

الفصل الثانى عشر

- الفصل الكروماتوجرافى بالالواح ذات الطبقة الرقيقة .

- * مقدمة
- * اساسيات الطريقة .
- * الاجهزة .
- * طريقة وخطوات التقدير .
- ١ - تغطية الالواح الزجاجية .
- ٢ - وضع العينات على الالواح .
- ٣ - استعمال الالواح .
- ٤ - تجهيز العينات .
- * تنظيف العينات .
- * انواع الوسط الصلب والسائل .
- طرق التطبيق والكشف عن مجموعات المبيدات المختلفة .
- ١ - الكشف عن المبيدات الكلورينية .
- ٢ - الكشف عن المبيدات الفوسفورية العضوية باستخدام نترات الفضة .
- ٣ - الكشف عن المركبات المحتوية على الكبريت او استرات حمض الفوسفوريك .
- ٤ - الكشف عن الروتينون .
- ٥ - الكشف عن البييرثرينات والمنشط بيرونيل بيوتوكسيد .
- ٦ - طرق جديدة مع الالواح الزجاجية المغطاة .
- (أ) طريقة الالواح .
- (ب) طريقة الالواح والانزيم الغير مباشرة .
- (ج) الالواح المغطاة ذات البعدين .
- (د) الالواح ذات الوسط المعكوس .
- (هـ) تسجيل الكروماتوجرام .
- (و) التحديد الكمى للكروماتوجرام .
- ٧ - الاختبارات التأكيديّة .
- ٨ - العوامل التى تؤثر على كفاءة الفصل بالـ TLC .
- * قائمة المراجع

الفصل الكروماتوجرافي بالالواح ذات الطبقة الرقيقة

Thin layer chromatography (TLC)

* مقدمة :

يطلق على هذه الطريقة « التقدير نصف أو شبه الكمي » -Semi quantitative determination وهي تستخدم اساسا كطريقة تأكيدية لما اسفر عنه التقدير الكروماتوجرافي الغازي كما يمكن الاعتماد عليها لتقدير المبيدات الكلورينية وغيرها في حالة عدم توفر او تعطل جهاز الكروماتوجرافي الغازي . وقد ثبت كفاءة هذه الطريقة وسهولتها وسرعة اجرائها وتمائل نتائج التحليلات مع تكرار الكشف عن نفس المبيد وكذلك تعطي نتائج توصف بانها شبه كمية مقبولة لحد ما . ولكي نتق ونتفهم امكانيات هذه الطريقة نقرر انها يمكن الاعتماد عليها للكشف عن كميات في حدود ٢٥ نانوجرام من المبيدات الكلورينية الدرین - ديلدرين - اندرين - هبتاكلور - هبتاكلورايبوكسيد - تي دي اى - دي دي اى - ددت .

* بساطة الطريقة تتمثل في انها تحتاج فقط الى طبقة رقيقة من مادة ادمصاص ودعامة صلبة مثل السليكا جيل ولوح زجاج على التوالي . في بعض المركبات الكيميائية تكون حدود التقدير في حدود النانوجرام وحيانا البيكوجرام . والتقدير يكون في غاية الدقة اذا احسن اختبار المواد والمذيبات ويمكن الاعتماد على النتائج المتحصل عليها . يمكن استخدام الطريقة لتحليل العديد من المركبات باستخدام مجموعة مختلفة من المذيبات او مخاليطها « كوسط متحرك - mobile phase ومواد ادمصاص مختلفة كوسط ثابت stationary phase والتحكم في سمك طبقة الوسط الثابت ونظام الكشف وظروف الفصل بما يتيح التقدير النوعي والكمي وكذلك تجهيز العينات اى التنقية وفصل المادة الفعالة من الشوائب . هذه الطريقة سريعة جدا لدرجة انه يمكن الحصول على النتائج خلال دقائق معدودة . وبسبب التكلفة البسيطة تستخدم هذه الطريقة في العديد من المعامل .

* استخدمت طريقة كروماتوجرافي الالواح TLC في العديد من المجالات ونجاح منقطع النظير كما في الكيمياء البيولوجية والعضوية والغير عضوية وغيرها . كذلك تستخدم في تنقية الكيميائيات قبل خطوات التعريف والتقدير الكمي . وسنحاول في هذا المقام ان نركز على امكانيات هذه الطريقة في الكشف عن المبيدات . وتضم قائمة المراجع ارقام ٢ ، ٣ ، ٤ ، ٥ ، ٦ ، ٧ ، ٨ ، ٩ وهي تختص باستخدام الـ TLC في الكشف عن المبيدات وهي مقسمة الى اقسام حسب مجاميع المبيدات الكاربامات والفوسفورية والكلورينية والفطرية وغيرها . وقد اشار Mendoza في المرجعين ١٠ ، ١١ لتقدير المبيدات من خلال دمج طريقة انزيم الاسيتايل كولين استريز مع الكروماتوجرافي TLC .

* اساسيات الطريقة Basic principles :

اساس الطريقة يعتمد على ادمصاص المركب محل التقدير على طبقة رقيقة من مادة الادمصاص او الوسط الثابت وذوبانه فى نظام من المذيبات او ما يعرف بالوسط المتحرك . يسمح الوسط المتحرك بحركة المركب من نقطة البداية حتى نقطة النهاية السابق تحديدها فى التجارب الاولى . نقطة البداية هى موضع تنقيط المركب وخط النهاية هو نهاية حركة المذيب (شكل - ١) . النسبة بين المسافة التى تحركها المركب الى مسافة حركة المذيب (النهاية) تعرف بالمعيار RF (معدل الانسياب Rate of flow) . تتأثر حركة المبيد والمذيب بالضغط البخارى والحرارة فى كابينة الكروماتوجرافى ومن ثم تكون قيمة RF تحت الظروف المتحكم فيها من الصفات الطبيعية للمركب .

LABEL	خط المذيب
FRONT	خط النهاية
ORIGIN	خط البداية

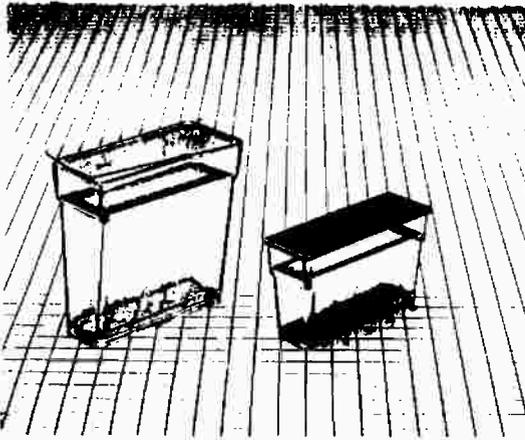
شكل (١) : لوح TLC مع خط البداية والنهاية .

يعبر عن الـ RF بقيمة نسبية (Relative RF value (Rst) اى النسبة بين المسافة التى تحركها المركب الى المركب القياسى وهذه تعطى الصلاحية للمقارنة بين قيم عند اوقات مختلفة وتحت ظروف كروماتوجرافية مختلفة عندما تكون مادة الادمصاص والمركب القياسى دون تغيير عند كل تقدير . بوجه عام يفترض ان حركة المركب ترتبط مباشرة بالمركب القياسى تحت الظروف المحددة وهذا الافتراض يجب ان يؤخذ بحذر بسبب احتمال اختلاف ذوبان وادمصاص المركب محل الاختبار ونظيره القياسى تحت نفس الظروف .

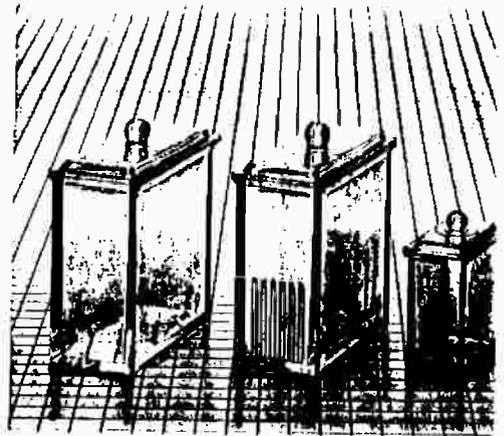
* الاجهزة Instrumentation :

تم حصر الاجهزة المتاحة لفصل وتعريف المركبات باسلوب عام بواسطة البحات Hurd tubise وآخرون (١٩٧٣) وكذلك Lott وآخرون (١٩٧٩) من حيث الفصل والكشف والتقدير الكمي للمركبات ، كما نوقشت اساسيات الاجهزة بواسطة Stahl (١٩٦٥) .. والاجهزة المطلوبة تشتمل على الآتى :

- ١ - ناشر الطبقة الرقيقة من مادة الادمصاص واللوحه وهى تقوم بنشر وتوزيع متجانس بعجينة مادة الادمصاص (الوسط الثابت) وهى مزودة بميكروميتر للتحكم فى سمك الطبقة واللوحه تثبت الواح الزجاج قبل وضع العجينة عليها .
- ٢ - الوسط الثابت Stationary phase يعمل على شكل طبقة رقيقة من السليكا جيل او السليلوز او الالومينا ... الخ والتي يجب ان تكون لها مقدرة على ادمصاص المركبات الكيميائية عندما يتحرك المذيب خلال الطبقة .
- ٣ - المواد الصلبة المعصدة Solid supports الواح زجاجية او الالومنيوم او رقائق من البلاستيك بشرط ان تكون مقاومة للمذيبات العضوية تستخدم كمواد معصدة .
- ٤ - حجرة الكروماتوجرافى (الشكل ٢ أ ، ٢ ب) وهى تصنع من زجاج شفاف وتستخدم للاحتفاظ بالوسط المتحرك (المذيب) .
- ٥ - محقن العينة والمسطرة Sample applicator and template تشمل حقنة دقيقة وانايب شمعية معايرة وهى تستخدم لتلقيط العينة على اللوح المجهد بمادة الادمصاص عند خط البداية والمسطرة من البلاستيك وتعاير لتحديد نقطة البداية والنهاية كما تستخدم فى قياس مساحة البقعة والمسافة التى تحركها المركب .

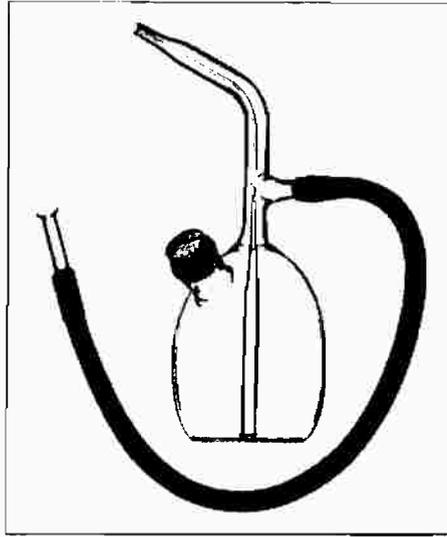
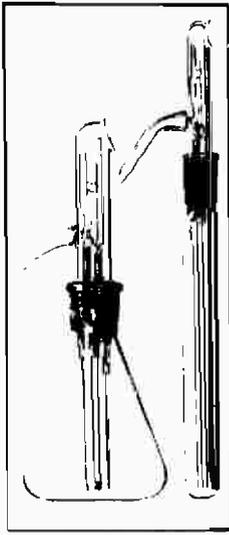


Separating Chambers



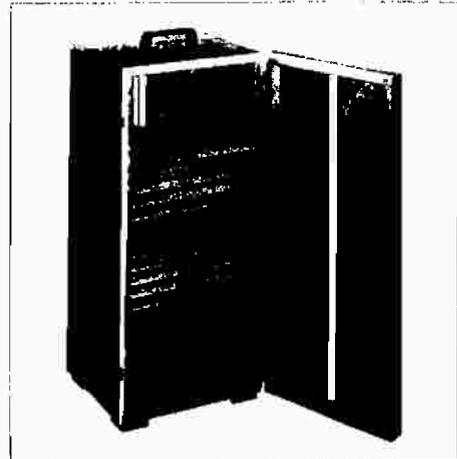
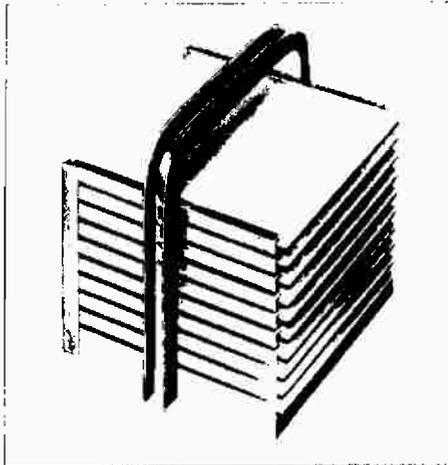
Standard Simultan and Nano Separating Chambers

شكل (٢) : نوعان من حجرات الكروماتوجرافى ذات الألواح

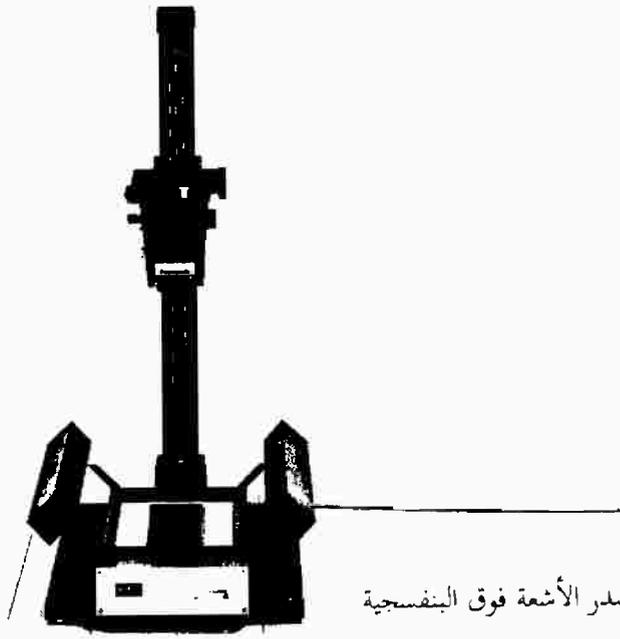


شكل (٣) : رشاشات زجاجية لرش المحاليل الملونة على الواح الكروماتوجرافي

- ٦ - وحدة لتجهيز كروماتوجرافي الألواح ذات الطبقة الرقيقة .
- ٧ - رشاشة لرش المواد المتفاعلة لتنشيط أو الكشف عن المركبات على اللوح الزجاجي (شكل - ٣) .
- ٨ - ماسك الألواح يمكن استخدام أى مادة بحيث لا تؤدي إلى تلوث طبقة الأدمصاص ويفضل الزجاج وإى مادة غير قابلة للتآكل .
- ٩ - حامل الألواح وصندوق التخزين المحكم (شكل - ٤) . ويفضل أن يصنع الحامل من الصلب الغير قابل للصدأ كما يجب أن يطن الصندوق بالصلب الغير قابل للصدأ أيضاً لمنع التلوث .
- ١٠ - صندوق ومصدر الأشعة فوق البنفسجية UV (شكل - ٥) وهو يستخدم لإظهار البقع .



شكل (٤) : وعاء التخزين (على اليسار) والصندوق المحكم الغلق (على اليمين)



شكل (٥) : رسم توضيحي لمصدر الأشعة فوق البنفسجية

الجواهر الكشافة المطلوبة تتوقف على المركبات المطلوب تحليلها .. ومع هذا يمكن الإشارة الى اهم المواد المستخدمة في :

- ١ - الوسط الثابت : سليكا جيل - اكسيد الالومنيوم - الفلوروسيل - السيليلوز ..
- ٢ - الوسط المتحرك : المذيبات العضوية - الماء - حمض الخليك .
- ٣ - المواد الملونة : نترات الفضة - اندوفينيل اسيتات - استرات النافثيل - الفاست بلو - اندوفتالات .

* طريقة وخطوات التقدير Techniques :

لن اخوض بالتفصيل في هذا المجال حيث ان التدريب على هذه الطريقة ميسر وسهل وليس فيه اى صعوبة وهذه مسؤولية الشركات المصنعة والموردة كما ان النشرات المصاحبة للاجهزة توضح كل شئ بالتفصيل ولا غضاضة في ان يقوم الباحث بتعليم نفسه وسوف يخطئ ويأخذ وقت حتى تصل حساسية التداول الى الحد المطلوب وكلما اجرى تجارب اكثر ازدادت خبرته .. وتشتمل خطوات تقدير المواد الكيميائية بأسلوب TLC على المراحل والخطوات الآتية (الصور تعبر عن نفسها) ..

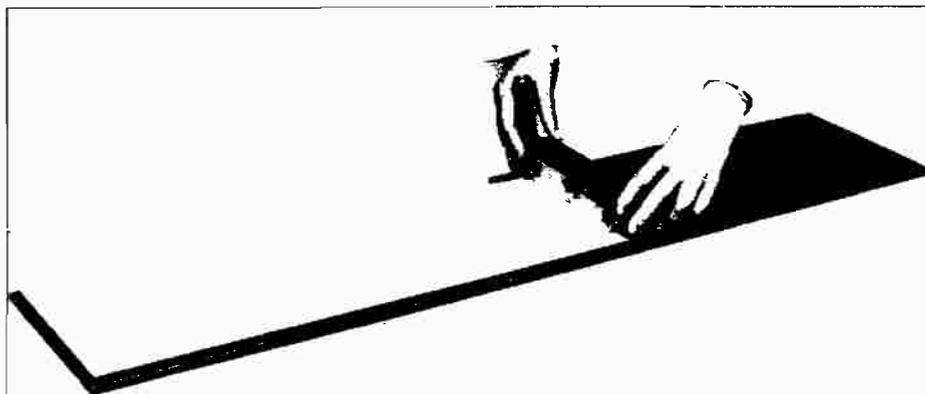
* ١ - تغطية الألواح الزجاجية Coating :

يتطلب هذا العمل تدريب وخبرة في خلط ونشر العجينة ويجب قبل عمل العجينة التنظيف الجيد للألواح وتخفيفها جيدا . وتوضع الألواح على الحامل بشرط ان تكون ذات سمك واحد ويضبط الميكروميتر للحصول على سمك واحد ومتجانس من مادة الادمصاص . تجهز العجينة بخلط مادة الادمصاص مع الماء ونسبة معينة محددة . تسكب العجينة وتفتح فتحة الدخول وتنتشر فوق

الالواح ثم تزال وتترك حتى تجف . اذا لم يكن الناشر متوفرا يمكن نشر العجينة باستخدام شريحة زجاجية رقيقة وهناك جهاز بسيط كما في الشكل (٧) . بعد ان تجف الالواح توضع في فرن على درجة ١١٠ م لمدة ٥,٥ ساعة على الاقل ويمكن ان تخزن الالواح المعاملة في صندوق محكم يحتوى على محبيات من السليكا جيل (الشكل - ٤) .

* ٢ - وضع العينات على الالواح Application of samples :

قبل تنقيط العينات توضع وتحدد ابعاد اللوح ومادة الادمصاص ويزال الجيل الزائد عند الحواف بابعاد ٢ - ٤ ملليمتر ثم يحدد خط البداية والنهاية (شكل - ١) . ومن المفضل



Coating of TLC-plates with TLC-Spreading Device and TLC-Spreading Template

شكل (٦) : رسم يوضح كيفية تغطية الألواح بالمادة الإدمصاصية

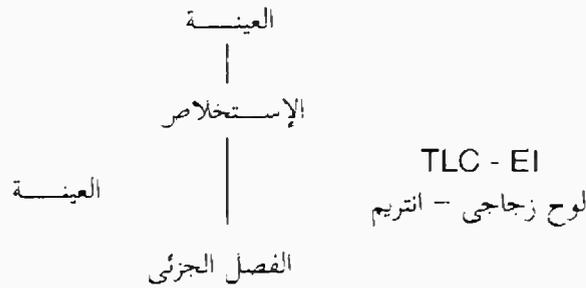
عمل خط عبر النهاية حتى يمكن سريان الوسط المتحرك ووصوله للنهاية . توضع العينة على خط البداية باستخدام المحقن الدقيقة أو الابوية الشعرية الدقيقة وتستخدم المسطرة الشفافة لتوضيح وضبط المسافة بين النقط . الحقنة يجب ان يكون لها شفة بزاوية ١٨٠ م . النقطة تكون صغيرة ما امكن وتترك لتجف قبل وضع العينة الثانية منعا للانتشار والتداخل .

* ٣ - استعمال الالواح Development of the plates :

يجب تحقيق الاتزان في حجرة الكروماتوجرافي قبل الاستخدام . توضع الالواح في التنك وتغطي في الحال (شكل - ٢) ، يمكن العمل على عدة الواح في نفس الوقت بوضعها في الحامل المصنوع من الصلب الغير قابل للصدأ . يجب ان يلامس المذيب الجيل تحت نقطة البداية - يزال اللوح بمجرد وصول المذيب للخط قبل النهاية . يسمح للمذيب بالبحر قبل استخدام المواد الملونة او المنشطة او محللول الانزيم .

* ٤ - تجهيز العينات Preparation of samples :

يجب ان تستخلص المبيدات من العينات النباتية والحيوانية أو الأرض أو الماء أو الهواء في المذيبات العضوية . العديد من مستخلصات العينات تتطلب عمليات تنظيف قبل اجراء الفصل بالكروماتوجرافى ذو الالواح المغطاءة TLC . يوضح الشكل (٧) رسم تخطيطى لتجهيز العينات قبل الفصل مع طريقة الالواح والتشبيط الانزيمى EI .. وهذه الخريطة تصلح لجميع طرق الـ TLC . يجب تركيز العينات وتقليل الحجم لاقبل ضرر ممكن عن طريق التبخير بالتفريغ Vacuum او تيار هادئ من الهواء أو النتروجين . لسنا فى حاجة لتأكيد ضرورة ان تكون الاجهزة خاصة الزجاجية فى منتهى النظافة كما تكون الغازات نقية جدا قبل الاستخدام لتفادى تلوث العينات .

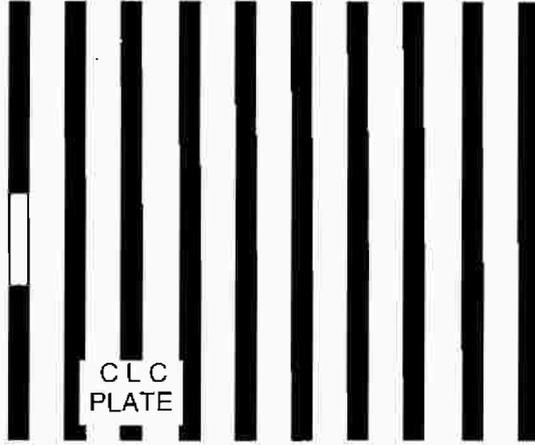


شكل (٧) : رسم تخطيطى يوضح تجهيز العينات قبل الفصل بالـ TLC مع الانزيم .

تنظيف العينات Clean-up of samples :

يجب تنظيف بعض العينات قبل اجراء التقدير بالـ TLC من خلال اعمدة الكروماتوجرافى او TLC او ترسيب الزيوت او الدهون بالتبريد او الفصل الجزئى او التقطير المتكرر او ترسيب البروتين بالطرد المركزى او الترشيح او الادمصاص على الفحم المنشط وهكذا . فى الفصل بالاعمدة الكروماتوجرافية توجد مواد ادمصاصية وذات القدرة التبادلية الايونية .

يمكن استخدام الالواح الزجاجية المغطاءة بطبقة سميكة (اكثر من ٠,٥ ملليمتر) فى تنقية العينات وكذلك يمكن استخدام طبقات وقنوات الكروماتوجرافى (شكل - ٩) حيث توجد تجاوير فى اللوح بما يحقق نظام العمود المفتوح لذلك توضع طبقة سميكة جدا من الجيل فى التجاوير . يتوقف استخدام هذه الطريقة على نوع العينة محل التحليل كما يجب التأكد من نظافة المذيبات ومواد الادمصاص منعا للتلوث .



شكل (٨) : لوح الكروماتوجرافي ذو القنوات

والجداول التالية توضح قيم RF مضروبا في ١٠٠ للمبيدات التي اختبرت مع نظم مختلفة من المذيبات الخاصة بالوسط المتحرك واذا اجريت عملية الفصل على اللوح تحت نفس الظروف لحصلنا على نفس القيم تقريبا .

*** انواع الوسط الصلب والسائل Stationary and mobile phases :**

هناك انواع عديدة من الجيل تصلح للكروماتوجرافي ذو اللوح المغطاة خاصة السليكا جيل كما يمكن استخدام اكسيد الالومنيوم او السليلوز او الفلوروسيل كوسط ثابت . استخدم الفلوروسيل مع ٩٠ مبيد . جدول (١) يعطى قيم RF للمبيدات مع الفلوروسيل وخمسة نظم من المذيبات اما جدولي (٢ ، ٣) توضح RF للكاريامات على الكيسلجيل مع مذيبات مختلفة . وجدولي (٤ ، ٥) توضح RF للمبيدات الكلورينية والفوسفورية مع نظم ثابتة ومتحركة مختلفة .

جدول (١) : قيم Rf (١٠٠ ×) للمبيدات والمركبات المرتبطة بها على الأرواح المنظفة بالفلوروسيل مع نظم مختلفة من المذيبات المضموية .

Sample No.	Compound	Hexane	Diethyl ether : hexane (6 : 94, v/v)	Diethyl ether : hexane (15 : 85, v/v)	Toluene	Acetone : toluene (1 : 9, v/v)
1	Hexachlorobenzene	70	76	80	90	90
2	Aldrin	61	71	77	90	90
3	Chlordane	52, 45, 37, 28, 20	69, 48, 22	75, 64, 57	90	90
4	DDE	51	69	80	87	88
5	Isobenzan	48	71	78	90	90
6	1-Chloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethylene	48	69	78	88	89
7	Quintozene	43	68	82	87	89
8	DDT	40	58	67	87	88
9	α - BHC	35	61	68	85	86
10	γ - BHC	26	51	61	86	87
11	TDE	24	46	63	83	86
12	Trifluralin	19	74	76	88	88
13	Peitachlorophenyl acetate	19	55	65	80	87
14	Benfluralin	12	63	74	83	90
15	Bromophos-ethyl	13	57	64	83	84
16	Dichlofenhion	7	57	65	78	89

Sample No.	Compound	Hexane	Diethyl ether : hexane (6 : 94, v/v)	Diethyl ether : hexane (15 : 85, v/v)	Toluene	Acetone : toluene (1 : 9, v/v)
17	Dursban	3	55	65	77	89
18	Fenoprop butyl	3	50	60	74	87
19	4, 4' - Dichlorobenzophenone	2	47	58	63	87
20	Endrin	9	39	57	74	85
21	Dieldrin	7	39	53	75	85
22	Ethion	2	33	50	79	89
23	Dicofol	4	(50) 32	(60) 48	63	87
24	Fenoprop methyl	4	34	48	62	84
25	2, 4, 5-T n-butyl	2	31	50	57	86
26	Dinocap	0	30	50	61	88
27	2,4,5-T isobutyl	0	32	50	52	87
28	2,4,5-T isopropyl	0	32	50	53	87
29	Tetradifon	2	30	47	65	87
30	Bromoxynil octanoate	0	28	46	57	86
31	2,4,5-T n-propyl	0	27	45	49	87
32	Nitrofen	2	26	43	78	85
33	N,N-Dimethyl-p-phenylazoaniline	0	26	41	42	84
34	2,4,5-T ethyl	0	25	41	43	86
35	2,4-D sec-butyl	0	23	44	51	83
36	Parathion	4	23	38	51	85

Sample No.	Compound	Hexane	Diethyl ether : hexane (6 : 94, v/v)	Diethyl ether : hexane (15 : 85, v/v)	Toluene	Acetone : toluene (1 : 9, v/v)
37	2,4-D isobutyl	0	21	39	43	86
38	Dieldrin	2	21	25	45	73
39	2,4-D n-butyl	0	20	37	47	84
40	2,4-Disopropyl	0	19	38	46	84
41	2,4,5-T methyl	1	18	33	43	82
42	2,4-D ethyl	0	17	31	43	82
43	Phenothiazine	1	16	28	65	75
44	2,4-Dichlorophenol	4	18	27	37	59
45	δ-BHC	4	14	28	80	84
46	Diazinon	2	14	28	30	84
47	2,4-D methyl	0	13	21	32	79
48	2,4,5-T butoxyethyl	0	11	23	26	83
49	α-Naphthol	2	11	23	29	63
50	3,4-Dichloroaniline	4	7	13	42	84
51	Mercaptodimethyl	0	7	22	23	65
52	Dioxathion	3	8	17	32	86
53	Malathion	2	5	14	22	79
54	2,4-D butoxyethyl	0	4	13	14	84
55	Folpet	0	0	12	27	80
56	p-Phenylazoaniline	0	4	10	24	68

Y 4 T

Sample No.	Compound	Hexane	Diethyl ether : hexane (6 : 94, v/v)	Diethyl ether : hexane (15 : 85, v/v)	Toluene	Acetone : toluene (1 : 9, v/v)
57	Trichlorophenol	2	3	4	13	86
58	Captaf	0	0	6	13	70
59	Linuron	0	2	5	11	68
60	Dithianon	0	0	0	13	81
61	Imidan	0	0	3	10	73
62	Carbaryl	0	(11) 1	(24) 4	(30) 11	(64) 53
63	Anetryne	1	4	6	10	59
64	2,4-Dichlorophenoxyethanol	0	2	3	8	52
65	Propazine	0	0	5	6	60
66	Azinphos-ethyl	0	0	4	5	73
67	Azinphos-methyl	0	0	2	4	68
68	Atrazine	0	2	4	5	60
69	Thiram	0	2	5	8	45
70	Dazomet	0	0	1	8	45
71	Simazine	0	0	0	1	43
72	Cyolane	0	2	3	3	41
73	4-Nitrophenol	1	3	4	5	35
74	Crotoxyphos	0	0	0	0	41
75	Demeton-methyl	0	0	1	3	39
76	Diuron	0	0	0	0	41

Sample No.	Compound	Diethyl ether : hexane		Toluene	Acetone : toluene (1 : 9, v/v)
		(6 : 94, v/v)	(15 : 85, v/v)		
77	Bromacil	0	0	0	41
78	Monuron	0	0	0	35
79	Fluometuron	0	2	3	33
80	1,1-Bis-(4-hydroxyphenol)- 2,2,2-trichloroethane	0	0	0	26
81	Methionyl	0	0	6	25
82	Fenuron	0	0	3	25
83	Haloxon	0	0	0	25
84	Cumaphos	0	5	6	14
85	Dimethoate	0	0	2	17
86	Thiabendazole	0	0	0	11
87	Warfarn	0	0	0	11
88	Trichlorfon	0	0	0	7
89	Pentachlorophenol	0	0	0	7
90	Amitrole	0	0	0	0

Source : From Hamilton and Simpson (16).

جدول (٢) : قيم RF (١٠٠ ×) لاحدى عشر مبيد كاربامات مع نظم منيات عضوية مختلفة على الكسماجيل G-HR .

Pesticide	1	2	3	3b	4	4b	5	6	7	8	9	9b	10	10b	11	12	13	14	15	16
Aldicarb (500)c	20	33	66	60	45	50	62	23	21	27	33	35	25	32	29	30	0	75	33	11
Banol (50)	33	38	77	72	65	57	89	40	35	39	46	47	39	40	40	32	3	79	45	33
Baygon (500)	27	40	76	63	50	53	77	28	30	32	35	33	38	35	27	25	1	76	35	11
Carbaryl (5)	24	38	75	63	43	57	77	28	29	28	35	27	25	27	32	24	1	75	35	25
Carbofuran (500)	26	39	71	61	49	43	80	29	20	27	37	38	31	33	31	24	2	70	33	8
Carbofuran 3-OH (500)	6	13	23	22	432	35	28	7	7	7	33	20	15	19	7	5	0	55	39	0
Metacil (500)	27	37	75	67	54	55	70d	28	28	33	39	40	30	37	33	25	2	70	33	7
Mesuroil (50)	32	48	77	72	64	61	80	40	35	39	45	51	39	43	37	31	0	77	37	30
Mobam (5)	22	37	71	61	50	52	69d	26	25	28	35	37	27	33	32	21	3	76	33	23
Ortho 5353 (50)	37	53	80	77	68	65	89	44	39	41	51	53	40	47	40	33	5	78	43	33
Zectran (500)	35	48	79	77	66	61	86	50	37	40	46	47	40	47	39	33	5	77	43	27

a (1) 20% acetone in cyclohexane, (2) 20% acetone + 10% benzene in hexane, (3) 20% acetone in pentane, (4) 30% acetone in hexane, (5) 20% acetone + 10% benzene in pentane, (6) 20% acetone in hexane saturated with methanol, (7) 20% acetone with hexane, (8) 20% acetone in 1 part of hexane : 1 part of cyclohexane, (9) 30% acetone in cyclohexane, (10) 30% acetone in heptane, (11) 20% acetone in 1 part of pentane : 1 part of hexane, (12) 20% acetone in 1 part of hexane : 1 part of heptane, (13) cyclohexane, (14) ethanol, (15) 10% ethanol + 10% benzene + 20% acetone in heptane, (16) chloroform.

b Figures in parentheses indicate the pesticide amounts (in ng) spotted.
d Inhibitor detected in the standard solution.

Source : From Mendoza and Shields (36).

جدول (3) : قيم RF لاثني عشر مبيد كاربامات على انواع مختلفة من الجيل مع نظام مذيبات عضوية مختلفة .

Pesticide	Types of layer ^a											
	Silical gel G		Silica gel D-5		Silica gel H		Silica AR TLC-7		Aluminum Oxide DS-5			
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B		
Aldicarb	43	14	38	8	43	17	--b	--	60	20		
Banol	64	26	55	18	63	28	--	27	73	42		
Baygon	57	22	42	14	49	22	47	23	63	20		
Carbaryl	46	18	33	12	51	22	52	26	57	20		
Carbofuran	45	18	33	12	51	21	53	26	57	20		
Carbofuran 3-OH	20	5	12	2	10	8	20	13	3	0		
Matcil	45	18	33	12	51	21	47	21	57	22		
Mesurool	54	22	47	18	60	27	62	33	63	27		
Mobam	45	14	33	9	51	20	47	26	52	16		
Ortho 5353	65	25	61	19	68	32	60	35	73	30		
Tranid	12	3	7	1	16	4	15	5	3	0		
Zeccran	64	24	61	19	71	30	60	39	73	30		

^aSolvent system : A, 20% acetone + 10% benzene in pentane; B, 20% acetone in hexane.
b-- = area of the spot, not definite.

Source : From Mendoza and Shields (36)

جدول (٤) : قيم RF (١٠٠٠ ×) لبعض المبيدات الكورينية المضوية والركبات المشابهة (مجمم ألتان ٢٨ × ٢٦ × ٢١ سم)

Pesticide	System number ^a and Rf Value							
	1 A	1 S	2 A	2 S	3 S	4 S	5 S	6 A/S
Aldrin	95	70	82	67	64	69	58	98
Alpha-BHC	87	34	63	52	28	43	---	69
Gamma-BHC	78	21	55	46	18	37	---	58
p, p'-DDE	95	65	78	65	57	62	74	98
o, p'-DDT	89	50	73	59	46	58	50	90
p, p'-DDT	89	42	69	57	39	54	52	91
deHCl p,p'-TDE	93	53	75	49	53	62	67	98
Dichlorobenzophenone	31	14	55	59	27	48	---	---
Dieldrin	37	12	52	65	48	48	30	58
Endosulfan A	65	17	64	58	35	52	---	---
Endosulfan B	4	2	9	12	---	---	---	---
Endrin	51	13	61	49	26	52	---	---
Heptachlor	95	58	78	65	53	62	48	98
Heptachlor epoxide	49	17	57	39	---	---	---	---
Methoxychlor	---	---	---	---	10	36	28	---
p, p'-TDE	71	25	57	52	26	46	67	77

a(1) Hexane; (2) 94 + 5 + 1 petroleum ether (40 to 60°C) : liquid paraffin : dioxane; (3) 4 + 1 petroleum ether (40 to 60°C) : liquid paraffin; (4) 7 + 2 + 1 cyclohexane : liquid paraffin : dioxane; (5) 9 + 9 + 2 cyclohexane : benzene : liquid paraffin; and (6) 92 + 8 cyclohexane : silicone oil. A = alumina, s = silica gcl, A/S = 1 + 1 A : s.

Source : Cited in Abbot and Thomson (3).

جدول (5) : قيم Rf (1000 ×) لبعض المبيدات الفوسفورية العضوية (40 دقيقة في كابتية 28 × 26 × 21 سم)

Pesticide	System number ^d and value								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Azinphosmethyl	5	14	24	0	27	0	3	58	0
Carbophenothion	52	66	80	45	96	36	39	92	27
Chlorthion	16	27	52	11	52	10	12	81	9
Dichlorvos	4	10	17	3	23	0	0	3	0
Dimethoalte	2	4	7	0	2	0	0	12	0
Ethion	60	82	88	38	96	50	57	---	39
Fenchlorphos	40	60	74	16	90	15	17	90	13
Malathion	50	68	81	60	96	64	68	93	45
Parthion	12	29	45	0	57	0	2	81	0
Phenkapton	37	62	72	14	80	11	18	90	95
Phorate	54	71	84	43	95	43	38	90	30
Phosphamidon	60	75	84	33	96	39	44	92	32
Thiometon	22	44	65	2	0	0	0	78	0
	46	61	66	18	90	23	26	90	0

^d(1) 19 + 1 Hexane : acetone; (2) 9 + 1 hexane : acetone; (3) 6 + 1 hexane : acetone; (4) petroleum ether (40 to 60°C) ; d(5) 0 + 1 cyclohexane : acetone; (6) cyclohexane; (7) petroleum ether (40 to 60°C); (8) 9 + 1 cyclohexane : acetone; and (9) 20 + 1 hexane : liquid paraffin. S = silica gel, K/S = 1 + 1 Kietselguhr : silica gel, and K/A = 1 + 1 Kietselguhr : alumina.

Source : Cited in Abbott and Thomson (3).

* طرق التطبيق والكشف عن مجموعات المبيدات المختلفة :

* ١ - الكشف عن المبيدات الكلورينية :

يتطلب الكشف عن المبيدات الكلورينية تنظيف جيد للعينة قبل اجراء الفصل الكروماتوجرافي وتتوقف طريقة الفصل على نوع المبيد والعينات المحتوية عليها ، ومن المعروف ان المواد الموجودة في المستخلصات مثل الزيوت والصبغات تتداخل مع طرق التقدير مع نترات الفضة والكشف بالاشعة فوق البنفسجية . المواد المتداخلة قد تتفاعل مع نترات الفضة أو تحجب مقدرة المركبات على الكشف بالفلورسنت والطرق المستخدمة بسيطة وتتطلب خطوة واحدة للرش لظهور البقع . يجب ان يدوم اللوح وان يكون ذا نوعية جيدة حتى يحتفظ بالكروماتوجرام لفترة كافية ويحتفظ باللوح للتصوير او للرجوع المستقبلي عند ظهور اى مشكلة قانونية . يمكن اظهار البقع بمحلول نترات الفضة « محلول ميتشل المعدل » المكون من ١,٧ جم نترات فضة تذاب في ٢٠ مليلتر ماء ثم يضاف ١٠ مليلتر ٢ - فينو كسي ايثانول ثم تخفف الى ١٩٠ مليلتر بالاسيتون وقبل الرش يضاف ١ مليلتر من محلول ايدروكسيد الامونيوم المركز الى ١٩ مليلتر نترات فضة من المحلول القياسي ويحتفظ بالمحلول في مكان مظلم في زجاجات الجواهر الكشافة . يمكن استخدام البرومين او الفلوريسين او ازرق البروموفينول بلو مع محلول نترات الفضة . كما يستخدم الرودامين Rhodamine وكذلك الاشعة فوق البنفسجية للكشف عن المبيدات الكلورينية .

* ٢ - الكشف عن المبيدات الفوسفورية العضوية باستخدام نترات الفضة :

استخدم الجواهر الكشاف نترات الفضة رشا مع البروموفينول بلو او الاستر الايثايل للتترايبروموفينولفتالين للكشف عن المركبات الهالوجينية والفوسفورية العضوية كذلك . توضح الجداول (٦، ٧) مقارنة للفصل بين طريقة نترات الفضة وتثبيت الانزيم على الالواح الزجاجية المغطاء TLC . يتضح من الجداول ان طريقة التثبيت الانزيمي اكثر حساسية من نترات الفضة في الكشف عن المشتقات الاكسجينية محل التقدير والكشف .

* ٣ - الكشف عن المركبات المحتوية على الكبريت او استرات حمض الفوسفوريك :

يمكن استخدام محاليل ايود وبلاتينات ، كلوروبلاتينات ، ٦,٢ - داى برومو - ن - كلورو - بارا - بنزوكوينون امين أو ن ، ٦,٢ - تراى كلورو - بارا - بنزوكوينون امين للكشف عن مركبات الثيوفوسفات والثيوكرامات . يحضر الايودوبلاتينات بخلط ٣ مليلتر من محلول كلوريد البلاتينيوم ١٠ ٪ مع ٩٧ مليلتر ماء ثم يضاف ١٠٠ مليلتر ٦ ٪ يوديد بوتاسيوم ويرج ويخزن في الظلام .

* ٤ - الكشف عن الروتينون :

يمكن الكشف عن الروتينون على الالواح الزجاجية المغطاء باستخدام الجواهر الكشاف Dragendroff's reagent الذى يحضر من كربونات البزموت (٦, ٢ جم) ويوديد الصوديوم (٧, ٠ جم) ويغلى المخلوط لعدة دقائق مع ٢٥ مليلتر من حامض الخليك الثلجى . بعد ١٢ ساعة

جدول (٦) : حدود الكشف عن ١٤ مييد فوسفورى باستخدام الألواح الزجاجية والإنزيمات ونواتر الفضة والبروموفينول بلو

المبيد Pesticide	حدود التقدير		TLC-EI ^a
	نترات الفضة AgnO ₃	بروموفينول bromophenol ble	
Azilnphosmethyl		100	n.d.
Azilnphosmethyl-oxon		100	0.001-0.025
Coumaphos		500	n.d.
Coumaphos-oxon		500	0.01-0.1
Malathion		100-200	n.d.
Malaoxon		100	2-10
Medthyl parathion		100	n.d.
Methyl paraoxon		100	0.5-2
Parathion		100-200	n.d.
Paraoxon		100	0.025-0.5
Ronnel		100	n.d.
Ronnoxon		500	0.025
Narlene		100	n.d.
Ruelene		100	0.1-0.25

^an.d. = not deterctable; p = s analogs were detected only after reaching with N-bromosuccinimide or bromine.

Source : From El-Refai and Hopkins (18).

جدول (٧) : حدود الكشف بالألواح والإنزيمات والطرق الكيميائية مع ٢٣ مبيد آفات

المبيد Pesticide	حدود التقديرات (نانوجرام)	
	الطرق الإنزيمية Enzymatic ^a method	الطرق الكيميائية Chemical ^b method
Promophos	8	200
Dichlorvos ^c	300	ND
Dimethoate	14	500
Methyl paraoxond	10	ND
Parathion	6	700
paraoxon ^c	5	ND
Disulfoton	40	70
Ethion	60	400
Azinphosmethyl	20	100
Malathion	800	500
Methyl Trithiuon	50	50
Phorate	600	100
Mevinphos ^c	100	ND
Ronnel	10	900
Diazinon	50	200
Aldicarb ^d	50	800
Azinphosethyl	7	100
Carbophenothion	10	400
Famphur	200	600
Dimethenthoate	100	100
Dursban	90	900
Abate	80	1,400

^aPesticides resolved on TLC plates (250- μ g thick layer of alumina G (Merck) type E) were exposed to bromine vapor before enzymatic detection.

^bND = not detected with the tetrabromophenol-phthalein ethyl ester and silver nitrate spray solution.

^cOxygen analogs.

^dA carbamate.

Source : From Leoni and Puccetti (19).

يرشح المحلول للتخلص من بللورات خلاات الصوديوم المترسبة ثم يؤخذ ٢٠ مليلتر من المحلول الرائق ويضاف اليه ٨ مليلتر من خلال الايثيل . عند الرش يخلط ١٠ مليلتر من المحلول السابق ويخلط مع حامض الخليك الثلجي (٢٥ مليلتر) مع خلاات الايثيل (٦٠ مليلتر) . بعد الرش تظهر بقع من مركبات الالكالويد والمركبات الخالية من النيتروجين .

* ٥ - الكشف عن البير ثرينات والمنشط برونيل بيوتوكسيد :

يمكن استخدام محلول رش يحتوى على احماض الفوسفوريك والتانيك والخليك للكشف عن البيرثرينات حيث تعطى لون وردى وكذلك البرونيل بيوتوكسيد التى تعطى بقع زرقاء . يحضر محول الفوسفوموليبيديك - تانيك - اسيتيك بخلط ٣ مليلتر من حمض الفوسفوريك ٨٥٪ مع ١ مليلتر من حمض التانيك ٠,٣٣٪ فى حمض الخليك (وزن /حجم) مع ٢٦ مليلتر اسيتون . ويحضر هذا المحلول مباشرة قبل الاستخدام . وهناك جواهر كشافه اخرى ، ويحضر محلول الفوسفوموليبيديك آسيد من ١٠ جم حمض فوسفوموليبيديك فى ١٠٠ مليلتر من الايثانول قبل الاستخدام مباشرة .

* ٦ - طرق جديدة مع اللواح الزجاجية المغطاة :

(أ) طريق اللواح TLC مع النشاط الانزيمى EI :

يستخدم هذا التكنيك (TLC - EI) مع المركبات ذات النشاط فى تثبيط الانزيمات ومثال ذلك المبيدات الفوسفورية والكارباماتية . عادة تتحول المشتقات الكيرتية (فو = كب) للمبيدات الفوسفورية الى مشتقات اكسجينية (فو = أ) قبل الرش بالانزيم على اللوح الزجاجى لأن هذه المشتقات مشطبات قوية جدا للانزيم . وبعد التحويل تعرض اللواح للأشعة فوق البنفسجية أو البرومين . يزال البرومين الزائد قبل رش اللواح بمحلول الانزيم . يمكن استخدام جواهر كشافه اخرى لتحويل المركبات الى متبسطات قوية . يقوم الأشعة فوق البنفسجية بتنشيط معظم المركبات فو = وتحويلها وتحويلها الى فو = أ ولكنها تعمل على انهيار مبيدات الكابامات .

توجد مصادر عديدة للاسترازات التى تصلح مع طريقة TLC - EI ومنها كبد الجاموس والخنازير والدواجن والقروود والفئران . يجب ان يكون الكبد طازجا لضمان عدم انهيار الانزيم . كذلك تعتبر بلازما الدم او السيرم أو رؤوس النمل والذباب مصادر ممتازة للاسترازات الحساسة للتنشيط بالمبيدات . وهناك التربسين والفوسفاتيز متاحة تجاريا ، قبل الرش تخفف المستخلصات الانزيمية بمحلول ٠,٠٥ مولر ذات الحموضة ٨,٣ البارد . للحصول على النشاط المطلوب على لوح الزجاج . كما يجب اختبار نشاط المستخلص الانزيمى لتحديد درجة التخفيف المناسبة . يمكن تخزين مستخلص الكبد لأكثر من عام دون حدوث فقد مؤثر للنشاط الانزيمى وبعد ذلك يتوقع حدوث فقد كبير . أى رشاش يصلح ويشترط الا يسيل محلول الرش من على اللواح ويترك لتجف تحت درجة حرارة الغرفة .

تستخدم المواد الملونة المختلفة لظهور البقع مثل ١ - نافثيل اسيتات ، اندوكسيل اسيتات ، اندوفينيل اسيتات ، حيث تذاب في الميثانول او الاليتون او الايثانول . خلال دقائق قليلة تظهر بقع او مساحات تحدد اماكن المبيدات على خلفية ملونة . حيث ان المبيدات تثبط النشاط الانزيمي في هذه البقع يقف التحلل المائي للمادة الملونة ومن ثم لا ينتج لون . اذا استخدم دليل الحموضة مثل البروموفينول بلو تظهر بقع زرقاء على خلفية صفراء أو خلفية عديمة اللون . تظهر البقع زرقاء طالما لم يحدث تحلل مائي للشق الحامضي من المادة الوسيطة . في بعض الطرق يرتبط الوسيط الانزيمي مثل ١ - نافثول مع ملح الديازدينوم منتجا مركبا ازو ذات لون غامق . الاندوكسيل او اندوفينيل اسيتات من احسن المواد الوسيطة لتكنيك TLC-EI حيث انها لا تحتاج لأي مواد اخرى لتكوين اللون .

الالواح التي رشت بالاندوكسيل اسيتات يمكن رشها بالبرومين بمجرد الحصول على البقع وهذه الخطوة ضرورية لايقاف التفاعل الانزيمي . الجداول التالية توضح حساسية الطرق الانزيمية مع الواح الزجاج المغطاة في الكشف عن المركبات .

جدول (A) : تثبيط الاستزازات بالمبيدات مع المعاملة بالبروتين أو بدونه وحدود التقدير على السليكا جيل GR HR

Pesticide	No bromine (N, Br) or with bromine (Br)	Inhibition ^{b,c}					Detection limit with beef esterase (ng)
		Beef	Sheep	Pig	Monkey	Chicken	
Dichlorvos : 8	N.Br Br	+	+	+	+	+	---
		+	+	+	+	+	2
Dimethoate : 10,000	N.Br Br	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	---
		+	+	+	+	+	8,000
Dimethoxon : 10,000	N.Br Br	+	+	+	+	+	---
		+	+	+	+	+	8,000
Demeton-S sulfone : 50	N.Br Br	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	---
		+	+	+	+	+	10
Carbaryl : 1	N.Br Br	n.d.	n.d.	+	T	T	---
		+	+	+	T	+	0.
Ethion : 10	N.Br Br	+	+	+	+	+	---
		+	+	+	+	+	1

Pesticide	No bromine (N, Br) or with bromine (Br)		Inhibition ^{b,c}					Detection limit with beef esterase (ng)
	Beef	Sheep	Pig	Monkey	Chicken			
Oxydemetonmethyl : 50	N.Br	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	---	
	Br	+	+	+	+	n.d.	50	
Demeton : 50	N.Br	n.d.	n.d.	+	+	n.d.	---	
	Br	+	+	+	+	n.d.	20	

^dFigure after each pesticide name was amount (ng) spotted on plates.

^b + = detectable; n.d. = not detectable ; T = detection with enzyme extracted with gris buffer, not with water; - = tested, 5-bromoindoxyl acetate was used as substrate.

^cEsterases were extracted with 0.01 M tris buffer at pH 7.2 or with distilled water and centrifuged at 2000 to 3000 g.

Source : From Mendoza et al. (37)

جدول (٩) : حدود التقدير لخمسة وعشرون مبيد فوسفوري باستخدام ثلاثة انواع من الكولين استريز ChE .

pesticide	Amount detected ^d (ng)		
	Horse serum ChE	Bovine erythrocyte ChE	Eel ChE
Naled	1	1	10
Dichlorvos	5	30	40
Dimethoate	300	200	200
Dimethoxon	50	50	100
Methyl parathion	30	1	10
Parathion	1	1	1
Demeton-O	1,000	2,000	50
Trichlorfon	1,000	1,500	1,000
Coumaphos	1	20	10
Disulfoton	50	50	50
Ethion	1	100	100
Azinphosmethyl	1	1	1
Malathion	35	1	1
Phorate	5	50	30
Mevinphos	10	5	10
Ronnel	5	100	200
Diazinon	1	50	30
Carbophenothion	5	50	50
Phosphamidon	10	200	10
Pensulfothion	5	20	50
Dyfonate	50	10	20
EPN	5	10	5
Fenthion	100	500	300
Dioxathion	10	200	100
Famphur	20	50	100

^dPesticides resolved on silice gel G or GF; the enzyme substrate was indoxyl acetate.

Source : From Gardner (38).

جدول (١٠) : حدود التقدير لاثني عشر مييد كارباماتي على طبقات كيسلجيل G-HR بطريقة TLC-EI مع مستخلصات كبد الخنزير .

Pesticidea	Liver extracts			
	Pig		Steer	
	Frozen	Frozen-dried	Frozen	Freeze-dried
Aldicarb	50 (±)b	100 (±)	100 (±)	100 (±)
	30 (-)	50 (-)	50 (-)	50 (-)
Banol	0.5 (±)	15 (±)	5 (±)	10 (±)
	0.1 (-)	1 (-)	1 (-)	5 (-)
Baygon	10 (±)	50 (±)	100 (±)	100 (±)
	5 (-)	10 (-)	50 (-)	50 (-)
Carbaryl	0.1 (±)	0.5 (±)	0.5 (±)	5 (±)
	0.05 (-)	0.1 (-)	0.1 (-)	1 (-)
Carbofuran	1 (±)	50 (±)	100 (±)	100 (±)
	0.5 (-)	10 (-)	50 (-)	50 (-)
Carbofuran 3-OH	10 (±)	100 (±)	100 (±)	400 (±)
	5 (-)	50 (-)	50 (-)	300 (-)
Matacil	10 (±)	50 (±)	50 (±)	50 (±)
	5 (-)	10 (-)	10 (-)	10 (-)
Mesuroil	0.1 (±)	10 (±)	10 (±)	10 (±)
	0.05 (-)	5 (-)	5 (-)	5 (-)
Mobam	0.5 (±)	1 (±)	5 (±)	5 (±)
	0.1 (-)	0.5 (-)	1 (-)	1 (-)
Ortho 5353	1 (±)	5 (±)	5 (±)	5 (±)
	0.1 (-)	0.5 (-)	1 (-)	1 (-)
Tranid	100 (±)	400 (±)	300 (±)	100 (±)
	50 (-)	400 (-)	200 (-)	50 (-)
Zectran	100 (±)	500 (±)	300 (±)	100 (±)
	50 (-)	400 (-)	200 (-)	50 (-)

aTranid = 5 - chloro-6-oxo-2-norbornanecarbonitrile 0- (methylcarbamo-
 yl) oxime (Union Carbide), 99.9%. Zectran = 4-dimethylamino-3,5-xylyl
 methylcarbamate (Dow Chemical Company, The Agricultural Products De-
 partment, Midland, Mich.), 99%. All the standards were dissolved in metha-
 nol and kept in refrigerator.

b(+) = TLC spots corresponding to the areas where enzymes were in-
 hibited lasted 5 min; (++) = lasted more than 5 min but less than 30 min;
 (+++) = 30 min or more. (±) = spots lasted 1-2 min, and (-) = no enzyme in-
 hibition detected. TLC plates were coated with 450-m-thick layer of kiesel-
 gel G-HR. the solvent was 20% acetone in cyclohexane.

Source : From Mendoza and Shields (36).

جدول (١١) : حدود الكشف عن المبيدات الحشرية الكلورينية مع المعاملة بالأشعة فوق البنفسجية UV أو بدون .

Pesticide	Detection Limit (μg)			
	Without UV		With UV	
	Bovine liver esterase	Trypsin	Bovine liver esterase	Trypsin
p,p'-DDT	5 ^a	100 ^c	1	6
p,p'-DDE	5 ^a	100 ^c	1	6
p,p'-DDE	6 ^a	---	1	6
Dicofol	1	70	1	6
Methoxychlor	5 ^a	70	1	6
Perthane	2 ^a	---	1	6
BHC	---	---	1	5
Lindane	1	---	0.25	20
Isodrin	50	100 ^c	0.25	6
Endrin	50	---	0.3	7
Aldrin	10	100 ^c	0.25	5
Dieldrin	1	---	1	7
Heptachlor	1	---	0.25	5
Heptachlor epoxide	1 ^b	---	0.3 ^c	7
Chloridane	5 ^b	---	1 ^b	9
Isobenzan	5	---	0.25	6
Endosulfan	5	---	0.3	7
Toxaphene	1 ^b	---	1 ^b	20

aActivation of enzyme.

bSpots tailing

^cNot clearly detected.

Source : Data from Geike (38, 40).

ب (طريقة الالواح والانزيم الغير مباشرة : An Indirect TLC-EI

ليست مفيدة بنفس قدر الطريقة المباشرة وفيها تطبع البقع التي تحدثها المبيدات المثبطة للانزيم على الالواح الزجاجية على ورق ترشيح باستخدام جوهر كشاف معين يمسك على اللوح .. والجدول (١٢) يوضح الفرق بين هذه الطريقة وغيرها مع ١٧ مبيد فوسفورى .

جدول (١٢) : حدود تقدير ١٧ مبيد فوسفورى على السليكا جيل H بثلاث طرق للكشف .

Pesticide	Detection Limit ^a (µg)		
	Method A ^b	Meghod B ^b	Method C ^b
Azinphosmethyl	0.5	0.1 (blue)	1
Demeton-O	0.2	0.2 (mauve)	1
Demeton-5	0.5	0.2 (blue)	1
Diazinon	0.1	0.2 (Mauve)	0.2
Dimethoate	0.2	0.1 (blue)	0.2
Ethion	0.5	<0.1 (mauve)	1
Malathion	0.5	0.1 (mauve)	1
Mevinphos	0.2	n.d.	1
sMorphothion	1	<0.1 (blue)	0.2
Methyl parathion	0.5	0.1 (mauve)	1
Phenkapton	0.2	0.1 (blue)	1
Phorate	1	0.2 (blue)	1
Phosphamidon	1	0.2 (blue)	n.d.
Ronnel	0.1	0.2 (mauve)	n.d.
Schradan	n.d.	n.d.	n.d.
Vamidothion ^c	n.d.	0.1 (blue)	0.2
Vamidothion sulfone ^c	n.d.	0.1 (blue)	0.2

^an.d. = not detectable.

^bA = indirect TLC-EI technique; B = bromothymol blue-UV light;
C = bromothymol blue-bromine; colors of spots in parentheses.

^cDesignation used by author in literature cited.

Source : From Bunyan (24)

(ج) اللوح المغطاة ذات البعدين Two dimentional TLC :

استخدم هذا التكنيك للكشف عن البيروثرويد والمركبات الاخرى .. وتوضح الجداول (١٣) ، (١٤) قيم الانسياب لبعض البيروثرويد والمبيدات الفوسفورية . فى هذا التكنيك يتم التطور فى المحلول المتحرك مرتان فى اتجاهان ١ - .

(د) اللوح ذات الوسط المعكوس Reverse-phase TLC :

استخدم هذا التكنيك للكشف عن المبيدات حيث يتم تشميع او تغليف اللوح المغطاة بحمض السليسيك بزييت او زيت السليكون (وسط ثابت) قبل الفصل . الجدول (١٥) يحتوى على قيم الانسياب RF للمبيدات مع هذا النظام .

جدول (١٣) : يتم الانسياب RF $100 \times$ لمركبات البيروثرويدز مع ٣ : ١ هكسان : خلاص الإثيل

Compound	First development	Second development
Pyrethrin I	50	60
11	30	41
Cinerin I	57	72
11	35	49
Pyrethrin I peroxide	--	23
II peroxide	--	11
Cinerin I peroxide	--	37 (23)
II peroxide	--	17
"Lumipyrethrin"	--	0
Allethrin	48	--
Piperonyl butoxide	35	--
Bucarpolate	23	--
S 421	67	--
Butter yellow	42	53
Indophenol	35	45
Sudan red G	27	36

Source : From Stahl (41).

جدول (١٤) : متوسط قيم الإنسياب RF للمبيدات الفوسفورية على الواح السليكاجيل

Pesticide	Rf values ^{b,c}	
	Solvent I	Solvent II ^d
GROUP I		
Ronnel	0.91	0.83
Carbophenothion	0.90	0.50, 0.88
Carbophenothion oxygen analog		0.88
Carbophenothion oxygen analog sulfoxide		0.50
Plhorate	0.79	0.47, 0.90
Dyfonate	0.75	0.61
Ethion	0.74	0.41
EPN	0.74	0.82
Fenthion	0.71	0.05, 0.25
Disulfoton	0.71	0.22
Parathion	0.67	0.72
Methyl parathion	0.60	0.56
Thiono demeton	0.45	0.82e
Dioxathion	0.16, 0.35f	0.26, 0.37
Coumaphos	0.24	0.59
Malathion	0.12	0.65
Azikhphosmethyl	0.07	0.44
Diazinon	0.07	0.53
GROUP II	Solvent II	Solvent III^d
Famphur	0.87	0.64
Naled	0.82	0.96
Thiol demeton	0.76	0.52
Dichlorvos	0.70	0.89
Mevinphos	0.54	0.79
Phosphamidon	0.23, 0.48 ^f	0.51, 0.77
Dasanit	0.40	0.66
Dimethoate	0.34	0.13
Trichlorfon	0.25	0.55, 0.89
Dimethoate oxygen analog	0.05	0.13

^aAverage of 10 determinations. Chromatography performed using a sandwich chamber at 23 to 26°C and from 50 to 65% relative humidity. Detection by horse serum cholinesterase inhibition and p-NBP.

^bSolvent systems : I = toluene, II = 25% heptane in ethyl acetate, III = ethyl acetate.

^cRf values of all group II pesticides in solvent system I were less than 0.05. Rf values of group I pesticides in solvent system II (development before oxidation) were greater than 0.85.

^dRf values of bromine oxidation products.

^eNonreproducible Rf value. May depend on concentration of bromine.

Two spots were present with both detection reagents. highest Rf value for phosphamidon represented stronger inhibitor, but p-NBP indicated it was a minor component.

Source : From Gardner (38)

Table 15. Rf (x 100) Values of Some Organic Phosphate Insecticides by Reverse-Phase Thin-Layer Chromatography^a

Insecticide	Silicic acid-mineral oil	Silicic acid-silicone oil
Colep	20	37
EPN	12	25
Methyl parathion	35	50
Parathion	25	30
P-Nitrophenol ^b	65	87
Phjenol ^b	50	70

^aDeveloping solvent : ethanol-water (1 : 1 : 2).

^bReference materials.

Source : From Conkin (2)

(هـ) تسجيل الكروماتوجرام : Revording of the chromatogram

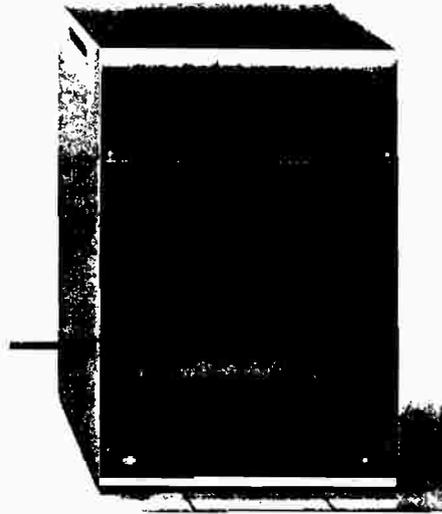
يمكن تسجيل الكروماتوجرام بطرق متعددة منها التحوير أو التصوير الفوتوغرافي أو الرسم بالأشعة أو قياس الكثافة الضوئية « سبكترودينسيومتري » أو تسجيل قيم الانسياب Rf ومساحة البقع . يجب تسجيل نوعية وكثافة الكروماتوجرام ويمكن تصنيفها إلى باهت ± Faint أو كثيف ± intense أو كثيف جدا ++ very intense .. يمكن تسجيل لون البقعة وخلفية اللوح كما يجب ملاحظة الوقت الذي فصلت فيه البقعة ودوامها . يمكن تحديد مكان البقعة في حالة ما إذا كانت ستختفي أو ستكشف بعد ذلك للتقدير الكمي .

(و) التحديد الكمي للكروماتوجرام Quantitation :

هناك طرق مختلفة للتقدير الكمي للمركبات بعد الفصل على الألواح المغطاة TLC . من هذه الطرق مقارنة مساحة المركب الغير معروف في مقابل المساحة الخاصة بالكمية المعلومة للمركب القياسي المقارن للمجهول . بالطبع يجب تعريف المركب المجهول قبل عمل هذه المقارنة . ولقد قارن kumar وآخرون عام ١٩٧٦ مساحة ووزن البقع والطرق اللونية للباراثيون كيارا او كسون . واطهرت العلاقة بين مساحات التثبيط بالمليمتر المربع او الملليجرام في مقابل تركيز الباراثيون علاقة خطية في حدود ٥ الى ٥٠ نانوجرام باراثيون .

هناك طريقة اخرى تتمثل في قياس الكثافة الضوئية للمساحة على اللوح حيث تم وضع المبيد باستخدام جهاز قياس الطيف . يمكن استخدام المركبات المشعة والكشف عنها على الواح TLC بواسطة العداد المناسب مباشرة او بعد كشط الجيل .

استخدم نترات الفضة ونظام DTLC-EI لتقدير المبيدات الفوسفورية المحتوية على الكلورين في الجزئ .



شكل (١٠) : جهاز قياس النشاط الإشعاعي على الألواح المغطاة TLC

يمكن أيضا استخدام الكروماتوجرافى الغازى السائل GLC للتقدير الكمى للمبيدات بعد فصلها من على الجيل وتنظيفها خاصة فى حالة المبيدات الكلورينية . ويوضح الجدول رقم (١٦) معدلات الاسترجاع لهذه المبيدات على السليكاجيل او الالومينا . يمكن ايضا بعد كشط البقع المفصولة ان تجرى عليها عمليات تحليل مائى ونفاعلها وتحويلها الى مشتقات ثم تذاب فى مذيب عضوى مناسب والكشف بالكروماتوجرافى الغازى .

استخدم Seifert and Davidak عام ١٩٧١ الطرق البولاروجرافية فى التقدير الكمى للفينتروثيون والفيترواكسون بعد الكشف والفصل بالـ TLC-EI والتنظيف من خلال عمود الكروماتوجرافى وتراوح الانحراف القياسى ٢٦٪ بينما وصل الانحراف فى البلاينميتر ٢٠٪.

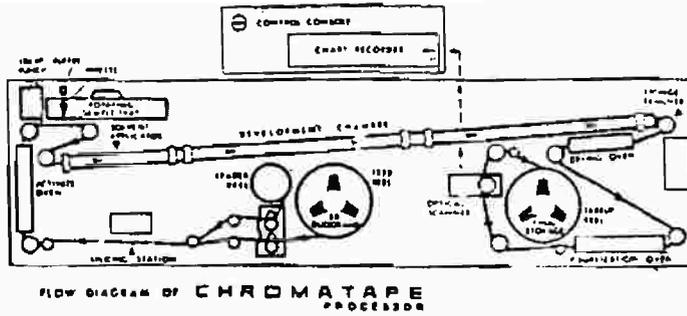
جدول (١٦) : معدل الإسترجاع للمبيدات على الواح الكروماتوجرام

pesticide	layerq	Percent recovery				
		Hexane	Acetone	Ethyl acetate	Dichloromethane	Chloroform
Gamma-BHC.	S	82	72	64	51	61
	A	77	65	64	43	57
p,P'-DDT	S	96	89	89	80	89
	A	87	75	83	84	
Dieldrin	S	94	97	91	88	92
	A	88	79	84	82	
Endrin	S	94	98	93	88	94
	A	88	80	85	84	
Heptachlor epoxide	S	92	89	84	74	80
	A	84	72	76	75	
p,P'-TDE	S	99	95	89	86	93
	A	87	77	82	83	
p,P'-DDE	S	95	97	98	90	95
	A	88	79	83	84	

aS = silica gel G; A = alumina G. Quantitation by gas-liquid chromatography.

Source : From Harrison (28).

والان .. تقسم البقعة المفصولة الى مساحات صغيرة جدا وتقاس بالدنيسيوميتير حتى نقلل من احتمالات الانحراف القياسى . حديثاً ظهرت فى المعامل وحدات متكاملة تعمل آليا (شكل - ١١) تقوم بوضع النقط والفصل والاظهار وقياس الكثافة الضوئية أوتوماتيكيا .



* ٧ - الاختبارات التأكيدية Confirmation :

يمكن فصل المركب القياسي مع المركب محل الاختبار للتأكد من التعريف . كذلك يمكن كشط البقعة وتحليلها بالكروماتوجرافي الغازي مع المركب القياسي . يمكن استخدام Gc-mass (الكروماتوجرافي الغازي مع طيف الكتلة) وهذا يمكن عمله قبل او بعد الفصل بالالواح او بالك . كذلك يمكن استخدام التحليل بالأشعة تحت الحمراء للتأكد كما في حالة مبيد الروتينون .

* ٨ - العوامل التي تؤثر على كفاءة الفصل بالـ TLC :

* العوامل التي تؤثر على قيم معامل الانسياب Rf كما يلي :

- ١ - نوع مادة الامصاص (الوسط الثابت)
- ٢ - نوع المذيب او مخلوط المذيبات (الوسط المتحرك)
- ٣ - نوع الوسط الغير متحرك (الزيت المعدني او السليكون) .
- ٤ - درجة الحرارة (جدول ١٧) .
- ٥ - الضغط البخاري (تشبيح المذيب) في حجرة الكروماتوجرافي .
- ٦ - سمك طبقة الجيل .
- ٧ - النشاط السطحي للجيل في ادمصاص المركب محل الكشف .

* العوامل التي تؤثر في الكشف عن المركب detection :

- ١ - كمية المركب تحت الاختبار على لوح الـ TLC .
- ٢ - انهيار أو تنشيط مركب الاختبار خلال الكروماتوجراف .
- ٣ - المواد المتداخلة مثل الزيوت والصبغات في المستخلص .
- ٤ - نوع مادة الامصاص .
- ٥ - الملوثات على اللوح الزجاجي او على طبقة الجيل او في حجرة الكروماتوجرافي او في المعمل

جدول (١٧) : إختلاف قيم RF مع حرارة الكشف

Compound	Rf x 100 at temperature (°C)					
	-20	0	10	20	30	40
Aldrin	33	55	68	77	85	90
p,P'-DDE	27	49	60	70	80	90
o,P'-DDT	20	37	50	58	68	77
p,P'-DDT	17	31	40	48	58	70
Dieldrin	1	7	10	12	12	12
Endrin	2	9	10	11	12	12
Heptachlor	22	45	55	65	75	86

Source : From Abbott et al. (42).

جدول (١٨) : جدول الكشف للمركبات الفوسفورية العضوية مع وبدون المعاملة

Resticide	Detection limit (ng/a)				
	No treatment	Bromine vapor (0.5 min)	Bromine water (15 min)	UV light (20 min)	Aqueous ammonia (15 min)
Butonate	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5
Coumaphos	n.d.	5	1	1	n.d.
Coumaphos-oxon	0,05	0.5	0.05	0.05	0.1
Disulfoton	n.d.	7	5	50	n.d.
Ethion	n.d.	0.5	0.5	0.1	n.d.
Ethoxon	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1
Azinphosmethyl	n.d.	0.2	0.05	1	n.d.
Azinphosmethyl-oxon	0.02	0.2	0.02	0.02	0.02
Malathion	n.d.	0.k5	0.1	10	n.d.
Malaoxon	0.05	0.5	0.05	0.05	0.05
oxydemetonmethyl	10	10	10	10	10
Methyl Trithion	n.d.	0.5	0.05	1	n.d.
Methyl Trithion-oxon	0.5	2	1	0.5	1
Phorate	n.d.	5	5	50	n.d.
Phoratoxon sulfone	1	5	2	1	2
Mevinphos	0.1	n.d.	n.d.	1	n.d.
Ronnel	n.d.	1	0.05	5	n.d.
Ronnoxon	0.05	0.5	0.05	0.05	0.1

an.d. = not detectable.

Source : Form Ackerman (41).

جدول (١٩) : تأثير البرومين والأشعة فوق البنفسجية على مصل ١٢ مييد كارباماتي ثم وضعه على الكيسلجين والرث بمستخلص الكبد

Compounds	Levels Evaluated (ng)	Br ₂	UV
Aldicarb	1000	Slight decrease	Decrease
Banol	10	Decrease	Decrease
Baygon	100	Decrease	Decrease
Carbofuran	10	Increase	Decrease
Carbofuran 3-OH	1000	Slight increase	Decrease
Mesurol	10	Slight increase	Decrease
Mobam	10	No change	No change
Ortho 5353	100	No change	No change
Tranid	100	No change	No change
Zectran	100	Decrease	Decrease

Source : From Mendoza and Shields (36).

- ٦ - تلوث الحفنة أو محقن العينة أو زجاجة العينة والمذيبات المستخدمة لاذابة العينة .
- ٧ - الشوائب فى الوسط المتحرك .
- ٨ - السمك الغير مناسب للجيل .
- ٩ - تداخل قيم الانسياب RF .
- ١٠ - نوعية وكمية جوه الكشف (يجب استخدام محلول الانزيم او محلول الرش الملون المجهزة حديثا (الطارجة) .
- ١١ - وقت التعرض الى العوامل المنشطة مثل الاشعة فوق البنفسجية UV او البرومين او اليود (يجب تقدير فترة التعرض المثلى لهذه العوامل) .
- ١٢ - الشوائب فى الغاز المستخدم لتركيز العينة .
- ١٣ - نوع المنشط (جدولى ١٨ ، ١٩) .
- ١٤ - نوع الجواهر الكشافة الخاصة بالاظهار .
- ١٥ - نوع الانزيم المستخدم فى طريقة TLC-EI .

قائمة المراجع REFERENCES

- 1 . Stahl, thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook, Springer Verlag, Berlin, 1965, p. 553.
- 2 . R.A. Conklin, Residue Rev. 6, 136 (1964).
- 3 . D.C. Abbott and J. Thomson, Residue Rev. 11, 1 (1965).
- 4 . J.J. Wise, in Analytical Methods for Pesticides, Plant Regulators and Food Additives, Vol. 5 (G. Zweig, Ed.). Academic Press, New York, 1967, p. 47.
- 5 . M.E. Getz, in Advances in Chemistry Series 104 (R.F.Gould, Ed.). American Chemical Society, Washington, D.C., 1971, p. 119.
- 6 . C.E. Mendoza, J. Chromatogr. 78, 29 (1973).
- 7 . K. Macek, I.M. Hais, J. Kopecky, and J. Gasparic, J. Chromatogr. Suppl. (1968).
- 8 . K. Macek, I. M. Hais, J. Kopecky, J. Gasparic, V. Rabek, and J. Churacek, J. Chromatogr, Suppl. 2, 532 (1972).
- 9 . K. Macek, I. M. Hais, J. Kopecky, V. Schwarz, J. Gasparic, and J. Churacek, J. Chromatogr. Suppl. 5, 340 (1976).

- 10 . C.E. Mendoza, Residue Rev. 43, 105 (1972) .
- 11 . C.E. Mendoza, Residue Rev. 50, 43 (1974).
- 12 . C.E. Mendoza, P. J. Wales, and D. F. Bray, Analyst, 93, 638 (19k68).
- 13 . R. J. Hurtubise, kP.F. Lott, and J. R. Dias, J. Chromatogr. Sci. 11, 476 (1973).
- 14 . P.F. Lott, J. R. Dias, and R. J. Hurtubise, J. Chromatogr. Sci. 14, 488 (1976).
- 15 . H.G. Lowelady, Microchem, J. 14, 22 (1969) .
- 16 . D. J. Hamilton and B. W. Simpson, J. Chromatogr. 39, 186 (1969).
- 17 . A. Gruene, K. Nendel, Th. Pahi, K. Schubert, and G. Woff, J. Riechst. Aromen. Doerperflegem 19, 4949, 496, 498, 500 (1969).
- 18 . A E]-Refai and T.L. Hopkins, J. Agric. Food Chem. 13, 477 (1965).
- 19 . V. Leoni and G. Puccetti, II Farmaco 26, 283 (1971).
- 20 . R.W. Frei and P.E. Belliveau, J. Chromatogr.,. 5, 392 (1972).
- 21 . S. Sinnappa and E. T. Chang, Malaysian Agric. 48, 20 (1971).
- 22 . B.M. Olived, J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 65, 915 (1973).
- 23 . C.E. Mendoza and J. B. Shields, J. Agric. Food Chem. 21, 178 (1973).
- 24 . P.J. Bunyan, analyst 89, 615 (1964) .
- 25 . D.G. Crosby, E. Leitis, and W.L. Winterlin, J. Agric. Food Chem. 13, 204 (1965).
- 26 . N.V.M. Kumar, dK. Visweshwaqriah, and S.K. Majunder, J. Assoc. Of- fic. Anal. Chem. 59, 641 (1976).
- 27 . Z. Stefanac, B. Stengl, and Z. Vasilic, J. Chromatogr. 124, 127 (1976).
- 28 . R.B. Harrison, J. Sci. Food Agric. 17, 10 (1966) .
- 29 . C. E. Mendoza, P. J. Wales, H. A. McLeod, and W. P. Mckinley, J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 51, 1095 (1968).
- 30 . J. Seifert and D. Davidek, J. Chrometogr, 59, 446 (1971).
- 31 . C.E. Mendoza, P. J. Wales, M. A. McLeod, and W.P. Mckinley, ana- lyst, 93. 34 (1968).

- 32 . H. Ackermann, B. Luxow, and E. Plewka, *J. Chromatogr*, 44, 414 (1969) .
- 33 . R. R. Goodall, *J. Chromatogr*, 78, 153 (1973).
- 34 . P. J. Wales, C. E. Mendoza, H. A. McLeod, and W. P. McKinley, *Analyst* 93, 691 (1968).
- 35 . N. Nash, P. Allen, A. Bevenue, and H. Beckman, *J. Chromatogr*. 12, 421 (1963).
- 36 . C. E. Mendoza and J. B. Shields, *J. Chromatogr*, 50, 92 (1970).
- 37 . C. E. Mendoza, P. J. Wales, D. L. Grant, and K. A. McCully, *J. Agric. Food Chem.* 17, 1196 (1969).
- 38 . A. M. Gardner, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 54, 517 (1971).
- 39 . F. Geike, *J. Chromatogr*, 44, 95 (1969).
- 40 . F. Geike, *J. Chromatogr*, 52, 447 (1970).
- 41 . E. Stahl, *Arch. Pharm.* 293/65, 531 (1960).
- 42 . D.C. Abbott, H. Egan, and J. Thomson, *J. Chromatogr*, 16, 481 (1964).
- 43 . H. Ackermann. *J. Chromatogr*. 44, 414 (1969).
- 44 . C.E. Mendoza, H. A. McLeod, J.B. Shields, and W. E. J. Phillips, *Pestic. Sci.* 5, 231 (1974)