

## تقدير الميثيونين بواسطة البريق الكيميائي-الحقن الجرياني المستمر

عصام محمد علي ، نغم شاكر تركي العوادي ، راند فالح حسن

جامعة بغداد- كلية العلوم- قسم الكيمياء

مفتاح البحث: الميثيونين، الحقن الجرياني، البريق الكيميائي

### الخلاصة

يقدم البحث طريقة بسيطة وسريعة لتقدير الميثيونين باستخدام منظومة الحقن الجرياني المستمر من خلال قياس البريق الكيميائي لنظام: ميثونين-هيدروكسيد الصوديوم-لومينال لتحريز مشتق اللومينال الباعث للبريق الكيميائي في الوسط القاعدي وعند حجم لانموذج محقن من الميثونين 83 مايكروليتر.

تم الحصول على علاقة لتغير الاستجابة مع التركيز تمتد من (0.2-20) مللي مول لتر<sup>-1</sup> ونسبة الخطية 96.17% او لمدى من التراكيز يمتد من (0.6-20) مللي مول لتر<sup>-1</sup> وبنسبة خطية 99.17% والتوصل الى حدود كشف (S/N=3) 5 مايكرو مول لتر<sup>-1</sup> من التخفيف التدريجي لاقل تركيز في منحنى المعايرة وبتكرارية (%R.S.D) اقل من 0.5% (n=10). اجريت مقارنة بين الطريقة المستحدثة والطريقة التقليدية للقياس الطيفي وذلك باختصاصها الى اختبار t- المزدوج او اختبار F- وتبين انه لا يوجد فرق جوهري بين الطريقتين، وبالإمكان استخدام طريقة قياس البريق الكيميائي المقترنة بتقنية الحقن الجرياني كبديل لطريقة القياس الطيفي.

## Determination of Methionine Via Chemiluminescence-Continuous Flow Injection Analysis

Issam M.A. Shakir , Nagam Shakir Turkey and Raad Faleh Hassan

Chemistry department-College of Science-University of Baghdad / Iraq

**Keyword :** methionine, chemiluminescence, continuous flow

(Received :August 2012 , Accepted: Desmber 2012 )

### Abstract

The research work represent a fast and simple method for the determination of methionine using chemiluminescence for the methionine-sodium hydroxide-luminol for the generation of a chemiluminescent derivative of luminol. The emission was measured by continuous flow analysis made sample size of 83µL was used.

Response versus concentration extended from 0.2-20 mM.L<sup>-1</sup> with a percentage linearity of 96.17% or with 99.17% percentage of linearity for the range 0.6-20 mM.L<sup>-1</sup>. Reaching to a L.O.D. at (S/N=3) for 5 µM.L<sup>-1</sup> from the gradual dilution for the minimum concentration in the calibration graph with a repeatability of less than 0.5% (n=10). A comparison was made between the new developed method with the classical method for the spectrophotometric determination by coupling with paired t-test or F-test and found that there is no significant difference between the two methods and the new adapted method which can be used as an alternative method.

### المقدمة

الميثيونين methionine: مركب عضوي وواحد من عشرين حامض اميني موجودة بشكل شائع في بروتينات الحيوانات. يعد الميثيونين من اهم الاحماض الامينية المحتوية على الكبريت (كبريته غير فعال) والضرورية المتطلبة في التغذية، ولا يستطيع الجسم البشري تخليقه من التمثيل الغذائي المبسط، ويجهز الجسم بالكبريت ومركبات اخرى يحتاجها الجسم للتمثيل الغذائي والنمو<sup>(1)</sup>. يعد الميثيونين من مضادات الاكسدة antioxidant، lipotrope الذي يساعد على ازالة الدهون من الكبد ويسيطر على المركبات المهمة المحتوية على الكبريت في الجسم وهذه المركبات بدورها تكون حيوية للدفاع ضد المركبات السامة مثلاً الفلزات الثقيلة في الكبد. بالإضافة الى انه يساعد على تقليص مستوى الهستامين المسيطر على توسيع الاوعية الدموية ويؤثر على وظائف الدماغ<sup>(2)</sup>. اما مصادر التغذية للحصول على الميثيونين: اللحم، الاسماك، ومنتجات الالبان، الفواكه والخضراوات والطعام المخمر، والجرعة المتطلبة منه ما يعادل 13 ملغم/كغم لوزن الجسم بالنسبة للبالغين، واعراض نقص الميثيونين: فقدان لون الشعر، تلف الكبد، وفقدان العضلات، فقدان الدهون، تقرحات جلدية وضعف وبطئ النمو بالنسبة للاطفال بالإضافة الى الاورام (edema) وفقدان طاقة

الجسم (lethargy)<sup>(4,3)</sup>، لذلك فقد اخذ تقدير الميثونين مجالا واسعا "ومتطورا" في البحث العلمي خلال تقدير العديد من الاحماض الامينية ومنها الطيفية باستخدام الاشعة فوق البنفسجية عند 230 نانومتر<sup>(5)</sup> والطيفية اللونية<sup>(6)</sup> لفعالية الميثونين في تكوين معقد بين Lactic acid و p-hydroxydiphenyl وكروماتوغرافيا الغاز<sup>(7)</sup> والقياسات الجهدية<sup>(8)</sup> والتفورية بالاقتران مع تقنية الحقن الجرياني المستمر<sup>(9)</sup> من خلال سلوكه كمركب دخيل خلال اختزال Ti(III) الى Ti(I) في وسط يحتوي على الكلوريد بوساطة Cysteine وتكوين الكاشف المتفلور<sup>(10)</sup>  $TiCl_3^{-2}$  ( $\lambda_{em}=419nm$ ,  $\lambda_{ex}=227nm$ ). ان التطور في طرائق التحليل باستخدام تفاعل البريق الكيميائي للكشف والتقدير<sup>(10)</sup> عن الاثار الضئيلة لمختلف الاصناف العضوية واللاعضوية والدوائية والاحيائية لاقت عناية رئيسية لما تمتاز بالبساطة وسرعة التحليل والدقة والضبط بالاضافة الى حدود الكشف الواسعة وتوسيع المدى الخطي لمنحنيات المعايرة وبساطة الالية المستخدمة، ومن اهم كواشف البريق الشائعة الاستخدام اللومينال والليوسجين،  $Ru(bipy)_3^{+2}$  وبيروكسي اوكزالا ت بحيث ان المادة المراد تحليلها اما تحرر او تستهلك المادة الاساسية لحدوث تفاعل البريق بفعل عملية الاكسدة والاختزال<sup>(11)</sup>، وهناك تطبيقات متعددة للبريق الكيميائي في تحليل المستحضرات الصيدلانية والاحيائية والصناعية او البيئية وغيرها<sup>(12-15)</sup>، ولان العديد من تفاعلات البريق الكيميائي تمتاز بسرعة حدوثها ولزيادة كفاءة المزج بين الامنودج والكواشف بتطابقية او تكرارية عالية فقد اقترنت مثل هذه التفاعلات مع تقنية التحليل بالحقن الجرياني المستمر (FIA)<sup>(14-15)</sup> وتستند على حقن الامنودج عبر تيار مستمر لمحلول ناقل بطرائق ذات تطابقية عالية ثم مزجه مع كواشف البريق الكيميائي في خلية التفاعل بصورة انية ومستمرة ودون فقدان للاشارة لان عملية المزج والتفاعل تحدثان امام المتحسس المثبت امام خلية التفاعل وعلى هذا الاساس فهناك تطبيقات عديدة لتقنية FIA عند اقترانها مع تفاعل البريق الكيميائي<sup>(16-20)</sup>، وان اغلب تفاعلات البريق الكيميائي اشتملت اكسدة اللومينال في وسط قاعدي بعامل مؤكسد مثل بيروكسيد الهيدروجين بوجود عامل مساعد: ايون موجب او سالب ومركبات قد تكون عضوية ولا عضوية ودوائية او احياية.

قدرت اغلب الاحماض الامينية بالاضافة الى الميثونين على اساس قابليتها في تحسين (enhanced) (زيادة) تفاعل البريق الكيميائي لنظام Luminol-Mn(II)-OH<sup>-</sup> وتفاعلها مع النحاس (II) لتكوين معقد يسلك سلوك كاشف البريق لنظام:  $Cu(II)/Aminoacid-MnO_4^{-}-H_2O_2$ <sup>(21)</sup> او تحسينها لتفاعل البريق الناتج من اكسدة اللومينال ب N-Bromo Succinimide في وسط قاعدي<sup>(22)</sup>. قدر الميثونين خلال سلوكه كدخيل محسن لانظمة البريق: اثناء تقدير cycteine في المستحضرات الصيدلانية وفي مزيج من الاحماض الامينية وادرار البشر لانظمة البريق:  $Luminol-S_2O_8^{-2}-OH$ <sup>(23)</sup> و  $L-cysteine-BrO_3^{-}-quinine$ <sup>(24)</sup> على التوالي او عقار Phenylephrine.HCl في مختلف الادوية باستخدام نظام  $Phenylephrine.HCl-MnO_4^{-}-H_3O^{+}$ <sup>(25)</sup> قدرت العديد من المركبات العضوية الحاوية على الكبريت في المستحضرات الصيدلانية خلال تحسين نظام البريق  $MnO_4^{-}-Glyoxal-H_3O^{+}$ <sup>(26)</sup> واعاقه البريق لنظام اكسدة اللومينال بيروكسيد الهيدروجين باستخدام الذهب الغروي كعامل مساعد<sup>(27)</sup> او التحسس (sensitized) بالبريق الناتج من اكسدة البروتينات الخلية بوساطة  $H_2O_2$  او  $HOCl$ <sup>(28)</sup>.

لوحظ انه بالامكان زيادة انبعاث ضوء البريق الكيميائي بتحفيز الفلورة باستخدام جزئيات مستقبلية لطاقة البريق كمصدر داخلي للتشعيع مثل الفلورسين<sup>(29)</sup>، رودامين 6G<sup>(30)</sup> او مشتقات فلوروفور لمزيج من بريلين مع dansyl methionine او ايسين مع البريلين<sup>(31)</sup> كمستقبل للضوء المتحرر من نظام  $peroxy\ oxalate-H_2O_2$  وانبعاث فلورة. خلال البحث الحالي طورت طريقة جديدة مبسطة لتقدير الميثونين باستخدام تقنية الحقن الجرياني كوسيلة للقياس وبالاقتران مع تفاعل البريق الكيميائي للكشف ويتضمن تكوين مشتق اللومينال ككاشف للبريق والناتج من تفاعل اللومينال مع الميثونين وبفعل عملية الاكسدة في الوسط القاعدي يتحرر ضوء البريق.

### الجزء العملي

#### المواد الكيميائية والمعدات

#### المواد الكيميائية

5-امينو فتالييل هيدرازيد (لومينال) (Fluka) (1 ملي مول. لتر<sup>-1</sup>): حضر باذابة 0.17716 غم من اللومينال في 1 لتر من 0.1 مول. لتر<sup>-1</sup> من  $Na_2CO_3$ ، وكذلك 0.5 مول. لتر<sup>-1</sup> من NaOH (BDH) من اذابة 10 غم/500 مل ماء مقطر، والميثونين (BDH) ( $C_5H_{11}O_2SN$ ) (0.1 مول. لتر<sup>-1</sup>) حضر باذابة 1.4921 غم/100 مل من ماء المقطر.

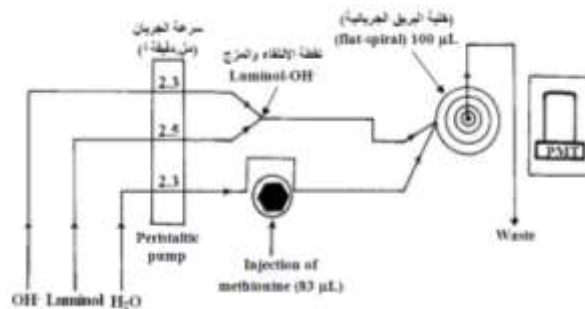
#### المعدات

مضخة تمعجية، (Ismatec type 796 made in Switzerland) انابيب ناقلة للمواد المتممة للتفاعل مصنعة من مطاط السليكون او متعدد البروبلين او من التفلون بقطر داخلي (0.5 و 0.7) ملم وصمام حقن سداسي المنفذ (Rheodyne U.S.A) ووصلة الامنودج بقطر داخلي 0.7 ملم (اطوال مختلفة) وخلية زجاجية حلزونية الشكل لالتقاء المحاليل المتممة للتفاعل ذات منفذين لدخول المحاليل ومخرج لنواتج التفاعل (المقطع المضئي في تفاعل البريق) بحجم 100 مايكروليتر، المنظومة الالكترونية: انبوية مضاعفة الفوتونات نوع (EMI 9785OB (Great Britain)) ومحاطة مع خلية البريق بجلد اسود اللون معتم لتقليل خلفية الانبعاث ومجهز فولتية (0-1.6) كيلو فولت نوع (JOBIN YVON-France) ومضخم تيار كهربائي- قراءة رقمي (United Detector Technology (Dual Channel Optometer)(PA-nA)

(U.S.A) ومسجلة خطوط بيانية مزود بقلمين ضمن مدى (500-1) مللي فولت او (500-1) فولت نوع (Kompen (Germany) (Siemens) (Sograph C1032).

#### طريقة العمل

منظومة التفاعل موضحة في الشكل رقم (1) والمكونة من ثلاث خطوط: الخط الاول: التيار الناقل (ماء مقطر) والمؤدي الى صمام الحقن الذي يتم ادخال مقطع الانموذج (المثيونين) من خلاله بحجم 83 مايكروليتر وسرعة جريان 2.3 مل/دقيقة<sup>-1</sup>، اما الخط الثاني: يمرر فيه تيار من محلول اللومينال بتركيز 0.5 مللي مول/لتر<sup>-1</sup> والخط الثالث محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 50 مللي مول/لتر<sup>-1</sup> وسرعة الجريان لكلا الخطين (2.5 و 2.3) مل/دقيقة<sup>-1</sup> على التوالي والذي يلتقيان معاً عند نقطة الالتقاء (مصممة محلياً من مادة الزجاج العضوي) (مثل ميتا اكريليت) ثم يلتقي محلول الخطان (لومينال-OH) مع محلول الخط الاول في خلية التفاعل (زجاجية حلزونية سعة 100 مايكروليتر ذات مدخلين ومنفذ لنواتج التفاعل) مؤدياً الى تحرير ضوء البريق الكيميائي بلون ازرق-مبييض في محيط قاعدي . تم تثبيت خلية التفاعل الحلزونية امام الانبوب المضاعف الفوتوني لتحويل الطاقة الفوتونية الى تيار كهربائي بحدود بيكو او نانومبير وتضخيمه ومن ثم تحويله الى فرق جهد (فولت او مللي فولت) لرسم الاستجابة باستخدام اسلوب القياس ارتفاع الاستجابة ليتم الحصول على مقدار الجهد وبالتالي على مقدار الشدة الضوئية لتفاعل البريق.



شكل رقم (1): مخطط منظومة الحقن الجرياني المستمر لتقدير

المثيونين باستخدام تفاعل البريق الكيميائي لنظام:

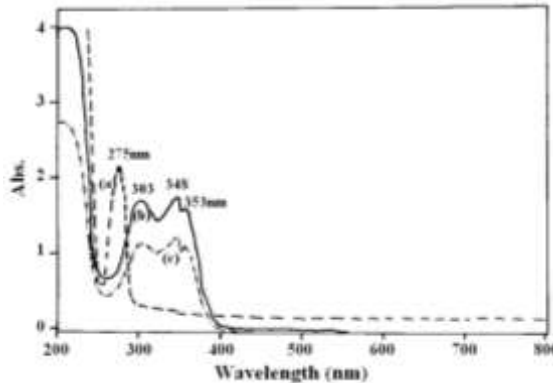
#### Luminol-OH-Methionine

#### النتائج والمناقشة

الدراسة الطيفية للمواد المتممة لنظام البريق

#### Luminol-OH-methionine

تم اجراء الدراسة باستخدام التراكيز المختارة: لومينال (0.5 مللي مول/لتر<sup>-1</sup> NaOH (50 مللي مول/لتر<sup>-1</sup>) - مثيونين (30 مللي مول/لتر<sup>-1</sup>) ولوحظ من الشكل رقم (a-2) ان طيف الامتصاص للمثيونين (عديم اللون) يظهر في المنطقة فوق البنفسجية عند 275 نانومتر اما طيف الامتصاص لمحلول اللومينال في الوسط القاعدي من هيدروكسيد الصوديوم (اصفر باهت) يظهر ثلاث قمم امتصاص عند (353، 348، 302) نانومتر على التوالي (شكل رقم (b-2)) وعند مزج المحاليل لنظام Luminol-OH-methionine تم الحصول على الشكل رقم (c-2) الذي يظهر انخفاضاً في امتصاصية محلول اللومينال بفعل استهلاك جزءاً منه من قبل المثيونين واعطاء مشتق جديد والتي تمثل القطعة الباعثة لضوء البريق الكيميائي (كما موضح في الميكانيكية المقترحة) وطيف الامتصاص المستحصل في الشكل رقم (c-2) هو المتبقي من محلول اللومينال.



شكل رقم (2): اطياف الامتصاص للمواد المتممة لنظام البريق

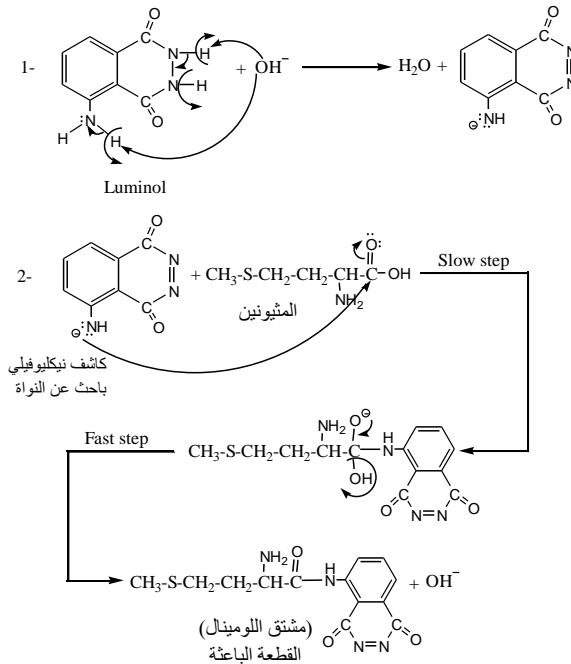
#### Luminol-OH-methionine

a: طيف الامتصاص (----) للمثيونين في الوسط المائي

b: طيف الامتصاص (—) للومينال في الوسط القاعدي

c: طيف الامتصاص (-.-) لنظام: لومينال-OH-مثيونين

ومن المتوقع ان القطعة الباعثة للبريق هي المشتق المتكون من الميكانيكية المقترحة والموضحة ادناه.

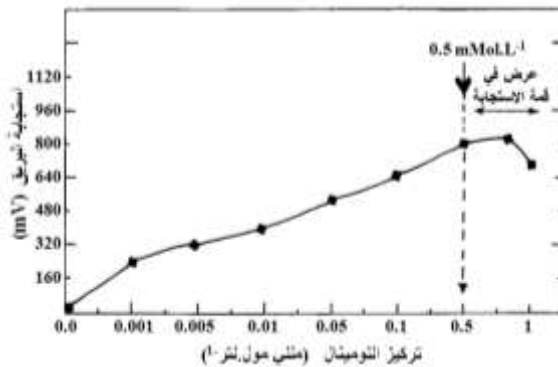


يلاحظ من الميكانيكية اعلاه ان الوسط القاعدي يسلك سلوك عامل مساعد فقط وتم البرهنة على صحة الميكانيكية المقترحة من خلال الدراسة الطيفية اعلاه.

### مفاضلة الظروف لنظام البريق ومنظومة التفاعل المتغيرات الكيميائية

#### تأثير التغير في تركيز اللومينال

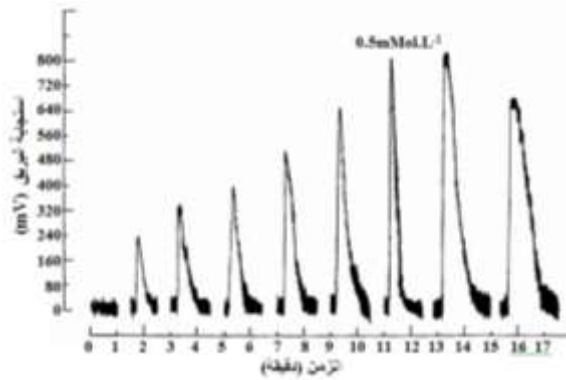
حضرت سلسلة من محاليل من اللومينال (1-0.0) مللي مول لتر<sup>-1</sup> وعند تركيز تجريبي لهيدروكسيد الصوديوم (40 مللي مول لتر<sup>-1</sup>) وتركيز مختار من المثيونين (10 مللي مول لتر<sup>-1</sup>) وسرعة جريان 1.8 مل دقيقة<sup>-1</sup> للتيار الناقل ومعدل سرعة جريان لكل من خط اللومينال وهيدروكسيد الصوديوم 2 مل دقيقة<sup>-1</sup> تم الحصول على الشكل رقم (A-3) والذي يبين انه عند التركيزات الواطئة (>0.5 مللي مول لتر<sup>-1</sup>) انبعاث ضعيف لضوء البريق معبرا عنه بانخفاض في ارتفاع الاستجابة (شكل رقم (B-3) قد يعزى الى قلة القطع الباعثة للبريق، كذلك الحال بالنسبة للتركيزات العالية للومينال لوحظ الانخفاض في ارتفاع الاستجابات وعرض في قممها (تراكيز <0.5 مللي مول لتر<sup>-1</sup>) قد يعزى الى تشبع المنظومة الالكترونية او الى حصول تصادمات منتجة لجزيئات ماثرة والفائض منها يتصادم مع جزيئات المواد المتفاعلة في المحيط والجزيئات الماثرة مسببة الى فقدان طاقة الاثارة بشكل حرارية لا اشعاعية (اخماد ذاتي) على هذا الاساس تم اختيار 0.5 مللي مول لتر<sup>-1</sup> كأفضل تركيز للومينال.



شكل رقم (A-3): تأثير التغير في تركيز اللومينال على تفاعل

البريق الكيميائي لتقدير المثيونين وعند حجم لانموذج محقن

70 مايكرو لتر

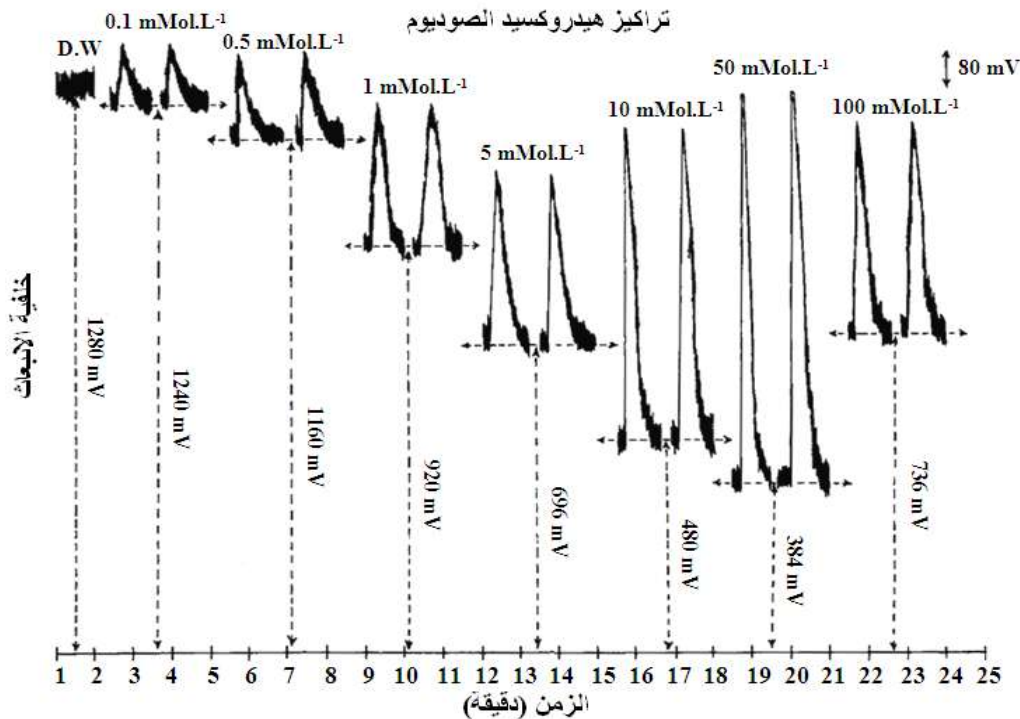


شكل رقم (B-3): تأثير التغير في تراكيز اللومينال على ارتفاع

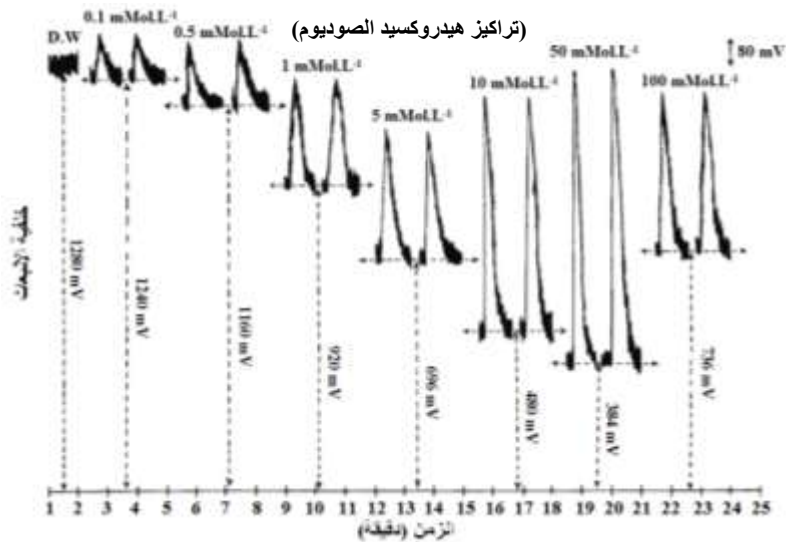
وهيئة الاستجابة لنظام البريق :لومينال- OH<sup>-</sup> - مثنوين

## - تأثير تراكيز هيدروكسيد الصوديوم

حضرت سلسلة محاليل من هيدروكسيد الصوديوم (0.0-100) ملي مول لتر<sup>-1</sup> وتركيز مختار من المثنوين 10 ملي مول لتر<sup>-1</sup> وعند التركيز الافضل للومينال (0.5 ملي مول لتر<sup>-1</sup>) وحجم لانموذج محقن 70 مايكرو لتر تم الحصول على الشكل رقم (A-4) موضحاً الزيادة في ارتفاع الاستجابة وانتظام هيئتها مع زيادة تركيز هيدروكسيد الصوديوم يقابله في نفس الوقت الانخفاض في خلفية الانبعاث شكل رقم (c-4) وصولاً الى تركيز 50 ملي مول لتر<sup>-1</sup>، وعند التراكيز العالية (<50 ملي مول لتر<sup>-1</sup>) لوحظ انخفاض ارتفاع استجابة البريق وارتفاع في خلفية الانبعاث (شكل رقم (c,B-4)) قد يعزى ذلك الى ان التراكيز العالية لهيدروكسيد الصوديوم (من المحاليل عالية اللزوجة وصعوبة التخلص منها) قد تسبب الى بقاء اثار ضئيلة منه في خلية التفاعل وصعوبة التخلص منها بالاضافة الى قابليته الى اطالة فترة بقاء المتبقي من المواد المتممة لنظام البريق او القطع الباعثة مما يضيف خلفية انبعاث مرافقة الى القياسات المتتالية وانخفاض في ارتفاع الاستجابات وهذا ما لوحظ في الشكل رقم (A-4) على حساب الزيادة في خلفية الانبعاث لذلك تم اختيار 50 ملي مول لتر<sup>-1</sup> كأفضل تركيز.



شكل رقم (A-4) تأثير التغير في تراكيز هيدروكسيد الصوديوم على ارتفاع وهيئة الاستجابة لنظام البريق وعلى خلفية الانبعاث

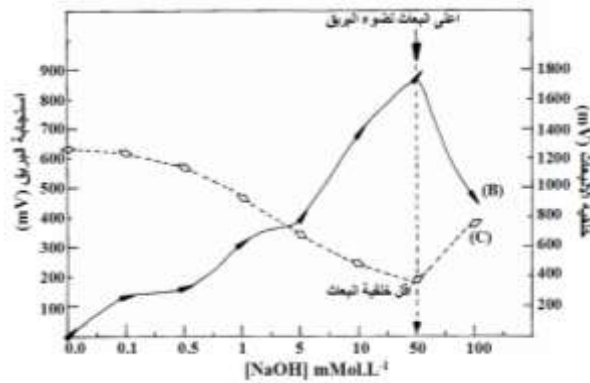


شكل رقم (4-A) تأثير التغير في تراكيز هيدروكسيد الصوديوم على ارتفاع وهينة الاستجابة لنظام البريق وعلى خلفية الانبعاث

### المتغيرات الفيزيائية

### تأثير سرعة الجريان

باستخدام الظروف الفضلى لمنظومة البريق (شكل رقم (1)) من المتغيرات الكيميائية وتركيز مختار من الميثونين (10 مللي مول/لتر<sup>-1</sup>) كأنموذج محقن على خط التيار الناقل من الماء المقطر بحجم 70 مايكرو لتر واستخدام سرع جريان متغيرة كما موضح في الجدول رقم (1).



شكل رقم (4): B- تأثير الزيادة في تركيز هيدروكسيد الصوديوم

على زيادة ضوء البريق.

C- تأثير الزيادة في NaOH على الانخفاض في

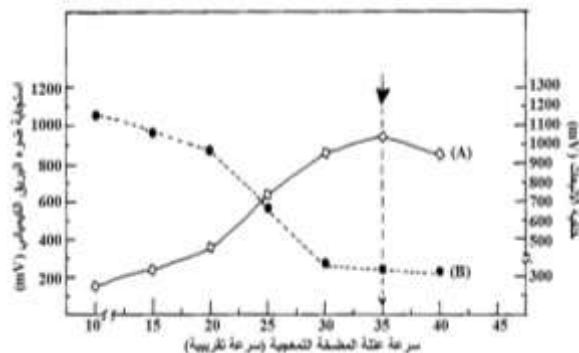
خلفية الانبعاث. تم اختيار 50 مللي مول/لتر<sup>-1</sup>

كأفضل تركيز لـ NaOH

جدول رقم (1): تأثير التغير في سرعة الجريان على تفاعل البريق في منظومة الجريان لنظام: لومينال (0.5 مللي مول.لتر<sup>-1</sup>)-NaOH (50 مللي مول.لتر<sup>-1</sup>)-مثنوين (10 مللي مول.لتر<sup>-1</sup>)

سرعة المضخة التمعجية (سرعة تقريبية)	سرعة الجريان (مل.دقيقة <sup>-1</sup> )			معدل استجابة البريق (mV) $\bar{y}_i$	حدود الفتاعة لمعدل الاستجابة عند 95% $\bar{y}_i \pm t_{0.05, n-1} \frac{\sigma_{n-1}}{\sqrt{n}}$	خلفية الانبعاث (mV)	زمن وصول مقطع الامنوج الى خلية البريق (sec)	الزمن المستغرق للمقطع المضى في الخلية (Sec)
	التيار الناقل (الاول)	خط اللومينا ل الثاني	خط NaOH الثالث					
10	0.8	0.9	0.7	160	160±0.75	1160	38	35
15	1.2	1.3	1.0	240	240±2.11	1080	30	30
20	1.6	1.7	1.5	360	360±2.98	980	25	27
25	1.7	1.9	1.6	650	650±4.92	695	20	25
30	1.8	2.0	2.0	875	875±1.44	380	15	23
35	2.3	2.5	2.3	936	936±4.97	358	12	22
40	2.8	3.1	2.7	830	830±3.73	356	10	15

يلاحظ من نتائج الجدول رقم(1) ان سرعة جريان الخط الثالث (محلول هيدروكسيد الصوديوم) اقل من سرع جريان الخطين (محلول اللومينال والتيار الناقل) وقد يعزى ذلك الى الاعاقة الناتجة من الكثافة العالية واللزوجة لمحلول هيدروكسيد الصوديوم والتي يزداد تأثيرها مع السرعة الواطئة الا ان هذه العوامل الفيزيائية قد تكون مهمة في تعجيل سرعة الجريان للخط الثالث عند السرعة العالية (سرعة عتلة المضخة التمعجية <25) لذلك يلاحظ ان جريانه سيكون اسرع في منظومة التفاعل (شكل رقم (1)) والتي تمتاز انابيبها الناقلة للمحاليل مرتبة بشكل انسيابي بالاضافة الى ان الزيادة في سرعة الجريان تزيد من انبعاث ضوء البريق وهذا ما لوحظ في الشكل رقم (A-5) وقد يعزى الى ان تفاعل البريق من التفاعلات السريعة وتتطلب سرعة عالية لاتمام مثل هذه التفاعلات والتقليل من تأثير كافة المتغيرات الفيزيائية (اهمها التشتت بفعل التنافذ او الحمل والتخفيف لمنطقة الامنوج بفعل المواد المتتممة لتفاعل البريق (لومينال-OH<sup>-</sup>)) والنقصان في خلفية الانبعاث (B-5) وصولا الى سرعة لعتلة المضخة التمعجية 35 ولكن عند سرعة اعلى من ذلك لوحظ انخفاض في انبعاث ضوء البريق قد يعزى الى عدم اتمام تفاعل البريق او عدم بقاء ضوء البريق لفترة زمنية كافية امام المتحسس مما ادى الى انخفاض في انبعاث ضوء البريق متمثلا بانخفاض في ارتفاع الاستجابة بناءً على ذلك تم تثبيت سرعة عتلة المضخة عند 35 (شكل رقم (A-5)) والتي تقابل سرع الجريان (2.3، 2.5، 2.3) مل.دقيقة<sup>-1</sup> لكل من التيار الناقل واللومينال وهيدروكسيد الصوديوم على التوالي لغرض الموازنة بين اكمال تفاعل البريق الكيميائي والاقتصاد في استهلاك المواد المتتممة للتفاعل، علما ان الفترة الزمنية المستغرقة لوصول مقطع الامنوج الى خلية البريق هي 12 ثانية وعند اقل خلفية انبعاث (358 مللي فولت) اما الزمن المستغرق لضوء البريق في خلية التفاعل هو 22 ثانية.



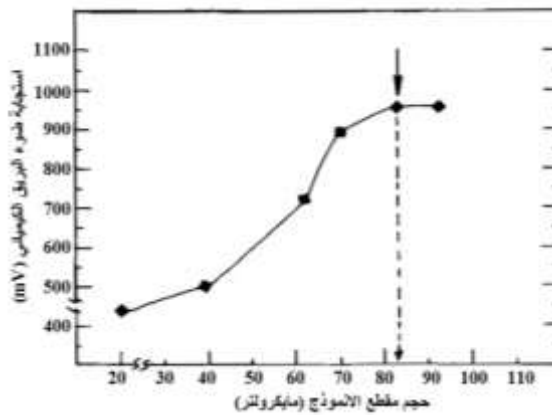
شكل رقم (5): تأثير التغير في سرعة الجريان على:

A: ارتفاع استجابة ضوء البريق

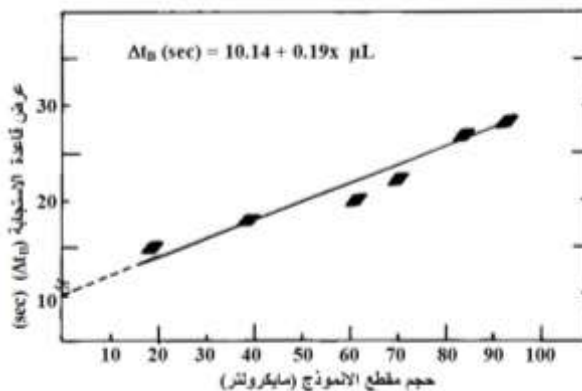
B: النقصان في خلفية الانبعاث

### حجم الانموذج المحقن:

باستخدام التراكيز الفضلى للمواد المتممة للتفاعل: لومينال (0.5 مللي مول. لتر<sup>-1</sup>) - هيدروكسيد الصوديوم (50 مللي مول. لتر<sup>-1</sup>) - ميثيونين (10 مللي مول. لتر<sup>-1</sup>) وباستخدام وصلات انموذج باطوال مختلفة (5، 10، 15، 18، 21.7، 24) سم وقطر داخلي 0.7 ملم تم الحصول على الشكل رقم (A-6) علما انه تم اجراء الدراسة بترك صمام الحقن مفتوح لضمان اكتمال خروج مقطع الانموذج باكماله من صمام الحقن (مهما كان طول مقطع الانموذج المحقن) ولوحظ انه مع زيادة مقطع الانموذج يزداد ضوء البريق معبرا عنه بزيادة معدل ارتفاع استجابة البريق وبمجم حادة ومنتظمة قد يعزى الى الزيادة في حجم الميثيونين المحقن بوساطة صمام الحقن في منظومة التفاعل (شكل رقم (1)) باعتبارها احد المواد الاساسية والمتممة لنظام البريق Luminol-OH-Methionine في حين لوحظ الانخفاض في ارتفاع الاستجابات الناتجة من حجوم لمقاطع الانموذج الاطوال من 83 مايكرو لتر بالاضافة الى عرض قممها وتشوهها بفعل الزيادة في طول الجزء المركزي ومناطق التشتت للمقطع المضئ ويعزى الى التشتت الناتج من التخفيف وبالتالي اطالة زمن بقاء المقطع المضئ امام المتحسس، بالاضافة الى ان استمرار مرور التيار الناقل خلال المسار الطويل لصمام الحقن (عندما يكون في وضعية الحقن) قد يسبب زيادة في تأثير كافة المتغيرات الفيزيائية واهمها التخفيف الناتج من التيار الناقل وهذه بدورها تزيد من مناطق التشتت المحيطة بالجزء المركزي لمقطع الانموذج وزيادة طوله بفعل الحجوم المضافة له من التيار الناقل وقلة تركيزه (ان التركيز المحقن هو 10 مللي مول. لتر<sup>-1</sup> في حين ان التركيز الذي يصل الى خلية التفاعل (البريق) بعد التخفيف هو 1.04 مللي مول. لتر<sup>-1</sup> عند حجم لانموذج محقن 93 مايكرو لتر) مما يقلل من ارتفاع الاستجابة (960 مللي فولت وبعد قليلا مقارنة بحجم الانموذج المحقن) على حساب الزيادة في عرض قمة وقاعدة الاستجابة ( $\Delta t_B$ ) (شكل رقم (B-6))، على هذا الاساس ولغرض الموازنة بين الاقتصاد في استهلاك المواد الكيميائية والحصول على اعلى انبعاث لضوء البريق تم اختيار 83 مايكرو لتر كأفضل انموذج محقن.



شكل رقم (A-6): تأثير التغير في حجم الانموذج المحقن على ضوء البريق المنبعث لانموذج محقن من الميثيونين بتركيز 10 مللي مول. لتر<sup>-1</sup> وسرعة جريان (2.3 و 2.5 و 2.3) مل. دقيقة<sup>-1</sup> لكل من التيار الناقل واللومينال وهيدروكسيد الصوديوم



شكل رقم (B-6): تأثير التغير في حجم مقطع الانموذج المحقن على عرض قاعدة الاستجابة ( $\Delta t_B$ )



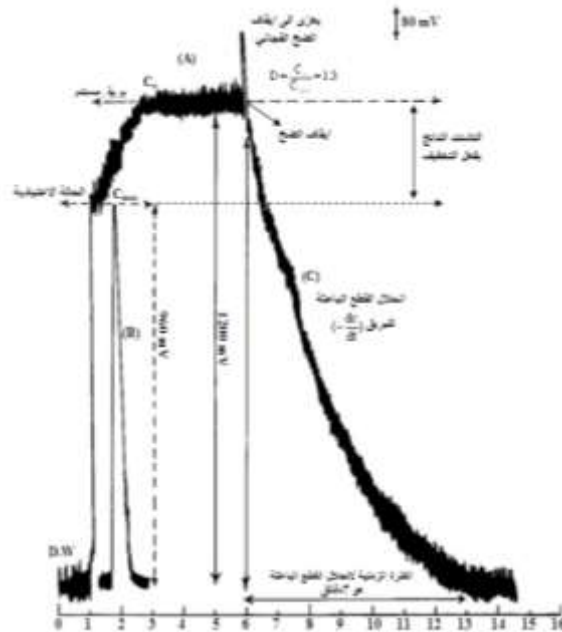
**قياس زمن انحلال القطع الباعثة للبريق وعامل التشتت الناتج بفعل التخفيف**

باستخدام منظومة الجريان (شكل رقم (1)) تم ضخ محلول الميثيونين (10 مللي مول. لتر<sup>-1</sup>) بدلاً من الماء المقطر في خط التيار الناقل للانموذج (الحالة الاعتيادية) ومنه تم الحصول على بريق مستمر (شكل رقم (A-7)) والذي يعكس عدم وجود تأثير للتخفيف او التشتت بفعل التنافذ والحمل على مقطع الانموذج او المقطع المضئ للبريق وهذه الحالة تتمثل بـ  $C_0=1200\text{ mV}$  وعند اعادة الدراسة والعودة الى الحالة الاعتيادية بوضع الماء المقطر كتيار ناقل للانموذج المحقن من الميثيونين (10 مللي مول. لتر<sup>-1</sup>) تم الحصول على استجابة مبينة في الشكل رقم (B-7) وبارتفاع اقل  $C_{\text{max}}=960\text{mV}$  ومن الملاحظ ان هنالك تأثير للمتغيرات الفيزيائية على مقطع الانموذج اهمها التخفيف (عند رحيله من صمام الحقن الى خلية القياس) بفعل الحجم المضافة اليه من التيار الناقل ( $\text{dil.}=9.3$ ) بالاضافة الى التخفيف الحاصل للمقطع المضئ في خلية القياس ومقداره  $\text{dil}=39.5$  بفعل الحجم المضافة اليه من المواد المتممة للتفاعل ولحساب التشتت الناتج بفعل التخفيف  $D = \frac{C_0}{C_{\text{max}}}$  ويساوي 1.3 مما يدل على ان التشتت (D) او التخفيف (dil) هي متغيرات فيزيائية محدودة الحدوث جدا في

المنظومة المستخدمة (شكل رقم (1)) ويعتمد ذلك على طول المسافة بين صمام الحقن و خلية التفاعل والقياس ومعدل سرعة الجريان وحجم الانموذج المحقن او طول مساره.

لحساب الفترة الزمنية المطلوبة لانحلال القطع الباعثة للبريق ( $-\frac{dc}{dt}$ ) لنظام  $\text{OH}^-$ -Luminol ( $0.5\text{ mMol.L}^{-1}$ )

( $10\text{mMol.L}^{-1}$ )-methionine ( $50\text{mMol.L}^{-1}$ ) تم ايقاف الضخ بواسطة ايقاف عمل المضخة التمعجية ولوحظ من الشكل رقم (c-7) انه بعد الحصول على بريق مستمر تم ايقاف الضخ وكانت الفترة الزمنية المستغرقة لاستهلاك القطع الباعثة للبريق (انحلالها) هو 7 دقائق، و تعد فترة طه لة و مهمة جداً لتحسين حدود الكشف



شكل رقم(7): دراسة تأثير التشتت الناتج بفعل التخفيف (dil.)

وزمن الانحلال للقطع الباعثة لنظام البريق

**Luminol-OH<sup>-</sup>-Methionine**

A: بريق اعتيادي B: بريق مستمر

C: انحلال القطع الباعثة عند ايقاف الضخ ( $-\frac{dc}{dt}$ )

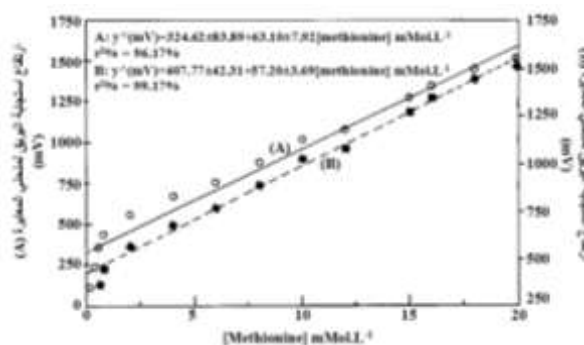
**علاقة تغير الاستجابة مع التركيز (تحضير منحنى معايرة) باستخدام نظام البريق (Luminol-OH<sup>-</sup>-Methionine)**  
حضرت سلسلة محاليل من الميثيونين (20-0.2) مللي مول. لتر<sup>-1</sup> بحجم 83 مايكرو لتر بعد تثبيت كافة المتغيرات الكيميائية: اللومينال (0.5 مللي مول. لتر<sup>-1</sup>) والفيزيائية وباستخدام المنظومة المصممة محليا (شكل رقم (1)) تم الحصول على الشكل رقم (A-8) مبينا التوزيع الطبيعي للنتائج المستحصلة عمليا ضد تراكيز متغيرة للميثيونين (تكرار كل قياس ثلاث مرات متتالية) وان هنالك علاقة خطية باستخدام معادلة الخط المستقيم للمدى (20-0.2) مللي مول. لتر<sup>-1</sup> ونسبة الخطية  $r^2=96.17\%$  وبالامكان تحسين نسبة الخطية  $r^2=99.17\%$  لمدى من التراكيز (20-0.6) مللي مول. لتر<sup>-1</sup> كما موضح في الشكل رقم (B-8). تم تلخيص كافة النتائج في الجدول رقم (2).

جدول رقم (2): ملخص لنتائج تغير الاستجابة للبريق مع التركيز لتقدير الميثونين عند حدود ثقة 95%

$t_{cal.}$ $t = \frac{ r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$	$t_{tab.}$ $(t_{\alpha/2, n-2})$ عند 95%	دقة معامل الارتباط $r \pm SE_r$	الخطأ القياسي لمعامل الارتباط $SE_r$	R و $r^2\%$	معادلة الخط المستقيم عند حدود ثقة 95% لـ n-2 $\hat{y}_i = a + ts_a + b + ts_b$ [methionine] mMol.L <sup>-1</sup>	عدد التراكيز المقاسة (n)	مدى تركيز منحنى المعايرة مللي مول.لتر <sup>-1</sup>
17.36 >>> 2.179		0.9807 ± 0.01	0.01	0.9807 96.17%	324.62 ± 83.89 + 63.10 ± 7.92 [methionine] mMol.L <sup>-1</sup>	14	20-0.2
34.56 >>> 2.228		0.9958 ± 0.002	0.002	0.9958 99.17%	407.77 ± 42.31 + 57.20 ± 3.69 [methionine] mMol.L <sup>-1</sup>	12	20-0.6

$\hat{y}$  = chemiluminescence intensity (average peak height) for n=3 in (mV)

$SE_r$  = standard error of the correlation coefficient =  $\frac{1-r^2}{\sqrt{n}}$



شكل رقم (8): تأثير التغير في تركيز الميثونين (مللي مول.لتر<sup>-1</sup>) على ارتفاع استجابة البريق الكيميائي لتقدير الميثونين  
A: منحنى المعايرة للمدى (20-0.2) مللي مول.لتر<sup>-1</sup>، العلاقة الخطية النظرية و (o) القيم العملية.  
B: منحنى المعايرة للمدى (20-0.6) مللي مول.لتر<sup>-1</sup>، العلاقة الخطية النظرية و (■) القيم العملية

#### حدود الكشف

تم قياس حدود الكشف للميثونين لنظام: Luminol-OH<sup>-</sup>-methionine خلال تحضير منحنى المعايرة لمدى (20-0.6) مللي مول.لتر<sup>-1</sup> وعند الظروف الفضلى لكافة المتغيرات الفيزيائية والكيميائية وفيما يلي تلخيص نتائج حساسية حدود الكشف بأربعة طرق وكما موضح في الجدول رقم (3).

جدول رقم(3): ملخص نتائج حدود الكشف لتقدير الميثونين عند حجم لامتزاج محقن 83 مايكرو لتر

من التخفيف التدريجي لاقل تركيز في منحنى المعايرة	على قيمة الميل $D.L = \frac{3S_b}{\text{slope}}$	من معادلة الخط المستقيم $L.O.D. = y(mV) = y_B + 3S_B$	على عامل التخفيف (dil) dil= 39.6
5 µMol	525 nMol.L <sup>-1</sup>	1.98 mMol.L <sup>-1</sup>	126 nMol.L <sup>-1</sup>

$S_b$  = الانحراف القياسي لعشرة قياسات من محلول بلانك = 0.01

$y_B$  = تكافئ قيمة نقطة التقاطع (a) في منحنى المعايرة

$y = L.O.D$  = قيمة الاستجابة لاوطى تركيز (حد الكشف النظري) بوحدة مللي فولت.

$S_B$  = الانحراف القياسي للبلانك وكافئ  $S_{y/x}$  (الانحراف القياسي لفضلة  $\frac{y}{x}$ ).

#### التكرارية

تم فحص دقة وتكرارية نتائج تقدير الميثونين لنظام البريق الكيميائي من خلال حساب قيم الانحراف القياسي النسبي المئوي لثلاث تراكيز ولعشرة قياسات متكررة لكل تركيز خلال تحضير منحنى المعايرة كما موضح في الجدول رقم (4) ولوحظ ان قيمة  $R.S.D > 0.5\%$

جدول رقم (4): تكرارية نتائج تقدير الميثونين بواسطة تفاعل البريق الكيميائي وعند الظروف الفضلى لكافة المتغيرات الفيزيائية والكيميائية

تركيز الميثونين مللي مول.لتر <sup>-1</sup>	المعدل الحسابي $\bar{y}$ mV	$\sigma_{n-1}$	التكرارية %R.S.D	حدود الثقة للمعدل عند %95 و $n-1$ $\bar{y}_i \pm t_{0.05, n-1} \frac{\sigma_{n-1}}{\sqrt{n}}$	زمن القياس الكلي لكل تركيز min
4	672	1.21	0.18	672±0.91	8
8	880	1.98	0.23	880±1.49	10
10	1021	2.34	0.23	1021±1.76	14

تحضير منحنى معايرة تقدير الميثونين بالطريقة التقليدية للقياس الطيفي في المنطقة فوق البنفسجية - المرئية وحدود الكشف

حضرت سلسلة محاليل للميثونين (0.001-0.08) مول.لتر<sup>-1</sup> وقيست الممتصية لكل تركيز ثلاث مرات عند الطول الموجي الاعظم للامتصاص (275 نانومتر) (شكل رقم ((2)) ودونت ملخص النتائج في جدول رقم (5)، ومن التخفيف التدريجي لاقل تركيز في منحنى المعايرة تم التوجه نحو تراكيز واطئة تصل الى 0.0005 مول.لتر<sup>-1</sup> (0.5 مللي مول.لتر<sup>-1</sup>) للميثونين.

وعند اجراء مقارنة بين الطريقة التقليدية للقياس الطيفي وتفاعل البريق الكيميائي المقترن بتقنية الحقن الجرياني تم الحصول على جدول رقم (6) بالاضافة الى مقارنة نتائج الطريقتين وذلك باخضاعها الى اختبار t- المزدوج و F-test كما مبين في الجدول رقم (7) ومن النتائج المستحصلة من الجدول والرجوع الى الجداول الخاصة بقيم t الجدولية<sup>(32)</sup> حيث لوحظ ان قيمة  $t_{tab}$  عند حدود ثقة 99.9%:

$$t_{\frac{\infty}{2}, n_1+n_2-2} \Rightarrow t_{0.0005, 19} = 3.88$$

وبما ان قيمة  $t_{cal} = 1.09$  اذا الاحتمالية هي:

$$\therefore p(|t| < 3.88) = 0.001$$

اي ان قيمة  $t_{cal.} < t_{tab.}$  عند حدود ثقة 99.9%  
كذلك الحال عند اجراء اختبار F- وعند الرجوع الى الجداول لوحظ ان قيمة  $F_{v_2}^{v_1}$  مع درجات حرية  $v_1 = 8$  و  $v_2 = 11$   
و عند حدود ثقة 99.9% مساوية 8.35 ويمكن ان تكتب الصيغة:

$$F_{v_2}^{v_1} = F_{\infty, v_1, v_2} = F_{0.00058, 11} = 8.35$$

$$\therefore F_{tab.} (8.35) > F_{cal.} (6.66)$$

وبذلك يمكن الاستنتاج انه لا يوجد فرق جوهري وبالغ الاهمية بين الطريقة المستحدثة (CL-FIA) والطريقة التقليدية للقياس الطيفي وتوحي هذه الاختبارات الاحصائية الى ان المنظومة المصممة وطريقة العمل المتبعة لتفاعل البريق الكيميائي يمكن اعتبارها من الطرق المتبعة لتقدير الميثونين بعد مقارنة نتائجها مع النتائج التي تم الحصول عليها لنفس النماذج المقدره بالطريقة الطيفية مع الاخذ بنظر الاعتبار ميزات الطريقة المستحدثة كما موضح في جدول رقم (6).

جدول رقم (5): ملخص بيانات علاقة الامتصاصية مع التركيز لتقدير الميثونين عند 275 نانومتر بالطريقة الطيفية

$t_{cal.} = \frac{ t \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$	$t_{tab.}$ n- 1 عند 2 حدود	r, r <sup>2</sup> %	معادلة الخط المستقيم A=a+b[X]	التركيز ضمن منحني المعايرة	التركيز المقاسة مول.لتر <sup>-1</sup>
28.41 >>> 2.365		0.9957 99.14%	0.076+ 53.136[x]	-0.001 0.05	-0.001 0.08

[x] = تركيز الميثونين بوحدة مول.لتر<sup>-1</sup>

جدول رقم (6): ملخص نتائج مقارنة بين الطريقة التقليدية والطريقة المستحدثة (CI-FIA) لتقدير الميثونين

CI-FIA	الطريقة التقليدية للقياس الطيفي	الخاصية المقارن بها
0.9958 99.17%	0.9957 99.14%	معامل الارتباط (r) ونسبة معامل التقدير (r <sup>2</sup> ) %
(0.6-20) مللي مول.لتر <sup>-1</sup>	(1-50) مللي مول.لتر <sup>-1</sup>	مدى الخطية
57204.17 مللي فولت/مول.لتر <sup>-1</sup>	53.14 الامتصاصية / مول.لتر <sup>-1</sup>	الميل (b) الحساسية
407.77 فولت مللي	0.076	نقطة التقاطع (a)
5 مايكرو مول.لتر <sup>-1</sup>	0.5 مللي مول.لتر <sup>-1</sup>	حد الكشف العملي (من التخفيف التدرجي)
50 انموذج	15 انموذج	عدد النماذج بالساعة
83 مايكرو لتر	25 مل	حجم الانموذج
30 ثانية	دقيقة	وقت القياس المنفرد

جدول رقم (7): ملخص نتائج اختبار t-المزدوج واختبار F- للمقارنة بين طريقة القياس بالبريق المقترن بالحقن الجرياني المستمر (CL-FIA) والطريقة الطيفية (المرجعية)

طريقة القياس	عدد القياسات n	معدل التركيز $\bar{x}$ مول.ل <sup>-1</sup> تر <sup>-1</sup>	معدل القياس سي (S) أو $\sigma_{n-1}$ مول.ل <sup>-1</sup> تر <sup>-1</sup>	معدل مربع الانحراف القياسي $S^2$	$F_{cal.} = \frac{S_1^2}{S_2^2}$	$t_{cal.} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$
القياس الطيفي	9	$\bar{x}_1 = 0.0156$	$S_1 = 0.0177$	$1.59 \times 10^{-4}$	6.66	1.09
CL-FIA	12	$\bar{x}_2 = 0.00937$	$S_2 = 0.00686$			

$$S^2 = [(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2] / n_1 + n_2 - 2 \Rightarrow S = 0.013$$

- درجات الحرية لاختبار t- المزدوج  $D_F = n_1 + n_2 - 2$

- درجات الحرية لاختبار F-  $11 = v_2$  و  $8 = v_1 \Leftarrow n - 1$

### المناقشة

قدم البحث الحالي نمطا جديدا لتقدير الاحماض الامينية ونخص بالذات جزيئة الميثونين والتي استخدمت مباشرة لتحفيز البريق الكيميائي في الوسط القاعدي بفعل تكوين مشتق لجزيئة اللومينال بميكانيكية من المحتمل انها تؤدي الى تكوين سلسلة من الخطوات لتكسير المشتق المتكون للومينال باعنا البريق الكيميائي. تم دراسة كيفية اختيار كافة المتغيرات الكيميائية والفيزيائية وتنبيتها لتقييم ومعالجة النتائج باستخدام معادلة الدرجة الاولى من صنف  $y = a + bx$  باستخدام اسلوب سريع وبسيط ولا يحتاج الى ممارسة طويلة مادامت كافة المتغيرات قد ثبتت وبن الطريقة المتبعة خلال هذا البحث ضمن الطرق المعتمدة في تقدير الميثونين في مختلف الاوساط الحياتية، كما تم الاستنتاج من خلال الاختبارات الاحصائية (t- المزدوج او اختبار F) الى انه لا يوجد فرق جوهري بين الطريقة التقليدية للقياس الطيفي والطريقة المستحدثة للبريق الكيميائي كوسيلة للكشف والمقترنة مع تقنية الحقن الجرياني المستمر كوسيلة للقياس وبعد اجراء مقارنة النتائج بين الطريقتين مع الاخذ بنظر الاعتبار ميزات الطريقة المستحدثة من ناحية سرعة تحليل الانموذج (لايستغرق وقت التفاعل والقياس لانموذج واحد اكثر من 30 ثانية) وعملية التقدير شبه التلقائية تتطلب حقن الانموذج فقط يدويا باستخدام صمام الحقن بالاضافة الى قلة استهلاك المواد الكيميائية وحجم الانموذج المحقن والحساسية العالية للمنظومة لان تتحسس بكمية الفوتونات الصادرة من نظام البريق مهما كانت قليلة بالتوجه نحو تراكيز واطئة (تحسين حدود الكشف) تصل الى 5 مايكرومول لتر<sup>-1</sup> (مقارنة بالطريقة التقليدية 0.5 مللي مول لتر<sup>-1</sup>) وهذا يعكس كفاءة التصميم الهندسي لكل من المتحسس وخليئة التفاعل (كلاهما يعكس كفاءة كم التفاعل الباعث للفوتونات وكفاءة كم المتحسس للتحسس بكل الفوتونات المتولدة ضمن منطقة العبور امام المتحسس) في منظومة الحقن الجرياني.

### Reference

- 1- Rang, H.P. and Dale, M.M. **1987**. *Pharmacology*. 1st Ed., Churchill livingstone, Edinburch London Melbourne & New York, p.376.
- 2- Tyler, V.E., Brady, L.R. and Robbers, J.E. **1988**. *Pharmacocny*. 9th Ed., Lea & Fibiger, Philadelphia, p.319
- 3- Laurence, D.R. and Bennett, P.N. **1980**. *Clinical pharmacology*. 5th Ed., Churchill livingstons, printed in great Britain at the pitman press, bath., p.418.

- 4- Gennaro&Chairman,A. R. **1985**. *Remington's pharmaceutical sciences*. 17<sup>th</sup> Ed., printed in the united state of America by Mack printing company Easton, Pennsylvania, p.1028.
- 5- Spies, J.R. **1951**. An ultraviolet spectrophotometric micromethod for studying protein hydrolysis, *J. Biol. Chem.*, **191**:65-74
- 6- Tonkovic, M. and Hadzija, O. **1997**. A simple spectrophotometric method for the micro determination of methionine. *Micro Chimica Acta*, **68**(3-4):241-244.
- 7- Savuck, S.A., Rudenko, B.A., Brodskii, E.S. and Soifer, V.S. **1995**. Application of gas chromatography with open tubular columns and chemiluminescent detection to the determination of sulfur-containing substances in oil pollution of Sea water. *J. Anal. chem., (Trans of Zh. Anal. Khim.)*. **50**:1081-1087., (C.A. **124**:96900, 1997).
- 8- Krick and L. J. **1994**. The clinical and research potential of bioluminescence and chemiluminescence in medicine, *In Biolumin. Chemilumin., proc. Int. symp.*, 8th, campell, A.K., Krick, L.J., stanely, P.E., Eds., wiley chistester, Uk., 171-178.
- 9- Ensafi, A.A., Rezaei, B. and Nourooi, S. **2009**. Flow injection spectrofluorimetric determination of cystine and cysteine. *J.Braz. chem. Soc.*, **20**(2):178-183.
- 10- Isacsson, U. and Wettermark, G. **1974**. Chemiluminescence in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta*. **68**:339-362.
- 11- Jemenz, A.M. and Navas, M.J. **2002**. Chemiluminescence methods (present and future), *Grasasy Aceites*. **53**(1):64-75.
- 12- Palilis, L.P. and Calokerinos, A.C. **2000**. Analytical applications of chemiluminogenic reactions, *Anal. Chim. Acta*. **413**:175-186.
- 13- Townshend, A. **1990**. Solution chemiluminescence-some recent analytical developments, *Analyst*. **115**:495-500.
- 14- Navas, M. J. and Jimenez, A.M. **1996**. Review of chemiluminescence method in food analysis, *Food Chem*. **55**:7-15.
- 15- Jimenez, A.M. and Navas, M.J. **1997**. Chemiluminescent methods in agrochemical analysis, *CRAC*. **27**:291-306.
- 16- Solich, P., Sklenarova, H., Polasek, M. and Karlieck, R. 2001. Application of flow injection technique in pharmaceutical analysis. *Anal chem*. **28**(1):1-8.
- 17- Mervartova, K., Polasek, M. and Calalayud, J.M. 2007. Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. **45**:367-381.
- 18- Shakir, I.M.A. and Al-Awadi, N.S.T. 2005. New mode for the study of chemiluminescence reactions by tracking via multi detection point through optical fibers in a completely newly designed cell. Ph.D. Thesis. Department of Chemistry, College of Science, Baghdad University.
- 19- Zheng, X. and Zhang, Z. 1999. Flow-injection chemiluminescence determination of isoniazid using on-line electrogenerated BrO<sup>-</sup> as an oxidant. *Analyst*. **124**:763-766.
- 20- Shakir, I.M.A. and Hassan, R.F. 2008. A novel method for the determination of oxonium ion in strong acids via flow injection-chemiluminescence, MSc., Thesis, Department of Chemistry, College of Science, Baghdad University.
- 21- Costin, J.W., Francis, P.S. and Lewis, S.W. 2003. Selective determination of amino acids using flow injection analysis coupled with chemiluminescence detection, *Anal. Chimica Acta*, **480**:67-77.
- 22- Zhou, G.J. and Chen, H.Y. 2002. Flow injection chemiluminescence determination of amino acids by oxidation with N-bromosuccinimide, *Analytical Sciences*, **18**(6):693.
- 23- Wasseem, A. and Abdul-Nabi, M.Y. 2008, flow-injection determination of cysteine in pharmaceuticals based on luminol-persulphate chemiluminescence detection, luminescence. **23**(3):144-149.

- 24- Li, B., Zhang, Z., Liu, M. and Xu, C. **2003**. Flow injection chemiluminescence determination of L-cysteine in amino acid mixture and human urine with the  $\text{BrO}_3^-$ -quinine system. *Anal Bioanal chem.*, **377**:1212-1216.
- 25- Mestre, Y.F. and Zamora, L.L. **2001**. Determination of phenylephrine hydrochloride by flow injection analysis with chemiluminescence detection. *Journal of AoAc international*. **84**(1):13-18.
- 26- Zhang, G., Tang, Y., Li, H., Yu, H. and Sun, S. **2009**. Chemiluminescence of potassium permanganate-glyoxal-sulfur contained compound system. *Anal. Let.* **42**(2):440,459.
- 27- Yang, P., Chen, Y. and Zhu, Q. **2008**. Sensitive chemiluminescence method for the determination of glutathione, *Microchim Acta*. **163**:263-269.
- 28- Fliss, H. **1988**. Oxidation of proteins in rat heart and lungs by polymorphonuclear leukocyte oxidants. *Molecular and cellular biochemistry*. **84**(2):177-188.
- 29- Shakir, I.M.A. and Al-Awadi, N.S. **2000**. New mode on-line automation insitu fluorescence determination of hydrogen peroxide by total luminescence (chemiluminescence & fluorescence) utilizing the energy. *Iraqi J.Sci.* **41A**(3).
- 30- Turkie, N.S., Mustafa, N. and Shakir, I.M.A. **1999**. New mode of on-line: determination of hydrogen peroxide by total luminescence utilizing the chemiluminescence energy released from 3-aminophthylhydrazide (luminol) oxidation as internal source for irradiation of Rh6G molecule. *Iraqi J.Sci.*, **40A**(2):223-240.
- 31- Ishimoto, S., Kudo, y., Jinno, N., Hashimoto, M. and Tsukagoshi, K. **2010**. Introduction of fluorescence and chemiluminescence detection to capillary chromatography based on tube radial distribution of water-hydrophilic-hydrophobic organic mixture carrier solvents. *Anal. Methods*. **2**:1377-1381.
- 32- Murdoch, J. and Barnes, J. A. **1974**. Statistical 33- tables, 2<sup>nd</sup> Ed., Macmillan, New York, 18.