مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية _ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (28) العدد (1) 2006
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research- Basic Science Series Vol. (28) No (1) 2006

معايرة السيلينيوم في بلازما الدم باستخدام التحليل الحقني الجرياني

الدكتورة فاتن شومان*

(قبل للنشر في 2006/8/31)

□ الملخّص □

أبحاث ووجهات نظر مختلفة أظهرت أن عنصر السيلينيوم يلعب دوراً مهماً في المجالات البيولوجية والبيئية وهذا يتطلب الوصول إلى معرفة كميته وتركيزه وحصره في مجال ضيق جداً لأنه بعيداً عن هذا المجال فإن عجزاً صحياً وتسمماً ممكن أن يحدث.

عنصر السيلينيوم مثل باقي العناصر المعدنية يوجد في المياه الطبيعية وفي المواد الغذائية بأشكال كيميائية مختلفة، لذلك اهتم الباحثون في المجالات الطبية ومجالات التغذية بدراسة العلاقة بين السيلينيوم والحمية الغذائية بالجذور الحرة الموجودة في الجسم والمسؤولة عن أمراض نقص التغذية والأمراض السرطانية.

تسمح تقنية التحليل الحقني الجرياني بالحصول على أفضل الشروط العملية في تحديد تركيز السيلينيوم في الدم حيث أمكن الحصول على منحني قياسي خطي في حدود التراكيز المدروسة.

ملاحظة : تم إجراء هذا العمل في كلية العلوم – قسم الدراسات الطبية – جامعة الملك سعود – الرياض في الفترة 2002 / 2003.

الكلمات المفتاحية : سيلينيوم – تحليل حقني سرياني – مانع أكسدة – طيف الامتصاص

* أستاذة مساعدة في قسم الكيمياء – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية– سوريا.

مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية _ سلسلة العلوم الأساسية المجلد (28) العدد (1) 2006
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research- Basic Science Series Vol. (28) No (1) 2006

Flow Injection Determination of Selenium in Blood Plasma

Dr. Faten Shoman*

(Accepted 31/8/2006)

□ ABSTRACT □

A short review of literature shows the role of selenium as an important trace element from an environmental and biological point of view, because its intake should be restricted to a very narrow concentration. Outside this range deficiency or toxicity occurs.

Selenium, like all other trace metals, is present in natural water and foodstuff in various chemical forms. Therefore, researchers in the field of human medicine and nutrition are studying the relationship of selenium in the diet, blood and free radical diseases like cancer and malnutrition.

The flow injection analysis technique creates the optimum conditions for the determination of selenium, the calibration graph was linear in the investigated range of concentration.

Key Word: Selenium, Flow injection analysis, antioxidant, Spectrophotometr

***Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of science, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

يدخل عنصر السيلينيوم كمكون بنيوي رئيس في العديد من أنزيمات بعض الأحياء، فهو يتحد مثلاً مع أنزيم يسمى فوق أكسيد الجلوتاثيون Glotathione Peroxidase، وهذا هو الإنزيم الحيوي والأساسي في جسم الإنسان الذي يقوم بحماية خلايا الدم الحمراء وأغشية الخلايا التي تعمل ضد أي تفاعل مع فوق الأكاسيد المنحلة غير المرغوب فيها ويمنع حدوث العديد من تفاعلات الأكسدة الناتجة عن الشوارد الحرة. وازداد الاهتمام بدراسة هذا العنصر بعد اكتشاف مقدرته على مقاومة الأورام السرطانية [1] كما يتم الربط بين وجوده في الجسم والوقاية من بعض الأمراض نتيجة دوره كمانع أكسدة [3,2] كما وجد أن السيلينيوم عنصر أساسي لمكونات الطعام عند وجوده بتراكيز ضئيلة ولكن عندما يزداد تركيزه في الجسم [6,5,4]، ونظراً للدور المهم الذي يؤديه عنصر السيلينيوم في مقاومة السمية التي تحدثها العناصر الثقيلة في الجسم فقد تمت إضافته إلى بعض التحضيرات الصيدلانية مثل فيتامين E أو C [6]، وقد قدرت الكمية المطلوبة للإنسان البالغ يومياً بـ 200µg /day، أما إذا زاد تركيزه عن ذلك فيؤدي إلى التسمم [8,7,6].

تم استخدام طرائق تحليلية عديدة لتقدير السيلينيوم في عينات مختلفة، ومن هذه الطرائق التحليل الطيفي [9]، والتحليل بواسطة طرق الامتصاص الذري [3] وطرق التحليل الكهربائي [10] وبعض طرائق الكروماتوغرافيا [12,11].

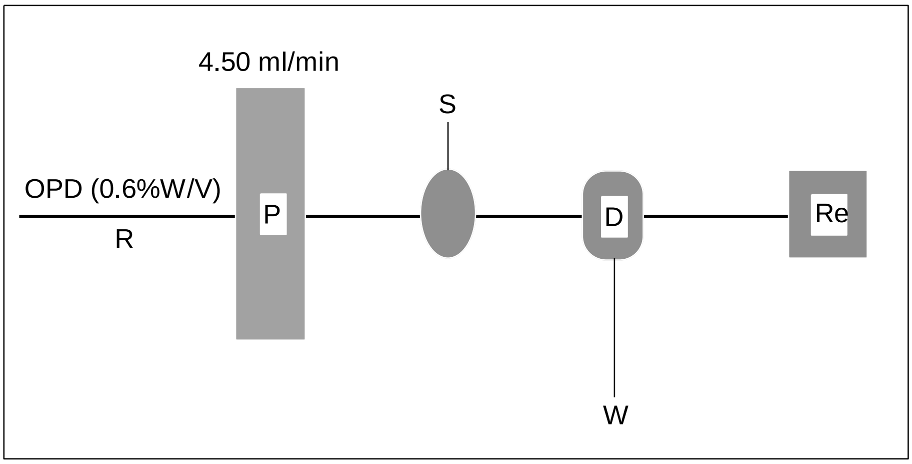
هدف البحث وأهميته:

استمرت الأبحاث في إيجاد طرائق تحليل دقيقة وتطوير الطرق المعروفة في معايرة السيلينيوم وقد وجد أن التحليل الحقني الجرياني من التقنيات الكيميائية الدقيقة التي نجحت استخداماته نجاحاً كبيراً في المخابر التابعة للدراسات البيئية والزراعية والمستشفيات بسبب إمكانية تحليل المئات من العينات في وقت قصير وقد استخدم في التجارب عينات من محلول السيلينيوم بهدف التأكد من صلاحية هذه التقنية للاستخدام في المجال الطبي.

أساسيات:

يعتمد التحليل الحقني الجرياني على حقن العينة في ناقل متحرك (Reagent Solution)، تكوِن العينة المحقونة منطقة تتحرك مع المحلول الناقل باتجاه المقدر(Detector)، الذي بدوره يقوم بتسجيل الأثر الناتج على هيئة امتصاص أو فرق جهد أو شدة تيار أو أي تغير فيزيائي نتيجة لمرور العينة من خلال الخلية الجريانية وبحسب نظرية التحليل الحقني الجرياني، فإن أثر التحليل الحقني الجرياني كقمة ناتج عن عاملين كلاهما حركي، الأول فيزيائي وهو عبارة عن عملية انتشار للعينة في المحلول الناقل، والثاني كيميائي وهو عبارة عن تكوين للمركب الكيميائي.

يتكون الجهاز البسيط للتحليل الحقني الجرياني كما في الشكل (1) من: مضخة (P) تقوم بضخ محلول الكاشف (R) عبر أنابيب من التفلون ويتم نقل محلول العينة (S) التي يتم حقنها عبر صمام الحقن حيث يلتقي الكاشف (R) مع العينة (S)، ويتم اتحاد المحلولين وتفاعلهما وذلك قبل الوصول إلى المقدر (D)، حيث يقاس بعد ذلك امتصاصية المتراكب الناتج بواسطة جهاز قياس الطيف ويتم تسجيل قمم الامتصاص بواسطة المسجل (Re). وتكون النتائج عادة على شكل منحنيات يتناسب فيها ارتفاع القمم مع تركيز المادة المدروسة. وتعبر الفترة الفاصلة بين لحظة الحقن وقمة المنحني عن زمن التفاعل الكيميائي، أما حجم العينة المحقونة فهو في حدود 25µl.



الشكل (1): رسم تخطيطي لجهاز الحقن الجرياني.

الأجهزة المستخدمة:

1.جهاز التحليل الحقني الجرياني Flow injection analysis (FIA) ويتكون من أنابيب تفلونية Teflon Tubing وأنابيب جريان Flow Lines وخلية جريانية Flow cell من نوع Pharmacia LKB, Biochemical Cambridge, England، وصمام حقن Injection valve من نوع (Omnifit) ومضخة محاليل Peristaltic pump من نوع CP Instrument company limited.

2.جهاز قياس الطيف Spectrophotometer من نوع LKB Bichrom Ulirospec.

3.مسجل أو راسم Recorder من نوع Chessell Ltd Worting suusex, England.

الكواشف والمحاليل المستخدمة:

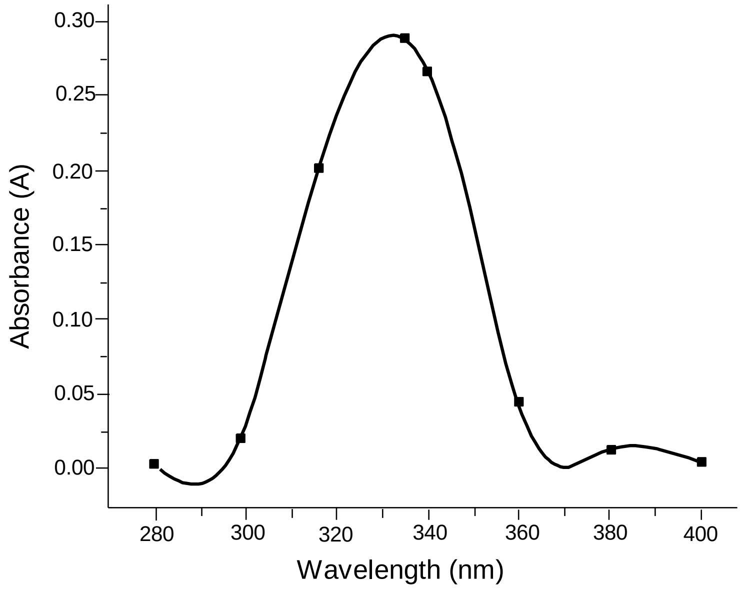
- اورتو فينيلين ثنائي الأمين:
(Kock – Light. Laboratories) O-phenyline diamine
- حمض كلور الماء HCl (BDH)
- حمض الكبريت H2SO4(Riedel de Heen)، حمض النتروجين HNO3(BDH)
- محلول السيلينيوم القياسي Standard Selenium Solution (Win Lab)
- فوق أكسيد الهيدروجين (33% H_2O_2) (Win Lab)

العمل التجريبي:

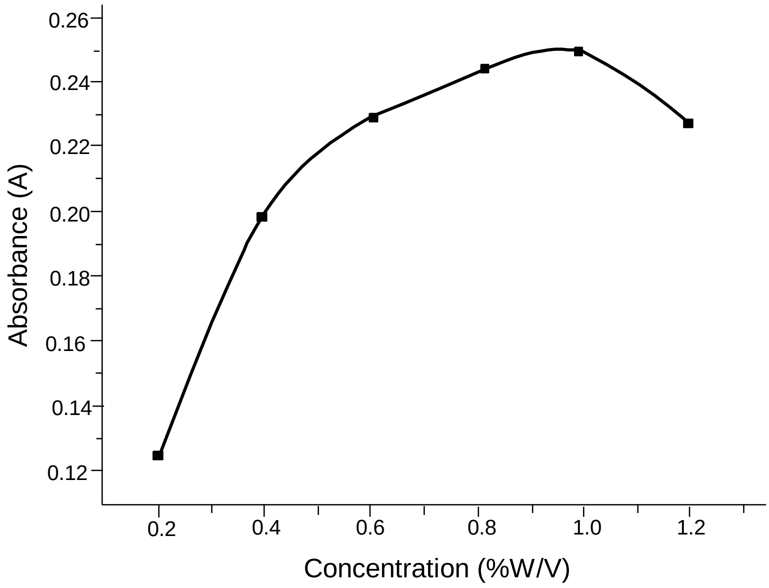
يتم تحضير محلول السيلينيوم القياسي بتركيز 1000 ppm في (HNO_3) 0.5 N، ومنه تحضر مختلف المحاليل المدروسة للسيلينيوم بالتمديد من المحلول القياسي بالماء المقطر. إن عملية تقدير السيلينيوم بواسطة جهاز التحليل الحقني الجرياني تتحكم فيها عدة مؤثرات لذلك يتم إجراء تجارب عديدة للتوصل إلى أفضل الشروط لإجراء

القياس، وتم الحصول على أفضل النتائج عند حقن 25µl من السيلينيوم القياسي بتركيز ثابت 8ppm، كما أن أفضل امتصاص لناتج تفاعل السيلينيوم مع الكاشف كان عند طول الموجة λ_{max} = 335 nm الشكل (2).

أما تركيز الكاشف أورتو فينيلين ثنائي أمين الذي يعطي أفضل حساسية وتكرارية للامتصاص فكان عند 0.6 % مع العلم أن الزيادة في التركيز أعطت زيادة في الامتصاص لكنها لم تعط حساسية وتكرارية جيدة الشكل (3).

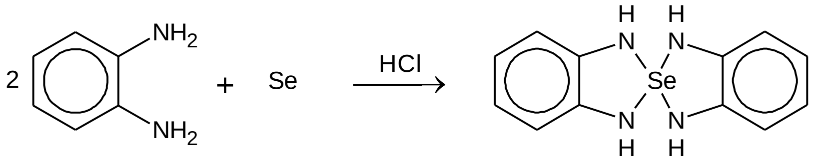


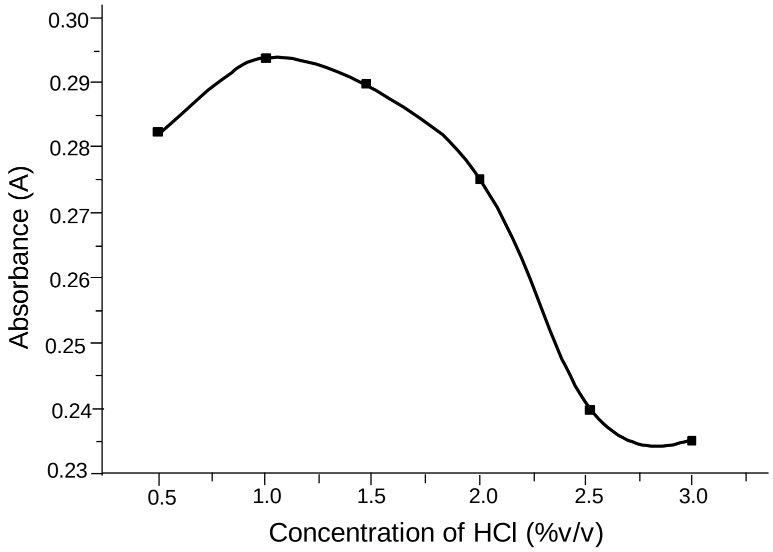
الشكل (2): طيف الامتصاص لناتج تفاعل السيلينيوم مع الكاشف OPDA.



الشكل (3): تأثير تركيز الكاشف أورتو – فينيلين ثنائي الأمين على امتصاص المركب الناتج.

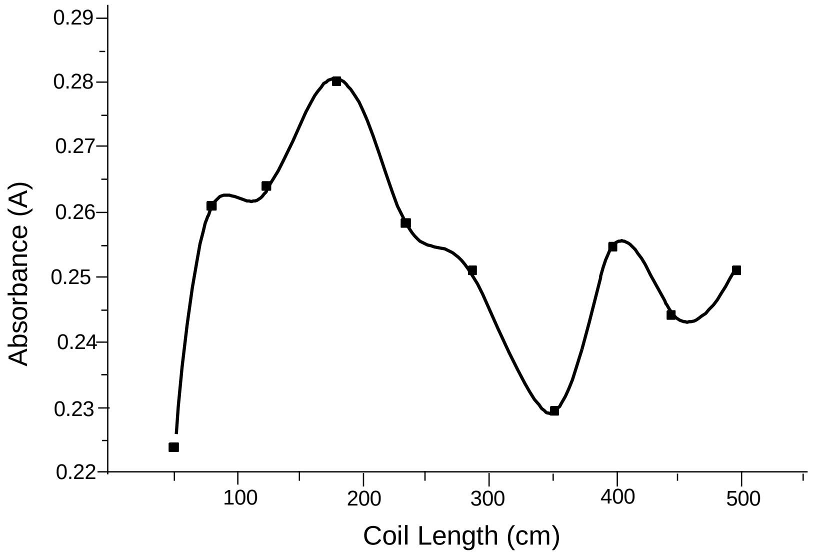
أعطى تركيز حمض كلور الماء المستخدم كمذيب للكاشف أفضل امتصاص لناتج التفاعل عند تركيز 1 % v/v الشكل (4) مع العلم أن الزيادة في تركيز الحمض تؤدي إلى تفكك المعقد الناتج:



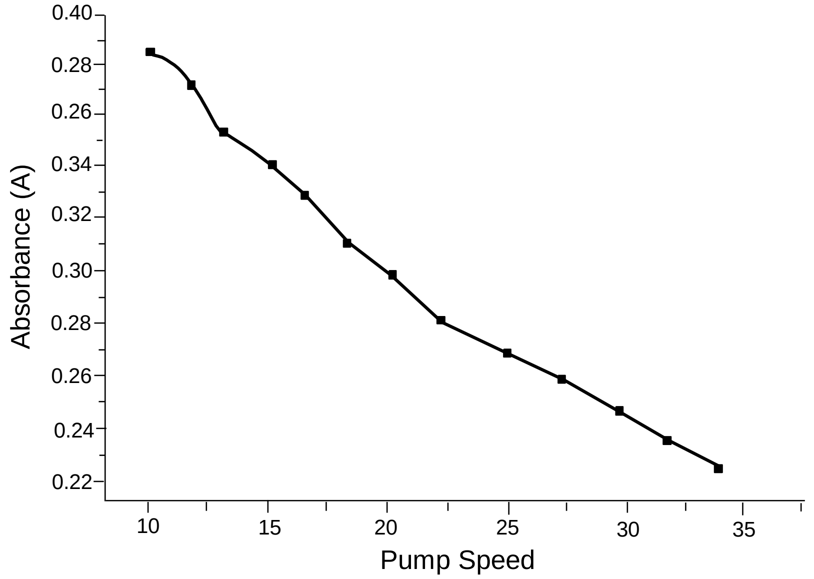


الشكل (4): تأثير تركيز حمض كلوريد الهيدروجين كمذيب للكاشف على امتصاص المركب الناتج.

وهناك أهمية كبيرة لمعدل تدفق (جريان) المحاليل في الجهاز ، لأن سرعة التدفق العالية تؤدي إلى الإقلال من الزمن اللازم لحدوث التفاعل، وبالتالي لن يصل التفاعل إلى نهايته. كما يؤدي خفض سرعة التدفق إلى تشكل قمة امتصاص مسطحة. أما سرعة التدفق التي تسمح بحدوث التفاعل وتعطي أفضل النتائج فكانت بحدود 4.5ml/min.
أما طول المسار في الجهاز فهو الذي يؤمن للمواد الزمن اللازم لحدوث التفاعل، وقد تبين بعد تجارب عديدة لأطوال ملفات (Coil Length) مختلفة (50-500)cm، أن ملف ذات طول 200 cm يعطي أفضل قيمة امتصاص للسيلينيوم الشكل (5)، وأعطت سرعة الضخ 22ml/min أفضل قيم امتصاص الشكل (6).



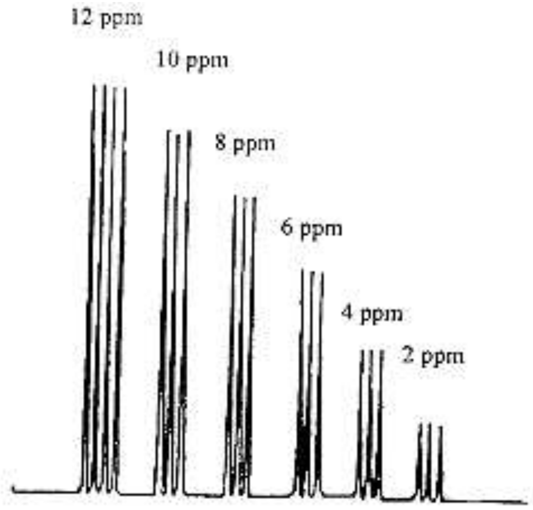
الشكل (5): تأثير طول ملف التفاعل على امتصاص المركب الناتج.



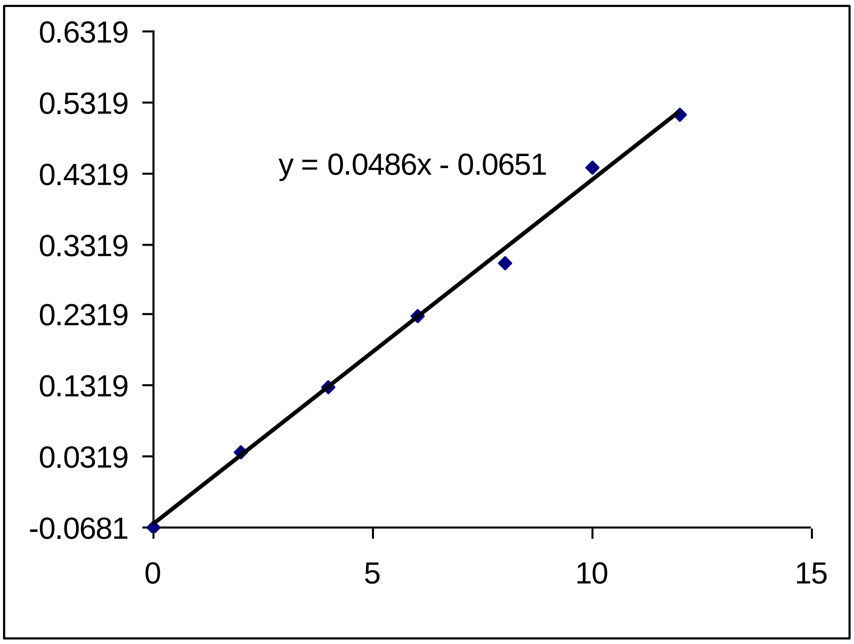
الشكل (6): تأثير سرعة مضخة التفاعل على امتصاص المركب الناتج.

النتائج والمناقشة:

باستخدام النتائج السابقة التي تمثل أفضل ظروف عمل، تمت دراسة المحاليل القياسية للسيلينيوم [الجدول(1) والشكل (7)]، وتم رسم العلاقة بين الامتصاص والتركيز لتلك المحاليل القياسية تم الحصول على منحني التعيير القياسي الشكل (8)، الذي يبين أن الاستجابة خطية، والمنحني القياسي خطي بمعامل ارتباط مقداره (r = 0.998) وذلك باستخدام معادلة الخط المستقيم $Y = mX + b$ ، حيث $m = 0.0483$ الميل، و$b = - 0.0681$ تقاطع الخط المستقيم، و X تمثل تركيز السيلينيوم.



الشكل (7): الإشارات التي تم تسجيلها لمحاليل السيلينيوم القياسية.



الشكل (8): منحنى التعيير لمحاليل السيلينيوم القياسية.

حيث يمثل محور السينات قيم (x) الدالة على تركيز السيلينيوم .

أما محور العينات فيمثل قيم (Y) الدالة على قيم الامتصاص الطيفي .

الجدول (1): قياسات منحنى تعيير السيلينيوم القياسي Calibration Curve of Standard Selenium

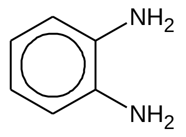
Conc. Of Se (ppm) تركيز السيلينيوم	Absorbance الامتصاص (A)	OPDA تركيز الكاشف	Flow Rate معدل التدفق	Coil Length طول الملف	Wavelength طول الموجة	Voltage قيمة الجهد
2	0.037	0.6 (%w/v)	4.5 ml/min	200 cm	335 nm	50 mV
4	0.131					
6	0.230					
8	0.304					
10	0.439					
12	0.514					

في ظل هذه النتائج من المفيد تطبيق هذه الطريقة على عينات مختلفة وتوسيع نطاق التطبيق. تم تطبيق هذه الطريقة المقترحة على عينات من بلازما الدم تم إحضارها من مستشفى الملك خالد الجامعي في الرياض وذلك لزيادة التأكد من صلاحية الطريقة ودقتها حيث يتم تقدير السلينيوم في مستشفى الملك خالد بالطريقة الفولتامترية (10)، وتم الحصول على عينات بلازما الدم بدون معرفة مسبقة بتركيز السيلينيوم فيها .

تم قصر اللون في العينات بواسطة الماء الاوكسجيني وبالتسخين للدرجة 100 مئوية يتم التخلص منه، ثم تم أخذ 1 ml من العينة، ووضعت في دورق قياسي سعة 5 ml، وبالتمديد بالماء المقطر حتى العلامة تم الحصول على العينات جاهزة للحقن، وتم حقن كل عينة ثلاث مرات للحصول على تكرارية جيدة [جدول (2)]، وباستخدام معادلة الخط المستقيم تم حساب تراكيز السيلينيوم في عينات الدم، ومن ثم تم إخضاع النتائج إلى التحاليل الإحصائية، حيث تم حساب الانحراف المعياري .S.D وذلك لتقدير دقة ومصداقية الطريقة المقترحة، وكانت قيم t-test المتحصل عليها 0.83 أقل من قيمة *t* الجدولية 2.179 عند مستوى ثقة مقداره 99% مما يدل على دقة الطريقة المقترحة.

الاستنتاجات والتوصيات:

تُعدُّ طريقة تقدير السيلينيوم باستخدام طريقة الحقن الجرياني، والأطياف الجزيئية طريقة دقيقة، وحساسة، وسريعة مقارنة بالطرائق الأخرى التي تحتاج إلى العديد من المعالجات، مثل استخدام الاستخلاص بواسطة المذيبات العضوية للمعقد المتكون، كما أن استخدام كاشف الأمين ثنائي فينيلين (Phenylene di amine):



الذي يُعدُّ من الكواشف الرخيصة وغير السامة يساعد على عدم استخدام مواد كيميائية ضارة بالبيئة، بالإضافة إلى إمكانية تطبيق الطريقة على عينات من الأدوية والأغذية لتقدير السيلينيوم فيها.

الجدول (2) : تركيز السيلينيوم في عينات مختلفة من بلازما الدم

No	X_1 (ppm)	X_2 (ppm)	X_3 (ppm)	X_4 (ppm)	X_5 (ppm)	X_6 (ppm)	X_7 (ppm)	X_8 (ppm)	X_9 (ppm)	X_{10} (ppm)	X_{11} (ppm)
1	27.58	21.00	19.63	14.26	41.37	18.21	36.84	23.47	11.95	36.95	47.84
2	27.58	21.10	19.53	14.10	41.42	18.21	36.84	24.16	11.95	36.32	48.37
3	28.00	21.00	19.68	14.32	41.42	18.10	36.94	24.16	11.95	36.95	48.00
$\overline{X}$	27.72	21.03	19.16	14.23	41.40	18.17	36.87	23.93	11.95	36.74	48.07
S.D.	0.241	0.0578	0.0765	0.1137	0.0291	0.0636	0.0578	0.3983	0	0.3637	0.2718
% R.S.D.	0.617	0.194	0.275	0.565	0.049	0.247	0.111	1.177	0	0.700	0.399

حيث تمثل X عينة بلازما الدم

المراجع:

1. CHENG, K.L., *Determination of trace of selenium 3,3-diaminobenzidine as selenium (IV) organic reagent*, Anal. Chem. 28 (1956), 1738 – 1742
2. SCHWARTZ, K. and Folts,, *Selenium as an integral part of factor 3 against dietary liver degeneration*, J. Chem. Soc., (1979), 329 – 335.
3. SCHROEDER, H.A ., Douglas, M. D., Forst V. and Balassa, J. J. essential, *Trace metals in man*, Chron-Dis 23, (1970), 227 – 245.
4. BURK, R. F. and Levander O. A., Inshils M. et Al. Eds. *Nutrition in health and disease*, Baltimore Williams & Wilkins, (1999),pp. 265 – 276.
5. RAYMAN, M. P., *The importance of selenium to human health, the lancet*. Vol. 356, (2000),pp. 233 – 241, (pub. med.)
6. AOYAMA, E., Akamatsu K., Nakahawa T. and Tanaka H., *Toxicity of selenium*, Anal. Sci., 7, (1991),617.
7. HUTTUNEN, J. K., *Selenium and cardiovascular diseases, an update biomedical and Environmental science*, 10 (2-3), (1997), pp. 220-226.
8. CLARK, L. C., Combs G. F. and Turnbull B. W., Jama, 276, (1996), 1957.
9. MERRIK, B. A., Devies M. H., Johnson K. L. and Schnell R. C., *Selenite inducel protein of bromobenzene hepatoxicity in male rats*, toxical. App. Pharmacol. 9 (1), (1984), 127 – 130.
10. INAM, R. and Somer P., *Determination of selenium in garlic by cathodic stripping voltammetry*, Food Chem ., 66 (3), (1999),381–385.
11. HAMPLE, C. A. (Ed.),, *Rare metal handbook 2 edh*., N., Y., reindhold, (1961), 879.
12. GARRY, J. Handelman, Paula Kosted, Sara Short and Edward A. Dratz,, *Determination of selenium*. Anl. Chem., 60, (1981), pp. 2244 – 2249.