استخدام أغشية السيلولوز ثلاثي الأستيل (السيلولوز المؤستل) في قياس السكر

الدكتور مليكا كرستيفا* محمد الحلاق**

الملخص

تتجلى أهمية أجهزة الامتصاص الضوئي من خلال تحديد المركبات الأساسية (السكر) في مجال الطب والبيئة, فمنذ وقت قريب تم تطوير طريقة تهدف للربط الاتحادي مابين الإنزيمات والبوليميرات من جهة ومركبات بيولوجية فعالة والبوليميرات من جهة أخرى، طبعاً من أمثلة البوليميرات (السيلولوز, الكيتوزان الخ).

الهدف من بحثنا هذا الحصول على نموذجين من الأغشية(Triacetylcellulose) بقصد استخدامها في أجهزة الـpH الضوئية

١ - النوع الأول : (Congo Red) مرتبط اتحادياً مع الغشاء

٢ - النوع الثاني : (Congo Red) + إنزيم (Glucose oxidase) مرتبطان اتحادياً مع الغشاء وبآن واحد.

هذان النموذجان من الأغشية سيستخدمان لاحقاً من أجل تحديد نسبة الغلوكوز في المحاليل النموذجية و السوائل البيولوجية الحيوية, حيث إن السكريات تمتلك خواصً مرجعة فيمكن للزمرة الالدهيدية أن تتأكسد إلى زمرة كربوكسيلية وذلك بتأثير إنزيم (Glucose oxidase) مشكلة حمض الغلوكونيك الذي يتسم بالقدرة على تغيير لون المشعر (Congo Red) المرتبط بالغشاء (في كلا النموذجين) هذا التغيير طبعاً متناسب طرداً مع التماص ، إن مثل هذه الحقيقة العلمية تتيح إمكانية إنشاء مخططات نموذجية يمكننا من خلالها قياس تركيز (الغلوكوز) استنادًا إلى التماص. من أهم النتائج التي توصل إليها البحث: هوأنه في الحالة التي يكون فيها المشعر مثبتاً

* قسم التكنولوجيا الحيوية _جامعة الكيمياء التطبيقية _صوفيا _ بلغاريا.

** طالب دراسات عليا في جامعة الكيمياء _صوفيا _بلغاريا.

على الغشاء يمكن أن تستخدم بنجاح من أجل تحديد تركيز(الغلوكوز) وذلك بإضافة إنزيم الغلوكوز اوكسيداز إلى المحلول ،أما النتيجة الأهم فهو أنه في الحالة التي يتم فيها تثبيت الإنزيم والمشعر في آن واحد على الغشاء يمكن أيضا أن تستخدم وبنجاح من أجل تحديد تركيز(الغلوكوز) وذلك طبعًا دون إضافة الإنزيم إلى المحلول . إن تمتع مثل هذه الأغشية بخاصية الثبات مع الزمن والاستخدام لمرات عديدة يمكننا من تطبيقها بنجاح في مجال البحوث السريرية.

Determination of Glucose on the base of triacetylcellulose membranes

Milka Krysteva [*] Mohamed Alhallak[**]

Abstract

Optical sensors are of great importance for determination of significant compounds in the field of medicine and ecology.

Recently a new method has been established for covalent binding of enzymes and other biologically active compounds to biopolymers like cellulose, chitosan and others.

The aim of the present study is to prepare membranes for optical pH sensors with immobilized Congo Red as well as with enzymes /glucose oxidase/ which are used later for determination of glucose concentration in model solutions and biological liquids.

As a result of our preliminary study it can be concluded that the immobilized indicator /Congo Red/ can successfully be used for substrate /glucose/ determination. As a result of the enzymatic reaction an acid has been released that changes the colour of the indicator proportionally to its absorption. That makes possible the drawing of a standard curve which give the concentration of the substrate /glucose/ versus the absorption.

An experiment of great interest proved to be the simultaneous immobilization of Congo Red and glucose oxidase on cellulose membranes. That kind of studies allow the successful determination of substrates /glucose/ without adding an enzyme to the solution. The membrane with

[*] Derpartment Of Biotechnology- University Of Chemical And Metallurgy Sofia -Bulgaria

[**]PhD Student in Department of Biotechnology- University of Chemical Technology and Metallurgy- Sofia

immobilized indicator as well as the membranes with simultaneously immobilized Congo Red and glucose oxidase are stable in time and can be used repeatedly. That characteristic is very valuable for such kind of methods used in clinical practice.

مقدمة

يمتص عدد كبير من المواد البيولوجية (Congo Red , Neutral Red) الضوء في المنطقة المرئية من الطيف الضوئي، ويؤدي وجود رابطة مضاعفة أو حلقة بنزينية في الجزيء عادة إلى تشكل طيف تماصي وغالباً ما يحدث تبدل كبير وملحوظ في هذا الطيف التماصي في موجة بطول محدد وذلك في درجات مختلفة من الـ pH, وبذلك فإنه يمكن تتبع سير التفاعل كمياً بواسطة قياس هذا التبدل التماصي ،إذ بالاعتماد على هذا التبدل التماصي تمكنا من تحديد بعض المركبات الهامة والأساسية مثل (السكر) في مجال الطب والبيئة [١] .

فمنذ وقت قريب طورت طريقة تهدف للربط الاتحادي ما بين الإنزيمات مع البوليميرات من جهة وما بين مركبات بيولوجية فعالة مع البوليميرات من جهة ثانية, طبعاً من أمثلة البوليميرات (أغشية Triacetylcellulose, الكيتوزان الخ), [٢،٣].

ومما زاد من طريقة الربط الاتحادي أهمية عندما تم التمكن من ربط أنواع مختلفة من الإنزيمات على غشاء واحد حيث استخدمت هذه الأغشية فيما بعد في أجهزة الطيف الضوئي [٤] كما أنه بإجراء بعض التعديلات الطفيفة على هذه الطريقة تم التمكن من ربط الإنزيمات مع عدد من البوليميرات التركيبية مثل (اكريل اميد، بولي اكريل اميد الخ) [٥] .

أما بالنسبة لعملية استحصال هذه الأغشية (Triacetylcellulose) فهي موضحة في [٦] .

طبعا الهدف من بحثنا الحالي هو الحصول على نموذجين من الأغشية بقصد استخدامها في أجهزة الطيف الضوئي :

١- النـوع الأول : (Congo Red) تـم ربطه اتحادياً مع الغشاء .

٢- النوع الثـاني : (Congo Red) + إنـزيم (Glucose oxidase) حيث تـم ربطهمـا اتحادياً على الغشاء وبآن واحد .

هذان النموذجان من الأغشية سيستخدمان لاحقاً في أجهزة الامتصاص الضوئي من أجل تحديد نسبة الغلوكوز في جميع المحاليل النموذجية والسوائل الحيوية ، حيث استخدم الـ(Congo Red) كمشعر pH وذلك لأن طيفه التماصي يعاني تبدلاً واضحاً في درجات مختلفة من الـ (pH).

أما بالنسبة لاستخدام إنـزيم (Glucose oxidase) فكما هو معروف أن السكريات تمتلك خواصَّ مرجعة فيمكن للزمرة الألدهيدية أن تتأكسد إلى زمرة كربوكسيلية وذلك بتأثير الإنزيم المذكور مشكلة حمض الغلوكونيك حسب التفاعل الآتية:

$$Glucose + H_2O + O_2 \rightarrow Gluconic\ acid + H_2O_2$$

فحمـض الغلوكونيـك المتحـرر بنتيجـة التفاعـل الإنزيمي يتسم بالقدرة على تغيير الـ P H للوسط ومن ثمَّ يستطيع تغيير لون المشعر (Congo Red) المرتبط اتحادياً مع الغشاء وذلك في كلا النموذجين من الأغشية ,طبعا التغيير في لون المشعر يكون متناسباً طرداً مع التماص .

- المواد والطرق المستخدمة

١- المواد المستخدمة في البحث

- (Congo Red) تم الحصول عليه من شركة (Merck) ألمانيا .

- إنـزيم (Glucose oxidase) معزولة ومنقاة من Penicillum chrisogenium تم الحصول عليها من شركة Sigma (USA).

- الغشـاء المكـون مـن triacetylcellulose والمستخدم من أجل ربط (Congo Red) وإنزيم (Glucose oxidase) تم الحصول عليه من أفلام تصوير عادية شفافة معالجة كيميائياً .

٢- الطرق المستخدمة في البحث

- معالجـة (تنشـيط) الغشـاء triacetylcellulose

عُولج ٥ غ من الغشاء بهيدروكسيد الصوديوم (NaOH ٥N) لمدة ٤٨ ساعة وذلك لإزاحة الزمر الأستيلية وبقاء الزمر الهيدروكسيلية ، ثم بعد ذلك يغسل الغشاء بالماء المقطرعدة مرات ، ثم يعالج بحمض فوق اليود (Periodic acid ٠،٢٥M) في درجة حرارة ٤ درجة مئوية وذلك بوجود محلول خلاتي دارئ (Macetate buffer ٠،٠١) في pH= ٣,٨, وذلك لمدة (١٤) ساعة في الظلام , بعد ذلك يغسل الغشاء بالماء المقطر عدة مرات أيضاً، ثم يغمر في محلول من الكاربامید ١٥% لمدة (١٤-١٦) ساعة وذلك بوجود حمض الكبريت(٠,٩% H_2SO_4), وعند درجة حرارة ٦٠ درجة مئوية في حمام مائي ساخن مع التحريك المستمر . وبذلك نكون قد حصلنا على زمر الكارباميد NH_2 الثابتة يغسل الغشاء بعد ذلك بالماء المقطر وعدة مرات .

- معالجة الغشاء (المؤكسد) بالفورم الدهيد

يغمر الغشاء بالفورم الدهيد في محلول فسفاتي دارئ (٠،٠١M) بدرجة حرارة (٤٥) درجة مئوية لمدة١٦ ساعة عند pH=٧،٥ في حمام مائي ساخن مع التحريك المستمر , ثم يغسل الغشاء بعد ذلك بالماء المقطر عدة مرات ويستخدم مباشرة من اجل عملية الربط أو الضم .

- ربط أو ضم الـ (Congo Red) مع الغشاء

يُغمر ٤ سم من الغشاء المعالج مع ٢٠ ملغ من الـ (Congo Red) في ١٠ مل من المحلول الفسفاتي الدارئ ٠,١ M وعند pH=٨ مع التحريك المستمر وفي درجة حرارة الجو المحيط في الغرفة ولمدة ٢٤ ساعة،ثم بعد ذلك يغسل الغشاء الذي ثبت عليه الـ(Congo Red) بالماء المقطر عدة مرات .

- ربط أو ضم الـ (Congo Red) + إنـزيم (Glucose oxidase) معاً على الغشاء وبآن واحد

يُغمر ٤ سم من الغشاء المعالج + ٢٠ ملغ من الـ (Congo Red) + ٢٠ملغ من إنزيم (Glucose

oxidase) في ١٠ مل من المحلول الفسفاتي الدارئ M٠,١ وعند pH=٨ وبدرجة حرارة الغرفة ولمدة ٢٤ساعة , ثم بعد ذلك يغسل الغشاء الذي ثبت عليه الـ (Congo Red) و (Glucose oxidase) بالماء المقطر عدة مرات .

- تحديد فعالية إنزيم (Glucose oxidase)

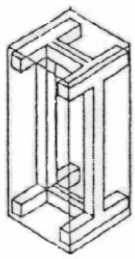
لقد تم تحديد وحدة الفعالية للإنزيم وذلك حسب الطريقة المتبعة في (Bergmayer) ٨ ويرمز لها بالرمز U وهي الكمية الإنزيمية الكافية للقيام بعمل الوساطة والقادرة على تحويل ميكرو مول (Micromole) واحد من الركيزة (الغلوكوز) في الدقيقة الواحدة , في درجة حرارة ٢٥درجة مئوية وفي pH وتركيز ركيزة مناسبتين . حيث تبين لنا كما هو موضح فيما بعد أن درجة الحموضة ph=٦ هو الحد الأفضل في الحالة التي يكون فيها الإنزيم بشكل حر في المحلول , أما في الحالة التي يكون فيها الإنزيم مرتبطاً مع الغشاء فتبين أن ph=٦,٥ و الحد الأفضل .

أما بالنسبة لتحديد كمية البروتين فقد تم استخدام طريقة (LOWRY) في كلتا الحالتين .

وبالنسبة لعمليات القياس الطيفي الضوئي فلقد أنجزت على جهاز (Perkin-Elmer Lambda ٢ spectrophotmeter) القادر على تسجيل تغير الكثافة الضوئية مع الزمن في أي طول موجة وبشكل آلي ،وتمثل النتائج على شكل مخطط بياني مستمر لسير التفاعل وبذلك يمكن تحديد سرعة التفاعل الأولية بشكل دقيق وبوقت قصير جداً .

أما بالنسبة للأغشية التي تم عليها ربط المشعر(Congo Red) أو تثبيته فقد تم وضعها وبشكل عمودي في حجرة الجهاز وذلك بواسطة إطار تم تصميمه لغرض التجربة موضح بالشكل رقم ١, أما العينة المعيارية (الشاهد) فقد كانت محتوية على غشاء شفاف خالٍ من أي شئ

شكل رقم ١ ، يوضح وضعية الغشاء ضمن إطار خاص داخل الحجرة التي ستوضع في الجهاز



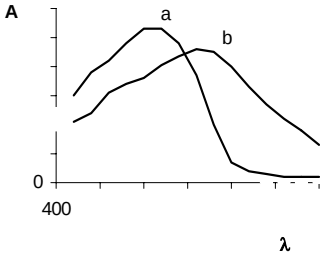
- النتائج والمناقشة:

لقد تم تتبع الطيف التماصي للـ (Congo Red) بحالتيه سواءً كان بشكل حر في المحلول أم كان مرتبطاً اتحاديا مع الغشاء، وفي كلتا الحالتين تم استخدام درجتين مختلفتين من الـpHعند pH=٦ وعند ph=٢,٦٧، حيث تبين كما هو واضح في الشكل رقم ٢ أن الطيف التماصي للـ (Congo Red) الواقع في منطقة الأشعة المرئية من الطيف الضوئي يعاني تبدلاً معيناً فيبدي عند الـ pH= ٦ عصبة امتصاصية عظمى واحدة في موجة طولها ٤٩٠ نانومتراً، في حين أنه عند الـ ph=٢,٧٦ يبدي بالإضافة إلى ذلك عصبة امتصاصية أخرى في طول الموجة ٦٣٠ نانومتراً وبذلك فقد تمت عملية قياس تغيرات الكثافة الضوئية عند طول الموجة ٦٣٠ نانومتراً.

شكل رقم ٢، يوضح الطيف الامتصاصي للـ(Congo Red)

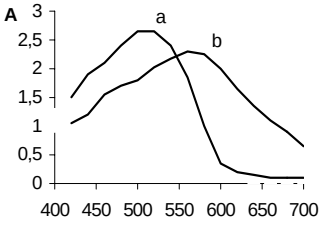
(A) عندما كان بشكل حرفي المحلول

(B) عندما كان مرتبطاً اتحاديا مع الغشاء



pH ٦,٠ (a)

ph٢,٧٦ (b)



أما بالنسبة للمحاليل المقياسية المستخدمة في البحث فقد كانت عبارة عن تراكيز مولية مختلفة من الغلوكوز من (٠،٦M   ٠،٠٠٥M)
وقد تم تسجيل نوعين من القياسات :

١- القياس الأول : حيث كان الـ (Congo Red) مرتبطاً اتحادياً مع الغشاء في حين كان إنزيم (Glucose oxidase) بشكل حر في المحلول .

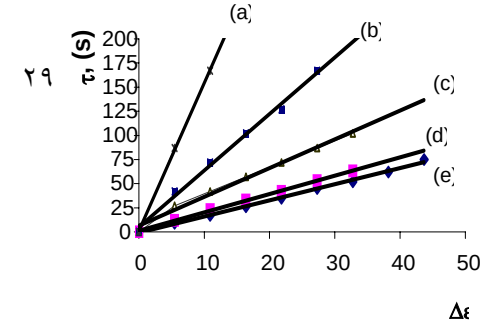
٢- القياس الثاني : حيث كان الـ (Congo Red) + إنزيم (Glucose oxidase) مرتبطين اتحادياً مع الغشاء وبآن واحد .

فبالنسبة للقياس الأول وكما هو واضح في الشكل رقم ٣ حيث إن سرعة التفاعل الإنزيمي ممثلة بمعامل الانطفاء لـ (Congo Red) ومعبر عنها بـ وعند طول الموجة ٦٣٠نانومتراً، تبين أن سرعة التفاعل الإنزيمي الأولية تعتمد على تركيز الركيزة (الغلوكوز) حتى درجة معينة وذلك في درجة حرارة وتركيز إنزيمي ثابتين ،وعندما يفوق تركيز الغلوكوز تلك الدرجة فإنَّ أي زيادة في تركيزه لا تعطي زيادة مقابلة في شدة التفاعل الإنزيمي.

حيث تم في بحثنا استخدام تراكيز مختلفة من الغلوكوز من (٠،٦M - ٠،٠٠٥M) فتبين أن سرعة التفاعل الأولية تزداد بزيادة تركيز الغلوكوز، ولكن حتى درجة معينة وذلك نتيجة لتحرر حمض الغلوكونيك الذي يغير pH الوسط ومن ثمَّ يتغير لون المشعر (Congo Red) المرتبط بالغشاء وهذا التغيير متوافق نسبيا مع التماص.

شكل رقم ٣، يوضح العلاقة بين معامل الانطفاء لـ (Congo Red) مع الزمن وذلك بوجود تراكيز مختلفة من الغلوكوز حيث كان إنزيم (Glucose oxidase) بشكل حر في المحلول

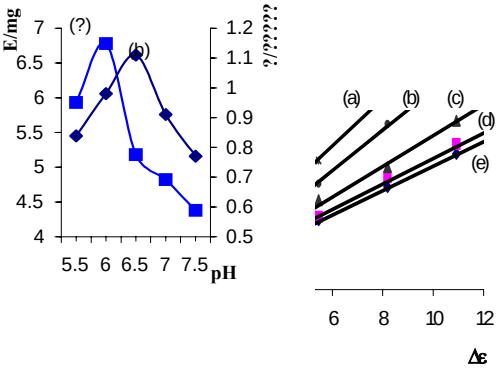
- تراكيز الغلوكوز (a) ٠،٠٠٥ , (b) ٠،١٥ , (c) ٠،٣ (d) ٠،٥ , (e) ٠،٦ .



أما بالنسبة لحالة القياس الثانية وكما هو واضح في الشكل رقم ٤، فقد استخدمت التراكيز نفسها من الغلوكوز من (٠،٦M - ٠،٠٠٥M) ،حيث تبين أيضاً أنَّ سرعة التفاعل الإنزيمي تزداد أيضاً بزيادة تركيز الغلوكوز، ولكن هذه الزيادة هنا تسير بشكل أبطأ مما هو عليه في القياس الأول وذلك طبعا بسبب انخفاض تركيز الإنزيم المثبت على الغشاء والقادر على تحويل الغلوكوز إلى حمض الغلوكونيك القادر على تغيير pH الوسط، ومن الجدير بالذكر هنا أن وحدة الفعالية للإنزيم المرتبطة مع الغشاء كانت (U١,١) وذلك لمساحة من الغشاء١,٧سم^{2} .

شكل رقم ٤، يوضح العلاقة بين معامل الانطفاء لـ(Congo Red) مع الزمن وذلك بوجود تراكيز مختلفة من الغلوكوز حيث كانت إنزيم (Glucose oxidase) مرتبطة مع الغشاء

- تراكيز الغلوكوز (a) ٠،٠٠٥ , (b) ٠،١٥ , (c) ٠،٣ , (d) ٠،٥ , (e) ٠،٦ .



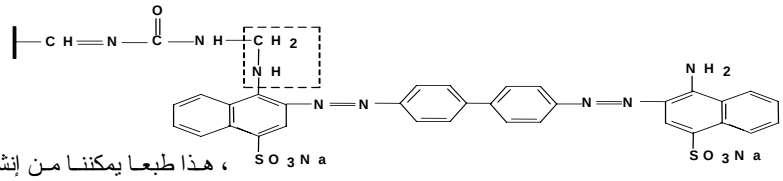
كما هو معروف أن جميع الإنزيمات حساسة جداً لتبدلات درجة حموضة أوساطها ، وتبدي معظم الإنزيمات تأثيرها الوساطي الأعظمي ضمن مجال محدد من الـ p H ، وكما هو واضح في الشكل رقم ٥ فقد تبين أن الـ pH الأفضل لإنزيم (Glucose oxidase) عندما كانت بشكل حر في المحلول

هو ph=٦ حيث كانت وحدة الفعالية لهذا الإنزيم u٦,٧، بينما الرقم الهيدروجيني الأفضل للإنزيم نفسه عندما كانت بشكل مرتبط مع الغشاء هو ph=٦,٥ حيث كانت وحدة الفعالية لهذا الإنزيم u١,١ لمساحة من الغشاء قرابة ١,٧ سم^{٢}.

شكل رقم ٥، يوضح الـpH الأفضل وذلك لإنزيم Glucose oxidase بحالتيها
A-عندما كانت بشكل حر في المحلول
B-عندما كان مرتبطاً مع الغشاء

أما بالنسبة لإمكانية ارتباط الـ (Congo Red) مع الغشاء فهو موضح في الشكل رقم ٦ حيث تبين أن الزمرة الأمينية من حلقة النفتالين في الـ (Congo Red) تشارك في الرابطة الكيميائية بين أحمر الكونغو و الغشاء وذلك عن ph=٨ وبهذه الطريقة يمكننا القول إنَّ الروابط الثنائية المسؤولة عن تغيير لون الكاشف (Congo Red) لا تتأثر بالتفاعل الكيميائي الحاصل والمؤدي إلى تشكل الرابطة الاتحادية .

مخطط رقم ٦، يوضح التفاعل المتوقع بين الكاشف (Congo Red) والغشاء triacetylcellulose حيث يشير الخط المنقط إلى مكان وجود الرابطة .



، هذا طبعا يمكننا من إنشاء مخططات نموذجية تسمح لنا بقياس نسبة تركيز الغلوكوز وذلك من خلال قراءة التماص .

أما النتيجة الأهم في بحثنا هذا فهو أنه في الحالة التي يكون فيها المشعر (Congo Red) + إنزيم (Glucose oxidase) مرتبطين مع الغشاء وبآن واحد يمكن أيضاً أن تستخدم في قياس تركيز الغلوكوز ولكن دون إضافة الإنزيم إلى المحلول ، إن تمتع مثل هذه الأنواع من الأغشية بخاصية الثبات مع الزمن والاستخدام لمرات عديدة ومتكررة يمكننا من استخدامها وبنجاح في مجال البحوث السريرية.

خاتمة

حسب نتائج الدراسة التي أجريناها يمكننا القول إنَّه في الحالة التي يكون فيها الكاشف (Congo Red) مرتبطاً مع الغشاء في حين إنزيم (Glucose oxidase) بشكل حرفي المحلول يمكن أن تستخدم بنجاح من أجل تحديد تركيز الركيزة (الغلوكوز)، وذلك نتيجة للتفاعل الإنزيمي الذي يؤدي إلى تحرير حمض الغلوكونيك الذي بإمكانه تغيير لون الكاشف طبعا هذا التغيير متوافق نسبيا مع التماص وذلك في تراكيز محددة من الغلوكوز

المصادر

١. C. Chen, K. Ishihara, N. Nakabayashi, E. Tamiya, I. Karube,

Biomedical Microdevices ١:٢, ١٥٥-١٦٦, ١٩٩٩

٢. M.A. Krysteva, S.R. Blagov and T.T. Sokolov, J. Appl. Biochem., ٦ (١٩٨٤) ٣٦٧.

٣. N. Todorova, M. Krysteva, K. Maneva, D. Todorov, J. Bioactive and Compatibble Polymers, ١٤ (١٩٩٩) ١٧٨.

٤. M.A. Krysteva and L.K. Yotova, J. Chem. Technol. Biotechnol., ٥٤ (١٩٩٢) ١٣.

٥. M.A. Krysteva, B.I. Shopova, L.K. Yotova and M.I. Karasavova, Biotechnol. Appl. Biochem., ١٣ (١٩٩١) ١٠٦.

٦. Y.Kostov, S.Tzonkov, L. Yotova, M. Krysteva, Analyt. Chimica Acta, ٢٨٠ (١٩٩٣) ١٥.

٧. M.A. Krysteva, G.A. Peev and L.K. Yotova, Acta Biotechnol., ٧ (١٩٨٧) ٩٣.

٨. Bergmeyer H.U., In Methods of Enzyme Analysis. Vol. ٣, eds H.U. Bergmeyer and K. Gawehn, ١٩٧٤, pp ١٢٠٦-١٢١٢.

٩. Schacterlle, G. Rand Pollack, R.L., Biol. Material. Anal. Biochem. ٥١ (١٩٧٣), ٦٤٥-٥.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق: ٢٠٠١/٨/٢٨.
تاريخ قبوله للنشر: ٢٠٠٢/٢/١٠.