الفصـــل الثـانـى عشـــر

– الفصل الكروماتوجرافى بالالواح ذات الطبقة الرقيقة .

* مقدمـــــة
* 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 البيرثرينات والمنشط بيرونيل بيوتوكسيد .

٦ – طرق جديدة مع الالواح الزجاجية المغطاة .

(أ) طريقة الالواح .

(ب) طريقة الالواح والانزيم الغير مباشرة .

(جـ) الالواح المغطاة ذات البعدين .

(د) الالواح ذات الوسط المعكوس .

(هـ) تسجيل الكروماتوجرام .

(و) التحديد الكمى للكروماتوجرام .

٧ – الاختبارات التأكيدية .

٨ – العوامل التى تؤثر على كفاءة الفصل بالـ TLC .

* قائمة المراجع

obeikandi.com

obeikandl.com

الفصل الكروماتوجرافي بالالواح ذات الطبقة الرقيقة

Thin layer chromatography (TLC)

* مقدمـــــة :

يطلق على هذه الطريقة « التقدير نصف أو شبه الكمى » Semiquantitative determination وهى تستخدم اساسا كطريقة تأكيدية لما اسفر عنه التقدير الكروماتوجرافى الغازى كما يمكن الاعتماد عليها لتقدير المبيدات الكلورينية وغيرها فى حالة عدم توفر او تعطل جهاز الكروماتوجرافى الغازى . وقد ثبت كفاءة هذه الطريقة وسهولتها وسرعة اجرائها وتماثل نتائج التحليلات مع تكرار الكشف عن نفس المبيد وكذلك تعطى نتائج توصف بانها شبه كمية مقبولة لحد ما . ولكى نثق ونتفهم امكانيات هذه الطريقة نقررانها يمكن الاعتماد عليها للكشف عن كميات فى حدود ٢٥ نانوجرام من المبيدات الكلورينية الدرين – ديلدرين – اندرين – هبتاكلور – هبتاكلورابيبوكسيد – تى دى اى – دد اى – ددت .

* بساطة الطريقة تتمثل فى انها تحتاج فقط الى طبقة رقيقة من مادة ادمصاص ودعامة صلبة مثل السليكا جيل ولوح زجاج على التوالى . فى بعض المركبات الكيميائية تكون حدود التقدير فى حدود النانوجرام واحيانا البيكوجرام . والتقدير يكون فى 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 فى سمك طبقة الوسط الثابت ونظام الكشف وظروف الفصل بما يتيح التقدير النوعى والكمى 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 فى العديد من المعامل .

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

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 البحاث Hurdtubise وآخرون (١٩٧٣) وكذلك Lott وآخرون (١٩٧٩) من حيث الفصل والكشف والتقدير الكمى للمركبات ، كما نوقشت اساسيات الاجهزة بواسطة Stahl (١٩٦٥) .. والاجهزة المطلوبة تشتمل على الآتى :

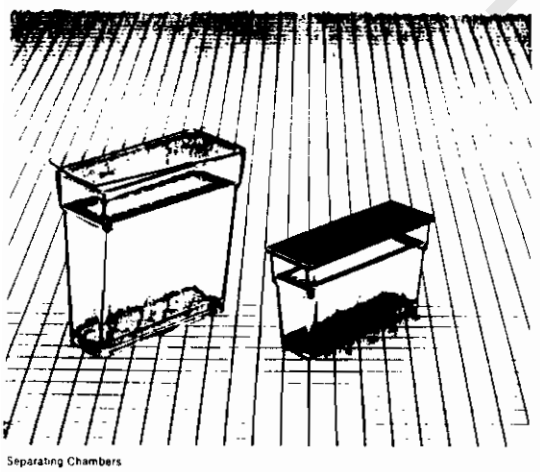
١ – ناشر الطبقة الرقيقة من مادة الادمصاص واللوحة وهى تقوم بنشر وتوزيع متجانس بعجينة مادة الادمصاص (الوسط الثابت) وهى مزودة بميكروميتر للتحكم فى سمك الطبقة واللوحة تثبت الواح الزجاج قبل وضع العجينة عليها .

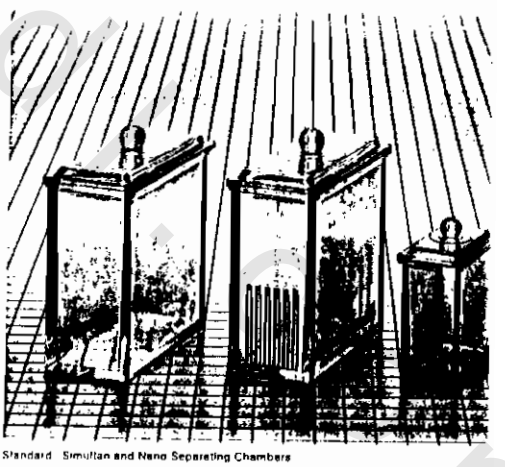
٢ – الوسط الثابت Stationary phase يعمل على شكل طبقة رقيقة من السليكا جيل او السليلوز او الالومينا ... الخ والتى يجب ان تكون لها مقدرة على ادمصاص المركبات الكيميائية عندما يتحرك المذيب خلال الطبقة .

٣ – المواد الصلبة المعضدة Solid supports الواح زجاجية او الالومنيوم او رقائق من البلاستيك بشرط ان تكون مقاومة للمذيبات العضوية تستخدم كمواد معضدة .

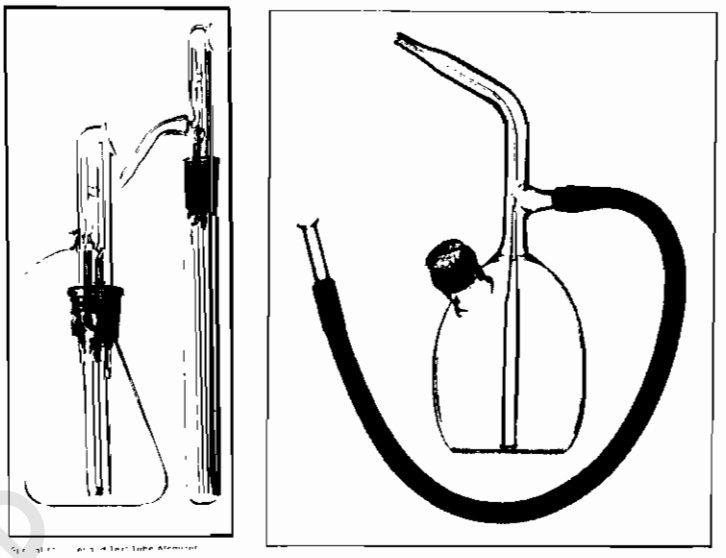
٤ – حجرة الكروماتوجرافى (الشكل ٢ أ ، ٢ جـ) وهى تصنع من زجاج شفاف وتستخدم للإحتفاظ بالوسط المتحرك (المذيب) .

٥ – محقن العينة والمسطرة Sample applicator and template تشمل حقنة دقيقة وانابيب شعرية معايرة وهى تستخدم لتنقيط العينة على اللوح المجهز 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 الكروماتوجرافى

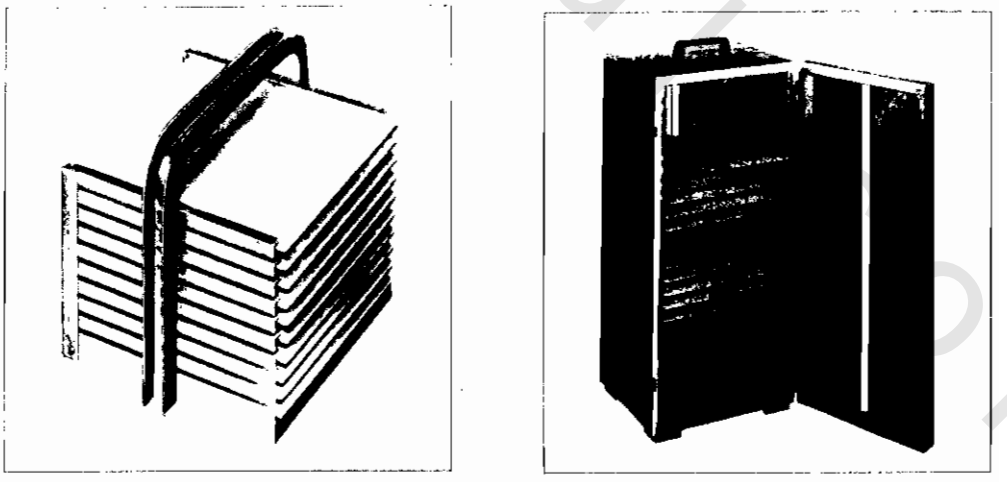
٦ – وحدة لتجهيز كروماتوجرافى الالواح ذات الطبقة الرقيقة .

٧ – رشاشة لرش المواد المتفاعلة لتنشيط او الكشف عن المركبات على اللوح الزجاجى (شكل – ٣) .

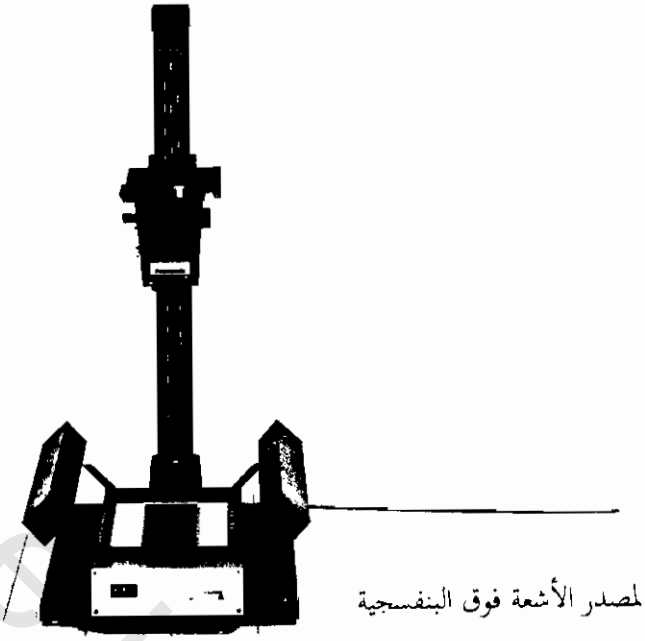
٨ – ماسك الالواح يمكن استخدام اى مادة بحيث لا تؤدى الى تلوث طبقة الادمصاص ويفضل الزجاج واى مادة غير قابلة للتآكل .

٩ – حامل الالواح وصندوق التخزين المحكم (شكل – ٤) . ويفضل ان يصنع الحامل من الصلب الغير قابل للصدأ كما يجب ان يبطن الصندوق بالصلب الغير قابل للصدأ ايضا لمنع التلوث .

١٠ – صندوق ومصدر الاشعة فوق البنفسجية UV (شكل – ٥) وهو يستخدم لاظهار البقع .



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



شكل (٥) : رسم توضيحى لمصدر الأشعة فوق البنفسجية

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

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 – اندوفثالات .

*** طريقة وخطوات التقدير Techniques :**

لن اخوض بالتفصيل فى هذا المجال حيث ان التدريب على هذه الطريقة ميسر وسهل وليس فيه اى صعوبة وهذه مسئولية الشركات المصنعة والموردة كما ان النشرات المصاحبة للاجهزة توضح كل شيء بالتفصيل ولا غضاضة فى 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 باسلوب TLC على المراحل والخطوات الآتية (الصور تعبر عن نفسها) ..

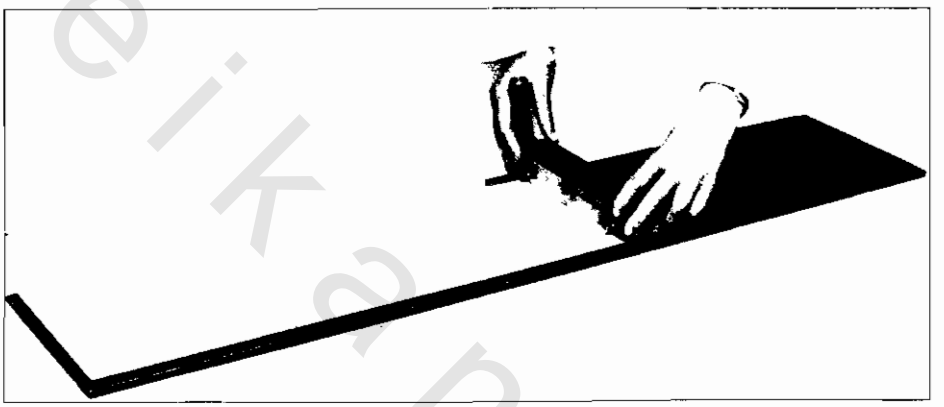
*** ١ – تغطية الالواح الزجاجية Coating :**

يتطلب هذا العمل تدريب وخبرة فى خلط ونشر العجينة ويجب قبل عمل العجينة التنظيف الجيد للالواح وتجفيفها جيدا . وتوضع الالواح 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 وبنسبة معينة محددة . تسكب العجينة وتفتح فتحة الدخول وتنشر فوق

الالواح ثم تزال وتترك حتى تجف . اذا لم يكن الناشر متوفرا يمكن نشر العجينة باستخدام شريحة زجاجية رقيقة وهناك جهاز بسيط كما فى الشكل (٧) . بعد ان تجف الالواح توضع فى فرن على درجة ١١٠ م لمدة ٠,٥ ساعة على الاقل ويمكن ان تخزن الالواح المعاملة فى صندوق محكم يحتوى على محببات من السليكا جيل (الشكل – ٤) .

*** ٢ – وضع العينات على الالواح Application of samples :**

قبل تنقيط العينات توضح 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 الإدمصاجية

عمل خط عبر النهاية حتى يمكن سريان الوسط المتحرك ووصوله للنهاية . توضع العينة على خط البداية بإستخدام المحقن الدقيقة أو الانبوبة 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 .

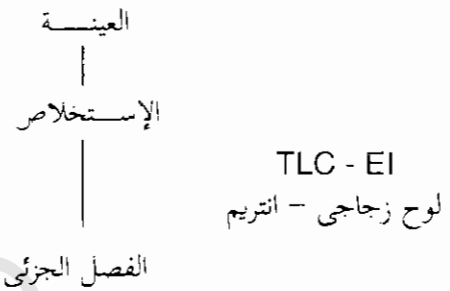
*** ٣ – استعمال الالواح Development of the plates :**

يجب تحقيق الاتزان فى حجرة الكروماتوجرافى قبل الاستخدام . توضع الالواح فى التنك وتغطى فى الحال (شكل – ٢) ، يمكن العمل على عدة الواح فى نفس الوقت بوضعها فى 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 بالبخر قبل استخدام المواد الملونة او المنشطة او محلول الانزيم .

obeikandl.com

* ٤ – تجهيز العينات **Preparation of samples** :

يجب ان تستخلص المبيدات من العينات النباتية والحيوانية أو الأرض أو الماء أو الهواء فى المذيبات العضوية . العديد من مستخلصات العينات تتطلب عمليات تنظيف قبل اجراء الفصل بالكروماتوجرافى ذو الالواح المغطاة TLC . يوضح الشكل (٧) رسم تخطيطى لتجهيز العينات قبل الفصل مع طريقة الالواح والتثبيط الانزيمى EI .. وهذه الخريطة تصلح لجميع طرق الـ TLC . يجب تركيز العينات وتقليل الحجم لاقل ضرر ممكن عن طريق التبخير بالتفريغ Vaccum 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 .

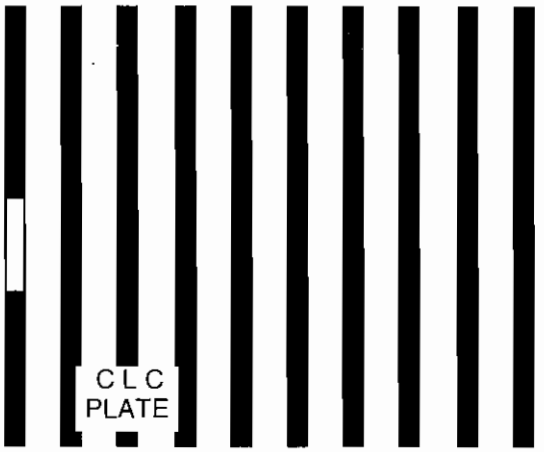


شكل (٧) : رسم تخطيطى يوضح تجهيز العينات قبل الفصل بالـ TLC مع الانزيم .

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



شكل (٨) : لوح الكروماتوجرافى ذو القنوات

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

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

هناك انواع عديدة من الجيل تصلح للكروماتوجرافى ذو الالواح 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 جدولى (٢ ، ٣) توضح RF للكاربامات على الكيسلجيل مع مذيبات مختلفة . وجدولى (٤ ، ٥) توضح RF للمبيدات الكلورينية والفوسفورية مع نظم ثابتة ومتحركة مختلفة .

جدول (١) : قيم RF (× ١٠٠) للمبيدات والمركبات المرتبطة بها على الالواح المغطاة بالفلوروسيل مع نظم مختلفة من المذيبات العضوية .

Sample No.	Compound	Hexane	Diethyl ether : hexane (6 : 94, v/v)	Diethyl ether : hexane (15 : 85, v/v)	Toluene	Acetone : toleuene (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	a - BHC	35	61	68	85	86
10	y - BHC	26	51	61	86	87
11	TDE	24	46	63	83	86
12	Trifluralin	19	74	76	88	88
13	Pentachlorophenyl acetate	19	55	65	80	87
14	Benfluralin	12	63	74	83	90
15	Bromophos-ethyl	13	57	64	83	84
16	Dichlofenthion	7	57	65	78	89

obeikandl.com

Sample No.	Compound	Hexane	Diethyl ether : hexane (6 : 94, v/v)	Diethyl ether : hexane (15 : 85, v/v)	Toluene	Acetone : toleuene (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 isopropyi	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

obeikandl.com

Sample No.	Compound	Hexane	Diethyl ether : hexane (6 : 94, v/v)	Diethyl ether : hexane (15 : 85, v/v)	Toluene	Acetone : toleuene (1 : 9, v/v)
37	2,4-D isobutyl	0	21	39	43	86
38	Dicloran	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	a-Naphthol	2	11	23	29	63
50	3,4-Diehloroaniline	4	7	13	42	84
51	Mercaptodimethyr	0	7	22	23	65
52	Dıoxathion	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

obeikandl.com

Sample No.	Compound	Hexane	Diethyl ether : hexane (6 : 94, v/v)	Diethyl ether : hexane (15 : 85, v/v)	Toluene	Acetone : toleuene (1 : 9, v/v)
57	Trichlorophenol	2	3	4	13	86
58	Captan	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	Ametryne	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

obeikandl.com

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

Source : From Hamilton and Simpson (16).

obeikandl.com

جدول (٢) : قيم RF (× ١٠٠) لاحدى عشر مبيد كاربامات مع نظم مذيبات عضوية مختلفة على الكيسلجيل 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
Mesurol (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 hcxane, (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 dtandard solution.

Source : From Mendoza and Shields (36).

obeikandl.com

جدول (٣) : قيم RF لاثنى عشر مبيد كاربامات على انواع مختلفة من الجيل مع نظام مذيبات عضوية مختلفة .

	Types of layer[a]									
	Silical gel G		Silica gel D-5		Silica get H		Silica AR TLC-7		Aluminum Oxide DS-5	
Pesticide	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
Matacil	45	18	33	12	51	21	47	21	57	22
Mesurol	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
Zectran	64	24	61	19	71	30	60	39	73	30

[a]Solvent 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)

obeikandl.com

جدول (٤) : قيم RF (×١٠٠) لبعض المبيدات الكلورينية العضوية والمركبات المشمائلة (حجم التنك ٢٨ × ٢٦ × ٢١ سم)

	System number[a] and Rf Value							
Pesticide	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
deHCI 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 parafin : 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 gel, A/S = 1 + 1 A : s.
Source : Cited in Abbott and Thomson (3).

obeikandl.com

جدول (٥) : قيم Rf (× ١٠٠) لبعض المبيدات الفوسفورية العضوية (٤٠ دقيقة فى كابينة ٢٨ × ٢٦٫٥ × ٢١ سم)

	System number[a] and value								
Pesticide	1 S	2 S	3 S	4 K/S	5 K/S	6 K/A	7 K/A	8 K/A	9 K/A
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
	40	60	74	16	90	15	17	90	13
Fenchlorphos	50	68	81	60	96	64	68	93	45
Malathion	12	29	45	0	57	0	2	81	0
Parthion	37	62	72	14	80	11	18	90	95
Phenkapton	54	71	84	43	95	43	38	90	30
Phorate	60	75	84	33	96	39	44	92	32
Phosphamidon	22	44	65	2	0	0	0	78	0
Thiometon	46	61	66	18	90	23	26	90	0

[a](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 Kielselguhr : silica gel, and K/A = 1 + 1 Kielselguhr : alumina.

Source : Cited in Abbott and Thomson (3).

obeikandl.com

*** طرق التطبيق والكشف عن مجموعات المبيدات المختلفة :**

*** ١ - الكشف عن المبيدات الكلورينية :**

يتطلب الكشف عن المبيدات الكلورينية تنظيف جيد للعينة قبل اجراء الفصل الكرماتوجرافى وتتوقف طريقة الفصل على نوع المبيدوالعينات المحتوية عليها ، ومن المعروف ان المواد الموجودة فى 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 لاظهار البقع . يجب ان يدوم اللوح وان يكون ذا نوعية جيدة حتى يحتفظ بالكروماتوجرام لفترة كافية ويحتفظ باللوح للتصوير او للرجوع المستقبلى عند ظهور اى مشكلة قانونية . يمكن اظهار البقع بمحلول نترات الفضة « محلول ميتشل المعدل » المكون من ١,٧ جم نترات فضة تذاب فى ٢٠ ملليلتر ماء ثم يضاف ١٠ ملليلتر ٢ - فينوكسى ايثانول ثم تخفف الى ١٩٠ ملليلتر بالاسيتون وقبل الرش يضاف ١ ملليلتر من محلول ايدروكسيد الامونيوم المركز الى ١٩ ملليلتر نترات فضة من المحلول القياسى ويحتفظ بالمحلول فى مكان مظلم فى زجاجات الجواهر الكشافة . يمكن استخدام البرومين او الفلوريسين او ازرق البروموفينول بلو مع محلول نترات الفضة . كما يستخدم الرودامين Rhodomine وكذلك الاشعة فوق البنفسجية للكشف عن المبيدات الكلورينية .

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

استخدم الجوهر الكشاف نترات الفضة رشا مع البروموفينول بلو او الاستر الايثايل للتترابروموفينولفثالين للكشف عن المركبات الهالوجينية والفوسفورية العضوية كذلك . توضح الجداول (٦ ، ٧) مقارنة للفصل بين طريقة نترات الفضة وتثبيط الانزيم على الالواح الزجاجية المغطاة TLC . يتضح من الجداول ان طريقة التثبيط الانزيمى اكثر حساسية من نترات الفضة فى الكشف عن المشتقات الاكسجينية محل التقدير والكشف .

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

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

*** ٤ - الكشف عن الروتينون :**

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

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

المبيد Pesticide	حـــدود التقـديـر Detection limit (ng) نترات الفضة Agno3 بروموفينول bromophenol بـلـــــو ble	TLC-EI[a]
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

[a]n.d. = not deterctable; p = s analogs were detected only after reaching with N-bromosuccinimide or bromine.

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

obeikandl.com

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

المبيد Pesticide	الطرق الإنزيمية Enzymatic[a] method	الطرق الكيميائية Chemical[b] method
	حدود التقديرات (نانوجرام) Detection limit (ng)	
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

[a]Pesticides resolved on TLC plates (250-µg thick layer of alumina G (Merck) type E) were exposed to bromine vapor before enzymatic detection.

[b]ND = not detected with the tetrabromophenol-phthalein ethyl ester and silver nitrate spray solution.

[c]Oxygen analogs.

[d]A carbamate.

Source : From Leoni and Puccetti (19).

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

*** ٥ – الكشف عن البير ثرينات والمنشط ببرونيل بيوتوكسيد :**

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

*** ٦ – طرق جديدة مع الالواح الزجاجية المغطاة :**

(أ) طريق الالواح 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 الكبريتية (فو = كب) للمبيدات الفوسفورية المى مشتقات اكسجينية (فو = أ) قبل الرش بالانزيم على اللوح الزجاجى لأن هذه المشتقات مثبطات قوية جدا للانزيم . وبعد التحويل تعرض الالواح للاشعة فوق البنفسجية أو البرومين . يزال البرومين الزائد قبل رش الالواح بمحلول الانزيم . يمكن استخدام جواهر كشافة اخرى لتحويل المركبات الى مثبطـــات قوية . يقوم الاشعة فوق البنفسجية بتنشيط معظم المركبات فو = وتحويلها وتحوينلا الى فو = أ ولكنها تعمل على انهيار مبيدات الكاباميات .

توجد مصادر عديدة للاسترازات التى تصلح مع طريقة TLC - EI ومنها كبد الجاموس والخنازير والدواجن والقرود والفئران . يجب ان يكون الكبد طازجا لضمان عدم انهيار الانزيم . كذلك تعتبر بلازما الدم او السيرم أو رؤوس النمل والذباب مصادر ممتازة للاسترازات الحساسة للتثبيط 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 لأكثرمن عام دون حدوث فقد مؤثر للنشاط الانزيمى وبعد ذلك يتوقع حدوث فقد كبير . أى رشاش يصلح ويشترط الا يسيل محلول الرش من على الالواح ويترك لتجف تحت درجة حرارة الغرفة .

تستخدم المواد الملونة المختلفة لاظهار البقع مثل ١ – نافثيل اسيتات ، اندوكسيل اسبتات ، اندوفينيل اسبتات ، حيث تذاب فى المثيانول او الاسيتون او الايثانول . خلال دقائق قليلة تظهر بقع او مساحات تحدد اماكن المبيدات على خلفية ملونة . حيث ان المبيدات تثبط النشاط الانزيمى فى هذه البقع يقف التحلل المائى 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 مائى للشق الحامضى من المادة الوسيطة . فى بعض الطرق يرتبط الوسيط الانزيمى 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 لأى مواد اخرى لتكوين اللون .

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

obeikandl.com

جدول (٨) : تثبيط الاستيرازات بالمبيدات مع المعاملة بالبرومين او 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	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	---
	Br	+	+	+	+	+	8,000
Dimethoxon : 10,000	N.Br	+	+	+	+	+	---
	Br	+	+	+	+	+	8,000
Demeton-S sulfone : 50	N.Br	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	---
	Br	+	+	+	+	n.d.	10
Carbaryl : 1	N.Br	n.d.	n.d.	+	T	n.d.	---
	Br	+	+	+	T	+	0.
Ethion : 10	N.Br	+	+	+	+	+	---
	Br	+	+	+	+	+	1

obeikandl.com

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

[a]Figure 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.

[c]Esterases 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)

obeikandl.com

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

pesticide	Amount detected[a] (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

[a]Pesticides resolved on silice gel G or GF; the enzyme substrate was indoxyl acetate.

Source : From Gardner (38).

obeikandi.com

جدول (١٠) : حدود التقدير لاثنى عشر مبيد كارباماتى على طبقات كيسلجيل G-HR بطريقة TLC-EI مع مستخلصات كبد الخنزير .

	Liver extracts			
	Pig		Steer	
Pesticidea	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 (-)
Mesurol	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- (methylcarbamoyl) oxime (Union Carbide), 99.9%. Zectran = 4-dimethylamino-3,5-xylyl methylcarbamate (Dow Chemical Company, The Agricultural Products Department, Midland, Mich.), 99%. All the standards were dissolved in methanol and kept in refrigerator.

b(+) = TLC spots corresponding to the areas where enzymes were inhibited 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 inhibition detected. TLC plates were coated with 450-m-thick layer of kieselgel 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 بالاشعة فوق البنفسجية UV أو بدون .

	Detection Limit (µg)			
	Withou UV		With UV	
Pesticide	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
[c]Not clearly detected.
Source : Data from Geike (38, 40).

obeikandl.com

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

ليست مفيدة بنفس قدر الطريقة المباشرة وفيها تطبع البقع التى 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 .

	Detection Limit[a] (µg)		
Pesticide	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 (bluc)	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

[a]n.d. = not detecltable.

[b]A = indirect TLC-EI technique; B = bromothymol blue-UV light; C = bromothymol blue-bromine; colors of spots in parentheses.

[c]Destignation used by author in literature cited.

Source : From Bunyan (24)

obeikandl.com

(جـ) الالواح المغطاة ذات البعدين Two dimentional TLC :

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

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

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

جدول (١٣) : يتم الإنسياب RF × ١٠٠ لمركبات البيرثريودز مع ٣ : ١ هكسان : خلات الإثيل

Compound	First development	Second development
Pyrethrin I	50	60
II	30	41
Cinerin I	57	72
II	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).

obeikandl.com

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

Pesticide	Rf values[b,c]	
GROUP I	Solvent I	Solvent 11d
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
Aziknphosmethyl	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

obeikandl.com

[a]Average of 10 determinations. Chromatography performed using a sandwich chamber at 23 to 26°C and from 50 59 65' relative humidity. Detection by horse serum cholinesterase inhibition and p-NBP.

[b]Solvent systems : I = toluene, II = 25' heptane in ethyl actate, III = ethyl acetate.

[c]Rf 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.

[d]Rf values of bromine oxidation products.

[e]Nonreproducible Rf value. May depend on concentration of bromine.

Two spots were present with both detection reagents. highest Ff 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
Paralthion	25	30
P-Nitrophenol[b]	65	87
Phjenol[b]	50	70

[a]Developing solvent : ethanol-water (1 : I : 2).

[b]Reference materils.

Source : From Conkin (2)

(هـ) تسجيل الكروماتوجرام **Revording of the chromatogram** :

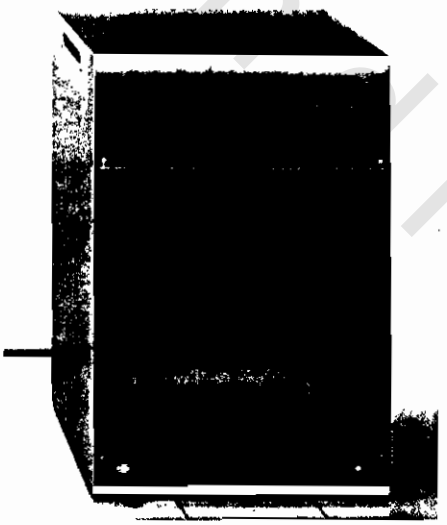
يمكن تسجيل الكروماتوجرام بطرق متعددة منها التحوير أو التصوير الفوتوغرافى او الرسم بالاشعة أو قياس الكثافة الضوئية « سبكترودينسيومترى » او تسجيل قيم الانسياب Rf ومساحة البقع . يجب تسجيل نوعية وكثافة الكروماتوجـــرام ويمكن تصنيفها الى باهت ± Faint أو كثيف ± intense أو كثيف جدا ++ very intonse .. يمكن تسجيل لون البقعة وخلفية اللواح كما يجب ملاحظة الوقت الذى فصلت فيه البقعة ودوامها . يمكن تحديد مكان البقعة فى حالة ما اذا كانت ستختفى او ستكشف بعد ذلك للتقدير الكمى .

(و) **التحديد الكمى للكروماتوجرام Quantitation** :

هناك طرق مختلفة للتقدير الكمى للمركبات بعد الفصل على الالواح المغطاة TLC . من هذه الطرق مقارنة مساحة المركب الغير معروف فى مقابل المساحة الخاصة بالكمية المعلومة للمركب القياسى المقارن للمجهول . بالطبع يجب تعريف المركب المجهول قبل عمل هذه المقارنة . ولقد قارن kumar واخرون عام ١٩٧٦ مساحة ووزن البقع والطرق اللونية للباراثيون كبارا اوكسون . واظهرت العلاقة بين مساحات التثبيط بالملليمتر المربع او الملليجرام فى مقابل تركيز الباراثيون علاقة خطية فى حدود ٥ الى ٥٠ نانوجرام باراثيون .

هناك طريقة اخرى تتمثل فى 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 فى الجزئ .



شكل (١٠) : جهاز قياس النشاط الإشعاعى على الألواح المغطاه TLC

obeikandl.com

يمكن ايضا 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 وتحولها الى مشتقات ثم تذاب فى مذيب عضوى مناسب والكشف بالكروماتوجرافى الغازى .

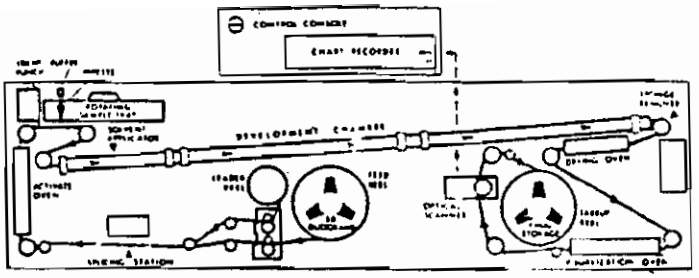
استخدم Seifert and Davidak عام ١٩٧١ الطرق البولاروجرافية فى التقدير الكمى للفينتروثيون والفينترواوكسون بعد الكشف والفصل بالـ TLC-EI والتنظيف من خلال عمود الكروماتوجرافى وتراوح الانحراف القياسى ٢٦ ٪ بينما وصل الانحراف فى البلانيميتر ٢٠ ٪.

جدول (١٦) : معدل الإسترجاع للمبيدات على الواح الكروماتوجرام

		Percent recovery				
pesticide	layerq	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	80	84	
Dieldrin	S	94	97	91	88	92
A	88	79	84	79	82	
Endrin	S	94	98	93	88	94
A	88	80	85	79	84	
Heptachlor epoxide	S	92	89	84	74	80
A	84	72	76	67	75	
p,P'-TDE	S	99	95	89	86	93
A	87	77	82	80	83	
p,P'-DDE	S	95	97	98	90	95
A	88	79	83	82	84	

aS = silica gel G; A = alumina G. Quantitation hy gas-liquid chromatography.
Source : From Harrison (28).

والان .. تقسم البقعة المفصولة الى مساحات صغيرة جدا وتقاس بالدينسيوميتر 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 .



FLOW DIAGRAM OF CHROMATAPE PROCESSOR

* ٧ – الاختبارات التأكيدية Confirmation :

يمكن فصل المركب القياسى مع المركب محل الاختبار للتأكد من التعريف . كذلك يمكن كشط البقعة وتحليلها بالكروماتوجرافى الغازى مع المركب القياسى . يمكن استخدام Gc-mass (الكرماتوجرافى الغازى مع طيف الكتلة) وهذا يمكن عمله قبل او بعد الفصل بالالواح او بالـ Glc . كذلك يمكن استخدام التحليل بالاشعة تحت الحمراء للتأكيد كما فى حالة مبيد الروتينون .

* ٨ – العوامل التى تؤثر على كفاءة الفصل بالـ TLC :

* العوامل التى تؤثر على قيم معامل الانسياب Rf كما يلى :

١ – نوع مادة الادمصاص (الوسط الثابت)

٢ – نوع المذيب او مخلوط المذيبات (الوسط المتحرك)

٣ – نوع الوسط الغير متحرك (الزيت المعدنى او السليكون) .

٤ – درجة الحرارة (جدول ١٧) .

٥ – الضغط البخارى (تشبيع المذيب) فى حجرة الكروماتوجرافى .

٦ – سمك طبقة الجيل .

٧ – النشاط السطحى للجيل فى ادمصاص المركب محل الكشف .

* العوامل التى تؤثر فى الكشف عن المركب detection :

١ – كمية المركب تحت الاختبار على لوح الـ TLC .

٢ – انهيار أو تنشيط مركب الاختبار خلال الكرماتوجراف .

٣ – المواد المتداخلة مثل الزيوت والصبغات فى المستخلص .

٤ – نوع مادة الادمصاص .

٥ – الملوثات على اللوح الزجاجى او على طبقة الجيل او فى حجرة الكروماتوجرافى او فى المعمل

جدول (١٧) : إختلاف قيم RF مع حرارة الكشف

	Rf x 100 at temperature (°C)					
Compound	-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

	Detection limit (ng)a]				
Resticide	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).

obeikandl.com

جدول (١٩) : تأثير البرومين والأشعة فوق البنفسجية على مصل ١٢ مبيد كارباماتى ثم وضعه على الكيسلچين والرش 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).

obeikandl.com

٦ – تلوث الحقنة 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 جوهر الكشف (يجب استخدام محلول الانزيم او محلول الرش الملون المجهزة حديثا (الطازجة) .

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).

obeikandl.com

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. Çruene, 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. Offic. 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, analyst, 93. 34 (1968).

Open Knowledge

32 . H. Ackermann, B. Luxow, and E. Plewka, J. Chromatogr, 44, 414 (1969) .

33 . R. R. Goodall, J. Chromato0gr, 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)

Openkandi.com