

الفصل الرابع والعشرون

-التقدير الامثل ومقاييس التنقيبية فى طرق التحليل المتعدد والحساسية
لمتبعيات المبيدات :

- المقدمة .
- اختيار ظروف الكروماتوجرافى الغازى .
- حمل اعمدة الكروماتوجرافى الغازى .
- حجم العمود .
- تحميل الاعمدة بالمستخلصات النباتية .
- مقدرة التحميل وكروماتوجرافى الطبقة الرقيقة .
- الاستنتاج .

التقدير الامثل ومقاييس التنقية في طرق التحليل المتعدد والحساسية لمتبقيات المبيدات

Optimization of determination and clean-up parameters for sensitive multi-residue analysis pesticides

لتسهيل الاستخدام الصحيح لطرق التحليل المتعدد .. فقد تم دراسة سلوك عدة مبيدات باستخدام طرق التحليل الكروماتوجرافي الغازي ، كما تم تحديد حساسية هذه المركبات لظروف الكروماتوجرافي الغازي ، كما تم اختبار المقدرة على التحميل لكل من اعمدة الكروماتوجرافي الغازي والواح كروماتوجرافي الطبقة الرقيقة وذلك باستخدام مستخلصات التفاح والجزر والسبانخ وذلك بعد اجراء عمليات التنقية لها . كما تم توضيح ما تم استنتاجه فيما يتعلق باستخدام كل من طرق التنقية والكشف .

المقدمة :

لقد اتضح ان هناك مقدرة اختيارية عالية للكشاف ذو اللهب المضيء Flame photometric (FPD) ، ومن النوع الحراري الايوني Thermionic (TID) ، والنوع ذو التوصيل الإلكتروني الإلكتروني (HCD) Electrolytic conductivity بالإضافة الى الكشف لبعض طرق الكروماتوجرافي ذو الطبقة الرقيقة TLC وذلك في تقدير بعض متبقيات المبيدات الموجودة في المستخلصات بدون الحاجة الى اجراء عمليات تنقية . حيث ان الحقن المباشر للمستخلصات المركزة ينتج عنها السرعة في الوقت وبساطة التحليل ، فانها طريقة متبعة في العديد من المعامل . الا ان هذا التطبيق المباشر للمستخلصات الخام من الممكن ان ينشأ عنها تأثير معاكس ومضاد لجودة الفصل الكروماتوجرافي . بسبب تغيير تفاعل بعض المركبات الحساسة مع العمود الكروماتوجرافي وبالتالي تغيير وقت الجبس النسبي . وهكذا فان عوامل الاستجابة النسبية (RRF) Relative Response Factors وأقل كميات يمكن كشفها (MDG) Minimum Detectable quantities من الممكن ان تختلف من وقت الى آخر وذلك اعتمادا على درجة التحميل وظروف اعمدة الكروماتوجرافي .

لكي يتم الوصول الى افضل استخدام لطرق التحليل المتعدد Multi-Residue Proce- dures (MRP) فهناك عدة قياسات هامة .. منها ان ظروف الكشف يجب اختبارها بصورة مستمرة للتأكد من ان الحساسية للكشف كافية للتعرف على المركبات المتغيرة . لذلك فانه تم دراسة سلوك عديد من المبيدات تم اختبارها من مجاميع كيميائية مختلفة وذلك باستخدام اعمدة معبأة تم تحميلها بمستخلصات نباتية وذلك بهدف :

١ - تعريف المركبات المتغيرة ، والتي تتطلب اهتمام خاص خصوصا عندما تكون ظروف التحليل المتعدد تستخدم للعينات الغير معروفة المنشأ .

٢ - تقدير مقدرة التحميل لأعمدة الكروماتوجرافي الغازي القصيرة وذات السعة المنخفضة .

في حالة عينات التفاح والجزر والسبانخ فان الاستخلاص قد يتم بالاسيتون وتمت عملية التوزيع باستخدام الميثيلين كلوريد مع اجراء التنقية على خليط منشط من (١ جم كربون منشط + ٢ جم مغنسيوم + ٤ جم طحالب ارضية) . ايضا تمت دراسة تأثير المستخلصات السابقة على طريقة التحليل الكروماتوجرافي الطبقة الرقيقة وذلك باستخدام هذه المستخلصات وتطبيقها على الواح جاهزة .

اختيار ظروف الكروماتوجرافي الغازي Selection of GC conditions

* خمول اعمدة الكروماتوجرافي الغازي Inertness of GC columns

ان الجزيئات المتغيرة كيميائيا من الممكن ان تتدهور في جزء الحقن وايضا في عمود الكروماتوجرافي وفي كلا الحالتين فان التأثيرات التحضيرية من كل من جزء الحقن والعمود ودرجة الحرارة تتحكم في معدل هذا التدهور . يتم ذلك باتباع الغسيل بحامض واستخدام اعمدة زجاجية من النوع Pyrex المعامل بمادة Silane مع استخدام مادة تعبئة خاملة وصوف زجاجي معاملة بالسيليله وبالتالي فان تكسير معظم المركبات المتغيرة من الممكن ازالتها او حفظها عند مستوى ثابت ومنخفض . بالتالي فان اعادة الحقن للمستخلصات النباتية المركزة او حقن كميات كبيرة من المركبات المتغيرة كيميائيا بحيث تجرى بعدها اجراء عملية سيللة للعمود فان ذلك يعمل على تحسين صفة الخمولية للنظام الكروماتوجرافي وعلى العكس فان تلوث جزء الحقن من الممكن ان يعمل على احداث تدهور جزئي او كامل لهذه المركبات المتغيرة .

عند اجراء مقارنة بين الاستجابات للمبيدات المختارة وهي : DDT , Propicana - P - P' - zole , Monocrotophos , Carbaryl وذلك تحت ظروف مختلفة للأعمدة . فقد وجد انه من الممكن الكشف عن هذه المبيدات حتى مستويات 10 ng و 10 pg وذلك مع انظمة الكشف من النوع ECD , NPTID , FPD على التوالي .

الظروف المستخدمة للفصل الكروماتوجرافي والتي اظهرت هذه الاستجابة كانت مناسبة لتقدير متبقيات اخرى والتي تم استرجاعها بواسطة طرق MRPS الاكثر شيوعا في الاستخدام .

فيما بين المبيدات الفوسفورية العضوية التي تم تحليلها فان معظم المركبات الغير ثابتة كانت مركبات قطبية وخاصة انها تحتوي على سلسلة جانبية تشمل :

أ - رابطة زوجية Monocrotophos ب - شق اميد Phospholan

ج - شق كيراماتي Dimethoate د - مجموعة استر Malathion

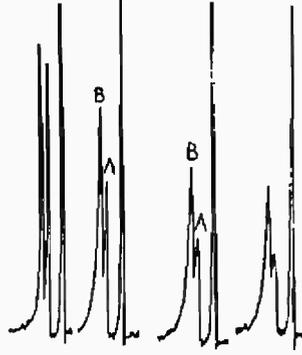
هـ - او اى تركيب يسمح بتكوين رابطة أيديروجينية

ذلك بالاضافة الى الاهتمام الخاص عند اجراء تحليل لمركبات الكارباتامات مثل Carbofu-

ran , Carbaryl وايضا مجموعة اليوراسيل Terbacil ومركبات اخرى تشمل الأندرين وال د د ت Thiobendazol dicofol .

* حجم العمود Column size :

عمود قصير (٥٠ - ٩٠ سم) وضيق قطر داخلي (١,٧٥ - ٢ مم) معياً ب مواد مفيدة جدا لاجراء عملية الغريلة والتأكد من وجود متبقيات المبيدات وذلك بالمقارنة مع الاعمدة التقليدية ذات طول ١٨- سم وقطر داخلي ٣ مم ، وقد تبين ان الاعمدة القصيرة ينتج عنها تحليل اسرع بمعدل ٢ الي ٥ مرات تعطى اقل قدرات للكشف MDQS اكثر بمقدار ٥ إلى ١٠ مرات كما انها تحتاج الي درجة حرارة اقل .



شكل (١) : كروماتوجرام المونوكروثوفوس (A) والباراثيون (B) بعد تحميل العمود من اليسار لليمين صفر ، ٢٠٠ ، ٣٠٠ مللجم مستخلصات السبانخ

: تحميل الاعمدة بالمستخلصات النباتية Loading columns with plant extracts :

في الاعمدة القصيرة (٤٥ سم × ٣ مم) فقد تم تعبيتها بمادة OV-101 chromosorb WAW ٣ ذات حجم حبيبات 60-80 mesh ، قد تم معاملة هذه الاعمدة بمادة Carbow- ax 20 M وبعد ذلك تم تحميل هذه الاعمدة باعادة عملية الحقن للمستخلصات المركزة بما يعادل ٥٠ - ١٠٠ مللجم من التفاح والجزر والسبانخ وتم استخدام الكشاف من نوع اللهب المضئ (FPD) وكانت درجة الحرارة المستخدمة كالآتي (140°C/2 min program at 10 °C min) ولم تلاحظ وجود تغيرات في قيم عوامل الاستجابة النسبية Relative Re- sponse Factor (RRF) او في قيم الحس النسبي او في مقدرة التحليل . وذلك عندما وصل اقصى تحميل الي 2000 mg . بينما عند تطبيق درجة حرارة ١٨٠م فان كل من قيمة RRF لمبيد monocrotophos (A) أو لمركب parathion-methyl (B) كذلك فان مقدرة التحليل قد انخفضت بصورة مستمرة مع زيادة التحميل .. وذلك كما هو مبين شكل (١) .

لقد تبين حدوث تدهور وتلف لعمود الكروماتوجرافي بسبب اجراء التحميل عليه بحقن 200 mg مستخلص سبانخ وحقن 140 mg مستخلص تفاح ، 600 mg مستخلص جزر . بينما عند تحميل الاعمدة بالمستخلصات بعد تنقيتها على مخلوط الادمصاص فان اداء العمود لم يتغير واصبح جيدا عندما وصلت درجة التحميل الكلية الى 3000 mg .

تدل هذه النتائج على ان المقدرة على التحميل تعتمد على نوع المستخلص ودرجة حرارة العمود وتأثر باقل الحدود بسعة العمود . لقد وجد ان المقدرة التحميلية للاعمدة من الممكن تقديرها سريعا وذلك بفحص قيم RRF وذلك بعد اعادة الحقن للمستخلصات التي تحتوى على مدى من ١٥٠ الى ٢٠٠ مللجم / عينة والتي تحتوى على زوج مناسب من المركبات المختبرة مثل Carbaryl/prophan أو Monocrotophos/parathion-methyl حتى نصل قيم RRF للمركبات الثابت / المتغير الى ٨٠٪ من القيمة الاصلية والتي تحدد بانها اقصى حمل اجمالى (LM) maximum total load .

من الممكن اجراء حقن مرة واحدة لعينة تمثل 0.03 LM على اساس ان يتم وضع صوف زجاجى معامل بالسيولة ويعاد تهيئة العمود على اقصى درجة حرارة مضاف اليها ٣٠ م لمدة ٨ ساعات بعد كل ٢٠ حقنة . عند تقدير اقصى تحميل متاح من المهم ايضا اختيار الكشاف ، ففى حالة استخدام الكشاف من النوع ECD لا بد من اجراء تنقية لكل مستخلص وايضا عند استخدام الكشاف من النوع NPTID .

اما عند استخدام الكشاف من النوع TID عادة يسمح بحقن مستخلصات نباتية بها ٢ - ١٠ مللجم ، بينما فى حالة استخدام FPD , HCD فان مقدرة الاعمدة على التحميل تكون محددة . لكى نضمن افضل اداء لنظام الكروماتوجرافي الغازى يجب ان يكون تحميل العمود باقل قدر من العينة المراد تقديرها وذلك يكون فى حدود (ملجم/كجم) .

: مقدرة التحميل وكروماتوجرافي الطبقة الرقيقة TLC and Loadability :

لقد تم اختبار مقدرة التحميل للسليكا جيل واكسيد الالومنيوم لالواح TLC وذلك باستخدام مستخلصات نباتية مختلفة وانظمة ازاحة مختلفة وكذلك مبيدات مختلفة فعندما تم استخدام مستخلصات مشتركة نتج عن ذلك حدوث انتشار وظهور بقع ذات ذبول وتأثرت طبيعة توزيع المبيدات على الالواح . مع ملاحظة البطء فى السرعة بالاضافة الى انخفاض مستويات الكشف لهذه المبيدات .

وهكذا فان مقدرة التحميل للطبقة تختلف باختلاف قوة المذيب المكون للطور المتحرك وحسب المبيدات وايضا تعتمد على طريقة الكشف . فى جدول (١) يتبين ان اقل تحميل ينتج عنه فصل وكشف وذلك عندما تم اتباع طرق الكشف التالية :

جدول (١) : التغير في حدود التقدير (مللجم/كجم) لبعض المبيدات اعتمادا على ظروف الفصل على الألواح

Compound	Eluent	Rf	MDQ /ug	Carrot			Spinach				
				Purified	Crude	Purified	Crude	Purified	Crude		
				extr.	extr.	extr.	extr.	extr.	extr.		
				sample LD							
				mg	mg	mg					
Carbaryl	EtAc	0.58		500	0.2	100	1	1000	0.1	100	1
	PE=E=1=2	0.23	0.05	2000	0.05	250	0.4	1000	0.5	50	2
	CH ₂ Cl ₂	0.11		500	0.1	200	0.4	1000	0.05	200	0.1
Dioxcarb	EtAc	0.41		500	0.4	100	2	1000	0.1	100	2
	PE=E=1=2	0.06	0.01	2000	0.05	250	0.8	1000	0.1	50	4
	CH ₂ Cl ₂	0.		500	0.4	200	1	1000	0.2	200	1
Atrazine	EtAc	0.59		250	0.2	100	0.5	1000	0.1	100	1
	PE=E=1=2	0.27	0.05	500	0.2	200	0.5	2000	0.05	100	1
	CH ₂ Cl ₂	0		400	0.25	100	1	1000	0.1	250	0.4
Carbendazim	EtAc	0.22		500	0.2	500	0.2	2000	0.4	250	0.3
	PE=E=1=2	0.02	0.01	400	0.2	100	0.8	2000	0.2	250	0.2
	CH ₂ Cl ₂	0		500	0.2	50	1.6	1000	0.30	500	0.3

قد لوحظ ان حدود التقدير كانت في مستويات منخفضة الى ان وصلت الى ٥ ر إلى ١ مللجم / كجم والتي نادرا ما تم الكشف عنها . وعندما تم تطبيق المستخلصات النباتية مباشرة على الواح TLC وحتى اذا استخدمت طرق التقييم الحيوى (باستخدام الانزيمات او جراثيم الفطريات) للكشف عن المتبقيات ومن خلال التجارب فقد تبين ان طرق الكشف بالتقييم الحيوى قد تكون متخصصة لنوع معين من المبيدات ولكنها طرق غير حساسة في حالة وجود كميات كبيرة من المستخلصات المشتركة . قد وجد ان اجراء عملية التنقية للمستخلصات الخام على خليط الادمصاص تعمل على خفض قيمة LD (حدود التقدير) ٣ أو ٥ اضعاف . واذا كانت حدود التقدير اقل من ١ ر مللجم/كجم فان ذلك يتطلب استخدام طريقة تنقية فعالة .

الاستنتاج Conclusion :

ان الثبات الحرارى للمبيدات لظروف التحليل الكروماتوجرافى تختلف بدرجة كبيرة وتتأثر بنوع العينة المستخلصة . ولضمان ان حساسية الكشف للمبيدات المسترجعة بواسطة طريقة المتبقيات المتعددة (MRPS) قد تم الوصول اليها فان ظروف الكروماتوجرافى الغازى يجب ان يتم الابقاء

عليها ويتم فحصها بصورة دورية اثناء تحليل العينات بحيث يتم اختبار قياسات التقدير باستخدام مخاليط تحتوي على كل من مركبات ثابتة ومتغيرة .

وهكذا نجد ان لكل من نوع العينة المستخلصة وظروف عمل الكروماتوجرافى وطريقة الكشف كلها عوامل تؤثر على تحميل الاعمدة والواح TLC . من الممكن اجراء الحقن المباشر للمستخلصات المركزة اذا ما تم استخدام الكاشفات من النوع TID أو EPD أو HCD مع اجهزة الكروماتوجرافى الغازى . اما اذا تم الكشف باستخدام (TLC) كروماتوجرافى الطبقة الرقيقة للتحليل المتعدد فلا بد من اجراء تنقية للمستخلصات .