الفصل السـابع عشـر

– استخدام تقدير المناعة فى تحليل مخلفات مبيدات الآفات :

* مقدمـــة
* مميزات تكنولوجيا كيمياء المناعة .
* استخدام الطريقة مع المبيدات الكيميائية .
* توازن مميزات التحليل بالمناعة .
* الاستخدامات فى كيمياء المبيدات .
* تحليل المركبات التى يصعب تحليلها بالطرق التقليدية .
* تمييز المشابهات والمركبات القريبة .
* تحليل سوائل جسم الانسان ومعلمات حيوية .
* تحليل اعداد كبيرة من العينات .
* التحليل السريع او / والميدانى .
* تحليل نواتج بحوث التكنولوجيا الحيوية .
* التوصيات .
* صلاحية التحليل بالمناعة .
* ادخال التحليل المناعى فى معامل التحليل .
* اختيار المركبات الاولية للتحليل .
* قائمة المراجع

obeikandl.com

obeikandl.com

استخدام تقدير المناعة في تحليل مخلفات مبيدات الآفات

Utility of immunoassay in pesticide trace analysis

مقدمـــة Introduction :

تستخدم طرق تقدير المناعة على نطاق واسع فى الكيمياء الحيوية وتحليلات الغدد الصماء وكذلك الكيمياء التشريعية ونادرا ما تستخدم فى الكيمياء البيئية . والفشل السابق الذى 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 . وفى عام ١٩٨٠ اشار Hammock & Mumma الى مقدرة كيمياء المناعة فى تحليل المبيدات وعددوا نقاط قبولها . وبعد ٦ سنوات اظهرت العديد من الهيئات اهتماما كبيرا بهذا التكنيك على المستوى الاكاديمى والحكومى والمعامل الصناعية . وخلال الحقبة الزمنية الاخيرة بدأ استخدام تكنولوجيا كيمياء المناعة فى تناول المشاكل المتعلقة بالكيمياء البيئية فى هذه المعامل . ونستطيع القول ان هذه التكنولوجيا لا تمثل العلاج الحاسم والشافى لكل المشاكل ولكنها تعتبر وسيلة مكملة لطرق التحليل التقليدية فى مختلف المجالات . وتقدم هذه الوسيلة مميزات متعددة عما هو الحال مع الطرق الكلاسيكية المعروفة فى حل بعض المشاكل وربما تكون الطريقة التكنولوجية الصالحة فى بعض المجالات الاخرى .

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

مميزات تكنولوجيا كيمياء المناعة Advantages of immunochemical technology :

طريقة تقدير المخلفات باستخدام اسلوب المناعة يستخدم بوجه عام فى كيمياء المبيدات ، وتتميز 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 كيمـــياء المناعـــة تمثل الاستخدام الـــفورى للتكنولوجيا الحـــيوية biotechnology وبالرغم من ان هذه الطريقة تعتبر طريقة طبيعية physical استنادا الى قانون فعل الكتلة وليس حيوية bioassays الا انها تستمد حساسيتها الفائقة وتخصصها العالى الى النظم الحيوية biological systems التى تنتج الاجسام المضادة التى سوف ترتبط بالمركبات التى

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 بصبح 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 المخلقة المعقدة (مثل مثبطات النمو الحشرية الدايفلوبنزيرون والكلور سلفيرون) ونواتج التخمر مثل الافيرمكتين والبروتينات مثل توكسينات بكتريا الباسيللس ثورينجينسيز ، يصبح من الأهمية ايجاد طرق مقبولة لتحليل هذه الجزيئات الضخمة .

تحليلات المناعة تجرى عادة فى محلول مائى ولذلك يجب ان يكون الجزئ المطلوب تحليله وتقديره ذو ثبات متوسط (على الاقل) فى الماء . ومن المثير للدهشة ان الذوبان فى الماء نادرا ما يعتبر مشكلة حيث انه حتى المركبات شديدة الحب للدهون Lipophilic غالبا ما تكون ذائبة فى الماء عند تركيزات غاية فى الصغر « البيكو pico أو الفيمتومولار Femtomolar » وهذه تلائم طريقة المناعة . وحتى المركبات شديدة القلة فى الذوبان يمكن ان تكون فى متناول الجسم المضاد فى صورة جسيم دقيق micelles او مع مرافقات الانزيمات الذائبة فى الماء .والمشاكل المصاحبة لتحليل المركبات عالية الذوبان فى الدهون ترجع فى العادة الى ازالتها من الوسط الزيتى بدرجة تفوق المشاكل الناجمة عن الذوبان المطلق . وكقاعدة عامة تستخدم تحليلات المناعة للكشف وتقدير الجزيئات التى يصعب تقديرها بالكروماتوجرافى الغازى السائل مما يضفى على هذه الطريقة اهمية كبيرة كتكنولوجيا مكملة مثيرة للاهتمام . وبالرغم من سهولة ايجاد طريقة تحليل المركبات الذائبة فى 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 فى الوقت الحالى ومن المتوقع ان تلائم هذه الطريقة للجيل التالى من المركبات .

* توازن مميزات التحليل Balancing the advantages of immunoassay :

فى عام ١٩٧٤ بدأت دراسات فى معامل جامعة كاليفورنيا لتحديد امكانية استخدام تكنولوجيا كيمياء المناعة لتحليل مبيدات الآفات وغيرها من الكيميائيات . ولقد صممت البحوث لتقييم مميزات وحدود هذه التكنولوجيا فى 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 البحاث 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 الآسيل يوريا) أو مخلوط المركبات (المواد ذات النشاط السطحى الغير ايونية) ولكن هذه التطويرات لا يمكن ضمان ان تحتفظ بميزة الحساسية العالية .

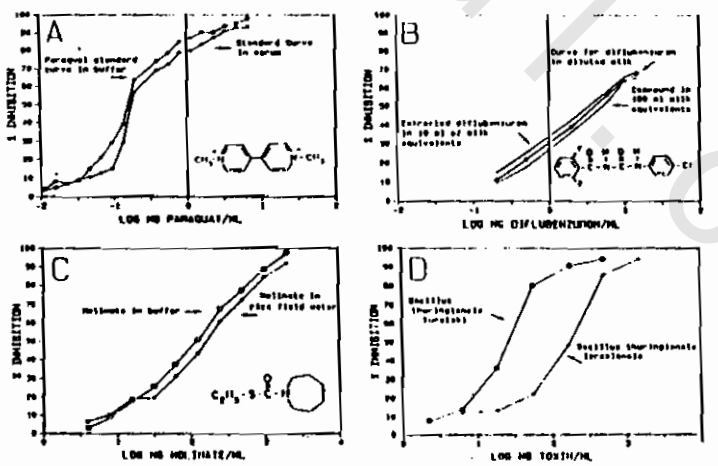
ولقد أكدت سنوات الخبرة العديدة فى مجال الكيمياء التشخيصية وزيادة الخبرات فى الكيمياء البيئية تعاظم مميزات اسلوب المناعة فى تحليل المخلفات . وتعتمد الحساسية العالية لهذا الاسلوب على الارتباط العكسى واللصيق للجسم المضاد مع المركب مجال التحليل . وحيث ان هذا الارتباط مبنى على مجموع التفاعلات الغير تكافؤية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

كما فى الشكل IA لمبيد الباراكوات فى 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 فى عينات الالبان المطلوب تجهيزها لكل عامل فى اليوم مع تقليل التكلفة وزيادة الدقة والحساسية .

وحيث انه طورت العديد من مجاميع المبيدات مثل البيرثرويدز ومشتقات آسيل يوريا الحشرية أو سلفونيل يوريا لمكافحة الحشائش ، اصبح من المهم تطوير طرق تحليل حساسة للكشف عن المخلفات ذات الاهمية التوكسيكولوجية . ومن اكفأ الانجازات التى امكن تحقيقها فى تحليلات المناعة مع اقل قدر ممكن من خطوات التنظيف ما تحقق مع مركب اليوريا دايفلوبنزيرون (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 التى 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 التنكنيك تتمثل فى امكانياتها فى تحقيق مستويات من الحساسية فى مجال التوكسيكولوجى مع توفير مجهودات وتكاليف كثيرة . وفى الحقيقة يمكن التحكم فى درجة حساسية هذه الطريقة بالمقارنة بالطرق الطبيعية الاخرى .

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



شكل (١) : بعض الامثلة لاستخدامات التحليل بالمناعة immunoassay فى تحليل مبيدات الآفات .

للباحث تطوير طريقة ميدانية سريعة أو طريقة تحليل النسبة المئوية للتثبيط فى الـ Elisa المتنافسة ممثلة فى مقابل لوغاريتم المادة محل التقدير بالنانوجرام / ملليلتر . الرسوم من A الى C توضح المنحنيات القياسية لمادة التحليل فى محلول المنظم فى مقابل واحد أو اكثر من منحنيات المركب والـــتى 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/ملليلتر ودرجة تخفيف الجسم المضاد ١ : ٤٠٠٠ . والشكل B يوضح تحليل الدايفلوبنزيرون (ديميلين) فى اللبن الخام ومستخلصات اللبن (الخطوط السادة) . تم استخلاص اللبن بمذيب الا يثايل اسيتات تبعا لطريقة AOAC المعروفة . وتوضح النتائج ان الجسم المضاد قادر على استخلاص الدايفلوبنزيرون 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 المولينييت فى عينات المياه من حقول الارز . وتم اضافة محلول PBS كمنظم لعينات المياه ثم عوملت بالمولينييت ولم تلاحظ اختلافات فى المنحنيات القياسية عندما كانت نسبة الماء فى العينات ٥٠ ٪ . ويمكن زيادة حساسية الطريقـــة باستخلاص المولينييـــت بخلات الايثايل او التولوين . ثم تركز المستخلصات ويؤخذ المولينييت فى البروبيلين جليكول ثم يضاف للجسم المضاد . ويمكن اضافة أكثر من ٥ ٪ بروبيلين جليكول مع الآليزا . وكان تركيز الانتيجين المغلف فى ميكروجرام /ملليلتر وتخفيف الجسم المضاد ١ : ٤٠٠٠ . والشكل (D) يمثل المنحنيات القياسية للتوكسينات المتبلورة للباسيللس 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 / ملليلتر وتخفيف

الجسم المضاد ١ : ٤٠٠٠ للبكتريا الاسرائيلية و ١ : ٨٠٠ لسلالة كورستاكى . والعديد من الطرق الطبيعية للتحليل تستخدم لتقدير المادة المرتبطة فى مقابل الحرة بما فيها جهاز قياس الوميض وقياس العكارة أو استقطاب الضوء او الأشعة المرئية أو الاشعة فوق البنفسجيية والطرق الاسبكتروفوتومترية بالالكترونات والعديد من الطرق الاخرى . وكل من هذه الطرق له مجالات مختلفة كثيرة .. وعلى سبيل المثال اذا تناولنا الطريقة الانزيمية المدعمة بتحليل المناعة « الاليزا En-zyme linked immunosorbant Elisa » 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 فى التكنيك ادى الى خلق تشويش على اساس الطريقة وتكنولوجياتها السهلة . واذا اكتسب شخص خبرة كبيرة فى مجال التحليل المناعى سيكون على دراية كافية بغيرها من المجالات الاخرى ، الا ان التسمية نفسها الخاصة بهذا التكنيك ما زالت تخوف وترعب الكثير من القائمون بالتحليل الكيميائى . وترجع جميع الاختلافات فى التحليل المناعى على التفاعل العكسى بين الجسم المضاد والمركب . ان تدبير جسم مضاد ممتاز يمكن من تجهيز واستخدام اى من الاصول الموجودة لتصميم طريقة تحليل مناعى للتقدير الكيفى والكمى للمركب محل الدراسة . والاقتراب من هذا الاتجاه فى التحليل يؤكد على الكيميائى الالتزام بمحددات نجاح الطرق الاخرى 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 التى ترتبط مع الانتيجين .

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

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

*** الاستخدامات فى كيمياء المبيدات Application to pesticide chemistry :**

المميزات والحدود الخاصة بتكنولوجيا كيمياء المناعة المدونة فى الجدول رقم (١) تترجم الى بعض الاستخدامات الحالية فى كيمياء المركبات التى ستذكر فيما يلى :

*** تحليل المركبات التى يصعب تحليلها بالطرق التقليدية :**

من اوضح استخدامات كيمياء المناعة هو تحليل المركبات التى يصعب تحليلها بالطرق التقليدية . وكما هو معروف فان الكروماتوجرافى الغازى السائل GLC يستخدم بدرجة كبيرة مع المركبات المتطايرة (عادة كارهة للماء وصغيرة الوزن) والثابتة فى الحرارة والتى لها بعض الصفات التى تمكن من الكشف عنها بواسطة الكاشفات المتخصصة . والكروماتوجرافى السائل عالى الكفاءة

HPLC اقل تقييدا ولكنه مازال يعتمد على بعض الصفات المحددة للكشف . والمعايير المذكورة اعلاه ليست ضرورية لتحقيق نجاح التحليل المناعى ولو ان هناك اتجاه يوضح ان التكنيك يعتبر مكملا للتكنولوجيا الموجودة ويمكن استخدامه ككاشفات عالية الكفاءة « HLPC » . وكما هى العادة البشرية فانه لا يبدأ بتجربة التكنولوجيا الجديدة الا عندما تفشل التكنولوجيا الموجودة والمستخدمة 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 الاليثيرين البيرثرويدى 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 لمركبات 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 البيئية قد يقرر البعض ان المركبات التى تباع 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 الاللثرين يتكون من ٨ مشابهات ضوئية وهندسية ومن اكثرها فعالية بيولوجيية 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 الديميلين وغيره من المركبات الفعالة مثل Bay Sir 8514 . وتيطلب 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 الديميلين وغيره من المركبات القريبة منه حتى التى ظهرت بعد تطوير هذه التكنولوجيا .

* تحليل سوائل جسم الانسان ومعلمات حيوية

Analysis of human body Fluids and as biomarkers

لتقييم درجة تعرض الانسان للسموم يصبح من الضرورى تحليل سوائل الجسم مثل البول والدم . وحيث اننا نتجه لايجاد علاقة بين التعرض والسمية توجه الاهتمامات المتزايدة الى تحليل المركبات الصلية ونواتج تمثيلها وعلامات التسمم فى الافراد الذين يتعرضون مهنيا او بيئيا . والتحليل المناعى يناسب التشخيص الاكلينيكى 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 فى عينات الدم والبول والليمف باستخدام التحليل المناعى وبحساسية شدية تفوق جميع الطرق الاخرى المعروفة . وسرعة اجراء التحليل تتيح فرصة كبيرة لاجراء دراسات حركية الكيميائيات Pharmacokientic لتقييم خطورة التعرض المهنى للسموم .

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

التحليل بالمناعة Immunoassay طريقة غاية فى السهولة وقليلة التكلفة مما يجعله اسلوب نموذجى لتحليل اعداد كبيرة من العينات . وهذا الوضع يجعل التحليل المناعى ملائما لاغراض تسجيل المبيدات وكذلك اختبارات النوعية ومطابقة المواصفات القياسية وتقدير المخلفات عندما يكون هناك شك فى وجود المركب . وعندما تستخدم الطرق التقليدية للتأكيد تفيد طريقة التحليل المناعى لتقليل السلبيات . وفى هذا المقام تطوير طريقة لتحليل مبيد الحشائش المولينييت " molinate " حيث ان هذا المركب مفيد جدا فى زراعات الارز ولكن اذا انفرد قبل الميعاد المطلوب سيؤدى الى قتل الاسماك . وساعدت هذه الطريقة فى تقييم ديناميكية وحركية المولينيت فى زراعات الازر بالرغم من العديد من العينات المطلوب تحليلها لتحقيق هدف الدراسة . ويوضح الشكل IC امكانية اضافة الماء المأخوذ من حقول الارز الى انابيب التحليل المناعى مما يمكن من تقدير درجات انفراد المولينييت فى الماء . وتوضح هذه النتائج امكانية تطوير طريقة التحليل المناعى 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 الثلوث البيئى بمستويات معينة من الملوثات . وتحليل وجود مبيدات الحشائش الذائبة فى الماء مثل الثيوكاربامات والـ 2,4-D ومركب 2, 4, 5-T ذات اهمية خاصة فى برامج استكشاف تلوث الماء السطحى بينما التحليل السريع للتريازين ومركبات الاسيتانيليدات تعتبر مهمة فى 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 ومسئولي الزراعة من الكشف عن آثار هذا المبيد فى المياه قبل الصرف . ويفيد هذا التكنيك كذلك فى التأكد من وجود الكيميائيات 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 الشئ 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 والإفيرمكتين Ivermectin بينما التوكسين الخارجى من بكتريا الباسيللس ثيورينجينسيز 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 للببتيدات والبروتينات . ولمثل 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 بإستخدام انواع قريبة من هذه البكتريا . وتمكن البحاث فى جامعة كاليفورنيا من تطوير طريقة تحليل مناعى لبللورات التوكسين الخاص

بسلالات BT الاسرائيلية ، وهذه الطرق تصلح للكشف عن جودة الانتاج ويمكن تحويرها لتقدير مخلفات المبيدات . وفى حالة ما اذا انفردت جينات غريبة فى البيئة يمكن بطرق التحليل المناعى الكشف عنها او نواتج تفاعلها مع البيئة ، وهذا يؤكد ان هذه الطريقة تعتبر مكملة 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 العشرون 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 التأكد من مقدرة هذه الطريقة على التقدير الكمى وليس النوعى فقط . ولم تجرى هذه المقارنات للتأكد من صلاحية الطريقة لتقدير اى مركب من المبيدات حتى الآن . ولقد وجد Wie and Hammock (١٩٨٢) ان الفرق بين طريقة التحليل المناعى وتلك التى اجريت بالـ Elisa لمركب الدايفلوبنزيرون (٣ و ٥ ٪ 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 والميتاليكسيل والترايديمفون . ولقد اشار Emon ومعاونوه (١٩٨٦) 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 (١٩٨٤) الى العلاقة الجيدة بين التحليل المناعى الانزيمى والتحليل المناعى الفلورينى مع مبيد الحشائش الدايكلوفوب – 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 معامل التحليل

Intorduction of Immunassays in the analytical laboratory

يجب ان يكون لدى الوكالات المعنية بمراقبة المبيدات ومنتجى هذه الكيميائيات 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 النواحى الكيميائية وابتكار نواحى جديدة . وهناك هدف هام ومحدد يتمثل فى دراسات تحديد المواقع المتخصصة للارتباط بالجسم المضاد . والمطلوب إجراء العديد من الاختبارات او الاقترابات عالية التكلفة للغربلة 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 الهيبابتين المناسب hapten . ولو امكن تطوير هذه الإتجاهات فى المراحل المبكرة من تطوير المركب (المبيد) يصبح من السهل توفير الهيبابتينات 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 المجهودات فى هذا السبيل . فلو امكن تجهيز الهيبابتين 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 البيتيدات العديدة المسئولة عن احداث السمية من بكتريا الباسيللس ثيورينجينسيز حيث لا مفر من تكنولوجيا التهجين . ولقد تناقصت تكلفة انتاج الاجسام المضادة الوحيدة بسرعة خاصة فى المعامل التى تأخذ فى الاعتبار اقتصاديات العملية . ولقد اجرى استخدام العديد من السلالات المختلفة وراثيا من الفئران لابتداء المناعة وكان ذلك متبوعا بغربلة 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 البحاث تقدير مدى الحاجة للجسم المضاد الاحادى وعليه ان يطور طريقة غربلة 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 والليجاندس والاجسام المضادة تمثل الجواهر الكشافة للتحليل بالمناعة ولكنها يجب ان تتآلف فى طريقة تحليل . وهناك طرق عديدة ذات تركيبات مختلفة ولكن تزييف هذا التحليل يحتاج لبراعة فنية وخداع والفنيون اللذين يقومون بهذا العمل من الضرورى ان يكونوا من العاملون فى معامل التحليل التى تتناول هذه الطريقة . لأن هذا التكنيك يجب ان يستخدم فى مشاكل تحليل حقيقية . فى مراحل التطوير والتطبيق يمكن للفنى الخبير العمل فى النواحى 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 الاولى 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 الالمام 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 وغيرها اصبحت تستجيب لأصداء هذا التكنيك الجديد .

R eferences قائمة المراجع

1 . B.D. Hammock and R. O. Mumma, Recent Advances in Pesticide Analytical Methodology, p. 321. American Chemical Society Publications, Wahsington 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. Zahnow, 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).

obeikandl.com

18. R. P. VAllejo, E. R. Bogus aqnd 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. kAgric, 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)