تحليل متبقيات المبيدات

أسسه وتطبيقاته

الدكتور/ على سليمان حامد درباله

أستاذ كيمياء المبيدات المساعد

قسم كيمياء المبيدات - كلية الزراعة - جامعة كفرالشيخ

راجعه وحققه

الأستاذ الدكتور / مصطفى عبداللطيف عباسى

أستاذ كيمياء وسمية المبيدات المتفرغ

كلية الزراعة - جامعة دمنهور

الدار العربية للنشر والتوزيع

الطبعة الأولى 2014

كتب الدار العربية للنشر والتوزيع

* في مجال علم المكافحة والآفات

مقدمة فى السيطرة على الآفات الحشرية	روبرت ميتكاف
المبيدات الخضراء ج1 – ج2	د. أبوشبانة مصطفى
الممارسة الزراعية لمكافحة أمراض وآفات وحشائش الخضر البدائل العلمية والعملية المتكاملة	أ. د. أحمد عبدالمنعم
الفطريات الممرضة للحشرات	د. رفعت المرسى الصفطى
مبيدات التربية الزراعية	د. زيدان هندى
عالم النيماتودا المشكلة والحل	د. أحمد أحمد عثمان
مبيدات الآفات ج1 – ج2	د. أبوشبانة مصطفى
مبادئ علم بيئة الحشرات	د. محمد محمد الشاذلى
مكافحة النيماتودا	عبدالقادر المالح
آفات المخازن الحشرية والحيوانية وطرق مكافحتها	إبراهيم سليمان
آفات الحديقة والمنزل	د. توفيق مصطفى
الحشرات التركيب والوظيفة ج1 – ج2	تشابمان
الاتجاهات الحديثة فى المبيدات الحشرية ج1 – ج2	د. زيدان هندى
المكافحة الحيوية (الجزء الثانى)	عصمت محمد حجازى
المكافحة الحيوية (الجزء الأول)	محمد أبومرداس
أساسيات مكافحة الآفات الحشرية	

* في مجال علم الفطريات والميكروبيولوجي

الكائنات الدقيقة عمليا	
أساسيات علم الأحياء الدقيقة	
الفطريات الممرضة للحشرات	
الفطريات ج1 – ج2	
أساسيات الميكروبيولوجيا الصناعية	
الفطريات الصناعية	د. محمد على أحمد

للدار إصدارات أخرى في مجالات علوم التربة والأراضي والحشرات والميكروبيولوجي والوراثة وعلوم تكنولوجيا الأغذية والعلوم الهندسية والبيئية والعلوم البحتة وغيرها.

تحليل متبقيات المبيدات
أسسه وتطبيقاته

تحليل متبقيات المبيدات

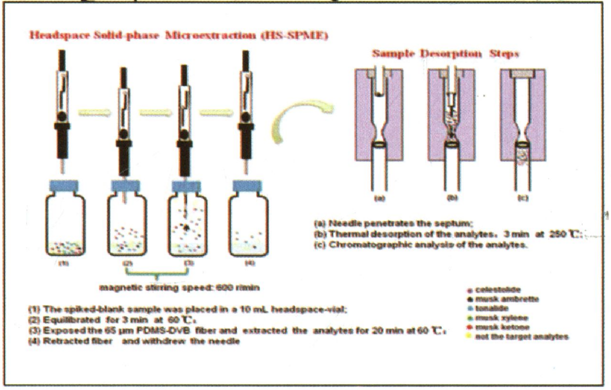
أسسه وتطبيقاته

الدكتور/ على سليمان حامد درباله
أستاذ كيمياء المبيدات المساعد
قسم كيمياء المبيدات - كلية الزراعة - جامعة كفرالشيخ

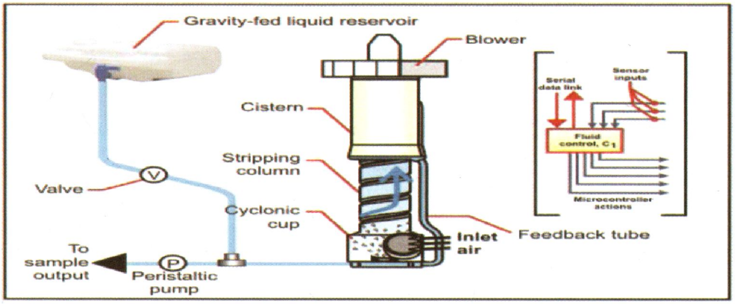
راجعه وحققه
الأستاذ الدكتور/ مصطفى عبداللطيف عباسى
أستاذ كيمياء وسمية المبيدات المتفرغ
كلية الزراعة - جامعة دمنهور

2014
الدار العربية للنشر والتوزيع
الطبعة الأولى

شكل (3): الاستخلاص بالوجه السائل باستخدام أقماع الفصل.



شكل (8): خطوات الاستخلاص بـ SPME.



شكل (12): تركيب جهاز اخذ عينات الهواء Air Sampler.

حقوق النشر

تحليل متبقيات المبيدات ـ أسسه وتطبيقاته

الطبعة الأولى / 2014
رقم الإيداع : 2013/10360
I.S.B.N. :978-977-258-417-8

حقوق النشر محفوظة

للدار العربية للنشر والتوزيع
32 شارع عباس العقاد – مدينة نصر – القاهرة
ت: 22753335 فاكس: 22753388
E-mail: aldar_alarabia1@yahoo.com

لا يجوز نشر أى جزء من هذا الكتاب، أو اختزان مادته بطريقة الاسترجاع أو نقله على أى وجه، أو بأى طريقة، سواء أكانت إليكترونية، أو ميكانيكية، أو بالتصوير، أو بالتسجيل، أو بخلاف ذلك إلا بموافقة الناشر على هذا كتابة، ومقدمًا.

بسم الله الرحمن الرحيم

" قُلْ بِفَضْلِ اللَّهِ وَبِرَحْمَتِهِ فَبِذَلِكَ فَلْيَفْرَحُوا

هُوَ خَيْرٌ مِّمَّا يَجْمَعُونَ "

صدق الله العظيم

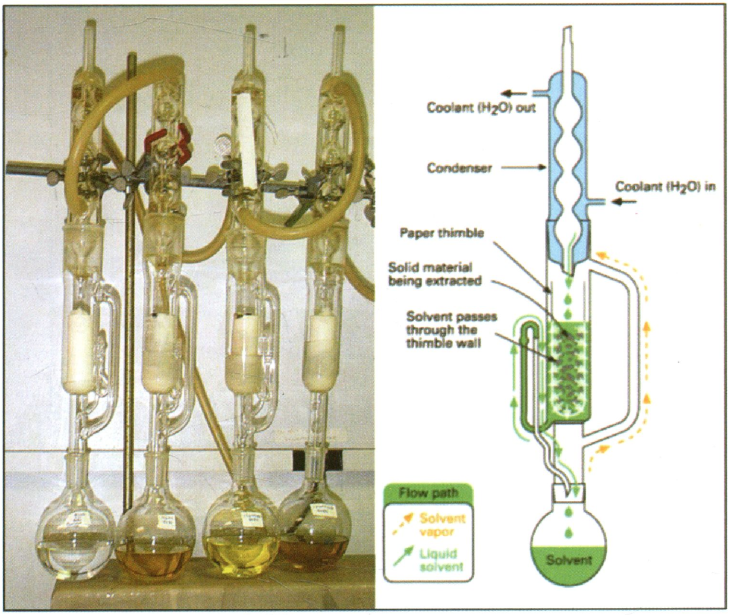
إهـــــداء

أهدى هذا العمل المتواضع إلى روح أبى رحمه الله وعفا عنه والى والدتى أطال الله عمرها وأكرمنا برها والى زوجتى الحبيبه الدكتور امانى محمد محمود حمزة مدرس كيمياء وسمية المبيدات بكلية الزراعة – جامعة كفرالشيخ والى أبنائى الأعزاء احمد وعمر والآء نسال الله العظيم أن يبارك لى فيهم وأن يجمعنى بكل هؤلاء فى مستقر رحمته يوم القيامة

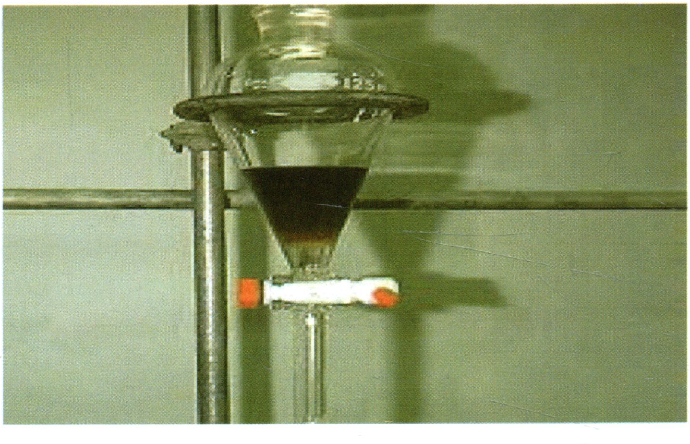
كما اتوجه بالشكر الى استاذتى بقسم كيمياء المبيدات بكلية الزراعة جامعة كفرالشيخ واخص بالشكر الاستاذ الدكتور محمد عبدالسلام عبدالباقى الأستاذ المتفرغ بالقسم والأستاذ الدكتور شريف السيد الحمضى الاستاذ بالقسم فهما من تعلمت على ايديهم أساسيات تحليل المبيدات واستفدت كثيرا منهم فى هذا المجال وفى إخراج هذا الكتاب فجزاهم الله عنى خيرا ولهم جزيل الشكر

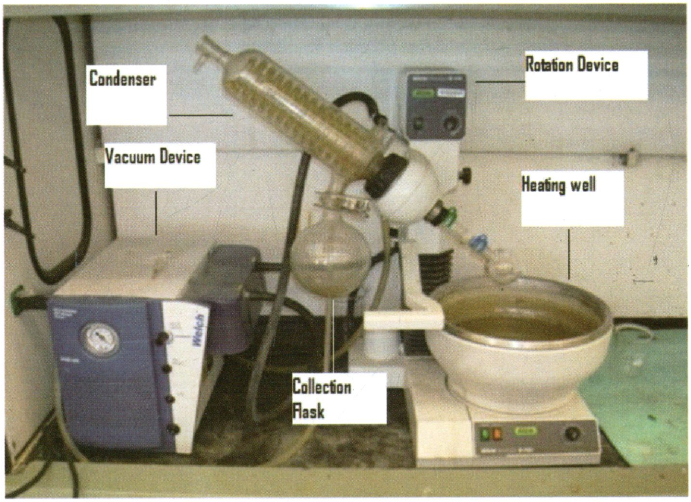
اهدى هذا الجهد المتواضع

المؤلف

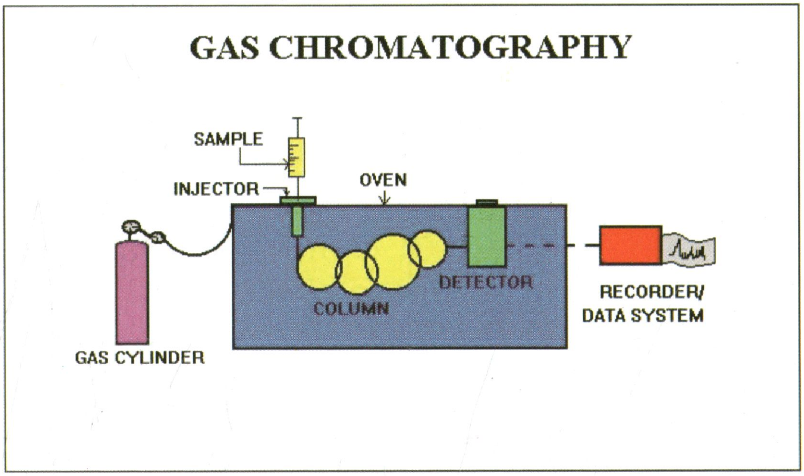


شكل (2): تركيب جهاز سوسكلت.

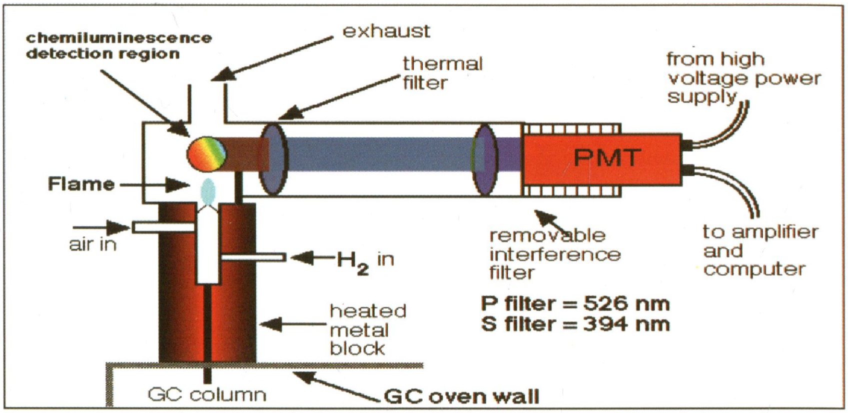




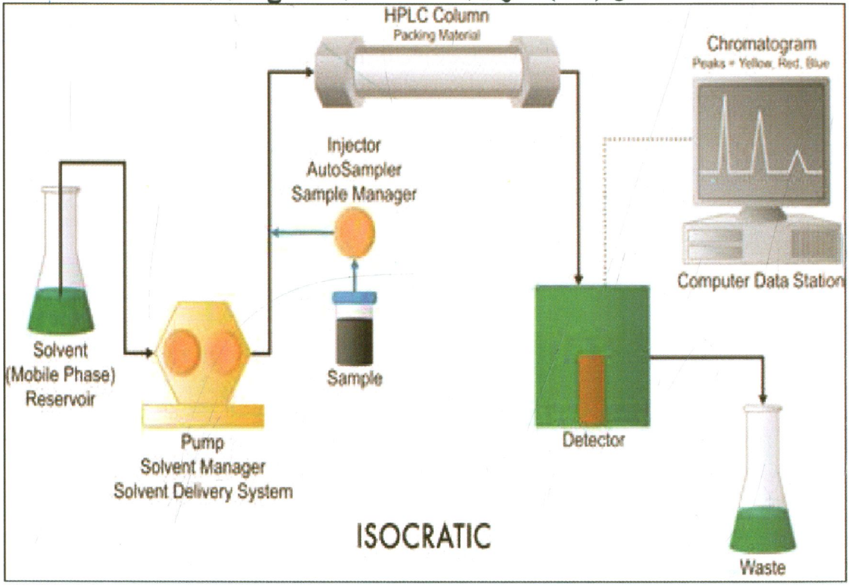
شكل رقم (15): جهاز التبخير الدوراني تحت ضغط.



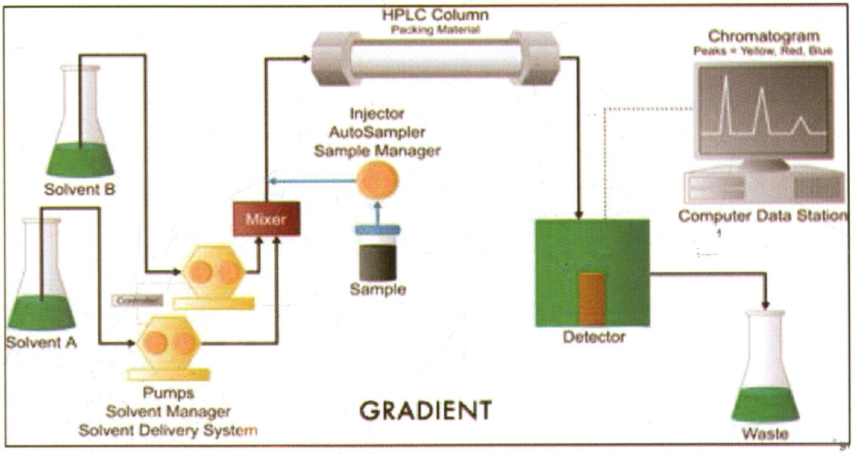
شكل (17): مكونات جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازي.



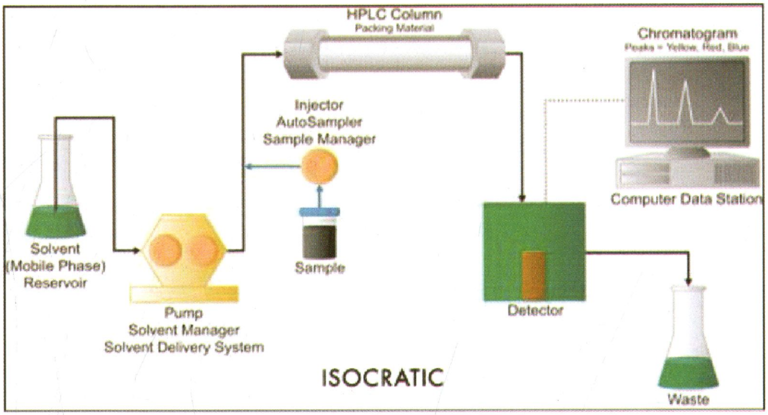
شكل (26): تركيب كشاف الانبعاث في اللهب.



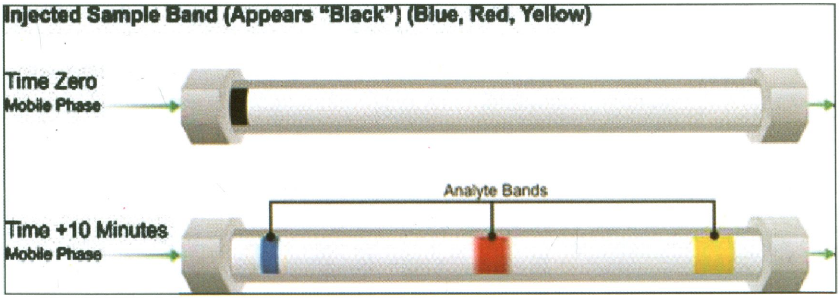
شكل (30): مكونات جهاز الكروماتوجرافى السائل عالي الأداء.



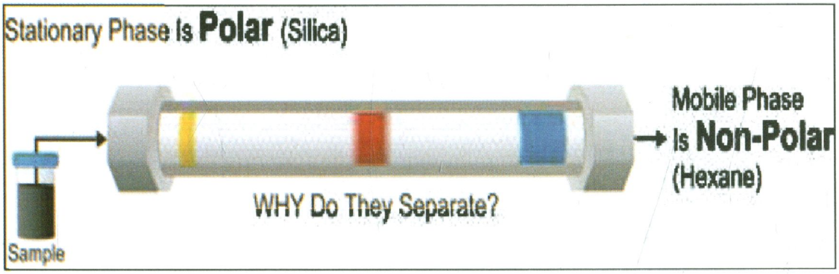
شكل (31): مكونات جهاز الكروماتوجرافى السائل عالي الأداء بنظام **gradient elution.**



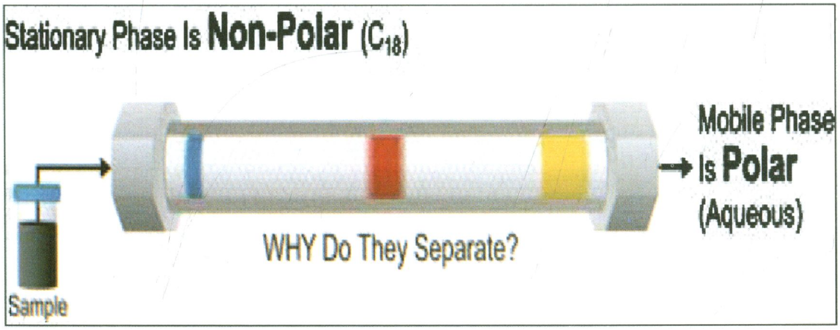
شكل (32): مكونات جهاز الكروماتوجرافى السائل عالي الأداء بنظام **isocratic elution.**



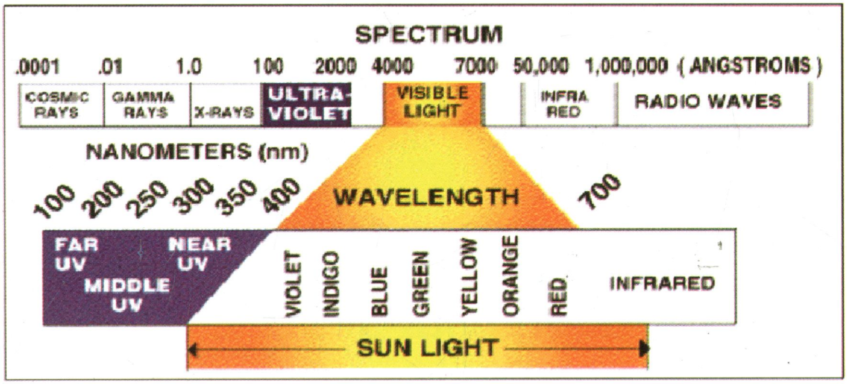
شكل (33): فصل مكونات عينة في عمود جهاز الكروماتوجرافى السائل عالي الأداء.



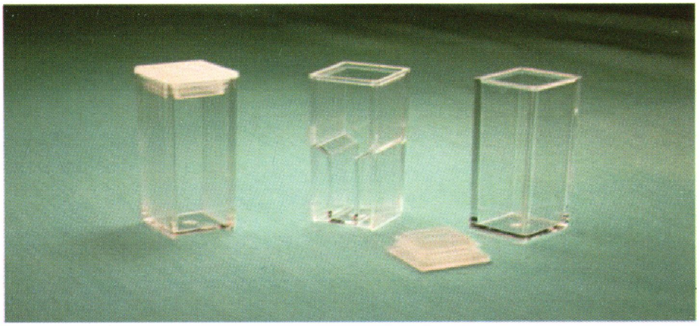
شكل (34): التوزيع المعتاد فى عمود جهاز الكروماتوجرافى السائل عالي الأداء.



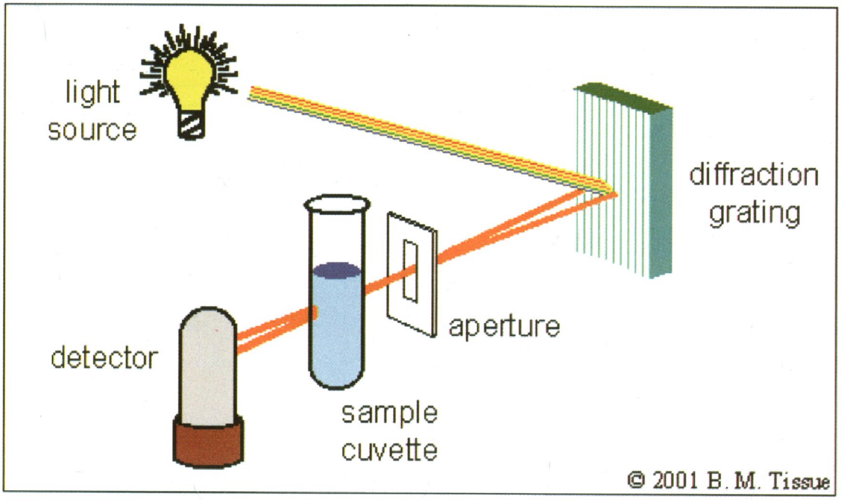
شكل (35): التوزيع المعتاد فى عمود جهاز الكروماتوجرافى السائل عالي الأداء.



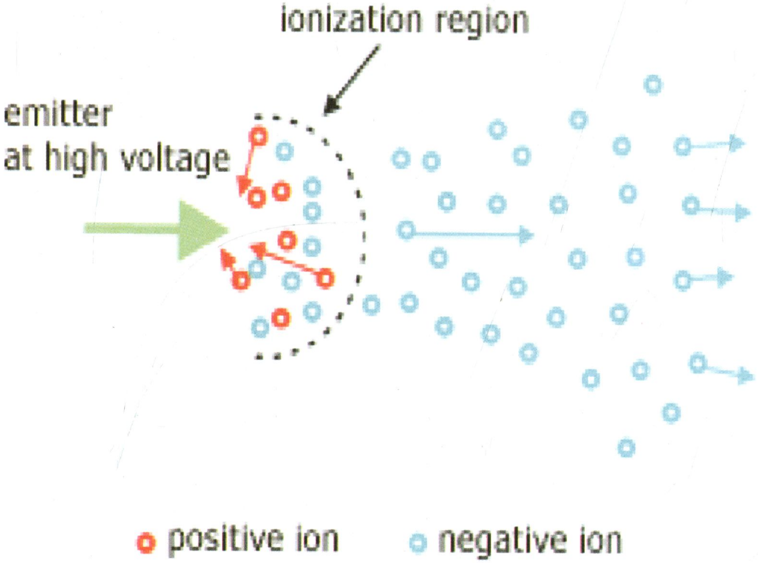
شكل (45): اقسام طيف الاشعة الكهرومغناطيسية.



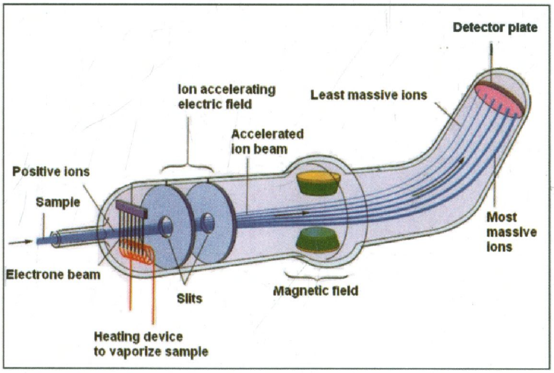
شكل (47): شكل وحدة وضع العينة.



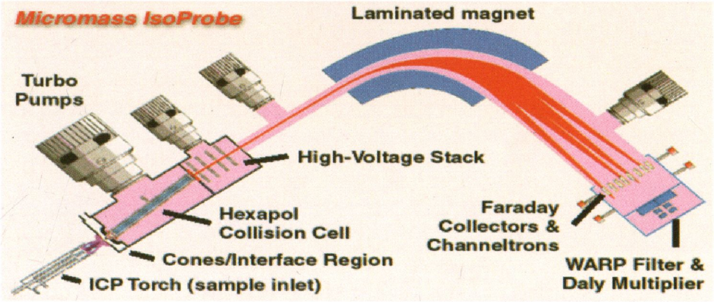
شكل(**49**): تركيب جهاز التحليل الاسبكتروفوتوميتر ذ و الحزمة الواحدة.

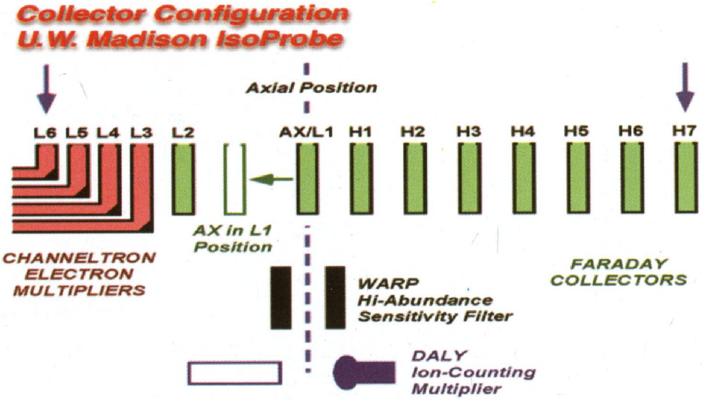


شكل (58): التأين بواسطة مجال كهربي **Field ionization**



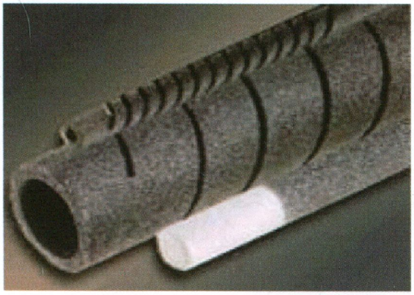
شكل (60): فصل الأيونات بالتركيز البؤري المزدوج **Double focusing MS**

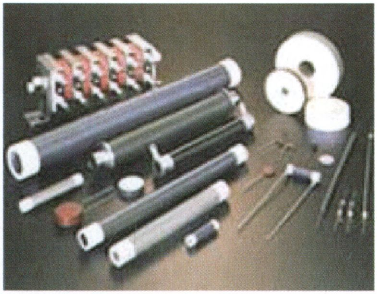




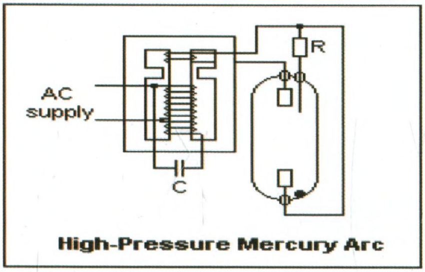
شكل (63): وحدة جمع الأيونات وقياسها Ions collector & Detector.

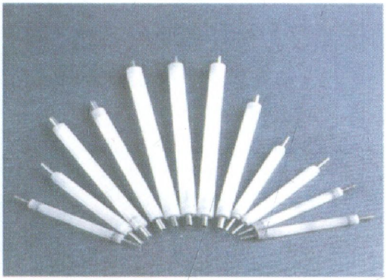
شكل (65): صورة الكرة الأرضية بواسطة الأشعة تحت الحمراء.





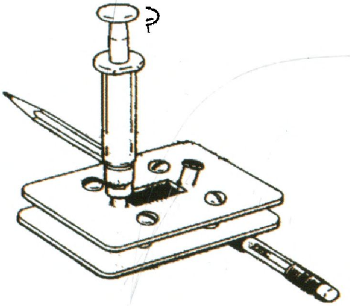
القضيب المتوهج



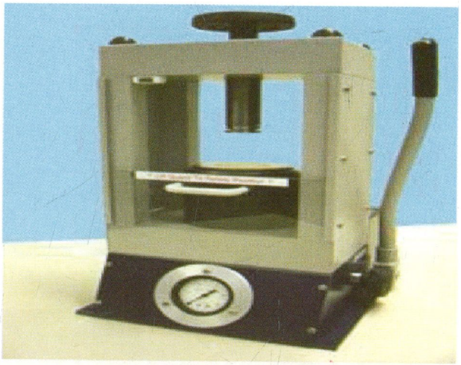


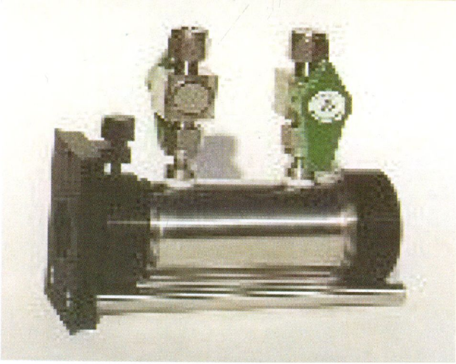
لمبة الزئبق القوسية ذات الضغط العالي

شكل (70): المصادر المختلفة للأشعة تحت الحمراء.



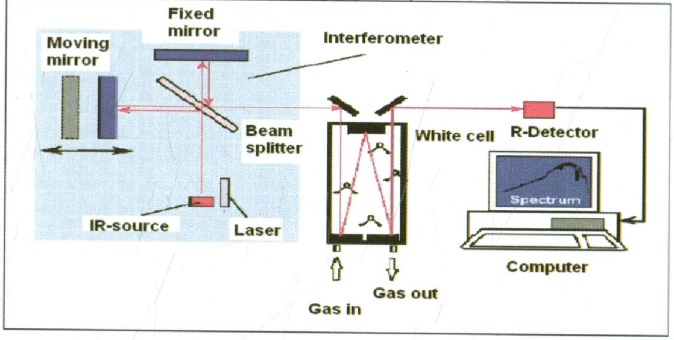
Metal blocks
KBr Die sets for KBr Discs

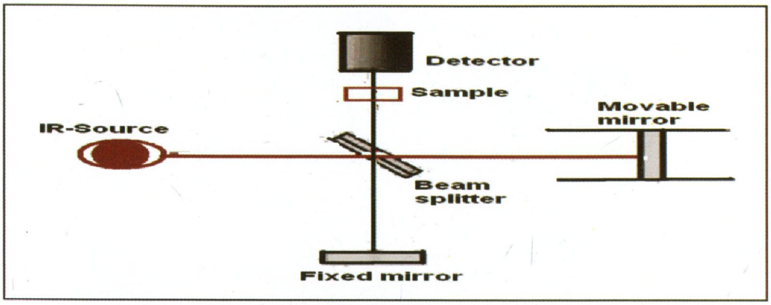




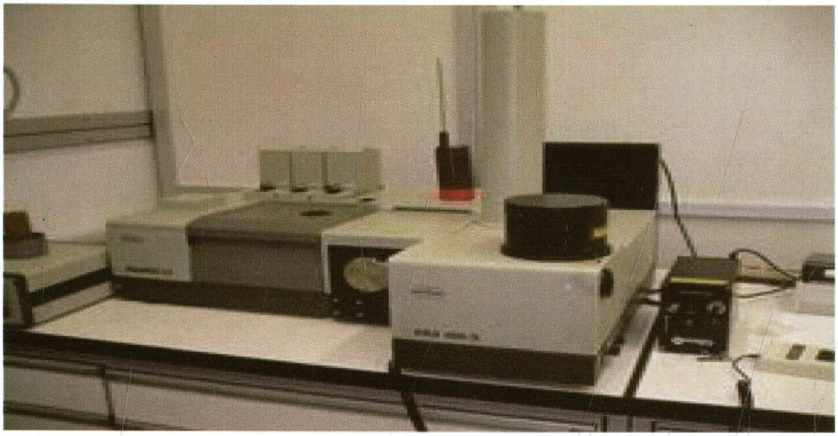
IR gas sampling supplies cells Laboratory hydrolyic press product

شكل (71): وحدة وضع العينات وتجهيزها.



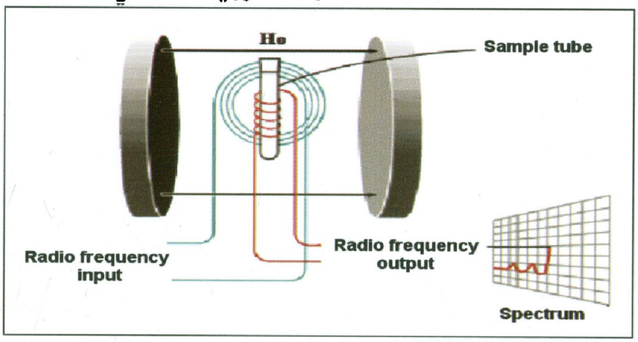


شكل (78): مسار الأشعة في مطياف FT-IR



شكل (79): مطياف Raman-IR.

شكل (82): مطياف الرنين النووي المغناطيسي.



شكل(83): رسم تخطيطي لمطياف الرنين النووي المغناطيسي.

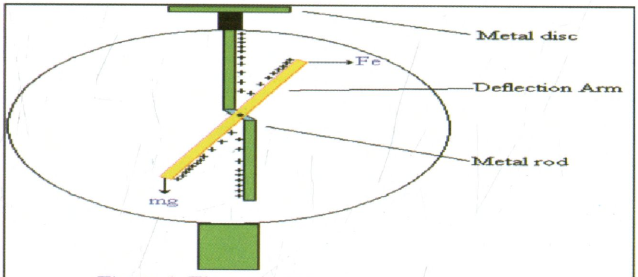


Figure 1: Electroscope

مقدمة الناشر

يتزايد الاهتمام باللغة العربية فى بلادنا يومًا بعد يوم. ولاشك أنه فى الغد القريب ستستعيد اللغة العربية هيبتها التى طالما امتهنت وأذلت من أبنائها وغير أبنائها. ولا ريب فى أن امتهان لغة أية أمة من الأمم هو إذلال ثقافى فكرى للأمة نفسها؛ الأمر الذى يتطلب تضافر جهود أبناء الأمة رجالاً ونساءً، طلابًا وطالبات، علماء ومثقفين، مفكرين وسياسيين فى سبيل جعل لغة العروبة تحتل مكانتها اللائقة التى اعترف المجتمع الدولى بها لغة عمل فى منظمة الأمم المتحدة ومؤسساتها فى أنحاء العالم، لأنها لغة أمة ذات حضارة عريقة استوعبت – فيما مضى – علوم الأمم الأخرى، وصهرتها فى بوتقتها اللغوية والفكرية، فكانت لغة العلوم والأدب، ولغة الفكر والكتابة والمخاطبة.

إن الفضل فى التقدم العلمى الذى تنعم به أوروبا اليوم يرجع فى واقعه إلى الصحوة العلمية فى الترجمة التى عاشتها فى القرون الوسطى. فقد كان المرجع الوحيد للعلوم الطبية والعلمية والاجتماعية هو الكتب المترجمة عن اللغة العربية لابن سينا وابن الهيثم والفارابى وابن خلدون وغيرهم من عمالقة العرب، ولم ينكر الأوروبيون ذلك، بل يسجل تاريخهم ما ترجموه عن حضارة الفراعنة والعرب والإغريق، وهذا يشهد بأن اللغة العربية كانت مطواعة للعلم والتدريس والتأليف، وأنها قادرة على التعبير عن متطلبات الحياة وما يستجد من علوم، وأن غيرها ليس بأدق منها، ولا أقدر على التعبير.

ولكن ما أصاب الأمة من مصائب وجمود بدأ مع عصر الاستعمار البريطانى والفرنسى، عاق اللغة عن النمو والتطور، وأبعدها عن العلم والحضارة، ولكن عندما أحس العرب بأن حياتهم لابد من أن تتغير، وأن جمودهم لابد أن تدب فيه الحياة، اندفع الرواد من اللغويين والأدباء، والعلماء فى إنماء اللغة وتطويرها، حتى أن مدرسة القصر العينى فى القاهرة، والجامعة الأمريكية فى بيروت درستا الطب بالعربية أول إنشائها. ولو تصفحنا الكتب التى ألفت أو تُرجمت يوم كان الطب يدرس فيهما باللغة العربية لوجدناها كتبًا ممتازة لا تقل جودة عن مثيلاتها من كتب الغرب فى ذلك الحين، سواء فى الطبع، أو حسن التعبير، أو براعة الإيضاح، ولكن هذين المعهدين تنكرا للغة العربية فيما بعد، وسادت لغة المستعمر، وفُرضت على أبناء الأمة فرضًا، إذ رأى المستعمر فى خنق اللغة العربية مجالاً لعرقلة الأمة العربية.

وبالرغم من المقاومة العنيفة التى قابلها، إلا أنه كان بين المواطنين صنائع سبقوا الأجنبى فيما يتطلع إليه، فتفننوا فى أساليب التملق له اكتسابًا لمرضاته، ورجال تأثروا بحملات المستعمر الظالمة، يشككون فى قدرة اللغة على استيعاب الحضارة الجديدة، وغاب عنهم ما قاله الحاكم الفرنسى لجيشه الزاحف إلى الجزائر: "علموا لغتنا وانشروها حتى نحكم الجزائر، فإذا حكمت لغتنا الجزائر، فقد حكمناها حقيقة".

فهل لى أن أوجه نداءً إلى جميع حكومات الدول العربية بأن تبادر – فى أسرع وقت ممكن – إلى اتخاذ التدابير، والوسائل الكفيلة باستعمال اللغة العربية لغة تدريس فى جميع مراحل التعليم العام، والمهنى، والجامعى، مع العناية الكافية باللغات الأجنبية فى مختلف مراحل التعليم لتكون وسيلة الإطلاع على تطور العلم والثقافة والانفتاح على العالم. وكلنا ثقة من إيمان العلماء والأساتذة بالتعريب، نظرًا لأن استعمال اللغة القومية فى التدريس ييسر على الطالب سرعة الفهم دون عائق لغوى، وبذلك تزداد حصيلته الدراسية، ويرتفع بمستواه العلمى، وذلك يعتبر تأصيلاً للفكر العلمى فى البلاد، وتمكينًا للغة القومية من الازدهار والقيام بدورها فى التعبير عن حاجات المجتمع، وألفاظ ومصطلحات الحضارة والعلوم.

ولا يغيب عن حكومتنا العربية أن حركة التعريب تسير متابطئة، أو تكاد تتوقف، بل تحارب أحيانًا ممن يشغلون بعض الوظائف القيادية فى سلك التعليم والجامعات، ممن ترك الإستعمار فى نفوسهم عقُدًا وأمراضًا، رغم أنهم يعلمون أن جامعات إسرائيل قد ترجمت العلوم إلى اللغة العبرية، وعدد من يتخاطب بها فى العالم لا يزيد عن خمسة عشر مليون يهوديًا، كما أنه من خلال زياراتى لبعض الدول واطلاعى وجدت كل أمة من الأمم تدرس بلغتها القومية مختلف فروع العلوم والآدب والتقنية، كاليابان، وإسبانيا، وألمانيا، ودول أمريكا اللاتينية، ولم تشك أمة من هذه الأمم فى قدرة لغتها على تغطية العلوم الحديثة، فهل أمة العرب أقل شأنًا من غيرها ؟!.

وأخيرًا .. وتمشيًا مع أهداف الدار العربية للنشر والتوزيع، وتحقيقًا لأغراضها فى تدعيم الإنتاج العلمى، وتشجيع العلماء والباحثين فى إعادة مناهج التفكير العلمى وطرائقه إلى رحاب لغتنا الشريفة، تقوم الدار بنشر هذا الكتاب المتميز الذى يعتبر واحدًا من ضمن ما نشرته – وستقوم بنشره – الدار من الكتب العربية التى قام بتأليفها أو ترجمتها نخبة ممتازة من أساتذة الجامعات المصرية والعربية المختلفة.

وبهذا .. ننفذ عهدًا قطعناه على المضى قدما فيما أردناه من خدمة لغة الوحى، وفيما أرداه الله تعالى لنا من جهاد فيها.

وقد صدق الله العظيم حينما قال فى كتابه الكريم: ﴿ وَقُلِ اعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ وَسَتُرَدُّونَ إِلَى عَالِمِ الغَيْبِ وَالشَّهَادَةِ فَيُنَبِّئُكُم بِمَا كُنتُمْ تَعْمَلُونَ﴾. سورة التوبة الآية 105.

محمد أحمد دربالة

الدار العربية للنشر والتوزيع

الفهرس

الموضوع	الصفحة
مقدمة	23
الفصل الأول : تحليل متبقيات المبيدات	
1. مقدمة	27
2. تعريف المبيد	27
3. الفائدة الاقتصادية من استخدام المبيدات الكيماوية	27
4. المشكلات الأساسية التي تسببها مبيدات الآفات	29
5. أهمية علم التحليل الكيماوي لمبيدات الآفات ومتبقياتها	32
6. تحليل مستحضرات المبيدات	33
6-1. أهمية تحليل مستحضرات المبيدات	33
6-1-1. تقييم المستحضر طبقا للمواصفات	33
6-1-2. دراسة ثبات المستحضر تحت ظروف التخزين	33
6-2. أساسيات تحليل وتقدير مستحضرات المبيدات	34
7. تحليل متبقيات المبيدات	35
8. دستور الحدود القصوى لمتبقيات المبيدات	40
9. المقدار المقبول تناوله يوميا	41
10. الحد الأقصى لمتبقي المبيد	43
11. التحقق من الالتزام بدستور الحدود القصوى للمتبقيات	46
الفصل الثاني : أسس تحليل المبيدات	
1. المحلل: The Analyst	52
2. المصادر الأساسية: Basic Resources	52
2-1. المعمل: The Laboratory	52

الموضوع	الصفحة
2-2. المعدات والإمدادات: Equipment and supplies	53
3. التحليل ويشمل ما يلي: The Analysis	54
1-3. تثبيت الطريقة: Validation of method	54
2-3. خطوات التشغيل القياسية: Standard Operating Procedures	54
3-3. المحافظة على أداء التشغيل: Maintenance of over-all analytical performance	55
4-3. تجنب الفقد: Avoidance of Losses	55
5-3. تجنب التلوث: Avoidance of contamination	56
4. خطوات تحليل متبقيات المبيد	57
1-4 عمليات ما قبل التحليل: Pre Analysis	57
2-4. عملية التقدير: Determination process	58
3-4. النتائج والتوصيات: Results and	58

الفصل الثالث: عمليات ما قبل التحليل

1. اخذ العينات Sampling	63
1-1. الغرض من جمع العينات: Purpose of Sampling	64
2-1. العشوائية في اختيار العينات Rondom selection	68
3-1. حجم العينة: Sample volume	68
4-1. طبيعة وتاريخ العينة: Nature and History of Sample	68
5-1. عدد المكررات: Number of replicates	70
6-1. العوامل المحيطة Environmental Factors	70
7-1. تاريخ المعاملة السابقة Histroy of preivous	70
8-1. الاعتبارات الواجب مراعاتها قبل أخذ العينة الحقلية	70
1-8-1. نوع المواد المعاملة Type of treated materials	70

الصفحة	الموضوع
71	1-8-2. تاريخ المعاملات السابقة ....
71	1-8-3. اختلاف وتنوع العينات البيولوجيه ....
71	1-8-4. تركيب المبيد المجهز (المستحضر) ....
72	1-8-5. توحيد طريقة المعاملة Similar method of treatment
72	1-8-6. العوامل الخارجية المحيطة Environmental Factors
72	2. تخزين العينات: Storage of Samples ....
73	3. إعداد العينات: Sample Preparation ....
74	4. الاستخلاص ....
75	4-1. الاعتبارات العامة التي تستلزم عند الاستخلاص ....
75	4-1-1. نقاوة المذيبات Purification of solvents ....
76	4-1-2. اختيار المذيب: Selection of solvent ....
77	4-1-3. تبخير المذيب Evaporation of the solvent ....
77	4-1-4. نسبة الاسترجاع Recovery percentage ....
80	4-2. طرق الاستخلاص Extraction Methods ....
80	4-2-1. طرق لاستخلاص العينات الصلبة ....
82	4-2-2. طرق لاستخلاص العينات السائلة ....
97	5. عملية التنقية Clean Up process ....
99	5-1. طرق تنقية كيميائية: (Chemical Clean Up methods) .....
99	5-1-1. الأكسدة (Oxidation): ....
99	5-1-2. التصبن (Saponification): ....
99	5-1-3. الاختزال (Reduction): ....
100	5-1-4. التحليل المائي (Hydrolysis): ....
100	5-2. عمليات تنقية طبيعية (Physical Clean-Up methods): ....

الموضوع	الصفحة
5-2-1. التقطير البخاري (Steam Distillation):	100
5-2-2. التجميد والبلورة (Crystallization & Freezing): ..	100
5-2-3. الفصل التجزيئي (Partition):	101
5-2-4. عملية التنقية بالفصل الكروماتوجرافي Chromatographic	101
6. تركيز العينات Samples concentration	103
6-1. التبخير باستخدام تيار هوائي (Air- evaporation):	103
6-2. التركيز باستخدام الكيودرنا دانيش (Kuderna danis h):	104
6-3. التركيز تحت ضغط (Concentration under vacuum):	105
7.تحضير وتخزين واستعمال المركبات القياسية	106

الفصل الرابع - طرق تحليل متبقيات المبيدات

1. الطرق البيولوجية لتقدير متبقيات المبيدات	111
1-1. الطريقة الإنزيمية Enzymatic Methods	111
1-1-1. رصد وتقدير المركبات الفوسفورية و الكارباماتية	112
1-1-2. طرق قياس نشاط إنزيم الكولين إستريز	113
1-1-3. إستخدام تثبيط إنزيم الكولين إستريز في تقدير المبيدات الفوسفورية والكارباماتية	115
1-1-4. الطرق الإنزيمية لرصد وتقدير متبقيات المبيدات الفطرية (مثل الداى ثيوكاربامات)	119
1-1-5. الطرق الإنزيمية لرصد وتقدير متبقيات مبيدات الحشائش (مركبات الترايازين Triazines)	120
1-1-6.الطرق الإنزيمية لرصد وتقدير متبقيات مبيدات الحشائش (السلفونيل يوريا، الاميدازولين)	121
1-2. الطرق البيولوجية المعتمدة استجابة خلية كاملة و ليس إنزيم.......	121

الصفحة	الموضوع
124	1-3. استخدام الاستجابة المناعية في تحليل المبيدات ....
125	1-3-1. مميزات التحليل: Advantages of Immunoassay
128	1-3-2. الاستخدامات في كيمياء المبيدات ....
133	1-3-4. تطبيقات الأليزا (ELISA) ....
135	1-3-5. أجهزة الاستشعار المناعية لتقدير متبقيات المبيدات ....
141	4.1. تقدير متبقيات المبيدات باستخدام التقييم الحيوي Bioassay ....

الفصل الخامس: الطرق الكروماتوجرافية لتقدير متبقيات المبيدات

الصفحة	الموضوع
145	التحليل باستخدام الغاز الكروماتوجرافى ....
145	1- الكروماتوجرافى الغازي: Gas chromatography ....
146	1-1. أسطوانة الغاز: Gas cylinder ....
146	1-2. مكان حقن العينة: Rubber septum ....
146	1-3. فرن: Oven ....
146	1-4. الكشاف: Detector ....
146	1-5. المكبر: Amplifier ....
147	1-6. المسجل: Recorder ....
147	1-7. الغاز الحامل: Carrier gas
149	1-8. حقن العينة: Injection of Sample ....
150	1-9. الأعمدة: Columns ....
150	1-9-1. أنواع الأعمدة ....
153	1-9-2. شروط المادة الدعامية ....
154	1-9-3. طرق تحضير وتجهيز العمود ....
158	1-10. الكشافات: Detectors ....

الصفحة	الموضوع
153	11-1. المبكر والمسجل: Amplifier & Recorder
174	2. التحليل الكروماتوجرافى السائل عالى الاداء ....
176	1- الخزان Reservoir ....
176	2- المضخة: Pump ....
176	أنواع الإزاحة فى جهاز HPLC ....
177	3- مكان الحقن: Injection port
178	4- العمود: column
180	5- الكشافات: Detectors الكشافات: Detectors
186	3. ازدواج أجهزة التحليل الكروماتوجرافى مع مطياف الكتلة ....
186	1-3. مقدمة ....
186	2-3 جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازي المزدوج مع مطياف الكتلة.
195	دور جهاز التحليل الكروماتوجرافى مع مطياف الكتلة فى التحليل الوصفى لمتبقيات المبيدات ....
196	التحليل الكمى للمبيدات بواسطة جهاز التحليل الكروماتوجرافى مع مطياف الكتلة ....
196	جهاز التحليل الكروماتوجرافى بالسائل المزدوج مع جهاز مطياف الكتلة.
	الفصل السادس: تقدير متبقيات المبيدات بالطرق الطيفية
204	1. التحليل الطيفي الجزيئي في المنطقة الفوق بنفسجيه و المرئية ....
204	1-1 مقدمة ....
205	2-1. مكونات الجهاز ....
205	1-2-1. مصدر الأشعة: Radiation source ....
206	2-2-1. وحدة فصل الأطوال الموجية: Monochromator ....

الموضوع	الصفحة
1-2-3. وحدة وضع العينة: Sample unit	206
1-2-4. وحدة قياس طاقة الأشعة (Detector)	206
1-2-5. وحدة التسجيل (Recorder)	207
1-3. المذيبات المستخدمة لتسجيل الأطياف الإلكترونية	207
1-4. انواع اجهزة التحليل الطيفى الجزيئى	207
1-4-1. اجهزة الحزمة الواحدة Single Beam instrument	207
1-4-2. الاجهزة ذات الحزمتين Double Beam instrument	208
1-5. القوانين التي تحكم الامتصاص	210
1-5-1. قانون لامبرت	210
1-5-2. قانون بيير	210
1-5-3.قانون لامبرت بيير	210
1-6. استخدام هذا النوع من التحليل في التحليل الوصفي	211
1-7. التحليل الكمي بواسطة اجهزة التحليل فى منطقة الضوء المرئى Visible و الاشعة الفوق بنفسجية U.V.	211
1-8. تخفيف العينات Samples dilution	212
1-9. تقوية العينات Samples fortification	212
1-10. الإجراءات المتعلقة باللون المتكون في التقديرات اللونية فى المنطقة المرئية	212
1-11. العوامل المؤثرة على ثبات اللون	212
1-12. مميزات التحليل فى المنطقة المرئية و الفوق بنفسجية	213
1-13. الاعتبارات التي يجب مراعاتها عند اختيار طريقة لونية أو طيفية للتحليل	213
1-14.دور التحليل اللونى في تقدير متبقيات المبيدات	214

الموضوع	الصفحة
2. مطياف الكتلة Mass Spectroscopy	216
2-1. نظرية التحليل بواسطة مطياف الكتلة	216
2-1-1. عملية التأين:	217
2-1-2. عملية التكسير:	217
2-2. مكونات جهاز مطياف الكتلة	217
2-2-1. وحدة وضع العينة: Sample unit	218
2-2-2. غرفة التأين Ionization Chamber	220
2-2-3. وحدة فصل أو فرز الأيونات	227
2-2-4. وحدة جمع الأيونات وقياسها Ions collector & Detector	233
2-2-5. المسجل Recorder	239
2-3. طرق القياس والكشف Detection methods	239
2-3-1. إستقبال الأيونات على سطح معزول	239
2-3-2. استخدام خلايا ضوئية للتكبير الأليكتروني	239
2-3-3. إستخدام لوحة فوتوغرافية	240
2-4. التحليل الوصفي بواسطة مطياف الكتله	240
2-5. التحليل الكمي بواسطة المطياف الكتله	242
2-6. تطبيقات التحليل بمطياف الكتلة في مجال تقدير متبقيات المبيدات	242
3. التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء	243
3-1. تطبيقات الأشعة تحت الحمراء	244
3-2. نطاق الأشعة تحت الحمراء	244
3-2-1. الأشعة تحت الحمراء القريبة Near infrared	244
3-2-2. الأشعة تحت الحمراء البعيدة Far infrared	244
3-2-3. لأشعة تحت الحمراء الوسطى Mid infrared	244

الموضوع	الصفحة
3-3. امتصاص الأشعة تحت الحمراء	245
3-3-1.أنواع الاهتزازات الجزيئية	247
3-3-2. النمط الاهتزازي Modes of vibration	250
3-3-3. التغيرات في طاقة الدوران Rotational energy change	251
3-3-4. الاستضواء Fluorescence	251
3-3-5. التغير في العزم القطبي Dipole moment change	253
3-4. مطياف الاشعة تحت الحمراء IR spectrometer	255
3-4-1. مصدر الأشعة تحت الحمراء Source of IR radiation	256
3-4-2. موحدات أطوال الموجات Monochromators	259
3-4-3. وحدة وضع العينات Sample cell	259
3-4-4. وحدة قياس طاقة الأشعة Detector	263
3-4-5. وحدة التسجيل Recorder	266
3-5. مطياف الأشعة تحت الحمراء مزدوج الحزمة	267
3-6. مطياف الأشعة تحت الحمراء المزود بمحول فورييه	267
3-7. مطياف رامان Raman Spectrometr	270
3-8. التحليل الوصفى باستخدام الاشعة تحت الحمراء	271
3-8-1. منطقة امتصاص عالية التردد	271
3-8-2. منطقة امتصاص منخفضة التردد	272
3-9. التحليل الكمي بواسطة الاشعة تحت الحمراء IR	273
3-10. دور التحليل الطيفى بالاشعة تحت الحمراء فى مجال المبيدات	273
4. التحليل الطيفي بواسطة الرنين النووي المغناطيسي	275
4-1. فكرة التحليل بالـ NMR	275
4-2. عملية الإسترخاء Relaxation process	280

الصفحة	الموضوع
280	4-2-1. الإسترخاء الطولي Longitudinal or spin-lattice ....
280	4-2-2. الإسترخاء المستعرض Transverse or spin- spin .....
281	4-3. طيف الرنين النووي المغناطيسي NMR spectrum ....
283	4-4. مكونات مطياف الرنين النووي المغناطيسي ....
283	4-4-1. المغناطيس Magnet ....
283	4-4-2. وحدة تغيير شدة المجال Magnetic Field Sweep....
284	4-4-3. مصدر إنتاج موجات أشعة الراديو Radiofrequency ..
284	4-4-4. وحدة وضع العينة Sample Holder and Probe ....
284	4-4-5. وحدة الكشاف ....
284	4-4-6. وحدة التكامل الأيكترونية Electronic Integrator....
286	4-5. تحضير العينات Sample handling ....
287	4-6. الانتقال الكيميائي Chemical Shift ....
292	4-7. الكثافة الأليكترونية حول البروتون ....
293	4-8. التأثير الناتج عن التباين فى الخواص المغناطيسية ....
295	4-9. تأثير الروابط الهيدروجينية Effect of hydrogen bonding .
296	4-10. إزدواج الحركات المغزلية Spin-Spin coupling ....
302	4-11. دور جهاز الرنين النووى المغناطيسى فى التحليل الوصفى للمركبات
302	4-11-1. الأنتقال الكيميائى للإمتصاصات Chemical shift (δ) .
302	4-11-2. عدد الانقسامات الداخلية فى كل إمتصاص رئيسى ....
303	4-11-3. كثافة الإمتصاصات Integration ....
303	4-11-4. ثابت الإزدواج Coupling Constant (J) ....
311	4-12. دور التحليل بالرنين النووى المغناطيسى في التحليل الوصفى لمتبقيات المبيدات: " ....

الموضوع | الصفحة

4-12-1. في حالة المركبات الفوسفورية 311
4-12-2. في حالة المركبات الكلورنية العضوية 311

الفصل السابع: استخدام التحليل الاشعاعى في تقدير متبقيات المبيدات

1. تعريف النظائر Isotopes 315
2. وحدات قياس النشاط الاشعاعى 315
2-1. وحدات النشاط الإشعاعي 315
2-2. وحدات التعرض للإشعاع 317
3. طرق الكشف عن وقياس النشاط الإشعاعى 317
3-1. الطرق التي تعتمد على مقدرة الإشعاعات الصادرة على تأين الهواء 317
3-1-1. الإلكتروسكوب: Electroscope 317
3-1-2. كشاف غرفة التأين: Ionization chamber 318
3-1-3. عداد جيجر ـ مولر: Giger-Muller Counter 319
3-2. الطرق التي تعتمد على إحداث تأثير على الألواح الفوتوغرافية الحساسة 320
3-3. الطرق التي تعتمد على مقدرة الإشعاعات الصادرة من المواد المشعة على إحداث توهج أو فسفرة 320
3-3-1. قياس الوميض الناتج من مادة صلبة 320
3-3-2. جهاز قياس الوميض الناتج من مادة سائلة 321
4. استخدام النظائر المشعة في التحليل الكروماتوجرافى لتقدير متبقيات المبيدات 326
4-1. المسح الكروماتوجرافى الإشعاعى 326
4-2. الفصل الكروماتوجرافى ثم قياس الوميض 327
4-3. عمل فصل كروماتوجرافى للمادة المشعة ثم التعريض لالواح حساسة لاظهار المبيدات المفصوله وتقديرها كميا 327

الموضوع	الصفحة
4-4. الكروماتوجرافى الغازى المحتوى على كشاف للمواد المشعة	328
4-5. الكروماتوجرافى السائل عالى الاداء المحتوى على كشاف للمواد المشعة	329
5. تعليم المبيدات باستخدام النظائر المشعة	330
قائمة المراجع	335
الملزمة الملونة	369

مقدمة

على الرغم من الاستخدام المكثف للمبيدات أيا كان نوعها سواء كانت من مصادر طبيعية أو مخلقة صناعيا لمكافحة الآفات مثل الحشرات الفطريات والحشائش الخ ثم ظهور العديد من المشاكل التي نجمت عن الإسراف في التطبيق خاصة ما يعرف بالتلوث البيئي بالمبيدات فان المكتبة العربية تحتوى على القليل جدا من الكتب والمراجع التي تتناول موضوع الكشف والتقدير لتلك الكيماويات المستخدمة في مكافحة الآفات

ولذلك تعاظم دور وأهمية تقدير مخلفات المبيدات في المكونات البيئية العديدة وكذلك التأكد من جودة المستحضرات التجهيزات النهائية والتي تستخدم في مكافحة الآفات على اختلاف المادة الفعالة الداخلة في تركيب كل مبيد آفة.

لذلك أصبح من اللازم على المشتغلون في مجال المبيدات والسموم التعريف بالمبادئ الأساسية في تحليل وتقدير مخلفات المبيدات من جمع للعينات وتجهيزها و استخلاصها و تنقيتها وتقديرها والاصطلاحات المتداولة والمستويات المقبول تواجدها في الغذاء والماء والهواء ....الخ وكذلك اللجان الدولية والمحلية المعنية بموضوع وخطورة المبيدات.

هناك مواصفات خاصة لمعامل التحليل وكذلك خبرات القائمين على التحليل ومهام كل مسئول وكذلك أساليب إجراء التجارب المعملية والحقلية واخذ العينات واسترجاع المبيد وعملية التقنية وكذلك متطلبات ما قبل التحليل وكذلك طرق القياس والتي تتفاوت في وقتها وسهولتها بين المستحضرات والمخلفات أو المتبقيات.

من الضروري تعاون الجميع من خبراء كيمياء والمبيدات وجميع فروع الكيمياء الحيوية والعضوية وكذلك التحليلية وخبراء الأجهزة والبيولوجي ورجال الصناعة وذلك من اجل هدف محدد وواضح وهو الوصول إلى أفضل الطرق والوسائل التي تمكن من

الكشف عن مخلفات المبيدات أيا كانت ضالة الكمية الموجودة من تلـــك المخلفـــات أو المتبقيات في أي مكون من مكونات البيئة.

توجد اختلافات بين المعامل المختلفة وحتى يمكن وجودها بين رجال نفس المعمـــل في قيم ونتائج تحليل نفس العينة بالرغم من إتباع الجميع لأسلوب واحد وطريقة واحدة بسب الاختلافات في الخبرة وتناول العينات وحساسية الأفراد وقد تصل هذه الاختلافات حدودا كبيرة لذلك اتفق دوليا علي إرسال العينة لأكثر من معمل.

ونرجوا من الله أن يكون هذا الكتاب يمثل إضافة بسيطة للمكتبة المصرية والعربية في مجال أسس تحليل المبيدات

دكتور / على سليمان حامد درباله

أستاذ كيمياء المبيدات المساعد

قسم كيمياء المبيدات – كلية الزراعة– جامعة كفرالشيخ

الفصـــل

الأ و ل

تحليل متبقيات المبيدات

الفصل الأول

تحليل متبقيات المبيدات
Analysis of Pesticide Residues

1. مقدمة :

إن أزمة الغذاء تتضح وتتفاقم وخاصة في بلدان العالم الثالث مما يهدد حصول أزمة غذاء خطيرة إضافة إلى احتمال استغلال هذه الأزمة من قبل الدول المتقدمة في الضغوط السياسية. وهذه الحقيقة تفرض على الأقطار النامية أن تجعل الاتجاه الطبيعي لسياستها الزراعية موجهة نحو معالجة العوامل التي تؤثر على زيادة الإنتاجية والقيمة الغذائية وفي مقدمتها تحسين الأصول النباتية والحيوانية وكذلك الحد من الإصابة بالحشرات والأمراض النباتية ونباتات الأدغال والآفات الأخرى والتي يشكل ضررها حوالي 50% من الإنتاج الزراعي.

وفي الوقت الحاضر تعد طريقة مكافحة الآفات باستخدام المواد الكيماوية من أكفاء الطرق المستعملة لسرعة فعاليتها وسهولة تطبيقها ولإمكانية استخدامها ضد مختلف الآفات الزراعية. لقد ساهمت المبيدات الكيماوية مساهمة فعالة في زيادة إنتاج المحاصيل الزراعية عن طريق وقايتها من الآفات المختلفة. وكذلك لعبت دورا متميزا في مجال الصحة العامة بالحد من الأمراض التي تنتقل للإنسان بواسطة الآفات.

2. تعريف المبيد :

هو أي مادة أو خليط من عدة مواد ينشر في بيئة الآفة بوسائل وأشكال مختلفة فيعمل على قتلها أو منع تكاثرها أو طردها بهدف تخفيض أعدادها إلى حد غير ضار اقتصادياً.

3. الفائدة الاقتصادية من استخدام المبيدات الكيماوية :

لقد ساهمت المبيدات الكيماوية مساهمة فعالة في زيادة إنتاج المحاصيل الزراعية عن

طريق وقايتها من الآفات المختلفة. وكذلك لعبت دورا متميزا في مجال الصحة العامة بالحد من الأمراض التي تنتقل للإنسان بواسطة الحشرات.

وقد أوضحت بعض الدراسات المعتمدة في أقطار مختلفة انه من الصعب الحصول على إنتاج اقتصادي دون استخدام المبيدات في العملية الإنتاجية فمحصول التفاح غير المعامل بالمبيدات في كاليفورنيا مثلا يصاب بنسبة 40 – 80 % بدودة ثمار التفاح وبنسبة 30 – 80 % بمرض جرب التفاح. ففي دراستين أجريتا في وزارة الزراعة الأمريكية لفترات تراوحت بين 20 – 24 سنة. وجد إن عدم استخدام المبيدات للوقاية من آفات القطن الحشرية والفطرية أدى إلى خفض الإنتاجية بنسبة 25 - 41% وأكدت بعض الدراسات في الدول العربية (العراق) إنه لا يمكن إنتاج الذرة الصفراء دون استخدام المبيدات بسبب إصابتها بحفار ساق الذرة (*Sessamia cretica*) كما لا يمكن إنتاج القرنبيط اقتصاديا دون مكافحة حشرة (*Brevicoryne brassicae*)

ولكن سهولة تطبيق المواد الكيماوية في المكافحة وسهولة الحصول عليها ونتائجها السريعة قد سببت إفراطا في استخدام المبيدات الكيماوية . رافقه استخدام خاطئ لهذه المواد مما جعل الرأي العام يوصي بالحد من استخدامها. وانعكس ذلك وبشكل غير عقلاني على استخدام هذه المواد حتى في بعض الدول التي ما زالت تعاني من نقص كبير في المواد الغذائية وعلى الرغم من ذلك فان الإحصاءات تشير إلى أن الكميات المستخدمة من المواد الكيماوية في المكافحة لم تقل حتى في الدول المتقدمة التي تؤكد على الأضرار التي قد تنجم من استخدامها وفي مقدمتها مسألة التلوث البيئي.

ساعدت على زيادة الكفاءة الإنتاجية لمختلف المحاصيل الزراعية عن طريق تقليل التلف الذي تسببه الآفات مما أدى إلى وفرة المنتجات الزراعية بأسعار مناسبة ففي أمريكا مثلا يصرف المستهلك من 20–25% من دخله على الغذاء في الوقت الحاضر في حين كان ما يصرفه يقدر 60% قبل 25 سنة.

إن وجود إصابة عالية بالآفات في المحصول (خاصة في الدول المتقدمة) ووجوب خلو المواد المسوقة من بقايا المبيدات والتي قد يكون لها تأثير على صحة المستهلك قد جعل المنتجين يستخدمون المكافحة الكيماوية بشكل مبرمج ودقيق كي تصبح محاصيلهم خالية من التلف أو التلوث.

لعبت المبيدات الكيماوية في حقل الصحة العامة دورا كبيرا في الحد من انتشار الحشرات الناقلة للأمراض التي تصيب الإنسان والحيوان ومن الأمثلة الأولي الواضحة على ذلك التخلص من مرض التيفوس في النيبال عام 1943-1944م باستخدام مبيد (DDT) للقضاء على حشرة القمل الناقلة للمرض عن طريق تعفير الملابس و الأجسام بمساحيق التعفير الحاوية على المبيد. ويمكن القول أن معظم الأضرار التي قد تنجم عن استعمال المبيدات الكيماوية تنحصر في حالات الاستعمالات الخاطئة نتيجة إهمال تطبيق تعليمات الخاصة باستعمالها ففي حالات التسمم الشديد الوفيات تقتصر على الأطفال في المنازل نتيجة لحفظ المبيدات في أماكن تكون في متناول أيديهم وقد أوضحت بعض بيانات دائرة الخدمات الصحية الأمريكية أن 62% من حالات التسمم كانت لأطفال دون العاشرة من العمر نتيجة خزن هذه المواد داخل المنزل وهناك بعض الحالات التي يستخدم فيها المبيد على محصول لا ينصح باستخدامه علية مما يؤدي إلى تغير في طعم ونكهة المحصول ويقلل من القيمة التسويقية له كاستخدام مبيد الجامكسان (BHC) على البطاطا أو استخدام المبيد على محصول يحرق أوراقه كاستخدام مركب (D.D.T) على المحاصيل القرعية وخاصة على البطيخ وأحيانا تستخدم مبيدات الأدغال (2,4D) بدل من المبيد الحشري (D.D.T) مما يؤدي إلى قتل المحصول ويمكن القول إن جميع هذه الاستخدامات الخاطئة للمبيدات الكيماوية سببها الإهمال وقلة وعي العاملين في عملية المكافحة.

4. المشكلات الأساسية التي تسببها مبيدات الآفات :

نستطيع القول مما سبق أنه إذا أصبحت المبيدات ضرورة حتمية للوقاية ومكافحة

الآفات. فالعديد من الأبحاث و الدراسات تشير بأن المبيدات غير خالية من الآثار الجانبية فهي سلاح ذو حدين. زيادة الاعتماد على المبيدات كوسيلة حاسمة في مجابهة الآفات كما وأن الاستعمال الغير سليم والمتزايد والغير مرشد أحياناً، أدى بلا شك " خاصة " وبحكم أن المبيدات مواد سامة أدى إلى ظهور العديد من المشاكل قد تفوق في خطورتها الضرر التي تسببه الآفات.

ومبيدات الآفات بحكم أنها مواد سامة وأن بعضها له صفة الثبات والبقاء الطويل أدى إلى تراكم متبقيات هذه المبيدات في البيئة وبالتالي أدى هذا إلى التلوث البيئي بالمبيدات وأصبحت مبيدات الآفات ومتبقياتها تلعب دوراً خطيراً في التلوث البيئي على سطح الكرة الأرضية في عصرنا الحديث.ومن أهم الأضرار المباشرة لها:

1- الإخلال بالتوازن البيئي و القضاء على الأعداء الحيوية , حيث إنها تؤثر على عدد كبير من الحشرات بما فيها المتطفلات والتي لها دور مهم في التوازن البيئي.

2- ا لتأثير على الحشرات النافعة اقتصادياً و التي منها نحل العسل لأن معظم المبيدات ذات تأثير قوي على طوائف النحل.

3- التأثير على الحيوانات البرية كالأرانب و الطيور وكذلك على الأسماك و بالتالي تسبب لها أضراراً مختلفة وبالتالي ينعكس ذلك على الإنسان الذي يتغذى عليها.

4- ظهور السلالات المقاومة من الآفات للمبيدات بسبب تعرض الآفة إلى مبيد معين بشكل متتابع ولفترة طويلة.

5- تدني خصوبة التربة بسبب قتل المبيدات لبكتريا تثبت النتروجين (الآزوت) في التربة والكائنات الحية النافعة وقد لوحظ أن النتريت الموجود في التربة يتفاعل مع بعض المبيدات ويكون مركباً ت تسمى النيتروز أمينات وهو مواد سامة تعمل على تلوث التربة و المياه الجوفية و تمتص بواسطة عصارة النبات و تخزن في أنسجته مؤديه إلى حدوث أمراض سرطانية عند الإنسان.

6- حوالي من 50 – 90 % من الكمية المرشوشة من المبيدات تجد طريقا للهواء لتلوثه حيث تقوم التفاعلات الكيموضوئية بتحويله إلى غازات تضر ببيئة الغلاف الجوى والأوزون وكذلك صحة الإنسان.

7- تلوث الغذاء ومياه الشرب مما يؤثر على الثروة الحيوانية نتيجة للتعرض لمتبقيات هذه المبيدات

8- كما ثبت أن معظم المبيدات قد يصيب الإنسان بدرجات مختلفة من السمية والأضرار الصحية التي تظهر آثارها على المدى البعيدة مثل أمراض الكلى والجهاز الهضمي والجهاز العصبي والسرطان.

والآن أصبحت معظم دول العالم تعاني من التلوث البيئي بالمبيدات ومتبقياتها والتأثيرات البيئية الضارة الناجمة من الاستخدام المكثف والغير مرشد أحياناً. وقد حظيت هذه المشاكل باهتمام قطاعات عريضة من المتخصصين المسئولين وذلك لارتباطها المباشر بصحة الإنسان ونظافة البيئة وتتكاتف الجهود الآن سواء على المستويات المحلية أو الدولية للوصول إلى أفضل الإجراءات التي تضمن بها أحسن استخدام للمبيدات بدون حدوث ضرر وأخطار تهدد حياة الإنسان وبيئته.

ومن أهم الاقتراحات التي نشرت في السنوات الأخيرة والتي تستهدف ذلك:

1- ضرورة استخدام المبيدات ضمن إطار التحكم الكامل في الآفات والالتزام بالتشريعات الخاصة بالرقابة عليها.

2- عمل إجراءات شديدة وشروط دقيقة لتسجيل أي مركب جديد يستخدم كمبيد للآفات تتعلق بفاعلية المبيد وتأثيراته الجانبية وأمانه بهدف أن المبيد عندما كان يستخدم وفقاً لهذه الشروط والتحذيرات والاحتياطات يكون فعالاً من أجل الغرض الذي أنتج من أجله فقط بدون أن ينتج عن استخدمه أي أضرار أو أثار جانبية على البيئة ومكوناتها بقدر الإمكان.كما يجب أن لا تتوقف إجراءات الرقابة على مرحلة التقييم ما قبل التسجيل بل يجب أن تشمل

المراقبة بعد التسجيل "مرحلة التطبيق" للتأكد من صحة التوقعات التي اعتمد عليها التسجيل.

5. أهمية علم التحليل الكيماوي لمبيدات الآفات ومتبقياتها:

- يلعب التحليل الكيماوي للمبيدات و متبقياتها دوراً أساسياً في هذا المجال حيث أن عمليات التحليل الكيماوي للمبيدات ومتبقياتها:
- توفر البيانات، والمعلومات اللازمة عن المبيدات ومتبقياتها في عناصر البيئة المختلفة وخاصة المنتجات الزراعية.
- والمعطيات الخاصة بمصير المبيدات في البيئة وتواجدها في العناصر وثيقة الصلة بالبيئة سواء في مراحل التسجيل أو بعدها.
- كما أنه السبيل الوحيد للتأكد من الالتزام بالحدود القصوى لمتبقيات المبيدات المسموح بها في الأغذية والتي تسمى بحدود الأمان والتي تحددها وتوصي بها الهيئات العلمية والمنظمات الدولية وذلك لحماية الإنسان.

وهناك القيود من الهيئات العالمية المتخصصة الدولية التي تقوم بالإشراف الرسمي وإصدار التوصيات والتحذيرات المختلفة من استخدام المبيدات ومتبقياتها وذلك من خلال دراسات متخصصة عن المبيدات وفاعليتها وسميتها وأضرارها وأخطارها وحدود الأمان.

ومن أهم المنظمات والهيئات الدولية في هذا المجال هي:

1- Food and Agriculture Organization "FAO" منظمة الاغذية والزراعة

2- Food and Drug Administration "FDA" ادارة الغذاء والدواء الامريكية

3- Environmental Protection Agency "EPA" منظمة حماية البيئة الامريكية

4- World Health Organization "WHO" منظمة الصحة العالمية

5- Collaborative International Pesticides Analytical council limited (CIPAC) اللجنة الدولية المحدودة المشتركة لتحليل المبيدات.

Commission International Methods of the Analysis of Pesticides -6
اللجنة الدولية لطرق تحليل المبيدات (CIMAP).

6. تحليل مستحضرات المبيدات:

يجرى تحليل المستحضرات بغرض الكشف عن التغير الذي حدث فيها نتيجة التخزين لفترة طويلة أو تحت ظروف تخزين قاسية ويتم ذلك بتقدير نسبة المادة أو المواد الفعالة بها والطرق المستخدمة فيها بسيطة نوعا ما

6-1. أهمية تحليل مستحضرات المبيدات:

6-1-1. تقييم المستحضر طبقا للمواصفات:

يتم تقييم مستحضرات المبيدات سواء التي تم تجهيزها محليا أو التي تم استردادها وذلك قبل أن تسجل على نطاق واسع ويتم ذلك أو يتساوى في ذلك تلك المبيدات التي يتم استخدامها في مجال مكافحة حشرات الصحة العامة أو الآفات الزراعية أو البيطرية ولابد من تحديد نسبة المادة الفعالة وكذلك تقييم خواصه الطبيعية والكيماوية ومواصفات المبيد المجهز في أي صورة من صور التجهيزة

6-1-2. دراسة ثبات المستحضر تحت ظروف التخزين:

يتم التقييم بعد تخزينها لمعرفة حدوث تدهور طبيعي أو كيميائي وكذلك يحكم تعرضها للتخزين القاسي علي حرارة مرتفعة ثم يحللها مرة أخري ويحدد مدي التخزين والتي تحافظ علي المستحضر ومن الجدير بالذكر أن التخزين السيئ يؤدي حتى إلي فساد المستحضر المجهز

وهناك عدة نقاط يجب مراعاتها عند تخزين المبيدات:

1- التخزين المثالي يجب أن يكون في مخازن ثم بنائها من مواد عازلة كالحجارة أو الطوب وليس من مواد تحتفظ بالحرارة كالجير

2- التخزين في العراء يجب التغطية بمشمعات لحمايتها من الأمطار أو أشعة الشمس.

3- جودة المخازن من ناحية التهوية.

4- يجب أن يكون الوميض Flash point مرتفعة للمذيبات الداخلة في تركيب المستحضر (درجة الوميض هي أقل درجة حرارة يعطي عندها المركب أبخرة بدرجة كافية لحدوث الاشتعال).

5- منع التدخين في مخازن المبيدات وإبعاد أي مصدر للحرارة عنها.

6- دراسة التوافق بين المستحضرات وبعضها أو بينها وبين الأسمدة ومنشطات النمو وذلك حتى يكون هذا الاستعمال ناجحا ومؤثرا يجب دراستها من حيث التوافق التطبيعي والحيوي والكيماوي ولا يحدث أي تأثيرات ضارة علي النبات أو قلة استفادة النبات من السماد أو منشط النمو والجدول يوضح المكونات الأساسية لمبيدات الآفات سواء مستحضرات صلبه أو سائلة كما يلي:

6-2. أساسيات تحليل وتقدير مستحضرات المبيدات:

حتى وقت قريب ومنذ الستينات فقط كانت مهمة الباحث الذي يتناول الكشف عن المستحضرات أو حتى تقدير متبقيات المبيدات سهلة نسبياً حيث كانت المركبات الموجودة في ذلك الوقت قليلة العدد -ومع تقدم وتطور واكتشاف العديد من المبيدات العضوية زال هذا الهدوء وأصبحت مهام الباحث في صعوبة دائمة حيث أدى ذلك لان يقوم بتقدير أجزاء أو أثار صغيرة جدا يصعب الكشف عنها من مخلفات المبيدات خاصة في الأغذية والمواد الغذائية الضرورية للإنسان والحيوان هذا بالإضافة إلى تقدير خواص المستحضرات والتأكد من مطابقتها للمواصفات

فلسفة تحليل مستحضرات المبيدات :

أ - التأكد من مطابقة المستحضرات للمواصفات القياسية Quality control حيث يقوم مصنع التجهيز بتقريب وتحوير طريقة التحليل الكيماوي بحيث تكشف عن مدى مطابقة المستحضرات لما هو مطلوب " وعادة يكون بكل مصنع وهذه ملحقة به مجهزة لهذا الغرض.

ب- المتابعة الدورية للتأكد من المطابقة للمواصفات (Regularity control: ويتم ذلك عن طريق اخذ عينات دورية ومنتظمة من التجهيزات المختلفة للتأكد من مطابقة المستحضر للمواصفات التي تم تسجيلها للمبيد –و يتيح ذلك الكشف عن أخطاء التحضيرات وكذلك يمكن الحكم على صلاحية التخزين أو وجود غش تجارى

ج- تدوين أو تسجيل النتائج الخاصة بالتحليل Reporting of the results: يجب تسجيل البيانات والنتائج في كتب مخصصة لذلك وتكون ى متناول كل شخص يعمل في هذا المجال- وغالبا ما تقوم الشركات الكبرى بعمل نشرات خاصة ومطبوعة بهذا الغرض.

د – ربط طريقة تحليل المستحضرات وتقدير المخلفات.

يجب أن تتبع نفس طريقة تقدير المخلفات الصغيرة عند تحليل المستحضرات للتأكد من مواصفاتها وهذا من الناحية العلمية صعب جدا ولذلك يفي بالغرض إيجاد طريقة تحليل سريعة وتنجز الهدف المطلوب في فترة بسيطة.

7. تحليل متبقيات المبيدات: Pesticide Residues analysis

يقصد بمتبقيات المبيدات بالمتبقيات من المبيدات بعد استخدامها أي بعد مرور فترة من الزمن سواء كانت هذه المتبقيات في صورتها الأصلية أو بعد تحللها وكذلك سواء كانت في الموقع المعامل أو بعد انتقالها إلى النظم البيئية المختلفة سواء كانت نباتية أو حيوانية أو تربة. ويتوقف تركيز متبقيات المبيدات ومقدارها على التركيز المبدئي للمبيد الذي تحدده الكميات المستقرة منه ابتداء من Deposit "المترسب" وثبات هذه المتبقيات يتوقف على سرعة تحللها نتيجة التأثيرات الجوية أو العوامل البيولوجية المختلفة أو العوامل التي ترجع إلى ثبات المتبقي نفسه.

وما يهمنا في دراسة تحليل متبقيات المبيدات معرفة كمية ونوع المتبقي لكل مركب

من المركبات المستخدمة وخصائصها البيولوجية وتأثيراتها المختلفة وما ينتج عنها من مركبات ناتجة من تحلل المبيد وذلك للأغراض الآتية:

1- تقدير الكميات المتبقية من المبيد سواء كانت في الصورة الأصلية أو في صور تحولات المركب الأصلي، خاصة في السلع الغذائية وعلف الحيوان لتحديد أمانها ومدى خطورة هذه المتبقيات وتأثيراتها المختلفة على صحة الإنسان وهل هذه المتبقيات في الحدود الآمنة المسموح بها أم لا.
2- دراسة سرعة تحلل المبيدات ومدى صمودها أمام العوامل البيئية المختلفة سواء كانت جوية أو بيولوجية ... الخ.
3- تقدير المتبقي لبيان مدى فاعلية المبيدات ومتبقياتها في مكافحة الآفات المختلفة، خاصة إذا كانت للأغراض الخاصة بالمكافحة الوقائية Protective Pesticides.
4- تقدير نسبة المادة الفعالة في تجهيزات المبيدات لبيان مدى مطابقتها للمواصفات.

حيث أن في بعض الأحيان يكون ثبات المبيد مرغوباً فيه وذلك لتحقيق مقاومة طويلة الأمد، وفي الجانب الآخر نجد أن تكسير المبيد وتحطيمه يكون مرغوباً فيه، وذلك لتجنب الآثار الناجمة عن تجمع هذه المبيدات وتراكمها في البيئة المحيطة خاصة على المحاصيل والخضر، حيث أن المبيدات تختلف في متبقياتها تبعاً لخواص المركب نفسه، فنجد أن المركبات التي تتحطم بعد رشها بفترة قصيرة تصلح لاستخدامها على محاصيل الخضر والفاكهة المسوقة بينما المبيدات التي يستمر بقاءها لفترة طويلة، ولها صفة الثبات (Persistence) العالي نجد أن متبقياتها على النبات تستمر فترة طويلة وتصلح هذه المبيدات كمبيدات وقائية.

وعموماً عند استخدام أي مبيد سواء كان رشاً أو تعفيراً يتم ترسيب المبيد مبدئياً ويفقد جزء منه عن طريق العوامل المختلفة جوية وبيوكيماوية ويبقى الجزء الباقي على السطح المعامل سواء كان نبات، حشرة، تربة، ثمرة وهذا الجزء ما يسمى بمتبقي المبيد والذي تجري عليه الدراسات والعمر المتبقي للمبيدات ويرمز لها RL50 من الصفات النوعية

لكل مبيد (فترة نصف عمر المبيد Residue Half-Life) "RL_{50} " وهي من أهم العوامل التي يتم دراستها في هذا المجال وتعرف بأنها الزمن اللازم للوصول إلى نصف كمية تركيز المتبقي المبدئي على السطح المعامل.

فترة نصف العمر للمبيد Residue half-live

بعد كم من الوقت

$$1g \longrightarrow {}^{1}/_{2}\,g$$

أي هو الزمن اللازم الذي يفقد فيه 50%من المتخلف وهذه القيمة تعتبر صفة نوعية لكل مبيد على محصول معين تحت ظروف معينة ويراعي في هذه الحالة إننا نقدر المادة الفعلية من المبيد الأصلي.

الفرق بين ومترسب و متبقي المبيد: Pesticide Deposit and Residue

Pesticide Deposit: هي الكمية المبدئية التي تستقر من المبيد فوق السطوح المختلفة عقب المعاملة بالمبيد مباشرة، وهذه الكميات المستقرة مبدئياً عند تحركها مع تقدم عمرها إلى متبقيات لهذه المبيدات سواء كان هذا التحرك بتأثير العوامل الجوية أو عمليات التحول الغذائي وتسمى Pesticide Residues.

فلما كانت المبيدات عند رشها أو تعفيرها تترك أولاً تركيزات عالية فوق السطح المعامل وهي عبارة عن كمية المبيد المبدئية على السطح المعامل ثم تبدأ هذه الكميات من المترسب في التحرك داخل الأنسجة أو التطاير بتأثير الحرارة أو الرياح أو التزحلق مع مياه المطر أو الندى أو التحلل بتأثير الأكسدة بالعوامل المختلفة ثم يبقى بعد ذلك المتبقيات ومقدار الكميات المستقرة مبدئياً من المبيدات Deposits تعتمد على عدة عوامل تضمن الجرعة أو التركيز تركيب ونوع خلائط المبيدات، وصور تجهيزاتها، طريقة استخدام المبيد، تجانس توزيع المبيد، اختلاف السطوح المعاملة، التفاوت في الظروف البيئية والموسمية.

والكميات المستقرة الأولية من المبيدات تعاني نقصاً وتغيراً فعقب استقرارها مباشرة قد تنزلق القطرات الزائدة بتأثير الجاذبية أو تأثير حركة الهواء هذا بالنسبة لقطرات الرش أما حبيبات المسحوق التعفير فقد تفقد أيضاً الجزء الزائد منها بمؤثرات ميكانيكية أهمها حركة الهواء، والجزء الباقي من الكميات المستقرة في البداية يسمى مخلفات فعالة (Effective Residues) لأن هذه المتخلفات تمثل الصورة الفعالة فعلاً من المبيدات على السطوح المعاملة والتي تستخدم في عملية المكافحة ومن الطبيعي أن تكون هذه المخلفات الفعالة تمثل أعلى قيمة لهذه المتخلفات لأن يتقدم عمرها تعاني النقص والتحلل اللذان يمران بمراحل ثلاث:

1- مرحلة التأثيرات الجوية مثل التطاير بتأثير حرارة الشمس أو بتأثير سرعة الرياح وكذلك غسيل السطوح للنباتات بمياه الأمطار وقطرات الندى ثم يبدأ التحلل تحت الظروف الجوية الذي يتمثل في الأكسدة بمساعدة الأشعة فوق البنفسجية وهذا الفقد يمثل 40%.

2- المرحلة الثانية تمثل التحلل الكبير الذي قد يحدث معظمه داخل الأنسجة الحية المعاملة سواء كان المبيد جهازياً أو غير جهازي نتيجة الامتصاص السطحي في الطبقات السطحية إذا ظل المبيد سطحياً وهذه المرحلة تمثل 60% من المتبقي من المرحلة الأولى.

3- وتمثل المرحلة الثالثة المتخلفات الباقية والتي تظل بعد أسبوع ويكون الفقد فيها لمجموع العوامل الجوية والبيولوجية وسرعة الفقد تكون بطيئة.

ولما كانت معظم مبيدات الآفات عبارة عن مركبات عضوية فإننا نتوقع أن تذوب في الطبقات الشمعية التي تعطي سطوح النباتات وكذلك الأنسجة الزيتية للثمار وأيضاً الطبقات الدهنية تحت جلد الحيوانات، وذوبان هذه المركبات يحول الكميات المستقرة من متخلفات سطحية إلى متخلفات تحت سطحية، إذا كانت المبيدات غير جهازيه أو متخلفات داخل الأنسجة إذا كانت المبيدات من النوع الجهازي، ولذلك لا يمكن الاعتماد على تقدير

المتخلفات السطحية فقط في تتبع الآثار الباقية من متخلفات المبيدات بل يجب تحليل كل أجزاء النبات وأنسجته وكل أجزاء الحيوان.

ومن مميزات المبيدات التي تبقى متخلفاتها سطحية أنه يمكن التخلص منها إن كانت على الثمار أو فوق أجزاء تستخدم في الغذاء وذلك بغسلها في محاليل غسيل سريعة مما يجعلها معدة للاستهلاك بطريقة مأمونة وذلك بخلاف الحالية إذا كانت المبيدات قابلة للتغلغل إلى داخل الأنسجة كما وأن المتخلفات الفعالة Effective Residues نظراً لأنها تكون مازالت سطحية يمكن التخلص منها بالمسح والغسيل أما المتخلفات النافذة (Penetrated Residues) فلا يمكن التخلص منها إلا إذا كانت من النوع تحت السطحي التي تخزن في طبقات تحت الكيوتيكل وهذه يمكن التخلص منها باستبعاد القشور مثل ثمار البرتقال أو الموز على سبيل المثال.

وهنا يجب الإشارة إلى أن كلمة Deposit وهي الكميات المترسبة من المبيد على السطح المعامل عقب الرش مباشرة لا يمكن أن تستعمل للتعبير عن المتبقي Residue لأن استعمال كلمة Deposit محدودة التعبير فقط تعبر عن المبيد لحظة ترسيبه على سطح النبات بينما كلمة Residue تشير إلى المركب بصفة عامة دون النظر إلى مكان تواجده على أو في المادة مع اعتبار ما يحدث من تغيرات وتحولات مختلفة ففي بعض الأحيان تتحطم المتبقيات من المبيدات وتختفي بين مكان وقوعها أو ترسيبها بالعوامل المختلفة (جوية – إنزيمية– ميكروبية).ولذلك لا يعتمد على تقدير المتخلفات السطحية فقط في تتبع الآثار الباقية من متخلفات المبيدات بل يجب تحليل كل أجزاء النبات وأنسجته وكل أجزاء الحيوان..الخ.

وكما هو واضح من أن متبقيات المبيدات تلعب دوراً خطيراً في التلوث وتؤدي أثار ضارة بالنسبة للإنسان وممتلكاته. ولهذا من الأهمية بمكان الاهتمام الكبير بدراسة تحليل متبقيات المبيدات في كل دول العالم بمتابعة كل ما يمكن أن يضيف جديداً في مجال تحليل متبقيات المبيدات وذلك لإعطاء الأمان والعمل على أن المستهلك لن تصله سوى

الكميات من المبيدات التي لا تضره في المنتجات التي يستهلكها ويتم ذلك بالتعاون الفعال بين الباحثين في مجال سمية المبيدات وتحليل المبيدات ومتبقياتها وهكذا يمكن تحديد نوع المبيدات الذي يمكن أن يستخدمه الإنسان بأمان في كل حالة، وكذلك تحديد الوقت الذي يجب أن يمر قبل تسويق المنتجات بأمان. وهذا من خلال الاهتمام المتزايد من العديد من الهيئات والمنظمات الدولية والحكومية. وبالتالي أدى كل هذا إلى الاهتمام العالمي والمحلي بحتمية التنظيم والإشراف الرسمي على المبيدات من خلال الحكومات والهيئات العلمية والتي أنشأت خصيصاً للدراسات المختلفة حول مبيدات الآفات وفاعليتها وطرق استخدامها وسميتها ومتبقياتها ومصير هذه المبيدات في البيئة بالإضافة إلى تحديد مدى خطورة الأضرار الناجمة من هذه المبيدات على الإنسان والبيئة هل هذه المبيدات ومتبقياتها تقع في الحدود الآمنة (Tolerance level) المسموح بها أم لا، وكيفية تلاشي هذه الأضرار.

8. دستور الحدود القصوى لمتبقيات المبيدات

Codex Maximum Limits For Pesticide Residues

لا شك أن حماية صحة الإنسان المستهلك للمنتجات الزراعية المعاملة بالكيماويات خاصة المبيدات هي أول أهداف وضع وإقرار الحدود القصوى لمتبقيات المبيدات في الأغذية والأعلاف الحيوانية.ويعتمد دستور الحدود القصوى لمتبقيات المبيدات على نتائج تجارب ودراسات المتبقيات المتحصل عليها من دراسات المقدار المقبول تناوله يومياً والتي يعبر عن الكميات من المتبقيات المقبول تناولها يومياً وقد يستوعبها الفرد لمدة طويلة والتي يتم إقرارها بالاعتماد على النتائج التوكسيكولوجية والمتحصل عليها أساساً من الدراسات على حيوانات التجارب، وكذلك على الحدود القصوى لمتبقيات المبيدات على المنتجات الزراعية المعاملة.

وتكون مقبولة دستور الحدود القصوى للمتبقيات في الحقل طبقاً لقواعد مقارنة المقدار المقبول تناوله يومياً مع المقادير المحسوبة التي يتناولها من الغذاء (الحدود القصوى

لمتبقيات الغذاء) حيث أنها مقدرة تبعاً لقواعد ودراسات وتجارب معتمدة علـــى المقـــدار الذي تناوله الإنسان من الغذاء. وتساعد مقارنة نتائج المقدار الذي يتم تناوله من مثل هذه الدراسات بالمقدار المقبول تناوله يومياً في تقدير أمان الأغذيـــة فيمـــا يتعلـــق بمقـــدار المتبقيات.

9. المقدار المقبول تناوله يومياً

Acceptable Daily Intake (ADI)

هو المقدار المقبول تناوله يومياً لمركب كيماوي طول فترة الحياة والذي لا يؤدي إلى ضرر ممكن تقديره أو إدراكه على صحة الإنسان المستهلك وذلك بالاعتماد علـــى كـــل الحقائق المعروفة وقت إجراء تقويم المركب الكيماوي بواسطة ملتقى منظمـــة الـــصحة العالمية و منظمة الأغذية والزراعة.

Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. (JMPR).

ويعبر عن هذا المقدار بكمية المركب الكيماوي بالمليجرام لكل كيلو جرام مـــن وزن الجسم (mg/kg).

وهذا معناه أن هذا المقدار أو الكمية التي لو أخذها أي شخص ناضج من أي مـــادة سامة في طعام كل يوم طوال حياته لا تحدث له أي تأثيرات ضارة معلومة في داخـــل إطار المعلومات الطبية الآن والكمية يمكن أن يعبر عنها في بعض الأحيـــان بجرعـــة التحمل Tolerance dose أو Tolerance level. ويتم حساب قيمةADI من خـــلال تقدير theoretical daily intake (TDI) و قسمتها على وزن جسم الشخص. و TDI عبارة عن كمية المبيدات التى يتناولها الشخص في غذائه في اليوم الواحد معبرا عنها mg pesticide/person وتعتمد في حسابها على قيم MRL في السلعة الخام بالكامل و كذلك معدل استهلاك الفرد من السلعة الغذائية كما فى المعادلة التالية:

$$TDI = MRL \times C$$

MRL = mg/kg food و هي الحد الأقصى لمتبقي المبيد في الغذاء

C= kg food /day و هي معدل استهلاك الفرد للغذاء في اليوم

ومن خلال قيمة TDI يمكن حساب قيمة ADI وذلك بقسمة TDI على وزن الجسم كالاتى كما بالمعادلة التالية:

ADI = TDI / Body weight

ويعبر عن ADI (mg pesticide/kg body weight)

ويجب أن نشير هنا إلى أن الاعتماد على ADI هو اعتماد مبالغ فيه للأسباب الآتية:

1- قيمة MRL تعتمد على المحصول أو السلعة الخام بينما أن أجزاء كثيرة السلعة الغذائية لا تؤكل مثل قشر البرتقال و الموز مثلا و لو قدرنا كمية المبيد في الجزء الذي يؤكل لكانت اقل بكثير من قيمة MRL ولهذا قام العلماء بعمل قيمة جديدة تسمى Estimated daily intake تعتمد في حسابها على كمية المبيد في الجزء المستهلك من الساعة الغذائية و ليس السلعة الخام ككل. كما أنها تأخذ في اعتبارها أيضا الفقد في المبيد الذي يحدث أثناء عمليات التجهيز و التصنيع و الطبخ كما فى المعادلة التالية:

EDI= MRL x A x P x C

حيث أن MRL الحد الأقصى لمتبقي المبيد و A تعبر عن الكمية المستهلكة من السلعة الغذائية P هو معامل التصحيح الخاص بعمليات تجهيز السلعة و C و هو معامل التصحيح الخاص بعمليات الطبخ (cooking).

و بقسمة EDI على وزن الجسم يمكن الحصول على EAD كما فى المعادلة التالية:

EADI = EDI/BW

10. الحد الأقصى لمتبقي المبيد: Maximum Residue Limit (MRL)

ويقصد به الحد الأقصى لتركيز متبقي المبيد الذي ينتج من استعمال المبيد وفقاً للتطبيق الزراعي الملائم والموصي به من قبل لجنة دستور الأغذية والتي يسمح به أو يجاز شرعياً أو يكون مقبولاً في أو على الغذاء أو السلعة الزراعيـة أو علـف الحيوان ويعبر عنه بالتركيز المتبقي من المبيد لكل جرام من السلعة (ppm) وبصفة عامة فإن التركيزات المقبولة تقدم لكي تلائم الدول الأعضاء بلجنة دستور الأغذيـة والتي لا تطبق قوانينها الوطنية الحدود القصوى للمتبقيات لحدود شرعية ويعتمد الحد الأقصى للمتبقي أساساً على التجارب المحكمة التي تجري تحت ظروف مختلفة من المناخ واحتياجات المكافحة. و يعبر عنه بعدد الجرامات من المبيد لكـل كيلـوجرام سلعة و معروف أن قيمةMRL تختلف من مبيد لأخر على نفس المحصول أو المنتج الغذائي الواحد كما أنها تختلف لنفس المبيد الواحد من محصول لأخر. وكمثال لذلك يمكن حساب التركيز من أي مبيد كحد أقصى لمتبقي المبيدات من خـلال المعادلـة التالية:

$$P\ (ppm) = A.G.E/000$$

حيث:

P= التركيز المسموح به (الحد الأقصى لمتبقي المبيد على أو في السلع الغذائية "حد الأمان").

A= الكمية المتوقع أخذها يومياً من المبيد بدون ضرر (ADI). (المقدار المقبـول تناوله يومياً. Mg/kg b. w.

G= الوزن kg للفرد الذي يتناول هذه الكمية.

E= كمية السلعة سواء كانت خضار أو فاكهة التي يتناولها الفرد يومياً.

1000= لتحول الكمية المأخوذة من جرام إلى كيلو جرام من السلعة.

وحسب تقديرات FAO وجد أن استهلاك الفرد من خضراوات وفاكهة يومياً هـو

400 جم وأن متوسط وزن الفرد هو 70كجم. فإذا كانت نتيجة الدراسات أوضحت أن الكمية المقبول أخذها يومياً من مبيد ماء هي 0.0125 ملليجرام/كجم من وزن الجسم بالتعويض في المعادلة التالية:

P= 0.0125 X 70 X 400/1000

وهذه الكمية الذي يعبر عنها بالحد الأقصى المتبقي المبيد في سلعة غذائية والمسموح بها في المواد الغذائية المسوقة لأي شخص وزنه 70كجم فى وتختلف هذه الكمية باختلاف وزن الجسم.

وتجري الاختبارات المختلفة سواء كانت الحد الأقصى لمتبقي المبيد أي أو المقدار المقبول تناوله يومياً بدقة وبدرجة محكمة على العديد من حيوانات التجارب بالتركيزات المختلفة وعلى فترات طويلة جداً ثم الفحص يومياً وبعد التأكد من الحدود الآمنة فإننا نقسم هذه القيمة على 100 قبل النصح باستخدامها بالنسبة للإنسان حتى تعطي الحدود القصوى المسموح بها وذلك لأن حيوانات التجارب في المعمل تكون في حالة صحية جيدة في حين أن بعض الأشخاص قد يكونوا أطفال أو مرضى وبالتالي قد لا يتحملوا هذه التركيزات المسموح بها من المادة السامة بالإضافة إلى حساسية الإنسان قد تكون أكبر من حساسية هذه الحيوانات لهذه المواد السامة أي يستخدم هذا الرقم للتغلب على الاختلافات الفردية بين الأفراد واختلاف النوع ذكوراً أو إناث والحالة الفسيولوجية والاختلاف الجغرافي وخلافه.

هناك ملاحظة هامة جداً يجب أن نلفت النظر إليها ألا وهي إذا كانت النتائج المتحصل عليها غير كافية أو متضاربة من التجارب المختلفة لتحديد الحدود الآمنة إذا ظهر لبعض المركبات تأثيرات سرطانية فإن الحد المسموح به في هذه الحالة يساوي صفراً ويسمى في بعض الأحيان Zero Tolerance وهذا يتوقف على حساسية الطرق المستخدمة في التحليل، ففي الماضي مثلاً كان هناك طرق لا تعطي متبقيات للمبيد. ولكن الآن ظهرت طرق للتحليل أكثر حساسية من الطرق السابقة وبالتالي تظهر جزء

من المتخلف أمكن تقديره على المواد الغذائية وبالتالي ينصح بعدم طرحها في الأسواق للاستهلاك.وبصفة عامة فإن إرشادات دراسة المقدار الذي يتم تناوله بالملوثات الكيماوية يتم إعدادها من خلال الجهود المشتركة لمنظماتFAO و WHO ومن ناحية أخرى فإن دستور الحدود القصوى لمتبقيات المبيدات يصدر من خلال CCRR و JMPR (لجنة دستور متبقيات المبيدات المشتركة Codex Committee on Pesticide Residues (CCPR) وملتقى متبقيات المبيدات المشترك من منظمة الأغذية والزراعة والصحة العالمية.

وتقوم لجنة دستور متبقيات المبيدات المشتركة من منظمة الأغذية والزراعة والصحة العالمية The Joint FAO/WHO Codex Committee on Pesticide Residues بالمسئوليات الآتية:

1- إقرار الحدود القصوى لمتبقيات المبيدات في أغذية معينة أو في مجاميع الأغذية.

2- إقرار الحدود القصوى لمتبقيات المبيدات في بعض الأعلاف الحيوانية التي تجري تبادلها عبر التجارة الدولية وذلك إذا ما كان يبرره أسباب ترجع لحماية صحة البشر.

3- إعداد أولية أو أسبقية قوائم المبيدات للتقويم بواسطة ملتقى متبقيات المبيدات المشترك من منظمة الأغذية والصحة العالمية (JMPR).

4- التفكير في طرق أخذ العينات والتحليل لتقدير متبقيات المبيدات، التفكير في الموضوعات الأخرى المتعلقة بأمان الأغذية والأعلاف المحتوية على متبقيات.

5- إقرار الحدود القصوى للملوثات البيئية والصناعية التي تدل على الكيماويات أو غيرها من مشابهات المبيدات في أغذية معينة أو مجموعات الأغذية.

ومجموعة السلع التي يطبق عليها دستور الحدود القصوى للمتبقيات تمثل كل من الأغذية المصنعة أو الخام أو الأعلاف الحيوانية وخاصة تلك السلع التي يتم تداولها عبر التجارة الدولية.

ويشمل المتبقي الذي يطبق عليه دستور الحدود القصوى للمركب الفعال الأصلي ونواتج الهدم والشوائب السامة في بعض الحالات الضرورية.

ويتم الحصول على قيم دستور الحدود القصوى لمتبقيات المبيدات (مجم/كجم) بالسلع الغذائية، من المنشورات الصادرة عن هيئة دستور الأغذية حتى عام 1988، ويجب الأخذ في الاعتبار إنه قد يحدث تعديل أو سحب لبعض الحدود المقررة ولذلك ينبغي إلى الرجوع إلى أحد منشورات هيئة دستور الأغذية الخاصة بالحدود القصوى لمتبقيات المبيدات للتأكد من تطابق هذه الحدود، ويلاحظ أنه قد توجد اختلافات في القيمة العددية بين مواصفات دستور الحدود القصوى للمتبقيات وتلك التي تشملها التنظيمات الوطنية في بعض الدول.

11. التحقق من الالتزام بدستور الحدود القصوى للمتبقيات:

التحقق من الالتزام بدستور الحدود القصوى توصي بمنظمة دستور الأغذية بخطوات وإجراءات عملية لأخذ العينات من اللوطات أو الرسائل للسلع الغذائية للحصول على العينة النهائية لتكون ممثلة للرسالة أو اللوط.

كذلك وضعت لجنة دستور متبقيات المبيدات من خلال خبراء يعملون في مجال التحليل توصيات لطرق تحليل متبقيات المبيدات وذلك لمساعدة الحكومات والعاملين بهذا المجال، ويصدر عنها مطبوعات بقوائم الطرق الموصي بها.

وهناك معايير لاختيار طرق التحليل يمكن أن يعتمد المحلل عليها عند اختيار التحليل أهمها:

1- أن تكون منشورة في مراجع متوفرة من السهل الحصول عليها.

2- أن يكون أجريت عليها دراسات مشتركة أو معروف أنه موصي باستخدامها في عدد من المعامل على أن تكون نشراتها مصحوبة بنتائج ثابتة.

3- أن تكون صالحة لطرق التحليل المتعدد للمتبقيات.

4- أن يكون قابلة للتطبيق في أي معمل منظم مزود بأجهزة التحليل الروتينية.

5- أن تكون دقيقة ومناسبة وحساسة لأقصى ما يمكن لأكبر عـدد مـن متبقيـات المبيدات في المواد المختلفة عند أو أقل من مقدار الحدود القصوى للمتبقيات.

الفصل الثاني

أسس تحليل المبيدات

الفصل الثانى

أسس تحليل المبيدات Principles of Pesticides Analysis[1]

يمكن القول انه من المسلم به أن يتم تجهيز المعامل لكي تكون قادرة على تحليل المبيدات المجهزة (المستحضرات) عند استلام عيناتها من أي مصدر بصرف النظر عن نوع المبيد أو صورته النهائية وتشمل كلمة المبيد في هذه الحالة مبيدات الحشرات –الفطريات –الحشائش – النيمادتودا وغيرها وكذلك منظمات النمو – المواد الجاذبة والطاردة وذلك بالإضافة للمواد المحسنة التي تضاف للمبيد الفعال ومن أهم تجهيزات المعاملة أن تكون مزودة بوسائل الكشف الطبيعية والكيماوية والضوء لونية.

تتوقف التطبيقات لناجحة لتحليل متبقيات المبيدات على خبرة ومؤهلات القائم بالتحليل وتوافر المصادر الأساسية وطرق التحليل القياسية والمناسبة الموثوق في نتائجها.وعموماً فإن عمليات التحليل الناجحة والجيدة يحكمها ثلاث اتجاهات مترابطة وهي:

1. المحلل: The Analyst
2. المصادر الأساسية: Basic Resources
   أ. المعمل: The Laboratory
   ب. المعدات والإمدادات: Equipment and supplies
3. التحليل ويشمل ما يلي: The Analysis
   أ. تثبيت الطريقة: Validation of method
   ب. خطوات التشغيل القياسية: Standard Operating Procedures
   ج. المحافظة على أداء التشغيل: Maintenance of over-all analytical performance

[1] كتبه الاستاذ الدكتور محمد عبد السلام عبدالباقى – أستاذ كيمياء المبيدات – كلية الزراعة – جامعة كفرالشيخ.

د. تجنب الفقد: Avoidance of Losses

هـ. تجنب التلوث: Avoidance of contamination

1. المحلل: The Analyst

تتكون عمليات تحليل متبقيات المبيدات من سلسلة من الخطوات ابتداء بتنفيذ وإجراء التجربة من أجل هدف معين ثم أخذ العينات ونقلها وإعدادها وتجهيزها وتخزينها ثم الاستخلاص والتنقية والتقدير النهائي بواسطة الطرق القياسية المناسبة ثم النتائج والبيانات وتحليلها ثم التوصيات وكيفية الاستفادة منها. وأي خطأ في أي خطوة من هذه الخطوات يمكن أن يؤدي إلى إلغاء قيمة التحليل كلية وإعطاء نتائج مضللة. وبناءاً على ذلك فإن الانتباه والحرص والدقة لتفاصيل هذه الخطوات والهدف منها يكون حتمياً وضرورياً من جانب المحلل، وبالتالي يجب أن يكون المحلل المسئول عن تحليل متبقيات المبيدات:

1- مؤهلاً عملياً ومتخصصاً.

2- ذو كفاءة وخبرة في مجال تحليل متبقيات المبيدات وأن يعي بتفاصيل كل خطوة بدقة وأن يكون ملماً بكل جديد في مجال تحليل متبقيات المبيدات والأجهزة المستخدمة في التحليل، ومن الضروري تدريب القائمين بالتحليل ببرامج تدريبية مختلفة للقواعد الأساسية لتحليل متبقيات المبيدات وخطواتها والاستخدام الصحيح والسليم للأجهزة والمعدات والمعرفة على كل جديد في مجال الأجهزة.

2. المصادر الأساسية: Basic Resources

2-1. المعمل: The Laboratory

1- يجب أن يكون المعمل مجهزاً ومعداً إعداداً سليماً وكاملاً بكل الأجهزة والمعدات والتوصيلات الكهربائية والغاز والأمان.

2- ويراعي عند تصميم المعمل أن يكون في موقع مناسب لضمان أقصى أمان

بمنع التلوث للعينات. ويجب أن تكون المواد المستخدمة في إعداد تجهيزات المعمل مقارنة للتفاعلات بالكيماويات التي تستخدم في المعمل.

3- إعداد حجرات منفصلة لاستلام العينات وإعدادها وتجهيزها والاستخلاص والتنقية والأجهزة المستخدمة في التقدير.

4- عدم السماح بالمعاملة بالكيماويات إلا في الأماكن المخصصة لذلك وبالنسبة للمذيبات فإنه يوضع منها كميات قليلة فقط في مكان العمل وتخزن الكميات الباقية الكثيرة من المذيبات في مكان منعزل، كما يجب استعمال المذيبات عالية السمية إذا كان ذلك ممكناً.

5- يجب أن تخزن مخلفات المذيبات في مكان آمن حتى يتم التخلص منها.

6- يجب إجراء عمليات الاستخلاص والتنقية والتركيز في أماكنها ويجب أن تكون هذه الأماكن جيدة التهوية والأفضل داخل خزانات غازات.

7- يجب توافر الأواني والأدوات الزجاجية الآمنة وغيرها من أدوات الأمان مثل القفازات والملابس الواقية ومواد مواجهة الطوارئ من طفايات الحريق وغيرها ويجب تدريب العاملين بالمعمل عليها.

2-2. المعدات والإمدادات: Equipments and Supplies

يتطلب العمل تواجد:

1- مصدر للكهرباء والماء والغازات المختلفة سواء كان غاز طبيعي في مواسير أو في اسطوانات.

2- مصدر ملائم للجواهر الكشافة والمذيبات والأواني الزجاجية وكافة الاحتياجات الأخرى.

3- يلزم توافر قطع الغيار لأجهزة الكروماتوجرافي والإكسسوارات اللازمة له وكذلك أجهزة قياس الألوان والموازين وكافة الأجهزة.

4- يجب تطوير المعدات والأجهزة باستمرار لتوفر إمكانية القيام بالعمل المطلوب

وخاصة عندما تكون هناك حاجة للاسترشاد بدستور الحدود القصوى للمتبقيات MRL بالمنتجات المختلفة وأيضاً عند الحاجة لها في أبحاث البيئة.

5- يجب أن يتوافر مدى واسع وكاف من المبيدات القياسية النقية ونواتج تمثيلها.

3. التحليل: The Analysis

هناك اعتبارات هامة يجب الاهتمام والأخذ بها عند تحليل متبقيات المبيدات من أهمها:

3-1. تثبيت الطريقة: Fixing the method

من أهم الاعتبارات الهامة في تحليل متبقيات المبيدات هو تثبيت الطريقة وبالتالي يجب مراعاة ما يلي:

أ. يجب استعمال الطرق القياسية خاصة في المعامل الروتينية والتي تتطلب الاسترشاد بدستور الحدود القصوى للمتبقيات أو حدود التحمل الدولية.

ب. يجب إجراء كشف دوري باستمرار وانتظام في كل الطرق في المعامل بالإضافة إلى الكشف الدوري على تأثير الاختلاف في مصادر الكيماويات والمذيبات.

ج. يجب عمل اختبارات لأداء الطريقة وعلى سبيل المثال استرجاع المركبات القياسية المضافة بمستويات قياسية سواء بمفردها أو في حالة وجود مواد أخرى.

د. يجب إجراء دراسات على تأثير الضوء والحرارة والتخزين خلال المراحل الوسطية لخطوات التحليل وعلى ثبات الجواهر الكشافة.

3-2. خطوات التشغيل القياسية: Standard Analytical Steps

أ. يجب توافر الكفاءة وقدرة استخدام خطوات التشغيل القياسية لدى القائمين بالتحليل.

ب. يجب تسجيل أي تعديل أو تحسين في الخطوات بواسطة المشتغلين بالتحليل.

3-3. المحافظة على أداء التحليل: Maintenance of over-all analytical performance

للمحافظة على أداء التحليل بصورة جيدة يجب إتباع ما يلي:

أ. هناك حاجة لدى معامل التحليل لمتبقيات المبيدات في التقويم المنتظم للطرق المستخدمة في تقدير الحدود الدنيا أو مستويات التحمل.

ب. يستخدم معدل الاسترجاع من العينات المقواة كطريقة شائعة لقياس كفاءة خطوات التحليل كالاستخلاص مثلاً، ويفضل أن يتضمن تقييم خطوات التحليل بالمركبات المرقمة إذا كان ذلك ممكناً أو يجب استخدام كذلك نواتج التمثيل القياسية، وذلك لقياس مدى الفقد في المركبات ونواتج تحولاتها، ويجب أن يكون معدل الاسترجاع بمتوسط أعلى من 80 5م.

ج. يجب العناية بالمحاليل القياسية للمبيدات وعمل الاحتياطات اللازمة حتى لا تتحلل بتأثير الحرارة أثناء التخزين أو يزداد تركيزها بسبب تبخر المذيب ويجب التأكد من حيث لآخر من ثبات هذه المركبات.

4-3. تجنب الفقد: Avoidance of Losses

يجب الحرص الكامل على الاحتفاظ بالعينات من الفقد خلال مراحل التحليل ويجب أن يراعي الآتي:

أ. يكون الوضع المثالي لتخزين العينات في مكان بارد على درجات حرارة منخفضة بعيداً عن الضوء الشمسي المباشر.

ب. يجب أن تحلل العينات سريعاً خلال فترة وجيزة بالرغم من أن هناك بعض العينات التي يمكن تخزينها لمدة ستة شهور قبل تحليلها يجب أن يراعي الاحتياجات اللازمة عند تخزينها.

ج. يجب أن تكون درجة الحرارة –20 ْم تقريباً حيث أن تدهور متبقيات المبيدات بفعل الإنزيمات يكون أقل ما يمكن عند هذه الدرجة، وإذا وجد أي

شك في ذلك يجب أن تقارن العينات الأخرى مقواة Fortified مخزنة تحت نفس الظروف.

د. يجب تجانس العينة بعد التجميد لأنه يكون هناك ميل لتكوين قطرات والتجمع على هيئة بلورات وتساقطها يؤثر على نتائج التحليل.

هـ. يجب أن تكون عبوات العينات محكمة، كما يجب أن تكتب كل البيانات التفصيلية واضع على هذه العبوات.

و. يجب أن لا تعرض المستخلصات أو المحاليل النهائية لضوء الشمس.

5-3 تجنب التلوث: Avoidance of contamination

- تعتبر مشكلة التلوث واحدة من أهم الظواهر الرئيسية التي تجعل من عملية تحليل متبقيات المبيدات تختلف عن عمليات التحليل الأخرى ويمكن أن تسبب الكميات النادرة أو الصغيرة جداً من الملوثات في العينة النهائية المستعملة في مرحلة التقدير في رفع نسبة الخطأ كما تؤدي إلى فقد الحساسية التي قد تمنع محلل متبقيات المبيدات من إحراز الحدود الضرورية للتقدير.
- يجب تجنب أي مواد كيماوية مثل الصابون والمعطرات والبلاستيك وأدوات التجميل لأنها قد تحدث التلوث بصفة خاصة في حالة استعمال كشاف التقاط الإلكتروني (E.C.D.) كما يجب كذلك استعمال البلاستيك، واستعمال قطن وأوراق ترشيح نظيفة لأن ذلك قد يؤدي إلى رفع نسبة التلوث في العينات. ويجب استعمال الأوعية الزجاجية في تخزين العينات.
- يجب تخزين العينات القياسية للمبيدات في حجرة منفصلة عن معمل المتبقيات الرئيسي وأيضاً يجب إعداد العينات الحقلية والاستخلاص والتنقية في أماكن منفصلة.
- يجب تجنب التلوث عن طريق الأواني الزجاجية والحقن وأعمدة جهاز الكروماتوجرافي من العينات السابقة، فيجب غسل وتوظيف الأواني الزجاجية

باستعمال مساحيق الغسيل ثم بالمذيب المستعمل ويجب توفر مخزون إضافي من هذه الأواني للعمل به عند الحاجة.

- قد تحتوي المذيبات المعملية والمواد الدامصة والجواهر الكشافة علـــى بعـــض المواد المتداخلة، وعليه فمن الضروري استعمال مذيبات معاد تقطيرها وكـــذلك تنقية الجواهر الكشافة والمواد الدامصة.
- تختلف طبيعة وحجم التلوث تبعاً لطريقة التقدير المستعملة ومستوى متبقيات المبيدات المطلوب تقديرها وتزداد أهمية التلوث عند طرق الكروماتوجرافي الغازي (GLC) و الكروماتوجرافى السائل عالى الاداء (HPLC) تقل أهميتها عند اســـتخدام الطـــرق الاسبكتروفوتومترية والعكس صحيح وفي حالة الزيادة النسبية لمتبقيات المبيدات فإن المواد المتدخلة من المذيبات ربما تكون غير مهمـــة بالمقارنـــة بكميـــة المتبقيـــات الموجودة، وأيضاً يمكن حل عدد من المشاكل باســـتعمال الكـــشافات المتخصـــصة وعلاوة على ذلك فإنه إذا كان الملوث لن يتداخل مع المتبقيات فإن تواجده ربما يكون متوقعاً.

4. خطوات تحليل متبقيات المبيدات:

Assay Procedures for Pesticide Residues

هناك مراحل متعددة لإجراء تحليل متبقيات المبيدات بعد تنفيذ التخزين سواء كانت حقلية أو معملية وتحديد الهدف من تحليل متبقيات المبيدات، ومن أهم هذه المراحل:

4-1. عمليات ما قبل التحليل: Pre Analysis وتشمل:

أ. أخذ العينات وإعدادها وتجهيزها وتخزينها.

ب. الاستخلاص Extraction ويقصد بها فصل أو نزع المبيد كمياً مـــن الوســـط البيولوجي الوجود فيه المبيد بواسطة المذيب.

ج. التنقية: Clean up ويقصد بها فصل وتنقية المبيد من المواد المتداخلة، حيث يجب أن يكون المبيد خالياً من معظم المواد التي تتداخل قبل إجـــراء تحليـــل

دقيق حيث يكون لذلك قيمة علمية للتحليل وعمليات ما قبل التحليل تعتبر من أهم العمليات في تنفيذ برنامج تحليل متبقيات المبيدات حيث أنه لو أجريت أي خطوة من خطوات ما قبل التحليل بطريقة خاطئة لأي سبب من الأسباب فإننا ستحصل على نتائج مضللة بالإضافة إلى المجهود والتكاليف في إجراء عمليات التحليل كلياً. وسوف نتكلم بالتفصيل عن كل خطوة من هذه الخطوات:

4-2. عملية التقدير: Determination process

بعد الوصول إلى المركب المراد تقديره بصورة معدة للتقدير بعد استخلاصه وتنقيته يمكن استخدام إحدى طرق التقدير الكمي الدقيق والذي يتوقف اختيار الطريقة على عدة عوامل أهمها: الهدف من التقدير، وبرنامج تحليل متبقيات المبيدات، توافر الطرق والأجهزة، درجة الحساسية المطلوبة للتقدير. ومن أهم هذه الطرق:

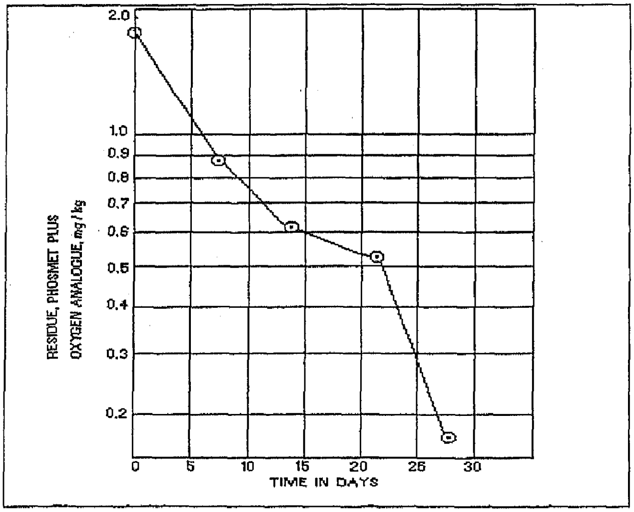
- الطرق الحيوية مثل: Biological methods
- الطرق الكروماتوجرافية Chromatographic methods
- الطرق الطيفية Spectrophotometeric methods
- الطرق الإشعاعية Isotopic methods وغيرها من الطرق.

4-3. النتائج والتوصيات: Results and Recommendation

وهذه تعتبر أهم خطوة حيث أنها تشمل التوصيات والإرشادات المختلفة من نتائج تحليل متبقيات المبيدات، وتقع على عاتق المحلل لمتبقيات المبيدات تفسير النتائج وشرحها وإصدار التوصيات. ويجب على المحلل نتيجة لذلك من التأكد من الطريقة المستخدمة وحساسيتها بدرجة كافية للنطاق المتوقع في حدود المتبقيات كما يجب عليه أن يتأكد من وجود المركب أو نواتج تحوله، وكذلك يتأكد من عدم وجود أي مواد تتداخل في التقدير.وبعد الانتهاء من عملية التقدير والحصول على النتائج، نتساءل ما هي الاستنتاجات التي يمكن تفيدنا في مجال تحليل متبقيات المبيدات. وأول ما نستنتجه

من النتائج هو عمل منحنيات تسمى (Disappearance curves) هذه المنحنيات يمكن رسمها عندما نمثل المتبقيات على هيئة ppm على المنحنى الصادي مقابل الزمن (بالأيام أو الساعات) على المنحنى السيني. ويلاحظ أن تركيز المتبقيات يختفي ويتناقص تدريجياً بعد فترة من الزمن وهذا يتوقف على عدة عوامل أهمها: خصائص المركب، درجة ثباته، العوامل المختلفة التي تؤثر على المركب.

وعموماً يشمل منحنى الاختفاء التدريجي (Disappearance curve) على ثلاث مراحل: المرحلة الأولى: مرحلة الفقد الطبيعي (تأثير العوامل الجوية، الغسيل، مدى تأثير سطح النبات، عوامل أخرى) وتمثل 40%، المرحلة الثانية: مرحلة التكسير بالعوامل المختلفة والذي يحدثه داخلياً في الأنظمة المعاملة بواسطة الإنزيمات– الميكروبات، وهذه العقد تمثل 60% من المرحلة الأولى. المرحلة الثالثة: هذه المرحلة توجد في معظم المبيدات التي تتمتع بالثبات مثل مركبات د. د. ت.



شكل (1): شكل منحنى الاختفاء والذي يكون عبارة عن علاقة بين تركيز المبيد والزمن بعد الرش.

ويمكن استنتاج الحقائق التالية من هذا المنحنى:

1- تحديد الفترات الآمنة المناسبة لجمع المحصول وتسويقه بحيث يمكن تحديد فترات الأمان التي يكون عندها الحد المسموح به فقط وما بعدها يمكن جني المحصول وتسويقه.

2- التأكد من وجود كمية المبيد المتبقية بعد فترات معينة من الزمن وهذا يبين ما إذا كان المبيد كاف لمكافحة الآفة من عدمه وهذا يفيد في عملية المكافحة الوقائية.

3- استنتاج العلاقات المختلفة بين الكميات المتبقية والعوامل الجوية وتأثيرها على تحطم المركب إلى صور سامة وحتى يمكن استنتاج وتطبيق المبيد المناسب والوقت المناسب لعمليات التطبيق المختلفة.

4- إمكانية التوجيه من خلال هذه المنحنيات ببعض العمليات التي يمكن بواسطتها إنقاص الكميات الموجودة بالغسيل أو التقشير أو الطبخ.

الفصل
الثالث

عمليات ما قبل التحليل

الفصل الثالث

عمليات ما قبل التحليل[1]

Pre-analysis processes

1. اخذ العينات: Sampling

اخذ عينات تقدير متبقيات المبيدات وجمعها وإعدادها للحصول على عينة دقيقة وممثلة للمادة المطلوب تحليل متبقيات المبيدات بها ثم نقلها وتخزينها بطرق سليمة من الأمور الهامة جدا في برنامج تحليل متبقيات المبيدات. وتعتبر الطرق السليمة والدقيقة لأخذ العينات وجمعها وإعدادها ونقلها وتخزينها البداية الصحيحة والأساس في التحليل الناجح البرنامج متبقيات المبيدات, حيث أنه إذا أخذت العينات بطريقة خاطئة لأي سبب من الأسباب فإن وقت المحلل وتكاليف التحليل سيضيع هباءاً بالإضافة إلى التقليل من النتائج المتحصل عليها وما يترتب على ذلك من أضرار.

وبناءا على ذلك يجب الحصول على عينات دقيقة وممثلة وأن تكون عشوائية بمعنى أن يكون لكل واحدة فيها فرصة متساوية للاختيار ومطابقة مع المادة التي أخذت منها أصلا, وبالتالي يجب أخذ العينات بواسطة أشخاص مدربين وعلى دراية كاملة ببرنامج تحليل متبقيات المبيدات وذلك لضمان الدقة وعدم التحيز, وقبل كل ذلك يجب أن يتبادر إلى الذهن دائماً الهدف الذي من أجله أخذت العينات, وما هي العينة التي تحقق ذلك, وما هي عدد الأماكن أو الأماكن المطلوبة لتمثيل الاختلافات, وأيضا ما هو مستوى الحساسية والدقة المطلوبة.

*يتم جمع العينات بصورة منتظمة من أماكن تواجدها وترسل لمعامل التحليل المعروفة- وتأخذ رقم كودي سرى لكل عينة – وتكون العينة مصحوبة بتقدير يوضح

---

[1] كتبه الاستاذ الدكتور محمد عبد السلام عبدالباقى – أستاذ كيمياء المبيدات – كلية الزراعة – جامعة كفرالشيخ.

مصدر ورقم العينة -كذلك يجب إحكام غلق العبوة لعدم حدوث غش تجارى وعلى الكيميائي إن يقارن رقم العينة الموجودة بتقرير المشرف على العملية تعطى كل عينة بعد ذلك رقم تحليل خاص بالمعمل Laboratory number ويتم تسجيل هذا الرقم توضح كل البيانات المتاحة بعد تعريفه العينة تماما في دفاتر التحليل الخاصة بالمعمل ويقوم الكيميائي بكتابة تقرير سريع ومفصل عن كل عينة ويقوم للجهة المسئولة يراعى عند جمع العينات عدم استعمال كميات كبيرة وذلك لان جرامات قليلة تكفى لعملية التحليل إما إذا كانت هذه العينة يراد بها تمثيل عدة ألاف من الأطنان فلابد وان تكون العينة ممثلة لمجموع العينات التي يراد دراستها يفضل جمع العينات في أواني زجاجية محكمة الغلق وبعيدة عن أي مصدر للتلوث بعد انتهاء التحليل وتدوين البيانات تحفظ بقية العينات التي تم تحليلها في المعمل لفترة محدودة ومعلومة عند نقل العينات من المعمل يجب إن يتم تدوين ذلك في أرقام ودفاتر خاصة أسلوب وطريقة الحفظ في حالة التخلص من عينات التحليل يجب إن يتم ذلك بحيث لا يتسبب في إحداث أي إضرار لأي كائن حي بصورة أو بأخرى , ويتم ذلك بعمل حفرة خارج نطاق المدينة وتدفن بها هذه العينات وتغطى بالتراب ويفضل وضع علامات تحذيرية زيادة في الاحتياط تخزن العينات التي انتهى تحليلها في أماكن مغلقة وعليها نفس الأرقام والبيانات وذلك حتى يمكن الرجوع إليها عندما يستلزم الأمر ذلك يكون التخزين في أماكن مظلمة لان الضوء ودرجات الحرارة المختلفة تؤدى في معظم الأحوال إلى حدوث تغيير في التركيب الكيميائي للمبيد

ولضمان كل ذلك يجب أن يراعى الاعتبارات التالية عند أخذ العينات:

1-1. الغرض من جمع العينات: Purpose of Sampling

عند جمع وأخذ العينات يجب أولا تحديد الهدف من برنامج تحليل متبقيات المبيدات حيث أن الهدف أو الغرض التي تؤخذ من أجله العينات تمثل أحد الاعتبارات الهامة التي يجب أخذها في الاعتبار وعلى سبيل المثال فإنه إذا كان الغرض هو اكتشاف إذا

كانت العينة تستجيب لدستور الحدود القصوى لمتبقيات المبيدات فإنه من الضروري إمداد العمل بعينة ممثلة للتحليل ويكون الغرض من عملية أخذ العينات هو الحصول على عينة نهائية Final Sample ممثلة للوط Lot, وذلك لتقدير متبقيات المبيدات بها ويجدر الإشارة لبعض المصطلحات المستخدمة في هذا المجال.

اللوط: LOT

كمية متماثلة من البضائع أو السلع التي تنقل مرة واحدة ويكون لها نفس المواصفات العامة أو المتجانسة, وعلى سبيل المثال يكون من نفس الأصل أو الصنف أو التاجر أو نفس الماركة أو نفس طريقة التعبئة والتغليف.

وقد يشكل عدد من اللوطات الرسالة كما أن اللوط الذي يؤخذ منه العينة الأولية بواسطة أشخاص مدربين.

الرسالة : Consignment

هي كمية من المواد المرسلة والتي يصاحبها مذكرة إرسال أو وثيقة شحن وقد ترسل اللوطات المشكلة للرسالة على مرات مختلفة، ولذا فإنها قد تحتوي على كميات مختلفة من متبقيات المبيدات، وبصفة عامة فإنه يمكن الوصول إلى العينات النهائية من المواد المختلفة التالية كمثال وذلك بإتباع التوصيات التالية:

الماء : Water

يجب أن لا يقل حجم العينة عن (2 لتر) تؤخذ من العينة المركبة) وتؤخذ العينة المركبة من أعماق مختلفة من النهر المستخدم مياهه في ماء الشرب وعلى أبعاد مختلفة، وعلى فترات مختلفة، أو على فترات مختلفة من مياه الحنفية مثلاً.

التربة : Soil

التربة السطحية: وذلك بالكشط أو الحفر حتى عمق 5سم وتزال بقايا المواد

العضوية ويمكن الحصول على العينة المركبة بخلط التربة السطحية أو المتحصل عليها من عدة مناطق وعادة تحتوي هذه الطبقة على معظم تركيز المبيد.

باطن التربة: على أعماق مختلفة يمكن أخذ عينات بطرق خاصة وتخلط التربة وتنخل ثم تؤخذ العينة الممثلة.

الأسماك : Fish

السمك الصغير: يكفي بضع سمكات من نفس النوع لإعطاء 100 جرام عينة بروتين على الأقل. السمك الكبير: يكفي سمكة واحدة، ولأخذ عينة من البروتين فقط تزال القشور والعظام وتنظف الأحشاء ويزال الذيل والرأس ويقطع السمك الكبير إلى شرائح من الرأس إلى الذيل ثم يفرم أو يضرب في الخلاط.

المنتجات الزراعية – (اللوطات): Agricultural products

يجب أن تمثل اللوطات العديدة بقدر الإمكان، وإذا كانت اللوطات كبيرة فإنه قد يكون من الضروري أن يتعامل مع كل لوط كعينة فردية ويجب أخذ العينة الأولية بأسرع ما يمكن من اللوط، ويجب تسجيل الملاحظات الخاصة بذلك ويجب ملاحظة أن تكون العينات الأولية متماثلة ويجب أن يكون ناتج خلطها (العينة الكبيرة) لا يقل عن الكمية المطلوبة للعينة النهائية، ويجب أن تكون كافية بالقدر الكامل والملائم لمواجهة الاحتياطات الممكنة للحصول على مزيد من العينات الفرعية ويمكن الاستعانة بالجدول الآتي في تحديد عدد العينات الأولية.

الأغذية المخزنة بكميات كبيرة:

عند تخزين الأغذية في حاويات كبيرة أو صناديق فإن يختار عدد من الوحدات عشوائياً على مستوى أو أماكن معينة مختلفة.

جدول (1): الحد الأدنى لعدد العينات الأولية تبعاً لوزن اللوط.

وزن اللوط بالكيلو جرام	الحد الأدنى لعدد العينات الأولية الذي يؤخذ
أقل من 50	3
500-51	5
2000-501	10
أكثر من 2000	15

بالنسبة للمنتجات المصنعة والمعبأة في علب أو زجاجات أو غيرها من العبوات الصغيرة وخاصة إذا كان وزن اللوط غير معروف فإنه يمكن الاستعانة بالجدول الآتي:

جدول (2): الحد الأدنى لعدد العينات الأولية الذي يؤخذ من المنتجات المصنعة.

عدد العلب أو العبوات في اللوط	الحد الأدنى لعدد العينات الأولية الذي يؤخذ
25-1	**1**
100-26	**5**
2500-101	**10**
أكثر من 250	**15**

ولتقدير عدد الوحدات يتبع الإرشادات التالية:

1- يؤخذ عينة مقدارها 20كجم على الأقل من الخضراوات أو الفواكه الصغيرة مثل العنب أو البازلاء.

2- يؤخذ عينة مقدارها 11كجم على الأقل من الفواكه أو الخضراوات المتوسطة مثل التفاح أو البرتقال أو البطاطس.

3- يؤخذ عينة مقدارها 3 كجم على الأقل من الفواكه والخضراوات مثل الشمام والخس.

4- يؤخذ عينة مقدارها 2 كجم على الأقل من اللحوم والأسماك والطيور الداجنة.

5- يؤخذ حجم 1 لتر على الأقل من اللبن.

6- يؤخذ دستة بيض (1 كجم من العينات) على الأقل.

محاصيل الحقل:

يختار عدد من الوحدات عشوائياً وعند الحاجة لتحليل الأجزاء المختلفة للمنتج يجب فصل هذه الأجزاء وتؤخذ عينات منفردة ثم تخلط للحصول على العينة الكبيرة ثم اختزال هذه العينة لتمثل العينة المعملية، وقد تقسم العينة النهائية لقسمين أو أكثر من المكونات وذلك لإجراء تحليل منفصل لكل منهما، ولذا فإنه يجب أن تمثل كل المكونات في العينة النهائية، ويوضح الجدول التالي في تحديد حجم العينات الموصي بها في تحليل متبقيات المبيدات في الأغذية المختلفة.

1-2. العشوائية في اختيار العينات: Rondom selection

يجب الدقة وعدم التحيز في جمع العينات من اللوطات وكذلك في حالة جمعها من القطع التجريبية في التجارب الحقلية.

1-3. حجم العينة: Sample volume

كما وضحت في الجداول السابقة يجب أن تكون حجم العينة بكميات كافية ويجب التأكد من أن العينة تكفي للحصول على كمية من المبيد تقع في نطاق طرق التحليل التي يستخدم في تقدير الكميات المتبقية الموجودة من هذا المبيد، كما يجب أن تكون العينة كبيرة بدرجة كافية بحيث يمكن الاعتماد عليها لتكون ممثلة لدراسة المتخلف الحقلي على فترات زمنية متتالية.

1-4. طبيعة وتاريخ العينة: Nature and History of Sample

يجب وصف وتحديد العينة وبيان ما إذا كانت سائلة أو صلبة أو ثمار أو

أوراق..الخ. وبالتالي يجب كتابة البيانات التفصيلية على العينة مثل تاريخ العينة، والمعاملات الكيماوية التي أجريت والتي تعرضت لها العينات، وذلك لبيان ما إذا كانت هذه الكيماويات تؤثر أو لا تؤثر على تركيز المتبقيات، كما يجب أن يشمل تاريخ أخذ العينة وفترات أخذ العينات، ويتوقف تحديد الفترات على نوع التحلل ونوع المحصول ونوع المبيد.

جدول (3): أحجام العينات الموصي بها لتحليل متبقيات المبيدات.

المنتج المراد تحليل المتبقيات به	كمية العينة المطلوبة للتحليل		
	الكمية المفضلة	الحد الأدنى المفضل(2)	الحد الأدنى المطلق(3)
التفاح، الخوخ، البطاطس، الموالح وغيرها من الفواكه والخضراوات المتماثلة في الحجم.	30 ثمرة	20 ثمرة	10 ثمرات
الكمثرى، الكريز، ....الخ	2كجم	1 كجم	0.5 كجم
العلف، التين، (غض أو جاف).	1-2كجم	1 كجم	0.5 كجم
الذرة (الحبوب والقولحة من إزالة أغطية الكوز).	12كوز	6 كيزان	6 كيزان
الحبوب (الجافة)، النقل، بذرة القطن..الخ	1-2كجم	1 كجم	0.5كجم
الخضراوات الصغيرة، البسلة... الخ	1-2كجم	1 كجم	0.5 كجم
البضائع المعلبة	4علب	علبتين	علبة واحدة
الكرنب، الخس، الشمام وغيرها من الفواكه والخضراوات المتماثلة في الحجم.	6-8ثمار (ب)	4-5ثمار (ب)	2-3 ثمار (ب)
عينات التربة	1-2كجم	0.5كجم	0.5 كجم
عينات الماء	1-4لتر	500مل	100 مل

(□) إذا ما كانت طريقة التحليل مجازة.

(□) يمكن أخذ قطاعات من 6-8 ثمار أو من نباتات الخضار إلى أن يصل ما تحتويه كل عينة حوالي 2كجم.

1-5. عدد المكررات: Number of replicates

يجب أن يؤخذ عدد من المكررات من العينات المعاملة وذلك للتغلب على اختلاف تنوع العينات.و يتوقف عدد المكررات على طبيعة طريقة التحليل و الناحية الاقتصادية.

1-6. العوامل المحيطة: Environmental Factors

تؤثر العوامل المحيطة على موضع و كمية المتبقيات الموجودة في العينة خاصة العوامل الجوية مثل الرياح و الضوء و بالتالي عند جمع العينة مراعاة درجة تأثرها من عدمه بالضوء مثلا مع الأخذ في الاعتبار تسجيل درجات الإشعاع.

1-7. تاريخ المعاملة السابقة: Histroy of preivous treatment

يجب عند جمع العينات الحقلية معرفة تاريخ ونوعية وكمية اى معاملات سابقة حتى لا يحث تداخل أثناء التقدير مع المركب المراد تقديره و إعطاء نتائج مضللة.

1-8. الاعتبارات الواجب مراعاتها قبل أخذ العينة الحقلية :

كثيرا ما تعطي التحليلات المختلفة في المناطق المختلفة بيانات مختلفة عن مخلفات المبيدات علي محصول معين ، وذلك يرجع إلي الصعوبات العديدة التي يقابلها القائم بعملية التحليل واختلاف المقاييس الواجب اتخاذها قبل أخذ العينات . لذلك تجب مراعاة الاعتبارات الآتية قبل أخذ العينات ، حتى يمكن أن تتوحد المقاييس بقدر الإمكان .

1-8-1. نوع المواد المعاملة :Type of treated materials

ثبت أن الطبيعة وتركيب السطوح المعاملة تأثير كبير علي درجة احتفاظها بمواد الرش أو التعفير، وكذلك علي طول بقاء المخلفات عليها . فالسطوح النباتية أو الشمعية أو الزيتية الملمس تحتفظ بالزيوت والمواد الصلبة المترسبة عليها بدرجة أكبر ، وبذلك تختلف كمية المادة المترسبة من محلول الرش أو مسحوق التعفير باختلاف العائلات النباتية ، بل الأصناف والأنواع المختلفة.

1-8-2. تاريخ المعاملات السابقة History of previous treatments:

في جميع الطرق المتبعة لتحليل مخلفات المبيدات يجب معرفة تاريخ المعاملات السابقة ، إن أمكن تقدير عامل ثابت لها يسمح بتعويض النتائج . وهذ التقدير يشمل تقارير ثابتة من معاملات التربة ، مثل : التسميد ، ومقاومة آفات التربة ، واستعمال منظمات النمو ، مثل 4،2 – د ، نوع المواد المساعدة التي استعملت في محاليل الرش . ومثل هذه المعلومات قد تكون ذات قيمة كبيرة بالنسبة للقائم بالعملية ... فمن الواجب استشارة القائم بعملية التحليل قبل إجراء التجارب والمعاملات المختلفة ، حتى يتجنب العمل في حقول قد تعطي عيناتها نتائج مشكوكا فيها .

1-8-3. اختلاف وتنوع العينات البيولوجيه Variation in Bio-samples:

تنوع العينات البيولوجية قد يكون أهم عامل ضمن الاعتبارات الواجب مراعاتها قبل أخذ العينة . وعدم مراعاة هذا قد يسبب أكثر وأفدح الأخطاء في برنامج التقييم الخاص بمخلفات المبيدات علي النباتات ... وهذا التنوع يمكن الحصول علية بتكرار أخذ العينات من أماكن مختلفة ، علاوة علي تنوع العينة من المعاملة الواحدة . ويمكن عموما تقدير العدد اللازم للمكررات باستعمال التقدير لإحصائي بحصر العوامل الحيوية التي قد تسبب اختلاف نوع العينة، وعلي ذلك .. فالمعلومات الأولية التي تقدمها الطرق الإحصائية تتمثل في تقييم التجارب .

1-8-4. تركيب المبيد المجهز (المستحضر) Formulation :

وجد أن اختلاف تركيب المستحضر من حيث نوع المادة الحاملة Carrier ، أو المواد المحسنة Supplemental، وكذلك طريقة المعاملة (رش أو تعفير) قد تؤثر تأثيرا واضحا في تحديد كمية الرواسب الأولية ودرجة بقائها علي النبات Persistence ، ودرجة تخللها Penetration ، كما وجد أن اختلاف المادة المستحلبة Emulsifiers ، أو عامل البلل Wetting agents ، أو تغير درجة الحموضة في مسحوق التعفير بتغير نوع المادة الحاملة يؤثر في صورة المادة المتخلفة ودرجة بقائها .

1-8-5. توحيد طريقة المعاملة Similar method of treatment:

من الصعوبة بمكان ضمان توحيد المعاملة للمبيد الواحد في الحقل ، وحتى لو كانت المعاملة علي شجرة واحدة أو ياردة مربعة من التربة ، فقد وجد أن أدوات الرش أو التعفير المختلفة تعطي كميات متفاوتة من المواد المترسبة أو المختلفة من المبيد ، وعلية .. فمن الواضح أن نوع الآلة المستعملة في الرش يجب أن يكون موضع الاعتبار عند دراسة المواد المتخلفة من المبيدات .

1-8-6. العوامل الخارجية المحيطة Environmental Factors:

العوامل الخارجية المحيطة بالنباتات المعاملة قد تؤثر تأثيرا واضحا في كمية المخلفات وسلوكها علي أو في الأجزاء المختلفة من النباتات المعاملة. وحتى في وحدة المساحة .

2. تخزين العينات: Storage of Samples

يجب أن يتم تحليل العينات عقب جمع العينات مباشرة دون الحاجة إلى تخزين، أو تكون الفترة التي تنقضي بين جمع المحصول وبدأ تحليلها أقصر ما يمكن، ولكن الإمكانات المعملية قد لا تيسر ذلك، وبالتالي نضطر إلى تخزين العينات لفترات معينة تبعاً لنوع المبيد تحت الصفر المئوي، وقد تصل أحياناً حتى −20°م لحين إجراءات عملية التحليل وذلك لإيقاف أو إبطاء العمليات البيولوجية في أنسجة العينات وذلك لعدم تغيير الصورة الحقيقية لمقدار ونوع المخلفات الموجودة في العينة.

وإذا كانت العينات تخزن لعدة شهور فإنه يجب الاحتياط الكامل في تخزين العينات حسب المركب وخواصه الطبيعية والكيماوية، ففي حالة المركبات الفوسفورية والتي يحدث لها تحلل كلما طالت مدة التخزين فإنه يجب الإسراع في تحليلها وذلك مقارنة بالمبيدات الكلورونية ويجب التخزين في هذه الحالة تحت الصفر المئوي ويجب أن يحتفظ في صورة مجمدة وفي أوعية مغلقة.

وللتأكد من عمليات التخزين يجب عمل عينة مقواه (Fortified sample) وذلك

بوضع كمية معلومة من المبيد النقي إلى عينات غير معاملة (Control) ثم يتم تخزينها مع باقي العينات بنفس الطريقة، ثم عند إجراء التحليل تحلل هذه العينات أو للتأكد من عدم حدوث أي فقد أو تحلل للمبيد تحت ظروف التخزين المختلفة التي تعرضت إليها العينات الأساسية، وإذا ما وجدت أن النتائج المتحصل عليها من هذه العينات المقواة انخفض فيها المبيد وحدث لها تحلل كبير فمن الأفضل أن لا يجري تحليل العينات الأساسية المعدة للتحليل وذلك لأنها ستعطي نتائج مضللة ولا يعتمد عليها في التوصيات والإرشادات، وهناك بعض المعامل يتم فيها تخزين العينات الخام كما هي وبعض المعامل تخزن العينات في صورة مجمدة والتي تسمى في بعض الأحيان Sub Sample وبعض المعامل تفضل تخزين العينات بعد استخلاصها وذلك لأن فقد المبيد في هذه الحالة يكون أقل وفي كل هذه الأحوال يجب عمل عينة مقواه.

3. إعداد العينات: Sample Preparation

تهدف هذه العملية للحصول على منتج نهائي يمثل الكمية التي أخذت منها العينة وذلك في صورة تصلح للاستخلاص دون فقد في متبقيات المبيدات أو تغيير في طبيعتها الكيميائية وتختلف طريقة إعداد العينة تبعاً لخواصها الطبيعية حيث تطحن الحبوب والبذور لأحجام معينة، بينما تقطيع الخضراوات والفواكه واللحوم وبعض المواد الأخرى، وبالنسبة للعينات السائلة والمحاليل المتجانسة فإنها في معظم الأحيان لا تحتاج أساساً إلى إعدادها.

وغالباً تؤخذ عينات من المنتج عشوائياً للحصول على عينة المركب الممثلة. وفي بعض الحالات يكون المطلوب تحليل متبقيات المبيدات الجزء الصالح للأكل، ولذا تزال الأجزاء الأخرى كالقشور والأصداف والسيقان والبذور والأنوية كما هو موضح بعض الجداول المرفقة.

وبصفة عامة فإن الحدود القصوى لمتبقيات المبيدات تطبق في معظم الأحوال على

السلعة الزراعية الخام ككل وخاصة في مجال التجارة الدولية إلا انه في بعض الأحوال تشمل المواصفات المطلوب تحديد جزء من السلعة الخام الذي يطبق عليه الحدود القصوى للمتبقيات.

وبصفة عامة فإنه يمكن إجراء العمليات التالية لإعداد عينات الأغذية المختلفة:

1- إزالة قشور الموز.　　　2- إزالة قشرة وقوالح كيزان الذرة.

3- تفرغ قشرة البيض.　　　4-إزالة السوق والأعناق والأنوية للفواكه.

5- إزالة قشور وبذور القرع والشمام.

6- إزالة رأس وأزهار وقشرة الأناناس.

7- إزالة التربة العالقة بالمحاصيل الجذرية بماء خفيف.

8- إزالة رأس وذيل وقشرة الأسماك والأنواع المشابهة لذلك.

4. الاستخلاص: Extraction

يقصد بعملية الاستخلاص لمتبقيات المبيدات بنزع أو فصل أو نقل المبيد (المركب الفعال المراد تقديره) من الوسط الموجود فيه سواء كان نباتاً أو حيواناً أو تربة ... إلخ بواسطة المذيب المناسب سواء كان منفرداً أو مزيج من المذيبات المناسبة، وتعتبر عملية الاستخلاص من أهم العمليات التي تتم في إجراء تحليل متبقيات المبيدات.وتتم عملية استخلاص متبقيات المبيد من المواد المختلفة باستعمال المذيبات العضوية وتتوقف فاعلية الاستخلاص على اختيار المذيب القادر على إذابة أكبر كمية ممكنة من متبقيات المبيد من الأنسجة النباتية والحيوانية أو أي من المواد المعاملة دون المواد المكونة للعينة المراد استخلاص المبيد فيها.أي أن كفاءة الاستخلاص تعتمد على الذوبان العالي جداً للمبيد في النظام المذيبي المستخدم دون ذوبان المواد المتدخلة أو الشوائب من مكونات العينة.ويفضل اختيار المذيب القادر على استخلاص متبقيات المبيد من أكبر عدد من الأنواع النباتية المختلفة دون تعديل بالنسبة لكل نوع أو محصول.

وتعتمد طريقة الاستخلاص المستخدمة واختيار النظام المذيبي المستخدم على الأسس الآتية:

1- الخواص الطبيعية والكيماوية للمبيد.

2- طبيعة وخصائص العينة المراد استخلاص المبيد منها.

3- طريقة التقدير النهائية.

وتوضح قائمة المراجع المختلفة في هذا المجال العديد من طرق الاستخلاص والتنقيـــة، ولا يجب اعتبار الطرق المأخوذة من هذه المراجع أنها الطرق النهائية الوحيدة التي يمكـــن استخدامها في معظم الأحوال، وينبغي عند استخدام طـــرق أخـــرى أو إجـــراء تطـــوير Modifications لهذه الطرق أن يؤخذ في الاعتبار نتـــائج الاســـترجاع Recovery Data المتحصل عليها من هذه الطرق المعدلة.

4-1. الاعتبارات العامة التي تستلزم عند الاستخلاص:
General Consideration involving extraction:

1- Purification of solvents

2- Selection of solvents

3- Evaporation of solvents

4- Pesticide recovery

5- General extraction procedure

4-1-1. نقاوة المذيبات: Purification of solvents

من الضروري جداً أن تكون المذيبات المستخدمة على درجة عالية جداً مـــن النقـــاوة خاصة إذا كانت الخطوة النهائية سوف تتضمن استخدام GLC خاصة عند استخدام كشاف (Electronic Capture Detector) (E. C. D.) فإنه من الضروري في هـــذه الحالـــة أن تكون المذيبات نقية جداً وذلك بتقطيرها ثم تقطيرها مرة أخرى في أجهزة زجاجية وذلـــك لنحصل على مذيب نقي 100% Distillation and Re-distillation وفي بعض الأحيان

يكون من الأفضل شراء مذيبات عالية النقاوة مقطرة خصيصاً للتحليلات الكروماتوجرافية الغازية. حيث أن الإيثير R- O- R قد يحتوي على Peroxide (فوق الأكسيد) $(CH_3)_2O_2$ المؤكسدة ويمكن التخلص من فوق الأكاسيد بواسطة عامل مختزل مثل كبريتات الحديدوز في حالة التقطير، وكذلك مذيب الكلورفورم CH_3CL_3 نجد أن به بعض الشوائب مثل الكلورال ورابع كلوريد الكربون وكل منهما له خواصه المعينة فلذا يجب التخلص منهما قبل استعمال هذا المذيب في الاستخلاص. كذلك الاسيتونتريل Acetonitrile (CH_3 C=N) المستخدم بكثرة في حالة استخلاص المبيدات فنجد أنه توجد به بعض المشتقات الثانوية تعمل على الأكسدة أو الاختزال لبعض المركبات كما يجب أ يتم تقطير المذيبات المحتوية على كلور مثل الكلوروفورم والمثيلين كلوريد قبل استخدامها مباشرة لإمكانية تكوين مركب الفوسوجين C1-C-r هوسام جداو, عند بقاءها مدة طويلة. كما يجب أن يؤخذ في الاعتبار عدم تلامس المذيب لأي أنابيب محاطة أو مواد بلاستيكية ما عدا التيفلون وذلك قبل حقن العينة في جهاز GL.C خاصة مع كشاف E.C.D.

4-1-2. اختيار المذيب: Selection of solvent

إن اختيار مذيب الاستخلاص سواء كان قطبياً أو غير قطبي أو خليط سوف يعتمد على طبيعة العينة المستخدمة وخواص المبيد الكيماوية والطبيعية.ونظراً لأن معظم المبيدات تذوب في مذيبات عضوية سواء كانت قطبية أو غير قطبية فإنها تنفصل من داخل العينة التي تحتوي على المواد المتداخلة مثل المكونات الخلوية النباتية كالأحماض الأمينية والبروتينات والدهون والكربوهيدرات والسليلوز والتي تذوب بدورها بدرجة قليلة في معظم المذيبات العضوية، وبالتالي يجب اختيار المذيب الذي يكون فيه درجة ذوبان المبيد بدرجة عالية دون المواد المتداخلة والشوائب والي هي عبارة عن مكونات العينة.

وعموماً يمكن القول بأنه لا يوجد مذيب أو مخلوط من المذيبات يمكن استخلاص المبيد ونواتج تحطمه بنسبة 100%. وفي بعض الأحيان قد يتكون مستحلبات خاصة في العينات التي تحتوي على نسبة عالية من الرطوبة في أثناء الهرس مع المذيب وبالتالي تصعب

عملية الفصل في هذه الحالة إما أنه يقوم بالهرس أولاً بدون إضافة المذيب أو وضع مذيب مساعد مع المذيب الأصلي على العينة، وهذا المذيب المساعد يجب أن يكون قابل للخلط مع الماء مثل الأسيتون أو كحول الأيزوبروبايل ثم يضاف المذيب المطلوب و يمكن كسر ما تبقى من مستحلبات بإضافة كمية مناسبة من الأملاح مثل كبريتات الصوديوم اللامائية أو يمكن استخدام القوى الطاردة المركزية والدور الذي تقوم به المذيبات المساعدة هو إحداث تغيرات في القوى البينية السطحية (بين المذيب العضوي والطبقة المائية بحيث يقلل التوتر السطحي البيني).

3-1-4. تبخير المذيب: Evaporation of the solvent:

يمكن اعتباره تقطير للمذيب تحت تفريغ حيث يتم تسخين مستخلص المبيد على حمام مائي ويتم سحب أبخرة المذيب خلال مكثف حيث تتكثف أبخرة المذيب ثانياً، ويمكن اعتبار هذه الطريقة من آلاف طرق التركيز حيث يتم دوران الدورق المحتوي على العينة (المستحلب) توفر تجانس التسخين لإجراء المحلول كله:

يجب أن نأخذ في اعتبار التحذيرات الآتية عند تركيز أي متبقي من المبيدات:

1- يجب تجفيف المستخلص(المذيب المحتوي على العينة) باستخدام كبريتات صوديوم لامائية (المذيب المحتوي على العينة).
2- درجة حرارة المذيب خلال التبخير يجب أن لا تتعدى 50 ٥م في معظمة الأحوال.
3- يجب ملاحظة العينة بدقة خلال مراحلها النهائية من إزالة المذيب، كما يجب أن لا نسخن العينة أو تتعرض للتفريغ بعد تطاير كل المذيب.
4- يجب عدم إزالة المذيبات تماماً من المستخلصات حتى لا يحدث فقد للمبيدات.
5- يجب الحذر من تكثيف الرطوبة أثناء عملية التبخير.

4-1-4. نسبة الاسترجاع لتقييم كفاءة الاستخلاص: Recovery percentage:

أن كمية المبيد المسترجعة بطريقة استخلاص معينة ليست مقياس حقيقي للمتبقي الأصلي إلا في حالة الاستخلاص الكامل، ودرجة نزع المبيد من العينة تتوقف عادة على

كفاءة الاستخلاص (Extraction efficiency) وتعتمد كفاءة الاستخلاص على الذائبية العالية للمبيد في المذيبات المستخدمة بالإضافة إلى الوصول إلى حالة اتزان معينة لتركيز المبيد في المذيب والكمية المتبقية في العينة. ويمكن التعبير على كفاءة الاستخلاص كنسبة مئوية للمبيد من عينة مقواة تحتوي على كمية معلومة من المبيد (كمية معلومة من المبيد على عينة غير معاملة) وتسمى Fortified sample or spiked sample. ثم يتم استخلاص هذه العينة وما عليها من كمية معينة من المبيد بالطريقة المتبعة، ثم تقدر كفاءة الاستخلاص والتي من خلالها تعدل النتائج فيما بعد. وهناك نوع أخر من العينات المقواة Fortified sample وتتبع في حالة خاصة. ففي حالة توقع وجود مستوى منخفض جداً من المبيد في العينة فإن إضافة كميات معلومة من المبيد إلى العينة ثم يتم التقدير ثم حساب الفرق وذلك للوصول إلى الحساسية الموجودة.

ملحوظات عامة:

*يجب على الكيميائي أولا - :تحديد الطريقة المناسبة لتحليل العينة كما إن معظم العينات يمكن تحليلها مباشرة إلا أنه يتحتم الاستخلاص في عينات أخرى كما في حالة المخاليط واتى يجب فصل مكوناتها أولا بالفصل الكروماتوجرافى

ومن أشهر طرق الاستخلاص تلك التي تستخدم في جهاز سوكسلت soxhlet مع احد المذيبات العضوية المتطايرة مثل الهكسان وفى التقدير اللوني لمبيدات الملاثيون والباراثيون والباراتيتروميتتول يجهز مستخلص كحولي للتحليل

ولابد من تجهيز مستخلصات في حالة مساحيق التعفير إذا أريد تقديرها بالطرق اللونية أو الضوئية وتتوقف كفاءة التقدير على مدى التوفيق في اختيار المذيبات المناسبة والتي تتحدد بدرجة الذوبان ودرجة الثبات والتطاير والنقاوة والثمن
□ومن أحسن المذيبات للتقدير بالأشعة فوق البنفسجية الأسيتونيتريل السيكلو هكسان الميثانول.

- ومن أحسن طرق الفصل نذكر أعمدة الكروماتوجراي وعلي سبيل المثال يمكن

فصل مخلوط من مبيدات الد.د.د.ت والألد رين والداي لدرين والأندرين ومشابه جاما سادس كلوريد البنزين ويتم ذلك بوضع العينة في عمود يحتوي علي حمض السيليسيليك Salicylic acid ثم يزاح مخلوط المبيدات باستخدام مذيبات البينـزو إيثان والهكسان ويؤدي اختلاف درجة ذوبان المركبات في المذيبان إلي اختلاف درجة تحركهما في العمود ,وبالتالي يمكن فصلهما كلية حيث يتم تجميع المترشحات وتقدر بالطريقة المناسبة

- وفي حالة عينة تحتوي علي مبيد عضوي مخلوط مع الكبريت فانه يمكن فصلهما بغسل عينة موزونة بمذيب الأسيتون المشبع بالكبريت لإزالة المبيد العضوي وبعد تجفيف المتبقي يوزن ويغسل بثاني كبريتور الكربون الخالي من الكبريت ومن الوزن الجاف المتبقي يمكن معرفة كمية الكبريت التي كانت في العينة الأصلية
- ولايكون الفصل ضروري إذا تم استخدام طرق متخصصة specific methods لتقدير المبيد في المخلوط بشرط عدم حدوث تداخل بين المركبات بما يؤثر علي كفاءة التقدير ومثال ذلك مخاليط المبيدات الفوسفورية والمبيدات الكلورونية
- وعند تقدير البيريرثين المخلوط بالمنشط المعروف (ببرونيل بيوتوكسيد) حيث أن تحليل أحدهما في وجود الأخر يخلق كثيرا من المشاكل لذلك تم وضع طريقة خاصة لفصلهما وتقديريهما استخدمت فيها وسائل مساعدة للفصل الكروماتوجرافي وحدث نفس الشيء لفصل مبيد الروتينون عن المركبات الموجودة معه
- يمكن تحليل بعض مستحضرات المبيدات مباشرة دون اللجوء للاستخلاص كما هو الحال فى محاليل المبيدات المائية أو العضوية (لانيت – ديبتركس) ويتم ذلك بأخذ جم أو وزن معلوم من المحلول ثم بتبخير المذيب وتقدير كمية المبيد المتبقية
- قد يكون فصل كل مبيد علي حدة ضروري في حالة استخدام خلائط المبيدات وعلي سبيل المثال فان مخلوط cotton-dust والذي يحتوي علي 10% د د ت ,

3% لندين , 40% كبريت والذي كان يستخدم في مصر لمكافحة آفات القطن في الخمسينات والستينات وكان يقدر كل مبيد كالأتي

يحدث استخلاص بالبنزين ويقدر في المستخلص د د ت لدينا واللندين بواسطة جهاز البولاروجراف ثم يهضم الكبريت في المخلوط مباشرة ويعاير باليود كما يمكن القول بأنه إذا كان المطلوب فصل مكونات المخلوط فانه تعتبر طريقة الفصل باستخدام أعمدة الكروماتوجراي مناسبة جدا وهي مستخدمة بكثرة في هذا المجال .

4-2. طرق الاستخلاص: Extraction Methods

تنقسم طرق الاستخلاص على حسب نوع العينة (صلبة – سائلة) إلى:

4-2-1. طرق لاستخلاص العينات الصلبة ومنها:

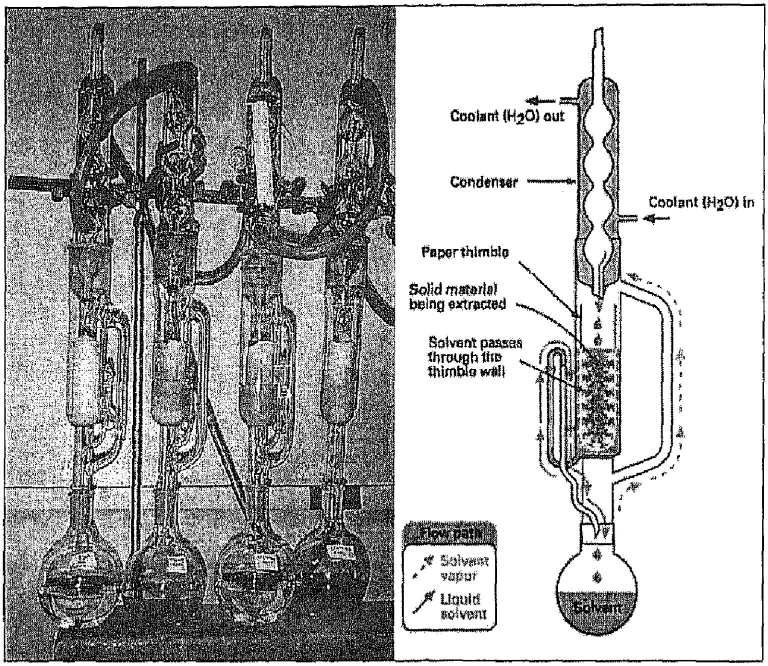
أ- (طريقة سوكسلت): Soxhlet Extraction

يستخدم جهاز سوكسلت في استخلاص المبيدات من العينات الصلبة بإضافة مذيبات مثل الهكسان، الداي كلور ميثان، الميثانول، ومازال يستخدم حتى الآن في تحليل متبقيات المبيدات في العينات الصلبة، والعينات القابلة للاستخلاص بواسطة هذا الجهاز من 5-50جم والمذيبات المضافة حتى 100مل والاستخلاص يستغرق من 4-18 ساعة.

ب- الاستخلاص بالنقع: Soaking Extraction

حيث توضح وزنة معلومة في العينة مع ضعف حجمها مذيباً مناسباً وتترك فترة زمنية تتفاوت طبقاً لما يترآى للمحلل ونوع المركب المراد استخلاصه والعينة المستخلص منها، وعادة ما تكون من 12-24ساعة على أن يتم رجها من وقت لآخر حتى يحدث تلامس تام بين المذيب وجزئيات العينة ويحدث التوازن ثم ترشح ويؤخذ الراشح كله أو جزء منه لاستكمال باقي العمليات، وهنا يجب تعديل التركيز في هذا الحجم نسبة إلى الحجم الكلي المترشح من العينة معلومة الوزن، وقد يستخدم النقع مع الرج بغرض زيادة كفاءة عملية الاستخلاص، ويلاحظ أنه مع زيادة الوقت المستغرق

في عملية النقع ربما يعرض العينة للضوء ولذا يجب وضع العينة في زجاجات بنية محكمة الغلق، حيث قد يكون المركب السام غير ثابت ضوئياً.



شكل (2): تركيب جهاز سوسكلت (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

ج- الاستخلاص بالخلط : Blending Extraction

تقطع العينة في خلاط عالي السرعة ثم يضاف ضعف حجمها مذيب ويجري الخلط بفترة كما يترآى للمحلل، وطبيعة العينة ثم يرشح محتوى الكأس خلال عمود كروماتوجرافي أو قمع بوخنر مع ملاحظة نقل محتويات الكأس نقل كمي للعمود أو القمح ثم يمرر المرشح على كبريتات صوديوم لا مائية لتجفيفه ويستخدم مع العينات المحتوية على مركبات ثابتة ضد التحلل المائي أو الحرارة.

2-2-4. طرق لاستخلاص العينات السائلة ومنها:

أ-.الاستخلاص بالتقطير: **Extraction by Distillation**

وفيها يتم استخلاص المركب السام عن باقي محتويات العينة وذلك تبعاً لاختلاف الضغط البخاري للمركب، حيث أنه يتم تجهيز المركب وتكثيفه واستقباله ويحدث العكس بالنسبة للمواد المتداخلة.وتتم عملية التقطير بتحويل السائل إلى الحالة البخارية ثم استقبال هذا البخار وتكثيفه في مكثف وجمع المتقطر في دورة استقبال وهذه هي الفكرة الأساسية لعملية التقطير ولكن تبعاً لظروف كل مركب قد تستخدم طريقة من طرق التقطير.

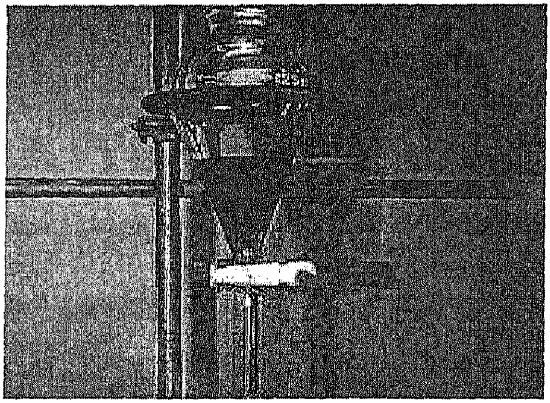
ب- الاستخلاص التجزيئي: **Liquid liquid extraction**

وهو يستخدم في استخلاص متبقيات المبيدات في العينات السائلة والمذيبات المستخدمة عموماً هي الهكسان، البنزين وخلات الإيثايل هذه المذيبات غير قطبية ويستخدم في استخلاص المتبقيات في العينات السائلة الغير قطبية أما بالنسبة للعينات السائلة المحتوية على نسبة عالية من المياه تستخدم الاسيتونتريل- الميثانول والأسيتون، وهذا النوع من الاستخلاص يستخدم كمية كبيرة من المذيبات ويحتاج أيضاً إلى عملية الرج.وتعتمد فكرته على معامل توزيع المركب بين مذيبين غير قابلين للامتزاج معامل التوزيع بحكم عملية انتشار المركب بين مذيبين كما بالمعادلة التالية:

$$K = \frac{\text{تركيز المبيد في المذيب الأول}}{\text{تركيز المبيد في المذيب الثاني}}$$

ومعامل التوزيع ذو قيمة ثابتة ومسايرة لدرجة ذوبان المركب بالمذيبين وغالباً ما يكون إحداهما الماء والذي يستحوذ على المركبات القطبية والآخر مذيب عضوي يستحوذ على المركبات العضوية (التركيزات العالية من المركبات الغير قطبية) في حالة تكون مستحلب بين المذيبين المستخدمين يمكن كسر المستحلب بإضافة كبريتات صوديوم لا مائية لنزع الماء المسبب لتكوين المستحلب أو ترك المستحلب ينفصل تبعاً

لخواصه الطبيعية قد تستغرق 2-10يوم ويمكن كسر المستحلب بالطرد المركـزي أو التقليب بهدوء أو إضافة مذيب مساعد.



شكل (3): الاستخلاص بالوجه السائل باستخدام أقماع الفصل (انظر الصورة الملونـة نهاية الكتاب).

ويقسم الاستخلاص التجزيئي تبعاً لمعامل التوزيع إلى:

ب-1. الاستخلاص البسيط Simple Extraction

وذلك عندما يكون معامل التوزيع كبيراً جداً أكبر من 100 فيمكن استخلاص المركـب بدفعة واحدة في المذيب المناسب وذلك من خلال قمع الفصل.

ب-2. الاستخلاص المتعدد Multiple Extraction

وذلك عندما يكون معامل التوزيع صغير أصغر من 1 فيفصل اسـتخلاص المركـب على عدة دفعات باستخدام نفس الحجم من المذيب حتى يتسنى الحصول على أكبر كفـاءة ممكنة منه و الحصول على اكبر كمية مستخلصة من المركب

ج- الاستخلاص بالوجه الصلب Solid phase extraction (SPE)

تم تطويره كبديل للطريقة السابقة (Liquid liquid extraction) للفصل والتنقية وتركيز

للمتبقيات الموجودة ويستخدم أيضا ال SPE كطريقة مباشرة لاستخلاص متبقيات المبيدات في العينات السائلة أو كطريقة لتنقية المستخلصات السائلة.وهذه الطريقة تمتاز بالبساطة في التطبيق وتوفير الوقت وتقليل التكاليف لأنها تستخدم كمية قليلة من المذيبات كما أنها أكثر دقة من النظام Liquid liquid extraction. وتعتمد فكرته على أنه عند إمرار العينة المراد استخلاص متبقيات المبيدات منها يحدث إدمصاص لمتبقيات المبيدات

على سطح المادة الدامصة (adsorbent material) ثم يتم فصلها بعد ذلك بالمذيب المناسب. ويعتمد اختيار المادة الدامصة على طبيعة التعامل بين المادة الدامصة والمادة المراد استخلاصها. وهذا بدوره يعتمد على مدى توافر المعلومات عن قطبيه وعدم قطبيه والخواص الطبيعية لكل من المادة الدامصة والمحلول المراد استخلاص المتبقيات منه ويوجد عديد من adsorbent تستخدم في SPE منها: C_8, C_{18} bonded silica phases, Porous graphic carbon-polymeric resin, cation exchanger.

يختلف حجم العينة المستخلصة حسب نوع العينة فالعينات البيولوجية في حدود 1- 5 مل، أما العينات البيئية 50-1000 مل والاستخلاص بهذه الطريقة يتم على خطوات وهي:

1- تهيئة المادة الدامصة Conditioning

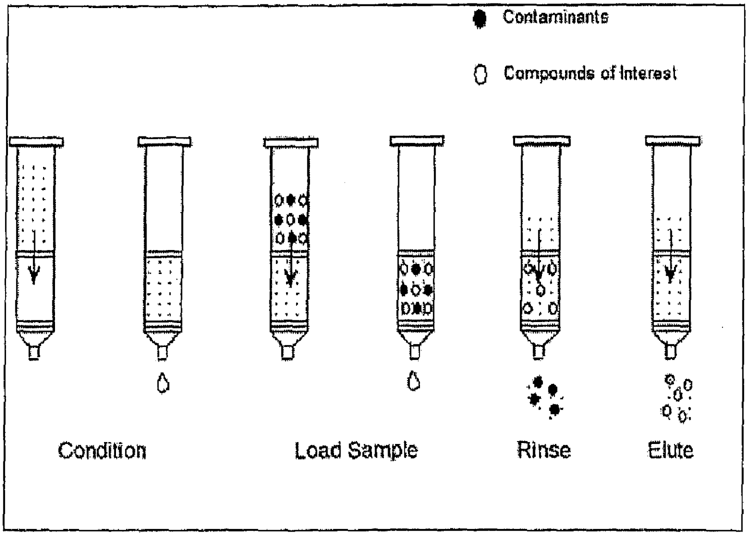
2- تطبيق العينة Sample application وهو إمرار العينة على المادة الدامصة

3- غسيل العمود وتجفيفه. Washing and drying و ذلك للتخلص من الرطوبة

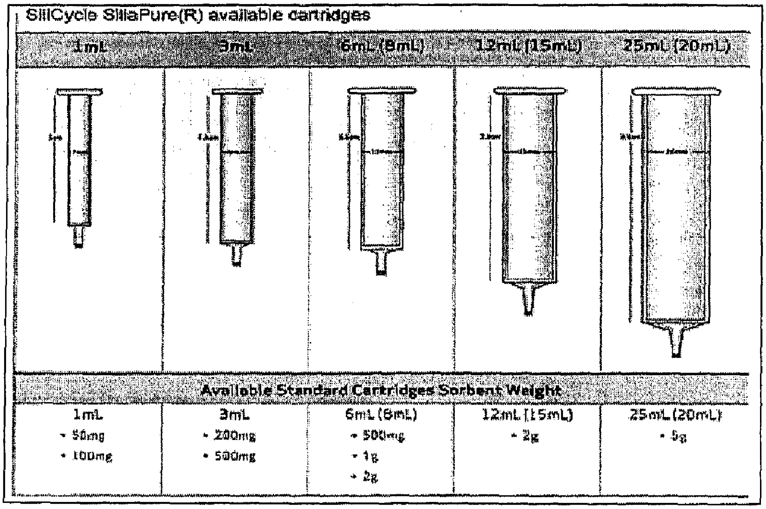
4- استعادة المركب من المادة الدامصة (de-sorption) باستخدام مذيب الازاحة المناسب

المادة الدامصة المستخدمة في عملية الاستخلاص تجهز في عدة أشكال منها أعمدة صغيرة تصنع من البولي إيثيلين تسمى Cartridges وكذلك الديسكات Disks.

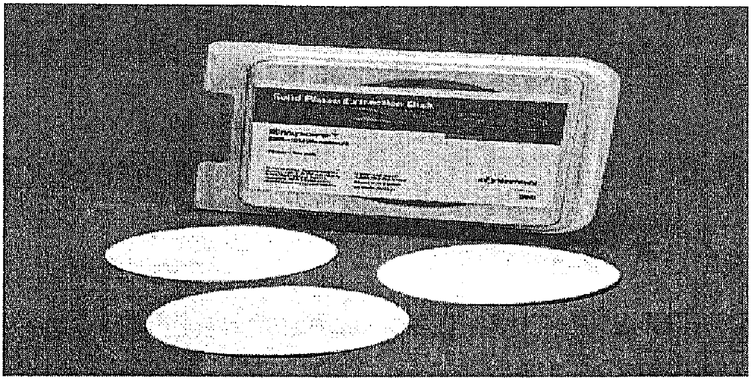
تحتاج الـ Cartridges معدل تطبيق بطيء للعينة- يمكن أن يحدث انسداد بها من العينات الملوثة - مساحة السطح أقل معدل التدفق أسرع- لا يحدث لها انسداد- مساحة السطح أكبر.



شكل (4): مراحل الاستخلاص بالوجه الصلب.

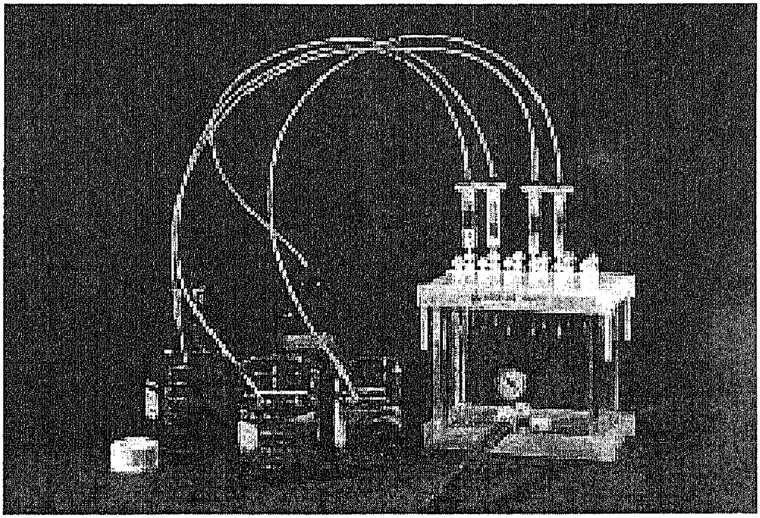


شكل (5): طبيعة أعمدة الاستخلاص بالوجه الصلب وأحجامها.



شكل (6): الديسكات التي تستخدم في الاستخلاص بالوجه الصلب.

ويوجد نوعين من SPE أولهم Offline SPE و Online SPE بالنسبة Offline SPE حيث يتم الاستخلاص كخطوة منفصلة ثم يتم التقدير، أما Online SPE فيتم الاستخلاص والتقدير معاً في نفس الوقت داخل الجهاز(داخل جهاز واحد).



شكل (7): جهاز الاستخلاص بالوجه الصلب.

د- الاستخلاص بالوجه الصلب الدقيق Solid phase micro extraction :

وهذه الطريقة ظهرت في أوائل التسعينات كطريقة سريعة وبسيطة لاستخلاص متبقيات المبيدات والمركبات الأخرى بدون الحاجة إلى استخدام أي مذيبات وهذه الطريقة تتكون من خطوتين: وهي إدمصاص المتبقيات على الوجه الثابت، والخطوة الثانية هي فصل هذه المتبقيات من كل السطح الثابت.

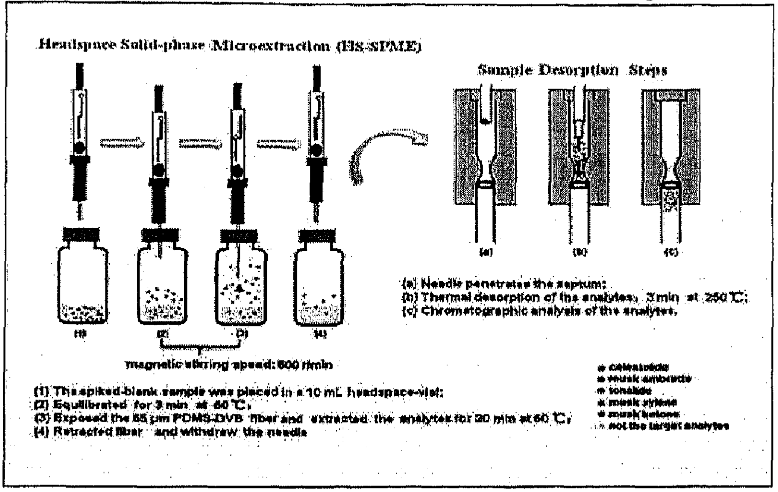
هناك عوامل تؤثر على استخلاص وهي المادة التي تقوم بالإدمصاص، وقت الاستخلاص، pH العينة، درجة حرارة الاستخلاص، أما بالنسبة لخطوة desorption أو فصل المتبقي مرة أخرى فالعوامل وقت الفصل، الحرارة ونوع المذيب وحجمه. ويكون الجهاز عبارة عن ألياف من السليكا مغطاة بنوع من البوليمر كمادة دامصة والذي يكون متصل بجهاز على شكل سرنجة وفي المنطقة التي يوجد بها إبرة السرنجة ويتم الاستخلاص بغمر هذا الجزء في المحلول ثم بعد ذلك يتم نقله إلى منطقة الحقن في جهاز GC بدون الحاجة لأي مذيبات ويحدث فصل أو تحرر للمادة المد مصة بعد ذلك داخل جهاز GC حرارياً، ثم تتجه إلى العمود ليتم تحليلها. تمتاز هذه الطريقة عن طريقة SPE أنها لا تحتاج لمذيبات لعمل Desorption أقل في لوقت، أقل في التكاليف. والشكل التالي يوضح التركيب.

ويوجد نوعان من ويوجد نوعين من SPME أولهم Offline SPME و Online SPME بالنسبة Offline SPE حيث يتم الاستخلاص كخطوة منفصلة ثم يتم التقدير، أما Online SPE فيتم الاستخلاص والتقدير معاً في نفس الوقت داخل الجهاز (داخل جهاز واحد).

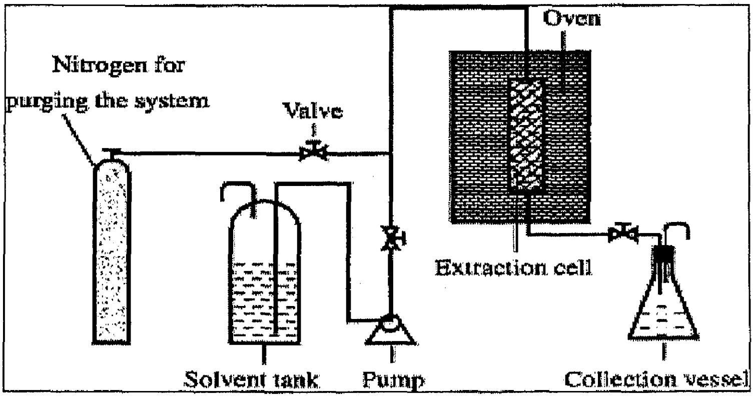
هـ- Accelerated solvent extraction :

وهي طريقة استخلاص بالمذيبات ولكن تحت ضغط عالي ودرجة حرارة عالية وهذه الطريقة أعطت فاعلية كبيرة في الاستخلاص كما أنها تستهلك وقت قصير وكميات صغيرة من المذيب. وفي هذه الطريقة يستخدم مذيب واحد أو مخلوط من المذيبات لها درجات

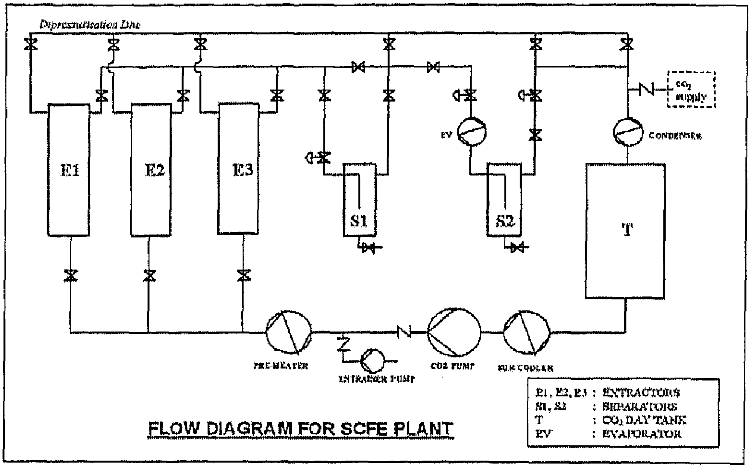
قطبية مختلفة يتم استخدام مدى واسع من الضغط ودرجة الحرارة ولا يجب ألا تزيد درجة الحرارة عن 200 5م للحفاظ على المذيبات في الصورة السائلة، كما أن حجم المذيب المستخدم في الاستخلاص يمكن تخفيضه لأنه تحت الحرارة والضغط العالي تزيد درجة الذوبان للمادة المراد استخلاصها.



شكل (8): خطوات الاستخلاص بـ SPME (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).



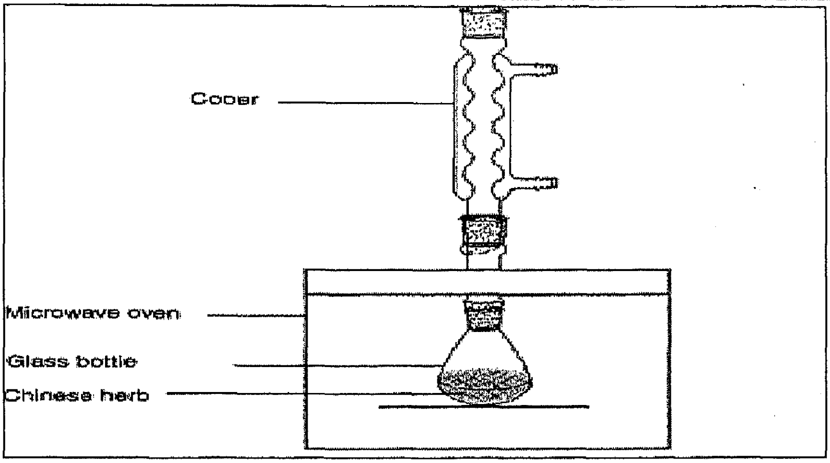
شكل (9): طريقة الاستخلاص تحت ضغط ودرجة حرارة عالية.



شكل (10): الاستخلاص بطريقة Supercritical fluid extraction.

و- Supercritical fluid extraction

وهذه الطريقة تعتمد على ا استخدام ثاني أكسيد الكربون تحت ظروف ضغط ودرجة حرارة أعلى من درجة الحرارة و الضغط الحرجين لثاني أكسيد الكربون والاستخلاص بهذه الطريقة يكون لمتبقيات المبيدات بالمواد الصلبة و أحيانا للمواد السائلة. أحيانا يضاف لثاني أكسيد الكربون نسبة من المياه أو الايثانول حسب الظروف. ظهرت هذه الطريقة كبديل للاستخلاص بالوجه السائل ومن مميزتها توفي استخدام المذيبات و عدم الحاجة لتبخير المذيبات بعد الاستخلاص. الفكرة في هذه الطريقة هي ضخ ثاني أكسيد الكربون باستخدام مضخة إلى مكان الاستخلاص الموجود داخل فرن لرفع درجة حرارة ثاني أكسيد الكربون لأعلى من درجة الحرارة الحرجة فيصبح قادر اختراق المادة الصلبة ويذيب المادة المراد استخلاصها ثم تنتقل المراد المادة المستخلص إلى أعمدة فصل تحت ضغط منخفض ثم تجميعها أما ثاني أكسيد الكربون فيتم تبريده وإعادة استخدامه مره أخرى ويستخدم هذه الطريقة في استخلاص متبقيات المبيدات في الأغذية و التربة.



شكل (11): الاستخلاص بطريقة Microwave assisted extraction.

ز- الاستخلاص بالميكروويف **Microwave assisted extraction**

و هذه الطريقة تبنى على رفع درجة حرارة المذيب عند خلطة بالمادة الصلبة المراد استخلاصها باستخدام طاقة الميكروويف لفصل المادة المراد استخلاصها عن المادة الصلبة ووصولها للمذيب. ويكون الجهاز في ابسط صوره عبارة عن مكان يوضع فيه المذيب أو خليط من المذيبات مع العينات و يكون متاح التسخين للمذيب مع العينة وتعتبر هذه الطريقة تطوير لطريقة الاستخلاص بالمذيبات البدائية وتستخدم هذه الطريقة في استخلاص متبقيات المبيدات في الأغذية

وفيما يلي الطرق المناسبة لاستخلاص متبقيات المبيدات من المكونات البيئية المختلفة:

1- العينات المائية: (Water Samples)

يتم استخلاص متبقيات المبيدات الفوسفورية العضوية الغير قطبية والكلورونية العضوية غير القطبية من العينات المائية باستخدام 15% ميثلين كلوريد في الهكسان وباستخدام ميثيلين كلوريد فقط في حالة المبيدات الفوسفورية العضوية القطبية (ن- أريل ، ا- أريل) وكذا مركبات الكربامات والتراي أزين واليوريا حيث يجفف

المستخلص من الرطوبة وذلك بإمراره على عمود كبريتات صوديوم لامائية ثم يركز لحجم نهائي قدره 5ملل لاستكمال باقي عمليات التحليل (التنقية (Clean-up) والتقدير (Determination).

2- عينات التربة والتربة الرسوبية: (Soil and Sediment)

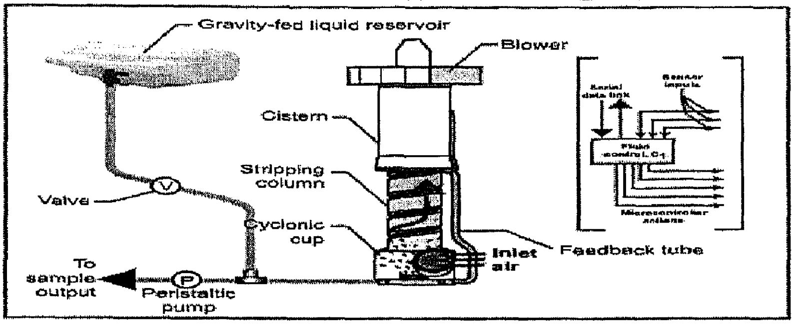
حيث يراعي التخلص من الرطوبة التي قد تتواجد في العينة وذلك في حالة:

2-1- التربة الجافة: تفرد في أطباق زجاجية أو على شرائح ألمونيوم لمدة ليلة.

2-2- التربة الرسوبية: تفرد في أطباق زجاجية أو على شرائح ألمونيوم لمدة ثلاث أيام حتى تتوازن الرطوبة الموجودة بها مع الرطوبة الجوية.وقد يتطلب الأمر إضافة كبريتات صوديوم لا مائية وتخلط جيداً حتى تصبح جافة تماماً. حيث تستخلص المبيدات الكلورونية والفوسفورية العضوية منها باستخدام نظام مذيبي مكون من الهكسان والأسيتون (1:1) باستخدام وحدة سوكسلت أو بالرج في زجاجات ذات غطاء محكم لمدة 12ساعة على 180 لفة/دقيقة في جهاز الرج الكهربائي (Shaker) حيث يؤخذ المستخلص بعد ذلك ويجري مع الماء في قمع فصل وتؤخذ طبقة الهكسان العلوية لاستكمال باقي مراحل التحليل.

3- عينات الهواء (Air Samples):

يتم استخلاص المبيدات الكلورنية والفوسفورية العضوية من عينات الهواء عن طريق امتصاص في الإيثيلين جليكول لمدة 12 ساعة والموجود في وعاء وحدة – Graensbeug smith impinger تحت نظام سحب لعينة الهواء أو عن طريق وضع الوعاء مفتوح لمدة أسبوع في المكان المراد التقدير فيه بعدها ينقل الإيثيلين جليكول إلى قمع فصل باستخدام الماء ويتم التجزئة بالهكسان حيث تؤخذ بعد ذلك طبقة الهكسان (العلوية) لاستكمال باقي مراحل التقدير.



شكل (12): تركيب جهاز اخذ عينات الهواء Air Sampler (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

4- الأغذية غير الدهنية: أقل من 2٪ دهن (Nonfatty foods):

4-1- الأغذية غير الدهنية أقل من 2% دهن عالية الرطوبة (أكثر من 75%) وذات مستوى سكريات أقل من 5%:

يتم استخلاص المبيدات من المنتجات الغذائية عالية الرطوبة وذات مستوى سكريات أقل من 5% من الأغذية غير الدهنية أقل من 2% دهن عن طريق خلط عينة 100جم مع الأسيتونتريل 200 ملل لمدة 2-5 دقيقة ثم يتم الترشيح خلال قمع بوخنر ويستقبل الراشح ويقاس حجمه بدقة (F) ثم ينقل لقمع فصل ويستخلص عدة مرات بالبتروليم إثير 100مل بعد إضافة حجم معين من الماء 6 مل ويقاس حجم المذيب المستخلص (P) حيث من الممكن حساب وزن العينة الموضوعة في عمود الفلوروسيل بالجرام باستخدام المعادلة التالية:

وزن العينة بالجرام الموضوعة في عمود الفلوروسيل=

وزن العينة × حجم الراشح بدقة (F)/ الحجم الكلي للماء بالعينة بالإضافة لحجم الأسيتونتريل المضاف (T) × حجم المذيب المستخلص (P)/100 (8)

$$g = S. (F/T). (P/100)$$

حيث تعبر: (S) عن وزن العينة.

(F) حجم الاسيتونتريل الراشح

(T) الحجم الكلي للماء في العينة + حجم الأسيتونتريل

(P) حجم البترووليم إيثير المسترجع.

فعلى سبيل المثال عند تحليل عينة وزنها 100جم باستعمال 200 مـل أسـيتونتريل + 80مل ماء في العينة وحجم المسترجع (F) هو 195 مل وحجم المسترجع مـن 100مـل بتروليم إيثر من 85 مل (P).

وعليه فإن وزن العينة بالجرام التي وضعت على عمود الفلورسيل = 195. 280/100 . 85/100 = 59.2جرام.

4-2- أغذية غير ذهنية أقل من 2% دهن عالية الرطوبة (أكثـر مـن 75%) وذات مستوى سكريات من 5-15%:

يتم الاستخلاص للمركبات السابقة الذكر بخلط 100جم عينة مع 50 مل ماء و200 مل أسيتونتريل لمدة 5دقائق ثم إتباع نفس الخطوات السابقة وهنا تكـون قيمـة (T)= حجم الماء في العينة مع مراعاة عدم استخدام أكثر من 250 مل مسترجع أسـيتونتريل (245 مل).

4-3- أغذية غير دهنية أقل من 2% دهن عالية الرطوبة (أكثـر مـن 75%) وذات مستوى سكريات من 15-30%:

يتم الاستخلاص للمركبات السابقة الذكر باستخدام مخلوط الأسـيتونتريل (200 مـل) والماء الساخن (50مل/75 5م) حيث يخلط مع 100جم عينة لمدة 5 دقائق وإتبـاع نفـس الخطوات السابقة بعد التبريد وهنا تكون قيمة (T)= حجم الماء في العينة + 245 مل.

4-4- أغذية غير دهنية أقل من 2% دهن متوسط الرطوبة (أقل من 75%) والجافة وذات مستوى سكريات اقل من 5%:

يتم استخلاص المركبات السابقة الذكر عن طريق خلط العينة (20-25جـم) مـع 350 مل أسيتونتريل في الماء 35% لمدة خمسة دقائق وإتباع نفس الخطوات السابقة.

وفي هذه الحالة تكون قيمة (T)= حجم الماء في العينة + 350مل أسيتونتريل مع مراعاة عدم استخدام أكثر من 250مل من مسترجع الأسيتونتريل. فعلى سبيل المثال وعند استخلاص 25 جم عينة تحتوي على نسبة 10.3% رطوبة فإن الحجم الكلي T: = 350+ (25جم × 10.3%)= 353 مل تقريباً.

5- الأغذية الدهنية: أكثر من 2٪ دهن (Fatty food):

5-1. الأنسجة الحيوانية (Animal tissues):

تخلط الأنسجة الحيوانية المحتوية على أكثر من 2% دهن (25-50جم) مع 100جم كبريتات صوديوم لامائية في الخلاط لمدة 2-5دقيقة مع مراعاة أن يكون وزن العينة المستخلص لا يحتوي على أكثر من 5جم دهن ثم يتم بعد ذلك الاستخلاص بواسطة إضافة 150مل بتروليم إيثر إلى كأس الخلاط ويتم الخلط لمدة دقيقتين ثم يرشح المستخلص خلال قمع بوخنر ويعاد الاستخلاص مرة ثانية على المتبقي من الأنسجة في كأس الخلاط باستخدام 100مل بتروليم إيثر لمدة دقيقتين ويتم الترشيح أيضاً كما سبق خلال قمع بوخنر مع مراعاة غسيل جدران الكأس بثلاث دفعات من البتروليم إيثر (25-50مل) والترشيح أيضاً ثم يمرر المترشح على عمود نزع الرطوبة المعبأ بكبريتات صوديوم لامائية حيث يتم بعدها تركيز المستخلص باستعمال تيار من الهواء أو النيتروجين ويسجل وزن الدهون المستخلص بحيث يؤخذ وزن (3جم) منه للتحليل بالفصل التجزيئي باستعمال الأسيتونتريل ومن الممكن حساب وزن العينة الأصلية المستخدمة في التحليل عن طريق المعادلة التالية:

وزن العينة الأصلية (المستعمل في التحليل)=

وزن الدهن الذي أخذ للتحليل/ وزن الدهن المستخلص × وزن العينة الأصلية

5-2 الزبدة: (Butter)

يتم تسخين الزبدة في حمام مائي على درجة 50 م حتى ينفصل الدهن ثم يرشح خلال

ورق ترشيح من نوع (Fluted filter paper) حيث يؤخذ 3جم من الدهن للفصل التجزيئي باستعمال الأسيتونتريل.

5-3 الجبن: (Cheese)

تؤخذ عينة من الجبن من 25-100جم (ليتسنى منها الحصول على وزنة 3جم دهن) حيث تخلط مع أكسالات صوديوم أو بوتاسيوم (2جم) في وجود كحول الإيثايل أو الميثايل (100 مل) لمدة 2-3 دقيقة على السرعة العالية بالخلاط ثم تنقل محتويات الكأس إلى أنبوبة طرد مركزي سعة 500 مل حيث يضاف إلى هذه المحتويات 50 مل داي إيثايل إيثر ويتم الرج لمدة دقيقة ثم يتم إضافة 50مل بتروليم إيثر ويتم الرج أيضاً لمدة دقيقة ثم يتم الطرد المركزي على سرعة 1500 لفة/دقيقة/5دقائق حيث تؤخذ الطبقة العلوية بعد ذلك وتنقل إلى قمع فصل يحتوي على 600 مل ماء و30 مل كلوريد صوديوم مشبع ويتم الرج ويعاد الاستخلاص مرتين باستخدام 25 مل داي إيثايل إيثر و25 مل بتروليم إيثر على الطبقة المائية حيث تجري بعد ذلك الطبقة المائية وتؤخذ طبقة المذيب وتمرر على عمود نزع الرطوبة ويتم التركيز باستعمال تيار من الهواء أو النيتروجين للحصول على 3جم للفصل التجزيئي بالأسيتونتريل.

5-4 اللبن: (Milk)

يؤخذ عينة 100ملل من اللبن (يخفف اللبن المركز بحجم مساوي من الماء) في زجاجة طرد مركزي سعة 500مل حيث يضاف إليها 1جم إكسالات صوديوم أو بوتاسيوم في وجود كحول الإيثايل أو الميثايل (100مل) ويتم الخلط ثم يتم إضافة 50ملل داي إيثايل إيثر والرج لمدة دقيقة ثم يضاف 50 مل بتروليم إيثر والرج لمدة دقيقة ثم يتم الطرد المركزي على سرعة 1500لفة/ دقيقة/ 5دقائق وكذلك يكرر ما سبق في عينات الجبن.

5-5 الزيوت: (Oils)

يؤخذ 3جم زيت وتستخلص بالبتروليم إيثر ثم يتم التوزيع التجزيئي بالأسيتونتريل ثم التنقية بعمود الفلورسيل ويتم الإشارة إليها فيما بعد).

6-5 الأنسجة البشرية (Human tissues)

تسحق الأنسجة البشرية وخاصة الدهنية في وجود الرمل النظيف وكبريتات الصوديوم اللامائية والتقليب باستعمال المجنس مع إضافة كبريتات الصوديوم اللامائية حتى يتم الحصول على كتل محببة جافة يؤخذ منها 5جم للاستخلاص باستعمال البتروليم إيثر والترشيح كما سبق.

7-5 الدم أو السيرم (Blood or Serum):

تؤخذ عينة من الدم أو السيرم ذات بحجم 2 مل ويتم إضافة 6مل هكسان إليها ثم ترج على جهاز الرج الدائري على سرعة 50-55 لفة/ دقيقة/ ساعتين بعدها توضع في جهاز الطرد المركزي على سرعة 200 لفة/ دقيقة/ 5دقائق حيث يؤخذ 5ملل من مستخلص الهكسان الناتج (الطبقة العلوية) ويتم التركيز لحجم نهائي يتناسب وطريقة التقدير.

ومن أمثلة هذه الأزواج للمذيبات (المتفاوتة في درجة قطبيتها) حيث يستخدم كل زوج تبعاً لطبيعة تركيب المركب السام والمواد المتداخلة معه:

- هكسان: أستونتريل (قطبي).
- إيثير بترولي: نيتروإيثان (قطبي).
- حمض كبريتك ورابع كلوريد الكربون (قطبي).

وترجع قطبيتهما إلى:

- قصر السلسلة الكربونية فتزداد معها القطبية.
- كما أن عدم وجود الروابط الزوجية يزيد القطبية.
- المجاميع الدالة القطبية الطرفية بالمذيب مثل مجموعة الأمين (NH_2) والنيتروجين (NO_2) والهيدروكسيل (OH) تزيد القطبية.

وتقدير المادة المسترجعة يعتمد على معامل التوزيع (K) وقد سبق الإشارة إليها.

5. عملية التنقية: Clean Up process

بعد إجراء عملية الاستخلاص نجد أنه من الضروري عمل تنقية للعينة المستخلصة وذلك قبل خطوات التقدير النهائية Final Determination ، حيث أن نتيجة استخلاص المبيد بواسطة لمذيبات المختلفة نجد أن هناك تداخل للمواد الأخرى من المبيد مثل الأصباغ والشموع والدهون مما يؤدي إلى الحصول على نتائج مضللة حيث أن هذه المواد قد تكون ملونة وتتداخل في التقدير إذا كان التقدير يعتمد على الطرق اللونية أو لا تكون ملونة ولكن بإضافة مواد تفاعل يحدث تفاعل مع الشوائب وينتج مواد ملونة قد تتداخل في التقدير.

وعملية التنقية (Clean Up) هو مصطلح يستخدم في علم المتبقيات وتعرف على أنها عزل المبيد من المواد المتداخلة الغريبة والتي لها القدرة على أن تستخلص بنفس مذيب الاستخلاص وطريقة التنقية Clean Up والتي يطلق عليها أحياناً عملية Purificationتعتمد على:

1- طبيعة المادة المستخلصة (المبيد) وكذلك على طريقة التحليل المستخدمة فمثلاً في حالة المستخلصات التي يتحلل بطريقة يمكنه أن تتداخل فيها المواد العضوية فإنه يمكن تنقية مكثفة تجري أكثر من مرة يجب إتباعها في تنقية مثل هذه المستخلصات.وكقاعدة عامة فإنه من المستحسن إجراء تنقية عند الضرورة القصوى حيث أن أحسن طرق التنقية ممكن أن تسبب فقد في المبيد نفسه.
2- وعند إجراء عمليات التنقية يجب عمل عينة مقارنة Blank Sample أي يجب إجراء التجربة بدون مبيد لمعرفة مدى تداخل الشوائب المختلفة في عملية التقدير ولضبط الجهاز على الصفر حيث يمكن إلغاء أي تأثير لهذه الشوائب.
3- كما يجب عمل تقدير لنسبة الاسترجاع Recovery percentage وذلك لبيان كفاءة الطرق المستخدمة في التنقية ويجب أن لا يقل كفاءة الاستعادة Recovery عن 75-80% بالنسبة للكمية المضافة قبل إجراء عملية التنقية.

ومن الضروري اختبار كفاءة التنقية بالنسبة لاستعادة المبيد على مستويات مختلفة (تركيزات مختلفة من المبيد) على أن تتضمن هذه المستويات من المبيد ذلك المستوى المتوقع وجوده في العينة أي يجب أن تنحصر في مدى متبقي المبيد المتوقع عندما تحلل العينات الغير معروفة.

4- ويجب التوصل إلى طريقة تنقية ناجحة وذلك قبل تحليل أي من العينات الحقلية ومحلل المبيدات ومتبقياتها يجب أن يجرب طريقة التنقية على مبيد قياسي بدون وجود عينة للوقوف على أي فقد من المبيد أثناء عملية التنقية، ثم بعد ذلك تجري طريقة للتنقية مع مبيد قياسي في وجود العينة.

ومعظم مستخلصات الأنسجة تحتاج لتنقية والتي يمكن بها إزالة المواد المتداخلة وذلك بإدمصاصها عل مذيب محمل على مادة دامصة.

وتنقية المستخلص الغني في نسبة الدهن يمكن أن تتم بالتوزيع بين مذيبين أحدهما قطبي والآخر غير قطبي حتى يتم فصل المبيد عن الدهن والمستخلصات المستخدمة فيها كربونات البروبلين لعينات ثمار الفاكهة والخضروات والحبوب واللحوم ومتبقيات الألبان والدهون وكذلك الزيوت فإنه يمكن استخدام عمود الفلوروسيل في تنقيتها كما يمكن أيضاً تنقية مستخلصات التربة وكذلك المنتجات الجافة بالمرور في عمود الفلوروسيل المشابه بفعالية.ويمكن اعتبار أن Petroleum من المذيبات الناجحة في عمليات التوزيع للمركبات الكلورونية العضوية من كربونات البروبلين بينما يكون الأيزوأوكتان أكثر ملائمة في حالة استخلاص المبيدات العضوية الفوسفورية من البروبلين كربونات.ولسوء الحظ كما هو الحل بالنسبة لعمليات الاستخلاص فإنه لا توجد طريقة عامة لتنقية كل المركبات على نفس الدقة يمكن تطبيقها على كل أنواع المستخلصات. ومعظم طرق التقدير الحديثة لمستخلصات متبقيات المبيدات تضم طرق التنقية مثل طريقة التوزيع و طريقة الادمصاص وتنقسم طرق التنقيه الى:

5-1. طرق تنقية كيميائية: (Chemical Clean Up methods)

وهي الطرق الكيميائية المستخدمة في فصل المركبات عن المواد المتداخلة معها مثل:

5-1-1. الأكسدة: (Oxidation)

وهنا يتم تنقية المركب من المواد المتداخلة معه في المستخلص بعملية أكسدة متحكم فيها مع الأخذ في الاعتبار أن تكون عينات السم ثابتة كيماوياً تحت ظروف الأكسدة، بينما تتأكسد المواد المتداخلة (الشوائب) لمركبات قابلة للذوبان في القلويات فيتم فصلها بمذيب مناسب. وتجري عمليات الأكسدة باستخدام حمض الخليك أو فوق الكلوريك أو النتريك أو كلورات البوتاسيوم.

وقد يحدث العكس فتتأكسد بعض المبيدات (الفوسفورية العضوية) وتتحول لفوسفات غير عضوية بأبخرة حمض النيتريك أو الفوق كلوريك ثم تقدر في صورة فوسفات غير عضوي يقدر لونياً أو إنزيمياً. وهنا يجب إجراء اختبارات تأكيدية (Confirmatory tests) في عينة المستخلص للتأكد من خلوها من المبيد المطلوب وعدم تأثر متبقيات المركب بالطريقة المستخدمة.

5-1-2. التصبن: (Saponification)

وينحصر استخدامها في تنقية المبيدات الثابتة كيماوياً تحت الظروف القلوية العضوية وتتم عملية التصبن باستخدام الكحولات حيث ينقي المركب من بقايا المحتوى الجليسريدي العالي لمكونات العينة البيئية أو البيولوجية، وتتم هذه العملية بنجاح على الإندرين- الألدرين- الدايلدرين لشدة ثباتها بالوسط القلوي وهنا يتم التخلص من العديد من المواد المتداخلة غير المشبعة بتصبنها وجعلها أقل ذوباناً في المذيبات العضوية.

5-1-3. الاختزال: (Reduction)

وتعتمد عملية الاختزال على إذابة المتبقيات في الميثانول ثم يشبع المحلول بثاني أكسيد الكبريت ثم يبخر الميثانول ويضاف الماء ثم تستخلص المذيب ثانية بأي مذيب

بترولي. فينقي مركب الباراثيون من خلال اختزال بقايا المركب بمحلول 15% حمض هيدروكلوريك وزنك حيث تختزل مجموعة النيترو (Nitro Group) بالمركب وتتحول إلى مجموعة أمين (Amino Group: NH_2) فيتحول الباراثيون من مركب غير ذائب في الماء إلى أمينو براثيون ذائباً في الماء أو في الأحماض المخففة. وهنا يصبح الباراثيون المختزل متحرراً من بقايا المواد المتداخلة كالشموع والدهون والتي لا تذوب في الماء وهنا يتم فصلها بالترشيح أو الترسيب.

5-1-4. التحليل المائي (Hydrolysis):

وتتم عملية التحليل المائي باستخدام الأحماض القوية مثل مخلوط من حمض الكبريتيك المركز أو النيتريك بنسبة 1:1 خاصة مع العينات النباتية أو يستخدم محلول 10% من حمض الهيدروكلوريك (كما في حالة الباراثيون) أو حمض الكبريتيك المدخن (كما في حالة اللندين).

5-2. عمليات تنقية طبيعية: (Physical Clean-Up methods)

وهي طرق طبيعية تعتمد على الصفات الطبيعية للمستخلص ومن أمثلتها:

5-2-1. التقطير البخاري: (Steam Distillation)

حيث يتم فصل متبقيات المركب الغير قابلة للتطاير (non-volatile) عن المواد المتداخلة معه والقابلة للتطاير من خلال عملية تقطير بخاري فيتم تطاير الشموع والزيوت ويتبقى بالنهاية متبقيات المبيد مع جزئيات من المذيب وقد يتحلل متبقيات السم خلال هذه العملية لتكوين صورة عطرية أمينية أو فينولات متطايرة مع البخار وهنا يتم استقبالها أولاً أثناء عملية التقطير.

5-2-2. التجميد والبلورة: (Crystallization & Freezing)

وهنا يعتمد فصل المتبقيات من الدهون أو الشموع على درجة ذوبانها في الأسيتون المبرد (-70م) فتذوب متبقيات المركب السام بالأسيتون المبرد بينما

تترسب الشموع والدهون المتبلورة ويتم ترشيحها تاركه جزيئات السم الذائبة بالأسيتون المبرد.

5-2-3. الفصل التجزيئي: (Partition)

حيث تفصل جزئيات المركب المذابة بين أزواج سائلة غير ممتزجة من المذيبات لاختلاف كثافتهما ودرجة قطبتهما كذلك ذو درجة غليان منخفضة ويكون إحدى المذيبين هو الوسط الثابت والآخر هو المتحرك (ويجب أن يكون المركب قابل للذوبان في كلاهما بمعامل توزيع أكبر من الواحد بينما يكون معامل تجزيئ المواد المتداخلة معه كالشوائب أقل من الواحد الصحيح حيث ترج جيداً وبعد الاتزان (أي توزع جزئيات السم في كلاهما وبمعدلات متباينة تبعاً بمعامل التجزئ لهذا المركب بين الوسطين (المذيبين) خاصة عند ثبات درجة الحرارة وهنا ينفصل المخلوط في طبقتين إحداهما قطبية والأخرى غير قطبية:

ويكون معامل التجزيئي P؛ = تركيز المبيد في المذيب الأول (C_1)/ تركيز المبيد في المذيب الثاني (C_2).

وعند استخلاص مركب الددت في الهكسان يضاف إلى المستخلص النهائي حجم مماثل من الأسيتونتريل ثم ترج في قمع فصل فنجد أن متبقيات السم تتوزع بين طبقة الهكسان والأسيتونتريل بينما تظل المواد المتداخلة بطبقة الهكسان والتي تصرف وتهمل (drain & discard) ولمزيد من التنقية يضاف لطبقة الأستيونتريل المتبقي بالقمع حجم أخر من الهكسان والماء ثم ترج بشدة وهنا تذاب متبقيات السم بدرجة أكبر في الهكسان والماء (قطبية أعلى عن الأسيتونتريل) حيث تهمل طبقة الأسيتونتريل.

5-2-4. عملية التنقية بالفصل الكروماتوجرافي: Chromatographic clean up

وذلك باستخدام العمود الكروماتوجرافي وذلك بفصل مكون العينة إلى مناطق كل على

حدة نتيجة لاختلاف درجة توزيعها بين وجهين أحدهما ثابتاً والأخر متحرك والوجه الثابت صلب يدمص معها العينة المبيد والشوائب في مناطق مختلفة داخل العمود حسب وزنها وقطبيها. وذلك عند إمرار الوجه المتحرك هو المذيب أو مخلوط مذيبات.

1- عمود الفلورسيل: Florisil column

يتكون من سيليكات المغنسيوم . التى لها خصائص قاعدية ، وهو الأكثر شيوعا في فصل و تنقية مبيدات الآفات المستهدفة وفصلها عن المواد المتداخلة. كما انه يستخدم في فصل مركبات النيتروجين من المواد الهيدروكربونيه ، وفصل الدهون والزيوت والشموع. واحدة من خصائص florisil هو قدرته على إتاحة الفرصة لعمليةالازاحة الاختيارية للمكونات المراد فصلها اعتمادا على المذيبات المستخدمة. وعمود الفلورسيل هو عمود زجاجي طوله 30 سم و قطره الداخلي 2.5سم ومزود بصنبور عند نهايته المسحوبة والتي يوضع بداخلها سداده من الصوف الزجاجي.ويتم تحضير العمود باستخدام 20 جرام فلورسيل نشط (على درجة حرارة 130 لمدة 16 ساعة) وهى تعطى ارتفاع 4 بوصات وتغطى بطبقة من كبريتات الصوديوم الامائية بارتفاع بوصة ويتم تهيئة العمود بعد تبريده على درجة حرارة الغرفة بإمرار

2- عمود السيليت و أكسيد الماغنسيوم: Mgo-celite column

هو عمود زجاجي طوله 30 سم و قطره الداخلي 2.4 سم ومزود بصنبور عند نهايته المسحوبة والتي يوضع بداخلها سداده من الصوف الزجاجي. ويتم تحضير العمود باستخدام 10 جرام من مخلوط متساوي من السيليت و أكسيد الماعنسيوم (5 جرام من كل منهما ويراعى تعبئة المادة الدامصة باستخدام ساق زجاجية ويتم تهيئة العمود بإمرار 40 مل بتروليم ايثر وتجرى عملية الإزاحة باستعمال 100 مل بتروليم ايثر.

3- التنقية بالوجه الصلب: Clean up by solid phase

حيث تستخدم هذه الطريقة للاستخلاص والتنقية أيضا وفكرة العمل وطريقة الاستخدام كما ذكر سابقا في باب الاستخلاص الوجه الصلب.

6. تركيز العينات Samples concentration

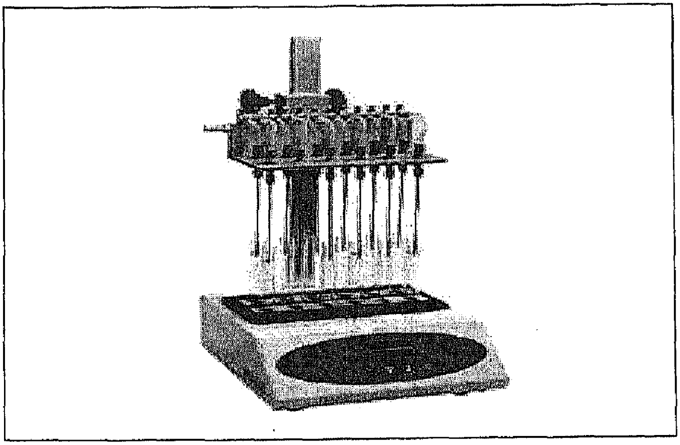
يجب وأن تركيز المستخلصات قبل إجراء عملية التخزين لحين إجراء باقي عمليات التحليل وهنا يجب أن يتم تخزين المركزات تحت ظروف تخزين مناسبة لكل مركب والتأكد من عدم تأثر متبقيات المركب أو نواتج تحولاته بظروف التخزين المختلفة وذلك بإجراء معدلات الاسترجاع تحت هذه الظروف التي تتوسط عمليات التحليل.كذلك يتم تركيز المستخلصات أيضاً قبل إجراء عملية التنقية وبعدها إلى أحجام مناسبة لعملية التحليل في النهاية ولو أنه يفضل إجراء عملية التنقية بعد الانتهاء من عملية الاستخلاص مباشرة خاصة في حالة العينات المحتوية على متبقيات لسموم هيدروكربونية عضوية فوسفورية أو كرباماتية وذلك لسرعة تمثيلها لعدم ثباتها.وعموماً تتم عمليات تركيز المستخلصات قبل تنقيتها بإحدى الطرق التالية على أن تحفظ العينات بعدها في أوعية محكمة الغلق على درجة الصفر ويمكن استخدام الشريط اللاصق (الورق الشمعي) لمنع تسرب أبخرتها:

6-1. التبخير باستخدام تيار هوائي : (Air- evaporation)

حيث يوضع كأس المستخلص ذو الفوهة الواسعة لزيادة مسطح السطح المعرض لتيار الهواء البارد أو الساخن نتيجة استخدام حمام مائي تضبط درجة حرارته على الدرجة المطلوبة والتي تتناسب ودرجة ثبات المركب المراد تركيزه ويوضع به كأس العينة. أو قد يستخدم مجفف الشعر (Hair Dryer) أو قد يستخدم غاز النيتروجين في التبخير خاصة مع المستخلصات التي يخشى عليها من أكسدة مكوناتها لو استخدام تيار الهواء. ويراعي تجفيف تيار الهواء المستخدم خاصة أثناء المراحل الأخيرة من التبخير ويجب وأن يكون تيار الهواء هادي (Gentle air stream) مع خفض درجة الحرارة حتى لا يحدث فقد في التركيز. وقد تضاف ميكروليترات من الإيثيلين جليكول أو حمض الاستياريك أو زيت خفيف شفاف للتغلب على تقشر المتبقيات الجافة وتطايرها.

2-6. التركيز باستخدام الكيودرنا دانيش: (Kuderna danis h)

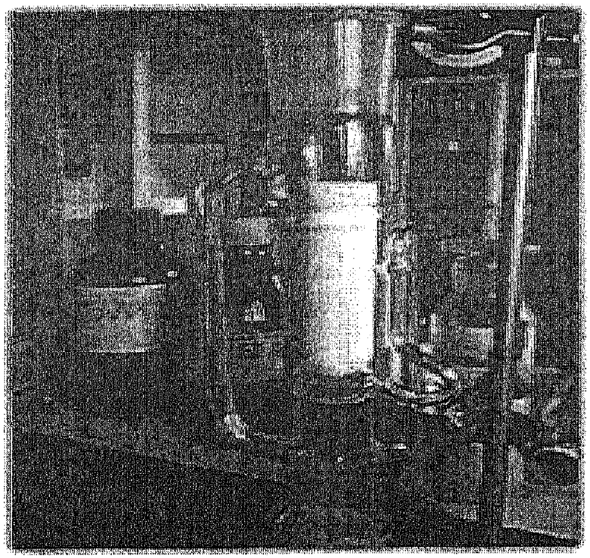
حيث يوضع المستخلص المراد تبخيره بـالمخزن الـسفلي (Reservoir) ذو الـسعات المختلفة ويوضع معه قطع من الزجاج (Glass beds) لمنع الفوران ثم تثبت فوهتها في عمود سنيدر ذو الثلاث أو الخمس كرات (3 or 5 ball snyder column) حيث ترتكز الكرات الزجاجية على وسائد زجاجية فتسمح بتسريب أبخرة المذيب على دفعات حيث دفعات منها ترتد مذيبة لمخلفات العينة المراد تركيزها والمترسبة على جدران العمود الداخلية وباقي الوحدة وتعود ي النهاية إلى المخزن. وتستمر عملية التبخير بوضع أنبوبة التركيز السفلية المدرجة في حمام الماء على درجة الحرارة المناسبة المرغوبة، شكل رقم (14). وعند وصول حجم المستخلص بأنبوبة التركيز المدرجة (المخزن السفلي) ترفع من الحمام وتبرد ثم يفصل وتؤخذ الأنبوبة الدرجة وتغطي بإحكام بغطائها المصنفر وتحفظ بالثلاجة لحين إكمال باقي خطوات التنقية والتحليل مع مراعاة ألا يزيد حجم العينة لأقل من 5 ملل خاصة في حالة استعمال عمود سنيدر الدقيق والذي يتصل بأنبوبة التركيز مباشرة وهنا يجب ألا يقل حجم المحلول المركز عن 0.5ملل.



شكل (13): جهاز تركيز العينات باستخدام تيار من الهواء أو النيتروجين (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

3-6. التركيز تحت ضغط: (Concentration under vacuum)

حيث تستخدم وحدة التبخير الدائري تحت ضغط (Rotary evaporator) سواء أكانت ذات ضغط مرتفع (RHV) وذلك مع السموم الثابتة أو ذات ضغط منخفض (RLV) مع السموم الغير ثابتة، شكل رقم (15). فعند دوران المخزن في حمام الماء الساخن لدرجة تتلائم والمركب المراد فصل متبقياته وطريقة التقدير فيتكون على جدرانها فيلم من المذيب الذي بملامسة الدورق للماء الساخن بالحمام سرعان ما يتبخر بفعل الحرارة الملامسة للمخزن المتحرك باستمرار.



شكل (14): جهاز الكيودرنادانيش المستخدم في تركيز لعينات **(انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).**

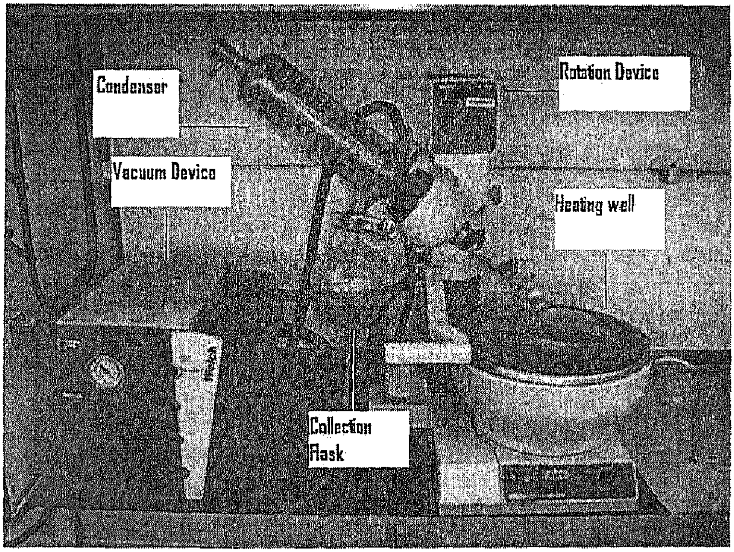
الاحتياطات اللازمة أثناء التبخير:

1- يجب تخفيف المستخلص بكبريتات صوديوم لامائية قبل التركيز.

2- درجة حرارة المذيب خلال التبخير يجب ألا يتعدى 50 ْم في معظم الأحوال.

3- يجب عدم إزالة المذيبات تماماً في المستخلص حتى لا يحدث فقد للمبيدات.

4- يجب ملاحظة العينة بدقة خلال مراحلها النهائية في إزالة المذيب كما أنه لا تسخن العينة أو تتعرض للتفريغ بعد تطاير كل المذيب.



شكل رقم (15): جهاز التبخير الدوراني تحت ضغط (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

7. تحضير وتخزين واستعمال المركبات القياسية:

تختلف المحاليل عن بعضها بكمية المادة المذابة فيها ، ويمكن التعبير عن ذلك بوحدات الوزن أو الحجم وهنالك عدة طرق للتعبير عن تركيز المحاليل منها والجزء من المليون parts per million (ppm) والجرام/ لتر والعيارية Normality المولارية Molarity ولتحضير محلول قياسي يجب معرفة الحجم المطلوب وليس من الصعب تحضير المحاليل القياسية فيما إذا كانت المادة المراد تحضيرها صلبة حيث يستخدم

ميزان حساس أما إذا كانت العينة سائلة كأحد الاحماض المعدنية مثلا ، فـان العمليـة تصبح أكثر صعوبة باستخدام الميزان الحساس لأنه لاينصح بوزن الاحماض المركزة علي الميزان مما يؤدي إلي تلفه ولهذا نقوم بأخذ حجم محدد ولذلك ينبغي معرفة كثافـة المبيد ونسبته المئوية الوزنية .

المركبات القياسية:

ينصح قبل تحضير المواد القياسية المستخدمة في تحليل المبيدات النظر بعين الإعتبـار لبعض العوامل المؤثرة على ثبات وسلامة المواد والمحاليل القياسية.

أ- ثبات المواد الصلبة أو السوائل الأولية القياسية:

تبقى المواد الصلبة القياسية بصفة عامة ثابتة ضد التحطم إذا ما حفظت في ثلاجـة أو مجمد وهذا عكس المركبات السائلة.

ب- ثبات المحاليل القياسية تبقى معظم المركبـات فـي الهكـسان - الأيزوأوكتـان والطولوين ثباتة ضد الهدم أكثر من عام مع حفظها في الثلاجة تحت درجة حرارة منخفضة

ج- مشاكل تبخير المذيب وهى من أهم المشاكل التى تتعلـق بـسلامة المحلـول القياسي حيث أحياناً يحدث تبخير للمذيب أثناء التخزين ويـؤدى إلـى تركيـز المحلول وإختلاف التركيز ويتوقف ذلك على الضغط البخاري للمـذيب عنـد درجة حرارة التخزين والتخزين تحت درجة حرارة منخفضة يحد من التبخـر بدرجة كبيرة عنه من التخزين تحت درجة حرارة المعمل وأيضاً نوعية عبوات التخزين يؤثر في التبخير حيث تعتبر الدوارق المعيارية عبوات مناسبة للتخزين مع غلقها بالتيفلون

* **تحضير المحلول القياسي المركز: Concentrated standard solution**

هو محلول عالي التركيز يحضر ويتم حفظه بالثلاجة ويحضر منه التركيزات الأقـل ويفضل الهكسان كمذيب لهذه التركيزات.

* **تحضير المحلول القياسي العامل: solution working standard**

وهى التركيزات التى تستخدم في الحقن والتقدير ويحضر من المحلول القياسي المركـــز ويحفظ في الثلاجة عند عدم إستعماله.

الفصل
الرابع

طرق تحليل متبقيات المبيدات

الفصل الرابع

طرق تقدير متبقيات المبيدات

Methods of pesticide residues determination

1. الطرق البيولوجية لتقدير متبقيات المبيدات Biological Methods:

1-1. الطريقة الإنزيمية Enzymatic Methods:

إن الكشف عن المبيدات بالطرق الإنزيمية يعتمد في بعض الحالات النادرة على عمليات التحطم للكيماويات الزراعية (المبيدات) بواسطة إنزيم متخصص مثل إنزيم التحلل المائي والذي يستخدم في الكشف عن المبيدات الفسفورية (organophosphorus hydrolase). والكشف الانزيمى عن المبيدات المنتشر بدرجة كبيرة هو الكشف عن تثبيط الإنزيمات بواسطة مبيد معين.

ومن هنا ظهرت أجهزة الاستشعار أو التقدير الإنزيمية لمتبقيات المبيدات والتي تعتبر من أجهزة الإنذار المبكر لأنها حساسة نسبياً لطيف واسع من المركبات في مجال الرصد البيئي لمتبقيات للمبيدات. لقد استخدمت هذه الأجهزة في عدد كبيراً من الأبحاث في الكشف عن المبيدات وتقدير متبقياتها.

- إن الغالبية العظمى من أجهزة الاستشعار الإنزيمي تكون متخصصة للكشف عن المركبات الفوسفورية العضوية ، والمركبات الكارباماتية لان هذه المركبات تعمل على تثبيط إنزيم الاستايل كولين استريز(AChE) .
- وفى حالة المبيدات الفوسفورية العضوية الحشرية والتي تكون مثبطات غير عكسية ، فإن واحد من أهم المتطلبات الأساسية لهذا النوع من الأجهزة يهدف إلى إعادة تنشيط الإنزيم المثبط للسماح بالكشف المستمر له (بمعنى استخدامه مرة أخرى). إن إعادة تنشيط الإنزيم يتم باستخدام كواشف قوية مثل:

2-PAM (Pyridine-2- aldoxime methiodide). كما أشار كل من:

Tran-Minh وآخرون (1990)، Mionetto وآخرون (1994)، Marty وآخرون (1995).

تمثل المبيدات الفوسفورية العضوية والكارباماتية نسبة كبيرة من المبيدات المستخدمة حالياً (المبيدات الحشرية– الفطرية). إن هذه المبيدات لها آثاراً ضارة لأنها تعمل بمثابة مثبطات لإنزيم الأستيل كولين استريز (AChE) والذي يعمل على نقل الإشارة العصبية. إن استخدام الكولين استريز كعنصر حساس لا يسمح بالاختيارية في الكشف عن مبيد معين ولكن يعطى تقدير النشاط الكلى لمضادات الأستيل كولين استريز(المبيدات الفوسفورية والكارباماتية) الموجودة في العينة.

1-1-1. رصد وتقدير المركبات الفوسفورية و الكارباماتية

تعتبر المركبات الفوسفورية والكاربامتية من المركبات الفعالة في مكافحة الحشرات وهذه المركبات هي إسترات لحامض الفوسفوريك أو حامض الكارباميك او مشتقاتهما.وتتميز هذه المركبات بصفة مميزة تتمثل في قدرتها على تثبيط نشاط مجموعة من الإنزيمات التي تشترك في تحليل إسترات الكولين ومن ثم تقدير التثبيط الانزيمى بواسطة هذه المبيدات تعتبر طريقة فعالة في تحليل متبقيات المبيدات.

* **تقسيم إنزيمات الكولين إستريز**

تقسم إلى مجموعتين:

أ- وهى الإنزيمات التي تثبط نشاطها مع زيادة من الوسيط الكيميائي (الأستايل كولين) وهى تعزل من الجهازالعصبى وكرات الدم وتتضمن هذه المجموعة أيضا التي تتبع نشاطها معادلة ميخائيل منتن وفيها يحدث النشاط الأقصى للمبيد عند تركيز ضئيل لكفايه من الوسيط الكيميائي وهى تشمل كولين استريز سيرم الدم

ب- مجموعة الكولين استريز المتخصصة يستخدم الوسيط الكيميائي الاستايل كولين والأستايل – بيتا ميثيل كولين وتوجد بتركيزات عالية في الأنسجة العصبية

في الفقاريات واللافقاريات. المجموعة الثانية إنزيمات الكولين استريز ذات قابلية عالية للبيوتيل كولين عنه في حالة الاستايل كولين ولاتحلل الاستايل ميثيل كولين بينما تحلل البنزويل كولين وتوجد في بلازما معظم الحيوانات مثل الحصان والإنسان

* **المواقع الفعالة على سطح إنزيم الكولين استريز**

المركز الفعال لسطح إنزيمات الكولين إستريز عبارة عن موقعين موقع يحمل شحنة سالبة هو ينظم النشاط الإنزيمي من خلال جذب أو إرتباط أوتوجيه المواد الوسطية الكاتيونية بواسطة قوى جذب فاندرفالز وموقع إستراتى وهو المسئول عن النشاط التحليلي . وإنزيم الاستايل كولين إستريز ذو فاعلية عالية لتثبيط الاستايل كولين أكبر من أي وسيط كيميائي أخر.

المبيدات الحشرية الفوسفورية تتفاعل بصورة مختلفة مع إنزيمات المجموعة الأولى والثانية مثلا الديازينون والسيفين والسيستوكس لها درجات متماثلة في تثبيط انزيمات بلازما الحصان أو الإنسان . أما مبيدى الملاثيون والباراثيون فكانا أكثر تثبيطاً لإنزيم بلازما دم الإنسان مقارنة بدم الحصان . وبذلك يمكن تقدير كميات صغيرة من الملاثيون باستخدام بلازما الإنسان .و على ذلك يمكن التفريق بين السيستوكس والملاثيون باستخدام بلازما دم الإنسان والحصان

2-1-1. طرق قياس نشاط إنزيم الكولين إستريز :

1- طريقة قياس الجهد:

وفى هذه الطريقة يسمح لإنزيم الكولين إستريز بالعمل على الوسيط الكيميائي الاستايل كولين في محلول منظم لفترة معلومة (1-2 ساعة) على درجة حرارة معينة . فعند التحضين يقوم إنزيم الكولين إستريز بتحليل مادة الأستايل كولين وينفرد حامض الخليك والذي يعتبر مقياس لتغير حموضة المحلول وبالتالي عند قياس pH المحلول في بداية التحضين وفى النهاية يكون التغير في pH المحلول دالة على نشاط الإنزيم.

2- طريقة المعايرة والتنقية:

تعتمد هذه الطريقة أيضاً على تحضين إنزيم الكولين إستريز مع الوسيط الكيميائي الأستايل كولين لفترة وبالتالي ينفرد حامض الخليك نتيجة تحلل مادة الاستايل كولين إلى حامض وقاعدة الكولين فيتم معايرة حامض الخليك المنفرد بمادة قلوية معلومة باستخدام دليل وبالتالي يمكن تقدير تركيز حامض الخليك المنفرد والذي يكون دالة في نشاط الإنزيم

3- الطريقة المانومترية:

تعتمد هذه الطريقة على تحضين إنزيم الكولين إستريز مع مادة التفاعل في وجود بيكربونات وأيونات كالسيوم وماغنسيوم كمنشطات للكولين إستريز وذلك عند رقم حموضة $pH=7.5$ وعندما ينشط الإنزيم يقوم بتحليل مادة الأستايل كولين وينفرد حامض الخليك والذي بدوره يتفاعل مع البيكربونات وينفرد CO_2والذي يكون دالة في النشاط الإنزيمي حيث أن CO_2 المنفرد دالة في حامض الخليك وحامض الخليك المنفرد دالة على نشاط الإنزيم.

4- الطرق اللونية:

يوجد طريقتان للتقدير اللوني:

أ- تعتمد هذه الطريقة على تحضين إنزيم الكولين إستريز مع الوسيط الكيميائي الفينيل بنزوات وإنتاج الفينول والذي يغطى لون عند إضافة صبغة النفثايل داى أزو الحمراء وبالتالي الفينول المقدر لونياً يكون دالة في نشاط الإنزيم.

ب- طريقة أخرى لونية وهى بقياس وتقدير الأستايل كولين المتبقي بعد تحضين كمية معلومة من مادة الأستايل كولين مع الإنزيم وذلك في وجود ايون الحديديك ووجود الهيدروكسيل أمين ليتكون لون بنفسجي يقاس على طول موجه 540 نانوميتر وكمية الأستايل كولين المقدرة لونياً تعبر عن الاستايل كولين المتبقي والذي يطرح من الكمية الأصلية ليعطى كمية الاستايل كولين المتحللة والتي تكون دالة على نشاط الإنزيم.

1-1-3. إستخدام تثبيط إنزيم الكو لين إستريز في تقدير المبيدات الفوسفورية والكارباماتية:

يتوقف اختيار الطريقة المناسبة للاستخلاص على الطبيعة الكيميائية للمبيد ووجود المواد المتداخلة الطبيعية والطريقة المستخدمة في قياس نشاط الكولين إستريز ويجب أن تستخلص العينة وتنقى قبل أن تصبح صالحة للتقدير بواسطة التثبيط الأنزيمي ويجب أن يحتوى المستخلص مع المركب المثبط مع أقل كمية ممكنة من المواد المتداخلة أويفضل خلو العينة منها

***مميزات طريقة الكولين إستريز :**

1- الحساسية العالية بشكل كبير

2- ملائمة الطريقة في حالة إذا تحول المبيد تحول في النبات منتجاً نواتج تمثيل ذات كفاءة تثبيطية عالية

***عيوب الطريقة**

إنها تفتقر إلى الخصوصية حيث لا يمكن من خلالها التفرقة بين الأنواع المختلفة من المثبطات خاصة مبيدات الآفات.

طرق تقدير متبقيات المبيدات بالتثبيط لإنزيم الكولين استريز :

تعتمد هذه الطرق بالأساس على قياس نشاط إنزيم الكولين استرسز السابق ذكرها ومنها ما يلى:

*** طريقة قياس فرق الجهد:**

Hall,Gaing 1951 method وهى طريقة تصلح لتقدير المبيدات الفوسفورية باستثناء بعض المبيدات الفوسفورية التي لها قدرة ضعيفة على تثبيط الإنزيم خارجياً وتعتمد هذه الطريقة على تحضير سلسلة من التركيزات من المبيد المراد تقديره في مذيب عضوي مناسب ويضاف إليها 50 ميكروليتر جليسرول لحفظ المبيد من الفقد أثناء البخر ثم يتم تبخير المذيب باستخدام هواء دافئ على درجة حرارة 25°م ثم

يضاف 3 مل من مخلوط البلازما (الإنسان أو الحصان كمصدر للإنزيم) في المحلول المنظم ويتم التحضين لمدة 29 دقيقة على 25"م ويقاس pH وبعد 30 دقيقة يضاف 1 مل من الاستايل كولين بروميد كوسيط كيميائي وبعد تحضين الإنـزيم مـع الوسـيط الكيميائي لمدة 60 دقيقة يقاس pH على 25"م يعاد قياس pH وتسجيلها والتغير في pH وتحسب النسبة المئوية للتثبيط كما بالمعادلة التالية:

التغير في الحموضة = pHالبداية – pH النهاية

ملحوظة : يتم ذلك أيضاً في عينة كنترول لاتحتوى على المثبط كمـا بالمعادلـة التالية.

$$\% I = 1 - \frac{\text{التغير في pH العينة}}{\text{التغير في pH العينة المقارنة}} \times 100$$

وبعد ذلك يتم عمل علاقة بين النسبة المئوية للتثبيط وتركيز المبيد المثـبط ورسـم المنحنى القياسي. ويتم إجراء نفس الخطوات على العينة المجهولة المراد تقدير متبقـي المبيد فيها وحساب نسبة التثبيط ومن خلال المنحنى القياسي يمكن تقدير تركيز العينـة وفى حالة إذا كان هناك حاجة لتنشيط المبيد حتى يصبح قادراً علـى تثبـيط الإنـزيم يضاف H_2O_2 مع حامض الخليك الثلجي .

*** الطريقة اللونية:**

طريقة Archer & Zweig 1959:

وفى هذه الطريقة يتم تحضين سلسلة من التركيزات القياسية من المبيد مـع إنـزيم الكولين إستريز المستخلص من المخ أوالدم لفترة ثم إضافة مادة التفاعـل إنـدوفينيل أسيتات لفترة حتى نعطى الفرصة للإنزيم المتبقي الذي لم يثبط بواسطة المبيـد ليقـوم بتحليل الوسيط الكيميائي فيتكون لون نتيجة لتحللها ويقاس علـى طـول موجـة 625 ميكرون فيكون دالة على كمية الإنزيم الغير مثبطة والتي تطرح من كميتـه الاصـليه لمعرفة كمية الإنزيم المثبطة والتي تعتبر دالة على تركيز المبيد ويتم ذلك حتـى فـي

وجود العينة المقارنة. وتحسب نسبة التثبيط من المعادلة التالية:

$$\% \ I = 1- \frac{\text{التغير في امتصاصية العينة}}{\text{التغير في امتصاصية المقارنة}} \times 100$$

ويتم عمل علاقة بين تركيز المبيد و % للتثبيط ورسم المنحنى القياسي

وبإجراء نفس الخطوات على العينة المجهولة وتحديد نسبة التثبيط للإنزيم يمكن تقدير تقدير تركيز المبيد من خلال المنحنى القياسي.

أجهزة الكشف الإنزيمي لتقدير المبيدات الفوسفوريةو الكارباماتية

بناء على الطرق الإنزيمية السابق شرحها تم تصميم أجهزة Biosensors للكشف عن و تقدير متبقيات المبيدات في العينات ومنها الاتى:

1- جهاز الاستشعار الإنزيمي المعتمد على فرق الجهد Potentiometer enzyme sensors:

إن تصميم أجهزة الاستشعار المعتمدة على فرق الجهد يكون على أساس قياس التغير في رقم الأس الهيدروجيني (pH) كما أشار العديد من العلماء مثل Gingili، وآخرون (1996)، Ivnitskii وآخرون (1994)، Dumschat, وآخرون 1991). وتعتبر هذه الأجهزة من أكثر الطرق المتطورة ويوجد منها جهازين الجهاز الأول هو Ion Selective Field- Effect Transistor (ISFET) والجهاز الثاني هو Light Potentiometric Sensors (LAPS). تعتمد هذه الطريقة على تثبيت إنزيم الكولين استريز على الكترود ال (pH) الزجاجي باستخدام بولي اكريلمايد فيقوم الإنزيم بتحليل مادة التفاعل وهى الاستايل كولين منتجا حامض الخليك الذي يغير ال (pH) ويكون دالة على نشاط الإنزيم وفى حالة العينة المحتوية على مبيد فوسفورى أو كارباماتى يحدث تثبيط في نشاط الإنزيم مقارنة بالكنترول و هنا يكون التثبيط دالة على تركيز المبيد.و بهذه الطريقة قام العالم Tran-Minh وآخرون (1990) بالكشف عن البار اكسون حتى 0.3ppb ، بهذه الطريقة.

ولقد وجد ان أجهزة (ISFET) تسمح بالكشف عن الباراكسون والداىكلورفوس حتى حدود (0.2ppm). بينما أجهزة (LAPS) أكثر حساسية حيث يمكن الكشف بها عن متبقيات الباراكسون حتى مستوى 2.8ppb.

وبالرغم من أن الطرق المعتمدة على فرق الجهد سريعة ودقيقة فإنها تظهر حدود الكشف بطريقة عالية للغاية. وعلاوة على ذلك فإن الكشف عن أيونات الهيدروجين يقلل من الحساسية لهذه الطريقة لأنه يتم استهلاك البروتونات بواسطة المحلول المنظم بعد تحررها أثناء التفاعل الإنزيمي فتعطى نتائج غير دقيقة

2- جهاز الاستشعار الإنزيمي المعتمد على قياس شدة التيار Amperometric enzyme sensor:

هذه الأجهزة تعتمد على تقدير شدة التيار المتولد بين اثنين من الالكترودات بينهم فرق جهد والتغير في شدة التيار هنا ينشأ من حدوث أكسدة واختزال لمادة التفاعل المرتبطة بنشاط الإنزيم والتغير في شده التيار تكون دالة على نشاط الإنزيم وبالتالى تركيز الملوث وعموماً ، فإن طريقة الكشف بهذه الأجهزة تكون أكثر حساسية وتسمح بالحصول على إشارة واحدة مباشرة ومتناسبة مع تركيز الملوث المراد الكشف عنه. وهناك طرق أخرى مختلفة تعتمد على قياس شدة التيار ، واستخدام الاستايل كولين كمادة تفاعل و تعتمد هذه الطريقة على استخدام نظام انزيمى واحد أو إنزيمين وذلك للكشف عن O_2 ، H_2O_2 أو aminophenol.

أشار العديد من العلماء مثل Bernabei وآخرون (1991) ، Wollenberger وآخرون (1991)، Cagnini و آخرون (1995)، Cremisiniوآخرون (1995) إلى إمكانية استخدام الأستيل (acetyl) أو بيتيوريل ثيوكولين (buturyl-thiocholine) كمادة تفاعل، حيث يتم أكسدة مادة التفاعل بواسطة hydrogen peroxide و قياس كمية فوق أكسيد الإيدروجين المستهلكة والتى تكون دالة على نشاط الإنزيم و يكون التثبيط في نشاط الإنزيم دالة على تركيز المبيد ووجدوا أن الكشف عن البار اكسون بهذه الطريقة كان حتى حدود 0.03 ppb.

جهاز استشعار آخر تم تصميمه كجهاز أحادي الإنزيم وذلك باستخدام الأستيل أو بيتيوريل ثيوكولين (buturyl- thiocholine) كمادة تفاعل. إن الأساس في هذه الطريقة هو الكشف عن الملوث عن طريق عملية الأكسدة للثيوكولين الناتج من تفاعل الإنزيم مع مادة البيوتريل ثيوكولين.و قياس الأكسدة بواسطة الأكسجين أو فوق أكسيد الإيدروجين لماده الثيوكولين. بذلك يكون الانخفاض في تركيز الأكسجين أو فوق أكسيد الإيدروجين نتيجة أكسدة مادة الثيوكولين الناتجة من التحلل الانزيمى. وبالتالي يكون الانخفاض في تركيز المادة المؤكسدة دالة في نشاط الإنزيم والانخفاض في نشاط الإنزيم دالة في تركيز المبيد. استخدام الكولين استريز ثابت في (PVA- SbQ matrix) حيث نجح العالم مارتى وآخرون باستخدام طريقة تثبيت إنزيم الأستيل كولين استريز في الوصول لحدود الكشف عن مبيد البار اكسون عند 0.03ppb.

هناك أجهزة الاستشعار إنزيمية اعتمدت على استخدام مادة 4-امينوخلات الفينيل (4-aminophenylacetate) كمادة تفاعل بدلا من مادتي الاستايل كولين أو البيوتريل ثيوكولين. في هذه الطريقة تحدث عملية الأكسدة ل 4-aminophenyl acetate بواسطة الأكسجين أو فوق أكسيد الإيدروجين والانخفاض في تركيز المادة المؤكسدة يكون دالة في نشاط الإنزيم والانخفاض في نشاط الإنزيم دالة في تركيز المبيد. وهذه الطريقة تعتمد على استخدام أقطاب زجاجية من الكربون وباستخدام هذه الأقطاب كانت حدود الكشف لمبيد البار اكسون في حدود 1.1ppb. وأخيراً، فمن الممكن توسيع المدى للكشف عن المركبات باستخدام نوعين مختلفين من مرافق ثابت من الكولين استريز في نفس طبقة الكشف الحيوي.

4-1-1. الطرق الإنزيمية لرصد وتقدير متبقيات المبيدات الفطرية (مثل الداى ثيوكاربامات):

تعتبر المبيدات الفطرية مثل (الداى ثيوكاربامات) من أهم مجاميع المبيدات والتي تستخدم لمكافحة مجموعة متنوعة من الأمراض الفطرية والتي تصيب المحاصيل من أمثلة هذه المركبات (مانيب- زينب ، مانكوزيب الزيرام ، الفيربام).

أجهزة الاستشعار التي استخدمت للكشف عن مركبات الداى ثيوكاربامات اعتمدت على تثبيط إنزيم الألدهيد ديهيدروجينيز (AIDH) aldehyde dehydrogenease أو التيروسينز (tyrosinase). وهذا الإنزيم يقوم بإنتاج مركب هكساسيانوفيريت (hexacyanoferrate) و الذي يمكن أكسدته بواسطة مادة مؤكسدة ويؤدى ذالك إلى تغير في شدة التيار ويكون ذلك دالة في نشاط الإنزيم و الانخفاض في نشاط الإنزيم يكون داله في تركيز المبيد.

العالمان Marty and Noguer (1993) قاموا بتطوير جهاز يعتمد على وجود إنزيمين (amperometric bienzymatic sensor) و يعتمد فكرته على قياس شدة التيار في وجود الإنزيمين وذلك للكشف عن مركبات الداى ثيوكاربامات بالازدواج بين إنزيم الألدهيد ديهيدروجينيز (AIDH) مع إنزيم الداى فوري (diaphorase). حيث اعتمد الكشف بهذه الطريقة على أكسدة هكساسيانوفيريت (hexacyanoferrate) وعملية الاكسده هذه تظهر في صورة تيار كهربي شدته دالة في تركيز الإنزيم والانخفاض في نشاط الإنزيم يكون دالة في تركيز المبيد. إن توفير الظروف المثلى للإنزيم وفترة لتحضين يساعد في الكشف عن مبيد المانيب عند حدود أقل من 1.5 ppb كما أشار العالمان ,Noguer و Marty (1997).

5-1-1. الطرق الإنزيمية لرصد وتقدير متبقيات مبيدات الحشائش (مركبات الترايازين Triazines):

مبيدات الحشاش هي مثبطات لعمليات البناء الضوئي والتي تتميز بالاستمرار لسنوات طويلة فعالة في البيئة مما يتسبب ذلك في حدوث تلوث مستمر للمياه.

أول إنزيم في جهاز الاستشعار عن هذه المبيدات تم استخدامه بواسطة العالمان Mcardle و Persaud (1993) حيث أوضحا في دراستهما أن ذلك الجهاز يعتمد على تثبيط إنزيم (tyrosinase) والذي يعتبر هدف لمركبات الترايازين والداى ثيوكاربامات والكاربامات والذي يقوم بإنتاج الصبغات من أكسدة التيروسين tyrosine وعملية الأكسدة يصحبها تغير في شدة التيار والذي يكون دالة في نشاط الإنزيم وعملية تثبيط الأكسدة يصحبها تغير في شدة التيار ويكون دالة في تركيز المبيد حيث و لقد استطاعوا بهذه

الطريقة الوصول لحدود كشف جيدة لمبيد الأترازين (0.1ppm) ويجب التأكيد أيضاً على أن إنزيمات(tyrosinase) استخدمت للكشف عن مدى واسع من المبيدات والملوثات التي تكون بمثابة مواد تفاعل أو مثبطات لهذا الإنزيم.

إن النقص في التخصص هنا يكون له ميزة وهى عند جهاز الاستشعار استخدم كنظام إنذار متعلق بالتلوث البيئي العام.

1-1-6.الطرق الإنزيمية لرصد وتقدير متبقيات مبيدات الحشائش (السلفونيل يوريا، الاميدازولين):

مبيدات الحشائش مثل (السلفونيل يوريا، اميدازولين) استخدما لمكافحة الحشائش عريضة الأوراق والأعشاب في محاصيل الحبوب. واستناداً على أن المبيدات هي مثبطات لإنزيم (ALSase) (acetolactate synthase) فان Seki وآخرون (1996) قاموا بتطوير جهاز الاستشعار المعتمد على قياس شدة التيار نتيجة لتثبيط إنزيم ALSase و كانت له الكفاءة العالية في الكشف عن مبيد sulfometuron methyl. وفي هذه الطريقة الكشف يكون معتمد على نشاط الأوكسجين الجانبي للإنزيم الاسيتولاكتيت سينسيز (ALSase).حيث أن نشاط إنزيم الاسيتولاكتيت يعتمد على استهلاك الأكسجين وبالتالي نشاط هذه الإنزيم سوف يعتمد على نشاط إنزيم الاوكسجينيز. وبالتالي النشط العالي لهذا الإنزيم يصاحبه نشاط على لإنزيم الاوكسجينيز مما يؤدى إلى تغير في شدة التيار الذي يكون داله في نشط الإنزيم. والانخفاض في نشاط إنزيم الاسيتولاكتيت يصاحبه انخفاض في نشاط إنزيم الاوكسجينيز وبالتالي ينخفض التيار ويكون ذلك داله في تركيز المبيد.

1-2. الطرق البيولوجية المعتمدة استجابة خلية كاملة و ليس إنزيم:

إن استخدام أجهزة الاستشعار الذي تعتمد على خلية ثابتة أو عضو والتي وصفت سابقاً في الأبحاث وجد أنها تعتمد على قياس الاحتياج اللازم من الأكسجين للمتطلبات

البيوكيميائية (Biochemical Oxygen Demond (BOD أو على تحديد الكميات اللازمة لعمليات البناء الضوئي ولأن هذه الأجهزة تتميز بأنها عالية التخصص ، فنجد أن أجهـزة الاستشعار للخلية كلها لديها القدرة على استخدامها كأجهزة إنذار مبكر لرصد الملوثات فـي المياه.

أ- أجهزة الاستشعار التي تعتمد على قياس الاحتياج اللازم من الأكسجين للمتطلبات البيوكيمائية (BOD):

هذا النوع من أجهزة الاستشعار من أهم المؤشرات المستخدمة فـي الكـشف علـى التلوث العضوي في الماء. تعتمد هذه الطريقة على قياس استهلاك الأكـسجين بواسـطة الكائنات الحية الدقيقة. ومنذ عام 1977 فإن عديد من الأبحاث المنـشورة للعديـد مـن العلماء مثل Riedel و آخرون (1990) ، Marty وآخرون (1996) استخدموا العديد من الكائنـات الدقيقـة مثـل *Trichosporum cutaneum* *Clostridium butyricum* ، *Hansenula anomala*، *Bacillus subtilis*، *Bacillus .Licheniformis* في أجهزة الاستشعار المعتمدة على قياس الاستهلاك أو الاحتياج اللازم من الأكسجين لهذه الكائنات لتحطيم الملوثات والذي يكون دالة في تركيز هذه الملوثات

وكانـت أفـضل النتـائج التـي تـم الحـصول عليهـا كانـت مـع الـسلالة: *Trichoderma cutaneum*. حيث وجد أنها تحتاج كميات عاليـة مـن الأوكـسجين للمتطلبات البيوكيميائية (BOD) و التي تكون مبنية على قدرة هذه السلالة على تحطيم الملوثات وبالتالي ستكون كمية الأكسجين المستهلكة دالة فـي مـستوى الملوثـات العضوية الموجودة. وتعتمد كل أجهزة الاستشعار اعتمدت على تثبيت الكائنات الدقيقة باستخدام طريقة كـلارك لقطـب الأكـسجين (Clark oxygen electrode). إن الاعتماد على هذه الأنظمة يمكن أن يحقق القياسات خلال دقائق معدودة. وهناك أجهزة استشعار متخصصة أخرى اعتمدت على أساس اسـتخدام سـلالات أخـرى و منهـا *Rhodococcus erythropolis*, *Issatchenkia orientalis* .

ب- أجهـزة الاستـشعار الـتي ترصـد عمليـات البنـاء الـضوئي Photosynthesis : Monitoring Sensors

لقد وجد العلماء ان حوالي من 30% من مبيدات الحشائش التجارية تعمـل علــى تثبيط أنظمة البناء الضوئي. الجزء الأساسي منها يعمل كمثبطات لانتقال الإلكترونات أثناء عملية البناء الضوئي ، والبعض منها يمنع عملية الفسفرة ومبيدات أخرى من هذه المجموعة تمنع كلا العمليتان كما أشار Trebst وآخرون (1978) .فمـثلا مبيــدات الحشائش مثل الأترازين (s-triazine) تؤثر على عملية تدفق الإلكترونات داخل تفاعل البناء الضوئي الثاني (Photo system II) ومركبات أخرى نجدها تؤثر على عملية الفسفرة. إن استخدام أجهزة الكشف عن مبيدات الحشائش كان عن طريــق اســتخدام مــستقبلات بيولوجيــة متنوعــة مثــل cyanobacteria، *chlorella vulgaris*، البلاستيدات الخضراء و *Synechoccus sp.* كما أشار العديد من العلماء فــي هــذا المجال مثل Pandar, و Rawson (1993) ، Rouillon و آخرون (1994) et al., Rouillon وآخرون (1995)

و تعتمد فكرة أجهزة الاستشعار لعملية البناء الـضوئي علــى اســتخدام عنــصر بيولوجي للقيام بعملية البناء الضوئي سواء خلية كاملة أو عضو والتحضين مع المبيــد فيحدث تثبيط لعملية البناء الضوئي عن طريق تثبيط نقل الالكترونات ويتم تحويل هذه الاستجابة البيولوجية باســتخدام مــواد ناقلــة للالكترونــات مثــل البنزوكينــون أ Benzoquenoneو الحديدوسيانيد Ferrocyanide وقياس التغير فــي شــدة التيــار والذي يكون دالة في التثبيط وبالتالي دالة في تركيز المبيد.

وعموماً، فإن أجهزة الإستشعارالبيولوجى التي تستخدم لرصد التثبيط في عمليــات البناء الضوئي ينقصها الحساسية والتخصص وخصوصاً عندما يتم المقارنــة بــأجهزة الاستشعار المناعية. فعلى سبيل المثال حدود الكشف لمبيد الأترازين يختلف مــا بــين 10ppb إلى 650ppb باستخدام السيانوبكتريا (cyanobacteria) والطحالب وحيــدة

الخلية و ال (thikaloyids) والتفاعلات الوسطية، بينما في حالة استخدام أجهزة الاستشعار المناعية فإن التركيزات كانت منخفضة حيث كانت 0.03ppb.

1-3. استخدام الاستجابة المناعية في تحليل المبيدات
Utility of immunoassay in Pesticides Analysis

التقدير بأسلوب كيمياء المناعة تمثل الاستخدام الفورى للتكنولوجيا الحيوية Biotechnology وبالرغم من أن هذه الطريقة تعتبر طريقة طبيعية Physical استنادا إلى قانون فعل الكتلة وليس حيوية Bioassays إلا أنها تستمد حساسيتها الفائقة وتخصصها العالى إلى النظم الحيوية (Biological systems) التي تنتج الأجسام المضادة التي سوف ترتبط بالمركبات التي تملك قابلية كبيرة للارتباط بها. ومن المحتمل أن تستخدم طرق تكوين المناعة لتقدير تركيبات واسعة الاختلاف بدرجة تفوق أيا من تكنولوجيات التحليل الأخرى. وحيث أن قابلية الجسم المضاد للمركب المعنى بالتقدير تتوقف على مجموع مختلف التداخلات الغير تكافؤية Non-covalent يصبح من الصعوبة بمكان تجهيز الأجسام المضادة للجزيئات الصغيرة. ومن حسن الحظ عدم وجود حدود قصوى لحجم المركبات الممكن تحليلها. وحيث أن مجال مكافحة الآفات يتجه لاستخدام الجزيئات المخلقة المعقدة (مثل مثبطات النمو الحشرية مثل الدايفلوبنزيرون الكلور سلفيرون) ونواتج التخمر مثل الأفيرمكتين والبروتينات مثل توكسينات بكتريا الباسيللس ثورينجينسيز ، يصبح من الأهمية إيجاد طرق مقبولة لتحليل هذه الجزيئات الضخمة.

تحليلات المناعة تجرى عادة في محلول مائي ولذلك يجب أن يكون الجزئ المطلوب تحليله وتقديره ذو ثبات متوسط (على الأقل) في الماء. ومن المثير للدهشة أن الذوبان في الماء نادرا ما يعتبر مشكلة حيث إنه حتى المركبات شديدة الحب للدهون Lipophilic غالبا ما تكون ذائبة في الماء عند تركيزات غاية في الصغر "البيكو Pico أو الفيمتومولار Femtomolar" وهذه تلائم طريقة المناعة. ولانه حتى المركبات شديدة الانخفاض في الذوبان فى الماء يمكن أن تكون في متناول الجسم المضاد في صورة جسيم دقيق

Micelles أو مع مرافقات الإنزيمات الذائبة في الماء. والمشاكل المصاحبة لتحليل المركبات عالية الذوبان في الدهون ترجع في العادة إلى إزالتها من الوسط الزيتي بدرجة تفوق المشاكل الناجمة عن الذوبان المطلق. وكقاعدة عامة تستخدم تحليلات المناعة للكشف وتقدير الجزيئات التي يصعب تقديرها بالكروماتوجرافى الغازي السائل مما يضفى على هذه الطريقة أهمية كبيرة كتكنولوجيا مكملة مثيرة للاهتمام. وبالرغم من سهولة إيجاد طريقة تحليل المركبات الذائبة في الماء إلا أنه يمكن القول وبدون استغراب أن تكنولوجيا كيمياء المناعة يمكن أن تستخدم لتحليل أي مركب. وبذلك تستخدم هذه التكنولوجيا بنجاح لتقدير مخلفات معظم مبيدات الآفات الشائعة في الوقت الحالي ومن المتوقع أن تلائم هذه الطريقة للجيل التالي من المركبات.

1-3-1. مميزات التحليل: Advantages of Immunoassay

في عام 1974 بدأت دراسات في معامل جامعة كاليفورنيا لتحديد إمكانية استخدام تكنولوجيا كيمياء المناعة لتحليل مبيدات الآفات وغيرها من المركبات الكيميائية. ولقد صممت البحوث لتقييم مميزات وحدود هذه التكنولوجيا في مجال الكيمياء البيئية. والجدول التالي (4) يوضح مميزات وحدود هذه الطريقة. وهذه المعايير ليست قواعد ثابتة حيث يمكن التغلب على العديد من محددات هذه الطريقة باللجوء إلى استخدامات مبتكرة لهذه التكنولوجيا المتطورة.

ويجب أن نعيد التذكرة بأن هذه الطريقة طبيعية تعاني من نقص تخيل حدوثها وإجراءها. والمشتغل الذي عنده دراية بهذه التكنولوجيا يستطيع عمل توازن بين مميزات وحدود التحليل الخاص بالمواصفات المطلوبة ، وهناك بعض البحاث غير قادرين على تحقيق كل مميزات طريقة التقدير المناعي. ومن الممكن تصميم طريقة تقدير مناعي غير مكلفة ذات حساسية متوسطة للكشف عن المخلفات الكيميائية وتطوير هذا الإنجاز مع عدم توفر أجهزة متخصصة أو أشخاص مدربين. والبعض لا يتوقع أن تكون هذه الطرق عالية الحساسية والدقة. وبالرغم من أن طريقة تقدير المناعة تتفوق في قوتها كطريقة لتحليل

المركب الواحد إلا أنه يمكن تطويرها وجعلها قادرة على الكشف عن مجموعة من المركبات (مثل المبيدات الحشرية من مجموعة الآسيل يوريا) أو مخلوط المركبات (المواد ذات النشاط السطحي الغير أيونية) ولكن هذه التطورات فى الطريقة لا يمكن ضمان أن احتفظاها بميزه الحساسية العالية.

جدول (4): يوضح مميزات وعيوب تكنولوجيا كيمياء المناعة:

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

ولقد أكدت سنوات الخبرة العديدة في مجال الكيمياء التشخيصية وزيادة الخبرات في الكيمياء البيئية تعاظم مميزات أسلوب المناعة في تحليل المخلفات. وتعتمد الحساسية العالية لهذا الأسلوب على الارتباط العكسي واللصيق للجسم المضاد مع المركب مجال التحليل. وحيث أن هذا الارتباط مبنى على مجموع التفاعلات الغير تكافؤية (خاصة التفاعلات الجزيئية الضعيفة التي تعتمد على القرب بين المجاميع المتفاعلة) فإن التفاعلات البيئية عالية التخصص. ومميزات التخصص والحساسية تمكن القائم بالتحليل من إجراء التحليل مباشرة على الوسط الحيوي الخام.

كما في الشكل IA لمبيد الباراكوات في السيرم. وهذه الميزة تسمح بالاستغناء عن بعض خطوات الاستخلاص أو التنظيف مما يزيد من سرعة إتمام التقدير وتقليل التكلفة وزيادة دقة العملية. وخير مثال لتأكيد هذه الميزات ما أمكن تحقيقه من زيادة كفاءة التحليل مائة مرة في

عينات الألبان المطلوب تجهيزها لكل عامل في اليوم مع تقليل التكلفة وزيادة الدقة والحساسية. وحيث أنه طورت العديد من مجاميع المبيدات مثل البيرثرويدز ومشتقات آسيل يوريا الحشرية أو سلفونيل يوريا لمكافحة الحشائش ، أصبح من المهم تطوير طرق تحليل حساسة للكشف عن المخلفات ذات الأهمية التوكسيكولوجية. ومن أكفأ الانجازات التي أمكن تحقيقها في تحليلات المناعة مع أقل قدر ممكن من خطوات التنظيف ما تحقق مع مركب اليوريا دايفلوبنزيرون (الشكل IB).

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

وجميع التحليلات المناعية تعتمد على قانون فعل الكتلة وكذلك على قياس الجسم المضاد الذي يرتبط بالمركب أو الجسم المضاد الحر والمركب. وهذا يقدم للباحث ميزة كبيرة للتصرف وتحرير التكنيك بما يتمشى مع المشكلة التي يتناولها. وباستخدام نفس الجسم المضاد يمكن للباحث تطوير طريقة ميدانية سريعة أو تحليل النسبة المئوية للتثبيط في الـ ELISA المتنافسة ممثلة في مقابل لوغاريتم المادة محل التقدير بالنانوجرام/ملليلتر.

وإذا اكتسب شخص خبرة كبيرة في مجال التحليل المناعي سيكون على دراية كافية بغيرها من المجالات الأخرى، إلا أن التسمية نفسها الخاصة بهذا التكنيك ما زالت تخوف وترعب الكثير من القائمون بالتحليل الكيميائي. وترجع جميع الاختلافات في التحليل المناعي على التفاعل العكسي بين الجسم المضاد والمركب. أن تدبير جسم مضاد ممتاز

يمكن من تجهيز واستخدام أي من الأصول الموجودة لتصميم طريقة تحليل مناعي للتقدير الكيفي والكمي للمركب محل الدراسة. والاقتراب من هذا الاتجاه في التحليل يؤكد على الكيميائي الالتزام بمحددات نجاح الطرق الأخرى فيما يختص بأخذ العينات وتداولها وتجهيزها وكذلك المفاهيم الأساسية للتحليل. والإلمام بالتعريفات الثلاثة الآتية يمكن من إضافة الاصطلاح كيمياء المناعة إلى مهمات القائم بالتحليل:

- الجسم المضاد Antibody أحد أقسام بروتينات السيرم التي ترتبط مع الانتيجين.
- الجزئ المحفز Antigen الجزئ (عادة بروتين) الذي يحفز إنتاج الأجسام المضادة يرتبط بها.
- الهيباتين Hepatin المركب (غالبا جزئ صغير) الذي يرتبط بالأجسام المضادة ولكنه غير قادر بمفرده على إنتاج الأجسام المضادة.

1-3-2. الاستخدامات في كيمياء المبيدات: Application to Pesticide Chemistry:

المميزات والحدود الخاصة بتكنولوجيا كيمياء المناعة المدونة في الجدول رقم (4) تترجم إلى بعض الاستخدامات الحالية في كيمياء المركبات التي ستذكر فيما يلي:

أ- تحليل المركبات التي يصعب تحليلها بالطرق التقليدية:

من أوضح استخدامات كيمياء المناعة هو تحليل المركبات التي يصعب تحليلها بالطرق التقليدية. وكما هو معروف فإن الكروماتوجرافى الغازي السائل (GLC) يستخدم بدرجة كبيرة لتقدير المركبات المتطايرة (عادة كارهة للماء وصغيرة الوزن) والثابتة في الحرارة والتي لها بعض الصفات التي تمكن من الكشف عنها بواسطة الكاشفات المتخصصة. والكروماتوجرافى السائل عالي الكفاءة (HPLC) أقل تقييدا ولكنه ما زال يعتمد على بعض الصفات المحددة للكشف. والمعايير المذكورة أعلاه ليست ضرورية لتحقيق نجاح التحليل المناعي ولو أن هناك اتجاه يوضح أن التكنيك يعتبر مكملا للتكنولوجيا الموجودة ويمكن استخدامه ككاشفات عالية الكفاءة HLPC

وكما هي العادة البشرية فإنه لا يبدأ بتجربة التكنولوجيا الجديدة إلا عندما تفشل التكنولوجيا الموجودة والمستخدمة فعلا ، ولسوء الحظ استخدم تكنيك التحليل المناعي في البداية مع بعض مشاكل التحليل المستعصية. وفى معظم الحالات تفوق هذا التكنيك لدرجة اعتباره المنقذ Savior. ونود الإشارة إلى أنه لو قدمت طرق التحليل المناعي في معمل به أفراد غير مدربون جيدا لتحليل بعض المركبات المستعصية التحليل "Night mare" (شديدة القدرة على التفاعل ــ صغير جدا ــ شديدة الحب للدهون ــ موجودة بمستويات قليلة جدا ــ يعوق ظهور المناعة) فإن الفشل في التقدير وعدم النجاح سيكون معوقا لهذه التكنولوجيا.

وفي معامل كاليفورنيا استخدم تكنولوجيا كيمياء المناعة لتحليل مجموعة من المركبات التي يصعب تحليلها بالطرق الكلاسيكية. ومثال ذلك: مركب الأليثيرين البيروثرويدى الذي يفتقر لوجود مجموعة يسهل الكشف عنها بالكروماتوجرافى الغازي السائل GLC والعالي الحساسية HPLC ، والمبيدات الحشرية من مجموعة الآسيل يوريا ومبيد الحشائش الباراكوات تتطلب إجراء خطوات عديدة قبل الكشف بالــ GLC مع ملاحظة أن طريقة الــ HPLC قليلة الحساسية جدا ، بينما مركب Triton-X غير متطاير يصعب استخلاصه ويعطى منحنيات عديدة على الــ HPLC. ومن المؤكد أن التركيب والنشاط العالي لمركبات السلفونيل يوريا يوضح أن تكنولوجيا التحليل المناعي تصلح تماما لتقدير مثل هذه المركبات.

ب- تمييز المشابهات والمركبات القريبة:

Discrimination of Chirality and Closely Related Compounds

نظرا للتكاليف المتزايدة لمستلزمات التحليل والقيود الخاصة بالاعتبارات البيئية قد يقرر البعض أن المركبات لا تباع في الأسواق قد تكون غنية في المراكز النشطة ضوئيا أو على صورة كيميائيات نقية. والمركبات الأخرى عبارة عن مخاليط راسيمية والتي يمكن أن تنهار بصورة مختلفة في البيئة. ومن ثم تصبح المقدرة على التمييز بين المشابهات الضوئية على مستوى المخلفات في غاية الأهمية. فمركب الاللثرين يتكون من 8 مشابهات ضوئية

وهندسية ومن أكثرها فعالية بيولوجية المشابهات 1R, 3, 4R. ولقد أمكن تطوي نظام تحليل مناعي عالي التخصص لكل مشابه على حده مما يؤكد مقدرة هذه التكنولوجيا على التعامل مع المشابهات.

وفى مجال كيمياء المبيدات تقوم المعامل بتطوير مركبات ذات صفات متماثلة وهذا هو الموقف منع الديميلين وغيره من المركبات الفعالة مثل Bay Sir8514. ويتطلب فصل هذه المركبات تجهيز عامود عالي الكفاءة جدا للـ HPLC. بينما أمكن تطوير طريقة تقدير مناعي يمكن بها الكشف عن مجموعة من المركبات والتفرقة بين الديميلين وغيره من المركبات القريبة منه حتى التي ظهرت بعد تطوير هذه التكنولوجيا.

ج- تحليل سوائل جسم الإنسان ومعلمات حيوية:

Analysis of Human Body Fluids and as Biomarkers

لتقييم درجة تعرض الإنسان للسموم يصبح من الضروري تحلل سوائل الجسم مثل البول والدم. وحيث أننا نتجه لإيجاد علاقة بين التعرض والسمية لذا توجه الاهتمامات المتزايدة إلى تحليل المركبات الصلبة ونواتج تمثيلها وعلامات التسمم في الأفراد الذين يتعرضون لها مهنيا أو بيئيا. والتحليل المناعي يناسب التشخيص الإكلينيكي وتحقيق الحساسية العالية لهذا التكنيك تتطلب مواد حيوية تافهة وقليلة. وعلى سبيل المثال تستخدم طريقة المناعة لتشخيص التسمم بمبيد الباراكوات ، ولقد ثبت إمكانية تقدير مخلفات المبيد مباشرة في عينات الدم والبول والليمف باستخدام التحليل المناعي وبحساسية شديدة تفوق جميع الطرق الأخرى المعروفة. وسرعة إجراء التحليل تتيح فرصة كبيرة لإجراء دراسات حركة الكيميائيات Pharmacokinetic لتقييم خطورة التعرض المهنى للسموم.

د- تحليل أعداد كبيرة من العينات:

Analysis of Large Numbers of Samples

التحليل بالمناعة Immunoassay طريقة غاية في السهولة وقليلة التكلفة مما يجعله أسلوب نموذجي لتحليل أعداد كبيرة من العينات. وهذا الوضع يجعل التحليل المناعي ملائما

لأغراض تسجيل المبيدات وكذلك اختبارات النوعية ومطابقة المواصفات القياسية وتقدير المخلفات عندما يكون هناك شك في وجود المركب. وعندما تستخدم الطرق التقليدية للتأكيد تفيد طريقة التحليل المناعي لتقليل السلبيات. وفى هذا المقام تم تطوير طريقة لتحليل مبيد الحشائش المولينييت "molinate" حيث أن هذا المركب مفيد جدا في زراعات الأرز ولكن إذا انفرد قبل الميعاد المطلوب سيؤدى إلى قتل الأسماك. وساعدت هذه الطريقة في تقييم ديناميكية وحركية المولينيت فى زراعات الأرز بالرغم من كثرة العينات المطلوب تحليلها لتحقيق هدف الدراسة. وتوضح هذه النتائج إمكانية تطوير طريقة التحليل المناعي لتقدير المركبات الصغيرة الحجم والمتطايرة والغير ثابتة. والتكنيك يطور بعد الاستخلاص بما يحقق حساسية عالية للكشف عن المخلفات. ولتحقيق التكامل أو التنسيق بين استخدام المبيدات مع الاعتبارات الاجتماعية يصبح من الأهمية تطوير هذه المعلمات Markers لتقدير التلوث البيئي بمستويات معينة من الملوثات. وتحليل وجود مبيدات الحشائش الذائبة فى الماء مثل الثيوكاربامات والـ 2,4-D ومركب 2,4, 5-T ذات أهمية خاصة فى برامج استكشاف تلوث الماء السطحي بينما التحليل السريع للتريازين ومركبات الأسيتانيليدات تعتبر مهمة فى برامج استكشاف تلوث الماء الأرضي.

هـ – التحليل السريع أو/والميداني:

Rapid and/or Field Analysis

تكلمنا قبلا عن إمكانية إحلال طريقة التحليل المناعي محل الطرق التقليدية في تقدير المبيدات ونشير هنا إلى أن هناك العديد من الاستخدامات لا تجرى بدقة إلا بطريقة التحليل المناعي. وعلى سبيل المثال تقدير المولينيت يجرى بصورة سريعة جدا في الحقل دون الحاجة لأية أجهزة أو القليل فقط وهذا يمكن الفلاحون ومسئولي الزراعة من الكشف عن آثار هذا المبيد فى المياه قبل الصرف. ويفيد هذا التكنيك كذلك فى التاكد من وجود الكيميائيات السامة قبل معاودة دخولها أو لاستكشاف الإشارة وهذا الأسلوب في غاية الأهمية خاصة من المركبات شديدة السمية مثل الباراكوات والباراثيون. ومن الفوائد

الأخرى الكشف عن وجود المبيد قبل زراعة النباتات الحساسية للتشوهات بمبيدات الحشائش المعينة كما فى حالة الترايزينات وكذلك السلفونيل يوريا. ويمكن للفلاحون استخدام هذا التكنيك للكشف عن الأدوية البيطرية ومسببات الأمراض الحيوانية والنباتية والمبيدات. وهذا يقدم اتجاه جديد فى مفهوم تحليل المخلفات باستغلال الإمكانيات التي توفرها التكنولوجيا فى المكان الميداني (الحقل) حيث التلوث. كما يقوم بها الفلاحون وهذا الأسلوب مهم جدا لتجار الجملة حيث يهمهم إثبات أن المخلفات السامة فى المحاصيل قليلة للغاية ونفس الشئ لتجار المبيدات المشتركة فى برامج الإشراف على أمان المخلفات.

3.3.1. اسس التحليل المناعي:

Antigen: هي المادة التي تشجع علي إنتاج الأجسام المضادة والتي تعطي استجابة مناعية.

Antibody: هي أجسام مضادة توجد في الدم وتستخدم في التعرف علي والقضاء علي الكائنات الغريبة عن الجسم.

ودائماً ما يستخدم الـ Antigen مع Antibody أو يرتبطا معاً.

جميع التقديرات المناعية تعتمد على الاختيارية العالية والحساسية للأجسام المضادة والأنتجين للمبيد. هذه الاختبارات تستخدم المواد المعلمة للكشف عن رد الفعل المناعي. وهذه المواد المعلمة ممكن أن تكون إنزيمات (تطبيق مناعي يعتمد على وجود الإنزيم)، تطبيقات تعتمد على المواد النشطة إشعاعيا (Radio active material). أو المركبات الكيميائية التي لها خاصية الوميض والتي تستخدم في التطبيقات المناعية. إن التطبيقات المناعية التي تعتمد في عملها على الإنزيم. ويتم فيها استخدام الإنزيمات المعلمة لتكبير ولإظهار الأجسام المضادة والأنتجين الأولى المرتبطين معاً في تفاعل حيث أن هذه الطريقة منتشرة جداً في هذه الآونة . حيث يترتبط الانتجين المراد قياسه مع الانتبدى ثم يحدث ارتباط مع إنزيم معين و يقوم الإنزيم بالتفاعل مع ماده تفاعل معينة وإعطاء لون أو شارة وميض يمكن قياسه و يكون داله في الاستجابة المناعية

المراد تقديرها. ومن غير المستحسن أن نتجنب استخدام النظائر المشعة والتي تستخدم في التطبيقات المعتمدة على الإشعاع. وتتميز الإنزيمات المعلمة بأنها تكون سهلة في التطبيق ورخيصة الثمن حيث تستخدم هذه المواد في تحويل مادة التفاعل عديمة اللون إلى ناتج ذو لون وتتميز أيضاً هذه الطريقة بأنها بسيطة وحساسة. ومن بين هذه التفاعلات المناعية المعتمدة على الإنزيمات هي تطبيقات الأليزا. وهذه التفاعلات تكون أكثر شيوعاً وتشير إلى الإنزيم المرتبط تطبيقات الأليزا تستخدم الأجسام المضادة والأنتجين مثبت على طور صلب (ثابت) لتسهيل عملية الإنفصال وتكوين الأصول الحرة والمرتبطة.

4-3-1. تطبيقات الأليزا (ELISA) Enzyme Linked Immune Sorbent Assay

تنقسم تطبيقات الاليزا إلى:-

1- تطبيقات الأليزا المعتمدة على التنافس المباشر.

2- تطبيقات الأليزا غير المباشرة.

أ- تطبيقات الأليزا المعتمدة على التنافس المباشر تتم بالخطوات التالية:

1- يتم إعداد سطح صلب من البوليمر مثلاً في صورة Plate معروف انه يمكن أن يرتبط بكمية معلومة من الانتجين .

2- يتم عمل رش للأجسام المناعية علي السطح لتثبيتها وادمصاصها على سطح Plate.

3- يتم غسل Plate حتى يتم إزالة أي Antigen أو جسم مناعي غير مرتبط

4- ثم يتم إضافة كمية العينة أو المبيد القياسي و المسمى بالمبيد الحر

5- يتم إضافة الإنزيم المرتبط بالمبيد المعلم والتحضين لفترة فيحدث تنافس بين المبيد الحر و المبيد المعلم على الارتباط بالأجسام المناعية.

6- يتم غسل Plate حتي يتم إزالة الأجسام التي لم ترتبط .

7- ثم يتم إضافة المادة التي تكون لون اووميض وغيرة حسب طريقة القياس وهى مادة تفاعل الإنزيم ويتم التحضين لفترة.

8- يتم إضافة المادة الكيماوية التي توقف التفاعل ثم يتم قياس اللون أو الوميض ويكون داله في كمية المبيد المرتبط بالجسم المناعي وعكسيا مع كمية المبيد المضاف.

ب- الطريقه غير المباشرة تتم بالخطوات التالية:

1- يتم إعداد سطح صلب من البوليمر مثلاً في صورة Plate والمعروف انه يمكن أن يرتبط بكمية معلومة من الانتجين .

2- يتم عمل رش للأجسام المناعية علي السطح لتثبيتها وادمصاصها على سطح Plate.

3- تم غسل Plate حتى يتم إزالة أي Antigen أو جسم مناعي غير مرتبط

4- م يتم إضافة كمية العينة أو المبيد القياسي و المسمى بالمبيد الحر ويتم التحضين والغسيل

5- ثم يتم إضافة أجسام مناعية أخرى ثم التحضين والغسيل

6- يتم إضافة الأجسام المناعية المعلمة بالإنزيم ثم الغسيل ثم يتم إضافة مادة تفاعل الإنزيم مع إضافة المادة التي تكون لون اووميض وغيرة حسب طريقة القياس.

7- يتم إضافة المادة الكيماوية التي توقف التفاعل يتم قياس اللون أو الوميض ويكون داله في كمية المبيد.

والفرق هنا بين الطريقة المباشرة والطريقة غير المباشرة هو أن الطريقة غير المباشرة تحتاج إضافة أجسام مضادة متخصصة فى الارتباط بالانتجين ويتم قياس الأجسام المضادة وليس الانتجين نفسه والأجسام المضادة تكون دالة فى الانتجين عكس الطريقة المباشرة التي يقاس فيها الانتجين نفسه ولا تتم فيها هذه الخطوة. وتمتاز

الطريقة الغير مباشرة بالدقة نتيجة لوجود أماكن كثيرة على الأجسام المضادة المتخصصة فى الارتباط بالانتجين وبالتالي تكون فرص ارتباط الإنزيم اكبر وحساسة التقدير أعلى عكس الطريقة المباشرة.

ولتقدير متبقي المبيد فى عينة بطريقة الأجسام المناعية يتم عمل منحنى قياسي يمثل العلاقة بين التركيزات القياسية من المبيد و اللون المقاس أو درجة الوميض أو الإشعاع حسب الطريقة المستخدمة ثم يقاس ذالك لعينة المبيد المجهولة و منها يمكن تقدير متبقي المبيد فى العينة

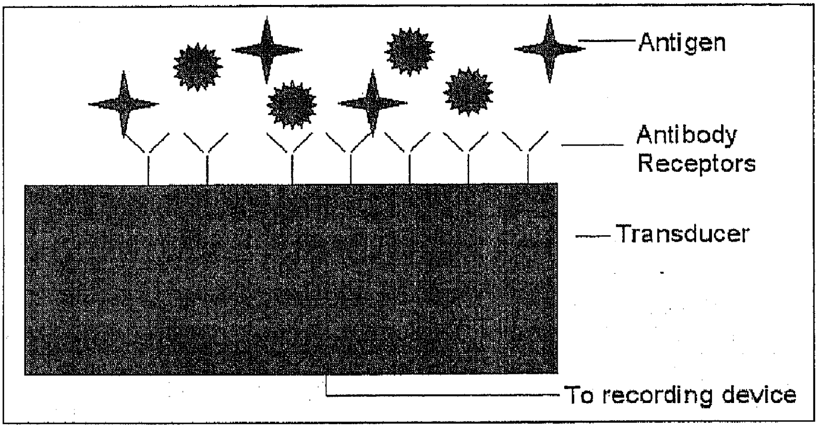
تم استخدام التطبيقات الإنزيمية المناعية كطرق للكشف عن المبيدات في عديد من الأبحاث بواسطة العديد من العلماء (Sherry و Crypt. (1992) Sadik, و Van Emon (1996) و Meulenberg (1995). وتم تصميم أجهزة لذلك سميت أجهزة الاستشعار المناعية.

5-3-1. أجهزة الاستشعار المناعية لتقدير متبقيات المبيدات (Immunosensors):

منذ أن ظهرت التطبيقات المناعية فإن انتشارها كان سريعاً في مجال التحاليل الطبية، ومع ذلك مؤخراً تم إدراك أهمية هذه التطبيقات في مجال علوم الأغذية، و التحليل البيئي كطريقة تقدير كمي جديدة وبديله للطرق التقليدية فى تقدير متبقيات المبيدات (Hammock وآخرون 1995 و نيلسون وآخرون 1980) و الشكل 15 يبين مكونات جهاز الاستشعار المناعي.

وجهاز الاستشعار المناعي يتكون من الوحدات الأساسية لاى جهاز استشعار بيولوجي وهى هدف بيولوجي ويكون هنا انتيجين antigen أو جسم مناعي antibody و أحيانا يكون الاثنين مرتبطين بإنزيم والمكون الثاني هو المحول الذي يحول الاستجابة إلى ا شارة يمكن قياسها.

جهاز الكشف المناعي يجب أن يكون قادر على الكشف على المـواد المـراد تحليلهـا بصورة مستمرة وأن يتميز بالاختيارية وإعطاء استجابة في الوقت المحدد. وعمومـاً فـإن الكشف المباشر في ارتباط مواد التفاعل المناعية لا يعطينا حساسية كافية. إن المواد المعلمة تسمح بالكشف بصورة أكثر حساسية في التفاعل البيولوجي المناعي . هذه المواد المعلمـة من الممكن أن تكون إنزيمات أو مواد كيمائية لها صفه الوميض أو مواد نشطة كيميائيـاً. والإنزيمات المعلمة التي تستخدم في أجهزة الكشف المناعي غالباً ما تكون البيروكسيديز أو ألالكالاين فوسفاتيز أو الكولين استريز.



الشكل(16) مكونات جهاز الاستشعار البيولوجي المناعي.

ويمكن تقسيم أجهزة الكشف المناعي إلى أربعة فئات اعتمادا على وظيفة المحول وهى:

1- أجهزة الاستشعار المناعية الكهروجهدية Piezoelectric .

2- أجهزة الاستشعار المناعية الضوئية. Optical.

3- أجهزة الاستشعار المناعية الكهروكيميائية Electorchemicals.

4- أجهزة الاستشعار المناعية الحرارية Thermal.

العنصر البيولوجي الثابت إما أن يكون جـسم مـضاد (Antibody) أو الانتجـين

(Antigen) والذي من الممكن أن يحدث به تغير كيميائي. في الحالة الأولى ارتباط الأنتجين على سطح الجسم المضاد الثابت يمكن قياسه مباشرة بينما في الحالة الثانية التنافس بين الأنتجين الثابت(AG) ، المادة المراد تحليلها من الأنتجين (AG) وكمية محدودة من الجسم المضاد (AB).

أ- أجهزة الاستشعار المناعية الكهروجهدية Piezoelectric immunosensors

تعتمد هذه الأجهزة على استخدام محولات عبارة عن مواد غالباً ما تكون بلورات من الكوارتز لقياس الرنين بواسطة مواد التفاعل والتي تعتمد على فعل إنزيم متخصص مرتبط بالأجسام المناعية وبالتالي التغير في هذه الاستجابة يكون تغير في نشاط الإنزيم وبالتالي الاستجابة المناعية تجاه الملوث المراد قياسه. هذه المواد التي تكون غالبا بلورات من الكوارتز عند تعرضها لحزمة الكترونات تحت تأثير تيار كهربي تحدث رنين. الرنين ينتج من التذبذب الناجم بواسطة طيف كتلة بلورة الكوارتز. وفى هذه الأجهزة تكون بلورات الكوارتز مغلفه ومرتبطه بالجسم المضاد أو الأنتجين والاستجابة الناتجة من الأجسام المناعية يتم تحويلها إلى ا شارة رنين نتيجة لحدوث تغير مادة الكوارتز وهذا التغير يكون دالة في تركيز الانتجين المراد قياسه الذي يكون دالة في تركيز الملوث.

أجهزة الكشف ل Piezoelectric استخدمت للكشف عن المبيدات مثل مبيد الحشائش الأترازين كما أشار العديد من العلماء مثل Guilbault وآخرون 1992 ، Steegborn و Skladal (1997) والمبيد الحشري الباراثيون كما أشار Ngeh-Ngwainbi وآخرون (1986). ولقد طور العالم Guilbault وآخرون (1992) طريقة الكشف المباشر لهذا الجهاز باستخدام بروتين A لتوجيهه نحو الأجسام المضادة على البلورة. ووجد أن استخدام هذا النظام يسمح بالكشف عن مبيد الأترازين حتى مستوى 0.03ppb.

ب- أجهزة الاستجابة المناعية البصرية Optical immunosensors

تعتمد تطبيقات المناعة البصرية على استخدام محول لقياس امتصاص أو انبعاث

الضوء بواسطة مواد التفاعل والتي تعتمد على فعل إنزيم متخصص مرتبط بالأجسام المناعية وبالتالي التغير في هذه الاستجابة يكون تغير في نشاط الإنزيم وبالتالي الاستجابة المناعية تجاه الملوث المراد قياسه . وهذه الألياف الضوئية الحساسة غالباً تتكون من ليفه ضوئية مستقيمة ولها طبقة حساسة على الغلاف الداخلي لليف الضوئية. حيث أن الضوء يعبر من خلال الليف الضوئية بواسطة الانعكاس الضوئي الداخلي ويمكن قياس التفاعلات بين الضوء والمادة المتفاعلة بالتغيرات في الامتصاص ، الوميض ، الاستقطاب.اى أنها تعتمد على تحويل الاستجابة البيولوجية للأجسام المناعية إلى إشارة ضوئية و التغير في الإشارة الضوئية يكون دالة في الاستجابة المناعية للملوث.

إن التطبيقات المناعية البصرية طورت لتستخدم في عمليات الرصد البيئي والتي تعتمد على الرنين السطحي (Plasmon) والتي تسمى بأجهزة Surface Plasmon Resonance (SPR). وهذا الجهاز تم تعديله باستخدام طبقة داخلية ثابتة من الأجسام المضادة حيث أنه يقيس التغيرات في زاوية الامتصاص الكلى للضوء الناتج من الطبقة المعدنية والذي يكون حاملاً معه الأجسام المضادة.

إن الهدف الأساسي لأجهزة الكشف المناعي تعتمد على استخدام جزيئات معلمة والتي تكون قادرة على أن تكرر الانبعاث في الفوتونات المد مصة على طول موجي أعلى كوميض وهذه الظاهرة تسمى بالوميض الناتج من الانعكاس الكلى الداخلي. العالمان Minunni وMascini (1993) استخدما الجهاز التجاري SPR من Pharmacia وذلك للكشف عن مبيد الحشائش الأترازين . في هذه الحالة كان الأترازين المرتبط ثابت على سطح الليفة الضوئية والتيار الحامل يحتوى على كمية معلومة من الأجسام المضادة الحرة ومادة الأترازين المراد تحليلها. ووجد أن مثل هذا الجهاز يعتمد على التنافس بين المواد الغير معلمة والتي تسمح بالكشف عن المبيد عند حدود تصل إلى 0.05ppb هذا المثال يوضح ان أجهزة الكشف المناعي والتي تعتمد على المنافسة والتي تكون قادرة على أن تعطينا قياسات سريعة ودقيقة لبعض الملوثات كما هو موضح بالجدول رقم 5.

جدول (5): بعض أجهزة الاستشعار المناعي الضوئي والمركبات التي تستخدم في الكشف عنها وحدود الكشف .

Immobilized reagent	Detected compound	Labelled reactive	Detection limit (ppb)
Hapten	Terbutryn	No	3.6
	Atrazine		3.2
Hapten	Atrazine	No	0.05
Hapten	Parathion	Fluorescein Anti IgG	0.3
Antibody	Imazethapyr	Fluorescein Hapten	0.3
Antibody	Polychloro-phenols	Fluorescein Hapten	10

Marty et al., (1998)

ج- أجهزة الكشف المناعية الكهروكيميائية Electrochemical immunosensors

تعتمد هذه الطريقة على استخدام محولات كهر وكيميائية تعطى قيم تكون دالة في الاستجابة المناعية تجاه الملوث المراد قياسه. و تعتبر هذه الطريقة التي تعتمد على محولات كهر وكيميائية طريقة غير مكلفة وتسمح بالكشف عن مركبات في حدود صغيرة جداً وخاصة عندما تستخدم مع نظم الكشف الأخرى مثل الإنزيمات وتنقسم هذه الأجهزة إلى قسمين من حيث الاستجابة الكهروكيميائية التي يمكن قياسها إلى مجموعتين :

أ- أجهزة قياس معتمدة على قياس فرق الجهد. (Potentiometric)

ب- أجهزة قياس معتمدة على قياس شدة التيار.(Amperometric)

1- أجهزة قياس فرق الجهد: Potentiometric immunosensors

إن الأجسام المضادة ما هي إلا بروتينات تتأثر شحنتها عند ارتباطها بالأنتجين. وهذه الأجهزة المعتمدة على التغير في فرق الجهد الناتج من ارتباط الأنتجين الحر أو الجسم

المضاد على المواقع المتخصصة الثابتة. الكشف المباشر غالباً ما يؤدى إلى تغيرات بسيطة في فرق الجهد ولذلك فإنه يمكن الحصول على حساسية قليلة وانخفاض في الدقة. ومع أن هذه الأجهزة يعيبها تفاعلات الارتباط الغير متخصصة فنجد أنه في محاولة لزيادة حساسية هذه الأجهزة في الكشف فإنها تستعمل الإنزيمات المعلمة مع مواد التفاعل المناعية. حيث أنه في هذه الأنظمة يقوم المحول بتحويل النشاط الإنزيمي إلى إشارة فيزيائية يمكن قياسها وتكون داله في تركيز الانتجين أو الجسم المناعي وبالتالي تركيز الملوث. ويعض من هذه الأجهزة المعتمدة على قياس فرق الجهد متخصصة في دراسات الرصد البيئي للمبيدات. وعلى سبيل المثال ذكر Dzantiev وآخرون (2005) طريقة للكشف عن مبيد 2,4,5 trichlorophenoxyacetic acid تعتمد على ارتباط تنافسي بين المبيد الحر وإنزيم (البيروكسيديز) الذي يكون مرتبط مع الجسم المضاد الثابت على قطب الجرافيت وبالتالي تكون الإشارة الفيزيائية للإنزيم في وجود سلسلة من تركيزات المبيد وسيلة لعمل منحنى قياسي ثم بعد ذلك تقاس الإشارة الفيزيائية للإنزيم ومنها يمكن تقدير تركيز العينة المجهولة والإشارة الفيزيائية تكون دالة في نشاط الإنزيم الذي يكون نشاطه استجابة مناعة من الانتجين أو الجسم المناعي المرتبط بالإنزيم.

2- الأجهزة المناعية لقياس شدة التيار: Amperometric Immunosensors

أجهزة الكشف المناعية المعتمدة على قياس شدة التيار تعتمد على قياس شدة التيار الناتج من المواد النشطة كهربياً والتي تتأكسد أو تختزل عند القطب. ويكون التيار المتولد مرتبط مباشرة بتركيز هذه المواد النشطة كهربياً. كما توجد بعض من هذه الأجهزة المتخصصة في قياسات الرصد البيئي. وهى جميعها تقوم على الإنزيمات المعلمة للأجسام المضادة وكمثال على ذلك استعمل Skladal وآخرون 1994 جهاز تنافسي يعتمد على ناتج تحطم ثابت من المبيد والأجسام المضادة المعلمة من إنزيمات البيروكسيديز المسئولة عن تحطيم المبيد والحصول على ناتج التحطم هذا وبالتالي التغير في التيار الكهربي الناتج يكون دالة في نشاط الإنزيم وتركيز المبيد . مثل هذا الجهاز يسمح بالكشف عن مركبات -2,4 dichlorophenoxyacetic acid و2,4D حتى مستوى 0.1ppb.

د – الأجهزة المناعية الأخرى المعتمدة على طرق كهر وكيميائية أخرى:

هذه الأجهزة عبارة عن أجهزة الكشف المناعية التي تعتمد على خاصية التوصيل الكهربي وخاصية المقاومة الكهربية وتستخدم أيضا في الرصد البيئي للملوثات. ولقد طور بعض العلماء جهاز يسمح بالكشف عن الأترازين في حدود 0.025ppb باستخدام بوليمر يسمح بالتوصيل الكهربي حيث يتغير التوصيل الكهربي له في وجود اليود يد (I-3). تعتمد فكرة عمل الجهاز على أن جلوكوز أوكسيديز الذي يتنافس مع المبيد الموجود فى العينة يعمل على أكسدة الجلوكوز وإنتاج فوق أكسيد الهيدروجين ثم يقوم إنزيم أخر وهو اللاكتوز بيروزكسيديز باختزال فوق أكسيد الإيدروجين ويصاحب ذلك أكسده متتالية لايون اليود -I إلى(I-3) فيتغير التوصيل الكهربي ويكون ذلك دالة فى نشاط جلوكوز أوكسيديز الهدف الخاص بالمبيد والتغير اوالانخفاض فى التوصيل الكهربي يكون دالة فى نشاط الإنزيم و نشاط الإنزيم يكون دالة فى تركيز المبيد.

هـ – مميزات وعيوب أجهزة الاستشعار المناعية

وبسبب تخصصها العالي، فإن أجهزة الكشف المناعي تقدم مزايا هامة كبدائل لطرق التحليل التقليدية. ولتقدير متبقيات المبيدات فى ماء الشرب، فنجد أن الطرق القائمة فقط على تفاعلات الأجسام المضادة تتناسب مع تشريعات اللجنة الأوروبية التي تضع حدود قصوى للتركيز من 0.1ppb للمبيدات المنفردة و 0.5ppb للمجموع الكلى للمبيدات. وبالرغم من أن التطبيقات المناعية وطرق الكشف المناعي تعانى من أوجه القصور حيث أننا نجدها غالية الثمن وتسمح بالكشف عن مبيد واحد فقط أو تسمح بالكشف عن مركبات متشابهة فى تركيبها لذلك فإنه تم التركيز حديثاً على تطوير أجهزة الكشف والتي تسمح بالكشف عن مجاميع بصورة كاملة للملوثات والتي تستخدم كفهرس (دلالة) عامة للسمية.

4-1. تقدير متبقيات المبيدات باستخدام التقييم الحيوي: Bioassay

وهى طريقة حساسة ودقيقة لتقدير متبقيات المبيدات وتعتمد على إختيار كائنات حية حساسة جداً للمبيدات مثل حشرة الدفينا ويتم معاملتها بتركيزات قياسية مناسبة من المبيد

المراد تقدير متبقياته مع عمل معاملة كنترول بدون المبيد ويتم توحيد الظروف المختلفة من الضوء والحرارة والرطوبة وعمر الحشرة وحجمها والنوع والعدد وجميع العوامل الخاصة بتجارب التقييم الحيوي وعمل المكررات فى كل تركيز ثم يتم معاملة الكائن الحساس بالتركيزات القياسية وبعد 24 ساعة يتم أخذ الحى والميت وحساب النسبة المئوية للموت بإستخدام معادلة أبوت وعمل علاقة بين تركيزات المبيد والنسبة المئوية للموت ويتم إجراء نفس الخطوات على العينة المحتوية على متبقي المبيد مع الكائن الحساس بنفس العدد ونفس الظروف فى حالة التركيزات القياسية وبعد 24 ساعة يتم حساب نسبة الموت ومن خلال خط السمية يمكن تقدير تركيز المبيد فى العينة.

1- تربية الكائن الحساس.

2- اختيار الافراد للتقييم الحيوي.

3- تحضير محاليل المبيدات وعمل سلسة من التركيزات القياسية.

4- الاختبارات الاولية.

5- المكررات.

6- المقارنة.

7- تقدير نسب الموت للتركيزات القياسية ورسم علاقة بين التركيزات القياسية ونسب الموت.

8-معاملة الكائن الحساس بالعينة مجهولة التركيز وحساب نسبة الموت ثم ايجاد تركيز العينة المجهولة.

الفصل
الخامس

الطرق الكروماتوجرافية لتقدير متبقيات المبيدات

الفصل الخامس

تقدير متبقيات المبيدات بالطرق الكروماتوجرافية
Determination of pesticide residues by chromatographic methods

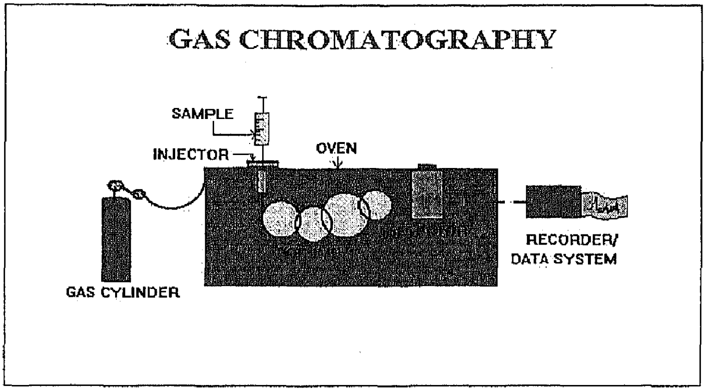
التحليل الكروماتوجرافى Chromatography analysis

هي طريقة طبيعية لفصل والتعرف وصفيًا وكميًا على مكونـات مخلـوط وهنالـك خاصية واحدة تتفق فيها كل أنواع الكروماتوجرافيا وهي أن عملية الفصل تعتمد على نوع المواد المراد فصلها بين وسطين أحدهما ثابت والآخر متحـرك.قـديمًا كـان يقتـصر الكروماتوغرافي على فصل المواد الملونة حتى تمكن العـالم الروسـى Tswett مـن اكتشاف الطرق الكروماتوجرافية وقام بفصل عصارة النبات على عمود معبأ بكربونات الصوديوم.نجد أن الكروموتوجرافيا يماثل التقطير التجزيئي الذي يعتمد علـى التحـرك النسبي لطورين ولكن في الكروموتوغرافيا نجد أن أحد الطورين يكون ثابتًـا ويعـرف بالطور الساكنStationary Phase والآخر يكون متحركًا ويـسمى الطـور المتحـرك Mobile Phase.

1- الكروماتوجرافى الغازي: Gas chromatography

يعد الكروماتوجرافى الغازي من أدق و أسرع وابسط و أهم طرق التحليل لفصل و تقدير مكونات أي مخلوط بدرجة عالية من الحساسية وتصل دقته فـى التقـدير إلـى مستوى البيكوجرام و ترجع سرعة انتشاره إلى تنوع الأعمدة والكشافات المـستخدمة فيه.

مكونات جهاز الكروماتوجرافى الغازي من الاجزاء الاتية كما هو موضح بالشكل 17:



شكل (17): مكونات جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازي (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

1-1. أسطوانة الغاز: Gas cylinder

حيث يوجد بها الغاز الخامل الذي يعتبر الوجه المتحرك mobilephase في الجهاز والغاز منه نواع كثيره وله شروط سيتم سردها فيما بعد

2-1. مكان حقن العينة: Rubber septum

وهو جزء مطاطي يتم حقن العينة فيه بطريقة يدوية وهناك الان اجهزة متطورة يتم الحقن فيها اليا باستخدام autosampler يكون لها سعةمحددة من دد لعينات وليكن 100 مثلا ويتم حقن العينات من خلال وحدة الكمبيوتر التى تلحق بالجهاز بادخال جميع بيانات العينات باستخدام برنامج عين قيتم حقن جميع لعينات اتوماتيكيا

1-3. فرن: Oven

ويحوى بداخله عمود حلزوني زجاجي به الوجه الثابت (سائل محمل على مادة صلبة داعمة فى حالة GLC أو مادة مدمصة فى حالة GSC).

1-4. الكشاف: Detector

وهو الجزء الذي تمر عليه المكونات المفصولة فتحدث لهذه المكونات تأثيرات

معينة تختلف باختلاف نوع الكشاف و عطى استجابة تكون دالة فى تركيز كل مكـون من مكونات العينة و يجد منها انواع مختلفة سيتم سردها لاحقا.

1-5. المكبر: amplifier

وهو يكبر استجابة الكشاف حتى يمكن قياسها.

1-6. المسجل: Recorder

وهو يحول الإشارة الواردة إليه من الكشاف فى صورة تيار كهربي أو غيره إلـى تسجيل فى صورة منحنيات لها زمن ظهور معين يعبر عن نوع كـل مكـون و لهـا ارتفاع او مساحة تكون دالة فى تركيز كل مكون.

وبناء على ما سبق يمكن إيجاد نظرية عمل الجهاز الآتي: فى أثنـاء مـرور الغـاز الحامل (carrier gas) تحقن العينة فى حجرة الحقن التي توجد عند بداية العمود المحاط بفرن ذو درجة حرارة ثابتة وبإجراء التسخين تتحول العينة إلى الصورة البخارية حيـث يحملها الغاز الحامل (يكون غالبا نيتروجين أو CO2 أو أرجون) إلى العمود الذي يحوى الوجه الثابت القادر على تأخير السريان بدرجات مختلفة لكل مكون من مكونات مخلوط العينة وبعد ذلك فإن المركبات المفصولة تخرج من العمود بعد فترات مميزة لكل مركب تسمى فترات الاحتجاز (Retention times) ثم تمر على نوع معين من الكشافات التي تعطى إشارة تعبر عن نوع وكمية كل مكون. وكقاعدة عامة إذا أريد تحليل عينة غازية فإنه من الممكن إجرائها على أعمدة إدمصاصية GSC بينما السوائل المتطايرة تفـضل بطريقة GLC وفيما يلى شرح مبسط لأجزاء الجهاز.

1-7. الغاز الحامل: Carrier gas

يعتمد اختيار الغاز الحامل على طبيعة العينة والكشاف المستخدم. ويجب أن تكـون الغازات المستخدمة أيا كان نوعها فى حالة جافة جـدا ومـن أمثلـة هـذه الغـازات النيتروجين ، CO_2 ، الأرجون والهليوم ويجب أن يمرر الغـاز قبـل مـروره علـى

مجففات drying tubes لتخليصه من أي آثار من بخار الماء. يتم تركيب فلتر و يستم توصيله بأنبوبة الغاز وذلك لإزالة الشوائب الموجودة بالغاز

الشروط الواجب توافرها فى الغاز الحامل:

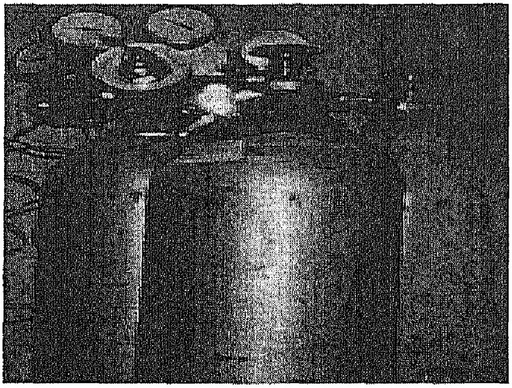
1- اللزوجة يستعمل غازات لزوجتها منخفضة لأن الغازات تزداد لزوجتها بزيادة درجة الحرارة عكس السوائل.

2- الانتشار يجب أن يكون الغاز ذو انتشار معتدل.

3- القابلية للانضغاط حيث أن هذه الخاصية هي المسئولة عن التغيرات فى معدل سرعة الغاز على طول العمود.

4- الأمان إذا ما أريد الأمان داخل المعامل يستخدم الهليوم المرتفع الثمن بدلا مــن الأيدروجين القابل للاشتعال.

وفيما يلى شكل (18) يوضح اسطوانات الغاز التي تستخدم فى الجهاز ويجب ضبط معدل تدفق الغاز أثناء عملية التحليل وتثبيته لان اى تغير فى معدل تدفق الغاز يــؤدى إلى تغير فى استجابة الكشاف وتغير فى وقت الاستبقاء وجــدول 1 يوضــح بعــض الغازات المستخدمة و معدلات التدفق الخاصة بها.



شكل (18): شكل اسطوانات الغاز الحامل فى الكروماتوجرافى الغازي.

جدول (6): معدلات اللزوجة والتدفق للغازات الخاملـة فـي جهـاز الكروماتوجرافى الغازي.

Diameter	Linear Velocity (cm/sec)		Flow Rate (mL/min)	
	Helium	Hydrogen	Helium	Hydrogen
0.18 mm	30-45	45-60	0.5-0.7	0.7-0.9
0.25 mm	30-45	45-60	0.9-1.3	1.3-1.8
0.32 mm	30-45	45-60	1.4-2.2	2.2-2.9
0.53 mm	30-45	45-60	4.0-6.0	6.0-7.9

1-8. حقن العينة: Injection of Sample

الكمية التي تؤخذ من العينة المراد فصلها إلى مكوناتها وتقديرها تعتمد على نوع وطبيعة هذه العينة كما تعتمد على حجم العمود ونوع وحساسية الكشاف ولكن عامة تستعمل عينات صغيرة تتراوح بين 0.1–10 مل للغازات والسوائل أما المواد الصلبة فتؤخذ مليجرامات قليلة. يمكن حقن كمية صغيرة من العينة السائلة مباشرة إلى عمود الفصل خلال سدادة رقيقة من مطاط السيليكون الذي يلتئم تلقائياً وذلك بإستخدام حقنة تنتهي .بإبرة مدببة . وفي بعض الأجهزة تحقن العينة في حجرة صغيرة مغلقة موجودة قبل بداية عمود الفصل مباشرة ومحفوظة عند درجة حرارة تكفي لتبخير العينة . ويقوم الغاز الحامل بنقل بخار العينة بسرعة من هذه الحجرة إلى عمود الفصل وتسمى هذه الطريقة التبخير الشراري (flash vaporization) أما العينات الغازية فتدخل إلى عمود الفصل بواسطة حقنة خاصة للغازات (gas-syringe)أو صمام خاص أما المواد الصلبة والسوائل اللزجة فإن الوزنة الصغيرة منها إما أن توضع فى أنبوبة صغيرة وهذه توضع فى تيار الغاز الخامل ثم يعمل لها تحطيم Crushing أو تذاب فى مذيب مناسب ثم تدخل بنفس طريقة العينات السائلة.و يراعى تنظيف المحقن بالمذيب قبل وبعد الحقن حتى لا يحدث انسداد

للإبرة. وبصفة عامة يجب أن تكون العينة المراد فصلها ثابتة تحت ظروف الضغط ودرجة الحرارة المستخدمة . وندخل العينة عادة بواسطة حقنها مباشرة عند قمة عمود الفصل من خلال سدادة مطاطية خاصة حيث يحملها الوسط المتحرك الغازي لتفصل على العمود وتصل مكوناتها المفصولة عند نهايتها ليكشف عنها بالكشاف المناسب.

1-9. الأعمدة: Columns

تصنع أعمدة أجهزة الغاز الكروماتوجرافى من عدة مواد إما زجاج أو بلاستيك أو معادن مثل النحاس والحديد. والأعمدة الزجاجية رخيصة وخاملة ولكنها سهلة الكسر أما الأعمدة البلاستيك من البولي إيثيلين فإنه ليس من السهل أن تتلف ولكن عيبها أنها تميل إلى عمل انحلال للسوائل العضوية من المادة المراد فصلها.

اختيار الأعمدة:

يعتمد اختيار الأعمدة على نوع العينة وخبرة المحلل مثلا العينة القطبية يختار لها أعمدة قطبية والعكس صحيح.

1-9-1. أنواع الأعمدة:

1- أعمدة الشعرية: Capillary columns

و هي عبارة عن أنبوب طويل 25-100م ذو قطر خارجي 0,2 - 1,2ملم و الأعمدة الشعرية غير معبأة و لكن يطلى على سطحها الداخلي طبقة رقيقة من الطور الثابت و هي ذات كفاءة عالية نظرا لطولها و لهذا تستخدم لفصل العينات المعقدة التركيب . نظرا لصغر سعة الأعمدة الشعرية فانه يجب تقليل العينة المستخدمة و يتم ذلك عادة باستخدام الحقن المجزء split injection و المقصود بذلك أن جزءا صغيرا فقط من كمية العينة المحقونة يدخل إلى العمود الشعري و الباقي يخرج خارج الجهاز.نظرا لطول الأعمدة الشعرية فإن الأسنان الناتجة عند استخدامها تكون ضيقة و حادة و مرتفعة و لهذا يفضل قياس ارتفاع السن بدلا من قياس مساحته كدالة لتركيز المادة.

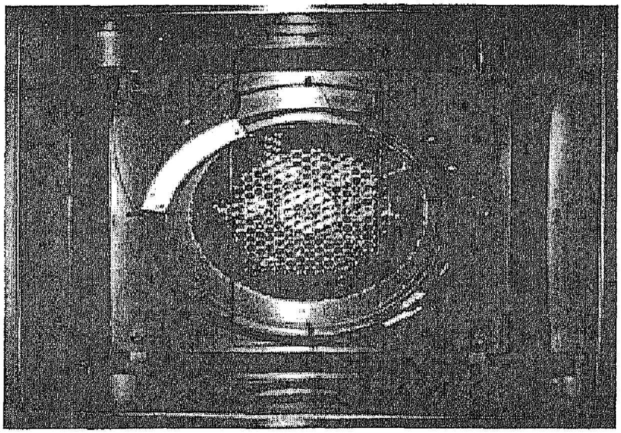
مميزاتها:

أ- تكون مستقيمة وتغطى بطبقة من الطور الثابت.

ب- أسهل كثيرا فى التعبئة من الأعمدة الحلزونية.

جـ- يعطى منحنيات حادة.

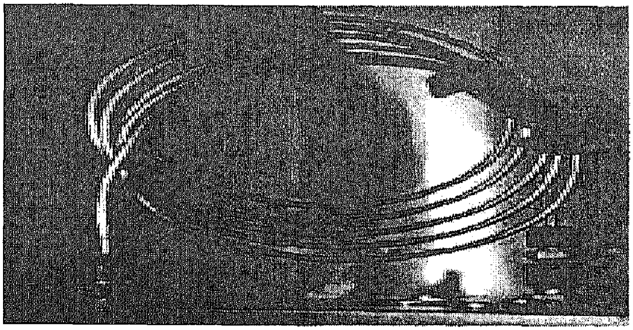
والشكل(19) التالى يوضح وضع هذه الاعمدة داخل الجهاز.



الشكل(19): شكل الاعمدة الشعرية داخل الجهاز.

2- الأعمدةالمعبأة: Packed column

- يملأ بحبيبات المادة الصلبة المساعدة المطلية بطبقة رقيقة من السائل الثابت و يصنع غالبا من الحديد الصلب و قطره الخارجي في حدود 3 -10 ملم و يتراوح طوله من 1-20 م كما هو بالشكل 20.يشترط في العمود المعبأ أن يكون الطور الثابت ثابت حراريا و غير متطاير عند درجة الحرارة المستخدمة و أن لا يتفاعل مع مكونات العينة .العمود المعبأ أكثر سعة و أرخص و أسهل استعمالا و يدوم مدة أطول و يناسب أغلب الأغراض. في الأعمدة المعبأة فإن السن (peak) يكون عادة عريض و لذا تقاس مساحته بدلا من ارتفاعه.



شكل (20): مثال لعمود معبأ.

ومن العوامل التي تؤثر على كفاءة التحليل الكروماتوجرافى الغازي هي ارتفاع العمود (طوله) ، حجم حبيبات المادة الصلبة فقد وجد أن 100-200 mesh تعطى كفاءة مناسبة وذلك على معدل سريان 30 مل/دقيقة أي أنه باستخدام الأعمدة الطويلة مع معدل السريان العالى يستخدم المدى الضيق من حجم الحبيبات. كذلك نسبة السائل إلى الصلب وهى 20-30% بالوزن وفى هذه الحالة تكون العينة المحقونة 4 ملليجرام. والتحميل الزائد (وضع كمية زيادة من العينة) يؤدى إلى إنتاج منحنيات peaks غير متجانسة أو حدوث تداخل بين المنحنيات وعموما يمكن سرد الاعتبارات الآتية:

1- نحصل على كفاءة عالية للأعمدة التي تحتوى على سوائل ذات درجات غليان مرتفعة وذلك باختيار أعمدة قصيرة 4-5 قدم ودرجة حرارة منخفضة ونسبة السائل إلى الصلب 5%.

2- أما العينة ذات درجة غليان منخفضة فيلزم لها أعمدة طويلة لزيادة كفاءتها.

3- فى الأعمدة العادية تحضر بحيث تكون هناك ممرات للغاز للمرور بين الحبيبات فإذا حدث خطأ فى العمود يعطل هذا المرور فإن الوقت الخاص بمرور الغاز حاملا للمكونات سوف يختلف وهذا سوف يجعل الـ peaks الناتجة مفلطحة مثلما يحدث فى حالة ما إذا كانت العجينة فى العمود غير منتظمة ولتلافى هذا الخطأ يمكن استخدام الأعمدة المغطاة من الداخل بواسطة

الوجه السائل النشط دون الحاجة إلى مادة حاملة صلبة وتكون المادة السائلة على صورة فيلم رقيق على سطح العمود من الداخل واتضح أن هذا النوع يعطى نتائج جيدة وأمكن بها فصل مشابهات الزيلين باستخدام مادة benzoqunoline 7-8 كمادة سائلة للعمود وهذا النوع من الأعمدة يسمى coated capillary columm ويستخدم فى حالة صغر العينة ويعطى منحنيات حادة ونتائج جيدة.

4- تأثير الوجه الثابت stationary phase ويقصد به هنا المادة الصلبة والسائل الغير نشط المحمل عليها.

ويتم اختيار الوجه الثابت (السائل) على حسب نوع المادة المراد فصلها والمدى الحراري المستخدم ويلزم أن تكون مادة السائل غير متطايرة ويجب أن تستخدم المادة السائلة على درجات الحرارة الموصى بها حتى لا يحدث للعمود ظاهرة الإدماء bleeding أي خروج المادة السائلة من الحبيبات الصلبة ومن أشهر السوائل المستخدمة كوجه ثابت هي Apezone-silicon gum , dimonyl phthalate وهى مواد قطبية كذلك الكحولات العالية والأسترات ، Polyglycoil وهى شديدة القطبية.

أما المادة الصلبة التي تحمل الوجه الثابت من أمثلتها الألو مينا ، السيليكاجيل ، الفحم النشط ، celite (مواد دياتومية) ، بودرة الزجاج ، ويجب أن تكون هذه المواد متجانسة فى أحجام الحبيبات ويحمل عليها المادة السائلة جيدا حتى لا تحدث ظاهرة التذييل Tailing منحنيات (peaks) غير منتظم الشكل لها نهاية حادة وينتهي بذيل منتشر كما فى الشكل.

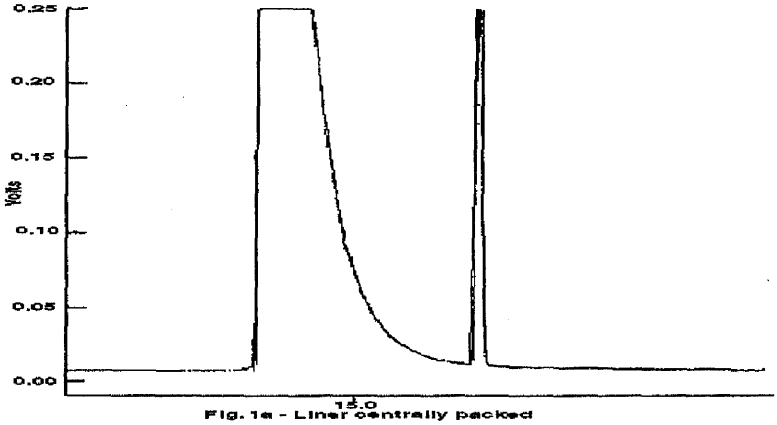
1-9-2. شروط المادة الدعامية:

1- يجب أن تكون مسامية أي تعطى مساحة سطح عالية.
2- يجب ألا يدمص المواد المراد فصلها.

3- يجب أن تكون خاملة كيماويا.

4- يجب أن تكون جزيئاتها ذات حجم واحد.

5- يجب أن تكون ثابتة تحت درجات الحرارة المختلفة.



شكل (21): تأثير عدم تجانس حبيبات المادة الصلبه التي تستخدم فى تعبئة أعمدة الكروماتوجرافى الغازي

3-9-1. طرق تحضير وتجهيز العمود: Columm packing, preparation

1- تطحن المادة الصلبة المالئة وتغربل إلى 100-120 مش (mesh) ثم تعامل بحامض HCl طول الليل ثم ترشح وتغسل ثم تعامل طول الليل بقلوى ثم ترشح وتغسل.

2- تجفف البودرة لمدة 6 ساعة على 120°م ثم تغربل مرة أخرى للتخلص من الحبيبات الناعمة ثم توزن الكمية المطلوبة وكمية السائل المناسبة.

3- يذاب الوجه الثابت (السائل) فى مذيب مناسب ثم تضاف البودرة إليه وتقلب العجينة ويبخر المذيب ثم تجفف البودرة المعاملة لمدة 3 ساعات على 100°م ثم تغربل وتعبأ فى العمود الزجاجي مع ملاحظة أنه قد يستعان بضبط هوائي

خفيف على طرف العمود بخفة بواسطة مطرقة خشبية فى نهايتها قطعة من المطاط ويسد نهاية العمود بالصوف الزجاجي ثم يوصل الطرف الأخر بواسطة مصدر الغاز الخامل وينتج الغاز بضغط مناسب (15 رطل/بوصة) لمدة ساعتين ويسد طرف العمود ويكتب عليه بياناته ويخيط لحين الاستعمال.

4- تهيئة العمود: وهى عملية إعداد العمود للاستخدام وهى تشمل تهيئة بالحرق الحراري للتخلص من الشوائب المتطايرة و هناك عملية تهيئة بالسيللة وهى معاملة العمود بمادة bistrimethyl silyl acetamide وذلك بغرض تفاعلها مع المواضع النشطة فى العمود فتؤدى إلى إزالتها.

5- الفرن المستخدم ودرجة الحرارة: يجب إجراء التحليل الكروماتوجرافى الغازي تحت درجة حرارة معينة لأن التحليل يعتمد على تحويل مخلوط المواد إلى أبخرة تزاح مع تيار الغاز الخامل. ودرجة حرارة غرفة الحقن هي التي تحدد معدل تبخير العينة ويلزم تثبيت درجة الحرارة أثناء التحليل بحيث تكون درجة حرارة المحقن (مكان الحقن) Injector أعلى من درجة حرارة العمود بحوالى 550م حتى لا تتكثف الأبخرة فيه ومعروف أنه بارتفاع درجة الحرارة تزيد سرعة الفصل ويقل زمن التحليل ولكن يجب ألا تتعدى الدرجة التي يتحطم عليها المركب المراد تحليله ولذا يلجأ إلى خفض درجة تطاير المركب المراد فصله عن طريق عمل مشتقات منه Derivatives مثال ذلك على عملية methylation للأحماض لتحويلها إلى أسترات حتى أن الأسترات أكثر تطايرا من الأحماض.

كفاءة الفصل: Resolution efficiency

هو النسبة ما بين المسافة المحصورة بين قمتي Two peaks متجاورين إلى متوسط عرض قاعدته كما بالمعادلة التالية وهو مقياس يعبر عن كفاءة فصل المكونات داخل العمود كما بالشكل 22.

$$R= T_2-T_1/W$$

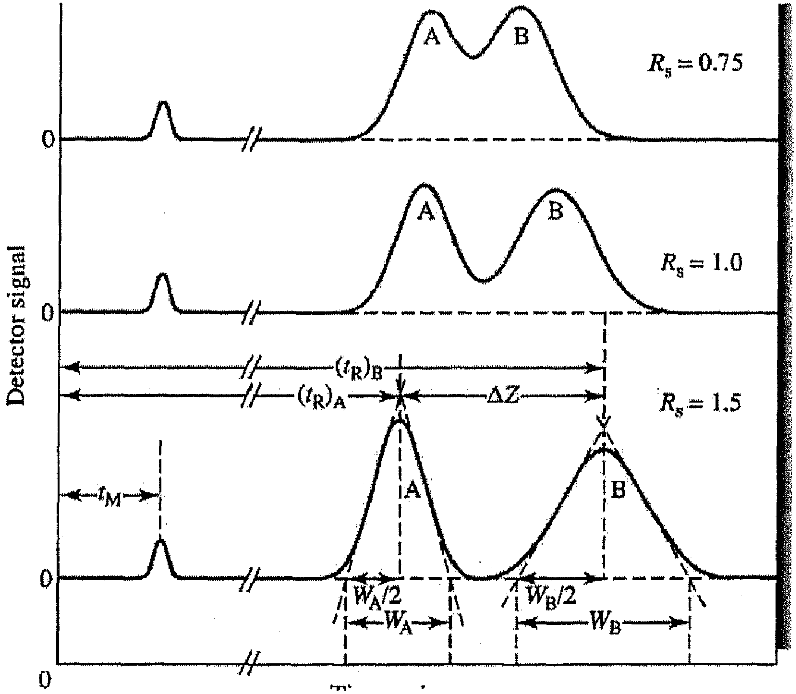
حيث:

T_2-T_1 = زمن فصل قمة البيك الأول والثاني.

R = معامل الفصل.

W = متوسط قاعدة القمتين(Two peaks).

وكلما كان معامل الفصل (R) أكبر من الواحد يعتبر الفصل مناسب.



شكل (22) : تاثير معامل الفصل على كفاءة العمود.

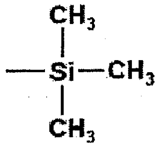
عملية الاشتقاق : Drevatization

هي عملية تستخدم فى حالة المركبات غير الثابتة حراريا وتتحطم أثناء عملية التحليل وهى تتم بإدخال المركب الأصلي الغير ثابت حراريا فى تفاعل كيماوي يؤدى

فى النهاية إلى تكون مشتق أو مركب جديد ثابت حراريا وتفاعلات الاشتقاق تنقسم إلى ثلاثة أنواع:

أ- Silylation:

وهى عبارة عن استبدال الأيدروجين النشط فى المركبات الغير ثابتة حراريا مثـل الكحولات والأمينات والكيتونات بمجموعة trimethylsilyl وهى مفضلة أكثر فى حالة الأمينات.



Trimethylsilyl group

ب- Alkylation:

وهى عملة استبدال الأيدروجين النشط فى المركبات الغير ثابتة حراريـا بواسـطة مجموعة اليفاتية أو مجموعة اليفاتية أرومانية وتستخدم مع الأحمـاض الكربوكـسيلية والفينولات وكذلك الثيوأثير.

جـ- عملية Acylation:

وهى إدخال مجموعة الاسيل (RCO) محل ذرة الإيدروجين فى المركب

R–CO–CO-R + R'–O–H = R–CO–O–R' + R-CO-O-H

برمجة درجة الحرارة: Temperature program

قد يلزم الأمر أثناء التحليل التدرج فى رفع درجة الحرارة مع الـزمن وذلـك حسب طبيعة المكونات فمثلا لو كان لدينا خليط من المركبات بعضها درجة غليانه منخفضة والباقي درجة غليانه مرتفعة فيلزم استخدام مستويان من درجات الحرارة فدرجات الحرارة المنخفضة تعطى فصل أفضل للمنحنيات الأولى وبارتفاع درجة

الحرارة يتم فصل المنحنيات البعيدة. هذا وعملية برمجة درجة الحرارة تستخدم لفصل مركبات ذات درجة غليان متباعدة أكثر من 100°م فرق. وفي جميع الحالات يجب ألا تزيد درجة الحرارة عن حد معين لأن ذلك يؤدى إلى تحطيم المركب ، كما يؤدى إلى ظاهرة الادماء (bleeding) ، قد يحدث تنشيط للمادة الخاملة الصلبة (تنشيط للإدمصاص) وهذا غير مرغوب فيه.

10-1. الكشافات: Detectors

تعتبر الكشافات أحد الوحدات الهامة فى جهاز الـ GLC ,HPLC حيث أنها الوسيلة التي يمكن بواسطتها التعرف على وقياس كمية المكونات التي تحت الاختبار والتي تحمل بواسطة تيار الغاز من عمود التجزئة ويجب أن يتوفر بالكشافات الصفات الآتية:

1- البساطة فى التركيب والأمان فى التشغيل.
2- الحساسية العالية للتركيزات الصغيرة مع الاستجابة السريعة لتسجيل التغيرات.
3- الثبات أثناء التقدير مع الملائمة للمواد التي يتم تقديرها.
4- سرعة الاستجابة.
5- الاستجابة خطية مع التركيز.

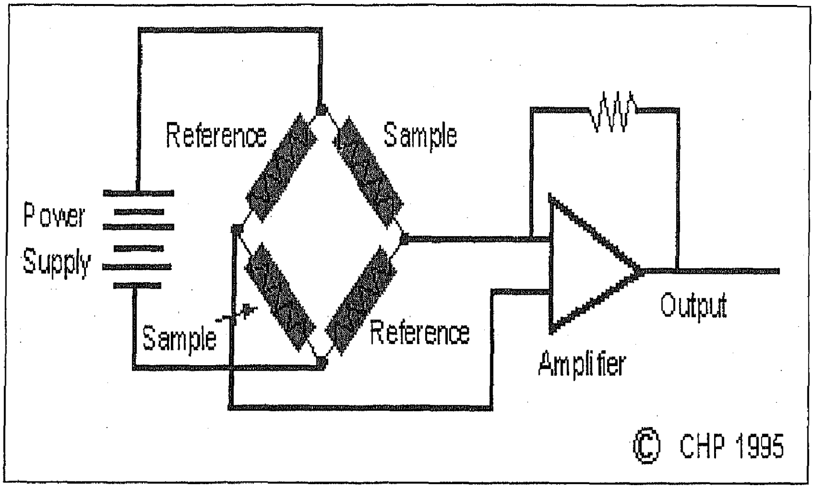
هذا ويتم تصميم تلك الكشافات باستغلال أحد الصفات المميزة للمركب المراد تقديره مثل حجم الجزئ ، الكثافة النوعية ، التأين ، امتصاص الأشعة ، الاشتعال ، التوصيل الكهربائي أو الحراري. فالكشافات إذا تستخدم كدالة لأي تغير بواسطة مكونات العينة لذا فإن الاستجابة يمكن أن تتحول إلى إشارة كهربية يحدث لها تكبير ثم تسجيل وفيما يلى أنواع الكشافات.

1- كشاف التوصيل الحراري:

Thermal conductivity detector (TCD)

يتكون هذا الكشاف كما بالشكل (23) من قناتين من النحاس فى كتلة معدنية وفى

كل قناة سلك بلاتين وله درجة عالية من المقاومة وكل من السلكين لهما نفس المقاومة ويكونان ذراعين لقنطرة wheatstone وعند مرور الغاز الحامل النقى فى أحد القناتين يتم ضبط التيار فى القنطرة بحيث يتم تسخين الأسلاك إلى درجة حرارة معينة ويمكن التحكم فيها عن طريق ترموستات ويمرر الغاز الآتى من العمود (غاز + العينة) فى القناة الأخرى. وتعتمد الفكرة هنا على أن لكل مادة درجة معينة من التوصيل الحراري ويسبب التغير فى التوصيل الحراري لبخار عينة المادة المجهولة تغيـر فـى درجـة حرارة السلك وبالتالي تغير فى درجة مقاومته الأمر الذي يؤدى إلى عدم اتزان القنطرة ويحدث التأين (عدم الاتزان) الذي يسجل ويتناسب عدم الاتزان هذا مع تركيز أبخـرة المادة المفصولة وعدم الاتزان هذا يكبر ويسجل فى صورة peak.

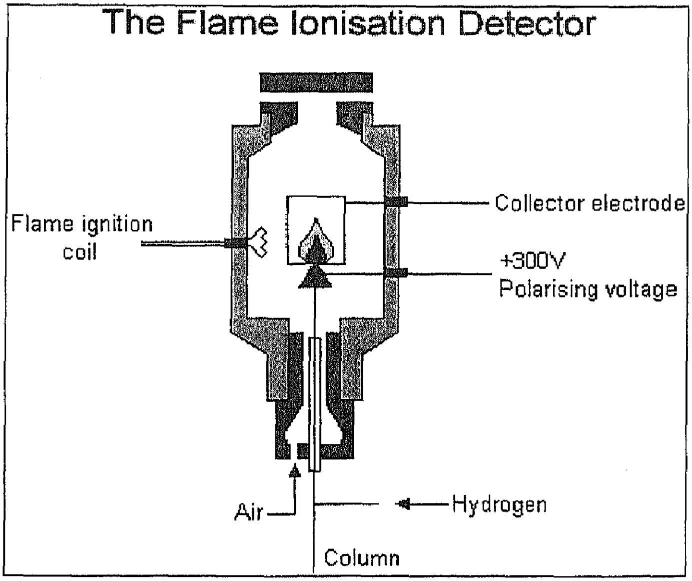


شكل (23): تركيب كشاف التوصيل الحراري.

2- كشافات التأين: Ionization Detectors

وفيه نجد أن المركبات الناتجة أو المنبثقة من العمود تتأين عندما تدخل الكشاف بأي طريقة مثلا بواسطة مصدر إشعاعي أو بحرق العينة الموجودة بالغاز بواسطة الحرارة

العالية كما بالشكل (24) وبالتالي يمكن الحصول على أيونات لأن المـواد العـضوية تتآين فى اللهب والأيونات الناتجة تجمع بين الكترودين ويقاس التيار الكهربائي النـاتج الذي يتناسب مع عدد الأيونات المتكونة (وبالتالي مع تركيز الأبخرة المزاحة فى الغاز الحامل) ومن أهم أنواع هذه الكاشفات Hydrogen flame ionization detector(FID). حيث يستخدم غاز الهيدروجين كغاز حامل وعندما يصل هذا الغاز إلى الكـشاف فـى وجود الهواء كمادة مؤكسدة يتم حرقة فيعطى لهب عديم اللون حيث يتم حرق العينـة وتأينها كما سبق.



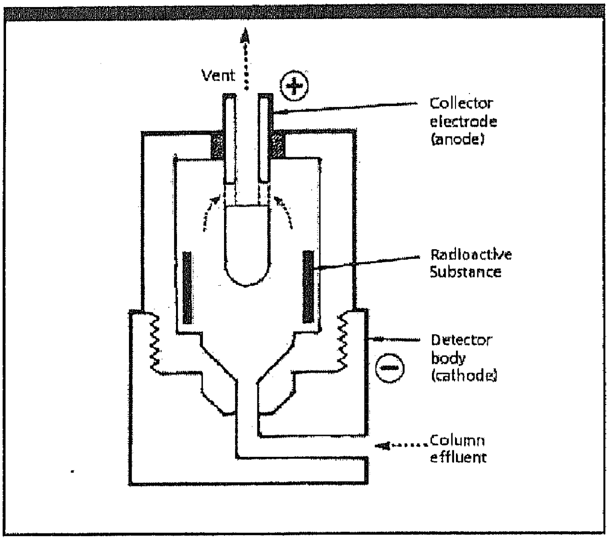
شكل (24): تركيب كشاف التأين في اللهب.

وهذا الكشاف حساس بالنسبة للمواد التي تحتوى على كربون و إيدروجين بينما هو أقل حساسية للمركبات العـضوية المحتويـة علـى ذرات أخـرى غيـر الكربـون والإيدروجين مثل الهالوجين والكبريت.

3- كشاف الالتقاط الالكتروني

Electron capture Detector (ECD)

وفى هذا الكشاف كما بالشكل (25) يستخدم مصدر مشع يتكون مـــن H^3 أو Ni^{63} ينتج جسيمات ألفا أو بيتا والتي تؤدى إلى تأين الغاز الخامـــل إلـــى أيونـــات موجبـــة والكترونات حرة وهذه يمكن قياس التيار الكهربائي النـــاتج عنهـــا بـــين الكتـــرودين مشحونين وعند مرور العينة (مكونات بخار الخليط) خلال الالكترودين يتغيـــر التيـــار الأصلي بدرجة تتناسب مع تركيز المادة المارة وبمعنى أدق تتناسب مع قـــدرة المـــادة على جذب الشحن السالبة Electro-negativity فالمركبات التي تحتوى على مجـــاميع قوية لجذب الشحن السالبة سوف تقتنص (Capture) قدر أكبر من الالكترونات الحـــرة وبالتالي سوف تنخفض شدة التيار الأصلي بنفس المقدار وعلى العكس من ذلك تكـــون المركبات ذات القدرة الضعيفة على جذب الشحن السالبة (الالكترونات).

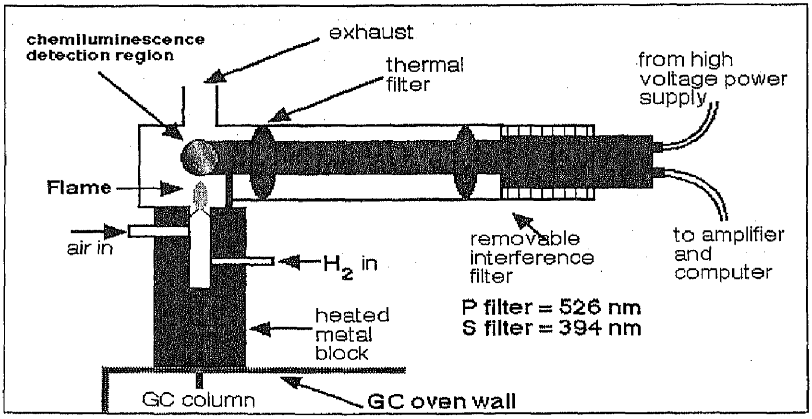


شكل (25): تركيب كشاف الالتقاط الالكتروني.

ومن هذا يتضح أن هذا الكشاف حساس جدا للمركبات التي تحتوى على هالوجين – فوسفور – رصاص – مجاميع نيترو – المركبات الحلقية العطرية متعددة الأنوية وهى مناسبة جدا لتقدير كميات صغيرة من المبيدات الحشرية.

4- كشاف الانبعاث فى اللهب: Flame photometric Detector(FPD)

هذا الكشاف كما بالشكل (26) يعتمد على أن المركبات عند احتراقها تميل إلى إخراج ضوء له أطوال موجية معينة مميزة للعناصر الموجودة فى العينة وخاصة الفوسفور والكبريت والتي ينبعث منها أشعة ذات أطوال موجية 256 ، 394 نانوميتر على التوالي. حيث أنه عندما يتم حرق العينة باستعمال لهب غنى بالأيدروجين تثار مكونات العينة وينتج منها أشعة لها طول موجي معين وبقياس كثافته يكون دالة فى تركيز العينة. وهذا الكشاف مفيد جدا فى تحليل المركبات المحتوية على الكبريت والفوسفور.يختلف هذا الكشاف عن كشاف التأين فى انه يتم حرق العينة الدرجة الإثارة فقط وتقاس الأشعة المنبعثة أما كشاف التأين فيتم حرق العينة حتى التأين ويقاس التيار الناتج.



شكل (26): تركيب كشاف الانبعاث في اللهب (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

11-1. المبكر والمسجل: Amplifier & Recorder

تقريبا كل الكشافات تعطى إشارات كهربائية صغيرة عندما تمر خلالها المكونات المنبثقة من العمود وهذه الإشارات ضعيفة جدا ولذا تمر خلال مكبر قبل أن تصل إلى المسجل ويحتوى المسجل جزئين رئيسيين شريط من الورق يتحرك بسرعة مختارة وقلم متحرك والذي ينشط بواسطة الإشارة الآتية من المكبر.

برنامج الجهاز: Gas-chromatography program

ادخل هذا المصطلح حديثا لأي مادة يراد تحليلها ويجب أن يشتمل هذا البرنامج على ما يلي:

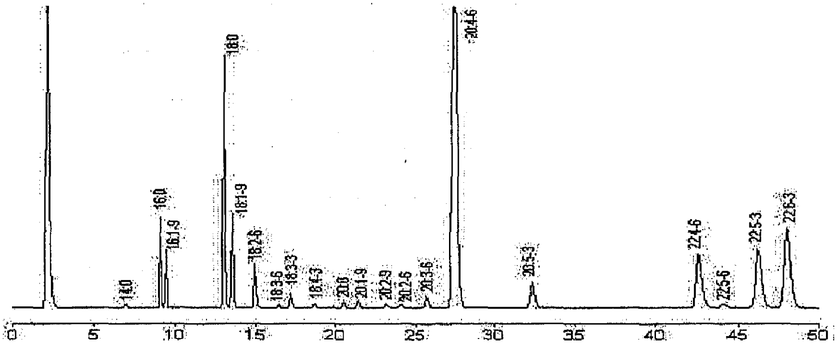
1- نوع مادة وعاء العمود وطوله ونصف قطره الداخلي والخارجي.
2- نوع الكشاف detector الموجود.
3- نوع المادة المالئة للعمود من حيث نوع ، حجم وتوع حبيبات المادة الصلبة.
4- درجة حرارة التحليل لكل من العمود ، الكشاف.
5- معدل تسجيل منحنيات العينة.

التحليل الوصفي في الكروماتوجرافى الغازي: Qualitative analysis

يلزم توفر المواد القياسية النقية Pure standards بحيث يتم تحليلها تحت ظروف معينة ثم يتم تحليل العينة المجهولة تحت نفس الظروف ثم عن طريق مقارنة الـ RV, RT يمكن معرفة العينة المجهولة وهى قيم مميزة للمادة أو المركب المفصول تحت ظروف معينة وفيما يلى تعريف لهذه القيم:

1- زمن الإعاقة Retention Time (RT)

الزمن الذي يمر بين حقن العينة فى الجهاز وحتى الحصول على الـ peak (قمة المنحنى الخاص بالمكون المفصول). بمعنى أنه الوقت اللازم لخروج أو انبثاق المركب من العمود ويمكن توضيحه على الكروماتوجرافى الناتج من الجهاز كما فى الشكل 27.



شكل (27): زمن الإعاقة للمركبات التي تنفصل من العمود فى جهاز الكروماتوجرافى الغازي.

الموضح أعلاه عبارة عن الكروماتوجرافى الناتج من تحليل عينة تم فصلها إلى مكوناتها وكل مكون من مكونات العينة له (RT) وهكذا ويلاحظ أن عدد القمم peaks الناتجة يمثل عدد مكونات العينة المراد تحليلها.

كل مركب له Rt محدد يظهر عنده ويعتمد على خواص المركب نفسه وبالتالي يمكن استخدامه فى التعرف على المركبات المختلفة. ولكن هذه القيمة Rt ليست متخصصة جدا كما فى طيف الكتلة للمركب أو طيف الاشعة تحت الحمراء IR) وذلك لأن Rt لا يعتمد فقط على تركيب المركب ولكن على نوع وتركيب الوجه الثابت والمتحرك ومدى تدفق الوجه المتحرك وأبعاد العمود. وعند ثبات جميع الظروف يبقى اختلاف حساسية الجهاز من حقنة إلى أخرى وللتغلب على هذا يتم إضافة IS( ) internal standardمع المركب المراد التعرف عليه (unknown) وكذلك يضاف المادة القياسية ويتم حساب Relative Rt وذلك بقسمة قيمة Rt للمادة القياسية على Rt لـ I.S ونفس الشئ من قسمة قيمة RT للمادة المجهولة على RT لـ I.S ومقارنة القيمتين وهذه الطريقة تساعده فى التغلب على الظروف المختلفة التي تتحكم فى قيمة RT لأي مركب.

2- حجم الإعاقة Retention volume (RV)

وهو حجم الغاز اللازم لإخراج المركب من العمود إلى الكشاف وبتعبير أخر هـو حجم الغاز الخامل المنبثق من العمود قبل انبثاق المكون المعطى من العمود ويحسب بضرب زمن الإعاقة فى معدل سريان الغاز. ويمكن حساب RV^0 (القيمة المصححة للـ Corrected retention volume RV باستخدام معادلات حيث أن الـ RV يتوقف على ضغط وحرارة العمود أثناء عملية التحليل ولذا يلزم أولا حساب متوسط الضغط فى العمود P^- باستخدام معادلة الغازات التالية:

$$P^- = P_0/J \; \frac{2[(P_i/P_0)^3 - 1]}{3[(P_i/P_0)^2 - 1]} \; P^- = P_0\,X$$

حيث:

P^- = متوسط الضغط فى العمود

P_i = inlet pressure ضغط الغاز الداخل إلى العمود

P_0 = outlet pressure ضغط الغاز الخارج من العمود

J = The pressure drop correction factor (معامل تصحيح خاص بالضبط)

وبالتالي يمكن حساب RV0 كما يلى:

$$\mathbf{RV^0 = RT.F.J}$$

حيث: Retention time = RT

Flow rate = F

J = سبق توضيح معناه.

التحليل الكمي فى الكروماتوجرافى الغازي

Quantitative Analysis in GC

يتم التحليل الكمى لمتبقيلت ملركبما عن طريق عمل مجموعة من التركيــزات القياسية التي تغطى مدى التركيز الموجود بالعينات ويتم حقنها فى الجهاز ثم يقاس مساحة أو ارتفاع البيك لها. ثم يتم عمل منحنى قياسي عبارة عــن علاقــة بــين مساحة أو ارتفاع البيك على المحور الصادي والتركيزات على المحور السيني.ثم يتم حقن العينة المجهولة و قياس مساحة أو ارتفاع البيك و من خــلال المنحنــى القياسي يمكن تقدير تركيز المادة المجهولة. حيث انه من المعــروف أن مــساحة المنحنى الناتج على الكروماتوجرافى تتناسب مع تركيز المركب المفصول مباشرة وفى حالة المنحنيات الضيقة ذات القمم العالية يؤخذ الارتفاع كمقيــاس للمــساحة. والذي يحدث أننا نقيس المساحة تحت كل منحنى بأي من الطرق الآتية:

1- استخدام البلانتيميتر Planimeter أو أي جهاز لقياس المساحة وذلك فى حالــة المنحنيات الغير منتظم والمعقدة.
2- حساب مساحة المثلث وذلك بعد عمل مماسات للمنحنى عند نقط الانقلاب.
3- بالإضافة إلى هذا وقد اخترعت طريقة الكترونية لحساب المساحة أوتوماتيكيا تعرف بالــ integrators تكون ملحقة بالجهاز وتعطى الرقم مباشرة وفى كــل ما سبق نجد أن التركيز يتناسب مع المساحة.

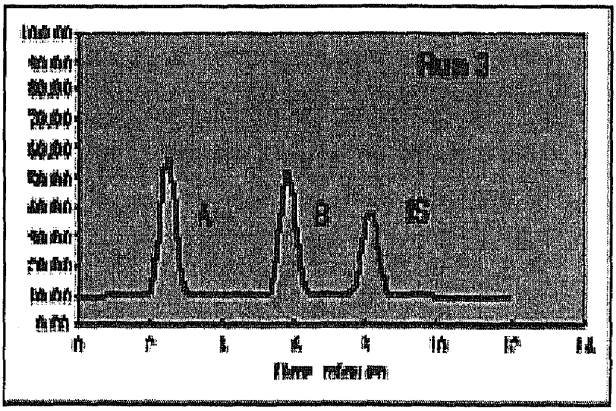
ملحوظة:

قد يحدث أحيانا أن نحصل على منحنيات غير واضحة (تمثل فصل غير جيد) حيث تكون المنحنيات متداخلة ويمكن علاج ذلك بتكملة كل منحنى على حده علــى امتــداده الطبيعي وحساب مساحة كل منحنى على حده ولا يصلح الحساب بهذه الطريقة إذا كان الفرق بين ارتفاعي المنحنيين أكبر من نصف ارتفاع الأكبر.

*المعايرة الداخلية باستخدام مادة قياسية داخلية :

Internal standard calibration

هناك مشكلة فى عملية التقدير الكمي بواسطة الغاز الكروماتوجرافى و هي اختلاف حساسية الجهاز من حقنة لأخرى وللتغلب على ذلك تضاف مادة معروفة ومعلومة التركيز للعينة وكذلك للتركيزات القياسية المستخدمة فى عمل المنحنى القياسي ويتم حقن العينات وأخذ النتائج كما فى الشكل (28) ورسم المنحنى القياسي والذى يعبر عن العلاقة ما بين تركيز المادة القياسية ونسبة مساحة البيك Peak area ratio للتركيزات القاسية و يتم حساب ونسبة مساحة البيك Peak area ratio بقسمة مساحة البيك للتركيزات القياسية على مساحة البيك للمادة القياسية المضافة و بعد رسم المنحنى القياسي يتم حساب ونسبة مساحة البيك Peak area ratio للعينة المجهولة و من خلال المنحنى القياسي يتم تقدير تركيزها اى اختلاف فى حساسية الجهاز لا يؤثر على التركيز لأنه يحدث للمادة القياسية الداخلية و المادة المراد تقديرها معا و بالتالي تظل النسبة ratio ثابته. وتعتبر هذه الطريقة أدق من الطريقة السابقة وتساعد فى التغلب على تغير حساسية الجهاز.



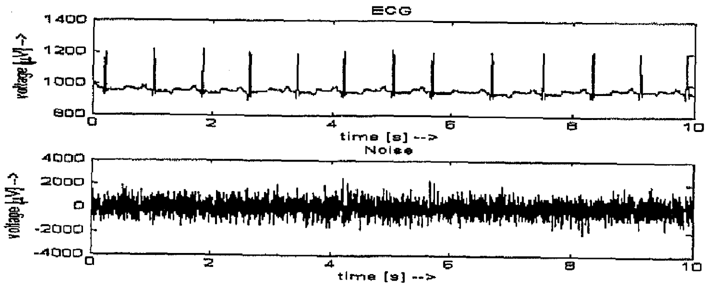
شكل (28): المنحنيات الخاصة بالمواد المراد تقديرها والمادة القياسية الداخلية (I.S).

المعايرة الخارجية : External standard

وهذه الطريقة فى المعايرة تستخدم فى حالة افتراض أنه يمكن أن يكون هناك تداخل بين المكونات الأخرى بالعينة والمركب المراد تحليله. حيث انه فى الظروف المثلى بالنسبة للتحليل الكروماتوجرافى نجد أن عملية الفصل سوف تبعد مخلوط المواد الموجودة مع المركب المراد تقديره وبالتالي يكون وقت الظهور المركب Rt منفصل عن المكونات الأخرى وبالتالي لسنا بحاجه لحقن المذيب أو البلانك لمعرفة هل هناك تداخل بين مكونات العينة الأخرى والمركب المراد تقديره. أما إذا كان هناك تداخل بين مكونات العينة و المركب المراد تقديره فيجب حقن عينة بلانك باستخدام نفس المذيب الخاص بالعينة ويجب أن تكون بنفس طريقة إعداد العينة ومن نفس الوسط الموجود فيه المركب المراد تقديره وهذه سوف تؤكد لنا غياب المنحنى الذي يمكن أن يتداخل مع منحنى المركب المراد تقديره أم لا؟ وإذا وجدت هذه المنحنيات المتداخلة فإنه يجب ضبط ظروف الفصل فى الجهاز وذلك لفصل هذه المنحنيات عن منحنى المركب المراد تقديره. ايضا المعايرة الخارجية يمكن استخدامها فى حالة ما يكون المنحنى القياسي غير خطى والتركيزات التي خارج حدود الخطية من هنا يمكن التغلب على ذلك بتخفيف التركيزات لتكون فى نفس المدى الخطى من التركيزات ويعاد حقنها مرة أخرى. فى حالة إذا كان المنحنى القياسي غير خطى يمكن استخدام لوغاريتم التركيز لتحويله إلى منحنى خطى اى رسم علاقة بين استجابة الجهاز و للوغاريتم الطبيعى للتركيز وليس التركيز نفسة. دقة هذه الطريقة تعتمد على ثبات إعداد العينة وحجم العينة المحقونة وحساسية الكشاف المستخدم. ولتقدير تركيز العينة المجهولة يتم عمل منحنى قياسي عبارة عن علاقة بين مساحة البيك على المحور الصادي و لوغاريتم التركيزات القياسية على المحور السيني و يمكن حساب التركيز عن طريق قسمة مساحة البيك العينة المجهولة على ميل الخط.

*الإشارة والذبذبة: Signal-Noise

معظم أجهزة التحليل تقيس أو تعتمد فكرتها على قياس خاصية طبيعية أو كيماوية للمركب المراد تحليله على سبيل المثال: كمية الأشعة الممتصة بواسطة المركب المراد تحليله عند طول موجي معين. أو نسبة الشحنة إلى الكتلة والتي تنتج فى المادة المراد تحليلها أو التغير فى التوصيل الكهربي ثم يتم قياس ذلك عن طريق الكشاف ثم يتم تحويل استجابة الكشاف إلى إشارة كهربية وهذه الإشارة يجب أن تكون راجعة إلى الخواص الطبيعية أو الكيماوية للمركب الذي يتم قياسه وتتناسب مع كمية هذا المركب. وعندما لا يكون هناك مركبا منطلقا فانه لايمكن ان توجد إشارة. عندما يكون تركيز المادة عالي ويستطيع الجهاز اكتشافها يكون الخط القاعدى baseline خط مستقيم. ولكن عندما يكون تركيز المادة المراد تحليلها منخفض نجد أن الإشارة تقل وتقترب من baseline أو خط الأساس وحينئذ يوجد إشارة عشوائية تسمى noise.ونجد كل الإشارات التي يتم قياسها تحتوى على ألإشارة الخاصة بالمركب المراد تحليله وكذلك الإشارات غير المرغوب فيها وهى noise مما يؤدى إلى عدم دقة فى عملية التحليل وهذه الذبذبة يمكن أن تأتى أو تظهر نتيجة تغير فى power الخاص بالجهاز وبعض الأجهزة المجاورة الموجودة مثل الراديو والتليفزيون واى من الذبذبات التي تصدر من أماكن قريبة من الجهاز والموتورات الكهربائية.



شكل (29): يوضح شكل noise على الكروماتوجرام الخاص بجهاز GLC.

و لهذا تستخدم نسبة الإشارة الخاصة بالمركب المراد تحليله إلـى الذبذبة (S/N ratio) لمقارنة كفاءة طريقة التحليل والأجهزة وعند تحليل أو قياس عينة لأكثر من مرة فإن الاختلافات فى القياس يمكن تسميتها noise ولهذا يعبر عن الذبذبة noise بالخطأ القياسي لعدد مرات تحليل العينة. حيث آن M تعبر متوسط قيمة الإشارة المقاسة و ,SD هو الخطا القياسي لعدد مرات التقدير بقسمة متوسط قيمة الإشارة على الخطا القياسي يعطى رقم كلما كبر هذا الرقم كلما زادت دقة التحليل و العكس صحيح كما فى المعادلة التالية:

$$\frac{S}{N} = \frac{mean}{STD}$$

***حد الكشف: Detection Limit (DL) or Limit of Detection(LOD) :**

هو أقل تركيز فى المركب يمكن أن يظهر له بيك على الجهاز ويمكن قياسه بحقن عدد من المكررات الخاصة بأقل تركيز من المركب ويعرف أيضا على أنه التركيز الذي يكافئ النسبة بين الإشارة إلى الذبذبات 3: 1. وبحساب SD والذي يعبر عن الذبذبات الموجودة فى الجهاز وبضرب SD فى 3 يعطى حد الكشف للجهاز Limit of detection.

***حد التقدير: Limit of Quantitation(LOQ)**

يجب ان نعلم ان دقة التحليل لتركيزات مركب ما بالقرب من حدود الكشف تكون منخفضة مقارنة بالتركيزات العالية من نفس المركب وهذا يؤدى عدم ثقة فى التركيزات المقدرة بالقرب أو أعلى قليلا من حدود الكشف ولهذا السبب عديد من المنظمات قامت بعمل حدود أخرى مثل الحد الكمي limit of quantitation وهو أعلى من حد الكشف ودقته أعلى منه. وهو عبارة عن أقل تركيز من المركب الذي يمكن تقديره كميا وبدقة عالية ويعرف على أن التركيز الذي يكافئ النسبة بين الإشارة إلى الذبذبات 10: 1. ويحسب عن طريق حقن تركيز قياسي من المركب يمكن الطريقة

تقديره وعمل عدد من المكررات ثم يحسب الخطأ القياسي SD لهذه المكررات ويضرب الخطأ القياسي × 10 يمكن حساب Limit of Quantitation ويعبر عنه بوحدات التركيز العادية. والتركيزات التي تقع بين كل من حد الكشف LOD و حد التقدير يمكن LOQ الكتابة عليها انه تم اكتشافها و لكن بطريقة غير كمية Detected but not quantifiable

دور جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازى فى تحليل متبقيات المبيدات:

يمكن تقدير المركبات الكلورنية العضوية مثل الـ د.د.ت ومشابهاته ومركبات السيكلودايين باستخدام كشاف الالتقاط الالكترونى E.C.D هو أفضل الكشافات التي تستخدم في الكشف عن هذه المبيدات ويعطى حساسية 1 ppb سواء كانت هذه المبيدات فى النبات أو فى التربة أو الحيوان. مركبات الفينوكس المستخدمة كمبيدات حشائش مثل 24D أيضا يمكن تحليلها بـ GC باستخدام كشاف الالتقاط الإلكتروني.

المركبات الفوسفورية العضوية Organophsophorus compounds:

يمكن تحليل المبيدات الفوسفورية العضوية عن طريق استخدام كشاف الالتقاط الالكترونى (E.C.D) وخصوصا مجموعة لمركبات الفوسفورية التي تحتوى على هالوجين أو مجموعة نيترو ولكن تعتبر كشافات التاين فى اللهب AFID و الانبعاث فى اللهب FPD هي أفضل الكشافات والأعلى حساسية واختيارية فى تحليل المبيدات الفوسفورية بواسطة GC.

مركبات N-methyl carbamates compounds:

ان تحليل المبيدات الكارباماتية لم يتم تثبيته كما هو الحالة فى تحليل المركبات الفوسفورية العضوية وهذا يرجع إلى مشاكل خاصة بالثبات الحراري لهذه المركبات وكذلك عدم وجود كشاف حساس أو ذو حساسية عالية للنيتروجين التى تحتوى عليه

هذه المركبات و مع هذا امكن استخدام كشاف الالتقاط الالكترونـــى (ECD) وكــذلك كشاف التاين (AFID) فى تحليل المركبات الكارباماتية حيث أن كشاف التاين (AFID) حساس للنيتروجين فى هذه المركبات.

ويمكن تحسين استجابة المركبات الكارباماتية لكشاف الالتقـــاط الالكترونـــى ECD عن طريق عمل اشتقاق بعملية الاســيلة (Acylation) لمجموعـــة N-H باســتخدام Trifluroacetic وأيضا وجد ان كشاف الانبعاث فى اللهـــب (FPD) يعتبـــر مناســـب لتحليل مركبات الكاربامات التي تحتوى على كبريت وعملية الاشتقاق بالألكله يمكـــن ان تزيد من ثبات مركبات الكاربامات فى التحليل.

مركبات اليوريا N-Arylcarbamates compounds:

يمكن تحليل هذه المركبات عن طريق عمل اشتقاق لمجموعة NH باستخدام عملية الألكله(Alkylation) أوالاسيله Acylation لتحسين الثبات ثم يمكن التحليل بعد ذلــك بواسطة كشاف الالتقاط الالكترونى (ECD) أو كشاف التاين (AFID).

مركبات الترايازين Triazine compounds:

يمكن تحليل هذه المركبات بواسطة كشاف الالتقاط الالكترونى (ECD) لأنهـــا تحوى على هالوجين و لكن تبقى الكشافات التي تستجيب للنيتروجين هي المفضلة لتحليل هذه المركبات مثل كشاف الالتقاط الالكترونى (ECD) أو كـــشاف التـــاين (AFID).

مركبات أو مبيدات الحشائش المتنوعة Unclassfied herbicides:

مركبات الداى نيترو ايثلين يمكن تحليلها بواسطة كـــشاف الالتقـــاط الالكترونـــى (ECD)أو أو كشاف التاين (AFID). أما مركبات أملاح البريدليم مثـــل البـــاراكوات يمكن تحليلها بواسطة كشاف التاين (AFID).

مبيدات البيروثرويدز: Pyrithroids compounds

يعتبر كشاف التاين (FID) من انسب الكشافات لتحليل هـذه المركبـات ويمكـن استخدام كشاف الالتقاط الالكترونى (ECD) فى تحليل هذه المركبات.

مركبـات الإثـيلين داى ثيوكاربامـات والـتي يـستخدم كمبيـدات فطريـة : Ethylene dithiocarbamate compounds

هذه المركبات مثل المانيب يستخدم لها كشاف التوصيل الحرارى (TCD) و يمكن عمل اشتقاق بواسطة مادة (TFA) Triflorouacetic acid والتـى يمكـن تحليلهـا بواسطة كشاف الالتقاط الالكترونى (ECD) لاحتواء مادة الاشتقاق علـى هـالوجين وهذا الكشاف حساس للهالوجينات. ويمكن عمل اشتقاق لهـذه المركبـات واسـتخدام كشاف الانبعاث فى اللهب (FPD) فى قياس انبعاث الكبريت و التى تحتوى عليه هذه المركبات (Sulphur mode) كما ان هذا النوع من الكشافات حساس للكبريت .

المركبات العضوية المعدنية Organometatic compounds

التي تحتوى على الزئبق مثلا وتستخدم كمبيدات فطرية ويمكن استخدام كشاف الالتقاط الالكترونى (ECD) لها بعد عمـل اشـتقاق لهـا بواسـطة عمليـة الالكلـة (Alkylation).

2. التحليل الكروماتوجرافى السائل عالى الاداء
(High Performance Liquid chromatography HPLC)
أو High Speed Liquid chromatography

يجمع نظام الكروماتوجرافى السائل عالى الاداء الـ HPLC بين الكروملتوجرافى السائل liquid chromatography وبين الكروماتوجرافى الغازى Gas chromatography حيث انه من المعروف أن فى العمود الكروماتوجرافى العادي (وهو نوع من أنواع L.C) يكون الوجه المتحرك mobile phase فيه سائل ينساب flows ببطء فى العمود تحت تأثير الجاذبية graveity وهذا العمود بهذه الطريقة له عيوب واضحة فى أنه يحتاج لوقت طويل وغير دقيق. كذلك هناك بعض المشاكل فى استخدام الـ GLC اذ نجد ان معدلات سريان الغاز منخفضة وبالتالي لا تعطى نتائج فصل سريعة بانتشار المادة المراد تقديرها إلا برفع درجة الحرارة وهذا لا يصلح مع المواد غير الثابتة فى الحرارة العالية thermalunstable وأيضا ان جهاز GLC يحتاج لمواد متطايرة حتى يمكن فصلها وقد تكون هناك مواد غير متطايرة لا نستطيع تقديرها.

ولحل هذه المشكلة وتلافى تلك العيوب أدخل Kirkland و Huber سنة 1969م نظام الـ HPLC وهو كما سبق أن قلنا يجمع بين فكرتي الـ L.C ، G.C وبالتالي أمكن الحصول على درجة عالية من الفصل High resolution فى وقت قصير. وفكرة عمل جهاز HPLC تعتمد على أن المادة تتوزع بين وجهين أحدهما ثابت وهو (سائل محمل على حبيبات مادة صلبة متناهية فى الصغر موجودة فى أعمدة ذات قطر صغير) وبين وجه متحرك وهو سائل وليس غاز بحيث يتم دفع هذا السائل (مذيب الإزاحة) تحت ضغط عالي بحيث يصبح معدل سريان الوجه السائل Flow rate عالي خلال العمود ثم تمر المكونات المفصولة بكشاف ثم تسجل بطريقة عادية كما هو فى الغاز الكروماتوجرافى GC.

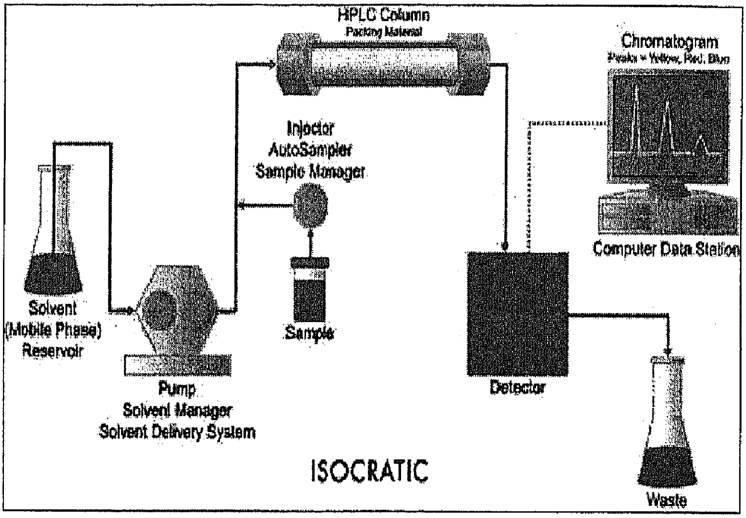
وبناء على ما سبق يمكن إيجاد الفروق الأساسية بين نظـــام الـــكروماتوجرافى السائل عالى الاداء HPLC وبين الــكروماتوجرافى الغازى GC كما يلى:

أ- فى الـ HPLC يكون الوجه المتحرك هو سائل (مذيب إزاحة) أما فى الغاز الكروماتوجرافى GC يكون غاز.

ب- يدفع مذيب الإزاحة (الوجه المتحرك) فى الـــ HPLC خلال العمود بضغط عالي بحيث يصبح معدل سريانه عالي.

جـ- مواصفات العمود فى الـ HPLC تختلف جذريا عن مواصفاته فى الـــ GC.

وفيما يلى رسم مبسط لنظام الـــ HPLC:كما بالشكل 30



شكل (30): مكونات جهاز الكروماتوجرافى السائل عالي الأداء (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

سنكتفي هنا بالإشارة إلى الأجزاء المهمة التي لا توجد فى الـــ GC أو تختلف عنه فقط.

1- الخزان Reservoir

وهو عبارة عن خزان للمذيبات التي تستخدم كوجه متحرك ويقوم هذا الخزان بإمداد المضخة بالمذيب أو المذيبات اللازمة أثناء عملية الفصل و التحليل.

2- المضخة: Pump

وهى التي تقوم بضخ المذيب أو النظام المذيبى المستخدم كوجه متحرك إلى العمود بمعدل تدفق معين والشروط الواجب توافرها فى المضخة هي:

أ- يجب أن تعطى مقدرة على ضخ المذيب بمعدل من صفر ــ 10مل/دقيقة.

ب- يجب أن يكون معدل سريان المذيب بالنسبة للضغط أقل ما يمكن حيث أن ثبات معظم أنواع الكشافات يتناسب عكسيا مع معدل سريان المذيب مع الضغط.

ج- يجب أن تكون ذات قوة ضغط عالية لتعطى سريان عالي للطور المتحرك.

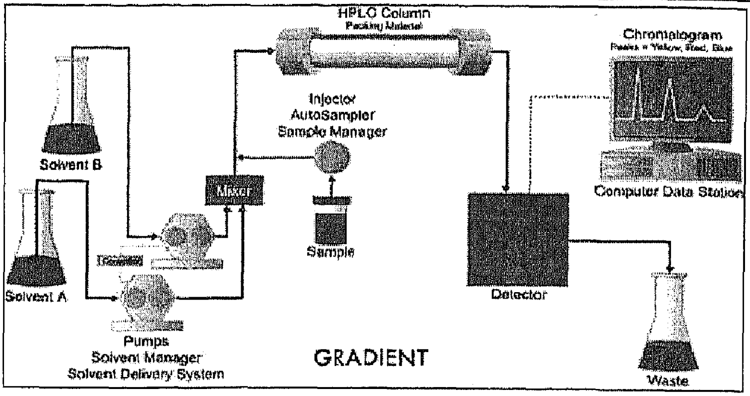
أنواع الإزاحة فى جهاز HPLC:

الازاحة التدريجية: Gradient elution

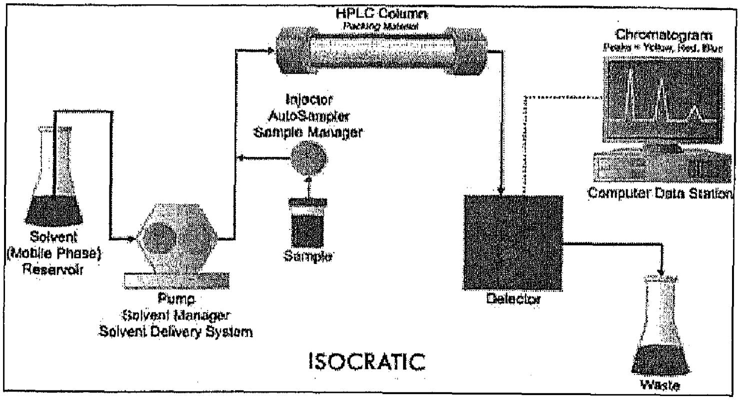
فى هذه الطريقة كما بالشكل (31) يكون الوجه المتحرك عبارة عن مخلوط فى المذيبات بنسب معينة وتتغير مع الوقت خلال فترة التحليل كما هو موضح بالشكل ويستخدم فى حالة ما تكون العينة تحتوى على مكونات تختلف كثيرا فى درجة قطبيتها ومن مميزاته يعطى فصل جيد ومنحنيات حادة.

الازاحة الثابتة: Isocratic elution

فى هذه الطريقة كما بالشكل (32) يكون الوجه المتحرك عبارة عن مذيب واحد أو نظام مذيبي بنسب ثابتة وله معدل تدفق ثابت خلال عملية التحليل كما هو موضح بالشكل.



شكل (31): مكونات جهاز الكروماتوجرافى السائل عالي الأداء بنظام **gradient elution** (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).



شكل (32): مكونات جهاز الكروماتوجرافى السائل عـالي الأداء بنظام **isocratic elution** (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

3- مكان الحقن: Injection port

و هو المكان إلى يتم حقن العينة به لتصل إلى مقدمة العمود و من شـروطه انـه يتحمل الضغط العالي.

4- العمود: column

يصنع العمود عادة من الصلب الغير قابل للصدأ Stainless steel أو الزجاج بطول 25سم ـ 2 متر وقطر 1-5 ملليمتر.

ولقد سبق أن عرفنا أن الوجه الثابت فى الـ GC يكون سائل يغلف حبيبات مادة صلبة داعمة فلو استخدم الوجه الثابت هذا فى الـ HPLC لتم غسله وإزاحته ويخرج من العمود أثناء التحليل تحت الضغط العالى لذلك يستخدم هنا مواد لها صفات معينة.

أ- بالنسبة للوجه الثابت يستخدم سائل يرتبط بروابط كيماوية مع المادة الصلبة الداعمة وذلك من خلال روابط الكربون مع السليكون C-Si وهذه الروابط تقاوم أي عملية تحلل ومن أمثلة هذه السوائل الهيدروكربونات المشبعة طويلة السلسلة وتستخدم بصفة خاصة عندما يكون الوجه المتحرك هو مذيبات قطبية.

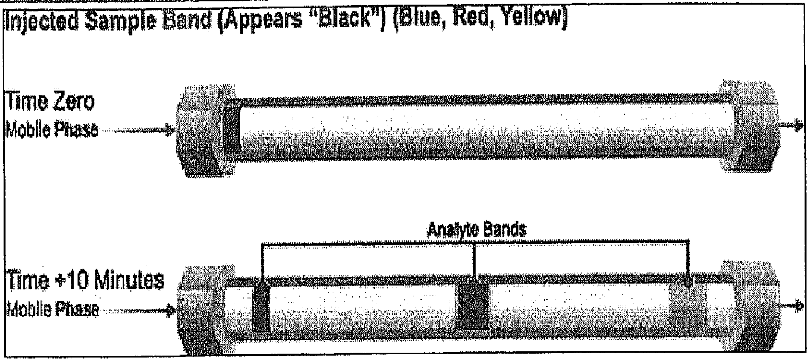
ب- تستخدم مواد صلبة (داعمة أو حاملة للوجه الثابت السائل) عبارة عن كريات صغيرة تحيط بها طبقة مسامية Porous layer beads وتكون من السيلكاجيل قطرها من 30-50 ميكروين (30-50 µm) (الميكروميتر = $10/1^{-4}$سم) وتحيط الطبقة المسامية (1-5 ميكروميتر) بالكريات كما ذكرنا كطبقة خارجية وتحمل هذه الكريات وترتبط بالوجه السائل الثابت كما سبق أن قلنا (هذا فى نظام الـ Partition) كما بالشكل (33)

جـ- فى حالة ما إذا كان الوجه الساكن صلب (adsorbent) تستخدم حبيبات كروية مسامية ذات حجم صغير جدا (5-20 µm) فى أعمدة قصيرة (10-25سم).

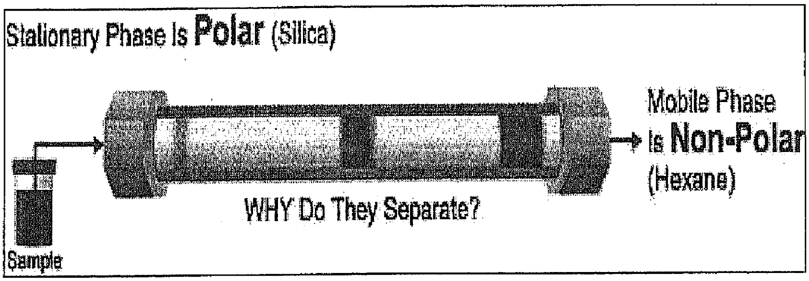
التوزيع المعتاد والتوزيع المنعكس فى HPLC:

Normal and reversed phase partition

فى الكروماتوجرافى بالتوزيع المعتاد كما بالشكل (34) نجد أن الوجه المتحرك يكون عضوي organic بينما الوجه الثابت يكون مائي aqueous.

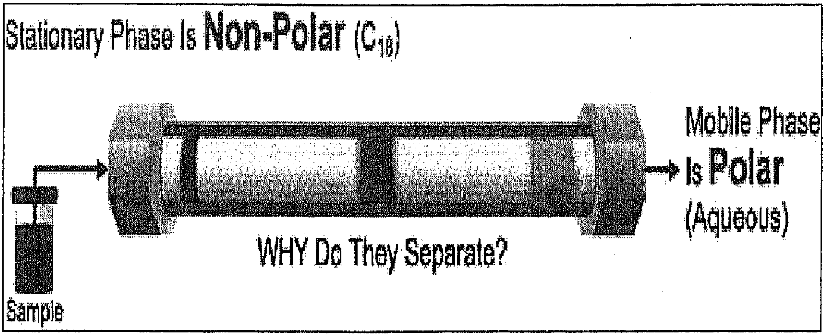


شكل (33): فصل مكونات عينة في عمود جهاز الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).



شكل (34): التوزيع المعتاد فى عمود جهاز الكروماتوجرافى السائل عالي الأداء (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

أما فى التوزيع المنعكس كما بالشكل (35) أو ما يسمى بالتوزيع ذو الوجه المنعكس Reversed phase فنجد العكس نجد أن الوجه المتحرك يكون مائي aqueous والوجه الثابت عضوي (مادة كارهة للماء hydrophobic) ويستخدم الكروماتوجرافى ذو الوجه المنعكس Reversed phase partition chromatography في فصل وعزل المواد القابلة للذوبان فى الدهون Lypophilic materials مثل الـ steroids.



شكل (35): التوزيع المعتاد في عمود جهاز الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

يتم اختيار الوجه المتحرك حسب نوع العينة:

1- إذا كانت العينة قطبيها ضعيفة يستخدم وجه ثابت Octadecyl ، ووجه متحرك Methanol: water.
2- إذا كانت العينة متوسطة القطبية: يستخدم وجه ثابت octadecyl ، ووجه متحرك Water: Actonitrile.
3- إذا كانت العينة قطبيها عالية: يستخدم وجه متحرك Dioxene: water.

ويمكن الحصول على وجه ثابت منعكس reversed phase بتشريب impregnation الوجه الثابت العادي في محلول مخفف من الشمع مذابة في الإيثير وهناك ألواح جاهزة تمثل هذه الوجه وهي عبارة عن خلات السليلوز cellulose acetate.

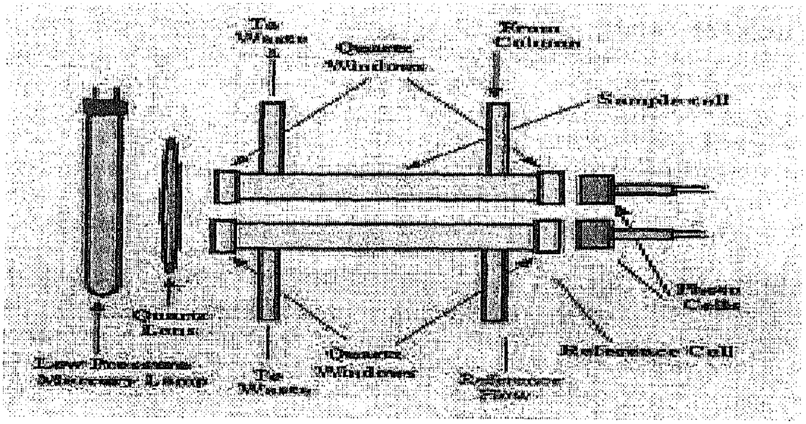
5- الكشافات: Detectors

قليلا ما تستخدم كشافات متخصصة لنظم الـ HPLC ويمكن استخدام الكشافات الخاصة بنظم الـ GC ولو بتعديلات معينة وعموما تستخدم الكشافات الآتية: Flame ionization detector ، UV absorbance detector ، Electrochemical detector.

ومن اشهر الكشافات المستخدمة فى HPLC ما يلى:

1- كشاف الامتصاص: U.V Absorbance Detector

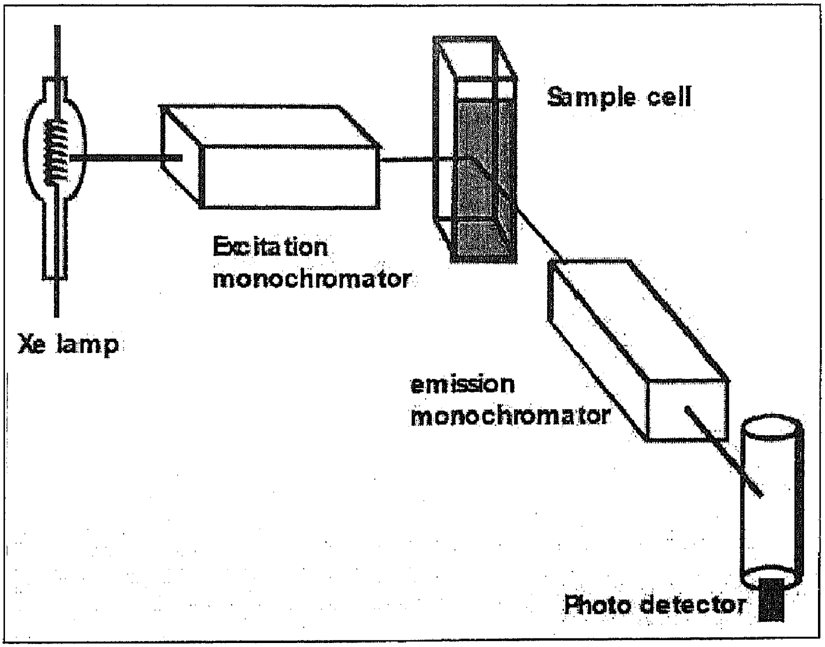
يعتبر أكثر أنواع الكواشف انتشارا فى HPLC ويعتمد كما بالشكل (36)على أساس أن العديد من المركبات العضوية تمتص أشعة المنطقة الفوق بنفسجية (.U.V) والامتصاص لهذه الأشعة عند طول موجي معين يكون دالة فى المركبات وبالتالي تقدير كثافة الأشعة الممتصة يكون دالة فى تركيز هذا المركبات.



شكل (36): تركيب كشاف الامتصاص فى جهاز الكروماتوجرافى السائل عالي الأداء.

2- كشاف الفلورسنس: Fluorsence detector

يتميز كشاف الفلورسنس بالحساسية و الدقة العالية ويتكون كما بالشكل (37) من لمبة زئبق كمصدر ضوئي لإعطاء شعاع ضوئي يمر خلال مرشح لاختيار الطول الموجى المناسب لاثارة للمادة المراد تقديرها ثم يمر على العينة فيحدث إثارة للمادة المراد تقديرها و ينبعث منها وميض يتم قياسه بواسطة خلية ضوئية وتحوله إلى إشارة كهربية ويكون دالة فى تركيز المادة.



شكل (37): تركيب كشاف الفلورسنس المستخدم جهاز الكروماتوجرافى السائل عالي الأداء.

عملية الاشتقاق للمادة المراد تقديرها بجهاز الكروماتوجرافى السائل عالى الاداء

High performance liquid chromatography

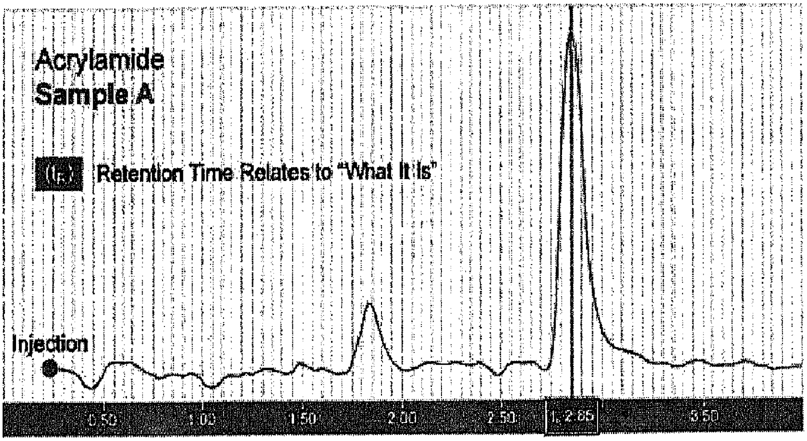
معروف أن الاشتقاق فى جهاز الكروماتوجرافى الغازى (GLC) كان بغرض الحصول على مركبات أكثر ثباتا حراريا و كذلك أكثر تطايرا ويسهل فصلها. وفى بعض الأحيان يمكن عمل اشتقاق فى التحليل بـ HPLC على الرغم من أن الحرارة أو الثبات الحراري فى HPLC ليست مهمة أو ضرورية ولكن الغرض الأساسي فى الاشتقاق هو إيجاد بدائل ومشتقات لزيادة حساسية أو اختيارية الجهاز فى عملية التحليل. على سبيل المثال من الأشياء المهمة هو تحليل وتقدير المواد المتأينة أو التي

تحمل شحنة اولفصل مخلوط من المركبات التى يحتوى على شحنات موجبة وسالبة والتى تحتاج لوقت طويل جدا للفصل.

أما عند اجراء عملية الاشتقاق كما فى حالة مجموعة الأحماض الأمينية وهى تحمل شحنات وجد أن تفاعلها مع مادة Orthophthalaldehyde يعطى مشتقات isoindole وهى مشتقات مناسبة جدا للفصل بأعمدة HPLC وتعطى فصل سريع للأحماض الأمينية كما أنها تعطى استجابة عالية للكشاف والذي يؤدى بدوره إلى زيادة حساسية الجهاز وحدود الكشف لهذه المركبات ويتم إجراء الاشتقاق فى المحلول كخطوة أخيرة فى إعداد العينة قبل التحليل.

التحليل الوصفي:

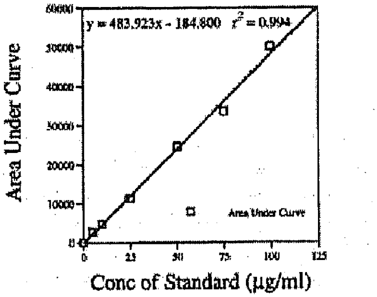
التحليل الوصفي بواسطة HPLC يتم عن طريق مقارنة قيم RT للمادة القياسية و العينة المراد تحليلها كما ذكر سابقا فى الغاز الكروماتوجرافى كما بالشكل (38).



شكل (38): استخدام زمن الإعاقة فى التعرف على المركبات المجهولة بواسطة جهاز الكروماتوجرافى السائل عالي الأداء.

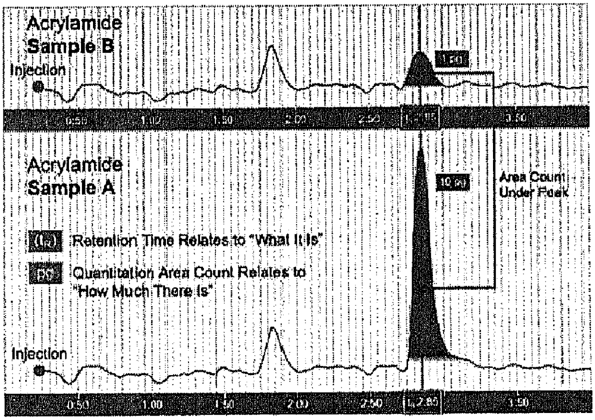
التحليل الكمى:

و يتم التحليل الكمي للمادة المراد تقديرها باستخدام HPLC: كما ذكر سابقا فى الكروماتوجرافى الغازي بالتفصيل وذلك بعمل منحنى قياسي شكل (39) وقياس مساحة البيك للعينة المجهولة شكل (40) ومن خلال المنحنى القيا سى يتم تقدير تركيز العينة المجهولة .



Pict. 2 Standard calibration graph of data generated by HPLC (data from pict. 1) using Cricket Graph III™ to generate linear curve fit

شكل (39): المنحنى القياسي المستخدم فى تقدير العينات المجهولة.



شكل (40): قياس المساحة تحت المنحنى للعينات المجهولة تمهيدا لتقدير تركيزها.

دور جهاز التحليل الكروماتوجرافى السائل عالى الاداء (HPLC) فى تحليل متبقيات المبيدات

يعد جهاز HPLC من الأجهزة المهمة والتي تستخدم فى تقدير متبقيات المبيدات ودوره فى التقدير الكمي أكبر من دوره فى عملية التحليل الوصفي وإن كان يمكن استخدامه فى الطريقتين.و يعتبر كشاف امتصاص الاشعة الفوق بنفسجية (U.V.) والذي يسمى U.V. absorbance Detector هو أشهر الكشافات المستخدمة فى تحليل متبقيات المبيدات بواسطة HPLC وذلك على طول موجة 254nm ويتم بالتدريج تطويره إلى كشافات لها أطوال موجية مختلفة.

3. ازدواج أجهزة التحليل الكروماتوجرافى مع مطياف الكتلة
Coupling of Chromatographic Methods with Mass Spectroscopy

3-1. مقدمة :

أصبحت الحاجة ملحة إلى إجراء تحليل بواسطة مطياف الكتلة لمجموعة من المركبات الموجودة معا فى عينة واحدة فى مجال تحليل المتبقيات residue analysis للملوثات البيئية أو المبيدات وغيرها ولما كان من الصعوبة بمكان إجراء ذلك التحليل لمخاليط المركبات فقد تم التفكير فى استخدام أجهزة التحليل الكروماتوجرافى لفصل تلك المخاليط وإدخال كل مركب على حدة إلى جهاز تحليل مطياف الكتلة أي أن أجهزة التحليل الكروماتوجرافى تستخدم فقط لعمل فصل (separation) لمخلوط المركبات ، وكما نعلم أن التحليل الكروماتوجرافى بالغاز لا يمكنه فصل كل المركبات ولكنه يعمل مع مركبات لها شروط معينة كما تم ذكرها فى الفصل السابق ولذلك يستخدم أيضا التحليل الكروماتوجرافى بالسائل لفصل المركبات التي يصعب أولا يتوافر فيها شروط قابلية تحليلها بواسطة كروماتوجرافيا الغاز ، ومن هنا تم عمل ازدواج بين GLC مع MS وسمى الجهاز الناتج GC-MS كما تم عمل ازدواج بين HPLC مع MS وسمى الجهاز الناتج HPLC-MS.

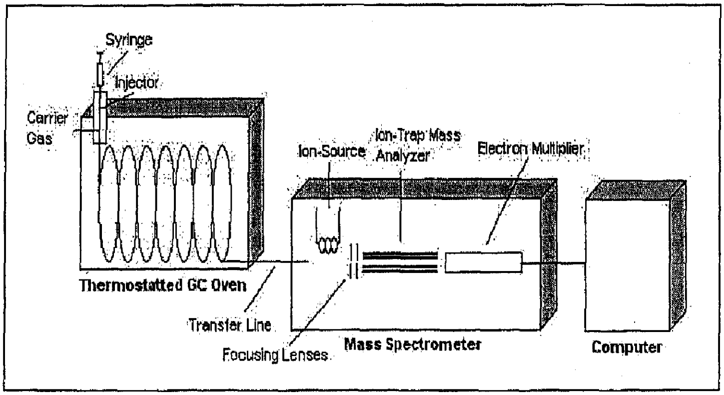
كما يوجد أيضا GC-MS-MS يستخدم لعمل فصل المركبات ثم تقدير طيف الكتلة لكل مركب على حدة ثم التركيز على ايون واحد من هذه الايونات لكل مركب وتقدير طيف الكتلة له منفردا.

3-2 جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازي المزدوج مع مطياف الكتلة :
Gas chromatography- Mass Spectrometry (GC-MS)

تم دمج جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازى مع مطياف الكتلة فى جهاز واحد وذلك عن طريق توصيل نهاية العمود فى جهاز التحليل الكروماتوجرافى مع غرفة التأين

Ion Source فى جهاز مطياف الكتلة من خلال وصلة مشتركة بينهما وعمل تفريغ للضغط وسمى الجهاز الناتج GC-MS Spectrometer كما هو موضح بشكل (41) حيث يسمح للعينة عن طريق فتحة تسرب ضئيلة جدا من عمود الـ GC بالدخول إلى غرفة والغاز الحامل خلال أنبوبة زجاجية رقيقة الجدار (إذا كان الغاز الحامل هيليوم) أو خلال أمبوبة Palladium (إذا كان الغاز الحامل هيدروجين) كما يتضح بعد ذلك.

وتعتمد كفاءة تشغيل هذا الجهاز على معدل سريان الغاز gas flow وعمليات التفريغ vacuum processes حتى الوصول إلى الضغط المطلوب 10-5 torr (mm hg) حيث أن جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازي يعمل على الضغط الجوى العادي 760 torr (mm hg) وعلى مدى واسع من معدل سريان الغاز (يكون كبير جدا فى الأعمدة المعبأة مثلا 40 ml/min وضئيل جدا فى الأعمدة الشعرية 2 ml/min) وكذلك يعمل على مدى واسع من درجات الحرارة والتركيز ، ومن ناحية أخرى نجد أيضا أن مطياف الكتلة يعمل على مدى واسع من نظام التفريغ Vacuum system ومصادر التأين وتصميمات مختلفة لنظم فصل الأيونات. ونجد أن الوصلات بين الجهازين عبارة عن وأنابيب trbing وفتحات ضيقة جدا orifices وكل واحد من هذه الوصلات يؤثر على تدفق الغاز gaseous flow.



شكل (41): تركيب جهاز الكروماتوجرافى الغازي مع مطياف الكتلة.

ويمكن استخدام جهاز GC-MS في تقدير المتبقيات residue analysis سواء للمبيدات أو أي ملوثات أخرى و التأكد confirmation كذلك من نتائج التحليل المتحصل عليها بواسطة جهاز التحليل الكروماتوجرافى بالغاز confirmation ولكن تظل المشكلة الصعبة قائمة وهى أن التحليل فى جهاز GLC يتم على الضغط الجوى العادي 760 torr بينما يتم التحليل بواسطة MS تحت تفريغ يصل إلى 10^{-5} torr ولذلك لا يمكن إدخال العينة من ضغط عالي إلى ضغط منخفض جدا بهذه الدرجة لأن ذلك يؤدى إلى فقد العينة ولكن يجب عمل خفض تدريجي للضغط حتى الوصول إلى الضغط المطلوب لاجراء التحليل عليه فى جهاز مطياف الكتلة.

ومشكلة GC-MS هى إدخال أكبر كمية ممكنة من المركبات العضوية الخارجة من عمود GC إلى غرفة تأين مطياف الكتلة بدون أن يحدث خلل فى نظام التفريغ داخل كل أجزاء مطياف الكتلة.

ومن المعروف أن مطياف الكتلة يتم فيه تفريغ الضغط داخل غرفة التأين حتى 10^{-4} torr وذلك لتجنب التفاعلات أو التصادمات بين أيونات الجزيئات وبعضها والتي قد تؤدى بدورها إلى تكوين شظايا غير معروفة unrecognized fragmentation patterns كما يجب أن يكون متوسط المسافة بين أيونات الجزيئات وبعضها أكبر من 200 حتى تتحرك بحرية دون حدوث تصادمات وهذه المسافة يطلق عليها متوسط المسار الحر mean free path والضغط المقابل لهذه المسافة حوالي 10^{-8} torr لتجنب تبعثر حزم الأيونات ion beam الناتجة عن عملية تكوين الشظايا fragmentation.

ومن المعلوم أيضا أن العينات الخارجة عن عمود التحليل فى جهاز كروماتوجرافيا الغاز تكون محمولة ومخلوطة مع الغاز المتحرك وإذا دخلت تلك العينة إلى غرفة التأين فى مطياف الكتلة وهى مخلوطة مع هذا الغاز فسوف يحدث زيادة شديدة فى الضغط داخل جهاز مطياف الكتلة أي يحدث ما يطلق عليه destroying the high vacuum conditions ولذلك يجب التخلص من الغاز الحامل ومنع دخوله مع العينة.

ولذلك يتم استخدام وصلة معينة بين الجهازين ومجموعة من مضخات التفريغ vacuum pumps ووظيفتها عمل ضبط adaptation للعينة بتخفيض الضغط الذي تدخل عليه العينة من الضغط العادي 760 torr إلى ضغط يصل إلى 10^{-5}torr وكذلك التخلص من الغاز الحامل والسماح لمكونات العينة فقط بالدخول إلى غرفة التأين.

مكونات الجهاز:

ويتكون جهاز GC-MS من الوحدات التالية:

أولا: جهاز التحليل الكروماتوجرافى: Gas chromatography

وهنا يمكن استخدام جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازي بالكامل ويتم عمل تقسيم لمسار العينة الخارجه من العمود إلى جزئين splitting الجزء الأول يكمل المشوار إلى الكشاف detector للتقدير الكمي Quantitative analysis والجزء الثاني يوصل بغرفة التأين فى جهاز مطياف الكتلة من خلال وصلة interface لرسم طيف الكتلة للمركب mass spectrum أو يمكن إدخال كل العينة والغاز الحامل الخارج من عمود التحليل column effluent إلى غرفة التأين فى جهاز مطياف الكتلة.

ثانيا – الوصلة بين الجهازين: GC-MS interface:

ويوجد عدة طرق لعمل هذه الوصلة وهى:

1- وصلة الاندماج المباشر Direct coupled interface:

يتم عند استخدام الأعمدة الشعرية (WCOT) wall-coated open tubular column حيث يكون معدل سريان الغاز الخامل مناسب 1-3ml/min وهذا المعدل يتلاءم مع نظام التفريغ المطلوب فى جهاز مطياف لكتلة ولذلك يمكن استخدام ما يسمى التوصيل المباشر Direct interface حيث يدخل كل من العينة والغاز الحامل معا إلى غرفة التأين فى المطياف ثم يتم دفع الغاز الخامل خارج المطياف pumped out بمعدل أسرع من دخول العينة وتتميز هذه الوصلة بأن كل العينة الخارجة من جهاز التحليل الكروماتوجرافى تدخل إلى مطياف الكتلة دون فقد أو نقص.

ولكن لا يمكن استخدام هذا النوع من الوصلات فى حالة الأعمدة المعبأة packed column لأن معدل سريان الغاز هنا يكون عالي 15-40 ml/min ولا يناسب ذلك المعدل العالى نظام التفريغ المطلوب فى جهاز مطياف الكتلة.

2- انبثاق البخار من فتحة ضيقة Jet orifice interface:

يعتمد استخدام هذا النوع من الوصلات على أساس مرور بخار العينة والغاز الخامل من عمود جهاز التحليل الكروماتوجرافى الغازي إلى غرفة التأين فى مطياف الكتلة من خلال فتحة صغيرة جدا وضيقة لمرور البخار jet orifice وعند مرور العينة من خلال هذه الفتحة تزداد سرعة جزئيات العينة وتمر خلال المنطقة المفرغة ثم تدخل فتحة ضيقة أخرى jet orifice حتى تصل إلى غرفة التأين فى المطياف وهنا نجد أن الغازات الحاملة الخفيفة الوزن مثل He, N2, H2 تطرح خارج المنطقة المفرغة ولكن جزيئات العينة الأكبر فى الوزن الجزيئي تواصل سيرها حتى تصل إلى الفتحة الضيقة الثانية دون أن تتحرف وبذلك لا يتم سحبها بواسطة المضخات الموجودة حول هذه الفتحات . وهذه الوصلة (انبثاق البخار من خلال فتحة ضيقة جدا get orifice) تعتبر جيدة الاستخدام فى حالة الأعمدة المعبأة packed columns وكذلك فى حالة الأعمدة الشعرية capillary column.

3- تدفق بخار العينة Effusive interface:

وهنا يتم فصل الغاز الخامل والعينة على أساس الفرق فى كتلة كل منهما حيث يدخل ناتج عمود التحليل ككل GC effluent إلى أنبوبة زجاجية مسامية تحت تفريغ porous glass fube وعند دخول كل من العينة والغاز إلى هذه الأنبوبة فإن الغاز الحامل الخفيف الوزن مثل الهليوم سوف يمر خلال الأنبوبة الزجاجية frittd glass إلى المنطقة المفرغة ويضخ خارج المطياف pumped away أما قابلية جزيئات العينة للمرور خلال المسام الصغيرة فى الأنبوبة الزجاجية فإنها تتناسب عكسيا مع كتلتها حيث أن هذه الجزيئات الصغيرة لها قابلية للمرور بدرجة أكبر من الجزيئات الكبيرة

وعلى ذلك فإن بعض جزيئات العينة الكبيرة الوزن الجزيئي سوف تفقد فى هذا المقام. ولذلك قل استخدام مثل هذه الوصلات.

4- خروج العينة من خلال غشاء منفذ Permeable membrane interface:

وهنا تمر العينة مع الغاز من عمود التحليل لأعلى سطح غشاء مطاطي مصنوع من السليكون silicone rubber membrane إلى غرفة تأين المطياف المفرغة على الجانب الأخر من الغشاء وهنا نجد أن الجزيئات العضوية تنفذ dissolve خلال هذا الغشاء وتنفذ خلال المنطقة المفرغة وتصل إلى غرفة التأين بينما الغاز الخامل الغير عضوي لا ينفذ do not dissolve ويطرح إلى الخارج فى الهواء الجوى vented to atmosphere وبذلك نجد أن أساس هذه الوصلة تعتمد على نفاذ الجزيئات العضوية من خلال سطح الغشاء.

ويتميز هذا النوع من الوصلات بأنه سهل الاستخدام وغير مكلف ، كما أن مشاكل هذه الوصلة بسيطة حيث لا يحدث فيها انسداد clog كما يحدث فى حالة jet orifice interface ولذلك تفضل هذه الوصلة على سائر الوصلات الأخرى عند تحليل المركبات العضوية باستخدام الأعمدة المعبأة.

ويمكن إجراء بعض التعديلات على هذه الوصلة لاستخدامها أيضا فى حالة الأعمدة الشعرية مثل إضافة وحدة make-up gas حيث يكون سريان الغاز ضئيل جدا فى حالة هذه الأعمدة كما هو معروف ، ولكن بصفة عامة لا يفضل استخدام تلك الوصلة مع الأعمدة الشعرية.

5- تقسيم العينة بطريقة مباشرة Direct split interface:

وهنا لا يتم إدخال العينة كلها بل يتم تقسيم العينة بعد خروجها من عمود التحليل والسماح لجزء منها بالدخول لجهاز مطياف الكتلة وطرح الجزء الآخر خارج الجهاز مع الهواء الجوى وهذا التقسيم يسمح بدخول كمية تلائم الضغط المطلوب لمطياف الكتلة.

ولكن نسبة التقسيم splitting ratio تختلف أثناء برمجة درجة حرارة التحليل بسبب تغير لزوجة الغاز تبعا لتغير درجة الحرارة ولذلك فإن هذه الوصلة لا تتناسب مع التقديرات الكمية الدقيقة.

6- التقسيم المفتوح للعينة Open split interface:

أدى تطور أعمدة مصهور السليكا والحاجة إلى تغيير الأعمدة المعتادة وكذلك تغيير ديناميكية الغاز عند الوصلة إلى شيوع استخدام هذا النوع من الوصلات الذي يطلق عليه open split interface.

وهنا توضع طرف نهاية عمود التحليل فى خط محدد restrictor line يؤدى إلى غرفة التأين فى المطياف ويحاط بهذه الوصلة أنبوبة معدنية من الخارج تسمى sleeve surrounds ويتم دفع تيار بطئ من غاز الهليوم حول هذه الأنبوبة المعدنية الخارجية. وهذا النوع من الوصلات جيد فى الاستخدام لأنه تم فيه التغلب على المشاكل الموجودة فى تقسيم العينة بطريقة مباشرة.

ثالثا: نظام تفريغ الضغط Ion source vacuum system:

وهنا يتم استخدام مجموعة متدرجة من المضخات vacuum pumps لعمل التفريغ اللازم فمثلا المضخة الأولى تعمل تفريغ من 760 torr حتى الوصول إلى 10-1 torr ثم مضخة أخرى لزيادة التفريغ حتى 10--3 torr ثم مضخة أخرى لزيادة التفريغ حتى 10-4 torr وهكذا.

رابعا: مصدر التأين فى مطياف الكتلة MS ion source:

يتم تأين الجزيئات داخل غرفة التأين حيث يتم فصل تلك الأيونات بعد ذلك ويجب اختيار مصدر التأين المناسب لكل عينة حيث توجد عدة طرق لتأين الجزيئات تتوقف أساسا على نوع العينة والغرض من التحليل كما سبق شرحه فى جهاز مطياف الكتلة ، ويتم تأين العينة إما بالتصادم الالكتروني أو التأين الكيميائي أو التأين بواسطة مجال كهربي.

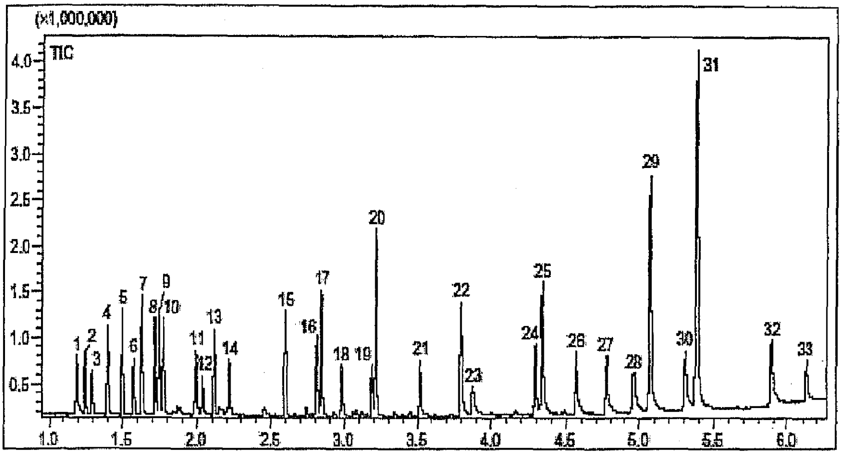
ومصدر التأين له وظيفة مزدوجة هي تأين الجزيئات دون التفرقة بين كتل الأيونات المختلفة ثم إسراع أو تعجيل accelerating ذهاب هذه الأيونات إلى وحدة تحليل الأيونات.

خامسا : وحدة فصل وتحليل الأيونات Mass analyzer:

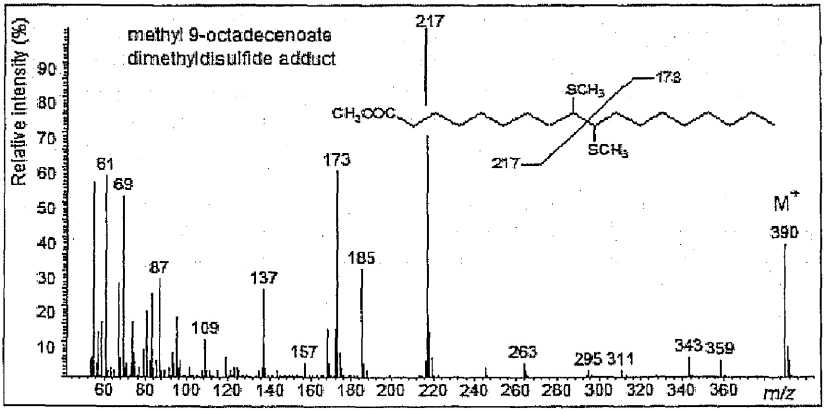
وهنا يتم فصل مخلوط الأيونات الناتجة من عملية التأين على أساس الاختلاف فى نسبة الكتله الى الشحنة (m/e) حتى يمكن رصد وتسجيل هذه الأيونات كل على حدة ويجب أن تكون عملية فصل الأيونات على درجة عالية من الدقة والتمييز وخاصة فى حالة الكتل المتقاربة جدا ، وتوجد عدة أنظمة مختلفة فى فصل وتحليل الايونات كما سبق شرحه مثل فصل الأيونات باستخدام المجال الناتج عن أربعة أقطاب كهربية أو انحراف الأيونات فى مجال مغناطيسي أو استخدام التركيز البؤري أو فصل الأيونات بالتركيز البؤري الدائري.

شكل طيف الكتلة Mass spectrum:

وفى نهاية التحليل نحصل على الطيف الكتلى للمادة (mass spectrum) كما بالشكل (42) والذى يتم تفسيره باستخدام الكمبيوتر Data interpretation using computer system وذلك عن طريق وجود دليل لقيم زمن الاحتباس لكل مركب عند ظروف تحليل معينة كما بالشكل (43) compound retention timeحيث يتم معمل بحث عن المركب بين البيانات الموجودة فى مكتبة الجهاز ومقارنته بكل المركبات التي لها نفس الوزن الجزيئي والموجود لها رسم طيف كتلي mass spectrum موجود ومخزن على الجهاز لكي نصل فى النهاية إلى التعرف على المركبات الموجودة فى العينة Compounds identification وكذلك تقديرها كميا Quantification.



شكل (42) المركبات المفصولة بواسطة الكروماتوجرافى الغازي فى جهاز GC-MS وهو ما يسمى **Total ion chromatogram**.



شكل (43) طيف الكتلة لأحد المركبات المفصولة فى جهاز GC-MS.

دور جهاز التحليل الكروماتوجرافى مع مطياف الكتلة فى التحليل الوصفى لمتبقيات المبيدات:

يعتبر جهاز التحليل الكروماتوجرافى مع مطياف الكتلة من اهم الاجهزة فى التحليل الوصفى للمركبات المجهولة سواء كانت مبيدات او مركبات عضوية اخرى و ذلك على خطوتين اساستين وهما:

الخطوة الاولى:

و هى مقارنة طيف الكتلة للمركب المجهول باطياف الكتلة للمركبات القياسية المخزنة داخل الجهاز والتى تحتوى على الاف الاطياف القياسية و احيانا يوجد داخل الجهاز مكتبة عامة تحتوى على الاطياف القياسية لالاف المركبات العضوية و منها المبيدات و احيانا توجد مكتبات متخصصة مثل مكتبة للمبيدات والتى تحتوى على الاطياف الكتلية للمبيدات فقط و بمقارنة طيف الكتلة للمركب المجهول بالاطياف الموجودة داخل الجهاز تعطى نتيجة البحث ان الطيف الكتلة للمركب المجهول يحتمل ان يموتن طيف لمركب ا و مركبات معينه يكون طيفها قريب الشبه بطيف الكتلة للمركب المجهول كما تعطى نسب كل احتمال.

الخطوة الثانية:

يتم حقن المركب القياسى المحتمل ان يكون هو نفس المركب الموجود فى العينة المجهولة و مقارنة الطيف القياسى للمركب المحقون بطيف المركب المجهول فى العينة فاذا ثبت انه نفس الطيف و ابضا يظهر عند نفس زمن الظهور RT ويعتبر هذا خطوة تاكيدية فى التعرف على المبيد المجهول فى العينة.

وتعتبر الخطوة الاولى تمهيد او تعرف اولى على احتمالية المركب المجهول وتعتبر الخطوة الثانية هى خطوة تاكيدية فى التعرف على المبيد او المركب المجهول مع ملاحظة ان تتم خطوات التعرف على المركبات المجهولة بوسطة جهاز التحليل الكروماتوجرافى مع مطياف الكتلة على نظام Scan Mode Monitoring.

التحليل الكمى للمبيدات بواسطة جهاز التحليل الكروماتوجرافى مع مطياف الكتلة :

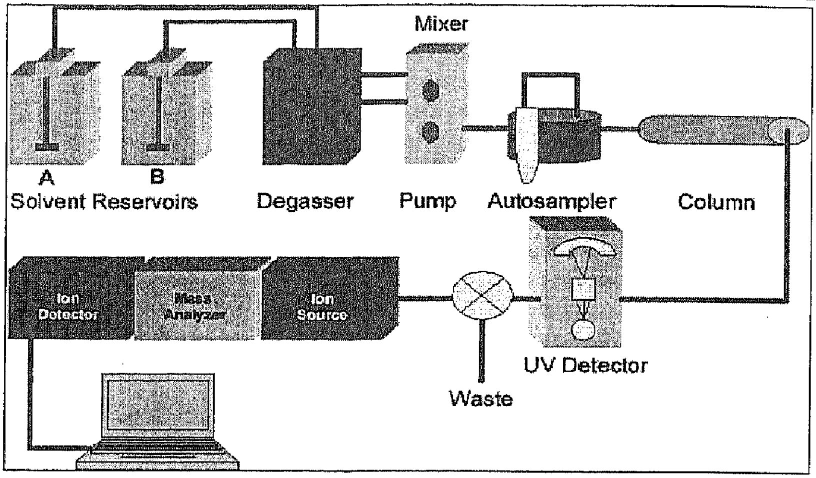
يتم استخدام هذا الجهاز فى التقدير الكمى للمبيــدات و المركبــات العــضوية الاخرى على نظام Select Ion Monitoring (SIM) وفيه يــتم اختبــار ايــون جزيئى واضح من طيف الكتلة لكل مركب ويتم استخدامه فى التقدير الكمى لكــل مركب ثم يتم عمل التركيزات القياسية من كل مركب وحقنها و تقدير مساحة البيك لكل مركب ثم حقن العينة القياسية وتقدير مساحة البيك و يــتم رســم المنحنــى القياسى كعلاقة بين التركيز و مساحة البيك و من خلال المنحى القياســى يمكــن تقدير تركيز العينة المجهولة.

جهاز التحليل الكروماتوجرافى بالسائل المزدوج مع جهاز مطياف الكتلة

Liquid chromatography- Mass Spectrometry - LC-MS

بعض المركبات لا يمكن تحليلها بواسطة جهاز GC-MS لأنها غير قابلة للتطــاير أو أن وزنها الجزيئي كبير مثل البوليمرات والبروتينات أو أنها غير ثابتــة حراريــا وتتحطم على درجات الحرارة المرتفعة مثل السكريات ولكن يمكن تحليلهــا بواســطة جهاز التحليل الكروماتوجرافى بالــسائل وعلــى ذلــك تــم دمــج جهــاز التحليــل الكروماتوجرافى بالسائل HPLC مع مطياف الكتلة MS فــى جهــاز واحــد يــسمى HPLC-MS spectrometer وذلك عن طريق توصيل نهاية العمود فى جهاز التحليل الكروماتوجرافى مع غرفة التأين Ion source فى جهاز مطياف الكتلــة مــن خــلال وصلة مشتركة Interface كما شرحنا فى جهاز GC-MS.

ويوضح شكل (44) جهاز التحليل الكروماتوجرافى بالسائل المزدوج مع مطيــاف الكتلة.



شكل (44): تركيب جهاز الكروماتوجرافى السائل عالي الأداء مع مطياف الكتلة.

وهنا المشكلة فى حالة دمج جهاز التحليل الكروماتوجرافى السائل مع مطياف الكتلة تكون أكبر لأن العينة الناتجة من جهاز HPLC مذابه فى مذيبات قطبية أو غير قطبية أو مخلوط من المذيبات وهنا يجب التخلص من تلك المذيبات قبل إدخال العينة إلى غرفة التأين فى جهاز مطياف الكتلة.

وتوجد طرق عديدة للتخلص من تلك المذيبات وإدخال العينة فى صورة بخارية إلى غرفة التأين فى مطياف الكتلة تشترك معظمها فى إمرار العينات على سخان Heater أو على سير ساخن Hot belt أو مبخر متوهج Flash Vaporizer أو دوارق مسخنة أو أنابيب مسخنة لتبخير المذيبات ، ثم يتم إدخال العينة خالية من المذيبات فى صورة بخار إلى غرفة التأين وكذلك عمل تفريغ للضغط.

وهنا أيضا يمكن استخدام جهاز التحليل الكروماتوجرافى بالسائل بالكامل ويتم عمل تقسيم لمسار العينة الخارجه من العمود إلى جزئين splitting ، جزء منها يكمل المشوار إلى بقية أجزاء جهاز HPLC للتقدير الكمي Quantitative analysis والجزء

الآخر يمرر على وسيلة التبخير المناسبة للتخلص من المذيبات وإدخالها إلى غرفة التأين فى جهاز مطياف الكتلة من خلال وصلة Interface لرسم طيف الكتلة للمركب mass spectrum.

أو يسمح للعينة effluent LC كلها بالدخول من خلال فتحة تسرب ضئيلة جدا إلى غرفة تأين جهاز مطياف الكتلة وذلك بعد التخلص من المذيب وتحويلها إلى بخار.

مكونات الجهاز:

يوضح شكل (40) الرسم التخطيطي لمكونات جهاز مطياف الكتلة Block diagram of HPLC/MS.

وتتلخص مكونات جهاز HPLC/MS فى:

1- جهاز التحليل الكروماتوجرافى بالسائل ، ويتم هنا عمل تقسيم لمسار العينة الخارجه من العمود بحيث تدخل جزء منها ويكمل المشوار إلى الكشافات المستخدمة فى HPLC أما الجزء الآخر يدخل إلى غرفة التأين الخاص بجهاز مطياف الكتلة.
2- الوصلة بين الجهازين وهى عبارة عن مبخر Flash vaporizer.
3- جهاز مطياف الكتلة.

ويمكن كذلك استخدام جهاز LC-MS فى التقدير الكمي للمركبات العضوية والحيوية والتي يصعب تحليلها بواسطة GC-MS وكذلك يمكن استخدامه كطريقة للتأكد من التحليل بواسطة كروماتوجرافيا السائل.

وحاليا أصبح من الممكن دمج العديد من الأجهزة معا مثل الاجهزة الموضحة GC/MS/MS وHPLC/MS/MS وهى أجهزة تستخدم لعمل فصل المركبات ثم تقدير طيف الكتلة لكل مركب على حدة ثم التركيز على ايون واحد من الطيف لكل مركب من هذه المركبات ثم تقدير طيف الكتلة لهذا الايون منفردا وهى تعطى دقة عالية فى التقدير.اى ان الغاز الكروماتوجرافى او الكروماتوجرافى السائل عالى

الاداء دورهم فى هذه الاجهزة فصل المركبات ثم يقوم مطياف الكتلة الاول بعمل طيف الكتلة لكل مركب وتحديد الايون المناسب لتحليل كل مركب مفصول ثم يقوم مطيـــاف الكتلة الثانى بعمل طيف الكتلة للايون الذى تم اختيارة للتقدير الكمى والوصـــفى لهـــذا المركب

الفصل

السادس

تقدير متبقيات المبيدات بالطرق الطيفية

الفصل السادس

تقدير متبقيات المبيدات بالطرق الطيفية

Spectroscopic methods for pesticide residues dertmination

التحليل الطيفي:

يعتبر التحليل الطيفي من أهم طرق التحليل حيث يعطى معلومات واسعة عند التحليل الكمي والوصفي للمركبات المختلفة منها المبيدات. وفى كل طرق التحليل الطيفي يعتمد التحليل على امتصاص أو انبعاث الأشعة الكهرومغناطيسية مما يؤدى إلى حدوث تغيرات معينة في النظام الذرى أو الجزيئي وهذه التغيرات ترتبط من مستويات معينة من الطاقة وبتسجيل هذه التغيرات تكون دالة في تركيز الجزيئات أو الذرات. والأشعة الكهرومغناطيسية يقسم طيفها حسب الطول الموجى من الاقل الى الاعلى كالأتي: أشعة جاما ـــ أشعة اكس– الاشعة الفوق بنفسجية – الاشعة المرئية ـــ الاشعة تحت الحمراء– الأشعة ذات الموجات القصيرة ـــ أشعة الراديو.

يعتمد التحليل الطيفى على ظاهرة امتصاص الطاقة الضوئية المرئية أو فوق البنفسجية أو تحت الحمراء او اشعة الراديو بالمادة المراد تحليلها، وذلك طبقاً لقواعد ثابتة ومعروفة، تحدد على أساسها طول الموجة الممتصة ومدى شدة هذا الامتصاص. وينتج الامتصاص الطيفي بسبب إثارة إلكترونية في الجزيئات. ويعتمد التحليل الكمى الطيفي على العلاقة الرياضية بين الامتصاص الطيفي وتركيز المادة الماصة للضوء وذلك طبقاً لقانون «لامبرت بير $A = abc$» حيث A الامتصاص، aمعامل الامتصاصية، b طول المسار الضوئي، c التركيز

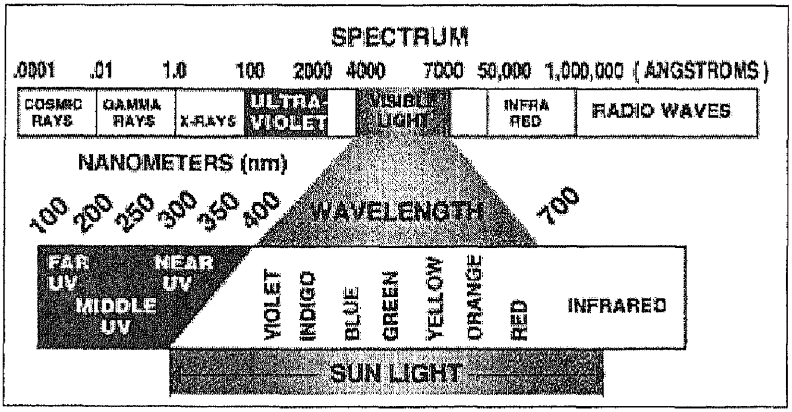
- **الطول الموجى:** هو المسافة بين قمتين متتاليتين أو قاعين متتاليين.
- **التردد:** عدد الموجات التي تمر بنقطة معينة في الثانية.
- **العدد الموجى:** عدد الموجات في السنتيمتر الواحد.

1- التحليل الطيفي الجزيئي في المنطقة الفوق بنفسجيه و المرئية

Ultra Valiet-Visible spectroscopy

1-1. مقدمة :

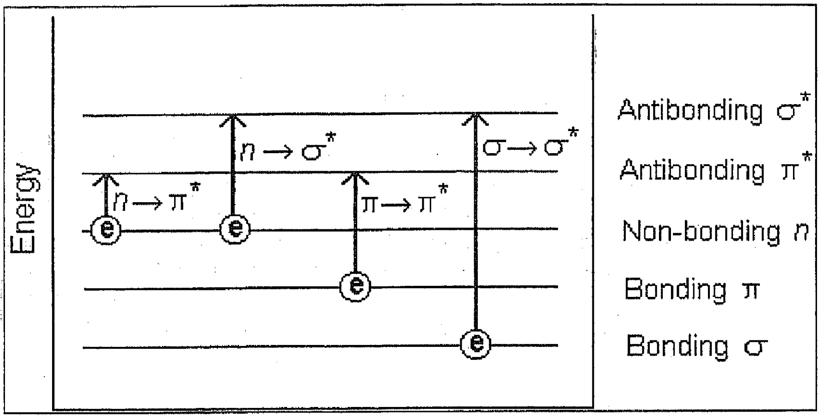
يسلك الضوء المرئي سلوك الضوء فوق البنفسجي في كثير من مظاهره حيث أن كلاهما ينتج عن إمتصاصة إثارة إلكترونية في الجزيئات . كما أن أغلب الأجهزة التي تستخدم في طرق التحليل الطيفي في مجال الأشعة المرئية هي نفسها التي تستخدم في طرق التحليل الطيفي في مجال الأشعة فوق البنفسجية . لذا فقد جرت العادة على دراستهما معاً . ويغطي هذان الطيفان المجال من 200 إلى 800 نانو ميتر كما بالشكل 45 (ميلى ميكرون).



شكل (45): اقسام طيف الاشعة الكهرومغناطيسية (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

- من المعروف أن جزيئات المادة العضوية ترتبط مع بعضها بروابط تعاونية هذه الروابط تنشأ من تداخل مدارات التكافؤ الخارجية والتي تحتوى على إلكترون واحد من كل ذرة ويتكون نتيجة هذا التداخل مدارين جديدين من المدارات الجزيئية هما مدار الرابطة ويحتوى على إلكترونات الرابطة ومدار أخر فارغ هو مدار مضاد الرابطة وهو أعلى في الطاقة.

- والروابط الموجودة في الجزيئات العضوية: الروابط الفردية من النوع سيجما δ والروابط المزدوجة و التى تتكون من رابطة سيجما δ ، ورابطة باى π وهناك إلكترونات لا ترابطية (لا تدخل في تكوين روابط) كما بالشكل 46.
- فعند تعرض مادة عضوية أو جزئ الأشعة .Visible, U.V يحدث حفز لإلكترونات الرابطة سواء كانت δ أو π أو الإلكترونات اللا ترابطية نتيجة لاكتسابها طاقة وتنتقل إلى مسار مضاد الرابطة الأعلى في الطاقة.
- وتختلف الانتقالات في كمية الطاقة اللازمة لحدوثها أي الطول الموجى المسبب لحدوث الانتقال وبالتالي تكون كمية الطاقة الممتصة من الاشعة الفوق بنفسجيه و المرئية دالة في تركيز الجزئ.



شكل (46): أنواع الروابط ومسارات الطاقة الجزيئية.

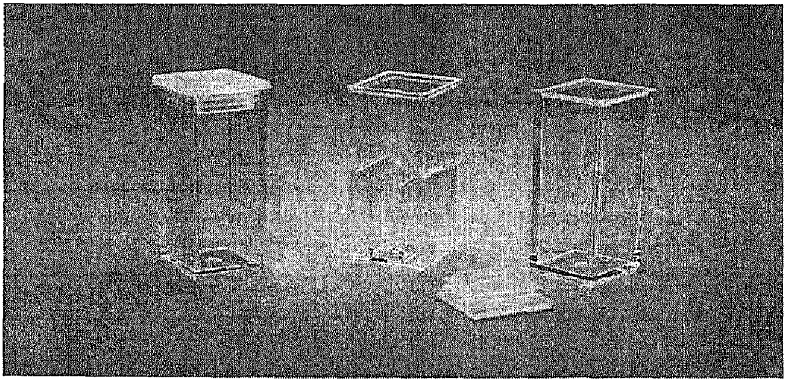
1-2. مكونات الجهاز:

1-2-1. مصدر الأشعة Radiation source: يجب توافر مصدر أشعة ذو طاقة مناسبة وتعتبر لمبة التنجستين أفضل المصادر لإنتاج الأشعة المرئية. ولمبة الديوتيريم من أفضل المصادر لإنتاج الأشعة فوق البنفسجية وهي لمبة

لايفضل مشاهدتها بالعين المجردة لأنها يمكن أن تسبب العمى المؤقت نظراً لقوة إشعاعها.

1-2-2. وحدة فصل الأطوال الموجية: **Monochromator**: يتم التحليل الطيفي للجزيئات عند طول موجي محدد أو في مدى قصير من الأطوال الموجية مما يستدعى وجود وحدة لفصل الأطوال الموجية عن بعضها وتوجيه الطول الموجى المناسب للعينة المراد تقديرها ويستخدم لذلك فلتر Monochromator فى اجهزة الفوتوميتر (المرشح الضوئي) والمحذوذ والمنشور فى اجهزة الاسبكتروفوتوميتر.

1-2-3. وحدة وضع العينة **Sample unit**: وهي إما أن تكون مصنوعة من الزجاج أو تكون مصنوعة من الكوارتز والكوارتز أفضل لأن الخلية المصنوعة من الزجاج من ضمن مكونات صنعها الصوديوم الذي يمتص في مجال UV لذلك يفضل إستخدام خلايا مصنوعة من الكوارتز وهذه الخلايا لايكون من ضمن مكونات صنعها الصوديوم كما بالشكل 47.



شكل (47): شكل وحدة وضع العينة (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

1-2-4. وحدة قياس طاقة الأشعة (**Detector**): تحول الطاقة الضوئية الى

طاقة كهربية يمكن تسجيلها في صورة امتصاصية باستخدام ال Photometer الذى يحتوى على خلية ذات الطبقة الحاجزة. أما في Spectrophotometer تستخدم الخلايا الضوئية الحساسة أو الخلايا الضوئية المركبة.

1-2-5. وحدة التسجيل (Recorder): المسئولة عن عرض النتائج وهناك طريقتين:

- في التقديرات الكمية والتي يحدث فيها الامتصاص عند طول موجي معين فإن الامتصاصية تقرأ مباشرة على التدريج.
- في أجهزة Spectro والتي يقاس فيها الامتصاصية كدالة في الطول الموحى وتعرض النتائج في صورة رسم بياني كطيف يعبر عن العلاقة ما بين الطول الموحى والامتصاصية.

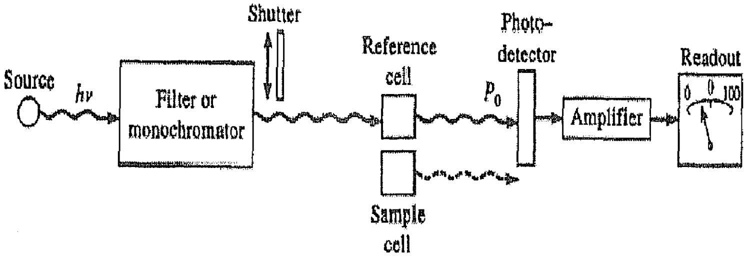
1-3. المذيبات المستخدمة لتسجيل الأطياف الإلكترونية :

لتسجيل الطيف الإلكتروني لمركب ما يجب إستخدام محلول المركب تحت الدراسة في مذيب مناسب . والمذيبات المستخدمة لهذا الغرض يجب أن تتميز بإمتصاصية ضعيفة جداً أو لا تمتص على الإطلاق الأشعة في المنطقة التي يمتص فيها المركب . ومن أمثلة هذه المركبات الإيثانول ،الإيثرات،السيكلوهكسان ،والكلوروفورم واجهزة التحليل الطيفى فى منطقة الاشعة الفوق بنفسحية و المرئية سواء كانت اجهزة الفوتوميتر او الاسبكتروفوتوميتر يوجد منها نوعان:

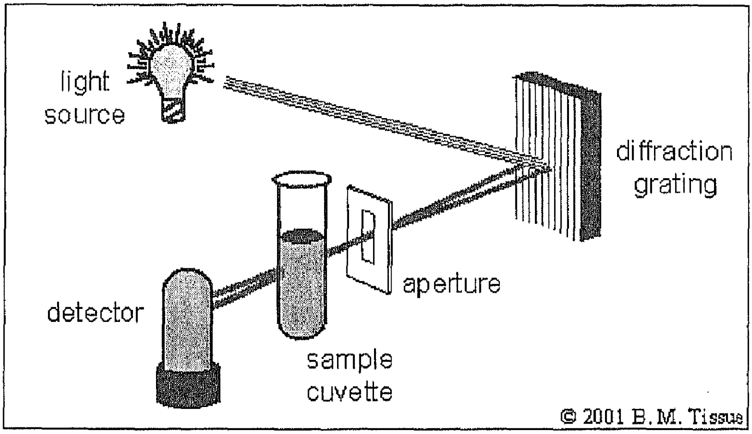
1-4. أنواع أجهزة التحليل الطيفى الجزيئى:

1-4-1. اجهزة الحزمة الواحدة Single Beam instrument

ففى الأجهزة ذات الحزمة الواحدة (شكل 48 و49)، فإن الأشعة الضوئية من المصدر الضوئى بعد مرورها على العينة (اللهب) توجه إلى وحدة فصل الأطوال الموجيه ، ومنها يوجه الشعاع المستخدم فى التحاليل إلى وحدة الكشف حيث يجرى تقدير طاقة الأشعة.



شكل (48): تركيب جهاز التحليل اللوني ذو الحزمة الواحدة.

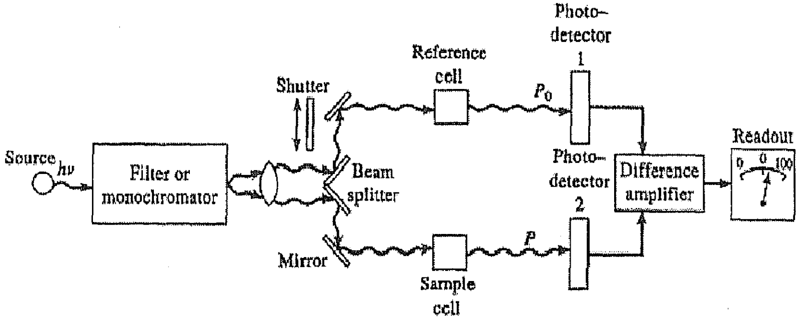


شكل(49): تركيب جهاز التحليل الاسبكتروفوتوميتر ذ و الحزمة الواحدة (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

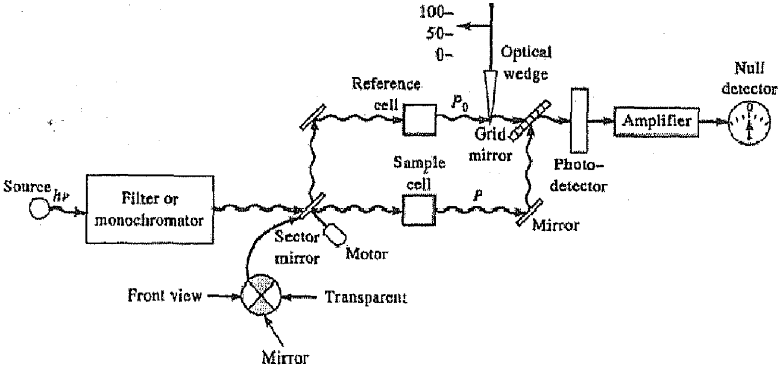
2-4-1. الاجهزة ذات الحزمتين Double Beam instrument:

فى أجهزة الحزمة المزدوجة (شكل 50 و 51) فإن الشعاع الخارج من المصدر يفصل إلى حزمتين بواسطة فاصل للحزمة Beam splitter ، حيث توجه إحداهما إلى العينة (حيث يحدث الامتصاص) ، أما الحزمة الأخرى والتى تشمل الحزمة المرجع Reference beam فتمر موازية للحزمة الأولى (فلا يحدث

امتصاص) ثم يعاد جمع الحزمتين معا ويوجهان إلى وحدة فصل الأطوال الموجية ومنها إلى وحدة القياس.واجهزة الحزمتين تعطى نتائج ادق لان الامتصاصية تقدركنسبة بين الكثافة الضوئية للعينة و الحزمة المرجع وبالتالى تتغلب على للاختلافات فى الكثافة الضوئية الناتجة من مصدر الضوء نتيجة لتغير التيار الكهربى (مصدر الطاقة) Power فى الحهاز.



شكل (49): تركيب جهاز التحليل اللوني ذو الحزمتين.



شكل (51): تركيب جهاز التحليل الاسبكتروفوتوميتر ذو الحزمتين .

جدول (7): المقارنة بين أجهزة الفوتوميتر والاسبكتروفوتوميتر.

وجه المقارنة	Photometer	Spectrophotometer
مصدر الضوء	• يستخدم في الأشعة المرئية Visible. • يستخدم في التقدير اللوني.	• هناك مصدرين للأشعة Visible, U.V.
وحدة فصل الأشعة	• فلتر.	• محذوز أو منشور.
وحدة قياس الأشعة	• الخلايا ذات الطريقة الحاجزة.	• خلايا ضوئية حساسية.
عرض النتائج	• يقرأ الامتصاصية مباشرة على الجهاز.	• قد تعرض مباشرة على الجهاز أو في صورة طيف يعبر عن العلاقة بين λ ، A.
التقدير	• يستخدم في التقدير الكمي. • يقدر على طول موجي محدد.	• يستخدم في التقدير الكمي (أو الوصفي في منطقة U.V فقط).
	• كل منهما يحتوى على Double beam, Single beam.	

1-5. القوانين التي تحكم الامتصاص:

1-5-1. قانون لامبرت: طاقة الأشعة المتوازية وحيدة الطول الموجى تتناقص أسيا مع زيادة سمك المادة التي تمر خلالها.

1-5-2. قانون بيير: طاقة الأشعة المتوازية وحيدة الطول الموجى تتناقص أسيا مع زيادة تركيز المادة.

1-5-3. قانون لامبرت بيير: طاقة الأشعة المتوازية وحيدة الطول الموجى تتناقص أسيا مع زيادة سمك المادة التي تمر خلالها والتركيز كما بالمعادلة التالية:

$$A = \quad E \quad b \quad C$$

حيث A ان تعبر عن

E تعبر عن معامل الخفوت

b تعبر عن السمك

C تعبر عن التركيز

6-1. استخدام هذا النوع من التحليل في التحليل الوصفي:

التحليل الوصفي بالـــ U.V "وسيلة محدودة جدا": الاستفادة الوحيدة في التحليل الوصفي هو إمكانية معرفة المجموعة الكيميائية بمقارنة λ-max للمركب المجهول بالجداول القياسية. يمكن نقارن الطيف كله بجداول بها أطياف قياسية ولكنه صعب جدا. التحليل الوصفي يكون في منطقة U.V وليس Visible.

7-1. التحليل الكمي بواسطة اجهزة التحليل فى منطقة الضوء المرئى Visible و الاشعة الفوق بنفسجية U.V. هناك طريقتين:

1- بمعلومية معامل الخفوت الجزيئي أو المولى ونعوض في المعادلة مباشرة ونحصل على التركيز. حيث ان سمك الخليه و الامتصاصية و معامل الخفوت تكون معلومه وبالتالى يمكن حساب التركيز كما فى المعادلة التالية:

$$A = E \quad b \quad C$$

حيث A ان تعبر عن

E تعبر عن معامل الخفوت

b تعبر عن السمك

C تعبر عن التركيز

2- باستخدام المنحنى القياسي: وتتم كالأتي:

- اختيار الطول الموحى المناسب بحيث يقع في المنطقة التي تمثل أقصى امتصاص للمركب.
- تحضير التركيزات القياسية بنفس الطريقة الموجود فيها العينة.
- قياس الامتصاصية للتركيزات القياسية.
- يتم عمل منحنى قياسي وهو عبارة عن علاقة بين الامتصاصية والتركيز.
- تقدير تركيز العينة وذلك بقياس الامتصاصية داخل الجهاز وعن طريق المنحنى القياسي نحصل على التركيز أو عن طريق التعويض في معادلة المنحنى القياسي.

1-8. تخفيف العينات: Samples dilution

يحتاج الامر عند قراءة الكثافة الضوئية لبعض العينات اجراء عملية تخفيف للعينة نتيجة القراءة العالية جدا للكثافة اللونية والتى تزيد من نطاق المدى المناسب للقياس حيث قد ترتفع قيمة الخطا النسبى فى حالة عدم التخفيف و فى هذه احاله للنصف او على حسب قراءة الكثافة الضوئية بالمدى المناسب ثم تترجم لتركيز حيث يضرب بعد ذلك فى قيمة معامل التخفيف

1-9. تقوية العينات: Samples fortification

يستدعى الامر اثناء قياس الكثافة الضوئية لبعض العينات اجراء عملية تقوية او تركيز لها نتيجة لوقوعها خارج النطاق الادنى للقياس حيث قد ترتفع نسبة الخطا النسبى فى هذا المدى ومن هنا يتم عمل تركيز معلوم من نفس المادة وتقرا الكثافة الضوئية له وتترجم الى تركيز و ليكن C_f ثم يضاف اليه بعد ذلك العينة ذات التركيز المنخفض بنفس الحجم و تقرا الكثافة الضوئية وتترجم الى تركي وليكن C_t ويتم حساب التركيز المنخفض فى العينه بطرح C_f من C_t

1-10. الإجراءات المتعلقة باللون المتكون في التقديرات اللونية فى المنطقة المرئية:

1- يجب أن يكون اللون المتكون ثابتا لمدة 15-30 دقيقة على الأقل بصرف النظر عن التركيز.

2- يمكن الحصول على اللون كلما تم إجراء التفاعل

3- أن يكون اللون متدرج مع التركيز.

4- يكون حساس لأي تغيرات بسيطة في التركيز.

1-11. العوامل المؤثرة على ثبات اللون:

1- الوقت اللازم لتكوين اللون.

2- حموضة الوسط.

3- خطوات تكوين اللون وتتابع المراحل.

4- تأثير زيادة التركيز للمادة محل التقدير.

5- تركيز الجواهر الكشافة وما إذا كانت حديثة التقدير أو مخزنة.

12-1. مميزات التحليل فى المنطقة المرئية و الفوق بنفسجية :

1- تعطي طرق التقدير اللونية أو الطيفية عموما نتائج أكثر دقة في حالة التركيزات المنخفضة Low concentrations عن الطرق الحجمية أو الوزنية للتقدير الكلي لنفس المادة

2- طرق التقدير اللوني أو الطيفي قد تكون أكثر بساطة في إجرائها

3- تمتاز هذه الطرق بسرعة كافية تصلح في عمليات التقدير الروتينية التي تتم بانتظام لمادة معينة ولذلك فهي تفضل عن الطرق الأخرى للتحليل في هذه الحالة

4- نلجأ لهذه الطرق تحت ظروف معينة لاتصلح فيها الطرق الحجمية أو الوزنية مثل حالات تقدير المركبات البيولوجية

13-1. الاعتبارات التي يجب مراعاتها عند اختيار طريقة لونية أو طيفية للتحليل :

يجب تحقيق الخطوات الآتية لضمان نجاح عمليات التحليل اللوني أو الطيفي.

1- نوعية تفاعل تكوين اللون Specificity of the color reaction :

تحقيق ذلك باختيار جواهر كشافة اختيارية وهي التي تكون لونا فقط ماعدا قليل من المركبات المتشابه ويفضل اختيار جواهر كشافة نوعية وهي التي تتفاعل فقط مع مركب بذاته ويمكن تحقيق النوعية أحيانا بتثبيت رقم ال pHأو بتكوين مركبات مزدوجة لدرجة كافية من الثبات

2- التناسب بين اللون والتركيز:

يجب وجود تناسب طردي بين كثافة اللون وبين التركيز ولكن يمكن علي أساس

استخدام الخلية الضوئية الكهربائية تسجيل العلاقة القياسية بين اللون والتركيـز سـواء كانت طردية أو غير منتظمة ويمثل المنحنى القياس هذه العلاقة بدقة كافية

3- ثبات اللون:

يجب أن يتمتع اللون المتكون بقدر كافي من الثبات بحيث يسمح بأخذ قراءات دقيقة كما يجب أن يتم بتثبيت كل العوامل التي تؤدى بتغييرها إلى عدم ثبات اللون مثل رقم pHودرجة الحرارة وكذلك حركة الهواء

4- ثبات النتائج في التقديرات المتكررة:

يجب أن تكون النتائج ثابتة عند تكرار التقديرات بحيث لا تتعدي الفـروق حـدود الخطأ التجريبي الذي يمكن السماح به – كما يجب تثبيت الظروف القياسـية لإجـراء التقدير لضمان الحصول على مثل هذه النتائج باستمرار.

5- نقاء المحلول وشفافيته:

يجب نقاء المحلول وخلوه من الشوائب وأن يكون شفافا لأن وجود الشوائب يـؤثر على كمية الضوء الممتص بواسطة المحلول.

6- فصل الشوائب والمواد التي تتداخل في تفاعل اللون:

يمكن فصل المواد المتداخلة بالطرق الطبيعية المعروفة مثل التقطير أو التبخيـر أو الفصل الكروماتوجرافى أو الإذابة في مذيبات اختيارية أو بطرق التحليل الكهربائي – كما يمكن الفصل للشوائب والمواد المتداخلة بتحويلها إلى مركبات مزدوجة خاملـة أو بالترسيب – وقد يساعد في ذلك التحكم في بعض ظروف البيئة مثل التركيز ورقـم ال pHودرجة الذوبان ونوع المذيب.

1-14. دور التحليل اللونى في تقدير متبيقات المبيدات :

أجريت محاولات عديدة لمعرفة المجموعة الفعالة التـي يمكـن أن تـستخدم فـي التحليلات اللونية للمبيدات ولقد تحققت نجاحات كثيرة في هذا المجال ومثال على ذلك

مجموعة الأمين العطرية حيث أنه من المعروف أن هذه المجموعة عند تفاعلها مع نيتريت الصوديوم في وسط حامضي تتكون أملاح الديازونيوم والتي ترتبط مع النفثايل وتكون مركب ملون يمتص عند 540 ميكرون. وهذا التفاعل يصلح في العديد من المبيدات الحشرية. ومبيدات الحشائش التي تحتوى على مجموعة أمين. ولقد تم تطوير هذه الطريقة لتلائم العديد من المبيدات التي تحتوى على مجموعة نيترو وذلك باختزالها لمجموعة الأمين ثم إكمال التفاعل اللوني كما سبق وأيضا نيترة حلقة البنزين في المركبات الهيدروكربونية المكلورة ثم اختزالها بعد ذلك لتكوين مجموعة أمين ثم إكمال التفاعل كما سبق.

2. مطياف الكتلة Mass Spectroscopy[1]

2-1. نظرية التحليل بواسطة مطياف الكتلة :

يختلف التحليل بواسطة مطياف الكتلة كما شكل (52)عن المطيافيات الأخرى في أن جزيئات المادة المطلوب تحليلها بواسطة جهاز مطياف الكتلة تتعرض إلى قدر عالى من الطاقة ، ويكون أكبر بكثير من الطاقة اللازمة لعملية الإنتقالات التي تحدث في حالة التحليل بالأشعة تحت الحمراء أو المرئية أو فوق البنفسجية. يتم قذف العينة bombarding بواسطة حزمة من الإليكترونات electron beam سريعة الحركة فتمتص العينة هذه الطاقة ، ويؤدي هذا الإمتصاص الطاقي إلى انفصال أليكترون أو أكثر من الجزىء أى تحدث عملية تأين ionization للجزىء . وتتكون أيونات موجبة positive ions للجزىء الأصلى بالاضافة إلى تكسير بعض الروابط الضعيفة فى الجزىء مما يؤدى إلى تكوين أيونات صغيرة أخرى تسمى شظايا fragments . وعند تعرض الجزىء لهذه الطاقة الهائلة الناتجة عن حزمة الأليكترونات ، يتكون عدد من الأيونات الموجبة تختلف عن بعضها فى الكتلة mass (m) والشحنة charge (e) . ولذلك يتم فصل هذه الأيونات على أساس إختلافها فى نسبة الكتلة إلى الشحنة m/e بإستخدام مجال مغناطيسى ، أو بإستخدام مجال مغناطيسى مزدوج مع مجال كهربى. وبذلك يتم تسجيل نتائج التحليل فى صورة طيف كتلي mass spectrum يوضح كتلة هذه الأيونات وتركيزها.وبذلك نجد أن تحليل العينات باستخدام جهاز Mass spectrometer يعتمد على عمليتين أساسيتين تحدث للمركب بعد قذفه بحزمة من الأليكترونات هما:

1- التأين ionization
2- التكسير fragmentation

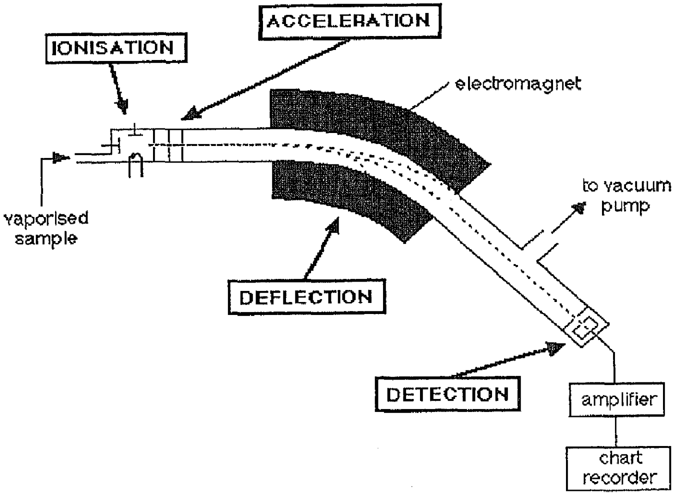
---

[1] كتبه الاستاذ الدكتور احمد خميس محمد سلامه - قسم كيمياء المبيدات-كلية الزراعة- جامعة الاسكندرية

2-1-1. عملية التأين: وفيه يحدث فقد أليكترون واحد من الجزيء ، ويتكون ما يسمى بالأيون الجزيئى molecular ion وكتلة هذا الأيون تساوى كتلة الجزيء وذلك لأن كتلة الأليكترون الذى فقده ضئيلة جداً جداً لاتؤثر على وزنه الجزيئي.

2-1-2. عملية التكسير: وفيها يتم تكسير الروابط الضعيفة فى الأيون الجزيئى الى شظايا ايونية ، أو أيونات أصغر فى الوزن الجزيئى fragment ions ويتم عن طريقها تحليل العينات الغازية أو السائلة أو الصلبة التى يمكن تحويلها إلى الصورة البخارية بإستخدام درجات حرارة معتدلة ، كما أن كمية المادة المطلوبة للتقدير تكون في حدود الميكروجرامات.وبدراسة طيف الكتلة MS لأي مركب يمكن تمييز الأيون الجزيئى ومن ثم الوزن الجزيئى. أما التركيب الجزيئى يمكن معرفته من موضع التكسير فى الأيون الجزيئى حيث أن الروابط الضعيفة تتكسر بسهولة عن الروابط القوية.

2-2. مكونات جهاز مطياف الكتلة :

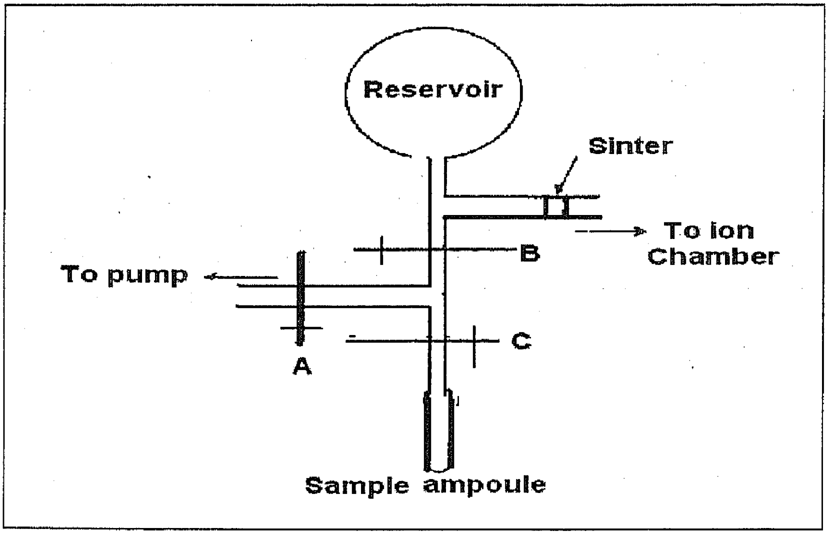


شكل (52): تركيب جهاز مطياف الكتلة.

1-2-2. وحدة وضع العينة Sample unit:

يوجد بالجهاز أكثر من نظام لوضع العينة حتى يمكن تحليل العينات سواء كانت غازية أو سائلة أو صلبة.وفى جميع الحالات تحول المادة إلى الصورة الغازية والتى تنطلق بدورها إلى خزان خاص reservoir سعته خمسة لترات بحيث يكون الضغط فى هذا الخزان أعلى مرتين من الضغط فى حجرة التأين وذلك لضمان إنتقال العينة من وحدة العينة إلى غرفة التأين المفرغة (شكل 53).

ويوجد بين وحدة وضع العينة ووعاء التأين مقياس ضغط دقيـــق micro manometer لتقدير كمية العينة الداخلة إلى حجرة التأين. وتحتوى وحدة إدخال العينات علـــى فتحتـــين إحداهما لإدخال المواد الغازية والسائلة Gas & Liquid inlet والأخرى لإدخـــال المـــادة الصلبةSolid vaporization inlet



شكل (53): وحدة ادخال العينة Inlet syste .

المواد الغازية: تحقن العينات الغازية في حدود $0.1\ cm^3$ بواسطة سرنجة دقيقة وقد يصل الحجم الى $10^{-8}\ cm^3$ حيث يتم تمدد العينات خلال وعاء أو خزان العينة.

العينات السائلة: إما أن يتم إدخال العينات السائلة بواسطة ماصة صغيرة خلال غشاء زجاجي يسمى Sintered glass disk ،أو تحقن خلال حاجز من المطاط والسليكون. وإذا كانت هذه المواد السائلة درجة غليانها أقل من 150°م فإنها سوف تتحول إلى بخار على درجة حرارة الغرفة نتيجة الضغط المنخفض فى وعاء العينة .

وفى حالة السوائل الأقل تطايرا : فإنه يمكن تسخين وحدة وضع العينة حتى حوالى 200°م ، وتتوقف درجة التسخين المستخدمة على تركيب ودرجة ثبات المادة المراد تحليلها . والمعروف أن المواد المحتوية على نتروجين أو أكسيجين يحدث لها إنحلال حرارى thermal decomposition على درجات حرارة أعلى من 200°م.

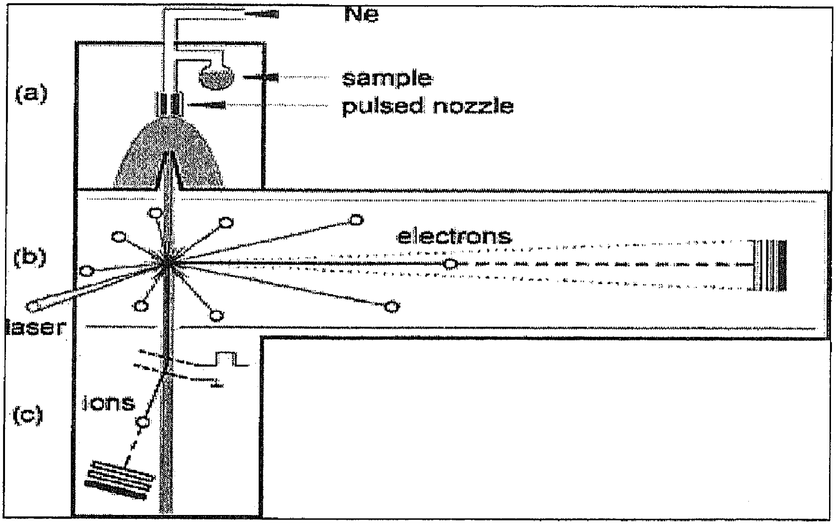
العينات الصلبة: العينات التى تنصهر عند درجة إنصهار أقل من درجة حرارة وعاء العينة يمكن إدخالها مباشرة وتسخن العينة بعد ذلك للوصول الى ضغط بخارى مناسب ويكون حجم العينة فى حالة المواد الصلبة أوالسائلة عدة ملليجرامات وقد يصل إلى ميكروجرامات.

والمطلوب للتحليل تدفق مناسب وثابت من العينة إلى الشعاع المؤين خلال عملية التحليل Steady flow of sample into the ion beam كما هو موضح بشكل (54).

وبصفة عامة نجد أن حجم العينة ودرجة تطايرها ، تتشابه مع تلك المتوفرة فى جهاز التحليل الكروماتوجرافى بالغاز.

ويمكن دمج جهازي التحليل الكروماتوجرافي الغازي وجهاز تحليل الطيف الكتلي معا ويسمى جهاز GC-MS ، حيث يسمح للعينة بالدخول عن طريق فتحة تسرب ضئيلة جداً من عمود جهاز التحليل الكروماتوجرافي الغازي إلى مطياف الكتلة ، وذلك بعد فصلها وتحويلها إلى بخار ، ويمكن التخلص من الغاز الخامل الحامل للعينة

أثناء خروجها من عمود جهاز التحليل الكروماتوجرافي الغازي ، وذلك بواسطة تمريره من خلال أنبوبة زجاجية رقيقة الجدار (إذا كان الغاز الحامل هيليوم) أو من خلال أنبوبة بلاديوم Palladium (إذا كان الغاز الحامل هيدروجين).ويعتبر دور جهاز التحليل الكروماتوجرافي الغازي فى هذه الحالة مجرد وسيلة لفصل مخاليط المركبات.



شكل (54): تدفق العينة إلى الشعاع المؤين خلال عملية التحليل. **Steady flow of sample into the ion beam**

2-2-2. غرفة التأين **Ionization Chamber**:

يسمح للعينة المراد تحليلها بالمرور من وحدة وضع العينة إلى غرفة التأين بعد تحويلها إلى صورة بخارية وفى هذه الحالة أيضاً يكون هناك تدرج فى الضغط لأن العينة تبدأ من الضغط الجوى العادي 760 torr (mmHg) إلى ضغط منخفض داخل وحدة وضع العينة يصل إلى 10^{-2} torr ثم يقل هذا الضغط داخل غرفة التأين ليصل إلى

10^{-5} torr . وهكذا يحدث تقليل تدريجى للضغط من نقطة وضع العينة حتى وحدة التسجيل للعينة وذلك لتفريغ الهواء داخل الجهاز ، لضمان إنتقال العينة من نقطة إلى أخرى بسهولة. ويتم داخل غرفة التأين عملية تأين الجزيئات التى يتم فصلها بعد ذلك.

ويجب مراعاة اختيار مصدر وطريقة التأين المناسبة لكل عينة حيث توجد عدة طرق لتأين الجزيئات تتوقف أساساً على نوع العينة ، والغرض من التحليل.ومصدر التأين له وظيفة مزدوجة هى:- تأين الجزيئات دون التفرقة بين كتل الأيونات المختلفة ، ثم اسراع أو تعجيل accelerating هذه الأيونات إلى وحدة تحليل الأيونات.

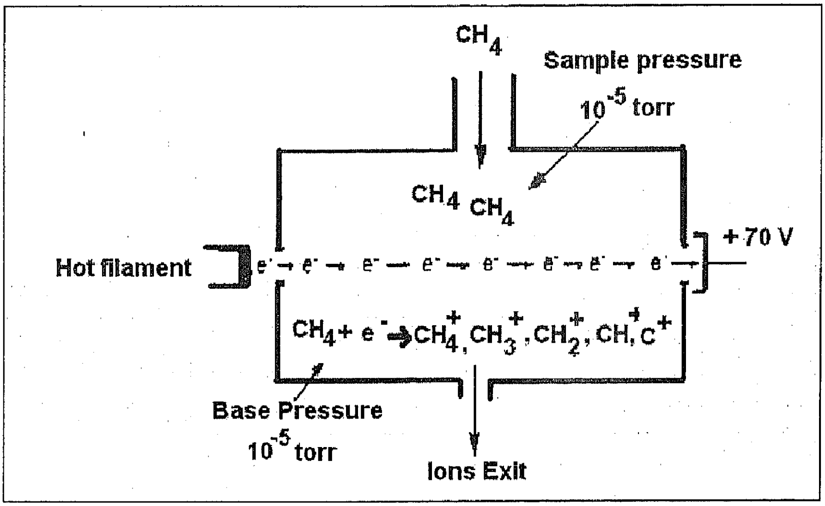
الطرق المختلفة لعملية التأين:

1- التأين بالتصادم الأليكترونى (EII) Electron Impact Ionization

يعتبر التاين بالتصادم الالكترونى الأكثر شيوعاً فى أجهزة مطياف الكتلة ، وفى هذه الطريقة يدخل تيار المادة فى صورتها الغازية إلى وحدة التأين والتى تكون مفرغة من الهواء ودرجة حرارتها 200°م فتتعرض جزيئات المادة إلى حزمة من الأليكترونات ذات طاقة تبلغ 70 electron volt وتنتج هذه الأليكترونات من فتيل مسخن كهربيا hot filament ، وتتحرك هذه الأليكترونات عمودياً على إتجاه سريان الجزيئات بواسطة فرق الجهد. ويمكن التحكم فى عدد الأليكترونات عن طريق تغيير درجة حرارة الفتيل وكذلك عن طريق تغيير فرق الجهد (شكل 55).

وعموماً عندما تتعرض جزيئات المادة لهذه الأليكترونات المرتفعة الطاقة ، فإنها تتأين وتتكون أيونات موجبة الشحنة ، وتتحرك الأيونات الموجبة للأمام نتيجة للتنافر مع الشحنات الموجبة الموجودة على لوحة مشحونة إليكتروستاتيكياً خلف الأيونات وتسمى هذه اللوحة باسم الطارد repeller ، وبتحرك الأيونات فإنها تتعرض لفرق جهد عالى مما يزيد من سرعتها أو تعجيلها ، ثم يتم تركيز هذه الأيونات فى صورة حزمة صغيرة تدخل إلى وحدة فصل الأيونات.وجهد التأين ionization potential

لمعظم المركبات العضوية حوالى 10 e.v. وهذه الطاقة تكفى فقط لإنتاج أيون جزيئ واحد Single charged molecular ion أى تعطى peak واحد فقط يقابل الوزن الجزيئى للمركب M^+ دون حدوث أى تكسير فى الجزىء الأصلى.ولكن بزيادة قيمة فرق الجهد بين 50-70 e.v. فإنه يتكون العديد من الشظايا أو نواتج تحطم وتكسير ثابتة عند تكرار هذه العملية وبذلك ينتج عندنا طيف للمركب يمكن تكراره عند استخدام نفس الظروف reproducible spectra وبذلك نجد أن الجزيئات عندما تتعرض لهذه الطاقة المرتفعة فإنها تفقد أليكترونات ـــ غالباً تفقد أليكترون واحد one electron ـــ ويتكون أيون جزيئى موجب الشحنة positive charged molecular ion



شكل (55) : التأين بالتصادم الأليكترونى.

ميكانيكية تكسير الأيونات الجزيئية:

من المعروف أن إحتمال تكسير رابطة كيميائية فى الأيون الجزيئى يتوقف على قوة الرابطة وطاقة التنشيط ودرجة ثبات الوحدات المتكونة من عملية التكسير سواء كانت

وحدات مشحونة أو غير مشحونة.وإذا رمزنا للأيون الجزيئى الذى يتكون من مجموعتين كيميائيتين هما A وB يرتبطان برابطة كيميائية بالرمز $(AB)^{+.}$ ، فإن الاحتمالات المختلفة لتكسير هذا الأيون هى:

1- تكسير بسيط يتكون عنه أيون موجب positive ion وشق حر free radical كما بالمعادلات التالية:

$$(AB)^{+.} \longrightarrow A^{+} + B^{.}$$

$$\text{or} \longrightarrow B^{+} + A^{.}$$

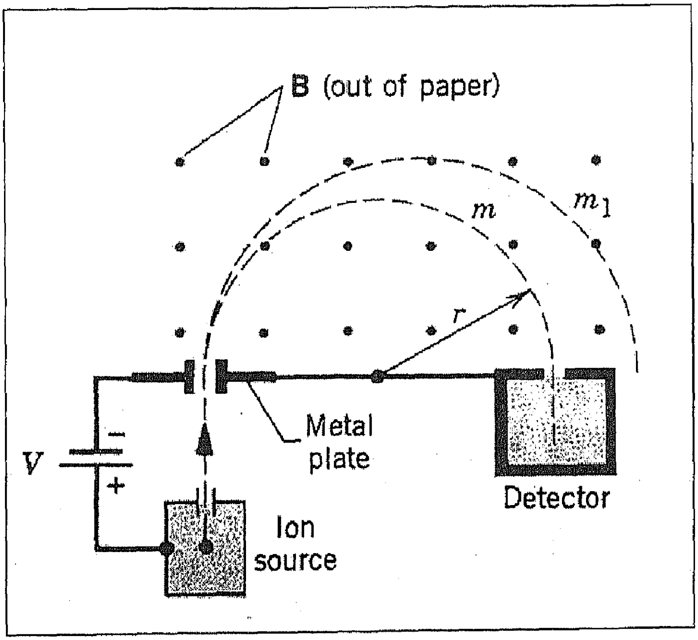
2- تكسير يؤدى إلى تكوين جزيء متعادل وشق حر كاتيونى radical ion

$$(AB)^{+.} \longrightarrow A^{+.} + B$$

$$\text{or} \longrightarrow B^{+.} + A$$

ويلاحظ أن الشق الحر أو الجزىء المتعادل لا يتم تسجيلهما فى طيـف الكتلـة ، لأنهما جزيئات متعادلة.ومن الملاحظ أنه بالإضافة إلى تكـوين الأيونـات الجزيئيـة الموجبة نتيجة لفقد الأليكترونات من هذه الجزيئات ، فإنه يتكون بعض الأيونات السالبة نتيجة لإتحاد الجزيئات المتعادلة مع الإليكترونات.

هذه الأيونات السالبة يتم إمتصاصها على اللوحة المعدنية الأولى (الموجبة) كما هو موضح فى الشكل (56) Repeller plate (e)



شكل (56): امتصاص الأيونات السالبة على اللوحة المعدنية Negative ion absorption on metal plate.

عيوب طريقة التأين بالتصادم الألكتروني:

1- أن تكوين الأيونات بواسطة التصادم الأليكترونى غير مناسب للجزيئات عديمة الثبات unstable molecule حيث يؤدى ذلك إلى تكسير الأيونات الجزيئية إلى أيونات أصغر.

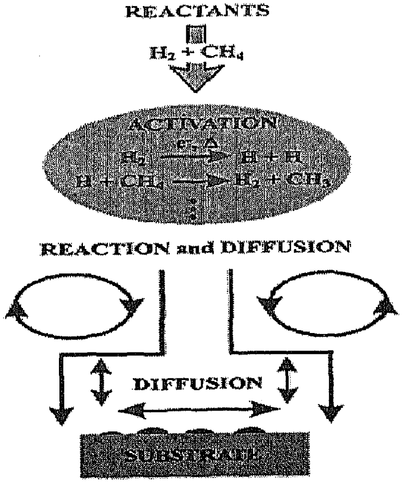
2- قد يحدث إختفاء للأيون الجزيئى molecular ion كلية فى بعض المركبات.

3- هذه الطريقة تتطلب أن تكون العينة فى الحالة البخارية.

4- وجود كمية قليلة من الغازات - نتيجة لعدم التفريغ الكامل - يؤدى إلى تأينها وظهورها فى طيف الكتلة.

2- التأين الكيميائى: Chemical ionization (CI)

وتعتمد هذه الطريقة على إستخدام غاز الميثان بتركيز عالى ، مما يحدث تأين لغاز الميثان نفسه عند دخوله مع العينة إلى غرفة التأين ، نتيجة تعرضه لحزمة الأليكترونات ثم تقوم أيونات الميثان بعد ذلك بالتفاعل مع جزيئات المادة. الدور الذى يلعبه غاز الميثان هنا هو تقليل طاقة الجزيئات. حيث أن التفاعل بين الجزيئات وأيونات الميثان ينتج عنه أيونات طاقتها أقل من طاقة التأين المباشر للجزيئات بواسطة حزمة الأليكترونات وبذلك فإن طاقة الأيونات الجزيئية تكون منخفضة وأقل تعرضاً لعملية التكسير ، ولذلك تعتبر هذه الطريقة مناسبة فى حالة الجزيئات غير الثابتة والتى يحدث للأيون الجزيئى الناتج منها تكسير كبير بإستخدام طرق التأين الأخرى (شكل57).



شكل (57): طريقة التأين الكيميائي Chemical ionization.

وتتم عملية التأين الكيميائى على الخطوات التالية كما بالمعادلة التالية:

$$CH_4 \longrightarrow CH_4^+,\ CH_3^+,\ ^+CH_2,\ ^+CH,\ ^+C,\ ^+H_2,\ H^+,\ 2e$$

وهذه الأيونات تتفاعل مع بقية جزيئات الميثان التى لم تتأين كالأتى:

$$CH_4 + CH_4^+ \longrightarrow CH_5^+ \quad , \quad CH_3^{\cdot}$$

$$CH_4 + CH_3^+ \longrightarrow C_2H_5^+ \quad , \quad H_2$$

وتتفاعل هذه الأيونات بدورها مع جزيئات العينة RH كالأتى:

$$RH + CH_5^+ \longrightarrow RH_2^+ + CH_4$$

$$RH + C_2H_5^+ \longrightarrow RH_2^+ + C_2H_4$$

ويتكون بذلك RH_2^+ والتى قد تفقد الهيدروجين H_2 كالأتى:

$$RH_2^+ - H_2 \longrightarrow R^+$$

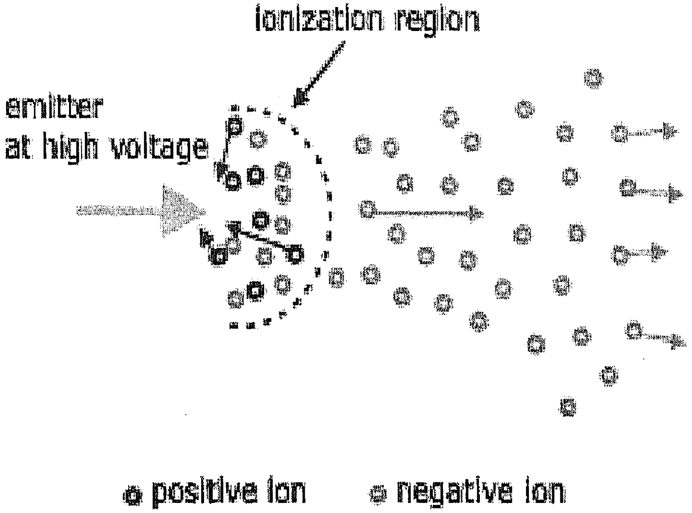
ولكن فى معظم الأحيان يظهر الأيون RH_2^+ والذى تكون كتلته أكبر من كتلة الأيون الجزيئى بواحد وبذلك يمكن معرفة كتلة الأيون الجزيئى RH^+

3- التأين بواسطة مجال كهربى Field ionization (FI)

وتعتمد هذه الطريقة- كما هو موضح في شكل (58) - على وجود سطح معدنى فى مجال كهربى عالى (10^8 volt/cm^2) وعند إقتراب الجزيئات ـــ المندفعة إلى حجرة التأين ـــ من هذا السطح المعدنى تنسحب الألكترونات من تلك الجزيئات إلى القطب الموجب مؤدية إلى تكوين أيونات جزيئية موجبة. وتتميز هذه الطريقة بحدوث عدد قليل جداً من التكسير ، وقد لا يحدث تكسير على الإطلاق. وبهذه الطريقة يمكن تقدير الوزن الجزيئى ، والرمز الجزيئى للمركبات.

وتوجد طرق أخرى لعملية التأين ، مثل :- إستخدام الأشعة فوق البنفسجية UV ، وأشعة الليزر laser microprobe وغيرها.وفى النهاية بعد عملية التأين فإن الناتج من وعاء التأين عبارة عن أيونات موجبة فى صورة مخلوط مع الأيون الجزيئى بالإضافة إلى بعض الأيونات الناتجة من تكسير الأيون الجزيئى ، والأيونات الناتجة عن وجود بعض

النظائر فى تركيب الجزيئات. وكل هذه الأيونات تختلف عن بعضها فى نسبة الكتلة إلى الشحنة m/e ، ولذلك يتم فصلها فى وحدة فصل الأيونات بناء على هذه الخاصية.



شكل (58): التأين بواسطة مجال كهربي **Field ionization** (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

3-2-2. وحدة فصل أو فرز الأيونات Ion analyzer or separator :

وفيها يتم فصل مخلوط الأيونات الناتجة من عملية التأين على أساس الاختلاف في نسبة m/e حتى يمكن رصد وتسجيل هذه الأيونات كل على حدة ويجب أن تكون عملية فصل الأيونات على درجة عالية من الدقة والتمييز وخاصة فى حالة الكتل المتقاربة جداً. ويعتبر جهاز مطياف الكتلة له قدرة فصل وتمييز عالية high resolution instrument اذا يستطيع الفصل بين الكتل التالية:

$C_{16}H_{22}O_2$, MW (246.1620) & $C_{17}H_{26}O$, MW (246.1984)

CH mass (13.0078) & ^{13}C mass (13.0034).

وبذلك تعتبر القدرة العالية على التمييز high resolution مطلب أول هام وضرورى فى وحدة فصل الأيونات ion analyzer ويمكن التعبير عن كفاءة فصل الأيونات للجهاز وهى قدرته فى تمييز الكتل المتقاربة بالمعادلة التالية:

$$R = M_1 \ / \ (M_2 - M_1)$$

حيث أن:

R تعبر عن كفاءة الفصل للجهاز resolution

M_1, M_2 كتلة الأيونات المتجاورة

أما المطلب الثانى والهام أيضاً فى الـ ion analyzer هو الإنتقال السريع للأيونات أو زيادة التيار الأيونى اللازم للتسجيل High transmission of ions وهنا يبدو التعارض بين القدرة على الفصل resolution وشدة التيار الأيونى لأنه بتصغير فتحة دخول وخروج الأيونات يزداد الفرز ولكن يقل التيار الأيونى اللازم للتسجيل والعكس صحيح ومن هنا نجد أن الأجهزة المختلفة تتباين فى طريقة التكييف بين هذين المطلبين.

طرق فصل الأيونات:

توجد عدة أنظمة مختلفة فى فصل الأيونات، وهى:

1- انحراف الأيونات في مجال مغناطيسي:

Single focusing magnetic analyzer (low resolution)

يتم فصل الأيونات هنا بإستخدام مجال مغناطيسى قوى ليعمل على إنحراف الأيونات الموجبة بدرجات متفاوتة أثناء مرورها فى أنبوبة التحليل analyzer كما سيتضح في اللاحق (شكل 59). ويتوقف مقدار الإنحراف deflection على نسبة m/e حيث تنحرف الأيونات الكبيرة الوزن بدرجة أقل من الأيونات الخفيفة على حسب المعادلة التالية:

$$m/e = H^2 \, r^2 / 2 \, V$$

حيث:

H = شدة المجال المغناطيسي

r = قطر المسار الدائري الذي تسير فيه الأيونات

V = جهد التعجيل

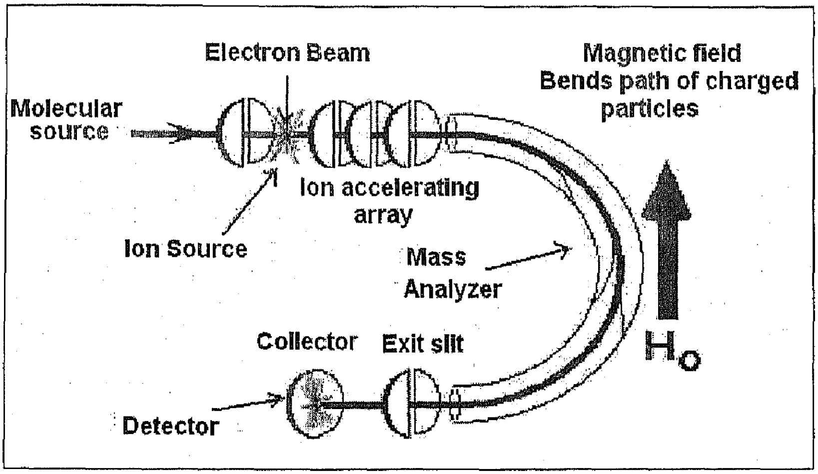
وعند ثبات جهد التعجيل V وشدة المجال المغناطيسى H فإن الأيونات المختلفة فى قيمة (m/e) تأخذ مساراً دائرياً يختلف فى القطر r وعلى ذلك فإن الأيونات التى يكون مسارها الدائرى مطابقاً مع أنبوبة التحليل تصل إلى وحدة القياس ، أما الأيونات الأخرى فيكون مسارها مخالفاً لمسار أنبوبة التحليل وتصطدم بجدار أنبوبة التحليل فتتعادل حيث يتم سحبها من وحدة تحليل الأيونات وعلى ذلك فإن المجال المغناطيسى يقوم بعزل الأيونات إلى حزم تختلف كل منها فى قيمة m/e وللحصول على طيف الكتلة يغير الجهد V بمعدل ثابت وعلى ذلك فإن الأيونات تصل إلى وحدة التسجيل بالتتابع ، تبدأ بالأيونات ذات الكتل الصغيرة وتنتهى بالكتل الكبيرة.

ويلاحظ أن إستخدام المجال المغناطيسى فى فصل الأيونات يتيح فصل الأيونات التى تختلف عن بعضها بمقدار الوحدة Unit resolution أى أنه يمكن فصل الأيونات التى كتلتها 200 من الأيونات التى كتلتها 199 والأيونات التى كتلتها 201 .وتعتبر الأجهزة التى تستخدم المجال المغناطيسى بمفرده فى فصل الأيونات أجهزة ذات قدرة فصل أو تمييز منخفضة low resolution ويمكن إستخدام هذا النوع من الأجهزة فى فصل المركبات التى كتلتها فى المدى من 200 – 600 وحدة من وحدات الوزن الجزيئى.

2- فصل الأيونات بالتركيز البؤري المزدوج Double focusing analyzer

يتم فصل الأيونات هنا باستخدام مجال كهربى ومجال مغناطيسي ويسمى ذلك بال double focusing ، ويعتمدالمجال الكهربى على أن الأيونات بعد خروجها من عملية التصادم مع حزمة الأليكترونات فإنها تخرج بطاقات حركية kinetic energies مختلفة

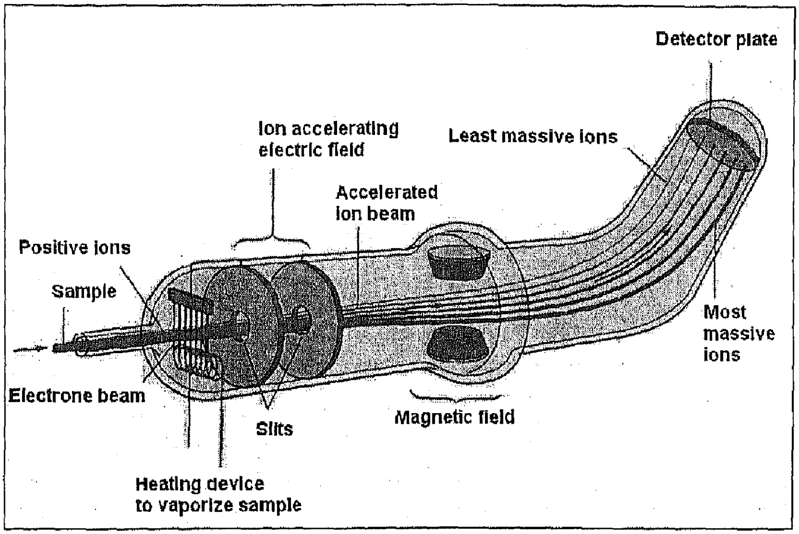
من غرفة التأين وبالتالى فإن سرعة هذه الأيونات تكون غير متكافئة أى ذات سرعات مختلفة لإختلاف طاقتها الإبتدائية ، وعلى ذلك يقوم المجال الكهربى بفصل تلك الأيونات بناء على طاقتها حيث يتم فصل الأيونات التى تختلف فى طاقتها إلى حزم قبل فصلها بواسطة المجال المغناطيسى ، بينما يقوم المجال المغناطيسى بعد ذلك بفصل الأيونات ذات الطاقة المتساوية بناء على نسبة الكتلة إلى الشحنة m/e أى أننا هنا نستخدم المجال الكهربى كوسيلة لتقليل تلك الفوارق الطاقية قبل وصولها إلى المجال المغناطيسى ولذلك فإن الفصل هنا يتم على أساس تركيز السرعة ، والإتجاه ، بينما الأجهزة التى تستخدم مجال مغناطيسى فقط يتم فيها فصل الأيونات بواسطة الإتجاه فقط.



شكل (59): انحراف الأيونات في مجال مغناطيسي.

وهنا فى أجهزة Double focusing لها القدرة على تجميع وتمييز الأيونات المتساوية في السرعة أو الطاقة الحركية (شكل 60) ، ولقد أعطى ذلك الفرصة لإستخدام تيار أيونى ضعيف نسبيا مع قدرة أكبر على االفصل.والأيونات الخارجة من مصدر الأيونات أى من غرفة التأين تمر أولا على مجال كهربى من الفتحة الأولى حيث يتم عمل تركيز focusing

للأيونات التى لها طاقة حركية متساوية عند الفتحة الثانية والتى تعمل فى هذه الحالة كنقطة بداية لفصل الأيونات المتساوية فى الطاقة بمرورها على مجال مغناطيسى بناء على نسبة الكتلة إلى الشحنة m/e وبذلك يحدث التركيز المزدوج double focusing .



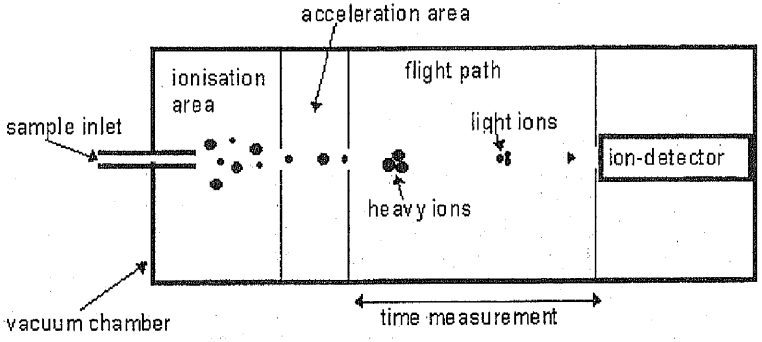
شكل (60): فصل الأيونات بالتركيز البؤري المزدوج Double focusing MS
(انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

3. فصل الأيونات بالتركيز البؤري الدائري Cycloidal focusing analyzer

وهنا أيضاً يستخدم مجال كهربى مع مجال مغناطيسى لفصل الأيونات ، ويكون المجال الكهربى عمودى على المجال المغناطيسى ، وبذلك تتعرض الأيونات إلى كل من المجال الكهربى والمغناطيسى فى نفس الوقت مما يجعل الأيونات تأخذ مساراً دائرياً .والأيونات التى لها نفس قيمة m/e ولكنها خارجة من وحدة التأين بطاقات حركية مختلفة سوف تأخذ مسارات دائرية مختلفة ، ولكنها ستصل جميعها إلى وحدة القياس وبتغيير شدة المجال الكهربى أو المغناطيسى فإن الأيونات تصل إلى وحدة القياس تباعاً بناء على نسبة m/e .

4. فصل الأيونات على أساس اختلاف سرعتها Time of flight system (TOF)

يعتمد الفصل بهذه الطريقة على أن الأيونات التي تختلف في كتلتها ولها نفس طاقة الحركة سوف تختلف في سرعتها وعلى ذلك سوف تختلف الأيونات التي تختلف في كتلتها في الوقت الذي تستغرقه من وحدة التأين الى وحدة القياس.وهنا يتم قذف الجزيئات بنبضات قصيرة short pulses من الأليكترونات لفترة تصل الى ميكروثانية والأيونات الناتجة تسير بسرعة تعجيلية بواسطة مجال كهربي موجود بين فتحتين تعجيل (شكل 61).



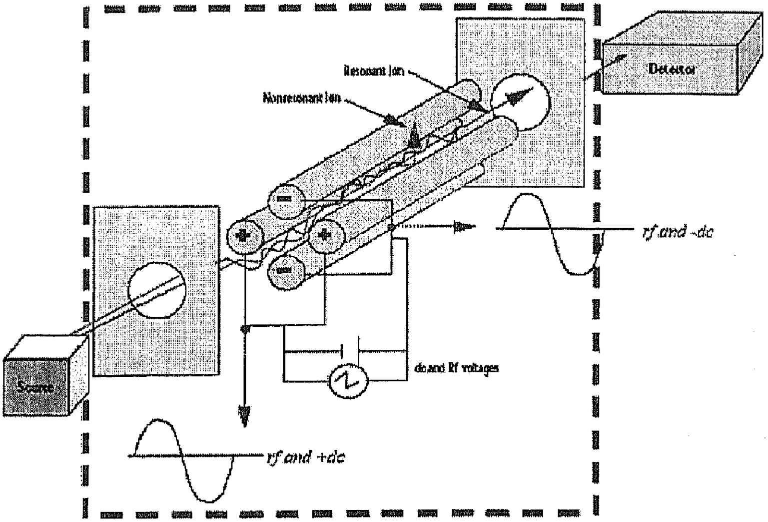
شكل (**61**): فصل الأيونات باختلاف سرعتها **Time of flight (TOF)**.

5. فصل الأيونات باستخدام المجال الناتج عن أربعة أقطاب كهربية

Quadrupole Analyzer system

يتكون المجال الكهربي الرباعي من أربعة أقطاب موضوعة بطريقة متماثلة حول مماس دائرة ، ثم يوصل كل زوج من هذه الأقطاب عن طريق تلامس أسطحها ، ويوصل كل زوج بجهد متساوي في الشدة ومضاد في الاتجاه ، وبذلك يكون الجهد في هذه المنطقة متذبذب ، وعندما تسير الأيونات في خط موازي للأقطاب يحدث لها تذبذب oscillation بين الأقطاب بدرجة تتوقف على نسبة الكتلة الى الشحنة. تمر

بعض الأيونات بدون الاصطدام بأحد الأقطاب والبعض الآخر يكون له حركة تذبذبية غير مستقرة وتصطدم بأحد الأقطاب (شكل62).

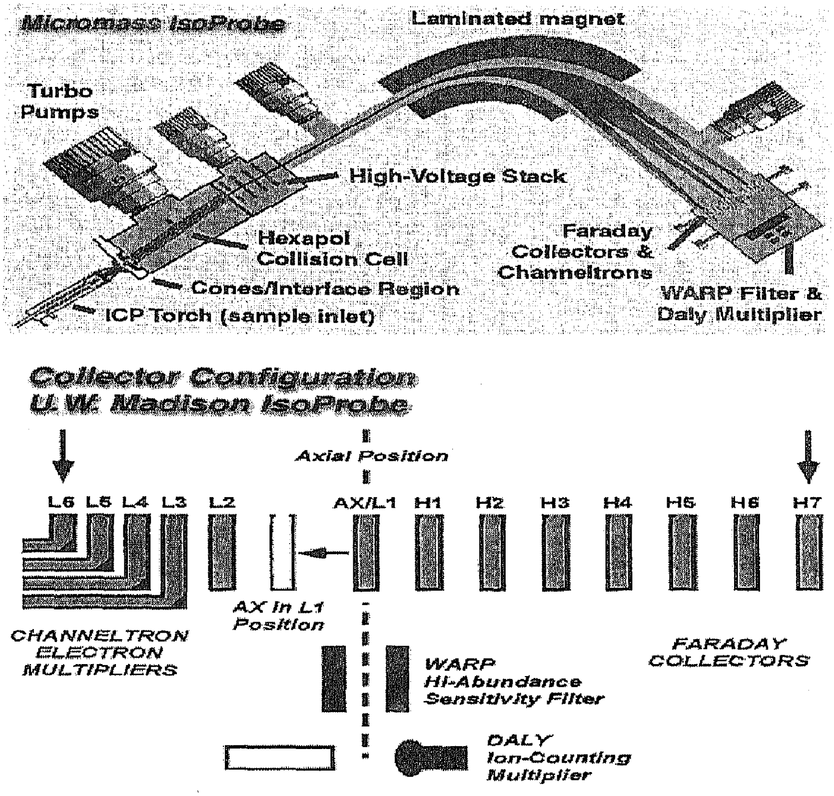


شكل (62): فصل الأيونات باستخدام المجال الناتج عن أربعة أقطاب كهربية. Quadrupole mass spectrometer.

4-2-2. وحدة جمع الأيونات وقياسها Ions collector & Detector :

تخرج الأيونات بالتتابع حسب نسبة m/e من وحدة الفصل ion analyzer من فتحة صغيرة إلى وحدة الكشف والقياس حيث يمكن تسجيلها (شكل 63) .

وعملية التأين تشمل تكوين الأيون الجزيئي والأيونات الناتجة من تكسيره ، والأيونات الناتجة عن تحويره ثم تكسيره ، كما أن تصادم الأيونات الجزيئية قد يؤدي الى تكوين أيون كتلته أكبر من كتلة الأيون الجزيئي.



شكل (63): وحدة جمع الأيونات وقياسها **Ions collector & Detector** (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

أنواع الأيونات الناتجة عن عملية التأين:

1- الأيون الجزيئي molecular ion (parent ion)

وهو الأيون الذى ينتج من فقد إليكترون واحد من الجزىء (M^+) أو يكتب M وهذا الأيون له كتلة مماثلة للوزن الجزيئي للمركب وعلى ذلك فان تمييز هذا الأيون يعتبر هام في تحديد الوزن الجزيئي للمركب وكذلك الرمز الجزيئي. ويعتمد تركيز هذا الأيون على

درجة ثباته والتي تتوقف بدورها على تركيبه. فيحتاج الأيون الجزيئي الى فترة زمنية حوالي 10^{-5} ثانية لكي يصل الى وحدة القياس (الكشاف) دون تكسير.وثبات الأيون الجزيئي يزداد فى حالة الجزيئات المحتوية على روابط باى (π) والتى يسهل فيها فقد الأليكترون بالمقارنة برابطة سيجما (σ) ، كما أن كسر رابطة باى (π) لا يؤدى إلى إنقسام الجزىء بل يظل الجزيئى كما هو بنفس وزنه ويعطى الأيون الجزيئى molecular ion أو يسمى الـــ parent peak ويختلف تركيز أو إرتفاع الأيون الجزيئى $[M^+]$ من مركب لآخر حيث يتوقف تركيزه على درجة ثباته ، ففى حالة ما يكون على درجة مناسبة من الثبات يكون تركيزه مرتفعاً وقد يمثل أعلى تركيز بين الأيونات جميعها فى طيف الكتلة mass spectrum بينما ينخفض تركيزه فى المركبات غير الثابتة. وفى بعض المركبات قد لا يظهر على الأطلاق نتيجة لتكسيره إلى أيونات أصغر مثال ذلك مركب رابع كلوريد الكربون CCl_4 حيث لايظهر له parent peak وبصفة عامة الارتفاع النسبي للأيون الجزيئي يقل في بعض المركبات على حسب الترتيب التالي:

المركبات العطرية > الألكينات المتبادلة الروابط conjugated olefins > الحلقات الأليفاتية alicylics > الكبريتيدات > الهيدروكربونات غير المتفرعة > الكيتونات >الأمينات > الاسترات >الايثرات > الأحماض الكربوكسيلية > الهيدروكربونات المتفرعة والكحولات.

2- الأيونات الناتجة عن تكسير الأيون الجزيئي (الشظايا) Fragments:

اذا كانت فترة حياة الأيون الجزيئي أقل من 10-5 ثانية يحدث له تكسير وتتكون أيونات أصغر fragment ions ويتوقف تركيب الأيونات الصغيرة على موضع انفصال الروابط في الجزيء وعلى درجة ثبات هذه الأيونات.

3- الأيون القاعدي أو الأساسي Base peak :

هو الأيون الذى يعطى أعلى تركيز بين الأيونات فى طيف الكتلة ، ولذلك تنسب

إليه تركيزات أو إرتفاعات باقى الأيونات كنسبة مئوية من هذا الأيون (abundancy) وقد يكون الأيون الأساسى هو الأيون الجزيئى أو أحد الأيونات الناتجة عن تكسيره.

4- الأيونات الناتجة عن وجود النظائر Isotopic peaks

فى المركبات العضوية توجد وفرة طبيعية natural abundance من النظائر الطبيعية isotopes مثل ^{13}C , ^{2}H , ^{37}Cl , ^{14}C وغيرها وهذه النظائر توجد بنسب معروفة فى الطبيعة، ولذلك تظهر عدة أيونات كتلتها أكبر من كتلة الأيون الجزيئى. فإذا كان موجود نظيران لعنصر فى نفس الجزىء مثل ^{14}C , ^{13}C فإنه يظهر [M+1] ، [M+2] بجوار الأيون الجزيئى [M] ويشذ عن ذلك عنصرى الكلور والبروم فنجد أن قمة الـــ peak الناتجة عن النظير [M+2] الخاص بكل منها عالية وإشارتها قوية وذلك يرجع إلى زيادة نسبة توفر هذه النظائر فى الجزىء high abundancy وتسمى isotopic peaks .

^{35}Cl , 75.8 %	$[M^+]$	^{79}Br , 50.5 %	$[M^+]$
^{37}Cl 24.2 %	[M+2]	^{81}Br , 49.5 %	[M+2]

5- الأيون شبه المستقر Meta stable ion (m*) :

فى بعض المركبات قد يظهر أيون يسمى ظاهرى أو مؤقت الاستقرار أو ما نسميه شبه المستقر meta stable ion وهو يختلف فى سلوكه عن الأيونات الأخرى. وهذا الأيون ينتج عن تكسير الأيون الجزيئى فى المنطقة بين حجرة التأين ووحدة الفصل وليس فى حجرة التأين كباقى الأيونات وبذلك يتكون أيون أصغر ويكون أيضا جزىء متعادل كما بالمعادلة التالية:

$$m^+ + m_1 \longrightarrow M^+$$

وتكون الطاقة الحركية لهذا الأيون أقل من طاقة الأيونات التى تتكون فى حجرة التأين وعلى ذلك فإنها تسلك سلوكا مخالفا لهذه الأيونات وتظهر فى وحدة التسجيل فى صورة خط ضعيف مفلطح broad peaks وغالباً ما تكون كتلته ليست رقماً صحيحاً ،

وظهور مثل هذا الأيون الشبه مستقر يفيد فى دراسة ميكانيكية التكسير للأيون الجزيئى. ويمكن حساب كتلة الأيون الشبة مستقر من المعادلة التالية:

$$m^* = (m^+)^2 / M^+$$

حيث m^* كتلة الأيون شبة المستقر المتوقعة

m^+ كتلة الأيون الناتج من تكسير الأيون الجزيئى

M^+ كتلة الأيون الجزيئى

وعند دراسة طيف الكتلة لمركب acetophenone تم اكتشاف وجود أيون شبه مستقر meta stable ion عند القيمة m/e = 91.88

ويمكن تفسير ذلك على النحو التالي:

عندما يفقد هذا المركب أليكترون يتحول إلى أيون جزيئى والذى يحدث له إنقسام بعد ذلك ويعطى meta stable ion .

$$[M]^+ \longrightarrow m^+ + m_1$$

$$[Ar\text{-}C(O)\text{-}CH_3]^{+\cdot} \longrightarrow [Ar\text{-}C(O)]^+ + CH_3$$

m/e =120 m/e = 105

$$m^* = (105)^2 / 120 = 91.88$$

6- الأيون الناتج عن التصادمات Peaks for collision products

يلاحظ فى بعض أطياف الكتلة ظهور أيون كتلته أكبر من $[M^+]$ وكذلك تركيزه مرتفعاً وقد يزيد حتى عن إرتفاع $[M^+]$ ولا يرجع هذا الأيون إلى وجود النظائر ولكنه يكون نتيجة لعملية التصادم بين الجزيئات أو الأيونات مع إنتقال أحد المجموعات الكيميائية للأيون الجزيئى.

7- الأيونات متعددة الشحنات Multiple charged ions

هناك إحتمال لتكوين أيونات تحمل شحنتين أو أكثر M^{++} ولكن غالبا ما يكون هذا الإحتمال ضئيلاً وعند ظهور هذه الأيونات فى طيف الكتلة يكون تركيزها صغير جداً.

ميكانيكية تكوين الأيونات:

تحتاج عملية التأين وتكوين M^+ إلى حزمة من الأليكترونات ذات طاقة فى حدود 8-15أليكترون فولت وذلك لمعظم المركبات العضوية. وهذه الكمية من الطاقة تمثل الحد الأدنى من الطاقة اللازم لعملية التأين.والأيون الجزيئى هو عبارة عن شق حر كاتيونى radical cation $M^{+\cdot}$ ويحتوى على مسار تحتوى على إلكترون واحد non-bonding من ذرة غير كربونية مثل Cl, S, N, O وعادة ما تستخدم طاقة فى حدود 50-70 e.v. لضمان تكوين الأيون الجزيئى بكمية كافية يمكن الكشف عنها فى وحدة القياس ولكن ذلك يؤدى أيضاً إلى تكسير بعض الروابط فى الأيون الجزيئى وتكوين أيونات أصغر فى الكتلة ، كما قد يحدث أيضاً تحوير وإعادة ترتيب فى الأيون الجزيئى نتيجة هذه الطاقة العالية، كما أن تصادم الأيونات الجزيئية قد يؤدى إلى تكوين أيون كتلته أكبر من كتلة الأيون الجزيئى.

وكما ذكرنا فإن الوفرة النسبية للأيونات الناتجة عن التكسير تعتمد على قوة الروابط الكيماوية فى الجزىء وكذلك شكل الجزىء هل هو سلسلى أم متفرع أم حلقى أو غيره.والتكسير يفضل عند ذرات الكربون الأكثر تفرعا على أساس أن أيون الكربونيوم الناتج عنها يكون أكثر ثباتا

Tertiary C^+ > secondary C^+ > primary C^+

ويزداد التحطم بزيادة إحتمال تولد جزيئات ثابته مثال:

CO, CO_2, H_2O, NH_3, H_2S, HCN

الأيونات الناتجة عن اعادة التنظيم Rearrangement ions

أحيانا نلاحظ تكون أيونات لاتعتبر جزءا من الجزيء الأساسي ولكنها تنتج عن عملية اعادة التنظيم داخل الأيونات.

$$CH_3\text{-}CH_2\text{-}X^{+\cdot} \longrightarrow CH_3\text{-}CH_2^{+} + X^{\cdot}$$

$$\downarrow$$

$$CH_2{=}CH_2^{+} + HX$$

2-2-5. المسجل: Recorder:

يسجل الإشارات الناتجة متوحدة جمع الأيونات وقياسها في صورة طيف عبارة عن علاقة بين نسبة الكتلة إلى الشحنة على المحور الأفقي والتركيز على المحور الرأسي.

2-3. طرق القياس والكشف: Detection methods

2-3-1. إستقبال الأيونات على سطح معزول (قفص فاراداى Faraday cage) :

بمجرد أن يصطدم الأيون الموجب بجامع الأيونات فإنه يلتقط أحد الأليكترونات ويتكون نتيجة ذلك تيار أليكترونى صغير فى إتجاة الجامع collector ، وهذا التيار يكون فى حدود 10^{-5} : 10^{-11} أمبير ويمكن تكبيره بواسطة تأثير المجال فى الترانزستور Field-effect transistor

2-3-2. استخدام خلايا ضوئية للتكبير الأليكترونى electron multiplier : phototube

تستخدم الخلايا الضوئية للتكبير الأليكتروني إذا كان التيار أقل من 10^{-15} أمبير وهذه الطريقة تسمح بعملية تسجيل سريع للأيونات وذلك لأنه يمكن خفض ثابت الوقت إلى درجة مناسبة. ونتائج التحليل تعرض فى صورة تسجيل كتابى بواسطة راسم الذبذبات Oscillograph بإستخدام عدد من 3 جلفانومتر الى 5 جلفانوميتر تختلف فى درجة حساسيتها.

2-3-3. إستخدام لوحة فوتوغرافية photographic plate :

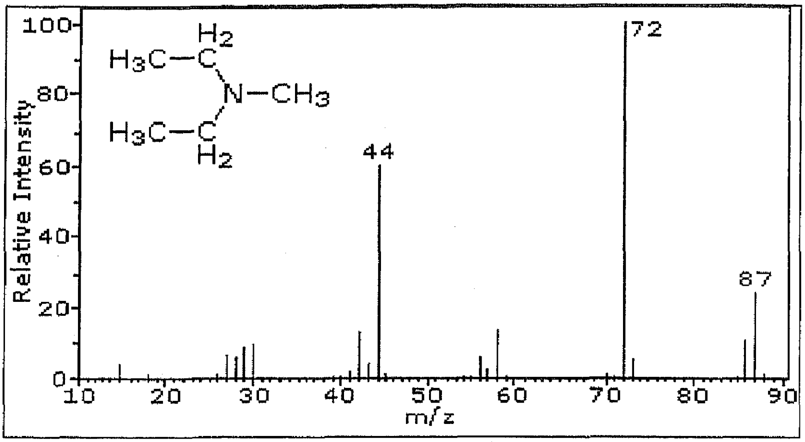
استخدام لوحة فوتوغرافية تعطى درجة فصل مناسبة أكبر من وحدات القياس الأليكترونية وهى من أكثر أجهزة القيـــــاس حساسية فيمكن بها الكشف عن كميات صغيرة من المواد ، وكذلك الأيونات غير الثابتة التى تكون فترة حياتها صغيرة جداً والتى قد يكون من غير الممكن الكشف عنها بوسائل الكشف الأليكترونية.

2-4. التحليل الوصفي بواسطة مطياف الكتلة Mass spectroscopy:

- طيف الكتلة الناتج يكون عبارة عن علاقة بين m/e للأيونات المنفـصلة علـى المحور الأفقي والتركيز على المحور الرأسي شكل (64).
- يحسب التركيز كنسبة مئوية من Base peak.
- تعبر عدد الحزم الموجودة بالطيف عن عدد الأيونات المنفصلة.
- ارتفاع أي حزمة يعبر عن تركيز الأيون المنفصل.
- الأيون الذي يعطى أعلى تركيز من الأيونات المنفصلة يسمى الأيـون القاعـدي Base peak ويعطى نسبة 100% وتنسب إليه تركيز باقي الأيونات.
- يمكن عن طريق هذا الطيف تحديد الأيون الجزيئي وهو أما + أو ـ ويمكن عن طريقه معرفة الوزن الجزيئي للمركب.

تقدير الوزن الجزيئي:

يعتبر مطياف الكتلة أدق طريقة لتقدير الوزن الجزيئي للمركبات العضوية بطريقة مباشرة ويمكن تقدير الوزن الجزيئي للمركبات التي قد يصل وزنها الى 10000 وحدة وذلك باستخدام الأجهزة ذات قدرة الفصل العالية.



شكل (64): شكل طيف الكتلة لأحد المركبات.

ويلاحظ أنه في بعض المركبات يصعب التعرف على الوزن الجزيئي وذلك بسبب:

- قد لا يظهر في طيف الكتلة لعدم ثباته بدرجة كبيرة أو يظهر بتركيز منخفض جدا لدرجة يصعب تحديده وهنا يمكن زيادة تركيزه برفع حساسية الجهاز وخفض طاقة الأليكترونات المستخدمة في التأين الى حوالي 15 electron volt ، كما أن زيادة تركيز المادة يؤدي في كثير من الأحيان الى زيادة تركيز الأيون الجزيئي.
- قد يكون الأيون الجزيئي موجودا ولكن ضمن مجموعة من الأيونات التي يكون تركيزها مساويا أو أكبر من الأيون الجزيئي. فقد يؤدي تصادم الأيونات الجزيئية التي تحتوي على ذرة غير كربونية (O,N, S) الى تكوين أيونات كتلتها (M+1) نتيجة لانتقال ذرة هيدروجين . وفي بعض الأحيان يكون تركيز هذا الأيون أكبر بكثير من الأيون الجزيئي.

وفي حالة عدم ظهور الأيون الجزيئي يستدل عليه من الأيونات الصغيرة فمثلا الكحولات تعطي أيون جزيئي تركيزه منخفض جدا ولكن في نفس الوقت يظهر أيون كتلته (M-18) نتيجة لفقد جزيئ ماء.

- يتم معرفة الرمز الجزيئي عن طريق أن كتلة الأيون الجزيئي تمثل المجموع الحسابي لكتلة مجموعة من العناصر بنسب معينة وحساب كتلتها لأقرب 3 أرقام عشرية. في جداول خاصة ثم يتم معرفة كتلة الأيون الجزيئي وتقارن بكتلة هذا الخليط من العناصر. فيكون الرمز الجزيئي للمركب هو الرمز الذي تكون كتلته مطابقة لكتلة الأيون الجزيئي.

2-5. التحليل الكمي بواسطة مطياف الكتله

Quantitative analysis by Mass spectroscopy

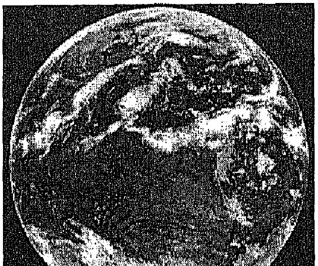
لايتم باستخدام هذا الجهاز بمفرده بل بازدواج الغاز الكروماتوجرافى مع مطياف الكتلة فيما يسمى GC-MS.

2-6. تطبيقات التحليل بمطياف الكتلة في مجال تقدير متبقيات المبيدات:

نجد أن كل مجموعة من المركبات مثل المركبات الفوسفورية العضوية تتميز يظهور أيونات معينة Fragments تتكرر في معظم المبيدات التابعة لهذه المجموعة ويكون لها وزن جزيئي معين وبهذا فعند عمل عينة مجهولة من أي مبيد وظهر أيونات لها وزن جزيئي معين يظهر في مجموعة مبيدات معينة مثل المركبات الفوسفورية العضوية فيمكن هنا أن نقول أن هذا المبيد يتبع مجموعة المبيدات الفوسفورية. وهى خطوة في التحليل الوصفي للتعرف على هذه المبيدات . كذلك يمكن معرفة الرمز الجزيئي للمبيد وكذلك الوزن الجزيئي.

3. التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء[1]
Infrared Spectroscopy

الأشعة تحت الحمراء infrared rays هي المنطقة التي تقع بين الأشعة الحمراء في الأشعة المرئية ، وطيف الموجات القصيرة (المايكروويف) في الطيف الكهرومغناطيسي، وبذلك تكون طاقة الأشعة تحت الحمراء أقل من طاقة الأشعة الحمراء كما يكون ترددها أقل من الأشعة الحمراء ، ولكن طاقتها وترددها أعلى من أشعة المايكروويف.والأشعة تحت الحمراء هي أشعة حرارية ، وتنبعث من المصباح الحراري ، أو من تسخين أي جسم . وكذلك تنبعث من الكرة الأرضية ، ومن الشمس ، والأجرام السماوية بالاضافة الى انبعاثها من جسم الانسان والحيوان والنبات. الأشعة تحت الحمراء لايمكن رؤيتها بالعين المجردة ، ولكن يمكن التصوير بها في الظلام الدامس ، لأنها تعتمد على الاشعاع الحراري المنطلق من الأجسام. هذا وقد تم تصوير الكرة الأرضية بواسطة قمر صناعي يعمل في مدى الأشعة تحت الحمراء وتظهر المسطحات المائية واليابسة على الكرة الأرضية كما واضح في كل (شكل 65).



شكل (65): صورة الكرة الأرضية بواسطة الأشعة تحت الحمراء (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

---

(1). كتبة الاستاذ الدكتور احمد خميس محمد سلامه - قسم كيمياء المبيدات-كلية الزراعة- جامعة الاسكندرية.

3-1. تطبيقات الأشعة تحت الحمراء:

- يستخدم الأطباء الأشعة تحت الحمراء لمعالجة الأمراض الجلدية ، ولتخفيف الآلام التي قد تصيب العضلات ، حيث يتم تسليط الأشعة تحت الحمراء على جسم المريض ، فتخترق الجلد وتعمل على تدفئته بدرجة معينة لتنشيط الدورة الدموية.
- استخدمت الأشعة تحت الحمراء في بعض الأفران الخاصة للطلاء الجاف للأسطح مثل الجلد ، والمعادن ، والأوراق ، والأقمشة.
- يستخدم بعض المصورين أفلام حساسة للأشعة تحت الحمراء للتصوير في الظلام باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء.

3-2. نطاق الأشعة تحت الحمراء:

يمتد نطاق الأشعة تحت الحمراء الى مناطق واسعة من الطيف الكهرومغناطيسي ويقسم نطاق هذه الأشعة إلى ثلاثة مناطق هي:

3-2-1. الأشعة تحت الحمراء القريبة Near infrared:

وهذه الأشعة هي الأقرب إلى الأشعة المرئية وبالتحديد الطيف الأحمر في النطاق المرئي وتعمل هذه الأشعة في المدى التالي:

0.75 - 2.5 μ or 14,000 - 4,000 cm^{-1}

3-2-2. الأشعة تحت الحمراء البعيدة Far infrared:

وهذه الأشعة هي الأبعد من الأشعة المرئية ولكنها الأقرب إلى أشعة المايكروويف وتعمل في المدى التالي: 15 - 500 μ

3-2-3. لأشعة تحت الحمراء الوسطى Mid infrared:

وهذه الأشعة تقع بين الأشعة تحت الحمراء القريبة والأشعة تحت الحمراء البعيدة وتعمل في المدى التالي:

15 - 500 μ or 650 - 20 cm^{-1}

وتعتبر منطقة الأشعة تحت الحمراء الوسطى Mid IR أكثر المناطق استخداما في أجهزة التحليل الطيفي للأشعة تحت الحمراء.

3-3. امتصاص الأشعة تحت الحمراء:

عندما تمتص جزيئات المادة الأشعة تحت الحمراء ، يحدث اثارة لذرات المادة نتيجة لهذه الطاقة الممتصة ، وهذه الاثارة تكون في صورة اهتزاز vibration لذرات هذه المادة أي يحدث انتقال اهتزازي vibrational transition للذرات بالنسبة لبعضها البعض في الجزيء ، مما يؤدي الى تغير دوري في طول الروابط الكيميائية ، أو تغير في الزوايا بين الروابط الكيماوية في الجزيء ، وقد تنتج كل حركة اهتزازية من حركة ذرتين أو قد تشمل مجموعة من الذرات. وتتوقف طول الموجة أو التردد الذي يحدث عنده هذا الامتصاص على العوامل التالية:

1- كتلة الذرة relative mass

2- قوة الروابط المكونة للجزيء bond strength

3- الشكل الهندسي للذرات في الجزيء atomic geometry

وبذلك يمكن القول أن طاقة الأشعة الممتصة والمسببة لأي من الانتقالات الاهتزازية في الجزئ ، تعتمد على نوع الذرات ، وطبيعة الروابط الكيميائية المشتملة في الحركات الاهتزازية.

ويتوقف عدد الانتقالات الاهتزازية في الجزيء ، على عدد الذرات المكونة له. وكذلك على التوزيع الفراغي للجزيء ، بمعنى هل الجزي خطي linear molecule أو غير خطي nonlinear molecule.

عدد الانتقالات الاهتزازية في حالة الجزيئات الخطية = $3n - 5$

عدد الانتقالات الاهتزازية في حالة الجزيئات غير الخطية = $3n - 6$

حيث: n تمثل عدد ذرات الجزيء.

وتمثل الانتقالات الاهتزازية مستويات الطاقة الاهتزازية في الجزيء حيث تمثل كل انتقالة اهتزازية مستوى طاقة اهتزازي.

وينتقل الجزيء من مستوى الطاقة الاهتــزازي الأدنــى ground vibrational stateالى مستويات الطاقة الاهتزازية المثاره excited vibratioal state ، وبذلك نقول: لقد تم حدوث حركة اهتزازية للجزيء نتيجة لامتصاص طاقة الأشــعة تحــت الحمراء.

وعادة تقاس هذه المنطقة من الطيف بوحدات الــرقم المــوجي wave numbers وهو مقلوب الطول الموجي – كما ذكرنا سابقا – وعلى ذلك فان طيف الأشعة تحــت الحمراء يشغل المنطقة من $14,000 - 20\ cm^{-1}$

ويعبر عن أماكن امتصاص IR بوحدات cm^{-1} reciprocal centimeter, وهذه الوحدات تتناسب طرديا مع طاقة التذبذب ، والأجهزة الحديثة تكــون خطيــة linear بوحدات cm^{-1} وللتحويل من وحدات الميكرون أو الميكروميتر μ الى وحدات مقلوب السنتيميتر cm^{-1} .

Since, $1\ \mu = 10^{-4}$ cm,
Therefore,
$$0.7\ \mu = 0.7 \times 10^{-4}\ cm$$
$$= 1 / 0.7 \times 10^{-4}$$
$$= 14,286\ cm^{-1}$$
$$500\ \mu = 500 \times 10^{-4}\ cm$$
$$= 1 / 500 \times 10^{-4}$$
$$= 20\ cm^{-1}$$

وقديما كان يستخدم طول الموجة λ وكانت بوحدات micro meter (10^{-6}m or 10^{-4} cm) وكان يطلق عليها microns (μ)

ونتيجة لحركة الذرات ، وتذبذبها في الجزئ ، واختلاف كتلة الذرات المعينة وقوة الروابط بينها فان درجة ترددات التذبذب vibrational frequencies تختلف من جزيء الى آخر معطية مايعرف بالبصمة finger print ، والتي تميز كل جزيء عن الآخر بمعنى أن كل جزيء له finger print vibrations خاص به.

كما أن هناك تذبذبات أخرى تتوقف على نوع المجاميع الفعالة في الجزيء.

3-3-1. أنواع الاهتزازات الجزيئية: Types of molecular vibrations

1. الاهتزاز بالتمدد وانكماش Stretching vibrations

ينشأ الاهتزاز بالتمدد والانكماش بين ذرتين مرتبطتين معا ، ويكون هذا التمدد والانكماش على نفس محور الرابطة بين الذرتين along the bond axis أي تغيير المسافة بين الذرتين دون تغيير المحاور أو الزوايا بين الروابط .

ويمكن تشبيه هذا الاهتزاز بين ذرتين في جزيء ما بحركة كرتين متصلتين بياي مرن (زنبرك) بحيث يمكن للياي أن يسمح للذرتين أن تبتعدا عند شد السلك و تقتربا عند تركه.

وينقسم الاهتزاز بالتمدد والانكماش الى نوعين:

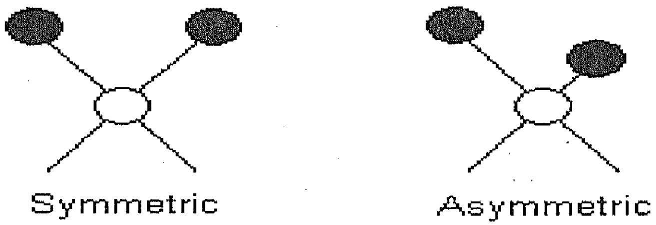
1- تمدد وانكماش اهتزازي بسيطا أو معزول isolated stretching :

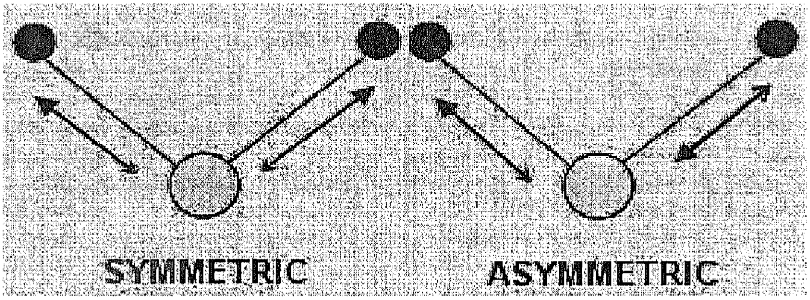
هذا النوع يشمل تمدد رابطة واحدة فقط ، مثل: الرابطة الفردية في جزيء حمض الهيدروكلوريك H-Cl أو الرابطة الكربونيلية C=O في الأسيتون.

2- تمدد وانكماش اهتزازي مزدوجا coupled stretching :

هذا النوع يشمل تمدد رابطتين أو أكثر في نفس الوقت، مثل: تمدد الرابطتين في جزيء الميثيلين H-C-H حيث نجد ذرة كربون ترتبط بذرتي هيدروجين أي رابطتين. وهنا يحدث نوعين من التمدد والانكماش الاهتزازي المزدوج:

- تمدد وانكماش مزدوج متماثل symmetrical stretching (ν_s) وفيه يحــدث تمدد أو انكماش للرابطتين في نفس الوقت شكل (66).
- تمدد وانكماش مـــزدوج غيـــر متماثـــل unsymmetrical stretching (ν_{As}) وفيه تتمدد احدى الروابط بينما تنكمش الأخرى في نفـــس اللحظـــة وبطريقـــة متزامنة كما يتضح من شكل (66).





شكل (66): التمدد والانكماش المزدوج المتماثل وغير المتماثل **Stretching vibrations**.

2. الاهتزاز بالانحناء **Bending vibrations**

هذه الترددات يتغير فيها زوايا الروابط (الزاوية بين الرابطتين) ، مما يؤدي الـــى حركة الذرات في اتجاه آخر غير اتجاه محور الرابطة ، وقد تكون حركة الذرات في مستوى الرابطتين أو خارج مستوى الرابطتين.

وينقسم الاهتزاز بالانحناء الى أربعة أنواع:

أ ـ اهتزاز Rocking:

حيث تتأرجح الوحدة التركيبية الى الخلف والى الأمام في نفس مستوى الاتزان inthe same plane كما يتضح في شكل (67) التالي.

ب ـ حركة مقص Scissoring:

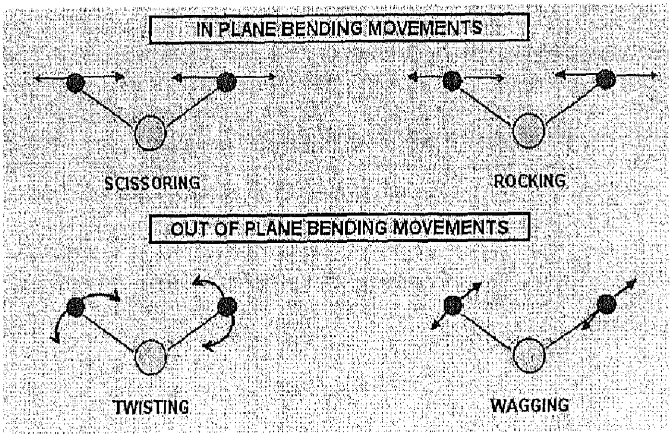
حيث تتقارب وتتباعد الذرتان الغير مرتبطتان سويا بالنسبة لبعضهما بحركة تشبه حركة المقص في نفس مستوى الاتزان in the same plane كما في شكل (67).

جـ ـ تأرجح Wagging:

حيث تتأرجح الوحدة التركيبية (الغير خطية) ثلاثية الذرة الى الخلف والى الأمام خارج مستوى الاتزان المشكل من الذرة وروابطها out of plane bending كما في شكل (67).

د ـ التواء Twisting:

حيث تلف الذرات حول الرابطة بينها وبين باقي الجزيء خارج مستوى الاتزان out of plane كما في شكل (67).



شكل (67): أشكال الاهتزاز بالانحناء **Bending Vibrations**.

وفي اطار الجزيئات المتعددة الذرات تتردد هذه الذبذبات المختلفة بقيمة محددة ، أي أن ترددات التمدد والانحناء الجزيئي مقننة quantized . وعند تعرض الجزيء للأشعة الكهرومغناطيسية ذات نفس تردد الذبذبة الجزيئية يحدث الامتصاص ، وتتوافق الموجات وتزداد سعة التردد ، وعندما يعود الجزيء الى الاستقرار ، فان الطاقة الفائضة تتسرب على هيئة حرارة.

2-3-3. النمط الاهتزازي Modes of vibration:

يمكن التكهن بعدد قمم الامتصاص لجزيء معين ، بتقدير عدد الذبذبات الجزيئية المسموح بها في الجزيئات متعددة الذرات.

ففي الجزيء المتعدد الذرات يوجد عدد n من الذرات ، بذلك يمكن تحديد موضع كل ذرة في الفراغ بتحديد قيم المحاور الثلاثة ، أي أننا نحتاج لتعريف 3n قيمة لتحديد موضع جميع ذرات الجزيء أن الجزيء له 3n درجات حرية: و من القيم الثلاث هذه تحدد الانتقالات الجزيئية كوحدة متكاملة ، وهناك ثلاث درجات أخرى لوصف دوران الجزيء عندما لا يكون خطيا وهكذا يؤخذ للجزيء الغير خطي 3n-6 نوع من التذبذب العادي والتي تمتص الأشعة الكهرومغناطيسية ، وبما أن الجزيئات الخطية تتطلب محورين فقط لوصف دورانها فان لها 3n-5 نوع من التذبذبات.أننا نلاحظ أن للجزيئات عدد أكبر من الذبذبات عن القيمة المحسوبة سواء 3n-6 or 3n-5 ، وأحيانا يكون عدد الذبذبات أقل من القيمة المحسوبة ويمكن تفسير ذلك كالآتي:

في حالة العدد الزائد من ذبذبات الامتصاص يرجع السبب الى:

1 ـ الايقاعات المتراكمة combination tones

2 ـ التسميعات over tones

3 ـ ايقاعات الاختلاف difference tones

في حالة العدد الأقل من ذبذبات الامتصاص يرجع السبب الى:

1ــ الجزيئات المتماثلة بحيث لا يتأثر قيمة عدم الاستقطاب الكهربــي بامتــصاص الاشعاع الكهرومغناطيسي.

2ــ قد تتماثل بعض الترددات المعينة في حالة الجزيئات عالية التماثل وهنا تتولــد ذبذبة واحدة فقط.

3ــ شدة تضاهي بعض الذبذبات حتى يصعب تفرقتها بالأجهزة المتاحة.

4 ــ شدة ضعف بعض الذبذبات حتى يصعب تسجيلها بالأجهزة المتاحة.

5ــ بعض الذبذبات الأصلية تنحرف عن نطاق تسجيل الجهاز المستعمل.

3-3-3. التغيرات في طاقة الدوران Rotational energy change:

يتولـد عـن امتـصاص الاشـعاع فـي نطـاق اشـعة الميكروويـف microwaves و الاشعة تحت الحمراء IR تغيرات في طاقة الدوران فقط ولا يحدث ذلك الا عند حدوث تغير في عزم الاستقطاب Dipole moment أثناء الدوران . ولذلك لابد أن يمتلك الجزيء عزم استقطاب مستديم ، ولا تسجل الانتقالات الدورانية الخالصة الا في حالة الغازات حيث يقل تحديد الانتقالات الدورانية للسوائل والجوامد فتتفلطح broaden بدلا من اعطاء خطوط حادة كمستديمة sharp

4-3-3. الاستضواء fluorescence :

عندما تمتص المادة الاشعاع الكهرومغناطيسي فانها تثار وتزداد طاقتها ، ويمكــن لهذه المادة المثارة – بعد ذلك – أن تبث فوتونات مختلفة الطاقة حتى تصل الى الحالة المستقرة ، أي أنه عند عودة تلك الجسيمات الى مستويات الطاقة الأقل تشع فوتونــات ذات طاقة محددة وطول موجة موحد ، ولكن في بعض الأحيان يمتص النظام المشع كم عالي من الطاقة والذي يثير بعض من الأليكترونات الى مستويات الطاقة الأعلــى بكثير من مستوى استقرار الجزيء ، وفي هذه الحالة يمكن للنظام العودة الى مــستوى الاستقرار مباشرة باطلاق فوتونات لها نفس طاقــة الفوتونــات الممتــصة أو يمكــن

للأليكترونات العودة الى الحالة المستقرة على مراحل متسلسلة باطلاق فوتونات ذات طاقة مقابلة لفرق الطاقة بين مختلف المراحل أي ذات طاقة أقل وطول موجة أطول من الممتصة أصلا وهذا ما يعرف بالاستضواء fluorescence

مستويات الطاقة الاهتزازية Vibrational energy levels

ان الانتقالات الاهتزازية في الجزيء لا تتم بصورة عشوائية ولكنها تحدث بتردد معين (تردد الحركة الاهتزازية vibrational frequency) والذي يحكم بكتلة الذرات وقوة الرابطة الكيميائية المشتملة في الحركة الاهتزازية كما ذكرنا ، وعلى ذلك فان كل حركة اهتزازية تمثل مستوى طاقة اهتزازيا في الجزيء ، وكما سبق أن ذكرنا أيضا فان عدد هذه المستويات هو 3N-5 or 3N-6 في الجزيئات الخطية وغير الخطية على التوالي.

وعلى ذلك فانه في الاهتزاز الجزيئي ينتقل الجزيء من مستوى الطاقة الاهتزازي الأدنى الى أحد مستويات الطاقة الاهتزازية المثارة.

الجزيئات في حالتها العادية على درجة حرارة الغرفة توجد عادة في مستوى الطاقة الاهتزازي الصفري $v=0$ وهو مستوى فردي ، وعندما يمتص الجزيء طاقة في نطاق الأشعة تحت الحمراء فيحدث الانتقال الاهتزازي بحيث يكون التغير في رقم الكوانتم الاهتزازي يساوي الوحدة $\Delta v = 1$ أي أن الانتقال يتم من $v=0$ الى $v=1$ ويطلق على هذا الانتقال الاهتزازي الأساسي fundamental vibration وهو عادة الانتقال الذي يشاهد في طيف الامتصاص للأشعة تحت الحمراء.

مستويات الطاقة الاهتزازية في جزيء الماء:

من المعروف أن جزيء الماء غير خطي ويحتوي على ثلاث ذرات وبذلك يحتوي مستوى الطاقة الاهتزازي الأول $v=1$ على ثلاثة مستويات وذلك لأن:

عدد مستويات الطاقة الاهتزازية في الجزيء غير الخطي هي 3N-6 ، وعلى ذلك يكون عدد مستويات الطاقة الاهتزازية في الماء تكون:

$3N-6 = (3 X 3) -6 = 3$

وبذلك يتضح من رسم الـــ IR لجزيء الماء الموضح بشكل (68) ثلاثة حركات اهتزازية وهي:

1. تمدد وانكماش متماثل

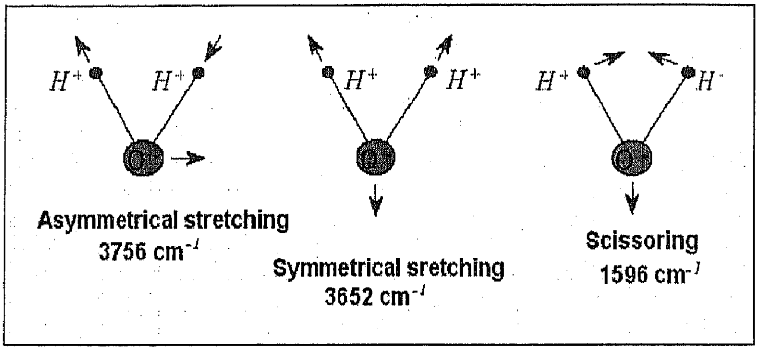
Symmetrical stretching ν_s OH ($3652\ cm^{-1}$)

2. تمدد وانكماش غير متماثل:

Asymmetrical stretching ν_{As} OH ($3756\ cm^{-1}$)

3. انحناء في شكل حركة مقص تؤدي الى التغير في زوايا الروابط

Bending scissoring δ_s HOH ($1596\ cm^{-1}$)



شكل (68): مستويات الطاقة الاهتزازية في جزيء الماء.

5-3-3. التغير في العزم القطبي Dipole moment change:

لكي يحدث امتصاص للأشعة تحت الحمراء في أي حركة اهتزازية يجب أن يحدث تغيير في العزم القطبي للجزيء كنتيجة للحركة الاهتزازية ، وتحت هذه الظروف فقط يمكن للمجال الكهربي المتناوب للأشعة أن يتفاعل مع الجزيء ويحــدث تغييــرا فــي حركة الذرات في الجزيء ، ومثال ذلك فان توزيع الــشحنات علــى جــزيء CO

يكون غير متماثل لأن ذرة الأكسيجين تحتوي على كثافة أليكترونيــة أكبــر مــن ذرة الكربون ، فعند تغير المسافة بين الذرتين مثلما يحدث في الحركة الاهتزازية فان مجال كهربي متذبذب oscillating electric field ينشأ في الجــزيء وهــذا يمكــن أن يتفاعل مع المجال الكهربي المرتبط بالأشعة فاذا كان تردد الأشعة متوافقا مع التــردد الاهتزازي الطبيعي للجزيء فانه يحدث في هذه الحالة انتقال لطاقة الأشعة يؤدي الــى تغير في السعة الاهتزازية للجزيء (أي حدوث انتقال اهتزازي).

ويمكن حساب أو تقدير العزم القطبي μ للرابطة القطبية (فـي جزيء HCl , CO أو غيرهما) من المعادلة التالية:

$$\mu = q\,l$$

حيث: q هي الشحنة على الذرات المكونة للرابطة ، l هي طول الرابطة وعلى ذلك فان التغير الدوري في طول الرابطة (الاهتزاز) سوف يؤدي الى التغير في العزم القطبي بصورة دورية وبذلك ينشأ تيار كهربي متذبذب نتيجــة للتغيــر فــي العــزم القطبي.أما في الجزيء غير القطبي مثل جزيء الهيدروجين ، فانه لايحتوي على عزم قطبي وبذلك لاينشأ مجال كهربي نتيجة لتمدد الرابطة ولا يحدث امتصاص.وتتوقــف كثافة الامتصاص لأي من الحركات الاهتزازية في الجزئء على حجم التغير في العزم القطبي المرتبط بهذه الحركة الاهتزازية ونظرا لأن التغير في العزم القطبي يتوقف في الأساس على قيمة العزم القطبي للمجموعة الكيميائية المشتملة في الحركة الاهتزازيــة فان الامتصاص يكون كبيرا في حالة المجموعات الكيميائيــة القطبيــة بينمــا يكــون الامتصاص ضعيفا في حالة الحركة الاهتزازيــة للمجموعــات غيــر القطبيــة فــي الجزيء.قد لا يحدث امتصاص لبعض الحركات الاهتزازية ، اما لعدم قطبية الجزيء ، أو الى التماثل الذي يؤدي الى عدم حدوث تغير في قطبية الجزيء القطبي ، وهناك بعض الحركات الاهتزازية في الجزيئات تكون مصحوبة بتغير صــغير فــي قطبيــة الجزيء مما يؤدي الى امتصاص ضعيف يصعب تمييزه في طيف الامتصاص. ويمكن

توضيح بعض هذه الظواهر بالنظر الى جزيء ثاني أكسيد الكربون CO_2 فهو جزيء خطي يحتوي على ثلاث ذرات $O = C = O$ وعلى ذلك فان لهذا الجزيء أربع حركات اهتزازية. بالتعويض في قانون عدد الحركات الاهتزازية للجزيئات الخطية:

$$3N - 5 = 3 \times 3 - 5 = 4$$

ويمكن تلخيص تلك الحركات الأربعة فيما يلي:

1- تمدد متماثل Symmetrical stretching $\nu_s CO$ (1340 cm^{-1})

وهو لا يؤدي الى تغير في قطبية الجزيء ، ولذلك لا يحدث له امتصاص في طيف الأشعة تحت الحمراء ولكنه يشاهد في طيف رامان Raman spectra 1340 cm^{-1} وهي طريقة أخرى للنظر الى الحركات الاهتزازية في الجزيء عن طريق تبعثر الأشعة.

2- تمدد غير متماثل Asymmetrical stretching νAs CO (2350 cm-1):

ويحدث فيه تمدد لأحد الروابط ، بينما يحدث انكماش للرابطة الأخرى وبطريقة متزامنة ويحدث له امتصاص عند 2350 cm-1 في طيف الأشعة تحت الحمراء.

3 & 4. التغير في زوايا الروابط بطريقة مقصية:

Bending scissoring δ_s CO_2 (666 cm^{-1}) δ_s CO_2 (666 cm^{-1})

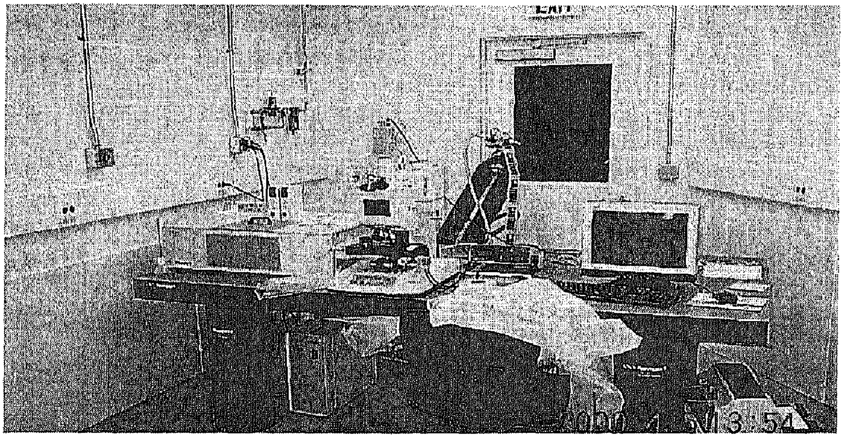
وهنا يحدث حركتين متماثلتين نتيجة لدرجة التماثل المرتفعة في الجزيء ، ولذلك يحدث لها امتصاص واحد عند 666 cm^{-1}

3-4. مطياف الاشعة تحت الحمراء IR spectrometer:

يفيد مطياف الأشعة تحت الحمراء في التعرف على المجاميع الفعالة functional groups في المركبات الكيميائية ، كما يمكن بواسطته التعرف على المركبات المختلفة ، نظرا لأن كل مركب له بصمة خاصة به finger print ، كذلك يمكنه التمييز بين

المركبات العطرية وغير العطرية ومجاميع الألكيل المختلفة بالاشتراك مع جهاز الرنين النووي المغناطيسي.

ويتكون مطياف الأشعة تحت الحمراء – (شكل 69) – من نفس الوحدات الأساسية التي يتكون منها مطياف الأشعة المرئية وفوق البنفسجية ، ولكن هناك بعض الاختلافات في تركيب بعض الوحدات بحيث تتلاءم مع طاقة الأشعة تحت الحمراء الضعيفة نسبيا.



شكل (69): مطياف الأشعة تحت الحمراء IR spectrometer (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب) .

1-4-3. مصدر الأشعة تحت الحمراء Source of IR radiation:

تنتج الاشعة تحت الحمراء(IR) من التسخين الكهربي لبعض المواد الصلبة الى درجة 1500 – 2000 درجة مئوية.

هناك مصادر عديدة لانتاج هذه الأشعة منها:

1. لبة نرنست المتوهجة Nernest glower

وتتكون من أكاسيد بعض العناصر الأرضية النادرة المصنعة على شكل قضيب

يبلغ قطره حوالي 1 – 2 مم ، أما طوله يكون حوالي 20 مم ، وعادة يستخدم أكسيد الزركونيوم zirconium oxide ويتصل القضيب من أحد طرفيه ببلاتين الرصاص platinum lead ليسمح بمرور التيار الكهربي ، ونظرا لأن مرور التيار الكهربي يكون صغير جدا على درجة حرارة الغرفة فانه يتم مبدئيا تسخين القضيب بواسطة مصدر خارجي الى درجة حرارة تسمح بمرور التيار الكهربي (1500°C) وعند مرور التيار ترتفع حرارة اللمبة الى الدرجة المناسبة واللازمة لانتاج الأشعة كما في شكل (70) التالي .وتبث لمبة نرنست المتوهجة طيفا في المدى $7100 - 1000\ cm^{-1}$

2. القضيب المتوهج Globar :

ويتكون هذا المصدر من قضيب من كربيد السليكون silicon carbide يبلغ طوله حوالي 50 مم ، أما قطره فيبلغ حوالي 0.4 مم كما في شكل (70) التالي.

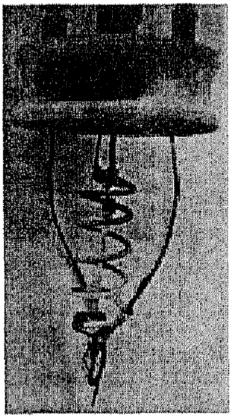
ويتم تسخين قضيب كربيد السليكون كهربيا حتى درجة 1200 °C لتعطي طيف مستمر بين $5000 - 600\ cm^{-1}$ ويتميز القضيب المتوهج بأنه يعطي طيفا أكثر انتظاما من الطيف الذي نحصل عليه من لمبة نرنست المتوهجة كما في شكل (70) التالي.

3. السلك المتوهج Incandescent wire:

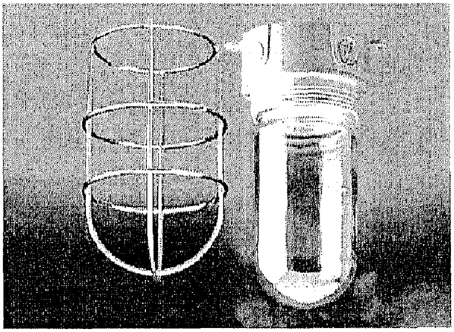
ويشبه السلك المتوهج الى حد كبير القضيب المتوهج كما في شكل (70) ،وينتج أيضا أشعة مستمرة في منطقة الأشعة تحت الحمراء المتوسطة Mid IR

4. لمبة الزئبق القوسية عالية الضغط High pressure mercury arc lamp:

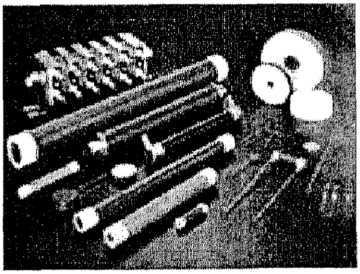
وتستخدم هذه اللمبة لانتاج الأشعة تحت الحمراء في المنطقة البعيدة منها والتي يطلق عليها Far IR كما في شكل (70).

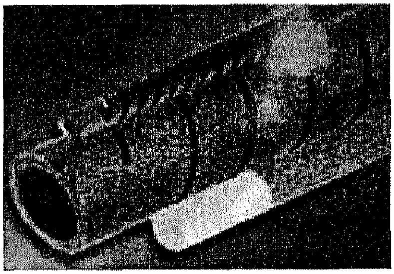


لمبة نرنست المتوهجة

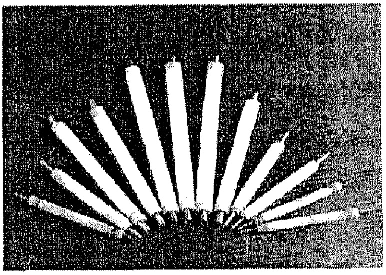


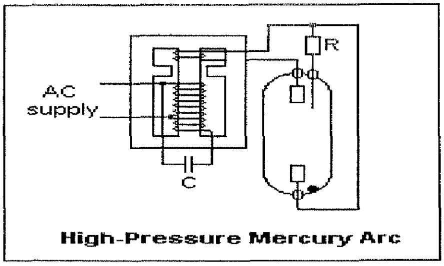
السلك المتوهج





القضيب المتوهج





لمبة الزئبق القوسية ذات الضغط العالي

شكل (70): المصادر المختلفة للأشعة تحت الحمراء (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

2-4-3. موحدات أطوال الموجات Monochromators :

تستخدم معظم الأجهزة الحديثة المحزوز Grating في فصل الأطوال الموجية المختلفة للأشعة تحت الحمراء بعد مرورها على العينة.ومن عيوب المحزوز زيادة كمية الأشعة المبعثرة وللتغلب على ذلك يستخدم منشور أو مرشح مع المحزوز في نفس الوقت.ونلاحظ هنا أن مكان وضع العينة يكون قبل موحد الموجات حتى لا تعوق ضبط الأشعة على الكشاف بينما في حالة أجهزة UV-VIS Spectrometer توضع العينة بعد موحد الموجات لتفادي أي تدهور في الاستضواء بواسطة أي من الموجات العالية الطاقة في الضوء المختلط.ويجب أن تكون جميع مكونات موحد الموجات شفافة IR transparent أي منفذة لكل الأشعة تحت الحمراء التي تمر عليها أي لا تمتص هي نفسها أي جزء من الضوء في مدى أطوال الموجات تحت الدراسة. تستخدم منشورات مصنوعة من مادة الزجاج الفلنت العادي Flint glass (المحتوي على الرصاص) أو يستخدم الزجاج الصواني بنجاح في نطاق الأشعة تحت الحمراء القريبة near IR

3-4-3. وحدة وضع العينات Sample cell:

يمكن استخدام عينات سائلة أو صلبة أو غازية ، ويختلف شكل الخلايا المستخدمة لوضع العينة عن تلك المستخدمة في مطياف الأشعة المرئية وفوق البنفسجية. في مطياف الأشعة تحت الحمراء يجب أن يكون سمك العينة صغير جدا ولذلك تستخدم خلايا دقيقة غالبا ما تكون معدنية لها نافذتان لمرور الأشعة خلال العينة.وتختار المادة التي تصنع منها النوافذ بحيث لا تمتص الأشعة تحت الحمراء في منطقة القياس (جدول 8) وعادة تستخدم هاليدات العناصر القلوية alkali halides في صناعة هذه النوافذ.

جدول (8): المواد المستخدمة في صناعة نوافذ الخلايا المستخدمة في أجهزة امتصاص الاشعة تحت الحمراء IR

المادة المصنع منها نوافذ الخلايا	الطول الموجي للأشعة التي تمر بدون امتصاص
NaCl	40,000 - 625 cm^{-1}
KBr	40,000 - 400 cm^{-1}
AgCl	25,000 - 435 cm^{-1}
Cesium bromide	10,000 - 270 cm^{-1}
Cesium iodide	10,000 - 200 cm^{-1}
Germanium	20,000 - 600 cm^{-1}
Polyethylene	625 - 33 cm^{-1}

ويلاحظ أن تعرض هذه المواد للرطوبة يؤدي الى حدوث تغير في سطحها وتصبح غير قادرة على الامرار الضوئي لكل الأشعة ويكون من الضروري في هذه الحالة اعادة صقل وتلميع سطح هذه المواد لأن كلوريد الصوديوم على سبيل المثال يذوب في الماء وبالتالي أي آثار للرطوبة في العينات تسبب تآكل في بلورات كلوريد الصوديوم .أما بالنسبة للعينات المائية والتي لايمكن معها استخدام بلورات كلوريد الصوديوم أو البلورات الأخرى التي تتأثر بالماء فيمكن أن تستخدم النوافذ المصنوعة من كلوريد الفضة حيث أنه لا يتأثر بالماء.وبذلك يجب الحفاظ على خلايا IR نظيفة من الماء أوالعرق أثناء تداولها بالأيدي ، ويجب تنظيفها بواسطة المذيبات العضوية فقط ولاتغسل بالماء لأنها تذوب فيه.

تجهيز العينات الغازية:

توضع العينة الغازية داخل خلية خاصة سبق تفريغها من الهواء ويختلف طول الخلية من بضعة سنتيمترات الى عدة أمتار (بواسطة تعدد الانعكاسات في الخلية) حيث توجد خلايا اسطوانية مصنوعة من زجاج البيركس طولها 10 سم أما نوافذها تكون مصنوعة من كلوريد الصوديوم أو فلوريد الكالسيوم أو بروميد البوتاسيوم. أما في حالة التركيزات

الضئيلة من الغاز يمكن استخدام خلية ذات امرار ضوئي كبير long path cell قد يصل الى 40 سم بواسطة تعدد الانعكاسات في الخلية أيضا ، وذلك باستخدام خلية قصيرة تحتوي على عدة مرايا عاكسة تعكس الأشعة الساقطة بطريقة تزيد من الامرار الضوئي الى الحد المطلوب.

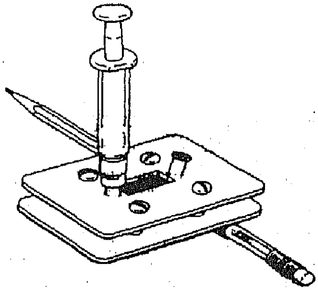
تجهيزالعينات السائلة:

يوضع غشاء رقيق من العينة للمركب النقي neat بسمك حوالي 0.01 mm وفي هذه الحالة تكون العينات في حدود mg 10-1 وقد يوضع محلول المادة بين قرصين من أملاح كلوريد الصوديوم ، أو فلوريد الكالسيوم ، أو بروميد البوتاسيوم. وتفصل الأقراص بواسطة 0.1 mm - 0.005 من السائل النقي أو 1 mm - 0.1 من المحلول. ويلاحظ أنه في حالة تقدير المواد السائلة النقية (بدون مذيب) تستخدم خلية مقارنة لا تحتوي على أي مادة ، أما في حالة المحاليل فيوضع في خلية المقارنة نفس المذيب المستخدم في اذابة العينة . ويراعى في المذيب أن يسمح بمرور الأشعة دون امتصاص في منطقة القياس ، وألا يتفاعل مع المادة المذابة ، أو يكون معها روابط هيدروجينية.وعندما تكون العينة صغيرة جدا تستخدم خلايا دقيقة تسمى ultra micro cavity cells مع مكثف للشعاع beam condenser.

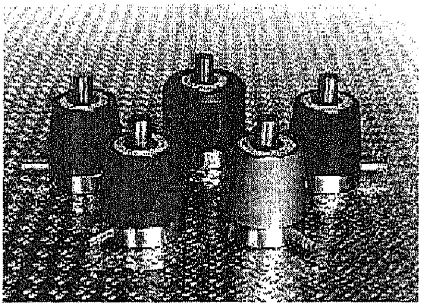
تجهيز العينات الصلبة:

يتم اعداد العينات بادوات كما بالشكل (71) و بالنسبة للمواد الصلبة عند عمل IR لها فانها تسحق في هون ، وتعلق في سائل عالي الوزن الجزيئي ، ثم يوضع منها فيلم رقيق يسمى mulls ، تحضر العينة في صورة فيلم وذلك بطحن 2 – 5 مللي جرام من العينة في هون من الكربوراندم ثم يضاف اليها بعض النقط من زيت هيدروكربوني petroleum oil يتميز بأن نقطة غليانه مرتفعة ويسمى هذا الزيت mulling oil مثل زيت النيوجول Nujol ، كما يمكن استخدام بوليمر يسمى fluorolube وهو يختلف عن النيوجول في أنه مهلجن تماما completely halogenated polymer ويحتوي على فلور وكلور ويستخدم

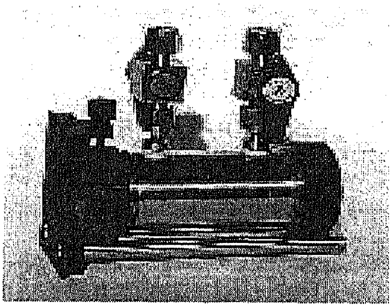
عندما يحدث تداخل في امتصاص hydrocarbon bands مع الطيف. وعموما يتميز كل من بوليمر Fluorolube وزيت Nujol بأنهما ليس لهما امتصاص في منطقة الأشـــعة تحت الحمراء المتوسطة أي في المدى $4000 - 250\ cm^{-1}$ وهو الذي يــتم فيــه معظــم عمليات القياس.ويمكن تحضير العينة الصلبة أيضا في صورة قرص مضغوط pressed disc من مادة بروميد البوتاسيوم KBr أو هاليدات العناصر القلوية الأخرى عن طريق كبسها تحت ضغط مرتفع فتكون قرصا منفذا للأشعة ، ويتم تحضير العينة عــن طريــق خلط 1 mg من العينة الصلبة خلطا متأنيا متجانسا مع حوالي مع 100 mg من بروميد البوتاسيوم الجاف بواسطة طاحونة كروية ball mill ، ثم يكبس المخلوط تحــت ضــغط يصل الى $20,000 - 50,000\ lb / in^2$

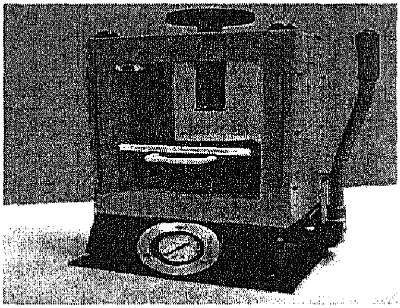


Metal blocks



KBr Die sets for KBr Discs





IR gas sampling supplies cells Laboratory hydrolyic press product

شكل (71): وحدة وضع العينات وتجهيزها (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

4-4-3. وحدة قياس طاقة الأشعة Detector:

يحتاج تقدير طاقة الأشعة تحت الحمراء ، الى أجهزة قياس خاصة نظرا لانخفاض طاقة فوتونات هذه الأشعة ، وانخفاض كثافة الأشعة المنتجة من المصادر الموجودة في تلك الأشعة ، وهنا لا يمكن استخدام الخلايا الضوئية في قياس طاقة هذه الأشعة، بينما تستخدم كشافات القياس الحراري Thermal detectors في قياس طاقتها.وعند امتصاص هذه الأشعة بواسطة كشافات القياس الحراري ترتفع درجة الحرارة بقدر يتناسب مع طاقة الأشعة ، وعلى ذلك يمكن تقدير الانخفاض في طاقة الأشعة الناتج عن الامتصاص نتيجة مرورها على العينة. ويجب أن تكون المادة المكونة لكشاف القياس الحراري ذات سعة حرارية صغيرة جدا. حتى يمكن الكشف عن التغيرات الصغيرة في طاقة الأشعة المنخفضة ، كما يجب أن تكون وحدة القياس الحراري معزولة تماما عن المحيط الخارجي ، حتى لا تحدث تأثيرات حرارية (انتقال حراري) من الوسط المحيط.

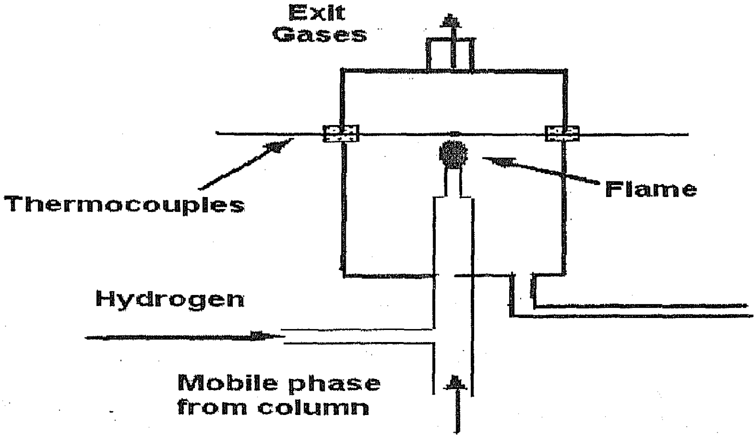
وتوجد ثلاثة أنواع من كشافات القياس الحراري هي:

1- كشاف المزدوجة الحرارية Thermocouple detector

هذا الكشاف هو الأكثر استخداما ، ويعتمد على تكوين فرق جهد بين نقطة اتصال معدنين مختلفين نتيجة لاختلاف درجة الحرارة بينهما ، فالوصلة الأولى تتكون من شريحة معدنية من الذهب أو البلاتين تستقبل الأشعة تحت الحمراء أما الوصلة الثانية فتتكون من عنصر سعته الحرارية مرتفعة ومعزولة عن هذه الأشعة ، وعلى ذلك فان ارتفاع درجة الحرارة في الوصلة الأولى (الذهب) نتيجة لاستقبالها الأشعة يؤدي الى تكوين فرق جهد بينها وبين الوصلة الثانية وهذا الفرق في الجهد يمكن تقديره بواسطة دائرة كهربية خاصة electric circuit، أي نه يتم تقدير فرق الجهد كدالة للتغير في درجة الحرارة (شكل 72).

2- كشاف الطاقة الحرارية الاشعاعية Bolometer detector:

يتركب هذا الكشاف من معدن أو مادة شبه موصلة semiconductor والتي تبدي تغير كبير في المقاومة الكهربية electric resistance كدالة للتغير في درجة الحرارة ، أي أنه يتم تقدير التغير في المقاومة كدالة للتغير في درجة الحرارة شكل (73).

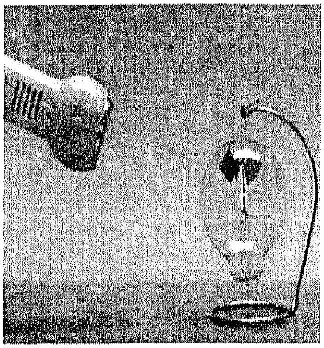


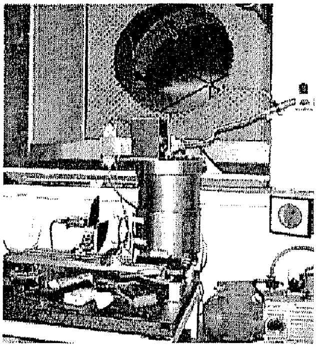
شكل (72): كشاف المزدوجة الحرارية Thermocouple detector.

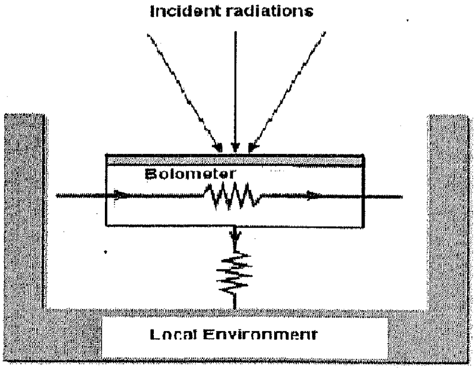
3- كشاف خلية جولاي Golay cell detector:

وهذا الكشاف يعتبر ترمومتر غازي حراري وهو عبارة عن خلية مملوءة بغاز ، وعند سقوط الأشعة تحت الحمراء على خلية جولاي ترتفع درجة حرارة الغاز نتيجة امتصاص هذه الأشعة وينتج عن ذلك ارتفاع في الضغط الذي يمكن تحويله الى اشارات كهربية ، أي نه يتم تقدير الارتفاع في ضغط الغاز كدالة للتغير في درجة الحرارة (شكل 74).وهذه الكشافات الثلاثة تستخدم لقياس Mid IR بالاضافة الى أن خلية جولاي يمكنها أيضا قياس Far IR

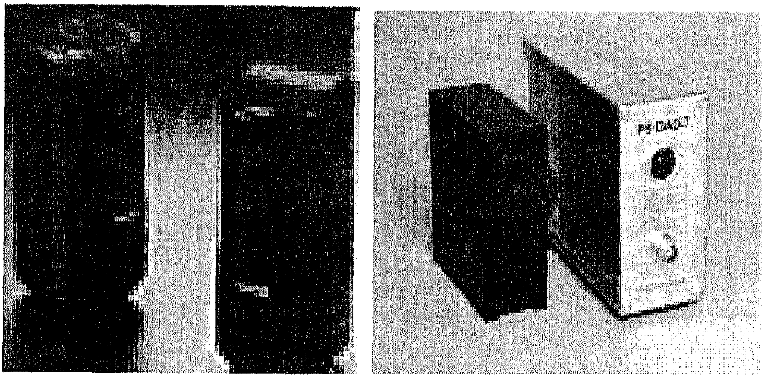
أما بالنسبة للكشف عن أشعة near IR فانه يمكن قياسها بواسطة الخلية الضوئية المكبرة PMT السابق ذكرها مع أجهزة UV-VL لأن طاقتها أعلى من طاقة Far & Mid IR







شكل (73) : مقياس الطاقة الحرارية الاشعاعية Bolometer.

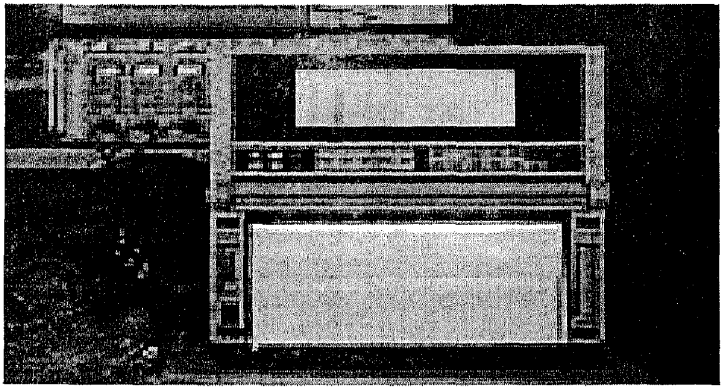


1

شكل (74): خلية جولاي Golay Cell .

3-4-5. وحدة التسجيل Recorder:

تستخدم وحدة التسجيل في مطياف الأشعة تحت الحمراء لتسجيل الامتصاص اما عند الأطوال الموجية المختلفة (nm) wavelength أو عند الأعداد الموجية المختلفة wave numbers (cm^{-1}) ، وبذلك يمكن تسجيل طيف الامتصاص في المدى المرغوب (شكل 75).

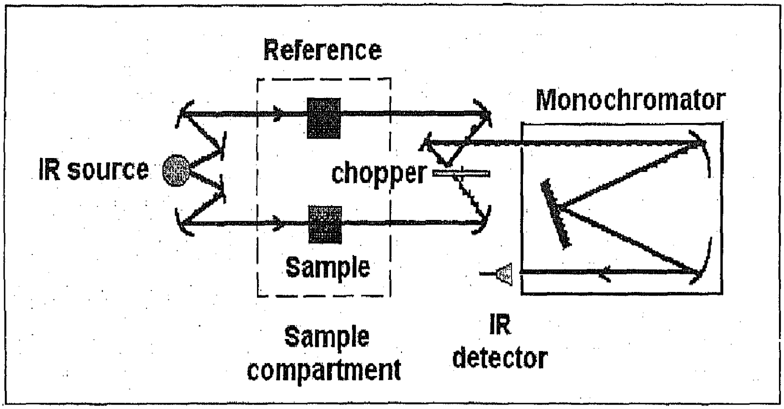


شكل (75): وحدة تسجيل النتائج في مطياف الأشعة تحت الحمراء.

3-5. مطياف الأشعة تحت الحمراء مزدوج الحزمة

Double beam IR spectrometer

معظم أجهزة مطياف الأشعة تحت الحمراء المستخدمة مزدوجة الحزمة أي أنهـا Double beam spectrometers لأن انخفاض طاقة الأشعة تحت الحمراء وعـدم ثبات المصدر الضوئي ووحدة القياس وضرورة تكبير الاشارات الكهربيـة الـضعيفة الناتجة يجعل من التصميم ذي الحزمتين أمرا ضروريا لهذه الأجهزة ، ويـتم فيهـا فصل أشعة المصدر الى حزمتين متساويتين بواسطة مرآة متحركـة rotating mirror وقاطع للضوء light interrupter حيث تتأرجح أشعة المصدر بالتناوب بـين خليـة العينة sample cell والخلية المرجعية أو البلانك reference cell وفي النهاية يمـر شعاع العينة بالتناوب الى وحدة تحليل الأشعة كما هو موضح في شكل (76).



شكل (76): مسار الشعاع المزدوج في مطياف IR.

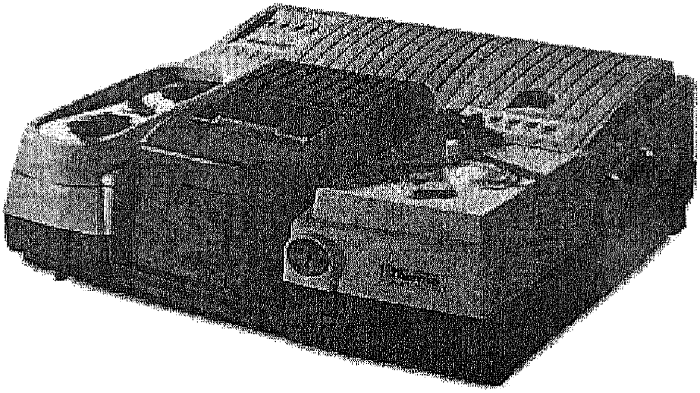
3-6. مطياف الأشعة تحت الحمراء المزود بمحول فورييه

Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectrometry

يختلف مطياف الأشعة تحت الحمراء المزود بمحول فورييه FT-IR (شـكل 77)

عن مطياف الأشعة تحت الحمراء العادي Regular IR فيما يلي:

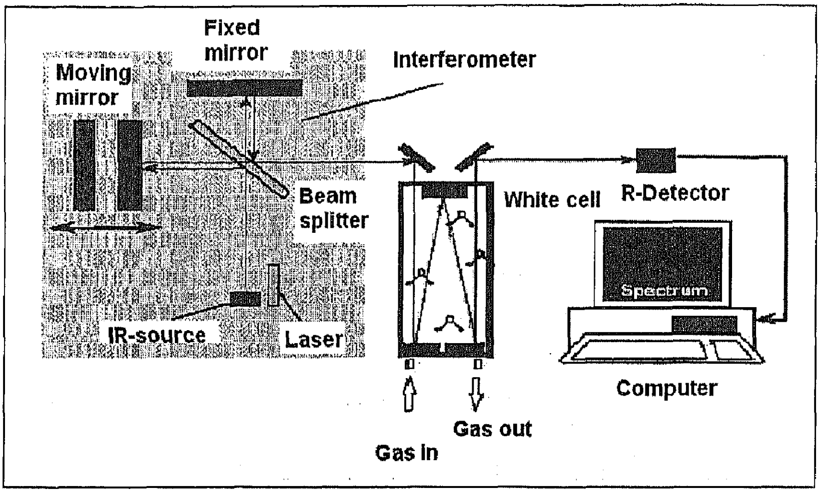
- مصدر الطاقة في مطياف FT-IR يكون LASER Monochromatic source.
- لا يحتوي مطياف FT-IR على موحد للموجات monochromator وعلى ذلك فان الشعاع الساقط يحتوي على كل أطوال موجات الأشعة تحت الحمراء المتوسطة المدى $5000 - 400\ cm^{-1}$.
- الجهاز مزود بمحول Analog to digital converter لكي يسهل دمجه مع أجهزة التحليل الكروماتوجرافي GC- FTIR or HPLC-FTIR
- يتميز جهاز FT-IR spectrometer بأنه يقوم بتحليل العينات الصغيرة الحجم وبدرجة أسرع وأدق من الجهاز العادي.
- يعطي درجة تمييز عالية جدا very high resolution

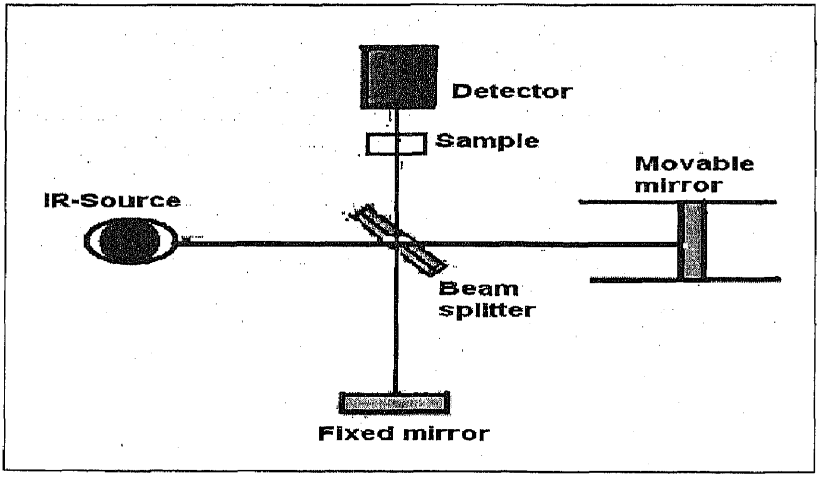


شكل (77): مطياف **FT-IR**.

وينقسم الشعاع الساقط الى حزمتين بواسطة Beam splitter كما هو موضح في شكل (78) ، الحزمة الأولى لها طول موجة ثابت fixed wavelength وتوجه الى

المرآة الثابتة ، أما الحزمة الثانية لها طول موجة متغير variable wavelength وتوجه الى المرآة المتحركة movable mirror

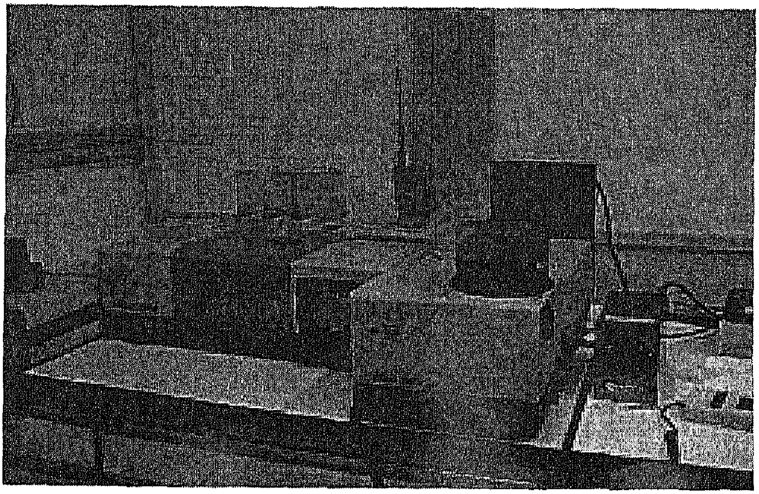




شكل (78): مسار الأشعة في مطياف FT-IR (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

7-3. مطياف رامان Raman Spectrometr:

وهي طريقة أخرى للنظر الى الحركات الاهتزازية في الجزيء عن طريق تبعثر الأشعة Raman scattering وليس امتصاص الأشعة كما هو الحال في Regular IR أو FT-IR ويهتم بدراسة التغيرات الاهتزازية وكذلك الدورانية في النظم المختلفة (شكل 79) .ويستخدم في مطياف رامان شعاع ضوئي موحد monochromatic light من أشعة الليزر LASER من خلال الضوء المرئي أو الأشعة تحت الحمراء القريبة أو الأشعة فوق البنفسجية القريبة ، ويتداخل شعاع الليزر مع الفوتونات أو الأنظمة المثارة الأخرى.وفي مطياف رامان يتم اثارة العينة بحزمة من أشعة الليزر ثم يتم تجميع الضوء من النقاط المثارة في المادة بواسطة عدسات ثم توجه الى موحد الموجات حيث تمر الأطوال الموجية القريبة من خط الليزر أما باقي الأطوال الموجية يتم بعثرتها خلال الكشاف.و في مطياف رامان يستخدم موحد الموجات holographic diffraction gratings كما يستخدم كشاف الخلية الضوئية PMTs



شكل (79): مطياف Raman-IR (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

3-8. التحليل الوصفي باستخدام الاشعة تحت الحمراء:

يعتبر التحليل الطيفي لامتصاص أشعة الـ IR من الطرق الأساسية المستخدمة في التعرف على تركيب الجزيئات في حالتها العادية ، كما يمكن استخدامه في الكشف عن التغيرات التي تحدث للجزيئات نتيجة لتفاعلها وتكوين جزيئات جديدة.

ومن ناحية أخرى فانه يمكن استخدام الـ IR في التقدير الكمي للمركبات ولو أن الطرق الأخرى (الامتصاص في منطقة UV, VIS) تعتبر أفضل في التقدير الكمي ، ويعتبر طيف الامتصاص لأشعة IR بصمة مميزة لتركيب الجزيء ككل.

ويلاحظ أن بعض الحركات الاهتزازية تكون متمركزة فقط في رابطة أو مجموعة كيميائية ولا يحدث ازدواج يذكر بين هذه المجموعات وبقية الجزيء ، وعلى ذلك فان موضع امتصاص هذه المجموعات لا يتغير من مركب الى آخر.ومن أمثلة المجاميع التي لايتغير امتصاصها من مركب لآخر مايلي:

- مجموعة الكربونيل C=O
- مجموعة السلفاهيدريل -SH
- مجموعة -NH
- مجموعة الهيروكسيل -OH
- مجموعة الميثلين $-CH_2$
- مجموعة الميثيل $-CH_3$

ونظرا لثبات امتصاص هذه المجموعات فانها تعتبر مفيدة بدرجة كبيرة للتعرف على الجزيئات. وبصفة عامة يمكن تقسيم طيف امتصاص الأشعة تحت الحمراء للمركبات العضوية الى قسمين :

1-8-3. منطقة امتصاص عالية التردد High frequency portion

وهي المنطقة التي يحدث فيها امتصاص للمجاميع الفعالة function groups ويمتد نطاق العدد الموجي في هذه المنطقة من $3600 - 1300\ cm^{-1}$

2-8-3. منطقة امتصاص منخفضة التردد Low frequency portion:

وهي المنطقة التي يحدث فيها امتصاص قوي للمجموعات الأروماتية aromatic ويمتد نطاق العدد الموجي في هذه المنطقة من $909\text{-}650\ cm^{-1}$

ويمكن عمل تقسيما أكثر تمييزا الى أربعة مناطق وهي:

أولا: المنطقة $3600 - 2700\ cm^{-1}$:

وهي المنطقة الخاصة بتمدد الروابط بين ذرة الهيدروجين وذرة أخرى ذات وزن ذري كبير مثل الأكسيجين أو النتروجين أو الكربون ولذلك هذه المنطقة خاصة بتمدد الروابط O-H, N-H, C-H

ثانيا: المنطقة $2700 - 1850\ cm^{-1}$:

وهي المنطقة الخاصة بتمدد الروابط الثلاثية C≡N , C≡C

ثالثا: المنطقة $1850 - 1555\ cm^{-1}$:

وهي المنطقة الخاصة بتمدد الروابط الزوجية C=N, C=O, C=C

رابعا: المنطقة $1500 - 700\ cm^{-1}$:

وهي منطقة البصمة fingerprint ويحدث فيها تمدد الروابط الأخرى والانحناء في الروابط وتحتوي هذه المنطقة على الامتصاصات الخاصة بالرابطة الفردية بين ذرات الكربون والذرات الأخرى غير ذرات الهيدروجين مثل C-C , C-O, C-Cl وغيرها ، أي الروابط التي تكون الهيكل الأساسي للجزيء ، وفي هذه المنطقة فان أي تغير بسيط في تركيب الجزيء يؤدي الى تغيير واضح في عدد ومواضع الامتصاصات ولذلك تسمى هذه المنطقة بمنطقة البصمة.

3-9. التحليل الكمي بواسطة الاشعة تحت الحمراء IR:

استخدامه محدود و يعتمد على قانون لمبرت بيير

C	b	E	A =
التركيز	السمك	معامل الخفوت	الامتصاصية

- لتقدير سمك الخلية: نحضر عينة فارغة. ونقدر امتصاصيتها فنحصل على خلط.

حيث n عدد القمم $b = \frac{n}{2} \cdot \frac{\lambda_1 \lambda_2}{\lambda_2 - \lambda_1}$

- تقدير معامل الخفوت (Σ): تختار أوضح حزمة ونقيس It, I0

الامتصاصية $A = \log \frac{I_0}{It}$

ومنها نحسب Σ.

3-10. دور التحليل الطيفى بالاشعة تحت الحمراء فى مجال المبيدات:

تعتبر أجهزة التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء مهمة في تحليل تجهيزات ومتبقيات المبيدات نظرا لبساطة هذه الأجهزة ، والرخص النسبي لأسعارها مقارنة بالأجهزة الأخرى.

- ويتم التحليل الوصفي للمبيدات بمقارنة الطيف الناتج من العينة المجهولة بالطيف الناتج من العينة القياسية وهذه الأطياف تكون مخزنة في داخل الكمبيوتر أو مكتبة الجهاز.
- يتم التحليل الوصفي باستخدام متبقي المبيد وتنقيته وإعداده وتثبيته في صورة مماثلة للعينة القياسية ثم يتم الحصول على الطيف الناتج ويقارن بالأطياف القياسية وذلك بمقارنة شكل الحزم الناتجة وعددها ومواضع امتصاصها.
- التحليل الكمي بالـ IR في مجال المبيدات: يمكن إجراؤه بالطريقة السابق ذكرها في التقدير الكمي وذلك باختيار أحد حزم الامتصاصات عند طول موجي معين (حزمة قوية غير متداخلة مع أى حزم أخرى) ويتم التقدير كميا كما ذ كر سابقا.

- ميزته: قد يصلح في حالة تقدير العينة دون استخلاص أو تنقية بطريقة معينة باختيار حزمة واحدة قوية فلو ظهرت مواد متداخلة لا يكون لها تأثير.

4. التحليل الطيفى بواسطة الرنين النووى المغناطيسى (3)
Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

4-1. فكرة التحليل بالـ NMR:

تعد ظاهرة الرنين النووي المغناطيسي Nuclear magnetic resonance (NMR) إحدى الظواهر الفيزيائية التي تعتمد على الخواص المغناطيسية الميكانيكية الكمية لنواة الذرة. ويستخدم الرنين النووي المغناطيسي للدلالة على مجموعة منهجيات وتقنيات علمية. وتستخدم هذه الظاهرة لدراسة الجزيئات من حيث البنية و التشكيل الفراغي.

وتعتمد الظاهرة أساسا على أن جميع الأنوية الذرية التي تملك عددا فرديا من البروتونات أو النيوترونات يكون لها عزم مغناطيسي أصلي intrinsic وعزم زاوي momentum angular ، وأكثر الأنوية التي تستخدم في هذه التقنيات هي نواة ذرة الهيدروجين H^1 وهي أكثر نظائر الهدروجين توافرا في الطبيعة ، وكذلك نواة ذرة الكربون ^{13}C . وهناك نظائر عناصر أخرى يمكن أن تستخدم لكن استخداماتها تبقى أقل.

وينتج عن الدوران المغزلي spining motion لأنوية هذه العناصر حول محورها عزم مغناطيسي magnetic moment (M) ، وعند وضع هذه الأنوية بين قطبي مجال مغناطيسى خارجي ، فإنه يحدث تأثير على مستويات الطاقة الخاصة بالحركة المغزلية spin energy level لهذه الأنوية ، مما يؤدي الى إنفصال splitting طاقة الحركة المغزلية إلى مستويين طاقيين مختلفين على أساس اتجاه العزم المغناطيسي الناشئ عن الحركة المغزلية وهما:-

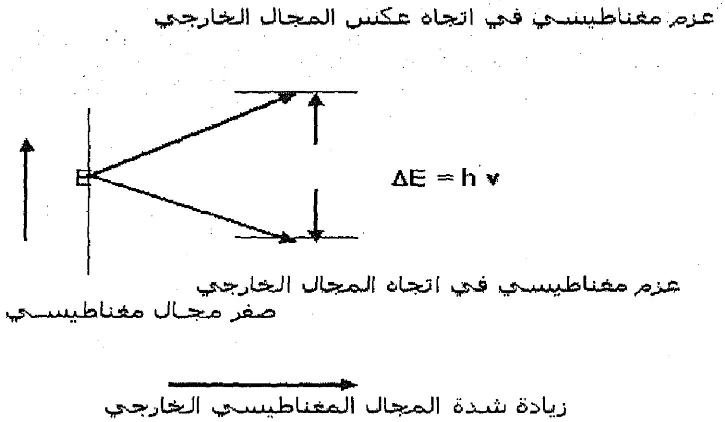
- مستوى طاقي منخفض Low energy level وهنا يكون العزم المغناطيسى فى إتجاه المجال المغناطيسى الخارجي.

---

(3) كتبة الاستاذ الدكتور احمد خميس محمد سلام - قسم كيمياء المبيدات-كلية الزراعة- جامعة الاسكندرية

- مستوى طاقي مرتفع High energy level وهنا يكون العزم المغناطيسى فى إتجاه مضاد للمجال المغناطيسى الخارجى.

ويمكن زيادة الفرق فى الطاقة بين هذين المستويين بزيادة شدة المجال المغناطيسى الخارجى كما سيتضح في شكل (80) ولذلك توضع هذه الأنوية فى مجال مغناطيسى خارجى (بين قطبي مغناطيس كبير) ويسلط عليها أشعة الراديو Radiowave فتمتص هذه الأنوية طاقة أشعة الراديو وتنتقل إلى مستوى الطاقة الأعلى ، وينتج عن ذلك تغير فى إتجاه الحركة المغزلية للنواة ، ثم ترجع الأنوية من المستوى العالي في الطاقة الى المستوى المنخفض مرة أخرى وهكذا ، ويطلق على هذه الظاهرة ظاهرة الرنين النووي المغناطيسي. وإمتصاص الطاقة يمكن الكشف عنه وتكبيره كطيف خطى ويطلق عليه إشارة الرنين المغناطيسي resonance signal ويظهر كل جزئ عدة إمتصاصات تعبر عن الظروف الأليكترونية المحيطة بكل نواة والتى تحدد نوع الرابطة والذرات الأخرى المرتبطة بهذه النواة ، ولذلك يستخدم تحليل الرنين النووي المغناطيسي فى التعرف على التركيب البنائي للجزيئات.



شكل (80): طاقة الحركة المغزلية.

ويعبر عن طيف الأشعة الكهرومغناطيسية فى منطقة أشعة الراديو بالتردد بوحدات هرتز، ميجاهيرتز $(1MHz = 10^6 Hz)$ Hertz (Hz), MHz,

ويوجد عدد محدود من العناصر التى تحتوى على أنوية ذات خواص مغناطيسية قوية تتيح التطبيق العملى لإمكانية تحليلها بواسطة مطياف NMR كما ذكرنا – مثل: الهيدروجين ^{1}H ، والكربون ^{13}C بالاضافة الى بعض العناصر الأخرى ، مثل: البورون ^{11}B، والفلور ^{19}F ، والفوسفور ^{31}P. وهذه العناصر تتميز أيضاً بأن ذراتها تحتوى على عدد فردى odd number من البروتونات أو النيترونات ، لها رقم كم مغزلى (Spin Quantum Number) يساوى ½ . وعلى ذلك يكون رقم الكم المغناطيسى (Magnetic Quantum Number) لها يساوى ±½ ويكون عدد الاتجاهات المحتملة للعزم المغناطيسى =2 ويمكن حساب طاقة المستويات الناتجة عن الإتجاهات المختلفة للعزم المغناطيسى بواسطة المعادلة 31

$$E = - m \mu B_o / I$$

حيث أن:

E هى طاقة المستوى

B_o شدة المجال المغناطيسى الخارجى

m رقم الكم المغناطيسى

I رقم الكم المغزلى

μ العزم المغناطيسى

وعلى ذلك ، فإن طاقة المستويات فى حالة الأنوية التى لها كوانتم مغزلى يساوى ½ تكون :

$E_1 = -\frac{1}{2} \mu B_o / \frac{1}{2}$ where: $m = +\frac{1}{2}$ • $E = -\mu B_o$

$E_2 = \frac{1}{2} \mu B_o / \frac{1}{2}$ where: $m = -\frac{1}{2}$ • $E = +\mu B_o$

$$\Delta E = E_2 - E_1 = +\mu B_o - (-\mu B_o)$$
$$= +\mu B_o + \mu B_o$$
$$= 2\mu B_o$$

ويوضح جدول (9) التالي حالة البروتونات والنيوترونات ، وكذا الدوران المغزلي لبعض الأنوية. كما يتضح من الجدول أن الدوران المغزلي لكل من الهيروجين-1 والفوسفور-31 والفلور-19 والكربون-13 يساوي ½

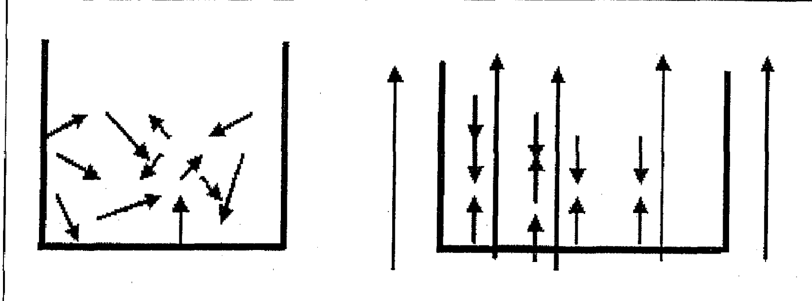
جدول (9): الدوران المغزلي لبعض الأنوية.

Number of protons	Number of neutrons	Spin number	Examples
Even	Even	0	^{12}C, ^{16}O, ^{32}S
Odd	Even	½	^{1}H, ^{31}P, ^{15}N, ^{19}F
Even	Odd	½	^{13}C
Odd	Odd	1	^{1}H, ^{15}N
Odd	Even	3/2	^{11}B, ^{79}Br
Even	Odd	5/2	^{127}I

وفي حالة الأنوية التي يكون فيها عدد البروتونات والنيترونات زوجي ، تكون حركتها مغزلية في اتجاه واحد ، وبذلك يكون رقم الكوانتم المغزلي لها يساوي صفرا . وفي حالة الأنوية التي يكون فيها عدد البروتونات أو النيترونات فردي ، فتكون حركتها المغزلية في اتجاهين ، ويكون رقم الكوانتم المغزلي لها يساوي ½ . أما فى غياب المجال المغناطيسى الخارجى ، فإن العزم المغناطيسى لهذه الأنوية يمكن أن يوجد فى أى إتجاه ، وتكون طاقة هذه الاتجاهات متساوية ، و عدد الأنوية (البروتونات) الموجودة فى هذه المستويات متساوية أيضاً .وأما فى وجود المجال المغناطيسى الخارجى ، فان طاقة الحركة المغزلية تنفصل الى مستويين: أحدهما ، عالي والآخر ، منخفض في الطاقة – كما سبق وشرحنا – ولذلك نجد أن هذه الأنوية تحت هذه الظروف توجه نفسها بحيث يكون إتجاه العزم المغناطيسى لها فى إتجاه المجال المغناطيسى الخارجى ، لتكون عند مستوى طاقي منخفض وتظل بعض الأنوية عكس اتجاه المجال المغناطيسي الخارجي وتتناوب هذه الأنوية بحيث تغير

اتجاهها لتصبح كل منها مرة في اتجاه المجال ومرة عكس اتجاه المجال – كما واضح في- (شكل 81).

ودائما يكون المستوى المنخفض فى الطاقة (m=½) مشغول بعــدد أكبــر مــن البروتونات عن المستوى المرتفع فى الطاقة (m= -½) لأن كل نظام يميل الى التواجد في المستوى الطاقي المنخفض.



شكل (81): اتجاه عزم الأنوية عند وضعها في مجال مغناطيسي.

وقيمة العزم المغناطيسى تعبر قيمة ثابتة بالنسبة للنوع الواحد من الأنويــة ، وقــد وجد أنه عند وضع تلك الأنوية ذات الخواص المغناطيسية فــى مجــال مغناطيــسي خارجى شدته 14.000 جاوس على درجة حرارة الغرفة (300 K) يكون 1.000010 نواة فى مستوى الطاقة المنخفض ، بينما نجد 1.000000 نواة فقط فى مستوى الطاقة العالى وبذلك يكون الفرق فى عدد الأنوية فى كلا المستويين هو عشر أنوية وهى التى تكون مسئولة عن عملية الأمتصاص للطاقة فى الرنين النووى المغناطيــسى.وبزيــادة شدة المجال المغناطيسى ، يزداد الفرق فى الطاقة بين المستويين ، وبالتالى يؤدى إلــى زيادة عدد الأنوية الموجودة فى مستوى الطاقة المنخفض بالنسبة لعدد الأنوية الموجودة فى مستوى الطاقة المرتفع. وتختلف أجهزة NMR عن بعضها فــى شــدة المجــال

المغناطيسى المستخدم ، وبزيادة شدة المجال المغناطيسى نحصل علـى فـصل جيـد للامتصاصات الناتجة من الأنوية المختلفة فى الجزيئات.

4-2. عملية الإسترخاء Relaxation process:

عندما يحدث امتصاص لطاقة موجات أشعة الراديو ، تنتقل الأنوية مـن مـستوى الطاقة المنخفض إلى مستوى الطاقة الأعلى ، وينتج عن ذلك إنحـراف النظـام عـن الإتزان الحرارى وإذا لم يتم رجوع الأنوية من المستوى العـالى فـى الطاقـة إلـى المستوى المنخفض مرة أخرى فإن عملية الإمتصاص لا يمكن أن تستمر وهـذا مـا يطلق عليه التشبع saturation ويكون الامتصاص فى هذه الحالة صغير جداً وقد لا يمكن الكشف عنه عمليا ، ولكن الذى يحدث فى الأنظمة الكيميائية أن الطاقة الممتصة عادة ما تفقد بسرعة وبذلك تستمر عملية الأمتصاص ويمكن الكشف عنها، وعملية فقد الطاقة المكتسبة فى هذه الحالة تسمى عملية الإسـترخاء relaxation process أمـا الوقت الذي يستغرق لفقد هذه الطاقة يسمى relaxation time.

وتتم عملية الإسترخاء relaxation process بطريقتين هما:

4-2-1. الإسترخاء الطولي Longitudinal or spin-lattice relaxation:

يتم الإسترخاء عن طريق فقد الطاقة من النواة إلى بقية الجزئ. وكفاءة هذه الطريقة يعبر عنها بالزمن الذى يستغرق فى عملية نقل الطاقة من النواة وهـى فـى مـستوى الطاقة العالى إلى مستوى الطاقة المنخفض ، وكلما كان هذا الزمن صغير يدل علـى كفاءة نقل الطاقة وينتج عن ذلك إتساع منحنى الإمتصاص broadening ، وتحـدث هذه العملية فى حالة السوائل والمحاليل والغازات.

4-2-2. الإسترخاء المستعرض Transverse or spin- spin relaxation:

يتم الإسترخاء عن طريق تأثير الحركات المغزلية للأنوية المجاورة ، وتحدث هذه العملية بإنتقال الطاقة من النواة وهى فى مستوى الطاقة العالى إلـى نـواة أخـرى

مجاورة توجد فى مستوى الطاقة المنخفض ، وهذه الطريقة ذات أهمية فـى حالـة المواد الصلبة.

4-3. طيف الرنين النووي المغناطيسي NMR spectrum :

يتم تسجيل طيف امتصاص الرنين النووى المغناطيسى لأنوية نوع واحد من العناصـر التى لها خواص مغناطيسية داخل نفس الجزئ الواحد. وذلك لأن كل نوع من أنوية ذرات العناصر يمتص طاقة الأشعة على تردد مختلف ، كما أن جهاز NMR يتميز بقدرته على تمييز نوع واحد من أنوية العناصر بالنسبة للظروف المحيطة بهذه الأنوية فى الجزئ.

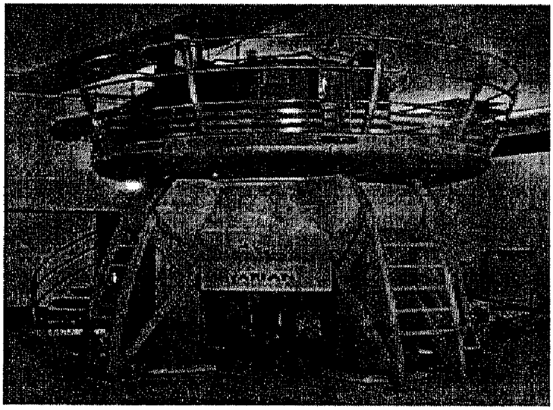
نواة ذرة الهيدروجين (البروتون) :

عند حدوث إمتصاص واحد لأنوية ذرات الهيدروجين ، فإنه لن نتحصل علـى أى معلومات مفيدة بالنسبة لتركيب الجزيئات ولكن وجود أنوية ذرات الهيـدروجين فـى الجزئ يؤدى إلى وجود هذه الأنوية فى ظروف أليكترونية مختلفـة بالنـسبة لتوزيـع الأليكترونات فى الرابطة بين نواة الهيدروجين والذرة الأخرى. وهـذا التبـاين فـى التوزيع الأليكترونى حول أنوية الهيدروجين فى الجزئ يؤدى إلـى إمتـصاص هـذه الأنوية على ترددات مختلفة وعلى ذلك فإن عدد الإمتصاصات يعبـر عـن الأنـواع المختلفة من ذرات الهيدروجين فى الجزئ. فنجد أن الهيدروجين فى كلا من - OH & $-CH_2$ & $-CH_3$ يختلف من ناحية الظروف الأليكترونية المحيطة، وبـذلك يحـدث إمتصاص لكل نوع من البروتونات على تردد مختلف ، كما أن كثافة الإمتصاص فى كل مجموعة ، يتناسب مع عدد البروتونات فى هذه المجموعة وبذلك نحـصل علـى معلومات مفيدة بالنسبة للتركيب الجزيئى.

وتختلف أجهزة الرنين النووى المغناطيسى (شكل 82) عن أجهزة التحليل الطيفى الأخرى حيث يعتمد وجود مستويات الطاقة المغناطيسية التى تحدث بينها عملية الانتقال على وجود مجال مغناطيسى خارجى قوى ، بينما فى طرق التحليل الطيفى الأخرى يعتبر

وجود مستويات الطاقة الخاصة بها (مستويات الطاقة الأليكترونية والأهتزازية) خاصية ذاتية قائمة فى الجزيئات. الأشعة الكهرومغناطيسية EMR المستخدمة فى أجهزة NMR ذات طول موجى كبير جداً radiowave . وعلى ذلك فإن الوحدات المستخدمة فى إنتاج هذه الأشعة والكشف عنها تختلف عن أجهزة التحليل الطيفى الأخرى.

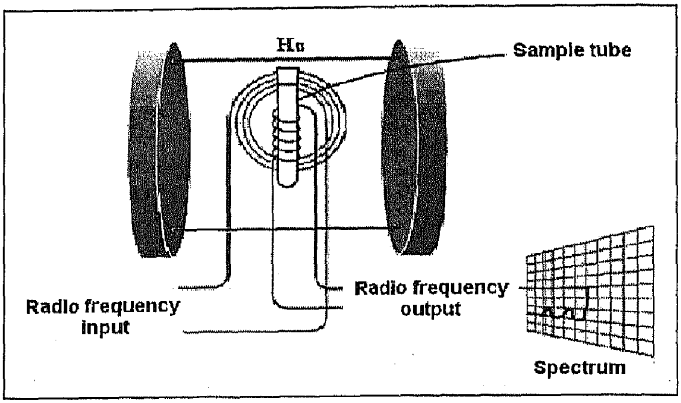
فى أجهزة التحليل الطيفى – السابق ذكرها – UV – VL & IR يمكن إحداث إمتصاص بتغيير طاقة الأشعة (الطول الموجى أو التردد) ويحدث الإمتصاص عند الطول الموجى الذى تكون فيه طاقة الأشعة مساوياً للفرق فى الطاقة بين مستويات الطاقة، ولكن وجد أنه من الصعب التحكم فى تغيير الطول الموجى فى منطقة radiowave المستخدمة فى أجهزة NMR بدقة كافية وعلى ذلك فإن أجهزة NMR تستخدم حزمة ثابتة من أشعة الراديو ، بينما يغير من شدة المجال المغناطيسى وبذلك يحدث الإمتصاص للشعاع عندما تتساوى مع طاقة الأشعة.وحيث أن كل بروتون (نواة ذرة الهيدروجين) فى الجزىء له طاقة خاصة به فتحدث الامتصاصات للبروتونات المختلفة فى الجزىء وذلك بتغيير شدة المجال المغناطيسى فى وجود حزمة ثابتة ذات تردد مناسب من أشعة الراديو.



شكل (82): مطياف الرنين النووي المغناطيسي (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

4-4. مكونات مطياف الرنين النووي المغناطيسي:

تتكون أجهزة الرنين النووي المغناطيسي من خمسة أجزاء رئيسية كما هو موضح لاحقا بشكل (83).



شكل(83): رسم تخطيطي لطياف الرنين النووي المغناطيسي (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب).

1-4-4. المغناطيس Magnet :

يستخدم المغناطيس لفصل مستويات الطاقة المغناطيسية للأنوية المختلفة ، ويمكن إستخدام مغناطيس دائم permanent mangnet أو مغناطيس كهربى electromangnet ، وتوضع العينة في الجهاز بين قطبى المغناطيس الذى يشترط فيه أن يعطى مجالاً مغناطيسياً متجانسا Homogeneous field وأن يكون ثابتاً بدرجة مناسبة.

2-4-4. وحدة تغيير شدة المجال Magnetic Field Sweep Generator

يتم تغيير شدة المجال المغناطيسي بواسطة ملف coil فى مواجهة قطبى المغناطيس وهذا الملف متصل بمولد كهربى متغير sweep generator فعند تغيير شدة التيار الكهربى المستمر DC فى الملف يتغير شدة المجال المغناطيسى فى منطقة العينة فى

حدود طفيفة وهذا التغيير يكون فى حدود 1000 هرتز فى مطيـــاف الــرنين النـــووي المغناطيسي الذي يستخدم أشعة ترددها 60 MHz والذي يسمي 60 MHz NMR.

4-4-3. مصدر إنتاج موجات أشعة الراديو Radiofrequency Transmitter

تنتج أشعة الراديو من متذبذب أشعة الراديـــو radiofrequency oscillator حيــث تغذى فى سلك مزدوج coil ملفوف حول العينـــة والـــذى يـــسمى ملـــف الأرســـال transmitter coil ويكون محوره عمودياً على اتجاه المجال المغناطيسي. ويتم اختيار وحدة إنتاج أشعة الراديو على حسب تردد الأشعة المطلوب والتى تتوقف بالتالى علـــى شدة المجال المغناطيسى المستخدم فى الجهاز ، على سبيل المثال فى حالة إســـتخدام مغناطيسى 14 كيلو جاوس يكون تردد الأشعة المطلوب 60 MHz.

4-4-4. وحدة وضع العينة Sample Holder and Probe:

تستخدم أنابيب من الزجاج قطرها الداخلى 5mm لوضـع العينات وهذه الأنبوبة تكون متصلة بتربين turbine يدار بالهواء ، يمكن بواسطته دوران الأنبوبة حـــول محورها الرأسى عدة مئات من الدورات فـــى الدقيقـــة x cycle / min ، وهـــذا الدوران يقلل من التأثير الناتج عن عدم التجانس فى المجال المغناطيسى الخارجى.

4-4-5. وحدة الكشاف Radiofrequency Receiver or Detector:

يمكن الكشف عن إمتصاص أشعة الراديو بواسطة ملف آخر من الـــسلك يحـــيط بالعينة أيضاً ويكون عمودياً على كل من ملف الإرسال والمجال المغناطيسي ويطلـــق عليه ملف الإستقبال receiver coil ويتولد فيه فيض كهربى ينتقل إلـــى المـــستقبل receiver حيث يتم تكبيره وتسجيله.

4-4-6. وحدة التكامل الأيكترونية Electronic Integrator:

تحتوى جميع أجهزة الرنين النووي المغناطيسي على وحدة لقياس المساحة تحت

كل منحنى إمتصاص وتسمى وحـــدة تكامـــل أليكترونيـــة Electronic Integrator وهذه المساحة تتناسب طردياً مع عدد البروتونات المسئولة عن هذا الامتصاص.

وكما ذكرنا سابقاً تختلف أجهزة NMR عن بعضها فى شـــدة المجـــال المـــستخدم وبالتالى فى تردد أشعة الراديو المستخدمة ، وتميز الأجهزة المختلفة بناء على تـــردد الأشعة المستخدمة فى الجهاز.

جهاز NMR 60 MHz : هو الجهاز الذى يستخدم أشـــعة ترددهـــا 60 MHz وللحصول على هذا التردد يستخدم شدة مجال مغناطيسى حوالى 14 كيلو جاوس وهذا المجال المغناطيسى يعمل على فصل مستويات الطاقة بحيث تكون فى مدى طاقة أشعة الراديو المستخدمة فى الجهاز. ومن الأجهزة الأخرى المـــستخدمة: 90, 100, 220, 300, 360 and 500 MHz وبزيادة شدة المجال نحصل على هذه الترددات العاليـــة لأشعة الراديو. وفى بعض الأجهزة نجد أنه يثبت شـــدة المجـــال Fixed Magnetic Field مثلاً عند 14 كيلو جاوس ثم يغير فى التـــردد Vary the Frequency حتـــى يعمل Location للرنين Resonance وهذه هى الأكثر شيوعاً ، حيث أن كل نواة – مثلا الهيدروجين ^{1}H أو الفلور ^{19}F أو الفوســـفور ^{31}P أو الكربـــون ^{13}C لهـــا تأرجح Resonance عند تردد مختلف. أما في الأجهزة الأعلى 300 MHz والتـــي تتطلب مجال قوي جدا يتم غمر مغناطيس قوي في حمام من الهليوم المسال liquid helium ويطلق عليه superconducting magnet لأن له مجال قوي high field بمعنى أن ملف المغناطيس هنا يوصل التيار الكهربي بالكامل بحيث تكـــون المقاومـــة تساوي صفرا.

ولكي يوصل ملف المغناطيس magnet coil التيار الكهربي بكفاءة عالية يجب أن يحفظ على درجة حرارة منخفضة جدا تصل الى درجة برودة الهليوم المسال ، أما اذا ارتفعت درجة حرارة ملف المغناطيس فان المقاومة تزداد وينطلق حرارة ويبدأ الهليوم في الغليان (درجة غليان الهليوم 4.3 درجة مطلقـــة) ويحـــدث اعاقـــة quenching

للمجال المغناطيسي. ويطلق على هذه الأجهزة.

- Fourier transform nuclear magnetic resonance (FT- NMR spectrometer).
- Magnetic resonance imaging (MRI) machine.

5-4. تحضير العينات Sample handling:

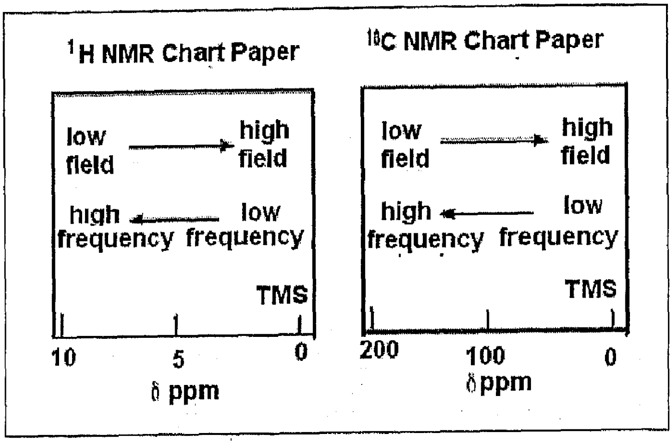
يمكن عمل ^{1}H-nmr للعينات السائلة أو الصلبة بعد عمل محلول منها افى مـذيب مناسب حيث يذاب وزنه من العينة فى حدود 30 mg فى المذيب ويشترط ألا يحتوى المذيب على هيدروجين فى تركيبه.

وفى حالة المركبات القطبية والتي تتطلب مذيب قطبى مثل الماء أو الايثانول يجب استخدام مذيب يحتوى على نظير الهيدروجين وهو الديويتريوم حيث أنـه لـيس لـه إمتصاص فى الـ ^{1}H-nmr وتسمى مثل هذه المذيبات Deuterated solvents وهي غالية الثمن. ومن أمثلة المذيبات الشائعة الاستخدام في هذا المجال:

Deuterated water (D_2O)
Deuterated Ethanol C_2D_5OD
Deuterated chloroform $CDCl_3$
Deuterated benzene C_6D_6

ولتحضير العينة للتحليل بواسطة جهاز الرنين النووي المغناطيسي نحتاج حـوالي 20–30 ملليجرام من المادة الصلبة أو 50 ميكروليتر من العينة السائلة وتذاب العينة الصلبة أو تخفف العينة السائلة بحوالى 0.5 مل من المذيب المناسب ، ثم توضع العينة فى أنبوبة التحليل (5mm i.d. glass tube) ، وإذا كان هناك عكـارة يجـب ترشـيح العينة حتى تكون شفافة ، ويجب أن يكون إرتفاع المحلول فى الأنبوبة حوالي 3–7 سم ، ويضاف إلى العينة مادة قياسية reference substance وهى غالباً عبارة عن مـادة رابع ميثيل سيلانTetra methyl silan ويطلق عليها (TMS) ثم تغطـى الأنبوبـة بغطاء بلاستيك ثم توضع الأنبوبة داخل الـ turbine ثم فى المكان المخصص لها وهو

بين قطبى المغناطيس ويدفع تيار من الهواء من خلال مضخة pump فتدور الأنبوبة بسرعة عالية ثم نعمل location لمادة TMS عند الصفر ثم نعمل scan للعينة على chart خاصة برسم طيف الامتصاص للعينات (شكل 84).



شكل (84): NMR Chart لرسم طيف الامتصاص..

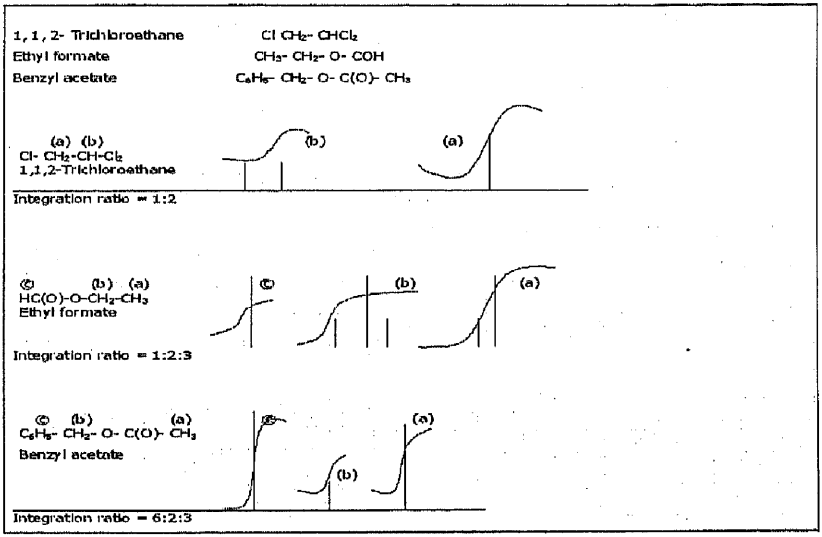
6-4. الانتقال الكيميائي Nuclear Spin & Chemical Shift:

يرتبط الهيدروجين في المركبات العضوية بعناصر أخرى عن طريق روابط كيميائية مما يجعل أنوية ذرات الهيدروجين فى ظروف أليكترونية مختلفة عن بعضها على حسب نوع الروابط والعناصر المرتبطة بها، بالاضافة إلى التوزيع الأليكترونى فى الجزىء ككل مما يؤدي الى حدوث إمتصاص للأشعة بواسطة هذه البروتونات على ترددات مختلفة، وهذا الاختلاف فى موضع الإمتصاصات الناتج عن وجود البروتونات فى ظروف أليكترونية مختلفة يطلق عليه الإنتقال الكيميائى (δ) chemical shift وعلى ذلك فإن قيمة الانتقال الكيميائى (δ) لأى إمتصاص فى الـ nmr تحدد نوع المجموعة الكيميائية فى الجزىء والتى تحتوى على البروتون المسئول عن هذا الإمتصاص مثل :

NH, OH, CH, CH_2, CH_3, SH

ولمعرفة عدد البروتونات فى كل مجموعة كيميائية يتم حساب المساحة تحت كـل إمتصاص peak area وذلـك باسـتخدام وحـدة تكامـل أليكترونيـة electronic integrator وعادة تتناسب المساحة تحت كل منحنى إمتصاص مع عدد البروتونـات التى ينتج عنها هذا الامتصاص.

ولكى نشرح طيف الرنين المغناطيسى للبروتون وخصائصه الأساسية دعنا نناقش nmr spectrum لثلاثة مركبات يختلف فيها وضع الهيدروجين وهى كما بالشكل (85).



شكل (85): nmr spectrum لثلاثة مركبات يختلف فيها وضع الهيدروجين.

ويمكننا ملاحظة طيف امتصاص أشعة موجات الراديو nmr spectra للمركبـات الثلاثة السابقة فيما يلي:

أولا: توجد عدة إمتصاصات للبروتونات (أنوية ذرات الهيدروجين) المختلفة فى كل جزىء ويرجع ذلك إلى وجود هذه البروتونات فى ظروف كيميائيـة مختلفـة داخـل

الجزىء. ويوجد فى حالة مركب 1,1,2- trichloroethane إمتصاصين فقط لتعبر عن عدد البروتونات المختلفة فى الجزىء ، بينما فى حالة كل من ethyl formate ، benzyl acetate يوجد ثلاثة إمتصاصات، كما نلاحظ أن هذه الأمتصاصات منفصلة عن بعضها وهي ما يسمى الإنتقال الكيميائى chemical shift

ثانيا: المساحة تحت كل منحنى إمتصاص تكون متناسبة مع عدد البروتونات التى ينتج عنها هذا الامتصاص حيث نجدها 1: 2 فى المركب الأول. بينما فى المركب الثاني نجد أن هذه النسبة 1: 2: 3 ، أما في المركب الثالث نجدها 6: 2: 3 ، وهذه النسب تشرح لنا نسبة توزيع ذرات الهيدروجين إلى بعضها فى الجزىء.

ثالثا: نلاحظ أن بعض هذه الإمتصاصات بسيطة أى إمتصاص فردى singlet ، والبعض الآخر إمتصاصات ليست بسيطة ، فنجدها تنقسم داخلياً إلى إمتصاصين doublet ، أو ثلاثة إمتصاصات triplet ، أو أربعة إمتصاصات quartet وهذا الإنقسام ينتج عن التأثير المتبادل بين العزم المغناطيسى للأنوية المتجاورة spin-spin coupling و الفرق بين طاقة هذه الإمتصاصات المنقسمة داخلياً بوحدات التردد يطلق عليها ثابت الإزدواج (J) coupling constant وعند إستخدام مجال مغناطيسى شدته 14 كيلو جاوس يحدث إمتصاص للبروتون الحر للأشعة التى ترددها 60 MHz ، ولكن إمتصاص البروتونات الأخرى المختلفة في الجزيء يحدث عند ترددات مختلفة للأشعة.ويحدث الانتقال الكيميائى أساساً (أى إمتصاص البروتونات للأشعة على تردد مختلف) نتيجة لتأثير الأليكترونات الموجودة فى الرابطة بين ذرة الهيدروجين والذرة الأخرى. فالمجال المغناطيسى الخارجى B يحدث دوران للسحابة الأليكترونية حول النواة، وينشأ عن حركة الأليكترون تيار مستحث induced current وهو ما ينتج عنه عزم مغناطيسى مستحث induced magnetic moment عند النواة فى إتجاه مضاد لإتجاه المجال المغناطيسى الخارجى وهذا يؤدى إلى خفض شدة المجال الخارجى عند النواة.

ويمكن حساب الإنخفاض فى شدة المجال المغناطيسى أى حساب شدة المجال المغناطيسى عند النواة من المعادلة التالية:

$$B_{local} = B_o - \sigma B_o$$

حيث أن:

B_{local} شدة المجال المغناطيسى المؤثر عند النواة.

B_o شدة المجال المغناطيسى الخارجى.

σ ثابت يسمى ثابت التغليف shielding constant

σB_o يعبر عن شدة المجال المغناطيسى المستحث الناتج عن دوران الألكترونات. ويتوقف ثابت التغليف على الكثافة الأليكترونية حول النواة والذى يتحدد على حسب المجاميع المجاورة للبروتون هل هى دافعة للأليكترونات فتزيد من الكثافة الأليكترونية حول النواة أم هى مجموعة ساحبة للأليكترونات فتقلل من الكثافة الإليكترونية حول النواة وذلك يعكس إختلاف تردد الأشعة الممتصة لأنوية الهيدروجين.

تقدير الانتقال الكيميائى Measurement of Chemical Shift

حتى يمكن تفادى الحصول على قيم مختلفة للانتقال الكيميائى δ لمركب واحد بإختلاف أجهزة NMR التى تستخدم مجالات مغناطيسية مختلفة الشدة يتم إستخدام مادة قياسية تحتوى على نوع واحد من الهيدروجين وأعتبار الإمتصاص الناتج عنها نقطة البداية، ثم تحدد مواقع الإمتصاصات الخاصة بالبروتونات فى المادة المراد دراستها بالنسبة لهذه المادة القياسية، وأكثر المواد المستخدمة كمادة قياسية هى مادة رابع ميثيل سيلان Tetramethylsilan (TMS) كما ذكرنا.

وتتميز مادة رابع ميثيل سيلان سهلة بأنها:

- سهلة الذوبان فى المذيبات العضوية.

- درجة غليانها 27°م وبذلك يمكن التخلص منها بسهولة والحصول على العينة مرة أخرى.
- تعطى إمتصاصاً حاداً كثيفاً نظراً لوجود 12 ذرة هيدروجين متماثلة وغير فعالة كيميائياً chemically equivalent

وجميع المركبات العضوية وجد أن رنين بروتوناتها resonate يكون عند مجال أقل من TMS ولذلك فإن TMS يظهر عند الصفر ويعتبر هذا المكان الذى تمتص عنده TMS أعلى مجال high field ، وعلى ذلك فان المجاميع التى تظهر بالقرب من TMS يكون امتصاصها عند المجال العالي high field ، بينما المجاميع التى تظهر بعيداً عن TMS يكون امتصاصها عند المجال المنخفض down field ويعبر عن الانتقال الكيميائى δ بالمعادلتين التاليتين:

$$\delta = \gamma_{sample} - \gamma_{TMS} \quad \textbf{Operating frequency in MHz} (\gamma_o)$$

$$= \gamma_{sample} - \gamma_{TMS} \quad / \quad \textbf{60 MHz}$$

ويعبر عن الانتقال الكيميائى النسبى كجزء فى المليون ppm ويرمز له بالرمز δ ومعظم المركبات العضوية يكون رنين بروتوناتها المختلفة فى المدى 1 - 12 ppm وقد يستخدم مقياس آخر يسمى تاو (τ) بدلاً من دلتا (δ) كما بالمعادلة التالية:

$$\tau = 10 - \delta$$

يستخدم فى أجهزة NMR ورق بيانى chart paper سبق معايرته وذلك لتسجيل طيف الامتصاص وعلى ذلك يكون المطلوب فى هذه الحالة هو ضبط إمتصاص TMS على صفر إنتقال كيماوى. فعند إجراء القياس لمادة معينة يضاف إليها نقط قليلة من TMS ويضبط الجهاز بحيث يعطى قراءة δ zero أو τ 10 للمادة القياسية ، حيث تظهر إمتصاصات البروتونات المختلفة عند قيم مختلفة من الانتقال الكيمياءي δ. فى أجهزة NMR $60MH_z$ تكون قيمة الوحدة من δ تساوى $60H_z$ بينما تساوى هذه الوحدة $100H_z$ فى أجهزة 100MHz وهكذا.

طيف الامتصاص في الرنين النووي المغناطيسي:

إذا إحتوى الجزىء على نوع واحد من البروتونات مثل جزيء الميثان CH_4 ، فإن الجزىء فى هذه الحالة يعطى إمتصاصاً واحداً مميزاً لنوع البروتونات الموجودة فى الجزىء، ويرجع ذلك إلى وجود درجة من التماثل فى هذه الجزيئات مما يجعل جميع البروتونات فى الجزىء متكافئة equivelent فالبروتونات التى يحدث لها إمتصاص على نفس التردد (أى لها نفس قيمة الانتقال الكيماوى) مثل البروتونات فى مجموعة CH_3 ومجموعة CH_2 يطلق عليها بروتونات متكافئة فى الانتقال الكيميائى chemical shift equivelent أو متكافئة فى ترددها Resonance frequency equevelent وتكون البروتونات متكافئة فى الانتقال الكيميائى (التردد) إذا أمكن لها تبادل مواضعها فى الجزىء نتيجة للدوران أو الإنعكاس بالنسبة لمحور التماثل.

طيف الرنين المغناطيسي nmr لمركب خلات البنزايل Benzyl acetate:

$CH_3 - C(O) - O - CH_2 - C_6H_5$

نجد أن له 3 إمتصاصات وذلك لوجود ثلاثة أنواع من البروتونات أى ثلاثة أنواع غير متكافئة وهنا نجد أن ثلاثة بروتونات فىCH_3− متكافئة ولذلك يكون لها إمتصاص واحد عند نفس قيمة الانتقال الكيماوى δ_1 وكذلك نجد أن البروتونين فى CH_2− متكافئة ولها إمتصاص واحد عند قيمة إنتقال كيماوى δ_2 وأخيراً نجد أن الخمسة بروتونات فى الحلقة العطرية يكون لها إمتصاص واحد عند قيمة إنتقال كيماوى واحدة وهى δ_3. وتوجد مجموعة من العوامل الأخرى التي تؤثر على الانتقال الكيميائي تسمى Intramolecualar factors يمكن ايجازها فيما يلي:

7-4. الكثافة الأليكترونية حول البروتون Inductive effect (Electron density):

تؤثر المجاميع أو الذرات المجاورة لذرة الهيدروجين على الانتقال الكيميائي لها ،

فالمجموعات الساحبة للأليكترونات electron withdrawal تقلل من الكثافة الأليكترونية حول البروتون أى تعمل تعرية للنواة وهذا ما يسمى deshielding وتزداد بذلك شدة المجال المغناطيسى الخارجى المؤثر عند النواة ، وتمتص الأنوية الأشعة على تردد مرتفع upfield بالنسبة للمادة القياسية، أى تكون قيمة الإنتقال الكيماوى لهذه البروتونات كبيرة بالمقارنة بالبروتونات المرتبطة بذرة أقل فى الكهروسالبية electronegativity.

فمثلاً معروف أن الفلور يسحب الأليكترونات بدرجة أعلى من الكلور يليه البروم يليه اليود:

الجزيء	CH3Br	CH3Cl	CH3F
درجة سحب الأليكترونات	**2.8**	**3**	**4**
الأنتقال الكيماوى δ	**2.6**	**3**	**4.6**

وكلما زادت عدد المجموعات الساحبة للأليكترونات تنخفض الكثافة الألكترونية أكثر:

CH_4	CH_3Br	CH_2Br_2	$CHBr_3$
0.2	2.6	4.9	6.8

وعلى العكس من ذلك نجد أن المجاميع الدافعة للأليكترونات تزيد من الكثافة الأليكترونية حول البروتون أى تعمل تغطية shielding للنواة، ويقل بذلك شدة المجال المغناطيسى الخارجى المؤثر عند النواة وتمتص الأنوية الأشعة على تردد منخفض down field بالنسبة للمادة القياسية أى تكون قيمة الانتقال الكيماوى لهذه البروتونات صغيرة بالمقارنة بالبروتونات المرتبطة بمجاميع أقل فى الدفع الأليكترونى.

8-4. التاثير الناتج عن التباين فى الخواص المغناطيسية

Magnetic Anisotropy of Chemical Bonds

نجد في المركبات التى تحتوى على أليكترونات electron فى روابط باي (الروابط

الزوجية أو الروابط الثلاثية) أن هذه الأليكترونات تكون أقل إرتباطاً عن الإليكترونات التى توجد فى رابطة sigma (الروابط فردية) ، ويقل الارتباط بصورة أكبر فى المركبات التى تحتوى على روابط زوجية أو ثلاثية متبادلة conjugated فعند وجود هذه الأليكترونات تحت تأثير المجال المغناطيسى الخارجى تدور هذه الألكترونات محدثة مجالاً مغناطيسياً ثانوياً يؤثر على قيمة المجال المغناطيسى الخارجى عند الأنوية ، وقد يكون هذا المجال المغناطيسى الثانوى فى اتجاه المجال المغناطيسى الخارجى مؤدياً إلى زيادة شدة المجال عند النواة أو قد يكون عكس إتجاة المجال المغناطيسى الخارجى مؤدياً إلى خفض شدة المجال عند النواة.وقد جد أن قيمة الانتقال الكيميائي للبروتون في مجموعة الألدهيد H-C=O هي 9.97 وهذه القيمة أكبر بكثير مما هو متوقع بناء على السحب الأليكترونية المتوفرة بواسطة ذرة الأكسجين ، ويرجع ذلك الى حركة الأليكترونات فى الرابطة C=O حيث وجد أن مجموعة الكربونيل تعمل تغطية shielding للبروتونات الواقعة فى الفراغ المخروطي cone أعلى وأسفل مجموعة الكربونيل ولكنها تعمل تعرية deshielding للبروتونات التى تقع خارج الفراغ المخروطي وهذا ما يسمى بـ anisotroic effect وتستخدم قيمة الانتقال الكيماوى chemical shift فى التعرف على المجموعات الكيميائية فى الجزىء وعلى ذلك يمكن إستخدام البيانات الخاصة بالانتقال الكيميائى فى التعرف على المجموعات الكيميائية فى جزىء غير معروف التركيب.

فمثلاً وجد أن: قيمة الانتقال الكيميائى للهيدروجين فى جزىء البنزين $\delta=7.23$

قيمة الانتقال الكيماوى للهيدروجين فى مجموعة الألدهيد CHO هى $\delta=9.97$

قيمة الانتقال الكيميائى للهيدروجين في الكلوروفورم عند $\delta=7.25$

قيمة الانتقال الكيميائى للهيدروجين في الأسيتون عند $\delta=2.09$

قيمة الانتقال الكيميائى للهيدروجين في المركبات الأليفاتية فى المجموعة C-H يزداد فى الاتجاه $CH > CH_2 > CH_3$ قيمة الانتقال الكيميائى للهيدروجين في

الأوليفينات مثلا فى المجموعة $=CH$ يقع فى المدى من $\delta = 4 - 6.5$ ، أما في المركبات العطرية يقع المدى بين $\delta = 7 - 9$

4-9. تاثير الروابط الهيدروجينية Effect of hydrogen bonding :

وجود روابط هيدروجينية بين الجزيئات وبعضها يؤثرعلى قيمة الانتقال الكيمائى للبروتون حيث يظهر down field بالمقارنة بمكان الامتصاص قبل تكوين تلك الروابط ، وينتج كذلك عن تأثير تكوين الروابط الهيدروجينية أن يكون الامتصاص عريضاً brood peak وقد يكون من الصعب فى بعض الأحيان الكشف عن هذا الأمتصاص.ويتوقف تكوين الروابط الهيدروجينية على طبيعة المذيب المستخدم ودرجة الحرارة وكذلك على تركيز المركب الكيماوى. ومن أهم المجاميع التى يكون لبروتونها القابلية العالية لتكوين روابط هيدروجينية هى:

-COOH $-NH_2$ -NH   -OH

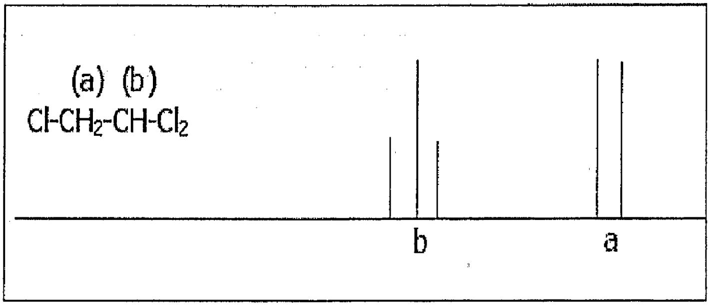
وقد وجد على سبيل المثال أن تكوين الروابط الهيدروجينية فى كل من الفينولات والأحماض الكربوكسيلية يجعل الانتقال الكيماوى يظهر عند قيمة أكبر من 10 ppm ويمكن كسر الرابطة الهيدروجينية عن طريق رفع درجة الحرارة أو بعمل تخفيف بواسطة مذيب قطبى.

فقد وجد أن مجموعة $OH-$ فى كحول الإيثانول ظهرت upfield عند زيادة درجة الحرارة أو عند تخفيف الإيثانول بواسطة رابع فلوريد الكربون والذى أدى إلى كسر الرابطة الهيدروجينية.ولذلك نجد أن معظم أجهزة NMR مزودة بوحدة تبريد ووحدة تسخين للعينة تسمح بإجراء القياس على درجات حرارة مختلفة تتراوح بين 150 : 200 °C ويستخدم لذلك نتروجين سائل فى عملية التبريد ، كما تستخدم وحدة تسخين كهربية.

10-4. إزدواج الحركات المغزلية Spin-Spin coupling :

مما سبق نجد أن الكثافة الأليكترونية حول البروتون والتوزيع الفراغى لذرات الهيدروجين فى الجزىء هى التى تحدد مواضع الانتقال الكيماوي chemical shift ، ولكن لماذا نجد بعض الأمتصاصات singlet والبعض الآخر doublet أو triplet وهكذا؟ فى الحقيقة نجد أن بعض الإمتصاصات الرئيسية تنقسم داخلياً إلى عدة إمتصاصات وترجع هذه الإنقسامات إلى التأثير المغناطيسى المتبادل بين البروتونات المتجاورة والغير متكافئة أى إلى ما يسمى بالإزدواج المغزلى spin-spin coupling وهذا التأثير المتبادل بين البروتونات المتجاورة يتم خلال الأليكترونات الداخلة فى تركيب الروابط التى تربط بين البروتونات ، ويؤدى هذا التأثير المتبادل إلى إنقسام الإمتصاصات الناتجة من كل نوع من البروتونات إلى عدة إنقسامات ، ويتوقف عدد هذه الإنقسامات على عدد ذرات الهيدروجين المتجاورة ، ويمكن شرح ازدواج الحركات المغزلية بالنظر الى طيف الرنين النووي المغناطيسي لمركب ثلاثي كلورو ايثان 1, 1, 2-trichloro ethane

حيث يظهر امتصاصين لهذا المركب ، الامتصاص الأول ثنائي doublet ويظهر عند قيمة انتقال كيماوي 3.95 أما الامتصاص الثاني يكون ثلاثي triplet ويظهر عند قيمة انتقال كيماوي 5.77 ، ولكن لماذا تظهر بروتونات (b) ثلاثية الامتصاص بينما بروتونات (a) ثنائية الامتصاص؟ يفسر ذلك فى شكل (86) كما يلي:



شكل (86): ظاهرة الاذدواج المغزلى.

اذا نظرنا الى ذرتي الهيدروجين a (بروتوني a) الاثنين ورمزنا الى البروتون الأول (á) والبروتون الثاني (ã) نجد أن تأثيرهما على هيدروجين (b) (بروتون b) المجاور يكون على النحو التالي:

1- كلا بروتوني a متوازيان مع المجال المغناطيسي أي في نفس الاتجاه Both paralle.

2- أحدهما يوازي المجال á Parallel والآخر عكس المجال ã antiparallel.

3- أحدهما يوازي المجالã Parallel والآخر عكس المجال á antiparallel .

4- كلا البروتونين غيرمتوازيان مع المجال المغناطيسي أي في عكس الاتجاه Both antiparalle.

وبما أن الحالة الثانية والثالثة متشابهة فيكون تأثيرهما متضاعف وعلى ذلك نجد أن بروتون b يتأثر ثلاث مرات ويظهر ثلاثة امتصاصات بنسبة 1 :2 :1 بدلا من 1:1:1:1 وثابت الازدواج بينهما حوالي 6 cps

وعلى الجانب الآخر نجد أن بروتوني ã & á متكافئين وبالتالي يؤثر بروتون b الوحيد على بروتونات a المتكافئة باحتمالين فقط اما أن يكون مع المجال أو يكون ضد المجال ولذلك نجد أن بروتوني a تظهر امتصاص ثنائي فقط وبنسبة متساوية 1:1 وثابت الازدواج بينهما أيضا حوالي 6 cps وأيضا نجد أن بروتونات (b) المجاورة لذرتين كلور تظهر رنين عند مجال منخفض down field أي بعيدا عن TMS بالمقارنة ببروتونات (a) المجاورة لذرة كلور واحدة والتي تظهر رنين عند مجال عالي up field ويرجع ذلك الى أن قدرة ذرتين كلور على سحب الأليكترونات أعلى من قدرة ذرة كلور واحدة وبالتالي فان تعرية بروتونات b تكون أكثر من تعرية بروتونات a فتظهر بروتونات b عند مجال منخفض بينما تظهر بروتونات a عند مجال أعلى أي قريبا من TMS

توجد طريقة أسهل في تقدير عدد الامتصاصات يمكن شرحها على النحو

التالي:تظهر مجموعة الميثيل (بروتونات a) امتصاص ثلاثي عند قيمة انتقال كيميائي 1.22 ppm لأن جميع بروتونات مجموعة الميثيل متكافئة فيكون لها امتصاص واحد ولكنها تجاور ذرة كربون تحمل ذرتي هيدروجين فتؤثر كل ذرة من تلك الذرتين على امتصاص مجموعة الميثيل وتقسمه الى قسمين متساويين ويتداخل القسم الثاني والثالث معا ليكون في النهاية نسبة التقسيم 1:2:1

أما مجموعة الميثيلين CH_2 (بوتونات C) المجاورة لمجموعة الميثيل CH_3 فانها لها امتصاص واحد لأنها تحمل بروتونين متكافئين ويتأثر هذا الامتصاص بثلاثة بروتونات مجموعة الميثيل فتقوم كل واحدة من بروتونات الميثل بشق امتصاص مجموعة الميثيلين الى نصفين تتداخل هذه الانشقاقات حتى تعطي في النهاية امتصاص رباعي بنسبة 1 :3 :3 :1 ولسهولة توقع امتصاص أي مجموعة فانها هي نفسها لها امتصاص واحد يضاف اليها امتصاصات بعدد ذرات الهيدروجين التي تحملها ذرة الكربون المجاورة.أي أن عدد الامتصاصات للبروتونات الموجودة على أي ذرة كربون = عدد البروتونات التي تحملها ذرة الكربون المجاورة + 1 .

وبذلك يكون امتصاص مجموعة الميثيل في كحول الايثانول = 2 +1 = 3 أما امتصاص مجموعة الميثيلين في كحول الايثانول = 3 +1 = 4 أما امتصاص مجموعة الهيدروكسيل في كحول الايثانول = 1 لأن ذرة الأكسيجين تحول دون ازدواج بروتون الهيدروكسيل مع البروتونات المجاورة ومن الجدير بالذكر أن قيمة ثابت الأزدواج coupling constant (J) لا تتغير بتغيير شدة المجال المغناطيسى الخارجى بعكس الأنتقال الكيماوى الذى يتوقف على شدة هذا المجال.يمكن تقسيم طيف الرنين المغناطيسي NMR بناء على قيمة ثابت الازدواج (J) وكذلك قيمة الانتقال الكيماوي (δ) إلى:

طيف الرتبة الأولى First order spectra:

وفيه تكون قيمة δ بين المجموعتين اللتين يحدث بينهما الازدواج المغزلى كبيرة ، ويكون عدد الانقسامات فى كل امتصاص رئيسى مساوياً (n+1) حيث n هى عدد

ذرات الهيدروجين فى المجموعة المجاورة. وإذا كانت هناك مجموعة مجاورة أخرى تختلف فى قيمة الإنتقال الكيميائى عن المجموعة الأولى ، فيجب الأخذ فى الأعتبار التأثير الناتج من المجموعتين كل على حدة.

المجموعة CH_y-CH_a-CH_x يكون تأثير ذرة الهيدروجين H_x على ذرة H_a هو أنقسامها إلى إمتصاصين ويكون تأثير الذرة H_y على الذرة H_a هو أنقسام هذين الأمتصاصين إلى أربعة إمتصاصات. ثم يحدث تداخل بين الإمتصاصين القريبين ويتضاعف كثافة الإمتصاص لتصبح 1 :2 :1 بدلاً من أن تكون النسبة 1 :1 :1 :1 وعلى ذلك فإن الكثافة النسبية للانقسامات فى هذه الرتبة تتبع العلاقة:- كما بالشكل (87).

1

1 1

1 2 1

1 3 3 1

1 4 6 4 1

1 5 10 10 5 1

1 6 15 20 15 6 1

شكل (87) : نوع العلاقة في طيف الرتبة الاولى.

وكذلك يكون قيمة J فى هذه الرتبة كبيرة بين البروتونات التى لا تنفصل عن بعضها بأكثر من 3 روابط كيميائية، وتقل بعد ذلك بحيث تكون قيمته أقل من عرض الامتصاص الرئيسى وبذلك لا يمكن ملاحظته. ويطلق على البروتونات التى تختلف

بدرجة كبيرة فى قيمة الانتقال الكيميائى بالرمز AX للنظام الذى يحتوى على نـوعين من البروتونات (بروتونات A وبروتونات X) ويعطى النظام فى هذه الحالة طيفاً مـن الدرجة الأولى ويمكن تفسيره بواسطة قواعد الرتبة الأولى.

طيف الرتبة الثانية Second order spectra:

إذا كان الاختلاف فى الانتقال الكيميائى بين البروتونات متوسطا فيرمز للنظام AM أو ABC للنظام الذى يحتوى على نوعين أو ثلاثة أنواع من البروتونات على التوالى ، ويكون طيف هذا النظام هو طيف الرتبة الثانية والذى يصعب تفـسيره فـى معظـم الحالات من نتائج تجربة واحدة ، ويستعان ببعض التجارب الإضافية لإمكان تفسير هذا النظام مثل إزالة الإزدواج decoupling أو أستخدام أجهزة ذات مجال مغناطيسى قوى أو إستخدام جواهر كشافة تزيد من قيمة الانتقال الكيميائى.

الازدواج بين الأنوية الأخرى Coupling with other nuclei :

يمكن أن يحدث إزدواج بين بروتون الهيدروجين ونوايا بعض الذرات الأخرى التى لها خواص مغناطيسية مثل الفوسفور والفلـور ، وعلـى ذلـك فـإن عـدد الانقسامات فى امتصاص البروتونات الناتجة من تأثير الفلور أو الفوسفور ، تكون متشابهة لتلك الناتجة من البروتون. ولكن الملاحظ فى هذه الحالة أن قيمة J يكون كبيراً وقد يحدث خلال عدة روابط. وقد يصل قيمة J إلى 12Hz بـين الفوسـفور والبروتون (J_{P-H})

الازدواج فى مركب CF_3- CH_2-OH (2, 2,2-Trifluoroetharol) :

نلاحظ أن إمتصاص مجموعة CH_2– يظهر فى صورة أربعة إنقـسامات نتيجـة لوجود 3 ذرات فلور مجاورة. ويختلف البروتون المرتبط بذرة غير ذرة الكربـون - OH من حيث أنه يكون أقل إرتباطا بهذه الذرات ، وبذلك يكون أقل تعرضـا للتـأثير الناتج من المجال المغناطيسى للبروتونات المجاورة ، وبذلك فإنه فى حـالات كثيـرة

يعطى إمتصاصا فرديا singlet كما أن دخول البروتون فى هذه الذرات يجعل موضع إمتصاصه غير ثابت بل يتوقف على كثير من الظروف المحيطة فى المحلول مثل التركيز ونوع المذيب ودرجة الحرارة. OH– فى الكحولات يمتص فى مدى كبير δ 2 - 5.35 ويتوقف ذلك على التركيز ودرجة الحرارة ، ومن ناحية أخرى يكون الإمتصاص singlet لأن البروتون سريع التبادل مع الوسط ، ولذلك لايستمر مدة كافية على ذرة الأكسجين حتى يحس بالتأثير المغناطيسى من البروتونات المجاورة ، ولذلك لا يحدث إزدواج بين هذا البروتون والبروتونات المجاورة.معاملة الكحولات النقية ببعض المركبات الخاصة مثل الأسيتون acetone أو مركب dimethylsulfoxide يؤدى إلى انخفاض معدل تبادل البروتون فى مجموعة OH– وفى هذه الحالة يحدث إزدواج بين هذا البروتون والبروتونات المجاورة. وعلى ذلك يصبح إمتصاص OH– ثلاثياً triplet فى الكحولات الأولية $R\text{-}CH_2\text{-}OH$ ، بينما يكون الامتصاص ثنائياً doublet فى الكحولات الثانوية $R_2\text{-}CH\text{-}OH$.

إزالة الإزدواج المغزلى Spin decoupling:

يعتبر ازالة الازدواج المغزلي decoupling من الطرق الفعالة فى تبسيط طيف NMR وكذلك لتحديد مصدر الانقسام فى كل إمتصاص رئيسى. فإذا تصورنا مجموعتين من البروتونات A & B يحدث بينهم إزدواج مغزلى وتعطى مثلا إمتصاص ثنائى لكل منهما -CH-CH- فإنه يمكن إزالة هذا الإزدواج المغزلى عن طريق إعطاء حزمة أشعة إضافية للذرة.

الجواهر الكشافة التى تزيد الانتقال الكيميائى Shift reagent:

يؤدى إستخدم الجواهر الكشافة إلى تبسيط طيف NMR وتأثيرها يشبه إستخدام مجال مغناطيسى قوى ، حيث يضاف إلى محلول العينات جوهر كشاف يعمل ازاحة للانتقال الكيميائي ويطلق على هذا الجوهر shift reagent ، وأشهر هذه الجواهر

بعض عناصر اللانثانيدات ومنها اليوربيوم Eu مع مجموعة عضوية حيث ترتبط هذه الجواهر مع المجموعات القطبية فى الجزىء وتكون معقد. ونظراً لأن هذه الجـواهر عبارة عن مواد paramagnetic فهى تؤدى إلى تغيير الانتقال الكيميائى للمجموعـات القريبة من الارتباط فى المعقد.

4-11. دور جهاز الرنين النووى المغناطيسى فى التحليل الوصفى للمركبات :

أهم المعلومات التى نحصل عليها من طيف الرنين المغناطيـسي nmr spectrum ما يلى:

4-11-1. الأنتقال الكيميائى للإمتصاصات (δ) chemical shift :

الانتقال الكيميائي يحدد نوع البروتونات فى الجزىء حيث أن عدد الإمتـصاصات يدل على أنواع البروتونات (الهيدروجين) الموجودة فى الجزىء. فنجد مثلاً أن مركب $C_6H_5\text{-}CH_2\text{-}CH_3$ يعطى ثلاثة إمتصاصات عند ثلاثة قيم مما يوضح أن هناك ثلاثة أنواع من البروتونات تختلف عن بعضها من ناحية الظروف الأليكترونية ، بينما نجد مركب $CH_3\text{-}OH$ يعطى إمتصاصين فقط عند قيمتين مختلفتين من الانتقال الكيميـائى ليدل بذلك على وجود نوعين من البروتونات. والطريقة النموذجيـة للتعـرف علـى التركيب الجزيئى للمركب هى البدء بالرمز الجزيئـى molecular formula وذلـك لتحديد درجة عدم التشبع unsaturation أو عدد الحلقات العطرية ويفيد فحص الانتقال الكيميائى chemical shift فى التفرقة بين عدم التشبع والحلقات العطرية ، فإذا كانـت هناك إمتصاصات فى المنطقة ما بين δ 8.5 : 7 فهذا يدل على وجود حلقة عطرية أما إذا ظهر إمتصاص فى المنطقة δ 6 : 4.5 فيمكن إفتراض وجود رابطة زوجية.

4-11-2. عـدد الانقسامات الداخليـة فـى كـل إمتـصاص رئيـسى Spin Spin Coupling:

إن فحص عدد الانقسامات فى كل إمتصاص رئيسى يفيد فى تحديد الوضع النـسبى لهذه البروتونات ، فالانقسام الثلاثي يشير إلــى وجــود مجموعــة CH_2 مجــاورة أو

مجموعة CH على كل جانب ، أما الانقسام الرباعي يشير إلى وجود مجموعة CH_3 مجاورة أو مجموعتين إحداهما CH_2 على جانب ، CH على الجانب الأخر ، أما الأنقسام الثنائى يشير إلى وجود مجموعة CH مجاورة وهكذا. وإذا كان الجزىء يحتوى على ذرة أكسجين أو نتروجين فإنه يجب أن نبحث عن إمتصاص فردى عريض للبروتون لمجموعة OH أو NH وفى حالة عدم وجود هذا الإمتصاص فإن هناك إحتمالا لأن تكون المادة مركب كربونيلى C=O أو R-O-R

4-11-3. كثافة الإمتصاصات integration :

يوضح نسبة ذرات الهيدروجين إلى بعضها فى الجزىء وكذلك عدد البروتونات فى كل مجموعة إمتصاص حيث أن كثافة كل إمتصاص يتناسب طردياً مع عدد ذرات الهيدروجين.

4-11-4. ثابت الإزدواج Coupling Constant (J):

إن عملية الإزدواج لاتظهر فى البروتونات المتكافئة مغناطيسياً مثال ذلك البروتونات الموجودة على مجموعة CH_3 لأن هذه البروتونات لها نفس التردد ويكون لها نفس ثابت الإزدواج مع البروتونات التى فى المجموعات المتجاورة. وهذه الثلاثة بروتونات فى المجموعة $C\text{-}CH_3$ لها حرية الدوران حول الرابطة الكربونية. أما فى حالة البروتونات الغير متكافئة مغناطيسياً يحدث لها إزدواج بقيم مختلفة مع بروتون معين من المجموعة الأخرى.ويقسم ثابت الإزدواج إلى ثلاثة أصناف:-

1- إزدواج البروتونات على نفس ذرة الكربون Geminal coupling ويفصل البروتونات فى هذه الحالة رابطتان H -C- H

2- إزدواج للبروتونات المتجاورة Vicinal coupling ويفصل البروتونات فى هذه الحالة ثلاثة روابط كيميائية كما في كل من

H - C - C - H or H - C= C- H

3- الازدواج على مدى طويل Long range coupling مثال ذرات الهيدروجين على جزئ البنزين أو الهكسان الحلقي.

وعموما قيمة ثابت الإزدواج مهمة جداً فى عملية تفسير الطيف spectrum حيث أن قيمة coupling constant (J) بين البروتونات (الهيدروجين) تكون صغيرة ، حيث نجد أنها مثلاً فى المركب HC-CH تتراوح بين 2-9 Hz بينما فى المركب $-CH_2$ تتراوح بين 12-20 Hz . كما أن قيمة J تختلف باختلاف المشابهات الهندسية فبينما نجد أن قيمة J فى المركب *cis*- ethylene تساوي 6-14 Hz نجده يكون فى المدى 11-18 Hz فى المشابة *trans*- ethylene أما فى حالة الإزدواج بين الهيدروجين والفلور أو الفوسفور فيكون أكبر من ذلك بكثير :

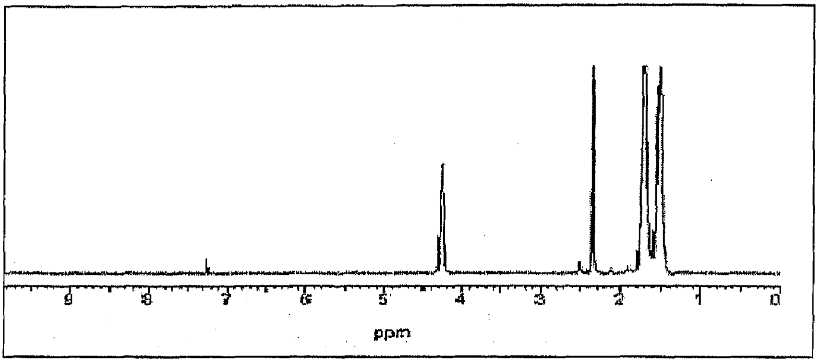
فى حالة المركب	H-C-C-F	يكون	J= 5 - 25 Hz
فى حالة المركب	H-C=C-F	يكون	J= 12 - 40 Hz
فى حالة المركب	H-C-F	يكون	J= 44 - 81 Hz
فى حالة المركب	H-C-C-C-F	يكون	J = 5 Hz
فى حالة المركب	H-P-	يكون	J = 200 Hz
فى حالة المركب	H-C-P=O	يكون	J = 10 Hz

وسوف نستعرض فيما يلي (شكل 88 حتى شكل 91) أطياف الرنين النووي المغناطيسي (^{1}H NMR) لبعض المركبات.

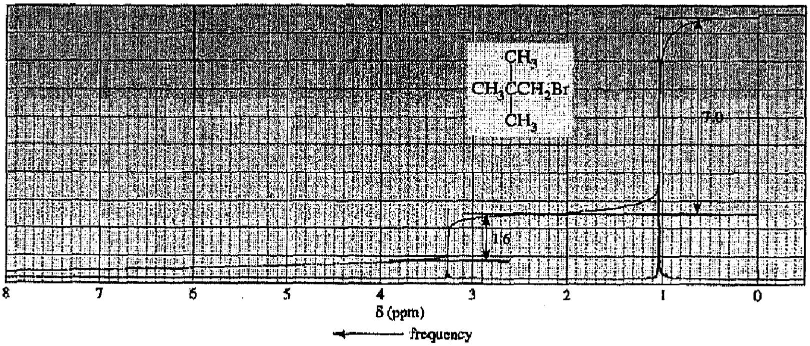
الرنين النووى المغناطيسى للكربون-^{13}

نسبة الكربون-13 في الطبيعة لاتتعدى نسبة 1.11 ٪ ولذلك فان الرنين النووي المغناطيسي للكربون-13 يكون ضعيف وله درجة حساسية أقل بكثير من الأنوية الأخرى ، ومن ناحية أخرى فان وجود ^{13}C بنسبة ضئيلة يعتبر مفيداً حيث أن التأثير المغزلى بين البروتون والكربون يكون غير واضح.ويجدر الإشارة هنا أنه لا يحدث

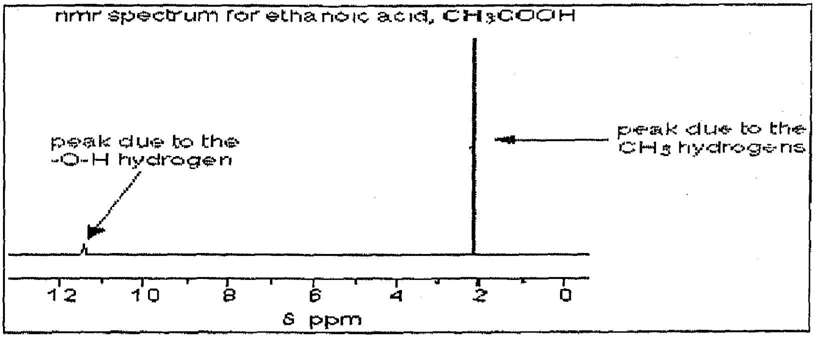
إزدواج بين ^{13}C ، ^{13}C أخرى لأن إحتمال وجود ذرتى كربون ^{13}C متجاورتين فـــى الجزىء إحتمال ضئيل جداً ولكن يمكـــن أن يحـــدث إزدواج بـــين ^{13}C وبـــين ذرات الهيدروجين المجاورة وقد يصل مدى الإزدواج إلى أربعة روابط كيميائية ، وفى هـــذه الحالة يكون الطيف معقد للغاية.



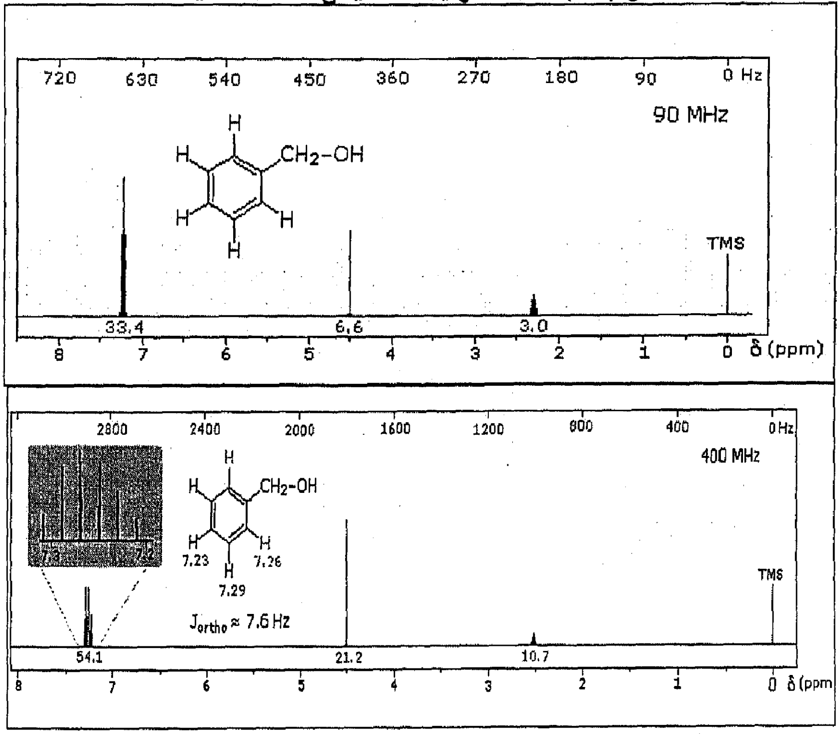
شكل (88): طيـف الـرنين المغناطيـسي لمركـب البنتـانول الحلقـي 1H NMR for cyclopentanol.



شكل (89): طيف الرنين المغناطيسي لمركب 2,2-Dimethyl-bromopropane.



شكل (90): طيف الرنين المغناطيسي لحمض الخليك.



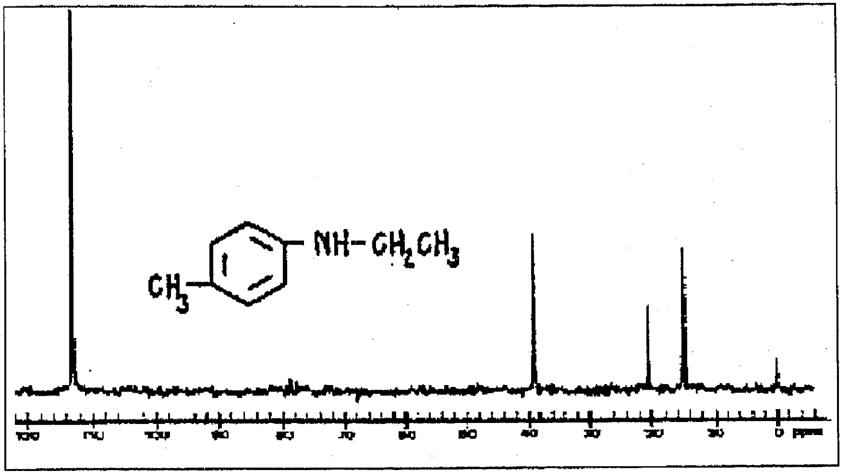
شكل (91): طيف الرنين المغناطيسي لكحول البنزايل.

ولذلك هنا نستخدم طريقة إزالة الإزدواج spin-decoupling وتحت هذه الظــروف فإن طيف nmr للكربون-13 يظهر فى صــورة إمتــصاصات فرديــة ويعبــر كــل إمتصاص عن ذرة كربون واحدة فى ظروف إليكترونية معينة. وباستخدام طيف الرنين المغناطيسي nmr للكربون-13 يمكن الحصول على صورة واضــحة عــن الهيكــل الكربونى العام للجزىء.ويلاحظ أيضاً أن الإنتقال الكيميائى فى الكربــون-13 يــشغل مدى كبير أيضاً حيث يبلغ قيمته حوالى δ 250 جزء فى المليون.ويــستخدم TMS أو CS_2 كمادة قياسية فى حالة الكربون 13 . وفيما يلي طيف الرنين المغناطيسي لبعض المركبات باستخدام ^{13}C -NMR (شكل 92) ، (شكل 93).

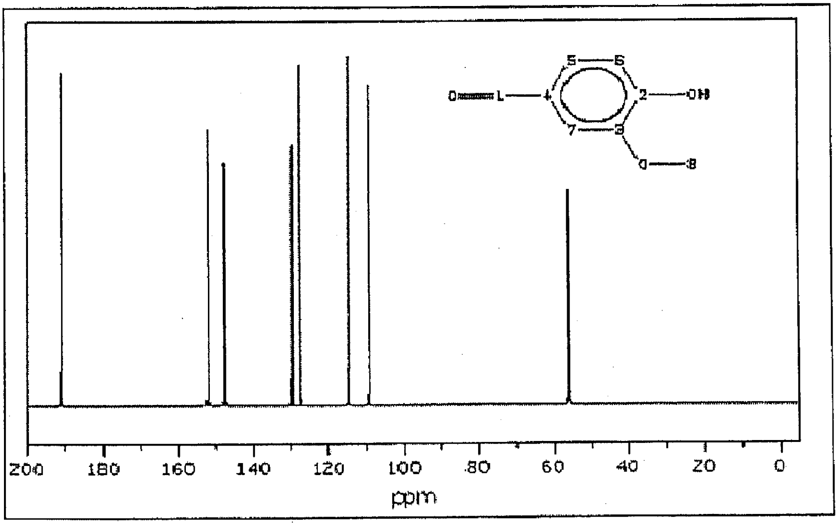
الرنين النووى المغناطيسى للفلور-19

تتشابه الخواص المغناطيسية للفلور مع البروتون ولذلك فإن التحليل الطيفى لكلاهما متشابة. ولكن طاقة الإمتصاص تكون قليلة فى حالة الفلور وذلك يعتبر ميــزة هامــة حيث يمكن بذلك إجراء التحليل للفلور فى وجود البروتونات فــى الجــزىء بإختيــار مصدر أشعة مناسب يكفى فقط للفلور . ويختلف أيضاً الفلور عن البروتون فى أن قيمة الإنتقال الكيميائى (δ) تكون فى مدى كبير حوالى 500 ppm وقد يــصل إلــى 1000 ppm بينما فى حالة البروتونات يكون δ فى حدود 10-15 ppmالمادة المرجعيــة فــى حالة الفلور هى Trichloro fluoro methane $CFCl_3$ حيث يعتبر الإنتقال الكيميــائى لهذه المادة يساوى صفر. وهنا يمكن أن يحدث إمتصاص قبــل المــادة المرجعيــة أو بعدها.

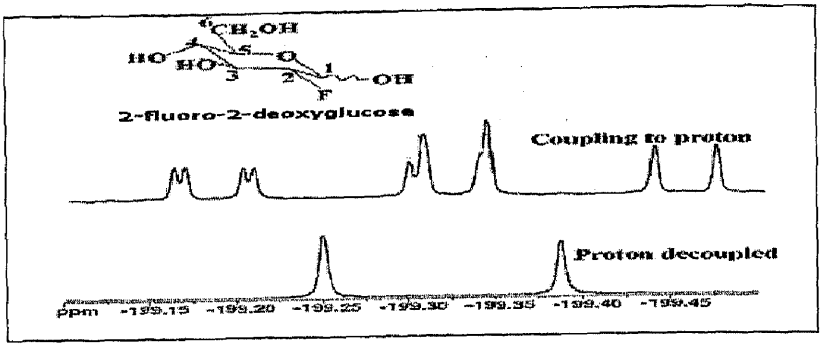
ويلاحظ أنه يحدث إزدواج مغناطيسى بين الفلور والفلور المجاور أو بــين الفلــور والبروتون المجاور وعلى ذلك فإن الطيف فى معظم الأحيان يتكون من عدد كبير من الإمتصاصات نتيجة لهذا الإزدواج ، وتكون قيمة الإزدواج فى هذه الحالة كبيرة حيث تكون بين الفلور والفلور فى حدود $F - F = 2 - 300$ Hz بينما تكون بــين الفلــور والهيدروجين في حدود $F - H = 40 - 90$ Hz (شكل 94).



شكل (92): طيف الرنين المغناطيسي 13C-NMR لمركب.



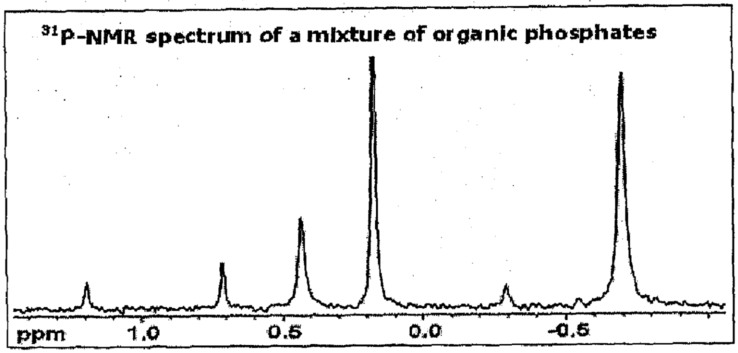
شكل (93): طيف الرنين المغناطيسي 13C-NMR لمركب عطري يحتوي على 8 ذرات كربون.



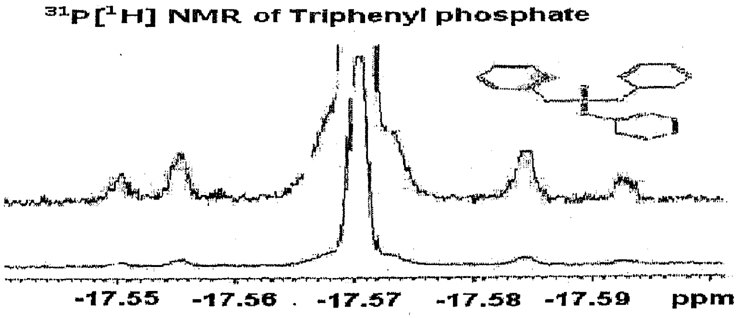
شكل (94): طيف الرنين النووي المغناطيسي ^{19}F-NMR للمركب 2-fluoro-2-deoxyglucose.

الرنين النووي المغناطيسي للفوسفور-31

يحدث إزدواج مغناطيسى بين الفوسفور والهيدروجين المجاور وعلى ذلك فإن الطيف قد يتكون من عدد كبير من الإمتصاصات نتيجة لهذا الإزدواج ، وتكون قيمة الإزدواج فى هذه الحالة كبيرة حيث تكون فى حالة المركب H-P- حوالي J= 200 Hz ويوضح شكل 95وشكل 96 طيف بعض المركبات الفوسفورية بواسطة مطياف الرنين النووي المغناطيسي للفوسفور-31.



شكل (95): الرنين المغناطيسي 31P-NMR لمخلوط من الفوسفات العضوي.



شكل (96): الرنين المغناطيسي 31P-[1 H] NMR لمركب ثلاثي فينايل فوسفات.

طيف الرنين النووي المغناطيسي ثنائي الاتجاه

Two-Dimentional (2D) NMR Techniques

يستخدم طيف الرنين المغناطيس ثنائي الاتجاه Two-dimentional Techniques لشرح عملية ازدواج وتداخل الأنوية مع بعضها ، أي توضيح تداخل البروتونات مع بعضها لشرح عملية الانقسام splitting كما يستخدم أيضا لشرح تداخل البروتونات مع الكربون المجاور لها حيث يتم رسم طيف الرنين النووي المغناطيسي على المحور السيني وكذلك على المحور الصادي أي في اتجاهين ولذلك يطلق عليه two dimentional وهنا يستخدم نطاقين من ذبذبات أشعة الراديو two radio frequency pulses مع تغيير الزمن بين كل نطاق بحيث يتم بث نطاق تلو الآخر.

وعندما نستخدم Two-Dimentional (2D) NMR Techniques لطيف H1-nmr يطلق عليه Correlation Spectroscopy H^1-H^1 أو يسمى COSY وهو مفيد في استنتاج العلاقة بين تداخلات ازدواج البروتونات مع بعضها (شكل 97). كما يوجد technique آخر يستخدم لشرح وفهم طبيعة التداخلات بين البروتونات مع ذرات أخرى مثل الكربون مثلا H^1-C^{13} ، ويطلق على هذا النوع Heteronuclear Correlation Spectroscopy أو يسمى HETCOR .

4-12. دور التحليل بالرنين النووى المغناطيسى (NMR) في التحليل الوصفى لمتبقيات المبيدات : "

يستفاد من نظام التحليل بالـــ NMR في التحليل الوصفي للمبيدات ومتبقياتها. حيث يستفاد من طيف NMR ببعض القيم التي تساهم في التمييز والتعرف علـــى المبيـــدات المختلفة هذه القيم مثل ثابت الإزدواج ، قيم Chemical shift ومن الامثلة على ذلك:

4-12-1. في حالة المركبات الفوسفورية:

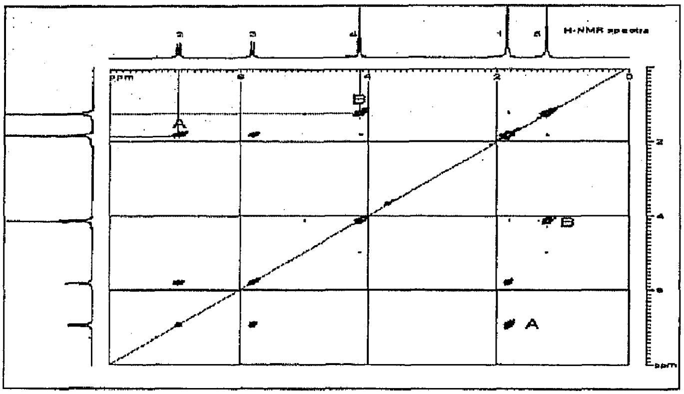
1- يحدث ازدواج كبير بين P, H يظهر في صورة انقسام ثنـــائي يعطـــى ثابـــت ازدواج قيمته J = 18hz.

2- وجود امتصاص رئيسي لبروتونات متكافئة وهى مجموعتي الألكيل مـــن 3.9- 3.8 قيم Chemical shift.

4-12-2. في حالة المركبات الكلورنية العضوية:

1- ذرة الكلور مع الهيدروجين تعطى قيم δ = 7.2 ، OH تعطـــى قـــيم δ = 4.8 والهيدروجين في حلقة البنزين قيم δ = 4.7.

2- لايستخدم الرنين النوى المغناطيسي في التحليل الكمي للمبيدات



شكل (97): طيف الرنين المغناطيسي ثنائي الاتجاه NMR COSY لمركب Ethyl 2-butenoate.

الفصل

السابع

استخدام التحليل الاشعاعى في تقدير متبقيات المبيدات

الفصل السابع

استخدام التحليل الاشعاعى في تقدير متبقيات المبيدات[1]

Isoptoic methods for pesticide resiudes determination

1. تعريف النظائر: Isotopes

تعرف النظائر بانها الذرات التي تحتوى على نفس العدد من البروتونـات ولكنهـا تختلف في عدد (النيترونات). أى أنها تتشابه في العدد الذرى وتختلف في عددا لكتلـه مع العنصر الأساسي ومثال لذلك C_6^{12} الكربون العادي ونظيره هـو C_6^{14}. نجـد أن نظيره مشابه للعنصر الأصلي لكنه غير مستقر والنظير نواته غير ثابتة ويحدث لهـا تحلل ويصدر منها أشعة وهى أشعة ألفا α ـ أشعة بيتا β ـ أشعة جاما δ.

أ- جسيمات ألفا (α) (أشعة ألفا): Alpha particle هي عبارة عن جسيمات تحمل شحنة موجبة وهى عبارة عن نواة ذرة الهليوم.

ب- جسيمات بيتا (β) (أشعة بيتا): Beta particle هي جسيمات تتحـرك بـسرعة وتحمل شحنة سالبة وهى عبارة عن سلسلة من الإلكترونات تسير بسرعة كبيرة.

جـ- جسيمات جاما (δ) (أشعة جاما): Gamma rays هي أشعة كهرومغناطيسية تسير بسرعة الضوء لا تتأثر بالمجال الكهربي أو المغناطيسي وهى أشعة غير مشحونة (عديمة الشحنة).

2. وحدات قياس النشاط الإشعاعي:

2-1. وحدات النشاط الإشعاعي:

1- الكوري: Curie (Ci) هو كمية النظير المشعة (كمية الأشعة الخارجـة مـن النظير) واللازمة لتفتت أو تحطم 3.7 × 1010 ذرة في الثانية.

[1] كتبه الاستاذ الدكتور شريف السيد الحمضى استاذ كيمياء المبيدات- كلية الزراعة- جامعـة كفر الشيخ

2- البكيرل: Becquerel (Bq) هو كمية النظير المشع اللازمة لتفتيت ذرة واحدة في الثانية.

∴ الواحد كوري يساوى 3.7 × 1010 بكريل IC = 3.7 X 1010 Ba

وأيضا نجد أن 1 Ba = 1 dps ويقصد بالـ dsp بالذرة الواحدة المفتتة في الثانية.

3- عدد التفتتات/دقيقة (dpm) هي الوحدة المستخدمة في قياس النشاط الإشعاعى في أجهزة الوميض الإشعاعى السائل Liquid Scintillation Count (L.S.C) .1 Ba = 60 dpm

جدول (10): مقارنة بين أشعة ألفا α ـ أشعة بيتا β ـ أشعة جاما δ.

وجه المقارنة	ألفا α	بيتا β	جاما δ
الطبيعة والكتلة	جسيمات مادية موجبة كتلتها هي كتلة ذرة الهليوم.	جسيمات مادية سالبة الشحنة كتلتها 1837/1 من كتلة ذرة الهيدروجين	موجات كهرومغناطيسية وليس لها كتلة.
الشحنة والسرعة	شحنتها موجبة وسرعتها 20/1 من سرعة الضوء	تحمل شحنة سالبة تقارب سرعة الضوء	غير مشحونة وتساوى سرعة الضوء
قدرتها على اختراق المواد الصلبة	ضعيفة	100 مرة قدرة α	100 مرة قدرة α
تأثرها بالمجالات الكهربية والمغناطيسية	تتأثر بما يثبت أنها موجبة	تتأثر بما يثبت أنها سالبة	لا تتأثر
قدرتها على تأين الغاز	لها قدرة كبيرة	لها قدرة أقل	لها قدرة ضعيفة

2-2. وحدات التعرض للإشعاع:

1- **الرونتجن (r) Roentgen:** هي كمية الأشعة اللازمة لتأين 0.001 جرام من الهواء.

2- **الراد Rad:** وهو وحدة القياس جرعة الإشعاع الممتص Radiation absorbed dose وهو كمية الأشعة الممتصة بالأرج لكل جرام من المادة الماصة. والجرعة المساوية لراد واحد تعنى امتصاص 100 أرج من طاقة الإشعاع في كل جرام من المادة الدامصة.

3- **الجاى Gy:** وهى تعبر عن جرعة التعرض لأشعة جاما وهى تساوى 100 راد 1 Gy = 100 Rad

3. طرق الكشف عن وقياس النشاط الإشعاعى:

Radiation Detection and Assay

هناك عدة طرق لقياس النشاط الإشعاعى وهذه الطرق هي:

1- طرق تعتمد على مقدرة الإشعاعات الصادرة على تأين الهواء.

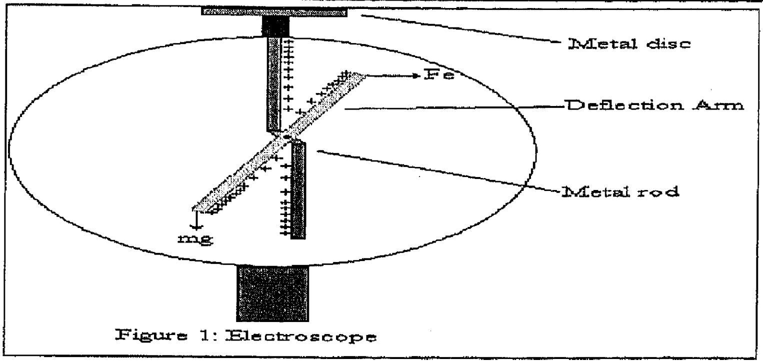
2- طرق تعتمد على مقدرة الإشعاعات الصادرة من المواد المشعة على التأثير على الألواح الفوتوغرافية الحساسة Radio autography.

3- طرق تعتمد على مقدرة الإشعاعات الصادرة من المواد المشعة على إحداث توهج أو فسفرة لبعض المركبات الكيماوية Scintillation technique.

1-3. الطرق التي تعتمد على مقدرة الإشعاعات الصادرة على تاين الهواء:

1-1-3. الإلكتروسكوب: Electroscope

وهو عبارة عن Simple electrometer حيث يكون فيه الإلكترون الموجب عبارة عن قضيب متصل به شريط معدني أما الإلكترون السالب فهو جدار الكشاف شكل (98).



شكل (98): تركيب الالكتروسكوب (انظر الصورة الملونة نهاية الكتاب)..

فكرة عمله:

عندما يكون الإلكتروسكوب مشحون تماما Fully changed فإن المرادف deflectional الشريط المعدني سيكون أقصى ما يمكن وعند تعرض الإلكتروسكوب لمصدر مشع Radioactive فإن الهواء داخله يتأين وبذا تتحرك الإلكترونات من الجدار إلى القضيب وبالتالي فإن انحراف الشريط سوف يتناقص (B). ويكون ذلك دالة في النشاط الإشعاعى ويستخدم ككشاف يحمل في الجيب Packet مع العاملين في معامل الإشعاع.

2-1-3. كشاف غرفة التأين: Ionization chamber

يتركب الجهاز كما هو موضح بالرسم ونجد أن غرفة التأين الموجودة في الجهاز عبارة عن غاز (هواء) وعن توصيل الدائرة الكهربائية لا يمر تيار كهربائي بين لوحى المكثف في الحالة العادية أما عند إدخال دقائق (جسيمات ألفا) إلى غرفة التأين من النافذة المصنوعة من الزجاج يحدث تأين للغاز الموجود بين لوحى المكثف وبالتالي يسرى تيار كهربي صغير به الدائرة الكهربائية يمكن الكشف عنه بواسطة مكبر الصوت.

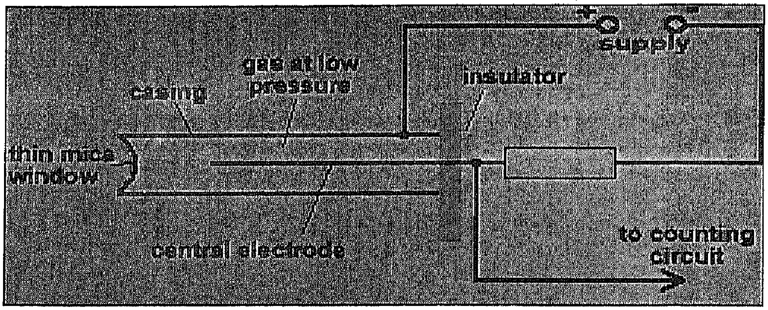
ملحوظة:

هذه الطريقة لا تصلح للتعرف على دقائق بيتا لأن التأين الذي تحدثه لذرات الغاز الموجودة يكون ضعيف إذا ما قورن بالذي تحدثه دقائق ألفا α غير أن بيتا تحمل

نصف الشحنة التي تحملها دقائق ألفا كما أنها أسرع من دقائق ألفا α ستة مرات ومن ثم تحدث نبض كهربي ضعيف يصعب التعرف عليه.

3-1-3. عداد جيجر ـ مولر: Giger-Muller Counter (GMC)

يتكون الجهاز من إناء أسطواني زجاجي مملوء بغاز يوجد بداخل الأسطوانة أسطوانة معدنية تعمل ككاثود ويمر على امتداد محورها سلك (الإنود) والكاثود والأنود معزولان كهربائيا عن بعضهم ومتصلان بدائرة كهربية تحتوى على مكبر صوت شكل 99.



شكل (99): تركيب عداد جيجر مولر.

فكرة العمل:

يتم ضبط الجهد الكهربائي بالجهاز إلى القدر الذي لا يؤدى إلى وجود تيار كهربائي فإذا أدخلت دقيقة ألفا أو بيتا إلى الإناء الزجاجي يؤدى ذلك إلى تأين الهواء الموجود ويترتب على ذلك حدوث سريان للتيار الكهربي ومن ثم فكلما دخل دقيقة من دقائق ألفا أو بيتا إلى الجهاز حدثت نبضة واحدة به مكبر الصوت وفى الأجهزة الحديثة يستبدل مكبر الصوت بجهاز عد كهربائي.

ملحوظة:

يستخدم هذا الجهاز للكشف عن دقائق ألفا وبيتا أما بالنسبة لأشعة جاما δ فهو ليس مؤثر جدا لأن معظم فوتونات جاما تخترق الغاز ولا تحدث تأين به.

3-2. الطرق التي تعتمد على إحداث تأثير على الألواح الفوتوغرافية الحساسة: Radio autography

من أحد الظواهر التي دلت على وجود الإشعاعات الصادرة من المواد المشعة هو تأثيراها على الألواح الفوتوغرافية الحساسة Photographic Films حيث تكون الإشعاعات الناتجة لها القدرة على تنشيط الألواح الفوتوغرافية الحساسة والمغطاة بطبقة من هاليد الفضة (بروميد الفضة) وهذه المادة تستجيب للإشعاعات الصادرة من المواد المشعة وعند تحميض هذه الألواح يظهر إطلاق darkness نتيجة لاستجابة بروميد الفضة لهذه الإشعاعات وشدة الانطلاق تكون دالة فوق على مكان النشاط الإشعاعي وكذلك شدته.

ومن التطبيقات المفيدة لهذه الظاهرة ما يعرف بـ Film budge والذي يستخدم في:

- معرفة مدى التعرض من قبل العاملين بالمواد المشعة (النظائر المشعة)
- وأيضا تتبع تركيز وتوزيع المركب الحامل لذرة مشعة في نسيج ما.
- تطبيق هذه التقنيات في التحليل الكروماتوجرافى بالطبقة الرقيقة TLC.

3-3. الطرق التي تعتمد على مقدرة الإشعاعات الصادرة من المواد المشعة على إحداث توهج أو فسفرة: Scintillation Techniques

3-3-1. قياس الوميض الناتج من مادة صلبة: Solid Scintillation Counting (SSC)

نجد أن المادة الصلبة المتوهجة هي مادة تبعث ضوءا Flash عندما تصطدم بدقيقة مشحونة changed partical ولذا تستخدم هذه المواد الصلبة المتوهجة Scintillator للكشف خصيصا عن أشعة جاما بالإضافة إلى أشعة (X) وأفضل هذه المواد هي الهاليدات القلوية NaI المنشطة بالتيتانيوم.

فكرة عمل الجهاز:

عند امتصاص أشعة جاما بواسطة البلورات الصلبة Scintillation crystals فإنه يحدث تحرر لإلكترون واحد أو أكثر في هذه البلورات وتكون هذه الإلكترونات سريعة فتؤدى إلى إشارة excitation وتأين خلال مساراتها في البلورة مما يؤدى إلى انبعاث ضوئي emits light photos في المنطقة البنفسجية والعدد الكلى لفوتونات الضوء المنبعث يكون متناسب مع طاقة أشعة جاما الساقطة على البلورات ثم أن الأشعة الضوئية الناتجة في البلورات تسقط على لوح فوتوغرافي Photo sensitive lags مما يؤدى إلى تحرير إلكترونات photo electrons يتم تحويلها إلى تيار كهربائي بعد مرورها على خلية ضوئية من نوع Photo multiplier tubs والذي يتناسب مع كمية المادة المشعة.

3-3-2. جهاز قياس الوميض الناتج من مادة سائلة ودوره فى تقدير متبقيات المبيدات: Liquid Scintillation Counting (L.S.C)

يبنى الأساس النظري لهذه الطريقة على أن هناك بعض المواد الكيماوية السائلة Liquid Scintillators والتي لها القدرة على إشعاع ضوئي عادى في المنطقة المرئية عندما تتعرض لأي أشعة مثل ألفا ـ بيتا ـ جاما ـ أكس X هذه المواد الكهربية مثل الأنثراسين ـ النفثالين وهذا الضوء عندما يسقط على Photocathode ينبعث منه إلكترونات والتي يمكن تكبيرها وتصل في النهاية إلى الأنود ويترتب على ذلك مرور تيار كهربائي يمكن قياسه وشدة هذا التيار تتناسب طرديا مع شدة الإشعاع الناتج من المواد المشعة شكل 100.

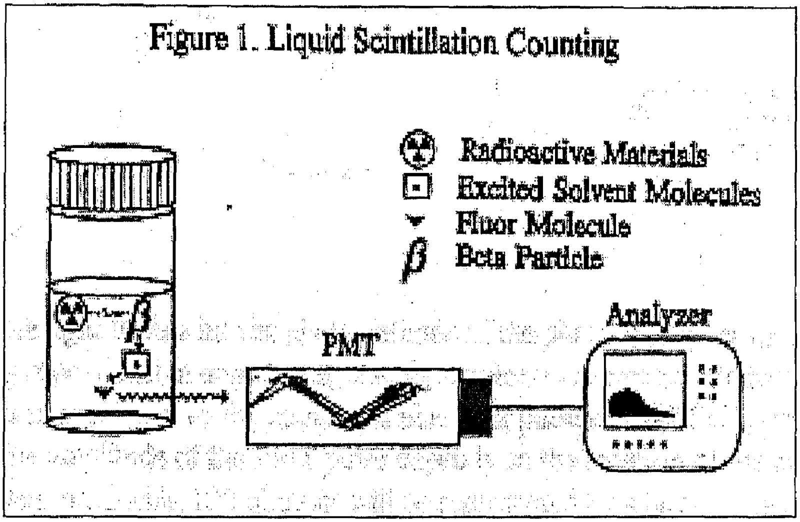
المواد المستخدمة في الفسفرة:

1- يوديد الصوديوم المنشط بالتيتانيوم.

2- الأنثراسين.

3- المذيب الذي تستخدم ليس له أى خواص تفاعلية مثل الطولوين. لو العينة قطبية

تستخدم مذيب الدايوكسان dioxan أما لو العينة غير قطبية تستخدم مذيب الـزيلين Xylen.



شكل (100): تركيب جهاز **Liquid scintillation counting**.

تصحيح الخطأ الناتج عن الخمود: Quenching correction

من المصادر الرئيسية للخطأ عند قياس النشاط الإشـعاعى بطريقـة L.S.C هـو ظاهرة الخمود Quenching أى خمود الضوء ، وهذا الخمود ناتج عن:

1- وجد اللون Color في العينة والذي يقوم بامتصاص فوتونات الضوء المتولـد وخفضها.

2- كذلك يمكن أن يكون الخمود نـاتج عـن التـداخل الكيمـاوي Chemical interference نتيجة وجود مادة مؤكسدة تؤكسد السائل الوميض.

3- من أسباب الخمود أيضا عدم ذوبان العينة المشعة ذوبـان جيـد فـي الـسائل الوميضى.

يمكن تصحيح الخطأ الناتج عن الخمود Quenching من خلال :

1- إزالة اللون الذي قد يكون موجود بمخلوط العينة من السائل الوميضى.

2- طريقة تعرف باسم نسبة المصدر Channel ratio method ويتم ذلك بمعرفة أو تميز النسبة بين الجزء العالي في الطاقة للوميض الغير متأثر بالخمود channel وبين الجزء المنخفض في الطاقة للوميض المتأثر بالخمود. وهى توجد بالأجهزة الحديثة وفى هذا النطاق يوضع مصدر مشع قياس أوتوماتيكيا قرب وعاء العينة وبذا فإن الخفض في قياس نشاط هذا المصدر يتناسب مع الخمود quenching الناجم في العينة.

دور هذا الجهاز فى تقدير متبقيات المبيدات

يمكن استخدام هذا الجهاز فى تقدير متبقيات المبيدات ن طريق همل تركيزات قياسية من المبيدات المعلمة بنظير مشع ثم قياس النشاط الاشعاعى لها فى الجهاز كما شرح سابقا فى طريقة عمل الجهاز ويكون النشاط الاشعاعى دالة فى تركيز المبيد حيث ان كل كمية معلومة من المبيد لها نشاط اشعاعى معين. ثم بعد ذلك يتم تقدير النشاط الاشعاعى لعينة و منها يمكن تقدير كميتها

الخطوات العملية للتحليل الإشعاعى : Practical radioactive analysis

لقياس النشاط الإشعاعى بطريقة Liquid Scintillation Counting توضع العينة في حجم معين من Aliquot في أواني خاصة كل منها 10مل ثم تكمل هذه الأوعية بالسائل الوميضى Liquid Scintillater ثم تنقل إلى جهاز LSC حيث يتم قياس عدد التفتتات أو الومضات الناتجة إلكترونيا ويعبر عن وحدات القياس بـــ dpm ويوجد أجهزة حديثة تتصل بالكمبيوتر مباشرة تعطى النتائج الخاصة بالقياس وهى:

1- توضع العينة في اوانى vials 1جم معين من العينة السائلة والتي تحتوى على المادة المشعة أو تكمل إلى حجم 10 مل بالسائل الوميضى وترص الأواني في

حوامل خاصة مرقمة مرتبة ابتدائية من ناحية الترقيم ويعمل كل قياس من 10 مكررات.

2- ترص الحوامل في جهاز LSC: ونجد أن الحامل يكون مرقم برقم معين يظهر - على الكارت الناتج من الكمبيوتر ونجد أن الإناء الأول الموجود بجوار رقم الحامل يكون عبارة عن البلانك وهو عبارة عن المذيب المستخدم + السائل الوميضى بدون العينة المراد تحليلها.

نجد أن كل حامل يتحرك في الجهاز بحيث يقف كل إناء Vials أمام الخلية الضوئية المركبة فترة تصل إلى 10 دقائق ثم تترك العينات للصباح ويخرج من الجهاز كارت به نتائج التحليل.

(النشاط الإشعاعي النوعي) : Specific Radio Activity

نجد أنه بالنسبة للمواد المشعة القياسية (المركبات المعلمة بذرة مشعة مثلا) يكتب عليها النشاط الإشعاعي النوعي لكل وزنه نقية من المبيد (المادة الفعالة فمثلا يقال النشاط النوعي لمبيد معين هو 3.77MBa/mgai فإذا كان مطلوب دراسة توزيع هذا المبيد في أجزاء مختلفة (أنسجة مختلفة في الكائن) وليكن الكبد يتم استخلاص هذا المبيد بمذيب ثم يتم قياس النشاط الإشعاعي النوعي وله وليكن 0.0001/MBa وبالتالي فإنه يوجد بالكبد 0.27 ميكروجرام من المبيد ويتم حساب ذلك من خلال:

حيث:

النشاط الإشعاعي للمبيد في وزن معلوم	ai 1 mg $\rightarrow$ 3.77 MBa
النشاط الإشعاعي في الكبد	X $\rightarrow$ 0.0001

∴ كمية المادة الفعالة (المبيد في الكبد) =

$$\therefore\ X = \frac{0.000\,X\,1}{3.77} = 0.27\ \text{Mg}\quad \text{ai}$$

هذا الكلام مبنى على أساس أن المبيد لم يحدث له ميتابولزم. وهكذا فإن بمعلومية النشاط الإشعاعى النوعي فإنه يمكن تقدير المبيدات كميا حيث أن هذا المصطلح يعنى كمية المادة المشعة المرتبطة بوزن معين من المادة.

في الدراسات البيولوجية قد يستلزم الأمر الحصول على كمية كبيرة من المركب المعلم (المشع) لكن هذا المركب لا يتوافر منه إلا كمية ضئيلة في هذه الحالة يمكن خلط المركب المعلم مع المادة الفعالة لنفس المركب ولكن هذه المادة المضافة غير معلمه (غير مشعة) وتكون الكمية الجديدة (كمية المخلوط) ممثلة لمركب ذو نشاط إشعاعي ولكن يصبح لها نشاط إشعاعي نوعى جديد.

مثال على ذلك:

في إحدى دراسات سلوك مبيد الأيمداكلوبريد في التربة والنبات تم الحصول على عينة من المبيد تحتوى على ذرة كربون 14 مشعة وزن هذه العينة 1.99Mg ولكن وجد أن الكمية الكلية من المبيد المطلوبة في التجربة هي 50.55 Mg في هذه الحالة يتم خلط الكمية المشعة من المبيد بكمية أخرى من نفس المبيد ولكن غير مشعة للحصول على المطلوب كما يلي:

يتم إضافة 48.55 مل جرام مادة فعالة غير معلمه إلى 1.99 مل جرام مادة فعالة معلمه للحصول على المخلوط 50.55 مل جرام ويمكن حساب النشاط النوعي للخليط كالتالي:

$$3.77\ \text{MBa} \rightarrow 1\ \text{Mg}$$
$$X \rightarrow 1.99$$

كمية النشاط النوعي:

$$X = \frac{1.99\ X\ 3.77}{1} = 7.5\ MBa$$

الموجودة في العينة 7.5 MBa → 50.55 Mg

كمية النشاط النوعي

$$X = \frac{1.99 \; X \; 3.77}{1} = 7.5 \; MBa$$

الموجودة في العينة 7.5 MBa → 50.55 Mg

ثم يحسب النشاط النوعي في المخلوط كما يلي: X → 1 Mg

$$\frac{\text{النشاط النوعي}}{\text{المخلوط}} = \frac{1 X 7.5}{50.55}$$ لمخلوط العينة = 0.148 MBa/Mg ai

4. استخدام النظائر المشعة في التحليل الكروماتوجرافى لتقدير متبقيات المبيدات

Use of Radioactivity in Chromatographic Analysis for pesticide residues determination

نجد أنه في التحليل الكروماتوجرافى خاصة PC وTLC لمتبقيات المبيدات ليس من السهل أن تحصل على chromomeric agent اى المواد المظهرة لمعاملة الـ chromatograms لتحديد مواقع البقع المفصولة وبدلا من ذلك وجد أنه باستخدام مبيدات تحتوى على ذرات لها خاصية النشاط الإشعاعى فإنه يمكن أن يستدل على مكان هذه البقع المفصولة (المركبات المفصولة) عن طريق قياس الإشعاعات الصادرة. والكروماتوجرافى الناتج عن استخدام المواد المشعة في P.C أو TLC يسمى Radio chromatogram وميزه إدخال الطرق الإشعاعية في التحليل الكروماتوجرافى هو التقدير الكمي للمبيدات بجانب التحليل الوصفي حيث أن كثافة النشاط الإشعاعى المنبعث من البقع المفصولة تتناسب مع تركيز المبيدات المفصولة.الطرق الآتية يمكن إدخالها في طرق التحليل الكروماتوجرافى:

4-1. المسح الكروماتوجرافى الإشعاعى:(Radiography)

Radioactive chromatogram Scanning

كما هو موضح فإن الصيغة Plate الخاص TLC أو PC يوضع على منضدة

متحركة بسرعة معينة يمرر الـ Plate أمام (كشاف جيجر) حيث يتم تسجيل المركبات المشعة المفصولة في صورة منحنيات يتناسب ارتفاعها وكثافتها مع تركيز المادة المشعة بالمبيد ويمكن بعد ذلك مقارنة المنحنيات الناتجة من Radiography أو Radio Chromatogram على الألواح الأصلية لتحديد أماكن البقع المفصولة ومن هنا يمكن عمل تحليل وصفى للمبيدات.

4-2. الفصل الكروماتوجرافى ثم قياس الوميض فى جهاز Liquid Scintillation Counting:

الفكرة في ذلك أن اللوح الكروماتوجرافى بعد أن يحدث له إزاحة بالمذيب Development يتم عمل شرائط سمك كل منهم 1سم ثم يعمل لكل طبقة كشط واستخلاص ثم يقاس النشاط الإشعاعى في هذه الطبقة بطريقة LSC بوضعها في Vail تحمل نفس الرقم وأينما وجد النشاط الإشعاعى في Vialsيمكن عن طريقها أن يتم تحديد المكان الذي يحمل النشاط الإشعاعى وبذا يمكن معرفة عدد البقع أو الحزم المفصولة و التعرف على المبيدات المفصولة وصفيا و كذلك يمكن تقديرها كميا لان النشاط لاشعاعى المقاس يتناسب مع تركيز المبيد.

4-3. عمل فصل كروماتوجرافى للمادة المشعة ثم التعريض لالواح حساسة لاظهار المبيدات المفصوله وتقديرها كميا Auto Radiography:

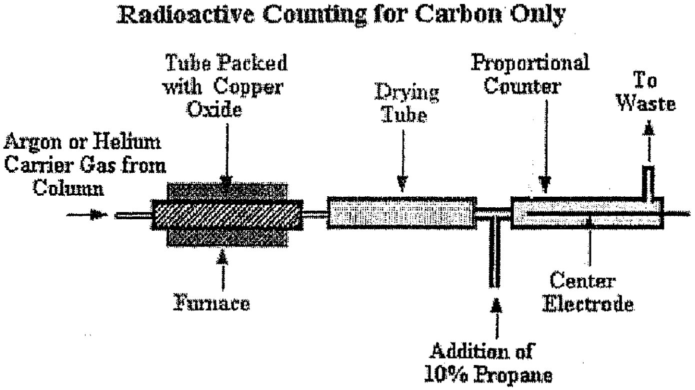
فى هذه التقنية يتم فصل المبيدات على الالواح بكروماتوجرفى الطبقة الرقيقة ثم بعد ذلك يتم تعريض المركبات المشعة المفصولة على Radio Chromatogram لالواح حساسة حيث يمكن قياس الإشعاعات الموجودة على أى RadioChromatogram باستخدام Auto-radiography وذلك بوضع الراديو كروماتوجرام ملاصق لفيلم حساس مثل (X ray Film) لمدة كافية ثم يؤخذ الفيلم ويحمض تحميضا عاديا فنحصل على ما يسمى radiograph والذي يظهر به أماكن سوداء أو داكنة تدل على مواقع المواد المشعة وحتى هذه الخطوة

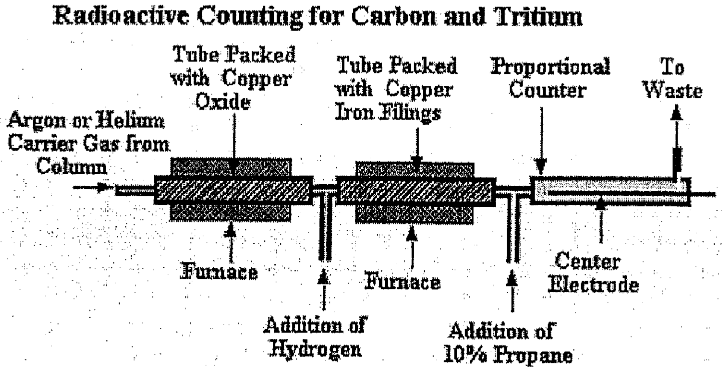
يكون هنا التعرف وصفى فقط او يستخدم فى دراسة توزيع المبيدات ولكن هنـاك أجهزة حديثة مثل IMAGER وهو يتصل بالكمبيوتر لإظهـار نتـائج التحليـل. ويستخدم هذا الجهاز ليس فقط في إظهار المركبات المفصولة على ألـواح TLC ولكن يمكن إجراء التقدير الكمي للمركبات المفصولة وذلك لأن الجهـاز يعطـى النسبة المئوية للمركبات المفـصولة وبمعلوميـة النـشاط النـوعي activity أم Specific يمكن معرفة تركيز المركبات المفصولة. وللعمل علـى هـذا الجهـاز تستخدم ألواح TLC جاهزة يتم وضع العينة Spotting على خط البداية بطريقـة أوتوماتيكية ثم يوضع اللوح بعد ذلك في الجهاز وبعد فترة كافية يمكـن ملاحظـة شكل وبيانات Radio chromatogram على شاشة الكمبيوتر المتصلة بالجهاز ثم الحصول على كارت يوضح البقع المفصولة وبيانات RF وكذلك تـصبح النـسبة المئوية للبيانات المفصولة شكل الكروماتوجرام Radio chromatogram الناتج.

4-4. الكروماتوجرافى الغازى المحتوى على كشاف للمواد المشعة

Radioactive Gas Liquid Chromatography

تعتمد فكرة هذا الجهاز عى نفس فكرة الجهاز الكروماتوجرافى الغازى العـادى وهى استخدام تركيزات قياسية من المبيد المعلم المراد تقدير متبقياتـه فـى العينـة المجهوله ثم حقنها فى الجهاز فيتم فصلها فى العمود الخاص بالجهاز ثم تمر علـى كشاف للمواد المشعة و ليس كشاف الجهاز الهادى و يقدر النشاط الاشـعاعى لكـل مكون مفصول او لكل تركيز و يكون هناك علاقة بين النشاط الاشعاعى المقـدر و تركيز المبيد و يتم اجراء نفس الخطوات مع العينة المجهولة المعلمه وبتقدير النشط الاشعاعى يمكن تقدير تركيز المبيد فى العينه المجهوله وكشاف النشاط الاشعاعى قد يكون كشاف لقياس نشاط الكربون المعلم او الايدوجين المعلـم و يوضـح الـشكل 101اسفل نموذج لكشاف النشاط الاشعاعى





شكل (101) : نماذج لكشاف النشاط الاشعاعى فى جهاز الكروماتجرافى الغازى.

5-4. الكروماتوجرافى السائل عالى الاداء المحتوى على كشاف للمواد المشعة

Radioactive high performance Liquid Chromatography

تعتمد فكرة هذا الجهاز عى نفس فكرة الجهاز الكروماتوجرافى السائل العادى وهى استخدام تركيزات قياسية من المبيد المعلم المراد تقدير متبقياته فى العينة المجهوله ثم حقنها فى الجهاز فيتم فصلها فى العمود الخاص بالجهاز ثم تمر على كشاف للمواد

المشعة و ليس كشاف الجهاز الهادى و يقدر النشاط الاشعاعى لكل مكون مفصول او لكل تركيز و يكون هناك علاقة بين النشاط الاشعاعى المقدر و تركيز المبيد و يتم اجراء نفس الخطوات مع العينة المجهولة المعلمه وبتقدير النشط الاشعاعى يمكن تقدير تركيز المبيد فى العينه المجهولهز وكشاف النشاط الاشعاعى قد يكون كشاف لقياس نشاط الكربون المعلم او الايدوجين المعلم

5. التعليم للمبيدات باستخدام المواد المشعة :

هناك ثلاثة مستويات للنشاط الإشعاعى:

1- المستوى المنخفض أقل من واحد وحتى 10 ميللكورى.

2- المستوى المتوسط 10-100 ميللكورى.

3- المستوى العالي 100-500 ميللكورى.

وليكن معلوم أن معظم دراسات سلوك المبيدات عن طريق تقدير متبقياتها في المكونات البيئية المختلفة وخاصة الحشرات والفئران والنباتات تستخدم كميات من المواد المشعة في حدود 1-10 ميللكورى كما أن النظائر المشعة التي تستخدم في بحوث المبيدات تكون من النوع الذي يصدر موجات بيتا مثل H2 الديوتريم ، C14 ، P32 وهناك مواد مشعة تصدر أشعة بيتا ذات طاقة منخفضة مثل S35 ، C14 وطريقة التشعيع تتم بخلط النظير المشع الموجود على هيئة مركب غير عضوي مع المبيد المراد تشعيعه أو تعليمه لمدة معينة وعلى درجة حرارة معينة فيحدث تبادل للنظير المشع على المركب العضوي (المبيد) المراد تشعيعه وقد يكون P أو C أو H.

هناك عوامل تؤخذ في الاعتبار عند اختيار النظير المشع وتحديد موضعه في الجزئ:

1- التركيب الكيماوي للمركب.

2- سهولة الحصول على النظير المشع.

3- نصف عمر النظير المشع.

4- سهولة قياس الإشعاع.

5- تكلفة النظير المشع.

6- لة التغذية.

ويعتبر الكربون المشع C14 الأكثر شيوعا واستعمالا في مجال دراسة سلوك المبيدات وتتبع آثارها لانه يعتبر أساس جميع المواد العضوية كما أنه يحقق الشروط السابقة من حيث التعلم وسهولة الحصول عليه ونصف فترة حياته وسهولة تخزينه.

عند تشعيع مبيد ما أو إدخال له نظير مشع عليه وهو ما يعرف Labeling ويجب عند إدخال النظير المشع الإلمام بمدى صلاحية موضع الذرة المشععة داخل المركب بما يتمشى مع هدف الدراسة فيجب اختيار الذرة المراد تعليمها بالإشعاع بحيث لا تهاجم بسهولة أو تفقد بسبب التحولات البيوكيميائية في الوسط. وهى مهمة في دراسة التمثيل والتحطم للمركبات أو المبيدات وكذلك معرفة الجزئ المسئول عن إحداث الفعل السام.

ويجب أن يكون التعليم أو التشعيع في معظم المجاميع الفعالة في الجزئ حيث اتفق على وضع ذر الكربون في السلسلة الأساسية الكربونية أو حلقة البنزين مع العلم بصعوبة التحضير.

مميزات استخدام الاشعاع في دراسة السلوك البيئي للمبيدات و تقديرها:

1- المادة المشععة لا تتأثر بالمادة الموجودة فيها من حيث اللون أو الحالة أو الصفات الطبيعية وكذلك المكونات الكيميائية والتي قد تتداخل مع طرق التقدير الأخرى كالطرق اللونية أو الكروماتوجرافية مما يستلزم إجراء عمليات تنقية للعينات المحتوية عليها ومن ثم يقل معدل استرجاع المركبات من المادة المحتوية عليها وهذا غير وارد عند التحليل بالإشعاع.

2- الحساسية العالية لهذه الطريقة والتي تصل إلى أجزاء في البليون أو أقل.

تخزين المواد المشعة:

يفضل عمل التخزين ولكن هناك فترة من وصول المواد المشعة حتى استخدامها وهذه الفترة تدخل تحت مسمى التخزين وتخزن في أوعية زجاجية خاصة وداخل صناديق البلاستيك.

شروط إنشاء معامل كيمياء المواد المشعة:

1- تحديد وتوصيف نوعية وكمية المواد المشععة المستعملة.

2- تحديد وضبط المساحة بين القائم بالعمل ومصدر الإشعاع بحيث يتم تفادى أى كمية تحدث ضرر.

3- تحديد مدة التعرض التي لا تحدث معها أية أضرار.

4- ضرورة الكشف المستمر عن مستويات الإشعاع في المعمل وكذلك للقائمين بالعمل من خلال الاختبارات القياسية المتعارف عليها.

5- التعامل مع المواد المشععة في حيز محدود أى صناديق محكمة الغلق.

6- نشر الخلايا الحساسة للكشف عن المواد المشعة وتحذير العاملون من احتمالات التسرب قبلها بوقت كاف.

7- ضرورة توفير وسائل الإسعافات الأولية المناسبة والسريعة.

8- ضرورة توفير وسائل التخلص من المواد المشعة بأسلوب مدروس بحيث يضمن عدم تسرب النفايات مرة أخرى.

9- ضرورة التعامل مع المواد المشعة بواسطة أدوات خاصة للتداول تجعل فرص تناثرها أو سقوطها في مكان التداول ضئيلة جدا أو معدومة.

10- ضرورة ارتداء الملابس الواقية أثناء تداول المواد المشعة.

المراجع الواردة بالكتاب

المراجع الواردة بالكتاب

أولاً : المراجع العربية :

1- الحمضي شريف السيد (2011) الأجسام المناعية ثورة في مجال تحليل المبيدات والملوثات البيئية مكتبة أوزوريس القاهرة.

2- الزميتى محمد سعيد صالح (1992) تحليل متبقيات المبيدات فى الاغذية دار الفجر للتوزيع و النشر

3- الاعصر عبد المنعم محمد (1987) التحليل الطيفي للأنظمة الكيميائية وا لبيوكيميائية . دار البحر الأبيض المتوسط للنشر

4- دربالة على سليمان (2011) مبيدات الافات والبيئة - دار الكتاب الحديث القاهرة

5- زيد محمود (1961) اسس اختبار و تحليل و استخدام مبيدات الافات. دار المطبوعات الجامعية الاسكندرية

6- سلامه احمد خميس (2003) المبيدات وسميتها للانسان والبيئة . مكتبة بستان المعرفة لطبع و نشر وتوزيع الكتب. الاسكندرية.

7- عبد الحميد زيدان هندي (1999) أساسيات وطرق تحليل مبيدات الآفات المكتبة الأكاديمية القاهرة

8- عبد الحميد زيدان هندى (2003) السمية والبيئة والتفاعلات الحيوية للكيميائيات والمبيدات.

9-عفيفي فتحي عبد العزيز (2000) دورة السموم والملوثات البيئية فى مكونات النظام البيئى . دار الفجر للتوزيع و النشر

10- عفيفي فتحي عبد العزيز- محمد خالد عبدا لعزيز (2000) التحليل الدقيق لمتبقيات السموم والملوثات البيئة في مكونات النظام البيئي دار الفجر للتوزيع و النشر

ثانياً: المراجع الأجنبية:

Albaigés J. (2005). Persistent organic pollutants in the Mediterranean Sea, Hdb. Env. Chem., Vol. 5, Part K: DOI 10.1007=b107145, Springer-Verlag, Berlin.

Aldenberg T. & Slob W. (1993). Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data. Ecotoxicol. Environ. Saf., 25, 48.

Anis N. A. Eldefrawi M. E. &Wong R. B. (1993). Reusable Fiber Optic Immunosensor for Rapid Detection of Imzethapyr Herbicide. J. Agric. FoodChem., 41, 843-848.

Anis N. A. Wright J. Rogers K. R. Thompson R. G. Valdes J. J. & Eldefrawi M. E. (1992). Fiber-Optic Immunosensor for Detecting Parathion Anal. Lett. 25, 627-635.

AOAC International AOAC Official Method (2007). Pesticide Residues in Foods byAcetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate.

Armenta S. Garrigues S. & De la Guardia M. (2007). Partial least squares-near infrared determination of pesticides in commercial formulations. Journal of Vibrational Spectroscopy. 44: 273-278.

Atanasse C. & Jean-Jacques A. (1998). Fluorimetric analysis of pesticides: Methods, recent developments and applications. Talanta, (46) 815-843.

Barriada-Pereira M. González-Castro M. J. Muniategui-Lorenzo, S. López-Mahía P. Prada-Rodríguez, D. & Fernández-Fernández E. (2007). Comparison of Pressurized Liquid Extraction and Microwave Assisted Extraction for the Determination ofOrganochlorine Pesticides in Vegetables. Talanta 71, 3, 1345-1351.

Bartram J. (2002). Water and Health in Europe: A Joint Report from the European Environment Agency and the WHO Regional Office for Europe, World Health Organization (WHO) Regional publications European series, No. 93.

Beltran J. Peruga A. Pitarch E. López F. J. & Hernández F. (2003). Application of Solid-Phase Microextraction for the Determination of Pyrethroid Residues in Vegetable Samples by GC-MS, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 376, 4, 502–511.

Bengt D. Ioana S. Anatoli D. Michael M. & Kumaran R. (2001). Optical detection of pesticides and drugs based on chemiluminescence-fluorescence assays [J]. Analytica Chimica Acta 426, 227-234.

Bernabei M. Cremisini C. Mascini M. & Palleschi G.(1991). Anticholinesterase activity measurement by a choline biosensor: application in water analysis Anal.Lett. 24, 1317-1331.

Berrada, H. Font G. & Moltó J. C. (2004). Application of Solid-Phase Microextraction for Determining Phenyl Urea Herbicides and Their Homologous Anilines from Vegetables. Journal of Chromatography A, 1042, 1, 9–14.

Berson S. A. Yalow R. S. & Ann. N. Y. (1959). Recent studies on insulin-binding antibodies. Acad. Sci. 82,338-344.

Besombes J. L. Cosnier S. Labbé P. & Reverdy G. (1995). A biosensor as warning device for the detection of cyanide, chlorophenols, atrazine and carbamate pesticides. Anal.Chem. Acta, 311, 255-263.

Bier F. F. & Schmid R. D. (1994). Real time analysis of competitive binding using grating coupler immunosensors for pesticide detection. Biosensors Bioelectronics 9,125-130.

Blackburn G. F. Talley D. B. Booth P. M. Durfor C. N. Martin M. T. Napper A. D. & Rees A. R. (1990). Potentiometric Biosensor Employing Catalytic Antibodies as the Molecular Recognition Element. Anal. Chem. 62, 2211-2216.

Blasco C. Font G. & Picó Y. (2002a). Comparison of Microextraction Procedures to Determine Pesticides in Oranges by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A 970, 1-2, 201-212.

Blasco C. Picó, Y. Mañes J. & Font G. (2002). Determination of Fungicide Residues in Fruits and Vegetables by Liquid Chromatography–Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A 947,1-2, 227-235.

Bogialli S. Curini R. Di Corcia A. Nazzari M. & Tamburro D. (2004). A Simple and Rapid Assay for Analyzing Residues of Carbamate Insecticides in Vegetables and Fruits: Hot Water Extraction Followed by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 4, 665-671.

Bogialli S. & Di Corcia A. (2007). Matrix Solid-phase Dispersion as a Valuable Tool for Extracting Contaminants from Foodstuffs. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 70, 2, 163-179.

Bouaid A. Martín-Esteban A. Fernández P. & Cámara C. (2000). Microwave-Assisted Extraction Method for the Determination of Atrazine and Four Organophosphorus Modern Extraction Techniques for Pesticides in Oranges by Gas Chromatography (GC). Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 367,3, 291-294.

Brewer B. N. Armbrust K. L. Mead, K. T. & Holmes W. E. (2004). Determination of Abamectin in Soil Samples Using High-Performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 18,15, 1693-1696.

Brunet D. T. Woignier M. Lesueur-Jannoyer R. Achard L. Rangon & B.G. Barthes. (2009). Determination of soil content in chlordecone (organochlorine pesticide) using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). Environmental Pollution 157, 3120-3125.

Budnikov H. C. & Evtugyn G. A. (1996). Electrochemical biosensors for inhibitor determination: Selectivity and sensitivity contro.l Electroanal. 8, 817-820.

Caddick, S. (1995). Microwave Assisted Organic Reactions. Tetrahedron, 51, 38, 10403-10432.

Cagnini A. Palchetti I. Lionti I. Mascini M. & Turner A. P.F. (1995) Disposable ruthenized screen-printed biosensors for pesticides monitoring. Sensors Actuators B 24-25, 85-89.

Cagnini A. Palchetti I. Mascini M. & Turner A. P. F. (1995). Characterization of screen-printed electrodes for detection of heavy metals.Mikrochim. Acta, 121, 155-166.

Calamari D. Jones K. Kannan K Lecloux A. Olsson M. Thurman M. & Zannetti P. (2000). Monitoring as an indicator of persistence and long-range transport. In Klecka G. Boethling B. Franklin J. Grady L. Graham D. Howard P.H. Kannan K. Larson R. Mackay D. Muir D. van de MeentD. Eds., Evaluation of Persistence and Long Range Transport of Organic Chemicals in the Environment, SETAC, 2000.

Camino-Sánchez F. Zafra-Gómez J. Oliver-Rodríguez A. Ballesteros B. Navalón O. Crovetto A. & Vílchez G. (2010). JLUNE-EN ISO/IEC

17025:2005-accredited method for the determination of pesticide residues in fruit and vegetable samples by LC-MS/MS. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.27, 11,1532-44.

Carabias-Martínez R. Rodríguez-Gonzalo E. Miranda-Cruz, E. Domínguez-Álvarez J. &Hernández-Méndez J. (2007). Sensitive Determination of Herbicides in Food Samples by Non Aqueous CE Using Pressurized Liquid Extraction. Electrophoresis 28, 20, 3606-3616.

Cervera M. I. Medina C. Portolés T. Pitarch, E. Beltrán J. Serrahima E. Pineda L.;Muñoz G. Centrich F. & Hernández F. (2010). Multi-Residue Determination of130 Multiclass Pesticides in Fruits and Vegetables by Gas Chromatography Coupled to Triple Quadruple Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 397, 7, 2873-2891.

Chai M. K. & Tan G. H. (2009). Validation of a Headspace Solid-Phase Microextraction Procedure with Gas Chromatography-Electron Capture Detection of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables. Food Chemistry 117, 3, 561-567.

Chen B. & Chen D. (2005). The application of uninformative variables elimination in near infrared spectroscopy. Spectronic Instruments and Analysis. 04, 26-30.

Chen J. Li Y. Wu J. & Peng Y.(2009). Rapid determination of ppm-order concentration of organophosphorus pesticide based on near-infrared spectroscopy[C]. The 3rd international symposium on sustainability in food production, agriculture and the environment in Asia, Japan103-107.

Chen T. & Chen G. (2007). Identification and Quantitation of Pyrethroid Pesticide Residues in Vegetables by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography /Electrospray Ionizationion Trap Mass Spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry 21, 12, 1848–1854.

Cho S.K. El-Aty A. M. Abd. Jeon H.R. Choi J.H. & Shim J.H. (2008). Comparison of Different Extraction Methods for the Simultaneous Determination of Pesticide Residues in Kiwi Fruit Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Biomedical Chromatography 22, 7, 727-735.

Chung S. W. C. & Chan B. T. P. (2010). Validation and Use of a Fast Sample Preparation Method and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Analysis of Ultra-Trace Levels of 98 Organophosphorus

Pesticide and Carbamate Residues in aTotal Diet Study Involving Diversified Food Types. Journal of Chromatography A,17, 29, 4815-4824.

Cieślik E. Sadowska-Rociek A. Ruiz J. M. M. & Surma-Zadora M. (2011). Evaluation of QuEChERS Method for the Determination of Organochlorine Pesticide Residues in Selected Groups of Fruits. Food Chemistry 125, 2, 773-778.

Commission of the European Communities, Directorate-General for Agriculture (1995). Guideline developed within the Standing Committee on Plant Health with regard to the Applicability of Good Laboratory Practice to Data Requirements according to Annexes II, Part A, and III, Part A, of Council Directive 91/414/EEC,Doc 7109/VI/94-Rev.

Concha-Graña E. Barriada-Pereira M. Turnes-Carou M .I. Muniategui-Lorenzo S. López-Mahía P. & Rodríguez D. P. (2003). Microwave Extraction ofOrganochlorine Pesticides from Soils. Analytical and Bioanalytical Chemistry 375,8, 1225-1228.

Coulet P. R. (1991). In: Biosensor principles and applications, Blum, L. J.; Coulet, P. R. Eds., Marcel Dekker, Inc., New York, pp 1-6.

Council Directive 76/769/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations. Consolidated version.

Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. Data requirements for active substances according to Annexes II and III.

Council Directive 98/24/EC of 7 April 1998 on the protection of the health and safety663 of workers from the risks related to chemical agents at work (fourteenth individual Directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). L 131/11 EN,Official Journal of the European Communities, 5.5.1998.

Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption (Drinking Water Directive). L 330/32 EN, Official Journal of the European Communities 5.12.1998.

Cremisini C. Di Sario S. Mela J. Pilloton R. PalleschiG. (1995). Binding of

acetylcholinesterase to multi wall carbon nanotube-cross-linked chitosan composite for flow-injection amperometric detection of an organophosphorous insecticide.Anal. Chim. Acta 311, 273-280.

Crommentuijn T. Sigim D. De Burijn D. Van Leeuwen K.Van De Plassche E. (2000). Maximum permissible and negligible concentrations for some organic substances and pesticides, J. Environ. Manag. 58, 297-312

Crovetto G. & Vílchez J. L. (2010). UNE-EN ISO/IEC 17025:2005-AccreditedMethod for the Determination of Pesticide Residues in Fruit and Vegetable Samples by LC-MS/MS. Food Additives & Contaminants: Part A 27, 11, 1532-1544.

De Andréa M. M. Papini S. & Nakagawa, L. E. (2001). Optimizing Microwave-Assisted Solvent Extraction (MASE) of Pesticides from Soil. Journal of Environmental Science Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis236.

Dehlawi M. Eldefrawi M. S. Eldefrawi A. T. Anis N.A & Valdes J. J. (1994). Choline derivatives and sodium fluoride protect acetylcholinesterase against irreversible inhibition and aging by DFP and paraoxon. J. Biochem. Toxicol. 9, 261-268.

Diagne R. G. Foster G. D. & Khan S. U. (2002). Comparison of Soxhlet and Microwave-Assisted Extractions for the Determination of Fenitrothion Residues in Beans. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50, 11, 3204-3207.

Di Muccio A. Fidente P. Attard Barbini D. Dommarco R. Seccia S. & Morrica P. (2006).Application of Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography–Mass Spectrometry to the Determination of Neonicotinoid Pesticide Residues in Fruitand Vegetables. Journal of Chromatography A 1108, 1, 1-6.

Directive 2006/118/EC of the European Parliament and of the Council of 12 December 2006 on the protection of groundwater against pollution and deterioration(Groundwater Directive). L 372/19 EN, Official Journal of the European Union, 27.12.2006.

Dong F. Liu X. Cheng L. Chen W. Li L. Qin D. & Zheng Y. (2009). Determination of Metaflumizone Residues in Cabbage and Soil Using Ultra-Performance Liquid Chromatography /ESI-MS/MS. Journal of Separation Science 32, 21, 3692- 3697.

Doong R. A. & Liao P. L. (2001). Determination of Organochlorine Pesticides and Their Metabolites in Soil Samples Using Headspace Solid-Phase Microextraction. Journal of Chromatography A 918, 1,177-188.

Drozdzyński, D. & Kowalska, J. (2009). Rapid Analysis of Organic Farming Insecticides in Soil and Produce Using Ultra-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 394, 8, 2241-2247.

Dumschat C. Müller H. Stein K. & Schwedt G. (1991). Pesticide sensitive ISFET based on enzyme inhibition Anal. Chim.Acta 252, 7-9.

Durand P. & Thomas D. J.(1984). Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 5, 4-5, 51-7.

Đurović R. Đorđević T. Šantrić L.J. Gašić S. & Ignjatović L.J. (2010a). Headspace Solid Phase Microextraction Method for Determination of Triazine andOrganophosphorus Pesticides in Soil. Journal of Environmental Science and Health, Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes 45, 7, 626-632.

Đurović R. Gajić Umiljendić J. Cupać S. & Ignjatović L.J. (2010b). Solid Phase Microextraction as an Efficient Method for Characterization of the Interaction of Pesticides with Different Soil Types. Journal of the Brazilian Chemical Society 21,6, 985-994.

Đurović R. Gajić Umiljendić J. & Đorđević T. (2008). Determination of Atrazine,Acetochlor, Clomazone, Pendimethalin and Oxyfluorfen in Soil by a Solid Phase Microextraction Method. Pesticides & Phytomedicine 23, 4, 265-271. .

Đurović R. & Marković M. (2005). Solid Phase Microextraction in the Analysis ofVinclozolin and Procymidone Residues in Strawbwrries. Pesticides & Phytomedicine 20, 3, 163-169.

Đurović R. Marković M. & Marković D. (2007a). Headspace Solid Phase Microextractionin the Analysis of Pesticide Residues–Kinetics and Quantification Prior to the Attainment of Partition Equilibrium. Journal of the Serbian Chemical Society 72,8-9, 879-887.

Đurović R. Milinović J. Cupać S. & Marković M. (2007b). Solid Phase Microextraction Method for Determination of 34 Pesticides in Soil Samples. The book of abstracts,Euroanalysis XIV, p. 75, Antwerp, Belgium, September 9-14, 2007.

Đurović R. Milinović J. Marković M. & Marković D. (2007c). Headspace Solid Phase Microextraction in Pesticide Residues Analysis: 2. Apple Samples. Pesticides &Phytomedicine 22, 2, 173-176.

Dushenkov V. Nanda Kumar P.B.A. Motto H. & Raskin I. (1995). Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. Environ. Sci. Technol. 29,1239–1245.

Dzantiev B. B. Zherdev A. V. Yulaev M. F. Sitdikov R. A. Dmitrieva N. M. & Moreva I. Y. (1996). Electrochemical immunosensors for determination of the pesticides 2,4-dichlorophenoxyacetic and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acids. Biosensors Bioelectronics 11, 179-185.

El-Yamani H. Tran-Minh C. Abdul M. A. & Chavanne D. (1988). Automated system for pesticides detection .Sensors Actuators 15, 193-198.

El-Yamani, H. Tran-Minh, C. Abdul, M. & Dupont, M. (1987). Réalisation d'un ensemble automatisé pour la mesure de la toxicité des eaux de rivière. J.Françd'Hydrobiol. 18, 67-75.

El-Masry G. Wang N. ElSayed A. & Ngadi M. (2007). Hyperspectral imaging for nondestructive determination of some quality attributes for strawberry. Journal of Food Engineering.81, 98-107.

El-Saeid M. H. & Al-Dosari S. A. (2010). Monitoring of Pesticide residues in Riyadh Dates by SFE, MSE, SFC, and GC Techniques. Arabian Journal of Chemistry 3, 3, 179-186.

Engvall E. & Perlmann P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry 8, 9, 871–874.

Ericsson M. & Colmsjö A. (2000). Dynamic Microwave-Assisted Extraction. Journal of Chromatography A 877, 1-2, 141-151.

EUROPEAN COMMISSION (2010).Directorate General Health and Consumer Protection Guidance document on pesticide residue analytical methods SANCO/825/00 rev. 8.16 16/11/2010.

European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection (2010). Guidance Document on pesticides analytical methods.

European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection (2002). Guidance Document on Aquatic Ecotoxicology in the context of the Directive 91/414/EEC, SANCO/3268/2001.

European Commission, Directorate General Health and Consumer Protection (2006). Guidance Document for the setting and application of acceptable operator exposure levels (AOELs), SANCO/7531/2006.

European Committee for Standardization (CEN) EN 12393-2:2008. Non-fatty foods.(2008). Multiresidue methods for the gas chromatographic determination of pesticide residues. Methods for extraction and clean-up.

European Committee for Standardization (CEN) EN 12393-3:2008. (2008). Non-fatty foods. Multiresidue methods for the gas chromatographic determination of pesticide residues.648 Determination and confirmatory tests.

European Committee for Standardization (CEN) EN 15637:2008. (2008).Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using LC-MS/MS following methanol635 extraction and clean-up using diatomaceous earth.

European Committee for Standardization (CEN) EN 15662:2008.(2008). Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/M following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE QuEChERS-method.

Falqui-cao C. Wang Z. Urruty L. Pommier J.J. & Montury M. (2001). Focused Microwave Assistance for Extracting Some Pesticide Residues From Strawberries Into Water Before Their Determination by SPME/HPLC/DAD. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 11, 5092-5097.

Fernandez-Alvarez M. Llompart M. Pablo Lamas J. Lores, M. Garsia-Jares C. Cela R. &Dagnac T. (2008). Simultaneous Determination of Traces of Pyrethroids,Organochlorines and Other Main Plant Protection Agents in Agricultural Soils by Headspace Solid-Phase Microextraction–Gas Chromatography. Journal of Chromatography A, 1188, 2, 154-163.

Fernández Moreno J. L. Garrido Frenich A. Plaza Bolaños P. & MartínezVidal J. L. (2008).Multiresidue Method for the Analysis of More Than 140 Pesticide Residues in Fruits and Vegetables by Gas Chromatography Coupled to Triple Quadruple Mass Spectrometry. Journal of Mass Spectrometry 43, 9, 1235-1254.

Fernández M. Picó Y. & Mañes J. (2000). Determination of Carbamate Residues in Fruits and Vegetables by Matrix Solid-Phase Dispersion and

Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A 871, 1, 43-56.

Fernando J. C. Rogers K. R. Anis N. A. Valdes J.J. Thompson R. G. Eldefrawi A. T. & Eldefrawi M. E. (1993). Rapid detection of ant cholinesterase insecticides by a reusable light addressable potentiometric biosensor J. Agric. Food Chem. 41, 511-516.

Fielding, M., Barcelo, D. Helweg, A. Galassi, S. Torstensson, S. Van Zoonen, P. Wolter, R.& Angeletti G. (1991). Pesticides in Ground and Drinking Water, EU, Water Pollution Research Report 27.

Filho A. M. Santos F. N. & De Paula Pereira P. A. (2010). Development, Validation and Application of a Methodology Based on Solid-Phase Microextraction Followed by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (SPME/GC–MS) for the Determination of Pesticide Residues in Mangoes. Talanta 81, 1-2, 346-354.

Font N. Hernández F. Hogendoorn E. A. Baumann R. A. & van Zoonen P. (1998).Microwave-Assisted Solvent Extraction and Reversed-Phase Liquid Chromatography–UV Detection for Screening Soils for Sulfonylurea Herbicides. Journal of Chromatography A 798, 1-2, 179-186.

Frost S.P. Dean J.R. Evans K.P. Harradine K. Cary C.Comber M.H.I. (1997). Extraction of hexaconazole from weathered soils: a comparison between Soxhlet extraction,MAE, SFE and ASE. Analyst 122, 895–898.

Fuentes E. Báez M. E. & Labra R. (2007). Parameters Affecting Microwave-Assisted Extraction of Organophosphorus Pesticides from Agricultural Soil. Journal of Chromatography A 1169, 1-2, 40-46.

Fytianos K. Raikos N. Theodoridis G. Velinova Z. & Tsoukali H. (2006). Solid Phase Microextraction Applied to the Analysis of Organophosphorus Insecticides in Fruits. Chemosphere 65, 11, 2090–2095.

Gambacorta G. Faccia M. Lamacchia C. Di Luccia A. & La Notte E. (2005). Pesticide residues in tomato grown in open field. Food control. 16, 629-632.

Gan J. Papiernik S. K. Koskinen W.C. & Yates S. R. (1999). Evaluation of Accelerated Solvent Extraction (ASE) for Analysis of Pesticide Residues in Soil. Environmental Science & Technology 33,18, 3249-3253.

Ganzler K. Salgó A. & Valkó K. (1986). Microwave Extraction: A Novel Sample Preparation Method for Chromatography. Journal of Chromatography 371, 299-306.

Garciá-López M. Canosa P. & Rodríguez I. (2008). Trends and Recent Applications of Matrix Solid-Phase Dispersion. Analytical and Bioanalytical Chemistry 391, 3, 963-974.

Garrido Frenich A. Martínez Salvador I. Martínez Vidal J. L. & López-López T. (2005).Determination of Multi Class Pesticides in Food Commodities by Pressurized Liquid Extraction Using GC–MS/MS and LC–MS/MS. Analytical and Bioanalytica chemistry 383, 7-8, 1106-1118.

Ghindilis A. L. Krishnan R. Atanasov P. &Wilkins E. (1997) Flow-through amperometric immunosensor: fast 'sandwich' scheme immunoassay .Biosensors Bioelectronics12, 415-423.

Ghindilis A.L. Morzunova T.G. Barmin A.V. & Kurochkin I.N.(1996). Potentiometric biosensors for cholinesterase inhibitor analysis based on madiatorless bioelectrocatalysis. Biosensors & Bioelectronics 11, 9, 873-880.

Gilbert-López B. García-Reyes J. F. & Molina-Díaz A. (2009). Sample Treatment and Determination of Pesticide Residues in Fatty Vegetable Matrices: A Review. Talanta 79, 2, 109-128.

Gilbert-López, B. García-Reyes, J. F. Lozano, A. Fernández-Alba A. R. & Molina-Díaz A.(2010). Large-Scale Pesticide Testing in Olives by Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry Using Two Sample Preparation Methods Based on Matrix Solid-Phase Dispersion and QuEChERS. Journal of Chromatography A, 1217,39, 6022-6035.

Goncalves C. Esteves da Silva J.C.G. Alpendurada, M.F. (2006). Chemometric interpretation of pesticide occurrence in soil samples from an intensive horticulture area in north Portugal. Anal. Chim. Acta 560, 164-169.

González-Rodríguez R. M. Rial-Otero R. Cancho-Grande B. & Simal-Gándara J. (2008).Determination of 23 Pesticide Residues in Leafy Vegetables Using Gas Chromatography–Ion Trap Mass Spectrometry and Analyte Protectants. Journal of Chromatography A 1196-1197,1-2, 100-109.

Guilbault G. G. Hock B. and Schmid R.(1992). A piezoelectric

immunobiosensor for atrazine in drinking water. Biosensors Bioelectronics. 7, 411-419.

Hammock B. D. &Mumma R. O. (1980). In: Pesticide Analytica Methodology, Harvey, J.; Zweig, G.; Eds., ACS Symp. Series, Washington, DC, 136, 321-352.

Hanrahan G. D. & Patil J. W. (2004). Electrochemical sensors for environmental monitoring: design, development and applications. J. Environ. Monit. 6, 657.

Harald H. Ravid B. Israel S. & Angelika A. (2007). Fast optical assessment of pesticide coverage on plants [J]. Analytica Chimica Acta 596, 1-8.

Herbert P. Morais S. Paíga P. Alves A. & Santos L. (2006). Development and Validation of a Novel Method for the Analysis of Chlorinated Pesticides in Soils Using Microwave-Assisted Extraction–Headspace Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytica chemistry 384, 3, 810-816.

Hoogerbrugge R. Molins C. & Baumann R. A. (1997). Effects of Parameters on Microwave Assisted Extraction of Triazines from Soil: Evaluation of an Optimization Trajectory. Analytica Chimica Acta 348, 1-3, 247-253.

Hu J. Deng Z. Liu C. & Zheng Z. (2010). Simultaneous Analysis of Herbicide Metribuzinand Quizalofop-p-ethyl Residues in Potato and Soil by GC-ECD. Chromatographia72, 7/8, 701–706.

Ivnitskii D. M. &Rishpon J. A (1994). Potentiometric *biosensor* for pesticides based on the thiocholine (III) reaction, Biosensors Bioelectronics 9, 569-576.

Jfgarcia R. LlorentMart E.J. Mnez P.O. Barrales A. &Molina D.(2004). Multiwavelengthfluorescence based opt sensor for simultaneous determination of fuberidazole,carbaryl and benomyl [J]. Talanta 64, 742-749.

Jingjing C. Yongyu L. Jianhu W. Yankun P. (2009). Rapid determination of ppm-order concentration of organophosphorus pesticide based on near-infrared spectroscopy[J]. Food safety & Quality Detection Technology1, 1,45-50. (In Chinese with English abstract).

Jockers R. Bier F. F. & Schmid R. D. (1993). Specific binding of photosynthetic reaction centres to herbicide-modified grating couplers Anal. Chim. Acta 280, 53-59.

JRC (2009). Technical Notes for Guidance: Risk Characterization of local effects in the absence of systemic effects. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, Ispra, Italy.

Juan-García A. Picó Y. & Font G. (2005). Capillary Electrophoresis for Analyzing Pesticides in Fruits and Vegetables Using Solid-Phase Extraction and Stir-BarSorptive Extraction. Journal of Chromatography A 1073, 1-2, 229–236.

Kaihara A. Yoshii K. Tsumura Y. Ishimitsu S. & Tonogai Y. (2002). Multi-Residue Analysis of 18 Pesticides in Fresh Fruits, Vegetables and Rice by Supercritical Fluid Extraction and Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. Journal of Health Science 48, 2, 173-178.

Kaihara A. Yoshii K. Tsumura Y. Nakamura Y. Ishimitsu S. & Tonogai Y. (2000). Multiresidue Analysis of Pesticides in Fresh Fruits and Vegetables by Supercritical Fluid Extraction and HPLC. Journal of Health Science 46, 5, 336-342.

Kaipper B. I. A. Madureira L. A. S. & Corseuil H. X. (2001). Use of Activated Charcoal in a Solid-Phase Extraction Technique for Analysis of Pesticide Residues in Tomatoes. Journal of the Brazilian Chemical Society 12,4, 514-518.

Kalab T. Skladal P. (1995). A disposable amperometric immunosensor for 2,4 dichlorophenoxyacetic acid Anal. Chim. Acta 304, 361-368.

Kannan K. Ridal J. & Struger J. (2005). Pesticides in the Great Lakes, Hdb. Env. Chem., 5, DOI 10.1007=698_5_041, Springer-Verlag, Berlin.

Karube I. Matsunaga T. & Suzuki S. (1988). J. Solid-Phase Biochem Riedel , K. Renneberg, R. Kuhn , M. Scheller, F. Applied Microb. Biotechnol. 28, 316-318.

Karube I. Yokoyama K. Sode K. & Tamiya E. (1989). Microbial sensor for preliminary screening of mutagens utilizing a phage induction test. Anal. Lett. 22, 791-801.

Keith L.H. (1996). Principles of Environmental Sampling, The American Chemical Society, Washington, USA.

Khanmohammadi M. Arment S. Garrigues S. &de la Guardia M. (2008).

Mid-and near infrared determination of metribuzin in agrochemicals. Journal of Vibrational Spectroscopy. 46, 82-88.

Kin C. M. & Huat T. G. (2010). Headspace Solid-Phase Microextraction for the Evaluation of Pesticide Residue Contents in Cucumber and Strawberry After Washing Treatment. Food Chemistry 123, 3,760–764.

Kmellár B. Fodor P. Pareja L. Ferrer C. Martínez-Uroz M. A. Valverde, A. &Fernandez-Alba A. R. (2008). Validation and Uncertainty Study of a Comprehensive List of 160 Pesticide Residues in Multi-Class Vegetables by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A1215, 1-2, 37-50.

Kmellár B. Abrankó L. Fodora P. & Lehotay S. J. (2010). Routine Approach to Qualitatively Screening 300 Pesticides and Quantification of Those Frequently Detected in Fruit and Vegetables Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). Food additives and contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure and risk assessment 27, 10, 1415-1430.

Koesukwiwat U. Lehotay S. J. Miao S. & Leepipatpiboon N. (2010). High Throughput Analysis of 150 Pesticides in Fruits and Vegetables Using QuEChERS and Low-Pressure Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A 1217, 43, 6692-6703.

Konstantinou I.K. Hela D.G. & Albanis T.A. (2006). The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels, Environ. Pollut. 141, 555.

Kristenson E. M. Brinkman U. A. Th. & Ramos L. (2006). Recent Advances in Matrix Solid-Phase Dispersion. Trends in Analytical Chemistry 25,2, 96-111.

Kruve A. Künnapas A. Herodes K. & Leito I. (2008). Matrix Effects in Pesticide Multi-Residue Analysis by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A 1187, 1-2, 58-66.

Kulys J. & Kadziauskiene K. (1980). Yeast BOD sensor. Biotechnol. Bioeng. 22, 221-226.

Kumaran S. & Morita M. (1995). Application of a cholinesterase biosensor to screen for organophosphorus pesticides extracted from soil.Talanta 42, 649-655.

La Rosa C. Pariente F. Hernandez L. & Lorenzo E. (1995). Determination of organophosphorus and carbamic pesticides with an acetylcholinesterase amperometric biosensor using 4-aminophenyl acetate as substrate Anal.Chem. Acta 295, 273-282.

La Rosa C. Pariente F. Hernandez L. & Lorenzo E. (1995). Amperometric flow-through biosensor for the determination of pesticides. Anal.Chem. Acta 308, 129-136.

Lai S. Wang F. &Deng Y.(2006). Research situation and development of pesticide residues analysis technology [J]. Guangdong Agricultural Science, (1): 76-77.(in Chinese with English abstract).

Lambropoulou D. A. & Albanis T. A. (2003). Headspace Solid-Phase Microextraction in Combination with Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Rapid Screening of Organophosphorus Insecticide Residues in Strawberries and Cherries. Journal of Chromatography A 993, 1-2, 197–203.

Lambropoulou D. A. & Albanis T. A. (2007). Methods of Sample Preparation for Determination of Pesticide Residues in Food Matrices by Chromatography–Mass Spectrometry-Based Techniques: a Review. Analytical and Bioanalytical Chemistry 389, 6, 1663-1683.

Langenfeld J. J. Hawthorne S. B. Miller D. J. & Pawliszyn J. (1994). Role of Modifiers for Analytical-Scale Supercritical Fluid Extraction of Environmental Samples. Analytical Chemistry 66, 4, 909-916.

Lehnik-Habrink, P.; Hein, S.; Win, T.; Bremser, W. & Nehls, I. (2010). Multi-Residue Analysis of PAH, PCB, and OCP Optimized for Organic Matter of Forest Soil. The Journal of Soils and Sediments 10, 8, 487–1498.

Lehotay S. J. (2007). Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning With Magnesium Sulfate: Collaborative Study. The Journal ofAOAC International, 90, 2, 485-520.

Lehotay S. J. de Kok A. Hiemstra M. & van Bodegraven P. (2005). Validation of a Fastand Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits.

Lehotay S. J. Mastovska K. & Lightfield A. R. (2005a). Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. The Journal of AOAC International 88, 2, 615-629.

Lehotay S. J. Mastovska K. & Yun S. J. (2005b). Evaluation of Two Fast and Easy Methods for Pesticide Residue Analysis in Fatty Food Matrixes. The Journal of AOAC International 88, 2, 630-638.

Leroy B. Lambotte S. Dotreppr O. Lecocq H. Istasse L. & Clinquart A. (2003). Prediction of technological and organoleptic properties of beef longissimus thoracis from near-infrared reflection and transmission spectra. Meat Science. 66, 45-54.

Li X. Jiang Y. Shan W. & Pan C. (2010). Dissipation and Residues Detection of Dioctyldiethylenetriamine Acetate in Rice Plant and Environment by Quechers Method and Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 84, 5, 596-601.

Li Z. Y. Zhang Z. C. Zhou Q. L. Gao R. Y. & Wang Q. S. (2002). Fast and Precise Determination of Phenthoate and its Enantiomeric Ratio in Soil by the Matrix Solid-Phase Dispersion Method and Liquid Chromatography. Journal of Chromatography 15, 1,17-25.

Lin Q. B. Shi H. J. & Xue P. (2010). MSPD–GC–MS–MS Determination of Residues of 15Organic Nitrogen-Containing Pesticides in Vegetables. Chromatographia, in press.

Ling Y. C. & Huang I. P. (1995). Multi-Residue Matrix Solid-Phase Dispersion Method for the Determination of Six Synthetic Pyrethroids in Vegetables Followed by Gas Chromatography With Electron Capture Detection. Journal of Chromatography A 695, 1, 75-82.

Lopez-Avila V. Young R. & Beckert W. F. (1994). Microwave-Assisted Extraction of Organic Compounds from Standard Reference Soils and Sediments. Analytical Chemistry, 66,7, 1097-1106.

Lopez-Avila V. Young R. Benedicto J. Ho P. Kim R. & Beckert F. (1995). Extraction of Organic Pollutants from Solid Samples Using Microwave Energy, Analytical Chemistry, 67, 13,2096-2102.

Luo L. Shao B. & Zhang J. (2010). Pressurized Liquid Extraction and Cleanup Procedure for the Determination of Pyrethroids in Soils Using Gas Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. Analytical Sciences 26, 4, 461-465.

Lou Z. & Huang S. (2008). Detecting of pesticide residue in vegetable using fluorescence technique [J]. Acta Laser Biology Sinica, 17, 6, 657-660. (in Chinese with English abstract).

Luypaert J. ang M.H. &Massart D.L. (2003). Feasibility study for the use of near infrared spectroscopy in the qualitative and quantitative analysis of green tea, Camellia sinensis (L.). Analytica Chimica Acta. 478, 303-312.

Maloschik E. Ernst A. Hegedûs G. Darvas B. Székacs A. (2007). Monitoring water-polluting pesticides in Hungary, Microchem. J. 85, 88.

Marchese S. Perret . Gentili A. Curini R. & Marino A. (2001). Development of a Method Based on Accelerated Solvent Extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for Determination of Arylphenoxypropionic Herbicides in Soil. Rapid Communications in Mass Spectrometry 15, 6, 393-400.

Marco M. P. & Barceló D. (1996). Environmental applications of analytical biosensors. Meas. Sci. Technol. 7, 1547-1562.

Marco M. P. Gee S. & Hammock B. D.(1995). Immunochemical Techniques for Environmental Analysis: I. Immunosensors Trends Anal. Chem. 14, 341-350.

Marković M. Cupać S. Đurović, R. Milinović J. & Kljajić P. (2010). Assessment of Heavy Metal and Pesticide Levels in Soil and Plant Products From Agricultural Area of Belgrade, Serbia. Archives of Environmental Contamination and Toxicol. 58, 2, 341-351.

Marty J. L. Mionetto N. Lacorte S. Barceló D. Durand P. &Thomas D. (1984). J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 5, 51-57.

Marty J. L. & Noguer T. (1993). Enzyme sensors for the detection of pesticides. Analysis 21, 231-233.

Marty J. L. Olive D. &Asano Y. (1996). Environ. Technol. 18,333-337.

Marty J. L. Sode K. &Karube I.(1992). Biosensor for detection of organophosphate and carbamate insecticides. Electroanal. 4, 249-252.

McArdle, F. A. & Persaud, K. C. (1993). Development of an enzyme-based biosensor for atrazine detection. Analyst, 118, 419-423.

Meulenberg, E. P. Mulder, W. H. &Stoks P. G. (1995). Environ. Sci.Technol. 29, 553-561.

Mingelgrin, U. & Gerstl, Z. (1983). Reviews and Analysis: Reevaluation of Partitioning of Nonionic Chemicals Adsorption in Soils. Journal of Environmental Quality. 12, 1-11.

Mionetto N. Marty J.L. &Karube I.(1994). Biosensors Bioelectronics 9, 463-470.

Mionetto N. Rouillon R. &Marty J. L.Z. (1992). Inhibition of acetylcholinesterase by organophosphorus and carbamates compounds. Studies on free and immobilized enzymes. Wasser-Abwasser-Forsch. 25, 171-174.

Minunni, M. &Mascini M.(1993). Detection of Pesticide in Drinking-Water Using Real-Time Biospecific Interaction Analysis. Anal. Lett. 26, 1441-1460.

Molins C. Hogendoorn E. A. Dijkman E. Heusinkveld H. A. G. & Baumann R. A. (2000). Determination of Linuron and Related Compounds in Soil by Microwave-AssistedSolvent Extraction and Reversed-Phase Liquid Chromatography with UVDetection. Journal of Chromatography A 869, 1-2, 487-496.

Montes R. Canosa P. Pablo Lamas J. Piñeiro A. Orriols I. Cela R. & Rodríguez I. (2009). Matrix Solid-Phase Dispersion and Solid-Phase Microextraction Applied to Study the Distribution of Fenbutatin Oxide in Grapes and White Wine. Analytical and Bioanalytical Chemistry 395, 8, 2601-2610.

Moreda-Piñeiro J. Alonso-Rodríguez E. López-Mahía P. Muniategui-Lorenzo S.; Prada-Rodríguez D. Romarís-Hortas V. Míguez-Framil M. Moreda-Piñeiro A. &Bermejo-Barrera P. (2009). Matrix Solid-Phase Dispersion of Organic Compounds and its Feasibility for Extracting Inorganic and Organometallic Compounds. Trends in Analytical Chemistry 28, 1, 110-116.

Motohashi N. Nagashima H. & Párkányi C. (2000). Supercritical Fluid Extraction for the Analysis of Pesticide Residues in Miscellaneous Samples. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 43, 1-3, 313–328.

Müller J.F., Duquesne S. Ng J. (2000). Pesticides in sediments from Queensland irrigation channels and drains. Mar. Pollut. Bull. 41, 294.

Munoz de la Pena M.C. &Mahedero A.B.(2002). High-performance liquid chromatographic determination of phenylureas by photochemically-induced fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography A 950, 287-291.

Namiesnik J. Zabiega B. Kot-Wasik, A. Partyka M. Wasik A. (2005). Passive sampling and=or extraction techniques in environmental analysis: a review. Anal. Bioanal. Chem.381, 279-301.

Navarro M. Picó Y. Marín R. & Mañes J. (2002). Application of Matrix Solid-Phase Dispersion to the Determination of a New Generation of Fungicides in Fruits and Vegetables. Journal of Chromatography A, 968, 1-2, 201-209.

Nelson, J. O. Karu A. E. &Wong R. B. (1995). In: Immunoanalysis of Agrochemicals, Emerging Technologies, ACS Symp. Series,ACS, Washington DC, Vol. 586.

Ngeh-Ngwainbi J. Foley P. H. Kuan S. S. &Guilbault G. G. (1986). Parathion Antibodies on. Piezoelectric Crystals J. Am. Chem. Soc. 108, 5444-5447.

Nguyen T. D. Yun M. Y. & Lee G. H. (2009). A Multiresidue Method for the Determination of 118 Pesticides in Vegetable Juice by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 21, 10095-10101.

Noguer T. & Marty J. L. (1997). High sensitive bienzymic sensor for the detection of dithiocarbamate fungicides. Anal. Chim. Acta 347, 63-70.

Nollet L.M.L. &Rathore H.S. (2009). Handbook of Pesticides: Methods of Pesticide Residues Analysis CRC Press; 1 edition .

Norman K. & Panton S. (2001). Supercritical Fluid Extraction and Quantitative Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Wheat and Maize Using Gas Chromatography with Fame Photometric and Mass Spectrometric Detection. Journal of Chromatography A 907, 1-2, 247–255.

Nyamsi Hendji A. M. Jaffrezic-Renault N. Martelet C.ClechetP. hul'ga, A. A. Strikha V. I. Netchiporuk L. I.Soldatkin A. P. &Wlodarski W. B.(1993). Anal. Chim. Acta 281,3-11.

OECD (2007). Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 72 and Series on Pesticides No. 39. ENV/JM/MONO)17.

Okihashi M. Kitagawa Y. Akutsu K. Obana H. & Tanaka Y. (2005). Rapid Method forthe Determination of 180 Pesticide Residues in Foods by Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Flame Photometric Detection. Journal of Pesticide Science 30, 4, 368–377.

Oldal B., et al.,(2006). Pesticide residues in Hungarian soils, Gendarme, 135, 163.

Ono Y. amasaki T. Nishina T. & Tobino T. (2006). Pesticide Multiresidue Analysis of 303 Compounds Using Supercritical Fluid Extraction. Analytical Science 22,11,1473-1476.

Onuska F. I. & Terry K. A. (1993). Extraction of Pesticides from Sediments Using a Microwave Technique. Chromatographia 36, 1, 191-194.

Paíga P. Morais S. Correia M. Alves A. & Delerue-Matos C. (2008). A Multiresidue Method for the Analysis of Carbamate and Urea Pesticides from Soils by Microwave-Assisted Extraction and Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection. Analytical Letters 41, 10, 1751-1772.

Paíga P. Morais S. Correia M. Delerue-Matos C. & Alves A. (2009). Determination of Carbamate and Urea Pesticide Residues in Fresh Vegetables Using Microwave-Assisted Extraction and Liquid Chromatography. International Journal of Environmental Analytical Chemistry 89, 3, 199-210.

Pandar P. Rawson D. M.(1993). Biosensors for the detection of pesticides Environ. Toxicol. Water Qual. An Int. J. 8, 323-333.

Pang G.F. Fan C.L. Liu Y.M. Cao Y.Z. Zhang J.J. Fu B.L. Li X.M. Li Z.Y. & Wu Y.P. (2006). Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Addit Contam. 23, 8,777-810.

Pang G.F.Fan C.L. Liu Y.M. Cao Y.Z. Zhang J.J. Li X.M. Li Z.Y. Wu Y.P. &Guo T.T. (2006). Determination of residues of 446 pesticides in fruits and vegetables by three-cartridge solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J AOAC Int. 2006 May-Jun 89,3, 740-71.

Pang G. F.Fan C. L. Liu Y.M. CaoY. Z. Zhang J. J. Li X. M. Li Z. Y. & Guo T. T.(2006). Determination of Residues of 446 Pesticides in Fruits and Vegetables by Three-Cartridge Solid-Phase Extraction-Gas Chromatography- Mass Spectrometry and Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry. The Journal of AOAC International 89, 3, 740-771.

Paré J. R. J. & Belanger J. M. R. (1994). Microwave-Assisted Process (MAP): a New Tool forthe Analytical Laboratory. Trends in Analytical Chemistry 13, 4, 176-184

Pariente, F. La RosaC. Galan F. Hernandez L. & Lorenzo E. (1996). Enzyme support systems for biosensor applications based on gold-coated nylon meshes. Biosensors Bioelectronics 11, 1115-1128.

Parrilla Vázquez P. Mughari A. R. & Martínez Galera M. (2008). Solid-Phase Microextraction (SPME) For the Determination of Pyrethroids in Cucumber and Watermelon Using Liquid Chromatography Combined With Post-Column Photochemically Induced Fuorimetry Derivatization and Fluorescence Detection. Analytica Chimica Acta 607, 1, 74-82.

Pawliszyn J. (1997). Solid phase microextraction – theory and practice. Wiley-VCH, New York,USA.

Peng Y. & Lu. R. (2006). Prediction of apple fruit Firmness and soluble solids content using characteristics of multispectral scattering images [J]. Journal of Food Engineering 82, 142-152.

Peng Y. & Lu R. (2008). Analysis of spatially resolved hyperspectral scattering images for assessing apple fruit firmness and soluble solids content. Postharvest Biology and Technology. 48,52-62.

Peng, Y. & Wu J. H. (2008). Hyperspectral scattering profiles for prediction of beef tenderness. ASABE Paper No. 080004. Rhode Island convention center, Rhode, USA.

Peng Y. Zhang J. & Wu J.H. (2009). Hyperspectral scattering profiles for prediction of the microbial spoilage of beef. SPIE Paper No. 7315-25, Orlando, Florida, USA.

Pérez Pita M. T. Reviejo A. J. Manuel de Villena F. J. & Pingarron J. M. (1997). Amperometric selective biosensing of dimethyl- and diethyldithiocarbamates based on inhibition processes in a medium of reversed micelles. Anal. Chim. Acta 340, 89-97.

Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANCO/10684/2009.

Pinto J. S. S. & Lanças F. M. (2009). Design, Construction and Evaluation of a Simple Pressurized Solvent Extraction System. Journal of the Brazilian Chemical Society 20, 5, 913-917.

Pous P. José Ruíz M. Píco Y. & Font G. (2001). Determination of Imidacloprid, Metalaxyl,Myclobutanil, Propham, and Thiabendazole in Fruits and Vegetables by Liquid Chromatography–Atmospheric Pressure Chemical Ionization–Mass Spectrometry. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 371, 2, 182-189.

Pritam S. & Mukherjee I. (2010). Substitution of Toxicologically Critical Solvents in the Residue Analysis of Acetamiprid: Towards Green Chemistry. Toxicological and Environmental Chemistry 92, 1, 13-19.

Pylypiw H. M. Jr. Arsenault T. L. Thetford C. M. & Mattina M. J. I. (1997). Microwave Extraction: A Novel Sample Preparation Method for Chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45, 9, 3522-3528

Quan C. Li S. Tian S. Xu H. Lin A. & Gu L. (2004). Supercritical Fluid Extraction and Clean-Up of Organochlorine Pesticides in Ginseng. Journal of Supercritical Fluids 31, 2, 149–157.

Que H. S. (1993). Biological Monitoring: An Introduction, Wiley & Sons, New York.

Ranz A. Maier E. Motter H. & Lankmayr E. (2008). Extraction and Derivatization of Polar Herbicides for GC-MS Analyses. Journal of Separation Science 31, 16-17, 3021-3029

Rashid A. Nawaz S. Barker H. Ahmad I. & Ashraf M. (2010). Development of a Simple Extraction and Clean-Up Procedure for Determination of Organochlorine Pesticides in Soil Using Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A 1217, 17, 2933-2939.

Raskin I. & Ensley B. D. (2000). Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up The Environment, Wiley, New York M. VIDALI

Ravelo-Pérez L. M. Hernández-Borges J. Borges-Miquel T. M. & Rodríguez-Delgado M.A. (2008). Pesticide Analysis in Tomatoes by Solid-Phase Microextraction and Micellar Electrokinetic Chromatography. Journal of Chromatography A 1185, 1, 151–154.

Rawson D. M. Willner A. J. & Cardosi M. (1987). Toxicity Assessment: Int. Quart. 2, 325-340.

Rawson D. M. Willmer A. J. & Turner A. P. F. (1989). Whole-cell *biosensors* for environmental monitoring. Biosensors 4, 299-311.

Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.

Renee D. J. Gary A. C. &Karl S. B. (1999). Excitation- emission matrix fluorescence based determination of carbamate pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons [J].Analytica Chimica Acta 397, 61-72.

Richter B. E. Hoefler F. & Linkerhaegner M. (2001). Determining

Organophosphorus Pesticides in Foods Using Accelerated Solvent Extraction With Large Sample Sizes. LC-GC North America 19, 4, 408-412.

Richter B. E. Jones B. A. Ezzell J. L. Porter N. L. Avdalovic N. & Pohl C. (1996).Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation. Analytical Chemistry 68, 6, 1033-1039.

Riedel K. Lange K. P. Stein H. J. Kuhn M. Ott P. & Scheller F. (1990). A Microbial Sensor for BOD. Water Research 24, 883-887.

Ripoll G. P. Alberti B. Panea J.L. Olleta & C. Sanudo (2008). Near-infrared reflectance spectroscopy for predicting chemical, instrumental and sensory quality of beef. Meat Science. 80, 697-702.

Rissato S. R. Galhiane M. S. Apon B. & Arruda M. (2005). Multiresidue Analysis of Pesticides in Soil by Supercritical Fluid Extraction /Gas Chromatography with Electron-Capture Detection and Confirmation by Gas Chromatography–MassSpectrometry. Journal of Agriculture and Food Chemistry 53, 1, 62–69.

Rissato S. R. Galhiane M. S. de Souza A. G. & Apon B. M. (2005). Development of a Supercritical Fluid Extraction method for simultaneous determination of organophosphorus, organohalogen, organonitrogen and pyretroids pesticides in fruit and vegetables and its comparison with a conventional method by GC-ECD and GC-MS. J. Braz. Chem. Soc. 16, 1038-1047

Rodrigues S. A. Caldas S. S. & Primel E. G. (2010). A Simple, Efficient and Environmentally Friendly Method for the Extraction of Pesticides From Onion by Modern Extraction Techniques for Matrix Solid-Phase Dispersion With Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometric Detection. Analytica Chimica Acta 678,1, 82-89.

Rogers K.R. Foley M. Alter S. Koga P. & Eldefrawi M.(1991). Light addressable potentiometric biosensor for the detection of anticholinesterases Anal. Lett. 24, 191-198.

Rouillon R. Sole M. Carpentier R. & Marty J. (1995). Immobilization of thylakoid membranes in polyvinylalcohol for the detection of herbicides. Sensors Actuators B 26-27, 477-479.

Rouillon, R. Tocabens, M. & Marty, J. L. (1994). Stabilization of chloroplasts by entrapment in polyvinyl alcohol bearing styrylpyridinium groups. Anal. Lett. 27, 2239-2248.

Sadik O.A. & Van Emon J. M. (1996). Applications of Electrochemical Immunosensors for Environmental Monitoring. Biosensors Bioelectronics, 11 (8), i-xi.

Sakamoto M. & Tsutsumi T. (2004). Applicability of Headspace Solid-Phase Microextraction to the Determination of Multi-Class Pesticides in Waters. Journal of Chromatography A 1028, 1, 63-74.

Salan H. & Israel S.(1998). A sensitive fluorescence probe for DDT-type pesticides [J].Analytica Chimica Acta 368, 77-82.

Salan H. & Israel S. (2000). In situ fluorimetric determination of pesticides on vegetables [J]. Analytica Chimica Acta 405, 9-15.

Sandberg R. G. Van Houten L. J. Schwartz J. L. BiglianoR. P. Dallas S. M. Silvia J. C. Cabelli M. A. & Narayanswamy V. (1992). ACS Symp. Ser. 511, 81-88.

Santalad A. Zhou L. Shang F. Fitzpatrick D. Burakham R. Srijaranai S. Glennon J.D.& Luong J. H. T. (2010). Micellar Electrokinetic Chromatography With Amperometric Detection and Off-Line Solid-Phase Extraction for Analysis of Carbamate Insecticides. Journal of Chromatography A 1217, 32, 5288-5297.

Sanusi A. Guillet V. & Montury M. (2004). Advanced Method Using Microwaves and Solid-Phase Microextraction Coupled With Gas Chromatography-Mass Spectrometry forthe Determination of Pyrethroid Residues in Strawberries. Journal of Chromatography A 1046, 1-2, 35-40.

Sapozhnikova Y. Bawardi O. &Schlenk D. (2004). Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA, Chemosphere 55, 797.

Saranwong S. & Kawano S. (2005). Rapid determination of fungicide contaminated on tomato surface. Journal of Near infrared spectrosc. 13,169-175.

Schenck F. J. Lehotay S. J. & Victor V. (2002). Comparison of Solid-Phase Extraction Sorbents for Cleanup in Pesticide Residue Analysis of Fresh Fruits and Vegetables. Journal of Separation Science 25, 14, 883–890.

Schenzler C. & Thier HP.(2001). European standardization of methods for pesticide residue analysis in foods--current status. Food Addit Contam. 18, 10,875-9.

Schnoor J.L. (1992). Fate of Pesticides and Chemicals in the Environment, John Wiley & Sons, New York, USA.

Seki A. Ortéga F. & Marty J. L. (1996). Enzyme sensor for the detection of herbicides inhibiting acetolactate synthase. Anal. Lett. 29, 259-1271.

Sharif Z. Che Man Y. B. Abdul Hamid N. S. & Keat C. C. (2006). Determination of Organochlorine and Pyrethroid Pesticides in Fruit and Vegetables Using Solid Phase Extraction Clean-up Cartridges. Journal of Chromatography A, 1127, 1, 254-261.

Shen X. Cai, J. Gao Y. & Su Q. (2006). Determination of Organophosphorus Pesticides in Soil by MMSPD-GC-NPD and Confirmation by GC-MS. Chromatographia, 64,1-2, 71-77.

Shen Z. Cai J. Gao Y. Zhu X. & Su Q. (2005). A New Matrix Solid Phase Dispersion-Accelerate Solvent Extraction-Gas Chromatographic Method for Determination ofOrganochlorine Pesticides Residues in Soil. Chinese Journal of Analytical Chemistry 33, 9, 1318-1320.

Shen X. Su Q. Zhu X. & Gao Y. (2007). Determination of Pesticide Residues in Soil by Modified Matrix Solid-Phase Dispersion and Gas Chromatography. Annali diChimica, 97, 8, 647-654.

Shengye J. Zhaochao X. Jiping C. Xinmiao L. Yongning W. & Xuhong Q. (2004). Determination of organophosphate and carbonate pesticides based on enzyme Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology inhibition using a pH-sensitive fluorescence probe [J]. Analytica Chimica Acta 523, 117-123.

Sherry, J. P. (1992). Environmental chemistry: the immunoassay option. Crit. Rev. Anal. Chem. 23, 4, 217-300.

Shi C. Gui W. Chen J. & Zhu G. (2010). Determination of Oxadiargyl Residues in Environmental Samples and Rice Samples. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 84, 2, 236-239.

Simplício A. & Boas L. (1999). Validation of a Solid-Phase Microextraction Method for the Determination of Organophosphorus Pesticides in Fruits and Fruit Juice. Journal of Chromatography A 833, 1, 35-42.

Singh S. B. Foster G. D. & Khan S. U. (2004). Microwave-Assisted Extraction for the Simultaneous Determination of Thiamethoxam, Imidacloprid, and CarbendazimResidues in Fresh and Cooked Vegetable Samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52, 1, 105-109.

Singh S. B. Foster G. D. & Khan S. U. (2007). Determination of Thiophanate Methyl and Carbendazim Residues in Vegetable Samples Using Microwave-Assisted Extraction. Journal of Chromatography A 1148, 2, 152-157

Skládal P. Pavlík M. & Fiala M. (1994). Pesticide biosensor based on coimmobilized acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase. Anal. Lett. 27, 29-40.

Smith R. M. (2002). Extractions With Superheated Water. Journal of Chromatography A 975, 1, 31-46.

Snchez-Brunete C. Albero B. & Tadeo J.L. (2004). Multiresidue determination of pesticides in soil by gas chromatography–mass spectrometry detection. J. Agric. Food Chem. 52, 1445.

Srivastava A. K. Trivedi P. Srivastava M. K. Lohani M. & Srivastava L. P. (2010).Monitoring of Pesticide Residues in Market Basket Samples of Vegetable from Lucknow City, India: QuEChERS Method. Environmental Monitoring and Assessment 176, 1-4, 465-72.

Stand S. E. & Carlson D. A.(1984). Rapid BOD measurement for municipal wastewater samples using a biofilm electrode. JWPCF, 56, 5, 464-467.

Steegborn C. & Skladal P. (1997). Construction and characterization of the direct piezoelectric immunosensor for atrazine operating in solution. Biosensors Bioelectronics, 12,19-27.

Steinheimer T. R. (1993). HPLC Determination of Atrazine and Principal Degradates in Agricultural Soils and Associated Surface and Ground Water. Journal of Agricultural and Food Chemistry 41, 4, 588-595.

Stout S. J. Babbitt B. W. Da Cunha A. R. & Safarpour M. M. (1998). Microwave-Assisted Extraction Coupled With Gas Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Detection or Electron Capture Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry for Determination of Dimethomorph Residues in Soil. The Journal of AOACInternational 81, 5, 1054-1059.

Stout S. J. Da Cunha A. R. Picard G. L. & Safarpour M. M. (1996). Microwave-Assisted Extraction Coupled with Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Simplified Determination of Imidazolinone Herbicides and Their Metabolites in Plant Tissue. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44, 11, 3548-3553.

Stout S. J. Da Cunha A. R. & Safarpour M. M. (1997). Simplified Determination of Imidazolinone Herbicides in Soil at Parts-Perbillion Level by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. The Journal of AOAC International 80, 2, 426-432.

Stuer-Lauridsen F. (2005). Review of passive accumulation devices for monitoring organic pollutants in the aquatic environment. Environ. Pollut.136, 503.

Subbiah J. Calkins C.R. Samal A. & Meyer G.E. (2008). Visible/near-infrared hyperspectral imaging for beef tenderness prediction. Journal of Computers and Electronics in Agriculture. 64, 225-233.

Sun L. & Lee H. K. (2003). Optimization of Microwave-Assisted Extraction and Supercritical Fluid Extraction of Carbamate Pesticides in Soil by Experimental Design Methodology. Journal of Chromatography A 1014, 1-2, 165-177.

Sunarso J. & Ismadji S. (2009). Decontamination of Hazardous Substances From Solid Matrices and Liquids Using Supercritical Fluids Extraction: A Review. The Journal of Hazardous Materials 161, 1, 1-20.

Tan T. C. Li F. & Neoh K. G. (1993). Sensors Actuators B, 10,137-142.

Tao C. J. Hu J. Y. Li J. Z. Zheng S. S. Liu W. & Li C. J. (2009). Multi-Residue Determination of Pesticides in Vegetables by Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 82, 1,111–115.

Tao S. Guo L. Q. Wang X. J. Liu W. X. Ju T. Z. Dawson R. Cao J. Xu F. L. & Li B. G.(2004). Use of Sequential ASE Extraction to Evaluate the Bioavailability of DDT and its Metabolites to Wheat Roots in Soils With Various Organic Carbon Contents. Science of the Total Environment 320, 1, 1-9.

Terada H. Noguchi S. Maruyama Y. Kato, H. Tamura Y. & Oka, H. (2008). Analytical Method for Carbamate Pesticides in Processed Foods by LC/MS/MS. Journal of the Food Hygienic Society of Japan 49, 3, 125-135.

Thanh D. N. Byung S. L. Bo R. L. Dae M. L. & Lee G.-H. (2007). A Multiresidue Method for the Determination of 109 Pesticides in Rice Using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) Sample Preparation Method and Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Temperature Control and Vacuum Concentration. Rapid Communications in Mass Spectrometry 21, 18, 3115-3122.

Thompson R. G. Eldefrawi A. T. & Eldefrawi M. E. (1993). J. Agric. Food Chem. 41, 511-516.

Torres C. M. Picó Y. & Mañes J. (1995). Analysis of Pesticide Residues in Fruit and Vegetables by Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) and Different Gas Modern Extraction Techniques for Pesticide Residues Determination in Plant and Soil Samples245.

Torres C. M. Picó Y. & Mañes J. (1996). Determination of Pesticide Residues in Fruitand Vegetables. Journal of Chromatography A 754, 1, 301-331.

Torres C. M. Picó Y. & Mañes J. (1997). Comparison of Octadecylsilica and Graphitized Carbon Black as Materials for Solid-Phase Extraction of Fungicide and Insecticide Residues From Fruit and Vegetables. Journal of Chromatography A 778, 1-2, 127-137.

Tran-Minh C. (1996). Biosensors in flow-injection systems for biomedical analysis, process and environmental monitoring. J. Mol. Recognit. 9, 5-6, 658-663.

Tran-Minh C. Giuonnet R. & Beaux J.(1978). Realisation et etude d'une electrode a acetylcholinesterase immbobilisee pour le dosage del'acetylcholine. Comp. Rend. Acad. Sci. Paris, SerC. 286, 3, 115-118.

Trebst A. & Draber W.(1978). In: A dvances in Pesticide Science,Geissbuehler, H. et al. Eds., Pergamon, New York, Part2; pp 222-234.

Trojanowicz M. & Hitchman M. L. (1996). Determination of pesticides using electrochemical biosensors. TRAC, 15, 38-45.

Tschmelak J. Proll G. & Gauglitz G. (2005) Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: assay optimization process for estrone as example, Talanta 65, 313.

Valdes J. J. & Eldefrawi M. E. (1992). A fiber optic immunosensor for detecting parathion Anal. Lett. 25, 627-635.

Valverde-García, A.; Fernandez-Alba, A.; Contreras, M. & Agüera A. (1996). Supercritical Fluid Extraction of Pesticides From Vegetables Using Anhydrous Magnesium Sulfate for Sample Preparation. Journal of Agriculture and Food Chemistry 44,7, 1780-1784.

Van Weemen B. K. & Schuurs H. H. W .M. (1971). Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. FEBBS Lett.15, 232-236.

Vega Moreno D. Sosa Ferrera Z. & Santana Rodriguez J. J. (2006). Sample Extraction Method Combining Micellar Extraction–SPME and HPLC for the Determination ofOrganochlorine Pesticides in Agricultural Soils. Journal of Agriculture and Food Chemistry 54, 20, 7747-7752.

Viana E. Moltó J. C. & Font G. (1996). Optimization of a Matrix Solid-Phase Dispersion Method for the Analysis of Pesticide Residues in Vegetables. Journal of Chromatography A 754, 1-2, 437-444.

Vlasov Y. Bratov A. Levichev S. & Tarantov Y.(1991). Enzyme semiconductor *sensor* based on butyrylcholinesterase. Sens. Actuat. B , 4, 283-286.

Vrana B. Mills G.A. Allan I. J. Dominiak E. Svensson K. Knutsson J. Morrison G. Greenwood R. (2005). Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. Trends Anal. Chem. 24, 845-853.

Wang J. Dempsey E. Eremenko A. & Smyth M. R. (1993). Organic-phase biosensing of enzyme inhibitors.Anal.Chim. Acta 279, 203-208.

Wang J. & Leung D. (2009). Applications of Ultra-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry on Analysis of 138 Pesticides in Fruit- and Vegetable- Based Infant Foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57, 6, 2162-2173.

Wang J. Leung D. & Chow W. (2010). Applications of LC/ESI-MS/MS and UHPLCQqTOF MS for the Determination of 148 Pesticides in Berries. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 10, 5904-5925.

Wang L. Liang Y. & Jiang X. (2008). Analysis of Eight Organophosphorus Pesticide Residues in Fresh Vegetables Retailed in Agricultural Product Markets of Nanjing, China. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 81, 4, 377–382.

Wang W. Meng B. Lu X. Liu Y. & Tao S. (2007). Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Organochlorine Pesticides from Soils: A Comparison betweenSoxhlet Extraction, Microwave-Assisted Extraction and Accelerated Solvent Extraction Techniques. Analytica Chimica Acta 602, 2, 211-222.

Wang Y. &Wang Z. (2005). Study on fluorescence spectrometer for

monitoring pesticide residues on vegetables [J]. Journal of Applied Optics, 26(5): 10-13.(in Chinese with English abstract).

Wang Z. & Wang Y. (2005). Theoretical and experimental study on fluorescence characteristics of common pesticides [J]. Chinese Journal of Luminescence26,1, 59-65. (in Chinese with English abstract).

Wania F. (1998). Multi-compartmental models of contaminant fate in the environment, Biother-apy, 11, 65.

Wennrich L. Popp P. & Breuste J. (2001). Determination of Organochlorine Pesticides and Chlorobenzenes in Fruit and Vegetables Using Subcritical Water Extraction Combined With Sorptive Enrichment and GC-MS. Chromatographia 53, 1, S-380-S-386.

Wheeler W. (2002). Pesticides in Agriculture and the Environment, CRC Press, New York, USA.

Whitford F. (2002). The Complete Book of Pesticide Management. Science, Regulation, Stew-ardship and Communication, John Wiley & Sons, New York, USA.

Wiersma B.G. (2004). Environmental Monitoring, CRC Press, Boca Raton, NY.

Wollenberger U. Setz K. Scheller W. Löffler U. Göpel W. & Gruss R. (1991). Sensors Actuators B 4, 257-260.

Wong R. B. Anis N. & Eldefrawi M. E. (1993). Reusable fiber-optic-based immunosensor for rapid detection of imazethapyr herbicide. Anal. Chim. Acta 279, 141-147.

Wu D. Wu H.X. Cao J.B. Huang Z.H. & He Y. (2009). Classifying the species of exopalaemo by using visible and near infrared spectra with uninformative variable elimination and successive projections algorithm. Journal of Infrared and Millimeter Waves. 28, 6, 423-427.

Xia X.R. & Leidy R.B. (2002). A simplified liquid-solid extraction technique for the analyses of pesticide residues in soil samples. Environ Monit Assess. 73, 2,179-90.

Xiangying S. Kaihao X. & Bin L. (2008). Design of fluorescent self-assembled multilayers and interfacial sensing for organophosphorus pesticides [J]. Talanta 76, 747-751.

Yang X.B. Ying G.G. & Kookana R. S. (2010). Rapid Multiresidue Determination for Currently Used Pesticides in Agricultural Drainage Waters and Soils Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Journal of Environmental Science and Health, Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes 45, 2, 152-161.

Zhang J.S. Pan F.D. & Cheng H. (2010). Determination of Organophosphorus Pesticide in Soil by Accelerated Solvent Extraction-GasChromagraphy/Mass Spectrometry, Pesticides in the Modern World – Trends in Pesticides Analysis246.

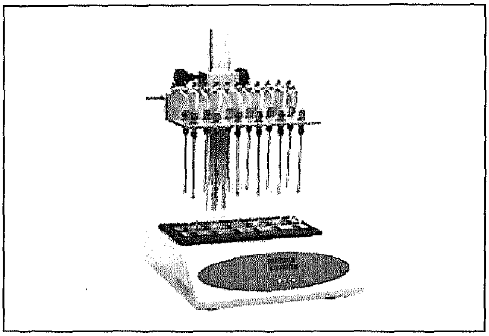
Zhao C. Q. Anis N. A. Rogers K. R. Kline R. H. Wright Eldefrawi J. A . T. & Eldefrawi M. E. (1995). Fiber Optic Immunosensor for Polychlorinated Biphenyls. J. A gric. Food Chem. 43, 2308-2315.

Zhao R. Wang X. Fu S. Yuan J. Jiang T. & Xu X. (2006). A Novel Headspace Solid-Phase Microextraction Method for the Exact Determination of Organochlorine Pesticides in Environmental Soil Samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry 384, 7-8, 1584-1589.

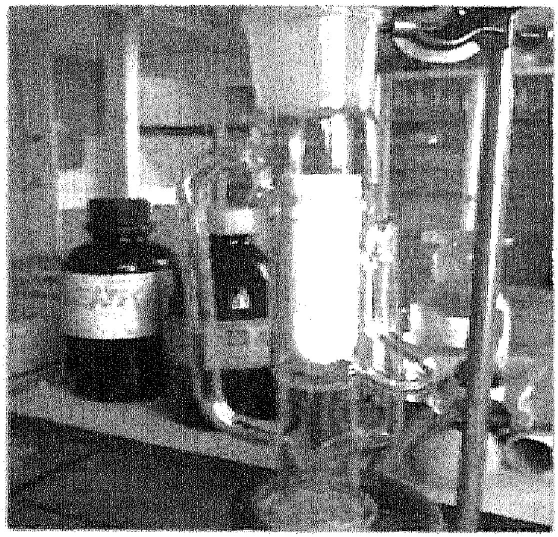
Zhao S. & Yan S. (2008). The detection technologies of pesticide residue [J]. Anhui Agricultural Sciences, 36(10): 4176-4178. (in Chinese with English abstract) .

Zhu C. Li W. & Li Y. (2008). Detection of organophosphorus pesticide residues on vegetables by using FTIR/ATR method [J]. Science and Technology Innovation Herald 2, 108-108. (in Chinese with English abstract).

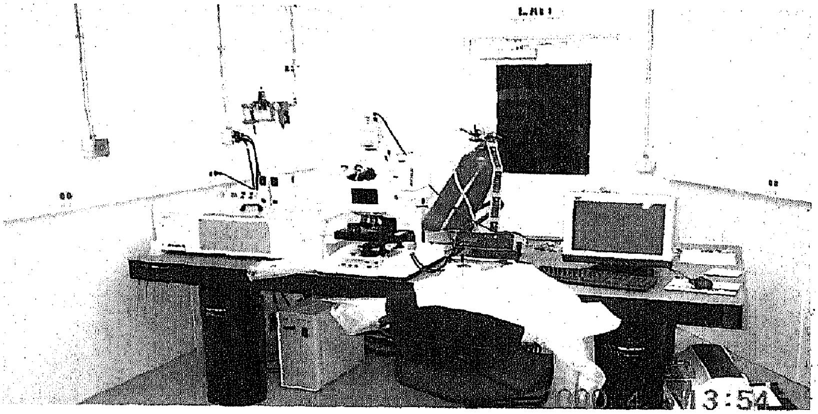
ملزمة الملونة



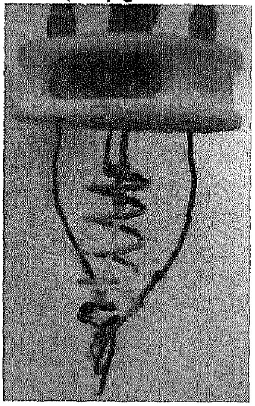
شكل (13): جهاز تركيز العينات باستخدام تيار من الهواء أو النيتروجين.



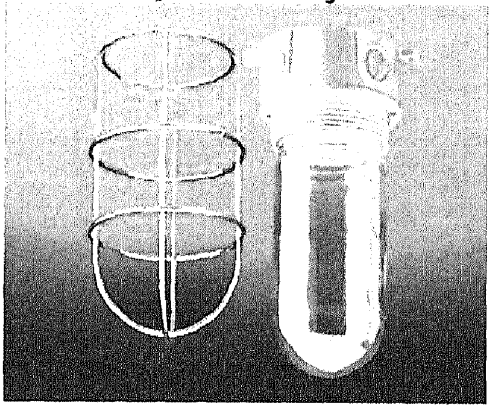
شكل (14): جهاز الكيودرنادانيش المستخدم في تركيز لعينات.



شكل (69): مطياف الأشعة تحت الحمراء IR spectrometer.



لمبة نرنست المتوهجة



السلك المتوهج