

## الفصل السابع عشر

- استخدام تقدير المناعة في تحليل مخلفات مبيدات الآفات :

\* مقدمة

\* مميزات تكنولوجيا كيمياء المناعة .

\* استخدام الطريقة مع المبيدات الكيميائية .

\* توازن مميزات التحليل بالمناعة .

\* الاستخدامات في كيمياء المبيدات .

\* تحليل المركبات التي يصعب تحليلها بالطرق التقليدية .

\* تمييز المشابهات والمركبات القريبة .

\* تحليل سوائل جسم الانسان ومعلومات حيوية .

\* تحليل اعداد كبيرة من العينات .

\* التحليل السريع او / والميداني .

\* تحليل نواتج بحوث التكنولوجيا الحيوية .

\* التوصيات .

\* صلاحية التحليل بالمناعة .

\* ادخال التحليل المناعي في معامل التحليل .

\* اختيار المركبات الاولية للتحليل .

\* قائمة المراجع



# استخدام تقدير المكافحة في تحليل مخلفات مبيدات الآفات

## Utility of immunoassay in pesticide trace analysis

### مقدمة Introduction :

تستخدم طرق تقدير المكافحة على نطاق واسع في الكيمياء الحيوية وتحليلات الغدد الصماء وكذلك الكيمياء التشريعية ونادرا ما تستخدم في الكيمياء البيئية . والفشل السابق الذي عانى منه الكيميائيون المعنيون بعلوم البيئة من عدم الاستفادة من هذه الوسيلة التكنولوجية المتقدمة على نطاق واضح يرجع الى الخلفية التاريخية السابقة وليس الى عدم ملائمة هذه التكنولوجيا . وفي عام ١٩٨٠ اشار Hammock & Mumma الى مقدرة كيمياء المكافحة في تحليل المبيدات وعددوا نقاط قبولها . وبعد ٦ سنوات اظهرت العديد من الهيئات اهتماما كبيرا بهذا التكنيك على المستوى الاكاديمي والحكومي والمعامل الصناعية . وخلال الحقبة الزمنية الاخيرة بدأ استخدام تكنولوجيا كيمياء المكافحة في تناول المشاكل المتعلقة بالكيمياء البيئية في هذه المعامل . ونستطيع القول ان هذه التكنولوجيا لا تمثل العلاج الحاسم والشافى لكل المشاكل ولكنها تعتبر وسيلة مكملية لطرق التحليل التقليدية في مختلف المجالات . وتقدم هذه الوسيلة مميزات متعددة عما هو الحال مع الطرق الكلاسيكية المعروفة في حل بعض المشاكل وربما تكون الطريقة التكنولوجية الصالحة في بعض المجالات الاخرى .

وسنحاول في هذا المقال وصف كيفية عمل وتطوير طريقة التقدير المناعي لمخلفات المبيدات وغيرها بما يطلق عليه كيمياء المكافحة immuno chemistry مع القاء الضوء على مميزات وعيوب هذه التكنولوجيا مع الاشارة الى البحوث السابقة والحالية التي تجرى في معامل الحشرات والتوكسينولوجيا البيئية في جامعة كاليفورنيا لتقدير مخلفات المبيدات . وهذه التكنولوجيا وبساطة اسلوب بديل وغير مكلف لطرق التحليل التقليدية .

### مميزات تكنولوجيا كيمياء المكافحة Advantages of immunochemical technology :

طريقة تقدير المخلفات باستخدام اسلوب المكافحة يستخدم بوجه عام في كيمياء المبيدات ، وتميز هذه الطريقة بالحساسية والتخصص والدقة مما يحقق تحليل سريع ومناسب التكلفة كما انها قابلة للتطوير بما يتلاءم مع العديد من المشاكل الخاصة بالتحليل .

### \* استخدام الطريقة مع المبيدات الكيميائية Applicability to pesticide chemicals :

التقدير باسلوب كيمياء المكافحة تمثل الاستخدام الفوري للتكنولوجيا الحيوية biotechnology وبالرغم من ان هذه الطريقة تعتبر طريقة طبيعية physical استنادا الى قانون فعل الكتلة وليس حيوية bioassays الا انها تستمد حساسيتها الفائقة وتخصصها العالي الى النظم الحيوية biological systems التي تنتج الاجسام المضادة التي سوف ترتبط بالمرکبات التي

تملك قابلية كبيرة للارتباط بها . ومن المحتمل ان تستخدم طرق تكوين المناعة لتقدير تركيبات واسعة الاختلاف بدرجة تفوق ايا من تكنولوجيات التحليل الاخرى . وحيث ان قابلية الجسم المضاد للمركب المعنى بالتقدير تتوقف على مجموع مختلف التداخلات الغير تكافؤية non covalent يصبح من الصعوبة بمكان تجهيز الاجسام المضادة للجزيئات الصغيرة . ومن حسن الحظ عدم وجود حدود قصوى لحجم المركبات الممكن تحليلها . وحيث ان مجال مكافحة الآفات تتجه لاستخدام الجزيئات المخلفة المعقدة (مثل مثبطات النمو الحشرية الدايفلوبيزيرون والكلور سلفيرون) ونواجج التخمر مثل الافيرمكتين والبروتينات مثل توكسينات بكتريا الباسيلس ثورينجينسيز ، يصبح من الأهمية ايجاد طرق مقبولة لتحليل هذه الجزيئات الضخمة .

تحليلات المناعة تجرى عادة في محلول مائي ولذلك يجب ان يكون الجزئ المطلوب تحليله وتقديره ذو ثبات متوسط (على الاقل) في الماء . ومن المثير للدهشة ان الذوبان في الماء نادرا ما يعتبر مشكلة حيث انه حتى المركبات شديدة الحب للدهون Lipophilic غالبا ما تكون ذائبة في الماء عند تركيزات غاية في الصغر « البيكو pico أو الفيمتومولار Femtomolar » وهذه تلائم طريقة المناعة . وحتى المركبات شديدة القلة في الذوبان يمكن ان تكون في متناول الجسم المضاد في صورة جسيم دقيق micelles او مع مرافقات الانزيمات الذائبة في الماء . والمشاكل المصاحبة لتحليل المركبات عالية الذوبان في الدهون ترجع في العادة الى ازلتها من الوسط الزيتي بدرجة تفوق المشاكل الناجمة عن الذوبان المطلق . وكقاعدة عامة تستخدم تحليلات المناعة للكشف وتقدير الجزيئات التي يصعب تقديرها بالكروماتوجرافى الغازى السائل مما يضىء على هذه الطريقة اهمية كبيرة كتكنولوجيا مكتملة مثيرة للاهتمام . وبالرغم من سهولة ايجاد طريقة تحليل المركبات الذائبة في الماء الا انه يمكن القول وبدون استغراب ان تكنولوجيا كيمياء المناعة يمكن ان تستخدم لتحليل اى مركب . وبذلك تستخدم هذه التكنولوجيا بنجاح لتقدير مخلفات معظم مبيدات الآفات الشائعة في الوقت الحالى ومن المتوقع ان تلائم هذه الطريقة للجيل التالى من المركبات .

#### \* توازن مميزات التحليل : Balancing the advantages of immunoassay :

في عام ١٩٧٤ بدأت دراسات في معامل جامعة كاليفورنيا لتحديد امكانية استخدام تكنولوجيا كيمياء المناعة لتحليل مبيدات الآفات وغيرها من الكيمائيات . ولقد صممت البحوث لتقييم مميزات وحدود هذه التكنولوجيا في مجال الكيمياء البيئية . والجدول التالى (١) يوضح مميزات وحدود هذه الطريقة . وهذه المعايير ليست قواعد ثابتة حيث يمكن التغلب على العديد من محددات هذه الطريقة باللجوء الى استخدامات مبتكرة لهذه التكنولوجيا المتطورة .

جدول (١) : مميزات وعيوب تكنولوجيا كيمياء المناعة .

المميزات	العيوب
عام الاستخدام	يعتبر تكنولوجيا جديدة فى معامل الدراسات البيئية
عالية الحساسية	فائق الحساسية
عالية التخصص	من الصعب استخدامه فى التحليل المتعدد
عالية الدقة	تتفاعل مع المواد المتداخلة .
سريعة جدا	الجواهر الكشافة غير متوفرة
قليلة التكاليف	مسمياتها غير محددة
يمكن تطويرها بدرجة كبيرة	تتطلب عينة كبيرة للتحليل

ويجب ان نعيد التذكرة بان هذه الطريقة طبيعية تعانى من نقص تخيل حدوثها واجراءها . والمشتغل الذى عنده دراسة بهذه التكنولوجيا يستطيع عمل توازن بين مميزات وحدود التحليل الخاص بالمواصفات المطلوبة ، وهناك بعض البحوث غير قادرين على تحقيق كل مميزات طريقة التقدير المناعى . ومن الممكن تصميم طريقة تقدير مناعى غير مكلفة ذات حساسية متوسطة للكشف عن المخلفات الكيميائية وتطوير هذا الانجاز مع عدم توفر اجهزة متخصصة أو اشخاص مدربين . والبعض لا يتوقع ان تكون هذه الطرق عالية الحساسية والدقة . وبالرغم من ان طريقة تقدير المناعة تتفوق فى قوتها كطريقة لتحليل المركب الواحد الا انه يمكن تطويرها وجعلها قادرة على الكشف عن مجموعة من المركبات (مثل المبيدات الحشرية من مجموعة الأسييل يوريا) أو مخلوط المركبات ( المواد ذات النشاط السطحى الغير ايونية ) ولكن هذه التطويرات لا يمكن ضمان ان تحتفظ بميزة الحساسية العالية .

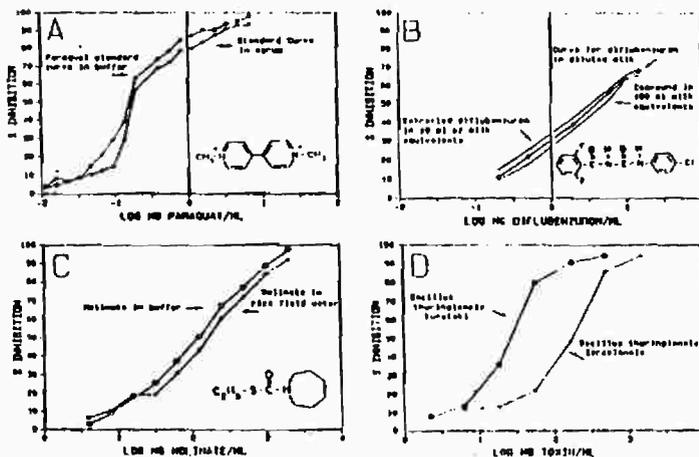
ولقد أكدت سنوات الخبرة العديدة فى مجال الكيمياء التشخيصية وزيادة الخبرات فى الكيمياء البيئية تعاظم مميزات اسلوب المناعة فى تحليل المخلفات . وتعتمد الحساسية العالية لهذا الاسلوب على الارتباط العكسى واللصيق للجسم المضاد مع المركب مجال التحليل . وحيث ان هذا الارتباط مبنى على مجموع التفاعلات الغير تكافؤية ( خاصة التفاعلات الجزيئية الضعيفة التى تعتمد على القرب بين الجاميع المتفاعلة ) فان التفاعلات البيئية عالية التخصص . ومميزات التخصص والحساسية تمكن القائم بالتحليل من اجراء التحليل مباشرة على الوسط الحيوى الخام

كما في الشكل IA لمبيد الباراكوات في السيرم . وهذه الميزة تسمح بالاستغناء عن بعض خطوات الإستخلاص او التنظيف مما يزيد من سرعة اتمام التقدير وتقليل التكلفة وزيادة دقة العملية . وخير مثال لتأكيد هذه المميزات ما امكن تحقيقه من زيادة كفاءة التحليل مائة مرة في عينات الالبان المطلوب تجهيزها لكل عامل في اليوم مع تقليل التكلفة وزيادة الدقة والحساسية .

وحيث انه طورت العديد من مجاميع المبيدات مثل البيرثرويدز ومشتقات أسيل يوريا الحشرية أو سلفونيل يوريا لمكافحة الحشائش ، اصبح من المهم تطوير طرق تحليل حساسة للكشف عن المخلفات ذات الاهمية التوكسيكولوجية . ومن اكفاً الانجازات التي امكن تحقيقها في تحليلات المناعة مع اقل قدر ممكن من خطوات التنظيف ما تحقق مع مركب اليوربا دايفلوبيزرون (الشكل IB) .

وبالرغم من المميزات العديدة للتحليل بالمناعة الا ان فرط الحساسية يمثل نقطة الخوف الكبيرة فهناك احتمال لامكانية الاعتماد على هذا التكنيك لتقليل مستويات المخلفات التي يمكن الكشف عنها . وبالتأكيد هذا الاحتمال صحيح ولكن نفس الخوف ينطبق على جميع التحليلات بالوسائل الطبيعية . ومن المضحك انه يمكن تطوير طرق تقدير مناعية حساسة ولكنها ستكون على حساب فقد مميزات السرعة والدقة واقتصادية التكاليف . والميزة الحقيقية لهذا التكنيك تتمثل في امكانياتها في تحقيق مستويات من الحساسية في مجال التوكسيكولوجي مع توفير مجهودات وتكاليف كثيرة . وفي الحقيقة يمكن التحكم في درجة حساسية هذه الطريقة بالمقارنة بالطرق الطبيعية الاخرى .

وجميع التحليلات المناعية تعتمد على قانون فعل الكتلة وكذلك على قياس الجسم المضاد الذي يرتبط بالمركب او الجسم المضاد الحر والمركب . وهذا يقدم للباحث ميزة كبيرة للتصرف وتحرير التكنيك بما يتمشى مع المشكلة التي يتناولها . وباستخدام نفس الجسم المضاد يمكن



شكل (1) : بعض الامثلة لاستخدامات التحليل بالمناعة immunoassay في تحليل مبيدات الآفات .

للباحث تطوير طريقة ميدانية سريعة أو طريقة تحليل النسبة المثوية للتثبيط فى الـ Elisa التنافسة ممثلة فى مقابل لوغارتم المادة محل التقدير بالنانوجرام / مليلتر . الرسوم من A الى C توضح المنحنيات القياسية لمادة التحليل فى محلول المنظم فى مقابل واحد أو أكثر من منحنيات المركب والستى اجريت مباشرة فى المادة البيئية أو مستخلصات هذه المادة . الشكل A يوضح تحليل مبيد الباراكوات فى سيرم الماشية . هذه النتائج توضح ان اكثر من ٣٣ ٪ سيرم (أو الليمف) يمكن تحليلها للكشف عن الباراكوات بدون تغيير المنحنى القياسى . ويمكن تحليل كميات كبيرة من السيرم بعمل منحنى قياسى فى السيرم او باستخلاص الباراكوات من السيرم . وكان تركيز الانتيجين المغلف ١ ميكروجرام/مليلتر ودرجة تخفيف الجسم المضاد ١ : ٤٠٠٠ . والشكل B يوضح تحليل الدايفلورينزون (ديميلين) فى اللبن الخام ومستخلصات اللبن (الخطوط السادة) . تم استخلاص اللبن بمذيب الايثايل اسيتات تبعا لطريقة AOAC المعروفة . وتوضح النتائج ان الجسم المضاد قادر على استخلاص الدايفلورينزون من الكريات الموجودة فى اللبن بواسطة فعل الكتلة . ولقد ادى اتباع طرق الاستخلاص البسيطة المتنوعة بادخال الجسم المضاد المناسب الى زيادة حساسية التحليل بالمناعة . وأكثر من ٥٠ ٪ لبن اضيفت دون حدوث اختلافات معنوية فى المنحنيات القياسية . وكانت الاختلافات داخل التجربة نفسها فى حدود ٣ ٪ ووصلت ٥ ٪ بين التجارب وبعضها لعدة شهور . كان تخفيف الجسم المضاد ١ : ١٢٠٠ . الشكل (C) يوضح تحليل مبيد المولينيت فى عينات المياه من حقول الارز . وتم اضافة محلول PBS كمنظم لعينات المياه ثم عوملت بالمولينيت ولم تلاحظ اختلافات فى المنحنيات القياسية عندما كانت نسبة الماء فى العينات ٥٠ ٪ . ويمكن زيادة حساسية الطريقة باستخلاص المولينيت بخلات الايثايل او التولوين . ثم تركر المستخلصات ويؤخذ المولينيت فى البروبيلين جليكول ثم يضاف للجسم المضاد . ويمكن اضافة أكثر من ٥ ٪ بروبيلين جليكول مع الأليزا . وكان تركيز الانتيجين المغلف فى ميكروجرام /مليلتر وتخفيف الجسم المضاد ١ : ٤٠٠٠ . والشكل (D) يمثل المنحنيات القياسية للتوكسينات المتبلورة للباسيلس التى اجريت فى مواد مجهزة . وتوضح النتائج امكانية استخدام طريقة التحليل بالمناعة للتحليل الكمى للبروتينات التى تمثل المواد الفعالة للمبيدات الحيوية ومواد الهندسة الوراثية . وتستخدم هذه الطريقة كوسيلة اضافة حيوية للكشف عن انتاج ومطابقة مواصفات المستحضرات . كان تركيز الانتيجين المغلف (ميكروجرام / مليلتر وتخفيف

الجسم المضاد ١ : ٤٠٠٠ للبيكتريا الاسرائيلية و ١ : ٨٠٠ لسلالة كورستاكي . والعديد من الطرق الطبيعية للتحليل تستخدم لتقدير المادة المرتبطة في مقابل الحرة بما فيها جهاز قياس الوميض وقياس العكارة أو استقطاب الضوء أو الأشعة المرئية أو الأشعة فوق البنفسجية والطرق الاسبكتروفوتومترية بالالكترونات والعديد من الطرق الأخرى . وكل من هذه الطرق له مجالات مختلفة كثيرة .. وعلى سبيل المثال اذا تناولنا الطريقة الانزيمية المدعمة بتحليل المناعة « الاليزا » En- zyme linked immunosorbant فان هناك العديد من انواع او تحت اقسام « الاليزا » وتعطى اسماء مختلفة على العبوات مع ان الاساس واحد . ومن المؤسف ان امكانية تحقيق تحويرات كثيرة في التكنيك ادى الى خلق تشويش على اساس الطريقة وتكنولوجيااتها السهلة . واذا اكتسب شخص خبرة كبيرة في مجال التحليل المناعي سيكون على دراية كافية بغيرها من المجالات الأخرى ، الا ان التسمية نفسها الخاصة بهذا التكنيك ما زالت تخوف وترعب الكثير من القائمون بالتحليل الكيميائي . وترجع جميع الاختلافات في التحليل المناعي على التفاعل العكسي بين الجسم المضاد والمركب . ان تدبير جسم مضاد ممتاز يمكن من تجهيز واستخدام اى من الاصول الموجودة لتصميم طريقة تحليل مناعي للتقدير الكيفي والكمي للمركب محل الدراسة . والاقتراب من هذا الاتجاه في التحليل يؤكد على الكيميائي الالتزام بمحددات نطاق الطرق الأخرى فيما يختص باخذ العينات وتداولها وتجهيزها وكذلك المفاهيم الاساسية للتحليل . والالمام بالتعريفات الثلاثة الآتية يمكن من اضافة الاصطلاح كيمياء المناعة الى مهمات القائم بالتحليل :

- الجسم المضاد Antibody احد اقسام بروتينات السيرم التي ترتبط مع الانتيجين .

- الجزئ المحفز Antigen الجزئ (عادة بروتين) الذي يحفز انتاج الاجسام المضادة ويرتبط بها .

- الهيپاتين Hepatin المركب (غالبا جزئ صغير) الذي يرتبط بالاجسام المضادة ولكنه غير قادر لوحده على انتاج الاجسام المضادة .

### \* الاستخدامات في كيمياء المبيدات Application to pesticide chemistry :

المميزات والحدود الخاصة بتكنولوجيا كيمياء المناعة المدونة في الجدول رقم (١) تترجم الى بعض الاستخدامات الحالية في كيمياء المركبات التي ستذكر فيما يلي :

### \* تحليل المركبات التي يصعب تحليلها بالطرق التقليدية :

من اوضح استخدامات كيمياء المناعة هو تحليل المركبات التي يصعب تحليلها بالطرق التقليدية . وكما هو معروف فان الكروماتوجرافي الغازي السائل GLC يستخدم بدرجة كبيرة مع المركبات المتطايرة (عادة كارهة للماء وصغيرة الوزن) والثابتة في الحرارة والتي لها بعض الصفات التي تمكن من الكشف عنها بواسطة الكاشفات المتخصصة . والكروماتوجرافي السائل عالي الكفاءة

HPLC اقل تقييدا ولكنه مازال يعتمد على بعض الصفات المحددة للكشف . والمعايير المذكورة اعلاه ليست ضرورية لتحقيق نجاح التحليل المناعى ولو ان هناك اتجاها يوضح ان التكنيك يعتبر مكملا للتكنولوجيا الموجودة ويمكن استخدامه ككاشفات عالية الكفاءة « HPLC » . وكما هي العادة البشرية فانه لا يبدأ بتجربة التكنولوجيا الجديدة الا عندما تفشل التكنولوجيا الموجودة والمستخدمه فعلا ، ولسوء الحظ استخدم تكنيك التحليل المناعى فى البداية مع بعض مشاكل التحليل المستعصية . وفى معظم الحالات تفوق هذا التكنيك لدرجة اعتباره المنقذ Savior . ونود الاشارة الى انه لو قدمت طرق التحليل المناعى فى معمل به افراد غير مدربون جيدا لتحليل بعض المركبات المستعصية التحليل "night mare" (شديدة القدرة على التفاعل - صغيرة جدا - شديدة الحب للدهون - موجودة بمستويات قليلة جدا - يعوق ظهور المناعة ) فان الفشل فى التقدير وعدم النجاح سيكون معوقا لهذه التكنولوجيا .

وفى معامل كاليفورنيا استخدم تكنولوجيا كيمياء المناعة لتحليل مجموعة من المركبات التى يصعب تحليلها بالطرق الكلاسيكية .. ومثال ذلك : مركب الاليتيرين البيروثرويدى الذى يفتقر لوجود مجموعة يسهل الكشف عنها بالكروماتوجرافى الغازى السائل GLC والعالى الحساسية HPLC ، والمبيدات الحشرية من مجموعة الاسيل يوريا ومبيد الحشائش الباراكوات تتطلب اجراء خطوات عديدة قبل الكشف بالـ GLC مع ملاحظة ان طريقة الـ HPLC قليلة الحساسية جدا ، بينما مركب Triton-x غير متطاير ويصعب استخلاصه ويعطى منحنيات عديدة على الـ HPLC . ومن المؤكد ان التركيب والنشاط العالى للمركبات السلفونيل يوريا يوضح ان تكنولوجيا التحليل المناعى تصلح تماما لتقدير مثل هذه التركيبات .

### \* تمييز المشابهات والمركبات القريبة

#### Discrimination of chirality and closely related compounds

نظرا للتكاليف المتزايدة لمستلزمات التحليل والقيود الخاصة بالاعتبارات البيعية قد يقرر البعض ان المركبات التى تبايع فى الاسواق قد تكون غنية فى المراكز النشطة ضوئيا او على صورة كيميائيات نقية . والمركبات الاخرى عبارة عن مخاليط راسيمية والتى يمكن ان تنهار بصور مختلفة فى البيئة . ومن ثم تصبح المقدرة على التمييز بين المشابهات الضوئية على مستوى المخلفات فى غاية الاهمية . فمركب الاللتيرين يتكون من 8 مشابهات ضوئية وهندسية ومن اكثرها فعالية بيولوجية المشابهات I R, 3 R, 4 S . ولقد امكن تطوير نظام تحليل مناعى عالى التخصص لكل مشابه على حده مما يؤكد مقدرة هذه التكنولوجيا على التعامل مع المشابهات .

وفى مجال كيمياء المبيدات تقوم المعامل بتطوير مركبات ذات صفات طبيعية متماثلة وهذا هو الموقف مع الاديميلين وغيره من المركبات الفعالة مثل Bay Sir 8514 . ويتطلب فصل هذه المركبات تجهيز عمود عالى الكفاءة جدا للـ HPLC . بينما امكن تطوير طريقة تقدير مناعى

يمكن من الكشف عن مجموعة هذه المركبات والتفرقة بين الـديميلين وغيره من المركبات القريبة منه حتى التي ظهرت بعد تطوير هذه التكنولوجيا .

### \* تحليل سوائل جسم الانسان ومعلومات حيوية

#### Analysis of human body Fluids and as biomarkers

لتقييم درجة تعرض الانسان للسموم يصحح من الضروري تحليل سوائل الجسم مثل البول والدم . وحيث اننا نتجه لاجداد علاقة بين التعرض والسمية توجه الاهتمامات المتزايدة الى تحليل المركبات الصلبة ونواج تمثيلها وعلامات التسمم في الافراد الذين يتعرضون مهنيا او بيئيا . والتحليل المناعي يناسب التشخيص الاكلينيكي وتحقيق الحساسية العالية لهذا التكنيك تتطلب مواد حيوية تافهة وقليلة . وعلى سبيل المثال تستخدم طريقة المناعة لتشخيص التسمم بمبيد الباراكوات ، ولقد ثبت امكانية تقدير مخلفات المبيد مباشرة في عينات الدم والبول والليمف باستخدام التحليل المناعي وبحساسية شديدة تفوق جميع الطرق الاخرى المعروفة . وسرعة اجراء التحليل تتيح فرصة كبيرة لاجراء دراسات حركية الكيمياءات Pharmacokientic لتقييم خطورة التعرض المهني للسموم .

### \* تحليل اعداد كبيرة من العينات Analysis of large numbers of samples

التحليل بالمناعة Immunoassay طريقة غاية في السهولة وقليلة التكلفة مما يجعله اسلوب نموذجي لتحليل اعداد كبيرة من العينات . وهذا الوضع يجعل التحليل المناعي ملائما لاغراض تسجيل المبيدات وكذلك اختبارات النوعية ومطابقة المواصفات القياسية وتقدير المخلفات عندما يكون هناك شك في وجود المركب . وعندما تستخدم الطرق التقليدية للتأكد تفيد طريقة التحليل المناعي لتقليل السليبات . وفي هذا المقام تطوير طريقة لتحليل مبيد الحشائش المولينيت " molinate " حيث ان هذا المركب مفيد جدا في زراعات الارز ولكن اذا انفرد قبل المعاد المطلوب سيؤدي الى قتل الاسماك . وساعدت هذه الطريقة في تقييم ديناميكية وحركية المولينيت في زراعات الارز بالرغم من العديد من العينات المطلوب تحليلها لتحقيق هدف الدراسة . ويوضح الشكل IC امكانية اضافة الماء المأخوذ من حقول الارز الى انابيب التحليل المناعي مما يمكن من تقدير درجات انفراد المولينيت في الماء . وتوضح هذه النتائج امكانية تطوير طريقة التحليل المناعي لتقدير المركبات الصغيرة الحجم والمتطايرة والغير ثابتة . والتكنيك يطور بعد الاستخلاص بما يحقق حساسية عالية للكشف عن المخلفات . ولتحقيق التكامل او التنسيق بين استخدام المبيدات مع الاعتبارات الاجتماعية يصبح من الأهمية تطوير هذه المعلمات markers لتقدير التلوث البيئي بمستويات معينة من الملوثات . وتحليل وجود مبيدات الحشائش الذائبة في الماء مثل الثيوكارامات والـ 2, 4-D ومركب 2, 4, 5-T ذات اهمية خاصة في برامج استكشاف تلوث الماء السطحي بينما التحليل السريع لتريازين ومركبات الـاسيتانيليدات تعتبر مهمة في برامج استكشاف تلوث الماء الارضى .

## \* التحليل السريع او / و الميدانى Rapid and /or field analysis :

تكلمنا قبلا عن امكانية احلال طريقة التحليل المناعى محل الطرق التقليدية فى تقدير المبيدات ونشير هنا الى ان هناك العديد من الاستخدامات لا تجرى بدقة الا بطريقة التحليل المناعى . وعلى سبيل المثال تقدير المولينيت يجرى بصورة سريعة جدا فى الحقل دون الحاجة لاية اجهزة او القليل فقط وهذا يمكن الفلاحون ومسئولى الزراعة من الكشف عن آثار هذا المبيد فى المياه قبل الصرف . ويفيد هذا التكنيك كذلك فى التأكد من وجود الكيمياءات السامة قبل معاودة دخولها او لاستكشاف الانتشار . وهذا الاسلوب فى غاية الاهمية خاصة مع المركبات شديدة السمية مثل الباراكوات والباراثيون . ومن الفوائد الاخرى الكشف عن وجود المبيد قبل زراعة النباتات الحساسة للتشوهات بمبيدات الحشائش المعينة كما فى حالة الترايزينات وكذلك السلفونيل يوريا . ويمكن للفلاحون استخدام هذا التكنيك للكشف عن الادوية البيطرية ومسببات الامراض الحيوانية والنباتية والمبيدات . وهذا يقدم إتجاه جديد فى مفهوم تحليل المخلفات باستغلال الامكانيات التى توفرها التكنولوجيا فى المكان الميدانى (الحقل) حيث التلوث . كما يقوم بها الفلاحون . وهذا الاسلوب مهم جدا لتجار الجملة حيث يهمهم اثبات ان المخلفات السامة فى المحاصيل قليلة للغاية ونفس الشيء لتجار المبيدات المشتركة فى برامج الاشراف على امان المخلفات .

## \* تحليل نواتج بحوث التكنولوجيا الحيوية

### Analysis of products from research in biotechnology

حتى وقت قريب كانت معظم المركبات التى تستخدم فى البيئة ولا سباب اقتصادية عبارة عن جزيئات صغيرة نسبيا ذات تركيبات بسيطة . والتكنولوجيا الحيوية وبالتاكيد سوف تغير من هذا الوضع . وعلى سبيل المثال انتجت تكنولوجيا التخمر مركبى الأفيرميكتين Avermectin والإفيرميكتين Ivermectin بينما التوكسين الخارجى من بكتريا الباسيلس نيورينجينسيس لم يؤخذ بعين الاعتبار فى المستحضرات الحالية . وهذه المواد شديدة التعقيد بدرجة تفوق المركبات العادية التى يمكن تحليلها باجهزة الكروماتوجرافى GLC أو HPLC . وبالتاكيد يمكن تحليل هذه المركبات بالوسائل التقليدية ولكن اسلوب التحليل المناعى يقدم مميزات كثيرة لتحليل هذه الجزيئات الضخمة والمعقدة .

الاهتمام العام فى المستقبل القريب لن يقتصر على نواتج التخمر ولكنه سيتعدى ذلك ليشمل المواد الناتجة من الهندسة الوراثية . ومن المؤكد ان معظم المركبات محل العناية ستكون تابعة للبيبتيدات والبروتينات . ومثل هذه المركبات تكون طرق التحليل المناعى غير باهرة الفائدة . وفى العام الاخير امكن الكشف عن البروتين السام الذى تفرزه بكتريا BT فى النباتات . وما زالت شركة Monsanto تحاول اختبار نفس السم فى الحقل باستخدام انواع قريبة من هذه البكتريا . وتمكن الباحث فى جامعة كاليفورنيا من تطوير طريقة تحليل مناعى لبلورات التوكسين الخاص

بسلالات BT الاسرائيلية ، وهذه الطرق تصلح للكشف عن جودة الانتاج ويمكن تحويلها لتقدير مخلفات المبيدات . وفي حالة ما اذا انفردت جينات غريبة في البيئة يمكن بطرق التحليل المناعى الكشف عنها او نواتج تفاعلها مع البيئة ، وهذا يؤكد ان هذه الطريقة تعتبر مكتملة للوسائل الوراثية التى تختص بالكشف عن الجين الحقيقى مما يزيد من فرصة نجاح منتجات الهندسة الوراثية . ومما لا شك فيه ان وسائل التحليل المناعى ستكون متوفرة وعلى الوكالات المعنية الوصول لكيفية استخدام هذا الاسلوب فى الكيمياء البيئية وكيفية اجراء تجارب ارشادية وتحقيق القبول الرسمى لهذه الطرق . ومن ثم يمكن تمثيل التحليل المناعى على انه حلقة متكاملة حيث لا يساهم الحصول على نواتج فعالة من التكنولوجيا الحيوية فقط وانما يساهم فى الكشف عن هذه المركبات ايضا .

### \* التوصيات Recommendations :

بالرغم من ان كيمياء المناعة ليست دواء لجميع الامراض اذا جاز التعبير Panacea الا انه لسوء الحظ انها لم تستخدم على نطاق واسع فى كيمياء البيئة خلال العشرين عاما الاخيرة . ومن المهم الاشارة الى اهمية ادخال هذه التكنولوجيا فى القطاعين العام والخاص . وهناك العديد من الشركات الخاصة الصغيرة تستثمر هذه التكنولوجيا وسوف تحقق دورا فى ادخال واستعمال الطريقة فى مجال مبيدات الآفات . واذا ما نجح التكنيك بكفاءة عالية يصبح فى الامكان تعميم الطريقة وانتشارها فى التحليلات الكيميائية .

### \* صلاحية التحليل بالمناعة Validation of immunoassays :

لكى تلقى طريقة التحليل بالمناعة القبول كطريقة تحليل يجب معاملتها فى البداية كما تعامل الطرق الاخرى وتقارن كفاءتها باى طريقة معروفة ومتداولة ، ومن الأهمية التأكيد من مقدرة هذه الطريقة على التقدير الكمي وليس النوعى فقط . ولم تجرى هذه المقارنات للتأكد من صلاحية الطريقة لتقدير اى مركب من المبيدات حتى الآن . ولقد وجد Wie and Hammock (1982) ان الفرق بين طريقة التحليل المناعى وتلك التى اجريت بالـ Elisa لمركب الدايفلوبنزيرون (3) و 5% على التوالى ) ، كما تناول تأثير المادة الحيوية على التحليل المناعى . والآن توجد مقارنات بين كفاءة هذه الطريقة والطرق التقليدية الاخرى فى مجال المبيدات الفطرية ، ومثال ذلك مركبات البينوميل والميتالكسيل والترايديمفون . ولقد اشار Emon ومعاونوه (1986) الى ان الكروماتوجرافى الغازى السائل GLC والطرق اللونية لتقدير مبيد الباراكوات لا تختلف فى كفاءتها عن التحليل المناعى مع عينات التحليل الخاصة بتعرض العمال للمبيد ، بينما اشار Sedwable وآخرون (1984) الى العلاقة الجيدة بين التحليل المناعى الانزيمى والتحليل المناعى الفلورىنى مع مبيد الحشائش الدايكوفوب - ميثايل . ويجب ان توجه الجهود للكشف عن مميزات تكنيك التحليل المناعى وتوضيح اهميتها فى الكشف عن المركبات البيولوجية وتلك الناتجة من الهندسة الوراثية والتى لا يوجد لها طرق تحليل طبيعية .

## \* ادخال التحليل المناعى معامال التحليل

### Intorduction of Immunassays in the analytical laboratory

يجب ان يكون لدى الوكالات المعنية بمراقبة المبيدات ومنتجى هذه الكيمياءيات خبراء فى مجال كيمياء المناعة اذا كان عليهم تقييم طرق التحليل المتاحة فى الهيئات الأكاديمية والقطاع الخاص . ويجب ان يعمل الخبراء بروح واسلوب الجماعة وتختفى من مفهومهم اية نزعات فردية . وعلى بعض هؤلاء الخبراء تفهم مشاكل المراقبة والتحليل الروتينى التى تجابه اى مركب بينما يتولى الاخرون مسئولية ادخال التكنولوجيا الحيوية فى الكيمياء . وبعض التوكسينات يسهل ارتباطها بالبروتينات بغرض التحليل ويقوم فريق ثالث بمهمة تذليل صعوبات النواحي الكيمياءية وابتكار نواحي جديدة . وهناك هدف هام ومحدد يتمثل فى دراسات تحديد المواقع المتخصصة للارتباط بالجسم المضاد . والمطلوب إجراء العديد من الاختبارات او الاقترابات عالية التكلفة للفريلة بين صلاحية وكفاءة العديد من مضادات السيرم لتطوير طريقة تحليل مناسبة ومفيدة عندما تستطيع الكيمياء قليلة التكاليف حل المشاكل الداخلية . ومن هنا يتأخر وقت الحصول على طريقة تحليل مناعى مناسبة لوقت طويل نظرا للحاجة لتصميم وتخليق الهيبتاتين المناسب hapten . ولو امكن تطوير هذه الإتجاهات فى المراحل المبكرة من تطوير المركب (المبيد) يصبح من السهل توفير الهيبتاتين كمواد وسيطة مخلقة قياسية على صور مشابهات أو ممثلات .

ويعتبر الجسم المضاد antibody المكون المحدد للتحليل بالمناعة Immunoassay بصرف النظر عن التصميم . ومن المثير للدهشة انه فى المراحل المبكرة من هذا البرنامج كان الهدف هو انتاج الاجسام المضادة ، وقد تركزت كل الجهود فى هذا السبيل . فلو امكن تجهيز الهيبتاتين Hapten الانتيجين Antigen بعناية يصبح من الممكن انتاج الاجسام المضادة بسهولة ويسر بواسطة العديد من الشركات المعنية بكيمياء المناعة دون اى فقد فى النوعية . وكما نوقش فى البداية بواسطة Hammock & Mumma عام ١٩٨٠ اتفق على ان الاجسام المضادة المتعددة الرجفان Poly clonal اكثر ملائمة وافضلية من الاجسام وحيدة الرجفان Monoclonal للعديد من التقديرات . وفى الماضى اعطت الاجسام المضادة المتعددة من الارانب طريقة تحليل اكثر حساسية مما اعطته طريقة الاجسام الوحيدة من الغنم ، وليس هناك ضمان من ان الاجسام الوحيدة تعطى اختبار اكثر تخصصا .

وليس هناك شك فى ان تكنولوجيا التهجين Hybridoma ستسود مجال التحليل بالمناعة فى السنوات القليلة القادمة للاسباب التجارية والعملية . وهناك مشاكل تحليل البيبتيدات العديدة المسؤولة عن احداث السمية من بكتريا الباسيللس ثيورينجينيسيز حيث لا مفر من تكنولوجيا التهجين . ولقد تناقصت تكلفة انتاج الاجسام المضادة الوحيدة بسرعة خاصة فى المعامل التى تأخذ فى الاعتبار اقتصاديات العملية . ولقد جرى استخدام العديد من السلالات المختلفة وراثيا من الفئران لابتداء المناعة وكان ذلك متبوعا بفريلة السيرم الخاص وادى هذا الاسلوب الى اثبات انه فى بعض الحالات كانت الاجسام المضادة الوحيدة اكثر حساسية من المتعددة .

وقبل اتخاذ قرار استخدام هذا التكنيك يصبح لزاما على الباحث تقدير مدى الحاجة للجسم المضاد الاحادى وعليه ان يطور طريقة غريبة سريعة لعزل الاجسام المطلوبة والتخلص من الغير مرغوبة . وعلى الباحث كذلك ان يتأكد من ان الأهمية الكبيرة القوية للتهجين تكنولوجيا تكمن فى تحقيق انتيسيرا متميزة .

وكما هو معروف فان الهيبتينات والليجانوس والاجسام المضادة تمثل الجواهر الكشافة للتحليل بالمناعة ولكنها يجب ان تتألف فى طريقة تحليل . وهناك طرق عديدة ذات تركيبات مختلفة ولكن تزييف هذا التحليل يحتاج لبراعة فنية وخداع والفنيون اللذين يقومون بهذا العمل من الضروري ان يكونوا من العاملون فى معاميل التحليل التى تتناول هذه الطريقة . لأن هذا التكنيك يجب ان يستخدم فى مشاكل تحليل حقيقية . فى مراحل التطوير والتطبيق يمكن للفنى الخبير العمل فى النواحي التشخيصية الاكلينيكية مع ان المواد فى مجال التحليل والعوامل المحددة له تختلف كثيرا . لذلك يمكن تدريب المشتغل بكيمياء البيئة على اسلوب التحليل بالمناعة او يجرى تنسيق بين فردين يعملان بهذين الفرعين منفردين .

استراتيجيات اخذ العينات وطرق التنظيف وتداول النتائج وايا من العوامل الاخرى فى الكيمياء التحليلية لها نفس الاساس سواء استخدام تكنيك GLC-MS أو التحليل بالمناعة والكيميائى المختص بالتحليل يعتبر خير ضمان لنجاح التحليل بالمناعة .

\* اختيار المركبات الاولية للتحليل

### Selection of initial compounds for analysis

عند ادخال اية تكنولوجيا جديدة يكون من الاهمية بنجاح الاستخدام الاوولى لهذه التكنولوجيا . لذلك فان الاختيار للمشكلة الاولى التى تتناولها طريقة التحليل بالمناعة من اهم العوامل المحددة . ومن الطبيعى ان عملية الاختيار تختلف من شركة او وكالة اخرى ومع هذا تظل المعايير عامة مأخوذة فى الاعتبار . والمركب يجب ان يكون متوسط الذوبان فى الماء على الاقل ولا يجب ان يكون معروفا عنه الالتصاق او المسك على السطوح او مواد التحليل . والمركب يجب الا يكون متطاير وثابت فى الماء . وعلى الشخص المسئول عن التحليل الامام بالمواصفات الطبيعية والكيميائية وعلى الاقل يسهل تداول مادة او وسط واحد من اوساط التحليل .

وبالتأكيد يجب ان يمثل المركب اهمية للباحث وليس ان يمثل اهم مشكلة من المشاكل التى تجابه الفريق البحثى . ويجب ان يكون عدد التحليلات للمركب الواحد كبيراً . اذا كان من الممكن ان تستخدم بيانات التحليل اولا فى داخل المعمل الذى تحصل عليها يمكن تجنب الاحباط والتأخير فى قبول التكنيك فى الوكالات الخارجية . ولدراسة صلاحية الطريقة الجديدة يجب ان يكون هناك طرق تقليدية جيدة ومعترف بها للمركب نفسه . ومن حسن الحظ ان العديد من الجهات والمعامل فى المجالات الصناعية وغيرهسا اصبحت تستجيب لأصدقاء هذا التكنيك الجديد .

## References قائمة المراجع

1. B.D. Hammock and R. O. Mumma, Recent Advances in Pesticide Analytical Methodology, p. 321. American Chemical Society Publications, Washington D. C. (1980).
2. S. I. Wie. A. P. Sylwester, K. D. Wing and B. D. hammock. J. Agric. Food Chem. 30, 943-948 (1982).
3. S. I. Wie and B. D. hammock, J. Agric. food Chem. 30, 949-957 (1982).
4. S. I. Wie and B. D. hammock, J. Agric. food Chem. 32, 1294-1301 (1984).
5. M. M. kelley, E. W. Zahnaw, W. C. petersen and S. T. Toy, J. Argic. Food Chem. 33,k 962-965 (1985).
6. A. I. Aronson, W. Beckman and P. Dunn, Microbiol, Rev. 50. 1-24 (1986).
7. J. J. langone and H. Van Vunakis, Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 10, 163-1717 (1975).
8. S. I. Wie and B. D. Hammock, Anal. Biochem. 125, 168-176 (1982).
9. K. D. Wing. B. D. Hammock and D. A. Wustner, J. Agric. Food Chem. 26, 1328-1333 (1978).
10. K. D. Wing and B. D. Hammock, Experientia 35, 1619-1620 (1979).
11. J. Van Emon, B. D. hammock and J. N. sEiber, Anal. Chem., 58 : 1866-1873 (1986).
12. D. Fatori and W. M. hunter, Clin. Chim. Acta 100, 81-90 (1980).
13. T. Levitt. Lancet 8033, 358 (1977).
14. Z. Niewola, S. T. Walsh and G. E. Davies. Int. J. Immunopharmac. 5, 211-218 (1983).
15. D. F. rinder and J. R. Fleeker, Bull. Environ. contam. Toxicol. 26, 375-380 (1981).
16. S. J. Huber and B. Hock, Z. Pflanzenkrankh, Pflanzenschutz 92, 147-156 (1985).
17. C. D. Ercegovich, R. P. Vallejo. dR. R. Gettig. L. Woods, E. R. Bogus and R. O. Mumma, J, Agric, Food Chem, 29, 559-563 (19981).

18. R. P. Vallejo, E. R. Bogus and R. O. Mumma, *J. Agric. Food Chem.* 30, 572-580 (1982)
19. K. W. Hunter and D. E. Lenz. *Life Sci.* 30, 355-361 (1982).
20. A. A. Brimfield, D. E. Lenz, C. Graham and K.W. Hunter, Jr., *J. Agric. Food Chem.* 33, 1237-1242 (1985).
21. S. I. Wie, R. E. Andrews, Jr., B. D. Hammock, R. M. Faust and L. A. Bulla, Jr., *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 891-894 (1982).
22. S. I. Wie, B. D. Hammock, S. S. Gill, E. Grate, R. E. Andrews, Jr., R. M. Faust, L. A. Bulla, Jr. and C. H. Schaefer, *J. Appl. Bacteriol.* 57, 447-454 (1984).
23. P. Y. K. Cheung and B. D. Hammock, *Current microbiol*, 12, 121-126 (1985).
24. P. Y. K. Cheung and B. D. Hammock, *Appl. environ. Microbiol*, in press.
25. T. R. Roberts, *Trends Anal. Chem.* 4, 3-7 (1985).
26. J. M. Van Emon, J. N. Seiber and B. D. Hammock, *Bioregulators for Pest Control*. p. 307, American chemical Society Publications, Washington D. C. (1985).
27. W. H. Newsome and J. B. Shields, *J. Agric. Food Chem.* 29, 220-222 (1981).
28. W. H. Newsome, *J. Agric. Food Chem.* 33, 528-530 (1985).
29. W. H. Newsome, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 9-14 (1986).
30. M. Schwalbe, E. Dorn and K. Beyermann, *J. Agric. Food Chem.* 32, 734-741 (1984).
31. J. Vinas, *Pure & Appl. Chem.* 57, 577-582 (1985).
32. R. M. Roe, P.Y.K. Cheung, B. D. hammock, D. Buster and A. R. Alford, *Bioregulators for Pest control*. p. 279, American Chemical Society publications, Washington D. C. (1985)