الفصل الرابع والعشرون

-التقدير الامثل ومقاييس التنقية فى طرق التحليل المتعدد والحساسية لمتبقيات المبيدات :

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

obeikandl.com

obeikandl.com

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 الكروماتوجرافى الغازى ، كما تم تحديد حساسية هذه المركبات لظروف الكروماتوجرافى الغازى ، كما تم اختبار المقدرة على التحميل لكل من اعمدة الكروماتوجرافى الغازى والواح كروماتوجرافى 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 .

المقدمـــــة :

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

لكى 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 اختيارها من مجاميع كيميائية مختلفة وذلك باستخدام اعمدة معبأة تم تحميلها بمستخلصات نباتية وذلك بهدف :

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

٢ – تقدير مقدرة التحميل لأعمدة الكروماتوجرافى الغازى القصيرة وذات السعة المنخفضة .

فى حالة عينات التفاح والجزر والسبانخ فان الاستخلاص قد يتم بالاسيتون وتمت عملية التوزنيع 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 الكرماتوجرافى الطبقة الرقيقة وذلك باستخدام هذه المستخلصات وتطبيقها على الواح جاهزة .

اختيار ظروف الكروماتوجرافى الغازى Selection of GC conditions

* خمول اعمدة الكروماتوجرافى الغازى Inertness of GC columns

ان الجزيئات المتغيرة كيميائيا من الممكن ان تتدهور فى جزء الحقن وايضا فى عمود الكرماتوجرافى وفى كلا الحالتين فات التأثيرات التحضيرية من كل من جزء الحقن والعمود ودرجة الحرارة تتحكم فى معدل هذا التدهور . يتم ذلك باتباع الغسيل بحامض واستخدام اعمدة زجاجية من النوع Pyrex المعامل بمادة Silane مع إستخدام مادة تعبئة خاملة وصوف زجاجى معاملة بالسيلله وبالتالى فان تكسير معظم المركبات المتغيرة من الممكن ازالتها او حفظها عند مستوى ثابت ومنخفض . بالتالى 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 الكرماتوجرافى وعلى العكس فان تلوث جزء الحقن من الممكن ان يعمل على احداث تدهور جزئى او كامل لهذه المركبات المتغيرة .

عند اجراء مقارنة بين الاستجابات للمبيدات المختارة وهى : P - P' - DDT , Propicana-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 FPD , NPTID , ECd على التوالى .

الظروف المستخدمة للفصل الكروماتوجرافى والتى اظهرت هذه الاستجابة كانت مناسبة لتقدير متبقيات اخرى والتى تم استرجاعها بواسطة طرق MRPS الاكثر شيوعا فى الاستخدام .

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

أ – رابطة زوجية Monocrotophos ب – شق اميد Phospholan

جـ – شق كرباماتى Dimethoate د – مجموعة استر Malathion

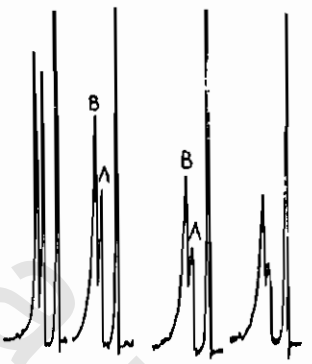
هـ – او اى تركيب يسمح بتكوين رابطة أيدروچينية

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

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

* حجم العمود Column size :

عمود قصير (٥٠ – ٩٠سم) وضيق قطر داخلى (١,٧٥ – ٢ مم) معبأ بمواد مفيدة جدا لاجراء عملية الغربلة والتأكيد من وجود متبقيات المبيدات وذلك بالمقارنة مع الاعمدة التقليدية ذات طول –١٨ سم وقطر داخلى ٣ مم ، وقد تبين ان الأعمدة القصيرة ينتج عنها تحليل اسرع بمعدل ٢ الى ٥ مرات تعطى اقل قدرات للكشف MDQS اكثر بمقدار ٥ إلى ١٠ مرات كما انها تحتاج الى درجة حرارة اقل .



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

تحميل الاعمدة بالمستخلصات النباتية Loading columns with plant extracts :

فى الاعمدة القصيرة (٤٥ سم × ٣ر مم) فقد تم تعبئتها 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 ملجم من التفاح والجزر والسبانخ وتم استخدام الكشاف من نوع اللهب المضئ (FPD) وكانت درجة الحرارة المستخدمة كالآتى (140°C/2 min program at 10 °C min, 220 °C/10 min.) . لم تلاحظ وجود تغيرات فى قيم عوامل الاستجابة النسبية Relative Response Factor (RRF) او فى قيم الحبس النسبى او فى مقدرة التحليل . وذلك عندما وصل اقصى تحميل الى 2000 mg . بينما عند تطبيق درجة حرارة ١٨٠°م 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 الكروماتوجرافى 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 وتتأثر باقل الحدود بسعة العمود . لقد وجد ان المقدرة التحميلية للاعمدة من الممكن تقديرها سريعا وذلك بفحص قيم RRF وذلك بعد اعادة الحقن للمستخلصات التى تحتوى على مدى من ١٥٠ الى ٢٠٠ مللجم / عينة والتى تحتوى على زوج مناسب من المركبات المختبرة مثل Monocrotophos/parathion-methyl أو Carbaryl/prophan ويتم الاستمرار فى الحقن حتى تصل قيم RRF للمركبات الثابت / المتغير الى ٨٠٪ من القيمة الاصلية والتى تحدد بانها اقصى حمل اجمالى maximum total load (LM) .

من الممكن اجراء حقن مرة واحدة لعينة تمثل 0.03 LM على اساس ان يتم وضع صوف زجاجى معامل بالسيللة 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 لابد من اجراء تنقية لكل مستخلص وايضا عند استخدام الكشاف من النوع NPTID .

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

مقدرة التحميل وكروماتوجرافى الطبقة الرقيقة Loadability and TLC :

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 ذيول 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 وحبس 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 فى حدود التقدير (ملليجم/كجم) لبعض المبيدات إعتمادا على ظروف الفصل على الألواح

Compound	Eluent	Rf	MDQ /ug	Carrot				Spinach			
				Purified extr.		Crude extr.		Purified extr.		Crude extr.	
				sample mg	LD	Sample mg	LD	Sample mg	LD	Sample	LD
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
	CH2CI2	0.11		500	0.1	200	0.4	1000	0.05	200	0.1
Dioxacarb	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
	CH2CI2	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
	CH2CI2	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
	CH2CI2	0		500	0.2	50	1.6	1000	0.30	500	0.3

قد لوحظ ان حدود التقدير كانت فى مستويات منخفضة الى ان وصلت الى ٥ر إلى ١ ملليجم /كجم والتى نادرا ما تم الكشف عنها . وعندما تم تطبيق المستخلصات النباتية مباشرة على الواح TLC وحتى اذا استخدمت طرق التقييم الحيوى (باستخدام الانزيمات او جرائيم 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 فى 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 ١ر ملليجم/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 تحتوى 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 .

obeikandl.com