

طريقة جديدة لتقدير الهستادين بتقنية الحقن الجرياني المستمر والتحسس بالبريق الكيميائي

عصام محمد علي شاكر الهاشمي* نعم شاكر تركي العوادي*

تاريخ قبول النشر 6 / 5 / 2009

الخلاصة:

يقدم البحث طريقة بسيطة وحساسة لتقدير الهستادين باستخدام منظومة الحقن الجرياني من خلال قياس البريق الكيميائي الناتج من اكسدة اللومينال بفعل بيروكسيد الهيدروجين في وسط قاعدي بوجود الهستادين بحجم 70 مايكرو لتر على التيار الناقل من هيدروكسيد الصوديوم والذي يعطي بريق أزرق-بنفسجي له قمة انبعاث عند 425 نانومتر. تم الحصول على علاقة لتغير استجابة البريق مع التركيز للهستادين باستخدام معادلة الخط المستقيم وكان مدى منحنى المعايرة يمتد من (5-60) ملي مول لتر⁻¹ ومعامل التقدير 95.79% ومعادلة الدرجة الثانية بمدى من (5-80) ملي مول لتر⁻¹ ومعامل التقدير 96.44% ولوحظ ان الاخير اكثر واقعية في التعبير عن كافة النتائج. تم التوصل الى حدود كشف (S/N = 3) 31.93 مايكرو غم/70 مايكرو لتر من التخفيف التدريجي لاقول تركيز في منحنى معادلة الخط المستقيم. تكرارية النتائج المستحصل عليها RSD > 5% لست قياسات متكررة. تم دراسة تأثير الايونات الموجبة والسالبة حيث ازيل تأثيرها باستخدام اعمدة صغيرة جداً معبأة بمبادل ايوني موجب او سالب ومربوطة بعد صمام الحقن مباشرة.

الكلمات المفتاحية: هستادين، البريق الكيميائي، الحقن الجرياني المستمر

المقدمة:

المثبت لتحرير بيروكسيد الهيدروجين ليُدخل في نظام البريق الكيميائي للتحسس وتقدير الهستادين [8]. تميزت هذه البحوث الحديثة باستخدامها لآليات معقدة ومتقدمة، اما البحث الحالي فتم تقدير الهستادين كونه عاملاً مساعداً في تكسير جزئية البيروكسيد منتجة جذر البيروكسيل الحر والذي يهاجم جزئية اللومينال لاعطاء بريقاً كيميائياً بوساطة منظومة حقن جرياني صممت محلياً، وسيتم دراسة المتغيرات المختلفة لايجاد افضل منحنى وافضل حد كشف.

المواد وطرائق العمل:

المواد الكيميائية

محلول قياسي للهستادين ثنائي الهيدروكلورايد (0.1 مول. لتر⁻¹) شركة BDH: اذابة 2.2809 غم من الهستادين ثنائي الهيدروكلورايد (C₆H₉N₃O₂.2HCl) في 100 مل ماء مقطر ومحلول اللومينال (1 ملي مول. لتر⁻¹) (Fluka): باذابة 0.17716 غم من 3-امينوفثاليل هيدرازيد في 1 لتر من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.2 مول. لتر⁻¹) ومنه تحضر سلسلة من المحاليل المخففة التي تخفف بنفس المحلول الاخير، بيروكسيد الهيدروجين (3 مول. لتر⁻¹): استخدم H₂O₂ صناعي (شركة degussa) وتم امراره على مبادل ايوني سالب واخر موجب للتخلص من الايونات الموجبة

يُعد الهستادين من الاحماض الامينية الاساسية الجوهرية والتي لا تنتج ولا تتحول من قبل الكبد لذلك لا بد وان يتواجد في التغذية ليتوفر في جسم الكائن الحي. معظم الهستادين يتواجد في اللحم والاسماك وكميات قليلة من الهستامين الحر يتواجد في النباتات والغذاء المخمر. يتحول الهستادين في الطعام الى الهستامين من خلال الفعل البكتيري لازالة مجموعة الكاربوكسيل الموجودة في الهستادين، لذلك فان الهستادين في جسم الكائن الحي يعد مقياس ومؤشر مباشر للهستامين ومستواه في الانسجة يزداد كلما ازداد تواجد الهستادين في الغذاء، ومن المعروف ان الهستامين مسؤول لعدد كبير من العمليات الوظيفية في الجسم وزيادته تسبب الانتفاخ والاحمرار والحساسية وخاصة في المناطق الملتهبة بالجسم [1]، لذلك فقد اخذ تقدير الهستادين مجالاً واسعاً في البحث العلمي واعتمدت اغلب طرائق التقدير على الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء حيث قدر في سوانل الجسم [2] اضافة الى استخدام نفس التقنية في التقدير الكمي له بوساطة النظائر المشعة للهستامين [3] وتقدير العديد من الاحماض الامينية خلال تقديره بهذه التقنية [4] والهجرة الكهربائية الشعرية عالية الاداء [5] واستخدام تفاعل البريق الكيميائي وبالاقتران مع تقنية الحقن الجرياني المستمر لتقدير العديد من الاحماض الامينية اضافة الى الهستادين [6] بالاضافة الى البريق الكيميائي المتولد كهربائياً [7] واستخدام انزيم هستادين اوكسيديز

*قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة بغداد

ومنفذ لخروج نواتج التفاعل (المقطع المضيء في تفاعل البريق الكيميائي) وجلد اسود اللون معتم لتغطية الوحدة التحسسية لتقليل خلفية الانبعاث والمنظومة الالكترونية: انبوبة مضاعفة الفوتونات (نوع RCA 2055) ومجهز الفولتية (0-1.6) كيلو فولت (نوع JOBIN YVON (France) ومضخم تيار كهربائي- قراءة رقمي (nA نانوامبير – بيكوامبير) (United detector technology (Dual channel optometer) (U.S.A.) ومسجلة خطوط بيانية مزود بقلمين ضمن مدى (500-1) مللي فولت او (500-1) فولت (نوع Siemens موديل (Germany) (Kom pen sograph C1032) ومرشح الكتروني يعمل على ترشيح الاستجابة وتقليل خلفية الانبعاث وتحسين نسبة الاشارة الى الضوضاء (S/N).

طريقة العمل

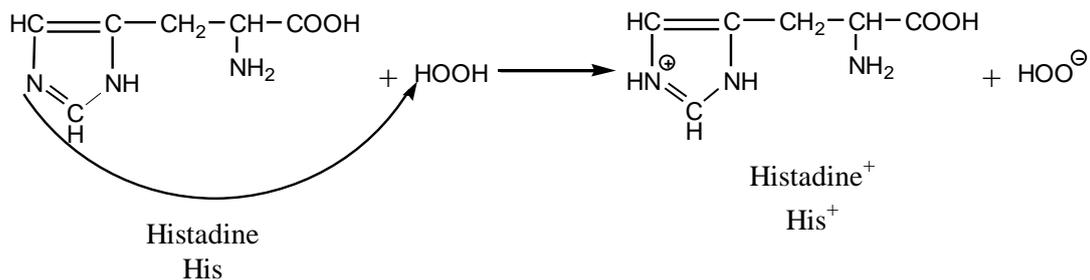
تتكون منظومة التفاعل (شكل رقم (1)) لنظام البريق الكيميائي: لومينال-بيروكسيد الهيدروجين-هيدروكسيد الصوديوم-هستادين من ثلاث خطوط: الاول يجهز بمحلول اللومينال (0.5 مللي مول/لتر⁻¹) والخط الثاني محلول بيروكسيد الهيدروجين (0.5 مللي مول/لتر⁻¹) ويلتقي كلا الخطان معاً عند نقطة الالتقاء قبل وصولهم الى خلية التفاعل (البريق الكيميائي) وبسرعة جريان 2.0 مل دقيقة⁻¹ اما الخط الثالث يمثل التيار الناقل من هيدروكسيد الصوديوم (0.1 مللي مول/لتر⁻¹) وبسرعة جريان 1.5 مل دقيقة⁻¹ والمؤدي الى صمام الحقن الذي يحقن من خلاله الانموذج من الهستادين بحجم 70 مايكرو لتر (طول الملف 18.2 سم ونق 0.35 مليمتراً). تلتقي محاليل الخطان في خلية التفاعل (زجاجية حلزونية سعة 100 مايكرو لتر) ذات مدخلين ومنفذ لنواتج التفاعل (مصممة محلياً) مؤدياً الى تحرر ضوء البريق الكيميائي بلون ازرق-مخضر بفعل عملية الاكسدة لجزيئة اللومينال بواسطة بيروكسيد الهيدروجين في وسط قاعدي وبوجود الهستادين والاستجابة المستحصلة معبراً عنها بوحدة نانوامبير او من خلال مسجلة الخطوط البيانية بوحدة مللي فولت، ومن المتوقع ان الميكانيكية المقترحة والتي تم اثباتها عملياً كما يلي [9,10].

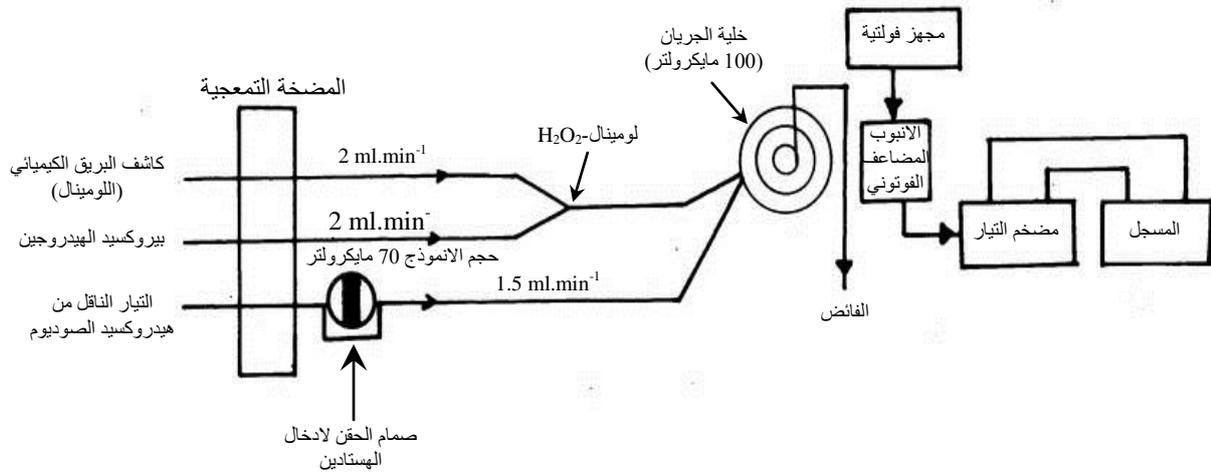
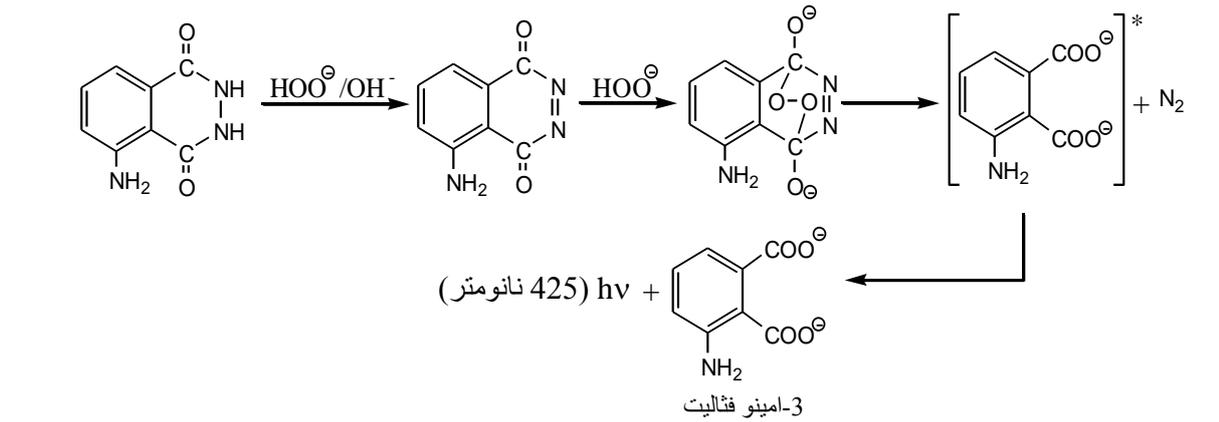
والسالبية ان وجدت لضمان عدم حدوث تلوث للمحاليل ثم تم تخفيف 170.07 مل من H₂O₂ (60% و 17.64 مول/لتر⁻¹) الى حجم 1 لتر وهيدروكسيد الصوديوم (0.5 مول/لتر⁻¹): اذابة 40 غم من NaOH (شركة Merck) في 2 لتر من الماء المقطر المغلي والمبرد، والايونات الدخيلة بتركيز 1000 مكغم.مل⁻¹: Na⁺ اذابة 1.8478 غم/500 مل من NaNO₃ و K⁺ اذابة 1.2949 غم/500 مل من KNO₃ و Mg²⁺ اذابة 1.5255 غم/250 مل من Mg(NO₃)₂ و Ca²⁺ اذابة 1.4726 غم/250 مل من Ca(NO₃)₂.4H₂O و Fe³⁺ اذابة 3.617025 غم/500 مل من Fe(NO₃)₃.9H₂O و Fe²⁺ اذابة 1.7543 غم/250 مل من FeSO₄(NH₄)₂.SO₄.6H₂O و PO₄³⁻: 0.9423 غم/250 مل من Na₂HPO₄.12H₂O و SO₄²⁻: 0.7393 غم/500 مل من Na₂SO₄ و KCl من 500 غم/1.05146 : Na₂CO₃.10H₂O من 250 غم/1.1917 و HCO₃⁻: 0.6885 غم/500 مل من NaHCO₃. جميع الاملاح ذات نقاوة عالية ومجهزة من عدة شركات (Riedel و BDH و Flucka A.G.) و Merck و M & B.

مبادل ايوني موجب نوع: Strong Cation Exchange Amberlite Resin IR-120(Na⁺)
مبادل ايوني موجب نوع: Strong Anion Exchange Amberlite Resin IRA-400(Cl⁻)

الاجهزة والادوات المستخدمة

مضخة تمعجية المائية المنشأ (نوع Ismatec) وانايبب ناقلة للمواد المتممة للتفاعل مصنعة من مطاط السليكون او متعدد البروبلين واخرى من التفلون بقطر داخلي (1 و 0.5) مليمتراً على التوالي وصمام حقن (سداسي المنفذ) (نوع Rheodyne (U.S.A.)، وصلة الانموذج من التفلون بقطر داخلي 0.7 مليمتراً وباطوال مختلفة (حسب حجم الانموذج المطلوب) وقناني الكواشف (زجاجية) سعة 500 مل ومحقنة طبية بلاستيكية لحقن الانموذج (سعة 10 مل) وتوصيلات من مطاط السليكون لربط وتوصيل الانايبب و خلية زجاجية حلزونية الشكل لالتقاء المحاليل المتممة للتفاعل (خلية التفاعل) ذات منفذين لدخول المحاليل





شكل (1): مخطط لمنظومة الحقن الجرياني لتقدير الهستادين بنظام: لومينال- H_2O_2 -OH-هستادين

جريان مختارة لخطي اللومينال وبيروكسيد الهيدروجين 2.0 مل. دقيقة⁻¹ وسرعة جريان التيار الناقل من هيدروكسيد الصوديوم (0.1 مول. لتر⁻¹) 1.5 مل. دقيقة⁻¹ وعند حجم لانموذج محقن من الهستادين 80 مايكرو لتر ولسلسلة متغيرة من التراكيز (0.1-0.002) مول. لتر⁻¹ تم الحصول على النتائج المدونة في الجدول رقم (1).

النتائج والمناقشة:

الظروف الفضلى لمنظومة التفاعل

- المتغيرات الكيميائية:

تركيز اللومينال:

حضرت سلسلة محاليل من اللومينال (1-0.05) مللي مول. لتر⁻¹ وعند تركيز تجريبي من بيروكسيد الهيدروجين (0.4 مول. لتر⁻¹) وسرع

جدول (1): مفاضلة تراكيز اللومينال لتقدير الهستادين حسب نظام البريق: لومينال- H_2O_2 -OH-هستادين

$r \pm S_{E_r}$	$S_{E_r} = \frac{1-r^2}{\sqrt{n}}$	المحسوبة $t = \frac{ r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$	قيمة t الجدولية عند حدود ثقة 95% n-2	معامل الارتباط (r) نسبة الخطية % r^2	معادلة الخط المستقيم $Y^{\wedge} = a + bx$	مدى تراكيز الهستادين في منحنى المعايرة مول. لتر ⁻¹	تركيز اللومينال مللي مول. لتر ⁻¹
0.9719±0.023	0.023	8.258 >> 2.776		0.9719 %94.46	-0.032+46.86x	0.025-0.0025	0.05
0.9689±0.022	0.022	9.594 >> 2.447		0.9689 %93.88	0.063+324.85x	0.04-0.005	0.1
0.9959±0.003	0.003	24.592 >> 2.571		0.9959 %99.18	0.43+553.29x	0.08-0.005	0.5
0.9643±0.022	0.022	10.31 >> 2.306		0.9643 %93.00	1.22+238.48x	0.07-0.01	1

حيث: $y^{\wedge} =$ معدل ارتفاع استجابة البريق لثلاث قياسات متكررة (n = 3) بوحدة نانو امبير (nA)
x = تركيز الهستادين بوحدة مول. لتر⁻¹

Standard error of the correlation coefficient = S_{E_r} (الخطأ القياسي لمعامل الارتباط)

الكيميائي)، كذلك الحال عند التراكيز الواطئة لبيروكسيد الهيدروجين لوحظ انخفاض في ارتفاع استجابة البريق (شكل رقم (2)) بالإضافة الى ان نسبة الاشارة الى الضجيج (S/N) واطئة جداً ولا يمكن تمييز الاستجابة المستحصلة بفعل التراكيز الواطئة له ويعد احد المواد الاساسية المتممة لتفاعل البريق لذلك تم اختيار 0.5 مول لتر⁻¹ كأفضل تركيز يعطي اعلى انبعاث لضوء البريق.

المتغيرات الفيزيائية: حجم الانموذج المحقن

باستخدام التراكيز الفضلى للمواد المتممة للتفاعل: اللومينال (0.5 مللي مول لتر⁻¹) -بيروكسيد الهيدروجين (0.5 مول لتر⁻¹) وتركيز تجريبي للتيار الناقل من هيدروكسيد الصوديوم (0.1 مول لتر⁻¹) وتركيز مختار من الهستادين (0.03 مول لتر⁻¹) واستخدام وصلات انموذج باطوال مختلفة (5 و 10 و 18 و 21 و 26) سم وقطر داخلي 0.7 ملم وسرعة جريان لخطي اللومينال وبيروكسيد الهيدروجين 2.0 مل دقيقة⁻¹ والتيار الناقل لهيدروكسيد الصوديوم (0.1 مول لتر⁻¹) 1.5 مل دقيقة⁻¹ تم الحصول على النتائج المدونة في الجدول رقم (2) وشكل رقم (3) ومنه يمكن الاستنتاج زيادة انبعاث البريق الكيميائي مع زيادة حجم مقطع الانموذج والحصول على استجابات بقمم حادة ومنظمة وصولاً الى 70 مايكرو لتر ومنه تم الحصول على اعلى استجابة مقارنة بالاستجابات الناتجة من حجوم لمقاطع الانموذج الاطوال (< 70 مايكرو لتر) والتي تمتاز بعرض قممها وتشووها (شكل رقم (3)) بفعل استمرار مرور المقطع المضي لتفاعل البريق امام المتحسس على هذا الاساس تم اختيار 70 مايكرو لتر للحصول على استجابات حادة ونقية وبارتفاعات عالية فضلاً عن الاقتصاد في استهلاك المواد الكيميائية.

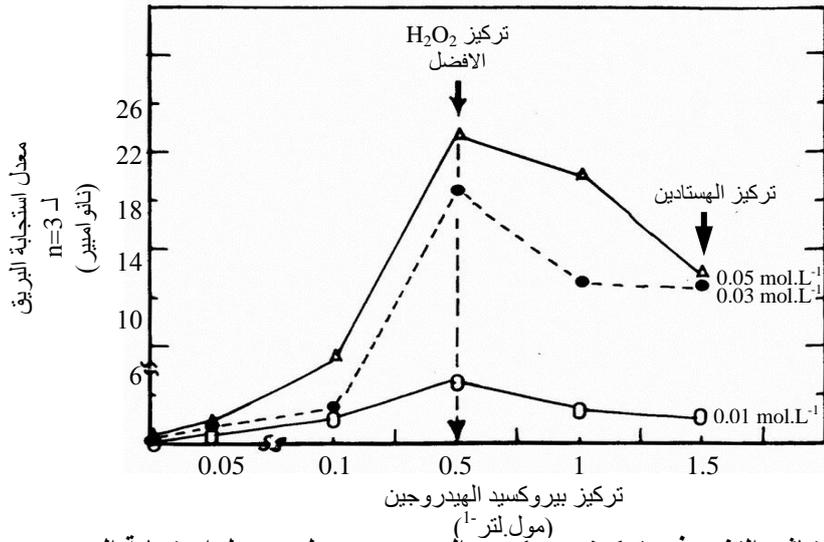
لوحظ من نتائج الجدول رقم (1)، انه عند التراكيز الواطئة للومينال (اقل من 0.05 مللي مول لتر⁻¹) وعند تراكيز متغيرة للهستادين فأن قيمة الميل (الحساسية) واطئة ونسبة الخطية قليل ($r^2 > 95\%$) ومدى ضيق من التراكيز قد يعزى الى قلة القطع الباعثة للبريق بفعل قلة تركيز اللومينال (احد المواد الاساسية والمتممة لتفاعل البريق) مؤدياً الى انبعاث ضعيف لضوء البريق، كذلك الحال عند التراكيز العالية (اكبر من 0.05 مللي مول لتر⁻¹) لوحظ انخفاض في ضوء البريق متمثلاً بانخفاض ارتفاع الاستجابات قد يعزى الى الزيادة العالية في جزيئات اللومينال مؤدية الى حصول تصادمات منتجة لجزيئات مثارة والفائض منها يتصادم مع جزيئات المواد المتفاعلة في المحيط والجزيئات المثارة مسببة الى فقدان طاقة الاثارة بشكل طاقة حرارية لا اشعاعية، بناءً على ذلك تم اختبار 0.05 مللي مول لتر⁻¹ هو التركيز الافضل للحصول على افضل نتائج، وكما مدون في الجدول رقم (1).

تركيز بيروكسيد الهيدروجين

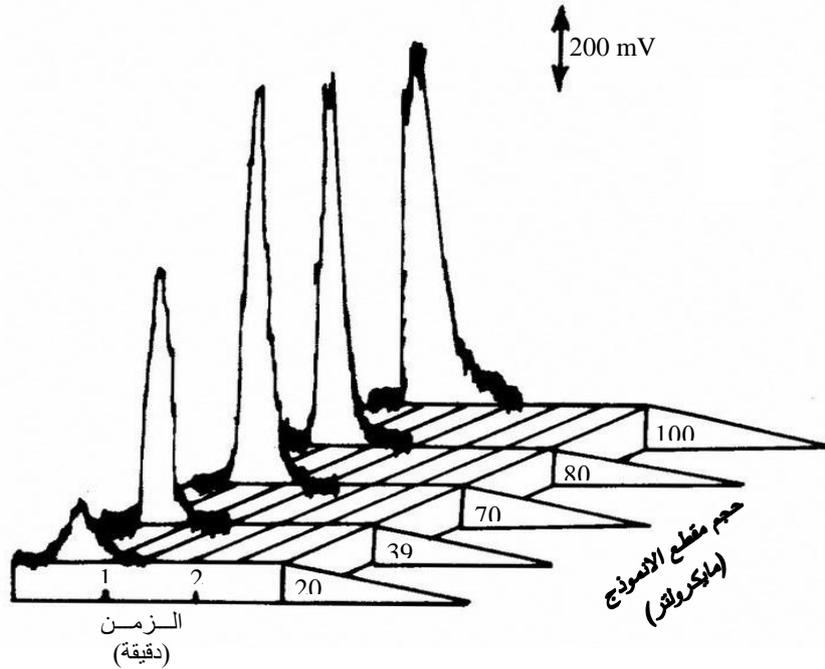
بتثبيت التركيز الافضل لمحلول اللومينال (0.05 مللي مول لتر⁻¹)، ولسلسلة محاليل بتراكيز متغيرة من بيروكسيد الهيدروجين (0.05-1.5) مول لتر⁻¹ ولثلاث تراكيز متغيرة من الهستادين (0.01 و 0.03 و 0.05) مول لتر⁻¹ وحجم لانموذج محقن 80 مايكرو لتر تم الحصول على الشكل رقم (2) الذي يوضح انه عند التراكيز العالية لبيروكسيد الهيدروجين (اكبر من 0.5 مول لتر⁻¹) تم الحصول على خلفية انبعاث عالية جداً واستجابات بارتفاعات منخفضة قد يعزى نتيجة لتكسر جزيئات الهستادين بفعل التراكيز العالية للعامل المؤكسد (بيروكسيد الهيدروجين) بدلاً من تحرر جذر البيروكسيد السالب (HOO⁻) والذي يكون القطع الباعثة للبريق من خلال تكسر جزيئة اللومينال (ميكانيكية البريق

جدول (2): تأثير التغير في حجم مقطع الانموذج على ارتفاع الاستجابة لنظام: لومينال-H₂O₂-OH-هستادين

حدود القناة للتعبير عن ارتفاع الاستجابة ل-n-1 من النتائج وعند حدود ثقة 95% $\bar{y}_i \pm t_{0.025} \frac{\sigma_{n-1}}{\sqrt{n}}$	الانحراف القياسي النسبي المنوي %R.S.D	الانحراف القياسي σ_{n-1} (n = 3)	معدل ارتفاع الاستجابة \bar{y}_i (نانو امبير)	حجم مقطع الانموذج (مايكرو لتر)
3.24 ± 0.049	0.62	0.02	3.24	20
8.43 ± 0.37	1.78	0.15	8.43	39
11.92 ± 1.07	3.61	0.43	11.92	70
11.40 ± 0.79	2.81	0.32	11.40	80
10.98 ± 0.75	2.73	0.30	10.98	100



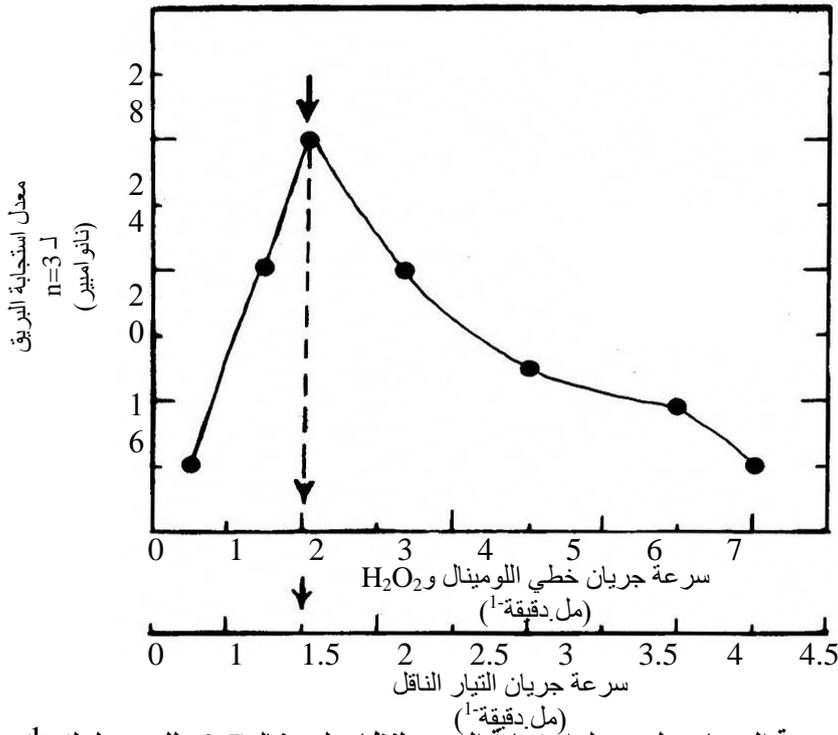
شكل (2): تأثير التغير في تركيز بيروكسيد الهيدروجين على معدل استجابة البريق



شكل (3): التغير في حجم مقطع الانموذج على ارتفاع وهينة الاستجابة للبريق الكيميائي عند تقدير الهستادين

الفيزيائية واهمها التشتت بفعل التنافذ والحمل والتخفيف لمقطع الانموذج مع المواد المتممة للتفاعل وصولاً الى سرعة 2.0 مل. دقيقة⁻¹ لخطي اللومينال وبيروكسيد الهيدروجين و1.5 مل. دقيقة⁻¹ لخط التيار الناقل ثم يعقبه النقصان في ارتفاع شدة البريق عند السرعة العالية جداً وقد يعزى ذلك الى سرعة خروج المقطع المضيء من خلية القياس وعليه يتم الحصول على استجابات بقمم حادة وسريعة ولكن واطئة الارتفاع وعليه تم استخدام 2.0 مل. دقيقة⁻¹ كافضل سرعة جريان لخطي اللومينال وبيروكسيد الهيدروجين و1.5 مل. دقيقة⁻¹ لخط التيار الناقل.

سرعة الجريان باستخدام الظروف الفضلى لمنظومة البريق (شكل رقم (1)) من المتغيرات الكيميائية وتركيز مختار للهستادين (0.03 مول. لتر⁻¹) كانبودج محقن على خط التيار الناقل من هيدروكسيد الصوديوم (0.1 مول. لتر⁻¹) واستخدام سرعة جريان متغيرة (0.5-8) مل. دقيقة⁻¹ لخطي اللومينال وبيروكسيد الهيدروجين و(0.5-4.5) مل. دقيقة⁻¹ لخط التيار الناقل، تم الحصول على الشكل رقم (4) ويلاحظ الزيادة في انبعاث البريق متمثلاً بارتفاع الاستجابة مع الزيادة في سرعة الجريان بفعل التقليل من تأثير كافة المتغيرات



شكل (4): التغير في سرعة الجريان على معدل استجابة البريق لنظام: لومينال (0.5 مللي مول. لتر⁻¹) -H₂O₂ (0.5 مول. لتر⁻¹) -OH⁻ (0.1 مول. لتر⁻¹) -هستادين (0.03 مول. لتر⁻¹) بحجم 70 مايكرو لتر كامنودج محقن

(معادلة الخط المستقيم) وبمعامل ارتباط 0.9788 وكما مبين في الجدول رقم (A-3) ولمدى من التراكيز (0.005-0.06) مول. لتر⁻¹ ولوحظ ان زيادة مدى التراكيز يؤدي الى ضعف في قيمة معامل الارتباط مما يوجب علينا ايجاد الموديل الرياضي الاكثر تعبيراً وواقعية في تمثيل النتائج المستحصلة عملياً والتي لو رسمت بالحالة الاعتيادية لظهرت منحني بيضوي (Parabola) وهذه هي صفات معادلات من الدرجة الثانية وباستخدام برامجيات [11] لايجاد معاملات المعادلة تم الحصول على النتائج المدونة في الجدول رقم (B-3) وشكل رقم (B-5) وبالاستناد على الطرق الاحصائية الحديثة تم معالجة كافة البيانات [12-16].

الموديل الرياضي لتغير استجابة البريق الكيميائي مع التركيز للهستادين وحدود الكشف لنظام: لومينال-بيروكسيد الهيدروجين-هيدروكسيد الصوديوم-الهستادين

حضرت سلسلة محاليل للهستادين (0.005-0.08) مول. لتر⁻¹ بحجم 70 مايكرو لتر بعد تثبيت كافة المتغيرات الكيميائية: اللومينال (0.5 مللي مول. لتر⁻¹) -بيروكسيد الهيدروجين (0.5 مول. لتر⁻¹)، والتيار الناقل من هيدروكسيد الصوديوم (0.1 مول. لتر⁻¹) باستخدام المنظومة المصممة محلياً (شكل رقم (1)) ولوحظ من التوزيع الطبيعي للنتائج المستحصلة عملياً (نانو امبير) ضد تراكيز متغيرة للهستادين (تكرار كل قياس ثلاث مرات) ان هنالك علاقة خطية (شكل رقم (A-5)) تنطبق عليها معادلة الدرجة الاولى

جدول (A-3): ملخص لنتائج تغير الاستجابة للبريق الكيميائي مع التركيز باستخدام معادلة الدرجة الاولى وحدود الكشف

حدود الكشف مايكروغم/70 مايكرو لتر	قيمة t المحسوبة	قيمة t الجدولية ل n=2	r	معادلة الخط المستقيم عند حدود ثقة 95% n=2	تركيز منحنى المعايرة	التركيبة المقاسة
معادلة الخط المستقيم y=y _B +3S _B	من عملياً من التخفيف	بحدود ثقة 95%	%r ²	y [^] = a ± S _a t + b ± S _b t [x]	10=nل (مول. لتر ⁻¹)	مول. لتر ⁻¹
198	31.93	13.49 >> 1.86	0.9788 %95.79	0.021 ± 0.039 + 373.334 ± 51.427[x]	0.06-0.005	0.005-0.08

y[^] = معدل استجابة البريق الكيميائي معبرة بارتفاع الاستجابة ل-n=3 (CL.I(av.pk.hgt.(n=3)) وبوحدة نانو امبير (nA) [Histidine] = [x] مول. لتر⁻¹ D.L.= حدود الكشف و S_B = الانحراف القياسي لعشرة قياسات من محلول بلانك=0.05 y = قيمة الاستجابة لاوطى تركيز (حدود الكشف نظرياً) والمستحصل من معادلة الخط المستقيم r = معامل الارتباط و r² = معامل التقدير.

(H₁) والذي يبين ان العلاقة خطية بين تغير استجابة البريق مع التركيز وان قيمة zero ≠ r وانما r = 0.9788.

من نتائج الجدول رقم (A-3) يمكن الاستنتاج: بما ان الفرض الاساسي (H₀) ان العلاقة لا خطية وان zero = r عندما t_{tab} > t_{cal} الا انه من النتائج المستحصلة لوحظ ان t_{tab} < t_{cal} (13.49) < 1.86) لذا يرفض الفرض الاساسي ويقبل بالبدل

جدول (B-3): ملخص نتائج معادلة الدرجة الثانية [17] (Quadratic) لتقدير الهستادين

قيمة t المحسوبة من $t = \frac{ r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$	قيمة t الجدولية لـ n-2 بحدود ثقة 95% %95	r %r ²	معادلة Quadratic عند حدود ثقة 95% لـ n $y^{\wedge}=a\pm S_a t+b\pm S_b t+c\pm S_c t[x^2]$	مدى تراكيز معادلة الدرجة الثانية لـ n=10 مول.لتر ⁻¹	التراكيز المقاسة مول.لتر ⁻¹
14.72 >> 1.86		0.9820 %96.44	-1.28±2.68+498.51±213.62[x] - 1987±3295.73[x ²]	0.08-0.005	-0.005 0.08

يلاحظ من نتائج الجدول (B-3)

المثالية) وقيمة الفضلة او الخطأ واطئة ادى ذلك الى زيادة قيمة F وتم الاقتراب من الحالة المثالية والتي تبين ان هنالك ارتباط وثيق بين تغير استجابة البريق مع تراكيز الهستادين وناتج العلاقة خط مستقيم لمدى معين من التراكيز (شكل رقم 5-).

ولتحليل المتغيرات للبيانات المستحصلة من معادلة الدرجة الثانية وبالاعتماد على النتائج المدونة في الجدول رقم (B-3) تم التوصل الى الجدول رقم (B-4) والتي لخصت فيه.

جدول (B-4): تحليل المتغيرات لنتائج معادلة الدرجة الثانية (Quadratic)

F = $\frac{S_1^2}{S_0^2}$	محل مجموع المربعات Mean square Msq	درجات الحرية D _F	مجموع المربعات (SSq)	مصدر التباين (Source)
94.73	S ₁ ² = 219.032	2	438.064	Regr (بسبب الانحدار)
	S ₀ ² = 2.312	7	16.184	Error (حول الانحدار)
		9	454.248	Total (الكلي)

وبما ان قيمة F الجدولية (F₇² = 4.74) عند حدود ثقة 95%.

ومن النتائج المدونة في الجدول رقم (B-4) لوحظ ان قيمة F المحسوبة اكبر بكثير من F الجدولية (4.74 >> 94.73) مما يدل على ان هنالك فرق بالغ الاهمية وجوهري بين التباين بفعل الانحدار والفضلة (الخطأ) مؤدياً زيادة عالية لقيمة F والتي تعطي فكرة على العلاقة الوثيقة وان هنالك ارتباط بالغ الاهمية في تغير استجابة البريق مع تراكيز الهستادين وكما مبين في الشكل (B-5) (منحني بيضوي).

وعند اجراء مقارنة لتحليل النتائج بمعادلة الخط المستقيم من الصنف y = a + bx حيث a: نقطة التقاطع و b: الانحدار يمثل حساسية الاستجابة

ان المدى الخطي الواسع (0.08-0.005) مول. لتر⁻¹ يعطي دلالة على ان معادلة الدرجة الثانية اكثر واقعية في التعبير على كل النتائج المستحصلة عملياً وخاصة لمدى من التراكيز العالية وان قيمة معامل الارتباط العالية (0.9820) تقيس قوة العلاقة بين متغيرين ولا تبين ان هنالك علاقة خطية كما في معادلة الدرجة الاولى كذلك تمثل قوة الارتباط الوثيق بين الموديل الرياضي المنتخب والقيم المستحصلة عملياً وعند استخدام الميل كمعيار للمقارنة بين الموديلين الرياضييين

اكثر حساسية في تفسير النتائج وخاصة عند التراكيز العالية بمقدار مرة ونصف تقريباً مما هو عليه لمعادلة الدرجة الاولى وللبرهنة على ذلك يتم متابعة الجدول رقم (4) بكافة فقراته (A) و (B) لتحليل المتغيرات [18].

جدول (A-4): تحليل المتغيرات لنتائج معادلة الدرجة الاولى

F = $\frac{S_1^2}{S_0^2}$	محل مجموع المربعات Mean square Msq	درجات الحرية D _F	مجموع المربعات Sum of square (SSq)	مصدر التباين (Source)
182.32	435.154	1 = v ₁	435.154	Regr (بسبب الانحدار)
	2.387	8 = v ₂	19.094	Error (حول الانحدار)
		9	454.248	Total (الكلي)

ومن نتائج جدول رقم (A-4) والرجوع الى الجداول الخاصة بقيم F الجدولية [15] لوحظ ان قيمة F_{v₂}^{v₁} مع درجات حرية v₁ = 1 و v₂ = 8 وعند حدود ثقة 95% مساوية الى 5.32 بناءً على ذلك فان F_{tab} (الجدولية) > F_{cal} (المحسوبة) ويمكن الاستنتاج ان هنالك فرق بالغ الاهمية بين التباين بسبب الانحدار والفضلة (حول الانحدار) وكلما كان قيمة التباين بسبب الانحدار عالية (الحالة

متتالية ومقارنة النتائج المستحصلة من المحاليل المحتوية على الايونات الدخيلة مع المحلول المرجع (تركيز ثابت للهستادين فقط) تم احتساب النسبة المئوية للتأثير على استجابة البريق الكيميائي وكما موضح في الجدول رقم (A-6) و(B).

جدول (A-6): نتائج تأثير الايونات الدخيلة الموجبة على البريق خلال تقدير الهستادين بتركيز 0.02 مول/لتر⁻¹

النسبة المئوية للتداخل (%)						
Fe ²⁺	Fe ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	الايون الموجب
12.34	48.68	5.32	2.53	0.22	0.89	1
30.68	65.76	6.78	4.67	0.32	1.48	5
65.67	88.66	6.98	5.56	0.56	2.32	10

جدول (B-6): نتائج تأثير الايونات الدخيلة السالبة على البريق

النسبة المئوية للتداخل (%)				
HCO ⁻	CO ₃ ²⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	PO ₄ ³⁻
+1.68	-2.34	-20.32	-58.42	-29.32
+30.42	-50.62	-11.22	-1.92	-11.32
+55.32	+16.86	-6.42	+89.42	+44.53

يمكن الاستنتاج ان المنظومة ذات حساسية عالية لان تتحسس بكمية الفوتونات الصادرة من نظام البريق مهما كانت قليلة بفعل وجود ايون دخيل وتعطي دلالة واضحة لاعادة النظر بنقاوة المواد الكيميائية والتي قد تعطي فوتونات ويمكن اعتماد هذا النظام لقياس التلوث الايوني (الايونات الموجبة او السالبة) مهما كانت بتركيز ضئيلة يقابله في نفس الوقت الانتقائية العالية لهذا النظام اتجاه بعض الايونات الموجبة مثل الحديدوز(II) والحديدك(III) ولكافة التراكيز جدول رقم (A-6) كذلك الحال بالنسبة للايونات السالبة حيث كانت النسبة المئوية لتأثير التداخل عالية ولجميع الايونات الدخيلة السالبة (جدول رقم (B-6)). وقد تعزى الزيادة في ارتفاع البريق الكيميائي الى قابلية بعض الايونات (الموجبة او السالبة) الى زيادة معدل سرعة التفاعل لنظام البريق او الى قابلية بعض الايونات وخاصة السالبة كونها عوامل مؤكسدة تعمل على زيادة اكسدة جزيئة البريق (اللومينال) وان اكثر الايونات اخماداً لتفاعل البريق هو الكبريتات (1 مكغم.مل⁻¹) وقد يعزى مقدار النقيصة في ارتفاع الاستجابة الى استهلاك جزء من بيروكسيد الهيدروجين قبل تفاعل

(y_i) مقابل التركيز (x_i) والتي اعطت فضلا متبقية (مقياس لمدى تقارب القيم العملية y_i من القيم المخمنة y_i[^]) عالية (1.60) والتي تساهم في اضعاف الخط المستقيم الذي يمثل النتائج اما المعادلة y=a+bx+cx² فكانت الفضلة المتبقية قليلة (1.50) وهذا معناه تطابقاً أكثر وتربطاً أفضل لذا كان معامل الارتباط قد تحول من 0.9788 للخط المستقيم الى 0.9820 لمعادلة من الدرجة الثانية.

التكرارية

تم فحص دقة وتكرارية نتائج تقدير الهستادين لنظام: لومينال-بيروكسيد الهيدروجين-هيدروكسيد البوتاسيوم-هستادين من خلال احتساب قيم الانحراف القياسي النسبي المئوي لثلاث تراكيز كما موضح في الجدول رقم (5) ولست قياسات متكررة لكل تركيز ولوحظ ان قيمة %R.S.D. اقل من 5%.

جدول (5): تكرارية نتائج تقدير الهستادين بواسطة تفاعل البريق الكيميائي

$\bar{y} \pm t \frac{\sigma_{n-1}}{\sqrt{n}}$	التكرارية %R.S.D	σ_{n-1}	المعدل الحسابي \bar{y}_i (ملي فولت)	عدد مرات الحن (n)	تركيز الهستادين مول/لتر ⁻¹
7.49 ± 0.24	3.07	0.23	7.49	6	0.02
12.07 ± 0.59	4.64	0.56	12.07	6	0.03
18.69 ± 0.84	4.28	0.80	18.69	6	0.05

تأثير الايونات الدخيلة

من خلال التجارب التي اجريت خلال تقدير الهستادين لنظام: لومينال-بيروكسيد الهيدروجين-هيدروكسيد البوتاسيوم-هستادين تم دراسة فيما اذا هناك تأثير لبعض الايونات الموجبة او السالبة على نظام البريق الكيميائي المتكون بفعل اكسدة جزيئة اللومينال بوساطة بيروكسيد الهيدروجين بوجود الهستادين وفي وسط القاعدي مما قد يؤدي الى انخفاض او ارتفاع في الضوء المنبعث من تفاعل البريق الكيميائي وهذا يعتمد على طبيعة سير التفاعل (خواص الايون الدخيل) وحسب ميكانيكية التفاعل، ومن الايونات التي تم انتقاءها والمعتاد وجودها في الاوساط البيولوجية:

الايونات الموجبة: Na⁺ و K⁺ و Mg²⁺ و Ca²⁺ و Fe²⁺ و Fe³⁺
الايونات السالبة: PO₄³⁻ و SO₄²⁻ و Cl⁻ و CO₃²⁻ و HCO₃⁻

تم اجراء الدراسة باستخدام تركيز ثابت للهستادين (0.02 مول/لتر⁻¹) في اربعة قناني سعة 100 مل والمحتوية على تراكيز متغيرة من الايون الدخيل (1 و 5 و 10) مكغم.مل⁻¹ في القناني 2 و 3 و 4 واعدت القنينة الاولى المحتوية على الهستادين فقط هي المرجع وبتكرار القياس لثلاث مرات

المناقشة:

قدم البحث الحالي نمطاً جديداً لتقدير الاحماض الامينية ونخص بالذات جزيئة الهستادين والتي استخدمت مباشرة لتحفيز البريق الكيميائي في الوسط القاعدي لجزيئة اللومينال بميكانيكية من المحتمل انها مشابه للميكانيكية الاعتيادية للبريق لتكسير جزيئة البيروكسيد وتكوين الجذر السالب الحر للبيروكسيد والذي يؤدي الى سلسلة من الخطوات لتكسير جزيئة اللومينال باعثاً البريق الكيميائي. قدم البحث حدود كشف واطئة بطريقة مبسطة واكثر حساسية وبألية مضممة محلياً لتقدير الهستادين بحدود 31.93 مايكروغرام لانموذج محقن بحجم 70 مايكرو لتر في المحاليل المستخدمة خلال هذا البحث.

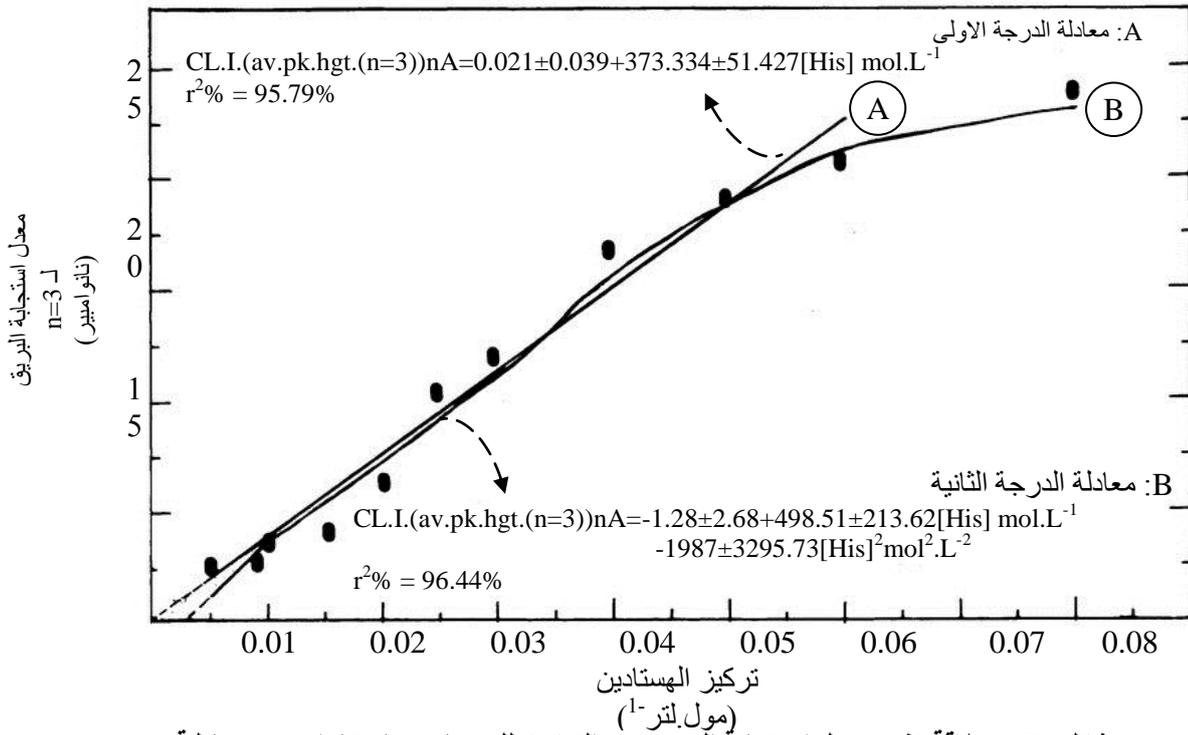
امتازت الطريقة بإمكانية الاستخدام لمعادلة الدرجة الاولى من صنف $y=a+bx$ ومعادلة من الدرجة الثانية $y=a+bx+cx^2$ حيث اعطت الطريقتين امكانية التطبيق باستخدامهما مع مفاضلة معادلة الدرجة الثانية على معادلة الدرجة الاولى وهذا يعد من الاساليب الحديثة في المقاربة الرياضية لهذا النوع من البحوث، والعمل مستمر في ايجاد تطبيقات مناسبة لاستخدام هذا التفاعل والذي لم يدون في أي ادبية منشورة، وللمقارنة فان حدود الكشف التي تم التوصل اليها تفوق ما مدون في الادبيات المذكورة ضمن المقدمة (حدود الكشف تتراوح بين 10^{-5} - 10^{-7} مول. لتر⁻¹) اخذين بنظر الاعتبار بساطة الالية المستخدمة مقارنة بالاليات المستخدمة في مصادر المقدمة. ويعد هذا البحث نواة لحالة بحوث مستمرة.

نظام البريق: لومينال-بيروكسيد الهيدروجين-هيدروكسيد البوتاسيوم-هستادين.

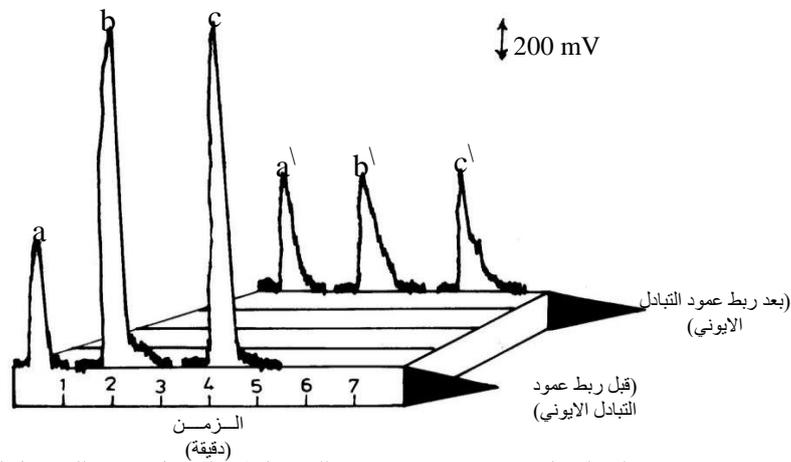
تأثير استخدام اعمدة مصغرة للتبادل الايوني

تم اختيار اسلوب المبادلات الايونية في اعمدة صغيرة وباقطار داخلية تقارب اقطار الانابيب المستخدمة في الوحدة المتشعبة وذلك ليساطتها وامكانية استخدامها لمرات متعددة في نظام الاتمتة وقد استخدم راتنج من نوع Amberlit-IR-120 للايونات الموجبة وAmberlit-IRA-400 للايونات السالبة.

في الجدول رقم (A-6) وشكل رقم (6-b) لوحظ ان اكثر الايونات الموجبة تداخلاً هو الحديدك (III) على هذا الاساس تم استخدام عمود مملوء بمبادل ايوني موجب بابعاد 10 سم وقطر داخلي 2 ملم (ظروف تجريبية) علماً ان العمود مربوط بعد نقطة الحقن مباشرة وبعد امرار الانموذج (الحديدك (III) بتركيز 10 مكغم. مل⁻¹) بوجود الهستادين بتركيز 0.02 مول. لتر⁻¹) لوحظ ان المزاح من العمود هو الهستادين فقط (شكل رقم 6-b)، كذلك الحال باستخدام عمود مملوء بمبادل ايوني سالب بابعاد تجريبية (9 سم وقطر داخلي 2 ملم) وبصيغة $RN^+(CH_3)_3OH$ وتمير انموذج يحتوي على اكثر الايونات السالبة تداخلاً (ايون الكبريتات بتركيز 10 مكغم. مل⁻¹) وبوجود الهستادين (0.02 مول. لتر⁻¹) لوحظ ايضاً ان المزاح من العمود هو الهستادين فقط وتم البرهنة على ذلك من خلال الاستجابة المستحصلة له (شكل رقم 6-c). يمكن الاستنتاج ان العمود المملوء بمبادل ايوني (سالب او موجب) ذو كفاءة عالية في التخلص من الايونات الدخيلة (السالبة او الموجبة).



شكل (5): علاقة تغير معدل استجابة البريق مع التركيز للهستادين باستخدام: A: معادلة الخط المستقيم (الدرجة الاولى) B: معادلة الدرجة الثانية



شكل (6): تأثير الايونات الدخيلة على ارتفاع وهيئة الاستجابة للبريق لنظام: لومينال (0.5 مللي مول لتر⁻¹) - بيروكسيد الهيدروجين (0.5 مول لتر⁻¹) - OH⁻ (0.1 مول لتر⁻¹) - هستادين (0.02 مول لتر⁻¹) بوجود الحديدك (III) او الكبريتات. a و a': ارتفاع وهيئة استجابة الهستادين قبل وبعد ربط عمود التبادل الايوني على التوالي. b و b': ارتفاع وهيئة استجابة الهستادين بوجود الحديدك (10 مكغم.مل⁻¹) قبل وبعد ربط عمود التبادل الايوني على التوالي. c و c': ارتفاع وهيئة استجابة الهستادين بوجود الكبريتات (10 مكغم.مل⁻¹) قبل وبعد ربط عمود التبادل الايوني على التوالي.

2- Miura, T., Tateda, N. and Matsuhisa, K., 2005. "Histidine in body fluid: specific determination by HPLC", Encyclopedia of

المصادر:

1- Lee, N.S., Fitzpatrick, D., Meier, E. and Fisher, H. 1981. Agents Actions, 11, 307.

- 9- Morrison, R.T. and Boyd, R.N. 1991. "Organic chemistry", Allyn and Bacon Inc. 5th Edition, Toronto, 1345.
- 10- White, E.H. and Roswell, D.F. 1985. "In Chem. and Bioluminescence", Dekker (J.G. Burr. Ed.), New York, 215-236.
- 11- Goel, B.S., Prakash, S. and Lal, R. 1986. "Mathematical statistics", K.K. Mittal, 1st Ed., New York, 108.
- 12- Miler, J.C. and Miller, J.N. 1988. "Statistics for analytical chemistry", John Wiley and N.Y. Sons, 2nd Ed., 23-50.
- 13- Turkie, N.S. 2005. "New mode for the study of chemiluminescence reaction by tracking via multidetection points through optical fibers in a completely newly designed cell", Thesis Ph.D., University of Baghdad, 105-113.
- 14- Book, S.A. 1978. "Essential of statistics", McGraw-Hill book company, New York, 50-58.
- 15- Murdoeh, J. and Barness, J.A. 1974. "Statistical tables", Macmillan, 2nd Ed., 54-60.
- 16- Sharma, S.D. 1989. "Operations research and statistical analysis", Published by N.N. Kedar & U.P. Co-Meerut, 1st Ed., India, 88-102.
- 17- Yamashiro, N., Uchida, S., Satoh, Y., Morishima, Y., Yokoyama, H., Satoh, T., Sugama, J. and Yamada, R. 2004. "Determination of hydrogen peroxide in water by chemiluminescence detection by quadratic equation", Journal of Nuclear Science & Technology, 41(9), 890-897.
- 18- Guide, A.B. 1997. "Practical Statistics for the analytical scientist", T.J. Farrant, 1st Ed., Laboratory of the government chemist, Teddington, Middlesex, UK., 21-23.
- chromatography, Marcel Dekker, pp.761-763.
- 3- Ortiz, J., Gomez, J., Torrent, A., Aldavert, M. and Blanco, I. 2000. "Quantitative radioisotopic determination of histidine decarboxylase using high performance liquid chromatography", Analytical Biochemistry, 280(1), 111-117.
- 4- El-Barshy, A. M. and Al-Ghannam, S. M. 1997. "High performance liquid chromatography determination of some amino acid after derivatization with 2-hydroxy-1-naphthol-dehyde", Analyst, 122, 147-150.
- 5- Hermann, K. and Abeek, D. 2000. "Determination of histidine and urocanic acid isomers in the human skin by high performance capillary electrophoresis", J. chromatogar B Biomed. Sci. Appl., 749(1), 41-47.
- 6- Costin, J.W., Francis, P.S. and Lewis, S.W. 2003. "Slective determination of amino acids using flow injection analysis coupled with chemiluminescence detection", Analytica Chimica Acta, 480(1), 67-77.
- 7- Zhu, L.D., Li, Y.X. and Zhu, G.Y. 2002. "Flow injection analysis of histidine with enhanced electrogenerated chemiluminescence of luminol", Chinese Chemical letters, 13(11), 1093-1096.
- 8- Kiba, N., Koga, A., Tachibana, M. and Tani, K. 2006. "Flow injection determination of L-histidine with an Immobilized histidine oxidaze from *Brevibacillus borstelensis* KAIT-022 and chemiluminescence detection", Analytical Sciences, 22(1), 95-98.

New Method for the Determination of DL-Histidine by FIA and Chemiluminometric Detection

*Issam M.A. Shakir**

*Nagam S. Turkey**

*Chemistry department-College of Science-University of Baghdad

Abstract:

This paper present a simple and sensitive method for the determination of DL-Histidine using FIA-Chemiluminometric measurement resulted from oxidation of luminol molecule by hydrogen peroxide in alkaline medium in the presence of DL-Histidine. Using 70 μ l. sample linear plot with a coefficient of determination 95.79% for (5-60) mmol.L⁻¹ while for a quadratic relation C.O.D = 96.44% for (5-80) mmol.L⁻¹ and found that quadratic plot in more representative. Limit of detection was 31.93 μ g DL-Histidine (S/N = 3), repeatability of measurement was less that 5% (n=6). Positive and negative ion interferences was removed by using minicolume containing ion exchange resin located after injection valve position.