

اختيار شروط الاستخلاص المثلى باستخدام الأمواج فوق الصوتية وسوكسليه في تحديد الدايمثوات لعينات تربة زراعية باستخدام HPLC

د. محمد معروف*

د. طارق عراج**

علي رمضان الشاعر***

(تاريخ الإيداع 26 / 10 / 2020. قُبِلَ للنشر في 17 / 2 / 2021)

□ ملخص □

تم في هذا البحث تحديد أفضل طريقة لاستخلاص مبيد الدايمثوات من عينات التربة الزراعية المأخوذة من البيوت المحمية الموجودة في منطقة برج إسلام الواقعة في محافظة اللاذقية بالإضافة إلى تحديد طول الموجة المناسب لتحليله باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي (HPLC).

أوضحت نتائج التحليل باستخدام مزائج مختلفة من المذيبات (هكسان: أسيتون - ماء ثنائي التقطير: ميثانول - ميثانول: دي كلورو ميثان - ماء ثنائي التقطير) وبنسب 1:1 أن أفضل مزيج كان (هكسان: أسيتون بنسبة 1:1) وذلك بتطبيق طريقتي استخلاص الأمواج فوق صوتية _ سوكسليه فكانت الأمواج فوق الصوتية الأفضل حيث أجريت التحاليل بأطول موجية مختلفة nm (240 - 225 - 205 - 200) فكان أفضلها (200nm) حيث تراوحت الاسترجاعية بين (106,38%) و (99,47%) وحد الكشف الكيفي (0,02)ppb وحد الكشف الكمي (0,068)ppb

الكلمات المفتاحية: تربة زراعية، الدايمثوات، أمواج فوق صوتية، سوكسليه، HPLC، برج إسلام، اللاذقية.

* أستاذ - قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة تشرين - سورية.

** دكتور - المعهد العالي لبحوث البيئة - جامعة تشرين - سورية

*** طالب ماجستير - قسم الكيمياء - كلية العلوم - جامعة تشرين - سورية. Email: alisamsfs992@gmail.com

Choosing The Optimal Extraction Condition by Ultrasonic and Soxhlet for Determination of Dimethoate in Agricultural Soil Samples By HPLC

Dr. Mohammad Maarouf *
Dr. Tareq Arraj**
Ali Ramadan AL Shaer***

(Received 26 / 10 / 2020. Accepted 17 / 2 /2021)

□ ABSTRACT □

In this research, the best method for extraction Dimethoate pesticide from agricultural soil samples taken from greenhouses in the Burj Islam area located in Lattakia Governorate was determined, in addition to determining the appropriate wavelength for analysis using a high-performance liquid chromatography.

The results of the analysis, using different mixtures of solvents (hexan:acetone – double distilled water:methanol- methanol:dichloromethane- double distilled water) showed that the best mixture was(hexane: acetone 1:1) by applied two extraction methods Ultrasonic- Soxhlet, the Ultrasonic waves were the best, as the analysis was performed with different wavelengths (240 - 225 - 205 - 200) nm, the best of which was (200 nm) . The recovery ranged between 99,47 and 106,38%, The limits of Detection (LOD) are 0,02 ppb , and the limit Quantitative Detection (LQD) are 0,068 ppb.

Keywords: Agricultural soil, Dimethoate, Ultrasonic, Soxhlet, HPLC, Burj Islam, Lattakia.

* Professor. Faculty of science- Department of Chemistry-Tishreen University- Lattakia-Syria.

** Doctor. Higher Institute for Environment research, Tishreen University – Lattakia -Syria.

***Postgraduate student-.faculty of science- Department of Chemistry-Tishreen University-Lattakia-Syria.

مقدمة:

تعد مبيدات الآفات من أهم وأشد الملوثات الكيميائية التي يتعرض لها الإنسان والبيئة معاً، إذ قدرت منظمة الصحة العالمية أن حوالي ثلاثة ملايين حالة تسمم تحدث كل عام معظمها يقع تقريباً خلال فترة العمل المرتبطة باستخدام المبيدات [1].

زيادة التسارع في وثيرة الإنتاج الزراعي على المستوى العالمي وحرص جميع الدول على توزيع إنتاجها الغذائي وزيادته بما يلبي احتياجاتها، أدى بجمع دول العالم إلى توظيف وسائل الإنتاج المتوفرة لديها في هذا الاتجاه، وبالتالي توفير مستلزمات الإنتاج بما فيها المبيدات الزراعية [2].

تعد المبيدات الفوسفورية من أهم أنواع المبيدات التي تستخدم بشكل كبير وواسع لحماية المحاصيل الزراعية والمباني السكنية والتجارية وذلك بسبب فعاليتها ضد الآفات والفطريات والحشرات الضارة وتوافرها وقلة تكلفتها [2,3].

أدى استعمال المبيدات الفوسفورية العضوية بشكل عشوائي وجائر إلى تلوث عناصر الوسط المحيط كافة ببقايا هذه المبيدات. علاوة على أن المتبقي منها في التربة، بسبب زمن مكوثها القصير، يتفكك فيها متحولاً إلى مركبات أخرى قد تكون أكثر سمية وخطورة من المبيد نفسه، وهذا بدوره يؤدي إلى مخاطر بيئية كبيرة من ناحية انتقال هذه المركبات إلى المياه الجوفية وهذا يشكل خطراً على صحة الإنسان [4,5].

ومن بين الآثار الحادة الناجمة عن التعرض للمبيدات الفوسفورية العضوية خلل وظيفي عصبي بسبب تثبيط عمل أنزيم الكولين أستيراز وتحويله إلى أنزيم مفسفر، يصعب عليه تحليل مادة الأستيل كولين الموجودة في النهايات العصبية وبالتالي حدوث ارتجاجات وارتعاشات تنتهي بالشلل [6].

لذلك يتردد الطلب العالمي على طرائق فصل وتنقية وتحليل هذه المبيدات في الكثير من العينات البيئية كالماء والهواء والتربة وأيضاً في جميع أصناف الخضار والفواكه والعسل والحليب. وقد استخدمت طرائق التحليل كافة لرصد آثار المبيدات المتبقية في الترب الزراعية بما في ذلك الطرائق الطيفية [7,8]، والكهركيميائية [9,10]، والبيولوجية [11,12].

ومع ذلك بقيت الطرائق الكروماتوغرافيا تنصدر تقنيات التحليل المعتمدة لرصد الأثر المتبقي للمبيدات الفوسفورية وغير الفوسفورية، وذلك بسبب حساسيتها وانتقائيتها العاليتين، ودقتها الفائقة خاصة عندما تزود بكواشف مناسبة، أو عندما تسبق عملية الحقن في العمود الكروماتوغرافي عمليات تنقية فعالة [13].

ومن بين الإجراءات المختلفة المستخدمة في استخلاص المبيدات الفوسفورية العضوية من العينات الصلبة كان الاستخلاص بجهاز سوكسليه هو الأكثر استخداماً. إذ تستغرق هذه الطريقة وقتاً يتراوح بين (8-12) hour وتحتاج إلى حوالي (150-300) ml من المذيبات العضوية التي يجب تبخيرها قبل خطوات التنقية الإضافية [14]. الاستخلاص بجهاز الأمواج فوق الصوتية والذي يستغرق وقتاً يتراوح بين (3-7) hour حيث يمكن إجراء العديد من عمليات الاستخلاص في وقت واحد وتحتاج إلى حوالي (100-200) ml من المذيبات العضوية التي يجب تبخيرها قبل خطوات التنقية الإضافية [15,16].

استخدمت الكروماتوغرافيا السائلة المزودة بكاشف مطيافية الكتلة (LC-MS/MS) لتحليل المبيدات الفوسفورية العضوية في عينات التربة بعد استخلاصها باستخدام الأمواج فوق الصوتية فقد تم تحديد (10) مبيدات من بينها مبيد الدايمنوات. وتراوح حد الكشف الكمي بين (1-14) ng/g، كما تراوحت الاسترجاعية بين (83,2- 106,4)%. وكان الانحراف المعياري النسبي المنوي أقل من 8,7% [17].

عُين الأثر المتبقي للمبيدات التالية (الكلوربيريفوس، الدايمثوات) في خلاصات مأخوذة من بعض أنواع القرنيبيط والملفوف بالكروماتوغرافيا السائلة، وذلك بعد استخلاصها من عينات الخضار بطريقتي استخلاص وهي الاستخلاص (سائل-سائل) والاستخلاص بسوكسليه وكانت استرجاعية المبيدات في العينات بعد تنقيتها تتراوح بين % (101.12-99.99). وكانت حدود الكشف التي تم الحصول عليها في المجال (0.0016-0.0028 µg/ml). والخطية تتراوح بين µg/l (0.01-1.5) [18].

تم تحديد مبيد الدايمثوات باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة المزودة بكاشف الأشعة فوق البنفسجية (UV) بعد استخلاصها من عينات التربة بطريقة سوكسليه وتراوحت استرجاعية المبيد بين % (94-75). وتراوح الانحراف المعياري النسبي المئوي بين % (1.5-6.5) [19].

مازالت دراسة الأثر المتبقي للمبيدات الفوسفورية العضوية في التربة الزراعية وخاصة في الزراعات المحمية في سورية في بداياتها، والأعمال التي خُصصت لهذا الموضوع قليلة جدا في البيئة السورية لذلك وضع هذا البحث لمقارنة الاستخلاص بجهاز الأمواج فوق الصوتية والاستخلاص بجهاز سوكسليه لتحديد الطريقة الأفضل من أجل استرجاعية جيدة لهذه المبيدات في التربة وبالتالي تحليلها بدقة بواسطة تقانة الكروماتوغرافيا المستخدمة.

أهمية البحث وأهدافه:

تتجلى أهمية البحث في إيجاد أفضل طريقة لاستخلاص مبيد الدايمثوات باستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية وجهاز سوكسليه من التربة الزراعية السورية والتي تعد دراسته قليلة. ومن هنا أتت أهداف الدراسة في:

- 1- إيجاد الشروط والطريقة المثلى للاستخلاص
- 2- تحديد طول الموجة الأمثل للتحليل

طرائق البحث ومواده:

1. المواد الكيميائية المستخدمة:

• استخدم في إنجاز هذا العمل محلول عياري مرجعي لمبيد الدايمثوات بنقاوة % 98,5 إنتاج شركة Accu Standard Inc الأمريكية وقد حُضرت المحاليل القياسية الأصلية بالتراكيز التالية ppm (50 - 30 - 20 - 10 - 5 - 2,5 - 1 - 0,5 - 0,25) وذلك بأخذ الوزنات المناسبة وحلها بالميتانول عالي النقاوة (% 99,9). وكانت المذيبات المستخدمة لإنجاز هذا البحث من الأنواع الخاصة بتحليل المبيدات على تقانات الكروماتوغرافيا السائلة Grad HPLC وهي:

- | | |
|---------------------------|------------------------------|
| 1- الأسيتون بنقاوة % 99,5 | 4- ميتانول بنقاوة % 99,9 |
| 2- هكسان بنقاوة % 99,0 | 5- اسيتونتريل بنقاوة % 99,99 |
| 3- دي كلورو ميتان % 100 | 6- ماء ثنائي التقطير |

واستخدمت في عملية تنقية مستخلصات العينات قبل الحقن في العمود تقانة كارتريدج باستخدام خرطوشة (C18).

2. الأجهزة المستخدمة:

- جهاز كروماتوغرافيا سائلة إنتاج شركة Shimadzu اليابانية نموذج (DGU-20A3)، مزود بكاشف الأشعة فوق البنفسجية نموذج (SPD-M20A) وقد ربط الجهاز بمعالج نموذج (CBM-20A) واستخدم العمود ذو المواصفات التالية:

Packing Material : LiChrosorb- 100 RP18,10 μm -
 Type of Column : Vertex Column -
 Length x ID : 125x 4 mm ID -
 Serial no : NE 51 -

- جهاز الأمواج فوق الصوتية إنتاج شركة jeken الصينية نموذج (PS-40A) بمؤقت (1-30) min وتواتر (40 KHZ).

- جهاز المبخر الدوار إنتاج شركة Heidolph الألمانية نموذج LABOROTA4000. استخدم منخل 2ml لتنظيف عينات التربة من بقايا الجذور والأعواد والحجارة، وميزاناً حساساً بدقة 0.0001g من نوع Shimadzu نموذج (AUW220) ياباني الصنع. وكان المبخر الدوار Rotary Evaporation مزوداً بحمام مائي وموصولاً مع مضخة تفريغ هواء. وجهاز تقطير يعمل وفق مبدأ التناضح العكسي Reverse Osmosis. كما استخدم الاسيتونتريل والماء كطور متحرك بنسبة (75: 25) والمعبئين في اسطوانات زجاجية يتم تبديلها دورياً عند الحاجة. وتمت عملية الحقن بحقن آلي سعة 20 μL .

حفظت العينات المحضرة والخلاصات العضوية والمحاليل العياريّة في مجمدة تعمل بالتبريد الهوائي (Hilife) تبرّد حتى الدرجة -26°C ، وكانت الأدوات الزجاجية (بياشر، أرلينات، ورق ألنيوم، ماصات، دوارق حجمية بسعات مختلفة وحجرات تبخير و أسطوانات مدرجة، أقماع زجاجية) صناعة الشركة الألمانية MERK ، وأقماع بوخنر و مرطبات زجاجية عاتمة لخلط العينات.

3 تحضير العينات:

جمعت عينات التربة من بيوت محمية (بيوت بلاستيكية) موجودة في منطقة برج إسلام الواقعة في محافظة اللاذقية، حيث قسم الموقع إلى 10 مربعات مساحة كل مربع 16 m^2 من أجل تحضير عينة مركبة إذ حفرت حفرة صغيرة بعمق 30cm بمعدل 3 حفر في كل مربع من أجل إجراء تكراريات للعينات، ثم نقلت العينات إلى مختبر المعهد العالي لبحوث البيئة حيث نظفت من بقايا الجذور والحجارة والأوراق بمنخل (2 ml) ثم وضعت بعبوات زجاجية عاتمة مغسولة جيداً بماء ثنائي التقطير وحفظت في البراد عند الدرجة (-20°C) لحين عملية الاستخلاص.

1.3 الاستخلاص بجهاز سوكسليه:

أخذت أربع وزنات من عينات التربة كل منها 20g) ووضعت في خرطوشة الجهاز واستخدم مزيج المذيبات وفق الآتي:

- 1- الوزن الأولى + (هكسان: اسيتون) (75: 75 V/ V) وتم الاستخلاص لمدة 12 ساعة.
 - 2- الوزن الثانية + (ماء ثنائي التقطير: ميثانول) (75: 75 V/ V) وتم الاستخلاص لمدة 12 ساعة.
 - 3- الوزن الثالثة + (ميثانول: دي كلورو ميثان) (75: 75 V/ V) وتم الاستخلاص لمدة 12 ساعة.
 - 4- الوزن الرابعة + (ماء ثنائي التقطير) فقط. وتم الاستخلاص لمدة 12 ساعة.
- وبعد الانتهاء من عملية الاستخلاص بخرت المستخلصات ذات الحجم الكبيرة بالمبخر الدوار إلى حجم صغير ثم وضعت في زجاجات صغيرة عاتمة وحفظت في البراد عند الدرجة (-20°C) [19,14].

2.3 الاستخلاص بجهاز الأمواج فوق الصوتية:

أخذت أربع وزنات من عينات التربة كل منها (10g) ووضعت كل وزنة في بيشر سعة (500ml) ثم أضيف لكل بيشر مزيج من المذيبات وفق ما يلي:

- 1- البيشر الأول: (10g) تربة + (هكسان: اسيتون) (50: 50 V/V).
- 2- البيشر الثاني: (10g) تربة + (ماء ثنائي التقطير: ميتانول) (50: 50 V/V).
- 3- البيشر الثالث: (10g) تربة + (ميتانول: دي كلورو ميتان) (50: 50 V/V).
- 4- البيشر الرابع: (10g) تربة + (ماء ثنائي التقطير) فقط.

بعدئذٍ غطيت البياشر الأربعة بورق ألمنيوم بشكل جيد منعاً لتطاير المذيبات ثم وضعت في جهاز الأمواج فوق الصوتية لمدة 3 ساعات، وبعد الانتهاء من عملية الاستخلاص رشحت بالإبانة بورق ترشيح $0.45\mu\text{m}$ نوع (CELLULOSE NITRATE)، ثم بخرت المستخلصات ذات الحجم الكبيرة بالمبخر الدوار إلى حجم صغير ووضعت في زجاجات صغيرة عاتمة وحفظت في البراد عند الدرجة (-20°C) [15,20].

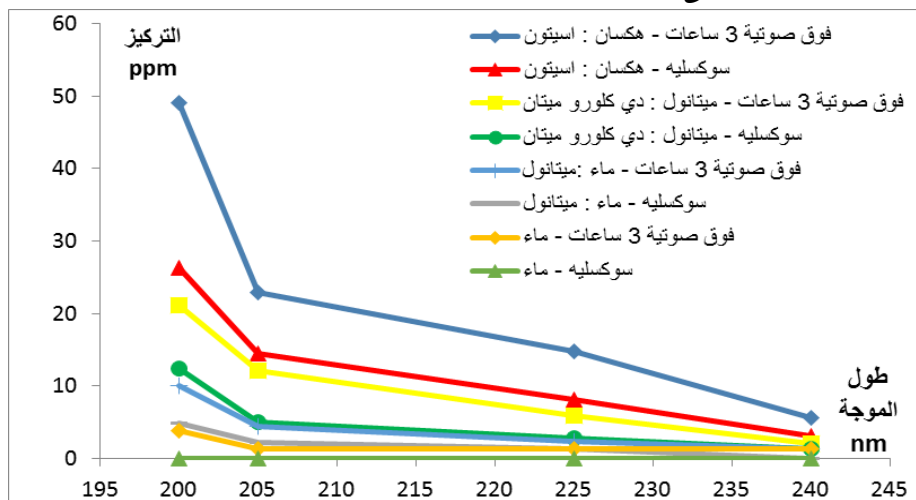
4. طريقة التنقية:

أجريت عملية تنقية للمستخلصات النهائية وذلك لفصل المواد العضوية عن بعضها والحصول على خلاصة تحتوي - فقط- على المبيدات المراد تعيينها و ذلك بعد تجفيفها بتيار هادئ من غاز الآزوت ثم أضيف إليها (1ml) اسيتونتريل من أجل عملية التنقية، وقد تمت عملية التنقية على خرطوشة C18 على النحو التالي :

- غسلت خرطوشة C18 ب 5ml اسيتونتريل
 - أضيفت العينة المذابة في الاسيتونتريل
 - أضيف 2ml اسيتونتريل و 1ml بروبانول على التوالي من أجل الاستخلاص.
- يستحصل على عينة نقية بحجم 4ml والتي تجفف من جديد بتيار من الآزوت ويضاف لها 1ml من الميتانول وتحفظ في عبوة محكمة الإغلاق في المجمدة وبذلك تكون جاهزة للحقن في الجهاز [21].

النتائج والمناقشة:

1-اختيار طريقة الاستخلاص المثلى:



الشكل (1) مقارنة طرائق الاستخلاص (أمواج فوق صوتية وسوكسليه)

من الشكل (1) نجد أن:

باستخدام الاستخلاص بالأموح فوق الصوتية لمدة 3 ساعات كان أكبر تركيز من المبيد تم الحصول عليه هو 49,185ppm في حين كان أكبر تركيز تم الحصول عليه بطريقة سوكلية هو 26,377ppm وبمقارنة هذه النتائج وجد أن الطريقة المثلى للاستخلاص هي بجهاز الأمواح فوق صوتية لمدة 3 ساعات، كون الأمواح فوق الصوتية تعمل على رفع وتيرة إشارات الاهتزاز في السوائل مما يؤدي إلى تشكيل ملايين الفقاعات الصغيرة المجهرية حيث تتوسع هذه الفقاعات وتنهار بسرعة مسببة فجوة تدعى الفجوة الصوتية. تسبب هذه الفجوة خللاً في جدران الخلايا يسمح بتغلغل مذيب الاستخلاص إلى المادة المراد استخلاصها من داخل العينة. وأيضاً يوفر الاستخلاص بجهاز الأمواح فوق الصوتية تلامساً أكثر كفاءة بين المادة الصلبة والمذيبات بسبب زيادة كل من الضغط (الذي يحسن تغلغل المذيب بالمادة الصلبة واستخلاص المواد العضوية منها) والحرارة (تحسن الذوبان وسرعة الانتشار) والتي لا تتجاوز 40°C، في حين أن عملية الاستخلاص بسوكلية تتم بدرجات حرارة لا تقل عن 50°C وهذا بدوره قد يؤدي إلى تحطم المبيد وبالتالي كفاءة استخلاص أقل.

2- شروط تحليل مبيد الدايمثوات باستخدام جهاز HPLC مرجعياً:

كانت الشروط الكروماتوغرافية المثلى لتحليل مبيد الدايمثوات وفقاً للدراسات المرجعية [22-25].

موضحة بالجدول (1):

الجدول (1) شروط تحديد مبيد الدايمثوات

liChrosorb-100RP18,10 µm (25cm,125 *4 mm)	العمود المستخدم
كاشف الأشعة فوق البنفسجية UV	الكاشف المستخدم
الميثانول % 99,9	المذيب المستخدم
اسيتونريل: ماء (75 : 25)	الطور المتحرك
1ml/min	تدفق الطور المتحرك
20µl	الحجم المحقون
40°C	درجة الحرارة
4,9 – 5,1min	زمن احتفاظ المبيد

3- تحديد طول موجة التحليل الأمثل:

تم تحليل العينات عند الأطوال الموجية (200 – 205 – 225 – 240) nm من أجل تحديد أفضل طول موجي لتحليل مبيد الدايمثوات:

• نتائج تحليل العينات:

(a) طول الموجة 200nm:

الجدول (2) تركيز مبيد الدايثوثات عند طول 200 nm

العينة	\bar{X}	C,ppm	SD	RSD%	CL
A 1	2321078	49,011	28631,22	1,233	2321078±52599,24
A 2	969029,7	21,212	12551,98	1,295	969029,7±31183,37
A 3	424531,7	10,017	9421,372	2,219	424531,7±23405,87
A 4	127341	3,906	1784,892	1,401	127341±4434,276
C 1	1220235	26,377	22438,42	1,838	1220235±55744,62
C 2	542622,7	12,428	5420,819	1,5	541789,3±20071,5
C 3	173446,3	4,854	5408,209	3,118	173446,3±13435,82
C 4	<DL	-	-	-	-

(b) طول الموجة 205nm:

الجدول (3) تركيز مبيد الدايثوثات عند طول 205 nm

العينة	\bar{X}	C,ppm	SD	RSD%	CL
A 1	1078086	23,454	19797,98	1,83	1078086±49184,88
A 2	528145,3	12,147	9959,897	1,88	528145,3±24743,75
A 3	424531,7	10,01	9421,372	2,219	424531,7±23405,87
A 4	127341	3,9	1784,892	1,401	127341±4434,27
C 1	644335,3	14,38	32732,98	5,080	644335,3±81319,8
C 2	178803,7	4,964	10432,21	5,834	178803,7±25917,15
C 3	46674,33	2,248	1394,73	2,98	46674,33±3464,98
C 4	DL	-	-	-	-

(c) طول الموجة 225nm:

الجدول (4) تركيز مبيد الدايثوثات عند طول 225 nm

العينة	\bar{X}	C,ppm	SD	RSD%	CL
A 1	654231	14,73	11495,24	1,75	654231±28558
A 2	223275,3	5,87	3617,949	1,62	223275,3±8988,208
A 3	53603,67	2,39	1216,383	2,269	53603,67±3021,9
A 4	4358	1,378	108,0401	2,479	4358±268,408
C 1	334692	8,101	16143,88	4,823	334682±81319,79
C 2	74974,67	2,836	2729,205	3,640	74974,67±6780,27
C 3	6657,667	1,425	212,4811	3,19	6657,667±527,875
C 4	<DL	-	-	-	-

(d) طول الموجة 240nm:

الجدول (5) تركيز مبيد الدايثوثات عند طول 240 nm

العينة	\bar{X}	C,ppm	SD	RSD%	CL
A 1	212564,3	5,66	8432,44	3,967	212564,3±20949,03
A 2	42362,67	2,159	1267,677	3,2	42362,67±3149,34
A 3	4665,667	1,384	112,60	2,413	4665,667±279,752
A 4	1186	1,312972	34,93	2,945	1186±86,88
C 1	90586	3,187	3897,52	4,302	90586±9682,76
C 2	5724	1,408	266,7296	4,66	5724±662,646
C 3	<DL	<DL	-	-	-
C 4	<DL	<DL	-	-	-

حيث:

A = الاستخلاص بالأمواج فوق الصوتية لمدة 3 ساعات

C = الاستخلاص بجهاز سوكسليه

DL < = تحت حدود الكشف

(1) = هكسان: أسيتون = 2 ميثانول: دي كلوروميثان = 3 ماء: ميثانول = 4 ماء

 \bar{X} = متوسط مساحة القمة لكل عينة من أجل n = 3 تكرارات

RSD% = الانحراف المعياري النسبي المئوي

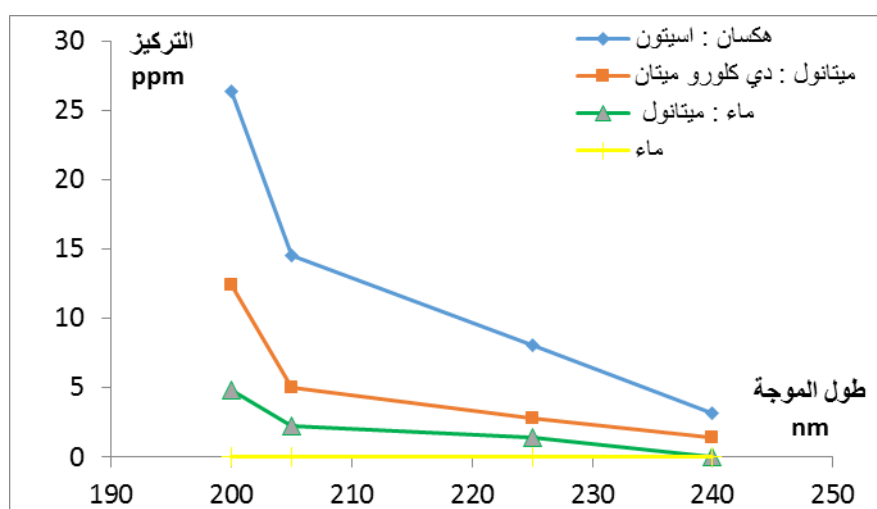
CL = حدود الثقة

- عند طول الموجة 200nm كان أكبر تركيز تم الحصول عليه بطريقة الأمواج فوق صوتية من المبيد هو 49 ppm وبطريقة سوكسليه 26,377ppm
- عند طول الموجة 205nm كان أكبر تركيز تم الحصول عليه بطريقة الأمواج فوق صوتية من المبيد هو 23,454ppm وبطريقة سوكسليه 14,536ppm
- عند طول الموجة 225nm كان أكبر تركيز تم الحصول عليه بطريقة الأمواج فوق صوتية من المبيد هو 14,739ppm وبطريقة سوكسليه 8,101ppm
- عند طول الموجة 240nm كان أكبر تركيز تم الحصول عليه بطريقة الأمواج فوق صوتية من المبيد هو 5,66ppm وبطريقة سوكسليه 1,4ppm

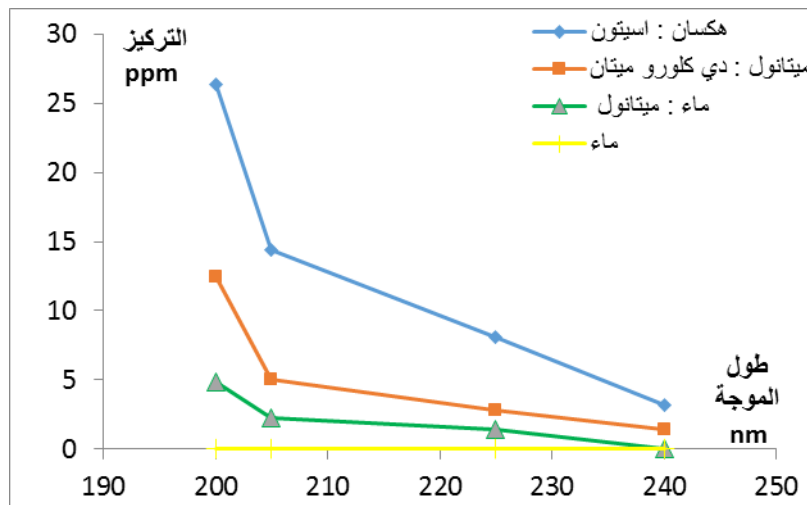
بمقارنة النتائج وجد أن طول الموجة الموافق لاستخلاص أكبر تركيز من المبيد هو 200nm وفق الجداول (2) و (3) و (4) و (5) وهو 49ppm بالتالي فإن أفضل طول موجة لتحليل مبيد الدايثوات 200nm

4- تحديد المذيب الأمثل للاستخلاص:

استخدمت مزائج المذيبات (هكسان: أسيتون - ماء ثنائي التقطير: ميثانول - ميثانول: دي كلورو ميثان - ماء ثنائي التقطير) وبنسب 50:50 v/v للاستخلاص بالأمواج فوق صوتية و 75:75 v/v للاستخلاص بسوكسليه ووجد من الأشكال (2) و (3) أن:



الشكل (2): الاستخلاص بالأمواج فوق الصوتية لمدة 3 ساعات



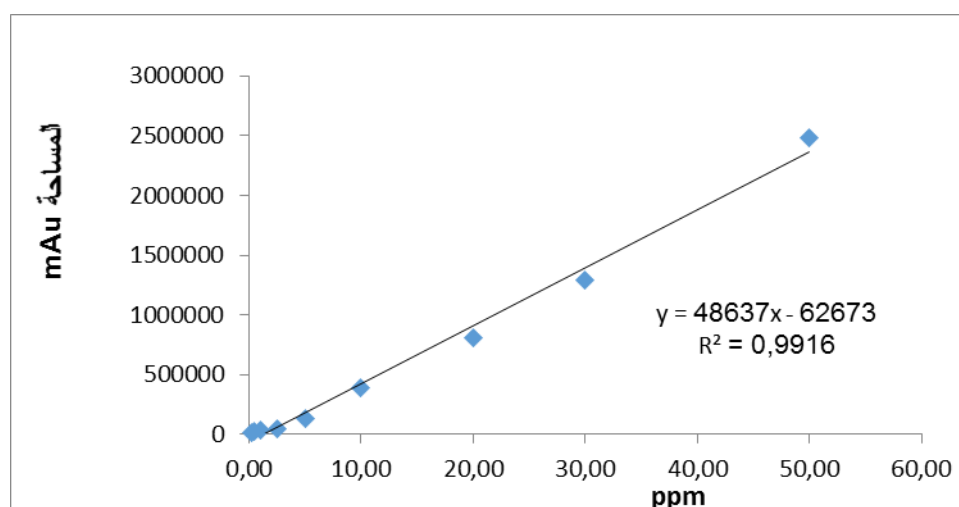
الشكل (3): الاستخلاص بجهاز سوكلية

- باستخدام المزيغ (هكسان: أسيتون بنسبة 1:1) كان أكبر تركيز تم الحصول عليه بطريقة الأمواج فوق صوتية من المبيد هو 49ppm وبطريقة سوكلية 26,377ppm.
- باستخدام المزيغ (ميتانول: دي كلورو ميتان بنسبة 1:1) كان أكبر تركيز تم الحصول عليه بطريقة الأمواج فوق صوتية من المبيد هو 21,212ppm وبطريقة سوكلية 12,428ppm.
- باستخدام المزيغ (ماء ثنائي التقطير: ميتانول بنسبة 1:1) كان أكبر تركيز تم الحصول عليه بطريقة الأمواج فوق صوتية من المبيد هو 10,01ppm وبطريقة سوكلية 4,854 ppm.
- باستخدام (ماء ثنائي التقطير) كان أكبر تركيز تم الحصول عليه بطريقة الأمواج فوق صوتية من المبيد هو 3,9ppm وبطريقة سوكلية لم يتم استخلاص مبيد بسبب تحطمه بالحرارة أثناء عملية الاستخلاص بمقارنة النتائج وجد أن مزيغ المذيبات الموافق لاستخلاص أكبر تركيز من المبيد هو (هكسان: أسيتون بنسبة 1:1) وفق الأشكال (2 و 3) وهو 49ppm للاستخلاص بالأمواج فوق صوتية و 26,337ppm للاستخلاص بسوكلية بالتالي فإن أفضل مزيغ مذيبات لاستخلاص مبيد الدايثوات هو (هكسان: أسيتون بنسبة 1:1). حسب كمية الدايثوات في 1ml من الخلاصة التي تم تحضيرها انطلاقاً من 10g تربة بالنسبة لطريقة الأمواج فوق الصوتية و 20g بالنسبة لطريقة سوكلية ومن ثم حسابها في 1000 g من التربة بالتالي تكون التراكيز الحقيقية مقدرة ب mg/kg، تراوحت تراكيز الدايثوات بين (0,19-4,9)mg/kg وهي تراكيز عالية وأكبر بكثير من الحد المسموح به ، حيث يبلغ المدخول اليومي المقبول ADI والجرعة المرجعية الحادة ARfD بحسب التقرير الناتج عن منظمة الأغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية المعنى بمخلفات مبيدات الآفات عام 2019 بالنسبة لمبيد الدايثوات وفق الآتي:
- المدخول اليومي المقبول (0-0,001)mg/kg من وزن الجسم يومياً [26].
- الجرعة المرجعية الحادة (0,02)mg/kg من وزن الجسم يومياً [26].
- إن تراكيز الدايثوات في التربة عالية جداً لدرجة أنها أكثر خطورة من كونها آثار متبقية وإن هذه الآثار العالية للمبيد المدروس تؤثر على التربة الزراعية وعلى الكائنات الحية بما فيها الإنسان.

تبين من نتائج التحليل أن المبيدات كانت تستخدم بشكل كبير ومكثف وبالتالي عدم وجود توازن بين أوقات الرش وأوقات الراحة الأمر الذي يؤدي إلى تراكم المبيدات في التربة ولفترات طويلة وبالتالي بطء تفككه، وهذا بدوره قد يؤثر على صحة المزارعين فقد يؤدي إلى إصابتهم بأمراض مزمنة نتيجة التعرض للمبيد بكميات كبيرة.

5- تحديد تركيز مبيد الدايثوثات بطريقة المنحني المعياري:

حضرت محاليل عيارية مختلفة من مبيد الدايثوثات بالتركيز التالية (1- 2,5- 5 - 10 - 20 - 30 - 50) ppm وحقنت هذه التركيزات في جهاز HPLC وبعد ذلك رسمت العلاقة بين هذه التركيزات ومساحة القمة لكل منها، واستخدم هذا المنحني فيما بعد لتحديد تركيز العينات المجهولة باستخدام معادلة الخط المستقيم لاختيار الشروط المثلى وفق الآتي:



الشكل (4): المنحني المعياري للدايثوثات

6- اختبار كفاءة طريقة التحليل:

لاختبار كفاءة طريقة تحليل المبيد المدروس عند طول الموجة المناسب له، حضرت ثلاثة تراكيز مختلفة وبثلاثة مكررات لكل تركيز وحقنت عند طول الموجة المناسب للمبيد وحُسبت نسب الاسترجاع R% من العلاقة (1):

$$R\% = \frac{\text{تركيز المبيد المقاس (تجريبي)}}{\text{تركيز المبيد المحنون (نظري)}} \times 100 \quad \dots\dots(1)$$

التركيز النظري ppm	Y	التركيز العملي C, ppm	R%	R%±SD	الوسطي
2,5	57394	2,468	98,745	99,47± 2,106	102,82± 2,248
2,5	56285	2,445	97,833		
2,5	61170	2,546	101,850		
10	446162	10,461	104,618	102,61± 2,206	
10	424922	10,025	100,251		
10	438201	10,298	102,982		
30	1475301	31,621	105,404	106,38± 3,07	
30	1539859	32,948	109,829		
30	1453762	31,178	103,928		

Y: مساحة قمة الامتصاص ، C: التركيز (mg/l) ، R%: نسبة الاسترجاع ، SD: الانحراف المعياري ، n=3

7- حد الكشف الكيفي LOD وحد الكشف الكمي LQD:

حسب حد الكشف الكيفي (LOD) (Limit of Detection) على أنه كمية المادة الفعالة من المبيد التي تعطي عند حقنها قمة (peak) ارتفاعها يعادل ثلاثة أضعاف قمة التشويش. وحسب من العلاقة (2):

$$LOD = \frac{3 \times SD}{m} \dots\dots(2)$$

أما حد الكشف الكمي (LQD) (Limit Quantitative Detection) فهو كمية المادة الفعالة من المبيد التي تعطي عند حقنها قمة (peak) ارتفاعها يعادل عشرة أضعاف قمة التشويش. وحسب من العلاقة من العلاقة (3):

$$LQD = \frac{10 \times SD}{m} \dots\dots(3)$$

حيث SD: الانحراف المعياري للاستجابة (ارتفاع التشويش)، m: ميل منحنى المعايرة الناتج عن السلسلة العيارية للدايمثوات عند تراكيز منخفضة.

ارتفاع التشويش	\bar{X}	SD	m	LOD	LQD
26	17,67	7,371	1081,4	0,02 ppb	0,068 ppb
12					
15					

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

- وجد من خلال هذا البحث أن:
 - 1- الطريقة المثلى للاستخلاص هي بجهاز الأمواج فوق الصوتية لمدة 3 ساعات باستخدام مزيج المذيبات (هكسان: اسيتون 1:1) وبطول موجة 200nm للتحليل.
 - 2- تعد طريقة الاستخلاص بالأمواج فوق الصوتية بالشروط المسبقة دقيقة وصحيحة حيث بلغ الانحراف المعياري (1,2-3,9) وهو أصغر من الانحراف المعياري النسبي المرتكب في حالة طريقة الاستخلاص بجهاز سوكسليه (1,5-5,834).
 - 3- تتصف الطريقة بالصحة حيث بلغ متوسط الاسترجاعية % (102,82±2,248) وهي استرجاعية جيدة بالمقارنة مع الدراسات المرجعية، بحد كشف كيمي (0,02 ppb) وحد كشف كمي (0,068 ppb)

التوصيات:

يوصى باستخدام طريقة الأمواج فوق الصوتية من أجل تحليل مبيد الدايمثوات في التربة الزراعية وضرورة مراقبة دورية لهذه التربة من أجل الوقوف عند الإمكانيات المسموح بها للتلوث بهذا المبيد.

References:

1. ASLAM, M. *Quantification of Organochlorine Pesticide Residues in the Buffalo Milk Samples of Delhi City, India*. Journal of Environmental Protection India, vol.4,N.9,2013,P.964-974.
2. The recommendations adopted for agricultural pest control. Egypt: Agricultural Pesticides Committee, (2018), p. 15-22.
3. BRATA,C; SOLAYAN; A; PORTE, C. *Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to Daphnia magna*. Journal of Aquatic Toxicology spain,vol.66,N.2,2004,P.125-139.
4. BAKER,R; BARNES,A; LOFTUS,N. *Solutions for Food Safety*.2nd.ed,shimadzu corporation,UK,2017,P.40-42.
5. TOMLIN,C.D.S. *The pesticide manual*.11th.ed.,British Crop Production Council,UK,2000,P.137-174.
6. RAHIMI,R; ABDOLLAHI, M. *A review on the mechanisms involved in hyperglycemia induced by organophosphorus pesticides*. Pesticide Biochemistry and Physiology iran,vol.88,N.2,2007,P.115-121.
7. NAMERA, A; UTSUMI,Y; YASHIKI,M; OHTANI ; IMAMURA, T; KOGIMA, T. *Direct colorimetric method for determination of organophosphates in human urine*.Clinica Chimica Acta japan,vol.291,N.1,2000,P.9-18.
8. TUOVINEN, K; PAAKKANEN, H; HANNINEN, O. *Detection of pesticides from liquid matrices by ion mobility spectrometry*. Analytica Chimica Acta Kuopio,vol.404,N.1,2000,P.7-17.
9. CIESIELSKI, W; SKOWRON, M; BALCZEWSKI, P; SZADOWIAK, A. *Determination of some thiophosphorus insecticides based on coulometric titration with the anodically generated chlorine: a further insight in the reaction mechanism in aqueous medium*.Talanta Poland,vol.60,N.4,2003,P.725-732.
10. SHELKOVNIKOV,V.V.; NOVOLOKOV,K.YU. *Voltammetric sensor for determining malathion and diazinon*. Zh Anal Khim Russia, vol.23,N.3, 2019,P.362-369.
11. SCHULZE, H; SCHERBAUM, E; ANASTASSIADES, M; VORLOVA, S; SCHMID,D.R.; BACHMANN,T.T. *Development, validation, and application of an acetylcholinesterase biosensor test for the direct detection of insecticide residues in infant food*. Biosensors and Bioelectronics germany,vol.17,N.11,2002,P.1095-1105.
12. MEDYANTSEVA, E. P; VERTLIB, M. G; BUDNIKOV, G. K; BABKINA, S. S; EREMIN, S. A. *Amperometric biochemical sensor based on immobilised cholinesterase in the immunoassay of pesticides*. journal of analytical chemistry New York, vol.50,N.7, 1995,P.719-722.
13. GARMOUMA,M; POISSANT,L. *Occurrence, temperature and seasonal trends of α - and γ -HCH in air (Québec, Canada)*. Atmospheric Environment Canada, vol.38,N.3, 2004,P.369-382.
14. U.S. Environmental Protection Agency, Method 3540 C, Washington,DC, 1996.
15. US. Environmental Protection Agency, Ultrasonic extraction, EPA standard method 3550C ; 2007.
16. GONCALVES C; ALPENDURADA,M.F. *Assessment of pesticide contamination in soil samples from an intensive horticulture area, using ultrasonic extraction and gas chromatography–mass spectrometry*. Talanta Portugal, vol.65,N.5, 2006,P.1179-1189.

17. VALCARCEL, I.A. ; TADEO, L.J. *A combination of ultrasonic assisted extraction with LC-MS/MS for the determination of organophosphorus pesticides in sludge Spain*, vol.641, N.1-2, 2009, P.117-129.
18. HARSHIT, D; CHARMY, K; NRUPESH, P. *Organophosphorus Pesticides Determination by Novel HPLC and Spectrophotometric Method*. Food Chemistry India, vol.230, N.11, 2017, P.448-453.
19. LI, Z.Y. ; ZHANG, Z.C. ; ZHOU, L.Q. ; GAO, Y.R. ; WANG, S.Q. *Determination of Dimethoate and its Enantiomeric Ratio in Soil by the matrix solid-phase dispersion method and liquid chromatography*. Journal of Chromatography A China, vol.997, N.1, 2002, P.17-25.
20. JIA, C; ZHU, X; CHEN, L; HE, M; YU, P; ZHAO, E. *Extraction of organophosphorus pesticides in water and juice using ultrasound-assisted emulsification-microextraction*. Institute of Plant and Environment Protection China, vol.33, N.9, 2010, P.244-250.
21. ZHU, X; YANG, J; SU, Q; CAI, J; GAO, Y. *Selective solid-phase extraction using molecularly imprinted polymer for the analysis of polar organophosphorus pesticides in water and soil sample*. Journal of Chromatography A China, vol.1092, N.2, 2005, P.161-169.
22. KHAN, A.B. ; FARID, A. ; ASIR, M. ; SHAH, H. ; BADSHAH, K.A. *Determination of residues of trichlorfon and dimethoate on guava using HPLC*. Food Chemistry Pakistan, vol.114, N.1, 2009, P.286-288.
23. GRAHOVAC, M.Z. ; MITIC, S.S. ; PECEV, T.E. ; PAVLOVIC, N.A. *Development of New Kinetic-spectrophotometric Method for Determination Insecticide Dimethoate in Milk and Water*. Journal of the Chinese Chemical Society Serbia, vol.57, NO.5A, 2010, P.1027-1034.
24. KRSTESKA, N.A. ; MIRCESKA, M. ; AARON, J.J. ; ZDRAVKOVSKI, Z. *Determination of Dimethoate, 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid, Mecoprop and Linuron Pesticides in Environmental waters in Republic of Macedonia by High Performance Liquid Chromatography*. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering Macedonia, vol.27, NO.1, 2008, P.25-33.
25. SANCHEZ, E.M. ; RABANAL, B. ; OTERO, M.; VILLACORTA, M.J. *Solid-Phase Extraction for the Determination of Dimethoate in Environmental Water and Soil Samples by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography (MEKC)*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies Spain, vol.26, NO.4, 2003, P.545-557.
26. FAO & WHO. 2020. Pesticide residues in food - Report 2019-Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Rome.