

التقدير الطيفي البارامينو ساليسيليك اسد في مصل الدم والادرار باستخدام تفاعل الاكسدة والاقتتران مع

بارا-امينو-انتي بايرين ودراسة تثبيط انزيم Aldose Reductase

اسماء هاشم شاكر

قسم الكيمياء ، كلية التربية للبنات ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

تضمن هذا البحث وصف طريقة طيفية جديدة لتقدير البارامينو ساليسيليك اسد في الوسط المائي إذ تعتمد على اقترانه مع الكاشف بارا-امينو انتي بايرين بوجود العامل المؤكسد بيرايودات الصوديوم . ليعطي صبغة حمراء ذائبة في الماء أظهرت أعلى شدة امتصاص عند الطول الموجي 516 نانوميتر . أمكن تطبيق الطريقة المقترحة بنجاح لتقدير البارامينو ساليسيليك اسد طيفيا حيث كانت حدود الخطية وانطباق قانون بير في مدى من التراكيز من 10-500 مايكروغرام في حجم نهائي 25 مللتر وكانت الامتصاصية المولارية للصبغة الناتجة 17568 لتر.مول⁻¹.سم⁻¹ ودلالة ساندل 0.0120 مايكروغرام.سم⁻² . أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها دقة وتوافق جيدة حيث تراوح مقدار الخطأ النسبي من (1.00- الى 3.65 +) % والانحراف القياسي النسبي من (0.008 إلى 0.1305) % اعتماداً على مستوى التركيز . تم تطبيق الطريقة المقترحة بنجاح لتقدير البارامينو ساليسيليك اسد وبنجاح على الدم والادرار ودراسة تأثيره على تثبيط انزيم Aldose reductase المنقى جزئياً من دم مرضى المصابين بالسكري من النوع الثاني ، حيث كانت نسبة الاستعادية (Reactivity) في مصل الدم بحدود 101.395 وفي الادرار بحدود 100.776 بينما اعطى نسب تثبيط على انزيم aldose reductase تصاعدياً مع التركيز بين (16- 84) %.

المقدمة

الطاقة ATP للحويصلات المنوية والكبد والمشيمة وخلايا شوان وعدسة العين والسكري والكريات الدم الحمراء⁽¹⁶⁾، ومن الملاحظ انه تم بعض الدراسات لتثبيط انزيم Aldose reductase بالعديد من الادوية^(17,18).

الجزء العملي

الأجهزة المستخدمة: تم استخدام كل من جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية والمرئية Ultraviolet Visible Spectrophotometer (Spectronic 21 D) ، مطياف الأشعة فوق البنفسجية _ المرئية ذات الحزمة المزدوجة (Sentra5)- باستخدام خلية زجاجية [سم، الميزان الحساس (HR-200)، الحمام المائي Water bath ، جهاز الدالة الحامضية pH meter من نوع (pH meter 3310) .
المواد الكيميائية المستخدمة: ان جميع المواد الكيميائية المستخدمة كانت بدرجة عالية من النقاوة ومجهزة من قبل Merck, B.D.H, Fluka, Hopkin & Willams.

المحاليل المستخدمة:

1. البارامينو ساليسيليك اسد (SAHD) (1000 مايكروغرام .مل⁻¹) : حضر 100 مل من SAHD وذلك بأخذ 0.1 غرام من مسحوق SAHD و إذابته بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة 100 مل
2. بارا-امينو انتي بايرين (PAA) (0.0738) مولاري وذلك بأخذ 1.5 غرام وإذابته بـ 100 مل بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة 100 مل.
3. محلول بيرايودات الصوديوم (0.1 مولاري) حضر بإذابة 2.1389 غرام في الماء المقطر واكمل الحجم بالمذيب نفسه في قنينة حجمية سعة 100 مل .
4. المتداخلات : حضرت المتداخلات (Starch , Urea , NaCl , Histdien , Leucine , Glutamic acid , Glucose ,

البارامينو ساليسيليك اسد هو عبارة عن مركب فينولي معوض (Sodium 4-amino-2-hydroxybenzoate dihydrate.) ذو صيغته الجزيئية $C_7H_6NNaO_3 \cdot 2H_2O$ ⁽¹⁾ يمتاز بكونه مسحوق ابيض اللون بلوري او ابيض مصفر الشكل وزنه الجزيئي 211.2 غم/مول يذوب بالماء بسهولة وقليل الذوبان في الكحول ومن الناحية العملية لا يذوب في كلوريد المثلثين⁽²⁾ . حيث يستخدم كمضاد حيوي لمرض السل⁽³⁾ .

تعد تفاعلات الاقتران التأكسدي من اهم التفاعلات العضوية ذات التطبيقات الواسعة خاصة في الكيمياء التحليلية. ويتضمن هذا التفاعل عادةً ازواج مادتين عضويتين بوجود عامل مؤكسد تحت ظروف تفاعل مناسبة . حيث تحصل اكسدة لهذه المواد مما يؤدي الى تكوين مركبات وسطية تتفاعل مع بعضها. وتعطي ناتج ملون يمكن قياسه طيفياً والاستفادة من التفاعل في التقدير الكمي للمركبات العضوية المختلفة^(4,5).

وقد قدر البارامينو ساليسيليك اسد بعدة طرق منها طيفية^(7,6) وفلورومتريية⁽⁸⁾ وكهربائية⁽⁹⁾ وكروماتوغرافيا⁽¹⁰⁾ وتقنية NMR⁽¹¹⁾ وطرق اخرى⁽¹²⁻¹⁴⁾.

تضمن هذا البحث دراسة التقدير الطيفي للبارامينو ساليسيليك اسد بالدم والادرار عن طريق الاكسدة والاقتتران مع كاشف بارا-امينوانتي بايرين. كما تم دراسة تأثيره على تثبيط انزيم Aldose reductase المنقى جزئياً من دم مرضى المصابين بالسكري من النوع الثاني الذي يعد من انزيمات الاكسدة والاختزال (EC1.1.1.21) التي تقوم بتحويل الكلوكون الى السوربيتول وهو من الطرق الاولية لايبض الكلوكون في الجسم⁽¹⁵⁾. كما يعد الخطوة الاولية لبناء الفركتوز من الكلوكون كما يعد مسار مهم لبناء G-6-ph. وهو مهم في تحرير

باستخدام محلول منظم الفوسفات $\text{pH} = 6.2$ Phosphate Buffer و $\text{M} 0.40$ Lithium sulfate و TPNH triphosphopyridine و $\text{M} 5 \times 10^{-5}$ nucleotide و DL- و glyceraldehydes 5×10^{-4} و اكمل الحجم 3 مل ماء مقطر وثم تقرأ الفعالية عند 340 نانوميتر المنقى من امصال المرضى المصابين بالسكري النوع الثاني المنقى جزئياً بالاعتماد على طريقة Sorenson & Ludvigson⁽²⁰⁾، حيث اخذ الانزيم المنقى التي تمت تنقيته بعدة خطوات اولها بالتريسيب بكميات الامونيوم ثم الفرز العشائي ثم تم استخدام تقنية التبادل الايوني ليتم الحصول الى درجة عالية من النقاوة للأنزيم .

المتداخلات: اضيف الى سلسلة قناني حجمية سعة 25 مل حجوم متسلسلة من (0.5 , 1 , 1.5 , 2) مل وطبقت خطوات العمل المتبعة عند تحضير المنحني القياسي الخطي على اربعة تراكيز (100 , 200 , 300 , 400) مايكروغرام .مل⁻¹ ثم تم قياس الامتصاصية بعد 5 دقائق عند الطول الموجي 516 نانوميتر يبين الجدول (2) مدى تأثير المتداخلات على الطريقة

النتائج والمناقشة

اعتمد العمل الحالي على التقدير الكمي للبارا امينو ساليسيلك اسد بتفاعل البارا امينو ساليسيلك اسد مع بارا امينو انتي بايرين بوجود العامل المؤكسد بيرايودات الصوديوم يتكون صبغة ذات لون احمر . اظهر طيف الصبغة المتكونة أعظم امتصاص (λ_{max}) عند طول موجي 516 نانوميتر في حين لم يظهر المحلول الصوري أي امتصاص عند الطول الموجي أعلاه، ولوحظ أن الناتج الملون يستقر بعد فترة زمنية 5 دقائق كما مبين في الشكل (1).

تم دراسة الظروف المثلى للتفاعل المقترح لأجل إمكانية استخدامه في تطوير طريقة طيفية بسيطة وحساسة لتقدير البار امينو ساليسيلك اسد، حيث تمت دراسة أفضل كمية للكاشف PAP باستعمال محلول ذو تركيز (0.0738 مولاري) وبإضافة حجوم مختلفة منه (0.2-1.6) مل كما في الشكل (2) و درس تأثير الكمية العامل المؤكسد لبيريودات الصوديوم (0.1 مولاري) بين (0.2-1.2) مل الشكل (3). بعد ذلك تمت دراسة تأثير الرقم الهيدروجيني pH وفي النهاية تم إجراء التفاعل تحت الظروف التي تم التوصل إليها عند درجات حرارية مختلفة (15 °C - 45 °C) ولوحظ ان درجة حرارة المختبر (25 °C) هي الأفضل وكما مبين في الشكل رقم (4).

أظهرت نتائج دراسة العوامل المشار إليها أن استعمال 0.8 مل من محلول الكاشف أعطى أعلى امتصاصية للصبغة المتكونة لذلك استخدم هذا الحجم بالتجارب اللاحقة وإن إضافة 1.2 مل من محلول بيرايودات الصوديوم اعطى أعلى امتصاصية وإن أفضل قيمة للدالة الحامضية ($\text{pH} = 7.17$) لمحلول التفاعل وأعطت أفضل النتائج والمبين في الشكل (5).

Arginine , Albomin , Cholestrol , Alanin , Thiourea , BaCl_2 , NH_4Cl) بتركيز 5000 مايكروغرام .مل⁻¹ وذلك باخذ 0.5 غرام في قنينة حجمية سعة 100 مل اكمل الحجم للعلامة بالماء المقطر .

التطبيقات : بعد جمع العينات

الدم : تم فصل الدم باستخدام جهاز الطرد المركزي لمدة خمسة دقائق واخذ مصل الدم وذلك بسحب 1 مل في قنينة حجمية سعة 25 مل .
الادرار : اخذت العينة بسحب امل في قنينة حجمية سعة 25 مل .
انزيم aldose reductase المنقى جزئياً^(19و20) من امصال مرضى المصابين بالسكري من النوع الثاني المبين بطريقة العمل (ج) ادناه .

طريقة العمل

أ. إعداد منحني المعايرة :

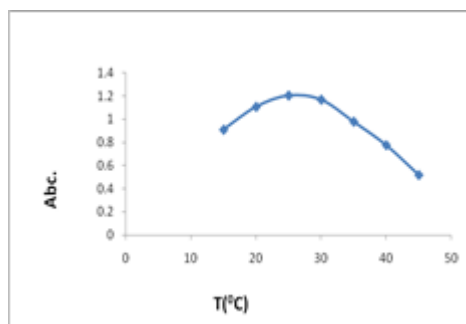
تم اضافة حجوم إلى سلسلة من قناني حجمية سعة 25 مل أضيفت حجوم من (0.05-5مل) من المحلول القياسي البارامينو ساليسيلك اسد بتركيز 100 مايكروغرام .مل⁻¹ و 1.2 مل من الكاشف PAA (0.0738 مولاري) و 2 مل بيرايودات الصوديوم (0.1 مولاري) وأكمل الحجم إلى العلامة (25 مل) بالماء المقطر وقيس الامتصاص مقابل المحلول الصوري (Blank) بعد فترة 5 دقائق عند الطول الموجي 516 نانوميتر . يبين الشكل (6) منحني المعايرة القياسي الخطي الذي يظهر أن قانون بير قد اتبع عند مدى من التراكيز 10-500 مايكروغرام من البارامينو ساليسيلك اسد في حجم نهائي 25 مل أي (0.02-20) مايكروغرام .مل⁻¹ ويحصل انحراف سلبي لقانون بير عند التركيز الأعلى .

ب. تطبيق الطريقة المقترحة لتقدير البار امينو ساليسيلك اسد مصل الدم والادرار :

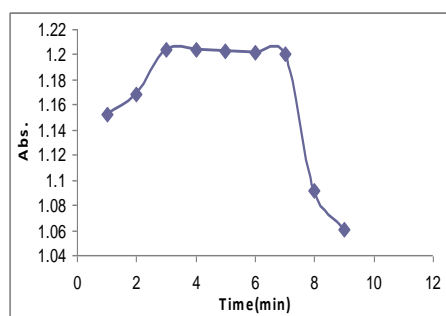
طبقت الطريقة المطورة لتقدير البارامينو ساليسيلك اسد على الدم والادرار وذلك بنقل ثلاث حجوم مختلفة (0.2, 2 , 4 مل) من المحلول القياسي (100 مايكروغرام .مل⁻¹) لكل مستحضر الى قناني حجمية سعة 25 مل وتطبيق خطوات العمل المتبعة عند تحضير المنحني القياسي للحصول على ثلاثة تراكيز مختلفة منه (0.8 , 8 , 16 مايكروغرام .مل⁻¹) ثم تم قياس الامتصاصية لها بعد مرور 5 دقائق عند الطول الموجي 516 نانوميتر . يبين جدول رقم (3) مدى دقة وتوافق النتائج التي تم الحصول عليها بتطبيق الطريقة المطورة لتقدير المستحضرات الصيدلانية حيث بلغ مدى الاستعادية بين (100-101.4)% .

ج. دراسة تأثير الـ SAHD على تثبيط انزيم ALDOSE REDUCTASE المنقى جزئياً من امصال مرضى المصابين بالسكري من النوع الثاني:

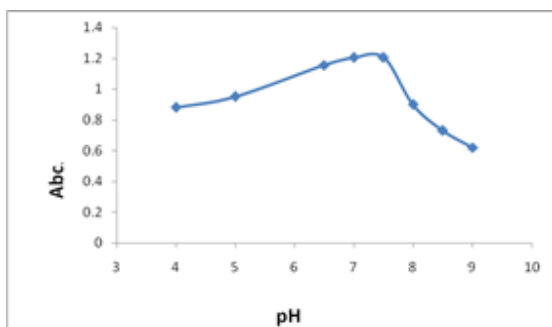
تم دراسة تأثير SAHD في تثبيط انزيم Aldose reductase حيث اظهرت تأثيره التثبيطي على فعالية انزيم Aldose reductase وبتراكيز (1 و 2 و 4 و 8 و 20) ملي مولار . حيث تم قياس فعالية الانزيم وفق طريقة Selma Hayman & Jin . H . Kinoshita⁽¹⁹⁾



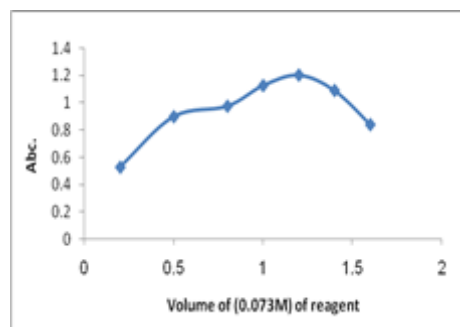
شكل (4) تأثير درجة الحرارة مقابل الامتصاصية



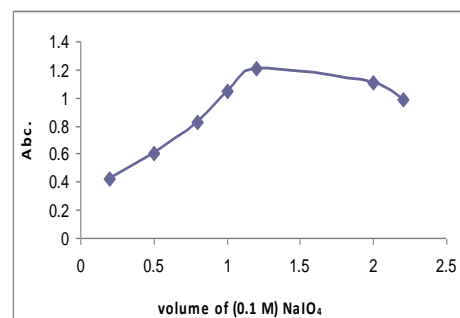
شكل (1) تأثير الزمن على شدة الامتصاصية



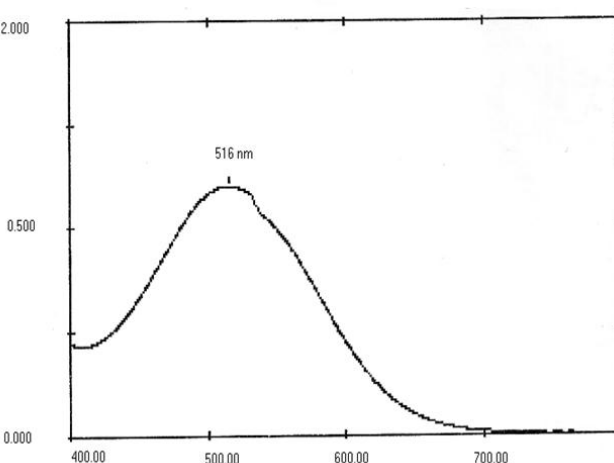
شكل رقم (5) تأثير الدالة الحامضية (pH) على شدة الامتصاصية



شكل (2) الحجم الامثل للكاشف مقابل الامتصاصية



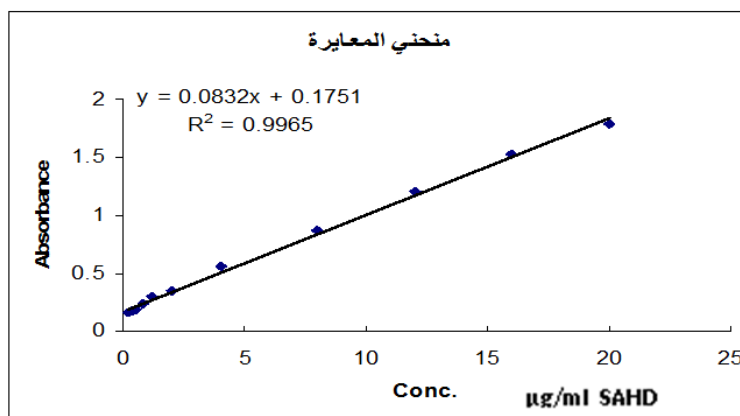
شكل (3) الحجم الامثل للعامل المؤكسد مقابل الامتصاصية



شكل (6) طيف الامتصاص النهائي للـ SAHD

طيف الامتصاص النهائي:
تم تسجيل طيف محلول الصبغة الملونة المحضرة تحت الظروف المثلى مقابل المحلول الصوري لمدى بين 400-700 نانومتر حيث يظهر الطيف الذي تم الحصول عليه (شكل (6)) إن الطول الموجي لأعلى امتصاص هو 516 نانومتر :

منحني المعايرة:
تحت الظروف المثلى للتفاعل اظهرت عملية قياس الامتصاصيات لمحاليل تحوي كميات مختلفة من البارامينو ساليك اسد ان النتائج تخضع لقانون بير عند مدى من التراكيز بين (0.2 – 20 مايكروغرام . مل⁻¹) كما هو مبين في الشكل (7). وقد تم حساب معامل الامتصاص المولاري للصبغة الناتجة ووجد انه يساوي (17568) لتر . مول⁻¹ . سم⁻¹ وكانت دلالة ساندل تساوي (0.012019) مايكروغرام . سم⁻².



الشكل (7): منحني القياسي الخطي لتقدير SAHD

توافق الطريقة ودقتها تمت دراسة توافق الطريقة ودقتها لتقدير البارامينو ساليك اسد في محلوله القياسي ولثلاثة مستويات من التراكيز هي (0.8 و 8 و 16) مايكروغرام . مل⁻¹ ولست تكرارات كما مبين في الجدول رقم (1).

جدول (1): نتائج توافق الطريقة ودقتها

Taken Conc. (ppm)	Found Conc. (ppm) Average	Recovery (%)	Error (%)	S.D	R.S.D (%)
0.8	0.792	99.00	-1.00	0.00357	0.4462
8	8.292	103.65	3.65+	0.1305	1.6315
16	16.188	101.175	1.175+	0.0840	0.525

المتداخلات : تم دراسة تأثير بعض المتداخلات على شدة امتصاص المركب الناتج كما مبين في الجدول (2)

جدول رقم (2) تأثير المتداخلات على استرجاعية الـ SAHD

Foreign compound	Recovery (%) of SAHD per µg foreign compound added			
	100	200	300	400
Starch	101.325	101.7	102.00	101.775
Urea	100.879	101.028	101.028	101.103
NaCl	101.25	101.03	101.325	101.104
Histden	100.277	100.65	100.353	100.353
Leucin	99.526	98.700	99.60	99.75
Glutamic acid	94.26	95.244	94.644	95.09
Glucose	100.95	100.95	101.028	101.104
Argenine	96.07	96.52	96.897	96.146
Albomin	97.648	97.526	97.944	97.798
Cholestrol	101.1325	99.526	96.97	97.122
Alanin	101.1037	101.028	100.953	100.878
Thiourea	95.169	95.770	95.770	95.620
NH ₄ Cl	100.65	100.785	94.52	99.52
BaCl ₂	100.725	100.953	101.106	101.25

التطبيقات:

2. استعادة عالية يمكن اعتمادها في الدراسة حيث تم التمكن من

تقدير SAHD فيها كما مبين في الجدول (3).

1. طبقت الطريقة المقترحة على الدم والادرار وبنجاح وبنسب

جدول رقم (3) نتائج تطبيقات الطريقة المقترحة على مصل الدم والادرار

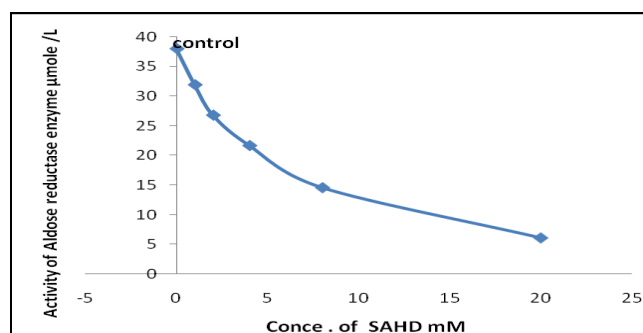
التطبيقات preparation	Amount		Recovery (%)	
	Conc. of SAHD (µg/ml)	Found conc.Averag (ppm)	Each assay	Average
Blood (serum)	0.8	0.816	102.000	101.395
	8	8.147	101.837	
	16	16.056	100.35	
urin	0.8	0.780	97.5	100.776
	8	8.256	103.200	
	16	16.260	101.630	

نسبة التثبيط طرديا مع تركيز SAHD لذا يجب التنبيه عند استخدامه لدى مرضى السكري لعمله التثبيطي. وقد بين الشكل (8) مدى تأثير اضافة تراكيز متزايدة من المثبط (SAHD) على فعالية الانزيم .

2. تم دراسة تأثير SAHD على تثبيط انزيم Aldose reductase والنتائج المبينة في الجدول (4) وايجاد النسبة المئوية له ، حيث لوحظ تأثير SAHD التثبيطي على انزيم Aldose reductase المنقى جزئيا من امصال مرضى السكري النوع الثاني حيث تزداد

جدول (4) النسبة المئوية لتثبيط انزيم Aldose reductase بواسطة SAHD بتركيزات مختلفة

[Inhibitor m M]	Inhibition %				
	1 mM	2 mM	4 mM	8 mM	20 mM
SAHD	16.5	29.5	43	62	84



شكل (8) تأثير اضافة الـ SAHD على فعالية انزيم Aldose reductase

المصادر

1. " The Merck Index on CD-ROM "12th Ed., Copyright by Merck Co., Inc., Whiteho., (2000).
2. " British Pharmacopoeia on –CD-ROM", 3rd Ed., Copyright by System Simulation Ltd., The Stationery Office , London, (2005).
3. Ellard, G.A.; Mitchison, D. A., Int J Tuberc Lung Dis 3 (10) : S231 –S279 (1999)
4. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). doi:10.1351/goldbook.
5. Grzybowski, M., Skonieczny, K., Butenschön, H. and Gryko, D. T. (2013), *Comparison of Oxidative Aromatic Coupling*
6. Vetuschi C, Ragno G, Mazzeo P. Determination of paminosalicylic acid and m-aminophenol by derivative UV-spectrophotometry. J Pharm Biomed Anal. 1988; 6(4): 383-391.
7. Mouayed QA, Al-Ghabsha TS, Salih ES. Application of promethazine hydrochloride as a chromogenic reagent for the spectrophotometric determination of aniline and its substituents. Microchem 1990; 41(1): 64-71.
8. Lianidou ES, Ioannou PC. Simple spectrofluorometric determination of p-aminobenzoic and p-aminosalicylicacids in biological fluids by use of terbium-sensitized luminescence. Clin Chem 1996; 42(10): 1659-1665.

9. Shucai W, Langlai X, Guojing L, Puyan C, Kai X, Xie Z. An ELISA for the determination of salicylic acid in plants using a monoclonal antibody. *Plant Sci* 2002; 162(4): 529-535.
10. Zhang X, Xuan Y, Sun A, Lv Y, Hou X. Simultaneous determination of isoniazid and p-aminosalicylic acid by capillary electrophoresis using chemiluminescence detection. *Luminescence*, 2009; 24(4): 243-249.
11. Rajesh Y, Mahatma OP, Rathore DS. Application of 2-Hydroxyethyl Methacrylate Polymer in Controlled Release of 4-Aminosalicylic Acid: A Colon Targeted Prodrug Approach. *Inter J Chem Environ Pharma Res* 2010; 1(2): 103-110.
12. Vasbinder, E., Vanderweken, G., Vander Geyden, Y., Baeyens, W. R. G., Debunne, A., Remon, J.P., Garcia, A. M., *Bimedical Chromatography*, 18, 55-63 (2003).
13. Miroshnichenko II, Sokolova GB, Mokhireva LV. Clinical pharmacokinetics of para-aminosalicylic acid tablets. *Antibiot Chemother* 2009; 54(1-2): 20-24.
14. Hong L, Jiang W, Zheng W, Zeng S. HPLC analysis of para-aminosalicylic acid and its metabolite in plasma, cerebrospinal fluid and brain tissues. *J Pharma Biomed Anal* 2011; 54(5): 110-119.
15. Petrash JM (April 2004). "All in the family: aldose reductase and closely related aldo-keto reductases". *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (7-8): 737-49. doi:10.1007/s00018-003-3402-3. PMID 15094999.
16. Nishimura, C., Furue, M., Omri, Y., Tanimoto, T. (1993) "Quantitative determination of human aldose reductase by enzyme-linked immunosorbent assay. immunoassay of human aldose reductase". *Biochem Pharmacol* 46:21-28
17. Wu LY, Ma ZM, Fan XL, Zhao T, Liu ZH, Huang X, Li MM, Xiong L, Zhang K, Zhu LL, Fan M (November 2009). "The anti-necrosis role of hypoxic preconditioning after acute anoxia is mediated by aldose reductase and sorbitol pathway in PC12 cells". *Cell Stress Chaperones* 15 (4): 387-94. doi:10.1007/s12192-009-0153-6. PMC 3082650. PMID 19902381.
18. Schemmel KE, Padiyara RS, D'Souza JJ (September 2009). "Aldose reductase inhibitors in the treatment of diabetic peripheral neuropathy: a review". *J. Diabetes Complicat.* 24 (5): 354-60. doi: 10.1016/j.jdiacomp. 2009. 07. 005. PMID 19748287.
19. Hayman, S. & Kinoshita, JH. (1965). "Isolation and properties of lens aldose reductase". *J. Biol. Chem.* 240:877-882.
20. Sorenson, R.L., Ludvigson, M.A (1980) "Immunohistochemical localization"; Vol. 29. Pp 438-449.

Spectrophotometric Determination of para aminosalicylic acid in Serum Blood and Urin By Oxidative Coupling With 4-Amino Antipyrine and Study The Inhibition of Aldose Reductase Enzyme

Asma'a H. Shakir

Department of Chemistry, College of Education for Women, Tikrit University, Tikrit, Iraq

Abstract

This work includes a new spectrophotometric method for the determination para aminosalicylic acid in aqueous medium based on the oxidation by NaIO_4 and coupling with 4-Amino Antipyrine producing a red dye soluble in water and of λ_{max} of 516 nm. The proposed method could be applied successfully for the determination of para aminosalicylic acid, with a molar absorptivity of $17568 \text{ L.ml}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ and the Value of Sandell's sensitivity $0.0120 \mu\text{g.cm}^{-2}$. The results showed good accuracy and compatibility with Value of the relative error (1.00- 3.65 %) relative standard deviation of (0.008 to 0.1305)% depending on the level of concentration. The application of the proposed method Show that the Beer's law is obeyed range of concentrations of 10-500 μg in a final volume of 25 ml. The new method was used for estimation of para aminosalicylic acid in Serum and urine, and study its effect to Aldose reductase which partially purified from sera of patients with type II diabetic mellitus. The results indicate that reactivity percentage were 101.395 in serum and 100.776 in urine, while the inhibition percentage for aldose reductase were increased with increasing of inhibitor concentration (16-84)%.