

الفصل السادس عشر

- الطرق الانزيمية لتقدير مبيدات الآفات Enzymatic methods .

* مقدمة .

* حركية تثبيط انزيم الكولين إستريز

* فعل انزيمات الكولين استريز Action of cholinesterases

أ - تقسيم الانزيمات Classification of enzymes

ب - تقنية الفعل Mechanism of Action

* طرق قياس نشاط كولين استريز Methods of measuring cholinesterase activity

أ - طريقة قياس الجهد Potentiometric method

ب - طريقة المعايرة أو التثقيط Titrimetric method

ج - الطريقة المانومترية Manometric method

د - الطرق اللونية Colorimetric methods

* استخدام تثبيط الكولين إستريز في تحليل مخلفات المبيدات

Application of cholinesterase inhibition to residue analysis

أ - الاستخلاص والتنقية Extraction and purification

ب - مميزات طريقة الكولين استريز Advantages

ج - وصف مختصر لبعض الطرق المتخصصة Specific methods

١ - طرق قياس فرق الجهد Δpti

٢ - الطريقة اللونية Colorimetric method

* قائمة المراجع

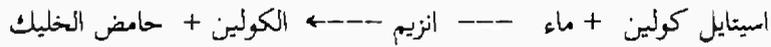
الطرق الانزيمية لتقدير مبيدات الآفات

** مقدمة

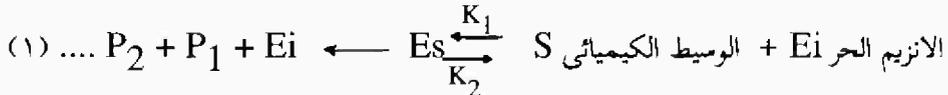
المركبات الفوسفورية العضوية مجموعة من الكيمائيات التي ثبتت فعاليتها ضد الحشرات وقد اكتشفت نتيجة للبحوث الرهبة في ألمانيا خلال الحرب العالمية الثانية للحصول على كيمائيات تصلح للحرب الكيمائية . وقد امكن تقييم هذه المبيدات كاسترات حمض الفوسفوريك او مشتقاته . تتميز هذه المركبات بصفة متميزة تمثل في مقدرتها على تثبيط نشاط مجموعة من الانزيمات التي تشترك في تحليل استرات الكولين . حيث ان هذه الانزيمات توجد بشكل واسع في الحشرات والثدييات فان المبيدات الحشرية الفوسفورية العضوية تحدث سمية عالية على الثدييات ومن ثم طورت طرق حساسة لتحليل مخلفات هذه المبيدات بالطرق الانزيمية بناء على مقدرة هذه المركبات على تثبيط نشاط انزيم الاستاييل كولين استريز ... وسوف نتناول هذه الطريقة كمثال :

** حركية نشاط الكولين استريز

يساعد انزيم الكولين استريز على تحليل الاستاييل كولين كما في المعادلة



هذا التفاعل يمكن تمثيله بالمعادلات التالية :



حيث E_s تمثل معقد الانزيم والوسيط الكيمائي والتي تتكسر وتنتج الانزيم الحر مرة اخرى ونواتج التحلل P_1 و P_2 . يعبر عن معدل التكسير للوسيط الكيمائي بالنشاط الانزيمي . وهذا النشاط يتناسب طرديا مع تركيز المعقد ds/dt . والمعادلة التالية تمثل معدل تفاعل الوسيط

$$-\frac{ds}{dt} = \left[-\frac{ds}{dt} \right]_{\max} \left[\frac{k_2}{s} + 1 \right] \quad (2)$$

حيث ان ثابت مايكل للانزيم Michaelis Constant والمعبر عنها K_s تساوى

$K_2 + K_3/K_1$ ومعدل التفاعل يساوى $(-ds/dt)_{\max}$ عندما يكون الانزيم كله في الصورة E_s . وهذا هو مقياس النشاط الانزيمي . عندما يظل تركيز الوسيط الكيمائي ثابتا خلال مدة التفاعل تكون قيمة ds/dt ثابتة لقيمة معينة من الوسيط S ومن ثم يمكن استخدامها لقياس النشاط الانزيمي . هذه الظروف مطلوبة في حالة ما اذا كان النشاط الانزيمي سيقاس بمعدل ظهور نواتج التحلل بناء على مصدر الانزيم فان ثابت مايكل يكون عادة في المدى 10^{-3} - 10^{-4} مول/لتر . ومن ثم يجب الا يقل تركيز الوسيط عن 2×10^{-3} مول . يجب تحاشي زيادة تركيز الوسيط الكيمائي لأن زيادته تسبب فعل تثبيطي على الانزيم نفسه .

* عند قياس النشاط الانزيمي بتقدير اختفاء الوسيط يصبح من المستحيل استخدام زيادة من الوسيط ولا تظل القيمة ds/dt ثابتة . في الظروف التي عندها S_0 و S تمثل تركيز الوسيط في البداية والنهاية ، t تمثل وقت التفاعل الانزيمي يمكن الحصول على المعادلة التالية بتكامل المعادلة السابقة (٢) :

$$K_s \log_e \frac{S}{S_0} - S_0 + S = t \left(\frac{-ds}{dt} \right)_{\max}$$

يعبر عن النشاط الانزيمي $- ds/dt$ وهذه القيمة ليست وظيفة بسيطة لقيم t و S و S_0 ويتطلب قياس النشاط الانزيمي بهذه الطريقة مع التغير في تركيز المادة الوسيطة ، ΔS عندما تكون S_0 والوقت t ثابتة . يجب الا ينخفض تركيز الوسيط الكيميائي لاكثر من ٧٠ ٪ من قيمته الاصلية لانه اذا حدث الى اقل من ذلك فان الخط بين النشاط والوقت سيخرج عن العلاقة الخطية .

** حركية تثبيط الكولين استريز :

* تبعا لدراسات Aldridge (١٩٥٣) وبحوث Casida (١٩٥٦) فان التفاعل الذي يحدث بين معظم المبيدات الفوسفورية العضوية والكولين استريز يتمثل في تكوين معقد غير ثابت الذي يتفكك (٥) وينتج عدة مركبات بالاضافة الى الانزيم المفسفر . ان فسفرة الانزيم تسد الموقع الاستراتيجي للنشاط . ان عملية التحلل المائي للانزيم المفسفر (معادلة ٦) عملية بطيئة ومن ثم يكون التثبيط بالمبيدات الفوسفورية غير عكسي irreversible . تعتمد التعاكسية على مقاومة الانزيم المفسفر للتحلل المائي . التفاعلات ٤ ، ٥ عكسية بينما التفاعلات ٥ ، ٦ غير عكسية .



$$P_2 = K_2 (EP)$$

بعد اضافة الوسيط الكيميائي فان الانزيم المفسفر EP يصبح غير فعال . معقد الانزيم والمثبط EI يتفكك ويصبح الانزيم قابلا للارتباط مع الوسيط ويتبع ذلك الانحلال المائي .. (٧)



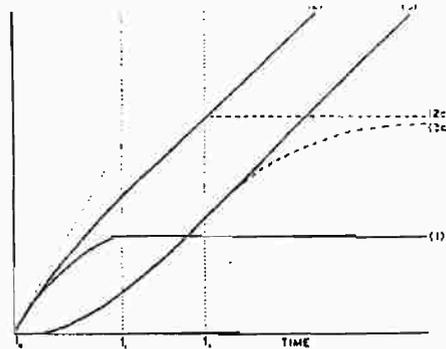
كمية الانزيم النشط Eact تحسب من المعادلة :

$$E_{act} = E + EI$$

* عندما يكون EP ثابتا ($K_2 = 0$) تعتمد قيمة التثبيط على النسبة بين الانزيم وتركيز المثبط الموجود اساسا في مخلوط التفاعل . قيمة التثبيط النصفى I_{50} (تركيز المثبط الذى يحدث ٥٠ % تثبيط لنشاط الانزيم) وهى من الناحية النظرية تساوى نصف تركيز الانزيم . تتناسب قيمة التثبيط طرديا مع تركيزات المثبطات مع فرض ان فترة التحضين (الوقت المتاح للتفاعل بين الانزيم والمثبط قبل اضافة الوسيط الكيميائى) تكون طويلة بما فيه الكفاية . يحدث التفاعل تبعا لحركية التفاعل من الدرجة الثانية . عندما يتحلل الانزيم المفسفر EP بمعدل اعتبارى يصل التثبيط لمستوى ثابت عندما يحدث التفاعل (٥) و (٦) بنفس السرعة مع فرض ان المثبط (I) اكبر من الانزيم (E) .

* لقد وصف Van Asperen and Dekhuizen عام ١٩٥٨ تصور لنظام التفاعل فى حالة التثبيط البطئ العكسى . الشكل (١) فيه المنحنى (٢) يمثل كمية الانزيم التى حدث لها فسفرة . المنحنى (٣) يمثل كمية الانزيم التى فقدت الفسفرة . المسافة الرأسية بين المنحنيين تمثل كمية الانزيم المفسفر (EP) الموجود فى اى وقت . نظام التثبيط الذى يختبر تجريبيا يمثل المنحنى (١) وهذا المنحنى يوضح العلاقة بين كميات الانزيمات المفسفرة (المسافة الرأسية بين المنحنيين ٢ ، ٣) مع الوقت . انحدار المنحنى (٢) يتناسب طرديا مع كمية الانزيم الغير مفسفر ويتناقص مع الوقت . انحدار المنحنى (٣) يتناسب طرديا مع كمية الانزيمات المفسفرة وتزداد مع الوقت . عند الوقت t_1 يصل الاتزان والانحدارات تكون متساوية . عندما يصل التفاعل للاتزان يضاف الوسيط الكيميائى (الاستايل كولين) عند وقت t_2 فى الشكل ، يقف التفاعل (٥) ويظهر المنحنى (٢) افقيا (2a) . التفاعل (٦) يمثل بالمنحنى (٣) ويستمر بسرعة متناقصة (3a) . عند الوقت t_1 يكون النشاط التجزيئى ما لا نهاية ∞ والانحدار Sa للمنحنى (٢) عند الوقت t_0 والانحدار S_1 للمنحنيين ٢ ، ٣ عند الوقت t_1 ترتبط بالعلاقات التالية :

فى الشكل ∞ اخذت عند القيمة ٠,٥ عند قياس النشاط البيولوجى باستخدام الكولين استريز تحت ظروف متحكم فيها فان درجة التثبيط لهذا التفاعل بواسطة المثبط تصبح قياسا لكمية المثبط الموجود .



شكل (١) : رسم تخطيطى لتفاعل التثبيط البطئ العكسى للكولين استريز .

**** فعل الانزيمات الكولين استريز**

*** أ - تقسيم الانزيمات**

لقد اقترح Augustinsson عام ١٩٥٧ تقسيم انزيمات الكولين استريز في مجموعتان على النحو التالي : (١) الانزيمات التي يشبط نشاطها مع زيادة الوسيط الكيميائي وتشمل هذه المجموعة الانزيمات التي تعزل من الجهاز العصبي وكرات الدم . يحدث النشاط الاقصى عندما يكون تركيز الوسيط الكيميائي 3×10^{-3} مولر . وتتضمن هذه المجموعة كذلك الانزيمات التي يتبع نشاطها معادلة ميخائيل منتن وفيها يحدث النشاط الاقصى عند تركيز ضئيل للغاية من الوسيط الكيميائي وهي تشمل كولين استريز سيرم الدم .

* تشمل الاستريزات جميع الانزيمات التي تساعد على التحلل المائي لاسترات حمض الكربوكسيليك . هذه الانزيمات شائعة الانتشار في الطبيعة وتتميز بالعديد من الصفات التي تعتبر كأساس للتقسيم . درجة الحموضة المناسبة لمعظم الاسترازات من المصادر الثديية من ٧,٥ الى ٨,٥ بينما الاستريز من المصادر الاخرى مثل ثمار الموالح لها حموضة مناسبة من ٥,٥ - ٦,٥ . ان وجود الكولين استريز تحت مجموعة للاستريز اقترحت في البداية بواسطة الباحث Dule (١٩٤٤) الذي وصف هذه الانزيمات على انها متخصصة لتحليل الاستايل كولين .

* لقد اصبح من الواضح ان خصوصية الوسيط الكيميائي لهذه الانزيمات ذات قيمة مطلقة بلا معنى . في الحقيقة وجدت بعض من هذه الانزيمات قدرة على تحليل الاسترات اللاكولينية بمعدل واضح . وكذلك اوضحت الدراسات البيوكيميائية انه بالرغم من اختلاف الاسترازات البسيطة والكولين استريز عن بعضهما البعض من عدة وجوه الا ان هناك تداخل في صفاتهم مما يصعب من وضع حدود فاصلة بين هذه المجموعتين . لقد تم حل هذه المشكلة عندما اقترح Richter and Croft عام ١٩٤٢ ان الانزيمات تقسم الى الكولين استرازات المتخصصة والغير متخصصة وليست استرازات بسيطة ويحدث لها تثبيط كلي عند تركيز 10^{-5} مولر ايزيرين بصرف النظر عن الوسيط الكيميائي المستعمل . ان مجموعة الكولين استريز (الحساسة للايزيرين) يمكن ان تقسم الى مجموعتان الاولى تسمى الكولين استريز الحقيقي او المتخصص او E - type والثانية الكولين استريز الكاذب او الغير متخصص او S - type . لقد حاول العديد من الباحث في مجال الكيمياء الحيوية التفرقة بين انواع الكولين استريز على اساس الوسيط الكيميائي المثبط باستخدام المبيدات الفوسفورية العضوية او قواعد الامونيوم الرباعية أو مشتقات البروكاين وغيرها من المواد ومع هذا لم يتمكنوا من وضع حدود فاصلة بين هذه المجموع .

* المجموعة الاولى .. انزيمات الكولين استريز المتخصصة Specific تستخدم المواد الوسيطة استايل كولين ، استايل - بيتا - ميثيل كولين ، بيوتريل كولين (ليست على صورة نشطة) ولا يستخدم البنزويل كولين . توجد هذه الانزيمات في تركيزات عالية في الانسجة العصبية

للفقاريات واللافقاريات . توجد استريز مخ الحمام بمستوى اكبر ٤ مرات من الموجود في مخ الثدييات وهو من المجموعة الاولى . توجد كولين استريز هذه المجموعة بمستويات منخفضة في الانسجة العضلية من اكبر المصادر الغنية للكولين استريز . المجموعة الاولى الاعضاء الكهربائية في السمك الرعاش . انزيم المجموعة الاولى في الدم يتركز في كرات الدم كما وجد في سم الكوبرا ولكنها تختلف في الفعل المتخصص وقد وجدت هذه المجموعة في سيرم الارانب بالاضافة الى استريز اخر لا يتأثر بالمبيدات الفوسفورية العضوية .

يوجد كولين استريز دم البقر المنقى (مجموعة ١) تجاريا في عبوات يحتوى كل منها ٢٠,٠٠٠ وحدة وهي تعنى كمية الانزيم التى تتحرر واحد مليلتر مكعب من ثانى اكسيد الكربون لكل دقيقة فى المحلول المنظم رينجر بيكربونات المتوازن مع ٥ ٪ ثانى اكسيد كربون فى النتروجين على درجة حرارة ٣٧,٥ ° م بتركيز ابتدائى من الاسيتايل كولين ٠,٠٠٩٢ مولر . الكولين استريز فى الحبل العصبى للصرصور الأمريكى ونحل العسل يحطم الاسيتايل بيتا ميثيل كولين اسرع من الاسيتايل كولين على تركيز عالى من الوسيط الكيميائى وتحدث ببطء عند تركيز وسيط قليل . كولين استريز مخ الذباب يحلل الاسيتايل كولين اسرع عند جميع التركيزات ومن ثم يعتبر كولين استريز متخصص (مجموعة - ١) . من البسلة يحتوى كولين استريز يحلل الـأسيتايل كولين والبنزويل كولين وليس اسيتايل - بيتا - ميثيل كولين (Fukuto - ١٩٥٧) . كولين استريز مخ الذباب يحلل ٢ جم أسيتايل كولين لكل جرام نسيج لكل ساعة وهي اعلى بمقدار ٥٠ - ١٠٠ مرة من انزيم مخ الثدييات وتساوى تقريبا لنشاط كولين استريز العضو الكهربى لسمك الرعاش E. electricys . ان مواصفات كولين استريز المجموعة الاولى الموجودة فى مخ الذباب ونحل العسل والفئران متماثلة جدا حيث ان ثوابت ميخائيل تساوى $1,75 \times 10^{-3}$ ، $1,95 \times 10^{-3}$ ، $2,58 \times 10^{-3}$ على التوالي .

* المجموعة الثانية ... انزيمات كولين استريز هذه المجموعة ذات قابلية عالية للبيوتريل كولين عنه فى حالة الاسيتايل كولين . لا يتحلل الاسيتايل ميثيل كولين بينما يتحلل البنزويل كولين . تقع انزيمات هذه المجموعة فى بلازما معظم الحيوانات . تحتوى بلازما الحصان والانسان على الكولين استريز من المجموعة الثانية وغيرها من الالليستريز .

* ب - تقنية الفعل

١ - المواقع الفعالة

المركز الفعال لسطح انزيم الاسيتايل كولين استريز تتكون من منطقتان اوليتان (١) موقع مشحون سالبا الذى ينظم النشاط الانزيمى من خلال جذب او ارتباط او توجيه المواد الوسيطة الكاتيونية بواسطة قوى الجذب الكولومبى وفاندرفالز (٢) الموقع الاستراتى وهو المسئول عن النشاط التحليلى . انزيم الاسيتايل كولين استريز ذو القابلية للاسيتايل كولين اعلى من اى استر اخر

معروف يحدث فى مواضع الالتقاء العصبى للأنسجة العصبية للفقاريات واللافقاريات .

* ٢ - الفعل الفسيولوجى :

يرتبط الاستيايل كولين باننتاج جهد العصب من خلال التحكم فى نفاذية الغشاء العصبى للأيونات وقد تحدث نفس الفعل فى التحكم فى نفاذية كرات الدم . يحتوى نسيج العصب على الاستيايل كولين استريز بزيادة عشرة اضعاف ويتم التوصيل عند تثبيط ٩٠ ٪ او اكثر من الانزيم (Metcalf - ١٩٥٥) .

* ٣ - مثبطات انزيمات المجموعة الاولى والثانية :

المبيدات الحشرية التى تثبط الكولين استريز تتفاعل بصور مختلفة على انزيمات المجموعة الاولى والثانية . مبيد الديازينون والسيفين والسيستوكس والتريشون والفورات وغيرها تحدث درجات متماثلة من التثبيط عندما تخضع مع بلازما الحصان او الإنسان . مبيدات الباراثيون والملاثيون اكثر تثبيطا لانزيم بلازما دم الانسان مقارنة ببلازما الحصان . لذلك ولكى يمكن الكشف وتقدير كميات صغيرة من الملاثيون (٢ر - ١٠ جزء فى المليون) يكون من الضرورى استخدام بلازما الانسان . يمكن التفرقة بين مبيد السيستوكس والملاثيون باستخدام بلازما الانسان والحصان .

* ٤ - سمية مثبطات الكولين استريز :

بوجه عام يمكن القول ان سمية بعض المبيدات الحشرية تحدث بسبب تثبيط الكولين استريز ومن احسن الامثلة على ذلك سمية المبيدات الفوسفورية العضوية على الثدييات . ولقد استنتج الباحث Dubois (١٩٦١) التقنيات المسئولة عن تقوية سمية هذه المبيدات فى التفاعلات خارج الكائن الحى ترجع الى التداخل بمركب واحد مع فقد سمية الاخر بواسطة استريز الكبد كما فى المعادلة (٣) . والتفاعلات الثلاثة التى تؤخذ فى الاعتبار هى التنشيط Activation والفعل mechanism وفقد السمية detoxification .

١ - التنشيط (رأ) ٢ - فو - ر + اوكسيديز ميكروسوم + دايفوسفويريدين + اكسجين
كبد ١١ الكبد نيوكليوتيد

ر - فو - (رأ) ٢
١١

٢ - الفعل واحداث التأثير السام من خلال تثبيط الكولين استريز .

بواسطة المركب (رأ) ٢ - فو - ر
١١

٣ - فقد السمية من خلال التحلل المائى للمركب (رأ) ٢ - فو - ر وهذا يحدث بواسطة الاليسيتيرازات الكبد والسيرم وغيرها من الانسجة .

جدول (١) : سمية بعض المبيدات الحشرية الفوسفورية على الفئران (معاملة فمية) .

المبيد الحشرى الفوسفورى العضوى	الجرعة النصفية القاتلة	(مللجم / كجم)
ديازينون	١٠٠ - ١٥٠	
داى بروم	٤٣٠	
داى سيستون	٢ - ١٢,٥	
داى لوكس	٤٥٠	
اثيرون	٢٠٨	
جوثيون	١٥ - ٢٥	
ملاييون	٥٨٠٠	
باراثيرون	٦ - ١٥	
فوزمدين	٦,٨	
سيستوكس	٢,٥ - ٧,٥	
	١,٢ - ٢,٠	
فورات	٣,٧	
ترايثيرون	٢,٨	

* * طرق قياس نشاط كولين استريز :

توجد اربعة طرق اساسية لقياس نشاط الكولين استريز وتأثير المثبطات وهى قياس الجهد Potentiometric والتنقيط titrimetric والمانومترية manometric واللونية colorimetric .. وفيم يلى وصف لكل طريقة مع توضيح المميزات والعيوب لكل منها .

* (أ) طريقة قياس الجهد

فى هذه الطريقة يسمح لانزيم الكولين استريز بالعمل على الاستيائل كولين فى محلول منظم لفترة معلومة (عادة ١ - ٢ ساعة) على درجة حرارة ثابتة . تقاس حموضة المخروط فى البداية والنهاية والتغير فى الحموضة بسبب انفراد حمض الخليك تمثل النشاط الانزيمى (Michel - ١٩٤٩) . مقياس التغير فى الحموضة يكون مرضيا لقياس نشاط الاستريز عندما يتناسب معدل التغير فى الحموضة مع النشاط الانزيمى ومن ثم يجب اخذ النقط التالية فى الاعتبار : (١) النقص الملحوظ فى نشاط الكولين استريز مع نقص الحموضة ، (٢) احتمال تأثير مستحضر الانزيم مع كفاءة المحلول المنظم للنظام . فى اصل الطريقة إختار ما يكل Michel محلول منظم فيه تناقص كفاءة الحفظ او التنظيم buffering فى المدى من ٨ الى ٦ مما يعوض عن نقص نشاط الكولين استريز .

* (ب) طريقة المعايرة او التنقيط :

يتمثل اساس هذه الطريقة في معايرة حمض الخليك المنفرد بواسطة مادة قلوية حتى درجة حموضة ثابتة باستخدام دليل قاعدى او باستخدام جهاز المعايرة Conductometric . الطريقة الاولى يعاير حمض الخليك المنفرد مع دليل احمر الكريزول للتحلل المائى للاستيتايل كولين كما يمكن قياس التغير فى التوصيل الكهربى Conductivity خلال التفاعل الانزيمى .

* (ح) الطريقة المانومترية :

تم وصف طريقة القياس المانومتري بجهاز فاربورج Warburg لقياس نشاط الكولين استريز بواسطة Ammon (١٩٣٣) . فى معظم الطرق المحورة فان الوسط ذو الحموضة ٧,٥ تحتوى بيكربونات وايونات الكالسيوم والماغنسيوم كمنشطات للكولين استريز وكذلك ايونات الصوديوم والبيوتاسيوم اعتمادا على نوع الكولين استريز . يستخدم هذه الوسط لاذابة وتخفيف كلا الوسيط الكيميائى وتجهيز الانزيم . ان دوارق فاربورج تكون ذات حجم وشكل ثابت والحجم الكلى لمخلوط التفاعل يحفظ على ٢ - ٣ مليلتر وهناك بعض الحالات يستخدم حجم كبير (٥ - ٧ مليلتر) . يوضع الانزيم فى الحجرة الاساسية للدورق او فى القابلة الجانبية ويظل الوسيط الكيميائى منفصل عن الانزيم حتى بداية القياس فى نقطة البداية Zero-time وبعد ذلك تسجل قياسات المانومتر بعد فترة معلومة من الوقت .

يعبر عن النتائج بقيم ثانى اكسيد الكبرون المنفرد بالميكروليتر من المنظم بيكربونات بواسطة حمض الخليك الناتج خلال التفاعل فى الثلاثين دقيقة الاولى . فى جميع الحالات يجب تصحيح النتائج لاستبعاد تأثير الامترات التى لم تتحلل انزيميا وتبادل الغاز من مصادر الكولين استريز فى غياب الوسيط الكيميائى . ان اهمية مختلف الايونات خاصة البيوتاسيوم والصوديوم لأنواع الكولين استريز ما زالت محل دراسة ونقاش . ان قياس نشاط الكولين استريز فى غياب الماغنسيوم والكالسيوم خاصة فى التجهيزات الغير نقية غير مستحب بسبب ضرورة هذه الايونات لاحداث النشاط .

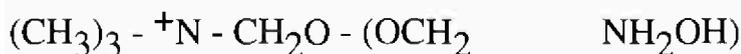
* (د) الطرق اللونية :

١ - الدلائل الداخلية والخارجية :

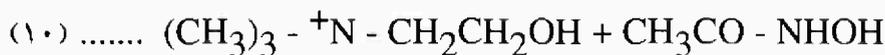
لقد بنى Rider ومعاونوه عام ١٩٥١ الطريقة اللونية على التحلل المائى للوسيط الكيميائى الفينيل بنزوات وانتاج الفينول الذى يقدر لونها من خلال الازدواج بصيغة النفثايل داي ازو الحمراء B . اما طريقة Jansen واخرون (١٩٤٩) تعتمد على تقدير مركب اوكس نيتروفينيل المنفرد من اوكسى نيتروفينيل اسيتات بفعل الاستيتايل استريز من الموالمح . لقد وضع Beggs ومعاونوه عام ١٩٥٨ طريقة لقياس الكولين استريز الموجود فى الخلايا والبلازما على اساس التغير فى الامتصاص الضوئى لصبغة مركب البروموثيمول بلو كنتيجة لانتاج حمض الخليك من الاستيتايل كولين . لقد قاس Caroway (١٩٥٦) النقص فى امتصاص الفينول .

٢ - التقدير اللوني للاستيتايل كولين :

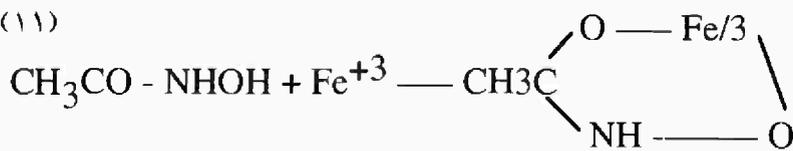
قام Hestrin (١٩٤٩) بقياس وتقدير الاستيتايل كولين الباقي اى الذى لم يدخل فى التفاعل لونيا عند تمام التفاعل الانزيمى فى وجود زيادة من ايون الحديدك فان اللون البنفسجى لمركب Ferric acethydro - xamate (الاستيتايل كولين + هيدروكسيل امين) (تفاعل ١٠) يقاس على موجة ٥٤٠ ميكرون . استرات الاحماض الكربوكسيلية وبعض المواد الاخرى قد تنتج لون بنفسجى ومن ثم تتداخل مع هذه الطريقة .. يمكن ايضاح معادلة هذا التفاعل فى الاتى :



هيدروكسيد امين + استيتايل كولين



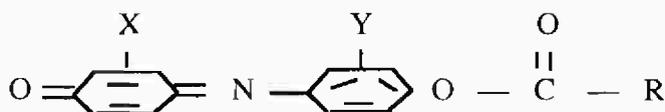
(١١)



لون بنفسجى

٣ - دلائل الوسيط الكيمائى الداخلية

تم وصف الطريقة اللونية بواسطة Kramer & Gamson (١٩٥٨) لقياس نشاط الكولين استريز على اساس أن الطريقة تتطلب استخدام وسيط كيمائى يعطى لونا بعد التحلل الانزيمى وهذه الجواهر الكشافة الملونة ذات التركيب التالى :



Y ، X مجموعات احلالية مختلفة فى حلقة الكوينويد (Δ) او حلقة البنزويد B بينما قد تكون مجموعة ميثيل CH3 - أو أى مجموعة اخرى . التفاعل الانزيمى للاندوفينيل اسيتات كما يلى :



لون أزرق يقاس على ٦٢٥ ميكرون

* ج - بعض دراسات تنشيط الفورات :

تم اكسدة المبيد الفوسفورى الجهازى الفورات بواسطة حمض فوق الخليك ثم قدرت نواتج الاكسدة بواسطة اسبتكروفوتومتري الاشعة تحت الحمراء والكرماتوجرافى الورقى وكذلك تثبيط انزيم الكولين استريز .. يوضح الشكل (٢) طيف الفورات ونواتج اكسدته ومشتق السلفون . والجدول (٣) يوضح فعالية وكفاءة تثبيط الفورات ونواتج التمثيل على انزيم الكولين استريز .

جدول (٢) : قيم التركيز النصف مولر التى تثبط الكولين استريز من المبيدات الفوسفورية او الكارباماتية عندما قدرت بطريقة قياس فرق الجهد .

Cholinesterase enzyme group	Enzyme group	Insecticide	Molar conc. for 50% inhibition	Method of oxidation
Horse plasma	11	Demeton	3.4 x 10-6	None
Human plasma	11		1.1 x 10-6	
Horse plasma	11	Diazinon	5.6 x 10-6	Bromine water
			8.0 x 10-6	Peracetic acid
Horse plasma	11	Di-Syston	2.9 x 10-6	Peracetic acid
Horse plasma	11	Dylox	5.0 x 10-7	None
Human plasma	11		4.1 x 10-7	
Horse plasma	11	Ethion	4.8 x 10-8	Bromine water
			6.0 x 10-8	Peracetic acid
Horse plasma	11	Guthion	2.2 x 10-7	Peracetic acid
Horse plasma	11	Malathion	6.4 x 10-5	Peracetic acid
Human plasma	11		6.0 x 10-7	Peracetic acid
Horse plasma	11	Parathion	3.2 x 10-6	Peracetic acid
Human plasma	11		9.1 x 10-9	Peracetic acid
Horse plasma	11		2.2 x 10-6	
Human plasma	11		6.7 x 10-6	
Houselly-head brei	1	Sevin	6.7 x 10-6	None
Bovine erythrocyte	1		5.1 x 10-6	
Horse plasma	11	TEPP	2.0 x 10-6	None
Horse plasma			1.5 x 10-7	Peracetic acid
			1.5 x 10-7	Perbenzoic acid
Human plasma	11	Phorate	1.5 x 10-7	Peracetic acid
Bec-head brei	1		8.2 x 10-7	Peracetic acid
Houselly-head brei	1		6.2 x 10-8	Peracetic acid
Horse plasma	11	Trithion	2.5 x 10-8	Peracetic acid
Human plasma	11		3.8 x 10-8	Peracetic acid

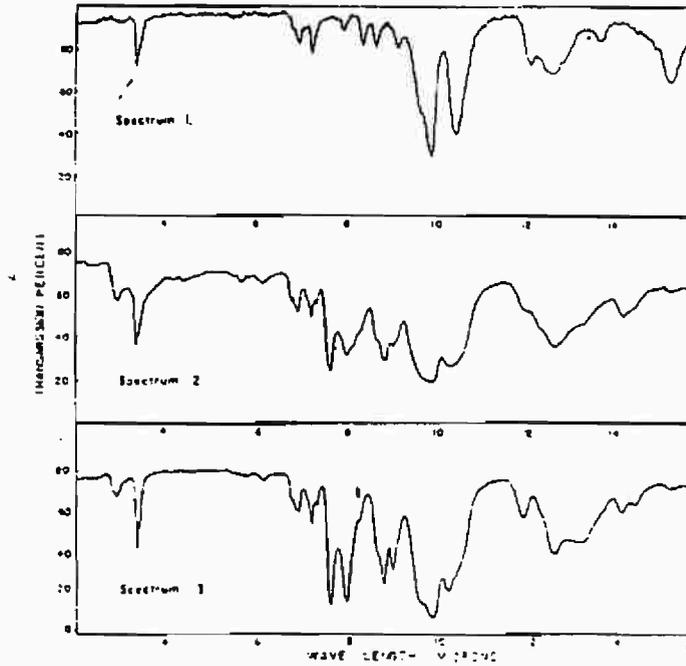
Amount of enzyme was chosen so that a Δ pH of 1.5 to 2.0 was attained in 60 minutes at 25°C with no inhibitor present. 150 is the molarity of inhibitor which results in 50°C of the activity of the control.

الذى يشبط انزيم الكولين استريز بالفوروات

جدول (٣) : التركيز النصفى بالمولر ونواتج تمثيله .

التركيب	التركيز بالمولر الذى يحدث ٥٠٪ تثبيط
الفوروات	$5,3 \times 10^{-5}$
الفوروات المؤكسد	$1,8 \times 10^{-7}$
فوسفوروداى ثيووات سلفوكسيد	$1,4 \times 10^{-7}$
فوسفوروداى ثيووات سلفون	$1,9 \times 10^{-7}$
فوسفوروداى ثيووات سلفوكسيد	$1,5 \times 10^{-7}$
فوسفوروداى ثيووات سلفون	$1,5 \times 10^{-7}$

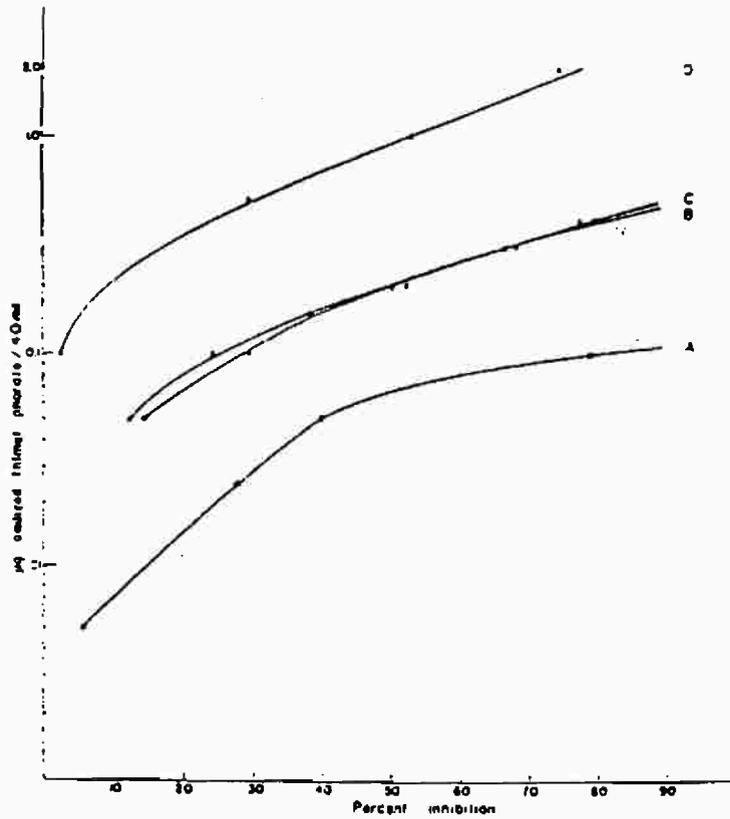
تلعب فترة الأكسدة دورا هاما فى تحديد نواتج التمثيل والاكسدة وقد ثبت ان الاكسدة حتى ٦٠ دقيقة باستخدام مخلوط من فوق اكسيد الايدروجين وحامض الخليك الثلجى وخلال هذه الفترة لا يحدث اى فقد يذكر .



شكل (٢) : طيف الاشعة تحت الحمراء للفوروات (١) والفوروات المؤكسد (٢) والفوروات غير المؤكسد السلفون (٣) .

* د - مصادر الكولين استريز :

يوضح الشكل (٤) منحنيات تثبيط انزيم الكولين استريز عندما قدرت بالتغير في درجة الحموضة ΔPH للانزيم من اربعة مصادر مع الفورات المنشط بحمض فوق الخليك . ثبت ان التركيز النصفى المثبط 150 لبلازما الحصان (C) وبلازما الانسان (B) تساوى 1.8×10^{-7} مولر بينما كانت مع رأس الذباب (A) 6.3×10^{-8} مولر ولانزيم مخ نحل العسل (D) 7.2×10^{-7} مولر .



شكل (٤) : منحنيات تثبيط الكولين استريز المقدرة بطريقة فرق الجهد عند تثبيطها بالفورات المنشط بحمض فوق الخليك .

* * استخدام تثبيط الكولين استريز في تحليل مخلفات المبيدات

ثبت قيمة الطرق الانزيمية في الكشف عن اثار العديد من المبيدات والتي يصعب قياسها بالوسائل الكيميائية الاخرى . يجهز المحصول او السلعة الغذائية المتوقع او المشكوك في احتوائها على المبيد وتنقى ويقدر المبيد من خلال مقدرته على تثبيط الانزيم .

* أ - الاستخلاص والتنقية

يتوقف اختيار الطريقة المناسبة للإستخلاص على الطبيعة الكيميائية للمبيد ووجود المواد المتداخلة الطبيعية والطريقة المستخدمة في قياس نشاط الكولين استريز . مع القليل من الاستثناءات يجب ان تستخلص العينة وتنظف قبل ان تصبح صالحة للتقدير بطريقة التثبيط الانزيمي . وكذلك يجب ان يحتوى المستخلص على جميع المثبط في العينة مع اقل كمية ممكنة من المواد المتداخلة وينبغي ان تخلو العينة منها . كما يجب ان تكون عينة التحليل ممثلة للمادة محل الاختبار والتقدير .

* ب - مميزات طريقة الكولين استريز

من مميزات استخدام طريقة تثبيط انزيم الكولين استريز لتقدير مخلفات المبيدات الفوسفورية العضوية (١) الحساسية الزائدة بشكل كبير عن الطرق الكيميائية الاخرى ، (٢) ملاءمة الطريقة خاصة اذا كان المبيد يتحول في النبات منتجا نواتج تمثيل ذات كفاءة تثبيطية عالية . ومن عيوب الطريقة انها تفتقر الى الخصوصية حيث لا يمكن من خلالها التفرقة بين الانواع المختلفة من المثبطات خاصة مبيدات الآفات .

* ج - وصف مختصر لبعض الطرق المتخصصة

١ - طرق قياس فرق الجهد

استخدم Giang & Hall (١٩٥١) في البداية طريقة فرق الجهد بنجاح لتقدير Tepp والبارا او كسون وغيرها من المبيدات الفوسفورية العضوية التي تعمل كمثبطات خارجية In Vitro . الطريقة غير مناسبة لمبيدات الشينونو والداى ثيو فوسفات بسبب مقدرتها الضعيفة على تثبيط الانزيم خارجيا . لقد استخدمت طرق كيميائية لتنشيط مثل هذه المبيدات وتحويلها الى مركبات عالية المقدرة على التثبيط .

تذاب المواد القياسية ومستخلصات العينة في مذيب عضوى مناسب وتوضع في كأس سعة ١٠ مليلتر يحتوى على ٥٠ ميكروليتر جليسرول . يتم تبخير المذيب العضوى بواسطة تيار هواء دافئ وفائدة الجليسرول انه يحفظ المبيد من الفقد بالبخار . يوضع الكأس مع قضيب زجاجى في حمام مائى هزاز مضبوط الحرارة على $CO + ١$ م . يضاف ٣ مليلتر من مخلوط البلازما فى المحلول المنظم على فترات ١ دقيقة . البلازما تؤخذ من بلازما دم الانسان او الحصان . يسمح لمخلوط الانزيم والمثبط للاستقرار فى الحضانة لمدة ٢٩ دقيقة على ٢٥ م . تقاس حموضة المحلول بواسطة

جهاز قياس الحموضة PH meter وبعد الدقيقة ٣٠ بالضبط يضاف ١ مليلتر من الاسيتايل كولين بروميد لكل كأس . الكؤوس المتبقية تعامل بنفس الطريقة على فترات كل دقيقة واحدة بعد تخضين الانزيم مع الوسيط الكيميائي لمدة ٦٠ دقيقة على ٢٥ م . يعاد قياس الحموضة وتسجيلها . التغير في الحموضة ΔPH للمقارنة يجب ان يقع في حدود ١,٥ - ٢ وحدة من المفضل تحليل ٣٦ عينة بما فيها العينات القياسية . تحسب النسبة المئوية للتثبيط من المعادلة التالية :

$$(٣) \quad \text{التغير في الحموضة} = PH \text{ البداية} - PH \text{ النهاية}$$

$$(٤) \quad \% \text{ تثبيط} = (١ - \frac{\Delta PH \text{ في العينة}}{\Delta PH \text{ في المقارنة}}) \times ١٠٠$$

اذا كانت هناك حاجة لتثبيط المبيد حتى يصبح قادرا على تثبيط الانزيم يحضر محلول طازج من مخلوط يحتوى على حجم ٣٠ % من فوق اكسيد الايدروجين مع ٥ حجوم من حمض الخليك الثلجى . سخن ٥ ملليلتر من مخلوط الأوكسدة لمدة ٢٠ دقيقة على ٧٥ ° م . بعد اكتمال الاكسدة يغسل حمض الخليك الثلجى الزائد من البنزين باستخدام محلول كبريتات الصوديوم المشبعة مرتان ١ ملليلتر فى كل مرة وثلاثة مرات من الماء المقطر كل مرة ١ ملليلتر كذلك . يتم تحفيف طبقة البنزين على طبقة من كبريتات الصوديوم اللامائية وترشح ثم تقدر كما سبق .

٢ - الطريقة اللون

استخدم Archer & Zweig (١٩٥٩) طريقة لونية مع الوسيط الكيميائي اندوفينيل اسيتات . وفى هذه الطريقة يكون من الضرورى استخدام انزيم كولين استريز المخ او الدم . تعتمد الطريقة على القياس المباشر للون على ٦٢٥ ميكرون لنتاج التحلل المائى للاندوفينيل اسيتات على درجة حموضة - ٨. الجدول التالى مقارنة للطرق الثلاثة لتقدير احد المبيدات الفوسفورية .

جدول (٣) : مقارنة لكفاءة ثلاثة طرق لتقدير بالانزيم .

الطريقة	الوسيط الكيميائي	جزء فى المليون ppm
التغير فى الحموضة	ايتايل كولين كلوريد	٣٥,٠
الكروماتوجرافى الورقى	--	٣٧,٥
الطريقة اللونية	اندوفينيل اسيتات	٣٩,٦

REFERENCES قائمة المراجع

Note : Only some of the papers dealing with the specific topic of the inhibition of cholinesterase by organophosphorus and carbamate insecticides are cited. This in no way ignores the important contribution by many other scientists, but an allinclusive bibliography does not fall within the scope of this chapter.

- Aldridge W. N. (1958). *Biochem. J.* 54, 442-448.
- Ammon, R. (1988d). *Pflügers Arch. Ges. Physiol.* 233, 486.
- Archer, T. E. and Zweig, G., (1959), *J. Agr. Food Chem.* 7, 168-181.
- Archer, T. E. and Zweig, G., Winterlin. W., and Francis, K. (1963), *J. Agr. Food Chem.* 11. 58-63.
- Augustinsson, K. B. (1957). In "Methods of Biochemical Analysis" (D. Glick, ed.). Vol. dI. pp. 1-63. Interscience. New York.
- Beggs, H. G., Carey, S., and Morrison, D. B. (1958). *Am. J. Clin. Pathol.* 30.181-186.
- Bowman, J., and Casida. J. (1957). *J. Food Chem.* 5, 192-197.
- Carawlay, W. (1956). *Am. J. Clin. Pathol.* 26, 945-955.
- Casida, J. E. (1955). *Biochem. J.* 60. 487-197.
- Casida, J. E. (1956). *J. Agr. Food Chem.* 4, 772-785.
- Casida, J. E. Allen. T. C., and Stahmann, M. A. (1952). *J. Am. Chem. Sec.* 74.5545.
- Cook, J. W. (1955a). *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists* 38, 826-882.
- Cook, J. W. (1955b). *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists* 38, 150-152.
- Curry, A. N., Kress, L. M., and paylor, R. A. L. (1961). *J. Agr. Food Chem.* 9. 469-177.
- Dale, H. H. (1914). *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 6, 147-150.
- Davies, D. R., and Rutland, J. P. (1950). *Biochem. J.* 47, 21-22.
- Dubois, K. P. (1961). *Advances in Pest Control Research* 4, 117-151.
- Dutch Paten (1953). No. 73307 (September 15, 1958(; *Chem. Abst.* (1954).48, 7104.

- Fallscheer, H. O., and Cook, J. W. (1956). *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists* 39, 691-697.
- Fukuto, T. R. (1957). *Advances in Pest Control Research* I, 147-192.
- Gage, J. C. (1961). *Advances in Pest Control Research* 4, 188-210.
- Clang, P. A., and hall, S. A. (1951). *Anal. Chem.* 23, 1880-1884.
- Clang, P. A., and Schechter, M.S. (1960). *J. Agr. Food Chem.* 8, 51-54.
- Hall. G. E. and Lucas, C. C. (1987). *J. Pharmacol. Exptl. Therap.* 59, 34.
- Hestrin, S. (1959), *J. Biol. Chem.* 180, 249-261.
- Jansen, E. F., Nutting. M.D.F., Jang. R., and Balls. A. K. (1949). *J. Biol. Chem.* 179, 189-199.
- Kramer, D. N., and Gamson, R. M. (1958). *Anal. Chem.* 30, 251-254.
- Lesuk, A. (1949). U.S. Paten 2.475.792 U.S. Patent 2.475.793.
- Metcalf, R. L. (1955). "Organic Insecticides" pp. 251-315. Interscience. New York.
- Metacalf. R. L., Fukuto, T. R., and March. R. B. (1957). *J. Econ. Entomol.* 50. 838-845.
- Michel. H. (1949). *J. Lab. Clin. Med.* 34. 1564-1586.
- Miskus, R. , and Hassan, S. (19k59). *J. Econ. Entomol.* 52, 3530355.
- Pack D. E., ospenson, J., and Kohn. G. K. (1960). Abstr. 188th Meeting Am. Chem. Soc., Atlanta City, September, No. 58. p. 20A.
- Patchett, G. G., and Batchelder, G. H. (1960). *J. Agr. Food Chem. S.* 54-57.
- Renshaw, R. R., and Bacon. N. J. (1926) . *J. Am. Chem. soc.* 48. 1726.
- Rithter, D., and Croft. P. C. (1942). *Biochem. J.* 36. 746.
- Rider, J. A., Moeller. H. C., and DuBois K. P. (1951). *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 76, 427.
- Strehler. E., and Meyer, H. (1952), *Helv. Med. Acta* 19.555.
- Van Asperen, K., and Dekhiujzen, H. M. (1958). *Blochim. et Biophys. acta* 25. 603-613.
- Zweig, G., and Archer. T. E. (1958). *J. Agr. Food Chem.* 6. 9100916.