الفصــــل الحــادى عــشــــر

طرق الكشف عن المبيدات بالوسائل الاسبكتروفوتومترية

* المقدمة والنظرية (الأساس النظرى) .
* التعريفات والمصطلحات الخاصة بالاسبكتروفوتومترى .
* قوانين التقدير الكمى اللونى للمبيدات .
- قانون بوخز ولامبرت .
- قانون بيير .
* العينات والتقديرات القياسية .
* اساسيات الطرق اللونية .
* اسباب استخدام الطرق اللونية والأشعة فوق البنفسجية .
* الاستخلاص والتنقية .

١ - ملاحظات عامة .

٢ - اعتبارات خاصة للتحليل بالاشعة فوق البنفسجية .

* طرق تجهيز البيانات والمنحنيات القياسية .
* اصطلاحات خاصة باجهزة القياس اللونية .
* امثلة للاجهزة المستخدمة فى التقدير اللونى .

١ - جهاز قياس الالوان المرئية .

٢ - جهاز ايفيلين .

٣ - جهاز اسبكتروفوتومتر بوش - لومب سبكترونيك ٢٠

٤ - جهاز بكمان دى يوسبكتروفوتومتر .

* القياس اللونى بالاشعة تحت الحمراء الاسبكتروفوتومترية .

طـرق الكشـف عن المبيدات بالوسـائل الاسبكتروفوتومترية

« الطيف ضوئية » Spectrophotometric

* المقدمة والنظرية (الاساس النظرى) :

لأسباب عديدة تغطى طرق التحليل التى تستخدم الوسائل الطيف ضوئية كلا من المجالات الخاصة بالاشعة فوق البنفسجية Ultraviolet والضوء المرئى Visible للطيف . والقواعد التى تحكم هذين المجالين متماثلة تقريبا كما ان التعريفات الخاصة بهما تصلح لها معا . والاختلافات الحقيقية بينهما تتمثل فى قياس اللون المرئى فى مقابل امتصاص الاشعة فوق بنفسجية بسبب تركيب التردد Resonance . ببساطة يمكن القول ان اساس الطرق الكيميائية اللونية للتحليل تتضمن معاملة المادة فى المحلول بجوهر كشاف يعمل على تكوين لون يرتبط امتصاصه بتركيز المادة المقدرة . عادة ما تكون العلاقة بين الامتصاص الضوئى Optical absorbance وتركيز المادة خطية . ان امتصاص الضوء فى المنطقة فوق بنفسجية للطيف يتحكم فيها نفس اعتبارات امتصاص الضوء المرئى . ان التركيز الخاص بالتقدير فى الاشعة فوق البنفسجية يقل كثيرا عنه فى حالة الضوء المرئى . كمية اللون للعينة مجال التحليل يقاس بعدة وسائل مثل اجهزة قياس الالوان . يتطلب التحليل الحالى الكشف عن المخلفات تقدير كمية ضئيلة للغاية مما يستلزم حساسية شديدة وعالية للأجهزة ولا يتحقق هذا الا فى نطاق الضوء غير المرئى بالاشعة فوق البنفسجية ويستخدم الاصطلاح قياس الطيف الضوئى Spectrophotometry للتعبير عن هذا النوع من القياس تمييزا له عن التحليل الضوئى العادى Photometry الذى يعتمد على قياس كثافة انتقال الضوء من خلال الطيف .

الضوء عبارة عن اشعاع مغناطيسى يحتوى اطوال موجات مختلفة او سيل من الفوتونات ذات الطاقة المختلفة ويستخدم الشعاع الكهرومغناطيسى فى التحليل الطيف الضوئى « سبكتروفوتومترى » عند اطوال الموجات التالية مقاسة بالنانوميتر أو الانجستروم على النحو التالى :

١٠ – ٢٢٠ نانوميتر مجال الاشعة فوق البنفسجية .

٢٢٠ – ٣٨٠ ،، مجال الاشعة القريبة من فوق البنفسجية

٤٠٠ – ٧٠٠ ،، مجال الاشعة المرئية

للبحاث * Herman F. Beckman بمعمل بحوث التوكسيكولوجى ومخلفات المبيدات – جامعة كاليفورنيا – دايفز – كاليفورنيا .

و * Robert B. Bruce شركة روبينز – ريشمون – فرجينيا .

و * D. MAC Dougall مؤسسة كيماجرو – كانساس سيتى – ميسورى – الولايات المتحدة الامريكية .

١,٧٥٠ – ٢,٥ ميكرون قريب من تحت الحمراء

٢,٥ – ٢٥ ،، الاشعة تحت الحمراء التقليدية

٢٥ – ٣٠ ،، بعيد عن الاشعة تحت الحمراء

النانوميتر = ١٠$^{-٩}$ والواحد نانوميتر يحتوى على ١٠ انجستروم

وقبل الخوض فى التفصيلات اود التذكرة ان الطرق الاسبكتروفوتومترية تشتمل على طرق الاشعة تحت الحمراء IR والطرق اللونية والاشعة فوق النفسجية UV وجميعها تعنى قياس ما يحدث من تأثير لتداخل الاشعاع الكهرومغناطيسى مع المادة محل التقدير بحيث يكون موضع امتصاص الاشعاع من خصائص المادة مما يفيد فى التعرف وتحديد المركب كما ان التركيز يمكن تحديده من درجة امتصاص الإشعاع .

*** التعريفات والمصطلحات الخاصة بالاسبكتروفوتومترى :**

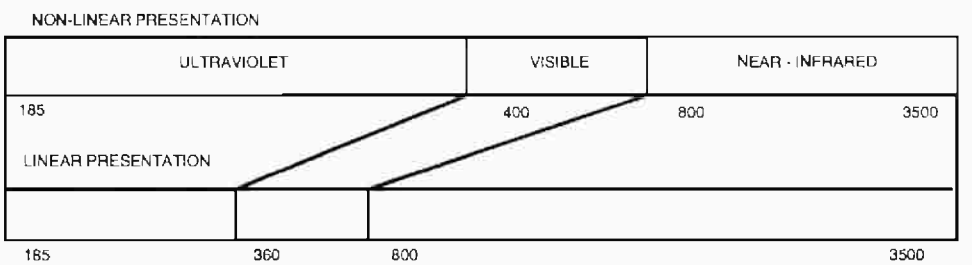
الامتصاصية Absorbtimetry تعنى قياس المدى الذى تستطيع المواد امتصاص الطاقة الاشعاعية عند اطوال موجة معينة خاصة . الطاقة الاشعاعية عادة تقسم الى ثلاثة مناطق تغطى المجالات التالية :

الأشعة فوق البنفسجية ١٨٥ – ٤٠٠ نانوميتر

الضوء المرئى ٤٠٠ – ٨٠٠ نانوميتر

الأشعة تحت الحمراء ٨٠٠ نانوميتر – ١٦ ميكرون

وغالبا ما يشار الى منطقة الاشعة فوق البنفسجية اقل من ٢١٠ نانوجرام على انها "Far-UV" والمنطقة من ٨٠٠ نانوميتر وحتى ٣٥٠٠ نانوميتر تسمى "Near IR" (شكل– ١) .



شكل (١) : أطوال موجات الطيف من بعيد الأشعة فوق البنفسجية إلى قريب تحت الحمراء

تعتبر المنطقة من ٤٠٠ – ٨٠٠ نانوميتر أكثر من غيرها استخداما فى التقدير اللونى . معظم اجهزة قياس الالوان تغطى هذا المدى بمساعدة المرشحات الضوئية ولكنها لا تصلح بكفاءة فى نهاية المدى . القياس اللونى يتميز عن القياس الاسبكتروفوتومترى المرئى حيث ان الأول colorimetry يعنى قياس كمية الضوء التى تمتصها المادة بالمقارنة باللون القياسى . القياس الاسبكتروفوتومترى

من جهة اخرى يعنى استخدام خلية ضوئية فى الجهاز ثم تتحول الاستجابة من الخلية الضوئية الى بعض الاشارات التى يمكن قياسها . التحليلات التى تستخدم الاشعة فوق البنفسجية يجب ان تكون طيف ضوئية بسبب طبيعة الطاقة .

يمكن تمثيل الطيف الممتص بواسطة مادة معينة عن طريق توقيع ورسم علاقة بين الامتصاص وطول الموجة . التغيير السريع فى الامتصاص مع التغير فى طول الموجة يوجد منطقة امتصاص قصوى تسمى منطقة الامتصاص المتخصصة أو الاختبارية Detective or specific absorption . طول الموجـــه الذى يمد بالامتـــصاص خلال الكثافة القصوى يســـمى اقصى إمتصاص Maximum absorption اما ادنى إمتصاص minimum Absorbance يمثل طول الموجة التى يحدث عندها اقل امتصاص . فى حالة المادة التى يحدث فيها امتصاص ذات قيمة تعلو وتنخفض بسرعة يقال عن الطيف المسجل ذو التركيب الدقيق Fine structure . من احسن الامثلة على التركيب الدقيق طيف ابخرة البنزين .

* قوانين التقدير الكمى اللونى للمبيدات :

قانون بوخرو لامبرت Boucuer and Lambert :

لا يعتمد نسبة الاشعاع أو الضوء الذى يمتص بواسطة وسط شفاف على شدة الضوء الواقع عندما تظل نوعية الاشعاع دون تغيير وكل طبقة متتابعة من الوسط تمتص جزء مساوى من الضوء المار من خلاله . هذه الحالة يعبر عنها بالمعادلة :

(١) ..... $I = Io\ l^{-ad}$

I = شدة الضوء المار

Io = شدة الضوء الحادث

a = معامل امتصاص الوسط

d = سمك طبقة الامتصاص بالسنتيمتر

يمكن التعبير عن هذه العلاقة بالمعادلة الآتية :

(٢) ... $Log \left(\frac{Ia}{I}\right) = ad$

واذا كتبت المعادلة (٢) مع اللوغاريتم الاساسى (١٠)

(٣) . $Loc \left(\frac{Ia}{I}\right) = kd$

والمعادلة (٣) تعبر عن معامل الامتصاص Extinction Coefficient

$\infty = 2.303\ k$

قانون بيير Beer's Law :

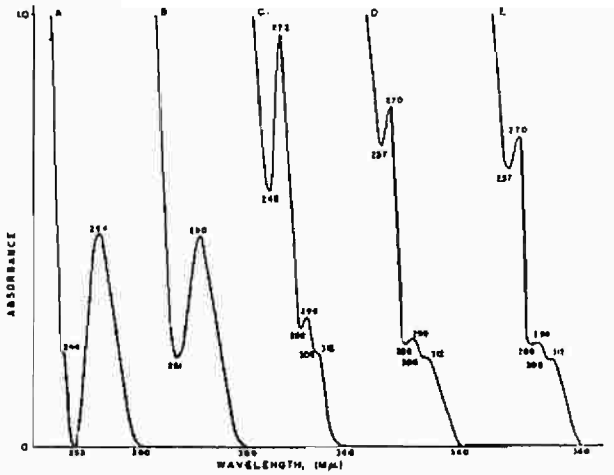
يعتبر امتداد لقانون لامبرت ومفاده ان الامتصاص لا يتناسب مع عدد جزئيات مادة الإمتصاص الموجودة فى مسار الضوء ولذلك يدخل عامل التركيز فى المعادلة (٣) بحيث يعبر عنه بالمعادلة :

$$. \text{Log} \left(\frac{Ia}{I}\right) = kcd \qquad (٤)$$

حيث c = التركيز وعادة يعبر عنه بالمول فى اللتر . عندما يكون التركيز ١ مول فى اللتر وطول المسار ١ سم يطلق على K معامل الامتصاص الجزيئى ويكتب E أو ٤ ولقد استخدم الاصطلاح k, cm 1% بواسطة العديد من البحاث خاصة عندما يكون الوزن الجزيئى للمركب غير معروف للحصول على قيمة الإمتصاص . وقد استخدم هذا الإصطلاح ايضا مع العديد من المركبات المعروفة حيث يعطى اساس للمقارنة . استخدام الاصطلاح يعطى قياس سريع لحساسية طريقة التحليل . عند محاولة الربط بين قيمة الامتصاص لطبقة ١ سم فى محلول ١ ٪ لمركب معين مع مركب آخر قيس بنفس الاسلوب يمكن الحكم على الحساسية النسبية للطريقة . اذا كان الوزن الجزيئى للمركب تحت الاختبار معروف يمكن تعريف وتقدير معامل الإمتصاص الجزيئى بالمعادلة التالية :

$$(٥) \quad E^{1\%}_{icm} \times \frac{\text{Mol. wt}}{10} = k$$

القيمة المدونة تصلح مع طول الموجة التى تم عندها القياس ولا تصلح لأية اطوال موجية اخرى . الامتصاص يمثل لوغاريتم Io / I وهو يساوى (I / T) والنفاذية (T) تساوى Io / I ويعبر عنها بالنسبة المئوية T x 100 والشكل (٢) يمثل منحنيات امتصاص الروتينون والمركبات المرتبطة به . المنحنيات توضح التغير فى الامتصاص مع التغير فى طول الموجة ومواضع الامتصاص الاقصى والادنى . تركيز المركبات الموجودة فى الشكل ١٠ ميكروجرام /ملليلتر ومسار الضوء ١ سم للحصول على هذه القياسات . يمكن تقدير معامل الامتصاص عند طول موجى من معادلة (٤) مع اقصى امتصاص .

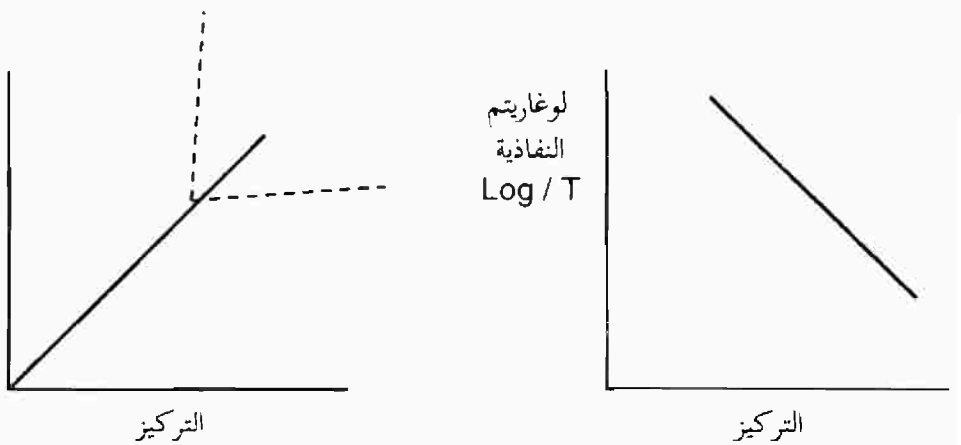


شـــكل (٢) : منحنيـــات توضح تأثيـر التغيـر فى طول الموجـــة على قيـــم الإمتصـــــاص (جميع المحاليل ١٠ ميكروجرام/ملليلتر فى الإيثانول)

A = روتينون　　B = ديجيدروتينون　٢ = توكسيكارول

D = ديجيولين　　E = تيفرومسين

ونتساءل متى يخطئ قانون بيير ؟ .. الاجابة تتمثل فى ان الخطأ يحدث اذا حدث تأين-Ion ization أو تفكك dissociation أو تجمع association أو حدثت تغيرات فى طبقة المذاب عند تغير التركيز وذلك يؤدى إلى الحصول على علاقة خط مستقيم بين الكثافة الضوئية والتركيز او بين النفاذية والتركيز .



* العينات والتقديرات القياسية Standards of Reference :

يجب ان تؤخذ سلسلة من التركيزات للمركب محل التحليل وتقدر بنفس الطريقة وتؤخذ قيم الامتصاص واللون كأساس لعمل منحنيات قياسية يمكن استخدامها لتعريف وتحديد التركيزات الغير معلومة من نفس المركب .

اساسيات الطرق اللونية Colorimetric والاشعة فوق البنفسجية Ultraviolet :

يجب ان تذاب عينة التحليل فى مذيب نقى خالى من اى مادة تكون لها المقدرة على امتصاص الضوء على نفس طول الموجة الخاصة بالمركب تحت القياس . هذا المطلب يعتبر اساسيا لدقة الطرق الاسبكتروفوتومترية . يجب الا يحتوى المحلول على مواد متداخلة قد تتفاعل مع الجوهر الكشاف الذى يكون اللون عند او بالقرب من طول موجة امتصاص المادة محل التحليل . ولنضرب مثلا يتمثل فى تحليل مبيد الباراثيون من خلال امتصاصه فى منطقة الاشعة فوق البنفسجية اذا كان المحلول النهائى محل التحليل به أية مركبات ذات تركيب متماثل فان قيمة الامتصاص المتحصل عليها لا تكون ممثلة تمثيلا حقيقيا لكمية الباراثيون . فى هذا الوضع تجرى خطوة تنظيف للعينة قبل القياس النهائى فى جهاز الاسبكتروفوتومتر ومثال ذلك الطرق الكروماتوجرافية . والطريقة يجب ان تزيل وتفصل اى مبيدات اخرى من المحلول تحتوى على تركيب بنزيتويد او اى مادة نباتية من المستخلص تمتص فى نطاق الاشعة فوق البنفسجية على ٢٨٠ نانوميتر .

* اسباب استخدام الطرق اللونية والاشعة فوق البنفسجية :

Reasons for colorimetric and ultraviolet procedures

هناك حاجة مستمرة لتطوير طرق التحليل الاسبكتروفوتومترية جنبا الى جنب وبنفس القدر من الاهمية لتطوير الطرق اللونية المرئية وتلك فى نطاق الاشعة فوق البنفسجية . وليكن معلوما ان الحساسية من اهم العوامل فى تقدير صلاحية الطريقة . العديد من الطرق اللونية تستطيع الكشف عن كميات فى حدود ١٠ ميكروجرام فى التحليلات الروتينية واقل من ذلك فى التحليلات الدقيقة . طرق الكشف التى تعتمد على الاشعة فوق البنفسجية اكثر حساسية بمقدار عشرة امثال او أكثر تبعا لطول موجة الإمتصاص . المركبات ذات الامتصاص الاقصى بالقرب من اقل تدريج موجى يمكن تقديرها بشكل اكثر حساسية من تلك المركبات التى تقع بالقرب من الضوء المرئى اذا وجدت ملوثات فى محلول التقدير تتداخل مع التقدير تسبب مشاكل فى الامتصاص مع زيادة الحساسية . يمكن زيادة الحساسية بزيادة مسار الضوء الفعال خلال المحلول . الخلايا ذات المسار الضوئى (١٠ سم) متاحة حاليا وهى لا تتطلب زيادة مناظرة فى حجم العينة . يمكن زيادة الحساسية بتركيز العينة لحجم صغير مما ادى الى إيجاد خلية جديدة ١٠٠ ميكروليتر تعطى ١ سم مسار ضوئى .

* متطلبات اخذ القياسات Sampling requirements :

طريقة اخذ العينات وتقسيمها وتخزينها وتجهيزها تتميز باسلوب معين تبعا لطريقة التحليل

حيث ان الطريقة اللونية والاسبكتروفوتومترية تختلف عن الطرق الاخرى خاصة فى مجال الاستخلاص كما ان الطرق الطيف ضوئية تتطلب خطوة اكثر فى التنظيف والتنقية وكذلك اخذ الحجم المناسب من العينة .

* الاستخلاص والتنقية Extraction and cleanup

١ – ملاحظات عامة General remarks :

من المعلوم ان طريقة التحليل الخاصة تصمم على اساس مبيد معين ولمحصول معين واية تغيرات تتطلب تحوير فى الطريقة الاصلية ، ومع هذا يمكن القول ان طرق الاستخلاص تجرى بشكل روتينى ولا جدال فيها ، اما طرق التنقية تتطلب دائماً جديد او تحوير عما هو منشور واى تهاون او تجاهل لأى خطوة بشكل غير مدروس او محسوب قد يؤدى الى قلة أو خطأ التحليل . مازالت مقولة Zweig وزملاؤه عن امكانية استخدام جهاز الكروماتوجرافى الغازى فى فصل المبيد قبل التقدير النهائى صالحة حتى وقتنا هذا وبعد مرور اكثر من ثلاثين عاما . ومن امثلة نجاحات الكرماتوجرافى الغازى تنظيف مستخلصات البطاطس قبل تقدير مركب حامض نفثالين اسيتيك اسيد وتنظيف مستخلصات فول الصويا قبل تقدير استر داى كلور امينو بنزويك اسيد وتنظيف مستخلص الكمثرى قبل تقدير مبيد الثيودان بالاشعة تحت الحمراء .

هناك طرق تنظيف اخرى تلائم مخاليط بعض المبيدات وهناك الكثير من الطرق الغير صالحة . لقد لاقى اسلوب عمود الكروماتوجرافى عناية واهتمام كبيرين واثبت نجاحات بدرجات متفاوتة ومن احسن الاعمدة التى ثبتت نجاحها عمود الفلوروسيل لفصل المبيدات الحشرية . يجب تجديد مادة الادمصاص بعد عدد من العمليات بسبب انخفاض الكفاءة مع تكرار التنظيف . لا يصلح هذا العمود لجميع المبيدات او جميع المستخلصات . استخدم عمود الفحم المنشط بنجاح فى فصل الديلدرين والـ د د ت والهبتاكلور والثيودان والهبتاكلور ابيوكسيد على المحاصيل المختلفة مثل التفاح والكمثرى والتوت والبرسيم ويشترط مع هذا العمود استخدام البنزين كمذيب مع الاحتفاظ بالنسبة بين العينة النباتية والمذيب ثابتة . التوزيع الجزئى بين سائلين نجحت لحد كبير فى فصل الدهون من المبيدات الحشرية حيث يستخدم مذيبان غير قابلين للامتزاج فى قمع الفصل او استخدام الكروماتوجرافى .

٢ – اعتبارات خاصة للتحليل الاشعة فوق البنفسجية (UV) :

التقديرات التى تعتمد على الاشعة فوق البنفسجيية تتطلب تنظيف عالى ومتميز للعينات بما يضمن عدم وجود اية شوائب تمتص الضوء فى منطقة الطيف الخاصة بالمبيد . يجب اختيار المذيب المناسب الذى يسمح بالمرور الكامل للضوء .. والجدول التالى يوضح الموجه الخاصة فوق

جدول (١) : المذيبات المناسبة للتحليلات الاسبكتروفوتومترية .

المذيب	نطاق الاشعة فوق البنفسجية
اسيتون	٣٣٠
اسيتونتريل	٢١٠
بنزين	٢٨٠
داى فينيل امين (بروموفورم)	٣٦٠
كحول البيوتايل	٢١٠
رابع كلوريد الكربون	٢٦٥
كلوروفورم	٢٤٥
سيكلوهكسان	٢١٠
٢,١ - داى كلورو ايثان	٢٣٥
داى كلورميثان	٢٣٥
ن . ن - داى ميثيل فورماميد	٢٧٥
ايثيل ايثر	٢١٠
ميثانول	٢١٠
ميثيل سيكلوهكسان	٢١٠
ميثيل فورمات	٢٦٠
نيروميثان	٢٨٠
كحول ايزوبروبيل	٢١٠
بيريدين	٣٠٥
تتراكلوروايثيلين	٢٩٠
٢ ، ٢ - ٤ تراى ميثيل بنتان	٢١٠

الفوق بنفسجية لكل مذيب ومنها يتضح ان افضل المذيبات ملاءمة لهذا النوع من التحليل هو الاسيتونتزيل وكحول البيوتيل والسيكلوهكسان والايثيل ايثر والميثانول وهى تفيد مع معظم المبيدات . كذلك يجب ان يكون المذيب الذى يستخدم فى الاستخلاص مختارا بعناية بحيث يكون قادراً على فصل المبيد من المواد الموجودة معه كما يجب الا يتداخل مع التحليل النهائى فى نظامى الاشعة فوق البنفسجية .

* هذه الاطوال الموجبة تمثل الموجة التى يكون امتصاص طبقة ١ سم يساوى الوحدة .

* تفاعلات الالوان Color reactions :

اجريت محاولات كثيرة لتحديد المجموعا الفعالة التى يمكن ان تستخدم فى التحليلات اللونية للمبيدات وقد تحققت نجاحات كثيرة في هذا الخصوص ومثال ذلك مجموعة الامين العطرية . التفاعل العام يتمثل فى اجراء تفاعلات الآزو الثنائية Azotize للأمين العطرية التى ترتبط بالمادة الملونة .

ان تفاعل الانيلين مع نتريت الصوديوم فى الوسط الحامضى يعطى بنزين ديازينوم كلوريد الذى يرتبط مع ن (١ – نافثيل) ايثيلين داى امين ليكون مركب ملون فى المحلول وهو غالبا لون وردى الى قرنفلى يمتص على طول موجة ٥٤٠ ميكرون . هذا التفاعل يصلح مع العديد من المبيدات الحشرية ومبيدات الحشائش والمواد الاضافية للأعلاف . ولقد تم تطوير التفاعل ليلائم تحليل العديد من المركبات المحتوية على مجموعة النيترو حيث تختزل إلى مجموعة الامين ثم يجرى التحليل .

من التفاعلات العامة نترتة حلقة البنزين كما فى الـ د د ت والعديد من المركبات المرتبطة به . اذا كانت الحلقة بها اكثر من مجموعتان نيترو او اكثر يمكن ظهور تفاعل لونى . من المعروف مثلا ان مركبات المنيتا – داى نيترو تعطى الوان عندما تذاب فى الاسيتون وتعامل بالقلوى وهذا ما يعرف بتفاعل Janovsky ولقد استخدم هذا التفاعل بنجاح مع العلائق والمواد الاضافية والمبيدات وعلى نفس المنوال فان المركبات التى عليها مجموعة احلالية للنيترو على حلقة البنزين تعطى لون اصفر فى الوسط القلوى .

يمكن إستغلال مجموعة الايدروكسيل على حلقة البنزين فى التفاعلات اللونية بشرط عدم احلال الوضع بارا بالنسبة لحلقة البنزين او يحتل بمجموعة متحركة مثل الهالوجين او الكربوكسيل او الهيدروكسيل او الميثوكسيل او حمض السفلونيك . يتضمن التفاعل تكثيف الحلقة مع ٤ – امينو انثيبيرين . ان احلال الوضع بارا بمجاميع الكيل – ازيل – نيتروبنزين – نيتروزو او الدهيد توقف التفاعل .

*** العلاقة بين طول الموجة والكثافة الضوئية وكذلك العلاقة بين طول الموجة والنفاذية :**

يمكن تمثيل مجال الامتصاص للمادة محل الاختبار وذلك برسم العلاقة بين طول الموجة والكثافة الضوئية Optical density (o) فعندما يحدث تغير سريع فى الامتصاص مع التغير فى طول الموجة مؤديا الى ظهور اقصى امتصاص يطلق عليه كما سبق القول الامتصاص النوعى Spe-cific absorption ويطلق على طول الموجة بطول موجة اقصى امتصاص Maximum absorp-tion .. ونكرر مرة اخرى ان طول الموجة التى يحدث عندها اقصى امتصاص هى التى يتم اختيارها لتقاس عندها كمية المادة الممتصة للضوء باستخدام جهاز الاسبكتروفوتوميتر . كما يلاحظ ان المرشح filter الذى يستخدم عن مقياس كمية المادة الممتصة للضوء فى جهاز قياس الالوان يعطى حزمة من اطوال الموجات بين ٣٠ – ٦٠ ميكرون .

نكرر التساؤل مرة اخرى عن السمك الامثل او المناسب للمادة الممتصة محل القياس بالطرق اللونية ؟

لقد اتضح كما هو مبين فى الرسم التالى ان احسن النتائج امكن الحصول عليها فى حالة السمك الامثل فى مدى الكثافة الضوئية O.P. من ٠,٢ – ٠,٦٥ ومن ثم يجب ضبط تركيز المادة او سمك طبقة المادة الممتصة على هذا الاساس .

* **اعتبارات متعلقة باللون المتكون فى التقديرات اللونية :**

ليست العبرة بالحصول على لون سواء مباشرة او بعد اجراء تفاعل كيميائى مع المبيد او تحويره او من جراء اضافة مادة ملونة ولكن الاهم توافر عدد من الشروط فى اللون المتكون والا كانت الطريقة اللونية غير صالحة ، ولقد شاهدت بنفسى احد الزملاء يختبر جميع المواد الملونة الموجودة فى المعمل بشكل عشوائى للحصول على طريقة لونية لبعض المبيدات وكان هذا خطأ كبير حيث لا بد من الالمام بكل المعلومات الخاصة بالتركيب الكيميائى والمواصفات الطبيعية والكيميائية واسس التفاعلات الكيميائية والطبيعية قبل البدء فى هذا العمل . ومن اهم شروط اللون المتكون (١) ان يكون ثابتا لمدة من ١٥ – ٣٠ دقيقة على الاقل بصرف النظر عن التركيزات ، (٢) يمكن الحصول على اللون كلما اجرى التفاعل وبنفس الاستجابة Reproducible ، (٣) ان يكون اللون متدرج مع التركيز وان يكون حساس لأية تغيرات بسيطة مع التركيز . وهناك العديد من العوامل التى تؤثر على ثبات اللون وتكرار حدوثه .. نذكرها فيما يلى :

- تأثير زيادة تركيز المادة محل التقدير والتحليل .
- تركيز الجواهر الكشافة وما اذا كانت طازجة او مخزنة .
- تأثير الحموضة فى الوسط وعلاقتها باللون .
- الوقت اللازم لتكوين اللون حتى يكون اللون ثابت .
- خطوات تكوين اللون وتتابع المراحل والتفاعلات .
- دور المذيب وطبيعته .
- دور حرارة الوسط والتفاعل اللونى .
- طرق التعريض والطرق الكيميائية التى تستخدم لاستبعاد التداخل .

*** طرق تجهيز البيانات والمنحنيات القياسية :**

١ – رسم العلاقة الخطية بين النفاذية (T) في المائة على المحور الرأسى اللوغاريتمى مع التركيز على المحور الافقى العادى ، ترسم العلاقة على ورق نصف لوغاريتمى .

٢ – رسم العلاقة بين لوغاريتم النفاذية على المحور الرأسى مع التركيز على المحور الافقى (يتم الرسم على ورق عادى) .

٣ – رسم العلاقة بين الكثافة الضوئية (O.D.) على المحور الرأسى مع التركيز على المحور الافقى (يتم الرسم على ورق عادى) .

٤ – يمكن رسم العلاقة حسابيا باستخدام قانون الميل حيث $k = \frac{D}{C}$ وتوضع قيم C K

ويؤخذ المتوسط ، والتركيز يساوى $C = \frac{D}{K}$ حيث C = التركيز ، D = الكثافة اللونية .

*** اصطلاحات خاصة باجهزة القياس اللونية Instrumentation :**

١ – اجهزة قياس الالوان المرئية visual وهى تعنى الاجهزة التى تقيس كمية المادة الماصة للضوء بالمقارنة بالالوان القياسية ويجب ان يؤخذ فى الاعتبار احتمالات حدوث اخطاء .

٢ – اجهزة قياس الالوان من خلال الخلايا الضوء كهربية وفيها تستخدم خلية ضوئية ومرشح ضوئى للحصول على حزمة ضوئية من اطوال الموجات (٣٠ – ٦٠ ميكرون) Photoelectric Photometer .

٣ – اجهزة الاسبكتروفوتومتر وفيها تستخدم خلية ضوئية monochromator لعزل حزمة ضيقة جدا من الضوء .

٤ – اجهزة القياس الضوئى photometer وهو يقيس كثافة الضوء النافذ على امتداد الطيف وهى بذلك تختلف عن اجهزة القياس الاسبكتروفوتومترية .

٥ – اجهزة قياس اللهب الضوئى "Flame photometer" .

مصدر الضوء فى هذه الطريقة العينة نفسها حيث يوجد لهب بدلا من مصدر الضوء (اللمبة) حيث توضع المادة المراد قياسها فى اللهب فتعطى لون معين بينما فى الطريقة الاسبكتروفوتومترية تقوم العينة بامتصاص الضوء ولا تكون مصدرا له .

امثلة للأجهزة المستخدمة فى التقدير اللونى Instruments :

من المؤسف ان العديد من البحاث فى معامل تخليق المبيدات وغيرها يشيعون مقدرة فائقة وعلم وافر عن الاجهزة . وقد يكون ذلك صحيحا ولكنى اود توضيح ان متخصصى الاجهزة هم من درسوا هذا العلم والفن من البداية وتلقوا دورات متعددة بصفة مستمرة على كيفية استخدام

وصيانة الاجهزة ومما اساءنى قول البعض « انا بتاع التحليل ، انا بتاع الـ HPLC... انا الوحيد اللى افهم فى تحليل المبيدات .. الخ » ذلك من المزايدات والمهاترات .. ولا خلاف بيننا ان الخبرة فى التحليل هى المطلب الاساسى ويتبعها التذوق والاحساس بالعمل الموكل للقائم بالتحليل . واهيب فى هذا المقام بالزملاء فى مجال تحليل المبيدات الا يحملوا انفسهم ما هو خارج عن نطاق تخصصاتهم وفى معامل الكشف عن المخلفات يفضل بل من الضرورى ان نضطلع بمسئولية التحليل اناس مدربون جيداً بصرف النظر عن مؤهلاتهم العلمية ولا غضاضة فى ان نتعلم ونكتسب الخبرة على استعمال الاجهزة ، اما الصيانة فلها متخصصيها وفنييها .. ان ادعاء المعرفة يحجب عن المدعى فرص كثيرة للحصول عليها وليس عيبا الجهل بشئ ولكن الاكثر عيبا والمعيب ادعاء الالمام بالاجهزة واتمنى من الله سبحانه وتعالى ان يجئ اليوم الذى يعمل البحاث معا فى تعاون وتتكامل المعامل . وفى هذا المقام اشير الى اهم الاجهزة المستخدمة فى التحليل اللونى :

(١) جهاز قياس الالوان المرئية Visual colorimeter :

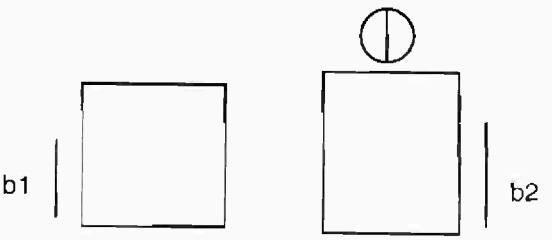
ومنه جهاز Debosque colorimeter وقد سبق تعريفه وهى تقيس كمية المادة الماصة للضوء بالمقارنة بالوان ذات تركيزات متباينة .. وهى تعتمد على المعادلة :

$$D = Kcb$$

$$D = Kc_1b_1 = K_c2b_2$$

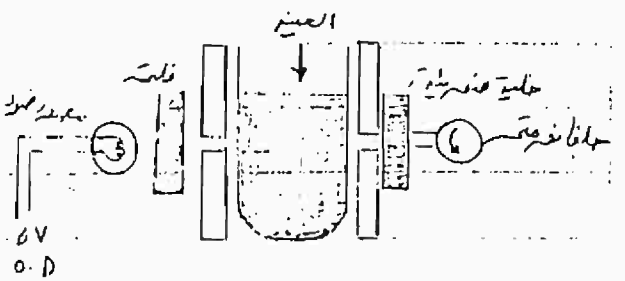
$$c_1b_1 = c_2b_2$$

$$\frac{c_1}{c_2} = \frac{b_2}{b1}$$



(٢) جهاز ايفيلين Evelyne colorimeter :

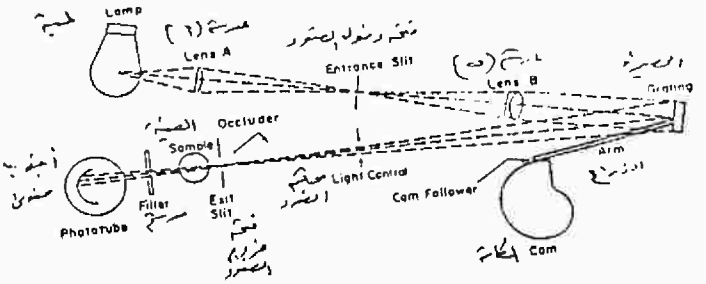
وقد سبق التعريف حيث يقيس كمية الضوء المار أو الممتص بواسطة العينة من خلال خلية ضوئية ومرشح ضوئى ومصدر للضوء .



(٣) جهاز اسبكتروفوتومتر بوش – لومب سبكترونيك ٢٠ :

Bausch and Lomb spectranic - 20

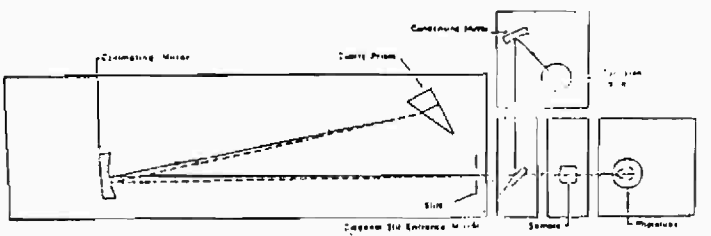
استعملت ظاهرة انكسار الضوء المتدرج Diffraction grating monochromator فى عمل هذا الجهاز حيث يقوم المنشور الزجاجى أو نوع من الحصائر بفصل الضوء الى اطوال موجات مختلفة ويحتوى الجهاز على امبليفير وكشاف الكترونى والجلفانومتر ويمكن القياس على اطوال موجات من ٣٧٥ – ٦٥٠ ميكرون ويمكن اضافة مرشح اخر وتغير الخلية الضوئية لزيادة المدى حتى ٩٥٠ ميكرون وعرض الحزمة الضوئية ٢٠ ميكرون . الجهاز يستخدم فى قياس الالوان فى المجال المرئى والغير مرئى .



شكل (٣) رسم توضيحى لجهاز إسبكتروفوتومتر بوش – لومب سبكترونيك ٢٠

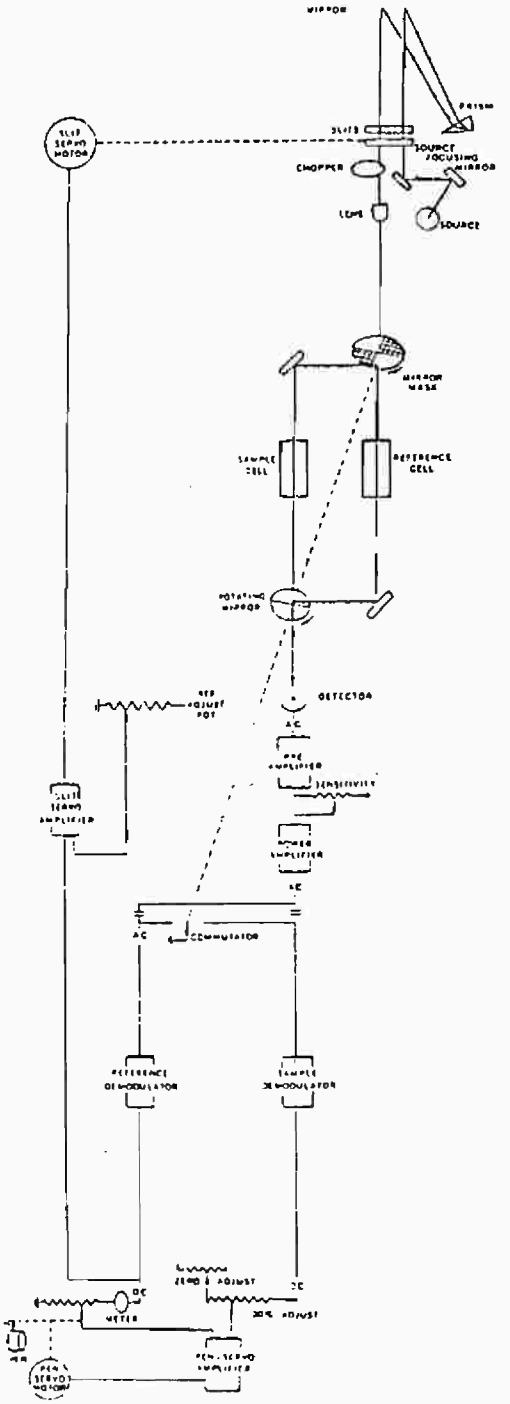
(٤) جهاز بكمان دى يو سبكتروفوتومتر Beckman Du :

يستخدم هذا الجهاز فى التقدير اللونى العادى وبالأشعة فوق البنفسجية اى المرئى والغير مرئى وهو عملى جدا وينتشر فى العديد من المعامل وحاليا توجد اجهزة يابانية والمانية وانجليزية على مستوى عالى جدا . مصدر الضوء فى هذا الجهاز لمبة من التنجستين او الايدروجين تركز الضوء الصادر منها على مرآة مجهر ثم يمر منها على مرآة الدخول التى تعكس الضوء الى فتحة دخول الضوء ثم الى مرآة مجمعة اخرى ينعكس منها الضوء الى منشور كوارتز حيث يحدث له انكسار . وتقوم خلفية المنشور اللامعة بعكس الضوء المتكسر خلال المنشور . يمكن اختيار طول الموجة المناسب باستخدام وحدة اختيار Selector حيث يقوم بضبط وضع المنشور ثم يمر الضوء الى العينة ومنها الى الخلية الضوئية مسببا تيار كهربى يتم تكبيره بواسطة اميليفير وتسجيله على مقياس لذلك .



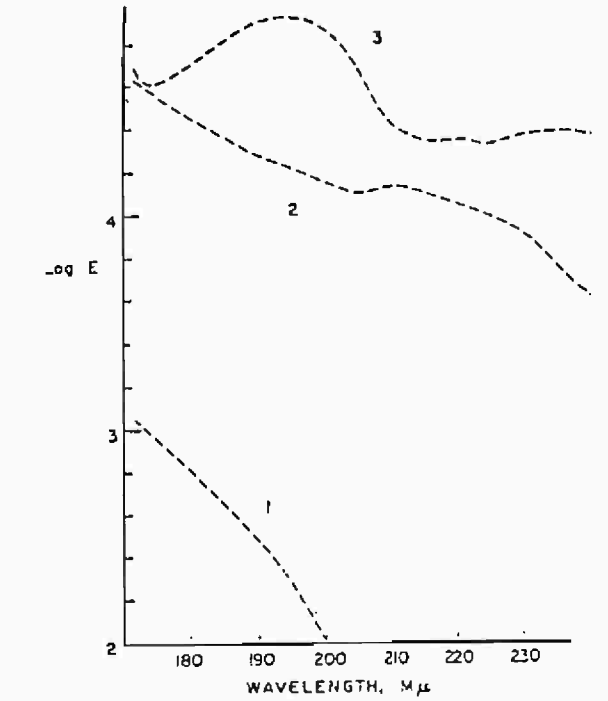
شكل (٤) رسم تخطيطى لجهاز سبكتروفوتوميتر بكمان دى يو

الشكل التالى يوضح رسم تخطيطى لجهاز بكمان الاسبكتروفوتومتر .

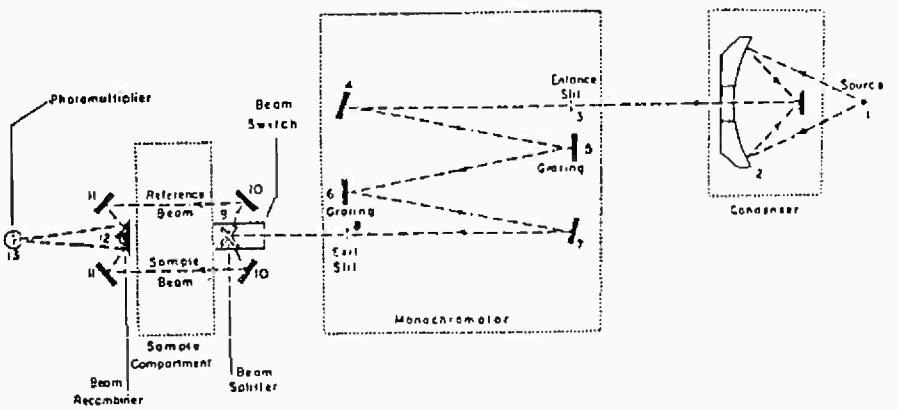


شـــكل (٥) النظـــام الضـــوئى لجـهـــاز بكمـــان طـــراز DK

والرسم التالى يوضح طبقة الاشعة فوق البنفسجية لمبيدات اللندين والالدرين والديلدرين .



شكل (٦) : طيف يعيد الأشعة فوق البنفسجية لمبيدات اللندين١ والألدرين٢ والدرن٣



شكل (٧) : رسم تخطيطى لجهاز بوش لومب طراز ٥٠٥ يوضح طريقة التشغيل

* القياس اللونى بالاشعة تحت الحمراء الاسبكتروفوتومترية Infrared spectrophotometric :

* تستخدم الاشعة تحت الحمراء للكشف والتقدير الوصفى والكمى للمبيدات وغيرها من الكيميائيات بطريقة مشابهة لما يحدث فى الطرق اللونية فى الضوء المرئى او فى نطاق الاشعة فوق البنفسجية . نود التأكيد على ان معظم استخدامات اجهزة القياس بالاشعة تحت الحمراء تتركز فى تحليل مستحضرات المبيدات formulations ولا تستخدم الا نادرا فى الكشف عن مخلفات المبيدات Residues بسبب قلة الحساسية وعدم توفر الاجهزة ذات المواصفات الخاصة لهذا الهدف . يمكن استخدام الاشعة تحت الحمراء لتحديد نوع المبيد وكميته بطريقة طبيعية دون اللجوء للتحليل الكيميائى .

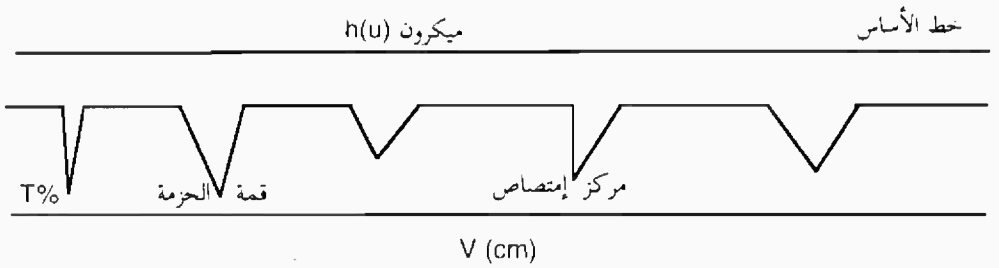
* يغطى حزام الاشعة تحت الحمراء الاطوال الموجية من ٠,٧٥ - ٣٠٠ ميكرون . وما يعنينا منها لقياس المبيدات الموجات من ٢ وحتى ١٥ ميكرون علما بان منطقة ٣٠ ميكرون تؤخذ فى الاعتبار . يعبر عن مواضع حزم الإمتصاص بطول الموجة بالميكرون او بالعدد الموجى بمقلوب الوحدة سنتيمتر cm-1 علما بان العدد الموجى هو مقلوب طول الموجة . يرجع ظهور حزم الإمتصاص فى منطقة الاشعة تحت الحمراء بسبب حدوث اهتزازات فى الجزيئات وهذا يماثل ما يحدث لكرات صغيرة مرتبطة بسوستة (الكرات تمثل الأنوية والسوستة تمثل الأنوية) ومن ثم يحدث او يتكون عدد هائل من الاهتزازات تختلف فى الزاوية وكتلة النواة وقدرة الروابط وغيرها من الصفات المميزة وبذلك يمكن تمييز هذه الاهتزازات الأساسية وغير الاساسية .

* تظهر المركبات العضوية من ٥ - ٣٠ حزمة امتصاص وليكون موضع الحزمة من خصائص الجزئ حيث يمكن تمييزه عن غيرها من الجزيئات والتعرف على تركيبه او نواتج تحوله من الموضع . أما تركيز أو كمية المركب يمكن معرفتها بواسطة تحديد كثافة الحزمة حيث تزيد الكثافة كلما زاد التركيز اى ينطبق عليها قانون (بيير - لامبرت) كما فى الطرق الإسبكتروفوتومترية التى تعتمد على الاشعة فوق البنفسجية أو الضوء المرئى .

* يمكن تتبع القراءات المسجلة على وحدة القياس المسماه « سبكتروجراف » بقراءة النسبة المئوية لنفاذية الاشعة تحت الحمراء عند اطوال موجات مختلفة بعد مرورها على العينة . وجهاز الكشف حساس للحرارة . ان طاقة بعض الاطوال الموجية تمتص فى شكل حزم امتصاص بسبب تداخلها مع جزيئات المركب بينما لا تمتص بقية اطوال موجات الاشعة تحت الحمراء . تتم قراءة هذه النتائج المسجلة على الاسبكتروجراف وقراءتها بتمييز مواضع حزم الإمتصاص الاساسية وربطها بالمجموعات الفعالة للمركب وتهمل باقى حزم الامتصاص الثانوية الناشئة عن حدوث تداخلات معقدة للاشعة مع الجزيئات .

* يتم التقدير الكمى للمركب محل التقدير من خلال شدة امتصاص الاشعة تحت الحمراء لحزمة معينة مميزة وحادة للمركب حيث تقدر النفاذية عند قمة الحزمة وتكرر نفس الخطوات والقياسات لتركيزات مختلفة ثم يرسم المنحنى القياسى من العلاقة بين لوغاريتم النفاذية والتركيز على ورق رسم بيانى عادى . والرسم التالى يوضح خط البداية حيث لا يحدث عنده امتصاص

للضوء ثم تظهر حزم الامتصاص تبعا لنوع وتركيب ومقدرة المركب على الإمتصاص ، وكما قلنا تمثل قمة الحزمة التركيز والمادة .



* للاجابة على التساؤل الخاص بكيفية عمل جهاز الاسبكتروفوتومتر الذى يعمل بالاشعة تحت الحمراء نقول ان الجهاز يتركب من مصدر للطاقة او الاشعة تحت الحمراء وغالبا ما يكون عبارة عن سلك ساخن من النيكل كروم او البلاتين ينبعث من وهج ثم تستقبل الاشعة تحت الحمراء على زوج من المرايا بحيث يمر شعاع الى العينة محل القياس وشعاع اخر الى المادة القياسية Reference . يحتوى الجهاز على نظام دوار من المرايا يضمن السماح للشعاعين الخارجين من العينة محل القياس والاخرى القياسية بالمرور المتعاقب فى نفس المساحة وتمر الاشعة المتعاقبة على مرشح للأشعة تحت الحمراء بما يسمح بمرور منطقة محددة من مجال الاشعة تحت الحمراء ثم تستقبل الاشعة المتعاقبة على منشور من كلوريد الصوديوم او حاجز لفصل اطوال الموجات المختلفة تبعا لطاقاتها المتميزة . بعد ذلك يتركز الشعاعان المتعاقبان للعينة والمادة القياسية على جهاز حساس للحرارة يمكن من خلاله مقارنة طاقة كلا الشعاعين المتعاقبين ففى حالة عدم اختلاف الشعاعين المتقابلين عن بعضهم يقوم الجهاز بتسجيل ١٠٠ ٪ نفاذية . اما اذا حدث اختلاف بينهما نتيجة امتصاص العينة للطاقة عند طول موجة معينة يتم تسجيل نسبةالاختلاف فى الطاقة بين الشعاعين فى صورة حزم امتصاص للطاقة على الاسبكتروجراف . وكما سبق القول تقاس حزم الامتصاص بالميكرون وهى تمثل طول الموجة أو يحدد العدد الموجى بالسنتيمتر وتدل هذه المواضع على وجود نوع معين من المجاميع الفعالة فى تركيب المركب الجزيئى كما فى الامثلة الآتية :

المجموعة الفعالة	العدد الموجى سم – ١	المجموعة الفعالة	العدد الموجى سم – ١
الكان	٢٩٥٠ – ١٤٥٠	كيتون	١٧٥٠ – ١٦٥٠
الكين	٣٠٠٠ – ١٦٠٠	أمين	٣٥٠٠ – ٣٣٠٠
اروماتيك	٣٠٥٠ – ١٦٠٠	فوسفات	١٢٥٥
كحول	٣٤٠٠ – ٣١٠٠	فو – ١ – الكبل	١١٦٠
احماض	٣٣٠٠ – ٢٩٠٠	اريل كلوريد	٦٠٠
استر	١٧٥٠ – ١٧٠٠	فو – ١ – ميثيل	١٢٥٠
الدهيد	٣٠٠٠ – ٢٨٠٠		

* بالنسبة للخلايا التى توضع بها العينة القياسية أو المرجع توجد منها انواع عديدة بعضها يصلح للعينات الغازية واخرى للسائلة أو الصلبة والنوعين الاخيرين هما الاكثر شيوعا . وقد تكون الخلية ثابتة أو حرة بحيث يمكن وضعها وازالتها والأخيرة تصلح للعينات الكبيرة والسوائل الغير المتطايرة أما الخلايا الثانية تستخدم فى المواد سهلة التطاير وهى مكلفة وذات حجوم مختلفة تناسب العينات المختلفة من المللیلتر وحتى الميكروليتر . وتصنع الخلايا من مواد منفذة للاشعة تحت الحمراء مثل خلايا كلوريد الصوديوم الذى ينفذ اطوال الموجات من ٢ – ١٥ ميكرون او بروميد البوتاسيوم التى تلائم الموجات من ٢ – ٢٥ ميكرون وبروميد السيزيوم لتلائم ٢ – ٥٥ ميكرون .

تحضر العينة السائلة مذابة فى ثانى كبريتور الكربون او رابع كلوريد الكربون لضمان عدم تداخل حزم امتصاص المذيب النقى مع حزم الامتصاص للعينة . اما فى حالة العينات الصلبة يخلط مسحوقها مع مسحوق بروميد البوتاسيوم ويضغط المخلوط تحت ضغط عالى يصل الى مئات مثل الضغط الجوى لفترة عدة ثوانى ثم تفصل قرص بروميد البوتاسيوم المحتوى على العينة ويوضع فى خلية من بروميد البوتاسيوم .

* من اهم المشاكل التى تعترض انتشار استخدام الاشعة تحت الحمراء فى الكشف عن متبقيات المبيدات ضرورة اجراء عمليات تنظيف للعينات عالية الجودة بما يمكن من التغلب على تداخل حزم الامتصاص للشوائب مع حزم الامتصاص الخاصة بالمبيد او نواتج التحول الكيميائى . لتحقيق التنظيف الجيد يمكن الإستعانة بطرق الفصل بالورق الكروماتوجرافى او كروماتوجرافى الالواح الزجاجية المغطاة وبعد الفصل يستخلص المركب بالمذيب المناسب ويحقن فى جهاز الكروماتوجرافى الغازى ويجمع من العمود الكروماتوجرافى ويجهز للتحليل بالاشعة تحت الحمراء حتى يمكن مقارنة النتائج بالعينة القياسية عالية النقاوة . اذا حدثت تحولات وتغيرات فى المركب الاصلى محل التقدير يمكن تحديد ما حدث بناء على خبرة ودراية القائم بالتحليل .

* لن اطيل على القارئ بتفصيلات كثيرة منعا للملل لأننى قصدت من هذا الكتاب ان اجعل كل مهتم بتحليلات المبيدات والكشف عن المخلفات ان يتذوق هذا الفن .. وكما سبق ان اشرت الى أننا جميعا ننهل من خبرات من سبقونا او من يعملون معنا دون حرج او عيب . من اخطر الامور على القائم بالتحليل سواء للمبيدات أو الملوثات البيئية الغرور وادعاء المعرفة وعليه ان يلقى نظرة للتطور الهائل الذى حدث فى اجهزة وطرق القياس حتى يثق بما حاولنا ان ننبه اليه .