک از آن‌ها طبق روش ذکر شده، خوانده شد سپس منحنی جذب بر حسب غلظت رسم گردید.

۲-۷-۲- حد تشخیص (LOD) و حد کمی بودن (LOQ)

این پارامترها با استفاده از نتایج منحنی کالیبراسیون و فرمول‌های زیر به دست می‌آید.

$$LOQ = 10 * S_{x/y} / \text{slope} , \quad LOD = 3.3 * S_{x/y} / \text{slope} (LOD)$$

۲-۷-۳- صحت

صحت روش ارائه شده توسط آماده سازی سه نمونه استاندارد با غلظت‌های حداقل، میانی و حداکثر منحنی کالیبراسیون و نمونه استاندارد حاوی ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر سلیوم (IV) بررسی گردید. این نمونه‌ها سه بار و در روزهای مختلف اندازه‌گیری شدند.

۲-۷-۴ دقت

دقت متوسط روش Intermediate precision تکرارپذیری repeatability و تجدید پذیری reproducibility نمونه توسط سه بار خوانش در سه غلظت متفاوت از نمونه بررسی گردید.

۲-۸- روش هضم و تعیین مقدار سلنیوم (IV) در نمونه ریزجلبک اسپیرولینا به روش طیف سنجی نوری فرابنفش-

مرئی

کروزهایی که قبلاً وزن آن‌ها تعیین شده بود را برداشته و به هر یک ۲ گرم از نمونه ریز جلبک آسیاب شده که حاوی به ترتیب ۰، ۴۰ و ۶۰ ppm سلنیوم (IV) می‌باشد، اضافه گردید. ۱۰ میلی لیتر از محلول DAT ۰/۰۱۲ توسط پیپت حجمی به داخل محلول نمونه اضافه شد. پس از تبخیر حلال محلول DAT، به کروزه ۲ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه می‌کنیم. حدود ۵ دقیقه ظروف را به حالت خود گذاشته و اجازه می‌دهیم تا نمونه خوب با اسید واکنش دهد (رنگ نمونه کاملاً تیره خواهد شد). سپس کروزه را بر روی شعله مستقیم آتش قرار داده و این کار را تا جایی ادامه می‌دهیم که هیچ گونه دوده ای از ظرف خارج نشود.

در مرحله بعد کروزه‌ها را در کوره الکتریکی با دمای ۷۰۰ درجه سانتی گراد قرار می‌دهیم. پس از گذشت ۳ ساعت نمونه‌ها از کوره خارج و در شرایط آزمایشگاه قرار داده می‌شود تا با محیط آزمایشگاه هم دما شوند. ۱۰ میلی لیتر محلول استخراج (شامل ۱ حجم دی کلرومتان و ۹ حجم استون) توسط پیپت حجمی به داخل محلول نمونه اضافه می‌شود که نمونه بصورت کاملاً کلوئیدی در می‌آید. پس از سانتریفیوژ نمونه (۱۵ دقیقه با دور ۵۰۰۰)، بخش محلول شفاف که شامل سلنیوم (IV) می‌باشد، به کروزه انتقال داده شده و با دمای کم خشک می‌گردد. ۵ میلی لیتر محلول سیتریک اسید ۳ مولار به کروزه اضافه کرده و محتویات کروزه را به بالن منتقل می‌کنیم. سپس ۱۰ میلی لیتر آب و ۱۰ میلی لیتر متانول نیز به آن اضافه می‌کنیم. پس از هم زدن با همزن ورتکس، ۳ دقیقه برای تکمیل فرآیند واکنش زمان می‌دهیم. پس از مدت زمان انجام واکنش جذب نمونه در مقابل شاهد در طول موج ۳۴۲nm قرائت می‌شود [۲۶-۲۳].

۳- بحث و نتیجه گیری

۳-۱- بررسی مزاحمت‌های طیفی و حداکثر طول موج جذبی واکنشگر DAT و کمپلکس آن با سلنیوم (IV)

وجود دو گروه عاملی آمینی که می‌توانند نقش بازی را در محیط آبی ایفا نمایند ما را بر این می‌دارد که واکنشگر DAT را در شرایط اسیدی برای واکنش تشکیل کمپلکس بررسی نماییم. این بررسی‌ها نشان می‌دهد که وجود شرایط اسیدی باعث جا به جایی طول موج حداکثر جذب واکنشگر به طرف طول موج‌های پایینتر (Blue Shift) می‌شود. طول موج بیشینه جذب واکنشگر

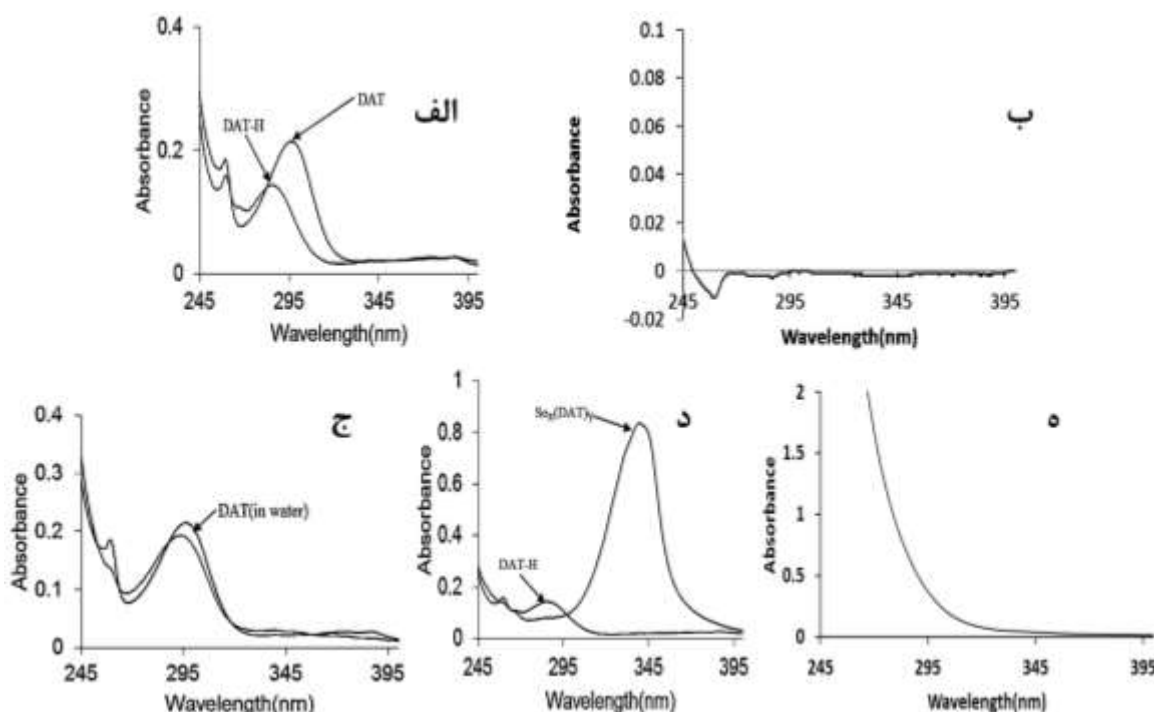
DAT در آب ۳۰۰ نانومتر می‌باشد که در شرایط اسیدی به طول موج حداکثر جذب ۲۷۵ نانومتر جا به جا می‌شود و در مقایسه از شدت جذب کاسته می‌شود (شکل ۳-الف).

تشکیل کمپلکس در محیط اسیدی صورت می‌گیرد بنابراین لازم است که اثر تداخلی احتمالی واکنش سلیوم (IV) و سیتريک اسید مورد مطالعه قرار گیرد. شکل ۳-ب به وضوح نشان می‌دهد که ترکیب سلیوم (IV) و سیتريک اسید هیچ گونه برهمکنشی با یکدیگر در ناحیه جذبی مورد مطالعه ندارند.

برای بررسی امکان تشکیل کمپلکس، سلیوم (IV) در دو محیط مختلف به آنالیت واکنشگر DAT افزوده شد. مشاهدات نشان می‌دهد در محیط خنثی هیچگونه تغییر طیفی بر روی طیف واکنشگر رخ نمی‌دهد (شکل ۳-ج) اما در حضور سیتريک اسید یک قله جذبی نسبتاً شدید در طول موج ۳۴۲ نانومتر پدیدار می‌گردد که دلیلی بر تشکیل کمپلکس می‌باشد (شکل ۳-د).

همینطور در این شکل عدم تداخل طیف واکنشگر و طیف کمپلکس به وضوح نشان داده شده است که از نقاط قوت این روش می‌باشد (شکل ۳-ه).

موضوع دیگر بررسی واکنش احتمالی واکنشگر DAT با گونه‌ی دیگر سلیوم در حالت اکسیداسیون بالاتر می‌باشد. طیف مربوط به محلول سلیوم (VI)-DAT در شرایط اسیدی نسبت به شاهد آب نشان می‌دهد که هیچ ترکیبی با بیشینه جذب در ۳۴۰ نانومتر تشکیل نمی‌شود (شکل ۳-و).



شکل ۳-الف: طیف جذبی واکنشگر DAT در محیط اسیدی و آبی، ب: اثر تداخلی احتمالی واکنش سلیوم (IV) و سیتريک اسید، ج: طیف جذبی واکنشگر DAT و طیف جذبی واکنشگر + سلیوم (IV) در محیط آبی، د: طیف جذبی واکنشگر DAT و طیف جذبی واکنشگر + سلیوم (IV) در محیط اسیدی، ه: طیف جذبی واکنشگر + سلیوم (VI) در محیط اسیدی

۲-۳- بهینه سازی روش به کار رفته

۲-۳-۱- بهینه سازی نوع محیط اسیدی

این آزمایش به منظور انتخاب شرایط بهینه محیط اسیدی که بتواند در درجه اول بر اجزا دیگر حداقل مزاحمت را داشته باشد و در درجه دوم اسیدیته محلول را تثبیت کند، انجام گرفت. همانطور که در شکل ۴-الف مشاهده می شود در شرایط یکسان، جذب مربوط به کمپلکس در شرایطی که از سیتریک اسید به عنوان عامل اسیدی کننده استفاده شده از سایر گونه ها بیشتر است. این نتایج نشان می دهد سیتریک اسید از نظر تامین اسیدیته بهینه و مزاحمت ماتریکسی نمونه نسبت به سایر محیط های اسیدی عملکرد بهتری داشته است از همین رو از سیتریک اسید به عنوان عامل اسیدی کننده بهینه روش در سایر مراحل آنالیز استفاده گردید [۲۷ و ۲۸].

۲-۳-۲- بهینه سازی غلظت اسید

همچنین مطابق شکل ۴-ب تغییرات غلظت اسید در بازه ۱ تا ۵ مولار نشان می دهد که جذب به طور معنی داری تا غلظت ۳ مولار افزایش می یابد و در مقادیر pH با غلظت بالاتر از ۳ ثابت می ماند. این افزایش معنی دار نشان دهنده افزایش غلظت اسید تا رسیدن به غلظت بهینه و ماکزیمم جذب کمپلکس Se(IV)-DAT می باشد. از این رو اسید سیتریک ۳ مولار به عنوان عامل اسیدی کننده در سایر مراحل آزمایش مورد استفاده قرار می گیرد [۲۹ و ۳۰].

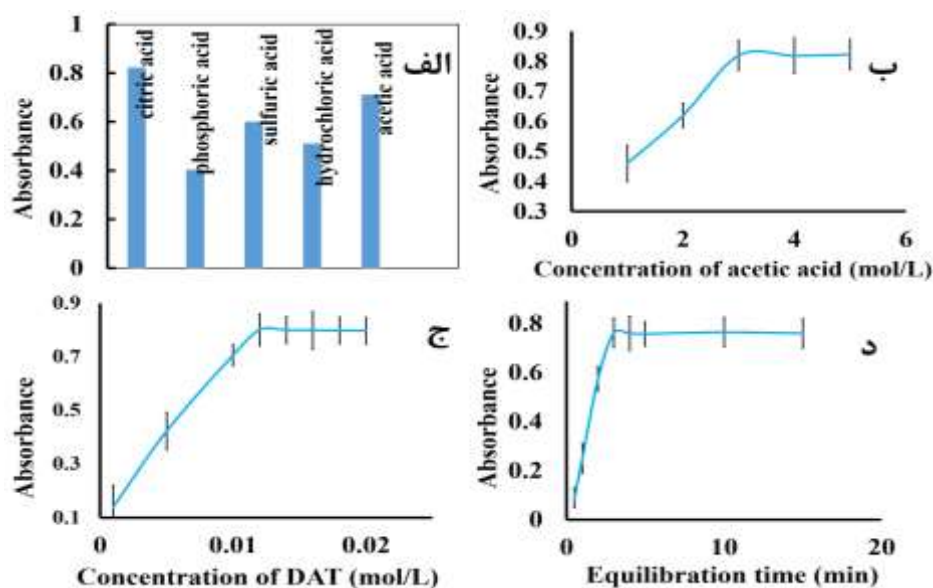
۲-۳-۳- بهینه سازی مقدار واکنشگر DAT

بطور کلی در یک فرآیند تشکیل کمپلکس، غلظت واکنشگرها برای حصول بیشترین راندمان حائز اهمیت است. به عبارت دیگر باید غلظت واکنشگرها به گونه ای باشد که با عامل محدود کننده تشکیل کمپلکس مواجه نباشیم. به همین خاطر معمولاً غلظت گونه محدود کننده بصورت اضافی در نظر گرفته می شود. ولی این مقدار اضافی می تواند در ماتریس نمونه اختلال ایجاد کند. لذا دانستن مقدار بهینه از عامل محدود کننده که در اینجا غلظت واکنشگر DAT می باشد دارای اهمیت است. از شکل ۴-ج نتیجه می شود که ماکزیمم جذب برای کمپلکس Se(IV)-DAT در غلظت مصرفی ۰/۱۲ مول بر لیتر از محلول واکنشگر DAT به دست می آید و مقدار اضافی این واکنشگر اثر نامطلوبی بر واکنش تشکیل کمپلکس نمی گذارد [۳۰].

۲-۳-۴- بهینه سازی اثر زمان بر تشکیل و پایداری کمپلکس

یکی از پارامترهای مهم و تعیین کننده در دستیابی به حداکثر جذب، یافتن مدت زمان لازم برای کامل شدن واکنش تشکیل کمپلکس و پایداری کمپلکس در طول زمان انجام آزمایش می باشد. برای این منظور محلولی از سلنیوم (IV) و واکنشگر DAT در شرایط بهینه تهیه شد و جذب آن در زمان های ۰/۵ تا ۱۵ دقیقه بررسی گردید. از شکل ۴-د نتیجه گیری می شود که جذب

کمپلکس پس از ۳ دقیقه به بیشترین مقدار خود رسیده و این بدین معناست که واکنش کامل شده است و پس از آن به مدت طولانی (سه روز) پایدار می ماند.



شکل ۴- الف: بهینه سازی نوع محیط اسیدی، ب: بهینه سازی غلظت اسید ج: بهینه سازی مقدار واکنشگر DAT د: بهینه سازی اثر زمان بر تشکیل و پایداری کمپلکس

۳-۳-۳- معتبرسازی روش

۱-۳-۳- خطی بودن روش

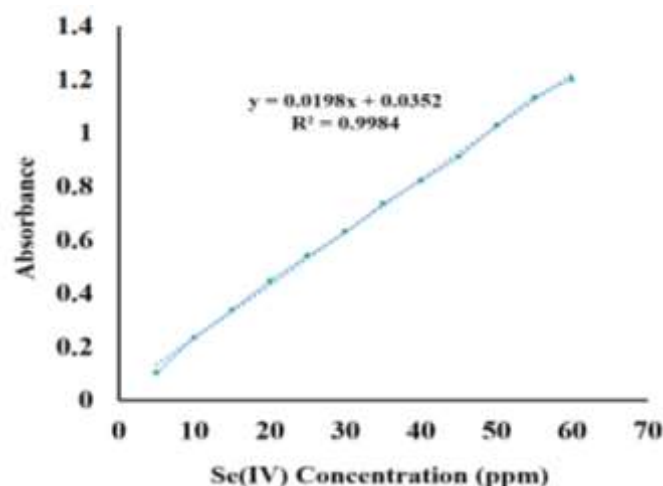
برای اندازه گیری میزان انحراف پاسخها در روش طیفسنجی نوری فرابنفش مرئی و همچنین تعیین مقدار کمی و برقراری رابطه جذب با غلظت در قانون بیر-لامبرت، ضروری است که گستره خطی بودن روش مورد بررسی قرارگیرد.

برای این منظور، محلول هایی از استاندارد سلیوم با غلظت های متفاوت (۵ تا ۶۰ ppm) تهیه و جذب هر یک از آنها طبق روش ذکر شده، خوانده شد. از منحنی شکل ۵ مشاهده می شود که تغییرات جذب بر حسب غلظت، خطی و از قانون بیر-

لامبرت ($A = \epsilon bC$) پیروی می کند.

از منحنی کالیبراسیون اطلاعات ذیل حاصل می شود.

شیب منحنی: ۰/۰۱۹۸، عرض از مبدا: ۰/۰۳۵۲، انحراف استاندارد خط کالیبراسیون ($S_{y/x}$): ۰/۰۱۵۰



شکل ۵- بررسی گستره خطی کمپلکس DAT-(IV)

۳-۳-۲- حد تشخیص (LOD) و حد کمی بودن (LOQ)

با توجه به نتایج استخراج شده از منحنی کالیبراسیون مقدار حد تشخیص (LOD) از فرمول $LOD = 3.3 * S_{x/y} / \text{slope}$ و حد

کمی بودن (LOQ) از فرمول $LOQ = 10 * S_{x/y} / \text{slope}$ ، به ترتیب ۲/۵۰۴ ppm و ۷/۵۸۸ ppm به دست می آید.

۳-۳-۳- صحت

صحت روش ارائه شده توسط آماده سازی سه نمونه در غلظت های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ ppm و یک نمونه استاندارد حاوی ۴۰ ppm سelenium (IV) بررسی گردید. جدول شماره ۱ نتایج حاصل از بررسی صحت توسط روش ارائه شده در روزهای مختلف را نمایش می دهد. با توجه به این نتایج و ریکاوری بالای ۹۰٪ می توان گفت روش از صحت خوبی برخوردار می باشد.

جدول ۱. بررسی صحت روش ارائه شده برای اندازه گیری سelenium (VI)

sample	Se(IV) added (mg/L)	Se(IV) found (mg/L)	Recovery (%)
Solution	10.00	9.70	96.99 ± 1.30
Solution	30.00	28.83	96.1 ± 0.89
Solution	50.00	47.69	95.38 ± 1.02
STD sample	40.00	37.61	94.18 ± 1.65

۳-۳-۴- دقت

برای اطمینان از دقت روش ارائه شده، جذب سه غلظت متفاوت در سه روز مختلف (دقت متوسط روش Intermediate precision، در یک روز و سه غلظت متفاوت) (تکرارپذیری repeatability) و سه نمونه توسط دو آنالیزست بررسی گردید (تجدید پذیری reproducibility). نتایج حاصل از این آزمایش ها در جدول شماره ۲ دقت خوب روش ارائه شده را

نمایش می‌دهد.

جدول ۲. بررسی دقت روش ارائه شده برای اندازه‌گیری سلیوم (VI)

Se (mg/L)	Intermediate precision, RSD (%)			Repeatabilit, RSD (%)	Reproducibility, RSD (%)	
	1 st day	2 nd day	3 rd day	Same day	Analist 1	Analist 2
10	2.23	2.28	2.32	2.29	2.23	2.31
30	1.31	1.29	1.59	1.67	1.65	1.78
50	1.17	1.3	1.16	1.39	1.45	1.37

۳-۴- تعیین مقدار سلیوم (IV) در نمونه ریز جلبک اسپیرولینا به روش طیف سنجی نوری فرابنفش-مرئی و مقایسه با روش‌های استاندارد

سلیوم به صورت کمی در جلبک اسپیرولینا توسط دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد و نتایج حاصله به صورت آماری با نتایج حاصل از طیف سنجی نوری فرابنفش-مرئی مقایسه گردید. با توجه به نتایجی که در جدول شماره ۳ ارائه شده است، در اندازه گیری محتوای سلیوم موجود در اسپیرولینا با دو دستگاه تفاوت معنا داری وجود ندارد.

جدول ۳. اندازه‌گیری سلیوم (IV) در اسپیرولینا توسط دستگاه uv-vis و GF-AAS

Concentration of Se (mg/L)	GF-AAS	UV-Vis
0.00	0.012 ± 0.004	< LQ
40.00	7.680 ± 2.769	5.015 ± 2.289
60.00	17.849 ± 3.391	19.971 ± 2.767

۴-نتیجه‌گیری

در این پژوهش، با استفاده از لیگاند دی آمینو تولوئن و دستگاه طیف‌سنجی نوری فرابنفش مرئی یک روش برای اندازه گیری سلیوم (IV) در جلبک اسپیرولینا ارائه شده است. پارامترهای: نوع و غلظت اسید، غلظت واکنشگر و زمان واکنش بهینه شدند. در شرایط بهینه روش با پارامترهای بررسی گستره خطی، تعیین حد تشخیص و حد کمی بودن، صحت، دقت متوسط، تکرار پذیری و تجدیدپذیری معتبرسازی شدند. در انتها روش ارائه شده با روش GF-AAS مقایسه شد که نتایج تفاوت معنی داری بین روش ارائه شده و استاندارد نشان نمی‌دهد ($p > 0.05$).

روش ارائه شده دارای مزیت‌هایی از جمله: روشی قابل اعتماد، ساده، نسبتاً ارزان، سریع، با حجم و غلظت حلال آلی کم (سبز)، حجم و غلظت واکنشگر کم، پایداری نمونه و آنالیز در دمای محیط می‌باشد. علاوه بر این بر معایب روش‌های موجود مانند

نیاز به پیش تغلیظ غلبه می کند. به طور کلی نتیجه می شود روش ارائه شده آسان، سریع و ایمن است و از آن برای کنترل کیفیت غلظت سلنیوم اسپیرولینا (در غلظت های میلی گرم بر لیتر) می توان بهره برد.

۵- تقدیر و تشکر

تمامی نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و همچنین شرکت داروسازی اسوه بخاطر حمایت های مادی و معنوی در انجام این کار پژوهشی اعلام می دارند.

۶-مراجع

- [1] M. Tamas, Z. S. Mandoki, J. Csapo, *Acta Univ. Sapientiae*. **3** (2010) 5.
- [2] J. Y. Sun, Y. J. Hou, X. Y. Fu, X. T. Fu, J. K. Ma, M. F. Yang, B. L. Sun, C. D. Fan, J. Oh, *Frontiers in physiology*. **9** (2019) 1907.
- [3] H. D. Mistry, F. B. Pipkin, C. W. G. Redman, L. Poston, *Am. J. Obstet. Gynecology*. **206** (2012) 21.
- [4] M. Navarrete, T. Martínez, A. Fernández, M.Á. Zúñiga, M. Camacho, M. Flores, *World J. Nuclear Sci. Technol.* **3** (2013) 6.
- [5] D. P. Waghmode, M. D. Jamdar, S. S. Kolekar, M. A. Anuse, *Int. J. Chem. Sci. Technol.* **3** (2013) 1.
- [6] M. S. El-Shahawi, A. M. Othman, A. S. Bashammakh, M. A. El-Sonbati, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **86** (2006) 941.
- [7] C. H. Guo, S. Hsia, M. Y. Shih, F. C. Hsieh, P. C. Chen, *Int. J. Health Sci.* **12** (2015) 748.
- [8] A. S. A. Ibrahim, R. Al-Farawati, U. Hawas, Y. Shaban, *Open Chemistry* **15** (2017) 103.
- [9] Y. V. Nancharaiah, P. N. L. Lens, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **79** (2015) 61.
- [10] M. Ponce, I. Giraldez, S. Calero, P. Ruiz-Azcona, E. Morales, C. Fernández-Díaz, I. Hachero-Cruzado, *Aquaculture* **484** (2018) 105.
- [11] L. M. Andrade, C. J. Andrade, M. Dias, C. A. O. Nascimento, M. A. Mendes, *Nutraceuticals and Food sci.* **6** (2018) 45.
- [12] B. Capelli, G. R. Cysewski, *Nutrafods* **9** (2010) 19.
- [13] G. Mughesh, H. B. Singh, *Chemical Society Reviews* **29** (2000) 347.
- [14] B. D. S. Vaz, J. B. Moreira, M. G. de Moraes, J. A. V. Costa, *Curr. Opin. Food Sci.* **7** (2016) 73.
- [15] R. Deng, T. Chow, *Cardiovascular Therapeutics* **28** (2010) 33.
- [16] X. Song, L. Zhang, X. Hui, X. Sunc, J. Yang, J. Wang, H. Wu, X. Wang, Z. Zheng, F. Che, G. Wang, *Pharmaceutical Biology*. **59** (2021) 629.
- [17] E. Zoidis, I. Seremelis, N. Kontopoulos, G. P. Danezis, *Antioxidants* **7** (2018) 66.
- [18] H. J. Zhang, P. F. Gao, X. F. Guo, H. Wang, *Microchem. J.* **110** (2013) 192.
- [19] A. Saleh, Y. Yamini, M. Faraji, S. Shariati, M. Rezaee, *J. chromatogr. B* **877** (2009) 1758.

- [20] T. Chen, W. Zheng, Y. S. Wong, F. Yang, Y. Bai, *Technol*, **97** (2006) 2260.
- [21] H. D. Yao, Q. Wu, Z. W. Zhang, S. Li, X. L. Wang, X. G. Lei, S. W. Xu, *Biochim. Biophys. Acta*, **1830** (2013) 3112.
- [22] D. Yadav, R. Jha, P Kumar, P Singh, *Selenium Contamination in Water*. **91** (2021) 114.
- [23] A. E. Ibrahim, M. M. Abdel-Daim, *Cell J*. **17** (2015) 137.
- [24] A. Daim, *Small Rumin. Res.* **120** (2014) 134.
- [25] M. M. Abdel-Daim, S. M. Farouk, F. F. Madkour, S. S. Azab, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **37** (2015) 126.
- [26] E. E. Mazokopakis, I. K. Starakis, M. G. Papadomanolaki, N. G. Mavroeidi, E. S. Ganotakis, *J. Sci. Food Agric.* **94** (2014) 432.
- [27] A. Asghari, S. Arghavani-Beydokhti, M. Rajabi, *J. Of Applied Chemistry*. **10** (1394) 111, in Persian.
- [28] Z. Amini, M. H. Givianrad, P. Aberoomand Azar, S. W. Husain, M. Saber Tehrani, *J. Of Applied Chemistry*. **15** (1399) 299, in Persian.
- [29] D. P. Mohapatra, D. M. Kirpalani, *Water Science and Technology*. **79** (2019) 842.
- [30] R. Khani, H. Dadresmoghaddam, *J. Of Applied Chemistry*. **56** (1399) 285, in Persian.
- [31] G. P. Pandey, A. K. Singh, L. Deshmukh, A. Asthana, M. Yoshida, S. Prasad, *Analytical Methods*. **12** (2020) 4327.

