

## تقدير بعض الاحماض الامينية بطريقة الحقن الجرياني - البريق الكيميائي

سهام توفيق أمين ، نزار أحمد ناجي ، نشوان حسين علي

قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

## الملخص

يتضمن هذا البحث تقدير بعض الاحماض الامينية (الستاتين، السستين، الهستدين) بالمنظومة المصممة محلياً (الكرونية-كيميائية-بصرية) وقياس البريق الكيميائي المقترن بالحقن الجرياني وكانت النتائج كالآتي :-

**الجزء الأول:** شمل دراسة تقدير الستاتين من خلال المتغيرات الكيميائية كافة للمواد الداخلة في التفاعل، اللومينول، ومحللول بيروكسيد الهيدروجين فضلاً عن دراسة المتغيرات الفيزيائية كافة وتم الحصول على منحنى المعايرة لنظام: (luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-cysteine) وكان المدى الخطي (5-110) مكغم.مل<sup>-1</sup> وحد الكشف بتركيز (9x10<sup>-6</sup>) مولاري والانحراف القياسي النسبي لتركيز 4.9x10<sup>-4</sup> مولاري (n=5) = 0.8%.

**اما الجزء الثاني:** فقد تطرق إلى دراسة تقدير الستاتين من خلال المتغيرات الكيميائية والفيزيائية كافة. وتم الحصول على منحنى المعايرة لنظام: (luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Cu<sup>2+</sup> - Cystine) وكان المدى الخطي (20-80) مكغم.مل<sup>-1</sup> وحد الكشف بتركيز (1.6x10<sup>-6</sup>) مولاري والانحراف القياسي النسبي لتركيز 2.08 x10<sup>-4</sup> مولاري (n=5) = 0.94%.

**اما الجزء الثالث:** فقد شمل دراسة تقدير الهستدين من خلال المتغيرات الكيميائية والفيزيائية . وتم الحصول على منحنى المعايرة لنظام: (luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mn<sup>2+</sup> Histidine) وكان المدى الخطي (10-160) مكغم.مل<sup>-1</sup> وحد الكشف بتركيز (9.2x10<sup>-6</sup>) مولاري والانحراف القياسي النسبي لتركيز 5.1 x10<sup>-4</sup> مولاري (n=5) = 1.27%، طبقت جميع الطرائق المقترحة بنجاح في تقدير الاحماض الامينية في المستحضرات الصيدلانية

## مقدمة عن الأحماض الأمينية

الاحماض الامينية ووجود دقائق متناهية الصغر ،أذ تم أنقلاء الستاتين من مزيج من الأحماض الأمينية نتيجة للتفاعل مجموعة الكبريت الموجودة في الستاتين مع الجزيئات متناهية الصغر وباستخدام طريقة الحقن الجرياني المستمر تم تقدير عدد من الأحماض الأمينية وذلك نتيجة مفاعله الحامض الأميني مع (2,4,6- ثلاثي نايترولين حامض السلفونيك) لتكوين ناتج اصفر يقاس طيفياً عند 305 نانوميتر اذ كانت سرعة التقدير 15 حامض أميني لكل ساعة<sup>(7)</sup>، كذلك تم تقدير العديد من الاحماض الامينية بالطرق الكروماتوغرافية<sup>(8,9,10)</sup> عن طريق تكوين مشتقات للاحماض الامينية ووجدت الطرق الكروماتوغرافية بأنها ذات حساسية وانتقائية عالية .

تم تقدير الستاتين بالطرق الكهربائية اعتماداً على التعويض الاروماتي لمجموعة النايول وتم انتقاء الستاتين من مصل الدم البشري<sup>(11)</sup>، كذلك قدرت الأحماض الامينية الحاوية على مجموعة النايول في الوسط القاعدي<sup>(12)</sup> بواسطة قطب الكربون الزجاجي ووجود دقائق متناهية الصغر (دقائق الكوبلت)، كما تم تقدير الاحماض الامينية بالطرق التفلورية<sup>(13,14,15)</sup>

## البريق الكيميائي:

يعرف البريق الكيميائي بأنه الضوء أو الأشعة الكهرومغناطيسية (غالباً ما يحدث في المنطقة فوق البنفسجية والمرئية أو منطقة الأشعة تحت الحمراء) المنبعثة كنتيجة لتفاعلات كيميائية منتجة حالة وسطية مثارة إلكترونياً<sup>(16,17)</sup> حيث تكتسب الجزيئة طاقة الإثارة نتيجة لتفاعلات كيميائية محرراً جزءاً من الطاقة خارج النظام وبشكل فوتونات (بريق مباشر) أو عن طريق نقل الطاقة إلى مادة مستقبلية تعمل على بعث البريق الكيميائي (بريق غير مباشر)<sup>(18)</sup>، بينما تبقى حرارة

الأحماض الأمينية عبارة عن جزيئات حيوية مهمة لأنها تعد الوحدات الأساسية لبناء جميع البروتينات في جسم الكائن الحي كما تدخل كمواد أولية لتوليد بعض المركبات، مثل : (التايروكسين ، الأنسولين ، الادرينالين ، البريميدينات والبيورينات والبورفيرينات والفيتامينات)<sup>(1)</sup>. تحتوي الأحماض الأمينية على مجموعتي الكربوكسيل (COO<sup>-</sup>) والأمين (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) ، فضلاً عن سلسلة جانبية (R-group) تختلف تبعاً للحامض الأميني<sup>(2)</sup>.

تتميز الأحماض الأمينية بانها مركبات عديمة اللون عندما تكون نقية وتوجد بشكل بلورات بيضاء اللون ولها درجات انصهار عالية (200 - 300)° كالملاح اللاعضوية ، أما من حيث المذاق فقد تكون عديمة الطعم مثل (الليوسين) ، أو حلوة المذاق مثل (الفالين ، الالينين ، الكلايسين ، التريبتوفان ، السيرين، الهيدروكسي برولين و البرولين والهستدين) ، أو مرة المذاق مثل (أيزوليوسين والارجنين). أما من حيث قابليتها على الذوبان في المذيبات فتتسم الأحماض الأمينية بالصفات الآتية<sup>(3,4)</sup> :-

أ. أن غالبية الأحماض الأمينية باستثناء (التايروسين) قليلة الذوبان في الماء البارد وتزداد الذوبانية في الماء الحار ، وبعض منها سريعة الذوبان في الماء مثل (الكلايسين والالينين).

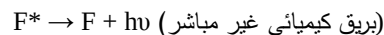
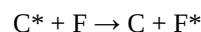
ب. لا تذوب أو قليلة الذوبان في الكحولات.

ج. غير ذائبة في الاثير.

وفيما يلي أستعراض لبعض البحوث الحديثة والمستمدة في تقدير

بعض الاحماض الامينية (الستاتين، السستين، الهستدين)

تم تقدير الستاتين بالطرق الطيفية-اللونية<sup>(5,6)</sup> اعتماداً على تغير لون المحلول من الأحمر إلى الأزرق عند إضافة ملح الطعام لمزيج من



### تفاعلات البريق الكيميائي

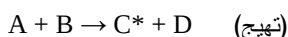
تعد تفاعلات الطور السائل من أكثر تفاعلات البريق الكيميائي شيوعاً وتطبيقاً في المجال التحليلي، وأغلب هذه التفاعلات هي أكسدة واختزال ، ومن أهم كواشف البريق هو اللومينال (3-أمينو فتاليل هيدرازيد) حيث تتأكسد جزيئة اللومينال بعدة عوامل مؤكسدة مثل البرمنغنات وهايبوكلور ايت وايودات وبيروكسيد الهيدروجين وهو الأكثر استخداماً ويتطلب وجود عوامل محفزة لتزويد من سرعة اكسدة اللومينال مثل الكروم(III) والكوبلت(II) والحديد(II) لتكوين حالة مثارة الكرونيو(ايون 3-أمينو فتاليت) وإعطاء بريقاً أزرق عند طول موجي 425 nm<sup>(14,13)</sup> حسب الميكانيكية الآتية:<sup>(21,22)</sup>.

النظام بعيدة عن حرارة أشعة الضوء المنبعث لذلك يطلق على البريق بالضوء البارد<sup>(19)</sup> لعدم مرافقة أنتاجه حرارة.

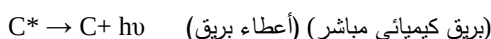
### ميكانيكية البريق الكيميائي<sup>(20,17)</sup>

يمكن تلخيص ميكانيكية البريق الكيميائي بطريقتين:

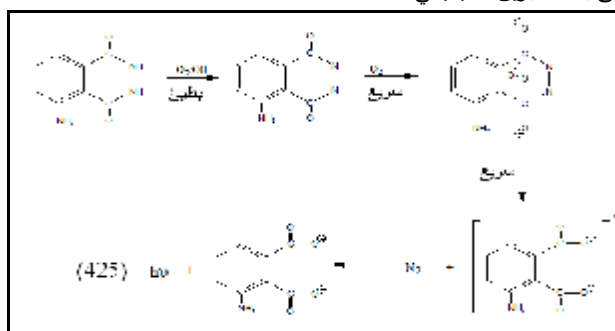
أ- مرحلة الإثارة : حيث تكسب الجزيئة طاقة نتيجة تفاعلات كيميائية فتعاني الجزيئة انتقالاً إلى حالة الكترونية مثارة والمكتسبة بفعل عملية الأكسدة لتفاعل البريق الكيميائي



ب- مرحلة انبعاث البريق: تفقد فيها الجزيئة المثارة الكترونيها "طاققتها الفائضة بشكل فوتونات ضوئية مرئية ومن ثم العودة إلى الحالة الأرضية المستقرة.



عندما تكون الحالة الالكترونية المثارة غير باعثة للبريق لذلك بالإمكان نقل الطاقة إلى مادة مستقبلية تعمل على بعث البريق الكيميائي .



### التطبيقات التحليلية للبريق الكيميائي:

نظراً لأهمية تفاعلات البريق الكيميائي في المجالات الإحيائية والطبية والدوائية والبيئة أو الصناعة والزراعية وغيرها لذلك سوف يتم التطرق ((1).

### جدول رقم (1) يمثل التطبيقات التحليلية للبريق الكيميائي

| المصدر | حدود الكشف                                        | ملخص الطريقة                                                                                                                                                                                                                                                              | الايون أو المادة المقطرة والنظام المستخدم                                         |
|--------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 23     | $2.9 \times 10^{-8} \text{ M}$                    | أكسدة حامض الستاتين بفعل $\text{Ce(IV)}$ في الوسط القاعدي وبوجود quinine                                                                                                                                                                                                  | Cysteine<br>Quinine-Ce(IV)-Cysteine                                               |
| 24     | $50 \text{ mg}^{-1}$                              | يتم الحصول على ضوء البريق عند مفاعلة tyrosine مع $\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$ في الوسط القاعدي وبدرجة حرارة الغرفة. وتم تحسين شدة البريق بإضافة (β-cyclodextrin and formic acid) وتم الحصول على نتائج مثالية وحدود كشفواطنة وطاقة إنتاجية عالية $98 \text{ h}^{-1}$        | Tyrosine<br>$\text{K}_3\text{Fe(CN)}_6$ -tyrosine                                 |
| 25     | $1.8 \times 10^{-8} \text{ M}$                    | يعمل الكلوتامين على إخماد تفاعل البريق الكيميائي لنظام (Luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$ - $\text{Cu(II)}$ ) بفعل تكوين معقدات مستقرة مع النحاس في الأوساط القاعدية                                                                                                        | Glutamine<br>$\text{Lu-H}_2\text{O}_2$ - $\text{Cu(II)}$                          |
| 26     | $3 \times 10^{-8} - 2.5 \times 10^{-9} \text{ M}$ | يتحرر ضوء البريق نتيجة التفاعل بين معقد الروثينيوم و15 حامض أميني في الوسط ألحامضي، فقط الهستدين والتريبتوفان أظهرت استجابات واضحة من بين هذه الأحماض الأمينية                                                                                                            | tryptophan and histidine<br>$\text{Ru(bpy)}_3^{3+}$ - $\text{KMnO}_4$             |
| 27     | $1 \times 10^{-8} - 1.8 \times 10^{-9} \text{ M}$ | عند تفاعل اللومينال مع $\text{NaOCl}$ يلاحظ انبعاث البريق وهذه الاحماض تعمل على تثبيط البريق ووجد ان الاحماض الأمينية الفينولية تثبط البريق أكثر من الحامضية والقاعدية والمتعادلة والثايولية                                                                              | مضادات التأكسد للاحماض الأمينية<br>Lu- sodiumhypochlorite-amino acids             |
| 28     | $1 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-4} \text{ M}$   | بالاستناد على البريق الكيميائي المحفز كهربائياً تم تقدير الستاتين والسستين عند مفاعلة هذه الاحماض مع معقد الروثينيوم و $\text{peroxydisulphate}$ تحت اشعة UV وتم الحصول على بريق كيميائي. اما الستين تم تقديره بعد الاختزال الى الستاتين بوجود النحاس المطلي بالكادميوم . | L-cysteine and L-cystine<br>$\text{Ru(bipy)}_2^{2+3}$ - $\text{peroxydisulphate}$ |
| 29     | $8 \times 10^{-2} \mu\text{M}$                    | يتفاعل $\text{H}_2\text{O}_2$ مع $\text{NaHCO}_3$ لإنتاج $\text{HCO}_4^-$ وبوجود $\text{gold(III)}$ ينبعث البريق وعند إضافة BPA يلاحظ انخفاض البريق نتيجة للعمل التثبيطي. وتم إزالة الايونات الموجبة بواسطة عمود التبادل الأيوني الموجب                                   | Bisphenol                                                                         |

## الأجهزة المستخدمة

من القاعدة فتم تغطيته بطبقة صقيلة من الألمنيوم تعمل عاكسة للضوء المنبعث من البريق الكيميائي وذلك لضمان عدم فقدان الضوء المنبعث ولقد تم تثبيت القاعدة على صندوق بلاستيكي معتم مغطى بقماس اسود لضمان عدم تسرب أي ضوء خارجي إلى داخل الخلية .

6.المكشاف :Detector

وتتألف هذه الوحدة من الأجزاء التالية :

- المضاعف الضوئي Photomultiplier tube
- منظومة رصد بريق : وهي منظومة تحدد فترة مراقبة البريق .
- منظومة ملف ثنائي : يتم فيها السيطرة على قراءة الإشارة .
- وحدة تصغير المنظومة الالكترونية قبل حقن النموذج .
- وحدة المقريء الالكتروني .

7. وحدة المسجل Recorder:

نوع المسجل المستخدم SIEMES موديل C1032 ، وتتضمن وحدة تسجيل الإشارة على ورقة بيانية حيث تسجل الإشارة الخارجة ويحسب ارتفاعها .

8.جهاز قياس الدالة الحامضية PH meter: موديل JENWAY 350

9.جهاز الإذابة بالأموح فوق الصوتية ULATROSONIC CLEANER : موديل CLEANER – 50 B

10. ميزان حساس: موديل SARTORIUS

11. قطب الكالوميل : موديل SWISS SOURCE

12. مسخن حراري مع محرك مغناطيسي : موديل JENWAY HOTPLATE WITE STIRRER – GERMANY .

المواد الكيميائية المستخدمة

استخدمت المواد الكيميائية في هذه التقنية والمبينة في جدول ( 2 ) وبنقاوة عالية .

الجدول(2) المواد الكيميائية المستخدمة في تقنية البريق الكيميائي

| الشركة<br>المجهزة | النقاوة % | الوزن الجزيئي<br>غم/مول | الصيغة الكيميائية                                            | المواد الكيميائية           | ت  |
|-------------------|-----------|-------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------|----|
| Fluka             | 98        | 177.16                  | $\text{PhNH}_2\text{C}_2\text{O}_2(\text{NH}_3)_2$           | Luminol                     | 1  |
| BDH               | 48        | 34                      | $\text{H}_2\text{O}_2$                                       | Hydrogen peroxide           | 2  |
| BDH               | 99        | 106                     | $\text{Na}_2\text{CO}_3$                                     | Sodium carbonate            | 3  |
| Fluka             | 98        | 40                      | $\text{NaOH}$                                                | Sodium hydroxide            | 4  |
| BDH               | 98        | 158                     | $\text{KMnO}_4$                                              | Potassium permanganat       | 5  |
| Fluka             | 99        | 187.5                   | $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$                                   | Copper(II) nitrate          | 6  |
| Fluka             | 98        | 178.95                  | $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2$                                   | Manganese(II) nitrate       | 7  |
| Fluka             | 99        | 121.1590                | $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$                    | Cysteine                    | 8  |
| Fluka             | 99        | 147.521                 | $\text{C}_3\text{H}_7(\text{NO}_2\text{S})_2$                | Cystine                     | 9  |
| Fluka             | 98        | 155.1552                | $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$                   | Histidine                   | 10 |
| BDH               | 98        | 369.24                  | $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ | Sodium borate               | 11 |
| BDH               | 99        | 84                      | $\text{NaHCO}_3$                                             | Sodium carbonate hydrogen   | 12 |
| BDH               | 97        | 119.97                  | $\text{NaH}_2\text{PO}_4$                                    | Sodium dihydrogen phosphate | 13 |

## تحضير المحاليل القياسية Stander Solution

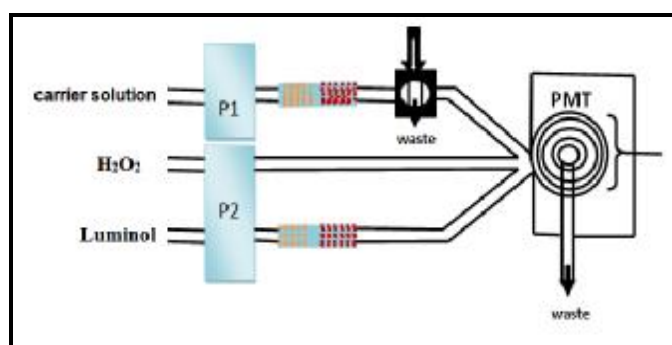
قليل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 1.0 لتر بالماء المقطر للحصول على محلول كربونات الصوديوم بتركيز 0.1 مولاري .

1. محلول كربونات الصوديوم  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  بتركيز 0.1 مولاري :  
حضر المحلول بإذابة 10.6 غم من ملح كربونات الصوديوم في

2. محلول اللومينال Luminol بتركيز  $1 \times 10^{-3}$  مولاري : حضر المحلول بإذابة 0.1771 من مسحوق اللومينال ذي اللون الأصفر الترابي في حجم قليل من محلول 0.1 مولاري كاربونات الصوديوم المحضر أعلاه ثم أكمل الحجم إلى 1.0 لتر بالمحلول نفسه إلى أن أصبحت الدالة الحامضية للمحلول pH=10.5.
3. محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز 0.1 مولاري : حضر المحلول بإذابة 3.9997 غم من مسحوق هيدروكسيد الصوديوم في قليل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 1.0 لتر وتم معايرة المحلول بتسحيحة مقابل محلول 0.1 مولاري من بيكاربونات الصوديوم .
4. محلول بيكاربونات الصوديوم  $\text{NaHCO}_3$  بتركيز 0.1 مولاري : حضر المحلول بإذابة 8.401 غم من مسحوق بيكاربونات الصوديوم في كمية قليلة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى حد العلامة في قنينة حجمه سعة 1.0 لتر .
5. محلول برمنغنات البوتاسيوم  $\text{KMnO}_4$  بتركيز 0.1 مولاري : حضر المحلول بإذابة 15.80 غم من مسحوق برمنغنات البوتاسيوم في قليل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 1.0 لتر .
6. محلول بيروكسيد الهيدروجين  $\text{H}_2\text{O}_2$  بتركيز 1.0 مولاري : تم تحضير المحلول بتخفيف 45.72 مل من بيروكسيد الهيدروجين (وزنه النوعي 1.54 ونسبة 48%) في قنينة حجمه سعة 1 لتر ثم أكمل الحجم بالماء المقطر للحصول على محلول بتركيز 1.0 مولاري وبعد ذلك تم معايرته بتسحيحة مقابل محلول برمنغنات البوتاسيوم 0.1 مولاري .
7. محلول حامض السستائين بتركيز 0.1 مولاري : حضر المحلول بإذابة 3.029 غم من مسحوق السستائين في كمية قليلة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى حد العلامة في قنينة حجمه سعة 250 مل.
8. محلول حامض السستين بتركيز 0.1 مولاري : حضر المحلول بإذابة 6.0075 غم من مسحوق السستين في كمية قليلة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى حد العلامة في قنينة حجمه سعة 250 مل.
9. محلول حامض الهستدين بتركيز 0.1 مولاري : حضر المحلول بإذابة 3.879 غم من مسحوق الهستدين في كمية قليلة من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى حد العلامة في قنينة حجمه سعة 250 مل.
10. محلول ايون النحاس  $\text{Cu}^{2+}$  بتركيز 1000 جزء من المليون : حضر المحلول بإذابة 1.9011 غم من نترات النحاس المائية في دورق حجمي سعة 500 مل ثم أكمل الحجم إلى حد العلامة. وقد حضرت التراكيز الأقل من هذه المحاليل عن طريق التخفيف المناسب .
11. محلول ايون المنغنيز  $\text{Mn}^{2+}$  بتركيز 1000 جزء من المليون : حضر المحلول بإذابة 1.1422 غم من نترات المنغنيز المائية في دورق حجمي سعة 250 مل ثم أكمل الحجم إلى حد العلامة. وقد حضرت التراكيز الأقل من هذه المحاليل عن طريق التخفيف المناسب .

#### تقدير الاحماض الامينية

تم تقدير الأحماض الأمينية (السستائين - السستين - الهستدين) من خلال دراسة مفصلة للمتغيرات الكيميائية والفيزيائية لانتقاء الظروف الفضلى لاجراء تفاعل البريق الكيميائي . عمل منحنيات معايرة وإيجاد حد الكشف ودراسة تأثير فعل الايونات الدخيلة من الايونات الموجبة والسالبة والأصناف الدخيلة وكيفية إزالة تأثيرها أو التقليل منها ضمن المنظومة المبتكرة باستخدام الظروف المثلى. استخدمت هذه الطريقة في المجال الدوائي بوساطة نظام البريق الذي تم التوصل إليه.



الشكل (1) مخطط يبين منظومة الحقن الجرياني المستخدمة لتقدير الاحماض الامينية

#### 1- تقدير السستائين

(الترينوفان، التايروسين، الكلايسين، اللايسين، الكلوتامين، حامض الكلوتاميك، وحامض الأسبارتك، السستائين، السستين والهستدين) ولوحظ أن السستائين فقط يعمل على تحفيز نظام البريق (اللومينول - بيروكسيد الهيدروجين) في الوسط القاعدي.

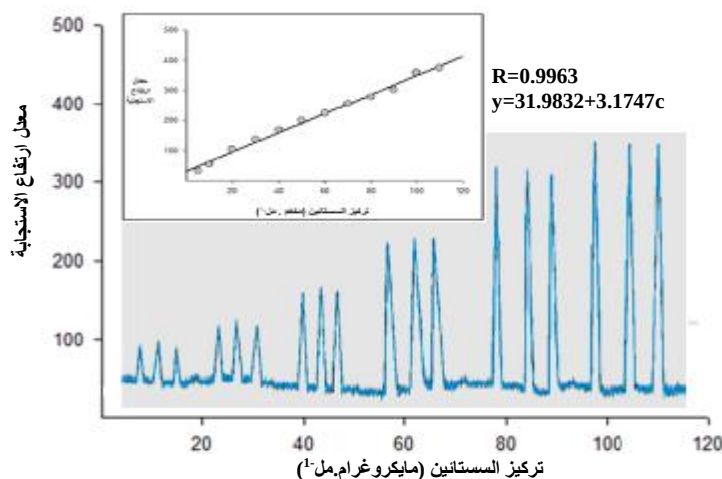
تم إجراء العديد من التجارب التمهيدية لمتابعة سير تفاعل اللومينول (الجزيئية الواهبة للبريق) التي تتأكسد بوجود بيروكسيد الهيدروجين، إذ لوحظ انه عند مزج اللومينول وبيروكسيد الهيدروجين في الوسط القاعدي انبعثت بريق ضعيف وهذا يحتاج إلى عامل محفز لزيادة انبعثات البريق. حيث تم اختبار العديد من الأحماض الأمينية

## بناء منحنى المعايرة لتقدير السستائين

تم تحضير سلسلة محاليل للأحماض الأمينية السستائين بتركيز (5-110) مايكروغرام /مل وباستخدام الظروف المثلى.

## جدول (3) الظروف المثلى لتقدير السستائين.

| الظروف المدروسة           | النتائج المثلى                                                                              |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| تركيز اللومينال           | $5 \times 10^{-4} \text{ M}$                                                                |
| تركيز بيروكسيد الهيدروجين | $1 \times 10^{-2} \text{ M}$                                                                |
| سرعة الجريان              | مل بالدقيقة 1.5 لخط lum, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> و 4 مل بالدقيقة لخط carrier solution |
| حجم الأنموذج المحقن       | $\mu\text{L } 125$                                                                          |



الشكل (2) العلاقة بين تركيز السستائين ومعدل ارتفاع الاستجابة

الاستجابة وهيئتها ؛ لذلك كان لابد من دراسة تأثير بعض الايونات والمواد الدخيلة.

أجريت هذه الدراسة باستخدام تركيز ثابت من السستائين (40 مكغم.مل<sup>-1</sup>) في قناني (عدد أربعة) سعة 100 مل والمحتوية على تراكيز متغيرة من الايون الدخيل (5 و 10 و 20) مكغم.مل<sup>-1</sup> في القناني 2 و 3 و 4 واعتبرت القنينة الاولى المحتوية على السستائين فقط هي المرجع للمقارنة مع التراكيز المتغيرة للايون الدخيل في القناني 2 و 3 و 4. ثم حقن الأول (السستائين فقط) لثلاث مرات متتالية وتسجيل ارتفاع الاستجابة وتحويل إلى مللي فولت، ومن ثم قورنت بالاستجابات الناتجة من المحاليل المحتوية على الايونات والمواد الدخيلة لاحتساب النسبة المئوية للتأثير في استجابة السستائين لنظام: اللومينال\_بيروكسيد الهيدروجين\_السستائين كما مدون في الجدول (4).

تم رسم العلاقة بين التغير في تركيز السستائين والتغير في معدل ارتفاع الاستجابة كما مبين في الشكل، ولوحظ أن هناك ارتفاع في شدة البريق نتيجة للعمل التنشيطي للسستائين ومدى الخطية يتراوح بين  $(4.1 \times 10^{-5} - 9 \times 10^{-4} \text{ ML}^{-1})$  وكانت معادلة الخط المستقيم (linear regression equation)  $y = 31.9832 + 3.1747c$ . أما حد الكشف فكان  $(9 \times 10^{-6})$  مولاري. والانحراف القياسي النسبي لتركيز  $4.9 \times 10^{-4}$  مولاري (n=5) = 0.8%. وطبقت هذه الطريقة على نماذج صيدلانية.

## تأثير فعل الأيونات الدخيلة

على الرغم من حساسية طرائق البريق الكيميائي والتي يمكن عن طريقها الوصول إلى تراكيز واطنة وغير انها عرضة لتداخل كثير من الايونات الموجبة والسالبة، ففي هذه الدراسة تم تقدير السستين بوصفه عاملاً محفزاً ويتأثر بوجود ايونات ومواد دخيلة تؤثر في ارتفاع

## جدول (4) تأثير الايونات الدخيلة على ارتفاع الاستجابة للبريق الكيميائي بدلالة النسبة المئوية لتأثير التداخل

وعند حقن أنموذج السستائين بتركيز 40 مكغم.مل<sup>-1</sup> عند الظروف الفضلى

| النسبة المئوية لتأثير التداخل (%) |        |        |         |        |        |      | تركيز الايون<br>مكغم.مل <sup>-1</sup> |
|-----------------------------------|--------|--------|---------|--------|--------|------|---------------------------------------|
| Mg(II)                            | Fe(II) | Co(II) | Fe(III) | Ca(II) | Cu(II) | K(I) |                                       |
| 0                                 | 72     | 104    | 14.4    | 0      | 0      | 0    | 5                                     |
| 0                                 | 138    | 248    | 118     | 0      | 32     | 0    | 10                                    |
| 0                                 | 286.2  | 357    | 348     | 0      | 108    | 0    | 20                                    |

(10) أقراص من المستحضر (x treme amino) الذي يحتوي كل قرص 75mg cysteine وأخذ منه ما يكافئ وزن قرص واحد وأذيب في 100مل من الماء المقطر و في بيكر سعة 250مل ووضع على جهاز فوق الأمواج الصوتية المزود بحمام مائي ولفترة 10 دقائق. حضرت سلسلة محاليل من المادة الدوائية بتركيز تتراوح بين (1-80) مكغم.مل<sup>-1</sup> باستخدام طريقة الإضافات القياسية، ثم حقنت محاليل المستحضرات خلال منظومة الحقن الجرياني وتحت الظروف الفضلى ولخصت النتائج الخاصة بتقدير الستاتين في الجدول (5) التي بينت نجاح الطريقة المؤتمتة لتقدير الستاتين في المستحضرات الصيدلانية.

جدول رقم (5): ملخص نتائج منحنى الإضافات القياسية للمادة الدوائية عند حدود ثقة 95% للنظام البريق الكيميائي

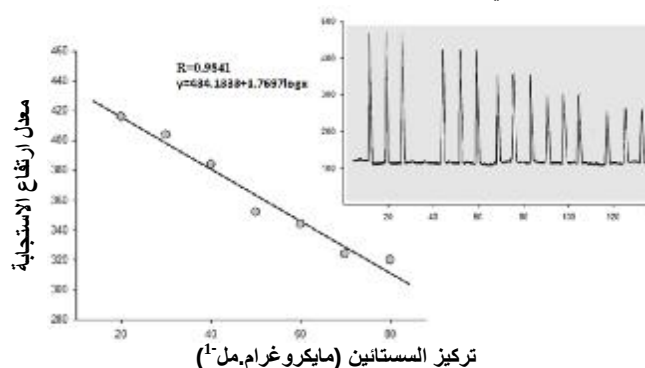
| مدى تراكيز الستاتين (مكغم. مل <sup>-1</sup> ) | نقطة التقاطع (a) (مللي فولت) | الميل (b) (مللي فولت/ مكغم. مل <sup>-1</sup> ) | معامل الارتباط (r) ونسبة الخطية (r <sup>2</sup> %) | قيمة t الجدولية عند حدود ثقة 95% و n=5 | قيمة t المحسوبة $t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$ | قيمة F الجدولية عند حدود ثقة 95% و n-2 | قيمة F المحسوبة |
|-----------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------|
| 80-1                                          | 83.4                         | 5.97                                           | 98.65% و 0.9932                                    | 2.57                                   | 1.883                                                  | 5.05                                   | 1.438           |

ولوحظ إن أيون النحاس الثنائي أفضل أيون فلزي يعمل على تنشيط هذا النظام، ولكن عند إضافة الستاتين لوحظ إن البريق ينخفض بصورة كبيرة وتم تقدير الستاتين عن طريق التأثير التثبيطي.

جدول رقم (6): الظروف المثلى لتقدير الستاتين

| الظروف المدروسة           | النتائج المثلى                  |
|---------------------------|---------------------------------|
| تركيز اللومينال           | $1 \times 10^{-4} M$            |
| تركيز بيروكسيد الهيدروجين | $1 \times 10^{-1} M$            |
| تركيز النحاس الثنائي      | 40 مايكروغرام. مل <sup>-1</sup> |
| سرعة الجريان              | 3 مل بالدقيقة 1.5               |

(II) 40 مايكروغرام /مل، حيث تم قياس استجابة البريق الكميائي (معبراً عنها بمعدل ارتفاع الاستجابة بالمللي فولت) ولخمس قياسات متتالية لكل تركيز وكما موضح في الشكل (3).



الشكل (3) العلاقة بين تركيز الستاتين ومعدل ارتفاع الاستجابة

تم رسم العلاقة بين التركيز الستاتين والتغير في معدل ارتفاع الاستجابة كما مبين في الشكل (3) بالمقارنة مع شدة البريق لأيون النحاس (II) 40 مايكروغرام/مل ولوحظ أن هناك انخفاض في شدة البريق نتيجة للعمل التثبيطي وكانت معادلة الخط المستقيم (linear

ويلاحظ في الجدول أن أيون الكوبلت (II) والحديد (II) والحديد (III) هي أكثر الايونات التي تسبب زيادة في ارتفاع الاستجابة لنظام البريق وللتركيز كافة المستخدمة، حيث تعمل هذه الايونات كعوامل مؤكسدة تعمل على زيادة أكسدة جزيئه اللومينال وبعض الأيونات لا تسبب أي تداخل مثل المغنيسيوم واليوتاسيوم والكالسيوم، وبعض الأيونات سببت تداخل طفيف مثل النحاس (II) وتم إزالة الأيونات الدخيلة بواسطة المبادلات الأيونية

## التطبيقات

تم التقدير الكمي للمستحضرات الصيدلانية التي تحوي المواد الفعالة إضافة إلى المواد الحاملة بإتباع الطريقة التالية، إذ تم سحق ومزج

## 2- تقدير الستاتين

تم تجريب العديد من الايونات (الكوبلت ، النحاس ، الحديد ، المغنيز والرصاص) لتحفيز نظام البريق (اللومينول -بيروكسيد الهيدروجين)

## بناء منحنى المعايرة لتقدير الستاتين

تم تحضير سلسلة محاليل للحامض الأميني الستاتين بتركيز (20\_80) مايكروغرام /مل وباستخدام الظروف المثلى وحقنت بشكل متزامن ونسبة مولية معينة (1:1) للحامض الأميني وأيون النحاس

النسبي RSD % فكان 0.94% (n=5) لتركيز  $(2.08 \times 10^{-4})$  حضرت سلسلة محاليل من المادة الدوائية بتركيز تتراوح بين (20-80) مكغم.مل<sup>-1</sup> باستخدام طريقة الإضافات القياسية، وتم الحصول على النتائج.

### التطبيقات

جدول رقم (7): ملخص نتائج منحنى الإضافات القياسية للمادة الدوائية عند حدود ثقة 95% لنظام البريق الكيميائي

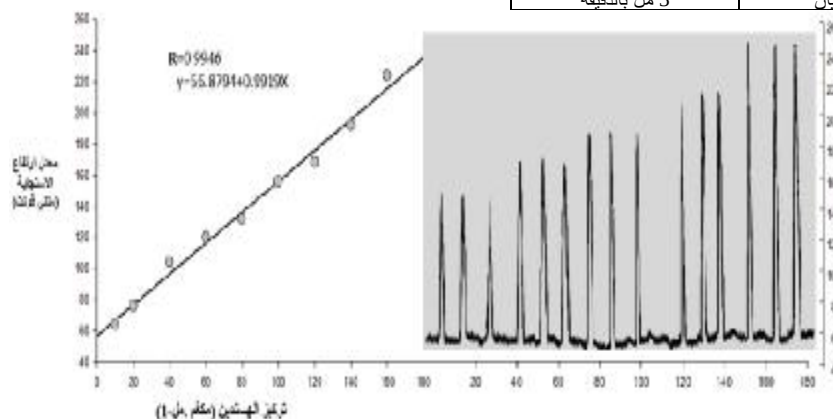
| مدى تراكيز السستين (مكغم. مل <sup>-1</sup> ) | نقطة التقاطع (a) (مللي فولت) | الميل (b) (مللي فولت/ مكغم. مل <sup>-1</sup> ) | معامل الارتباط (r) ونسبة الخطية (%r <sup>2</sup> ) | قيمة t الجدولية عند حدود ثقة 95% و n-2 | قيمة t المحسوبة $t = \frac{ r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$ |
|----------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| 80-20                                        | 73.58                        | 3.87                                           | 0.9873 و 98.47%                                    | T <sub>(2,433)</sub>                   | T <sub>(0,484)</sub> >> T <sub>(2,433)</sub>             |

### 3-تقدير الهستدين

تم اختبار العديد من الايونات (الكوبلت ، النحاس ، الحديد ، المغنيز والرصاص ) لتحفيز نظام البريق (اللومينول -بيروكسيد الهيدروجين- الهستدين) فقد لوحظ أن ايون المنغنيز الثنائي على زيادة تفاعل البريق بشكل كبير. ولأجل تطوير طريقة طيفية بسيطة وحساسة لتقدير الهستدين، تم تصميم وتنفيذ الوحدة المتشعبة لنظام البريق (اللومينول - بيروكسيد الهيدروجين- المنغنيز الثنائي-الهستدين) ودراسة المتغيرات الكيميائية والفيزيائية للتفاعل.

جدول رقم (8): الظروف المثلى لتقدير الهستدين

| الظروف المدروسة           | النتائج المثلى       |
|---------------------------|----------------------|
| تركيز اللومينال           | $1 \times 10^{-3} M$ |
| تركيز بيروكسيد الهيدروجين | $5 \times 10^{-2} M$ |
| تركيز النحاس الثنائي      | $5 \times 10^{-3} M$ |
| سرعة الجريان              | 3 مل بالدقيقة        |



الشكل (4) المنحنى القياسي لتقدير الهستدين

تم رسم العلاقة بين التغير في تركيز الهستدين والتغير في معدل ارتفاع الأستجابة كما مبين في الشكل (4) ولوحظ أن هناك ارتفاع في شدة البريق نتيجة للعمل التنشيطي ومدى الخطية يتراوح بين  $1 \times 10^{-3}$  و  $(3.2 \times 10^{-5} - ML^{-1})$  وكانت معادلة الخط المستقيم (linear regression equation)  $y=56.8794+0.9919x$ . أما حد الكشف فكان  $(9.2 \times 10^{-6})$  مولاري. والانحراف القياسي النسبي لتركيز  $5.1 \times 10^{-4}$  مولاري  $(n=5)$  = 1.27%.

### التطبيقات

حضرت سلسلة محاليل من المادة الدوائية بتركيز تتراوح بين (20-120) مكغم.مل<sup>-1</sup> باستخدام طريقة الإضافات القياسية، وتم الحصول على النتائج

جدول رقم (9): ملخص نتائج منحنى الإضافات القياسية للمادة الدوائية عند حدود ثقة 95% لنظام البريق الكيميائي

| مدى تراكيز الهستدين (مكغم. مل <sup>-1</sup> ) | نقطة التقاطع (a) (مللي فولت) | الميل (b) (مللي فولت/ مكغم. مل <sup>-1</sup> ) | معامل الارتباط (r) ونسبة الخطية (%r <sup>2</sup> ) | قيمة t الجدولية عند حدود ثقة 95% و n-2 | قيمة t المحسوبة $t = \frac{ r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$ | الجدولية F | المحسوبة F |
|-----------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------|------------|
| 120-20                                        | 81.57                        | 4.27                                           | 0.9831 و 98.54%                                    | 21.65                                  | 1.375                                                    | 4.34       | 9.277      |

## المصادر

- with o-phthalic aldehyde in the presence of sulfite and cyanide ions", *Anal. Chem.*, (2000), 55(12),p(1148-1151).
- 14- J.M. Yon, X.J. Fan, Q.C. Zhu and Y.Z. Su, "Liquid chromatography determination of amino acid and peptides by per-column fluorescence derivatization with N-hydroxy succinimide- $\alpha$ -(9-acridine)-acetate", *Anal. Chim. Acta*, (1998), 367(1-3)p(69-79).
  - 15- L. Zhang and M. Sun, "Determination of histamine and histidine by capillary zone electrophoresis with pre-column naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde derivatization and fluorescence detection" *Journal of Chromatography A*, (2004), 1040, p (133-140).
  - 16- Y.F. Mestre, L.L. Zamora, and J.M. Calatayud, "Luminescence" (2001) 16,p213.
  - 17- A.M. Garcia-Campana, W.R.G.E. Baeyens, "Chemiluminescence in Analytical Chemistry", Marcel Dekker, New York, (2001) p(42-45).
  - 18- A. M. García-Campaña and F. J. Lara, "Chemiluminescence and Bioluminescence", *Bioanal Chem*, (2007), 387,p(165-169).
  - 19- L. Erdey. "Indicator", (E. Bishop, Editor), pergamon, Oxford, (1972), P. 709.
  - 20- J.Chen and Y. Fang, "Flow Injection Technique for Biochemical Analysis with Chemiluminescence detection in Acidic Media" *Sensors*, (2007), 7,p(448-458).
  - 21- F.J. Larrea, A. M. García-Campaña and J. Aaron, "Analytical applications of photoinduced chemiluminescence in flow systems—A review" *Analytica Chimica Acta*, (2010), 679,p(17-30).
  - 22- R.D. Jalkine and M.B. Deton, *Appl. Spectro Sc.*, (1988), 42(7), P. (1194-1199). *Anal. Abst.*, 51, (1989), 3B18.
  - 23- L. Nie, H. Ma, M. Sun, X. Li, M. Su and S. Liang, "Direct chemiluminescence determination of cysteine in human serum using quinine\_ Ce(IV) system", *Talanta*, (2003), 59,p (959\_ 964).
  - 24- M.C. Sanfeliu Alonso a, L. Lahuerta Zamora a, J. Martínez Calatayud, "Determination of tyrosine through a FIA-direct chemiluminescence procedure", *Talanta*, (2003), 60, p(369\_ 376).
  - 25- Y.Liu, Z.Liu, Y.Shi and W.Tian, "Chemiluminescent of glutamine, *Talanta*," (2009) 34,p(54-56).
  - 26- Z. Lin, X. Chen, Z. Cai, P. Li, X. Chen and Xiaoru Wang, "Chemiluminescence of tryptophan and histidine in Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>+2</sup>-KMnO<sub>4</sub> aqueous solution" *Talanta*, (2008), 75,p (544-550).
  - 27- T.M. Triantis, E. Yannakopoulou, A. Nikokavoura, D. Dimotikali and K. Papadopoulos, "Chemiluminescent studies on the antioxidant activity of amino acids" *Analytica Chimica Acta*, (2007), 591,p106-111).
  - 1- L.Z. Geoffrey, "Biochemistry" 3<sup>ed</sup> Wm.C Brown Publishers, England (2001).
  - 2- قصي عبدالقادر الجلي، فائزة عز الدين، "الوجيزة في الكيمياء الحياتية"، (1982)، ص(33-35).
  - 3- سامي عبدالمهدي مظفر، "اساسيات الكيمياء الحياتية"، (1991)، ص(216).
  - 4- D. W. Martin, P. A. Mayes, V. W. Radwell and D. K. Grannar, "Harper's Review Of Biochemistry", Lange, New York, (1985), p (14-21).
  - 5- X. Weia, L. Qi, J. Tanb, R. Liuc and F. Wang, "A colorimetric sensor for determination of cysteine by carboxymethyl cellulose-functionalized gold nanoparticles", *Analytica Chimica Acta*, (2010) 671,p(80-84).
  - 6- Z. Chen, S. Luo, Ch. Liu and Q. Cai, *Anal Bioanal Chem* "Simple and sensitive colorimetric detection of cysteine based on ssDNA-stabilized gold nanoparticles", (2009), 395, p(489-494).
  - 7- J.V. Staden and M.C. Cormack, "Sequential injection spectrophotometric of amino acid using 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid", *Anal. Chim. Acta*, (1998), 389,p(163-170).
  - 8- M. Y. Khuhawar and S. A. Majidano, "GC Analysis of Amino Acids Using Trifluoroacetylacetone and Ethyl Chloroformate as Derivatizing Reagents in Skin Samples of Psoriatic and Arsenicosis Patients" *Chromatographia* (2011), 73,p(701-708).
  - 9- G. Li, Y. Cui, J. You, X. Zhao, Z. Sun, L. Xia, Y. Suo and X. Wang, "Determination of trace amino acids in human serum by a selective and sensitive pre-column derivatization method using HPLC-FLD-MS/MS and derivatization optimization by response surface methodology" *Amino Acids*, (2011), 40,p(1185-1193).
  - 10- W. Yue Hong, L. H. Yin, Qi. F. Sheng, Z. Wei Fang, Z. Hui1 and L. Lina, "Determination of free amino acids and taurine in Sinonovacula constricta with 2,4-dinitrochlorobenzene Precolumn Derivatization" (2011), 978(1), p(4244-9577).
  - 11- J. Lu, C. Sun, W. Chen, H. Ma, W. Shi and X. Li, "Determination of non-protein cysteine in human serum by a designed BODIPY-based fluorescent probe" *Talanta*, (2011), 83,p(1050-1056).
  - 12- M. Tabeshnia, M. Rashvandavei, R. Amini and F. Pashaei, "Electrocatalytic oxidation of some amino acids on a cobalt hydroxide nanoparticles modified glassy carbon electrode" *Journal of Electroanalytical Chemistry*, (2010), 647,p(181-186).
  - 13- V.I. Beketov, R.D. Voronina and N.B. Zorov, "Spectrophotometric and fluorometric determination of amino acid by their reaction

29- C. Lu, J. Li, Y. Yang, and J. Lin, "Determination of bisphenol A based on chemiluminescence from gold(III)-peroxymonocarbonate", *Talanta*, (2010), 82, p(1576–1580).

28- T. Pe´rez-Ruiz, C. M. nez-Lozano, V. Toma´s and J. Marti´n," Flow injection chemiluminescent method for the successive determination of L-cysteine and L-cystine using photogenerated tris(2,2-bipyridyl) ruthenium (III)", *Talanta*, (2002), 58,p (987\_ 994).

## Quantification of some amino acids by Flow injection-Chemiluminescence technique

<sup>1</sup> Suham Towfig Ameen, <sup>2</sup> Nazar Ahmed Naje, <sup>3</sup> Nashwan Hussien Ali

<sup>1, 2, 3</sup> Chem. Dept., College of Science, University of Tikrit, Tikrit, Iraq

### Abstract

This research includes the determination of some amino acids (Cysteine-Cystine, Histidine) by an innovative system (Electronic-chemical optical) for the measurement of chemiluminescence coupled with flow injection techniques. The results are as follows:

**Section A:** Involves the study and assessment of Cysteine through all chemical variables for all involved chemicals in the reaction, also various physical parameters were studied, the optimum condition for the determination of the system, based on the system chemiluminescence (luminol –hydrogen peroxide- cysteine), the concentration of cysteine over a range of (5-110)  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . The limit of detection was  $9 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ , RSD % for five replicates of a standard ( $4.9 \times 10^{-4}$ ) was 0.8%.

**Section B:** The optimum condition for the determination of Cystine, based on system chemiluminescence (luminol –hydrogen peroxide-Cu II- cystine), calibration was linear between (20-80)  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for cystine. The limit of detection was ( $1.6 \times 10^{-6}$ )  $\text{mol.L}^{-1}$ , RSD % for five replicates of a standard ( $2.08 \times 10^{-4}$ ) was 0.94 %.

**Section C:** The optimum conditions for the determination of Histidine, based on the system chemiluminescence for (luminol – hydrogen peroxide –Mn II- Histidine), calibration was linear between (10-160)  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for histidine. The limit of detection was ( $9.2 \times 10^{-6}$ )  $\text{mol.L}^{-1}$ . RSD % for five replicates of standard ( $5.1 \times 10^{-4}$ )  $\text{mol.L}^{-1}$  was 1.27%.

All the proposed methods have been applied successfully for the determination of amino acids in pharmaceutical.