جامعة السعيد

دار السعيد للطباعة والنشر SPPH

علم السموم التحليلي

دليل شامل للباحثين في تحليل السموم

ANALYTICAL TOXICOLOGY



إعداد وتأليف:

أمين محمد محمد نعمان البريهي

نيازي عبد المولى سلام العريقي

علي عبده مطير

Ameen M.M.N. Albureihi; Niyazi A.S. Al-Areqi & Ali A. Mutair

الطبعة الأولى - 2026م

دار السعيد للطباعة والنشر – جامعة السعيد، تعز – اليمن

Al-Saeed University

Taiz - Yemen

كلمة دار السعيد للطباعة والنشر

بسم الله الرحمن الرحيم

يسر دار السعيد للطباعة والنشر بجامعة السعيد أن تقدم للقراء والباحثين الطبعة الأولى من كتاب «**علم السموم التحليلي» (ANALYTICAL TOXICOLOGY)**، الذي أعده نخبة من الأكاديميين والمتخصصين، وهم: **الكيميائي/ أمين محمد محمد نعمان البريهي، والأستاذ الدكتور/ نيازي عبد المولى سلام العريقي، والدكتور/ علي عبده مطير**.

يأتي نشر هذا الكتاب في إطار رسالة الدار الرامية إلى دعم التأليف الأكاديمي، وتشجيع الإنتاج العلمي المتخصص، وإثراء المكتبة العربية بالمراجع التي تلبي احتياجات الطلبة والباحثين والعاملين في المختبرات العلمية والسريرية والجنائية.

ويقدم الكتاب، عبر عشرين فصلاً مترابطًا، عرضًا علميًا متدرجًا لأسس علم السموم التحليلية، بدءًا من جمع العينات وحفظها واستخلاص السموم وتنقيتها، ومرورًا بتقنيات الفصل والتحليل الطيفي ومطيافية الكتلة، ووصولاً إلى تحليل الأدوية والسموم المختلفة والتفسير السريري والسمومي للنتائج.

وتعتز الدار بإصدار هذا العمل العلمي، مقدرةً الجهود التي بذلها المؤلفون في إعداده وتنظيم موضوعاته. ونأمل أن يمثل إضافة نوعية للمكتبة العلمية العربية، ومرجعًا نافعًا لطلبة الجامعات والباحثين والمختصين.

والله ولي التوفيق.

دار السعيد للطباعة والنشر
جامعة السعيد
تعز- 2026م

كلمة المؤلفين

بسم الله الرحمن الرحيم

الحمد لله رب العالمين، والصلاة والسلام على سيدنا محمد، وعلى آله وصحبه أجمعين.

يعد علم السموم التحليلية من العلوم التطبيقية المهمة، لما يؤديه من دور في الكشف عن المواد السامة والعقاقير والمخدرات والمعادن والمواد الكيميائية الخطرة، وتحديد هويتها وقياس تراكيزها وتفسير دلالاتها السريرية والسمومية.

وقد جاء إعداد كتاب «**علم السموم التحليلي**» **(ANALYTICAL TOXICOLOGY)** استجابةً للحاجة إلى مرجع عربي أكاديمي يجمع بين الأسس النظرية والتطبيقات المختبرية والتقنيات التحليلية الحديثة. ويضم الكتاب عشرين فصلاً تتناول سلامة العينات وسلاسل الحيازة، وطرائق استخلاص السموم وعزلها، وتقنيات الكروماتوغرافيا والرحلان الكهربائي، والتحليل الطيفي ومطيافية الكتلة، فضلاً عن تحليل المعادن والمواد المتطايرة والسموم الطبيعية والأدوية والمقايسات المناعية والتفسير السريري للنتائج.

وقد حرصنا على تقديم المادة العلمية بأسلوب منهجي متدرج يربط بين جودة العينة، وكفاءة الطريقة التحليلية، ودقة القياس، وسلامة تفسير النتائج، ليكون الكتاب معينًا لطلبة الكيمياء والصيدلة والطب وعلوم المختبرات والطب الشرعي، ومرجعًا مساعدًا للباحثين والممارسين في مختبرات السموم والمختبرات السريرية والجنائية.

ونتقدم بخالص الشكر والتقدير إلى جامعة السعيد ودار السعيد للطباعة والنشر على دعمهما لهذا العمل.
كما نرحب بكل ملاحظة علمية بناءة تسهم في تطوير الطبعات اللاحقة.

نسأل الله أن ينفع بهذا الكتاب، وأن يجعله إضافةً نافعةً إلى المكتبة العلمية العربية.

والحمد لله رب العالمين.

المؤلفون
الكيميائي/ **أمين محمد محمد نعمان البريهي**
الأستاذ الدكتور/ **نيازي عبد المولى سلام العريقي**
الدكتور/ **علي عبده مطير**
تعز – 2026م

الفهرس

رقم الفصل	العنوان	رقم الصفحة
1	مقدمة في علم السموم التحليلي	1
2	نزاهة العينة السمية: المعايير المتقدمة في الاســـــتخلاص، الحفظ، وســـــلاسل الحيازة	43
3	اختيار العينة، وأخذ العينات، والتخزين، والاستقرار	79
4	العمليات المختبرية الأساسية	113
5	عزل وتنقية السموم: من الطرق التقليدية إلى التقنيات الحديثة	165
6	مقدمة في الكروماتوغرافيا والرحلان الكهربائي الشعيري	208
7	الكروماتوغرافيا الغازية: حوار الأبخرة ومسرح الفصل الجزيئي	235
8	الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء	268
9	كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة	325
10	تقنيات الرحلان الكهربائي الشعيري	340
11	مكونات الأجهزة البصرية	362
12	اختبارات الألوان، وتقنيات الطيف الضوئي والوميض الفسفوري	430
13	مطيافية الكتلة	454
14	العناصر الشحيحة والمعادن السامة	487
15	المعادن والأنيونات	515
16	المواد المتطايرة	567
17	السموم الطبيعية	597
18	التحليل الحديث للأدوية في المختبرات السريرية: مراجعة سردية للطرق العملية والتكنولوجيات الناشئة	642
19	المقايسات المناعية	666
20	التفسير السريري والسمومي للنتائج التحليلية	692

CHAPTER (1) الفصل الأول

علم السموم التحليلي

ANALYTICAL TOXICOLOGY



الفصل الأول

علم السموم التحليلي

Analytical Toxicology

مقدمة (Introduction)

لطالما مثّل اكتشاف السموم وتحديد هويتها تحديًا علميًا وتاريخيًا كبيراً؛ فحتّى القرن التاسع عشر الميلادي، اعتمد الأطباء والعلماء بصورة شبه رئيسية على الملاحظات البصرية الظاهرية والخصائص الشمية لتقدير ما إذا كان التسمم هو المسبب المباشر للوفاة. وكان السائد آنذاك الاعتقاد بأن ظهور تغيرات لونية على الجثة – مثل تحول الجلد إلى اللون الأسود أو الأزرق أو ظهور بقع بأماكن متفرقة – أو انبعاث روائح كريهة منها، يُعد دليلاً قاطعاً على الوفاة بالسم. وقد ارتبط هذا الاعتقاد ارتباطاً وثيقاً بالأطروحات المبكرة للطبيب الهولندي البارز هيرمان بوير هوف (Hermann Boerhaave) (1668–1738م)، والذي افترض أن لكل سم بصمة روائح نموذجية تظهر بوضوح عند تعرضه للظروف البخارية الساخنة. وفي سبيل تطبيق ذلك عملياً، اعتمد بوير هوف على تعريض المواد المشتبه بها لحرارة الفحم المشتعل لاختبار روائحها بغرض تحديد طبيعتها الكيميائية. وعلى الرغم من أن هذه المحاولات التاريخية مثلت لبنات أساسية وبدايات مبكرة نحو تأسيس كيمياء السموم، إلا أنها عانت من قصور ملحوظ تمثل في افتقارها التام للدقة المنهجية والمعيارية اللازمة لإثبات الوجود القاطع للسموم داخل الأنسجة الحيوية.

وقد تجلت نقطة التحول الكبرى والانعطافة التاريخية الحقيقية في مسار علم السموم التحليلي في عام 1836م، حين نجح الكيميائي الأسكتلندي جيمس مارش (James Marsh) في تطوير اختبار مخبري مبتكر تميز بحساسية وموثوقية عالية للكشف عن عنصر الزرنيخ (As) في الأنسجة البشرية والبيولوجية. و"اختبار مارش" ($Marsh\ test$) شكل علامة فارقة ومحطة جوهرية؛ لكونه أدخل ولأول مرة منهجية كيميائية مخبرية متكاملة قادرة على البرهان الحاسم واليقيني على وجود المواد السامة ضمن العينات الحيوية، حتى وإن وجدت بكميات ضئيلة وشحيحة للغاية. ومثلت هذه الطفرة التقنية حجر الأساس الذي انطلقت منه كافة الابتكارات والتطورات اللاحقة في هذا الحقل العلمي. وفي الوقت الراهن، وبفضل النهضة الهائلة في مجالات الكيمياء التحليلية المتقدمة، غدت تتوافر منظومة واسعة ومتنوعة من التقنيات والأجهزة الدقيقة القادرة على التعامل مع شتى أنواع السموم، وتتدرج هذه التقنيات بدايةً من الطرق اللونية (Colorimetric methods) البسيطة، وصولاً إلى الأساليب الآلية المعقدة وعالية الدقة مثل كروماتوغرافيا الغاز-مطياف الكتلة ($GC-MS$)، وكروماتوغرافيا السائل عالية الأداء-مطياف الكتلة ($HPLC-MS$)، وهي تقنيات تتيح الكشف الشامل والكمي الدقيق للسموم في مختلف العينات سواء كانت ذات أصل بيولوجي أو غير بيولوجي.

وهكذا، يختص علم السموم التحليلي بالتحري الدقيق عن العقاقير والمركبات الغريبة الوافدة إلى الجسم – والمعروفة اصطلاحاً بالمركبات الأجنبية أو Xenobiotics – بالإضافة إلى متابعة نواتج الأيض الخاصة بها (Metabolites)، وتحديد هويتها الكيميائية بدقة وقياس تراكيزها في العينات البيولوجية وما يرتبط بها من سوائل وأنسجة. ولا يقتصر دور أخصائي ومحلل

السموم على الجانب المخبري البحت، بل يتعداه ليؤدي دوراً محورياً في مساعدة الأطباء على تشخيص حالات التسمم الحاد والمزمن وإدارتها بالشكل السريري الأمثل، وربما المساهمة الفعالة في الوقاية منها مسبقاً. ولتحقيق هذه الغاية بنجاح، يصبح الإلمام بالمعارف والأساسيات النظرية والتطبيقية لعلم السموم السريري والجنائي أمراً حتمياً لا غنى عنه. كما يتوجب على المحلل امتلاك مهارات تواصل فعالة ومتقنة للتنسيق المستمر مع الأطباء السريريين، وأطباء علم الأمراض (Pathologists)، وفاحصي الوفيات (Coroners)، والأجهزة الأمنية والشرطية، إلى جانب الجهات المعنية الأخرى. وفضلاً عن ذلك، يُعد الإدراك العميق لمفاهيم الكيمياء السريرية، وعلم الأدوية (Pharmacology)، والحركية الدوائية ($Pharmacokinetics$) مطلباً أساسياً ومحبذاً لضمان تقديم تحليلات دقيقة تسهم بفاعلية في تحقيق العدالة وصحة المجتمع.



التطور التاريخي (Historical development)

يعود الاستخدام المنهجي للتقنيات الفيزيائية والكيميائية في تحليل العقاقير والسموم ضمن سوائل الجسم، والأنسجة الحيوية، والعينات المرتبطة بها، إلى الجذور الأولى لتطور علم السموم الجنائي (Forensic toxicology). وقد تضافرت لاحقاً جهود علمية مكثفة أثمرت عنها مساهمات بارزة تم تحقيقها في مجالات تحسين السلامة الغذائية والوقاية المهنية. وتُعد محاكمة "ماري بلاندي" (Mary Blandy) في مدينة أكسفورد في مارس عام 1752م بتهمة تسميم و قتل والدها، أول موثقة تاريخياً لاستخدام الاختبارات والكشوفات الكيميائية للكشف عن السم – والذي كان زرنيخاً في هذه الحالة المحددة – ضمن سياق محاكمة جنائية رسمية. وفي العاصمة الفرنسية باريس، أخذ الطبيب والمختص "ماتيو جوزيف بونافنتورا أورفيلا" (Mathieu Joseph Bonaventure Orfila) (1787–1853م) على عاتقه مواصلة وتطوير مسيرة سلفه الطبيب "فرانسوا إيمانويل فوديري" (François Emmanuel Fodéré) (1764–1835م)، فقام بتقسيم السموم ومعاوناتها علمياً إلى ست فئات رئيسية هي: "المواد المسببة للتآكل، القابضة، اللاذعة، المذهلة أو المخدرة، المخدرة اللاذعة، والمفسدة أو المتعفنة". وبذلك، أصبح أورفيلا رائدًا بلا منازع في الدراسة المنهجية المنظمة لدور التحليل الكيميائي في التشخيص الدقيق لحالات التسمم. واستمر تلاميذه ومن بعده في الدفع بهذا العلم قدماً، ولا سيما السير "روبرت كريستيسون" (Sir Robert Christison) (1797–1882م) في مدينة إدنبرة، و"ألفريد سوين تايلور" (Alfred Swaine Taylor) (1806–1880م)

في مستشفى جاي بالعاصمة لندن، بالإضافة إلى إسهامات "يونز ياكوب بيرزيليوس" (Jöns Jacob Berzelius) (1779–1848م) في دولة السويد.

وفي عام 1781م، أشار العالم "بلينك" (Plenck) إلى أن "العلامة الأكيدة الوحيدة للتسمم هي الخصائص النباتية للسم النباتي أو التحديد الكيميائي للسم المعدني الموجود في الجسم". وعلى الرغم من هذه المقولة، إلا أن علماء السموم في المدرسة البريطانية لم يتقبلوا هذا المعيار بشكل مطلق، وتحديداً "كريستيسون" الذي اعتبر أن الأدلة الطبية المستندة إلى الاحتمالات المقترنة بالشراكة مع القرائن العامة قد تكون قوية وحاسمة لدرجة تجعل تشخيص التسمم قطعياً لا شك فيه. ومع وجود هذا التحفظ النظري، ظلت الأهمية البالغة للاختبارات والكشوفات الكيميائية في تأكيد وحسم الاشتباه في التسمم جلية وواضحة، وقد تبلورت وتنامت هذه الشراكة الحيوية بين علم السموم السريري وعلم السموم التحليلي (الكيميائي) على مدار الأعوام الـ 250 الماضية.

وشهدت ثلاثينيات القرن التاسع عشر إدخال طرق كيميائية تميزت بحساسية وانتقالية عاليتين مخصصتين للكشف عن السموم المعدنية والفلزية في العينات البيولوجية؛ مثل اختبار الزرنيخ الشهير $(Marsh,\ 1836)$، تلاه إدخال طرق كشف الأنتيمون والبزموت والزئبق $(Reinsch,\ 1841)$. وفي خمسينيات القرن ذاته، تم ابتكار تقنيات استخلاص القلويدات (Alkaloids) – مثل النيكوتين – من العينات البيولوجية بالاستعانة بالمذيبات العضوية لتسهيل عمليات الكشف عنها وتحديد هويتها باستخدام الاختبارات الكيميائية أو الفسيولوجية على يد "ستاس" (Stas)، ليقوم "أوتو" (Otto) لاحقاً بتطويرها وتحويلها إلى طريقة منهجية متكاملة لاستخلاص المركبات العضوية غير المتطايرة من سوائل الجسم المختلفة. وبحلول أواخر القرن التاسع عشر، تم ابتكار وتطوير طرائق كيميائية وطيفية لقياس غاز أول أكسيد الكربون (CO)، فضلاً عن الطرائق الكيميائية المخصصة لتقدير وقياس تراكيز الإيثانول $(Ethanol)$ في الدم. وشملت المسيرة التطورية المرتبطة بعلم السموم الكيميائي إدخال تقنية القياس اللوني (Colorimetric measurement) في عام 1933م لتقدير الباربيتورات (Barbiturates)، واستخدام كبريتات الأمونيوم $((NH_4)_2SO_4)$ لغرض "تتمليح" (Salting out) القلويدات في عام 1937م. كما وُصف نهج بديل لتنقية العقاقير القاعدية من العينات البيولوجية، اعتمد على ترسيب البروتين باستخدام حمض ثلاثي كلور أسيتيك $(Trichloroacetic\ acid)$ متبوعاً بالامتزاز على مادة الكاولين (Kaolin) ثم استخلاص العقاقير المعنية في عام 1937م، وأُعقب ذلك بإدخال تقنية ترسيب البروتين بتنغستات الصوديوم $(Sodium\ tungstate)$ في عام 1946م. وفي عام 1949م، جرى إدخال "الفلوريسيل" (Florisil) – وهي عبارة عن سيليكات المغنيسيوم الاصطناعية $(Synthetic\ magnesium\ silicate)$ – كبديل للكاولين لامتزاز العقاقير القاعدية مثل المواد المخدرة من العينات البيولوجية، إلى جانب تطوير طرائق الانتشار الدقيق $(Microdiffusion)$ للمواد المتطايرة بواسطة "كونواي" (Conway) في عام 1947م.

وتبع هذه الإنجازات طفرات وتطورات كبرى في المنهجية التحليلية إثر دخول وتطبيق تقنيات فيزيائية وكيميائية متطورة للغاية، مثل القياس الطيفي والكروماتوغرافيا (التصاوغ اللوني) مع حلول أواخر الأربعينيات من القرن العشرين. وعلى وجه الخصوص، استُخدم القياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية $(UV\ Spectrophotometry)$ والأشعة تحت الحمراء $(IR\ Spectrophotometry)$ على نطاق واسع، جنباً إلى جنب مع القياس الطيفي للمرئي $(Colorimetry)$، وكروماتوغرافيا الورق $(Paper\ chromatography)$ وكروماتوغرافيا التبادل الأيوني $(Ion\ exchange\ chromatography)$. وفي المراحل اللاحقة، حلت كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة $(TLC -$

$Thin - Layer\ Chromatography$) محل كروماتوغرافيا الورق بصورة كبيرة؛ نظراً لتمتع التقنية الأخيرة بمزايا تفضيلية تشمل سرعة التحليل الفائقة وحدود كشف ($Limits\ of\ detection$) أدنى وأكثر حساسية. وقد أدى التطوير المستمر للأجهزة الخاصة بالقياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية (متضمنةً مرافق ومعدات مطيافية المشتقات)، وقياس الطيف الفلوري ($Fluorimetry$)، ومطيافية الامتصاص الذري ($Atomic\ absorption\ spectroscopy$)، وفولتامتري التجريد الأنودي ($Anodic\ stripping\ voltammetry$)، والتقنيات الكيميائية الكهربائية ($Electrochemistry$)، وحيود الأشعة السينية ($X - ray\ diffraction$), ومطيافية الكتلة ($Mass\ spectrometry$), والرنين المغناطيسي النووي ($NMR - Nuclear\ magnetic\ resonance$), إضافة إلى التحليل بالتنشيط النيوتروني ($Neutron\ activation\ analysis$); إلى توسيع دائرة تطبيق هذه التقنيات المتقدمة على نطاق واسع لمعالجة وحل المشكلات التحليلية المعقدة والمحددة بدقة متناهية.

علم السموم التحليلي الحديث (Modern analytical toxicology)

شهدت الأعوام الخمسة والعشرون الماضية طفرات متتالية وتطورات تقنية هائلة في طرائق الكشف عن العقاقير ومختلف السموم ضمن السوائل البيولوجية، فضلاً عن تحسين سبل تحديد هويتها وقياس تراكيزها، مما أدى إلى رفع كفاءة وموثوقية النتائج التحليلية بصورة ملحوظة. وقد برزت بوضوح القيمة التشخيصية والعلاجية البالغة لبعض التحاليل الطارئة والإسعافية في توجيه التدخلات الطبية الحرجة. وعلى الرغم من أن جانباً كبيراً من هذه الفحوصات يُجرى لأغراض سريرية بحتة، إلا أن لها تداعيات طبية شرعية ($Medicolegal$) جوهرية تستوجب مستويات عالية للغاية من الموثوقية والدقة المخبرية؛ ومن أبرز الشواهد على ذلك: فحوصات تحديد "الموت الدماغي" ($Brain\ death$), الفحوصات المرتبطة بحالات إساءة معاملة الأطفال ($Child\ abuse$), والتحري عن حالات الاشتباه في التسمم علاجي المنشأ ($Iatrogenic\ poisoning$).

بالإضافة إلى ذلك، تصاعدت الحاجة الملحة لقياس تراكيز العقاقير – وأحياناً نواتج الأيض الخاصة بها ($Metabolites$) – في بلازما الدم لغايات المراقبة الدوائية العلاجية ($Therapeutic\ drug\ monitoring - TDM$), والكشف عن تعاطي العقاقير المخدرة ($Drugs\ of\ abuse$) ومسهلات الأمعاء أو مدرات البول ($Diuretics$), فضلاً عن إنجاز التحليلات المخبرية اللازمة لمراقبة مستويات التعرض المهني ($Occupational\ exposure$) للمواد الكيميائية السامة.

وفي الوقت الراهن، تتوفر تحت تصرف محلل السموم ترسانة متكاملة من الطرائق والتقنيات التحليلية القوية، لا سيما الطرق الكروماتوغرافية المتقدمة، والمقايسات المناعية للربيطة ($Ligand\ immunoassays$), إلى جانب تقنيات متفرقة أخرى موضحة في الجدول (1). ومع ذلك، يبقى من المستحيل عملياً إخضاع كل عينة بحثية أو سريرية للفحص الشامل عن كافة السموم المحتملة وبالحساسية المطلوبة في آنٍ واحد؛ ولهذا السبب، فإن حصر وتحديد الهدف السريري أو الجنائي من أي تحليل يعد ضرورة حتمية لا غنى عنها. ورغم أن المبادئ الكيميائية والفيزيائية الأساسية تظل ثابتة عبر مختلف فروع علم السموم التحليلي، إلا أن طبيعة العينة المتاحة وحجمها يتباينان بصورة كبيرة، تماماً كالجدول الزمني المحدد لإصدار النتيجة والغرض الأساسي من التحليل، وهي عوامل تتضافر معاً لتوجيه واختيار الطريقة الأنسب لكل حالة تحليلية معينة.

وقد أسهمت الكروماتوغرافيا الغازية-الصلبة (GSC)، وبصورة أكثر شيوعاً الكروماتوغرافيا الغازية-السائلة (GLC), بإضافات جوهرية في إجراء التحليلات النوعية والكمية للعقاقير والسموم العضوية الأخرى، لا سيما مع إدخال كواشف ($Detectors$) شديدة الحساسية مثل كاشف التأين باللهب ($FID - Flame\ ionization\ detector$) وكاشف التقاط الإلكترون ($ECD - Electron\ capture\ detector$). وغالباً ما تتكامل وظائف هذين الكاشفين؛ إذ يُبدي كاشف

(ECD) استجابة فائقة الانتقائية تجاه مركبات محددة أو مشتقات كيميائية تحتوي في بنيتها على هالوجينات أو مجموعات سالبة كهربياً تسمى "الملتقطة للإلكترونات" (مثل مجموعة النيترو $-NO_2$), في حين يستجيب كاشف (FID) لمعظم المركبات العضوية بشكل عام. وفي مراحل لاحقة، أدى ابتكار واستخدام الكواشف الانتقائية للنيتروجين (NSD), والمعروفة أيضاً بكواشف التأين باللهب القلوي $(AFID)$ وكواشف النيتروجين-الفوسفور (NPD), والتي تمنح استجابة معززة وانتقائية للمركبات الحاوية على روابط كربون-نيتروجين (C–N) أو ذرات الفوسفور، إلى توسيع النطاق التطبيقي لتقنية (GLC) بدرجة أكبر. ورغم ذلك، فإن تقنية الكروماتوغرافيا الغازية المقترنة بمطيافية الكتلة $(GC-MS)$, والتي تُمثّل نموذجاً ممتازاً لما يُعرف بـ "التقنيات المقترنة" $(Hyphenated\ techniques)$, توفر حساسية مذهلة مقترنة بانتقالية فريدة لا تُضاهى؛ مما يتيح التعرف القاطع على بنية العديد من المركبات الكيميائية باستخدام كميات ضئيلة للغاية تُقدر بالنانوجرام (ng), الأمر الذي أدى إلى حلولها محل كاشف (NPD) في الغالب، وبخاصة في نطاق الأعمال النوعية $(Qualitative\ work)$.

الجدول (1): بعض طرق تحليل العقاقير والسموم العضوية الأخرى في العينات البيولوجية

التقنية(Technique)	المبدأ(Principle)
اختبار الألوان$(Colour\ test)$	كيميائي$(Chemical)$
المستشعرات الحيوية$(Biosensors)$ البولاروغرافي النبضي التفاضلي(DPP)	كهرومغناطيسي $(Electrochemical)$
مطيافية الكتلة] (MS) وتعرف أيضاً بتصوير الشظايا الكتلي$[MF$ - الرنين المغناطيسي النووي(NMR) قياس الطيف الفلوري$(SPFM)$ مطيافية امتصاص الأشعة فوق البنفسجية/المرئية(UV/Vis)	طيفي$(Spectrometric)$
الكروماتوغرافيا الغازية] (GC) تشمل الكروماتوغرافيا الغازية-الصلبة (GSC) والكروماتوغرافيا الغازية-السائلة$[(GLC)$ الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء$(HPLC)$ كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عالية الأداء$(HPTLC)$ كروماتوغرافيا السوائل فوق الحرجة$[S(C)FC]$	كروماتوغرافي $(Chromatographic)$
الهجرة الكهربائية الشعرية$[C(Z)E]$ الكروماتوغرافيا الكهربائية الشعرية(CEC) الكروماتوغرافيا الشعرية الحركية الكهربائية المذيلة$(MECC)$	كهربائي$(Electrophoretic)$
مقايسة المانح الإنزيمي المستنسخ$(CEDIA)$ مقايسة الممتز المناعي المرتبط بالإنزيم$(ELISA)$ تقنية المقايسة المناعية الإنزيمية المضاعفة$(EMIT)$ المقايسة المناعية باستقطاب الفلورة$(FPIA)$ اختبارات تراص اللاتكس(LAT) المقايسة المناعية الإنزيمية للجسيمات الدقيقة$(MEIA)$ المقايسة المناعية الشعاعية(RIA)	مناعي$(Immunoassay)$
تفاعل نزع هيدروجين الكحول (للإيثانول) تفاعل أريل أسيل أميد أميدوهيدرولاز (للباراسيتامول)	إنزيمي$(Enzyme-based)$

وعلى الصعيد ذاته، حققت تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء $(HPLC-High-Performance\ Liquid\ Chromatography)$, والتي عُرفت تاريخياً بكروماتوغرافيا السائل عالي الضغط، انتشاراً وتطبيقاً واسعين في مجالات علم السموم التحليلي منذ مطلع سبعينيات القرن العشرين. وباستثناء الغازات والمذيبات شديدة التطاير، فإن أغلب المواد الكيميائية المراد تحليلها $(Analytes)$ تُعد قابلة للقياس والتحليل بكفاءة عالية عبر تقنية $(HPLC)$ أو باستخدام أحد بدائل إجراءاتها الأساسية، وذلك على النقيض تماماً من الكروماتوغرافيا الغازية (GC) التي تقتصر حصراً

على المركبات المتصفة بالاستقرار الحراري والتطاير الجيد عند درجات حرارة قد تصل إلى نحو $350°C$. وعلى الرغم من ذلك، فإن توظيف $(HPLC)$ في التحليل النوعي للعقاقير يظل مقيداً نسبياً بغياب كاشف عالمي شديد الحساسية يكافئ كاشف (FID) المستخدم في (GC)؛ إلا أنه تتوفر حالياً حزمة متكاملة من الكواشف الموثوقة والحساسة، ولا سيما كواشف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية (UV), والكواشف الفلورية $(Fluorimetric)$, والكواشف الكهرومغناطيسية (ED), فضلاً عن مطيافية الكتلة (MS), بتفاوت ملحوظ في درجات الحساسية والانتقائية. وإلى جانب ذلك، تتيح هذه التقنية إمكانية جمع أجزاء السائل الخارج من العمود الكروماتوغرافي $(Effluent)$ المقابلة للقمم المراد دراستها لإخضاعها لتحاليل لاحقة $(Off - line)$, كاستخدام المقايسات المناعية.

وفي السياق ذاته، وجدت المقايسات المناعية $(Immunoassays)$ تطبيقات واسعة ومهمة، سواء تمثلت في المقايسة المناعية الشعاعية التقليدية $(RIA - Radioimmunoassay)$ أو عبر متغيراتها الحديثة والمتطورة؛ مثل تقنية المقايسة المناعية الإنزيمية المضاعفة $(EMIT - Enzyme - multiplied\ immunoassay\ technique)$ ومقايسة المانح الإنزيمي المستنسخ $(CEDIA - Cloned\ enzyme\ donor\ immunoassay)$, وهي أساليب تتميز غالباً بحساسية استثنائية. كما أُتيحت بدائل تعتمد على المقايسات الإنزيمية، كالتطبيقات المستخدمة لتقدير عقار الباراسيتامول (الأسيتامينوفين). ورغم المزايا العديدة لهذه المقايسات، إلا أنها تشترك في عيب رئيسي يتمثل في استلزامها تحضير أجسام مضادة، أو إنزيمات، أو بروتينات ارتباط نوعية خاصة بكل مادة مفردة أو مجموعة دوائية قبل الشروع في التحليل. وفي المقابل، تتميز هذه المقايسات بإمكانية تطبيقها المباشر في أحجام صغيرة جداً من الأوساط المائية والمعروف بـ "المقايسة المتجانسة" $(Homogenous\ assay)$, على عكس الطرائق الكروماتوغرافية التي تتطلب بالضرورة خطوات تمهيدية معقدة لتنقية العينة، مثل استخلاص المذيبات $(Solvent\ extraction)$، قبل إتمام التحليل. ورغم بلوغ المقايسات المناعية درجات عالية من الحساسية، إلا أن بعضها قد يعاني من قصور في درجة الانتقائية؛ بمعنى أن الجسم المضاد قد يتفاعل مع عدة جزيئات متشابهة بنيئياً وهيكلياً، وهي ظاهرة تُعرف بالتفاعل التقاطعي $(Cross - reactivity)$، والذي يمكن استغلاله أحياناً وبشكل إيجابي لفحص مجموعات وفئات كاملة من العقاقير المخدرة مثل مشتقات الأفيون $(Opiates)$.

أهداف علم السموم التحليلي (Objectives of Analytical Toxicology)

يضطلع علم السموم التحليلي $(Analytical\ toxicology)$ بدور بالغ الأهمية يتمثل في تقديم الدعم الحاسم واليقيني في سياقات متعددة ومتنوعة، تتراوح ما بين التطبيقات السريرية العلاجية للمرضى وبين التحقيقات الجنائية والشرعية المرتبطة بإنفاذ القوانين. ويمكن تلخيص هذه الأهداف الرئيسية بصورة منهجية باستخدام الاختصار الشهير **DIMPLE** (Baselt, 2008):

- **التشخيص $(Diagnosis - D)$:** يهدف إلى التحقق مما إذا كان التعرض للمواد السامة هو المسبب المباشر للأعراض السريرية الظاهرة على المريض أو لحالة الوفاة؛ إذ يساعد التحليل السمومي بدقة في تأكيد أو استبعاد حالات التسمم عندما تكون اللوحات السريرية غامضة أو متداخلة وتتشابه مع أمراض أخرى (Baselt, 2008).
- **تحديد السموم $(Identification\ of\ poisons - I)$:** يتضمن الكشف عن السموم النوعية والمحددة بدقة داخل العينات البيولوجية المختلفة (مثل الدم، البول، وسوائل الجسم، وأنسجة الأعضاء) أو العينات غير البيولوجية (مثل بقايا الأطعمة، والمستحضرات الدوائية المشتبه بها)، وهو ما يشمل معرفة الطبيعة الكيميائية الدقيقة للمادة (Baselt, 2008).

- **إدارة وعلاج التسمم ($Management\ and\ treatment\ of\ poisoning - M$):** يساهم بصورة مباشرة في توجيه مسار العلاج السريري للمريض المسمم؛ حيث تمكن معرفة نوع السم وتركيزه الكادر الطبي من اختيار الترياق المناسب ($Antidote$) أو اتخاذ تدابير استعجالية لإزالة السموم من الجسم مثل غسيل الكلى ($Hemodialysis$) (Baselt, 2008).
- **التنبؤ بمصير الحالة ($Prognosis - P$):** يختص بتقييم النتيجة المتوقعة لمسار التسمم، سواء أفضى إلى الشفاء التام، أو خلف أضراراً عضوية دائمة، أو أدى إلى الوفاة. وتُعد تراكيز السم المقاسة في الدم مؤشرات كمية هامة لتقدير شدة التسمم والتنبؤ بالمضاعفات الوشيكة (Baselt, 2008).
- **تطبيق القانون ($Law\ enforcement - L$):** يرتكز على توفير الأدلة العلمية الرصينة والموثوقة في القضايا الجنائية أو المدنية المتعلقة بحوادث التسمم، ويشمل ذلك قضايا القتل العمد، الانتحار، الحوادث العرضية، أو جرائم تعاطي المخدرات، حيث يؤدي المختبر السمومي دوراً محورياً في إسناد الجهات القضائية (Baselt, 2008).
- **التعليم والبحث ($Education\ and\ research - E$):** يهدف إلى تعميق الفهم العلمي لآليات السمية، وتطوير تقنيات كشف مبتكرة وأكثر حساسية، وتحسين استراتيجيات العلاج السريري؛ إذ تسهم البيانات المستمدة من الحالات الواقعية في بناء قاعدة معرفية رصينة تعزز الممارسات الطبية والتشريعية (Baselt, 2008).

وللمختبر السمومي المعاصر وظائف وأبعاد تشغيلية هامة أخرى يمكن تذكرها باختصار موازٍ وهو **PROMISE** (Gowda & Gowda, 2011):

- **التنبؤ ($Prognosis$):** لتقدير مآل حالة التسمم على المديين القصير والطويل (Gowda & Gowda, 2011).
- **البحث ($Research$):** لدراسة الحركية السمية ($Toxicokinetics$ – المعنية بما يفعله الجسم بالسم) وآلية العمل ($Mechanism\ of\ action$ – المعنية بما يفعله السم بأعضاء الجسم) (Gowda & Gowda, 2011).
- **الأمر ($Order$):** للاستجابة للأوامر القضائية الصادرة عن المحاكم أو جهات إنفاذ القانون لإنجاز تحاليل سموم تخصصية في قضايا معينة (Gowda & Gowda, 2011).
- **المراقبة ($Monitoring$):** لتتبع الكفاءة العلاجية ومتابعة تراكيز السموم في جسم المريض للاطمئنان على تناقصها واستجابة العضوية الحيوية للعلاج (Gowda & Gowda, 2011).
- **التعرف ($Identification$):** للوصول إلى الهوية الدقيقة للسم أو الأدوية أو المركبات الكيميائية الملوثة الموجودة في العينة (Gowda & Gowda, 2011).
- **الشدة ($Severity$):** لتقييم درجة خطورة الحالة المرضية استناداً إلى تراكيز السم المقاسة والاضطرابات الفسيولوجية المرافقة (Gowda & Gowda, 2011).
- **الاستبعاد ($Exclusion$):** لتأكيد أو نفي الاستجابة السمية واستبعاد أسباب مرضية أخرى محتملة قد تتسبب في ظهور ذات الأعراض (Gowda & Gowda, 2011).

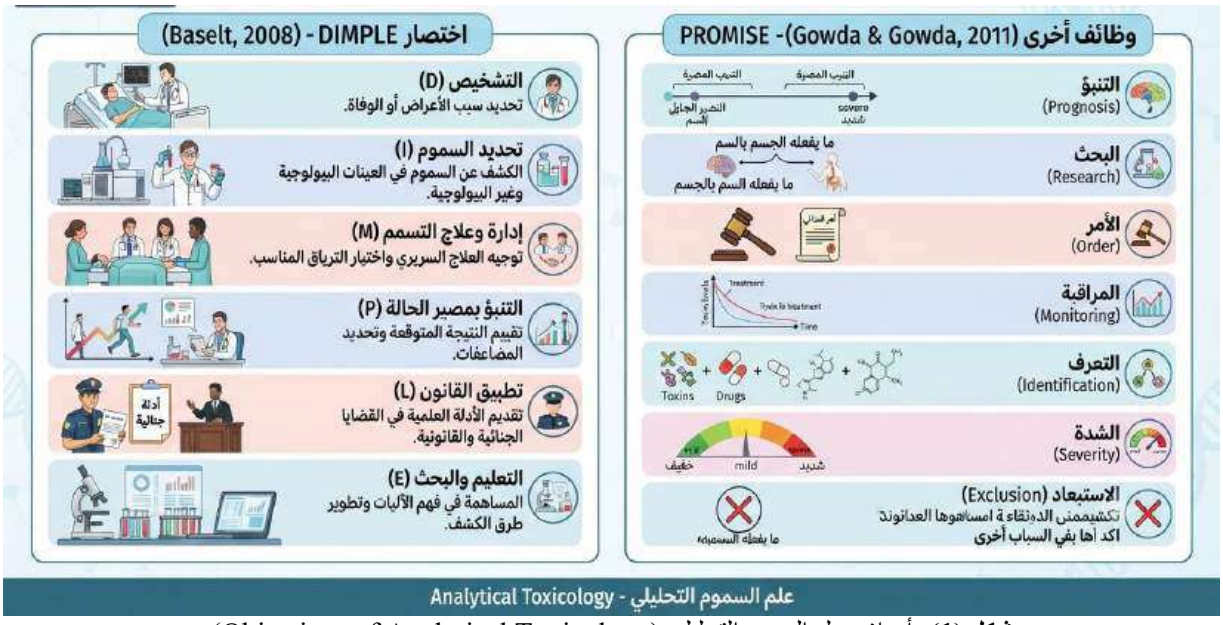
وفي الدول المتقدمة، يُلاحظ أن الخدمات التحليلية السمومية تُقدّم عادةً عبر مختبرات تخصصية بالغة التطور، وغالباً ما تكون ملحقة بوحدة سموم سريرية متكاملة مدعومة بمختبر كيمياء حيوية راسخ، ووحدة صيدلية تحليلية متقدمة، إلى جانب قسم جامعي مختص بالطب الشرعي (Flanagan et al., 2007). ويضمن هذا التكامل المنهجي تقديم خدمات تشخيصية وعلاجية عالية الشمولية والدقة. أما في العديد من الدول النامية، فلا تتوفر هذه البنى التحتية المتقدمة بصورة منتظمة؛ وحين تتوافر، غالباً ما يعتمد الأطباء على مختبرات الصحة الوطنية أو الإقليمية التي أُنشئت أصلاً لأغراض عامة أخرى وتعمل بالطاقة

الجزئية فقط. وفي مثل هذه البلدان، تتولى مختبرات علوم الطب الشرعي الحكومية تلبية الحصة الأكبر من الاحتياجات الخدمية المطلوبة، بينما يظل حضور المختبرات الخاصة في هذا المجال ضئيلاً للغاية. وتعتمد غالبية المختبرات الحكومية في هذه المناطق على طرائق تحليلية بسيطة للغاية وغير مكلفة، إذ لا تتطلب معدات متطورة باهظة الثمن، أو كواشف كيميائية عالية التكلفة، أو حتى استمرارية في إمدادات الطاقة الكهربائية (UNODC, 2009).



الصورة أعلاه للمؤلفين الثلاثة وهم يضعون الأسس العامة لـ أهداف علم السموم التحليلي باستخدام إطار DIMPLE، الذي يوضح:

← التشخيص Diagnosis
← تحديد السموم Identification of Poisons
← إدارة وعلاج التسمم Management & Treatment
← التنبؤ بمصير الحالة Prognosis
← تطبيق القانون Law Enforcement
← التعليم والبحث Education & Research



شكل (1): أهداف علم السموم التحليلي (Objectives of Analytical Toxicology)

أهمية الأساليب التحليلية في علم السموم

يتم سنوياً إنتاج وتداول ما يقارب 200,000مادة كيميائية جديدة حول العالم، وتظل سمية النسبة الأكبر منها مجهولة تماماً. وفي حين يصل عدد محدود جداً من هذه المواد إلى مراحل التطوير والاستخدام الفعلي، إلا أنها غالباً ما تجد طريقها بمرور الوقت إلى النظم البيئية المختلفة. ويمكن لهذه الملوثات أن تحدث أضراراً بالغة وبعيدة المدى وفقاً للآليات الآتية:

- **التراكم البيئي ($Environmental\ accumulation$):** تتسم بعض المواد الكيميائية بالثبات والدوام العالي وقدرتها على الالتصاق بجزيئات التربة والرواسب لفترات طويلة.
- **التنقل ($Mobility$):** تتميز مركبات أخرى بقدرتها الفائقة على الانتقال والانتشار عبر المسطحات المائية أو الغلاف الجوي لمسافات شاسعة.
- **التحول ($Transformation$):** قد تتعرض بعض المركبات لعمليات تحلل أو تغير حوي-كيميائي بفعل نشاط الكائنات الدقيقة، مما ينتج عنه مركبات أشد سمية تتراكم تدريجياً داخل السلسلة الغذائية ($Food\ chain$).
- **الآثار الصحية ($Health\ effects$):** يؤدي تراكم هذه المواد في الكائنات الحية العليا إلى إحداث تغيرات مرضية ضارة في مسارات الأيض ($Metabolism$), مما يسبب أمراضاً مزمنة قد تستغرق سنوات طويلة لكي يُتعرف على المسبب الكيميائي المسؤول عنها. ومن أبرز الشواهد المعاصرة على ذلك؛ المخاوف المتزايدة المرتبطة بتأثير المركبات الكلورية العضوية ($Organochlorines$) ودورها المحتمل كمقلدات لهرمون الإستروجين أو ما يُعرف بـ إستروجينات خارجية ($Xenoestrogens$) في جسم الإنسان.

العملية التحليلية الأساسية ($Basic\ Analytical\ Process$)

على الرغم من التطور التقني والتكنولوجي المتسارع في أجهزة القياس، إلا أن الخطوات الهيكلية للعملية التحليلية الأساسية تظل ثباتاً وموحدة، وتتلخص فيما يلي:

1. **تحديد الهدف ($Defining\ the\ objective$):** صياغة وتحديد الغرض أو الهدف البحثي أو السريري من التحليل بدقة متناهية.
2. **أخذ العينات ($Sampling$):** تصميم واعتماد خطة منهجية لجمع عينات تمثيلية ودقيقة.
3. **عزل المركب ($Compound\ isolation$):** فصل المركب (أو المركبات) الكيميائي المستهدف عن مصفوفة العينة.
4. **إزالة الشوائب ($Cleanup$):** التخلص من المكونات المتداخلة والشوائب التي قد تؤثر سلباً على دقة وموثوقية التحليل.
5. **التقدير الكمي والتقييم ($Quantification\ and\ evaluation$):** تحديد التراكيز الكمية للمركب وتقييم البيانات المخبرية بما يتوافق مع الفرضية العلمية الأولية.

وتجدر الإشارة إلى أن التفاصيل الإجرائية لكل خطوة تتباين وتبنى بصورة خاصة استناداً إلى الخصائص الفيزيائية والكيميائية للمادة السامة المراد تحليها.

بروتوكولات تحليل المواد السامة ($Toxic\ AnalysisProtocols$)

يوضح الجدول أدناه نماذج لبروتوكولات تحليلية معتمدة لمواد سامة مختلفة، مبينةً المراحل المتسلسلة بدءاً من معالجة العينة وحتى التحليل النهائي (جدول 2).

الجدول (2): البروتوكولات النموذجية لتحليل بعض المواد السامة
Table 2: Typical Protocols for Analysis of Toxicants

الخطوة(*Step*)	الزرنيخ(*Arsenic*)	مركب ديوكسين(*TCDD*) - *TCDD*	كلوربيريفوس (*Chlorpyrifos*)
أخذ العينات (*Sampling*)	طحن العينة الصلبة أو تجنيس الأنسجة (*Homogenization*)	طحن العينة الصلبة أو تجنيس الأنسجة (*Homogenization*)	طحن العينة الصلبة أو تجنيس الأنسجة (*Homogenization*)
الاستخلاص والتنقية *action and Cleanup*	حرق جاف (*Dry ashing*)؛ إعادة إذابة المتبقي؛ توليد غاز الأرسين (AsH_3) وامتصاصه	الاستخلاص بالإيثانول وهيدروكسيد البوتاسيوم (KOH)؛ إزالة الدهون المتصبنة؛ ثم تنقية متعددة عبر مراحل كروماتوغرافيا العمود (*Column Chromatography*) وكروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (*HPLC*)	استخلاص سوكسليه (*Soxhlet extraction*) باستخدام خليط الهكسان:الأسيتون؛ ثم إزالة المكونات المتداخلة باستخدام مادة فلوريسيل (*Florisil*)
التحليل النهائي (*Analysis*)	الامتصاص الذري *ion spectroscopy* – *AA*	كروماتوغرافيا الغاز مقترنة بمطيافية الكتلة– *Gas chromatography – mass spectrometry – GC/MS*)	كروماتوغرافيا الغاز مع كاشف النيتروجين والفسفور (*GC/NPD*) أو كاشف التألق اللهبي *photometric detector – FPD*

مصطلحات علمية هامة:

- *TLC* **(كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة):** *Thin – layer chromatography*.
- *HPLC* **(كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء):** *High – performance liquid chromatography*.
- *GC* **(كروماتوغرافيا الغاز):** *Gas chromatography*.
- *AA* **(الامتصاص الذري):** *Atomic absorption*.
- *GC/MS* **(كروماتوغرافيا الغاز/مطيافية الكتلة):** *Gas chromatography/mass spectrometry*.
- *NPD* **(كاشف النيتروجين والفسفور):** *Nitrogen phosphorus detector*.
- *FPD* **(كاشف التألق اللهبي):** *Flame photometric detector*.

وتبرهن هذه النماذج بوضوح على أن كل مادة كيميائية تتطلب بروتوكولاً تحليليا فريداً ومصمماً بدقة ليتناسب مع خواصها الفيزيائية والكيميائية المميزة.

المخططات التحليلية للكشف عن المواد السامة (*Analytical Schemes for ToxicantDetection*)

تحدد الظروف المحيطة والملابسات الخاصة بأي قضية طبيعة الاختبارات السمومية التحليلية المطلوبة، حيث توجد فحوصات نوعية متعددة ترتبط ارتباطاً وثيقاً بنبيعة المادة المراد الكشف عنها. وغالباً ما يتبع أي مختبر تخصصي خوارزمية (*Algorithm*) واضحة ومحددة لإتمام خطوات التحليل الكيميائي بدقة (Gutteridge, 2010 & Cairns).

المواد ذات الأهمية السمية (*Toxicologically Significant Substances*)

تتنوع المواد القادرة على إحداث التسمم بشكل كبير، وتُصنف غالباً بناءً على خصائصها الفيزيائية والكيميائية لتسهيل اختيار وتطبيق أفضل المنهجيات التحليلية. وأبرز هذه المجموعات تشمل ما يلي:

- **الأدوية والمواد المسببة للإدمان (*Drugs of abuse and pharmaceuticals*):** وتضم المستحضرات الدوائية التي تؤخذ بجرعات مفرطة أو تستخدم لأغراض غير علاجية، مثل المسكنات الأفيونية (*Opioid analgesics*), والمنشطات (*Stimulants*), والمهدئات (*Sedatives*).
- **المواد المتطايرة (*Volatile substances*):** وهي مواد كيميائية تتميز بسرعة تحولها إلى الحالة الغازية في درجات الحرارة الاعتيادية، مما يجعل الاستنشاق طريقاً رئيسياً للتسمم بها؛ ومن أبرز أمثلتها الإيثانول (*Ethanol* – C_2H_5OH), الميثانول (*Methanol* – CH_3OH), التولوين (*Toluene*), والمذيبات العضوية المختلفة.

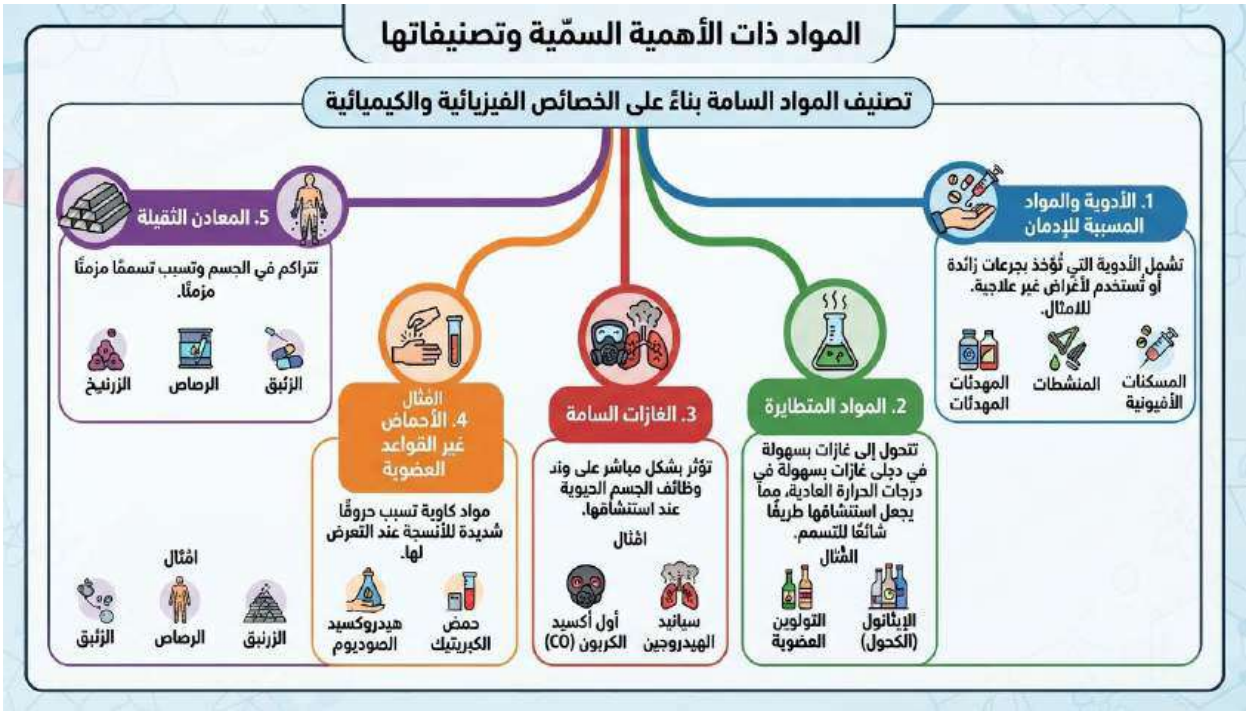
- **الغازات السامة** $(Toxic\ gases)$**:** وهي غازات تؤثر بشكل مباشر وفوري على الوظائف الحيوية للجسم عند استنشاقها، ومنها غاز أول أكسيد الكربون $(Carbon\ monoxide - CO)$ الذي يمنع ارتباط الأكسجين ونقله إلى الأنسجة الحيوية، وسيانيد الهيدروجين $(Hydrogen\ cyanide - HCN)$.
- **الأحماض والقواعد غير العضوية** $(Inorganic\ acids\ and\ bases)$**:** وهي مواد شديدة التآكل $(Corrosive\ materials)$ تحدث حروقاً بالغة في الأنسجة عند التعرض المباشر لها، مثل حمض الكبريتيك $(Sulfuric\ acid - H_2SO_4)$ أو هيدروكسيد الصوديوم $(Sodium\ hydroxide - NaOH)$.
- **المعادن الثقيلة** $(Heavy\ metals)$**:** وهي عناصر تتميز بقدرتها العالية على التراكم الحيوي داخل أنسجة الجسم مسببة تسمماً مديماً أو م مزمناً؛ وتشمل الأمثلة الرئيسية عنصر الزرنيخ $(Arsenic - As)$, الرصاص $(Lead - Pb)$, والزئبق $(Mercury - Hg)$.

يُظهر الجدول (3) أدناه نماذج توضيحية للفئات الرئيسية من الأدوية والمركبات التي يتم البحث عنها بصورة روتينية في الفحوصات والتحاليل السمومية المختلفة. وتجدر الإشارة إلى أن هذه القائمة تُعد إرشادية في المقام الأول، حيث تتباين المواد المحددة التي يتم فحصها عملياً تبعاً لسياسة المختبر، والمنطقة الجغرافية، والأولويات السريرية أو الطبية الشرعية المتبعة (Moeller et al., 2017).

الجدول (3): الأدوية الشائعة المدرجة في معظم فحوصات السموم
Table 3: Common Drugs Included in Most Toxicology Screens

الفئة$(Category)$	**أمثلة محددة**$(Specific\ Examples)$
كحوليات$(Alcohols)$	إيثانول(C_2H_5OH) ، ميثانول(CH_3OH) ، إيزوبروبانول، أسيتون (CH_3COCH_3)
باربيتورات/مهدئات $(Barbiturates/Sedatives)$	أموباربيتال، سيكوباربيتال، بنتوبربيتال، بيوتالبيتال، بيوتاباربيتال، فينوباربيتال، غلوتيثيميد، إيثكلورفينول، ميثاكوالون
مضادات الصرع$(Anticonvulsants)$	فينيتوين، كاربامازيبين، بريمادون، فينوباربيتال
بنزوديازيبينات$(Benzodiazepines)$	كلورديازيبوكسيد، ديازيبام، ألبرازولام، تيمازيبام
مضادات الهيستامين $(Antihistamines)$	ديفينهيدرامين، كلورفينيرامين، برومفينيرامين، تريبلينامين، تريكسيفينيديل، دوكسيلامين، بيريل أمين
مضادات الاكتئاب$(Antidepressants)$	أميتريبتيلين، نورتريبتيلين، دوكسيبين، إيميبرامين، ديسيميبرامين، ترازيدون، أموكسابين، مابروتيلين
مضادات الذهان$(Antipsychotics)$	تريفلوبيرازين، بيرفينازين، بركلوربيرازين، كلوربرومازين
منشطات$(Stimulants)$	أمفيتامين، ميثامفيتامين، فينيل بروبانول أمين، إيفيدرين،MDA ، MDMA(فينيثيلامينات أخرى)، كوكايين، فينسيكلايدين
مسكنات مخدرة $(Narcotic\ analgesics)$	هيروين، مورفين، كوديين، أوكسيكودون، هيدروكودون، هيدرومورفون، ميبيريدين، بنتازوسين، بروبوكسيفين، ميثادون
مسكنات أخرى$(Other\ analgesics)$	ساليسيلات (مثل الأسبرين)، أسيتامينوفين (باراسيتامول)
أدوية القلب والأوعية الدموية $(Cardiovascular\ drugs)$	ليدوكائين، بروبرانولول، ميتوبرولول، كينيدين، بروكاينااميد، فيراباميل
أخرى$(Others)$	ثيوفيلين، كافيين، نيكوتين، خافضات سكر الدم الفموية، سترکنين $(Strychnine)$





العقاقير والمبيدات الحشرية (Drugs and Pesticides)

تُستخدم تقنية الكروماتوغرافيا الغازية الشعرية ($Capillary\ GC$)، وغالباً ما تقترن بنظام الكشف عبر مطيافية الكتلة (MS)، على نطاق واسع وواسع النطاق في كل من التحليل السمي المنهجي ($Systematic\ toxicological\ analysis - STA$) وفي فحوصات الكشف عن مواد وعقاقير محددة، على الرغم من أن تقنية الكروماتوغرافيا الغازية ذات الأعمدة المحشوة ($Packed\ column\ GC$) لا تزال تحتفظ بمكانة محدودة في بعض التطبيقات المخبرية الخاصة. كما تُوظّف تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء ($HPLC$)، والتي غالباً ما تقترن في الوقت الحاضر بمطيافية الكتلة ($HPLC - MS$)، لتحليل مركبات أو مجموعات كيميائية معينة بدقة عالية، إلى جانب الاعتماد على

إجراءات (STA) القائمة على استخدام كواشف مصفوفة الصمام الثنائي ($Diode - array\ detectors - DAD$) وتقنيات قياس نسبة الطول الموجي ($Wavelength\ ratio\ techniques$).

وتتمثل المشكلة والتحدي الأساسي في التحليل السمي المنهجي (STA) – والمعروف بفحص السموم، أو فحص العقاقير، أو التحري عن المجهولات – ببساطة في القدرة على الكشف الموثوق والآمن عن أوسع نطاق ممكن من المركبات الكيميائية باستخدام أقل كمية ممكنة من العينة المتاحة (سواء كانت بلازما، مصل، دم كامل، بول، الخلط الزجاجي، محتويات المعدة أو القيء، أو الأنسجة الحيوية المختلفة) وبدرجة عالية جداً من الحساسية، ودون الوقوع في فخ النتائج الإيجابية الكاذبة ($False\ positive\ results$). ومن الناحية المنهجية المثالية، ينبغي الاحتفاظ بجزء من العينة الأصلية دون معالجة للسماح بتأكيد النتائج المخبرية لاحقاً باستخدام تقنية تحليلية مغايرة، فضلاً عن إتاحة الفرصة لإجراء التقدير الكمي لأي سم أو سموم مكتشفة للمساعدة بصورة فعالة في التفسير السريري للنتائج.

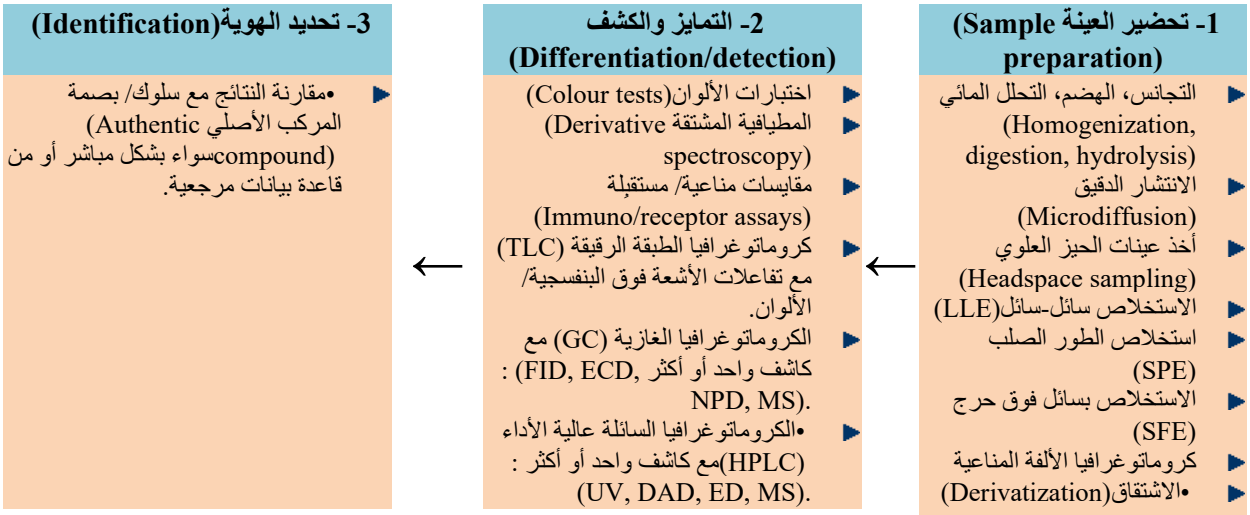
وعند الشروع في الفحص عن مواد ومجهولات غير معروفة، من الضروري اعتماد نهج استدلالي ومنهجي منظم بغرض استبعاد الاحتمالات غير الممكنة والتركيز بدقة على المركب أو المركبات الموجودة فعلياً في العينة. ويمكن تقسيم عمليات التحليل السمي المنهجي (STA) بصورة رئيسية إلى ثلاث مراحل أساسية. تهدف **مرحلة تحضير العينة** ($Sample\ preparation$) إلى الاحتفاظ بكافة المواد ذات الأهمية السمية مع التخلص التام من مكونات مصفوفة العينة التي قد تتسبب في إحداث تداخلات غير مرغوب فيها؛ وبناءً عليه، يجب عزل أوسع نطاق ممكن من المواد المستهدفة، ويشمل ذلك الأنواع المحبة للدهون ($Lipophilic$), والقطبية المعتدلة، فضلاً عن المركبات الحمضية والقاعدية والمتعادلة. ولتعزيز كفاءة استخلاص ورفع عائد المادة المحللة ($Analyte$), يمكن إخضاع العينة لمعالجة إنزيمية باستخدام إنزيمات مثل (β-glucuronidase/arylsulfatase) لغرض تمييز وفك ارتباط نواتج الأيض المقترنة ($Conjugated\ metabolites$).

أما **مرحلة التمييز والكشف** ($Differentiation/detection$), فتتلخص غايتها الأساسية في تحديد هويات المركبات ذات الصلة في أسرع وقت ممكن؛ وهو ما يتطلب دمجاً متوازناً بين المقايسات غير النوعية نسبياً والمعروفة بـ "العالمية" وبين الطرائق عالية النوعية. وفي هذا السياق، تكتسب المقايسات المناعية ($Immunoassays$) أهمية بالغة لتحديد فئات العقاقير والمخدرات، سيما إذا كان الجسم المضاد المستخدم يتمتع بتفاعل تقاطعي ($Cross - reactivity$) واسع النطاق. وتتميز تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) بميزة عملية تتمثل في بقاء كافة المواد غير المتطايرة المكونة للمستخلص مستقرة على اللوحة، بينما تواجه تقنيات مثل (GC) و ($HPLC$) احتمالاً قائماً ألا تكون بعض المركبات قد خرجت أو انفصلت بالكامل من العمود ($Eluted$). ومن البديهي أنه لا يمكن لتقنية تحليلية منفردة بمفردها أن تقوم بفصل وتحديد كافة المركبات الممكنة؛ وعلى سبيل المثال، لا يمكن فصل سوى عدد محدودة من المركبات الكيميائية على صفيحة (TLC) واحدة نظراً لمحدودية سعتها الفصلية.

تُعرف قدرة طريقة تحليلية معينة على تحديد مركب من مجموعة من مركبات الاختبار بـ **قوة التحديد** ($Identification\ power$). أحد الأساليب المتبعة لقياس قوة التحديد كمياً هو استخدام **قوة التمييز** ($Discriminating\ Power - DP$)، والتي تُحسب وفق المعادلة الرياضية التالية:

$$DP = 1 - \frac{2M}{N(N-1)}$$

حيث تُمثل Mعدد أزواج المركبات التي لم يتم فصلها أو التمييز بينها (غير المتمايزة)، بينما تُمثل Nالعدد الإجمالي للمرتبات أو المركبات التي خضعت للفحص (Moffat et al., 1974).



الشكل (2): الخطوات الرئيسية الثلاث في التحليل السمي المنهجي (STA)

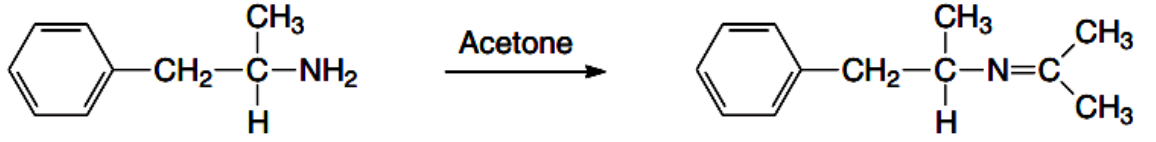
وقد تم تقديم مفهوم قوة التمييز بواسطة (Moffat et al., 1974) بهدف القياس الكمي والتقييم الدقيق لقدرة كروماتوغرافيا الورق، وكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC), والكروماتوغرافيا الغازية السائلة (GLC) على توفير تحديد قاطع للمواد المجهولة. وعند تطبيق هذا النهج البحثي على استقصاء فصل 34مركباً متعادلاً موزعة في 15نظاماً مختلفاً من أنظمة (TLC), تبين أن نظاماً واحداً امتلك أعلى قوة تمييز بلغت 0.75. ومع ذلك، من خلال دمج النتائج والبيانات المستمدة من نظامين متكاملين، أمكن رفع وزيادة قوة التمييز لتصل إلى 0.88(Owen et al., 1978). ومع تعزيز وتطوير قوة التحديد في أي نظام تحليلي، تقترب قيمة معامل (DP) تدريجياً من القيمة المثالية 1.0.

أما النهج الثاني المعتمد لتعريف وقياس قوة التحديد فيتمثل في **متوسط طول القائمة** $(Mean\ List\ Length - MLL)$. ويُقصد "بطول القائمة" عدد المرشحين المحتملين لمعامل تحليلي معين، مثل مؤشر الاحتجاز $(Retention\ index)$ في نظام الكروماتوغرافيا الغازية (GC). وعند حساب المتوسط الحسابي لجميع أطوال القوائم، يتم الحصول على قيمة (MLL) لمجموعة المركبات داخل ذلك النظام التحليلي. وقياساً على ذلك، يمكن حساب قيم (MLL) لمزيج من النظم الكروماتوغرافية المختلفة. وتكون قيم (MLL) دائماً أكبر من 1.0، إلا أنها تتقارب من القيمة 1.0كلما زادت قوة التحديد. وفي كلا المعيارين $(DP$ و $MLL)$, فإن الاقتصار على فحص عدد قليل من مركبات الاختبار سيؤدي حتماً إلى تقدير مفرط ومبالغ فيه لقوة تحديد الطريقة التحليلية المستخدمة (Boone et al., 1999).

ومع ازدياد عدد وتنوع التقنيات المتاحة لمحلل السموم، يرتفع باطراد احتمال التحديد الصحيح والدقيق للمادة أو المواد المجهولة. إن استقصاء ودراسة الاستجابات المختلفة للمواد المحللة $(Analytes)$ تجاه كواشف متنوعة، مثل كاشف التأين باللهب (FID) وكاشف التقاط الإلكترون (ECD), يوفر معلومات نوعية بالغة الأهمية حول البنية الكيميائية للمركب. ولا تقتصر تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء المقترنة بكاشف مصفوفة الصمام الثنائي $(HPLC - DAD)$ على توفير بيانات طيفية فحسب، بل تتيح كذلك تأكيد **نقاء القمة الكروماتوغرافية** $(Peak\ purity)$ عبر إجراء عمليات المسح المتعدد للقمة أثناء خروجها من العمود. وبالمثل، يمكن للتقنيات المدمجة والمقترنة مثل الكروماتوغرافيا الغازية مقترنة بمطيافية الكتلة $(GC - MS)$ أن توفر قدرة فائقة وقاطعة على تحديد المادة المحللة، لا سيما عند ربطها بقواعد بيانات حاسوبية ومكتبات طيفية لبيانات تشظي التأين الإلكتروني $(Electron\ Ionization - EI)$, والتي تمكن الباحثين من البحث السريع وتأكيد الهوية الكيميائية للمركب بدقة متناهية. إضافة إلى ذلك، يُمكن الاستعانة بمطيافية الكتلة بالتأين الكيميائي

$(Chemical\ Ionization\ Mass\ Spectrometry - CI - MS)$ للتعرف على **الوزن الجزيئي النسبي** (M_r) للمادة السامة.

وفي سياق متصل، يمكن إخضاع المواد المحللة لتعديلات كيميائية مقصودة بهدف تحسين خواصها الكروماتوغرافية أو رفع "قابليتها للكشف"، حيث تُعرف عملية **الاشتقاق** $(Derivatization)$ بأنها إجراء كيميائي يزود المحلل بمعلومات نوعية ذات قيمة عالية. ومن الأمثلة الكلاسيكية والتاريخية على ذلك تفاعل يُعرف بـ **"إزاحة الأسيتون"** $(Acetone - shift)$, وهو تفاعل كيميائي يتضمن اتحاد الأسيتون مع أمين أولي $(Primary\ amine)$ لإنتاج قاعدة شيف $(Schiff\ base)$ المقابلة؛ فعلى سبيل المثال، يتفاعل مخدر الأمفيتامين $(Amfetamine)$ مع الأسيتون لينتج مركب $(N$-(1-methyl-2-phenylethyl)propanimine)، كما يتضح في الشكل (3).



(∓)-Amfetamine — *N*-(1-Methyl-2-phenylethyl)propanimine

الشكل (3): تفاعل الأمفيتامين مع الأسيتون $(Reaction\ of\ amfetamine\ with\ acetone)$

وتتمثل **الخطوة الثالثة** والأخيرة في منظومة التحليل السمي المنهجي (STA) في إجراء عملية مقارنة دقيقة للبيانات المرصودة مع معلومات وقواعد البيانات المعيارية المعتمدة. ومن البديهي أن قواعد البيانات المستخدمة في التعرف على هويات المركبات والعقاقير تستوجب تحديثاً دورياً ومستمراً، بحيث لا تقتصر حصراً على المركبات الأصلية $(Parent\ compounds)$ فحسب، بل يجب أن تمتد لتشمل نواتج الأيض $(Metabolites)$, والمداخلات الشائعة $(Interferences)$, والملوثات المختلفة. ويبقى من الأساسيات الحتمية أن تتسم التقنيات والطرائق التحليلية المعتمدة في إنشاء ومطابقة هذه القواعد بدرجة عالية من **القابلية للتكرار** $(Reproducibility)$, سواء على مستوى المختبر الواحد أو بين المختبرات والمراكز البحثية المختلفة.

الإيثانول والمواد المتطايرة الأخرى (Ethanol and other volatile substances)

تتوافر الطرائق الإنزيمية المعتمدة لتقدير وقياس تراكيز إيثانول الدم بالاستعانة بإنزيم **نزع هيدروجين الكحول** $(Alcohol\ dehydrogenase - ADH)$ مقترناً بالقياس الطيفي لمرافق إنزيمي $(Coenzyme)$, وذلك في هيئة أطقم تحليلية جاهزة $(Kits)$, مثل تلك المصممة خصيصاً للاستخدام مع أجهزة مثل $(Abbott\ TDx/ADx)$. إلى جانب ذلك، يُعد تحليل الإيثانول باستخدام **الكروماتوغرافيا الغازية** $(Gas\ Chromatography - GC)$ الأسلوب الأكثر شيوعاً واتساعاً، سيما في مجالات التحليل الجنائي والطب الشرعي؛ حيث يُجرى إما عبر الحقن المباشر لعينات الدم أو البول المخففة بالماء منزوع الأيونات $(Curry\ et\ al.,\ 1966)$, أو بالاعتماد على تقنية أخذ عينات الحيز العلوي الساكن $(Static\ headspace\ sampling)$ (Machata, 1975). وتتميز تقنية الكروماتوغرافيا الغازية بقدرتها الفائقة على الفصل والتقدير المتزامن لكل من الميثانول (CH_3OH), و2-بروبانول، والأسيتون (CH_3COCH_3) في آنٍ واحد. وتجدر الإشارة إلى أن حالات التسمم بالميثانول الناجمة عن تعاطي المشروبات الكحولية المغشوشة تُمثل أحد الأسباب الرئيسية وراء حدوث "أوبئة" التسمم الحاد، مما يجعل القياس الدقيق لميثانول الدم ضرورة علاجية قصوى لتأكيد التشخيص السريري

ومتابعة خطة العلاج ($Antidotal\ therapy$). وعلاوة على ما سبق، قد يواجه المختبر السريري أكثر من عشرين مركباً متطايراً إضافياً في حالات التسمم الحاد الناتجة عن الاستنشاق المتعمد للأبخرة بغرض التعاطي أو السكر – والمعروفة اصطلاحاً بإساءة استخدام المواد المتطايرة ($Volatile\ substance\ abuse - VSA$), مثل ظاهرة "شم الغراء" والمذيبات الصناعية والمستنشقات الطيارة. وتمتلك بعض هذه المركبات المتطايرة نواتج أيض ($Metabolites$) محددة يمكن قياسها في البول لتقدير حجم ومدى التعرض؛ ومن أبرزها: أحماض الهيبوريك ($Hippuric\ acid$) والميثيل هيبوريك – التولوريك ($Methylhippuric\ acid$) الناتجة عن أيض التولوين والزايلينات على التوالي، إضافة إلى حمض ثلاثي كلور أسيتيك ($Trichloroacetic\ acid$) الناتج عن أيض ثلاثي كلور الإيثيلين ($Trichloroethylene$). ورغم ذلك، فإن الغالبية العظمى من هذه المواد المتطايرة تُطرح من الجسم دون تغيير عبر هواء الزفير ($Exhaled\ air$), مما يجعل **الدم الكامل** ($Whole\ blood$) العينة البيولوجية المثلى والأفضل على الإطلاق للكشف عن هذه المركبات وتحديد هويتها بدقة (Flanagan et al., 1990).

الجدول (4): طرق تحليل المعادن السامة في المواد البيولوجية

Table 4: Methods for Analysis of Toxic Metals in Biological Materials

التقنية($Technique$)	**النمط**($Mode$)	**المتغير أو النوع الفرعي**($Variant$)
كهروكيميائية ($Electrochemical$)	قياس الجهد ($Potentiometric$)	أقطاب انتقائية للأيونات($Ion\ selective\ electrodes$)
	قياس الكولوم ($Coulometric$)	البولاروغرافي (النبضي التفاضلي) $[(Differential\ pulse)\ polarography - DPP]$
	فولتامتري التجريد الأنودي/الكاثودي (A/CSV)[أ]	تحليل التجريد القياسي للجهد(PSA)
طيفية ($Spectrophotometric$)	الانبعاث الذري ($Atomic\ emission - AE$)	قياس اللهب الضوئي– ($Flame\ emission\ photometry$) [ب$FEP$]
		بلازما التيار المستمر($DC\ plasma$)
		البلازما المقترنة بالحث($ICP - AES$)
	الامتصاص الذري ($Atomic\ absorption - AA$)	اللهب($Flame$)
		توليد الهيدريد($Hydride\ generation$)
		التذرية الكهروحرارية($Electrothermal$)
		البخار البارد($Cold\ vapour$)
	الأشعة السينية($X - Ray$)	الفلورة($Fluorescence$)
نووية($Nuclear$)	التنشيط النيوتروني ($Neutron\ activation$)	—
	التنشيط البروتوني ($Proton\ activation$)	—
مطيافية الكتلة ($Mass\ spectrometry$)	مطيافية الكتلة بالبلازما المقترنة بالحث($ICP - MS$)	—

- [أ] تُعرف أيضاً باسم تحليل التجريد القياسي للجهد (PSA).
- [ب] تشير عادةً إلى استخدام المرشحات ($Filters$) لاختيار الطول الموجي للانبعاث؛ وتُستخدم بشكل أساسي لتقدير البوتاسيوم، والليثيوم، والصوديوم.

العناصر الزهيدة والمعادن السامة (Trace elements and toxic metals)

تتطلب عملية التشخيص الدقيق لحالات التسمم المزمن – حيث تكتسب الارتفاعات الطفيفة التي لا تتجاوز بضعة ميكروجرامات لكل لتر (μg/L أو أجزاء في المليار، ppb) في الدم أو المصل أهمية تشخيصية بالغة – مستويات عالية للغاية من الدقة والقابلية للتكرار ($Reproducibility$) (Braithwaite and Brown, 1988). وتجدر الإشارة إلى أن تلوث العينات أثناء مراحل الجمع (سواء من أنابيب سحب الدم أو حتى من إبر المحاقن، خصوصاً في تحاليل عنصري الكروم والمنغنيز) أو التلوث الحاصل داخل بيئة المختبر نفسه، يمثل مصدراً خطيراً وكامناً للأخطاء التحليلية؛ وينطبق هذا التحذير بصفة خاصة على العناصر الشائعة والمنتشرة بكثرة مثل الرصاص (Pb) والألمنيوم (Al).

وفي الوقت الحاضر، تتباين الطرق الحديثة المخصصة لقياس المعادن السامة في المواد والأنسجة البيولوجية (موضحة في الجدول 4) تبايناً هائلاً من حيث درجة التعقيد، والتكلفة التشغيلية، والدقة، والحساسية. وتُعتبر بعض التقنيات التخصصية، مثل مطيافية الكتلة بتخفيف النظائر ($Isotope\ dilution\ mass\ spectrometry$) والتحليل بالتنشيط النيوتروني ($Neutron\ activation\ analysis$)، بمثابة طرائق مرجعية ($Reference\ methods$). وفي المقابل، أُستخدمت تقنية **مطيافية الامتصاص الذري** ($Atomic\ absorption\ spectrometry - AAS$)، سواء بنظام اللهب ($Flame$) أو بنظام التذرية الكهروحرارية باستخدام فرن الجرافيت ($Electrothermal$)، على نطاق واسع عبر العقود الماضية، إلا أنه بدأ استبدالها تدريجياً بتقنية **مطيافية الكتلة بالبلازما المقترنة بالحث** ($ICP - MS$). أما فيما يتعلق بتقدير حديد المصل ($Serum\ iron$)، فلا تزال الأطقم الكيميائية الموثوقة القائمة على تكوين معقدات ملونة مستخدمة على نطاق واسع في مختبرات الكيمياء السريرية.

وتُعد تقنية ($ICP - MS$) **تقنية متعددة العناصر** ($Multi - element\ technique$) فائقة القدرة، إذ تتيح اكتشاف وقياس العناصر بتراكيز دقيقة تصل إلى حدود كشف تتراوح بين الميكروجرام لكل لتر (μg/L) والنانوجرام لكل لتر (ng/L). كما تمتاز بقدرتها على قياس النظائر المختلفة ($Isotopes$) للعنصر الواحد؛ ونظراً لأن الوفرة النسبية للنظائر تختلف تبعاً للمصدر الجيولوجي أو التصنيعي للمعدن بالنسبة لبعض العناصر، يتيح هذا القياس الدقيق تطبيقات بالغة الأهمية (Delves and Campbell, 1988).

وعليه، فمن خلال قياس نسب النظائر لعنصر سام مثل الرصاص في عينة مريض يعاني من تسمم مزمن ومقارنتها بالقيم النظيرية للمصادر الموجودة في بيئته المعيشية أو المهنية المباشرة، يصبح من الممكن تماماً تحديد المصدر الدقيق للتعرض (Delves and Campbell, 1988). فعلى سبيل المثال، قد تحتوي بعض مستحضرات التجميل التقليدية والعرقية – مثل "الخُطب" أو "الكحل" ($Surma$) – على نسب مئوية مرتفعة تتراوح بين 0%إلى 80%من عنصر الرصاص في صورة أكسيد أو كبريتيد، مما يجعلها مصدراً خطيراً وخفياً للتسمم بالرصاص. وبالمثل، قد تحتوي بعض العقاقير والمستحضرات المصففة تحت مسمى الأدوية "التقليدية" أو الشعبية على تراكيز سامة وجرعات قاتلة من أملاح الرصاص أو غيرها من المعادن الثقيلة السامة (Braithwaite and Brown, 1988).

تقديم خدمات السموم التحليلية (Provision of Analytical Toxicology Services)

يمكن تقسيم مراحل المعالجة التحليلية والخطوات المنهجية عند الاشتباه في حدوث حالات التسمم إلى ثلاث مراحل رئيسية ومتكاملة، وهي: مرحلة ما قبل التحليل، ومرحلة التحليل الفعلي، ومرحلة ما بعد التحليل، كما هو موضح في الجدول (5).

الجدول (5): خطوات إجراء استقصاء سمي تحليلي
Table 5: Steps of an Analytical Toxicological Investigation

المرحلة(*Stage*)	الإجراءات والخطوات المنهجية(*Procedures*)
ما قبل التحليل (*Pre − analytical*)	الحصول على تفاصيل نوبة التسمم الحالية المشتبه بها بدقة، بما في ذلك جمع كافة الأدلة الظرفية والقرائن المحيطة بحالة التسمم، ومطالعة نتائج الفحوصات الكيميائية الحيوية والدموية المتاحة. ويشمل ذلك أيضاً استجماع التاريخ الطبي والمهني للمريض، وضمان تأمين الوصول إلى العينة أو العينات البيولوجية المناسبة وتحديد الأولويات القصوى للتحليل.
التحليل (*Analytical*)	إنجاز وإجراء التحليل المخبري المتفق عليه والموجه لاكتشاف المواد المشتبه بها.
ما بعد التحليل (*Post − analytical*)	تفسير النتائج المخبرية والمرصودة من خلال التشاور والتواصل الفعال مع الطبيب المعالج للمريض أو طبيب علم الأمراض .(*Pathologist*) إجراء فحوصات وتحليلات إضافية عند الضرورة القصوى، بالاعتماد على العينات الأصلية أو عينات إضافية مستمدة من المريض. الحفظ الآمن لأي عينات غير مستخدمة أو متبقية تحسباً لتطلب الفحوصات المستقبلية مزيداً من التحريات.

العينات وأخذ العينات (Samples and Sampling)

في مجالات السموم التحليلية، والكيمياء السريرية، والميادين العلمية ذات الصلة، تُستخدم غالباً مصطلحات **"عينة"** (*Sample*) و"نموذج" (*Specimen*) للدلالة على ذلك الجزء المقتطع من سوائل الجسم، أو الأنسجة الحيوية، أو أوساط الحضانة، والتي يتم استحصاله وفق شروط وظروف مضبوطة ودقيقة. وقد تتراوح العينات التي يتعامل معها المختبر من محلول نقي نسبياً لأحد العقاقير الدوائية، وصولاً إلى قطعة نسيجية متعفنة أو متحللة. وعموماً، تُعتبر السوائل الحيوية – مثل الدم، واللعاب، والبول، والسائل الدماغي الشوكي (*Cerebrospinal fluid − CSF*) – أسهل بكثير في عمليات الجمع والتحليل مقارنة بالمواد الصلبة وشبه الصلبة التي تستوجب بالضرورة إجراء عمليات معالجة تمهيدية كالتجنيس (*Homogenization*) أو الهضم الكيميائي (*Digestion*) قبل الشروع في التحليل الفعلي.

ويُعتمد على **بلازما الدم** بصورة أساسية في التطبيقات السريرية متى ما كانت القياسات الكمية دقيقة مطلوبة لتقييم الجرعات الدوائية أو لأغراض المراقبة الدوائية العلاجية (*Therapeutic drug monitoring − TDM*). وفي المقابل، يُستخدم **البول** عادةً في الأعمال والتحاليل النوعية مثل برامج فحص المخدرات (*Drugs of abuse*); ويرجع ذلك إلى كون عملية جمعه غير باذعة (*Noninvasive*), فضلاً عن أن تراكيز العديد من العقاقير والسموم الأخرى ونواتج أيضها تكون مرتفعة فيه مقارنة بالدم، مما يسهل كثيراً عمليات الكشف عنها.

أنواع الفحوصات السمومية (Types of Toxicological Screens)

تتعدد الفحوصات السمومية وتتنوع بتنوع الأهداف السريرية والشرعية، ومن أبرزها:

- **فحص المتطايرات (*Volatile screen*):** يُستعمل بصورة متكررة للتحري عن المركبات العضوية المتطايرة وتقديرها، مثل الإيثانول (C_2H_5OH) (الكحول)، والميثانول (CH_3OH)، والإيزوبروبانول، والأسيتون (CH_3COCH_3). وتتميز هذه المواد بسرعة استقلابها داخل الجسم، وغالباً ما تتسبب في حالات تسمم حاد وخطيرة تتطلب تدخلاً عاجلاً (Baselt, 2008).
- **فحص عقاقير الإساءة (*Drugs of abuse screen*):** يُطبق بصورة شائعة للكشف عن المواد غير المشروعة أو العقاقير التي تُساء استخدامها وتناولها بغير الأغراض العلاجية، مثل الأمفيتامينات (*Amphetamines*), والكوكايين (*Cocaine*), والماريجوانا أو الحشيش (*Marijuana* − THC), والمواد الأفيونية (*Opioids*),

والفينسيكليدين ($Phencyclidine - PCP$). وغالباً ما يُصار إلى إجراء هذا الفحص في حالات الاشتباه بتعاطي المخدرات أو في اختبارات الفحص الوظيفي والمهني (Moeller et al., 2017).

- **فحص عام للأدوية ($General\ drug\ screen$):** يُلجأ إليه عندما تكون أسباب الوفاة غامضة وغير واضحة، أو عند الاشتباه بوقوع التسمم بمادة مجهولة الهوية تماماً. ويُعد هذا الفحص واسع النطاق ويهدف إلى مسح وكشف مجموعة ضخمة ومتنوعة من الأدوية والعقاقير ضمن العينات البيولوجية المتاحة (Flanagan et al., 2007).
- **الفحص الحمضي/المحايد ($Acidic/neutral\ screen$):** يُستخدم أساساً للتحري عن الأدوية والمركبات التي تتسم بخصائص كيميائية حمضية أو محايدة، مثل الباربيتورات ($Barbiturates$) التي تعمل كمهدفات ومسكنات، وبعض أنواع مرخيات العضلات، ومضادات الصرع (Baselt, 2008).
- **فحوصات الأدوية الأساسية/القاعدية ($Basic\ drug\ screens$):** تُعتبر هذه الفحوصات أكثر تخصصاً وانتقائية للكشف عن العقاقير التي تحمل خصائص قاعدية؛ ومن أبرزها الكوكايين ($Cocaine$), ومضادات الاكتئاب ثلاثية الحلقات ($Tricyclic\ Antidepressants - TCAs$), ومضادات الهيستامين، ومضادات الذهان ($Antipsychotics$) (Moeller et al., 2017).

اعتبارات هامة في التحليل السمومي:

- **تكيد النتائج:** يوصى بشدة بالتحقق من وجود دواء أو مادة سامة في أكثر من عينة واحدة (مثل الدم والبول)، حيث يعزز هذا الإجراء موثوقية النتائج المعملية. ومع ذلك، في حال توفر عينة واحدة فقط، يجب إجراء تحليلات متكررة في مناسبات مختلفة بالتزامن مع استخدام ضوابط إيجابية وسلبية مناسبة لضمان الدقة المطلقة وتجنب الأخطاء (Flanagan et al., 2007).
- **أهمية الضوابط ($Controls$):** تُعد الضوابط الإيجابية (وهي عينات تحتوي مسبقاً على المادة المعروفة) والضوابط السلبية (عينات خالية تماماً من المادة) ضرورة حتمية لضمان كفاءة عمل الأجهزة التحليلية والكواشف الكيميائية بالشكل الصحيح، ولتجنب الحصول على نتائج إيجابية كاذبة أو سلبية كاذبة.

مراحل سير العمل في التحليل السمّي ($Steps\ of\ Toxicological\ Analysis$)

يتبع التحليل السمّي منهجية علمية منظمة تتكون من عدة خطوات أساسية متسلسلة لضمان دقة النتائج وموثوقيتها، وتتلخص فيما يلي:

1. **الفحص الأولي ($Screening$):** تُستخدم في هذه المرحلة طرائق سريعة وعالية الحساسية للكشف عن وجود فئة معينة من السموم (مثل الأفيونات والبنزوديازيبينات)، ويهدف الفحص للحصول على نتيجة إيجابية أو سلبية سريعة، وغالباً ما يُعتمد في هذه المرحلة على الوسائل الآتية:
   - **الطرق المناعية ($Immunochemical\ methods$):** التي تعتمد على التفاعل النوعي بين الأجسام المضادة والمادة السامة أو نواتج أيضها.
   - **الكروماتوغرافيا الرقيقة ($Thin - layer\ chromatography - TLC$):** وهي طريقة فصل بسيطة يمكن أن تظهر وجود مواد متعددة ضمن نفس العينة.
2. **التأكيد والتعريف ($Confirmation\ and\ Identification$):** إذا كانت نتيجة الفحص الأولي إيجابية، تُستخدَم تقنيات وطرائق أكثر تعقيداً وتطوراً للتأكد القاطع من وجود المادة السامة وتحديد هويتها بشكل لا لبس فيه، ومن أبرز هذه التقنيات:

- **الكروماتوغرافيا الغازية مع مطياف الكتلة ($GC-MS$):** والتي تُعتبر "المعيار الذهبي" ($Gold\ standard$) لتحليل العديد من المواد السامة المتطايرة وغير المتطايرة.
- **الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء مع مطياف الكتلة ($HPLC-MS$):** وهي مناسبة جداً للمواد التي لا يمكن تبخيرها بسهولة دون أن تتحلل.

3. **التقدير الكمّي ($Quantitative\ Estimation$):** بعد التأكد قطعياً من وجود المادة السامة، يُصار إلى قياس تراكيزها بدقة متناهية؛ وتُعد هذه الخطوة حاسمة لتقييم مدى خطورة التسمم ومقارنة التراكيز المرصودة بمستويات السمية المعروفة.
4. **تقييم النتائج ($Results\ evaluation$):** وتُعد هذه المرحلة النهائية والأكثر أهمية، حيث يتعاون الطبيب وأخصائي السموم لتحليل النتائج الكمية والنوعية، ومقارنتها بالبيانات السريرية للمريض لتحديد سبب التسمم بدقة، وضع الخطة العلاجية الملائمة، وتقدير المآل ($Prognosis$).

ويُقدم الجدول (6) الخطوات الأساسية الواجب اتخاذها في سياق الإجراء التحليلي السمومي:

الجدول (6): الخطوات الواجب اتباعها في التحقيق السمومي التحليلي
Table 6: Steps to be Followed in Analytical Toxicological Investigation

الخطوة($Step$)	الوصف($Description$)
الخطوة 1	بناءً على الأدلة الظرفية والقرائن: إجراء تحقيق كيميائي حيوي ودموي.
الخطوة 2	بناءً على التاريخ الطبي للمريض: تحديد الأولويات الدقيقة للتحليل.
الخطوة 3	تنفيذ المرحلة التحليلية المعملية.
الخطوة 4	تفسير النتائج المخبرية والسريرية.
الخطوة 5	إجراء تحليلات إضافية بالاعتماد على العينات الأصلية أو عينات إضافية مستمدة من المريض، إذا اقتضت الضرورة ذلك.

شرح تفصيلي للخطوات:

- **الخطوة 1: بناءً على الأدلة الظرفية: تحقيق كيميائي حيوي ودموي.** تبدأ العملية التحليلية بجمع أكبر قدر ممكن من المعلومات والقرائن من مسرح الحادث أو التاريخ السريري للمريض. فإذا توافرت أدلة تشير إلى التعرض لمادة معينة (مثل زجاجات أدوية فارغة، أو انبعاث روائح غريبة، أو ظروف بيئية خاصة)، فإن ذلك يوجه التحقيقات الأولية بكفاءة عالية. ويمكن أن تشمل الفحوصات الأولية تحاليل كيميائية حيوية للدم (مثل قياس مستويات الجلوكوز، وتقييم وظائف الكلى والكبد) وتحاليل دموية شاملة (مثل تعداد الدم الكامل - CBC) التي قد تشير إلى حدوث تلف عضوي معين أو اضطرابات فسيولوجية تتوافق مع حالات التسمم (Levine, 2011).
- **الخطوة 2: بناءً على التاريخ الطبي: تحديد الأولويات للتحليل.** بناءً على الأعراض السريرية الظاهرة على المريض، وتاريخه المرضي، أو الشكوك القائمة حول مادة سامة محددة، يتم تحديد أولويات المركبات الواجب البحث عنها أولاً. فعلى سبيل المثال، إذا كان المريض يعاني من ضيق حاد في التنفس وبطء في معدل ضربات القلب، فقد يتركز الاهتمام والتحليل على السموم التي تثبط الجهاز العصبي المركزي أو تؤثر على وظائف القلب (Flanagan et al., 2007). هذا التحديد المدروس للأولويات يسهم بشكل فعال في تقليص نطاق الفحوصات المطلوبة ويسرع من سرعة التشخيص السريري.

- **الخطوة 3: المرحلة التحليلية.** وهي المرحلة التي تُنفذ فيها الاختبارات والتحاليل المعملية الفعلية على العينات البيولوجية، حيث تُستخدَم فيها مجموعة واسعة ومتنوعة من التقنيات، ومنها:
  - **الاختبارات اللونية** $(Colorimetric\ tests)$**:** وهي فحوصات أولية بسيطة وسريعة تعتمد أساساً على تغير اللون عند تفاعل المادة السامة مع كاشف كيميائي معين؛ وعلى سبيل المثال، توفر الاختبارات اللونية الخاصة بالكشف عن وجود مركبات الفينوثيازين $(Phenothiazines)$ – وهي فئة دوائية تنتمي لمضادات الذهان – معلومات أولية ومبدئية حول فئة الدواء الموجود في العينة (Baselt, 2008). ومع أن هذه الاختبارات تُعد ذات قيمة تشخيصية أولية ممتازة، إلا أنها لا تُعتبر نهائية وتستوجب التأكيد بتقنيات أدق.

وعلاوة على ما سبق، يوضح الشكل (3) المخطط الهيكلي للاختبار المتدرج النموذجي المُعتمد في التقييم السمّي للمركبات والكيميائيات الحديثة.



شكل (4): مخطط اختبار متدرج نموذجي للتقييم السمي للمواد الكيميائية الجديدة Figure: Typical Tiered Testing Scheme for the Toxicological Evaluation of New Chemicals

- **الاختبارات المناعية** $(Immunoassays)$**:** تُستعمل هذه الفحوصات بفعالية عالية للتحقق من وجود مواد ومركبات معينة استناداً إلى التفاعل النوعي المتبادل بين الجسم المضاد $(Antibody)$ والمستضد $(Antigen)$. وتتميز بسرعة فائقة ودقة ملحوظة تجاه مركبات بعينها؛ ومن الأمثلة النموذجية الفحوصات المناعية المخصصة للكشف عن مجموعة الباربيتورات $(Barbiturates)$ أو عقاقير الإساءة والتعاطي الشائعة كالماريجوانا $(Moeller\ et\ al., 2017)$.

- **تقنيات الفصل** $(Separation\ techniques)$**:** تعقب الفحوصات الأولية اختبارات أخرى أشد تخصصاً وانتقاية بهدف التحديد القاطع لهوية المركب الفعلي إلى جانب توفير بيانات كمية دقيقة لتركيزه. وتتضمن هذه التقنيات بصورة رئيسية:
  - **كروماتوغرافيا الغاز** $(Gas\ Chromatography - GC)$**:** وتُستخدم لفصل المركبات المتطايرة أو تلك التي يمكن تحويلها كيميائياً لتصبح متطايرة.
  - **كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء** $(High - Performance\ Liquid\ Chromatography - HPLC)$**:** وتُوظّف لفصل المركبات غير المتطايرة أو شديدة التأثر بالحرارة.
  - **مطيافية الكتلة** $(Mass\ Spectrometry - MS)$**:** وتُستعمل للتعرف على الهوية الكيميائية للمركبات بدقة متناهية وتقدير كتلها، وغالباً ما تقترن تقنياً بطرائق الكروماتوغرافيا $(GC - MS$ أو $HPLC - MS)$ لتحقيق فصل وتحديد شامل ودقيق للمادة (Gutteridge, 2010 & Cairns).
  - **المطيافية الضوئية** $(Spectrophotometry)$**:** وتعتمد على قياس امتصاص أو انبعاث الإشعاع الضوئي للمادة لغرض تحديد هويتها وتقدير تراكيزها الكمية.
- **الخطوة 4: تفسير النتائج** $(Results\ interpretation)$**:** تُعد هذه المرحلة من أكثر الخطوات حساسية واحتياجاً للخبرة السريرية والسمومية العالية؛ فمجرد الكشف عن وجود سم معين في العينة لا يعني بالضرورة القاطعة أنه المسبب المباشر للتسمم أو الوفاة. إذ يتوجب على أخصائي السموم قراءة وتفسير النتائج ضمن السياق السريري الشامل للمريض، متضمنةً التاريخ المرضي والأدلة الظرفية. ويُشترط مقارنة تراكيز السم المقاسة بالمستويات العلاجية، والسامة، والمميتة المعروفة مرجعياً (Baselt, 2008)، مع ضرورة أخذ عوامل أخرى بعين الاعتبار؛ مثل طريقة إدخال السم (سواء بجرعة حادة واحدة أو جرعات متكررة)، ومسار الامتصاص الحيوي، والتوقيت الدقيق لسحب العينة.
- **الخطوة 5: إجراء تحليل إضافي للعينات الأصلية أو العينات الإضافية للمريض، إذا لزم الأمر.** في بعض الحالات المعقدة، قد لا تكون النتائج الأولية حاسمة، أو قد تظهر على المريض أعراض سريرية مستجدة تستدعي مزيداً من التحري. وحينئذٍ، يُصار إلى إعادة تحليل العينات الأصلية باستخدام تقنيات فائقة الحساسية والانتقائية، أو طلب عينات بيولوجية إضافية من المريض (مثل عينات الشعر، أو الأظافر، أو أنسجة الأعضاء المختلفة) لتقييم حالات التعرض المزمن بدقة أو تأكيد النتائج السابقة (Levine, 2011).

وتُعتبر **اختبارات التأكيد** $(Confirmatory\ tests)$ إجراءً إلزامياً وحتمياً لتحديد الدواء العيني بدقة ضمن الفئة المكتشفة وتوفير القياس الكمي الموثوق. وتُمثل هذه الاختبارات العمود الفقري والركيزة الأساسية لعلم السموم التحليلي؛ لكونها تقدم النتائج النهائية المعتمدة التي يمكن الاستناد إليها إما في التشخيص السريري العلاجي أو باعتبارها أدلة علمية قاطعة في ساحات القضاء.

خطوات ما قبل التحليل وبعده في العمل المعملي

لضمان الحصول على نتائج تحليلية تتسم بأعلى درجات المصداقية والقيمة العلمية، يلزم الالتزام بخطوات تنظيمية دقيقة قبل الشروع في التنفيذ العملي:

أ- خطوات ما قبل التحليل ($Pre-analysis\ steps$)

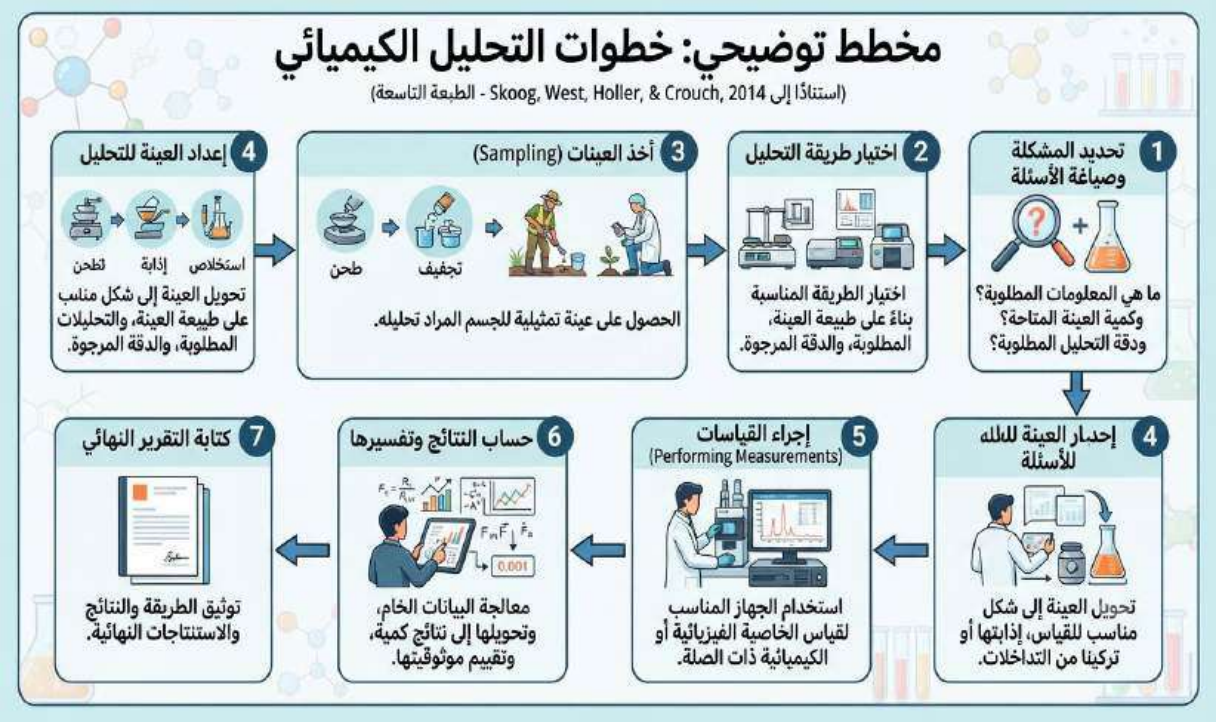
- **تحديد الهدف من عملية التحليل:** صياغة واضحة ودقيقة للسؤال أو المشكلة الملحة التي يسعى التحليل للإجابة عنها.
- **توفير الوسائل المتاحة للتحليل:** التأكد التام من جاهزية وتوافر الأجهزة المخبرية، والكواشف الكيميائية، والكوادر البشرية المؤهلة.
- **اختيار الطرق التحليلية الأنسب:** المفاضلة الموضوعية بين الطرائق المتاحة بناءً على معايير الدقة، والتكلفة، والزمن المستغرق، والحساسية المطلوبة.
- **الحصول على نتائج دقيقة:** تطبيق بروتوكولات صارمة لضبط الجودة ($Quality\ control$) والتحقق من صلاحية وصحة النتائج ($Validation$).
- **إعداد تقرير مفصل:** توثيق شامل لكافة جوانب العمل التحليلي، متضمناً المنهجية، والنتائج، والحسابات الرياضية، والاستنتاجات النهائية.

ب- خطوات التحليل الكيميائي ($Chemical\ analysis\ steps$)

- **الغرض من التحليل ($The\ purpose\ of\ analysis$):** يتحدد بناءً على السياق العام والمشكلة المطروحة، فقد يستهدف اتخاذ قرار علاجي إسعافي، أو إجراء مراقبة جودة روتينية، أو توفير دليل قانوني، وهي أهداف توجه متطلبات التحليل مباشرة.
- **أخذ العينة ($Sampling$):** تُعنى بانتقاء الجزء الممثل للدراسة والتحليل بدقة بالغة. ففي حالات المواد الصلبة الكبيرة (مثل خام المعادن)، تُجمع كميات أولية عشوائية لضمان شمولية المكونات، ثم يُصغر حجم العينة تدريجياً عبر الطحن والتقسيم (مثل طريقة "التربيع") مع المحافظة على التركيب النسبي للمكونات لضمان تجانسها وتمثيلها الحقيقي للكمية الكلية.
- **تجهيز العينة ($Sample\ preparation$):** تتطلب معظم العينات معالجة تمهيدية نظراً لعدم ملائمة حالتها الفيزيائية أو حجومها، وتتضمن:
  - تصغير حجم العينة إن كانت كبيرة.
  - تحويل العينة إلى الحالة الفيزيائية الملائمة للتحليل (كإذابة المواد الصلبة).
  - إزالة أو تقليل تأثير العناصر المتداخلة المعيقة لدقة التحليل.
- **تجفيف ووزن العينة ($Drying\ and\ weighing$):** تُجفف العينات الصلبة في فرن حراري بدرجة حرارة تتراوح بين $110°C$ إلى $120°C$ لمدة ساعة أو أكثر لضمان نزع الرطوبة تماماً، ثم تُنقل إلى مجفف ($Desiccator$) يحتوي على مادة ماصة للرطوبة (مثل كبريتات الصوديوم اللامائية $-Na_2SO_4$) للتأكد من جفافها قبل وزنها بدقة على زجاجة ساعة، ونقلها لاحقاً لوعاء الإذابة دون فقد.
- **طرق إذابة العينة ($Sample\ dissolution\ methods$):**
  - **إذابة المركبات غير العضوية:** تبدأ بالماء المقطر البارد أو الساخن؛ فإن لم تذب، تُستخدم أحماض مخففة (مثل حمض الهيدروكلوريك $-HCl$ أو حمض النيتريك $-HNO_3$) على البارد أو الساخن، وعند الاستمرار في عدم الذوبان تُلجأ للأحماض المركزة، وصولاً إلى الماء الملكي ($Aqua\ regia$ – وهو خليط قوي من HCl المركز و HNO_3 المركز بنسبة 1 :3). وإن فشلت كافة المحاولات، يُلجأ لعملية الصهر ($Fusion$) مع مواد كيميائية مساعدة عند درجات حرارة عالية.

- **إذابة المركبات العضوية:** يعتمد اختيار المذيب على القطبية؛ فالمواد القطبية تذوب في مذيبات قطبية كالكحولات أو الكيتونات (كالأسيتون CH_3COCH_3-أو الكلوروفورم $-CHCl_3$), بينما تذوب المواد غير القطبية في مذيبات غير قطبية مثل الأثير البترولي، الهكسان، أو ثنائي ميثيل الأثير.

- **فصل الشوائب أو المتداخلات ($Separation\ of\ impurities\ or\ interferences$):** بعد إتمام الإذابة، يُصبح فصل المكونات المتداخلة خطوة حرجة لضمان عدم إعاقتها للتقدير المباشر للعنصر المطلوب ($Interference$). ويتم الفصل بوسائل متعددة تشمل ترسيب الشوائب، أو الترسيب الكهربائي ($Electrodepositing$), أو طرق الفصل الكروماتوجرافي كالتبادل الأيوني والاستخلاص، أو باستخدام مواد حاجبة ($Masking\ agents$) لتحييد تأثير المواد المتداخلة.



جـ- اختيار طريقة التحليل (*Select Analysis Method*)

بعد إتمام مرحلة فصل المتداخلات والشوائب عن المادة المراد تقديرها، تأتي خطوة بالغة الأهمية تتمثل في اختيار طريقة التحليل الأمثل. ويرتكز هذا الاختيار بصورة أساسية على الغاية من التحليل، والإجابة عن السؤال الجوهري المتعلق بتحديد مكونات العينة المدرسة. ويُسترشد في هذه المرحلة بعدة اعتبارات ومعايير أساسية لاتخاذ القرار السليم، من أبرزها:

- **السرعة:** مدى الحاجة الملحة للحصول على النتائج في أسرع وقت ممكن (لا سيما في الحالات الإسعافية).
- **الدقة والمصداقية:** المستوى المطلوب من دقة النتائج وموثوقيتها العلمية.
- **سهولة تطبيق الطريقة وتوفر الأجهزة والمواد الكيميائية:** مدى توافر الأجهزة المخبرية والكواشف اللازمة وسهولة تطبيق الإجراء داخل المختبر.
- **عدد التحاليل المطلوبة:** تقييم ما إذا كان المطلوب إجراء تحليل واحد فردي أم حزمة واسعة من التحاليل لعينات متعددة.

وبالنظر إلى التنوع الهائل في طرائق التقدير المتاحة، يجب أخذ العوامل التالية بعين الاعتبار عند المفاضلة واختيار الطريقة الأنسب:

- **تركيز المكون المراد تقديره:** إذ تتباين الطرق من حيث حساسيتها ومدى ملاءمتها لتراكيز معينة (عالية أو ضئيلة).

- **درجة الدقة المطلوبة:** التفرقة بين الحاجة لدقة مطلقة وعالية جداً وبين قبول مستويات أقل من الدقة في بعض التطبيقات الاستكشافية.
- **وجود مواد متداخلة متبقية:** مدى تأثر طريقة القياس المختارة بأي شوائب متبقية لم تُفصل تماماً.
- **السرعة والوقت والتكلفة:** تحقيق الموازنة الاقتصادية والزمنية بين سرعة إنجاز النتائج وتكلفة المواد المستهلكة والوقت المستغرق.
- **عدد العينات المراد تحليلها:** كفاءة الطريقة وقدرتها على استيعاب تحليل أعداد كبيرة من العينات ($High-throughput$).
- **الغرض من التحليل:** فالغاية النهائية توجه بدقة متطلبات الطريقة وصرامتها.

د- التحليل الفعلي ($Actual\ Analysis$)

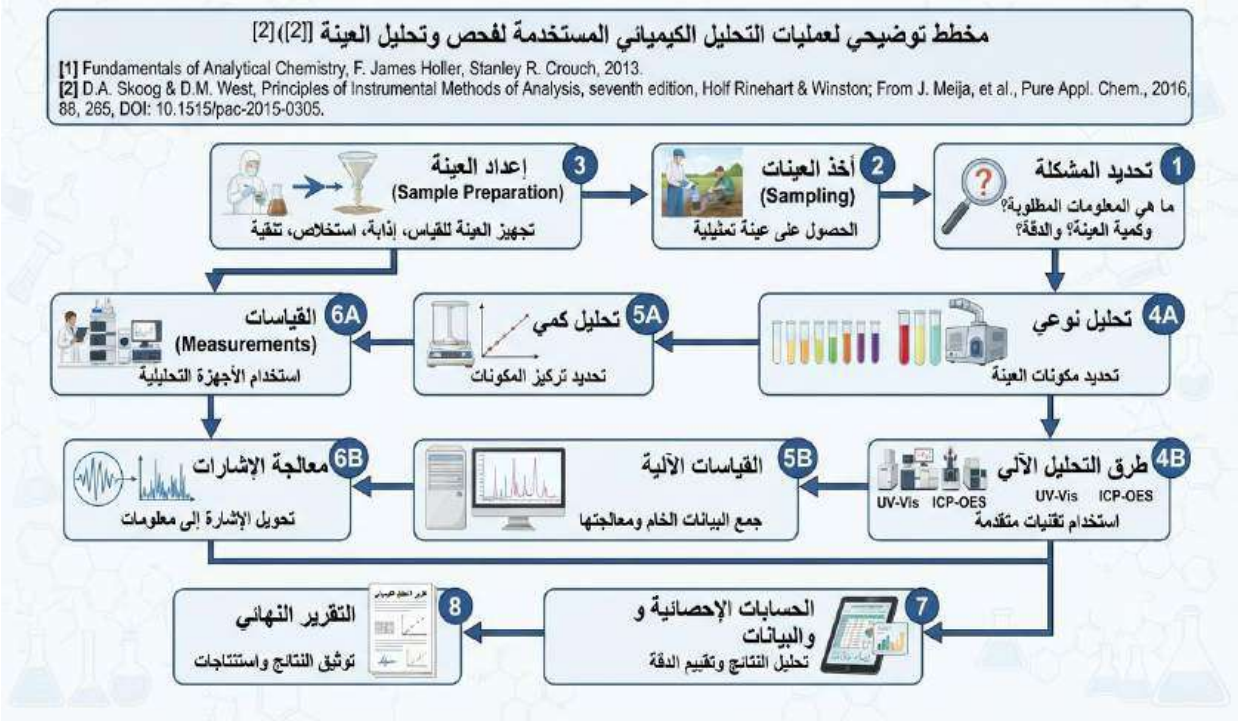
تتضمن هذه المرحلة التنفيذ العملي والميداني للقياس الفعلي للمكون المطلوب تحديده وتقديره، وذلك بالاعتماد كلياً على الطريقة التي تم اختيارها في المرحلة السابقة. ويتم خلال هذه الخطوة الالتزام الصارم بالبروتوكولات والإجراءات القياسية ($Standard\ operating\ procedures-SOPs$) الخاصة بالطريقة المختارة؛ لضمان الحصول على بيانات ورسوم ومخرجات معملية موثوقة وخالية من التحيز.

هـ- معالجة البيانات ($Data\ Processing$)

عقب الانتهاء من إجراء القياسات المخبرية، يتم جمع البيانات الناتجة وإخضاعها للتحليل الإحصائي. وعادة ما تتسم هذه البيانات باتجاهين إحصائيين رئيسيين ومهمين: **الاتجاه المركزي** ($Central\ Tendency$) و**التشتت** ($Dispersion$). وتتضمن عمليات المعالجة استخلاص مقاييس هذين الاتجاهين؛ حيث يُعبَر عن الاتجاه المركزي عادةً باستخدام **المتوسط الحسابي** ($Mean$) أو **الوسيط** ($Median$)، بينما يُقاس التشتت ومدى تقارب البيانات أو تبادلها باستخدام مقاييس إحصائية مثل **المدى** ($Range$)، **الانحراف المعياري** ($Standard\ Deviation-SD$)، و**معامل الاختلاف** ($Coefficient\ of\ Variation-CV$)، وغيرها من المعاملات. وتُعد هذه المعالجة الإحصائية أداة أساسية لتلخيص الكم الهائل من البيانات وفهم طبيعة توزيعها بدقة.

و- تفسير النتائج ($Interpretation\ of\ Results$)

تمثل هذه المرحلة المحطة الأخيرة والأكثر أهمية في المنظومة التحليلية؛ حيث يتم عرض النتائج وصياغتها بطريقة علمية واضحة ومفهومة للمستفيدين منها (سواء كانوا أطباء سريريين أو جهات قانونية). ويستوجب الأمر فهماً عميقاً للأرقام والبيانات المستحصلة، وربطها المباشر بالسياق الإكلينيكي أو الجنائي الأصلي للتحليل، وصولاً إلى استنتاجات منطقية وموضوعية تجيب بدقة عن التساؤلات والمشكلات التي طُرحت في مبيت العمليات التحليلية.



شكل (5): مخطط توضيحي لعمليات التحليل الكيميائي المستخدمة لفحص وتحليل العينة ([1])([2]).

اختيار الطريقة التحليلية (*Choice of Analytical Method*)

عند الاستجابة لأي مشكلة تحليلية، يجب مراعاة عوامل عديدة ومتداخلة (Peng and Chiou, 1990). ومن البديهي تماماً أن تكون الطريقة المستخدمة ملائمة ومناسبة للتحليل المقصود. ومن الناحية العملية، يعتمد اختيار الطريقة الأنسب على مجموعة من العوامل الأساسية، تشمل: الظروف التي يُطلب فيها التحليل (أي طبيعة السؤال المطروح)، والعينة الخاضعة للتحليل، وطبيعة المادة المحللة ($Analyte$) في حال كانت معروفة مسبقاً، والتركيز المتوقع وجوده، والوقت المتاح للإنجاز، والأجهزة المخبرية المتوفرة، فضلاً عن مستوى تدريب وخبرة المحلل.

يؤثر نوع العينة والتركيز المتوقع للمواد المحللة بشكل مباشر وواضح على اختيار الطريقة المعملية. فمن الممكن، على سبيل المثال، قياس تركيز مادة معروفة في محلول نقي نسبياً بصورة مباشرة باستخدام تقنية بسيطة وسريعة مثل قياس الطيف بالأشعة فوق البنفسجية (UV spectrophotometry). ومع ذلك، إذا كانت العينة عبارة عن قطعة من أنسجة ما بعد الوفاة مثل الكبد، فسيستلزم الأمر اتباع منهج مختلف تماماً؛ إذ يجب في هذه الحالة تجانس جزء ممثل من النسيج وعزل المادة المحللة في صورة نقية نسبياً عن طريق إجراء عملية استخلاص سائل-سائل ($Liquid - liquid\ extraction$) للمتجانس عند قيمة أس هيدروجيني (pH) ملائمة.

وفي حالة السموم العضوية، يُلجأ عادةً إلى اعتماد طريقة كروماتوغرافية مثل الكروماتوغرافيا الغازية (GC) أو الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء ($HPLC$)؛ نظراً لأنها تتيح الحصول على معلومات نوعية وكمية دقيقة أثناء عملية التحليل. أما بالنسبة للعقاقير ذات النشاط الضوئي أو **الأدوية الكيرالية** ($Chiral\ drugs$) (كما موضح في الجدول 7)، غالباً ما يتركز التأثير السريري المطلوب في أيزومر ($Isomer$) واحد فقط، بينما قد يكون الأيزومر المقابل غير فعال فارماكولوجياً أو يحمل خصائص سمية أو فيزيولوجية مختلفة تماماً. وعليه، فإن إعطاء مزيج راسيمي ($Racemate$) –

[1] *Fundamentals Analytical Chemistry F.James Holler, Stanley R.Crouch 2013*
[2] *D.A. Skoog & D.M. West, principles of Instrumental Methods of Analysis, seventh edition, Holf Rinehart & Wiston, From J. Meija, et al., Pure Appl. Chem., 2016, 88, 265, DoI: 10.1515/pac-2015-0305.*

وهو خليط متكافئ بنسبة 50 :50من الإنانتيومرات $(Enantiomers)$, الجدول 8 – يُعادل من الناحية الحيوية إعطاء مركبات مختلفة تماماً للجسم. ويُشار أحياناً إلى المركبات النشطة ضوئياً في أسمائها العلمية بصراحة (مثل: $Dexamfetamine$، $Dextropropoxyphene$، $Levorphanol$)، غير أن هذا التمييز لا ينطبق دائماً في التسميات الشائعة (مثل: $Morphine$). وتشير التقديرات إلى أن ما يصل إلى 25%من الأدوية المستخدمة حالياً هي مركبات كيرالية $(Chiral)$ وغالباً ما تُورد على هيئة مخاليط راسيمية دون الإشارة الصريحة إلى ذلك، ومثالها الواضح دواء الأتروبين $(Atropine)$ باعتباره الاسم المعتمد للمركب hyoscyamine-$(\pm)$. ورغم قلة المؤشرات الحالية لضرورة توفر منهجية كيرالية دقيقة في فحوصات السموم الروتينية، إلا أن التقنيات الكروماتوغرافية الحديثة ساهمت بدور جوهري في إتاحة فصل هذه الإنانتيومرات بدقة داخل العينات البيولوجية المختلفة.

الجدول (7): ملخص تسميات الكيمياء الكيرالية (Chiral Nomenclature) Table 7: Summary of Chiral Chemistry Nomenclature

الموضوع$(Topic)$	**التوصيف العلمي**$(Scientific\ Description)$
عدد المراكز الكيرالية $(Number\ of\ chiral\ centers)$	إذا افترضنا أنn يمثل عدد المراكز البصرية ,$(Chiral\ centers)$ فسيكون هناك إجمالاً 2^nمن الأيزومرات الفراغية. الجزيئات التي تحتوي على مركزين بصريين يمكن أن توجد في صورة أربعة جزيئات: اثنان منها يُعرفان بـ**" الدياستيريومرات "** $(Diastereoisomers)$,ويتكون كل منهما من زوج من**" الإنانتيومرات "** $(Enantiomers)$.ويُستثنى من ذلك الحالة التي يمتلك فيها الجزيء مستوى تماثل $(Plane\ symmetry)$يلغي الدوران البصري الصافي، وحينها تُعرف هذه الأشكال بـ **"أشكال ميزو**.$(Meso\ forms)$ **"**
التسمية$(Nomenclature)$	تمتلك الإنانتيومرات خاصية فريدة تتمثل في قدرتها على تدوير مستوى الضوء المستقطب $(Plane-polarized\ light)$في اتجاهين متساويين ومتضادين. وهذا هو الأساس التاريخي لاستخدام الرموز$(-/+)$ أو .(d/l) ويُفضل استخدام التدوين الأول$(-/+)$ لتجنب الخلط مع مواضعة ,(D/L) ومع ذلك فهو لا يميز بشكل قاطع بين البنية المطلقة للإنانتيومرات لأن بعض الجزيئات قد تُغير اتجاه دورانها البصري عند تكوين الأملاح. كما أن هذا التدوين لا يقدم معلومات حول **التكوين المطلق** $(Absolute\ configuration)$ للذرات في الفراغ.
دوران الضوء المستقطب $(Polarized\ light\ rotation)$	***التدوير لليمين :**يُعرف بالدوران اليميني $(Dextrorotatory)$ ويُرمز له بالرمز$(+)$ أو (d). ***التدوير لليسار :**يُعرف بالدوران اليساري $(Levorotatory)$ ويُرمز له بالرمز$(-)$ أو (l).
تسمية فيشر $(Fischer\ projection)$	تعطي الترتيب المكاني المطلق بالاستناد إلى السكر المرجعي .$(D$-glyceraldehyde$)$ وتُستخدم فيها عادةً الحروف الكبيرة $D)$ أو .$(L$ ولا تزال هذه المواضعة متبعة على نطاق واسع في كيمياء الكربوهيدرات والأحماض الأمينية. وقد أثبتت دراسات حيود الأشعة السينية$-X)$ $(ray\ crystallography$صحة الاختيار التاريخي الأصلي لـ.$(D$-glyceraldehyde$)$
نظام كان-إنجولد-بريلاج$(CIP-Cahn-Ingold-Prelog)$	يُعد الطريقة النظامية النهائية والمعتمدة لتعيين التكوين المطلق بدقة. وتُشير الحروف(R) و (S)إلى الترتيب المكاني وفق القواعد التالية: إعطاء أولويات وترتيب للمجموعات المستبدلة استناداً إلى أعلى رقم ذري .$(Atomic\ number)$ توجيه المجموعة ذات الأقل أولوية بعيداً عن الناظر. إذا كان ترتيب المجموعات المتبقية (من الأعلى للأقل أولوية) باتجاه عقارب الساعة، يُرمز لها بـ.$(R-Rectus)$ .4إذا كان الترتيب عكس اتجاه عقارب الساعة، يُرمز لها بـ.$(S-Sinister)$

- **ملاحظة تقنية هامة:** لا يمكن تحويل مواضعة "فيشر" الكيميائية ببساطة إلى نظام (CIP); بمعنى أن الحرف (R)لا يعادل دائماً الحرف (D). فجميع الأحماض الأمينية من نوع ألفا (α) الموجودة طبيعياً في بروتينات الثدييات هي من النوع (L). وعند تطبيق نظام (CIP), نجد أن حمضي السيستين والسيستين تقع في النوع (S), بينما بقية الأحماض الأمينية الطبيعية (الخالية من الكبريت) تتبع النوع (R).

تنفيذ المنهجية وتوثيقها (Method Implementation and Validation)

مهما كانت الطريقة التحليلية أو الجهاز المستخدم في إنجاز تحليل معين، فإنه يجب توثيق واختبار صلاحية هذه الطريقة علمياً ($Validation$)؛ أي إثبات قطعياً أنها **"صحيحة للغرض المقصود منها"** ($Fit\ for\ purpose$). إن الفهم العميق لتوثيق المنهجية يعد أمراً بالغ الأهمية، ليس فقط عند ابتكار وتطوير طريقة تحليلية جديدة، بل يمتد ليشمل مرحلة تطبيق أي طريقة قائمة للاستخدام الروتيني.

ويرد في الجدول المخصص لذلك مجموعة واسعة من المصطلحات والاصطلاحات الأساسية الهامة لاستيعاب مفاهيم توثيق المنهجية التحليلية. وتُعد نقطة البداية الأساسية والحتمية في أي مقايسة معملية هي الحصول على **مواد مرجعية نقية معتمدة** ($Certified\ pure\ reference\ material$), أو الاعتماد على أفضل تقريب معملي متاح وموثوق لهذه المواد المرجعية القياسية.

وعند إعداد وتحضير المعايير الأولية ($Primary\ standards$), يجب إيلاء اهتمام بالغ ودقيق بالوزن الجزيئي النسبي (M_r) للأملاح ومدى درجة تميؤها المرتبطة بماء التبلور ($Water\ of\ crystallization$). وعادةً ما جرى العرف على الإبلاغ عن النتائج التحليلية المخبرية بدلالة الحمض الحر ($Free\ acid$) أو القاعدة الحرة ($Free\ base$) وليس بصورة الملح الكامل.

إلى جانب ذلك، يجب أن تتسم الطريقة التحليلية بحساسية كافية للمهمة المطلوبة. وغالباً ما يُستخدم شذوذاً مصطلح "حد الحساسية" للدلالة على حد القياس الدقيق، غير أنه من الأفضل علمياً تعريفه بـ **الحد الأدنى للقياس الكمي** ($Lower\ limit\ quantification - LLoQ$). وفي المقابل، يُعد مصطلح **حد الكشف** ($Detection\ limit$) أو قيمة القطع - ($Cut\ off\ value$) التعبير الأمثل لوصف حد الحساسية المطلق. وفضلاً عن ذلك، يُشترط في الطرق الكمية أن تتمتع بدقة عالية تُعرف بـ **قابلية التكرار** ($Reproducibility$ أو $Precision$), و**ضبط** ($Accuracy$) يضمن أن تعكس النتائج التركيز الحقيقي والفعلي للمادة المحللة ($Analyte$). وتكتسب **الانتقائية** ($Selectivity$) – المتمثلة في الخلو التام من التداخلات الكيميائية – أهمية حيوية فائقة عند قياس نوع كيميائي مفرد، بينما قد تكون الانتقائية الواسعة مفيدة ومرغوبة عند الرغبة في الفحص الشامل والكشف عن فئة كاملة من المركبات.

ويُعد استخلاص المادة المحللة ($Recovery$) – والمقصود به مقدار الكمية المستردة والفعالية المستحصلة من المادة المراد تحليلها مقارنة بمصفوفة العينة الأصلية أثناء عملية الاستخلاص – أمراً حيوياً للغاية إذا كانت حدود الحساسية محدودة، ولكنه قد لا يشكل عائقاً رئيسياً في حال كانت حدود الكشف الدنيا، والدقة، والضبط للمقايسة ضمن الحدود المقبولة. ومن الناحية المثالية والمطلوبة، أياً كانت المنهجية التحليلية المتبعة، يجب أن تتم **معايرة المقايسة الكمية** ($Quantitative\ assaycalibration$) من خلال تحليل متسلسل لمحاليل قياسية لكل مادة محللة (عادة ما تتراوح بين 6إلى 8تراكيز تغطي بدقة نطاق المعايرة المنشود)، بحيث تُحضّر في نفس المصفوفة الحيوية وتُحلل كدفعة واحدة ($Batch$) متزامنة مع عينات الاختبار. ويتم إعداد رسم بياني دقيق يربط بين الاستجابة المقاسة وتركيز المادة المحللة، ويُعتمد عليه في حساب التركيز المجهول للعينة فيما يُعرف بطريقة **"المعيار الخارجي"** ($External\ standard$).

ولما كان أي تحليل كمي يُمثل في جوهره عملية قياس فيزيائي-كيميائي، فإنه – كغيره من القياسات – لا يخلو تماماً من وجود أخطاء عشوائية ($Random\ errors$) وأخطاء نظامية ($Systematic\ errors$). وفي نطاق طرائق الفصل الكروماتوغرافية وغيرها، غالباً ما تُلجأ استراتيجية **"المعيار الداخلي"** ($Internal\ standard$) للتقليل الفعّال لتأثيرات الأخطاء النظامية؛ مثل التغيرات الطفيفة في حجوم الحقن أو معدلات تبخر مذيب الاستخلاص أثناء مجريات التحليل. وبناءً على ذلك، تُضاف كمية معلومة بدقة من مركب ثانٍ (يُعرف بالمعيار الداخلي) يتصرف كيميائياً وفيزيائياً بشكل مشابه للمادة

المحللة طوال مراحل التحليل، ولكنه يخرج $(Elutes)$ في زمن احتجاز مختلف على المخطط الكروماتوغرافي $(Chromatogram)$ أو يتم الكشف عنه بشكل مستقل تماماً في خطوة مناسبة من التحليل. وفي المراحل اللاحقة، يتم رسم نسبة استجابة الكاشف للمادة المحللة مقارنة باستجابة المعيار الداخلي في مواجهة تركيز المادة المحللة عند إنشاء منحنى المعايرة النهائي.

الجدول (8): بعض المصطلحات المستخدمة في الكيمياء الفراغية
Table 8: Some Terms Used in Stereochemistry

المصطلح$(Term)$	**التعريف العلمي**$(Scientific\ Definition)$
الكيمياء الفراغية المطلقة $(Absolute\ stereochemistry)$	التكوين الفراغي المكاني المطلق لذرات الجزيء.
كيرالي$(Chiral)$	صفة شبيهة باليد، تعبر عن وجود صور مرآتية يمينية ويسارية لا يمكن انطباقهما.
إنانتيومر$(Enantiomer)$	أحد شكلي الصورة المرآتية لزوج من المركبات النشطة بصرياً $(Chiral\ pair)$.
إبيمرات$(Epimers)$	جزيئات نشطة بصرياً تحتوي على أكثر من مركزين كيراليين وتختلف في تكوين مركز كيرالي واحد فقط.
الأبمرة$(Epimerization)$	تعادل بصري $(Racemization)$ جزئي يحدث لمركز كيرالي واحد في جزيء يحتوي على مركزين كيراليين أو أكثر.
دياستيريومرات$(Diastereoisomers)$	هياكل جزيئية تحتوي على أكثر من مركز كيرالي بحيث لا تمثل صوراً مرآتية لبعضها البعض (أي أنها ليست إنانتيومرات).
الانعكاس$(Inversion)$	عملية تحويل إنانتيومر معين إلى نظيره الآخر.
ميزو$(Meso)$	أيزومر غير نشط بصرياً $(Achiral)$ نتيجة توازن النشاط البصري للمراكز الكيرالية داخلياً.$(Internal\ compensation)$
مزيج راسيمي$(Racemate)$	خليط متساوي المولات بنسبة$50:50$ من كلا الإنانتيومرين لمركب نشط بصرياً.
الترسيم$(Racemization)$	عملية تحويل إنانتيومر نقي مفرد إلى مزيج راسيمي متعادل بصرياً.

الجدول (9): المصطلحات المستخدمة عند التقرير عن توثيق المنهجية
Table 9: Terms Used When Reporting Method Validation

المصطلح$(Term)$	**ملاحظات توضيحية**$(Notes)$
الضبط$(Accuracy)$	مقدار الفرق والحيود بين القيمة المقاسة عملياً والقيمة المقبولة أو "الحقيقية" المفترضة.
نطاق المعايرة$(Calibration\ range)$	نطاق تراكيز المحاليل الواقع بين أعلى وأقل معايير معايرة مستخدمة. ويُشترط أن يغطي هذا النطاق كافة تراكيز المواد المتوقع وجودها في عينات الاختبار.
معامل الاختلاف $(Coefficient\ of\ Variation - CV)$	مصطلح إحصائي تقليدي ومستخدم سابقاً للتعبير عن الانحراف المعياري النسبي.(RSD)
الحد الأعلى للقياس الكمي $(Upper\ Limit\ of\ Quantification - HLoQ)$	أعلى تركيز مادي يمكن قياسه كمياً وبدقة. ولا يتم ذكره دائماً، لكنه يحمل أهمية بالغة في المقايسات التي تتميز بوجود "قطع $(Cut - off)$ "علوي واضح، مثل المقايسات المناعية والفلورية.
المعيار الداخلي$(Internal\ standard)$	مركب كيميائي ثانٍ (مخالف للمادة المحللة)، يُضاف في مرحلة معينة ومناسبة من التحليل بهدف تصحيح الأخطاء النظامية المصاحبة للعمليات.
حد الكشف$(Limit\ of\ Detection - LoD)$	أصغر وأدنى كمية ممكنة من المادة المحللة يمكن رصدها واكتشافها. ويُعرّف عملياً كمضاعف محدد (مثل5 أضعاف) لضوضاء خط الأساس – أي أن نسبة الإشارة إلى الضوضاء –$(Signal\ to\ noise\ ratio) \geq 5$ أو كمضاعف للانحراف المعياري لإشارة العينة البيضاء.$(Blank)$

المصطلح($Term$)	ملاحظات توضيحية($Notes$)
الخطية($Linearity$)	وجود علاقة طردية محددة وثابتة وقابلة للتكرار بين القياس الفيزيائي-الكيميائي (مثل الامتصاص الضوئي فوق البنفسجي (UV - وتركيز المادة المحللة، مع الإشارة إلى أن العلاقة لا يشترط دائماً أن تكون خطاً مستقيماً تاماً.
الحد الأدنى للقياس الكمي ($Lower\ Limit\ of\ Quantification - LLoQ$)	أدنى تركيز محتمل يمكن قياسه كمياً ضمن حدود دقة وضبط محددة ومعيارية. وعادةً ما يُحدد بكونه التركيز الذي أُثبتت عنده مقاييس الدقة والضبط بشكل اعتباري (مثل أن يكون الانحراف المعياري النسبي.($RSD < 20\%$)
الدقة($Precision$)	مدى تشتت القيم والقراءات المقاسة حول القيمة المتوسطة الحسابية. وغالباً ما تُعبير عنها كنسبة مويّة للانحراف المعياري النسبي ,(RSD) وتنقسم تقديراً إلى: الدقة داخل المقايسة الواحدة ($Within - assay$) والدقة بين المقايسات المختلفة.($Between - assay$)
الانحراف المعياري النسبي ($Relative\ Standard\ Deviation - RSD$)	الانحراف المعياري (SD) للقياسات المكررة معبراً عنه كنسبة مئوية من القيمة المتوسطة ,($Mean$) وفق العلاقة الرياضية: $$\mathrm{RSD} = \left(\frac{SD}{Mean}\right) \times 100\%$$ وتكمن أهميته البالغة في مقارنة درجات الدقة عند تراكيز مختلفة.
الانتقائية($Selectivity$)	القدرة الفائقة للنظام التحليلي على التمييز بدقة بين المادة المستهدفة المحللة وبين أي مركبات كيميائية أخرى متداخلة.($Interferences$)
نسبة الإشارة إلى الضوضاء($S/N\ ratio$)	استجابة المادة المحللة ($Analyte\ response$) مقسومة هندسياً على سعة الضوضاء الإلكترونية العشوائية لنظام الكشف. وعملياً، غالباً ما تكون إشارة الخلفية الناشئة عن المركبات المتداخلة الحقيقية أكبر بكثير من قيمة الضوضاء الإلكترونية البحتة.

ضبط الجودة وتوكيد الجودة (Quality Control and Quality Assurance)

بمجرد إتمام توثيق المنهجية التحليلية ($Method\ validation$) وتنفيذها مخبرياً، يصبح من الضروري القدرة على البرهنة المستمرة على أن الطريقة لا تزال تعمل وتؤدي وظيفتها بالكفاءة المخططة. ففي **العمل النوعي** ($Qualitative\ work$), يلزم بصورة روتينية تحليل عينات موجبة وأخرى سالبة معروفة بالتزامن تماماً مع توقيت تحليل عينة الاختبار ($Test\ sample$). ويساعد **الضابط السالب** أو ما يُعرف بـ **"العينة البيضاء"** ($Blank$) في التيقن من عدم الحصول على نتائج إيجابية كاذبة (الناجمة مثلاً عن تلوث الكواشف الكيميائية أو الأواني والأدوات الزجاجية). وبالمثل، يعمل إدراج ضابط موجب حقيقي على التحقق من أن الكواشف قد أُعدت بالشكل السليم وظلت مستقرة وفعالة.

أما في **العمل الكمي** ($Quantitative\ work$), فيتم مراقبة أداء المقايسة التحليلية بانتظام عبر التحليل المنهجي لعينات **ضبط الجودة الداخلي** ($Internal\ Quality\ Control - IQC$); وهي عبارة عن محاليل قياسية محضرة بصورة مستقلة وذات تراكيز معروفة تماماً ومذابة في نفس مصفوفة العينات، على ألا تُستعمل نهائياً في عملية معايرة المقايسة. ويُتيح رسم نتائج عينات الـ (IQC) على مخطط بياني دوري تتبع الأداء اليومي للمقايسة، مما يتيح إطلاق تحذيرات مبكرة لأي خلل أو مشكلة فور ظهورها. وعند تحضير دفعات جديدة من عينات المعايرة و(IQC), من الحكمة التأكد من تماثل النتائج مع تلك الصادرة عن الدفعة السابقة، أو مقارنتها بالنتائج المستحصلة عبر مواد ضبط الجودة الخارجية.

كما تُعد المشاركة في برامج **تقييم الجودة الخارجية** ($External\ Quality\ Assessment - EQA$) أو ما يُعرف باختبارات الكفاءة ($Proficiency\ Testing - PT$) أمراً بالغ الأهمية والموثوقية (Wilson, 2002). وفي هذه البرامج، تُرسل عينات تخصصية (غالباً ما تكون مجففة بالتجميد - $Lyophilized$) مستمدة من البلازما، أو المصل، أو الدم الكامل، أو البول إلى شبكة من المختبرات المشاركة. وبعد إعادة إذابتها وتحضيرها باستخدام الماء منزوع الأيونات عند

الضرورة، تُفحص العينات وكأنها عينات سريرية حقيقية، وترسل النتائج للجهة المُقيمة قبل الكشف عن التراكيز الحقيقية أو المستهدفة.

تطبيقات علم السموم التحليلي (Applications of Analytical Toxicology)

تنقسم الحالات المرضية والجنائية التي تُطلب لأجلها الفحوصات السمومية بصورة عامة إلى فئتين رئيسيتين:

1. **سموم الطوارئ والمستشفيات العامة**، وتتضمن "فحوصات السموم" الإسعافية.
2. **فئات تخصصية دقيقة**، تشمل: السموم الجنائية $(Forensic\ toxicology)$، فحص العقاقير المخدرة $(Drugs\ of\ abuse)$، المراقبة الدوائية العلاجية $(Therapeutic\ drug\ monitoring - TDM)$، والسموم المهنية والبيئية. ورغم هذا التقسيم، إلا أن ثمة تداخلاً وثيقاً وكبيراً يجمع بين كافة هذه المجالات.

علم السموم السريري (Clinical Toxicology)

تفرض الطبيعة الفنية والمتخصصة لاستقصاءات السموم التحليلية تمركز المرافق والوحدات المختصة في مواقع غالباً ما تبعد جغرافياً عن مكان تواجد المريض. وفي كثير من الأحيان، تُنفذ فحوصات الكيمياء السريرية الروتينية في موقع معين، بينما تُجرى التحليلات السمية المعقدة في قسم مستقل، وربما في منشأة أو مدينة أخرى. وغالباً ما ينجز مختبر السموم حزمة واسعة من التحليلات تضاف إلى مهام سموم الطوارئ والإسعاف. ورغم ذلك، لا يمكن بأي حال المبالغة في التأكيد على الأهمية القصوى للتواصل المباشر والمستمر بين الطبيب المعالج وأخصائي السموم؛ فمن المثالي أن يبدأ هذا التنسيق قبل الشروع في جمع أي عينات، نظراً لأن بعض المواد الخطرة – مثل المعادن السامة – تستلزم احتياطات خاصة ودقيقة عند السحب والحفظ. ومن جانب آخر، قد تكتسب بقايا العينات المحفوظة مسبقاً في مختبر الكيمياء السريرية أو الأقسام الأخرى (مثل ثلاجة قسم الطوارئ - ED) قيمة علاجية وجنائية لا تُقدر بثمن إذا ثار الشك بوقوع التسمم لاحقاً.



وفي الوقت الحاضر، يتم إنجاز فحص السموم بصورة أساسية بالاعتماد على **المقايسات المناعية** $(Immunoassays)$، أو **كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة** (TLC)، أو **كروماتوغرافيا الغاز الشعرية المبرمجة حرارياً والمقترنة بمطيافية الكتلة** $(GC - MS)$. ويُعد مفهوم **التحليل السمي المنهجي** (STA) أداة قيمة وفعالة، رغم أنه يبالغ أحياناً في اشتراط القابلية المطلقة

لتكرار بيانات الاحتجاز ($Retention\ data$). إذ تُؤخذ في الواقع العملي اعتبارات عديدة بالحسبان (مثل: الأدلة السريرية والظرفية، توافر سم معين في بيئة المريض، التاريخ الطبي السابق، المهنة، عدد القمم الكروماتوغرافية، واستجابات الكاشف الانتقائية) قبل الإبلاغ النهائي عن النتائج. ويجب أن يغطي نطاق الفحوصات التي تقدمها المختبرات المتخصصة مئات السموم المختلفة، وغالباً ما يُطلب إنجاز ذلك على أساس طارئ وعاجل. كما يجب أن تستخدم فحوصات السموم أحجاماً معقولة من العينات المتاحة عادة (حوالي 30 ml – 20من البول، و5 ml – 2 من البلازما). وإذا كانت الاختبارات ستلعب دوراً مباشراً في توجيه الإدارة العلاجية الفورية للمريض، فيتعين إصدار النتائج الأولية في غضون ساعتين إلى ثلاث ساعات من لحظة استلام العينات (وتقل المدة لتصل إلى ساعة واحدة فقط في حالات التسمم بعقار الباراسيتامول). وفي بعض الحالات المعقدة، قد يؤدي وجود أكثر من سم واحد في جسم المريض إلى تعقيد مجريات التحليل، مما يستوجب فحص عينات إضافية.

وعادةً ما يكون التحليل الكمي للدم الكامل أو البلازما مطلوباً لتأكيد حالات التسمم بصورة قاطعة، غير أن ذلك قد يتعذر أحياناً بسبب محدودية الإمكانيات والمرافق المعملية. ومن الضروري مناقشة نطاق وحدود الفحوصات بوضوح مع الطبيب المعني مع الحفاظ على أعلى معايير الجودة والممارسة المخبرية؛ إذ يُعد الامتناع عن تقديم نتيجة غير موثوقة أفضل بكثير من إرسال بيانات مضللة مبنية على اختبارات ضعيفة الأداء. وغالباً ما يبادر الأطباء إلى معالجة المرضى بناءً على الاشتباه الإكلينيكي والتاريخ المرضي دون انتظار النتائج المخبرية، مع احتفاظهم بحق تعديل مسار العلاج فور ورود النتيجة (مثلما يحدث في حالات التسمم بالباراسيتامول).
وغالباً ما تتسم الأدلة الظرفية للمركبات المتورطة في حوادث التسمم بالغموض، ولهذا يُنصح باعتماد "فحص سموم" روتيني في كافة الحالات باستثناء أبسطها. وبالمثل، لا ينبغي أن يتوقف التحليل المعملي بمجرد ظهور أول نتيجة إيجابية؛ فقد تكون هناك مركبات سامة إضافية لم تكن مشتبهاً فيها مسبقاً. ويُستثنى من ذلك حالات التسمم غير القاتل بغاز أول أكسيد الكربون (CO)، والتي قد يصعب تشخيصها بدقة حتى مع توافر قياسات الكاربوكسي هيموجلوبين ($Carboxyhemoglobin$)، وحينها تلعب الأدلة الظرفية دوراً حاسماً لا يُقدر بثمن. وبطبيعة الحال، فإن النتيجة "الإيجابية" عند فحص السموم لا تؤكد بذاتها وقوع تسمم سريري، إذ قد تنشأ النتيجة عن تعرض عرضي أو مهني للمادة المعنية أو نتيجة استخدام علاجي مشروع لأدوية معينة.

وغالباً ما يمثل الدم العينة الأسهل استحصالا من مريض فاقد الوعي، وهو مطلوب أساساً لإنجاز العديد من القياسات الكمية. كما يُعتبر **البول** عينة بالغة الأهمية نظراً لأن تراكيز العقاقير ونواتج أيضها ($Metabolites$) تميل للارتفاع مقارنة بالدم، وغالباً ما تتوافر منه حجوم كبيرة نسبياً. ومع ذلك، فإن بعض المركبات – مثل العديد من أدوية **البنزوديازيبينات** ($Benzodiazepines$) – تتعرض لعمليات استقلاب مكثفة وواسعة النطاق قبل طرحها، وفي هذه الظروف تكون بلازما الدم العينة المفضلة والأدق للكشف عن المركب الأصلي ($Parent\ compound$). وبصفة عامة، تظل القياسات الكمية المجرية على البول ذات فائدة طفيفة للغاية في سياق سموم الطوارئ الإسعافية.
ويجدر التأكيد على أن لجميع فحوصات السموم حدوداً ومعوقات تقنية يجب الإلمام بها (Wiley, 1991). فمن بين الأدوية الشائعة الوصف لعلاج الاكتئاب، يتطلب الأمر البحث المخصص عن عنصر **الليثيوم** (Li)، بينما تترك مثبطات إنزيم مونوامين أكسيداز ($Monoamine\ oxidase\ inhibitors - MAOIs$) التي ترتبط بشكل غير عكسي – مثل الفينيلزين ($Phenzeline$) – مفعولاً ممتداً وطويل الأمد في الجسم، رغم أن تراكيزها البلازمية تبدو ضئيلة للغاية عقب تعاطي جرعات زائدة. وأي عقار لا يرتبط بصورة قوية بالإنزيمات قد يُطرح من الجسم بسرعة فائقة ويصعب اكتشافه إلا عبر عينة بول مسحوبة بعد فترة قصيرة جداً من وقوع الحادثة. أما **مضادات الاكتئاب ثلاثية الحلقات**

$(Tricyclic\ antidepressants - TCAs)$, فتتسم بدرجة عالية من المحبة للدهون $(Lipophilic)$, ولهذا السبب قد تتدنى تراكيزها في البول – حتى في حالات التسمم القاتلة – لتصل إلى ما دون الحد الأدنى للقياس الكمي $(LLoD)$ للطريقة التحليلية إذا حدثت الوفاة بعد وقت قصير نسبياً من الابتلاع.

علم السموم الجنائي (Forensic Toxicology)

تُجرى التحقيقات والتحاليل السمية للوفيات المشبوهة (بما في ذلك حوادث الطرق المميتة) غالباً عند وجود احتمال لتورط عقاقير، أو أدوية، أو سموم أخرى. وتغطي هذه الحالات احتمالات التسمم العمدي، كالتسمم الذاتي (الانتحار)، سيما إذا وقعت الوفاة بين الأطفال أو أثناء فترة الاحتجاز لدى الشرطة، أو عندما يبلغ التحلل الجسدي درجة تعيق استخلاص معلومات كافية حول سبب الوفاة من خلال الفحص السريري التقليدي بعد الوفاة (التشريح).

أما الحالات غير المميتة التي تتطلب تحقيقات سمية، فتشمل حالات الانهيار الصحي المفاجئ أثناء الاحتجاز، والجرائم المتعلقة بقوانين المرور الخاصة بتعاطي الإيثانول أو العقاقير المؤثرة عصبياً، وادعاءات تسميم الأقارب أو الحيوانات الأليفة، إضافة إلى حالات التخدير المستهدفة في الاعتداءات الجنسية والجرائم الأخرى $(DFSA)$. وقد يتطلب الأمر أحياناً تحليل عينات مأخوذة من المشتبه بهم للبحث عن مواد مثل الإيثانول، والتي يُحتمل أنها أثرت على إدراكهم أو سلوكهم أثناء ارتكاب الجريمة. وتتفاوت العينات البيولوجية المتاحة بشكل كبير، بدءاً من الدم الطازج وأنسجة الأعضاء وصولاً إلى الأنسجة المتحللة المستخرجة من هياكل عظمية جزئية، وبكميات قد تتراوح بين كيلوجرام كامل من الكبد وحتى بقعة دم جافة وشحيحة. وفي المملكة المتحدة، أُدخل تحليل النفس للكشف عن السائقين المخمورين في عام 1967م، معتمداً في بداياته على أنابيب كاشفة تعتمد على اختزال ثنائي كرومات البوتاسيوم $(K_2Cr_2O_7)$, ليتطور لاحقاً إلى أجهزة إثبات إيثانول النفس الحديثة. ومع ذلك، لا تزال هناك تحديات معقدة تتمثل في الفحص عن مروحة واسعة من المركبات المؤثرة على كفاءة القيادة ضمن حجوم ضئيلة جداً (مثل 2 ml من الدم الكامل) مع ضرورة ترك كمية كافية للقياس الكمي، فضلاً عن رصد العقاقير المستخدمة في الاعتداءات الجنسية. ويتمثل الدور الأساسي لفاحص الوفيات $(Coroner)$ في إنجلترا وويلز والوكيل المالي $(Procurator\ Fiscal)$ في اسكتلندا في استبعاد الأفعال الجنائية كسبب محتمل للوفاة. وتُعد البيانات المستمدة من هذه الجهات القضائية ذات قيمة استثنائية في مراقبة معدلات التسمم القاتل. وتبرز هنا الأهمية البالغة للتوثيق الدقيق والشامل لكافة حوادث التسمم الحاد – سواء في السجلات المستشفائية أو المعملية – نظراً لاحتمال مراجعة أبسط التفاصيل لاحقاً أمام محاكم فاحصي الوفيات.

وتتضمن الوثائق والسجلات الأساسية المطلوبة ما يلي:

- تفاصيل المريض والعينة المسجلة بدقة.
- تاريخ ووقت جمع العينات البيولوجية.
- تفاصيل الفحص البدني والإكلينيكي.
- طبيعة وتوقيت التدخلات العلاجية (لا سيما العلاج الدوائي والدوائر الإسعافية).
- نتائج الاستقصاءات المخبرية مدعومة بوحدات القياس $(Units)$.
- توثيق المراسلات والمحادثات مع مراكز معلومات السموم والمختبرات.

ويلتزم المختبر بتوثيق كافة التحليلات بشكل كامل والاحتفاظ بنسخ محفوظة من التقارير الصادرة، مع ضرورة حفظ وتخزين العينات المتبقية ضمن درجات حرارة منخفضة ملائمة (مثل $-20°\ C$) لحين الانتهاء التام من القضية. وعند تقييم شهادة خبير السموم، تولي المحاكم عناية خاصة لخبرة المحلل، ومصدر الحالة المادية للعينات، والتقنيات التحليلية المطبقة؛ إذ تُعد القدرة

على إثبات **"سلسلة الحضانة"** ($Chain\ of\ custody$) المستمرة والسليمة للعينة أمراً جوهرياً لا غنى عنه. وعادةً ما يُشترط اعتماد طريقتين تحليليتين مستقلتين وغير مرتبطتين على الأقل قبل قبول تحديد الهوية الأولي للمادة. كما يجب تقديم النتائج مشفوعة بمعلومات تفسيرية واضحة تضمن للقاضي أو هيئة المحلفين فهمها بدقة، مع وضع احتمالية إخضاع العينات لفحص مستقل من قبل خبير آخر في الاعتبار دائماً.

فحص العقاقير المخدرة (Drug Abuse Screening)

تتجلى القيمة التشخيصية لقياسات الدم، أو النفس، أو البول بوضوح في تشخيص حالات تعاطي الإيثانول ومراقبة برامج الامتناع عنه. كما يُعتبر فحص العقاقير المخدرة في البول أداة فعالة لمراقبة التعاطي غير المشروع لدى المرضى المعتمدين، ويشكل درع حماية ضد وصف الأدوية الخاضعة للرقابة ($Controlled\ drugs$) لمرضى غير مستحقين. وتختفي بعض المواد من الأنسجة الحيوية بسرعة كبيرة، وبحسب الفترة الزمنية المنقضية بين وقت التعاطي ولحظة سحب العينة، قد يتعذر اكتشاف المركب الأصلي ($Parent\ compound$)؛ ورغم ذلك، يمكن الاستعانة بتحديد نواتج الأيض الخاصة ($Metabolites$) للبرهنة على تعاطي عقار معين. وفي الوقت الحالي، يُلجأ إلى عينات بديلة ومتزايدة الأهمية، مثل اللعاب أو السائل الفموي والعرق، لاختبار العقاقير المخدرة. كما أن تحليل الشعر – الذي استُخدم مطولاً لتقييم التعرض المزمن للمعادن السامة – يتيح توفير سجل تاريخي متعاقب للتعرض للمخدرات غير المشروعة والسموم العضوية الأخرى (Baumgartner et al., 1979; Kintz, 2004). كما يكتسب اختبار العقاقير المخدرة أهمية بالغة في التقييم النفسي للمرضى الذين يفتقرون لتاريخ ظاهر للتعاطي، إضافة إلى دوره الحيوي في تشخيص تعاطي الأم للمخدرات (سواء خلال الحمل أو بعد الولادة) لتوجيه رعاية المولود الجديد بفعالية.

وقد استقر العرف في السنوات الأخيرة على ضرورة إخضاع العاملين في الوظائف الحساسة – كالعاملين في القوات المسلحة، والأجهزة الأمنية، والطيارين، والسائقين المهنيين – لفحوصات دورية ("فحص التوظيف" و"فحص ما قبل التوظيف"). واكتسب الكشف عن المنشطات والمخدرات في المجال الرياضي أهمية بالغة؛ ففي رياضات الحيوانات، يُعد تحديد المركب غير المشروع أيسر مقارنة بالإنسان، إذ يشمل أي مادة لا تنحدر بصورة طبيعية من الأعلاف.
ويُعد **البول** العينة المفضلة في أغلب هذه التطبيقات؛ نظراً لارتفاع تراكيز المركبات المستهدفة فيه مقارنة بالدم، ولكونه العينة الأسهل استحصالاً، خصوصاً من المرضى الذين يعانون من تضرر الأوردة، فضلاً عن تمثيله خطورة بيولوجية أقل على طاقم المختبر. وتشمل أكثر العقاقير غير المشروعة انتشاراً في المملكة المتحدة: الأفيونات [وخاصة الهيروين أو ثنائي أسيتيل مورفين، والمعروف بالديامورفين ($C_{21}H_{23}NO_5$)]، البنزوديازيبينات، الكوكايين، الأمفيتامينات (متضمنة الميثامفيتامين والإكستاسي - MDMA)، والقنب ($Cannabis$). وفي الولايات المتحدة، يشيع تعاطي الكوكايين بصورة هيدروكلوريد أو كقاعدة حرة ("كراك")، إلى جانب مركبات أخرى كالديكستروبروبوكسيفين، والفنتانيل، والفينسيكليدين (PCP أو "غبار الملائكة").

وتتفاوت درجات نقاء مخدرات "الشوارع" تفاوتاً هائلاً، فقد تتراوح نسبة نقاء الهيروين مثلاً بين 2%و95%. وتُعد حالات الجرعات الزائدة – الناتجة عن تعاطي مخدر شديد النقاء أو مغشوش بمواد بالغة السمية – سبباً رئيسياً في حدوث موجات من التسمم الحاد. ومن المكونات المستخدمة لغش مخدرات الشوارع: الأتروبين، الستركنين، الليدوكائين، الكلوروكين، الكينين، والباربيتورات. وقد ينشأ تسمم حاد خطير نتيجة انفاض درجة تحمل الجسم للهيروين أو الميثادون بسبب انقطاع التعاطي.

ويُستعمل الميثادون بكثرة لعلاج إدمان الأفيونات، رغم تزايد لجوء المختصين لاستخدام البوبرينورفين ($Buprenorphine$)، فضلاً عن ظهور أفيونات أخرى كالكودايين، وثنائي هيدروكودايين، والبيثيدين (ميبيريدين). وقد أثبت توفر أطقم المقايسات المناعية ($Immunoassays$) جدوى كبيرة في برامج فحص التوظيف وما قبل التوظيف عند ترقب أعداد ضخمة من النتائج السلبية والحاجة لسرعة وحساسية عاليتين. ومع ذلك، يظل التأكيد القاطع للنتائج الإيجابية باستخدام مطيافية الكتلة (MS) المقترنة بالكروماتوغرافيا الغازية الشعرية (GC) أو السائلة ($HPLC$) أمراً أساسياً لا غنى عنه. وفي العينات السريرية، يمكن توظيف كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) لفصل عقاقير كمورفين عن مركبات كالكودايين والفولكودين المتاحة دوائياً دون وصفة طبية؛ فرغم تطلبها حداً أدنى من الأجهزة وكفاءتها الاقتصادية وإمكانيتها لمعالجة دفعات متسلسلة، إلا أنها متعبة عملياً ($Labor - intensive$)، منخفضة السعة الفصلية، وقد تكون تفسيرات نتائجها غير مباشرة. وللكشف عن الأمفيتامينات وتحديد هويتها، تُرشح دائماً تقنيات ($Capillary\ GC$)، أو ($GC - MS$)، أو ($HPLC - MS$)، التي تُستخدم متزايداً لتأكيد نتائج (TLC) والمقايسات المناعية. وأخيراً، يُعد تناول المسهلات ومدرات البول لغايات تخفيف الوزن أمراً وارداً يصعب تشخيصه، لذا يُنصح بجمع عينات بول متسلسلة لعدة أيام، تماماً كحالات الإعطاء الخفي لمضادات التخثر الموثقة طبياً ولكنها صعبة التشخيص المعملي.

المراقبة الدوائية العلاجية ($Therapeutic\ drug\ monitoring - TDM$)

يُعد قياس تراكيز البلازما للأدوية الموصوفة علاجياً أداة بالغة الأهمية لتقييم مدى التزام المريض بالخطة العلاجية ($Adherence$)؛ وخصوصاً بالنسبة للمركبات التي تتعذر مراقبة تأثيراتها الفارماكولوجية بسهولة، أو لتلك التي تتسم بهامش علاجي ضيق ($Narrow\ therapeutic\ index$) يفصل بدقة بين الجرعة الفعالة والجرعة السامة (Hallworth and Watson, 2007). ومع أن توافر منظومة واسعة من أطقم المقايسات المناعية ($Immunoassays$) يتيح إنجاز العديد من فحوصات المراقبة الدوائية العلاجية (TDM) بوسائل أسرع وأكثر يسراً مقارنة بالطرائق الكروماتوغرافية، إلا أن الأخيرة لا تزال تحتفظ بأهمية قصوى وحتمية في حالة الأدوية المضادة للذهان، والأدوية المضادة للفيروسات القهقرية ($Antiretrovirals$)، والمثبطات المناعية ($Immunosuppressants$)، فضلاً عن عقار **"الأميودارون"** ($Amiodarone$)؛ نظراً لاستحالة إنتاج أجسام مضادة لا تُبدي تفاعلاً تقاطعياً ($Cross - reactivity$) كبيراً مع الهرمونات الطبيعية كاليروكسين وثلاثي يود الثيرونين. وبصورة عامة، تبرز الحاجة الماسة للكروماتوغرافيا في الحالات التي تستوجب القياس المتزامن لنواتج الأيض النشطة بجانب المركب الأصلي ($Parent\ compound$)، ومن أبرز الأمثلة الإكلينيكية على ذلك:

- ثنائي كربامازيبين/كربامازيبين-10,11-إيبوكسيد (Carbamazepine/Carbamazepine-10,11-epoxide)
- كلوهابين/نوركلوهابين (Clozapine/Norclozapine)
- بروكايينااميد/ن-أستيل بروكايينااميد (Procainamide/N-acetylprocainamide)
- أميتريبتيلين/نورتريبتيلين (Amitriptyline/Nortriptyline)

السموم المهنية والبيئية (Occupational and Environmental Toxicology)

تُعتبر متابعة ومراقبة التعرض المهني أو البيئي للمواد السامة مجالا حيوياً وبالغ الأهمية. فبعض الأيونات المعدنية الثقيلة مثل الرصاص (Pb)، فضلاً عن بعض مبيدات الآفات الكلورية العضوية ($Organochlorine\ pesticides$) مثل "الكلوردان" ($Chlordane$) و"الديلدرين" ($Dieldrin$)، تمتلك فترات نصف عمر ($Half - lives$) طويلة جداً داخل

الجسم البشري، مما يؤدي حتماً إلى تراكمها التدريجي مع استمرار التعرض لتركيزات منخفضة نسبياً لفترات طويلة. كما قد تشكل عمليات تصنيع المستحضرات الدوائية خطراً صحياً جسيماً على العاملين نتيجة الامتصاص الجلدي المباشر أو الاستنشاق المستمر للأبخرة الدوائية.

ويُعد التحكم في مستويات التعرض المهني للمعادن السامة، والمذيبات المتطايرة، وغيرها من الملوثات جزءاً لا يتجزأ من **النظافة الصناعية** $(Industrial\ hygiene)$; وقد تحقق ذلك جزئياً عبر مراقبة تراكيز هذه المركبات في هواء بيئة العمل المحيطة $(Ambient\ air)$. غير أن الأنماط السلوكية الفردية ومدى التزام العامل بإجراءات السلامة قد تؤثر بشكل ملحوظ على حجم التعرض الفعلي. ولهذا السبب، تستوجب ممارسة المهن الخطرة إجراء ما يُعرف بـ **"مراقبة التأثير البيولوجي"** $(Biological\ effect\ monitoring)$, والتي تُقاس من خلالها مؤشرات الكيمياء السريرية الحيوية – مثل مستوى **"بروتوبورفيرين الزنك"** $(Zinc\ protoporphyrin - ZPP)$ في الدم كمشعر حيوي موثوق للتعرض للرصاص. ولأن ليس كل السموم تتيح مراقبة تأثيراتها، يُلجأ على نطاق واسع إلى تطبيق **"المراقبة البيولوجية"** $(Biological\ monitoring)$, والتي تشتمل على القياس الكمي لتركيزات المركب السام ونواتج أيضه المحتملة في عينات الدم، أو البول، أو النفس. وفي هذا السياق، وضعت المؤتمر الأمريكي لخبراء الصحة الصناعية الحكوميين $(ACGIH)$ قيمًا توجيهية مرجعية لـ 38مادّة في الولايات المتحدة (ACGIH, 2005)، بينما اعتمدت مؤسسة البحوث الألمانية (DFG) قيم عتبة لـ 63مادة كيميائية خطرة (DFG, 2005).

ويُمثل التحري عن حالات التسرب العرضي للمواد الكيميائية في بيئات العمل أو النطاقات البيئية المحيطة (ما يصطلح على تسميته بـ **الحوادث الكيميائية** - $Chemical\ accidents$) موضوعاً بالغ الأهمية والاهتمام. ومن أبرز الشواهد التاريخية على ذلك: كارثة "بوبال" $(Bhopal)$ في الهند نتيجة انطلاق غاز ميثيل إيزوسيانات $(Methyl\ isocyanate)$ في الغلاف الجوي، وحادثة "كاميلفورد" $(Camelford)$ في المملكة المتحدة التي أُضيف فيها كبريتات الألمنيوم $(Al_2(SO_4)_3)$ بطريق الخطأ والتتار إلى شبكات إمدادات مياه الشرب المحلية. وتلعب التحليلات السمية دوراً محورياً، لا فقط في توفير أدلة قاطعة حول طبيعة وحجم التعرض الكيميائي، بل وفي إثبات عدم وقوع أي تعرض مَرَضي خطير، مما يسهم بفعالية في تهدئة المخاوف العامة للجمهور.

ومن المجالات التي حظيت بنصيب من الإهمال نسبياً؛ **السموم المشتقة من الغذاء** $(Food - derived\ poisons)$. وعادةً ما تُدرس سموم البوتولينوم $(Botulinum\ toxin)$ وغيرها من الذيفانات ذات الأصل الميكروبيولوجي بالتزامن مع دراسات التسمم الغذائي البكتيري. كما تقع حالات التسمم بفعل سموم طبيعية أخرى؛ مثل الأتروبين $(Atropine)$ المستخلص من نبات "ست الحسن" $(Atropa\ belladonna)$, والسولانين $(Solanine)$ الموجود في البطاطس الخضراء، والسيانيد $(Cyanide)$ المستمد من نبات "الكسافا" وبذور التفاح (de Wolff, 2004). وفي هذه الحالات الإكلينيكية، قد يُقدم تحليل المادة الغذائية نفسها فوائد تشخيصية أكبر بكثير من تحليل العينات البيولوجية للمريض. وبالمثل، تظهر حالات التسمم الحاد بمبيدات الآفات أحياناً جراء استهلاك منتجات غذائية ملوثة (Stinson et al., 1993). وتجدر الإشارة إلى أن الإقبال المتزايد على استخدام العلاجات العشبية أو "الطبيعية" الأخرى يمثل مجالاً يثير قلقاً صحياً وتنظيمياً خاصاً.

احتياطات عامة في المختبر (*General Precautions*)

إن العمل داخل مختبر السموم، شأنه شأن أي منصب كيميائي أو بيولوجي معملي، يستوجب التزاماً صارماً وحرفياً بقواعد وإجراءات السلامة المهنية لضمان الحماية التامة للعاملين والحيلولة دون وقوع أي تلوث أو أخطاء معملية. وهذه الاحتياطات لا تُعد مجرد إرشادات استرشادية، بل تشكل ركيزة أساسية من ركائز **الممارسة المعملية الجيدة** (*Good Laboratory Practice − GLP*) (EPA, 1989):

- **يجب دائمًا إضافة الأحماض القوية أو القلويات إلى الماء وليس العكس:** تُعتبر هذه القاعدة أساساً أمانياً ثابتاً في الكيمياء؛ فعند إضافة حمض أو قاعدة قوية (*Strong acid/base*) إلى كمية كبيرة من الماء، تتوزع الحرارة الناتجة عن التفاعل الطارد للحرارة (*Exothermic reaction*) بأمان، مما يقلل من مخاطر الغليان المفاجئ أو التناثر. أما عكس العملية بإضافة الماء إلى الحمض المركز، فيؤدي إلى فوران وغلّيان كمية الماء المضافة فوراً مما يتسبب في تناثر الحمض وتكوين حروق كيميائية بالغة الخطورة (American Chemical Society, 2003).
- **يجب عدم حفظ الأحماض والقلويات القوية معًا أبدًا:** يهدف فصل وتخزين هذه المواد بمعزل عن بعضها إلى منع حدوث تفاعلات خطيرة في حالات انسكاب السوائل أو تسرب الحاويات؛ إذ تتسبب تفاعلات التعادل بين الأحماض والقلويات القوية في إطلاق طاقة حرارية هائلة وغازات ضارة (OSHA, 1990).
- **لا ينبغي تسخين المذيبات العضوية فوق لهب مكشوف، بل في حمام مائي:** تتسم المذيبات العضوية (*Organic solvents*) بدرجات اشتعال عالية، واستخدام اللهب المكشوف يعرض أبخرتها المتطايرة لخطر الاشتعال السريع مسبباً حرائق أو انفجارات كارثية. لذا يُعتمد **الحمام المائي** (*Water bath*) أو حمامات الزيت والرمال لتوفير تسخين لطيف ومضبوط تبعد درجات حرارته آمنة عن مصادر اللهب المباشر (Fisher Scientific, 2011).
- **استخدم خزائن/أغطية سحب الغاز (*Fume cupboards/hoods*) عند تسخين المذيبات العضوية:** تُعد خزائن سحب الأبخرة ضرورة حتمية لتأمين التهوية المعملية الفعالة؛ حيث تعمل على سحب الأبخرة الكيميائية المتطايرة والسامة بعيداً عن حيز عمل الباحث وإطلاقها بأمان تام خارج مبنى المختبر، مما يصون صحة العاملين ويمنع تراكم الغازات القابلة للاشتعال (National Research Council, 2011).

ملخص الفصل (*Summary*)

يستحيل فصل دراسة المنهجيات والطرائق التحليلية المعتمدة في إنجاز الاختبارات السمية للعينات البيولوجية وما يرتبط بها عن دراسة علم السموم ذاته، ولا سيما في فرعيه السريري والجنائي. وبذات المنطق، يقف المختبر عاجزاً عن تقديم أي مساعدة تشخيصية ما لم يساور الشك شخصاً ما – سواء كان طبيباً إكلينيكياً، أو طبيب أمراض، أو غيرهما – بوقوع حالة تسمم أولاً، مع ضمان دقة جمع العينات البيولوجية وإرسالها وفق الأصول المعملية للتحليل. ورغم ذلك، فإن عمليات جمع العينات والتعامل الإكلينيكي معها ليست أمراً يسيرًا أو بسيطاً في كل الأحوال، بل هي علم دقيق وقائم بذاته يتطلب وعياً منهجياً متكاملاً.



المراجع العلمية References

ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) (2005) TLVs and BEIs Based on the Documentation of the Threshold Limit Values for Chemical and Physical Agents and Biological Exposure Indices 2005. ACGIH, Cincinnati, OH.

American Chemical Society. (2003). Safety in Academic Chemistry Laboratories. ACS Publications.

Baselt, R. C. (2008). Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man (8th ed.). Biomedical Publications.

*Baumgartner, A.M., Jones, P.F., Baumgartner, W.A. and Black, C.T. (1979) Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. J Nucl Med, **20**, 748–52.*

Bertol, E., & De Rome, L. (2012). From the ancient toxicological chemistry to the modern analytical toxicology. Forensic Science International, 216(1-3), 1-13.

*Boone, C.M., Franke, J.P., de Zeeuw, R.A. and Ensing, K. (1999) Evaluation of capillary electrophoretic techniques towards systematic toxicological analysis. J Chromatogr A, **838**, 259–72.*

Braithwaite, R.A. and Brown, S.S. (1988) Clinical and sub-clinical lead poisoning: A laboratory perspective. Human Toxicol, 7, 503–13.

Cairns, T., & Gutteridge, S. (Eds.). (2010). Comprehensive Analytical Toxicology. Elsevier Science.

Cairns, T., & Gutteridge, S. (Eds.). (2010). Comprehensive Analytical Toxicology. Elsevier Science.

Christian, G. D. (2004). Analytical Chemistry (6th ed.). John Wiley & Sons.

*Coley, N. G. (1998) Forensic chemistry in 19th century Britain. Endeavour **22**, 143–7.*

Conway, E.J. (1947) Microdiffusion Analysis and Volumetric Error, 2nd edn, Crosby, Lockwood, London.

*Curry, A.S., Walker, G.W. and Simpson, G.S. (1966) Determination of ethanol in blood by gas chromatography. Analyst **91**, 742–3.*

de Wolff, F.A. (2004) Natural toxins, in Clarke's Analysis of Drugs and Poisons (eds A.C. Moffat, M.D. Osselton and B. Widdop), 3rd edn, Pharmaceutical Press, London, pp. 189–201.

*Delves, H.T. and Campbell, M.J. (1988) Measurement of total lead concentrations and lead isotope ratios in whole blood by use of inductively coupled plasma source mass spectrometry. J Anal At Spectrom, **3**, 343–8.*

DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (2005) List of MAK and BAT values 2005. Commission for the investigation of health hazards of chemical compounds in the work area. Report 41. Wiley VCH, Weinheim.

Environmental Protection Agency (EPA). (1989). Good Laboratory Practice Standards. 40 CFR Part 160.

Fisher Scientific. (2011). Safety Data Sheets for Common Laboratory Chemicals. (Manufacturer's safety guidelines).

Flanagan, R. J., Taylor, A., & Whelpton, R. (2007). Principles of Analytical Toxicology. John Wiley & Sons.

*Flanagan, R.J., Ruprah, M., Meredith, T.J. and Ramsey, J.D. (1990) An introduction to the clinical toxicology of volatile substances. Drug Saf, **5**, 359–83.*

Gowda, S. A., & Gowda, K. S. (2011). Forensic Medicine and Toxicology. Jaypee Brothers Medical Publishers.

Hallworth, M. and Watson, I. (2007) Therapeutic Drug Monitoring and Laboratory Medicine, ACB Venture Publications, London.

*Jones, A.W. (1998) Historical developments and present status of forensic toxicology in Sweden. Nordic Rettsmedisin, **4**, 35–44.*

Kintz, P. (2004) Hair analysis, in: Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 3rd edn (eds A.C. Moffat, D. Osselton and B. Widdop), Pharmaceutical Press, London, pp. 124–133.

Klaassen, C. D. (Ed.). (2012). Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (8th ed.). McGraw-Hill Education.

Klaassen, C. D. (Ed.). (2012). Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (8th ed.). McGraw-Hill Education.

Kricka, L. J. (1994). Ligand-binding assays: development and applications. Marcel Dekker.

Levine, B. (Ed.). (2011). Principles of Forensic Toxicology (3rd ed.). AACC Press.

Lindeboom, G. A. (1968). Herman Boerhaave: The Man and His Work. Methuen.

*Machata, G. (1975) The advantages of automated blood alcohol determination by head space analysis. Z Rechtsmed, **75**, 229–34.*

*Marsh, J. (1836) Account of a method of separating small quantities of arsenic from substances with which it may be mixed. Edin N Philosoph J, **21**, 229–36.*

Marsh, J. (1836). Account of a method of separating small quantities of arsenic from substances with which it may be mixed. Edinburgh New Philosophical Journal, 21(41), 229-236.

Mitchell, C.A. (1938) Forensic Chemistry in the Criminal Courts, Institute of Chemistry of Great Britain and Ireland, London.

Moeller, M. R., Guserle, R., & Lachenmeier, D. W. (2017). Handbook of Analytical Separations: Vol. 13, Drug Abuse. Elsevier.

*Moffat, A.C., Smalldon, K.W. and Brown, C. (1974) Optimum use of paper, thin-layer and gas-liquid chromatography for the identification of basic drugs. I. Determination of effectiveness for a series of chromatographic systems. J Chromatogr, **90**, 1–7.*

National Research Council. (2011). Prudent Practices in the Laboratory: Handling and Management of Chemical Hazards (Updated Version). National Academies Press.

Niyogi, S.S. (1981) Historical overview of forensic toxicology, in Introduction to Forensic Toxicology (eds R.H. Cravey and R.C. Baselt), Biomedical Publications, Davis, pp. 7–24.

*Orfila, M.P. (1821) A General System of Toxicology, or, A Treatise on Poisons, drawn from the Mineral, Vegetable, and Animal Kingdoms, considered as to their relations with Physiology, Pathology, and Medical Jurisprudence, Vol **1** & **2**, 2nd edn. Trans. Waller JA, E Cox, London.*

*Owen, P., Pendlebury, A. and Moffat, A.C. (1978) Choice of thin-layer chromatographic systems for the routine screening for neutral drugs during toxicological analyses. J Chromatogr, **161**, 187–93.*

*Peng, G.W. and Chiou, W.L. (1990) Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. J Chromatogr, **531**, 3–50.*

Plenck, J.J. (1781) Elementa Medicinae et Chirurgiae Forensis, Graeffer, Wien, p. 36.

*Reinsch, H. (1841) On the action of metallic copper on solutions of certain metals, particularly with reference to the detection of arsenic. Philosoph Mag, **19**, 480–83 (first published J Praktische Chem 1841; 19).*

Richard, J. L., & Codd, A. (2011). Mycotoxins in Food: Detection and Control. CRC Press.

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). Principles of Instrumental Analysis (7th ed.). Cengage Learning.

*Stinson, J.C., O'Gharabhain, F., Adebayo, G., Chambers, P.L. and Feely, J. (1993) Pesticide-contaminated cucumber. Lancet, **341**, 64.*

UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime). (2009). Forensic Science Laboratory Guide for the Identification of Controlled Substances. UN Publications.

Wallace, J. E., & Diamond, J. L. (1972). Clinical chemistry of salicylate. Clinical Chemistry, 18(4), 209-218.

Watson, K. (2004) Poisoned Lives: English Poisoners and Their Victims, Hambledon and London, London. Wiley, J.F. (1991) Difficult diagnoses in toxicology: Poisons not detected by the comprehensive drug screen. Pediatr Clin North Am, ***38****, 725–37.*

Wilson, J. (2002) External quality assessment schemes for toxicology. Forensic Sci Int, ***128****, 98–103.*

CHAPTER (2) الفصل الثاني

نزاهة العينة السّـــــــمية: المعايير المتقدمة في الاســـــــتخلاص، الحفظ، وســـــــلاسل الحيازة

TOXICOLOGICAL SPECIMEN INTEGRITY: ADVANCED STANDARDS IN SAMPLING, PRESERVATION, AND CHAIN OF CUSTOD



الفصل الثاني

نزاهة العينة السّـــــــمية: المعايير المتقدمة في الاســـــتخلاص، الحفظ، وســـــلاسل الحيازة

Toxicological Specimen Integrity: Advanced Standards in Sampling, Preservation, and Chain of Custod

مقدمة: فلسفة العينة وجسر الحقيقة التحليلية

Introduction: The Philosophy of Sampling and the Bridge to Analytical Truth

في محراب علم السموم التحليلي (*Analytical Toxicology*)، تظل النتائج المخبرية – مهما بلغت دقة الأجهزة المستخدمة من تعقيد تقني متطور – رهينةً للحظة الفارقة التي تُنتزع فيها العينة من سياقها الحيوي والمكاني. إن المبدأ الذهبي والراسخ الذي يحكم هذا العلم هو أن **"التحليل لا يتجاوز في جودته جودة العينة ذاتها"**؛ فالعينة هي الأساس الهيكلي المادي الذي تُبنى عليه كافة الاستنتاجات العلمية والقانونية، وأي خلل أو قصور في جمعها، أو نقلها، أو تخزينها يحول أكثر الأجهزة تطوراً إلى مجرد أدوات لإنتاج بيانات مضللة لا قيمة لها علمياً أو قضائياً.

فمما لا شك فيه أن القيام بـ **"جمع العينات ونقلها"** يتطلب مزيجاً متجيناً من **"فلسفة المختبر"** و"صرامة المنهج". فالعينة ليست مجرد مادة كيميائية عابرة، بل هي **"كبسولة زمنية"** دقيقة تحمل الدليل القاطع على واقعة التسمم، وأي خطأ أو إهمال في تداولها يعد اغتيالاً صريحاً للحقيقة العلمية قبل وصولها للمحلل المختص. كما إن التعامل مع المادة المحللة (*Analyte*) داخل مصفوفة العينة (*Sample Matrix*) يتطلب إدراكاً عميقاً لطبيعتها الكيميائية ودرجة استقرارها (*Stability*), وفهماً دقيقاً للظروف الديناميكية المحيطة بها. لذا، فإن التوثيق الصارم لتاريخ العينة، أو ما يُعرف بـ **سلسلة الحيازة** (*Chain of Custody*), لا يمثل إجراءً إدارياً روتينياً، بل هو الضمانة القانونية والأخلاقية المطلقة التي تربط الأصل بالنتيجة النهائية.

من البيولوجيا إلى الكيمياء الكمية

تعتمد فرضيتنا الأساسية على أن تركيز المادة الكيميائية في العينة هو انعكاس أمين ودقيق للحالة الفسيولوجية في اللحظة الزمنية المحددة للتعرض. ومن هنا، يبرز **الدم الكامل** (*Whole Blood*), و**البلازما** (*Plasma*), و**المصل** (*Serum*) كركائز أساسية في العمل السريري؛ ليس لسهولة الحصول عليها فحسب، بل لقدرة التحليل الكمي (*Quantitative Analysis*) فيها على تقديم قراءة دقيقة لحجم التعرض (*Exposure magnitude*) وشدة التسمم (*Severity of poisoning*).

وفي المقابل، تظل الإفرازات والسوائل الحيوية الأخرى مثل **البول** (*Urine*), و**اللعاب** (*Saliva*), و**هواء الزفير** (*Exhaled air*) بمثابة كنوز بحثية للتحري عن الأدلة في التحليل النوعي (*Qualitative Work*), حيث تبرز كأدوات استقصائية فاعلة تفتح آفاقاً واسعة للكشف عن هوية المادة السامة حتى وإن كانت قدرتها على التفسير الكمي محدودة نسبياً.

تحديات ما بعد الوفاة: صراع مع التحلل

تتبلغ الصعوبة المنهجية ذروتها القصوى عند التعامل مع **عينات ما بعد الوفاة** ($Postmortem\ Specimens$); حيث يتحول الجسم البشري من نظام حيوي منظم ومضبوط إلى بيئة كيميائية مضطربة ومتحللة. إن محاولة استرجاع تركيز المادة في اللحظة السابقة للوفاة ($Perimortem$) تشبه محاولة إعادة بناء لوحة فنية فريدة من شظايا متناثرة؛ وهنا تبرز معضلات كبرى مثل التحلل الدموي ($Haemolysis$), وركود الدم ($Haemostasis$), وظاهرة **إعادة التوزيع بعد الوفاة** ($Postmortem\ Redistribution$), حيث تتسرب المواد المحللة تدريجياً من الأنسجة الصلبة إلى الدورة الدموية، مما قد يمنح المحلل نتائج زائفة الارتفاع لا تعكس الواقع الفعلي للجرعة.

إن هذا الفصل ليس مجرد دليل إجرائي عابر، بل هو رحلة استكشافية في فن الحفاظ على **النزاهة الكيميائية** ($Chemical\ Integrity$) للعينة، حيث نستعرض فيه البروتوكولات والسياسات الصارمة التي تضمن بقاء العينة "حية" من الناحية المعلوماتية، حتى تنطق بالحقائق الدامغة داخل أروقة المختبر.

العينات السريرية وأخذ العينات (Clinical Samples and Sampling)

الصحة والسلامة (Health and Safety)

قد تحتضن العينات البيولوجية طيفاً واسعاً من العوامل والمسببات المعدية، لذا يجب التعامل معها بأقصى درجات الحذر والحيطة، سيما إذا كانت مأخوذة من متعاطي المخدرات أو الفئات عالية الخطورة، وينبغي معاملتها دائماً واعتبارها معدية افتراضياً. وتتمثل المخاطر الشائعة والمهددة لصحة العاملين في المعامل بصورة رئيسية في مرض **السل** ($Tuberculosis$), و**التهاب الكبد الوبائي ب** ($Hepatitis\ B$), و**فيروس نقص المناعة البشرية المكتسب** (HIV).

وتجدر الإشارة إلى أن **البول** يُعد الأقل احتمالاً من بين العينات لنقل العدوى مقارنة بالدم ومشتقاته.

ويُعتقد بدرجة ترجيح عالية أن العوامل المعدية تفقد قدرتها الفعالة وتُبطَل مفعولها تماماً عقب إتمام عمليات استخلاص المذيبات أو إجراءات تحضير العينات القوية الأخرى، ويُستثنى من ذلك مرض **"كرويتزفيلد جاكوب" المتغير** ($vCJD$). أما في المقايسات المتجانسة، مثل المقايسات المناعية المختلفة، فقد تظل العينات محتفظة بخواصها المعدية حتى بعد خطوات التحضين والتخفيف؛ بل إن ظروف التحضين المعملي قد تتسبب أحياناً في زيادة عيار أو تركيز ($Titre$) العامل المعدي.

توصيات السلامة لفريق العمل المعملي:

- **التدريب المستمر:** يجب إخضاع جميع الموظفين والعاملين الذين لهم اتصال دائم بالمواد المعدية المحتملة لتدريبات صارمة حول التداول الآمن للعينات البيولوجية وطرق التخلص الآمن منها.
- **التطعيم والتحصين:** يجب إلزام الموظفين بتلقي التطعيمات الوقائية ضد التهاب الكبد الوبائي ب ($Hepatitis\ B$), وشلل الأطفال ($Poliomyelitis$), والسل ($Tuberculosis$), والكزاز أو التيتانوس ($Tetanus$).
- **الوقاية من التناثر والهباء الجوي:** يجب إيلاء عناية فائقة لمنع تناثر القطرات السائلة في العين وتقليل معدل تكوين **الهباء الجوي** ($Aerosol$), وذلك من خلال اتباع الإجراءات الآتية:
  - ارتداء واقيات العين المعتمدة ($Eye\ protection$).
  - إنجاز عمليات الخلط والمعالجة داخل خزائن السلامة الميكروبيولوجية أو خزائن شفط الغازات ($Fume\ cupboards$).
  - استخدام أنابيب طرد مركزي قابلة للغلق المحكم ($Screw-capped\ centrifuge\ tubes$) أو أجهزة طرد مركزي مزودة بدوارات ذات أغطية مانعة للتسرب.

- تفضيل **أنابيب العينات ذات الأغطية اللولبية** $(Screw - capped\ tubes)$ بصورة قطعية على تلك المزودة بأغطية ضغط تقليدية $(Push - in\ stoppers)$, وذلك لتقليل مخاطر تطاير السوائل وتكون الهباء الجوي الخطير عند فتح الأنابيب في بيئة العمل.



صورة لمناقشة **توصيات السلامة لفريق العمل**

الجدول (1): أنواع المتغيرات المؤثرة على العينات السريرية
Table 1: Types of Variables Affecting Clinical Samples

المتغير $(Variable)$	**الأمثلة وتأثيرها** $(Examples\ and\ Their\ Effect)$
أولاً: متغيرات فسيولوجية $(Physiological\ Variables)$	
العمر (Age)	تزداد مؤشرات تجدد العظام (مثل الروابط المتشابكة للكولاجين) بصورة ملحوظة خلال مرحلة الطفولة.
الجنس (Sex)	تختلف مستويات الهرمونات الجنسية طبيعياً بين الذكور والإناث.
وزن الجسم $(Body\ weight)$	يرتفع تركيز الكرياتينين في البول طردياً مع زيادة الكتلة العضلية للجسم.
تناول الطعام حديثاً $(Recent\ food\ intake)$	يرتفع جلوكوز البلازما والدهون الثلاثية بعد الوجبات؛ كما قد يتأخر أو يقل امتصاص بعض الأدوية، في حين يزداد امتصاص أدوية أخرى.
النظام الغذائي $(Diet)$	يؤدي سوء التغذية أو الصيام الطويل إلى تقليل ألبومين المصل $(Serum\ albumin)$, واليوريا، والفوسفات.
التباين اليومي $(Circadian\ variation)$	تُظهر بعض المواد الحيوية (مثل الكورتيزول والحديد) تغيرات دورية يومية في تركيزها بالبلازما.
الدورة الشهرية $(Menstrual\ cycle)$	تختلف تراكيز الهرمونات (مثل: الملوتن LH, – المحفز للجريب FSH, – الإستراديول oestradiol, – والبروجستيرون (progesterone – باختلاف مراحل الدورة.
الحمل $(Pregnancy)$	تتفاوت تركيزات هرمون الحمل (HCG) والإستراديول طوال فترة مراحل الحمل المختلفة.
التغيرات النفسية $(Psychological\ changes)$	قد تؤدي عملية سحب الدم $(Venepuncture)$ أو دخول المستشفى إلى زيادة هرمونات التوتر كالكاتيكولامينات.$(Catecholamines)$
التغيرات الفسيولوجية البدنية $(Physiological\ changes)$	قد تؤثر وضعية الجسم (الجلوس مقابل الاستلقاء) على قياسات الألدوسترون والألبومين. كما يغير التمرين البدني تراكيز اللاكتات في الدم.
الأدوية $(Drugs)$	قد يُحدث العلاج الدوائي تغييراً في مكونات البلازما حتى لدى الأصحاء (مثال ذلك: عقار التريميثوبريم يزيد من كرياتينين المصل).
ثانياً: متغيرات العينة والمادة المحللة $(Sample/Analyte\ Variations)$	
عينة غير صحيحة $(Incorrect\ sample)$	وجود فروق جوهرية في القيم بين البلازما والمصل، أو الدم الوريدي والشرياني، أو عينة البول العشوائية وعينة تجميع الـ 24 ساعة (فعلى سبيل المثال، يكون البوتاسيوم أعلى في المصل مقارنة بالبلازما).
جمع غير صحيح $(Incorrect\ collection)$	غياب المثبط الإنزيمي المناسب قد يسمح باستمرار النشاط الإنزيمي (مثل تحلل الجلوكوز). وعدم تحميض البول يقلل الكاتيكولامينات. بينما الجمع في أنابيب مانعة

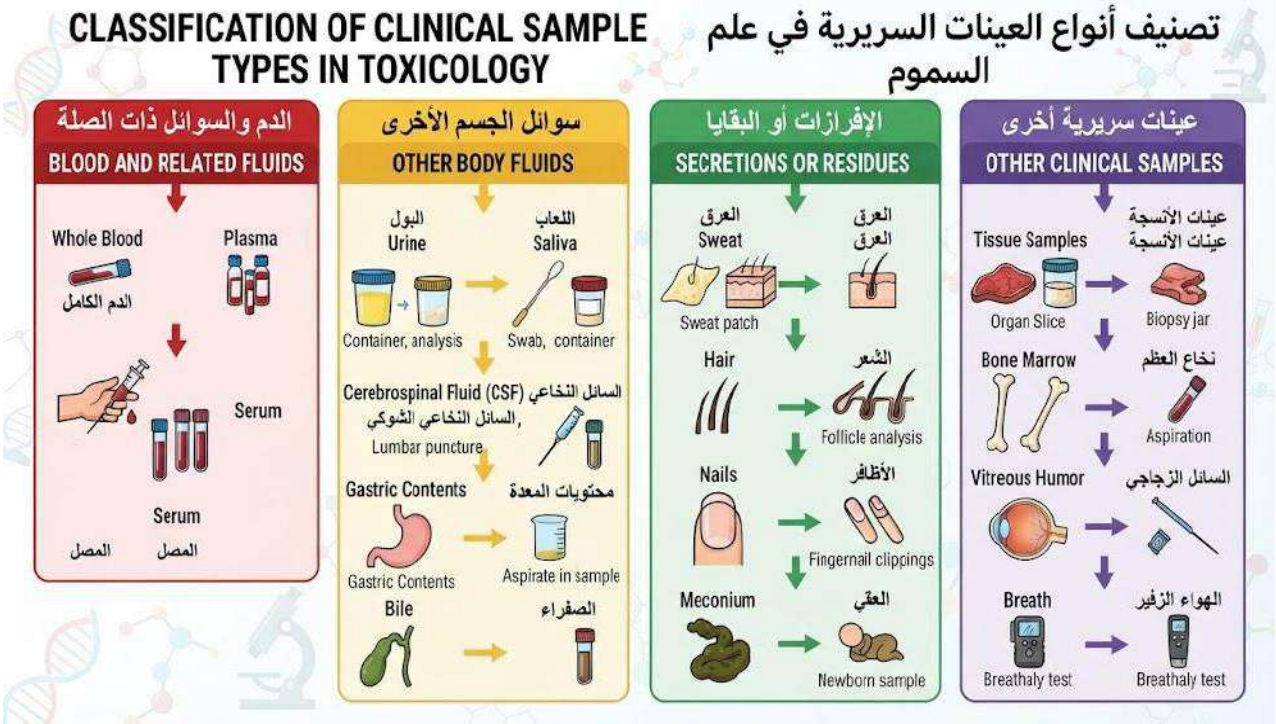
المتغير(*Variable*)	الأمثلة وتأثيرها(*Examples and Their Effect*)
	للتجلط مثل (*EDTA*) يقلل كالسيوم البلازما. أما التلوث بالكحول المستخدم للتطهير فيبطل فحص الإيثانول تماماً.
التحلل الدموي(*Haemolysis*)	يؤدي تكسر خلايا الدم الحمراء إلى إحداث تغيرات في مكونات البلازما (لا سيما البوتاسيوم والفوسفات) وقد يتداخل مع الطريقة التحليلية المستخدمة.
التلوث الخلوي (*Cellular contamination*)	وجود الصفائح الدموية نتيجة الطرد المركزي الخلوي الخاطئ يرفع مستوى السيروتونين في البلازما ظاهرياً.
تخزين خاطئ أو مفرط(*Faulty/excessive storage*)	قد تتأكسد بعض المركبات الكيميائية حتى عند تجميدها، أو تخضع لتحلل بكتيري (مثل الأحماض الأمينية في البول غير المحمض).
الجمع أثناء التسريب (*Collection during infusion*)	سحب الدم بالقرب من موقع التسريب الوريدي (*Infusion*) يعطي تركيزات مضللة للمادة المحقونة أو يؤدي لتخفيف مكونات الدم الأخرى.
التداخل الدوائي (*Drug interference*)	قد تتداخل الأدوية أو نواتج أيضها مع المقايسة التحليلية وتؤدي لنتائج غير دقيقة.

أنواع العينات السريرية (Clinical Sample Types)

تُقسم العينات السريرية المستخدمة في التحليل السمي إلى أربع فئات رئيسية (الجدول 2):

1. الدم والسوائل المرتبطة به.
2. سوائل الجسم الأخرى.
3. السوائل الإفرازية أو البقايا.
4. عينات سريرية أخرى.

ويستوجب الأمر اتخاذ احتياطات خاصة وصارمة عند التعامل مع المواد المحللة غير المستقرة. وبصورة عامة، تتسم معظم المركبات الموجودة في البول بقدرتها على الثبات والاستقرار لعدة ساعات في درجة حرارة الغرفة؛ نظراً لأن البول يكون قد قضى فترة زمنية داخل الجسم في درجة حرارة الأعضاء قبل إفراغه.



الدم الشرياني والدم الشعيري (Arterial and Capillary Blood)

عادة ما يُستحصل على الدم الشرياني بواسطة ممارس طبي خبير ونخبوي نظراً لخطورة الإجراء، ويُستخدم أساساً لتقييم غازات الدم ولا يُرسل بصورة روتينية للتحليل السمي. أما **الدم الشعيري**، والذي يقترب في تركيبه الكيميائي من الدم الشرياني، فيمكن جمعه عن طريق وخز الكعب، أو الإصبع، أو شحمة الأذن، وغالباً ما يُطبق هذا الإجراء مع الأطفال الصغار حديثي الولادة.

الدم الوريدي (Venous Blood)

يتم الحصول على الدم الوريدي عن طريق بزل الوريد أو سحب الدم ($Venepuncture$), وغالباً ما يكون من الوريد المرفقي الناصف ($Median\ cubital\ vein$) في ذراع تبعد تماماً عن أي موقع تسريب وريدي نشط.

توصيات هامة لعملية السحب:

- يمكن استعارة عاصبة ($Tourniquet$) لتمديد وتبريز الوريد قبل السحب، شريطة فكها فوراً وبشكل مباشر قبل أخذ العينة لمنع حدوث تكدس دموي.
- في حال الحاجة الملحة لسحب عينات متكررة، يمكن إدخال قنية ($Cannula$) رفيعة، غير أنها قد ترفع من احتمالية:
  1. حدوث **التحلل الدموي** ($Haemolysis$).
  2. **تلوث العينة** بفعل المحاليل مانعة للتجلط المستخدمة مع هذه الأجهزة.

الحاويات والأوعية المعملية ($Containers$):

- **الأنابيب البلاستيكية:** تُلجأ إليها وتُفضل عند البحث عن السموم الأساسية ($Basic\ analytes$) مثل مضادات الاكتئاب ثلاثية الحلقات، الباراكوات، والألومنيوم؛ نظراً لكون هذه المركبات تلتصق بجدران الأنابيب الزجاجية. كما أنها تمتاز بكونها أقل عرضة للكسر أثناء عمليات التجميد العميق.
- **الأنابيب الزجاجية:** تُفضل بصورة قطعية عند الشروع في تحليل المذيبات المتطايرة أو الغازات المخدرة لضمان منع تسربها أو تفاعلها الكيميائي مع مواد البلاستيك.

الدم والسوائل المرتبطة به (Blood and Related Fluids)

السوائل الإفرازية والبقايا ($Excretory\ fluids/residues$):

- **الصفراء ($Bile$):** سائل حيوي أصفر مخضر يفرزه الكبد؛ وتتجمع وتتركز فيه بكثافة الأدوية والمركبات التي تخضع لدورة الدوران الكبدي المعوي ($Enterohepatic\ circulation$).
- **هواء الزفير ($Exhaled\ air$):** يحتوي على نواتج أيضية متطايرة وهامة (مثل الإيثانول).
- **البراز ($Faeces$):** المكونات والبقايا شبه الصلبة الناتجة عن عمليات الهضم المعوي.
- **العرق ($Sweat$):** سائل مائي يُفرز عبر مسام الجلد؛ ويمكن استخدامه في تقنيات الكشف عن التعرض المزمن عبر لصقات مخصصة تعرف بـ **"لصقات العرق"** ($Sweat\ patches$).

- **البول ($Urine$):** العينة الأكثر شيوعاً على الإطلاق في فحوصات الفحص النوعي؛ نظراً لغناها بنواتج الأيض وسهولة إجراءات جمعها.

الجدول (2): أنواع العينات السريرية والبيولوجية وخصائصها التحليلية
Table 2: Types of Clinical/Biological Samples and Their Analytical Characteristics

نوع العينة($Sample\ type$)	الوصف والخصائص التحليلية($Description\ and\ Analytical\ Characteristics$)
الدم الكامل($Whole\ blood$)	السائل الحيوي الذي يدور في الشرايين والشعيرات والأوردة الدموية، ويحتوي جسم البالغ تقريباً على$6 - 5$ لترات منه. ويتكون أساساً من بلازما وخلايا دم مختلفة. وإذا تطلب الاختبار التحليلي استخدام "دم كامل"، فيجب جمع العينة بوجود مانع تجلط ملائم، وتقليبها برفق، ثم تجميدها لغرض إحداث التحلل الخلوي ($Lysis$) قبل الشروع في التحليل.
خلايا الدم($Blood\ cells$)	وتضم خلايا الدم الحمراء ,($Erythrocytes$) والبيضاء ($Lymphocytes,\ Leucocytes$),والصفائح الدموية .($Platelets$) ويمكن فصلها بدقة عن الدم الطازج باتباع إجراءات فصل معيارية.
السائل الدماغي الشوكي ($Cerebrospinal\ fluid - CSF$)	نضح فائق للبلازما ($Ultrafiltrate$) يشابهها في التركيب الكيميائي لكنه يفتقر للبروتينات ذات الوزن الجزيئي العالي؛ يحيط بالجهاز العصبي المركزي، ويُستحصل عليه عبر البزل القطني ($Lumbar\ puncture$) ويُجمع في أنابيب معقمة.
دم الحبل السري($Cord\ blood$)	يُسحب مباشرة من الأوردة الحبلية عند الولادة؛ ويُفضل سحب الدم الوريدي منه ليعكس بدقة الحالة الفسيولوجية لحديث الولادة بدلاً من المشيمة. ويمكن استخلاص البلازما أو المصل منه حسب الحجم المتاح.
البلازما($Plasma$)	الجزء السائل غير الخلوي من الدم والذي يحتفظ بعوامل التجلط ,($Clotting\ factors$) ويُستحصل عليها بإضافة مانع تجلط وطرد مركزي.($Centrifugation$)
المصل($Serum$)	السائل الأصفر الباهت المتبقي بعد تجلط الدم الكامل؛ ويماثل البلازما في تراكيبه لكنه يخلو تماماً من الفيبرينوجين ($Fibrinogen$) وعوامل التجلط.

سوائل الجسم الأخرى ($Body\ fluids\ other\ than\ blood$)

تُعتبر هذه السوائل أوساطاً تحليلية بالغة الأهمية في التطبيقات الإكلينيكية والشرعية:

- **السائل السلوي ($Amniotic\ fluid$):** السائل المحيط بالجنين؛ ويُعد أساسياً لتقييم درجات تعرض الجنين للمواد السامة.
- **الخلط المائي ($Aqueous\ humour$):** السائل الشفاف الواقع بين قرنية العين وقزحيتها.
- **حليب الثدي ($Breast\ milk$):** سائل غني بالدهون والبروتينات؛ وتتمركز فيه السموم المحبة للدهون ($Lipophilic\ toxicants$).
- **نضح المعدة ($Gastric\ aspirate$):** سائل حمضي يضم إنزيمات وبقايا طعام؛ وهو عينة محورية في حالات التسمم الفموي الحديث.
- **اللعاب ($Saliva$):** إفراز صافٍ لزج، ترتبط تراكيبه بالبلازما ويحتوي على إنزيمات هاضمة.
- **السائل المنوي ($Semen$):** يتكون من السائل الإفرازي والحيوانات المنوية ($Spermatozoa$).
- **السائل الزليلي ($Synovial\ fluid$):** سائل لزج ومرن يعمل على تشحيم المفاصل وحمايتها.
- **الخلط الزجاجي ($Vitreous\ humour$):** سائل لزج وشفاف يقع خلف عدسة العين؛ ويُعتبر بحق **"العينة الذهبية"** في طب السموم الشرعي نظراً لثباته واستقراره النسبي بعد الوفاة ومقاومته النسبية للتحلل.

عينات أخرى ($Other\ samples$)

وتشمل عينات تخصصية أو ناتجة عن تدخلات طبية تشخيصية:

- **غسيل القصبات والأسناخ** $(Bronchoalveolar\ lavage - BAL)$**:** عينة تُستحصل بغسل الرئتين بمحلول ملحي معقم؛ وتكتسب أهمية كبرى في التسمم الاستنشاقي.
- **الحصوات** $(Calculi)$**:** رواسب معدنية وبلورية صلبة (مثل حصى الكلى والمرارة).
- **الشعر والأظافر** $(Hair\ and\ nails)$**:** تُوظف لتقييم حالات التعرض المزمن والتاريخي للسموم كالزرنيخ، والمعادن الثقيلة، والعقاقير؛ حيث ترتبط السموم كيميائياً بمادة الكيراتين $(Keratin)$.
- **محتويات المعدة** $(Gastric\ contents)$**:** وتشمل النضح، الغسيل المعدي، القيء، أو البقايا المأخوذة أثناء التشريح.
- **العينات النسيجية** $(Tissue\ specimens)$**:** وتُؤخذ جراحياً (خزعة - $Biopsy$) أو بعد الوفاة لتقدير توزيع السموم في الأعضاء.
- **سائل الفم** $(Oral\ fluid)$**:** خليط معقد يضم اللعاب، بقايا الخلايا، حطام الطعام، والمخاط؛ ويُستعمل كبديل غير باذع $(Noninvasive)$ للدم في برامج الكشف عن المخدرات.

وتجدر الإشارة إلى أن **التحلل الدموي الطفيف** $(Mild\ haemolysis)$ قادر على إبطال دقة مقايسات الحديد أو البوتاسيوم في المصل، كما يخلّ بدقة نتائج المواد التي تتركز أساساً داخل خلايا الدم الحمراء (مثل عقار الكلورتاليدون - $Chlortalidone$). وإن ترك البلازما أو المصل متلامساً مع الخلايا الحمراء لفترة طويلة يسبب تغيرات ناتجة عن النشاط الإنزيمي المستمر أو إعادة توزيع المادة المحللة بين الخلايا ومحيطها السائل.

قاعدة ذهبية لفريق العمل: يجب فصل البلازما أو المصل عن خلايا الدم في أسرع وقت ممكن $(Centrifugation)$. وفي حال الضرورة القسوى، يمكن تخزين الدم الكامل عند درجة حرارة $-20\ ^\circ C$ أو أقل، مع الأخذ في الاعتبار أن التجميد سيؤدي حتماً إلى **التحلل الخلوي** $(Lysis)$ لمعظم خلايا الدم.

الجدول (3): موانع التجلط للاستخدام المعملي $(In\ vitro)$
Table 3: In Vitro Laboratory Anticoagulants

مانع التجلط$(Anticoagulant)$	التركيز لكل مل دم $(Concentration)$ $(mL^{-1}\ blood)$	ملاحظات واستخدامات تخصصية $(Comments\ and\ Uses)$
هيبارين الليثيوم$(Lithium\ heparin)$	$10 - 20$وحدة	يُستخدم في فحوصات الكيمياء الحيوية العامة $(General\ biochemistry)$.
هيبارين الصوديوم$(Sodium\ heparin)$	$10 - 20$وحدة	يُستخدم في فحوصات الكيمياء الحيوية العامة $(General\ biochemistry)$.
فلوريد الصوديوم$(Sodium\ fluoride)$	$1 - 2$ mg	مُخصص لقياسات الجلوكوز في الدم؛ حيث يثبط بنجاح تحلل السكر بالأنزيمات $(Glycolytic\ inhibition)$.
EDTAأو الأوكسالات$(Oxalate)$	$6 - 10$ mg	مانع تجلط عام.$(General\ anticoagulant)$
سترات الصوديوم$(Sodium\ citrate)$	3 mg	مخصص لدراسات التجلط فقط؛ ولا يُنصح به للأغراض السمية الأخرى نظراً لأن المحلول المائي المضاف يحدث تخفيفاً $(Dilution)$ للعينة.
EDTA $(Ethylenediaminetetraacetic\ acid)$	2 mg	يُستخدم في فحوصات أمراض الدم $(Hematology)$؛ ويسهم بفاعلية في استقرار المركبات سريعة التأكسد.

المصل ($Serum$)

عندما يُترك الدم الكامل ليركد تماماً (لمدة تقارب 15دقيقة في درجة حرارة الغرفة) داخل أنبوب تجميع عادي وخالٍ من موانع التجلط، تتكون جلطة دموية ($Clot$) تنكمش تدريجياً بشكل يسمح بفصل وتجمع المصل الصافي. وفي العديد من التحليلات السريرية والسمية، يُفضل المصل على البلازما لكونه ينتج رواسب أقل (من شبكات الفيبرين) عند خضوعه لعمليات التجميد والإذابة المتكررة.

- [1] **تنبيه تقني هام:** إذا تم سحب الدم باستخدام محقنة ($Syringe$), فإنه يتعين لزاماً **إزالة الإبرة** قبل تفريغ الدم برفق في أنبوب الجمع والسماح له بالتدفق الانسيابي الهادئ على الجدار الداخلي للأنبوب؛ وذلك لمنع حدوث ظاهرة **التحلل الدموي** ($Haemolysis$) التي تكفلت بإبطال نتائج العديد من التحليلات السمية. ويتبع ذلك تقليب رفيق ومزمن (متجنباً أي رجّ عنيف) لضمان اختلاط الدم بمانع التجلط تماماً.

تحذيرات هامة لفريق العمل (Technical Cautions)

- **تجنب الاستبدال العشوائي:** يجب الالتزام التام بنوع مانع التجلط الموصى به والمخصص لكل اختبار تحليلي على حدة (كما هو موضح في الجدول 3).
- **خطر التخفيف ($Dilution\ risk$):** تحتوي أنابيب سترات الصوديوم على حجم يقدر بنحو 0.5أو 1 ml من مانع التجلط في صورة محلول مائي، مما يجعلها غير صالحة إطلاقاً للعمل الكمي الدقيق؛ نظراً لأن هذا التخفيف الإضافي للعينة قد يُقلل من درجة ارتباط البروتين بالبلازما، وبالتالي يغير بصورة ملحوظة توزيع المادة المحللة بين البلازما وخلايا الدم.
- **تداخلات العناصر:** يجب التأكد من عدم استخدام **"هيبارين الليثيوم"** إذا كان الهدف الأساسي للتحليل هو قياس مستويات عنصر الليثيوم في البلازما. كما عُرف عن الهيبارين تداخله المباشر في بعض تحليلات الأدوية الأخرى.

البلازما (Plasma)

يتطلب فصل البلازما عن الدم الكامل المضاف إليه مانع التجلط إجراء عملية **الطرد المركزي** ($Centrifugation$).
وتعتمد كفاءة ومثالية الفصل على العلاقة الفيزيائية بين قطر دوار الطرد المركزي ($Rotor$), وسرعة الدوران، وقوة الطرد المركزي النسبية ($RCF - g - force$), كما هو مفصل في الإطار (1). ويُفضل دائماً اعتماد **الدوارات المتأرجحة للخارج** ($Swing - out\ rotors$) عند فصل الأطوار السائلة؛ لضمان الحصول على طبقات أفقية واضحة ومستقرة تماماً.

طبقات العينة بعد الطرد المركزي:

عند إخضاع الدم لعملية الطرد المركزي (بسرعة $g \times 2000$لمدة 10دقائق في درجات حرارة منخفضة تتراوح بين $2 - 8°$ C عند الضرورة)، ينفصل الدم بوضوح إلى ثلاث طبقات أساسية:

1. **الطبقة السفلية:** تتكون من خلايا الدم الحمراء ($Erythrocytes$), وتمثل نحو 45%من الحجم الكلي.
2. **الطبقة الوسطى (الطبقة البيضاء - Buffy coat):** طبقة رقيقة وفاصلة تضم خلايا الدم البيضاء والصفائح الدموية.
3. **الطبقة العلوية (البلازما - Plasma):** تمثل نحو 50%من الحجم الكلي، وهي سائل مائي ذو لون شبيه بلون القش.

ملاحظات تقنية هامة للفريق:

- **الاستقرار ($Stability$):** يمكن حفظ الدم الكامل المحتوي على مانع التجلط في درجة حرارة الغرفة أو مبرداً في درجات ($2 - 8°\ C$) لمدة تقارب يومين قبل الشروع في فصل البلازما، شريطة استقرار المادة المحللة وعدم تفككها.
- **المواد الفاصلة ($Gels\ \&\ Beads$):** تحتوي بعض الأنابيب التجارية الحديثة على خرز بلاستيكي دقيق أو **"جل فاصل"** يستقر فيزيائياً بين الخلايا والبلازما لتسهيل عمليات الجمع والشفط.
  - **تحذير معملي:** أثبتت الدراسات المخبرية المعتمدة أن الجل الفاصل يتسبب في مشكلات وتداخلات معقدة في تحليل بعض العقاقير والأدوية (Karppi et al., 2000; Berk et al., 2006).
  - **توصية المنهجية:** يُفضل تجنب استخدام الأنابيب المزودة بالجل الفاصل في أبحاثكم وتحليلاتكم السمية؛ لأنها تبطل بدقة نتائج العديد من تحليلات العناصر الزهيدة ($Trace\ elements$) وقد تؤثر سلباً على قياس المذيبات والمواد المتطايرة.

الإطار (1): حساب قوة الطرد المركزي النسبية (RCF)

- تعتمد قوة الطرد المركزي النسبية (g) أساساً على سرعة الجهاز بالدورات في الدقيقة (RPM) ونصف قطر الدوران الفعال (r).
- تزود الشركات المصنعة للأجهزة جداول تحويل ومخططات بيانية ($Nomograms$) خاصة بكل دوار.
- تتيح أجهزة الطرد المركزي الحديثة إمكانية ضبط قيمة (RCF) بصورة مباشرة.
- تبلغ قوة الطرد المركزي أقصى مستوياتها عند قاع الأنبوب ($Tube\ bottom$).

المعادلات الحسابية المعتمدة:

- **لحساب السرعة (RPM) المطلوبة للوصول إلى قوة طرد معينة:**

$$\mathrm{RPM} = \sqrt{\frac{\mathrm{RCF}}{1.118 \times 10^{-6} \times r}}$$

(حيث يُقاس نصف القطر r بوحدة المليمتر)

- **لحساب قوة الطرد المركزي (RCF) من السرعة المتوفرة (RPM):**

$$\mathrm{RCF} = (1.118 \times 10^{-6}) \times r \times (\mathrm{RPM})^2$$

خلايا الدم (Blood Cells)

عزل كرات الدم الحمراء (Erythrocytes)

لغرض جمع وتوقيف كرات الدم الحمراء، يُطرد الدم الكامل المضاف إليه الهيبارين مركزياً بمعدل ($2000 \times g$) لمدة 10دقائق)، وتُزال بعدها البلازما بحذر، تليها الطبقة البيضاء ($Buffy\ coat$), فضلاً عن إزالة أعلى 10%من كتلة كرات الدم الحمراء (والتي تتألف أساساً من الخلايا الشبكية الفتية - $Reticulocytes$). عقب ذلك، تُغسل الكرات الدموية المتبقية بعناية فائقة باستخدام محلول ملحي منظم متساوي التوتر ($Isotonic\ buffered\ saline$) لغرض تخليصها نهائياً من البلازما المحتبسة. وتُستعمل الخلايا المغسولة إما مباشرة في التحليل أو تُجمد لإحداث التحلل الخلوي ($Haemolysis$) أو لغايات التخزين طويل الأمد.

عزل الصفائح الدموية (Platelets)

تُعزل الصفائح الدموية عادةً عن طريق الطرد المركزي البطيء (بسرعة $300 \times g$لمدة 15دقائق) للحصول على بلازما غنية بالصفائح الدموية، ثم تلي ذلك عملية طرد مركزي ثانية بقوة أكبر (بسرعة $2000 \times g$لمدة 10دقائق) لتجميع وترسيب الصفائح. أما خلايا الدم البيضاء الأخرى، فتُجمع غالباً باستخدام أوساط فصل ذات كثافة ملائمة أو عبر تقنيات الأجسام المضادة ذات الطور الصلب ($Solid-phase\ antibodies$).

توزيع المادة بين الكرات الحمراء والبلازما (Erythrocyte:plasma Distribution)

من الناحية العملية والفنية، يُعد قياس نسبة تركيز المادة المحللة في الدم الكامل مقارنة بالبلازما أسهل بكثير من تحضير كرات حمراء مغسولة ونقية. ويمكن حساب تركيز المادة داخل الكرات الحمراء (C_E) بدقة إذا عُلمت قيمة الهيماتوكريت (H - الحجم الخلوي المكدس) باستخدام المعادلة الرياضية التالية:

$$C_E = \frac{C_B - C_P(1-H)}{H}$$

حيث تُمثل الرموز المعلمات الآتية:

- ← C_E**:** تركيز المادة المحللة في الكرات الحمراء ($Erythrocyte\ concentration$).
- ← C_B**:** تركيز المادة المحللة في الدم الكامل ($Whole\ blood\ concentration$).
- ← C_P**:** تركيز المادة المحللة في البلازما ($Plasma\ concentration$).
- ← H**:** الهيماتوكريت أو الحجم الخلوي المكدس ($Haematocrit$, ككسر عشري من الحجم الكلي).

البول (Urine)

تتعدد وتتنوع أنواع عينات البول تبعا للغاية السريرية أو البحثية (عشوائية، صباحية باكرة، نهاية النوبة العملي، أو تجميع متسلسل لمدة 24ساعة). وفي دراسات الأيض ($Metabolic\ studies$), يُعد تسجيل توقيت بداية ونهاية فترة الجمع أمراً حتمياً وضرورياً لحساب معدل إنتاج وإفراز البول بدقة.

الخصائص الفيزيائية والتغيرات الملحوظة:

- **اللون:** يظهر البول الطازج بلون أصفر مخضر، غير أنه عند التخزين في أوساط حامضية يتحول تدريجياً إلى البني الداكن نتيجة أكسدة مركب اليوروبيلينوجين ($Urobilinogen$) ليتحول إلى يوروبيلين ($Urobilin$).
- **العكارة:** قد تترسب بلورات من حمض اليوريك وأوكسالات الكالسيوم مسببة تعكراً ملحوظاً في العينة.
- **التصحيح بالكرياتينين ($Creatinine\ correction$):** جرى العرف الطبي على ربط وقياس نتائج التحليل السمي بتركيز الكرياتينين البولي؛ نظراً لأنه يُفرز بمعدل شبه ثابت يومياً.

تنبيه للفريق: قد لا ينطبق هذا المعيار بدقة في حالات ضمور العضلات الشديد أو لدى الرياضيين ولاعبي كمال الأجسام الذين يتناولون مكملات الكرياتين الغذائية.

الحفظ والتخزين ($Preservation$):

- **البول المحمض:** (بإضافة حمض الهيدروكلوريك بتركيز 2 mol/L), تظل غالبية العقاقير ونواتج أيضها مستقرة فيه لمدة تصل إلى أسبوع كامل في درجة حرارة الغرفة، ولمدة شهر كامل داخل الثلاجة (في درجات حرارة $2 - 8° C$).
- **البول غير المحمض:** يتعرض سريعاً لهجوم ميكروبيولوجي وبكتيري يؤدي حتماً إلى الفقدان الكامل للأحماض الأمينية وحدوث تفاعلات وتغيرات كيميائية متسارعة.
- **التخزين طويل الأمد:** يجب تجميد البول المحمض عند درجة حرارة $-20° C$، وقد يتطلب الأمر إخضاعه لعملية طرد مركزي مسبقة قبل التحليل لإزالة الرواسب والبلورات المترسبة أثناء التجميد العميق.

محتويات المعدة (Stomach Contents)

تضم هذه العينة البيولوجية كلًا من القيء ($Vomit$), النضح المعدي ($Gastric\ aspirate$), سوائل غسيل المعدة ($Gastric\ lavage$), إضافة إلى المحتويات المعدية المأخوذة أثناء التشريح الشرعي. وبما أن طبيعة هذه العينة متغيرة للغاية وغير متجانسة بطبيعتها، فقد تستوجب إجراءات تحضيرية تكميلية كالتجنيس ($Homogenization$) المتبوع بعمليات الترشيح أو الطرد المركزي للحصول على مستخلص سائل قابل للحقن والتحليل المعملي.

البراز (Faeces)

نادراً ما يُطلب تحليل عينات البراز ضمن روتين الكيمياء السريرية، غير أنه قد يصبح ضرورياً وحيوياً في دراسات الحركية الدوائية ($Pharmacokinetics$) والأيض الدوائي. كما يُطلب التحليل في حالات جنائية واحترازية خاصة مثل الاشتباه بحالات تهريب وتخزين حزم المخدرات المبتلعة في الجهاز الهضمي ($Body\ packing$).

- **تحدي التجانس:** على عكس السوائل الحيوية المنتظمة، يُعد البراز مصفوفة غير متجانسة بالمرة، لذا يجب تحليل العينة بأكملها أو إخضاعها لتجنيس كلي وشامل لضمان أن الجزء المقتطع للتحليل يمثل العينة الكلية بدقة تامة.
- **الفترة الزمنية:** قد يستغرق ظهور العقار المدروس أو نواتج أيضه في البراز فترة تتجاوز اليوم الواحد بعد التناول الفموي الأولي.

الأنسجة (Tissue Specimens)

تُجمع عينات الأنسجة المخصصة للفحص النسيجي والهيستولوجي عادة في مواد حافظة كيميائية مثل **الفورمالين** ($Formalin$ - محلول الفورمالدهيد المائي). ويجب أخذ هذه المعالجة المسبقة بعين الاعتبار تماماً إذا ما طُلب لاحقاً إجراء تحليلات سمية عليها، نظراً لأن الفورمالين يتداخل كيميائياً مع العديد من الطرائق التحليلية. أما عينات الأنسجة الحشوية المأخوذة بعد الوفاة لغايات التحليل السمي، فتُحفظ عادة وتُبرد عند درجة حرارة $4° C$لحين بدء التحليل.

إرشادات جمع العينات في علم السموم التحليلية (Guidelines for Sample Collection)

تتطلب غالبية استقصاءات السموم التحليلية جمع عينات أساسية كالدم، البول، ومحتويات المعدة، فضلاً عن **"مخلفات المشهد"** ($Scene\ residues$) مثل عبوات الأقراص الفارغة أو المحاقن الطبية المُكتشفة في موقع الحادث أو مسرح الجريمة (الجدول 4).



بروتوكول الحفظ والاستبقاء (*Retention protocol*):

- يجب جمع سوائل وأنسجة إضافية وموسعة عند التحقيق في حالات الوفيات المشبوهة، خاصة في حالات التحلل الجسدي المتقدم (Forrest, 1993; Skopp, 2004; Flanagan et al., 2005).
- حتى وإن غابت الحاجة الفورية لتحليل كافة العينات المستحصلة، يجب استبقاؤها وتخزينها بصورة آمنة (عند درجة حرارة 4° C أو 20° C−) تحسباً لأي طارئ يتطلب فحوصات تكميلية أو استجابات قضائية لاحقة.

ملاحظات فنية تكميلية (*Footnotes*):

- **الأطفال:** قد يُستغنى عن الكميات الكبيرة وتُقبل أحجام مصغرة من العينات في حالة الأطفال الصغار نظراً لصعوبة السحب الوريدي.
- **عينات ما بعد الوفاة:** يجب سحب عينات الدم حصراً من **الوريد الفخذي** (*Femoral vein*) أو أي وريد طرفي آخر لضمان تلافي التلوث المحتمل بدم التجويف المركزي والمحتوى المعوي. ويُقسم الدم المأخوذ إلى جزأين: الأول يُحفظ بوجود فلوريد الصوديوم بنسبة 2%, والثاني في أنبوب تجميع عادي.
- **اشتباه الكحول:** في حال تعذر توافر عينة دم، يجب إضافة فلوريد الصوديوم (2% *w/v*) مباشرة إلى عينة البول للحيلولة دون التخليق والإنتاج الكحولي الميكروبيولوجي داخل العينة (*In vitro microbial alcohol production*).
- **الأنسجة التخصصية:** في حالات التسمم بالمذيبات العضوية أو المركبات المتطايرة، تكتسب عينات الأعضاء الصلبة (مثل: الدماغ، الكبد، الكلية، الرئة، والدهون تحت الجلد – بواقع 5جرامات لكل عضو) قيمة تحليلية فائقة.

الجدول (4): متطلبات العينات للتحليل السمي التحليلي العام
Table 4: Sample Requirements for General Analytical Toxicological Investigation

نوع العينة (*Sample type*)	الحجم أو الكمية المطلوبة (*Required volume/ quantity*)	ملاحظات هامة وتنبيهات تقنية (*Important notes and technical cautions*)
الدم الكامل (*Whole blood*)	10 ml	•يُجمع في أنبوب يحتوي على هيبارين الليثيوم (*Lithium heparin*) أو (*EDTA*). •يُستخدم مزيج (فلوريد/أوكسالات (*Fluoride/oxalate* - حتمياً عند الاشتباه بوجود إيثانول. •تُستعمل أنابيب بلاستيكية بحتة عند الاشتباه بعقار الباراكوات (*Paraquat*). •تُستخدم أنابيب (زجاجية أو بلاستيكية) مع ترك **أقل فراغ علوي ممكن** (*Minimal headspace*)عند الاشتباه بأول أكسيد الكربون أو المواد المتطايرة.
البلازما / المصل (*Plasma/Serum*)	5 ml	•يُفضل دائماً إرسال عينة دم كاملة إذا دار الاشتباه حول مواد متطايرة أو معادن ثقيلة (راجع الجدول الخاص بالمعادن).
البول(*Urine*)	20 − 50 ml	•يُجمع في عبوة معقمة ونظيفة وخالية تماماً من أي مواد حافظة. •يُعد العينة المفردة والوحيدة المطلوبة في العادة لفحوصات تعاطي العقاقير المخدرة.
محتويات المعدة (*Stomach contents*)	25 − 50 ml	•تشمل القيء وسائل الغسيل المعدي (ويُفضل عينة الغسيل الأولى). •تُجمع في وعاء نظيف وخالٍ من المواد الحافظة.
مخلفات المشهد (*Scene residues*)	بحسب المتاح ميدانياً	•تشمل زجاجات الأقراص، حاويات المشروبات، وعلب الرذاذ (*Aerosols*). •**تنبيه حاسم :**يجب تعبئتها وحفظها بشكل منفصل تماماً عن العينات البيولوجية لمنع أي تلوث متبادل.(*Cross − contamination*)
عينات تخصصية أخرى (*Other samples*)	بحسب المتاح	•في حالات الوفاة: الخلط الزجاجي (أقصى حجم ممكن من العينين بشكل منفصل)، الصفراء(2 ml) ، أو عينة كبد (حوالي5 جرامات) كبدائل ممتازة للبول.

اعتبارات خاصة بالأنسجة والمعادن (*Special considerations*)

توجد ضوابط دقيقة ومحددة لجمع وتخزين العينات الموجهة خصيصاً لتحليل العناصر الزهيدة والمعادن السامة. ونظراً لمحدودية الشواهد المرجعية المتاحة حول التوزيع المكاني للأدوية والسموم داخل الأنسجة الصلبة لدى الإنسان، يُنصح دائماً بجمع عينات بوزن يقارب 5جرامات مأخوذة من عدة مواقع تشريحية موزعة في أعضاء حيوية كالدماغ. أما في حالة **الكبد،** فيُشترط استخدام **الفص الأيمن** (*Right lobe*) حصراً لضمان دقة وتمثيلية التحليل.

بروتوكول التدخل السريع (*Rapid Intervention Protocol*)

عند الاشتباه الجدي في وقوع حالة تسمم، يجب سحب عينة دم كاملة بحجم يقارب 10 ml(باستخدام أنبوب هيبارين الليثيوم أو *EDTA*) من المرضى البالغين في أسرع وقت ممكن (مع مراعاة تقليل الحجم نسبياً في حالة الأطفال). ويُفضل تماماً إرفاق **"نموذج طلب تحليل"** (*Request form*) مصمم خصيصاً ومخصص للتحقيقات السمية؛ لضمان وصول كافة البيانات السريرية، والإكلينيكية، والميدانية بدقة إلى المختبر (Flanagan et al., 2005).

احتياطات إضافية لجمع العينات السريرية

- عند استقبال المريض في المستشفى مع وجود اشتباه بحالة تسمم كحولي، يجب سحب عينة دم بحجم 2 ml في أنبوب خاص يحتوي على مزيج **(فلوريد/أوكسالات -** *Fluoride/oxalate*).

- **تنبيه تقني حاسم:** تحتوي الأنابيب السريرية العادية المتاحة على تركيز لا يتجاوز 0.1%فقط من الفلوريد، بينما تتطلب الضرورة العلمية توفير تركيز بنسبة 2%(ما يقارب 40 mg من صوديوم فلوريد لكل 2 ml من الدم) لإحداث التثبيط التام للنشاط الميكروبي ومنع حدوث التحلل الذاتي والتفكك للعقاقير غير المستقرة مثل الكوكايين، والكلونازيبام، والنيترازيبام.
- **تجنب التلوث الخارجي:** يُحظر تماماً استخدام المسحات المطهرة المادية التي تحتوي على الكحول عند تطهير مكان الوخز، كما يجب تجنب محاليل الهيبارين المانعة للتجلط التي تحتوي على مواد حافظة فينولية (*Phenolic preservatives*).

بروتوكول التوثيق (Documentation)

يجب أن يحمل كل وعاء عينة بيولوجية البيانات التعريفية الآتية بوضوح تام وثابت:

- الاسم الكامل للمريض أو الحالة (الاسم الأول واسم العائلة).
- رقم المريض، أو رقم الحالة، أو رقم السجل الحيواني.
- تاريخ ووقت سحب العينة بدقة متناهية.
- موقع أخذ وسحب العينة (على سبيل المثال: الوريد الفخذي - *Femoral vein*).
- نوع العينة البيولوجية وطبيعة المادة الحافظة المضافة إليها.

الجدول (5): مزايا وعيوب أنواع العينات المختلفة في علم السموم التحليلية
Table 5: Advantages and Disadvantages of Various Sample Types in Analytical Toxicology

نوع العينة (*Sample type*)	المزايا(*Advantages*)	العيوب (*Disadvantages*)	ملاحظات وتنبيهات إضافية (*Additional Notes*)
الدم (بلازما، مصل، أو دم كامل)	يتيح الكشف عن المركب الأصلي (*Parent compound*) وإجراء وتفسير البيانات الكمية بدقة.	حجم العينة محدود نسبياً؛ وتراكيز الأدوية الأساسية والسموم الأخرى تبدو منخفضة.	قد يكتنف تفسير النتائج الكمية المستمدة من دم ما بعد الوفاة صعوبات بالغة.
البول(*Urine*)	يتوافر غالباً بحجوم كبيرة نسبياً؛ ويحتوي على تراكيز عالية جداً للعديد من السموم ونواتج أيضها.	لا يتوافر دائماً (خاصة مع الحالات الحرجة)؛ والبيانات الكمية المستمدة منه غالباً ما تكون غير مفيدة إكلينيكياً.	يُعد العينة المعيارية والقياسية الأولى لفحص العقاقير المخدرة والمنشطات.
نضح المعدة (محتويات، غسيل، أو قيء)	قد يحمل كميات ضخمة ومباشرة من السم، خاصة عند حدوث التناول الفموي الحديث.	عينة غير متجانسة ومتغيرة للغاية؛ ولا تُجدي نفعاً في حالات الاستسمام عبر الاستنشاق أو الحقن.	يجب اتخاذ كافة التدابير لضمان منع التلوث المتبادل للعينات الأخرى أثناء عمليات النقل.
اللعاب / سوائل الفم (*Oral fluids*)	وسيلة تشخيصية غير باذعة (*Noninvasive*);وتمنح معلومات نوعية فورية عن التعرض للعديد من العقاقير.	عينة متغيرة التأثير؛ ذات فائدة ضئيلة جداً للعمل الكمي نظراً لانخفاض التراكيز.	يختلف نمط ظهور نواتج الأيض فيها عن الدم أو البول بالنسبة للعديد من المواد.
الشعر والأظافر (*Hair and nails*)	تظل متاحة ومتوافرة حتى في حالات التحلل الجسدي المتقدم وهياكل الجثث.	تتطلب تقنيات فائقة الحساسية؛ وتقدم بيانات استرجاعية تخص التعرض للأيام والأسابيع السابقة فقط.	تتميز بسهولة بالغة في التخزين والحفظ في درجات حرارة الغرفة الاعتيادية.

نوع العينة (*Sample type*)	المزايا(*Advantages*)	العيوب (*Disadvantages*)	ملاحظات وتنبيهات إضافية (*Additional Notes*)
هواء الزفير (*Exhaled air*)	وسيلة غير باذعة؛ ويتوافر بحجوم كبيرة متاحة للقياس المباشر.	تتطلب مريضاً حياً ومتجاوباً؛ ويشترط أن تكون المادة المحللة ذات طبيعة متطايرة.	تُستخدم أساساً لتقييم تعاطي الإيثانول وحالات التسمم بغاز أول أكسيد الكربون.
مخلفات المشهد (زجاجات، علب رذاذ)	قد تحتوي على كميات هائلة وواضحة من المادة السامة المتورطة.	قد لا تمثل بالضرورة المادة السامة التي تم تناولها أو دخولها للجسم فعلياً.	يجب ضمان التعبئة المنفصلة التامة عن العينات البيولوجية لتلافي التلوث المتبادل.
الخلط الزجاجي (*Vitreous humour*)	يُمكن استخدامه كبديل ممتاز للبول في حال تعذر توافر الأخير (سيما في حالات الوفاة الشرعية).	حجم العينة محدود وصغير جداً (يتوافر عادة في عينتين منفصلتين فقط من العينين).	يُعد تحليله ذو قيمة فائقة للمساعدة في تفسير بيانات دم ما بعد الوفاة.
أنسجة إضافية (كبد، دماغ، رئة، كلية)	قد تحتضن تراكيز ضخمة من السم؛ وتتوفر بكميات وفيرة كافية للتحليلات الواسعة.	احتمالية حدوث تداخلات كيميائية (*Interferences*) معملية؛ والبيانات الكمية ليست سهلة التفسير دائماً.	يمتلك التحليل النسيجي للأنسجة قيمة استثنائية لتفسير تراكيز السموم في الدم بعد الوفاة.

الإطار (2): المعلومات الواجب إرفاقها مع طلب التحليل السمي العام

- **بيانات التواصل:** الاسم الكامل، والعنوان، ورقم الهاتف الخاص بالطبيب المعالج أو الطبيب الشرعي.
- **ملابسات الحادث:** وصف دقيق ومفصل للواقعة الإكلينيكية أو الجنائية (مع إرفاق نسخة من تقرير الوفاة المفاجئة إن توفر).
- **التاريخ الطبي:** الأدوية الموصوفة للمريض حالياً، والتاريخ المرضي للأمراض المعدية الخطيرة (مثل فيروس نقص المناعة المكتسب *HIV*أو السل).
- **بيانات التعرض السمّي:** السبب المحتمل للتعرض، الوقت المقدر لتناول المادة أو حصول الوفاة، وطبيعة وكمية المادة المشتبه بها.
- **التدخلات الطبية الإسعافية:** ملخص موجز للملاحظات المستشفائية، والعلاجات الطارئة، وقوائم الأدوية المعطاة للمريض أثناء التدخلات العلاجية.
- **البيانات الديموغرافية:** المهنة، وطبيعة العمل، والهوايات الشخصية (وهي معلومات حرجة للغاية في تحقيقات السموم المهنية والبيئية).
- **التقارير الأولية:** إرفاق نسخة أولية من تقرير التشريح المبدئي (*Autopsy report*) إن وجد.

جمع العينات وحفظها (Sample Collection and Preservation)

بصورة عامة وقاعدية، يجب تخزين وحفظ كافة العينات البيولوجية في درجات حرارة منخفضة تبلغ نحو 4° C قبل شروع نقلها الفعلي إلى المختبر التحليلي. ويُستثنى من ذلك عينات الشعر والأظافر التي تظل مستقرة تماماً في درجة حرارة الغرفة، إضافة إلى عينات الدم المجفف على ورق الترشيح (*Dried blood spots*)، والتي تُشكل وسيلة مريحة وعملية للغاية للتخزين والنقل الميداني في حال غياب أو تعذر توفر التبريد المعملي (Croes et al., 1994).

بروتوكول التغليف والنقل (*Packaging and Transport Protocol*)

- **الإغلاق الفردي:** يجب إغلاق كل زجاجة عينة بإحكام تام لمنع أي تسرب محتمل، وتغليفها بشكل فردي داخل أكياس بلاستيكية منفصلة ومانعة للرش.
- **اللوائح النظامية:** يجب الالتزام الصارم بلوائح وقواعد الصحة والسلامة المعتمدة عند نقل العينات البيولوجية عبر البريد أو بواسطة شركات الشحن المتخصصة.
- **ملحوظة إكلينيكية للفريق:** على الرغم من أن الكميات الأصغر من تلك الموصى بها في الجدول (4) قد تفيد أحياناً في تسيير الفحص، إلا أنها قد تقلل من حساسية ونطاق التحليل؛ ومع ذلك، **يجب إرسال كافة العينات المتاحة للمختبر في كل الأحوال** دون استثناء.

- **الاستبقاء طويل الأمد:** يجب الاحتفاظ بأي عينة بيولوجية متبقية في درجات حرارة منخفضة تبلغ -20° C أو أقل حتى الانتهاء التام من مجريات التحقيق والتقاضي.

اعتبارات خاصة بحالات الوفاة ($Postmortem\ Considerations$)

- يُوصى باستخدام أنابيب البلاستيك الصلب عالية المتانة والمخصصة لهذا الغرض (مثل أنابيب ماركة $Sterilin$).
- في حال وقوع الوفاة داخل المستشفى، يجب الحصول بشكل عاجل على عينات ما قبل الوفاة ($Antemortem\ specimens$) المحفوظة في مختبرات المستشفى المختلفة (كالكيمياء الحيوية، أمراض الدم، المناعة، وبنك الدم)، وتقديمها للتحليل المعملي متزامنة مع عينات ما بعد الوفاة.
- يجب وضع الأعضاء الحشوية، الأنسجة الصلبة، ومخلفات المشهد في حاويات منفصلة ومستقلة تماماً لمنع وقوع أي **تلوث تبادلي** ($Cross-contamination$).

نزاهة العينة والآثار القانونية (Sample Integrity)

تُمثل نزاهة العينة مصدر قلق رئيسي لا يقبل التهاون متى ما وجدت تبعات طبية قانونية ($Medicolegal$); نظراً للزامية تقديم الأدلة القاطعة أمام ساحات القضاء. وتشمل حزمة الاحتياطات الصارمة لضمان هذه النزاهة ما يأتي:

- **الملصقات السليمة:** التوثيق الدقيق لكافة البيانات التعريفية على جدار الحاوية الخارجي.
- **حاويات مانعة للعبث:** الاعتماد على أوعية معملية مزودة بأختام وأقفال مانعة للعبث ($Tamper-proof\ containers$).
- **ترتيب الجمع السليم:** استخراج عينات الشعر، الأظافر، ودم الوريد الفخذي قبل الشروع في فتح الجثة أو إحداث شق التشريح.
- **سلسلة الحضانة ($Chain\ of\ Custody$):** التوثيق المعياري الدقيق لمسار العينة البيولوجية منذ اللحظة الأولى لجمعها ولحين إتمام التحليل (والتي سيتم تفصيلها في القسم 2.4).
- **تنبيه تقني هام:** يمكن اللجوء إلى اختبارات الحمض النووي ($DNA\ testing$) للقطع بأصل العينات في حال ثوران أي شكوك حول سلامة نزاهتها أو احتمالية اختلاطها.

الدم (للعمل الكمي) - Blood (for Quantitative Work)

في نطاق علم السموم التحليلي، تُعتبر البلازما أو المصل الوسيط المفضل للمقايسات الكمية الروتينية. ومع ذلك، توجد طائفة من السموم التي تتركز أساساً داخل كريات الدم الحمراء أو ترتبط بها كيميائياً بقوة، وفي هذه الظروف الحتمية، يجب استخدام **الدم الكامل المتحلل** ($Haemolyzed\ whole\ blood$).

السموم التي تتطلب حصراً استخدام الدم الكامل:

- أول أكسيد الكربون (CO).
- السيانيد ($Cyanide$).
- المركبات العضوية المتطايرة ($Volatiles$).
- الرصاص وغيره من المعادن الثقيلة ($Lead\ and\ heavy\ metals$).
- بعض الأدوية النوعية (مثل عقار الكلورتاليدون - $Chlortalidone$).

تقليل الفراغ العلوي (Headspace)

عند الاشتباه بوجود أول أكسيد الكربون، أو المذيبات، أو أي سموم متطايرة أخرى، يجب ملء أنبوب الدم بالكامل وبصورة كاملة لتقليل **الفراغ العلوي** ($Headspace$) إلى أدنى حد ممكن؛ وذلك للحيلولة دون هروب المواد المتطايرة من السائل الحيوي إلى حيز الهواء المتواجد داخل الأنبوب.

التوزيع بين البلازما والكرات الحمراء ($Distribution$)

في الظروف الفسيولوجية العادية، لا توجد فروق جوهرية تذكر في تراكيز السموم بين المصل والبلازما. غير أنه إذا كان المركب السام لا يتواجد بتركيز عالٍ داخل كرات الدم الحمراء، فإن استخدام الدم الكامل المتحلل ($Lysed$) سيؤدي حتمياً إلى تخفيف العينة بمقدار النصف تقريباً مقارنة بالبلازما الصافية.

- **حالات استثنائية:** تُعد الأدوية المثبطة للمناعة (مثل **السيكلوسبورين** و**التاكروليموس**) حالات خاصة وتستوجب الحذر؛ لأن عمليات إعادة التوزيع الديناميكية بين البلازما والكرات الحمراء تبدأ فور سحب العينة، ولهذا يُنصح حصراً بالاعتماد على الدم الكامل المتحلل لقياس هذه المركبات بدقة.

موثوقية قياسات ما بعد الوفاة (Postmortem Measurements Reliability)

لضمان بلوغ أقصى درجات الموثوقية والدقة في عينات ما بعد الوفاة، يُوصى بالتدابير الآتية:

- تقليص الفترة الزمنية الفاصلة بين ساعة الوفاة ووقت الفحص التشريحي ($Autopsy$).
- تخزين جثة المتوفى والعينات المسحوبة في درجات حرارة منخفضة تبلغ 4° C.
- سحب عينات الدم من موقعين طرفيين متميزين (يُفضل الأوردة الفخذية) بعد إجراء ربط تشريحي للوريد بالقرب من موقع السحب لمنع اختلاط دم العينة بدم التجويف المركزي.
- إضافة مادة حافظة مناسبة (تقارب $2\%\ w/v$من فلوريد الصوديوم) لجزء مخصص من عينة الدم ولعينة البول أيضاً.
- **تنبيه معملي صارم:** يجب تدوين موقع السحب بدقة بالغة في التقرير (مثلاً: الوريد الفخذي الأيمن)، وإذا كان الدم المتاح مقتصراً على دم القلب أو دم التجويف فقط، فيتعين الإفصاح عن ذلك بوضوح تام؛ نظراً لأن تراكيز السموم فيها تختلف جوهرياً عن تراكيز الدم الطرفي.

الدم (للتحليل النوعي) - Blood (for Qualitative Analysis)

لغايات المسح والتحري النوعي ($Screening$) حصراً في حالات الوفيات الشرعية، يمكن سحب كمية تقارب 20 ml من دم القلب (ويُفضل الأذين الأيمن) أو من الوريد الأجوف السفلي. ويُشترط أن يكون الدم متدفقاً بحرية، مع ضرورة تسجيل الموقع الدقيق للسحب بوضوح على أنبوب الحفظ.

البول (Urine)

يُمثل البول العينة المثالية والفضلى لـ "مسح السموم"؛ نظراً لتوافر أحجام وفيرة منه واحتوائه على تراكيز مرتفعة من المواد السامة أو نواتج أيضها ($Metabolites$) التي تيسر وتدعم عمليات تحديد الهوية باستخدام التقنيات الكروماتوغرافية المتقدمة.

بروتوكول جمع البول:

- **الحجم المعياري:** 50 ml للبالغين، تُمجمع في حاوية معقمة ومحكمة الإغلاق.
- **المواد الحافظة:** لا تُضاف أي مواد حافظة إطلاقاً للبول المخصص للمسح السمّي العام.
- **التوقيت الزمني:** يجب جمع العينة فور الاشتباه بوقوع التسمم، وبصورة قطعية قبل الشروع في إعطاء أي علاج دوائي إسعافي.

ملاحظات سريرية هامة:

- **الاحتباس البولي ($Urinary\ retention$):** تتسبب بعض العقاقير (مثل مضادات الاكتئاب ثلاثية الحلقات) في احتباس بولي حاد، وعليه فقد تبدو العينات المبكرة جداً خالية من كميات كافية من الدواء.
- **التأخر في الجمع:** في حالات التسمم الحاد بعقار الباراسيتامول، قد لا يتبقى سوى نزر يسير جداً من السم في البول إذا سُحبت العينة بعد مرور ساعات أو أيام طويلة على التعرض الأولي، بغض النظر عن مدى خطورة الحالة الإكلينيكية للمريض.

الجدول (6): الأسباب المحتملة لتلون البول
Table 6: Potential Causes of Urine Discoloration

لون البول($Color$)	الأسباب المحتملة (مواد حيوية / أدوية وسموم)($Potential\ causes$)
أصفر / بني/($Yellow/Brown$)	•**مواد حيوية :**البيليروبين، الهيموجلوبين، الميوجلوبين، البورفيرينات، اليوروبيلين. •**أدوية وسموم :**مشتقات الأنثرون (الألوين، السنا، الرواند)، بورمسلفثالين [أ]، كاروتينات، كلوروكين، كريسول، الفلافينات (ذات فلورة صفراء/خضراء)، فلوريسين، ميثوكاربامول (عند الاستقرار)، ميثيل دوبا (عند الاستقرار)، نيتروبنزين، نيتروفورانتوين، كينين.
أحمر / بني/($Red/Brown$)	•**مواد حيوية :**البيليروبين، الهيموجلوبين، الميوجلوبين، البورفيرينات، اليوروبيلين. •**أدوية وسموم :**أمينوفينازون، مشتقات الأنثرون [أ]، ديفركسامين [ب]، ليفودوبا (يتحول للأسود عند الاستقرار)، فيناستين، فينازوبيريدين، فينيتوين، ريفامبيسين، وارفارين، سلفاميثوكسازول.
أزرق / أخضر/($Blue/Green$)	•**مواد حيوية :**الصفراء، بيليروفيردين، إنديكان (عند الاستقرار). •**أدوية وسموم :**أكريفلافين (ذو فلورة خضراء)، أميتريبتيلين، أملاح النحاس، إندوميتاسين، ميثيلين أزرق [ب]، ريبوفلافين، ريسورسينول، تريامتيرين (ذو فلورة زرقاء).
أسود] ج[($Black$)	•**مواد حيوية :**الدم المتحلل (عند الاستقرار)، حمض الهوموجنتيسيك، إنديكان (عند الاستقرار)، بورفوبيلين. •**أدوية وسموم :**كاسكارا (عند الاستقرار)، ليفودوبا (عند الاستقرار)، الفينولات (متضمنة البروبوفول)، بيروجالول، ثيمول.

- [أ] تلون يعتمد ارتباطه بشكل مباشر على الرقم الهيدروجيني (pH).
- [ب] تُستخدم أحياناً كعوامل مضادة وتدابير علاجية في التسمم.
- [ج] **"متلازمة كيس البول الأرجواني"** ($Purple\ urine\ bag\ syndrome$): تنشأ نتيجة تفاعل إنزيمات بكتيرية تحول نواتج أيض التريبتوفان إلى صبغات كيميائية تتفاعل مع بلاستيك كيس جمع البول؛ وهي حالة حميدة غير ضارة وتختفي تلقائياً بمجرد علاج العدوى البكتيرية المصاحبة.

دلالات سمية إضافية في البول (*Additional Urinary Toxic Indicators*)

- **الروائح المميزة (*Characteristic odors*):** يمكن تمييز بعض السموم ذات النفحات القوية والنفاذة مباشرة من البول (مثل: الكافور، الإيثكلورفينول، وميثيل ساليسيلات)؛ نظراً لإفرازها جزئياً بصورة غير متغيرة (Unchanged).
- **البلورات (Crystals):**
  - ظهور بلورات **أوكسالات الكالسيوم** عديمة اللون في البول يُعد مؤشراً هاماً بعد تناول مادة **الإيثيلين جليكول** (المتواجدة في مضادات تجمد المحركات) أو حمض الأكساليك.
  - العقاقير الوريدية (مثل أدوية السلفا) قد تطرح في البول القلوي على هيئة بلورات ذات ألوان صفراء أو بنية.
- **الفلورة (*Fluorescence*):** قد تظهر بصورة واضحة نتيجة إضافة مادة **الفلوريسين** (Fluorescein) إلى سوائل مضادات تجمد السيارات للمساعدة في تتبع وكشف التسريبات؛ وتُعتبر هذه الظاهرة علامة سريرية فارعة لتشخيص حالات الابتلاع التسممي لهذه المواد.

بروتوكول عينات ما بعد الوفاة للبول (*Postmortem Urine Protocol*)

- يُفضل جمع عينتي بول منفصلتين بحجم يقارب 25 ml لكل منهما داخل حاويات بلاستيكية معقمة ومحكمة، مع إضافة مادة حافظة (تحديداً فلوريد الصوديوم بنسبة 2%) إلى إحداهما.
- **تحذير معملي حاسم للفريق:** يُحظر تماماً استخدام حاويات الجمع المزودة بمادة **حمض البوريك** (*Boric acid*) أو **الثيومرسال** (*Thiomersal*)؛ وذلك تفادياً لتلوث العينة بالبورات أو الزئبق السام، مما يؤدي قطعاً إلى إبطال دقة التحليل لعناصر البورون والزئبق.
- تُعتبر عينات البول المأخوذة بعد الوفاة ذات قيمة تحليلية فائقة في عمليات المسح الشامل عن السموم، وخصوصاً المخدرات غير المشروعة، كما تُستغل لتعزيز وتأكيد نتائج تحليل الإيثانول في الدم.

محتويات المعدة (*Stomach Contents*)

على الرغم من أن إجراء **غسيل المعدة** (*Gastric lavage*) أصبح نادراً للغاية في البروتوكولات العلاجية الحديثة للتسمم الحاد، إلا أن استخراج عينة تمثيلية من محتويات المعدة فور وقوع الحادثة يوفر فرصة ذهبية للكشف عن تراكيز هائلة وضخمة من المادة السامة الأصلية، في الوقت الذي تغيب فيه عادة نواتج الأيض (*Metabolites*) في هذه المرحلة المبكرة.

بروتوكول الجمع والتداول:

- **الأولوية القصوى:** يجب الحرص على الحصول على **العينة الأولى** المفرغة من سائل الغسيل المعوي؛ نظراً لأن العينات اللاحقة تكون مخففة بشدة وغير مجدية تحليلياً.
- **الحجم المعتمد:** يُؤخذ جزء ممثل بحجم يقارب 50 ml خالياً تماماً من المواد الحافظة لإجراء التحليل.
- **الاستبقاء الشامل:** يجب الاحتفاظ بكامل محتويات المعدة المستخرجة مع تدوين حجمها الكلي بدقة؛ حيث يلعب قياس الكمية الكلية للسم المتبقي داخل المعدة دوراً تفسيرياً حاسماً في ملابسات حالات الوفاة عندما تكون التراكيز الدموية غير واضحة أو ملتبسة.

مخاطر كيميائية وتنبيهات أمان متقدمة

يجب توخي أقصى درجات الحيطة والحذر عند الاشتباه بتناول أملاح **السيانيد** أو مركبات **الفوسفيدات** (مثل فوسفيد الألومنيوم والمعروف تجارياً بـ "حبوب الغاز")، خصوصاً إذا كانت المعدة فارغة؛ نظراً لأن التفاعل الكيميائي المباشر مع حمض المعدة الهيدروكلوري يؤدي إلى الانطلاق السريع لغازات شديدة الخطورة والسمية (وهي غاز سيانيد الهيدروجين أو غاز الفوسفين القاتل). كما أن هذه الغازات المتطايرة تملك القدرة على إحداث تلوث تبادلي ($Cross - contamination$) لكافة العينات البيولوجية المجاورة ما لم تُتخذ تدابير العزل المحكم.

الفحص الفيزيائي والمجهري ($Physical\ and\ Microscopic\ Examination$)

تُقدم الألوان غير الطبيعية أو الروائح النفاذة المميزة (الجدول 7) دلائل إرشادية أولية ومبكرة لمجموعة واسعة من المواد السامة. كما تشير قيم الرقم الهيدروجيني (pH) المنخفضة جداً أو المرتفعة للغاية إلى ابتلاع مواد حمضية أو قلوية كاوية، بينما يوحي ظهور الألوان الخضراء أو الزرقاء بوجود أملاح معدنية سامة كالنحاس أو الحديد.

الفحص المجهري ($Microscopy$):

- يمكن توظيف **المجهر المستقطب** ($Polarizing\ microscope$) بفاعلية للتحري عن بقايا الأقراص أو كبسولات الأدوية غير المتصبرة.
- **حبيبات النشا ($Starch\ granules$):** تُستخدم شائعة كمادة مالئة ($Filler$) في تركيبات الأقراص الدوائية، وتظهر تحت المرشحات المستقطبة المتصالبة على هيئة حبيبات مضيئة مميزة تتخذ شكل علامة **"صليب مالطا"** ($Maltese\ cross$) الداكنة.

التعامل مع البقايا الصلبة ($Solid\ residues$):

- في حال العثور على أقراص أو كبسولات سليمة في مسرح الحادث أو محتويات المعدة، يجب عزلها ووضعها في حاويات مستقلة تماماً (مثل أنابيب ماركة $Sterilin$).
- يُفترض فحص أي بقايا نباتية أو أجزاء عشبية مشتبه بابتلاعها بصورة مستقلة ومخصصة.
- يمكن الاستعانة بمراكز معلومات السموم أو الكوادر الصيدلانية للتعرف على هوية الأقراص القانونية أو غير المشروع تداولها بالاستناد إلى معايير الأوزان، العلامات البارزة، الألوان، الأشكال، أو عبر قواعد البيانات المحوسبة المعتمدة (Ramsey, 2004).

الجدول (7): الروائح المصاحبة لبعض السموم النوعية
Table 7: Odors Associated with Specific Toxins

الرائحة المميزة($Smell$)	السبب المحتمل والسم المرتبط($Possible\ Cause$)
لوز($Almonds$)	السيانيد($Cyanide$)
قرنفل($Cloves$)	زيت القرنفل($Oil\ of\ cloves$)
فاكهية($Fruity$)	الكحوليات المتطايرة (بما في ذلك الإيثانول)، والإسترات المختلفة($Esters$)
ثوم($Garlic$)	الزرنيخ($Arsenic$) ، وغاز الفوسفين($Phosphine$)
كرات العث($Mothballs$)	الكافور ($Camphor$) أو مركب النفتالين($Naphthalene$)
مزيل طلاء الأظافر	الأسيتون($Acetone$) ، وبيوتانون($Butanone$)

الرائحة المميزة(*Smell*)	السبب المحتمل والسم المرتبط(*Possible Cause*)
إجاص أو كمثرى(*Pears*)	كلورال هيدرات / كلورال(*Chloral*)
بنزين(*Petrol*)	مقطرات البترول الحاملة في تركيبات المبيدات الحشرية
فينولية (صابون كاربوليك)	المطهرات التجارية، الكريسول، والفينولات
ورنيش أحذية	نيتروبنزين(*Nitrobenzene*)
تبغ قديم	النيكوتين(*Nicotine*)
حلوة(*Sweet*)	الكلوروفورم (*Chloroform*) والهيدروكربونات الهالوجينية الأخرى

(أ) تحذيرات أمان صارمة لفريق العمل:

- **غاز السيانيد:** العينات الحاملة للسيانيد قادرة على إطلاق غاز سيانيد الهيدروجين السام (حمض البروسيك)، سيما إذا كانت أوساطها حامضية (علماً بأن محتويات المعدة طبيعياً حامضية الطابع). ويُراعى أن قدرة الأفراد على تمييز وشم رائحة سيانيد الهيدروجين تتفاوت وراثياً وجينياً ولا يمتلكها الجميع.
- **الكبريتيدات والفوسفيدات:** تُطلق الكبريتيدات غاز كبريتيد الهيدروجين السام، بينما تنطلق غازات الفوسفين القاتلة من الفوسفيدات.
- **ظاهرة فقدان حاسة الشم:** إن القدرة الحساسة على تمييز رائحة كبريتيد الهيدروجين المميزة (رائحة البيض الفاسد) تُفقد وتتلاشى تماماً عند التركيزات العالية من الغاز، مما يشكل خطراً مهنياً داهماً لغياب القدرة على اكتشافه بالشم.

اللعاب وسوائل الفم (Saliva / Oral Fluids)

على الرغم من أن اللعاب لا يُصنف ضمن العينات الروتينية المعتمدة في حالات الطوارئ السريرية أو تحقيقات ما بعد الوفاة، إلا أن هناك تصاعداً مستمراً في الاهتمام بجمعه من الأفراد الأحياء؛ لكونه إجراءً تشخيصياً غير باذع (*Noninvasive*) يعكس بدقة وحداثة مستويات تعاطي المخدرات أو الكحول (Schramm et al., 1992a; Aps and Martens, 2005).

تحديات الجمع والتعامل التقني:

- **التوافر الإفرازي:** قد تتسبب بعض الحالات المرضية، أو الأدوية المثبطة، أو الحالات النفسية كالقلق الحاد في تثبيط إفراز اللعاب، مما يجعل العينة غير متوافرة لدى كافة الأفراد في جميع الأوقات.
- **اللزوجة العالية:** يُعد اللعاب سفلاً لزجاً يصعب صبه أو سحبه بدقة بواسطة الماصات مقارنة بالبلازما؛ لذا يُنصح أحياناً بتخفيفه بمحلول منظم (*Buffer*) ملائم لتسهيل تداوله مع ضرورة إدخال عامل التخفيف المحسوب في أي تقرير كمي لاحق.
- **الميزة الجنائية:** تكمن الميزة الأساسية لجمع سوائل الفم للأغراض القانونية والجنائية في إمكانية إتمام عملية السحب تحت **الملاحظة المباشرة الكاملة**، مما يجعل محاولات غش العينة أو استبدالها أمراً بالغ الصعوبة والاستحالة عملياً (Spiehler, 2004).

فيزيولوجيا الإفراز وطرق التحفيز (*Physiology and Stimulation*):

في الظروف الطبيعية، لا تفرز الغدد اللعابية كميات معتبرة من اللعاب دون وجود محفز، غير أن البصق البسيط يكفي لإنتاج تدفق إفرازي زهيد يصل إلى نحو 0.5 ml/min. ولغرض الحصول على حجوم كافية في أوقات قياسية، يُلجأ إلى التحفيز بأسلوبين:

- **المحفزات الفيزيائية:** مثل مضغ شرائح شمع البارافين ($Paraffin\ wax$), أو "البارافيلم" ($Parafilm$), أو قطع المطاط المعقمة، وهي تدابير ترفع معدل التدفق اللعابي إلى $1 - 3$ ml/min.
- **المحفزات الكيميائية:** استخدام بضع قطرات من محلول حمض الستريك (0.5 mol/L) على اللسان.

ملاحظات تقنية هامة للفريق المعملي:

- **تأثير الرقم الهيدروجيني (pH):** يبلغ متوسط الرقم الهيدروجيني للعاب المحفز فيزيائياً حوالي 7.4، بينما يُظهر اللعاب غير المحفز تفاوتاً أوسع في قيمة الـ pHقد تؤثر بشكل ملحوظ على عمليات إفراز وتوزيع الأحماض والقواعد الضعيفة.
- **تحذير من ظاهرة الامتصاص الانتقائي:** يجب التيقن التام من أن المادة المحفزة المستخدمة (مثل شمع البارافين) لا تمتص الجزيئات شديدة الألفة للدهون ($Lipophilic$), فضلاً عن ضرورة التأكد من أن المحفزات الحامضية لا تؤدي إلى تغيير معدلات إفراز المركبات القابلة للتأين في اللعاب.

احتياطات لضمان نقاء العينة

في الأشخاص الأصحاء، قد يشكل سائل الشق اللثوي ($Gingival\ crevicular\ fluid$) ما يصل إلى 0.5%من حجم اللعاب المختلط، وترتفع هذه النسبة بصورة ملحوظة في حالات التهاب اللثة ($Gingivitis$). كما قد يساهم نضح البلازما الناتج عن الجروح أو التقرحات الفموية الصغيرة في إحداث تغيرات مضللة في نتائج التحليل.

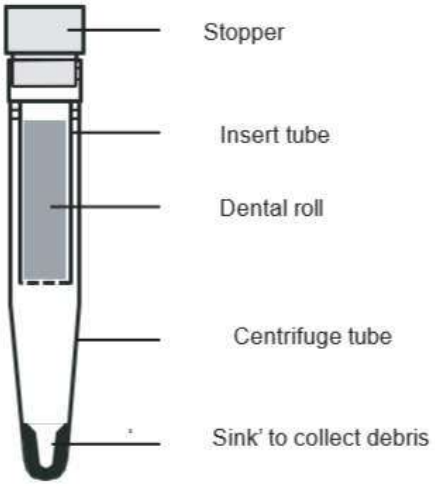
- **التوصية الإكلينيكية:** يجب توجيه الأشخاص الخاضعين للفحص بالامتناع التام عن تنظيف أسنانهم بالفرشاة أو ممارسة أي من وسائل نظافة الفم لعدة ساعات قبل الشروع في جمع العينة؛ وذلك لضمان عدم تلوث اللعاب بدم أو بمواد كيميائية خارجية قد تؤثر على دقة المقايسة.

أدوات جمع اللعاب وسوائل الفم (Collection Devices)

تُعد أداة **Salivette** (الم produite من شركة *Sarstedt*) من أشهر وأبرز الوسائل المعتمدة في المختبرات؛ حيث يتم فيها مضغ لفافة قطنية (أو بوليستر) لفترة تتراوح بين $45 - 30$ثانية، سواء مع استخدام محفز إضافي أو دونه. وتتوفر هذه الأداة تجارياً بنسختين، إحداهما مضاف إليها سترات الصوديوم والأخرى خالية منها.

- **آلية العمل المعملية (كما يوضح الشكل 1):**

1. توضع اللفافة القطنية المشبعة باللعاب داخل الحاوية وتُغلق بإحكام باستخدام سدادة بلاستيكية ($Stopper$).
2. تُخضع الحاوية لعملية طرد مركزي ($Centrifugation$) لمدة 3دقائق بسرعة $1000 \times g$.
3. أثناء الدوران، يمر اللعاب بانسياق من اللفافة القطنية إلى الجزء السفلي ($Insert\ tube$) ليتم جمعه، بينما تُحتجز الخلايا والحطام والشوائب العالقة في **"حوض"** ($Sink$) صغير مصمم خصيصاً في قاع الأنبوب.



الشكل (1): مثال على جهاز جمع عينات اللعاب (Salivette, Sarstedt)

المزايا والعيوب:

- **الميزة:** تمتلك قدرة على امتصاص كمية كبيرة نسبياً من اللعاب تقارب 1.5 ml.
- **العيب:** قد يتفاعل القطن الطبي المستعمل في اللفافة مع بعض المقايسات الحساسة (مثل مقايسات هرمون التستوستيرون).
- **البدائل المتاحة:** توجد أدوات أخرى مثل **OraSure** التي تمتص حجماً يقارب 1.0 mlفقط، وتقوم بجمع **"سائل الفم"** $(Oral\ fluid)$ عبر وضع الوسادة الإسفنجية بين الخد واللثة، وليس اللعاب الصافي مباشرة.

تقنيات الامتصاص والترشيح المستمر

- **أجهزة الغمر الانتشاري $(Oral-diffusion-sink)$:** تُوظف لجمع فرازة اللعاب $(Ultrafiltrate)$. وتحتوي هذه الأجهزة المتقدمة على "مصيدة" متخصصة للمادة المحللة (مثل بيتا-سيكلوديكسترين غير القابل للذوبان)، مما يحافظ على تدرج التركيز ويسمح بالانتشار الحر للمادة من اللعاب إلى جهاز التجميع، وهي تقنية توفر بيانات تعرض لفترات أطول مقارنة بالطرائق التقليدية.
- **المضخات الأسموزية $(Osmotic\ pumps)$:** طورها الباحثان *Schramm et al*. لجمع فرازة اللعاب لغرض قياس مواد نوعية كالفينيتوين والكاربامازيبين، غير أنها لم تكتسب قبولاً واسعاً في الممارسات المعملية الروتينية.

العرق (Sweat)

يُعد جمع العرق وسيلة تشخيصية غير باذعة $(Noninvasive)$ للكشف الموثوق عن العقاقير المخدرة. ويمكن جمعه كعرق سائل أو عبر مسح الجبهة $(Forehead\ wipes)$ (Kintz et al., 2000).

لصقات العرق ($SweatPatches$):

- **الميزة الأساسية:** يمكن ارتداء هذه اللصقات التجارية المتاحة لفترة زمنية ممتدة تتراوح بين 10إلى 14يوماً تقريباً.
- **النطاق الزمني للرصد:** تتمكن هذه اللصقات من كشف تعاطي المخدرات الذي حدث قبيل وضع اللصقة بقليل، ويمتد الرصد طوال فترة تلامسها المستمر مع الجلد.
- **مجالات الاستخدام:** تُعتبر أداة فعالة للغاية لمراقبة الالتزام بالعلاج ($Compliance$) أو الرصد المستمر في البيئات الإصلاحية أو التأهيلية.

هواء الزفير (Exhaled Air)

يُعد قياس تراكيز المواد المتطايرة في هواء الزفير – بالاستعانة بأجهزة الأشعة تحت الحمراء أو التقنيات الأخرى – أمراً لا غنى عنه في اختبارات الطرق الميدانية للكشف عن الإيثانول، كما يحمل قيمة بالغة في تقييم حالات التعرض لسموم استنشاقية خطيرة مثل غاز أول أكسيد الكربون.

- **التقنيات المتقدمة:** يتيح استخدام أجهزة مطياف الكتلة المباشر ($Direct\ MS$) لهواء الزفير رصد العديد من المركبات المختلفة، متضمنة المواد المتطايرة والمخدرات الوريدية، لعدة أيام تالية للتعرض.
- **أجهزة التجميع:** يمكن تجميع هواء الزفير داخل أكياس بلاستيكية غير منفذة للغازات (مثل أكياس **Tedlar** أو **PTFE**) أو عبر أجهزة تجميع متخصصة لتسهيل التحليل اللاحق للمواد المتطايرة ونواتج الأيض بواسطة التقنيات الكروماتوغرافية (GC أو $GC-MS$).
- **العائق التقني:** يقتصر الاستفادة من هذه التقنيات حصراً على الأفراد الأحياء ($Harrison\ et\ al.,\ 2003$).

السائل الدماغي النخاعي (Cerebrospinal Fluid - CSF)

يُستحصل على السائل الدماغي النخاعي عن طريق سحب الإبرة الدقيقة (البزل القطني)، ويُوظف أحياناً لتقييم التعرض للأدوية التي تؤثر بشكل مباشر على الجهاز العصبي المركزي (Shen et al., 2004)، أو عند التحقيق في الأخطاء العلاجية المتعلقة بإعطاء الأدوية.

- **ميزة الحماية البيولوجية:** نظراً لتواجد هذا السائل في بيئة تشريحية محمية نسبياً (تشابه في ذلك الخلط الزجاجي والسائل الزليلي)، فإنه يمثل عينة ذات قيمة استثنائية لتعزيز وتأكيد نتائج قياس الإيثانول في حال تعذر توافر العينات الأساسية الأخرى.

الخلط الزجاجي (Vitreous Humour)

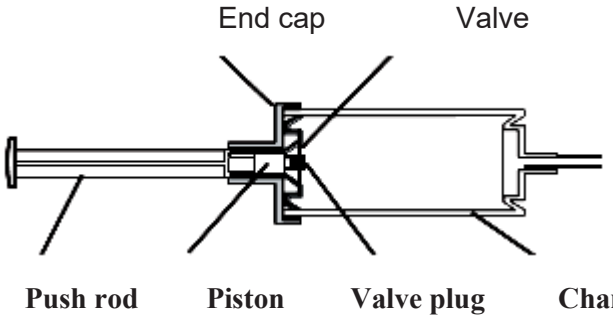
يُمكن الحصول على الخلط الزجاجي (سائل العين) حتى في أصعب الظروف؛ كحالات الجثث المتضررة بشدة أو المحترقة، أو عند بداية مراحل التعفن ($Putrefaction$), أو في حال غياب العينات التقليدية كالبول.

الأهمية التحليلية:

- **حالات استشصائية خاصّة:** يُعد عينة بالغة النفع والأهمية عند التحقيق في الوفيات المرتبطة بأمراض السكري أو التسمم بالأنسولين، ولتحليل الكحوليات، والديجوكسين، والليثيوم.
- **التركيب الكيميائي الفريد:** يمثل الخلط الزجاجي في جوهره محلياً ملحياً نقياً يحتوي على كمية ضئيلة جداً من البروتينات، مما يسهل بصورة كبيرة عمليات استخلاص السموم منه وكأنها مذابة في محلول منظم مثالي $(Buffer)$.

بروتوكول الجمع والحفظ للخلط الزجاجي:

- يجب جمع عينات السائل من كل عين على حدة $(Individually)$.
- إضافة مادة حافظة معتمدة من فلوريد الصوديوم بتركيز $(2\%\ w/v)$.
- **تنبيه معملي:** يجب تجنب إجراء **الشفط المفرط** أثناء عملية السحب؛ لأنه يغير بشكل ملحوظ تراكيز العديد من المكونات الحيوية والمواد المحللة (Forrest, 1993).
- يجب مراعاة احتمالية وجود أمراض موضعية في العين قد تؤثر على سلامة النتائج (Parsons et al., 2003)، ويمكن بصورة تجميلية استبدال السائل المسحوب بمحلول ملحي متساوي التوتر $(Isotonic\ saline)$ للحفاظ على المظهر الخارجي للجثة.



الشكل (2): مثال لجهاز جمع عينات الأنفاس لتحليل المذيبات المتطايرة يعتمد هذا الجهاز (المبتكر بواسطة *Dyne et al., 1997*) على نظام ميكانيكي هندسي يضمن حبس عينة الهواء بدقة داخل غرفة التحليل $(Chamber)$ دون ضياع المكونات المتطايرة:

المكونات الرئيسية للجهاز:

- **غطاء الطرف $(End\ cap)$:** مخصص للإغلاق المحكم لمنع التسرب.
- **الصمام $(Valve)$:** للتحكم الدقيق في توجيه دخول وخروج الهواء.
- **المكبس وقضيب الدفع $(Piston\ \&\ Push\ rod)$:** لسحب عينة الهواء وضغطها داخل الغرفة.
- **سدادة الصمام $(Valve\ plug)$:** لضمان عدم تسرب الغازات المحبوسة عقب عملية الجمع.

السائل الدماغي النخاعي (Cerebrospinal Fluid - CSF)

يُجمع السائل الدماغي النخاعي عن طريق **بزل الإبرة** $(Needle\ aspiration)$, ويُوظف أساساً لتقييم درجات التعرض للأدوية التي تؤثر بشكل مباشر على الجهاز العصبي المركزي (Shen et al., 2004). كما يُطلب تحليله عند التحقيق في احتمالية وقوع أخطاء دوائية علاجية.

- **الميزة التحليلية:** نظراً لتواجد هذا السائل في بيئة تشريحية محمية ومغلقة نسبياً، فإنه يوفر عينة بالغة القيمة لتعزيز نتائج قياس الإيثانول، سيما عند تعذر توافر العينات الحيوية الأخرى.

الخلط الزجاجي (Vitreous Humour)

يُمثل الخلط الزجاجي (سائل العين) عينة إسعافية وجنائية يمكن الحصول عليها حتى في أصعب الظروف المعقدة؛ كحالات الجثث المحترقة أو المتضررة بشدة، أو عند بدء مظاهر التعفن الجسدي.

- **الاستخدامات الإكلينيكية والشرعية:** يُعد مفيداً للغاية عند التحقيق في الوفيات المرتبطة بالسكري أو فرط/نقص الأنسولين، وتحليل الكحوليات، والديجوكسين، والليثيوم.
- **التركيب الكيميائي:** يُشكل محلولاً ملحياً فقيراً جداً بالبروتينات، مما يسهل بصورة كبيرة عمليات استخلاص السموم منه وكأنها مذابة في محلول منظم معملي $(Buffer)$.

السائل الزلالي (Synovial Fluid)

يُجمع السائل الزلالي عن طريق سحب الإبرة من تجاويف المفاصل، وقد استُخدم لتقييم كفاءة وصول الأدوية المضادة للالتهابات غير الستيرويدية $(NSAIDs)$ إلى مواقع عملها العضوية المحتملة (Day et al., 1999).

- **الميزة التحليلية:** تماماً مثل السائل النخاعي، يُعتبر السائل الزلالي بيئة تشريحية محمية، مما يجعله عينة بالغة الأهمية والقيمة في حالات الوفاة الناشئة عن الإصابات العنيفة $(Traumatic\ deaths)$ أو في الجثث التي تعرضت لتحلل شديد.

الكبد (Liver)

يُعد **الكبد** من أسهل الأنسجة الحشوية جمعاً بعد الوفاة، كما يسهل إخضاعه لعمليات التجنيس $(Homogenization)$. وغالباً ما يحتضن تراكيز هائلة وضخمة من العقاقير ونواتج أيضها، ليصبح أحياناً العينة الرئيسية والأساسية للتحليل في حال تعذر توافر عينات الدم.

بروتوكول الجمع:

- **الكمية المعتمدة:** يُجمع جزء رطب بوزن يقارب $(10 - 20\ gram)$ من نسيج الكبد غير المثبت (الخالي تماماً من أي مواد حافظة).
- **الموقع التشريحي الدقيق:** يجب أخذ عينة النسيج حصراً من **الفص الأيمن** $(Right\ lobe)$؛ وذلك لتقليل مخاطر التلوث بفرط العصارة الصفراوية $(Bile)$, ولأن احتمالية انتشار واجتياح السموم من المعدة نحو الفص الأيمن تبدو أقل بكثير مقارنة بالفص الأيسر المجاور (Pounder et al., 1996a, 1996b).

- **القيمة التحليلية:** يتيح التحليل المعملي لأنسجة الكبد في بعض الحالات المساعدة في التمييز بين ما إذا كان التعرض السمّي حاداً أم مزمناً، بينما قد لا يتعدى دوره في أحيان أخرى كونه دليلاً قاطعاً على حصول التعرض ($Exposure$) فحسب، نظراً لغياب المعلومات الموثوقة الكافية لتفسير النتائج الكمية بدقة.

أنسجة تخصصية أخرى (Other Tissues)

تُعتبر عينات الأنسجة الإضافية ذات نفع عظيم عند التحقيق في الوفيات المرتبطة بالمواد المتطايرة كالمذيبات الصناعية والغازات السامة.

- **الأعضاء الأكثر فائدة:** الدماغ، الدهون تحت الجلد، قمة الرئة ($Apex$), الطحال، والكلية.
- **بروتوكول الجمع:** يُجمع ما بين 20 – 10جراماً من النسيج الرطب غير المثبت داخل حاويات مستقلة.
- **التعبئة والحفظ:** توضع العينات في جرة زجاجية محكمة أو كيس نايلون عازل (سيما في حالات الوفيات الناشئة عن إساءة استخدام المواد المتطايرة أو التخدير) وتُخضع لتجنيس وتجميد عميق قبل النقل المعملي.
- **تنبيه تقني حاسم:** يجب عدم ملء حاويات التجميد بشكل مفرط؛ لكونها عرضة للكسر والانفجار عند التجمد العميق نتيجة التمدد الطبيعي للسوائل.

تطبيقات خاصة:

- **الدماغ:** قياس مستويات وتراكيز بعض السموم العصبية في الدماغ يكتسب أهمية بالغة في حالات نوعية، مثل التحقيق في الوفيات المرتبطة بتعاطي الكوكايين.
- **الطحال:** نظراً لكونه غنياً جداً بخلايا الدم الحمراء، فهو يوفر عينة بديلة وثمينة لتقدير نسبة تشبع **كربوكسي هيموجلوبين** ($Carboxyhaemoglobin$) إذا تعذر الحصول على الدم (Vreman et al., 2006).

يرقات الحشرات (Insect larvae)

في ظروف الجثث المتحللة، يمكن للتحليل السمّي المجرى على **يرقات الذباب الأزرق** ($Calliphora\ vicina$) وغيرها من الحشرات المتغذية على الأنسجة المتحللة أن ييسر بفاعلية الكشف عن العديد من العقاقير التي كانت مترسبة أصلاً في الأنسجة البشرية أو الحيوانية.

الاعتبارات التحليلية والهامة:

- **غياب الدقة الكمية:** لا يمكن الركون إلى اليرقات لإجراء استقراءات كمية موثوقة تحدد بدقة التركيز الأصلي للسم داخل جسم المتوفى (Pounder, 1991; Tracqui et al., 2004).
- **عمر اليرقة والتمثيل الغذائي:** تتسم تراكيز الأدوية ونواتج أيضها في اليرقات التي توقفت عن التغذية أو التي بلغت مرحلة **الخادرة** ($Pupae$) بانخفاض حاد وملموس مقارنة باليرقات النشطة في مرحلة التغذية؛ مما يدل بوضوح على أن اليرقات تقوم بعمليات تمثيل غذائي ($Metabolism$) والتخلص الحيوي من الأدوية أثناء مراحل نموها المتسارعة (Sadler et al., 1995).
- **مثال كيميائي توضيحي:** أثبتت الملاحظات المخبرية قدرة يرقات بعض أنواع الذباب على استقلاب وتحويل عقار **النوردازيبام** ($Nordazepam$) إلى مشتقة **الأنصازيبام أوكسازيبام** ($Oxazepam$) (Pien et al., 2004).

الأنسجة الكيراتينية: الشعر والأظافر (Keratinous Tissues: Hair and Nails)

تتميز الأنسجة الكيراتينية بقدرتها الفائقة على احتجاز وحجز العديد من أيونات المعادن الثقيلة، والأدوية، ونواتج أيضها أثناء مراحل تكوينها ونموها، حيث تظل مستقرة بعد ذلك دون أن يخضع المحتوى المحتجز لأي تمثيل غذائي إضافي. وتبرز القيمة القصوى لهذه العينات الحيوية في حالات الاشتباه بالتعرض المزمن ($Chronic\ exposure$)، مثل الوفيات المرتبطة بإساءة استخدام العقاقير والمخدرات (ولا سيما الأفيونات والميثادون)، وللكشف عن السموم التي قد تكون تلاشت أو فُقدت من السوائل الحيوية الأخرى قبل إتمام عملية الجمع.

تطبيقات خاصة:

- رُصدت مادة **الليدوكائين** ($Lidocaine$) – وهي مادة غش شائعة وشبه منتظمة في إمدادات الهيروين والكوكايين – بنجاح في عينات الشعر.
- يمتاز الشعر بقدرته الهائلة على البقاء والصمود لفترات زمنية طويلة بعد الدفن مقارنة ببقية الأنسجة الرخوة الأخرى.
- **الاعتداءات الجنسية المسهلة بالعقاقير ($DFSA$):** في حال تعذر رصد المادة السامة في الدم أو البول، يتيح الانتظار لفترة تتراوح بين شهر إلى شهرين لنمو شعر الرأس إمكانية إجراء **التحليل القطاعي** ($Segmental\ analysis$) الدقيق للكشف القاطع عن وجود الدواء.

بروتوكول جمع شعر الرأس ($Scalp\ hair\ collection\ protocol$)

لضمان دقة التحليل القطاعي الذي يحدد بدقة "الجدول الزمني" لتاريخ التعرض السمّي، يجب الالتزام التام بالخطوات الآتية:

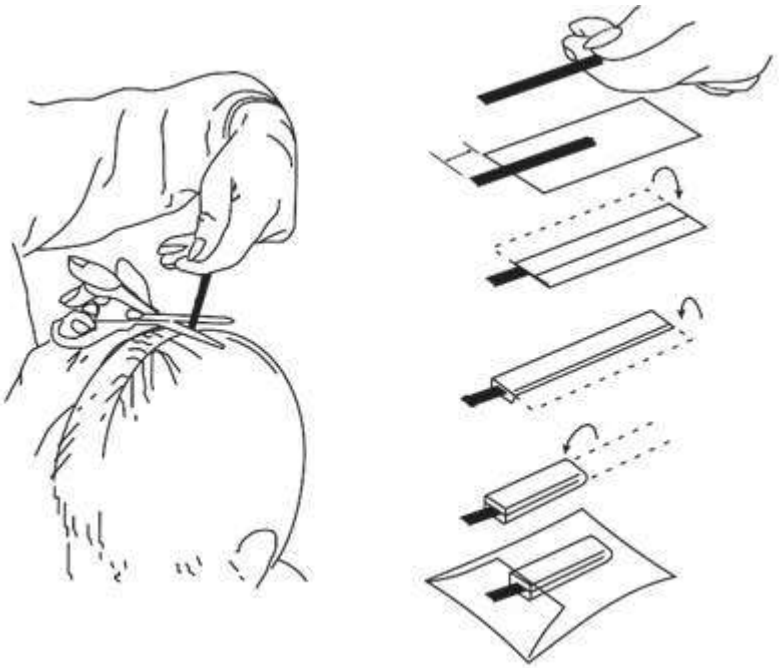
- **الموقع المثالي:** تُقتطع عينة الشعر من منطقة **قمة الرأس الخلفية** ($Vertex\ posterior/Crown$).
- **الكمية المطلوبة:** حزمة شعر بسمك يعادل قلم الرصاص (تقريباً $200 - 100$شعرة).
- **طريقة القص السليمة:** تُربط الحزمة بعناية فائقة باستخدام خيط قطني عند طرف الجذور قبل الشروع في القص، ثم يُقص الشعر على مسافة تقارب 2 mm من فروة الرأس مباشرة، مع التأكد التام من أن أصل القص يوازي الفروة وليس بزاوية مائلة.
- **الحفظ والتغليف:** توضع عينة الشعر في وضع مستوٍ وبمحاذاة أفقية على ورقة ألومنيوم (قصدير)، مع تحديد طرف الجذور ($Proximal\ end$) بوضوح تام، ثم تُطوى الورقة بعناية وتوضع داخل مظروف رسمي مانع للعبث.
- **البدائل المتاحة:** يمكن اللجوء إلى استخدام شعر العانة أو الإبط في حال عدم توافر شعر الرأس أو إذا كان مصبوغاً أو معالجاً كيميائياً بشكل مفرط يفسد التحليل.

الأظافر (Nails)

تُستعمل قصاصات الأظافر لمراقبة الانتظام في تناول أدوية معينة (مثل الأدوية المضادة للفطريات كالإيتراكونازول). أما في ظروف ما بعد الوفاة، فيُفضل نزع ورفع الأظافر كاملة من الأصابع، وهو إجراء يمنح نافذة زمنية أوسع وأطول للكشف عن التعرض مقارنة بتحليل الشعر.

التحديات التحليلية:

- المعلومات المتوافرة حول الآليات الدقيقة لاحتجاز الأدوية ودمجها في الأظافر لا تزال محدودة ومقارنة بالشعر.
- **بطء معدل النمو:** يتسبب النمو البطيء للأظافر (لا سيما أظافر القدمين) في جعل التحليل القطاعي وتفسير النتائج أكثر صعوبة وتعقيداً.



الشكل (3): رسم تخطيطي لجمع شعر الرأس (*Scalp hair collection diagram*)

العظام ونخاع العظم (Bone and Bone Marrow)

يبرز دور **نخاع العظم** كخيار حيوي واستثنائي لتحديد السموم والكشف عنها في حالات استخراج الجثث ودراسات الهياكل المعملية (*Exhumations*) عندما تكون الأنسجة الرخوة قد تعرضت لتحلل كامل (*Watterson, 2006*).

- **أمثلة توضيحية:** أثبتت الدراسات التجريبية أن نسبة تركيز عقار **النورتريبتيلين** (*Nortriptyline*) في نخاع العظم مقارنة بالدم قد تصل إلى 30ضعفاً بعد دورة علاجية استمرت لمدة 5أيام.
- **العظام الصلبة:** تكتسب أهمية بالغة ومرجعية عند الاشتباه في حالات التسمم المزمن بالمعادن الثقيلة الخطرة كالزرنيخ (*Arsenic*) أو الرصاص (*Lead*).

مواقع الحقن (Injection Sites)

عند الاشتباه بحدوث التسمم أو التعاطي عن طريق الحقن الوريدي، يجب استئصال نسيج موقع الحقن المحتمل بدقة تشريحية، وتغليفه بصورة فردية ومستقلة مع تحديد الموقع المستأصل بوضوح على الحاوية.

- **تنبيه تقني معملي:** يجب الحرص على توفير **"عينة ضابطة" أو شهيدة** (*Control*) مُستأصلة من موضع بجسد المتوفى غير محقون وله ذات التركيب النسيجي، على أن تُرسل في حاوية منفصلة تماماً لغايات المقارنة المعملية الدقيقة.

مخلفات المشهد (*Scene Residues*)

وتضم الأقراص الدوائية، المساحيق، المحاقن الطبية، وسوائل التسريب الوريدي المتواجدة في مسرح الحادث. وتمنح هذه المواد أدلة ومعلومات لا تُقدر بثمن حول طبيعة السموم المتورطة في الواقعة.

- **قاعدة الفصل التام:** يجب تعبئة هذه المخلفات في حاويات منفصلة تماماً عن العينات البيولوجية، خصوصاً إذا تضمنت مواد متطايرة، وذلك لتلافي أي **تلوث تبادلي** $(Cross - contamination)$.
- **الأهمية المهنية:** تشتد قيمة وخطورة هذه المخلفات في حالات الوفيات الحاصلة بين العاملين في القطاع الصحي والطبي (كالأطباء، الممرضين، وأطباء الأسنان) ممن يمتلكون صلاحية وسهولة الوصول إلى مواد عقاقيرية دقيقة يصعب اكتشافها روتينياً بمجرد دخولها الجسم.
- **تنبيه أمان صارم:** يجب إدخال الإبر والمحاقن المستعملة حصراً داخل دروع واقية وحاويات مخصصة للأدوات الحادة $(Sharps\ container)$ للتقليل الجذري من مخاطر الإصابات الوخزية للعاملين بالمختبر.

نقل وتخزين العينات (Sample Transport and Storage)

يُوصى دائماً بالتواصل الهاتفي المسبق مع الطاقم المعملي للمختبر لمناقشة الحالات الإسعافية العاجلة أو المعقدة.

ضمان النزاهة والهوية:

عند احتمالية اتخاذ مسار قانوني وقضائي بناءً على نتائج التحليل، يصبح ضمان هوية العينة ونزاهتها المطلقة من لحظة الجمع وحتى إصدار التقرير النهائي أمراً حتمياً لا يحتمل التهاون:

- استخدام **أختام مانعة للعبث** $(Tamper - evident\ seals)$ طوال مراكز النقل والحفظ.
- يُفضل تسليم العينات شخصياً للمختبر يدوياً عبر ضابط التحقيق أو الشخص المخول رسمياً بعهدة العينة.

سلسلة الحضانة $(Chain\ of\ Custody)$

هو المصطلح المعياري والتشريعي المعتمد للإشارة إلى المنظومة والعملية الصارمة المتبعة لحفظ تاريخ العينة وتوثيق مسارها كاملاً (كما هو مفصل في الإطار 3).

الإطار (3): وثائق سلسلة الحضانة $(Chain\ of\ Custody\ Documentation)$ لضمان قطع الطريق أمام أي تشكيك قضائي في نزاهة العينة أو احتمالية تلاعبها أو استبدالها، يجب أن يرافق كل عينة بيولوجية سجل توثيقي دقيق ومستمر يتضمن المعطيات الآتية:

- **بيانات الجامع:** الاسم الرسمي والشخصي للشخص الذي قام بسحب أو جمع العينة في المقام الأول.
- **سجل التداول $(Audit\ trail)$:** أسماء كافة الأشخاص أو الجهات التي آلت إليها عهدة العينة تدريجياً، مع إرفاق تفاصيل دقيقة حول ظروف تخزينها في كل مرحلة.
- **التوثيق الزمني:** التواريخ والأوقات الدقيقة لعمليات الجمع أو النقل من عهدة إلى أخرى.
- **أرقام التعريف المعملية:** الرقم التسلسلي الفريد للعينة أو رقم تقرير ما بعد الوفاة $(Postmortem\ number)$.
- **بيانات الحالة:** الاسم الرسمي للشخص الخاضع للفحص السريري أو اسم المتوفى.
- **وصف العينة:** إثبات وصف موجز لطبيعة العينة وحالتها الفيزيائية وقت الاستلام.
- **سلامة الأختام:** سجل دوري يوضح حالة الأختام المانعة للعبث $(Tamper - evident\ seals)$ عند كل خطوة تسليم وتسلم.

استقرارية العينات (Analyte Stability)

يجب أن تتضمن المقايسات التي تم التحقق من صحتها بالكامل $(Fully\ validated\ assays)$ بيانات تفصيلية ودقيقة حول مدى استقرار المادة المحللة تحت ظروف تخزين معيارية محددة. وفي حال غياب المعلومات المرجعية الخاصة، يجب الالتزام بالقواعد الآتية:

- **التخزين الأولي** $(Primary\ storage)$**:** يجب تخزين العينات البيولوجية المستحصلة عند درجات حرارة تتراوح بين $8^{\circ}\ C - 2$قبل البدء الفعلي في التحليل.
- **الاحتفاظ بالعينات المتبقية:** من الناحية المثالية، يجب حفظ أي عينة بيولوجية متبقية عقب إتمام التحليل عند درجات حرارة $8^{\circ}\ C - 2$لمدة تتراوح بين $4 - 3$أسابيع، تحسباً لأي متطلبات تستدعي إجراء تحليلات إضافية.
- **الاعتبارات القانونية** $(Legal\ considerations)$**:** نظراً للتبعات الطبية القانونية الخطيرة (مثل حالات التسمم الغامضة أو الوفيات قيد التحقيق)، يتعين الاحتفاظ بالعينات المتبقية (ويُفضل تجميدها عند $-20^{\circ}\ C$) لحين اكتمال التحقيقات القضائية في الحادثة تماماً.

المواد غير المستقرة والاحتياطات الخاصة

تتعرض بعض المركبات الكيميائية للتحلل السريع والذاتي داخل العينات البيولوجية بمجرد تعرضها لدرجة حرارة الغرفة، ومن أبرزها: **الكلونازيبام** $(Clonazepam)$, **الكوكايين** $(Cocaine)$, **النيفيديبين** $(Nifedipine)$, **النيترازيبام** $(Nitrazepam)$, الأدوية المحتوية على مجموعة الثيول $(Thiol - containing\ drugs)$, والعديد من مركبات الفينوثيازينات $(Phenothiazines)$ ونواتج أيضها.

- **تأثير الضوء** $(Light\ effect)$**:** إن التعرض المباشر لأشعة الشمس قد يتسبب في فقدان ما يصل إلى 99%من مركب الكلونازيبام الموجود في المصل خلال ساعة واحدة فقط في درجة حرارة الغرفة.
- **إجراء وقائي بسيط:** تُعد تغطية الجزء الخارجي لأنبوب العينة بورق الألومنيوم (القصدير - $Aluminium\ foil$) تدبيراً بسيطاً وفعالاً للغاية لمنع هذا التلف الضوئي.
- **إعادة التحلل** $(Re - hydrolysis)$**:** بعض النواتج الأيضية مثل **الأسيل جلوكورونيد** $(-N - Glucuronides)$ تتسم بعدم الاستقرار، وعند تحللها قد يعاد تشكيل المركب الأصلي $(Parent\ compound)$ مجدداً، مما يمنح قراءات مضللة حول التركيز الفعلي للمادة الأصلية في العينة.

الجدول (8): بعض الأدوية، ونواتج الأيض، والسموم غير المستقرة في الدم الكامل أو البلازما

Table 8: Unstable Drugs, Metabolites, and Toxins in Whole Blood or Plasma

المركبات المتطايرة$(Volatiles)$	**المركبات غير المتطايرة**$(Non - volatiles)$
وقود الهباء الجوي ,$(Aerosol\ propellants)$ غازات التخدير، أول أكسيد الكربون ,(CO) الإيثانول، إيثكلورفينول، سيانيد الهيدروجين، الزئبق، الميثانول، النيكوتين، غازات الأعصاب الفوسفورية العضوية ,(OP) المذيبات العضوية، البارالدهيد، والنتريت المتطاير (مثل نتريت الأميل).	•**نواتج الأيض :**أسيل جلوكورونيد، أميوداورون، بوبروبيون، إسترات الكربامات (فيزوستيغمين، بيريدوستيغمين)، سيكلوسبورين أ [أ]، أيون السيانيد،-1,4 ديهيدروبيريدين (نيفيديبين). •**الإسترات والمشتقات الحساسة :**الأسبرين، بنزوكائين، كوكايين، ديلتيازيم، هيروين، ميثيل فينيديت، ببتيد سي للبروأنسولين، مركب LSD، مركبات نيتروبنزوديازيبين (كلونازيبام، لوبرزولام، نيترازيبام)، أولانزابين، نواتج الأيض ,$(S - oxide)$ الباراسيتامول (أسيتامينوفين)، البيروكسيدات والعوامل المؤكسدة القوية، الفينيلزين، الفينوثيازينات [ب]، ريفامبيسين، سيروليموس أ [أ], تاكروليموس أ [أ], ثاليدومايد، الأدوية المحتوية على الثيول (كابتوبريل)، ثيوبنتال، وزوبيكلون.

- [أ] تعيد التوزيع بانتظام بين البلازما وخلايا الدم الحمراء عند الاستقرار – لذا يُشترط حتماً استخدام الدم الكامل.
- [ب] سيما تلك التي تخلو من بديل يسحب الإلكترونات عند الموضع 2$(2 - position)$.

استقرار العينات وإضافة المواد المثبطة (Analyte Stability and Inhibitors)

كما جرى بيانه، يُضاف **فلوريد الصوديوم الصلب** $(2\%\ w/v)$ لتثبيط النشاط الميكروبي والإنزيمات الهاضمة $(Glycolytic/enzymatic\ inhibition)$. ومع ذلك، تستوجب بعض المركبات الكيميائية الخاصة بروتوكولات حماية متقدمة:

- **الإسترات $(Esters)$:** مثل الكوكايين والفيزوستيغمين، حيث تتحلل بسرعة فائقة بواسطة إنزيمات **"الإستيراز"** $(Esterases)$ المتواجدة في البلازما. ولقياسها بدقة، يجب سحب الدم في أنابيب مجهزة بـ **فائض من النيواستيغمين** $(Neostigmine)$ لتثبيط هذه الإنزيمات بصورة تامة.
- **الأكسدة والاختزال $(Redox\ stability)$:**
  - المركبات الدوائية مثل **الأولانزابين** $(Olanzapine)$ و4-هيدروكسي بروبرانولول تتأكسد بكل سهولة، لذا يجب حفظها وإستقرارها بإضافة عامل مختزل مثل **الأسكوربات** أو **ميتابيسلفيت الصوديوم**.
  - *تنبيه معملي:* قد تؤدي إضافة العوامل المختزلة (في حالة الأولانزابين مثلاً) إلى عكس العملية وإرجاع نواتج الأيض $(N-oxide)$ إلى المركب الأصلي، مما يشوه القيمة الحقيقية للتركيز الفعلي.
- **التجميد العميق $(Deep\ freezing)$:** يُوصى بالتخزين الدائم عند درجة حرارة -20° C أو أقل عند تعذر إجراء التحليل بشكل فوري، مع مراعاة أن التجميد قد يقلل نواتج الأكسدة $(N-\text{ and } S-oxides)$ ويعيدها لأشكالها الأصلية.

الإطار (4): إرشادات تخزين العينات في المجمد $(Freezer\ Storage\ Guidelines)$

- يُحظر تماماً تجميد الدم الكامل إذا كان الغرض المطلوب هو تحليل البلازما أو المصل حصراً (نظراً لأن التجميد يحدث تحللًا شاملاً لكرات الدم الحمراء - $Lysis$).
- التأكد التام من أن الملصقات والبيانات التعريفية مقاومة للماء والترطيب.
- إغلاق أنابيب العينات بإحكام؛ مع ملئها جيداً وتجنب الملء المفرط (خصوصاً الزجاجية منها) لتلافي خطر الانفجار والكسر نتيجة تمدد السوائل عند التجمد.
- توثيق محتويات المجمد المعملي ومراقبة درجات الحرارة باستمرار بواسطة مسجلات البيانات التلقائية $(Data\ loggers)$.
- تزويد المجمد بنظام إنذار مبكر وموثوق للتحذير الفوري عند حدوث أي عطل تقني أو ارتفاع مفاجئ في درجات الحرارة.

التداخلات التحليلية الشائعة (Common Interferences)

يجب على فريق العمل المعملي التحلي بأعلى درجات الحذر تجاه المواد التي قد تظهر طوال مسار التحليل دون أن تكون سموماً أصلية متواجدة بجسم المريض:

1. **الملدنات $(Plasticizers)$ والملوثات البلاستيكية:**
   - تتسرب مركبات **الفثالات** $(Phthalates)$ من أكياس نقل الدم، أنابيب القسطرة، وسدادات الأنابيب البلاستيكية لتستقر داخل العينات.
   - قد تحتوى أنابيب الـ (PVC) على نسبة تصل إلى 40%من مركب $(di-2-ethylhexylphthalate)$، وقد تبلغ تراكيزه في البلازما نحو 0.5 g/L عقب مرور 14يوماً من التخزين داخل الأكياس البلاستيكية.
   - تبرز هذه الملوّثات بوضوح وثبات عند الاعتماد على تقنية كروماتوغرافيا السوائل عالية الأداء $(HPLC)$ (عند قياس الطول الموجي 254 nm أو أقل).

2. **نواتج التعفن والتحلل (*Putrefactive bases*):**
   - في عينات ما بعد الوفاة، قد تتكون قواعد أمينية ناتجة عن التحلل العضوي مثل الفينيل إيثيل أمين والإندول، والتي تتداخل مع تحليلات الأمفيتامينات والمحفزات الأخرى.
3. **مصادر غذائية ودوائية غير متوقعة:**
   - قد تظهر بعض المواد المخبرية نتيجة تناول أغذية شائعة أو أدوية تُصرف دون وصفة طبية (*OTC*):
     - **الكينين:** قد يكون مصدره الأساسي مشروب "التونيك" (*Tonic water*).
     - **الكافيين:** مستمد من الشاي، القهوة، أو المشروبات الغازية.
     - **المورفين:** قد يتواجد بتركيزات محددة في بعض مستحضرات مضادات الإسهال.
     - **الليدوكائين:** يُستعمل كـ "جل" مزلق موضعي أثناء القسطرة أو تنظير القصبات، ويمكن امتصاصه ووصوله للبلازما بتركيزات قابلة للقياس والتقدير.
4. **الإجراءات الطبية والمواد المضافة:**
   - **المهدئات والمرخيات العضلية:** (مثل البيثيدين، الأتراكوريوم، والفيكورونيوم) قد تتواجد في عينات المرضى الخاضعين للتنفس الاصطناعي وحدات العناية المركزة أو الفحوصات التشخيصية المتقدمة.
   - **المواد الحاملة والحافظة:** مثل البروبيلين جليكول المستخدم كمادة حاملة في محاليل الحقن الوريدي، وحمض البنزويك المستعمل كمادة حافظة في الأغذية والأدوية.
   - **المواد المضافة لأنابيب السحب:** قد تضم أنابيب جمع الدم الحديثة مواد خافضة للتوتر السطحي (*Surfactants*) تتداخل بشكل سلبي مع المقايسات المناعية (*Immunoassays*).

المراجع العلمية References

Aps, J.K. and Martens, L.C. (2005) Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. Forensic Sci Int, 150, 119–31.

Badcock, N.R. and Davies, A. (1990) Assay of itraconazole in nail clippings by reversed phase, high performance liquid chromatography. Ann Clin Biochem, 27, 506–8.

Berk, S.I., Litwin, A.H., Du, Y., Cruikshank, G., Gourevitch, M.N. and Arnsten, J.H. (2006) False reduction in serum methadone concentrations by BD Vacutainer serum separator tubes (SSTTM). Clin Chem, 52, 1972–4.

Beunk, J., Lambert, M. and Mets, T. (2006) The purple urine bag syndrome. Age Ageing, 35, 542.

Bush, V., Blennerhasset, J., Wells, A. and Dasgupta, A. (2001) Stability of therapeutic drugs in serum collected in vacutainer separator tubes containing a new gel (SST II). Ther Drug Monit, 23, 259–62.

Campobasso, C.P., Gherardi, M., Caligara, M., Sironi, L. and Introna, F. (2004) Drug analysis in blowfly larvae and in human tissues: a comparative study. Int J Legal Med, 118, 210–4.

Croes, K., McCarthy, P.T. and Flanagan, R.J. (1994) Simple and rapid HPLC of quinine, hydroxychloroquine, chloroquine, and desethylchloroquine in serum, whole blood, and filter paper-adsorbed dry blood. J Anal Toxicol, 18, 255–60.

Dabbs, J.M. (1991) Salivary testosterone measurements: collecting, storing, and mailing saliva samples. Physiol Behav, 49, 815–7.

Day, R.O., McLachlan, A.J., Graham, G.G. and Williams, K.M. (1999) Pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in synovial fluid. Clin Pharmacokinet, 36, 191–210.

Dine, T., Luyckx, M., Cazin, M., Brunet, C., Cazin, J.C. and Goudaliez, F. (1991) Rapid determination by high performance liquid chromatography of di-2-ethylhexyl phthalate in plasma stored in plastic bags. Biomed Chromatogr, 5, 94–7.

Drummer, O.H. and Gerostamoulos, J. (2002) Postmortem drug analysis: analytical and toxicological aspects. Ther Drug Monit, 24, 199–209.

Flanagan, R.J., Connally, G. and Evans, J.M. (2005) Analytical toxicology: guidelines for sample collection postmortem. Toxicol Rev, 24, 63–71.

Forrest, A.R.W. (1993) Obtaining samples at postmortem examination for toxicological and biochemical analysis. J Clin Pathol, 46, 292–6.

Hammond, M.D. (1981) Detection of drugs in blood stains. Anal Proc, 18, 299–303.

Harrison, G.R., Critchley, A.D., Mayhew, C.A. and Thompson, J.M. (2003) Real-time breath monitoring of propofol and its volatile metabolites during surgery using a novel mass spectrometric technique: a feasibility study. Br J Anaesth, 91, 797–9.

Karppi, J., Akerman, K.K. and Parviainen, M. (2000) Suitability of collection tubes with separator gels for collecting and storing blood samples for therapeutic drug monitoring (TDM). Clin Chem Lab Med, 38, 313–20.

Kintz, P. (2004) Value of hair analysis in postmortem toxicology. Forensic Sci Int, 142, 127–34.

Kintz, P., Cirimele, V., Jamey, C. and Ludes, B. (2003) Testing for GHB in hair by GC/MS/MS after a single exposure. Application to document sexual assault. J Forensic Sci, 48, 195–200.

Kintz, P., Cirimele, V. and Ludes, B. (2000) Detection of cannabis in oral fluid (saliva) and forehead wipes (sweat) from impaired drivers. J Anal Toxicol, 24, 557–61.

Parsons, M.A., Start, R.D. and Forrest, A.R. (2003) Concurrent vitreous disease may produce abnormal vitreous humour biochemistry and toxicology. J Clin Pathol, 56, 720.

Pfleger, K., Maurer, H.H. and Weber, A. (eds) (2007) Mass Spectral and GC Data of Drugs, Pollutants, Pesticides and their Metabolites, 3rd edn, Wiley-VCH, Weinheim.

Pien, K., Laloup, M., Pipeleers-Marichal, M., Grootaert, P., De Boeck, G., Samyn, N., Boonen, T., Vits, K. and Wood, M. (2004) Toxicological data and growth characteristics of single postfeeding larvae and puparia of Calliphora vicina (Diptera: Calliphoridae) obtained from a controlled nordiazepam study. Int J Legal Med, 118, 190–3.

Pounder, D.J. (1991) Forensic entomo-toxicology. J Forensic Sci Soc, 31, 469–72.

Pounder, D.J., Adams, E., Fuke, C. and Langford, A.M. (1996b) Site to site variability of postmortem drug concentrations in liver and lung. J Forensic Sci, 41, 927–32.

Pounder, D.J., Fuke, C., Cox, D.E., Smith, D. and Kuroda, N. (1996a) Postmortem diffusion of drugs from gastric residue: an experimental study. Am J Forensic Med Pathol, 17, 1–7.

Ramsey, J.D. (2004) Solid dosage form identification, in Clarke's Analysis of Drugs and Poisons (eds A.C. Moffat, D. Osselton and B. Widdop), 3rd edn, Pharmaceutical Press, London, pp. 249–258.

Rowe, D.J., Watson, I.D., Williams, J. and Berry, D.J. (1988) The clinical use and measurement of theophylline. Ann Clin Biochem, 25, 4–26.

Sadler, D.W., Fuke, C., Court, F. and Pounder, D.J. (1995) Drug accumulation and elimination in Calliphora vicina larvae. Forensic Sci Int, 71, 191–7.

Schramm, W., Annesley, T.M., Siegel, G.J., Sackellares, J.C. and Smith, R.H. (1991) Measurement of phenytoin and carbamazepine in an ultrafiltrate of saliva. Ther Drug Monit, 13, 452–60.

Schramm, W., Pomerleau, O.F., Pomerleau, C.S. and Grates, H.E. (1992b) Cotinine in an ultrafiltrate of saliva. Prev Med, 21, 63–73.

Schramm, W., Smith, R.H., Craig, P.A. and Kidwell, D.A. (1992a) Drugs of abuse in saliva: a review. J Anal Toxicol, 16, 1–9.

Schramm, W., Smith, R.H., Craig, P.A., Paek, S.H. and Kuo, H.H. (1990) Determination of free progesterone in an ultrafiltrate of saliva collected in situ. Clin Chem, 36, 1488–93.

Shen, D.D., Artru, A.A. and Adkison, K.K. (2004) Principles and applicability of CSF sampling for the assessment of CNS drug delivery and pharmacodynamics. Adv Drug Deliv Rev, 56, 1825–57.

Skopp, G. (2004) Preanalytic aspects in postmortem toxicology. Forensic Sci Int, 142, 75–100.

Spiehler, V. (2004) Drugs in saliva, in Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 3rd edn (eds A.C. Moffat, D. Osselton and B. Widdop), Pharmaceutical Press, London, pp. 109–123.

Sporkert, F. and Pragst, F. (2000) Determination of lidocaine in hair of drug fatalities by headspace solid- phase microextraction. J Anal Toxicol, 24, 316–22.

Stankovic, A.K. and Parmar, G. (2006) Assay interferences from blood collection tubes: a cautionary note. Clin Chem, 52, 1627–8.

Thieme, T., Fitchen, J., Bartos, F., Salinsky, M., Green, T. and Holden, W. (1993) Therapeutic drug monitoring using oral samples collected with the OraSure device. Ann N Y Acad Sci, 694, 337–9.

Tracqui, A., Keyser-Tracqui, C., Kintz, P. and Ludes, B. (2004) Entomotoxicology for the forensic toxicol- ogist: much ado about nothing? Int J Legal Med, 118, 194–6.

Vreman, H.J., Wong, R.J., Stevenson, D.K., Smialek, J.E., Fowler, D.R., Li, L., Vigorito, R.D. and Zielke, H.R. (2006) Concentration of carbon monoxide (CO) in postmortem human tissues: effect of environ- mental CO exposure. J Forensic Sci, 51, 1182–90.

Wade, S.E. (1992) Less-invasive measurement of tissue availability of hormones and drugs: diffusion-sink sampling. Clin Chem, 38, 1639–44.

Watterson, J. (2006) Challenges in forensic toxicology of skeletonised human remains. Analyst, 131, 961–5.

Winek, C.L., Morris, E.M. and Wahba, W.W. (1993) The use of bone marrow in the study of postmortem redistribution of nortriptyline. J Anal Toxicol, 17, 93–8.

CHAPTER (3) الفصل الثالث



اختيار العينة، وأخذ العينات، والتخزين، والاستقرار

SAMPLING, STORAGE AND STABILITY

الفصل الثالث

أخذ العينات، والتخزين، والاستقرار

SAMPLING, STORAGE AND STABILITY

اختيار العينة، وأخذ العينات، والتخزين، والاستقرار SAMPLING, STORAGE AND STABILITY

يعد الاختيار المناسب للعينة، وطريقة أخذها، وتخزينها بالشكل الصحيح، خطوات بالغة الأهمية في **علم السموم الشرعي** ($Forensic\ Toxicology$)، ومع ذلك غالباً ما يتم التغاضي عنها أو التقليل من شأنها. ويمكن لهذه العوامل – إلى جانب مدى استقرار المادة المخدرة أو السمية – أن تؤثر بشكل عميق ومباشر على التفسير السريري والقضائي للنتائج ومسار القضايا الجنائية برمتها. وسيتم استعرض ومناقشة المعايير الناظمة لكل منها في الأجزاء التالية. كما يمكن للقارئ العثور على مراجع تخصصية إضافية حول أخذ عينات الأنسجة في فصول أخرى من هذا الكتاب، مع الإشارة إليها تبادلياً داخل النص حيثما استدعى الأمر.

اختيار العينة (Specimen Selection)

يُعد اختيار العينة الملائمة عنصراً حاسماً وحاسماً في أي تحقيق سمومي ناجح؛ إذ تفرض الظروف المحيطة بالملابسات، ومدى توافر العينات، وطبيعة التحقيق، وحتى الاعتبارات القانونية أو التشريعية، ضرورة تحديد العينات المختارة بدقة والهدف التشخيصي من وراءها. ويُمثل **التوقيت** عاملاً جوهرياً في عملية جمع العينات، سيما في الحالات التي تسبق الوفاة ($Antemortem\ cases$)؛ نظراً لأن بعض المواد المخدرة تمتلك أوقات كشف قصيرة جداً، وبالتالي نوافذ كشف زمنية محدودة. ومن أبرز الأمثلة على ذلك: الكشف عن تراكيز مرتفعة لمركب **دلتا-9-تيتراهيدروكانابينول** $(-)-trans-\Delta^9-tetrahydrocannabinol-THC$ في دم سائق مركبة مشتبه بتعاطيه، أو الكشف عن **حمض الهيدروكسي بروبيونيك/البديل المهدئ** $(\gamma-hydroxybutyric\ acid-GHB)$ عقب وقوع حادثة اعتداء جنسي مزعومة جرى فيها استغلال المخدرات ($DFSA$). وفي المقابل، تطرح **عينات ما بعد الوفاة** ($Postmortem\ specimens$) تحديات منهجية معقدة بسبب التغيرات العضوية الناجمة عن **التحلل الذاتي** ($Autolytic$) و**التعفن** ($Putrefactive$). كما يبرز التوقيت كعنصر حاسم في تحقيقات الوفيات؛ إذ تتصاعد صعوبة الحصول على عينات عالية الجودة طردياً كلما امتدت الفترة الزمنية الفاصلة بين ساعة الوفاة ووقت سحب العينة ($Postmortem\ interval$). ويمكن لعوامل بيئية كتحنيط الجثة، أو درجات التحلل المتقدمة، أو عمليات الدفن أن تزيد من تعقيد عملية التفسير والتقدير الكمي إذا ما جرى حفظ الأنسجة، أو في حال كانت العينات متعفنة، أو عندما يصبح **استخراج الجثة** ($Exhumation$) أمراً حتمياً.

ولكي يتمكن خبير السموم من انتقاء العينة (أو منظومة العينات) المناسبة بكفاءة، يتعين أن تتوفر لديه صلاحية الوصول الكامل إلى تاريخ الحالة السريرية، سجلات التشريح وتقارير أخصائي علم الأمراض ($Pathology\ reports$)، وكافة المستندات والوثائق ذات الصلة. وقد أُدرجت أهم الاعتبارات التشخيصية لاختيار العينات في الجدول (1).

الجمع وأخذ العينات (Collection and Sampling)

حاويات العينات (Specimen Containers)

يُشترط بصورة قطعية أن تكون حاوية العينة ملائمة تماماً للاستخدام المقصود وألا تتسبب في أي تأثيرات جانبية سلبية على النتائج التحليلية. ويجب أن يتناسب الحجم الكلي للحاوية مع حجم أو وزن العينة بصورة تقلل **"حيز الرأس"** $(Headspace)$ إلى أدنى حد ممكن وممكن. وترد الكميات المعيارية النموذجية لتجميع العينات المختلفة في الجدول (1).

إن وجود حيز رأس مفرط وخالٍ داخل حاوية العينة قد يرفع بصورة ملحوظة من احتمالية:

- حدوث الفقدان التأكسدي للمادة.
- تطاير المادة التحليلية المستهدفة (مثل الإيثانول وغيره من المركبات ذات نقاط الغليان المنخفضة).
- ظاهرة **التمليح** $(Salting\ out)$, والتي قد تظهر بوضوح في حال وجود مواد حافظة كيميائية.

وتمتلك بعض المواد التحليلية ميلاً طبيعياً للالتصاق بالأسطح البلاستيكية أو الزجاجية بحسب خصائصها الفيزيائية والكيميائية. ومن الممكن لعملية **"سيلنة الأواني الزجاجية"** $(Silanisation)$ أن تُقلص إلى حد بعيد من فاقد الامتزاز $(Adsorptive\ losses)$ للمواد المخدرة المتواجدة بتراكيز ضئيلة للغاية (10 mg/L أو أقل). ورغم أن العديد من المختبرات تفضل الاعتماد على الأواني الزجاجية، إلا أن الحاويات البلاستيكية الاستعمالية (للاستخدام لمرة واحدة) تُوظف روتينياً لمروحة واسعة من أنسجة ما بعد الوفاة وعينات ما قبل الوفاة، وتحديداً عينات البول.

مقارنة بين الزجاج والبلاستيك:

- **الأواني الزجاجية:** تتطلب استخدام حوامل وأرفف $(Racks)$ ملائمة للتخزين والنقل الآمن. ويتمثل عيبها الرئيسي في احتمالية الكسر الحتمي، سيما عند الخضوع لظروف التخزين في درجات حرارة منخفضة جداً. ولتقليص فرص فقدان العينات، تُفضل الحاويات الزجاجية حتماً إذا دار الاشتباه حول وجود مواد تحليلية متطايرة كالمذيبات الصناعية أو غازات التخدير.
- **الحاويات البلاستيكية:** تتسم بارتفاع عرضتها للتداخل الكيميائي بفعل **الملدنات** $(Plasticisers)$ مثل مركبات **الفثالات** $(Phthalates)$ التي قد تتداخل مع مسار التحليل الكروماتوغرافي. غير أن الاعتماد على أنواع بلاستيكية خاملة ونقية مثل **"نالجين"** $(Nalgene)$ يقلل بكفاءة من احتمالية التداخلات الكيميائية، مع وجوب قيام المختبر المعملي بإجراء تقييم شامل لكافة أنواع الحاويات الجديدة قبل إدخالها في الاستخدام الروتين. وفي حال اختيار الحاويات البلاستيكية، يجب التحقق من متانتها في درجات الحرارة المنخفضة؛ إذ يُعد **البوليسترين** $(Polystyrene)$ أكثر عرضة للتشقق والانكسار تحت درجات التجمد مقارنة بأوعية **البولي بروبيلين** $(Polypropylene)$.

تنبيه تقني صارم: يجب تجنب استخدام السدادات المطاطية التقليدية $(Rubber\ septa)$ أو البطانات المصنوعة من المطاط في الحاويات ذات الأغطية اللولبية، والاستعاضة عنها ببطانات خاملة كيميائياً ومصنوعة من مواد مثل **بولي تترافوروإيثيلين** $(Polytetrafluoroethylene - PTFE)$ أو مادة **التيفلون** $(Teflon)$, وذلك لتقليل معدلات التسرب وتلافي امتزاز المادة المخدرة على الأسطح.

وتُجمع عينات دم ما قبل الوفاة $(Antemortem\ blood\ samples)$ بصورة عامة داخل أنابيب زجاجية مفرغة ومعقمة مثل أنابيب **فاكوتاينر** $(Vacutainer)$ أو **فينوجيكت** $(Venoject)$ المخصصة لعلم السموم الشرعي. كما يُعد جمع الدم في أوعية تجميع زجاجية مشابهة ممارسة معملية مثالية عند أخذ عينات دم ما بعد الوفاة؛ إذ تتيح هذه الأنابيب سحب العينة مباشرة

داخل وعاء يحمل مسبقاً الإضافات والمواد الكيميائية اللازمة لتثبيت العينة والحفاظ على سلامة مباينها ($Matrix$). ويُعد **الخلط والتجنيس الصحيح** أمراً حتمياً عند استخدام فلوريد الصوديوم أو غيره من الإضافات لضمان التامة والكاملة لعمليات الذوبان الكيميائي.

الدم (Blood)

يُعد الدم أحد أهم العينات البيولوجية ذات الأهمية القصوى في علم السموم؛ إذ يوفر مزايا فريدة مقارنة بالمصفوفات الأخرى من حيث التنوع الواسع في المنهجيات التحليلية المتاحة، والكم الهائل من البيانات المرجعية المنشورة لتركيزات الأدوية في حالات ما قبل الوفاة وما بعدها، فضلاً عن القيمة التفسيرية العالية لهذه المصفوفة من المنظور الصيدلاني والإكلينيكي. ومع ذلك، تختلف عينات دم ما قبل الوفاة اختلافاً جذرياً عن عينات ما بعد الوفاة، كما أن موقع سحب الدم بعد الوفاة (سواء كان مركزياً أو محيطياً) يكتسي أهمية بالغة وحاسمة. إن التحديد الدقيق لتركيزات الدواء الأصلي ونواتج الأيض ونسبهما المئوية قد يوفر أيضاً معلومات استقصائية قيمة تتعلق بتحديد ما إذا كان الاستخدام حاداً أم مزمناً. وتلخيصاً لذلك، يُعرض ملخص شامل لأبرز المزايا والعيوب الشائعة للعينات المختلفة في الجدول (1).

الجدول (1): اعتبارات اختيار العينة Table 1: Specimen Selection Considerations

الاعتبار($Consideration$)	الوصف الدلالي($Description$)
Ease of use	سهولة الاستخدام العملي
Ease of specimen collection	سهولة جمع عينة المصفوفة الحيوية
Presence of interferences	وجود التداخلات المعملية والمادية
Matrix effects	تأثيرات مصفوفة العينة($Matrix\ effects$)
Parent drug and/or metabolites	توفر الدواء الأصلي و/أو نواتج الأيض($Metabolites$)
Detection time	نافذة ووقت الكشف($Detection\ time$)
Stability of the drug(s) in the specimen	مدى استقرار الدواء (أو الأدوية) داخل المصفوفة الحيوية للعينة
Putrefaction	مقاومة التعفن والتفسخ($Putrefaction$)
Potential for automated analysis	إمكانية إخضاع العينة للتحليل الآلي($Automated\ analysis$)
Sample volume	حجم العينة المتاح($Sample\ volume$)
Indication of short-term or long-term drug use	دلالة العينة على التعاطي أو الاستخدام قصير الأمد مقابل طويل الأمد
Reference data	وفرة وموثوقية البيانات المرجعية المنشورة
Interpretive value	القيمة التفسيرية والسرعية/القانونية للنتائج

دم ما قبل الوفاة (Antemortem Blood)

يُجمع دم ما قبل الوفاة عادةً عن طريق بزل الوريد ($Venepuncture$), وغالباً ما يُسحب من المنطقة المرفقية ($Antecubital\ region$) للذراع، باستخدام حقنة طبية معقمة أو حاوية مفرغة (مثل أنابيب $Vacutainer$ أو $Venoject$). وقبل إتمام عملية الجمع، يُشترط تنظيف وتطهير موقع الوخز باستخدام مسحة مطهرة، مع **التفضيل القطعي للمسحات الخالية تماماً من الكحول** – مثل مسحات "بيتادين" ($Betadine$ - بوفيدون-يود) – وذلك لتفادي أي تلوث كحولي محتمل قد يتداخل بصورة كارثية مع تحليلات الكحول الإيثيلي الميدانية. ورغم أن أنابيب تفريغ الدم تُصنع عادة من الزجاج، إلا أنه جرى تقييم واعتماد الأنابيب البلاستيكية المختبرية في هذا المجال (Karinen et al., 2010).

دم ما بعد الوفاة (Postmortem Blood)

يختلف دم ما بعد الوفاة المُستحصل عليه أثناء التشريح الجسدي اختلافاً شاسعاً عن دم ما قبل الوفاة المُجمع ببزل الوريد، وذلك من كلا المنظورين النوعي والكمي. فغالباً ما يتسم دم ما بعد الوفاة بكونه أكثر لزوجة، وقد يحوي العديد من التخثرات الدموية الدقيقة أو خلايا الدم المترسبة، كما يمتلك درجة حموضة منخفضة (pH) قد تصل إلى حدود 5.5نتيجة للتحلل البروتيني المستمر، وقد يحتوي على نسبة مائية تتراوح بين $90\% - 60$, فضلاً عن عروضته لدرجات متباينة من **التحلل الدموي** $(Haemolysis)$.

قاعدة معملية صارمة: يجب تحديد موقع جمع عينة الدم بوضوح تام على وعاء العينة في حالات ما بعد الوفاة، ويُحظر تماماً خلط الدم المأخوذ من مصادر تشريحية مختلفة.

الدم المركزي (Central Blood)

من الناحية المثالية والنموذجية، تُمجمع عينات **الدم القلبي** $(Cardiac\ blood)$ عقب فتح الكيس التاموري بدقة، وإزالة غشاء التامور، وسحب الدم حصراً من الغرفة القلبية اليسرى أو اليمنى بعد تجفيف محيطها. إن عملية جمع الدم المركزي عبر إدخال إبرة عبر جدار الصدر والتعرف عليها بـ **"الوخز الأعمى"** $(Blind\ stick)$ تُعد ممارسة شائعة ومتبعة ميدانياً، غير أنه لا يُنصح بها نهائياً. ورغم أن الدم المركزي المُجمع بتلك الطريقة قد يصنف معملياً على أنه "دم قلب"، إلا أنه غالباً ما يتعرض للتلوث بسائل التامور، أو السائل المتواجد في التجويف الجنبي $(Pleural\ cavity)$, أو الدم المرتشح والمصرف من الوريد أو الشريان الرئوي أو الوريد الأجوف السفلي (Jones, 2007). ونتيجة لذلك، يُعتبر الدم القلبي المُستخرج بهذه الآلية عينة **غير متجانسة** $(Non - homogeneous)$.

ظاهرة إعادة التوزيع بعد الوفاة $(Postmortem\ Redistribution)$:

قد يحتضن الدم المركزي تراكيز مرتفعة بشكل مضلل من الأدوية نتيجة ظاهرة **إعادة التوزيع بعد الوفاة** $(Postmortem\ Redistribution)$ أو التلوث الانتشاري القادم من أقسام وأعضاء الجسم الأخرى (Prouty and Anderson, 1990; Yarema and Becker, 2005)، وتشتد هذه الظاهرة حدةً عقب التعرض لحوادث الإصابات الرضّية العنيفة $(Blunt\ force\ trauma)$. وعقب الوفاة مباشرة، يحدث إطلاق سلبي تدريجي للأدوية المتراكمة في مستودعات الجسم الحشوية مثل الجهاز الهضمي، الكبد، الرئتين، وعضلة القلب نفسها؛ وفي مرحلة لاحق، تساهم عمليات التحلل الذاتي الخلوي $(Autolysis)$ والتعفن $(Putrefaction)$ في تسريع وتيرة إعادة التوزيع (Pelissier-Alicot et al., 2003).

العوامل المؤثرة في إعادة التوزيع:

تتداخل خصائص وطبيعة الدواء الكيميائية بصورة مباشرة؛ مثل:

- حجم التوزيع $(Volume\ of\ distribution - V_d)$.
- القدرة على الذوبان في الدهون $(Lipophilicity)$.
- درجة الارتباط ببروتينات البلازما $(Protein\ binding)$.
- ثابت التفكك الحمضي (pK_a).

وتلعب هذه المعلمات دوراً أساسياً في تحديد الآليات المعتمدة على الموقع، والوقت، والمسؤولة بمجملها عن ظاهرة إعادة التوزيع بعد الوفاة. وتُبدي الأدوية ذات **أحجام التوزيع الكبيرة** والخصائص **القاعدية** $(Basic\ character)$ عرضة واستجابة خاصة وخاصة جداً لإعادة التوزيع بعد الوفاة، وعليه يجب تفسير قيم تراكيزها المرصودة في الدم القلبي بحذر شديد وبما يتوافق مع تلك المعطيات. إن إعادة التوزيع بعد الوفاة قادرة على إحداث تفاوت هائل في تراكيز الدواء بين الدم المركزي والدم المحيطي بمقدار 10**أضعاف أو أكثر**. وتجدر الإشارة إلى أن هذه الظاهرة ترتبط ارتباطاً وثيقاً بالوقت والتركيز معاً، مما يجعل التنبؤ بمقدارها أمراً بالغ الصعوبة. وعلى الرغم من أن الدم القلبي قد يكون عينة نافعة للغاية لغايات المسح والتحري الأولي $(Screening)$, إلا أن العلاقة الارتباطية بين تراكيز الأدوية المقاسة في الدم القلبي وتراكيزها الفعلية في دم ما قبل الوفاة تظل علاقة معقدة وملتبسة للغاية؛ ولهذا السبب، يحذر العديد من علماء السموم الشرعيين بصرامة من الاعتماد على الدم المركزي في الأغراض الكمية والتقديرية التفسيرية.

الدم المحيطي (Peripheral Blood)

يُعد **دم الفخذ** $(Femoral\ blood)$ أفضل عينة إطلاقاً للاستخدام في فحوصات واختبارات ما بعد الوفاة، ويجب الحرص على أخذ العينات منه كلما أمكن ذلك. إن جمع الدم من **وريد مربوط** $(Ligated\ vein)$ يُعد الخيار الأقل عرضة للتلوث بمصادر الدم الأخرى أو للناتج عن التحرر والهجرة الثانوية للدواء من الأنسجة والأعضاء المحيطة.

وممع ذلك، فإن ما يُعرف بـ **"وخز الفخذ"** $(Femoral\ stick)$ يتضمن عادةً جمع دم الفخذ من وريد فخذي غير مربوط في منطقة الأربية $(Groin\ area)$. ويتعين الاكتفاء بجمع حجم صغير فقط من الدم لتلافي ظاهرة **"حلب" الوريد** $(Milking)$ وسحب الدم بطريق الخطأ من مصادر وعائية أخرى؛ وغالباً ما يمكن جمع حجم يتراوح بين $10 - 20$ ml من دم الفخذ.

إن الإفراط والتوسع في سحب الدم من الوريد الفخذي سيؤدي حتماً إلى سحب الدم بطريق غير مباشر من الوريد الأجوف السفلي، وبالتالي من الكبد، ومن الوريد الحرقفي الأكبر. وعلى الرغم من تفضيل أخذ العينات من وريد مربوط عموماً، إلا أن الدراسات المقارنة لتركيزات الأدوية في الأوعية الفخذية المربوطة وغير المربوطة أظهرت توافقاً معملياً ممتازاً لثمانية أدوية رئيسية؛ متضمنة مثبطات استرداد السيروتونين الانتقائية $(SSRIs)$، البنزوديازيبينات، مضادات الهيستامين، وأحد العقاقير الأفيونية (Hargrove and McCutcheon, 2008). وإذا تعذر تماماً توافر دم الفخذ، فقد يمثل الدم **تحت الترقوة** $(Subclavian)$ أو **الحرقفي** $(Iliac)$ بديلًا معملياً مناسباً.

الجدول (2): الكميات النموذجية لجمع العينات Table 2: Typical Specimen Collection Quantities

عينة ما بعد الوفاة $(Postmortem\ sample)$	**الكمية المعيارية** $(Quantity)$	**عينة ما قبل الوفاة** $(Antemortem\ sample)$	**الكمية المعيارية** $(Quantity)$
دم القلب$(Cardiac\ blood)$	25 ml	**الدم**$(Blood)$	$10 - 20$ ml
الدم المحيطي $(Peripheral\ blood)$	$10 - 20$ ml	**البول**$(Urine)$	$25 - 100$ ml
البول$(Urine)$	الكمية الكاملة المتاحة	**السائل السلوي** $(Amniotic\ fluid)$	$5 - 30$ ml
العصارة الصفراوية$(Bile)$	الكمية الكاملة	**حليب الثدي**$(Breast\ milk)$	$10 - 20$ ml
الخلط الزجاجي $(Vitreous\ humour)$	الكمية الكاملة	**العقي**$(Meconium)$	الكمية الكاملة
السائل الدماغي النخاعي(CSF)	الكمية الكاملة	**شعر الرأس**$(Hair)$	خصلة بحجم قلم (100-200 شعرة)

عينة ما بعد الوفاة (*Postmortem sample*)	الكمية المعيارية (*Quantity*)	عينة ما قبل الوفاة (*Antemortem sample*)	الكمية المعيارية (*Quantity*)
محتويات المعدة (*Stomach contents*)	الكمية الكاملة	**اللعاب**(*Saliva*)	$1-5$ ml
الكبد(*Liver*)	الكمية الكاملة	**العرق**(*Sweat*)	ميكرولترات (-عرق غير محسوس؛ أو -1 5 ml عرق محسوس
الكلى(*Kidneys*)	50 g لكل كلية		
الطحال(*Spleen*)	50 g		
الدماغ(*Brain*)	50 g		
الرئة(*Lungs*)	50 g		
الشعر(*Hair*)	خصلة بحجم قلم 50 mg أو نحو $150-200$ شعرة		

المصادر المرجعية: Dinis-Oliveira et al., 2010; Hepler and Isenschmid, 2007; Kerrigan, 2002; Kidwell et al., 1998; Skopp, 2004; SOFT/AAFS, 2006).

جلطات الدم (*Blood Clots*)

عقب التعرض لحوادث السقوط أو الصدمات الرضّية القوية في الرأس (*Blunt force trauma*), قد يظل الضحية على قيد الحياة مع بقاء الدورة الدموية تعمل بصورة سليمة لعدة ساعات متتالية. ونظراً لانخفاض التروية الدموية في المنطقة المخية المتضررة، فقد تتأثر تراكيز الأدوية أو الكحول داخل **جلطات الدم** المتكونة (مثل الجلطات تحت الجافية - *Subdural*, تحت العنكبوتية - *Subarachnoid*, و/أو فوق الجافية - *Epidural*) نتيجة لعدم اكتمال عمليات الاستقلاب والأيض فيها.

وقد اقترح بعض الباحثين أن الجلطات الدموية داخل الجمجمة قد تلعب دور **"الكبسولات الزمنية"** السابقة للوفاة؛ لأنها قادرة على عكس تراكيز الأدوية التي كانت سائدة قبل الوفاة بعدة ساعات، وهي ذات الفترة الزمنية التي يُرجح أن الإصابة قد وقعت خلالها.

الجدول (3): مزايا وعيوب العينات البيولوجية في حالات ما قبل الوفاة وما بعدها

Table 3: Advantages and Disadvantages of Antemortem and Postmortem Biological Specimens

العينة	المزايا	العيوب
السائل السلوي (Amniotic fluid)	تحديد التعرض للأدوية قبل الولادة؛ يصعب تزويره؛ يتطلب تحضيراً بسيطاً للعينة؛ تداخلات قليلة نسبياً.	جمع العينة جراحي (تداخلي)؛ خطر حدوث مضاعفات؛ بيانات مرجعية محدودة؛ يتطلب جمعها بواسطة طاقم طبي.
العصارة الصفراوية (Bile)	سهولة الكشف عن أدوية معينة (تراكمية)؛ مفيدة بشكل خاص للأدوية المقترنة (conjugated drugs).	مصفوفة معقدة؛ تداخلات بسبب الأملاح الصفراوية والدهون؛ تتطلب تحضيراً/معالجة مسبقة للعينة؛ بيانات مرجعية محدودة.
الدم -قبل الوفاة - AM)	مصفوفة مقبولة على نطاق واسع؛ تحدد تعاطي المخدرات الأخير (ساعات إلى أيام)؛ مرتبطة بالتأثير الصيدلاني؛ يصعب تزويره؛ بيانات مرجعية واسعة.	جمع العينة جراحي (تداخلي)؛ يتطلب جمعها بواسطة طاقم طبي؛ نافذة كشف أقصر.
الدم بعد الوفاة - PM	)انظر أعلاه للـ(AM ؛ بيانات مرجعية متاحة على نطاق واسع؛ نسب تركيز الدواء بين الدم المركزي/المحيطي معروفة لبعض الأدوية؛ الدم القلبي يتوفر عادة بكميات وافرة.	يتطلب حذراً في التفسير؛ عرضة لإعادة التوزيع بعد الوفاة (المركزي)؛ عرضة للمصنوعات (artefacts) والتداخلات بعد الوفاة؛ عرضة للتلوث (مثل الصدمات)؛ جودة العينة تعتمد بشدة على بروتوكول الجمع؛ حجم الدم المحيطي محدود.

العينة	المزايا	العيوب
الدماغ(Brain)	مفيد بشكل خاص للأدوية المحبة للدهون، والمواد المتطايرة، والأدوية ذات التأثير المركزي.	مصفوفة غير متجانسة؛ تختلف تركيزات الدواء حسب المنطقة؛ مصفوفة معقدة؛ تتطلب تحضيراً/معالجة مسبقة؛ بيانات مرجعية محدودة.
حليب الثدي (Breast milk)	تحديد التعرض للأدوية عند الوليد؛ يصعب تزويره.	الخصوصية؛ جمع تداخلي؛ بيانات مرجعية محدودة؛ تداخلات بسبب المحتوى الدهني العالي؛ محتوى الدواء يتغير مع تكوين الحليب؛ مصفوفة متغيرة.
السائل النخاعي	يحدد تعاطي المخدرات الأخير (ساعات إلى أيام)؛ يتطلب تحضيراً بسيطاً؛ تداخلات قليلة.	جمع تداخلي؛ بيانات مرجعية محدودة.
محتويات المعدة (Gastric contents)	تحديد التناول الحاد/تأخر الامتصاص؛ إمكانية التعرف على بقايا الأقراص؛ مفيد جداً للأدوية/السموم التي تؤخذ عن طريق الفم.	مصفوفة غير متجانسة؛ مصفوفة معقدة؛ تتطلب تحضيراً/معالجة مسبقة؛ تتطلب جمع العينة بالكامل للتفسير.
الشعر(Hair)	تاريخ تعاطي المخدرات (أشهر)؛ متوفر بسهولة؛ سهل الجمع؛ احتمال تلاعب المتبرع منخفض؛ مفيد للمواد التحليلية الدوائية وغير الدوائية (مثل المعادن).	تقنية جديدة؛ لا يكشف تعاطي المخدرات الأخير؛ التلوث البيئي؛ احتمال التحيز العرقي؛ بيانات مرجعية محدودة.
الكلى(Kidney)	مفيد بشكل خاص للمواد غير الدوائية (مثل المعادن).	مصفوفة معقدة؛ تتطلب تحضيراً/معالجة مسبقة.
الكبد(Liver)	سهولة الكشف عن أدوية معينة (تراكمية)؛ قيمة تفسيرية لبعض الأدوية؛ بيانات مرجعية متاحة.	مصفوفة معقدة؛ تتطلب تحضيراً/معالجة مسبقة.
الرئة(Lung)	مهمة بشكل خاص لتحليل المواد المتطايرة.	مصفوفة معقدة؛ تتطلب تحضيراً/معالجة مسبقة.
العقي (Meconium)	نافذة طويلة الأمد للتعرض للأدوية؛ جمع العينة غير تداخلي (غير جراحي).	مصفوفة غير متجانسة؛ مصفوفة معقدة (شمعية)؛ تداخلات؛ تتطلب تحضيراً/معالجة مسبقة؛ بيانات مرجعية محدودة.
الأظافر(Nails)	سهولة الجمع؛ تاريخ تعاطي الأدوية (أشهر)؛ مفيدة بشكل خاص للمعادن.	بيانات محدودة؛ تقنية جديدة؛ غير مقبولة على نطاق واسع بعد؛ لا تكشف تعاطي المخدرات الأخير؛ التلوث البيئي.
اللعاب(Saliva)	متوفر بسهولة، سهل الجمع؛ وجود الدواء الأصلي؛ يرتبط بتركيز الدواء الحر في البلازما؛ تحضير بسيط للعينة؛ العديد من الأدوية قابلة للتحديد؛ يشير إلى تعاطي حديث.	تقنية جديدة؛ وقت كشف قصير للأدوية؛ حجم عينة صغير (1–5 مل)؛ احتمال حدوث تلوث فموي؛ طريقة الجمع تؤثر على درجة حموضة العينة ومحتواها من الدواء.
الطحال(Spleen)	مفيد بشكل خاص لتحاليل معينة في حال عدم توفر الدم.	مصفوفة معقدة؛ تتطلب تحضيراً/معالجة مسبقة؛ بيانات محدودة لمعظم المواد التحليلية.
العرق(Sweat)	تاريخ تعاطي الأدوية (أسابيع)؛ مقياس تراكمي لتعاطي المخدرات؛ وجود الدواء الأصلي؛ جمع غير تداخلي؛ يتطلب اختبارات أقل تكراراً.	تقنية حديثة؛ احتمال التلوث البيئي؛ تباين كبير بين الأفراد؛ يتطلب جهاز جمع خاص؛ تهيج الجلد وعدم الارتياح؛ حجم عينة صغير.
البول(Urine)	يصعب تزويره؛ مصفوفة مقبولة على نطاق واسع؛ سهل الجمع؛ توفر وفير؛ قابل للتحليل الآلي؛ نافذة كشف أطول من الدم (أيام–أسابيع).	لا يمكن تقديم تفسير صيدلاني؛ مصفوفة غير متجانسة (عرق/زهم)؛ احتمال تلاعب المتبرع؛ الحد الأدنى من الدواء الأصلي؛ غير مفيد للتحليل الكمي؛ لا يرتبط بالضعف أو التأثير الصيدلاني؛ بيانات محدودة مقارنة بالدم.
الخلط الزجاجي (Vitreous humour)	يحدد تعاطي المخدرات الأخير (ساعات–أيام)؛ يرتبط بالتأثير الصيدلاني؛ مقاوم للتعفن؛ قيمة تفسيرية لتحقيقات الكحول؛ تحضير بسيط للعينة؛ تداخلات قليلة نسبياً؛ مفيد لكيمياء ما بعد الوفاة.	حجم عينة صغير.

الخلط الزجاجي (Vitreous Humour)

يمكن أن يسفر الشفط المباشر للخلط الزجاجي (سائل العين) باستخدام حقنة تحت الجلد عن الحصول على حجم يتراوح بين 2 – 3 ml من السائل لكل عين على حدة. ويجب إدخال الإبرة بعناية في مركز مقلة العين والقيام بعملية الشفط بضغط خفيف ومضبوط. ويُبدي النصيحة العامة بوجوب الحفظ المسبق باستخدام فلوريد الصوديوم.

ونظراً لأن مقلة العين تقع داخل البيئة التشريحية الواقية للحجاج $(Orbit)$, وتتواجد جوهرياً خارج التجويف الجسمي العام، فهي بعيدة مسافة معتبرة عن الأنسجة العضوية الأخرى؛ لذا يُعد سائل الخلط الزجاجي عينة نافعة بشكل استثنائي بفضل **عزلها التشريحي الطبيعي**، الأمر الذي يمنحها مقاومة ملحوظة وحاسمة تجاه الغزو الميكروبي وعمليات التحلل، فضلاً عن كونها بعيدة عن الأعضاء الحشوية المركزية، وبالتالي تكون أقل عرضة لظواهر **"إعادة التوزيع بعد الوفاة"** $(Postmortem\ redistribution)$.

الأهمية الإكلينيكية والشرعية:

- يكتسي الخلط الزجاجي أهمية بالغة في الحالات التي تتضمن عقار **الديجوكسين** $(Digoxin)$ أو المواد التحليلية المحبة للماء $(Hydrophilic)$ متضمنة الباراسيتامول (أسيتامينوفين) والساليسيلات.
- إن التوازن الحركي والتوزيعي القائم بين الدم وسائل الخلط الزجاجي أبطأ نسبياً مقارنة بسوائل الجسم خارج الخلية الأخرى، مما قد يتسبب في تأخير طفيف ومؤقت في معدلات الامتصاص.
- لا يمكن إلا للأدوية الحرة وغير المرتبطة $(Unbound\ drugs)$ مغادرة الدورة الدموية ودخول الخلط الزجاجي.
- وبما أن سائل العين يتسم بالعقم النسبي ويقل عرضه للتلوث الميكروبي – وبالتالي ينخفض احتمال حدوث التخليق الكحولي الداخلي بعد الوفاة – فهو يُعتمد بشكل روتيني وموثوق لتحديد مستويات الإيثانول بالاستناد إلى قيمته التفسيرية الفائقة من منظور رصد إنتاج الكحول اللاحق للوفاة وتحديد مرحلة ما قبل أو ما بعد الامتصاص لتعاطي الإيثانول (Honey et al., 2005).
- يُمثل الخلط الزجاجي عينة ممتازة لتحليل الجلوكوز، نيتروجين اليوريا (BUN), حمض اليوريك، الكرياتينين، الصوديوم، والكلوريد بعد الوفاة؛ وهي مؤشرات تحليلية رئيسية لتقييم مرض السكري، درجة الإماهة $(Hydhydration)$, اضطرابات توازن الإلكتروليتات، تقدير الفترة الزمنية بعد الوفاة (PMI), وحالة الوظيفة الكلوية قبل الوفاة (Coe, 1977, 1993). كما يمكن توظيف تراكيز الصوديوم، الكالسيوم، والكلوريد خلال الفترة المبكرة بعد الوفاة لتقدير تراكيزها المناظرة في مصل دم المريض قبل وفاته.

تنبيه تقني معملي: يجب تجنب إضافة فلوريد الصوديوم تماماً إلى العينات المخصصة لإجراء التحاليل الكيميائية الحيوية للخلط الزجاجي؛ ولهذا السبب، يُلجأ في الممارسة الميدانية إلى تجميع الخلط الزجاجي في حاويتين مستقلتين: الأولى محفوظة (NaF لاختبارات الأدوية والكحول)، والأخرى غير محفوظة $(Unpreserved)$ للاختبارات السريرية والكيميائية الحيوية).

السائل الدماغي النخاعي (Cerebrospinal Fluid - CSF)

يمكن جمع السائل الدماغي النخاعي إما عن طريق **البزل القطني** $(Lumbar\ puncture)$ عند القاعدة السفلية للعمود الفقري مستخدمين حقنة تحت الجلد، أو عبر سحب السائل من **الصهريج** $(Cisternal\ fluid)$ عن طريق ثقب قاعدة الرقبة. ورغم المحدودية النسبية للبيانات المرجعية المنشورة المتعلقة بالتراكيز الكمية للأدوية داخل السائل النخاعي، إلا أن هذا السائل الصافي الذي يتكون في غالبيته العظمى من الماء يتقبل التحليل بكفاءة عبر أغلب الطرائق الروتينية للتحليل السمّي.

ويكتسب السائل النخاعي أهمية استثنائية في الحالات المرتبطة بتعاطي الكحول عندما يتعذر الحصول على عينة الخلط الزجاجي، سيما عند الاشتباه بحدوث إنتاج كحولي ميكروبيولوجي بعد الوفاة. ومثله مثل الخلط الزجاجي، يتميز السائل النخاعي بعزله التشريحي وانخفاض عرضه للتلوث أو الغزو البكتيري. ورغم أنه يتوافر بحجوم أكبر نسبياً مقارنة بالخلط

الزجاجي، إلا أن شح البيانات المرجعية المتاحة يقلل أحياناً من نطاق استخدامه، مع بقائه عينة نافعة للغاية في تحقيقات الوفيات الجراحية ($Surgical\ deaths$).

العصارة الصفراوية (Bile)

تُسحب العصارة الصفراوية ($Bile$) روتينياً من المرارة التشريحية بالاستعانة بحقنة تحت الجلد. وقد يتطلب الأمر إجراء عملية **ربط المرارة** ($Ligation$) قبل الشروع في الجمع إذا تبين أن خطر التلوث المحتوي للنسيج يشكل عائقاً. وتُجمع العصارة الصفراوية لزاماً **قبل أخذ عينة الكبد** لتفادي أي تلوث متبادل.

تتراكم العديد من الأدوية والعقاقير ذات الأهمية الشرعية والسمية بكثافة عالية داخل العصارة الصفراوية، وخاصة تلك المركبات التي تخضع لارتباطات وانقسامات مكثفة (**الأدوية المقترنة** - $Conjugated\ drugs$؛ كالمركبات الأفيونية، البنزوديازيبينات، ومخدر القنب). كما تُوظف العصارة الصفراوية بفعالية في الحالات التي يُشتبه فيها بوقوع تسمم مزمن بالمعادن الثقيلة. غير أنه، ونظراً لطبيعة المصفوفة المعقدة المتمثلة في وجود الأملاح الصفراوية والدهون الكثيفة، فإن عمليات استخلاص الدواء منها قد تتسم بالتعقيد، وتستوجب في الغالب إخضاعها لإجراءات استخلاص وتنقية معملية مكثفة ومتقدمة.

محتويات المعدة (Gastric Contents)

تُعد محتويات المعدة عينة ذات قيمة تشخيصية واحتمالية هامة للغاية للتحليل المعملي في كل من حالات ما بعد الوفاة والحالات الإكلينيكية والسريرية. إذ توفر الأدوية غير الممتصة أو بقايا الأقراص المتبقية في محتويات المعدة معلومات لا تقدر بثمن تتعلق بطبيعة المركبات المتناولة، وتشكل مادة أولية ممتازة للفحص والاستكشاف ($Screening$) نظراً للكميات الهائلة والضخمة من الدواء التي قد تحتضنها.

ومع ذلك، يجب الحذر من أن **غياب الدواء في محتويات المعدة لا يمنع قطعاً حقيقة كونه أُخذ عن طريق الفم**. كما أن الروائح النفاذة المنبعثة من محتويات المعدة قد تقدم أدلة استقصائية دقيقة حول ماهية المواد المستهلكة؛ كالمبيدات الحشرية والسيانيدات.

بروتوكول التحضير والتفسير:

- يجب تجميع **الوزن الكلي والكامل لمحتويات المعدة**.
- وبما أن محتويات المعدة تتسم بكونها **غير متجانسة بالمرة**، فيتعين إخضاعها لعملية تجنيس وتجانس شامل ($Homogenisation$) قبل الشروع في سحب العينات الفرعية.
- يجب تفسير قياسات تراكيز الدواء الكمية في سياق **الكتلة أو الكمية الإجمالية** للمعدة (أي الكمية الكلية للسم بدلاً من الاكتفاء بالتركيز التقريبي)، مع ضرورة مراعاة تباين معدلات الامتصاص المعوي للأدوية استناداً إلى خصائصها الفيزيائية والكيميائية، فضلاً عن تركيباتها الصيدلانية وأغلفتها الخارجية.

تنبيه إكلينيكي هام: إن وجود دواء ما داخل محتويات المعدة، وخصوصاً بتراكيز منخفضة، لا يدل بالضرورة على تناوله فموياً؛ فقد تُمتص بعض الأدوية وتحتجز في المعدة عبر العصارات المعدية التي تكون في حالة توازن ديناميكي مع الدم، أو نتيجة لاستخدام الدواء عن طريق الاستنشاق الأنفي. وتُبدي الأدوية ذات الطبيعة **القاعدية** ($Basic\ drugs$) عرضة أكبر لهذه الظاهرة نظراً لميلها الطبيعي للانحباس داخل حجرة المعدة بسبب انخفاض درجة الحموضة (pH).

وفي حالات الاشتباه بوجود **معادن ثقيلة**، يجب جمع محتويات المعدة متزامنة مع محتويات الأمعاء. أما في حالات التسمم المشتبه بها والتي عاش فيها المريض لبضعة أيام داخل المستشفى قبل وفاته – وحيث تكون الأدوية قد تعرضت للاستقلاب ($Metabolised$) والطرح الكامل من الجسم قبل الوفاة – فإن أي محتوى معدي قام الطاقم الطبي بجمعه والاحتفاظ به قد يشكل مصدراً حيوياً للمعلومات المتعلقة بالسموم التي استهلكها المريض في بداية الحادثة.

البول (Urine)

- **في سياق ما قبل الوفاة:** تُجمع عينة البول بأسلوب التبول في المنتصف ($Mid-stream$), وعادة ما توضع داخل حاوية بلاستيكية مجهزة بفلوريد الصوديوم كمادة حافظة. وقد يستدعي الأمر في بعض الظروف الجنائية اتخاذ تدابير واحتياطات صارمة ضد تزوير العينة ($Tampering$).
- **في سياق ما بعد الوفاة:** يُجمع البول حصراً عن طريق البزل المباشر باستخدام حقنة تحت الجلد موجهة مباشرة نحو المثانة وتحت الرؤية المباشرة ($Direct\ visualization$). ويُشترط تماماً تجنب ثقب جدار البطن العشوائي لتقليل احتمالية تلوث العينة.

يُعد البول عينة كريمة وثمينة لاختبارات التحري عن الأدوية في الحالتين (قبل وبعد الوفاة) لكونه مصفوفة حيوية غير معقدة نسبياً. ورغم ذلك، فإن تعدد وتداخل العوامل المؤثرة على تراكيز الأدوية داخل البول (مثل حجم البول الإجمالي، معدل التصفية الكلوي، التمثيل الغذائي، درجة الحموضة، وتوقيت آخر تفريغ للمثانة) يعني ضمناً أن هذه النتائج الكمية، عند قراءتها بمعزل عن المصفوفات الأخرى، تملك **قيمة كمية محدودة جداً**.

وتشمل الاستثناءات المحدودة لهذه القاعدة: التحديد الكمي للإيثانول كعينة ثانية مؤكدة. كما يلزم توخي أقصى درجات الحذر والتدقيق عند تفسير تراكيز **حمض الغاما-هيدروكسي بروبيونيك/البديل** ($\gamma-hydroxybutyric\ acid-GHB$) في البول؛ نظراً لكون الـ GHBمركباً داخلي المنشأ ($Endogenous$) يتكون أصلاً كناتج ثانوي لعمليات التمثيل الغذائي الخلوي، وقد يُصنع معملياً أو ينشأ كـ **مصنوع** ($Artefact$) بعد الوفاة نتيجة التفكك الحيوي لمركب "حمض نصف ألدهيد السكسينيك" ($Succinic\ acid\ semialdehyde$).

الأنسجة الحشوية (Tissues)

عند الشروع في أخذ عينات من الأنسجة العضوية، يجب جمعها بسرعة فائقة ووضعها فوراً داخل حاويات معملية محكمة الإغلاق. و تكتسب هذه السرعة أهمية حرجة بالغة إذا دار الاشتباه حول وجود مواد متطايرة أو غازات مستنشقة سامة. وتُعد أعضاء **الكبد، الكلى، الدماغ، الرئة، والطحال** أهم وأكثر أنسجة ما بعد الوفاة تجميعاً واعتماداً في التحقيقات الشرعية.

1. الكبد (Liver)

يُعد الكبد عضواً محورياً واستثنائياً نظراً للعدد الهائل من الأدوية والعقاقير التي تخضع لعمليات الاستقلاب الكبدي ($Hepatic\ metabolism$) فيه، ولتوافر بيانات مرجعية عالمية واسعة النطاق حوله. ولتقليل احتمالية الهجرة والانتشار الثانوي للدواء القادم من الأمعاء الدقيقة، يُفضل أخذ عينات النسيج حصراً من **أعماق الفص الأيمن** ($Deep\ right\ lobe$) (Drummer, 2004).

ورغم أن تراكيز الأدوية ونواتج أيضها في نسيج الكبد غالباً ما تكون مرتفعة جداً مما يمنح العينة قيمة تفسيرية مباشرة، إلا أن الكبد يظل مفيداً للغاية للأدوية عالية الارتباط ببروتينات الأنسجة؛ إذ تسمح مقارنة نسب تراكيز الدواء بين الكبد والدم بالتمييز الفاصل بين حالات **الجرعة الزائدة الحادة** الحاصلة وبين التعاطي المزمن المستمر لبعض العقاقير.

2. الكلى (Kidneys)

تُعد الكلى ممر العبور الرئيسي لمعظم الأدوية عبر عملية الإطراح البولي. وتكتسب الكلية مكانة بارزة وحاسمة في حالات الاشتباه في التسمم بالمعادن الثقيلة نتيجة ميلها الطبيعي للتراكم العالي في هذا النسيج الحشوي. وغالباً ما يصاحب وجود المعادن الثقيلة السامة أو مادة الإيثيلين جليكول ظهور **تغيرات هيكلية ومرضية دقيقة في الكلى** والتي يمكن توثيقها جلياً باستخدام الفحوصات النسيجية والهيستولوجية المتخصصة.

3. الطحال والرئة والدماغ (Spleen, Lungs, and Brain)

- **الطحال ($Spleen$):** يمثل عينة تشخيصية بالغة الأهمية لتحليلات التسمم بالسيانيد أو أول أكسيد الكربون، خصوصاً في وفيات الحرائق المأساوية حيث قد يكون الدم المتوافر ملوثاً بشدة أو غير متاح بالمرة.
- **الرئة والدماغ ($Lungs\ and\ Brain$):** تُشكلان عينات مرجعية قيمّة في الحالات الجنائية التي تنطوي على التعرض للمواد المتطايرة، المذيبات الصناعية، أو الغازات المخدرة والمستنشقة.

الدماغ (Brain)

تتسم أنسجة الدماغ بغناها الملحوظ بالدهون وميلها الطبيعي لتركز أعداد كبيرة من العقاقير والأدوية، لا سيما **المواد التحليلية المحبة للدهون** ($Lipophilic$), المخدرات، والهيدروكربونات المهلجنة (Skopp, 2004).

عند الاعتماد على التراكيز الكمية للأدوية المستخلصة من الدماغ، يُعد من الحتمي معرفة **الموقع التشريحي الدقيق لأخذ العينة**؛ نظراً لأن الدماغ مصفوفة بيولوجية **غير متجانسة بالمرة**. ونتيجة للتركيب العصبي المعقد وتكوينه المتباين، قد تتباين تراكيز الدواء داخل أجزاء الدماغ المختلفة بعدة أضعاف؛ ولهذا السبب، لا يُستخدم الدماغ كعينة أساسية أو واسعة النطاق في فحوصات السموم الروتينية.

العضلات (Muscle)

لا تُفحص الأنسجة العضلية كإجراء روتيني معتاد، رغم احتوائها في كثير من الأحيان على تراكيز عالية نسبياً من الأدوية، وتحديداً للمركبات ذات **أحجام التوزيع الكبيرة** ($High\ volumes\ of\ distribution$).

ونظراً لأن معدلات التروية الدموية بين المواقع العضلية المختلفة تتسم بعدم الاتساق، يجب التعامل مع تراكيز الدواء المقاسة وتفسيرها بحذر بناءً على ذلك. وغالباً ما تُستعمل العضلات في سياقات محددة لتحديد مستويات الإيثانول عند تعذر الحصول على الدم، أو عند الضرورة الميدانية أثناء التحقيق في موضع حقن مشتبه به.

الشعر (Hair)

استُخدم الشعر على نطاق واسع في طيف متنوع من تحقيقات السموم التي تسبق الوفاة لتوفير سجل تاريخي وموثوق للتعرض للعقاقير، ووجد تطبيقات رائدة في:

- اختبارات تعاطي المخدرات في بيئات العمل ($Workplace\ drug\ testing$).
- مراقبة الخاضعين للاختبارات القانونية أو برامج الإفراج المشروط.
- فحوصات التأمين للتحقق من صدق إقرارات المتقدمين بشأن تعاطيهم للمخدرات أو التدخين.

- قضايا تعريض الأطفال للخطر ($Child\ endangerment$).
- الاعتداءات الجنسية المسهلة بالعقاقير ($DFSA$) وغيرها من الجرائم الجنائية (Nakahara, 1999; Kintz et al., 2006; Curtis and Greenberg, 2008).

مزايا التحليل وقواعد الجمع:

- **نافذة كشف طويلة الأمد:** تكمن الميزة الرئيسية في قدرته على توفير نافذة كشف ممتدة لعدة أسابيع أو شهور استناداً إلى طول خصلة الشعر.
- **الجدول الزمني:** يتيح التقسيم القطاعي للشعر بحسب الطول إمكانية وضع جدول زمني تقريبي للتعرض السمّي، بالاستناد إلى متوسط معدلات نمو شعر الرأس البالغة نحو 1 cm **شهرياً** (Clauwaert et al., 2000).
- **بروتوكول الجمع السليم:** يُشترط قص الشعر **بالقرب من فروة الرأس قدر الإمكان** وتحديداً من منطقة **قمة الرأس الخلفية** ($Posterior\ vertex\ region$)؛ لكونها المنطقة الأقل تباظاً في معدل النمو المعياري. وعادة ما تُجمع خصلة تعادل سمك القلم الرصاص، مع ضرورة تدوين لون الشعر، طوله، موقع الجمع، وأي معالجات تجميلية ظاهرة. كما يجب **تحديد أقسام الجذر القريبة ($Proximal$) والأطراف البعيدة ($Distal$) بوضوح تام**.

ورغم أن شعر الرأس يظل العينة المفضلة، يمكن أحياناً الاعتماد على شعر العانة أو الإبطين، غير أن تفسير النتائج حينها يصبح أكثر تعقيداً. وعقب الجمع، تُربط الخصلة، وتُلف بورق الألومنيوم (القصدير)، وتُحفظ في ظروف جافة، بعيداً عن الضوء، وفي درجة حرارة الغرفة.

استخدام الشعر في حالات ما بعد الوفاة:

يُعد الشعر عينة قيّمة في تحقيقات ما بعد الوفاة عند الاشتباه بالتسمم بالزرنيخ أو المعادن الثقيلة. ورغم أن تحليل الشعر بعد الوفاة لا يزال قيد التطوير غير المنتشر واسعاً، إلا أن الاهتمام المتزايد به يعود لقدرته على تقديم دلالات تفسيرية فائقة تتعلق بالتسلسل الزمني للتعرض (Cirimele et al., 2002). كما ثبتت جدواه في حالات **استخراج الجثث** ($Exhumations$) (Tsatsakis et al., 2001)، شريطة جمع العينة في بداية الفحص التشريحي للحد من مخاطر التلوث الخارجي.

تحديات المعالجة والتلوث:

يجب الانتباه لمشكلات التلوث الخارجي للشعر (عبر الترسب البيئي، العرق، أو الزهم). وعموماً، يُقلل من هذا التلوث بإجراء **خطوات المعالجة المسبقة وغسل العينة** باستخدام سلسلة من الشطف المائي والعضوي قبل إتمام التحليل.

الأنسجة الكيراتينية البديلة (الأظافر): يمكن توظيف قصاصات الأظافر لتحديد التعرض طويل الأمد للمعادن الثقيلة السامة مثل الثاليوم، الزرنيخ، أو الرصاص. غير أن معدل تترسب الأدوية في الأظافر أبطأ بكثير مقارنة بالشعر، وتتطلب بدورها إجراءات دقيقة لإزالة التلوث الخارجي قبل التحليل.

مواقع الحقن (Injection Sites)

عند الاشتباه بحصول التعاطي أو التسمم عن طريق الحقن، قد يصبح **استئصال الجلد والأنسجة العضلية** أمراً ضرورياً في تحقيقات ما بعد الوفاة لموقع الحقن المحتمل، وغالباً ما يُزال مكعب نسيجي من العضلات والجلد لهذا الغرض.

- **أهمية العينة الضابطة ($Control$):** من الحتمي مقارنة تراكيز الدواء المستخلصة من موقع الحقن المشتبه به بتراكيز عينة ضابطة تُأخذ من نفس الفرد من موضع نسيجي مماثل يخلو تماماً من أي آثار للحقن.

- **تنبيه تقني:** لا تُشكل مواقع الحقن مؤشرات قطعية وموثوقة بنسبة مطلقة على تعاطي المخدرات؛ نظراً لأن غياب أو وجود الأدوية في نسيج موقع الحقن يعتمد كلياً على **نوع الحقن وعمقها**. فإذا تم الحقن بصورة مباشرة داخل مجرى وعاء دموي، فمن المرجح تماماً أن يتبقى نزر يسير جداً أو لا يتبقى شيء من الدواء داخل الأنسجة المحيطة.

العينات الحشرية (Entomological Specimens)

ثبتت فاعلية واستخدام الحشرات في الكشف عن العقاقير ومختلف السموم داخل الأنسجة المتحللة، كما تمت مراجعة ذلك في أبحاث سابقة (Introna et al., 2001). وعند جمع حشرات أو يرقات من على الرفات البشرية، يجب **تجميدها في أسرع وقت ممكن**؛ نظراً لأن اليرقات تتخلص من الأدوية بسرعة فائقة بمجرد إزالتها من مصدرها الغذائي.

وقد جرى التعرف بنجاح على أدوية، معادن، ومبيدات حشرية داخل عينات حشرية شملت اليرقات ومرحلة الخادرات $(Pupae)$. وعقب إتمام خطوات الغسل اللازمة لتخليصها من التلوث الخارجي السطحي، تُخضع العينات الحشرية لعملية تجنيس $(Homogenisation)$ ثم تُحلل مخبرياً بطريقة مشابهة تماماً لتلك المتبعة مع الأنسجة الحشوية العادية.

اللعاب (Saliva)

يمكن جمع اللعاب أو السوائل الفموية بأسلوب غير باذع $(Non-invasive)$ عبر البصق، الشفط، التفريغ الهوائي، أو بالاستعانة بمسحة ماصة مشبعة (Kidwell et al., 1998). وتماثل أوقات الكشف المتاحة عبر اللعاب تلك المسجلة في الدم. تنتج الغدد اللعابية الثلاث الكبرى (تحت الفكية، النكفية، وتحت اللسان) حجماً يصل إلى 1.5 litters **من اللعاب يومياً**. ويمكن جمع الإفرازات الصادرة من غدة تشريحية معينة باستخدام أجهزة خاصة أو عن طريق القسطرة، ورغم أن إفرازات الغدد المحددة تفيد في ضبط نسبة اللعاب إلى البلازما وتقليل التلوث الفموي، إلا أن المتبع روتينياً هو جمع اللعاب المختلط $(Mixed\ saliva)$.

طرق التحفيز والتحذيرات المعملية:

- يمكن تحفيز الإفراز عبر مضغ مادة خاملة كشريط "تيفلون" $(Teflon)$ أو قطعة مطاطية، مع وجوب التحقق من عدم حدوث أي امتزاز $(Adsorption)$ ثنائي بين الدواء والمادة المضوغة. كما استُخدمت الحلويات الحامضية أو حمض الستريك للغاية ذاتها.
- يجب توخي الحذر التام لضمان عدم تداخل بقايا الطعام، المشروبات، أو المواد العالقة داخل الفم مع التحليل، وهي إشكالية تبرز بوضوح مع الأدوية المتناولة فموياً أو عن طريق التدخين.

القيمة التشخيصية والارتباط بالبلازما:

نظراً لسهولة وسرعة الطريقة غير الباذعة للجمع، يكتسب اللعاب اهتماماً متزايداً في اختبارات المخدرات بأماكن العمل، فحوصات التأمين، و**اختبارات القدرة على القيادة على جانب الطريق** $(Roadside\ testing)$.

يحتوي اللعاب على سائل مصلي مشتق أساساً من البلازما؛ وهذا المرشح الفائق $(Ultrafiltrate)$ للسائل الخلالي يضم الجزء غير المرتبط $(Free\ fraction)$ من الدواء بتراكيز تتناسب طردياً مع تلك المقاسة في البلازما. ومع ذلك، فإن العلاقة المتوقعة نظرياً بين تراكيز الأدوية في اللعاب والبلازما تتأثر بعوامل ديناميكية عديدة، مثل **معدل تدفق اللعاب**، مما قد يعقد أحياناً عملية التفسير الصيدلاني والإكلينيكي (Crouch, 2005).

العرق (Sweat)

يحدث الفقد الطبيعي للرطوبة عبر الجلد وإطراح العرق غير المحسوس (غير المرئي) أثناء التنفس الاعتيادي بمعدل يتراوح بين 0.7 l/day – 0.3. ويُقصد بالعرق المحسوس ذلك الذي يُفرز بنشاط تحت وطأة الإجهاد، التمارين البدنية، أو درجات الحرارة المرتفعة، بمعدلات تتراوح من 4 l/hour – 2. وتُطرح تقريباً نصف كمية العرق الإجمالية من جذع الجسم، بينما يُفقد السائل المتبقي من الساقين، الأطراف العلوية، والرأس بكميات متساوية تقريباً (Kidwell et al., 1998).

بروتوكول الجمع ورقع العرق (*Sweat Patches*):

- يُجمع العرق عادةً بواسطة **رقعة لاصقة ماصة** تُثبت بإحكام على سطح جلد نظيف، أو عبر مسح الجلد بقطنة أو شاش معقم. ويشترط تحضير الجلد بعناية فائقة قبل تثبيت الرقعة للحد من التلوث الخارجي أو التحلل البكتيري للدواء عقب احتجازه.
- يمنع الغشاء شبه المنفذ المكون للرقعة المكونات البيئية غير المتطايرة من اختراق الوسادة خارجياً، مع السماح بانتشار الحرارة، الأكسجين، الماء، وثاني أكسيد الكربون. وتُحتجز الأملاح والمواد الصلبة والأدوية النافذة عبر الجلد داخل الوسادة لتخزن مؤقتً في الموقع (*In situ*) لحين نزع الرقعة.
- نظراً لصغر حجم العرق غير المحسوس المفرز (ml أو أقل)، تُرتدى الرقع لعدة أيام متتالية على السطح الخارجي لأعلى الذراع أو الظهر.

وفي الواقع العملي، تحتوي معظم مسحات الجلد ورقع العرق على خليط متداخل من العرق و**الزهم** (*Sebum* - الإفراز الزيتي للغدد الدهنية). وكما هو الحال في اللعاب، قد تؤثر معدلات التدفق المرتفعة على كميات الدواء المطروحة في العرق؛ وتُعتبر هذه العينة أداة بالغة النفع **لاختبارات الالتزام والامتثال** (*Compliance testing*) أو لمراقبة التعرض طويل الأمد (الذي يمتد لأسابيع)، وهو ما يطلبه غالباً في أوضاع الرعاية الإصلاحية وبرامج الإفراج المشروط.

السائل السلوي (Amniotic Fluid)

استُخدم السائل السلوي لغرض التحقيق في حالات التعرض للأدوية والمواد السامة قبل الولادة. ويتم جمع هذا السائل الحيوي عبر إجراء طبي يُعرف بـ **بزل السلى** (*Amniocentesis*)، وعادةً ما يُجرى بين الأسبوعين السادس عشر والعشرين من الحمل.

حيث تُدخل إبرة دقيقة عبر الجدار البطني إلى جوف الرحم في منطقة تتضاءل فيها إلى أدنى حد ممكن احتمالية ملامسة المشيمة أو الجنين النامي. وعادة ما يُنفذ الجمع بالتزامن مع المراقبة الحية بالرنين أو **الموجات فوق الصوتية** (*Ultrasound*) لتقليص مخاطر إلحاق أي ضرر بالطفل. ورغم ندرة المضاعفات السريرية، إلا أن خطر الإجهاض قد يقع بنسبة طفيفة جداً. ويُسحب عادة حجم يتراوح بين 30 ml – 5من السائل السلوي خلال الإجراء.

حليب الثدي (Breast Milk)

أثناء فترة الحمل، يحفز هرمونا الإستروجين والبروجسترون – المُفرزان من المبيض والمشيمة – تطوير وتنشيط غدد إنتاج الحليب داخل الأنسجة الدهنية للثديين. ويقوم هرمون البرولاكتين النخامي بتحفيز إنتاج السائل (بمعدل يتراوح بين 600 – 1000 ml/day) بواسطة الخلايا المفرزة للحليب، بينما يؤدي انقباض الخلايا الظهارية العضلية المحيطة بالأسناخ (*Alveoli*) إلى دفع الحليب وإخراجه.

ولأغراض التجميع المعملي، يمكن الاستعانة بمضخات الثدي الطبية. وتتسم هذه المصفوفة بكونها **غير متجانسة** بطبيعتها:

- قد يُفرز **"اللبأ"** $(Colostrum)$ – وهو سائل أولي كريمي اللون يتأرجح بين الأبيض والأصفر – من الحلمات خلال الثلث الأخير من الحمل وفترة ما بعد الولادة بقليل.
- تُطرح العديد من الأدوية والعقاقير في حليب الثدي، وتزخر الأدبيات الطبية والسمومية بالعديد من الشواهد حول وجودها.
- إن الأدوية عالية الارتباط ببروتينات البلازما قد لا تعبر بسهولة إلى الحليب، غير أن **الدهون المستحلبة** الموجودة فيه قد ترفع بصورة ملحوظة من تراكيز الأدوية شديدة الذوبان في الدهون $(Lipophilic)$.
- وبسبب المحتوى الدهني المرتفع وعوامل الاستحلاب الطبيعية في حليب الثدي، غالباً ما تكون **عملية المعالجة المسبقة للعينة** أمراً حتمياً ولا غنى عنه قبل التحليل.

العقي (Meconium)

يبدأ التكوين الجنيني للعقي بين الأسبوعين الثاني عشر والسادس عشر من الحمل. وبما أنه يُعد أول مادة برازية يطرحها المولود الجديد، فإنه يُجمع عادةً خلال الأيام **الأربعة إلى الخمسة الأولى من الولادة** $(1-5\ \text{days})$.

يوفر تحليل الأدوية والمواد السامة في العقي **سجلاً تاريخياً طويل الأمد نسبياً** للتعرض للمواد أثناء فترة الحمل، وتحديداً خلال **العشرين أسبوعاً الأخيرة** منه؛ وهو ما يمنح معلومات أكثر اكتمالاً وشمولاً مقارنة ببول المولود الجديد أو دم الحبل السري.

تُعد عينة العقي مصفوفة معقدة وغير متجانسة بالمرة؛ وعليه، يجب جمع كافة العينات المتاحة وإخضاعها لعملية **تجنيس شامل** $(Homogenisation)$ قبل الشروع في التحليل (Gray and Huestis, 2007; Lozano et al., 2007).

معالجة العينة (Sample Handling)

تُعتبر مرحلة معالجة العينات اعتباراً حاسماً خلال **المرحلة ما قبل التحليل** $(Pre-analytical\ phase)$. وعلى النقيض تماماً من البيئة الإكلينيكية السريرية التي تتسم بقصر الفاصل الزمني بين جمع العينة وإجراء الاختبار، فإن **التأخيرات الكبيرة شائعة للغاية في البيئة الشرعية والعدلية**.

طبيعة التأخير الزمني:

- **في تحقيقات ما قبل الوفاة:** قد يكون التأخير الزمني بين الجريمة المزعومة ووقت سحب العينة قصيراً (كالدقائق والساعات في قضايا القيادة تحت تأثير المخدرات)، أو طويلاً (كالساعات والأيام في بعض قضايا الاعتداء الجنسي). وتخضع العينات لاحقاً لتأخيرات إضافية بسبب عمليات النقل، طلبات الفحص المقدمة من الجهات الوصائية، والتخزين المؤقت قبل الفحص الفعلي.
- **في تحقيقات ما بعد الوفاة:** تمتد المرحلة ما قبل التحليل عبر نطاق واسع يبدأ من لحظة الوفاة، اكتشاف الجثة، إجراء التشريح الجسدي، جمع العينات، تخزينها، نقلها للمختبر، وحتى التخزين اللاحق قبل التحليل المختبري.

ورغم أن خبير السموم ملزم بأخذ التأخير الزمني الفاصل بين الحدث (سواء أكان وفاة أو جريمة) وبين ساعة جمع العينة بعين الاعتبار عند تفسير النتائج، إلا أن هذه التأخيرات تظل **خارجة عن السيطرة المباشرة للمختبر**.

مع ذلك، يمكن تطبيق تدابير واحتياطات صارمة للحفاظ على سلامة العينات واستقرارها عقب الجمع؛ إذ تلعب **جودة العينة** دوراً محورياً لا يُقدر بثمن في ضمان صحة وفائدة النتائج التحليلية اللاحقة، حيث إن الحفظ أو التخزين المعيب وغير المناسب يترك تأثيراً ضاراً ومدمراً على النتائج النوعية والكمية على حد سواء.

الحفظ والتخزين (Preservation and Storage)

يجب تخزين العينات في درجات حرارة ملائمة، مع توافر مواد حافظة كافية، وضمن بيئة معزولة لا يمكن الوصول إليها إلا من قبل الموظفين المخولين قانونياً لضمان الأمن والسلامة التامة.

- **التخزين قصير الأمد:** يُنصح بحفظ معظم العينات في درجة حرارة مبردة تتراوح بين $2 - 4^{\circ}\ C$.
- **التخزين طويل الأمد:** يُشترط التخزين بالتجميد عند $-20^{\circ}\ C$ **أو أقل** عندما تتجاوز مدة الاحتفاظ أسبوعين.
- **الاستثناءات:** تشمل عينات الشعر، الأظافر، ولطخات الدم المجففة على ورق الترشيح، والتي تظل مستقرة ويمكن تخزينها بأمان في درجة حرارة الغرفة الاعتيادية.

وفي حين أن العينات الإكلينيكية السريرية غالباً ما تُحفظ بدون مواد إضافية، فإن استخدام المواد الحافظة الكيميائية يُعد مبرراً بل وحتمياً في العينات الشرعية والعدلية.

المواد الحافظة والإضافات المعملية:

- **فلوريد الصوديوم ($2\%\ w/v$):** يُعد الحفظ الفعلي لعينات الدم بفلوريد الصوديوم إجراءً روتينياً ومعيارياً في جل المختبرات. وتحتوي أنابيب جمع الدم المفرغة التجارية (مثل الأنابيب ذات الغطاء الرمادي) على فلوريد الصوديوم كمادة حافظة وأوكسالات البوتاسيوم كمانع للتجلط؛ وتُشكل هذه الأنابيب الخيار المفضل في قضايا السموم الشرعية الخاصة بمرحلة ما قبل الوفاة. ويلعب الفلوريد دوراً مزدوجاً كمثبط إنزيمي قوي يمنع نشاط الكائنات الحية الدقيقة ويعيق عملية **تحلل السكر** ($Glycolysis$)، وهو أمر حيوي للمواد التحليلية الحساسة مثل الإيثانول والكوكايين.
- **موانع التجلط البديلة:** قد تحوي أنابيب الدم التجارية على إضافات متنوعة (السيترات، الهيبارين، $EDTA$، الثرومبين، مخاليط حمض الستريك والدكستروز، ومنشطات التجلط). ورغم تصميمها للأغراض السريرية، إلا أنها **ليست الحاويات المفضلة لاختبارات المخدرات**، وحال استلامها من المستشفيات يجب توخي أقصى درجات الحذر عند تفسير نتائجها (LeBeau et al., 2000; Toennes and Kauert, 2001). وعند الحاجة لمانع تجلط، تُفضل أوكسالات البوتاسيوم على البدائل كالـ $EDTA$أو الهيبارين أو السيترات.
- **مضادات الأكسدة وتعديل الـ pH:** تُستخدم أحياناً مضادات الأكسدة مثل **حمض الأسكوربيك** ($0.25\%\ w/v$) أو **ميتابيسلفيت الصوديوم** ($1\%\ w/v$) لمنع الفقد التأكسدي، غير أن لها القدرة على العمل كعوامل مختزلة لبعض الأدوية (خصوصاً نواتج الأيض من نوع $N-oxide$التي قد تتبدل وتتحول رجعياً إلى الدواء الأصلي). وبالمثل، **لا يُفضل** إجراء تعديل روتيني لرقم الحموضة (pH) للعينة؛ نظراً لأن تباين الأدوية يجعل بعضها غير مستقر في الأوساط القلوية (كالكوكايين و6-أستيل مورفين) بينما يتأثر البعض الآخر سلباً بالأوساط الحمضية.
- **أزيد الصوديوم ($0.1\%\ w/v$):** يُستعمل أحياناً كمادة حافظة وعامل مضاد للميكروبات في عينات البول، شريطة **عدم استخدامه** إذا كانت المقايسات ستتم عبر تقنية الامتصاص المناعي المرتبط بالإنزيم ($ELISA$)؛ لأنه يتداخل بصورة مباشرة مع الكشف اللوني المعتمد على إنزيم "بيروكسيداز الفجل الحار" ($Horseradish\ peroxidase$).
- **موانع الاستخدام واستثناءات الحفظ:** رغم روتينية المواد الحافظة، يُجمع أحياناً جزء من دم ما بعد الوفاة خفيفاً بدون مواد حافظة؛ حيث يُحظر استخدام فلوريد الصوديوم عند الاشتباه بوجود مواد **فوسفورية عضوية** ($Organophosphorus$) نظراً لتسريعها للتحلل الكيميائي (Skopp and Potsch, 2004). كما يجب حماية الأدوية الحساسة للضوء ($Photolabile$) – مثل قلويدات الإرغوت (LSD) والفينوثيازينات – عبر حفظها في قوارير كهرمانية داكنة أو مغلفة بأوراق الألومنيوم، مع تجنب دورات التجميد والذوبان المتكررة.

الوسم ونقل العينات (Labelling and Specimen Transfer)

- **بيانات الوسم التعريفية:** يجب وضع ملصقات واضحة ودقيقة على كافة حاويات العينات تتضمن: رقم القضية، اسم المتبرع، تاريخ ووقت الجمع، توقيع أو الأحرف الشخصية للشجم الذي أجرى عملية السحب، ووصفاً دقيقاً للعينة.
- **أختام الأمان والشحن:** تُستخدم حاويات مانعة للعبث و/أو أشرطة لاصقة تحمل توقيع وتاريخ الشخص الجامع.

وتُرسل العينات داخل مواد تغليف وشحن محكمة مانعة للتسريب ومقاومة للعبث، مصحوبة بكافة الوثائق والمستندات النظامية (نماذج سلسلة الحيازة $Chain - of - custody$، طلبات الفحص والطلبات الخاصة، معلومات القضية، قائمة الأدوية، تقرير الشرطة، ومعلومات المتبرع كالهوية أو تاريخ الميلاد، ورقم قضية الوكالة، واسم الطبيب الشرعي/ضابط التحقيق وجهات الاتصال).

- **إجراءات الاستلام المعملي:** تُعاد أي مواد تم تغليفها أو تعريفها بصورة خاطئة إلى الوكالة المرسلة دون فحص. وفور وصول العينات للمختبر، تُخضع لعملية فحص وتوثيق دقيقة للحالة والكمية خلال **مرحلة القيد والتسجيل** ($Accessioning\ process$).

التلوث (Contamination)

تتعدد مصادر التلوث المحتملة لعينات ما قبل الوفاة وما بعدها؛ فبالإضافة للمصادر الناشئة عن حاويات الجمع والتداخلات الخارجية، يتعين الحذر من الملوثات الخارجية ($Exogenous$) والداخلية ($Endogenous$).

الملوثات الخارجية (Exogenous Contaminants)

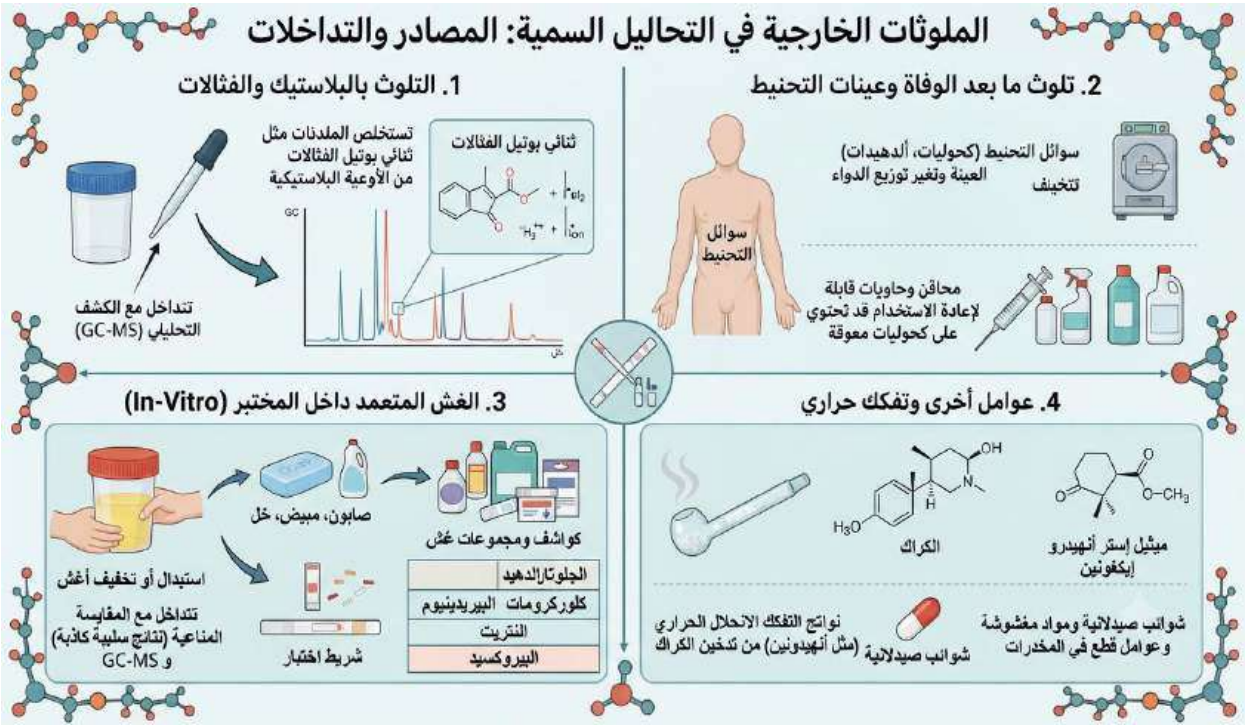
- **الفثالات ($Phthalates$):** تُظهر العينات المُجمعة في حاويات بلاستيكية عرضة واضحة للتداخل بفعل الملدنات البلاستيكية؛ حيث تستخلص مركبات مثل ثنائي بوتيل الفثالات وتتداخل مع التحاليل الكروماتوغرافية الغازية أو مطيافية الكتلة ($GC - MS$) لتنتج أيونات فثالات مميزة. وعليه، يُشترط تقييم واختبار كافة الحاويات البلاستيكية مسبقاً.
- **مصادر التلوث التحليلي والبيئي:** قد يقع التلوث بالفثالات أثناء المعالجة المخبرية ذاتها من خلال رؤوس الماصات الاستعمالية، حاويات المذيبات، خراطيش الاستخلاص بالطور الصلب (SPE)، والأنابيب. كما أن التعرض البيئي اليومي للمواد المنزلية، الأغذية، والمشروبات يترك تراكيز قابلة للكشف من استرات الفثالات ونواتج أيضها داخل المصفوفات الحيوية كالدم، المصل، البول، وحليب الثدي (Silva et al., 2005; Högberg et al., 2008).

تُعد **سوائل التحنيط** – والتي تحتوي في العادة على تراكيز متنوعة من الكحوليات والألدهيدات المختلفة – مصدراً محتملاً وخطيراً للتلوث في قضايا ما بعد الوفاة. فهذه السوائل لا تكتفي بتخفيف أي سوائل حيوية متبقية في أنسجة الجثة فحسب، بل تُحدث تغييراً جذرياً في أنماط توزيع الأدوية داخل الأنسجة المتبقية.

وثمة مصدر إضافي محتمل للتلوث ينشأ من **المحاقن والحاويات القابلة لإعادة الاستخدام** والمستخدمة روتينياً في تجميع عينات ما بعد الوفاة؛ إذ قد تحتوي بعض سوائل التنظيف والمطهرات المستعملة لتعقيم هذه المحاقن على كحوليات قادرة على إعاقة وإفساد تحليلات المواد المتطايرة. ويسلط هذا الواقع الضوء على الأهمية البالغة لإجراء التحاليل باعتماد عينات مستمدة من مواقع تشريحية متعددة، والحرص على استخدام **محاقن استهلاكية قابلة للتصرف** (تستعمل لمرة واحدة) كلما أمكن ذلك.

التلاعب بالعينة والغش في حالات ما قبل الوفاة

ينشأ الهاجس والشاغل الرئيسي فيما يخص التلوث في سياق اختبارات ما قبل الوفاة من **التلاعب المتعمد بالعينة** بقصد إخفاء تعاطي أو وجود المخدرات. وغالباً ما يتخذ هذا التلاعب شكل استبدال العينة البيولوجية، تخفيفها، أو غشها بمدخلات ومواد غريبة. ويظهر تلاعب المتبرع بصورة متكررة وواضحة مع **عينات البول** في سياق اختبارات المخدرات الميدانية في بيئات العمل؛ ونتيجة لذلك، أصبح ما يُعرف بـ **"اختبار صلاحية العينة"** ($Specimen\ validity\ testing$) متطلباً إزامياً في العديد من برامج فحص المخدرات المعتمدة، مثل برامج الموظفين الفيدراليين تحت إشراف توجيهات وزارة الصحة والخدمات الإنسانية الأمريكية ($DHHS$).



1. الغش خارج الجسم ($In-vitro\ Adulteration$):

في البداية، اعتمد غش البول على إضافات منزلية بدائية كالصابون، المبيض، الخل، الأمونيا، أو سوائل التنظيف المنزلية. ورغم نجاح بعضها نسبياً، إلا أنه توفرت لاحقاً مروحة واسعة من الكواشف ومجموعات الغش التجاري المتاحة على نطاق واسع (Dasgupta, 2007).

وتحتوي أشهر المنتجات التجارية المغشوشة على مواد فعالة مثل:

- **الجلوتارالدهيد** ($Glutaraldehyde$ - مادة مثبتة ومصلبة).
- **كلوركرومات البيريدينيوم** (PCC) أو مركبات **الكروم سداسي التكافؤ** ($Hexavalent\ chromium$ - عوامل مؤكسدة قوية).
- **النتريت** ($Nitrite$ - عامل مؤكسد).
- **البيروكسيد/البيروكسيداز**.

وبشكل عام، تستطيع عوامل الغش المعملي هذه التداخل سلبياً مع الفحوصات الأولية للمقايسة المناعية ($Immunoassays$) بقصد توليد نتائج سلبية كاذبة ($False\ negatives$). ومع ذلك، تمتلك بعض هذه العوامل القدرة على إحداث تداخلات مع الاختبارات التأكيدية المتقدمة مثل تقنية **الكروماتوغرافيا الغازية المقترنة بمطيافية الكتلة** ($GC-MS$).

وتتوفر تجارياً منتجات مخصصة للكشف عن الغش، فضلاً عن وجود اختبارات فورية وأشرطة فحص سريعة ($Dipsticks$) لرصد مستويات النتريت، الجلوتارالدهيد، الرقم الهيدروجيني (pH)، الجاذبية النوعية ($Specific\ gravity$)، الكرياتينين، المبيض، مركب الـ PCC، والمؤكسدات الكيميائية.

2. الغش داخل الجسم ($In-vivo\ Adulteration$):

يُصار إلى معالجة مسألة تخفيف العينة أو "الغش داخل الجسم" عبر تناول مواد نوعية لإخفاء المخدرات، ويتحقق ذلك غالباً بشرب كميات هائلة من السوائل قبل موعد الاختبار مباشرة أو بتعاطي مدرات البول ($Diuretics$).

ويمكن اكتشاف استبدال أو تخفيف عينة البول يقيناً عند إجراء اختبارات صلاحية العينة المعتمدة وفق المعايير الآتية:

- **درجة الحموضة (pH):** تُعتبر العينة غير صالحة إذا تراوح الـ pHبين 3و4.5 أو بين 9و11، وتُصنف على أنها مغشوشة قطعاً إذا قل الـ pHعن 3أو تجاوز 11.
- **نطاق درجة الحرارة المعياري:** يجب أن تتراوح حرارة العينة وقت التسليم بين $32-38^{\circ}C$.
- **معايير التخفيف:** تُعتبر عينة البول مخففة إذا انخفض تركيز الكرياتينين فيها عن 200 mg/Lوتدنت الجاذبية النوعية عن 1.003.

مصادر أخرى للملوثات والشوائب التحليلية

- **نواتج التفكك الانحلال الحراري ($Pyrolytic\ breakdown$):** تنجم عن التحلل الحراري للأدوية، وقد تتواجد بسبب عمليات الانحلال أثناء تعاطي الدواء (مثل تكوين مركب *متيل إستر أنهيدرو إيكغونين* عقب التدخين الحر للمخدرات كالكراك كوكايين)، أو قد تنشأ موضعياً ($In\ situ$) أثناء فترات التحليل المعملي إن لم يتم ضبط وتقييم الظروف الحرارية بدقة.
- **الشوائب الصيدلانية وعوامل القطع ($Cutting\ agents$):** وهي المواد المغشوشة والمواد الحاملة التي تُمزج عمداً بالمواد المخدرة غير المشروعة قبل تداولها وبيعها في الأسواق غير القانونية.

الجدول 4: عوامل الغش داخل المختبر (in-vitro) (Table 4: In-vitro adulteration agents)

المادة / العامل(Agent)	المكون النشط / طبيعة المادة
حمض الأسكوربيك(Ascorbic acid)	مضاد أكسدة
الكحوليات(Alcohols)	مذيبات / عوامل كيميائية
Amber-13	حمض الهيدروكلوريك(Hydrochloric acid)
الأمونيا(Ammonia)	مادة قاعدية
المبيض(Bleach)	عامل مؤكسد(Hypochlorite)
Clear Choice	جلوتارالدهيد(Glutaraldehyde)
المنظفات أو الصابون	مواد خافضة للتوتر السطحي(Surfactants)
Drano	منظف أنابيب (يحتوي على مواد كاوية)
إيثيلين جلايكول(Ethylene glycol)	مادة كيميائية (مذيب)

المادة / العامل(Agent)	المكون النشط / طبيعة المادة
البنزين(Gasoline)	مذيب عضوي
جلوتارالدهيد(Glutaraldehyde)	مادة مثبتة(Fixative)
بيروكسيد الهيدروجين(Hydrogen peroxide)	عامل مؤكسد
Klear	نتريت البوتاسيوم(Potassium nitrite)
عصير الليمون(Lemon juice)	حمض عضوي
الصابون السائل(Liquid soap)	مواد خافضة للتوتر السطحي
Lime-A-Way	منظف حمضي (لإزالة الترسبات الكلسية)
Mary Jane Super Clean 13	مواد خافضة للتوتر السطحي(Surfactant)
الملح(Salt)	مادة أسموزية
Stealth	بيروكسيد/بيروكسيداز(Peroxide/peroxidase)
THC-Free	حمض الهيدروكلوريك(Hydrochloric acid)
UrinAid	جلوتارالدهيد(Glutaraldehyde)
Urine Luck	كروم سداسي التكافؤ - (Chromium VI) مؤكسد
Vanish	عامل تنظيف (عادةً مبيض أو كاشط)
الخل(Vinegar)	حمض الخليك(Acetic acid)
Visine	قطرة عين (تحتوي على تتراهيدروزولين)
الماء(Water)	عامل تخفيف
Whizzies	نتريت الصوديوم(Sodium nitrite)

المصدر: Kerrigan, Goldberger (2005).

الجدول 5: عوامل الغش داخل الجسم (in-vivo) (Table 5: In-vivo adulteration agents)

النوع	العوامل
مدرات البول الموصوفة	الثيازيدات والأدوية الشبيهة بالثيازيد (مثل هيدروكلوروثيازيد، ميتولازون)، مثبطات إنزيم كربونيك أنهيدراز (مثل أسيتازولاميد)، مدرات البول العروية (مثل بوميتانيد، فوروسيميد، تورسيمايد)، مدرات البول الأسموزية (مثل مانيتول).
مدرات البول المتاحة دون وصفة(OTC)	**Premsyn PMS.، Pamprin، Midol، Fem-1، Diurex،Aqua-Ban**
أخرى	المشروبات الكحولية، الزانثينات (مثل الكافيين، الثيوفيلين، 8-بروموثيوفيلين)، الأعشاب ومدرات الماء (مثل جذر الختم الذهبي، العرعر).

المصدر: Kerrigan, Goldberger (2005).

المصنوعات الطبية (Medical Artefacts)

قد يؤدي التدخل والعلاج السريري أحياناً إلى نشوء ما يُعرف بـ **"المصنوعات الطبية"** ($Medical\ artefacts$) التي تعقد تفسير النتائج السمومية. وتبرز هذه المصنوعات بوضوح أكبر في قضايا ما بعد الوفاة، حيث قد تستمر مضخات الحقن الآلية في العمل لبعض الوقت بعد حدوث الوفاة الفعلي، مما يتسبب في ضخ تراكيز هائلة وعالية للغاية من الأدوية في أقسام الجسم الموضعية المرتبطة بالخط الوريدي.

ولهذا السبب، يُعد الوصول السريع إلى السجلات المستشفائية ومعلومات الحالة السريرية، إلى جانب الاعتماد على جمع الدم المحيطي، الخلط الزجاجي، وعينة الكبد، أموراً بالغة الحهمية والحساسية في مثل هذه القضايا. ومن المصادر الأخرى

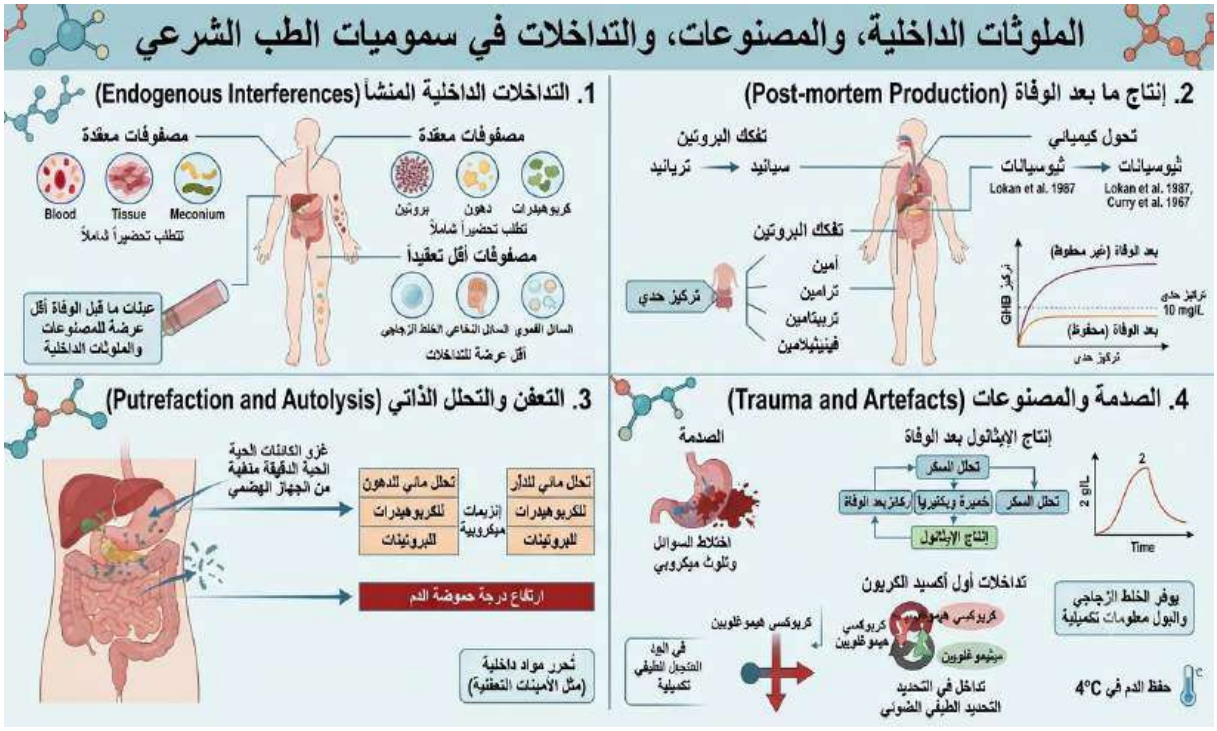
للمصنوعات الطبية: أدوية حصاد الأعضاء مثل حاصر قنوات الكالسيوم **"فيراباميل"** $(Verapamil)$ أو مادة **"بابافيرين"** $(Papaverine)$ المُستعملة خصيصاً لتثبيط التضيق الوعائي خلال جراحات زرع وعمليات نقل الأعضاء.

إعطاء السوائل الحية والتخفيف الدموي:

عند إعطاء سوائل وريدية (كالمحلول الملحي) للمرضى الأحياء أثناء الرعاية الطبية، **فإن الدم لا يتلوث أو يُخفف** بمحلول الحقن إلا إذا أُخذت العينة حصراً من موضع يقع أسفل مكان إدخال الخط الوريدي. ونظراً لسرعة دوران الدم والتوازن الديناميكي السريع بين الدم والأنسجة، فإن ضخ السوائل لا يؤثر عادةً على تراكيز الأدوية أو الكحول في الدم طالما جرى اتخاذ الاحتياطات الاعتيادية في السحب. وعند الاشتباه بأن عملية الجمع تمت من مسار يقع تحت الخط الوريدي، يصبح لزاماً مراجعة السجلات الطبية بعناية أو **قياس الهيماتوكريت** $(Haematocrit)$ للتحقق من مدى تعرض العينة للتخفيف.

الملوثات الداخلية، المصنوعات، والتداخلات (Endogenous Contaminants, Artefacts and Interferences)

تخضع كافة العينات البيولوجية بطبيعتها لتداخلات داخلية المنشأ $(Endogenous\ interferences)$، بصرف النظر عما إذا كانت مستمدة من أشخاص أحياء أو متوفين. وتستوجب العينات العالية التعقيد – كالدم، الأنسجة، أو العقي – عمليات تحضير معملية شاملة لإزالة هذه التداخلات مقارنة بالمصفوفات الأقل تعقيداً كالخلط الزجاجي، السائل النخاعي، أو السائل الفموي. ورغم ذلك، تظل عينات ما قبل الوفاة **أقل عرضة بكثير** للمصنوعات أو الملوثات الداخلية مقارنة بعينات ما بعد الوفاة.



التخليق الحيوي بعد الوفاة $(Postmortem\ Synthesis)$:

يمكن أن تتشكل مواد مثل الإيثانول، غاما-هيدروكسي بروبيونيك (GHB), أول أكسيد الكربون، السيانيد، وغيرها من الكحوليات قصيرة السلسلة نتيجة **العمليات الاستقلابية الحيوية بعد الوفاة** (Skopp, 2004).

- **السيانيد:** أُرجع تكوّن تراكيز ذات دلالة سمومية من السيانيد في أنسجة ما بعد الوفاة إلى تحول مركب الثيوسيانات إلى سيانيد وتفكك البروتينات العضوية (Lokan et al., 1987; Curry et al., 1967).

- **الإيثانول:** رغم إمكانية تخليقه محلياً ($In\ situ$) في ظروف محددة داخل سوائل ما قبل الوفاة غير المحفوظة، إلا أن هذه الظاهرة تتسع بصورة هائلة في عينات ما بعد الوفاة، وتحديداً في الدم.
- **مركب الـ (GHB):** يتواجد في سوائل ما قبل الوفاة بتراكيز ضئيلة للغاية في غياب اضطرابات وراثية استقلابية نادرة مثل "بيلة الـ GHB" (Knerr et al., 2007). ويصبح التمييز بين GHBالخارجي والداخلي معقداً للغاية بسبب طبيعة العينة، ظروف التخزين، والمادة الحافظة؛ لذا تعتمد المختبرات تركيزاً حدياً ($Cut-off$) للمساعدة في التفرقة، كاعتماد 10 mg/L في البول (Kerrigan, 2002; LeBeau et al., 2007). وترتفع تراكيز الـ GHBفي البول أثناء التخزين أو في الدم غير المحفوظ، بينما تبدو عينات بول ما بعد الوفاة والخلط الزجاجي **أقل عرضة** لهذه الزيادة المصنوعة.

التحلل الذاتي والتعفن ($Autolysis\ and\ Putrefaction$):

تنشأ التغيرات الكبرى بعد الوفاة بفعل التحلل الذاتي وغزو الكائنات الحية الدقيقة (وخاصة من الجهاز الهضمي نحو الأنسجة والسوائل خلال ساعات من الوجود في درجة حرارة الغرفة). حيث تُميّه الإنزيمات الميكروبية الدهون، الكربوهيدرات، والبروتينات، لترتفع درجة حموضة الدم (pH) بثبات، وتتحرر **الأمينات التعفنية**، الترامين، التريبتامينات، والفينيثيلامينات.

تأثير الصدمات والإنتاج الكحولي المتفرع:

- **الصدمات ($Trauma$):** تُشكل الصدمات مصدراً حتمياً للتلوث في سموميات ما بعد الوفاة؛ إذ يؤدي تمزق الأعضاء أو الحجرات الداخلية إلى إفساد التحاليل الكمية للأدوية نتيجة **اختلاط السوائل الحيوية** ببعضها (مثل امتزاج محتويات المعدة بالدم) وما يتبعه من تنشيط ميكروبي.
- **إنتاج الكحول بعد الوفاة ($Postmortem\ ethanol\ production$):** تؤدي عملية تحلل السكر بوجود الخمائر والبكتيريا إلى تحويل مجموعة من ركزايا ما بعد الوفاة إلى إيثانول. ورغم أن التراكيز تكون منخفضة غالباً (< 0.7 g/L)، إلا أنه سُجلت حالات وصلت إلى 2 g/L وأعلى (Zumwalt et al., 1982; O'Neal and Poklis, 1996). ويتأثر هذا التخليق بعوامل عدة كالوقت الفاصل، الظروف البيئية، الإصابات الرضية الحادة، والحروق. وهنا تبرز القيمة التكاملية للخلط الزجاجي والبول للمساعدة في تفسير النتائج. كما يمكن للكائنات الدقيقة تخليق كحوليات أخرى مثل **الأيزوبروبانول** ($Isopropanol$) محلياً، سيما في جثث ضحايا الغرق.
- **تداخلات أول أكسيد الكربون:** يعقد التعفن تحديد أول أكسيد الكربون في دم ما بعد الوفاة؛ حيث سُجلت زيادات ظاهرية في تراكيز **كربوكسي هيموغلوبين** نتيجة تكون ناتج تحلل يسمى **ميثيموغلوبين** ($Methaemoglobin$) الذي يتداخل مع التحليل الطيفي الضوئي. وعليه، يُوصى بحفظ دم ما بعد الوفاة وتخزينه حصراً في الظلام عند درجة حرارة 4° C أو أقل (Skopp, 2004).

الاستقرار (Stability)

يمكن أن يتأثر استقرار الدواء داخل العينات البيولوجية بمجموعة معقدة من العوامل؛ تتضمن الخصائص الفيزيائية والكيميائية للدواء، طبيعة المصفوفة الحيوية، الميل للارتباط أو فك الارتباط ($Conjugate/Deconjugate$)، إجراءات الجمع (كالتلوث الميكروبي)، اختيار الحاوية المعملية (مثل تفاعلات الأكسدة والامتزاز)، ومدى الاعتماد على المواد الحافظة والإضافات المختلفة.

- **دراسات الاستقرار المتاحة:** تركز أغلب الأبحاث المنشورة على عينات ما قبل الوفاة أو المصفوفات غير البيولوجية. وتتسم النتائج في العينات الحيوية بالتعقيد لكون عدم الاستقرار مرتبطاً ارتباطاً وثيقاً بالمصفوفة ودرجة الحموضة (pH)، فضلاً عن وجود مركبات متداخلة وعوامل خارجية. وبصورة عامة، ينشأ التلف أو التغير في تركيز الدواء نتيجة للتحلل الأيضي $(Metabolic\ degradation)$، التحول الكيميائي $(Chemical\ transformation)$، أو مزيج متزامن من الاثنين (مثلما يحدث بوضوح مع مركب الكوكايين).

تعقيدات الاستقرار في مصفوفات ما بعد الوفاة:

يفرض تحليل عينات ما بعد الوفاة تحديات إضافية نظراً لضعف السيطرة على الظروف البيئية، وتسارع تحلل المواد التحليلية بفعل **التعفن** $(Putrefaction)$، **الغزو الميكروبي، وتكاثر البكتيريا**؛ ومن أبرز الأمثلة على ذلك:

- **التحويل الإنزيمي البكتيري:** تحويل "مورفين جلوكورونيد" $(Morphine\ glucuronides)$ إلى مورفين حر داخل الدم (Carroll et al., 2000).
- **التحويل الحيوي لمركبات النيتروبنزين:** بفعل نشاط البكتيريا المعوية (Robertson and Drummer, 1998).

وعقب جمع العينات، قد تظل الإنزيمات الحيوية نشطة وتستمر في استقلاب وتفكك الدواء **داخل المختبر** $(In\ vitro)$ أثناء النقل أو التخزين المؤقت، وخصوصاً **إنزيمات الإستيراز** $(Esterases)$ التي تزيد من معدلات تميؤ الأدوية ما لم تُثبط بفاعلية تامة عبر مواد حافظة مناسبة.

المجموعات الوظيفية الحساسة:

ينشأ عدم استقرار الأدوية عادةً نتيجة لاحتواء التركيب الكيميائي على **مجموعات وظيفية حساسة وقابلة للتحول**؛ مثل:

- **الإسترات:** (مثل 6-أستيل مورفين، الكوكايين، وحمض أسيتيل ساليسيليك - الأسبرين).
- **الأدوية المحتوية على الكبريت أو مجاميع الأكسدة والاختزال السهلة.**
- **الأدوية الحساسة للضوء** $(Photolabile)$**:** (مثل الفينوثيازينات، الميدازولام، وحمض الليسرجيك ثنائي إيثيل أميد LSD -).

ورغم أن عدم الاستقرار يقود غالباً إلى انخفاض ملحوظ في تراكيز الدواء، إلا أن ذلك ليس قاعدة مطلقة؛ فالعقاقير المقترنة كـ "الجلوكورونيدات" قد تتعرض لعمليات **إزالة الاقتران** $(Deconjugation)$ تحت ظروف معينة، مما يؤدي إلى زيادة زائفة في تركيز الدواء الحر $(Free\ drug)$. وعليه، قد يختلف تركيز الدواء وقت الفحص التحليلي الفعلي عن تركيزه الأصلي وقت سحب العينة، وهو سياق حتمي يجب أخذه في الاعتبار عند تفسير النتائج الشرعية.

الاستقرار الحراري ونواتج الانحلال:

تُبدي بعض الأدوية درجات متفاوتة من **عدم الاستقرار الحراري**؛ وهو اعتبار جوهري للأدوية التي تتعرض لدرجات حرارة فائقة أثناء التعاطي بالتدخين أو خلال الفحص المعملي (بتقنية الكروماتوغرافيا الغازية بمسح الكتلة - $GC-MS$). ويمكن اعتبار نواتج الانحلال الحراري دليلاً قاطعاً على ممارسة التدخين إذا جرى التيقن من أنها لا تتشكل طوال مسار التحليل المعملي؛ ومن أمثلتها:

- مركب **أنهيدرو إيكغونين ميثيل إستر** $(AEME)$ عقب تدخين "الكراك" كوكايين.
- مركب 1-**فينيل-سيكلوهكسين** بعد تعاطي الفينسيكليدين (PCP).
- مركب **ترانس-فينيل بروبين** إثر تعاطي الميثامفيتامين.

تقييم الاستقرار المعياري:

يُفترض أن يُخضع استقرار أي دواء لتقييم متعدد المحاور يتضمن:

1. الاستقرار طويل الأمد ضمن المصفوفة المعنية.
2. تأثير دورات التجميد والذوبان المتكررة.
3. الاستقرار قصير الأمد (في ظروف التبريد الاعتيادية).
4. الاستقرار على طاولة العمل ($Bench-top\ stability$) عند درجة حرارة الغرفة).

وتجدر الإشارة إلى أن المتغيرات الحركية المتحكمة بعدم الاستقرار ترتبط ارتباطاً وثيقاً بطبيعة المصفوفة ودرجات الحرارة؛ فمعرفة استقرار دواء معين في الدم لا تعني أبداً القدرة على التنبؤ بنتائج مماثلة عند تخزينه في البول. ورغم وفرة الأدبيات حول استقرار الأدوية في المصفوفات الشائعة (الدم، البول، المصل، البلازما)، إلا أن الدراسات المخصصة للمصفوفات غير التقليدية أو غير البيولوجية تظل محدودة نوعاً ما (مثل البقع الجافة البيولوجية، محاليل الفورمالديهايد بعد التحنيط، أو ألياف الشعر المعالجة تجميلياً كالتبييض والفرد والتجعيد).

ويُعد **الكوكايين** المثال الأبرز والأكثر شهرة على عدم الاستقرار الحاد بين كافة العقاقير الشائعة، بينما تتسم الغالبية العظمى من الأدوية الأخرى باستقرار معتدل يتيح وضع افتراضات تفسيرية معقولة. وفيما يلي عرض ملخص لاستقرار أبرز الأدوية الشائعة.

الأمفيتامينات (Amphetamines)

أثبتت الدراسات أن الميثامفيتامين والأمفيتامين في عينات البول المحفوظة بفلوريد الصوديوم (بتركيز $1\%\ w/v$) يظلان **مستقرين بصورة تامة** أثناء التخزين طويل الأمد عند درجة حرارة -20° C لمدة عام كامل على الأقل (Moody et al., 1999).

وفي المقابل، أظهرت دراسة طويلة الأمد أُجريت على الدم الكامل المخزن لأكثر من 5سنوات في درجة حرارة الغرفة حدوث انخفاضات متقلبة لكنها جوهرية في مستويات الميثامفيتامين تراوحت بين 9%إلى 38%(Giorgi and Meeker, 1995). وأشارت المعطيات إلى أن **الأمفيتامين ربما كان أقل استقراراً من الميثامفيتامين**. وقد جُمعت تلك العينات في أنابيب مفرغة ($Vacutainer$) سعة 10 ml ذات أغطية رمادية تحوي فلوريد الصوديوم (100 mg) وأوكسالات البوتاسيوم (20 mg). ورغم تصنيف كلا الدواءين ضمن المركبات المستقرة بصورة معتدلة، **إلا أنه لا يُنصح نهائياً بتخزين عينات الدم في درجة حرارة الغرفة**؛ نظراً لعمليات التحلل ونشوء مواد تداخلية جديدة.

الأمفيتامينات المصممة ($Designer\ Amphetamines$):

تمتد الاستقرارية العامة لفئة الأمفيتامينات لتشمل مشتقاتها التصميمية الشهيرة؛ مثل:

- 3,4-ميثيلين ديوكسي ميثامفيتامين ($MDMA$).
- 3,4-ميثيلين ديوكسي أمفيتامين (MDA).
- 3,4-ميثيلين ديوكسي إيثيل أمفيتامين ($MDEA$).

وقد أُخضعت استقرارية هذه العقاقير للتقييم في البول، الدم، والماء لفترة بلغت 21أسبوعاً عند درجات حرارة -20° C, 4° C, و 20° C (Clauwaert et al., 2001). ورغم استقرار كافة هذه المواد بامتياز عند درجة -20° C، إلا أن النتائج

التحليلية في عينات الدم أصبحت **غير موثوقة** بعد الأسبوعين الخامس والثالث عشر عند التخزين في درجات حرارة $20^\circ C$و $4^\circ C$ على التوالي؛ ويُعزى ذلك لتفسخ المصفوفة البيولوجية وظهور مواد متداخلة.

القنب والمحطّمات القنبية (Cannabinoids)

تُعزى التناقصات الملحوظة في تراكيز القنب داخل العينات المبردة والمجمدة بصورة رئيسية إلى الفقدان التأكسدي، التأثيرات الحرارية، أو **الارتباط المحب للدهون** ($Lipophilic\ binding$) بحاويات التخزين المعملية.

- **حساسية الـ (THC):** يتعرض مركب الدلتا-9-تيتراهيدروكانابينول (THC) للتلف عند تعرضه المباشر للهواء، الحرارة، أو الضوء؛ فيخضع لعملية تميؤ متحولة إلى "كانابيديول" ($Cannabidiol$), أو يتأكسد إلى "كانابينول" ($Cannabinol$) نتيجة التفاعل مع الأكسجين أو الأوسط الحمضية. وقد سُجل أن مركب الـ THCيظل مستقراً في الدم المبرد لمدة 6أشهر وفي درجة حرارة الغرفة لمدة شهرين (Johnson et al., 1984).
- **مشكلة الامتزاز الوعائي:** يجب أخذ ميل الـ THCللارتباط بالأسطح غير المحبة للماء (مثل الحاويات الزجاجية غير المسلّنة أو السدادات المطاطية) بعين الاعتبار؛ فقد ثبت أن THCالمخزن بدم وُضع في أنابيب زجاجية غير مسلّنة ($Unsilanised$) ظل مستقراً لمدة 4أيام في حرارة الغرفة و4 أسابيع عند $-20^\circ C$. وفي المقابل، سجلت عينات متطابقة خُزنت في أنابيب بوليسترين انخفاضات فادحة بلغت $60-100\%$في التركيز (Christophersen, 1986).

نواتج الأيض والمركبات المقترنة:

يُبدي ناتج الأيض الرئيسي استقراراً أعلى نسبياً من الدواء الأصلي؛ حيث أثبتت الدراسات أن مركب 11-نور-9-كربوكسي-Δ^9-تيتراهيدروكانابينول (THCA) ظل مستقراً في البول المجمد والمحفوظ بفلوريد الصوديوم ($1\%\ w/v$) لمدة عام كامل (Moody et al., 1999)، شريطة الاستعانة بأوانٍ زجاجية مسلّنة ($Silanised$) – وهو شرط قد لا يتوافر مع الحاويات المستخدمة روتينياً في القضايا الفعلية.

ويُعزى الفقد المحصود في تراكيز الـ THCAبالبول غالباً إلى **الامتزاز السطحي** أو احتجازه داخل رغوة العينة ($Foaming$), مما قد يتسبب في خسائر تصل إلى 89%(Dextraze et al., 1989). ويمكن الحد من ذلك عبر إضافة عامل مضاد للرغوة (مثل 2-أوكتانول)، رغم أن استخدامها ليس معياراً روتينياً. وقد أشارت الأبحاث إلى أن خسائر الامتزاز لـ THCAمن البول المخزن في حاويات بلاستيكية وإن حدثت سريعاً (خلال ساعة من الجمع)، إلا أنها لا تبلغ الحد الذي يهدد سلامة التحليل (Stout et al., 2000). علاوة على ذلك، ترتبط خسائر الامتزاز بدرجة الحموضة (pH) للبول، حيث تتفاقم الخسائر في الأوساط الحمضية (Jamerson et al., 2005).

وفيما يخص **إزالة الاقتران** ($Deconjugation$) لمشتقات القنب (مثل تحول "THCA-جلوكورونيد" إلى THCAحر)، فإن تميؤ إسترات "الأسيل جلوكورونيد" يؤدي حتماً لمضاعفة تراكيز ناتج الأيض غير المقترن (Skopp and Pötsch, 2004). وقد ثبت أن مركب "THCA-جلوكورونيد" يتسم **بعدم الاستقرار** في البول عند درجات حرارة $4^\circ C$فما فوق، أو عند ارتفاع درجة حموضة البول (Skopp, 2004)، كما أنه يبدو **أقل استقراراً في البلازما** مقارنة بالبول (Skopp and Pötsch, 2002). ورغم غياب الخسائر المعتبرة عند التخزين المجمد عند $-20^\circ C$، إلا أن عدم الاستقرار وُثق بوضوح عقب حفظ البلازما والبول في درجات حرارة مبردة أو حرارة الغرفة، أحياناً خلال يومين فقط من التخزين (Skopp and Pötsch, 2002).

الأفيونات (Opioids)

يُعتبر مركب **"6-مونوأسيتيل مورفين" (MAM − 6)** ناتج أيض غير مستقر لـ "ديامورفين" (الهيروين) بسبب التميؤ السريع لروابط الإستر؛ حيث يخضع لعملية نزع الأسيتيل $(Deacetylation)$ ليتحول تدريجياً إلى مورفين أثناء فترات التخزين. وقد ثبت أن أدوية: البيوبرينورفين، الكوديين، الفينتانيل، الهيدروموروفون، الميثادون، المورفين، الأوكسيكودون، الأوكسيمورفون، والترامادول تتسم جميعها **بدرجة عالية من الاستقرار** داخل البلازما المجمدة المخزنة لمدة تقارب ثلاثة أشهر والمعرضة لدورتي تجميد وذوبان (Musshoff et al., 2006). كما أن التركيزات الحرة للمورفين، الكوديين، والميثادون ظلت مستقرة بمعتدل في البول المجمد والمحفوظ بفلوريد الصوديوم على مدار عام كامل (Moody et al., 1999)، في حين تبدو **تركيزات المورفين الكلية أقل استقراراً** في الظروف ذاتها (Moriya and Hashimoto, 1997). وبالمقابل، أظهر التخزين طويل الأمد لدم كامل محفوظ في درجة حرارة الغرفة تذبذبات وانخفاضات جوهرية خلال فترة امتدت من سنة إلى خمس سنوات (Giorgi and Meeker, 1995)، مما يعكس وجود تباينات حاسمة في الاستقرار بين الأنواع الحرة والمقترنة (المترافقة).

استقرارية "مورفين جلوكورونيد" $(Morphine\ glucuronide)$:

تكتسي استقرارية هذا المركب أهمية بالغة نظراً للاعتماد على نسب المورفين الحر إلى المورفين الكلي في التفسير الطبي الشرعي. وتبرز فروق جوهرية في استقرار الجلوكورونيد بين دم ما قبل الوفاة ودم ما بعد الوفاة:

- **دم ما قبل الوفاة:** كان مركب "مورفين-3-جلوكورونيد" مستقراً في الدم المبرد والمحفوظ بفلوريد الصوديوم، بينما أظهر عدم استقرار واضح في دم ما بعد الوفاة تحت نفس الظروف (Carroll et al., 2000). وتتفاقم معدلات تميؤ الأنواع الجلوكورونيدية إلى مورفين حر مع تصاعد درجات الحرارة، طول زمن التخزين، وتقدم التحلل التعفني.
- **تأكيد الدراسات:** أثبتت أبحاث أخرى استقرار "مورفين-3-جلوكورونيد" في دم وبلازما ما قبل الوفاة المبردة لمدة تصل إلى ستة أشهر (Skopp et al., 2001)، بينما نجح التخزين المجمد لعينات ما بعد الوفاة عند $-20°\ C$ في منع التميؤ المعملي $(In\ vitreo)$ للجلوكورونيد بصورة تامة.

الفينسيكليدين (Phencyclidine)

تشير الدراسات المعملية إلى أن مركب **الفينسيكليدين** (PCP) يُعد دواءً مستقراً نسبياً، حتى عند تخزينه في الدم بدرجة حرارة الغرفة لمدة تصل إلى ثمانية عشر شهراً (Levine et al., 1983). ومع ذلك، سُجلت انخفاضات ملحوظة في تراكيزه داخل دم محفوظ بحرارة الغرفة على مدى خمس سنوات كاملة (Giorgi and Meeker, 1995).

الكوكايين (Cocaine)

يُعد **الكوكايين** بلا منازع الدواء الأكثر شهرة وشيوعاً من حيث **عدم الاستقرار الشديد** بين كافة مواد الإساءة؛ إذ يمر بتحولات كيميائية وإنزيمية متسارعة تُنتج نواتج تميؤ $(Hydrolytic\ products)$:

- **التميؤ التلقائي:** يتحول الكوكايين تلقائياً إلى "بنزويل إيكغونين" (BE) عبر رابطة الإستر في الأوسط ذات الدلالات الفيزيولوجية والقلوية. ففي وسط ذي درجة حموضة (pH) تساوي 5، غابت الانخفاضات القابلة للقياس في تركيز الكوكايين عند حرارة $40°\ C$ بعد واحد وعشرين يوماً، مقارنة بانهيار بنسبة $70\% - 40\%$ في البول عندما ترتفع الـ pH إلى 8 (Baselt, 1983). وبما أن روابط الإستر تتسم بالهشاشة في الوسط القلوي، فإن مسار التحول الكيميائي للكوكايين إلى مركب الـ BE يتسارع مطرداً بارتفاع قلوية المصفوفة.

العوامل الإنزيمية والحماية المعملية:

- **التثبيط والضبط:** رغم أن إضافة مادة حافظة لا تمنع التميؤ الكيميائي البحت، إلا أنه يمكن كبح حركية التفاعل عبر خفض درجة حرارة التخزين أو تعديل الرقم الهيدروجيني (رغم تجنب التعديل الروتيني لاحتمالية تضرر الأدوية الحساسة للأوسط الحمضية).
- **الدور الإنزيمي:** تتحمل **إنزيمات ميثيل إستريز الكبدية** المسؤولية الكبرى عن التحول الإنزيمي للكوكايين إلى BE، بينما يتولى **إنزيم بسودوكولين إستريز البلازمي** تحويله إلى "إيكغونين ميثيل إستر" (EME).
- هنا تبرز الأهمية البالغة لإضافة مثبط الكولين إستريز (مثل فلوريد الصوديوم) وخفض درجات الحرارة كاحتياطات معملية جوهرية. وتخضع مشتقات الـ BEوالـ EMEبدورها لتحول إضافي منتجاً ناتج الأيض القطبي "الإيكغونين".

سلوك الكوكايين في الدم:

في الدم غير المحفوظ، يسود مسار تميؤ إستر الفينيل لينتج الـ EME؛ بينما تعمل إضافة فلوريد الصوديوم على تثبيط إنتاج الـ EMEدون أن تمنع التميؤ الكيميائي البحت للكوكايين إلى BE. وعند تخزين الدم بحرارة 4° C دون مادة حافظة، أصبح الكوكايين غير قابل للكشف خلال ثلاثة أيام فحسب، ولم يُكتشف سوى $40 - 60\%$منه في الدم والبلازما المحفوظين بعد واحد وعشرين يوماً (Baselt, 1983).

ورغم أن الـ BEيبدي استقراراً يفوق الكوكايين، إلا أن التراجع التدريجي في تراكيزه يعود لتميؤه اللاحق إلى إيكغونين، مع ثبوت استقرار الـ BEفي البول المحفوظ لمدة عام كامل عند تخزينه عند $-20°$ C (Moody et al., 1999).

تنبيه تحليلي هام: يحدث التميؤ الكيميائي للكوكايين **أثناء مراحل التحليل المخبري ذاتها**؛ فعمليات الاستخلاص المستعملة لعزل الكوكايين ونواتج أيضه من العينات (كسائل-سائل أو الاستخلاص بالطور الصلب - SPE) تعتمد روتينياً أوساطاً قلوية أثناء خطوات الاستخلاص والشطف، مما قد يحفز تميؤ الكوكايين إلى BEكمصنوع معملي $(Artefact)$. ولتفادي ذلك، يُنصح باختصار مدة التعرض القاعدي والاعتماد السليم على **المقاييس الداخلية الموسومة بالديوتيريوم** $(Deuterated\ internal\ standards)$.

مضادات الاكتئاب (Antidepressants)

أظهرت الدراسات المختبرية المُجراءة على عينات المصل أن **مضادات الاكتئاب ثلاثية الحلقات** $(TCAs)$ تتمتع بدرجة استقرار معتدلة؛ حيث وُجد أن مركبات "أميتريتيلين"، "إيميبرامين"، "كلوميبرامين"، و"دوكسيبين" تظل مستقرة نسبياً في المصل المخزن عند درجة حرارة 25° C لفترة تتراوح بين 6 – 3أشهر، أو عند 4° C لمدة سبعة أيام (Rao et al., 1994). وفي السياق ذاته، أثبتت مضادات الاكتئاب الأحدث – متضمنة "ريبوكستين"، "سيرترالين"، و"فينلافاكسين" – استقراراً جيداً داخل البلازما المجمدة. غير أنه سُجلت انخفاضات فادحة في تراكيز كل من "سيرترالين"، "ديسميثيل سيرترالين"، و"ريبوكستين" عند تخزينها في حرارة الغرفة لأكثر من سبعة أيام (Heller et al., 2004). كما أبدى كل من "أتوموكسيتين"، "سيتالوبرام"، "فلوكسيتين"، "ميرتازيبين"، و"باروكستين" مستويات مقبولة من الاستقرار طويل الأمد عند الحفظ بالتجميد (Peters, 2007).

المهدئات العصبية (Neuroleptics)

أكدت الأبحاث أن المهدئات العصبية اللانمطية الأحدث، مثل **"كيتيابين"** و"أولانزابين"، تُبدي **عدم استقرار واضحاً وحاداً** عند تعرضها لدرجة حرارة الغرفة (Heller et al., 2004). ورغم ثباتهما نسبياً لبضعة أيام، إلا أن تراكيز الكيتيابين هبطت بنسبة تصل إلى 50%بعد مرور أربعة عشر يوماً، بينما غاب الأولانزابين كلياً ولم يعد قابلاً للكشف في بعض العينات.

وعلى الرغم من ذلك، فإن الغالبية العظمى من أدوية المهدئات العصبية (بما فيها الأولانزابين والكيتيابين) ظلت مستقرة ومحفوظة في البلازما المجمدة عند درجة -20° C لمدة شهر كامل رغم تعرضها لثلاث دورات تجميد وذوبان متعاقبة (Kratzsch et al., 2003).

ملاحظات معملية هامة:

- تُظهر مركبات **"الفينوثيازينات"** حساسية فائقة للضوء تتأثر طردياً بدرجة الحموضة (pH).
- سُجلت زيادات ظاهرية ومفاجئة في تراكيز **"كلوربرومازين"** و**"ثيوريدازين"** داخل عينات المرضى، وهي ظاهرة تُعزى إلى حدوث تفاعلات ارتدادية يتحول من خلالها ناتج الأيض عائداً إلى الدواء الأصلي طوال فترة التخزين (Davis et al., 1977; Holmgren et al., 2004).

البنزوديازيبينات (Benzodiazepines)

أثبتت الفحوصات أن مجموعة البنزوديازيبينات الواسعة – المتضمنة: ألبرازولام، كلورديازيبوكسيد، كلونازيبام، ديازيبام، فلونيترازيبام، فلورازيبام، لورازيبام، ميدازولام، نيترازيبام، نورديازيبام، أوكسازيبام، تيمازيبام، وتريازولام – تظل مستقرة في البلازما لمدة شهر كامل عند حفظها في درجة -20° C (Kratzsch et al., 2004). كما ثبت أن مركب "الديازيبام" مستقر في الدم المخزن بدرجة حرارة الغرفة أو المبرد لمدة خمسة أشهر كاملة (Levine et al., 1983).

في المقابل، أظهر كل من "الديازيبام" و"التيمازيبام" **عدم استقرار وانهياراً واضحاً** في دم ما بعد الوفاة عند تعرضه لظروف التحلل التعفني.

التحديات والتحولات الخاصة بمجموعة البنزوديازيبينات:

- **مجموعة النيترو $(Nitro-group)$:** تُصنف البنزوديازيبينات الحاوية على مجموعة نيترو (مثل كلونازيبام، نيترازيبام، وفلونيترازيبام) من بين المركبات **الأكثر عدم استقراراً**؛ نتيجة تعرض مجموعة النيترو لعمليات اختزال تلقائية. ويُسهم استخدام إضافات مثبطة للاختزال (مثل 2% w/v **ميتابيسلفيت الصوديوم**) في إبطاء وتيرة هذا التحلل. كما قد تتبدل بنزوديازيبينات النيترو بعد الوفاة لتتحول إلى نواتج تفككها المقابلة من نوع **"7-أمينو"** (-7 $amino\ metabolites$) بفعل نشاط البكتيريا اللاهوائية (Robertson and Drummer, 1995, 1998).
- **مجموعات الـ $(N-oxide)$:** يُعد مركب **"كلورديازيبوكسيد"** – الحاوى على وظيفة $N-oxide$– غير مستقر بالمرة في الدم الكامل؛ حيث تهاوت تراكيزه بسرعة فائقة في درجة حرارة الغرفة لتصبح غير قابلة للكشف بحلول اليوم الثامن (Levine et al., 1983). ورغم أن فلوريد الصوديوم يُثبط تحول الكلورديازيبوكسيد إلى نورديازيبام وديموكسيبام، إلا أنه لا يمنعه بصورة تامة؛ لذا يُوصى قطعاً بالتخزين في درجات حرارة منخفضة، مع **التفضيل المطلق للتجميد العميق** (Drummer and Gerostamoulos, 2002; Peters, 2007).

حمض الليسرجيك ثنائي إيثيل أميد / الليسرجيد (LSD)

مركب **"ليسرجيد"** (LSD) شديد الحساسية للضوء؛ لذا يُشترط وجوب حماية العينات المشتبه باحتوائها عليه من أي تعرض ضوئي مباشر. وقد وُثقت انخفاضات ملحوظة في تراكيز الدواء ضمن الدم، المصل، والبول، بغض النظر عن وجود فلوريد الصوديوم من عدمه.

مع ذلك، أثبتت إحدى الدراسات أن تراكيز الـ LSDفي عينات البول ظلت مستقرة تماماً لفترة أربعة أسابيع عند الاحتفاظ بها في درجة حرارة الغرفة وفي الأوسط المبردة (Francom et al., 1988).

الإيثانول (Ethanol)

تخضع تراكيز الإيثانول أثناء فترات التخزين لاحتمالين متعاكسين؛ إما بالزيادة أو النقصان:

- **خسائر الإيثانول:** تؤول بصورة أساسية إلى عمليات التبخر، الأكسدة الكيميائية، والاستهلاك الميكروبي.
- **زيادات الإيثانول:** تُعزى في الغالب إلى العمليات الاستقلابية للتحول الميكروبي للركائز العضوية إلى الإيثانول داخل العينة.

ورغم توثيق زيادات ملحوظة في مستويات إيثانول الدم تحت ظروف معينة، إلا أن هذه الظاهرة تُثبط بفاعلية تامة عبر **إضافة فلوريد الصوديوم كمادة حافظة والالتزام بالتخزين في درجات حرارة مبردة**.

استقرار الإيثانول في الدم:

- ثبت أن الإيثانول يظل **مستقراً تماماً** في الدم المفلور لمدة شهرين كاملين عند حفظه في درجة حرارة الغرفة (Glendening and Waugh, 1965).
- حتى مع امتداد التخزين لمدد تتراوح بين سنة إلى ثلاث سنوات بحرارة الغرفة، لم تتجاوز متوسطات الانخفاضات المسجلة حاجز 0.4 g/L. وفي دراسات أخرى، بلغت متوسطات الفقد إثر تخزين الدم بحرارة الغرفة لمدة 3سنوات و6.75 سنوات نحو 0.19 g/Lو0.33 g/L على التوالي (Chang et al., 1984).
- سُجل فقدان ملحوظ للإيثانول في عينات الدم الملوثة ببكتيريا **"الزائفة"** (*Pseudomonas*)؛ ورغم أن استخدام فلوريد الصوديوم بنسبة 1%لم يمنع هذا التحلل كاملاً، إلا أن **مضاعفة نسبة المادة الحافظة إلى** 2%نجحت تماماً في كبح منع فقدان الإيثانول (Dick and Stone, 1987).

استقرار الإيثانول في البول:

يُعد البول أقل عرضة بمراتب مقارنة بالدم لإنتاج الإيثانول معملياً (*In vitro*)، باستثناء حالات نادرة وشاذة. فحتى عينات البول المحقونة بالكائنات الدقيقة المعروفة بقدرتها على إنتاج الكحول لم تسجل زيادات تتجاوز 0.2 g/L، حتى بعد حضنها عند درجة حرارة 37° C(Blackmore, 1968). وعليه، يُعتبر الاعتماد على المواد الحافظة والتبريد المسبق للبول إجراءً فائق الفاعلية لحفظ استقرار الإيثانول.

الاستثناءات النادرة: وثُقت حالات استثنائية نادرة شهدت ارتفاعاً دراماتيكياً حاداً في تراكيز الإيثانول ضمن بول مريض مصاب بمرض السكري تبيّن تلوث عينته بفطريات **"المبيضات البيضاء"** (*Candida albicans*)، وتزامن هذا الارتفاع الكحولي الحاد مع هبوط فادح ومفاجئ في تراكيز الجلوكوز داخل البول (Ball and Lichtenwalner, 1979).

المراجع(References)

Ball, W., & Lichtenwalner, M. (1979). Ethanol production in infected urine. New England Journal of Medicine, 301(11), 614.

Baselt, R. C. (1983). Stability of cocaine in biological fluids. Journal of Chromatography, 268, 502–505.

Berankova, K., Skopp, G., & Musshoff, F. (2006). Gamma-hydroxybutyric acid stability and formation in blood and urine. Forensic Science International, 161(2-3), 158–162.

Blackmore, D. J. (1968). The bacterial production of ethyl alcohol. Journal of the Forensic Science Society, 8(2-3), 73–78.

Carroll, F. T., Derlet, R. W., & Nakazawa, K. (2000). Morphine-3-D-glucuronide stability in postmortem specimens exposed to bacterial enzymatic hydrolysis. The American Journal of Forensic Medicine and Pathology, 21(4), 323–329.

Chang, R. B., Smith, L., & Schlegel, R. (1984). The stability of ethyl alcohol in forensic blood specimens. Journal of Analytical Toxicology, 8(2), 66–67.

Christophersen, A. S. (1986). Tetrahydrocannabinol stability in whole blood: plastic versus glass containers. Journal of Analytical Toxicology, 10(4), 129–131.

Cirimele, V., Kintz, P., & Ludes, B. (2002). Determination of chronic abuse of the anaesthetic agents midazolam and propofol as demonstrated by hair analysis. International Journal of Legal Medicine, 116(1), 54–57.

Clauwaert, K. M., De Letter, E. A., Lambert, W. E., & Van Bocxlaer, J. F. (2000). Segmental analysis for cocaine and metabolites by HPLC in hair of suspected drug overdose cases. Forensic Science International, 110(3), 157–166.

Clauwaert, K. M., Van Bocxlaer, J. F., Lambert, W. E., & De Leenheer, A. P. (2001). Stability study of the designer drugs 'MDA, MDMA and MDEA' in water, serum, whole blood, and urine under various storage temperatures. Forensic Science International, 124(1), 36–42.

Coe, J. I. (1977). Postmortem chemistry of blood, cerebrospinal fluid, and vitreous humor. Legal Medicine Annual 1976, 55–92.

Coe, J. I. (1993). Postmortem chemistry update: Emphasis on forensic application. The American Journal of Forensic Medicine and Pathology, 14(2), 91–117.

Crouch, D. J. (2005). Oral fluid collection: The neglected variable in oral fluid testing. Forensic Science International, 150(2-3), 165–173.

Curry, A. S., Lloyd, R. J., & Rutter, E. R. (1967). The production of cyanide in post mortem material. Acta Pharmacologica et Toxicologica, 25(3), 339–344.

Curtis, J., & Greenberg, M. (2008). Screening for drugs of abuse: Hair as an alternative matrix: A review for the medical toxicologist. Clinical Toxicology, 46(1), 22–34.

Dasgupta, A. (2007). The effects of adulterants and selected ingested compounds on drugs-of-abuse testing in urine. American Journal of Clinical Pathology, 128(3), 491–503.

Davis, C. M., Fenimore, D. C., & Farmer, R. W. (1977). Improved gas chromatographic analysis of chlorpromazine in blood serum. Clinica Chimica Acta, 78(1), 71–77.

Dextraze, P., Sarlin, J., & Cimbura, G. (1989). Comparison of fluorescence polarization immunoassay, enzyme immunoassay, and thin-layer chromatography for urine cannabinoid screening: Effects of analyte adsorption and vigorous mixing of specimen on detectability. Annals of Clinical and Laboratory Science, 19(2), 133–138.

Dick, G. L., & Stone, H. M. (1987). Alcohol loss arising from microbial contamination of drivers' blood specimens. Forensic Science International, 34(1-2), 17–27.

Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., Duarte, J. A., Remião, F., Marques, A., Santos, A., & Magalhães, T. (2010). Collection of biological samples in forensic toxicology. Toxicological Mechanisms and Methods, 20(7), 363–414.

Drummer, O. H. (2004). Postmortem toxicology of drugs of abuse. Forensic Science International, 142(2-3), 101–113.

Drummer, O. H., & Gerostamoulos, J. (2002). Postmortem drug analysis: Analytical and toxicological aspects. Therapeutic Drug Monitoring, 24(2), 199–209.

DuBey, I. S., & Caplan, Y. H. (1996). The storage of forensic urine drug specimens as dry stains: Recovery and stability. Journal of Forensic Sciences, 41(5), 845–850.

Francom, P., Brush, D., George, C. E., & Doshier, G. A. (1988). Determination of LSD in urine by capillary column gas chromatography and electron impact mass spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 12(1), 1–8.

Giorgi, S. N., & Meeker, J. E. (1995). A 5-year stability study of common illicit drugs in blood. Journal of Analytical Toxicology, 19(6), 392–398.

Glendening, B. L., & Waugh, T. C. (1965). The stability of ordinary blood alcohol samples held at various periods of time under different conditions. Journal of Forensic Sciences, 10(2), 192–200.

Gray, T., & Huestis, M. (2007). Bioanalytical procedures for monitoring in utero drug exposure. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388(7), 1455–1465.

Hargrove, V. M., & McCutcheon, J. R. (2008). Comparison of drug concentrations taken from clamped and unclamped femoral vessels. Journal of Analytical Toxicology, 32(8), 621–625.

Heller, S., Bücking, S., & Gries, W. (2004). Assessment of storage and transport stability of new antidepressant and antipsychotic drugs for a nationwide TDM service. Therapeutic Drug Monitoring, 26(4), 459–461.

Hepler, B. R., & Isenschmid, D. S. (2007). Specimen selection, collection, preservation and security. In S. B. Karch (Ed.), Drug abuse handbook (2nd ed., pp. 975–991). CRC Press.

Högberg, J., Hanberg, A., Berglund, M., Skerfving, S., Rylander, L., & Axelsson, G. (2008). Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. Environmental Health Perspectives, 116(3), 334–339.

Holmgren, P., Druid, H., Holmgren, A., & Ahlner, J. (2004). Stability of drugs in stored postmortem femoral blood and vitreous humor. Journal of Forensic Sciences, 49(4), 820–825.

Honey, D., O'Driscoll, P., & Jalloh, H. (2005). Comparative alcohol concentrations in blood and vitreous fluid with illustrative case studies. Journal of Analytical Toxicology, 29(5), 365–369.

Introna, F., Campobasso, C. P., & Goff, M. L. (2001). Entomotoxicology. Forensic Science International, 120(1-2), 42–47.

Isenschmid, D. S., Levine, B. S., & Caplan, Y. H. (1989). A comprehensive study of the stability of cocaine and its metabolites. Journal of Analytical Toxicology, 13(5), 250–256.

Jamerson, M. H., Huestis, M. A., & Goldberg, M. (2005). Urine pH, container composition, and exposure time influence adsorptive loss of 11-nor-delta9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid. Journal of Analytical Toxicology, 29(7), 627–631.

Johnson, J. R., Jennison, T. A., Peat, M. A., & Wong, A. S. (1984). Stability of Δ^9-tetrahydrocannabinol (THC), 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC in blood and plasma. Journal of Analytical Toxicology, 8(5), 202–204.

Jones, G. R. (2007). Interpretation of post-mortem drug levels. In S. B. Karch (Ed.), Drug abuse handbook (2nd ed., pp. 1069–1085). CRC Press.

Karinen, R., Øiestad, E. L., Knapskog, A. B., Hasvold, I., & Morland, J. (2010). Comparison of ethanol and other drugs of abuse concentrations in whole blood stored in Venoject glass and plastic and Venosafe plastic evacuated tubes. Journal of Analytical Toxicology, 34(8), 420–428.

Kerrigan, S. (2002). In vitro production of gamma-hydroxybutyrate in antemortem urine samples. Journal of Analytical Toxicology, 26(8), 571–574.

Kerrigan, S., & Goldberger, B. A. (2005). Forensic toxicology. In V. Lynch (Ed.), Forensic nursing (pp. 539–559). Elsevier Mosby.

Kidwell, D. A., Holland, J. C., & Athanaselis, S. (1998). Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 713(1), 111–135.

Kintz, P., Villain, M., & Ludes, B. (2006). Hair analysis for drug detection. Therapeutic Drug Monitoring, 28(3), 442–446.

Knerr, I., Schossig, A., Kustermann-Kuhn, B., Lehnert, W., & Koch, H. G. (2007). Diagnostic challenges in a severely delayed infant with hypersomnolence, failure to thrive and arteriopathy: A unique case of gamma-hydroxybutyric aciduria and Williams syndrome. American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics, 144B(7), 946–948.

Kratzsch, C., Tenberken, O., Peters, F. T., Weber, A. A., & Maurer, H. H. (2003). Screening, library-assisted identification and validated quantification of fifteen neuroleptics and three of their metabolites in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. Journal of Mass Spectrometry, 38(3), 283–295.

Kratzsch, C., Peters, F. T., Weber, A. A., & Maurer, H. H. (2004). Screening, library-assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumazenil, zaleplone,

zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. Journal of Mass Spectrometry, 39(8), 856–872.

LeBeau, M. A., Montgomery, M. A., & Morris-Kukoski, C. L. (2000). Elevated GHB in citrate-buffered blood. Journal of Analytical Toxicology, 24(5), 383–384.

LeBeau, M. A., Morris-Kukoski, C. L., Baumann, M. H., & Kalasinsky, K. S. (2007). Further evidence of in vitro production of gamma-hydroxybutyrate (GHB) in urine samples. Forensic Science International, 169(2-3), 152–156.

Levine, B., Smith, M. L., & Smialek, J. E. (1983). Postmortem stability of benzodiazepines in blood and tissues. Journal of Forensic Sciences, 28(1), 102–115.

Lokan, R. J., James, R. A., & Dinan, J. P. (1987). Apparent post-mortem production of high levels of cyanide in blood. Journal of the Forensic Science Society, 27(4), 253–259.

Lozano, J., Kintz, P., & Raudrant, D. (2007). Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse. Therapeutic Drug Monitoring, 29(6), 711–734.

Moody, D. E., Crouch, D. J., Okasinski, G. F., & Schroeder, J. R. (1999). Long-term stability of abused drugs and antiabuse chemotherapeutical agents stored at -20°C. Journal of Analytical Toxicology, 23(6), 535–540.

Moriya, F., & Hashimoto, Y. (1997). Distribution of free and conjugated morphine in body fluids and tissues in a fatal heroin overdose: Is conjugated morphine stable in postmortem specimens? Journal of Forensic Sciences, 42(4), 736–740.

Musshoff, F., Junker, H., Wiese, B., & Madea, B. (2006). An automated and fully validated LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of 11 opioids used in palliative care, with 5 of their metabolites. Journal of Mass Spectrometry, 41(5), 633–640.

Nakahara, Y. (1999). Hair analysis for abused and therapeutic drugs. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 733(1-2), 161–180.

O'Neal, C. L., & Poklis, A. (1996). Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation: A critical review. The American Journal of Forensic Medicine and Pathology, 17(1), 8–20.

Pelissier-Alicot, A. L., Gaulier, J. M., Champsaur, P., & Marquet, P. (2003). Mechanisms underlying postmortem redistribution of drugs: A review. Journal of Analytical Toxicology, 27(8), 533–544.

Peters, F. T. (2007). Stability of analytes in biosamples–an important issue in clinical and forensic toxicology? Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388(7), 1505–1519.

Pötsch, L., & Skopp, G. (1996). Stability of opiates in hair fibers after exposure to cosmetic treatment. Forensic Science International, 81(1), 95–102.

Prouty, R. W., & Anderson, W. H. (1990). The forensic science implications of site and temporal influences on postmortem blood-drug concentrations. Journal of Forensic Sciences, 35(2), 243–270.

Rao, M. L., Hiemke, C., & Grabe, A. (1994). Monitoring tricyclic antidepressant concentrations in serum by fluorescence polarization immunoassay compared with gas chromatography and HPLC. Clinical Chemistry, 40(6), 929–933.

Robertson, M. D., & Drummer, O. H. (1995). Postmortem drug metabolism by bacteria. Journal of Forensic Sciences, 40(3), 382–386.

Robertson, M. D., & Drummer, O. H. (1998). Stability of nitrobenzodiazepines in postmortem blood. Journal of Forensic Sciences, 43(1), 5–8.

Silva, M. J., Slakman, A. R., Reidy, J. A., Preau, J. L., Herbert, A. R., Samandar, E., & Needham, L. L. (2005). Automated solid-phase extraction and quantitative analysis of 14 phthalate metabolites in human serum using isotope dilution-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 29(8), 819–824.

Skopp, G. (2004). Preanalytic aspects in postmortem toxicology. Forensic Science International, 142(2-3), 75–100.

Skopp, G., & Pötsch, L. (2002). Stability of 11-nor-Δ^9-carboxy-tetrahydrocannabinol glucuronide in plasma and urine assessed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clinical Chemistry, 48(2), 301–306.

Skopp, G., & Pötsch, L. (2004). An investigation of the stability of free and glucuronidated 11-nor-Δ^9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in authentic urine samples. Journal of Analytical Toxicology, 28(1), 35–40.

Skopp, G., Pötsch, L., & Klingmann, A. (2001). Stability of morphine, morphine-3-glucuronide, and morphine-6-glucuronide in fresh blood and plasma and postmortem blood samples. Journal of Analytical Toxicology, 25(1), 2–7.

Society of Forensic Toxicologists (SOFT) & American Academy of Forensic Sciences (AAFS). (2006). Forensic toxicology laboratory guidelines. https://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf

Stout, P. R., Horn, C. K., & Klette, K. L. (2000). Loss of THCCOOH from urine specimens stored in polypropylene and polyethylene containers at different temperatures. Journal of Analytical Toxicology, 24(7), 567–571.

Toennes, S. W., & Kauert, G. F. (2001). Importance of vacutainer selection in forensic toxicological analysis of drugs of abuse. Journal of Analytical Toxicology, 25(5), 339–343.

Tracy, T. S., Klinke, B., & Marra, C. (2001). Stability of benzodiazepines in formaldehyde solutions. Journal of Analytical Toxicology, 25(3), 166–173.

Tsatsakis, A. M., Koutselinis, A., & Tsakalof, A. (2001). Evaluation of the addiction history of a dead woman after exhumation and sectional hair testing. The American Journal of Forensic Medicine and Pathology, 22(1), 73–77.

Yarema, M. C., & Becker, C. E. (2005). Key concepts in postmortem drug redistribution. Clinical Toxicology, 43(4), 235–241.

Zumwalt, R. E., Bost, R. O., & Sunshine, I. (1982). Evaluation of ethanol concentrations in decomposed bodies. Journal of Forensic Sciences, 27(3), 549–554.

CHAPTER (4) الفصل الرابع



العمليات المختبرية الأساسية

BASIC LABORATORY OPERATIONS

الفصل الرابع

العمليات المختبرية الأساسية

BASIC LABORATORY OPERATIONS

مقدمة (Introduction)

تكتسب إدارة الجودة، بما في ذلك اعتماد المختبرات — أي التفتيش وإصدار شهادات مستقلة للمختبرات لضمان جودة وموثوقية العمل المنتج قدر الإمكان — أهمية متزايدة (Burnett, 2002). يناقش هذا الفصل القضايا المتعلقة بالاعتماد والجودة، لا سيما فيما يتعلق بالتحليل الكمي. ويجب أن تصف الإجراءات المكتوبة، والتي تُعرف عادةً بـ **إجراءات التشغيل القياسية** ($Standard\ Operating\ Procedures - SOPs$) أو **الإجراءات المختبرية** ($Laboratory\ Procedures - LPs$)، جميع جوانب العمليات المختبرية، بما في ذلك إدارة المختبر. ويمكن تقسيم العمليات المختبرية إلى ثلاث مراحل رئيسية: ما قبل التحليل، التحليل، وما بعد التحليل (**الإطار 1**).

تعتمد طرق التحليل الفعلية المستخدمة على الظروف المحلية والموارد المتاحة. وليس من الضروري الالتزام بمنهجية موحدة حصرياً، بل يكفي أن تعطي الطريقة المستخدمة نتائج دقيقة، موثوقة، وقابلة للتكرار عندما تُوظف للغرض المخصص لها. ويجب أن يتوافق التحقق من صحة المقايسة ($Assay\ validation$) قدر الإمكان مع توجيهات "مركز تقييم وأبحاث الأدوية" ($CDER$) التابع لـ "إدارة الغذاء والدواء الأمريكية" (FDA) بشأن التحقق من صحة الطرق الحيوية التحليلية (FDA/CDER, 2001). كما يجب حساب بيانات التكرارية داخل اليوم الواحد ($Repeatability$)، والدقة بين الأيام المختلفة، والدقة الكلية ($Intermediate\ precision$) وفقاً للبروتوكول المعياري المقترح من قبل "معهد المعايير السريرية والمختبرية" ($CLSI$, 2004).

الإطار 1: مراحل تشغيل مختبر السموم التحليلي

- **مرحلة ما قبل التحليل** ($Pre - analytical$)**:** يجب وضع إجراءات تفصيلية لتقديم المشورة بشأن جمع العينات المناسبة (بما في ذلك أنابيب العينات المعتمدة)، وضمان النقل الآمن للعينات البيولوجية، واستلامها وتخزينها بصورة سليمة بمجرد وصولها إلى المختبر، مع تحديد أولويات التحليل بدقة.
- **مرحلة التحليل** ($Analytical$)**:** يجب استخدام إجراءات مختبرية تم التحقق من صحتها مسبقاً (أي مجربة ومختبرة بدقة) لإجراء التحاليل المطلوبة أو المناسبة، بالدرجة الكافية من الدقة والموثوقية، وضمن إطار زمني ملائم.
- **مرحلة ما بعد التحليل** ($Post - analytical$)**:** يجب توافر آلية معتمدة لإبلاغ النتائج والحفاظ على سريتها التامة عبر الهاتف، الفاكس، الوسائل الإلكترونية الآمنة، أو كتابةً. كما يجب توفير التفسير الإكلينيكي والشرعي الصحيح للنتائج، سيما للمواد التحليلية غير الشائعة. ويُشترط الاحتفاظ بالسجلات الكاملة للتحليل لمدة لا تقل عن 5**سنوات** (وتُمدد إلى 10**سنوات أو أكثر** إذا كانت القضية ذات مضامين طبية شرعية). ويجب تخزين بقايا العينات البيولوجية بشكل مناسب لحين التخلص الآمن منها في إطار زمني متفق عليه مسبقاً.

الكواشف والمحاليل القياسية (Reagents and Standard Solutions)

يتم تصنيف المواد الكيميائية التي يتم الحصول عليها من موردين معتمدين عادةً حسب درجة نقائها [مثل: **درجة الكاشف التحليلي** (AR أو $AnalaR$)، **درجة الكاشف للأغراض العامة** (GPR)، أو **درجة الكاشف المختبري**]. وبشكل عام، يجب استخدام المواد ذات أعلى درجات النقاء المتاحة في العمل التحليلي السمومي. وغالباً ما يُشار إلى الحدود القصوى للشوائب المعروفة أو المؤثرة على ملصق العبوة، إلى جانب ظروف التخزين الموصى بها.

التحديات الكيميائية والفيزيائية للمحاليل:

- **المواد المتميعة ($Hygroscopic$):** تمتص بعض المواد الكيميائية بخار الماء الجوي بسهولة، وتظل إما صلبة متميعة (مثل ملح الصوديوم للفينيتوين) أو تذوب وتتحول إلى محلول سائل (مثل حمض ثلاثي كلورو أسيتيك)؛ وبالتالي يجب تخزينها حصراً داخل **مجفف معملي** ($Desiccator$).
- **امتصاص ثاني أكسيد الكربون:** تمتص مواد أخرى (مثل هيدروكسيد الصوديوم) غاز ثاني أكسيد الكربون الجوي بسهولة، سواء كانت في حالتها الصلبة أو ضمن المحاليل. وتؤدي المحاليل القلوية الممتصة للـ CO_2 إلى انخفاض تدريجي في قيمة الرقم الهيدروجيني (pH).
- **النمو الميكروبي:** تنمو البكتيريا والفطريات – التي تظهر غالباً على شكل رواسب عكرة – في غالبية المحاليل المائية، سيما محاليل **فوسفات المنظم** ($Phosphate\ buffer\ solutions$). ولا يقتصر خطر النمو البكتيري على تغيير تركيبة المحلول فحسب، بل يشكل مصدراً خطيراً للتلوث، خصوصاً عند فحص الجزيئات البيولوجية الدقيقة (مثل الأحماض الأمينية والبروستاغلاندين).



حسابات التركيز والكتلة الجزيئية:

غالباً ما يتم تحضير تركيزات المحاليل المنظمة بوحدة **مول لتر**$^{-1}$ **(**mol L^{-1} **أو** M**)** [مع الإشارة إلى أن الأدبيات القديمة قد تستخدم الرمز (M) للدلالة على المولارية]. وغالباً ما توجد الكتلة الجزيئية النسبية للملح (ويُشار إليها أحياناً بوزن الصيغة، $Formula\ weight$) على ملصق العبوة أو في كتالوج المورد.

- *مثال عملي:* لتحضير محلول بتركيز محدد من مركب فوسفات هيدروجين ثنائي الصوديوم، يجب وزن الكتلة الملائمة (بالجرام) للملح المتوفر، وإذابته في حجم يقل عن لتر واحد من الماء المنقى، ثم إكمال الحجم الكلي إلى لتر واحد $(1\ \text{L})$ بالماء. وإذا تطلب البروتوكول وزناً دقيقاً لملح معين، فيجب الالتزام بالملح المحدد حصراً، أو إجراء **التصحيح الحسابي المناسب** إن لم يكن متوافراً بالصيغة ذاتها (لتجنب الأخطاء الشائعة؛ مثل الخلط بين "فوسفات هيدروجين ثنائي الصوديوم ثنائي الهيدرات" -ملح سورنسن- وبين الملح الشائع الآخر "اثنا عشري الهيدرات" - $Dodecahydrate$).

اعتبارات تحضير المعايير الدوائية:

إن تحضير المحاليل القياسية للأدوية والسموم قد يتسم بقدر إضافي من التعقيد:

- بالنسبة للأدوية التي تُعتبر **إلكتروليتات ضعيفة**، جرى العرف على إبلاغ نتيجة الفحص الكمي من حيث تركيز **"الحمض" أو "القاعدة" الحرة** $(Free\ acid/base)$.
- ومع ذلك، فإن العديد من المركبات تُورّد وتُباع على شكل **أملاح**، وقد توفر الشركات الموردة خيارات متعددة لذات المادة؛ فمثلاً، يورد أحد الموردين مركب **الكودايين** إما على هيئة قاعدة (رقم التسجيل $(CAS: 3-57-76$؛ الكتلة الجزيئية تساوي $299.36)$ أو على هيئة كبريتات $(CAS: 7-53-1420$؛ الكتلة الجزيئية تساوي $696.81)$. كما قد يتوافر **المورفين** كسلفات لا مائية، هيدروكلوريد، سلفات خماسي الهيدرات، أو طرطرات لا مائية $(CAS: 8-31-302)$ (مع ملاحظة أن حمض الطرطريك ثلاثي القاعدية، لكن الملح في الواقع هو "طرطرات هيدروجين ثنائي المورفين").
- ومن المعلومات الحاسمة المطلوبة بدقة: **عدد جزيئات ماء التبلور** لكل جزيء من الملح ليتسنى حساب الأوزان المعيارية بدقة متناهية (**الإطار 2**).

ملاحظة منهجية نهائية: ما لم يتم تعريف أو تخصيص المصطلح بصورة صريحة خلاف ذلك، يجب حصر استخدام مصطلحي **"حر" (**$Free$**)** و**"كلي" $(Total)$** في التقارير المعملية والشرعية للدلالة حصراً على: قياسات الأدوية غير المرتبطة بالبروتين، والقياسات التي تُجرى بعد إتمام التحلل الكامل للنواتج الأيضية المقترنة $(Conjugated\ metabolites)$، على التوالي.

المركبات المرجعية (Reference Compounds)

يُشترط تسجيل اسم المورد بدقة، ورقم التشغيلة أو الدفعة $(Lot\ number)$، درجة النقاء، تاريخ انتهاء الصلاحية، وأي معلومات توثيقية إضافية تُرفق مع المركب. كما يجب تخزين هذه المركبات في أماكن مظلمة ووفقاً للظروف البيئية الموصى بها من قبل الشركة المصنعة. ويجب بذل أقصى الجهود للحصول على **شهادة تحليل (**$Certificate\ of\ Analysis$**)** أو أي وثائق معيارية مناسبة عند استلام أي دفعة جديدة من المركبات، مع الإشارة إلى أن تقديم هذه المستندات يظل خاضعاً

لتقدير الجهة المصنعة. أما المركبات المرجعية التي يتوقف استخدامها، فيتم التخلص الآمن منها وفقاً للبروتوكولات البيئية والمحلية المعتمدة، ما لم يُطلب رسمياً إرجاعها إلى المورد.

الإطار 2: أوزان المورفين المطلوبة لتحضير لتر واحد من محلول بتركيز $10.00\ \text{mg L}^{-1}$

يوضح الجدول التالي معاملات التصحيح والأوزان اللازمة لتحضير محاليل المورفين بدقة بناءً على صيغته الكيميائية ونقاوته:

المركب$(Compound)$	رقم التسجيل (CAS)	الكتلة الجزيئية (M_r)	الوزن (mg) المحتوي على 10.00 mg قاعدة حرة	الوزن (mg) لتحضير محلول $10.00\ \text{mg L}^{-1}$
مورفين$(Morphine)$	$57-27-2$	285.34	10.00	28.5
هيدروكلوريد المورفين $(Morphine\ hydrochloride)$	$52-26-6$	321.80	11.28	32.1
سلفات المورفين$(Morphine\ sulfate)$	$64-31-3$	668.76	11.72	33.4
سلفات المورفين خماسية الهيدرات $(Morphine\ sulfate\ pentahydrate)$	$6211-15-0$	758.83	14.32	37.9
طرطرات هيدروجين المورفين ثلاثية الهيدرات $(Morphine\ hydrogen\ tartrate\ trihydrate)$	$6032-59-3$	774.82	14.58	38.7

شرح حسابات معاملات التصحيح: تعتمد هذه الحسابات الرياضية حصراً على نسبة الكتلة الجزيئية للملح (M_{salt}) إلى الكتلة الجزيئية لقاعدة المورفين $(M_{base} = 285.34)$، مع مراعاة عدد جزيئات المورفين في الصيغة الكيميائية:

- **هيدروكلوريد المورفين:** كل 321.80 mg من الملح تحتوي على 285.34 mg من القاعدة.

$$\text{معامل التصحيح} = \frac{321.80}{285.34} = 1.128$$

- **سلفات المورفين:** كل 334.38 mg $(668.76/2)$ من الملح تحتوي على 285.34 mg من القاعدة.

$$\text{معامل التصحيح} = \frac{334.38}{285.34} = 1.172$$

- **سلفات المورفين خماسية الهيدرات:** كل 379.42 mg $(758.83/2)$ من الملح تحتوي على 285.34 mg من القاعدة.

$$\text{معامل التصحيح} = \frac{379.42}{285.34} = 1.432$$

- **طرطرات هيدروجين المورفين ثلاثية الهيدرات:** كل 387.41 mg $(774.82/2)$ من الملح تحتوي على 285.34 mg من القاعدة.

$$\text{معامل التصحيح} = \frac{387.41}{285.34} = 1.458$$

استراتيجيات التخزين والتعامل مع المعايير

يمكن تقسيم المواد المرجعية، بل وحتى الكواشف الكيميائية، إلى حصص وأجزاء صغيرة عند استلامها للمرة الأولى، وتخزينها داخل حاويات محكمة الإغلاق مع تقليل المساحة الفارغة فوق المادة $(Headspace)$ إلى الحد الأدنى.

- **المركبّات الحساسة:** يُعد هذا الإجراء مثالياً للمواد المتميعة ($Deliquescent$)، الهيدروسكوبية، وتلك القابلة للأكسدة السريعة؛ لضمان عدم تعرض المادة المرجعية للغلاف الجوي بصورة متكررة. ومع ذلك، قد يتعذر تطبيق ذلك إذا كانت الكميات المتاحة شحيحة جداً أو في حال محدودية مساحة التخزين في الثلاجات المعملية.
- **التوازن الحراري:** يجب ترك المركبات المرجعية التي خُزنت في الثلاجة أو المجمد لفترة **حتى تكتسب درجة حرارة الغرفة تماماً** قبل فتح حاوياتها؛ وذلك لتفادي أخطار تكثف بخار الماء الجوي على المادة الصلبة.

التحقق من النقاء والمعايير الأولية

لضمان درجات دقة فائقة، يجب استخدام أنقى المواد المتاحة لتحضير معايرات القياس ($Calibration\ standards$)، والتأكد من تخزينها السليم، وتجفيفها مسبقاً عند الحاجة. ونظراً للصعوبة البالغة في توفير عينات مرجعية للمركبات النادرة ونواتج الأيض، تُقترح طرائق بديلة للتخليق الحيوي؛ مثل حضين الدواء الأصلي مع خميرة الانشطار (*Schizosaccharomyces pombe*) المعدلة وراثياً للتعبير عن إنزيم التخليق البشري CYP2D6، يلي ذلك عزل ناتج الأيض المستهدف (Peters et al., 2005).

وفي جميع الأحوال، وحال الحصول على معايير أولية من مصادر غير مفصلة كلياً، يصبح لزاماً تكوين تصور واضح عن نقاء كل عينة عبر التدابير الآتية:

1. **الفحص البصري:** لرصد أي تناقضات أو تغيرات لونية قد تشير إلى حصول تحلل مسبق.
2. **التحليل الكروماتوجرافي والطيّفي:** إجراء فحوصات نوعية سريعة مثل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء ($HPLC$)، أو الفحوص الطيفية المختلفة (UV, IR, NMR). كما يُعد **التجفيف لوزن ثابت** مؤشراً واضحاً على نسبة الرطوبة المحتواة.
3. **القياسات الطيفية فوق البنفسجية (UV):** تُعد قياسات الامتصاص الطيفي UVذات قيمة استثنائية؛ حيث يمكن قياس امتصاصية محلول الدواء ومقارنتها بالقيم المعيارية المذكورة في الأدبيات العلمية عبر **الامتصاصية النوعية ($A^{1\%}_{1\ cm}$) أو اللوغاريتمية ($E^{1\%}_{1\ cm}$)**. ويُفضل دوماً قياس هذه القيم عند **طول الموجة الأقصى (λ_{max})** للتقليل من أخطاء معايرة الأطوال الموجية للأجهزة. ورغم احتمال تفاوت الأدبيات، إلا أن التناقض الجذري بين القيمة المرصودة والمذكورة ينبئ بوجود خطأ فادح. ومن الممارسات المعملية الممتازة حفظ الأطياف الطيفية للـ UVكمرجع أساسي للمستقبل.

تحضير وتخزين محاليل المعايرة (Calibration Solutions)

تُتم معايرة المقايسات السمومية روتينياً عبر تحليل محاليل قياسية تحتوي على كل مادة تحليلية مرجعية ضمن نطاق تركيزات ملائم، على أن تُحضّر هذه المحاليل داخل بلازما أو بول **خالٍ تماماً من المادة المستهدفة** ($Blank\ matrix$)، أو أي سائل بيولوجي مناسب آخر.

- **فحص المصفوفة الخالية:** يجب تحليل الوسط أو المصفوفة المختارة مسبقاً قبل إضافة أي مادة تحليلية للتأكد التام من خلوها من أي قمم تداخلية.
- **دقة المعدات:** تُحفظ نظافة الموازين الدقيقة المستعملة لوزن الكواشف ومعايير المعايرة، وكذلك الماصات الآلية وشبه الآلية، وتُخضع لاختبارات دورية للتحقق من دقتها. وتُدون عمليات وزن أثقال التحقق الخاصة بالميزان في سجلات رسمية، بينما تُوثق دقة الماصات عبر تفريغ حجوم مقاسة من الماء المنقى وتسجيل أوزانها.

- **سياسات الشاهد الثنائي:** تقتضي الممارسات المعملية السليمة أن يتم وزن المركبات المرجعية من قبل محلل واحد **ويشهد عليه محلل ثانٍ**، ويسري هذا المبدأ ذاته على الخطوات التابعة لتحضير معايير المعايرة ومحاليل مراقبة الجودة الداخلية (IQC)، كإجراء الحسابات الرياضية والتخفيفات المخبرية.

ممارسات الوزن الدقيق وتحضير المحاليل

ما لم تكن المادة المرجعية شحيحة للغاية، يُفضل وزن كمية "مناسبة" ودقيقة.

- **الدقة الميزانية:** إذا استُخدم ميزان تحليلي رباعي الأرقام (دقة 0.1 mgأو 0.0001 g)، فيمكن وزن كمية مقدارها 10 mgبدقة تصل إلى ± 0.1 mg، وغالباً ما تكون هذه الدقة كافية، سيما إذا كانت دقة الخطوات الحجمية اللاحقة أقل منها شأناً.
- **منع التلوث التبادلي:** من المثالي سكب وتقدير جزء جزئي من المادة المرجعية داخل حاوية نظيفة مستقلة لأخذ عينات الوزن منها، مع **التخلص التام من أي فائض وعدم إعادته نهائياً إلى حاوية المخزون الأساسية**؛ تفادياً لتلوث المادة المرجعية الأم عبر استخدام ملاعق معملية $(Spatulas)$ غير نظيفة.

التقليل من تحيز المشغل:

لتخفيض نسبة التحيز البشري أثناء الوزن، يُفضل **وزن كمية تقريبية دقيقة بدلاً من محاولة مطابقة قيمة صلبة ومحددة مسبقاً** (فمثلاً: يُفضل قبول وزن فعلي قدره 9.82 mgوتسجيله بدقة، عوضاً عن إهدار الوقت في محاولة الوصول إلى 10.00 mgتماماً). وبفضل الانتشار الواسع للحاسبات الرقمية وجداول البيانات الإلكترونية، لم تعد الحسابات المعقدة الناتجة عن هذه الأوزان الفريدة تشكل أي عاقة تشغيلية كما كان الحال في حقبة رسم منحنيات المعايرة يدوياً.

نصيحة تقنية: لتلافي أخطاء نقل المحاليل والمساحيق، يمكن إجراء عملية **الوزن مباشرة داخل الدورق الحجمي** **$(Volumetric\ flask)$**. وتبرز جدوى هذه الطريقة بوضوح عند توفر كميات شحيحة ومحدودة من المادة، وهي سمة شائعة في سموميات التحليل. ومع ذلك، يجب دائماً مراعاة درجة ذوبانية المادة في المذيب المختار عند اختيار حجم الدورق المناسب.

القياسات الحجمية والماصات (Volumetric Measurements and Pipettes)

تُعد القياسات الحجمية بطبيعتها أقل دقة ودنوّاً مقارنة بالقياسات الوزنية البحتة؛ لذا تستوجب العمليات المعملية استخدام أدوات زجاجية معيارية وماصات فائقة الجودة:

1. **قواعد التعامل مع الزجاجيات:** يجب **عدم تجفيف الزجاجيات الحجمية مطلقاً عن طريق التسخين بالفرن**، لتفادي تشوهها الحراري وتغير سعتها الحجمية المعيارية.
2. **عامل اللزوجة:** تُمثل السوائل البيولوجية (كالدم والبلازما) سوائل عالية اللزوجة مقارنة بالماء الصافي، وعليه فهي تتطلب أوقات تفريغ أطول لضمان سكب الحجم الكامل بدقة.
3. **الماصات شبه الآلية:** خُنعت هذه الماصات ومعيرت خصيصاً لقياس السوائل المائية البحتة (بكثافة نسبية تعادل 1.0)؛ ولهذا السبب، **يحظر استخدامها مع المذيبات العضوية** أو المحاليل ذات الكثافة واللزوجة المختلفة جذرياً عن الماء.

4. **الإزاحة الموجبة** $(Positive\ displacement\ pipettes)$**:** تُعد الخيار الإلزامي والوحيد للتعامل مع السوائل شديدة اللزوجة مثل الدم الكامل. كما أن استخدام نفس الماصة مع رؤوس $(Tips)$ جديدة، نظيفة، ومناسبة يضمن الإلغاء التام لأي خطأ نظامي $(Systematic\ error)$ في الحجم المُسلّم.

تحضير منحنيات المعايرة (Calibration Curves)

يجب أن يغطي منحنى المعايرة بكفاءة **نطاق التركيزات المتوقع** لوجود المادة في عينات المرضى أو الضحايا، مع **منع إجراء أي "استكمال"** $(Extrapolation)$ **للمنحنى** خارج نطاق المعايير المعتمدة (سواء بالزيادة أو النقصان).

- **التعامل مع العينات المتطرفة:** إذا جاءت تركيزات عينة ما أقل من أدنى معيار معايرة موجود بالمنحنى، فيتعين إعادة الفحص باستخدام تركيزات أدنى، أو الاكتفاء بالإبلاغ بأن النتيجة هي "أقل من أدنى معيار معايرة". أما العينات ذات التركيزات العالية جداً، فيمكن تخفيفها باستخدام **مصفوفة فارغة مطابقة** $(Blank\ matrix)$ لتندرج ضمن نطاق المعايرة المعتمد، شريطة إثبات صحة وصلاحية هذا الإجراء مسبقاً أثناء مراحل تطوير وتطويع الطريقة التحليلية.
- **مطابقة مصفوفة العينة:** يجب إنجاز التخفيفات اللازمة بالاستعانة **بنفس المصفوفة البيولوجية** (كاستخدام بلازما فارغة ومنزوعة الدواء مأخوذة من نفس الفرد إن أمكن) أو مصفوفة وثيقة الشبه بها. وغالباً ما يُلجأ إلى استخدام **مصل العجل حديث الولادة** $(Neonatal\ calf serum)$ في تحضير محاليل المعايرة لاختبارات البلازما أو المصل البشري نظراً لتوافره وخصائصه الملائمة.
- **التحقق المعياري:** يجب التحقق التام من صلاحية محاليل المعايرة المُحضرة حديثاً قبيل الشروع في استخدامها التحليلي، وذلك بمقارنتها بمحاليل معايرة قديمة معتمدة أو بمحاليل مراقبة الجودة الداخلية (IQC) المُحضرة مسبقاً في بلازما أو مصل بشري موثوق.

اعتبارات دم بنك الدم والأجهزة المبردة:

يُستخدم أحياناً دم بنك الدم الكامل (دم النقل) لتحضير معايير المعايرة، إلا أن هذا الدم والمشتقات البلازمية الناتجة عنه تتسم بخصائص حرجة تتطلب الانتباه:

1. غالباً ما يكون مخففاً بمحلول السترات، والذي يتمتع بقدرة تنظيمية عالية $(High\ buffering\ capacity)$.
2. يحتوي على مادة الليدوكائين وأحياناً نواتج أيضه العلاجية.
3. قد يحوي بصورة مؤكدة مواد ملدنة $(Plasticisers)$ وملوثات أخرى قادرة على التداخل مع الفحوصات الكروماتوغرافية والتحاليل الأخرى، وقد تؤدي إلى إحداث تغيرات مضللة في توزيع الأدوية بين خلايا الدم الحمراء والبلازما نتيجة تأثيرها على الارتباط البروتيني.

وتواجه عينات الدم الخيلي أو البقري التجارية بعض هذه المشكلات المشابهة.

الشروط اللوجستية وتخزين المحاليل:

- فور اجتياز معايير المعايرة ومحاليل مراقبة الجودة الداخلية $(IQCs)$ المُحضرة حديثاً لكافة معايير القبول المعملية، يجب نقلها فوراً إلى أنابيب بلاستيكية سعة 3 ml، ووضع ملصقات تعريفية واضحة عليها، وتخزينها في درجات حرارة مناسبة $(-20^{\circ}\ C)$ لحين موعد الاستخدام الفعلي.

- يجب تعليق **سجلّات التنظيف وقوائم المحتويات** بصورة ظاهرة على أبواب جميع الثلاجات والمجمدات المعملية لتلبية متطلبات الأمن والسلامة المهنية. كما يجب تزويد هذه الوحدات التخزينية بنظم إنذار مبكر عند الأعطال وأجهزة مراقبة دقيقة لدرجات الحرارة، مع ضرورة الاحتفاظ بسجلات ورقية أو إلكترونية منتظمة لدرجات الحرارة.

جوانب التحليل الكمي (Quantitative Analytical Aspects)

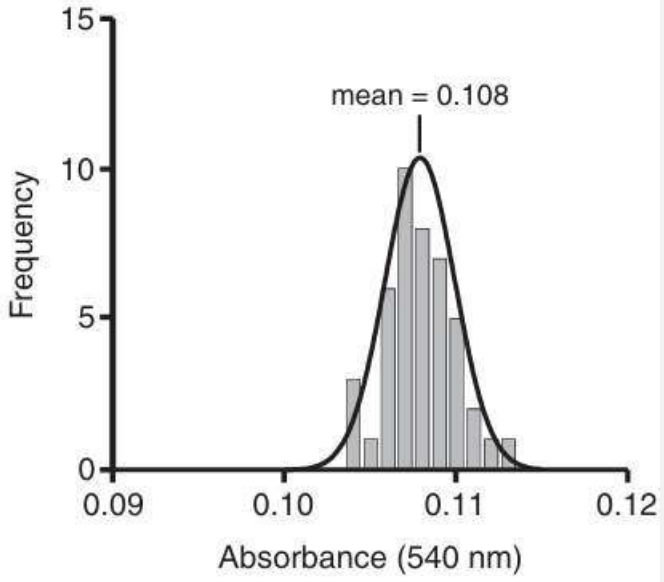
الخطأ التحليلي (Analytical Error)

عادةً ما تُسفر التحليلات المتكررة لعينة واحدة عن قيم غير متطابقة تماماً، ويرجع ذلك إلى الأخطاء المرتبطة بالعمليات التحليلية. وتنقسم هذه الأخطاء إلى نوعين رئيسيين:

- **الأخطاء العشوائية ($Random\ errors$):** وهي تذبذبات حتمية غير متوقعة تؤثر على كل قياس على حدة.
- **الأخطاء النظامية ($Systematic\ errors$):** وهي انحرافات منتظمة وثابتة الاتجاه (مثل استخدام ماصة معيرة بشكل غير صحيح، أو تفاوت نسب الاسترداد أثناء الاستخلاص السائل-سائل $[LLE]$).

ويجب التحقيق الفوري في الأخطاء النظامية والعمل على إزالتها أو تطبيق التصحيح المناسب لها. ويمكن تقليل بعض هذه الأخطاء من خلال أساليب العمل التنفيذية، مثل **استخدام نفس الماصة الآلية لمعايير المعايرة وللعينات الفحصية معاً**. أما الأخطاء الجسيمة ($Gross\ errors$) – كإسقاط عينة أو إضافة كاشف كيميائي خاطئ – فغالباً ما تكون واضحة للعيان أو يُكشف عنها عبر الانخفاض الحاد والسيئ جداً في نسبة استرداد المعيار الداخلي ($Internal\ standard$).

إن أي قياس معملي هو في حقيقته **تقدير تقريبي للقيمة "الحقيقية"**؛ ونتيجة لذلك، يرتبط كل قياس بخطأ محدد يعبر عن الفرق بين القيمة الحقيقية وتلك المقاسة. وعند إجراء قياسات متكررة، تتوزع النتائج لتغطي نطاقاً من القيم. ورغم إمكانية الإبلاغ عن النتيجة كمتوسط حسابي لقيم القياسات، إلا أن القيم المتطرفة عند الطرفين (الأكبر والأصغر) لا تقدم تمثيلاً دقيقاً لتوزيع النتائج حول المتوسط. وإذا استُخدم عدد كبير وكافٍ من التكرارات، فيمكن معاينة هذا التوزيع بصرياً عبر **مخطط ترددي أو مدرج تكراري**.



الشكل 1: رسم بياني لتوزيع قياسات الامتصاص المتكررة (عددها 44) لسلفاديميدين البلازما. *(الخط المتصل يمثل منحنى غاوسي مُلائم للبيانات؛ حيث المتوسط الحسابي = 0.108، والانحراف المعياري = 0.002).*

- **المجتمع ($Population$):** يُعرف بأنه مجموعة كل القياسات الممكنة (بعدد لا نهائي).
- **العينة:** يمثل المدرج التكراري للنتائج الحالية (**الشكل 1**) عينة إحصائية مسحوبة من ذلك المجتمع الأصلي.



صورة للمؤلفين وهم يناقشون / **جوانب التحليل الكمي (Quantitative Analytical Aspects)**

الإحصاءات المعلمية والتوزيع الطبيعي (*Parametric Statistics*)

تخضع توزيعات المجتمع للقياسات التحليلية غالباً لما يُسمى **بالتوزيع الطبيعي (*Normal distribution*)** أو **"منحنى غاوسي" (*Gaussian curve*)**. وفي غياب أي أخطاء نظامية، فإن **متوسط المجتمع (μ)** يمثل حصراً القيمة الحقيقية المستهدفة. وتُعرف الإحصاءات القائمة على مثل هذه التوزيعات المنتظمة بالإحصاءات **"المعلمية"**.

يمكن وصف مدى اتساع وتشتت المنحنى من خلال **الانحراف المعياري للمجتمع (σ)**؛ وكلما ارتفعت قيمة الانحراف المعياري، زاد عرض المنحنى ودل ذلك على زيادة التشتت. وفي نطاق التوزيع الطبيعي المعياري:

- تقع حوالي 68%من النتائج الإجمالية ضمن نطاق $\pm 1\sigma$من المتوسط.
- تقع 95%من النتائج ضمن نطاق $\pm 2\sigma$ (1.96σ).
- تقع 99.7%من النتائج ضمن نطاق $\pm 3\sigma$من المتوسط الحسابي.

الحسابات الرياضية للمعيار الطبيعي:

إذا كانت قيم μو σ معلومة، فمن الممكن حساب النسبة الدقيقة للقيم التي تقع ضمن أي فترة. أولاً، يتم الحصول على "المتغير الطبيعي المعياري" **(Standardized normal variable)** z:

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma} \quad (1)$$

ثم يمكن استخدام جداول قيم zللتأكد من نسبة القيم التي تقع خارج النطاق، أو يمكن استخدام دالة NORMSDIST(z) في برنامج Microsoft Excel، والتي تحسب:

$$f(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{z^2}{2}\right) \quad (2)$$

باستخدام قيم ± 1.96، نحصل على 0.025و 0.975على التوالي. وبالتالي، فإن 95% من النتائج تقع ضمن نطاق $\pm 1.96\sigma$. وبالمثل، يمكن استخدام الصيغة لإثبات أن 99% من النتائج تقع ضمن $\pm 2.58\sigma$من المتوسط، و99.9% ضمن $\pm 3.29\sigma$.

من الواضح أنه لا يمكن قياس μو σمباشرة، بل يجب تقديرهما من قيم العينة. متوسط العينة $(\bar{x})$ هو:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n} \quad (3)$$

والانحراف المعياري للعينة (s) هو:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(\bar{x} - x)^2}{n - 1}} \quad (4)$$

وتاين العينة هو s^2. في هذه الحالة، $(n - 1)$ هو عدد "درجات الحرية" (**Degrees of freedom**)، وبالتالي فإن التباين هو مجموع المربعات مقسوماً على درجات الحرية. لاحظ أن قيم المجتمع تُرمز بأحرف يونانية، بينما تُرمز قيم العينة بأحرف لاتينية.

ما لم يحدث ذلك بمحض الصدفة، فإن متوسط العينة المحسوب لن يكون مطابقاً تماماً لقيمة متوسط المجتمع، ولكن كلما زاد عدد القياسات المدرجة في حسابه، اقتربت القيمتان من بعضهما البعض. يُعرف الخطأ في متوسط العينة باسم "الخطأ المعياري للمتوسط" (**Standard error of the mean - s.e.m.**):

$$\text{s.e.m.} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

وهذا يعطي مقياساً لتغير $\bar{x}$. غالباً ما يكون وصف الانحراف المعياري كنسبة أو مئوية من المتوسط أكثر إفادة. هذا هو "الانحراف المعياري النسبي" (**Relative standard deviation - RSD**)، المعروف أيضاً باسم "معامل الاختلاف" (**Coefficient of variation - CV**):

$$\text{RSD} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (6)$$

فترات الثقة (Confidence intervals)

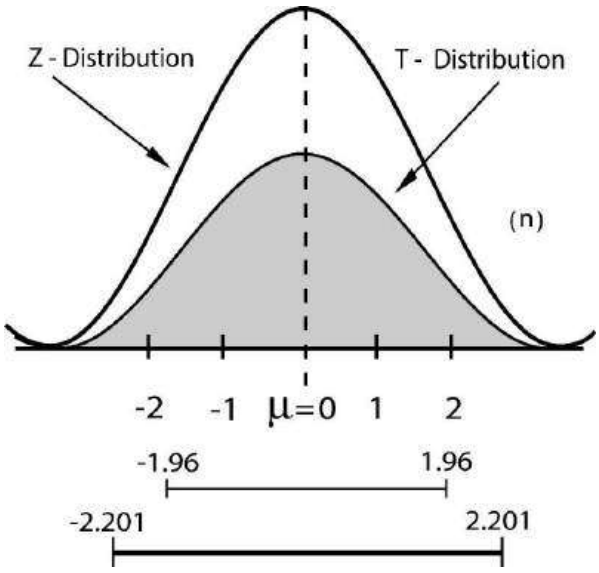
عندما يكون حجم العينة (n) كبيراً $(200 <)$، يُعتبر الانحراف المعياري للعينة (s) تقديراً موثوقاً لانحراف المجتمع المعياري (σ)، وتُعطى الصيغة العامة لفترة الثقة بالمعادلة التالية:

$$\bar{x} \pm \frac{zs}{\sqrt{n}} \quad (7)$$

يتم اختيار القيمة المناسبة لـ z بناءً على مستوى الثقة المطلوب: 1.96لمستوى ثقة 95%، و2.326 لمستوى ثقة 99.0%، وهكذا. أما بالنسبة لأحجام العينات الأصغر، فإن التوزيع الطبيعي لا ينطبق تماماً، ويُصبح sتقديراً أقل موثوقية لـ σ، لذا يُستخدم توزيع بديل وهو **توزيع** t(أو توزيع ستودنت - Student's distribution). وتُحسب فترات الثقة حينها كالتالي:

$$\bar{x} \pm \frac{t_v s}{\sqrt{n}} \quad (8)$$

حيث $v = n - 1$وتُعرف بـ "درجات الحرية" (**Degrees of freedom**). تُستخرج قيم t_vمن الجداول الإحصائية بناءً على مستوى الثقة المطلوب، ويوضح الجدول 1 أمثلة على هذه القيم.



الجدول 1: أمثلة على قيم tلثلاثة مستويات ثقة

يوضح الجدول التالي قيم معامل tالخاصة بتوزيع ستودنت استناداً إلى عدد التكرارات (n) ودرجات الحرية $(v = n - 1)$ لمستويات الثقة المختلفة:

عدد التكرارات (n)	درجات الحرية (v)	مستوى ثقة90%	مستوى ثقة95%	مستوى ثقة99%
2	1	6.31	12.71	63.66
3	2	2.92	4.30	9.92
4	3	2.35	3.18	5.84
5	4	2.13	2.78	4.60
6	5	2.02	2.57	4.03
10	9	1.83	2.26	3.25
20	19	1.73	2.09	2.86

جدوى التحليلات المتكررة (n) في المختبرات السمومية

يُعد موضوع الحاجة إلى إجراء تحليلات متكررة (n) في مجالات التحليل السريري والشرعي مسألة تخضع لاعتبارات علمية واقتصادية مثيرة للجدل. إحصائياً، ومن خلال احتساب المتوسط الحسابي لـ nمن التكرارات، فإن **تباين التحليل (الانحراف المعياري النسبي - RSD) ينخفض بمقدار الجذر التربيعي لـ n(الجدول 2)**.

الجدول.2: تأثير التحليلات المتكررة (n) على الانحـــــــراف المعـــــــياري النسبي (RSD) (بافتراض أن RSDالأساسي للمقايسة هو 10%)

عدد التكرارات (n)	الجذر التربيعي $(\sqrt{n})$	RSDالمقدر (%)	عدد التكرارات (n)	الجذر التربيعي $(\sqrt{n})$	RSDالمقدر (%)
1	1.00	10.00	**6**	2.45	4.08
2	1.41	7.07	**7**	2.65	3.78
3	1.73	5.77	**8**	2.83	3.54
4	2.00	5.00	**9**	3.00	3.33
5	2.24	4.47	**10**	3.16	3.16

ففي بعض اختبارات المقايسة المناعية الإشعاعية (RIA) التاريخية، على سبيل المثال، كانت نسبة التباين العشوائي كبيرة لدرجة استوجبت اعتماد ثلاث أو حتى أربع تكرارات معملية. أما من الناحية العملية، ومع التقنيات الكروماتوجرافية الحديثة خاصة، وفي عينات السموم السريرية والشرعية التي تُحلل لمرة واحدة $(One - off)$، عادةً ما تُمثل **التحليلات المزدوجة $(Duplicates)$** حلاً وسطاً مثالياً يوازن بحكمة بين تكاليف الكواشف والتشغيل، الوقت المتاح، محدودية حجم العينة، والحاجة الماسة إلى دقة النتائج.

مزايا التحليل المزدوج واحتياطاته:

- إذا تعرض أحد أنبوبي التحليل المزدوج للكسر أو التلف العرضي، يتبقى على الأقل أنبوب سليم لإتمام الفحص.
- إن وجود تفاوت أو اختلاف ملحوظ وغير مقبول بين التكرارين يعد مؤشراً قاطعاً على حدوث خطأ جسيم ويستوجب حتماً إعادة الاختبار إن توفرت كمية كافية من العينة.

اعتبارات الحركية الدوائية وضمان الجودة

من ناحية أخرى، يُجادل بعض الخبراء بأن الاكتفاء بتحليل فردي واحد قد يكون كافياً في دراسات **التوصيف الحرائكي الدوائي** ($Pharmacokinetic\ profiling$)؛ نظراً لإمكانية رصد الخطأ الجسيم بسهولة عبر مقارنة النتائج الرقمية مع العينات الزمنية المجاورة لها.

- **ضمان الجودة (QA):** يمكن تحليل عديد التكرارات المزدوجة حصراً لأغراض ضمان الجودة والمراقبة الداخلية، على **ألا يُصار إلى دمج هذه البيانات الإضافية في التوصيف الحركي الأساسي**؛ لأن الطبيعة الإحصائية لأخطائها تختلف جوهرياً عن أخطاء التحليلات الفردية المعتادة. ومع ذلك، يمكن تضمين إحدى النتيجتين فقط من كل زوج، شريطة اتخاذ القرار الحاسم بشأن أي التكرارين سيتم اعتماده **قبل الشروع في إجراء المقايسة التحليلية**.
- **م,حودية حجم العينة:** إن لم تتوافر كمية كافية من المصفوفة البيولوجية للسماح بإجراء تحليل مزدوج كامل، فقد يصبح اللجوء إلى استخدام حجم عينة أصغر حجماً في أحد التكرارين أو كليهما أمراً مقبولاً، بشرط استكمال الحجم الأصلي باستخدام **بلازما أو مصل "فارغ"** ($Blank$)، والتأكد المسبق من أن مثل هذه التخفيفات غير النمطية قد خضعت لعمليات التحقق والاعتماد الرسمي الخاصة بهذا الفحص تحديداً.

تقليل الأخطاء العشوائية

في كل مرة يتم فيها إجراء قياس، يرتبط به خطأ معين، ويكون الخطأ الكلي دالة في إجمالي عدد القياسات وكيفية ارتباطها ببعضها البعض. عند إضافة القيم المقاسة أو طرحها، يكون التباين (s^2) للنتيجة هو مجموع تباينات كل قياس. على سبيل المثال، عند وزن عينة، إذا كانت كتلة قارب الوزن هي $M_1 \pm s_1$وكتلة القارب مع العينة المضافة هي $M_2 \pm s_2$، فإن:

$$\text{Variance}(M_2 - M_1) = \text{Variance}(M_1) + \text{Variance}(M_2)$$

وعليه، يكون الانحراف المعياري المشترك، s_{diff}هو:

$$s_{diff} = \sqrt{s_1^2 + s_2^2} \quad (9)$$

تُستخدم نفس العلاقة للانحراف المعياري المشترك عند جمع القيم.

أما العلاقة الخاصة بالضرب والقسمة فهي أكثر تعقيداً، ولكن يمكن الحصول على قيم تقريبية باستخدام الانحرافات المعيارية النسبية (**RSDs**). فبالنسبة لنسبة بين قياسين، تكون العلاقة:

$$\text{RSD}_{ratio} \approx \sqrt{\text{RSD}_1^2 + \text{RSD}_2^2} \quad (10)$$

تحضير محلول بتركيز معلوم

في هذا المثال، يتم وزن 10 mgمن المادة التحليلية في دورق سعة 10 mLوتُكمل للحجم. بافتراض أن وزن الدورق هو 12 gوأن للوزنات انحرافاً معيارياً قدره 0.2 mg، فإن:

$$s_w = \sqrt{0.2^2 + 0.2^2} = 0.283 \text{ mg} \quad (11)$$

تقدير وزن الدواء هو 10 ± 0.283 mg، لذا فإن الـ RSD_wهو $\pm 0.283/10 \times 100 = 2.83\%$. إذا كان الحجم المضاف إلى الدورق هو 10 ± 0.1 mL(أي $\text{RSD} = 1\%$)، فإن الـ RSD للتركيز يكون:

$$\mathrm{RSD}_{concn} = \sqrt{2.83^2 + 1^2} = \sqrt{9.01} = 3\% \quad (12)$$

ويكون التركيز 1 ± 0.03 mg mL^{-1} (أي $1 gL^{-1}$).

إذا اعتبرنا أن الـ RSD بنسبة 3%مرتفع جداً، فإن فحص المعادلة (12) وبيانات الجدول 3 يوضح أن الـ RSD الأكبر مرتبط بوزن المادة التحليلية. وزن 25 mgيقلل الـ RSD إلى 1.5%، لكن زيادة الوزن إلى 50 mgلا تعطي سوى تحسن هامشي. أما وزن 100 mgفسيكون هدراً للمركب لأن معظم الخطأ في التركيز عند هذا الوزن يعود إلى الخطأ في قياس الحجم. ويوضح هذا نقطة هامة مفادها أنه إذا أردنا تحسين دقة التحليل، فيجب تحديد الخطوات ذات الأخطاء الأكبر واتخاذ التدابير المناسبة بشأنها.

الجدول 3: تأثير كمية الدواء الموزونة على خطأ التحليل الكلي

وزن الدواء (ملجم)	$(\%)\mathrm{RSD}_w$	$(\mathrm{RSD}_w)^2$	$(\%)\mathrm{RSD}_{concn}$
5	4.76	22.7	4.9
10	2.83	8.0	3.0
25	1.13	1.28	1.5
50	0.57	0.32	1.15
100	0.28	0.078	1.04

الدقة (Accuracy) والإحكام (Precision)

عند تحليل أي عينة، كلما كان التركيز المقاس أقرب إلى التركيز الفعلي، كانت النتيجة أكثر **دقة (Accuracy)**. أما إذا أُجريت تحليلات متكررة، فكلما قل التباين بين الملاحظات (أي قل التشتت حول قيمة المتوسط)، زاد **الإحكام (Precision)**. ويمكن تلخيص الفروق الجوهرية كالآتي:

- **الإحكام (Precision):** يحدد مقدار الأخطاء العشوائية ويعبر عن مدى التوافق بين القياسات المتكررة.
- **الانحياز (Bias):** يحدد مقدار الأخطاء النظامية.
- **الدقة (Accuracy):** تحدد مدى قرب القيمة المقاسة (أو متوسط القيم) من القيمة "الحقيقية" أو المرجعية المقبولة، وهي تتضمن كلا نوعي الأخطاء (العشوائية والنظامية).

ملاحظة منهجية: لا يمكن تحديد القيمة "الحقيقية" بشكل مطلق نظراً لوجود نسبة خطأ متأصلة في أي عملية قياس؛ لذا يُعتمد التعريف العملي الذي يرى أن الدقة هي مدى التقارب بين نتيجة الاختبار وقيمة مرجعية مقبولة.

مفاهيم ذات صلة بالإحكام:

- **التكرارية (Repeatability):** تُستخدم لوصف الإحكام "داخل الدفعة الواحدة" (Intra-batch)، وذلك عندما يتم القياس بواسطة محلل واحد، باستخدام نفس المحاليل المعيارية والأجهزة خلال فترة زمنية قصيرة.
- **القابلية لإعادة الإنتاج (Reproducibility):** تشير إلى الإحكام "بين الدفعات" (Inter-batch)، وعادة ما تتم المقارنة فيها بين محاليل قياسية، أو أجهزة، أو مشغلين مختلفين، وربما مختبرات مختلفة.

تقييم الإحكام والدقة (Assay Precision and Accuracy Evaluation)

لتقييم إحكام المقايسة، تُجرى تحليلات متكررة (بعدد nمن القياسات) عند عدة مستويات تركيز مختلفة، ويتم حساب المتوسطات والانحرافات المعيارية النسبية $(RSDs)$. من المعتاد التعبير عن النتائج باستخدام النسبة المئوية للانحراف المعياري النسبي (RSD) لأن الأخطاء التجريبية غالباً ما تتناسب طردياً مع التركيزات المقاسة.

في التطبيقات العملية، يتم تصميم معظم المقايسات وتنفيذها لضمان ألا يتجاوز الـ RSDنسبة 15%(أو أي نسبة أخرى يتم تحديدها بناءً على طبيعة التحليل) بغض النظر عن التركيز. وتُصنف أنواع الإحكام كالتالي:

1. **الإحكام داخل الدفعة $(Intra\text{-}batch/Within\text{-}day)$:** يتم تحديده من خلال سلسلة تحليلات داخل تشغيل تجريبي واحد.
2. **الإحكام بين الدفعات $(Inter\text{-}batch/Between\text{-}day)$:** يتم تحديده من خلال مقارنة النتائج الناتجة عن عدة تشغيلات تحليلية منفصلة.

تنبيه: يُفترض عموماً أن قيم الـ RSDبين الدفعات تكون أكبر من نظيراتها داخل الدفعة الواحدة، إلا أن ذلك قد لا يصدق في بعض الأحيان.

أما **الدقة (Accuracy)** فتعتبر أكثر صعوبة في التقييم، حيث تتطلب توفر عينة ذات تركيز معلوم وموثوق لمقارنة النتائج بها. وتوفر مخططات تقييم الجودة الخارجية (EQA) إحدى الطرق الفعالة لتقييم الدقة، على الرغم من عدم توفرها لجميع المواد التحليلية.

اكتشاف الخطأ النظامي (الانحياز الثابت - Fixed Bias)

أ. اختبار (t-test) لمقارنة قيمة بمستهدف معلوم

إذا كان لعدد nمن القياسات المتكررة تركيز متوسط قدره $\bar{x}$وانحراف معياري قدره s، فيمكن اختبار ما إذا كانت النتيجة تختلف اختلافاً جوهرياً عن التركيز المستهدف (μ) باستخدام اختبار (t):

$$t_{(n-1)} = \frac{(\bar{x} - \mu)}{s/\sqrt{n}} \quad (13)$$

إذا كانت قيمة tالمحسوبة أكبر من القيمة الحرجة $(t_{critical})$، فهذا يعنيه أن النتيجة $\bar{x}$تختلف جوهرياً عن التركيز المستهدف μ. وإذا كانت القيمة المستهدف تعود لعينة مراقبة جودة (QA)، فإن التقدير يحتوي على خطأ نظامي يُعرف بـ **الانحياز $(Bias)$**.

ب. اختبار (t) لمقارنة مجموعتي بيانات (محللين اثنين)

لمقارنة نتائج محللين لبيان ما إذا كانت الاختلافات ناتجة عن أخطاء عشوائية بحتة، يُشترط ألا تختلف النتائج جوهرياً. في حال كانت مجموعتا العينات متساويتين في الحجم (n)، يُستخدم اختبار (t):

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (14)$$

حيث تُمثل $(\bar{x}_1, \bar{x}_2)$متوسطي المجموعتين، ويُحسب **الانحراف المعياري المجمع (s_p)** بالمعادلة التالية:

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{v}} \quad (15)$$

4. اختبار التباين $(F - test)$

يُستخدم اختبار (F) للتأكد ممّا إذا كانت تباينات مجموعتي القياسات تختلف اختلافاً جوهرياً، وذلك وفق العلاقة:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (16)$$

ملاحظة هامة: تُكتب نسبة التباين دائماً بحيث يكون التباين الأكبر في البسط ($s_A^2 > s_B^2$) لضمان أن تكون قيمة $F > 1$.
يتم إدراج القيم الحرجة لـ Fفي الجداول الإحصائية بدلالة درجات الحرية لـ البسط (v_1) على المحور الأفقي ودرجات الحرية لـ المقام (v_2) على المحور العمودي، ويجب استخدام **اختبار ذي طرفين** ($two\text{-}tailed\ test$).
ملاحظة توضيحية: في حال عدم تساوي تباينات العينات بشكل واضح، تصبح المعالجة الرياضية أكثر تعقيداً، غير أن المبدأ الأساسي للاختبار يظل كما هو.

تحليل التباين (ANOVA)

توجد حالات تستدعي مقارنة أكثر من متوسطين، على سبيل المثال عند مقارنة النتائج الواردة من عدة مختبرات. فبجانب التباين "داخل المختبر"، قد يوجد تباين إضافي ناتج عن التباين "بين المختبرات". يمكن اختبار ذلك باستخدام **تحليل التباين أحادي العامل (One-way ANOVA)**.

كمثال على ذلك، تُعطي البيانات المستمدة من تجربة لاختبار تأثيرات ظروف التخزين الموضحة في **(الجدول 4)** متوسط قيم للتحليلات المتكررة للعينات المحضرة حديثاً والمخزنة. والسؤال المطروح هنا: *"هل تأتي كل هذه المتوسطات من نفس المجتمع الإحصائي؟"*

بوجود عدد nمن التكرارات لكل معالجة، تُحسب مجاميع المربعات وفق الصيغ الآتية:

مجموع المربعات الكلي (TSS):

$$TSS = \sum (x - \bar{x}_{total})^2$$

مجموع مربعات داخل المعالجة (WSS):

$$WSS = \sum (x - \bar{x}_{treatment})^2$$

مجموع مربعات بين المعالجات (BSS):

$$BSS = TSS - WSS$$

$$\text{Total sum of squares } (TSS) = \Sigma(\text{Measured concentration} - \text{Overall mean})^2$$
$$\text{Within-treatment sum of squares } (WSS) = \Sigma(\text{Measured concentration} - \text{Treatment mean})^2$$
$$\text{Between-treatment sum of squares } (BSS) = \Sigma n\ (\text{Treatment mean} - \text{Overall mean})^2$$

الجدول 4: بيانات من تجربة ثبات نموذجية

المعالجة	التركيز المقاس	المتوسط	s	s^2
محضرة حديثاً	104، 100، 98، 95، 101	99.6	3.36	11.3
مخزنة عند -20" " ^ه "C" (18 ساعة)	100، 97، 95، 103، 98	98.6	3.05	9.3
مخزنة عند 18C° 4 ساعات	98، 94، 89، 100، 95	95.2	4.21	17.7
درجة حرارة الغرفة (4 ساعات)	99، 89، 93، 85، 88	90.8	5.04	29.2
المتوسط العام	-	96.05	4.01	16.88

في هذا المثال، التباين داخل المعالجة (WSS) له $I(n-1)$درجة حرية، حيث أن كل تكرار من Iعينة له $(n-1)$درجة حرية، وهناك أربع معالجات، وعليه تكون درجات الحرية:

$$\mathrm{DF}_{within} = I(n-1)$$

حيث Iهو عدد المعالجات. يُشار إلى هذا التباين أيضاً بـ **متوسط المربعات داخل المعالجة (σ_w^2)**، ويمكن إثبات أنه يمثل متوسط التباين داخل المعالجة بناءً على البيانات الواردة في **(الجدول 4)**، حيث:

$$\sigma_w^2 = MS_w = \frac{WSS}{m(n-1)} \quad (17)$$

حيث mهو عدد المعالجات. يُشار إليه أيضاً بـ "متوسط المربعات داخل المعالجة" (**MS**)، ويمكن إثبات أنه متوسط التباين داخل المعالجة (الجدول 4). أما تباين "بين المعالجات" فله (عدد المعالجات - 1) درجة حرية، ويمثله متوسط المربعات بين المعالجات MS_b، ومن ثم:

$$MS_b = \frac{BSS}{m-1} \quad (18)$$

إذا لم يكن هناك تباين إضافي ناتج عن ظروف التخزين المختلفة، فإن MS_bيجب أن يساوي MS_w، وبالتالي فإن:

$$F = \frac{MS_b}{MS_w} \quad (19)$$

لن تكون مختلفة بشكل جوهري عن القيمة 1.

التطبيق العملي على البيانات:

في المثال المذكور، نجد أن $MS_b = 78.98$و $MS_w = 16.88$، وبالتالي فإن F=4.68. القيمة الحرجة لـ F(عند مستوى دلالة P=0.05) لدرجتي حرية 3 و 16، والتي يتم الحصول عليها من الجداول الإحصائية، هي 3.239. لاحظ أنه تُستخدم دائماً جداول "الطرف الواحد" (One-tailed) في اختبار تحليل التباين أحادي العامل (One-way ANOVA). وبما أن 4.68>3.239، فإن ظروف التخزين لها تأثير جوهري (معنوي) على متوسط التركيزات المقاسة. ويتم تضمين تحليل التباين (ANOVA) ضمن الأدوات الإحصائية المتاحة في برنامج Microsoft Excel. وتتضمن المخرجات مجموع المربعات بين المجموعات (BSS)، وداخل المجموعات (WSS)، والمجموع الكلي (TSS)، ودرجات الحرية (df)، ومتوسط مربعات القيم بين المجموعات (MS_b) وداخلها (MS_w)، وقيمة F، ومستوى الدلالة (P) (الشكل 2).

مصدر التباين	مجموع المربعات (SS)	درجات الحرية (df)	متوسط المربعات (MS)	قيمةF	قيمةP	القيمة الحرجة لـ F
بين المجموعات	236.95	3	78.98333	4.680494	0.015666	3.238867
داخل المجموعات	270	16	16.875	-	-	-
المجموع الكلي	**506.95**	**19**	-	-	-	-

الشكل 2: جدول نتائج Excel لتحليل التباين أحادي العامل (ANOVA) لبيانات الجدول 4

بعد إثبات وجود تأثير ذي دلالة إحصائية بين ظروف التخزين، يمكن إجراء اختبارات إضافية للكشف عن الاختلافات بين المعالجات المحددة. تتضمن البرامج الإحصائية عادةً هذا الخيار، بحيث يتم تطبيق الاختبارات تلقائياً إذا كانت قيمة Fمعنوية.

على سبيل المثال، يقوم برنامج Prism (من GraphPad Software) بإجراء اختبار Bonferroni t-test للمقارنات المتعددة، أو اختبار Dunnett's test، حيث تتم مقارنة متوسطات المعالجات بمتوسط التحكم (المحلول المحضر حديثاً في هذا المثال). أظهر كلا الاختبارين وجود فرق جوهري بين القيمة المتوسطة للمحلول المحضر حديثاً وتلك الخاصة بالعينة المخزنة في درجة حرارة الغرفة. كما يوجد خيار لاختبار "الاتجاه الخطي" (Linear trend)، وهو مفيد عند فحص تأثير عامل ما (مثل الزمن) على أحد المتغيرات.

منحنيات المعايرة (Calibration graphs)

عادةً ما يتم إنشاء منحنى معايرة يمثل استجابة المادة التحليلية مقابل التركيز في معايير المعايرة. في التحليلات الكروماتوجرافية، قد تكون الاستجابة هي ارتفاع القمة أو مساحتها، أو نسب ارتفاع أو مساحة القمة إلى المعيار الداخلي. وقد تكون العلاقة خطية (خط مستقيم) أو منحنية. وقبل سهولة الوصول إلى برامج ملاءمة المنحنيات ($Curve\text{-}fitting\ programs$)، كانت منحنيات المعايرة تُرسَم على ورق بياني وتُستنبط التركيزات يدوياً. كان وجود خط مستقيم يجعل المهمة أسهل بكثير، وكان المحللون يحاولون العمل ضمن منطقة "خطية" للمنحنى حتى بالنسبة للتقنيات التي لا تكون خطية بطبيعتها (مثل التألق، وكاشف التقاط الإلكترون ECD). أما اليوم، فيمكن إجراء ملاءمة **المربعات الصغرى** ($Least\text{-}squares\ fitting$) لمنحنيات المعايرة باستخدام آلات حاسبة محمولة أو برمجيات متقدمة، مما يوفر ميزة هامة تتمثل في أن الملاءمة الإحصائية للبيانات تتيح تقييم جودة النتائج بدقة من حيث فترة الثقة أو الانحراف المعياري.

الانحدار الخطي (Linear Regression)

الانحدار الخطي للمربعات الصغرى هو طريقة إحصائية للحصول على أفضل مطابقة لخط مستقيم ($y = mx + c$) مع البيانات التجريبية. تقوم الصيغة الرياضية بتحديد ومعالجة مجموع مربعات البواقي ($Residuals$)، أي $\sum(y_i - \hat{y}_i)^2$، حيث $\hat{y}_i$هي قيمة yالمحسوبة من خط الانحدار عند النقطة x_i**(الشكل 1)**.

ملاحظة منهجية: يتم استخدام مجموع مربعات البواقي لأن مجموع البواقي البسيطة بحد ذاته يكون مساوياً لصفر.

- **ميل خط الانحدار (m):**

$$b = \frac{\sum(x_i - \bar{x})\,(y_i - \bar{y})}{\sum(x_i - \bar{x})^2} \quad (20)$$

- **المقطع الصادي (c):**

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (21)$$

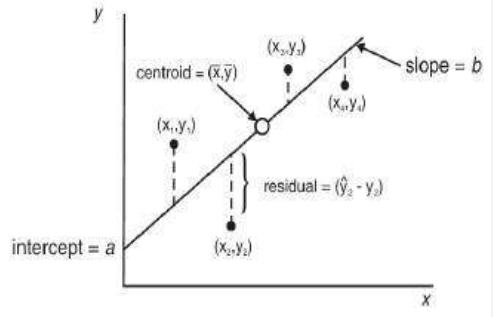
خاصية هندسية: يمر خط الانحدار دائماً عبر نقطة المتوسطات لـ $\bar{x}$و $\bar{y}$، وهي نقطة محورية يمكن الاستفادة منها عند التحقق من رسم المنحنى يدوياً.

يمكن تقييم تقديرات الميل (m) والمقطع (c) من المعادلتين السابقتين أو من الرسم البياني، وعند توفر الخط، يمكن استنتاج القيم المجهولة للتركيزات (x) من القياسات الجديدة باستخدام المعادلة العكسية:

$$x = \frac{(y - a)}{b} \quad (22)$$

أما معامل الارتباط (r)، فيمكن حسابه من:

$$r = \frac{\sum(x_i - \bar{x})\,(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}} \quad (23)$$



الشكل 3 مبدأ الانحدار باستخدام طريقة المربعات الصغرى

تتراوح قيم معامل الارتباط (r) بين $1-$و $1+$، والتي تمثل ارتباطاً عكسياً وطردياً تاماً على التوالي. يعطي معامل الارتباط مؤشراً على كيفية تغير yكدالة في x، ويمثل r^2"التباين المفسر" (**Explained variance**). على سبيل المثال، إذا كان $r = 0.95$، فإن $r^2 = 0.903$، وهذا يعني أن 10%من التغير في yلا يمكن عزوه إلى التغير في x، أو أن نسبة الملاءمة هي 90.3%.

ما لم تكن البيانات مطابقة تماماً لخط الانحدار، فمن الواضح أنه يجب أن تكون هناك أخطاء مرتبطة بتقديرات a(المقطع الصادي) و b(الميل). يُفترض أن الأخطاء في x(تركيزات محاليل المعايير) ضئيلة مقارنة بتلك الموجودة في y، ويُستخدم مجموع مربعات البواقي لحساب الانحراف المعياري لتقديرات yبالنسبة لـ x($s_{x/y}$):

$$s_{x/y} = \sqrt{\frac{\sum(\hat{y}_i - y_i)^2}{n - 2}} \quad (24)$$

ومنها يمكن حساب الخطأ المعياري للمقطع الصادي (s_a):

$$s_a = s_{x/y}\sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (25)$$

والخطأ المعياري للميل (s_b):

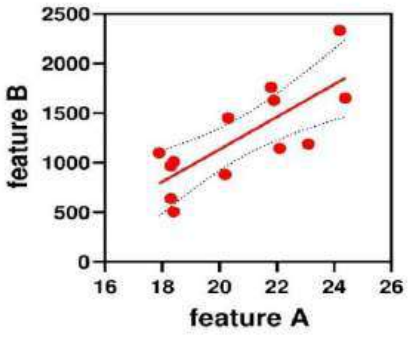
$$s_b = \frac{s_{x/y}}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (26)$$

يمكن حساب فترات الثقة للمقطع الصادي والميل على التوالي من خلال:

$$a \pm t_{(n-2)}s_a \quad \text{و} \quad b \pm t_{(n-2)}s_b$$

تجدر الإشارة إلى أنه في الانحدار الخطي، يكون عدد درجات الحرية هو $(n - 2)$، لأن الخط المستقيم سيمر عبر أي نقطتين، لذا لا يمكن اشتقاق الملاءمة إحصائياً من نقطتين فقط. بعد الحصول على قيم aو b، يمكن حساب التركيزات في عينات الاختبار من:

$$\text{Concentration} = \frac{\text{Response} - a}{b} \quad (27)$$



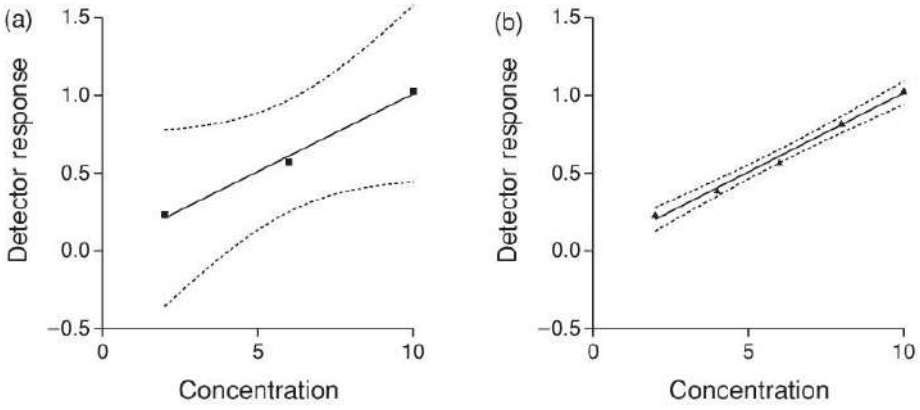
تعد معادلة حساب فترات الثقة للتركيزات المستنبطة (المستقاة بالاستيفاء) معقدة لأن الخطأ ينشأ من أخطاء تقدير الميل والمقطع الصادي، وبالطبع فإن الاستجابة نفسها تحتوي على أخطاء عشوائية. بشرط أن يكون bومجموع مربعات xكبيرين نسبياً (وهو الحال في منحنى المعايرة المصمم جيداً)، يمكن استخدام تقريب لحساب فترة الثقة (Miller, 1991):

$$CI = \pm \frac{t_{(n-2)} s_{x/y}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(\text{Response} - \bar{y})^2}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (28)$$

حيث mهو عدد التكرارات المستخدمة للحصول على قيمة لاستجابة العينة المجهولة. تتميز المعادلة (28) بالخصائص التالية:

1. تكون فترة الثقة (**CI**) أصغر ما يمكن لاستجابات الإشارة التي تساوي متوسط الاستجابات في منحنى المعايرة.
2. يمكن أن يكون للقياسات المتكررة تأثير ملحوظ في تقليل فترة الثقة.
3. زيادة عدد نقاط المعايرة تؤدي إلى تقليل فترة الثقة.

عادةً ما تقوم برامج رسم وتوفيق المنحنيات (**Curve plotting and fitting programs**) بإنتاج الإحصاءات المطلوبة، وتقوم برسم فترات الثقة على منحنى المعايرة (الشكل 4).



الشكل 4: توضيح تأثير عدد نقاط البيانات على فترة الثقة (95%): (أ) ثلاث نقاط، (ب) خمس نقاط.

لاحظ كيف تنحني فترات الثقة بشكل متماثل حول خط الانحدار، وتأثير عدد نقاط المعايرة على هذه الفترات. ومما لا يثير الدهشة، أن المنحنى المكون من ثلاث نقاط فقط له فترات ثقة واسعة جداً؛ حيث لا توجد سوى درجة حرية واحدة $(n-2)$ وقيمة t_v تكون 12.71. وعلاوة على ذلك، فإن معامل الارتباط الذي تم اختباره باستخدام:

$$t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (29)$$

لم يكن مختلفاً بشكل جوهري عن الصفر. مع إضافة معيارين إضافيين [الشكل 4(ب)]، تصبح $v = 3$ و$t_v = 3.18$.

ملاحظة منهجية: كلما زادت نقاط المعايرة وتكرارات القياس، زادت موثوقية المنحنى وقلت درجة عدم اليقين (فترة الثقة) المحيطة بالنتائج المستنبطة.

اختبار الخطية (Testing for Linearity)

تعتمد مطابقة بيانات المعايرة لخط مستقيم – كما وُصف سابقاً – على مجموعة من الافتراضات الأساسية، أبرزها الفرض البديهي القاضي بأن الاستجابة تتناسب طردياً وخطياً مع زيادة التركيز. وللتحقق من صحة هذه الفرضية، تبرز الحاجة إلى اعتماد منهجيات علمية دقيقة.

1. الفحص البصري والتعرف على الأنماط (Pattern Recognition)

يُعد الفحص النقدي البصري للبيانات الخطوة الأولى والأكثر فاعلية؛ إذ يجب دائماً رسم بيانات المعايرة أو تمثيلها بيانيًا وفحصها بعناية.

- **قصور معامل الارتباط (R):** للوهلة الأولى، قد تبدو بيانات بعض المجموعات وكأنها تتقارب مع خط مستقيم – حيث يُظهر تحليل الانحدار الخطي للمربعات الصغرى قيمة مرتفعة جداً لمعامل الارتباط ($R \approx 1$). ومع ذلك، يثبت الفحص الدقيق وجود انحناء واضح في المنحنى.
- ومما يؤكد عليه (Analytical Methods Committee, 1988)، فإن الاعتقاد السائد بأن الاقتراب الشديد لمعامل الارتباط من الواحد ($R \to 1$) يُعد دليلاً قاطعاً على خطية منحنى المعايرة هو اعتقاد غير صحيح؛ فبينما يحقق الخط المستقيم المثالي هذه القيمة، فإن مجرد اقتراب المعامل منها لا يكفي بمفرده لإثبات الخطية.

2. مخطط البواقي (Residual Plot)

يُكشف عن الانحرافات الدقيقة من خلال تتبع توزيع النقاط حول خط الانحدار. على سبيل المثال، قد يُظهر الفحص وجود نقاط تقع تحت الخط تليها سلسلة من النقاط فوقه ثم نقطة تحته.

- يمكن رصد هذا النمط بوضوح أكبر عبر رسم **البواقي (e_i)** مقابل التركيز [**الشكل 5 (ب)**].
- في حالة البيانات الخطية السليمة، يجب أن تكون البواقي (التي يُفترض أن يساوي مجموعها الجبري صفراً) موزعة توزيعاً عشوائياً وطبيعياً حول خط الصفر.
- أما ظهور توزيع منتظم على شكل حرف **(U)** في مخطط البواقي فيُعد دليلاً نموذجياً وقاطعاً على أن البيانات تتبع نموذجاً غير خطي (منحني) تتطلب مطابقتها منحنى بدلاً من خط مستقيم.

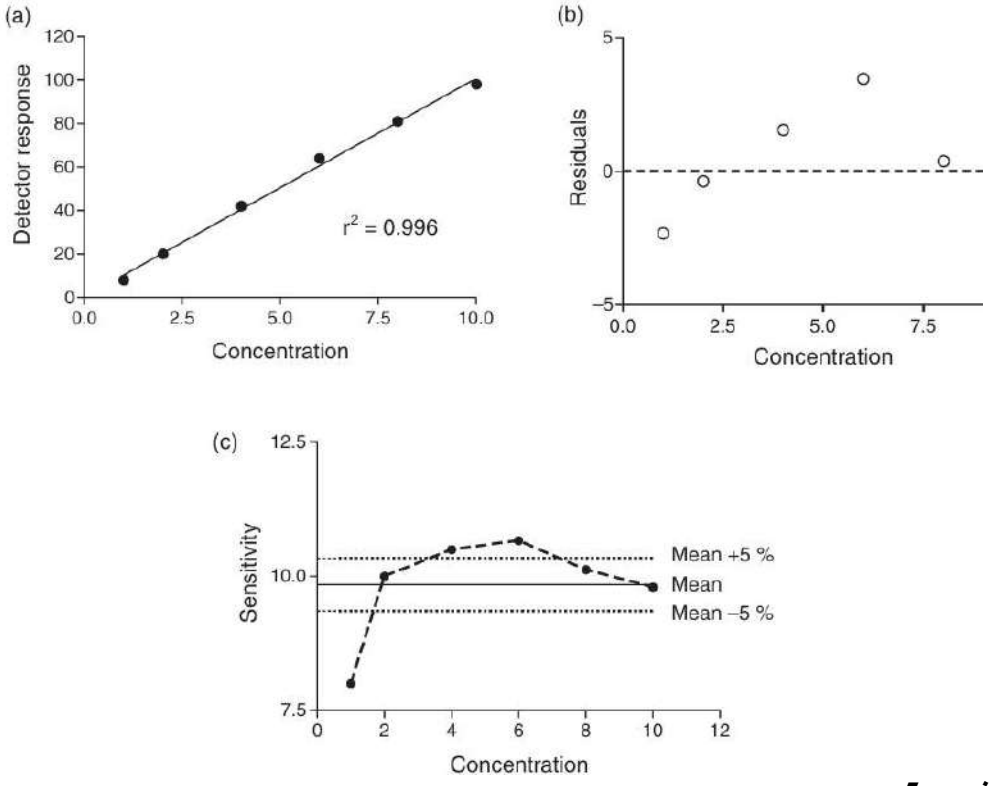
3. تقنيات إضافية للتحقق من الخطية (تحليل الحساسية)

من التقنيات الفعالة الأخرى لإثبات عدم خطية المنحنى هو **رسم الحساسية (S)** كدالة في التركيز (C) – أو لوغاريتم التركيز ($\log C$) في حالة منحنى المعايرة الذي يغطي نطاقات واسعة.

- **تعريف الحساسية:** تُعرّف رياضياً بأنها ناتج قسمة الاستجابة (R) على التركيز (C):

$$S = \frac{R}{C}$$

- **معيار القبول الخطي:** في حالة المعايرة الخطية المثالية، يجب أن تتطابق قيمة الحساسية عند كل نقطة تركيز. وعملياً، لكي يُعتبر منحنى المعايرة مقبولاً وخطياً، **يجب ألا تختلف الحساسية بأكثر من 5%عن قيمتها المتوسطة** [**الشكل 5 (ج)**].



الشكل التوضيحي 5:

- **الشكل 5 (أ) - بيانات مطابقة لخط مستقيم:** يوضح حالة عملية يُعطي فيها الانحدار الخطي قيمة مرتفعة جداً لمعامل الارتباط (R) رغم وجود انحناء واضح في البيانات الأصلية.
- **الشكل 5 (ب) - مخطط البواقي (Residual Plot):** يمثل رسم البواقي في مواجهة التركيز؛ حيث يُبرز التوزيع المنهجي على شكل حرف (U) عوضاً عن التوزيع العشوائي، مما يؤكد عدم ملاءمة النموذج الخطي.
- **الشكل 5 (ج) - رسم الحساسية مقابل التركيز:** يوضح تمثيلاً بيانيًّا لنسبة (استجابة الكاشف / التركيز) في مواجهة التركيز، مما يساعد في تقييم مدى ثبات الحساسية أو تغيرها.

تطبيقات عملية: تظهر أهمية فحص الحساسية كدالة في التركيز في قدرتها على تحديد "نطاق العمل الخطي" بدقة، وهو أمر بالغ الأهمية للرسوم البيانية المنحنية التي تصاحب غالباً تقنيات التحليل المتقدمة مثل **الفلورة** و**قياس الطيف الكتلي** (MS)، حيث أثبتت هذه التقنية كفاءة عالية في تعيين الحدود الخطية للكواشف بدقة متناهية.

الانحدار الخطي الموزون (Weighted Linear Regression)

يفترض نموذج الانحدار الخطي البسيط المُشار إليه سابقاً تساوي التباين (Homoscedasticity) لجميع قيم التركيز. غير أن الواقع العملي لبيانات المعايرة يشير إلى أن التباين يميل للزيادة طردياً مع ارتفاع التركيز؛ بل إن ضبط قيم الانحراف النسبي المئوي (RSD) لتظل ضمن نطاق محدود ومحدد مسبقاً يجعل الأخطاء متناسبة تقريباً مع قيمة التركيز. ونتيجة لذلك، تصبح الأخطاء المصاحبة للتراكيز العالية أكبر حجماً، مما قد يمنحها وزناً غير مبرر يؤثر سلباً في ميل خط المعايرة.

1. إشكاليات الانحدار غير الموزون

يتعامل الانحدار غير الموزون مع جميع نقاط القياس بدرجة الأهمية ذاتها، وهو ما يؤدي عملياً إلى تدني جودة مطابقة نقاط التركيز المنخفضة للخط المستقيم. وتتفاقم هذه المشكلة بصورة ملحوظة عندما يمتد منحنى المعايرة عبر عدة مراتب مقدارية

(Orders of Magnitude). ويتمثل الحل الأمثل في **وزن البيانات (Weighting)** وتقليل مجموع المربعات الموزونة وفق العلاقة الرياضية التالية:

$$\text{Weighted sum of residual squares} = \sum[\text{weight} \times (\text{residual})^2] \quad (30)$$

$$\sum w_i\,(y_i - \hat{y}_i)^2$$

حيث يُعبَّر عن مقدار الأخطاء العشوائية في الاستجابة المقاسة بالتباين (s_i^2). ومن المعتاد وزن البيانات باستخدام معامل الوزن (w_i)، والذي يتناسب طردياً مع مقلوب التباين:

$$\text{Weighted sum of residual squares} = \sum[1/s^2 \times (\text{residual})^2] \quad (31)$$

$$w_i \propto \frac{1}{s_i^2}$$

وبناءً عليه، تصبح المعادلة السابقة بالشكل الموزون الذي يعكس تفاوت موثوقية القياسات.

2. آلية الوزن وتطبيقاتها الإحصائية

تعني عملية الوزن ببساطة إعطاء النقاط ذات الأخطاء الأقل أهمية وأولوية أكبر مقارنة بتلك التي تحمل أخطاءً أكبر.

- إذا كان الانحراف النسبي (RSD) ثابتاً عبر نطاق التراكيز المستخدم، فإن مقدار التباين (s_i^2) يتناسب طردياً مع حجم الإشارة، وبالتالي مع تركيز العينة في حالة العلاقات الخطية.
- في ظل هذه الظروف، يمكن وزن البيانات باستخدام المعامل $\left(\frac{1}{y_i^2}\right)$أو $\left(\frac{1}{x_i^2}\right)$.
- تدعم العديد من الحزم والبرمجيات الإحصائية المتاحة تجارياً خيارات وزن البيانات المباشرة بهذه المعاملات.

3. خصائص خط المعايرة الموزون

- يمر خط المعايرة الناتِج عبر ما يُعرف بـ **"النقطة المركزية الموزونة" (Weighted Centroid)**.
- تكون فترات الثقة عند هذه النقطة عند أدنى مستوياتها، إلا أنها – بخلاف حالة تجانس التباين – لا تتسم بالتماثل حول الخط المستقيم، بل تتسع بشكل غير متناسب مع زيادة التركيز، وهو سلوك طبيعي متوقع وفقاً للنموذج الإحصائي المستخدم.

ملاحظة منهجية: إن استخدام طريقة وزن البيانات – سواء في تحليل المعايرة أو في دراسات الحرائك الدوائية (Pharmacokinetics) – لا يُعد بحال من الأحوال وسيلة للتلاعب بالنتائج أو تحسينها مصطنعاً، بل يمثل **المعالجة الإحصائية الصحيحة والملزمة للبيانات غير متجانسة التباين (Heteroscedastic Data)**. ومع ذلك، إذا كانت قيم الأخطاء ضئيلة وكان نطاق التركيز محدوداً، فقد يظل الانحدار الخطي البسيط كافياً ومناسباً للغرض التحليلي المطلوب.

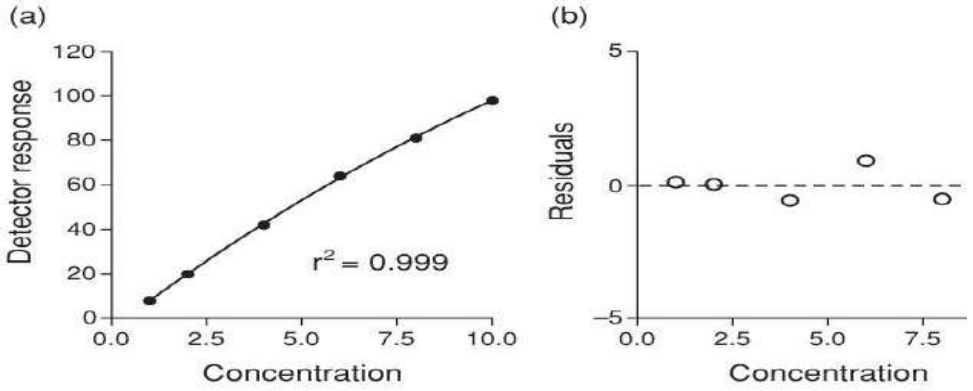
منحنيات المعايرة غير الخطية (Nonlinear Calibration Curves)

لا يوجد أي مسوغ نظري أو عملي يفرض أن تكون خطوط المعايرة مستقيمات طردية عبر نطاق القياس كاملاً. وفي الواقع، من الثابت علمياً أن بعض الكواشف – مثل كاشف التقاط الإلكترون (ECD) وكواشف التألق $(Fluorescence)$ – تمتلك نطاقات خطية محدودة نسبياً. علاوة على ذلك، فإن قانون "بير-لامبرت" (Beer-Lambert Law) نفسه ينهار ويتوقف

عن الخطية عند التركيزات العالية للمادة التحليلية. كما تُظهر تقنيات مطيافية الكتلة (MS) وبعض المقايسات المناعية (مثل مقايسة الإنزيم المناعي المرتبط $EMIT$) استجابات منحنية غير خطية مع تغير التركيز.

عند ثبوت عدم خطية العلاقة بين التركيز والاستجابة، يصبح لزاماً اتخاذ قرار بشأن النموذج الرياضي الأنسب لمطابقة البيانات:

- فبيانات **الشكل 5 (أ)** – التي اتضح عدم خطيتها بصورة قاطعة – يمكن مطابقتها بنجاح باستخدام معادلة تربيعية كما يظهر في **الشكل 6**.
- لا يبدو النموذج التربيعي خياراً أفضل بصرياً فحسب، بل إنه يحقق معامل ارتباط (R) أعلى، مما يؤكد مجدداً أن اقتراب قيم Rمن الواحد لا يُعد بمفرده دليلاً كافياً على الخطية.
- يُعزز هذا الاعتقاد الفحص الدقيق للبواقي $(Residuals)$؛ إذ تقترب قيمها من الصفر وتتوزع بشكل عشوائي ومتجانس حوله، مما يؤكد تفوق النموذج التربيعي على النموذج الخطي في هذه الحالة.



الشكل 6:

- **الشكل 6(أ):** البيانات من الشكل 5(أ) مطابقة لدالة تربيعية $(y = a + bx + cx^2)$.
- **الشكل 6(ب):** البواقي الناتجة عن المطابقة التربيعية، والتي تظهر توزيعاً عشوائياً حول الصفر.

.

1. اختيار النماذج الرياضية للمنحنيات غير الخطية

في بعض الأحيان، يمكن اقتراح نموذج رياضي مبني على أسس فيزيائية أو كيميائية للعلاقة بين استجابة الكاشف والتركيز:

- على سبيل المثال، تُظهر بيانات معايرة عقار **الميدازيبام (**$Medazepam$**)** المقاسة بجهاز كروماتوغرافيا الغاز ذي كاشف التقاط الإلكترون $(GC\text{-}ECD)$ في وضع التيار المستمر $(DC$ Mode$)$ انحناءً ملحوظاً [**الشكل 7 (أ)**].

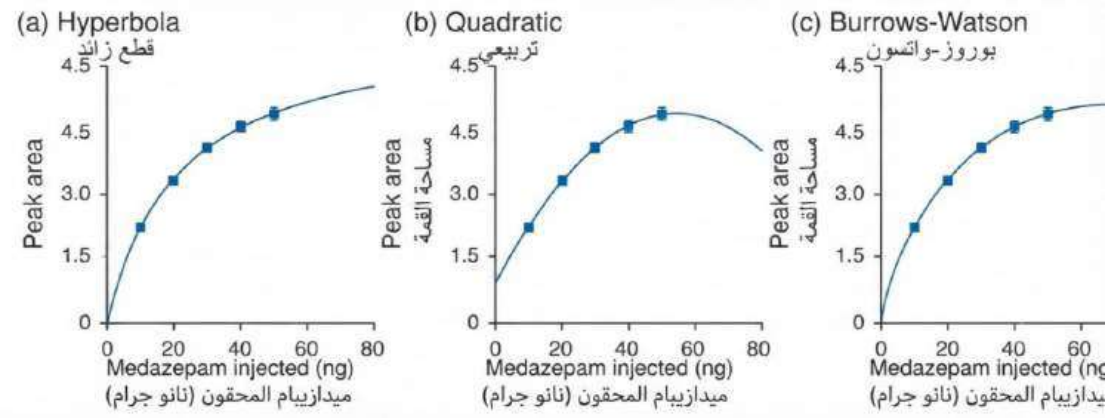
وبما أن عملية التقاط الإلكترونات تؤدي إلى انخفاض التيار الساكن، فإنه يُتوقع نظرياً أن يُعرّف هذا المنحنى بواسطة **معادلة قطع زائد** $(Hyperbola)$، بحيث يمر المنحنى عبر النقاط ونقطة الأصل مقترباً من قيمة عظمى تفقد عندها الإشارة حساسيتها. ومع ذلك، تظل المطابقة باستخدام الدالة التربيعية [**الشكل 7 (ب)**] بديلاً عملياً ومقبولاً ضمن نطاق العمل التحليلي المتاحة للبيانات.

2. النماذج التجريبية ومعادلة "بوروز-واتسون"

مع أغلب المنحنيات غير الخطية، يندر وجود نموذج فيزيائي متكامل يفسر العلاقة بدقة مطلقة، نظراً لتداخل عدة مكونات في إحداث الانحناء. وعليه، يصبح اختيار المعادلة **اختياراً تجريبياً (Empirical)**، حيث تُستخدم التعبيرات الرياضية التربيعية أو التكعيبية.

أما بالنسبة للرسوم البيانية المنحنية والمعقدة التي غالباً ما تظهر في تحليلات مطيافية الكتلة (MS)، فيوصي الباحثان **"بوروز وواتسون" (Burrows and Watson, 1994)** باستخدام المعادلة اللوغاريتمية المعدلة التالية لضمان دقة المطابقة [**الشكل 7 (ج)**]:

$$y = a + bx + cx \log x \quad (32)$$



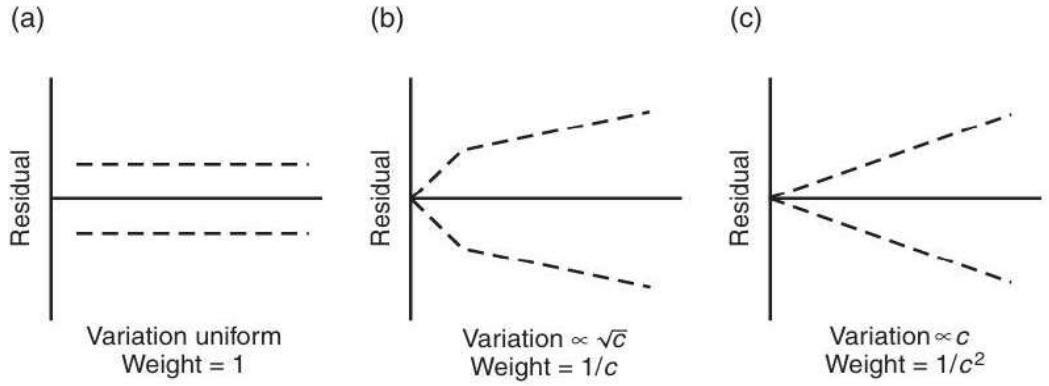
الشكل 7:

- **الشكل 7(أ):** بيانات معايرة لميدازيبام مطابقة لنموذج القطع الزائد.
- **الشكل 7(ب):** نفس البيانات مطابقة لدالة تربيعية.
- **الشكل 7(ج):** نفس البيانات مطابقة لمعادلة "بوروز-واتسون" اللوغاريتمية.

1. البواقي (Residuals) والبواقي المعيارية

يُعد فحص ورسم البواقي أداة تشخيصية بالغة الأهمية للتحقق من ملائمة النموذج الرياضي وطريقة الوزن المُختارة لبيانات المعايرة، فضلاً عن دورها في الكشف عن القيم الشاذة $(Outliers)$.

- من الناحية المثالية، يجب أن تتوزع البواقي بصورة عشوائية ومتجانسة حول خط الصفر [**الشكل 6 (ب)**]؛ بينما يشير ظهور أنماط منحنية – مثل تلك الملاحظة في [**الشكل 5 (ب)**] – إلى خطأ في اختيار النموذج الرياضي.
- إذا أظهر مخطط البواقي مقابل التركيز قيماً ثابتة نسبياً عبر النطاق بأكمله، فهذا يدل على تجانس التباين وعدم الحاجة لأي معامل وزن [**الشكل 8 (أ)**].
- غير أن الواقع العملي يؤكد أن أحجام البواقي غالباً ما تتناسب طردياً مع تركيز المادة التحليلية [**الشكل 8 (ج)**]، وهو أمر حتمي نظراً لتصميم الطرق التحليلية لتوفير قيم انحراف معيارية نسبية $(RSDs)$ شبه ثابتة عبر نطاق المعايرة.



الشكل 8: استخدام مخططات البواقي لتحديد الطريقة الأكثر ملاءمة لوزن بيانات المعايرة:

- **(أ) تباين منتظم (Weight = 1):** البواقي ثابتة عبر كامل النطاق.
- **(ب) التباين يتناسب مع التركيز (c) (Weight = 1/c):** البواقي تزداد مع التركيز.
- **(ج) التباين يتناسب مع مربع التركيز (c^2) (Weight = 1/c²):** تباين مرتفع جداً يتطلب وزناً تصحيحياً قوياً.

2. عينات بلانك (Blank Samples) والمقطع الصادي

يُعد تحضير وتحليل العينات الفارغة – المتمثلة عادةً في مصفوفة خالية تماماً من المادة المراد تحليلها $(Drug\text{-}free\ matrix)$ – ركيزة أساسية في بروتوكولات مراقبة الجودة (QC). وتقتضي الشروط الواجب توفرها في العينة الفارغة ما يلي:

- خلوها التام من أي قمم متداخلة ضمن منطقة اهتمام المادة التحليلية أو المعيار الداخلي في التحليل الكروماتوجرافي.
- ألا تكون استجابتها مرتفعة بشكل يحد من نطاق عمل المقايسة.
- **حظر طرح الإشارة:** لا يُسمح نهائياً بطرح إشارة العينة الفارغة من استجابات المعايير؛ لأن ذلك يغير نموذج الخطأ الإحصائي، كما لا يُنصح بتشغيل المقايسات الضوئية الكمية مقابل عينات فارغة في الخلايا المرجعية للأجهزة مزدوجة الحزمة (وهو ما يختلف عن الفحوصات النوعية).

طبيعة العينة الفارغة وعلاقتها بالمقطع الصادي:

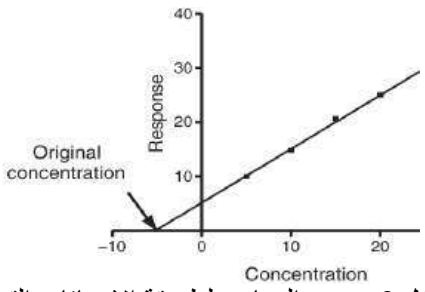
لا تُعتبر العينة الفارغة معياراً ذا تركيز صفري (0)، ولذا **يجب ألا تُدرج ضمن نقاط جدول المعايرة**. كما لا يجوز تقدير كميات المادة التحليلية للعينات الواقعة دون أدنى معيار معايرة.

- تتطلب إشارة العينة الفارغة تكرارات تحليلية لتحديد "حد الكشف" $(Limit\ of\ Detection)$ بدقة.
- عند الاعتقاد أو استخدام أنظمة التقاط البيانات الإلكترونية، يجب التأكد من **عدم إجبار منحنى المعايرة على المرور عبر نقطة الأصل** $(0{,}0)$؛ إذ كانت بعض أجهزة التكامل القديمة تفترض ذلك حتمياً بسبب محدودية الذاكرة.
- عملياً، نادراً ما تمر منحنيات المعايرة الحقيقية عبر الأصل $(0{,}0)$، وإن كان الأصل قد يقع أحياناً ضمن حدود فترات الثقة بنسبة 95%للمقطع الصادي.
- **دلالة المقطع الصادي:** يرجع ظهور مقطع صادي موجب غالباً إلى مساهمات إشارات الخلفية، ومن المتوقع أن يتطابق تقريباً مع القيمة الناتجة عن العينة الفارغة (وهو مؤشر رقابي ممتاز لمراقبة الجودة). أما المقاطع الصادية السالبة فغالباً ما تعبر عن خسائر ناجمة عن الامتصاص، والتي تظهر بوضوح أكبر عند التركيزات المنخفضة جداً. وعلى الرغم من إمكانية استخدام تقنيات إحصائية لإجبار المعايرة على التقاطع مع الأصل، إلا أن هذا الإجراء غير مبرر نظراً لسهولة حساب تراكيز العينات المجهولة رياضياً (مثلاً باستخدام المعادلة رقم 27).

طريقة الإضافات القياسية (Method of Standard Additions)

تفترض طرق المعايرة القياسية الموصوفة سابقاً أن استخدام بلازما أو بول خالٍ تماماً من المادة التحليلية يُعد نموذجاً ممثلاً بدقة لمصفوفة العينة المراد قياسها. ومع ذلك، تواجه التحاليل حالات تعذر أو استصعب الحصول على مصفوفة خالية نظرياً من المادة التحليلية (مثل قياس المركبات الداخلية الداخلية - $Endogenous\ compounds$)، أو وجود تباينات واسعة بين مصفوفات العينات.

في هذه الحالة، تُعتمد **طريقة الإضافات القياسية**، حيث يُحضّر منحنى المعايرة باستخدام العينة المجهولة ذاتها. يُحسب المنحنى بالطرق الاعتيادية، ويُستخرج التركيز المجهول من قيمة التقاطع الخطي لمنحنى المعايرة مع محور التركيز (x-axis) [**الشكل 9**].



الشكل 9 منحنى المعايرة لطريقة الإضافات القياسية.

عيوب الطريقة:

1. **استهلاك عالي للحجم:** تطلب حجماً كبيراً نسبياً من العينة المجهولة لتحضير السلسلة المطلوبة من المعايير.
2. **استهلاك الوقت:** تُعد طريقة بطيئة ومستهلكة للوقت نظراً لأن كل عينة مجهولة تتطلب بناء منحنى معايرة مستقل خاص بها. *(ملاحظة: يمكن تجزئة العينة المجهولة وإضافة كمية معلومة من المادة التحليلية إلى جزء واحد منها، إلا أن نهج المعايرة بنقطة واحدة هذا يعتمد افتراضاً صارماً بوجود استجابة خطية مثالية بين التركيز والاستجابة).*

حدود الكشف والتقدير (Limits of Detection and Quantitation)

يُعد تحديد الحساسية الحدية للقياس معياراً أساسياً لأي طريقة تحليلية، وينقسم هذا المفهوم إلى مستويين رئيسيين:

1. حد الكشف $(LoD - Limit of Detection)$

يُعرف **حد الكشف** بأنه أقل تركيز (أو كمية) من المادة التحليلية يمكن اكتشافه بصورة موثوقة والتمييز بينه وبين أي إشارات خلفية مقاسة في عينات خالية تماماً من المادة التحليلية.

- **صعوبة التعريف والقياس:** لا يُعد تعريف حد الكشف بسيطاً؛ نظراً لوجود أخطاء عشوائية مقترنة بكل من العينة الفارغة والعينات الواقعة عند أو بالقرب من هذا الحد.
- **النسبة بين الإشارة والضجيج (S/N):** في التحليلات الكروماتوجرافية، يُحدد حد الكشف غالباً كمضاعف اصطلاحي لنسبة الإشارة إلى الضجيج (S/N)، مثل 3أو 5أو 10أضعاف. ومع ذلك، في العينات البيولوجية المعقدة، نادراً ما يكون ضجيج الجهاز هو العامل المحدد، بل تتحدد الاستجابة غالباً بفعل الإشارات المتداخلة الناتجة عن مكونات المصفوفة الداخلية.
- **معادلة الـ IUPAC:** على الرغم من غياب تعريف متفق عليه عالمياً بشكل مطلق، إلا أن المعادلة المعتمدة من الاتحاد الدولي للكيمياء البحتة والتطبيقية $(IUPAC)$ تُستخدم على نطاق واسع:

$$LoD = \bar{y}_B + k\sigma_B \quad (33)$$

حيث تمثل $(\bar{y}_b)$ متوسط إشارة العينة الفارغة، و(s_b) الانحراف المعياري لإشارة العينة الفارغة.

- إذا كانت إشارة العينة الفارغة قريبة جداً من الصفر، فإن بعض الاستجابات ستقع في نطاق القيم السالبة، والتي يُعد قياسها أمراً بالغ الأهمية.
- باستخدام المعامل 3في المعادلة السابقة (وهو ما يُعرف أحياناً باتفاقية 3σ)، يوجد احتمال يبلغ نحو 7%لارتكاب خطأ من النوع الأول (الاعتقاد الخاطئ بوجود المادة التحليلية وهي غير موجودة). ولتقليص هذا الاحتمال إلى مستوى 5%, يُشترط رفع المعامل إلى 3.28(Miller, 2000 & Miller).
- **طريقة الإبلاغ:** بعد حساب تقدير الـ LoD، يُفضل الإبلاغ عن النتائج الأدنى منه بصيغة **"غير مكتشفة" (Not Detected)** عوضاً عن استخدام الصيغة التعبيرية $(< LoD)$؛ لكون الأولى أتفهماً وأكثر أماناً علمياً، إذ لا تُشير ضمنياً إلى احتمالية وجود المادة التحليلية بشكل مضلل.

2. حد التقدير الكمي الأدنى $(LLoQ - Lower Limit of Quantitation)$

في التحليلات الكمية، يُعنى حد التقدير الكمي بتحديد أقل تركيز أو كمية يمكن قياسها بدقة وإحكام مقبولين:

- تظل المعايير هنا اصطلاحية، وتتراوح قيم الانحراف المعياري النسبي (RSD) الخاصة بالدقة والإحكام عادةً بين 10%إلى 15%حسب متطلبات الفحص والدقة المطلوبة.

- أما في تحليلات التتبعات الدقيقة ($Trace\ Analyses$) وتجارب الحرائك الدوائية ($Pharmacokinetics$)، فقد يُضطر الباحثون لقبول قيم تصل إلى 20%، على الرغم من أن قيم الـ RSDللتراكيز التي تتجاوز الـ $LLoQ$تكون أدنى من ذلك بكثير.
- يُضبط تركيز أدنى معيار معايرة عادةً ليطابق قيمة الـ $LLoQ$، وإن لم يكن ذلك ضرورياً في كافة التطبيقات. وفي جميع الأحوال، يُحظر الإبلاغ عن التراكيز الواقعة دون مستوى أدنى معيار معايرة. (ملاحظة: يُستخدم أحياناً نهج بديل يعتمد معامل $10s_b$في معادلة الـ IUPAC، لكنه أقل انتشاراً).

3. حد التقدير الكمي الأعلى ($HLoQ - HigherLimitofQuantitation$)

لا تدرج التقارير التحليلية بانتظام حداً أعلى للتقدير الكمي ($HLoQ$)، لا سيما في الطرق ذات النطاق الخطي الواسع. غير أن بعض التقنيات الحساسة – مثل المقايسات المناعية ($Immunoassays$) والكشف بالتألق ($Fluorescence$) في أنظمة الفصل اللحظي ($HPLC$) – تتطلب تأطير نطاق عمل المقايسة بدقة تامة باستخدام كلا الحدين ($LLoQ$ و $HLoQ$).

ملاءمة المنحنى واختيار المعادلة (Curve Fitting and Choice of Equation)

تعتمد كيفية توظيف بيانات المعايرة لاستنباط التراكيز المجهولة للمادة التحليلية على عوامل متعددة، تشمل: الغرض من الفحص، طبيعة المقايسة (روتينية لعينات ضخمة أم تحليل فردي لمادة نادرة)، والموارد المتاحة في المختبر.

- **طرق التقييم السريع:** في بعض التطبيقات البسيطة، قد ينتفي الاحتياج لرسوم منحنيات المعايرة، كما في استخدام قيم القطع ($Cut\text{-}off\ values$) في المقايسات المناعية؛ حيث تزود أنظمة معالجة البيانات أو أجهزة التكامل الحديثة ببرمجيات مدمجة تظهر التركيزات مباشرة. ومع أعداد العينات المحدودة، قد يكفي الرسم اليدوي على ورق بياني واستنتاج القيم بالعين، بيد أن هذه الطريقة معطّلة، بطيئة، وعرضة لأخطاء جسيمة فادحة، فضلاً عن افتقارها للتحليل الإحصائي الرصين.
- **الحلول الرياضية البسيطة:** تتيح الآلات الحاسبة البسيطة أو برمجيات الجداول الحسابية (مثل *Microsoft Excel*) إجراء حسابات الانحدار الخطي بكفاءة، وبمجرد الحصول على قيم الميل (m) والمقطع الصادي (c) لخط المعايرة، يصبح حساب التراكيز لعينات الاختبار أمراً يسيراً باستخدام المعادلات الرياضية المعتمدة (مثل المعادلة رقم 27).
- **النماذج المعقدة والحلول التكرارية:** في حال العلاقات الرياضية الأكثر تعقيداً غير الخطية، تصبح الحزم الحاسوبية والإحصائية التجارية ضرورة ملحة. بينما تمتلك المعادلات الخطية والتربيعية حلولاً تحليلية محددة ومباشرة، تتطلب بعض العلاقات المعقدة حلولاً **تكرارية ($Iteratively$)** تُنفذ عبر برمجيات إحصائية متخصصة.

خوارزميات المطابقة والتكرار (Neilsen-Kudsk Algorithm)

تُعد خوارزمية **"نيلسن-كودسك" (Neilsen-Kudsk, 1983)** – المكتوبة بلغة BASIC – مصدراً تاريخياً ومفيداً للمطابقة التكرارية للمنحنيات؛ حيث تميزت بسهولة تعديل الكود البرمجي لملاءمة مجموعة واسعة من المعادلات والنماذج، بما في ذلك منحنيات المعايرة، وعلاقات الحرائك الدوائية ($Pharmacokinetics$) لمختلف الأجزاء، ومنحنيات الاستخلاص عند درجات حموضة متفاوتة (Whelpton, 1989; 2004).

اختيار النموذج الأمثل ومعيار معلومات أكايكي (AIC):

يجب أن ينبع اختيار معادلة المعايرة (النموذج الرياضي) من طبيعة البيانات نفسها. تتيح الملاءمة الإحصائية مقارنة النماذج المختلفة (كالنموذج التربيعي والتكعيبي).

- لا يُعد الاعتماد على أقل مجموع مربعات للبواقي (SS) معياراً كافياً بحد ذاته لاختيار النموذج؛ نظراً لأن المعادلة ذات المعاملات الأكثر ستعطي حتماً أدنى مجموع مربعات للبواقي بغض النظر عن كفاءتها الحقيقية.
- لذا، تحسب الحزم الإحصائية الحديثة مؤشرات **"جودة الملاءمة" ($Goodness\ of\ fit$)** التي تأخذ بعين الاعتبار عدد المعاملات في المعادلة. وتقوم بعض البرامج بمطابقة معادلتين متوازيتين ومقارنتهما باستخدام اختبار (F-test).
- استخدم "نيلسن-كودسك" (1983) **معيار معلومات أكايكي (AIC)** للمقارنة الفعالة، والذي يُحسب وفق العلاقة الرياضية التالية:

$$AIC = N \ln(SS) + 2M \quad (34)$$

حيث Nهو عدد نقاط البيانات، وM هو عدد المعاملات. المعادلة ذات أقل قيمة لـ **AIC** هي الأكثر ملاءمة إحصائياً.

المعايرة بنقطة واحدة (Single Point Calibration)

على الرغم من أن منحنيات المعايرة متعددة النقاط تظل هي المعيار القياسي للتحليلات على دفعات، إلا أن هناك ظروفاً استثنائية تصبح فيها **المعايرة بنقطة واحدة** خياراً عملياً ومناسباً، مثل الطلبات الطارئة للفحوصات غير الروتينية في المختبر.

- **اشتراطات الاعتماد:** يجب التحقق من صحة طرق المعايرة بنقطة واحدة بدقة، ومقارنة نتائجها دورياً مع تلك الناتجة عن المعايرة متعددة النقاط (Peters et al., 2005). ويشمل ذلك: إثبات خلو العينات الفارغة من التداخلات، تحديد النطاق الخطي للفحص (بحيث يشمل أدنى وأعلى التراكيز العلاجية المتوقعة)، وتقييم حجم المقطع الصادي. كما يُشترط اختيار تركيز المعيار المفرد بحيث تقع فترات الثقة بنسبة 95%للقيم المتوسطة ضمن حدود مقبولة من القيمة المستهدفة.
- **المقايسات المناعية التجارية:** يطور المصنعون أحياناً معادلات تمكّن – ظاهرياً – من استخدام معايرة خط مستقيم بسيطة، والتي يمكن "التحقق" من صلاحيتها روتينياً بنقطة واحدة بافتراض مقطع صادي صفري. ومع ذلك، يظل استخدام المعايير المتعددة أمراً بالغ الأهمية لتأكيد استقرار الأداء عند تغيير دُفعات الكواشف؛ إذ قد تُصمم معايير الفحص لتكون خاصة بدفعة معينة، وقد يؤدي إهمال المعايرة متعددة المستويات إلى **انحراف المعايرة ($Calibration\ Drift$)**.

التحليلات على دفعات (Batch Analyses)

تتطلب ضمانات الجودة في التحليل الكمي – بغض النظر عن الأنظمة الأجهزة المستخدمة – إخضاع الدفعات التحليلية لضوابط صارمة:

- **بناء منحنى المعايرة:** يتم عادةً عبر تحليل محاليل قياسية لكل مادة تحليلية تتوزع بين (8 – 6 تراكيز) عبر نطاق المعايرة، ومحضرة في مصل بشري أو مصل عجل حديث الولادة خالٍ تماماً من المادة التحليلية.
- **ضبط الجودة الداخلي (IQC):** تُوضع إجراءات صارمة تتضمن تحليل محاليل قياسية محضرة بشكل مستقل ومجهولة التركيبة بالنسبة للمحلل، وغالباً ما تُحضر بتراكيز منخفضة، ومتوسطة، وعالية لكل مادة تحليلية ضمن مصل خالٍ منها.
- **نظام التكرار والدوريات التحليلية:**
  - تُحلل معايير المعايرة في صورة **مكررات مزدوجة ($Duplicate$)**؛ تُقاس مرة في بداية الدفعة وأخرى في نهايتها.

- تُحلل عينات ضبط الجودة (IQC) في البداية والنهاية، وتتخللها قياسات دورية بعد كل $(10 - 5)$ عينات مرضى حسب الاقتضاء.
- أما **عينات تقييم الجودة الخارجي** (EQA) فتُعالج وتُحلل بما يتوافق حصرياً مع المتطلبات التنظيمية الخاصة بمخططات (EQA).

معايير قبول التحليل (Analytical Acceptance Criteria)

يخضع أداء التحليلات على دفعات (أي تحليل مجموعة من العينات ضمن تسلسل تحليلي واحد) ومعايير قبول النتائج لتوجيهات وإرشادات التحقق من صحة الطرق الصادرة عن الجهات التنظيمية (مثل FDA/CDER, 2001). وتتمثل المعايير النموذجية لقبول الفحص فيما يلي:

- **الكروماتوغرافيا:** اشتراط امتلاك القمم لخصائص شكلية واضحة وأزمنة احتجاز قابلة للتكرار، إلى جانب ضمان استقرار خط الأساس $(Baseline)$.
- **منحنى المعايرة:** أن يحقق معامل ارتباط مقبول $R^2 \geq 0.99$ أو وفق المعايير المعتمدة للفحص)، مع التأكد من أن المقطع الصادي لا يختلف بصورة جوهرية ومعنوية عن الصفر.
- **نتائج ضبط الجودة الداخلي (IQC):** يجب أن تقع النتائج ضمن الحدود المقبولة مسبقاً (والتي تُحدد عموماً ضمن حدود $\pm 10\%$من القيمة الاسمية).

معايير قبول عينات المرضى:

1. الحصول على كروماتوجرام "نظيف" يخلو قدر الإمكان من التداخلات الكيميائية أو البيولوجية.
2. أن تكون قيم المكررات المزدوجة (معبراً عنها بنسبة ارتفاع القمة إلى المعيار الداخلي) ضمن حدود $\pm 10\%$، باستثناء الحالات التي تقترب من حد الحساسية الأدنى للفحص (حد الكشف أو التقدير)، حيث يُكتفى أحياناً بقبول تباين ضمن حدود $\pm 20\%$.
3. أن تقع نتائج التحليل ضمن نطاق معايرة الفحص المعتمد؛ مع إمكانية إعادة تحليل عينات المرضى التي تتجاوز حدود القبول طالما توفرت كمية كافية من العينة.

اعتبارات إضافية:

1. المقايسات المناعية $(Immunoassays)$:

قد تخضع هذه المقايسات لنظام "الوصول العشوائي" $(Random\ Access\ Analysis)$. في هذه الظروف، يُفضل إجراء فحوصات ضبط الجودة الداخلي (IQC) على فترات زمنية محددة ومنتظمة عند مستويات تراكيز منخفضة، ومتوسطة، وعالية. أما في المقايسات المستخدمة كأدوات مسح كيميائي للكشف عن الأدوية، فيُعتمد على **تركيز القطع** $(Cut\text{-}off\ Value)$ للتمييز بين النتائج الإيجابية والسلبية؛ ومن ثم يصبح من الأهمية بمكان التحقق بدقة فائقة من الأداء التحليلي عند نقطة القطع (وغالباً عند تركيز يعادل $\pm 50\%$من قيمة القطع) لتقليل احتمالات الوقوع في خطأ النتائج الإيجابية الكاذبة أو السلبية الكاذبة.

2. تخفيف العينات ($Sample\ Dilution$):

- عند الحصول على نتيجة تحليلية تفوق الحد الأعلى لنطاق المعايرة، يجب – إن أمكن – تخفيف جزء من العينة باستخدام بلازما أو مصل "فارغ" ($Blank\ matrix$) وإعادة تحليلها.
- في حالات الاشتباه بجرعات زائدة ($Overdose$)، يجب إجراء تخفيفات مسبقة (مثل 1 :1، 3 :1، 9 :1) باستخدام مصل فارغ أثناء خطوة التحليل الأولي.
- بالنسبة للعينات المأخوذة من الدم الكامل بعد الوفاة ($Postmortem\ blood$) في حالات الجرعات الزائدة المشتبه بها، يُشترط تخفيفها بنسبة 3 :1و 9 :1قبل الشروع في التحليل بالطرق القياسية. وإذا أشارت المعلومات الإكلينيكية أو المعطيات المتوفرة إلى وجود جرعة زائدة هائلة، فيمكن إجراء تخفيفات إضافية أوسع حسب اقتضاء الحاجة الفنية.

استخدام المعايير الداخلية (Internal Standards)

المعيار الداخلي هو مركب كيميائي يُضاف بكمية معلومة ومحددة بدقة عند مرحلة معينة من خطوات الفحص، بهدف التحقق من سلامة الطريقة التحليلية وتصحيح أي أخطاء نظامية قد تحدث أثناء العملية.

- **مجالات الاستخدام:** تُستخدم المعايير الداخلية أساساً في التحليلات الكروماتوجرافية، وتقنيات الرحلان الكهربائي، ومقايسات مطيافية الكتلة؛ نظراً لأن القدرة التحليلية العالية لهذه الأنظمة تتيح قياس المركب المضاف بشكل مستقل.
- تاريخياً، أمكن استخدام المعايير الداخلية المشعة في أنواع مختلفة من المقايسات، إلا أن متطلبات الأجهزة المعقدة، وضعف دقة العد الإشعاعي، فضلاً عن المخاوف البيئية والصحية المرتبطة بسلامة الإشعاع وطرق التخلص منه، جعلت هذا النهج مهجوراً وغير مستخدم حالياً.

آلية الإضافة والتحكم:

يجب إضافة كمية ثابتة من المعيار الداخلي إلى كل عينة بدرجة عالية من الدقة، مع ضمان الخلط التام. وعلى العكس من ذلك، فإن الدقة المطلقة للكمية المضافة ذاتها تعد أقل أهمية في الغالب، وضمن حدود معينة، لا يشترط أن يتمتع المعيار الداخلي بنفس درجة نقاء المادة التحليلية المطلوبة. واعتماداً على الغرض من استخدامه، قد يُضاف المعيار الداخلي إما في مستهل الإجراء التحليلي أو في مرحلة لاحقة منه. وتتلخص المتطلبات الأساسية الواجب توفرها في المعيار الداخلي للتحليلات الكروماتوجرافية وفقاً لما حدده (Haefelfinger, 1981) في **الإطار (3)**:

إطار رقم (3): متطلبات المعيار الداخلي (Haefelfinger, 1981)

يجب أن يتميز المعيار الداخلي المثالي بالخصائص الآتية:

1. أن يكون **منفصلاً تماماً** (غير متداخل محلولاً) عن كافة المواد المعلومة والمجهولة في الكروماتوجرام.
2. أن يظهر (يخرج من العمود الكروماتوجرافي) **بالقرب من قمم الاهتمام** (ويفضل أن يخرج مباشرة بعد القمة الأخيرة).
3. أن يمتلك **استجابة كاشف مماثلة** (من حيث ارتفاع القمة أو مساحتها) لاستجابة المادة أو المواد التحليلية.
4. أن تتطابق **خصائصه الكيميائية والفيزيائية** مع خصائص المادة التحليلية.
5. أن يخضع لأي **تفاعل اشتقاقي** ($Derivatization$) بالطريقة ذاتها التي تخضع لها المادة التحليلية.
6. أن يكون **مستقراً كيميائياً وفيزيائياً** عند التخزين في المحاليل وأثناء ظروف التحليل.
7. أن يتوفر بسهولة وبدرجة **نقاء كافية**.

بدائل المعايرة الداخلية: المعايرة الخارجية (External Calibration)

تُعد ممارسة استخدام المعيار الداخلي من الأساسيات الجيدة في المقايسات الكروماتوجرافية؛ غير أن إضافة المعيار الداخلي قد تزيد من زمن التحليل والتكلفة، مما يستوجب التأكد من جدوى وفعالية توظيف مركب مناسب. يجب إثبات أن اعتماد المعايرة الداخلية يمثل إضافة حقيقية أو على الأقل ليس ضاراً بأداء الفحص العام. وفي حال تعذر إيجاد معيار داخلي مناسب، يصبح اللجوء إلى **المعايرة الخارجية** ($External\ Calibration$) أمراً حتمياً. ولا يعني ذلك بالضرورة تراجع دقة الطريقة أو إحكامها؛ فاستخدام أنظمة حقن عالية القابلية للتكرار، وكواشف مستقرة، وطرق استخلاص ذات كفاءة وموثوقية عالية، يمكن أن يمنح نتائج مقبولة تماماً (كما هو موضح في **الجدول 5**).

الجدول 5: مقارنة الدقة والإحكام داخل الفحص (Intra-assay) لفحص بوجود وبدون معيار داخلي (البيانات هي متوسطات لـ 6 عينات مكررة) (Wilson, 1990)

التركيز الاسمي (ملجم/لتر)	التركيز المكتشف (بدون IS)	التركيز المكتشف (مع IS)	RSD (%) بدونIS	RSD (%) معIS
1	1.3	1.3	15.4	15.4
3	3.6	3.5	11.1	11.4
10	10.6	10.3	5.7	4.9
30	35	33.9	4.3	5.3
100	107	104	2.4	2.8
300	319	316	2.5	3
1000	1051	1037	2.8	0.4

- **تقنية حقن "شطف المذيب" ($Solvent\text{-}flush$):** تُستخدم لتحسين دقة الحقن؛ حيث يُسحب حجم صغير من المذيب داخل المحقنة يليه سحب كمية من الهواء حتى يظهر غضروف المذيب ($Meniscus$). بعد ذلك تُسحب العينة باستخدام حركة الغضروف لضبط الحجم بدقة، وأخيراً يُسحب المزيد من الهواء لضمان رؤية كتلة العينة بالكامل. يتيح هذا النهج التحقق من حجم العينة المحصور بين الغضاريف قبل إتمام عملية الحقن، كما يساهم بفاعلية في تقليل ظاهرة انتقال المكونات بين الحقنات ($Carry\ over$).
- **الأنظمة الآلية:** تُعد أنظمة الاستخلاص الآلية أكثر ملاءمة وتوافقاً مع استراتيجيات المعايرة الخارجية، مما يلغي الحاجة الملحة لوجود معيار داخلي، بشرط أن يكون نظام الاستخلاص قد خضع لعمليات تحقق صارمة وموثوقة.

شروط واشتراطات إضافة المعيار الداخلي

كلما أمكن ذلك، يجب إضافة المعيار الداخلي إلى العينة البيولوجية في صورة محلول (ويفضل أن يكون مائياً). وفي حال تضمن الإجراء خطوات استخلاص، يجب أن يُبدي المعيار الداخلي سلوكاً فيزيائي-كيميائياً مماثلاً للمادة التحليلية، بمعنى تقارب معاملات التوزيع ($Partition\ coefficients$) بينهما.

ومن البديهي أن يحقق المعيار الداخلي استجابة كاشف متقاربة مع المادة التحليلية، مع ضمان انعزاله تماماً عنها وعن أي مركبات أخرى يحتمل تواجدها في الكروماتوجرام أو طيف الكتلة. وبصورة خاصة، يُحظر أن يكون المعيار الداخلي عبارة عن عقار دوائي محتمل وجوده في العينات قيد الفحص، كما يجب ألا يكون ناتجاً معروفاً أو محتملاً لتحلل المادة التحليلية أو لعمليات الأيض الخاصة بها.

إطار رقم (4)	نقاط يجب مراعاتها عند استخدام المعايرة الخارجية (External calibration)

عند العمل بنظام المعايرة الخارجية، تصبح دقة خطوات المعالجة والتحضير هي العامل الحاسم في جودة النتائج، لذا يجب مراعاة ما يلي:

- تقليل خطوات النقل والتبخير: يجب تقليل عدد خطوات نقل المستخلص وعمليات التبخير إلى أدنى حد؛ فكر في حقن العينة أو مستخلص العينة مباشرة أو بعد تخفيفها، مع زيادة حساسية/انتقائية الكاشف إذا لزم الأمر.
- استخدام الاستخلاص بالطور الصلب (SPE): إذا كانت خطوات تركيز المادة التحليلية ضرورية، ففكر في استخدام SPE (Solid Phase Extraction) لأنها غالباً ما تعطي استرداداً عالياً مع قابلية جيدة للتكرار.
- قياس الأحجام بدقة: عند استخدام الاستخلاص السائل-سائل (LLE)، يجب قياس أحجام نقل المستخلص بدقة.
- تجنب المذيبات المتطايرة: تجنب استخدام مذيبات الاستخلاص المتطايرة؛ لأنه من الصعب تقييم التغير في الحجم أثناء المناولة.
- الاستخلاص العكسي (Back-extraction): إذا كان ذلك ممكناً، فإن تركيز المادة التحليلية في مستخلصات العينة عن طريق الاستخلاص العكسي في حجم صغير من السائل، يُفضل على تبخير المذيب.
- حقن الـ HPLC: عند الحقن في أجهزة الـ HPLC، يجب ملء حلقة العينة (Sample loop) بالكامل (أو تجاوز ملئها) لضمان دقة الحجم المحقون.
- تقنية الحقن في الـ GC: احقن أكبر حجم ممكن في أجهزة الـ GC لتقليل الأخطاء المرتبطة بقياس الأحجام الصغيرة، و/أو استخدم تقنية "شطف المذيب" (Solvent-flush).

مزايا المعايرة الداخلية (Advantages of Internal Standardization)

تتعدد المزايا التطبيقية لاستخدام المعايير الداخلية في التحليلات الآلية، وتبرز أهمها في الجوانب الآتية:

1. قابلية تكرار حجم الحقن (Reproducibility of Injection Volume)

يتسم الحقن اليدوي للأحجام المجهرية من المستخلصات – لا سيما في أجهزة الكروماتوجرافيا الغازية (GC) – بمحدودية دقته. وبافتراض إبداء الكاشف استجابة خطية تجاه المعيار الداخلي، فإن الإشارة الناتجة عنه يجب أن تتناسب طردياً مع حجم العينة المحقونة. وعليه، إذا عوملت كافة العينات القياسية والمجهولة بنفس الطريقة، فيمكن بناء منحنى المعايرة بالاعتماد على **نسبة استجابة المادة التحليلية إلى استجابة المعيار الداخلي**:

$$\textbf{تركيز المادة التحليلية مقابل } \frac{\textbf{استجابة المادة التحليلية}}{\textbf{استجابة المعيار الداخلي}}$$

يتيح استخدام هذه النسب تعويض أي تباينات في حجم الحقن بدقة عالية. وينطبق هذا المبدأ ذاته على حالات استخدام مذيبات حقن متطايرة؛ إذ يتزايد تركيز كل من الدواء والمعيار الداخلي مع تبخر المذيب، لتكون الإشارة الناجمة عن المعيار الداخلي متناسبة عكسياً مع حجم المحلول المتبقي، مما يجعله خياراً حتمياً وضرورياً في **تحليلات فراغ الرأس** **(**$Headspace\ Analysis$**)**.

2. التعويض عن عدم استقرار نظام الكشف (Instability of the Detection System)

تعاني بعض أنظمة الكشف من تراجع في استقرارها التشغيلي؛ ففي أنظمة الـ GC، تُظهر كواشف التقاط الإلكترون (ECD) وكواشف النيتروجين والفوسفور (NPD) انخفاضاً ملحوظاً في الاستجابة عند تعرضها للتلوث، وتتصرف الكواشف الكهروكيميائية في أنظمة الـ $HPLC$بطريقة مشابهة. هنا يأتي دور المعيار الداخلي المختار بعناية ليعوض هذه التغيرات، بشرط أن تظل نسبة الإشارة بين المادة التحليلية والمعيار الداخلي ثابتة لخليط القياس المعين.

- **مثال توضيحي:** يمكن إثبات ذلك عبر استخدام عقار **"الثيوريدازين"** **(**$Thioridazine$**)** للتعويض عن الفقدان المتكرر لاستجابة كاشف الـ NPDتجاه الحقن المتكرر لمشتق **"فلوبينازين تريميثيل سيلل إيثر"** **(**$Fluphenazine\ trimethylsilyl\ ether$**)**.

- على الرغم من حدوث تراجع هائل في استجابة الفلوبينازين المطلقة (حيث انخفض ارتفاع القمة بنسبة وصلت إلى 80%)، إلا أن نسبة ارتفاع قمة الفلوبينازين إلى الثيوريدازين في محاليل الاختبار ظلت مستقرة وبتغير لم يتجاوز 2%فقط.
- تَمَّت استعادة الحساسية الأصلية للكاشف عبر زيادة درجة حرارة خرزة سيليكات الروبيديوم دورياً لبضع دقائق، وقد أُكدت صحة هذا النهج عبر دراسة تأثير تغير درجة حرارة الخرزة كما يوضح **الجدول 6**.

الجدول 6: تأثير تغيير درجة حرارة خرزة الروبيديوم في كاشف ($GC\text{-}NPD$) على الاستجابة لحقن متكرر يحتوي على فلوبينازين TMSإيثر والثيوريدازين

إعداد درجة حرارة الخرزة (بقيم اعتباطية)	ارتفاع قمة الفلوبينازين (mm)	ارتفاع قمة الثيوريدازين (mm)	نسبة ارتفاع القمة (الفلوبينازين / الثيوريدازين)
620	61.5	36.5	1.68
640	75.5	45.5	1.66
650	105.0	62.5	1.68
660	109.5	66.0	1.67
المتوسط	**87.9**	**52.6**	**1.67**
المدى (% من المتوسط)	**54.6%**	**56.1%**	**1.20%**

(ملاحظة تحليلية: عندما تم تغيير معدل تدفق الهيدروجين بطريقة مشابهة، بقيت نسب ارتفاع القمة محصورة بدقة ضمن النطاق – 1.66 1.68*)*. ومع ذلك، تجدر الإشارة إلى أنه إذا أدى تلوث الكاشف إلى التأثير على الاستجابات التفاضلية للمركبات المختلفة بطرق متباينة، فلن يقدم المعيار الداخلي أي فائدة تصحيحية.

3. تدارك أخطاء الأنابيب وتبخر مذيب الاستخلاص (Pipetting Errors and Evaporation)

بمجرد إضافة المعيار الداخلي في بداية التحليل، فإن أي خسائر ناتجة عن نقل المستخلص بين الأوعية المختبرية، أو أي تركيز محتمل للمستخلص بفعل تبخر مذيب متطاير أثناء الخطوات التحليلية، ستنعكس وتُصحح تلقائياً عبر قياس معدل استرداد ($Recovery$) المعيار الداخلي.

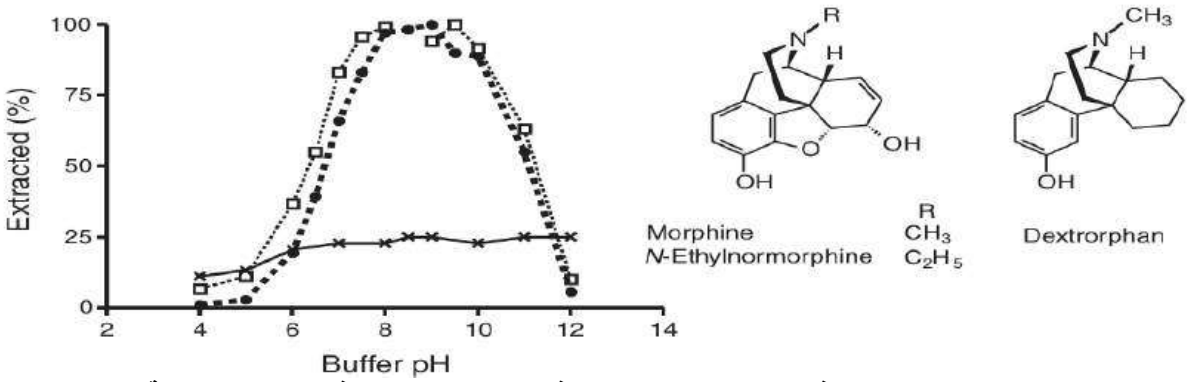
ويمكن القول إذن إن إدراج المعيار الداخلي **يلغي الحاجة إلى النقل الكمي التام** (على الأقل جزئياً)، مما يتيح الاعتماد على أدوات زجاجية أقل تكلفة (مثل ماصات باستور - *Pasteur pipettes*) أو طرق فصل أسرع (مثل السكب عند فصل الأطوار البيئية أو الكيميائية).

- على الرغم من إمكانية الحصول على دقة مقبولة باستخدام المعايرة الخارجية في حال قياس أحجام النقل بدقة، إلا أنه يظل من القواعد المختبرية الرصينة:
  1. الحرص دائماً على تحقيق نقل كمي كامل للطور.
  2. استخدام مذيبات استخلاص غير متطايرة نسبياً؛ لضمان بقاء استجابة المعيار الداخلي على الكروماتوجرام ثابتة نسبياً، حيث يُعد أي انخفاض حاد ومفاجئ في إشارته مؤشراً إنذارياً مبكراً ينبه المحلل إلى وجود خلل تقني كامن.

كفاءة الاستخلاص (Extraction Efficiency)

لكي يؤدي المعيار الداخلي دوره المنشود في التعويض الفعال عن خسائر الاستخلاص، يجب أن يتطابق كيميائياً مع المادة التحليلية قدر الإمكان. ولهذا السبب، تُعد **المعايير الداخلية الموسومة بنظائر مستقرة** **(*Isotopically Labeled Standards*)** هي الخيار الأمثل والأنسب في مقايسات مطيافية الكتلة (MS).

- أما في الطرق التي لا ترتبط بتقنية الـ MSأو عندما تتعذر التفرقة، فيجب اختيار أقرب مركب متماثل $(Homologue)$ متوافق؛ وغالباً ما يحقق هذا النهج نجاحاً أكبر مقارنة باستخدام نظير هيكلي مجرد أو معيار داخلي "عام" [**الشكل 10، الجدول 7**].



الشكل 10: خصائص استخلاص المورفين (•)، N-إيثيل نورمورفين (□)، وديكستروورفان (×) المستخدمة كمعيار داخلي في فحص مورفين منشور.

- يوضح الشكل منحنيات استخلاص لكل من: المورفين (·)، ومركب N-إيثيل نورمورفين (□)، وديكستروورفان (×) المستخدم كمعيار داخلي في أحد فحوصات المورفين المنشورة.

- **ظروف التجربة:**
  - الطور المائي: محاليل بريتون-روبنسون $(0.1\ \text{mol L}^{-1})$.
  - مذيب الاستخلاص: خليط (بوتانول : تولوين بنسبة 1:9).
  - نسبة المذيب إلى المحلول المنظم: 1 :10.

يُبرز الشكل بوضوح مدى التباين في كفاءة الاستخلاص – التي تتأثر بشكل مباشر بدرجة الحموضة (pH) للمحلول المنظم – بين المورفين ومتماثليه، مما يشدد على حتمية اختيار معيار داخلي يمتلك ذات السلوك الفيزيوكيميائي لضمان تعويض دقيق عن خسائر الاستخلاص في كافة مراحل التحليل.

الجدول 7: الانحراف المعياري النسبي داخل الفحص $(Intra\text{-}assay\ RSD)$ لتحليل المورفين بواسطة $(HPLC)$، بوجود وغياب مركب N-إيثيل نورمورفين كمعيار داخلي

التركيز $(\mu g\ L^{-1})$	العدد (n)	متوسط ارتفاع القمة المطلق	الانحراف المعياري النسبي لارتفاع القمة $(RSD\ \%)$	متوسط نسبة قمة المورفين إلى المعيار	الانحراف المعياري النسبي لنسبة القمة $(RSD\ \%)$
100	6	10.00	3.58%	0.985	**0.55%**
50	6	4.75	5.11%	0.510	**1.24%**
10	6	0.75	5.96%	0.075	**3.52%**

(ملاحظة تحليلية: يُظهر الجدول بوضوح التحسن الهائل في دقة النتائج المتمثل في الانخفاض الحاد لقيم الـ RSDعند الاعتماد على نسبة القمم بدلاً من ارتفاع القمم المطلق، مما يؤكد الفعالية القصوى للمعيار الداخلي في تصحيح المتغيرات العشوائية أثناء الحقن أو الاستخلاص).

1. التحديات عند قياس عدة مركبات (Multianalyte Assays):

تظهر إشكالية حقيقية عند محاولة التقدير الكمي لعدة مركبات دفعة واحدة (كالدواء الأساسي وأيضاته)، حيث تختلف خصائص الاستخلاص لكل مركب عن الآخر. وقد تفرض بعض الدراسات المتقدمة استخدام **أكثر من معيار داخلي واحد،** لا سيما عند توظيف كاشفين مختلفين، أو في حال اتساع النطاق الكروماتوجرافي كما في فحوصات المسح الشامل عن المخدرات بتقنية $(LC\text{-}MS\text{-}MS)$.

2. حدود فائدة المعيار الداخلي:

- إذا كانت **كفاءة الاستخلاص مرتفعة للغاية** (تبلغ نحو 95%)، فإن إدراج معيار داخلي لن يقدم سوى تحسن طفيف في دقة الفحص. وينطبق ذات الأمر على الحالات التي تكون فيها كفاءة الاستخلاص منخفضة ولكنها تتسم بثبات وقابلية عالية للتكرار.
- بالمقابل، من المستبعد تماماً أن يسهم المعيار الداخلي في تصحيح التغيرات الناتجة عن:
  1. التباين في نسب الارتباط ببروتينات الدم.
  2. الخسائر الناجمة عن خطوات ترسيب البروتين.
  3. خسائر الامتزاز على الأسطح الزجاجية للأواني.
  - *(استثناء: يمكن تدارك هذه العوامل فقط في حال استخدام معيار داخلي موسوم بنظائر مشعة أو مستقرة مطابقة تماماً).*

تفاعلات الاشتقاق (Derivatization) والتفاعلات غير المتكافئة

بافتراض تساوي العوامل الأخرى، لا ينبغي الاعتماد سوى على المعايير الداخلية الموسومة بالنظائر في تفاعلات اشتقاق المادة التحليلية؛ نظراً لأن المركبات المتميزة كيميائياً تكون أقل عرضة للتفاعل بصورة مطابقة تماماً.

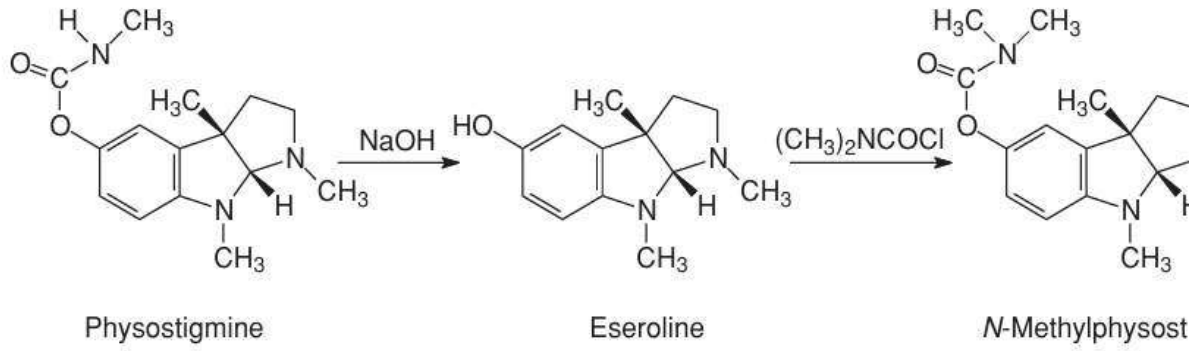
- **متانة الظروف التحليلية $(Robustness)$:** يجب دائماً التحقيق بعمق في أسباب أي تباين أو عدم دقة، والعمل على تعديل ظروف التفاعل لضمان اتسامها بالمتانة والقوة والاستقرار، بدلاً من الاكتفاء بالاعتماد العشوائي على إدراج مركب ثانٍ.
- **تحديات المعايير الموسومة:** قد تظهر إشكاليات حتى مع استخدام المعايير الداخلية الموسومة بنظائر مستقرة، لا سيما إذا كانت الروابط الكيميائية التي تربط النظير بقية الهيكل الجزيئي متضمنة مباشرة في تفاعل الاشتقاق. وفي مثل هذه الظروف، يصبح لزاماً اللجوء إلى مركبات تمتلك مواقع وسم بديلة ومحمية.

توفر المعايير الداخلية (Internal Standard Availability)

تتوفر المركبات المرشحة للاستخدام كمعايير داخلية عبر موردي المواد الكيميائية المتخصصين، أو شركات الأدوية، أو المصادر البحثية المختلفة.

- **نظائر مطيافية الكتلة (MS):** تتوافر تجارياً العديد من النظائر المهدرجة $(Deuterated)$ أو نظائر الكربون-13 (^{13}C) للعديد من الأدوية ومستقلباتها لاستخدامها المباشر في تحليلات مطيافية الكتلة.
- **التصنيع المعملي:** في حال تعذر الحصول على المركب المطلوب فوراً، يمكن تصنيحه أو تحضيره مخبرياً داخل وحدة التحليل. ولا يُشترط في المعيار الداخلي أن يتمتع بنقاء كيميائي مطلق (100% بنسبة النقاء)، بل غالباً ما تكفي كمية يسيرة منه لتقييم جدوى توظيفه قبل الشروع في تصنيع كميات أكبر.

- وغالباً ما تتشابه التفاعلات الكيميائية اللازمة لتصنيع هذه المعايير مع تلك المستخدمة في تفاعلات الاشتقاق الشائعة.
  - **مثال توضيحي:** تم تصنيع معيار داخلي مخصص لفحص عقار **"الفيزوستيجمين"** **(*Physostigmine*)** عن طريق تميؤ الدواء تحت جو من غاز النيتروجين، يليه تفاعل ناتج التميؤ المسمى **"إيسيرولين"** **(*Eseroline*)** مع مركب *كلوريد N,N-ثنائي ميثيل كارباموايل* [**الشكل 11**]؛ وهو مركب أصبح متاحاً تجارياً اليوم تحت اسم *(N-ميثيل فيزوستيجمين)*.
- **المراقبة والعزل:** يمكن متابعة مراحل التفاعلات الكيميائية باستخدام ذات الأدوات التحليلية المعتمدة في الفحص المقترح؛ وفي حالة التحليلات الدقيقة لآثار المواد (*Trace Analyses*)، غالباً ما يمكن عزل كميات كافية من المنتج المستهدف باستخدام تقنيات **الكروماتوجرافيا الطبقية الرقيقة** **(*TLC*)** أو **السائل عالي الأداء** **(*HPLC*)**.



الشكل التوضيحي 11: يوضح المسار التفاعلي لتصنيع وتركيب المعيار الداخلي الخاص بتحليل عقار الفيزوستيغمين باستخدام نظام الفصل الكروماتوجرافي (*HPLC*).

العيوب المحتملة للمعايرة الداخلية (Potential Disadvantages of Internal Standardization)

لا ينبغي افتراض أن إدراج المعيار الداخلي سيؤدي حتماً وبصورة مطلقة إلى تحسين دقة وإحكام فحوصات الكروماتوجرافيا الغازية (*GC*) أو السائلة (*HPLC*). فالمركب الداخلي عاجز عن تقليل عدم الدقة الناجمة عن الأخطاء العشوائية البحتة؛ بل على العكس، قد تؤدي الأخطاء العشوائية المرتبطة بعملية تحديد كمية المعيار الداخلي نفسه إلى تفاقم الخطأ الكلي بدلاً من تقليله (وفق المعادلة رقم 28).

عند إجراء قياسات مكررة للمادة التحليلية والمعيار الداخلي، يمكن الحصول على متوسط الاستجابات والانحرافات المعيارية النسبية لكل منهما (RSD_a و RSD_is). وترتبط الانحرافات في قياس استجابات المركبات الفردية بالنسبة المستخدمة في الفحص وفق العلاقة الرياضية التالية:

$$(RSD_r)^2 \approx (RSD_a)^2 + (RSD_{is})^2 - 2r.(RSD_a.RSD_{is}) \quad (35)$$

$$RSD_r = \sqrt{RSD_a^2 + RSD_{is}^2 - 2r(RSD_a \cdot RSD_{is})}$$

حيث يمثل (r) معامل الارتباط بين استجابات المادة التحليلية والمعيار الداخلي. ولكي يتحقق تحسن حقيقي في إحكام الفحص نتيجة إدخال المعيار الداخلي، يجب أن تحقق النسبة الشرط الآتي:

$$RSD_r < RSD_a \quad (36)$$

وبالتعويض في المعادلة (35) وإعادة ترتيب الحدود الجبرية، نحصل على معيار التحسن:

$$RSD_{is} < 2r.RSD_a \quad (37)$$

$$r > \frac{RSD_{is}}{2 \cdot RSD_a}$$

- **الاستنتاج الإحصائي:** بناءً على درجة الارتباط (r) بين استجابات المادة التحليلية والمعيار الداخلي، قد يؤدي إدراج المعيار الداخلي إما إلى تقليل عدم الدقة الكلية أو زيادتها.
- حتى في أفضل حالات الارتباط التام $(r = 1)$، يجب أن يكون الانحراف المعياري النسبي للمعيار الداخلي (RSD_{is}) أقل من نصف نظيره للمادة التحليلية لضمان تحقيق تحسن إجمالي في الإحكام.
- وإذا كانت المادة التحليلية قابلة للقياس بدقة عالية في غياب المعيار الداخلي أصلاً، فإن هذه المعادلات تؤكد قاطعاً أن إضافة معيار داخلي لن تقدم أي تحسين يذكر في النتائج.

الفرضيات الأساسية الحاكمة:

- يُفترض دائماً أن العلاقة بين تركيز المعيار الداخلي واستجابة الكاشف هي **علاقة خطية تمر حصراً عبر نقطة الأصل** $(0,0)$.
- وفي حين لا يشترط أن تكون علاقة التركيز بالاستجابة للمادة التحليلية خطية بالضرورة، إلا أن عدم خطية استجابة المعيار الداخلي ستجعل الاعتماد على منحنى المعايرة بنسبة الاستجابة أمراً شاذاً وغير دقيق إحصائياً.

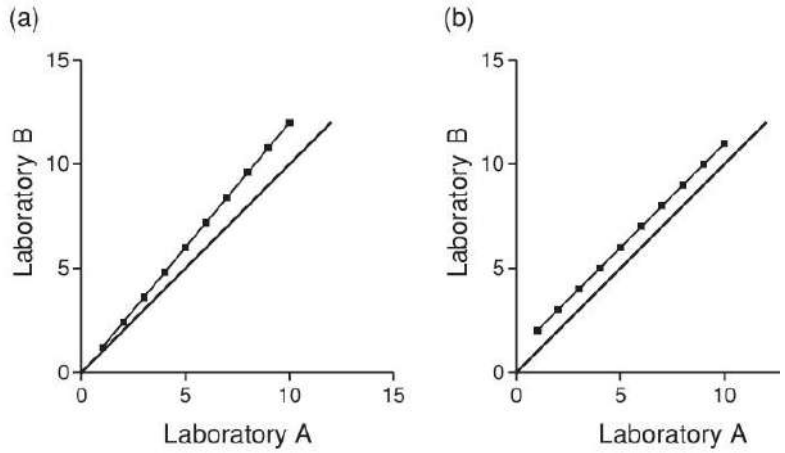
مقارنة الطرق التحليلية (Method Comparison)

تنشأ الحاجة لإجراء مقارنات بين الطرق التحليلية لعدة أسباب جوهرية؛ كإثبات تكافؤ طريقة جديدة أو تفوقها على طريقة قائمة، سواء داخل المختبر نفسه أو بين مختبرات مختلفة. كما تتطلب البروتوكولات أحياناً مقارنة الأداء الذاتي لذات الإجراء التحليلي عند تنفيذه بواسطة محللين مختلفين أو في مراكز بحثية متعدية.

- **افتراضات تحليل الانحدار الخطي:** يفترض تحليل انحدار المربعات الصغرى التقليدي أن كافة الأخطاء تتركز في المتغير التابع (y)، مع افتراض إهمال الخطأ في المتغير المستقل (x). ومع ذلك، فقد أثبتت الممارسة أن العيب المتأصل في هذا الفرض يفقد تأثيره إذا استُخدم ما لا يقل عن 10**أزواج من البيانات** الموزعة بانتظام على كامل نطاق التركيز قيد الدراسة (Miller, 1991).
- **خط الهوية $(Line\ of\ Identity)$:** يتم تمثيل نتائج الطريقة ذات الدقة الأعلى على المحور السيني (x)، وتلك المقارنة على المحور الصادي (y). وعند تماثل النتائج بين الطريقتين تماماً، سيعطي تحليل الانحدار ميلاً $(slope)$ مساوياً للواحد ومقطعاً صادياً مساوياً للصفر $(y = x)$؛ ويُعرف هذا الخط بـ **"خط الهوية"** ويُرسُم بوضوح على مخطط المقارنة (y مقابل x) [**الشكل 12**].

دلالات الانحرافات على المخطط:

- إذا ظهر خطأ نظامي واضح في نتائج أحد المختبرين [**الشكل 12 (أ)**]، فيمكن رصده بصصرية تامة، وإن عجزت البيانات وحدها عن تحديد أي الطريقتين أدق دقة مطلقة.
- إن وجود ارتباط ممتاز بين نتائج المختبرين مصحوباً بـ **انحياز نسبي واضح $(Relative\ Bias)$** يرجح وجود خلل في محلول المعايرة الأساسي $(Stock\ Solution)$ المستخدم لتحضير المعايير (مثل تحلل المحلول جزئياً في أحد المختبرين مسبباً تقديراً مبالغاً فيه للتركيزات، أو إغفال تأثير الوزن الجزيئي لملح المادة المعيارية). وهنا يُعد **تبادل المعايير والمعايرات** بين المختبرين أداة فعالة لكشف أسباب التناقض.



الشكل 12: الانحدار الخطي لمقارنة النتائج من مختبرين، يظهر أخطاء نظامية مع انحياز نسبي (أ) وانحياز ثابت (ب). يظهر خط الهوية بالخط العريض.

ولا يجوز أبداً اعتماد تحليل الانحدار الخطي الأعمى دون تمحيص الشروط السابقة والتصريح بها رسمياً.

- في سياق **التجارب التعاونية** (أي عند تقييم طريقة ما عبر عدة مختبرات متزامنة)، يُفضل استخدام **مخططات "يودن" (*Youden Plots*)** للكشف عن الانحياز النظامي (Steiner, 1975 & Youden).
- أما للحصول على تقدير صارم وموثوق لقابلية التكرار (*Reproducibility*)، فيُعتمد على **تحليل التباين (*Analysis of Variance − ANOVA*)** (Boddy, 1983 & Caulcutt).
- وغالباً ما تتم مقارنة طرق القياس المختلفة عملياً باستخدام **مخططات "بلاند-ألتمن" (*Bland-Altman Plots*)** كما سيتضح لاحقاً.

1. مخططات بلاند-ألتمن (Bland–Altman Plots)

تُعد طريقة **"بلاند-ألتمن" (Altman, 1986; 1999 & Bland)** من أهم الأساليب الإحصائية المعتمدة للمقارنة بين تقنيات القياس المختلفة:

- تعتمد الفكرة على رسم **الفروقات بين القياسات** الناتجة عن الطريقتين في مواجهة **متوسطات هاتين الطريقتين**.
- في حالات زيادة تقلبات الفروقات طردياً مع مقدار القياس، يمكن رسم الفروقات معبراً عنها كنسبة مئوية من المتوسط، أو اللجوء إلى رسم نسب القياسات مباشرة، مما يغني عن الحاجة لتحويل البيانات لوغاريتمياً.

أهمية المخطط وتطبيقاته:

يُعد مخطط بلاند-ألتمن أداة تشخيصية فائقة الكفاءة لـ:

1. الكشف عن وجود أي ارتباط خفي بين الفروقات والمتوسطات.
2. البحث عن أي **انحياز نظامي (*Systematic Bias*)**.
3. رصد وتحديد القيم الشاذة المحتملة (*Outliers*).

- وفي حال وجود انحياز ثابت، يمكن تصحيحه برياضيات بسيطة عبر طرح قيمة متوسط الفرق من نتائج الطريقة الجديدة مباشرة.

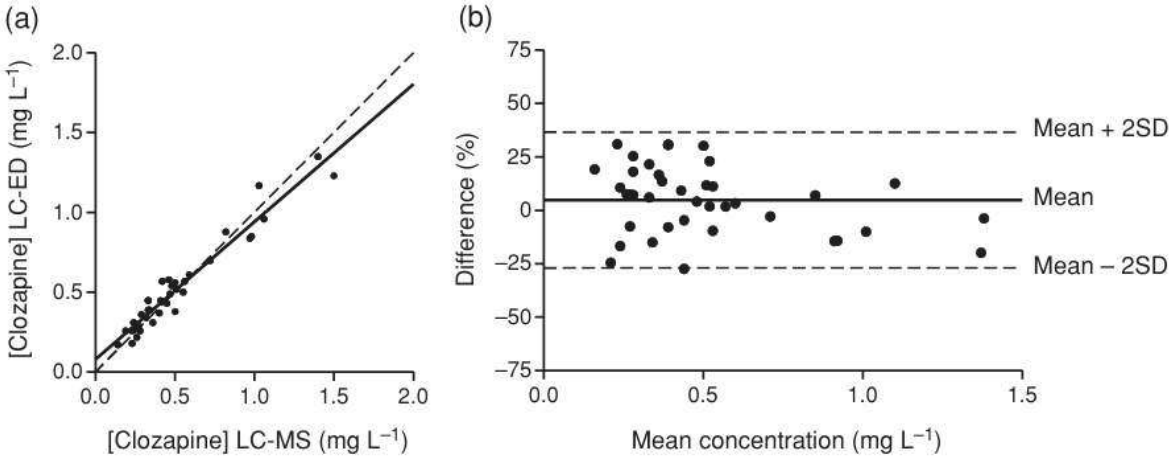
مثال تحليلي تطبيقي:

تم عرض مقارنة تطبيقية بين تحليل الانحدار الخطي ومخطط بلاند-ألتمن لطريقتين مختلفتين لقياس تركيز عقار **"الكلوزابين" (*Clozapine*)** في البلازما [**الشكل 13**]:

- **نتائج الانحدار الخطي [الشكل 13 أ]:** تشير المعطيات إلى احتمال وجود انحياز ثابت وانحياز نسبي متزامن؛ نظراً لأن فترات الثقة بنسبة 95%لكل من المقطع الصادي $(0.04 - 0.12)$ والميل $(0.79 - 0.94)$ لا تتضمن الصفر والواحد على التوالي.
- **نتائج مخطط بلاند-ألتمن [الشكل 13 ب]:** يؤكد رسم فروق التركيزات كنسبة مئوية وجود انحياز مقداره 12.5%–لصالح طريقة $(LC\text{-}MS)$.

ملاحظة منهجية هامة: لا يعتمد مخطط بلاند-ألتمن على اختبارات إحصائية رسمية صارمة، بل يترك للمحلل سلطة تقرير ما إذا كانت الفروقات الواقعة ضمن حدود المتوسط ± 1.96 SD(والتي تبلغ نحو 25%في هذا المثال) متقاربة بالقدر الكافي لاعتبار الطريقتين متكافئتين عملياً.

- **الفرق الجوهري:** بينما يركز **الانحدار الخطي** على تقييم *الارتباط* $(Correlation)$، يركز **مخطط بلاند-ألتمن** حصراً على قياس *الاتفاق والقبول* $(Agreement)$، وهو المعيار الأهم في التحقق من صحة الطرق السريرية والسمومية.



الشكل 13: مقارنة بين الانحدار الخطي (a) ورسم "بلاند-ألتومان" (b) (Bland–Altman plot)

- يُستخدم هذان الرسمان لمقارنة طريقتين تحليليتين $(LC\text{-}MS$ مقابل $LC\text{-}ED)$ في قياس تراكيز الكلوزابين البلازمي. ويمثل الخط المتقطع في الجزء (a) خط الهوية الأساسي $(y = x)$.

2. استخدامات إضافية لمخططات بلاند-ألتمن

إلى جانب مقارنة الطرق، تُستخدم مخططات بلاند-ألتمن لتقييم **تكرارية الطرق** $(Repeatability)$ عبر مقارنة عدة قياسات منجزة بطريقة واحدة على سلسلة متتالية من العينات، والتحقق مما إذا كانت الدقة $(Precision)$ أو التباين مرتبطان بحجم الخاصية المقاسة. وبما أننا نستخدم الطريقة نفسها في القياسات المتكررة، فيجب أن يكون متوسط الفرق يساوي صفراً. وبناءً عليه، يمكن حساب **معامل التكرارية (Coefficient of Repeatability - CR)** كحاصل ضرب 1.96 في الانحراف المعياري (SD) للفروقات بين القياسين $(d_1$ و $d_2)$:

$$CR = 1.96 \times \sqrt{\frac{\sum(d_2 - d_1)^2}{n - 1}}$$

الإحصاء اللامعلمي (Non-parametric Statistics)

تتطلب الاختبارات الإحصائية المعلمية ($Parametric\ Statistics$) أن تكون البيانات المراد تحليلها مستمدة من مجتمع إحصائي يتبع توزيعاً طبيعياً ($Normal\ Distribution$) حول المتوسط. وفي كثير من الأحيان، يُفترض التوزيع الطبيعي للبيانات، مع إمكانية زيادة حجم العينة واختبار مدى مطابقتها له (كما تم توضيحه في الشكل 1). وعند التعامل مع البيانات غير الطبيعية، تبرز ثلاثة مسارات رئيسية للمعالجة:

1. **تحويل البيانات ($Data\ Transformation$):** في حال كانت البيانات ملتوية أو منحرفة ($Skewed$)، يمكن تحويلها رياضياً إلى توزيع يتبع النمط الطبيعي (مثل أخذ اللوغاريتمات)، وبعدها يصبح ممكناً تطبيق الإحصاء المعلمي على البيانات المحولة.
2. **معالجة القيم المتطرفة ($Outlier\ Treatment$):** إذا وُجد اشتباه في أن البيانات تتبع أساساً التوزيع الطبيعي ولكنها تظهر انحرافاً أو التواءً ناتجاً عن وجود قيمة متطرفة فردية، فيمكن تطبيق **اختبار "جرابز" ($Grubbs'\ Test$)** للتحقق منها ومعالجتها (كما هو مفصل في **الإطار 5**).
3. **البدائل اللامعلمية ($Non\text{-}parametric\ Alternatives$):** إذا تعذر إثبات التوزيع الطبيعي للبيانات تماماً، تُعتمد الاختبارات الإحصائية اللامعلمية. وتعتمد هذه الاختبارات أساساً على **البيانات المرتبة أو الرتب ($Ranked\ Data$)**، مما يجعلها أقل عرضة بصورة ملحوظة لتأثير القيم المتطرفة مقارنة بنظيراتها المعلمية (كما يوضح **الجدول 8**).

إطار رقم (5): اختبار "جرابز" ($Grubbs'\ Test$) للقيم المتطرفة

يُستخدم هذا الاختبار الإحصائي للمقارنة بين مدى انحراف القيمة المشتبه بكونها متطرفة عن متوسط العينة وبين الانحراف المعياري (s) المحسوب شاملاً لتلك القيمة المشتبه بها.
تُحسب قيمة الاختبار الإحصائية (G) وفق المعادلة الرياضية التالية:

$$G = \frac{|\text{suspected outlier} - \bar{x}|}{s}$$

حيث إن:

- suspected outlier: هي القيمة المفردة المشتبه بكونها متطرفة.
- $\bar{x}$: متوسط العينة الإحصائي (محسوباً مع تضمين القيمة المشتبه بها).

s: الانحراف المعياري للعينة (محسوباً مع تضمين القيمة المشتبه بها).

آلية اتخاذ القرار: إذا كانت القيمة المحسوبة (G_{calc}) أكبر من القيمة الحرجة المجدولة (G_{crit}) – التي يتم الحصول عليها من الجداول الإحصائية المعتمدة لاختبار جرابز – فعندئذ **يُسمح باستبعاد القيمة المشتبه بها رسمياً**، وتحليل البيانات المتبقية باستخدام الاختبارات المعلمية المعتادة.

الجدول 8: مقارنة شاملة بين الاختبارات المعلمية واللامعلمية لمقارنة المتوسطات والوسيطات

غرض الاختبار الإحصائي	الاختبار المعلمي ($Parametric$)	الاختبار اللامعلمي($Non\text{-}parametric$)
مقارنة المتوسط / الوسيط بقيمة قياسية	اختبار (t-test) الفردي	اختبار الإشارة($Sign\ Test$)
مقارنة متوسطات / وسيطات عينتين مستقلتين	اختبار (t-test) للعينات المستقلة	اختبار "ويلكوكسون" للإشارات المرتبة، أو اختبار "مان-ويتني U" ($Mann\text{-}Whitney\ U$)
مقارنة مجموعتين من البيانات المقترنة($Paired$)	اختبار (t-test) المقترن	اختبار "ويلكوكسون" للإشارات المرتبة ($Wilcoxon\ Signed\text{-}Rank$)
مقارنة متوسطات / وسيطات أكثر من عينتين	تحليل التباين($ANOVA$)	اختبار "كروسكال-واليس($Kruskal\text{-}Wallis$) "

غرض الاختبار الإحصائي	الاختبار المعلمي $(Parametric)$	الاختبار اللامعلمي$(Non\text{-}parametric)$
التعامل مع القيم المتطرفة $(Outliers)$	اختبار "جرابز " $(Grubbs' Test)$	— (الاعتماد على رتب البيانات بطبيعته يقلل تأثيرها)

1. مفاهيم أساسية في الإحصاء اللامعلمي (Core Concepts in Non-parametric Statistics)

عند التعامل مع البيانات الملتوية أو المنحرفة $(Skewed\ Data)$، يُعد **الوسيط** $(Median)$ مقياساً أفضل للنزعة المركزية مقارنة بالمتوسط الحسابي. ويُعرف الوسيط أحياناً بالربيع الأوسط؛ حيث تُقسم الربيعات $(Quartiles)$ مجموعة البيانات المرتبة تصاعدياً أو تنازلياً إلى أربعة أجزاء متساوية:

- **في مجموعات البيانات ذات العدد الفردي (n):** يُحسب ترتيب الوسيط بالمعادلة:

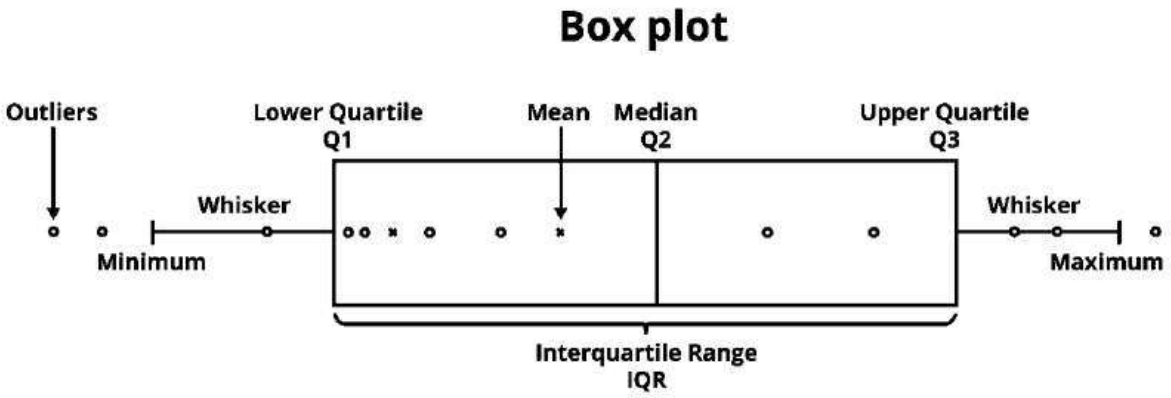
$$\frac{n+1}{2}$$

وتكون القيمة الواقعة عند هذا الترتيب هي الوسيط مباشرة.

- **في مجموعات البيانات ذات العدد الزوجي (n):** يُحسب الوسيط على أنه المتوسط الحسابي للقيمتين الواقعتين في المنتصف.

تشتت البيانات ومخططات الصندوق والشارب:

يُعبَّر عن تشتت البيانات اللامعلمية باستخدام **المدى** $(Range)$ و/أو **الربيعات العليا والسفلى** $(Interquartile\ Range)$، والتي يمكن تمثيلها بصرياً بكفاءة عالية باستخدام **مخططات الصندوق والشارب** $(Box\text{-}and\text{-}whisker\ Plots)$ [**الشكل 14**]، نظراً لقدرتها الفائقة على إبراز مدى تشتت البيانات وتماثلها أو التواءها.



2. اختبارات الإشارة (Sign Tests)

يُعد اختبار الإشارة أبسط الاختبارات الإحصائية اللامعلمية وأقلها حساسية، لكنه في الوقت ذاته من أكثرها وضوحاً وسهولة في التطبيق.

- **الفرضية الصفرية (H_0):** تفترض أن احتمالية الحصول على قيم أكبر $(+)$ أو أصغر $(-)$ من الوسيط الافتراضي في التوزيع متساوية. وعند تطبيق الاختبار على أزواج مترابطة أو متطابقة $(Matched\ Pairs)$، تكون احتمالية ملاحظة إشارة موجبة مساوية لاحتمالية ملاحظة إشارة سالبة، بحيث يكون وسيط الفروقات (d) مساوياً للصفر.
- إذا كان عدد القيم الموجبة هو (r) وعدد القيم السالبة هو $(n-r)$، فإن هذه الاحتمالات تخضع لتوزيع ذي الحدين $(Binomial\ Distribution)$؛ حيث عدد التجارب هو (n)، واحتمالا النجاح والفشل هما $(p = q = 0.5)$.

النموذج الرياضي لاحتمال الإشارات:

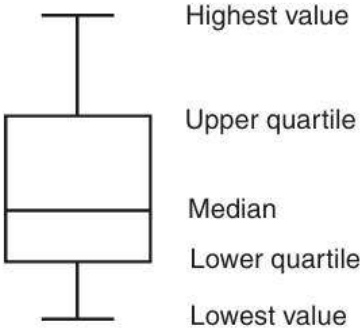
إذا كان عدد القيم الموجبة هو n_+وعدد القيم السالبة هو n_-، فإن هذه القيم تتبع **التوزيع ذو الحدين (Binomial distribution)**، حيث $p + q = 1/2$، وتمثل pو qاحتمالية حدوث قيمة موجبة أو سالبة على التوالي. ويمكن التعبير عن احتمالية الحصول على rمن الملاحظات (مثل ظهور الصورة عند رمي العملة) من إجمالي nمن الأحداث باستخدام المعادلة التالية:

$$P(r) = {}^{n}C_r \times p^r \times q^{(n-r)}$$

حيث إن:

$$^{n}C_r = \frac{n!}{r!\,(n-r)!}$$

يمكن الحصول على قيم Pمن الجداول الإحصائية المشتقة باستخدام التوزيع ذو الحدين مع فرض $p = q = 1/2$. مع الممارسة المنتظمة، يصبح من السهل تذكر التوليفات التي تشير إلى فروق ذات دلالة إحصائية، مثل (6 من 6)، (8 من 9)، (10 من 12)، وهكذا (انظر الجدول 9).



الشكل 14: مخطط الصندوق والشارب (Box-and-whisker plot)

يُستخدم هذا المخطط لتوضيح مدى تشتت البيانات وتماثلها.

جدول 9: قيم Pلاختبار الإشارة (ذو الطرفين - Two-tailed)

المجموع الكلي(n)	6	9	12	15	17	20
r	0	1	2	3	4	5
$n-r$	6	8	10	12	13	15
P	0.0313	0.039	0.0386	0.0352	0.0490	0.044

2. اختبار "ويلكوكسون" للإشارات المرتبة (Wilcoxon Signed-Rank Test)

على عكس اختبار الإشارة البسيط – الذي يكتفي بتصنيف اتجاه البيانات كقيم موجبة أو سالبة دون اعتبار لحجم الانحراف – يأخذ **اختبار "ويلكوكسون"** مقدار الانحراف في الحسبان. يفترض هذا الاختبار أن البيانات موزعة بشكل متماثل حول الوسيط (وهو لا يشترط بالضرورة أن تتبع التوزيع الطبيعي، رغم تطابق المتوسط والوسيط في التوزيعات المتماثلة).

- **مجالات الاستخدام:** يُستعمل هذا الاختبار للتحقق مما إذا كانت قيمة الوسيط (أو المتوسط) مستمدة من مجموعة بيانات محددة (كبديل لـ **اختبار-t الفردي**)، أو لتطبيق التحليل على البيانات المقترنة فيما يُعرف بـ **اختبار الرتب للأزواج المتطابقة** $(Matched\text{-}pairs\ Rank\ Test)$ (كبديل لـ **اختبار-t المقترن**).

خطوات إجراء الاختبار العملي:

1. **حساب الفروق:** يتم إيجاد الفروق (سواءً مقارنة بقيمة وسيطة مفترضة، أو بين أزواج البيانات المقترنة).
2. **الترتيب $(Ranking)$:** تُرتب هذه الفروق تصاعدياً **دون النظر إلى إشاراتها الموجبة أو السالبة**، مع استبعاد أي فروق تساوي صفراً.

3. **معالجة الرتب المتساوية:** في حال ظهور قيم فروق متطابقة، تُمنح ذات الرتبة لجميع القيم المتساوية (والمحسوبة كمتوسط للرتب التي كانت ستُخصص لو كانت القيم متباينة).
4. **تطبيق الإشارات:** تُعاد الإشارات الأصلية (الموجبة أو السالبة) إلى أرقام الرتب المقابلة لها.
5. **عملية الجمع:** يتم جمع **الرتب الموجبة** (W^+) و**الرتب السالبة** (W^-) بشكل مستقل لكل مجموعة.
6. **تحديد القيمة الاختبارية:** تُؤخذ **القيمة المطلقة الأصغر** بين المجموعين الإحصائيين كإحصائية للاختبار (W)، لغرض مقارنتها بالقيم الحرجة المجدولة في الجداول الإحصائية المخصصة لاختبار ويلكوكسون.

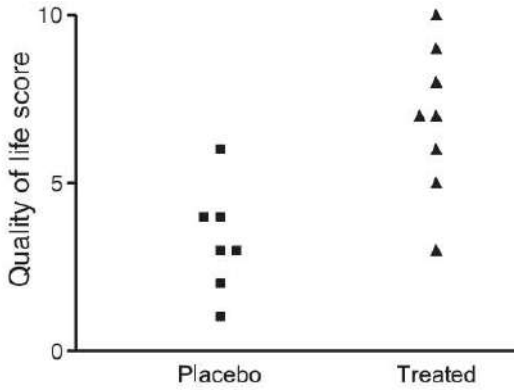
3. اختبار التتابعات (Runs Test)

بينما يقتصر اختبار الإشارة على حصر إجمالي النتائج الموجبة والسالبة، تبرز الحاجة أحياناً للتحقق من مدى **عشوائية تسلسل البيانات وترتيبها**.

- على سبيل المثال، عند تحليل سلسلة بيانات تظهر تسلسلاً مثل: $(+, +, +, -, -, -)$، نجد أنها تحتوي على ثلاث قيم سالبة وثلاث قيم موجبة، ولكنهما تشكلان **ثلاثة "تتابعات"** $(Runs)$ فقط.
- توفر الجداول الإحصائية المتخصصة قيماً حرجة لعدد التتابعات التي تختلف بصورة جوهرية عما يمكن توقعه نتيجة للصدفة وحدها.

ملاحظة منهجية هامة: لكي ترتقي البيانات إلى مستوى الدلالة الإحصائية عند وجود ثلاثة تتابعات فقط، يتطلب الأمر حجماً عينة لا يقل عن $n \geq 6$. وتُعد هذه الظاهرة سمة نموذجية للإحصاء اللامعلمي، الذي يتطلب عادةً أحجام عينات وملاحظات أكبر مقارنة بالاختبارات المعلمية لإثبات وجود فروق حقيقية. كما يُستخدم **اختبار التتابعات** بفاعلية للكشف عن التذبذبات غير العشوائية المنتظمة حول خط الانحدار.

Placebo	Treated
4.00	9.00
6.00	7.00
3.00	8.00
3.00	7.00
1.00	6.00
4.00	3.00
2.00	10.00
	5.00



الشكل 15: درجات جودة الحياة من المرضى الذين يتلقون العلاج الوهمي أو العلاج الدوائي.

4. اختبار "مان-ويتني U" (Mann–Whitney U-Test)

يُستعمل هذا الاختبار اللامعلمي الأساسي للمقارنة بين مجموعتين مستقلتين من البيانات. وكمثال توضيحي، عند ترتيب بيانات درجات جودة الحياة للمرضى الواردة في الشكل 15 وفق الخطوات المبينة في **الإطار رقم (6)** وتخصيص رتب لكل منها، يمكننا حساب إحصائية الاختبار المعرّفة بـ (U).

إطار رقم (6): إجراءات حساب قيم اختبار "مان-ويتني U"

1. **تحديد المجموعات:** حدد المجموعة ذات العدد الأصغر كـ (n_1) والمجموعة الأخرى الأكبر كـ (n_2).
2. **الترتيب التصاعدي:** رتب الدرجات المجمعة للمجموعتين معاً من الأدنى إلى الأعلى، بحيث تأخذ أصغر درجة الرتبة (1). وفي حال تساوي القيم (الدرجات المكررة)، تُعطى كل قيمة **متوسط الرتب** التي كانت ستشغلها لو كانت متباينة.
3. **حساب مجموع الرتب:** احسب مجموع رتب المجموعة الأولى (R_1) ومجموع رتب المجموعة الثانية (R_2).
4. **تطبيق معادلات حساب U:** تُحسب قيمتا U_1 وU_2 باستخدام العلاقتين الرياضيتين الآتيتين:

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1+1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2+1)}{2} - R_2$$

5. **اختيار القيمة الاختبارية:** استخدم القيمة الأقل بين (U_1) و(U_2) كإحصائية للاختبار الفعلي، لمقارنتها بالقيم الحرجة المجدولة في الجداول الإحصائية الخاصة.

تطبيق عملي على المثال: عند حساب قيمتي (U) لمجموعة العلاج الدوائي ومجموعة الغفل (البلاسيبو - $Placebo$)، كانت النواتج مساوية لـ (50.5) و(5.5) على التوالي. وبمقارنة القيمة الأدنى البالغة (5.5) مع القيم الحرجة المجدولة، تبين وجود **فرق جوهري وذو دلالة إحصائية معتبرة** بين المجموعتين.

5. معامل ارتباط الرتب لـ "سبيرمان" (Spearman Rank Correlation)

يُعد معامل ارتباط سبيرمان (r_s) أشهر الاختبارات اللامعلمية لقياس قوة واتجاه الارتباط بين زوج من الملاحظات، ويُستخدم بكثرة في تقييم المعالجات والنتائج السريرية عندما تعبر البيانات عن رتب ومستويات $(Rank\ Order)$ عوضاً عن القيم الكمية المطلقة. ويُحسب معامل الارتباط وفق المعادلة الرياضية:

$$r_s = 1 - \frac{6\sum d_i^2}{n(n^2-1)}$$

حيث إن:

- d_i: يمثل فرق الرتبة لكل زوج من البيانات $(d_i = R_{1i} - R_{2i})$.
- n: إجمالي عدد أزواج البيانات المقارنة.
- **الرتب المتساوية:** عند وجود قيم رتب متطابقة، تُستخدم القيم المتوسطة للرتب كما هو معتاد. ويتم التحقق من الدلالة الإحصائية لقيمة (r_s) بالاستعانة بالجداول الإحصائية المخصصة.

الجدول 10: تفصيل بيانات الشكل 15 مرتبة وفق إجراءات الإطار (6)

نوع المعالجة	P	P	P	P	P	P	D	P	D	P	P	D	P	D	D	D	D	D	المجموع
درجة الجودة	1	2	3	3	3	4	4	5	6	6	7	7	8	9	10	—
رتبة (الغفل)	1	2	4	4	—	6.5	6.5	—	9.5	—	—	—	—	—	—	**33.5**
رتبة (المعالجة)	—	—	—	—	4	—	—	8	—	9.5	11.5	11.5	13	14	15	**86.5**

يوضح هذا الجدول توزيع الرتب بين مجموعة الغفل (Placebo - P) ومجموعة العلاج (Drug - D) بناءً على درجات جودة الحياة، حيث تم التعامل مع القيم المتساوية (مثل الدرجة 3 والدرجة 6) بأخذ متوسط رتبها.

الانحدار اللامعلمي (Non-parametric Regression)

على الرغم من توفر طرق رياضية متنوعة لمطابقة المنحنيات وفق النماذج المعلمية، تُعد **طريقة "ثيل" غير المكتملة (Theil's Incomplete Method)** خياراً عملياً ومناسباً للغاية للتطبيق المباشر باستخدام برمجيات الجداول الحسابية (مثل *Microsoft Excel*).

خطوات تنفيذ طريقة "ثيل" (كما وردت في الإطار رقم 7):

تعتمد هذه الطريقة على إنشاء خط معايرة متين يتجاوز تأثير القيم المتطرفة من خلال الاعتماد الكلي على الوسيط $(Median)$ عوضاً عن المتوسط الحسابي.

$$y = m \cdot x + c$$

إطار رقم (7)	خطوات طريقة "ثيل" غير المكتملة لمنحنيات المعايرة اللامعلمية

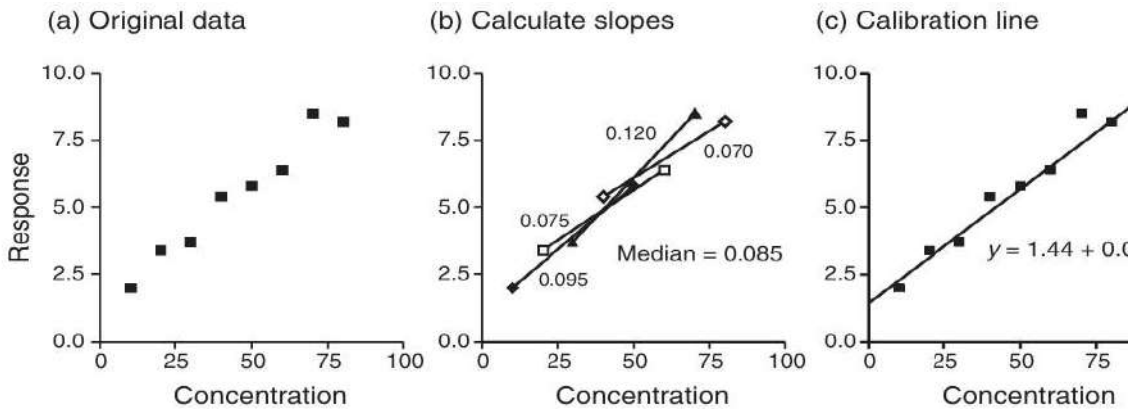
تُستخدم هذه الطريقة لإنشاء منحنى معايرة قوي يتجاوز تأثير القيم المتطرفة من خلال الاعتماد على الوسيط بدلاً من المتوسط.

1. ترتيب البيانات:
   - يجب أن يكون عدد النقاط $(\boldsymbol{n})$ زوجياً. [انظر الشكل 16(a)].
   - إذا كان عدد النقاط فردياً، يتم استبعاد النقطة الوسيطة للحصول على عدد زوجي من النقاط.
2. الحصول على "وسيط الميل" $(\boldsymbol{b})$:
   - يتم حساب الميول للأزواج المتقابلة:
     - النقطة الأولى $(\boldsymbol{x_1, y_1})$مع النقطة الأولى بعد الوسيط.
     - النقطة الثانية $(\boldsymbol{x_2, y_2})$مع النقطة الثانية بعد الوسيط، وهكذا.
     - النقطة الأخيرة قبل الوسيط $\boldsymbol{(x_{n/2}, y_{n/2})}$مع آخر نقطة في البيانات.
   - تُرتب الميول الناتجة تصاعدياً.
   - يتم اختيار الوسيط لهذه الميول ليكون هو قيمة الميل $(\boldsymbol{b})$. [انظر الشكل 16(b)].
3. الحصول على "وسيط التقاطع" $(\boldsymbol{a})$:
   - لكل نقطة بيانات $(\boldsymbol{x_i, y_i})$، يتم حساب قيمة التقاطع $(\boldsymbol{a_i})$ باستخدام المعادلة:
     $$\boldsymbol{a_i = y_i - (b \cdot x_i)}$$
   - تُرتب قيم $\boldsymbol{a_i}$تصاعدياً، ويتم اختيار الوسيط لهذه القيم ليكون هو قيمة التقاطع $(\boldsymbol{a})$.
4. إنشاء خط المعايرة:
   - استخدم قيم الوسيط لكل من $(\boldsymbol{a})$ و $(\boldsymbol{b})$ لبناء معادلة الخط المستقيم: $\boldsymbol{y = ax + b}$. [انظر الشكل 16(c)].

مزايا نهج المعايرة اللامعلمي:

- لا يفترض أن الأخطاء تتبع بالضرورة توزيعاً طبيعياً.
- لا يشترط تركيز كافة الأخطاء في اتجاه المحور الصادي (y) مع إهمالها في المحور السيني (x).
- **أكثر متانة وموثوقية:** أقل تأثراً بالقيم الشاذة والمتطرفة مقارنة بطريقة انحدار المربعات الصغرى التقليدية $(Least\ Squares\ Regression)$.

ملاحظة إحصائية عملية: يتيح استدعاء دالة MEDIAN في برنامج *Microsoft Excel* تحديد القيم الوسيطة بيسر وسهولة، مما يسهل تصميم قوالب تحليلية ثابته $(Templates)$ لأتمتة هذه العمليات الحسابية بكفاءة عالية.



الشكل 16: مثال على طريقة "ثيل" غير المكتملة للمعايرة اللامعلمية

- يوضح التطبيق العملي للخطوات الواردة في الإطار (7)، حيث يُرسم خط المعايرة استناداً إلى قيم الوسيط بدلاً من المربعات الصغرى؛ لضمان استقرار النتائج ومناعتها ضد القيم الشاذة.

مراقبة الجودة واختبارات الكفاءة (Quality Control and Proficiency Testing)

بعد الانتهاء من تطوير أو تطبيق أي طريقة تحليلية وإثبات أنها **"ملائمة للغرض المخصص لها" (*Fit for Purpose*)** عبر إجراءات التحقق الصارمة، يصبح من الضروري والمستمر إثبات قدرة الطريقة على مواصلة أدائها المطلوب بكفاءة.

- **عينات مراقبة الجودة الداخلية (*IQC*):** تُوزع هذه العينات بصورة عشوائية منتظمة ضمن دفعة العينات المراد تحليلها. ومن الناحية المثالية، يجب تحضير عينات الـ (*IQC*) بصورة مستقلة تماماً باستخدام مواد مرجعية مغايرة، ومحاليل قياسية منفصلة، وأدوات قياس حجمي مختلفة.
- **إرشادات إدارة الغذاء والدواء (*FDA*):** تشترط هذه الإرشادات وجود عينات مراقبة جودة مكررة (*Duplicate*) عند ثلاثة مستويات تركيز مختلفة (عالية، ومتوسطة، ومنخفضة)؛ وذلك لضمان جودة الأداء التحليلي واستقرار المقايسة عبر نطاق المعايرة بالكامل.
- **معايير قبول دفعة التحليل:** تُعتبر دفعة التحليل مقبولة إذا حققت شرط أن **أربعة على الأقل من أصل ستة** من عينات المراقبة (بشرط وجود عينة واحدة على الأقل لكل مستوى تركيز) تقع ضمن حدود المواصفات المحددة مسبقاً (مع وجود استثناءات ومعايير خاصة لحالات العمل الطارئ).

خرائط مراقبة الجودة (Quality Control Charts)

تُعد خرائط مراقبة الجودة (*QC Charts*) أداة تشخيصية إحصائية بالغة الأهمية لسببين رئيسيين:

1. تقديم دليل مستمر موثوق على الأداء المرضي والمقبول للتحليل.
2. توفير **إنذار بصري مبكر** في حال بدء الأداء التحليلي بالتدهور أو الانحراف عن المسار المعياري.

متطلبات إعداد الخرائط:

- يجب استخلاص قيمة المتوسط الحسابي ($\bar{x}$) بالاعتماد على **عشرة (10) ملاحظات أو قياسات على الأقل**.
- يجب أن يمثل الانحراف المعياري (s) القيمة المقاسة بين التحاليل المختلفة (*Inter-assay Value*).
- يُشترط قياس وتثبيت هذه المعايير (المتوسط والانحراف المعياري) حصرياً عندما يكون النظام التحليلي في حالة أداء مستقر ومرضٍ تماماً.

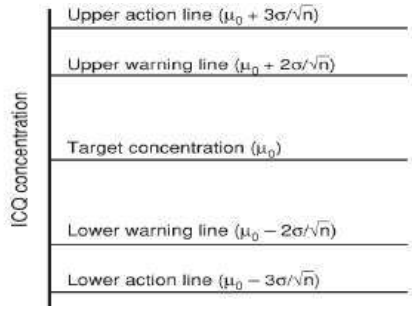
خرائط "شوارت" (Shewhart Charts)

تُستخدم هذه الخرائط الإحصائية لتحديد **القيمة المستهدفة (*Target Value*)** بالإضافة إلى حدود الثقة الإحصائية (مثل حدود الثقة عند 95%وعند 99.7%).

قواعد قبول أو رفض دفعة التحليل:

- **الوضع المقبول:** تُعتبر قيم المراقبة الواقعة ضمن حدود الأمان والتحذير (الخطوط الممثلة لـ $3s\pm$أو حدود 99.7%) مقبولة وتحت السيطرة.
- **الوضع المرفوض:** يجب إيقاف ورفض دفعة التحليل فوراً والبحث عن الأسباب الكامنة وراء الفشل في الحالات الآتية:

1. وقوع قيمتين متتاليتين لعينات مراقبة الجودة خارج ذات خط التحذير.
2. وقوع قيمة مفردة واحدة لعينات الـ (*IQC*) خارج خط الإجراء الأساسي (*Action Line*).



الشكل 17: مثال على خريطة "شوارت" (Shewhart) (Chart

- نموذج لخريطة "شوارت" (*Shewhart Chart*) يوضح القيمة المستهدفة (*Target Value*) وحدود التحذير والحدود الإجرائية، مما يتيح مراقبة مدى استقرار العملية التحليلية بصرياً.

كما تُستعمل خرائط شوارت لاكتشاف **الاتجاهات المتسلسلة** $(Trends)$، مثل حصول زيادة أو نقصان تدريجي ومستمر في قيم النتائج؛ حيث تُبرمج إجراءات مراقبة الجودة لإطلاق إنذار وفتح تحقيق فوري بمجرد رصد عدد محدد مسبقاً من القيم المتزايدة أو المتناقصة باتجاه واحد.

خرائط المجموع التراكمي (Cusum Charts)

تكمن المحدودية الأساسية لخرائط "شوارت" في بطء استجابتها وضعف حساسيتها تجاه **الانحرافات المنهجية التدريجية** $(Systematic\ Drift)$ في النتائج، حيث قد يتطلب الأمر أحياناً إجراء نحو 50تحليلاً متمادياً قبل أن تخرج قيمة مراقبة الجودة (IQC) عن حدود الإجراء.

وتعالج **خرائط المجموع التراكمي** $(Cumulative\ Sum - Cusum)$ هذا القصور بفعالية؛ فبدلاً من رسم القيمة المرصودة بشكل مباشر، يتم حساب **الفرق بين القيمة المقاسة والقيمة المستهدفة** لكل دورة تحليل، ثم يُضاف هذا الفرق تراكمياً إلى المجموع السابق.

- **في حالة التحكم وسكون العملية:** يتذبذب المجموع التراكمي عشوائياً حول خط الصفر.
- **في حالة حدوث انحراف منهجي:** يظهر هذا التوجه على شكل ابتعاد تدريجي ومنتظم (سواء نحو الأعلى باتجاه موجب أو الأسفل باتجاه سالب) عن خط الصفر.

طرق تقييم خروج العملية عن السيطرة في خرائط Cusum:

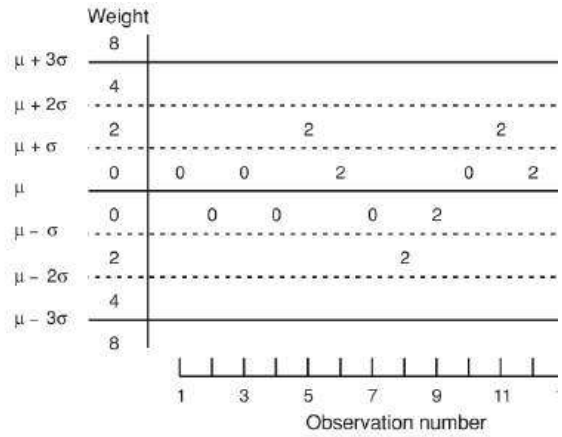
1. **قناع V $(V\text{-}mask)$:** وهو أداة تقييم رسومية هندسية توضع فوق الرسم البياني للتقييم.
2. **خريطة "كوسوم" الجدولية $(Tabular\ Cusum)$:** وهي الطريقة المفضلة والأكثر دقة وموضوعية (Montgomery, 2005).

خريطة J (J-Chart)

تُعرف أيضاً بـ **"خريطة التحكم بالمنطقة" $(Zone\ Control\ Chart)$**، وهي تمثل أداة هجينة تجمع بذكاء بين خصائص خرائط "شوارت" وخرائط "كوسوم"، مما يجعلها شديدة الاستجابة والفعالية في اكتشاف كل من التغيرات المفاجئة والانحرافات التراكمية التدريجية في النتائج على حد سواء (Analytical Methods Committee, 2003).

آلية عمل خريطة J:

- يُرسم خط المتوسط الحسابي، وتُقسّم المساحة المحيطة به إلى **ثلاثة نطاقات (مناطق) متساوية الحجم**، بحيث يبلغ عرض كل نطاق انحرافاً معيارياً واحداً $(1s)$ على جانبي المتوسط [**الشكل 18**].
- تُمنح كل ملاحظة وزن ترجيحي محدد (0، أو 2، أو 4، أو 8) استناداً إلى النطاق أو المنطقة التي تقع فيها القيمة المرصودة.
- تُجمع أوزان الملاحظات المتتالية وتُسجل القيمة التراكمية على الخريطة في النقطة المقابلة.
- **قاعدة إعادة التعيين $(Reset)$:** إذا وقعت ملاحظة تحليلية جديدة في الجانب المعاكس لخط المركز (المتوسط) مقارنة بالملاحظة السابقة مباشرة، يتم **تصفير المجموع التراكمي للأوزان $(Reset\ to\ zero)$** وتبدأ العملية الحسابية من جديد.



الشكل 18: مثال على خريطة J (J-chart)

آلية اتخاذ القرار في خريطة J:

تُعتبر العملية التحليلية **خارج نطاق السيطرة** $(Out\ of\ Control)$ إذا بلغ المجموع التراكمي للأوزان 8**أو أكثر**. ونتيجة لذلك، فإن ظهور قيمة مفردة واحدة كبيرة تتجاوز حدود $(3s)$ يتطلب إيقاف التسلسل التحليلي فوراً والشروع في التحقيق الجذري لمعرفة أسباب هذا الانحراف.

مثال توضيحي لآلية عمل خريطة J (من الشكل 18)

يوضح التطبيق العملي كيف يتفاعل النهج التراكمي للأوزان مع الانحرافات التدريجية نحو القيم العالية لتفعيل التنبيه:

- **الملاحظة رقم 12:** كانت القيمة المدروسة أقل من الانحراف المعياري الأول $(< 1s)$ عن المتوسط (وهو ما لا يضيف وزناً)، لكن الملاحظة السابقة كانت واقعة في النطاق بين $1s$و $2s$، مما أبقى المجموع التراكمي عند قيمة قدرها 2.
- **الملاحظة رقم 13:** وقعت ضمن النطاق بين $1s$و $2s$(وتمنح وزناً قدره 2)، ليصبح المجموع التراكمي الإجمالي مساوياً لـ 4.
- **الملاحظة رقم 14:** وقعت ضمن النطاق بين $2s$و $3s$(وتمنح وزناً قدره 4)، ليصبح المجموع التراكمي 8؛ وهو الرقم الحرج والمعيار القاطع الذي يعلن أن الطريقة قد **خرجت عن نطاق السيطرة** $(Out\ of\ Control)$.

قواعد "ويستجارد" (Westgard Rules)

تُعد **قواعد "ويستجارد" (Westgard et al., 1981)** المعيار الأكثر انتشاراً واستخداماً في المختبرات السريرية والسمومية لضمان كفاءة الأداء التحليلي وموثوقية النتائج. وتُعرف هذه القواعد اصطلاحاً بـ **"القواعد المتعددة"** $(Multirules)$؛ وهي تمثل تطويراً متقدماً لخرائط "شوارت" التقليدية، حيث توظف منظومة متكاملة تضم خمس قواعد تحكم أساسية لتقييم مدى مقبولية سلسة القياسات التحليلية بدقة فائقة.

ترميز القواعد $(Notation)$: تعتمد القواعد على صيغة ترميزية تعبيرية، مثل:

- 1_{2s}**:** تشير إلى وجود قياس مفرد انحراف بمقدار $2s$عن متوسط المراقبة (وتُعد بمثابة **إشارة تحذير** وليست سبباً للرفض الفوري).
- 1_{3s}**:** تشير إلى وجود قياس مفرد انحراف بمقدار $3s$عن المتوسط (وهي **سبب جذري لرفض الدفعة** فوراً).

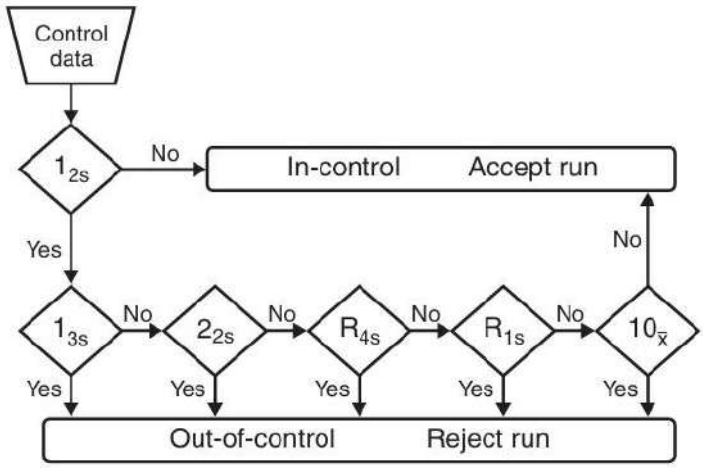
الجدول 11: تفصيل قواعد "ويستجارد" (Westgard Rules) وإجراءاتها التنظيمية

القاعدة الإحصائية	الشرح الإحصائي والوصف	الإجراء المتخذ
1_{2s}	قياس واحد يقع خارج حدود $(\pm 2s)$ عن المتوسط.	**تحذير** – $(Warning)$ لفت الانتباه لفحص النظام.
1_{3s}	قياس واحد يقع خارج حدود $(\pm 3s)$ عن المتوسط.	**رفض** – $(Reject)$ استبعاد دفعة التحليل فوراً.
2_{2s}	قياسان متتاليان لعينات المراقبة يتجاوزان حد$2s$ (في نفس الاتجاه)، أو تجاوز قيمتين في الدفعة ذاتها لهذا الحد.	**رفض** – $(Reject)$ مؤشر على خطأ نظامي $(Systematic\ Error)$.

القاعدة الإحصائية	الشرح الإحصائي والوصف	الإجراء المتخذ
R_{4s}	الفرق المطلق بين قياسين متتاليين في نفس المجموعة التحليلية يتجاوز $4s$ أي قياس في أقصى الأعلى وقياس في أقصى الأسفل.	**رفض** – $(Reject)$ مؤشر قوي على وجود خطأ عشوائي حاد. $(Random\ Error)$
4_{1s}	أربعة قياسات متتالية تتجاوز جميعها حد $1s$ في نفس الاتجاه (أعلى أو أسفل المتوسط).	**رفض** – $(Reject)$ دليل على وجود انحياز منهجي مستمر.
10_x أو 10_{1s}	عشرة قياسات متتالية تقع جميعها في جانب واحد من خط المتوسط.	**رفض** – $(Reject)$ انحراف منهجي واضح ومستقر في النظام.

ملاحظات تطبيقية هامة:

1. يمكن استبدال قاعدة التكرار الطويل (10_x) بقواعد مصغرة مثل (8_x) أو (12_x) لتناسب حالات قياس عينات مراقبة الجودة (IQC) بمعدلات تكرار أقل في بعض المختبرات المتخصصة.
2. للمزيد من التفاصيل المعمقة والاطلاع على أوراق العمل التفاعلية الخاصة بتطبيق هذه القواعد، يمكن زيارة الموقع الرسمي المعتمد: **www.westgard.com**.



الشكل 19: شجرة اتخاذ القرار لتطبيق قواعد "ويستجارد" (Westgard rules)

تُستخدم هذه الشجرة كخارطة طريق للمحلل المختبري لاتخاذ قرارات سريعة بشأن قبول أو رفض دفعة التحليل بناءً على قواعد المراقبة المتعددة.

جدول 11: تفصيل قواعد "ويستجارد" (Westgard Rules)

القاعدة	الشرح الإحصائي	الإجراء المتخذ
1_{2s}	قيمة واحدة تقع خارج حدود $(\text{mean} \pm 2s)$	**تحذير (Warning)**
1_{3s}	قيمة واحدة تقع خارج حدود $(\text{mean} \pm 3s)$	**رفض (Reject)**
2_{2s}	قياسان متتاليان يتجاوزان حد $+2s$ أو $-2s$	**رفض (Reject)**
R_{4s}	فرق قيمتين متتاليتين في نفس المجموعة يتجاوز $4s$	**رفض (Reject)**
4_{1s}	4 قياسات متتالية تتجاوز حد $+1s$ أو $-1s$	**رفض (Reject)**
$10_{\bar{x}}$	10 قياسات متتالية تقع جميعها في جانب واحد من المتوسط	**رفض (Reject)**

المراجع References

Analytical Methods Committee. (1988). Uses (proper and improper) of correlation coefficients. Analyst, 113(10), 1469–1471.
Analytical Methods Committee. (1994). Is my calibration linear? Analyst, 119(11), 2363–2366.

Analytical Methods Committee. (2003). The J-chart: A simple plot that combines the capabilities of Shewhart and cusum charts, for use in analytical quality control (AMC Technical Brief No. 12). Royal Society of Chemistry. http://www.rsc.org/images/brief12_tcm18-25954.pdf

Bland, J. M., & Altman, D. G. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet, 1(8476), 307–310.

Bland, J. M., & Altman, D. G. (1999). Measuring agreement in method comparison studies. Statistical Methods in Medical Research, 8(2), 135–160.

Bullock, D. G., & Wilde, C. E. (1985). External quality assessment of urinary pregnancy oestrogen assay: Further experience in the United Kingdom. Annals of Clinical Biochemistry, 22(3), 273–282.

Burnett, D. (2002). A practical guide to accreditation in laboratory medicine (2nd ed.). ACB Venture Publications.

Burrows, J. L., & Watson, K. V. (1994). Development and application of a calibration regression routine in conjunction with linear and nonlinear chromatographic detector responses. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 12(4), 523–531.

Caulcutt, R., & Boddy, R. (1983). Statistics for analytical chemists. Chapman & Hall.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2004). Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods (2nd ed., Approved Guideline EP05-A2). https://webstore.ansi.org/ansidocstore/product.asp?sku=EP05%2DA2

Dorschel, C. A., Ekmanis, J. L., Oberholtzer, J. E., Warren, F. V., & Bidlingmeyer, B. A. (1989). LC detectors: Evaluation and practical implications of linearity. Analytical Chemistry, 61(22), A951–A968.

Food and Drug Administration/Center for Drug Evaluation and Research. (2001). Guidance for industry: Bioanalytical method validation. https://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm

Haefelfinger, P. (1981). Limits of the internal standard technique in chromatography. Journal of Chromatography A, 218, 73–81.

Healy, M. J. (1979). Outliers in clinical chemistry quality-control schemes. Clinical Chemistry, 25(4), 675–677.

Miller, J. N. (1991). Basic statistical-methods for analytical chemistry Part 2: Calibration and regression methods. A review. Analyst, 116(1), 3–14.

Miller, J. N., & Miller, J. C. (2000). Statistics and chemometrics for analytical chemists (4th ed.). Pearson Education.

Montgomery, D. C. (2005). Introduction to statistical quality control (5th ed.). Wiley.

Neef, C., Touw, D. J., Harteveld, A. R., Eerland, J. J., & Uges, D. R. (2006). Pitfalls in TDM of antibiotic drugs: Analytical and modelling issues. Therapeutic Drug Monitoring, 28(6), 686–689.

Neilsen-Kudsk, F. (1983). A microcomputer program in BASIC for iterative, non-linear data-fitting to pharmacokinetic functions. International Journal of Bio-Medical Computing, 14(2), 95–107.

Peters, F. T., Jung, J., Kraemer, T., & Maurer, H. H. (2005). Fast, simple, and validated gas chromatographic-mass spectrometric assay for quantification of drugs relevant to diagnosis of brain death in human blood plasma samples. Therapeutic Drug Monitoring, 27(3), 334–344.

Society of Forensic Toxicologists & American Academy of Forensic Sciences. (2006). Forensic toxicology laboratory guidelines. http://www.soft-tox.org/docs/Guidelines%202006%20Final.pdf

Tsanaclis, L. M., & Wilson, J. F. (1997). Comparison by external quality assessment of performance of analytical systems for measurement of therapeutic drugs in serum. Therapeutic Drug Monitoring, 19(4), 420–426.

Watson, I. D., Wilson, J. F., Toseland, P. A., Smith, B. L., Williams, J., Capps, N. E., Thomson, A. H., Sweeney, G., & Sandle, L. N. (2002). Scoring and performance of analysis and interpretation of toxicologic cases assessed by external quality assurance. Therapeutic Drug Monitoring, 24(2), 156–158.

Westgard, J. O., Barry, P. L., Hunt, M. R., & Groth, T. (1981). A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. Clinical Chemistry, 27(3), 493–501.

Whelpton, R. (1989). Iterative least squares fitting of pH-partition data. Trends in Pharmacological Sciences, 10(5), 182–183.

Whelpton, R. (2004). Iterative least squares fitting of pH-extraction curves using an object-orientated language. Chromatographia, 59, S193–S196.

Whelpton, R. (2005). Internal standards. In P. Worsfold, A. Townshend, & C. Poole (Eds.), Encyclopedia of analytical science (pp. 432–441). Academic Press.

Wilson, I. D. (1990). Observations on the usefulness of internal standards in the analysis of drugs in biological fluids. In E. Reid & I. D. Wilson (Eds.), Analysis for drugs and metabolites including anti-infective agents (pp. 79–82). Royal Society of Chemistry.

Wilson, J. F. (2002). External quality assessment schemes for toxicology. Forensic Science International, 128(1-2), 98–103.

Wilson, J. F., & Smith, B. L. (1999). Evaluation of detection techniques and laboratory proficiency in testing for drugs of abuse in urine: An external quality assessment scheme using clinically realistic urine samples. Annals of Clinical Biochemistry, 36(5), 592–600.

Wilson, J. F., Newcombe, R. G., Marshall, R. W., Williams, J., & Richens, A. (1984). Analysis of assay errors in drug measurements from the Heathcontrol interlaboratory quality assessment schemes. Clinica Chimica Acta, 143(3), 203–216.

Wilson, J. F., Watson, I. D., Williams, J., Toseland, P. A., Thomson, A. H., Sweeney, G., Smith, B. L., Sandle, L. N., Ramsey, J. D., & Capps, N. E. (2002). Primary standardization of assays for anticonvulsant drugs: Comparison of accuracy and precision. Clinical Chemistry, 48(11), 1963–1969.

Youden, W. J., & Steiner, E. H. (1975). Statistical manual of the Association Official Analytical Chemists. AOAC.

CHAPTER (5) الفصل الخامس

عزل وتنقية السموم: من الطرق التقليدية إلى التقنيات الحديثة

ISOLATION AND PURIFICATION OF POISONS: FROM CLASSICAL TO MODERN TECHNIQUES



الفصل الخامس

عزل وتنقية السموم: من الطرق التقليدية إلى التقنيات الحديثة

Isolation and Purification of Poisons: From Classical to Modern Techniques

مقدمة (INTRODUCTION)

تعد تقنيات الكيمياء التحليلية أدوات لا غنى عنها في مجال العلوم الجنائية، حيث توجد علاقة تكافلية تدفع عجلة التقدم في منهجيات التحقيق وتضمن تحقيق العدالة (Lee & Lee, 2019). يهدف هذا البحث إلى استكشاف التفاعل المعقد بين تقنيات الكيمياء التحليلية والعلوم الجنائية، وتسليط الضوء على التقدم الملحوظ الذي تم إحرازه والاعتبارات العملية التي تدعم تطبيقاتها.

تلعب العلوم الجنائية دوراً محورياً في النظام القانوني من خلال تقديم الأدلة العلمية لدعم التحقيقات الجنائية وإجراءات المحاكم (Directorate of Forensic Science Laboratories, n.d.). وتعتبر الكيمياء التحليلية مكوناً رئيسياً في العلوم الجنائية، حيث تمكن من تحديد وقياس المواد الضرورية لإثبات الحقائق في القضايا القانونية (Skoog et al., 2024). يقدم هذا القسم نظرة عامة على أهمية الكيمياء التحليلية في العلوم الجنائية والتحديات المحددة التي تعالجها هذه التقنيات (DeForest, 2018). ومن خلال استكشاف التآزر بين الكيمياء التحليلية والعلوم الجنائية، يقدم هذا البحث رؤية شاملة للتقدم المحرز والاعتبارات العملية المتبعة في تسخير هذه التقنيات للتحليل الجنائي. ومن خلال فهم أعمق لهذه العلاقة التكافلية، يمكننا دفع عجلة التطور في العلوم الجنائية والمساهمة في التحسين المستمر لممارسات التحقيق (David & Black, 2018).

يهدف هذا الفصل إلى تبديد التباين والغموض فيما يتعلق بقضايا علم السموم بشكل عام وذلك نظراً لزيادة الإجراءات الفائضة والمتكررة المعلنة لعزل وتحليل وتقدير السموم، حيث أصبح اختيار الإجراءات الصحيحة أمراً شاقاً ومربكاً. وهذا يستلزم الحاجة إلى إجراءات معيارية قابلة للمقارنة وعملية، مع التركيز على **الدقة** (**Accuracy**) و**الضبط** (**Precision**).

وإدراكاً لهذه الحقائق، يستوعب هذا الفصل نتائج لمختلف الإجراءات الموصوفة في كتب المراجع المتنوعة المتعلقة بعلم السموم. ومن خلال توفير مرجع سريع وموحد وسهل الاستخدام، تجنبنا بدقة التفاصيل والإجراءات غير الضرورية في هذا الفصل. ورغم أنه لا يمكن أن يكون بديلاً عن كتب المراجع والكتب المدرسية. لا يفصل هذا الفصل الأعراض السريرية أو الآثار الفارماكولوجية (الدوائية) للسموم، بل يركز بدلاً من ذلك على **تصنيف** (**Classification**)، و**عزل** (**Isolation**)، و**كشف** (**Detection**)، و**تقدير كمية** (**Quantitation**) السموم. وكما ذكر أعلاه، لا يهدف الفصل إلى استبدال الإجراءات أو المنهجيات المقبولة، بل يدمج فقط تلك الإجراءات ذات الصلة والقابلة للتطبيق (Stewart & Stolman, 1961). ومع ذلك، تظل الخيارات مفتوحة لخبراء السموم لتبني أي إجراء اختبار آخر إذا لزم الأمر (Curry, 1976).

عزل السموم وتنقيتها (ISOLATION AND PURIFICATION OF POISONS)

الخطوات المنهجية في علم السموم التحليلي (Analytical Toxicology)

تستند منهجية العمل في علم السموم التحليلي إلى سلسلة من الإجراءات المخبرية الدقيقة لضمان دقة النتائج وموثوقيتها؛ تبدأ العملية **باستخلاص (Extraction)** المكون النشط (السم) من المصفوفة العينية المحددة، وهي خطوة جوهرية تتطلب اختيار المذيبات أو التقنيات المناسبة لضمان أعلى كفاءة في الاستخلاص. تليها عملية **التجريد (Stripping)** أو التنقية (Purification)، وتهدف إلى إزالة الشوائب والمواد المتداخلة من المستخلص الخام لزيادة نقاء المكون المراد تحليله. بعد ذلك، تأتي مرحلة **الفحص السريع (Rapid Screening)** والتعريف (Identification) النوعي، حيث يتم تحديد هوية المادة السامة باستخدام تقنيات أولية أو استباقية. وفي حال التوصل لهوية المادة، يتم الانتقال إلى مرحلة **التقدير الكمي (Quantitation)** لقياس تركيز المادة السامة بدقة متناهية، وهو أمر حيوي لتقييم مدى خطورة التعرض. تختتم هذه العملية **بالتفسير (Interpretation/Conclusion)** العلمي للنتائج، حيث تُربط المعطيات المخبرية بالمعلومات السريرية أو الجنائية للوصول إلى استنتاج نهائي يدعم التحقيق السمومي أو التشخيص الطبي.

مسرد المصطلحات الأساسية في عمليات الاستخلاص

يتطلب العمل في هذا المجال فهماً دقيقاً للمصطلحات الإجرائية؛ إذ تُعرف **المصفوفة (Matrix)** بأنها الوسط المادي (سواء كان حيوياً أو غير حيوي) الذي يتواجد فيه المكون النشط، حيث يكون مشتتاً، أو متراكماً، أو مرتبطاً به فيزيائياً أو كيميائياً. ويُشار بـ **المكون النشط (Active Constituent)** إلى المادة الكيميائية السمية المستهدفة في عملية البحث. أما عملية **التجريد (Stripping)**، فهي مرادف تقني لعملية التنقية (Purification)، حيث يتم عزل السم عن المكونات غير المرغوب فيها الموجودة في المصفوفة للوصول إلى عينة جاهزة للقياس التحليلي الدقيق.

تصنيف المصفوفات السمومية (Classification of Matrices)

يتم تصنيف المصفوفات (الوسط الذي يتواجد فيه السم) إلى فئتين رئيسيتين تبعاً لطبيعتها ومنشئها: تشمل **المصفوفات الحيوية (Biological Matrices)** كافة العينات ذات المنشأ البيولوجي المستخلصة من الكائن الحي، مثل الأنسجة الحشوية (Viscera)، والدم، والبول، واللعاب، ومحتويات الجهاز الهضمي (المعدة، الأمعاء)، وسوائل غسل المعدة (Gastric lavage)، والقيء، وأنسجة الدماغ، والبراز، بالإضافة إلى العينات الصلبة والملحقات كالعظام، والأظافر، والشعر، والجلد. في المقابل، تضم **المصفوفات غير الحيوية (Non-Biological Matrices)** كافة المواد الخارجية التي قد تكون وسيطاً لنقل السم، مثل عينات الماء، وبقايا المواد السامة في الحاويات والأوعية، والأغذية بمختلف أشكالها (كالألبان ومنتجاتها، الفواكه، الخضروات، المواد المطبوخة)، والمشروبات (كالشاي، القهوة، المشروبات الغازية، الخمور)، وكذلك الحبوب والبقوليات.

التصنيف التحليلي لفئات السموم (Different Classes of Poisons)

اعتماداً على البروتوكولات المخبرية المتبعة في عزل وتحديد المواد السامة، يتم تصنيف السموم إلى فئات وظيفية تتيح للكيميائي السمومي اختيار المنهجية الأمثل للاستخلاص والتحليل وفقاً للتصنيف الكلاسيكي الذي أرساه (Lundquist, 1962). تتوزع هذه الفئات إلى: **الغازات الضارة (Noxious gases)**، و**السموم الطيارة (Volatile poisons)** بشقيها العضوي وغير العضوي، و**السموم غير الطيارة (Non-volatile poisons)** وتضم أيضاً صنفين (عضوي وغير

عضوي)، و**السموم النباتية (Plant poisons)** ذات الطبيعة القلويدية أو الجليكوسيدية المعقدة، وأخيراً **السموم المتنوعة (Miscellaneous poisons)** التي لا تندرج بدقة تحت الفئات السابقة وتتطلب تقنيات تحليلية خاصة.



طرق الاستخلاص المختلفة (DIFFERENT METHODS OF EXTRACTION)

جدول (1): طرق الاستخلاص الكلاسيكية والحديثة حسب فئة السم:

فئة السم (Class of poison)	الطرق الكلاسيكية(Classical Method)	الطرق الحديثة(Modern Method)
الغازات(Gases)	الانتشار الدقيق(Micro-diffusion) ، الامتزاز والانتزاع.(Adsorption-desorption)	محلل الغاز المعتمد على الحساسات (Sensor Based Gas Analyzer)، كروماتوغرافيا الغاز (Gas Chromatography).
المواد الطيارة غير العضوية (Volatile Inorganic)	طريقة غوتزايت(Gutzeit) ، طريقة مارش-بيرزيليوس(Massh-Berzelius) ، الانتشار الدقيق، الهضم بكواشف محددة، اختبار البلورات واللون.	تقنية فرن الميكروويف للهضم متبوعة بكروماتوغرافيا الأيونات (Ion Chromatography) باستخدام الراتنجات التبادلية، والمطيافية.
المواد الطيارة العضوية (Volatile Organic)	التقطير(Distillation) ، التقطير البخاري (Steam Distillation)، الانتشار.	كروماتوغرافيا الغاز المرتبطة بمطياف الكتلة-GC) MS).
المواد غير الطيارة غير العضوية-(Non Volatile Inorganic)	الرماد الجاف والمبلل(Dry and wet ashing) ، تحليل المجموعات، الديلزة الكهربائية-Electro) (dialysis، الهضم تحت ظروف تحليلية، المعايرة، كروماتوغرافيا الورق والطبقة الرقيقة.	تقنية فرن الميكروويف للهضم، مطيافية الانبعاث الذري للبلازما المقترنة حثياً (ICP-AES)، ومطيافية الكتلة (ICP-MS).
المواد غير الطيارة العضوية-(Non Volatile Organic)	الاستخلاص بالمذيبات(Solvent Extraction) ، طريقة ستاس-أوتو(Stas-Otto, 1851, 1856) ، الهضم بكبريتات الأمونيوم أو تنكستات الصوديوم.	HPLC، HPTLC(Sethi, 1996)، الاستخلاص بالسائل فوق الحرج، الاستخلاص بالطور الصلب (SPE)، الاستخلاص الميكروي، الاستخلاص بالمذيبات المتسارع (Dionex, n.d) (ASE.).
الأنيونات(Anions)	الديلزة(Dialysis) ، الهضم الكيميائي، كروماتوغرافيا الورق والطبقة الرقيقة (TLC) (Stahl, 1969).	كروماتوغرافيا الأيونات بواسطة الراتنجات التبادلية الأيونية.

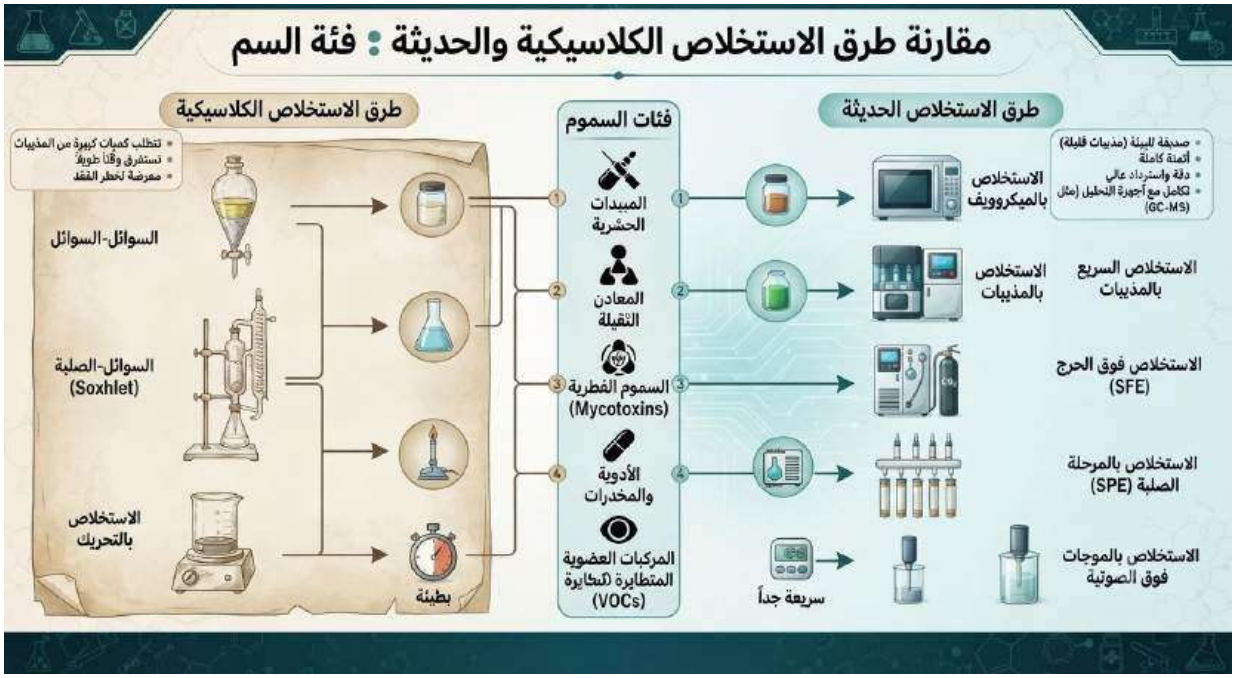
يوضح الجدول أعلاه وجود طرق استخلاص مختلفة، كلاسيكية وحديثة. وتعتبر الطرق الكلاسيكية شائعة في مختبرات العلوم الجنائية الهندية التي تتعامل مع عدد كبير من حالات التسمم، حيث تغطي السموم طيفاً واسعاً بخلاف الدول الأجنبية. وبما أن المختبرات تعمل على تطوير مواردها، فإن الطرق الحديثة تحل تدريجياً محل الطرق التقليدية، وهو ما يتطلب مناقشات منفصلة.



الصورة للمؤلفين الثلاثة وهم يناقشون طرق الاستخلاص الكلاسيكية والحديثة حسب فئة السم، مع عرض مقارن للفئات التالية:

- الغازات.
- المواد الطيارة غير العضوية.
- المواد الطيارة العضوية.
- المواد غير الطيارة غير العضوية.
- المواد غير الطيارة العضوية.
- الأنيونات.
- وتتضمن الصورة أمثلة على:
- الانتشار الدقيق والامتزاز والانتزاع والتقطير والرماد الجاف والرطب والاستخلاص بالمذيبات.
- كروماتوغرافيا الغاز وGC-MS.
- الهضم بالميكروويف وICP-AES / ICP-MS.
- HPLC، SPE، SFE، ASE.
- كروماتوغرافيا الأيونات وطرائق التبادل الأيوني الحديثة.

توجد طرق كلاسيكية وحديثة متنوعة للاستخلاص. ويعتمد اختيار الطريقة المناسبة على عدة عوامل ضابطة، منها: طبيعة السم، ونوع المصفوفة أو المصفوفات (**Matrices**)، وكذلك كمية العينات المتاحة أو المرسلة للتحليل. يجب استخلاص المكون النشط من العينة بأقل عدد ممكن من الخطوات لتجنب الفقد أثناء المعالجة. كما تتطلب المادة المستخلصة **تجريداً** (**Stripping**) أو تنقية صحيحة لتجنب تداخلات المصفوفات قدر الإمكان. وتحدد كفاءة الاستخلاص والتنقية **الحد الأدنى للكشف** (**Lower limit of detection**)، والدقة (**Precision**)، والضبط (**Accuracy**) في التحديد. ويلعب المحلل دوراً هاماً في اختيار المنهجية المناسبة بناءً على معايير مختلفة مثل: تاريخ الحالة (**Case history**)، وكمية الحالة الفيزيائية للمصفوفات، والمتطلبات التحليلية، وكذلك المرافق والبنية التحتية المتاحة. ومن المناسب عرض الطرق بشكل تخطيطي بناءً على تصنيف السموم.



العمليات الكيميائية الأولية في التحليل السمومي

تعد عمليات الفصل الفيزيائي والكيميائي حجر الزاوية في علم السموم التحليلي، حيث تعتمد الكفاءة التحليلية على دقة تقنيات العزل المسبقة.

التقنيات المعتمدة على التقطير (Distillation Techniques)

تُعد عملية **التقطير (Distillation)** من التقنيات الأساسية التي تعتمد على تحويل العينة السائلة إلى طور بخاري عبر التسخين، ثم تكثيف البخار الناتج في وعاء منفصل لاستعادته في حالته السائلة. وتتعدد تطبيقات هذه التقنية لتشمل تعديلات هيكلية تتناسب مع طبيعة المادة المستهدفة، ومنها التقطير تحت الضغط المنخفض، والتقطير التجزيئي، والتقطير المشترك بالكنس.

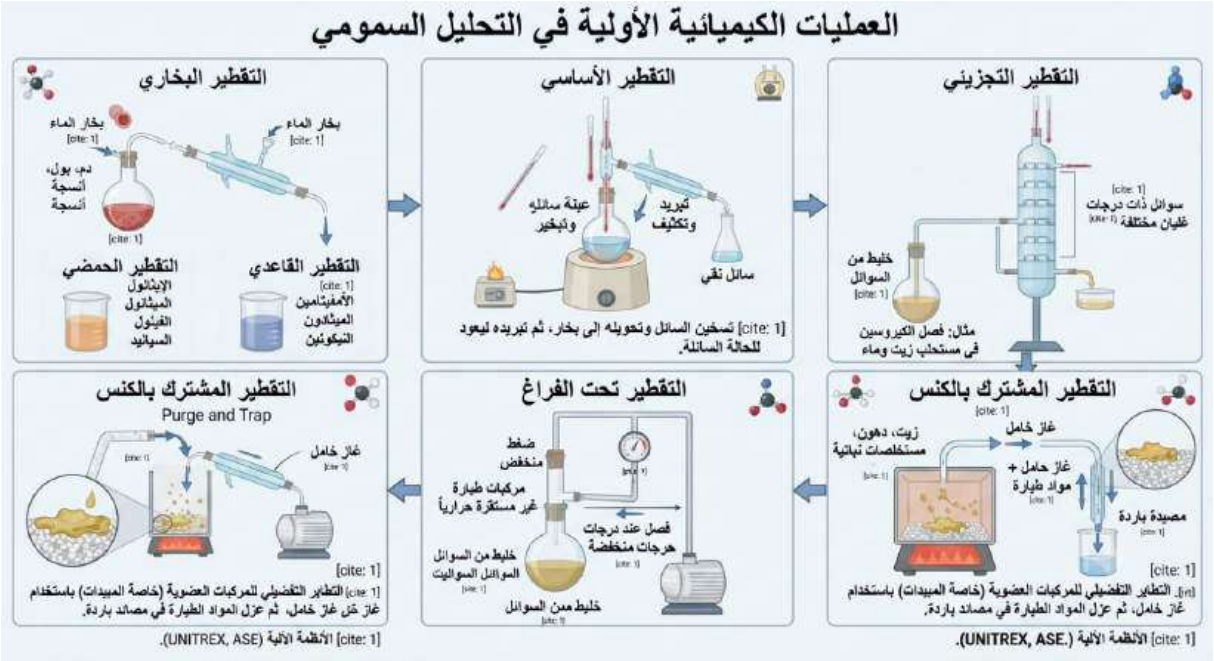
التقطير البخاري (Steam Distillation)

تُستخدم هذه التقنية لعزل المركبات الطيارة من المصفوفات الحيوية المعقدة مثل الدم، والبول، ومتجانسات الأنسجة (Homogenates)، والأحشاء المفرومة. تعتمد الآلية على تمرير تيار من البخار عبر المحلول العيني، مما يسمح بحمل المركبات الطيارة مع البخار، ليتم تجميعها لاحقاً عبر التكثيف المائي. وتُصنف المواد المستخلصة بهذه الطريقة إلى:

- **السموم المستخلصة في الوسط الحمضي:** وتشمل المواد ذات الطبيعة الحمضية أو المتعادلة، مثل الإيثانول، والميثانول، والفينول، والهيدروكربونات الهالوجينية، وأيونات السيانيد.
- **السموم المستخلصة في الوسط القاعدي:** وتضم العقاقير ذات الخصائص القاعدية، مثل الأمفيتامينات، والميثادون، بالإضافة إلى مركبات الأنيلين، والبيريدين، والنيكوتين.

التقطير التجزيئي (Fractional Distillation)

تُعد هذه التقنية متخصصة في فصل مخاليط السوائل الطيارة بناءً على تباين درجات غليان مكوناتها. وتبرز أهميتها في تطبيقات مثل فصل المواد الهيدروكربونية (مثل زيت الكيروسين أو التربنتين المعدني) من المستحلبات النفطية والزيتية المعقدة، مما يسمح بعزل المكونات بدقة عالية تتجاوز التقطير البخاري البسيط.



التقطير تحت الضغط المخلخل (Vacuum Distillation)

تُطبق هذه التقنية في حالة المركبات الطيارة الحساسة حرارياً (Thermally labile)، حيث يسمح خفض الضغط الجوي بخفض درجات غليان المركبات، مما يمنع تحللها الكيميائي أثناء عملية الفصل، ويضمن الحصول على نواتج نقية دون المساس بسلامة الجزيئات المستهدفة.

التقطير المشترك بالكنس (Sweep Co-distillation)

تُعد تقنية "الكنس" حالة متقدمة من التقطير تعتمد على التطاير التفضيلي للمركبات العضوية (لاسيما المبيدات الحشرية) من المصفوفات الدهنية أو المستخلصات النباتية. تعتمد التقنية على "التطهير والاحتجاز" (Purge and Trap)، حيث يتم تشتيت العينة في طبقات رقيقة على وسائط خاملة أو نشطة كيميائياً (مثل الحبيبات الزجاجية، الفلوريسيل، الألومينا، السيليكا جل، أو التينكس) تحت درجات حرارة مرتفعة، وتيار من غاز خامل. وقد تطورت هذه المنهجية لتشمل أنظمة آلية متطورة للاستخلاص السريع للعينات المتعددة، مثل جهاز (UNITREX) ومستخلص المذيبات المتسارع (ASE) الذي يعد معياراً ذهبياً في المختبرات الحديثة لسرعة وكفاءة الاستخلاص (Dionex, n.d.).

الانتشار الدقيق (Micro diffusion):

يُعد الانتشار الدقيق عملية ملائمة وشائعة تسهل الكشف عن المواد السامة (الغازية والطيارة) في الدم والبول ورشافات المعدة (**Gastric aspirates**) أو تحديدها بعد عزلها بتقنيات مختلفة. يتم ذلك باستخدام أطباق كونواي للانتشار الدقيق (**Conway Micro-diffusion dish**) (والتي سيتم شرحها بالتفصيل بشكل منفصل).

الديلزة (Dialysis):

تتضمن هذه العملية فصل المواد المتبلورة (**Crystalloid**) عن الغرويات (**Colloid**) من خلال الترشيح عبر غشاء شبه نفاذ (**Semi-permeable membrane**). يمكن استخدام طريقة الفصل هذه لعزل الكاتيونات والأنيونات السامة في المحاليل أو التشتتات الغروية، أو في المصفوفات الغروية وخاصة المواد الحيوية بما في ذلك الدم. ويمكن تسريع عملية الفصل هذه بتطبيق قوة دافعة كهربائية (e.m.f.)، وهو ما يعرف بـ **الديلزة الكهربائية** (**Electro-dialysis**).

التسامي (Sublimation):

تشبه هذه العملية التقطير، إلا أن العينة تبدأ في الحالة الصلبة وتتحول مباشرة إلى بخار ثم تعود مرة أخرى إلى الحالة الصلبة عند التبريد. يُطبق التسامي لعزل المواد السامة في المصفوفات الصلبة مثل النفتالين (**Naphthalene**) والأنثراسين (**Anthracene**) التي تتميز بخاصية التسامي.

الهضم أو المعالجة الكيميائية (Digestion or chemical treatment):

أحياناً يتم فصل المكونات النشطة (المواد السامة) عن طريق المعالجة بالأحماض أو القلويات، أو الهضم في حمام مائي أو فرن لفح (**Muffle furnace**). فعلى سبيل المثال، يتم هضم المصفوفات الحيوية في حمام مائي لمدة ساعة أو أكثر، أو هضمها في فرن اللفح مع الأحماض أو القلويات أو المواد الكيميائية لعزل المكون النشط. كما يتم عزل السموم غير العضوية الطيارة مثل الفوسفين (**Phosphine**)، والأرسين (**Arsine**)، وكبريتيد الهيدروجين من أملاحها عند المعالجة بالأحماض المخففة (Lundquist, 1962).

الهضم بالميكروويف (Microwave Digestion):

يتم هضم المصفوفات بالأحماض أو القلويات داخل فرن الميكروويف لتسهيل عزل السموم غير العضوية الموجودة في المصفوفات العضوية تحت ظروف تحليلية محددة للتشغيل، مثل تشغيل الفرن عند موجة ميكروويف محددة لفترة زمنية معينة. يؤدي تفاعل الميكروويف مع المصفوفات إلى إنتاج حرارة مع ارتفاع في درجة الحرارة، مما يؤدي إلى حدوث الهضم.

الامتصاص (Absorption):

الامتصاص عملية بطيئة (مقارنة بالامتزاز الذي يحدث عند السطح) وتتضمن انتشار مادة ما إلى داخل مادة ممتصة. يتم احتجاز الغازات السامة والمواد الطيارة في الزيت وتركيزها باستخدام أنبوب يحتوي على مواد ماصة متنوعة ونوعية لمادة سامة معينة، مما يسهل عملية الكشف والتحديد المباشر (**On-line detection**).



الشكل (1): طرق فصل وعزل السموم في المختبر

العمليات الموحدة في طرق الاستخلاص (Unit processes/operation in extraction methods)

نورد فيما يلي العمليات الموحدة المختلفة المتعلقة بالاستخلاص تيسيراً للباحث، مع العلم أن التفاصيل الدقيقة لهذه العمليات متوفرة في المراجع القياسية للكيمياء التحليلية (Gour, 1972).

الاستخلاص بالمذيبات (Solvent Extraction):

يتطلب فصل المواد عن طريق الاستخلاص بالمذيبات وجود نظام يتكون من سائلين **غير متمازجين** (**Immiscible liquids**). يجب أن يكون المكون النشط ذو ذوبانية غير متساوية في النظام، مما يسهل عملية انتقال المكون من طور إلى آخر. وتتحدد كفاءة الاستخلاص من خلال **معامل التوزيع** (**Distribution coefficient**) ويرمز له بالرمز (D):

D=Total weight (gms) of solute in the Aqueous PhaseTotal weight (gms) of solute in the Organic Phase

إذا كان أحد السائلين يحتوي على مادة مذابة وتم رج النظام ثم تركه ليستقر، فسينتقل جزء من المذاب إلى السائل الآخر. يُشار إلى كل سائل في هذا المزيج باسم **الطور** (**Phase**). وبناءً عليه، يتم نقل بعض المذابات من طور إلى آخر في النظام ثنائي الطور. تعتمد الكمية المنقولة على **الألفة النسبية** (**Relative affinity**) للمذاب تجاه كل من المذيبين (الذوبانية النسبية)، والتي يحددها المعامل D. كلما زادت قيمة D، زادت كفاءة الاستخلاص. وقد يشتمل النظام غير المتمازج على مذيبين عضويين، وفي هذه الحالة قد تتعطل عملية الاستخلاص بسبب تكون **المستحلب** (**Emulsion**). يعد الاستخلاص بالمذيبات تقنية شائعة في السموم الجنائية المتعلقة بالمصفوفات الحيوية. وقد تم تطوير هذه الطريقة حالياً لتصبح آلية، كما هو الحال في **الاستخلاص بالمذيبات المتسارع** (**Accelerated Solvent Extraction - ASE**) (Dionex, n.d.). أما في حالة المصفوفات غير الحيوية الصلبة، فيمكن استخدام الاستخلاص المستمر بواسطة **جهاز سوكسليت** (**Soxhlet extractor**).

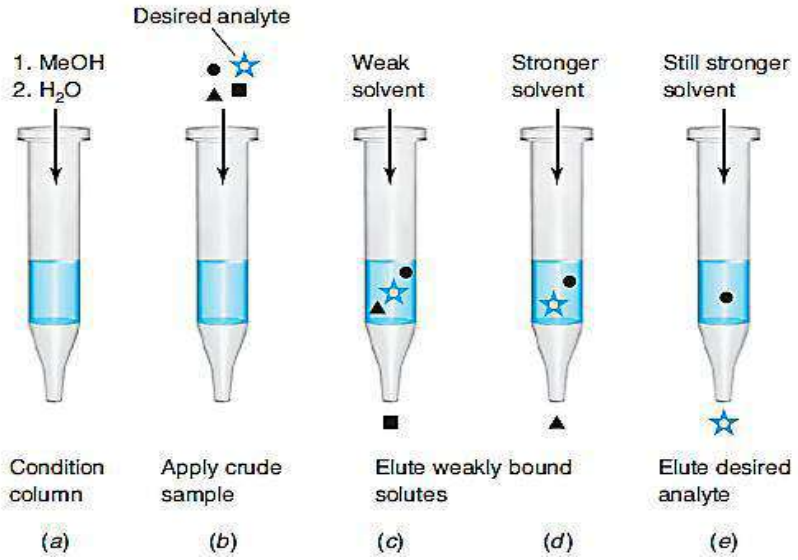
الاستخلاص بالطور الصلب (Solid Phase Extraction - SPE)

تطورت هذه الطريقة من الامتزاز الكلاسيكي على الفلوريسيل (**Florisil**) لتستخدم الآن خراطيش معبأة بمواد سيليسية مرتبطة بمجموعات وظيفية مثل **C18** أو **CN** أو **NH2**. تكمن أهمية **SPE** في قدرتها على تنظيف العينات وتركيزها لتحسين حدود الكشف (**Detection limits**) وتجنب تدهور أعمدة **HPLC**. تتكون الخرطوشة من جسم الأنبوب، والمرشحات المسامية (**Frits**)، والمادة الممتزة (**Sorbent**). وتصنف الأطوار فيها إلى: **الطور الطبيعي** (**Normal Phase**) حيث تزداد قوة المذيب بزيادة قطبيته، و**الطور المعكوس** (**Reverse Phase**) حيث تزداد قوة المذيب بزيادة لزوجته غير القطبية، و**طور التبادل الأيوني** (**Ion Exchange**) الذي يعتمد على الشحنات الكهربائية والرقم الهيدروجيني (**pH**) لاحتجاز الكاتيونات أو الأنيونات (Maehly, 1981).

كما تطورت الملاحظات القديمة في استخلاص العقاقير عن طريق الامتزاز على مواد صلبة مثل **الفلوريسيل** (**Florisil**) (سيليكات المغنيسيوم الاصطناعية) أو الكربون المنشط، ثم الاستخلاص الاختياري بالمذيبات، لتتحول إلى طريقة **الاستخلاص بالطور الصلب** (**SPE**). وفي هذه الطريقة، يتم استخدام مواد سيليسيّة ذات توزيع حجمي متقارب نسبياً (**15** إلى **100** ميكروميتر) وأطوار سيليكا مرتبطة مختلفة مثل:

- **(C18, ODS) n-octadecyl**
- **(C8) n-octyl**
- **(C6) n-hexyl**
- **(C2) ethyl**
- **(CN) cyanopropyl**
- **(APS) aminopropyl**

تستخدم هذه المواد كمواد ممتزة بكفاءة فصل أكبر بكثير. تعتمد الطريقة على استخدام أنابيب صغيرة أو خراطيش مملوءة بـ **100-500** ملجم من الممتز المناسب. وهناك نوع حديث من خراطيش **SPE** تُثبت فيه جزيئات صغيرة جداً من الممتز داخل نسيج من ألياف الـ **PTFE** الدقيقة، مما يعطي كفاءة مماثلة للأعمدة المعبأة ولكن بضغط أقل. ويتم تطبيق العينة على خرطوشة **SPE** إما من خلال حقنة أو مجمع عينات (**Manifold**) عن طريق الضغط أو السحب (الشفط) من الطرف السفلي. يتم استعادة المكونات لاحقاً عن طريق غسلها بالمذيب (**Solvent flashing**). هذه الطريقة جذابة نظراً للكميات الصغيرة المطلوبة من العينات والمواد، فضلاً عن السرعة الكبيرة للإجراء مقارنة بطريقة الامتزاز الكلاسيكية (Maehly, 1981).



الشكل (2): خطوات استخراج الطور الصلب.
Steps in solid-phase extraction.

فوائد وتطبيقات الاستخلاص بالطور الصلب (Benefits and Applications of SPE):

غالباً ما يمكن تحقيق تركيز المادة المحللة (**Analyte**) بسهولة أكبر باستخدام **SPE** مقارنة بالاستخلاص سائل-سائل (**Liquid-liquid extraction**). كما أن استخدام أعمدة **SPE** لتركيز المادة من مستخلص المذيب يوفر بديلاً أسرع وربما أكثر أماناً لعملية تبخير المذيب. وتتمثل الميزة الرئيسية لـ **SPE** في تبسيط معالجة الدفعات (**Batch processing**). وميزة إضافية عند البحث عن مواد مجهولة هي إمكانية استخلاص مجموعة واسعة من المواد في وقت واحد، وإن كان هذا قد يسبب تحدياً إذا كان المطلوب استخلاص مكون واحد فقط. من ناحية أخرى، تعتبر أعمدة **SPE** مكلفة، وقد يصعب أحياناً الاحتفاظ بالمواد شديدة الذوبان في الماء بداخلها. وتُستخدم خراطيش **SPE** بشكل أساسي لتنظيف العينات قبل التحليل أو تركيزها لتحسين حدود الكشف (**Detection limits**). إن الافتقار إلى التحضير الكافي للعينات سيؤدي إلى حدود كشف ضعيفة، وأخطاء في التعريف والتقدير الكمي، ومشاكل تلوث، وتدهور سريع في أداء أعمدة **GC** أو **HPLC**.

مميزات تقنية SPE:

- توفير تنقية واستعادة عينات أفضل من تقنيات الاستخلاص سائل-سائل.
- استخدام أحجام صغيرة من المذيبات الشائعة.
- تتطلب مهارات مخبرية بسيطة ولا تحتاج لمعدات معقدة للغاية.
- تسمح بمرور سريع للعينات (**Rapid sample throughput**).

تتم العملية بصب العينة السائلة (أو الصلبة المذابة في مذيب) في خرطوشة **SPE** مهيأة مسبقاً، ثم يتم استخدام التفريغ (**Vacuum**) أو الضغط لإجبار العينة على المرور عبر المادة الممتزة (**Sorbent**) داخل الخرطوشة. وعادة ما يُستخدم مجمع فراغي (**Vacuum manifold**) لمعالجة عدة خراطيش في وقت واحد. تم تصميم هذه الطرق للاحتفاظ بالمواد المراد تحليلها، ثم يتم غسلها (**Eluted**) لاحقاً من المادة الممتزة باستخدام مذيب آخر يُجمع للتحليل (Jennings, 1987).

مكونات خرطوشة SPE(SPE Cartridges):

تتكون خرطوشة الاستخلاص بالطور الصلب من ثلاثة أجزاء أساسية:

1. **جسم الخرطوشة أو الأنبوب (Cartridge or Tube Body):** يكون جسم الخرطوشة عادةً على شكل أسطوانة حقنة مصنوعة من مادة البولي بروبيلين ذات الدرجة المصلية (**Serological grade polypropylene**).
2. **المرشحات المسامية (Frits):** تُستخدم لتثبيت المادة الممتزة داخل الأسطوانة وتعمل كمرشح للجسيمات العالقة.
3. **الطور أو المادة الممتزة (Phase or Sorbent):** أكثر الأطوار شيوعاً هي المواد القائمة على **السيليكا المرتبطة** (**Bonded silica**). تُستخدم جزيئات سيليكا غير منتظمة الشكل بحجم **40 ميكرومتر** مع مسام بحجم **60 أنجستروم** كمادة أساسية. تُستخدم أنواع مختلفة من السيلان لربط المجموعات الوظيفية بالمساحات المتاحة من جزيئات السيليكا. بالإضافة إلى ذلك، تُستخدم عدة أطوار غير قائمة على السيليكا بشكل شائع.

ويمكن استخدام خزانات مذيبات (**Solvent reservoirs**) لزيادة سعة الأسطوانة فوق الطور، مما يسمح بإضافة كميات كبيرة من العينة أو المذيب (تصل إلى **75 مل**) دفعة واحدة بدلاً من إضافتها على أجزاء صغيرة، وتُستخدم وصلات ربط خاصة لتوصيل هذه الخزانات بالخراطيش.

أنواع الأطوار في الاستخلاص بالطور الصلب (Types of SPE Phases):

تُعد تقنية الاستخلاص بالطور الصلب (SPE) ركيزة أساسية في التحضير الكروماتوغرافي، حيث تُصنف المواد الممتزة (Sorbents) المستخدمة في خراطيش الاستخلاص إلى ثلاثة أنماط رئيسية وفقاً لآلية التفاعل الكيميائي الفيزيائي بين الطور والمادة المحللة (Analyte).

1. الطور الطبيعي (Normal Phase)

تعتمد هذه الأطوار على الطبيعة القطبية (Polar) للممتزات، وتُخصص لاحتجاز المواد التحليلية القطبية. وتخضع عملية الغسل (Elution) لمبدأ "قوة المذيب"، حيث تتناسب هذه القوة طردياً مع قطبية المذيب المستخدم؛ فكلما زادت قطبية المذيب، ازدادت فاعليته في إزاحة المادة المحللة من الممتز. على سبيل المثال، يتطلب غسل المادة المحللة حجماً أقل من الميثانول (قطبي) مقارنة بالكلوروفورم. ولضمان الوصول إلى أعلى درجات النقاء وأقصى نسبة استعادة للمادة المحللة (Analyte recovery)، غالباً ما تُستخدم مخاليط من مذيبين أو أكثر للتحكم الدقيق في قوة المذيب (Eluent strength).

2. الطور المعكوس (Reverse Phase)

خلافاً للطور الطبيعي، تتكون هذه الأطوار من مواد غير قطبية (Non-polar) وتُستخدم لاحتجاز المواد التحليلية ذات الطبيعة غير القطبية. وتنعكس فيها قواعد قوة المذيب؛ إذ تزداد القوة الاستخلاصية للمذيب كلما انخفضت قطبيته (أو ازدادت طبيعته غير القطبية). وفي هذا السياق، يكون حجم الأسيتونيتريل اللازم لغسل مادة محتجزة أقل من حجم الماء المطلوب لنفس الغرض. وتقتصر المذيبات النموذجية في هذا النوع على الماء، والميثانول، والأيزوبروبانول، والأسيتونيتريل، مع إمكانية اللجوء إلى مذيبات ذات قدرة إذابة عالية مثل الأسيتون أو ثنائي كلورو ميثان للمواد التي تُحتجز بقوة شديدة داخل الطور (Middleditch, 1989).

3. طور التبادل الأيوني (Ion Exchange Phase)

تعتمد هذه الأطوار في آليتها على التفاعلات الكهروستاتيكية بين المادة المحللة والممتز، حيث تلعب الخصائص الكيميائية للمحلول — وتحديداً الرقم الهيدروجيني (pH)، والقوة الأيونية (Ionic strength)، وقوة الأيون المقابل (Counter ion

strength) — الدور الجوهري بدلاً من قوة المذيب التقليدية. وتتم عملية الاحتجاز نتيجة تجاذب شحنات متعاكسة بين المادة المحللة والممتز، وتُقسم هذه الأطوار إلى:

- **أطوار التبادل الكاتيوني (Cation Exchange):** وتُستخدم لاحتجاز المركبات ذات الشحنة الموجبة. ويُلاحظ أن المركبات غير المشحونة بطبيعتها، كالأمينات والأحماض الكربوكسيلية، يمكن توجيهها للاحتجاز عبر تعديل الرقم الهيدروجيني (pH) الوسطي لشحنها.
- **أطوار التبادل الأنيوني (Anion Exchange):** وتُستخدم لاحتجاز المركبات ذات الشحنة السالبة.

إن التبصر في هذه الآليات يُمكّن المحلل من اختيار المزيج الأمثل بين الطور والمذيب، وهو ما يُعد شرطاً ضرورياً لضمان كفاءة الفصل الكروماتوغرافي ودقة النتائج النهائية (Jennings, 1987).

جدول(2): قوى المذيبات (Solvent Strengths)

يوضح هذا الجدول تدرج قوة المذيبات من الأضعف إلى الأقوى حسب نوع الطور المستخدم:

قوة المذيب	الطور الطبيعي(NORMAL PHASE)	الطور المعكوس(REVERSE PHASE)
ضعيف(Weak)	الهكسان(Hexane)	الماء(Water)
	الأيزوأوكتان(Isooctane)	الميثانول(Methanol)
	التولوين(Toluene)	كحول الأيزوبروبيل(Isopropyl alcohol)
	الكلوروفورم(Chloroform)	الأسيتونيتريل(Acetonitrile)
	كلوريد الميثيلين(Methylene chloride)	الأسيتون(Acetone)
	رباعي هيدرو الفوران(THF)	إيثر الإيثيل(Ethyl ether)
	إيثر الإيثيل(Ethyl ether)	خلات الإيثيل(Ethyl acetate)
	خلات الإيثيل(Ethyl acetate)	رباعي هيدرو الفوران(THF)
	الأسيتون(Acetone)	كلوريد الميثيلين(Methylene chloride)
	الأسيتونيتريل(Acetonitrile)	الكلوروفورم(Chloroform)
	كحول الأيزوبروبيل(Isopropyl alcohol)	التولوين(Toluene)
	الميثانول(Methanol)	الأيزوأوكتان(Isooctane)
قوي(STRONG)	الماء(Water)	الهكسان(Hexane)

جدول (3): المواد الممتزة (Sorbents)

تصنيف المواد الممتزة حسب آلية الفصل:

الطور الطبيعي (NORMAL PHASE)	الطور المعكوس (REVERSE PHASE)	طور التبادل الأيوني (ION EXCHANGE)
سيانو*(**Cyano - CN**)	أوكتاديسيل **C18**) أو(**ODS**	بنزين سلفونيل بروبيل(**SCX**)
ديول(**DIOL**)	أوكتيل(**C8**)	أمين رباعي(**SAX**)
سيليكا(**Silica - SI**)	ميثيل(**C1**)	
أمينو**(**Amino - NH2**)	فينيل(**Phenyl - Ph**)	

ملاحظات التنسيق:

- *(*) يمكن استخدام طور السيانو (**Cyano**) كطور معكوس أيضاً في حالات معينة.*
- *(**) يمكن استخدام طور الأمينو (**Amino**) كطور تبادل أيوني أيضاً (Gauglitz & Vo-Dinh, 2003).*

التبادل الأيوني المقابل النسبي (Relative counter ion exchange):

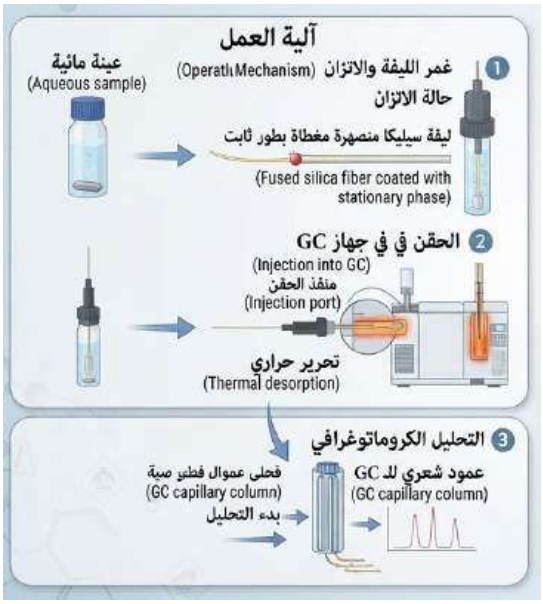
تعتمد كفاءة الاستخلاص في أطوار التبادل الأيوني على قدرة الأيونات الموجودة في المحلول على استبدال الأيونات المرتبطة بالطور الثابت. يوضح الجدول التالي الانتقائية النسبية للأيونات المقابلة؛ حيث تم تعيير الأيونات ذات الانتقائية الأعلى عند القيمة **10** لتكون القيم الأخرى نسبية ومقارنة بها.

جدول(4): أطوار التبادل الأيوني (Ion Exchange phases**)**

الكاتيونات(CATIONS)	القيمة النسبية	الأنيونات(ANIONS)	القيمة النسبية
Li^{+1}, H^{+1}	0.5	$OH^{-}1, F^{-1}$, بروبيونات	0.1
Na^{+1}	1.5	أسيتات، فورمات	0.2
$(NH_4)^{+1}$	2.0	$(HPO_4)_2^{-}, (HCO_3)^{-1}$	0.4
$Mn^{+2}, K^{+1}, Mg^{+2}, Fe^{+2,+3}$	2.5	$Cl^{-1}, (NO_2)^{-1}$	1.0
$Zn^{+2}, Co^{+2}, Cu^{+1}, Cd^{+2}$	3.0	$(HSO_3)-1, CN^{-1}$	1.5
Ca^{+2}	4.5	$(NO_2)^{-1}$	4.0
Cu^{+2}	6.0	$(ClO_3)^{-1}$	4.5
Pb^{+1}, Ag^{+1}	8.5	$(HSO4)^{-1}$	5.0
Ba^{+1}	10.0	سترات(Citrate)	9.5
		بنزين سلفونات	10.0

الاستخلاص الميكروي بالطور الصلب (Solid Phase Micro Extraction - SPME):

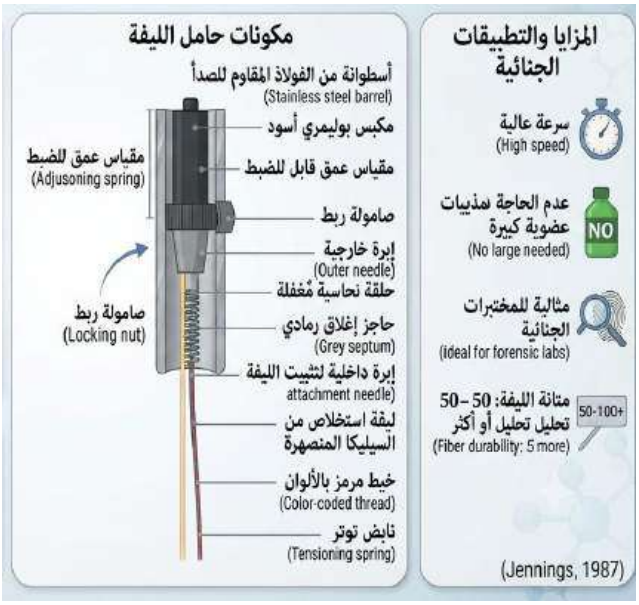
تُعد تقنية الاستخلاص الميكروي بالطور الصلب (SPME) إحدى التقنيات التحليلية المتقدمة التي أحدثت نقلة نوعية في معالجة العينات العضوية، خاصة في الأوساط المائية. تعتمد هذه التقنية على مبدأ الامتزاز المباشر للمواد التحليلية (Analytes) من مصفوفة العينة على ألياف دقيقة من السيليكا المنصهرة (Fused silica fiber) المطلية بطبقة رقيقة من طور ثابت (Stationary phase) مناسب. تتميز هذه الطريقة بكونها تقنية "خضراء" تُغني عن استخدام المذيبات العضوية الضخمة، فضلاً عن سرعة إنجازها وكفاءتها العالية في التحليل (Jennings, 1987).



آلية العمل

تتم عملية الاستخلاص عبر سلسلة من الخطوات المنهجية التي تضمن وصول النظام إلى حالة الاتزان:

1. **الامتزاز (Absorption/Adsorption):** عند غمر الليفة في العينة (سواء كانت سائلة أو في طور الغاز فوق العينة)، تبدأ المواد المحللة بالانتقال من مصفوفة العينة إلى الطور الثابت المغلف لليفة، وتستمر هذه العملية حتى الوصول إلى حالة الاتزان الديناميكي (Equilibrium).
2. **التحقين (Injection):** بعد اكتمال مرحلة الامتزاز، تُسحب الليفة وتُدخل مباشرة في منفذ الحقن لجهاز كروماتوغرافيا الغاز (GC).
3. **الانتزاز الحراري (Thermal Desorption):** يتم تسخين الليفة داخل منفذ الحقن، مما يؤدي إلى تحرر المواد المحللة بسرعة عن طريق الانتزاز الحراري وانتقالها مباشرة إلى العمود الشعري (Capillary column) للبدء بعملية الفصل والتحليل.



حامل الليفة (Fiber Holder) والوحدات الملحقة

يُصمم حامل الليفة ليكون أداة دقيقة قابلة لإعادة الاستخدام، حيث يمكن لليفة الواحدة إجراء ما يتراوح بين 50 إلى 100 تحليل أو أكثر، وذلك رهنًا بطبيعة العينات المقطوعة ومدى العناية المخبرية بها. يتألف الحامل من هيكل هندسي دقيق يشمل:

- **أسطوانة من الفولاذ المقاوم للصدأ (Stainless steel barrel)** لضمان المتانة.
- **مكبس بوليمري** للتحكم في حركة الليفة.
- **مقياس عمق قابل للضبط** مع دليل للإبرة لضمان التموضع الصحيح داخل منفذ حقن الـ GC.
- **صامولة ربط فولاذية.**

أما وحدة الألياف (Fiber assembly) المخصصة للحقن اليدوي، فتتكون من إبرة خارجية قوية قادرة على اختراق الحاجز المطاطي (Septum) الخاص بمنفذ الحقن، وهي مزودة بحلقة نحاسية (Brass ferrule) وحاجز إغلاق، وإبرة داخلية تحمل ليفة السيليكا المنصهرة. يُثبت الطرف المقابل لليفة بخيط مرمز بالألوان يشير إلى نوع الطور الثابت المستخدم، كما يعمل نابض التوتر (Tensioning spring) الموجود بين الصامولة وحاجز الإغلاق على ضمان استقرار وثبات الليفة

أثناء التشغيل. إن دمج هذه التقنية في المختبرات الجنائية والتحليلية يساهم بشكل فعال في تعزيز دقة النتائج وتقليل المخاطر البيئية المرتبطة بالمذيبات التقليدية (Jennings, 1987).

الاستخلاص بالسائل فوق الحرج (Supercritical Fluid Extraction - SFE)

تكون الغازات فوق ضغطها ودرجة حرارتها الحرجة في حالة "فوق حرجة" (**Supercritical state**)، وهي حالة وسيطة بين الغاز والسائل. تمتلك السوائل فوق الحرجة خواص استخلاص قوية لأن ذوبانية المركبات في السائل تقترب من ذوبانيتها في المذيب الحقيقي، كما أن لزوجتها المنخفضة تسمح لها بالتخلل عبر الطبقات المعبأة للعينة. وبذلك، لا يتحقق فقط تلامس فعال بين سائل الاستخلاص والعينة، بل يسهل أيضاً إزالة السائل بمجرد تحريره من حالته فوق الحرجة. وتستخدم هذه التقنية الغازات في حالتها فوق الحرجة (**Supercritical state**) التي تجمع بين ذوبانية السوائل ولزوجة الغازات المنخفضة. يعد ثاني أكسيد الكربون هو الغاز المفضل نظراً لظروفه الحرجة المعتدلة (75 بار و 31 درجة مئوية). يتم تمرير الغاز فوق الحرج عبر خراطيش العينات (تربة أو رواسب)، ثم تُحمل المواد المستخلصة لتُكثف في مصيدة باردة (**Cold trap**) قبل تبخيرها للتحليل، وهي تقنية مثالية لاستخلاص آثار المبيدات (Jennings, 1987).

ثاني أكسيد الكربون كوسط استخلاص:

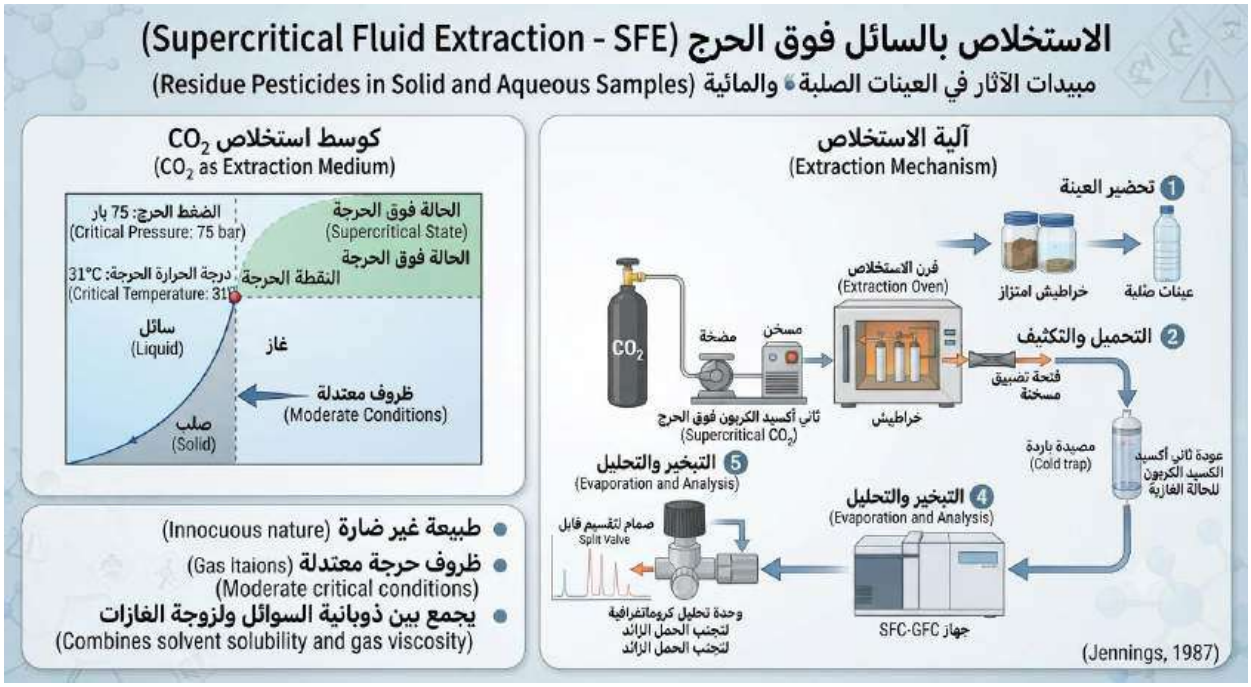
يعد **ثاني أكسيد الكربون** (CO_2) الغاز المختار دائماً لعمليات **SFE** نظراً لطبيعته غير الضارة وظروفه الحرجة المعتدلة، وهي:

- **الضغط الحرج:** 75 بار.
- **درجة الحرارة الحرجة:** 31°C. وهي ظروف يسهل تحقيقها تقنياً في الوقت الحالي.

آلية الاستخلاص:

1. يتكون حامل العينة من عدد من الخراطيش الصغيرة المصنوعة من الفولاذ المقاوم للصدأ، والتي تُملأ بالعينة.
2. تُعبأ العينات الصلبة (مثل التربة أو الرواسب) في الخراطيش دون معالجة مسبقة، أما العينات المائية فيمكن تمريرها عبر خراطيش مملوءة بممتز مناسب لتركيز الملوثات.
3. تُلقم الخراطيش في فرن الاستخلاص وخط الغاز الحامل الذي يتكون في هذه المرحلة من ثاني أكسيد الكربون فوق الحرج.
4. تُحمل المركبات المستخلصة إلى مصيدة باردة (**Cold trap**) حيث تُكثف بعد المرور بفتحة تضييق مسخنة تعيد ثاني أكسيد الكربون إلى حالته الغازية الحقيقية.
5. بعد فترة الاستخلاص، يتوقف تدوير المبرد ويتم تسخين المصيدة بسرعة لتبخير المكونات، وبالتزامن مع ذلك، يتم برمجة درجة حرارة العمود الكروماتوغرافي وفقاً للظروف المطلوبة.

يساعد صمام التقسيم القابل للضبط (**Adjustable split**) في توزيع حجم العينة لتجنب تأثير الحمل الزائد (**Overloading effect**). وتعد تقنية **SFC** مثالية لاستخلاص آثار المبيدات الحشرية في العينات الصلبة والمائية (Jennings, 1987).



طرق الاستخلاص الحديثة (Modern Methods of Extraction)

تشمل هذه الطرق أساليب متنوعة في الكروماتوغرافيا، بالإضافة إلى منهجيات استخلاص خاصة من الجيل الحالي مثل: تكوين الزوج الأيوني (**Ion-pair formation**)، والاستخلاص بالطور الصلب (**Solid Phase Extraction - SPE**)، والاستخلاص الميكروي بالطور الصلب (**SPME**)، والاستخلاص الميسلي (**Micellar extraction**). كما برزت أنواع خاصة من الهضم لعزل المواد السامة كيميائياً، مثل الهضم بالميكروويف (**Microwave digestion**) والهضم بمصدر البلازما للعينات غير العضوية، ليتم دمجها في التحليلات السمومية الروتينية.



وبسبب التدفق الكبير للأحراز (**Exhibits**)، بدأت هذه الطرق الحديثة تحل محل الطرق التقليدية لتحقيق سرعة التحليل، وأصبحت تقنيات مثل **HPLC** و **HPTLC** و **GLC** و **GC-Head Space** وتقنية فرن الميكروويف هي الطرق المفضلة. أما التقنيات الهجينة مثل **HPLC-GC** و **SFC-GC** و **GC-MS** فهي قيد التطوير لتوحيد معاييرها في السياق المخبري (Gauglitz & Vo-Dinh, 2003).

تقنية حيز الرأس والاحتجاز الديناميكي (Purge and Trap Technique & Headspace)

تعتبر طريقة حيز الرأس (**Headspace**) مناسبة بشكل خاص للفصل السريع للمكونات الطيارة (مثل الكحولات، والأسيتون، والألدهيدات) في المصفوفات الحيوية المعقدة، وخاصة الدم في حالات الخمور والقضايا المتعلقة بقوانين الحظر. تمتاز هذه الطريقة بإلغاء مخاطر التلوث بالمكونات غير الطيارة لإجراء التحليل المباشر للمادة السامة بواسطة كروماتوغرافيا الغاز.

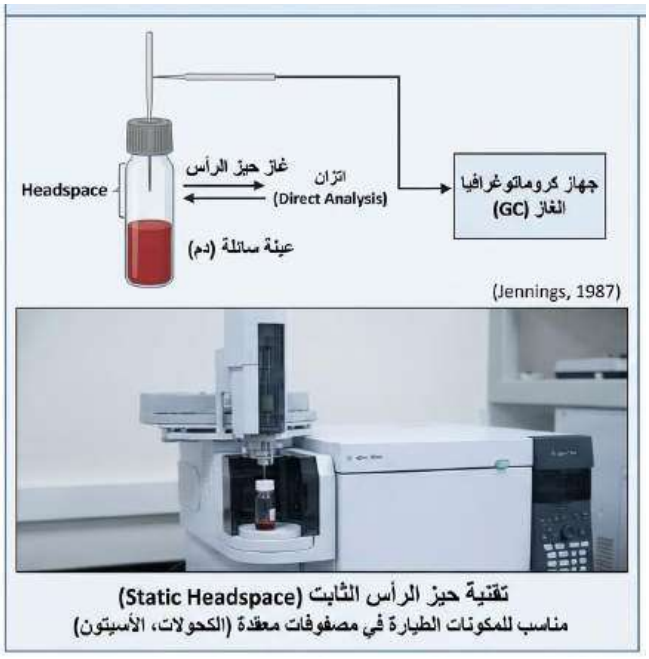


تعتمد الفكرة على الوصول لحالة اتزان (**Equilibrium**) في وعاء مغلق بين العينة السائلة والطور الغازي الذي يعلوها (حيز الرأس)، حيث يُسحب جزء من الغاز بليتم حقنه مباشرة في جهاز **GC** (Jennings, 1987). أما في تقنية التطهير والاحتجاز (**Purge and Trap**)، فيتم تحرير السموم الطيارة بتمرير غاز خامل ثم احتجازها على مادة ممتزة صلبة مثل الـ **Tenax**، وهو بوليمر مستقر حرارياً حتى **C°180**، أو استخدام **Tenax GR** المحتوي على الغرافيت لاستعادة المركبات قليلة القطبية. تُستخدم هذه التقنية لاحقاً في الانتزاز الحراري (**Thermal desorption**) وتبخير المواد فجائياً للتحليل الكروماتوغرافي، وهي فعالة جداً في الكشف عن التركيزات الضئيلة بنطاق جزء من المليار (**ppb**) (Dionex, n.d).

تقنية حيز الرأس الديناميكي، وطريقة التطهير والاحتجاز (Dynamic Headspace, Purge and Trap Technique):

تعد هذه التقنيات نسخاً مطورة أو إصدارات أعلى من طريقة حيز الرأس التقليدية، وذلك لتحسين فصل المواد الطيارة للتحليل المباشر بواسطة كروماتوغرافيا الغاز (**GC**). في طريقة **التطهير والاحتجاز** (**Purge and Trap**)، يتم تحرير المركبات الطيارة (السموم) من العينة عن طريق تمرير فقاعات من غاز حامل خامل، ثم يتم بعد ذلك إما تكثيفها في مستقبل مبرد عادةً بثاني أكسيد الكربون الصلب أو النيتروجين السائل، أو امتزازها على خرطوشة (**Cartridge**) مملوءة بمادة ممتزة صلبة مثل الـ **Tenax**.

الـ **Tenax** هو بوليمر يعتمد على ثنائي فينيل-بي-فينيلين أوكسيد، ويتوفر بأشكال متعددة؛ منها **Tenax TA** وهو شكل عالي النقاء ومستقر حتى درجة حرارة **C°375**، ولا يعطي انبعاثات عضوية تذكر. أما المادة المناسبة لاستعادة المركبات ذات الوزن الجزيئي المنخفض فهي **Tenax GR** الذي يحتوي على **23%** غرافيت. هذا الممتز مناسب للاحتجاز الفعال للمركبات ذات القطبية المنخفضة إلى المتوسطة واستعادتها كمياً إما عن طريق الاستخلاص بالمذيبات أو **الانتزاز الحراري** (**Thermal desorption**). بعد فترة وجيزة، يتم تبخير المواد الطيارة المحتجزة فجائياً (**Flash vaporized**) في تيار من الغاز الحامل لتحليلها بواسطة **GC**.



تقنية حيز الرأس الثابت (Static Headspace)
مناسب للمكونات الطيارة في مصفوفات معقدة (الكحولات، الأسيتون)

بدلاً من ذلك، يمكن استخدام خراطيش مملوءة بالكربون المنشط لاحتجاز المواد الطيارة، والتي يتم استخلاصها بعد ذلك في حجم صغير من ثنائي كبريتيد الكربون قبل التحليل. تُستخدم هذه التقنية على نطاق واسع في تحليل المركبات الطيارة في عينات المياه، لصعوبة تفسير النتائج عند التركيزات الأقل من تلك التي يمكن قياسها باستخدام طريقة حيز الرأس العادية. وتتشابه تقنية التطهير والاحتجاز مع أخذ عينات حيز الرأس الديناميكي، باستثناء أن الغاز يمر عبر العينة نفسها. تتوفر كل من الطرق الديناميكية وطرق التطهير في مجموعة متنوعة من الأنظمة الآلية، لتمكين فصل المكونات ذات التركيزات الضئيلة في نطاق جزء من المليار (**ppb**) إلى جزء من التريليون (**ppt**).

الاستخلاص الميسلي والتفاعل المتسارع بالميكروويف (Microwave Extraction & Micellar)

يوظف الاستخلاص الميسلي (**Micellar extraction**) البيئة الميسلية للمواد الخافضة للتوتر السطحي (**Surfactants**) عند التركيز الميسلي الحرج (**CMC**) لإذابة الدهون وإزالة البروتينات (**Deproteinization**) من الأحشاء، مما يسهل عزل السموم في السائل الطافي (**Supernatant**). أما نظام التفاعل المتسارع بالميكروويف (**Microwave Accelerated Reaction System**)، فيعتمد على التسخين السريع للعينة مع المذيب تحت ضغط مرتفع، مما يسمح باستخلاص مبيدات مثل **المونوكروتوفوس** في غضون 15-20 دقيقة عند درجة حرارة 80-100 درجة مئوية، كما يُستخدم في هضم المواد الحيوية لعزل المعادن السامة مثل الزرنيخ والرصاص (Lundquist, 1962).

نظام استخلاص بقايا الآثار العالمي (Universal Trace Residue Extraction - UNITREX)

يُعد هذا النظام نظاماً متطوراً لاستعادة المبيدات الحشرية والبقايا العضوية من مجموعة واسعة من العينات، بما في ذلك المواد الحيوية. يعتمد النظام على مبدأ **التقطير المشترك بالكنس** (**Sweep co-distillation**)، الذي يرتكز بدوره على **التطاير التفضيلي** (**Preferential volatilization**) للمبيدات أو الكيماويات العضوية الأخرى من المواد الحيوية والدهون والمستخلصات النباتية باستخدام تيار من غاز خامل، يليه عزل هذه المواد الطيارة في مصائد باردة (**Cold traps**) أو على ممتزات صلبة. وتعتبر هذه العملية تقنية "تطهير واحتجاز" (**Purge and trap**) تتضمن تشتيت العينة في أغشية رقيقة على حبيبات زجاجية خاملة عند درجات حرارة مرتفعة.

تم تصميم نظام المستخلص خصيصاً لاستعادة المركبات العضوية الكلورية (**Organochloro**) والعضوية الفوسفورية (**Organophosphorous**) المستقرة حرارياً من الدهون واللحوم والزبدة والأحشاء (**Viscera**). وفي الوقت الحالي، لا يحتوي أنبوب التقطير على حبيبات زجاجية أو صوف زجاجي لأن ذلك يقلل من نسبة الاستعادة؛ وبدلاً من ذلك، وُجد أن استخدام **الفلوريسيل** (**Florisil**) مع كبريتات الصوديوم يعطي نتائج مرضية لاحتجاز فئات مختلفة من المركبات العضوية الطيارة. كما تُعد الألومينا والسيليكا جل والـ **Tenax** مواد ذات إمكانات واعدة للعمل كوسائط احتجاز تتفوق على الفلوريسيل في تطبيقات محددة.



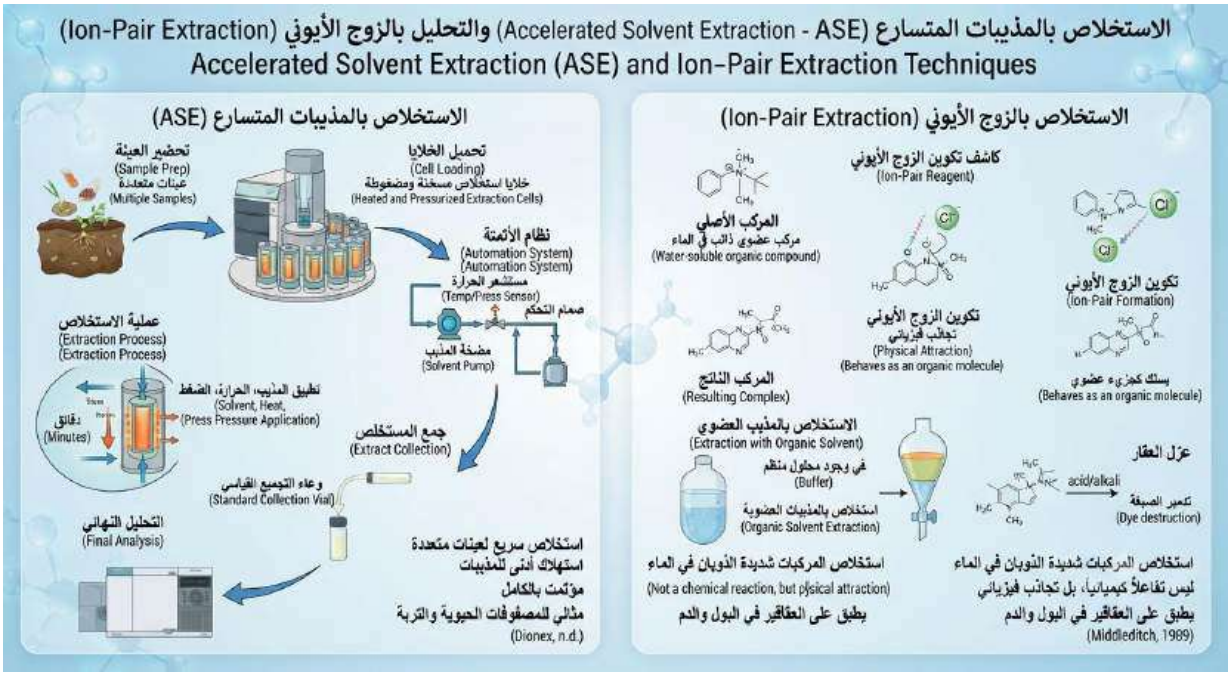
ومن المتوقع ألا تنجح هذه الطريقة مع المبيدات غير المستقرة حرارياً (**Thermally labile**). وتمتاز باستهلاك أدنى للمذيبات، وهي عملية "اثنين في واحد"؛ أي أنها تحقق الاستخلاص والتنقية (**Clean up**) معاً في وقت قصير جداً وبكلفة اقتصادية منخفضة مقارنة بطرق الاستخلاص التقليدية بالمذيبات (Jennings, 1987).

الاستخلاص بالمذيبات المتسارع (Accelerated Solvent Extraction - ASE)

يشير اسم هذه الطريقة إلى القدرة على التعامل مع عينات متعددة في وقت قصير جداً بواسطة نظام استخلاص محدث يعمل بنفس مبدأ مستخلص بقايا الآثار العالمي (التقطير المشترك بالكنس). في هذه الطريقة، يتم ضخ مذيب شائع الاستخدام في خلية استخلاص تحتوي على العينة، ثم تُرفع درجة حرارتها وضغطها. وبعد دقائق، يُنقل المستخلص من الخلية المسخنة إلى وعاء تجميع قياسي (**Collection vial**) لإجراء تحليل التنقية. وعملية الاستخلاص بالكامل مؤتمتة وتتم في دقائق، مما يسمح باستخلاص سريع وسهل لعينات متعددة بأقل استهلاك للمذيبات. وتتطلب هذه الطريقة الوصول إلى الظروف التحليلية المثالية لتطبيقها على المصفوفات الحيوية في العمل السمومي الجنائي لتشمل طيفاً واسعاً من المبيدات، علماً بأنها أثبتت كفاءة عالية في عينات التربة (Dionex, n.d.).

الاستخلاص بالزوج الأيوني (Ion-Pair Extraction):

تُطبق هذه الطريقة لاستخلاص المركبات العضوية شديدة الذوبان في الماء، والتي لا يمكن استخلاصها من العينات عن طريق الاستخلاص المباشر بالمذيبات. وقد تم التغلب على هذه الصعوبة عن طريق تكوين **زوج أيوني** (**Ion pair**) مع كاشف مناسب، مثل أملاح الأمونيوم الرباعية التي تعمل كعامل تكوين للأزواج الأيونية. تكوين الزوج الأيوني هو عبارة عن تجاذب بين شحنة موجبة وأخرى سالبة؛ وهو ليس تفاعلاً كيميائياً بالمعنى التقليدي بقدر ما هو تجاذب فيزيائي. وبمجرد تشكل هذا الزوج، فإنه يسلك سلوك الجزيء العضوي تماماً وليس كمركب أيوني، مما يسمح بإجراء الاستخلاص لاحقاً بواسطة المذيبات العضوية، ويفضل أن يكون ذلك في وجود محلول منظم (**Buffer**). وتُطبق هذه الطريقة أيضاً لاستخلاص العقاقير التي توجد على شكل أملاح رباعية في البول أو الدم. حيث يتم إزالة البروتينات (**Deproteinization**) من المصفوفات الحيوية ومعالجتها بصبغة اختيارية في وجود محلول منظم لتكوين **معقد (عقار-صبغة)**، والذي يتم استخلاصه بواسطة مذيب عضوي. بعد ذلك، يتم تدمير الصبغة بفعل حمض أو قلوي، ويُعزل العقار لإجراء التحليل (Middleditch, 1989).



استخلاص السموم الطيارة بالتقطير (Extraction of Volatile Poisons by Distillation):

تُطبق هذه الطريقة لاستخلاص السموم العضوية أو غير العضوية الطيارة تحت ظروف مختلفة من الرقم الهيدروجيني (**pH**)، سواء كانت حمضية أو قلوية (Lundquist, 1962).

التقطير المتعادل والحمضي (Neutral and Acid Distillation)

الإجراء العملي: يتم أخذ **50 جراماً** من الأحشاء (**Viscera**) المفرومة جيداً، أو محتويات المعدة، أو القيء، أو أي مواد أخرى مراد فحصها. يجب التنبيه على **عدم خلط** هذه العينات بل يتم فحص كل منها على حدة. تُخفف العينة بإضافة 3 إلى 5 أضعاف حجمها من الماء المقطر لتصل إلى قوام يشبه "الحساء الرقيق"، ثم تُحمّض باستخدام **حمض الطرطريك** (**Tartaric acid**) أو حمض الكبريتيك، وتخضع للتقطير البخاري.

ملاحظات التشغيل:

- يجب تبريد المكثف ودورق الاستقبال جيداً (خاصة في المواسم الحارة) باستخدام الجليد.
- يُغمر طرف المكثف في كمية قليلة من الماء أو محلول هيدروكسيد الصوديوم (**NaOH**) حسب الحاجة.
- تُوضع قطع من "حجر الخفاف" (**Pumice stone**) في الدورق لمنع حدوث الفوران المفاجئ (**Bumping**).
- يُفضل جمع المقطر في 4 أو 5 أجزاء؛ بحيث لا يتجاوز الجزء الأول **20 مل**، والأجزاء التالية **50 مل** لكل منها.
- يُسخن الدورق المحتوي على العينة في حمام مائي.

▶ **حالة خاصة (الفوسفور):** إذا كان هناك اشتباه بوجود الفوسفور، يجب إجراء التقطير في غرفة مظلمة مع وضع حاجز أسود بين الموقد والمكثف لملاحظة **الوميض الفسفوري** (**Phosphorescence**) بوضوح.

▶ **المواد المستخلصة:** يحتوي المقطر الناتج على الكحولات، البارالدهيد، الألدهيدات الأخرى، الأسيتون، حمض الكربوليك والفينول، ثنائي كبريتيد الكربون، الثيمول، الكافور، التربنتين، النيتروجليسرين، البنزين، والأحماض الطيارة الأخرى. أما بالنسبة للسيانيد وحمض الكربوليك، فيُجمع المقطر في **10 مل** من محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز **0.1 عياري**.

التقطير القلوي (Alkaline Distillation)

بعد الانتهاء من التقطير الحمضي، يُترك الدورق ليبرد، ثم يتم تحويل محتوياته إلى الوسط القلوي بإضافة محلول هيدروكسيد الصوديوم (**NaOH**). يتم تقطير الخليط القلوي مرة أخرى بنفس الطريقة السابقة، ويُجمع المقطر في جزأين؛ الأول حوالي **20 مل** والثاني **50 مل**. **المواد المستخلصة:** قد يحتوي هذا المقطر على الأنيلين، البيريدين، النيكوتين، الكونيين، الأمونيا، والقواعد الطيارة الأخرى (Lundquist, 1962).

استخلاص المعادن السامة في المصفوفات (Extraction of Toxic Metals in Matrices)

المصفوفات غير الحيوية (Non-Biological Matrices):

تخضع هذه المصفوفات للتحليل الكيميائي عبر تحضير محاليل من العينات وإجراء تحليل مجموعات نظامي (**Systematic group analysis**) للكشف عن المعادن.

المصفوفات الحيوية (Biological Matrices):

نظراً لأن المادة العضوية تشكل الجزء الأكبر من هذه العينات، يجب تدميرها بوسائل كيميائية لتحرير الأيونات المعدنية تماماً للتحليل الكيفي والكمي. تشمل الطرق المتبعة ما يلي:

1. **طريقة الرماد الجاف (Dry Ashing Method):** تسخين العينة في فرن لفح لتدمير المادة العضوية.
2. **طريقة الهضم الرطب (Wet Digestion):** أو الهضم الحمضي باستخدام أحماض قوية مؤكسدة.
3. **طريقة فريزينيوس وبابو (Fresenius and Babo Method):** وهي طريقة كلاسيكية موثوقة في الكيمياء الجنائية لتدمير المادة العضوية باستخدام حمض الهيدروكلوريك وكلورات البوتاسيوم.
4. **المعالجة الكيميائية الانتقائية (Selective Chemical Treatment).**

طريقة الرماد الجاف (Dry Ashing Method)

يتم أخذ حوالي **10 جم** من الأنسجة أو المواد البيولوجية الأخرى في **جفنة سيليكا (Silica crucible)**، وتُسخن على **لهب بنزن (Bunsen burner)** لإزالة الرطوبة وتدمير المواد العضوية جزئياً. بعد ذلك، توضع الجفنة في **فرن متموج (Muffle furnace)**، حيث تُرفع درجة حرارة الفرن إلى **550 درجة مئوية**، وعند هذه الدرجة يتم إجراء **الرماد الكامل (Incineration)** للمادة العضوية بترك الجفنة لمدة ساعة واحدة (Ghosh & Bagchi, 1948). وبعد اكتمال عملية الرماد، تُخرج الجفنة ويُلاحظ لون **الرواسب (Residue)** وهي ساخنة؛ ففي حالة وجود **الزنك (Zinc)** يتخذ الراسب لوناً أصفراً، بينما في حالة وجود **النحاس (Copper)** يكون لون الراسب مائلاً إلى الخضرة المزرقة. تُغلى الرواسب الموجودة في حوض السيليكا مع **10 مل** من **حمض الهيدروكلوريك (Hydrochloric acid)** بتركيز 4(N) ثم تُصفى. يُختبر المحلول الحمضي الصافي للكشف عن **السموم المعدنية (Metallic poisons)** مثل النحاس، البزموت، الزنك، والباريوم وغيرها، وذلك بإجراء **تحليل المجموعات العام (General group analysis)** باستخدام **الأساليب الدقيقة (Micro methods)**، والتقنيات الكروماتوغرافية والآلية (Maehly, 1981; Stahl, 1969).

طريقة الهضم الرطب (Wet Digestion Method)

الإجراء (Procedure): يتم وضع **100 جم** من المواد البيولوجية أو **10 مل** من الدم في **دورق كيلدال (Kjeldahl flask)** كبير، ويُضاف من **20 إلى 40 مل** من **حمض النيتريك المركز (Conc. HNO3)** لتغطية المادة، ثم يُسخن الدورق

بلطف على لهب صغير حتى تبدأ الكتلة في التميع. يستمر التسخين حتى يكتمل تميع المادة، ويجب أن يتم ذلك في ظل وجود أبخرة بنية كثيفة من **ثاني أكسيد النيتروجين (Nitrogen dioxide)** داخل الدورق (Curry, 1976). في هذه المرحلة، يُضاف حوالي **20-30 مل** من **حمض الكبريتيك المركز (Conc. H_2SO_4)** ويُسخن الدورق بقوة فوق **شبكة سلكية (Wire gauge)**، ويُضاف حمض النيتريك المركز قطرة بقطرة (باستخدام **قمع تنقيط - Dropping funnel**) بمعدل **10 قطرات في الدقيقة** تقريباً، بحيث لا يخلو جو الدورق في أي وقت من الأبخرة البنية. يستمر التسخين حتى يتم تدمير جميع المواد العضوية ويصبح السائل صافياً وعديم اللون أو بلون القش (Stewart & Stolman, 1961).

وللتأكد من اكتمال **الأكسدة (Oxidation)**، يُسخن الدورق دون إضافة أي حمض نيتريك؛ فإذا كان هناك أي مادة عضوية غير محترقة، يبدأ السائل في التحول إلى اللون الداكن، أما إذا كان **الهضم (Digestion)** مكتملاً، فلا يحدث أي اسوداد وتتصاعد أبخرة بيضاء من **ثالث أكسيد الكبريت (SO_3)**. في الحالة الأولى، يستمر إضافة الحمض والتسخين حتى تتأكسد المادة العضوية تماماً. ثم يُستمر في التسخين القوي لمدة **15 دقيقة** إضافية لطرد حمض النيتريك تماماً (Clarke, 1986). وبعد التبريد، يُضاف **25 مل** من محلول **أوكسالات الأمونيوم المشبع (Saturated ammonium oxalate)**، ويُغلى السائل حتى تظهر أبخرة SO_3 لضمان الإزالة الكاملة لحمض النيتريك. ثم يُبرد ويُخفف بحجم مساوٍ من الماء ويُنقل بعناية إلى مخبار. يُسخن المخبار على **لوح تسخين (Hot plate)** أو حمام رملي لطرد الفائض من حمض الكبريتيك. يُبرد المحلول ويُخفف بالماء بحيث تكون قوة الحمض في حدود **10%**. في هذه المرحلة، قد يتكون راسب يحتوي على أملاح غير قابلة للذوبان من **الرصاص، البزموت، القصدير، الباريوم، الاسترونشيوم أو الفضة**. يُرشح الراسب ويُختبر للمعادن المذكورة، بينما يحتوي **الراشح (Filtrate)** على جميع المعادن الأخرى باستثناء **الزئبق**، ويخضع لتحليل المجموعات المنتظم والتقدير الكمي حسب الحاجة (Lundquist, 1962; Bamford, 1940).

طريقة فريزينيوم وبابو - للزئبق (Fresenium and Babo Method - for Mercury)

إن طريقة حمض النيتريك والكبريتيك لتدمير المواد العضوية ليست مناسبة على الإطلاق للكشف عن **الزئبق (Mercury)**، الذي يُفقد بالكامل تقريباً بسبب **التطاير (Volatilization)**. وتعتبر هذه الطريقة (فريزينيوم وبابو) هي الأكثر ملاءمة لتحرير الزئبق رغم وجود احتمالية لفقدان جزء منه بالتبخر (Stas, 1851; Otto, 1856).

الإجراء (Procedure): تؤخذ كمية محددة من المادة البيولوجية (مثلاً **20-25 جم** من الأحشاء أو **5-10 مل** من الدم) في دورق مزود بـ **مكثف مرتد (Reflux condenser)**. في حالة الأحشاء أو المواد الصلبة الأخرى، يُضاف ماء كافٍ لجعل القوام شبيهاً بالهريس. يُضاف ثلث حجمه من **حمض الهيدروكلوريك (Hydrochloric acid)** النقي كيميائياً وبضعة جرامات من **كلورات البوتاسيوم الصلبة (Solid KClO3)**.

تُخلط المكونات بالرج، ويُسخن المزيج فوق شبكة سلكية على لهب أو في **حمام مائي مغلي (Boiling water bath)**. تُضاف كميات صغيرة من كلورات البوتاسيوم من وقت لآخر مع رج الدورق، حيث ينبعث **غاز الكلور (Chlorine gas)**. يستمر التسخين حتى تصبح محتويات الدورق سائلاً متجانساً بلون القش وخالياً من المواد العضوية باستثناء بعض المواد الدهنية العالقة التي لا يمكن أكسدتها. إذا لم يؤدِ التسخين لمدة ساعة بعد آخر إضافة للكلورات إلى اسوداد المزيج، يمكن اعتبار أكسدة المادة العضوية قد اكتملت، وتستغرق هذه المرحلة عادة من **4 إلى 6 ساعات** (Gour, 1972). يتم الترشيح والغسل بالماء، وتُجمع السوائل المرشحة. يُضاف كمية كافية من **كبريتيت الصوديوم (Sodium sulphite)** أو البيكبريتيت لاختزال

الكلور الزائد إلى حمض هيدروكلوريك. يُدفأ السائل في حمام مائي ويُمرر تيار من الهواء لطرد الفائض من **ثاني أكسيد الكبريت (SO_2)**، ليصبح المحلول بعدها جاهزاً للتحليل (Jennings, 1987; Ewing, 1990).

المعالجة الكيميائية الانتقائية (Selective Chemical Treatment)

يمكن إخضاع بعض المعادن السامة، وتحديداً **الزرنيخ (Arsenic)** و**الأنتيمون (Antimony)** في حالة أكسدتهما النوعية (+3)، لعملية اختزال بواسطة **الهيدروجين الوليد (Nascent hydrogen)** -الناتج عن التفاعل بين الزنك وحمض الكبريتيك المخفف- وذلك لعزل المعادن من قوالب مادية (Matrices) مثل العظام المحروقة، الأظافر، الشعر، والمواد غير البيولوجية مثل مستحضرات الطعام والمشروبات والشاي والقهوة، حيث تظهر على شكل **هيدريدات متطايرة (Volatile hydrides)** وهي (ASH3 و SbH3).

يمكن إجراء هذه العملية بواسطة **طريقة غوتزيت (Gutzeit method)** أو **طريقة مارش بيرزيليوس (Marsh Berzelius method)**. وتعتبر هذه الطريقة مزدوجة (Two in one) حيث تدمج بين العزل والكشف المباشر أو التقدير الكمي (Sethi, 1996; Gauglitz & Vo-Dinh, 2003).

في حالة وجود الزرنيخ والأنتيمون في حالة أكسدة أعلى (+5)، يجب إجراء الاختزال إلى الحالة (+3) قبل المعالجة الكيميائية. ويجب ألا ينحاز المحلل للنتائج الإيجابية فوراً، حيث توجد احتمالات للتداخل (Interference) بسبب وجود الفسفور أو الكبريتيد أو الزرنيخ/الأنتيمون في القالب نفسه. لذا يجب إجراء **اختبار أعمى (Blank test)** دائماً للتأكد من خلو الكواشف أو القالب الأصلي من هذه المعادن (Whelpton, 1984).

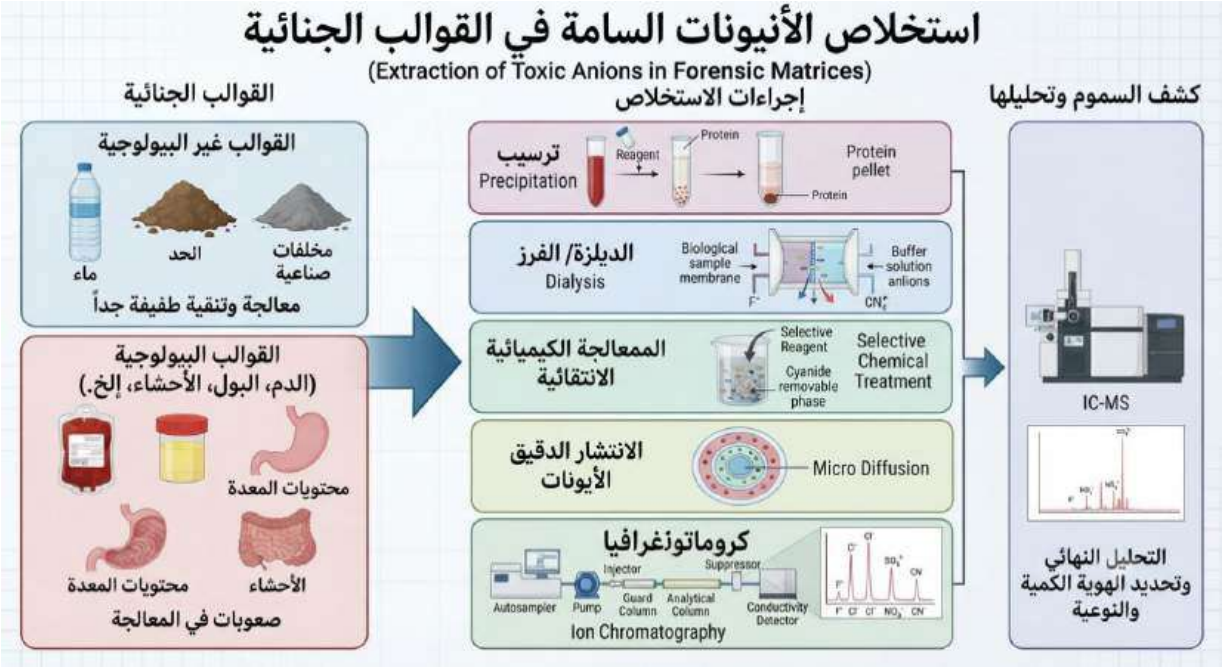
استخلاص الأنيونات السامة في القوالب الجنائية (Extraction of Toxic Anions in Forensic Matrices)

يتطلب استخلاص **الأنيونات السامة (Toxic anions)** في القوالب غير البيولوجية معالجة وتنقية طفيفة جداً. تكمن الصعوبات في حالة القوالب البيولوجية مثل **الأحشاء (Viscera)**، ومحتويات المعدة، وغسول المعدة، والبول، والدم. وتشمل إجراءات الاستخلاص الطرق التالية:

- ترسيب البروتين (Protein Precipitation).
- الديلزة/الفرز الغشائي (Dialysis).
- المعالجة الكيميائية الانتقائية (Selective Chemical Treatment).
- الانتشار الدقيق (Micro Diffusion).
- كروماتوغرافيا الأيونات (Ion Chromatography).

ترسيب البروتين (Protein Precipitation)

يتم تحضير **ملاط (Slurry)** من العينة (10-20 جم من الأحشاء المفرومة أو محتويات المعدة). يتم تخثير البروتين في العينة بإضافة 0.5 - 1.0 جم من **كبريتات الأمونيوم (Ammonium sulphate)**. يُرشح المزيج عبر طبقة سمكها 2 سم من القطن الطبي الموضوع في أسطوانة حقنة. يتم ترسيب الفائض من كبريتات الأمونيوم في الراشح بواسطة **الميثانول (Methanol)**. يُجمع السائل الطافي ويُبخر إلى حجم صغير فوق حمام مائي، ليصبح السائل المركز جاهزاً لتحليل الأنيونات (Middleditch, 1989; A.O.A.C., 1980).



الديلزة / الفرز الغشائي (Dialysis)

يتم تقطيع **10 جم** من الأنسجة إلى قطع صغيرة وتوضع في غشاء سيلوفان مصمم على شكل كيس. يتم تدوير الكيس ببطء في مخبار يحتوي على **100 مل** من الماء المقطر بواسطة محرك كهربائي أو جهاز ميكانيكي. تحدث **الديلزة (Dialysis)** بسرعة؛ وبعد ساعة واحدة، يُستبدل الماء في المخبار بماء عذب ويستمر تدوير الكيس لنصف ساعة إضافية. يُؤخذ الماء بعد ذلك، ويُخلط مع الجزء السابق ويُبخر فوق حمام مائي إلى حجم صغير. يُرشح السائل إذا لزم الأمر ويُختبر للأنيونات السامة (Jones & Singer, 1989).

المعالجة الكيميائية الانتقائية (Selective Chemical Treatment)

تُخضع **الفوسفيدات (Phosphides)** و**الكبريتيدات (Sulphides)** الموجودة في القوالب البيولوجية (الأحشاء، محتوى المعدة) للمعالجة بحمض مخفف فوق لوح تسخين أو حمام مائي. المواد السامة التي تتحرر على شكل **فوسفين (PH_3)** أو **كبريتيد الهيدروجين (H_2S)** تخضع للتحليل الكيميائي (Dionex, n.d.).

الانتشار الدقيق (Micro-Diffusion)

يمكن استخدام هذه الوحدة التشغيلية للقوالب البيولوجية (الدم، البول، غسول المعدة) وغير البيولوجية (الماء، المشروبات) التي تحتوي على آثار من الأنيونات السامة مثل **السيانيد (Cyanide)**، الفوسفيد، والكبريتيد. يتم ذلك باستخدام كاشف تحرير وختم وكشف انتقائي في **جهاز كونواي للانتشار الدقيق (Conway Micro-Diffusion assembly)**. وتُستخدم هذه الطريقة أيضاً للسموم المتطايرة مثل الإيثانول، الميثانول، الأسيتالدهيد، والكلوروفورم، والغازات السامة مثل أول أكسيد الكربون، والنيترات (Curry, 1976; Bough, 1993).

وصف جهاز كونواي للانتشار الدقيق (Description of Conway Micro-Diffusion Assembly)

يتكون الجهاز من خلايا مصنوعة من مادة **البولي بروبيلين (Polypropylene cells)** من نوع "أوبرينك"، مع أغطية شفافة من **البوليسترين (Polystyrene covers)**. تحتوي الخلايا على بئر حلقي خارجي مخصص للإغلاق المحكم، وبئر حلقي متوسط للعينة وعامل التحرير، وبئر مركزي للكاشف المستخدم لامتصاص الغاز أو البخار المنتشر.

خطوات العمل: يتم وضع **عامل الختم (Sealing agent)** (عادةً 2 مل) في البئر الخارجي. ثم توضع كمية تقريبية (1 مل) من **عامل التحرير (Liberating agent)** في نصف البئر المتوسط (عادةً ما يكون عامل الختم هو نفسه عامل التحرير، مثل حمض الكبريتيك بتركيز 10% لأول أكسيد الكربون، أو محلول كربونات الصوديوم المشبع للميثانول والإيثانول).

يُوضع **عامل الامتصاص (Trapping agent)** في البئر المركزي (على سبيل المثال: محلول كلوريد البالاديوم $PdCl_2$ للكشف عن أول أكسيد الكربون حيث يتحول للون الأسود، أو ثاني كرومات البوتاسيوم المحمضة التي تتحول للون الأخضر في حالة الميثانول أو الإيثانول). تُضاف العينة (1 مل) في النصف الآخر من البئر المتوسط مع الحرص على عدم اختلاطها بعامل التحرير قبل الإغلاق. يُوضع الغطاء وتُدور الخلية لضمان **الإغلاق المحكم (Airtight seal)**، ثم تُرج الخلية ذهاباً وإياباً لخلط العينة مع عامل التحرير. تُوضع الخلية على الطاولة أو في حمام مائي إذا استلزم التفاعل ذلك. يتم تحضير **عينة ضابطة (Control sample)** بنفس الطريقة ولكن باستخدام الماء بدلاً من العينة الفعلية، ويُلاحظ تغير اللون في الحجرة المركزية (Curry, 1976; Bough, 1993).

استخلاص السموم العضوية غير المتطايرة (Extraction of Non-volatile Organic Poisons)

تشمل هذه المجموعة طيفاً واسعاً من **المبيدات الحشرية (Pesticides)**، وفئات مختلفة من الأدوية (حمضية، قاعدية، متعادلة، ومترددة)، والسموم النباتية (خاصة القلويدات والجليكوسيدات). ومن بين هذه الفئات، تشكل المبيدات الحشرية أكثر من 80% من حالات التسمم القاتلة في معظم ولايات الهند. لذا، فإن استخلاص المبيدات يتطلب نقاشاً منفصلاً، وفي الوقت ذاته يجب تفصيل طرق استخلاص فئات الأدوية المتنوعة والسموم النباتية لتطبيقاتها المختلفة (Stewart & Stolman, 1961; Jones & Singer, 1989).

استخلاص المبيدات الحشرية في القوالب المادية (Extraction of Pesticides in Matrices)

يعتبر استخلاص المبيدات الحشرية من المواد البيولوجية (مثل الأحشاء، محتويات المعدة، غسول المعدة، والدم) أمراً صعباً بسبب تداخل **الدهون (Fat)**، والبروتينات المتحللة، والمواد الملونة الموجودة في تلك الأوساط. تتطلب هذه المستخلصات عملية **تنقية (Clean up)** دقيقة، باستثناء **طريقة المذيلات (Micellar method)**. أما الاستخلاص من القوالب غير البيولوجية فهو عملية شاقة قد تتطلب تنقية بسيطة أو قد لا تتطلبها إطلاقاً. تعتمد الطرق الموضحة أدناه على **الاستخلاص بالمذيبات (Solvent extraction)** مع إجراء عملية **النزع (Stripping)** تحت ظروف متنوعة مثل طبيعة القالب ونوع المذيب العضوي المستخدم (Middleditch, 1989; Sethi, 1996).

الطريقة الأولى (Method – I)

تُهرس المواد البيولوجية (الأحشاء، محتويات المعدة، أو غسول المعدة، إلخ) لتتحول إلى **ملاط ناعم (Fine slurry)** عن طريق خلطها بكمية مساوية من **كبريتات الصوديوم اللامائية (Anhydrous sodium sulphate)**، ثم تُنقل إلى دورق مخروطي مزود بـ **مكثف هوائي (Air condenser)**. يُضاف **50 مل** من **الهكسان العادي (n-hexane)** إلى الدورق

ويُسخن على حمام مائي ساخن لمدة ساعة واحدة. تُبرد المحتويات وتُصفى، ثم يُستخلص الملاط المتبقي مرتين باستخدام **25 مل** من الهكسان. وتُجمع أجزاء الهكسان المفلترة وتوضع في **قمع فصل (Separating funnel)**. تُرج طبقة الهكسان بقوة مع **15 مل، 10 مل، و10 مل** من **الأسيتونتريل (Acetonitrile)** الذي سبق إشباعه بالهكسان. تُخلط طبقات الأسيتونتريل وتوضع في قمع فصل نظيف آخر وتُخفف بمقدار 10 أضعاف بالماء المقطر. يُضاف إليها **25 مل** من محلول كبريتات الصوديوم المشبع وتُستخلص ثلاث مرات بـ **25 مل** من الهكسان. تُجمع طبقات الهكسان، وتُركز إلى **5 مل** بالتبخير، ويُضاف إليها **5 جم** من كبريتات الصوديوم اللامائية، ثم يُبخر المستخلص عند الحاجة للتحليل (Stahl, 1969; Jennings, 1987).

الطريقة الثانية (Method – II)

يتم خلط **50 جم** من الأنسجة المهروسة أو المواد البيولوجية مع كمية مساوية من كبريتات الصوديوم اللامائية و**100 مل** من **الأسيتون (Acetone)** في دورق مخروطي، ثم يتم إجراء **تكثيف مرتد (Reflux)** على حمام مائي ساخن لمدة ساعة واحدة. بعد التبريد، يُصفى مستخلص الأسيتون، ويُستخلص الراسب مرتين بـ **50 مل** إضافية من الأسيتون. وتُجمع أجزاء الأسيتون وتُركز بالتبخير حتى **50 مل** للمعالجة اللاحقة (**التنقية - Clean up**). يُنقل مستخلص الأسيتون (50 مل) إلى قمع فصل ويُخفف بـ **150 مل** من الماء، ويُضاف إليه **20 مل** من محلول كبريتات الصوديوم المشبع. تُستخلص المحتويات ثلاث مرات بـ **25 مل** من **الكلوروفورم (Chloroform)** مع الرج اللطيف. تُجمع مستخلصات الكلوروفورم، وتُغسل بمزيج (الماء والأسيتون بنسبة 1:1) وأخيراً بـ **50 مل** من الماء. تُمرر طبقة الكلوروفورم المغسولة عبر كبريتات الصوديوم اللامائية ثم تُبخر حتى الجفاف بتمرير الهواء. يصبح الراسب بعدها جاهزاً للتحليل (Maehly, 1981; Curry, 1976).

الطريقة الثالثة: استخلاص المبيدات من غسول المعدة، البول، والقيء

تُؤخذ العينة (20 مل من غسول المعدة أو البول، أو 20 جم من القيء) في دورق مخروطي، ويُضاف إليها **50 مل** من الهكسان العادي. يتم إجراء **تكثيف مرتد (Reflux)** على حمام مائي لمدة نصف ساعة. بعد التبريد، يُصفى السائل ويُخلط مع **20 مل** من الهكسان ويُوضع في قمع فصل. تُفصل طبقة الهكسان، وتُمرر عبر كبريتات الصوديوم اللامائية وتُبخر حتى الجفاف بتمرير تيار من الهواء الجاف. يصبح الراسب جاهزاً للتحليل (Lundquist, 1962).

الطريقة الرابعة: استخلاص المبيدات من الدم

تُخلط عينة الدم (**20 مل**) مع **10 مل** من محلول **تنجستات الصوديوم (Sodium tungstate)** بتركيز 10% و**15 مل** من حمض الكبريتيك بتركيز 1(N)، وتُرج لمدة دقيقتين ثم تُصفى. يُحتفظ بالراشح جانباً، ويُغسل الراسب مرتين بـ **15 مل** من حمض الكبريتيك بتركيز 0.1(N). تُجمع سوائل الغسيل وتُخلط مع الراشح المحفوظ، وتُنقل إلى قمع فصل وتُستخلص ثلاث مرات بـ **20 مل** من الهكسان العادي. تُجمع طبقات الهكسان، وتُمرر عبر كبريتات الصوديوم اللامائية ويُزال المذيب بتمرير تيار من الهواء كما ذكر في الطرق السابقة. يُحفظ الراسب للتحليل (Stewart & Stolman, 1961; Whelpton, 1984).

الطريقة الخامسة (Method – V)

الاستخلاص المباشر للمبيدات بالمذيبات متبوعاً بالتنقية للمواد البيولوجية: يتم خلط المواد البيولوجية (**50 جم من الأحشاء**) مع **5 جم** من **كبريتات الأمونيوم (Ammonium sulphate)** وتجانس جيداً. بعد إضافة **100 مل** من **ثنائي إيثيل إيثر (Diethyl ether)**، يُرج الخليط على فترات ويُترك طوال الليل. يُصفى المزيج ويُركز كما في الطرق السابقة. وتتم تنقية المستخلص المركز بتمريره عبر **عمود كروماتوغرافيا (Chromatographic column)** بقطر **1 بوصة**، يحتوي على ثلاث طبقات متتالية بأطوال مختلفة وهي: طبقة بطول **2 بوصة** من **الألومينا (Alumina)** (الطبقة العليا)، و**1 بوصة**

من **الفحم المنشط (Activated charcoal)** (الوسطى)، و**1 بوصة** من **كبريتات الصوديوم اللامائية (Anhydrous sodium sulphate)** (السفلية)، والتي سبق غسلها بالإيثر. يُبخر **السائل الناضح (Eluate)** حتى الجفاف ويُحفظ الراسب للتحليل (Sethi, 1996; Stahl, 1969).

الطريقة السادسة (Method – VI)

- **استخلاص المبيدات بالتقطير البخاري المدمج مع الاستخلاص بالمذيبات متبوعاً بالتنقية:** عندما تكون المواد البيولوجية نظيفة ونقية (أي أقل تحللاً وتحتوي على كمية قليلة جداً من الدهون والمواد الملونة)، يمكن اتباع هذه الطريقة.
- **الإجراء (Procedure):** يُعالج **50 جم** من المواد البيولوجية ببضع قطرات من **حمض الفوسفوريك (Phosphoric acid)** وتُجرى عملية **التقطير البخاري (Steam distillation)** لمدة **15 دقيقة**. يُجمع **المقطر (Distillate)** (حوالي 100 مل) ويُخضع للاستخلاص بالمذيبات باستخدام **100 مل** من ثنائي إيثيل إيثر (يُضاف على أجزاء، كل جزء 20 مل). تُجمع الطبقات الإيثرية أثناء الاستخلاص وتُدمج وتُخضع للتنقية بتمريرها عبر عمود كروماتوغرافيا كما هو موضح في (الطريقة الخامسة) (Bough, 1993; Jennings, 1987).

الطريقة السابعة (Method – VII)

- **عزل المبيدات من المواد غير البيولوجية: القوالب (Matrices):** تشمل **20-25 جم** من الأرز (أو أكثر إن وجد)، **100 مل** من مياه الشرب أو الشاي أو القهوة أو الحليب، ملابس (يتم قص **20-25 قطعة** مستديرة من النسيج، قطر كل منها 1 بوصة)، **20-25 جم** من التربة أو الرمل أو الحبوب أو الغلال.
- **الإجراء (Procedure):** بالنسبة للمواد المذكورة أعلاه، يتم إجراء **استخلاص مباشر بالمذيبات (Direct solvent extraction)** باستخدام **50-100 مل** من ثنائي إيثيل إيثر دون إضافة كبريتات الأمونيوم. يُركز المستخلص الإيثري إلى **20 مل** ويُنقى باستخدام **كروماتوغرافيا العمود (Column chromatography)** كما ذكر سابقاً. يُجمع المستخلص الإيثري ويُبخر حتى الجفاف بتمرير تيار من الهواء، ويُحفظ الراسب المتبقي للتحليل (Ewing, 1990; A.O.A.C., 1980).

استخلاص المبيدات بالمذيلات في القوالب البيولوجية (Micellar Extraction)

تُعد هذه الطريقة متطورة لتنقية المستخلصات من الدهون والبروتينات باستخدام المنظفات.

- **الإجراء (Procedure):** يتم خلط **50 جم** من المواد البيولوجية (الأحشاء) مع **5 جم** من كبريتات الأمونيوم وتجانسها. يُضاف **100 مل** من ثنائي إيثيل إيثر، ويُرج الخليط على فترات ويُترك طوال الليل ثم يُصفى. يُنقل المستخلص الإيثري إلى قمع فصل، ويُضاف إليه **10 ملجم** من **كبريتات لوريل الصوديوم (Sodium lauryl sulphate)** (وهو **خافض توتر سطحي أنيوني - Anionic surfactant** وُجد أنه الأكثر ملاءمة من بين الأنواع الأخرى). يُحرك المزيج بلطف؛ وعند الترسيب، تنفصل الدهون في شكل سائل وشبه صلب وتُزال من النظام.

يستمر إضافة خافض التوتر السطحي حتى تنفصل جميع المواد الدهنية والبروتينات وتترسب في القاع. تُعرف نهاية العملية بتحول لون الطبقة الإيثرية من الداكن إلى عديم اللون. يُغسل المستخلص الإيثري بـ **25 مل** من الماء مرتين. في حالة

تكون **مستحلب (Emulsion)**، يتم كسره بإضافة فائض من الإيثر والتحريك اللطيف. تُجفف الطبقة الإيثرية فوق كبريتات الصوديوم اللامائية وتُبخر حتى الجفاف (Sethi, 1996; Middleditch, 1989).

استخلاص المبيدات من الفواكه والخضروات ودهون الزبدة (Universal Trace Residue Extractor)

- **الإجراء (Procedure):** تُستخلص العينة مباشرة بالمذيب باستخدام **ثنائي كلورو ميثان (Dichloromethane)**. يُجفف المستخلص في عمود يحتوي على كبريتات الصوديوم اللامائية الحبيبية، ثم يُركز المستخلص تحت تيار من النيتروجين. يُخضع المستخلص المركز لعملية **التقطير التشاركي الكسحي (Sweep co-distillation)** في جهاز استخلاص الآثار العالمي عند درجة حرارة **230 درجة مئوية** لمدة 30 دقيقة مع تمرير النيتروجين (بمعدل 230 مل/دقيقة) واستخدام كبريتات الصوديوم مع **الفلوريسيل (Florisil)** بنسبة 1:1. تتم عملية **الاستخلاص (Elution)** باستخدام 5 مل من (10% أسيتون في الهكسان) أو 5 مل من ثنائي كلورو ميثان، ويُجمع المستخلص للتحليل (Jennings, 1987; A.O.A.C., 1980).

استخلاص المبيدات في الرواسب والتربة والأنسجة بواسطة الاستخلاص بالمذيب المعجل (ASE)

تعتمد تقنية **الاستخلاص بالمذيب المعجل (Accelerated Solvent Extraction - ASE)** على استخدام درجات حرارة وضغط مرتفعين لزيادة كفاءة وسرعة الاستخلاص.

- **الإجراء (Procedure):** تُخلط العينة جيداً أو تُمرر عبر منخل **1 ملم**. تُجفف العينة بالهواء في درجة حرارة الغرفة لمدة 48 ساعة، أو تُخلط مع كبريتات الصوديوم اللامائية حتى يتم الحصول على مسحوق حر التدفق (لا ينصح بالتجفيف الهوائي للمبيدات المتطايرة). يتم وضع قرص سلولوز عند مخرج **خلية الاستخلاص (Extraction cell)**. يُوضع حوالي 10-20 جم من العينة في خلية استخلاص (سعة 11 مل أو 22 مل).
- تُوضع الخلايا في صينية العينات الآلية، وتُضبط ظروف الجهاز لاستخدام مزيج **الأسيتون : الهكسان (1:1)** كمذيب. تشمل ظروف التشغيل:
  - **درجة حرارة الفرن:** 100 درجة مئوية.
  - **الضغط:** 1500 رطل/بوصة مربعة (psi).
  - **وقت التسخين والوقت الساكن:** 5 دقائق لكل منهما.
  - **حجم الشطف (Flush volume):** بنسبة 60% من حجم الخلية.
- تُجمع المستخلصات في عبوات سعة 40 مل مزودة بأغطية محكمة. تم التحقق من صحة هذه الطريقة لتحليل المبيدات في التربة والرواسب وأنسجة الأسماك، لكنها تتطلب مزيداً من التقييس للتطبيق على القوالب البيولوجية في العمل الجنائي السمومي (Dionex, n.d.; Ewing, 1990).

استخلاص الأدوية، الجليكوسيدات، والسموم النباتية

تشمل هذه المجموعة طيفاً واسعاً من المواد مثل **القلويدات (Alkaloids)**، الجليكوسيدات، الباربيتورات، الفينوثيازينات، الساليسيلات، السلفوناميدات، أدوية الإدمان، والسموم النباتية والحيوانية. يعتمد استخلاص هذه السموم على قابليتها للذوبان عند درجات **أس هيدروجيني (pH)** مختلفة (حمضية أو قلوية) وذوبانها التفاضلي في المذيبات العضوية.

تتضمن الطرق التقليدية طريقة **ستاس-أوتو (Stas-Otto)** أو **دراغيندورف (Dragendorff)**، وطريقة كبريتات الأمونيوم، وصولاً إلى الطرق الحديثة مثل **استخلاص الطور الصلب (Solid Phase Extraction - SPE)** (Stewart & Stolman, 1961; Maehly, 1981).

التحديات الرئيسية: تكمن الصعوبة الكبرى في التخلص من الدهون، البروتينات المتحللة، والصبغات التي تتداخل مع عملية العزل. وبما أن كميات هذه السموم في العينات البيولوجية تكون ضئيلة جداً، فإن كثرة خطوات التنقية قد تؤدي إلى فقدان جزء من السم (خطأ بالسالب)، بينما يؤدي عدم التنقية الكافية إلى نتائج إيجابية كاذبة (خطأ بالموجب). لذلك، فإن النتائج الكمية غالباً ما تمثل **نسبة الاستخلاص (Recovery)** وليس الكمية الدقيقة الموجودة فعلياً في الأنسجة (Curry, 1976; Clarke, 1986).

عملية ستاس-أوتو (Stas-Otto Process)

بعد استخلاص المبيدات الحشرية من المواد البيولوجية (الأحشاء، الدم، غسول المعدة)، يتم جعل المتجانس حمضياً باستخدام **حمض الخليك (Acetic acid)** أو **حمض الطرطريك (Tartaric acid)** عند (pH=2). يُضاف إليه 2-3 أضعاف حجمه من الكحول المطلق، ويُترك المزيج طوال الليل مع التحريك. يُجرى له **تكثيف مرتد (Reflux)** لمدة 30 دقيقة ثم يُصفى لإزالة البروتينات المترسبة. يُبخر الراشح، ويُخلط الراسب جيداً مع 100 مل من الماء المقطر البارد، ثم يُعالج المحلول المائي وفقاً للخطوات التالية:

أ. استخلاص المركبات الحمضية والمتعادلة: يُتأكد من أن المحلول المائي حمضي، ثم يُستخلص عدة مرات باستخدام **ثنائي إيثيل إيثر** أو **الكلوروفورم**. يذوب في المذيب كل من:

- الأحماض الحرة والمركبات الحمضية (مثل حمض البكريك، حمض الساليسيليك، والفيرونال).
- المركبات المتعادلة (مثل الأسيتانيليد والفيناسيتين).
- القواعد الضعيفة جداً (مثل الأنتيبيرين، الكافيين، الكولشيسين، والباركوتين - بآثار ضئيلة).

ب. استخلاص القواعد القوية (القلويدات): يتم جعل الجزء المائي الحمضي المتبقي قلوياً قوياً باستخدام محلول **هيدروكسيد الصوديوم (NaOH)**، ويُستخلص مجدداً بالإيثر أو الكلوروفورم. هذه الخطوة تعزل المواد القاعدية الحرة (معظم القلويدات)، باستثناء **القواعد الفينولية (Phenolic bases)** مثل المورفين والأبومورفين التي تظل في المحلول المائي كمركبات صوديوم (Lundquist, 1962).

ج. استخلاص المورفين والأبومورفين: يتم تحييد المحلول المائي بإضافة **كلوريد الأمونيوم (Ammonium chloride)** أو أحماض مخففة، ثم يُجعل قلوياً مرة أخرى باستخدام **محلول الأمونيا (Ammonia solution)**. ويُستخلص المحلول القلوي الناتج كالتالي:

1. أولاً باستخدام **الإيثر** لعزل الأبومورفين وآثار المورفين.
2. ثانياً باستخدام **الكلوروفورم الساخن** أو **كحول الأميل النقي** لعزل المورفين والنارسين (Bamford, 1940; Ghosh & Bagchi, 1948).

طريقة ستاس-أوتو المعدلة (Modified Stas-Otto Method)

تتميز هذه النسخة المعدلة بالدقة في إضافة المذيبات والتحكم في قوام الرواسب لضمان تحرير القلويدات بشكل كامل.

الإجراء (Procedure):

أ. الاستخلاص الأولي: يتم فرم **50 جم** من المواد البيولوجية (يفضل باستخدام آلة فرم)، وتُخلط بـ **الروح المقطرة (Rectified spirit)** (حوالي 2-3 أضعاف وزن المادة) في دورق، وتُحمض باستخدام **حمض الطرطريك (Tartaric acid)**. يُسخن الخليط في حمام بخاري لمدة 1-2 ساعة مع الرج المستمر، ثم يُترك للاستخلاص لمدة **24 ساعة** بعد إطفاء البخار. يُصفى المزيج، ويُعاد استخلاص الراسب بالكحول المحمض بنفس الطريقة، ثم يُغسل عدة مرات بالروح المقطرة الساخنة. تُجمع الرواشح وتُبخر في حوض بورسلين حتى تصل إلى **قوام شرابي (Syrupy consistency)**.

ب. التخلص من المواد الصمغية: يُضاف حوالي **100 مل** من الروح المقطرة إلى البقايا الشرابية **ببطء شديد** مع التحريك المستمر، وذلك لضمان أن تكون المواد غير الذائبة **حبيبية (Granular)** وليست صمغية.

ملاحظة هامة: إذا أُضيف الكحول بسرعة، ستتحول المواد غير الذائبة إلى كتلة صمغية (Gummy) تحبس القلويدات داخلها، مما يؤدي لفقر الاستخلاص. يُسخن المزيج مع التحريك لمدة نصف ساعة ثم يُصفى، وتُكرر العملية مرة أخرى قبل تبخير المستخلصات الكحولية حتى الجفاف تقريباً (Maehly, 1981; Curry, 1976).

ج. استخلاص الأوساط الحمضية: يُذاب الراسب في **50 مل** من الماء المحمض بـ **حمض الكبريتيك المخفف** ويُصفى بعد ساعة. يُنقل المحلول المائي إلى قمع فصل ويُستخلص بمذيب مناسب (إيثر أو كلوروفورم) على أجزاء (25 مل لكل منها). يسحب المذيب في هذه المرحلة:

- المواد الملونة، الزيوت السامة، والراتنجات.
- حمض الساليسيليك ومشتقاته (الأسبرين، السالول، إلخ).
- الباربيتورات، السلفونال، والأسيتانيليد.
- **الناركوتين (Narcotine)** وقلويدات الإرغوت، وبعض الجليكوسيدات مثل **الثيفيتين (Thevetin)** (Clarke, 1986).

د. استخلاص الأوساط القلوية (القلويدات): يتم جعل المحلول المائي الحمضي قلوياً باستخدام **كربونات الصوديوم** أو **الأمونيا** لتحرير القواعد الحرة من أملاحها. يُستخلص المحلول القلوي بالكلوروفورم، والذي سيسحب جميع القلويدات باستثناء **المورفين** (الذي يُستخلص منه أثر ضئيل فقط في هذه المرحلة). تُكرر العملية 2-3 مرات (Bamford, 1940; Stewart & Stolman, 1961).

هـ. استخلاص المورفين النوعي: إذا كان يُشتبه بوجود المورفين، يُستخلص في هذه المرحلة باستخدام **كحول الأميل (Amyl alcohol)** أو مزيج (كلوروفورم-إيثر 3:1) أو (كلوروفورم-كحول 9:1).

- يُعد كحول الأميل الأفضل، لكنه يميل لتكوين **مستحلبات (Emulsions)** مزعجة، لذا يفضل الكثيرون مزيج الكلوروفورم والإيثر. إذا كان المورفين هو السم الوحيد المحتمل، يمكن تجاوز المرحلة (د) تماماً. تُبخر المستخلصات حتى الجفاف لتصبح جاهزة للتحليل (Lundquist, 1962).

و. التنقية النهائية: يُنقى مستخلص الكلوروفورم المتبخر بإذابته في **20 مل** من الماء المحمض بحمض الكبريتيك وتصفيته. يُستخلص الراشح بالكلوروفورم، أولاً في وسط حمضي ثم في وسط قلوي كما في المراحل الأولى، ثم تُبخر هذه المستخلصات النهائية حتى الجفاف التام تمهيداً للتحليل الكيميائي (Ghosh & Bagchi, 1948).

تعديلات إضافية على طريقة "ستاس–أوتو" (Further Modification of Stas–Otto Method)

بما أن طريقة "ستاس-أوتو" التقليدية تتضمن خطوات استخلاص متعددة، فإن احتمالية فقدان السم في كل خطوة تظل قائمة، مما قد يؤدي إلى فشل كامل في الكشف عن السم إذا كان الفقد كبيراً. تهدف هذه التعديلات إلى تقليل الخطوات قدر الإمكان وضمان سلامة المركبات الحساسة وفقاً للظروف الخاصة بكل عينة:

1. **للسموم الحساسة للحرارة (Aconite, Belladonna, Datura, Cocaine):** يجب إجراء الاستخلاص الكحولي للمواد البيولوجية في درجة حرارة الغرفة (لا تتجاوز **40 درجة مئوية**)، أي دون استخدام حمام بخاري. ويُفضل استخدام **الكحول المطلق (Absolute alcohol)** بدلاً من الروح المقطرة لمنع التحلل المائي (Hydrolysis). كما يجب أن يتم تبخير المستخلص الكحولي تحت **ضغط منخفض (Reduced pressure)** (Singer, 1989 & Jones).
2. **للعينات المحفوظة:** إذا كانت المواد البيولوجية محفوظة في محلول مشبع، يجب أن تستمر عملية الاستخلاص بالروح المقطرة لمدة **48 ساعة**.
3. **لمحتويات المعدة السائلة:** في حال كانت محتويات المعدة تحتوي على سوائل كثيرة، يتم الاستخلاص باستخدام الكحول المطلق بمقدار 3 أو 4 أضعاف حجم العينة.
4. **لعينات غسول المعدة:** يُستخلص بضعف الكمية من الكحول المطلق المحمض بحمض الطرطريك، ثم يُترك ليتبخر على حمام بخاري.
5. **الترشيح:** يُفضل استخدام **قمع بوخنر (Buchner funnel)** لضمان سرعة وكفاءة الفصل.
6. **منع تكون المستحلبات (Emulsions):** لتجنب الفقد الناتج عن تكون المستحلبات عند الرج مع المذيبات العضوية (إيثر، كلوروفورم، أو كحول الأميل)، يجب أن يكون التحريك لطيفاً في البداية ثم يزداد تدريجياً (مرتان أو ثلاث في البداية، ولا يتجاوز 12 مرة في النهاية). إذا استمر المستحلب، يتم تبخيره على حمام بخاري وإعادة إذابة الراسب في مذيب جديد (Stahl, 1969; Middleditch, 1989).

طريقة كبريتات الأمونيوم (Ammonium Sulphate Method)

تعتبر هذه الطريقة هي الأكثر فائدة في عمليات **التحليل الأولي (Screening)** للكشف عن الباربيتورات، القلويدات، والأدوية المهدئة (Tranquilizers)، وتستخدم أيضاً في التحديد النوعي وشبه الكمي.

الإجراء (Procedure):

1. يتم تقطيع المواد العضوية (حوالي **100 جم**) إلى قطع صغيرة، وتُهرس (Macerated)، ثم تُخلط مع **100 مل** من حمض الخليك بتركيز **5%** في مخبار سعة 600 مل.
2. تُضاف **كبريتات الأمونيوم الصلبة (Solid ammonium sulphate)** مع الرج المتكرر حتى الوصول إلى **محلول مشبع**. ثم تُضاف زيادة قدرها حوالي **20 جم** من كلوريد الأمونيوم الصلب.
3. يُسخن الخليط في حمام مائي مغلي لمدة ثلاث ساعات.
   تنبيه: في حالات الاشتباه بالتسمم بـ **الآكونيت (Aconite)**، يجب ألا تتجاوز درجة الحرارة **60 درجة مئوية** (Curry, 1976).
4. يُبرد الخليط قليلاً ويُصفى عبر لب ورقة الترشيح. يُعاد استخلاص الراسب المتبقي على القمع مرتين باستخدام **100 مل** من حمض الخليك (5%) ويُصفى كما سبق.

5. تُجمع الرواشح وتُنقل إلى قمع فصل سعة 500 مل. يتم غسل (Leaching) الملاط المتبقي على ورقة الترشيح بـ **100 مل** من **ثنائي إيثيل إيثر** ويُستقبل في وعاء بارد.
6. تُضاف طبقة الإيثر إلى المستخلص الحمضي المائي في قمع الفصل، وتُرج لمدة 5 دقائق ثم تُفصل. تُكرر العملية بـ 100 مل إضافية من الإيثر.
7. تُجمع طبقات الإيثر معاً. يُستخدم هذا **المستخلص الإيثري الحمضي** للكشف عن:
   - حمض الساليسيليك والأسبرين.
   - الباربيتورات والـ Meprobamates.
   - الـ Lysergides(LSD) والـ Benzodiazepines(Maehly, 1981; Whelpton, 1984).

استخلاص القواعد (القلويدات) من المحلول المائي

بعد فصل الأدوية الحمضية في المرحلة السابقة، يتم التعامل مع المحلول المائي المتبقي في قمع الفصل لاستخلاص السموم القاعدية:

1. يتم جعل المحلول المائي **قلوياً** بإضافة **هيدروكسيد الأمونيوم (Ammonium hydroxide)**.
2. يُستخلص ثلاث مرات باستخدام **100 مل** من مزيج (الكلوروفورم والإيثر بنسبة 1:3).
3. **ملاحظة:** يتم الاحتفاظ بالطبقة المائية لاستخلاص قلويدات الأفيون لاحقاً.
4. تُجمع الطبقات العضوية وتُغسل بـ **50 مل** من الماء، ثم تُستخلص ثلاث مرات بـ **25 مل** من حمض الكبريتيك بتركيز 10%.
5. تُجمع أجزاء حمض الكبريتيك في قمع فصل جديد (ويتم التخلص من الطبقة العضوية).
6. يُضاف **50 مل** من مزيج الكلوروفورم والإيثر (1:3)، ثم يُضاف محلول هيدروكسيد الأمونيوم المخفف لجعل الوسط قلوياً مع الرج لمدة 5 دقائق.
7. تُفصل الطبقة العضوية وتُكرر العملية ثلاث مرات. تُجمع الطبقات العضوية وتُغسل بـ **150 مل** من الماء، ثم تُجفف عبر كبريتات الصوديوم اللامائية وتُبخر حتى الجفاف.
8. يُختبر المستخلص للكشف عن: قلويدات الأفيون، قلويدات الداتورا والآكونيت، الأمفيتامينات، الميبيروبامات، والميثاكوالون (Stewart & Stolman, 1961; Maehly, 1981).

تقسيم مستخلص (الحمض-إيثر) إلى ثلاثة أجزاء نوعية

يمكن تقسيم الجزء المستخلص بالإيثر في الوسط الحمضي إلى ثلاث رتب لزيادة دقة التشخيص:

- **الجزء الأول (R1) - الساليسيلات:** يُرج جزء (الحمض-إيثر) مع **25 مل** من محلول بيكربونات الصوديوم (5%). تُنقل الطبقة المائية لقمع فصل آخر، وتُحمض بحمض الكبريتيك المخفف، وتُعاد استخلاصها بـ **25 مل** من الإيثر. يُجفف الإيثر ويُبخر؛ والراسب الناتج يحتوي على **الساليسيلات (Salicylates)**.
- **الجزء الثاني (R2) - الباربيتورات:** تُستخلص طبقة الإيثر المتبقية (بعد غسلها بالبيكربونات) مرتين بـ **25 مل** من محلول هيدروكسيد الصوديوم (N. NaOH). تُجمع الطبقات المائية، وتُحمض بحمض الكبريتيك المخفف، وتُستخلص مرتين بـ **25 مل** من الإيثر. يُغسل الإيثر بالماء ويُجفف ويُبخر؛ والراسب يحتوي على **الباربيتورات (Barbiturates)** بشكل نقي نسبياً (Curry, 1976; Clarke, 1986).

- **الجزء الثالث (R3) - الأدوية المتعادلة:** يتم تبخير طبقة الإيثر المتبقية بعد غسلها بهيدروكسيد الصوديوم والماء. يحتوي الراسب على **الميبروبامات (Meprobamate)**، الكاربامات الأخرى، والأدوية المتعادلة.

استخلاص الأدوية من البول (Extraction of Drugs in Urine)

تعتبر عينة البول من أهم العينات الجنائية لسهولة التعامل معها، ويتم الاستخلاص وفقاً للمراحل التالية:

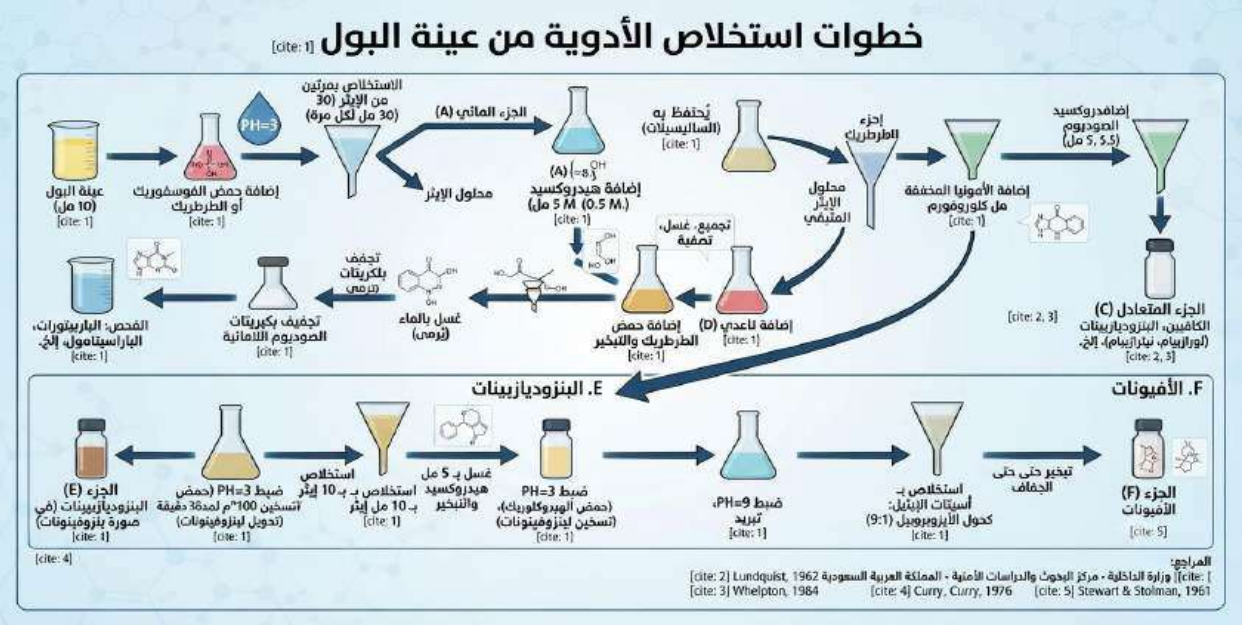
1. **الوسط الحمضي:** يُضاف حمض الفوسفوريك أو الطرطريك لـ **10 مل** من البول لضبط الأس الهيدروجيني عند (PH=3). يُستخلص بمرتين من الإيثر (**30 مل** لكل مرة).
   - **الجزء المائي (A):** يُحتفظ به لاحتمال وجود الساليسيلات.
   - **الجزء الحمضي الضعيف (B):** يُستخلص محلول الإيثر بـ **5 مل** من هيدروكسيد الصوديوم (M 0.5). يُفحص هذا الجزء للكشف عن: **الباربيتورات، الباراسيتامول، الفينيتوين، والفينيل بوتازون**.
2. **الجزء المتعادل (C):** يُغسل محلول الإيثر بالماء (يُرمى ماء الغسيل)، ثم يُجفف بكبريتات الصوديوم اللامائية ويُبخر. قد يحتوي الراسب على: **الكافيين، البنزوديازيبينات (لورازيبام، نيترازيبام)، الميثاكوالون، والميبروبامات** (Lundquist, 1962; Whelpton, 1984).
3. **الجزء القاعدي (D):** نعود للمحلول المائي المحفوظ من الخطوة الأولى، ويُضاف إليه محلول الأمونيا المخفف لضبط الأس الهيدروجيني عند (PH=8). يُستخلص مرتين بـ **10 مل** من الكلوروفورم. تُجمع المستخلصات وتُغسل وتُصفى، ويُضاف القليل من **حمض الطرطريك** لمنع فقدان القواعد المتطايرة، ثم تُبخر. قد يحتوي الراسب على: **الأمفيتامين، الأميتريبتيلين، الفينوثيازينات، قلويدات الإرغوت، والمورفين**.

بعد استخلاص الأجزاء السابقة، يتم التعامل مع المحلول المائي المتبقي لاستعادة مركبات محددة قد تكون مرتبطة كيميائياً:

- **الجزء (E) - البنزوديازيبينات (Benzodiazepines):** يتم ضبط الأس الهيدروجيني للمحلول المائي المتبقي (بعد استخلاص الجزء D) إلى **PH 3** بإضافة حمض الهيدروكلوريك. يُسخن المزيج عند **100 درجة مئوية** لمدة 30 دقيقة (لتحويل البنزوديازيبينات إلى بنزوفينونات)، ثم يُبرد ويُستخلص مرتين بـ **10 مل** من الإيثر. يُحتفظ بالمحلول المائي. تُغسل مستخلصات الإيثر بـ **5 مل** من هيدروكسيد الصوديوم وتُبخر حتى الجفاف. قد يحتوي الراسب على البنزوديازيبينات في صورة **بنزوفينونات** (Curry, 1976).
- **الجزء (F) - الأفيونات (Opiates):** يتم ضبط الأس الهيدروجيني للمحلول المائي المحفوظ من الخطوة السابقة إلى **PH 9** ثم يُبرد. يُستخلص بمزيج من **أسيتات الإيثيل وكحول الإيزوبروبيل** بنسبة (9:1). تُفصل طبقة المذيب وتُبخر حتى الجفاف. قد يحتوي الراسب على الأفيونات (Stewart & Stolman, 1961).

استخلاص الأدوية من الدم (Extraction of Drugs in Blood)

نظراً لأن حجم العينة في حالة الدم (أو السيروم أو البلازما) يكون صغيراً، ولأن عدداً محدوداً فقط من الأدوية يمكن كشفه بسهولة فيها، فإن الإجراء يختلف قليلاً عن البول. الأجزاء (A, B, C, D) تحمل نفس المعنى المذكور سابقاً، لكن الاستخلاص الأولي يبدأ عند **PH 7.4**، لأن العديد من الأدوية القاعدية يمكن استعادتها بالكلوروفورم عند هذا المستوى (Whelpton, 1984; Clarke, 1986).

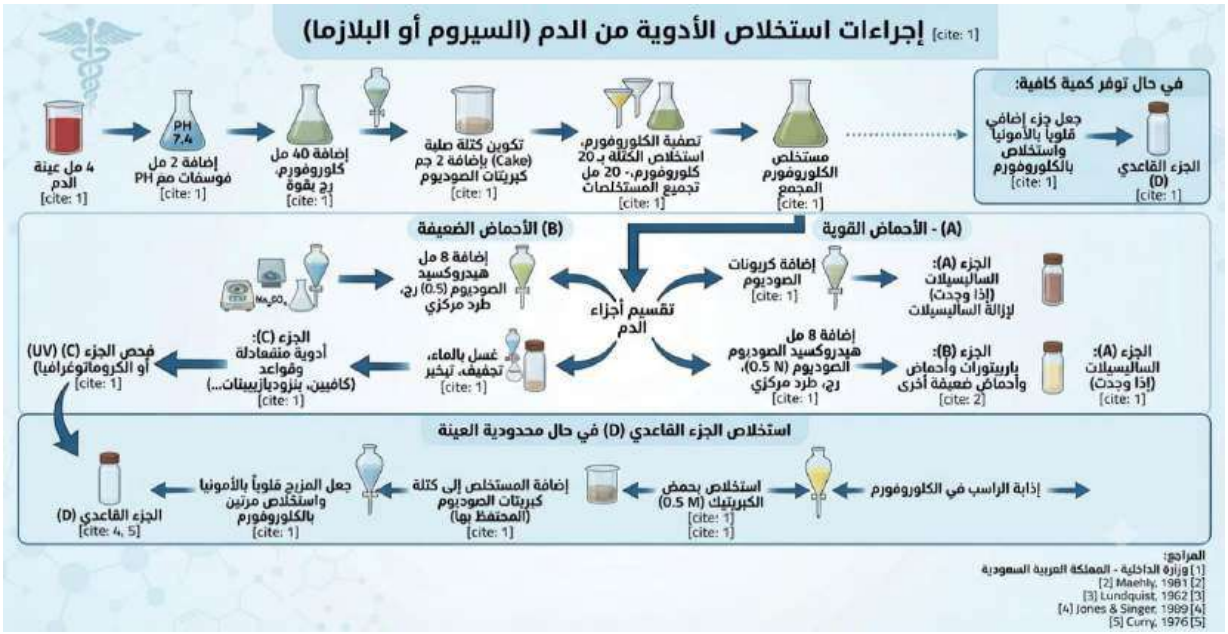


الإجراء (Procedure):

1. يُضاف **2 مل** من محلول الفوسفات المنظم (**PH 7.4**) و **40 مل** من الكلوروفورم إلى **4 مل** من العينة وتُرج بقوة.
2. يُضاف **2 جم** من كبريتات الصوديوم اللامائية وتُرج مجدداً لتكوين **كتلة صلبة (Cake)**. يُصفى الكلوروفورم، وتُستخلص الكتلة الصلبة مرة أخرى بـ **20 مل** من الكلوروفورم، ثم تُجمع المستخلصات.

تقسيم أجزاء الدم:

- **الجزء (A) - الأحماض القوية:** تُستخلص طبقة الكلوروفورم بكربونات الصوديوم لإزالة **الساليسيلات** (إذا كشفت الاختبارات الأولية عن وجودها).
- **الجزء (B) - الأحماض الضعيفة:** يُضاف إلى طبقة الكلوروفورم **8 مل** من محلول هيدروكسيد الصوديوم (0.5 N). يُرج المزيج ويُفصل بجهاز الطرد المركزي (**Centrifuge**). قد يحتوي هيدروكسيد الصوديوم على **الباربيتورات** وأحماض ضعيفة أخرى (Maehly, 1981).
- **الجزء (C) - المتعادل والقاعدي:** تُغسل طبقة الكلوروفورم بالماء (يُرمى ماء الغسيل)، ثم تُجفف بكبريتات الصوديوم وتُبخر. قد يحتوي الراسب على أدوية متعادلة (مثل الكافيين، البنزوديازبينات، الميبروبامات) مع عدد من القواعد (Lundquist, 1962).



استخلاص الجزء القاعدي (D) في حال محدودية العينة

إذا توفرت كمية كافية من العينة الأصلية، يتم جعل جزء إضافي قلوياً بالأمونيا ويُستخلص بالكلوروفورم للحصول على **الجزء القاعدي D**.

أما إذا كانت العينة **غير كافية**، يتم اتباع الآتي: بعد فحص الجزء (C) كيميائياً (بواسطة UV أو الكروماتوغرافيا)، يتم إذابة الراسب المتبقي في الكلوروفورم واستخلاصه بحمض الكبريتيك (0.5 M). يُضاف هذا الجزء المستخلص إلى **كتلة كبريتات الصوديوم** التي تم الاحتفاظ بها من الخطوة الأولى. يُجعل المزيج قلوياً بالأمونيا ويُستخلص مرتين بالكلوروفورم. تُجمع الطبقات وتُبخر للحصول على **الجزء القاعدي (D)** (Jones & Singer, 1989; Curry, 1976).

استخلاص الأدوية من البول بالطور الصلب (Solid Phase Extraction - SPE)

تعتبر هذه الطريقة أكثر كفاءة ونظافة من الاستخلاص السائل التقليدي، حيث تعتمد على ادمصاص السموم على مادة صلبة داخل عمود خاص ثم غسلها (elution).

الإجراء (Procedure):

1. يُضاف **5 مل** من البول إلى **2 مل** من محلول فوسفات منظم (0.1 مول/لتر، PH 6.0) في أنبوب اختبار زجاجي، ويُضبط الأس الهيدروجيني بين **5.5 – 6.5** باستخدام هيدروكسيد الصوديوم أو حمض الخليك (حسب طبيعة الدواء).
2. يُوضع عمود **SPE** في جهاز توزيع الفراغ (Vacuum manifold) ويُغسل بـ **1 مل** من الميثانول ثم **1 مل** من محلول الفوسفات المنظم.
3. يُلحق خزان ترشيح سعة 8 مل بأعلى عمود الاستخلاص ويُضاف البول إليه. يُجفف العمود تحت الفراغ ويُغسل بـ **1 مل** من محلول الفوسفات المنظم متبوعاً بـ **0.5 مل** من حمض الخليك المائي (1 مول/لتر).
4. يُجفف العمود مرة أخرى تحت الفراغ ويُغسل بـ **1 مل** من الهكسان.

5. **استخلاص الأدوية الحمضية والمتعادلة:** يتم غسل العمود بـ **4 أجزاء** (1 مل لكل منها) من **ثنائي كلورو ميثان (Dichloromethane)**. يُبخر السائل الناتج حتى الجفاف تحت تيار من النيتروجين عند درجة حرارة **30° – 40° مئوية**. ويُحفظ الراسب للتحليل.
6. **استخلاص الأدوية القاعدية:** يُغسل العمود بالميثانول (1 مل)، ثم يتم الغسل بـ **2 مل** من هيدروكسيد الأمونيوم الميثانولي (0.2%). يُضاف **3 مل** من الماء منزوع الأيونات ويُجرى الاستخلاص النهائي بـ **0.2 مل** من الكلوروفورم. تُجمع طبقة الكلوروفورم وتُبخر كما في الخطوة السابقة (Sethi, 1996; Gauglitz & Vo-Dinh, 2003).

هضم الأنسجة باستخدام الإنزيمات المحللة للبروتين (Tissue Digestion using Proteolytic Enzyme)

يؤدي الهضم باستخدام الإنزيمات إلى تحسين نسبة استعادة السموم (Recovery) بشكل كبير، ويتميز بإمكانية تطبيق منهجية مشابهة لتلك المستخدمة مع البلازما بمجرد تحلل النسيج.

- **التحديات والمميزات:** من المهم التأكد من أن المستحضر الإنزيمي لا يسبب تداخلات في التحليل. ومن المشاكل المحتملة أن النواتج المقترنة (Conjugates) والأيضات الأخرى قد لا تنجو من هذه العملية.

الإجراء (Procedure):

1. يُحضر محلول (2 جم/لتر) من إنزيم **سوبتيلوزين (Subtilisin)** المجفف بالتجميد في محلول منظم من فوسفات ثنائي هيدروجين الصوديوم / فوسفات هيدروجين ثنائي الصوديوم (7 مول/لتر، PH 7.4).
2. يتم تقطيع أجزاء من الأنسجة بزنة **100 ملجم** وإزالة السوائل الزائدة بورق الترشيح.
3. تُوضع الأنسجة في أنابيب زجاجية مخروطية وتُسجل الأوزان الدقيقة، ثم يُضاف **1 مل** من محلول السوبتيلوزين.
4. تُغلق الأنابيب بسدادات زجاجية وتُحضن في حمام مائي عند **50° مئوية** لمدة **16 ساعة**.
5. تُبرد الأنابيب وتُخلط محتوياتها باستخدام جهاز الرج الدوامي (**Vortex mixer**).
6. بعد ذلك، يتم الاستخلاص باستخدام أجزاء بحجم **0.2 مل** باتباع نفس البروتوكولات المستخدمة للبلازما أو المصل (Curry, 1976; Whelpton, 1984).

استخلاص الأدوية بالمذيلات في المواد البيولوجية (Micellar Extraction)

تُعد هذه الطريقة فعالة جداً للتخلص من الدهون المعقدة والمواد الزيتية التي تعيق عزل القلويدات والأدوية في العمل الجنائي.

الإجراء (Procedure):

1. يتم فرم **100 جم** من المواد البيولوجية ناعماً، ويُضاف إليها فائض من **الروح المقطرة** (حوالي 200 مل) وتُحمض بـ **حمض الخليك الثلجي (Glacial acetic acid)** قطرة بقطرة مع التحريك.
2. يُسخن المزيج على حمام بخاري لمدة ساعة مع الرج، ثم يُترك لمدة **24 ساعة** في درجة حرارة الغرفة.
3. يُصفى المزيج باستخدام **قمع بوخنر** يحتوي على طبقة من الرمل (0.3 سم) فوق ورقة الترشيح.

4. يُنقل الراشح إلى قمع فصل ويُضاف إليه **50 مل** من إيثر المذيب؛ سيلاحظ تعكر المحلول وانفصال جزيئات الدهون الدقيقة التي يتم تصريفها.
5. تُرج محتويات القمع مع أجزاء (1 ملجم) من **كبريتات لوريل الصوديوم (Sodium lauryl sulphate)**؛ حيث تنفصل الدهون شبه الصلبة. يمكن تسريع العملية بإضافة بضع قطرات من الماء، مما يؤدي لترسب كتلة زيتية بنية محمرة في القاع يتم تصريفها.
6. تستمر العملية حتى يتوقف انفصال الدهون ويصبح المستخلص شفافاً تماماً.
7. تُبخر محتويات القمع حتى الجفاف، ثم يُستخلص الراسب بخمسة أجزاء من الماء (20 مل لكل جزء).
8. **فصل الأدوية الحمضية والمتعادلة:** يُحمض المستخلص المائي بحمض الخليك ويُستخلص بـ **80 مل** من ثنائي إيثيل إيثر (على 4 دفعات). يُغسل الإيثر بالماء حتى يخلو من الحمض، ثم يُجفف بكبريتات الصوديوم ويُبخر للتحليل.
9. **فصل الأدوية القاعدية:** يُجعل الجزء المائي المتبقي قلوياً بوضوح بإضافة الأمونيا، ويُستخلص بـ **80 مل** من الكلوروفورم (على 4 دفعات). يُغسل الكلوروفورم بالماء حتى يخلو من القلويات، ثم يُجفف ويُبخر للتحليل (Sethi, 1996; Middleditch, 1989).

إجراء الحيز العلوي لعزل المواد المتطايرة (Headspace procedure)

تعتمد هذه التقنية على مبدأ التوازن الديناميكي؛ حيث تستقر المكونات المتطايرة للعينة السائلة في وعاء مغلق بين الحالة السائلة والغازية (الحيز العلوي) عند درجة حرارة ثابتة.

الإجراء (Procedure):

1. تُضاف **المادة القياسية الداخلية (Internal standard)** (مزيج من إيثيل بنزين و 1،1،2 ثلاثي كلورو إيثان) إلى **200 ميكرولتر** من مزيج (الدم المحلل والماء منزوع الأيونات بنسبة 1:24) داخل عبوة زجاجية سعة 7 مل مزودة بحاجز (Septum).
2. تُغلق العبوة بإحكام باستخدام قرص سيليكون مبطن بـ PTFE.
3. تُحضن العبوة عند درجة حرارة **65 درجة مئوية** في كتلة تسخين لمدة 15 دقيقة تقريباً للوصول إلى حالة التوازن.
4. يتم سحب جزء (**100-300 ميكرولتر**) من الغاز الموجود في الحيز العلوي باستخدام محقنة غازية دافئة ومحكمة، ثم تُحقن مباشرة في جهاز **كروماتوغرافيا الغاز (GC)** للتحليل (Dionex, n.d.; Bough, 1993).

إجراءات التنقية (Clean-Up Procedures)

من المرجح جداً أن تحتوي المستخلصات الناتجة عن الطرق السابقة على مواد متداخلة تسبب مشاكل في التحليل، خاصة في عينات التربة، الرواسب، والأنسجة التي تحتوي على دهون وزيوت طبيعية.

الأساليب المتبعة:

- **الطريقة التقليدية:** تمرير المستخلص عبر عمود من **الألومينا (Alumina)** لإزالة الشوائب، ثم فصل المركبات المستهدفة عبر عمود من **السيليكا (Silica)**.
- **الكروماتوغرافيا التحضيرية (Preparative TLC):** تُستخدم إذا تم تحديد المكونات النشطة مائياً في الفحص الأولي.

- **التقنيات الآلية:** يمكن تحقيق التنقية باستخدام **الكروماتوغرافيا الغازية (GC)** أو **الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)**.
- **للمواد المتطايرة:** يتم استخدام تقنية "التطهير والمصيدة" (**Purge or Trap technique**) ضمن نظام (GC-Headspace).
- **التقنيات المهجنة (Hyphenated techniques):** مثل (GC-MS) و (LC-MS)، حيث تعمل التقنية الأولى على فصل المكونات في حالة نقية، بينما تقوم الثانية بالتعرف عليها وتحليلها مباشرة (Gauglitz & Sethi, 1996; Vo-Dinh, 2003).

حديثاً، تم تبسيط هذه العمليات باستخدام **خراطيش استخلاص الطور الصلب (SPE cartridges)** المتوفرة تجارياً.

التنقية باستخدام أعمدة الألومينا والسيليكا

تعتمد هذه التقنية على إزالة المركبات المتداخلة بتمرير المستخلص عبر أعمدة قاعدية وحمضية، ثم فصل المواد الفعالة (خاصة المبيدات الحشرية) على عمود السيليكا (Stahl, 1969; Maehly, 1981).

تحضير المواد المدمصة الصلبة (Preparation of Solid Adsorbents):

يتطلب الأمر تحضير الألومينا والسيليكا بخصائص محددة لضمان كفاءة التنقية:

1. الألومينا القاعدية (Basic Alumina):

- يتم وضع حوالي **100 جم** من الألومينا في طبق سيليكا، وتُسخن في فرن متموج لمدة 4 ساعات عند **800 درجة مئوية**.
- تُبرد إلى حوالي 200 درجة مئوية، ثم تُترك لتصل لدرجة حرارة الغرفة في **مجفف (Desiccator)**.
- يُضاف الماء بنسبة (4% وزن/وزن) إلى الجزء الموزون في دورق سدادي، ويُرج جيداً ويُحفظ محكم الإغلاق.

2. الألومينا الحمضية (Acidic Alumina):

- يتم غسل جزء من الألومينا بحمض الهيدروكلوريك (M1) عن طريق تحويلها إلى ملاط (Slurry) في مخبار.
- تُصفى عبر **قمع زجاجي مسامي (Sinter funnel)** وتُجفف في طبق سيليكا عند **150 درجة مئوية** لمدة 4 ساعات وتُبرد في المجفف.
- يُضاف الماء بنسبة (4% وزن/وزن) ويُخلط جيداً ويُحفظ.
- **ملاحظة:** تفقد هذه التحضيرات فعاليتها ببطء عند التعرض للهواء، لذا يجب التخلص منها بعد أسبوعين من التحضير (Jennings, 1987; Ewing, 1990).

3. هلام السيليكا (Silica Gel)

يتم تسخين حوالي **100 جم** من هلام السيليكا في طبق سيليكا داخل فرن متموج لمدة ساعتين عند **500 درجة مئوية**، ثم يُبرد ويُوضع في المجفف. يُوزن جزء منه في وعاء زجاجي سدادي ويُضاف إليه ماء يعادل (3%) من وزن السيليكا.

ملاحظة: يفقد هلام السيليكا فعاليته (Deactivates) بسرعة أكبر من الألومينا، لذا يُفضل تحضيره يومياً (Stahl, 1969).

إجراءات التنقية (Procedure)

1. يُغسل العمود مسبقاً بالأسيتون ثم بالهكسان ويُترك ليجف.

2. **تحضير عمود الألومينا (حمضي/قاعدي):** يُضاف **2 جم** من الألومينا الحمضية أولاً، ثم **1 جم** من الألومينا القاعدية. يتم النقر على العمود لضمان استقرار الطبقات.
3. **تحضير عمود السيليكا:** يُضاف **2.5 جم** من هلام السيليكا غير النشط ويتم النقر عليه. يُمرر **10 مل** من الهكسان لترطيب العمود ويُصرف الفائض حتى يصل مستوى الهكسان إلى سطح مادة العمود.
4. يُنقل المستخلص العضوي (الناتج عن استخلاص المبيدات أو الأدوية) إلى العمود.
5. يتم غسل (Elution) المكونات النشطة من العمود باستخدام الهكسان أو ثنائي إيثيل إيثر أو أي مذيب عضوي مناسب. يُجمع السائل الناضح (Eluate) ويُمرر عبر عمود السيليكا لإتمام عملية الفصل.
6. يُجمع السائل النهائي ويُجفف فوق كبريتات الصوديوم اللامائية ثم يُبخر حتى الجفاف (Maehly, 1981; Ewing, 1990).

الطريقة المعدلة للتنقية والفصل باستخدام (الألومينا / نترات الفضة) وهلام السيليكا

تُستخدم هذه الطريقة المتقدمة لتحسين فصل بعض أنواع المبيدات التي تتأثر بنترات الفضة.

تحضير المواد المدمصة الصلبة:

- **الألومينا:** تُسخن عند **500 درجة مئوية** لمدة 4 ساعات ثم تُبرد. يُضاف ماء منزوع الأيونات بنسبة (7% وزن/وزن) وتُرج جيداً. تظل مستقرة لمدة أسبوع واحد فقط بعد تعرضها للجو.
- **الألومينا / نترات الفضة:** يتم إذابة **0.75 جم** من نترات الفضة في **0.75 مل** من الماء، ثم يُضاف **4 مل** من الأسيتون. يُضاف هذا المحلول إلى **10 جم** من الألومينا المجففة في دورق مخروطي ويُرج جيداً. يُترك الأسيتون ليتبخر وتُحفظ المادة في الظلام. يجب تحضيرها طازجة قبل الاستخدام (Sethi, 1996; Jennings, 1987).

الإجراء (Procedure):

1. يُسد العمود الكروماتوغرافي بقطن زجاجي أو قطن عادي مغسول بالهكسان، ويُضاف **15 مل** من الهكسان.
2. يُسكب **1 جم** من (الألومينا / نترات الفضة) ويُترك ليستقر، ثم يُضاف **2 جم** من الألومينا ويُترك ليستقر أيضاً. تُغطى الطبقات بقليل من كبريتات الصوديوم اللامائية.
3. يُصرف الهكسان الزائد حتى يصل المستوى لقمة العمود. يُضاف المستخلص العضوي المركز (المحتوي على السموم) مع الشطف.
4. يُمرر **30 مل** من الهكسان أو الإيثر عبر العمود ويُجمع السائل الناضح ويُركز حتى **10 مل**.
5. يُحضر عمود سيليكا بإضافة **2 جم** من السيليكا مع طبقة من كبريتات الصوديوم في الأعلى. يُضاف السائل الناضح المركز من العمود الأول إلى عمود السيليكا ليتم امتصاصه.
6. يُضاف **10 مل** من المذيب العضوي المناسب، ويُجمع السائل النهائي، ويُجفف، ثم يُبخر تمهيداً للتحليل النهائي (Vo-Dinh, 2003 & A.O.A.C., 1980; Gauglitz).

التنقية بطريقة كروماتوغرافيا العمود البسيطة

يمكن استخدام هذه الطريقة بكفاءة عالية لتنقية المستخلصات الناتجة عن المواد البيولوجية سواء كانت مبيدات حشرية أو أدوية.

الإجراء (Procedure): يتم تنقية المستخلص المركز (الطبقة العضوية) بتمريره عبر عمود كروماتوغرافي (قطره 1 بوصة) يحتوي على الطبقات التالية مرتبة من الأعلى إلى الأسفل:

1. **الطبقة العليا:** ألومينا بطول 2 بوصة.
2. **الطبقة الوسطى:** فحم منشط بطول 1 بوصة.
3. **الطبقة السفلية:** كبريتات صوديوم لامائية بطول 1 بوصة.

يتم إعداد العمود مسبقاً عن طريق سده وغسله بالهكسان أو ثنائي إيثيل إيثر أو أي مذيب مناسب. يتم إجراء الاستخلاص (Elution) باستخدام المذيب العضوي الملائم، ثم يُجفف السائل الناضح فوق كبريتات الصوديوم ويُبخر حتى الجفاف، ويُحفظ الراسب للتحليل (Sethi, 1996).

التنقية باستخدام خراطيش استخلاص الطور الصلب (SPE Cartridges)

تتوفر مجموعة متنوعة من الخراطيش التجارية مثل (Bond Elut). تكون هذه الخراطيش معبأة بمادة ماصة من السيليكا المعدلة كيميائياً، ويتم اختيار النوع المناسب بناءً على طبيعة المادة السامة (مثلاً: "أمينو بروبيل" للمركبات العضوية الكلورية).

الإجراء (Procedure):

1. يتم تركيب محول أسود (Adapter) فوق الخرطوم المخصص، وتُثبت عليه حقنة زجاجية سعة 10 مل.
2. يُوضع **5 مل** من الميثانول في الحقنة ويُمرر عبر الأنبوب (يجب أن يظل الأنبوب رطباً دائماً).
3. يُغسل الأنبوب بـ **5 مل** من الهكسان، ثم تُفصل الحقنة.
4. يُضاف المستخلص العضوي المركز المحتوي على المادة الفعالة إلى قمة الأنبوب ويُترك ليمر من خلاله.
5. يُجمع المستخلص النقي، ويُغسل الأنبوب والحقنة بنفس المذيب ويُضاف للنواتج.
6. تُجفف الطبقات المجتمعة فوق كبريتات الصوديوم اللامائية وتُبخر حتى الجفاف (Gauglitz & Vo-Dinh, 2003).

التنقية بطريقة الكروماتوغرافيا الطبقية التحضيرية (Preparative TLC)

تُطبق هذه الطريقة عندما تكون هوية المادة السامة قد حُددت مسبقاً.

الإجراء (Procedure):

1. يتم تطوير الكروماتوغرام (لوح TLC) باستخدام نفس الظروف الكروماتوغرافية التي استُخدمت في عملية التعريف (نفس نظام المذيب، المادة المدمصة، ودرجة الحرارة).
2. يتم كشط المناطق الدائرية المحيطة بالمكونات المنفصلة عند قيم Rf المختلفة.
3. يتم استخلاص المواد المكشوطة من المناطق المختلفة باستخدام مذيب عضوي انتقائي.
4. يُجمع المستخلص، ويُجفف فوق كبريتات الصوديوم، ويُبخر حتى الجفاف تمهيداً للتحليل النهائي (Stahl, 1969; Jennings, 1987).

التنقية باستخدام طريقة HPLC (Clean-Up by HPLC method)

تُطبق هذه الطريقة بنفس المنطق المستخدم في التقنيات التحضيرية السابقة؛ أي عندما يتم تحديد هوية المادة السامة مسبقاً باستخدام جهاز الـ **HPLC**.

الإجراء (Procedure):

1. يتم تحديد **زمن الاحتفاظ (Retention Time)** والمواصفات الكروماتوغرافية للمادة (نظام المذيب، معدل التدفق، ونوع العمود).
2. يُعاد حقن المستخلص في جهاز الـ HPLC باستخدام نفس الظروف.
3. يتم جمع المكونات المنفصلة عند الأوقات الزمنية المحددة (بناءً على زمن الاحتفاظ المسجل سابقاً) باستخدام **جامع أجزاء (Fraction Collector)**، وذلك لإخضاعها لمزيد من التحاليل التأكيدية (Vo-Dinh, & Gauglitz, 2003; Ewing, 1990).

خلاصة الفصل (Chapter Summary)

تم في الفقرات السابقة استعراض الطرق المتنوعة لاستخلاص وعزل المواد السامة من مختلف القوالب المادية (Matrices)، بالإضافة إلى طرق تجريدها وتنقيها (Stripping and Clean-up).

النقاط الجوهرية لاختيار الطريقة:

- **طبيعة المادة السامة:** (متطايرة، عضوية، معدنية، أو أنيونات).
- **نوع القالب:** (بيولوجي مثل الأحشاء والدم، أو غير بيولوجي مثل التربة والطعام).
- **الإمكانيات المتاحة:** (بناءً على البنية التحتية للمختبر الجنائي، من الأدوات الزجاجية البسيطة إلى الأجهزة المعقدة مثل SPE و HPLC).

ونختتم بمناقشة التحديات التي تواجه الكيمياء التحليلية الجنائية، والتي تشمل:

1. **تعقيد العينات (Sample complexity):** تداخل المكونات في العينات الملوثة.
2. **المقبولية القانونية (Legal admissibility):** ضمان مطابقة النتائج للمعايير القضائية.
3. **الحاجة إلى التقييس (Need for standardization):** توحيد البروتوكولات المخبرية عالمياً (David & Black, 2018).

تسلط التوجهات المستقبلية الضوء على التطورات المحتملة في التكنولوجيا والمنهجيات، مع التأكيد على التحسين المستمر لتقنيات التحليل الجنائي لضمان دقة وسرعة الوصول إلى النتائج (**Lee, H., & Lee, S.** 2019).

المراجع العلمية الهامة

Agapiou, A. *(2018). Recent advances in the application of mass spectrometry and its instrumental setup for forensic chemistry. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 33(10), 1649-1676. https://doi.org/10.1039/C8JA00164E*

Alsop, L., & Matousek, P. *(2020). Forensic applications of Raman spectroscopy: A review. Analytical Methods, 12(2), 141-155. https://doi.org/10.1039/C9AY02133D*

Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.). *(1980). Official and tentative methods of analysis.*

Bamford, F. *(1940). Poisons: Their isolation and identification. J. & A. Churchill Ltd.*

Bough, P. J. *(1993). Gas chromatography: A practical approach (1st ed., p. 174). Oxford University Press.*

Caddy, B. *(2019). Forensic DNA analysis: A laboratory manual. CRC Press.*

Chatwal, G. R., & Anand, S. K. *(2019). Instrumental methods of chemical analysis. Himalaya Publishing House.*

Clarke, E. G. C. *(1986). Isolation and identification of drugs (2nd ed.). The Pharmaceutical Press.*

Curry, A. S. *(1976). Poison detection in human organs (3rd ed.). Charles C. Thomas.*

David, N. N., & Black, S. (Eds.). *(2018). Forensic science education and training: A tool-kit for lecturers and practitioners. Wiley.*

DeForest, P. R. *(2018). Analytical techniques in forensic science. John Wiley & Sons.*

Dionex. *(n.d.). Applicable note nos. 320 & 321 on ASE. Dionex Corporation.*

Directorate of Forensic Science Laboratories. *(n.d.). Home page. Government of Maharashtra Department. https://dfsl.maharashtra.gov.in/en*

Ewing, G. W. *(Ed.). (1990). Analytical instrumentation handbook. Marcel Dekker, Inc.*

Gauglitz, G., & Vo-Dinh, T. *(Eds.). (2003). Handbook of spectroscopy. Wiley-VCH.*

Ghosh, S., & Bagchi, K. N. *(1948). Organic and toxicological chemistry. Art Press.*

Gour, T. H. *(Ed.). (1972). Guide to modern methods of instrumental analysis. Wiley-Interscience.*

Harvey, D. *(2000). Modern analytical chemistry. McGraw-Hill Education.*

Jennings, W. *(1987). Analytical gas chromatography. Academic Press, Inc.*

Jones, G. R., & Singer, P. P. *(1989). In R. C. Baselt (Ed.), Advances in analytical toxicology (Vol. 2). Year Book Medical Publishers.*

Kellner, R., Mermet, J. M., Otto, M., Valcarcel, M., & Widmer, H. M. *(2004). Analytical chemistry: A modern approach to analytical science (2nd ed.). Wiley-VCH.*

Lee, H., & Lee, S. *(2019). Applications of analytical chemistry techniques in forensic science: A review. Analytical Sciences, 35(2), 123-136. https://doi.org/10.2116/analsci.18R001*

Lennard, C. J., & Stanley, C. M. (Eds.). *(2019). Forensic microscopy for skeletal tissues: Methods and protocols (Vol. 1878). Humana Press.*

Lundquist, F. *(Ed.). (1962). Methods of forensic science (Vols. 1–4). Interscience Publishers.*

Maehly, A. *(1981). Chemical criminalistics. Springer-Verlag.*

Middleditch, B. S. *(1989). Analytical artifacts: GC, HPLC, TLC and PC (Journal of Chromatography Library, Vol. 44). Elsevier.*

Otto, J. *(1856). Annalen der Chemie und Pharmacie, 100(1), 39–??.*

Sethi, P. D. *(1996). High performance thin layer chromatography. CBS Publishers and Distributors.*

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. *(2024). Fundamentals of analytical chemistry (11th ed.). Cengage Learning.*

Stahl, E. *(1969). Thin-layer chromatography (2nd ed.). Springer-Verlag.*

Stanley, C. M., & Lennard, C. J. (Eds.). *(2018). Forensic science and humanitarian action: Interacting with the dead and the living (Vol. 1188). Humana Press.*

Stas, J. S. *(1851). Bull. Acad. Roy. Med. Belg., 11, 304.*

Stewart, C. P., & Stolman, A. *(Eds.). (1961). Toxicology: Mechanisms and analytical methods (Vol. 2). Academic Press.*

Whelpton, R. *(1984). In A. S. Curry (Ed.), Analytical methods in human toxicology. Macmillan.*

Willard, H. H., Merritt, L. L., & Dean, J. A. *(1988). Instrumental methods of analysis (7th ed.). Wadsworth Publishing Company.*

Wilson, E. R., & Scrimgeour, R. J. (Eds.). *(2019). Mass spectrometry imaging: Principles and protocols. Springer.*

CHAPTER (6) الفصل السادس



مقدمة في الكروماتوغرافيا

INTRODUCTION TO CHROMATOGRAPHY

الفصل السادس

مقدمة في الكروماتوغرافيا والرحلان الكهربائي الشعيري

INTRODUCTION TO CHROMATOGRAPHY AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS

مقدمة عامة

ضمن منظومة **تقنيات التحليل الكيميائي البيئي** التي تُعنى بفهم خصائص المواد لاستخدامها في الفصل والتحديد والقياس، تبرز **الكروماتوجرافيا** كإحدى أكثر الوسائل فعالية لتفكيك الخليط إلى مكوناته، والسعي نحو فصل "المجهول" عن "المعلوم"، في رحلة علمية تُشبه إلى حد بعيد عمل الفيلسوف الذي يُحلل أطياف الآراء ليبلغ جوهر الحقيقة([1]). من خلال استخدام تقنيات GC، HPLC، IC، و TLC، يمكن للمختبرات تحديد وقياس مجموعة واسعة من الملوثات والمكونات الهامة، مما يساهم بشكل كبير في حماية صحة الإنسان والبيئة. فالتطور المستمر في تكنولوجيا الكروماتوجرافيا، بما في ذلك تطوير أعمدة فصل أكثر كفاءة وكواشف أكثر حساسية وتقنيات اقتران مثل GC-MS و LC-MS، يعزز باستمرار قدرات مختبرات التحليل. وجميع هذه التقنيات، من كروماتوغرافيا الغاز إلى الأيونات، تشكّل منظومة متكاملة في خدمة التحليل البيئي. إنها ليست مجرد أدوات علمية، بل **وسائط فكرية** تربط بين صفاء البيئة وغموض مكوناتها، بين الطبيعة والرقابة، وبين الحس الفلسفي بالوجود والحس التقني بالمعيار.

وتعتبر طرق الكيمياء التحليلية مثل الكروماتوجرافيا الغازية (**GC**) والكروماتوجرافيا السائلة (**LC**) حاسمة لتحليل الآثار الزهيدة (**Trace evidence**) الموجودة في مسرح الجريمة. يوضح هذا الفصل كيف تساعد هذه التقنيات في فصل وتحديد خلائط المركبات المعقدة، بما في ذلك الألياف، والدهانات (الأصباغ)، ومخلفات إطلاق النار (**Gunshot residue**) (DeForest, 2018). تسمح هذه التقنيات لعلماء الأدلة الجنائية بفصل الخلائط المعقدة إلى مكونات فردية لتحديد هويتها وتقدير كميتها، وتستخدم على نطاق واسع في تخصصات جنائية متنوعة مثل التحقيق في حوادث الحريق العمد (**Arson investigation**)، تحليل المخدرات، السموم البيئية، وتحليل المواد (Lee & Lee, 2019).

وتعد الكروماتوغرافيا (Chromatography) والرحلان الكهربائي (Electrophoresis) من طرق الفصل (Separation methods). في الحالة الطبيعية، يُضاف الخليط في صورة محلول كمنطقة أولية ضيقة أو "بلعة" (Bolus) إلى طور ساكن (Stationary phase) مناسب، أو في حالة الرحلان الكهربائي، إلى عمود أو هلام (Gel) يحتوي على إلكتروليت (Electrolyte).

في الكروماتوغرافيا، يُضاف طور متحرك (Mobile phase) أو سائل استخلاص (Eluent) يتدفق بانتظام عبر الخليط، أو يتم تحفيز تدفقه بطريقة أخرى، حيث تنفصل مكونات الخليط بناءً على التفاعلات الفيزيائية والكيميائية التفاضلية بين الطور الساكن والطور المتحرك. قد يكون الطور الساكن مادة صلبة مسامية مثل هلام السيليكا (Silica gel) في حالة **كروماتوغرافيا**

[1] البريهي , أمين , 2024, سلسلة تحاليل وفحص المياه ومياه الصرف , الفصل الثامن , ص3 .

الامتزاز (Adsorption chromatography)، أو سائلاً غير ممتزج أو غير متطاير محمولاً على دعامة صلبة مناسبة في حالة **كروماتوغرافيا التجزئة (Partition chromatography)**. تتشابه هذه التقنية إلى حد كبير مع تقنية الاستخلاص بالطور الصلب (SPE)، والتي يمكن اعتبارها في بعض الجوانب شكلاً من أشكال الكروماتوغرافيا التحضيرية. أما في الرحلان الكهربائي، فيتم تطبيق جهد كهربائي (Electrical potential)، ويحدث الفصل نتيجة حركة الأنواع المتأينة (Ionized species) نحو القطب المناسب.

التطور التاريخي (Historical development)

يُعرف عالم النبات الروسي م. س. تسويت (M.S. Tswett) (1872–1919) بأنه "أب الكروماتوغرافيا". وقد ذكر أن "الكروماتوغرافيا هي طريقة يتم فيها فصل مكونات الخليط على عمود امتزاز في نظام متدفق". في تجاربه الأولية (1903)، قام تسويت بملء أنبوب زجاجي بمسحوق ناعم مثل السكروز لإنتاج عمود بالارتفاع المطلوب. وبعد استخلاص أصباغ الكلوروبلاست الخضراء والصفراء من الأوراق ونقلها إلى إيثر البترول، قام بصب حجم صغير من المستخلص على العمود. عندما شكلت الأصباغ نطاقاً أولياً ضيقاً في أعلى المادة الممتزة، أضيف مذيب جديد (إيثر البترول) مع تطبيق ضغط على قمة العمود. ومع تدفق المذيب عبر العمود، تحركت الأصباغ الفردية بمعدلات مختلفة وانفصلت في النهاية عن بعضها البعض. كانت السمات الرئيسية لتقنية تسويت هي إضافة الخليط كمنطقة أولية ضيقة، وتطوير الكروماتوغرام عن طريق إضافة مذيب جديد. على الرغم من أن آخرين استخدموا إجراءات تعتمد على ظواهر الامتزاز أو التجزئة، إلا أنها كانت تفتقر إلى خطوة التطوير الحاسمة التي وضعها تسويت، وبالتالي لم تحقق فصلاً فعالاً للمخاليط.

من بين التطورات اللاحقة، تبرز أعمال أ. ج. ب. مارتن (A.J.P. Martin) (1910–2002) و ر. ل. م. سينغ (R.L.M. Synge) (1914–1994)، اللذين حصلا على جائزة نوبل في الكيمياء عام 1952 لاكتشافهما كروماتوغرافيا التجزئة (Martin and Synge, 1941)، وأعمال أ. ت. جيمس (A.T. James) وأ. ج. ب. مارتن اللذين طوّرا **كروماتوغرافيا الغاز-سائل (Gas–liquid partition chromatography)** (Adlard, 2003) (James and Martin, 1952). كما تمثلت أعمال هامة أخرى في تطوير كواشف حساسة لكروماتوغرافيا الغاز (GC). يستجيب **كاشف التأين اللهبي (Flame-ionization detector - FID)** لمعظم المركبات العضوية، بينما يُظهر **كاشف التقاط الإلكترون (Electron-capture detector - ECD)** استجابة معززة وانتقائية للمركبات التي تحتوي على مجموعات كهروسالبة قوية مثل ذرات الهالوجين أو مجموعات النيترو. كما يُظهر **كاشف النيتروجين-الفوسفور (Nitrogen–phosphorus detector - NPD)**، المعروف أيضاً بـ **كاشف التأين اللهبي القلوي (Alkali flame-ionization detector - AFID)**، استجابة معززة وانتقائية للمركبات التي تحتوي على روابط كربون-نيتروجين (C–N) أو الفوسفور.

في عام 1948، حصل المحلل السويدي أ. و. ك. تيسيليوس (A.W.K. Tiselius) (1902–1971) على جائزة نوبل في الكيمياء تقديراً لأعماله الرائدة في تطوير الرحلان الكهربائي. أما **الرحلان الكهربائي الشعيري (Capillary electrophoresis - CE)**، فقد كان هجيرتن (Hjerten) هو الرائد فيه؛ حيث قام ببناء وحدات رحلان كهربائي أنبوبية بحلول عام 1959، وأثبت أن الرحلان الكهربائي الحر في الأنابيب الشعيرية مع الكشف بالأشعة فوق البنفسجية (UV detection) أمر ممكن عملياً. وفي عام 1981، طور جورجنسون ولوكاكس (Jorgenson and Lukacs, 1981) أول جهاز فعلي ومفيد للرحلان الكهربائي الشعيري وأظهرا أنه يتمتع بقدرة فائقة على الفصل (Resolution). وفي الآونة الأخيرة، استُخدمت تقنيات الرحلان الكهربائي الشعيري والتقنيات المرتبطة بها في تحليل الأدوية والسموم الأخرى.

تطورت الكروماتوغرافيا والرحلان الكهربائي لتشمل مجموعة واسعة من الأنماط، منها: **كروماتوغرافيا الورق (Paper chromatography - PC)**، **كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Thin-layer chromatography - TLC)**، **كروماتوغرافيا التبادل الأيوني (Ion-exchange chromatography)**، **كروماتوغرافيا نفاذية الهلام (Gel-permeation chromatography - GPC)**، وتُعرف أيضاً بـ **كروماتوغرافيا استبعاد الحجم (Size-exclusion chromatography - SEC)**، **كروماتوغرافيا الألفة (Affinity chromatography)**، **كروماتوغرافيا الغاز (Gas chromatography - GC)**، **كروماتوغرافيا الموائع فوق الحرجة (Supercritical-fluid chromatography - SFC)**، **الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (High-performance liquid chromatography - HPLC)**، **الرحلان الكهربائي الشعيري (Capillary electrophoresis - CE)**، ويُعرف أيضاً بـ **رحلان المنطقة الشعيري (Capillary zone electrophoresis - CZE)**، وأخيراً **الكروماتوغرافيا الكهربائية الشعيرية (Capillary electrochromatography - CEC)**. وتعد تقنيتا CE و CEC تقنيتين هجينتين يتم فيهما توليد تدفق سائل الاستخلاص (Eluent) عن طريق **التناضح الكهربائي (Electro-osmosis)**.

في خمسينيات القرن الماضي، كان هناك اهتمام كبير بتطوير طرق الكروماتوغرافيا الطبقية الرقيقة (TLC). وفي الوقت ذاته، أدت الأبحاث في الكروماتوغرافيا السائلة إلى تطوير أجهزة متنوعة لتحليل الأحماض الأمينية. استخدمت هذه الأجهزة أعمدة مصنوعة من بوليمرات الستيرين/ثنائي فينيل بنزين (Styrene/divinylbenzene polymers) التي تمت مشتقتها (Derivatized) لتكوين مواد **تبادل كاتيون قوي (Strong cation-exchange - SCX)**. بعد إجراء **الاستخلاص بالتدرج (Gradient elution)** (وهو تغيير تكوين سائل الاستخلاص مع مرور الوقت بطريقة محددة)، كان يتم خلط المادة الخارجة من العمود مع "النينهيدرين" (Ninhydrin)، ثم تسخينها وتمريرها عبر خلية طيف ضوئي لمراقبة الامتصاص عند طول موجي (570 نانومتر). وكان تحليل العينة الواحدة قد يستغرق يومين.

في تقنيتي PC و TLC، اللتين يُشار إليهما أحياناً بـ **الكروماتوغرافيا المستوية (Planar chromatography)** أو **كروماتوغرافيا التطوير (Development chromatography)**، تُطبق محاليل المواد التحليلية (Analytes) عادةً في شكل نقاط أو نطاقات صغيرة منفصلة. يتم تبخير مذيب التطبيق قبل وضع حافة الورقة أو الشريحة، أو لوح الطبقة الرقيقة، في الطور المتحرك السائل، الذي يتم سحبه عبر الورقة أو اللوح (الطور الساكن) بواسطة **الفعل الشعيري (Capillary action)**. يمكن إجراء العديد من التحليلات بالتوازي، ويتم الكشف عن (أو إظهار) جميع المواد التحليلية في نهاية عملية التطوير.

أما في معظم أشكال الكروماتوغرافيا الأخرى، تُضاف العينة (أو مستخلص العينة) إما إلى سائل الاستخلاص، الذي قد يكون غازاً أو سائلاً أو مائعاً فوق حرج (مثل ثاني أكسيد الكربون)، أو توضع على مادة داعمة أو يتم تركيزها بطريقة أخرى قبل إدخال سائل الاستخلاص. بعد ذلك، يُسمح لسائل الاستخلاص المحتوي على المادة التحليلية والمكونات الأخرى للعينة بالتدفق عبر طور ساكن مدعوم داخل عمود. يتم اختيار الطورين المتحرك والساكن بحيث يكون لمكونات العينة ألفة (Affinity) مختلفة لكل طور. فالمكون الذي يمتلك ألفة ضعيفة للطور الساكن سيمر عبر العمود بسرعة كبيرة، والعكس صحيح. ونتيجة لهذه الاختلافات في الحركة، تنفصل مكونات العينة أثناء انتقالها عبر العمود. تُسمى هذه العملية **كروماتوغرافيا الإزاحة أو الاستخلاص (Elution chromatography)**، حيث يتم الكشف عن المواد التحليلية بالتتابع عند خروجها من العمود. وفي

كل من كروماتوغرافيا التطوير وكروماتوغرافيا الإزاحة، يتم نقل العينة عن طريق الإضافة المستمرة للطور المتحرك. ومن الممكن إجراء تعديلات متنوعة على هذه التقنيات، مثل تطوير لوح TLC في بُعد ثانٍ باستخدام طور متحرك مختلف.
منذ ستينيات القرن الماضي، حدث تطوير مستمر في العديد من فروع الكروماتوغرافيا وفي الرحلان الكهربائي الشعيري (CE)، لا سيما في المواد وتحسين الأجهزة، مما أدى إلى ظهور طرق تحليلية فعالة وموثوقة وحساسة تشكل العمود الفقري للتحاليل المختبرية الروتينية الحديثة (Ettre, 2002; Issaq, 2002; Grob and Barry, 2004). غالباً ما تحتوي كتالوجات ومواقع الشركات المصنعة على معلومات محدثة عن المنتجات الأحدث، رغم أنها قد تفتقر إلى تفاصيل تجريبية هامة. على سبيل المثال، قد تكون الكروماتوجرامات الناتجة قد حُصل عليها باستخدام مركبات نقية و/أو قد حُقنت محاليل مركزة؛ وفي بعض الحالات، قد لا يُذكر الكمية الفعلية المحقونة أو حساسية الكاشف. وبالإضافة إلى المراجع العلمية الرسمية، أدى التوجه نحو المنشورات التي ترعاها الشركات المصنعة أو الممولة من الإعلانات إلى ظهور بعض المجلات المجانية المفيدة؛ ولعل مجلة *LC GC* هي الأفضل بينها.

الجوانب النظرية للكروماتوغرافيا (Theoretical aspects of chromatography)

بدأ دراسة النظرية الكروماتوغرافية على يد ويلسون (Wilson, 1940)، الذي ناقش الجوانب الكمية للكروماتوغرافيا من حيث الانتشار (Diffusion)، ومعدل الامتزاز (Rate of adsorption)، وعدم خطية **متساوي الحرارة (Isotherm nonlinearity)**. وقدم مارتن (Martin, 1949) أول معالجة رياضية شاملة لوصف أداء العمود (باستخدام مفهوم **الارتفاع المكافئ للطبق النظري - HETP**) من حيث حجم جسيمات الطور الساكن والانتشار. ومع ذلك، كان فان ديمتر وآخرون (van Deemter et al., 1956) هم من طوروا **نظرية المعدل (Rate theory)** لوصف عمليات الفصل بناءً على أعمال سابقة لكل من لابيدوس وأدمونسون. كما نظر جيدينغز وإيرينغ (Giddings and Eyring, 1955) لأول مرة في النظرية الديناميكية للكروماتوغرافيا، ومنذ الستينيات فصاعداً، بحثوا في جوانب عديدة من نظرية الكروماتوغرافيا الغازية (GC) والكروماتوغرافيا العامة. كما يتوفر ملخص للمصطلحات المتعلقة بالكروماتوغرافيا والمجالات المرتبطة بها (مثل الاستخلاص سائل-سائل LLE) (IUPAC, 1997).

تتضمن الكروماتوغرافيا فصل المواد بناءً على **الألفة النسبية (Relative affinity)** لكل منها تجاه طورين: أحدهما ثابت (**Stationary phase**) والآخر متحرك (**Mobile phase**). تتحرك المواد التي تمتلك ألفة أعلى تجاه الطور المتحرك معه ويتم حملها بواسطته، وبذلك تنفصل عن المواد التي تمتلك ألفة أعلى تجاه الطور الثابت. وهكذا، يمكن فصل المواد السامة في الخلائط الجزيئية بسهولة تحت طرق كروماتوغرافية وظروف تشغيل مختلفة. وهناك معايير ضابطة مختلفة منها: طبيعة المادة السامة، والطورين المتحرك والثابت، ودرجة الحرارة. نورد فيما يلي الجوانب البارزة لمختلف الطرق الكروماتوغرافية:

في أبسط أشكال الكروماتوغرافيا الغازية (GC) والسائلة عالية الأداء (HPLC)، يكون الطور الساكن ببساطة مادة صلبة صلبة تُعبأ داخل عمود يتدفق عبره سائل الاستخلاص (Eluent). ولكن في الغالب، يُطلى الطور الساكن أو يُربط مباشرة بالعمود، أو بجسيمات من مادة داعمة صلبة معبأة داخل العمود. في منتصف الستينيات، أشارت النقاشات حول أوجه التشابه بين الكروماتوغرافيا السائلة (LC) والغازية (GC) إلى أن استخدام جسيمات أصغر في HPLC سيؤدي إلى كفاءة أفضل، وبالتالي سرعة أكبر في التحليل، ونتيجة لذلك حساسية وانتقائية أفضل. كانت المشكلة في الأعمدة المعبأة بجسيمات أكبر هي بطء **انتقال الكتلة (Mass transfer)** لجزيئات المادة التحليلية داخل وخارج مسام المادة الساكنة. ومن ثم، تم البحث في

استخدام مواد تعبئة مكونة من جسيمات أصغر لتحسين **الفصل (Resolution)**. وسرعان ما طُرحت مجموعة من مواد التعبئة ذات أحجام جسيمات صغيرة ومناسبة تعتمد على هلام السيليكا بمتوسط حجم جسيمات 10 ميكرومتر، وبدأ العمل على أفضل الطرق لتعبئة هذه الجسيمات الصغيرة للحصول على أعمدة ذات كفاءة عالية، كما أُدخلت تقنيات **الربط بالأورغانوسيلان (Organosilane bonding technologies)**.

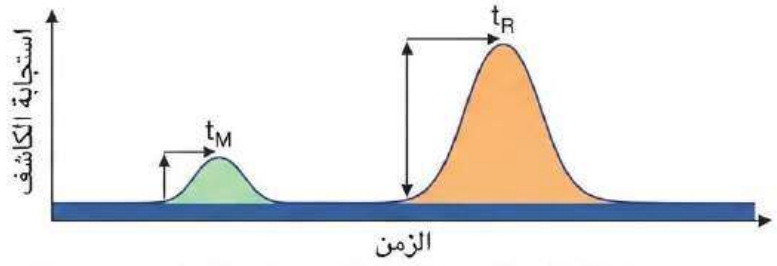
توزيع المادة التحليلية بين الأطوار (Analyte phase distribution)

تتوزع مكونات الخليط بين الطورين الساكن والمتحرك أثناء نقلها عبر الطور الساكن بواسطة الطور المتحرك السائل. وتنتج عملية الفصل عن الاختلافات بين **معاملات التوزيع (Distribution coefficients - KD)**:

$$K_D = \frac{C_s}{C_m} \quad (1)$$

حيث يمثل C_s التركيز المولي للمكون في الطور الساكن، و C_m التركيز المولي للمكون نفسه في الطور المتحرك. في "كروماتوغرافيا التطوير"، تُسمى المسافة التي تقطعها المادة التحليلية بالنسبة للمسافة التي يقطعها سائل الاستخلاص ("جبهة المذيب") **كسر الاستبقاء (Retention fraction - RF)**.

في "كروماتوغرافيا الإزاحة" (Elution chromatography)، يُسمى الوقت المنقضي بين حقن العينة ووصول قمة المادة التحليلية (Analyte peak) إلى الكاشف في نهاية العمود بـ **زمن الاستبقاء (Retention time - tR)**.



الشكل (1): كروماتوغرافيا الإذابة: زمن الاحتفاظ.

يُسمى الوقت الذي يستغرقه الطور المتحرك نفسه للعبور خلال العمود بـ t_M (الشكل 1). في HPLC، يعطي ضرب زمن الاستبقاء في معدل تدفق سائل الاستخلاص (الذي يمكن اعتباره ثابتاً عادةً) **أحجام الاستبقاء (Retention volumes - VM and VR)**. يُعرف V_M بـ **حجم الفراغ (Void volume)** للعمود، وهو حجم المذيب الذي يحيط بمادة التعبئة. وبما أن الغازات أكثر قابلية للانضغاط بكثير من السوائل، فإن متوسط معدل التدفق في عمود GC يكون أقل من معدل التدفق المقاس عند مخرج العمود، ويُعطى **حجم الاستبقاء المصحح (Corrected retention volume)** بالمعادلة:

$$V_R^0 = j \cdot V_R = \frac{3}{2}\left[\frac{(P_i/P_o)^2 - 1}{(P_i/P_o)^3 - 1}\right] V_R \quad (2)$$

حيث P_i و P_o هما ضغط الدخول والخروج على التوالي. ويتطلب قياس معدل التدفق عند مدخل العمود بدلاً من المخرج تصحيحاً مختلفاً.

يُستخدم مصطلح **عامل الاستبقاء (Retention factor - k)**، ويسمى أحياناً **عامل السعة ('Capacity factor - k)**، لوصف معدل هجرة المادة التحليلية في العمود. ويُعرف عامل الاستبقاء للمادة A كالتالي:

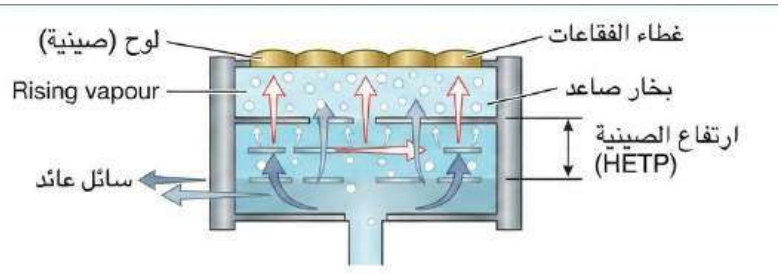
$$k_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (3)$$

ونظراً لأن هجرة المادة التحليلية تُحدد بناءً على عدد أحجام العمود، فإن هذا المعامل مستقل عن هندسة العمود ومعدل التدفق. تكمن المشكلة في صعوبة قياس t_M بدقة؛ حيث يمكن أن يؤدي خطأ بسيط هنا إلى أخطاء كبيرة في قيمة k، خاصة في الأعمدة القصيرة جداً. في GC، يُعتبر t_M عادةً هو أول انحراف عن خط الأساس بعد الحقن (يُفترض دخول بعض الهواء للنظام عند الحقن، لذا يُعرف بـ "ذروة الهواء" - air peak)، بينما في HPLC مع الكشف بالأشعة فوق البنفسجية (UV)، يُستخدم أول انحراف عن خط الأساس بعد حقن كمية صغيرة من مذيب غير مستبق (مثل الأسيتون) كعلامة لـ t_M.

من ناحية أخرى، قد يكون القياس الدقيق لزمن الاستبقاء (t_R) صعباً في حالة القمم غير المتماثلة (Asymmetric peaks). فإذا كان عامل الاستبقاء ($k < 1$)، قد يصعب قياس t_Rبدقة، وقد تضيع قمة المادة التحليلية في "جبهة المذيب" (Solvent front) التي تظهر غالباً عند تحليل المستخلصات البيولوجية. وعلى العكس من ذلك، ترتبط قيم ($k > 20$) عادةً بأزمنة استبقاء طويلة وقمم عريضة؛ ولذلك فإن **برمجة درجة الحرارة** في كروماتوغرافيا الغاز (GC)، أو **الاستخلاص بالتدرج** (Gradient elution) في الكروماتوغرافيا السائلة (HPLC)، تُعد إحدى الطرق الفعالة لجعل القمم التي تظهر متأخرة أكثر حدة، وبالتالي توسيع نطاق المواد التحليلية التي يمكن الكشف عنها أو قياسها في تحليل معين. من الناحية المثالية، في الكروماتوغرافيا السائلة متساوية المذيبات (Isocratic HPLC) وفي الكروماتوغرافيا الغازية متساوية درجة الحرارة (Isothermal GC)، ينبغي أن تكون قيمة k في نطاق (2–5) أو ما يقارب ذلك.

كفاءة العمود (Column efficiency)

للحصول على أفضل حساسية وانتقائية، نهدف في "كروماتوغرافيا الإزاحة" (Elution chromatography) إلى الحصول على قمم حادة ومتماثلة (تُسمى بذلك نظراً لمظهرها على جهاز التسجيل)، بينما نهدف في "كروماتوغرافيا التطوير" (Development chromatography) إلى الحصول على نقاط أو نطاقات صغيرة ومنفصلة. تميل قمم أو نطاقات المادة التحليلية التي تتحرك بسرعة أكبر في النظام الكروماتوغرافي إلى أن تكون أكثر حدة من تلك التي تظهر متأخرة، وذلك لقلة الوقت المتاح لـ **اتساع النطاق (Zone broadening)**. ويحدد مدى اتساع النطاق كفاءة العمود للمادة التحليلية المستخدمة في ظل ظروف تحليلية معينة. ومن أجل إجراء أي مقارنة ذات معنى بين عمودين، يجب قياس الكفاءة باستخدام المادة التحليلية نفسها وتحت الظروف نفسها. يمكن التعبير عن الكفاءة إما بعدد الأطباق النظرية أو **رقم الطبق (Plate number - N)**، أو بـ **الارتفاع المكافئ للطبق النظري (Height equivalent of a theoretical plate - HETP أو H)**.



الشكل (2): تمثيل تخطيطي لعمود التجزئة يوضح مفهوم ارتفاع الصفيحة.

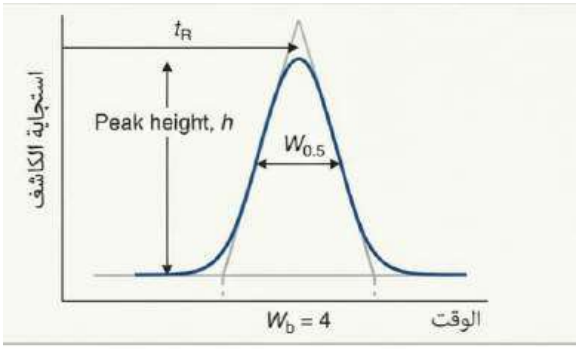
تفترض "نظرية الطبق النظري" (Theoretical plate model) في الكروماتوغرافيا أن العمود يحتوي على عدد كبير من الطبقات أو الأطباق المنفصلة، وهو مفهوم مستمد من أعمدة التجزئة ذات الأغطية الفقاعية (Bubble-cap fractionation columns)، حيث إنه كلما زاد عدد الأطباق في طول معين، زادت القدرة على الفصل. ويُفترض حدوث توازن منفصل للعينة بين الطورين الساكن والمتحرك عند كل طبق.

يتأثر عرض القمة الكروماتوغرافية بعدد من العمليات العشوائية، ولكل منها تباينها (Variance) الخاص؛ لذا فإن القمة الكروماتوغرافية المثالية تتخذ شكلاً **غاوسياً (Gaussian shape)** بتباين (σ^2) يساوي مجموع التباينات الكلية (الشكل 3).
هناك طريقتان رئيسيتان لحساب عدد الأطباق (N):
الأولى هي تقدير "عرض القمة عند القاعدة" ($W_b = 4\sigma$) عن طريق رسم مماس لنقاط الانعطاف في القمة. ويكون عدد الأطباق:

$$N = 16\left(\frac{t_R}{W_b}\right)^2 \quad (4)$$

والطريقة الأكثر عملية هي استخدام "عرض القمة عند نصف الارتفاع" ($W_{0.5} = 2.355\sigma$)، فتصبح المعادلة:

$$N = 5.54\left(\frac{t_R}{W_{0.5}}\right)^2 \quad (5)$$



الشكل (3): كفاءة الكروماتوغرافيا: قياس HETP.

تكمن ميزة الارتفاع المكافئ للطبق النظري ($HETP$ أو H) في أنه لا يعتمد على طول العمود. فإذا كان طول العمود هو Lسم، فإن:

$$H = \frac{L}{N} \quad (6)$$

يتميز العمود الكفء بقيمة صغيرة لـ H. يمكن أيضاً التعبير عن الكفاءة بعدد الأطباق لكل متر:

$$\text{Plates m}^{-1} = \frac{100N}{L} \quad (7)$$

اتساع النطاق (Zone broadening)

يفترض نموذج الطبق أن توازن المادة التحليلية بين الطور الساكن والطور المتحرك يحدث لحظياً تقريباً. إلا أن الوصف الأكثر واقعية للعملية الكروماتوغرافية يأخذ في الاعتبار الوقت اللازم لهذا التوازن. يتأثر شكل القمة الكروماتوغرافية بمعدل الاستخلاص (Elution rate)، كما يتأثر بالمسارات المختلفة المتاحة لجزيئات المذاب أثناء انتقالها بين جسيمات الطور الساكن. ومن خلال دراسة الآليات المختلفة التي تساهم في اتساع النطاق، نصل إلى **معادلة فان ديمتر (van Deemter equation)** (van Deemter et al., 1956):

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (8)$$

حيث تمثل u السرعة الخطية المتوسطة للطور المتحرك، بينما تُمثل Aو Bو C العوامل التي تساهم في اتساع النطاق (Band broadening).

ملاحظة تعليمية: معادلة فان ديمتر تعتبر حجر الزاوية في فهم كيفية تحسين أداء الأعمدة الكروماتوغرافية من خلال التحكم في معدل تدفق الطور المتحرك.

المسارات المتعددة والانتشار الدوامي (Multiple path and eddy diffusion)

تأخذ جزيئات المادة التحليلية مسارات مختلفة وعشوائية عبر العمود؛ وهذا يسبب اتساعاً في نطاق المذاب لأن المسارات ليست متساوية في أطوالها. يتناسب هذا الانتشار طردياً مع حجم الجسيمات (القطر d_p) وهو مستقل عن سرعة الطور المتحرك. قدم فان ديمتر ثابتاً (2λ) لمراعاة عدم التجانس وجودة التعبئة داخل العمود، وبذلك كان تعبيره لمساهمة حد المسارات المتعددة هو:

$$A = 2\lambda d_p \quad (9)$$

بالنسبة لعمود معبأ بشكل مثالي، يكون $A = d_p$، أي أن $\lambda = 0.5$.

الانتشار الطولي (Longitudinal diffusion)

عند النظر إلى نطاق المادة التحليلية داخل العمود، نجد أن التركيز عند حواف النطاق يكون أقل منه في المركز، وذلك لأن المادة التحليلية تنتشر من المركز نحو الحواف. وكلما زاد الوقت الذي يقضيه النطاق داخل العمود، زاد الانتشار، وبالتالي اتسع النطاق. تؤدي سرعات الطور المتحرك العالية إلى تقليل تأثير الانتشار الطولي عن طريق تقليل الوقت الذي تقضيه المادة التحليلية داخل العمود؛ أي أن المساهمة في (H) الناتجة عن الانتشار الطولي تتناسب عكسياً مع السرعة (u). ونظراً لأن معادلة فان ديمتر قد استُنتجت أساساً لكروماتوغرافيا الغاز (GC) ذات الأعمدة المعبأة، فقد كان الانتشار الطولي في الطور الساكن مهملاً مقارنة بالطور الغازي، لذا:

$$B = 2\gamma D_m \quad (10)$$

حيث D_mهي **معامل انتشار (Diffusivity)** المادة التحليلية في الطور المتحرك، و γهو عامل تصحيح لهندسة التعبئة، والذي يؤثر بالضرورة على مسار الانتشار.

ملاحظة تعليمية: يوضح هذان المصطلحان (A و B) كيف أن تصميم العمود (حجم الجسيمات وجودة التعبئة) وسرعة التدفق يؤثران بشكل مباشر على حدة القمم.

مقاومة انتقال الكتلة (Resistance to mass transfer)

تستغرق المادة التحليلية وقتاً للوصول إلى حالة التوازن بين الطورين. فإذا كانت سرعة سائل الاستخلاص (Eluent) عالية، وكانت المادة التحليلية تمتلك ألفة قوية للطور الساكن، فإن المادة التحليلية الموجودة في سائل الاستخلاص ستتحرك متقدمةً على المادة التحليلية الموجودة في الطور الساكن، مما يؤدي إلى اتساع النطاق. وكلما زادت سرعة سائل الاستخلاص، زاد اتساع النطاق. التعبير الذي استخدمه فان ديمتر لهذا الحد هو:

$$C = \frac{8k}{\pi^2(1+k)^2} \cdot \frac{d_s^2}{D_s} \quad (11)$$

حيث D_sهو معامل انتشار المادة التحليلية في الطور الساكن، و d_s هو سُمك طبقة الطور الساكن. ومجدداً، نظراً لأن الدوامات في سائل الاستخلاص تساعد على الخلط، فقد اعتُبرت مقاومة انتقال الكتلة في الطور المتحرك مهملة وتم تجاهلها.

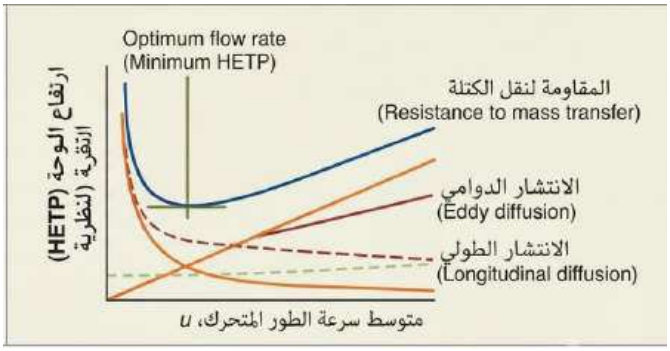
وعليه، يمكن كتابة معادلة فان ديمتر بالصورة التالية:

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_m}{u} + \left[\frac{8k}{\pi^2(1+k)^2} \cdot \frac{d_s^2}{D_s}\right] u \quad (12)$$

على الرغم من أن معادلة فان ديمتر قد استُنتجت لكروماتوغرافيا الغاز (GC) ذات الأعمدة المعبأة، إلا أن هذه الحدود توضح أهمية كل من:

- **حجم الجسيمات (d_p):** الجسيمات الأصغر تعطي كفاءة أكبر.
- **سُمك الطور الساكن (d_s):** الطبقات الرقيقة تعطي كفاءة أكبر.
- **سرعة سائل الاستخلاص (u):** للتحكم في زمن التوازن واتساع النطاق.

إذا أُريد استخدام معادلة فان ديمتر لتفسير السلوك الكروماتوغرافي في الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)، فيجب إضافة حد خاص بمقاومة انتقال الكتلة في سائل الاستخلاص. ومثل مقاومة انتقال الكتلة في الطور الساكن، فإن هذا الحد يتناسب طردياً مع السرعة (u)، لذا فإن الشكل العام للمعادلة، وإن كان أكثر تعقيداً، يظل هو نفسه المعادلة (8). تُعد **منحنيات فان ديمتر (van Deemter plots)**، التي يتم فيها رسم قيم ($HETP$) مقابل سرعة سائل الاستخلاص، مفيدة جداً لضمان أن يكون معدل تدفق الطور المتحرك عند قيمته المثلى (الشكل 4).



الشكل (4): كفاءة الكروماتوغرافيا: تأثير سرعة الطور المتحرك على HETP.

ومن الضروري مراعاة تأثير قطر العمود على معدل التدفق الخطي. فإذا تم تقليل قطر العمود إلى النصف، يجب تقليل معدل التدفق (مل/دقيقة) إلى الربع للحفاظ على التدفق الخطي الأصلي.

تمت صياغة **معادلة غولاي (Golay equation)** لوصف التشتت في الأعمدة الأنبوبية المفتوحة أو الشعيرية (Golay, 1958). ونظراً لعدم وجود حد للمسارات المتعددة (A) في هذه الأعمدة، فإن المعادلة تأخذ الشكل التالي:

$$H = \frac{B}{u} + Cu \quad (13)$$

بالنسبة لعمود ذي نصف قطر داخلي (r)، تكون المعادلة التفصيلية:

$$H = \frac{2D_m}{u} + \frac{(1+6k+11k^2)r^2}{24(1+k)^2 D_m} u + \frac{k^3 r^2}{6(1+k)^2 K^2 D_s} u \quad (14)$$

حيث Kهو معامل التوزيع للمادة التحليلية بين الطورين الساكن والمتحرك. وفي حين أن حجم المادة المعبأة هو المساهم الرئيسي في اتساع النطاق في الأعمدة المعبأة، فمن الواضح أن حدود مقاومة انتقال الكتلة في الأعمدة الشعيرية تتناسب طردياً مع مربع نصف القطر.

تم اشتقاق **معادلة جيدينغز (Giddings equation)** باستخدام نموذج "المشي العشوائي" (Random walk model) وتأخذ الشكل العام التالي:

$$H = \frac{A}{1 + (E/u)} + \frac{B}{u} + Cu \quad (15)$$

على عكس معادلة فان ديمتر، تصبح هذه المعادلة صفراً عندما لا يكون هناك تدفق لسائل الاستخلاص، ولكن مع زيادة التدفق، يقترب الحد (E/u) من الصفر، وتأخذ المعادلة حينها نفس شكل معادلة فان ديمتر.

تعد **معادلة نوكس (Knox equation)** معادلة مشتقة تجريبياً وقابلة للتطبيق على الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) (Done et al., 1973)، وهي أبسط من معادلة جيدينغز. يتم فيها استبدال (H) بـ **الارتفاع المختزل للطبق (Reduced plate height - h)**، والذي يساوي (H/d_p) (أي ارتفاع الطبق بدلالة حجم الجسيمات):

$$h = Av^{1/3} + \frac{B}{v} + Cv \quad (16)$$

حيث v هي **السرعة المختزلة (Reduced velocity)** وتساوي (ud_p/D_m). يتراوح المعامل Aعادة بين (0.2–1.7) وينخفض مع زيادة تجانس التعبئة. أما B فتتراوح بين (1.6–1.8)، و C بين (0.05 إلى 0.03). عادة ما يكون لـ h قيمة دنيا تتراوح بين (2–3) عند سرعة مختزلة $v \approx 2 - 3$؛ لذا في HPLC، تكون $H \approx 2 - 3d_p$عند القيمة المثلى. على سبيل المثال، إذا تم استخدام طور ساكن بمتوسط حجم جسيمات 3 ميكرومتر، فإن H المثالية تكون (6–9) ميكرومتر، وفي حالة عمود بطول 25 سم، فإن عدد الأطباق النظرية التي يجب الحصول عليها هو حوالي 40,000 طبق.

ملاحظة منهجية: تم استخدام الرموز الرياضية المعتمدة دولياً في هذا السياق لتسهيل فهم العلاقات المتناسبة بين الكفاءة وخصائص العمود.

المساهمات خارج العمود في اتساع النطاق (Extra-column contributions)

يجب مراعاة ثلاثة عوامل رئيسية: (1) حجم العينة، (2) حجم الكاشف، و(3) الأنابيب الواصلة بين صمام الحقن والعمود، وبين العمود والكاشف. يتناسب اتساع النطاق الناتج عن العاملين الأولين طردياً مع أحجامهما. لذا، يجب عموماً أن يكون الحجم المحقون صغيراً قدر الإمكان. في حال توصيل الكواشف على التوالي، يجب وضع الكاشف ذي أكبر حجم خلية داخلية (مساحة كاسحة) في النهاية كلما أمكن ذلك. كما يمكن للقطر الداخلي (d) للأنابيب الواصلة أن يكون له تأثير كبير، حيث يتناسب الاتساع طردياً مع d^4. وتُعد أنابيب البوليتيترافلوروإيثيلين (PTFE) ذات القطر الضيق مناسبة عموماً للتوصيلات التي تلي العمود في نظام HPLC.

برمجة درجة الحرارة والاستخلاص بالتدرج (Temperature programming and gradient elution)

متغير آخر ذو أهمية عملية في الكروماتوغرافيا السائلة (LC) وإلى حد ما في الغازية (GC)، هو **"سعة القمة" (Peak capacity)**، أي عدد القمم التي يمكن تمثيلها على الكروماتوجرام. يُنتج عمود HPLC معبأ نمطي بـ $N \approx 5000$طبق سعة قمة بين 17 لقيم kمن (0.2–2) وحوالي 50 لقيم kمن (0.5–20). ومع ذلك، عندما تحتوي العينة على عدد كبير من المواد التحليلية ذات تقلبات أو قطبيات متفاوتة، تصبح **برمجة درجة الحرارة** (في GC) أو **الاستخلاص بالتدرج** (في LC) ضرورية. إن إجراء تحليل متساوي الحرارة (Isothermal) أو متساوي المذيبات (Isocratic) لمثل هذا الخليط لن يتطلب أوقات تشغيل طويلة جداً فحسب، بل ستكون القمم المتأخرة عريضة جداً لدرجة أنها قد "تضيع" في ضوضاء خط الأساس للكروماتوجرام. مع برمجة درجة الحرارة، تتكثف المواد التحليلية في نطاق ضيق في أعلى العمود ولا تبدأ في الهجرة إلا

عندما تكون درجة الحرارة كافية؛ أي أن بعض المواد التحليلية تنفصل بينما تظل الأخرى ساكنة. وبذلك، يكون الوقت الذي تتحرك فيه مادة تحليلية معينة في العمود مشابهاً لأي مادة أخرى، مما يقلل بشكل كبير من اتساع النطاق الناتج عن **الانتشار الطولي (Longitudinal diffusion)** (الذي يتناسب عادة مع $t^{0.5}$) بالنسبة للقمم التي تظهر متأخرة. ينطبق المبدأ نفسه على الاستخلاص بالتدرج في LC، ولكن في هذه الحالة، يتم تعديل تكوين سائل الاستخلاص.

الانتقائية (Selectivity)

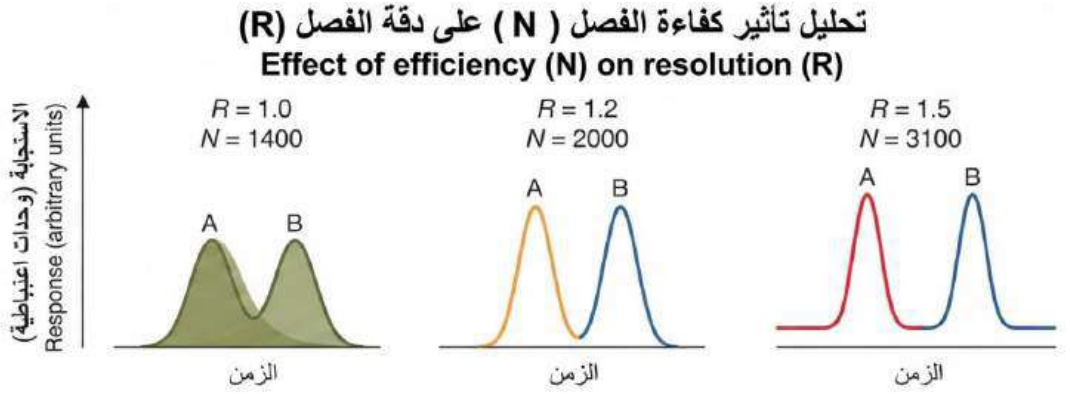
يصف **عامل انتقائية العمود (α)** فصل مادتين (A و B) على العمود. عند حساب عامل الانتقائية، تخرج المادة A دائماً قبل B، أي أن α دائماً أكبر من 1.

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} \quad (17)$$

على الرغم من أن α تصف فصل مراكز النطاقات، إلا أنها لا تأخذ في الاعتبار عرض القمة. ويتم توفير مقياس آخر للفصل بواسطة **القرار أو الدقة (Resolution - R)**:

$$R = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad (18)$$

حيث Wهو عرض القمة عند خط الأساس. يتحقق "فصل خط الأساس" (Baseline resolution) عندما تكون $R = 1.5$.



الشكل (5): تأثير الكفاءة على دقة A و B. القيم المحسوبة باستخدام N=10, =1.2; k_A المحسوبة للذروة B.

ملاحظة: يوضح الشكل أعلاه كيف أن القيمة $R = 1.5$ تضمن عدم تداخل ذيل القمة الأولى مع بداية القمة الثانية بشكل مؤثر، وهو المعيار الذهبي في التحليل الكروماتوغرافي.

من المفيد أيضاً ربط "دقة الفصل" (R - Resolution) بعدد الأطباق النظرية (N)، وعامل الانتقائية (α)، وعوامل الاستبقاء (k) للمذابين:

$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{k_B}{k_B + 1}\right) \quad (19)$$

للحصول على دقة فصل جيدة، يجب تعظيم الحدود الثلاثة في المعادلة (19). إن زيادة Nعن طريق إطالة العمود ستؤدي إلى زيادة معينة في اتساع النطاق. وبدلاً من ذلك، يمكن زيادة Nعن طريق تقليل حجم جسيمات الطور الساكن، ولكن توجد حدود عملية لذلك؛ لأن استخدام جسيمات أصغر يزيد من الضغط اللازم للحفاظ على تدفق سائل الاستخلاص. وفي كروماتوغرافيا الغاز (GC) خاصة، يعد هذا أمراً مقيداً ذاتياً لأن زيادة ضغط الغاز تؤدي ببساطة إلى ضغط الطور المتحرك. وتكمن الميزة

النظرية الكبرى للرحلان الكهربائي الشعيري (CE) والكروماتوغرافيا الكهربائية الشعيرية (CEC) في أن تدفق سائل الاستخلاص لا يعتمد على ضغط المدخل.

يُقدم مقياس بديل لكفاءة العمود بواسطة **رقم الفصل (Separation number - TZ)**، المعروف بـ (Trennzahl)، والذي يُحسب كالتالي (Kaiser, 1976a, 1976b):

$$TZ = \frac{t_{RB} - t_{RA}}{W_{0.5A} + W_{0.5B}} - 1 \quad (20)$$

يمثل TZ عدد القمم التي يمكن وضعها بين قمتي مادتين هيدروكربونيتين متتاليتين في الكروماتوجرام، وهو مرتبط بدقة الفصل (R):

$$TZ = \frac{R}{1.18} - 1 \quad (21)$$

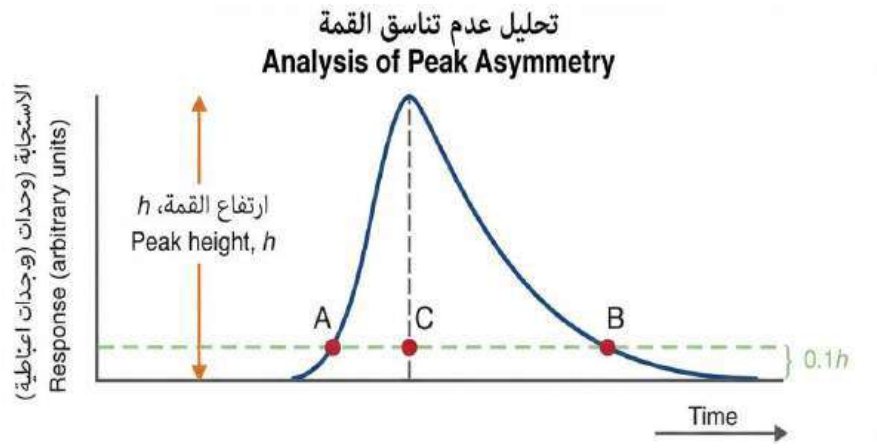
يُعد رقم الفصل مفيداً جداً في برمجة درجة الحرارة في GC والبرمجة المتدرجة في LC حيث لا يمكن استخدام المقاييس التقليدية (متساوية الحرارة أو متساوية المذيبات) لكفاءة العمود. إذا كانت $TZ = 0$، فلن تتسع قمة إضافية بين القمتين المعنيتين، وإذا كانت $TZ = 1$، فستتسع قمة واحدة، وهكذا.

على المستوى العملي، يمكن غالباً تحسين عمليات الفصل الكروماتوغرافي عن طريق تغيير درجة حرارة العمود (خاصة في GC) أو تغيير تكوين سائل الاستخلاص (في LC). كما يمكن التلاعب بعامل الانتقائية (α) لتحسين الفصل. أحياناً يكون تغيير تكوين الطور الساكن (خاصة في GC، وكذلك في LC) أو استخدام إضافات لسائل الاستخلاص - مثل مادة تشكل معقداً مع إحدى المواد التحليلية في الطور الساكن - فعالاً في تحسين دقة الفصل و/أو شكل القمة. من المهم فهم أن مكونات المصفوفة أو المواد التحليلية الأخرى قد تؤثر على عمليات الفصل. ففي TLC، على سبيل المثال، قد تؤثر مكونات العينة المستخلصة معاً على التحليل إذا كانت موجودة بتركيزات أعلى بكثير من المادة التحليلية الأخرى. وفي GLC و HPLC و CE، قد يؤدي مذيب الحقن، أو حجم الحقن (في حالة الكروماتوغرافيا الغازية للرأس الثابت - Headspace GC)، أو حتى وجود مواد تحليلية أخرى بتركيزات عالية، إلى تغيير خصائص الاستبقاء لمكونات أخرى في الخليط.

ملاحظة منهجية: تم استعراض المعادلات التي تربط بين N و α و k لتوضيح التوازن المطلوب بين هذه العوامل لتحقيق فصل كافٍ.

عدم تماثل القمة (Peak asymmetry)

تكون القمة الكروماتوغرافية المثالية ذات شكل **غاوسي (Gaussian shape)** تام، مما يعكس المزيج التراكمي للحركات العشوائية للمادة التحليلية في النظام. ولكن عملياً، لا يتم الحصول على قمم متماثلة، ويمكن قياس انحرافها عن شكل القمة الغاوسية الحقيقية — أي عدم تماثل القمة — والمقارنة بينها. وللقيام بذلك، تُقاس القمة عادةً كما هو موضح في الشكل 6.



الشكل (6): قياس عدم التماثل الأقصى.

هنا، يتم قياس المسافتين AC وCB عند 10% من إجمالي ارتفاع القمة (h) فوق خط الأساس، ويُحسب **عامل عدم التماثل (Asymmetry factor - A_s)** كالتالي:

$$A_s = \frac{CB}{AC} \quad (22)$$

تكون قيمة A_s للقمة الغاوسية مساوية للواحد الصحيح. أما **القمم ذات الذيل (Tailing peaks)**، والتي تنتج عادةً عن امتزاز المادة التحليلية على "المواقع النشطة" في العمود أو جدرانه، فستنتج قيماً لـ A_s أكبر من 1. بينما **القمم ذات المقدمة (Fronting peaks)**، والتي غالباً ما تنتج عن تحميل العمود فوق طاقته بالمادة التحليلية أو تدفق سائل الاستخلاص عبر قنوات داخل العمود، فستكون $A_s < 1$. يمكن اعتبار شكل القمة سيئاً إذا تجاوزت قيمة A_s(2–1.5)، اعتماداً على نوع التحليل والظروف المستخدمة، وذلك نظراً لتأثير ذلك على دقة فصل المكونات والخطأ المحتمل في قياس أزمنة الاستبقاء. تؤدي القمم ذات المقدمة إلى تقدير مبالغ فيه لزمن الاستبقاء الحقيقي، بينما يؤدي التذييل (Tailing) إلى تقدير أقل من الواقع لزمن الاستبقاء مقارنة بالقمة الغاوسية.

قياس استبقاء المادة التحليلية (Measurement of analyte retention)

تُعد عوامل الاستبقاء (k)، وأزمنة (أحجام) الاستبقاء المطلقة، وأزمنة الاستبقاء النسبية لاستبقاء مركب معين (معيار داخلي)، طرقاً مفيدة لتسجيل بيانات الاستبقاء في كروماتوغرافيا الغاز (GC). ومع ذلك، يوفر **مؤشر استبقاء كوفاتس (Kovats retention index)** (Kovats, 1961) طريقة لتسجيل بيانات الاستبقاء تكون مستقلة عن معدل تدفق سائل الاستخلاص، وطول العمود، ونسبة الطور الساكن، ودرجة حرارة التشغيل. علاوة على ذلك، لا يتطلب الأمر قياساً دقيقاً لـ t_0. يتم تخصيص مؤشر 100 × عدد ذرات الكربون في الجزيء للهيدروكربونات ذات السلسلة المستقيمة (النظامية) (مثلاً الديكان = 1000). ثم يُحسب مؤشر الاستبقاء لمادة تحليلية معينة عند درجة حرارة عمود محددة عن طريق الفرق من مؤشرات استبقاء الألكانات النظامية التي تخرج قبل وبعد المادة التحليلية (Supelco, 1997).

يمكن أيضاً حساب مؤشرات الاستبقاء من البيانات الناتجة عن برمجة درجة الحرارة بتطبيق الصيغة التالية أثناء مراحل البرنامج الفردية (van den Dool and Kratz, 1963; Lee and Taylor, 1982):

$$RI_x = 100z + 100\left[\frac{t_{Rx} - t_{Rz}}{t_{R(z+1)} - t_{Rz}}\right] \quad (23)$$

حيث: RI_xهو مؤشر استبقاء المادة x، zهو n-ألكان ذو z ذرة كربون يخرج قبل x، t_{Rx} هو زمن استبقاء x، t_{Rz}هو زمن استبقاء z، و $t_{R(z+1)}$هو زمن استبقاء n-ألكان ذو $z+1$ ذرة كربون يخرج بعد x.

تتمثل المشكلة العملية في استخدام بيانات مؤشر الاستبقاء في GC في أن الهيدروكربونات النظامية لا تستجيب للكواشف الانتقائية مثل ECD أو NPD ، ولا تعطي استجابات جيدة بشكل خاص على مطياف الكتلة (MS)، ومن هنا تم إجراء محاولات لبناء أنظمة مؤشر استبقاء تعتمد على مركبات أخرى مثل ثلاثي ألكيل أمين (Watts and Simonick, 1987) أو نيترو ألكان (Aderjan and Bogusz, 1988). عملياً، تعتبر الألكيل أمينات مركبات غير مريحة في التعامل، ولم تلقَ هذه الأنظمة قبولاً واسعاً، حيث يُستخدم عادةً نظام تقسيم التدفق (Effluent splitter) إلى كاشف التأين اللهبي (FID) لإعطاء استجابات هيدروكربونية إذا لزم الأمر. كما اقترح تحليل مجموعة مختارة من المركبات المشابهة هيكلياً للمواد التحليلية، ولكن ذات قيم مؤشر استبقاء معروفة، كوسيلة لتصحيح الأخطاء المنهجية في قياسات مؤشر استبقاء المواد غير المعروفة (Franke et al., 1993).

في الكروماتوغرافيا السائلة (HPLC)، جرت محاولات كثيرة لتطوير نظام مناسب لمؤشر الاستبقاء باستخدام، على سبيل المثال، سلاسل متجانسة من الكحوليات، أو الكيتونات، أو النيترو ألكانات، ولكن عملياً لا توفر هذه الطرق أي ميزة على عوامل الاستبقاء وغيرها من الطرق الأبسط للتعبير عن الاستبقاء في HPLC.

تقنيات الكروماتوغرافيا

كروماتوغرافيا العمود (Column Chromatography):

يتم تحقيق فصل المكون النشط هنا من خلال **الامتزاز التفضيلي** (**Preferential adsorption**) للمكونات النشطة على المادة الممتزة (الطور الثابت) وكذلك الامتصاص بواسطة الطور المتحرك. في هذه الطريقة، يتم ملء أنبوب زجاجي رأسي بمادة ممتزة حبيبية تعمل كطور ثابت، ثم تضاف العينة إلى الجزء العلوي من العمود على شكل محلول في مذيب مناسب أو خليط من المذيبات. بعد ذلك، يضاف نظام المذيب كطور متحرك (يتم اختياره مسبقاً). ومع تدفق نظام المذيب عبر العمود تحت تأثير الجاذبية أو الضغط، تهاجر المكونات المختلفة لخليط العينة بمعدلات مختلفة لتصل إلى الطرف السفلي من العمود في أوقات مختلفة. وبذلك تحتوي الأجزاء (**Fractions**) التي يتم جمعها على فترات زمنية مختلفة على المكونات المختلفة المنفصلة، والتي يمكن إخضاعها لمزيد من التحليل. تُعرف هذه العملية أيضاً باسم **الاستخلاص بالتصفية** (**Elution**).

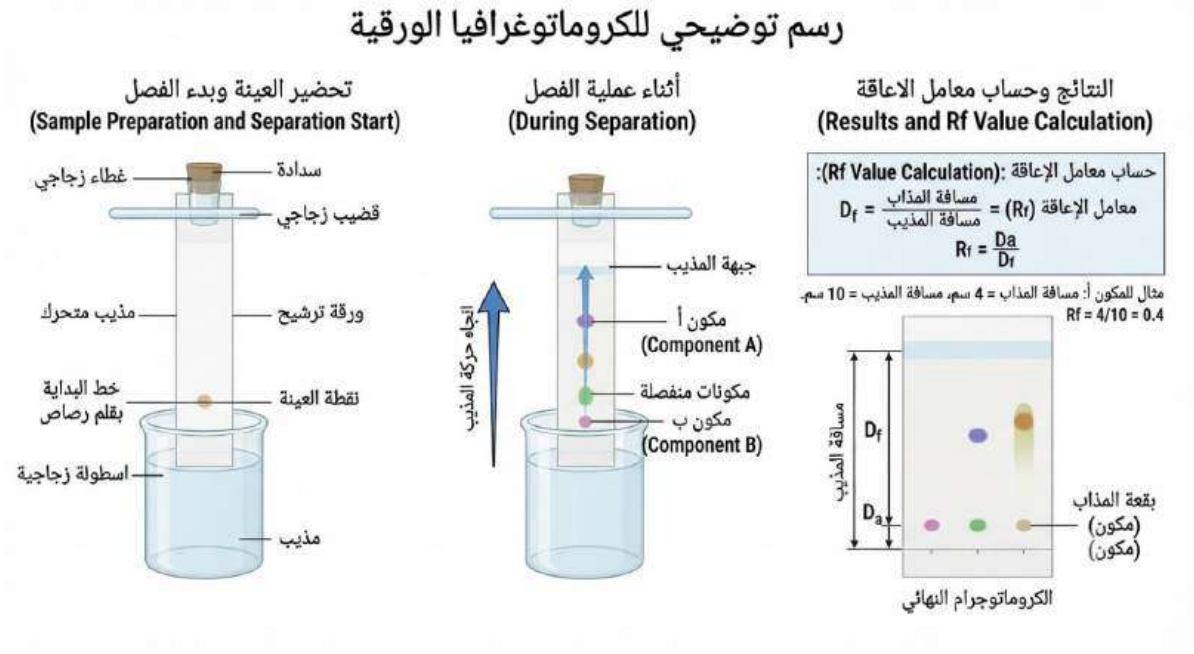
تعتمد كفاءة الفصل في العمود على مادة الامتزاز، واختيار نظام المذيب، وطبيعة المكون النشط، بالإضافة إلى تدفق الطور المتحرك. وقد تم استكشاف هذه العوامل لتطوير طرق مختلفة مثل:

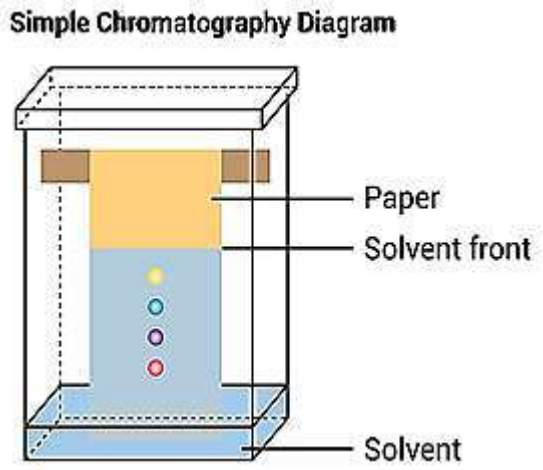
- **HPLC** (الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء).
- **HPTLC** (الكروماتوغرافيا الطبقية الرقيقة عالية الأداء) (Sethi, 1996).
- كروماتوغرافيا الألفة (**Affinity**).
- النفاذ الهلامي (**Gel permeation**).
- التبادل الأيوني (**Ion-exchange**).
- الاستخلاص بالطور الصلب (**SPE**).
- الكروماتوغرافيا بالسائل فوق الحرج (**Super critical fluid chromatography**).

إن الظروف التحليلية المطلوبة لفصل السموم متوفرة في النصوص القياسية والمراجع (Middleditch, 1989)، أو يمكن تطويرها بالتجربة بناءً على طبيعة السم والمصفوفات.

الكروماتوغرافيا الورقية (Paper Chromatography):

يحدث فصل المكون النشط هنا على ورق السليلوز الذي يعمل كطور ثابت. تعد هذه الطريقة بدائية في طرق الكروماتوغرافيا، وتُستخدم لفصل الصبغات العضوية، والخضاب، والأحبار، والكاتيونات، والأنيونات.



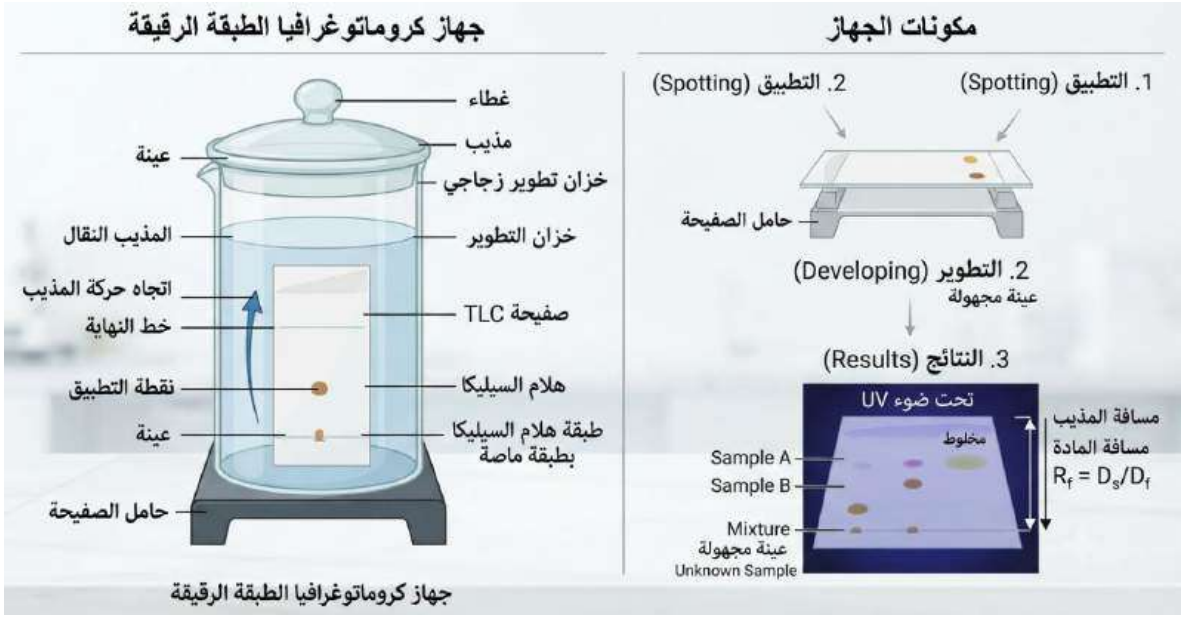


- **التاريخ:** أحدثت هذه التقنية ثورة في الكيمياء الحيوية وعلم السموم في ثلاثينيات القرن الماضي.
- **المبدأ:** الطور الثابت هو الماء الممتز على الورق، والطور المتحرك هو المكون العضوي للمذيب. يتم الفصل بناءً على توزيع المكونات بين الطورين أثناء تحرك المذيب عبر الورقة.
- **الاستخدام الحالي:** على الرغم من فعاليتها، إلا أن هذه التقنية حلت محلها أنظمة أكثر تقدمًا تستخدم طبقات رقيقة من مواد ماصة مثبتة على دعامة خاملة.

كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Thin Layer Chromatography - TLC):

يحدث الفصل في طبقة رقيقة من مادة ممتزة مثل الألومينا، أو السيليكا جل G، أو السليلوز المغلف على مادة دعم خاملة مثل الألواح الزجاجية، أو الصفائح البلاستيكية، أو رقائق الألومنيوم. يتم تطوير الكروماتوغرافيا عن طريق وضع العينات على هيئة بقع صغيرة، ثم يُغمر اللوح في غرفة تحتوي على مذيب التطوير. يُسمح للمذيب بالهجرة لمسافة معينة حيث يتم تحقيق الفصل. هناك طرق مختلفة شائعة في **TLC** مثل: الصاعد، والنازل، وثنائي الأبعاد وغيرها. يتم تحقيق الفصل الكمي من خلال تحسين الظروف التحليلية (Stahl, 1969).

- **المبدأ (Principle):** تعتمد على فصل المركبات بناءً على تباين معدلات هجرتها عبر طبقة رقيقة من الطور الساكن (غالباً سيليكا جل أو ألومينا) المطلية على لوح زجاجي أو بلاستيكي (Moffat et al., 1986).
- **التطبيقات (Applications):** تُستخدم غالباً في **المسح الأولي (Preliminary screening)** للمواد في العينات الجنائية نظراً لبساطتها وسرعتها وانخفاض تكلفتها. ويمكن تطبيقها لتحليل المخدرات، المتفجرات، الأحبار، والأصباغ (Skoog et al., 2024).



الكروماتوجرافيا السائلة (Liquid Chromatography - LC):

- **المبدأ (Principle):** تعتمد على فصل المركبات بناءً على تباين تفاعلاتها مع الطور الساكن (صلب أو سائل) والطور المتحرك (مذيب سائل) (Harvey, 2000).
- **التطبيقات (Applications):** تمتاز بتعدد استخداماتها في تحليل مجموعة واسعة من المركبات تشمل العقاقير، المبيدات الحشرية، الأصباغ، والجزيئات الحيوية مثل البروتينات والببتيدات (Willard et al., 1988).

الكروماتوغرافيا الطبقية الرقيقة عالية الأداء (High Performance Thin Layer Chromatography - HPTLC):

نوع من كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة حيث يتم تصميم الطور الثابت لتقديم خصائص فصل وتحليل (**Resolution**) معززة. ويعود هذا الفصل المعزز إلى السمات الهيكلية الخاصة للمادة الممتزة التي يتم الحصول عليها من خلال معالجة خاصة لتحقيق أقصى قدر من الوضوح لفصل الخلائط الجزيئية. أصبح نظام **HPTLC** الآن آلياً بالكامل، مما يسمح بالتعامل مع عينات متعددة بسرعة ودقة وسهولة (Sethi, 1996). تتوفر أدبيات متنوعة حول فئات مختلفة من العينات العضوية لفصلها في المصفوفات البسيطة والمعقدة.

الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (High Performance Liquid Chromatography - HPLC):

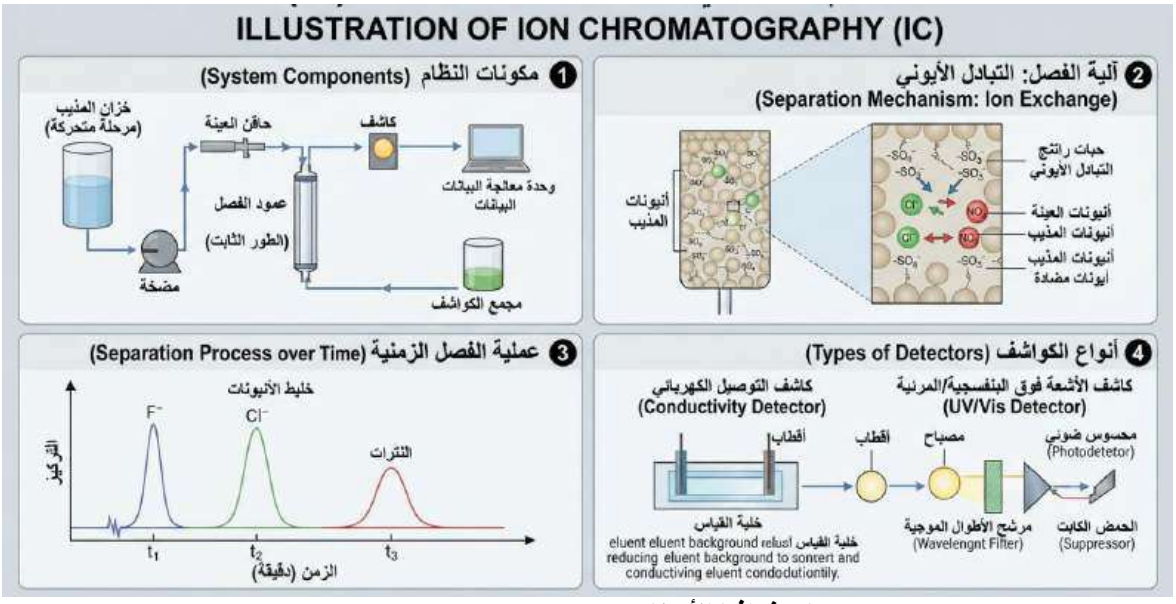
تعتمد هذه التقنية على قوى الجذب المختلفة للمواد التحليلية غير الطيارة مثل العقاقير، والمبيدات الحشرية، والمتفجرات، والمواد العضوية، بين طور سائل (يتم ضخه عبر عمود) وطور صلب (معبأ داخل العمود كطور ثابت). تشمل معايير التشغيل تكوين الطور المتحرك، ونوع المادة الممتزة، وطبيعة المادة المراد تحليلها لتحسين جودة الفصل (Middleditch, 1989).



- **المبدأ (Principle):** هي شكل متطور من الكروماتوجرافيا السائلة يستخدم ضغطاً عالياً لتحسين كفاءة وسرعة الفصل (Chatwal & Anand, 2019).
- **التطبيقات (Applications):** تُستخدم بشكل شائع في المختبرات الجنائية لتحليل العقاقير، والسموم، والآثار الزهيدة الأخرى في العينات البيولوجية مثل الدم والبول والأنسجة (Skoog et al., 2024).

كروماتوغرافيا الأيونات (Ion Chromatography)

يعتمد هذا الأسلوب على **التبادل الانتقائي للأيونات (Preferential exchange of ions)** فوق **راتنجات التبادل الأيون (Ion-exchange resins)** المعبأة في عمود جهاز كروماتوغرافيا الأيونات. تتيح هذه العملية فصل الأنيونات باستخدام **أطوار متحركة (Mobile phases)** هي غالباً محاليل منظمة (Buffers) ذات درجات حموضة (PH) متنوعة (Dionex, n.d.; Gauglitz & Vo-Dinh, 2003).



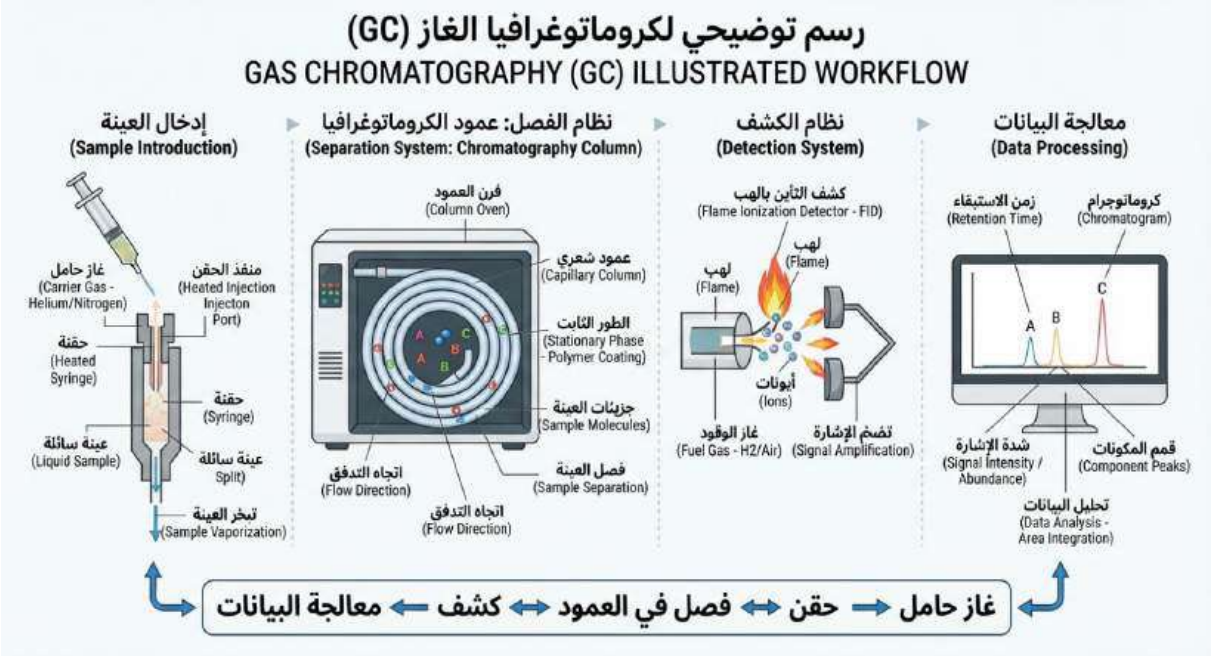
كروماتوغرافيا الأيونات (Ion Chromatography)

وتعمل بنفس المبدأ المتبع في **HPLC**. يتم اختيار تركيب الطور الثابت والطور المتحرك بحيث يمكن فصل الكاتيونات والأنيونات بسهولة. المكونات النشطة في مادة المصفوفة تكون مرتبطة كيميائياً بجزيئات ذات شحنة ثابتة. في شكلها المناسب، يمكن تعبئة **راتنجات التبادل الأيوني (Ion exchange resins)** في أعمدة واستخدامها لفصل مزيج من الجزيئات التي تحمل شحنة معاكسة (لأن الشحنات المختلفة تتجاذب). في بعض الحالات، تعتمد الشحنة الصافية لمادة العمود أو جزيئات العينة أو كليهما على الرقم الهيدروجيني (**pH**)، مما يعطي مرونة أكبر في عملية الفصل.

- **المبدأ (Principle):** تقوم بفصل الأيونات بناءً على تفاعلاتها مع أطوار ساكنة تعمل بنظام التبادل الأيوني (**Ion exchange**) أو الاستبعاد الأيوني.
- **التطبيقات (Applications):** مفيدة بشكل خاص لتحليل الأيونات غير العضوية، مثل تلك الموجودة في مخلفات المتفجرات، والعقاقير، والعينات البيئية (Harvey, 2000).

كروماتوغرافيا الغاز (Gas Chromatography (GC:

هو إجراء يتم من خلاله فصل المكونات الطيارة للخليط عن طريق التوزيع (**Partition**) بين طور ثابت صلب أو سائل وطور متحرك غازي. تتحقق الكفاءة في الفصل من خلال تحكم المحلل في عدة عوامل مثل: نوع العمود (شعري **Capillary** أو واسع التجويف **Wide bore**)، طول العمود، قطره، طبيعة الطور السائل، معدل تدفق الغاز الحامل، ودرجة الحرارة (Jennings, 1987). وقد تم دمج هذه التقنية الآن مع تقنيات أخرى فيما يعرف بالأنظمة الهجينة مثل: **SFC-GC** و **HPLC-GC-MS**. وتطبق هذه الطريقة بشكل خاص على المبيدات الحشرية، والعقاقير، والمواد العضوية الطيارة، والمذيبات وغيرها.

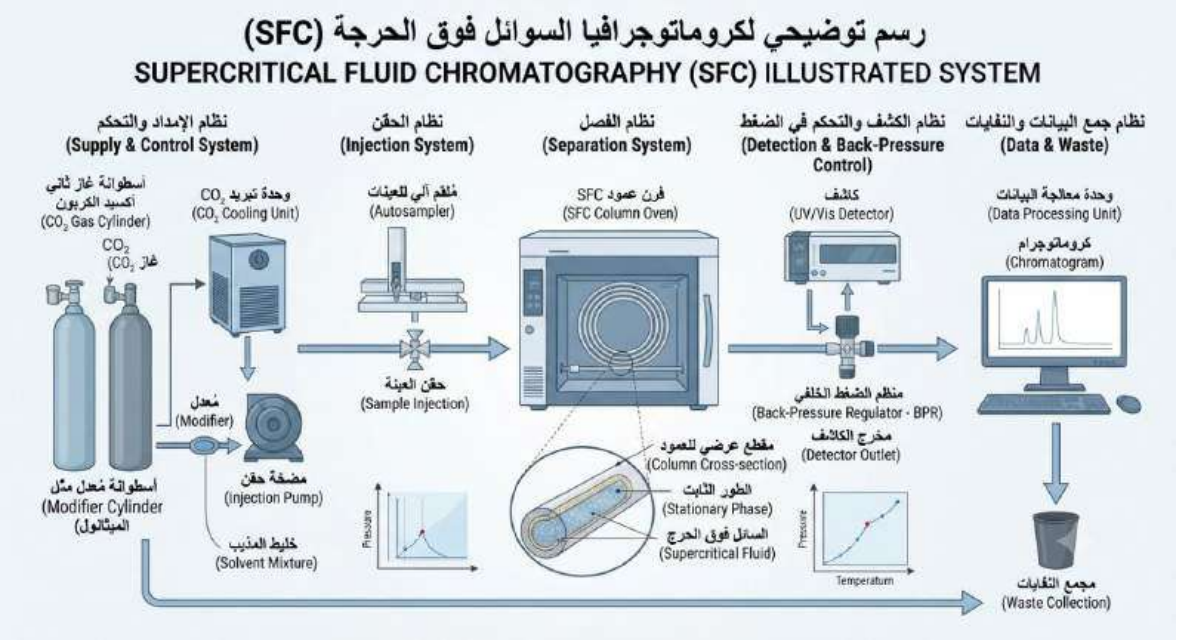


- **المبدأ (Principle):** تعتمد على فصل المركبات المتطايرة بناءً على توزيعها بين الطور الساكن (**Stationary phase**) -وعادة ما يكون طلاءً سائلاً داخل عمود شعري- والطور المتحرك (**Mobile phase**) وهو غاز خامل مثل الهيليوم أو النيتروجين (Skoog et al., 2024).
- **التطبيقات (Applications):** مفيدة بشكل خاص لتحليل المركبات العضوية المتطايرة (**VOCs**) مثل معجلات الاشتعال (**Accelerants**) في تحقيقات الحريق العمد، والمخدرات، ومخلفات المتفجرات، والملوثات البيئية (Agapiou, 2018).

كروماتوجرافيا السوائل فوق الحرجة (Supercritical Fluid Chromatography - SFC):

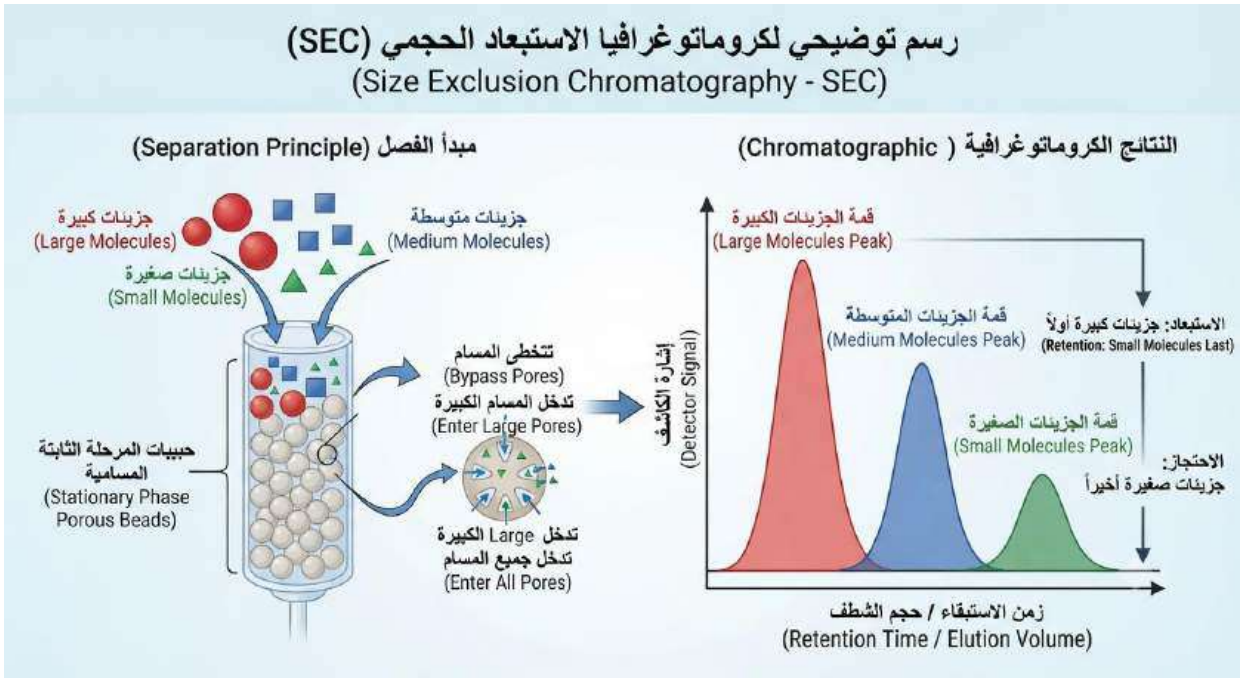
- **المبدأ (Principle):** تستخدم السوائل فوق الحرجة (عادةً ثاني أكسيد الكربون) كطور متحرك، مما يوفر مزايا مثل التحليل السريع والتوافق مع المركبات القطبية وغير القطبية (Willard et al., 1988).
- **التطبيقات (Applications):** يمكن تطبيقها لتحليل العقاقير، المنتجات الطبيعية، والآثار الزهيدة الأخرى في العينات الجنائية.

وغالباً ما تُقرن هذه التقنيات الكروماتوجرافية بطرق كشف متطورة مثل مطيافية الكتلة (**GC-MS, LC-MS**) أو مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية (**UV-Vis**) لتعزيز الحساسية والانتقائية وقدرات التحديد في تحليل الآثار الزهيدة (Agapiou, 2018).



كروماتوغرافيا الاستبعاد الحجمي (Size Exclusion Chromatography - SEC)

يمكن استخدام هذه التقنية كميزة تحضيرية للتجزئة المسبقة (**Prior fractionation**) للزيوت والدهون والعينات البيئية إلى أجزاء ذات أوزان جزيئية محددة، وهي وسيلة فعالة لإزالة المواد ذات الوزن الجزيئي العالي جداً من العينات المعقدة (Gauglitz & Vo-Dinh, 2003).



طرق الاستخلاص الحديثة (Modern Methods of Extraction):

تشمل هذه الطرق أساليب متنوعة في الكروماتوغرافيا، بالإضافة إلى منهجيات استخلاص خاصة من الجيل الحالي مثل: تكوين الزوج الأيوني (**Ion-pair formation**)، والاستخلاص بالطور الصلب (**Solid Phase Extraction - SPE**)، والاستخلاص الميكروي بالطور الصلب (**SPME**)، والاستخلاص الميسلي (**Micellar extraction**). كما بدأت تظهر أنواع خاصة من الهضم كوسيلة لعزل المواد السامة من خلال المعالجة الكيميائية، مثل الهضم بالميكروويف (**Microwave**

digestion) والهضم بمصدر البلازما للعينات غير العضوية، ليتم النظر فيها ضمن التحليلات السمومية الروتينية. وبناءً على ذلك، توجد طرق استخلاص متنوعة تحت مسمى "الطرق الحديثة" التي قد تكون غير مستغلة بالقدر الكافي في السياق الهندي بسبب نقص المرافق التحليلية أو الخبرة الفنية. ونظراً لصعوبة مواكبة التدفق الكبير للأحراز (**Exhibits**)، بدأت الطرق الحديثة تحل محل الطرق التقليدية لتحقيق سرعة التحليل. وقد أصبحت بعض الطرق مثل **HPLC** و **HPTLC** و **GLC** و **GC-Head Space** وتقنية فرن الميكروويف هي الطرق المفضلة. أما الطرق الأخرى، بما في ذلك التقنيات الهجينة مثل **HPLC-GC** و **SFC-GC** و **GC-MS**، فهي قيد التطوير لتوحيد معاييرها. ويجب اتباع المراجع المتاحة في الأدبيات العلمية لتوحيد المعايير أو الوصول إلى ظروف تحليلية قياسية بعد التجارب والمقارنة مع الطرق الأخرى (Gauglitz & Vo-Dinh, 2003).

التطبيقات الرئيسية للتقنيات الكروماتوجرافية

تجد التقنيات الكروماتوجرافية تطبيقات واسعة عبر تخصصات متنوعة داخل العلوم الجنائية، مما يساعد في تحليل وتفسير الأدلة التي يتم مواجهتها في التحقيقات:

1. تحليل المخدرات (Drug Analysis):

- تُستخدم الكروماتوجرافيا لتحديد وقياس العقاقير المخدرة (**Drugs of abuse**) في السوائل البيولوجية (الدم، البول، اللعاب) والعينات الصلبة (المساحيق، الأقراص).
- تساعد في الكشف عن المواد الخاضعة للرقابة (**Controlled substances**)، والأدوية الصيدلانية، ونواتج أيضها (**Metabolites**)، مما يوفر أدلة حاسمة في قضايا تهريب المخدرات، الجرعات الزائدة، والقيادة تحت التأثير (Skoog et al., 2024).

2. التحقيق في الحرائق العمد (Arson Investigation):

- تساعد الكروماتوجرافيا في تحليل معجلات الاشتعال (**Accelerants**) مثل البنزين، الكيروسين، وسوائل الولاعات الموجودة في مواقع الحريق.
- تُستخدم الكروماتوجرافيا الغازية المقترنة بمطيافية الكت (**GC-MS**) بشكل شائع لتحديد وتوصيف البقايا المتطايرة التي تتركها المعجلات، مما يساعد في تحديد سبب وأصل الحريق (Agapiou, 2018).

3. علم السموم (Toxicology):

- تعتبر التقنيات الكروماتوجرافية حيوية في تحديد وقياس المواد السامة والسموم ونواتج الأيض في العينات البيولوجية.
- توفر أدلة أساسية في القضايا المتعلقة بالتسمم، والقتل العمد، والوفيات العرضية، والتعرض المهني للمواد الكيميائية الخطرة (Alsop & Matousek, 2020).

تحليل الآثار الزهيدة (Trace Evidence Analysis):

تساعد الكروماتوجرافيا في تحليل المواد الزهيدة مثل الألياف، والدهانات، والأحبار، ومخلفات المتفجرات، ومخلفات إطلاق النار. تمكن هذه التقنية علماء الأدلة الجنائية من تحديد ومقارنة المواد الموجودة في مسرح الجريمة مع تلك المأخوذة من المشتبه بهم أو المصادر المعروفة، مما يساعد في ربط الجناة بمسرح الجريمة أو تحديد مصدر المواد الجرمية (DeForest, 2018).

الأنثروبولوجيا الجنائية (Forensic Anthropology):

تُستخدم التقنيات الكروماتوجرافية في تحليل البقايا العضوية على عينات العظام، مثل الدم أو البول أو الملوثات البيئية. وتساعد هذه التقنيات في تقدير "فترة ما بعد الوفاة" (**Postmortem interval - PMI**)، وتحديد سبب الوفاة، والكشف عن الأدوية أو السموم الموجودة في الرفات الهيكلية (Lennard & Stanley, 2019).

العلوم الجنائية البيئية (Environmental Forensics):

تساعد الكروماتوجرافيا في تحليل العينات البيئية مثل التربة والمياه والهواء والنباتات بحثاً عن الملوثات والسموم. كما تساهم في التحقيق في الجرائم البيئية، والتخلص غير القانوني من النفايات، والتسربات الكيميائية، وتقييم تأثير التلوث على صحة الإنسان والنظم البيئية (Lee & Lee, 2019).

الكيمياء الجنائية (Forensic Chemistry):

تُستخدم الكروماتوجرافيا على نطاق واسع في تحليل الأدلة غير البيولوجية مثل الألياف، والدهانات، وشظايا الزجاج، ومخلفات المتفجرات. وهي تساعد في تحديد وتوصيف المكونات الكيميائية لمواد الأدلة، مما يوفر معلومات حاسمة لإعادة بناء مسرح الجريمة (**Reconstructing crime scenes**) وإثبات الروابط بين المشتبه بهم والضحايا ومسرح الجريمة (Skoog et al., 2024).

التقنيات الهجينة (SFC-GC & Hyphenated Techniques: HPLC-GC):

تسمح التقنيات الهجينة مثل (**HPLC-GC**) و (**SFE-GC**) بتجزئة العينات المعقدة مسبقاً وبسرعة وفقاً للوزن الجزيئي أو التصنيف الكيميائي باستخدام عمود تمهيدي (**Pre-column**) مناسب في جهاز **HPLC** أو **SFC**، ثم يتم فصل الأجزاء المناسبة عن طريق كروماتوغرافيا الغاز الشعري (**Capillary GC**) المتصل مباشرة بالنظام (**On-line**). ويتم الربط بين التقنيتين بواسطة صمام تحويل (**Bypass valve**) مزود بحلقة عينة (**Sample loop**) ذات حجم مناسب. تُمرر الأجزاء المختارة إلى العمود الشعري عبر فجوة احتجاز كبيرة (**Retention gap**) تستخدم عملية تبخير المذيب المتزامن لاحتجاز الجزء داخل الفجوة، مما يتجنب أي تلامس أولي مع العمود، مع ضرورة ضبط ظروف التشغيل بشكل مناسب (Jennings, 1987).

مطيافية الكتلة في علم السموم الجنائي (Mass Spectrometry in Forensic Toxicology)

أدت التطورات في مطيافية الكتلة (**Mass Spectrometry - MS**) إلى تعزيز علم السموم الجنائي بشكل كبير، مما سمح بالكشف عن العقاقير والسموم ونواتج الأيض (**Metabolites**) وقياسها في مختلف العينات البيولوجية (Agapiou, 2018). يستكشف هذا القسم كيف تساهم تقنيات مثل الكروماتوجرافيا السائلة المقترنة بمطيافية الكتلة (**LC-MS**)

والكروماتوجرافيا الغازية المقترنة بمطيافية الكتلة (**GC-MS**) في التحليل الدقيق للعينات الجنائية (Wilson & Scrimgeour, 2019). وتعد مطيافية الكتلة تقنية تحليلية حاسمة تستخدم على نطاق واسع في علم السموم الجنائي لتحديد وقياس العقاقير والسموم والمواد الأخرى في العينات البيولوجية (Chatwal & Anand, 2019). يستخدم خبراء السموم الجنائيون مطيافية الكتلة جنباً إلى جنب مع تقنيات أخرى مثل الكروماتوجرافيا السائلة (**LC**) أو الكروماتوجرافيا الغازية (**GC**) لفصل المزيج المعقد من المركبات قبل إخضاعها لتحليل مطياف الكتلة (Willard et al., 1988).

تطبيقات مطيافية الكتلة في علم السموم الجنائي Applications of MS in Forensic Toxicology

فيما يلي كيفية تطبيق مطيافية الكتلة بشكل نموذجي في مختبرات السموم الجنائية:

1. تحضير العينة (Sample Preparation): يتم جمع العينات البيولوجية مثل الدم، البول، اللعاب، أو الشعر من الأفراد المشتبه في تعاطيهم للمخدرات أو تعرضهم للتسمم. يتم بعد ذلك معالجة هذه العينات لاستخلاص المركبات المستهدفة (**Target compounds**). تشمل طرق التحضير: ترسيب البروتين (**Protein precipitation**)، الاستخلاص سائل-سائل (**LLE**)، الاستخلاص بالطور الصلب (**SPE**)، أو الاشتقاق (**Derivatization**) لتحسين حساسية وانتقائية الكشف (Skoog et al., 2024).

2. الفصل الكروماتوجرافي (Chromatographic Separation): قبل دخول مطياف الكتلة، يتم فصل المركبات المستهدفة باستخدام تقنيات مثل الكروماتوجرافيا السائلة (**LC**) أو الغازية (**GC**). ويعد **LC-MS** و **GC-MS** التكوينين الأكثر شيوعاً في علم السموم الجنائي (Agapiou, 2018):

- يفضل استخدام **LC-MS** لتحليل المركبات القطبية والحرارية غير المستقرة (**Thermally labile**).
- بينما يعد **GC-MS** مناسباً للمركبات المتطايرة والمستقرة حرارياً (Willard et al., 1988).

3. التأين (Ionization): تعد مرحلة التأين خطوة حاسمة حيث يتم تحويل جزيئات المادة المراد تحليلها (**Analyte**) إلى أيونات. تشمل التقنيات الشائعة في **LC-MS**: التأين بالرش الإلكتروني (**ESI**) والتأين الكيميائي عند الضغط الجوي (**APCI**). أما في **GC-MS** فيستخدم التأين الإلكتروني (**EI**) أو التأين الكيميائي (**CI**) (Chatwal & Anand, 2019).

4. تحليل الكتلة (Mass Analysis): بعد التأين، يتم تسريع الأيونات داخل محلل الكتلة (**Mass analyzer**)، الذي يقوم بفصلها بناءً على نسبة الكتلة إلى الشحنة (z/m). ومن المحللات الشائعة في السموم الجنائية: المحلل رباعي الأقطاب (**Quadrupole**)، زمن الطيران (**TOF**)، ومصيدة الأيونات (**Ion trap**) (Harvey, 2000). يوفر المحلل معلومات حول كتلة ووفرة كل أيون موجود في العينة.

5. الكشف وتحليل البيانات (Detection and Data Analysis): يقوم الكاشف بتسجيل الأيونات المارة عبر المحلل، مما يولد أطياف الكتلة (**Mass spectra**) التي تمثل توزيع الأيونات. يقوم خبراء السموم بتحليل هذه الأطياف لتحديد وجود المركبات المستهدفة بناءً على نسب z/m الفريدة وأنماط التجزئة (**Fragmentation patterns**) (Agapiou, 2018). ويتم تقدير الكمية (**Quantification**) غالباً بمقارنة شدة إشارة أيونات المادة مع المعايير الداخلية (**Internal standards**) أو منحنيات المعايرة.

6. التفسير وكتابة التقارير (Interpretation and Reporting): بعد انتهاء التحليل، يفسر خبراء السموم النتائج في سياق القضية ويعدون تقارير تلخص نتائجهم. تُستخدم هذه المعلومات كأدلة في الإجراءات القانونية لتحديد قضايا مثل التسمم

الدوائي، أو الجرعات الزائدة، أو الامتثال لبرامج العلاج من الإدمان (David & Black, 2018). وتلعب مطيافية الكتلة دوراً حاسماً في علم السموم الجنائي من خلال توفير تحليل دقيق وموثوق لمجموعة واسعة من المركبات، مما يساهم بفعالية في دعم التحقيقات الجنائية والمسار القضائي (DeForest, 2018).

التقنيات الطيفية لتحديد المواد Spectroscopic Techniques for Substance Identification

تلعب الطرق الطيفية، بما في ذلك مطيافية الأشعة تحت الحمراء (**Infrared spectroscopy**) ومطيافية رامان (**Raman spectroscopy**)، دوراً حيوياً في التحديد السريع وغير المدمر (**Non-destructive identification**) للمواد في التحليل الجنائي (Alsop & Matousek, 2020). يستكشف هذا القسم تطبيقاتها في تحديد المخدرات، والمتفجرات، والمواد الأخرى التي يتم مواجهتها في التحقيقات الجنائية (Kellner et al., 2004).

المراجع References

Aderjan, R., & Bogusz, M. (1988). Nitroalkanes as a multidetector retention index scale for drug identification in gas chromatography. J. Chromatogr., 454, 345–351.

Adlard, E. R. (2003). Fifty years of gas chromatography. Chromatographia, 57(Suppl), S13–S18.

***Agapiou, A.** (2018). Recent advances in the application of mass spectrometry and its instrumental setup for forensic chemistry. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 33(10), 1649-1676. https://doi.org/10.1039/C8JA00164E*

***Alsop, L., & Matousek, P.** (2020). Forensic applications of Raman spectroscopy: A review. Analytical Methods, 12(2), 141-155. https://doi.org/10.1039/C9AY02133D*

***Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.).** (1980). Official and tentative methods of analysis.*

***Bamford, F.** (1940). Poisons: Their isolation and identification. J. & A. Churchill Ltd.*

Bogusz, M., Neidl-Fischer, G., & Aderjan, R. (1988). Use of corrected retention indices based on 1-nitroalkane and alkyl arylketone scales for HPLC identification of basic drugs. J. Anal. Toxicol., 12(6), 325–329.

***Bough, P. J.** (1993). Gas chromatography: A practical approach (1st ed., p. 174). Oxford University Press.*

***Caddy, B.** (2019). Forensic DNA analysis: A laboratory manual. CRC Press.*

***Chatwal, G. R., & Anand, S. K.** (2019). Instrumental methods of chemical analysis. Himalaya Publishing House.*

***Clarke, E. G. C.** (1986). Isolation and identification of drugs (2nd ed.). The Pharmaceutical Press.*

***Curry, A. S.** (1976). Poison detection in human organs (3rd ed.). Charles C. Thomas.*

***David, N. N., & Black, S. (Eds.).** (2018). Forensic science education and training: A tool-kit for lecturers and practitioners. Wiley.*

***DeForest, P. R.** (2018). Analytical techniques in forensic science. John Wiley & Sons.*

***Dionex.** (n.d.). Applicable note nos. 320 & 321 on ASE. Dionex Corporation.*

***Directorate of Forensic Science Laboratories.** (n.d.). Home page. Government of Maharashtra Department. https://dfsl.maharashtra.gov.in/en*

Done, J. C., Kennedy, G. J., & Knox, J. H. (1973). The role of particle size and configuration in high speed liquid chromatography. In S. G. Perry & E. R. Adlard (Eds.), Gas Chromatography (pp. 145–155). Applied Science Publishing.

Ettre, L. S. (2002). Milestones in the evolution of chromatography. ChromSource.

***Ewing, G. W.** (Ed.). (1990). Analytical instrumentation handbook. Marcel Dekker, Inc.*

Franke, J. P., de Zeeuw, R. A., & Bogusz, M. (1993). An overview of the standardization of chromatographic methods for screening analysis in toxicology by means of retention indices and secondary standards. Fresenius J. Anal. Chem., 347(1), 67–72.

***Gauglitz, G., & Vo-Dinh, T.** (Eds.). (2003). Handbook of spectroscopy. Wiley-VCH.*

Ghosh, S., & Bagchi, K. N. *(1948). Organic and toxicological chemistry. Art Press.*

Giddings, J. C., & Eyring, H. (1955). A molecular dynamic theory of chromatography. J. Phys. Chem., 59(5), 416–421.

Golay, M. J. E. (1958). Theory of chromatography in open and coated tubular columns with round and rectangular cross sections. In D. H. Desty (Ed.), Gas Chromatography 1958 (pp. 36–55). Butterworths.

Gour, T. H. *(Ed.). (1972). Guide to modern methods of instrumental analysis. Wiley-Interscience.*

Grob, R. L., & Barry, E. F. (Eds.). (2004). Modern practice of gas chromatography (4th ed.). Wiley.

Harvey, D. *(2000). Modern analytical chemistry. McGraw-Hill Education.*

Huizer, H. (1991). The use of gas chromatography for the detection and quantitation of abused drugs. In T. A. Gough (Ed.), The analysis of drugs of abuse (pp. 23–92). Wiley.

Issaq, H. J. (Ed.). (2002). A century of separation science. Dekker.

IUPAC. (1997). Compendium of analytical nomenclature: Definitive rules (3rd ed.). https://www.iupac.org/publications/analytical-compendium/

James, A. T., & Martin, A. J. P. (1952). Gas-liquid partition chromatography: The separation and microestimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. Biochem. J., 50(5), 679–690.

Jennings, W. *(1987). Analytical gas chromatography. Academic Press, Inc.*

Jones, G. R., & Singer, P. P. *(1989). In R. C. Baselt (Ed.), Advances in analytical toxicology (Vol. 2). Year Book Medical Publishers.*

Jorgenson, J. W., & Lukacs, K. D. (1981). Free-zone electrophoresis in glass capillaries. Clin. Chem., 27(9), 1551–1553.

Kaiser, R. E. (1976a). Correct measurement and evaluation of efficiency factors in chromatography—real separator stage factor, separator factor, apportioning efficiency factor. 1. Gas-Chromatography. Chromatographia, 9(7), 337–349.

Kaiser, R. E. (1976b). True quality of separation in chromatography (GC, HPLC, HPTLC). Chromatographia, 9(10), 463–467.

Kellner, R., Mermet, J. M., Otto, M., Valcarcel, M., & Widmer, H. M. *(2004). Analytical chemistry: A modern approach to analytical science (2nd ed.). Wiley-VCH.*

Kovats, E. (1961). Zusammenhänge zwischen struktur und gaschromatographischen daten organischer verbindungen. Fresenius Z. Anal. Chem., 181(4), 351–366.

Lee, H., & Lee, S. *(2019). Applications of analytical chemistry techniques in forensic science: A review. Analytical Sciences, 35(2), 123-136. https://doi.org/10.2116/analsci.18R001*

Lee, J., & Taylor, D. R. (1982). Relationships between temperature programmed and isothermal Kovats retention indexes in gas-liquid-chromatography. Chromatographia, 16(1), 286–289.

Lennard, C. J., & Stanley, C. M. (Eds.). *(2019). Forensic microscopy for skeletal tissues: Methods and protocols (Vol. 1878). Humana Press.*

Lundquist, F. *(Ed.). (1962). Methods of forensic science (Vols. 1–4). Interscience Publishers.*

Maehly, A. *(1981). Chemical criminalistics. Springer-Verlag.*

Martin, A. J. P. (1949). Some theoretical aspects of partition chromatography. Biochem. Soc. Symp., 3, 4–20.

Martin, A. J. P., & Synge, R. L. M. (1941). A new form of chromatogram involving two liquid phases. Biochem. J., 35(12), 1358–1368.

Middleditch, B. S. *(1989). Analytical artifacts: GC, HPLC, TLC and PC (Journal of Chromatography Library, Vol. 44). Elsevier.*

Otto, J. *(1856). Annalen der Chemie und Pharmacie, 100(1), 39–??.*

Sethi, P. D. *(1996). High performance thin layer chromatography. CBS Publishers and Distributors.*

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. *(2024). Fundamentals of analytical chemistry (11th ed.). Cengage Learning.*

Smith, R. M. (Ed.). (1995). Retention and selectivity in liquid chromatography. Elsevier.

Stahl, E. *(1969). Thin-layer chromatography (2nd ed.). Springer-Verlag.*

Stanley, C. M., & Lennard, C. J. (Eds.). *(2018). Forensic science and humanitarian action: Interacting with the dead and the living (Vol. 1188). Humana Press.*

Stas, J. S. *(1851). Bull. Acad. Roy. Med. Belg., 11, 304.*

Stewart, C. P., & Stolman, A. *(Eds.). (1961). Toxicology: Mechanisms and analytical methods (Vol. 2). Academic Press.*

Supelco. (1997). The retention index system in gas chromatography: McReynolds constants. http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/7800/7741.pdf

van Deemter, J. J., Zuiderweg, F. J., & Klinkenberg, A. (1956). Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. Chem. Eng. Sci., 5(6), 271–289.

Van Den Dool, H., & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. J. Chromatogr., 11, 463–471.

Watts, V. W., & Simonick, T. F. (1987). A retention index library for commonly encountered drugs and metabolites using tri-n-alkylamines as reference compounds, nitrogen–phosphorus detectors, and dual capillary chromatography. J. Anal. Toxicol., 11(5), 210–214.

Whelpton, R. *(1984). In A. S. Curry (Ed.), Analytical methods in human toxicology. Macmillan.*

Willard, H. H., Merritt, L. L., & Dean, J. A. *(1988). Instrumental methods of analysis (7th ed.). Wadsworth Publishing Company.*

Wilson, E. R., & Scrimgeour, R. J. (Eds.). *(2019). Mass spectrometry imaging: Principles and protocols. Springer.*

Wilson, J. N. (1940). A theory of chromatography. J. Am. Chem. Soc., 62(7), 1583–1591.

CHAPTER (7) الفصل السابع



الكروماتوغرافيا الغازية: حوار الأبخرة ومسرح الفصل الجزيئي

GAS CHROMATOGRAPHY: THE DIALOGUE OF VAPORS AND THE THEATER OF MOLECULAR SEPARATION

الفصل السابع

الكروماتوغرافيا الغازية: حوار الأبخرة ومسرح الفصل الجزيئي

Gas Chromatography: The Dialogue of Vapors and the Theater of Molecular Separation

مقدمة

تعد **الكروماتوغرافيا الغازية (Gas Chromatography - GC)** حجر الزاوية في الكيمياء التحليلية الحديثة، ولا سيما في سياق **علم السموم التحليلي (Analytical Toxicology)**. إنها التقنية التي تمثل التزاوج المثالي بين الفلسفة الميكانيكية للعلوم والقدرة التحليلية الفائقة.

وفي علم السموم التحليلي، تتميز الكروماتوغرافيا الغازية (GC) بعدة مزايا تفوق التقنيات الأخرى واسعة الانتشار مثل الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) والمقايسة المناعية.

أولاً: تمتلك الكروماتوغرافيا الغازية مجموعة من الكواشف الحساسة، مثل كاشف تأين اللهب (FID) "العام"، وكواشف اختيارية مثل (NPD) و (ECD) و (MS)، والتي يمكن استخدامها بالتوازي.

ثانياً: تتوفر الآن على نطاق واسع أعمدة كروماتوغرافيا غازية (شعرية) مستقرة وعالية الكفاءة.

ثالثاً: يسهل ربط الكروماتوغرافيا الغازية بتقنيات تعطي معلومات مباشرة حول هوية المركب، مثل مطيافية الكتلة بتأين الإلكترونات (EI-MS) ومطيافية الأشعة تحت الحمراء بتحويل فوريه (FTIR) **(Grob and Barry, 2004; Rood, 2006)**. كما يتوفر دليل شامل لمصطلحات وتقنيات الكروماتوغرافيا الغازية **(Hinshaw, 2002)**.



وكما هو الحال في (HPLC)، يمكن غالباً الحصول على معلومات نوعية وكمية في نفس التحليل باستخدام (GC)، بشرط اتباع إجراءات المعايرة ومراقبة الجودة (QC) المناسبة. ويعد **برمجية درجة الحرارة** (Temperature programming) في (GC) مناظراً لـ **الشطف المتدرج** (Gradient elution) في (HPLC)، لكنه أسهل بكثير في التنفيذ ويسمح بتحليل مركبات ذات تطايرية مختلفة في تحليل واحد. علاوة على ذلك، فإن العودة إلى الظروف الأولية سهلة، كما أن الترابط بين الوزن الجزيئي (Mr) وزمن الاستبقاء ودرجة حرارة العمود يعد ذا قيمة كبيرة في المساعدة على تحديد القمم في التحليل

السمي الشامل (STA). بالإضافة إلى ذلك، فإن بيانات الاستبقاء في (GC) قابلة للتكرار بين الأيام والأعمدة والأجهزة والمشغلين والمراكز المختلفة، وما إلى ذلك (**الإطار 1**).

الإطار 1: مزايا الكروماتوغرافيا الغازية (GC) في علم السموم التحليلي
إمكانية حقن الخلائط المائية في بعض التطبيقات مثل الإيثانول، رغم أن تحليل "الحيز العلوي" (Headspace) سهل ومطبق على نطاق واسع من المواد المتطايرة.
سهولة استخدام استخلاص المرحلة الصلبة الدقيق (SPME) والامتزاز الحراري.
توفر مجموعة من الأعمدة الشعرية المستقرة والكفؤة.
كواشف حساسة عامة (FID) واختيارية (NPD, ECD, MS).
التحليل النوعي والكمي:
استخدام الأعمدة الشعرية واسعة التجويف مع بطانات الحقن يسهل العمل الكمي.
الاعتماد المتبادل بين زمن الشطف، ودرجة حرارة العمود، والوزن الجزيئي (Mr) ذو قيمة في العمل النوعي.
بيانات الاستبقاء قابلة للتكرار بين الأيام/الأعمدة/المشغلين/المختبرات/الدول.
سهولة برمجة درجة الحرارة والربط مع (MS) أو (FTIR) – الحاجة لأنواع قليلة من الأعمدة بسبب قدرة الفصل العالية خاصة مع (GC-MS).
إمكانية توليد أطياف تأين الإلكترونات (EI) من (GC-MS).
فهرس القمم الرئيسي (Principal peak index) ذو قيمة في التعرف على المركبات.
يمكن استخدامها لمجموعة واسعة من الغازات والمذيبات.

في كروماتوغرافيا الغاز، يتم فصل مكونات العينة المتبخرة نتيجة للتوزيع التفاضلي بين طور متحرك غازي وطور ساكن سائل أو صلب مثبت داخل عمود (Column). عند إجراء عملية الفصل بكروماتوغرافيا الغاز، يتم تبخير العينة وحقنها عند مدخل (رأس) العمود الكروماتوغرافي. وتتم عملية الإلويشن أو الاستخلاص (Elution) من خلال تدفق طور متحرك غازي خامل. وخلافاً لمعظم الأنواع الأخرى من الكروماتوغرافيا، فإن الطور المتحرك لا يتفاعل مع جزيئات المادة المراد تحليلها (التحليلية أو الأناليت - Analyte)؛ وتتمثل وظيفته الوحيدة في نقل الأناليت عبر العمود. **وهناك نوعان من كروماتوغرافيا الغاز:**

1) **كروماتوغرافيا الغاز والسائل (GLC - Gas-Liquid Chromatography).**
2) **كروماتوغرافيا الغاز والصلب (GSC - Gas-Solid Chromatography).**

تُستخدم كروماتوغرافيا الغاز والسائل (GLC) في جميع مجالات العلوم؛ وعادة ما يتم اختصار اسمها إلى **كروماتوغرافيا الغاز (GC)**[1]. أما كروماتوغرافيا الغاز والصلب (GSC) فتعتمد على طور ساكن صلب يحدث فيه احتجاز الأناليت بسبب الامتزاز الفيزيائي (Physical Adsorption). ويُعد تطبيق كروماتوغرافيا الغاز والصلب (GSC) محدوداً بسبب الاحتجاز شبه الدائم للجزيئات النشطة أو القطبية، والذيل الشديد (Severe Tailing) لقمم الإلويشن. ويعود تكون الذيل إلى الطبيعة غير الخطية لعملية الامتزاز. ونتيجة لذلك، لا تُستخدم هذه التقنية على نطاق واسع إلا لفصل أنواع غازية معينة منخفضة الكتلة الجزيئية.

في كروماتوغرافيا الغاز والسائل (GLC)، يتم توزيع الأناليت بين طور متحرك غازي وطور سائل مثبت على سطح مادة مالئة صلبة خاملة أو على الجدران الداخلية لأنبوب شعري (Capillary Tubing). تم اقتراح مفهوم كروماتوغرافيا الغاز والسائل (GLC) لأول مرة في عام 1941 من قبل **مارتن وسينج (Martin and Synge)**، اللذين كانا مسؤولين أيضاً عن تطوير كروماتوغرافيا التوزيع بين سائل وسائل. ومع ذلك، انقضى أكثر من عقد من الزمان قبل أن يتم إثبات قيمة

[1] For detailed treatment of GC, see C. Poole, ed., Gas Chromatography, Amsterdam: Elsevier, 2012; H. M. McNair and J. M. Miller, Basic Gas Chromatog raphy, 2nd ed., Hoboken, NJ: Wiley, 2009; R. L. Grob and E. F. Barry, eds., Mod ern Practice of Gas Chromatography, 4th ed., New York: Wiley-Interscience, 2004; R. P. W. Scott, Introduction to Analytical Gas Chromatography, 2nd ed., New York: Marcel Dekker, 1997; W. Jennings, E. Mittlefehldt, and P. Stremple, Analytical Gas Chromatography, 2nd ed., Orlando, FL: Academic Press, 1997.

كروماتوغرافيا الغاز والسائل (GLC) تجريبياً[2] وقبل أن تبدأ هذه التقنية في الاستخدام كأداة مخبرية روتينية. وفي عام 1955، ظهر أول جهاز تجاري لكروماتوغرافيا الغاز والسائل (GLC) في السوق. ومنذ ذلك الوقت، كان النمو في تطبيقات هذه التقنية هائلاً. وفي الوقت الحالي، يوجد ما يقريب من مليون جهاز لكروماتوغرافيا الغاز قيد الاستخدام في جميع أنحاء العالم.

المنظور الفلسفي: الوجود المختزل في "الزمن"

من الناحية الفلسفية، تجسد الكروماتوغرافيا الغازية مبدأ **"الهوية عبر الزمن"**؛ فالمادة لا تُعرف فقط بتركيبها الذري، بل بسلوكها الديناميكي أثناء الرحلة. إنها عملية **"تفريد" (Individuation)** للمركبات المختبئة داخل المزيج المعقد. في علم السموم، ننتقل من الفوضى الجزيئية (العينة الحيوية) إلى النظام الخطي، حيث يمثل كل "زمن احتجاز" **(Retention Time - RT)** بصمة وجودية فريدة لمركب سام أو ناتج استقلابي.

التأصيل العلمي: التوزيع الديناميكي

علمياً، تعتمد الكروماتوغرافيا الغازية على مبدأ **التوزيع المتزن (Equilibrium Distribution)** للمواد المتطايرة بين طورين:

الطور المتحرك (Mobile Phase): غاز خامل (مثل الهيليوم أو النيتروجين) يعمل كحامل للمواد.

الطور الساكن (Stationary Phase): سائل مجهري أو صلب داخل عمود التحليل.

تعتمد كفاءة الفصل على **الألفة الانتقائية (Selective Affinity)**؛ حيث تنفصل الجزيئات بناءً على ضغطها البخاري وتفاعلها الكيميائي الفيزيائي مع الطور الساكن. في موسوعة السموم، تبرز أهمية هذه التقنية نظراً لقدرتها العالية على كشف المركبات في مستويات تركيز ضئيلة جداً (Trace levels)، مما يجعلها الأداة المثلى في تحليل السموم الطيارة والمنشطات والمخدرات.

الهيكل التنظيمي للفصل (Chapter Framework)

يستعرض هذا الفصل المسار التقني والميكانيكي لعملية التحليل السمومي، بدءاً من هندسة الجهاز وصولاً إلى أعقد تطبيقات الفصل:

- **الأجهزة (Instrumentation):** دراسة التشريح الميكانيكي للجهاز، بدءاً من **المحاقن (Injectors)** التي تضمن الانتقال الحراري السليم للعينة، وصولاً إلى تقنيات **التركيز بالتبريد والامتزاز الحراري (Cryofocusing/thermal desorption)** لرفع حساسية الكشف.
- **ترسانة الكواشف (Detectors for GC):** وهي "الحواس" الاصطناعية للجهاز. تتنوع من الكواشف العامة مثل **كاشف تأين اللهب (FID)**، إلى الكواشف المتخصصة في السموم مثل **كاشف التقاط الإلكترونات (ECD)** الحساس للهالوجينات، و**كاشف النيتروجين والفسفور (NPD)** الضروري لتحليل الأدوية والمبيدات.
- **هندسة الأعمدة (Columns):** الانتقال من **الأعمدة المحشوة (Packed columns)** الكلاسيكية إلى **الأعمدة الشعرية (Capillary columns)** ذات الكفاءة العالية، مع استعراض **الكروماتوغرافيا متعددة الأبعاد (Multidimensional GC)** لفك شفرات العينات الأكثر تعقيداً.

[2] A. T. James and A. J. P. Martin, Analyst, 1952, 77, 915–932, DOI: 10.1039/ AN9527700915.

- **التحوير الكيميائي (Derivatization):** فن تحويل المواد غير المستقرة حرارياً أو غير القابلة للتطاير إلى مشتقات يمكن تحليلها غازياً، وهو أمر حيوي في البحث عن السموم القطبية.
- **الفصل الكيرالي (Chiral Separations):** التمييز بين المتصاوغات المرآتية، وهو ما يمثل ذروة الدقة في التفريق بين الأدوية المتماثلة في الصيغة والمختلفة في التأثير السمي.
- **التطبيق السمي (Toxicological Application)**
- يختتم الفصل بالجانب العملي التطبيقي، حيث تبرز **الكروماتوغرافيا الغازية** كأداة لا غنى عنها في **التحليل السمومي المنهجي (Systematic Toxicological Analysis - STA)**. وبفضل تقنيات مثل **تثبيت زمن الاحتجاز (Retention Time Locking - RTL)**، أصبح بإمكان المختبرات الجنائية والسمومية توحيد النتائج عبر القارات، مما يحول البيانات الكروماتوغرافية إلى أدلة قطعية في ساحات القضاء.

عيوب الكروماتوغرافيا الغازية

تشـــــمل عيوب الكروماتوغرافيا الغازية اشتراط أن يكون المادة المراد تحليلها (Analyte) أو مشتقاتها متطايرة ومستقرة عند درجة الحرارة المطلوبة للتحليل (عملياً أقل من 400 درجة مئوية تقريباً). بالإضافة إلى ذلك، فإن المواد التي تحتوي على مجموعات وظيفية شديدة القطبية أو قابلة للتأين قد تعطي أداءً ضعيفاً (قمم عريضة وذات تذييل)، وعادة ما تكون هناك حاجة لشكل من أشكال تحضير العينة (**الإطار 2**). علاوة على ذلك، قد تكون بعض المركبات الموجودة في مستخلصات العينات غير مستقرة حرارياً، وقد تتداخل نواتج التحلل في التحليل. وبناءً على ذلك، بالإضافة إلى اختيار إجراء تحضير العينة، والعمود، وظروف الكروماتوغرافيا والكشف، يجب إيلاء الاعتبار الواجب لعوامل أخرى تشمل جمع العينات وتخزينها، واختيار المعيار الداخلي وضمان الجودة. ومع ذلك، تظل الكروماتوغرافيا الغازية هي الطريقة المفضلة للغازات والمواد المتطايرة الأخرى مثل الإيثانول والمخدرات الاستنشاقية. كما تُستخدم (GC) على نطاق واسع في تحليل المركبات الأخرى، وفي التحليل السمي الشامل (STA)، وكواجهة لمطيافية الكتلة (MS)، حيث تبرز الميزة الخاصة هنا في إمكانية الحصول على أطياف تأين الإلكترونات (EI).

الإطار 2: محددات (عيوب) الكروماتوغرافيا الغازية في علم السموم التحليلي
الأجهزة والبنية التحتية مكلفة: تتطلب مشغلين ذوي خبرة، وإمدادات غاز نقية، ومواد استهلاكية، ودعماً تقنيّاً من الشركة المصنعة للجهاز.
الحقن عبر الحاجز (Septum): يحتاج إلى صيانة دورية متكررة.
التحليل المتسلسل: يتطلب وجود أجهزة حقن تلقائي (Autoinjectors).
المعالجة المسبقة: عادة ما تكون هناك حاجة لشكل من أشكال المعالجة المسبقة للعينة.
محدودية التحكم: لا يمكن تعديل "الاصطفائية" (Selectivity) عن طريق تعديل الطور المتحرك (كما هو الحال في HPLC).
المركبات القطبية: لا يمكن تحليل المركبات شديدة القطبية أو ذات الوزن الجزيئي (Mr) العالي (مقارنة بـ HPLC)، وإن كان يمكن إجراء "الاشتقاق" (Derivatization) أحياناً.
أول أكسيد الكربون: لا يمكن تحليله مباشرة بواسطة كاشف تأين اللهب (FID).
التداخل: هناك دائماً احتمالية لحدوث تداخل من المركبات التي تخرج في نفس زمن الاستبقاء (Coeluting compounds).

مبادئ كروماتوغرافيا الغاز والسائل (Principles of GLC)

إن المبادئ العامة للكروماتوغرافيا، التي تم تطويرها ، والعلاقات الرياضية الملخصة ، قابلة للتطبيق على كروماتوغرافيا الغاز (GC) مع تعديلات طفيفة فقط تنشأ من انضغاطية الأطوار المتحركة الغازية.

حجوم الاحتجاز(Retention Volumes)

لأخذ تأثيرات الضغط ودرجة الحرارة في الاعتبار في كروماتوغرافيا الغاز(GC) ، غالباً ما يكون من المفيد استخدام **حجوم الاحتجاز (Retention Volumes)** بدلاً من أوقات الاحتجاز التي تمت مناقشتها في **القسم B. 26** وتُعطى العلاقة بين الاثنين في المعادلتين (1) و:(2)

$$V_R = t_R F \quad (1)$$

$$V_M = t_M F (2)$$

حيث يمثل F متوسط معدل التدفق الحجمي داخل العمود؛ ويمثل V و t حجوم وأوقات الاحتجاز، على التوالي؛ وتشير اللاحقتان (الرمز السفلي) R و M إلى الأنواع التي يتم احتجازها والتي لا يتم احتجازها على العمود.

معدل التدفق داخل العمود غير قابل للقياس المباشر. وبدلاً من ذلك، يتم تحديد معدل تدفق الغاز عند خروجه من العمود تجريبياً باستخدام مقياس التدفق(Flow Meter) ، بالنسبة لمقاييس التدفق الشائعة من نوع الفقاعة الصابونية-(Soap-bubble type)، حيث يكون الغاز مشبعاً بالماء، يرتبط متوسط معدل التدفق F بمعدل التدفق المقاس F_m بالعلاقة التالية:

$$F = F_m \times \frac{T_c}{T} \times \left(1 - \frac{P_{H_2O}}{P}\right) (3)$$

حيث يمثل T_c درجة حرارة العمود بوحدة الكلفن(K) ، و T هي درجة الحرارة عند مقياس التدفق، و P هو ضغط الغاز في نهاية العمود. وعادة ما يكون P و T هما الضغط ودرجة الحرارة المحيطين. أما الحد المتضمن لضغط بخار الماء (P_{H_2O}) فهو تصحيح للضغط المستخدم عندما يكون الغاز مشبعاً بالماء. ويعتمد كل من V_R و V_M على متوسط الضغط داخل العمود — وهي كمية تقع بين ضغط المدخل P_i وضغط المخرج P (الضغط الجوي). عامل تصحيح انخفاض الضغط j ، المعروف أيضاً باسم **عامل الانضغاطية(Compressibility Factor)** ، يأخذ في الحسبان أن الضغط داخل العمود يعد دالة غير خطية للنسبة P_i/P. ويتم الحصول على حجوم الاحتجاز المصححة V_R^0 و V_M^0 ، والتي تتوافق مع الحجوم عند متوسط ضغط العمود، من العلاقات الآتية:

$$V_R^0 = jt_R F \quad \text{و} \quad V_M^0 = jt_M F (4)$$

حيث يمكن حساب j من العلاقة:

$$j = \frac{3}{2}\left[\frac{\left(\frac{P_i}{P}\right)^2 - 1}{\left(\frac{P_i}{P}\right)^3 - 1}\right] (5)$$

يتم بعد ذلك تعريف **حجم الاحتجاز النوعي (V_g)** كالتالي:

$$V_g = \frac{V_R^0 - V_M^0}{m_S} \times \frac{273.15}{T_c} = \frac{jF(t_R - t_M)}{m_S} \times \frac{273.15}{T_c} (6)$$

حيث يمثل m_S كتلة الطور الساكن، وهي كمية يتم تحديدها وقت تحضير العمود.

العلاقة بين حجم الاحتجاز النوعي (V_g) ومعامل التوزيع (K)

يمكن ربط حجم الاحتجاز النوعي (V_g) بمعامل التوزيع (K_c). للقيام بذلك، نقوم بالتعويض بالتعبير الذي يربط بين t_R و t_M بعامل السعة k في المعادلة (6)، مما يعطي:

$$V_g = \frac{jFt_M k}{m_S} \times \frac{273.15}{T_c}$$

وبدمج هذا التعبير مع المعادلة (4) ينتج لدينا:

$$V_g = \frac{V_M^0 k}{m_S} \times \frac{273.15}{T_c}$$

وبالتعويض بالمعادلة (26-9) الخاصة بعامل السعة k(حيث يكون هنا V_M^0و V_Mمتطابقين) نحصل على:

$$V_g = \frac{KV_S}{m_S} \times \frac{273.15}{T_c}$$

وبما أن كثافة السائل على الطور الساكن ρ_Sتُعطى بالعلاقة:

$$\rho_S = \frac{m_S}{V_S}$$

حيث يمثل V_Sحجم الطور الساكن. إذن تصبح المعادلة:

$$V_s = \frac{K}{\rho_S} \times \frac{273.15}{T_c}$$

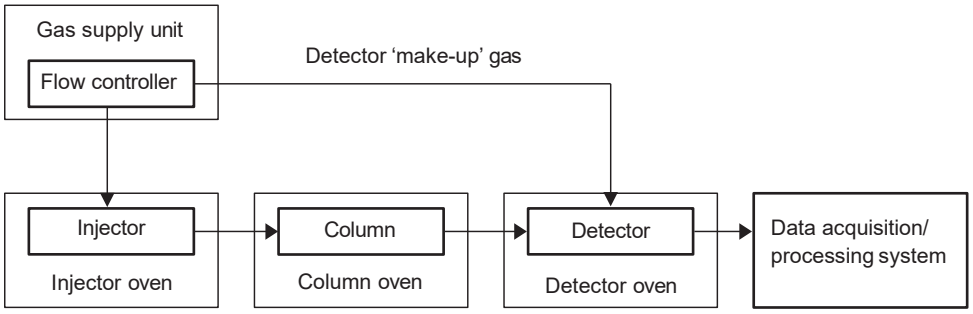
ملاحظة: تجدر الإشارة إلى أن حجم الاحتجاز النوعي (V_g) عند درجة حرارة معينة لا يعتمد إلا على معامل التوزيع للمذاب وكثافة السائل المكون للطور الساكن.

تأثير معدل تدفق الطور المتحرك (Effect of Mobile-Phase Flow Rate)

يعتبر حد الانتشار الطولي (B/u) يُعد أكثر أهمية في كروماتوغرافيا الغاز والسائل (GLC) مقارنة بالعمليات الكروماتوغرافية الأخرى؛ وذلك بسبب معدلات الانتشار الكبيرة جداً في الغازات (حيث تكون أكبر بـ 10^4إلى 10^5مرة مقارنة بالسوائل). ونتيجة لذلك، فإن النقاط الدنيا في المنحنيات التي تربط بين ارتفاع النظريّة (H) ومعدل التدفق (منحنيات فان ديمتر - van Deemter plots) عادة ما تكون عريضة بشكل ملحوظ في كروماتوغرافيا الغاز.

الأجهزة (Instrumentation)

يتكون نظام الكروماتوغرافيا الغازية (GC) عادةً من: وحدة التحكم في الغاز (التي تمد العمود بالغاز الحامل، وتمد الكاشف بالغازات اللازمة مثل الهواء المضغوط والهيدروجين)، ونظام حقن العينة، وعمود التحليل، وكاشف متصل بوحدة الحصول على البيانات ومعالجتها (**الشكل 1**).



المكونات الأساسية لنظام الكروماتوغرافيا الغازية(GC)

Primary Components of a Gas Chromatography (GC) System

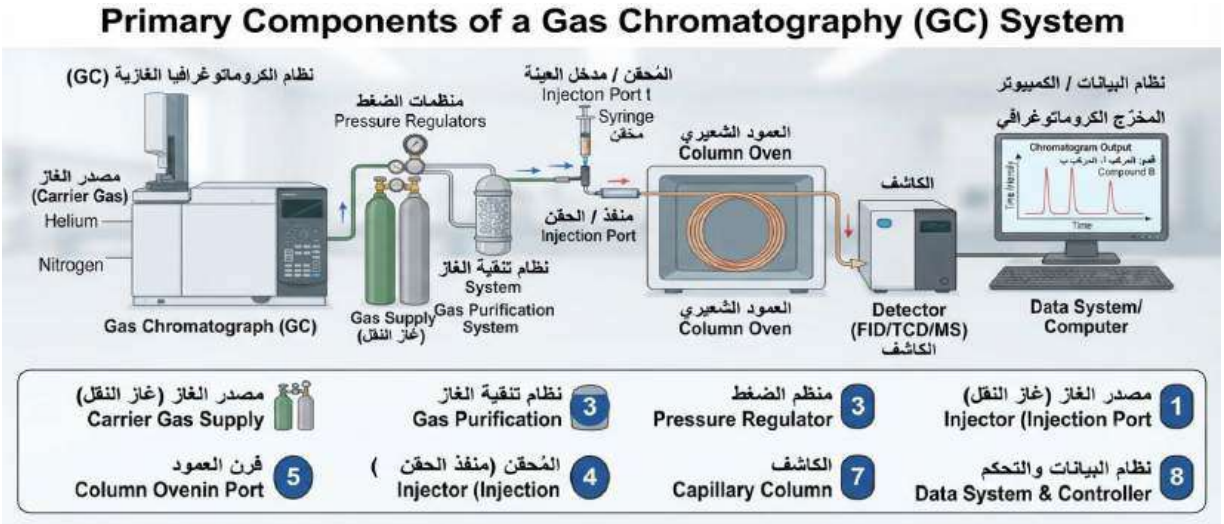


Figure 1 Block diagram of a gas chromatograph.

الشكل(1-أ): مخطط كتلي لجهاز الكروماتوغرافيا الغازية.

يتم تسخين أفران المحقن، والعمود، والكاشف بشكل مستقل عادةً. ويُحافظ على الكاشف عموماً عند درجة حرارة أعلى من أقصى درجة حرارة يصل إليها فرن العمود؛ وذلك لتقليل مخاطر "التجزئة" أو تكثف مكونات العينة داخل الكاشف. وينطبق اعتبار مماثل على فرن المحقن في وضع التشغيل المتساوي الحرارة (Isothermal). كما تتطلب بعض الكواشف، مثل كاشف التقاط الإلكترونات (ECD) ، تدفق غاز إضافي "تعويضي" (Make-up gas) لتقديم الأداء الأمثل.

عادةً ما تُشترى أجهزة الكروماتوغرافيا الغازية كوحدة واحدة، بينما تكون إمدادات الغاز ونظام التقاط البيانات منفصلة. وبشكل متزايد، يتم التحكم في الأجهزة من خلال جهاز كمبيوتر شخصي يوفر أيضاً تسهيلات التقاط البيانات. ورغم أن الأسطوانات التجارية تعد مصدراً ملائماً للغازات، إلا أن هناك بدائل متاحة للهواء (ضاغط بسيط)، والهيدروجين (مولد هيدروجين إلكتروليتي)، والنيتروجين (مولد نيتروجين يعتمد على المنخل الجزيئي). ومع ذلك، فإن المراقبة والصيانة الدورية، واستخدام الفلاتر المناسبة لإزالة الهيدروكربونات والأكسجين والرطوبة، هي أمور إلزامية. يجب دائماً استخدام الفلاتر مع الغاز القادم من الأسطوانات.



شكل رقم (1- ب) : مكونات جهاز الكروماتوغرافي الغازي

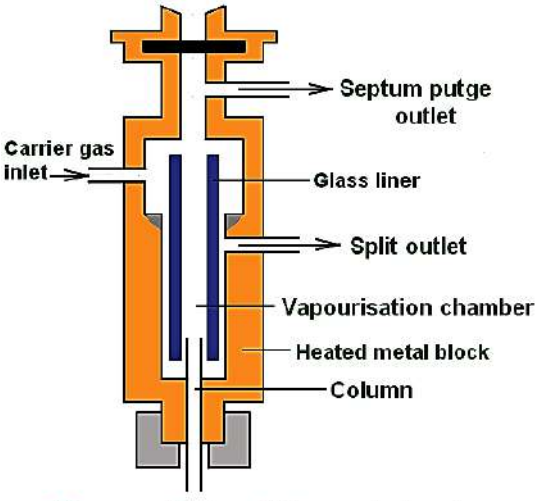
المحاقن وتقنية الحقن

غالباً ما يكون علم السموم التحليلي عبارة عن "تحليل آثار" (Trace analysis)، وبالتالي تكون الحساسية هي العامل المحدد غالباً. لذا، من المهم حقن أكبر قدر ممكن من مستخلص العينة في العمود، مع توازن العوامل الأخرى (مثل نسبة الإشارة إلى الضوضاء). في (GC)، تكون سعة العينة لكل حقنة محدودة، لكن هذا لا يهم كثيراً لأن كواشف (GC) حساسة للغاية. ومع ذلك، في معظم طرق (GC)، فإن الصعوبات الكامنة في حقن أحجام صغيرة نسبياً من المستخلص بشكل متكرر وتكراري تفرض استخدام **المعايرة الداخلية** (Internal standardization). في الأعمدة المحشوة (Packed columns)، يتم حقن العينة عادةً عبر حقنة (Syringe) تمر من خلال حاجز مطاطي من السيليكون (Septum) في منفذ الحقن؛ ومن المهم استخدام حواجز "منخفضة النزف" (Low-bleed septa)، خاصة مع الكواشف الحساسة مثل (ECD).

إن استخدام "بطانة منفذ حقن زجاجية" (Glass injection port liner) يمكن إزالتها وتنظيفها يقلل من تراكم البقايا غير المتطايرة على العمود، ولكن قد يُفضل "الحقن المباشر داخل العمود" (On-column injection) إذا كان المطلوب تحليل مواد غير مستقرة (Labile). وفي مثل هذه الحالات، يجب استبدال الحشوة الملوثة في رأس العمود بمادة جديدة إذا تأثرت الكفاءة. عادةً، يتم حقن كمية ضئيلة من المذيب لتقليل آثار المذيب عند الكاشف، أما بالنسبة للغازات والأبخرة، فيمكن حقن أحجام أكبر بكثير عبر حقنة محكمة الغاز أو صمام أخذ عينات غازي.

يمكن استخدام مجموعة متنوعة من أجهزة الحقن مع الأعمدة الشعرية (Capillary columns)، وقد تكون المصطلحات المستخدمة هنا مربكة للغاية. ومع ذلك، لا يمكن المبالغة في أهمية استخدام تقنية حقن مناسبة عند العمل مع هذه الأعمدة؛ فالموضوع يستحق دراسة متخصصة إذا أردنا استغلال القدرات الكاملة للأعمدة الحديثة **(Grob, 2001)**. بالنسبة للأعمدة الشعرية ذات القطر الداخلي الضيق نسبياً (أقل من 0.32 مم)، عادةً ما تكون هناك حاجة لشكل من أشكال **مجزئ المدخل** (Inlet splitter) لمنع تحميل العمود بمواد زائدة عن طاقته (**الشكل 2**). عند استخدام مجزئ المدخل، وكما هو الحال مع أجهزة حقن الـ GC الأخرى، من المهم أن يكون لجزء محلول الحقن المار إلى العمود نفس تركيبة بقية المحلول.

أما مع الأعمدة الشعرية ذات القطر الأوسع (0.32 مم أو أكثر)، فإن الحقن بالسرنجة (بدون تجزئة - splitless) سواء عبر الحاجز إلى بطانة زجاجية، أو مباشرة داخل العمود عبر عمود حماية شعري من السيليكا المنصهرة أو **فجوة استبقاء** (Retention gap) -وهي عبارة عن أنبوب معطل بطول 1-10 أمتار بدون طور ساكن- يكون بسيطاً نسبياً ويضمن ترسيب المواد المراد تحليلها على العمود. وإذا تدهورت الكفاءة، فإن إزالة السنتيمترات القليلة الأولى أو حتى لفة كاملة من عمود الحماية غالباً ما يعيد الأداء دون تغيير استبقاء المادة على عمود التحليل. وتُطلب فجوة الاستبقاء أحياناً لتحسين الأداء الكروماتوغرافي عند حقن أحجام كبيرة نسبياً (> 2 ميكرولتر) من المذيب، وبالطبع يمكنها أن تعمل أيضاً كعمود حماية.



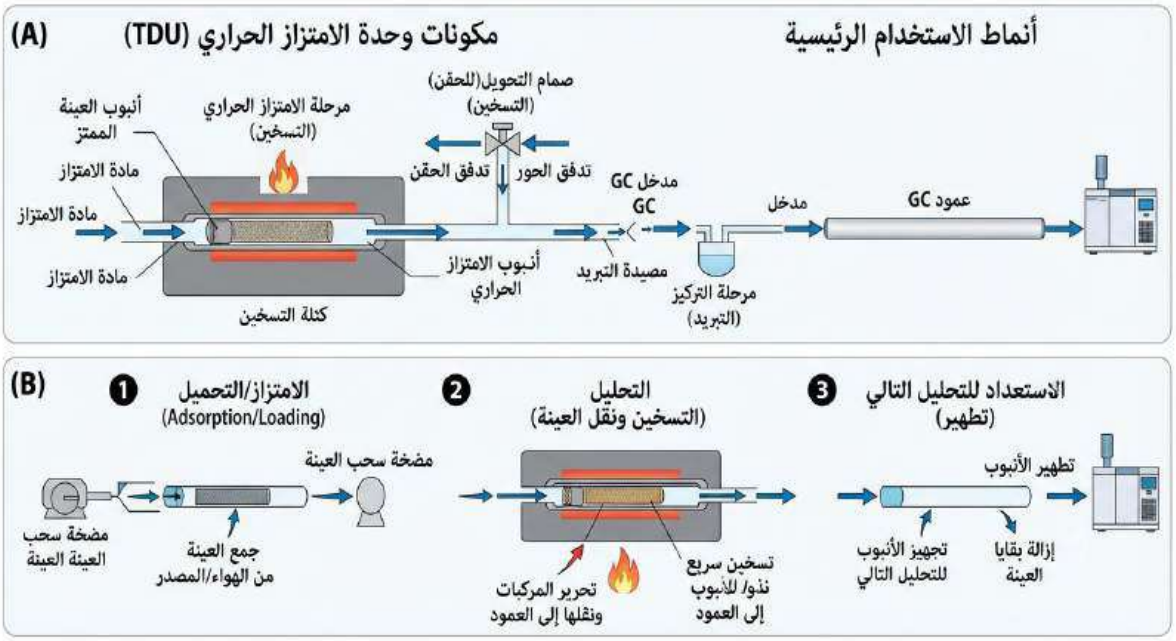
شكل رقم (2): حاقن المجزئ/غير المجزئ Split/splitless injector

وفي حالة **الحقن داخل العمود** (On-column injection)، من المعتاد الحقن عند درجة حرارة أقل من نقطة غليان مذيب الحقن. ومع تبخر المذيب في تيار الغاز الحامل، تتركز المواد المراد تحليلها في حزمة صغيرة ثم تتطاير بزيادة درجة حرارة فرن العمود.

التركيز بالتبريد/الامتزاز الحراري (Cryofocusing/thermal desorption)

يمكن استغلال المرونة الكبيرة التي توفرها القدرة على استخدام برمجة درجة الحرارة في GC في عمليات **التركيز بالتبريد** أو تقنية "التطهير والمصيدة" (Purge-and-trap) للمواد المتطايرة. وتعد تقنيات الامتزاز الحراري وإعادة التركيز بسيطة الاستخدام، وسهلة الأتمتة، ومطبقة على مجموعة واسعة من العينات **(Kolb and Ettre, 1997)**.

تتمثل الفائدة الرئيسية الأخرى للامتزاز الحراري المتصل مباشرة بـ GC في تعزيز الحساسية؛ لأن جميع المكونات القابلة للامتزاز يتم حجزها عند درجة حرارة منخفضة، إما في عمود قصير موضوع داخل فرن الـ GC مملوء بمادة ممتزة مثل Tenax-GC، أو على عمود الـ GC نفسه، وذلك قبل التبخير الوميضي (Flash vaporization) عن طريق رفع درجة حرارة الفرن بسرعة (**الشكل 3**).



الشكل (3): مخطط لـ (أ) وحدة الامتزاز الحراري في GC، (ب) أنماط الاستخدام.

قد يكون استخدام "المصيدة" ضروريًا إذا كانت المادة الحاملة (Matrix) تحتوي على ماء. في هذه الحالة، يتم حجز المواد المراد تحليلها على المادة الممتزة، ثم يُزال الماء من النظام عن طريق التطهير بالنيتروجين قبل التسخين للسماح بالانتقال السريع للمواد إلى عمود الـ GC. وبدلاً من ذلك، يمكن استخدام مصيدة نافيون (Nafion trap). ومن عيوب تقنيات الامتزاز الحراري أنها غير انتقائية؛ إذ تمر جميع المواد المتطايرة المحتجزة إلى العمود ما لم تُزل، على سبيل المثال، عن طريق التطهير بالنيتروجين.

يمكن أيضاً استخدام خراطيش (Cartridges) مملوءة بطبقات من مواد ممتزة مختلفة. وبعد وقت أخذ عينات مناسب، يتم تبخير المواد المتطايرة المحتجزة وميضياً في تيار من الغاز الحامل ونقلها إلى عمود الـ GC. وبدلاً من ذلك، يمكن استخدام خراطيش مملوءة بالكربون المنشط "لحجز" المواد المتطايرة، والتي يتم استخلاصها بعد ذلك في حجم صغير من ثاني كبريتيد الكربون قبل التحليل. لقد استخدمت هذه التقنية على نطاق واسع في تحليل المركبات المتطايرة في عينات مياه الشرب مثلاً،

لكنها لم تجد تطبيقاً واسعاً في تحليل العينات البيولوجية، ويرجع ذلك أساساً إلى صعوبة تفسير النتائج عند تركيزات أقل من تلك التي يمكن قياسها باستخدام طرق "الحيز العلوي" (Headspace) العادية.

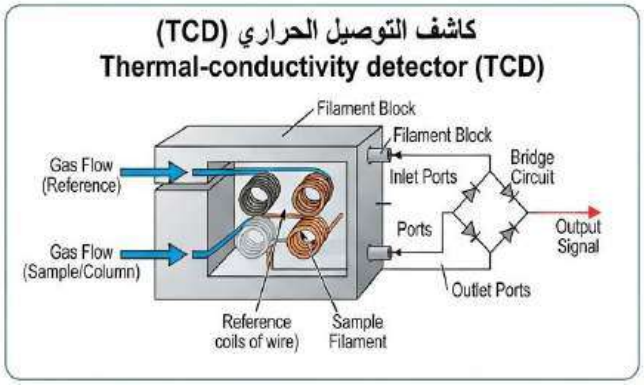
قد تشمل آليات إيصال العينة تحليل "الحيز العلوي" (Headspace)، وتطهير السوائل عن طريق فقاقيع النيتروجين، والاستخلاص بالتسخين النبضي للسوائل، أو الامتزاز الحراري للمصفوفات الصلبة، أو ببساطة ضخ الهواء المحيط عبر المصيدة المبردة (Cryogenic trap). وبشكل رئيسي، تجد تقنيات التركيز بالتبريد والتقنيات المرتبطة بها تطبيقاً في علم السموم المهني والبيئي. ومع ذلك، على سبيل المثال، تم تحليل أدوية التخدير الاستنشاقية المفلورة (هالوثان، إنفلوران، إيزوفلوران، سيفوفلوران وديسفلوران) في العينات البيولوجية، بشكل أساسي بواسطة GC مع تقنية الحيز العلوي، أو التطهير والمصيدة، أو الاستخلاص بالتسخين النبضي **(Pihlainen and Ojanpera¨, 1998)**.

كواشف الكروماتوغرافيا الغازية (Detectors for GC)

من بين الكواشف الأربعة الأكثر استخداماً، اكتسب مطياف الكتلة (MS) أهمية كبيرة لدرجة أنه سيتم مناقشته بالتفصيل في الفصل العاشر. تعتبر كواشف الـ GC، في واقع الأمر، كواشف "مُتلفة" (Destructive). وعلى الرغم من أن كاشف التقاط الإلكترونات (ECD) غير مُتلف في جوهره ويمكن نظرياً استخدامه بالتسلسل مع FID أو NPD، إلا أن معدل التدفق العالي المطلوب لـ ECD يجعل هذا الأمر غير عملي. لذلك، عادة ما تُستخدم أنظمة "تجزئة ما بعد العمود" (Post-column splitter) إذا أريد استخدام أكثر من كاشف في وقت واحد، حيث توفر استجابة الكاشف النسبية مَعلماً إضافياً للمساعدة في التعرف على المركب، على الرغم من ندرة استخدام هذا عملياً. ويمكن لكاشف قياس الضوء باللهب (FPD) أن يعطي استجابة اختيارية للمركبات التي تحتوي على الفسفور أو الكبريت، بينما يعطي كاشف التأين الضوئي (PID) نسبة إشارة إلى ضوضاء أعلى من FID لمركبات مثل الباربيتورات. ومع ذلك، في الوقت الحاضر، تجد كواشف التوصيل الحراري (TCD) وFPD وPID تطبيقات قليلة في علم السموم التحليلي.

كاشف التوصيل الحراري (Thermal-conductivity detection)

كان أول كاشف للكروماتوغرافيا الغازية هو "الكاثاروميتر" (Katharometer) أو كاشف السلك الساخن، المعروف أيضاً بكاشف التوصيل الحراري (**TCD**؛ **الشكل 4**). يعد هذا الكاشف غير حساس نسبياً (عادة لا تزيد حساسيته عن 1 نانوغرام في العمود) وله نطاق خطي ضعيف، ولكنه قد يكون مفيداً في علم السموم التحليلي للغازات الدائمة ولأول أكسيد الكربون، وهي مركبات لا تستجيب لكواشف FID أو ECD أو MS. ويعتمد مبدأ عمله على أن مقاومة الفتيل المسخن كهربائياً والموضوع في مخرج العمود تتغير بتغير تركيب الغاز الخارج من العمود.



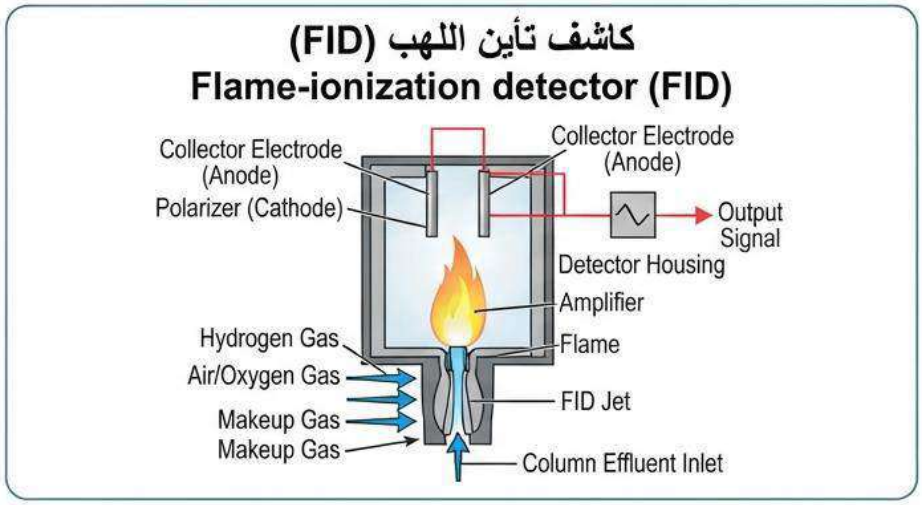
الشكل (4): مخطط توضيحي لكاشف التوصيل الحراري (TCD) في الكروماتوغرافيا الغازية.

كاشف تأين اللهب (Flame-ionization detection - FID)

يعتمد كاشف **FID** على مبدأ أن التأين الناتج عند مرور الغاز الخارج من العمود في لهب (هيدروجين/هواء) يتغير بتغير تركيب هذا الغاز (**الشكل 5**). يتم مراقبة هذا التغير في التأين كحالة من التغير في التيار القائم (Standing current) الذي يتم الحفاظ عليه عبر تطبيق فرق جهد بين طرف اللهب وقطب التجميع (Collector electrode).

إن الحساسية العالية لهذا الكاشف (10^{-11} إلى 10^{-12} غرام/ثانية من الميثان، وعادة ما تكون 0.1-10 نانوغرام في العمود)، والاستقرار الجيد (تيار خلفية منخفض)، والمدى الخطي الواسع (يصل إلى 10^6)، والعدد الكبير من المركبات التي تستجيب له (جميع الجزيئات العضوية التي تحتوي على روابط C–H باستثناء الفورمات)، ضمنت بقاءه قيد الاستخدام على نطاق واسع. تتناسب قوة الاستجابة تقريباً مع عدد ذرات الكربون الموجودة في المادة، وإن كانت تقل إذا وجد الأكسجين أو النيتروجين في الجزيء.

ملاحظة: أول أكسيد الكربون لا يعطي استجابة. كما أن عدم استجابة الكاشف للماء تتيح إجراء حقن للمحاليل المائية عند قياس الإيثانول والمركبات المشابهة. ومن ناحية أخرى، فإن خطر التداخل مرتفع، خاصة عند تحليل العينات المأخوذة بعد الوفاة، ولذلك تُفضل الكواشف الانتقائية، لا سيما مطياف الكتلة (MS). قد تتراكم بعض الترسبات السيليكونية إذا استخدم الكاشف مع أعمدة محشوة أو كواشف اشتقاق تحتوي على السيليكون، مما يستلزم تنظيفاً دورياً. ويُنصح عادةً باستخدام FID بالتوازي مع ECD أو NPD إذا كانت قياسات الاستبقاء تعتمد على مؤشرات كوفاتس (Kovats retention indices) . كما يُوصى بحد أدنى لدرجة حرارة التشغيل تبلغ 125 درجة مئوية لمنع تكثف بخار الماء.



شكل رقم (5): كاشف التأين باللهب (FID)

كاشف النيتروجين والفسفور (Nitrogen–phosphorus detection - NPD)

يعتمد كاشف **NPD** في تصميمه على الـ FID، ولكنه يختلف في احتوائه على خرزة زجاجية من سيليكات الروبيديوم أو ربما السيزيوم، تقع داخل ملف تسخين على مسافة قصيرة من لهب الهيدروجين. يؤدي هذا إلى إدخال بخار معدن قلوي إلى اللهب، مما يسهل الاستجابة الانتقائية للمركبات التي تحتوي على الفسفور أو روابط C–N عبر ضبط غازات اللهب.

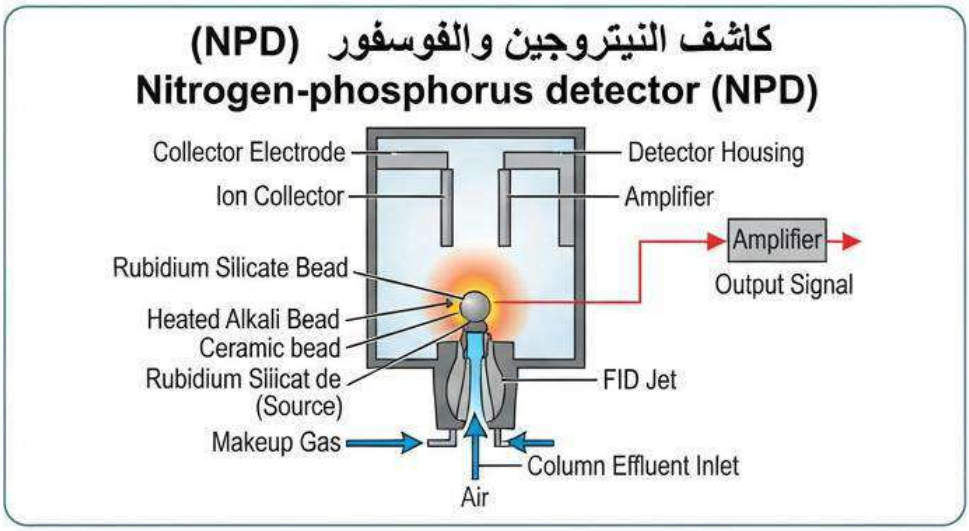
ولأن العديد من الأدوية والسموم تحتوي على روابط C–N بينما تفتقر إليها معظم مذيبات الحقن والتداخلات المحتملة، فقد استُخدم هذا الكاشف (المعروف أيضاً بالكاشف الأيوني الحراري أو كاشف تأين اللهب القلوي **AFID**؛ **الشكل 6**) على نطاق واسع في نمط "انتقاء النيتروجين" (نسبة استجابة النيتروجين إلى الكربون تبلغ حوالي 5000:1).

تعد الحساسية الزائدة للفسفور عيباً محتملاً، حيث تُظهر الملدنات (Plasticisers) التي تحتوي على الفسفور استجابة قوية (نسبة استجابة الفسفور إلى النيتروجين حوالي 10:1 في نمط النيتروجين). وفي "نمط الفسفور"، يؤدي تأريض جهد

الاستقطاب (**الشكل 6**) إلى زيادة الانتقائية (نسبة استجابة الفسفور إلى الكربون حوالي 50,000:1)، وهو ما يمكن استغلاله في حالات قليلة، لا سيما في تحليل مبيدات الفسفور العضوية ونواتج أيضها.

تنبيهات فنية:

- لا يُنصح باستخدام المذيبات المكلورة بشدة مثل ثنائي كلورو ميثان مع NPD لأنها تميل إلى تطاير المعدن القلوي من المصدر.
- أثبت خلات البوتيل (Butyl acetate) أنه مذيب استخلاص وحقن قيم عند استخدامه مع هذا الكاشف ومع ECD.
- استخدام الأطوار الساكنة التي تحتوي على النتريل مثل OV-225 قد يسبب زيادة في "ضوضاء" خط الأساس.
- تستخدم الإصدارات الحديثة من NPD مصدراً لسيليكات الروبيديوم يتم تسخينه كهربائياً، وهي أكثر استقراراً من الإصدارات القديمة، لكن تشغيل هذا الكاشف لا يزال يتطلب مهارة تقنية عالية؛ فالتعديل الصحيح لموقع الخرزة ومعدلات تدفق الغاز أمر بالغ الأهمية. ويتراوح عمر الخرزة من بضعة أيام إلى ثلاثة أشهر حسب جودتها واستخدامها. ورغم هذه التحديات، قد يظل كاشف NPD خياراً أكثر حساسية من مطياف الكتلة (MS) في بعض التحليلات، بما في ذلك التحليل السمي الشامل (STA) للأدوية القلوية.



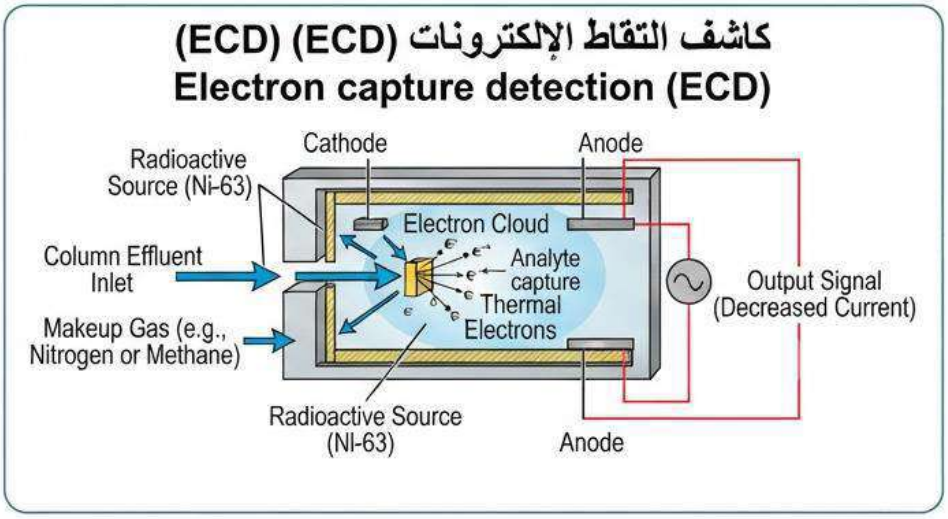
الشكل (6): مخطط توضيحي لكاشف النيتروجين والفسفور (NPD).

كاشف التقاط الإلكترونات (Electron capture detection - ECD)

يعتمد كاشف **ECD** (**الشكل 7**) على مبدأ أن الإلكترونات الناتجة من مصدر النيكل المشع (^{63}Ni) أو عبر تفريغ البلازما يتم "التقاطها" بشكل انتقائي بواسطة مواد معينة في الغاز الخارج من العمود، مما يتسبب في انخفاض التيار القائم (Standing current) المستمر بين المصدر وقطب التجميع. ويمكن تشغيل الكاشف إما بجهد تيار مستمر ثابت (**نمط DC**)، أو بجهد نبضي (**النمط النبضي**) يتم تطبيقه عبر الأقطاب:

في نمط DC: يتم تطبيق جهد ثابت (بضع فولتات) يكفي فقط لجمع جميع الإلكترونات الناتجة من المصدر ليعطي تياراً قائماً. عندما يدخل جزيء "صائد للإلكترونات" (فقير بالإلكترونات) إلى الكاشف، يكتسب الجزيء شحنة سالبة. وبما أن حركية الجزيئات المشحونة أصغر بكثير من حركية الإلكترونات، وتكون أكثر عرضة للتعادل عند التصادم مع الأيونات الموجبة، ينخفض التيار القائم بشكل كبير.

في النمط النبضي: يتم ضبط فترة الجهد النبضي بحيث تصل جزيئات المادة المشحونة سلبياً بعدد قليل نسبياً إلى المصعد، بينما تصل الإلكترونات الأكثر حركية. وعندما تكون النبضة في حالة "إيقاف"، تعيد الإلكترونات التوازن مع غاز الكاشف ويتم الحفاظ على تيار ثابت إجمالاً.



الشكل (7): مخطط توضيحي لكاشف التقاط الإلكترونات (ECD) في الكروماتوغرافيا الغازية

يعد **ECD** من أكثر كواشف الـ GC حساسية، حيث يظهر استجابة معززة وانتقائية (أعلى بنحو 10^3 غرام/ثانية من FID) للمركبات التي تحتوي على **هالوجين**، أو مجموعة **نيترو**، وبدرجة أقل للمركبات التي تحتوي على الكربونيل. ولذلك فهو مهم جداً لتحليل المذيبات المهلجنة، والمبيدات الحشرية، وبعض الأدوية المحتوية على الهالوجين أو النيترو، لا سيما **البنزوديازيبينات**.

يستخدم "الاشتقاق" (Derivatization) باستخدام كواشف مثل "أنهيدريد هيبتافلوروبوتيريك" على نطاق واسع؛ ليس فقط لتحسين تطاير المواد، بل أيضاً لاستغلال الحساسية والانتقائية العالية. وبالنسبة لبعض المركبات، تتجاوز حساسية هذا الكاشف حساسية مطياف الكتلة (MS) بمراحل، حيث تصل حدود الحساسية إلى بضع "فيمتوغرامات" (fg) للمبيدات الكلورية العضوية مثلاً.

ملاحظات التشغيل والصيانة:

أ) **الخطية:** الكواشف الحديثة في نمط DC لها استجابة خطية تصل إلى 10^4.

ب) **غاز التعويض:** تتطلب الكواشف معدلات تدفق تتراوح بين 30-60 مل/دقيقة، لذا يلزم توفير إمداد غاز "تعويضي" (Make-up gas) عند نهاية العمود الشعري. عادة ما يكون النيتروجين الخالي من الأكسجين مناسباً، ويمكن استخدام الهيليوم في الكواشف الحديثة.

ج) **درجة الحرارة:** يوصي المصنعون بالتشغيل بالقرب من أقصى درجة حرارة (300-350 درجة مئوية) لتقليل مخاطر ترسب المواد وتلوث المصدر.

المشاكل والقيود

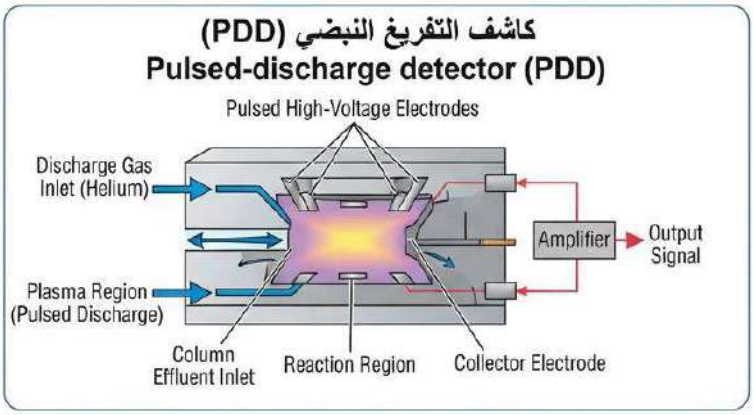
1) يعاني الـ ECD من عدة مشاكل في الاستخدام الروتيني:
2) **القيود الحرارية:** يجب عدم استخدامه فوق 350 درجة مئوية لتجنب تطاير رقاقة النيكل (^{63}Ni).
3) **المتطلبات القانونية:** يلزم قانوناً إجراء اختبار دوري للتسرب الإشعاعي (Wipe test).
4) **الحساسية للشوائب:** الكاشف حساس جداً للأكسجين وبخار الماء في الغازات، لذا فإن الغازات عالية النقاء إلزامية.

5) **التلوث:** في حال تلوث الكاشف، قد ينجح تشغيله عند أقصى درجة حرارة طوال الليل مع استمرار تدفق الغاز في استعادة استجابته.
6) **التخلص من الأجهزة:** برزت مشكلة التخلص من الأجهزة القديمة بسبب وجود المصدر المشع، مما دفع نحو الانتقال إلى "تفريغ البلازما" كمصدر للإلكترونات بدلاً من المواد المشعة.

الإطار 3: عيوب كواشف التقاط الإلكترونات (^{63}Ni)
عدد محدود من المواد المحللة: (يجب أن تكون المادة فقيرة بالإلكترونات).
سهولة التلوث: مما يؤدي إلى فقدان التيار القائم.
الحجم الكبير: يتطلب غازاً تعويضياً (Make-up gas).
نطاق خطي محدود.
قضايا السلامة:
النيكل (^{63}Ni) هو باعث لجسيمات بيتا (β) القوية.
الحد الأقصى لدرجة حرارة التشغيل عادة 350 درجة مئوية.
قضايا تشريعية:
يتطلب "اختبار المسح" (Wipe-test) للنشاط الإشعاعي.
صعوبة التخلص من الأجهزة القديمة.

كاشف التفريغ النبضي (Pulsed-discharge detection)

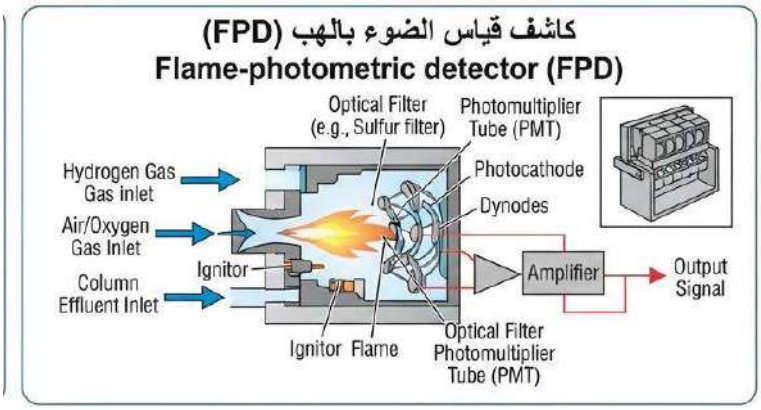
يعد كاشف التفريغ النبضي (**PDD**؛ **الشكل 8**) تطوراً حديثاً نسبياً، ويمكن تشغيله بثلاثة أنماط: التأين الضوئي بالهيليوم (He-PDPID)، والتقاط الإلكترونات (PDECD)، وانبعاث تأين الهيليوم (PDED) **(Forsyth, 2004)**. يمكن لنظام **He-PDPID** اكتشاف الغازات الدائمة، والأنواع غير العضوية المتطايرة، وغيرها من المركبات التي لا تعطي استجابة تذكر مع كاشف FID، كما يمتلك حدود كشف أقل [مع حد أدنى للكميات القابلة للكشف (MDQs) في نطاق البيكوغرام المنخفض] مما يمكن تحقيقه باستخدام كاشف التوصيل الحراري (TCD)، بالإضافة إلى نطاق خطي واسع **(Roberge et al., 2004)**. في هذا النمط، يمر الهيليوم عبر غرفة حيث يتم توليد تفريغ توهجي وإنتاج فوتونات عالية الطاقة، والتي تمر عبر فتحة إلى غرفة أخرى حيث تؤين الغاز أو البخار في تيار العينة. يتم توجيه الإلكترونات الناتجة بواسطة أقطاب الانحياز إلى قطب التجميع وتُقاس باستخدام مقياس كهربائي (Electrometer) قياسي. وعند استخدامه ككاشف لالتقاط الإلكترونات (**PDECD**)، يتم إضافة نسبة صغيرة من غاز إضافي ("منشط" أو Dopant)، والذي يتأين ويوفر الإلكترونات لإنتاج التيار القائم. تم اختبار عدة منشطات، ويبدو أن أفضلها هما الميثان والزينون. يتميز **PDECD** بحساسية مماثلة أو أفضل من كاشف النيكل (^{63}Ni) التقليدي، ولكنه لا يتطلب تراخيص أو اختبارات مسح إشعاعي أو متطلبات إدارية وأمنية أخرى. كما يظهر نمط **PDED** إمكانات واعدة ككاشف عنصري حساس وانتقائي للغاية.



الشكل (8): مخطط توضيحي لكاشف التفريغ النبضي (PDD).

كاشف قياس الضوء باللهب (Flame-photometric detection)

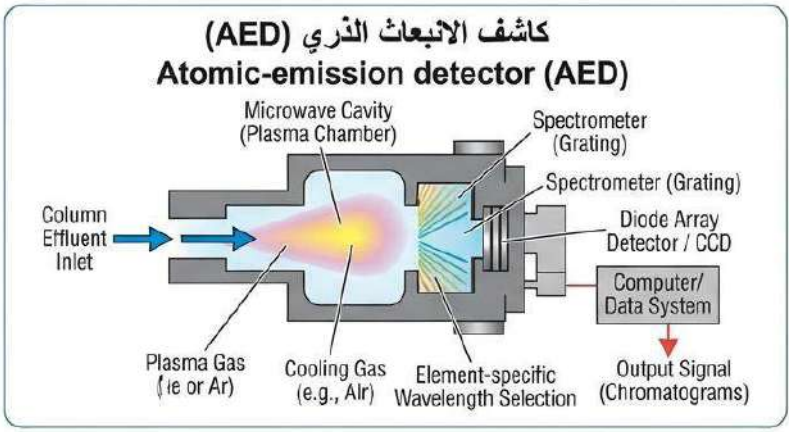
يستغل كاشف قياس الضوء باللهب (**FPD**) ظاهرة "التلألؤ الكيميائي" (Chemiluminescence) للكبريت أو الفسفور عند تسخينهما في اللهب، لإعطاء كشف نوعي ومحدد للمواد التي تحتوي على أي من هذين العنصرين. يبلغ الطول الموجي الأقصى (λ_{max}) لانبعاث الكبريت المثار (S2) حوالي 394 نانومتر، بينما يظهر جزيء (HPO) المثار ثنائية عند 510-526 نانومتر. يحدد مرشح التداخل (Interference filter) الموجود بين اللهب وأنبوب المضاعف الضوئي درجة الانتقائية (**الشكل 9**). لا يجد هذا الكاشف تطبيقاً واسعاً في علم السموم التحليلي، ولكنه يُستخدم في تطوير المبيدات الحشرية والمجالات المتخصصة الأخرى.



الشكل (9): مخطط توضيحي لكاشف قياس الضوء باللهب (FPD) في الكروماتوغرافيا الغازية.

كاشف الانبعاث الذري (Atomic-emission detection - AED)

كان كاشف الانبعاث الذري المستحث بالميكروويف أو كاشف الانبعاث الذري (**AED**)، يُسمى سابقاً كاشف بلازما الميكروويف (MPD). يمكن لهذا الكاشف قياس عدد من العناصر، عادةً حوالي 15 عنصراً، بشكل انتقائي ومتزامن في الغاز الخارج من الـ GC. تمر المواد الخارجة من عمود الـ GC إلى تجويف بلازما الميكروويف (أو التفريغ) حيث تُثار الذرات الفردية من الحالة المستقرة بواسطة الطاقة الحرارية للبلازما. ويصدر كل عنصر ضوءاً بطول موجي محدد عند العودة من حالة الإثارة، ويمكن قياس ذلك عبر مصفوفة صمامات ثنائية ضوئية (Photodiode array)، عادةً في النطاق من 170 إلى 800 نانومتر (**الشكل 10**). ويمكن لجهاز الكمبيوتر المتصل إنتاج كروماتوغرامات تتكون من قمم للمواد التي تحتوي فقط على عنصر محدد. وقد وجد الـ AED تطبيقاً بالاقتران مع مطياف الكتلة (MS) في التحليل الصيدلاني، حتى وإن لم يجد انتشاراً واسعاً في علم السموم التحليلي بحد ذاته **(Hooker and Dezwaan, 1989; Laniewski et al., 2004)**.

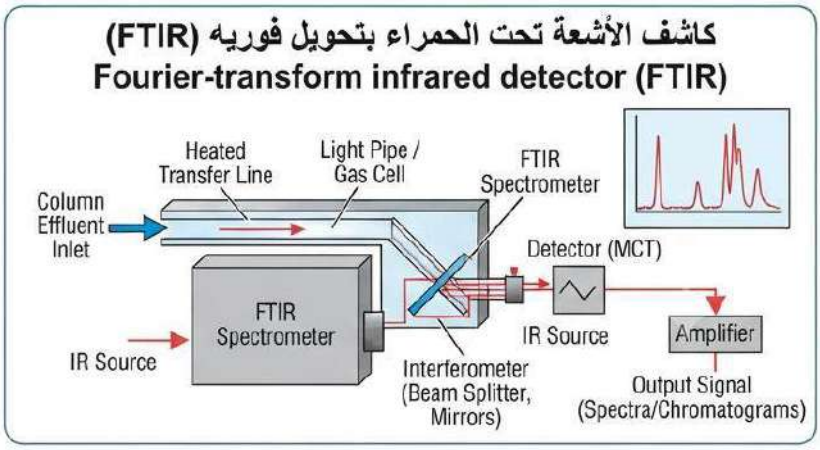


الشكل (10): كاشف الانبعاث الذري Atomic emission detector (AED)

كاشف الأشعة تحت الحمراء بتحويل فوريه (Fourier-transform infrared detection)

إن فكرة استخدام مطيافية الأشعة تحت الحمراء (IR) ككاشف للـ GC ليست جديدة، ولكنها لم تصبح قابلة للتطبيق العملي إلا مع تطوير أجهزة تحويل فوريه (FT). يقوم نظام (FT) بتحويل البيانات من مخطط الشدة مقابل الزمن إلى طيف الشدة (نسبة النفاذية) مقابل التردد.

لم يتم تطبيق تقنية (GC-FTIR) على نطاق واسع في علم السموم التحليلي، ويرجع ذلك إلى حد كبير للتكلفة، ولحقيقة أن تقنية (GC-MS) غالباً ما تعطي معلومات أكثر، باستثناء حالات الأيزومرات (Isomers) والجزيئات البسيطة مثل المذيبات المتطايرة. ومع ذلك، فإن الكشف عن طريق FTIR هو كشف غير مُتلف ويمكن استخدامه في النمطين الكمي والنوعي، رغم أن حساسيته ضعيفة (حد الحساسية في أفضل الأحوال هو 10 نانوغرام في العمود). لقد استُخدم نظام الـ GC مع كاشفي FTIR وFID بالتسلسل للكشف عن المواد المتطايرة وقياسها في الدم **(Ojanperä et al., 1998)**. كما تمت مراجعة بعض التطبيقات الطبية الحيوية الأخرى لتقنية GC-FTIR في مراجع متخصصة **(Lacroix et al., 1989)**.



الشكل (11): كاشف الاشعة تحت الحمراء بتحويل فوريه

الجدول 1: كواشف كروماتوغرافيا الغاز النموذجية (Typical Gas Chromatographic Detectors)

النوع(Type)	العينات القابلة للتطبيق (Applicable Samples)	حد الكشف النموذجي (Typical Detection Limit)
التأين اللهبي(Flame ionization)	الهيدروكربونات	1 pg/s
التوصيل الحراري (Thermal conductivity)	كشف شامل (عالمي)	500 pg/mL
التقاط الإلكترون(Electron capture)	المركبات الملوجنة	5 fg/s
مطياف الكتلة(Mass spectrometer - MS)	قابل للتعديل لأي نوع	0.25 – 100 pg
الثرمونيوني(Thermionic)	مركبات النيتروجين والفوسفور	0.1 pg/s للفوسفور، 1 pg/s للنيتروجين
التوصيل الإلكتروليتي (Hall - Electrolytic conductivity)	المركبات التي تحتوي على الهالوجينات، الكبريت، أو النيتروجين	4 pg N/s، 2 pg S/s، 0.5 pg Cl/s
التأين الضوئي(Photoionization)	المركبات المؤينة بإشعاع الأشعة فوق البنفسجية(UV)	2 pg C/s
تحويل فورييه للأشعة تحت الحمراء (Fourier transform IR - FTIR)	المركبات العضوية	0.2 – 40 ng

الأعمدة وحشوات الأعمدة (Columns and column packings)

في الأصل، كان يتم التمييز بين الكروماتوغرافيا الغازية-الصلبة (GSC) التي يكون فيها الطور الساكن مادة صلبة نشطة، والكروماتوغرافيا الغازية-السائلة (GLC) التي يتم فيها طلاء الطور الساكن السائل على دعامة خاملة. ومع ذلك، مع الانتشار الواسع للأعمدة الشعرية التي يتم فيها ربط الطور الساكن كيميائياً بالسطح الداخلي للعمود، أصبحت هذه الفوارق أقل وضوحاً في كثير من الأحيان. وبما أن الطور المتحرك (الغاز الحامل) له تأثير ضئيل على الانتقائية وتأثير بسيط فقط على الكفاءة، يُستخدم النيتروجين عادةً مع الأعمدة المحشوة (بمعدلات تدفق 30-60 مل/دقيقة) والهيليوم مع الأعمدة الشعرية (بمعدلات تدفق 1-10 مل/دقيقة). ومن الضروري في كافة الأنظمة (باستثناء أبسطها) استخدام غاز حامل خالٍ من الأكسجين، لأن وجود كميات ضئيلة جداً من الأكسجين قد يؤدي إلى أكسدة بعض الأطوار الساكنة. كما يتم تركيب "مُضيّق" (Constrictor) عند طرف الكاشف في العمود للحد من الانتشار العكسي للهواء من كاشف FID مثلاً.

تم تلخيص بعض مزايا استخدام الأعمدة الشعرية في **الجدول 1**. وتتطلب معظم الأعمدة، وخاصة المحشوة منها، عملية "تهيئة" (Conditioning) لإزالة الشوائب المتطايرة قبل الاستخدام. يجب تزويد الأعمدة التجارية بتعليمات كاملة؛ وبخلاف ذلك، يجب تطهير العمود (دون توصيله بالكاشف) بالغاز الحامل لإزالة الأكسجين قبل تطبيق الحرارة. بعد ذلك، يتم رفع درجة حرارة العمود ببطء إلى مستوى أعلى قليلاً من درجة حرارة التشغيل القصوى المنشودة، إما باستخدام برنامج درجة حرارة أو عبر سلسلة من الخطوات، ويُترك لمدة 12 ساعة تقريباً، مع مراعاة درجة الحرارة القصوى الموصى بها للطور الساكن في التشغيل المتساوي الحرارة.

الجدول 2: الأعمدة الشعرية مقابل الأعمدة المحشوة في GC: اعتبارات عملية

وجه المقارنة	الأعمدة المحشوة(Packed)	الأعمدة الشعرية(Capillary)
الكفاءة	منخفضة (حوالي 20,000 طبق نظري لكل عمود)	عالية (حوالي 500,000 طبق نظري لكل عمود)
تناظر القمم	سيئ للمركبات القطبية	جيد
وقت التحليل	طويل	قصير (لدقة فصل مماثلة)
برمجة الحرارة	صعبة (بسبب زحف خط الأساس)	سهلة
سعة العينة	عالية	قد تكون منخفضة
الحساسية	جيدة (بسبب حقن كمية أكبر من العينة)	جيدة (بسبب حدة القمم)
التحليل الكمي	نعم	حقن مباشر
الربط معMS	صعب (يتطلب نظام تجزئة/مجزئ)	سهل

يجب تهيئة الأعمدة الشعرية وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة واختبارها عن طريق حقن خليط مناسب قبل استخدامها في تحليل العينات. وإذا كان سيتم استخدام برمجة درجة الحرارة، فمن المهم عدم ترك العمود عند درجة حرارة التشغيل القصوى لفترة طويلة. عند تهيئة الأعمدة، من الضروري التأكد من أن وحدة التحكم في درجة حرارة فرن الـ GC تعمل بشكل صحيح وأن تدفق الغاز الحامل كافٍ، حيث لا يوجد مخرج للكاشف للمساعدة في الإشارة إلى وجود أي خلل.

الأعمدة المحشوة (Packed columns)

لا تزال الأعمدة المحشوة التقليدية المصنوعة من زجاج البورسليكات، أو الفولاذ المقاوم للصدأ، أو الفولاذ المبطن بالزجاج (بطول 0.5-4 متر وقطر داخلي 2-4 مم) تجد تطبيقاً في بعض المجالات. وبالرغم من أن الزجاج أقل متانة من الفولاذ، إلا أنه أقل عرضة لامتزاز المواد القطبية أو التفاعل معها. بالإضافة إلى ذلك، يمكن التحقق بصرياً من أي هبوط في الحشوة أو تلوث في العمود.

قد يساعد معالجة الأعمدة الزجاجية لمدة 8 ساعات تقريباً باستخدام كاشف "سيلنة" (Silanizing reagent) مثل ثلاثي ميثيل كلوروسيلان (TMCS) (بتركيز 10% حجم/حجم في التولوين)، واستخدام صوف الكوارتز أو صوف الزجاج المُسيلن لتثبيت الحشوة، في تقليل آثار الامتزاز. ويمكن إزالة الكاشف الزائد عن طريق الشطف بالميثانول والتجفيف قبل حشو العمود. ويظل كتاب **(Supina, 1974)** مصدراً ممتازاً للمعلومات حول هذه الجوانب والجوانب الأخرى للأعمدة المحشوة. تُستخدم حشوات الكروماتوغرافيا الغازية-الصلبة (GSC) بشكل أساسي في تحليل الغازات والمذيبات. وتعد حشوات المنخل الجزيئي (الزيوليت الصناعي) أو هلام السيليكا (Silica gel) مفيدة لتحليل الغازات الدائمة وأول أكسيد الكربون. وتعتبر سلسلتا **Chromosorb** و **Porapak** عبارة عن بوليمرات إسهامية من ثنائي فينيل بنزين بولي ستيرين مرتبطة تشابكياً، وتصل درجات حرارة تشغيلها القصوى إلى حوالي 250 درجة مئوية. يمكن فصل الكحوليات من الميثانول إلى البنتانول على **Porapak Q** أو **Chromosorb 101**. أما **Tenax-GC** فهو بوليمر مسامي من أكسيد 2،6-ثنائي فينيل-بارا-فينيلين، ويُستخدم كطور ساكن وكمصيدة للمواد المتطايرة قبل الـ GC. وتعد مواد **Carbopaks B** و **C** عبارة عن أسود كربون ممزوج بالجرافيت (Graphitized carbon blacks). تُستخدم عادةً بعد تعديلها بطلاء خفيف من طور ساكن قطبي مثل **Carbowax 20M**، ويمكن أن تعطي أشكال قمم جيدة وفصلاً ممتازاً للكحوليات والمتطايرات الأخرى، إلا أن هذه المواد هشة للغاية ومن الشائع وجود اختلافات بين التشغيلات (Batch-to-batch) في أشكال القمم الناتجة.

في الكروماتوغرافيا الغازية-السائلة (GLC) ذات الأعمدة المحشوة، يجب ألا يلعب "الدعامة" (Support) أي دور في عملية الفصل. وتستخدم التربة الدياتومية المحمصة المصنفة إلى أحجام مناسبة (80–100 أو 100–120 مش) على نطاق واسع، وتشمل العلامات التجارية:

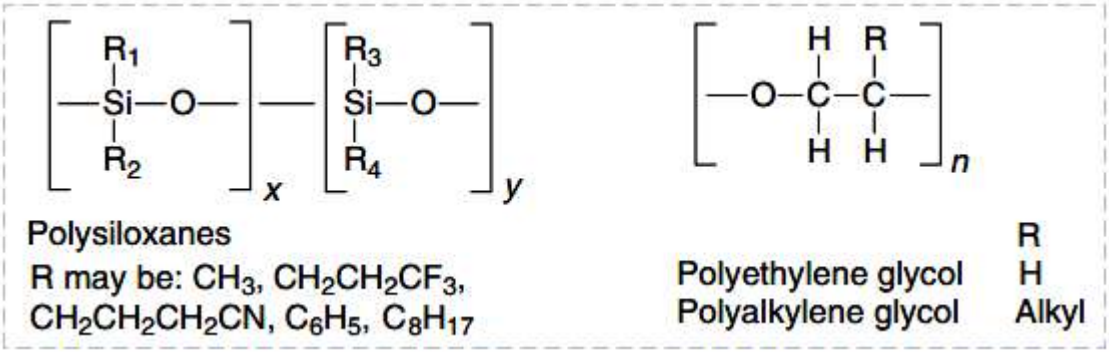
- **Chromosorb W** و **Chromosorb G**.
- **Supelcoport**.

تُستخدم إجراءات نزع نشاط (Deactivation) متنوعة، بما في ذلك الغسل بالحمض لإزالة الشوائب المعدنية (ويرمز لها بـ **AW**) ونزع نشاط مجموعات السيلانول السطحية باستخدام سداسي ميثيل ثنائي سيلازان (**HMDS**) أو ثنائي ميثيل ثنائي كلوروسيلان (**DMCS**) (**الجدول 2**). قد يؤدي الطلاء الأولي الخفيف بطور ساكن قطبي قبل الطور الرئيسي إلى زيادة نزع نشاط الدعامة، ولكنه قد يؤثر أيضاً على عمليات الفصل المحققة. كما استُخدم الطلاء المسبق بهيدروكسيد البوتاسيوم (1-5% وزن/وزن) على نطاق واسع لتحسين أشكال القمم التي تعطيها القواعد القوية مثل الأمفيتامينات، ومع ذلك، ليست كل الأطوار الساكنة مستقرة في الظروف القلوية القوية. يتم التعبير عادةً عن تحميل الطور الساكن كنسبة مئوية من وزن الطور إلى وزن الدعامة (% وزن/وزن). ولا يتجاوز تحميل الطور عادةً 5 أو 10% (وزن/وزن). يتم تطبيق الطور عادةً على الدعامة وهو مذاب في مذيب مناسب، وبعد تركه لفترة، يُزال المذيب إما عن طريق التبخير اللطيف تحت الفراغ في مبخر دوار (مع الحرص على عدم التسبب في تلف ميكانيكي للجزيئات) أو عن طريق الترشيح في قمع بوخنر يليه التجفيف بالهواء.

في طريقة التبخير، قد لا يتم طلاء الطور الساكن بشكل متساوٍ، بينما تعطي طريقة الترشيح طلاءً أكثر تجانساً خاصة عند نسب التحميل المنخفضة، ولكن لا يتم امتزاز كل الطور الساكن ويُفقد بعضه في مرحلة الترشيح. هناك حاجة للخبرة لتقدير النسب الأولية للطور والمذيب والدعامة، ويمكن وزن الطور المفقود عن طريق جمع الراشح وتبخيره حتى الجفاف.

هناك المئات من الأطوار الساكنة في الكروماتوغرافيا الغازية، ولكن القليل منها فقط – خاصة تلك القائمة على **البولي سيلوكسان** (والتي تسمى غالباً بشكل غير دقيق "السيليكونات") أو **البولي إيثيلين جليكول** – هي التي وجدت تطبيقاً واسعاً في علم السموم التحليلي. في أبسط أطوار البولي سيلوكسان، عندما تكون المجموعات 1R–4 عبارة عن مجموعات "ميثيل"، يُعرف البوليمر باسم **بولي ثنائي ميثيل سيلوكسان (PDMS)** أو ببساطة "ميثيل بولي سيلوكسان". إن استبدال أجزاء الميثيل

بمجموعات أخرى ذات قطبية متزايدة يغير من انتقائية المادة. على سبيل المثال، في الطور الساكن **OV-17**، تكون المجموعتان 1R و 2R ميثيل، بينما 3R و 4R فينيل، وتكون النسب x و y كلاهما 50% (**الشكل 12**). يمكن الإشارة إلى هذا الطور باسم "50% ثنائي ميثيل، 50% ثنائي فينيل بولي سيلوكسان"، أو "50% ميثيل، 50% فينيل بولي سيلوكسان"، أو حتى "50% فينيل بولي سيلوكسان". وفي أطوار أخرى، قد ترتبط مجموعتان مختلفتان بنفس ذرة السيليكون؛ فمثلاً يختلف الطور **OV-225** عن **OV-17** في أن 3R عبارة عن مجموعة "سيانو بروبيل".



الشكل 12: تراكيب الأطوار الساكنة من البولي سيلوكسان والبولي إيثيلين جليكول المستخدمة في GC .

أما أطوار **البولي إيثيلين جليكول (PEG)** (**الشكل 11**) فتستخدم إما مباشرة، أو بعد استبدالها بأجزاء ألكيل مثل حمض 2-نيترو تيريفثاليك كما في طور **FFAP** (طور الأحماض الدهنية الحرة). كما تتوفر أطوار (PEG) منزوعة النشاط القاعدي والمصممة لتحليل الأمينات. ورغم أن أطوار (PEG) تمتلك انتقائية فريدة، إلا أنها أقل متانة من البولي سيلوكسانات، ولها حدود درجات حرارة تشغيل أقل وعمر افتراضي أقصر.

الجدول 3: بعض الأطوار الساكنة ودعامات الأطوار الساكنة المستخدمة في الكروماتوغرافيا الغازية ذات الأعمدة المحشوة
(ما لم يذكر خلاف ذلك، حجم المش المقصود هو 100/80 أو 120/100).

المادة	الوصف	مرجع USP
Chromosorb P-AW, Chromosorb W-AW	تربة دياتومية، محمصة، مغسولة بالحمض والماء حتى التعادل، مُسيلنة.	S1A
Chromosorb W-HP	تربة دياتومية، مغسولة بالقاعدة، مُسيلنة.	S1AB
Chromosorb P-AW DMCS	طوب حراري مسحوق، محمص مع رابط طيني، مغسول بالحمض، مُسيلن.	S1C
Chromosorb W-NAW	تربة دياتومية، غير معالجة.	S1NS
GasChrom 254, Chromosorb 101	بوليمر إسهامي ستيرين-ثنائي فينيل بنزين (المساحة السطحية.(1−$m2g$ 50 >	S2
Super Q, Porapak Q	بوليمر إسهامي إيثيل فينيل بنزين-ثنائي فينيل بنزين (المساحة السطحية m^2g^{-1} 500-600).	S3
Porapak R	بوليمر إسهامي ستيرين-ثنائي فينيل بنزين مع مجموعات عطرية -O- و-N-	S4
Chromosorb T	بوليمر رباعي فلورو إيثيلين ذو وزن جزيئي عالٍ، 60/40 مش.	S5
Graphpac-GC	كربون جرافيتي (المساحة السطحية حوالي m^2g^{-1} 12).	S7
Tenax TA	بوليمر مسامي من (أكسيد 2،6-ثنائي فينيل-بارا-فينيلين)	S9
Graphpac-GB / Carbograph 1	كربون جرافيتي (surface area 100 $m^2\ g^{-1}$)، معدل بالبولي إيثيلين جليكول.	S11

أصل المرجع: مأخوذ من الدليل المرجعي لحشوات الـ GC في دستور الأدوية الأمريكي **(US Pharmacopoeia Convention, 1999)**.

كقاعدة عامة، يتأثر الاستبقاء على الأطوار غير القطبية نسبياً (مثل PDMS) بشكل أساسي بالوزن الجزيئي للمادة (Mr)، وهو المؤثر المهيمن على التطاير. ومع ذلك، قد تؤثر الروابط الهيدروجينية وتفاعلات ثنائي القطب أيضاً على التطاير، وبالتالي على الفصل الكروماتوغرافي في نظام معين. وكدليل توجيهي، تظهر المركبات القطبية (مثل العديد من الأدوية والمبيدات الحشرية) فصلاً متزايداً وتعطي أشكال قمم أفضل وحساسية أكبر عند استخدام أطوار أكثر قطبية.

اعتمد **McReynolds (1970)**، بناءً على عمل Rohrschneider، على استبقاء البنزين، والبيوتانول، و2-بنتانون، والنيتروبروبان، والبيريدين لتلخيص قطبية الأطوار الساكنة. ويُستخدم مجموع الفرق في مؤشرات الاستبقاء (القسم 5.3) لكل من هذه المركبات على الطور الساكن قيد الاختبار مقارنة بمؤشر استبقائها على طور قياسي غير قطبي (السكوالين) للاشتقاق "ثابت ماكرينولدز" (McReynolds constant) للطور. يوفر هذا الثابت مقياساً لقطبية الطور يُستخدم لأغراض التصنيف، وقد شُرح هذا النظام بالكامل في مصادر أخرى **(IUPAC, 1986; Supelco, 1997)**.

بشكل عام، تُعرف الأطوار التي يقل ثابت ماكرينولدز الخاص بها عن 100 بأنها **غير قطبية**، ومن 100 إلى 400 بأنها **متوسطة القطبية**، وأكثر من 400 بأنها **قطبية**. ويرد في **الجدول 3** ثوابت ماكرينولدز لبعض الأطوار الساكنة مع المراجع التبادلية لدستور الأدوية الأمريكي (USP). وتجدر الإشارة إلى أن "قطبية" الأطوار الساكنة تزداد مع ارتفاع درجة الحرارة. يعد **Apiezon L** شحماً هيدروكربونياً ويتميز بأنه، على عكس أطوار السيلوكسان البوليمرية، مستقر إذا طُلي على حشوة معالجة بالقلوية، رغم أن درجة حرارة التشغيل القصوى (tmax) تبلغ حينها 225 درجة مئوية فقط. وتعتبر الأطوار **SE-30** و **OV-1** و **OV-101** (وأيضاً HP-1 و DB-1 و RTX-1 و SPB-1) أطوار PDMS متكافئة تقريباً، حيث تكون التفاعلات القطبية فيها في حدها الأدنى، وبالتالي يحدث الفصل إلى حد كبير على أساس الوزن الجزيئي (Mr). ومع ذلك، فإن أحد عيوبها هو احتمال حدوث "تذييل للقمم" (Peak tailing) مع المركبات القطبية، وهو ما يقل عادةً عند استخدام أطوار أكثر قطبية. وتعد **SE-54** و **OV-7** و **OV-17** (ومكافئاتها الواسعة HP-50 و RTX-50) و **OV-225** من بين أطوار البولي سيلوكسان الأكثر قطبية المتاحة . وبشكل عام، كلما زادت قطبية أطوار البولي سيلوكسان، انخفضت درجة حرارة التشغيل القصوى قبل أن يصبح "نزف العمود" (Column bleed) عاملاً عائقاً. يعد **Carbowax 20M** (بولي إيثيلين جليكول بمتوسط وزن جزيئي 20,000) طوراً عالي القطبية، ولكن له درجة حرارة تشغيل قصوى (tmax) منخفضة نسبياً. ومع ذلك، كما هو الحال مع Apiezon L، فإن الطلاء المسبق للدعامة بهيدروكسيد البوتاسيوم يقلل بفعالية من تذييل القمم للقواعد القوية دون التأثير على tmax. وقد اقتُرحت أطوار البوليستر مثل **CHDMS** وأيضاً البولي أميدات مثل **Poly A 10**[3] لعمليات فصل محددة للمركبات القطبية مثل الباربيتورات، ولكن هذه الأساليب استُبدلت إلى حد كبير مع الاعتماد الواسع لأنظمة الأعمدة الشعرية.

الأعمدة الشعرية (Capillary columns)

تُسمى الأعمدة الشعرية أيضًا بالأعمدة الأنبوبية المفتوحة (Open tubular columns) بسبب مسار التدفق المفتوح عبرها. وتنقسم إلى نوعين أساسيين: أعمدة أنبوبية مفتوحة مطلية الجدار ($WCOT$)، وأعمدة أنبوبية مفتوحة مطلية الدعامة ($SCOT$)[3].

الأعمدة مطلية الجدار ($WCOT$): عبارة عن أنابيب شعرية مطلية ببساطة بطقة رقيقة من الطور الثابت.

[3] For a detailed description of open tubular columns, see M. L. Lee, F. J. Yang, and K. D. Bartle, Open Tubular Column Gas Chromatography: Theory and Practice, New York: Wiley, 1984.

الأعمدة مطلية الدعامة ($SCOT$): يُبطن السطح الداخلي للأنبوب الشعري بطبقة رقيقة سمكها (1.3 μm) من مادة داعمة، مثل التراب الدياتومي (Diatomaceous earth). يحمل هذا النوع من الأعمدة كمية من الطور الثابت تزيد عدة مرات عن تلك الموجودة في الأعمدة مطلية الجدار، وبالتالي يتمتع بسعة أكبر للعينات. وعمومًا، تكون كفاءة عمود ($SCOT$) أقل من كفاءة عمود ($WCOT$)، لكنها أعلى بكثير من كفاءة العمود المعبأ.

صُنعت أعمدة ($WCOT$) المبكرة من الفولاذ المقاوم للصدأ (الاستانلس ستيل)، أو الألومنيوم، أو النحاس، أو البلاستيك. وفي وقت لاحق، بدأت أعمدة الزجاج في الاكتساح. وغالبًا ما كان الزجاج يُحفر بحمض الهيدروكلوريك الغازي، أو حمض الهيدروكلوريك المائي القوي، أو هيدروجين فلوريد البوتاسيوم لإنشاء سطح خشن يربط الطور الثابت بشكل أكثر احكامًا. أما الأعمدة الشعرية الأكثر استخدامًا على نطاق واسع فهي **الأعمدة الأنبوبية المفتوحة المصنوعة من السيليكا المنصهرة المطلية الجدار ($FSWC$)**. وتُسحب شعيرات السيليكا المنصهرة من سيليكا منقاة خصيصًا تحتوي على الحد الأدنى من أكاسيد المعادن. وتتميز هذه الشعيرات بجدران أرق بكثير من أعمدة الزجاج. وتُمنح الأنابيب قوة إضافية بواسطة طلاء واقٍ خارجي من البولي إيميد (Polyimide)، يُوضع أثناء سحب الأنبوب الشعري. وتتميز الأعمدة الناتجة بأنها مرنة للغاية ويمكن ثنيها في شكل لفائف بأقطار بضع بوصات. تتوفر هذه الأعمدة تجاريًا وتوفر مزايا مهمة عديدة مثل:

أ) القوة الفيزيائية.
ب) التفاعل الأقل بكثير تجاه مكونات العينة.
ج) المرونة العالية.
د) وقد استبدلت هذه الأعمدة أعمدة الزجاج القديمة من نوع ($WCOT$) في معظم التطبيقات.

المواصفات والأبعاد

الأعمدة القياسية: أوسع أعمدة السيليكا الأنبوبية المفتوحة استخدامًا لها أقطار داخلية تبلغ 0.32 mmو0.25 mm.

الأعمدة عالية الدقة: تتوفر أيضًا بأقطار تبلغ 0.20 mmو0.15 mm، إلا أن استخدامها أكثر صعوبة وأكثر متطلبات لأنظمة الحقن والكشف؛ لذا يجب استخدام مقسّم عينات (Sample splitter) لتقليل حجم العينة المحقونة في العمود، مع تطلب نظام كشف أكثر حساسية وذو زمن استجابة سريع.

الأعمدة الواسعة ($Megabore$): تتوفر تجاريًا شعيرات أكبر بحجم 530 μmتسمى أحيانًا أعمدة ميجابور ($Megabore\ columns$). تتحمل هذه الأعمدة أحجام عينات مشابهة لتلك الخاصة بالأعمدة المعبأة. وعلى الرغم من أن خصائص أداء الأعمدة الأنبوبية المفتوحة الواسعة ليست جيدة مثل الأعمدة ذات القطر الأصغر، إلا أنها أفضل بكثير مقارنة بالأعمدة المعبأة.

مواد الدعامة الصلبة (Solid Support Materials)

تعمل المادة الحشوَة أو الدعامة الصلبة في العمود المعبأ على تثبيت الطور الثابت السائل في مكانه بحيث يتعرض أكبر قدر ممكن من مساحة السطح للمطور أو الطور المتحرك.

المواصفات المثالية للدعامة:

أ) جسيمات صغيرة، موحدة، وكروية الشكل. وقوة ميكانيكية جيدة. ومساحة سطح محددة لا تقل عن 1 m^2/g.
ب) خمول كيميائي عند درجات الحرارة المرتفعة.

ج) قابلية للبلل بانتظام بواسطة الطور السائل. *(حتى الآن، لا توجد مادة تلبي كل هذه المعايير بشكل مثالي).*

د) تغلف طبقة خارجية من **البولي إيميد** (Polyimide) السيليكا الهشة، مما يمنحها قوة ميكانيكية ومرونة؛ حيث يمكن غالباً تمرير العمود عبر تمديدات معقدة ليصل، على سبيل المثال، إلى مدخل الكاشف. وبما أن أعمدة السيليكا المنصهرة مستقيمة بطبيعتها، فإنها عادة ما تكون ملفوفة ومثبتة في حامل معدني (قفص). يجب التعامل معها بحذر لأنها عندما تنكسر تستقيم فجأة وقد تسبب إصابة. وتتراوح أبعادها النموذجية بين 0.05–0.53 مم للقطر الداخلي، وطول يتراوح بين 10–50 متراً. تفرض طبقة البولي إيميد حداً أقصى لدرجة حرارة التشغيل يبلغ 360 درجة مئوية (وتصل إلى 400 درجة مئوية في أنواع الطلاء الخاصة بالدرجات العالية).

نزيف العمود (Column Bleed) واستقرار الطور الساكن

يتم تقليل **نزيف العمود (Column bleed)** وبالتالي ضجيج الكاشف (detector noise) مقارنة بالأعمدة المعبأة (packed columns) للأسباب التالية:

أ) كمية الطور الساكن الموجودة قليلة.

ب) غالباً ما يكون الطور مرتبطاً تشابكياً (**cross-linked**) ومرتبطاً كيميائياً بجدار الأنبوب الشعري عبر مجموعات السيلانول السطحية (surface silanols).

يتم إحداث الترابط التشابكي عبر الإشعاع غاما (**γ-irradiation**)، على سبيل المثال، والذي يعمل على بدء تفاعلات الجذور الحرة بين جزيئات الطور الساكن المتجاورة. يؤدي ذلك إلى زيادة متوسط الوزن الجزيئي (Mr) للبوليمر، مما يزيد بدوره من الاستقرار ثلاثي الأبعاد، واللزوجة، ومقاومة المادة للمذيبات. تتوفر أيضاً بولي سيلوكسانات معدلة يتم فيها دمج شق فينيل، على سبيل المثال (**arylene-stabilized**)، في سلسلة السيلوكسان بدلاً من بعض ذرات الأكسجين (—O–Si(R1R2)–C6H5–Si(R3R4)–O–). تمنح هذه الأطوار استقراراً معززاً يؤدي إلى انخفاض إضافي في نزيف العمود، وهي عوامل قيمة في التحليلات ذات الحساسية العالية ودرجات الحرارة المرتفعة. ويمكن تعديل استبدال الآريلين (arylene substitution) للحفاظ على نفس خصائص الفصل كما في طور فينيل سيلوكسان الأصلي غير المستقر بالآريلين.

المزايا والوصل مع الكواشف

من المزايا الهامة للأعمدة الشعرية أن كتلتها الحرارية منخفضة، وبالتالي يتم تسهيل **البرمجة الحرارية (temperature programming)**. والأهم من ذلك، أن الربط مع مطياف الكتلة (**interfacing to MS**) يصبح بسيطاً لأن معدلات تدفق غاز الحامل (ونزييف العمود) منخفضة. ميزة إضافية مقارنة بالأعمدة المعبأة هي أنه عند استخدام أطوار بولي سيلوكسان الساكنة، يتم تقليل تراكم الرواسب السيليكونية على كواشف **FID/NPD/ECD**. من ناحية أخرى، فإن أحد التعقيدات هو أن كواشف الكروماتوغرافيا الغازية (GC) بخلاف مطياف الكتلة (MS) تتطلب معدلات تدفق أعلى مما يستخدم عادةً مع الأعمدة الشعرية، وبالتالي هناك حاجة لمصدر غاز تعويضي (**make-up' gas'**).

أنواع الأعمدة الشعرية

تُستخدم مصطلحات **PLOT** و **SCOT** و **WCOT** لوصف أنواع مختلفة من الأعمدة الشعرية:

1) **أعمدة PLOT (porous-layer open tubular):** ترتبط طبقة رقيقة (10 ميكرومتر أو أقل) من جزيئات الطور الساكن (مثل الألومينا المنشطة) بالسطح الداخلي للأنبوب الشعري. هذه الأعمدة احتجازية جداً وتخصص

عادةً لتحليل المواد شديدة التطاير مثل الغازات الدائمة. لا يُنصح بها للاستخدام مع كاشف MS بسبب ميلها لتساقط جزيئات الطور الساكن.

2) **أعمدة SCOT (support-coated open tubular):** يتم طلاء طور ساكن سائل على جزيئات (مثل بلورات كلوريد الباريوم الدقيقة) المرتبطة بالسطح الداخلي للأنبوب الشعري.

3) **أعمدة WCOT (wall-coated open tubular):** يتم طلاء طور ساكن سائل، أو الأكثر شيوعاً، ربطه كيميائياً بجدار الأنبوب الشعري مباشرة.

رغم إمكانية تحضير أعمدة WCOT الزجاجية داخلياً، إلا أنه من الأنسب شراء أعمدة مختبرة مسبقاً. الأطوار الساكنة المستخدمة هي بشكل عام تلك التي تم تطويرها للأعمدة المعبأة ، ولكن إلغاء تنشيط العمود بشكل أفضل وطلاء الطور بشكل أكثر تجانساً يعني الحصول على أشكال قمم (peaks) جيدة حتى عند استخدام أطوار منخفضة القطبية. علاوة على ذلك، عند استخدام البرمجة الحرارية، تكون معظم الأطوار مستقرة عند استخدامها بزيادة **20–50 C°** فوق حد درجة حرارة العمود المعبأ لفترات قصيرة.

الجدول 4: بعض الأطوار الساكنة المستخدمة في علم السموم التحليلي

Table 3 Some GC stationary phases used in analytical toxicology.

الطور الساكن (Phase)	النوع(Type)	نطاق حرارة التشغيل المقترح(C°)	مرجع USP	مجموع ثوابت ماكرينولدز
Squalane	هيدروكربون (المرجع غير القطبي)	20/100	—	0
SPB-Octyl	50%ثنائي ميثيل، 50% أوكتيل بولي سيلوكسان	-60/280	—	51
Apiezon L	شحم هيدروكربوني	50/300	—	143
SE-30 / OV-1	100%ميثيل بولي سيلوكسان (صمغي)	-60/320	G2	217 - 222
OV-101 / DB-1	100%ميثيل بولي سيلوكسان (زيتي)	-60/320	G1	229
Apiezon L/KOH	شحم هيدروكربوني مع هيدروكسيد البوتاسيوم	50/225	G44	301
SE-52 / HP-5	95%ميثيل، 5% فينيل بولي سيلوكسان	-60/320	G27	334
SE-54	94%ميثيل، 5% فينيل، 1% فينيل بولي سيلوكسان	-20/280	G36	337
RTX-1301	6%سيانو بروبيل فينيل، 94% ميثيل بولي سيلوكسان	-20/280	G43	592
OV-17 / SP-2250	50%ميثيل، 50% فينيل بولي سيلوكسان	30/310	G3	884
Poly A 103	بولي أميد(Polyamide)	50/275	G10	1072
OV-210	50%ميثيل، 50% ثلاثي فلورو بروبيل بولي سيلوكسان	40/230	G6	1520
OV-225	50%سيانو بروبيل فينيل، 50% ميثيل بولي سيلوكسان	40/230	G19	1813
Carbowax 20M	بولي إيثيلين جليكول (عالي القطبية)	35/280	G16	2308
FFAP	بولي إيثيلين جليكول مع حمض تيريفثاليك	50/250	G25	2546
DEGS	بوليستر (ثنائي إيثيلين جليكول سكسينات)	20/200	G4	3504

ملاحظات هامة على الجدول:

التدرج في القطبية: نلاحظ أن القطبية تبدأ من الصفر (Squalane) وتتصاعد حتى تصل إلى قمتها مع الأطوار مثل DEGS و FFAP. في علم السموم، يُعد الانتقال من **OV-1** (غير قطبي) إلى **OV-17** (متوسط القطبية) ثم **Carbowax** (قطبي) هو المسار المعتاد لتغيير انتقائية الفصل.

درجة الحرارة القصوى: لاحظ العلاقة العكسية غالباً؛ فكلما زادت قطبية الطور (مثل DEGS أو OV-225)، انخفضت درجة حرارة التشغيل القصوى المسموح بها مقارنة بالأطوار غير القطبية مثل OV-1.

رموز الموردين: DB: شركة W&J. **OV:** شركة Ohio Valley. **SP:** شركة Supelco. **HP:** شركة Hewlett Packard (حالياً Agilent). **RTX:** شركة Restek.

تنبيه فني: الطور **Apiezon L/KOH** مطلي أولاً بهيدروكسيد البوتاسيوم لتقليل تذييل القمم للقواعد القوية (مثل الأمفيتامينات)، مما يجعله مثالياً لفصلها رغم محدودية حرارته.

الكفاءة والسعة (Efficiency and Capacity)

بشكل عام، تزداد الكفاءة مع أقطار الأعمدة الأضيق وسماكة الغشاء الأقل، ولكن سعة العينة تكون أكبر مع الأقطار الواسعة والأغشية الأسمك، وبالتالي يتم تقليل خطر التحميل الزائد للعمود (**column overloading**)، والذي يظهر عادةً كظاهرة "البروز الأمامي" (‘**fronting**’ أو ذروة زعانف القرش).

الأعمدة بقطر داخلي 0.32 مم: وطول 30-50 متر مع تحميل معتدل للطور (سماكة غشاء 0.2-0.3 ميكرومتر) واستخدام نظام حقن مناسب، تعتبر مناسبة للعديد من الأغراض في علم السموم التحليلي مثل **STA.**

الأعمدة بقطر داخلي 0.53 مم (Wide-bore): وطول 15-30 متر مع تحميل عالٍ نسبياً للطور (سماكة غشاء 1-5 ميكرومتر)، تمتلك سعة وكفاءة مماثلة للأعمدة المعبأة عند معدلات تدفق 8-20 مل/دقيقة، ولكن مع مزايا أفضل في شكل القمم، وقابلية التكرار، والتطبيق في البرمجة الحرارية. عند استخدام هذه المعدلات، قد لا يلزم غاز تعويضي للكاشف. وبدلاً من ذلك، يمكن استخدام هذه الأعمدة بمعدلات تدفق أقل (1-2 مل/دقيقة) وهي الأكثر ملاءمة للربط مع MS.

يمكن للأعمدة ذات سماكة الغشاء العالية (5 ميكرومتر) أن تتحمل حقن ما يصل إلى 1 ميكرولتر من الماء، وغالباً ما يمكن استبدال هذه الأعمدة مباشرة بالأعمدة المعبأة في طريقة معينة. تتوفر "أطقم تحويل" (**conversion kits**) لتمكين استخدام هذه الأعمدة الشعرية واسعة القطر في الأجهزة المصممة للأعمدة المعبأة التقليدية.

اطار4: اختيار العمود الشعري للـ GC

الأعمدة الأطول (25 أو 50 متر نموذجياً) تزيد من الكفاءة، ولكنها تزيد من زمن التحليل.

الأعمدة الأضيق تعطي عدداً أكبر من الصفائح لكل متر، ولكن العوامل الأخرى مهمة أيضاً:

0.15 مم قطراً داخلياً: كفاءة عالية مع تدفق غاز حامل منخفض، ولكن سعة منخفضة (حقن بالتجزئة split). جيدة للـ GC-MS.

0.32 مم قطراً داخلياً: كفاءة وسعة عينة معقولة (حقن داخل العمود on-column). جيدة لـ STA والأعمال ذات الحساسية العالية.

0.53 مم قطراً داخلياً: تعطي كفاءة وسعة عينة تعادل على الأقل الأعمدة المعبأة، ولكن مع ذيول (tailing) أقل للمركبات القطبية وبرمجة حرارية أسهل.

سماكة الغشاء (0.1–5 ميكرومتر، غالباً 0.25 ميكرومتر): مهمة أيضاً وتؤثر على كل من الاحتجاز وسعة العينة.

الأطوار المرتبطة تشابكياً (المثبتة): مستقرة نسبياً. يمكن استخدام حقن عينات بأحجام كبيرة وغسل العمود لإزالة الملوثات غير المتطايرة.

الكفاءة العالية تعني الحاجة إلى عدد أقل من الأطوار الساكنة. البولي سيلوكسانات الشائعة هي:
OV-1/SE-30/O-101, HP-5, OV-17, OV-225.
تشمل الأطوار الأخرى المستخدمة: Carbowax 20M, FFAP.

الكروماتوغرافيا الغازية متعددة الأبعاد (Multidimensional GC)

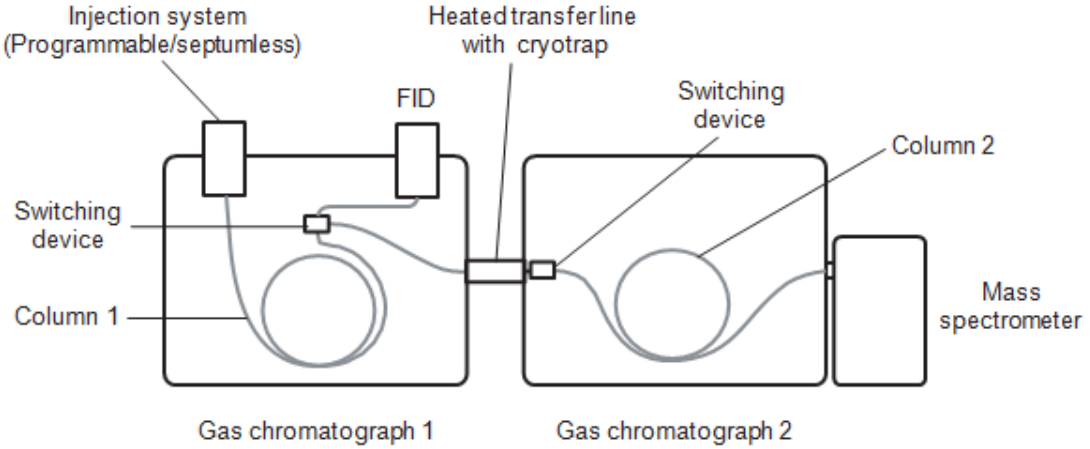
في الكروماتوغرافيا الغازية متعددة الأبعاد (**MD-GC**)، يتم تشتيت العينة في أبعاد زمنية مختلفة. فعندما يتم فصل عينة باستخدام عمودين غير متماثلين، تكون سعة القمة الإجمالية (**total peak capacity**) هي نتاج ضرب سعات قمم الأعمدة الفردية. وللحصول على أقصى قدر من زيادة الدقة (resolution)، يجب أن يكون الفصل في الأبعاد الزمنية الفردية غير مترابط تماماً أو متعامداً (**orthogonal**). ورغم ندرة تحقيق ذلك عملياً، إلا أنه يمكن الحصول على مكاسب كبيرة في الانتقائية دون الحاجة إلى تعامد تام (**Marriott et al., 2004**).

الكروماتوغرافيا ثنائية الأبعاد (2D-GC) بتقنية "القطع القلبي" (heartcutting): ويُرمز لها بـ (‘**GC-GC**’)، حيث يتم نقل جزء (كسر) من محور الاحتجاز الأول للفصل على محور الاحتجاز الثاني.

الكروماتوغرافيا ثنائية الأبعاد الشاملة (comprehensive 2D-GC): ويُرمز لها بـ (‘**GC×GC**’)، حيث يتم تمرير أجزاء من العينة بأكملها، بعد فصلها في العمود الأول، لتحليلها في العمود الثاني.

استخدمت الأعمال المبكرة في **D-GC2** صمامات لربط العمودين وتجزئة المادة الخارجة من العمود الأول. وفي عام 1968، قدم **Deans** نظام تبديل بدون صمامات عبر توظيف موازنة الضغط الهوائي (pneumatic pressure balancing). ومن خلال التحكم في تدفقات غاز الحامل إلى منفذ الحقن ونقطة تقاطع الأعمدة، يمكن تحويل الأجزاء إلى العمود الثاني أو تفريغها (vented) كنفايات (**Figure 12**). واجه هذا التصميم تحدي استقرار ضغط غاز الحامل في المحقن وعند موصل المنتصف، وهو تحدٍ تم التغلب عليه الآن باستخدام أجهزة التحكم الإلكترونية الحديثة في تدفق الكتلة ومنظمات الضغط الخلفي الإلكترونية التناسبية مع استشعار الضغط.

هناك نوع أحدث من **2D-GC** يستخدم عمودين متصلين مباشرة ويوظف مصيدة تبريد معدلة طولياً (**longitudinally modulated cryogenic trap**) تقع بين العمودين (**Marriott et al., 2000**). وبالمقارنة مع **MD-GC** العادي، حيث يتم تحويل مخرجات العمود الأول مؤقتاً إما إلى كاشف مراقبة أو إلى العمود الثاني، يمكن نظرياً تمرير جميع المخرجات من العمود الأول إلى الثاني. بدلاً من ذلك، يسمح تعديل المصيدة باختيار مناطق مستهدفة لتعزيز الفصل في العمود الثاني. ونظراً لأن البيانات تُعرض بتنسيق (الزمن-الاستجابة)، فإن التقدير الكمي وإنشاء التقارير هما في الأساس نفس ما يتم في أي طريقة **GC** أخرى، مع ميزات إضافية تشمل تعزيز الحساسية. تُعد **MD-GC** أداة تحليلية قوية (**Dalluge et al., 2003**)، ورغم أن التطبيقات السمومية لها قليلة في الوقت الحاضر، إلا أن بعض المنشورات أظهرت إمكانات هذا النهج (**Kueh et al., 2003**).



شكل (13): المخطط التوضيحي للكروماتوغرافيا ثنائية الأبعاد (2D-GC)

يعتمد هذا التصميم على ما يُعرف بـ **"مبدأ عميد" (Deans Switch)**، ويتكون من الأجزاء الرئيسية التالية:

1) **المحقن (Injector):** حيث يتم إدخال العينة وتبخيرها لتنتقل مع غاز الحامل.
2) **العمود الأول (Primary Column):** يتم فيه الفصل الأولي للمكونات بناءً على خاصية معينة (مثل القطبية).
3) **نقطة الربط/التحويل (Switching Point):** هي المنطقة الحرجة التي يتم فيها التحكم بمسار المادة الخارجة من العمود الأول باستخدام ضغط الغاز (Pneumatic control):
   - **إلى المهملات (To Vent):** حيث يتم التخلص من المكونات غير المرغوب فيها.
   - **إلى العمود الثاني (To Secondary Column):** حيث يتم إرسال "القطع القلبي" (**Heartcut**) المختار لمزيد من الفصل.

4) **العمود الثاني (Secondary Column):** يحتوي عادةً على طور ساكن مختلف تماماً عن العمود الأول لتحقيق فصل متعامد (**Orthogonal separation**).
5) **الكاشف (Detector):** غالباً ما يكون مطياف كتلة (MS) أو كاشف تأين اللهب (FID) لرصد المكونات المنفصلة بدقة عالية.

ملاحظة تقنية: في الأنظمة الحديثة، استُبدلت أدوات التحكم اليدوية بالضغط بأجهزة تحكم إلكترونية (**Electronic Pneumatic Control - EPC**) تضمن استقرار التدفق بنسبة خطأ تكاد تكون معدومة، مما يسهل عملية مطابقة النتائج وتكرارها.

الاشتقاق للكروماتوغرافيا الغازية (Derivatization for GC)

المواد المراد تحليلها والتي تحتوي على مجموعات وظيفية قطبية، وخاصة الفينولات والكحوليات والأحماض الكربوكسيلية، تعطي أحياناً قممًا غير فعالة وذات تذييل (**tailing**) في الـ **GC**، مما يؤدي إلى ضعف الانتقائية والحساسية. وتشكل معظم الهيدروكسيلات العطرية والأليفاتية إيثرات سيليلية (**silyl ethers**) عند معالجتها بكواشف ثلاثي ميثيل السيليل (**TMS**) في درجة حرارة الغرفة، أو عند التسخين في حالة المركبات المعاقة فراغياً (sterically hindered).

- **HMDS:** استخدم على نطاق واسع، لكنه لا يتفاعل مع مجموعات الهيدروكسيل المعاقة.
- **BSA:** بديل مناسب.
- **BSTFA:** الذي يحتوي على 1% (v/v) من **trimethylchlorosilane (TMCS)** يعتبر كاشفاً أكثر قوة.
- **TSIM:** فعال بشكل خاص في سيلنة مجموعات الهيدروكسيل المعاقة، لكنه لا يتفاعل مع الأمينات.

ونظراً لأن كواشف السيلنة ونواتج التفاعل تتحلل مائياً بسهولة، يجب استبعاد الماء تماماً. ومع ذلك، فإن **tert-butyldimethylsilylimidazole** يشكل إيثرات مستقرة نسبياً تجاه التحلل المائي. ومن عيوب استخدام مشتقات السيليل تراكم نواتج التحلل عند كاشف الـ **GC**، مما يؤدي لفقدان الحساسية ويستوجب التنظيف الدوري. وفي هذا الصدد، يُقال إن **BSTFA** هو المفضل إذا تم استخدام كاشف **FID**، لأن نواتج الاحتراق متطايرة ولا تلوث الكاشف. تُحلل الأحماض الكربوكسيلية عادةً كأسترات ميثيل أو بوتيل. يمكن تحقيق **الميثلة (Methylation)** عن طريق التسخين (60-100 درجة مئوية، 30 دقيقة) مع 14% (w/v) من ثلاثي فلوريد البورون في الميثانول. وبعد تبخير معظم المذيب وإضافة الماء، يمكن استخلاص المشتق الميثيلي في مذيب عضوي مثل الهكسان. كما يمكن استخدام **الديازو ميثان (Diazomethane)** ككاشف ميثلة، حيث يتفاعل بسرعة في المختبر في درجة حرارة الغرفة، ويمكن إزالة الكاشف الزائد ببساطة عن طريق التبخير. ومع ذلك، يجب الحذر لأن الديازو ميثان مادة مسرطنة، وشديدة السمية، ومن المحتمل أن تكون متفجرة. بالإضافة إلى ذلك، يتفاعل الديازو ميثان ببطء مع الفينولات، وقد يكون هذا غير مرغوب فيه لأنه قد ينتج عنه خلائط من نواتج ميثلة جزئية. يمكن تحقيق **الميثلة داخل العمود (On-column methylation)** للباربيتورات، والهيدانتوينات، وبعض الأحماض الكربوكسيلية عن طريق حقن العينة مخلوطة مع $0.2 mol\ L^{-1}$ من هيدروكسيد ثلاثي ميثيل أنيلينيوم في الميثانول. ومع ذلك، قد تظهر قمم "شبحية" (**ghost' peaks'**) عند حقن كاشف الاشتقاق لاحقاً إذا تراكمت مادة غير متمثلة تماماً على العمود. تشمل التفاعلات الشائعة قبل تحليل الـ GC للأمينات الأولية والثانوية، وهيدروكسيلات الفينول، عملية **الأسْتلة (Acylation)** باستخدام كواشف مثل أنهيدريد الخليك والبروبيونيك، أو كلوريدات الأحماض الخاصة بها.

مثال الباراسيتامول: يمكن إجراء أسئلة استخلاصية للباراسيتامول و butyryl-p-aminophenol-N (كمعيار داخلي) باستخدام أنهيدريد الخليك و methylimidazole-N كعامل حفاز (**Huggett et al., 1981**). يمكن تحليل العينة مع عينة ضبط جودة داخلي (**IQC**) مكررة في غضون 20 دقيقة، وكان حد القياس الدقيق للمقايسة هو $10mg\ L^{-1}$.

تتفاعل الأمينات الأولية مع الألدهيدات أو الكيتونات (مثل الأسيتون، والبنزالدهيد، والسي كلوهيكسانون) لتعطي **إيمينات (imines)**، بينما تنتج الأمينات الثانوية **إينامينات (enamines)**. كما تتفاعل الهيدرازينات والهيدروكسيلامينات مع مركبات الكربونيل لتعطي الهيدرازونات والأوكسيمات على التوالي. وقد تم تمثيل تكوين الإيمين بالتفاعل بين الأسيتون والأمفيتامين .

إن تفاعل أحماض البورونيك (مثل حمض فينيل بورونيك) مع 1,2- و 3,1-diols- لتكوين **بورونات حلقية (cyclic boronates)** لا يتأثر بوجود الماء، وقد استُخدم في قياس الإيثيلين جليكول في البلازما، البول، أو سائل غسيل الكلى بواسطة الـ GC-FID باستخدام عمود معبأ (**Flanagan et al., 1987**). استُخدم 3,1-Propanediol- كمعيار داخلي تفاعلي. كان حد القياس الدقيق $0.1mg\ L^{-1}$على الأقل، وامتد النطاق الخطي حتى $5mg\ L^{-1}$. يُعد الإيثيلين جليكول قطبياً جداً ويصعب قياسه بشكل خاص باستخدام الأعمدة المعبأة؛ وقد خُلط بين 3,2-butanediol و 2,1-propanediol وبينه في تحاليل GC أخرى.

الاشتقاق في فراغ الرأس (Derivatization in Headspace GC)

يمكن استخدام الاشتقاق أيضاً في تحليل فراغ الرأس (**Headspace GC - Section 3.2.4**) لزيادة الحساسية وتحسين الأداء الكروماتوغرافي لمركبات معينة. قد تدمص بعض الأحماض، والكحوليات، والأمينات ليس فقط على عمود التحليل، بل أيضاً في منفذ الحقن، مما يؤدي إلى قمم متذيلة واستجابة ضعيفة للكاشف. بالإضافة إلى ذلك، قد تكون شديدة الذوبان في المصفوفة (matrix)، مما يسبب توزيعاً سيئاً جداً في فراغ الرأس. يمكن للاشتقاق تحسين التطاير وتقليل احتمالية الامتصاص على مكونات نظام الـ GC.

تفاعلات الاشتقاق الشائعة التي يمكن إجراؤها داخل وعاء العينة (vial) هي **الأسترة (esterification)**، **الأسئلة (acetylation)**، و **الألكلة (alkylation)**. ورغم فوائده، قد يسبب تفاعل الاشتقاق مشاكل أخرى؛ فقد تكون كواشف الاشتقاق أو النواتج الثانوية متطايرة وتنتقل إلى فراغ الرأس مع المادة المحللة، وتنفصل في أزمنة احتجاز مشابهة للمركبات المستهدفة. كما قد يتطلب التفاعل درجات حرارة مرتفعة، مما قد يؤدي لزيادة الضغط داخل الوعاء بما يتجاوز قدرة الوعاء أو السدادة (septum). تتوفر أغطية مصممة خصيصاً تسمح بتصريف الضغط الزائد أثناء التفاعل.

مشتقات التقاط الإلكترون (Electron-capturing derivatives)

تتوفر كواشف سيلنة مهلجنة، مثل **BMDMCS** و **CMDMCS**، لإضفاء خصائص التقاط الإلكترون على المشتق، ولكن تُستخدم أساساً كواشف الأسئلة والألكلة المفلورة. من عيوب استخدام هذه المشتقات أن المستخلصات البيولوجية غالباً ما تحتوي على العديد من المركبات ذات المجموعات الوظيفية التفاعلية، وبالتالي قد تحتوي الكروماتوغرامات الناتجة على قمم إضافية قد تسبب تداخلاً.

جدول5: كواشف الاشتقاق لـ GC-ECD.

المركب(Compound)	الاستخدامات(Uses)	ملاحظات(Notes)
الأنهيدريدات المشبعة بالفلور (Perfluorinated anhydrides): TFAA, PFPAA, HFBAA	تتفاعل مع الكحوليات، الأمينات، والفينولات. تنتج مشتقات مستقرة وشديدة التطاير. مناسبة لكاشفي FIDو .ECDتزداد أزمنة الاحتجاز مع زيادة الكتلة الجزيئية النسبيةMr).	يجب إزالة الناتج الحمضي الثانوي (تيار من النيتروجين) قبل الحقن في العمود. يمكن إضافة القواعد (مثل ثلاثي إيثيل أمين) كمستقبل للبروتونات وبالتالي تعزيز التفاعل.
بيرفلوروأسيل إيميدازول (Perfluoracylimidazoles): TFAI, PFBI, HFBI	تعمل بشكل أفضل مع الأمينات ومركبات الهيدروكسي. خيار أفضل لتكوين مشتقات كاشف.ECD	تتفاعل في ظروف معتدلة. الناتج الثانوي (الإيميدازول) ليس حمضياً، لذا هو أقل ضرراً للعمود. الكواشف حساسة للماء وتتفاعل معه بعنف.
N-Methyl-bis(trifluoroacetamide) (MBTFA)	يتفاعل مع الأمينات الأولية والثانوية. يتفاعل ببطء مع مجموعات الهيدروكسيل والثيولات.	يتفاعل في ظروف معتدلة. الناتج الثانوي للتفاعل (N-methyltrifluoroacetamide)متعادل، مستقر، ومتطاير، ولا يسبب تداخلاً في التحليل.
كلوريد بنزويل مشبع بالفلور (Pentafluorobenzoylchloride) (PFBC)	الأكثر تفاعلاً مع الفينولات. يتفاعل مع الكحوليات والأمينات الثانوية.	ستتفاعل الأمينات الثانوية مع هذا المركب.
بروميد بنزيل مشبع بالفلور (Pentafluorobenzyl bromide) (PFBB)	يتفاعل مع الأحماض الكربوكسيلية، الفينولات والثيولات.	مادة مسيلة للدموع قوية – يجب استخدامه داخل خزانة طرد الغازات.(Fume hood)

عمليات الفصل الكيرالي (Chiral separations)

تم تطبيق تقنية HPLC على نطاق واسع في هذا المجال، ولكن تم استخدام الكروماتوغرافيا الغازية (GC) أيضاً (**Zief and Crane, 1988; Pasutto, 1992; König, 1998**). يتميز الـ HPLC بسهولة استعادة المواد المحللة المفصولة من مخرجات العمود كما أن الأنظمة التحضيرية (preparative-scale) شائعة فيه، بينما تعتبر كواشف الـ GC بشكل عام أكثر حساسية. وقد أثبتت مشتقات السيكلودكسترين (**cyclodextrin - CD**) المحبة للدهون والمعدلة تفوقها على جميع الأطوار الساكنة الكيرالية (**CSPs**) الأخرى المستخدمة سابقاً في الـ GC الشعري، ولها نطاق تطبيق غير محدود تقريباً. إذا كان المادة المحللة تحتوي على مجموعة وظيفية تفاعلية، فقد يكون الاشتقاق باستخدام كاشف نقي ضوئياً (**optically pure reagent**) وتحليل "الدياستيريوميرات" (diastereoisomers) الناتجة على عمود GC غير كيرالي (achiral) كافياً (**Srinivas et al., 1995**). تم استخدام مجموعة من كواشف الاشتقاق تشمل، بالنسبة للأمينات، كاشف **S-(–)-N-trifluoroacetylprolyl chloride**.

بدلاً من ذلك، يمكن استخدام التحليل باستخدام طور ساكن كيرالي (**CSP**). تم وصف عدد من أطوار الـ GC الكيرالية بما في ذلك الأميدات، الدياميدات، الديبيتيدات والبولي سيلوكسانات ذات المستبدلات الكيرالية (**Liu and Ku, 1983**)، ولكن الاستقرار الحراري المنخفض لهذه الأطوار حال دون استخدامها على نطاق واسع. ومع ذلك، فإن تعديل بولي سيلوكسانات الفينيل والميثيل عن طريق إدخال أجزاء من **L-valine-tert-butylamide** أو **L-valine-S-α-phenylethylamide** يمكن أن يعطي أطواراً كيرالية باستقرار حراري يصل إلى **230 C°**. كما استُخدمت أطوار **PDMS** المعدلة بمشتقات **(S)-(-)-tert-leucine** (**Abe et al., 2000**). بالإضافة إلى ذلك، تم تطوير طور ساكن بوليمري مشترك يتكون من مكون

كيرالي، وهو **(R-trans)-N,Nr-1,2-cyclohexylenebisbenzamide1**، وطور **PDMS** يتمتع باستقرار حراري جيد (**Juvanc et al., 2002**).

تُعد السيكلودكسترينات (**CDs**) جزيئات كيرالية حلقية تشبه شكل "الطوق" (torus-shaped) تتكون من ستة أو أكثر من وحدات **D(+)-glucose** المرتبطة عبر روابط **α-(1–4) glycoside**.

- ← **α-CDs:** تحتوي على ست وحدات أميلوز.
- ← **β-CDs:** تحتوي على سبع وحدات.
- ← **γ-CDs:** تحتوي على ثماني وحدات

يمكن استخدام الـ CDs "المؤلكلة تماماً" (Peralkylated) في الشعيرات الدموية المصنوعة من السيليكا المصهورة والمذابة في البولي سيلوكسانات للحصول على أعمدة GC كيرالية (**König, 1998**). وبدون مضافات الـ CD، تكون هذه الأعمدة غير كيرالية (achiral).

يمكن فصل enantiomers (المتصاوغات المرآتية) للمركبات القطبية مثل الكحوليات، والديولات والأحماض الكربوكسيلية دون الحاجة للاشتقاق. علاوة على ذلك، يمكن فصل الألكانات والألكانات الحلقية الراسيمية (racemic) باستخدام الأطوار المعدلة بالـ CD. تم فصل enantiomers لمركبات التخدير المهلجنة (enflurane, halothane, isoflurane) باستخدام هذه الأنظمة (**Meinwald et al., 1991**)، وكذلك enantiomers للكيتامين والنوركيتامين (**Williams and Wainer, 2002**). غالباً ما تقوم هذه الأعمدة بفصل المتصاوغات الموضعية (positional isomers) بالإضافة إلى المتصاوغات المرآتية. يتراوح نطاق درجة الحرارة القابل للاستخدام بين **30–240 C°**. ومن التطبيقات العملية لاستخدام الـ GC الشعري في تحليل المتصاوغات المرآتية هو قياس enantiomers لكل من: **Amfetamine, metamfetamine, MDA, MDMA, MDEA** في عينات البلازما من حالات السموم الإكلينيكية وحالات القيادة تحت تأثير المخدرات (**Peters et al., 2003a**).

تطبيقات الكروماتوغرافيا الغازية في علم السموم التحليلي

Applications of gas chromatography in analytical toxicology

أدى التطور المستمر في تكنولوجيا الأعمدة الشعرية وإدخال أنظمة **GC-MS** المكتبية (bench-top) إلى تجديد التقدير لقيمة الـ GC في علم السموم التحليلي. عند تطوير طرق GC، من المهم معرفة الوزن الجزيئي (Mr) والتركيب الكيميائي للمركب المستهدف حتى لو تم اتباع طريقة منشورة مسبقاً. كما أن المعلومات حول أي أدوية مصاحبة في التركيبة أو يتم تناولها معاً قد تكون ذات قيمة كبيرة. في بعض الأحيان، قد توفر الشركات المصنعة تفاصيل حول طرق المقايسة، والأدبيات الحالية، والمعايير الداخلية المحتملة لمركبات معينة.

التحليل السمومي المنهجي (Systematic Toxicological Analysis - STA)

تمت مناقشة دور الـ GC الشعري في الـ **STA** بشكل موسع (**Maurer, 1992; Peters et al., 2003b**)، وقورن مؤخراً بتقنيات أخرى مثل **HPLC-DAD** و **HPLC-MS** (**Polettini, 1999; Maurer, 2004**). أظهرت بيانات الاحتجاز (retention data) للأعمدة المعبأة للعديد من الأدوية والسموم الأخرى على مجموعة من الأطوار الساكنة ذات القطبيات المختلفة ارتباطاً وثيقاً (**Moffat et al., 1974**)، وذلك بسبب العلاقة المتبادلة بين الوزن الجزيئي (Mr) والتطاير

والاحتجاز التي تهيمن في الـ GC. وبناءً على ذلك، استُنتج أنه لا فائدة تُذكر من استخدام أكثر من عمود واحد في الـ STA، واقتُرح استخدام طور منخفض القطبية مثل **SE-30/OV-1/OV-101** (انظر **Table 7.3**) لهذا الغرض لأن معظم المركبات المدروسة تخرج (eluted) باستخدامه. وقد أكدت الخبرة اللاحقة مع الأعمدة الشعرية الحديثة عالية الكفاءة أن استخدام عمود واحد منخفض أو متوسط القطبية مع البرمجة الحرارية يعد كافياً لمعظم الأغراض، بشرط استخدامه مع إجراءات تحضير عينة انتقائية وشكل من أشكال الكشف الانتقائي، والمثالي هو مطياف الكتلة (**MS**). تتميز أطوار **PDMS** (مثل SE-30/OV-1/OV-101) الآن بميزة إضافية وهي توفر بيانات **دليل الاحتجاز (Retention Index)** لعدد كبير من الأدوية والمركبات التي تم الحصول عليها سابقاً باستخدام الأعمدة المعبأة (**de Zeeuw et al., 1992**)، وهذه البيانات قابلة للنقل مباشرة إلى الأعمدة الشعرية بشكل عام.

تقنية تثبيت زمن الاحتجاز (Retention Time Locking - RTL)

أدى الإدخال الأخير لتقنية **"تثبيت زمن الاحتجاز" (RTL)** للأعمدة الشعرية (من شركة Agilent) إلى إعادة تقييم استخدام بيانات دليل الاحتجاز في الـ STA. تم إجراء دراسة حول الدقة طويلة المدى لثلاثة بارامترات للاحتجاز:

- ♣ زمن الاحتجاز المطلق (absolute retention time).
- ♣ زمن الاحتجاز النسبي (RRT) المرتبط بمركب **dibenzepin**.
- ♣ دليل الاحتجاز المبني على سلسلة **alkylfluoroaniline**.

أُجريت هذه الدراسة على 14 دواءً قاعدياً باستخدام أعمدة **HP-5** و **DB-17** (المكافئ لـ OV-17) مع وبدون استخدام تقنية **RTL**. وباستخدام وضع التدفق الثابت (constant flow mode)، أعطت تقنية RTL تكرارية (reproducibility) أفضل في جميع بارامترات الاحتجاز الثلاثة مقارنة بالطريقة التي لا تستخدم RTL على كلا العمودين. وفرت تقنية **RTL** ميزة كبيرة ليس فقط بين الطرق المختلفة، بل ضمن طريقة الجهاز الواحد، مع انحراف معياري نسبي (**RSD**) أقل من **0.1%** في زمن الاحتجاز النسبي (**Rasanen et al., 2003**). كما تم توظيف تقنية RTL أيضاً في تحليل بقايا المبيدات الحشرية (**Cook et al., 1999**).

المراجع References

Abe, I., Terada, K., & Nakahara, T. (2000). Enantiomer separation of pharmaceuticals by capillary gas chromatography with novel chiral stationary phases. Biomedical Chromatography, 14(2), 125–129.

Calafat, A. M., & Stanfill, S. B. (2002). Rapid quantitation of cyanide in whole blood by automated headspace gas chromatography. Journal of Chromatography B, 772(1), 131–137.

Caldwell, R., & Challenger, H. (1989). A capillary column gas-chromatographic method for the identification of drugs of abuse in urine samples. Annals of Clinical Biochemistry, 26(5), 430–443.

Cook, J., Engel, M., Wylie, P., & Quimby, B. (1999). Multiresidue screening of pesticides in foods using retention time locking, GC-AED, database search, and GC/MS identification. Journal of AOAC International, 82(2), 313–326.

Dalluge, J., Beens, J., & Brinkman, U. A. (2003). Comprehensive two-dimensional gas chromatography: A powerful and versatile analytical tool. Journal of Chromatography A, 1000(1-2), 69–108.

Dawling, S., Ward, N., Essex, E. G., & Widdop, B. (1990a). Rapid measurement of basic drugs in blood applied to clinical and forensic toxicology. Annals of Clinical Biochemistry, 27(5), 473–477.

Dawling, S., Essex, E. G., Ward, N., & Widdop, B. (1990b). Gas chromatographic measurement of cocaine in serum, plasma and whole blood. Annals of Clinical Biochemistry, 27(5), 478–481.

Deans, D. R. (1968). A new technique for heartcutting in gas chromatography. Chromatographia, 1(1), 18–22.

Dumas, P., Gingras, G., & LeBlanc, A. (2005). Isotope dilution-mass spectrometry determination of blood cyanide by headspace gas chromatography. Journal of Analytical Toxicology, 29(2), 71–75.

Flanagan, R. J., Dawling, S., & Buckley, B. M. (1987). Measurement of ethyleneglycol (ethane-1,2-diol) in biological specimens using derivatisation and gas-liquid chromatography with flame ionisation detection. Annals of Clinical Biochemistry, 24(1), 80–84.

Forsyth, D. S. (2004). Pulsed discharge detector: Theory and applications. Journal of Chromatography A, 1050(1), 63–88.

Gill, R., Hatchett, S. E., Osselton, M. D., Wilson, H. K., & Ramsey, J. D. (1988). Sample handling and storage for the quantitative analysis of volatile compounds in blood: The determination of toluene by headspace gas chromatography. Journal of Analytical Toxicology, 12(3), 141–146.

Grob, K. (2001). Split and splitless injection for quantitative gas chromatography: Concepts, processes, practical guidelines, sources of error (4th ed.). Wiley-VCH.

Grob, R. L., & Barry, E. F. (Eds.). (2004). Modern practice of gas chromatography (4th ed.). Wiley-Interscience.

Hinshaw, J. V. (2002). A compendium of GC terms and techniques. LCGC North America, 20(11), 1034–1040.

Hooker, D. B., & Dezwaan, J. (1989). Applications of a simultaneous atomic emission mass spectral gas chromatography detector in drug analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 7(12), 1591–1597.

Huggett, A., Andrews, P., & Flanagan, R. J. (1981). Rapid micromethod for the measurement of paracetamol in blood plasma or serum using gas-liquid chromatography with flame-ionisation detection. Journal of Chromatography, 209(1), 67–76.

IUPAC. (1986). Characteristics of liquid stationary phases and column evaluation for gas chromatography. Pure and Applied Chemistry, 58(9), 1291–1306.

Juvanc, Z., Markides, K. E., Petersson, P., Johnson, D. F., Bradshaw, J. S., & Lee, M. L. (2002). Copolymeric (1R-trans)-N,N'-1,2-cyclohexylene-bisbenzamide oligodimethylsiloxane chiral stationary phase for gas chromatography. Journal of Chromatography A, 982(1), 119–126.

Kolb, B., & Ettre, L. S. (1997). Static headspace-gas chromatography: Theory and practice. Wiley.

König, W. A. (1998). Gas chromatographic enantiomer separation with modified cyclodextrins. Wiley.

Kueh, A. J., Marriott, P. J., Wynne, P. M., & Vine, J. H. (2003). Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography to drugs analysis in doping control. Journal of Chromatography A, 1000(1-2), 109–124.

Lacroix, B., Huvenne, J. P., & Deveaux, M. (1989). Gas chromatography with Fourier transform infrared spectrometry for biomedical applications. Journal of Chromatography, 492, 109–136.

Laniewski, K., Vagero, M., Forsberg, E., Forngren, T., & Hagman, G. (2004). Complementary use of gas chromatography-mass spectrometry, gas chromatography-atomic emission detection and nuclear magnetic resonance for identification of pharmaceutically related impurities of unknown structures. Journal of Chromatography A, 1027(1-2), 93–102.

Liu, R. H., & Ku, W. W. (1983). Chiral stationary phases for the gas-liquid chromatographic separation of enantiomers. Journal of Chromatography, 271(2), 309–323.

Marriott, P. J., Haglund, P., & Ong, R. C. (2003). A review of environmental toxicant analysis by using multidimensional gas chromatography and comprehensive GC. Clinica Chimica Acta, 328(1-2), 1–19.

Marriott, P. J., Massil, T., & Hugel, H. (2004). Molecular structure retention relationships in comprehensive two-dimensional gas chromatography. Journal of Separation Science, 27(15-16), 1273–1284.

Marriott, P. J., Ong, R. C., Kinghorn, R. M., & Morrison, P. D. (2000). Time-resolved cryogenic modulation for targeted multidimensional capillary gas chromatography analysis. Journal of Chromatography A, 892(1-2), 15–28.

Maurer, H. H. (1992). Systematic toxicological analysis of drugs and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography, 580(1-2), 3–41.

Maurer, H. H. (2004). Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control. Clinica Chimica Acta, 42(10), 1310–1324.

Mayes, R. W. (1993). ACP Broadsheet No 142: November 1993. Measurement of carbon monoxide and cyanide in blood. Journal of Clinical Pathology, 46(11), 982–988.

McReynolds, W. O. (1970). Characterization of some liquid phases. Journal of Chromatographic Science, 8(12), 685–691.

Meinwald, J., Thompson, W. R., Pearson, D. L., König, W. A., Runge, T., & Francke, W. (1991). Inhalational anesthetics stereochemistry: Optical resolution of halothane, enflurane, and isoflurane. Science, 251(4993), 560–561.

Moffat, A. C., Stead, A. H., & Smalldon, K. W. (1974). Optimum use of paper, thin-layer and gas-liquid chromatography for the identification of basic drugs. 3. Gas-liquid chromatography. Journal of Chromatography, 90(1), 19–33.

Murphy, K. E., Schantz, M. M., Butler, T. A., Benner, B. A. Jr., Wood, L. J., & Turk, G. C. (2006). Determination of cyanide in blood by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. Clinical Chemistry, 52(3), 458–467.

Ojanperä, I., Pihlainen, K., & Vuori, E. (1998). Identification limits for volatile organic compounds in the blood by purge-and-trap GC-FTIR. Journal of Analytical Toxicology, 22(4), 290–295.

Pasutto, F. M. (1992). Mirror images: The analysis of pharmaceutical enantiomers. The Journal of Clinical Pharmacology, 32(10), 917–924.

Peters, F. T., Samyn, N., Wahl, M., Kraemer, T., De Boeck, G., & Maurer, H. H. (2003a). Concentrations and ratios of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, and MDEA enantiomers determined in plasma samples from clinical toxicology and driving under the influence of drugs cases by GC-NICI-MS. Journal of Analytical Toxicology, 27(8), 552–559.

Peters, F. T., Schaefer, S., Staack, R. F., Kraemer, T., & Maurer, H. H. (2003b). Screening for and validated quantification of amphetamines and of amphetamine- and piperazine-derived designer drugs in human blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry, 38(6), 659–676.

Pihlainen, K., & Ojanperä, I. (1998). Analytical toxicology of fluorinated inhalation anaesthetics. Forensic Science International, 97(2-3), 117–133.

Polettini, A. (1999). Systematic toxicological analysis of drugs and poisons in biosamples by hyphenated chromatographic and spectroscopic techniques. Journal of Chromatography B, 733(1-2), 47–63.

Rasanen, I., Kontinen, I., Nokua, J., Ojanperä, I., & Vuori, E. (2003). Precise gas chromatography with retention time locking in comprehensive toxicological screening for drugs in blood. Journal of Chromatography B, 788(2), 243–250.

Roberge, M. T., Finley, J. W., Lukaski, H. C., & Borgerding, A. J. (2004). Evaluation of the pulsed discharge helium ionization detector for the analysis of hydrogen and methane in breath. Journal of Chromatography A, 1027(1-2), 19–23.

Rood, D. (2006). The Troubleshooting and Maintenance Guide for Gas Chromatographers (4th ed.). Wiley.

Sharp, M. E. (2001). A comprehensive screen for volatile organic compounds in biological fluids. Journal of Analytical Toxicology, 25(7), 631–636.

de Zeeuw, R. A., Franke, J. P., Maurer, H. H., & Pfleger, K. (1992). Gas-chromatographic retention indices of toxicologically relevant substances on packed or capillary columns with dimethylsilicone stationary phases (3rd ed.). VHC.

Srinivas, N. R., Shyu, W. C., & Barbhaiya, R. H. (1995). Gas chromatographic determination of enantiomers as diastereomers following precolumn derivatization and applications to pharmacokinetic studies: A review. Biomedical Chromatography, 9(1), 1–9.

Supelco. (1997). The retention index system in gas chromatography: McReynolds constants. Sigma-Aldrich. http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/7800/7741.pdf

Supina, W. R. (1974). The packed column in gas chromatography. Supelco.

US Pharmacopoeia Convention. (1999). USP 24—NF-19: US Pharmacopoeia and National Formulary. United States Pharmacopoeia Convention.

Williams, M. L., & Wainer, I. W. (2002). Role of chiral chromatography in therapeutic drug monitoring and in clinical and forensic toxicology. Therapeutic Drug Monitoring, 24(2), 290–296.

Zief, M., & Crane, L. J. (1988). Chromatographic chiral separations. Marcel Dekker.

CHAPTER (8) الفصل الثامن

الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء

HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

الفصل الثامن

الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء

High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

المقدمة Introduction

تُعدّ الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) تقنية ملائمة للغاية لتحليل المركبات المحبة للماء (Hydrophilic)، أو غير المستقرة حرارياً (Thermally labile)، و/أو ذات الوزن الجزيئي المرتفع ($High\ M_r$). وعند تحليل الأدوية والسموم الأخرى، تتمتع تقنية (HPLC) بمزايا عملية إضافية تتمثل في المرونة العالية، وانخفاض تكاليف التشغيل عموماً، وتوفر مجموعة متنوعة من الكواشف الانتقائية (Selective detectors) التي يمكن ربطها غالباً على التوالي (In series)، فضلاً عن سهولة الأتمتة (Automation) (الإطار 1). وغالباً ما يمكن استغلال هذه الخصائص لتسهيل تحليل عدة مركبات دفعة واحدة (مثل الأدوية ومستقلباتها). وتشمل الاستخدامات الرئيسية لتقنية (HPLC) دراسات حركية الدواء والتمثيل الغذائي (Pharmacokinetic and metabolic studies)، وقياس تركيزات الأدوية في البلازما أثناء العلاج (- TDM Therapeutic Drug Monitoring)، ورصد التعرض للمواد الكيميائية السامة.

وعموماً، يُجرى تحليل الأدوية والسموم الأخرى ومستقلباتها باستخدام تقنية (HPLC) بطريقة الإلصاق أو الشطف متساوي التركيز (Isocratic elution)؛ أي بثبات تركيب المكون الشاطف (Constant eluent composition)، على الرغم من أن الشطف المتدرج (Gradient elution) -وهو تغيير تركيب المكون الشاطف أثناء التحليل- قد يكون مطلوباً إذا كان المراد قياس مدى واسع من المركبات متباينة القطبية بشكل كبير، أو إذا تطلب الأمر سرعة في وقت التحليل. وغالباً ما يُلجأ إلى التشغيل في درجة حرارة الغرفة (Ambient temperature) للبساطة ولتقليل انحلال مواد التعبئة الخاصة بالعمود (Column packing).

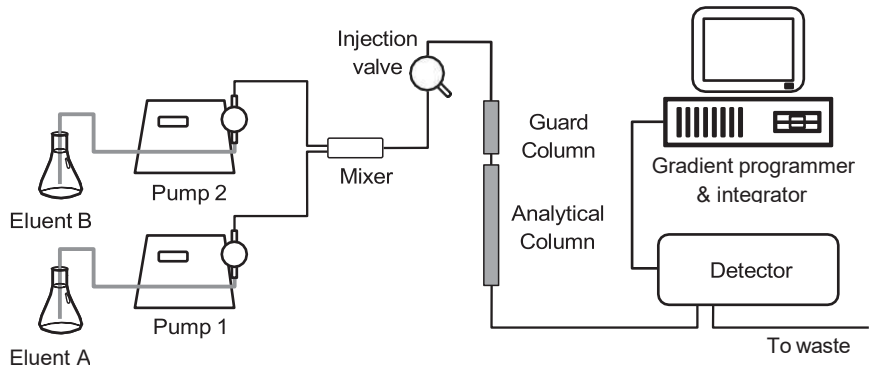
ومع ذلك، لا تخلو تقنية (HPLC) من الصعوبات؛ فقد يُشكّل كلٌّ من حجم العينة وحساسية الكاشف عاملين محددين، كما أن التداخلات المحتملة لا حصر لها. علاوة على ذلك، قد يسهم تراكم مكونات العينة على العمود و/أو تراكم المواد الدقيقة (Particulate material) في قمة الأعمدة في فقدان الكفاءة الذي يُلاحظ عادةً في الاستخدام الروتيني. وتتلخص بعض القيود الإضافية في (الإطار 2).وفي حين أن الاستقرار الحراري للتحليل (Analyte thermal stability) ليس بنفس أهمية الحالة في الكروماتوغرافيا الغازية (GC)، إلا أن العديد من المركبات (وخاصة المستقلبات) تكون غير مستقرة في العينات البيولوجية، أو عند تعرضها لدرجات حموضة شديدة (Extremes of pH)، مثل ما يحدث أثناء تحضير العينة.

لذا، فضلاً عن اختيار التركيبة المناسبة للعمود والمذيب الشاطف (Column/eluent combination)، يجب إيلاء العناية الواجبة لكل من: جمع العينات وتخزينها، واختيار إجراء تحضير العينة ، وشروط الكشف والتفلّس. كما يُعدّ اختيار المعيار الداخلي المناسب (Internal standard) خطوة مهمة أيضاً.

من الناحية التشغيلية، تتمثل الفارق الجوهري بين الكروماتوغرافيا الغازية (GC) والكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) في طبيعة الطور المتحرك (Mobile phase)؛ فالسوائل غير قابلة للانضغط بنفس درجات الغازات، وهو ما يعني أنه في تقنية (HPLC)، يمكن استخدام حشوات ذات أحجام جسيمات أصغر (Smaller particle-size packings)، مما يمنح كفاءة عالية باستخدام أعمدة قصيرة نسبياً في درجة حرارة الغرفة. بالإضافة إلى ذلك، يمكن تعديل تكوين المكون الشاطف (Eluent) للتحكم في زمن الاستبقاء (Retention) والانتقائية (Selectivity)، مما يمنح درجة عالية جداً من التحكم في عملية الفصل المطلوبة.

الاعتبارات العامة لتقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC: General Considerations

يتكون نظام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) النموذجي من: مستودع للمذيب الشاطف (Eluent reservoir)، ومضخة عالية الضغط (High-pressure pump) -أو مضخات عدة في حالة أنظمة التدرج ذات الخلط عالي الضغط- مزودة بمتحكم في التدفق، ونظام حقن العينة (Sample injection system)، وأعمدة حراسة وتحليلية من الفولاذ المقاوم للصدأ (Stainless steel guard and analytical columns) محشوة بمواد الطور الثابت (Stationary-phase material)، وكاشف مزود عادةً بخلية تدفق ذات حجم منخفض (Low volume flow cell)، ونظام التقاط بيانات (Data capture system) (**الشكل 1**).



الشكل 1: مخطط توضيحي لنظام كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء (HPLC) ذي تدرج يعتمد على الخلط عالي الضغط.

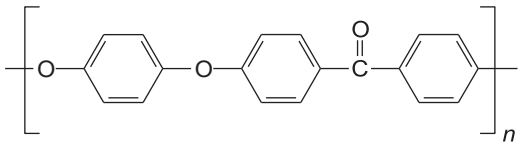
أما الكواشف الأكثر استخداماً في علم السموم التحليلي (Analytical toxicology) فتشمل: كواشف الأشعة فوق البنفسجية/المرئية (UV/visible) بما في ذلك مصفوفة الدايود (DAD - Diode Array Detector)، والكواشف الفلورية (Fluorescence)، والكواشف الكهروكيميائية (ED - Electrochemical detectors)، وكواشف قياس الطيف الكتلي (MS - Mass Spectrometry). ويُعدّ الشطف متساوي التركيز (Isocratic elution) أبسط أشكال تقنية (HPLC) بوضوح، وهو نظير التشغيل متساوي الحرارة (Isothermal operation) في الكروماتوغرافيا الغازية (GC). ومع ذلك، إذا تم تغيير تكوين المذيب الشاطف (محتوى المذيب العضوى، أو درجة الحموضة pH، أو القوة الأيونية) بطريقة محددة مسبقاً، إما باستخدام مستودع مذيب ثانٍ ومضخة وغرفة خلط (**الشكل 1**)، أو باستخدام مستودعي مذيبات وغرفة خلط ومضخة واحدة (الخلط منخفض الضغط - Low-pressure mixing)، فإن هذه التقنية يُطلق عليها اسم **الشطف المتدرج (Gradient elution)** (قارن ذلك ببرمجة درجة الحرارة في الكروماتوغرافيا الغازية GC).

كما يمكن أيضاً استخدام التدرجات الثلاثية (Ternary gradients). وتتمثل الميزة في هذا الأسلوب بالطبع في جعل القمم التي تخرج لاحقاً أكثر حدة (Sharpened). ويمكن برمجة الأجهزة للعودة إلى ظروف البداية، إلا أن ذلك قد يستغرق وقتاً أطول مقارنة ببساطة تبريد فرن الكروماتوغرافيا الغازية (GC oven). ويمكن التقليل إلى أدنى حد من انحراف خط الأساس (Baseline drift) أثناء الشطف المتدرج مع الكشف بالأشعة فوق البنفسجية، إذا تم موازنة الامتصاصية لمكونات التدرج

عند الطول الموجي للكشف مسبقاً. وكبديل لذلك، نادراً ما يُستخدم مقسم المذيب الشاطف (Eluent splitter) لتحويل جزء من المذيب إلى الخلية المرجعية في كاشف ذي شعاع مزدوج (Double-beam detector).

العمود The Column

كما هو الحال في أشكال كروماتوغرافيا الشطف الأخرى، يُعدّ عمود الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC column) قلب النظام. وللحفاظ على العمود في حالة عمل جيدة، من المهم استخدامه بحذر، لا سيما فيما يتعلق بسلامة طبقة تعبئة العمود (Column bed). ويرجع الفضل في الكفاءات الأعلى التي توفرها تقنية (HPLC) مقارنة بالكروماتوغرافيا السائلة التقليدية (Conventional LC)، إلى إدخال مواد حشو بأحجام جسيمات تتراوح عادةً بين (3–10 ميكرومتر - μm). وتتطلب الضغوط العكسية (Back-pressures) الناتجة مواد حشو قادرة على تحمل مثل هذه القوى، وبما أن هلام السيليكا (Silica) يمكن استخدامه لفترات طويلة عند ضغوط تصل إلى 28,000 كيلو باسكال (4000 رطل لكل بوصة مربعة - psi) دون حدوث تلف مادي، فهو مادة الحشو الأكثر شيوعاً في تقنية (HPLC). علاوة على ذلك، يمكن استغلال مجموعات السيلانول السطحية (Surface silanol groups) لتكوين نطاق واسع من الأطوار المعدلة كيميائياً، والتي نناقشها بمزيد من التفصيل أدناه ولمقاومة ضغوط التشغيل المستخدمة، تُحشى مادة العمود غالباً في أنابيب من الفولاذ المقاوم للصدأ (Stainless steel tubing) مزودة بمرشحات مسامية أو حواجز دقيقة (Porous frits) في كل طرف (بحجم مسام نموذجي يتراوح بين 0.5–2 ميكرومتر، اعتماداً على حجم مادة الحشو). كما طور العديد من المصنعين أنظمة خراطيش (Cartridge systems) تستخدم أعمدة مصنوعة من الفولاذ المقاوم للصدأ، أو الزجاج، أو بولي إيثر إيثر كيتون (**PEEK Polyetheretherketone -، الشكل 2**) داخل غلاف من الفولاذ المقاوم للصدأ أو الألومنيوم. وإذا تعرض حاجز المدخل (Inlet frit) لانسداد جزئي بجسيمات لم تتم إزالتها مسبقاً من المذيب الشاطف ومستخلصات العينات، فلن يرتفع الضغط العكسي للعمود فحسب، بل قد تتأثر كفاءة العمود سلباً أيضاً نتيجة عدم توزيع العينة بشكل متساوٍ على قمة العمود.



الشكل 2: تركيب بولي-أوكسي-4،1-فينيلين-أوكسي-4،1-فينيلين-كاربونيل-4،1-فينيلين (بولي إيثر إيثر كيتون، PEEK).

يمكن أن يكون استخدام مرشح داخلي خطي (**In-line filter**) موضوعاً بين المضخة وحقن العينة لحجز الجسيمات القادمة من موانع تسرب المكبس (Piston seal) أمراً مفيداً، لا سيما إذا لم يكن صمام الإخراج مزوداً بمرشح خاص به. وتتميز المرشحات بأن استبدالها يتم بسرعة وسهولة. أما **عمود الحراسة (Guard column)** فهو عمود صغير يُوضع أمام العمود التحليلي أو التحضيري لحمايته من الشوائب الموجودة في العينة، وجسيمات التآكل القادمة من صمام الحقن وما شابه ذلك. ويجب أن يبلغ حجمه تقريباً 5% من حجم العمود العامل، وينبغي تغييره بشكل متكرر.

إن استخدام عمود قصير (وليكن بطول 50 مم) بقطر داخلي أضيق من العمود التحليلي (وليكن بقطر داخلي 2 مم إذا تم استخدام عمود تحليلي بقطر داخلي 4.6 مم) سيساعد في تقليل اتساع القمم (**Peak broadening**). ويجب أن يحتوي عمود الحراسة على نفس مادة الحشو الموجودة في العمود التحليلي. من ناحية أخرى، يمكن إدخال عمود حراسة تضحية (**Sacrificial guard column**) محشو بسيليكا غير معدلة ذات حجم جسيمات كبير نسبياً -على سبيل المثال- بشكل خطي

بين المضخة وصمام حقن العينة لحجز جسيمات التآكل القادمة من المضخة، وليعمل كمثبط للنبضات (**Pulse dampener**)، ولتشبع المذيب الشاطف بالسيليكا.

لا ينبغي استخدام الأعمدة مع مذيبات شاطفة قد تؤدي -على سبيل المثال- إلى إذابة مادة الحشو، أو مع عينات أو مستخلصات عينات قد تدخل جسيمات أو تسبب ترسيب مواد صلبة في النظام. ومن المهم التأكد من استخدام المذيبات العضوية فقط مع المذيبات التي تمتزج معها (Miscible)، وينبغي وضع ذلك في الاعتبار عند تغيير المذيبات الشاطفة. عادةً ما تُورد أعمدة السيليكا غير المعدلة وهي مملوءة بالهكسان (Hexane) نظراً لكونها تُستخدم عادة في الكروماتوغرافيا طورية الطور الطبيعي (**Normal-phase chromatography**). ومع ذلك، إذا تم استخدامها مع مذيبات الميثانول أو مخاليط الميثانول مع المحازم (Methanol:buffer eluents)، فسيلزم إزالة الهكسان.

ويضمن التطهير باستخدام مادة **MTBE** (ميثيل ثالثي بويتل إيثير) أو خلات الإيثيل (Ethyl acetate) -والتي تمتزج مع الهكسان- ثم باستخدام الميثانول، ضمان الإزالة الآمنة للهكسان قبل استخدام نظام الميثانول والماء. ويمكن استخدام الأيزوبروبانول (Isopropanol) بدلاً من خلات الإيثيل، مما يلغي الحاجة لخطوة الميثانول، إلا أنه أكثر لزوجة ومن ثم يميل إلى توليد ضغوط عكسية عالية. إن استخدام ضغط دخول مرتفع للغاية قد يؤدي إلى سحق حشوات السيليكا، مما يسبب تكوين فراغات (**Void formation**)، وفي حالة السيليكا المعدلة كيميائياً، يكشف عن أسطح غير معالجة يترتب عليها ضعف في الانتقائية و/أو الكفاءة. وحتى في ضغوط التشغيل العادية، يبرز ميل لتكوين فراغات في قمة الأعمدة أثناء الاستخدام، على الرغم من أن هذا يبدو أقل شيوعاً مع الجسيمات الكروية مقارنة بحشوات السيليكا غير المنتظمة القديمة.

يؤدي وجود الفراغ إلى اتساع القمم، ومع ذلك قد يعطي العمود نتائج مقبولة مع ذلك. غير أن التغيرات المفاجئة في الضغط أو سقوط العمود قد يتسببان في تكوين قنوات (Channels) في مادة الحشو وينجم عن ذلك فقدان للأداء، والذي قد يظهر في شكل أشكال قمم سيئة أو حتى قمم مزدوجة (Double peaks). تُورد الأعمدة مرفقة بإشارة توضح اتجاه حشوها، ومن المعتاد الحفاظ على اتجاه التدفق أثناء الاستخدام. ومع ذلك، توفر شركة مصنعة واحدة على الأقل أعمدة مصممة للاستخدام مع التدفق في أي من الاتجاهين، حيث توجّه التعليمات بضرورة عكس التدفق بانتظام لتقليل خطر انسداد الحواجز المسامية (**Frits**). وتذكر عدم الاتصال بالكاشف حتى يتم استقرار التدفق لعدة حجوم من العمود لتقليل مخاطر جرف الجسيمات إلى داخل خلية تدفق الكاشف. وبشكل عام، من الممكن عكس اتجاه تدفق أعمدة (HPLC)، لا سيما تلك المحشوة بجسيمات كروية، دون حدوث تدهور ملحوظ في الأداء. ومع ذلك، يبقى منع انسداد حاجز المدخل في المقام الأول هو الخيار الأفضل. ويجب استخدام أعمدة السيليكا أحادية الكتلة (**Monolithic silica columns**) في اتجاه التدفق الموضح حصراً.

فرن العمود Column Oven

من المسلّم به عموماً في عمليات الفصل ذات الطور المعكوس (**Reversed-phase separations**) أن درجة حرارة العمود التي تتراوح بين 35–40 درجة مئوية ($°C$) تحسن الكفاءة وقابلية إعادة الإنتاج (**Reproducibility**). وبشكل عام، فإن تغيير درجة حرارة عمود (HPLC) بمقدار 1 درجة مئوية ($°C$) سيغير زمن الاستبقاء (**Retention time**) بنسبة 1–2%.

لذا، فإن تغير درجة حرارة العمود بمقدار 5–10 درجة مئوية ($°C$) خلال اليوم يُرجح أن يكون مصدر تباين كبير في زمن الاستبقاء. بناءً على ذلك، فإن استخدام التحكم في درجة حرارة العمود في تقنية (HPLC) لا يرفع كفاءة العمود فحسب، بل يحسن أيضاً قابلية إعادة إنتاج زمن الاستبقاء والتحكم في الانتقائية. يمكن القضاء على انحراف خط الأساس (**Baseline**

drift)، الذي يُلاحظ مع الكواشف الحساسة للتدفق مثل الكواشف الكهروكيميائية (**ED**)، من خلال التحكم الدقيق في درجة الحرارة. ويمكن استخدام أفران أعمدة مزودة بمراوح تدوير هواء عالية السرعة موازية لأفران الكروماتوغرافيا الغازية (GC ovens).

كذلك، تم استخدام التدفئة بالتلامس عبر كتل الألومنيوم أو عن طريق تدوير السوائل من حمام ثابت الحرارة. ومن الناحية المثالية، يجب التحكم في درجة حرارة العمود في حدود 0.2 درجة مئوية ($^{\circ}C$) للقضاء على انحراف القمم. وتوفر أفران تأثير بلتيير (**Peltier effect ovens**) كلاً من التدفئة والتبريد ضمن حدود دقيقة. وإذا لم يتوفر الفرن، فيجب عدم وضع العمود في مكان قد يتعرض لتغيرات مفرطة في درجة الحرارة، مثل وضعه بالقرب من نافذة مفتوحة أو تحت ضوء الشمس المباشر لفترة من اليوم. في حالة عقار تثبيط المناعة السيكلوسبورين (**Ciclosporin**)، يصبح تشغيل (HPLC) عند درجة حرارة 60 درجة مئوية ($^{\circ}C$) تقريباً أمراً ضرورياً؛ لأنه في درجات الحرارة المنخفضة يوجد هذا الدواء في هيئات توافقية مختلفة (**Conformers**)، لكل منها زمن استبقاء مختلف قليلاً على كروماتوغرافيا الطور المعكوس، مما ينتج عنه قمة عريضة جداً (Hasumi et al., 1994).

المذيب الشاطف The Eluent

يُعدّ استخدام الماء النقي أمراً بالغ الأهمية، لا سيما مع الشطف المتدرج حيث قد يتم الاحتفاظ بالشوائب وتركيزها على العمود في بداية التحليل لتعود وتخرج كقمم مع زيادة نسبة المكون العضوي في المذيب الشاطف. وقد يكون الماء المنقى بالتناضح العكسي (**Reverse osmosis**) مناسباً، لا سيما عمليات الفصل متساوية التركيز. أما الماء منزوع الأيونات (**Deionized water**) فيكون مناسباً عادة لأنظمة التدرج، على الرغم من احتمال ظهور ملوثات ناتجة عن الشوائب في راتنجات التبادل الأيوني (**Ion-exchange resins**).

لذلك، بالنسبة لأعمال التدرج عالية الحساسية، يُنصح باستخدام ماء معتمد بجودة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (**HPLC quality water**). ويجب أن تكون أملاح التنظيم (**Buffer salts**) والكواشف الأخرى ذات أعلى نقاوة متاحة. وعموماً، ينبغي أن تكون المذيبات العضوية من درجة (HPLC)، على الرغم من أن هذا غالباً ما يشير فقط إلى أن المذيب يمتلك حداً منخفضاً ملائماً للامتصاص فوق البنفسجي (**UV cut-off**). وتتوفر مادة الأسيتونتريل (**Acetonitrile**) بعدة درجات، إحداها عالية النقاوة للاستخدام حتى تقريباً 205 نانومتر (nm). ومن المهم أن يكون إعداد المذيب الشاطف لتقنية (HPLC) قابلاً لإعادة الإنتاج لضمان تحقيق عمليات فصل وأزمنة استبقاء متسقة. ويجب قياس حجوم المذيبات في أجهزة مناسبة وخلط السوائل بعناية مع التبريد إذا لزم الأمر. وقد تكون أسطوانات القياس مناسبة للحجوم الكبيرة، بينما قد يكون استخدام الماصات (**Pipetting**) أكثر ملائمة للحجوم الصغيرة. ويمكن التحكم في الرقم الهيدروجيني للمذيب الشاطف (**Eluent pH**) بوساطة الطرق التالية:

1. استخدام منظم (**Buffer**) ذي درجة حموضة معلومة.
2. ضبط درجة حموضة المذيب الشاطف مباشرة قبل إكماله إلى الحجم النهائي.
3. إضافة حجم معلوم من حامض أو قاعدة مثل حامض ثلاثي فلوروأسيتيك (**Trifluoroacetic acid**) أو ثلاثي إيثيل أمين (**Triethylamine**) إلى حجم محدد من المذيب الشاطف.

ويجدر الإجماع على ملاحظة أن إضافة مذيب عضوي إلى المنظم يغير نشاط أيون الهيدروجين، بحيث تختلف درجة حموضة الخليط عن درجة حموضة المنظم (Tindall, 2002a, 2002b, 2003). وتزداد الفجوة بين درجة حموضة المنظم و"الرقم

الهيدروجيني الظاهري" (**Apparent pH, pH***) لمخلوط المذيب العضوية والمنظم كلما زادت كمية المذيب العضوي المضاف. وغالباً ما يُستخدم المصطلحان (pH) و(pH^*) دون تمييز دقيق، وليس من الممكن دائماً استنتاج كيفية إعداد المذيب الشاطف من التقارير المنشورة.

إن الخلط بين (pH) أو (pH^*) قد يؤدي إلى الفشل في إعادة إنتاج عملية الفصل، وإذا كان (pH^*) مرتفعاً جداً، فقد يتناقص عمر العمود القائم على السيليكا بشكل جذري. يتطلب قياس (pH^*) بدقة في المذيبات الشاطفة التي تحتوي على نسبة عالية من المعدل العضوي (**Organic modifier**) استخدام قطب رقم هيدروجيني ذي "وصلة غلافية" (**" "Sleeve junction pH electrode**). ويحتوي هذا القطب على فتحة واسعة نسبياً يمكن من خلالها إلامس كلوريد البوتاسيوم المشبع المائي مع خليط الاختبار دون ترسيب كلوريد البوتاسيوم في الفتحة. وبناءً على ذلك، يتم عادةً ضبط درجة حموضة المنظم قبل الخلط مع المذيب العضوي، وهو أمر مقبول بشرط أن يكون المذيب الناتج مناسباً وقابلاً لإعادة الإنتاج. ومع ذلك، فإن تغيير حجم المنظم المضاف يمكن أن يكون له تأثير ملحوظ على (pH^*).

يجب إزالة أي جسيمات من المذيب الشاطف قبل الاستخدام عن طريق الترشيح عبر غشاء بحجم 0.45 ميكرومتر (**0.45 µm membrane**). ويُوصى بالترشيح حتى 0.2 ميكرومتر عند استخدام قطاد الجرافيت المسامي للأجهزة الكهروكيميائية (**Porous graphite ED electrodes**). وتقوم بعض الطرق بترشيح المنظم قبل خلطه بالمذيب العضوي أو حتى قبل ضبط الرقم الهيدروجيني (pH). ونظراً لاحتمال تكوين راسب عند ضبط الرقم الهيدروجيني أو إضافة المذيب، فقد يكون من الأفضل ترشيح المذيب الشاطف قبيل استخدامه مباشرة، بشرط ألا يؤدي ذلك إلى تغيير تكوين المذيب الشاطف بشكل ملحوظ. تتمثل المرحلة النهائية في تحضير المذيب الشاطف في **"إزالة الغازات" (Degassing)**؛ حيث يجب إزالة الغازات المذابة لمنع تكوين فقاعات في رأس المضخة (**التجويف أو التكهف - Cavitation**)، مما يؤثر على التحكم في التدفق، وكذلك في خلية تدفق الكاشف، مما يؤثر على استقرار خط الأساس (**Baseline stability**). كما قد تكون إزالة الأكسجين من المذيب الشاطف أمراً مهمّاً أيضاً إذا كان سيتم استخدام كواشف الأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي المنخفض أو الكواشف الكهروكيميائية الاختزالية.

وبالنسبة لبعض التطبيقات، قد يكون الترشيح تحت التفريغ (**Vacuum filtration**) كافياً. وإذا رغب في إزالة إضافية للغازات بعد الترشيح، يمكن ترك مضخة التفريغ قيد التشغيل مع وضع سدادة فوق قمة الدورق الذي يحتوي على المذيب الشاطف المفلتر. ويُشار إلى استمرار إزالة الغازات من المذيب بتكوين فقاعات صغيرة. ويُعدّ الغثيان أو الفقاعات (**Sparging**) باستخدام غاز الهيليوم (وقد يكون غاز بالونات الهيليوم أرخص تكلفة بذاته) الطريقة الأكثر فعالية لإزالة الغازات، وينبغي الحفاظ على تدفق بطيء وثابت من الهيليوم لمنع انحراف خط الأساس الناتج عن إعادة ذوبان الأكسجين في المذيب الشاطف إذا تم العمل عند نطاق 200–215 نانومتر (nm). ومع ذلك، فإن كلاً من إزالة الغازات بالتفريغ وتطهير الهيليوم قد يغيران تكوين المذيب الشاطف عن طريق إزالة المكونات الأكثر تطايراً بشكل انتقائي. ويعد وضع مستودع المذيب الشاطف في حمام بالموجات فوق الصوتية (**Ultrasonic bath**) لبضع دقائق خياراً بديلماً آخر. كما أصبحت وحدات إزالة الغازات الخطية (**In-line degassing units**)، التي تطبق تفريغاً هوائياً على المذيب الشاطف أثناء تدفقه عبر أنابيب فلوروبوليمر شبه مسامية، تحظى بشعبية متزايدة.

المضخة The Pump

تتمثل وظيفة المضخة في إضخاخ المذيب الشاطف بمعدل تدفق ثابت وقابل لإعادة الإنتاج، بشكل مستقل عن الضغط العكسي للعمود. وعلى الرغم من تصنيع مضخات الإزاحة الإيجابية (المحَقنة - **Syringe pumps**)، إلا أن تدفق المذيب الشاطف يُحفّز حالياً بواسطة الحركة الترددية لمكبس الياقوت (**Sapphire piston**)، ولذلك تُزود المضخة بصمامات فحص دخول وخروج (**Inlet and outlet check valves**) للحفاظ على التدفق في الاتجاه المطلوب. خلال شوط الملء (**Filling stroke**)، يفتح صمام فحص الدخول بينما يُسحب المذيب الشاطف إلى رأس المضخة (**الشكل 3**). وخلال شوط الإزاحة (**Displacement stroke**)، يعمل الضغط المتزايد على إغلاق صمام فحص الدخول وفتح صمام الخروج بحيث يُضخ المذيب عالي الضغط في الاتجاه المطلوب.

ويمنع مرشح صمام الخروج (**Outlet valve filter**) حطام موانع تسرب المضخة من دخول الصمام حيث قد يستقر في صمام كروي، مما يتسبب في تعطل الصمام. كما يمنع مانع التسرب المرن المقاوم للضغط (غالباً من مادة التيفلون المملوء بالجرافيت - **Graphite-filled PTFE**) تسرب المذيب الشاطف حول المكبس.

يجب أن تكون مكونات المضخة التي تتلامس مع المذيب (المذيبات) الشاطف مصنوعة من مواد خاملة، وعادة ما تكون من الزجاج، والسيراميك، والفولاذ المقاوم للصدأ. ولتقليل تلوث المذيب الشاطف بالحديد، يمكن خمول النظام (**Pacification**) أو تصنيعه باستخدام التيتانيوم أو البولي إيثر إيثر كيتون (**PEEK**).

ويتضمن تخامل الحديد إزالة العمود وأي مكونات حساسة أخرى وشطف (لمدة 30 دقيقة لكل منها بمعدل 1 مل دقيقة$^{-1}$ $1\ mL\ min^{-1}$) لكل من المضخة، وصمام الحقن، وأنابيب الفولاذ المقاوم للصدأ المتصلة باستخدام:

1. ماء منزوع الأيونات مفلتر.
2. حامض النتريك (6 مول لتر- $6\ mol\ L^{-1}$).
3. حامض الخليك الثلجي (**Glacial acetic acid**).
4. ماء منزوع الأيونات مفلتر حتى يصبح الرقم الهيدروجيني للمحلول الخارج 4 أو أعلى.

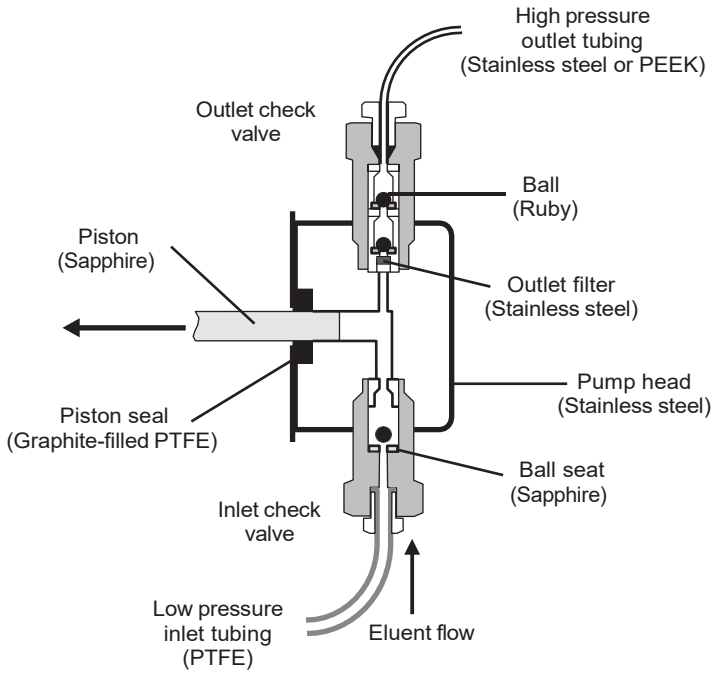
ويمكن استبدال الخطوة (2) بمحلول (EDTA) المائي (0.5 مول لترpH) متبوعاً بالماء منزوع الأيونات قبل خطوة حامض الخليك الثلجي. ومع ذلك، قد يكون لإضافة (EDTA) إلى المذيب الشاطف نفس التأثير. وقد يكون التخامل مفيداً مع الكواشف الكهروكيميائية عالية الحساسية (**ED**)، ولكنه نادراً ما يُطلب مع أنظمة الكشف الأخرى، ما لم تكن المواد المحللة حساسة للحديد.

يجب أن تتضمن الصيانة الروتينية التحقق من عمل الصمامات بشكل صحيح وعدم تسرب مانع تسرب المكبس. وعند العمل مع أنظمة المنظمات المائية، يجب شطف/غسل المكبس بشكل متكرر بالماء لإزالة أملاح المنظم المترسبة وبالتالي إطالة عمر كل من المكبس ومانع تسرب المكبس. ويجب شطف المنظم من رأس المضخة باستخدام مذيب متوافق قبل إيقاف تشغيل المضخة. وعند استبدال مانع تسرب المكبس، يمكن إزالة أي حطام ملتصق بالمكبس عن طريق التلميع اللطيف باستخدام معجون الأسنان، على سبيل المثال. وغالباً ما يلزم استبدال المكبس الخدش أو التالف.

يجب وضع المذيب الشاطف المفروغ من الغازات والمفلتر في مستودع المذيب الشاطف. ويجب أن يُزود أنبوب الدخول إلى المضخة بمرشح لمنع الجسيمات التي ربما دخلت المستودع بالخطأ من المرور إلى المضخة. وتتطلب بعض المضخات وضع المستودع في مستوى أعلى من المضخة لتوفير ضغط رأس استاتيكي (**Static head pressure**)، وتكون هذه الترتيبات

مفيدة عند بدء تحضير المضخة (**Priming**). ويمكن ضغط المستودع، ولكن هذا عادةً ما يكون غير ضروري. وتتراوح معدلات تدفق المذيب الشاطف المستخدمة عادة بين 1–2 مل دقيقة ($1 - 2\ mL\ min^{-1}$) مع أعمدة بقطر داخلي 2–5 مم تحتوي على حشوات بحجم جسيمات متوسط يبلغ 3–5 ميكرومتر. ولدى معظم المضخات حد أقصى لضغط التشغيل يبلغ 34,500 كيلو باسكال (5000 رطل لكل بوصة مربعة - $5000\ psi$). ويمكن استخدام بعض المضخات مع أعمدة (HPLC) ذات التجويف الدقيق أو الشعري (**Microbore or capillary HPLC columns**)، بمعدلات تدفق في نطاق ميكرولتر دقيقة. وتُعدّ تقلبات الضغط (النبضات - **Pulsations**) أثناء ضخ المذيب الشاطف أمراً غير مرغوب فيه لتأثيراتها المحتملة على استقرار خط الأساس للكاشف، ولذلك تم تصميم مضخات (HPLC) لتقليل مثل هذه التقلبات (بنسبة تباين قصيرة الأجل أقل من 1% أو أفضل). وفي الأنظمة القديمة، كانت مُثبطات النبضات (**Pulse dampeners**)، التي تتكون عادةً من ملف أنابيب شعرية، تُدرج بين المضخة ونظام الحقن للمساعدة في تقليل نبضات المضخة. ولدى استخدام عمود حراسة تضحية تأثير مشابه.

من ناحية أخرى، فإن مُثبطات النبضات البديلة تكون من نوع الغشاء (**Membrane type**). ويحتوي أحد هذه المثبطات على غشاء (PTFE) مع مستودع من الهبتان لامتصاص النبضات، ولكن يمكن أن يمزق الغشاء مسرباً الهبتان إلى المذيب الشاطف. وقد يضع المصنعون صبغاً أزرق في الهبتان للإشارة إلى حدوث ذلك. وتشمل بعض المضخات مثبطات نبضات غشائية تحت الغلاف، ويُستحسن معرفة وجودها تحسباً لتعطلها. ويستخدم التصميم الأكثر متانة كتلة من الحديد القابل للصدأ لامتصاص النبضات. وتُعدّ المضخات ذات المكبس المزدوج (**Dual piston pumps**)، التي تعمل إما بالتوازي أو على التوالي، وسيلة أخرى لتقليل تقلبات التدفق. ويمكن أن يؤدي تعطل صمام الفحص في تصميم المضخة المتوازية إلى مشكلات كبيرة، لا سيما مع الكواشف الحساسة لتغيرات معدل التدفق.



الشكل 3: رأس مضخة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) أثناء شوط الملء. *(Figure.3 HPLC pump head during a filling stroke).*

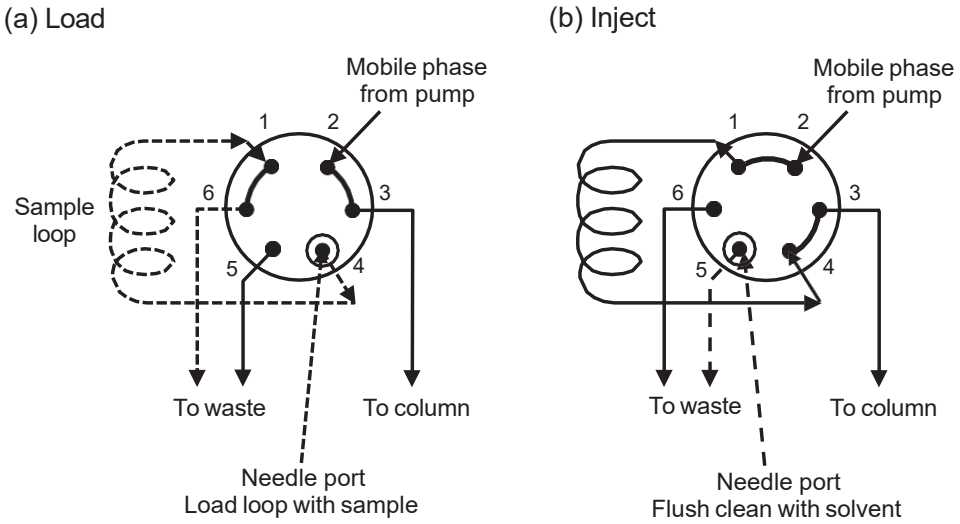
إدخال العينة Sample Introduction

في الوقت الحاضر، يتم إدخال العينةمءادراً دائماً عبر **حلقة حقن العينة (Sample injection loop)** والتي تُشغّل إما يدوياً أو كهروميكانيكياً. وهناك نوعان من صمامات حقن (HPLC): الحلقات الداخلية (**Internal loops**) والحلقات الخارجية (**External loops**). صُممت الحلقات الداخلية لتقديم حجوم عينات أقل من 1 ميكرولتر (μL)، بينما يمكن للحلقات الخارجية تقديم حجوم عينات تتراوح من بضعة ميكرولترات إلى 20 مل أو أكثر. تستخدم الحلقات الخارجية أنابيب ذات تجويف ضيق كمقياس للحجم، بينما يحتوي النوع الداخلي على ثقب صغير أو مساحة ضيقة في قرص، مما يمنح الحجم الثابت. وتعمل معظم الصمامات بوجود جسم ثابت يُعرف بـ **الستاتور (Stator)**، وغالباً ما يُصنع من الفولاذ المقاوم للصدأ، وجزء متحرك يُعرف بـ **الروتور (Rotor)**، والذي يجب أن يُصنع من مادة أكثر ليونة مثل **Vespel** أو **PEEK** لضمان إحكام خلو التسرب بين السطحين. وإذا لزم الأمر، يمكن استخدام صمامات مصنوعة من مواد متوافقة حيوياً (**Biocompatible materials**) مثل (PEEK) أو التيتانيوم بدلاً من الفولاذ المقاوم للصدأ.

صُممت صمامات حقن عينات (HPLC) لتحمل ضغوط تصل إلى 69,000 كيلو باسكال (10,000 رطل لكل بوصة مربعة - psi)، ولكنها غالباً ما تُورد مضبوطة في المصنع لتحمل 42,000 كيلو باسكال (6000 رطل لكل بوصة مربعة) فقط؛ لأنه، بشكل عام، لا تتجاوز ضغوط التشغيل سوى حوالي 21,000 كيلو باسكال (3000 رطل لكل بوصة مربعة). إن ضبط الصمام للعمل عند ضغوط تزيد عن 28,000 كيلو باسكال (4000 رطل لكل بوصة مربعة) يؤدي إلى زيادة البلى والتلف في الروتور. يُعرض مخطط لصمام حقن عينة (HPLC) سداسي المنافذ (**Six-port HPLC sample injection valve**) في **الشكل 4**. في وضع التحميل (**Load position**)، يمر تدفق المذيب الشاطف عبر شق على الروتور من المضخة (المنفذ 2) إلى العمود (المنفذ 3). وتتصل أطراف حلقة العينة بالمنفذين 1 و4. ويتم شحن حلقة العينة بوساطة محقنة عبر منفذ الحقن، والذي يكون مصطفاً بحيث يستند طرف الإبرة مباشرة ضد أحد طرفي حلقة العينة (المنفذ 4).

وبناءً على ذلك، من المهم التأكد من استخدام الإبرة المناسبة. ويتم تصريف السائل الموجود في الحلقة عبر شق في الروتور، والذي يربط في هذا الوضع المنفذ 1 بالنفايات أو الصرف (**المنفذ 6 - Waste**). وعند تدوير الصمام إلى وضع الحقن (**Inject position**)، توضع حلقة العينة بين العمود والمضخة المزودة للمذيب الشاطف عن طريق ربط المنفذين (1) و(2) والمنفذين (3) و(4). بعد ذلك، يقوم المذيب الشاطف بجرف العينة -في الاتجاه المعكس لاتجاه تحميلها- إلى داخل العمود. ويصبح منفذ الحقن الآن فوق منفذ النفايات الثاني (المنفذ 5)، مما يسمح بشطف منفذ الحقن. وبعد أخذ العينة، يُعاد الروتور إلى وضع التحميل، ويُغسل أنبوب العينة الخارجي بالمذيب، وتُملأ حلقة العينة بالعينة التالية للتحليل. ونظراً لإمكانية أن تكون حلقة العينة بأي طول أو قطر، وقد تتضمن حتى عموداً قصيراً يمكن تركيز المادة المحللة عليه، فإن هناك عدة تكوينات ممكنة.
وللحصول على أقصى دقة، يجب ملء حلقة العينة جزئياً، بما لا يزيد عن 50%، مع حجم عينة مُراقب بعناية، أو ملؤها بشكل مفرط (أكثر من ضعفي حجم الحلقة - 2 <loop volumes). تُستخدم حاقنات العينات الآلية (**Automated sample injectors**) على نطاق واسع، وغالباً ما تكون مزودة بمحاقن مُحركة عالية الدقة لضمان الصحة والضبط. وهناك خطر التلوث المتبادل (**Cross contamination / Carry-over**) في مثل هذه الأنظمة، لا سيما في حال وجود فروق واسعة في تركيز المادة المحللة بين عينة وأخرى، وهو ما يجب الحذر منه واتخاذ التدابير الوقائية ضده.
يجب مراعاة التأثير المحتمل لمذيب الحقن على الكفاءة الكروماتوغرافية. ففي العديد من الطرق المنشورة، تُذاب المادة المحللة للحقن في مذيب شاطف (HPLC). ومع ذلك، إذا كان حجم الحقن كبيراً جداً، فسيسهم ذلك في اتساع الحزمة (**Band broadening**). ويفضل أن تُحقن العينات في مذيب ذي "قوة إشطاف" (**"Eluting power"**) أقل من المذيب الشاطف.

وهذا يتيح تركيز المادة (المواد) المحللة في قمة العمود الأولي أو العمود التحليلي. على سبيل المثال، في أنظمة الطور المعكوس (**Reversed-phase systems**)، فإن استخدام مذيب حقن يحتوي على معدل عضوي أقل من المذيب الشاطف يتيح حقن حجوم أكبر دون أي تأثير ضار على الكفاءة وشكل القمة. وعلى العكس من ذلك، فإن استخدام مذيب حقن بنسبة أعلى ملحوظة من المذيب العضوي مقارنة بالمذيب الشاطف سيؤدي إلى بدء التحليل قبل وصول المذيب الشاطف بوقت طويل، ما لم يُستخدم حجم حقن صغير جداً والذي يحد بطبيعة الحال من الحساسية.



الشكل 4: صمام حقن عينة (HPLC) سداسي المنافذ يوضح: (أ) وضع التحميل، و(ب) وضع الحقن. *Figure.4 Six-port HPLC (injection valve showing (a) load and (b) inject positions).*

تشغيل النظام System Operation

ينبغي الاحتفاظ بسجل دقيق لمعلمات أداء العمود الأساسية، مثل: ضغط عكس النظام، وزمن استبقاء المادة المحللة، وحد أدنى للاكتشاف (**LLoD**)، وضوضاء خط الأساس وانحرافه. وعندئذٍ، سيتضح أي تدهور في الأداء مبكراً، ويمكن إجراء الصيانة الوقائية (**Preventative maintenance**). ففي كروماتوغرافيا الطور المعكوس، والوضعيات الأخرى التي تُستخدم فيها المنظمات المائية (**Aqueous buffers**)، يُستحسن شطف العمود بشكل دوري بالماء منزوع الأيونات لتقليل خطر ترسيب الأملاح غير العضوية، أو بشطفه بمذيب عضوي لإزالة المواد المحبة للدهون والمحتجزة (**Lipophilic material**). ولا ينبغي استخدام المذيبات العضوية إلا بعد إزالة مخلفات الأملاح غير العضوية. وعادةً، يجب شطف العمود الذي يُستخدم مع منظم مائي كجزء من المذيب الشاطف بالتتابع باستخدام: الماء منزوع الأيونات، والميثانول أو الأسيتونتريل، والماء منزوع الأيونات مرة أخرى، وذلك قبل عملية التوازن (**Equilibration**) مع المذيب الشاطف الطازج. ويجب إجراء شطف مماثل قبل تخزين العمود، بحيث يكون الشطف النهائي باستخدام الميثانول أو خليط (الأسيتونتريل:الماء بنسبة 1+1) لمنع نمو البكتيريا.

إذا كان أداء العمود لا يزال سيئاً بعد إعادة تكييف العمود (**Reconditioning**)، فقد يرجع الخلل إلى إذابة أو انضغاط طبقة مدخل العمود (**Column inlet bed**). ولإصلاح أي مدخل للعمود، يلزم إزالة الوصلة (**Fitting**). وقبل الشروع في إصلاح عمود في نظام الطور المعكوس، يجب تكييفه مع (الميثانول:الماء بنسبة 1+1). وسيقوم هذا بإذابة طلاء (C_8) أو (C_{18}) بمخليط معتدل الألفة الدهنية ومن ثم منع حشوة العمود من التمدد والخروج من العمود بعد إزالة الوصلة. ويجب إزالة الوصلة أو سدادة الحاجز (**Frit closure**) من طرف مدخل العمود وفحص مادة الحشو، والتي يجب أن تكون بيضاء مائلة

للاصفرار أو رمادية فاتحة (**Off-white**). إذا كانت المادة المحشوة ملونة، فقد يشير ذلك إلى حدوث تآكل في مكونات الفولاذ بنظام (HPLC)، أو إلى تراكم شوائب موجودة في مستخلصات العينات على قمة العمود. وإذا كانت طبقة المدخل تعاني من بعض الانخفاض، فيجب تسويتها لمنع اتساع القمم أو -ربما- انشسام القمم (**Peak splitting**). وينبغي ملء الفراغ بمادة حشو مناسبة (إضافة حشوة عمود بحجم 5 أو 10 ميكرومتر على شكل ملاط كثيف باستخدام ملعقة وتسويتها، أو استخدام خرز زجاجي بحجم 30–40 ميكرومتر). ونادراً ما تنجح محاولة استخدام أحجام أصغر من مادة الحشو. ويجب دائماً استخدام حاجز مسامي جديد (**New frit**) في الوصلة أو الغطاء عند إعادة تجميع العمود.

قد تظهر مشكلات المضخة في شكل: أزمنة استبقاء غير منتظمة، وخطوط أساس مزعجة، و/أو قمم حادة مفاجئة (**Spikes**) على خط الأساس بسبب تغيرات الضغط. وغالباً ما يحدث تسرب المضخة عند وصلات الدخول أو الخروج، أو عند مانع تسرب المكبس. وتشير بلورات الأملاح على الوصلة عادةً إلى وجود تسرب. أما المشكلات المنسوبة إلى المذيبات المستخدمة كمذيبات شاطفة فتشمل:

1. تلويث المضخة و/أو انسداد صمامات الفحص بسبب الجسيمات.
2. انخفاض الحساسية بسبب المذيب الملوث.
3. انحراف خطوط الأساس و/أو أزمنة الاستبقاء بسبب الشوائب، على سبيل المثال في منظمات المذيب الشاطف.

ينبغي أن يكون ترشيح المذيب الشاطف قبل الاستخدام أمراً روتينياً. وإذا كان هناك خطر من ترسيب أملاح المنظم، يمكن ترشيح المذيب الشاطف بعد خلط المنظم والمعدل العضوي، مع ضرورة توخي الحذر لضمان ألا يغير ذلك من تركيب المذيب الشاطف -إذ إن التغير بنسبة 1% في المحتوى العضوي يمكن أن يغير الاستبقاء بنسبة 5–10% في نظام الطور المعكوس-. وسيكون هذا أكثر وضوحاً عندما يحتوي المذيب الشاطف على نسبة صغيرة فقط من مذيب متطاير نسبياً، أو إذا جرى استخدام مكونات منظم متطايرة مثل الأمونيا أو حامض ثلاثي فلوروأسيتيك.

الكشف في الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء Detection in HPLC

يتميز كاشف (HPLC) المثالي بالخصائص التالية:

1. حساسية عالية.
2. استجابة عامة أو نوعية (محددة) حسب الحاجة.
3. نطاق خطي ديناميكي واسع (**Wide linear dynamic range**).
4. الحد الأدنى من اتساع الحزمة (**Minimal band broadening**).
5. استجابة مستقرة مع تغير درجة الحرارة أو معدل التدفق.

وحتى الآن، لا يوجد كاشف يحقق جميع هذه المتطلبات تماماً.

وتنقسم كواشف (HPLC) إلى نوعين: كواشف الخواص الكلية (**Bulk property**) أو الكواشف الانتقائية (**Selective**). تقيس الأولى التغير في إحدى الخواص الفيزيائية للمذيب الشاطف، مثل معامل الانكسار (**Refractive index, RI**)، أو التوصيلية (**Conductivity**)، أو تشتت الضوء (**Light scattering**)، والتي تتأثر بوجود المادة المحللة. ومع ذلك، لا تتمتع هذه الكواشف عموماً بالحساسية أو الانتقائية الكافية للاستخدام في علم السموم التحليلي (**Analytical toxicology**). ولهذا السبب، يُلجأ حصرياً تقريباً إلى الكواشف التي تستغل الخواص الكيميائية أو الفيزيائية للمادة المحللة، وهي: امتصاص الأشعة فوق البنفسجية/المرئية (بما في ذلك أجهزة مصفوفة الدايود والأجهزة الماسحة)، والفلورية (**Fluorescence**)،

والأكسدة أو الاختزال الكهروكيميائي (**Electrochemical oxidation or reduction**)، وقياس الطيف الكتلي (**MS**) (**الجدول 1**).

الجدول 1: الكشف في الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC). *(Table 1 Detection in HPLC)*

المبدأ(Principle)	المتغير(Variant)	الخيار(Option)
طيفي(Spectroscopic)	مطيافية الامتصاص الذري$^a(AAS)$	—
	التلألؤ الكيميائي(CLD)	—
	الفلورية(Fluorescence)	طول موجة الإثارة والإنبعاث المتغير) تركيبة من الفلتر ومُوحِّد اللون(Monochromator -
	مطيافية الأشعة تحت الحمراء بتحويل فورييه$(FTIR)$	—
	مطيافية الكتلة(MS)	التأين بالبخاخ الإلكتروني(ESI)
		التأين الكيميائي الضغطي الجوي$(APCI)$
		مراقبة أيونات مختارة موجبة أو سالبة(SIM)
	البلازما المقترنة حثياً(ICP)	—
	الرنين المغناطيسي النووي(NMR)	—
	الفسفرة(Phosphorescence)	—
	الأشعة فوق البنفسجية/المرئية$(UV/Visible)$	طول موجي ثابت
		طول موجي مزدوج
		المسح متعدد الأطوال الموجية (فلتر أو مُوحِّد لون)
		مصفوفة الدايود$(Diode\ array)$
كهروكيميائي(ED)	أمبيرومتري$(Amperometric)$	مستمر أو نبضي
	كولومومتري$(Coulometric)$	—
	التوصيلية$(Conductivity)$	—
المقايسة المناعية$^a(IA)$	—	—
الخاصية الكلية (Bulk property)	معامل الانكسار(RI)	—
	تشتت الضوء التبخيري$(ELSD)$	—
	النيتروجين المتلألئ كيميائياً $(CLND)$	—
كيرالي(Chiral)	الدوران البصري(OR)	—
	الاستقطاب الدائري(CD)	—
النشاط الإشعاعي (Radioactivity)	—	—

- ^{a}كشف خارج الخط (**Off-line detection**).

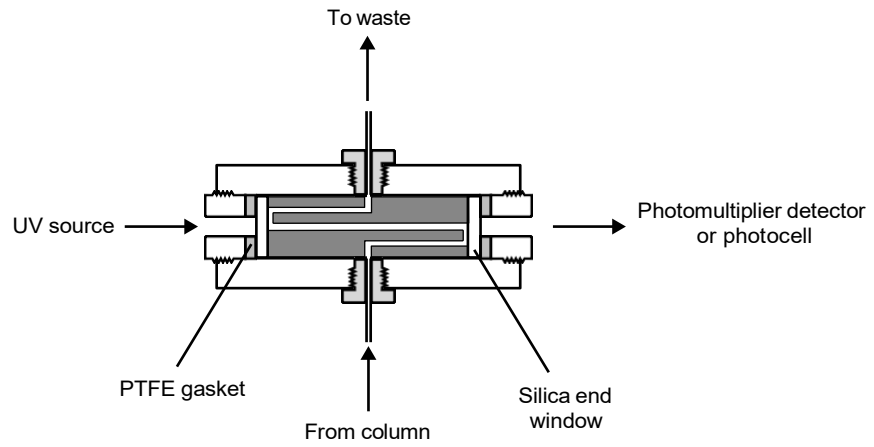
وتتميز كواشف الامتصاص بالأشعة فوق البنفسجية/المرئية والفلورية بأنها غير مدمرة (**Non-destructive**)، وهي غير حساسة نسبياً للتقلبات الصغيرة في معدل التدفق. وتشمل الخيارات الإضافية جمع ما بعد العمود (**Post-column collection**) أو تعديل المادة المحللة لتحسين الحساسية أو الانتقائية. وأياً كان نظام الكشف المستخدم، فمن الضروري استخدام خلية كشف ذات حجم ميت منخفض جداً (**Low dead volume detection cell**) ومعدل أخذ عينات للإشارة أو

ثابت زمني ملائم (عادة 0.2 ثانية أو أقل)؛ لضمان عدم ضياع قوة الفصل العالية التي توفرها الحشوات دقيقة الجسيمات الحديثة عند معدلات التدفق الشائعة التي تتراوح بين 1–2 مل دقيقة ($1 - 2\ mL\ min^{-1}$). ونظراً لعدم توفر كاشف عام بسيط وحساس في (HPLC) يماثل كاشف التأين اللهبي (**FID**) في الكروماتوغرافيا الغازية (GC)، فقد أصبح استخدام قياس الطيف الكتلي (**MS**) واسع الانتشار. وعلى الرغم من أن ربط قياس الطيف الكتلي بالكروماتوغرافيا الغازية يُعدّ أمراً نسبيّاً بسيطاً، إلا أنه في (HPLC) يجب التخلص من التداخلات الناجمة عن المذيب الشاطف. ولتجاوز هذه المشكلة، تم تطوير العديد من الوصلات أو الواجهات (**Interfaces**) لأغراض مختلفة.

إن الجمع بين تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) وممتلكات التحليل الطيفي الذري يمكن أن يوفر معلومات مفصلة عن التركيب الذري للمادة المحللة (**Analyte atomic composition**). ومن الأمثلة على ذلك نظام (**HPLC-ICP-MS**). وتُعدّ هذه التقنية أكثر قوة مقارنة بنظام (**HPLC-AAS**، أي مطيافية الامتصاص الذري - **Atomic absorption spectrometry**)؛ نظراً لأن البلازما المقترنة حثياً (**ICP**) تتمتع بحساسية عالية ويمكنها اكتشاف العديد من العناصر في وقت واحد. قد تكون مشكلات الكواشف كهربائية، أو ضوئية، أو ميكانيكية. وعند مواجهة أي مشكلة، أوقف تشغيل المضخة؛ فإذا استمر ظهور القمم الحادة (**Spikes**) على خط الأساس، فمن المرجح أن تكون المشكلة كهربائية. كما أن وجود فقاعات غازية في خلية الكشف قد يتسبب أيضاً في ظهور قمم حادة على خط الأساس، لذا ينبغي أن يؤدي الإزالة الشاملة للغازات من المذيب الشاطف (**Thorough eluent degassing**) إلى علاج المشكلة عن طريق إزالة الغاز المذاب ومنع تكوين فقاعات جديدة. ويمكن أيضاً تقليل تكوين الفقاعات في خلية الكشف باستخدام مقيد للتدفق (**Flow restrictor**) للحفاظ على ضغط أعلى بعد العمود (**Post-column**)، شريطة أن تتمكن خلايا الكشف من تحمل هذا الضغط.

كشف الامتصاص بالأشعة فوق البنفسجية/المرئية UV/Visible Absorption Detection

بشرط أن تمتلك المادة المحللة امتصاصية كافية في نطاق 200–600 نانومتر (nm)، يمكن أن تقل حساسية كواشف الامتصاص بالأشعة فوق البنفسجية/المرئية عن بضعة نانوغرامات (ng) محقونة، في حال عدم وجود أي مساهمة في ضوضاء خط الأساس ناتجة عن التغيرات الصغيرة في معدل تدفق المذيب الشاطف ودرجة الحرارة. تستخدم كواشف الأشعة فوق البنفسجية/المرئية إما مصباح زئبق منخفض الضغط كمصدر ضوئي، وهو مفيد بشكل خاص للمراقبة عند طول موجي 254 نانومتر (خط انبعاث مكثف)، أو -في أغلب الأحيان- مصباح تفريغ الديوتيريوم (**Deuterium discharge lamp**، 200–400 نانومتر) ومصباح تنجستن (**Tungsten lamp**، 400–700 نانومتر). أما خلايا التدفق الأكثر شعبية والمتاحة تجارياً لكواشف الأشعة فوق البنفسجية/المرئية فلها حجوم خلايا تبلغ 8 ميكرولتر (μL) أو أقل وبطول مسار بصرى يبلغ 10 مم (**الشكل 5**)، ولكن بالنسبة لأنظمة (HPLC) ذات التجويف الدقيق أو الشعري (**Microbore or capillary HPLC**)، يجب استخدام حجم خلية أقل (0.1–0.3 ميكرولتر) حتى لا يتم المساس بالحساسية المتزايدة الناتجة عن العمود ذي الحجم المنخفض.



الشكل 5: مخطط توضيحي لخلية تدفق كشف الأشعة فوق البنفسجية/المرئية في نظام (HPLC). *Figure.5 Schematic diagram (.(of UV/visible detector flow cell for HPLC*

إن استخدام أطوال موجية للكشف غير انتقائية نسبياً (200–220 نانومتر) قد يطرح مشكلات إذا كان التفكير متجهاً نحو العمل عالي الحساسية مع المستخلصات البيولوجية؛ فالعديد من التقارير التي تدعو إلى استخدام مثل هذه الأطوال الموجية لمواد محللة معينة لا تأتي على ذكر التداخلات المحتملة. كما قد تنخفض الحساسية أيضاً عند العمل بالقرب من حد الامتصاص فوق البنفسجي (**UV cut-off**) للمذيب الشاطف. وقد يحدّ وجود الأكسجين المذاب في المذيب الشاطف أيضاً من الحساسية عند الأطوال الموجية المنخفضة (200–210 نانومتر). وقد أثبتت الكواشف متعددة الأطوال الموجية (**Multiwavelength detectors**)، أي الكواشف القادرة على توليد بيانات امتصاصية لأكثر من حزام ضيق واحد من الأطوال الموجية في نفس الوقت، فائدتها في التحليل الشامل السام (**STA - Systematic Toxicological Analysis**). وتستخدم هذه الأجهزة إما مجموعة من شبكة الحيود الثابتة ومصفوفة الدايود (**Fixed grating / DAD combination**) أو موحّد لون عالي السرعة للبحث والمسح (**Scanning monochromator**) بالتزامن مع خلية تدفق بحجم 8–13 ميكرولتر. وعادةً ما يكون معدل جمع البيانات البالغ طيفاً واحداً في الثانية هو الأفضل في التقنية التقليدية (HPLC). ويُحصل على رسم بياني ثلاثي الأبعاد (الامتصاصية مقابل الطول الموجي والزمن)، والذي يمكن استخدامه في كل من الأعمال النوعية والكمية. ويمكن الاستعانة بالرجوع إلى طول موجي محدد لتقليل انحراف خط الأساس أثناء العمل المتدرج (**Gradient work**).

وقد تم تطوير العديد من البروتوكولات للمساعدة في تقييم تحديد المواد المحللة وتجانس القمم (**Peak homogeneity**) باستخدام هذه الأجهزة، بما في ذلك بيانات نسبة الامتصاصية ومستجدات نقاوة القمم (White, 1988; Naish et al., 1989). فإذا كانت نسبة طولين موجيين مختلفين غير ثابتة عبر القمة، فإن القمة لا تكون متجانسة. وعلى الرغم من الدفاع عن طريقة تحديد الباربيتورات باستخدام نسبة الامتصاصية (White, 1980)، إلا أن اعتماد نسبة الامتصاصية ليس مثالياً نظراً لأن امتصاصية هذه المركبات عند 200–254 نانومتر تتأثر بشكل كبير بالتغيرات الطفيفة في الرقم الهيدروجيني للمذيب الشاطف (pH).

الكشف الفلوري Fluorescence Detection

يحدث التألق أو الفلورية (**Fluorescence**) عندما يمتص الجزيء الضوء ويصدر ضوءاً عند طول موجي أطول (أقل طاقة) أثناء الاضمحلال من الحالة المثارة (**Excited state**) وعموماً، تُستخدم مصادر ضوء الزئبق أو الزينون؛ ولم تعد كواشف الفلورية المزودة بمصباح ديوتيريوم متاحة تجارياً. ويمكن أن يكون الكشف الفلوري عالي الحساسية للغاية (عادة زيادة بنفاذية

تتراوح من 10 إلى 100 ضعف مقارنة بكواشف الأشعة فوق البنفسجية/المرئية التقليدية)، ولكنه انتقائي ولا تتألق سوى عدد قليل من المواد المحللة ذات الاهتمام السمّي ما لم يتم اشتقاقها (**Derivatized**). وتعتمد الاستجابة التي يتم الحصول عليها على كل من طاقة الضوء الساقط والتركيب البصري للكشف.

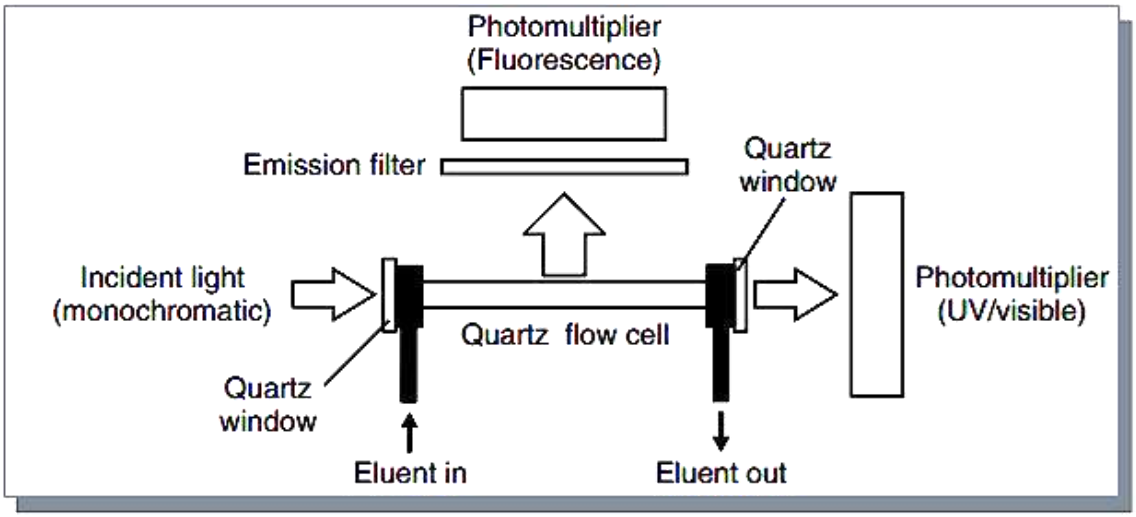
وبعض المواد المحللة -مثل الكينين (**Quinine**)- لا تتألق إلا في ظل الظروف الحامضية. وفي مثل هذه الحالات، يمكن إنجاز تعديل الرقم الهيدروجيني للمذيب الشاطف بعد العمود (**Post-column adjustment of eluent pH**) بسهولة، كما أن تكرار التحليل بدون التدفق اللاحق للعمود يتيح معامل تحديد إضافي. يمكن أن تكون كواشف الفلورية مزودة بموحّد لون مزدوج (**Double monochromator**)، أو فلتر مزدوج، أو أجهزة تجمع بين موحّد اللون للإثارة والفلتر للانبعاث. وتستخدم أجهزة المسح الأكثر تكلفة مقسماً للشعاع (**Beam splitter**) لتحويل 50% من الضوء الساقط إلى خلية ضوئية مرجعية (**Reference photocell**).

وتوفر أطوال موجات الإثارة والإنبعاث المنفصلة التي يمكن الحصول عليها باستخدام أجهزة موحّد اللون المزدوج أقصى قدر من الانتقالية للمادة المحللة المستهدفة. ومع ذلك، ونظراً لأن المركبات ذات التراكيب الكيميائية المتشابهة، بما في ذلك المستقلبات، غالباً ما تمتلك طياف فلورية مختلفة، فقد لا يكون هذا ميزه دائماً. وفي بعض الأجهزة، من الممكن برمجة تغييرات أطوال موجات الإثارة والإنبعاث أثناء التحليل، ولكن هذا يفترض مسبقاً أن المواد المحللة وأزمنة استبقائها وأطياف فلوريتها معلومة مسبقاً. يتيح استخدام فلاتر نطاق العبور الواسع (**Wide band-pass filters**) اكتشاف المزيد من المركبات. وقد طورت إحدى الشركات المصنعة كشفاً مدمجاً وغير مكلف مزوداً بفلاتر للإثارة (330–365 نانومتر) والانبعاث (440–530 نانومتر) تم اختيارها خصيصاً لقياس مشتقات (OPA) الفلورية.
تختلف خلايا الكشف في تصاميمها؛ فبعضها عبارة عن أنبوب كوارتز ضيق التجويف مزود بوصلات دخول وخروج في الأسفل والأعلى، وتكون مسارات الضوء للإثارة والإنبعاث متعامدة مع الأنبوب ومع بعضها البعض. وفي تصاميم أخرى، يُوجّه الضوء الساقط طولياً عبر الأنبوب ويُكتشف الضوء المنبعث بزوايا قائمة. وقد استُخدم هذا الترتيب في كواشف الأشعة فوق البنفسجية/الفلورية المدمجة (**الشكل 6**).

كشف التلألؤ الكيميائي Chemiluminescence Detection

يُعدّ كشف التلألؤ الكيميائي (**CLD - Chemiluminescence Detection**) أكثر حساسية محتملة مقارنة بالكشف الفلوري؛ لأنه لا يتطلب تشعيع خلية التدفق (**Irradiation of the flow cell**)، وبالتالي يتم تجنب مشكلة تشتت الضوء وما ينتج عنها من انخفاض في نسبة الإشارة إلى الضوضاء (**Signal-to-noise ratio**). كما أن الأجهزة المستخدمة أسهل وأبسط، ويتمتع نظام (CLD) بنطاق خطي ديناميكي أوسع من الكشف الفلوري التقليدي. وعادةً ما يتم إدخال المواد المتفاعلة بعد العمود (**Post-column**، ، أو قد يكون التلألؤ الكيميائي محفزاً ضوئياً (**Photo-induced**).
وجَد كشف التلألؤ الكيميائي (CLD) استخداماً له في الدراسات البيئية، مثل قياس أكسيد النيتروجين، ولكنه لم يتم تبنيه على نطاق واسع في علم السموم التحليلي. وقد وُصِف نظام (HPLC-CLD) للمواد الأفيونية باستخدام أكسدة برمنغنات البوتاسيوم (Abbott et al., 1987). وقد تم استخدام نهج مشابه في تقنية (CE-CLD) للمورفين والمورفين-6-أستات (**MAM-6**) والديامورفين؛ حيث أدى تضمين بيتا-سيكلودكسترين (**cyclodextrin-β**) في المذيب الشاطف إلى زيادة إشارة التلألؤ (Gong et al., 1999). كما استقصى باحثون آخرون التلألؤ الضوئي الكيميائي لـ 97 عقاراً (,.Gómez-Taylor et al

2006)، مما قد يثير اهتماماً متجدداً بكشف التلألؤ الكيميائي (CLD). وتمت مراجعة استخدام (CLD) في تحليلات (HPLC) و(CE) (Li et al., 2003).



الشكل 6: مخطط توضيحي لخلية كشف مدمجة (فلورية / أشعة فوق بنفسجية) لنظام (HPLC). *Figure.6 Schematic diagram (of a combined fluorescence/UV detector cell for HPLC.*

الكشف الكهروكيميائي Electrochemical Detection

يوجد نوعان أساسيان من الكواشف الكهروكيميائية لنظام (HPLC):

1. كواشف الأمبيرومتري (**Amperometric**) أو الكولومومتري (**Coulometric**).
2. كواشف التوصيل الكهربائي (**Electrical conductivity**).

تُعدّ الأولى كواشف تفاعل؛ أي أن المواد المحللة إما أن تتأكسد أو تخضع للاختزال عند سطح قطب العمل (**Working electrode**)، وهي التي وجدت التطبيق الأوسع في علم السموم التحليلي. وللحفاظ على الدائرة الكهربائية، يلزم وجود قطب ثانٍ (مضاد - **Counter electrode**)، والذي قد يكون من نفس مادة قطب العمل أو ببساطة من الفولاذ المقاوم للصدأ الخاص بأنابيب الإخراج.

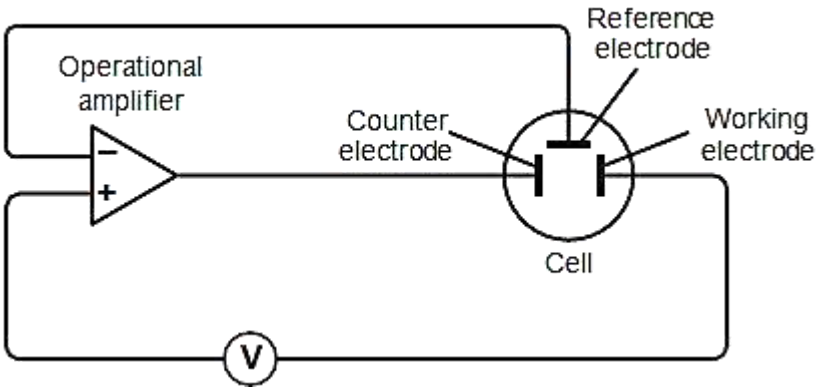
إن نظاماً ثنائي الأقطاب سيكون غير مستقر للغاية للاستخدام العملي، ولذلك يُستخدم عادةً دائرة ثلاثية الأقطاب (**Three-electrode circuit**). ويُستخدم القطب الثالث -وغالباً ما يكون من الفضة/كلوريد الفضة وبجهد معلوم- كمرجع يمكن من خلاله الحفاظ على استقرار الجهد المطبق على قطب العمل عبر دائرة التغذية المرتدة (**Feedback circuitry**) (**الشكل 7**). ويمكن تعزيز الكشف عن طريق اشتقاق المواد المحللة المناسبة لإنتاج أنواع نشطة كهربائياً (**Electroactive species**).

أما قطب العمل الأكثر استخداماً فهو الكربون (الكربون الزجاجي - **Glassy carbon**، عجينة الكربون، الجرافيت المسامي)؛ نظراً لأن هذه المادة يمكن استخدامها لكل من الأكسدة والاختزال ولا تتسمم بسهولة بنواتج التفاعل. ويمكن استخدام البلاتين، أو الفضة، أو الذهب، أو ملغم الذهب للتطبيقات الأكثر تخصصاً. وتُستخدم كواشف الأمبيرومتري مع قطب عمل من الكربون الزجاجي في ترتيب نفاث جداري أو طبقة رقيقة (**Wall jet or thin-layer arrangement**، **الشكل 8**).

وتعطي هذه الترتيبات حساسية ملائمة للعديد من المركبات؛ بينما قد تكون أقطاب عجينة الكربون أكثر حساسية، إلا أن الحفاظ على أداء مرضٍ فيها يعد أكثر صعوبة. وتوفر خلايا التدفق المصنوعة من الجرافيت المسامي إمكانية الكشف الكولومومتري

(**Coulometric detection**)؛ أي الكشف الذي يتضمن تحولاً شبه كمي، وتتوفر هذه الخلايا في تكوين ثنائي القطب (**Dual-electrode configuration**، ESA Coulochem).

وعلى الرغم من نسبية تكلفتها العالية، إلا أن هذه الأجهزة يمكن أن توفر نسبة محسنة من الإشارة إلى الضوضاء للمواد المحللة مثل الفيزوستيغمين (**Physostigmine**)، وقد تكون أكثر مرونة في الاستخدام الروتيني مقارنة بتجميعات النفاث الجداري (Flanagan et al., 2005). وتحتاج الأقطاب المسامية إلى عناية فائقة لتجنب الانسداد، ويجب دائماً استخدامها مع مرشحات الجرافيت.



الشكل 7: مخطط توضيحي لدائرة كاشف كهروكيميائي ثلاثي الأقطاب. *(Figure.7 Schematic diagram of a three-electrode electrochemical detector circuit).*

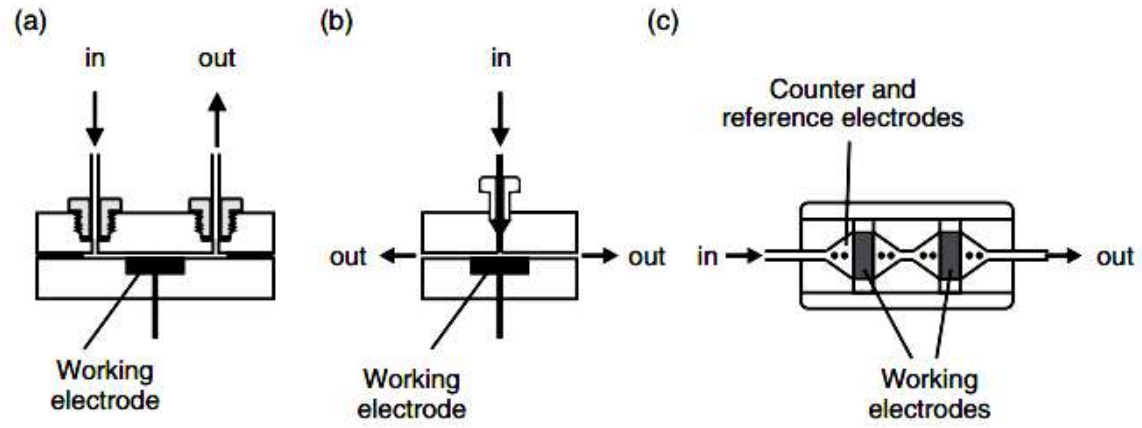
لقد استُخدم **الاختزال الكهروكيميائي (Electrochemical reduction)** للكشف عن الأدوية، مثل بعض مركبات البنزوديازيبينات (**Benzodiazepines**) وثنائي السبريت (**Disulfides**)؛ ولكن، بشكل عام، يُعدّ الكشف الاختزالي أكثر صعوبة من الأكسدة، لا سيما عند الجهود السالبة العالية؛ نظراً لضرورة استبعاد الأكسجين المذاب. من ناحية أخرى، استُخدمت **الأكسدة الكهروكيميائية (Electrochemical oxidation)** على نطاق واسع للكشف عن الأدوية القاعدية، وخاصة المورفين والقلويات ذات الصلة. وغالباً ما تكون الحساسية المتحصل عليها متفوقة على تلك التي توفرها تقنية الكشف بالأشعة فوق البنفسجية (UV). ومع ذلك، لا تُطلب الحساسية العالية جداً عادةً، ولكن قد يلزم تطبيق جهود كهروكيميائية عالية نسبياً للكشف عن بعض الأدوية القاعدية (**الجدول 2**). وبناءً على ذلك، تكون نسبة الإشارة إلى الضوضاء مشابهة لتلك التي تواجه، على سبيل المثال، في تحليل الأنواع سهلة الأكسدة التي تتطلب جهوداً مطبقة أدنى مثل الكاتيكولامينات في البلازما (**Catecholamines**). ولا يُستخدم الكشف الكهروكيميائي (ED) على نطاق واسع للمركبات الحامضية أو المتعادلة مثل الساليسيلات أو الباراسيتامول؛ نظراً لأن هذه الأدوية، ورغم سهولة أكسدتها، توجد غالباً بتراكيز عالية نسبياً وعادة ما يكون الكشف بالأشعة فوق البنفسجية كافياً لها.

يُعدّ **إلغاء تنشيط القطب (Electrode deactivation)** عيباً كبيراً يواجه استخدام الكشف الكهروكيميائي في نظام (HPLC). وعادة ما يصاحب فقدان الاستجابة انخفاض في التيار الثابت (**Standing current**)، بينما يتوازي التلوث المفرط في المذيب الشاطف -بسبب الضوضاء الناتجة على سبيل المثال- عادةً مع زيادة في التيار الثابت. ويُعدّ الكشف الكهروكيميائي حساساً للغاية لتغيرات معدل التدفق، لدرجة أن نبضات المضخة غالباً ما تكون واضحة للعيان، وحتى التغيرات الطفيفة في درجة حرارة الوسط المحيط يمكن أن تؤدي إلى انحراف ملحوظ في خط الأساس. ومن ثم، يصبح التحكم في درجة الحرارة أمراً مهمّاً إذا كان التفكير متجهاً نحو التشغيل عالي الحساسية. ومع تساوي العوامل الأخرى، فإن كواشف الأشعة فوق البنفسجية/المرئية والفلورية تبدو أكثر متانة وقوة، ولذلك يُفضل استخدامها.

الجدول 2: الظروف الكهروكيميائية المثلى المقترحة لبعض المجموعات الوظيفية. *(Table.2 Suggested optimal ED conditions for certain functional groups)*

المجموعة الوظيفية(Functional group)	جهد الأكسدة الأمثل (V) مقابل(Ag/AgCl)	حد الكشف التقريبي على العمود(ng)	التيار الثابت النموذجي(nA)
الفينول، الأمين العطري(Phenol, aromatic amine)	0.7	0.1	2–5
كبريت الفينوثيازين(Phenothiazine sulfur)	0.8	0.1	5–10
نيتروجين الإيميدازويل، الإندول (Imidazoyl nitrogen, indole)	0.9	0.2	10–20
الأمين الأليفاتي الثالثي(Tertiary aliphatic amine)	1.0	0.5	50–100
الأمين الأليفاتي الثانوي (Secondary aliphatic amine)	1.2	2	200–500
الأمين الأليفاتي الأولي(Primary aliphatic amine)	1.6	20	> 2000
نيتروجين البيريديل، مركب الأمونيوم الرباعي (Pyridyl nitrogen, quaternary ammonium)	> 1.6	—	—

- **شروط النظام التجريبي المرجعي:** العمود: مم 5 × 125قطر داخلي سيليكا Spherisorb S5W. المذيب الشاطف: بيركلورات الأمونيوم الميثانولية ($^{-1}$مل مول لتر 10) مع $^{-1}$مل لتر 1هيدرازكسيد الصوديوم الميثانولي ($^{-1}$مول لتر 0.1)، الرقم الهيدروجيني الظاهري $pH^* = 6.7$. معدل التدفق: $^{-1}$مل دقيقة 2.0. قطب العمل: كربون زجاجي بدرجة V25 (Le Carbone)؛ القطب المرجعي: Ag/AgCl(Jane et al., 1985). أقصى جهد مطبق قابل للاستخدام للمستخلصات البيولوجية عادةً فولت 1.2+.



الشكل 8: التصاميم المبسطة لخلايا (HPLC-ED): (أ) خلايا الطبقة الرقيقة (**Thin-layer cell**)، (ب) خلايا النفاث الجداري (**Wall-jet cell**)، (ج) خلايا التدفق الخلالي المسامية (**Porous flow-through cell**). *Figure 8 Simplified designs of (HPLC-ED cells: (a) thin-layer cell, (b) wall-jet cell, (c) porous flow-through cell).*

كشف النيتروجين المتلألئ كيميائياً Chemiluminescent Nitrogen Detection

يُعدّ كشف النيتروجين المتلألئ كيميائياً (**CLND - Chemiluminescent Nitrogen Detection**) كاشفاً طورياً غازياً يستغل تفاعل أكسيد النيتروجين والأوزون لإنتاج ثنائي أكسيد النيتروجين المثار مع الانبعاث اللاحق للضوء وفق التفاعل التالي:

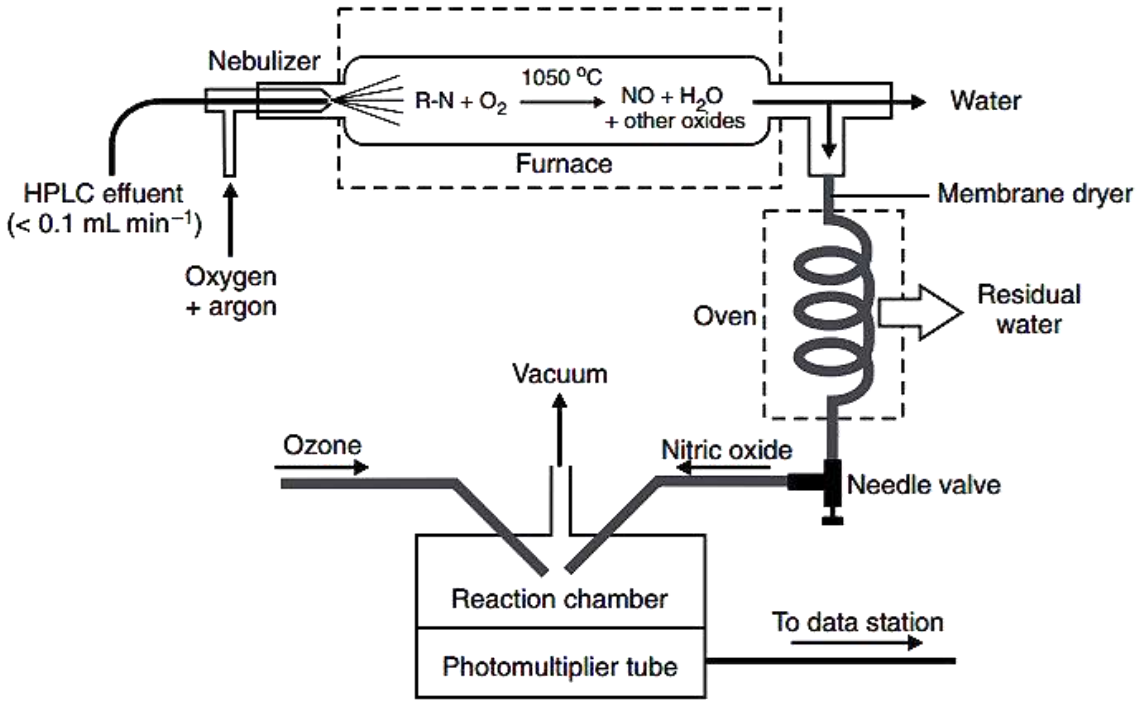
$$NO + O_3 \rightarrow [NO_2]^* \rightarrow NO_2 + O_2 + h\nu$$

يتم إنتاج أكسيد النيتروجين عن طريق تسخين المركبات المحتوية على النيتروجين عند درجة حرارة 1050 درجة مئوية ($^{\circ}C$) في جو من الأكسجين، وبعد فصل نواتج الانحلال الحراري الأخرى، يتم خلطه مع الأوزون تحت ضغط منخفض (حوالي 2.7 كيلو باسكال) في غرفة تفاعل أمام صمام ضوئي مضاعف (**Photomultiplier**) (Taylor et al., 1998). وتم استخدام

صمام إبرة مصنوع من مادة (PEEK) للتحكم في تدفق الغاز إلى غرفة التفاعل (**الشكل 9**). ومن الواضح تماماً أنه لا يمكن استخدام نظام (CLND) مع المذيبات أو المنظمات الشاطفة المحتوية على النيتروجين.

يُقال إن حساسية (CLND) تبلغ 0.1 بيكوغرام (pg) من النيتروجين، بنطاق خطي يزيد عن 10^4. وبالنسبة لمجرد مركب مثل الإبراميل (**Imipramine**، الوزن الجزيئي $M_r = 280$) والذي يحتوي بشكل مناسب على 10% نيتروجين بالوزن، فإن هذا يعادل 1 بيكوغرام من الدواء. وبما أن هذا القياس قد أُجري باستخدام تحليل حقن التدفق (**FIA - Flow Injection Analysis**) مع إعطاء قمم حادة للغاية، فإن الحساسية الكروماتوغرافية تقع على الأرجح في حدود 1–2 بيكوغرام ثانية ($1 - 2\ pg\ s^{-1}$) للإبراميل.

إن قابلية الاستجابة لإعادة الإنتاج للمقادير متساوية المولات من النيتروجين، بغض النظر عن المادة المحللة، تعني أن هذا الكاشف قد استُخدم لقياس المركبات المحتوية على النيتروجين دون الحاجة إلى معايير أولية، مثل فحص المكتبات التوافقية (**Combinatorial libraries**)، والدراسات الأيضية (Taylor et al., 2002)، وفحص ضبط الأدوية والمخدرات المهربة (Laks et al., 2004).



الشكل 9: مخطط توضيحي لكاشف النيتروجين المتلألئ كيميائياً.

كشف تشتت الضوء التبخيري Evaporative Light Scattering Detection

في كاشف تشتت الضوء التبخيري (**ELSD - Evaporative Light Scattering Detection**)، يُتحول السائل الخارج من عمود (HPLC) إلى رذاذ دقيق (**Fine mist**) بوساطة مرذاذ (**Nebulizer**)، ثم يُتبخر المذيب ليترك تياراً من جسيمات المذاب التي يُوجه نحوها شعاع من الضوء. ويقوم كاشف ضوئي، مضبوط على زاوية مناسبة، بقياس الضوء المشتت (**Scattered light**).

ونظراً لأن الكشف لا يعتمد على أي خصائص طيفية، غالباً ما يُشار إلى (ELSD) بالكاشف العام (**Universal detector**)، ولكن من الواضح أنه لا يمكن استخدامه مع المواد المحللة المتطايرة (**Volatile analytes**). ومثل كاشف

(CLND) المذكور سابقاً، ينبغي أن يكون (ELSD) مفيداً لقياس المركبات سيئة توصيف البنية، مثل المنتجات المستمدة من المكتبات التوافقية ومستقلبات الأدوية. وقد تتأثر النتائج المستحصل عليها من (ELSD) بتكوين المذيب الشاطف لـ (HPLC)، على سبيل المثال أثناء برمجة الشطف المتدرج (**Gradient programming**)، ولكن ربما تتمثل العيوب الكبرى في افتقاره للحساسية. وعندما قام باحثون (Fries et al., 2005) بتقييم كاشف (ELSD) لدراسات الأيض المخبري (**In vitro metabolism studies**)، وُجد أن مصفوفة العينة تتداخل، وحتى مع العينات الاصطناعية الأقل تعقيداً، كان حد الكشف (**LoD**) يتراوح بين 1–10 ملغ لتر ($1 - 10\ mg\ L^{-1}$). وقد يثبت (ELSD) فائدته في قياس المركبات الداخلية (**Endogenous compounds / Biomarkers**)، والتي تلبي أهمية في علم السموم التحليلي (Aradottir and Olsson, 2005).

الكشف بالهباء الجوي المشحون Charged Aerosol Detection

يُعدّ كاشف الهباء الجوي المشحون (**CAD - Charged Aerosol Detection**) شكلاً حديثاً نسبياً من أشكال الكشف في (HPLC) (Corona Plus, ESA). ومثل كاشف (ELSD)، يمر المذيب الشاطف عبر مرذاذ ويتبخر المذيب في درجة حرارة الغرفة. ومع ذلك، في كاشف (CAD)، تُشحن الجسيمات عن طريق الاصطدام بتيار من غاز النيتروجين المشحون إيجابياً. وتُزال الأيونات عالية الحركة بواسطة مصيدة ذات جهد منخفض وسالبة الشحنة. وتُنقل شحنة أيونات المادة المحللة المتبقية إلى جامع (**Filter-electrometer**)، وتكون الشحنة المنقولة متناسبة مع كتلة المادة المحللة (Gamache et al., 2005). يتمتع كاشف (CAD) بحدود تشابه تلك الخاصة بكاشف (ELSD)، بما في ذلك القيود المفروضة بسبب تطاير المادة المحللة ومذيب (HPLC) الشاطف. ومع ذلك، يُزعم أن كاشف (CAD) أكثر استقراراً فيما يتعلق بالشطف المتدرج، وأقل تأثراً بالاختلافات في أقطار جسيمات الهباء الجوي، وأكثر حساسية بنحو 10 مرات على الأقل مقارنة بـ (ELSD). ومن المبكر جداً الجزم ما إذا كان (CAD) سيُطور إلى الحد الذي يجعله مناسباً للاستخدام الروتيني في علم السموم التحليلي.

كشف النشاط الإشعاعي Radioactivity Detection

يمكن رصد المواد المحللة الموسومة إشعاعياً (**Radioactively labelled analytes**) عبر خلية تدفق باستخدام أنظمة كشف نشاط إشعاعي (**RA detection systems**) مختلفة، مثل عداد وميض يوديد الصوديوم (**Sodium iodide scintillation counter**)، أو عداد جيجر-مولر (**Geiger–Muller counter**)، أو عداد الوميض السائل (**Liquid scintillation counter**)، وذلك اعتماداً على النظير المشع (**Radionuclide**) المستخدم.

يُنتج الوميض ضوءاً عبر تأين المصفوفة الناجم عن الإشعاع المنبعث، ويتم تضخيم الضوء عبر أنبوب ضوئي مضاعف (**Photomultiplier tube**). وعادةً، يُستخدم مادة موسومة بالتريتيوم (^{3}H) أو الكربون-14 (^{14}C) بحيث تكون المادة الموسومة مشابهة قدر الإمكان للمركب غير الموسوم. وتشمل النظائر المشعة المناسبة الأخرى (^{32}P) و(^{35}S)، إذا كانت هذه العناصر موجودة في المركب قيد الدراسة، ولكن يُفضل عموماً استخدام (^{14}C).

يشترك التصميم الأساسي في ميزات مشتركة مع كواشف التلألؤ الكيميائي (CL). ولسرعة تحسين الحساسية، تلزم خلية تدفق ذات حجم كبير، ولكن الحجم الكبير جداً يتسبب في اتساع الحزمة ومن ثم فقدان الحساسية. ويمكن تقليل ذلك إلى حد ما عن طريق بناء الخلية على شكل ملف من الأنابيب موضوعة أمام الأنبوب الضوئي المضاعف. ومع ذلك، فإن اضطرار النظام لدمج العدات (أي العد عند فترات زمنية منفصلة) يقلل من الدقة، ومن الواضح أنه لتحقيق حساسية عالية سيتعين زيادة فترة العد، مما ينتج عنه مزيد من الفقد في الدقة. أما التريتيوم، وباعتباره باعث بيتا "خفيفاً" (**"Soft" emitter-β**، الإطار 12.2)، فيجب عدّه في المحلول؛ لأن الإلكترونات منخفضة الطاقة لن تخترق جدران خلية الكشف. ويسهم تيار سائل عداد

الوميض المضاف (**Liquid scintillator cocktail**) في اتساع القمم ويزيد من حجم النفايات الإشعاعية منخفضة المستوى المخصصة للتخلص منها.

على الرغم من القيود المرتبطة بكواشف النشاط الإشعاعي (**الإطار 3**)، فهي مفيدة إذا كان هناك عدد كبير من العينات المراد قياسها. ومع ذلك، بالنسبة للدراسات صغيرة النطاق، يُعدّ جمع أجزاء المذيب الشاطف والعد خارج الخط (**Off-line counting**) بديلاً مجدياً، إن لم يكن مفضلاً. وبالنسبة للمواد المحللة المستهدفة، يمكن إضافة المركبات غير الموسومة مسبقاً بحيث يمكن الكشف عنها، على سبيل المثال، باستخدام كشف الأشعة فوق البنفسجية وجمع القمم الفردية لعد النشاط الإشعاعي.

الإطار 3: الاعتبارات العملية في استخدام كواشف النشاط الإشعاعي

- ليست حساسة بشكل خاص.
- لا يمكن إعادة تدوير المذيب الشاطف لنظام (HPLC).
- تتطلب المواد المحللة الموسومة بالتريتيوم (^3H) إضافة سائل وميضي.
- توليد حجوم كبيرة من النفايات الإشعاعية منخفضة المستوى.
- يؤدي انتشار الحزم إلى ضعف الدقة وفقدان الحساسية.
- ينتج عن دمج الإشارة رسم بياني شريطي (**Histogram**).
- غير متوافقة مع عمليات الفصل عالية الكفاءة في نظام (HPLC).

الكشف الكيرالي (التماكلي) Chiral Detection

تكتسب الكواشف الكيرالية (**Chiral detectors**) أهمية بالغة في تحليل وفصل المتماكبات الفراغية أو الإنانتيوميرات (**Enantiomers**). وتتوفر عدة كواشف تجارياً، وتعتمد إما على الدوران البصري لمستوى الضوء المستقطب (كواشف الدوران البصري - **OR detectors**) أو على قياس الفرق بين امتصاص الضوء المستقطب دائرياً لليمين ولليسار، أو ما يُعرف بالثنّائي الدائري (**Circular dichroism - CD detectors**). وتكون كواشف (CD) عموماً أكثر حساسية بنحو 10 إلى 100 مرة مقارنة بكواشف (OR)، وهي مناسبة للمرّكبات التي تمتص في النطاق 220–420 نانومتر (nm). ونظراً لوجود إشارة امتصاص بالإضافة إلى إشارة (CD)، يمكن استخدام كواشف (CD) لقياس فائض أحد الإنانتيوميرين دون إجراء فصل كيرالي، ومن خلال قياس الدوران المحدد للقمم المفصولة، يمكن إعطاء تعيين صحيح للقمم (**Proper peak assignment**). ومن ناحية أخرى، يمكن استخدام كواشف (OR) للكشف عن الإنانتيوميرات التي لا تحتوي على حاملات ألوان (**Chromophores**). ويتراوح حد الكشف المفيد للمستحضرات الصيدلانية النموذجية بين 1 إلى 100 ميكروغرام على العمود، وذلك اعتماداً بشكل أساسي على الدوران المحدد الذي تبديه المادة المحللة في المذيب الشاطف، وبشكل ثانوي على زمن الاستبقاء وشكل القمة. ويُقال إن أجهزة (CD) المعتمدة على الليزر (**Laser CDs**) أكثر حساسية من الأجهزة التقليدية، ولكنها لا تبدو حتى الآن مالكة للحساسية المطلوبة لرصد المركبات الكيرالية في السوائل البيولوجية. وهذا العامل، مضافاً إليه تكلفة هذه الأجهزة، يجعل من غير المرجح تبنيها على نطاق واسع في علم السموم التحليلي.

التعديل ما بعد العمود Post-Column Modification

مقارنة بغازات حمل الكروماتوغرافيا الغازية (GC)، فإن المذيبات الشاطفة لتقنية (HPLC) غير قابلة للانضغط جوهرياً، ولذلك توفر تقنية (HPLC) أيضاً مجموعة من الخيارات لتعديل المادة المحللة بعد العمود، بما في ذلك: ضبط الرقم الهيدروجيني بعد العمود (**Post-column pH adjustment**)، والتحلل المائي (**Hydrolysis**), والاشتقاق

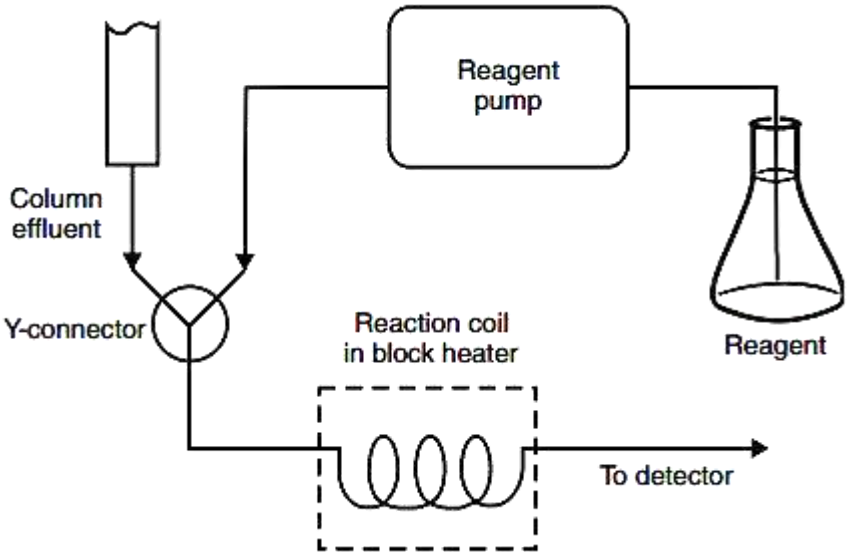
(**Derivatization**)، والتحلل الضوئي (**Photolysis**). عادةً ما تُستخدم مثل هذه التعديلات لتسهيل أو تعزيز الفلورية نظراً لأن كواشف الفلورية غير حساسة نسبياً لتغيرات معدل التدفق. وقد لا يكون الاشتقاق أو التلاعب بالرقم الهيدروجيني بعد العمود قابلاً للتطبيق العملي مع الكشف الكهروكيميائي (ED)؛ لأن هذا الكاشف حساس بشكل خاص للاضطرابات في معدل التدفق. ولتقليل اتساع الحزمة (**Band broadening**) أثناء إضافة الكاشف بعد العمود، يلزم وجود نظام مصمم خصيصاً؛ حيث يُخلط السائل الخارج من العمود مع محلول الكاشف الذي توفره مضخة مساعدة باستخدام قطعة على شكل حرف T أو - ويفضل- وصلة على شكل حرف Y (**Y-connector**)، مما يعطي خلطاً أفضل (**الشكل 10**). ويمكن بناء **ملف التفاعل (Reaction coil)** من أنابيب الفولاذ المقاوم للصدأ ذات التجويف الضيق أو أنابيب (PTFE)، أو أي مادة مناسبة أخرى، والتي يمكن وضعها في فرن أو كتلة تسخين إذا كان التفاعل يتطلب درجة حرارة مرتفعة. ويتأثر وقت التفاعل بهندسة ملف التفاعل ومعدلات تدفق المذيب الشاطف وتيارات الكاشف.

على سبيل المثال، إذا كان معدل تدفق الخارج والكاشف كلاهما 1 مل دقيقة ($1\ mL\ min^{-1}$)، فإن الطول (L) للأنابيب بقطر داخلي 0.2 مم اللازم لمنح زمن بقاء في الملف قدره دقيقة واحدة يُحساب كالتالي:

[حجم الاسطوانة 63.7 م $\pi r^2 L$، ومن ثم $L = 2/(\pi r^2) = 63.7$ م]

إن مضاعفة القطر الداخلي لملف التفاعل ستزيد من زمن التفاعل أربعة أضعاف، ولكن من المرجح أن يؤدي ذلك إلى تقليل كفاءة النظام. أما تقليل معدل التدفق لأي من تيار المذيب الشاطف أو الكاشف فسيزيد من زمن البقاء، وبشرط توفير كمية كافية من الكاشف، فإن تقليل معدل تدفق الكاشف إلى الحد الأدنى سيؤدي إلى تعظيم الحساسية.

إن تعريض المركبات لضوء عالي الطاقة غالباً ما ينتج عنه منتجات شديدة التألق. وتتمثل مزايا التحلل الضوئي (**Photolysis**) مقارنة بالاشتقاق بعد العمود في عدم الحاجة إلى مضخة ثانية، وعدم تخفيف العينة، ولأنه يقلل من اضطرابات معدل التدفق، فإنه ملائم لكل من الفلورية والكشف الكهروكيميائي (Lihl et al., 1996). ويمكن استخدام أنابيب (PTFE) رقيقة الجدران، والمجدولة على شكل حصيرة مسطحة، كغرفة تفاعل؛ لأنها توفر مساحة سطحية كبيرة للتشعيع.



الشكل 10: ترتيب إضافة الكاشف بعد العمود في الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC). *Figure.10 Arrangement for (post-column reagent addition in HPLC).*

وتُعدّ الأكسدة الكهروكيميائية الكولومومترية بعد العمود للمواد المحللة وتحويلها إلى منتجات فلورية بديلاً للتحلل الضوئي؛ وقد استُخدم هذا النهج لقياس أموكسيسيلين البلازما (**Plasma amoxicillin**)، على سبيل المثال (Mascher and Kikuta, 1990).

الكشف بالمقايسة المناعية Immunoassay Detection

تكون تقنيات المقايسة المناعية (**Immunoassay techniques**) مفيدة أحياناً للأعمال التي تُجرى خارج الخط (**Off-line work**). وفي هذه الطريقة، يُجمع السائل الخارج من العمود في أجزاء صغيرة (حوالي 1 مل)، ويُفحص كل جزء، ثُم يُرسم مخطط كروماتوغرافي عن طريق توقيع نتيجة الفحص مقابل رقم الجزء (Daldrup et al., 1985). وتُعدّ هذه الإجراءات طويلة، ولكن يمكن تحقيق حساسية/انتقالية عالية للغاية. علاوة على ذلك، يمكن توفير الوقت نظراً لإمكانية استخدام إجراءات تحضير عينات بسيطة نسبياً، نظراً لكون الكشف عالي الانتقائية. وقد استُخدمت تقنية (HPLC) مع الكشف بالمقايسة المناعية للمواد القنبية (**Cannabinoids**)، والأفيونات، والليسرجيد (**Lysergide**)، والجليكوسيدات المقوية للقلب (**Cardioactive glycosides**) في السوائل البيولوجية، من بين مركبات أخرى.

الأعمدة ومواد حشو الأعمدة Columns and Column Packings

في علم الســــــــموم التحليلي، غالباً ما يُفضل استخدام أعمدة الفولاذ المقاوم للصدأ التقليدية (100 أو 4.6 × 125أو مم 5قطر داخلي) المحشوة بمواد ذات حجم جســــــــيمات يبلغ 5 ميكرومتر (μm)؛ لأنه عند معدلات تدفق تتراوح بين 1.5–2.0 مل دقيقة ($1.5 - 2.0\ mL\ min^{-1}$)، يمكن عادةً ضبط الاستبقاء، وزمن التحليل، والانتقائية، والحساسية ضمن حدود مقبولة.

وقد توفر الأعمدة الأطول (150 أو مم 250)، أو المواد الأصغر حجماً (ميكرومتر 3 أو أقل)، أو حتى الأعمدة ذات التجويف الدقيق (مم 2 – 1 قطر داخلي) (**الجدول 3**) كفاءة محسنة، وبالتالي حساسية أكبر في تطبيقات معينة؛ بينما تعطي المواد بحجم 10 ميكرومتر ضغوطاً عكسية أقل، إلا أن لها مزايا قليلة بخلاف ذلك ونادراً ما تُستخدم. ويجب تذكّر أن كلما صغر حجم جسيم مادة الحشو، زادت الحاجة إلى العناية الفائقة في تحضير العينة والمذيب الشاطف لإطالة عمر العمود؛ وذلك لأن الجسيمات والشوائب الأخرى يمكن أن تتجمع بسرعة أكبر على العمود ذي الجسيمات الأصغر مسببة مشكلات في الضغط العكسي، والانتقائية، والدقة والفصل. وعادةً ما يتحقق تقليل زمن التحليل من خلال استخدام أعمدة أقصر ومعدلات تدفق أعلى؛ فالأعمدة الأقصر تتطلب جسيمات أصغر للحفاظ على الكفاءة، غير أن زيادة الضغط العكسي للعمود عند استخدام جسيمات سيليكا أصغر تحد من طول العمود.

الجدول 3: التصنيف الواسع لأنواع أعمدة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC). *Table.3 Broad) (classification of HPLC column types*

النوع(Type)	القطر الداخلي) مم - mm)	الطول) مم - mm)	حجم الجسيمات العادي (μm)	معدل تدفق المذيب الشاطف ($mL\ min^{-1}$)
تحضيري(Preparative)	100	600	10–50	> 5
شبه تحضيري-(Semi preparative)	25	250	5–20	2–5
عادي(Normal)	3.9–5	50–250	5–10	1–2
شبه تجويف دقيق(Minibore)	2.1–3.9	50–200	3–5	0.5–1.5
تجويف دقيق(Microbore)	1.0–2.1	50–150	3–5	0.1–0.5
شعري(Capillary)	0.05–1.0	50–250	2–5	0.0002–0.1

تكوين العمود Column Configuration

تُستخدم الأنابيب والوصلات ذات الحجم الميت المنخفض (**Low dead volume - LDV**) لربط العمود بجهاز الحقن والكاشف. ويمكن للأعمدة ذات التجويف الأصغر أن توفر حساسية أكبر وتستهلك كمية أقل من المذيب، ولكن إذا كان حجم الحجم الميت للنظام أو حجم خلية الكشف مرتفعين للغاية، فإن اتساع الحزمة خارج العمود (**Extra-column band broadening**) سيجعل العمود ذي التجويف الأصغر يبدو ضعيف الأداء. وعادةً ما تُستخدم الوصلات البلاستيكية الخاملة القابلة للربط بالأصابع (**Finger-tight male PEEK fittings**) والوصلات الأنثوية المصنوعة من الفولاذ المقاوم للصدأ. ولا تقفل الوصلات البلاستيكية على أنابيب التوصيل بنفس الطريقة التي تعمل بها وصلات الفولاذ المقاوم للصدأ، بل تنزلق لتناسب أي نوع من تركيبات الأعمدة بشكل صحيح.

إذا تُستخدم وصلات الذكر التقليدية، فينبغي استخدام حلقات منع التسرب البلاستيكية (**Plastic ferrules** من أنواع PTFE أو Vespel أو PEEK) حتى عند طرف مدخل العمود؛ لأن ذلك يقلل من مخاطر التلف المادي لوصلات وأنابيب الفولاذ المقاوم للصدأ الناتج عن الربط المفرط، ويسمح بضبط الأنابيب تماماً كما هو الحال مع الوصلات القابلة للربط بالأصابع. ويمكن استخدام أنابيب من الفولاذ المقاوم للصدأ أو -بشكل متزايد- من البولي إيثر إيثر كيتون (**PEEK**) للاتصالات السابقة للعمود (**Pre-column connections**). ولا يقتصر استخدام أنابيب (PTFE) ذات التجويف الضيق (0.15 مم قطر داخلي) للاتصالات اللاحقة للعمود (**Post-column connections**) على كونها ملائمة فحسب، بل إنها تقلل أيضاً من اتساع الحزمة، لا سيما عند ربط عدة كواشف على التوالي.

مواد حشو الأعمدة Column Packings

يُعدّ هلام السيليكا [السيليكا جيل، وثاني أكسيد السيليكون، $[(SiO_2)_n \cdot xH_2O]$ مصفوفة الأعمدة الأكثر استخداماً؛ لأنه رخيص نسبياً، ومستقر، وخامل، ويمتلك قوة ميكانيكية جيدة. علاوة على ذلك، فهو يتوفر بأحجام جسيمات متوسطة مختلفة (3–80 ميكرومتر)، وأحجام مسام (4–33 نانومتر)، ومساحات سطحية (100–800 متر مربع غرام- $m^2\ g^{-1}$)، ويمكن تعديله كيميائياً عبر مجموعات السيلانول السطحية (Si–OH) لإنتاج نطاق واسع من الأطوار الثابتة.
كما يُلجأ أحياناً لاستخدام أكسيدات أخرى (مثل أكسيد الألومنيوم، أو المغنيسيوم، أو الزركونيوم) أو بوليمرات متشابكة (ستايرين/ديفينيل بنزين، بولي أكريلاميد، إلخ) نظراً لامتلاكها قوة ميكانيكية جيدة. وفي بعض الأحيان، يمكن استخدام المصفوفة وحدها كطور ثابت؛ فالسيليكا -على سبيل المثال- تُستخدم في كروماتوغرافيا الامتزاز، بينما يُستخدم الستايرين/ديفينيل بنزين في كروماتوغرافيا الطور المعكوس .

إن استخدام مواد حشو ذات قوة ميكانيكية جيدة يجعل من الممكن حشو مواد ذات أحجام جسيمات صغيرة داخل الأعمدة باستخدام ضغط عالي للحصول على أعمدة عالية الكفاءة. علاوة على ذلك، يُقلل إلى أدنى حد من خطر انهيار حشوة العمود أثناء الاستخدام، والذي قد يؤدي إلى ضغوط عكسية عالية، وتكوين فراغات، وفقدان الكفاءة.
أما الدعم البوليمري واسع المسام [حجم المسام (500 Å) نانومتر 50 <]، والذي غالباً ما يُستخدم في كروماتوغرافيا استبعاد الحجم (**SEC - Size-exclusion chromatography**)، فلا يحتوي على روابط متقاطعة كثيرة، ولذلك يجب التعامل معه وتخزينه بحذر. وبالمثل، فإن سيليكا المسام الواسعة (نانومتر 50 <، والتي تُستخدم كدعم في أعمدة البروتينات) تمتلك جدران دعم أرق وتتطلب أيضاً التعامل بحذر. وقد تختلف أنواع السيليكا المتاحة لكل مصنع، وسواء صُنعت محلياً أو تم شراؤها، في حجم المسام، والمساحة السطحية، وحجم المسام، والرقم الهيدروجيني لسطح السيليكا (pH). يُصنع هلام السيليكا

عن طريق الترسيب من محاليل السيليكات أو سول السيليكا في نطاق الرقم الهيدروجيني 4–10، ويعكس الرقم الهيدروجيني للسطح درجة حموضة خليط البدء. ويحاول معظم المصنعين جعل الرقم الهيدروجيني للسطح أقرب ما يكون إلى 7 لتقليل التفاعلات مع المواد المحللة الحامضية أو القاعدية. ويمكن تصنيع هلام السيليكا بحجم مسام ومساحة سطحية مختلفين اعتماداً على الاستخدام المقصود منه. يمتلك هلام السيليكا الكلاسيكي المستخدم في كروماتوغرافيا الامتزاز حجم مسام يتراوح بين 6–8 نانومتر ومساحة سطحية تتراوح بين 300–500 متر مربع غرام ($m^2\ g^{-1}$). ونظراً لأن حجم المسام قد ينخفض بعد الارتباط الكيميائي للطور الثابت، يستخدم بعض المصنعين مواد ذات حجم مسام أكبر (10–12 نانومتر) للسيليكا الأساسية لضمان وصول كافٍ إلى الطور المرتبط.

أما لفصل المواد المحللة ذات الوزن الجزيئي $M_r > 2000$مثل الببتيدات والبروتينات، فيمكن استخدام سيليكا أساسية بقطر مسام يبلغ 30، أو 50، أو 100 نانومتر، أو حتى بأقطار مسام أكبر. ومع ذلك، كلما زاد قطر المسام، انخفضت المساحة السطحية، وهو ما يمكن أن يحد من سعة العينة (**Sample capacity**). تتحلل العديد من حشوات هلام السيليكا إذا استُخدمت خارج نطاق الرقم الهيدروجيني 2–8.5. وفي محاولة لحل هذه المشكلة، تم تحضير حشوات باستخدام سيليكا عالية النقاوة وإجراءات ربط خاصة باستخدام السيلانات المستقرة (**Stable silanes**).
وهناك اهتمام متزايد أيضاً بحشوات بوليمر مشترك من البولي ستايرين-ديفينيل بنزين مكطوري المسام (**Macroporous PSDVB copolymer packings**) والتي تتسم بكونها خاملة كيميائياً ومستقرة عبر نطاق واسع من الرقم الهيدروجيني. وقد دُعِي إلى استخدام هذه المواد في بعض التطبيقات بما في ذلك تحليل مضاد الاختلاج فيجاباترين (**Vigabatrin**) والمركبات ذات الصلة (Cope and Davidson, 1987).

ومع ذلك، وبشكل عام، تُعدّ أعمدة (PSDVB) أقل كفاءة مقارنة وتلك المحشوة بمواد سيليسية؛ وتتمثل المشكلات الأخرى في ميلها لعدم الاستقرار عند الضغوط العالية والميل المعتمد على المذيب الشاطف للتورم أو الانكماش.
كما قُدِّح الكربون الجرافيتي المسامي (**Porous graphitic carbon - PGC**)، والمتاح تجارياً تحت اسم **Hypercarb** (من شركة Shandon)، كحشوة لنظام (HPLC) (Knox et al., 1986). وعلى الرغم من كون أعمدة (PGC) خاملة كيميائياً وذات قوة ميكانيكية جيدة، إلا أنها عرضة لتكوين الفراغات. بالإضافة إلى ذلك، يعتمد شكل القمة، إلى حد ما، على طبيعة المذيب الشاطف، كما أن الكفاءة وشكل القمة كلاهما يتناقصان بسرعة كبيرة مع زيادة معامل الاستبقاء (k). ويُعدّ حامض ثلاثي فلوروأسيتيك معدلاً مفيداً في تحليل كل من المركبات الحامضية والقاعدية (Lim, 1991)، ولكن لا توجد حتى الآن طريقة بسيطة للتحكم في الانتقائية.

التعديل الكيميائي للسيليكا Chemical Modification of Silica

عادةً ما يُغسل هلام السيليكا بالحامض، وربما باستخدام حامض النتريك و/أو حامض الهيدروكلوريك، لإزالة أيونات المعادن. وبعد الغسل بالماء المقطر لجعل السيليكا متعادلة الحموضة، تُجفف المادة طوال الليل عند درجة حرارة 120 درجة مئوية ($°C$). ولإجراء التعديل الكيميائي، توضع السيليكا في دورق مع التولوين المجفف أو مذيب مناسب آخر، ويُضاف كاشف سيلان أحادي أو ثنائي أو ثلاثي الوظيفة (**Mono-, di-, or trifunctional silane reagent**).
ويمكن أن تكون المجموعة الوظيفية (المُغادرة) عبارة عن هاليد (**Halide**)، أو مجموعة ميثوكسي أو إيثوكسي (**Methoxy or ethoxy moiety**). وعموماً، ترتبط مجموعة وظيفة واحدة فقط لتكوين رابطة (Si–O–Si). وبشكل أقل تكراراً، تتفاعل مجموعتان وظيفيتان لتكوين روابط (Si–O–Si)متجاورة. أما المجموعات الوظيفية المتبقية على كل جزيء كاشف

فتتحلل مائياً لتكوين مجموعات سيلانول بعد اكتمال التفاعل الأول. ومجموعات السيلانول الإضافية هذه الناتجة عن التحلل المائي للكواشف ثنائية وثلاثية الوظيفة يمكن أن تترابط مع بعضها البعض بالقرب من سطح دعم السيليكا، ولهذا السبب تُسمى الأطوار المرتبطة والمصنوعة بأي كاشف ثنائي أو ثلاثي الوظيفة بالأطوار **"البوليمرية" (Polymeric phases)**. وبقياس التماثل، فإن أي مادة حشو مصنوعة باستخدام كاشف سيلان أحادي الوظيفة يُشار إليها بالطور **"المونوميري" (Monomeric phase)**.

غالباً ما تظهر للأطوار المونوميرية والبوليمرية انتقائيات مختلفة. ولا يمكن لكاشف سيلان أحادي الوظيفة سوى الارتباط بمجموعات السيلانول السطحية، بينما يُزال أي فائض عن طريق المعالجة بالماء:

$$2\begin{bmatrix} R_r \\ R\text{–}Si \mid \\ X \end{bmatrix} + H_2O \longrightarrow \begin{matrix} R_r \\ R\text{–}Si \mid \text{–}Si\text{–}R + 2HX \\ O \\ \mid_{R_r} \quad \mid_{R_r} \end{matrix}$$

حيث تُمثل (R)مجموعات مثل: (C_{18})، (C_8)، وسيانوبروبيل **(Cyanopropyl)**، وما شابه ذلك، بينما تُمثل (R_r)مجموعة ألكيل أقصر (ميثيل، إيثيل، أو بروبيل). وتضفي مجموعة الألكيل الأصغر هذه حجماً فراغياً أقل على الكاشف، مما يعزز تغطية أكثر اكتمالاً لمجموعات السيلانول السطحية.

واعتماداً على ظروف التفاعل -التي قد تشمل إضافة الماء إلى خليط التفاعل- ومعالجة ما بعد التفاعل، يمكن تحقيق نطاق من تراكيز الأطوار الثابتة على سطح السيليكا. ويمكن التحقق من نسبة التحميل السطحي للكربون ($C\%$) عن طريق تحليل الكربون والهيدروجين الروتيني؛ بينما قد يكون تحليل النيتروجين مفيداً للأطوار المحتوية على الأمين والنتريل، فضلاً عن بعض حشوات الأطوار الكيرالية المحتوية على النيتروجين. مع ذلك، ستعتمد التغطية السطحية أو كثافة الارتباط (**Bonding density**) على المساحة السطحية للسيليكا؛ إذ من الواضح أن الأعمدة ذات تحميل الكربون المتساوي والمساحات السطحية المختلفة ستدعم كثافات ارتباط مختلفة. علاوة على ذلك، إذا كانت السيليكا تمتلك توزيعاً واسعاً لحجم المسام، فقد تكون التغطية السطحية غير متساوية، وقد يكون حساب كثافة الارتباط بناءً على تحميل الكربون والمساحة السطحية مضللاً.
ويحاول كل مصنع إبقاء أرقام تحميل الكربون أو تغطية الطور المرتبط ثابتة قدر الإمكان لتحقيق قابلية إعادة الإنتاج بين الدفعات (**Batch-to-batch reproducibility**). بطبيعة الحال، يختلف كل رقم باختلاف طول السلسلة أو عدد الحلقات العطرية على سيلان الاستخدام؛ فكلما كانت السلسلة الأليفاتية أطول أو زاد عدد الحلقات العطرية، زاد الوزن المضاف لكل جزيء مرتبط. وعادة ما يتراوح تحميل الكربون في النطاق 5–25%، بينما تتراوح التغطية السطحية بين 1.19 إلى 3.8 ميكرومول متر (μmol m^{-2}). ولا يمكن تفاعل كل سيلانول سطحي بسبب الإعاقة الفراغية (**Steric hindrance**)، والتي تظهر بشكل أكثر وضوحاً عند ارتباط سيلانات ذات وزن جزيئي مرتفع (M_r).

إذا صُنعت مادة الحشو من نفس الكاشف والسيليكا الأساسية، فبشكل عام، كلما زاد تحميل الكربون، زادت قدرة الاستبقاء لأي تركيبة محددة من المذيب الشاطف والمادة المحللة. وسيحتوي العمود ذو تحميل الكربون الأقل على نسبة أكبر من السيلانول المتبقي (غير المتفاعل). ومن الممكن أخذ المادة المرتبطة واشتقاق السيلانول المتبقي باستخدام كاشف مثل تريمليثيل كلوروسيليان (**TMCS**) أو هساميثيلديسلازان (**HMDS**)، وتُعرف هذه العملية بـ **"التغطية النهائية" (End-capping)**. ونظراً لصغر الوزن الجزيئي (M_r) لهذه الكواشف، فإنها لا تضيف الكثير إلى تحميل الكربون (فقط 0.1–0.2% كربون

بالوزن) مقارنة بالطور المرتبط الأولي. وبالطبع، لا يمكن تغطية جميع الأطوار المرتبطة نهائياً؛ فالتفاعلات المذكورة أعلاه تتفاعل مع مجموعات الديول والأمين على سبيل المثال.

تُحضّر أعمدة الديول (**Diol columns**) باستخدام كاشف سيلان بالتركيب الحبيبي ($Si–O–CHOH–CH_2OH$). أما أعمدة النتريل والأمين فتُصنع غالباً من ثنائي ميثيل سيانوبروبيل سيلان وثنائي ميثيل أمينوبروبيل سيلان على التوالي. ويُصنع العديد من مواد التبادل الأيوني عبر تفاعلات متعددة الخطوات؛ فعلى سبيل المثال، بعد ربط مجموعة فينيل بروبيل ($Si–CH_2–CH_2–CH_2–C_6H_5$)بسطح السيليكا، يؤدي سلفنة الحلقة إلى الحصول على مادة **تبادل كاتيوني قوي (SCX - Strong Cation Exchange)**. وبالمثل، يمكن تحويل أمين ثانوي مرتبط إلى مركب رباعي لتكوين طور **تبادل أنيوني قوي (SAX - Strong Anion Exchange)**.

اختيار الطور المرتبط Bonded-Phase Selection

تشمل المعلمات المهمة التي يجب مراعاتها عند تحديد الأطوار الثابتة المراد تقييمها لتطبيق جديد:

1. شكل الجسيمات (كروية أو غير منتظمة).
2. حجم المسام والمساحة السطحية.
3. نوع الارتباط (طور مونوميري أو بوليميري).
4. طول السلسلة المرتبطة.
5. تحميل الكربون (أو التغطية بوحدة ميكرومول متر إن توفرت من المصنع).
6. ما إذا كان الطور مغطى نهائياً (**End-capped**).

وهناك معلمات أخرى قد لا تتوفر إلا عن طريق القياس المباشر وهي: الرقم الهيدروجيني لسطح السيليكا ونسبة تغطية السيلانول السطحي. يجب اختبار ملاءمة العمود لعملية فصل معين كجزء من عملية تطوير الطريقة. وينبغي أن يعطي عمود مختلف من نفس النوع ومن نفس المصنع نفس النتائج، ولكن نفس نوع العمود من مصنع مختلف قد يعطي نتائج مختلفة. وقد تحتاج مثل هذه الأعمدة إلى التحسين فيما يتعلق بتكوين المذيب الشاطف لجعل الفصل وأزمنة استبقاء المادة المحللة في نفس النطاق تقريباً للعمود المستخدم مبدئياً. وقد يعتمد ترتيب الشطف على الحشوات ذات السيلانول المتبقي على درجة الحموضة (pH). وسيلزم ضبط معدل التدفق (السرعة الخطية - **Linear velocity**) إذا كانت أقطار الأعمدة المختبرة مختلفة.

استقرار حشوات السيليكا Stability of Silica Packings

يجب دائماً اتباع تعليمات المصنع المتعلقة بالتخزين السليم والاستخدام لأعمدة (HPLC). وتتمثل العيوب الكبرى لهلام السيليكا في أنه قابل للذوبان في الماء، وإلى حد ما في الميثانول. وهذا صحيح بغض النظر عما إذا كانت السيليكا معدلة كيميائياً أو غير معدلة، على الرغم من أن مادة الطور المرتبط يجب أن تذوب بمعدل أبطأ نظرياً. وكلما زادت القوة الأيونية للمذيب الشاطف وارتفع الرقم الهيدروجيني (pH)، كان انحلال مادة الحشو أسرع. وبشكل عام، يجب عدم استخدام الحشوات القائمة على السيليكا في نطاق يرتفع عن pH 7.5–8.0. وقد يؤدي خلط محاليل المنظمات أو كواشف تكوين الأزواج الأيونية مع المذيبات العضوية إلى رفع الرقم الهيدروجيني الظاهري (pH^*)، ربما إلى قيم تزيد عن 8 . تكون الأطوار الثابتة المرتبطة عبر روابط ($Si–O–Si$)مستقرة بشكل عام، إلا في الظروف الحامضية القوية (أقل من $2pH$) كما هو مذكور أعلاه. ومع ذلك، فإن الحشوات المعدلة بالأمين تكون تفاعلية بشكل خاص (مثل تفاعلها مع الألدهيدات والكيتونات) ويجب استخدامها بحذر. أما الحشوات الأخرى للسيليكا المنتجة عن طريق الارتباط الموقعي (**In situ bonding**) أو طرق البوليمرات المطلية فتكون

أكثر استقراراً في وجود الماء عند درجات الحموضة المتطرفة، ولكن قد يكون لها قيود أخرى تتعلق بالتوافق مع المذيبات العضوية.

الأعمدة أحادية الكتلة Monolithic Columns

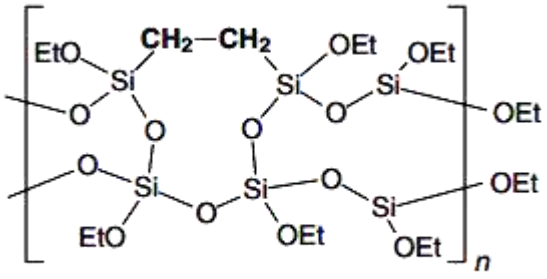
في الكروماتوغرافيا الغازية (GC)، يوفر استخدام أعمدة شعرية أنبوبية مفتوحة رقيقة الأغشية (**Thin-film open-tubular capillary columns**) ذات سعة حرارية منخفضة وغاز حامل خامل ذي لزوجة منخفضة نقلاً سريعاً للكتلة بين الأطوار وضغوطاً عكسية منخفضة. وهذا يؤدي إلى عمليات فصل عالية الكفاءة، لا سيما عند دمجها مع برمجة درجات الحرارة، مما يمنح تقنية تحليليّة قوية. وفي حين أن تقنية (HPLC) تمتلك العديد من الميزات المكملة للكروماتوغرافيا الغازية (GC)، فإن عيوب (HPLC) التقليدية تتمثل في بطء نقل الكتلة بين الأطوار والقيود الناجمة عن الضغط العكسي للعمود. علاوة على ذلك، فإن بطء نقل الكتلة داخل الأطوار وبينها يجعل الاعتماد على الأعمدة الأبوبية المفتوحة أمراً غير عملي. في أعمدة (HPLC) المحشوة التقليدية، يجب أن يتدفق المذيب الشاطف عبر المسام الموجودة في جسيمات الحشو أو عبر الفراغات بين الجسيمات. وفي محاولة لتجنب بعض المشكلات المرتبطة بالأعمدة المحشوة من خلال توفير مسار تدفق متاح بسهولة داخل العمود، دُرست مجموعة متنوعة من المصفوفات البديلة. ومن بين "الأوساط المستمرة" (**Continuous media**) التي تم تطويرها، جرى دراسة الأعمدة أحادية الكتلة (**Monolithic columns**) بشكل مكثف، وطُرحت في الأسواق أعمدة (HPLC) تعتمد على "كتلة أحادية" من السيليكا المسامية (**Porous silica monolith**) (Nakanishi and Soga, 1991) (مثل أعمدة Chromolith من شركة Merck). تتكون الأعمدة أحادية الكتلة من قضيب واحد، صلب أو شبه صلب، واسع المسام (**Macroporous**، بمتوسط حجم مسام يبلغ حوالي 2 ميكرومتر). ومثل الأوساط المستمرة الأخرى، تسمح الأعمدة أحادية الكتلة بمعدلات تدفق أعلى مقارنة بالأعمدة المحشوة التقليدية مع بقاء الضغوط العكسية للعمود ضمن حدود معقولة. وغالباً ما توفر المسام الأصغر داخل بنية المادة أحادية الكتلة سعة المادة المحللة (**Analyte capacity**). وقد تم تطوير نوعين من الأعمدة أحادية الكتلة للكروماتوغرافيا هما: بوليمرات عضوية تعتمد على الميثاكريلات، أو البولي ستايرين، أو البولي أكريلاميد، وبوليمرات غير عضوية تعتمد على السيليكات. ومن بين هذه الأنواع، توفر أعمدة سيليكات الكتلة الأحادية المتاحة حالياً مع مجموعة من الأطوار المرتبطة (http://www.merck.de/servlet/PB/menu/1229750/index.html، تاريخ الدخول 4 أغسطس 2007) إمكانيات معززة لتحليل (HPLC) السريع (Smith and McNair, 2003; Bugey and Staub, 2004; Samanidou et al., 2004)، على الرغم من بقاء بعض المخاوف المتعلقة بقابلية إعادة الإنتاج التي يمكن تصنيع أعمدة الكتلة الأحادية بها.

أعمدة الجسيمات الهجينة Hybrid Particle Columns

تجمع تكنولوجيا الجسيمات الهجينة (**Hybrid particle technology - HPT**, Waters) بين خصائص السيليكا والبوليمرات العضوية لإنتاج أعمدة ذات قوة ميكانيكية متزايدة. وتستغل تقنية الكروماتوغرافيا السائلة فائقة الأداء (**UPLC - Ultra-performance liquid chromatography**) حشوات (HPT) من الجيل الثاني تعتمد على هجينة إيثيل سيلوكسان/سيليكا مجسرة (**BEH - Bridged ethylsiloxane/silica hybrids**) والمصنوعة عن طريق تفاعل تترا إيثوكسي سيلان مع بيس(ثلاثي إيثوكسي سيلان) إيثان بنسبة (4:1) (**الشكل 11**).

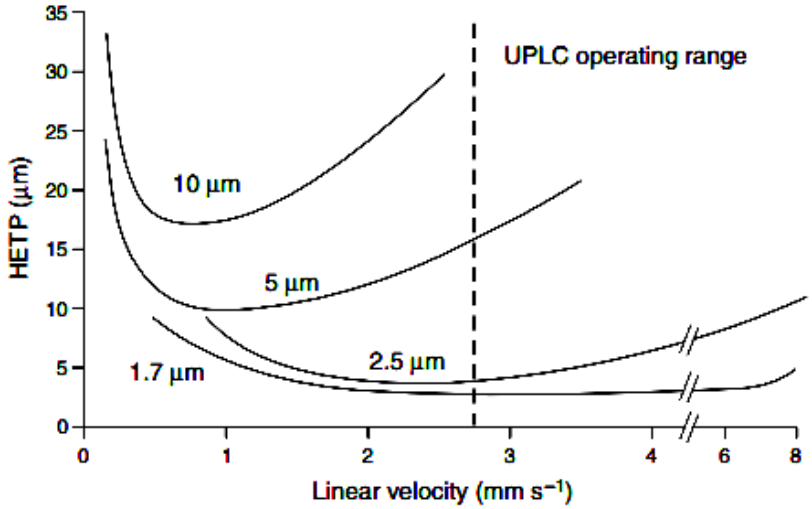
ونظراً لأن حشوة (BEH) قادرة على تحمل ضغوط حشو تصل إلى 172,000 كيلو باسكال (25,000 رطل لكل بوصة مربعة - psi) وضغوط تشغيل تصل إلى 103,500 كيلو باسكال (15,000 رطل لكل بوصة مربعة)، فإن تقنية (UPLC)

تستخدم جسيمات بحجم 1.7 ميكرومتر وأعمدة ذات تجويف دقيق لتحقيق كفاءة أعلى (**الشكل 12**)، مما ينتج عنه حساسية متزايدة وأزمنة تحليل أقصر (Wyndham et al., 2003; Lurie, 2005). وقد صُممت هذه الأعمدة للاستخدام مع نظام Waters Acquity UPLC والأنظمة المشابهة، والتي صُممت للتعامل مع الضغوط الأعلى والكفاءات المتزايدة المتحققة.



Polyethoxysiloxane

الشكل 11: مثال على حشوة (HPLC) هجينة مجسرة من إيثيل سيلوكسان/سيليكا. *Figure.11 Example of a bridged (ethylsiloxane/silica hybrid HPLC packing).*



الشكل 12: تأثير حجم الجسيمات والسرعة الخطية على ارتفاع الصفيحة المكافئ (*HETP*). *Figure.12 Effect of particle size and linear velocity on HETP).*

أنماط الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء Modes of HPLC

تشمل أنماط (HPLC) المتاحة: كروماتوغرافيا الامتزاز (**Adsorption**)، وتوزيع سائل-سائل (**Liquid-liquid partition**)، والتبادل الأيوني (**Ion-exchange**)، والأزواج الأيونية (**Ion-pair**)، واستبعاد الحجم (**Size-exclusion**)، والكروماتوغرافيا التقاربية أو الألفة (**Affinity chromatography**). ويتيح كل نمط تركيبات مختلفة من التفاعلات الجزيئية بين المادة المحللة والأطوار الثابتة والمتحركة، مما يوفر فرصة لضبط الانتقالية بلا حدود تقريباً. وعادة ما يُستخدم التوزيع أو التبادل الأيوني للمادة المحللة بين طور ثابت مرتبط كيميائياً بمادة دعم خاملة والطور المتحرك. وفي الممارسة العملية، قد تعمل عدة آليات مختلفة في وقت واحد.

كروماتوغرافيا الطور الطبيعي Normal-Phase Chromatography

تُعرف مجاورة طور متحرك غير قطبي وطور ثابت قطبي بـ **"كروماتوغرافيا الطور الطبيعي"** (**Normal-phase chromatography**). ويُجسَّد هذا النمط في كروماتوغرافيا الامتزاز باستخدام هلام السيليكا كطور ثابت، حيث تُحتجز المواد المحللة عن طريق الامتزاز على مجموعات السيلانول القطبية الموجودة على سطح السيليكا. والمذيبات الشاطفة

النموذجية في هذا النمط هي الألكانات مثل الهبتان، أو الألكانات المعدلة بالكحول. وتكون الكحولات طبقة ثنائية على سطح السيليكا، ويمكن تعديل مثل هذه الطبقات بأيونات قابلة للمتزاج. وتتمثل الطريقة المنهجية لاختيار مذيب مناسب لـ (HPLC) في مثل هذه الحالات فيما يلي:

1. استبعاد المذيبات ذات الخصائص الفيزيائية والكيميائية غير المناسبة (نقطة الغليان، اللزوجة، الامتصاص فوق البنفسجي، إلخ).
2. اختيار المذيبات من المذيبات المتبقية التي تعطي استبقاءً مناسباً ($2 \leq k \leq 10$).
3. إجراء الاختيار النهائي بناءً على الفصل المناسب (α) للمكونات محل الاهتمام.

ويمكن تقدير قطبية المذيب بواسطة **قوة المذيب (Solvent strength)**، والتي يمكن حسابها بقيمة الإضافة لكل مذيب إذا تم استخدام خليط. ومن الممكن إعادة إنتاج مذيبات شاطفة متوافقة مع كاشف (HPLC) من أنظمة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة التقليدية (**TLC**؛ Snyder and Kirkland, 1979). ونظراً لأن المذيب الشاطف لا يحتوي على ماء، فمن الضروري تقديم المادة المحللة في وسط غير مائي بعد إجراء استخلاص السائل-السائل (**LLE**) أو استخلاص الطور الصلب (**SPE**)، على سبيل المثال. وتشمل المواد الماصة الأخرى المستخدمة في كروماتوغرافيا الطور الطبيعي إما بشكل مباشر أو بعد التعديل الكيميائي: الألومينا [أكسيد الألومنيوم، (Al_2O_3)] وأكسيد الزركونيوم [الزركونيا، (ZrO_2)]، ولكن لا يُستخدم أي من المادتين على نطاق واسع في التحليلات السمية. كما دُرست حشوات هلام البولي ستايرين؛ حيث يُعزى الاستبقاء هنا إلى التفاعل بين المادة المحللة وإلكترونات باي (π-electrons) في المجموعة العطرية، وعلى الرغم من القول بأن الاستبقاء يكون في الطور الطبيعي عندما يُستخدم الهبتان كطور متحرك، إلا أنه يُقال إن الاستبقاء يصبح في **"الطور المعكوس" (Reversed-phase)** إذا استُخدم الميثانول. ينطبق هذا أيضاً في حال استخدام السيليكا المعدلة بالأمينوبروبيل أو السيانوبروبيل كطور ثابت.

كروماتوغرافيا الطور المعكوس Reversed-Phase Chromatography

تستخدم كروماتوغرافيا الطور المعكوس (**"Reversed-phase" HPLC**) مذيباً شاطفاً قطبياً وطوراً ثابتاً غير قطبي. وعادةً ما يكون الطور الثابت عبارة عن سيليكا معدلة بإضافة مجموعات سيلانية من أوتاكتاديسيل (**ODS,** C_{18})، أو أوكتيل (C_8)، أو إيثيل (C_2)، أو ميثيل (C_1)، أو فينايل بروبيل (فينايل - **Phenyl**). وهناك العديد من الأنواع المختلفة للأطوار اعتماداً على ظروف التحضير والتخليق؛ حتى أن أطوار (C_{18}) تختلف فيما بينها عند الحصول عليها من شركات مصنعة مختلفة. وعلى الرغم من أن الطور المعكوس هو النمط الأكثر شعبية في الفصل بـ (HPLC)، إلا أن ميكانيكية الاستبقاء غالباً ما تكون غير واضحة، سيما فيما يتعلق بالمناطق المحللة القطبية. وقد تسهم آليات التوزيع (**Partition**)، والامتزاز (**Adsorption**)، والآليات الأيونية في استبقاء المواد المحللة المختلفة تحت نفس ظروف المذيب الشاطف والعكس صحيح. وينعكس هذا في حقيقة أن تأثير تغيير نسبة الماء في المذيب الشاطف على الاستبقاء قد لا يكون قابلاً للتنبؤ.

وُصفت استراتيجيات التحسين لكروماتوغرافيا الطور المعكوس على أعمدة سيليكا معدلة بالأورغانوسيلان (Naish-Chamberlain and Lynch, 1990). وفي حين أن هذه الاستراتيجيات ممتازة جداً للمركبات الحامضية والمتعادلة، إلا أنها قد لا تكون قابلة للتطبيق على الأدوية القاعدية، لا سيما عندما تطغى التفاعلات الأيونية مع الطور الثابت. وهناك أربعة تفاعلات بين جزيئية رئيسية بين المذيب والمذاب في الكروماتوغرافيا السائلة: التشتت (**Dispersion**)، وثنائي القطب (**Dipole**)، الرابطة الهيدروجينية (**Hydrogen bonding**)، والعازلة للكهرباء (**Dielectric**).

- تتمثل تفاعلات التشتت في التجذب بين كل زوج من الجزيئات المتجاورة.

- تحدث تفاعلات ثنائي القطب القوية عندما يكون لكل من العينة والمذيب عزم ثنائي القطب دائم مصطف.
- تحدث تفاعلات الروابط الهيدروجينية القوية بين مانحي البروتون ومستقبلي البروتون.
- تفضل التفاعلات العازلة للكهرباء ذوبان الجزيئات الأيونية في المذيبات القطبية.

ويُعدّ التفاعل الكلي للمذيب والعينة هو مجموع التفاعلات الأربعة. ويُعرف التفاعل الكلي لجزيء العينة أو المذيب بالطريقة الرباعية بـ **"قطبية" الجزيء (Polarity)**. تحل المذيبات القطبية الجزيئات القطبية، وبالنسبة لكروماتوغرافيا توزيع الطور الطبيعي، تزداد قوة المذيب مع قطبية المذيب، بينما تنخفض قوة المذيب مع زيادة القطبية في أنظمة الطور المعكوس (Snyder and Kirkland, 1979).

مذيبات المذيب الشاطف النموذجية في كروماتوغرافيا الطور المعكوس هي الميثانول و/أو الأسيتونتريل المعدل بإضافة الماء لضبط الاستبقاء والانتقائية. وتؤدي إضافة الماء إلى زيادة قطبية المذيب الشاطف، مما يؤدي عموماً إلى زيادة استبقاء المادة المحللة. كما أن إضافة الماء إلى الميثانول تزيد بشكل ملحوظ من اللزوجة وبالتالي ترفع الضغط العكسي للعمود، مع تساوي العوامل الأخرى. وتميل مخاليط الماء:الأسيتونتريل إلى أن تكون أقل لزوجة مقارنة بمخاليط الماء:الميثانول، وهذا -إلى جانب الحد الأدنى المنخفض للأشعة فوق البنفسجية لأسيتونتريل عالي النقاء فوق البنفسجي- يُعدّ من الأسباب التي قد تجعل الأسيتونتريل مفضلاً. ولصعوبة فصل المركبات غير القابلة للذوبان في الميثانول، أو الأسيتونتريل، أو رباعي هيدروفوران (**THF**) والماء، يمكن استخدام مخاليط ثنائي كلورو ميثان:الميثانول أو THF:الميثانول كمذيب شاطف، إلا أن استخدام مثل هذه المخاليط يعد أمراً غير شايع.

أوساط الوصول المقيد (**Restricted access media - RAM**) هو مصطلح عام يُطلق على حشوات كروماتوغرافيا الطور المعكوس ذات حجم المسام الكبير والتي تهدف إلى فصل البروتينات وغيرها من المركبات عالية الوزن الجزيئي ($High\ M_r$) مع الاحتفاظ وفصل المركبات كارهة الماء (**Hydrophobic**) مثل الأدوية (**Section 3.2.1**). وكانت كروماتوغرافيا الطور المعكوس للسطح الداخلي (**ISRP - Internal surface reversed-phase**) أول مجموعة عمود/مذيب شاطف يتم اقتراحها (Hagestam and Pinkerton, 1985; Cook and Pinkerton, 1986). ومع ذلك، يجب الحفاظ على الرقم الهيدروجيني للمذيب الشاطف عند حوالي 7 ويجب استخدام مذيب غني بالماء لتقليل خطر ترسيب البروتينات. وعلى الرغم من صدور بعض المنشورات عنها (Rainbow et al., 1989; Rainbow et al., 1990)، إلا أن النظام ليس واسع الانتشار. وتُعدّ أعمدة السطح شبه النفاذ (**SPS**) والطور المحجوب كاره الماء (**Hisep**) متغيرات أخرى لهذا النهج وقد جرى تقييمها في بعض التطبيقات (Haque and Stewart, 1999).

كروماتوغرافيا التبادل الأيوني Ion-Exchange Chromatography

كروماتوغرافيا التبادل الأيوني هي عملية تُنجذب فيها المادة المحللة المؤينة بقوى أيونية (كهروستاتيكية) نحو أنواع ذات شحنة معاكسة على الطور الثابت. وعندما تحمل المادة المحللة شحنة موجبة ويحمل الطور الثابت شحنة سالبة، تسمى التقنية **كروماتوغرافيا التبادل الكاتيوني (Cation-exchange chromatography)**، وعندما تنعكس الشحنات تُعرف بـ **كروماتوغرافيا التبادل الأيوني السالب أو الأنيوني (Anion-exchange chromatography)**. تتكون المذيبات الشاطفة المستخدمة في كروماتوغرافيا التبادل الأيوني التقليدية عموماً من محاليل مائية لملح مناسب أو خليط من الأملاح، مع إضافة كمية صغيرة أحياناً من مذيب عضوي. قد يكون خليط الملح في حد ذاته منظماً، أو يمكن استخدام منظم منفصل. المكون الأساسي للمذيب الشاطف هو الأيون المقابل (**Counter ion**)، والذي تتمثل وظيفته في شطف مكونات العينة من العمود في

وقت معقول. في كروماتوغرافيا التبادل الكاتيوني، يؤدي وجود أيونات أخرى موجبة الشحنة في المذيب الشاطف إلى تقليل استبقاء المادة المحللة. وعوماً، تُحتجز أيونات المذاب بالترتيب التالي:

$$Ba^{2+} < Ca^{2+} < Cu^{2+} < Zn^{2+} < Mg^{2+} < K^{+} < NH_4^{+} < Na^{+} < H^{+} < Li^{+}$$

وبناءً عليه، إذا استُخدم K^+كأيون مقابل بدلاً من Na^+، فإن شطف المادة المحللة يكون أسرع. أما في كروماتوغرافيا التبادل الأنيوني، يكون ترتيب الاستبقاء على النحو التالي:

$$Citrate < SO_4^{2-} < oxalate < NO_3^{-} < Br^{-} < SCN^{-} < Cl^{-} < CH_3COO^{-} < OH^{-} < F^{-}$$

ونظراً لأن المذيب الشاطف هو محلول يحتوي على أملاح غير عضوية مختلفة، يمكن تغيير الاستبقاء بواسطة أنواع مختلفة من الأملاح، وتراكيزها، والرقم الهيدروجيني للمذيب الشاطف (pH). في الوقت الحاضر، يُستخدم نوعان رئيسيان من المصفوفات، هما: هلام السيليكا والمواد البوليمرية العضوية. ومن بين هذه الأنواع، يُستخدم هلام السيليكا في (HPLC). وتتسم معظم مواد التبادل الأيوني القائمة على السيليكا بكونها ذات تبادل أنيوني قوي أو تبادل كاتيوني قوي (**SAX or SCX**، على التوالي).

يُعرف تحليل (HPLC) للأنيونات غير العضوية والعضوية مثل الكلوريد، والنترات، والأوكسالات، والسلفات، غالباً باسم **كروماتوغرافيا الأيونات (IC - Ion Chromatography)**. وهي مجموعة فرعية متخصصة من كروماتوغرافيا التبادل الأيوني يُستخدم فيها عمود مثبط (**Suppressor column**) لتبادل الأيون المقابل لأيون المادة المحللة بعد عمود الفصل، وبالتالي تعزيز الكشف عن التوصيلية لأيونات المادة المحللة. تكون قياسات الأنيونات ضرورية أحياناً في علم السموم التحليلي؛ فأيون البروميد -على سبيل المثال- هو مستقلب لمخدر الهالوثان (**Halothane**)، وبالفعل استُخدمت أملاح البروميد كمضادات للاختلاج. وعلى الرغم من الاعتقاد السائد بأنها تتطلب جهازاً مخصصاً، إلا أنه يمكن استخدام أعمدة ومعدات (HPLC) التقليدية لإجراء كروماتوغرافيا الأيونات (Wheals, 1987).

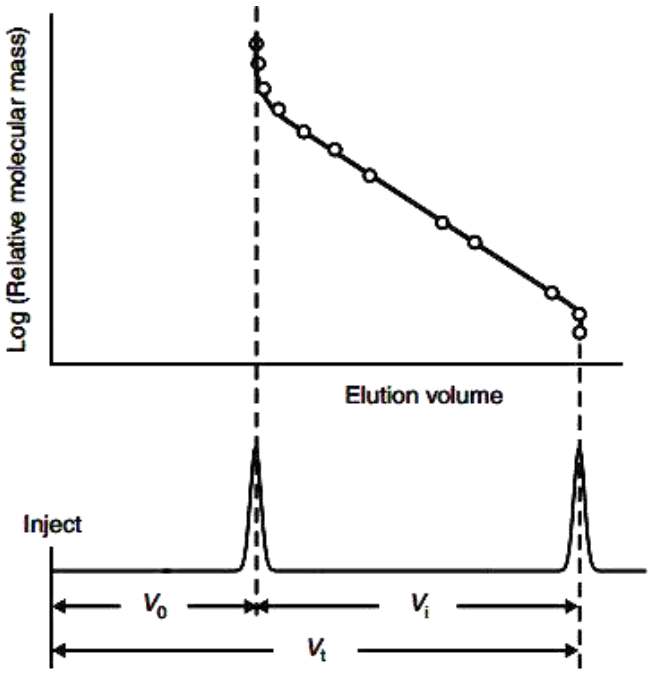
كروماتوغرافيا الأزواج الأيونية Ion-Pair Chromatography

على الرغم من إمكانية فصل المركبات الأيونية بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني، إلا أن نمط التبادل الأيوني قد لا يعطي الانتقائية المطلوبة. وبدلاً من ذلك، يمكن استخدام كروماتوغرافيا الأزواج الأيونية (**Ion-pair chromatography**) مع عمود سيليكا معدل بـ (C_{18})، على سبيل المثال. ووفقاً للتفسير الأبسط، يقترن أيون المادة المحللة بأيون ذي شحنة معاكسة مُضاف إلى المذيب الشاطف لإنتاج نوع متعادل (**زوج أيوني - Ion-pair**) يمكن فصله بواسطة توزيع الطور المعكوس. وتشمل عوامل تكوين الأزواج الأيونية النموذجية سلفونات الألكانات (**Alkane sulfonates**) ومكثفات الأمونيوم الرباعي الألكانية (**Alkane quaternary ammonium compounds**). ونظراً لأن المواد المحللة والأيونات المقابلة مؤينة وبالتالي محبة للماء (**Hydrophilic**)، فإن المذيبات الشاطفة النموذجية هي مخاليط الميثانول أو الأسيتونتريل مع المنظم المائي.

كروماتوغرافيا استبعاد الحجم Size-Exclusion Chromatography

تعتمد كروماتوغرافيا استبعاد الحجم (**SEC - Size-Exclusion Chromatography**) على الشكل الفعال وحجم الجزيئات في المحلول. وتُسمى أيضاً كروماتوغرافيا نفاذ الهلام (**GPC - Gel-Permeation Chromatography**) إذا استُخدمت مع المذيبات العضوية، أو كروماتوغرافيا ترشيح الهلام (**GFC - Gel-Filtration Chromatography**) إذا استُخدمت مع المذيبات المائية. والأطوار الثابتة عبارة عن جسيمات مسامية ذات أحجام مسام متحكم بها بدقة. وخلافاً لأنماط

(HPLC) الأخرى، يجب ألا يكون هناك أي تفاعل في (SEC) بين المادة المحللة وساحة الطور الثابت -وإذا لزم الأمر، يمكن معالجة حشوات السيليكا بـ (TMCS) لتقليل تأثيرات الامتزاز-. وعندما تكون المواد المحللة أكبر من حجم المسام، فإنها تخرج في حجم الفراغ للعمود (V_0). أما الجزيئات الأصغر بكثير من حجم المسام فتكون قادرة على الانتشار بحرية في الحجم الداخلي (V_i) لمادة الحشو وتخرج في حجم مساوٍ للحجم الكلي للعمود (V_t). بينما الجزيئات ذات الحجم المتوسط ستكون قادرة على اختراق بعض المسام، وستخرج في حجم يتراوح بين V_0وV_t، اعتماداً على حجمها (**الشكل 13**). تحتوي أعمدة (SEC) على نطاقات عمل محددة ويجب اختيارها على أساس حجم المواد المحللة المراد دراستها. وتُعاير الأعمدة باستخدام بولي ستايرات ذات وزن جزيئي معلوم (M_r؛ إذ يتناسب الحجم الهيدروديناميكي تقريباً طردياً مع M_r). ويُعدّ اختيار المذيب الشاطف بسيطاً نظراً لضرورة استخدام مذيب واحد فقط. وعلى الرغم من تطبيق (SEC) في الأصل بشكل أساسي لتوصيف البوليمرات، إلا أن لها الآن استخدامات عديدة في مجالات أخرى بما في ذلك تحليل البروتينات والببتيدات.



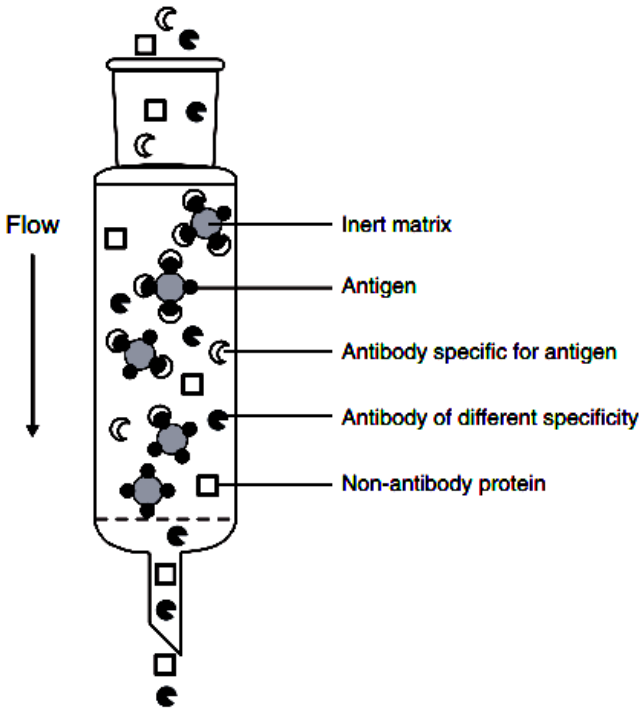
الشكل 13: منحنى معايرة نموذجي لكروماتوغرافيا استبعاد الحجم. *(Figure.13 Typical calibration curve for size-exclusion chromatography).*

كروماتوغرافيا الألفة (التقاربية) Affinity Chromatography

تعتمد تفاعلات الاستبقاء المذكورة أعلاه، في الغالب، على فروق صغيرة في القابلية للامتزاز، أو كارثية الماء (**Hydrophobicity**)، أو التفاعلات الأيونية للمواد المحللة (Hage, 1999). وتكون هذه التفاعلات عامة وليست خاصة بأي مادة محللة معينة، ولذلك يمكن فصل أنواع مختلفة من الجزيئات. وفي المقابل، تعتمد كروماتوغرافيا الألفة (**Affinity chromatography**) على تفاعل نوعي ومحدد مثل تفاعل إنزيم-ركيزة (**Enzyme–substrate**) أو جسم مضاد-مستضد (**Antibody–antigen interaction**). ويُعدّ هذا النوع من آلية التعرف الجزيئي تفاعلاً مهمّاً في عمليات فصل (HPLC)، ويمتد مفهوم كروماتوغرافيا الألفة ليشمل مشكلات فصل أخرى مثل الفصل الإنانتيومي والكيرالي. لفصل جسم مضاد -على سبيل المثال-، يجب تحضير ماص مناعي (**Immunoadsorbent**). يتكون هذا من مصفوفة صلبة رُبط بها المستضد (غالباً برابطة تساهمية). ويمكن استخدام الأجاروز (**Agarose**) أو السيفادكس (**Sephadex**، أي السليلوز المعدل)، أو بوليمرات أخرى كمصفوفة. وعند إضافة العينة، وطالما لم يتم تجاوز سعة العمود، فإن الأجسام المضادة الموجودة في الخليط والتي تكون نوعية للمستضد سترتبط (برابطة غير تساهمية) وتحتجز.

بينما ستمر الأجسام المضادة ذات النوعيات الأخرى وبروتينات المصل الأخرى دون عائق (**الشكل 14**). ويُمرر مذيب شاطف للاستخلاص عبر العمود لتحرير الأجسام المضادة من الماص المناعي. وغالباً ما تُستخدم المنظمات التي تحتوي على تركيز ملحي عالٍ و/أو درجة حموضة منخفضة لتعطيل تفاعل الجسم المضاد-المستضد.

كما أن العامل المُمسِخ (**Denaturing agent**)، مثل اليوريا بتركيز 8 مول لتر ($8\ mol\ L^{-1}$)، سيكسر التفاعل أيضاً عن طريق تغيير تكوين موقع ارتباط المستضد لجزيء الجسم المضاد. وهناك نهج آخر أكثر لطفاً يتمثل في الاستخلاص بشكل قابل للذوبان من المستضد؛ حيث تتنافس هذه مع الماص المناعي على مواقع ارتباط المستضد للأجسام المضادة وتحرر الأجسام المضادة من المصفوفة. ثُم يُدال الكاثول (**Eluate**) مقابل، على سبيل المثال، محلول كلوريد الصوديوم المنظم لإزالة كاشف الاستخلاص.



الشكل 14: مخطط توضيحي لكروماتوغرافيا الألفة. *(Figure Schematic of affinity chromatography.)*

الكروماتوغرافيا شبه التحضيرية والتحضيرية Semipreparative and Preparative Chromatography

نادراً ما تُستخدم الكروماتوغرافيا التحضيرية في علم السموم التحليلي، ولكن يمكن استخدامها للحصول على مواد مرجعية مثل المستقلبات والمعايير الداخلية إذا كانت غير متوفرة من مصادر بديلة. وعندما يتطلب الأمر عزل كميات كبيرة نسبياً من المادة المحللة (أكثر من 1 غرام)، تلزم أعمدة ذات قطر داخلي أكبر (10–15مل مم قطر داخلي) وأطوال أكبر. وعند تجاوز القطر الداخلي 25 مم تقريباً، تصبح الأعمدة المحشوة بمواد ذات حجم 3–5 ميكرومتر باهظة الثمن تدريجياً بسبب الكمية الكبيرة من مواد الحشو اللازمة، فضلاً عن صعوبة حشوها نظراً لضرورة وجود مضخات ذات معدل تدفق عالٍ لضخ حجوم كبيرة من الملاط. وفي الممارسة العملية، تُحمل الأعمدة التحضيرية دائماً بشكل مفرط لتوليد إنتاجية عالية للمنتج، لكن ذلك يتسبب في نفس الوقت في انخفاض الكفاءة. لذا، غالباً ما تُحشو هذه الأعمدة الكبيرة (أي القطر الداخلي 25 <مم) بمواد ذات حجم جسيمات أكبر (مثل 25–40 أو 40–63 ميكرومتر) لتقليل التكاليف. وعلى الرغم من انخفاض الكفاءة، طالما كانت الانتقائية هي نفسها المستخدمة في الفصل الأولي على العمود التحليلي، يمكن عادةً فصل المركب (المركبات) المستهدف، على الرغم من أن وقت التحليل قد يكون أطول (McDonald and Bidlingmeyer, 1987).

الفصل الكيرالي (فصل المتماكبات الفراغية) Chiral Separations

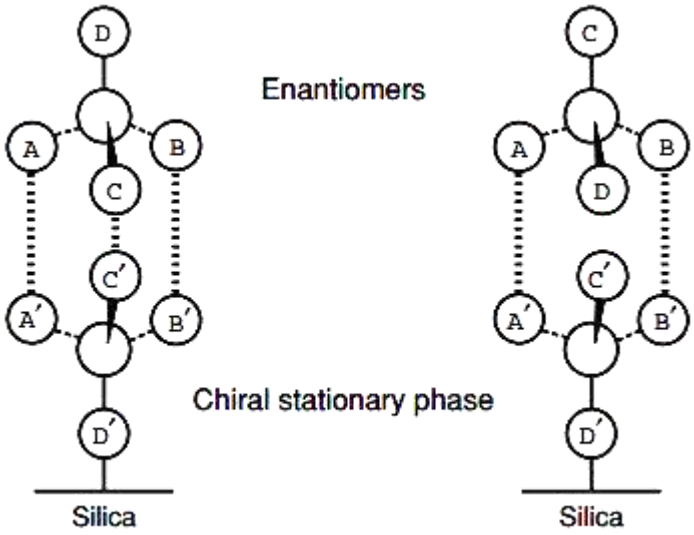
تُعدّ الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء الكيرالية (**Chiral HPLC**) أكثر تنوعاً من الكروماتوغرافيا الغازية الكيرالية (Chiral GC)؛ لأنه يمكن استخدامها مع المركبات غير المتطايرة (**Non-volatile compounds**)، وتُعتبر عموماً الطريقة المفضلة لفصل الإنانتيوميرات (**Enantiomers**)، فضلاً عن الأعمال شبه التحضيرية وحتى التحضيرية. ويمكن أن توفر تقنية (HPLC) تحليلات سريعة وقابلة لإعادة الإنتاج، وتتيح الكشف المستمر والكمي لكل من الكتلة والدوران البصري

للإنانتيوميرات، في حال استخدام الكواشف المناسبة. وتتمثل المشكلات في الاستخدام الروتيني في التكلفة العالية جداً لبعض الأعمدة وحقيقة أن حشوات الأعمدة المصممة لفصل الإنانتيوميرات قد لا تفصل المستقلبات؛ وبالتالي، قد يتطلب الأمر عمود (HPLC) تقليدياً ثانياً متسلسلاً مع عمود الأطوار الثابتة الكيرالية (**CSP column**).

يُعدّ الفصل الكيرالي مجالاً معقداً (Chen et al., 2005). وتشمل النهج المُعتمدة استخدام الأطوار الثابتة الكيرالية (**CSPs**)، واستخدام المضافات الكيرالية في أنظمة الطور المعكوس التقليدية، وكذلك تكوين المشتقات الكيرالية. وتعتبر عمليات الفصل الكيرالية المباشرة باستخدام (CSPs) أكثر انتشاراً وغالباً ما تكون أكثر قابلية للتنبؤ مقارنة وتلك التي تستخدم المضافات الكيرالية للمذيب الشاطف. وقد تم تسويق نحو 100 طور ثابت كيرالي لتقنية (HPLC)، ومع ذلك، لا يوجد طور ثابت واحد يمتلك القدرة على فصل جميع فئات المركبات الراسيمية (**Racemic compounds**).

تُصنع بعض الأطوار الثابتة الكيرالية عن طريق تثبيت إنانتيوميرات فردية على مصفوفة العمود. ويعتمد دقة أو فصل الإنانتيوميرات (**Enantiomer resolution**) على تكوين متماثلات دياسية مؤقتة (**Transient diastereoisomers**) على سطح حشوة العمود. وسيكون الإنانتيومير الذي يُكوّن المتماثل الدياسي الأكثر استقراراً هو الأشد احتجازاً. وتكون القوى المتضمنة ضعيفة جداً (عادةً ما يؤدي فرق في طاقة تفاعل حرة قدره 0.03 كيلو جول مول فقط بين زوج من الإنانتيوميرات والطور الثابت إلى حدوث الفصل)، وتتطلب تحبيذاً دقيقاً من خلال ضبط المذيب الشاطف ودرجة حرارة العمود لتعظيم الانتقائية. ولتحقيق التمييز بين الإنانتيوميرات، يجب أن توجد ثلاث نقاط تفاعل لأحد الإنانتيوميرات مع الطور الثابت الكيرالي (CSP)، على أن تكون واحدة على الأقل تابعة من الناحية المجسمة الفراغية (Pirkle and House, 1979) (**الشكل 15**). وتتمثل القوى بين الجزيئية المشاركة في التعرف الكيرالي في: التفاعلات القطبية/الأيونية، وتفاعلات باي-باي ($\pi - \pi$ interactions)، والتأثيرات كارهة الماء (**Hydrophobic effects**)، والروابط الهيدروجينية. ويمكن تعزيز هذه القوى من خلال تكوين متراكبات الادماج (**Inclusion complexes**) والارتباط بمواقع محددة مثل مواقع الببتيد أو المستشعرات في الأطوار المعقدة. ويمكن معالجة هذه القوى بين الجزيئية اختيارياً باختيار المذيبات الشاطفة المناسبة -فالتفاعلات القطبية، على سبيل المثال، يمكن التحكم بها عن طريق ضبط الرقم الهيدروجيني للمذيب الشاطف (pH). ويكتسي تأثير درجة الحرارة أهمية بالغة في تقنية (HPLC) الكيرالية؛ فالدرجات المنخفضة تزيد من التعرف الكيرالي، لكنها تقلل أيضاً من سرعة نقل الكتلة بين الأطوار مما ينتج عنه قمم أوسع. ونتيجة لذلك، غالباً ما توجد درجة حرارة مثلى لعملية الفصل، وهو ما يوفر عاملاً آخراً يمكن استغلاله في تطوير الطرق التحليلية.

غالباً ما يكون نوع العمود المطلوب لفصل فئة معينة من الإنانتيوميرات شديد التخصص، مما يجعل اختيار العمود لفصل معين يبدو معقداً. علاوة على ذلك، قد تحد التكلفة العالية للأعمدة الكيرالية من عدد الأطوار الثابتة الكيرالية (CSPs) المتاحة. ولحسن الحظ، فإن دراسة بنية الأطوار الكيرالية وتصور التفاعلات المحتملة مع المادة المحللة يمكن أن تضيق نطاق اختيار العمود بشكل ملحوظ. ويتمثل مفتاح تطوير فصل إنانتيومي ناجح لفئة معينة من الراسيمات على نظام معين في فهم آليات التعرف الكيرالية المحتملة التي قد تدخل حيز التنفيذ. ويجب مراعاة طبيعة المادة المحللة أو المادة المحللة المشتقة، والطور الثابت، والمذيب الشاطف. وأكثر الأطوار الثابتة الكيرالية فعالية هي تلك القائمة على الببتيدات السكرية الكبيرة حلقياً (**Macrocyclic glycopeptides**) والسيلدكسترينات (**Cyclodextrins**).



الشكل 15: تمثيل توضيحي للتعرف الكيرالي. التركيب ذو النقاط الثلاث للتفاعل (يسار) يُحتجز بقوة أكبر من إنانتيوميره ذي النقطتين فقط (يمين).

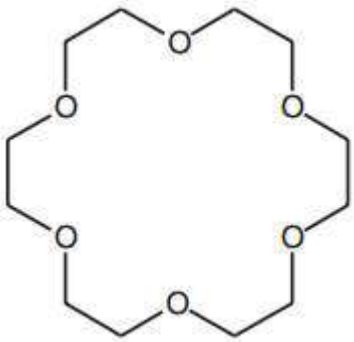
الأطوار الثابتة الكيرالية Chiral Stationary Phases (CSPs)

بوليمرات الأميلوز والسليلوز Amylose and Cellulose Polymers

تتكون هذه الأطوار الثابتة الكيرالية من أميلوز مشتق (نشا) أو بوليمرات سليلوز مطلية على دعامة من السيليكا (**Silica support**). وتشمل أطوار السليلوز المتاحة: ثلاثي أسيتات السليلوز متبلور الدقائق (**MCTA**)، وثلاثي بنزوات، وثلاثي فينايل، وكاربامات، وثلاثي (3،5-ثنائي ميثيل فينايل كاربامات)-سليلوز. وتُستخدم هذه الأطوار مع مذيبات شاطفة مثل: مخاليط الهكسان:الإيثانول، أو الهكسان:2-بروبانول، أو حتى الإيثانول بنسبة 100%. ويجب تجنب المذيبات المهلجنة؛ لأنها قد تؤدي إلى إزالة السليلوز من دعامة السيليكا. وتُظهر أطوار الأميلوز الثابتة الكيرالية انتقائية مختلفة مقارنة بأطوار السليلوز، لكنها أقل متانة. ونظراً لأن النشا قابل للذوبان في الماء، فيجب ألا تحتوي المذيبات الشاطفة على الماء مطلقاً.

إيثرات التاج Crown Engines (Crown Ethers)

تُعدّ أطوار إيثرات التاج الثابتة الكيرالية تراكيب حلقية تعتمد على وحدات متكررة من ($–OCH_2CH_2–$). ويعني الاسم 18-تاج-6 (1,4,7,10,13,16-هيكساأوكساسيكلوأكتاديكان، **الشكل 16**؛ الوزن الجزيئي $M_r = 264$) وجود 18 ذرة في الحلقة، 6 منها عبارة عن أكسجين. وتكون داخلية التجويف محبة للماء، بينما تكون الخارجية كارهة له. ويؤدي تغيير حجم إيثر التاج إلى تغيير حجم التجويف. تُعدّ إيثرات التاج مواد مسرطنة، ولكن يمكن تثبيتها لتشكيل أطوار ثابتة لـ (HPLC) تتفاعل مع الأمينات الأولية البروتونية. ويجب بالطبع استخدام مذيبات شاطفة حامضية. ويتوفر طور إيثر التاج الثابت الكيرالي الأكثر استخداماً، وهو 18-تاج-6، تجارياً (Daicel ,Crownpak). وتعطي أعمدة Crownpak عمليات فصل عالية الكفاءة وتتوفر في الشكلين (+) و(−)، مما يسمح بعكس ترتيب الشطف وهو ما قد يكون مفيداً، على سبيل المثال، إذا كان سيتم إجراء تحليل ضئيل لأحد الإنانتيوميرات في حضور فائض من الإنانتيومير الآخر.



الشكل 16: التركيب الجزيئي لـ 18-تاج-6. *(Figure.16 Molecular structure of 18-crown-6).*

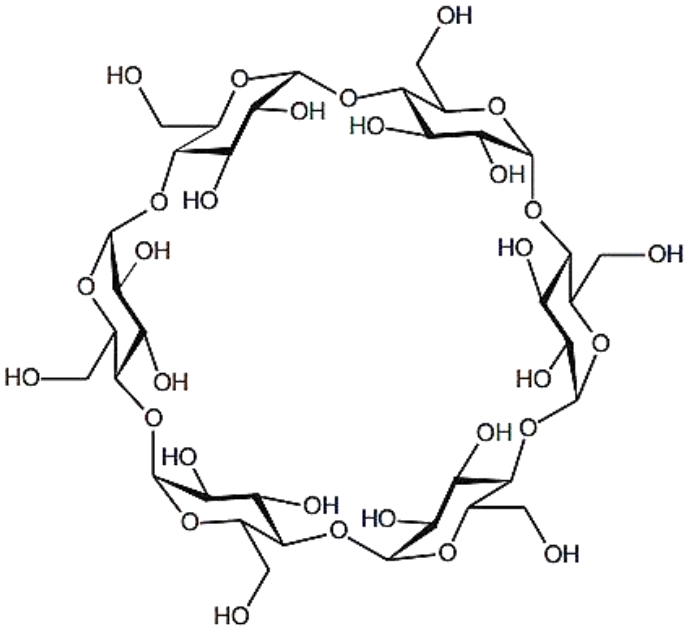
السيلدكسترينات (السيكلودكسترينات) Cyclodextrins

تُعدّ السيلدكسترينات المرتبطة بجسيمات السيليكا بحجم 5 ميكرومتر أطواراً ثابتة كيرالية شائعة. ويمكن استخدامها مع مخاليط الميثانول:المنظم المائي ومع المذيبات الشاطفة غير المائية. وتعني سعة العينة الجيدة أنها مفيدة في الأعمال التحضيرية.

تُنتج السيلدكسترينات عن طريق التدهور الجزئي للنشا يليه الارتباط الإنزيمي لوحدات دي-غلوكوز (**D-glucose units**) عبر روابط غليكوسيدية من نوع (4-1)-αإلى تراكيب حلقية متماثلة ومتبلورة (**Toroidal structures**) ذات أحجام جزيئية مختلفة.

- α-**سيلدكسترين** (سيكلوهكساميلوز، **الشكل 17**؛ الوزن الجزيئي $M_r = 973$).
- β-**سيلدكسترين** (سيكلوهيبتاميلوز؛ الوزن الجزيئي $M_r = 1135$).
- γ-**سيلدكسترين** (سيكلوأوكتاميلوز؛ الوزن الجزيئي $M_r = 1297$).

تحتوي هذه الجزيئات على 6 و7 و8 وحدات غلوكوز على التوالي. فعلى سبيل المثال، يحتوي β-سيلدكسترين على 35 مركزاً كيرالياً.



الشكل 17: التركيب الجزيئي لـ α-سيلدكسترين. *(Figure.17 Molecular structure of α-cyclodextrin).*

تتمتع فتحة جزيء السيلدكسترين ذي الشكل الحلقي (**Torus-shaped**) بمحيط أكبر من القاعدة، وهي مرتبطة بمجموعات الهيدروكسيل الثانوية لذرات الكربون (C_2) و(C_3) لكل وحدة أميلوز. أما مجموعات الهيدروكسيل الأولية فتتوضع في قاعدة

الحلقة على ذرات الكربون (C_6)، وتُستخدم هذه المجموعات لتثبيت السيلدكسترين على مصفوفة السيليكا. ويزداد حجم تجويف السيلدكسترين مع زيادة عدد وحدات الأميلوز في الجزيء. وعندما يتم اشتقاق (α-)، أو (β-)، أو (γ-سيلدكسترينات)، تتفاعل مجموعات الهيدروكسيل على المواضع-2 أولاً. ومع ذلك، يظل المشتق محتفظاً بخاصية **انتقائية الحجم (Size-selective)**، وتُحدد التفاعلات بواسطة حجم المواد المحللة بالإضافة إلى المجموعات الوظيفية الموجودة.

كروماتوغرافيا تبادل الليغاند (الرابط) Ligand-Exchange Chromatography

يمكن لكروماتوغرافيا تبادل الليغاند الكيرالية (**CLEC - Chiral Ligand-Exchange Chromatography**) فصل الإنانتيوميرات عبر تكوين متراكبات معدنية ديازيومية (**Diastereomeric metal complexes**؛ Kurganov, 2001). وتُستخدم هذه الطريقة أساساً في تحليل الأحماض الأمينية (**Amino acid analysis**). حيث يُربط متراكب حمض أميني-نحاس كيرالي بالسيليكا أو بطور ثابت بوليمري، وتُدمج أيونات النحاس في المذيب الشاطف. ويمكن بعد ذلك فصل الأحماض الأمينية عبر تكوين متراكبات نحاسية ديازيومية. ويقوم الماء بتثبيت المتراكبات، وتحدد العوامل الفراغية بعد ذلك أيّاً من المتراكبين يكون أكثر استقراراً؛ ففي إحدى الحالات، غالباً ما يُعيق الفراغ جزيء ماء من التنسيق مع النحاس. وقد استُخدمت فلزات انتقالية أخرى في تبادل الليغاند الكيرالي. وتُعدّ درجة الحرارة المثلى لمثل هذا العمل حوالي 50 درجة مئوية ($^{\circ}C$).

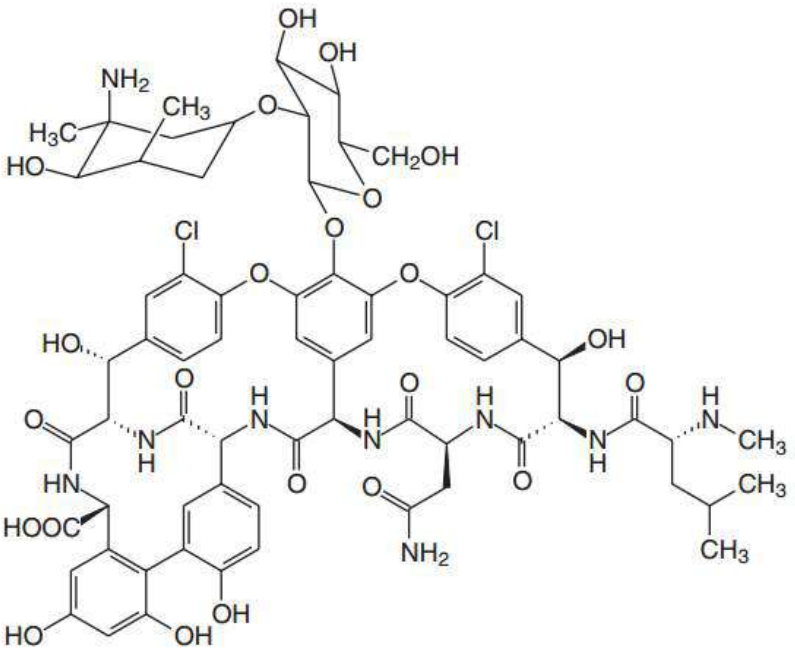
الببتيدات السكرية الكبيرة حلقياً Macrocyclic Glycopeptides

يمكن استخدام المضادات الحيوية كبيرة الحلقة (**Macrocyclic antibiotics**) مثل الريفاميسين (**Rifamycin**)، أو التيكوبلانين (**Teicoplanin**)، أو الفانكومايسين (**Vancomycin**) المرتبطة كيميائياً بهلام السيليكا كأطوار ثابتة كيرالية (Armstrong et al., 1994).

يحتوي الفانكومايسين (Chirobiotic V؛ الوزن الجزيئي $M_r = 1449$؛ **الشكل 18**) على 18 مركزاً كيرالياً تحيط بثلاثة "جيوب" أو "تجويفات" (A–C) مترابطة بخمس حلقات عطرية. وهو يمتلك بنية تشبه السلة مع "غلاف" كربوهيدراتي مرن واحد. علاوة على ذلك، فهو يحتوي على مجموعة من الوظائف المفيدة للفصل الإنانتيومي [روابط هيدروجينية، وجيوب كارهة للماء (تكوين متراكبات إدماج)، ومجموعات عطرية (interaction $\pi - \pi$)، ومجموعات قابلة للتأين]. وتتسم أطوار الفانكومايسين الثابتة الكيرالية بأنها مستقرة، وتمتلك سعة عينة عالية نسبياً، ويمكن استخدامها مع مذيبات شاطفة غير مائية أو مائية في نطاق الرقم الهيدروجيني 4.0–7.0. وقد استخدمت منظمات نترات الأمونيوم، وأسيتات ثلاثي إيثيل الأمونيوم، وسترات الصوديوم مع هذه المواد.

يحتوي التيكوبلانين (Chirobiotic T؛ الوزن الجزيئي $M_r = 1885$) على 20 مركزاً كيرالياً، وثلاث مجموعات كربوهيدراتية، وأربع حلقات منصهرة تحيط بأربعة "جيوب". ويُقال إن أطوار التيكوبلانين الثابتة الكيرالية تكمل أطوار الفانكومايسين، ويمكن استخدامها مع مذيبات شاطفة مشابهة. وتكون أطوار التيكوبلانين مستقرة في نطاق الرقم الهيدروجيني 3.8–6.5، على الرغم من إمكانية استخدامها خارج هذه الحدود لفترات قصيرة. ومما يثير الاهتمام أن هذا الطور الثابت الكيرالي يعطي استبقاءً أطول ودقة مفصولة متزايدة كلما زادت نسبة المعدل العضوي في المذيب الشاطف. كما استُخدم الأفوبارسين (Chirobiotic A)، وهو خليط بنسبة (1:4) من (α-) و(β-أفوبارسين) (الوزن الجزيئي 1909 و1944 على التوالي)، كطور ثابت كيرالي. يحتوي أغليكون الأفوبارسين على ثلاث حلقات كبيرة حلقية شبه صلبة متصلة (واحدة بـ 12 ضلعة، واثنتان بـ 16 ضلعة) تشكل جيوب إدماج محتملة. ويحتوي هذا الببتيد السكري على سبع حلقات عطرية مع أربع مجموعات فينول، وأربع سلاسل كربوهيدراتية، و16 مجموعة هيدروكسيل، وحامض كربوكسيلي واحد، وأمينين أوليات،

وأمين ثانوي واحد، وست روابط أميد، وذرة كلور واحدة أو ذرتين لكل من (α-) و(β-أفوبارسين) على التوالي، و32 مركزاً كيرالياً.



الشكل 18: التركيب الجزيئي للفانكومايسين. *(Figure Molecular structure of vancomycin).*

أطوار بيركل من نوع الفرشاة Pirkle Brush-Type Phases (Brush-Type Phases)

تتكون هذه الأطوار الثابتة الكيرالية من مواد كيرالية منخفضة الوزن الجزيئي مرتبطة بهلام السيليكا (Pirkle and House, 1979). وكل مجموعة مرتبطة تمتلك عدداً محدودة من المراكز الكيرالية، ولكن نظراً لصغر المجموعات المتضمنة، يمكن ارتباط عدد كبير منها بسطح السيليكا. ويترتب على ذلك احتمال كبير نسبياً لتفاعل المواد المحللة مع المركز الكيرالي. وتكمن ميزة أطوار الفرشاة الثابتة الكيرالية في أنه نظراً لصغر مجموعة الطور الثابت المتفاعلة وعدم احتجاز المواد المحللة بقوة، فإن الانتقائية الكيرالية هي العامل المهيمن المؤثر على الاستبقاء. وهناك نوعان رئيسيان من أطوار بيركل الثابتة الكيرالية: **مستقبلات باي (π-acceptors) ومانحات باي (π-donors)**. أكثر أطوار مستقبلات باي شيوعاً هو (N-(3,5-دينيتروبنزويل)-فينيل غلايسين) المرتبط بسيليكا معدلة بالأمينوبروبيل. وتقدر هذه الأطوار على فصل نطاق واسع من المركبات التي تمتلك مجموعة عطرية مانحة لباي، والتي يمكن إدخالها عن طريق الاشتقاق باستخدام كلوريد النافثويل أو كاشف مناسب آخيرا.

ومن المزايا الأخرى لأطوار الفرشاة سهولة تخليقها؛ حيث يمكن تحضير أطوار ثابتة مرتبطة باليوريا عن طريق حقن الإيوسيانات الكيرالي المناسب على أعمدة سيليكا معدلة بالأمينوبروبيل (Buckley and Whelpton, 1992).

وقد أُعدّ طور (Spherisorb Chiral 2) (N-1-نافثيلهيل-N'-بروبيلوريا) بحقن الإيوسيانات، بينما أُعدّ (Chiral 1) (N-1-فينيليثيل-N'-بروبيلوريا) بالطريقة الأكثر تقليدية عبر تفاعل السيلان المناسب مع السيليكا. وليس من السهل دائماً التنبؤ بكيفية سلوك حتى المركبات المرتبطة بنيوياً على هذه الأطوار؛ فعلى سبيل المثال، تم فصل الأمفيتامين (**Amfetamine** -كمشتق 3,5-دينيتروبنزاميد) على طور (Chiral 2)، ولكن ليس على (Chiral 1) [**الشكل 19 (أ)**]. وفي المقابل، فُصل مشتق النورفنفلورامين جزئياً على طور (Chiral 1)، وليس كلياً على طور (Chiral 2) [**الشكل 19 (ب)**]. أما الترانيلسيبرومين (**Tranylcypromine** -باعتباره 3,5-دينيتروبنزاميد أيضاً) فقد فُصل على كلا الطورين الثابتين [**الشكل 19 (ج)**].

تتوفر أطوار بيركل الثابتة الكيرالية (Pirkle brush-type CSPs) تجارياً بسهولة وبتكلفة معقولة (مثل منتجات شركتي Regis وSumitomo). ويمكن لهذه الأعمدة أن توفر انتقائية جيدة وبالتالي سعة عينة عالية نسبياً. وتكمن عيوبها في أن الأعمدة لا تفصل سوى المركبات العطرية فحسب، ولذلك قد يتطلب الأمر إجراء اشتقاق (غير كيرالي - **Achiral derivatization**) للمساعدة في عملية الفصل.

وقد استُخدم طور ثابت كيرالي مُشتق من (ثنائي ميثيل N-3,5-دينيتروبنزويل-α-أمينو-2,2-ديميثيل-4-بينتينيل-فوسفونات) المرتبط تساهمياً بسيليكا معدلة بالميركابتوبروبيل بحجم 5 ميكرومتر (طور Burke-II) لتحليل إنانتيوميرات حاصرات بيتا غير المشتقة (**Underivatized β-blockers**) (Pirkle and Burke, 1991). وأدى خفض درجة الحرارة إلى تقليل استبقاء الإنانتيوميرين الأقل احتجازاً وزيادة استبقاء الإنانتيوميرين الأشد احتجازاً دون حدوث اتساع ملحوظ في الحزمة. ويعتمد الفصل بين الإنانتيوميرات (α) على الفرق في طاقة غيبس الحرة (ΔG) للتفاعلات مع الطور الثابت الكيرالي (CSP):

$$\ln(\alpha) = \frac{(\Delta G)_R - (\Delta G)_{SR}}{RT}$$

حيث (R) هو ثابت الغازات، و(T) هي درجة الحرارة المطلقة. وإذا كان التفاعل مدفوعاً بالمحتوى الحراري (**Enthalpy driven**)، فإن خفض درجة الحرارة يزيد من (α)، غير أن التنبؤ بتأثير تغير درجة الحرارة ليس سهلاً؛ فقد وُجد أن بعض عمليات الفصل تمتلك درجة حرارة مثلى. ولا تزال أطوار فرشاة كيرالية جديدة تُطرح في الأسواق؛ فعلى سبيل المثال، جرى وصف طور ثابت كيرالي "مختلط" من نوع الفرشاة (مانح لباي، مستقبل لباي - donor-π, acceptor-π) مُشتق من ((R)-N-(3,5-دينيتروبنزويل) أليلغلايسين-2,6-ديميثيل أنيليد) (Uzunov et al., 1995). كما استُخدمت أطوار الكاربامات للكينيدين (**Quinidine carbamate CSPs**) لفصل الأحماض الإنانتيوميرية عبر التفاعل الأيوني مع المجموع القاعدي المثبت. وإذا استُخدم طور الكينين (**Quinine-CSP**) بدلاً من الكينيدين، فإن ترتيب الشطف لزوج الإنانتيوميرات المدروس ينعكس (Lämmerhofer et al., 2004).

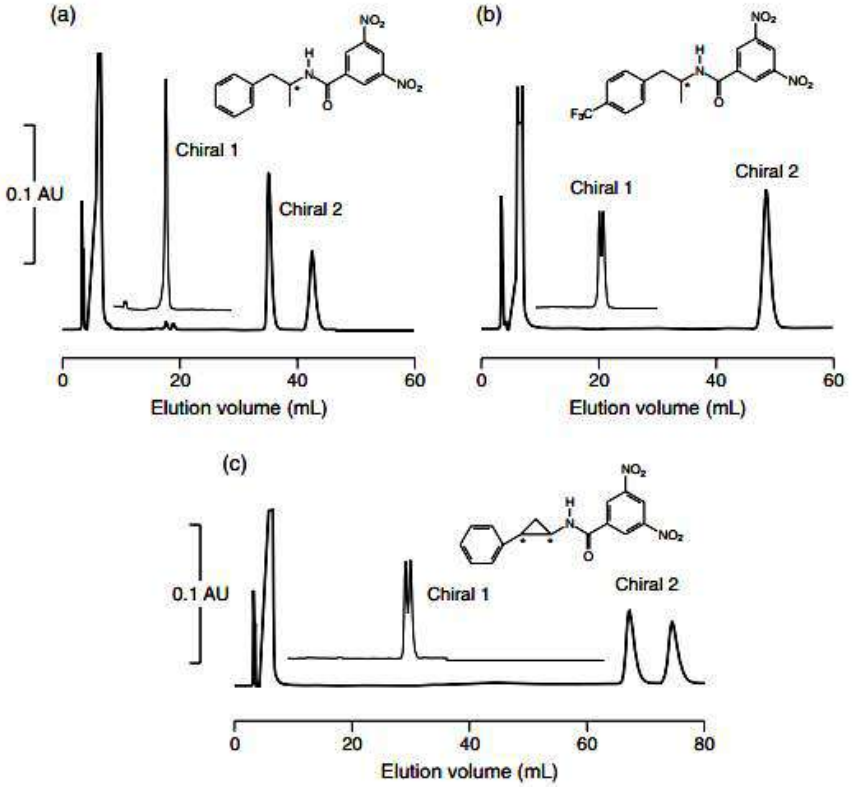
الأطوار القائمة على البروتينات Protein-Based Phases

وُصفت أطوار ثابتة كيرالية تعتمد على زلال الألبومين البشري (**HSA - Human serum albumin**) أو بروتين غليكوزيد حمض ألفا-1 (**Acid glycoprotein-α_1 - AAG**) (Fitos et al., 1992). وتشمل أطوار البروتين الكيرالية الأخرى زلال الألبومين البقري (**BSA**) وبروتينات البيض (**Ovomucoid**). ولاستخدامها كأطوار ثابتة كيرالية، يتم تثبيتها عادةً على سيليكا كروية بحجم 5 ميكرومتر. وتعمل مضافات المذيب الشاطف مثل أوكتيلامين على تقليل الاستبقاء الكلي وزيادة الانتقائية الكيرالية. وتكون الأعمدة القائمة على زلال الألبومين البشري مفيدة بشكل خاص لفصل المركبات الحامضية، وثنائية القطب المتعادلة (**Zwitterionic**)، وغير الحالة للبروتونات (**Nonprotolytic**). ويمكن فصل إنانتيوميرات المركبات الحامضية دون اشتقاق. وقد يكون بروتين (AAG) أكثر ملاءمة للبروتينات القاعدية. أما الراسيمات التي لا ترتبط ببروتين البلازما فلن تُفصل باستخدام هذه الأعمدة.

المضافات الكيرالية للمذيب الشاطف Chiral Eluent Additives (CEAs)

تتمتع مضافات المذيب الشاطف الكيرالية ببعض المزايا وبعض العيوب مقارنة بالأطوار الثابتة الكيرالية (**الإطار 4**). وتتعدد أنواع هذه المضافات لتشمل: الأزواج الأيونية، ومتراكبات الإدماج، وتبادل الليغاند، والتفاعل البروتيني. ويمكن استخدام عوامل الأزواج الأيونية الكيرالية مع السيليكا غير المعدلة، على الرغم من أن سعة التحميل منخفضة للغاية. وتُفصل

الإنانتيوميرات كأزواج أيونية ديازيومية؛ فعلى سبيل المثال، فُصلت إنانتيوميرات البروبرانولول (**Propranolol**) باستخدام حامض الطرطريك كأيون مقابل. وتشمل الأيونات المقابلة الأخرى المستخدمة بهذه الطريقة: الكينين، و(*N*-بنزوكسي كاربونيل غليسيريل-L-برولين)، و((+)-حامض 10-كامفورسلفونيك).



الشكل 19: تحليل مشتقات 3,5-دينيتروبنزاميد لكل من: (أ) الأمفيتامين، (ب) النورفنفلورامين، و(ج) الترانيلسيبرومين. الأعمدة: مم 4.6 × 250قطر داخلي Spherisorb 5 Chiral 1 وChiral 2. المذيب الشاطف: هكسان:ثنائي كلورو إيثان:إيثانول (1 :10 :50). معدل التدفق: $^{-1}$مل دقيقة 1. الكشف: بالأشعة فوق البنفسجية عند 254 نانومتر. (مُقتبس بإذن من الجمعية الملكية للكيمياء نقلاً عن Whelpton and Buckley, 1992b).

الإطار 4: مزايا وعيوب مضافات المذيب الشاطف في تقنية (HPLC) الكيرالية

- **المزايا:**
  - إمكانية استخدام أعمدة قياسية (أقل تكلفة).
  - احتمالية توفر سعات تحميل عالية.
  - إمكانية تعديل طبيعة المذاب (مثل تكوين الأزواج الأيونية).
  - توفر نطاق واسع من المضافات.
  - الأعمال شبه التحضيرية أو التحضيرية غير مقيدة بتوفر الأعمدة.
- **العيوب:**
  - ضرورة إزالة الانتقائي الكيرالي بعد التحليل في بعض الأحيان.
  - صعوبة تطوير عمليات الفصل نسبياً.
  - احتمالية ارتفاع التكلفة على نطاق واسع ما لم يتم إعادة تدوير المضافات.
  - سمية إيثرات التاج المرتفعة التي تمنع استخدامها كمضافات شاطفة كيرالية (CEAs).

قد يتم تكوين متراكبات الإدماج (**Inclusion complexes**) عن طريق إضافة السيلدكسترين إلى المذيبات الشاطفة المائية. وفي بعض الأحيان، يمكن التنبؤ بعملية الفصل من خلال النتائج المستحصل عليها على أطوار سيلدكسترين ثابتة كيرالية (CSPs)، على الرغم من أن ترتيب الشطف غالباً ما يكون معكوساً. ويمكن استخدام الاستخلاص الحامضي أو القاعدي لإزالة السيلدكسترينات من السائل الخارج من العمود. أما النهج الثاني فيتمثل في استخدام استخلاص الطور الصلب (**SPE**) على عمود (C_{18}). وبعد التحميل، يُغسل عمود (SPE) بمخلوط الميثانول:الماء بنسبة (1:9) لإزالة السيلدكسترين وأي أملاح منظمة، ثم تُشطف المادة المحللة باستخدام الميثانول.

ويمكن إجراء كروماتوغرافيا الليغاند (**Ligand chromatography**) باستخدام منتقي كيرالي مثل (*N*-أكيل-L-هيدروكسي برولين) مع خلات النحاس الثنائي (Cu(II) acetate) في المذيب الشاطف على عمود (C_{18}). ويلتصق المنتقي الكيرالي بشدة على الطور الثابت؛ فإذا استُخدمت مذيبات شاطفة غنية بالماء، فسيكون هناك القليل جداً من تسرّب العمود (**Column bleed**)، وبالتالي يمكن حذف مضاف المذيب الشاطف الكيرالي (CEA) من المذيب الشاطف أثناء التحليل الفعلي. وقد استُخدم كلٌّ من زلال الألبومين البقري وبروتين غليكوزيد حمض ألفا-1 (AAG) كمضافات للمذيب الشاطف الكيرالي (CEAs). ويمكن إضافة زلال الألبومين البقري إلى المذيب الشاطف المائي بتعكيز يبلغ حوالي 3 غرام لتر ($3\ g\ L^{-1}$) ويُستخدم مع أعمدة (C_{18})، أو (CN)، أو أعمدة الديول. وعلى الرغم من رخص ثمنه، إلا أن له حداً أدنى للامتصاص فوق البنفسجي عند 340 نانومتر مما يحد من استخدامه. ويتميز (AAG) بكونه شفافاً في نطاق الأشعة فوق البنفسجية (**UV transparent**)، ولكنه -لكونه منتج دم بشري- باهظ الثمن. ومثل الأطوار الثابتة البروتينية، فإن سعة التحضير منخفضة للغاية. وأخيراً، يمكن استخدام الأعمدة المحشوة بالكربون الجرافيتي المسامي (**PGC**) لفصل المتماكبات المجسمة (**Stereoisomers**) بعد التعديل الامتزازي للسطح باستخدام كاشف كيرالي أو بإضافة معدلات مذيب شاطف كيرالية (Dolphin, 1989).

المشتقات في الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء Derivatives for HPLC

باستثناء تسهيل عمليات الفصل الكيرالية، تُجرى عملية الاشتقاق (**Derivatization**) في نظام (HPLC) عادةً لتعزيز الحساسية/الانتقالية، وتتوفر كواشف لإضفاء خصائص الامتصاص فوق البنفسجي، والفلورية، والخصائص الكهروكيميائية على الناتج (Imai, 1987; Lingeman and Underberg, 1990). والحاجة إلى وجود مجموعة وظيفية قابلة للاشتقاق على المادة المحللة أمر بديهي لا يحتاج لتوضيح. ويمكن استخدام العديد من الكواشف إما في وضع ما قبل العمود أو ما بعد العمود. وكما هو الحال في الكروماتوغرافيا الغازية (GC)، يوجد دائماً خيار الاشتقاق ما قبل العمود (**Section 3.7**)، ولكن هذا الخيار:

1. يغير الخصائص الكروماتوغرافية للمادة المحللة.
2. قد يؤدي أيضاً إلى اشتقاق مكونات عينة غير مرغوب فيها.
3. قد يجعل اختيار المعيار الداخلي (**Internal standard**) أكثر صعوبة.

أما بالنسبة لأعمال ما بعد العمود، فسيكون التفاعل المثالي مكتملاً في غضون ثوانٍ قليلة، ولكن بشرط أن يكون التفاعل من الرتبة الأولى فيما يتعلق بالمادة المحللة ومن الرتبة الصفرية فيما يتعلق بالمتفاعلات، ستكون الإشارة متناسبة طردياً مع تركيز المادة المحللة. ومع ذلك، من الأهمية بمكان ضمان ثبات أزمنة التفاعل؛ ولذلك، يكون استهلاك الكاشف أعلى مقارنة بالاشتقاق ما قبل العمود نظراً لضرورة الحفاظ على فائض كبير. ولا يُستخدم استسقاء الاشتقاق لزيادة الامتصاصية فوق البنفسجية على نطاق واسع في علم السموم التحليلي والمجالات المرتبطة به. فقد قُدّرت العديد من الكواشف المتاحة للاستخدام مع كواشف

الطول الموجي المفرد المبكرة. ونتيجة لذلك، يعتمد العديد منها على مجموعات (p-نيتروبنزويل) أو (p-نيتروفينيل) التي لها أقصى امتصاص (λ_{max}) عند حوالي 254 نانومتر، وهو خط انبعاث قوي في مصابيح الزئبق. ويمكن معالجة مركبات الكاربونيل بـ (2,4-ديتروبينزيل هيدرازين)، مما يعطي هيدرازونات بـ λ_{max}عند 360 نانومتر ومعامل انقراض ($\epsilon \approx$ 20,000 L cm^{-1} mol^{-1}) وعند 254 نانومتر ($\epsilon \approx$ 10,000 L cm^{-1} mol^{-1}).

المشتقات الفلورية Fluorescent Derivatives

توفر المشتقات الفلورية حساسية معززة مقارنة بالكشف بالأشعة فوق البنفسجية. ويمكن اشتقاق الأمينات الأولية باستخدام (o-فثالديلديهايد - **OPA**) في وجود ثيول (2-ميركابتوإيثانول، N-أتيليسيتين، 3-ميركابتوبروبيونات، ثالثي-بوتيليثيول) أو سلفيت الصوديوم، وبطرق أخرى أُسست في المقام الأول لتحليل الأحماض الأمينية. ويُعيب (2-ميركابتوإيثانول) عدم استقرار المشتقات، ولكن إذا أُجري التفاعل في جهاز أخذ عينات آلي مناسب (**Autosampler**)، فيمكن التحكم في زمن التفاعل بعناية. يُعدّ الكشف الفلوري غير حساس نسبياً لتغيرات معدل تدفق المذيب الشاطف، ومن ثم فإن النهج البديل هو الاشتقاق ما بعد العمود، والذي يتميز بمزايا إمكانية تحليل المادة المحللة مباشرة. والهدف هو تحقيق تكوين مشتق سريع وانتقائي في وجود المذيب الشاطف مع الحد الأدنى من "خلفية" الكاشف (**Reagent "background"**). ويُعدّ (OPA) كاشفاً جيداً بشكل خاص لإجراءات ما بعد العمود؛ لأنه "صامت" بمعنى أنه لا يمتلك فلورية ذاتية.

المشتقات النشطة كهربائياً Electroactive Derivatives

يُعدّ تكوين المشتقات النشطة كهربائياً لـ (HPLC) أمراً غير شايع، لا سيما وأن الكشف الكهروكيميائي (ED) شديد الحساسية لتغيرات معدل التدفق وبالتالي لا يُعدّ الاشتقاق ما بعد العمود خياراً متاحاً عادةً. وتُعدّ مشتقات (OPA) نشطة كهربائياً، وقد يكون الكشف الكهروكيميائي مفيداً لا سيما مع المواد المحللة المشتقة في أكثر من موقع والتي لا تتألق بسبب الإخماد (**Quenching**). وقد جرى تحليل المشتق المتكون من تفاعل حامض غاما-أمينو باكلوفين (**Baclofen**) مع (OPA/ثالثي-بوتيليثيول) بواسطة نظام (HPLC-ED). ويُعدّ (2,3-نافتالينديالهايد - **NDA**) في وجود أيون السيانيد بديلاً لـ (OPA) (Lunte et al., 1989; Kline and Matuszewski, 1992). أما الأمثلة الأخرى للمشتقات النشطة كهربائياً فهي ذات اهتمام بحثي إلى حد كبير ولا تُستخدم حالياً في علم السموم التحليلي والمجالات ذات الصلة. وبشكل عام، يجب تخليق كواشف الاشتقاق المطلوبة خصيصاً (**Custom synthesized**).

المشتقات الكيرالية Chiral Derivatives

يُجرى الاشتقاق الكيرالي دائماً ما قبل العمود؛ نظراً لأن الغرض هو الفصل وليس تعزيز الكشف (Toyo'oka, 2002; Kato et al., 2001; Kraml et al., 2005). وتتلخص متطلبات كاشف الاشتقاق الكيرالي المثالي في **الإطار 5**. ومن الواضح أن الاشتقاق الكيرالي سيكون الملاذ الأخير في الأعمال شبه التحضيرية أو التحضيرية.

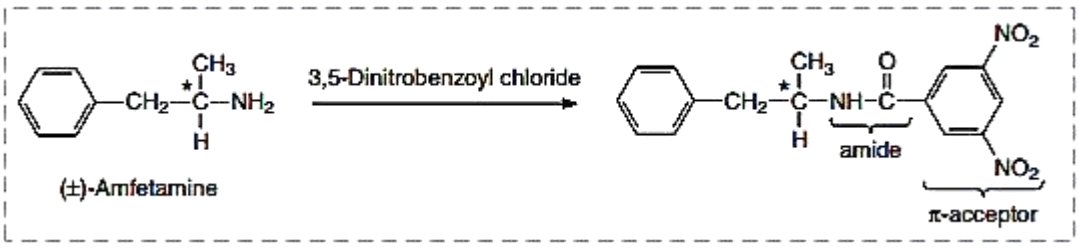
الإطار 5: متطلبات كاشف الاشتقاق الكيرالي المثالي

- نقاوة بصرية عالية جداً (عدم وجود تلوث بالمتماثل المقابل).
- تفاعل سريع ومكتمل تحت ظروف خفيفة لتجنب حدوث الراسَمة (**Racemization**).
- خلو الكاشف ونواتج الثانوية من التداخل مع المواد المستهدفة في الكروماتوغرافيا.
- استقرار المشتقات المتكونة أثناء الفصل الكروماتوغرافي.

- إضفاء خصوصية على كشف المشتق (مثل امتصاص UV أو الفلورية).

يتطلب إتمام عمليات الفصل على الأطوار الثابتة الكيرالية (CSPs) من نوع فرشاة مستقبلات باي (acceptor brush--π type / Pirkle) أن تحتوي المادة المحللة على مجموعة مستقبلة لباي (**acceptor-π**)، مثل مجموعة النيترو العطرية. وتشمل الكواشف المتاحة بسهولة: كلوريد 3,5-دينيتروبنزويل (**dinitrobenzoyl chloride-3,5**)، و4-نيتروفينيل إيوسيانات (**nitrophenyl isocyanate-4**)، و2,4-دينيتروبنزيل هيدرازين، وبروميد 4-نيتروفيناسيل، والتي يمكن اختيارها بناءً على المجموعة الوظيفية المراد اشتقاقها (أمين، كحول، حامض كربوكسيلي، إلخ) (Whelpton and Buckley, 1992a).

ويمكن تحويل الأحماض الكربوكسيلية إلى كلوريدات الحامض والتفاعل مع 2,4-دينيتروانيلين. وتُعدّ مشتقات الأميد، واليوريا، والكاربامات هي الأنسب؛ نظراً لتوفرها مواقع لتكوين الروابط الهيدروجينية وتراكم ثنائي القطب (**Dipole stacking**)، وهو نقطة تفاعل ثانية. أما التفاعل الثالث فهو الترتيب الفراغي للمجموعات حول المركز غير المتماثل (**Asymmetric centre**) (**الشكل 20**). وعادةً ما تكون مشتقات الاستر أقل نجاحاً مقارنة بالأميدات. ويُعدّ الاشتقاق باستخدام كاشف كيرالي لتكوين متماثل ديازيومي (**Diastereoisomer**) والتحليل اللاحق على طور ثابت تقليدي وغير كيرالي خياراً إضافياً آخر. تعتمد التفاعلات الأساسية المستخدمة في الاشتقاق الكيرالي للأحماض الأمينية والكحولات الأمينية على تكوين الأميدات، والكاربامات، واليوريا، والإيزويوريا. كما تُستخدم تفاعلات الأميد الديازيومية على نطاق واسع لفصل الأمينات الأولية. وبالنسبة للكشف بالأشعة فوق البنفسجية/المرئية، تُفضل بالطبع المشتقات التي تمتص في النطاق المرئي؛ لأن ذلك يمنح انتقائية معززة وبالتالي حساسية أعلى. وتتوفر أيضاً عدة عوامل مؤلقة فلورية (**Chiral fluorigenic agents**).



الشكل 20: اشتقاق الأمفيتامين الراسيمي لتوفير نقاط تفاعل مع عمود مانح لباي من نوع بيركل. *(Figure 20 Derivatization of racemic amfetamine to provide points of interaction with a Pirkle-type π-donor column).*

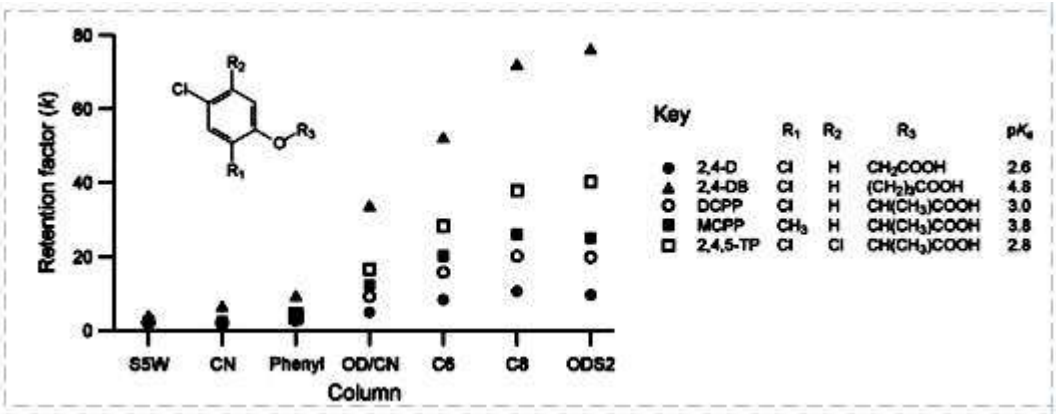
استخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) في علم السموم التحليلي

Use of HPLC in Analytical Toxicology

المركبات الحامضية والمتعادلة Acidic and Neutral Compounds

عموماً، يُجري تحليل المركبات الحامضية والمتعادلة بشكل ملائم عن طريق كروماتوغرافيا الطور المعكوس باستخدام سيليكا معدلة بمجموعات سيانوبروبيل، أو فينايل بروبيل، أو (C_8)، أو (C_{10}/C_{18})، أو حشوات مشابهة مع مذيبات شاطفة مائية من الميثانول أو الأسيتونتريل (**الإطار 6**). ولا تكتسب التفاعلات الأيونية مع مصفوفة السيليكا -التي تتسم بكونها حامضية ضعيفة في حد ذاتها- أهمية كبيرة، في حين أن تأثير تغيير نسبة المكون العضوية للمذيب الشاطف إلى المكون المائي له التأثير الأكبر بكثير ويكون قابلاً للتنبؤ عموماً؛ حيث تؤدي زيادة الماء إلى زيادة الاستبقاء والعكس صحيح. وغالباً ما يمكن تحقيق عمليات فصل مشابهة باستخدام حشوات معدلة بالفينايل مقارنة بمواد معدلة بـ (ODS)، غير أن استبقاء المكونات ذات الشطف المتأخر قد لا يزداد بالسرعة نفسها كما في حالة (ODS). ويمكن أن ينتج عن ذلك أزمنة تحليل أقصر وحساسية أكبر نظراً لتقليل اتساع القمم. وبشكل عام، تميل الجرعات العلاجية، وبالتالي تراكيز البلازما، إلى أن تكون أعلى (وزن/وزن) مع الأدوية

الحامضية والمتعادلة مقارنة بالعديد من القواعد، مما يسهل عملية الكشف. ومع ذلك، لا يكون هذا مفيداً مع الأدوية مثل الباربيتورات، والتي لا يمكن الكشف عنها إلا بالأشعة فوق البنفسجية ذات الطول الموجي المنخفض ما لم يتم اشتقاقها.



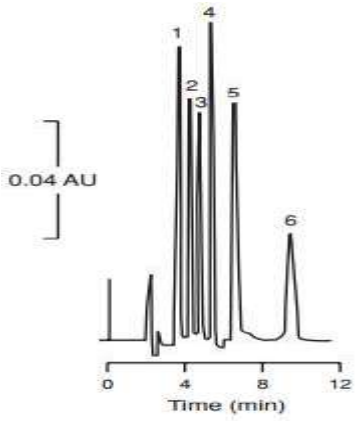
الشكل 21: تأثير طبيعة حشوة العمود على فصل بعض مبيدات الأعشاب من نوع كلوروفينوكسي حامضي (**Chlorophenoxy acid herbicides**) باستخدام تقنية (HPLC). العمود: مم 4.6 × 100قطر داخلي، 5 ميكرومتر Waters Spherisorb [S5 MM2 (50% ODS، 50% سيانوبروبيل)]. معدل التدفق: $^{-1}$مل دقيقة 1.8. الكشف: بالأشعة فوق البنفسجية عند 280 نانومتر. درجة الحرارة: حوالي 20 درجة مئوية ($°C$). الحقن: 25 ميكرولتر من محلول مائي لكل من: D-2,4، وDCPP، وMCPP، وTP-2,3,5، وDB-2,4 (تركيز $^{-1}$ملغ لتر 50لكل مادة محللة). المذيب الشاطف: حامض أورثو-فوسفات ثنائي هيدروجين البوتاسيوم المائي ($^{-1}$مل مول لتر 50، الرقم الهيدروجيني 3.5):الأسيتونتريل (25 :75). [المفاتيح: D-2,4 حامض 2,4-ديكلوروبينوكسي أكتيك، 2,4-DB حامض 4-(2,4-ديكلوروبينوكسي)بيوتيريك، DCPP حامض 2-(2,4-ديكلوروبينوكسي)بروبيونيك، MCPP حامض 2-(4-كلورو-2-ميثيل فينوكسي)بروبيونيك، TP-2,4,5 حامض 2-(2,4,5-تريكلوروبينوكسي)بروبيونيك].

يُوضح **الشكل 21** تحليل بعض مبيدات الأعشاب الكلوروفينوكسيّة على حشوات سيليكا معدلة وغير معدلة عند ثبات تكوين المذيب الشاطف. وقد كان تسلسل الشطف هو نفسه في كل حالة. أعمدة S5 C6، وS5 C8، وS5 ODS2 (C_{18}) أعطت استبقاءً وأشكال قمم متشابهة أساساً، بينما أعطى العمود ذو "النمط المختلط" (S5 OD/CN، بنسبة 50% C_{18}، 50% معدل بالسيانوبروبيل، وهي مادة مصممة للاستخدام مع كل من الأحماض والقواعد) استبقاءً أكثر اعتدالاً وأشكال قمم جيدة. وقد انخفض الاستبقاء بشكل كبير على المواد المعدلة بالفينايل والنتريل، وكان أقل حتى على السيليكا غير المعدلة (S5W). ومع ذلك، أعطى عمود الفينايل أفضل توازن بين شكل القمة، وزمن التحليل، والدقة (**الشكل 22**). وعموماً، تُحلل مضادات الاختلاج، والبنزوديازيبينات، والكافيين وغيره من الزانثينات (**Xanthines**)، والمواد المحللة الأمفوتيرية قطبية التواجد مثل الكاتيكولامينات -باعتبارها أدوية حامضية أو متعادلة أو ضعيفة القاعدة- على أنظمة الطور المعكوس. وفي حالة الزانثينات، دُعي إلى إضافة رباعي هيدروفوران (**THF**) إلى المذيب الشاطف لضمان فصل مستقلب الكافيين، الباراكسانثين (**Paraxanthine**)، عن الثيوفيلين (**Theophylline**).

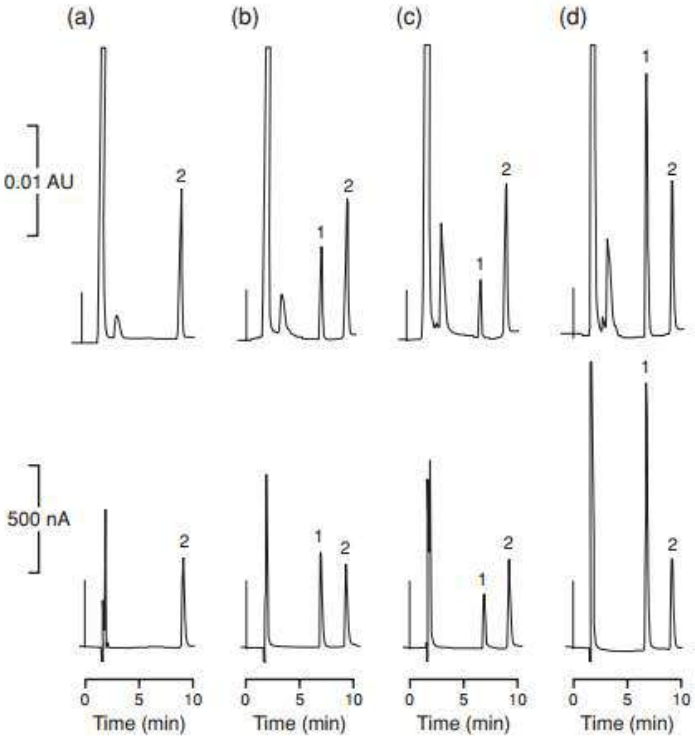
الأدوية القاعدية ومركبات الأمونيوم الرباعية Basic Drugs and Quaternary Ammonium Compounds

تتلخص جوانب تحليل (HPLC) للأدوية القاعدية في **الإطار 7**. وقد تُستخدم على نطاق واسع أنظمة المذيبات الشاطفة المكونة من طور مرتبط/ميثانول أو أسيتونتريل مائي في تحليل (HPLC) للأدوية القاعدية. ومع ذلك، فضلاً عن أملاح المنظمات، غالباً ما توجد حاجة إلى مضافات مختلفة (أيونات مقرونة أو مقابلة مثل سلفونات الألكانات، أو ألكيل أمينات، أو مركبات الأمونيوم الرباعية) لتحقيق أداء كفء. علاوة على ذلك، وعلى عكس سلوك المركبات الحامضية/المتعادلة، فإن تأثير تغيير كمية الماء في المذيب الشاطف على الاستبقاء قد لا يكون قابلاً للتنبؤ. وربما يُعزى ذلك إلى أن التفاعلات الأيونية بين المادة المحللة ومجموعات السيلانول السطحية تكون قوية، أو أقوى، من التفاعلات كارهة الماء مع الطور المرتبط. وبالفعل، غالباً ما

يمكن الحصول على استبقاء وتسلسلات شطف مشابهة (وعموماً أشكال قمم أفضل) لتلك التي تُتحصل عليها على مجموعة من الأطوار المرتبطة عند استخدام السيليكا غير المعدلة (Law, 1990).



الشكل 22: كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء (HPLC) لبعض مبيدات الأعشاب الكلوروفينوكسيّة والأيوكسينيل (**Ioxynil** - 4-هيدروكسي-3,5-ثنائي يودوبنزونتريل). العمود: 250 مم Spherisorb S5 Phenyl. المذيب الشاطف: حامض أورثو-فوسفات ثنائي هيدروجين البوتاسيوم (10^{-1} مل مول لتر 50، الرقم الهيدروجيني 3.5):الأسيتونتريل (1 :3). معدل التدفق: 10^{-1} مل دقيقة 1.8. الكشف: بالأشعة فوق البنفسجية عند 240 نانومتر. الحقن: 20 ميكرولتر من منظم Tris يحتوي على 10^{-1} غرام لتر 0.10من كل مركب (10^{-1} غرام لتر 0.025 أيوكسينيل). القمم 1: D-2,4، DCPP2 :؛ MCPP3 :؛ 4 : 2,4,5-TP، 5: أيوكسينيل، 6: DB-2,4.



الشكل 23: تأثير حشوة العمود على تحليل (HPLC) لبعض الأدوية القاعدية باستخدام مذيب شاطف للطور المعكوس. العمود: × 100 مم 4.6قطر داخلي، 5 ميكرومتر Waters Spherisorb (S5 OD/CN: 50% ODS، 50% سيانوبروبيل). معدل التدفق: 10^{-1} مل دقيقة 2.0. الكشف: بالأشعة فوق البنفسجية عند 215 نانومتر. درجة الحرارة: حوالي 22 درجة مئوية. الحقن: 20 ميكرولتر من محلول يحتوي على: نورتريبتيلين (1)، وأميتريبتيلين (2)، وإبراميل (3)، وميثديلازين (4) (تركيز 10^{-1} ملغ لتر 10لكل مركب في الميثانول). المذيب الشاطف: حامض أورثو-فوسفات ثنائي هيدروجين البوتاسيوم المائي (10^{-1} مل مول لتر 10، الرقم الهيدروجيني 6.0):الميثانول:الأسيتونتريل (+ 10 + 30 60).

يُعرض تحليل خليط اختباري من الأدوية القاعدية على مجموعة من الحشوات باستخدام مذيب شاطف نموذجي للطور المعكوس ذي تركيب ثابت في **الشكل 23**. وتتجلى ميزة السيليكا غير المعدلة فيما يتعلق بشكل القمة في تحليل الأدوية القاعدية بوضوح في هذه الحالة.

وفي الممارسة العملية، قد تتيح كروماتوغرافيا الطور المعكوس التحليل المتزامن للأدوية القاعدية والمركبات المتعادلة أو حتى الحامضية أو المستقلبات (الأميدات، أو الغلوكورونيدات، أو السلفات).

وتشمل العوامل التي قد تحسن تماثل القمم للواعد:

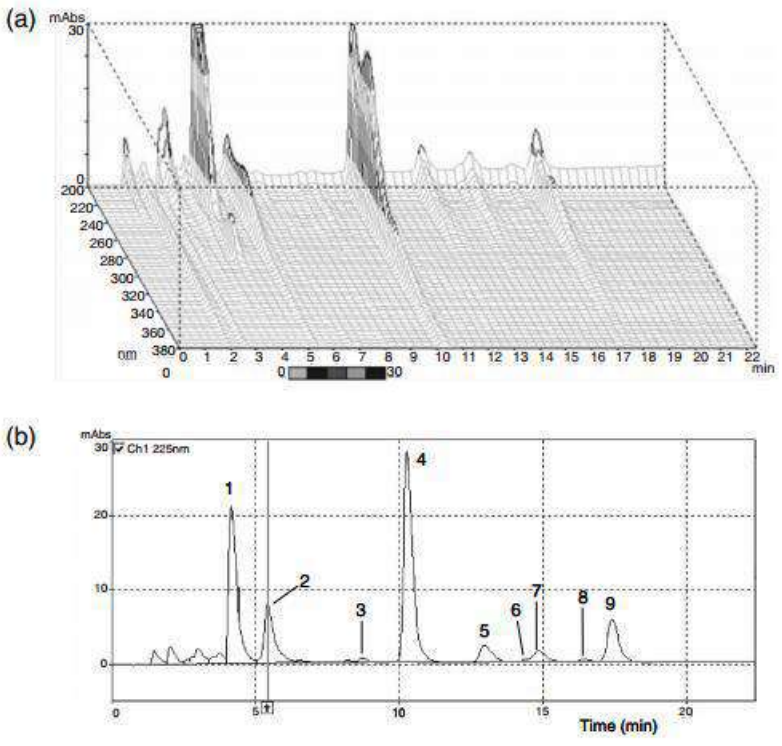
- استخدام مذيب شاطف بدرجة حموضة تتراوح بين 2.5 و3.5.
- استخدام تراكيز أعلى من المنظمات عموماً.

- استخدام أملاح البوتاسيوم بدلاً من أملاح الصوديوم.
- إضافة مضافات أمينية مثل ثلاثي إيثيل أمين (**Triethylamine**، 30 إلى $^{-1}$مل مول لتر 50) أو ثنائي ميثيل أوكتيلامين (5 إلى $^{-1}$مل مول لتر 10).

ومع ذلك، فإن هذه المضافات تقيد إلى حد كبير استخدام كشف الأكسدة الكهروكيميائية. وتُنتج العديد من الشركات المصنعة الآن سيليكا ذات أطوار مرتبطة خاصة "معطلة القواعد" (**Base-deactivated" bonded-phase silicas"**) المصممة لتقليل التفاعلات مع مجموعات السيلانول السطحية، وبالتالي السماح بسلوك طور معكوس أكثر قابلية للتنبؤ وإعطاء أشكال قمم أفضل.

أنظمة المذيبات الشاطفة الأيونية غير المائية Nonaqueous Ionic Eluent Systems

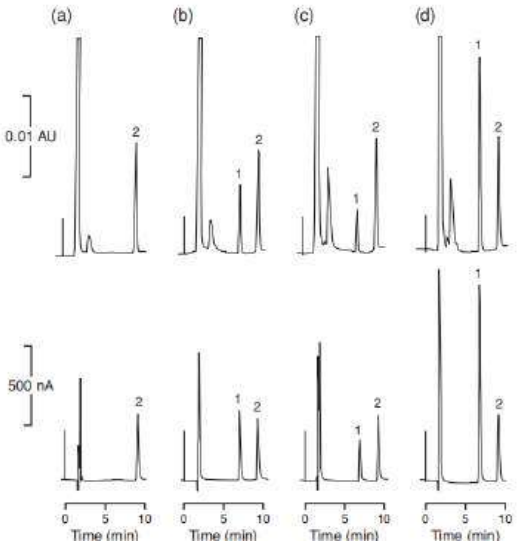
منذ فترة طويلة، عُرف أن الأداء الكفء يمكن الحصول عليه للعديد من الأدوية القاعدية على السيليكا غير المعدلة باستخدام الميثانول الذي يحتوي على حامض البيركلوريك (0.01 أو 0.02% حجم/حجم، أي حوالي 1 أو 2 مل مول لتر${^{-1}}$) كمذيب شاطف. ويُعدّ حامض البيركلوريك معدلاً أيونياً مفيداً إذا تطلب الأمر مديماً شاطفاً حامضياً بقوة. وتتمتع المحاليل الميثانولية للبيركلورات بحد أدنى للامتصاص فوق البنفسجي يبلغ حوالي 200 نانومتر (nm). أما المذيب الشاطف المعدل ببيركلورات الأمونيوم ($^{-1}$مل مول لتر 10، الرقم الهيدروجيني الظاهري $pH^* = 6.7$) فيوازن بين الاستبقاء، وشكل القمة، والاستجابة الكهروكيميائية للعديد من المواد المحللة (Jane et al., 1985). إن استبقاء القواعد البروتونية (**Protonated bases**) ومركبات الأمونيوم الرباعية على السيليكا غير المعدلة باستخدام الميثانول أو مذيبات الميثانول المائية يعود بصفة أساسية إلى التبادل الكاتيوني مع مجموعات السيلانول السطحية (**الشكل 24**). وعليه، يُعدّ الرقم الهيدروجيني للمذيب الشاطف (pH) والقوة الأيونية من المؤثرات الرئيسية على الاستبقاء (Flanagan and Jane, 1985).



الشكل 24: تأثير طبيعة حشوة العمود على كروماتوغرافيا بعض الأدوية القاعدية باستخدام مذيب شاطف أيوني غير مائي. المذيب الشاطف: بيركلورات الأمونيوم الميثانولية ($^{-1}$مل مول لتر 5، $pH^* = 6.7$). الظروف الكروماتوغرافية الأخرى وعمليات الحقن مطابقة لما ورد في **الشكل 23**. *Figure Effect of the nature of the column packing on the chromatography of some basic drugs using a nonaqueous ionic eluent (...)*

كما يتأثر شكل القمة لبعض المواد المحللة -ولا سيما القلويات مثل المورفين، والكينين، والستريكنين- في أنظمة المذيب الشاطف الأيوني غير المائي بالر الرقم الهيدروجيني للمذيب؛ حيث تمنح القيم الأعلى للرقم الهيدروجيني عادةً قممًا أفضل. وتُعدّ أنظمة أعمدة السيليكا والمذيب الشاطف الأيوني غير المائي مفيدة لتحليل الأدوية القاعدية في المستخلصات البيولوجية؛ نظراً لأنه لا يُحتجز سوى القواعد البروتونية ومركبات الأمونيوم الرباعية وحدها. بالإضافة إلى ذلك، عادةً ما يتم فصل المستقلبات الناتجة عن نزع مجموعة الألكيل المرتبطة بالنيتروجين (dealkylated-*N*)، والمستقلبات الفينولية، وغيرها من المستقلبات مثل السلفوكسيدات (**Sulfoxides**) (Cashman and Yang, 1990).

نادراً ما تؤدي التغييرات الصغيرة في تركيب مذيب المذيب الشاطف إلى تغيير الاستبقاء حتى إذا أُضيف الماء بنسبة تصل إلى 20% (حجم/حجم)؛ غير أن إضافة المزيد من الماء تعزز الاستبقاء بشكل ملحوظ لغالبية المواد المحللة، بينما تظل الانتقالية دون تغيير يذكر (Flanagan and Jane, 1985). ومع ذلك، يمكن فصل البنبوتولول و4-هيدروكسي بنبوتولول باستخدام خليط (إيزو-أوكتان:MTBE:ميثانول بنسبة 25 :37.5 :37.5) عند درجة حموضة 6.7. ولا يؤدي التحليل المباشر لمستخلصات بلازما (MTBE) مع إعادة تدوير المذيب الشاطف إلى تغيير الاستبقاء ما لم تكن إعادة التدوير طويلة (عدة مئات من مرات الحقن) حيث قد تحدث بعض التغيرات في انخفاض الاستبقاء. تتمثل إحدى المشكلات المتعلقة بالسيليكا غير المعدلة والعديد من أنواع السيليكا المعدلة في أن بعض المركبات تُحتجز بشكل ضعيف حتى لو كانت القوة الأيونية للمذيب الشاطف منخفضة للغاية. ومع ذلك، فإن مبادلات الكاتيونات القوية دقيقة الدقائق (**Microparticulate strong cation exchangers**) توفر استبقاءً جيداً وشكل قمة ممتازاً للعديد من الأدوية القاعدية (Croes et al., 1995؛ **الشكل 25**). وتكمن المزايا العملية في أن مخاليط الميثانول أقل لزوجة بكثير من مخاليط الماء/الميثانول، ومن ثم تكون كفاءة القمم عالية، وضغوط الأعمدة العكسية منخفضة نسبياً. بالإضافة إلى ذلك، فإن استخدام الميثانول كمذيب شاطف يقلل من مخاطر انحلال السيليكا وتكوين فقاعات الهواء، بحيث لا تكون إزالة الغازات من المذيب الشاطف (**Eluent degassing**) لازمة في الغدد العادية. وميزة أخرى لأنظمة المذيبات الشاطفة الأيونية غير المائية تتمثل في إمكانية حقن مستخلصات المذيبات كبيرة الحجم نسبياً مباشرة في مذيب "غير شاطف" (**Noneluting" solvent"**) دون أي فقد في الكفاءة.



الشكل 25: تحليل (HPLC) للميدوكايين (**Lidocaine**) باستخدام عمود Waters Spherisorb S5 SCX. العمود: مم 5 × 250قطر داخلي. المذيب الشاطف: بيركلورات الأمونيوم بتركيز 10^{-1}مل مول لتر 20في الميثانول ($pH^* = 6.7$). معدل التدفق: 10^{-1}مل دقيقة 2.0. الكشف: بالأشعة فوق البنفسجية عند 215 نانومتر، والكشف الكهروكيميائي (ED) عند فولت 1.1−مقابل قطب (Ag/AgCl). الاستخلاص: 200 ميكرولتر عينة + 50 ميكرولتر منظم Tris مائي (10^{-1}مول لتر 4، الرقم الهيدروجيني 11) + 50 ميكرولتر بوبيفاكين مائي (معيار داخلي، 10^{-1}ملغ لتر 10) + 200 ميكرولتر (MTBE). يمزج بالدوامة (**Vortex-mix**) ويُحفز بالنبذ (**Centrifuge**). الحقن: 100 ميكرولتر من المستخلص. العينات: (أ) مصل عجل حديث الولادة. (ب) معيار في مصل العجل (10^{-1}ملغ لتر 1.0 ميدوكايين). (ج) مصل خيلي وُجد أنه يحتوي على 10^{-1}ملغ لتر 0.7ميدوكايين. (د) بلازما بشرية من بنك الدم منتهية الصلاحية وُجد أنها تحتوي على 10^{-1}ملغ لتر 3.3ميدوكايين. القمم: 1 = ميدوكايين، 2 = بوبيفاكين

التحليل الشامل السام Systematic Toxicological Analysis (STA)

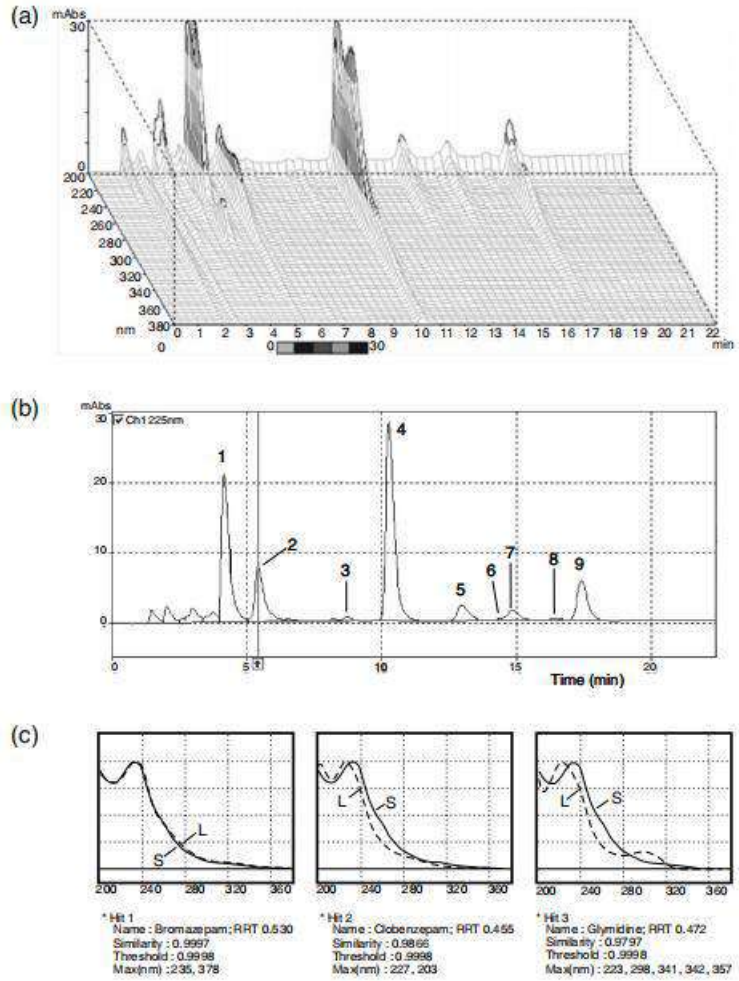
عادةً ما يُجرى الفحص السمي باستخدام المقايسات المناعية (**Immunoassays**) والكروماتوغرافيا الغازية المرتبطة بمطياف الكتلة (**GC-MS**). ومع ذلك، لا تزال كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (**TLC**) والكروماتوغرافيا الغازية الشعرية المزودة بكواشف نوعية تُستخدم في بعض مختبرات السموم. وتتمثل المشكلات في استخدام (HPLC) للفحص عن المجهول في:

1. التباين في بيانات الاستبقاء الناتج، على سبيل المثال، عن التباين في مواد الحشو أو نقص التحكم في درجة الحرارة.
2. غياب كاشف عام (**Universal detector**).
3. المشكلات المرتبطة عادة بالشطف المتدرج مقارنة ببرمجة درجة الحرارة في (GC).

يمكن استخدام أنظمة أعمدة السيليكا والمذيب الشاطف الأيوني غير المائي للكشف والفحص عن الأدوية القاعدية؛ حيث توفر نسب الاستجابة بين الكشف بالأشعة فوق البنفسجية (254 نانومتر) والكشف الكهروكيميائي (فولت 1.2− مقابل Ag/AgCl) معياراً إضافياً للمساعدة في تعيين القمم (Jane et al., 1985). كما استُخدمت أعمدة السيليكا غير المعدلة أيضاً مع المذيبات الشاطفة المائية الميثانولية أو الأسيتونتريل في تحليلات الأدوية القاعدية، وفي الآونة الأخيرة جنباً إلى جنب مع استخلاص العينات المتصل (**On-line sample extraction**) (Kelly et0 al., 1989). واستخدم نظام (REMEDI) مذيبات شاطفة وأعمدة قياسية مع بيانات طيفية للأشعة فوق البنفسجية من كاشف مسح سريع لتوصيف الأدوية وبعض المستقلبات. وفي حين حقق النظام نجاحاً تجارياً واستُخدم على نطاق واسع، إلا أن الارتفاع الأخير في أجهزة (LC-MS) و(HPLC-DAD) ميسورة التكلفة بدأ يحل محل هذا النظام.

وُصفت عديد من أنظمة (HPLC-DAD) للتحليل الشامل السام (STA) (Lai et al., 1997). وقد جرى وصف نظام (HPLC-DAD) متدرج يعتمد على عمود من النمط المختلط (C_{18}/سيانوبروبيل) مع بيانات الاستبقاء وبيانات الاستجابة لأكثر من 250 مركباً بما في ذلك الأدوية والمستقلبات الحامضية، والقاعدية، والمتعادلة -والتي لم تكن بعضها قابلة للتحليل بواسطة (GC) و(Elliott and Hale, 1997, 1) -(998TLC). وجرى تحديد الهوية للمركبات باستخدام كلٍّ من مؤشرات الاستبقاء (المحسوبة عن طريق الاستيفاء بين سلسلة من علامات الأدوية المرجعية، بمقاييس منفصلة للأدوية الحامضية والقاعدية) والبيانات الطيفية. وكان للعمود اختلافات انتقائية مفيدة محتملة مقارنة بأعمدة (C_{18}). كما كانت قاعدة البيانات مفيدة أيضاً في المساعدة على تكييف النظام للتحليلات الكمية للأدوية والمستقلبات تحت ظروف أيزوقراطية (**Isocratic conditions**)، مستغلين المرونة المتأصلة في (HPLC) مقارنة بـ (GC) في التحليلات المستهدفة. وكانت سعة العينة ميزة أخرى في تحليل المساحيق.

أصبحت كواشف مصفوفة الدايود (**DADs**) الآن أكثر تحسناً بكثير فيما يتعلق بدقة الأطوال الموجية والدقة (**Resolution**)، والحساسية، والخطية، وبرمجيات التشغيل. وتعطي أطياف الأشعة فوق البنفسجية المقاسة باستخدام كواشف (DAD) الحديثة من مختلف المصنعين توافقاً جيداً، وتتمتع بنفس جودة الأطياف المقاسة بواسطة مطياف الأشعة فوق البنفسجية التقليدي، وهي عالية القابلية لإعادة الإنتاج. ويتضمن حساب معلمات التشابه بواسطة برمجيات (DAD) النطاق بأكمله للطيف ويسمح بالتعرف على الفروق الطيفية الصغيرة جداً (Pragst et al., 2001؛ **الشكل 26**).



الشكل 26: تحليل (HPLC-DAD) لمستخلص ثنائي كلورو ميثان (الرقم الهيدروجيني 9) لعينة دم مأخوذة من مريض تسمم. (أ) مخطط كروماتوغرافي ثنائي الأبعاد (3-D). (ب) مخطط كروماتوغرافي (225 نانومتر). المركبات ($^{-1}$*رملغلت*) المحددة بواسطة طيف الأشعة فوق البنفسجية وزمن الاستبقاء: القمم: 1 = ترامادول (1.2)، 2 = بروميزام(0.15) epam، 3 = أوكسازام(0.01) epam، 4 = نوردازام(0.51) epam، 5 = نورتريبتيلين (0.07)، 6 = نورتريبرامين (0.01)، 7 = أميتريبتيلين (0.08)، 8 = تريبرامين (0.02)، 9 = ديازيبام (0.12). (ج) نتيجة البحث في المكتبة للقمة 2 (الطول الموجي بالنانومتر). مؤشر التشابه أعلى من 0.9990 يعد دليلاً قوياً جداً على تطابق الأطياف. ($= S$ طيف العينة، $= L$طيف المكتبة).

في دراسة شاملة شملت 2682 مادة ذات صلة سمية، سُجلت أزمنة الاستبقاء بالنسبة لمعيار داخلي والأطياف في النطاق 195–380 نانومتر باستخدام عمود بحجم 5 ميكرومتر ولشبر-RP8ec (مم 4 × 250 قطر داخلي) مع خليط من الأسيتونتريل:منظم فوسفات مائي ($^{-1}$مول لتر 0.1، الرقم الهيدروجيني 2.3) بنسبتين مختلفتين - المذيب أ (37:63) [المعيار الداخلي: 5-(4-ميثيل فينايل)-5-فينايل هيدانتوين] والمذيب ب (63:37) [المعيار الداخلي: 4-فينايل بنزوفينون]. ووجدت 1650 مجموعة حاملة ألوان أو تركيبات حاملة ألوان مختلفة (**Chromophores**).

وإجمالاً، تم تحديد 1619 مادة (60.4%) بشكل لا يقبل الشك من خلال الطيف وحده؛ وارتفع معدل التحديد إلى 84.2% من خلال الجمع بين الطيف وزمن الاستبقاء النسبي (Herzler et al., 2003; Pragst et al., 2004). بناءً على ذلك، تُعدّ تقنية (HPLC-DAD) الحديثة بالاشتراك مع قاعدة بيانات طيفية جيدة للأشعة فوق البنفسجية وإعداد عينات محدد وبيانات استبقاء (HPLC) تقنية إضافية قيّمة في التحليل الشامل السام (Maurer, 2000) (STA). علاوة على ذلك، قد يكون تحضير العينات أبسط مقارنة بـ (GC)، على الرغم من احتمال افتقاره لقوة الفصل التي تتميز بها مطيافية الكتلة المرتبطة بالكروماتوغرافيا الغازية المبرمجة حرارياً (**Temperature programmed GC-MS**) (Maurer, 2004). كما تُعدّ (HPLC-DAD) مفيدة أيضاً في تحديد المستقلبات؛ لأنه في حالات عديدة تمتلك مثل هذه المركبات نفس أطياف الأشعة فوق

البنفسجية أو أطيافاً مشابهة جداً مقارنة بالمادة الأم وتتغير أزمنة استبقائها على أعمدة الطور المعكوس بطريقة مميزة للمنتج الأيضي المتوقع.

أخيراً، وعلى الرغم من تقييم تقنية الكروماتوغرافيا السائلة المرتبطة بمطياف الكتلة (**HPLC-MS**) إلى حد ما للاستخدام في التحليل الشامل السام (STA) (Saint-Marcoux et al., 2003)، إلا أن غياب نظام كشف مماثل للتأين الالكتروني (**EI - Electron Ionization**) في الكروماتوغرافيا الغازية المرتبطة بمطياف الكتلة (GC-MS) يعني أنه في الوقت الحالي، يُفضل استخدام (HPLC-MS) للتحليلات المستهدفة (**Targeted analyses**) (Dams et al., 2000; Maurer, 2004).

التحليلات الكيرالية Chiral Analyses

على الرغم من أن المنهجية الكيرالية تحظى بأهمية أساسية في تطوير الأدوية، إلا أن احتمال حدوث الانقلاب داخل الحي (**Inversion in vivo**) يعد أمراً حقيقياً. فعلى سبيل المثال، يُسوق عقار الإيبوبروفين (**Ibuprofen**) عادةً كراسيم، غير أن نسبة من متماثل (*R*-(-)-ibuprofen) غير الفعال تخضع لانقلاب إلى الإنانتيومير الفعال داخل الجسم عبر إنتاج مستقلب غير مستقر (Evans, 2001). وكذلك يُوصف السيتالوبرام (**Citalopram**)، وهو مثبط انتقائي لاسترداد السيروتونين (**SSRI**)، كراسيم أيضاً. وقد كشف الفحص الكيرالي الانتقائي لتقنية (HPLC) للسيتالوبرام و(*N*-ديسميثيل سيتالوبرام / نورسيتالوبرام) في دم الفخذ من 53 حالة تشريح جثث عن نسبة (*S*:*R*) للسيتالوبرام بلغت 0.25 ± 0.67وللنورسيتالوبرام بلغت 0.20 ± 0.68(Holmgren et al., 2004). وارتفعت نسب (*S*:*R*) مع زيادة تركيز السيتالوبرام وكانت مرتبطة أيضاً بارتفاع نسب الدواء الأم إلى المستقلب.

وفي المقابل، وجد (Rochat et al., 1995) أن نسب (*S*-(-)-citalopram) و(*S*-(-)-norcitalopram) إلى إنانتيوميراتها غير الفعالة كانت تعادل نحو 0.05 ± 0.35فقط. وعامل إضافي يكمن في أن الإسيتالوبرام (*S*-citalopram) يتوفر بذاته ويُستخدم بجرعات تصل إلى 50% تقريبًا من جرعات السيتالوبرام نفسه، مع افتراض الجرعات بالطبع لقلة الانقلاب الانتقائي إلى الإنانتيومير الفعال من الإنانتيومير غير الفعال عند إعطاء الراسيم.

الخلاصة Summary

لقد استبدلت تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) قياسات الطيف الضوئي للأشعة فوق البنفسجية/المرئية والكروماتوغرافيا الغازية (GC) في قياس العديد من المواد المحللة والمستقلبات النوعية، سيما عند تسخيرها للانتقائية والحساسية التي توفرها مطيافية الكتلة (**MS**). ومع ذلك، فإن الميزة الكبرى لتقنية (HPLC)، وهي المرونة التي توفرها القدرة على تعديل المذيب الشاطف، تُمثل في الوقت ذاته أكبر عيوبها في الاستخدام الروتيني؛ فلن تتعرض حشوة العمود للذوبان، أو الانضغط، أو التغير الجسدي فحسب، بل قد تتراكم الشوائب أيضاً في أعلى الأعمدة (أو بداخلها)، مما يؤدي إلى فقدان الأداء. ويمكن أن يساعد استخدام ترشيح المذيب الشاطف والأعمدة الأولية أو الحارسة (**Pre- or guard-columns**) في إطالة عمر العمود. كما يتيح استخدام تكنولوجيا الحشوات الحديثة إجراء التحليل المتصل (**On-line analysis**) للبلازما للمواد المحللة المستهدفة، على الرغم من أن (HPLC) لا يزال يلعب دوراً أكثر محدودية في التحليل الشامل السام (STA) مقارنة بـ (GC) (**الإطار 8**). وتكمن القيود الأساسية في عدم وجود كاشف "عام" حساس في (HPLC) مماثل لكاشف التأين اللهبي (**FID**) في (GC)، وثانياً عدم وجود نظير في (HPLC-MS) لتأين (EI) في (GC-MS).

الإطار 8: خلاصة استخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) في علم السموم التحليلي

- يجب مراعاة الانتقائية بدءاً من معالجة العينة (غالبًا ما يكون استخلاص السائل-السائل - LLE - هو الأفضل) والكاشف فضلاً عن العمود.
- غالباً ما تكون حشوات حجم 5 ميكرومتر ملائمة إذا استُخدمت مع تركيبة عمود/مذيب شاطف مناسبة.
- من المتوقع روتينياً تحقيق 3000–4000 صفيحة نظرية لكل عمود بطول 125 مم عند معدل تدفق للمذيب الشاطف يتراوح بين 1–2 مل دقيقة مع مستخلصات العينات السريرية.
- يمكن أن تعطي الحشوات بحجم 3 ميكرومتر أو أنظمة التجويف الدقيق/الشعري كفاءات أعلى، ولكنها قد تؤدي أيضاً إلى ضغوط عكسية أعلى، وأزمنة تحليل أطول، وانخفاض سعة المذاب، وتتطلب تعديلات على أجهزة الحقن/الكواشف.
- إن استخدام المذيبات الشاطفة الميثانولية أو الغنية بالميثانول في تحليل الأدوية القاعدية بـ (HPLC) (باستخدام حشوات سيليكا معدلة بمبادلات الكاتيونات القوية - SCX) يعطي أشكال قمم جيدة ويسهل التحليل المباشر لمستخلصات المذيبات.
- قد يكون استخدام كواشف مصفوفة الدايود (**DAD**) مفيداً في التحليل الشامل السام (STA)، ولكن يُفضل عموماً استخدام (GC) المبرمج حرارياً.

المراجع العلمية References

Abbott, R. W., Townshend, A., & Gill, R. (1987). Determination of morphine in body fluids by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. Analyst, 112(4), 397–406.

Aradottir, S., & Olsson, B. L. (2005). Methodological modifications on quantification of phosphatidylethanol in blood from humans abusing alcohol, using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. BMC Biochemistry, 6, Article 18. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1249557

Armstrong, D. W., Tang, Y., Chen, S., Zhou, Y., Bagwill, C., & Chen, J.-R. (1994). Macrocyclic antibiotics as a new class of chiral selectors for liquid chromatography. Analytical Chemistry, 66(9), 1473–1484.

Binder, S. R., Regalia, M., Biaggi-McEachern, M., & Mazhar, M. (1989). Automated liquid chromatographic analysis of drugs in urine by on-line sample cleanup and isocratic multi-column separation. Journal of Chromatography, 473, 325–341.

Buckley, D. G., & Whelpton, R. (1992). Direct injection of chiral isocyanates, not marketed, onto aminopropyl columns to render them chiral. In E. Reid & I. D. Wilson (Eds.), Bioanalytical approaches for drugs, including anti-asthmatics and metabolites (Vol. 22, pp. 317–320). Royal Society of Chemistry.

Bugey, A., & Staub, C. (2004). Rapid analysis of benzodiazepines in whole blood by high-performance liquid chromatography: Use of a monolithic column. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 35(3), 555–562.

Cashman, J. R., & Yang, Z.-C. (1990). Analysis of amine metabolites by high-performance liquid chromatography on silica gel with a non-aqueous ionic eluent. Journal of Chromatography, 532(2), 405–410.

Chen, J., Korfmacher, W. A., & Hsieh, Y. (2005). Chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for stereoisomeric pharmaceutical determinations. Journal of Chromatography B, 820(1), 1–8.

Cook, S. E., & Pinkerton, T. C. (1986). Characterization of internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography. Journal of Chromatography, 368, 233–248.

Cope, M. J., & Davidson, I. E. (1987). Use of macroporous polymeric high-performance liquid chromatographic columns in pharmaceutical analysis. Analyst, 112(4), 417–421.

Croes, K., McCarthy, P. T., & Flanagan, R. J. (1995). HPLC of basic drugs and quaternary ammonium compounds on microparticulate strong cation-exchange materials using methanolic or aqueous methanol eluents containing an ionic modifier. Journal of Chromatography A, 693(2), 289–306.

Daldrup, T., Michalke, P., & Szathmary, S. (1985). HPLC in forensic chemistry. In H. Engelhardt (Ed.), Practice of high performance liquid chromatography (pp. 241–285). Springer.

Dams, R., Lambert, W. E., Clauwaert, K. M., & De Leenheer, A. P. (2000). Comparison of phenyl-type columns in the development of a fast liquid chromatographic system for eighteen opiates commonly found in forensic toxicology. Journal of Chromatography A, 896(1-2), 311–319.

Dolphin, J. (1989). Enantiomer separations. Laboratory Practice, 38, 71–73.

Elliott, S. P., & Hale, K. A. (1997). Development of a high-performance liquid chromatography retention index scale for toxicological drug screening. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 694(1), 99–114.

Elliott, S. P., & Hale, K. A. (1998). Applications of an HPLC-DAD drug-screening system based on retention indices and UV spectra. Journal of Analytical Toxicology, 22(4), 279–289.

Evans, A. M. (2001). Comparative pharmacology of S(+)-ibuprofen and (RS)-ibuprofen. Clinical Rheumatology, 20(Suppl 1), S9–S14.

Fitos, I., Visy, J., Simonyi, M., & Hermansson, J. (1992). Chiral high-performance liquid chromatographic separations of vinca alkaloid analogues on alpha 1-acid glycoprotein and human serum albumin columns. Journal of Chromatography, 609(1-2), 163–171.

Flanagan, R. J., & Jane, I. (1985). High-performance liquid chromatographic analysis of basic drugs on silica columns using non-aqueous ionic eluents: I. Factors influencing retention, peak shape and detector response. Journal of Chromatography, 323(2), 173–189.

Flanagan, R. J., Perrett, D., & Whelpton, R. (2005). Electrochemical detection in the HPLC of drugs and poisons. Royal Society of Chemistry.

Fries, H. E., Evans, C. A., & Ward, K. W. (2005). Evaluation of evaporative light-scattering detection for metabolite quantification without authentic analytical standards or radiolabel. Journal of Chromatography B, 819(2), 339–344.

Gamache, P. H., McCarthy, R. S., Freeto, S. M., Asa, D. J., Woodcock, M. J., Laws, K., & Cole, R. O. (2005, February). HPLC analysis of nonvolatile analytes using charged aerosol detection. LCGC North America.

Gómez-Taylor, B., Palomeque, M., Garcia Mateo, J. V., & Martinez Calatayud, J. (2006). Photoinduced chemiluminescence of pharmaceuticals. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41(2), 347–357.

Gong, Z., Zhang, Y., Zhang, H., & Cheng, J. (1999). Capillary electrophoresis separation and permanganate chemiluminescence on-line detection of some alkaloids with β-cyclodextrin as an additive. Journal of Chromatography A, 855(1), 329–335.

Hage, D. S. (1999). Affinity chromatography: A review of clinical applications. Clinical Chemistry, 45(5), 593–615.

Hagestam, I. H., & Pinkerton, T. C. (1985). Internal surface reversed phase silica supports for liquid chromatography. Analytical Chemistry, 57(8), 1757–1763.

Haque, A., & Stewart, J. T. (1999). Direct injection HPLC analysis of some non-steroidal anti-inflammatory drugs on restricted access media columns. Biomedical Chromatography, 13(1), 51–56.

Hasumi, H., Nishikawa, T., & Ohtani, H. (1994). Effect of temperature on molecular structure of cyclosporin A. Biochemistry and Molecular Biology International, 34(3), 505–511.

Herzler, M., Herre, S., & Pragst, F. (2003). Selectivity of substance identification by HPLC-DAD in toxicological analysis using a UV spectra library of 2682 compounds. Journal of Analytical Toxicology, 27(4), 233–242.

Holmgren, P., Carlsson, B., Zackrisson, A. L., Lindblom, B., Dahl, M. L., Scordo, M. G., Druid, H., & Ahlner, J. (2004). Enantioselective analysis of citalopram and its metabolites in postmortem blood and genotyping for CYP2D6 and CYP2C19. Journal of Analytical Toxicology, 28(2), 94–104.

Imai, K. (1987). Derivatization in liquid chromatography. In J. C. Giddings, E. Grushka, & P. R. Brown (Eds.), Advances in chromatography (pp. 215–245). Dekker.

Jane, I., McKinnon, A., & Flanagan, R. J. (1985). High-performance liquid chromatographic analysis of basic drugs on silica columns using nonaqueous ionic eluents: II. Application of UV, fluorescence and electrochemical oxidation detection. Journal of Chromatography, 323(2), 191–225.

Kato, M., Fukushima, T., Shimba, N., Shimada, I., Kawakami, Y., & Imai, K. (2001). A study of chiral recognition for NBD-derivatives on a Pirkle-type chiral stationary phase. Biomedical Chromatography, 15(4), 227–234.

Kelly, M. T., Smyth, M. R., & Dadgar, D. (1989). Analysis of basic drugs by high-performance liquid chromatography using on-line solid-phase extraction and an unmodified silica column. Analyst, 114(11), 1377–1380.

Kline, W. F., & Matuszewski, B. K. (1992). Improved determination of the bisphosphonate alendronate in human plasma and urine by automated precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorescence and electrochemical detection. Journal of Chromatography, 583(2), 183–193.

Knox, J. H., Kaur, B., & Millward, G. R. (1986). Structure and performance of porous graphitic carbon in liquid chromatography. Journal of Chromatography, 352, 3–25.

Kraml, C. M., Zhou, D., Byrne, N. & McConnell, O. (2005). Enhanced chromatographic resolution of amine enantiomers as carbobenzyloxy derivatives in high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography. Journal of Chromatography A, 1100(1), 108–115.

Kurganov, A. (2001). Chiral chromatographic separations based on ligand exchange. Journal of Chromatography A, 906(1-2), 51–71.

Lai, C. K., Lee, T., Au, K. M., & Chan, A. Y. (1997). Uniform solid-phase extraction procedure for toxicological drug screening in serum and urine by HPLC with photodiode-array detection. Clinical Chemistry, 43(2), 312–325.

Laks, S., Pelander, A., Vuori, E., Ali-Tolppa, E., Sippola, E., & Ojanperä, I. (2004). Analysis of street drugs in seized material without primary reference standards. Analytical Chemistry, 76(24), 7375–7379.

Lammerhofer, M., Gyllenhaal, O., & Lindner, W. (2004). HPLC enantiomer separation of a chiral 1,4-dihydropyridine monocarboxylic acid. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 35(2), 259–266.

Law, B. (1990). Use of silica with reversed-phase type eluents for the analysis of basic drugs and metabolites. Trends in Analytical Chemistry, 9(1), 31–36.

Li, F., Zhang, C., Guo, X., & Feng, W. (2003). Chemiluminescence detection in HPLC and CE for pharmaceutical and biomedical analysis. Biomedical Chromatography, 17(2-3), 96–105.

Lihl, S., Rehorek, A., & Petz, M. (1996). High-performance liquid chromatographic determination of penicillins by means of automated solid-phase extraction and photochemical degradation with electrochemical detection. Journal of Chromatography A, 729(1-2), 229–235.

Lim, C. K. (1991). Porous graphitic carbon in biomedical applications. In J. C. Giddings, E. Grushka, & P. R. Brown (Eds.), Advances in chromatography (Vol. 32, pp. 1–19). Dekker.

Lingeman, H., & Underberg, W. J. M. (Eds.). (1990). Detection orientated derivatization techniques in liquid chromatography. Dekker.

Lunte, S. M., Mohabbat, T., Wong, O. S., & Kuwana, T. (1989). Determination of desmosine, isodesmosine, and other amino acids by liquid chromatography with electrochemical detection following precolumn derivatization with naphthalenedialdehyde/cyanide. Analytical Biochemistry, 178(1), 202–207.

Lurie, I. S. (2005). High-performance liquid chromatography of seized drugs at elevated pressure with 1.7 µm hybrid C18 stationary phase columns. Journal of Chromatography A, 1100(2), 168–175.

Mascher, H., & Kikuta, C. (1990). Determination of amoxicillin in plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after online oxidation. Journal of Chromatography, 506, 417–421.

Maurer, H. H. (2000). Screening procedures for simultaneous detection of several drug classes used for high throughput toxicological analyses and doping control: A review. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 3(6), 467–480.

Maurer, H. H. (2004). Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 42(11), 1310–1324.

McDonald, P. D., & Bidlingmeyer, B. A. (1987). Strategies for successful preparative liquid chromatography. In B. A. Bidlingmeyer (Ed.), Preparative liquid chromatography (pp. 1–103). Elsevier.

Naish, P. J., Lynch, R. J., & Blaffert, T. (1989). A study of the practical limitations of principal components analysis and the labelling of unresolved HPLC peaks. Chromatographia, 27(7-8), 343–358.

Naish-Chamberlain, P. J., & Lynch, R. J. (1990). Evaluation of a complete HPLC solvent optimization system involving piecewise quadratic modelling. Chromatographia, 29(1-2), 79–89.

Nakanishi, K., & Soga, N. (1991). Phase separation in gelling silica-organic polymer solution: Systems containing poly(sodium styrenesulfonate). Journal of the American Ceramic Society, 74(10), 2518–2530.

Pirkle, W. H., & Burke, J. A. (1991). Chiral stationary phase designed for beta-blockers. Journal of Chromatography, 557, 173–185.

Pirkle, W. H., & House, D. W. (1979). Chiral high pressure liquid chromatographic stationary phases 1. Separation of the enantiomers of sulfoxides, amines, amino acids, alcohols, hydroxy acids, lactones, and mercaptans. Journal of Organic Chemistry, 44(12), 1957–1960.

Pragst, F., Herzler, M., & Erxleben, B.-T. (2004). Systematic toxicological analysis by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 42(11), 1325–1340.

Pragst, F., Herzler, M., Herre, S., Erxleben, B.-T., & Rothe, M. (2001). UV-spectra of toxic compounds: Database of photodiode array UV spectra of illegal and therapeutic drugs, pesticides, ecotoxic substances and other poisons [Handbook and CD]. Dieter Helm.

Rainbow, S. J., Dawson, C. M., & Tickner, T. R. (1989). Non-extraction HPLC method for the simultaneous measurement of theophylline and caffeine in human serum. Annals of Clinical Biochemistry, 26(6), 527–532.

Rainbow, S. J., Dawson, C. M., & Tickner, T. R. (1990). Direct serum injection high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of phenobarbital, carbamazepine and phenytoin. Journal of Chromatography, 527(2), 389–396.

Rochat, B., Amey, M., & Baumann, P. (1995). Analysis of enantiomers of citalopram and its demethylated metabolites in plasma of depressive patients using chiral reverse-phase liquid chromatography. Therapeutic Drug Monitoring, 17(3), 273–279.

Saint-Marcoux, F., Lachâtre, G., & Marquet, P. (2003). Evaluation of an improved general unknown screening procedure using liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry by comparison with gas chromatography and high-performance liquid chromatography-diode array detection. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 14(1), 14–22.

Samanidou, V. F., Ioannou, A. S., & Papadoyannis, I. N. (2004). The use of a monolithic column to improve the simultaneous determination of four cephalosporin antibiotics in pharmaceuticals and body fluids by HPLC after solid phase extraction—A comparison with a conventional reversed-phase silica-based column. Journal of Chromatography B, 809(1), 175–182.

Smith, J. H., & McNair, H. M. (2003). Fast HPLC with a silica-based monolithic ODS column. Journal of Chromatographic Science, 41(4), 209–214.

Snyder, L. R., & Kirkland, J. J. (1979). Introduction to modern liquid chromatography (2nd ed.). Wiley.

Taylor, E. W., Jia, W., Bush, M., & Dollinger, G. D. (2002). Accelerating the drug optimization process: Identification, structure elucidation, and quantification of in vivo metabolites using stable isotopes with LC/MS^n and the chemiluminescent nitrogen detector. Analytical Chemistry, 74(14), 3232–3238.

Tindall, G. W. (2002a). Mobile-phase buffers, Part I: The interpretation of pH in partially aqueous mobile phases. LCGC North America, 20(11), 1028–1032.

Tindall, G. W. (2002b). Mobile-phase buffers, Part II: Buffer selection and capacity. LCGC North America, 20(12), 1114–1118.

Tindall, G. W. (2003). Mobile-phase buffers, Part III: Preparation of buffers. LCGC North America, 21(1), 28–32.

Toyo'oka, T. (2002). Resolution of chiral drugs by liquid chromatography based upon diastereomer formation with chiral derivatization reagents. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 54(1-3), 25–56.

Uzunov, D. P., Zivkovich, I., Pirkle, W. H., Costa, E., & Guidotti, A. (1995). Enantiomeric resolution with a new chiral stationary phase of 7-chloro-3-methyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4-benzothiadiazine

S,S-dioxide, a cognition-enhancing benzothiadiazine derivative. Journal of Pharmaceutical Sciences, 84(8), 937–942.

Wheals, B. B. (1987). Ion chromatography of inorganic anions on a dynamically modified polystyrene-divinylbenzene packing material and its application to anion screening by sequential ultraviolet absorbance and electrochemical detection. Journal of Chromatography, 402, 115–126.

Whelpton, R., & Buckley, D. G. (1992). Resolution of compounds on urea-bonded chiral HPLC columns—Effect of derivatization. In E. Reid & I. D. Wilson (Eds.), Bioanalytical approaches for drugs, including anti-asthmatics and metabolites (Vol. 22, pp. 311–315). Royal Society of Chemistry.

Whelpton, R., & Buckley, D. (1992). Comparison of Chiral 1 and Chiral 2 high-performance liquid chromatographic columns for the resolution of some drug enantiomers. Analytical Proceedings, 29(6), 249–251.

White, P. C. (1980). Use of dual-wavelength UV detection in high-performance liquid chromatography for the identification of barbiturates. Journal of Chromatography, 200, 271–276.

White, P. C. (1988). Comparison of absorbance ratios and peak purity parameters for the discrimination of solutes using high-performance liquid chromatography with multi-wavelength detection. Analyst, 113(11), 1625–1629.

Wyndham, K. D., O'Gara, J. E., Walter, T. H., Glose, K. H., Lawrence, N. L., Alden, B. A., Izzo, G. S., Hudalla, C. J., & Iraneta, P. C. (2003). Characterization and evaluation of C18 HPLC stationary phases based on ethyl-bridged hybrid organic/inorganic particles. Analytical Chemistry, 75(24), 6781–6788.

CHAPTER (9) الفصل التاسع



كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

الفصل التاسع

كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

مقدمة

تتضمن كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) حركة الطور السائل (عادةً مذيب عضوي) عبر طبقة رقيقة وموحدة من الطور الثابت (عادةً هلام السيليكا المميّأ، SiO_2)، وذلك بفعل الخاصية الشعرية. يتم تثبيت هذه الطبقة على دعامة صلبة أو شبه صلبة، تكون عادةً عبارة عن لوح من الزجاج، أو الألومنيوم، أو البلاستيك (Poole, 2004). تُعد تقنية TLC غير مكلفة نسبياً وبسيطة التنفيذ، على الرغم من أنها تتطلب عادةً وجود خزانة أو غطاء لسحب الأبخرة (fume cupboard or hood)، لا سيما إذا تم رش الألواح بالكاشف لإظهار التحاليل بدلاً من غمرها. يمكن أن تكون تقنية TLC أداة نوعية قوية عند استخدامها بالتزامن مع مرحلة معالجة مسبقة للعينة، مثل الاستخلاص السائل-السائل (LLE). ومع ذلك، قد يصعب تكرار بعض عمليات الفصل، حتى عند إجرائها في المختبر نفسه. كما يمكن أن يكون تفسير النتائج صعباً للغاية، خاصةً عند وجود العديد من الأدوية و/أو نواتج الأيض (الإطار 1).

يُستخدم الفصل الكروماتوغرافي للطبقة الرقيقة لمستخلصات المذيبات من البول، أو محتويات المعدة، أو بقايا مسرح الجريمة على نطاق واسع في إجراءات "فحص" السموم، كما يُوصى به للكشف عن وتحديد عدد من المركبات ومجموعات المركبات المحددة. من بعض النواحي، تُعتبر TLC امتداداً لاختبارات الألوان، حيث تُشكل الألوان المتكونة مع كواشف مختلفة أساساً لتحديد هوية المركب. ومع ذلك، فإن دمج: (1) خطوة الاستخلاص والتركيز بالمذيب، و(2) خطوة كروماتوغرافية، يعزز كلاً من الحساسية والانتقائية. وإذا لزم الأمر، يمكن إزالة المناطق غير المتفاعلة (أي المناطق التي لم تُعالج بكاشف إظهار) وإعدادها للتحليل بواسطة GC، أو HPLC، أو MS.

الإطار 1: تطبيقات TLC في السموم التحليلية

- تقنية نوعية قوية.
- تحليل الدفعات (Batch analysis): يمكن تحليل العديد من المستخلصات معاً.
- تُستخدم بشكل أساسي للبول، على الرغم من إمكانية تحليل مستخلصات عينات أخرى.
- تقنية غير مدمرة: يمكن عادةً استعادة التحليل إذا لم تتم معالجة اللوح بكاشف إظهار.
- لا تتطلب معدات معقدة (ولكن تتطلب خزانة أو غطاء لسحب الأبخرة).
- سعة العينة منخفضة نسبياً: يسهل تحميل النظام الكروماتوغرافي فوق طاقته.
- القياسات الكمية ممكنة باستخدام المسح التكثيفي (Densitometric scanning).

بشكل عام، من غير الحكمة الاعتماد فقط على TLC دون تأكيد النتائج بواسطة تقنية أخرى مثل GC، وذلك لأن قوة الفصل (resolving power) لتقنية TLC محدودة، وتفسير الكروماتوغرامات التي يتم الحصول عليها هو، إلى حد ما، تفسير ذاتي (Ojanpera, 1992). ومع ذلك، تتمتع كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عالية الأداء (HPTLC) بقوة فصل فائقة مقارنةً بـ

TLC التقليدية، كما أن الجمع بين الكروماتوغرافيا الكفؤة وإظهار النتائج بالألوان يمنح انتقائية جيدة. وتعتبر الأعمال الكمية ممكنة باستخدام الماسح التكثيفي (densitometric scanner).

من المهم ملاحظة أن العديد من كواشف الرش المستخدمة في إظهار التحاليل سامة للغاية، ويجب دائماً إجراء عملية الرش داخل خزانة أو غطاء مناسب لسحب الأبخرة. علاوة على ذلك، يمكن أن تترك بقايا الرش المتطايرة آثاراً على جدران الخزانة، لذا يُنصح بتبطين الخزانة لتسهيل التنظيف الدوري. كما يجب التخلص من ألواح TLC المرشوشة بعناية فائقة بعد تسجيل النتائج. وقد تم تلخيص بعض النقاط العملية في الإطار 2.

تحضير ألواح الطبقة الرقيقة

في ألواح TLC القياسية، يكون الطور الثابت عادةً عبارة عن طبقة موحدة (سماكتها **0.25 مم**) من هلام السيليكا (بمتوسط حجم جزيئات **20 ميكرومتر**). الحجم المعتاد للوح هو **20 × 20 سم**، على الرغم من إمكانية استخدام أحجام أصغر. تتوفر ألواح مدمج بها مؤشر فلوري بحيث يمكن تحديد مواقع المركبات التي تمتص الأشعة فوق البنفسجية (UV) على شكل بقع داكنة على خلفية فلورية قبل الرش بكواشف الإظهار، إذا لزم الأمر. إن نقع اللوح مسبقاً في هيدروكسيد البوتاسيوم الميثانولي وتجفيفه قد يحسّن من عملية الفصل الكروماتوغرافي لبعض المركبات القاعدية عند استخدام أنظمة مذيبات معينة، ولكن بشكل عام، فإن إضافة هيدروكسيد الأمونيوم المركز (كثافة نسبية 0.88) إلى الطور المتحرك له نفس التأثير.

الإطار 2: جوانب عملية لتقنية TLC في السموم التحليلية

- من الصعب الحصول على ألواح TLC موثوقة؛ لذا يجب اختبار لوح من كل دفعة يتم شراؤها مسبقاً.
- يصعب أتمتة هذه التقنية.
- إذا كان مذيب التنمية يحتوي على هيدروكسيد الأمونيوم، فيجب استخدام الأمونيا المركزة (كثافة نسبية 0.88، 28% وزن/حجم)؛ حيث أن فقدان الأمونيا من المذيب المعاد استخدامه سبب شائع لضعف النتائج.
- استخدم خزانات TLC "مشبعة" للحصول على نتائج قابلة للتكرار.
- يجب تخطيط (تسنين) الأعمدة على الألواح الكبيرة للحصول على نتائج جيدة.
- العديد من كواشف الرش سامة جداً – توخَّ الحذر!

يمكن تحضير ألواح TLC في المختبر من هلام السيليكا المحتوي على عامل رابط مناسب (يحتوي هلام السيليكا G على الجبس – كبريتات الكالسيوم المميأة – كعامل رابط) باستخدام جهاز بسيط لنشر الملاط (slurry-spreading apparatus). من المهم التأكد من أن الألواح الزجاجية (عادةً **20 × 20 × 0.5 سم**) نظيفة وخالية من الدهون قبل الاستخدام. يُخلط هلام السيليكا مع ضعف وزنه من الماء لتكوين ملاط، ثم يُطبق بسرعة على اللوح الزجاجي باستخدام أداة نشر تجارية لتكوين طبقة بسماكة **0.25 مم** تقريباً. يمكن إضافة إضافات مثل المؤشر الفلوري إذا لزم الأمر. يجب تجفيف الألواح في الهواء وحفظها بعيداً عن الرطوبة قبل الاستخدام. يجب مراقبة جودة هذه الألواح "المصنعة منزلياً" بعناية؛ حيث يمكن أن يساعد التنشيط (أي التسخين عند **100 درجة مئوية** لمدة **30 دقيقة** قبل الاستخدام) في الحفاظ على الأداء. إن تحضير الألواح عن طريق غمس الألواح الزجاجية في ملاط السيليكا ثم تجفيفها يعطي نتائج متغيرة للغاية ولا يُنصح به. بشكل عام، تعطي الألواح المصنعة منزلياً طبقات سيليكا أكثر هشاشة بكثير من تلك المتوفرة تجارياً. بالإضافة إلى ذلك، يميل الأداء الكروماتوغرافي إلى أن يكون أقل قابلية للتكرار بشكل ملحوظ مع الألواح المصنعة منزلياً. تشير الخبرة إلى أنه من الأفضل توحيد استخدام علامة تجارية معينة من الألواح المتوفرة تجارياً، مثل **Silica gel 60** F_{254}(شركة ميرك، دارمشتات، ألمانيا). ومع ذلك، حتى مع الألواح التجارية، قد تحدث اختلافات بين الدفعات في قيم الاستبقاء، وكذلك في الحساسية مع بعض تركيبات التحليل وكواشف الرش.



تطبيق العينة

تأتي بعض الألواح المتوفرة تجارياً مزودة بطبقة ماصة خاصة لتبسيط تطبيق العينة. ومع ذلك، يتم تحميل العينة عادةً مباشرة على طبقة هلام السيليكا. يجب تحضير اللوح عن طريق تحديد نقطة الأصل برسم خط خفيف بقلم رصاص على بعد **2 سم** على الأقل من أسفل اللوح – مع الحرص على عدم إتلاف سطح السيليكا بأي شكل من الأشكال. يجب بعد ذلك رسم خط على اللوح على ارتفاع **10 سم** فوق نقطة الأصل للإشارة إلى الموضع الأمثل لجبهة المذيب؛ ويمكن استخدام مسافات أخرى إذا لزم الأمر. يُنصح عند استخدام ألواح **20 × 20 سم** بتخطيط أعمدة بعرض **2 سم** تقريباً بشكل عمودي على اللوح، مع ترك هوامش مخططة على جانبي اللوح لتقليل "تأثيرات الحواف" (edge effects) كما سيتم مناقشته لاحقاً.

يجب تطبيق العينات وأي معايير قياسية عند نقطة الأصل في الأعمدة المخصصة. يجب إجراء تحميل العينة بعناية باستخدام ماصة دقيقة (micropipette) أو محقنة لتكوين "بقع" لا يزيد قطرها عن **5 مم**. إذا تم تكوين بقع أكبر، فسيضعف الفصل عند تنمية الكروماتوغرام. يجب إبقاء حجم المذيب المطبق عند حده الأدنى؛ وعادةً ما يكون **5-10 ميكرولتر** من المحلول الذي يحتوي على حوالي **10 ميكروغرام** من المادة التحليلية مناسباً. يجب تطبيق مستخلصات العينة التي تم إعادة تشكيلها أولاً، متبوعة بالمعيار (المعايير) المطلوب أو مخاليط المعايير؛ فعملية تطبيق مستخلصات العينة قبل المعايير تقلل من خطر التلوث المتبادل. إن استخدام مذيب غير قطبي لتطبيق البقع سيؤدي إلى بقع صغيرة ومركزة، حيث تميل المواد التحليلية إلى

الامتصاص على السيليكا. ومع ذلك، هذا ليس عملياً دائماً، وعادةً ما يكون الميثانول مرضياً. يجب تجفيف البقع بتيار من الهواء أو النيتروجين قبل الكروماتوغرافيا. يجب استخدام منفاخ الهواء الدافئ بحذر، مع مراعاة ثبات وتطاير المواد التحليلية مثل الأمفيتامينات. يجب ترك اللوح ليبرد قبل البدء بعملية التنمية.

تنمية الكروماتوغرام (Developing the Chromatogram)

تتوفر خزانات تنمية TLC الزجاجية بمجموعة متنوعة من الأحجام لتناسب مختلف ألواح TLC لدى العديد من الموردين. تحتوي هذه الخزانات عادةً على حافة زجاجية مصنفرة، والتي تشكل سدادة محكمة الإغلاق مع غطاء زجاجي؛ حيث يمكن استخدام كمية صغيرة من هلام التشحيم السيليكوني لضمان إحكام السدادة. تحتوي بعض الخزانات على تجويف (well) في القاع لتقليل كمية المذيب المطلوبة. يجب تبطين الخزانات بورق ترشيح أو ورق نشاف على ثلاثة جوانب، ويُضاف المذيب قبل **30 دقيقة** على الأقل من وقت تنمية الكروماتوغرام لتشبيع الجو ببخار المذيب، حيث يساعد ذلك في الحصول على نتائج كروماتوغرافية قابلة للتكرار. كما تُعد عمليات الفصل أسرع في الخزانات المشبعة، وتكون النتائج أقل اعتماداً على الظروف الكروماتوغرافية، مثل أبعاد وشكل الخزان ودرجة حرارة الوسط المحيط.

تتكون بعض أطوار TLC المتحركة من مذيب واحد، لكن معظمها عبارة عن مخاليط. ومن أكثر الأطوار المتحركة استخداماً في السموم التحليلية خليط "EMA"، وهو: خلات الإيثيل : الميثانول : هيدروكسيد الأمونيوم المركز بنسبة (**85 : 10 : 5**). من المهم تحضير الأطوار المتحركة يومياً، لأن تركيبها قد يتغير بمرور الوقت بسبب التبخر أو التفاعل الكيميائي. وبشكل خاص، فإن فقدان الأمونيا -ليس فقط من الطور المتحرك، بل أيضاً من زجاجات الكواشف بمجرد فتحها- يسبب العديد من المشكلات.

يتم تنمية الكروماتوغرام عن طريق وضع اللوح المحمّل بالعينة في الخزان الموازن، مع التأكد من أن مستوى المذيب أعلى من الحافة السفلية لطبقة السيليكا على اللوح، ولكن تحت مستوى "البقع" المطبقة على اللوح، ثم إعادة الغطاء بسرعة (الشكل 1). يجب مراقبة اللوح للتأكد من أن جبهة المذيب ترتفع بانتظام. إن حركة الطور المتحرك ترجع أساساً إلى القوى الشعرية، وبما أن الطور الثابت جاف، فإن شكل جبهة الطور المتحرك يكون مقعراً (شكل الغضروف المتقدم). ونتيجة لذلك، ستظهر جبهة المذيب درجة من الانحناء، خاصة عند حواف اللوح؛ وقد يُلاحظ انحناء أو تقوس أكثر حدة إذا لم يكن الجو داخل الخزان مشبعاً بدرجة كافية ببخار المذيب. يمكن تقليل "تأثير الحافة" هذا عن طريق تقسيم اللوح إلى أعمدة بعرض **2 سم** تقريباً، كما نوقش سابقاً. تتناقص سرعة الطور المتحرك بسبب لزوجته وزيادة وزن الطور المتحرك مع تقدمه نحو الأعلى على اللوح. وتتغلب أنظمة التدفق القسري على ذلك من خلال الحفاظ على معدل تدفق ثابت (الشكل 2).

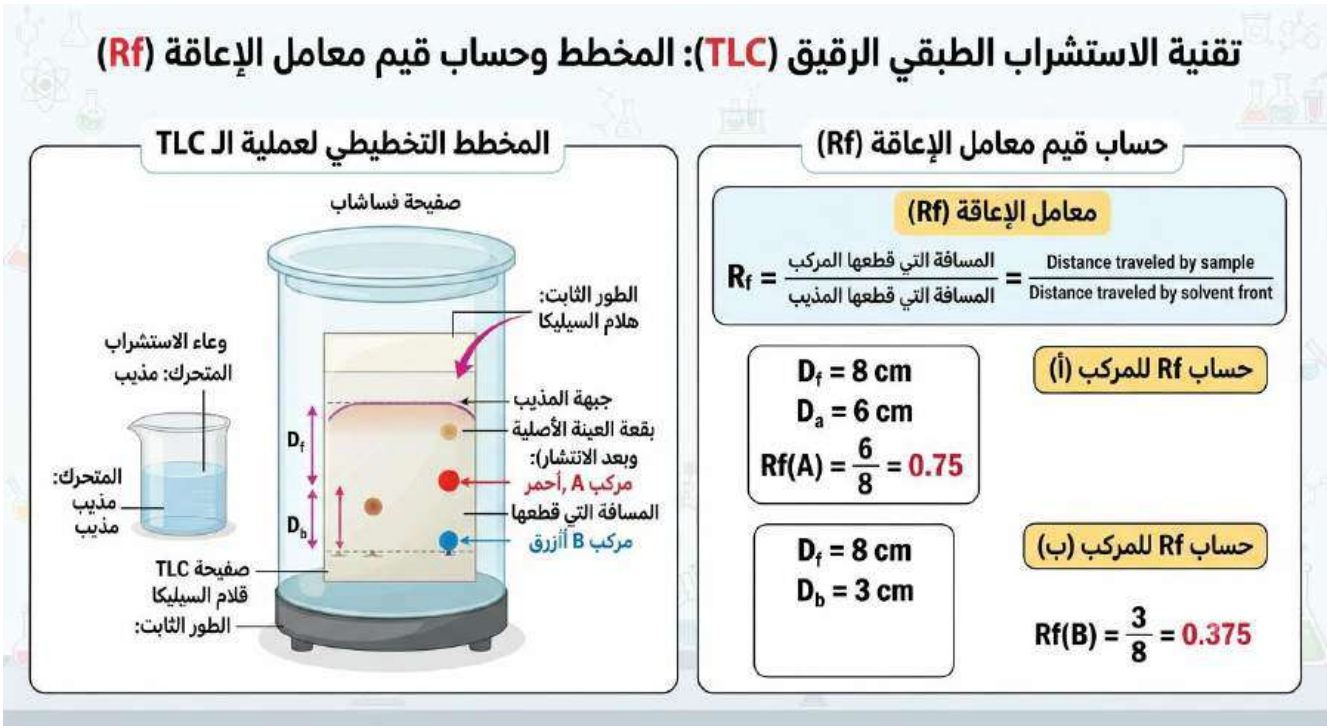
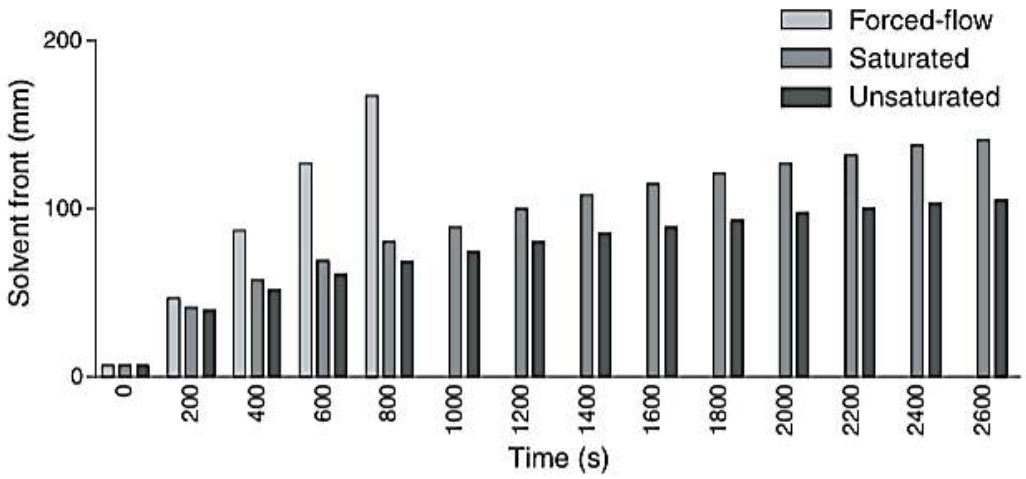


Figure 1 Thin-layer chromatography: schematic and calculation of R_f values.

الشكل 1: كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة: مخطط وحساب قيم R_f.



الشكل 2: مقارنة بين حركة جبهة المذيب في خزانات مشبعة وغير مشبعة. مع كروماتوغرافيا التدفق القسري، تتحرك جبهة المذيب بمعدل ثابت. الطور المنمي (Eluent): الكلوروفورم. (أعيد طباعته من: Kalász, H. and Báthori, M. (2001) Pharmaceutical applications of TLC. LC GC Europe, 14, 311–21، بإذن من Advanstar Communications).

يجب ترك الكروماتوغرام ينمو للمسافة المحددة، وعادةً **10 سم** من نقطة الأصل، وبعد ذلك يجب إخراج اللوح من الخزان، ووضعه في خزانة أو تحت غطاء لسحب الأبخرة وتركه ليجف. يمكن تسريع عملية التجفيف عن طريق نفخ هواء دافئ (باستخدام مجفف شعر) فوق اللوح حتى تتم إزالة جميع آثار المذيب. وهذا أمر مهم بشكل خاص عند استخدام الأطوار المتحركة الأمونيومية (التي تحتوي على الأمونيا)، لأن وجود بقايا الأمونيا يؤثر على التفاعل الملاحظ مع بعض كواشف الرش.

إظهار الكروماتوغرام (Visualizing the Chromatogram)

بعد تنمية الكروماتوغرام وتجفيف اللوح، يجب فحص الكروماتوغرام تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية (بطول موجي **254** و **366 نانومتر**) في صندوق مغلق مناسب، وتدوين مواقع أي مركبات فلورية ("بقع"). إذا تم إضافة مؤشر فلوري إلى السيليكا، فإن العديد من المواد الموجودة تظهر كمناطق داكنة مقابل خلفية فلورية. وعادةً ما يؤدي رش الألواح أو غمرها إلى إخماد تألق المؤشر.

في سموم الطب السريري، يعطي استخدام كواشف الكشف الكيميائي الملونة (chromogenic) عموماً معلومات أكثر فائدة. يمكن "غمر" الألواح في الكاشف، ولكن ما لم تُتخذ احتياطات خاصة، فإن بنية السيليكا تميل إلى التلف، مما يؤدي إلى تدمير الكروماتوغرام. لذا، يُطبق الكاشف عادةً بشكل خفيف كرذاذ (aerosol) باستخدام زجاجة رش تجارية متصلة بخط هواء مضغوط أو نيتروجين. ويؤدي تغيير ضغط المدخل إلى تغيير كثافة الرذاذ، وبالتالي كمية الكاشف التي تصل إلى الكروماتوغرام في وقت معين.

عند رش اللوح، قد يكون من الصعب الحصول على تغطية متساوية، خاصةً عندما يكون اللوح موضوعاً على سطح ما، حيث قد يرتفع رذاذ الكاشف الفائض على اللوح بفعل الخاصية الشعرية، مما يدمر الجزء السفلي من الكروماتوغرام. وتتغلب تقنية بسيطة تتمثل في قلب اللوح (جعل الأعلى للأسفل) قبل الرش على هذه المشكلة. يمكن استخدام ألواح زجاجية "الحجب" أجزاء من اللوح إذا كان المراد رش أعمدة مختارة بكواشف مختلفة (الإطار 3، الشكل 3). وبدلاً من ذلك، إذا تم استخدام ألواح ذات ظهر بلاستيكي أو ألومنيوم، فيمكن قص المناطق المناسبة ورشها بشكل منفصل. قد يتغير مظهر بعض المركبات بمرور الوقت، لذا من المهم تسجيل النتائج بأسرع ما يمكن وبدقة، مع ملاحظة أي تغيرات زمنية. يُعد نظام تسجيل البيانات الموحد قيماً لأغراض المرجعية - ومن الناحية المثالية، يجب استخدام كاميرا رقمية وأرشفة الملفات.

الإطار 3: كواشف الإظهار للمستخلصات الحمضية والقاعدية (انظر الشكل 3)

- **كاشف نترات الزئبق (I):** نترات الزئبق (I) (**1 جم**) + ماء (**100 مل**) – تُضاف نترات حمض الهيدروكلوريك المركزة حتى يصبح المحلول صافياً.
- **كاشف يودوبلاتينات المحمض:** كلوريد البلاتين (II) (**0.25 جم**) + يوديد البوتاسيوم (**5 جم**) + حمض الهيدروكلوريك المركز (**5 مل**) – يُكمل الحجم إلى **100 مل** بالماء.
- **كاشف ماندلين (Mandelin's reagent):** فانادات الأمونيوم (مسحوق ناعم، **0.5 جم**) + حمض الكبريتيك المركز (**100 مل**) – يُرج جيداً قبل الاستخدام.
- **حمض الكبريتيك المائي:** ماء (**50 مل**) + حمض الكبريتيك المركز (**50 مل**) – يُضاف الحمض ببطء مع الحرص والتبريد.

يمكن استخدام مجموعات متنوعة من كواشف الرش للمساعدة في تحديد هوية المواد غير المعروفة، كما يمكن أن تكون بعض العوامل مفيدة للتعرف على المجموعات الوظيفية. على سبيل المثال، يعطي كاشف دراجندورف (Dragendorff's reagent) بقعاً ذات لون برتقالي إلى برتقالي محمر مع الأمينات، لا سيما الأمينات الثالثية ومركبات الأمونيوم الرباعية، ولذا استُخدم تقليدياً للكشف عن القلويات (Alkaloids). يتفاعل النينهيدرين (Ninhydrin) مع الأمينات الأولية، بما في ذلك الأحماض الأمينية. يمكن إظهار الأمينات الثانوية باستخدام نيتروبروسيد: أسيتالدهيد (الجدول 1).

في المثال الموضح في الشكل 3، تم حجب مناطق من اللوحة بألواح زجاجية رقيقة ورُشّ كل منطقة على حدة. ومع ذلك، فإن الرش المتسلسل بكواشف مختلفة يُعد تقنية تحديد قيمة. فعلى سبيل المثال، يمكن رش كاشف دراجندورف بعد رش اللوحة بالنينهيدرين وكاشف FPN (الجدول 1). علاوة على ذلك، يمكن إجراء تفاعلات معقدة إلى حد ما عن طريق الرش المتسلسل.

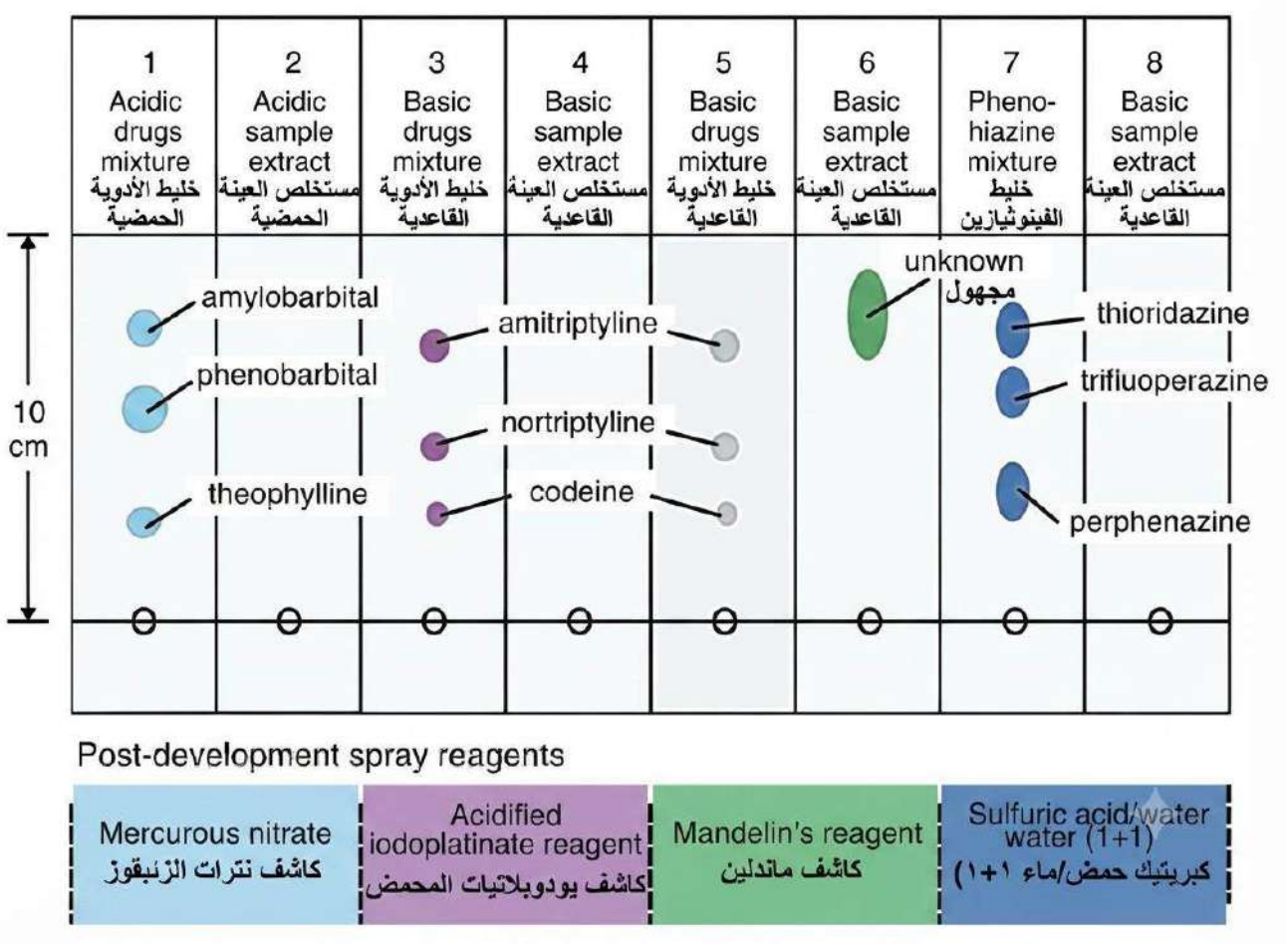
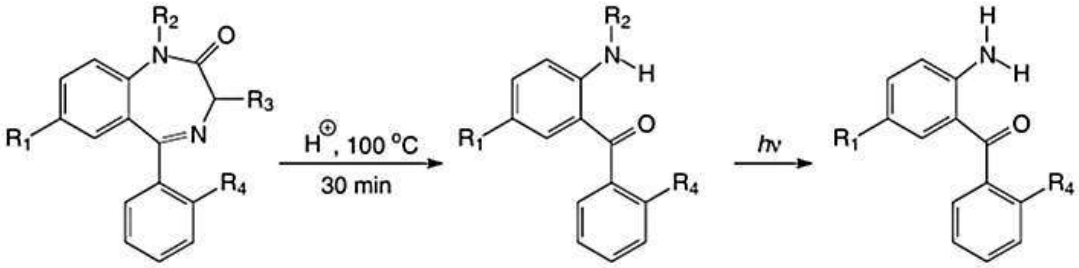


Figure 3: Example of differential visualization of a TLC plate.
الشكل 3: مثال على الإظهار التفاضلي للوحة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC).

لقد تم تحديد البنزوديازيبينات (Benzodiazepines) في البول بعد التحلل المائي الحمضي لتحويلها إلى أمينوبنزوفينونات (aminobenzophenones). تلك التي تحتوي على أمين عطري أولي يمكن تحديد موقعها باستخدام تفاعل براتون-مارشال (Bratton–Marshall reaction) (الإطار 4). تتم أزتة (diazotization) المواد التحليلية بحمض النيتروز ومزجها (coupled) مع N-1-نافثيل إيثيلين ثنائي الأمين (N-1-naphthylethylene diamine) لتعطي صبغات آزو ملونة للغاية، بعد إزالة فائض حمض النيتروز عن طريق التفاعل مع سلفامات الأمونيوم (Berry and Grove, 1973). يمكن إزالة ألكلة البنزوفينونات الناتجة عن البنزوديازيبينات ذات مستبدلات N^1-ألكيل، على سبيل المثال عن طريق التعرض للأشعة فوق البنفسجية (Schütz, 1989)، وهو ما يبدو مفضلاً على التسخين (Volf, 1998)، وذلك قبل التفاعل مع حمض النيتروز لضمان حساسية متزايدة (الشكل 4).



الشكل 4: التحلل المائي للبنزوديازيبينات وإزالة ألكلة N-ألكيل بنزوفينونات.

من الواضح أن هذه الطريقة لا يمكنها التمييز بين البنزوديازيبينات التي تتحلل مائياً إلى بنزوفينون مشترك (مثل ديازيبام، كيتازولام، تيمازيبام). ومع ذلك، فإن هجرة 5 (migration)-كلورو-2-ميثيل أمينو بنزوفينون تختلف عن تلك الخاصة بـ 2-أمينو-5-كلورو بنزوفينون المتكون من نورديازيبام وأوكسازيبام. بشكل عام، تكون البقع ذات لون أرجواني، ولكن نواتج أيض 7-أمينو بنزوديازيبين الخاصة بنيترازيبام وكلونازيبام، على سبيل المثال، تعطي ثنائي أمينو بنزوفينونات التي تظهر باللون الأزرق مع كاشف براتون-مارشال. يتم تقليل التداخل من الأمينات الأولية الأخرى مثل السلفوناميدات باستخدام أطوار منمية (eluents) غير قطبية نسبياً.

الجدول 1: أمثلة على الكواشف الملونة (Chromogenic reagents)

الكاشف	المكونات	التعليقات / الاستخدام
4-نيتروأنيلين المأزوت (Diazotized 4-nitroaniline)	4- (1)نيتروأنيلين (0.7 جم) في حمض الهيدروكلوريك (1 مول/لتر، 100 مل) (2)نتريت الصوديوم (1 جم) في الماء (100 مل) أضف 4 مل من (1) قطرة قطرة إلى 5 مل من (2) المبردة بالثلج، وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء.	الفينولات
كاشف دراجندورف(Dragendorff)	(1)نترات البزموت القاعدية· $[4BiNO_3(OH)_2$ 0.85) $[BiO(OH)$جم) مذابة في حمض الخليك الثلجي (10 مل) والماء (40 مل((2)يوديد البوتاسيوم (8 جم) في الماء (20 مل) اخلط 5 مل من (1) و 5 مل من (2) وحمض الخليك الثلجي (20 مل)، وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء.	الأمينات ومركبات الأمونيوم الرباعية، وخاصة القلويات (Alkaloids)
فولين-سيوكالتو–(Folin Ciocalteau)	متوفر كمحلول مركز (2 مول/لتر). يُخفف بالماء أو الإيثانول بنسبة (1+1) قبل الاستخدام.	الفينولات
FPN (حديد، حمض البيركلوريك، حمض النيتريك)	كلوريد الحديد (III) (5% وزن/حجم، 5 مل)، حمض البيركلوريك (20% وزن/وزن، 45 مل)، حمض النيتريك (50% حجم/حجم، 50 مل).	أساساً للفينوثيازين (Phenothiazines)
النينهيدرين(Ninhydrin)	نينهيدرين (0.3 جم)، بيريدين (5 مل)، ميثانول (95 مل).	الأمينات الأولية، الأحماض الأمينية
نيتروبروسيد: أسيتالدهيد (Nitroprusside:acetaldehyde)	(1)نيتروبروسيد الصوديوم (5 جم) + أسيتالدهيد (10 مل) + ماء حتى 100 مل (2)كربونات الصوديوم (5 جم) في الماء (100 مل) اخلط حجوم متساوية من (1) و (2) قبل الاستخدام.	الأمينات الثانوية

تم وصف تقنية كروماتوغرافيا البنزوفينونات ونواتج التحلل المائي ذات الصلة لبعض البنزوديازيبينات التي طُرحت مؤخراً، بما في ذلك كلونازيبام، ولورازيبام، وفلونيتر ازيبام، وبرازيبام، وكوازيبام (Schütz, 1989).

عامل الاستبقاء (R_f)

يُستخدم عامل الاستبقاء (R_f، ويُعرف أيضاً بعامل الإعاقة) عادةً لتسجيل بيانات الاستبقاء في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC). يُعرّف R_f بالمعادلة التالية:

$$R_f = \frac{\text{المسافة التي قطعتها المادة التحليلية من نقطة الأصل}}{\text{المسافة التي قطعتها جبهة المذيب من نقطة الأصل}}$$

Retention factor (R_f)

The retention factor (R_f, also known as the retardation factor) is normally used to record TLC retention data. R_f is defined as:

$$R_f = \frac{\textbf{Distance the analyte has travelled from the origin}}{\textbf{Distance the solvent front has travelled from the origin}}$$

وبالتالي، فإن R_f هو كسر (0.30، 0.75، إلخ) وهو مستقل (بشكل معقول) عن طول الكروماتوغرام (المسافة التي قطعتها جبهة المذيب من نقطة الأصل). تُعد قيم hR_f (حيث $hR_f = R_f \times 100$) أكثر ملاءمة، خاصة إذا تم توحيد طول الكروماتوغرام عند **10 سم (100 مم)**، حيث تصبح hR_f حينها ببساطة هي المسافة (بالميليمتر) التي قطعتها المادة التحليلية من نقطة الأصل.

هناك العديد من العوامل التي تؤثر على دقة قيم hR_f، بما في ذلك: (1) لوح TLC، (2) كمية المادة التحليلية المطبقة على اللوح، (3) مسافة التنمية، (4) درجة تشبع الخزان، (5) درجة حرارة الوسط المحيط، و(6) تأثير المركبات المستخلصة (تأثيرات المصفوفة). يمكن تقليل تأثير بعض هذه العوامل إذا تم تحليل مركبات مرجعية (معايير) مع كل عينة. عند حساب قيم hR_f لمواد غير معروفة، من المعتاد حساب "قيمة hR_f مصححة" من القيم الملاحظة تجريبياً للعينة والمركبات المرجعية (الإطار 5). بدلاً من ذلك، يمكن رسم قيم hR_f المقبولة في المراجع مقابل القيم الملاحظة للمعايير المرجعية (من الناحية المثالية أربعة، متباعدة بالتساوي على الكروماتوغرام). وهكذا يمكن الحصول على القيمة المصححة للمادة غير المعروفة عن طريق الاستيفاء (interpolation).

الإطار 4: تحديد البنزوديازيبينات بالـ TLC على هيئة بنزوفينونات
• **التحلل المائي:** اخلط العينة (بول، محتويات المعدة) أو المعيار (**10 مل**) مع حمض الهيدروكلوريك المركز (**3 مل**) – سخن عند **100 درجة مئوية** (**30 دقيقة**). • **الاستخلاص:** برد واستخلص باستخدام إيثر البترول (جزء **40-60 درجة مئوية**)[a] – طرد مركزي لفصل الأطوار – انقل الطور العضوي إلى أنبوب نظيف وقم بتبخيره حتى الجفاف – أعد الذوبان في إيثر البترول (جزء **40-60 درجة مئوية**) (**0.1 مل**). • **الكروماتوغرافيا:** ألواح هلام السيليكا (محضرة كما هو موضح أعلاه) – تنمية في خليط التولوين : حمض الخليك الثلجي (**97 + 3**)[b].

- **الإظهار:** رش الألواح بالتتابع بالكواشف التالية مع التجفيف بين كل عملية تطبيق: (1) حمض الكبريتيك المائي (الإطار 6.3) (2) محلول نتريت الصوديوم المائي المحضر طازجاً (**10 جم/لتر**) (3) محلول سلفامات الأمونيوم المائي (**50 جم/لتر**) (4) 1-N-نافثيل إيثيلين ثنائي الأمين (**10 جم/لتر** في أسيتون : ماء، **80 + 20**)

^{a}يمكن جعل الطور المائي قلوياً قبل الاستخلاص (Schütz, 1989). ^{b}تم استخدام البنزين : حمض الخليك الثلجي (**97 + 3**) في الأصل.

من التعقيدات الرئيسية أن كروماتوغرافيا المركبات التي تنشأ من مستخلصات بيولوجية تختلف غالباً عن تلك الخاصة بالمواد النقية بسبب وجود مكونات عينة إضافية في مستخلصات المذيبات، على سبيل المثال. ليس من العملي تحضير محاليل قياسية في كل نوع من أنواع المصفوفات التي قد نصادفها، ولكن بافتراض وجود ما يكفي من العينة، فإن إضافة كمية صغيرة من مكون مشتبه به إلى مستخلص متبوعاً بإعادة التحليل قد يساعد في توضيح ما إذا كان هذا المكون موجوداً في المستخلص أم لا. إذا لم تهاجر المادة المضافة والمادة غير المعروفة معاً (co-chromatograph)، فهذه طريقة قوية لاستبعاد المكون المشتبه به.

يتطلب التفسير الصحيح لبيانات TLC ممارسة وخبرة، ولكن هناك بعض المبادئ التوجيهية الأساسية (الإطار 6).

الإطار 5: حساب قيم hR_fالمصححة

لحساب قيمة hR_fالمصححة لمادة تحليلية غير معروفة (U) لها قيمة hR_fمرصودة قدرها U_{obs}. إذا كانت قيمة U_{obs}تقع بين قيمتي معيارين (A) و (B)، واللتين لهما قيم hR_fغير مصححة قدرها A_{obs}و B_{obs}على التوالي، فإن القيمة المصححة للمادة غير المعروفة تُحسب كالتالي:

$$\text{corrected } hR_f \text{ of unknown (U)} = A_{lit} + \frac{B_{lit} - A_{lit}}{B_{obs} - A_{obs}} \times (U_{obs} - A_{obs})$$

حيث تُمثّل A_{lit}و B_{lit}القيم المرجعية المعتمدة (في قواعد البيانات) لـ hR_fالخاصة بالمعيارين Aو B.

الإطار 6: السموم التحليلية – تفسير وتخزين بيانات TLC

- قم بتحليل المركبات المرجعية المعروفة على نفس اللوح المستخدم للمواد غير المعروفة.
  - ضع المستخلصات أولاً!
- بيانات R_fليست قابلة للتكرار بشكل كبير.
  - قارن النتائج بمركب أصلي للأدوية/السموم غير الشائعة.
  - حللها على نفس اللوح المستخدم للمادة غير المعروفة.
- يعتمد التفسير على تعقيد الحالة وخبرة القائم بالتحليل.
  - تعطي العديد من الأدوية القاعدية تفاعلات لونية متشابهة جداً مع بعض الكواشف الرشاشة.
  - يجب دائماً ربط النتائج ببيانات GC، وHPLC، والمقايسة المناعية (immunoassay).
- يصعب تخزين الكروماتوغرامات التي تم تنميتها – استخدم التصوير (الرقمي).

يمكن تحديد الجزيئات المرشحة لمزيد من التحقيق من خلال الاستخدام الحكيم لمزيج من أنظمة التنمية وكواشف الإظهار. باستخدام خمسة أنظمة تنمية، تمكن Zingales (1967, 1968) من تحديد **45** دواءً نفسياً. ومع ذلك، تكمن المشكلة في استخدام اللون كوسيلة لتحديد هوية المادة التحليلية في صعوبة وصف لون معين بشكل لا لبس فيه. على سبيل المثال، وُصف اللون الذي ينتجه الفلوفينازين (fluphenazine) مع كاشف FPN بأنه لون "الكاميو" (cameo)، أو السلمون، أو البرتقالي (وربما درجات ألوان أخرى كثيرة). كما أن إدراك لون معين من المحتمل أن يتغير مع كمية المادة التحليلية الموجودة. ومن المحاولات للتغلب على ذلك فيما يتعلق بالألوان التي تنتجها الفينوثيازينات (phenothiazines) مع حمض الكبريتيك هو قياس الطول الموجي الأقصى (Whelpton, 1997). وتجدر الإشارة إلى أن التمثيل الغذائي، وخاصة الهيدروكسلة

(hydroxylation)، يغير الألوان؛ فعلى سبيل المثال، يعطي الميسوريدازين (mesoridazine) -وهو أحد نواتج أيض الثيوريدازين- لوناً مشابهاً جداً لذلك الذي يعطيه الكلوربرومازين.

عند تفسير نتائج TLC، كما هو الحال في أي نتائج في السموم التحليلية، من المهم فهم طبيعة العينة وكيمياء المادة (المواد) التحليلية. عادةً، لا تُفرز إلا كميات صغيرة من المركبات شديدة المحبة للدهون (lipophilic) في البول، على الرغم من أن نواتج أيضها قد تكون موجودة بتركيزات عالية. الثيوريدازين، على سبيل المثال، يُوصف كراسمات (racemate)، وبسبب إدخال التأكسد الكبريتي (sulfoxidation) والأكسدة النيتروجينية (oxidation-*N*) لمراكز مراوية (chiral) إضافية، فإن هذا يؤدي إلى ظهور نواتج أيض دياستيريوميرية (diastereoisomeric metabolites)، والتي غالباً ما تظهر في الكروماتوغرافيا كأزواج مميزة من البقع (Flanagan et al., 1995; plate 11).

تجميع بيانات R_f لـ TIAFT-DFG

توفر الطبعة الثانية من تجميع بيانات R_f لـ TIAFT-DFG (TIAFT-DFG, 1992) قيم R_f لحوالي **1800** مادة ذات أهمية سمية في **10** أنظمة TLC يمكن استخدامها لأغراض الفحص العام. وهناك أيضاً بيانات حول أنظمة خاصة لتحليل المبيدات ونواتج التحلل المائي للبنزوديازيبينات (البنزوفينونات) في البول. وتتوفر الكثير من هذه المعلومات من مصادر أخرى (Moffat et al., 2004).

نظام Toxi-Lab

يُعد Toxi-Lab (شركة Varian، متاح عبر الموقع الإلكتروني المذكور، تم الوصول إليه في 12 يوليو 2007) نظام TLC قياسياً متوفراً في شكل مجموعة (kit) مع دليل من الألواح الملونة يوضح قيم R_f والتفاعلات اللونية ومعلومات إضافية لتسهيل التفسير (نظام AB). تحل السليلوز المشبع بالسيليكا محل لوح TLC التقليدي، ومن المزايا العملية لهذا النظام أنه يمكن استخدام الغمر في كواشف الإظهار، مما يلغي الحاجة إلى خزانة لسحب الأبخرة.

تم توثيق أكثر من **700** مادة تحليلية ونواتج أيضها لتسهيل التعرف عليها. ويتم تحديث النظام باستمرار؛ حيث أُضيفت مركبات مثل سيتالوبرام، وميرتازابين، وأولانزابين، وكويتيابين في السنوات الأخيرة. ومع ذلك، وكما هو الحال مع تقنية TLC بشكل عام، قد تنشأ مشكلات عند محاولة التمييز بين المركبات ذات الحركية (mobility) والتفاعلات اللونية المتشابهة، خاصةً إذا كان هناك أكثر من مركب موجود. علاوة على ذلك، تستهدف المجموعة بشكل أساسي السوق الأمريكية، وبالتالي فإن بعض الأدوية الشائعة في المملكة المتحدة غير مدرجة في هذا الدليل. وقد تم التأكيد على المخاطر الكامنة في الاستخدام غير المناسب لهذه المجموعة في حالات الجرعات الزائدة (Dawling and Widdop, 1988). ويجب استخدامها بحذر عند اختبار تعاطي المخدرات في البول (Wilson et al., 2001).

كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة عالية الأداء (HPTLC)

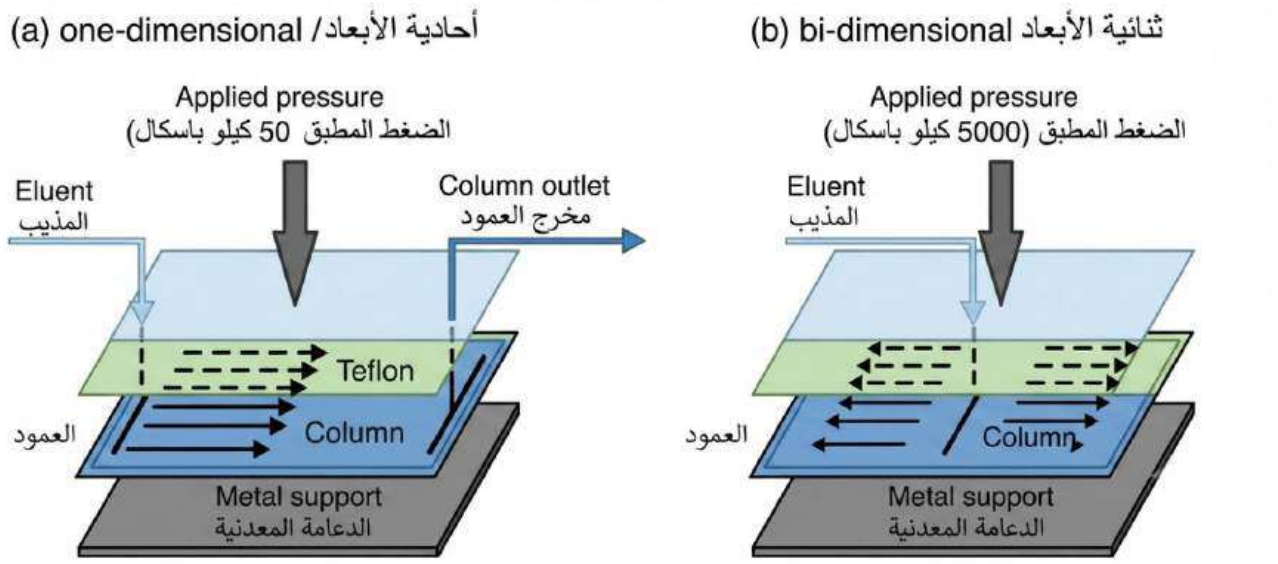
تتميز ألواح HPTLC بحجم جزيئات أصغر (5-10 ميكرومتر) وتعطي كفاءة أكبر من الألواح التقليدية. كما تتوفر ألواح "الطور المعكوس" (Reversed-phase)، حيث يتم ربط جزء كاره للماء (عادةً C_2 أو C_8 أو C_{18}) بمصفوفة السيليكا. ومع ذلك، فإن ألواح HPTLC وألواح الطور المعكوس أكثر تكلفة ولها سعة عينة أقل من الألواح التقليدية، وهو اعتبار مهم في سموم الجرعات الزائدة حيث يمكن لكميات المادة التحليلية الموجودة أن تغمر بسهولة حتى ألواح TLC العادية.

عادةً ما تكون ألواح HPTLC بحجم **10 × 10 سم**. يجب أن تكون بقع HPTLC محددة قدر الإمكان (قطرها 1-2 مم). يُنصح باستخدام أنظمة التنقيط الآلية (spotting systems) وتعتبر إلزامية للعمل الكمي.

الكروماتوغرافيا المستوية ذات التدفق القسري (Forced-flow planar chromatography)

بدلاً من الاعتماد على الخاصية الشعرية لسحب الطور المنمي عبر اللوح، وُصفت عدة طرق "لدفع" التدفق (Nyiredy, 2003)، بما في ذلك الكروماتوغرافيا المستوية الدورانية (RPC) التي تُستخدم فيها القوة الطاردة المركزية، والكروماتوغرافيا الكهربائية المستوية (EPC) التي تعادل تقنية CEC (القسم 9.9.1) في TLC، وكروماتوغرافيا الطبقة ذات الضغط الفائق (OPLC).

وقد شهدت التقنية الأخيرة، التي قُدمت في السبعينيات، حياة جديدة منذ عام 2000 مع تقديم أجهزة محسنة وتغيير في الاسم؛ حيث يرمز الاختصار الآن إلى "كروماتوغرافيا الأداء الأمثل الصفائحي" (Optimum Performance Laminar Chromatography). ومع كون التدفق مدفوعاً بمضخات عالية الضغط وإمكانية الكشف المباشر (on-line detection)، يمكن اعتبار OPLC بمثابة كروماتوغرافيا سائلة عالية الأداء (HPLC) مسطحة؛ في الواقع، يشير المصنعون إلى طبقة المادة الماصة كعمود بدلاً من لوح (الشكل 5).



الشكل 5: نمطان للكروماتوغرافيا المستوية ذات التدفق القسري. (أعيد إنتاجه من: Bryston, N. and Papillard, D. (2004) An introduction to OPLC. Operation and applications. LC GC Europe, 17, 41–7.).

يمكن توصيل وحدة OPLC الأساسية بنفس طريقة توصيل عمود HPLC الأسطواني واستخدامها عبر الإنترنت (on-line) مع الاستخلاص بنظام متساوي القوة (isocratic) أو متدرج (gradient). أو يمكن استخدامها خارج الإنترنت (off-line)، بنفس الطريقة المتبعة مع ألواح TLC التقليدية. وهكذا، تحتفظ OPLC بمزايا TLC، بما في ذلك القنوات المتعددة، والتنمية ثنائية الأبعاد، بالإضافة إلى العديد من الابتكارات، مثل القدرة على إجراء كروماتوغرافيا ثنائية الأبعاد لأربع عينات على لوح

واحد. وقد وُصفت طريقة لفحص الأدوية القاعدية في عينات بول بحجم **2 مل** باستخدام OPLC ثنائية الألواح (Pelander et al., 2003).

كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة الكمية (Quantitative Thin-Layer Chromatography)

بشرط توخي الحذر الكافي، يمكن أن تعطي تقنية TLC الكمية نتائج عالية القابلية للتكرار، مع قيم انحراف معياري نسبي (RSDs) تتراوح بين **2-3%**. وتُعد تقنية HPTLC مع المسح التكثيفي (scanning densitometry) -والتي يمكن استخدامها في أنماط متعددة تشمل النفاذية (transmittance)، وإخماد الفلورة (fluorescent quenching)، والفلورة- هي الطريقة الأكثر موثوقية على الأرجح. يضمن التنقيط التلقائي تطبيقاً دقيقاً للعينة. ومع ذلك، بالنسبة للعمل الكمي، يمكن أن يمثل التباين في تطبيق الكاشف الملون مشكلة. الغمر اليدوي يعتمد بشكل كبير على مهارة القائم بالتحليل، ويُعد الغمر الآلي هو النهج المقبول الوحيد. تسمح تقنية OPLC المتصلة مباشرة (القسم 6.8.1) بالقياس الكمي المستمر باستخدام كواشف HPLC القياسية كما نوقش أعلاه. إذا لم يتوفر مقياس كثافة (densitometer)، فيمكن كشط البقع من الألواح واستخلاص المواد التحليلية للقياس الكمي بأي تقنية تُعتبر مناسبة.

تم تقديم جهاز "إيتروسكان" (Iatroscan) كنظام TLC كمي يعتمد على قضبان كوارتز (قطرها الخارجي **150 × 0.9 مم**) مغطاة بالسيليكا أو الألومينا (Chromarod). تُجرى عمليات الفصل على القضبان (المثبتة في إطار من الفولاذ المقاوم للصدأ)، وبعد التجفيف يتم قياس المواد التحليلية كمياً بواسطة كاشف التأين اللهبي (FID). تحتوي نسخة MK6 على كاشف مزدوج FID/FPD، مما يسمح بالكشف عالي الحساسية عن المركبات المحتوية على الكبريت والفوسفور. وعلى الرغم من الميزة الواضحة المتمثلة في القدرة على فصل المركبات ذات نقاط الغليان العالية، إلا أن هذه التقنية لم تُعتمد على نطاق واسع. في الدراسات الأيضية، تُستخدم المركبات الموسومة إشعاعياً بشكل متكرر، ويمكن تحديد مواقع المواد التحليلية على ألواح TLC (على سبيل المثال عن طريق التصوير الإشعاعي الذاتي autoradioraphy) وإزالتها للعد الوميضي (scintillation counting)، أو تحديد مواقعها وقياسها كمياً عن طريق المسح الإشعاعي. تُعد TLC مفيدة بشكل خاص للدراسات الأيضية والسمية أثناء تطوير المنتجات؛ لأن جميع نواتج الأيض في المستخلص ستكون موجودة في مكان ما على اللوح، حتى لو كانت عند جبهة المذيب أو عند نقطة الأصل، بافتراض أنها ليست متطايرة حيث قد تُفقد بالتبخر. أما مع HPLC، فهناك دائماً احتمال أن تكون نواتج الأيض قد احتُجزت على العمود.

قائمة المراجع **References**

Berry, D. J., & Grove, J. (1973). Emergency toxicological screening for drugs commonly taken in overdose. Journal of Chromatography A, 80, 205–220.

Dawling, S., & Widdop, B. (1988). Use and abuse of the Toxi-Lab TLC system. Annals of Clinical Biochemistry, 25(6), 708–709.

Flanagan, R. J., Braithwaite, R. A., Brown, S. S., Widdop, B., & de Wolff, F. A. (1995). Basic Analytical Toxicology. World Health Organization.

Moffat, A. C., Osselton, D., & Widdop, B. (Eds.). (2004). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons (3rd ed.). Pharmaceutical Press.

Nyiredy, S. (2003). Progress in forced-flow planar chromatography. Journal of Chromatography A, 1000(1–2), 985–999.

Ojanperä, I. (1992). Toxicological drug screening by thin-layer chromatography. Trends in Analytical Chemistry, 11(6), 222–230.

Pelander, A., Ojanperä, I., Sistonen, J., Rasanen, I., & Vuori, E. (2003). Screening for basic drugs in 2-mL urine samples by dual-plate overpressured layer chromatography and comparison with gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 27(4), 226–232.

Poole, C. F. (2004). Thin-layer chromatography. In A. C. Moffat, D. Osselton, & B. Widdop (Eds.), Clarke's Analysis of Drugs and Poisons (3rd ed., pp. 392–424). Pharmaceutical Press.

Schütz, H. (1989). Benzodiazepines II. A Handbook: Basic Data, Analytical Methods, Pharmacokinetics and Comprehensive Literature. Springer-Verlag.

The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT)/Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). (1992). Thin-Layer Chromatographic Rf Values of Toxicologically Relevant Substances on Standardized Systems (2nd ed.). VCH.

Volf, K. (1998). Detection of 1,4-benzodiazepines and benzophenones with a secondary amino group by thermal conversion and diazotization and spraying with Bratton–Marshall reagent. Journal of Planar Chromatography – Modern TLC, 11(2), 132–136.

Whelpton, R. (1997). Neuroleptics. In H. Brandenberger & R. A. A. Maes (Eds.), Analytical Toxicology for Clinical, Forensic and Pharmaceutical Chemists (Vol. 5, pp. 451–470). Walter de Gruyter.

Wilson, J. F., Smith, B. L., Toseland, P. A., Watson, I. D., Williams, J., Thomson, A. H., Capps, N. E., Sweeney, G., & Sandle, L. N. (Steering Committee for the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme for Drug Assays). (2001). A survey of extraction techniques for drugs of abuse in urine. Forensic Science International, 119(1), 23–27.

Zingales, I. (1967). Systematic identification of psychotropic drugs by thin-layer chromatography. I. Journal of Chromatography A, 31, 405–419.

Zingales, I. (1968). Systematic identification of psychotropic drugs by thin-layer chromatography. II. Journal of Chromatography A, 34, 44–51.

CHAPTER (10) الفصل العاشر



تقنيات الرحلان الكهربائي الشعيري

CAPILLARY ELECTROPHORETIC TECHNIQUES

الفصل العاشر

تقنيات الرحلان الكهربائي الشعيري

CAPILLARY ELECTROPHORETIC TECHNIQUES

مقدمة (Introduction)

من بين العديد من تقنيات الرحلان الكهربائي (Electrophoretic techniques) المتاحة، تعد التقنيات الأكثر استخداماً في السموم التحليلية (Analytical toxicology) والمجالات ذات الصلة هي: الرحلان الكهربائي الشعيري (**Capillary electrophoresis - CE**)، والذي يسمى أيضاً رحلان المنطقة الشعيري (**Capillary zone electrophoresis - CZE**)، والكروماتوغرافيا الحركية الكهربائية المذيلية (**Micellar electrokinetic chromatography - MEKC** أو **MECC**)، والكروماتوغرافيا الحركية الكهربائية الشعيرية (**Capillary electrokinetic chromatography - CEC**).

يُشار إلى الـ CE أحياناً بـ الرحلان الكهربائي الشعيري في المحلول الحر (**Free solution capillary electrophoresis - FSCE**) للتمييز بينه وبين الـ MEKC، ويشير إلى فصل الأيونات في محلول حر بناءً على اختلاف سرعتها في مجال كهربائي. تعزى الانتقائية (Selectivity) في المقام الأول إلى الاختلافات في الكتلة والشحنة؛ حيث تهاجر الجزيئات المشحونة الصغيرة بسرعة أكبر من تلك الكبيرة التي تحمل نفس الشحنة. تعتمد هذه التقنية بشكل كبير على توفر أنابيب شعرية من السيليكا المنصهرة (Fused silica capillary tubing) عالية الجودة وكواشف (Detectors) فائقة الحساسية. وفي تقنية الـ CE، يوضع شعير من السيليكا المنصهرة، يكون قطره الداخلي (i.d.) عادةً بين 25-75 ميكرومتر (أي أضيق مما يُستخدم عادةً في كروماتوغرافيا الغاز الشعيرية) ومطلي بالبوليميد (Polyimide) لتوفير القوة الميكانيكية، بين خزانين من محلول منظم يُشار إليه باسم إلكتروليت الخلفية (**Background electrolyte - BGE**). في الرحلان الكهربائي الشعيري غير المائي (**Nonaqueous CE - NACE**)، يُستبدل المنظم المائي بإلكتروليت خلفية في (خليط من) المذيبات العضوية.

يُملأ الشعير بالمنظم وتوضع أقطاب بلاتينية (Platinum electrodes) في كلا الخزانين بحيث يمكن تطبيق فرق جهد (Potential difference) يتراوح بين 5 إلى 30 كيلو فولت (kV) عبر الشعير، مما يؤدي بدوره إلى خلق تيار كهربائي يتراوح بين 150 إلى 300 ميكرو أمبير (μA). ومع الكشف الطيفي الضوئي (Spectrophotometric detection)، يتم الكشف عن القمم (Peaks) داخل العمود (On-column)، حيث تُزال مساحة صغيرة من البوليميد لتوفير نافذة لمسار الضوء إلى الكاشف (الشكل 1). تم تلخيص إعداد والعناية بالشعير في الإطار 1.

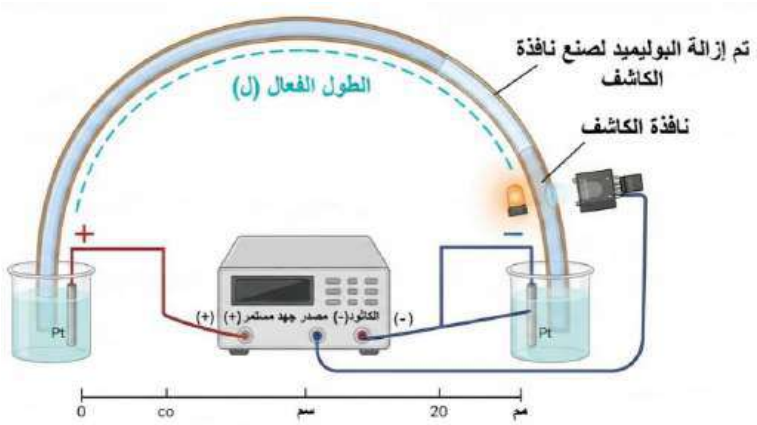


Figure 1 Schematic diagram of the arrangement for capillary electrophoresis.
الشكل 1: رسم تخطيطي لترتيب الفصل الكهربائي الشعيري.

الإطار 1: إعداد، تهيئة، وتخزين الشعيرات للرحلان الكهربائي
(Preparation, conditioning, and storage of capillaries for electrophoresis)

القطع إلى الطول المطلوب (Cutting to length)
- القطع بالطول باستخدام قاطع سيراميكي – يُسحب الشعير طولياً لكسره.
- حرق 1 مم من طلاء البوليميد عند كل طرف
- التحقق من نظافة القطع باستخدام المجهر.

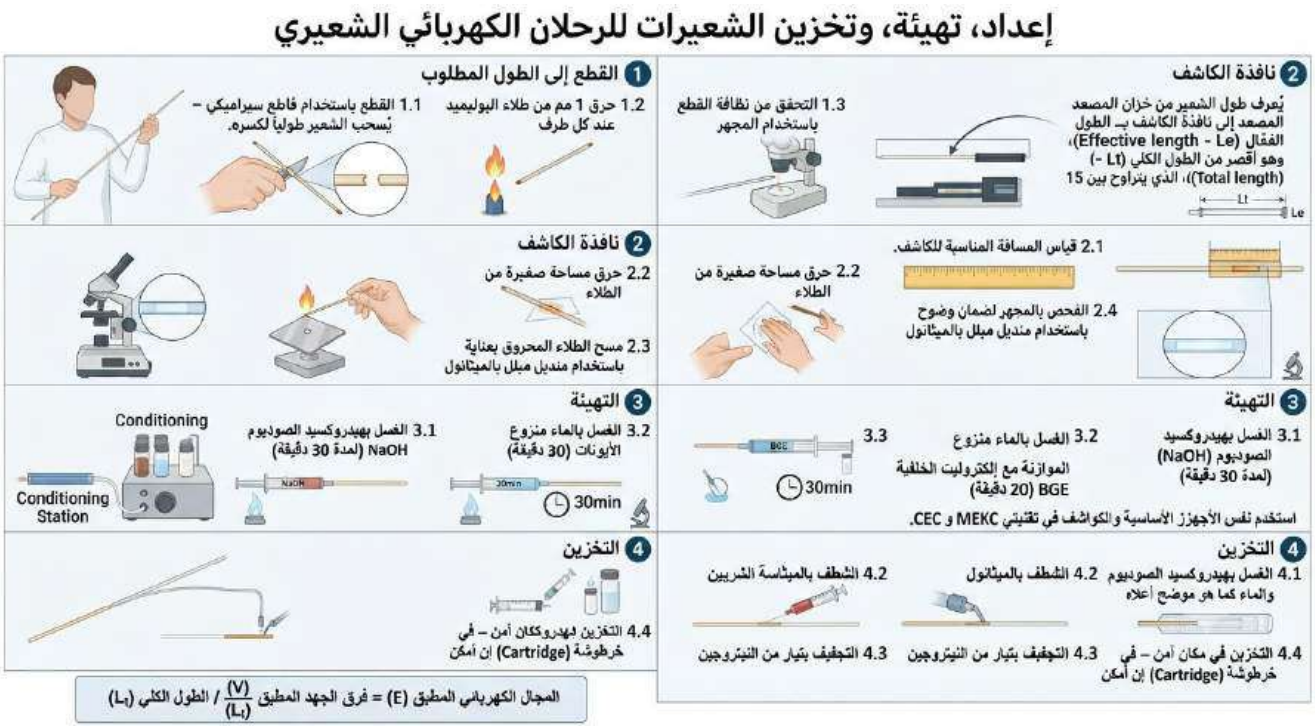
نافذة الكاشف (Detector window)
- قياس المسافة المناسبة للكاشف.
- حرق مساحة صغيرة من الطلاء.
- مسح الطلاء المحروق بعناية باستخدام منديل مبلل بالميثانول.
- الفحص بالمجهر لضمان وضوح مسار الضوء.

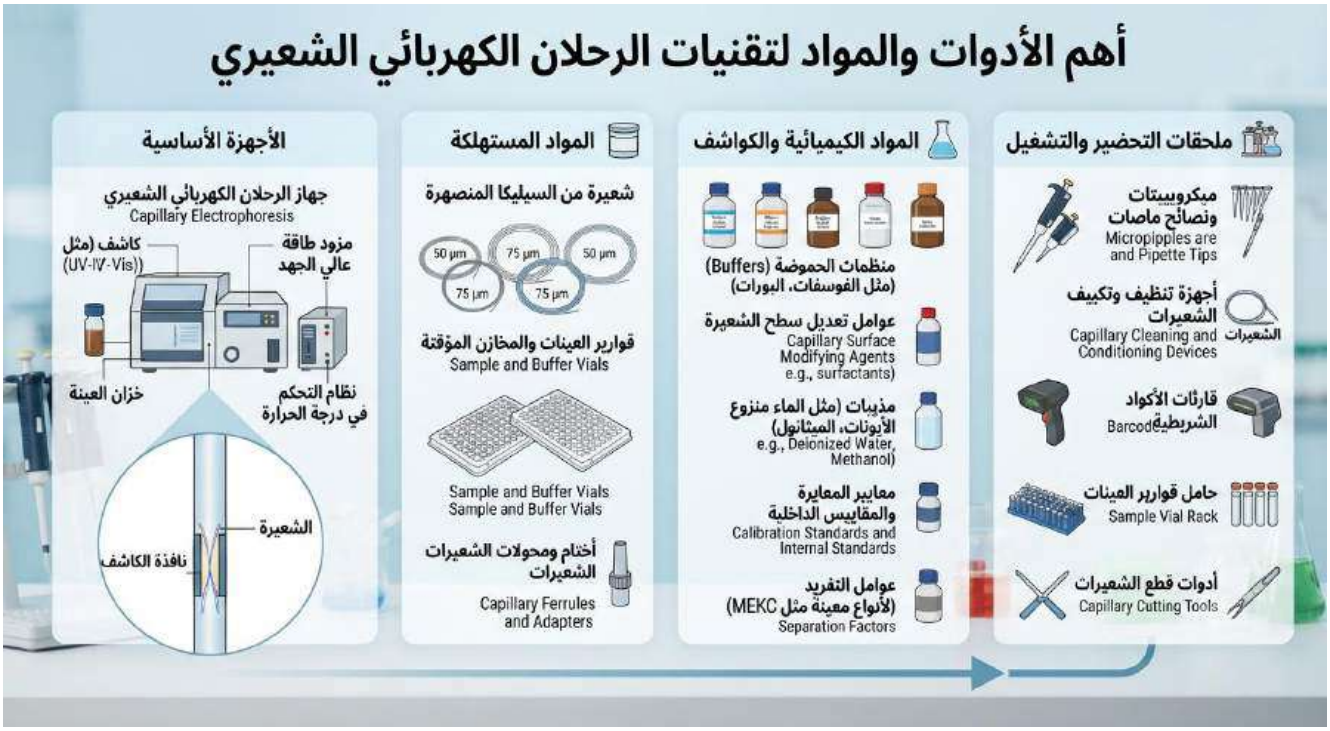
التهيئة (Conditioning)
- الغسل بهيدروكسيد الصوديوم المائي ($1\ mol\ L^{-1}$، لمدة 30 دقيقة).
- الغسل بالماء منزوع الأيونات (30 دقيقة).
- الموازنة (Equilibration) مع إلكتروليت الخلفية BGE (20 دقيقة).

التخزين (Storage)
- الغسل بهيدروكسيد الصوديوم والماء كما هو موضح أعلاه.
- الشطف بالميثانول.
- التجفيف بتيار من النيتروجين.
- التخزين في مكان آمن – في خرطوشة (Cartridge) إن أمكن.

^{a}استخدم لهبًا صغيرًا مثل عود ثقاب ممسوك تحت قطعة من صفيحة الألمنيوم بها ثقب صغير محفور، أو سلك مسخن كهربائيًا.

يُعرف طول الشعير (Capillary) من خزان المصعد (Anode reservoir) إلى نافذة الكاشف بـ **الطول الفعّال (Effective length - l)**، وهو عادةً أقصر ببضع سنتيمترات من **الطول الكلي (Total length - L)**، الذي يتراوح نموذجياً بين 15 إلى 100 سم. المجال الكهربائي المطبق E(بوحدة $V\ cm^{-1}$) هو فرق الجهد المطبق (V) مقسوماً على الطول الكلي L. تُستخدم نفس الأجهزة الأساسية والكواشف في تقنيتي MEKC و CEC.





الحركية الكهربائية (Electrophoretic mobility)

تُفصل الأيونات على أساس الحجم والشحنة. تُعطى الحركية الكهربائية (μ_e) لأيون نصف قطره rويحمل شحنة qبالمعادلة التالية:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

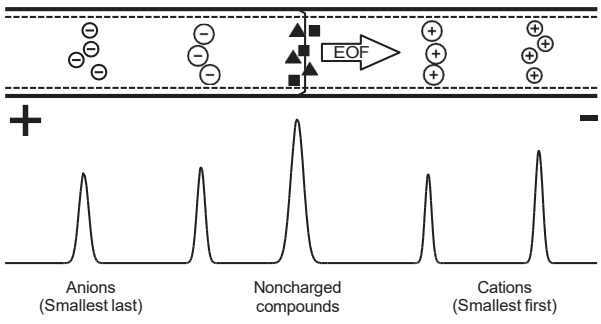
حيث تمثل ηلزوجة المنظم (Buffer viscosity). وبناءً عليه، تهاجر الأيونات الصغيرة عالية الشحنة بسرعة أكبر من الأيونات الكبيرة التي تحمل شحنة أقل.

في الظروف القلوية، تكون جدران شعير السيليكا المنصهرة مشحونة بشحنة سالبة بسبب تأين مجموعات السيلانول (Silanols) المتبقية وربما بسبب وجود أيونات ممتزة. تهاجر الكاتيونات (الأيونات الموجبة) نحو الجدار، مكونة طبقة من الأيونات غير المتحركة نسبياً (طبقة **ستيرن - Stern layer**). وتوجد طبقة أكثر انتشاراً من الأيونات المميّهة تمتد إلى السائل الأساسي (طبقة **غوي - Gouy layer**). يُعرف الجهد بين طبقة ستيرن والسطح البيني مع الطبقة المزدوجة المنتشرة بـ **جهد زيتا (Zeta potential - ζ)**.

من الممكن حساب سُمك الطبقة المزدوجة التي تبلغ، اعتماداً على الظروف، حوالي 1-10 نانومتر (Knox and Grant, 1987). عند تطبيق مجال كهربائي، تنجذب الكاتيونات المميّهة في الطبقة المنتشرة نحو المهبط (القطب السالب)، مما يؤدي إلى حدوث قص (Shearing) في منطقة الطبقة المزدوجة. ومع ذلك، يُدفع الجزء الأكبر من السائل في هذا الغلاف نحو المهبط، وتُعرف هذه الظاهرة بـ **التدفق التناضحي الكهربائي (Electro-osmotic flow - EOF)**. لا تتأثر سرعة هذا التدفق بقطر الشعير، بشرط أن يكون القطر أكبر بحوالي 20 مرة من سُمك الطبقة المزدوجة.

يؤدي الـ EOF إلى زيادة معدل هجرة الكاتيونات، وينقل الجزيئات غير المتأينة وحتى الأنيونات (بشرط أن يكون الـ EOF قوياً بما يكفي للتغلب على الهجرة الكهربائية للأنيونات نحو المصعد) باتجاه المهبط. وبالتالي، تتحرك الكاتيونات والأنيونات في نفس الاتجاه ويمكن قياسها أثناء تدفقها أمام الكاشف (الشكل 2).

من المميزات الهامة لـ EOF هي أن القوى المسؤولة عن التدفق تتوزع بانتظام عبر الشعير، مما يجعل التدفق منتظماً ويكون مظهر التدفق (Flow profile) عمودياً على جدار الشعير (تدفق سدادي - **Plug flow**)، على عكس مظهر التدفق المكافئ (Parabolic flow profile) في الأنظمة التي تعمل بضغط مثل كروماتوغرافيا الغاز (GC) والكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC). يؤدي هذا إلى تشتت أقل للمنطقة (Zone dispersion)، ومن الناحية النظرية، كفاءة أعلى بكثير مما يمكن تحقيقه بواسطة تقنيات الكروماتوغرافيا العادية. تُستغل ميزة التدفق غير الصفائحي (Nonlaminar flow) هذه في تقنية الـ CEC.



الشكل 2: مخطط يوضح كيفية قيام التدفق التناضحي الكهربائي (EOF) بنقل التحاليل (Analytes) نحو المهبط.

تتحدد حركية الـ EOF إلى حد كبير بجهد زيتا (ζ) وفقاً للمعادلة:

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon\zeta}{\eta} \quad (2)$$

حيث تمثل ϵثابت العزل الكهربائي (Dielectric constant) لإلكتروليت الخلفية (BGE). يزداد جهد زيتا، وبالتالي يزداد الـ EOF، بزيادة الأس الهيدروجيني (pH) للمنظم (BGE)؛ لأن ذلك يزيد من عدد مجموعات السيلانول المتأينة على جدار الشعير.

تتناسب سرعة الـ EOF طردياً مع المجال الكهربائي المطبق (E). تشمل العوامل الأخرى المؤثرة على الـ EOF درجة الحرارة (عبر تغيير لزوجة الـ BGE)، ونسبة أي مُعدل عضوي (Organic modifier)، وتركيز أي خافض توتر سطحي

(Surfactant) مضاف، والتغيرات في طبيعة جدار الشعير. من الأهمية بمكان القدرة على التحكم في الـ EOF؛ فإذا كان معدل التدفق عالياً جداً، لن يتم فصل التحاليل، وإذا كان منخفضاً جداً، فقد تُمتز الكاتيونات على جدار الشعير المشحون سالباً. يمكن لإضافة خافضات التوتر السطحي الكاتيونية (Cationic surfactants) بتركيزات أقل من **التركيز المذيلي الحرج (Critical micellar concentration - CMC)** أن تعكس اتجاه الـ EOF. تنجذب طبقة من خافض التوتر السطحي إلى الشحنة السالبة على جدار الشعير، وتتكون طبقة ثانية (نتيجة لتفاعلات الذيول الكارهة للماء) مع توجيه الشحنات الموجبة نحو السائل الأساسي. ومن ثم، تصبح الأيونات الفعالة موجبة بدلاً من كونها سالبة.

تؤدي زيادة القوة الأيونية (Ionic strength) لـ BGE إلى تقليل ζوبالتالي تقليل الـ EOF. يمكن أن يؤدي ذلك إلى تحسين الانتقائية (Resolution) لأن أزمنة الهجرة تطول. كما أنه يزيد من استقرار الرقم الهيدروجيني لـ BGE، وهو أمر قد يكون مهماً لأن الأس الهيدروجيني يتغير أثناء الرحلان الكهربائي. وبناءً على ذلك، يوصى بتجديد الـ BGE بشكل متكرر، على سبيل المثال كل خمس تحليلات، حيث يعد الأس الهيدروجيني عموماً أحد العوامل الرئيسية المؤثرة على زمن الهجرة. علاوة على ذلك، تضمن هذه الممارسة تساوي مستويات السائل في القوارير، حيث أن أدنى درجة من "التأثير السيفوني" (Siphoning) يمكن أن يكون لها تأثير ملحوظ على الكفاءة. يجب ترشيح الـ BGE وإزالة الغازات منه قبل الاستخدام؛ نظراً للأحجام الصغيرة المستخدمة، يمكن إجراء الترشيح باستخدام محاقن مزودة بمرشحات غشائية $(0.2\mu m)$، وعادة ما تكون إزالة الغازات بالسونيكيت (Sonication) كافية.

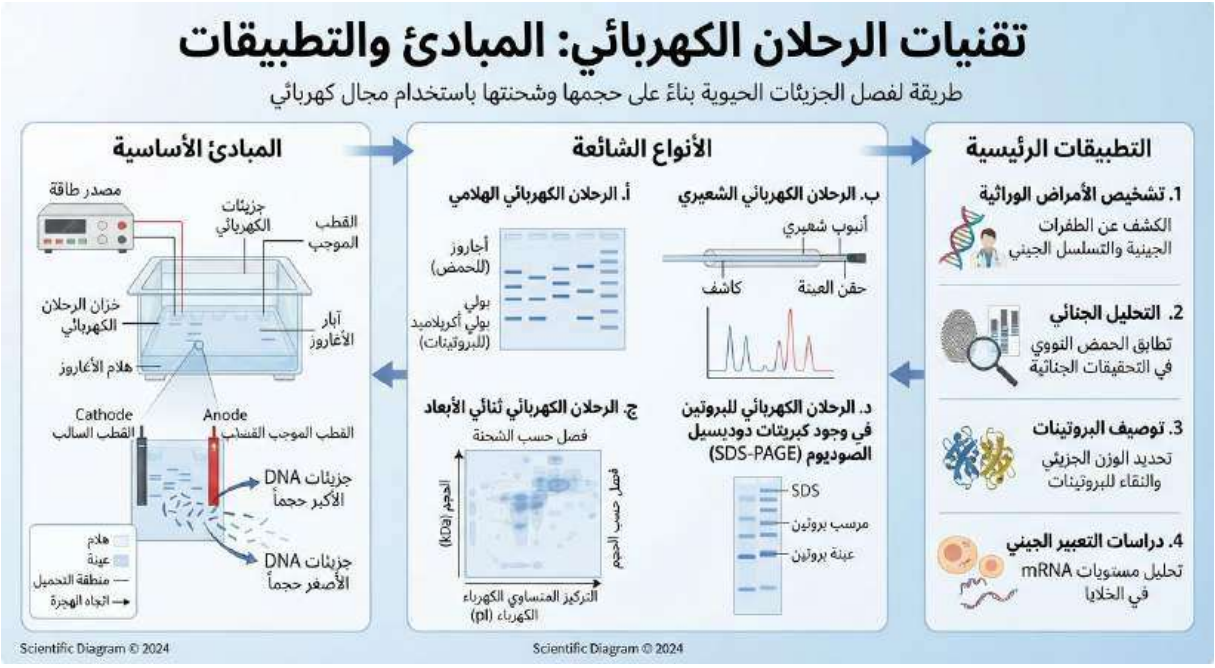
من المناقشة أعلاه، يتضح أن زمن هجرة (Migration time) أي تحليل سيكون دالة في الحركية الكهربائية و الـ EOF. تُعطى الحركية الظاهرية (μ_a) بالمعادلة:

$$\mu_a = \mu_e + \mu_{EOF} \quad (3)$$

وتتناسب طردياً مع الطول الفعّال للعمود (l) وعكسياً مع المجال المطبق، وتُحسب بـ:

$$\mu_a = \frac{l}{Et} = \frac{lL}{Vt} \quad (4)$$

حيث tهو زمن الهجرة (بالثواني). وبناءً على ذلك، فإن وحدات الحركية هي $\mathrm{cm^2V^{-1}s^{-1}}$. الجزيئات غير المتأينة ستهاجر مع الـ EOF، وبالتالي لا يمكن فصلها بواسطة الرحلان الكهربائي الشعيري (CE). أما الأنيونات (الأيونات السالبة) فلها حركية سالبة.



الكفاءة وتوسيع النطاق (Efficiency and zone broadening)

يمكن التعبير عن كفاءة الفصل بالرحلان الكهربائي الشعيري بدلالة **عدد الصفائح النظرية (Number of theoretical plates - N)**، حيث $N = l^2/\sigma^2$. العامل الرئيسي المحدد لتوسيع النطاق (Zone broadening) هو **الانتشار الطولي (Longitudinal diffusion)**، لأن الانتشار الشعاعي مهمل نتيجة لمظهر التدفق السدادي (Plug-flow profile). يُعطى تباين الانتشار الطولي بالمعادلة:

$$\sigma^2 = 2D_m t \quad (5)$$

حيث D_mهو معامل الانتشار (Diffusion coefficient) للتحليل. تمتلك الجزيئات الكبيرة، مثل الببتيدات والبروتينات، قيماً صغيرة لـ D_mوعادة ما تنتج قممًا حادة في تقنية الـ CE. بالتعويض عن tمن المعادلة (4)، نحصل على:

$$N = \frac{\mu_e V l}{2D_m L} \quad (6)$$

من الواضح، من خلال المعادلة (6)، أن فرق الجهد العالي المطبق يؤدي إلى كفاءة عالية، وبالتالي تحسين في الانتقائية (Resolution). وكما هو الحال في الكروماتوغرافيا، كلما زادت سرعة هجرة المركب، أصبحت القمة أكثر حدة. وبما أن Nتتناسب طردياً مع الجهد V، فإن جهود التشغيل لا تُخفض عادةً كوسيلة للتحكم في الـ EOF. هناك عدد من الأسباب العملية التي تجعل قيمة Nأقل مما تنبأت به المعادلة (6)، كما نناقش أدناه.

تسخين جول (Joule heating)

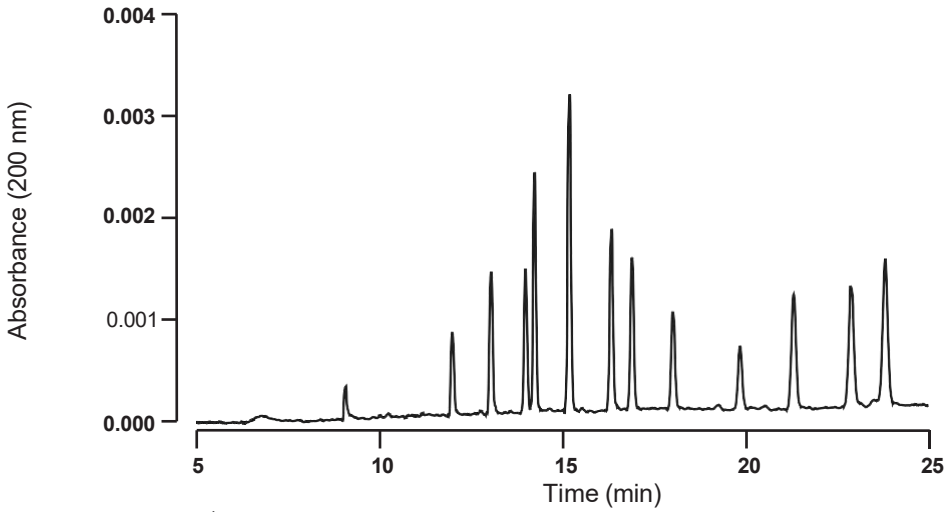
من المهم ليس فقط فهم دور تسخين جول، بل أيضاً تقليل آثاره. الحرارة المتولدة عن التيار الكهربائي، والتي تتناسب مع القدرة (التيار ×الجهد)، تخلق تدرجات حرارية تسبب تغيرات موضعية في اللزوجة، وبالتالي تؤدي إلى توسيع النطاق. يمكن أن يؤدي استخدام شعيرات ضيقة القطر (Narrow-bore capillaries) وتنظيم درجة الحرارة (التبريد بالهواء القسري أو السائل) إلى تقليل هذه الآثار، ولكن الشعيرات الضيقة جداً ستحد من تحميل العينة وطول مسار الضوء الفعال في حال استخدام الكشف الطيفي الضوئي. يُستخدم قياس التيار كدالة لفرق الجهد المطبق للتحقق من نطاق الجهد التشغيلي للطريقة (**مخطط قانون أوم - Ohm's Law plot**). سيكون هذا المخطط خطياً طالما أن مساهمة تسخين جول ضمن الحدود المقبولة.

ملاحظة تقنية: مخطط قانون أوم ضروري جداً لتحديد "نقطة الانحراف"، حيث تبدأ الحرارة في التأثير سلباً على فصل التحاليل. هل ترغب في الانتقال إلى القسم الخاص بتأثيرات الانحراف عن المثالية في هذا النظام، أم تود مناقشة كيفية اختيار المنظمات (Buffers) لتقليل المقاومة الكهربائية والحرارة الناتجة؟

التشتت الكهربائي (Electrodispersion)

يؤدي الاختلاف بين موصلية (Conductivity) منطقة العينة وموصلية إلكتروليت الخلفية (BGE) إلى تشوه القمم (Peak distortion). بالنسبة للكاتيونات، عندما تكون الموصلية في منطقة العينة عالية، تكون الحافة الأمامية لمنطقة العينة منتشرة، مع تركيز عالٍ للأيونات عند الواجهة الخلفية؛ مما يؤدي إلى حدوث **"تذييل للقمم" (Tailing peaks)**. وعلى العكس من ذلك، يحدث **"تصدير للقمم" (Fronting)** عندما تكون منطقة العينة ذات موصلية أقل من الـ BGE. والعكس صحيح بالنسبة للأنواع ذات الشحنة المعاكسة. عندما تتشابه موصلية العينة والـ BGE، تكون القمم أكثر تماثلاً. ولا تتأثر الأنواع المتعادلة بهذه الظاهرة. يمكن ملاحظة هذه التأثيرات عند حقن عينة تحتوي على مجموعة من الأنواع ذات حركيات مختلفة

(الشكل 3). وعلى الرغم من أن مثل هذه التشوهات تحدث دائماً مع الأيونات، إلا أن عواقبها قد تكون صغيرة مقارنة بتأثيرات التشتت الأخرى.



الشكل 3: مخطط رحلاني كهربائي (Electropherogram) للمادة P و12 من شظاياها يوضح تأثير التشتت الكهربائي. القمم المبكرة معرضة للتذييل (Tailing) بينما القمم المتأخرة معرضة للتصدير (Fronting). الظروف: شعير سيليكا منصهرة (57 cm × 75μm قطر داخلي)؛ BGE: منظم فوسفات (50 mmol L^{-1}, pH 2.44)؛ حقن هيدروديناميكي (10 ثوانٍ).

امتزاز التحليل على جدار الشعير (Adsorption of analyte onto the capillary wall)

قد يؤدي تفاعل التحليل (Analyte) مع جدار الشعير إما إلى تذييل القمة أو فقدان كامل للتحليل. غالباً ما تُمتز البروتينات والببتيدات عن طريق التجاذب الكهروستاتيكي بجدار الشعير المشحون سالباً وعن طريق التفاعلات الكارهة للماء (Hydrophobic interactions). يؤثر امتزاز المركبات على جهد زيتا، وبالتالي على الـ EOF، مما يؤدي إلى تغيرات في أزمنة الهجرة. لذا، فإن حقن العينات البيولوجية التي تحتوي على بروتين قد يؤدي إلى تغيرات ملحوظة في أزمنة هجرة التحليل، حتى وإن كان التأثير على التحليل مهملاً عند حقن المعايير المائية. قد يكون من الضروري غسل الشعير بهيدروكسيد الصوديوم المائي (مثلاً 0.1 mol L^{-1}لمدة 10 دقائق)، ثم إعادة الموازنة مع BGE (ربما لمدة 10 دقائق) بين عمليات الحقن. وبالطبع، يمكن أن يضيف هذا وقتاً كبيراً إلى دورة التحليل.

حقن العينة (Sample injection)

في تقنيات الرحلان الكهربائي الشعيري، يتم إدخال العينات إما عن طريق **الحقن الهيدروديناميكي (Hydrodynamic injection)** أو **الحقن الحركي الكهربائي (Electrokinetic injection)**. في كلتا الحالتين، سيكون لحجم العينة المحقونة الكبير جداً ("طول السدادة" - **Plug length**) تأثير ضار على الكفاءة، تماماً كما هو الحال في الكروماتوغرافيا. تُعطى مساهمة طول السدادة في التباين الكلي بالمعادلة:

$$\sigma_{inj}^2 = \frac{w_{inj}^2}{12} \quad (7)$$

حيث w_{inj} هو طول سدادة الحقن. من الناحية المثالية، يجب أن يكون التباين الناتج عن الحقن أقل من التباين الناتج عن الانتشار الطولي [المعادلة (5)]. إذا أمكن، يجب ألا يتجاوز طول سدادة الحقن 1-2% من طول العمود. ومع ذلك، إذا كانت الحساسية تمثل مشكلة، فقد يكون من الضروري حقن كمية أكبر من العينة.

ملاحظة منهجية: تم استخدام الرمز σ_{inj}^2لتمثيل تباين الحقن، وهو معيار أساسي في تقييم جودة الفصل. هل ترغب في شرح الفروقات التشغيلية بين الحقن الهيدروديناميكي والحقن الحركي الكهربائي من حيث دقة القياس الكمي؟

الحقن الهيدروديناميكي (Hydrodynamic injection)

يعد الحقن الهيدروديناميكي الطريقة الأكثر استخداماً لإدخال العينة، لأنها تتميز بأن تركيب العينة لا يتغير بفعل عملية الحقن. يمكن إدخال حجم صغير (بضعة نانولترات) من العينة إلى طرف الشعير عن طريق الضغط الهيدروستاتيكي، والذي يمكن تطبيقه عبر: (1) ضغط موجب عند طرف الحقن، (2) تفريغ (Vacuum) عند طرف الخروج، أو (3) رفع قنينة العينة فوق مستوى قنينة الخروج لإحداث سحب (Siphoning). بالنسبة للطريقتين الأوليين، يجب إغلاق قنينة العينة أو قنينة الخروج؛ ويتم ذلك عادةً باستخدام أغطية مزودة بحواجز (Septum caps) يمكن إدخال خطوط الغاز من خلالها. في حال استخدام السحب (Siphoning)، يجب أن يكون الفرق في الارتفاع بين القنينتين 5-10 سم.

تتأثر كمية العينة المحقونة (Q) بالقطر الداخلي للشعير (d)، ولزوجة منظم التحليل (η)، وطول الشعير (L)، وفرق الضغط (ΔP). بالنسبة لعينة ذات تركيز (c)، فإن الكمية المحقونة في زمن قدره (t) ثانية تُعطى بالمعادلة:

$$Q = \frac{\Delta P \cdot \pi d^4}{128 \eta L} \cdot c \cdot t \quad (8)$$

يُعطى فرق الضغط في حالة السحب (Siphoning) بالمعادلة:

$$\Delta P = \Delta h \cdot g \cdot \rho \quad (9)$$

حيث Δhهو فرق الارتفاع، و ρهي كثافة المنظم، و gهو ثابت الجاذبية الأرضية. للحصول على أعلى دقة في تكرار الحقن، يجب ألا يكون الزمن (t) قصيراً جداً، وفي الوقت نفسه يجب أن يتوافق ذلك مع عدم تقليل الكفاءة نتيجة حقن عينة كبيرة جداً، كما يجب الحفاظ على لزوجة الـ BGE من خلال التحكم الجيد في درجة الحرارة. للزوجة محلول العينة تأثير ضئيل بسبب الأحجام الصغيرة جداً المحقونة.

الحقن الحركي الكهربائي (Electrokinetic injection)

من خلال وضع طرف الحقن للشعير في قنينة العينة وتطبيق فرق جهد عبر الشعير (عادة 3-5 مرات أقل من جهد التشغيل)، سيتم سحب حجم من العينة إلى داخل الشعير بواسطة الـ EOF. ومع ذلك، سيتم أيضاً سحب الأيونات (أو استبعادها) نتيجة لحركيتها الكهربائية. تُعطى كمية التحليل المحقونة بالمعادلة:

$$Q = (\mu_{EOF} + \mu_e) \cdot \pi r^2 \cdot E \cdot c \cdot t \quad (10)$$

حيث المجال الكهربائي المطبق $E = V/L$. يتضح من المعادلة (10) أن تركيب السائل المحقون سيختلف عن تركيب العينة الأصلية، حيث تحدث زيادة في الكاتيونات الأكثر حركية، وانخفاض في تركيز الأنيونات (التي تكون حركيتها الكهربائية μ_eسالبة). علاوة على ذلك، سيتغير تركيب العينة المتبقية؛ وفي بعض الظروف، تظهر عمليات الحقن المتكررة من نفس قنينة العينة نتائج مختلفة بشكل واضح، مما يعكس تغير تركيب العينة مع كل عملية حقن.

تكديس العينة (Sample 'stacking')

عندما تكون موصلية منظم العينة أقل من موصلية إلكتروليت الخلفية (BGE)، تهاجر الأيونات بسرعة أكبر في منطقة العينة وتتركز عند الواجهة مع منظم التحليل، وهي ظاهرة يشار إليها عادة باسم **"التكديس" (Stacking)**. يتم تحقيق التكديس بسهولة أكبر عن طريق إذابة العينة في الماء قبل حقنها (سواء هيدروديناميكياً أو حركياً كهربائياً). إذا لم يكن ذلك ممكناً وكانت

موصلية العينة والـ BGE متشابهة، يمكن حقن حجم صغير (بضعة نانولترات) من الماء قبل العينة. ويمكن تحقيق زيادة تتجاوز 10 أضعاف في الكميات المحقونة بهذه الطريقة. ومن المشكلات المحتملة التي يجب مراعاتها عند استخدام تكديس العينة أن معظم هبوط الجهد يحدث في منطقة التكديس، مما يؤدي إلى توليد كمية كبيرة من الحرارة مع خطر تدمير التحاليل الحساسة حرارياً.

الكشف (Detection)

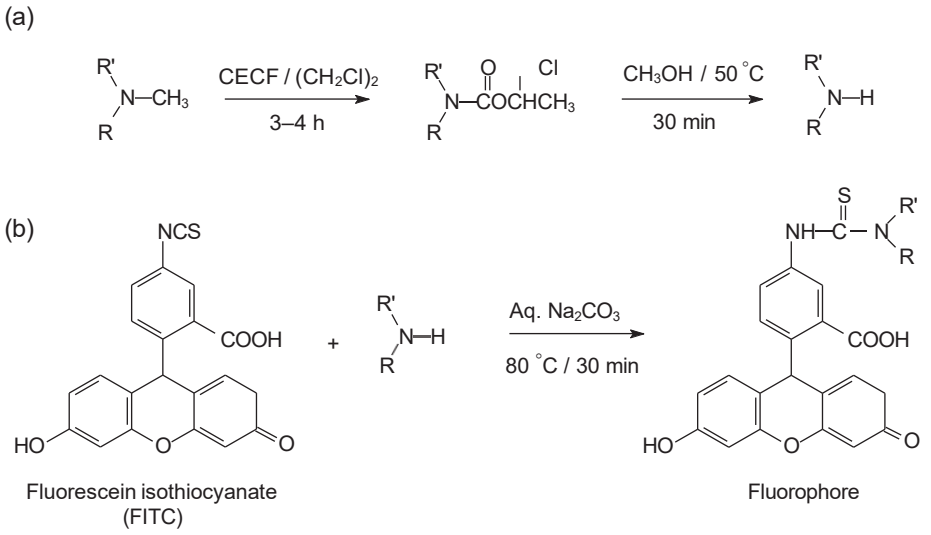
أنظمة الكشف المستخدمة في الـ CE والتقنيات ذات الصلة هي: الكشف الطيفي الضوئي (بما في ذلك الأشعة فوق البنفسجية UV والفلورة)، والكشف الكهروكيميائي، وكشف مطيافية الكتلة (Mass spectrometric). تكتشف الأنظمة البصرية عادةً التحاليل داخل العمود (On-column). إن استخدام شعيرات السيليكا يسمح باستخدام أطوال موجية تصل إلى 190 نانومتر. تتمثل المشكلة الواضحة في استخدام الشعير في أن طول المسار الضوئي محدود بالقطر الداخلي للشعير، ما لم يتم استخدام شعيرات "خلية الفقاعة" (Bubble cell capillaries)، حيث يتم زيادة القطر الداخلي للشعير (حوالي ثلاثة أضعاف) في منطقة الكاشف. عادة ما تكون كواشف الأشعة فوق البنفسجية (UV) - والتي تناسب الـ CE بشكل خاص بسبب حجمها الصغير نسبياً وأوقات استجابتها السريعة - ذات طول موجي ثابت (مصباح ديوتيريوم مع مرشحات تداخل) أو مصفوفة صمام ثنائي (Diode array).

من بين كواشف الفلورة، توفر كواشف **الفلورة المستحثة بالليزر (Laser-induced fluorescence - LIF)** حساسية عالية جداً، ولكن الأطوال الموجية للإثارة المتاحة تعتمد على أنواع الليزر المستخدمة.

جدول 1: أمثلة على ليزرات الغاز وكواشف الاشتقاق المناسبة لها

الليزر	طول موجة الإثارة (نانومتر)	المشتق(Derivative)
هيليوم-كادميوم	325	كلوريد الدانسيل(Dansyl chloride) ، أو-فثالديهايد(OPA)
هيليوم-كادميوم	442	نافثالين-2،3-ديكاربوكسالدهيد(NDA) ، 3-(4-كربوكسي بنزويل) كينولين-2-كربوكسالدهيد(CBQCA)
أيون الأرجون	488	إيزوثيوسيانات الفلورسين(FITC) ، 5-(4,6)-ثنائي كلوروتريازينيل) أمينوفلورسين (DTAF)، 3-(2-فورويل) كينولين-2-كربوكسالدهيد(FQ) ، 7-نيتروبنز-2-أوكسادايازول(NBD)
أيون الأرجون	514	-
هيليوم-نيون	543أو 594	-
كريبتون	568	-

على الرغم من أن نطاق الأطوال الموجية المتاحة يتوسع بفضل إدخال ليزرات الصمام الثنائي (Diode-based lasers)، إلا أنه لا يزال من الضروري غالباً اشتقاق التحليل لإنتاج فلوروفور (Fluorophore) مناسب (جدول 1). في حالة ليزرات أيون الأرجون، تكون مشتقات إيزوثيوسيانات الفلورسين (FITC) مناسبة، ولكن يجب نزع مجموعة الألكيل (N-dealkylation) من الأمينات الثالثية، باستخدام مثلاً 1-كلورو إيثيل كلوروفورمات (CECF، الشكل 4)، قبل أن يتم اشتقاقها. من الواضح أن الأمينات الثانوية والثالثية يمكن أن تتفاعل مع FITC دون الحاجة إلى نزع الألكيل مسبقاً – فعلى سبيل المثال، يتفاعل الأمفيتامين (Amfetamine) مباشرة (Pa´ez et al., 1996).



الشكل 4: التحضير متعدد المراحل للمشتقات الفلورية للأمينات الثالثية (نقلاً عن Alnajjar et al., 2004)

يوضح هذا الشكل مسارين كيميائيين ضروريين لتحويل الأمينات إلى مركبات قابلة للكشف الفلوري في تقنيات الرحلان الكهربائي الشعيري:

أ) نزع الألكيل من الأمينات الثالثية (N-Dealkylation): في هذه المرحلة، يتم التعامل مع الأمين الثالثي باستخدام **1-كلورو إيثيل كلوروفورمات (CECF)** في مذيب مثل ثنائي كلورو إيثان $(CH_2Cl)_2$. هذا التفاعل يزيل مجموعة الميثيل ويربط مجموعة "كلورو إيثيل كربامات" بالنيتروجين. بعد ذلك، يتم التفاعل مع الميثانول (CH_3OH) عند درجة حرارة 50 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة لتحرير الأمين الثانوي (Secondary amine)، مما يجعله جاهزاً لعملية الاشتقاق.

ب) التفاعل مع FITC: يتم تفاعل الأمين الناتج (أو الأمين الأولي/الثانوي المباشر) مع **إيزوثيوسيانات الفلورسين (FITC)** في وسط مائي من كربونات الصوديوم (Na_2CO_3) عند درجة حرارة 80 درجة مئوية لمدة 30 دقيقة. يؤدي هذا التفاعل إلى تكوين رابطة "ثيويوريا" (Thiourea linkage) بين الأمين وجزيء الفلورسين، مما ينتج عنه مركب "الفلوروفور" (Fluorophore) الذي يمنح العينة خاصية الفلورة المطلوبة للكشف عنها بحساسية عالية في كاشف LIF.

يؤدي تخليق FITC إلى إنتاج العديد من المتصاوغات (Isomers)، والأكثر وفرة، والذي يُستخدم عموماً، يُعرف باسم متصاوغ FITC I أو FTIC-5. مع الاشتقاق باستخدام FITC، يمكن تحقيق حساسيات تتراوح بين 50-100 نانوغرام لكل لتر ($ng\ L^{-1}$) للمورفين والكوديين و6-أحادية أسيتيل المورفين باستخدام كاشف LIF مع إثارة وانبعاث عند 488 و520 نانومتر على التوالي (Alnajjar et al., 2004)، مقارنة بحساسيات 250-300 ميكروغرام لكل لتر ($\mu g\ L^{-1}$) التي يمكن تحقيقها باستخدام الفلورة الذاتية (إثارة 245 نانومتر، انبعاث 320 نانومتر).

حصل كاسلافسكا وثورمان (Caslavska and Thormann, 2004) على حساسيات عالية باستخدام مصباح الزينون-الزئبق في كاشف فلورة مصمم خصيصاً. تتميز هذه الطريقة عن LIF بأن طول موجة الإثارة قابل للتعديل ويمكن الكشف عن المركبات باستخدام الفلورة الذاتية، مما يلغي الحاجة إلى الاشتقاق.

إن أحجام الخلايا الصغيرة التي يمكن تحقيقها باستخدام الكشف الكهروكيميائي (**Electrochemical detection - ED**) تجعل استخدام وضع الكشف هذا مع الـ CE أمراً جذاباً (Wallingford and Ewing, 1987). وبدلاً من تطوير كواشف مستقلة للـ CE، اتجهت الأبحاث نحو عمليات الفصل "على رقاقة" (On a chip) مع دمج الفصل الرحلاني الكهربائي والـ ED (Vandaveer et al., 2004). إن إمكانية التصغير وأوقات التحليل السريعة تجعل الـ CE-ED على رقاقة موضع

اهتمام في الكيمياء السريرية، وربما في اختبارات نقطة الرعاية (POCT) لأدوية الإساءة (مثل Dolnik and Liu, 2005 - انظر الفصل 13).

إن معدلات التدفق المنخفضة المستخدمة في الـ CE تجعل كشف مطيافية الكتلة (**Mass spectrometric detection - MS**) خياراً بديهياً، وتتوفر العديد من الواجهات التجارية لذلك. يعتمد معظمها على التأين بالرش الكهربائي (**Electrospray ionization - ESI**)، وهو حساس ويمكنه توليد أيونات لنطاق واسع من الأنواع. يمكن لـ MS، وخاصة MS-MS، توفير معلومات حول هوية القمم، ويمكن استخدام مراقبة الأيونات المختارة (SIM) لحل تداخل القمم إذا لزم الأمر. إذا استُخدمت منظمات متطايرة (Volatile buffers)، فإن ربط CE بـ MS يكون مباشراً نسبياً، ولكن وجود خافضات توتر سطحي غير متطايرة يجعل ربط MEKC بـ MS أكثر صعوبة، حيث قد تسبب خافضات التوتر السطحي كبتاً شديداً للأيونات. وقد تم بنجاح ربط أجهزة الكوادربول (Quadrupole) ومصيدة الأيونات (Ion-trap) بـ CE. على سبيل المثال، تم قياس متصاوغات MDA باستخدام ESI و Ramseier et al., 2000; Gaus et al., 1996) MS-MS). في كلتا الحالتين، استُخدم BGE متطاير لـ CE-MS. كما وُصفت أيضاً النهج المعتمدة على الرقائق (Deng et al., 2001).

تكرارية زمن الهجرة (Reproducibility of migration time)

من الانتقادات الموجهة لتقنية الـ CE والتقنيات ذات الصلة هي مشكلة **تكرارية زمن الهجرة**. إن التغيرات الطفيفة في التدفق التناضحي الكهربائي (EOF) لها تأثير أكبر بكثير على زمن هجرة المركبات التي تهاجر متأخراً مقارنة بالمركبات التي تهاجر قريباً من زمن الـ EOF. على سبيل المثال، حُسب من المعادلات الرحلانية الأساسية أنه عندما يتغير زمن الـ EOF في نظام CE أو MEKC من 3.0 إلى 3.1 دقيقة، فإن زمن هجرة مادة مذابة تهاجر في الأصل عند 4.0 دقائق سيزداد إلى 4.2 دقيقة (زيادة بنسبة 5%)، بينما مركب يهاجر عند 20.0 دقيقة ستصبح زمن هجرته 25.5 دقيقة (زيادة بنسبة 27.5%) (Hilhorst et al., 2001).

لذا، يجب توخي الحذر لضمان تقليل التغيرات في الـ EOF إلى أدنى حد، على سبيل المثال من خلال التنظيف والتهيئة المنتظمة للشعير، وتجديد الـ BGE بشكل متكرر للحفاظ على الرقم الهيدروجيني (pH) التشغيلي الصحيح. كما قد يكون استخدام **الشعيرات المطلية ديناميكياً (Dynamically coated capillaries)** مفيداً (Boone et al., 2001). ومع ذلك، قد لا تكون هذه الإجراءات وحدها كافية إذا كان الغرض من استخدام أزمنة الهجرة هو المساعدة في تحديد هوية التحليل في التحليل السمومي الشامل (STA)، وقد يتم الإبلاغ عن أزمنة الهجرة بالنسبة لـ **معيار داخلي (Internal standard)** يُستخدم كعلامة لزمن الهجرة (Migration time marker).

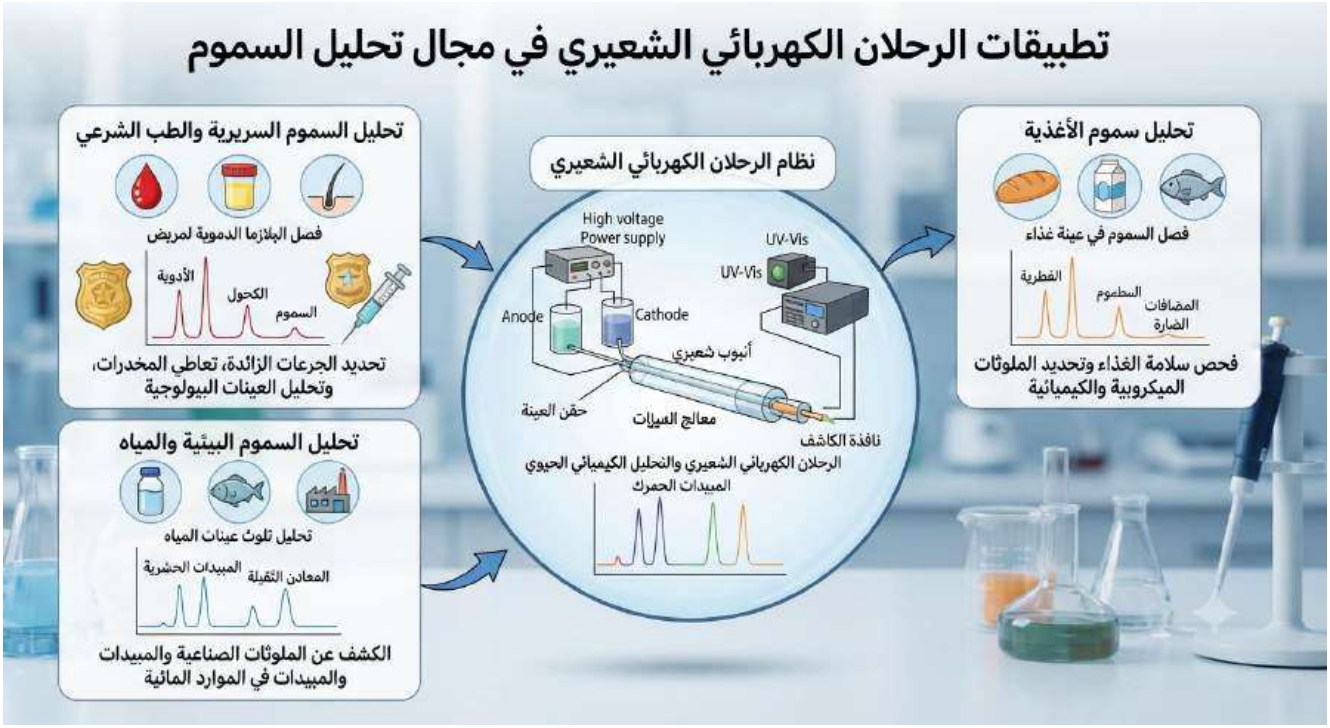
يمكن الحصول على نتائج أفضل باستخدام أكثر من علامة واحدة، وتسمح بعض برامج التكامل (Integration software) بضبط مقياس المخططات الرحلانية (electrophoretograms) والكروماتوغرافية بناءً على علامتين لزمن الاستبقاء. وقد اقتُرح استخدام نسب الحركية أو نسب زمن الهجرة للحصول على نتائج أكثر اتساقاً. كما اقتُرح استخدام العلامات لحساب **مؤشرات الهجرة (Migration indices)** (Hyo¨tyla¨inen et al., 1996)، ولكن من المرجح أن يظل هذا النهج محصوراً في المختبرات الفردية بدلاً من اعتماده عالمياً كما حدث مع مؤشرات الاستبقاء في كروماتوغرافيا الغاز (GC). تجدر الإشارة إلى أن استخدام قيم الهجرة المصححة، رغم تحسينها لتكرارية زمن الهجرة بين المختبرات في تقنية MEKC، لم يكن له أي تأثير على تكرارية زمن الهجرة في تقنية CE (Boone et al., 2002).

تشمل الطرق الأخرى للتحقق من هوية القمة **إضافة المعيار (Standard addition)**، أي إضافة كمية مناسبة من مركب معروف وتكرار التحليل لمعرفة ما إذا كان المركب المضاف يهاجر مع المركب قيد الدراسة. طريقة أخرى هي تغيير ظروف

الفصل؛ إذ يعد تغيير الـ BGE بسيطاً نسبياً في CE، وهذا النهج مفيد بشكل خاص للمواد الأمفوتيرية (مثل الأحماض الأمينية والببتيدات). فعلى سبيل المثال، من خلال زيادة الأس الهيدروجيني للمنظم، سيتم تثبيط تأين الأمينات بينما ستزداد درجة تأين المجموعات الحمضية. وبالتالي، ستؤدي هذه التغيرات إلى تغيير أزمنة الهجرة وترتيب الهجرة، مما قد يعطي معلومات قيمة حول طبيعة مركب غير معروف. إن استخدام أنظمة الكشف مثل DAD (مصفوفة صمام ثنائي) و MS (مطيافية الكتلة)، على وجه الخصوص، يتجاوز بعض هذه المشكلات، حيث لا يعتمد تحديد الهوية على زمن الهجرة فقط.

تطبيقات الرحلان الكهربائي الشعيري (Applications of capillary electrophoresis)

نظراً لأن تقنية الـ CE تفصل التحاليل على أساس الكتلة والشحنة، فهي تُعتبر تقنية متعامدة (Orthogonal technique) مع الكروماتوغرافيا. ومن بين أمور أخرى، من غير المرجح جداً أن يكون لمركبين نفس زمن الاستبقاء الكروماتوغرافي وزمن الهجرة الرحلانية، وبالتالي فإن استخدام كلتا التقنيتين يوفر قدرة تمييزية عالية. استُخدم هذا النهج لتأكيد وجود شظية المادة P (SP)، وهي SP(1–7)، في قمة HPLC. من خلال تجميع القمة المقابلة لزمن استبقاء SP(1–7) وإخضاع هذا الجزء (Fraction) للـ CE، تم تأكيد وجود شظية SP، من بين مركبات داخلية المنشأ مجهولة مختلفة (الشكل 5). تم إضافة الشظايا SP(1–4) و SP(2–11) إلى الجزء المجمع كعلامات لزمن الهجرة.



الكروماتوغرافيا الحركية الكهربائية المذيلية (Micellar electrokinetic capillary chromatography)

لقد تمت معالجة عدم قدرة الـ CE على فصل الجزيئات المتعادلة (Neutral molecules)، جزئياً، من خلال استخدام الـ MEKC (Terabe et al., 1984). وتعد هذه التقنية واحدة من أكثر أنماط الـ CE استخداماً. تتكون المذيلات (Micelles) عندما تُضاف خافضات التوتر السطحي (المنظفات) إلى المحاليل بتركيز أعلى من **تركيزها المذيلي الحرج (CMC)**، وتؤدي التفاعلات بين المذيلات والتحاليل المتعادلة إلى تحقيق الفصل. عادة ما تكون خافضات التوتر السطحي متأينة بحيث يمكن التحكم في الهجرة بواسطة المجال الكهربائي و/أو الـ EOF (Mukerjee and Mysels, 1971; Myers, 1988).

على الرغم من أن المذيلات سالبة الشحنة تهاجر نحو المصعد، إلا أن الـ EOF يكون عادة قوياً بما يكفي لدفعها نحو الكاشف. تتوزع الأنواع المتعادلة داخل وخارج المذيلات، وكلما زاد تفاعل التحليل مع المذيلة، زاد زمن الهجرة. وعندما لا يكون التحليل داخل المذيلة، فإنه يُحمل بواسطة الـ EOF (الشكل 6).

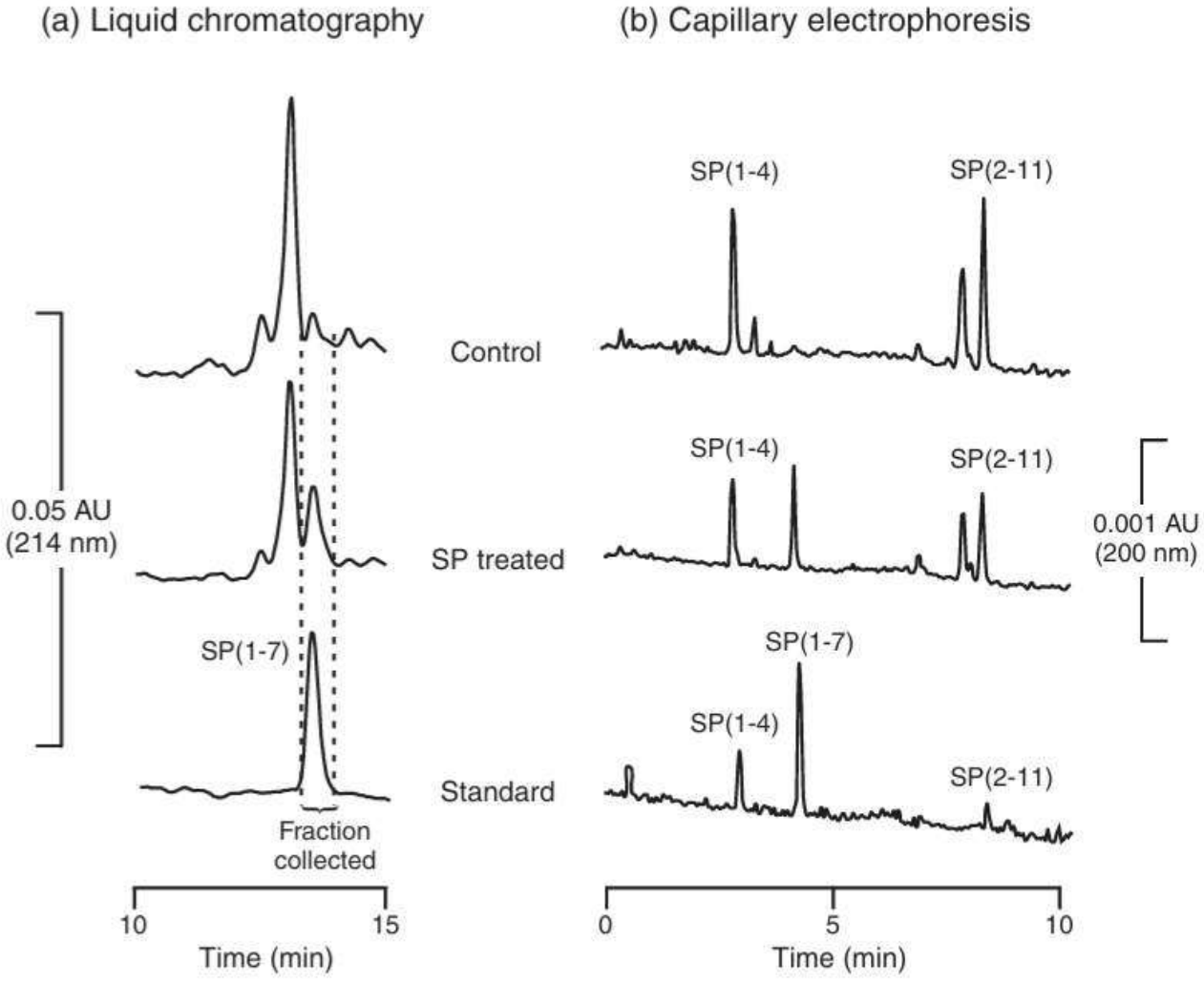
إذا كان التحليل المتعادل لا يتوزع داخل المذيلات، فلن يتم فصله عن الـ EOF، ولكن من ناحية أخرى، إذا كان مرتبطاً بقوة بالمذيلات، فإنه سيهاجر معها. بالنسبة لتحليل متعادل يتوزع داخل المذيلة، يُعطى **عامل الاستبقاء (Retention factor - k)** بالمعادلة:

$$k = \frac{\text{amount of analyte in micelle}}{\text{amount of analyte in buffer}} \quad (11)$$

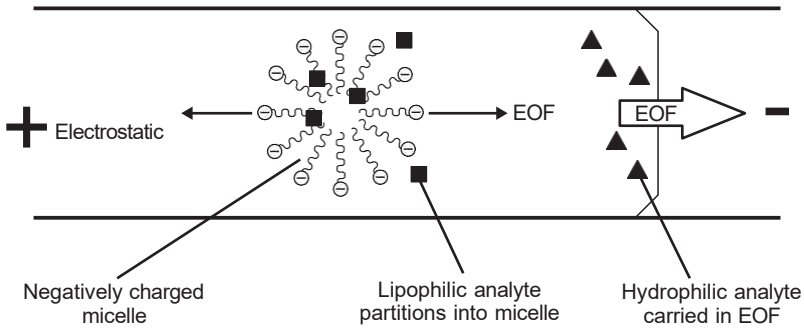
يُعطى زمن الهجرة (t_R) للمادة المذابة في تقنية الـ MEKC بالمعادلة:

$$t_R = t_0 \frac{1 + k}{1 + (t_0/t_{mc})k} \quad (12)$$

حيث t_0هو زمن هجرة التحليل الذي لا يتفاعل مع المذيلة (أي زمن هجرة التدفق التناضحي الكهربائي - EOF)، و t_{mc}هو زمن هجرة المذيلة نفسها. وبناءً على ذلك، توجد منطقة (أو نافذة زمنية) في المخطط الرحلاني، تقع بين الـ EOF والمذيلات، حيث يجب أن يتم فصل التحاليل فيها .



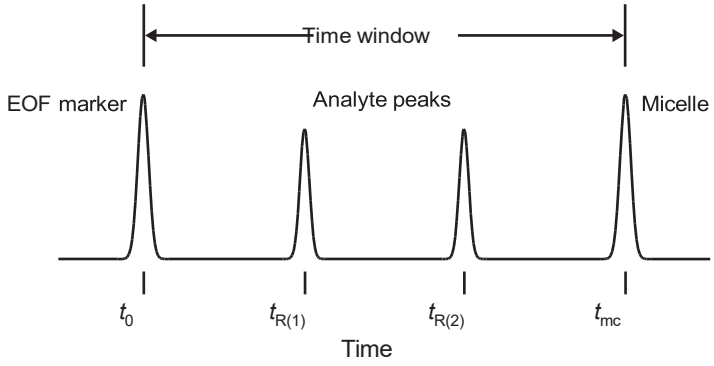
الشكل 5: فصل شظية المادة ((SP(1–7) P بواسطة كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (HPLC) ذات التدرج، والتأكيد بواسطة الـ CE بعد معالجة الفئران بـ SP. (مقتبس من Whelpton et al., 1998).



الشكل 6: مبدأ الكروماتوغرافيا الحركية الكهربائية المذيلية (MEKC).

تؤدي الكفاءات العالية التي يمكن تحقيقها بواسطة MEKC إلى سعات قمة (Peak capacities) عالية، وبالتالي يمكن تحليل خلائط متعددة المكونات . تُعد MEKC أيضاً متعددة الاستخدامات للغاية؛ إذ يمكن استخدام خافضات توتر سطحي كاتيونية أو أنيونية أو متعادلة، كما يمكن تعديل التوزيع (Partitioning) عن طريق إضافة مُعدلات عضوية (Organic modifiers). ومع ذلك، فإن عمليات الفصل في MEKC هي، كما يوحي الاسم، عمليات كروماتوغرافية، ولذلك لا ينبغي اعتبار MEKC تقنية متعامدة (Orthogonal) مع الكروماتوغرافيا التقليدية.

ملاحظة منهجية: تعتمد المعادلة (12) على مفهوم أن الجزيء يظل "محصوراً" في زمن هجرة يقع بين سرعة التدفق الكلي (EOF) وسرعة المذيلات (التي تعمل كطور ثابت). هل تود الانتقال إلى القسم الخاص بـ "الكروماتوغرافيا الحركية الكهربائية الشعيرية" (CEC) أو مناقشة كيف تؤثر إضافة المُعدلات العضوية على تغير الـ CMC وتوازن التوزيع في MEKC؟



الشكل 7: نافذة زمن الاستبقاء (Elution time window) للأنواع غير المتأينة في تقنية MEKC.

أنماط حركية كهربائية شعيرية أخرى (Other capillary electrokinetic modes)

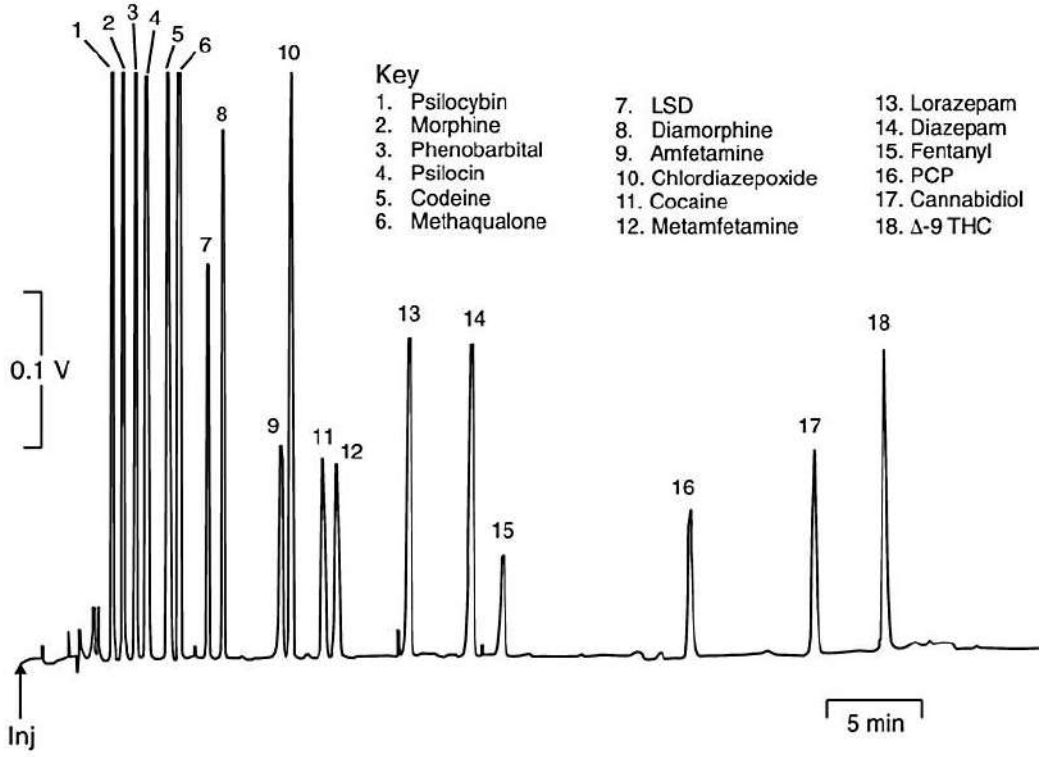
تشمل أنماط الفصل الأخرى المتعلقة بالـ CE كلاً من: الكروماتوغرافيا الكهربائية الشعيرية (**CEC**)، الرحلان الكهربائي الهلامي الشعيري (**CGE**)، التركيز متساوي الكهربائية الشعيري (**CIEF**)، والرحلان الكهربائي متساوي التاك (تساوي السرعة) الشعيري (**CITP**) (Watzig and Gunter, 2003). في تقنية CITP، يتم استخدام نظامين من المنظمات لخلق مناطق منفصلة تتحرك جميعها بنفس السرعة.

الكروماتوغرافيا الكهربائية الشعيرية (Capillary electrochromatography - CEC)

تُعد CEC طريقة فصل هجينة تستخدم مجالاً كهربائياً بدلاً من الضغط الهيدروليكي لدفع المذيب (Eluent) عبر طبقة محشوة (Packed bed). ونظراً لوجود ضغط عكسي قليل أو معدوم، فمن الممكن استخدام جزيئات ذات أقطار صغيرة، وهو ما يعني – عند اقترانه بمظهر التدفق السدادي – إمكانية تحقيق كفاءات عالية جداً.

تعتبر الحدود A و Cفي معادلة فان ديمتر (van Deemter equation) صغيرة نسبياً في CEC، لأن سرعة المذيب الثابتة بين الجزيئات تعني أن حد الانتشار الدوامي (A) يكون مهملاً، كما أن القدرة على استخدام جزيئات صغيرة تقلل من الحد (C)؛ مما يجعل من الممكن تحقيق كفاءات مشابهة لتلك الموجودة في CE. تتراوح أحجام الجزيئات النموذجية بين 1-3 ميكرومتر. يجب استخدام أحجام جزيئات 0.5 <ميكرومتر ومنظمات مائية مخففة جداً ($< 0.01 \text{ mol L}^{-1}$) (Knox and Grant, 1987).

يتم حشو الشعيرات باستخدام مضخة ذات ضغط عالٍ (62 ميجا باسكال). تُصنع "فريتة" الحجز (Retaining frit) من السيليكا، ثم يُضخ ملاط الطور الثابت إلى داخل الشعير. بمجرد الحشو، تُحرق "فريتة" حجز ثانية في مكانها، وتُزال الحشوة الزائدة عن طريق عكس اتجاه التدفق. يتم تشكيل نافذة الكشف بعد فريتة الحجز مباشرة. لا تُعد هذه التقنية سهلة التعلم، ولكن الشعيرات المحشوة أصبحت متاحة الآن من العديد من المصنعين بمجموعة من الأبعاد ومع مجموعة متنوعة من الحشوات. وقد تم تقليل مشكلة تكون الفقاعات في منطقة الفريتة المخرجة، الناتجة عن إزالة الغاز من الـ BGE، عن طريق ضغط العمود.



الشكل 8: الكروماتوغرافيا الحركية الكهربائية المذيلية (MEKC) لبعض الأدوية غير المشروعة.

ملاحظة منهجية: تمثل CEC دمجاً ذكياً بين مميزات الكروماتوغرافيا السائلة (استخدام الطور الثابت) ومميزات الرحلان الكهربائي (التدفق السدادي). هل تحتاج إلى توضيح إضافي حول كيفية تأثير "فريتة" الحجز على تدفق التيار الكهربائي، أم ننتقل لمناقشة تطبيقات تقنية CGE في فصل البروتينات أو الأحماض النووية؟

إليك ترجمة الجزء الأخير من الفصل، والذي يختتم بالتقنيات المتخصصة ودور الرحلان الكهربائي في السموم التحليلية:
كما هو الحال في تقنية HPLC، استُخدمت السيليكا المعدلة بـ C18 على نطاق واسع في تقنية CEC. ومع ذلك، في CEC، ينشأ جزء مهم من التدفق التناضحي الكهربائي (EOF) من مجموعات السيلانول المتبقية المشحونة سالباً على مادة الحشو، وهي مساهمة تنخفض عند استخدام أطوار C18. وبذلك، يعتمد الـ EOF بقوة على الرقم الهيدروجيني (pH)، مما يجعل الفصل السريع في الظروف الحمضية أمراً صعباً. ونظراً لهذا العيب، كان هناك اهتمام بالعديد من الأنواع الأخرى من الأطوار المرتبطة (Bonded phases) لاستخدامها في CEC، بما في ذلك أطوار التبادل الأيوني، وبشكل خاص حيث يُستخدم مزيج من حشو التبادل الأيوني والحشو المعدل بـ C18، وهي ما تسمى بأطوار **"النمط المختلط" (Mixed mode phases)**. وقد ثبت أن أطوار النمط المختلط من نوع تبادل كاتيونات قوي (SCX)/سلسلة ألكيل تنتج EOF مستقراً على مدى واسع من الأس الهيدروجيني، وذلك بسبب احتفاظ مجموعات SCX بشحنة سالبة حتى في درجات pH منخفضة. كما استُخدمت أطوار النمط المختلط مع كواشف كيرالية (Chiral selectors) لفصل المتصاوغات المرآتية. ويمكن عكس اتجاه الـ EOF باستخدام أعمدة CEC المعتمدة على تبادل الأنيونات القوي (Byrne et al., 2001) (SAX).
كما تمت مراجعة تحضير واستخدام الأعمدة متجانسة البنية (**Monolithic columns**) في تقنية CEC (Svec et al., 2000)، وتم تطوير مجموعات وأطوار وظيفية من نوع SCX لهذه الأعمدة.

الرحلان الكهربائي الهلامي الشعيري (Capillary gel electrophoresis - CGE)

في تقنية CGE، يُملأ الشعير بخليط بوليمري، وتُفصل الجزيئات على أساس الحجم. يمكن إنتاج البوليمرات المتشابكة، مثل بولي أكريلاميد، في الموقع (in situ) داخل الشعير، وبالتالي تبقى بداخله. تعتبر CGE مفيدة بشكل خاص لفصل شظايا DNA لأن نسب الكتلة إلى الشحنة متشابهة جداً، لذا لا يمكن فصلها بواسطة تقنية CE في المحلول الحر.

التركيز متساوي الكهربائية الشعيري (Capillary isoelectric focusing - CIEF)

بالنسبة لـ CIEF، تُضخ منظمات أمفوتيرية (Amphoteric buffers) وتحاليل، مثل الببتيدات والبروتينات، داخل الشعير. عند تطبيق المجال الكهربائي، تتحرك جزيئات المنظم حتى تصبح غير مشحونة، مما يخلق تدرجاً في الأس الهيدروجيني (pH gradient) داخل الشعير. تهاجر التحاليل حتى تصل إلى المنطقة التي يتساوى فيها الرقم الهيدروجيني مع نقطة التعادل الكهربائي (**pI**) للمادة. هذا "التركيز" (Focusing) للببتيدات في مناطق منفصلة، والذي يُستدل عليه بتوقف التيار الكهربائي، يمكن أن يفصل الجزيئات التي تختلف قيم pI الخاصة بها بمقدار ضئيل يصل إلى 0.005. يمكن "سحب" محتويات الشعير أمام الكاشف عن طريق تطبيق ضغط على الطرف المصعدي.

تقنيات CE في السموم التحليلية (CE techniques in analytical toxicology)

لم يبدأ تطبيق عدد من التقنيات القائمة على الظواهر الحركية الكهربائية، بما في ذلك CE و MEKC، في السموم التحليلية إلا في التسعينيات (Hilhorst et al., 2001; Thormann, 2002). ومع ذلك، لا يزال تطبيق هذه التقنية في هذا المجال محدوداً على الرغم من المنشورات اللاحقة (Hempel, 2003; Lin et al., 2003; Smyth and Brooks, 2004; Tagliaro and Bortolotti, 2006).

تمت مراجعة دور طرق الرحلان الكهربائي الشعيري في التحليل السمومي الشامل (**STA**) (Boone and Ensing, 2003). ولا تزال التكرارية الضعيفة وسعة العينة المنخفضة، وبالتالي الحساسية الضعيفة للطرق الحالية، تشكل قيوداً رئيسية، وكذلك التكلفة العالية لأجهزة CE والهشاشة المادية للعديد من الأنظمة. ومع ذلك، فإن التعامد مع الكروماتوغرافيا والحاجة إلى

حجم عينة صغير جداً تعد مزايا محتملة على المدى الطويل. وقد يكون التطبيق في تحليل الشعر للكشف عن المخدرات مثالاً على ذلك (Gottardo et al., 2007).

الفصل الكيرالي (Chiral separations)

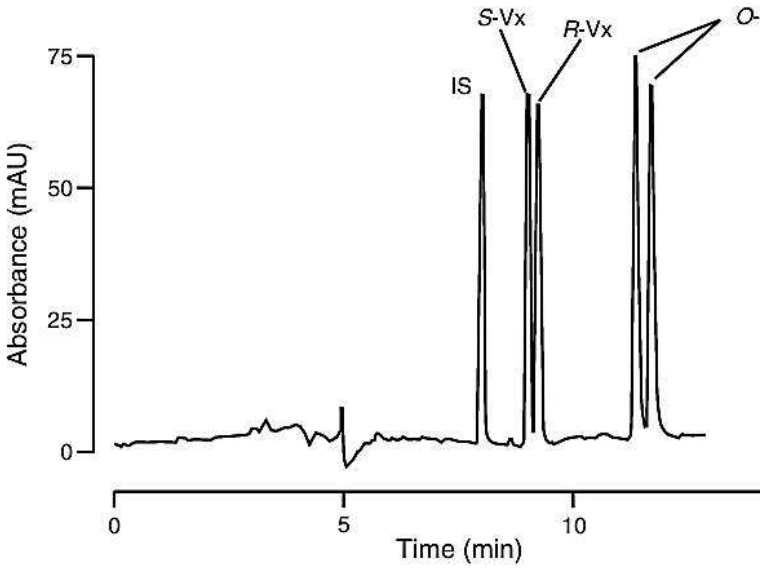
وُصفت طرق الفصل الكيرالي لكل من تقنيات CE و MEKC و CEC (Fanali et al., 2001; Bonato, 2003). وتتوازي الأساليب المتبعة مع تلك الموصوفة لكروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (HPLC) ، وتشمل استخدام إضافات كيرالية، ومواد خافضة للتوتر السطحي كيرالية مثل أحماض الصفراء (لـ MEKC)، وفي حالة CEC، استخدام إضافات أو أطوار ثابتة كيرالية (CSPs).

في تقنية CE، استُخدمت "محددات كيرالية" (Chiral selectors) متعادلة مع تعديل قيم الأس الهيدروجيني (pH) للـ BGE لضمان تأين التحليل: pH منخفض للقواعد، وpH مرتفع للأحماض. استُخدمت السيكلودكسترينات (Cyclodextrins) المعدلة على نطاق واسع، وكذلك إيثرات التاج (Crown ethers)، والبروتينات، وإضافات أخرى مستخدمة في HPLC الكيرالي. تم فصل متصاوغات "باكلوفين" (Baclofen) المرآتية بعد التفاعل مع NDA باستخدام α-سيكلودكسترين كمحدد كيرالي (Chiang et al., 2001). كما استُخدمت بروتينات AGP (بروتينات سكرية حمضية) طبيعية ومؤتلفة من الدجاج ($20\mu mol\ L^{-1}$) لفصل الراسيمات (Racemates) لكل من إيبيريسون، بيندولول، وتولبيريسون؛ وكان البروتين الطبيعي هو المفضل، ولكن حتى في هذه الحالة كانت الكفاءة ضعيفة مع وجود قمم عريضة ومذيّلة (Matsunaga et al., 2003). وتم تقييم الفانكومايسين (Vancomycin) والتيكوبلانين (Teicoplanin) كمحددات كيرالية في CE (Bednar et al., 2001).

استُخدمت مركبات من نوع "بيركل" (Pirkle-type) كإضافات، فعلى سبيل المثال، استُخدم (R)-DNBPG لفصل نواتج الأيض السلفوكسيدية لمركب ألبيندازول (Thormann et al., 2002). من مزايا CE أنه نظراً للحاجة إلى أحجام صغيرة جداً من الـ BGE، فإن كميات الإضافات الكيرالية باهظة الثمن تكون صغيرة أيضاً. قام Otsuka et al. (2000) باستخدام جزيئات سيليكا جل بأحجام 5 و3 ميكرومتر مطلية بـ "سليلوز تريس(5،3-ثنائي ميثيل فينيل كاربامات)" مع عدد من الراسيمات الاختبارية بما في ذلك إنيلكونازول، هوماتروبين، إيبوبروفين، بيندولول، بروبرانولول، فيراباميل، ووارفارين. لم تكن جميع أزواج المتصاوغات المرآتية قابلة للفصل، ولا سيما متصاوغات البروبرانولول.

تم استخدام الفانكومايسين، المدمج في سيليكا معدلة بالديول (Diol-modified silica) كطور ثابت كيرالي (CSP) لأعمدة CEC، لفصل المتصاوغات المرآتية لمركب فينلافاكسين (Venlafaxine) و O-ديسميثيل فينلافاكسين (الشكل 9). طُبقت الطريقة على بلازما أُضيفت إليها التحاليل.

وصف Lämmerhofer et al. (2001) تخليق أعمدة CEC متجانسة البنية (**Monolithic columns**) تدمج مجموعات وظيفية كيرالية، ومؤخراً تم تطوير متجانسات كيرالية تحتوي على مجموعات SCX (Preinerstorfer et al., 2005). كما تمت مراجعة دور تقنيات CE و CEC و MEKC في فصل المتصاوغات المرآتية لمثبطات استرداد السيروتونين الانتقائية (SSRIs)، ومثبطات استرداد النوربينفرين، ومثبطات استرداد السيروتونين والنوربينفرين، ومضادات الاكتئاب النورادرينالية والسيروتونينية النوعية (Mandrioli and Raggi, 2006).



الشكل 9: الفصل الكيرالي للفينلافاكسين (Vx) و O-ديسميثيل فينلافاكسين (O-Vx). (الظروف: شعير بقطر داخلي 75 مم، طول كلي 35 سم، محشو بـ 11 سم سيليكا ديول، و23 سم سيليكا فانكومايسين CSP، و1 سم سيليكا ديول؛ المذيب: خلات الأمونيوم (100 mmol L^{-1}, pH 6.0):ماء:أسيتونيتريل (5:5:90)؛ الجهد المطبق 27 كيلو فولت؛ درجة الحرارة 20 درجة مئوية).

خلاصة الفصل (Summary)

على الرغم من الوعود التي قدمتها تقنيات الرحلان الكهربائي الشعيري بتحقيق كفاءة غير مسبوقة بفضل كون التدفق مدفوعاً كهربائياً وليس بضغط هيدروليكي، إلا أن المشكلات العملية الناتجة عن الحاجة إلى الحد من إنتاج الحرارة والتحكم فيها قد قيدت القطر الداخلي للأعمدة، مما أدى بالتبعية إلى تقليل سعة العينة ومن ثم الحساسية. علاوة على ذلك، لا تزال الأنظمة التحليلية في هذا المجال تفتقر إلى المتانة (Robustness)، كما أن أعمدة CEC يصعب حشوها بطريقة تكرارية (Reproducible). لذلك، وفي حين حققت هذه التقنيات مكانة بارزة في مجالات متخصصة، يظل الوعد الذي حملته تقنيات CE غير محقق بالكامل في سياق السموم التحليلية؛ حيث لا تزال التقنيات الكروماتوغرافية السائلة المقترنة بمطيافية الكتلة (HPLC-MS) هي المهيمنة نظراً لتفوقها من حيث القوة التمييزية والاعتمادية.

توصيات هامة للممارسين (Key Recommendations)

بناءً على المعطيات العلمية الواردة في هذا الفصل، نوصي بما يلي عند التعامل مع تقنيات الرحلان الكهربائي الشعيري:

1. **التحكم الدقيق في درجة الحرارة:** يجب تفعيل أنظمة التبريد القسرية بشكل دائم ومراقبة "مخطط قانون أوم" (Ohm's Law plot) باستمرار لضمان أن النظام يعمل في النطاق الخطي بعيداً عن تأثيرات "تسخين جول" التي تؤدي إلى تدهور دقة الفصل.
2. **استراتيجية تجديد المحاليل:** يُنصح بتجديد إلكتروليت الخلفية (BGE) بشكل دوري (مثلاً كل 5 حقنات) لمنع التغيرات في الأس الهيدروجيني (pH) التي تؤدي إلى انحراف زمن الهجرة، مع ضرورة ترشيح المحاليل وتفريغ الغازات منها لضمان استقرار التدفق التناضحي الكهربائي (EOF).

3. **التعامل مع مشكلات الامتزاز:** عند تحليل عينات بيولوجية (مثل البلازما أو الشعر)، يجب تنفيذ بروتوكول تنظيف دوري للشعير باستخدام هيدروكسيد الصوديوم، مع النظر في استخدام الشعيرات المطلية ديناميكياً لتقليل امتزاز البروتينات على الجدران.
4. **استخدام المعايير الداخلية:** نظراً لصعوبة تحقيق تكرارية زمن الهجرة، يجب اعتماد نهج "أزمنة الهجرة النسبية" باستخدام معيار داخلي واحد أو أكثر لتعزيز موثوقية تحديد هوية المركبات المجهولة في التحليل السمومي الشامل (STA).
5. **التكامل التقني:** يُفضل استخدام تقنيات كشف متطورة مثل DAD أو MS للتحقق من هوية القمم بدلاً من الاعتماد الكلي على زمن الهجرة وحده، مما يقلل من التبعية للظروف الرحلانية المتقلبة.

المراجع(References)

Alnajjar, A., Butcher, J. A., & McCord, B. (2004). Determination of multiple drugs of abuse in human urine using capillary electrophoresis with fluorescence detection. Electrophoresis, 25(10-11), 1592–1600.

Bednar, P., Aturki, Z., Stransky, Z., & Fanali, S. (2001). Chiral analysis of UV nonabsorbing compounds by capillary electrophoresis using macrocyclic antibiotics: 1. Separation of aspartic and glutamic acid enantiomers. Electrophoresis, 22(10), 2129–2135.

Bonato, P. S. (2003). Recent advances in the determination of enantiomeric drugs and their metabolites in biological fluids by capillary electrophoresis-mediated microanalysis. Electrophoresis, 24(22-23), 4078–4094.

Boone, C. M., & Ensing, K. (2003). Is capillary electrophoresis a method of choice for systematic toxicological analysis? Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 41(6), 773–781.

Boone, C. M., Jonkers, E. Z., Franke, J. P., de Zeeuw, R. A., & Ensing, K. (2001). Dynamically coated capillaries improve the identification power of capillary zone electrophoresis for basic drugs in toxicological analysis. Journal of Chromatography A, 927(1-2), 203–210.

Boone, C. M., Manetto, G., Tagliaro, F., Waterval, J. C., Underberg, W. J., Franke, J. P., de Zeeuw, R. A., & Ensing, K. (2002). Interlaboratory reproducibility of mobility parameters in capillary electrophoresis for substance identification in systematic toxicological analysis. Electrophoresis, 23(1), 67–73.

Byrne, C. D., Smith, N. W., Dearie, H. S., Moffatt, F., Wren, S. A., & Evans, K. P. (2001). Influence of the unpacked section on the chromatographic performance of duplex strong anion-exchange columns in capillary electrochromatography. Journal of Chromatography A, 927(1-2), 169–177.

Caslavska, J., & Thormann, W. (2004). Monitoring of drugs and metabolites in body fluids by capillary electrophoresis with XeHg lamp-based and laser-induced fluorescence detection. Electrophoresis, 25(10-11), 1623–1631.

Chiang, M. T., Chang, S. Y., & Whang, C. W. (2001). Chiral analysis of baclofen by α-cyclodextrin-modified capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. Electrophoresis, 22(1), 123–127.

Deng, Y. Z., Zhang, N. W., & Henion, J. (2001). Chip-based quantitative capillary electrophoresis/mass spectrometry determination of drugs in human plasma. Analytical Chemistry, 73(7), 1432–1439.

Dolnik, V., & Liu, S. (2005). Applications of capillary electrophoresis on microchip. Journal of Separation Science, 28(15), 1994–2009.

Fanali, S., Catarcini, P., Blaschke, G., & Chankvetadze, B. (2001). Enantioseparations by capillary electrochromatography. Electrophoresis, 22(15), 3131–3151.

Gaus, H.-J., Gögüs, Z. Z., Schmeer, K., Behnke, B., Kovar, K. A., & Bayer, E. (1996). Separation and identification of designer drugs with capillary electrophoresis and on-line connection with ionspray mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 735(1-2), 221–226.

Gottardo, R., Bortolotti, F., De Paoli, G., Pascal, J. P., Miksík, I., & Tagliaro, F. (2007). Hair analysis for illicit drugs by using capillary zone electrophoresis-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1159(1-2), 185–189.

Hempel, G. (2003). Biomedical applications of capillary electrophoresis. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 41(6), 720–723.

Hilhorst, M. J., Somsen, G. W., & de Jong, G. J. (2001). Capillary electrokinetic separation techniques for profiling of drugs and related products. Electrophoresis, 22(12), 2542–2564.

Hyötyläinen, T., Sirén, H., & Riekkola, M.-L. (1996). Determination of morphine analogues, caffeine and amphetamine in biological fluids by capillary electrophoresis with the marker technique. Journal of Chromatography A, 735(1-2), 439–447.

Knox, J. H., & Grant, I. H. (1987). Miniaturization in pressure and electroendosmotically driven liquid chromatography—Some theoretical considerations. Chromatographia, 24, 135–143.

Lämmerhofer, M., Peters, E. C., Yu, C., Svec, F., & Fréchet, J. M. (2000). Chiral monolithic columns for enantioselective capillary electrochromatography prepared by copolymerization of a monomer with quinidine functionality. 1. Optimization of polymerization conditions, porous properties, and chemistry of the stationary phase. Analytical Chemistry, 72(19), 4614–4622.

Lin, C. C., Li, Y. T., & Chen, S. H. (2003). Recent progress in pharmacokinetic applications of capillary electrophoresis. Electrophoresis, 24(22-23), 4106–4115.

Mandrioli, R., & Raggi, M. A. (2006). Advances in the enantioseparation of second-generation antidepressant drugs by electrodriven methods. Electrophoresis, 27(1), 213–221.

Matsunaga, H., Sadakane, Y., & Haginaka, J. (2003). Separation of basic drug enantiomers by capillary electrophoresis using chicken α1-acid glycoprotein: Insight into chiral recognition mechanism. Electrophoresis, 24(14), 2442–2447.

Mukerjee, P., & Mysels, K. J. (1971). Critical micelle concentrations of surfactant systems. National Standard Reference Data Series, NSRDS-NBS 36. National Bureau of Standards.

Myers, D. (1988). Surfactant science and technology. VCH.

Otsuka, K., Mikami, C., & Terabe, S. (2000). Enantiomer separations by capillary electrochromatography using chiral stationary phases. Journal of Chromatography A, 887(1-2), 457–463.

Paéz, X., Rada, P., Tucci, S., Rodríguez, N., & Hernández, L. (1996). Capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence detection of amphetamine in the brain. Journal of Chromatography A, 735(1-2), 263–269.

Preinerstorfer, B., Lindner, W., & Lämmerhofer, M. (2005). Polymethacrylate-type monoliths functionalized with chiral amino phosphonic acid-derived strong cation exchange moieties for enantioselective nonaqueous capillary electrochromatography and investigation of the chemical composition of the monolithic polymer. Electrophoresis, 26(10), 2005–2018.

Ramseier, A., Siethoff, C., Caslavska, J., & Thormann, W. (2000). Confirmation testing of amphetamines and designer drugs in human urine by capillary electrophoresis-ion trap mass spectrometry. Electrophoresis, 21(2), 380–387.

Smyth, W. F., & Brooks, P. (2004). A critical evaluation of high performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry and capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry for the detection and determination of small molecules of significance in clinical and forensic science. Electrophoresis, 25(10-11), 1413–1446.

Svec, F., Peters, E. C., Sýkora, D., & Fréchet, J. M. (2000). Design of the monolithic polymers used in capillary electrochromatography columns. Journal of Chromatography A, 887(1-2), 3–29.

Tagliaro, F., & Bortolotti, F. (2006). Recent advances in the applications of CE to forensic sciences (2001–2004). Electrophoresis, 27(1), 231–243.

Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., & Ando, T. (1984). Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. Analytical Chemistry, 56(1), 111–113.

Thormann, W. (2002). Progress of capillary electrophoresis in therapeutic drug monitoring and clinical and forensic toxicology. Therapeutic Drug Monitoring, 24(2), 222–231.

Thormann, W., Prost, F., & Prochazkova, A. (2002). Capillary electrophoresis with (R)-(+)-N-(3,5-dinitrobenzoyl)-α-phenylglycine as chiral selector for separation of albendazole sulfoxide enantiomers and their analysis in human plasma. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 27(3-4), 555–567.

Vandaveer, W. R., Pasas-Farmer, S. A., Fischer, D. J., Frankenfeld, C. N., & Lunte, S. M. (2004). Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis. Electrophoresis, 25(21-22), 3528–3549.

Wallingford, R. A., & Ewing, A. G. (1987). Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. Analytical Chemistry, 59(14), 1762–1766.

Watzig, H., & Gunter, S. (2003). Capillary electrophoresis—a high performance analytical separation technique. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 41(6), 724–738.

CHAPTER (11) الفصل الحادي عشر



مكونات الأجهزة البصرية

COMPONENTS OF OPTICAL INSTRUMENTS

الفصل الحادي عشر

مكونات الأجهزة البصرية

COMPONENTS OF OPTICAL INSTRUMENTS

المقدمة

تتشارك الأجهزة المخصصة لمناطق الأشعة فوق البنفسجية **(Ultraviolet - UV)**، والمرئية **(Visible - Vis)**، وتحت الحمراء **(Infrared - IR)** في خصائص كافية تجعلها تُصنف غالباً تحت مسمى **الأجهزة البصرية (Optical Instruments)**، على الرغم من أن العين البشرية غير حساسة للأطوال الموجية للأشعة فوق البنفسجية أو تحت الحمراء. يتناول هذا الفصل وظائف ومتطلبات وسلوك مكونات أجهزة التحليل الطيفي البصري لأنواع الإشعاع الثلاثة هذه. وتجدر الإشارة إلى أن الأجهزة المستخدمة للدراسات الطيفية في المناطق ذات الطاقة الأعلى من الأشعة فوق البنفسجية والأقل من الأشعة تحت الحمراء تمتلك خصائص تختلف جوهرياً عن الأجهزة البصرية، وسيتم تناولها بشكل منفصل في فصول أخرى.

التصميمات العامة للأجهزة البصرية (General Designs of Optical Instruments)

تعتمد طرق التحليل الطيفي البصري غالباً على ست ظواهر فيزيائية:

1. الامتصاص **(Absorption)**.
2. الوميض/الفلورة **(Fluorescence)**.
3. التفسفر **(Phosphorescence)**.
4. التشتت **(Scattering)**.
5. الانبعاث **(Emission)**.
6. التألق الكيميائي **(Chemiluminescence)**.

وعلى الرغم من اختلاف تكوين الأجهزة المستخدمة لقياس كل منها، إلا أن معظم مكوناتها الأساسية متشابهة بشكل ملحوظ. علاوة على ذلك، فإن الخصائص المطلوبة لهذه المكونات تظل ثابتة بغض النظر عن الجزء من الطيف (UV، أو Vis، أو IR) الذي تُطبق عليه [1].

المكونات الخمسة الأساسية للأجهزة الطيفية:

تحتوي الأجهزة الطيفية النموذجية على خمسة مكونات رئيسية:

1. **مصدر للطاقة الإشعاعية (Source of radiant energy)**.
2. **حاوية للعينة (Container for holding the sample)**.
3. **جهاز لعزل منطقة محددة من الطيف للقياس (Wavelength selector)** [2].

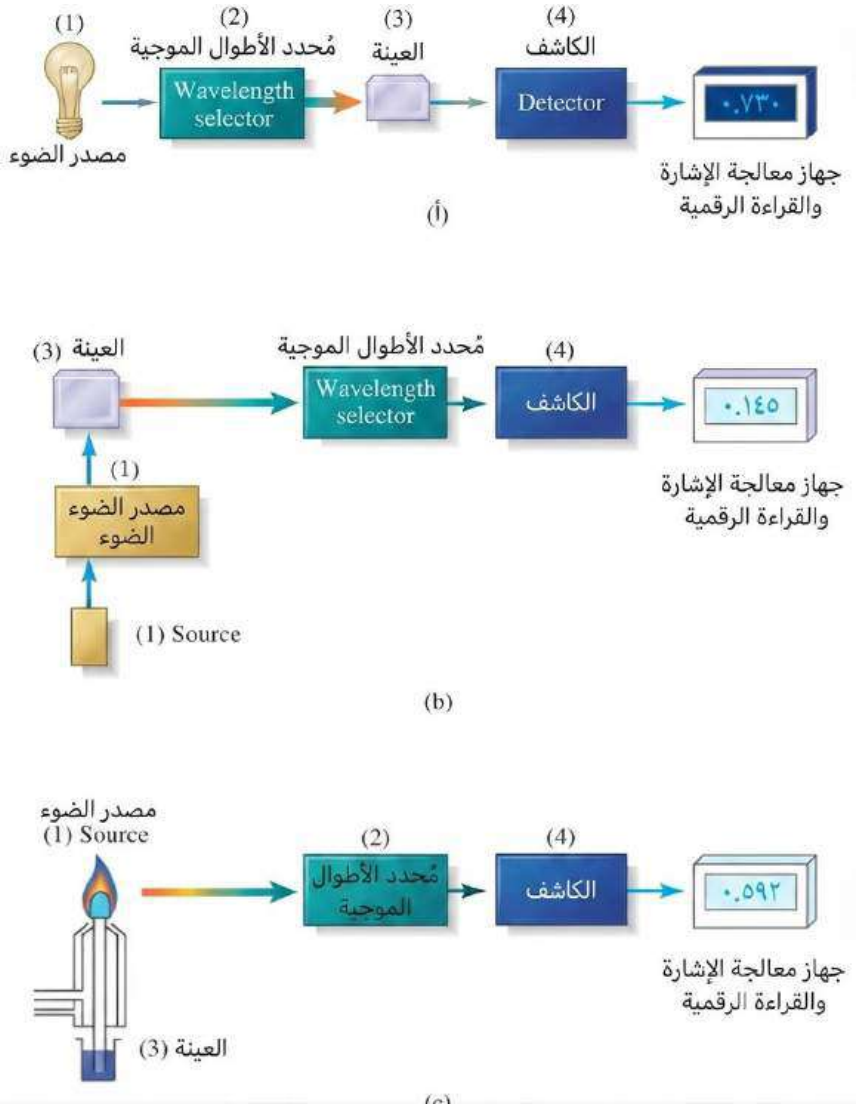
---

[1] *Skoog, D. A., Holler, F. J & ,.Crouch, S. R .(2017) .Principles of Instrumental Analysis .Cengage Learning.*

[2] تُعرف الأجهزة المستخدمة لعزل الأطوال الموجية بـ "الموحدات اللونية" **(Monochromators)** أو "مرشحات الألوان" **(Filters)** اعتماداً على دقة العزل المطلوبة.

4. **كاشف إشعاعي (Radiation detector)**: يقوم بتحويل الطاقة الإشعاعية إلى إشارة كهربائية قابلة للاستخدام.
5. **معالج إشارة ووحدة قراءة (Signal processor and readout)**: تعرض الإشارة المحولة على شاشة رقمية أو شاشة حاسوب أو أي جهاز تسجيل آخر.

يوضح الشكل (1) الطرق الثلاث التي يتم بها تهيئة هذه المكونات لإجراء أنواع القياسات الطيفية الستة المذكورة أعلاه. كما يوضح الشكل أن المكونات (1، 4، 5) تُرتب بنفس الطريقة في كل نوع من أنواع القياس.



الشكل (1)

- **(a) قياسات الامتصاص:** يتم توجيه إشعاع المصدر ذو الطول الموجي المحدد عبر العينة، ويُقاس الإشعاع النافذ بواسطة وحدة الكاشف ومعالجة الإشارة.
- **(b) قياسات الفلورة:** يُستخدم "محددان للطول الموجي" (واحد لاختيار طول موجة الإثارة، وآخر لطول موجة الانبعاث). يسقط إشعاع المصدر على العينة، ويُقاس الإشعاع المنبعث عادة بزاوية قائمة لتجنب التداخل الناتج عن التشتت.
- **(c) قياسات الانبعاث:** يُستخدم مصدر طاقة حرارية (مثل اللهب أو البلازما) لإنتاج بخار المادة التحليلية الذي يصدر إشعاعاً، ثم يُعزل هذا الإشعاع بواسطة محدد الطول الموجي ويُحول إلى إشارة كهربائية.

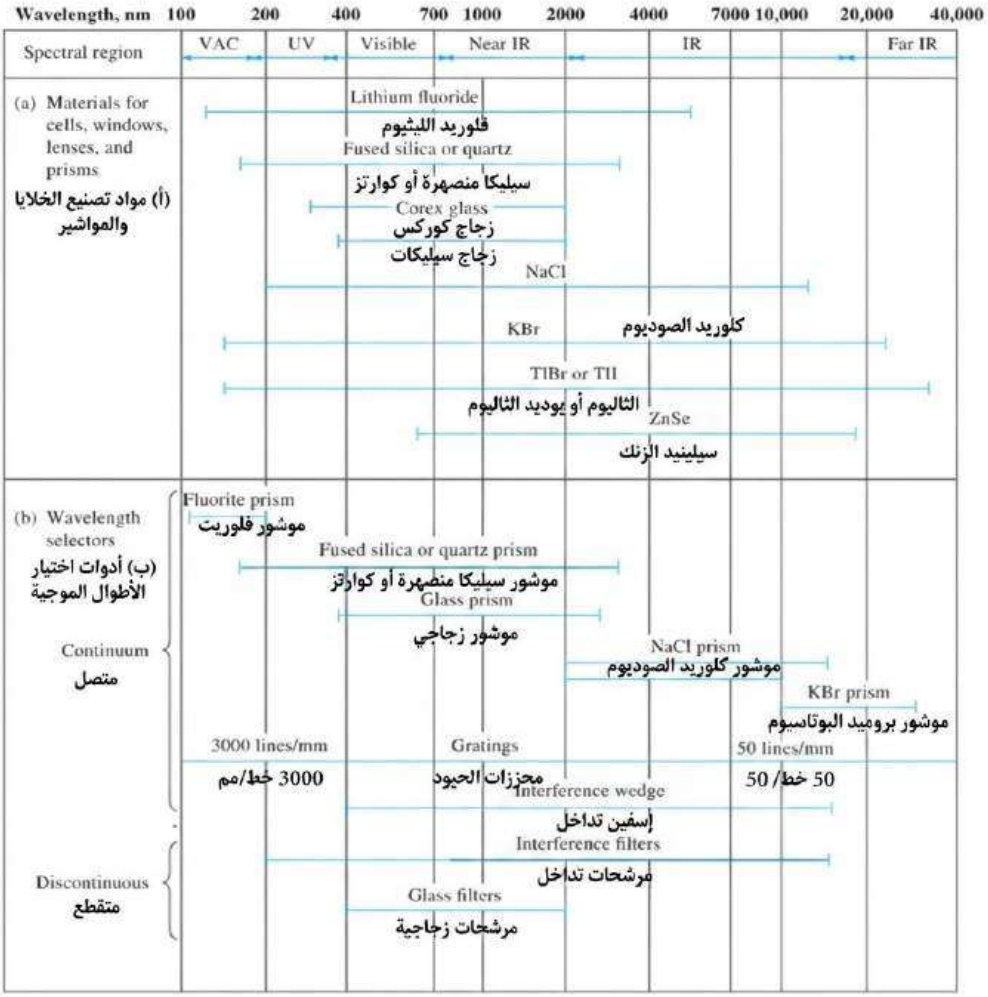
أنماط تهيئة الأجهزة (Instrumental Configurations)

- **الامتصاص والفلورة والتفسفر:** تتطلب هذه القياسات مصدراً خارجياً للطاقة الإشعاعية. في حالة **الامتصاص (Absorption)**، يمر الشعاع من المصدر عبر "محدد طول الموجة" ثم عبر العينة (أو بالعكس في بعض الأجهزة). أما في حالة **الفلورة والتفسفر (Fluorescence and Phosphorescence)**، يحفز المصدر العينة المحفوظة في الحاوية لإصدار إشعاع مميز، يُقاس عادةً بزاوية قدرها 90 درجة بالنسبة للمصدر.
- **الانبعاث والتألق الكيميائي:** تختلف هذه الطرق في عدم حاجتها لمصدر إشعاعي خارجي؛ حيث تُعد العينة نفسها هي المصدر الباعث (انظر الشكل c1).

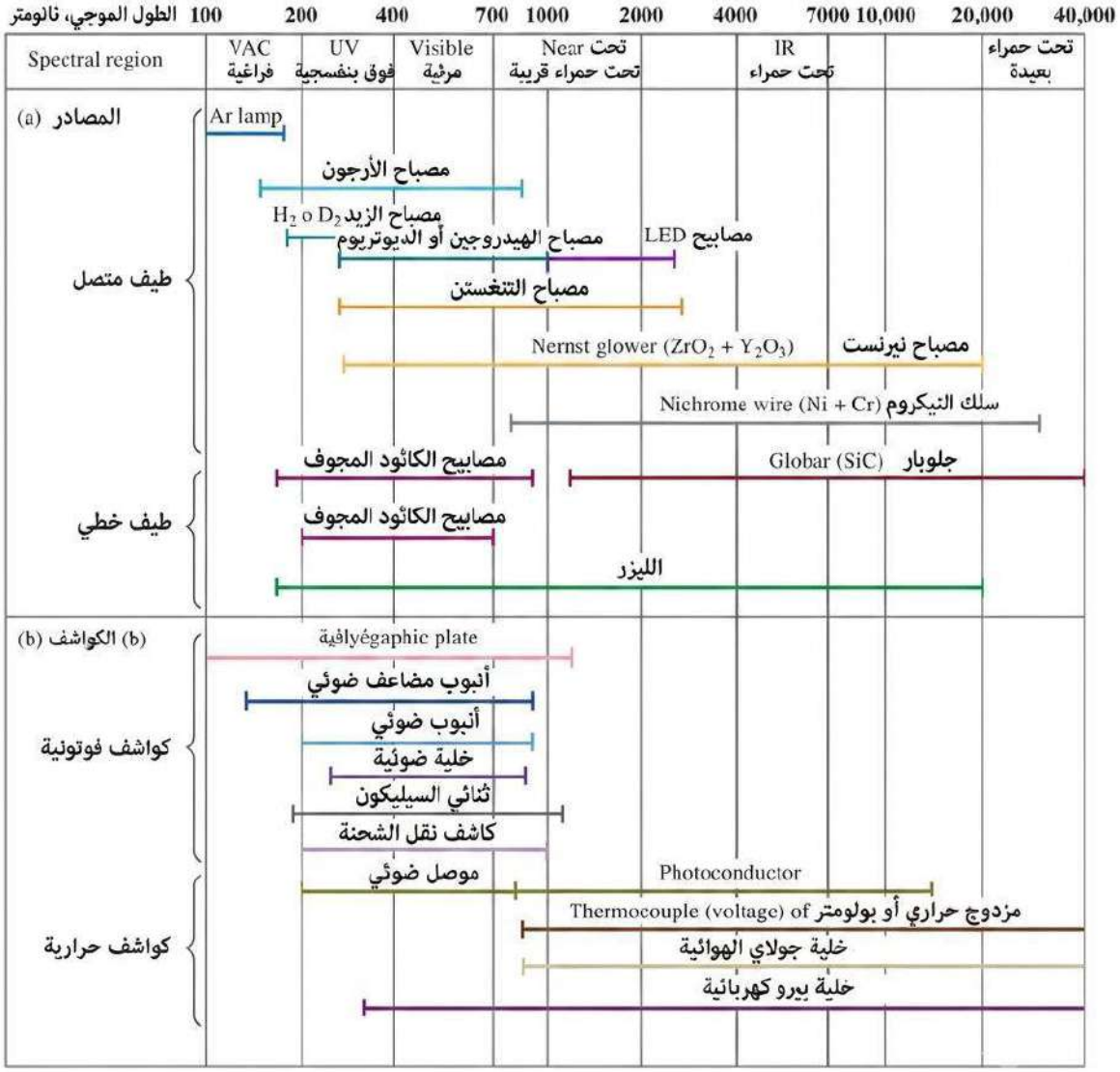
- في **مطيافية الانبعاث (Emission spectroscopy)**، تكون حاوية العينة عبارة عن بلازما أو شرارة أو لهب، حيث تعمل هذه الوسائط على احتواء العينة وتحفيزها لإصدار إشعاع مميز.
- في **مطيافية التألق الكيميائي (Chemiluminescence spectroscopy)**، يكون مصدر الإشعاع هو محلول يحتوي على المادة التحليلية (Analyte) بالإضافة إلى كواشف موضوعة في حامل عينة شفاف. ينشأ الانبعاث نتيجة للطاقة المتحررة من تفاعل كيميائي تشارك فيه المادة التحليلية بشكل مباشر أو غير مباشر.

خصائص مكونات الأجهزة (Component Characteristics)

تلخص الأشكال (2) و(3) الخصائص البصرية لجميع المكونات الموضحة في الشكل (1)، باستثناء معالج الإشارة ووحدة القراءة. تجدر الملاحظة أن مكونات الأجهزة تختلف في تفاصيلها بناءً على **منطقة الطول الموجي (Wavelength region)** التي ستُستخدم فيها. كما يعتمد تصميمها أيضاً على ما إذا كان الجهاز سيُستخدم بشكل أساسي للتحليل النوعي **(Qualitative analysis)** أو التحليل الكمي **(Quantitative analysis)**، وما إذا كان سيُطبق في مجال المطيافية الذرية **(Atomic spectroscopy)** أو الجزيئية **(Molecular spectroscopy)**. ومع ذلك، تظل الوظيفة العامة ومتطلبات الأداء لكل نوع من المكونات متشابهة بغض النظر عن منطقة الطول الموجي أو التطبيق.



الشكل (2): يوضح (a) مواد التصنيع، و(b) محددات الطول الموجي المستخدمة في الأجهزة الطيفية.



الشكل (3): يوضح (a) مصادر الإشعاع، و(b) الكواشف المستخدمة في الأجهزة الطيفية.

مصادر الإشعاع (Sources of Radiation)

لكي يكون المصدر مناسباً للدراسات الطيفية، يجب أن يولد شعاعاً ذا **طاقة إشعاعية (Radiant power)** كافية لضمان سهولة الكشف عنه وقياسه. بالإضافة إلى ذلك، يجب أن تكون طاقة خرجه مستقرة لفترات زمنية معقولة.

عادةً ما تتغير الطاقة الإشعاعية للمصدر بشكل أسي مع تغير جهد مصدر الطاقة الخاص به. لذا، غالباً ما تكون هناك حاجة إلى **مصدر طاقة منظم (Regulated power source)** لتوفير الاستقرار المطلوب. وكبديل لذلك، يمكن أحياناً تجاوز مشكلة استقرار المصدر باستخدام **تصميمات ثنائية الشعاع (Double-beam designs)**، حيث يتم استخدام نسبة الإشارة القادمة من العينة إلى إشارة المصدر في غياب العينة كمتغير تحليلي. في هذه التصميمات، تُقاس شدة الشعاعين في وقت واحد أو في أوقات متقاربة جداً، بحيث يتم إلغاء تأثير التقلبات في خرج المصدر إلى حد كبير.

أنواع مصادر الإشعاع:

يوضح الشكل (a3) المصادر الطيفية الأكثر استخداماً. وتُصنف هذه المصادر إلى نوعين:

1. **مصادر مستمرة (Continuum sources):** وهي التي تبعث إشعاعاً تتغير شدته بشكل تدريجي (مستمر) كدالة في الطول الموجي.
2. **مصادر خطية (Line sources):** وهي التي تبعث عدداً محدوداً من الخطوط أو حزم الإشعاع، حيث يغطي كل منها نطاقاً محدوداً من الأطوال الموجية.

ملاحظة تقنية: في التصميم ثنائي الشعاع، إذا رمزنا لشدة الشعاع المار عبر العينة بـ Pوشدة الشعاع المرجعي بـ P_0، فإن الإشارة التحليلية التي يتم معالجتها تعتمد غالباً على النفاذية (T) التي تُحسب كنسبة $T = P/P_0$، مما يساعد في التخلص من الضوضاء الناتجة عن تذبذب المصدر.

المصادر المستمرة (Continuum Sources)

تعد المصادر المستمرة مفيدة في عدة أنواع من المطيافية، بما في ذلك الامتصاص والفلورة.

- **منطقة الأشعة فوق البنفسجية (UV):** المصدر الأكثر شيوعاً هو **مصباح الديوتيريوم (Deuterium lamp)**. أما عند الحاجة إلى مصدر ذو كثافة إشعاعية عالية، تُستخدم مصابيح القوس الكهربائي المملوءة بالغازات تحت ضغط عالٍ مثل الأرجون، أو الزينون، أو الزئبق.
- **المنطقة المرئية (Visible):** يُستخدم **مصباح فتيل التنجستن (Tungsten filament lamp)** في العديد من التطبيقات.
- **منطقة الأشعة تحت الحمراء (IR):** المصادر الشائعة هي **مواد صلبة خاملة (Inert solids)** تُسخن إلى درجات حرارة تتراوح بين **1500 إلى 2000 كلفن (K)**، وهي درجة الحرارة التي يحدث عندها أقصى خرج إشعاعي عند أطوال موجية تتراوح بين **1.5 إلى 1.9 ميكرومتر** .

المصادر الخطية (Line Sources)

تُستخدم المصادر التي تبعث عدداً قليلاً من الخطوط المنفصلة على نطاق واسع في مطيافية الامتصاص الذري، ومطيافية الفلورة الذرية والجزيئية، ومطيافية رامان (كما تُستخدم أيضاً في قياسات الانكسار والاستقطاب).

- **مصابيح بخار الزئبق والصوديوم:** توفر عدداً قليلاً نسبياً من الخطوط الحادة في مناطق الأشعة فوق البنفسجية والمرئية، وتُستخدم في العديد من الأجهزة الطيفية.
- **مصابيح الكاثود المجوف (Hollow-cathode lamps) ومصابيح التفريغ بدون أقطاب (Electrodeless discharge lamps):** تُعد أهم المصادر الخطية لطرق الامتصاص والفلورة الذرية .

مصادر الليزر (Laser Sources)

تعتبر **الليزرات (Lasers)** مصادر مفيدة للغاية في الأجهزة التحليلية نظراً لشدتها العالية، ونطاقاتها الترددية الضيقة، وطبيعة أشعتها المتوافقة (Coherent) [3].

[3] **حول الليزر والمطيافية الليزرية :**للحصول على مناقشة أكثر شمولاً حول الليزرات ومطيافية الليزر، يمكن الرجوع إلى المصادر التالية:

- K. Thyagarajan and Ajoy Ghatak, *Lasers: Fundamental and Applications*, 2nd ed., New York: Springer, 2010.
- W. T. Silfvast, *Laser Fundamentals*, 2nd ed., Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2008.
- H. H. Telle, A. G. Urena, and R. J. Donovan, *Laser Chemistry: Spectroscopy, Dynamics and Applications*, Chichester: Wiley, 2007.

- **تعريف الليزر:** المصطلح **LASER** هو اختصار لعبارة **"تضخيم الضوء بواسطة الانبعاث المحفز للإشعاع"** (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation).
- **الخصائص:** نظراً لخصائصها في تضخيم الضوء، تنتج الليزرات أشعة ضيقة مكانياً (بضعة أجزاء من المئة من الميكرومتر) وعالية الكثافة بشكل استثنائي. تنتج عملية **الانبعاث المحفز (Stimulated emission)** شعاعاً أحادي اللون بشكل كبير (نطاق ترددي يبلغ 0.01 نانومتر أو أقل) ومتوافقاً بدرجة ملحوظة .
- **التطبيقات:** تُستخدم الليزرات في المطيافية عالية الدقة، ومراقبة الظواهر فائقة السرعة، والكشف عن العناصر النزرة (Trace elements) في تربة المريخ والغلاف الجوي للأرض، وفي العلوم الجنائية [4]. كما أصبحت جزءاً مهماً من طرق تحليلية روتينية مثل مطيافية رامان، والامتصاص الجزيئي، والفلورة، والانبعاث، ومطيافية تحويل فوريه للأشعة تحت الحمراء (FTIR).
- **تطور الليزر:** كان القيد الرئيسي لليزرات المبكرة هو اقتصارها على عدد محدود من الأطوال الموجية المنفصلة، ولكن الآن أصبحت **الليزرات القابلة للضبط (Tunable lasers)** متاحة، والتي توفر حزم إشعاع ضيقة نسبياً في مناطق طيفية متعددة.

مكونات الليزر (Components of Lasers)

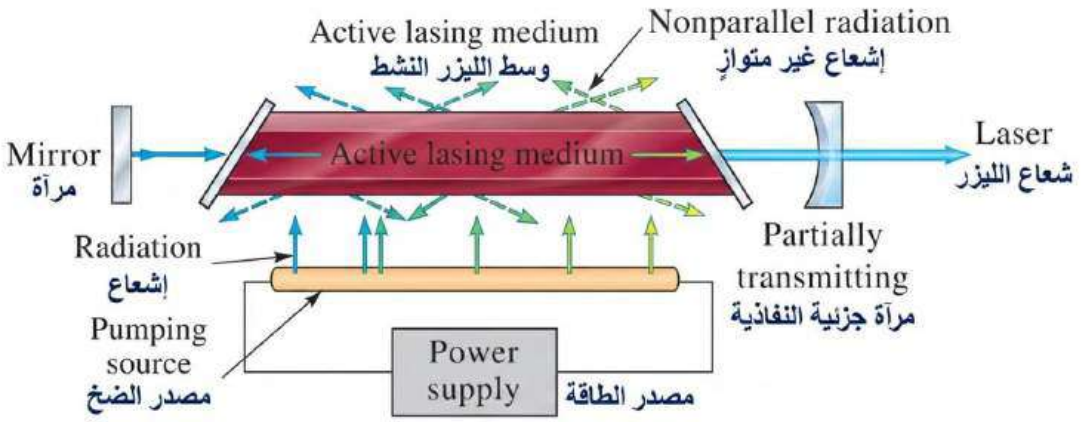
يوضح الشكل (4) تمثيلاً تخطيطياً لمكونات مصدر الليزر النموذجي. قلب هذا الجهاز هو **وسط الليزر (Lasing medium)**، والذي قد يكون بلورة صلبة مثل الياقوت (**Ruby**)، أو مادة شبه موصلة مثل زرنيخيد الغاليوم (**Gallium arsenide**)، أو محلولاً لصبغة عضوية، أو غازاً مثل الأرجون أو الكريبتون.

غالباً ما يتم تنشيط أو ضخ مادة الليزر بواسطة إشعاع من مصدر خارجي، بحيث تؤدي بضعة فوتونات ذات طاقة مناسبة إلى إطلاق سلسلة من الفوتونات ذات الطاقة نفسها. يمكن أن يتم الضخ أيضاً بواسطة تيار كهربائي أو تفريغ كهربائي؛ ولهذا السبب، فإن ليزرات الغاز لا تحتوي عادةً على مصدر إشعاع خارجي كما في الشكل (4)، بل يتم توصيل مصدر الطاقة بزوج من الأقطاب الكهربائية داخل خلية مملوءة بالغاز. يعمل الليزر عادةً كـ **مذبذب (Oscillator)** أو **رنان (Resonator)**، حيث يتم توجيه الإشعاع الناتج عن عملية الليزر ليتحرك جيئة وذهاباً عبر الوسط عدة مرات بواسطة زوج من المرايا كما هو موضح في الشكل (4). تتولد فوتونات إضافية مع كل مرور، مما يؤدي إلى تضخيم هائل. هذا المرور المتكرر ينتج أيضاً شعاعاً متوازياً للغاية (**Highly parallel**)، لأن الإشعاع غير المتوازي يهرب من جوانب الوسط بعد انعكاسه بضع مرات. ومن أسهل الطرق للحصول على شعاع ليزر قابل للاستخدام هو طلاء إحدى المرايا بطبقة رقيقة جداً من مادة عاكسة، بحيث ينفذ جزء من الشعاع بدلاً من انعكاسه.

- D. L. Andrews and A. A. Demidov (eds.), *An Introduction to Laser Spectroscopy*, 2nd ed., New York: Springer, 2002.

[4] **حول مقالات ومراجعات لتطبيقات الليزر في الكيمياء التحليلية :**للاطلاع على مقالات ومراجعات حول بعض هذه التطبيقات المذكورة في النص، انظر:

- J. B. Baxter and G. W. Guglietta, *Anal. Chem.*, 2011, 83, 4342–4368, DOI: 10.1021/ac200907z.
- F. J. Fortes, J. Moros, P. Lucena, L. M. Cabalín, and J. J. Laserna, *Anal. Chem.*, 2013, 85, 640–669, DOI: 10.1021/ac303220r.
- K. H. Cochran, J. A. Barry, D. C. Muddiman, and D. Hinks, *Anal. Chem.*, 2013, 85, 831–836, DOI: 10.1021/ac302519n.
- F. A. Orellana, C. G. Gálvez, M. T. Roldán, and C. García-Ruiz, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 2013, 42, 1–34, DOI: 10.1016/j.trac.2012.09.015.



الشكل (4): التمثيل التخطيطي لمصدر ليزر نموذجي.

آلية عمل الليزر (Mechanism of Laser Action)

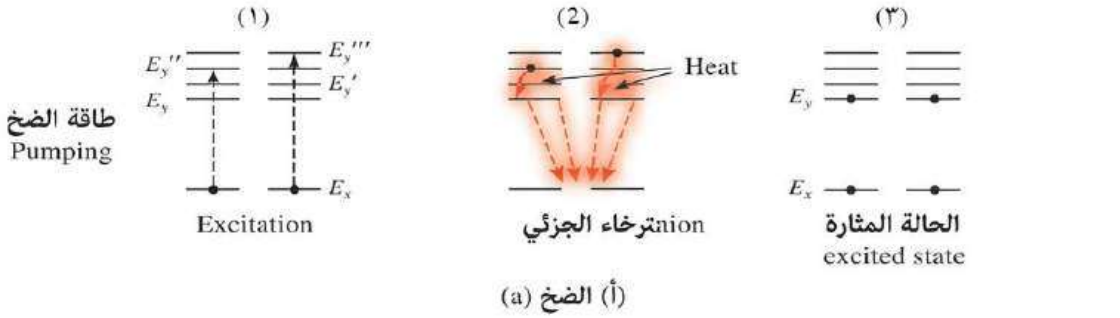
لتوضيح آلية عمل الليزر، سننظر في نظام جزيئي. ومع ذلك، فإن العديد من الليزرات هي ليزرات ذرية أو أيونية، وعلى الرغم من أن آليات عملها مشابهة لليزرات الجزيئية، إلا أن التفاصيل تختلف قليلاً. يمكن فهم عمل الليزر من خلال النظر في العمليات الأربع الموضحة في الشكل (5):

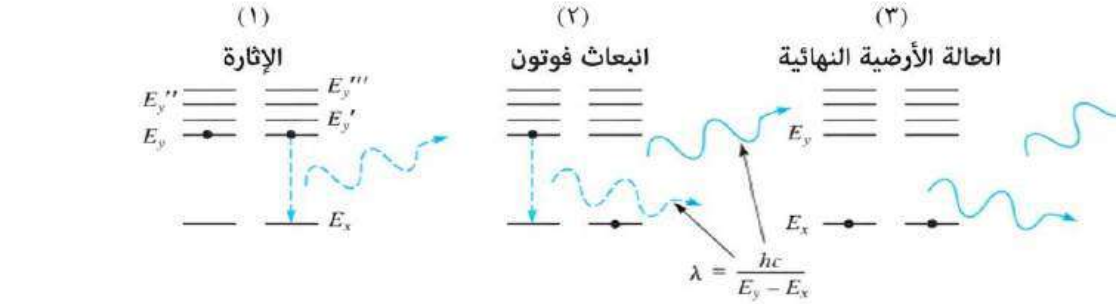
1. **الضخ (Pumping).**
2. **الانبعاث التلقائي (Spontaneous emission/Fluorescence).**
3. **الانبعاث المحفز (Stimulated emission).**
4. **الامتصاص (Absorption).**

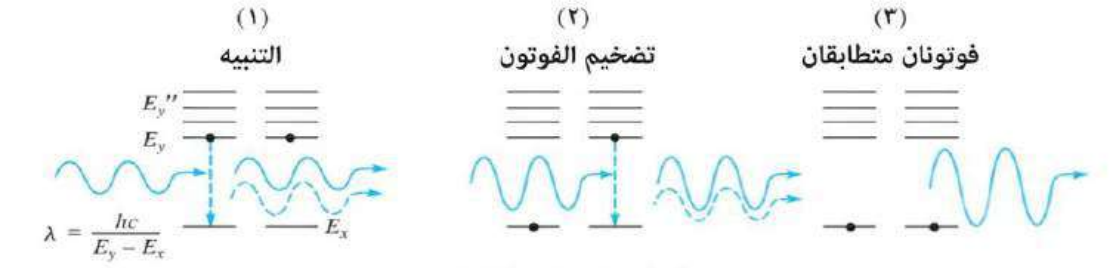
في هذا الشكل، نوضح سلوك اثنين من الجزيئات التي تشكل وسط الليزر. يُظهر الشكل مستويين من مستويات الطاقة الإلكترونية، بطاقات E_y و E_x. لاحظ أن الحالة الإلكترونية الأعلى لكل جزيء لها عدة مستويات طاقة اهتزازية مختلفة قليلاً، يرمز لها بـ E_{sy}، E_{ty}، وما إلى ذلك. لاحظ أن ليزرات الهيليوم-نيون (He-Ne)، والأرجون (Ar)، والياقوت (Ruby)، ونيوديميوم-ياج (Nd-YAG)، وغيرها من الليزرات الذرية أو الأيونية، لا تحتوي على مستويات اهتزازية؛ بدلاً من ذلك، تمتلك هذه الأوساط حالات إلكترونية أخرى.

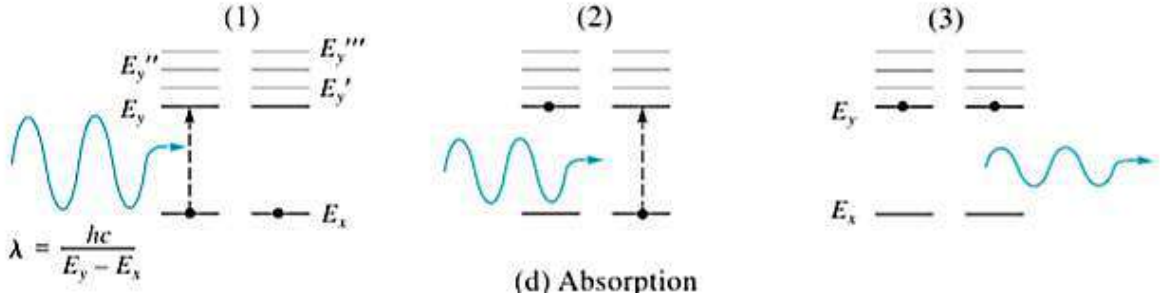
الضخ (Pumping)

الضخ ضروري لعمل الليزر، وهو عملية يتم من خلالها إثارة المادة النشطة في الليزر عن طريق تفريغ كهربائي، أو تمرير تيار كهربائي، أو التعرض لمصدر إشعاعي مكثف. أثناء الضخ في نظام جزيئي، يتم شغل العديد من مستويات الطاقة الإلكترونية والاهتزازية الأعلى. في الرسم (1) من الشكل (a5)، يظهر إلكترون يتم رفعه إلى حالة الطاقة E_{sy}؛ ويُثار الثاني إلى مستوى اهتزازي أعلى قليلاً E_{ty}. وعمر حالة الاهتزاز المثارة قصير جداً، لذا بعد 10^{-13}إلى 10^{-15}ثانية، يسترخي الإلكترون إلى أدنى مستوى اهتزازي مثار [E_y في الشكل a(35)]، وتنتج كمية من الحرارة لا يمكن رصدها. وفي بعض الحالات الإلكترونية المثارة في مواد الليزر لها أعمار أطول بكثير (غالباً 1 مللي ثانية أو أكثر) من نظيراتها الاهتزازية؛ وتُسمى هذه الحالات طويلة العمر أحياناً بـ **الحالات شبه المستقرة (Metastable states).**









الشكل 5: أربع عمليات مهمة في عمل الليزر: (أ) الضخ (الإثارة بواسطة الطاقة الكهربائية أو الإشعاعية أو الكيميائية)، (ب) الانبعاث التلقائي، (ج) الانبعاث المحفز، و (د) الامتصاص.

الانبعاث التلقائي (Spontaneous Emission)

كما تمت الإشارة في مناقشة الفلورة ، قد تفقد المادة الموجودة في حالة إلكترونية مثارة جزءاً أو كل طاقتها الزائدة عن طريق **الانبعاث التلقائي** للإشعاع. توضح المخططات الثلاثة في الشكل (b5) هذه العملية. تجدر الإشارة إلى أن الطول الموجي لإشعاع الفلورة يُعطى بالعلاقة:

$$\lambda = \frac{hc}{E_y - E_x}$$

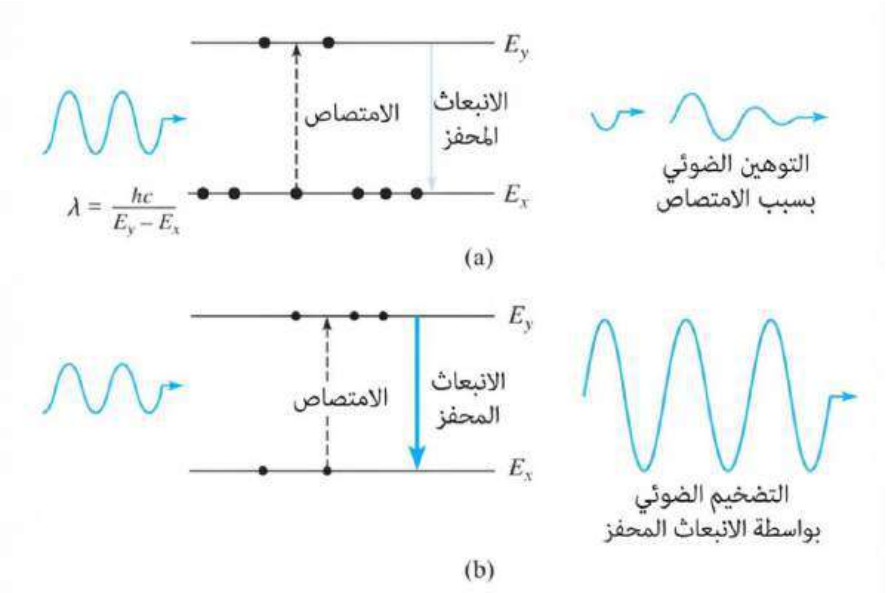
حيث hهو ثابت بلانك و cهي سرعة الضوء. من المهم أيضاً ملاحظة أن اللحظة التي يحدث فيها الانبعاث ومسار الفوتون الناتج يختلفان من جزيء مثار إلى آخر؛ لأن الانبعاث التلقائي هو **عملية عشوائية**. وبناءً على ذلك، فإن إشعاع الفلورة الناتج عن أحد الجزيئات في الشكل b5(1) يختلف في الاتجاه والطور عن ذلك الناتج عن الجزيء الثاني في الشكل b5(2). وعليه، ينتج عن الانبعاث التلقائي إشعاع أحادي اللون غير متوافق (**Incoherent**).

الانبعاث المحفز (Stimulated Emission)

يُعد الانبعاث المحفز الأساس الذي يقوم عليه سلوك الليزر، وهو موضح في الشكل (c5). في هذه الحالة، تصطدم الجزيئات المثارة (في وسط الليزر) بفوتونات تمتلك طاقة مطابقة تماماً للفرق في الطاقة $(E_y - E_x)$، أي نفس طاقة الفوتونات الناتجة عن الانبعاث التلقائي. تسبب هذه التصادمات استرخاء الجزيئات المثارة فوراً إلى حالة الطاقة المنخفضة، مع انبعاث فوتون في الوقت نفسه يمتلك طاقة مطابقة تماماً لطاقة الفوتون الذي حفز العملية. والأهم من ذلك، أن الفوتون المنبعث يتحرك في نفس اتجاه الفوتون المحفز ويكون مطابقاً له تماماً في الطور (**In phase**). لذلك، فإن الانبعاث المحفز يكون متوافقاً (**Coherent**) تماماً مع الإشعاع الساقط.

الامتصاص (Absorption)

عملية الامتصاص، التي تتنافس مع الانبعاث المحفز، موضحة في الشكل (d5). هنا، يتم امتصاص فوتونين بطاقة مساوية تماماً للفرق $(E_y - E_x)$ لإنتاج الحالة المثارة شبه المستقرة الموضحة في الشكل d5)؛ لاحظ أن هذه الحالة مطابقة تماماً لتلك التي تم الوصول إليها في الشكل a5) عن طريق الضخ.



الشكل 6:

- **الشكل (a6):** يوضح مرور الإشعاع عبر **توزيع غير معكوس (Noninverted population)** (أي أن عدد الجزيئات في الحالة الأرضية أكبر منه في الحالة المثارة)، حيث يتم امتصاص الإشعاع.
- **الشكل (b6):** يوضح مرور الإشعاع عبر **توزيع معكوس (Inverted population)** تم إنشاؤه عن طريق إثارة الإلكترونات إلى حالات افتراضية بواسطة مصدر طاقة خارجي (الضخ)، وهنا يسود الانبعاث المحفز ويحدث تضخيم للضوء

.

معكوسية التوزيع وتضخيم الضوء (Population Inversion and Light Amplification)

لكي يحدث تضخيم للضوء داخل الليزر، يجب أن يتجاوز عدد الفوتونات الناتجة عن **الانبعاث المحفز (Stimulated emission)** عدد الفوتونات المفقودة نتيجة **الامتصاص (Absorption)**. لا يسود هذا الشرط إلا عندما يتجاوز عدد الجسيمات في حالة الطاقة الأعلى نظيره في الحالة الأقل؛ وبعبارة أخرى، يجب أن يحدث **توزيع معكوس للسكان (Population inversion)** مقارنة بالتوزيع الطبيعي لحالات الطاقة.

يتم تحقيق هذه الحالة عن طريق "الضخ" (Pumping). يوضح الشكل (6) الفرق بين تأثير الإشعاع الساقط على نظام غير معكوس وآخر معكوس:

- في النظام **غير المعكوس**: توجد 6 جزيئات في مستوى الطاقة الأدنى و3 في المستوى الأعلى. هنا يمتص الوسط الفوتونات، مما يؤدي إلى خمود (attenuation) في شدة الشعاع.
- في النظام **المعكوس (الشكل b6)**: يتم ضخ الجزيئات إلى مستويات طاقة افتراضية (E_n) ثم تسترخي إلى المستوى (E_y)، مما يجعل عدد الإلكترونات في (E_y) أكبر منه في (E_x). في هذه الحالة، يسود الانبعاث المحفز على الامتصاص، مما يؤدي إلى كسب صافٍ في عدد الفوتونات، وهو ما يُعرف بـ **تضخيم الضوء (Light amplification)** أو حدوث "الليزرة" (Lasing).

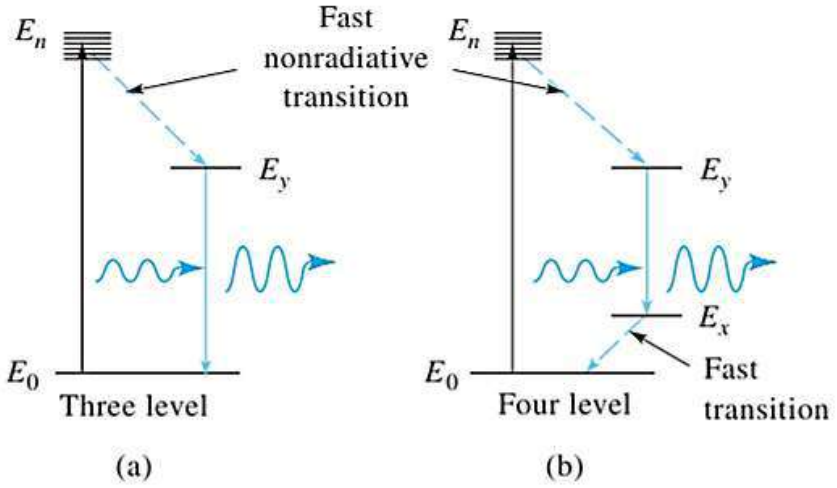
أنظمة الليزر ذات المستويات الثلاثة والأربعة (Three- and Four-Level Laser Systems)

ميزة نظام المستويات الأربعة:

تكمن ميزة نظام المستويات الأربعة في سهولة تحقيق "معكوسية التوزيع السكاني" مقارنة بنظام المستويات الثلاثة:

1. **في نظام المستويات الثلاثة:** عند درجة حرارة الغرفة، تكون غالبية الجزيئات في الحالة الأرضية (E_0). لذا، يجب توفير طاقة ضخ كافية لتحويل أكثر من **50%** من الجزيئات إلى المستوى (E_y) لتحقيق المعكوسية.
2. **في نظام المستويات الأربعة:** يكفي الضخ لجعل عدد الجسيمات في المستوى (E_y) أكبر من عددها في المستوى (E_x). ولأن عمر الجسيم في الحالة (E_x) قصير جداً (بسبب سرعة انتقاله إلى E_0)، فإن عدد الجزيئات في (E_x) يظل ضئيلاً جداً.

النتيجة: يحقق ليزر المستويات الأربعة معكوسية سكانية بجهد طاقة ضخ أقل بكثير، مما يجعله أكثر كفاءة في التطبيقات التحليلية.



الشكل (7) مخططات طاقة مبسطة لهذين النوعين الشائعين:

- **نظام المستويات الثلاثة:** يكون الانتقال المسؤول عن إشعاع الليزر بين حالة مثارة (E_y) والحالة الأرضية (E_0).
- **نظام المستويات الأربعة:** يتولد الإشعاع من انتقال بين مستوى مثار (E_y) ومستوى (E_x) له طاقة أعلى من الحالة الأرضية. ومن الضروري هنا أن تكون الانتقالات بين (E_x) والحالة الأرضية سريعة جداً.

بعض أمثلة الليزرات المفيدة (Some Examples of Useful Lasers)

يُلخص الجدول (1) الأنواع الرئيسية لليزرات المفيدة في الكيمياء وبعض خصائصها، بينما نناقش هنا بعض أكثر هذه الأنواع استخداماً في الكيمياء التحليلية [5].

جدول (1): أنواع الليزرات (Types of Lasers)

النوع	وسط الكسب والاسم	الطول الموجي (الأطوال الموجية)	الضخ(Pump)	التطبيقات الرئيسية	الحالة (CW/Pulsed)
غازي	He-Ne	632.8 nmوغيرها	تفريغ كهربائي	المحاذاة، مطيافية، تداخل، تصوير تجسيمي، ماسحات الرموز	مستمر(CW)
	أيون الأرجون	454.6,488.0,514.5 nmوغيرها	تفريغ كهربائي	مطيافية، طباعة حجرية، علاج ضوئي، ضخ ليزرات أخرى	مستمر(CW)
	أيون الزينون	خطوط عديدة في المرئي، تمتد للأشعة فوق البنفسجية وتحت الحمراء	تفريغ كهربائي	أبحاث	مستمر(CW)
	النيتروجين	337.1 nm	تفريغ كهربائي	ضخ ليزرات الصبغة، مراقبة تلوث الهواء، أبحاث	نبضي
	ثاني أكسيد الكربون(CO_2)	10.6 μm	تفريغ كهربائي	مواد، جراحة	مستمر(CW)
	إكسيمر (Excimer)	193 nm (ArF), 248 nm (KrF), 308 (XeCl), 353 (XeF)	إعادة اتحاد الإكسيمر بالتفريغ الكهربائي	طباعة حجرية، جراحة الليزر، عمليات الليزك	نبضي
صلب	الياقوت(Ruby)	694.3 nm	مصباح وميضي	تصوير تجسيمي، استئصال ليزري	نبضي
	Nd:YAG	1.06 μm، وأطوال أخرى بمضاعفة التردد	مصباح وميضي، صمام ثنائي ليزري	مطيافية، مواد، جراحة، أبحاث	نبضي
	Nd:glass	1.062 μmأو1.054 μm ، وأطوال أخرى بالمضاعفة	مصباح وميضي، صمام ثنائي ليزري	اندماج ليزري، حزم طاقة عالية متعددة	نبضي
	Ti:sapphire	650 – 1100 nm	ليزرات أخرى	مطيافية، ليدار (LIDAR)، أبحاث	نبضي
	ألياف بصرية مشوبة	1.0 – 1.55 μm)حسب المادة المشوبة(	صمام ثنائي ليزري، ليزر ألياف آخر	مطيافية، اتصالات، طب	مستمر/نبضي
صبغة	صبغة عضوية	أطوال عديدة تعتمد على نوع الصبغة	ليزر آخر، مصباح وميضي	مطيافية، طب ليزري، فصل النظائر	نبضي
بخار معدن	بخار السترونشيوم (Sr)	430.5 nm	تفريغ كهربائي في بخار المعدن	أبحاث	نبضي
	بخار النحاس (Cu)	510.6,578.2 nm	تفريغ كهربائي في بخار المعدن	أبحاث	نبضي
شبه موصل	ليزر الصمام الثنائي	0.40 – 20 μm حسب المادة	تيار كهربائي	اتصالات، تصوير تجسيمي، مصدر ضخ لليزرات أخرى، ماسحات الرموز	مستمر(CW)
	GaN	400 – 405 nm	تيار كهربائي	أقراص ضوئية، أقراص بلو-راي، مطيافية، تسجيل	مستمر(CW)

[5] لمراجعات حول أنواع الليزرات المفيدة في الكيمياء، انظر :For reviews of lasers types useful in chemistry, see
O. Svelto, Principles of Lasers, 5th ed., New York: Springer, 2010; K. Thyagarajan and Ajoy Ghatak, Lasers: Fundamental and Applications, 2nd ed., New York: Springer, 2010; C. Gooijer and A. J. G. Mank, Anal. Chim. Acta, 1999, 400, 281, DOI: 10.1016/S0003-2670(99)00656-X.

النوع	وسط الكسب والاسم	الطول الموجي (الأطوال الموجية)	الضخ(Pump)	التطبيقات الرئيسية	الحالة (CW/Pulsed)
	InGaAsP	$1.0 - 2.1$ μm	تيار كهربائي	اتصالات، ضخ ليزرات الحالة الصلبة	مستمر(CW)
	الشلال الكمي	متوسط إلى بعيد في الأشعة تحت الحمراء	تيار كهربائي	أبحاث، تحليل التنفس، استشعار الغاز	مستمر(CW)
أخرى	الإلكترون الحر	نطاق واسع	حزمة إلكترونات	أبحاث الغلاف الجوي، طب، مواد، أسلحة	نبضي
	مذبذب بارامتري بصري	قابل للضبط واسع النطاق من فوق البنفسجية إلى متوسط تحت الحمراء	ليزر آخر	مطيافية	نبضي/مستمر

ملاحظات:

- **CW (Continuous Wave):** تعني موجة مستمرة.
- **Pulsed:** تعني نبضي.
- Sources: F. Trager, ed. Springer Handbook of Lasers and Optics, 2nd ed., Berlin: Springer-Verlag, 2012; O. Svelto, Principles of Lasers, 5th ed., New York: Springer, 2010; K. Thyagarajan and Ajoy Ghatak, Lasers: Fundamental and Applications, 2nd ed., New York: Springer, 2010.

الليزرات الحالة الصلبة (Solid State Lasers):

يُعد ليزر الياقوت (**Ruby laser**) أول ليزر ناجح، وهو جهاز ذو ثلاثة مستويات يتكون فيه الوسط النشط من بلورة الياقوت. يتكون الياقوت بشكل أساسي من أكسيد الألومنيوم (Al_2O_3) ولكنه يحتوي على حوالي **0.05%** من أيونات الكروم الثلاثي (Cr^{3+}) الموزعة في مواقع شبكة الألومنيوم، وهي المسؤولة عن لونه الأحمر وتعمل كمادة ليزرية نشطة. في الليزرات المبكرة، كان يتم تشكيل الياقوت على هيئة قضيب يبلغ طوله حوالي 4 سم وقطره 0.5 سم، ويُستخدم مصباح وميضي (غالباً مصباح زينون منخفض الضغط) ملفوف حول الأسطوانة كمصدر للضخ، مما ينتج شعاع ليزر نبضي، رغم توفر مصادر الياقوت ذات الموجة المستمرة (**CW**). ومن ناحية أخرى، يُعتبر ليزر **Nd-YAG** (نيوديميوم-ياج) من أكثر ليزرات الحالة الصلبة استخداماً، حيث يتكون الوسط الليزري من أيون النيوديميوم في بلورة عقيق إيتريوم الألومنيوم (**Yttrium Aluminum Garnet**)، ويتميز بكونه ليزراً رباعي المستويات، مما يجعله أكثر كفاءة من ليزر الياقوت ثلاثي المستويات. يمتلك هذا الليزر طاقة خرج إشعاعية عالية جداً عند طول موجي **1064 نانومتر**، والتي عادةً ما يتم مضاعفة ترددها (انظر صفحة 160) للحصول على خط شديد عند **532 نانومتر**.

يعتبر ليزر تيتانيوم-ياقوت (**Ti-sapphire laser**) مهماً جداً في المطيافية لأن طوله الموجي قابل للضبط بشكل مستمر في النطاق الأحمر وتحت الأحمر القريب. ويمكن من خلال توليد التوافقيات (Harmonic generation - انظر التأثيرات البصرية غير الخطية لاحقاً في هذا القسم) إنتاج خرج قابل للضبط في المناطق الطيفية المرئية أو فوق البنفسجية. يستطيع ليزر الـ Ti-sapphire توليد نبضات فائقة القصر بعروض تتراوح بين عشرات ومئات الفيمتو ثانية. يتكون الوسط الليزري من بلورة ياقوت (Al_2O_3) مطعمة بحوالي **0.1%** من التيتانيوم، وعادةً ما يتم ضخه بواسطة ليزر أيون الأرجون (انظر ليزرات الغاز)، رغم إمكانية استخدام ليزر Nd-YAG مضاعف التردد أيضاً.

أما ليزر الألياف البصرية (**Optical fiber laser**) فهو نوع حديث نسبياً، يتكون فيه الوسط الليزري من ليفة بصرية مطعمة بعنصر من الأتربة النادرة مثل الإربيوم، أو الإيتيربيوم، أو الثوليوم. يمكن ضخ الليفة مباشرة من الأطراف أو الجوانب باستخدام ليزر ديود شبه موصل (انظر لاحقاً في هذا القسم) أو أحياناً باستخدام ليزر ألياف آخر. يتميز ليزر الألياف بجودة شعاع عالية مع خرج مقترن بالفعل بليف مرن. كما يمكن أن يكون أكثر إحكاماً من ليزرات الحالة الصلبة الأخرى، وتمنحه الليفة الطويلة والنحيفة نسبة مساحة سطح إلى حجم عالية، مما يشتت الحرارة الناتجة بفعالية أكبر من الأوساط الليزرية ذات الشكل القضيب، مما يسمح بإنتاج

قدرات خرج عالية في نطاق الكيلوواط. يتمتع ليزر الألياف بموثوقية عالية مع تشغيل لا يتطلب صيانة تقريباً، ويمكن صنعه ليكون قابلاً للضبط في المنطقة الطيفية تحت الحمراء القريبة [6].

ليزرات الغاز (Gas Lasers)

تتوفر أنواع عديدة من ليزرات الغاز تجارياً، وتُصنف إلى أربع فئات:

1. **ليزرات الذرات المتعادلة**: مثل ليزر الهيليوم-نيون (**He-Ne**)، وهو الأكثر انتشاراً بين جميع الليزرات نظراً لانخفاض تكاليفه الأولية وصيانته، وموثوقيته العالية، واستهلاكه المنخفض للطاقة، حيث يعمل عادةً في وضع الموجة المستمرة (**CW**) بطول موجي رئيسي يبلغ **632.8 نانومتر**.
2. **ليزرات الأيونات**: مثل ليزر أيون الأرجون (**Argon ion laser**)، وهو جهاز رباعي المستويات يُستخدم فيه تفريغ كهربائي أو ترددي لتكوين أيونات الأرجون، وينتج خطوطاً شديدة في المناطق الخضراء (**514.5 نانومتر**) والزرقاء (**488.0 نانومتر**)، ويُستخدم كمصدر في مطيافية الفلورة ورامان.
3. **ليزرات الجزيئات**: مثل ليزر النيتروجين (**Nitrogen laser**)، الذي يُضخ بواسطة نبضة تيار لحظية (1-5 نانوثانية) عالية الجهد، مما ينتج نبضة قصيرة جداً وشديدة من الأشعة فوق البنفسجية (تصل إلى **1 ميجا واط**)، وليزر ثاني أكسيد الكربون (**CO2**) الذي ينتج إشعاعاً أحادي اللون في منطقة الأشعة تحت الحمراء عند **10.6 ميكرومتر**.
4. **ليزرات الإكسيمر (Excimer lasers)**: تحتوي على خليط غازي من الهيليوم، والفلور، وأحد الغازات الخاملة (الأرجون، الكريبتون، أو الزينون). يتم إثارة الغاز الخامل كهربائياً ليتفاعل مع الفلور مكوناً أنواعاً مثل (ArF^*, KrF^*, XeF^*)، وتُسمى "إكسيمرات" لأنها مستقرة فقط في الحالة المثارة. وبما أن الحالة الأرضية للإكسيمر غير مستقرة، فإنها تتفكك سريعاً مطلقةً فوتوناً، مما يخلق "توزيعاً معكوساً للسكان" طالما استمر الضخ، وتنتج هذه الليزرات نبضات عالية الطاقة في نطاق الأشعة فوق البنفسجية (UV).

ليزرات الصبغة (Dye Lasers)

تعد ليزرات الصبغة [7] مصادر إشعاعية هامة في الكيمياء التحليلية؛ لأنها قابلة للضبط (Tunable) بشكل مستمر ضمن نطاق يتراوح بين 20 إلى 50 نانومتر في المنطقة المرئية من الطيف. من خلال تغيير الصبغات المستخدمة، يمكن توسيع نطاق الطول الموجي لليزر الصبغة ليصبح واسعاً جداً، مع نطاق ترددي (Bandwidth) لا يتجاوز بضعة أجزاء من المئة من النانومتر.
تتكون المواد النشطة في هذه الليزرات من محاليل مركبات عضوية قادرة على إظهار الفلورة في مناطق الأشعة فوق البنفسجية أو المرئية أو تحت الحمراء. تعمل ليزرات الصبغة كأنظمة رباعية المستويات، ولكنها تختلف عن غيرها في أن مستوى الطاقة الأدنى لعمل الليزر (E_x في الشكل b6) ليس مستوى طاقة مفرداً، بل هو "حزمة" من الطاقات الناتجة عن تراكب عدد كبير من مستويات الطاقة الاهتزازية والدورانية المتقاربة فوق مستوى الطاقة الإلكتروني الأساسي. بالتالي، يمكن للإلكترونات في (E_y) الانتقال إلى أي من هذه المستويات، مما ينتج فوتونات بطاقات مختلفة قليلاً.

[6] F. J. Duarte, Tunable Laser Applications, 2nd ed., Boca Rotan, FL: CRC Press, 2009; J. Hecht, Understanding Lasers: An Entry-Level Guide, 3rd ed., Piscataway, NJ: Wiley, 2008.
[7] For further information, see **M. Stuke, ed., Dye Lasers**: Twenty-Five Years, New York: Springer, 1992; F. J. Duarte and L. W. Hillman, Dye Laser Principles with Applications, San Diego: Academic Press, 1990; see also reference 6.

يتم ضبط ليزرات الصبغة بسهولة عن طريق استبدال المرآة غير النافذة (الموضحة في الشكل 7-4) بشبيكة انعكاس (**Reflection grating**) أو مفرّق "فابري-بيرو" (**Fabry-Perot etalon**) (انظر صفحة 162)، الذي يعكس فقط نطاقاً ترديدًا ضيقاً من الإشعاع إلى وسط الليزر؛ حيث يمكن تغيير الطول الموجي للذروة عن طريق تحريك الشبيكة أو إمالة المفرّق. ونتيجة لذلك، يتم تحفيز الانبعاث فقط لجزء معين من طيف الفلورة، أي الطول الموجي المختار بواسطة عنصر الضبط. يمكن تشغيل ليزرات الصبغة في الوضع النبضي أو الوضع المستمر (**CW**) اعتماداً على مصدر الضخ.

ليزرات أشباه الموصلات (Semiconductor Lasers)

تعتبر مصادر الضوء شبه الموصلة مهمة للغاية في الفوتونيات التجارية، وفي العلوم والتكنولوجيا (انظر القسم C2 لمناقشة مبادئ أشباه الموصلات). لقد أحدث الصمام الثنائي الباعث للضوء (**LED**) وليزر الدايود (**Diode laser**) ثورة في هذه المجالات. تمتاز ليزرات أشباه الموصلات بصغر حجمها، وكفاءتها العالية في تحويل الطاقة الكهربائية إلى طاقة إشعاعية، وقدرتها على التشكيل (**Modulated**). بالإضافة إلى ذلك، يمكن تصميم ليزرات أشباه الموصلات لإنتاج إشعاع عبر نطاق واسع من الأطوال الموجية [8].

جدول 2: خصائص الانبعاث لمواد الصمام الثنائي الباعث للضوء (LED) غير العضوية النموذجية

المادة / الركيزة(Material/Substrate)	الطول الموجي الأقصى أو نطاق الطول الموجي (نانومتر)
InGaN/GaN	360–525 (حسب التركيب)
SiC	470
GaP	550
$GaAs_{1-x}P_x/GaAs$	589–700 (حسب التركيب)
$Ga_{1-x}Al_xAs/GaAs$	650–900 (حسب التركيب)
GaAs	880–1020 (حسب التركيب)
InGaAsP/InP	600–1600 (حسب التركيب)

ملاحظات تقنية:

- تم استخدام تنسيق LaTeX للرموز الكيميائية لضمان دقة عرض الأرقام السفلية (Subscripts) مثل x و $1-x$.
- تستخدم هذه المواد في تصنيع مصابيح LED، حيث يحدد التركيب الكيميائي (خاصة قيم xفي المواد المركبة) فجوة الطاقة (Bandgap)، وبالتالي يحدد لون الضوء المنبعث وطول موجته.

فيزياء الصمامات الثنائية الباعثة للضوء (LEDs)

عند تطبيق جهد كهربائي في الاتجاه الأمامي على الصمام الثنائي شبه الموصل، تُثار الإلكترونات إلى **حزمة التوصيل (Conduction band)**، وتتكون أزواج من "الثقوب والإلكترونات" (Hole-electron pairs)، فيصبح الصمام موصلاً للتيار. في النهاية، تسترخي بعض هذه الإلكترونات لتعود إلى **حزمة التكافؤ (Valence band)**، مما يؤدي إلى انبعاث طاقة تعادل **طاقة فجوة النطاق (Band-gap energy)** التي تُعطى بالعلاقة $E_g = h\nu$. يتم تحرير جزء من هذه الطاقة على شكل إشعاع كهرومغناطيسي بتردد $\nu = E_g/h$. وتُصنع الصمامات الثنائية الباعثة للضوء (LEDs) خصيصاً لتعزيز إنتاج هذا الضوء، وغالباً ما تُصنع من زرنيخيد فوسفيد الغاليوم $(GaAs_{1-x}P_x)$. تعتمد طاقة فجوة النطاق على الكميات النسبية للزرنيخ (As) والفسفور (P) وفقاً للكسر الجزئي x؛ حيث يؤدي تغيير هذا الكسر من **0.15 إلى 0.6** إلى تغيير الطول الموجي الأقصى للانبعاث من **589 نانومتر** (الأصفر)

[8] For additional information on semiconductor lasers, see L. A. Coldren, S. W. Corzine, and M. L. Mashanovitch, Diode Lasers and Photonic Integrated Circuits, Hoboken, NJ: Wiley 2012; J. Ohtsubo, Semiconductor Lasers: Stability, Instability, and Chaos, 3rd ed., Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2013; T. Numai, Fundamentals of Semiconductor Lasers, New York: Springer-Verlag, 2004.

إلى **650 نانومتر** (الأحمر). تُستخدم هذه الصمامات على نطاق واسع كمؤشرات ووحدات قراءة في الأجهزة الإلكترونية. ومن خلال استخدام مركبات ثنائية وثلاثية ورباعية من عناصر المجموعتين الثالثة والخامسة، يمكن إنتاج نطاقات انبعاث متعددة (كما هو موضح في الجدول 2). أما صمامات الـ LED التي تنتج "الضوء الأبيض" فيمكن تصنيعها بدمج صمامات LED حمراء وخضراء وزرقاء في حزمة واحدة متكاملة، أو عن طريق تسليط ضوء LED أزرق مكثف على مواد فسفورية مناسبة. تُستخدم هذه الصمامات حالياً في الكشافات اليدوية، وأنوار الليل، وفوانيس التخييم، وغيرها من أجهزة الإضاءة العامة. كما تُستخدم على نطاق واسع في مقاييس الضوء البسيطة وغيرها من الكواشف الضوئية.

ليزرات الدايود (Diode Lasers)

ترتبط ليزرات الدايود ارتباطاً وثيقاً بصمامات LED؛ فكلاهما يولد الضوء من إعادة اتحاد أزواج "الإلكترون-ثقب"، وكلاهما يولد انبعاثاً تلقائياً يعتمد على التيار المار عبر الوصلة المنحازة أمامياً. ومع ذلك، تمتلك ليزرات الدايود أسطحاً عاكسة تخلق **تغذية راجعة بصرية (Optical feedback)** عندما يصل التيار إلى حد يسمح بتحقيق "معكوسية التوزيع السكاني".

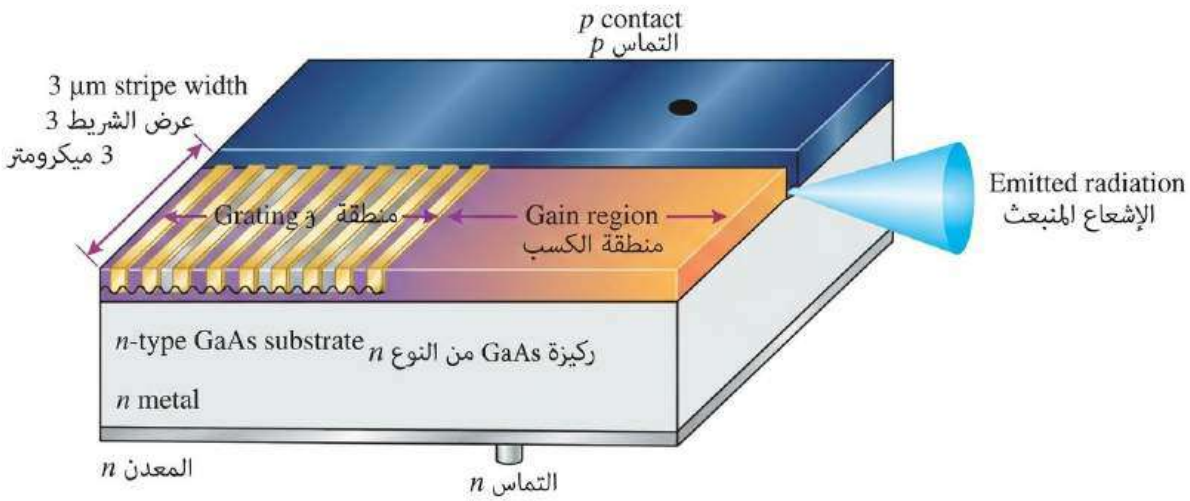
- **نوع "فابري-بيرو":** هو أبسط أنواع ليزرات الدايود، حيث يتم شق طرفين متوازيين من شبه الموصل على طول محور البلورة لتكوين مرايا عاكسة لتجويف الليزر (الشكل 4). تُستخدم هذه الأجهزة حيث تكون التكلفة المنخفضة أولوية قصوى ولا تكون دقة الطول الموجي حرجة (مثل مشغلات الأقراص المدمجة CD وأقلام الليزر).
- **ليزرات التغذية الراجعة الموزعة (Distributed-feedback laser):** تُستخدم في التطبيقات الأكثر تطلباً التي تحتاج إلى نطاق أضيق من الأطوال الموجية.
- **ليزرات DBR:** بفضل طرق التصنيع الحديثة، أمكن بناء أجهزة متكاملة ومعقدة مثل ليزر الدايود ذو **عاكس "براج" الموزع (Distributed Bragg-reflector)** الموضح في الشكل (8). يحتوي هذا الجهاز على وصلة (pn-junction) من زرنيخيد الغاليوم تنتج إشعاعاً تحت أحمر عند **975 نانومتر**. كما يتم تصنيع شريط من المادة على الرقاقة يعمل كـ "تجويف رنيني" يسمح بتضخيم الضوء داخل الجهاز، بينما توفر شبيكة متكاملة تغذية راجعة لهذا التجويف، مما يجعل الإشعاع الناتج ذا نطاق ترددي ضيق للغاية يصل إلى حوالي 10^{-5}**نانومتر**.

لقد حققت ليزرات الدايود من هذا النوع قدرات خرج مستمرة عالية (<100 ميجا واط) واستقراراً حرارياً ممتازاً، وقد أدى التطور السريع لهذه التقنية إلى استخدامها كمصادر ضوئية أساسية في مشغلات CD وDVD، وماسحات الباركود، وغيرها من الأجهزة الإلكترونية الضوئية المألوفة.

التطورات الحديثة في ليزرات أشباه الموصلات

تشمل التطورات الأخيرة ليزرات البئر الكمي (**Quantum well lasers**)، وليزرات النقطة الكمية (**Quantum dot lasers**)، وليزرات المتتالية الكمية (**Quantum cascade lasers**).

- في ليزر البئر الكمي: تُصنع المنطقة النشطة ضيقة جداً بحيث يحدث "حبس كمي" (Quantum confinement) للفوتونات والإلكترونات، فيصبح الطول الموجي المنبعث معتمداً على عرض البئر بدلاً من طاقة فجوة النطاق لشبه الموصل.
- أما النقاط الكمية: فهي تحبس الإلكترونات في الأبعاد الثلاثة، مما يوفر إمكانية تحقيق كفاءات عالية جداً.



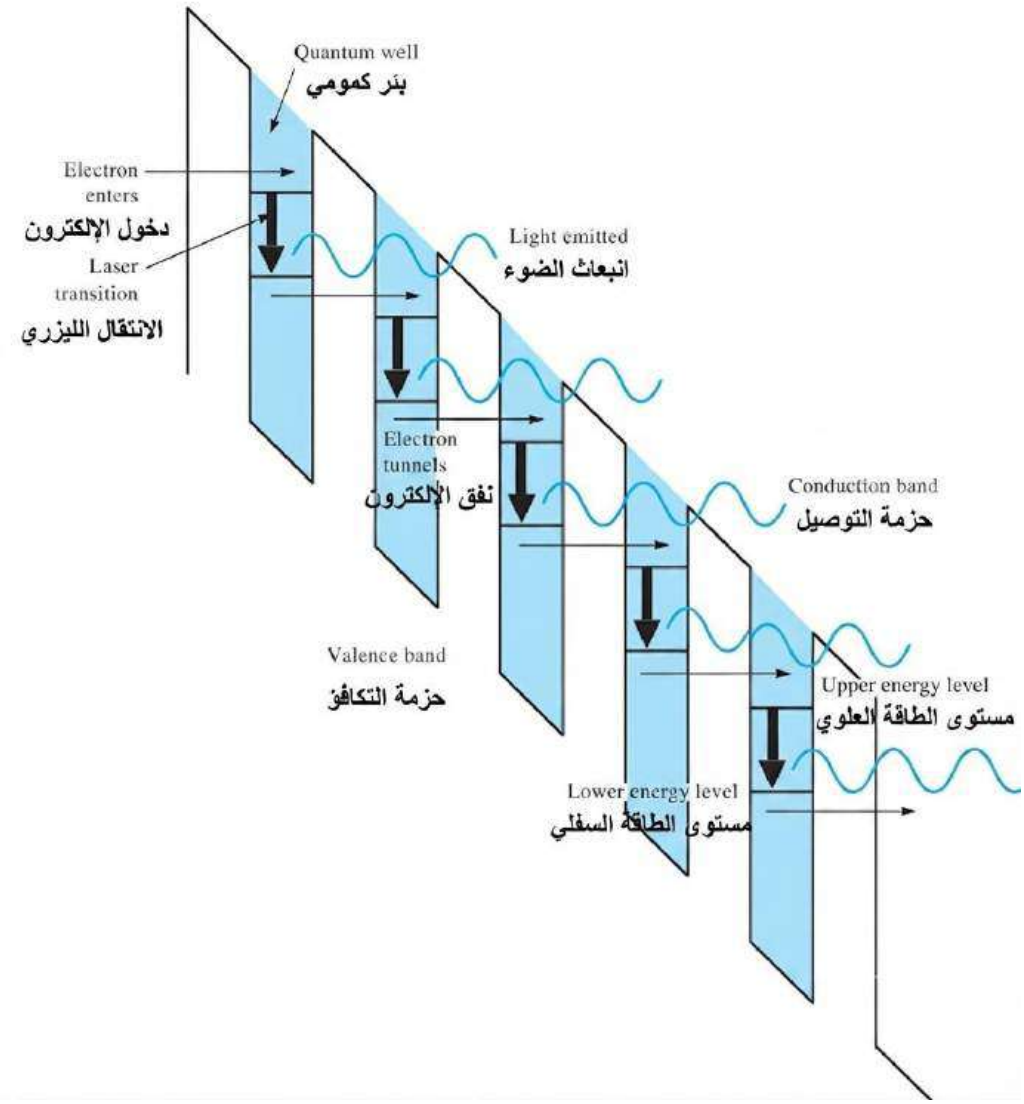
الشكل 8: صمام ليزر عاكس براغ الموزع.

ليزر المتتالية الكمية (Quantum Cascade Laser)

يختلف هذا النوع اختلافاً جوهرياً عن الأنواع الأخرى من ليزرات أشباه الموصلات [9]. في هذا الليزر، تكون الإلكترونات مقيدة ضمن سلسلة من مصائد الإلكترونات أو "الآبار الكمية" التي لا يتعدى سمكها بضعة نانومترات. عندما تهبط الإلكترونات إلى المستوى الأدنى داخل البئر، يمكنها الانتقال (Tunneling) خارج ذلك البئر إلى المستوى الأعلى في بئر مجاور، كما هو موضح في الشكل (9). ومن خلال تغيير سماكة الطبقات، يمكن تغيير الطول الموجي لليزر.

تصدر ليزرات المتتالية الكمية في منطقة الأشعة تحت الحمراء (**3.4–9.6 ميكرومتر**)، ويمكن أن تصل قدرة خرجها إلى مستويات عالية (>100 ميجا واط). تتوفر هذه الليزرات تجارياً في أشكال الموجة المستمرة (CW) أو النبضية، وقد استُخدمت في تطبيقات تحليلية متنوعة، بما في ذلك الاستشعار عن بُعد للملوثات البيئية وتحليل التنفس.

[9] **J. Faist, Quantum Cascade Lasers, Oxford, UK: Oxford University Press, 2013**.



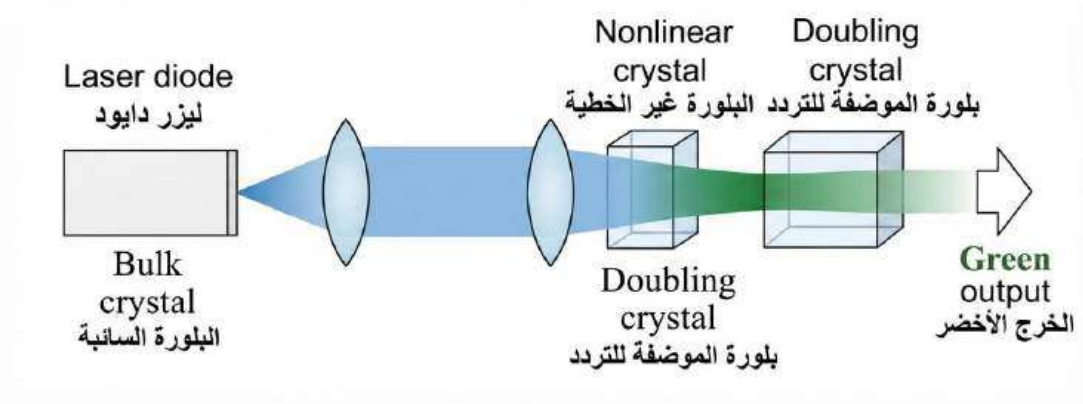
الشكل (9): ليزر المتتالية الكمية (Quantum cascade laser): يتم تطبيق مجال كهربائي على طول البنية. تكون عشرات الآبار الكمية متدرجة في انخفاض طاقتها بسبب تدرج المجال الكهربائي. يتم حقن إلكترون في بئر كمي في حالة طاقة أعلى، وعندما يتم تحفيز الإلكترون لإصدار إشعاع، فإنه ينتقل إلى حالة طاقة أقل داخل البئر، ثم يعبر (يُنتفق) إلى بئر مجاور حيث يكون في حالة طاقة أعلى. تؤدي هذه "المتتالية" إلى إنتاج فوتونات متعددة لكل إلكترون، مما يوفر كسباً بصرياً عالياً. *(مقتبس بتصرف من: J. Hecht, Understanding Lasers: An Entry-Level Guide, figure 9.18, IEEE Press, 2008).*

التغلب على قيود الطول الموجي في ليزرات الدايود

كان العائق الرئيسي أمام استخدام ليزرات الدايود في التطبيقات الطيفية هو اقتصار نطاق أطوالها الموجية على المنطقتين الحمراء وتحت الحمراء. يمكن التغلب على هذا العيب عن طريق تشغيل ليزر الدايود في الوضع النبضي لتحقيق قدرة ذروة (Peak power) كافية لاستخدام البصريات غير الخطية لتوفير "مضاعفة التردد" (Frequency doubling) كما هو موضح في الشكل (10). هنا، يتم تركيز الإشعاع الصادر من ليزر الدايود في "بلورة مضاعِفة" لتوفير خرج في المنطقة الزرقاء-الخضراء من الطيف (<490 نانومتر).

باستخدام بصريات خارجية مناسبة، يمكن لليزرات الدايود مضاعفة التردد أن تحقق قدرات خرج متوسطة تتراوح بين **0.5 إلى 1.0 واط** مع نطاق طيفي قابل للضبط يبلغ حوالي **30 نانومتر**. تشمل مزايا هذه المصادر الضوئية: صغر الحجم، كفاءة الطاقة، الموثوقية العالية، والمتانة. وعلى الرغم من أن إضافة بصريات خارجية تزيد من تكلفة الجهاز بشكل كبير، إلا أنها تظل منافِسة لليزرات الغازية

الأكبر حجماً والأقل كفاءة وموثوقية. تجدر الإشارة إلى أن ليزرات الدايود المصنوعة من **نيتريد الغاليوم (Gallium nitride)** تنتج إشعاعاً مباشراً في المناطق الزرقاء والخضراء والصفراء من الطيف [10]، وأصبحت هذه الليزرات تُستخدم الآن بشكل روتيني في الدراسات الطيفية.



الشكل (10): نظام مضاعفة التردد: يوضح نظاماً لتحويل خرج ليزر بطول موجي 975 نانومتر إلى 490 نانومتر (عبر بلورة مضاعفة). *(المصدر: D. W. Nam and R. G. Waarts, Laser Focus World, 1994, 30 (8), 52).*

التأثيرات البصرية غير الخطية باستخدام الليزرات (Nonlinear Optical Effects with Lasers)

كما أشرنا عندما تنتقل موجة كهرومغناطيسية عبر وسط عازل (Dielectric) [11]، فإن المجال الكهرومغناطيسي للإشعاع يسبب تشويهاً لحظياً أو استقطاباً لإلكترونات التكافؤ في الجزيئات المكونة للوسط. بالنسبة للإشعاع العادي، يتناسب مقدار الاستقطاب (P) تناسباً طردياً مع مقدار المجال الكهربائي (E) للإشعاع، وبذلك يمكننا كتابة المعادلة:

$$P = \alpha E$$

حيث (α) هو ثابت التناسب. تُسمى الظواهر البصرية التي تحدث عندما تسود هذه العلاقة **ظواهر خطية (Linear phenomena)**.

التأثيرات البصرية غير الخطية (Nonlinear Optical Effects)

عند شدة الإشعاع العالية التي توفرها ليزرات، تنهار العلاقة الخطية السابقة، خاصة عندما تقترب (E) من طاقة ارتباط الإلكترونات. في هذه الظروف، تُلاحظ تأثيرات بصرية غير خطية، وتُعطى العلاقة بين الاستقطاب (P) والمجال الكهربائي (E) بالمعادلة التالية:

$$P = \alpha E + \beta E^2 + \gamma E^3 + \cdots \quad (1)$$

حيث تكون مقادير الثوابت الثلاثة بالترتيب: $\alpha \gg \beta \gg \gamma$. عند شدة الإشعاع العادية، يكون الحد الأول فقط على اليمين مهماً، وتكون العلاقة بين الاستقطاب وشدة المجال خطية. ومع ذلك، مع ليزرات عالية الشدة، يصبح من الضروري استخدام الحد الثاني وأحياناً الثالث لوصف درجة الاستقطاب. عندما نحتاج إلى حدين فقط، يمكن إعادة كتابة المعادلة (1) بدلالة تردد الإشعاع (ν) وسعة شدة المجال القصوى (E_m):

$$P = \alpha E_m \sin(\nu t) + \beta E_m^2 \sin^2(\nu t) \quad (2)$$

وباستخدام المتطابقة المثلثية $\sin^2(\nu t) = (1 - \cos(2\nu t))/2$، نحصل على المعادلة:

$$P = \alpha E_m \sin(\nu t) + \frac{\beta E_m^2}{2}(1 - \cos(2\nu t)) \quad (3)$$

[10] **G. Fasol, Science, 1996, 272**, 1751, DOI: 10.1126/science.272.5269.1751.

[11] العوازل (Dielectrics) هي فئة من المواد غير الموصلة لأنها لا تحتوي على إلكترونات حرة. وعموماً، تكون هذه المواد شفافة بصرياً، وذلك على عكس المواد الصلبة الموصلة كهربائياً التي إما أن تمتص الإشعاع أو تعكسه بقوة.

الحد الأول في المعادلة (3) هو الحد الخطي العادي الذي يسود عند شدة الإشعاع المنخفضة. أما عند شدة عالية بما يكفي، يصبح حد الرتبة الثانية مهماً وينتج إشعاعاً بتردد (2ν) يمثل ضعف تردد الإشعاع الساقط. تُستخدم عملية "مضاعفة التردد" هذه حالياً على نطاق واسع لإنتاج ترددات ليزر ذات أطوال موجية أقصر. على سبيل المثال، يمكن مضاعفة تردد إشعاع ليزر Nd-YAG (طول موجي 1064 نانومتر) لإنتاج إشعاع أخضر بطول موجي 532 نانومتر بنسبة عائد 30% عن طريق تمريره عبر بلورة مثل فوسفات هيدروجين البوتاسيوم (KH_2PO_4)، ثم يمكن مضاعفة تردد الـ 532 نانومتر مرة أخرى لإنتاج إشعاع فوق بنفسجي عند 266 نانومتر باستخدام بلورة فوسفات هيدروجين الأمونيوم.

المذبذبات المعلمية البصرية (Optical Parametric Oscillators - OPO)

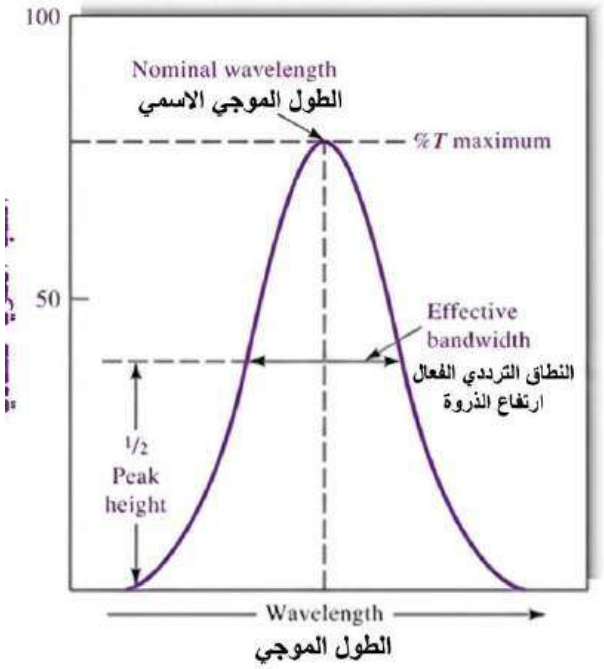
لا يُعد المذبذب المعلمي البصري (OPO) ليزراً حقيقياً، ولكنه غالباً ما يُسمى مصدراً "شبيهاً بالليزر". يتم ضخ الـ OPO بواسطة ليزر ويستخدم تجويفاً رنينياً، لكنه لا يعتمد على الانبعاث المحفز.

نتيجة لعمليات غير خطية في بلورة (تشبه العمليات المذكورة أعلاه)، يستخدم الـ OPO تقنية "خلط الموجات الثلاث" (Three-wave mixing) لتحويل الإشعاع من طول موجي قصير إلى طولين موجيين أطول، يُطلق عليهما: **طول موجة الإشارة (Signal wavelength)** و**طول موجة الخامل (Idler wavelength)**. يجب أن يساوي مجموع ترددي الإشارة والخامل تردد المضخة. توضع البلورة غير الخطية داخل التجويف، المصمم ليتذبذب عند أحد الترددات الأقل. بدءاً من ليزر مضخة يصدر في المنطقة المرئية، تكون مخرجات الـ OPO في منطقة الأشعة تحت الحمراء. ويتميز خرج الـ OPO بأنه متوافق (Coherent) مثل الليزر الحقيقي، وذو عرض طيفي ضيق جداً، ويمكن أن يكون الخرج نبضياً أو مستمراً. وتتمثل الميزة الرئيسية للمذبذب المعلمي البصري (OPO) في إمكانية ضبط الخرج عبر نطاق طيفي واسع نسبياً في منطقة الأشعة تحت الحمراء. فمع ثبات تردد المضخة، يمكن تغيير تردد الخرج عن طريق تغيير درجة حرارة البلورة غير الخطية، أو تطبيق مجال كهربائي خارجي عليها، أو تغيير اتجاهها. تتوفر تجارياً مذبذبات ذات أطوال موجية قابلة للضبط من **1.4 إلى 4.6 ميكرومتر**، بالإضافة إلى مذبذبات قريبة من الضوء المرئي يمكنها الوصول إلى أطوال موجية تصل إلى **600 نانومتر**. ونظراً لقدرته على الضبط عبر نطاق واسع، يُستخدم الـ OPO في تطبيقات عديدة في المطيافية، والاستشعار الغازي، والتبريد بالليزر، والحجز بالليزر (Laser trapping).

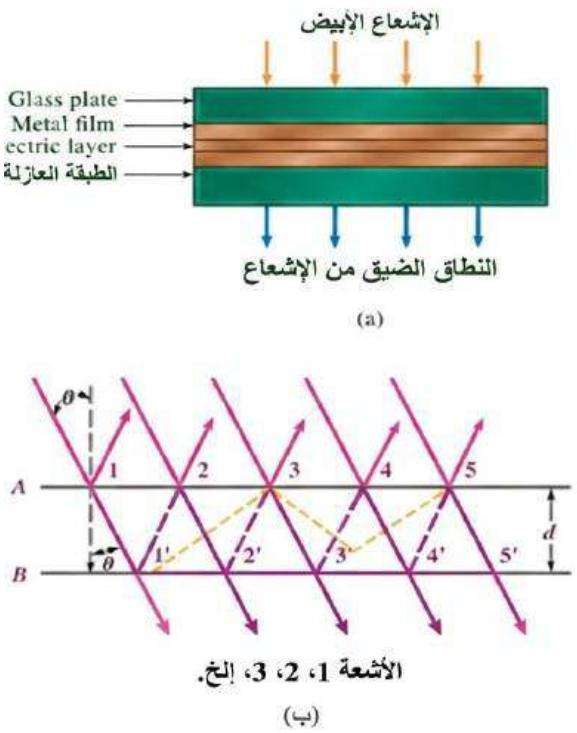
محددات الطول الموجي (Wavelength Selectors)

تتطلب معظم التحليلات الطيفية إشعاعاً يتكون من مجموعة محدودة وضيقة ومستمرة من الأطوال الموجية تُسمى **الحزمة (Band)** [12]. إن الحزمة الضيقة تعزز من حساسية قياسات الامتصاص، وقد توفر انتقائية لطرق الانبعاث والامتصاص، كما أنها مطلوبة غالباً للحصول على علاقة خطية بين الإشارة الضوئية والتركيز . ومن الناحية المثالية، يجب أن يكون خرج محدد الطول الموجي عبارة عن إشعاع بطول موجي أو تردد واحد. ونظراً لأنه لا يوجد محدد طول موجي حقيقي يقترب من هذا المثالي، فإنه يُنتج بدلاً من ذلك حزمة من الأطوال الموجية، كما هو موضح في الشكل (11). في هذا الرسم البياني، يتم رسم النسبة المئوية للإشعاع الساقط ذي الطول الموجي المعين الذي ينفذ من خلال المحدد كدالة في الطول الموجي. يُعد **عرض الحزمة الفعال (Effective bandwidth)** -وهو العرض الكامل عند نصف ارتفاع الذروة والموضح في الشكل 11- مقياساً عكسياً لجودة الجهاز؛ حيث يمثل عرض الحزمة الأضيق أداءً أفضل.

[12] لاحظ أن مصطلح "حزمة" (Band) في هذا السياق له معنى مختلف قليلاً عما استُخدم في وصف أنواع الأطياف في فصل اخر.



الشكل 11: مخرجات جهاز اختيار الطول الموجي النموذجي.



الشكل 12: (أ) *رسم تخطيطي لمقطع عرضي لمرشح تداخل. لاحظ أن الرسم ليس بمقياس رسم دقيق وأن النطاقات المركزية الثلاثة أضيق بكثير مما هو موضح. (ب) رسم تخطيطي يوضح شروط التداخل البنّاء.*

تستخدم العديد من الأجهزة **الموحد اللوني (Monochromator)** أو **المرشح (Filter)** كمحدد للطول الموجي. بينما تستخدم أجهزة أخرى كواشف متعددة الأطوال الموجية مع "مطياف" (Spectrograph)، أو عدة كواشف أحادية الطول الموجي مع "معدد أطوال موجية" (Polychromator).

المرشحات (Filters)

تُستخدم عدة أنواع من المرشحات لاختيار الطول الموجي في التطبيقات الطيفية. تاريخياً، كانت المرشحات إما **مرشحات تداخل (Interference filters)** -تُسمى أحياناً مرشحات "فابري-بيرو"- أو **مرشحات امتصاص (Absorption filters)**.

- **مرشحات الامتصاص:** تقتصر على المنطقة المرئية من الطيف.
- **مرشحات التداخل:** تتوفر لمناطق الأشعة فوق البنفسجية والمرئية وتمتد إلى منطقة الأشعة تحت الحمراء.
- **مرشحات الضبط الصوتي البصري (Acousto-optic tunable filters):** أصبحت متاحة تجارياً في السنوات القليلة الماضية، وتتمتع بمزايا هامة مقارنة بمرشحات التداخل في منطقة الأشعة تحت الحمراء القريبة.

مرشحات التداخل (Interference Filters)

كما يوحي الاسم، تعتمد مرشحات التداخل على **التداخل الضوئي (Optical interference)** لتوفير حزم ضيقة من الإشعاع. يتكون مرشح التداخل من مادة عازلة شفافة (مثل فلوريد الكالسيوم أو فلوريد المغنيسيوم) تشغل المساحة بين غشاءين معدنيين شبه شفافين. هذا الترتيب محصور بين لوحين من الزجاج أو مواد شفافة أخرى (انظر الشكل a12). يتم التحكم بدقة في سمك الطبقة العازلة، وهو ما يحدد الطول الموجي للإشعاع النافذ. عندما يسقط شعاع عمودي من إشعاع متوازي (مُجمع) على هذا النظام، يمر جزء منه عبر الطبقة المعدنية الأولى بينما ينعكس الباقي. ويتعرض الجزء النافذ لتقسيم مماثل عند اصطدامه بالغشاء المعدني الثاني. إذا كان الجزء المنعكس من هذا التفاعل الثاني يمتلك الطول الموجي المناسب، فإنه ينعكس جزئياً من الجانب الداخلي للطبقة الأولى بحيث يكون

متوافقاً في الطور (In phase) مع الضوء الساقط من نفس الطول الموجي. النتيجة هي تعزيز هذا الطول الموجي المعين، بينما تتداخل معظم الأطوال الموجية الأخرى تداخلاً هداماً لأنها تكون خارج الطور. وبما أن مرشحات التداخل تفصل الضوء إلى أشعة نافذة وأخرى منعكسة، فهي تُعرف أحياناً بـ **المرشحات ثنائية اللون (Dichroic filters)**.

العلاقة الرياضية للتداخل:

إذا كان سمك الطبقة العازلة هو dوالطول الموجي النافذ هو λ_r، يمكن استنتاج العلاقة بينهما بمساعدة الشكل (b12). لغرض التوضيح، يظهر الشعاع الساقط بزاوية θمن العمودي على سطح العازل. ولكي يحدث التعزيز (التداخل البناء)، يجب أن تكون المسافة التي يقطعها الشعاع المنعكس مضاعفاً صحيحاً لطوله الموجي في الوسط (λ_r). بشرط أن يكون:

$$n\lambda_r = \frac{2d}{\cos\theta}$$

حيث nهو عدد صحيح صغير، وλ_r هو الطول الموجي للشعاع النافذ داخل العازل، وd هو سمك العازل.

في الاستخدام العادي، تقترب θمن الصفر، وبالتالي تقترب $\cos\theta$ من الواحد، فتتبسط المعادلة لتصبح:

$$n\lambda_r = 2d$$

وبما أن الطول الموجي في الهواء (λ) يرتبط بالطول الموجي في العازل (λ_r) بمعامل الانكسار (n_{ref}) للعازل من خلال العلاقة $\lambda = \lambda_r \cdot n_{ref}$، فإن الأطوال الموجية النافذة عبر المرشح تُعطى بالمعادلة:

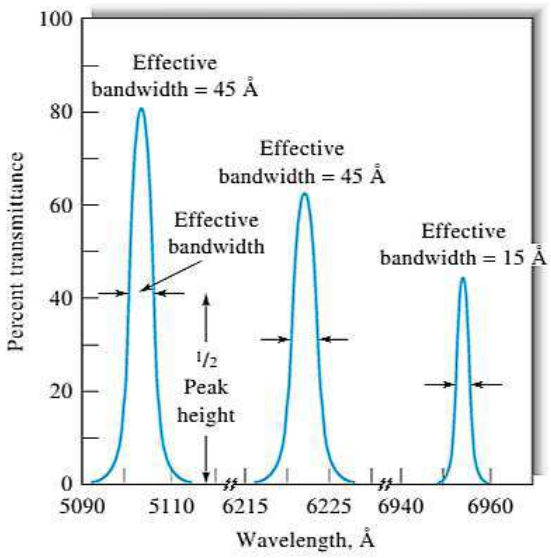
$$\lambda = \frac{2d \cdot n_{ref}}{n} \quad (5)$$

حيث يمثل العدد الصحيح n**رتبة التداخل (Order of interference)**. غالباً ما يتم اختيار الطبقات الزجاجية للمرشح بحيث تمتص جميع الحزم المعززة باستثناء واحدة؛ وبذلك يقتصر النفاذ على رتبة واحدة فقط.

خصائص أداء مرشحات التداخل

يوضح الشكل (13) خصائص أداء مرشحات التداخل النموذجية. تُصنف المرشحات بشكل عام -كما هو موضح- من خلال الطول الموجي لقمة نفاذيتها، والنسبة المئوية للإشعاع الساقط النافذ عند القمة وعروض حزمها الفعالة.

تتوفر مرشحات التداخل بقمم نفاذية عبر مناطق الأشعة فوق البنفسجية والمرئية وحتى حوالي 14 ميكرومتر في منطقة الأشعة تحت الحمراء. عادةً ما تكون عروض الحزمة الفعالة حوالي **1.5%** من الطول الموجي عند قمة النفاذية، على الرغم من أن هذا الرقم ينخفض إلى **0.15%** في بعض المرشحات ضيقة الحزمة؛ والتي غالباً ما تمتلك نفاذية قصوى تبلغ 10%.



الشكل 13: خصائص الإرسال لمرشحات التداخل النموذجية.

مفرّق فابري-بيرو (Fabry-Perot Etalon)

جهاز آخر مهم يعتمد على التداخل وهو "مفرّق فابري-بيرو" (Fabry-Perot etalon). يتكون هذا الجهاز من لوح مصنوع من مادة شفافة ذات وجهين متوازيين بدقة ومطليين بمادة غير ممتصة وعالية الانعكاس. كبديل لذلك، يتم وضع فاصل بسمك مختار (مصنوع من "الإنفار" أو الكوارتز) ذو وجهين متوازيين تماماً بين مرآتين لتشكيل المفرّق.

يتحدد عرض الحزمة (Bandwidth) للجهاز من خلال انعكاسية الطلاءات أو المرايا، بينما يتحدد الفصل بين الحزم النافذة بواسطة المسافة بين المرايا. يمكن إمالة المفرّق لتغيير الحزمة التي يتم تمريرها. وإذا تم تهيئة الأسطح العاكسة مع وجود فجوة هوائية بينها بحيث يمكن تعديل المسافة بينهما ميكانيكياً، يُسمى الجهاز حينها **مقياس تداخل فابري-بيرو (Fabry-Perot interferometer)**.

تُستخدم مفرّقات فابري-بيرو في تجارب الليزر، والمطيافية، واتصالات الألياف البصرية (حيث تُستخدم لفصل حزم الترددات). وتتميز مرشحات فابري-بيرو بقدرتها على عزل حزم ضيقة جداً من الإشعاع، وهي متوفرة تجارياً بأطوال موجية مركزية تتراوح من 190 نانومتر إلى 2100 نانومتر.

إسفين التداخل (Interference Wedges)

يتكون **إسفين التداخل** من زوج من الألواح المِراوية شبه الشفافة يفصل بينهما طبقة إسفينية الشكل من مادة عازلة. يتراوح طول الألواح بين 50 إلى 200 ملم. يتغير الطول الموجي للإشعاع النافذ باستمرار من طرف إلى آخر مع تغير سمك الإسفين. ومن خلال اختيار الموضع الخطي المناسب على طول الإسفين، يمكن عزل أطوال موجية بعرض حزمة يبلغ حوالي 20 نانومتر. يمكن لهذه المرشحات تمرير الأطوال الموجية الطويلة (مرشحات تمرير النطاق الطويل/العالي) أو الأطوال الموجية القصيرة (مرشحات تمرير النطاق القصير/المنخفض). وعن طريق دمج مرشح تمرير عالٍ مع مرشح تمرير منخفض، يتم إنشاء **مرشح تمرير حزمة قابل للضبط (Variable bandpass filter)**. تتوفر أسافين التداخل للمنطقة المرئية (300 إلى 800 نانومتر)، ومنطقة الأشعة تحت الحمراء القريبة (1000 إلى 2000 نانومتر)، ولأجزاء متعددة من منطقة الأشعة تحت الحمراء (2.5 إلى 14.5 ميكرومتر)، ويمكن استخدامها كبديل للمنشورات أو الشبيكات في أجهزة المطياف.

المرشحات الهولوغرافية (Holographic Filters)

تُعد الأجهزة البصرية الهولوغرافية، وخاصة **المرشحات الهولوغرافية [13]**، جزءاً من قائمة متنامية من الأجهزة والمواد البصرية التي ظهرت نتيجة التوفر الواسع لتقنية الليزر.

تصنيع المرشحات الهولوغرافية

- **الترتيب التجريبي:** يوضح الشكل (a14) مخططاً تخطيطياً لترتيب تجريبي نموذجي لإنتاج الهولوغرام. يصطدم الإشعاع المتوافق (Coherent) لشعاع الليزر بـ "مقسم شعاع" (Beamsplitter)، حيث ينقسم إلى شعاعين (1 و2). يتم توجيه الشعاعين بواسطة مرآتين ليتم إعادة دمجهما على سطح غشاء رقيق حساس للضوء (سمكه 10-50 ميكرومتر).
- **نمط التداخل:** نظراً لأن الشعاعين متوافقان، فإنهما ينتجان نمطاً موحداً للغاية من الأشرطة المضيئة والمظلمة (أهداب التداخل) على سطح الغشاء، كما هو موضح في الشكل (b14). تؤدي هذه الأهداب إلى تحسيس الغشاء (الذي يكون عبارة عن مستحلب فوتوغرافي أو بوليمر حساس للضوء)، بحيث يمكن تطوير المناطق المحسسة أو إذابتها، مما يترك بنية محززة

[13] V. Toal ,*Introduction to Holography* ,Boca Raton, FL: CRC Press, 2012; J. R. Lakowicz ,*Principles of Fluorescence Spectroscopy*3 ,rd ed., New York: Springer, 2006.

على سطح الركيزة. يتم بعد ذلك طلاء هذه البنية بالألومنيوم أو أي مادة عاكسة أخرى لإنتاج **شبيكة انعكاس هولوغرافية (Holographic reflection grating)**.

الهولوغرام الحجمي النافذ (Volume Transmission Hologram)

نوع ثانٍ من الأجهزة الهولوغرافية التي يمكن تصنيعها بطريقة مشابهة هو "الهولوغرام الحجمي النافذ". تُشكل هذه الأجهزة داخل طبقة سميكة (>100 ميكرومتر) من مادة حساسة للضوء محصورة بين طبقتين شفافتين (كما في يمين الشكل a14).

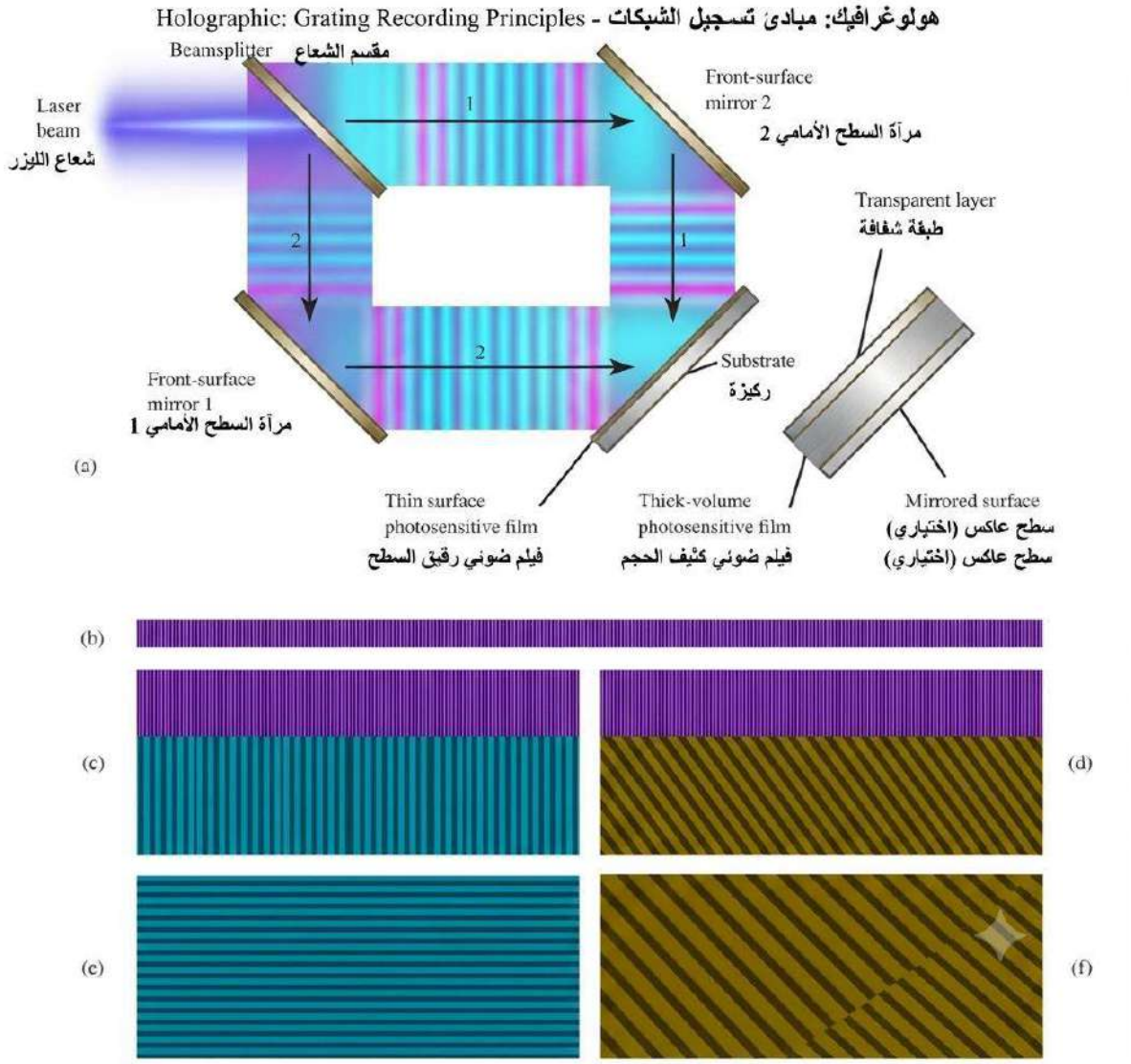
- **العملية:** توضع هذه المجموعة عند مستوى تقاطع شعاعي الليزر كما في الحالة السابقة، وتتشكل أهداب التداخل خلال **حجم الغشاء** بالكامل وليس فقط عند سطحه. عندما يتقاطع الشعاعان بزوايا متساوية بالنسبة لعامودي السطح، يتكون نمط أهداب معدل جيبياً (كما في الشكل c14) داخل الفيلم.
- **التطوير والتثبيت:** يتم تطوير الفيلم كيميائياً "لتثبيت" النمط، مما ينتج عنه نمط مقابل من التغيرات في **معامل الانكسار** داخل مادة الفيلم. ومن خلال جعل زاوية سقوط الشعاعين غير متماثلة بالنسبة لعامودي الفيلم، يمكن إمالة نمط تعديل معامل الانكسار الناتج (الشكل d14).

الاستخدامات: عن طريق التحكم في الطول الموجي لليزر وزاوية السقوط، يمكن تخصيص تردد تعديل معامل الانكسار لتلبية متطلبات محددة. تُستخدم هذه الأجهزة أيضاً كشبيكات وكمرشحات لإزالة الإشعاع غير المرغوب فيه، مثل خطوط البلازما والنطاقات الجانبية (Sidebands) من إشعاع الليزر.

الهولوغرامات الحجمية ومرشحات "النوتش" (Notch Filters)

ربما يكون أكثر الأجهزة الهولوغرافية الحجمية فائدة هو ذلك الذي يُصنع عند استبدال الوجه الخلفي الشفاف للفيلم السميك بمرآة، ثم تعريض الفيلم لشعاع ليزر واحد. يدخل الشعاع السطح الأمامي للفيلم، وينعكس من الواجهة بين خلفية الفيلم والمرآة، مما يُشكل نمط تداخل داخل الفيلم يكون موازياً لوجهه (كما في الشكل e14). تُسمى هذه الأجهزة **هولوغرامات الانعكاس المطابقة (Conformal reflection holograms)**، وتجعل خصائصها منها أجهزة شبه مثالية للاستخدام كـ **مرشحات "نوتش" (Notch filters)**.

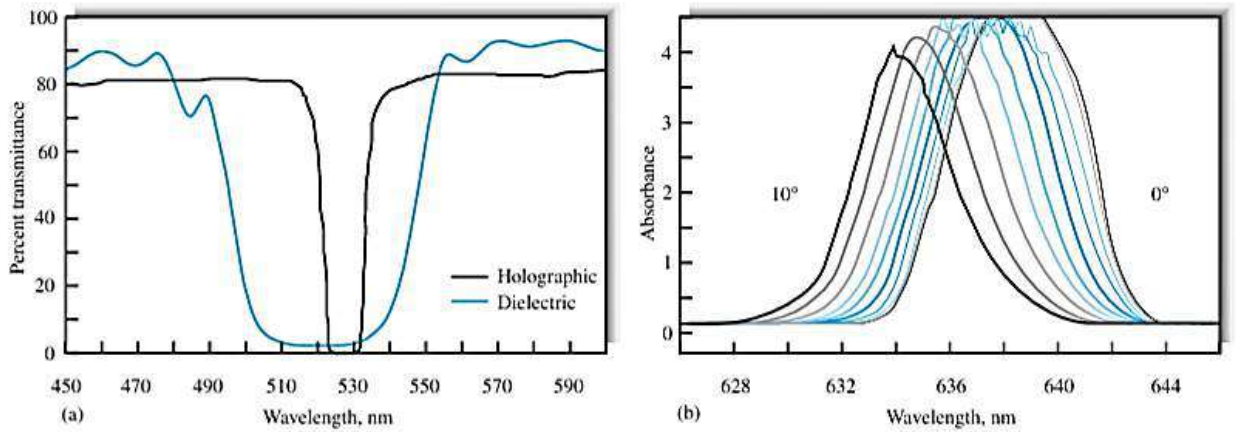
- **خصائص المرشح:** يقارن الشكل (a15) بين خصائص نفاذية مرشح هولوغرافي نموذجي ومرشح تداخل عازل. يوفر المرشح الهولوغرافي نفاذية منتظمة للغاية (مسطحة) عند جميع الأطوال الموجية، باستثناء منطقة الـ "نوتش" (الشق)، حيث يحجب أكثر من **99.99%** من الإشعاع الساقط، وهو ما يعادل امتصاصية (كثافة ضوئية) تبلغ 4. يقل عرض الحزمة الفعال للمرشح عن **10 نانومتر**، بينما يقل "عرض الحافة" (نطاق الطول الموجي الذي تتراوح فيه الامتصاصية من 0.3 إلى 4) عن **4 نانومتر**.



الشكل 14: (أ) الترتيب التجريبي لتصنيع الهولوغرامات. يُقسّم شعاع ليزر إلى شعاعين، يُوجّهان بواسطة مرايا ليتحدا على سطح غشاء حساس للضوء. يُستخدم الجهاز الموضح لإنتاج محززات انعكاس هولوغرافية. باستبدال الجسم السطحي بغشاء حساس للضوء ذي حجم كبير كما هو موضح على اليمين، ينتج هولوغرام نفاذي حجمي. (ب) نمط التداخل على سطح الغشاء الحساس للضوء، والذي يُنتج نمط معامل انكسار مطابق على الغشاء. (ج) نمط أهداب غير مائل، (د) نمط أهداب مائل، (هـ) نمط أهداب متطابق ناتج عن جعل السطح الخلفي للغشاء ذي الحجم الكبير مرآة، (و) نمط أهداب غير متطابق.

- **الضبط الدقيق:** يوضح الشكل (b15) كيف يمكن ضبط نطاق الرفض (Rejection band) لمرشح الـ "نوتش" بدقة عن طريق إمالته بالنسبة للإشعاع الساقط. تتوفر هذه المرشحات بأحجام ونطاقات رفض متنوعة مصممة لتناسب خطوط الليزر الأكثر شيوعاً في المدى من **350 إلى 1400 نانومتر**.
- **الأثر العلمي:** أحدث التوفر التجاري لمرشحات "النوتش" الهولوغرافية ثورة في استخدام **مطيافية رامان (Raman spectroscopy)** ، من خلال القضاء فعلياً على الحاجة إلى "مُوحدات لونية مزدوجة" (Double monochromators) عالية الدقة ومكلفة في العمل الروتيني.

أما خصائص تعديل معامل الانكسار للعناصر البصرية الهولوغرافية **غير المطابقة** (nonconformal) فهي موضحة في الشكل (f14). ونظراً لوجود بعض التعديل في معامل الانكسار عند سطح الجهاز، فإنه يعمل من حيث المبدأ كـ "مرشح نوتش" و"شبيكة" (Grating) في آن واحد.

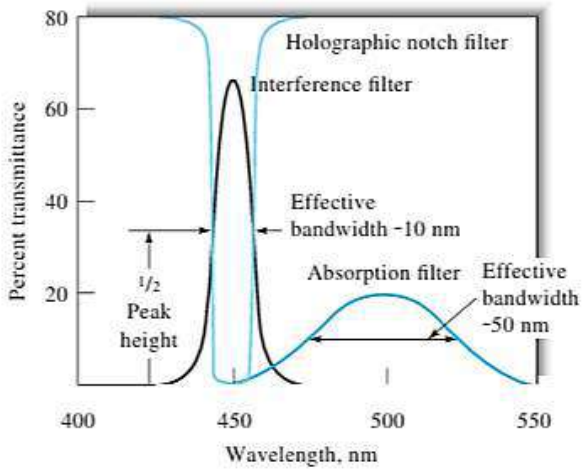


الشكل 15: (أ) مقارنة بين نطاقي التردد لمرشح حجب هولوغرافي نموذجي ومرشح تداخل. (ب) ضبط ميل مرشح الحجب الهولوغرافي بزيادات قدرها 1° من الوضع العمودي على شعاع الليزر الساقط. يمكن ضبط نطاق الحجب بدقة عن طريق تغيير زاوية مرشح الحجب بالنسبة لليزر. (بإذن من شركة كايزر للأنظمة البصرية، آن أربور، ميشيغان).

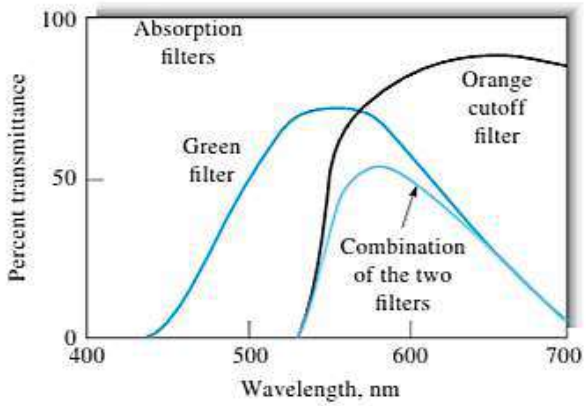
مرشحات الامتصاص (Absorption Filters)

تُعد مرشحات الامتصاص بشكل عام أقل تكلفة من مرشحات التداخل، وقد استُخدمت على نطاق واسع لاختيار الحزم الطيفية في المنطقة المرئية. تعمل هذه المرشحات عن طريق امتصاص أجزاء مختارة من الطيف.

- **الأنواع الشائعة:** يتكون النوع الأكثر شيوعاً من زجاج ملون، أو من صبغة معلقة في جيلاتين ومحصورة بين لوحين زجاجيين. تتميز مرشحات الزجاج الملون باستقرار حراري عالٍ.
- **خصائص الأداء:** تتراوح عروض الحزمة الفعالة (Effective bandwidths) لمرشحات الامتصاص ما بين **30 إلى 250 نانومتر** (انظر الشكلين 16 و 17). المرشحات التي توفر أضيق عروض حزمة تقوم أيضاً بامتصاص جزء كبير من الإشعاع المطلوب، وقد تصل نفاذيتها عند قمة الحزمة إلى **10% أو أقل**. وتتوفر تجارياً مرشحات زجاجية ذات قمم نفاذية تغطي كامل المنطقة المرئية.



الشكل 16: النطاقات الترددية الفعالة لثلاثة أنواع من المرشحات.



الشكل 17: مقارنة بين أنواع مختلفة من مرشحات الامتصاص للإشعاع المرئي.

مرشحات القطع (Cutoff Filters)

هي مرشحات تمتلك نفاذية تقارب **100%** عبر جزء من الطيف المرئي، ثم تنخفض نفاذيتها بسرعة إلى الصفر في الجزء المتبقي. يمكن عزل حزمة طيفية ضيقة عن طريق دمج مرشح قطع مع مرشح ثانٍ (انظر الشكل 17).

المُوحدات اللونية (Monochromators)

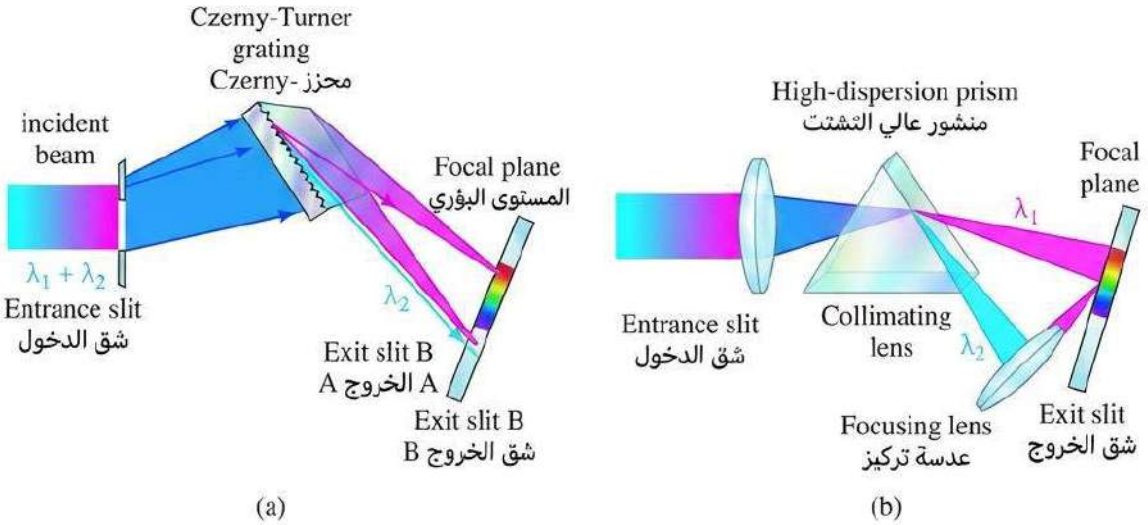
المُوحد اللوني (Monochromator) هو جهاز يستخدم "فتحة دخول" (Entrance slit) لتحديد مساحة المصدر المرصود، و"فتحة خروج" (Exit slit) لعزل حزمة ذات طول موجي واحد. يمكن تحقيق المسح الطيفي (Spectral scanning) عن طريق تمرير حزم مختلفة من الأطوال الموجية، واحدة تلو الأخرى، عبر فتحة الخروج. وتتشابه المُوحدات اللونية للأشعة فوق البنفسجية والمرئية وتحت الحمراء في تركيبها الميكانيكي، حيث تستخدم جميعها فتحات، وعدسات، ومرايا، ونوافذ، وشبيكات أو مناشير. وتعتمد المواد المصنعة منها هذه المكونات على منطقة الطول الموجي المخصصة للاستخدام (انظر الشكل 2).

مكونات المُوحدات اللونية

يوضح الشكل (18) العناصر البصرية الموجودة في جميع المُوحدات اللونية، والتي تشمل:

1. **فتحة دخول:** توفر صورة بصرية مستطيلة.
2. **عدسة أو مرآة مجمّعة (Collimating):** تُنتج حزمة متوازية من الإشعاع.
3. **منشور أو شبيكة (Prism or Grating):** تُشتت الإشعاع إلى أطواله الموجية المكونة له.
4. **عنصر تركيز:** يُعيد تشكيل صورة فتحة الدخول ويركزها على سطح مستوٍ يُسمى "المستوى البؤري" (Focal plane).
5. **فتحة خروج:** تقع في المستوى البؤري وتعمل على عزل الحزمة الطيفية المطلوبة. بالإضافة إلى ذلك، تحتوي معظم المُوحدات اللونية على نوافذ دخول وخروج مصممة لحماية المكونات من الغبار والأبخرة المختبرية المسببة للتآكل.

آلية التشتيت (Dispersing Elements)



الشكل (18): نوعين من عناصر التشتيت الشائعة: شبيكات الانعكاس والمناشير. لغرض التوضيح، يظهر شعاع مكون من طولين موجيين فقط، λ_1 وλ_2 (حيث $\lambda_1 > \lambda_2$). يدخل هذا الإشعاع عبر فتحة مستطيلة ضيقة، ثم يُجمع (Collimated)، ويصطدم بسطح عنصر التشتيت بزاوية معينة:

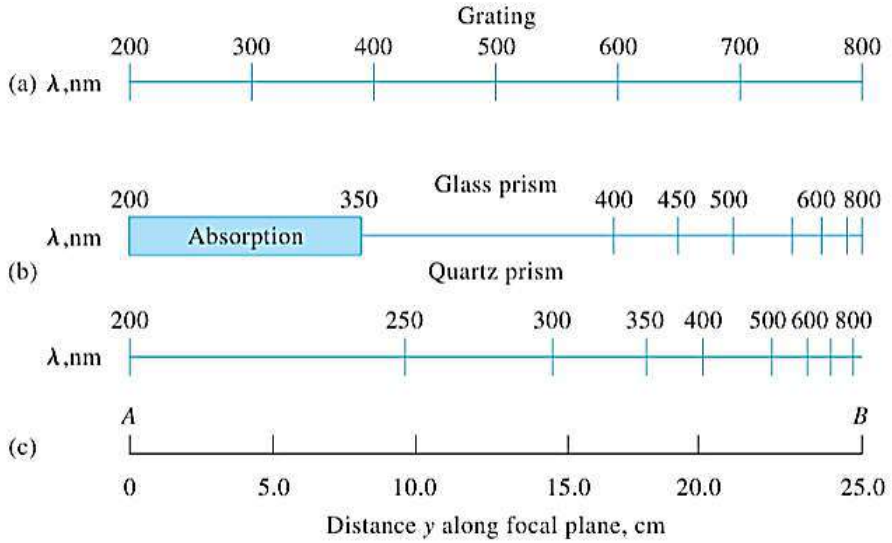
- **في حالة الشبيكة:** ينتج التشتت الزاوي للأطوال الموجية عن **الحيود (Diffraction)** الذي يحدث عند السطح العاكس.
- **في حالة المنشور:** ينتج التشتت الزاوي عن **الانكسار (Refraction)** عند وجهي المنشور، كما هو موضح.

في كلا التصميمين، يتركز الإشعاع المشتت على المستوى البؤري **AB** حيث يظهر كصورتين مستطيلتين لفتحة الدخول (واحدة لـ λ_1 والأخرى لـ λ_2). ومن خلال تدوير عنصر التشتيت، يمكن تركيز إحدى الحزمتين أو الأخرى على فتحة الخروج.

التفضيل الصناعي: الشبيكات مقابل المناشير

عندما ظهرت المُوحدات اللونية تجارياً لأول مرة في الخمسينيات، كانت في الغالب أجهزة تعتمد على المناشير. أما حالياً، فإن جميع المُوحدات اللونية التجارية تقريباً تعتمد على **شبيكات الانعكاس**؛ لأنها أرخص في التصنيع، وتوفر فصلاً أفضل للأطوال الموجية لنفس الحجم من عنصر التشتيت، وتشتت الإشعاع خطياً على طول المستوى البؤري. كما هو موضح في الشكل (a19)، يعني التشتت الخطي أن موقع الحزمة على طول المستوى البؤري للشبيكة يتغير خطياً مع طولها الموجي. وعلى النقيض من ذلك، بالنسبة لأجهزة المنشور، تظهر الأطوال الموجية القصيرة تشتتاً أكبر من الأطوال الموجية الطويلة، مما يعقد تصميم الجهاز. يوضح الشكل (b19) التشتت غير الخطي لنوعين من مُوحدات المنشور. ونظراً لشيوع استخدامها، سنركز مناقشتنا على مُوحدات الشبيكة.

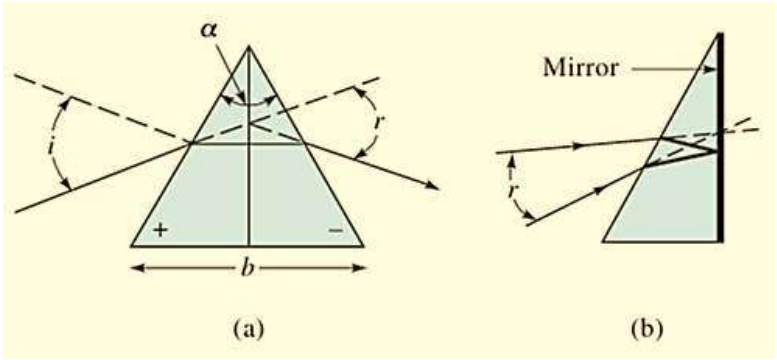
- **الشكل 18:** نوعان من المُوحدات اللونية: (a) مُوحد الشبيكة من نوع "سيرني-تيرنر" (Czerny-Turner)، و (b) مُوحد المنشور من نوع "بونسن" (Bunsen). (في كلتا الحالتين $\lambda_1 > \lambda_2$).



الشكل 19: التشتت لأنواع ثلاثة من المُوحدات اللونية. النقاط A و B على المقياس في (c) تطابق النقاط الموضحة في الشكل 18.

مُوحدات المنشور (Prism Monochromators)

يمكن استخدام المناشير لتشتيت الأشعة فوق البنفسجية والمرئية وتحت الحمراء. ومع ذلك، تختلف المادة المستخدمة في تصنيعها اعتماداً على منطقة الطول الموجي .



الشكل 20: التشتيت بواسطة منشور: (a) نوع "كورنو" من الكوارتز، و (b) نوع "ليترو".

يوضح الشكل (20) أكثر نوعين شيوعاً من تصاميم المناشير:

1. **منشور 60°:** يُصنع عادةً من قطعة واحدة من المادة. ولكن عند استخدام الكوارتز البلوري (وليس المصهور)، يُصنع المنشور عادةً عن طريق لصق منشورين بزاوية 30° معاً، كما في الشكل (a20)؛ حيث يُصنع أحدهما من كوارتز يميني والآخر من كوارتز يساري. وبهذه الطريقة، لا يسبب الكوارتز النشط ضوئياً أي استقطاب صافٍ للإشعاع المنبعث؛ ويسمى هذا النوع من المنشورات **منشور "كورنو" (Cornu prism)**.
2. **منشور "بونسن" (Bunsen):** الموضح في الشكل (b18)، ويستخدم منشوراً بزاوية 60° عادةً ما يكون مصنوعاً من الكوارتز.

كما يوضح الشكل (b20)، فإن **منشور "ليترو" (Littrow prism)** -الذي يسمح بتصاميم أكثر إحكاماً للمُوحد- هو منشور بزاوية 30° مع وجود مرآة على خلفيته. يحدث الانكسار في هذا النوع مرتين عند نفس الوجه، بحيث تكون خصائص الأداء مشابهة لخصائص منشور 60° في قاعدة "بونسن".

مُوحدات الشبيكة (Grating Monochromators)

يمكن تحقيق تشتيت الأشعة فوق البنفسجية والمرئية وتحت الحمراء عن طريق توجيه حزمة متعددة الأطوال الموجية عبر **شبيكة نفاذة** أو على سطح **شبيكة انعكاس**؛ والأخيرة هي الأكثر شيوعاً بفارق كبير.

- **شبيكات النسخ (Replica gratings):** تُستخدم في معظم المُوحدات، وتُصنع من "شبيكة أصلية" (Master grating) [14]. تتكون الشبيكة الأصلية من سطح صلب مصقول ومستوٍ بصرياً، يحتوي على عدد كبير من الأخاديد المتوازية والمتقاربة، تُصنع بواسطة أداة ماسية.
- **مواصفات الأخاديد:** يوضح الشكل (21) منظراً مقطعياً مكبراً لبعض الأخاديد النموذجية. عادةً ما تحتوي الشبيكة المخصصة للمناطق فوق البنفسجية والمرئية على **300 إلى 2000 أخدود/مم**، والأكثر شيوعاً هو 1200 إلى 1400 أخدود/مم. أما لمنطقة الأشعة تحت الحمراء، فغالباً ما تحتوي الشبيكات على **10 إلى 200 أخدود/مم**؛ ولمطيافات الأشعة تحت الحمراء المستخدمة في المدى الشائع (5 إلى 15 ميكرومتر)، تكون الشبيكة ذات الـ 100 أخدود/مم مناسبة.
- **تحديات التصنيع:** يُعد بناء شبيكة أصلية جيدة أمراً مضنياً ومستغرقاً للوقت ومكلفاً، لأن الأخاديد يجب أن تكون متطابقة الحجم، ومتوازية تماماً، ومتباعدة بمسافات متساوية على طول الشبيكة (3 إلى 10 سم).
- **عملية النسخ:** تُصنع شبيكات النسخ من الشبيكة الأصلية عن طريق عملية "صب الراتنج السائل" (Liquid-resin casting)، التي تحافظ بشكل مثالي تقريباً على الدقة البصرية للشبيكة الأصلية على سطح راتنج شفاف. يُجعل هذا السطح عاكساً عادةً بطلائه بالألومنيوم، أو أحياناً بالذهب أو البلاتين.

شبيكة الإيشيليت (The Echellette Grating)

يوضح الشكل (21) تمثيلاً تخطيطياً لشبيكة من نوع "إيشيليت"، وهي شبيكة محززة (أو "مُسددة" - blazed) بحيث تمتلك أوجهًا عريضة نسبياً يحدث عندها الانعكاس، وأوجهاً ضيقة غير مستخدمة. توفر هذه الهندسة حيوداً عالي الكفاءة للإشعاع، والهدف من التسديد (Blazing) هو تركيز الإشعاع في اتجاه مفضل [15]. يمكن اعتبار كل وجه من الأوجه العريضة كمصدر خطي للإشعاع

[14] For an interesting and informative discussion of the manufacture, testing, and performance characteristics of gratings, see C. Palmer, Diffraction Grating Handbook, 6th ed., Rochester, NY: Newport Corp., 2005 (www.newport.com). For a historical perspective on the importance of gratings in the advancement of science, see A. G. Ingalls, Sci. Amer., 1952, 186 (6), 45.

[15] J. D. Ingle Jr. and S. R. Crouch, Spectrochemical Analysis, p. 66, Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 1988.

متعامد مع مستوى الصفحة، مما يسمح بحدوث تداخل بين الأشعة المنعكسة (1، 2، و3). لكي يكون التداخل بناءً، يجب أن تختلف أطوال المسارات بمضاعف صحيح (n) لطول الموجة (λ) للشعاع الساقط.

اشتقاق شرط التداخل البناء

في الشكل (21)، تسقط حزم متوازية من الإشعاع أحادي اللون (1 و2) على الشبيكة بزاوية سقوط (i) بالنسبة لعمودي الشبيكة. يظهر الحد الأقصى للتداخل البناء عند زاوية الانعكاس (r). يقطع الشعاع (2) مسافة أكبر من الشعاع (1)، والفرق في المسارات يساوي $(CB + BD)$ (موضح كخط ملون في الشكل). ولكي يحدث تداخل بناء، يجب أن يساوي هذا الفرق $(n\lambda)$. أي:

$$n\lambda = (CB + BD)$$

حيث (n) هو عدد صحيح صغير يُسمى **رتبة الحيود (Diffraction order)**. ومن علم المثلثات، وبما أن الزاوية CABتساوي زاوية السقوط (i)، والزاوية DABتساوي زاوية الانعكاس (r)، يمكننا كتابة:

$$CB = d \sin i$$

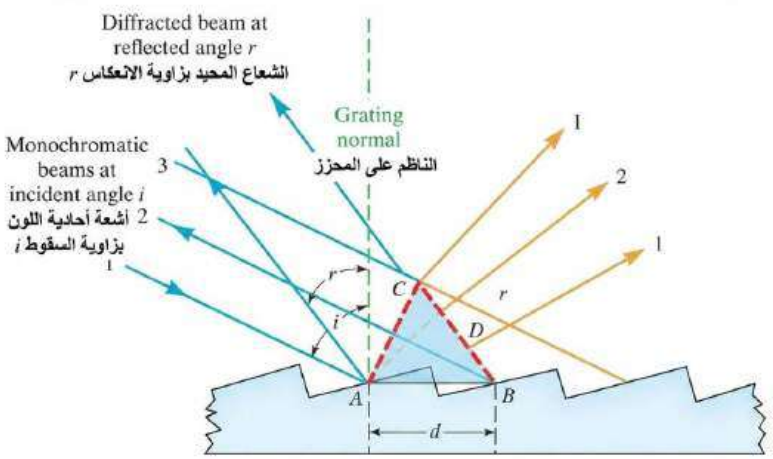
$$BD = d \sin r$$

(حيث dهي المسافة بين الأسطح العاكسة). وبالتعويض في المعادلة الأولى، نحصل على شرط التداخل البناء:

$$n\lambda = d(\sin i + \sin r) \quad (6)$$

رتب الحيود والتداخل

تشير المعادلة (6) إلى وجود قيم متعددة لـ (λ) لزاوية حيود معينة (r). فإذا وُجد خط من الرتبة الأولى $(n = 1)$ عند طول موجي 900 نانومتر عند الزاوية (r)، فإن خطوط الرتبة الثانية (450 نانومتر) والرتبة الثالثة (300 نانومتر) ستظهر أيضاً عند نفس الزاوية. عادةً ما يكون خط الرتبة الأولى هو الأكثر شدة. ومن الممكن تصميم شبيكات بزوايا تسديد (Blaze angles) وأشكال تركّز ما يصل إلى **90%** من شدة الإشعاع الساقط في هذه الرتبة. ويمكن استخدام مرشحات لإزالة خطوط الرتب العليا؛ فعلى سبيل المثال، الزجاج الذي يمتص الإشعاع أقل من 350 نانومتر، يمكنه التخلص من الأطياف المرتبطة بالرتب العليا الناتجة عن إشعاع الرتبة الأولى في معظم المنطقة المرئية.



الشكل 21: آليات الحيود من شبيكة من نوع "إيشيليت".

مثال (1)

شبيكة "إيشيليت" تحتوي على 1450 "تسديدة" (blaze) لكل مليمتر، سُلط عليها شعاع متعدد الأطوال الموجية بزاوية سقوط (i) تساوي 48° بالنسبة لعامودي الشبيكة. احسب الأطوال الموجية للإشعاع التي ستظهر عند زوايا انعكاس (r) تساوي 20°، 10°، و0°.

الحل:

لإيجاد المسافة (d) بين الأسطح العاكسة في المعادلة (6)، نكتب:

$$d = \frac{1\text{ mm}}{1450\text{ blazes}} \times \frac{10^6\text{ nm}}{1\text{ mm}} = 689.7\text{ nm/blaze}$$

عندما تكون زاوية الانعكاس (r) في الشكل (21) تساوي **20°**، نستخدم المعادلة (6) [مع العلم أن الزاوية rتُؤخذ بإشارة سالبة إذا كانت في جهة الزاوية iبالنسبة لعامودي الشبيكة، ولكن هنا يُفترض أن الزاوية تُحسب رياضياً بناءً على اتجاهاتها]:

$$\lambda = \frac{d(\sin i + \sin r)}{n} = \frac{689.7(\sin 48° + \sin 20°)}{n} = \frac{748.4}{n}\text{ nm}$$

وبالتالي، تكون الأطوال الموجية للرتب الأولى والثانية والثالثة هي:

- للرتبة الأولى ($n = 1$): **748 نانومتر**.
- للرتبة الثانية ($n = 2$): **374 نانومتر**.
- للرتبة الثالثة ($n = 3$): **249 نانومتر**.

نتائج حسابية إضافية:

بإجراء حسابات مماثلة للزوايا الأخرى (10° و 0°)، نحصل على البيانات التالية:

الطول الموجي (λ) بالنانومتر	$r = 20°$	$r = 10°$	$r = 0°$
الرتبة الأولى($n = 1$)	748	632	513
الرتبة الثانية($n = 2$)	374	316	256
الرتبة الثالثة($n = 3$)	249	211	171

الشبيكات المقعرة (Concave Gratings)

يمكن تشكيل الشبيكات على سطح مقعر بنفس الطريقة المستخدمة على السطح المستوي. تسمح الشبيكة المقعرة بتصميم مُوحد لوني دون الحاجة إلى مرايا أو عدسات تجميع (Collimating) وتركيز إضافية، لأن السطح المقعر يقوم بتشتيت الإشعاع وتركيزه في آنٍ واحد على فتحة الخروج. يُعد هذا الترتيب ميزة من حيث التكلفة، كما أن تقليل عدد الأسطح البصرية يؤدي إلى زيادة "نفاذية الطاقة" (Energy throughput) عبر الجهاز.

الشبيكات الهولوغرافية (Holographic Gratings)

تظهر الشبيكات الهولوغرافية [16] بأعداد متزايدة في الأجهزة البصرية الحديثة، حتى في الأجهزة منخفضة التكلفة منها. توفر الشبيكات الهولوغرافية طيفاً خالياً نسبياً من "الإشعاع الشارد" (Stray radiation) و"الأشباح" (الصور المزدوجة - ghosts)، وذلك بفضل كمالها الأكبر فيما يتعلق بشكل الأبعاد وجودتها.

عملية التحضير: في تحضير الشبيكات الهولوغرافية، يتم توجيه حزم من زوج من ليزرات متطابقة بزوايا مناسبة على سطح زجاجي مطلي بـ "مقاوم ضوئي" (Photoresist). تعمل أهداب التداخل الناتجة عن الحزمتين على تحسيس المقاوم الضوئي بحيث يمكن إذابته، تاركاً بنية محززة يمكن طلاؤها بالألومنيوم أو أي مادة عاكسة أخرى لإنتاج شبيكة انعكاس. يمكن تغيير تباعد الأخاديد عن طريق تغيير الزاوية بين حزمتي الليزر. كما هو موضح في الشكل (14)، تُنتج الشبيكات الهولوغرافية عن طريق توليد نمط تداخل على سطح غشاء رقيق من مادة حساسة للضوء، والذي يُطور للحصول على البنية المحززة المطلوبة. بهذه الطريقة يمكن تصنيع

[16] C. Palmer, Diffraction Grating Handbook, 6th ed., Ch. 4, Rochester, NY: Newport Corp., 2005.

شبيكات كبيرة (تصل إلى أكثر من 50 سم) ذات دقة تكاد تكون مثالية، وبكثافة خطوط تصل إلى **6000 خط/مم**، وبتكلفة منخفضة نسبياً. وكما هو الحال مع الشبيكات "المُسطرة" (Ruled gratings)، يمكن صب "شبيكات نسخ" (Replica gratings) من شبيكة هولوغرافية أصلية. ويبدو أنه لا يوجد اختبار بصري يمكنه التمييز بين الشبيكة الهولوغرافية الأصلية وشبيكة النسخ [17].

خصائص أداء مُوحدات الشبيكة (Performance Characteristics)

تعتمد جودة المُوحد اللوني على:

1. نقاء خرج الإشعاع.
2. قدرته على تمييز الأطوال الموجية المتقاربة.
3. قدرته على تجميع الضوء (Light-gathering power).
4. عرض الحزمة الطيفية (Spectral bandwidth).

النقاء الطيفي (Spectral Purity)

عادةً ما يكون الشعاع الخارج من المُوحد اللوني ملوثاً بكميات صغيرة من إشعاع شارد أو متشتت ذي أطوال موجية تختلف تماماً عن الإعداد الذي تم ضبط الجهاز عليه. يمكن إرجاع هذا الإشعاع غير المرغوب فيه إلى عدة مصادر، منها: انعكاسات الشعاع عن الأجزاء البصرية المختلفة وجسم المُوحد اللوني نفسه، أو العيوب الميكانيكية في الأجزاء البصرية (خاصة في الشبيكات) التي تحدث أثناء التصنيع، أو تشتت الإشعاع بسبب جزيئات الغبار الموجودة في الغلاف الجوي أو على أسطح الأجزاء البصرية.

- **الوقاية:** يتم تقليل تأثيرات هذا الإشعاع الزائف عادةً عن طريق إدخال حواجز (Baffles) في مواضع مناسبة داخل المُوحد اللوني، وطلاء الأسطح الداخلية بطلاء أسود مطفأ. بالإضافة إلى ذلك، يتم إغلاق المُوحد اللوني بنوافذ فوق الفتحات لمنع دخول الغبار والأبخرة.
- **الأثر:** على الرغم من هذه الاحتياطات، لا يزال يظهر بعض الإشعاع الزائف، والذي -كما سنوضح في القسم B-213- يمكن أن يكون له تأثيرات خطيرة على قياسات الامتصاص في ظروف معينة.

التشتيت (Dispersion)

تعتمد قدرة المُوحد اللوني على فصل الأطوال الموجية المختلفة على تشتيته. يُعرّف **التشتيت الزاوي (Angular dispersion)** بـ $(dr/d\lambda)$، حيث (dr) هو التغير في زاوية الانعكاس أو الانكسار مع تغير الطول الموجي $(d\lambda)$.

بالنسبة للشبيكة، يمكن الحصول على التشتيت الزاوي عن طريق اشتقاق المعادلة (6) مع اعتبار (i) ثابتة، مما يعطي:

$$\frac{dr}{d\lambda} = \frac{n}{d\cos r} \quad (7)$$

أما **التشتيت الخطي (Linear dispersion)** (D)، فيشير إلى التغير في الطول الموجي كدالة في (y)، وهي المسافة على طول الخط AB في المستوى البؤري (كما في الشكل 18). إذا كان (f) هو البعد البؤري للمُوحد اللوني، فإن التشتيت الخطي يرتبط بالتشتيت الزاوي بالعلاقة:

$$D = \frac{dy}{d\lambda} = f\frac{dr}{d\lambda} \quad (8)$$

المقياس الأكثر فائدة للتشتيت هو **مقلوب التشتيت الخطي** (D^{-1}):

[17] I. R. Altemose, J. Chem. Educ., 1986, 63, A216.

$$D^{-1} = \frac{d\lambda}{dy} = \frac{1}{f}\frac{d\lambda}{dr} \quad (9)$$

وعادة ما تكون وحدات (D^{-1}) هي نانومتر/مم أو أنجستروم/مم في منطقة الأشعة فوق البنفسجية والمرئية.

بالتعويض عن المعادلة (7) في المعادلة (9)، نحصل على مقلوب التشتيت الخطي لمُوحد شبيكة:

$$D^{-1} = \frac{d\lambda}{dy} = \frac{d\cos r}{nf} \quad (10)$$

ملاحظات هامة:

1. يزداد التشتيت الخطي كلما قلت المسافة (d) بين الحزوز (أي كلما زاد عدد الخطوط لكل مليمتر)، أو كلما زاد البعد البؤري (f).
2. عند زوايا حيود صغيرة ($\theta < 20°$)، فإن $\cos r \approx 1$، وتصبح المعادلة (10) تقريباً:

$$D^{-1} \approx \frac{d}{nf} \quad (11)$$

وبالتالي، ولجميع الأغراض العملية، إذا كانت الزاوية (r) صغيرة، فإن التشتيت الخطي لمُوحد الشبيكة يكون **ثابتاً**، وهي خاصية تُبسط تصميم المُوحدات اللونية بشكل كبير.

القدرة على التمييز (Resolving Power)

تصف القدرة على التمييز (R) للمُوحد اللوني حده الأقصى في فصل الصورتين المتقاربتين اللتين تختلفان اختلافاً طفيفاً في الطول الموجي. وبحكم التعريف:

$$R = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} \quad (12)$$

حيث (λ) هو متوسط الطول الموجي للصورتين، و($\Delta\lambda$) هو الفرق بينهما. تتراوح القدرة على التمييز لمُوحدات الأشعة فوق البنفسجية والمرئية المخبرية النموذجية ما بين 10^3إلى 10^4. ويمكن إثبات [18] أن القدرة على التمييز للشبيكة تُعطى بالتعبير التالي:

$$R = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} = nN \quad (13)$$

حيث (n) هو رتبة الحيود، و(N) هو عدد "تسديدات" (blazes) الشبيكة التي يسقط عليها الإشعاع من فتحة الدخول. وبالتالي، فإن الدقة الأفضل هي خاصية تتميز بها الشبيكات الأطول، وذات المسافات البينية (بين التسديدات) الأصغر، ورتب الحيود الأعلى. تنطبق هذه المعادلة على كل من شبيكات "الإيشيليت" (Echellette) وشبيكات "الإيشيل" (Echelle) التي سنناقشها لاحقاً.

قدرة تجميع الضوء (Light-Gathering Power)

لزيادة "نسبة الإشارة إلى الضجيج" (Signal-to-noise ratio) في أي مطياف، من الضروري أن تكون الطاقة الإشعاعية التي تصل إلى الكاشف كبيرة قدر الإمكان. يُقدم **الرقم البؤري** (F) -أو السرعة- مقياساً لقدرة المُوحد اللوني على تجميع الإشعاع المنبعث من فتحة الدخول. يُعرف الرقم البؤري بـ:

$$F = f/d \quad (14)$$

[18] J. D. Ingle Jr. and S. R. Crouch, Spectrochemical Analysis, pp. 71–73, Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 1988.

حيث (f) هو البعد البؤري للمرآة (أو العدسة) المجمِّعة، و(d) هو قطرها. تزداد قدرة تجميع الضوء لأي جهاز بصري وفقاً للمقلوب التربيعي للرقم البؤري. وبذلك، فإن عدسة ذات رقم بؤري **f/2** تجمع ضوءاً أكثر بأربع مرات من عدسة ذات رقم بؤري **f/4**. وعادة ما تقع الأرقام البؤرية لمعظم المُوحدات اللونية في المدى ما بين 1 إلى 10.

مُوحدات الإيشيل (Echelle Monochromators)

تحتوي مُوحدات الإيشيل على عنصري تشتيت مرتبين على التوالي. العنصر الأول هو نوع خاص من الشبيكات يُسمى **شبيكة الإيشيل**، بينما الثاني عادةً ما يكون منشوراً أو شبيكة ذات تشتيت منخفض. توفر شبيكة الإيشيل، التي وصفها لأول مرة "جي. آر. هاريسون" (G. R. Harrison) عام 1949، تشتتاً وقدرة تمييز أعلى من شبيكة الإيشيليت (Echellette) التي لها نفس الحجم [19].

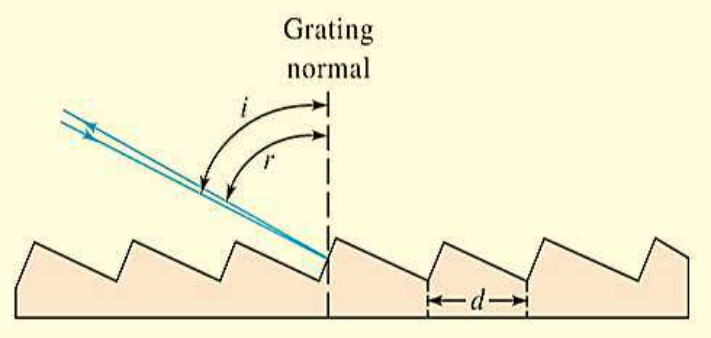
مميزات وتصميم شبيكة الإيشيل

يوضح الشكل (22) مقطعاً عرضياً لشبيكة إيشيل نموذجية، وهي تختلف عن شبيكة الإيشيليت بعدة جوانب:

- **زاوية التسديد (Blaze angle):** لتحقيق زاوية سقوط عالية، تكون زاوية التسديد في شبيكة الإيشيل أكبر بكثير منها في الأجهزة التقليدية، ويُستخدم الجانب القصير للتسديد بدلاً من الطويل.
- **كثافة الحزوز:** الشبيكة خشنة نسبياً، حيث تحتوي عادةً على 300 أخدود/مم أو أقل للأشعة فوق البنفسجية أو المرئية.
- **زاوية الانعكاس:** لاحظ أن زاوية الانعكاس (r) تكون عالية جداً في شبيكة الإيشيل وتقترب من زاوية السقوط (i)، أي أن: $r \approx i = \beta$.

في ظل هذه الظروف، تصبح معادلة الشبيكة:

$$n\lambda = 2d \sin \beta \quad (15)$$



الشكل 22: شبيكة "الإيشيل" (Echelle grating):

- حيث i= زاوية السقوط.
- r= زاوية الانعكاس.
- d= المسافة بين الأخاديد.
- في الممارسة المعتادة، تكون $i \approx r = \beta \approx 63°26'$.

تعزيز الأداء

في شبيكة الإيشيليت العادية، يتم الحصول على تشتيت عالٍ (أو مقلوب تشتيت منخفض) عن طريق جعل عرض الأخدود (d) صغيراً والبعد البؤري (f) كبيراً. لكن البعد البؤري الكبير يقلل من قدرة تجميع الضوء ويجعل المُوحد اللوني كبيراً وضخماً. على النقيض من

[19] For a more detailed discussion of the echelle grating, see C. Palmer, Diffraction Grating Handbook, 6th ed., Rochester, NY: Newport Corp. (www.newport.com), 2005, pp. 196–201; D. J. Brady, Optical Imaging and Spectroscopy, Hoboken, NJ: Wiley, 2009, pp. 393–397; D. A. Cremers and L. J. Radziemski, Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy, Chichester, England: Wiley, 2006, pp. 80–83.

ذلك، تحقق شبيكة الإيشيل تشتتاً عالياً عن طريق جعل كل من الزاوية (β) ورتبة الحيود (n) كبيرتين. يُعطى مقلوب التشتيت الخطي لمُوحد الإيشيل بالمعادلة:

$$D^{-1} = \frac{d\cos\beta}{nf} \quad (16)$$

مقارنة الأداء

يسرد الجدول (3) خصائص الأداء لمُوحدين: أحدهما بشبيكة إيشيليت تقليدية والآخر بشبيكة إيشيل. توضح هذه البيانات مزايا شبيكة الإيشيل؛ حيث نلاحظ أنه لنفس البعد البؤري، فإن **التشتيت الخطي** و**القدرة على التمييز** للإيشيل أكبر بمرتبة مقدار (10 أضعاف)، كما أن قدرتها على تجميع الضوء أفضل نوعاً ما.

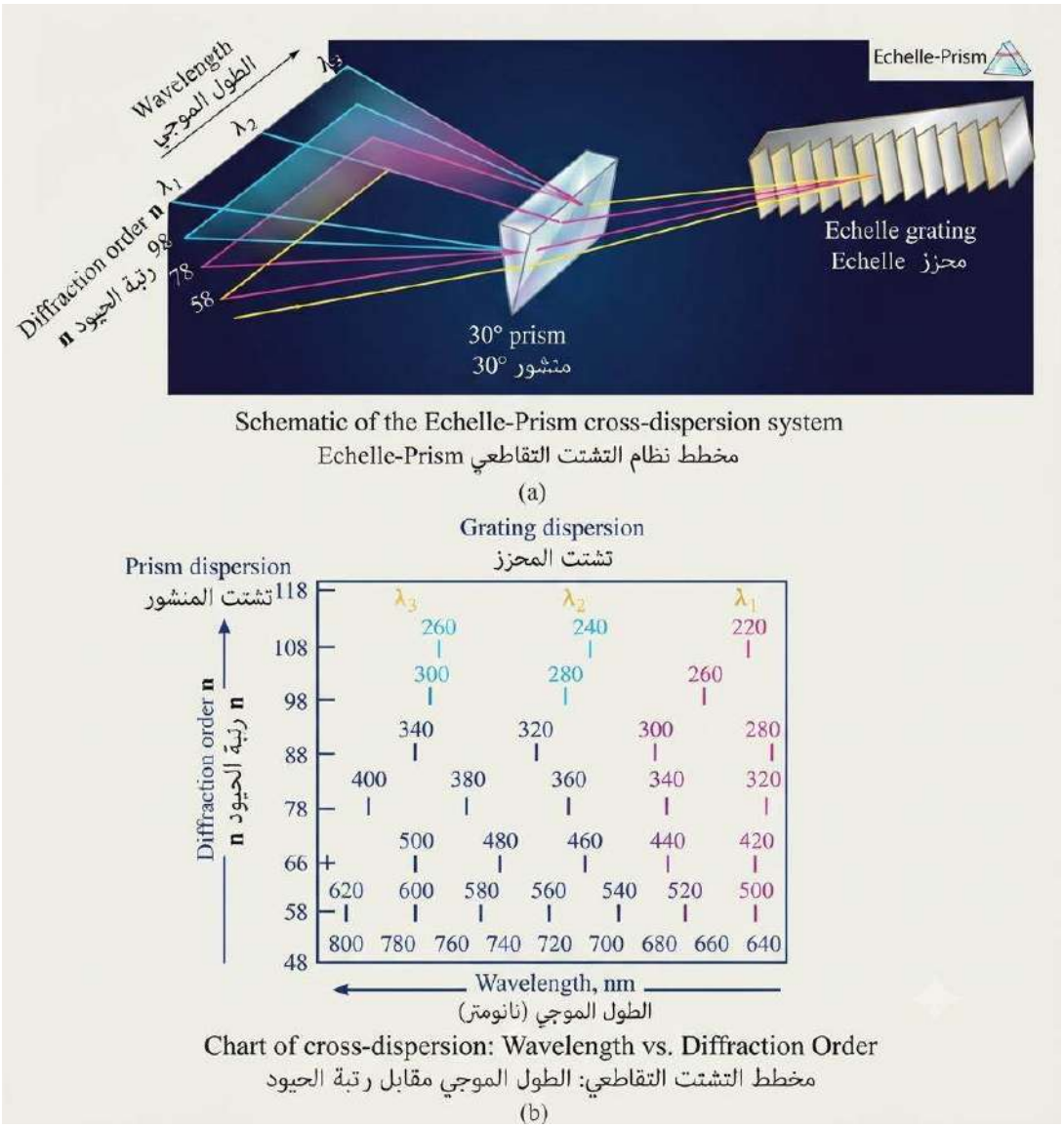
الجدول 3: مقارنة بين خصائص أداء مُوحد لوني تقليدي ومُوحد لوني "إيشيل"

الخاصية	المُوحد التقليدي	مُوحد الإيشيل
البعد البؤري	0.5متر	0.5متر
كثافة الأخاديد	1200خط/مم	79خط/مم
زاوية الحيود(β)	10° 22'	63° 26'
الرتبة (n) (عند 300 نانومتر)	1	75
القدرة على التمييز (عند 300 نانومتر)$(\lambda/\Delta\lambda)$	62,400	763,000
مقلوب التشتيت الخطي(D^{-1})	16 أنجستروم/مم	1.5 أنجستروم/مم
قدرة تجميع الضوء(F)	f/9.8	f/8.8

التشتيت المتقاطع (Cross Dispersion)

من المشاكل التي تواجه استخدام شبيكة "الإيشيل" أن التشتيت الخطي عند رتب الحيود العالية يكون كبيراً جداً، لدرجة أنه لتغطية نطاق طيفي واسع بشكل معقول، يلزم استخدام العديد من الرتب المتعاقبة. فعلى سبيل المثال، أحد الأجهزة المصممة لتغطية نطاق من 200 إلى 800 نانومتر يستخدم رتب الحيود من 28 إلى 118 (أي 90 رتبة متعاقبة). ولأن هذه الرتب تتداخل حتماً، فمن الضروري استخدام نظام **تشتيت متقاطع**، كما هو موضح في **الشكل (a23).** في هذا النظام، يمر الإشعاع المشتت من الشبيكة عبر منشور (أو شبيكة ثانية) يكون محوره بزاوية 90 درجة بالنسبة للشبيكة الأولى. تأثير هذا الترتيب هو إنتاج **طيف ثنائي الأبعاد** كما هو موضح تخطيطياً في **الشكل (b23)**.

في هذا الشكل، يُشار إلى مواقع 8 من أصل 70 رتبة بخطوط عمودية قصيرة. بالنسبة لأي رتبة معينة، يكون تشتيت الطول الموجي خطياً تقريباً، ولكن كما يمكن ملاحظته، فإن التشتيت يكون صغيراً نسبياً عند الرتب الدنيا أو الأطوال الموجية الأعلى. يتكون الطيف الحقيقي ثنائي الأبعاد من مُوحد "إيشيل" من سلسلة معقدة من الخطوط العمودية القصيرة الممتدة على طول 50 إلى 100 محور أفقي، حيث يتوافق كل محور مع رتبة حيود واحدة. ولتغيير الطول الموجي في هذا الجهاز، يلزم تغيير زاوية كل من الشبيكة وعنصر التشتيت المتقاطع (المنشور أو الشبيكة).



الشكل 23: مُوحد "إيشيل": (a) ترتيب عناصر التشتيت، و(b) منظر تخطيطي من النهاية للإشعاع المشتت من وجهة نظر الكاشف.

شقوق المُوحد اللوني (Monochromator Slits)

تلعب شقوق المُوحد اللوني دوراً مهماً في تحديد خصائص أداء الجهاز وجودته. تُصنع "فكوك الشق" (Slit jaws) عن طريق تشكيل قطعتين من المعدن بدقة لمنحهما حوافاً حادة، مع الحرص على أن تكون هذه الحواف متوازية تماماً لبعضها البعض وأن تقع في نفس المستوى. في بعض الأجهزة، تكون فتحات الشقوق ثابتة، ولكن في الغالب، يمكن تعديل المسافة بينهما ميكانيكياً أو إلكترونياً.

- **فتحة الدخول:** (انظر الشكل 18) تعمل كمصدر للإشعاع؛ وتتركز صورتها في النهاية على المستوى البؤري الذي يحتوي على فتحة الخروج. إذا كان مصدر الإشعاع يتكون من بضعة أطوال موجية منفصلة، تظهر سلسلة من الصور المستطيلة على هذا السطح كخطوط ساطعة، يتوافق كل منها مع طول موجي معين. يمكن تركيز خط معين على فتحة الخروج عن طريق تدوير عنصر التشتيت.
- **آلية العمل:** إذا كانت فتحة الدخول وفتحة الخروج بنفس العرض (وهي الحالة المعتادة)، فمن الناحية النظرية ستملأ صورة فتحة الدخول فتحة الخروج تماماً عندما يتوافق ضبط المُوحد اللوني مع الطول الموجي للإشعاع. وأي حركة في ضبط المُوحد اللوني في أي اتجاه تؤدي إلى انخفاض مستمر في شدة الإشعاع المنبعث، والتي تصل إلى الصفر عندما تكون صورة فتحة الدخول قد تحركت مسافة تعادل عرضها بالكامل.

تأثير عرض الشق على القدرة على التمييز (Resolution)

يوضح الشكل (24) إشعاعاً أحادي اللون بطول موجي (λ_2) يسقط على فتحة الخروج. هنا، تم ضبط المُوحد اللوني على (λ_2) والفتحتان متطابقتان في العرض؛ حيث تملأ صورة فتحة الدخول فتحة الخروج تماماً. إن حركة المُوحد اللوني لضبطه على (λ_1) أو (λ_3) تؤدي إلى خروج الصورة تماماً من الشق. النصف السفلي من الشكل (24) يوضح رسماً بيانياً للقدرة الإشعاعية المارة عبر الشق كدالة في إعداد المُوحد اللوني.

لاحظ أن **عرض الحزمة (Bandwidth)** يُعرف بأنه مدى إعدادات المُوحد اللوني (بوحدات الطول الموجي، أو أحياناً بوحدات سم$^{-1}$) اللازمة لتحريك صورة فتحة الدخول عبر فتحة الخروج. إذا استُخدم إشعاع متعدد الأطوال الموجية، فإن هذا العرض يمثل أيضاً مدى الأطوال الموجية المارة عبر فتحة الخروج عند إعداد معين للمُوحد.

عرض الحزمة الفعال (Effective Bandwidth):

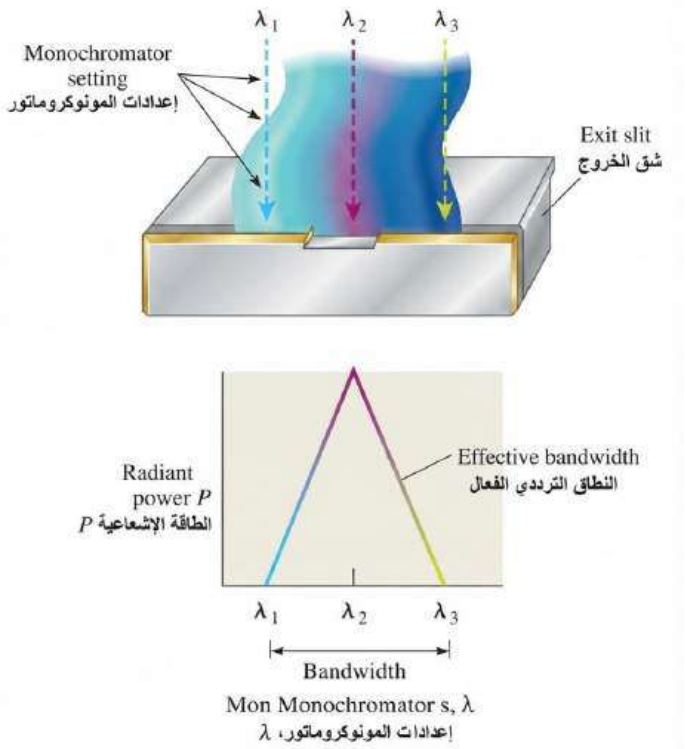
يُعرف أيضاً بـ "الممر الطيفي" (Spectral bandpass)، وهو نصف عرض الحزمة عندما تكون فتحتا الشق متطابقتين، ويُعتبر نطاق الأطوال الموجية التي تخرج من المُوحد اللوني عند ضبطه على طول موجي معين. يمكن ربط عرض الحزمة الفعال بمقلوب التشتيت الخطي (D^{-1}) من خلال إعادة صياغة المعادلة (9) كالتالي:

$$D^{-1} = \frac{\Delta\lambda}{\Delta y}$$

حيث ($\Delta\lambda$) و(Δy) هما فترات محدودة من الطول الموجي والمسافة الخطية على طول المستوى البؤري، على التوالي. وكما يوضح الشكل (24)، عندما تكون (Δy) مساوية لعرض الشق (w)، فإن ($\Delta\lambda$) هي عرض الحزمة الفعال ($\Delta\lambda_{eff}$)، أي:

$$\Delta\lambda_{eff} = w \cdot D^{-1} \quad (17)$$

إضاءة شق الخروج بواسطة إشعاع أحادي اللون عند إعدادات مختلفة للمونوكروماتور
Illumination of an Exit Slit by Monochromatic Radiation at Various Monodromator Settings



الشكل 24: إضاءة فتحة الخروج بإشعاع أحادي اللون (λ_2) عند إعدادات مختلفة للمُوحد اللوني. (فتحات الخروج والدخول متطابقة).

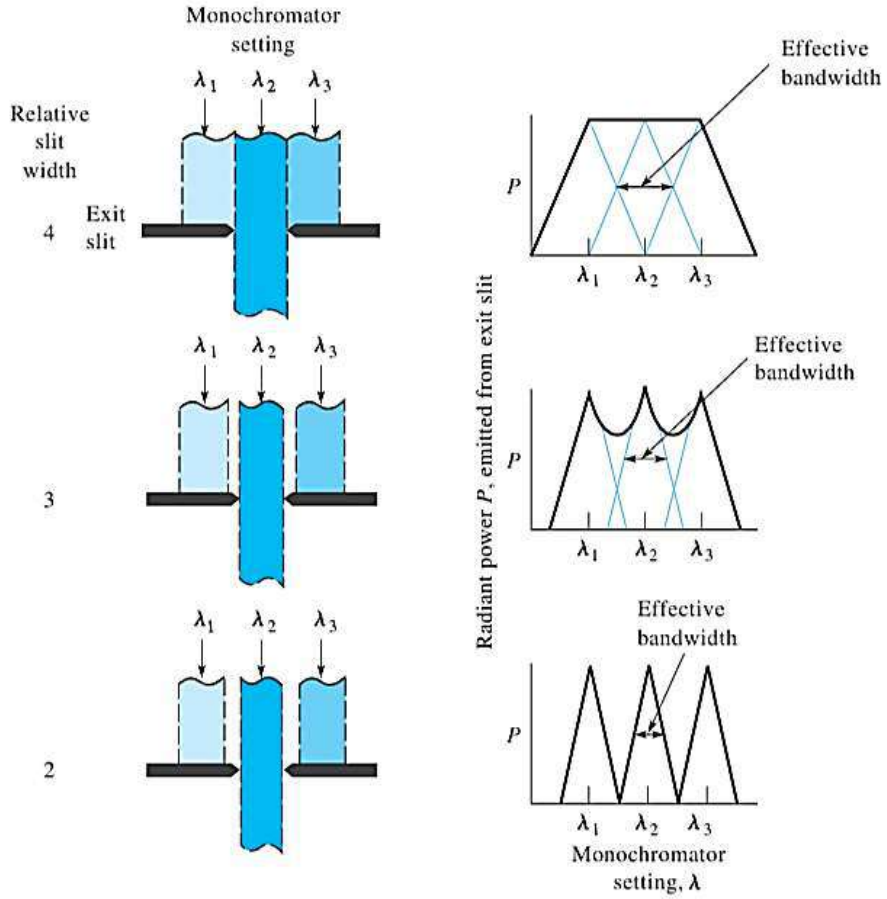
العلاقة بين عرض الحزمة والقدرة على التمييز

يوضح **الشكل (25)** العلاقة بين عرض الحزمة الفعال للجهاز وقدرته على تمييز القمم الطيفية. هنا، تُضاء فتحة الخروج بحزمة مكونة من ثلاثة خطوط متساوية التباعد عند الأطوال الموجية (λ_1، λ_2، λ_3)، مع افتراض تساوي شدتها.

- **الشكل العلوي:** عندما يكون عرض الحزمة الفعال مساوياً تماماً للفرق في الطول الموجي بين الخطوط، وعند ضبط المُوحد على (λ_2)، يملأ الإشعاع الشق تماماً. أي حركة للمُوحد في أي اتجاه تقلل من شدة الإشعاع (λ_2) النافذ ولكنها تزيد من شدة أحد الخطوط الأخرى بمقدار مكافئ. كما يظهر في الخط المتصل في الرسم البياني جهة اليمين، **لا يتم تحقيق أي فصل طيفي** للخطوط الثلاثة.
- **الشكل الأوسط:** تم تقليل عرض الحزمة الفعال بتضييق فتحات الشقوق إلى ثلاثة أرباع أبعادها الأصلية، مما ينتج عنه **فصل جزئي** للخطوط الثلاثة.

- **الشكل السفلي:** عندما يتم تقليل عرض الحزمة الفعال إلى نصف الفرق في الأطوال الموجية بين الحزم، يتم تحقيق **فصل كامل**.

الخلاصة: الفصل الكامل لخطين طيفيين ممكن فقط إذا تم ضبط عرض الشق بحيث يكون عرض الحزمة الفعال للمُوحد اللوني مساوياً لنصف الفرق في الطول الموجي بين الخطين.



الشكل 25: تأثير عرض الشق على الأطياف. فُتحة الدخول مضاءة بالأطوال الموجية λ_1 و λ_2 و λ_3 فقط. فتحات الدخول والخروج متطابقة. الرسوم البيانية على اليمين تظهر التغيرات في القدرة المنبعثة مع تغير إعداد المُوحد اللوني.

مثال (2)

مُوحد لوني بشبيكة له مقلوب تشتيت خطي مقداره **1.2 نانومتر/مم**، يُراد استخدامه لفصل خطي الصوديوم عند **588.9950 نانومتر** و **589.5924 نانومتر**. نظرياً، ما هو عرض الشق المطلوب؟

الحل: يتطلب الفصل الكامل للخطين أن يكون:

$$\Delta\lambda_{eff} = \frac{1}{2}(589.5924 - 588.9950) = 0.2987 \text{ nm}$$

بالتعويض في المعادلة (17) بعد إعادة ترتيبها نحصل على:

$$\Delta\lambda_{eff} = w \cdot D^{-1} \quad (17)$$

$$w = \frac{\Delta\lambda_{eff}}{D^{-1}} = \frac{0.2987 \text{ nm}}{1.2 \text{ nm/mm}} = 0.25 \text{ mm}$$

من المهم ملاحظة أن عروض الشقوق المحسوبة كما في المثال (2) هي عروض **نظرية**. نظراً للعيوب الموجودة في معظم المُوحدات اللونية، عادة ما يتطلب الأمر عروض شقوق أضيق من تلك النظرية لتحقيق القدرة على التمييز المطلوبة.

يوضح **الشكل (26)** تأثير عرض الحزمة على الأطياف التجريبية لأبخرة البنزين. لاحظ التفاصيل الطيفية الأكبر بكثير التي يمكن الحصول عليها مع إعداد الشق الأضيق، وبالتالي عرض الحزمة الأضيق.

اختيار عرض الشق

يعتمد عرض الحزمة الفعال للمُوحد اللوني على تشتيت الشبيكة أو المنشور وكذلك على عرض فتحتي الدخول والخروج. معظم المُوحدات مزودة بشقوق قابلة للتعديل بحيث يمكن تغيير عرض الحزمة الفعال. من المرغوب فيه استخدام الحد الأدنى لعرض الشق عند الحاجة لتمييز حزم امتصاص أو انبعاث ضيقة. من ناحية أخرى، تقل القدرة الإشعاعية المتاحة بشكل كبير عند تضييق الشقوق، ويصبح قياس القدرة بدقة أكثر صعوبة. لذا، قد تُستخدم شقوق أعرض في التحليل الكمي مقارنة بالعمل النوعي (الوصفي) الذي تكون فيه التفاصيل الطيفية مهمة.

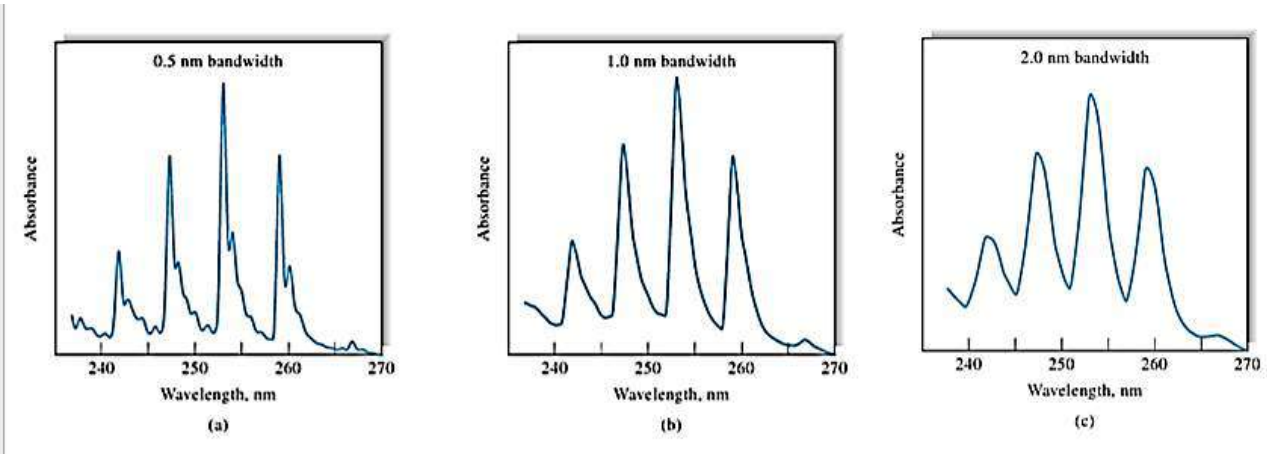
محددات أخرى للأطوال الموجية

بالإضافة إلى المُوحدات اللونية، تُستخدم أجهزة أخرى لتحديد الأطوال الموجية في المطيافية، وتشمل:

المُوحدات متعددة الأطوال الموجية (Polychromators)

تماماً كما يعزل المُوحد اللوني حزمة طول موجي واحدة، يعزل "المُوحد متعدد الأطوال الموجية" (Polychromator) عدة حزم في آن واحد. بدلاً من فتحة خروج واحدة، يحتوي هذا الجهاز على عدة فتحات خروج، مع وضع كاشف إشعاعي خلف كل منها، مما يسمح بمراقبة أطوال موجية متعددة.

- **الفائدة:** هذا الترتيب مفيد جداً في بعض أشكال المطيافية الذرية، حيث يسمح بمراقبة خطوط من عناصر مختلفة في وقت واحد.
- **المقارنة:** بينما لا يمكن للمُوحد اللوني تمرير إلا خط واحد في كل مرة، ولا يمكن مراقبة أطوال موجية متعددة إلا بالتسلسل عن طريق تغيير موضع الشبيكة بسرعة (وهو ما يُعرف بـ Slewing أو Slew-scanning).



الشكل 26: تأثير عرض الحزمة على التفاصيل الطيفية لأبخرة البنزين: 0.5 (a) نانومتر، 1.0 (b) نانومتر، 2.0 (c) نانومتر.

المطياف (Spectrographs)

المطياف (Spectrograph) هو جهاز لا يحتوي على شقوق خروج، بل يحتوي فقط على شق دخول. يُعرض الطيف مكانياً في المستوى البؤري. في الماضي، كانت القياسات الطيفية تُجرى باستخدام المطياف ولوحة فوتوغرافية موضوعة في المستوى البؤري؛ حيث يُعرض الطيف على طول اللوحة، وتكون المسافة على اللوحة مرتبطة بالطول الموجي، بينما كثافة الفضة المترسبة مرتبطة

بالشدة. أما اليوم، فتُستخدم **كواشف متعددة القنوات** (Multichannel transducers) تتكون من مصفوفة من عناصر صغيرة حساسة للضوء، وتوضع هذه المصفوفة في المستوى البؤري للمطياف.

مرشحات الضبط الصوتي البصري (Acousto-Optic Tunable Filters - AOTFs)

تقوم هذه المرشحات بتشتيت الإشعاع الساقط بناءً على تفاعله مع موجة فوق صوتية داخل بلورة صوتية-بصرية. تتكون من محول طاقة كهرضغطية (Piezoelectric transducer) مرتبط ببلورة مزدوجة الانكسار (Birefringent crystal) [20].

- **آلية العمل:** عند تطبيق إشارة بتردد راديوي (RF) على محول الطاقة، تتولد موجة صوتية تنتشر داخل البلورة مسببة تغيرات دورية في معامل الانكسار. تعمل البلورة حينها كـ "شبيكة حيود نفاذة" وتشتت الإشعاع الساقط وفقاً لطوله الموجي.
- **الضبط:** بالنسبة لتردد راديوي معين، يتم حيود حزمة ضيقة فقط من الأطوال الموجية بزاوية ثابتة. وعند تغيير التردد الراديوي، تتغير فترة تغير معامل الانكسار، مما يؤدي إلى تمرير حزمة مختلفة من الأطوال الموجية.

المميزات والتطبيقات:

- **السرعة:** يمكن ضبط الأطوال الموجية في مرشحات AOTF عبر مئات النانومترات في المناطق المرئية وتحت الحمراء القريبة، ويحدث الضبط بسرعة فائقة (بالمايكروثانية) بمجرد تغيير التردد الراديوي.
- **غياب الأجزاء المتحركة:** إحدى أهم مزاياها مقارنة بالشبيكات والمناشير هي عدم وجود أجزاء متحركة، مما يسمح بالمسح الطيفي السريع أو التنقل السريع بين طولين موجيين أو أكثر.
- **التطبيقات:** تتميز هذه المرشحات بمجال رؤية واسع، مما يجعلها مفيدة جداً في تطبيقات "التصوير الطيفي" (Spectral imaging) مثل المجهر الفلوري. كما تُستخدم في مطيافية الإثارة والانبعاث الفلوري، وفي مطيافية الأشعة تحت الحمراء القريبة (NIR)، حيث أثبتت سرعتها ومتانتها قدرتها على تمكين تطبيقات تشخيصية وتحليلية جديدة.

حاويات العينات (Sample Containers)

تُعد حاويات العينات ضرورية لجميع الدراسات الطيفية باستثناء "مطيافية الانبعاث". يجب أن تُصنع الخلايا، أو ما يُعرف بـ "الكوفيت" (Cuvettes)، من مادة شفافة للإشعاع في المنطقة الطيفية محل الدراسة:

- **المنطقة فوق البنفسجية (UV):** كما هو موضح في الشكل (2)، يلزم استخدام الكوارتز أو السيليكا المصهورة للعمل في هذه المنطقة (أقل من 350 نانومتر). كلا المادتين شفافتان أيضاً في المنطقة المرئية وحتى حوالي 3 ميكرومتر في منطقة الأشعة تحت الحمراء (IR).
- **المنطقة المرئية:** يمكن استخدام زجاج السيليكات في المنطقة ما بين 350 و 2000 نانومتر، كما استُخدمت الحاويات البلاستيكية أيضاً في المنطقة المرئية.
- **منطقة الأشعة تحت الحمراء (IR):** تُعد بلورات كلوريد الصوديوم المادة الأكثر شيوعاً لنوافذ الخلايا في هذه المنطقة؛ كما يمكن استخدام المواد الأخرى الشفافة للأشعة تحت الحمراء والمدرجة في الشكل (2).

[20] انكسار مضاعف (Birefringence): هو خاصية للمواد ذات معاملات انكسار تعتمد على استقطاب واتجاه انتشار الإشعاع الساقط. يعمل انكسار الضوء المزدوج على تقسيم الحزمة الساقطة إلى حزمتين مستقطبتين بشكل متعامد. المواد البلورية مثل الكالسيت، والكوارتز، وثاني أكسيد التيلوريوم (TeO_2) تظهر هذه الخاصية وتسمى بلورات متباينة الخواص (Anisotropic).

كواشف الإشعاع (Radiation Transducers)

كانت الكواشف في الأجهزة الطيفية المبكرة تعتمد على العين البشرية أو اللوحات والأفلام الفوتوغرافية. أما اليوم، فقد حلت "المحولات" (Transducers) التي تحول الطاقة الإشعاعية إلى إشارة كهربائية محل هذه الأجهزة بالكامل تقريباً. سنركز هنا على المحولات الحديثة.

خصائص المحول المثالي

المحول المثالي هو الذي يمتلك حساسية عالية[21]، ونسبة إشارة إلى ضجيج عالية، واستجابة ثابتة عبر نطاق واسع من الأطوال الموجية. بالإضافة إلى ذلك، يجب أن يمتلك زمن استجابة سريعاً، وألا يُنتج أي إشارة خرج في حالة عدم وجود إضاءة (الظلام). وأخيراً، يجب أن تكون الإشارة الكهربائية الناتجة متناسبة طردياً مع القدرة الإشعاعية (P):

$$S = kP \quad (18)$$

حيث (S) هي خرج التيار أو الجهد للمحول، و(k) هي حساسية المعايرة.

المحولات الواقعية (الظاهرة المظلمة)

تُظهر العديد من المحولات الواقعية استجابة صغيرة وثابتة تُعرف بـ **"الإشارة المظلمة" (Dark signal)** عند غياب الإشعاع. وتوصف استجابة هذه المحولات بالعلاقة:

$$S = kP + k_d \quad (19)$$

حيث (k_d) تمثل الإشارة المظلمة (تيار أو جهد)، والتي عادة ما تكون ثابتة خلال فترات القياس القصيرة. غالباً ما تكون الأجهزة التي تستخدم محولات ذات إشارة مظلمة مجهزة بدائرة تعويض تقلل (k_d) إلى الصفر، لتعود المعادلة (18) للتطبيق.

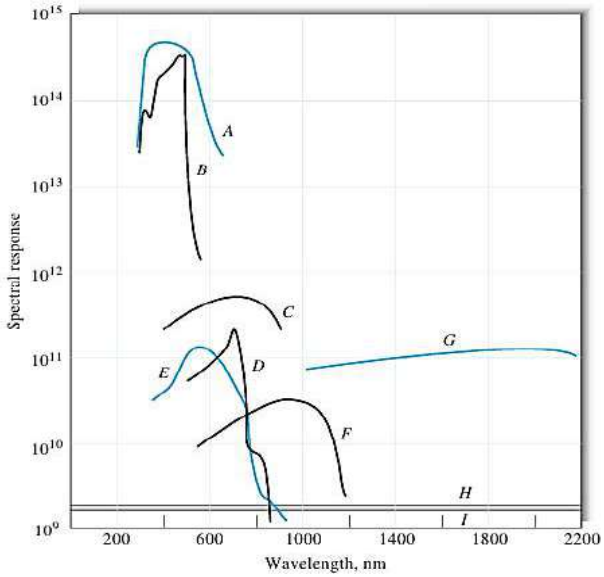
أنواع محولات الإشعاع

هناك نوعان عامان من محولات الإشعاع (كما في الشكل b3):

1. **محولات الفوتونات (Photon Transducers):** وتسمى أيضاً الكواشف الكهروضوئية أو الكمية، وتمتلك سطحاً نشطاً يمتص الإشعاع.
   - في بعض الأنواع، تسبب الطاقة الممتصة انبعاث إلكترونات وإنتاج تيار ضوئي.
   - في أنواع أخرى، ترفع الإشعاعات الإلكترونات إلى حزم التوصيل، ويعتمد الكشف هنا على زيادة الموصلية الناتجة (التوصيل الضوئي).
   - تُستخدم بشكل أساسي لقياس إشعاعات UV والمرئية وNear-IR. عند استخدامها لأطوال موجية أطول من 3 ميكرومتر، يجب تبريدها (باستخدام الثلج الجاف أو النيتروجين السائل) لتجنب الضجيج الحراري.
2. **المحولات الحرارية (Thermal Transducers):** تُستخدم على نطاق واسع لكشف إشعاع IR، وتستجيب للقدرة المتوسطة للإشعاع الساقط.

ملاحظة هامة: الفرق بينهما جوهري لأن "ضجيج الطلقة" (Shot noise) غالباً ما يحد من أداء كواشف الفوتونات، بينما يحد "الضجيج الحراري" (Thermal noise) من أداء المحولات الحرارية.

[21] For a comparison of the performance characteristics of the three most sensi tive and widely used photon transducers—photomultipliers, silicon diodes, and charge-transfer devices—see W. E. L. Grossman, J. Chem. Educ., 1989, 66, 697, DOI: 10.1021/ed066p697.



الشكل 27: الاستجابة الطيفية النسبية لأنواع مختلفة من محولات الإشعاع:

- (A) أنبوب مضاعف ضوئي (Photomultiplier).
- (B) كادميوم سلفيد (CdS) للتوصيل الضوئي.
- (C) خلية غاليوم أرسينيد (GaAs) ضوئية جهدية.
- (D) كادميوم سيلينيد (CdSe) للتوصيل الضوئي.
- (E) خلية سيلينيوم/سيلينيوم أكسيد (Se/SeO) ضوئية جهدية.
- (F) ثنائي ضوئي من السيليكون (Silicon photodiode).
- (G) كادميوم سلفيد (PbS) للتوصيل الضوئي.
- (H) مزدوج حراري (Thermocouple).
- (I) خلية "جولاي" (Golay cell). *(ملاحظة: الاستجابة النسبية للمحولات الحرارية H و I مستقلة عن الطول الموجي ولكنها أقل بكثير في الحساسية من المحولات الكهروضوئية).*

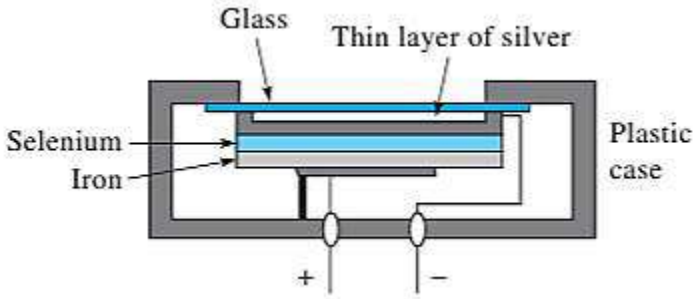
محولات الفوتونات (Photon Transducers)

تشمل الأنواع المتاحة: (1) خلايا ضوئية جهدية، (2) أنابيب ضوئية، (3) أنابيب مضاعفة ضوئية، (4) محولات التوصيل الضوئي، (5) ثنائيات ضوئية من السيليكون، (6) محولات نقل الشحنة.

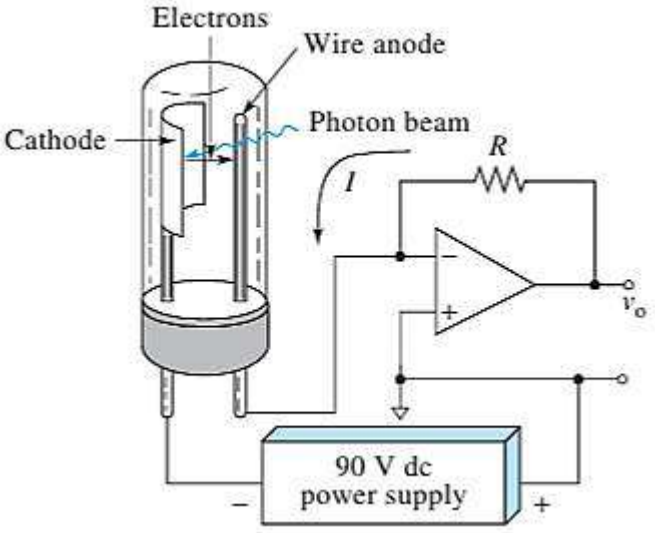
خلايا الطبقة الحاجزة الضوئية (Barrier-Layer Photovoltaic Cells)

هي جهاز بسيط يُستخدم لكشف وقياس الإشعاع في المنطقة المرئية. تصل حساسيتها القصوى عند حوالي 550 نانومتر، وهو نطاق مشابه لنطاق العين البشرية.

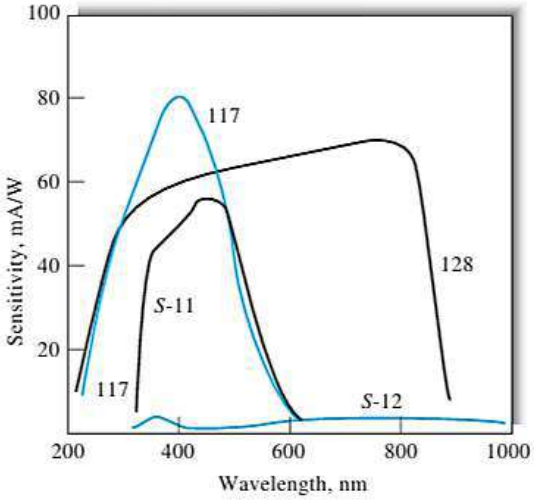
- **التركيب (انظر الشكل 28):** تتكون من قطب مسطح من النحاس أو الحديد، توضع عليه طبقة من مادة شبه موصلة (مثل السيلينيوم). يُطلى السطح الخارجي للسطح شبه الموصل بغشاء معدني رقيق وشفاف من الذهب أو الفضة (القطب الجامع).
- **آلية العمل:** عندما يصل إشعاع ذو طاقة كافية إلى المادة شبه الموصلة، تتكون أزواج من الإلكترونات والفجوات. تهاجر الإلكترونات إلى الغشاء المعدني، بينما تهاجر الفجوات إلى القاعدة. ينتج عن ذلك تيار كهربائي يتناسب طردياً مع عدد الفوتونات الساقطة.
- **القياس:** تكون التيارات الناتجة (عادة 10 إلى 100 ميكرو أمبير) كبيرة بما يكفي لقياسها بمقياس ميكرو أمبير (Microammeter).



الشكل 28: مخطط تخطيطي لخلية الطبقة الحاجزة النموذجية. (يوضح ترتيب القطب المعدني الأساسي، طبقة السيلينيوم شبه الموصلة، والغشاء المعدني الرقيق الشفاف في الأعلى).



الشكل 29: أنبوب ضوئي مع دارة تضخيم (Op amp readout). يؤدي التيار الضوئي المستحث بفعل الإشعاع إلى هبوط في الجهد عبر المقاومة (R)، والذي يظهر كـ (v_o) عند مخرج محول التيار إلى جهد. يمكن عرض هذا الجهد على مقياس أو تسجيله بواسطة نظام تجميع البيانات.



الشكل 30: الاستجابة الطيفية لبعض الأسطح الباعثة للضوء النموذجية. (من: F. E. Lytle، مجلة *Anal. Chem*، 1974، 46، a545، حقوق النشر 1974 الجمعية الكيميائية الأمريكية).

الأنابيب الضوئية المفرغة (Vacuum Phototubes)

الأنبوب الضوئي المفرغ هو جهاز كهروضوئي يتكون من مهبط (Cathode) نصف أسطواني ومصعد (Anode) سلكي، كلاهما مغلق داخل غلاف زجاجي شفاف مفرغ من الهواء [22].

- **آلية العمل:** يحتوي السطح المقعر للمهبط على مادة "باعثة للضوء" (Photoemissive) تنبعث منها الإلكترونات عند تعرضها للإشعاع. عند تطبيق جهد كهربائي، تتدفق الإلكترونات المنبعثة إلى المصعد السلكي، مما يولد تياراً ضوئياً.
- **المميزات:** على الرغم من أن التيار الناتج يعادل عُشر التيار الناتج عن الخلية الضوئية الجهدية لنفس شدة الإشعاع، إلا أنه يمكن تضخيم هذا التيار بسهولة لأن الأنبوب الضوئي يمتلك مقاومة كهربائية عالية.
- **التشغيل:** يتناسب عدد الإلكترونات المنبعثة طردياً مع القدرة الإشعاعية. عند زيادة الجهد المطبق، يزداد عدد الإلكترونات التي تصل للمصعد حتى الوصول إلى "جهد التشبع"، حيث يصبح التيار مستقلاً عن الجهد ومتناسباً فقط مع القدرة الإشعاعية. تُشغل هذه الأنابيب عادة عند جهد 90 فولت.
- **أنواع الأسطح الباعثة للضوء:** تتوفر أنواع متعددة تجارياً (عالية الحساسية، حساسة للضوء الأحمر، حساسة للأشعة فوق البنفسجية، ذات استجابة مسطحة).

التيار المظلم: تنتج الأنابيب الضوئية تياراً مظلماً صغيراً (كما في المعادلة 19) ناتجاً عن الانبعاث الإلكتروني الحراري أو النشاط الإشعاعي الطبيعي لعنصر البوتاسيوم-40 (^{40}K) الموجود في زجاج الأنبوب.

الأنابيب المضاعفة الضوئية (Photomultiplier Tubes - PMTs)

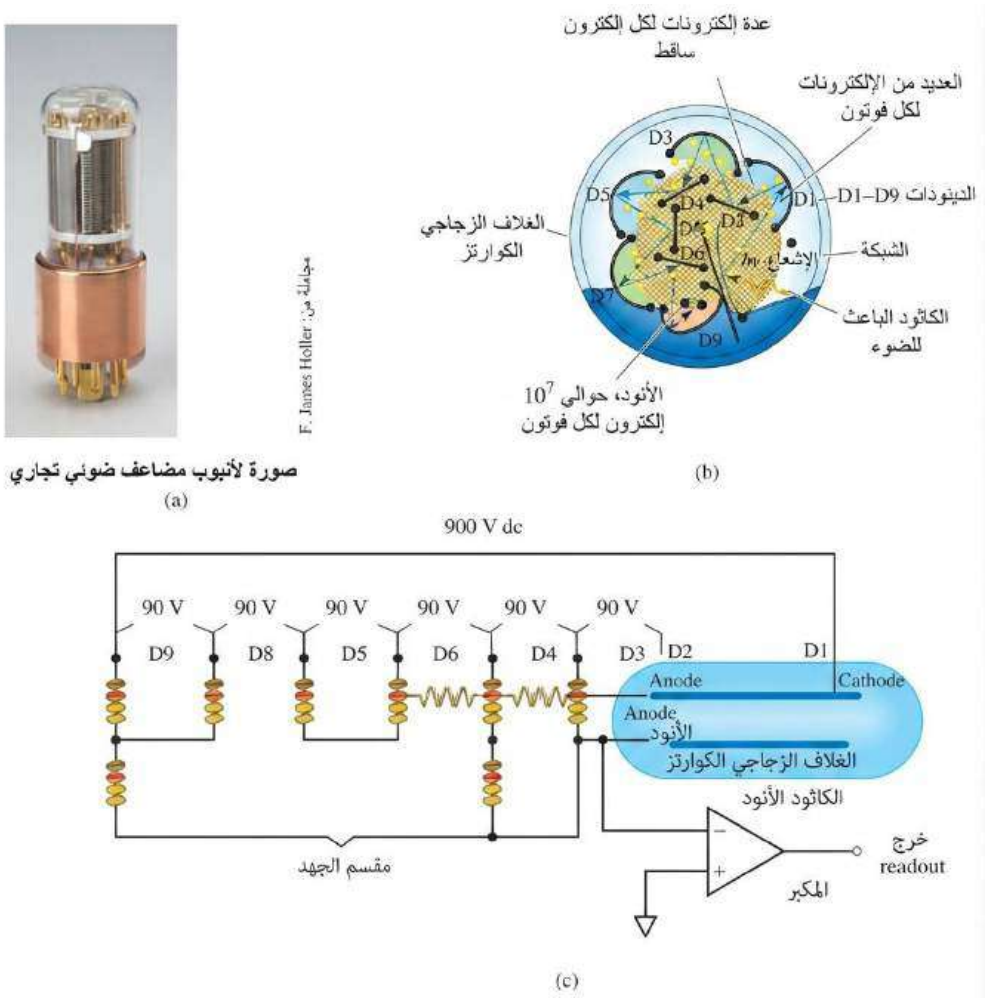
تُستخدم هذه الأنابيب لقياس القدرة الإشعاعية المنخفضة جداً وتوفر مزايا كبيرة مقارنة بالأنابيب الضوئية العادية [23].

[22] For a practical, although somewhat dated, discussion of vacuum phototubes and photomultiplier tubes and circuits, see F. E. Lytle, Anal. Chem., 1974, 46, 545A, DOI: 10.1021/ac60342a718.

[23] For a detailed discussion of the theory and applications of photomultipli ers, see Photomultiplier Tubes: Basics and Applications, Hamamatsu Photonics, K. K., Hamamatsu City, Japan, 2006; R. W. Engstrom, Photomultiplier Handbook, Lancaster, PA: RCA Corporation, 1980.

- **آلية العمل (انظر الشكل 31):** يتكون الأنبوب من مهبط ضوئي (Photocathode) مشابه في تكوينه للأنابيب الضوئية، بالإضافة إلى تسعة أقطاب إضافية تُسمى **"الدينودات" (Dynodes)**.
  1. يُحافظ على جهد الدينود الأول (D1) أعلى بـ 90 فولت عن المهبط، مما يسرع الإلكترونات نحوه.
  2. يؤدي اصطدام الإلكترون بالدينود إلى انبعاث عدة إلكترونات إضافية.
  3. تتسارع هذه الإلكترونات الجديدة نحو الدينود الثاني (D2)، وهكذا دواليك.
- **التضخيم:** بتكرار هذه العملية تسع مرات، يتكون من 10^6إلى 10^7إلكترون لكل فوتون واحد ساقط. أخيراً، تُجمع هذه الإلكترونات عند المصعد ويُحول التيار الناتج إلى جهد كهربائي ليتم قياسه.

يوضح المنحنى (A) في الشكل (27) أن المضاعفات الضوئية حساسة للغاية لإشعاعات الأشعة فوق البنفسجية والمرئية، بالإضافة إلى أنها تمتلك أوقات استجابة سريعة للغاية. غالباً ما تكون حساسية الجهاز الذي يستخدم مضاعفاً ضوئياً محدودة بـ "تياره المظلم"؛ وبما أن الانبعاث الحراري هو المصدر الرئيسي لإلكترونات التيار المظلم، يمكن تحسين أداء المضاعف الضوئي عن طريق التبريد. في الواقع، يمكن القضاء على التيارات المظلمة الحرارية فعلياً عن طريق تبريد الكاشف إلى -30 درجة مئوية، وتتوفر تجارياً مبيتات للكواشف يمكن تبريدها عن طريق تدوير سائل تبريد مناسب. تُعد المضاعفات الضوئية (PMTs) محدودة بقياس الإشعاعات ذات القدرة المنخفضة لأن الضوء الشديد يسبب ضرراً لا يمكن إصلاحه للسطح الكهروضوئي؛ ولهذا السبب، يُوضع الجهاز دائماً في حجرة محكمة الإغلاق ضد الضوء، مع توخي الحذر لتجنب تعريضه ولو للحظة لضوء النهار أو أي ضوء قوي آخر أثناء تشغيله. ومع استخدام دوائر خارجية مناسبة، يمكن للمضاعفات الضوئية الكشف عن وصول فوتونات فردية إلى المهبط الضوئي.
تتوفر أيضاً مضاعفات ضوئية مزودة بـ "لوحات القنوات الدقيقة" (Microchannel plates) بدلاً من الدينودات التقليدية، وغالباً ما تسمى هذه الأجهزة بـ "مكثفات الصورة" (Image intensifiers). تتكون لوحة القناة الدقيقة من عدد كبير من الشعيرات الزجاجية المجمعة بشكل متوازٍ على شكل قرص رقيق. فعندما يصطدم إلكترون أولي بالجدار الداخلي للقناة، تنبعث إلكترونات ثانوية، والتي تُسرع بواسطة مجال كهربائي مطبق عبر اللوحة وتصطدم مرة أخرى بجدران القناة، مما يؤدي إلى توليد إلكترونات ثانوية إضافية؛ وتتكرر هذه العملية عدة مرات على طول القناة، مما ينتج عدداً كبيراً من الإلكترونات عند المصعد. تُستخدم هذه المضاعفات في تطبيقات التصوير منخفض المستوى، وفي التقنيات التي تتطلب استجابة سريعة جداً، وفي التطبيقات ذات الإضاءة المنخفضة التي تكشف عن فوتونات فردية (عد الفوتونات). كما يمكن تشغيل وإيقاف جهد لوحة القناة الدقيقة بسرعة لتوفير "بوابة" (Gating) للتطبيقات التي تتطلب تمييزاً زمنياً (مثل قياسات عمر الفلورة، ومطيافية الانهيار المستحث بالليزر، وغيرها).
تتكون محولات "الثنائي الضوئي السيليكوني" (Silicon photodiode) من وصلة (pn) منحازة عكسياً مشكلة على رقاقة سيليكون. وكما هو موضح في الشكل (32)، يخلق الانحياز العكسي "طبقة نضوب" (Depletion layer) تقلل موصلية الوصلة إلى الصفر تقريباً. ومع ذلك، إذا سقط إشعاع على الرقاقة، تتكون ثقوب وإلكترونات في طبقة النضوب وتنجذب إلى القطب المناسب لإنتاج تيار يتناسب مع القدرة الإشعاعية. وهي تتطلب فقط مصادر طاقة ذات جهد منخفض أو يمكن تشغيلها بدون انحياز؛ ولهذا السبب، تُستخدم على نطاق واسع في الأجهزة المحمولة التي تعمل بالبطاريات. تُعد الثنائيات الضوئية السيليكونية أكثر حساسية من الأنابيب الضوئية المفرغة ولكنها أقل حساسية من المضاعفات الضوئية (PMTs) (انظر المنحنى F في الشكل 27)، وتمتد نطاقاتها الطيفية من حوالي 190 إلى أكثر من 2000 نانومتر. يمتلك "الثنائي الضوئي من نوع pin" منطقة جوهرية (غير مشوبة) بين المنطقتين المشوبتين بـ (p) و (n)، وبالتالي فهو يمتلك منطقة نضوب كبيرة نسبياً. يتم معظم امتصاص الفوتونات في المنطقة الجوهرية، مما يؤدي إلى نشوء حاملات شحنة يتم تجميعها بكفاءة. وبالمقارنة مع الثنائيات الضوئية العادية (pn)، يمتلك الثنائي الضوئي من نوع (pin) كفاءة كمية أعلى ووقت استجابة أسرع بسبب انخفاض سعه الكهربائي (Capacitance).

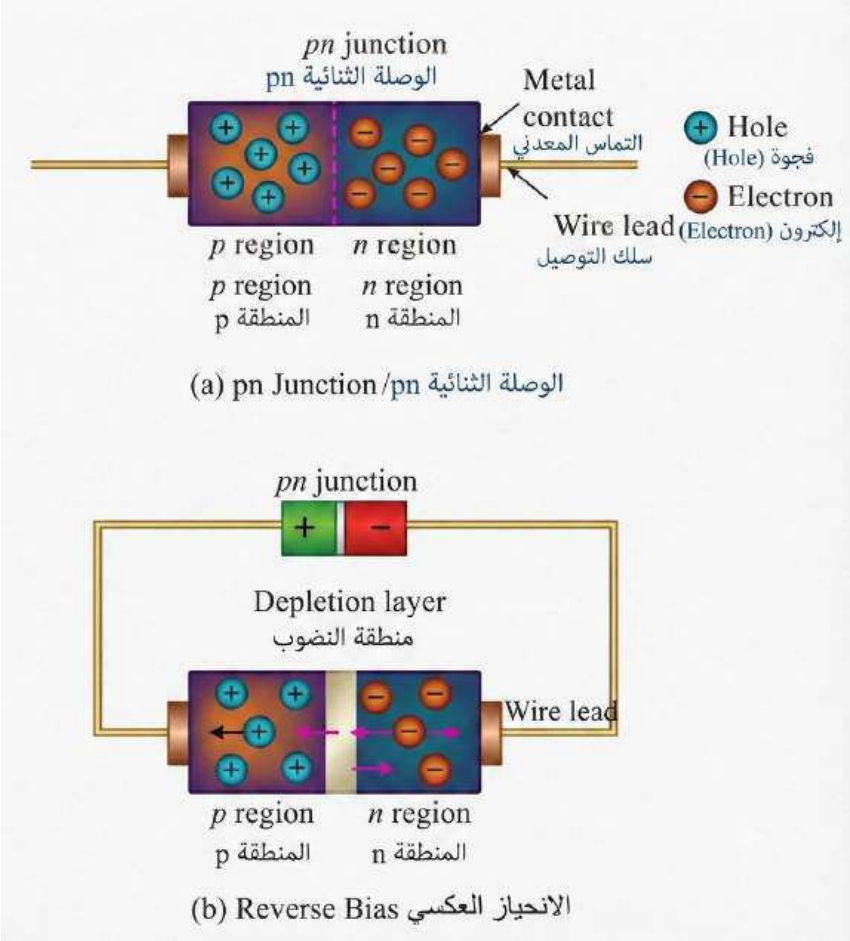


الشكل 31: أنبوب مضاعف ضوئي: (a) صورة فوتوغرافية لأنبوب تجاري نموذجي؛ (b) مقطع عرضي؛ (c) مخطط كهربائي يوضح استقطاب الدينودات وقياس التيار الضوئي.

- *شرح الشكل:* يؤدي الإشعاع الساقط على المهبط الحساس للضوء (b) إلى انبعاث إلكترونات ضوئية بفعل التأثير الكهروضوئي. يُحافظ على الدينود (D1) عند جهد موجب بالنسبة للمهبط الضوئي، فتنجذب الإلكترونات المنبعثة من المهبط إلى الدينود الأول وتتسارع في المجال الكهربائي. كل إلكترون يصطدم بالدينود (D1) يؤدي إلى انبعاث إلكترونين إلى أربعة إلكترونات ثانوية، تنجذب بدورها إلى الدينود (D2)، الذي يكون أيضاً موجباً بالنسبة لـ (D1). يمكن أن يصل التضخيم الناتج عند المصعد إلى 10^6أو أكثر. يعتمد عامل التضخيم الدقيق على عدد الدينودات وفرق الجهد بين كل منها. هذا التضخيم الداخلي التلقائي هو إحدى المزايا الرئيسية للمضاعفات الضوئية. باستخدام الأجهزة الحديثة، يمكن كشف وعد نبضات التيار الضوئي الفردية بدلاً من قياسها كمتوسط تيار، وتُسمى هذه التقنية "عد الفوتونات"، وهي مفيدة جداً عند مستويات الإضاءة المنخفضة جداً.

الثنائيات الضوئية الانهيارية (Avalanche Photodiodes)

الثنائي الضوئي الانهياري هو ثنائي ضوئي سيليكوني يتميز بوجود "كسب" (Gain). كما هو الحال في الثنائي الضوئي العادي، تولد الفوتونات الساقطة أزواجاً من الإلكترونات والفجوات. يتم تشغيل الثنائي الانهياري عند انحياز عكسي عالٍ نسبياً، يتراوح عادة بين عشرات أو مئات الفولتات، بالقرب من "جهد الانهيار" (Breakdown voltage) للجهاز. يعمل المجال الكهربائي الداخلي القوي على تسريع الإلكترونات عبر الشبكة البلورية للسيليكون، مما يؤدي إلى إنشاء إلكترونات ثانوية من خلال عملية "التأين التصادمي" (Impact ionization). يمكن أن تؤدي "انهيارات" الإلكترونات الناتجة عن هذه العملية إلى كسب يصل إلى عدة مئات.



الشكل 32: (a) مخطط تخطيطي لثنائي سيليكوني. (b) تكون طبقة النضوب، التي تمنع تدفق الكهرباء تحت الانحياز العكسي.

المضاعفات الضوئية السيليكونية (SiPMs)

تمتلك الثنائيات الضوئية الانهيارية مساحة نشطة أصغر بكثير من أنابيب المضاعفات الضوئية (PMT) التقليدية. ومع ذلك، تم تصنيع مصفوفات من هذه الثنائيات بمساحات نشطة تقترب من مساحة المضاعف الضوئي العادي، وتُسمى تجارياً بـ **المضاعفات الضوئية السيليكونية (SiPMs)**.

- **المميزات:** تمتلك هذه الأجهزة كسباً يقارن بكسب المضاعف الضوئي القياسي (يصل إلى أقل من 10^6)، ولكن بجهد تشغيل يتراوح بين 20 و100 فولت فقط، وهو أقل بكثير من جهد تشغيل المضاعف الضوئي التقليدي.
- **الأداء:** تتميز SiPMs بكفاءة كشف للفوتونات تتراوح بين 20% إلى 50%، واستجابة سريعة جداً. كما أنها تغطي نطاقاً طيفياً من الأشعة فوق البنفسجية إلى تحت الحمراء، وهي أكثر دمجاً (أصغر حجماً) من المضاعفات الضوئية التقليدية.
- **التطبيقات:** نظراً لحساسيتها للفوتونات الفردية وقدرتها على "عد الفوتونات"، تُستخدم SiPMs في أجهزة التصوير الطبي، مثل أجهزة التصوير المقطعي بالإصدار البوزيتروني (PET) وأجهزة التصوير المقطعي المحوسب بإصدار فوتون واحد (SPECT).

محولات الفوتونات متعددة القنوات (Multichannel photon Transducers)

كان أول كاشف متعدد القنوات يُستخدم في المطيافية هو اللوح الفوتوغرافي أو شريط الفيلم، الذي كان يوضع على طول المستوى البؤري للمطياف بحيث يمكن تسجيل جميع خطوط الطيف في وقت واحد. يعتبر الكشف الفوتوغرافي حساساً نسبياً، حيث تستجيب

بعض المستحلبات لما لا يقل عن 10 إلى 100 فوتون. ومع ذلك، فإن القيد الرئيسي لهذا النوع من الكواشف هو الوقت اللازم لتحميض (تظهير) صورة الطيف وتحويل سواد المستحلب إلى شدة إشعاعية.

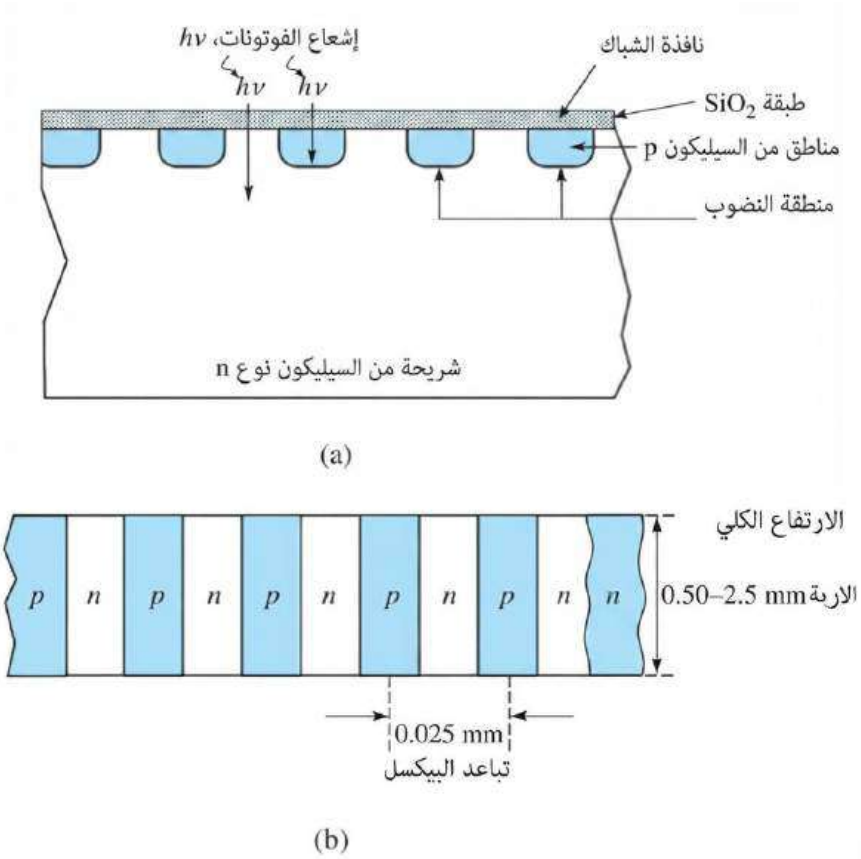
تتكون المحولات متعددة القنوات الحديثة [24] من مصفوفة من عناصر صغيرة حساسة للضوء مرتبة إما بشكل خطي أو في نمط ثنائي الأبعاد على رقاقة أشباه موصلات واحدة. تحتوي هذه الرقاقة، التي عادة ما تكون من السيليكون وتتراوح أبعادها عادةً بضعة مليمترات، أيضاً على دوائر إلكترونية لتوفير إشارة خرج من كل عنصر إما بشكل تسلسلي أو متزامن. للدراسات المطيافية، يتم وضع المحول متعدد القنوات عموماً في المستوى البؤري للمطياف (Spectrograph) بحيث يمكن تحويل وقياس العناصر المختلفة للطيف المشتت في وقت واحد.

تُستخدم ثلاثة أنواع من الأجهزة متعددة القنوات في الأجهزة المطيافية التجارية: **مصفوفات الثنائيات الضوئية (PDAs)**، **أجهزة حقن الشحنة (CIDs)**، و**أجهزة مزدوجة الشحنة (CCDs)**. تُعد الـ PDAs محولات أحادية البعد حيث يتم ترتيب العناصر الحساسة للضوء خطياً على وجه المحول. على النقيض من ذلك، يتم تشكيل العناصر الفردية الحساسة للضوء في أجهزة CID وCCD عادةً كمصفوفات ثنائية الأبعاد. تعمل محولات حقن الشحنة ومزدوجة الشحنة عن طريق تجميع الشحنات المتولدة ضوئياً في مناطق مختلفة من سطح المحول ثم قياس كمية الشحنة المتراكمة في فترة وجيزة. في كلا الجهازين، يتم القياس عن طريق نقل الشحنة من منطقة التجميع إلى منطقة الكشف. ولهذا السبب، يُطلق على هذين النوعين من المحولات أحياناً اسم **أجهزة نقل الشحنة (CTDs)**. تحظى هذه الأجهزة باستخدام واسع النطاق كمحولات صور لتطبيقات التلفزيون، وللتصوير المطيافي، وفي علم الفلك.

مصفوفات الثنائيات الضوئية (Photodiode Arrays)

في مصفوفة الثنائيات الضوئية (PDA)، تكون العناصر الفردية الحساسة للضوء عبارة عن ثنائيات ضوئية سيليكونية صغيرة، يتكون كل منها من وصلة (pn) منحازة عكسياً (انظر القسم السابق). الثنائيات الضوئية الفردية هي جزء من دائرة متكاملة واسعة النطاق مشكلة على رقاقة سيليكون واحدة. يوضح **الشكل (33)** هندسة المنطقة السطحية لبعض عناصر المحول؛ حيث يتكون كل عنصر من شريط مشوب من النوع (p) في ركيزة سيليكون من النوع (n) لإعطاء منطقة سطحية تتكون من سلسلة من العناصر أو "البكسلات" (Pixels) المتجاورة. غالباً ما تكون البكسلات متباعدة بمقدار 25 ميكرومتر ولها ارتفاعات تتراوح من 0.5 إلى 2.5 مم (**الشكل b33**). تتوفر أيضاً بكسلات مربعة بأبعاد صغيرة تصل إلى 14 × 14 ميكرومتر. الإشعاع الساقط على هذه العناصر يخلق شحنات في كل من منطقتي (p) و (n). تُجمع الشحنات الموجبة وتُخزن في الأشرطة من النوع (p) للتكامل اللاحق (تتوزع الشحنات المتكونة في مناطق nتناسبياً بين منطقتي pالمتجاورتين). يتراوح عدد عناصر المحول في الرقاقة من 64 إلى 4096، ويعتبر العدد 1024 هو الأكثر استخداماً على نطاق واسع.

[24] For a discussion of multichannel photon detectors, see D. J. Brady, Optical Imaging and Spectroscopy, Ch. 5, Hoboken, NJ: Wiley, 2009; J. M. Harnly and R. E. Fields, Appl. Spectros., 1997, 51, 334A, DOI: 10.1366/0003702971941971; J. V. Sweedler, K. L. Ratzlaff, and M. B. Denton, eds., Charge-Transfer Devices in Spectroscopy, New York: VCH, 1994; J. V. Sweedler, Crit. Rev. Anal. Chem., 1993, 24, 59, DOI: 10.1080/10408349308048819.



الشكل 33: كاشف مصفوفة ديود خطي منحاز عكسياً: (a) مقطع عرضي، و(b) منظر علوي.

آلية عمل مصفوفات الثنائيات الضوئية (PDAs)

تحتوي الدائرة المتكاملة التي تشكل مصفوفة الثنائيات أيضاً على مكثف تخزين ومفتاح لكل ثنائي، بالإضافة إلى دائرة للمسح المتسلسل لدوائر الثنائي-المكثف الفردية. يوضح **الشكل (34)** رسماً مبسطاً لترتيب هذه المكونات؛ حيث يوجد مكثف تخزين (10 بيكوفاراد) متصل على التوازي مع كل ثنائي ضوئي. يتم توصيل كل زوج (ثنائي-مكثف) بشكل متسلسل بخط إخراج مشترك بواسطة "مسجل الإزاحة" (Shift register) والمفاتيح الترانزستورية.

- **دورة العمل:** يغلق مسجل الإزاحة كل مفتاح متسلسلاً، مما يتسبب في شحن المكثف لحظياً بجهد 5 فولت، وهو ما يخلق انحيازاً عكسياً عبر وصلة (pn) للكاشف. عندما يسقط الإشعاع على طبقة النضوب، تتكون شحنات (إلكترونات وفجوات) تنشئ تياراً يفرغ المكثف جزئياً. في الدورة التالية، يتم تعويض الشحنة المفقودة، ويقوم مضخم أولي بدمج (تكامل) تيار الشحن الناتج، لينتج جهداً يتناسب مع شدة الإشعاع. بعد التضخيم، تمر الإشارة التناظرية إلى "محول تناظري-رقمي" ثم إلى الحاسوب الذي يتحكم في عملية القراءة.
- **الأداء:** عند استخدام مصفوفة الثنائيات، يتم ضبط عرض شق المطياف بحيث تملأ صورة شق الدخول المساحة السطحية لأحد الثنائيات. المعلومات التي يتم الحصول عليها تعادل تلك المسجلة أثناء المسح بجهاز طيفي تقليدي، لكن مع المصفوفة، يتم تجميع معلومات الطيف بالكامل تقريباً في وقت واحد وبشكل عناصر منفصلة. تمتلك مصفوفات الثنائيات الضوئية أوقات استجابة سريعة جداً (بالنانو ثانية)، وتتوفر مع واجهات من "لوحات القنوات الدقيقة" لزيادة الكسب والسماح بكشف مستويات الضوء المنخفضة.

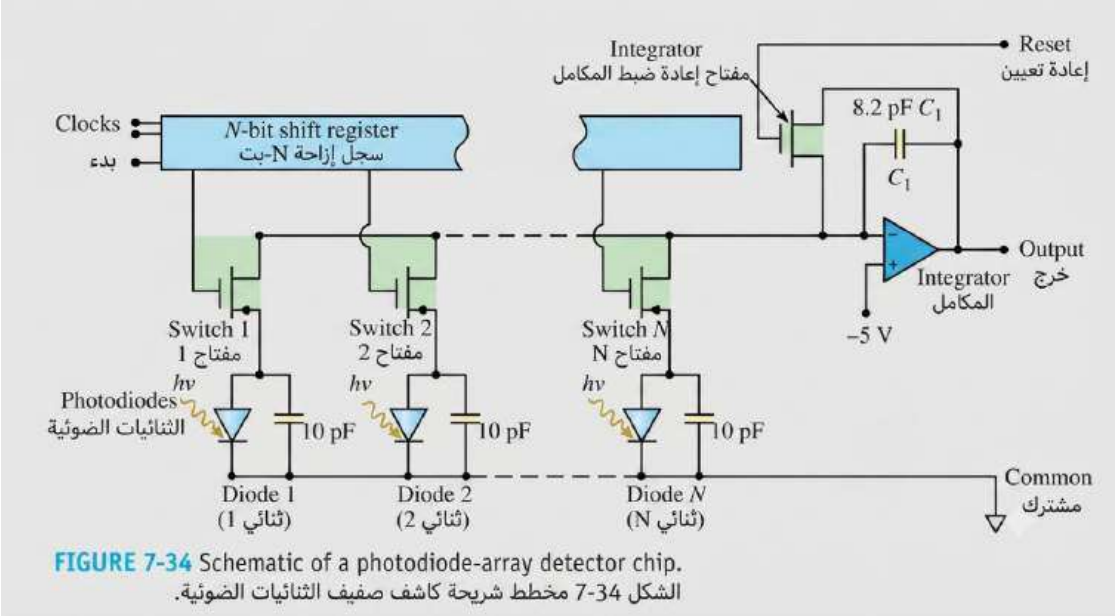


FIGURE 7-34 Schematic of a photodiode-array detector chip.
الشكل 7-34 مخطط شريحة كاشف صفيف الثنائيات الضوئية.

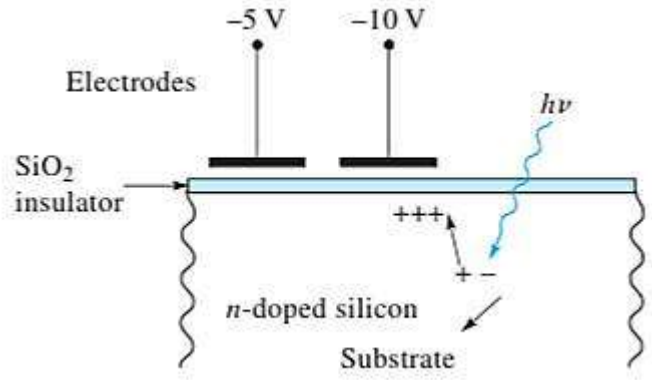
الشكل 34: مخطط تخطيطي لرقاقة كاشف مصفوفة الثنائيات الضوئية.

أجهزة نقل الشحنة (Charge-Transfer Devices - CTDs)

لا تستطيع مصفوفات الـ PDAs مطابقة أداء المضاعفات الضوئية (PMTs) من حيث الحساسية، والمدى الديناميكي، ونسبة الإشارة إلى الضجيج. في المقابل، تقترب خصائص أداء أجهزة نقل الشحنة (CTDs) من أداء المضاعفات الضوئية أو تتفوق عليها أحياناً، بالإضافة إلى ميزتها في تعدد القنوات [25].

- **الميزة الثنائية الأبعاد:** الميزة الإضافية هي ترتيب عناصر المحول في صفوف وأعمدة. على سبيل المثال، أحد الكواشف يحتوي على 244 صفاً و388 عموداً، مما ينتج مصفوفة ثنائية الأبعاد من 19,672 بكسل على رقاقة سيليكون صغيرة (6.5 × 8.7 مم). هذا يسمح بتسجيل طيف كامل ثنائي الأبعاد من مطياف "إيشيل" في وقت واحد.
- **آلية العمل (انظر الشكل 35):** تعمل أجهزة CTD مثل الفيلم الفوتوغرافي؛ حيث تدمج معلومات الإشارة أثناء سقوط الإشعاع عليها. يتكون البكسل من زوج من الأقطاب الموصلة فوق طبقة عازلة من السيليكا، تفصل الأقطاب عن منطقة سيليكون مشوب بنوع (n).
  - عند تطبيق جهد سالب، تُخلق "منطقة قلب الشحنة" (Charge inversion region) تحت الأقطاب، مما يجعلها ملائمة لتخزين الفجوات.
  - تهاجر الفجوات المتنقلة الناتجة عن امتصاص الفوتونات وتتجمع في هذه المنطقة، التي تعمل كـ "بئر جهد" (Potential well) قادرة على استيعاب ما يصل إلى 10^5إلى 10^6شحنة.
- **طرق القياس:**
  1. **جهاز حقن الشحنة (CID):** يتم قياس تغير الجهد الناتج عن حركة الشحنة من المنطقة تحت قطب إلى المنطقة تحت الآخر.
  2. **الجهاز مزدوج الشحنة (CCD):** يتم نقل الشحنة إلى مضخم كشف خاص لقياسها.

[25] For details on CTDs, see J. M. Harnly and R. E. Fields, Appl. Spectros., 1997, 51, 334A; J. V. Sweedler, K. L. Ratzlaff, and M. B. Denton, eds., Charge- Transfer Devices in Spectroscopy, New York: VCH, 1994; J. V. Sweedler, Crit. Rev. Anal. Chem., 1993, 24, 59, DOI: 10.1080/10408349308048819.



الشكل 35: مقطع عرضي لجهاز CTD في وضع دمج الشحنة. يتم تجميع الفجوة الموجبة الناتجة عن الفوتون $(h\nu)$ تحت القطب السالب.

أجهزة حقن الشحنة (Charge-Injection Devices - CIDs)

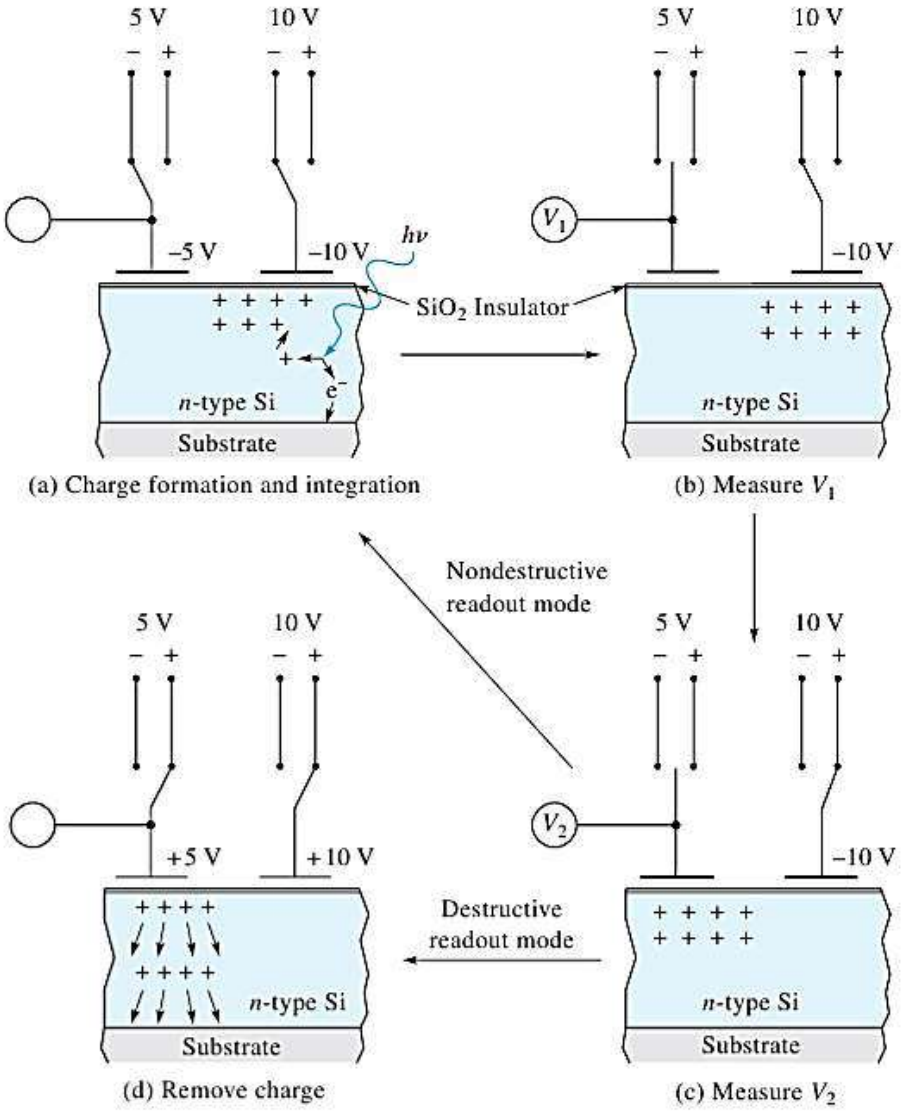
يوضح الشكل (36) رسماً تخطيطياً مبسطاً للخطوات المتضمنة في تجميع وتخزين وقياس الشحنة المتولدة عند تعرض بكسل واحد من أشباه الموصلات للفوتونات:

- **(a) الإنتاج والتخزين:** يتم تطبيق جهد سالب على قطبين، مما يؤدي إلى تكوين "آبار جهد" (Potential wells) تجمع وتخزن الفجوات المتكونة في طبقة (n) نتيجة امتصاص الفوتونات. نظراً لأن القطب الأيمن أكثر سلبية، تُحتجز جميع الفجوات تحت هذا القطب.
- **(b) القياس الأول:** يتم تحديد جهد المكثف على اليسار (V_1) بعد إزالة الجهد المطبق عليه.
- **(c) القياس الثاني:** تُنقل الفجوات المتراكمة على القطب الأيمن إلى بئر الجهد تحت القطب الأيسر عن طريق تبديل الجهد على القطب الأيمن من سالب إلى موجب. ثم يُقاس الجهد الجديد للقطب (V_2). يتم تحديد مقدار الشحنة المتراكمة من فرق الجهد $(V_1 - V_2)$.
- **(d) إعادة الحقن:** يُعاد الكاشف إلى حالته الأصلية بتطبيق جهد موجب على القطبين، مما يؤدي إلى هجرة الفجوات نحو الركيزة (Substrate).

ملاحظة: يمكن إرجاع الكاشف إلى الحالة (a) دون فقدان الشحنة المتراكمة مسبقاً، وتسمى هذه العملية "وضع القراءة غير المتلفة" (NDRO). الميزة الكبرى لأجهزة CID مقارنة بـ CCD هي إمكانية إجراء قياسات متتالية أثناء استمرار عملية التجميع (Integration).

جهاز اقتران الشحنة (Charge-Coupled Device - CCD)

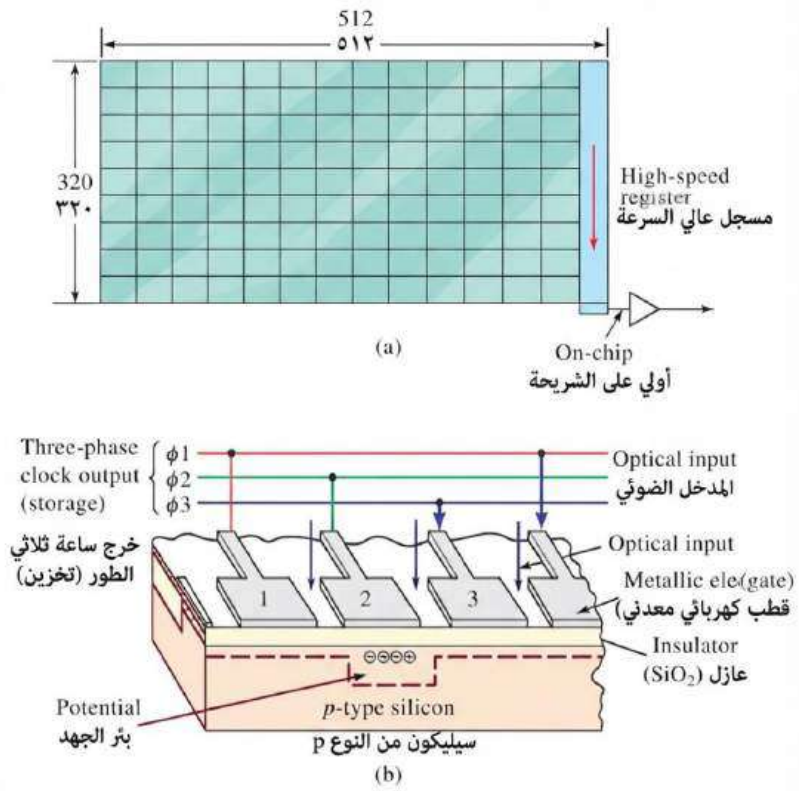
تأتي أجهزة CCD بأشكال وأنواع متنوعة. يوضح الشكل (a37) ترتيب الكواشف الفردية في مصفوفة نموذجية مكونة من 320×512 بكسل:



الشكل 36: دورة عمل جهاز CID: (a) إنتاج وتخزين الشحنة، (b) قياس الشحنة الأول، (c) قياس الشحنة الثاني بعد نقل الشحنة، (d) إعادة حقن الشحنة في شبه الموصل.

- **آلية العمل:** يتكون شبه الموصل من سيليكون من النوع (p)، ويتم تحييز المكثف موجباً بحيث تتجمع الإلكترونات المتكونة نتيجة امتصاص الإشعاع في بئر الجهد تحت القطب. يتكون كل بكسل من ثلاثة أقطاب (موضحة كـ 1، 2، 3 في الشكل b37).
- **القراءة:** لقياس الشحنة المتراكمة، تُستخدم دائرة توقيت (Clock circuit) ثلاثية الأطوار لنقل الشحنة تدريجياً نحو اليمين إلى "مسجل الإزاحة عالي السرعة" (الشكل a37). تُنقل الشحنات بعد ذلك إلى مضخم أولي ثم إلى وحدة القراءة.
- **المميزات والعيوب:** يتم تنفيذ مسح صف تلو الآخر لسطح الكاشف. على عكس CID، فإن عملية القراءة في CCD تؤدي إلى تفريغ (إتلاف) الشحنة المتراكمة. يتميز CCD بحساسية أكبر لمستويات الضوء المنخفضة.

قدّم جايلز وآخرون(1998) Giles et al. [26] دليلًا شاملًا لاختيار كاميرات الـ CCD للتطبيقات الطيفية. ويقدم هؤلاء المؤلفون مناقشة تفصيلية لمواد المصفوفة، والحساسية، والكفاءة الكمية، واعتبارات الضوضاء، والنطاق الديناميكي، والدقة، وأوضاع القراءة، والقضايا المتعلقة بالأجهزة والبرمجيات المصاحبة لعملية الاستحواذ على البيانات واستخدام هذه الأجهزة.



الشكل 37: مصفوفة (a) :CCD ترتيب 320 × 512بكسل، و(b) مخطط يوضح أربعة من الكواشف الفردية.

محولات التوصيل الضوئي (Photoconductivity Transducers)

تُعد أشباه الموصلات التي تنخفض مقاومتها عند امتصاص الإشعاع ضمن نطاق الأشعة تحت الحمراء القريبة (من 0.75 إلى 3 ميكرومتر) هي المحولات الأكثر حساسية لمراقبة الإشعاع في هذا النطاق. ويمكن تمديد النطاق المفيد للموصلات الضوئية ليصل إلى منطقة الأشعة تحت الحمراء البعيدة عن طريق التبريد؛ وذلك لقمع الضوضاء الناشئة عن الانتقالات المحفزة حراريًا بين مستويات الطاقة المتقاربة. وتعد هذه الخاصية للموصلات الضوئية مهمة في أجهزة تحويل فورير للأشعة تحت الحمراء (IR Fourier transform instrumentation). وتُصنّع أشباه الموصلات البلورية من كبريتيدات وسيلينيدات وأنتيمونيدات معادن مثل الرصاص، والكادميوم، والجاليوم، والإنديوم. يؤدي امتصاص الإشعاع بواسطة هذه المواد إلى دفع بعض إلكتروناتها المرتبطة إلى حالة طاقة تصبح فيها حرة لتوصيل الكهرباء.

يعتبر كبريتيد الرصاص (Lead sulfide) أكثر المواد الموصلة ضوئيًا استخدامًا والتي يمكن تشغيلها في درجة حرارة الغرفة. وتتميز محولات كبريتيد الرصاص بحساسية في المنطقة الواقعة بين 0.8 و 3 ميكرومتر (12,500 إلى 3300 سم$^{-1}$). ولتكوين الخلية، يتم ترسيب طبقة رقيقة من هذا المركب على ألواح من الزجاج أو الكوارتز. ثم تُغلق المجموعة بالكامل في وعاء مُفرغ من الهواء لحماية

[26] J. H. Giles, T. D. Ridder, R. H. Williams, D. A. Jones, and M. B. Denton, Anal. Chem., 1998, 70 (19), 663A, DOI: 10.1021/ac981990y.

شبه الموصل من التفاعل مع الغلاف الجوي. وتظهر حساسية محولات كبريتيد الكادميوم، وسيلينيد الكادميوم، وكبريتيد الرصاص في المنحنيات B و D و G في الشكل (27).

المحولات الحرارية (Thermal Transducers)

إن المحولات الضوئية (phototransducers) [27] العملية التي تناولناها للتو غير قابلة للتطبيق بشكل عام في نطاق الأشعة تحت الحمراء؛ لأن الفوتونات في هذا النطاق تفتقر إلى الطاقة اللازمة لإحداث انبعاث ضوئي للإلكترونات. وبالتالي، يجب استخدام المحولات الحرارية أو محولات التوصيل الضوئي التي وصفت للتو. ومع ذلك، لا يعتبر أي منهما مرضياً بقدر المحولات الفوتونية. في المحولات الحرارية، يسقط الإشعاع على جسم أسود صغير ويتم امتصاصه، ومن ثم يتم قياس الارتفاع الناتج في درجة الحرارة. وبما أن مستوى القدرة الإشعاعية من حزمة أشعة تحت تحت حمراء نموذجية يكون ضئيلًا للغاية (من 10^{-7}إلى 10^{-9}واط)، فيجب أن تكون السعة الحرارية لعنصر الامتصاص صغيرة قدر الإمكان إذا أُريد الكشف عن تغير في درجة الحرارة. يتم تقليل حجم وسمك عنصر الامتصاص إلى الحد الأدنى، وتُركّز حزمة الأشعة تحت الحمراء بالكامل على سطحه بحيث تقتصر التغيرات في درجة الحرارة، في ظل الظروف المثالية، على بضعة أجزاء من الألف من الكلفن.

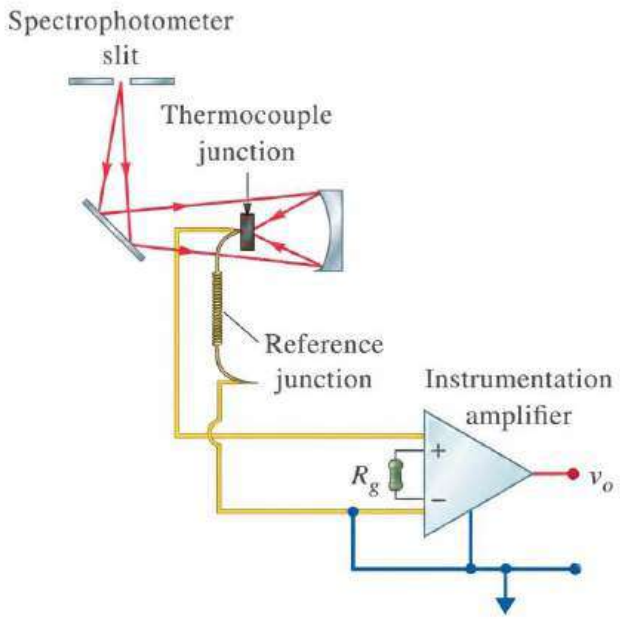
يُعد قياس إشعاع الأشعة تحت الحمراء بالوسائل الحرارية أمرًا معقدًا بسبب الضوضاء الحرارية الناتجة عن الوسط المحيط. ولهذا السبب، توضع الكاشفات الحرارية داخل وعاء مفرغ، وتُعزل بعناية عن الإشعاع الحراري المنبعث من الأجسام القريبة الأخرى. ولتقليل تأثيرات مصادر الحرارة الخارجية بشكل أكبر، يتم عادةً "تقطيع" (chopping) الحزمة المنبعثة من المصدر. وبهذه الطريقة، تصبح إشارة التحليل، بعد عملية التحويل، ذات تردد يتوافق مع "القاطع" (chopper)، مما يتيح فصلها إلكترونيًا عن الضوضاء الخارجية التي تتغير عادةً ببطء مع الزمن.

المزدوجات الحرارية (Thermocouples)

في أبسط صورها، تتكون المزدوجة الحرارية من زوج من الوصلات يتشكل عندما يتم دمج قطعتين من معدن ما، مثل النحاس، بطرفي قطعة من معدن مختلف، مثل الكونستانتان (constantan)، كما هو موضح في الشكل (3-13). ينشأ جهد كهربائي بين الوصلتين يتغير تبعًا لاختلاف درجات الحرارة بينهما. تُصنع وصلة المحول المخصصة لإشعاع الأشعة تحت الحمراء من أسلاك دقيقة جدًا من البزموت والأنتيمون، أو بدلاً من ذلك عن طريق تبخير المعدنين على دعامة غير موصلة. وفي كلتا الحالتين، تُطلى الوصلة عادةً باللون الأسود لتحسين قدرتها على امتصاص الحرارة، وتُحكم داخل حجرة مفرغة مزودة بنافذة شفافة لإشعاع الأشعة تحت الحمراء. أما الوصلة المرجعية، التي تُوضع عادةً في نفس الحجرة مع الوصلة النشطة، فقد صُممت بحيث تمتلك سعة حرارية كبيرة نسبيًا، كما أنها محمية بعناية من الإشعاع الساقط. ونظرًا لأن إشارة المادة المراد تحليلها يتم "تقطيعها" (chopped)، فإن الفرق في درجة الحرارة بين الوصلتين هو المهم فقط؛ وبالتالي، لا توجد حاجة للحفاظ على درجة حرارة الوصلة المرجعية ثابتة. ولتعزيز الحساسية، يمكن توصيل عدة مزدوجات حرارية على التوالي لتشكيل ما يُعرف بـ "المكدس الحراري" (thermopile).

يتمتع محول المزدوجة الحرارية المصمم جيدًا بالقدرة على الاستجابة لفروق درجات حرارة تصل إلى 10^{-6}كلفن. ويقابل هذا الفرق في درجة الحرارة فرق جهد يتراوح بين 6 إلى 8 ميكروفولت/ميكروواط ($\mu V/\mu W$). وتُعد المزدوجة الحرارية في كاشف الأشعة تحت الحمراء جهازًا منخفض المعاوقة (low-impedance)، وعادة ما يتم توصيله بمضخم تفاضلي عالي المعاوقة، مثل مضخم الأجهزة (instrumentation amplifier) الموضح في **الشكل (38)**. كما تُستخدم المضخمات التفاضلية، لتهيئة الإشارة (signal conditioning) في دوائر كواشف المزدوجات الحرارية.

[27] For a good discussion of optical radiation transducers of all types, including thermal detectors, see E. L. Dereniak and G. D. Growe, Optical Radiation Detectors, New York: Wiley, 1984.



الشكل 38: المزدوجة الحرارية ومضخم الأجهزة (Instrumentation amplifier). يتناسب جهد الخرج (v_o) تناسبًا طرديًا مع جهد المزدوجة الحرارية. وتتحدد قيمة (v_o) بواسطة مقاومة الكسب (R_g)، والتي تؤدي نفس وظيفة (R_1/a).

البولومترات (Bolometers)

البولومتر هو نوع من موازين الحرارة المقاومة (resistance thermometer)، ويُصنع من شرائح معدنية، مثل البلاتين أو النيكل، أو من أشباه الموصلات. وغالبًا ما يُطلق على البولومترات المصنوعة من أشباه الموصلات اسم "الثيرمستورات" (thermistors). وتُظهر هذه المواد تغيرًا كبيرًا نسبيًا في المقاومة كدالة في درجة الحرارة. يتم الحفاظ على العنصر الحساس صغيرًا ومطليًا باللون الأسود لامتصاص الحرارة الإشعاعية. لا تُستخدم البولومترات على نطاق واسع مثل محولات الأشعة تحت الحمراء الأخرى في منطقة الأشعة تحت الحمراء المتوسطة، ومع ذلك، فإن البولومتر المصنوع من الجرمانيوم، والذي يعمل عند درجة حرارة 1.5 كلفن، يُعد محولًا مثاليًا تقريبًا للإشعاع في النطاق من 5 إلى 400 سم$^{-1}$ (أي من 2000 إلى 25 ميكرومتر).

المحولات الكهروحرارية (Pyroelectric Transducers)

تُصنع المحولات الكهروحرارية من رقائق بلورية أحادية من مواد كهروحرارية، وهي مواد عازلة (مواد ذات عازلية كهربائية) تمتلك خصائص حرارية وكهربائية فريدة جدًا. ويُعد كبريتات ثلاثي الجلايسين (Triglycine sulfate) [$(NH_2CH_2COOH)_3 \cdot H_2SO_4$] (الذي يكون عادةً مُدكترًا، أو يتم استبدال جزء من الجلايسين فيه بالألانين) أهم مادة كهروحرارية تُستخدم في بناء محولات الأشعة تحت الحمراء.

عند تسليط مجال كهربائي عبر أي مادة عازلة، يحدث استقطاب كهربائي تعتمد قيمته على ثابت العزل الكهربائي للمادة. وبالنسبة لمعظم العوازل، يتلاشى هذا الاستقطاب المستحث بسرعة إلى الصفر عند إزالة المجال الخارجي. في المقابل، تحتفظ المواد الكهروحرارية باستقطاب قوي يعتمد على درجة الحرارة حتى بعد إزالة المجال. وبناءً على ذلك، ومن خلال وضع البلورة الكهروحرارية بين قطبين كهربائيين (أحدهما شفاف للأشعة تحت الحمراء)، يتم إنتاج مكثف يعتمد على درجة الحرارة. يؤدي تغيير درجة حرارته عن طريق تعريضه لإشعاع الأشعة تحت الحمراء إلى تغيير توزيع الشحنة عبر البلورة، مما يولد تيارًا قابلًا للقياس في الدائرة الكهربائية الخارجية التي تصل طرفي المكثف. وتتناسب شدة هذا التيار مع مساحة سطح البلورة ومع معدل تغير استقطابها

بالنسبة لدرجة الحرارة. تفقد البلورات الكهروحرارية استقطابها المتبقي عند تسخينها إلى درجة حرارة تُعرف بنقطة كوري (Curie point)؛ وبالنسبة لكبريتات ثلاثي الجلايسين، تبلغ نقطة كوري 47 درجة مئوية.

تُظهر المحولات الكهروحرارية أزمنة استجابة سريعة بما يكفي لتمكينها من تتبع التغيرات في إشارة النطاق الزمني (time-domain signal) القادمة من مقياس التداخل (interferometer). ولهذا السبب، تستخدم معظم مطيافات الأشعة تحت الحمراء بتحويل فورير (FTIR) هذا النوع من المحولات.

معالجات الإشارة وأجهزة القراءة (Signal Processors and Readouts)

يُعد معالج الإشارة عادةً جهازًا إلكترونيًا يقوم بتضخيم الإشارة الكهربائية القادمة من المحول. بالإضافة إلى ذلك، قد يقوم بتحويل الإشارة من تيار مستمر (dc) إلى تيار متردد (ac) (أو العكس)، وتغيير طور (phase) الإشارة، وفلترتها لإزالة المكونات غير المرغوب فيها. وفي بعض الحالات، قد يجري معالج الإشارة عمليات رياضية على الإشارة مثل الاشتقاق، أو التكامل، أو التحويل اللوغاريتمي.

توجد عدة أنواع من أجهزة القراءة في الأجهزة الحديثة؛ إذ تُعد المقاييس الرقمية (Digital meters)، وشاشات الكريستال السائل (LCD)، وشاشات الحاسوب من الأنواع الشائعة. بينما قد تحتوي الأجهزة القديمة على مقاييس تناظرية (analog meters)، أو مسجلات تناظرية، أو أنابيب أشعة الكاثود (cathode-ray tubes) كأجهزة للقراءة.

عد الفوتونات (Photon Counting)

يتكون خرج أنبوب التضاعف الضوئي (PMT) من نبضة إلكترونية لكل فوتون يصل إلى سطح الكاشف. وغالبًا ما تتم فلترة هذه الإشارة التناظرية لإزالة التقلبات غير المرغوب فيها الناتجة عن الظهور العشوائي للفوتونات عند المهبط الضوئي (photocathode)، ثم تُقاس كجهد أو تيار مستمر (dc). ومع ذلك، إذا كانت شدة الإشعاع منخفضة جدًا بحيث لا توفر نسبة إشارة إلى ضوضاء (signal-to-noise ratio) مرضية، فمن الممكن، وغالبًا ما يكون مفيدًا، معالجة الإشارة وتحويلها إلى سلسلة من النبضات الرقمية التي يمكن عدّها كما نوقش سابقاً. عند مستويات الإشعاع المنخفضة، تتناسب القدرة الإشعاعية مع عدد النبضات في وحدة الزمن بدلاً من متوسط التيار أو الجهد. ويُطلق على هذا النوع من القياس "عد الفوتونات".

استُخدمت تقنيات العد لسنوات عديدة لقياس القدرة الإشعاعية لحزم الأشعة السينية والإشعاع الناتج عن اضمحلال الأنواع المشعة. كما يُستخدم عد الفوتونات للأشعة فوق البنفسجية والمرئية، ولكن في هذا التطبيق، ما يتم عدّه هو خرج أنبوب التضاعف الضوئي (PMT). أشرنا في القسم السابق إلى أن فوتونًا واحدًا يصطدم بمهبط أنبوب التضاعف الضوئي يؤدي في النهاية إلى شلال من 10^6إلى 10^7إلكترون، مما ينتج عنه نبضة شحنة يمكن تضخيمها وعدّها. وتُعد المقارنات مفيدة لهذه المهمة لأن تيار الظلام (dark-current) وضوضاء الجهاز غالبًا ما تكون أصغر بكثير من نبضة الإشارة، وبالتالي لا يتم عدّها؛ مما يؤدي إلى تحسن في نسبة الإشارة إلى الضوضاء.

يتمتع عد الفوتونات بعدد من المزايا مقارنة بمعالجة الإشارات التناظرية، منها: تحسين نسبة الإشارة إلى الضوضاء، والحساسية لمستويات الإشعاع المنخفضة، وتحسين الدقة لفترة قياس معينة، وانخفاض الحساسية لتقلبات جهد ودرجة حرارة أنبوب التضاعف الضوئي (PMT). ومع ذلك، فإن المعدات المطلوبة أكثر تعقيدًا وتكلفة. ونتيجة لذلك، لم تُطبق هذه التقنية على نطاق واسع في قياسات الامتصاص الجزيئي الروتينية في منطقتي الأشعة فوق البنفسجية والمرئية حيث لا تتطلب حساسية عالية. ومع ذلك، فقد أصبحت

طريقة الكشف المفضلة في بعض تقنيات التألق (fluorescence)، والتلألؤ الكيميائي (chemiluminescence)، ومطيافية رامان (Raman spectrometry)، حيث تكون مستويات القدرة الإشعاعية منخفضة.

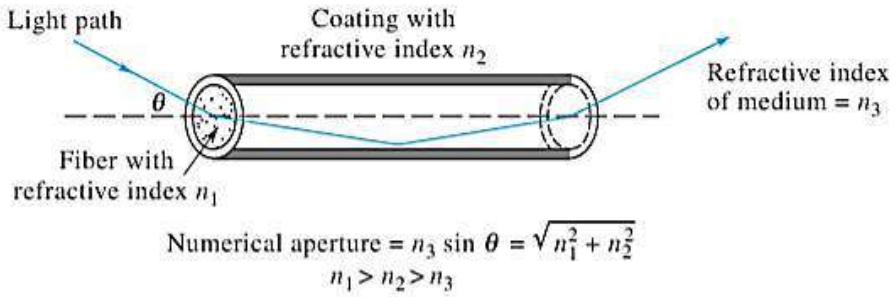
الألياف البصرية (Fiber Optics)

في أواخر ستينيات القرن العشرين، بدأت تظهر في الأسواق أجهزة تحليلية تحتوي على ألياف بصرية لنقل الإشعاع والصور من مكون في الجهاز إلى آخر. وقد أضافت الألياف البصرية بُعدًا جديدًا من الفائدة لتصاميم الأجهزة البصرية[28].

خصائص الألياف البصرية (Properties of Optical Fibers)

الألياف البصرية هي خيوط دقيقة من الزجاج أو البلاستيك تنقل الإشعاع لمسافات تصل إلى عدة مئات من الأقدام أو أكثر. ويتراوح قطر الألياف البصرية من 0.05 ميكرومتر ليصل إلى 0.6 سم. وعند الحاجة لنقل الصور، تُستخدم حزم من الألياف المدمجة عند أطرافها. ومن أهم تطبيقات حزم الألياف هذه في التشخيص الطبي، حيث تسمح مرونتها بنقل صور الأعضاء عبر مسارات متعرجة إلى الطبيب. لا تُستخدم الألياف البصرية للمراقبة فحسب، بل تُستخدم أيضًا لإضاءة الأجسام؛ وفي مثل هذه التطبيقات، غالبًا ما تكون القدرة على الإضاءة دون تسخين أمرًا بالغ الأهمية.

يحدث انتقال الضوء في الليفة البصرية عن طريق الانعكاس الداخلي الكلي كما هو موضح في الشكل (39). ولكي تحدث الانعكاسات الداخلية الكلية، من الضروري أن تكون الليفة الناقلة مغطاة بمادة ذات معامل انكسار أصغر قليلًا من معامل انكسار مادة الليفة. وبناءً على ذلك، تحتوي الليفة الزجاجية النموذجية على قلب بمعامل انكسار يبلغ حوالي 1.6، وطبقة طلاء زجاجية بمعامل انكسار يبلغ حوالي 1.5. أما الألياف البلاستيكية النموذجية، فتحتوي على قلب من بولي ميثيل ميثاكريلات (polymethylmethacrylate) بمعامل انكسار يبلغ 1.5، وطبقة طلاء بوليمرية بمعامل انكسار يبلغ 1.4.



الشكل 39: رسم تخطيطي لمسار الضوء عبر ليفة بصرية (optical fiber).

تستطيع الليفة (الشكل 39) نقل الإشعاع المحتوى ضمن مخروط سقوط محدود بنصف زاوية يشار إليها بالرمز uفي الشكل. ويوفر "الفتحة العددية" (numerical aperture) لليفة قياسًا لمقدار ما يسمى بمخروط القبول (acceptance cone).

من خلال الاختيار المناسب لمواد التصنيع، يمكن تصنيع ألياف قادرة على نقل الأشعة فوق البنفسجية، أو المرئية، أو تحت الحمراء. وسوف تجد أمثلة عديدة على تطبيقها في الأجهزة التحليلية التقليدية في الفصول التالية.

[28] For a thorough discussion of fiber optics, see J. Hayes, FOA Guide to Fiber Optics, Fallbrook, CA: Fiber Optics Association, 2009; J. Hayes, Fiber Optics Technician's Manual, Clifton Park, NY: Delmar Learning, 2006.

مستشعرات الألياف البصرية (Fiber-Optic Sensors)

تتكون مستشعرات الألياف البصرية، التي تسمى أحيانًا "أوبترودات" (optrodes)، من طور كاشف (reagent phase) مُثبّت على نهاية ليفة بصرية. ويؤدي تفاعل المادة المراد تحليلها (analyte) مع الكاشف إلى إحداث تغير في الامتصاصية، أو الانعكاسية، أو التألق، أو التلألؤ، والذي يتم نقله بعد ذلك إلى كاشف عبر الليفة البصرية[29]. تُعد مستشعرات الألياف البصرية عمومًا أجهزة بسيطة وغير مكلفة يسهل تصغير حجمها. وتُستخدم على نطاق واسع لاستشعار المواد البيولوجية، حيث يُطلق عليها غالبًا "المستشعرات الحيوية" (biosensors). وفي الواقع، تم تصغير مثل هذه المستشعرات لتصل إلى مقياس النانومتر، وتسمى هذه الأجهزة "المستشعرات الحيوية النانوية" (nanobiosensors)[30].

أنواع الأجهزة البصرية (Types of Optical Instruments)

في هذا القسم، نُحدد المصطلحات التي نستخدمها لوصف الأنواع المختلفة من الأجهزة البصرية. ومن المهم إدراك أن التسميات المقترحة هنا لا تحظى بإجماع جميع العلماء؛ فهي ببساطة مصطلحات شائعة، وهي التي ستصادفها في جميع فصول هذا الكتاب.

يُعد **المطياف (Spectroscope)** جهازًا بصريًا يُستخدم للتعرف البصري على خطوط الانبعاث الذري. ويتكون من مُوحد لون (monochromator)، مثل أحد تلك الموضحة في الشكل (18)، حيث تُستبدل فتحة الخروج بـ "عدسة عينية" (eyepiece) يمكن تحريكها على طول مستوى البؤرة. وبذلك يمكن تحديد طول موجة خط الانبعاث من خلال الزاوية المحصورة بين الحزمة الساقطة والحزمة المشتتة عندما يتمركز الخط على العدسة العينية.

نستخدم مصطلح **المقياس اللوني (Colorimeter)** للدلالة على أداة لقياسات الامتصاص التي تعمل فيها العين البشرية ككاشف، وذلك باستخدام معيار واحد أو أكثر للمقارنة اللونية. أما **مقياس الضوء (Photometer)** فيتكون من مصدر، ومرشح (filter)، ومحول كهروضوئي، بالإضافة إلى معالج إشارة وجهاز قراءة. لاحظ أن بعض العلماء ومصنعي الأجهزة يشيرون إلى مقاييس الضوء باسم مقاييس الألوان أو مقاييس الألوان الكهروضوئية. وتتوفر تجاريًا مقاييس الضوء المرشحة (Filter photometers) لقياسات الامتصاص في مناطق الأشعة فوق البنفسجية، والمرئية، وتحت الحمراء، وكذلك لقياسات الانبعاث والتألق في نطاقي الطول الموجي الأولين. وتُسمى مقاييس الضوء المصممة لقياسات التألق بـ **مقاييس التألق (Fluorometers)**.

المطياف (Spectrometer) هو جهاز يوفر معلومات حول شدة الإشعاع كدالة في الطول الموجي أو التردد. و**المطياف الضوئي (Spectrophotometer)** هو مطياف مجهز بفتحة خروج واحدة أو أكثر ومحولات كهروضوئية تسمح بتحديد نسبة القدرة الإشعاعية لحزمتين كدالة في الطول الموجي، كما هو الحال في مطيافية الامتصاص. ويُطلق أحيانًا على المطياف الضوئي المخصص لتحليل التألق اسم **مطياف التألق (Spectrofluorometer)**.

تستخدم جميع الأجهزة المذكورة في هذا القسم حتى الآن مرشحات أو مُوحدات لون لعزل جزء من الطيف للقياس. وعلى النقيض من ذلك، يحصل **الجهاز المتعدد (Multiplex instrument)** على المعلومات الطيفية دون الحاجة أولاً إلى تشتيت الإشعاع أو ترشيحه لتوفير الأطوال الموجية المطلوبة.

تعتمد معظم الأجهزة التحليلية المتعددة على تحويل فورير (Fourier transform) لفك تشفير الإشارة، ولذلك غالبًا ما تُسمى **مطيافات تحويل فورير (Fourier transform spectrometers)**. ولا تقتصر هذه الأجهزة بأي حال من الأحوال على المطيافية الضوئية؛ فقد وُصفت أجهزة تعتمد على تحويل فورير لمطيافية الرنين المغناطيسي النووي، ومطيافية الكتلة، ومطيافية الميكروويف.

[29] X. E. Wong and O. S. Wolfbeis, Anal. Chem., 2012, 85, 487, DOI: 10.1021/ ac303159b; O.S. Wolfbeis, Anal. Chem., 2008, 80, 4269, DOI: 10.1021/ac800473b; M. A. Arnold, Anal. Chem., 1992, 64, 1015A, DOI: 10.1021/ac00045a720.
[30] T. Vo-Dinh, in Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, Stevenson Ranch, CA: American Scientific Publishers, 2004, 6, 53–59. J. M. Song, P. M. Kasili, G. D. Griffin, T. Vo-Dinh, Anal. Chem., 2004, 76, 2591, DOI: 10.1021/ ac0352878.

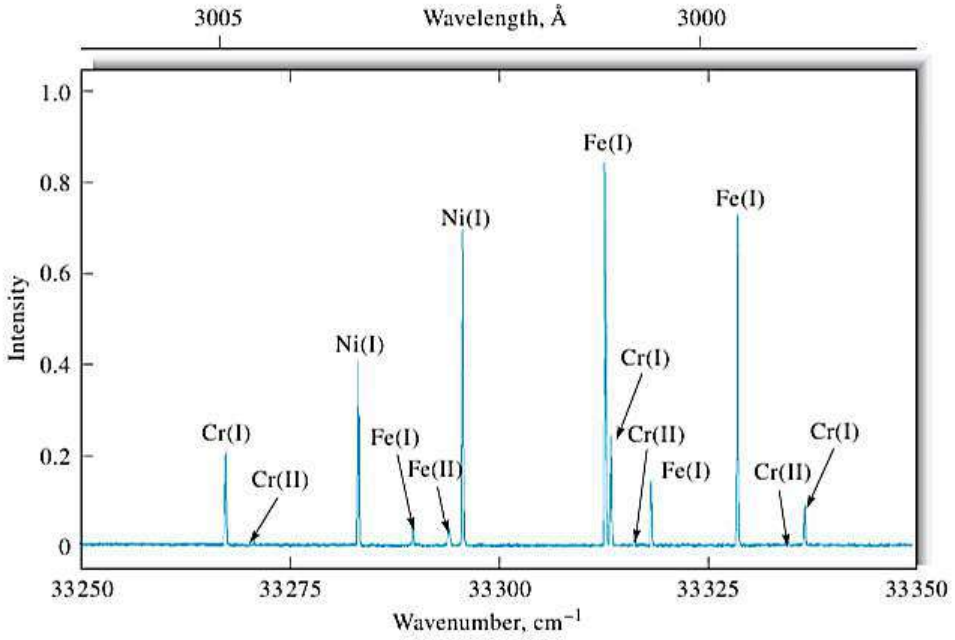
وتتم مناقشة العديد من هذه الأجهزة بشيء من التفصيل في الفصول اللاحقة. ويصف القسم التالي مبادئ تشغيل مطيافات تحويل فورير الضوئية.

مبادئ قياسات تحويل فورير البصرية (Principles of Fourier Transform Optical Measurements)

طوّر علماء الفلك مطيافية تحويل فورير لأول مرة في أوائل الخمسينيات من القرن العشرين لدراسة أطياف الأشعة تحت الحمراء للنجوم البعيدة. وكانت أولى التطبيقات الكيميائية لمطيافية تحويل فورير في منطقة الأشعة تحت الحمراء البعيدة حيث تكون الطاقات وحساسيات الكاشف منخفضة. وبحلول أواخر الستينيات، أصبحت أجهزة الدراسات الكيميائية في كل من منطقة الأشعة تحت الحمراء البعيدة (من 10 إلى 400 سم$^{-1}$) ومنطقة الأشعة تحت الحمراء العادية متاحة تجاريًا [31]. كما يمكن العثور في المراجع العلمية على أوصاف لأجهزة تحويل فورير المخصصة لمناطق الأشعة فوق البنفسجية والمرئية، لكن اعتمادها كان أقل انتشارًا.

المزايا المتأصلة في مطيافية تحويل فورير (Inherent advantages of Fourier Transform Spectrometry)

يتمتع استخدام أجهزة تحويل فورير بالعديد من المزايا الرئيسية. الأولى هي ميزة "الإنتاجية" (throughput advantage)، أو ميزة "جاكينو" (Jaquinot advantage)، والتي تتحقق لأن أجهزة تحويل فورير تحتوي على عناصر بصرية قليلة ولا تستخدم شقوقًا (slits) لتوهين الإشعاع. ونتيجة لذلك، تكون القدرة الإشعاعية التي تصل إلى الكاشف أكبر بكثير مما هي عليه في الأجهزة المشتتة (dispersive instruments)، مما يؤدي إلى ملاحظة نسب إشارة إلى ضوضاء (signal-to-noise ratios) أعلى بكثير.



الشكل 40: طيف انبعاث للحديد يوضح قوة التمييز العالية لمطياف انبعاث بتحويل فورير. (مأخوذ عن: A. P. Thorne, Anal. Chem., 1991, 63, 57A, DOI: 10.1021/ac00002a712).

[31] For more complete discussions of optical Fourier transform spectroscopy, consult the following references: B. C. Smith, Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy, 2nd ed., Boca Raton, FL: CRC Press, 2011; P. Hariharan, Basics of Interferometry, 2nd ed., Burlington, MA: Academic Press, 2007; P. R. Griffiths and J. A. de Haseth, Fourier Transform Infrared Spectrometry, 2nd ed., Hoboken, NJ: Wiley, 2007; A. G. Marshall and F. R. Verdun, Fourier Transforms in NMR, Optical, and Mass Spectrometry, New York: Elsevier, 1990.

الميزة الثانية لأجهزة تحويل فورير هي قوة تمييزها العالية للغاية وقابليتها لإعادة إنتاج الأطوال الموجية، مما يجعل تحليل الأطياف المعقدة ممكنًا، حيث يجعل العدد الكبير من الخطوط والتداخل الطيفي تحديد السمات الطيفية الفردية أمرًا صعبًا. يوضح الشكل (40)، الذي يمثل جزءًا من طيف انبعاث للصلب، هذه الميزة. إذ يحتوي الطيف، الذي يمتد فقط من 299.85 إلى 300.75 نانومتر، على ثلاثة عشر خطًا متباعدًا بشكل جيد لثلاثة عناصر. وتبلغ دقة الطول الموجي $(\Delta\lambda/\lambda)$ لأقرب زوج من الخطوط حوالي 6 أجزاء في المليون (ppm).

تنشأ الميزة الثالثة من وصول جميع عناصر المصدر إلى الكاشف في وقت واحد (بشكل متزامن). تجعل هذه الخاصية من الممكن الحصول على بيانات لطيف كامل في ثانية واحدة أو أقل. لنفحص عواقب هذه الميزة الأخيرة بمزيد من التفصيل.

لأغراض هذا النقاش، من الملائم اعتبار الطيف المشتق تجريبيًا مكونًا من m من قياسات النفاذية الفردية عند فواصل ترددية أو طول موجية متساوية تسمى "عناصر الدقة" (resolution elements). تزداد جودة الطيف ـــ أي مقدار التفاصيل الطيفية ـــ كلما أصبح عدد عناصر الدقة أكبر أو كلما أصبحت الفواصل الترددية بين القياسات أصغر [32]. وبالتالي، لزيادة الجودة الطيفية، يجب جعل m أكبر؛ ومن الواضح أن زيادة عدد عناصر الدقة تؤدي بالضرورة إلى زيادة الوقت اللازم للحصول على طيف باستخدام جهاز مسح (scanning instrument).

لننظر، على سبيل المثال، في قياس طيف أشعة تحت حمراء من 500 إلى 5000 سم$^{-1}$. إذا تم اختيار عناصر دقة بمقدار 3 سم$^{-1}$، فسيكون m يساوي 1500؛ وإذا تطلب تسجيل نفاذية كل عنصر دقة 0.5 ثانية، فسيلزم 750 ثانية، أو 12.5 دقيقة، للحصول على الطيف. ومن المتوقع أن يوفر تقليل عرض عنصر الدقة إلى 1.5 سم$^{-1}$ تفاصيل طيفية أكبر بكثير؛ لكنه سيؤدي أيضًا إلى مضاعفة عدد عناصر الدقة وكذلك الوقت المطلوب لقياسها.

بالنسبة لمعظم الأجهزة البصرية، ولا سيما تلك المصممة لمنطقة الأشعة تحت الحمراء، فإن تقليل عرض عنصر الدقة له تأثير مؤسف يتمثل في تقليل نسبة الإشارة إلى الضوضاء. يحدث هذا لأنه يجب استخدام شقوق أضيق، مما يؤدي إلى إشارات مصدر أضعف تصل إلى المحول. ومع ذلك، بالنسبة لكواشف الأشعة تحت الحمراء، لا يصاحب انخفاض قوة الإشارة انخفاض مماثل في ضوضاء الكاشف. وبالتالي، ينتج عن ذلك تدهور في نسبة الإشارة إلى الضوضاء.

أشرنا إلى أن نسب الإشارة إلى الضوضاء (S/N) يمكن تحسينها بشكل كبير عن طريق "متوسط الإشارة" (signal averaging). وقد أوضحنا (المعادلة 5-11) أن نسبة الإشارة إلى الضوضاء (S/N) لمتوسط n من القياسات تُعطى بالعلاقة:

$$\left(\frac{S}{N}\right)_n = \sqrt{n}\left(\frac{S}{N}\right)_i$$

حيث أن $(S/N)_i$ هي نسبة الإشارة إلى الضوضاء لقياس واحد. ومما يؤسف له أن تطبيق متوسط الإشارة على المطيافية التقليدية مكلف من حيث الوقت؛ ففي المثال الذي تناولناه للتو، يلزم 750 ثانية للحصول على طيف مكون من 1500 عنصر دقة. ولتحسين نسبة الإشارة إلى الضوضاء بمعامل قدره 2، سيتطلب الأمر أخذ متوسط أربعة أطياف، وهو ما سيتطلب 4 × 750 ثانية، أي 50 دقيقة.

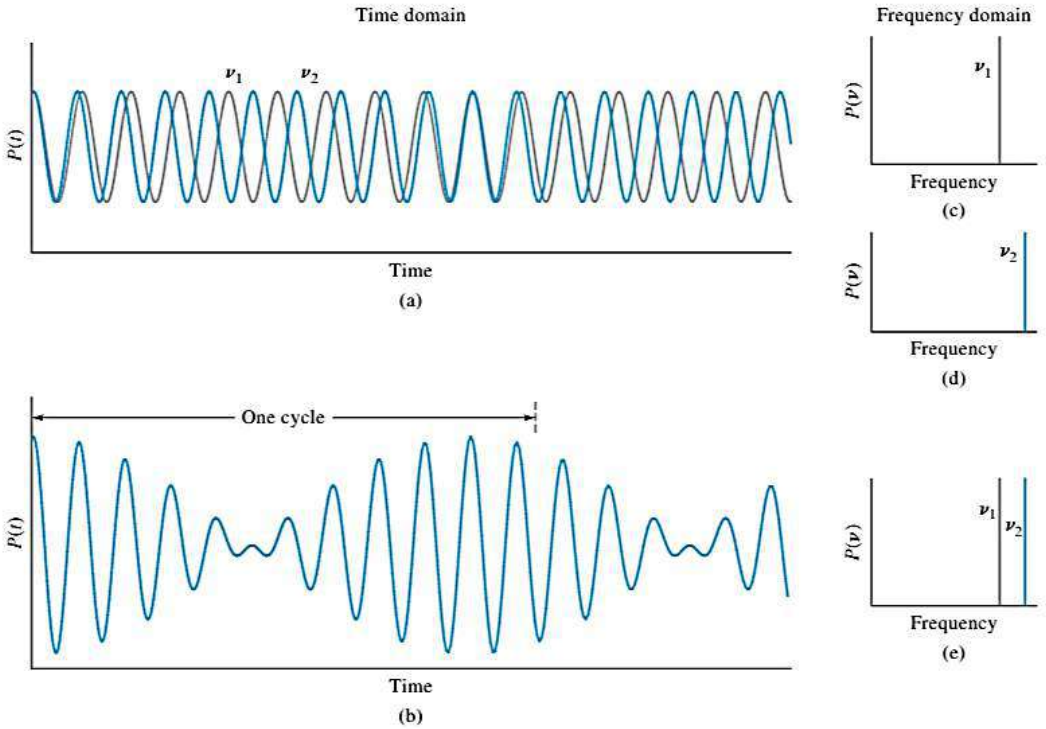
تختلف مطيافية تحويل فورير عن المطيافية التقليدية في أن جميع عناصر الدقة للطيف تُقاس في وقت واحد (بشكل متزامن)، مما يقلل بشكل هائل الوقت اللازم للحصول على طيف عند أي نسبة إشارة إلى ضوضاء مختارة. وبذلك يمكن تسجيل طيف كامل مكون من 1500 عنصر دقة في وقت يماثل تقريبًا الوقت اللازم لملاحظة عنصر واحد فقط في المطيافية التقليدية (0.5 ثانية في مثالنا السابق). غالبًا ما يُستخدم هذا الانخفاض الكبير في وقت الرصد لتعزيز نسبة الإشارة إلى الضوضاء في قياسات تحويل فورير بشكل ملحوظ.

على سبيل المثال، في الـ 750 ثانية اللازمة لتحديد الطيف عن طريق المسح، يمكن تسجيل 1500 طيف بتحويل فورير وأخذ

[32] Individual point-by-point measurements are not made with a recording spectrophotometer; nevertheless, the idea of a resolution element is useful, and the ideas generated from it apply to recording instruments as well .

متوسطها. ووفقًا للمعادلة (20)، سيكون التحسن في نسبة الإشارة إلى الضوضاء مساويًا لـ $\sqrt{1500}$، أي حوالي 39. وقد أدرك بي. فيلجيت (P. Fellgett) هذه الميزة المتأصلة لمطيافية تحويل فورير لأول مرة في عام 1958، وتُسمى "ميزة فيلجيت" أو "الميزة المتعددة" (multiplex advantage). ومن الجدير بالذكر هنا أنه، لأسباب عدة، نادرًا ما يتحقق التحسن النظري في نسبة الإشارة إلى الضوضاء بمقدار $\sqrt{n}$بشكل كامل. ومع ذلك، تُلاحظ عمومًا تحسينات كبيرة في نسب الإشارة إلى الضوضاء باستخدام تقنية تحويل فورير.

تُعد الميزة المتعددة مهمة بما يكفي لجعل جميع مطيافات الأشعة تحت الحمراء تقريبًا من نوع تحويل فورير في الوقت الراهن. ومع ذلك، فإن أجهزة تحويل فورير أقل شيوعًا بكثير في مناطق الأشعة فوق البنفسجية والمرئية والأشعة تحت الحمراء القريبة؛ لأن قيود نسبة الإشارة إلى الضوضاء في القياسات الطيفية باستخدام هذه الأنواع من الإشعاع نادرًا ما تكون نتيجة لضوضاء الكاشف، بل تعود بدلاً من ذلك إلى "ضوضاء الطلق" (shot noise) و"ضوضاء الوميض" (flicker noise) المصاحبة للمصدر. وعلى عكس ضوضاء الكاشف، يزداد مقدار كل من ضوضاء الطلق والوميض بزيادة القدرة الإشعاعية للإشارة. علاوة على ذلك، تميل الضوضاء الكلية لجميع عناصر الدقة في قياس تحويل فورير إلى أن يتم أخذ متوسطها وتوزيعها بانتظام على الطيف المحوّل بالكامل. وبالتالي، فإن نسبة الإشارة إلى الضوضاء للقمم القوية في وجود قمم ضعيفة تتحسن عن طريق أخذ المتوسط، ولكنها تتدهور بالنسبة للقمم الأضعف. أما بالنسبة لضوضاء الوميض، مثل تلك التي تُصادف في الإشعاع الخلفي من العديد من المصادر الطيفية، فيُلاحظ تدهور في نسبة الإشارة إلى الضوضاء لجميع القمم. يُطلق على هذا التأثير أحيانًا "العيب المتعدد" (multiplex disadvantage)، وهو المسؤول بشكل كبير عن عدم تطبيق تحويل فورير على نطاق واسع في مطيافية الأشعة فوق البنفسجية والمرئية [33].



الشكل 41: (أ) مخطط في النطاق الزمني لترددين (ν_1 و ν_2) مختلفين قليلًا ولهما نفس السعة. (ب) مخطط في النطاق الزمني لمجموع الموجتين في (أ). (ج) مخطط في النطاق الترددي للتردد ν_1. (د) مخطط في النطاق الترددي للتردد ν_2. (هـ) مخطط في النطاق الترددي للموجة الموضحة في (ب).

[33] For a further description of this multiplex disadvantage in atomic spectroscopy, see A. P. Thorne, Anal. Chem., 1991, 63, 62A, DOI: 10.1021/ac00002a712; A. G. Marshall and F. R. Verdun, Fourier Transforms in NMR, Optical, and Mass Spectrometry, Chap. 5, New York: Elsevier, 1990.

مطيافية النطاق الزمني (Time-Domain Spectroscopy)

يمكن وصف المطيافية التقليدية بأنها "مطيافية النطاق الترددي" (frequency-domain spectroscopy)، حيث تُسجل بيانات القدرة الإشعاعية كدالة في التردد أو الطول الموجي. وعلى النقيض من ذلك، تهتم "مطيافية النطاق الزمني"، التي يمكن تحقيقها بواسطة تحويل فورير، بالتغيرات في القدرة الإشعاعية بمرور الزمن. يوضح الشكل (41) هذا الفرق.

تمثل المخططات في الشكلين (41 ج و د) الأطياف التقليدية لمصدرين أحاديي اللون بترددات ν_1 و ν_2 هيرتز. أما المنحنى في الشكل (41 هـ) فهو طيف لمصدر يحتوي على كلا الترددين. وفي كل حالة، يتم رسم القدرة الإشعاعية $P(\nu)$ مقابل التردد بالهيرتز؛ حيث أُضيف الرمز بين القوسين للتأكيد على اعتماد القدرة على التردد، في حين يُشار إلى قدرة النطاق الزمني بالرمز $P(t)$.

تُظهر المنحنيات في الشكل (41 أ) أطياف النطاق الزمني لكل من المصدرين أحاديي اللون. وقد تم رسمهما معًا لجعل فرق التردد الصغير بينهما أكثر وضوحًا. وهنا، يتم رسم القدرة اللحظية $P(t)$ كدالة في الزمن. والمنحنى في الشكل (41 ب) هو طيف النطاق الزمني لمصدر يحتوي على الترددين معًا. وكما يظهر بالسهم الأفقي، يُظهر المخطط دورية، أو "نبضًا" (beat)، بينما تدخل الموجتان في حالة توافق طوري وتخرجان منها.

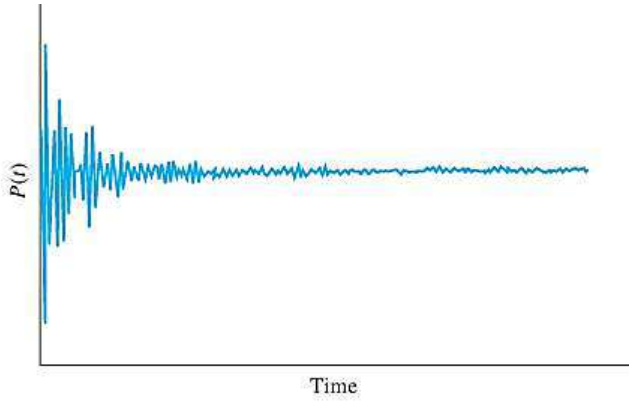
يُعد الشكل (42) إشارة في النطاق الزمني لمصدر يحتوي على العديد من الأطوال الموجية. وهي أكثر تعقيدًا بكثير من تلك الموضحة في الشكل (41). ولأن عددًا كبيرًا من الأطوال الموجية متضمن، فلا تكتمل دورة كاملة في الفترة الزمنية الموضحة. ويظهر نمط من النبضات (beats) مع دخول بعض الأطوال الموجية في حالة توافق طوري وخروجها منها. وبشكل عام، تتناقص قدرة الإشارة مع الزمن لأن الأطوال الموجية المتقاربة تصبح غير متوافقة طوريًا بشكل متزايد.

من المهم إدراك أن إشارة النطاق الزمني تحتوي على نفس المعلومات التي يحتوي عليها الطيف في النطاق الترددي، وفي الواقع، يمكن تحويل أحدهما إلى الآخر عن طريق حسابات عددية. وهكذا، تم حساب الشكل (41 ب) من بيانات الشكل (41 هـ) باستخدام المعادلة:

$$P(t) = k\cos(2\pi\nu_1 t) + k\cos(2\pi\nu_2 t) \quad (21)$$

حيث k ثابت، و t هو الزمن. وكان الفرق في التردد بين الخطين حوالي 10% من ν_2.

إن التحويل المتبادل بين إشارات النطاق الزمني والنطاق الترددي عملية معقدة ومضنية رياضيًا عندما تتضمن أكثر من بضعة خطوط؛ لذا لا تكون العملية عملية إلا باستخدام الحاسوب. واليوم، تسمح خوارزميات "تحويل فورير السريع" (fast Fourier transform algorithms) بحساب أطياف النطاق الترددي من أطياف النطاق الزمني في ثوانٍ.

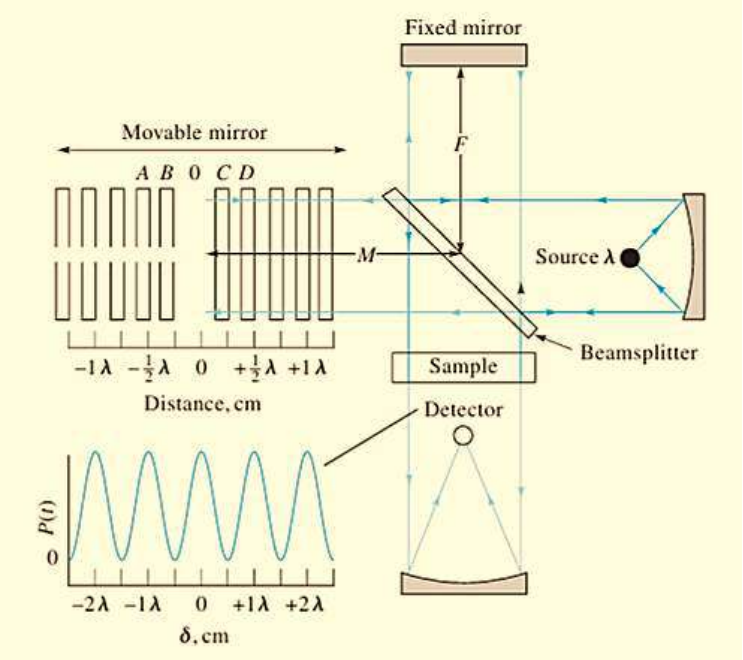


الشكل 42: إشارة في النطاق الزمني لمصدر مكون من العديد من الأطوال الموجية.

الحصول على أطياف النطاق الزمني باستخدام مقياس تداخل مايكلسون (Michelson Interferometer)

لا يمكن الحصول تجريبيًا على إشارات النطاق الزمني، مثل تلك الموضحة في الشكلين (41) و(42)، باستخدام الإشعاع في نطاق التردد المرتبط بالمطيافية الضوئية (10^{12} إلى 10^{15}هيرتز)؛ وذلك لعدم وجود محولات (transducers) قادرة على الاستجابة لتغيرات القدرة الإشعاعية عند هذه الترددات العالية. وبناءً على ذلك، يعطي المحول النموذجي إشارة تتوافق مع متوسط قدرة إشارة عالية التردد وليس مع تغيرها الدوري. لذا، يتطلب الحصول على إشارات النطاق الزمني طريقة لتحويل (أو تضمين) إشارة عالية التردد إلى أخرى ذات تردد قابل للقياس دون تشويه العلاقات الزمنية المحمولة في الإشارة؛ أي أن الترددات في الإشارة المُضمّنة يجب أن تتناسب طرديًا مع تلك الموجودة في الإشارة الأصلية. وتُستخدم إجراءات مختلفة لتضمين الإشارة لمختلف مناطق الطول الموجي في الطيف. ويُستخدم مقياس تداخل مايكلسون على نطاق واسع لتضمين الإشعاع في النطاق الضوئي.

الجهاز المستخدم لتضمين الإشعاع الضوئي هو مقياس تداخل مشابه في تصميمه للجهاز الذي وصفه مايكلسون لأول مرة في أواخر القرن التاسع عشر. ومقياس تداخل مايكلسون هو جهاز يقسم حزمة من الإشعاع إلى حزمتين متساويتي القدرة تقريبًا، ثم يعيد دمجهما بطريقة يمكن فيها قياس تغيرات الشدة للحزمة المدمجة كدالة في الاختلافات في أطوال مسارات الحزمتين. الشكل (43) هو رسم تخطيطي لمقياس تداخل كهذا كما يُستخدم في مطيافية تحويل فورير الضوئية.



الشكل 43: رسم تخطيطي لمقياس تداخل مايكلسون مُضاء بواسطة مصدر أحادي اللون.

كما هو موضح في الشكل (43)، يتم تجميع حزمة الإشعاع الصادرة من المصدر لتصبح متوازية (collimated) ثم تسقط على "مقسّم الحزمة" (beamsplitter)، الذي ينفذ حوالي نصف الإشعاع ويعكس النصف الآخر. تنعكس الحزمتان التوأم الناتجتان بعد ذلك عن مرآتين، إحداهما ثابتة والأخرى متحركة. تلتقي الحزمتان مرة أخرى عند مقسّم الحزمة، حيث يتم توجيه نصف كل حزمة نحو العينة والكاشف، بينما يتم توجيه النصفين الآخرين عائدين نحو المصدر. وتُستخدم للأغراض التحليلية فقط الحزمتان اللتان تمران عبر العينة إلى الكاشف.

تتسبب الحركة الأفقية للمرآة المتحركة في جعل القدرة الإشعاعية التي تصل إلى الكاشف تتذبذب بطريقة قابلة للتكرار. فعندما تكون المرآتان على مسافة متساوية من مقسّم الحزمة (الموضع 0 في الشكل 43)، يكون جزأا الحزمة المدمجة في حالة توافق طوري دقيق

(in phase) وتكون قدرة الإشارة عند حدها الأقصى. وبالنسبة لمصدر أحادي اللون، فإن حركة المرآة المتحركة في أي من الاتجاهين بمسافة تساوي ربع طول موجي تمامًا (الموضع B أو C في الشكل) تغيّر طول مسار الحزمة المنعكسة المقابلة بمقدار نصف طول موجي (ربع طول موجي لكل اتجاه). وعند موضع المرآة هذا، يؤدي التداخل الهدّام (destructive interference) إلى خفض القدرة الإشعاعية للحزم المدمجة إلى الصفر. وعندما تتحرك المرآة إلى الموضع A أو D، يعود نصفا الحزمتين إلى حالة التوافق الطوري بحيث يحدث التداخل البنّاء (constructive interference) مرة أخرى.

يُطلق على فرق طول المسار بين الحزمتين، أي $2(M-F)$ في الشكل، اسم "الإعاقة" (retardation) ويرمز له بالرمز δ(دلتا). ويُسمى المخطط البياني للقدرة الخارجة من الكاشف مقابل δبـ "مخطط التداخل" (interferogram). بالنسبة للإشعاع أحادي اللون، يتخذ مخطط التداخل شكل منحنى جيب تمام (كوساين) مثل ذلك الموضح في الجزء السفلي الأيسر من الشكل (43) (جيب تمام وليس جيب، لأن القدرة تكون دائمًا في حدها الأقصى عندما تكون δصفرًا ويكون المساران متطابقين).

إن الإشارة المتغيرة زمنيًا الناتجة عن اصطدام الإشعاع بالكاشف في مقياس تداخل مايكلسون تكون أقل ترددًا بكثير من تردد المصدر. وتُشتق العلاقة بين الترددين بالرجوع إلى المخطط البياني للقدرة $P(t)$مقابل δفي الشكل (43). تحدث دورة واحدة من الإشارة عندما تتحرك المرآة مسافة تتوافق مع نصف طول موجي $(\lambda/2)$. إذا كانت المرآة تتحرك بسرعة ثابتة v_M، وإذا عرفنا tعلى أنه الزمن اللازم لتحرك المرآة مسافة $\lambda/2$سم، يمكننا كتابة المعادلة التالية:

$$v_M t = \frac{\lambda}{2} \quad (22)$$

وبالتالي فإن تردد الإشارة fعند الكاشف هو ببساطة مقلوب t:

$$f = \frac{1}{t} = \frac{v_M}{\lambda/2} = \frac{2v_M}{\lambda} \quad (23)$$

يمكننا أيضًا ربط هذا التردد بالعدد الموجي $\bar{\nu}$للإشعاع، وبذلك:

$$f = 2v_M\bar{\nu} \quad (24)$$

أما العلاقة بين التردد الضوئي للإشعاع وتردد مخطط التداخل فيمكن الحصول عليها بالتعويض بـ $\lambda = c/\nu$في المعادلة (23):

$$f = \frac{2v_M}{c}\nu \quad (25)$$

حيث νهو تردد الإشعاع، و cهي سرعة الضوء (3×10^{10} سم/ثانية). عندما تكون v_Mثابتة، فإن تردد مخطط التداخل fيتناسب طرديًا مع التردد الضوئي ν. وعلاوة على ذلك، فإن ثابت التناسب هو رقم صغير جدًا. على سبيل المثال، إذا تم تحريك المرآة بمعدل 1.5 سم/ثانية، فإن:

$$\frac{2v_M}{c} = \frac{2 \times 1.5 \text{ cm/s}}{3 \times 10^{10} \text{ cm/s}} = 10^{-10}$$

و

$$f = 10^{-10}\nu$$

وكما يوضح المثال التالي، يمكن بسهولة تضمين تردد الأشعة المرئية وتحت الحمراء في النطاق السمعي بواسطة مقياس تداخل مايكلسون.

مثال 3

احسب نطاق تردد الإشارة المُضمّنة الخارجة من مقياس تداخل مايكلسون بسرعة مرآة تبلغ 0.20 سم/ثانية، لإشعاع مرئي بطول موجي 700 نانومتر، وإشعاع تحت حمراء بطول موجي 16 ميكرومتر (4.3×10^{14} إلى 1.9×10^{13}هيرتز).

الحل:

باستخدام المعادلة (23)، نجد:

للإشعاع المرئي:

$$f_1 = \frac{2 \times 0.20 \text{ cm/s}}{700 \text{ nm} \times 10^{-7} \text{ cm/nm}} = 5700 \text{ Hz}$$

للإشعاع تحت الحمراء:

$$f_2 = \frac{2 \times 0.20 \text{ cm/s}}{16 \text{ μm} \times 10^{-4} \text{ cm/μm}} = 250 \text{ Hz}$$

تستطيع أنواع معينة من محولات الأشعة المرئية وتحت الحمراء تتبع تقلبات قدرة الإشارة التي تقع ضمن نطاق التردد السمعي (audio-frequency range). لذا، من الممكن تسجيل إشارة نطاق زمني مُضمّنة في نطاق التردد السمعي، والتي تُعد ترجمة دقيقة لمظهر إشارة النطاق الزمني ذات التردد العالي جدًا الصادرة عن مصدر مرئي أو تحت أحمر. يوضح الشكل (44) ثلاثة أمثلة لمخططات تداخل (interferograms) في النطاق الزمني. يوجد في أعلى كل عمود صورة لنمط التداخل الذي يظهر عند خرج مقياس تداخل مايكلسون. وفي المنتصف توجد إشارات مخطط التداخل الناتجة عن الأنماط الموجودة في الأعلى، بينما تظهر أطياف النطاق الترددي المقابلة في الأسفل.

تحويل فوريير لمخططات التداخل (Fourier Transformation of Interferograms)

يمكن وصف موجة جيب التمام لمخطط التداخل الموضح في الشكل (44 أ) (وأيضًا في الشكل 43) بالمعادلة:

$$P(\delta) = \frac{1}{2} P(\nu) \cos(2\pi f t) \quad (26)$$

حيث $P(\nu)$هي القدرة الإشعاعية للحزمة الساقطة على مقياس التداخل، و $P(\delta)$هي سعة، أو قدرة، إشارة مخطط التداخل. تؤكد الرموز بين القوسين أن إحدى القدرتين في النطاق الترددي والأخرى في النطاق الزمني. وعمليًا، نقوم بتعديل المعادلة (26) لتأخذ في الاعتبار حقيقة أن مقياس التداخل لا يقسم المصدر إلى نصفين تمامًا، وأن استجابة الكاشف وسلوك المضخم تعتمد على التردد. لذا، من المفيد إدخال متغير جديد، $B(\nu)$، الذي يعتمد على $P(\nu)$ولكن يأخذ هذه العوامل في الاعتبار. يمكننا حينئذٍ إعادة كتابة المعادلة في الشكل:

$$P(\delta) = B(\nu) \cos(2\pi f t) \quad (27)$$

يؤدي التعويض بالمعادلة (24) في المعادلة (27) إلى:

$$P(\delta) = B(\nu) \cos(4\pi \nu v_M t) \quad (28)$$

لكن يمكن التعبير عن سرعة المرآة بدلالة الإعاقة (retardation) كالتالي:

$$v_M = \frac{\delta}{2t}$$

بالتعويض بهذه العلاقة في المعادلة (28) نحصل على:

$$P(\delta) = B(\nu) \cos(2\pi \delta \bar{\nu}) \quad (29)$$

والتي تعبّر عن مقدار إشارة مخطط التداخل كدالة في عامل الإعاقة والعدد الموجي للمصدر.

يمكن وصف مخططات التداخل الموضحة في الشكل (44 ب، هـ، ح) بحدّين، أحدهما لكل عدد موجي:

$$P(\delta) = B_1(\nu_1)\cos(2\pi\delta\bar{\nu}_1) + B_2(\nu_2)\cos(2\pi\delta\bar{\nu}_2) \quad (30)$$

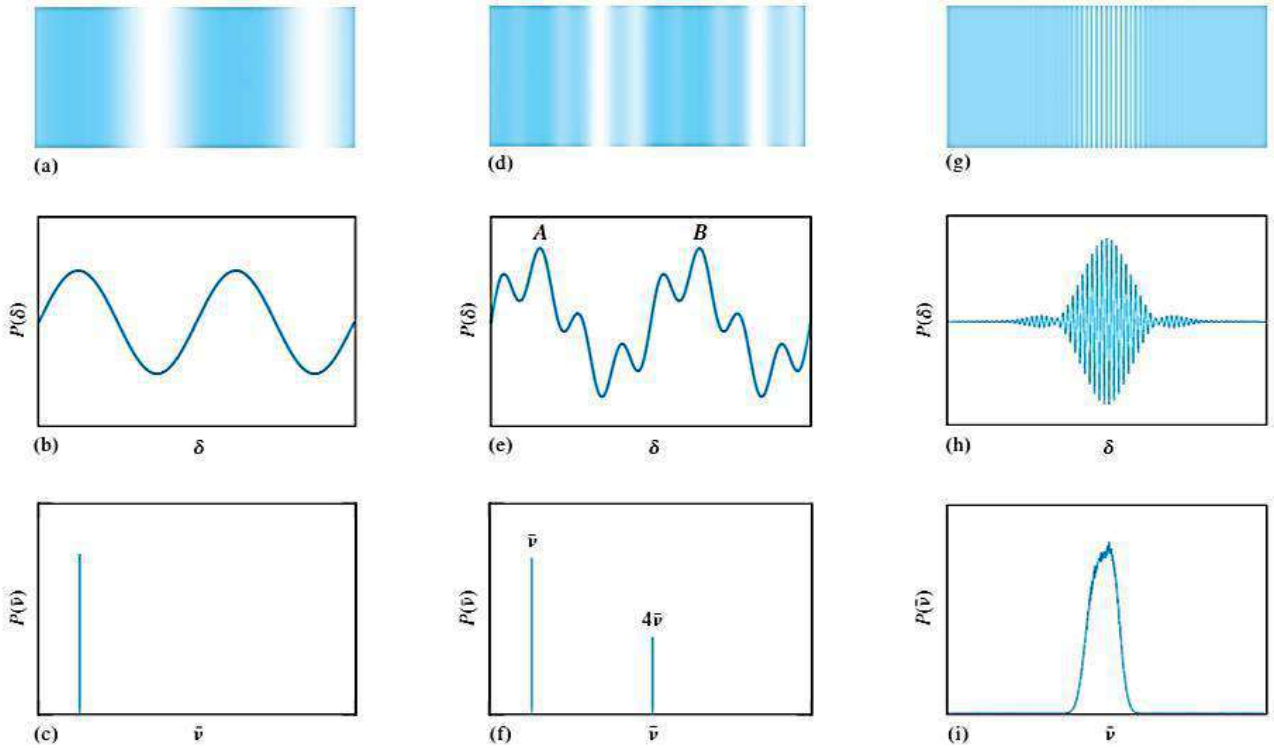
بالنسبة لمصدر مستمر (continuum source)، كما في الشكل (44 ط)، يمكن تمثيل مخطط التداخل كمجموع لعدد لا نهائي من حدود جيب التمام. أي أن:

$$P(\delta) = \int_0^\infty B\,(\nu)\cos(2\pi\nu\delta)\; d\nu \quad (31)$$

تحويل فورير لهذا التكامل هو:

$$B(\nu) = \int_0^\infty P\,(\delta)\cos(2\pi\nu\delta)\; d\delta \quad (32)$$

يتطلب تحويل فورير الكامل مكونات حقيقية (جيب تمام) وتخيلية (جيب)؛ وقد قدمنا هنا جزء جيب التمام فقط، وهو كافٍ لمعالجة الدوال الحقيقية والزوجية.



الشكل 44: تكوّن مخططات التداخل عند خرج مقياس تداخل مايكلسون. (أ) نمط التداخل عند خرج مقياس التداخل الناتج عن مصدر أحادي اللون. (ب) إشارة متغيرة جيبيًا (مخطط تداخل) ناتجة عند الكاشف مع مسح النمط في (أ) عبر الكاشف. (ج) طيف التردد لمصدر الضوء أحادي اللون الناتج عن تحويل فورير للإشارة في (ب). (د) نمط التداخل عند خرج مقياس التداخل الناتج عن مصدر بترددين. (هـ) إشارة معقدة ناتجة عن نمط التداخل في (د) عند سقوطه على الكاشف؛ يشار إلى نقطة انعدام الإعاقة (Zero retardation) بالرمز A. (و) طيف التردد للمصدر ذي الترددين. (ز) نمط التداخل الناتج عن حزمة انبعاث عريضة. (ح) مخطط تداخل المصدر في (و). (ط) طيف التردد لحزمة الانبعاث.

تتكون مطيافية تحويل فورير الضوئية من تسجيل $P(\delta)$كدالة في δ(المعادلة 29) ثم تحويل هذه العلاقة رياضيًا إلى علاقة تعطي $B(\bar{\nu})$كدالة في $\bar{\nu}$(طيف التردد) كما توضح المعادلة (32).

لا يمكن استخدام المعادلتين (30) و (32) كما هما مكتوبتان؛ لأنهما تفترضان أن الحزمة تحتوي على إشعاع من عدد موجي صفر إلى عدد موجي لانهائي، وأن محرك المرآة ذو طول لانهائي. علاوة على ذلك، تتطلب تحويلات فورير باستخدام الحاسوب أن يكون خرج

الكاشف رقميًا؛ أي يجب أخذ عينات من الخرج بشكل دوري وتخزينها في شكل رقمي. ومع ذلك، تتطلب المعادلة (32) أن تكون فواصل أخذ العينات $d\delta$متناهية في الصغر، أي $d\delta \rightarrow 0$. ومن وجهة نظر عملية، لا يمكن جمع سوى فواصل أخذ عينات محدودة الحجم على مدى نطاق إعاقة محدود يبلغ بضعة سنتيمترات. تؤدي هذه القيود إلى الحد من دقة (resolution) جهاز تحويل فورير وتقييد نطاقه الترددي.

الدقة (Resolution)

يمكن وصف دقة مطياف تحويل فورير بدلالة الفرق في العدد الموجي بين خطين يمكن تمييزهما بالكاد بواسطة الجهاز. أي:

$$\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_1 - \bar{\nu}_2 \quad (33)$$

حيث $\bar{\nu}_1$و $\bar{\nu}_2$هما العددان الموجيان لزوج من الخطوط التي يمكن تمييزها بالكاد.

من الممكن إثبات أنه لتمييز خطين، يجب مسح إشارة النطاق الزمني لفترة كافية بحيث تكتمل دورة واحدة كاملة، أو نبضة واحدة، للخطين؛ عندها فقط سيتم تسجيل جميع المعلومات الموجودة في الطيف. على سبيل المثال، يتطلب تمييز الخطين $\bar{\nu}_1$و $\bar{\nu}_2$في الشكل (44 و) تسجيل مخطط التداخل من النهاية العظمى A عند انعدام الإعاقة إلى النهاية العظمى B حيث تعود الموجتان إلى حالة التوافق الطوري مرة أخرى. تحدث النهاية العظمى عند B، ومع ذلك، عندما تكون $\delta\bar{\nu}_1$أكبر من $\delta\bar{\nu}_2$بمقدار 1 في المعادلة (29). أي عندما:

$$\delta\bar{\nu}_2 - \delta\bar{\nu}_1 = 1 \Longrightarrow \delta(\bar{\nu}_2 - \bar{\nu}_1) = 1$$

بالتعويض في المعادلة (33) نحصل على الدقة:

$$\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_2 - \bar{\nu}_1 = \frac{1}{\delta} \quad (34)$$

تعني هذه المعادلة أن الدقة بالعدد الموجي ستتحسن بالتناسب مع مقلوب المسافة التي تقطعها المرآة.

مثال 4

ما هو طول مسار حركة المرآة الذي يوفر دقة قدرها 0.1 سم$^{-1}$؟

الحل: بالتعويض في المعادلة (34) نحصل على:

$$0.1\ \text{cm}^{-1} = \frac{1}{\delta}$$

$$\delta = 10\ \text{cm}$$

تكون حركة المرآة المطلوبة هي نصف الإعاقة، أي 5 سم.

المراجع (References):

المرجع الرئيسي

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Principles of instrumental analysis*. Cengage Learning.

المراجع الثانوية

Altemose, I. R. (1986). [Title unknown]. Journal of Chemical Education, 63, A216.
Andrews, D. L., & Demidov, A. A. (Eds.). (2002). An introduction to laser spectroscopy (2nd ed.). Springer.
Arnold, M. A. (1992). [Title unknown]. Analytical Chemistry, 64(1), 1015A. https://doi.org/10.1021/ac00045a720
Baxter, J. B., & Guglietta, G. W. (2011). [Title unknown]. Analytical Chemistry, 83(12), 4342–4368. https://doi.org/10.1021/ac200907z

Brady, D. J. (2009). Optical imaging and spectroscopy. Wiley.
Cochran, K. H., Barry, J. A., Muddiman, D. C., & Hinks, D. (2013). [Title unknown]. Analytical Chemistry, 85(2), 831–836. https://doi.org/10.1021/ac302519n
Coldren, L. A., Corzine, S. W., & Mashanovitch, M. L. (2012). Diode lasers and photonic integrated circuits. Wiley.
Cremers, D. A., & Radziemski, L. J. (2006). Handbook of laser-induced breakdown spectroscopy. Wiley.
Dereniak, E. L., & Growe, G. D. (1984). Optical radiation detectors. Wiley.
Duarte, F. J. (2009). Tunable laser applications (2nd ed.). CRC Press.
Duarte, F. J., & Hillman, L. W. (1990). Dye laser principles with applications. Academic Press.
Faist, J. (2013). Quantum cascade lasers. Oxford University Press.
Fasol, G. (1996). [Title unknown]. Science, 272(5269), 1751. https://doi.org/10.1126/science.272.5269.1751
Fortes, F. J., Moros, J., Lucena, P., Cabalín, L. M., & Laserna, J. J. (2013). [Title unknown]. Analytical Chemistry, 85(2), 640–669. https://doi.org/10.1021/ac303220r
Gooijer, C., & Mank, A. J. G. (1999). [Title unknown]. Analytica Chimica Acta, 400, 281. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00656-X
Griffiths, P. R., & de Haseth, J. A. (2007). Fourier transform infrared spectrometry (2nd ed.). Wiley.
Grossman, W. E. L. (1989). [Title unknown]. Journal of Chemical Education, 66(8), 697. https://doi.org/10.1021/ed066p697
Hamamatsu Photonics, K. K. (2006). Photomultiplier tubes: Basics and applications. Hamamatsu City.
Hariharan, P. (2007). Basics of interferometry (2nd ed.). Academic Press.
Harnly, J. M., & Fields, R. E. (1997). [Title unknown]. Applied Spectroscopy, 51(3), 334A. https://doi.org/10.1366/0003702971941971
Hayes, J. (2006). Fiber optics technician's manual. Delmar Learning.
Hayes, J. (2009). FOA guide to fiber optics. Fiber Optics Association.
Hecht, J. (2008). Understanding lasers: An entry-level guide (3rd ed.). Wiley.
Ingalls, A. G. (1952). [Title unknown]. Scientific American, 186(6), 45.
Ingle, J. D., Jr., & Crouch, S. R. (1988). Spectrochemical analysis. Prentice Hall.
Lytle, F. E. (1974). [Title unknown]. Analytical Chemistry, 46(4), 545A. https://doi.org/10.1021/ac60342a718
Marshall, A. G., & Verdun, F. R. (1990). Fourier transforms in NMR, optical, and mass spectrometry. Elsevier.
Nam, D. W., & Waarts, R. G. (1994). [Title unknown]. Laser Focus World, 30(8), 52.
Numai, T. (2004). Fundamentals of semiconductor lasers. Springer-Verlag.
Ohtsubo, J. (2013). Semiconductor lasers: Stability, instability, and chaos (3rd ed.). Springer-Verlag.
Orellana, F. A., Gálvez, C. G., Roldán, M. T., & García-Ruiz, C. (2013). [Title unknown]. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 42, 1–34. https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.09.015
Palmer, C. (2005). Diffraction grating handbook (6th ed.). Newport Corp.
Silfvast, W. T. (2008). Laser fundamentals (2nd ed.). Cambridge University Press.
Smith, B. C. (2011). Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy (2nd ed.). CRC Press.
Song, J. M., Kasili, P. M., Griffin, G. D., & Vo-Dinh, T. (2004). [Title unknown]. Analytical Chemistry, 76(9), 2591. https://doi.org/10.1021/ac0352878
Stuke, M. (Ed.). (1992). Dye lasers: Twenty-five years. Springer.
Svelto, O. (2010). Principles of lasers (5th ed.). Springer.
Sweedler, J. V. (1993). [Title unknown]. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 24(1), 59. https://doi.org/10.1080/10408349308048819
Sweedler, J. V., Ratzlaff, K. L., & Denton, M. B. (Eds.). (1994). Charge-transfer devices in spectroscopy. VCH.
Telle, H. H., Urena, A. G., & Donovan, R. J. (2007). Laser chemistry: Spectroscopy, dynamics and applications. Wiley.
Thorne, A. P. (1991). [Title unknown]. Analytical Chemistry, 63(3), 62A. https://doi.org/10.1021/ac00002a712
Thyagarajan, K., & Ghatak, A. (2010). Lasers: Fundamental and applications (2nd ed.). Springer.
Toal, V. (2012). Introduction to holography. CRC Press.
Trager, F. (Ed.). (2012). Springer handbook of lasers and optics (2nd ed.). Springer-Verlag.
Vo-Dinh, T. (2004). In Encyclopedia of nanoscience and nanotechnology (Vol. 6, pp. 53–59). American Scientific Publishers.
Wolfbeis, O. S. (2008). [Title unknown]. Analytical Chemistry, 80(11), 4269. https://doi.org/10.1021/ac800473b
Wong, X. E., & Wolfbeis, O. S. (2012). [Title unknown]. Analytical Chemistry, 85(1), 487. https://doi.org/10.1021/ac303159b

CHAPTER (12) الفصل الثاني عشر



اختبارات الألوان، وتقنيات الطيف الضوئي والوميض الفسفوري

COLOUR TESTS, AND SPECTROPHOTOMETRIC AND LUMINESCENCE TECHNIQUES

الفصل الثاني عشر

اختبارات الألوان، وتقنيات الطيف الضوئي والوميض الفسفوري

COLOUR TESTS, AND SPECTROPHOTOMETRIC AND LUMINESCENCE TECHNIQUES

مقدمة

يعود أصل استخدام اختبارات الألوان في علم السموم التحليلي إلى التحليل الكيفي غير العضوي. ولا تزال بعض اختبارات الألوان البسيطة للسموم تجد مكاناً لها في ظروف معينة، ولكن التفاعلات اللونية (Chromogenic) تكون أكثر قيمة عند استخدامها في إظهار ألواح كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) المستظهرة. كما كان الامتصاص بالأشعة فوق البنفسجية/المرئية وقياس الطيف الفلوري الضوئي (Spectrophotofluorimetry) من بين التقنيات المبكرة التي طبقت في التحليلات السمومية الكيفية والكمية، وبينما لا تزال تُستخدم كتقنيات قائمة بذاتها، فإن هذه التقنيات تجد الآن تطبيقاً كبيراً كأنظمة كشف في تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC). كما يعد قياس الطيف الضوئي بالأشعة فوق البنفسجية (UV spectrophotometry) مهماً لمراقبة معدلات التفاعل في المقاييس المناعية أو في مراقبة تفاعلات الإنزيم المرتبطة بـ NAD/NADH أو NADP/NADPH. وتظل تقنيات قياس الطيف الضوئي بالامتصاص والانبعاث الذري والتقنيات الطيفية الأخرى مهمة في تحليل العناصر الزهيدة والمعادن السامة (الفصل 11).

التطور التاريخي

تمتص المركبات العضوية المقترنة الأشعة فوق البنفسجية (190-400 نانومتر) أو الضوء المرئي (400-700 نانومتر) - وكلما زادت درجة الاقتران، زادت درجة الامتصاص عند أطوال موجية أطول. وهكذا، فإن المركبات عالية الاقتران مثل بيتا كاروتين والهيموجلوبين تمتص في الجزء المرئي من الطيف وتكون ملونة. أما المركبات العطرية الأقل اقتراناً فتمتص في منطقة الأشعة فوق البنفسجية من الطيف. قد تعطي ملاحظة اللون، سواء كان طبيعياً أو بعد المعالجة الكيميائية، معلومات كيفية مفيدة. ومع ذلك، تبعت ذلك تطورات رئيسية عقب اكتشافات أساسية في علم الطيف (Spectroscopy)، وهو دراسة امتصاص الإشعاع الكهرومغناطيسي بواسطة المركبات الكيميائية، وقياس الطيف (Spectrometry)، وهو الدراسة الكمية لهذه الظاهرة. استُكشف امتصاص الضوء بواسطة المواد لأول مرة من قبل عالم الرياضيات الألماني يوهان هاينريش لامبرت (1728-1777) الذي اكتشف أنه بالنسبة للإشعاع أحادي اللون (عملياً الإشعاع ذو حزمة ضيقة من الأطوال الموجية)، فإن كمية الضوء الممتص تتناسب طردياً مع طول مسار الضوء عبر المادة وتكون مستقلة عن شدة الضوء الساقط. ووسع عالم الفلك الألماني فيلهلم بير (1797-1850) هذا العمل ووجد أنه بالنسبة للمحاليل المخففة، كانت هناك علاقة خطية بين تركيز المادة المحللة والامتصاص. استخدم الكيميائي السريري هنري بنس جونز (1813-1873) منظار الانبعاث الطيفي للكشف عن الليثيوم في البول وفي الأنسجة الأخرى بما في ذلك العدسات المستأصلة من أعين مرضى المياه البيضاء (Jones, 1865a, 1865b)، وبالعمل مع أوغست دوبريه (1835-1907)، استخدم تحليل الفلورة للكشف عن الكينين في الدم والأنسجة الأخرى (Jones and Dupre´, 1866). تم استخلاص العينات بحمض الكبريتيك المخفف، والذي جُعل قلوياً بهيدروكسيد الصوديوم واستُخلص باستخدام ثنائي إيثيل الإيثر. تُرك الإيثر ليتبخر وأُذيب الراسب في حمض الكبريتيك قبل قياس

الفلورة باستخدام شرارة حثية كمصدر للضوء. ونظراً لأن هذا الاستخلاص فشل في إزالة الفلورة الخلفية، فُحصت عينات ضابطة عبر الإجراء للمقارنة مع عينات من خنازير غينيا المعالجة.

أدى إدخال أول مقياس طيف ضوئي للأشعة فوق البنفسجية متاح تجارياً، "Beckman DU"، بواسطة أرنولد أو. بيكمان (1900-2004)، مخترع مقياس الأس الهيدروجيني (pH meter)، وهوارد هـ. كاري (1908-1991)، إلى توسيع نطاق الطول الموجي القابل للاستخدام من المنطقة المرئية إلى منطقة الأشعة فوق البنفسجية مما سمح بالكشف عن العديد من المركبات وقياسها (Cary and Beckman, 1941). كان الدافع لتطوير هذا الجهاز هو الاهتمام العسكري بفيتامين A، وهو ناتج تحلل عديم اللون للبيتا كاروتين. ومع ذلك، مضت مجموعات مثل تلك التي قادها برنارد ب. برودي (1907-1989) لاستخدام الجهاز لتطوير مقاييس كمية للعديد من الأدوية. وضع برودي بعض القواعد الأساسية للقياس الناجح للأدوية والسموم الأخرى في العينات البيولوجية (Brodie et al., 1947)، والتي لا يزال الكثير منها قابلاً للتطبيق اليوم. وكما هو الحال مع تطوير مقاييس الطيف الضوئي العملي للأشعة فوق البنفسجية، شجع الاهتمام العسكري، وهذه المرة بالأدوية المضادة للملاريا، التقدم في قياس الطيف الفلوري الضوئي. استخدم برودي وسيدني أودينفريند (1918-2001) مقياس فلورة مرشح كولمان البسيط لتقدير الكويناكرين في البلازما، ولكن كان من الواضح أنه إذا أمكن تغيير طول موجة الإثارة، فإنه يمكن تحليل العديد من الجزيئات باستخدام هذه التقنية. طور روبرت ل. بومان (1916-1995) أول مقياس طيف فلوري ضوئي مزدوج الموحد اللوني (Double monochromator)، والذي عُرِض بالتعاون مع شركة الأدوات الأمريكية في مؤتمر بيتسبرغ للأدوات التحليلية عام 1956 باسم AMINCO-Bowman SPF(Udenfriend, 1995).

اختبارات الألوان

تعطي العديد من الأدوية والسموم الأخرى ألواناً مميزة مع كواشف مناسبة إذا وجدت بكميات كافية، وفي غياب المركبات المتداخلة. وتعد القليل من هذه الاختبارات نوعية (Specific) للأغراض العملية، ولكن عادةً ما تتفاعل أيضاً المركبات التي تحتوي على مجموعات وظيفية مماثلة، وبالتالي فمن المتوقع حدوث تداخل من سموم أخرى أو نواتج أيض (Metabolites) أو ملوثات. ومن التعقيدات الإضافية أن وصف اللون هو أمر شخصي للغاية (Subjective)، حتى لدى الأشخاص الذين يتمتعون برؤية طبيعية للألوان، في حين أن الألوان الناتجة تختلف عادةً في شدتها أو تدرجها مع التركيز، وقد تكون غير مستقرة. كما أن تسجيل نتائج الاختبارات أمر مستحيل بدون التصوير الفوتوغرافي (Box 4.1). تحتوي كواشف هذه المقاييس المتجانسة عادةً على أحماض أو قلويدات قوية، أو تستخدم مواد كيميائية عضوية قد تكون خطرة؛ لذا يجب مراعاة احتياطات السلامة المناسبة. يمكن إجراء العديد من الاختبارات بشكل مرضٍ في أنابيب اختبار زجاجية شفافة، ومع ذلك، فإن استخدام "بلاطة التنقيط" (Spotting tile) -وهي بلاطة من البورسلين المصقول الأبيض بها عدد من المنخفضات الضحلة أو العيون في سطحها- يوفر خلفية موحدة لتقييم أي ألوان ناتجة،

إطار(1): اختبارات الألوان

- **سريعة جداً ورخيصة الثمن:** أضف الكاشف (أو الكواشف) ولاحظ اللون الناتج.
- **عادةً ما تكون مقايسات متجانسة (Homogenous):** بخلاف بعض المقايسات المناعية، تتطلب معظم اختبارات السموم الأخرى شكلاً من أشكال المعالجة المسبقة للعينة.
- **مفيدة أساساً لـ:** البول، محتويات المعدة، ومخلفات مسرح الحادث.
- **تُجرى عادةً في أنابيب اختبار زجاجية شفافة:** لكن استخدام بلاطة بورسلين بيضاء مصقولة يعد أفضل (توفر خلفية موحدة، وتستهلك كمية أقل من الكاشف).
- **يجب دائماً تحليل "كاشف فارغ" (Reagent blank) وعينة ضابطة إيجابية (Positive control) مع العينات.**
- **ذاتية (Subjective):** يختلف الأشخاص في كيفية إدراكهم أو وصفهم للألوان؛ كما أن اللون قد يختلف في شدته.
- **مجموعة هائلة من الاختبارات متاحة:** ولكن معظمها يفتقر إلى الانتقائية العالية (Poor selectivity).

كما يقلل من أحجام الكواشف والعينات المستخدمة.

تبرز اختبارات الألوان بشكل أساسي في دليل IPCS للتحليل السمي الأساسي (Flanagan et al., 1995)، حيث يتم التأكيد على المشكلات الشائعة ومصادر التداخل في اختبارات معينة، كما يتم توضيح الألوان الناتجة عن بعض الاختبارات الشائعة الاستخدام. وقد أدرج كل من (Badcock, 2000) و (Jeffery, 2004) بعض الاختبارات الإضافية.

عند إجراء اختبارات الألوان، من المهم دائماً إجراء تحليل متزامن مع عينة الاختبار لكل من:

1. **"كاشف فارغ" (Reagent blank):** وهو عبارة عن عينة مناسبة يُعرف عدم احتوائها على المركب (أو المركبات) المستهدفة. إذا كان الاختبار سيُجرى على البول، فيجب استخدام بول "فارغ" (خالٍ من المادة المحللة)، وإلا فإن الماء منزوع الأيونات يكون كافياً بشكل عام.
2. **عينة إيجابية معروفة بتركيز مناسب:** إذا كان الاختبار سيُجرى على البول، فمن الناحية المثالية يجب استخدام بول من مريض أو متطوع يُعرف أنه تناول المركب المعني. ومع ذلك، فإن هذا ليس ممكناً دائماً، وفي هذه الحالة يجب استخدام بول "محصن" (Spiked urine) (وهو بول "فارغ" أضيف إليه كمية معروفة من المركب قيد التحليل).

تعتبر اختبارات الألوان مفيدة كونها تتطلب حداً أدنى من المعدات والخبرة، ومع ذلك، يجب أن يكون الكاشف متاحاً ومستقراً. الحساسية محدودة وعادة ما تكون الاختبارات قابلة للتطبيق فقط على البول و/أو العينات الأخرى التي تحتوي على كميات كبيرة نسبياً من السم، مثل محتويات المعدة. ومن الممكن استخلاص السم وتطبيق اختبار اللون على الراسب، رغم أن هذا نادراً ما يتم للسوائل البيولوجية. كما أن النتائج السلبية الكاذبة تمثل خطراً حتى عند استخدام الاختبار للغرض المخصص له في عينات مناسبة. وتعمل النتائج الإيجابية مع سموم مثل الباراسيتامول أو الباراكوات للإشارة إلى الحاجة إلى قياس كمي في البلازما. أما الاختبارات الأخرى مثل اختبار "فورست" (Forrest test) للمركبات الشبيهة بالإيميبرامين واختبار "FPN" للفينوثيازينات (Table 1) فهي أقل فائدة وتكتفي بالإشارة إلى الحاجة إلى تحليل كروماتوغرافي تأكيدي. ويمكن استخدام هذه الكواشف نفسها كعوامل تحديد للمواقع (Location agents) بعد الكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)، وقد تم تطوير بعضها للاستخدام في القياسات الكمية.

أحياناً يُطلب من مختبر علم السموم التحليلي تحديد الأشكال الصيدلانية (الأقراص، إلخ) أو المواد النباتية، سواء كانت سليمة أو موجودة في محتويات المعدة. وقد أصدرت منظمة الصحة العالمية (WHO) للأعوام (1986, 1991, 1998) سلسلة من الكتيبات التي تقدم تفاصيل عن اختبارات ألوان بسيطة لتأكيد هوية المستحضرات الصيدلانية، ومؤخراً الأدوية العشبية. تهدف هذه الاختبارات إلى تأكيد هوية التركيبات، والتي يمتلك الكثير منها سمية ذاتية منخفضة، وذلك قبل الاستخدام السريري، وتتطلب مجموعة من الكواشف لإجراء هذه الاختبارات.

قياس الطيف الضوئي بالأشعة فوق البنفسجية/المرئية

عندما يتم تشعيع مركب بإشعاع كهرومغناطيسي ذو طول موجي مناسب، فإنه يمتص الطاقة. قد تُنبعث هذه الطاقة الممتصة كإشعاع عند طول موجي أقل طاقة (أطول) (الوميض الفلوري "fluorescence" أو الوميض الفسفوري "phosphorescence")، أو تتبدد كحرارة، أو تؤدي إلى تفاعل كيميائي ضوئي. تحتل أشعة غاما وأشعة إكس منطقة الطول الموجي القصير (الطاقة العالية) من الطيف، تليها الأشعة فوق البنفسجية (UV)، والمرئية، والأشعة تحت الحمراء، وإشعاعات الميكروويف، وأخيراً موجات الراديو.

جدول (1): بعض اختبارات الألوان شائعة الاستخدام [1]

الاختبار	المادة (المواد) المحللة	السائل	حد الحساسية (ملغ لتر—1)	مركبات إضافية يتم الكشف عنها
o-Cresol/ ammonia	باراسيتامول	البول	1[a]	أنيلين[b] ، بنوريلات[b] ، إيثيلين دياميين[c]، نيتروبنزين[b] ، فيناسيتين
Diphenylamine	عوامل مؤكسدة	محتويات المعدة[d]	10	برومات، كلورات، يودات، نترات، نتريت، بيروكسيدات
Dithionite	باراكوات (أزرق) ديكوات (أصفر-أخضر)	البول[e]	1 5	—
Diphenylamine	إيثكلورفينول	البول	1	—
Forrest	إيميبرامين	البول	25	كلوميبيرامين، ديسيبرامين، تريميبرامين
FPN[f]	فينوثيازينات	البول	25[g]	—
Fujiwara	مركبات ثلاثي الكلور	البول	1[h]	هيدرات الكلورال، كلوروفورم، ثنائي كلورال فينازون، ثلاثي كلورو إيثيلين، تريكلوفوس
Trinder's[i]	ساليسيلات	البلازما، البول، محتويات المعدة[d]	10	ألوكسيبرينb^، أمينوساليسيلات، أسبرين[b]، بنوريلات[b] ، ميثيل ساليسيلاتb^، ساليسيل أميد[b]

- a^ كما في p-aminophenol.
- b^ بعد الأيض أو التحلل المائي.
- c^ من الأمينوفيلين، على سبيل المثال.
- g^ كما في الكلوربرومازين.
- h^ كما في ثلاثي كلورو الأسيتات.
- i^ تتداخل الكيتونات مع هذا الاختبار.
- d^ تشمل القيء، وغسيل المعدة، ومخلفات مسرح الحادث والعينات المماثلة.
- e^ يمكن استخدامه على البلازما في الحالات الشديدة.
- f^ كلوريد الحديديك/ حمض البيركلوريك/ حمض النيتريك.

تنتج تأثيرات مختلفة عن امتصاص الأنواع المختلفة من الإشعاع؛ حيث يعمل الضوء المرئي والأشعة فوق البنفسجية (UV) على إثارة الإلكترونات من حالتها المستقرة (Ground state) إلى حالات طاقة أعلى (مُثارة). ويُرمز للأطوال الموجية (λ) التي يحدث عندها أقصى امتصاص بالرمز λmax. أما الأشعة تحت الحمراء (IR) فتحفز اهتزازات جزيئية (في الروابط)، بينما تُستخدم الموجات الدقيقة (Microwaves) لتحفيز تحولات دوران الإلكترون في مطيافية الرنين المغناطيسي للإلكترون (ESR). وتستخدم مطيافية الرنين المغناطيسي النووي (NMR) أطوالاً موجية تقع بين موجات الراديو والتلفزيون للكشف عن انقلابات دوران الإلكترون النووي.

قانون بير-لامبرت (The Beer–Lambert law)

في قياس الطيف الضوئي بالأشعة فوق البنفسجية/المرئية، تمتص المادة المحللة بعض طاقة الضوء الساقط نتيجة إثارة الإلكترونات في الجزيئات إلى مستويات طاقة أعلى. إذا كانت شدة الضوء الساقط هي I_0 وطاقة الضوء النافذ هي I، فإن النفاذية T هي:

$$T = \frac{I}{I_0} \qquad (1)$$

إن القانون الذي يحكم العلاقة بين شدة الضوء الداخل إلى الخلية والخارج منها هو قانون "بير-لامبرت". وينص هذا القانون على أنه بالنسبة لمحلول من مذاب ممتص في مذيب شفاف، فإن كسر الضوء الساقط الممتص يتناسب مع عدد جزيئات المذاب في مسار الضوء (قانون بير) وطول المسار (قانون لامبرت):

$$\text{Absorbance} = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon c b \qquad (2)$$

[1] انظر Flanagan et al. (1995) لمزيد من التفاصيل

حيث أن I_0 هي شدة الضوء الساقط، و I هي شدة الضوء النافذ، و c هو تركيز المذاب (mol L^{-1})، و ϵ هي الامتصاصية المولية (Molar absorptivity)، والتي كانت تُعرف سابقاً باسم معامل الانقراض ($\text{L cm}^{-1}\ \text{mol}^{-1}$)، و b هو طول المسار (cm).

تعد الامتصاصية المولية خاصية أساسية للمادة المحللة، لكنها تعتمد أيضاً على درجة الحرارة، والطول الموجي، والمذيب. وترتبط الامتصاصية (A) خطياً بكل من تركيز المذاب وطول المسار في المحاليل المخففة فقط. في الكتب المدرسية القديمة، كان يُشار إليها باسم الكثافة الضوئية (OD) أو الانقراض (E)، لكن هذه المصطلحات أصبحت مهجورة الآن. أما الامتصاصية النوعية ($A1\%_{,1cm}$) فهي امتصاصية محلول بتركيز 1% (وزن/حجم) من المذاب في خلية طول مسارها 1cm، وعادة ما تُكتب بالصيغة المختصرة A11. وهناك عدد من الأسباب التي قد تؤدي إلى ظهور انحرافات عن قانون بير-لامبرت (Box 4.2).

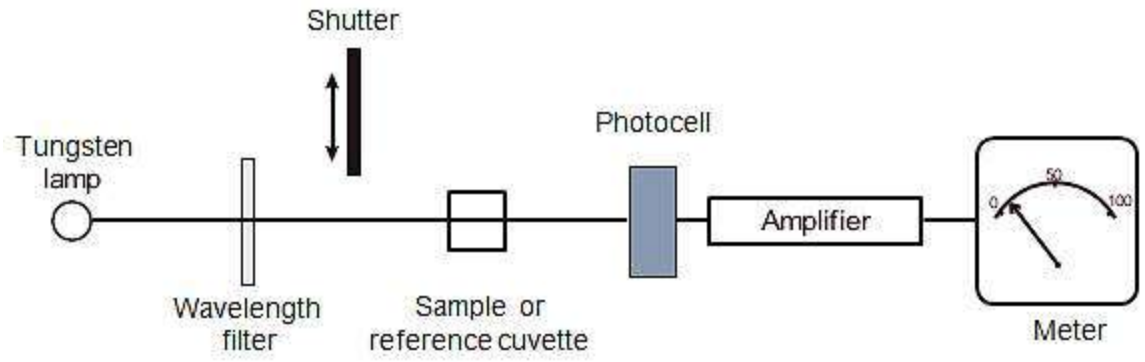
إطار (2): قانون بير-لامبرت: العوامل المسببة لعدم الخطية

- **تركيز المادة المحللة (Analyte concentration)**
  - عند التركيز العالي (أكبر من $0.01\ mol\ L^{-1}$)، تقلل التفاعلات الكهروستاتيكية بين الأنواع الكيميائية من الامتصاصية.
  - تغيرات معامل الانكسار عند التركيز العالي للمادة المحللة.
- **التفاعلات/التحلل (Interactions/decomposition)**
  - تفكك المادة المحللة أو ارتباطها أو تفاعلها مع المذيب.
  - وجود جسيمات في مسار الضوء.
  - وجود وميض فسفوري (Phosphorescence) أو وميض فلوري (Fluorescence) في العينة.
  - يصبح امتصاص الأكسجين عاملاً مقيداً عند أطوال موجية أقل من حوالي 205 nm.
- **عوامل ناتجة عن الأجهزة (Instrumental)**
  - الضوء الساقط متعدد الألوان (Polychromatic) وليس أحادي اللون (Monochromatic). فتحة الدخول ذات عرض محدود، وبالتالي فإن الضوء الساقط يتكون من أكثر من طول موجي واحد. ولأن قيمة ϵ تختلف باختلاف الطول الموجي، فإن هذا يؤدي إلى انحرافات في قانون بير. بالنسبة لعرض فتحة معين، سيكون التباين في ϵ أكبر عند منحدر قمة الامتصاص منه عند القمة القصوى، لذا يتم تقليل هذا التأثير عن طريق إجراء القياس عند λ_{max}.
  - يصبح تأثير الضوء الشارد (Stray light) الناتج عن الإشعاع المنعكس في الموحد اللوني (Monochromator) والذي يصل إلى فتحة الخروج أكثر وضوحاً عند قيم الامتصاصية العالية.

الأجهزة (Instrumentation)

يمكن تقسيم أجهزة قياس الطيف الضوئي إلى نوعين أساسيين: أحادية الحزمة (Single beam) أو مزدوجة الحزمة (Double beam). غالباً ما يُشار إلى أبسط تصميمات الحزمة الأحادية (الشكل 1) باسم "المقاييس اللونية" (Colorimeters) عندما يقتصر عملها على المنطقة المرئية من الطيف الكهرومغناطيسي. مصدر الضوء في هذه الأجهزة هو مصباح ذو فتيلة من التنجستن، ويتم اختيار الطول الموجي التحليلي باستخدام مرشح (Filter) ملون مناسب. تمر حزمة الضوء عبر خلية العينة (Cuvette) الموجودة في غرفة عينات مانعة للضوء، ويتم قياس شدة الضوء النافذ بواسطة خلية ضوئية (Photocell). وبعد التضخيم، تتم مراقبة الإشارة

بواسطة مقياس. كانت المقاييس اللونية القديمة تُعاير بنظام النفاذية الخطي، بينما كانت الامتصاصية توضع كمقياس لوغاريتمي متراكب على لوحة المقياس.



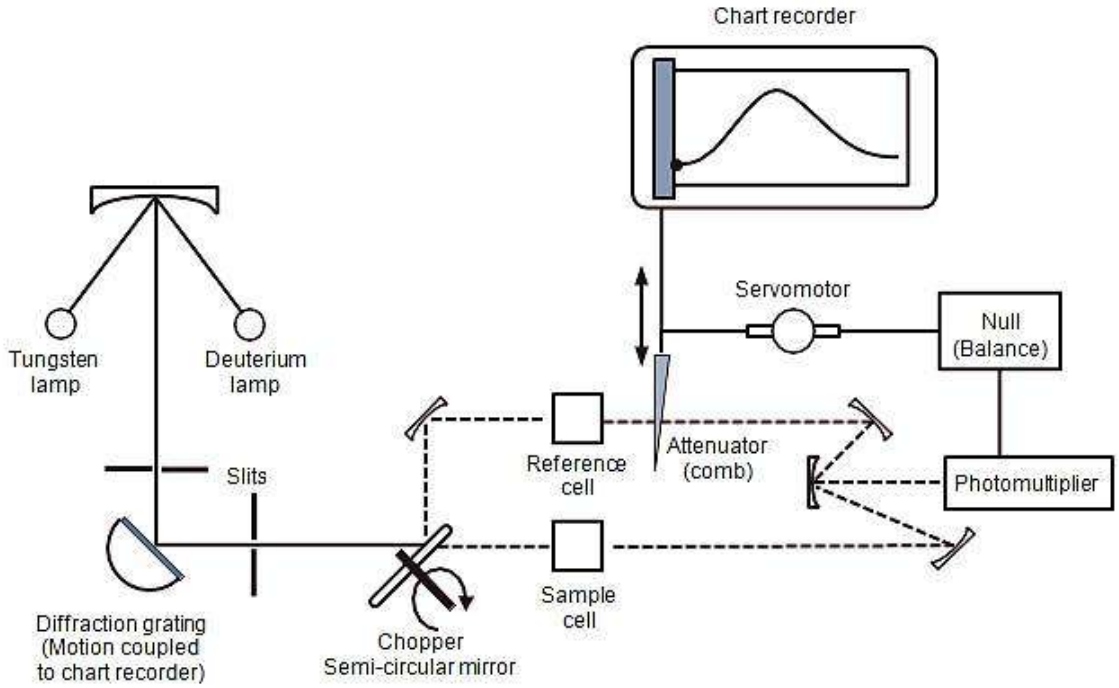
الشكل (1): المكونات الأساسية لمقياس الألوان أحادي الحزمة أو مقياس الطيف الضوئي بالأشعة فوق البنفسجية.

لقياس امتصاصية محلول عينة:

- اختر الطول الموجي.
- أغلق الغالق (Shutter) واضبط المقياس على صفر نفاذية.
- ضع خلية المرجع (Reference cuvette) في غرفة العينة واضبط المقياس على نفاذية 100% (صفر امتصاصية).
- استبدل خلية المرجع بخلية العينة وسجل الامتصاصية.

أدى إدخال مصابيح الهيدروجين (ولاحقاً الديتيريوم) والموحدات اللونية (Monochromators) -مثل منشورات الكوارتز أو محزوزات الحيود- إلى توسيع نطاق الطول الموجي القابل للاستخدام ليشمل منطقة الأشعة فوق البنفسجية (UV). كما أن مصابيح فتيلة التنجستن-هالوجين، والتي يساعد فيها وجود كمية صغيرة من اليود في إعادة ترسيب التنجستن المتبخر على الفتيلة مما يطيل عمر المصباح، قابلة للاستخدام أيضاً في منطقة الأشعة فوق البنفسجية البعيدة.

تتميز مقاييس الطيف الضوئي أحادية الحزمة بالطاقة العالية ونسب الإشارة إلى الضوضاء الجيدة، وهي مناسبة للقياسات الكمية عند طول موجي واحد. يمكن الحصول على الأطياف يدوياً، ولكن عند كل طول موجي يجب ضبط الصفر ونفاذية 100% كما هو موضح أعلاه، مما يجعل العملية مملة للغاية؛ فعلى سبيل المثال، قد يستغرق الحصول على طيف الامتصاص المعقد نسبياً للبنزين يوماً كاملاً من الجهد المكثف لمشغل ماهر. وتتغلب أجهزة قياس الطيف الضوئي مزدوجة الحزمة على هذه المشكلة من خلال التعويض التلقائي للفروق في شدة الضوء الساقط أثناء المسح الطيفي. في أجهزة "العدم البصري" (Optical-null instruments)، يتم تقسيم حزمة الضوء إلى حزمتي عينة ومرجع بواسطة مرآة نصف دائرية دوارة (غالباً ما تُسمى قاطع الحزمة أو ببساطة "Chopper"). يتم توجيه الحزم، التي تتكون من نبضات ضوئية غير متوافقة في الطور (Out of phase)، عبر حجرات العينة أو المرجع ثم يتم تجميعها مرة أخرى قبل توجيهها إلى أنبوب مضاعف ضوئي واحد (الشكل 2).



الشكل (2): مخطط لمقياس طيف ضوئي نموذجي مزدوج الحزمة بنظام العدم البصري.

عندما تكون قيم الامتصاصية في حزمتي العينة والمرجع متطابقة، فإن أنبوب المضاعف الضوئي "يرى" حزمة ضوئية مستمرة. ومع ذلك، إذا كانت للعينة امتصاصية أعلى من عينة المرجع، فلن تعود الحزمة مستمرة، بل تصبح متقطعة (درجية). تقوم دائرة "العدم البصري" (Optical-null) بتشغيل محرك مؤازر (Servomotor) يحرك مخففاً (مشطاً) داخل حزمة المرجع حتى تتوازن الإشارات، ويتم تسجيل حركة المخفف كطيف. يتم الحفاظ على دقة الطول الموجي عن طريق ربط حركة المسجل بحركة الموحد اللوني (Monochromator). عند الامتصاصية العالية (A=2)، تكون النفاذية 1% ويصل القليل من الضوء -إن وجد- إلى الكاشف، ويصبح قلم المسجل "ساكناً" (Dead)، ولا يمكن إجراء أي قراءات. وتظهر قيم حد القطع (Cut-off) للأشعة فوق البنفسجية لبعض المذيبات الشائعة في الجدول اللاحق.

تستخدم الأجهزة الحديثة مزدوجة الحزمة أنبوبين للمضاعف الضوئي وتقوم بحساب نسبة الإشارات. ومع ذلك، يمكن أن تكون الضوضاء الكهربائية الخلفية عاملاً مقيداً عند قيم الامتصاصية العالية، لذا تماماً مثل أجهزة "العدم البصري"، لا يمكن إجراء قياسات في هذه الظروف. أما الأجهزة الحديثة أحادية الحزمة فتستخدم معالجات دقيقة، بحيث يمكن تخزين عمليات المسح الخلفية وطرحها من بيانات العينة.

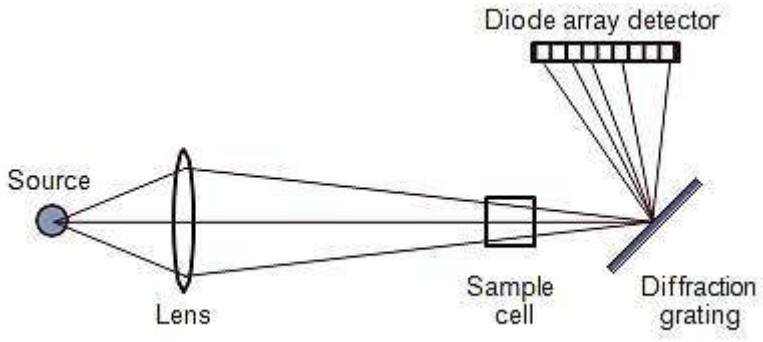
في كاشف مصفوفة الثنائيات (DAD، الشكل 3)، يكون الكاشف عبارة عن مصفوفة خطية، يتراوح طولها عادة بين 3 إلى 7 سم، وتتكون من أكثر من 1000 ثنائي (في الأجهزة الحديثة تبلغ دقة الطول الموجي حوالي 1 نانومتر لكل ثنائي، ودقة الطول الموجي 1 نانومتر، والحساسية أفضل من 10−4 وحدة امتصاص "au"). يمر الضوء من المصدر عبر العينة إلى محزوز الحيود (Diffraction grating)، الذي يشتت الحزمة على المصفوفة؛ حيث يسجل كل ثنائي الامتصاصية عند طول موجي محدد. وبالتالي، يتم تسجيل الطيف بشكل لحظي تقريباً، مما يجعل كاشف مصفوفة الثنائيات مفيداً بشكل خاص لكروماتوغرافيا السوائل عالية الأداء (HPLC)، حيث يمكن مسح عدة أطياف عبر قمة الشطف (Eluting peak).

جدول(2): بعض مذيبات الاستخلاص واسعة الاستخدام

المذيب (Solvent)	الكثافة النسبية (RD)	درجة الغليان (BPt)م°	حد قطع الأشعة فوق البنفسجية(nm)	قابل للاشتعال	ثابت العزل الكهربائي	القطبية[a]	الذوبانية في الماء (جم/لتر)
بيوتيل أسيتات[b]	0.88	125	255	نعم	5.01	—	7.0
كلوروفورم[c]	1.49	61	245	لا	4.81	4.4	8.0
سيكلوهكسان	0.78	81	210	نعم	2.03	0	0.0
2,1-ثنائي كلورو إيثان	1.25	83	230	نعم	10.65	3.7	8.7
ثنائي كلورو ميثان	1.32	40	235	نعم	8.93	3.4	13
إيثيل أسيتات[b]	0.90	77	255	نعم	6.02	4.3	83
هيبتان	0.68	98	210	نعم	1.92	0	0.5
MTBE^b	0.74	55	220	نعم	4.5	—	48
إيثر بترولي[d]	0.65	40–60	210	نعم	حوالي 2	—	0.0
تولوين	0.87	111	285	نعم	2.38	2.3	0.53
4,2,2-ثلاثي ميثيل بنتان	0.69	99	210	نعم	1.9	0.4	0.0

هوامش الجدول:

- a وفقاً لـ (Snyder, 1974).
- b مستقبل للبروتون (Hydrogen acceptor).
- c مانح للبروتون (Hydrogen donor).
- d نطاق الغليان 40-60 درجة مئوية - خليط من البنتان والهكسان وما إلى ذلك (تتوفر نطاقات غليان أخرى).



الشكل (3): مخطط لكاشف مصفوفة الثنائيات الخطية.

ومع جميع أنواع مقاييس الطيف الضوئي، من المهم التأكد من محاذاة الموحد اللوني بشكل صحيح. ويمكن التحقق من ذلك من خلال ملاحظة قمم الامتصاص القصوى (λmax) لمحلول أو مادة مرجعية معروفة. فعلى سبيل المثال، يحتوي مرشح زجاج أكسيد الهولميوم على قمم رئيسية عند عدد من الأطوال الموجية المهمة (241.5، 279.4، 287.5، 333.7، 360.9، 418.4، 453.2، 536.2، و 637.5 نانومتر). وهناك طريقة بسيطة للتحقق من الدقة القياسية الضوئية وهي قياس امتصاصية محلول ثنائي كرومات البوتاسيوم الحمضي (Flanagan et al., 1995).

ومن المهم أن تكون الخلايا (Cuvettes) المستخدمة في مقياس الطيف الضوئي ذات مواصفات صحيحة وأن تكون نظيفة تماماً. تقليدياً، كانت تُستخدم الخلايا الزجاجية للقياسات في المنطقة المرئية (أكبر من 400 نانومتر)، بينما تُستخدم خلايا السيليكا المنصهرة أو الكوارتز للعمل في الأشعة فوق البنفسجية (190-400 نانومتر). ومع ذلك، تتوفر خلايا بلاستيكية يمكن التخلص منها للعمل من 220 إلى 900 نانومتر. عادة ما يتم استخدام خلايا بطول مسار 1 سم، ولكن يمكن أحياناً استخدام خلايا بطول مسار 2 أو 4 سم لتعزيز

الحساسية. تحتوي خلايا قياس الطيف الضوئي عادة على وجهين بصريين ووجهين مطفيين أو مضلعين، ويجب الإمساك بها من الوجوه المطفية أو المضلعة فقط. يمكن مسح الوجوه البصرية بقطعة قماش ناعمة أو ورق تنظيف عدسات فوتوغرافية إذا لزم الأمر. ويجب إدخال العينات بمساعدة ماصة مناسبة، مع الحرص على عدم خدش السطح الداخلي للخلية. كما يجب وضع علامات على خلايا الكوارتز، على الوجه المطفي مثلاً، لضمان وضعها دائماً في مقياس الطيف الضوئي في نفس الاتجاه. وبعد الاستخدام، يجب تنظيف هذه الخلايا بعناية وتركها لتجف.

تتميز أجهزة قياس الطيف الضوئي مزدوجة الحزمة بميزة إمكانية مراعاة الامتصاصية "الخلفية" الناتجة عن الكواشف والمذيبات وما إلى ذلك، وذلك عن طريق وضع مستخلص "فارغ" (خالٍ من المادة المحللة) في موضع المرجع. وعادةً ما يُستخدم مستخلص من بلازما أو مصل "فارغ" لتوفير المحلول المستخدم في خلية المرجع، ولكن يمكن استخدام الماء النقي في مقايسات معينة. من الضروري استخدام زوج متطابق من الخلايا في الأجهزة مزدوجة الحزمة؛ فعند ملئها بمحاليل متطابقة، يجب أن تكون قراءات الامتصاصية ضمن نطاق تفاوت 1%. يمكن شراء أزواج الخلايا المتطابقة ويجب تخزينها معاً في بيئة خالية من الغبار.

قياس الطيف الضوئي الاشتقاقي (Derivative spectrophotometry)

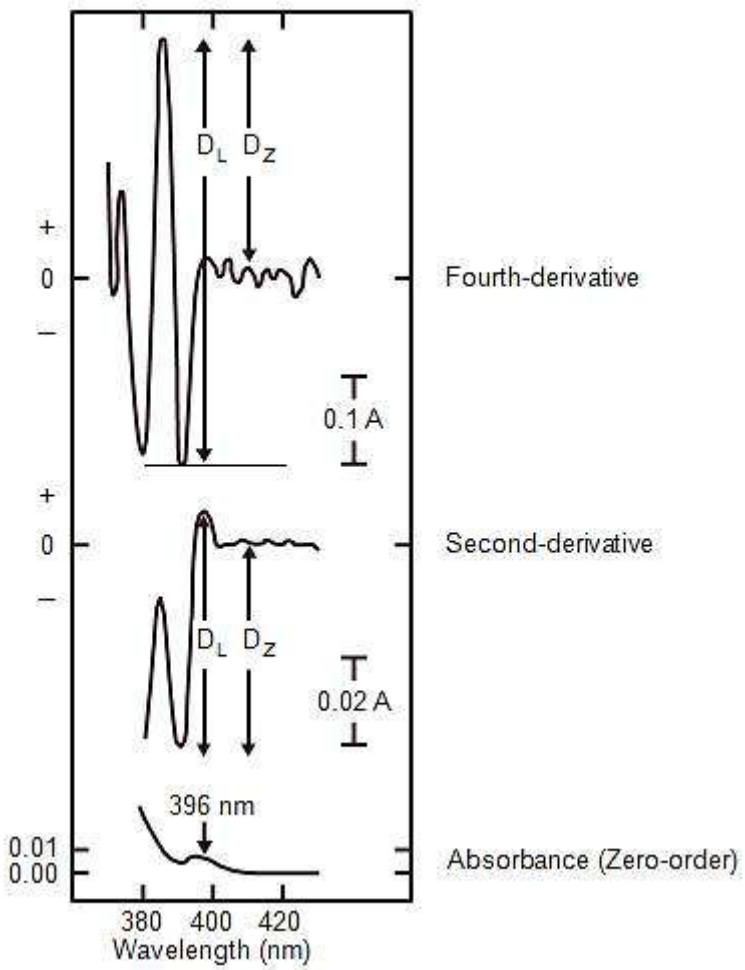
بدلاً من رسم الامتصاصية مقابل الطول الموجي، فإن رسم المشتق الأول (أو مشتق من رتبة أعلى) مقابل الطول الموجي يمكن أن يكشف عن تفاصيل طيفية قد تضيع بخلاف ذلك:

$$\frac{d^n A}{d\lambda^n} = \frac{d^n \varepsilon}{d\lambda^n}.c.b \qquad (3)$$

حيث n هي رتبة المشتق [الرموز الأخرى كما هي معرفة في المعادلة (2)]. ولأن الحساسية تعتمد على معدل تغير ϵ بالنسبة للطول الموجي ($d\lambda/d\epsilon$) بدلاً من ϵ نفسها، فإن هذه التقنية مناسبة للمواد المحللة ذات قمم الامتصاص الحادة. ونتيجة لذلك، عندما يصعب تقدير إشارة المادة المحللة كمياً بسبب التداخلات -كما هو الحال غالباً مع مستخلصات العينات البيولوجية- قد يكون قياس الطيف الضوئي الاشتقاقي مفيداً، لا سيما عندما يكون عرض القمة المتداخلة أكبر بمرتين من عرض قمة المادة المحللة. وبشكل عام، تتناسب الارتفاعات من قمة إلى قمة طردياً مع تركيز المادة المحللة. ومع ذلك، لاحظ أن المعلومات الطيفية تميل إلى التدهور مع زيادة رتبة المشتق، خاصة عندما يكون الطيف غير واضح (مليء بالضوضاء) في البداية، كما أن هناك زيادة واضحة في تكلفة الأجهزة الأكثر تعقيداً.

يمكن الحصول على الأطياف الاشتقاقية باستخدام دوائر إلكترونية لتحويل إشارة الامتصاصية التناظرية (الرتبة صفر) إلى مشتق من الرتبة المناسبة، أو يمكن تحويل الإشارات الرقمية رياضياً. وهناك طريقة ثالثة لأطياف الرتبة الأولى وهي استخدام تعديل الطول الموجي؛ حيث إن مسح الطيف بحزم متبادلة من موحدين لونيين، مع ضبط الأطوال الموجية بفارق 2-3 نانومتر، سينتج شيئاً قريباً جداً من الطيف الاشتقاقي (ΔA تمثل تقريباً الميل عند طول موجي معين).

لقد ثبت أن استخدام قياس الطيف الضوئي الاشتقاقي يحسن نوعية وحساسية طريقة الديثيونيت للباراكوات (الشكل 4)، ولكن بشكل عام، لم يتم اعتماد قياس الطيف الضوئي الاشتقاقي على نطاق واسع، وربما يرجع ذلك إلى النمو السريع لتقنية HPLC.



الشكل (4): أطياف الرتبة صفر، والمشتق الثاني، والمشتق الرابع للباراكوات بعد الاختزال بالديثيونيت

المقاييس الطيفية الضوئية (Spectrophotometric assays)

يمكن استخدام القياس الطيفي الضوئي في كل من العمل النوعي والكمي. ومع ذلك، فإن إحدى المشكلات الرئيسية في محاولة تطبيق القياس الطيفي الضوئي في حد ذاته على المصفوفات المعقدة هي أنها ليست تقنية انتقائية بطبيعتها. فمعظم المركبات الداخلية تمتص في الأشعة فوق البنفسجية (UV)، إن لم يكن في الجزء المرئي من الطيف، وحتى تلك التي تمتلك معاملات امتصاص مولية منخفضة قد توجد بتركيزات فائضة جداً مقارنة بتركيز المادة المحللة (analyte)، مما يجعل الانتقائية وبالتالي الحساسية مشكلة قائمة.

بينما تفتقر المقاييس الطيفية الضوئية عموماً إلى الانتقائية، إلا أنه يمكن غالباً الحصول على بعض المعلومات المتعلقة بنقاء مستخلص العينة من خلال فحص طيف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية باستخدام مقياس طيف ضوئي ماسح؛ كما يمكن إجراء المسح اليدوي على أجهزة أبسط. يمكن لأطياف الأشعة فوق البنفسجية لمستخلصات البول، أو محتويات المعدة، أو رواسب مسرح الجريمة أن تعطي معلومات نوعية مفيدة، ويمكن استخدامها كعامل مساعد لإجراءات فحص الأدوية الأكثر نوعية وحساسية، على الرغم من أنه حتى في هذه الحالة، إذا كان نظام (HPLC-DAD) مستخدماً في المختبر، فقد يكون من الأسهل استخدامه، على الأقل كخطوة أولى. أطياف امتصاص الأشعة فوق البنفسجية للعديد من المركبات ذات الأهمية مذكورة في مرجع **(Moffat et al., 2004)**، ولكن يجب توخي الحذر لضمان أن مزيج الرقم الهيدروجيني (pH)/المذيب المستخدم هو نفسه المستخدم لإنتاج الطيف المرجعي. يمكن أن يكون مسح الطول الموجي عند قيم مختلفة للرقم الهيدروجيني مفيداً في تحديد مكونات الأقراص الدوائية. تم تلخيص بعض جوانب استخدام القياس الطيفي الضوئي في التحليل السمّي في الإطار 3.

إطار 3: القياس الطيفي الضوئي المرئي وفوق البنفسجي

القياس الطيفي الضوئي المرئي (Colorimetry)

- يعد القياس الطيفي الضوئي المرئي أول طريقة كمية موثوقة حقاً استُخدمت لتحليل الأدوية/المستقلبات في الدم.
- الهدف هو إجراء تفاعل مولد للون (chromogenic) مباشرة في العينة مع الحد الأدنى من المعالجة.
  - يمكن استخدام ترويب البروتين (protein precipitation) أو الانتشار الدقيق (microdiffusion).
- **المشكلات:**
  - عدد قليل نسبياً من المواد المحللة تخضع لتفاعلات مولدة للون مناسبة.
  - الانتقائية/الحساسية ضعيفة نسبياً (تداخل من المستقلبات/الأدوية الأخرى).

القياس الطيفي الضوئي فوق البنفسجي (UV)

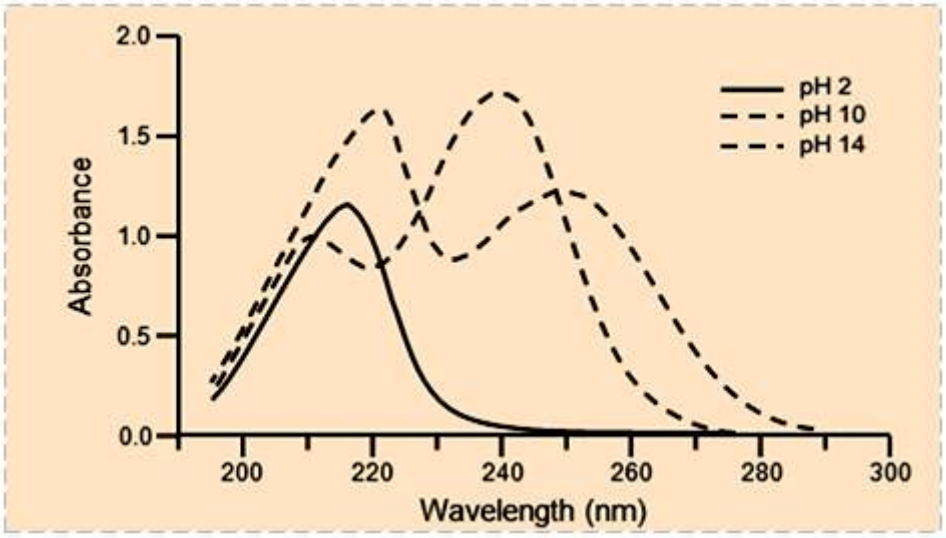
- تعطي أجهزة قياس الطيف الضوئي ثنائية الشعاع أو أجهزة مصفوفة الصمام الثنائي الخطي (linear diode array) النتائج الأكثر موثوقية.
- يمكن إجراء قياس الطيف فوق البنفسجي مباشرة على مستخلصات العينة.
  - تنبيه: استخدم كوفيتات (cuvettes) من السيليكا أو البلاستيك المناسب.
  - انتقائية ضعيفة بشكل عام.
- استخدام أجهزة المسح ثنائية الشعاع (210-400 نانومتر) أو مصفوفات الصمام الثنائي الخطي يمكن أن يساعد في تحديد المادة المحللة.
  - العديد من السموم إما أن يكون لها طيف امتصاص فوق بنفسجي غير محدد بوضوح أو لا تمتص في الأشعة فوق البنفسجية، على الرغم من أن المركبات التي لها أطياف مميزة يمكن تحديدها بسهولة.
  - هناك دائماً احتمال حدوث تداخل إذا وجد أكثر من دواء/مستقلب.
  - يمكن فك الأطياف المعقدة باستخدام القياس الطيفي الاشتقاقي (derivative spectrophotometry).
- يجد القياس الطيفي فوق البنفسجي أكبر تطبيق له ككاشف في تقنية (HPLC)، أو مراقبة معدل التفاعل في المقاييس المناعية، أو في المقاييس القائمة على الإنزيمات المرتبطة بـ NAD/NADH أو NADP/NADPH.

JWBK176-04 JWBK176-Flanagan November 14, 2007 20:19 Char Count= 0 4.3 UV/VISIBLE SPECTROPHOTOMETRY 105

قد يكون من الممكن، باستخدام تقنيات مثل ترويب البروتين، أو استخلاص المذيبات (ربما مع الاستخلاص العكسي عند رقم هيدروجيني مناسب)، أو الانتشار الدقيق، تطوير مقايسة طيفية ضوئية لمادة محللة معينة في سائل بيولوجي محدد. إن تركيز المادة المحللة في حجم أصغر أثناء استخلاص المذيب، على سبيل المثال، قد يعطي حساسية كافية بشرط عدم وجود ملوثات متداخلة. ومع ذلك، فإن العديد من الطرق الطيفية الضوئية تعاني من تداخل المستقلبات بدرجة أو بأخرى. وتعد الأدوية الأخرى مصادر محتملة إضافية للتداخل؛ فقد تكون هذه الأدوية قد وُصفت طبياً أو تم الحصول عليها بدون وصفة طبية، وقد لا تكون مرتبطة كيميائياً بالمادة المحللة، على الرغم من أن المركبات المرتبطة كيميائياً وأي مستقليات تكون أكثر عرضة للتداخل. قد يتم وصف مركبات من نفس الفئة الفارماكولوجية للمادة المحللة في وقت واحد، وقد تكون متشابهة كيميائياً مع المادة المحللة، وبالتالي فمن المرجح أن تكون عمليات التمثيل الغذائي (Metabolism)، والاستخلاص، والاشتقاق، وأطياف الامتصاص جميعها متشابهة.

تاريخياً، استندت طرق الأشعة فوق البنفسجية لقياس الباربيتورات المستبدلة في الموضعين 5,5 (5,5-disubstituted barbiturates) في البلازما أو البول إلى حقيقة أن هذه المركبات تظهر امتصاصاً مختلفاً بشكل ملحوظ عند قيم pH مختلفة (الشكل 5). على سبيل المثال، تم تأييد القياسات عند الرقم الهيدروجيني 10 و14 من أجل توفير الانتقائية على الساليسيلات والسلفونااميدات

(Broughton, 1956)، ووُصف التمييز بين الباربيتورات طويلة وقصيرة المفعول عن طريق تكرار القياسات بعد التحلل المائي القلوي تحت ظروف مضبوطة. ومع ذلك، حتى في ذلك الوقت، ظهرت العديد من التداخلات والشذوذات **(Broughton, 1963; Tompsett, 1969)**.



الشكل (5): طيف الأشعة فوق البنفسجية للباربيتال (50 مجم لتر$^{-1}$) في المحاليل المنظمة المائية.

الساليسيلات في البلازما أو البول

يعتمد مبدأ هذا الاختبار (الإطار 4) على اللون الذي يظهر غالباً عند معاملة الفينولات بملح الحديديك [الحديد (III)]. تعطي الفينولات المختلفة مجموعة من الألوان، حيث ينتج الساليسيلات لوناً أرجوانياً محمراً. يتم ترويب بروتينات البلازما باستخدام كلوريد الزئبقيك [كلوريد الزئبق (II)] بحيث يمكن قياس اللون في السائل الطافي مباشرة. يمكن الاستغناء عن كلوريد الزئبقيك إذا كان المطلوب تحليل عينات البول فقط. ويتم تقليل أي تداخل ناتج عن اللون الأصلي في العينة من خلال التخفيف الكبير المعتمد في هذا الإجراء.

إطار (4): قياس الساليسيلات في البلازما أو البول

الكواشف (Reagents):

- كاشف ترينذر (Trinder's reagent): [10] جم كلوريد زئبقيك + 12 مل حمض هيدروكلوريك (1 مول لتر$^{-1}$) + 4 جم نترات الحديد (III) تساعي الهيدرات [$Fe(NO_3)_{3\cdot 9}H_20$] في 200 مل من الماء منزوع الأيونات].
- محاليل المعايرة: تحتوي على حمض الساليسيليك (0، 200، 400 و800 مجم لتر$^{-1}$) في ماء منزوع الأيونات. تحفظ في درجة حرارة 4 درجة مئوية.

الطريقة (Method):

- أضف كاشف ترينذر (5 مل) إلى البلازما/المصل أو محلول المعايرة (1 مل).
- اخلط بجهاز الفورتكس (30 ثانية) ثم استخدم الطرد المركزي (3000 دورة في الدقيقة، لمدة 10 دقائق).
- قم بكياس امتصاص الطبقة الطافية (مقياس طيف ضوئي ثنائي الشعاع، عند 540 نانومتر) مقابل "عينة بلازما ضابطة" (blank).
- ارسم منحنى الامتصاص مقابل تركيز الساليسيلات في محاليل المعايرة، واحسب تركيز الساليسيلات في البلازما.
- حد القياس الكمي (Limit of quantification): 50 مجم لتر$^{-1}$ ساليسيلات.

الكربوكسي هيموجلوبين (COHb) في الدم الكامل

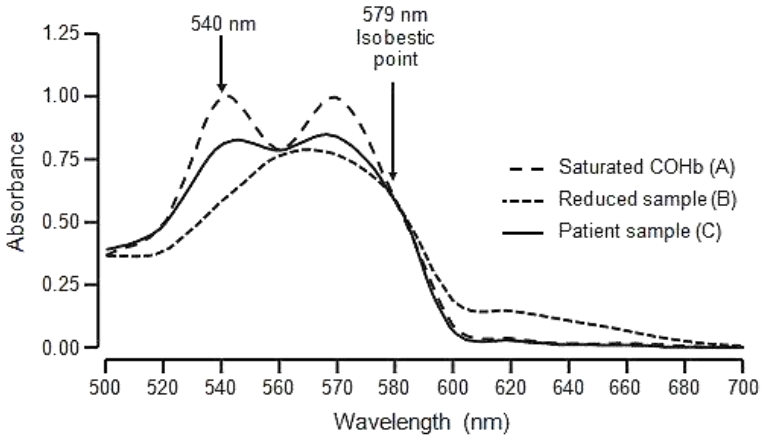
عادة ما يكون عمر النصف لـ COHb في الدم قصيراً جداً، خاصة إذا تم إعطاء الأكسجين، لذا نادراً ما يُطلب تحليل COHb سريرياً. ومع ذلك، فإن قياس COHb طيفياً يعد بسيطاً إذا تم التخلص من الهيموجلوبين المؤكسج (O2Hb) الذي قد يسبب تداخلاً (الإطار 5). يوجد الهيموجلوبين عادة في الدم كشكل غير مؤكسج (HHb) وشكل مؤكسج (O2Hb) مع كمية صغيرة من الكربوكسي هيموجلوبين.

إطار (5): قياس الكربوكسي هيموجلوبين

الطريقة (Method):

- أضف 25 مل من هيدروكسيد الأمونيوم بتركيز 0.1% (حجم/حجم) إلى 0.2 مل من الدم.
  - الجزء (أ) – يتم تشبعه بـ CO نقي. - الجزء (ب) – يتم تشبعه بالأكسجين لفصل COHb.
  - الجزء (ج) – عينة الاختبار.
- أضف ديثيونيت الصوديوم، اخلط واقرأ الامتصاص عند 500-600 نانومتر مقابل الكاشف الضابط (blank).
- قس الامتصاص عند 540 نانومتر (أقصى امتصاص لـ COHb)، وعند 579 نانومتر (نقطة التساوي Isosbestic point) واحسب النسبة A540/A579 للأجزاء أ، ب، ج.
- احسب نسبة تشبع COHb (%).

والميثيموجلوبين (MetHb)، وهو الهيموجلوبين المتأكسد الذي يوجد فيه الحديد في صورة حديد (Fe^{+3}) (III). في هذه المقايسة ، يتم اختزال الأكسي هيموجلوبين (الذي يمتلك طيفاً مشابهاً لطيف COHb) والميثيموجلوبين إلى هيموجلوبين غير مؤكسج (HHb) باستخدام ديثيونيت الصوديوم. لا يتأثر الكربوكسي هيموجلوبين (COHb) بهذا الاختزال، وبالتالي يحتفظ بطيفه المميز الذي يمكن قياسه طيفياً. يتم أخذ قراءات الامتصاص عند 579 نانومتر (نقطة التساوي - isobestic point، أي الطول الموجي الذي يتساوى عنده امتصاص كل من HHb وCOHb) وعند 540 نانومتر، وهو الطول الموجي الذي يكون فيه الفرق في الامتصاص ($A_{COHb} - A_{HHb}$) في أقصى درجاته (الشكل 6). لاحظ كيف يتم الحصول على قيم 100% و0% لـ COHb عن طريق معالجة أجزاء من العينة إما بأول أكسيد الكربون أو بالأكسجين، على التوالي. تتوفر أنظمة تجارية مثل جهاز (IL 682 Co-Oximeter) ، والتي تهدف إلى التعويض عن وجود أنواع الهيموجلوبين الأخرى مثل السلفهيموجلوبين (sulfhaemoglobin) في الدم الذي يتم الحصول عليه بعد الوفاة **(Mayes, 1993; Widdop, 2002)**.



الشكل (6): قياس الكربوكسي هيموجلوبين (لاحظ تمدد الطول الموجي بين 560-580 نانومتر)

السيانيد في الدم الكامل عن طريق الانتشار الدقيق (Microdiffusion)

يوجد أيون السيانيد في الدم بشكل أساسي داخل كرات الدم الحمراء، لذا يُستخدم الدم الكامل في مقايسة السيانيد، ولكن يجب توخي الحذر لتجنب التداخل من الثيوسيانات الموجودة بشكل كبير في البلازما. أيون السيانيد غير متطاير في درجة حرارة الغرفة، ولكنه يتحول إلى سيانيد الهيدروجين المتطاير في الظروف الحمضية؛ بينما لا يتأثر الثيوسيانات بذلك. إذا تم تحميض عينة بيولوجية (مثل الدم المحتوي على السيانيد) في خلية "كونواي" للانتشار الدقيق ، فإن سيانيد الهيدروجين المنطلق يمكن احتجازه في مادة قلوية كأيون سيانيد في البئر المركزي للخلية.

يعطي التفاعل مع "3-نيتروبنزالدهيد / 1,2-دينيتروبنزين" ناتجاً ملوناً يمكن إزالته من الخلية وقياس كثافة لونه طيفياً، باستخدام المزيج الناتج من تحليل "العينة الضابطة" (blank) في موضع المرجع (الإطار 6). تتم معايرة المقايسة عن طريق تحليل محاليل قياسية من سيانيد الصوديوم أو البوتاسيوم في خلايا منفصلة **(Mayes, 1993)**.

إطار (6): قياس السيانيد بطريقة الانتشار الدقيق

الطريقة (Method):

- ضع 1 مل من حمض الكبريتيك (3.6 مول لتر$^{-1}$) في البئر الخارجي لخلية كونواي.
- ضع العينة، أو العينة الضابطة، أو المحلول القياسي (0.5 مل) في الجانب المقابل من البئر الخارجي.
- ضع في البئر المركزي المزيج التالي: [0.5 مل من محلول 3-نيتروبنزالدهيد + 0.5 مل من محلول 1,2-دينيتروبنزين (كلاهما بتركيز 0.05 مول لتر$^{-1}$ في 2-ميثوكسي إيثانول) + 0.1 مل من هيدروكسيد الصوديوم المائي (0.5 مول لتر$^{-1}$)].
- أحكم إغلاق الخلية، واخلط محتويات البئر الخارجي برفق، واتركها لتستقر (20 دقيقة في درجة حرارة الغرفة).
- أضف 1 مل من الميثانول المائي (بنسبة 1:1) إلى البئر المركزي، وانقل المحتويات إلى كوفيتات جهاز قياس الطيف الضوئي وقس الامتصاص عند 560 نانومتر.

القياس اللوني للسلفوناميدات (Colorimetric measurement of sulfonamides)

تعتمد هذه المقايسة على "تفاعل براتون-مارشال" (Bratton–Marshall reaction) الذي تخضع له الأمينات العطرية الأولية. فبعد ترويب البروتين باستخدام حمض ثلاثي كلورو الأسيتيك (TCA)، يتم إجراء عملية "دوزنة" (diazotized) للسلفاديميدين (سلفاميثازين) باستخدام نتريت الصوديوم، ثم يقرن مع مركب "N-نافثيل إيثيلين دياميين" (NED). ويجب إزالة أيون النتريت الزائد عن طريق التفاعل مع سلفامات الأمونيوم قبل إضافة الـ NED. أما مركب "N-أستيل سلفاديميدين"، الذي لا يتفاعل مع النتريت، فيتم قياسه كـ "سلفاديميدين" بعد إجراء عملية التحلل المائي الحمضي. يمكن استخدام هذه الطريقة لتقييم حالة الأستلة (acetylator status) ، وهي طريقة ملائمة وغير مكلفة عند الحاجة لتحليل أعداد كبيرة من العينات؛ كما أنه ليس من الضروري استخدام معايير معايرة لـ N-أستيل سلفاديميدين. ومع ذلك، توفر تقنية (HPLC) دقة أكبر **(Whelpton et al., 1981)**.

التلألؤ (Luminescence)

يُطلق مصطلح "التلألؤ" على الظاهرة التي يتم من خلالها انبعاث الضوء عندما تعود الجزيئات "المثارة" إلى حالة أرضية (ground state) ذات طاقة أقل. الأقسام الثلاثة الرئيسية للتلألؤ هي: الفلورة (fluorescence)، والفسفرة (phosphorescence)، والتلألؤ الكيميائي (chemiluminescence). في حالتي الفلورة والفسفرة، تُثار الجزيئات عن طريق امتصاص الإشعاع

الكهرومغناطيسي الساقط (الضوء)، والذي يُعاد انبعاثه بعد ذلك (عادةً كضوء ذو طول موجي أطول)، أو عن طريق الحرارة، كما هو الحال في قياس انبعاث اللهب ، على التوالي. أما التلألؤ الكيميائي، كما يوحي اسمه، فينتج عندما ينبعث الضوء من جزيئات مُثارة نتيجة تفاعل كيميائي في درجات حرارة المحيط أو قريبة منها دون إدخال أو توليد حرارة.

الفلورة والفسفرة (Fluorescence and phosphorescence)

عندما تمتص الجزيئات الضوء، تنتقل الطاقة من الضوء إلى الإلكترونات الموجودة في الجزيئات، بحيث يتم تعزيز الجزيئات من الحالة الأرضية ذات الطاقة المنخفضة إلى حالة مثارة ذات طاقة أعلى. تبقى الجزيئات عادةً في الحالة المثارة لفترة قصيرة جداً قبل أن تعود إلى الحالة الأرضية. وأثناء عودة الجزيئات إلى الحالة الطاقية الأدنى، يجب أن تفقد طاقة. تفقد معظم الجزيئات هذه الطاقة في شكل اهتزاز جزيئي عن طريق التبديد كحرارة، ولكن بعض الجزيئات تفقد جزءاً من هذه الطاقة عبر انبعاث الضوء.

يكون الضوء المنبعث عادةً ذا طول موجي أطول (أقل طاقة) من الضوء الممتص. ويرجع ذلك إلى أن الجزيئات المثارة تفقد بعض الطاقة الممتصة من خلال انتقالات غير إشعاعية، مثل التصادم مع جزيئات أخرى، أو عودة الإلكترونات إلى مستويات طاقة أعلى في الحالة الأرضية، وبالتالي تكون طاقة الضوء المنبعث أقل بالمقابل.

- **الفلورة (Fluorescence):** هو المصطلح المستخدم عندما ينبعث الضوء بشكل فوري تقريباً، عادةً في غضون 10^{-9} أو 10^{-12} ثانية من امتصاص الطاقة. وتصف "فلورة الرنين" الحالة التي يكون فيها تردد الضوء المنبعث هو نفسه تردد الضوء الممتص.
- **الفسفرة (Phosphorescence):** تحدث عندما ينتقل إلكترون مثار في حالة "السينجليت" (singlet state) (إلكترونات مزدوجة لها دوران مغزلي متعاكس) إلى حالة "التريبلت" (triplet state) (إلكترونات مزدوجة لها نفس الدوران المغزلي). تُعرف هذه الانتقالات باسم "الانتقالات المحظورة" لأن احتمالية حدوثها منخفضة جداً. يجب أن يعود الإلكترون إلى حالة السينجليت المثارة قبل أن يتمكن من العودة إلى الحالة الأرضية للسينجليت وينبعث الضوء أثناء قيامه بذلك، وبالتالي فإن الفسفرة أطول عمراً بكثير من الفلورة، وتكون عادةً في حدود عدة ثوانٍ. لا تُستخدم مقاييس الفسفرة على نطاق واسع في التحليل السمّي، وإحدى المشكلات هي الحاجة في بعض الأحيان إلى تبريد العينات بالنيتروجين السائل (77 كلفن) **(Hadley et al., 1974)**، على الرغم من وجود اهتمام حديث بمقاييس الفسفرة الحركية لليورانيوم في العينات البيولوجية **(Ejnik et al., 2000)**.

شدة الفلورة والعائد الكمي (Intensity of fluorescence and quantum yield)

إن كسر الجزيئات المثارة التي تنبعث منها الضوء هو ما يُعرف بالعائد الكمي (quantum yield) أو الكفاءة الكمية (ϕ) للفلورة. الجزيئات ذات الفلورة العالية يكون لها عائد كمي يقترب من **1**. بالنسبة للمحاليل المخففة، فإن شدة الفلورة (If) هي دالة في (ϕ) والامتصاصية وشدة الضوء الساقط (I_0). وبما أن الامتصاصية تُعطى حسب قانون "بير"، فإن:

$$I_f = 2.3 I_0 (\varepsilon c b) \phi \quad \rightarrow (4)$$

من المعادلة (4)، يتضح أن مقدار الإشارة يتناسب طردياً مع شدة الضوء الساقط وكذلك مع تركيز المادة المحللة (c)، ونتيجة لذلك، فإن الفلورة -على عكس الامتصاصية- هي قيمة "نسبية" وليست مطلقة. لا يمكن حساب تركيز المادة المحللة من شدة الفلورة

بنفس الطريقة التي يُحسب بها من الامتصاصية والامتصاصية المولية في القياس الطيفي الضوئي. يجب دائماً الحصول على تركيزات عينة المادة المحللة عن طريق المقارنة مع تركيزات المحاليل القياسية للمادة. ويتم الإبلاغ عن الفلورة كـ "شدة نسبية" أو "فلورة (وحدات اعتبارية)".

تنطبق المعادلة (4) فقط على المحاليل المخففة. أما "الخمود" (Quenching)، الناتج عن امتصاص الضوء الساقط أو المنبعث من قبل مركبات أخرى، أو من قبل المادة المحللة نفسها (الامتصاص الداخلي)، فإنه يقلل من كفاءة الفلورة، كما يفعل الخمود الناتج عن التفاعلات الجزيئية (التصادمات) التي تؤدي إلى الاسترخاء غير الإشعاعي للجزيئات المثارة إلى الحالة الأرضية. ومن النتائج الهامة جداً للخمود أنه مع زيادة تركيز المادة المحللة، ستصل شدة الفلورة إلى حد أقصى ثم تنخفض. وبالتالي، من الممكن لعينتين، إحداهما مخففة والأخرى مركزة، أن تظهرا نفس الدرجة من الفلورة. إذا اشتُبه في وجود درجة عالية من الخمود، فيجب تخفيف العينة وإعادة فحصها.

عادة ما تنخفض الفلورة عند درجات الحرارة المرتفعة (بسبب زيادة عدد التصادمات) وغالباً ما تعتمد على الرقم الهيدروجيني (pH). قد يكون كل من الشكل المتأين وغير المتأين للإلكتروليت الضعيف فلورياً، ولكن من النادر أن يكون لكلا النوعين نفس الكفاءة الكمية. الباربيتورات، على سبيل المثال، تظهر فلورة في هيدروكسيد الصوديوم بتركيز **0.1 مول لتر$^{-1}$**. عند هذا الرقم الهيدروجيني، تكون هذه المركبات متأينة ولها امتصاص قوي عند **255 نانومتر** تقريباً (الشكل 5). ومع ذلك، فإن الفينولات مثل الكاتيكول، تظهر الفلورة عندما تكون غير متأينة، أي في الظروف الحمضية **(Miles and Schenk, 1973)**.

الأجهزة (Instrumentation)

على الرغم من أن الضوء المنبعث في الفلورة يكون غير اتجاهي، إلا أنه يتم قياسه بزوايا قائمة (90 درجة) بالنسبة لشعاع الإثارة لتقليل كمية الضوء الساقط التي تصل إلى الكاشف (الشكل 7). تحتوي بعض الأجهزة على مرشحات (filters) لكل من الإثارة والانبعاث، أو قد يحتوي الجهاز على مزيج من محزوز الحيود (diffraction grating) ومرشح، أو كما في الأجهزة الأكثر تكلفة، قد يكون هناك محزوزا حيود.

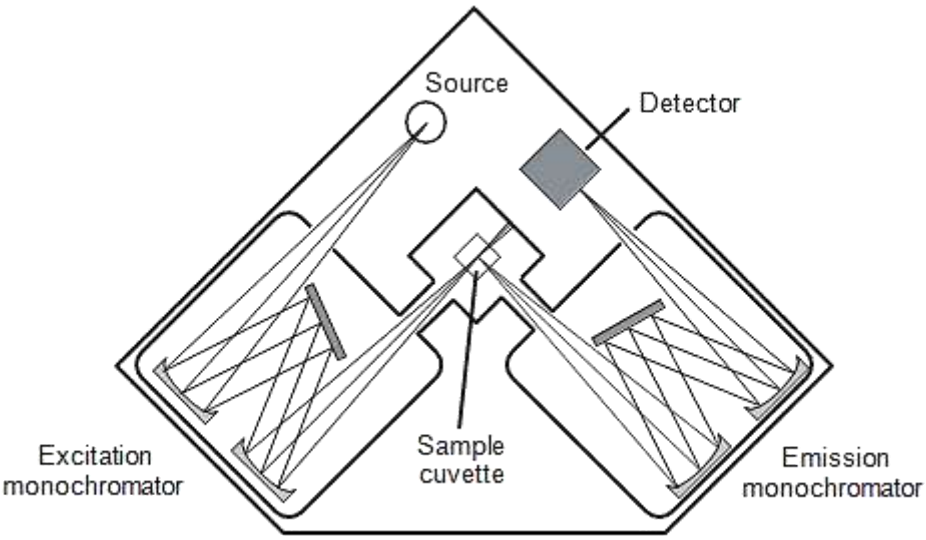


Figure 7. Diagram of a double-grating spectrophotofluorimeter (based on the AMINCO-Bowman design).
الشكل (7): مخطط لمقياس الفلورة الطيفي ثنائي المحزوز (استناداً إلى تصميم AMINCO-Bowman).

تحظى مصابيح الزينون (Xenon lamps) بشعبية كبيرة لأنها تمتلك طاقة مخرجة عالية بين **350-1000 نانومتر**، لذا فهي مصادر ضوئية مفيدة للأغراض العامة. يمكن استخدام مصابيح الزينون حتى **200 نانومتر**، ولكن شدة الضوء تكون أقل بنحو مرتبة مقدار عند هذا الطول الموجي، وبالنسبة لبعض التطبيقات، قد يكون مصباح الديوتيريوم، أو حتى مصباح الزئبق (عندما يمكن استخدام الخط المكثف عند **254 نانومتر**)، أفضل. يمكن استخدام مصابيح الهالوجين للإثارة في المنطقة المرئية. ونظراً لأن شدة الفلورة تعتمد على شدة الضوء الساقط [المعادلة (4)]، فمن المهم في أي تقرير ذكر نوع المصباح المستخدم. قد يتم تشغيل مصابيح الزينون عالية الشدة بنظام النبضات (pulsed) لتقليل خطر التحلل الضوئي للمادة المحللة.

قد تكون كوفيتات العينات مربعة أو دائرية في مقطعها العرضي. الكوفيتات المربعة لها أربعة أوجه بصرية، لذا يجب التعامل معها بعناية من الأعلى وليس من مكان مرور حزم الضوء. على الرغم من أن حوامل العينات غالباً ما تكون مصممة لاستيعاب كوفيتات مربعة مقاس **1 سم**، إلا أن المساحة التي يتم إجراء القياسات عليها تحددها عرض شقوق الانبعاث، ويمكن استخدام كوفيتات أصغر دون أي فقدان في إشارة الفلورة؛ وفي الواقع، تتميز الخلايا ذات المسار الضوئي الأصغر بقلة فقدان الضوء الناتج عن الامتصاص.

ونظراً لأن شدة الضوء الساقط تكون عموماً أعلى بكثير من شدة الضوء المنبعث، فإن تشتت الضوء الناتج عن الجسيمات في محلول العينة يمكن أن يؤثر بشكل خطير على حساسية المقايسة. لذا، فإن تقنية التحليل الجيدة مهمة في مقايسات الفلورة عالية الحساسية. أيضاً، كلما كانت أطوال موجات الإثارة والانبعاث متشابهة، زاد احتمال تداخل الضوء الساقط مع إشارة الانبعاث. وسيؤدي استخدام محزوزات الحيود المزدوجة وعرض الشقوق الضيق إلى تقليل هذه المشكلة.

يمكن استنتاج الطول الموجي للإثارة (Excitation wavelength) لمادة محللة معينة من طيف الأشعة فوق البنفسجية (UV). إذا تم ضبط طول موجة الإثارة عند ذروة الامصاص، فيمكن حينها مسح طول موجة الانبعاث حتى يتم العثور على الحد الأقصى للانبعاث. وبمجرد ضبط مونوكروماتور (مُوحّد لون) الانبعاث عند أقصى طول موجي له (λmax)، يمكن مسح مونوكروماتور الإثارة لتحديد الـ λmax الدقيق للإثارة. وبذلك يصبح طيفا الإثارة والانبعاث عند أقصى قيمة لهما ومتساويين (الشكل 8).

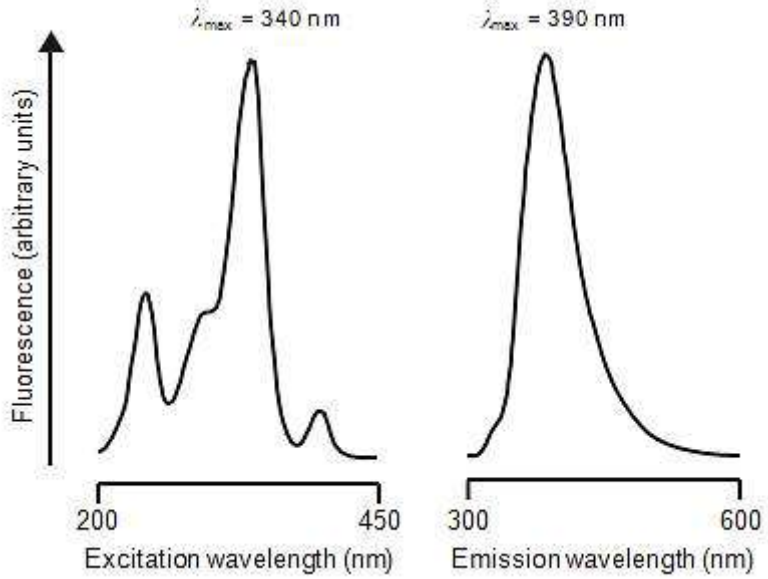


Figure 8. Excitation and emission spectra of quinine (1 mg L^{-1}) in deionized water.
الشكل (8): أطياف الإثارة والانبعاث للكينين (1 مجم لتر$^{-1}$) في ماء منزوع الأيونات.

مقايسات الفلورة (Fluorescence assays)

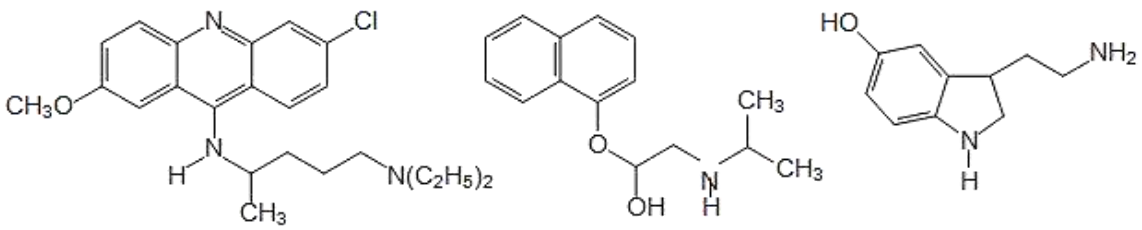
يوفر قياس الفلورة حساسية معززة مقارنة بالطرق الطيفية الضوئية للأدوية التي تتمتع بفلورة طبيعية. وبشكل عام، تزداد الحساسية بمقدار مرتبة أو مرتبتين عشريتين لأن:

1. عدداً محدوداً فقط من الأدوية والسموم الأخرى يمتلك فلورة طبيعية.
2. يمكن تغيير كل من أطوال موجات الإثارة والانبعاث.

ترتبط الكفاءة الكمية العالية بالمركبات التي تمتلك انتقالات من نوع $\pi \longrightarrow {}^*\pi$ ذات الطاقة المنخفضة؛ وتشمل هذه المركبات العطرية المقترنة (وعادةً كلما كان الهيكل البنائي أكثر صلابة، زادت الفلورة). غالباً ما يؤدي استبدال مجموعة "ألكيلوكسي" (alkyloxy) على حلقة عطرية إلى ظهور خصائص فلورية. ومع ذلك، فإن استبدال المجموعات الساحبة للإلكترونات (الCarbonyl، الCarboxylate، الNitro) يقلل عادةً من شدة أي فلورة. تشمل الأدوية التي تمتلك مجموعات حاملة للفلورة (fluorophores) جيدة العديد من مضادات الملاريا والمضادات الحيوية من فئة التتراسيكلين، والبروبرانولول، والقلويدات مثل الإرغومترين، وLSD، والفيزوستيغمين (الشكل 9).

إذا كانت المادة المحللة لا تمتلك فلورة ذاتية، فقد يكون من الممكن إجراء عملية "اشتقاق" (derivatization) لتحويلها إلى ناتج فلوري إذا كانت المادة تمتلك مجموعة وظيفية تفاعلية قابلة للتفاعل الكيميائي. تتوفر مجموعة من الكواشف المولدة للفلورة، بما في ذلك "دانزيل كلوريد" (dansyl chloride) و"فلوريسامين" (fluorescamine). ويعد مركب "1,2-فثاليك ديكاربوكسالدهيد" (o-phthaldialdhyde, OPA) مفيداً بشكل خاص للأمينات الأولية، وقد استُخدم لتعزيز القدرة على الكشف في تقنية HPLC .

كمثال على مقايسة الفلورة، يظهر الكينين وصنوه الفراغي (stereoisomer) الكينيدين فلورة طبيعية قوية تحت الظروف المتعادلة أو الحمضية. كلا الدواءين محبان للدهون (lipophilic) نسبيًا، وبالتالي يمكن استخدام استخلاص المذيبات لفصل المركبات الأصلية عن المستقلبات القطبية الفلورية، لا سيما مستقلب "3-هيدروكسي"، وهذا يشكل أساس مقايسات الفلورة الحساسة مثل تلك المستخدمة لقياس الكينين في البلازما (الإطار 7). ومع ذلك، يمكن أن يحتوي الكينين والكينيدين التجاريان على ما يصل إلى 10% (وزن/وزن) من مشتقات "ثنائي الهيدرو" المقابلة، والتي تمتلك خصائص استخلاص وفلورة مشابهة للمركبات الأصلية، وبالتالي فإن الجمع بين استخلاص المذيبات والقياس الطيفي الفلوري ليس انتقائياً تماماً في هذه الحالة. ولذلك، هناك حاجة إلى طريقة كروماتوغرافية مثل HPLC مع كاشف الفلورة لفصل نظائر ثنائي الهيدرو للكينين والكينيدين، مما يسمح بالقياس الانتقائي.



Chloroquine Propranolol Serotonin (5-HT)

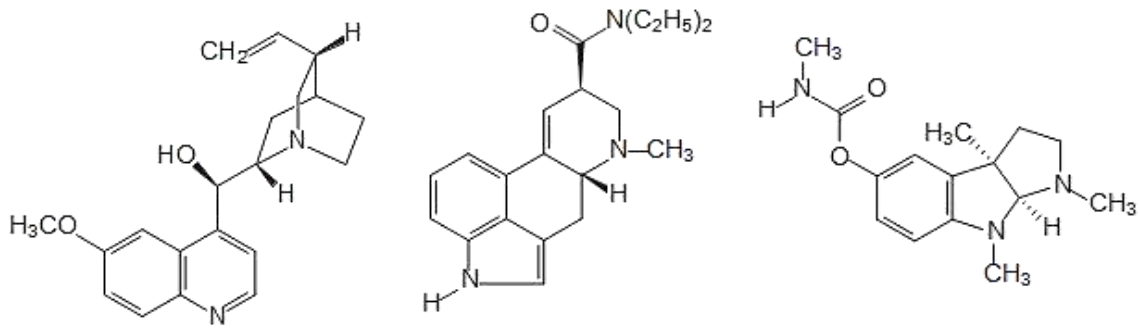


Figure 9. Some compounds that exhibit natural fluorescence.
الشكل (9): بعض المركبات التي تظهر فلورة طبيعية.

إطار(7): مقايسة الفلورة للكينين في البلازما (Hall et al., 1973)

الطريقة (Method):

- أضف بلازما خالية من المادة المحللة (عينة ضابطة)، أو العينة، أو المحلول القياسي (0.5 مل) إلى أنبوب طرد مركزي زجاجي محكم الإغلاق.
- أضف محلول هيدروكسيد الصوديوم بتركيز 0.1 مول لتر$^{-1}$ (1 مل) والتولوين (5 مل).
- اخلط المزيج بجهاز الخلط الدوار (5 دقائق) ثم استخدم الطرد المركزي (3000 دورة في الدقيقة، لمدة 10 دقائق).
- انقل 4 مل من الطبقة الطافية إلى أنبوب زجاجي ثانٍ وأضف 5 مل من حمض الكبريتيك (0.05 مول لتر$^{-1}$).
- اخلط مجدداً بالجهاز الدوار (5 دقائق) ثم استخدم الطرد المركزي (3000 دورة في الدقيقة، لمدة 10 دقائق).
- تخلص من طبقة التولوين (الطبقة الطافية) وقم بقياس المحلول المائي باستخدام مقياس الطيف الفلوري (الإثارة عند 350 نانومتر، والانبعاث عند 450 نانومتر).

التلألؤ الكيميائي (Chemiluminescence)

أحد أشهر الأمثلة على التلألؤ الكيميائي هو الضوء الذي تنبعث منه اليراعات (fireflies). يقوم إنزيم "لوسيفيراز اليراعة" (Firefly luciferase)، المستخلص من اليراعة الأمريكية الشمالية (*Photinus pyralis*) والمستخدم عادةً في العمل المختبري، بتحفيز أكسدة مركب "D-luciferin" مع تحلل مائي لـ ATP وانبعاث الضوء. عندما تكون كمية ATP هي العامل المحدد، فإن الضوء المنبعث يتناسب طردياً مع كمية ATP الموجودة، وهذا يشكل أساس مقايسات ATP بالتلألؤ الكيميائي.

عادةً ما تؤدي أكسدة نوع كيميائي مناسب إلى إنتاج حالة مثارة، والتي تضمحل إلى الحالة الأرضية مع انبعاث الضوء. على الرغم من أن مقايسات التلألؤ الكيميائي ليست قابلة للتطبيق على نطاق واسع مثل المقايسات الطيفية الضوئية، إلا أن حساسيتها المتزايدة (من 10 إلى 100 مرة) مقارنة بطرق التلألؤ الأخرى وبساطة الأجهزة المطلوبة، تجعلها جذابة عندما تكون هناك حاجة إلى حساسية عالية. تُستخدم هذه المقايسات لزيادة حساسية المقايسات المناعية ، كما تتوفر أيضاً كواشف للتلألؤ الكيميائي في تقنية HPLC .

يُستخدم اللومينول (5-أمينو-2,3-ثنائي هيدرو فثالازين-1,4-ديون) غالباً في مقايسات التلألؤ الكيميائي حيث يمكن أكسدته بواسطة البيربورات، والبرمنجنات، والهيبوكلوريت، واليود، ولكن التفاعل الأكثر فائدة هو تفاعله مع بيروكسيد الهيدروجين (الشكل 10). عندما يضمحل مركب "3-أمينوفثالات" المثار، فإنه ينبعث منه ضوء أزرق كثيف (425 نانومتر). تنتج العديد من التفاعلات المحفزة بالإنزيمات بيروكسيد الهيدروجين، وبالتالي يمكن استخدام التلألؤ الكيميائي للومينول لمراقبة هذه التفاعلات، بما في ذلك المقايسات

المناعية الإنزيمية . يمكن تحفيز هذا التفاعل بواسطة المعادن، بما في ذلك الحديد الموجود في الهيموجلوبين، وهذا يشكل الأساس لاستخدام رذاذ اللومينول/بيروكسيد الهيدروجين للكشف عن بقع الدم في مسرح الجريمة.

يُستخدم اللومينول (5-أمينو-2,3-ثنائي هيدرو فثالازين-1,4-ديون) غالباً في مقايسات التلألؤ الكيميائي حيث يمكن أكسدته بواسطة البيربورات، والبرمنجنات، والهيبوكلوريت، واليود، ولكن التفاعل الأكثر فائدة هو تفاعله مع بيروكسيد الهيدروجين (الشكل 10).

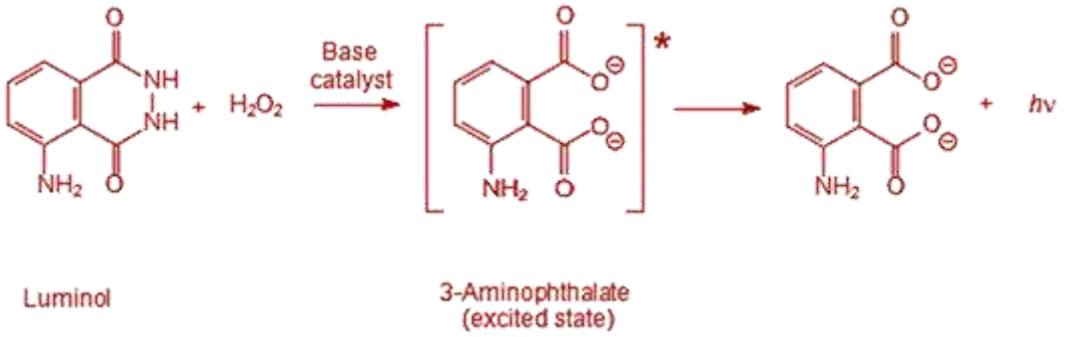


Figure 10. Chemiluminescent reaction of luminol with hydrogen peroxide.
الشكل (10): تفاعل التلألؤ الكيميائي للومينول مع بيروكسيد الهيدروجين.

عندما يضمحل مركب "3-أمينوفثالات" المثار، فإنه ينبعث منه ضوء أزرق كثيف (425 نانومتر). تنتج العديد من التفاعلات المحفزة بالإنزيمات بيروكسيد الهيدروجين، وبالتالي يمكن استخدام التلألؤ الكيميائي للومينول لمراقبة هذه التفاعلات، بما في ذلك المقايسات المناعية الإنزيمية . يمكن تحفيز هذا التفاعل بواسطة المعادن، بما في ذلك الحديد الموجود في الهيموجلوبين، وهذا يشكل الأساس لاستخدام رذاذ اللومينول/بيروكسيد الهيدروجين للكشف عن بقع الدم.

يمكن استخدام نظام اللومينول لتقدير كمية الأيونات التي تحفز التفاعل (مثل Fe^{+2} و Cu^{+2})، حيث يتناسب التلألؤ طردياً مع تركيز هذه الأيونات. ويمكن للمحسنات (Enhancers) مثل "باريودوفينول" (p-iodophenol) أن تزيد من شدة الضوء بمقدار يصل إلى 2500 مرة، وينبعث الضوء على هيئة توهج مطول، مما يسهل إجراء القياسات التي قد تتم بعد عدة دقائق من بدء التفاعل **(Kricka et al., 1987)**.

يمكن أن تكون تفاعلات التلألؤ الكيميائي مباشرة، كما هو موضح في حالة اللومينول، أو غير مباشرة عبر نظام انتقال الطاقة كما هو الحال في مشتقات "بيروكسي أوكسالات" (peroxyoxalate). وتنتج أكسدة البيروكسي أوكسالات وسائط مثارة، مثل "1,2-ديوكسيتان ديون" (1,2-dioxetanedione) ، التي تتفاعل مع حامل الفلورة (fluorophore)، والذي قد يكون هو المادة المحللة نفسها أو مشتقاً فلورياً لها.

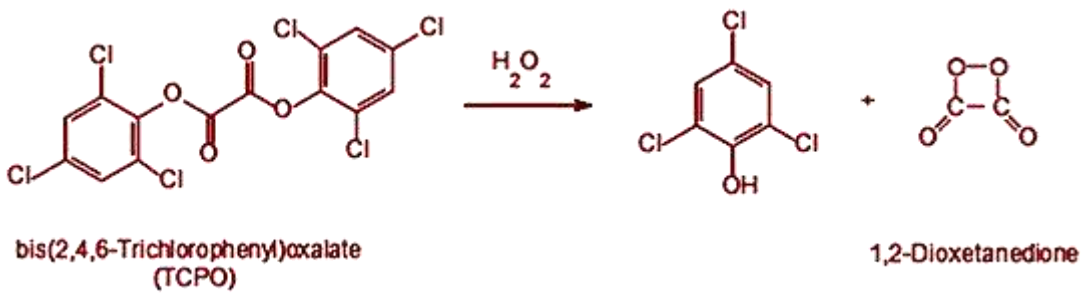


Figure 11. Hydrogen peroxide oxidation of TCPO.
الشكل (11): أكسدة TCPO بواسطة بيروكسيد الهيدروجين.

يمثل "التلألؤ الكيميائي الكهربائي" (Electrochemiluminescence) تطويراً إضافياً يتم استخدامه بشكل متزايد، لا سيما مع نظام "تريس (2,2-بيبيريديل)-الروثينيوم (III)" **(Li et al., 2003)**. حيث يعطي الاختزال معقداً مثاراً، يضمحل مع انبعاث الضوء وفق المعادلة:

$$Ru(bpy)_3^{3+} + reductant \rightarrow [Ru(bpy)_3^{2+}]^* + hv$$

حيث ترمز (bpy) إلى 2,2-بيبيريدين. وقد استخدم **Greenway and Dolman (1999)** نظام "تريس (2,2-بيبيريديل)-الروثينيوم (III)" المتولد كهربائياً لقياس بعض مضادات الاكتئاب ثلاثية الحلقات والفينوثيازين. حيث تمت أكسدة "تريس (2,2-بيبيريديل)-الروثينيوم (II)" والمادة المحللة كهربائياً في وقت واحد، ليعمل ناتج أكسدة المادة المحللة كعامل مختزل في تفاعل التلألؤ الكيميائي.

قد تؤدي أكسدة بعض المواد المحللة إلى توليد نواتج ذات تلألؤ كيميائي؛ فقد استُخدم برمنجنات البوتاسيوم الحمضي للكشف عن عدة أدوية بما في ذلك المورفين **(Abbott et al., 1986)**.

الأجهزة (Instrumentation)

يعد مقياس التلألؤ (luminometer) الأساسي بسيطاً جداً، حيث يتكون من صندوق محكم الغلق للضوء يوضع فيه أنبوب العينة، وأنبوب مضاعف ضوئي (photomultiplier tube) (الشكل 12). لا يوجد مصدر ضوء خارجي ولا حاجة لمرشحات أو مونوكروماتورات، على الرغم من إمكانية إدراجها في الأجهزة الأكثر تعقيداً.

قد تشمل التحسينات وضع مرآة خلف حامل أنبوب العينة، ومنفذ حقن (injection port) لإضافة الكواشف التي تبدأ التفاعل، ومحرك مغناطيسي. إن استبدال أنبوب العينة بملف من أنابيب (PTFE) أمام أنبوب المضاعف الضوئي يحول النظام الأساسي إلى نظام يمكن استخدامه إما للتحليل بحقن التدفق (flow injection analysis) أو ككاشف لتقنية HPLC. يبعث كل حدث كيميائي فوتوناً واحداً من الضوء؛ وأثناء سير التفاعل، يقوم أنبوب المضاعف الضوئي والدوائر الإلكترونية بـ "عد" عدد الومضات، وبالتالي يكون الناتج عداً رقمياً، وإن كان بالإمكان في بعض الأجهزة مكاملة الإشارة لإعطاء منحنى بطريقة مماثلة لكواشف النشاط الإشعاعي في HPLC. تتوفر أيضاً مقاييس تلألؤ قادرة على قراءة الأطباق الدقيقة ذات الـ 96 بئراً (96-well format microplates). ونظراً لبساطة المتطلبات الجهازية، تتوفر أيضاً إصدارات محمولة لاستخدامها في التطبيقات البيئية على سبيل المثال.

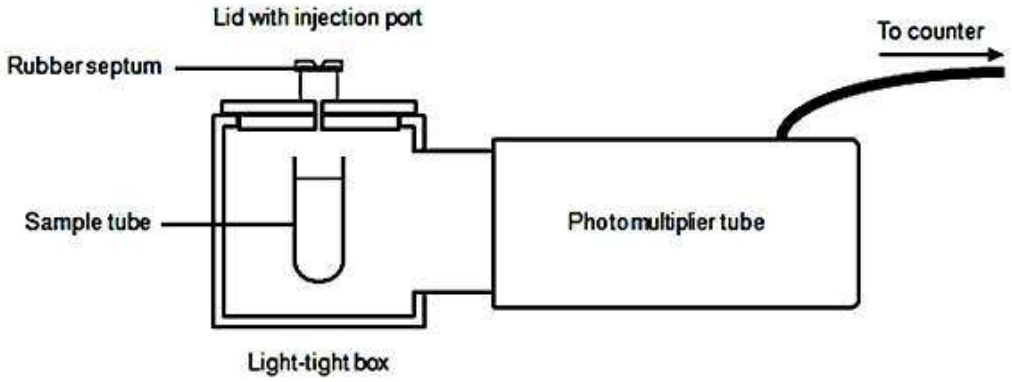


Figure 12. A simple luminometer.

الشكل (12): مقياس تلألؤ (Luminometer) بسيط

مقايسات التلألؤ الكيميائي (Chemiluminescence assays)

لتحسين الانتقائية، عادةً ما يتم دمج مقايسات التلألؤ الكيميائي مع تقنيات الفصل مثل الكروماتوغرافيا أو التحليل الكهربائي الشعري (capillary electrophoresis)، أو مع المقايسات المناعية. إن طريقة التحليل بحقن التدفق (FIA) الأصلية للمورفين **(Abbott et al., 1986)** تم تعديلها لاحقاً بإضافة خطوة HPLC كما ورد في **(Abbott et al., 1987)**. كما استُخدمت خلايا كشف تتكون من بوليمرات مطبوعة جزيئياً (MIP) داخل أنابيب زجاجية؛ حيث استُخدم هذا النهج للكشف عن المورفين الذي يتم احتجازه على الـ MIP بينما تُغسل التداخلات المحتملة، قبل إضافة البرمنجنات لتحفيز التلألؤ الكيميائي **(He et al., 2005)**.

استُخدمت التفاعلات الإنزيمية لإضفاء الانتقائية؛ ومن الأمثلة على ذلك مقايسة الأسيتيل كولين، حيث يتم تحلل الأسيتيل كولين مائياً إلى كولين بواسطة إنزيم "أسيتيل كولين إستريز"، ثم يُؤكسد الكولين إلى بيتين وبيروكسيد الهيدروجين، حيث يتم قياس الأخير عبر نظام اللومينول الموصوف سابقاً **(Israël and Lesbats, 1982)**. ظهرت عدة بدائل لهذا النهج، بما في ذلك بناء مفاعلات إنزيمية مثبتة للكشف عن الأسيتيل كولين بواسطة HPLC. وعلى الرغم من إمكانية استخدامها مع اللومينول وكاشف التلألؤ الكيميائي، فإن الكشف الكهروكيميائي لبيروكسيد الهيدروجين عند أقطاب البلاتين يعد بديلاً قابلاً للتطبيق **(Flanagan et al., 2005)**.

يعتبر التلألؤ الكيميائي مهماً في كواشف محددة مثل كاشف القياس الضوئي باللهب للكشف عن الكبريت والفوسفور، وكاشف النيتروجين بالتلألؤ الكيميائي .

ملخص (Summary)

تعد تقنيات القياس الطيفي للأشعة فوق البنفسجية/المرئية، والقياس الطيفي الفلوري، والتلألؤ الكيميائي تقنيات قيمة في التحليل السمّي، سواء كانت قائمة بذاتها أو عند استخدامها بالتزامن مع تقنيات أخرى مثل HPLC والمقايسات المناعية. توفر أجهزة قياس الطيف الضوئي الحديثة التي يتم التحكم فيها بواسطة المعالجات الدقيقة العديد من المزايا مقارنة بالأجهزة القديمة أحادية وثنائية الشعاع؛ وتشمل هذه المزايا ليس فقط زيادة الاستقرار والحساسية، بل أيضاً تصحيح الخلفية (background correction) لتسهيل المسح الطيفي.

ومع ذلك، وباستثناء أنظمة HPLC-DAD المحتملة في تقييم تجانس القمم (peak homogeneity) وفي التحليل السمّي المنهجي (STA)، وتقنية FTIR في كروماتوغرافيا الغاز (GC) للمذيبات والمواد المتطايرة الأخرى، فقد تم استبدال المسح الطيفي إلى حد كبير في STA بواسطة تقنية GC-MS. وباستثناء اختبارات البول للباراسيتامول والباراكوات، تم أيضاً استبدال الاختبارات اللونية إلى حد كبير، وإن كانت هذه الاختبارات لا تزال ذات قيمة إذا استُخدمت بحذر شديد عند عدم توفر طرق أخرى.

المراجع العلمية References

Abbott, R.W., Townshend, A. and Gill, R. (1986) Determination of morphine by flow injection analysis with chemiluminescence detection. Analyst, 111, 635–40.

Abbott, R.W., Townshend, A. and Gill, R. (1987) Determination of morphine in body fluids by high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. Analyst, 112, 397–406.

Badcock, N.R. (2000) Detection of poisoning by substances other than drugs: a neglected art. Ann Clin Biochem, 37, 146–57.

Brodie, B.B., Udenfriend, S. and Baer, J.E. (1947) The estimation of basic organic compounds in biological material. 1. General principles. J Biol Chem, 168, 299–309.

Broughton, P.M. (1956) A rapid ultraviolet spectrophotometric method for the detection, estimation and identification of barbiturates in biological material. Biochem J, 63, 207–13.

Broughton, P.M. (1963) Barbiturates giving atypical results on ultraviolet spectrophotometric analysis. Lancet, i, 1266–7.

Cary, H.H. and Beckman, A.O. (1941) A quartz photoelectric spectrophotometer. J Opt Soc Am, 31, 682–9. Ejnik, J.W., Hamilton, M.M., Adams, P.R. and Carmichael, A.J. (2000) Optimal sample preparation condi- tions for the determination of uranium in biological samples by kinetic phosphorescence analysis (KPA). J Pharm Biomed Anal, 24, 227–35.

Flanagan, R.J., Braithwaite, R.A., Brown, S.S., Widdop, B. and de Wolff, F.A. (1995) Basic Analytical Toxicology, World Health Organization, Geneva.

Flanagan, R.J., Perrett, D. and Whelpton, R. (2005) Electrochemical Detection in HPLC. Analysis of Drugs and Poisons, Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Greenway, G.M. and Dolman, S.J. (1999) Analysis of tricyclic antidepressants using electrogenerated chemi-luminescence. Analyst, 124, 759–62.

Hall, A.P., Czerwinski, A.W., Madonia, E.C. and Evensen, K.L. (1973) Human plasma and urine quinine levels following tablets, capsules, and intravenous infusion. Clin Pharmacol Ther, 14, 580–5.

He, Y., Lu, J., Liu, M. Du J, Nie F. (2005) Determination of morphine by molecular imprinting-chemiluminescence method. J Anal Toxicol, 29, 528–32.

Hadley, S.G., Muraki, A.S. and Spitzer, K. (1974) The fluorescence and phosphorescence spectra and phos-phorescence decay time of harmine, harmaline, harmalol, harmane and norharmane in aqueous solutions and EPA at 77K. J Forensic Sci, 9, 657–69.

Israe¨l, M. and Lesbats, B. (1982) Application to mammalian tissues of the chemiluminescent method for detecting acetylcholine. J Neurochem, 39, 248–50

Jeffery, W. (2004) Colour tests, in Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, 3rd edn. (eds A.C. Moffat, D. Osselton, and B. Widdop), Pharmaceutical Press, London, pp. 279–300.

Jones, H.B. (1865a) On the rate of passage of cystalloids into and out of the vascular and non-vascular textures of the body. Proc R Soc Lond, 14, 63–64.

Jones, H.B. (1865b) On the rate of passage of cystalloids into and out of the vascular and non-vascular textures of the body. Proc R Soc Lond, 14, 220–223.

Jones, H.B. and Dupre´, A. (1866) On a fluorescent substance, resembling quinine, in animals; and on the rate of passage of quinine into the vascular and non-vascular textures of the body. Proc R Soc Lond Series B, 15, 73–93.

Kricka, L.J., Thorpe, G.H.G. and Stott, R.A.W. (1987) Enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay. Pure Appl Chem, 59, 651–4.

Li, F., Zhang, C., Guo, X. and Feng, W. (2003) Chemiluminescence detection in HPLC and CE for pharma-ceutical and biomedical analysis. Biomed Chromatogr, 17, 96–105.

Mayes, R.W. (1993) ACP Broadsheet No 142: November 1993. Measurement of carbon monoxide and cyanide in blood. J Clin Pathol, 46, 982–8.

Miles, C.I. and Schenk, G.H. (1973) Fluorescence and phosphorescence of phenylethylamines and barbitu-rates. Analysis of amphetamine and barbiturate preparations. Anal Chem, 45, 130–6.

Moffat, A.C., Osselton, M.D. and Widdop, B. (eds.) (2004) Clarke's Analysis of Drugs and Poisons, Vol. 2, 3rd edn, Pharmaceutical Press, London.

Stewart, M.J., Adriaenssens, P.I., Jarvie, D.R. and Prescott, L.F. (1979) Inappropriate methods for the emergency determination of plasma paracetamol. Ann Clin Biochem, 16, 89–95.

Tompsett, S.L. (1969) Interference from the presence of other substances in detecting and determining barbiturates in biological material. J Clin Pathol, 22, 291–5.

Udenfriend, S. (1995) Development of the spectrophotofluorometer and its commercialization. Protein Sci, 4, 542–55.

Whelpton, R., Watkins, G. and Curry, S.H. (1981) Bratton-Marshall and liquid-chromatographic methods compared for determination of sulfamethazine acetylator status. Clin Chem, 27, 1911–4.

WHO (World Health Organization). (1986) Basic Tests for Pharmaceutical Substances, WHO, Geneva. WHO (World Health Organization). (1991) Basic Tests for Pharmaceutical Dosage Forms, WHO, Geneva. WHO (World Health Organization). (1998) Basic Tests for Drugs: Pharmaceutical Substances, Medicinal

Plant Materials and Dosage Forms, WHO, Geneva.

Widdop, B. (2002) Analysis of carbon monoxide. Ann Clin Biochem, 39, 378–91.

CHAPTER (13) الفصل الثالث عشر



مطيافية الكتلة

MASS SPECTROMETRY

الفصل الثالث عشر

مطيافية الكتلة

MASS SPECTROMETRY

المقدمة

تُعنى مطيافية الكتلة (MS) بفصل الأنواع الذرية أو الجزيئية المتأينة في الطور الغازي بناءً على نسبة الكتلة إلى الشحنة (m/z) (Downard, 2004; Watson, 1997). فعند تأين المادة التحليلية، يتشكل أيون مميز يمثل الذرة أو الجزيء السليم، و/أو مجموعة من الأيونات ذات كتل مختلفة تمثل شظايا (fragments) الأنواع المتأينة. يتم فصل هذه الأيونات عن طريق معالجة المجالات المغناطيسية و/أو الكهروستاتيكية في تفريغ عالٍ (عادة 10^{-5}باسكال)، ويشكل الرسم البياني لوفرتها النسبية مقابل نسبة (m/z) لكل أيون ما يعرف بـ "طيف الكتلة" (mass spectrum). تعتمد دقة الكتلة المتاحة على الجهاز المستخدم، ومن الناحية المثالية يجب أن تكون الدقة أقل من 1 وحدة كتلة ذرية (u). وتعد مطيافية الكتلة مع البلازما المقترنة بالحث (ICP-MS) فرعاً متخصصاً من مطيافية الكتلة يُستخدم في تحليل العناصر النزرة والمعادن السامة، وستتم مناقشته بمزيد من التفصيل في فصل أخر.

يمكن لمطيافية الكتلة تقديم معلومات أكثر عن المادة التحليلية باستخدام كمية عينة أقل مقارنة بالتقنيات الأخرى. إن تحديد هوية جزيء ما من طيف كتلته أسهل بكثير مقارنة بأنواع المعلومات الطيفية الأخرى، خاصة مع استخدام قواعد البيانات الحاسوبية الحديثة. كما تعد مطيافية الكتلة التقنية الأكثر موثوقية لقياس الكتلة بدقة. ومن عيوب مطيافية الكتلة مقارنة ببعض التقنيات الأخرى أن العينة المأخوذة للتحليل تُستهلك، كما أن الاستثمارات في رأس المال (الأجهزة) وتدريب المشغلين مرتفعة نسبياً. وعلى الرغم من أن تشغيل مطيافية الكتلة أصبح بسيطاً نسبياً مع الأجهزة الحديثة (bench-top) والبرمجيات المرتبطة بها، إلا أن الأطياف ذات الجودة الضعيفة يمكن أن تكون مضللة وقد تؤدي إلى نتائج غير دقيقة (Barwick et al., 2007).

يمكن استخدام قياسات الكتلة الدقيقة للمساعدة في تحديد هوية المركب، كما يمكن استخدام أنماط التفتت الجزيئي ("البصمات") لتحديد المواد التحليلية تجريبياً أو عن طريق المقارنة مع البيانات المنشورة. وبدلاً من ذلك، يمكن مراقبة الأيونات ذات نسبة (m/z) معينة فقط (مراقبة الأيون المختار، SIM). كما يمكن استخدام التفتت المتحكم فيه، حيث تخضع الأيونات الخارجة من محلل كتلة واحد لتفتيت/فصل إضافي في محلل (أو محاللات) لاحق (MS-MS و MS^n) في كل من العمليات النوعية والكمية. إن المجال بأكمله يتطور بسرعة، لذا يلزم الرجوع إلى المصنعين والأدبيات العلمية الحالية لمواكبة التطورات.

يمكن إجراء إدخال مباشر للعينة مع المصفوفات البسيطة نسبياً، مثل هواء الزفير (مطيافية الكتلة التنفسية)، ولكن يفضل تحليل المخاليط المعقدة مثل البلازما والبول عبر تقنيات "مزدوجة" (hyphenated)، ولا سيما (GC-MS) و (LC-MS) (انظر الإطار 1). وبالطبع، هناك حاجة عادةً إلى شكل من أشكال تحضير العينة، على الرغم من أن التعامل مع العينة يمكن تبسيطه أحياناً مقارنة بإجراءات (GC) و (HPLC) التقليدية (Van Bocxlaer et al., 2000). ومع ذلك، فإن القيد الأساسي في مطيافية الكتلة هو أنها "غير كيرالية" (achiral)؛ وبالتالي، يجب إجراء الفصل الكيرالي بواسطة (GC) أو (HPLC) أو (CE) قبل مطيافية الكتلة من أجل الكشف عن المتصاوغات المرآتية (enantiomers) وقياسها (Cody, 1992; Chen et al., 2005; Speranza et al., 2005).

الإطار 1: مطيافية الكتلة في علم السموم التحليلي

وجه المقارنة / الفنة	التفاصيل والملاحظات
العمل النوعي (Qualitative)	← **تفوق تقنية GC-MS على LC-MS في التحليل المنهجي للسموم.(STA)** ← **الاعتماد على قياس الكتلة الدقيقة، أنماط التفتت (البصمات)، وقواعد بيانات الاستبقاء (GC)ووفرة الأيونات.**
العمل الكمي (Quantitative)	← **كفاءة عالية في القياس عند استخدام مراقبة الأيون المختار (SIM) أو التفتت المتحكم فيه (MS/MS).** ← **الحاجة إلى نظير مستقر كمعيار داخلي (يرفع تكلفة التحليل).**
القيود والمحدوديات	← **الحساسية :قد تكون أقل مقارنة بـ GC-ECD أو HPLC مع كاشف الفلورة.** ← **الاستقرار :تقنية GC-MS مقيدة بالاستقرار الحراري للمادة.** ← **التداخل :خطر "قمع الأيونات (Ion suppression) "عند خروج المكونات معاً-Co) (eluting فيLC-MS.**
العيوب العامة	← **تكاليف تشغيلية ورأسمالية مرتفعة، وتتطلب تدريباً متخصصاً.** ← **العينة تُستهلك أثناء التحليل.** ← **التقنية غير كيرالية.(Achiral)**

التطور التاريخي (Historical development)

أدى العمل الذي قام به السير جوزيف جيه طومسون (1856–1940) وفرانسيس دبليو أستون (1877–1945) في مختبرات كافنديش بكامبريدج إلى تطوير مطيافية الكتلة (MS)؛ حيث حصل كلاهما على جوائز نوبل، طومسون (في الفيزياء، 1906) لاكتشافه الإلكترون، وأستون (في الكيمياء، 1922) لعمله في "مطياف الكتلة" (mass spectrograph). وفي تلك الفترة تقريباً، طور آرثر جيه ديمبستر (1856–1950) في جامعة شيكاغو جهازاً ذا قطاع مغناطيسي (magnetic sector instrument) مع تركيز اتجاهي. كما طور أول مصدر للتأين الإلكتروني (EI، وغالباً ما يُسمى خطأً "الصدم الإلكتروني")، والذي يقوم بتأين المواد التحليلية المتطايرة بواسطة حزمة من الإلكترونات المنبعثة من فتيلة سلكية ساخنة. وتابع ألفريد أو. سي. نير (1911–1994) في جامعة مينيسوتا دراسات أستون حول التركيب النظائري للعناصر، وقام بعزل ^{40}Kو ^{235}U، بالإضافة إلى مساهمات كبرى أخرى تضمنت تطوير أجهزة مصغرة استُخدمت في استكشاف الفضاء. وظهرت أول أجهزة مطياف كتلة عملية تعمل بالتأين الإلكتروني (أجهزة قطاعية) في أوائل الأربعينيات. وفي عام 1948، أنتجت شركة "فيكرز" (Vickers) في مانشستر جهاز (MS-2)، وهو أول جهاز مطياف كتلة تجاري، وكان يتميز بدقة محدودة ومدى كتلي أقصى يبلغ حوالي 300 وحدة كتلة ذرية (u). في ذلك الوقت، تم اكتشاف قياس "زمن الطيران" للأيونات (ToF) كتقنية لتحليل الكتلة؛ وتعتمد هذه التقنية على مبدأ أن الأيونات ذات قيم (m/z) المختلفة تنتقل بسرعات مختلفة عند تطبيق نفس جهد التسارع.

في أوائل الخمسينيات، بدأ فهم مسارات تفتت الأيونات، لكن الأجهزة كانت لا تزال ذات مدى كتلي محدود. وفي عام 1953، تم الحصول على براءة اختراع لمحلل الكتلة رباعي الأقطاب (quadrupole mass analyzer)، على الرغم من أن العمل الذي قامت به شركة "فينيغان مات" (Finnigan MAT) في الثمانينيات هو الذي جعل مطياف الكتلة بمصيدة الأيونات رباعية الأقطاب (QIT) أداة متعددة الاستخدامات كما هي عليه اليوم. وقد تشارك هانز جي. ديميلت (1922–) وفولفغانغ بول (1913–1993) في جائزة نوبل في الفيزياء لعام 1989 لتطويرهما المحلل رباعي الأقطاب وتقنية مصيدة الأيونات المرتبطة به. وقد أدت الأجهزة رباعية الأقطاب وأنظمة زمن الطيران (ToF)، جنباً إلى جنب مع التقدم في حواسيب المختبرات، إلى ظهور أنظمة مطياف الكتلة "المكتبية" (bench-top) بأسعار معقولة نسبياً، والتي أصبحت الآن واسعة الانتشار.

أثبتت الطرق الكروماتوغرافية والكهربائية (الرحلان الكهربائي)، ولا سيما كروماتوغرافيا الغاز الشعرية (capillary GC) والرحلان الكهربائي الشعري (CE)، أنها طرق مثالية لإدخال العينات في مطياف الكتلة بسبب معدلات التدفق المنخفضة المستخدمة. ومؤخراً، تم تطوير واجهات لكروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (HPLC) لا تكتفي بالتعامل مع وجود كميات كبيرة نسبياً من الطور المتحرك لـ (HPLC)، بل تسمح أيضاً بتأين الجزيئات الكبيرة مثل البروتينات (Abian, 1999). وقد تشارك جون بي. فين (1917–) وكويتشي تاناكا (1959–) في جائزة نوبل في الكيمياء لعام 2002 لعملهما في تقنيات التأين بالرذاذ الكهربائي (ESI) والامتزاز بالليزر اللطيف (SLD) على التوالي. كما تم تقديم منهجية ذات صلة عام 1988 من قبل كاراس وهيلينكامب، وهي "الامتزاز/التأين بالليزر بمساعدة مصفوفة" (MALDI)؛ وتستخدم هذه التقنية نبضات قصيرة من ضوء الليزر يتم تركيزها على العينة الممتزة على مصفوفة تمتص ضوء الأشعة فوق البنفسجية. كما وسعت تقنيات تأين أخرى، مثل الامتزاز/التأين بالليزر المعزز بالسطح (SELDI) والتأين المباشر على السيليكون (DIOS)، بالتزامن مع مطياف الكتلة غير المقيد بقيمة قصوى لـ (m/z) (مثل أجهزة ToF)، من نطاق استخدام مطيافية الكتلة بشكل كبير.

الأجهزة (Instrumentation)

تتكون المكونات الأساسية لمطياف الكتلة من جهاز إدخال (inlet device)، ومصدر أيوني (ion source)، ونظام اختيار الأيونات (محلل الكتلة - mass analyzer)، وجميعها توجد تحت تفريغ هوائي (فراغ)، بالإضافة إلى كاشف (عادة ما يكون نوعاً من مضاعف الإلكترونات) ونظام بيانات. قد يتم إدخال العينة إلى المصدر عبر مجس (probe) يتم إدراجه من خلال قفل تفريغي (vacuum interlock)، ولكن في هذه الحالة، يكون فصل المادة التحليلية الوحيد الذي يمكن تحقيقه هو عن طريق تسخين المجس ببطء لتبخير المواد التحليلية ذات درجة الغليان المنخفضة أولاً.



علاوة على ذلك، ليس من السهل أتمتة الحقن بالمجس؛ لذا، فمن المعتاد أكثر إدخال العينات بعد خطوة كروماتوغرافية أو خطوة فصل أخرى، كما نوقش أعلاه.

تدخل الأيونات القادمة من جهاز الإدخال إلى الجهاز عبر شق تركيز (focusing slit). وتمنح الطاقة الحركية المكتسبة من الحركة عبر مجال كهربائي الجسيمات قصوراً ذاتياً يعتمد على كتلتها، ويقوم المحلل بتوجيه هذه الجسيمات إلى الكاشف بناءً على قيم (m/z) الخاصة بها عن طريق تغيير مجال كهربائي و/أو مغناطيسي. وتتحرك الأيونات الأصغر حجماً والتي تحمل أعلى شحنة بسرعة أكبر. يمكن ضبط المحلل لاختيار نطاق ضيق من قيم (m/z)، أو للمسح عبر نطاق من القيم لتسجيل الأيونات الموجودة.

هناك عدة أنواع من محللات الكتلة بالإضافة إلى الأجهزة ذات القطاع المغناطيسي وأجهزة زمن الطيران (ToF) (انظر الإطار 2). تستخدم محللات الكتلة رباعية الأقطاب (quadrupole mass analyzers) ومصائد الأيونات مجالات كهربائية

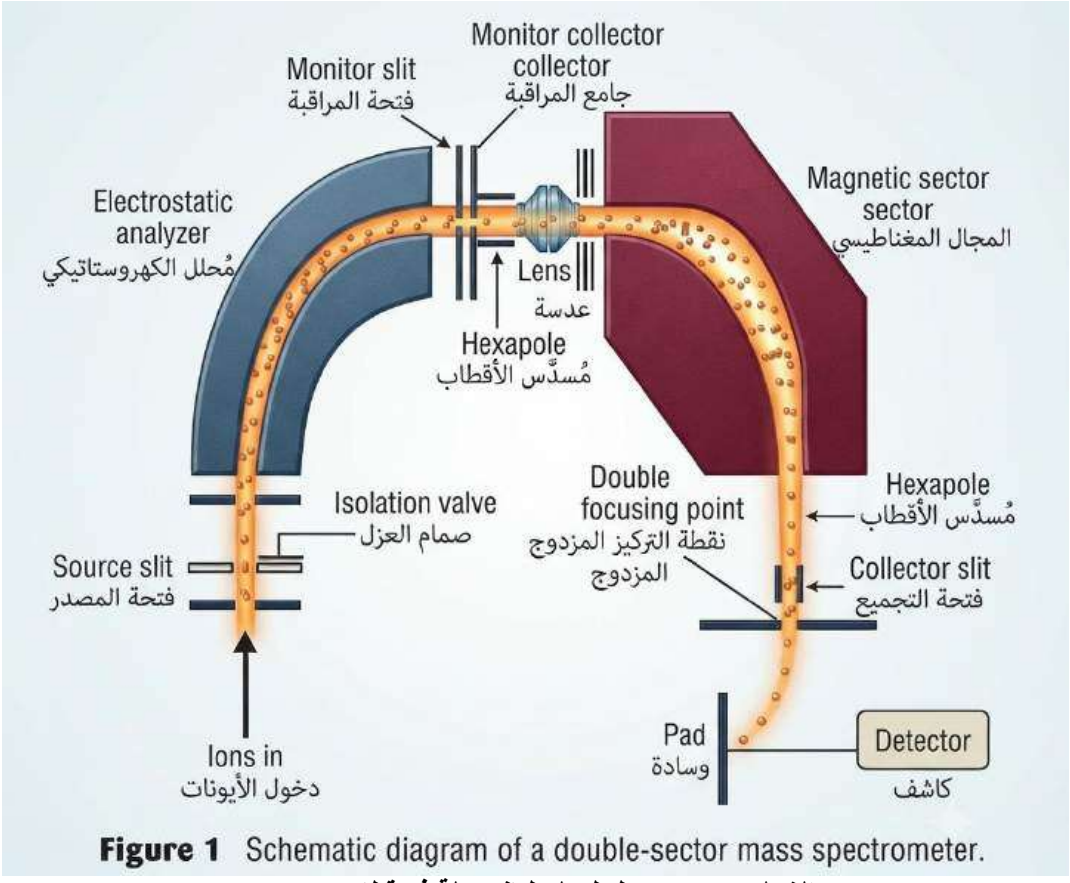
لتثبيت أو زعزعة استقرار الأيونات التي تقع ضمن نطاق ضيق من قيم (m/z) بشكل انتقائي. أما مطيافية الكتلة برنين السيكلوترون الأيوني بتحويل فوريه (FTICR-MS) فتقيس الكتلة عن طريق الكشف عن تيار الصورة (image current) الناتج عن دوران الأيونات في مجال مغناطيسي.

الإطار2: أنواع محللات الكتلة في مطيافية الكتلة

نوع محلل الكتلة	الخصائص والمميزات
الأجهزة القطاعية / ذات التركيز المزدوج (مغناطيسي/كهروستاتيكي)	**•تمتاز بدقة أعلى مقارنة بأجهزة رباعية الأقطاب. •لها حد أقصى لقيمة.(m/z)**
زمن الطيران(ToF)	**•لا يوجد حد أقصى لقيمة.(m/z)**
رباعي الأقطاب(Quadrupole)	**•تمتاز بحساسية أعلى بطبيعتها من الأجهزة القطاعية. •يمكن ربطها على التوالي لإجراء تفتيت متحكم فيه.(MS-MS)**
مصيدة الأيونات رباعية الأقطاب(QIT)	**•قدرة على إجراء عمليات تفتيت متعددة (MS^) داخل جهاز واحد.**
رنين السيكلوترون الأيوني بتحويل فوريه(FTICR)	**• (تستخدم في التحليلات عالية الدقة والسرعة).**

الأجهزة القطاعية (Sector instruments)

تتكون الأجهزة القطاعية "ذات التركيز المزدوج" من مزيج بين جهاز تركيز كهروستاتيكي (قطاع E) وقطاع كهرومغناطيسي كبير (قطاع B)؛ ويستخدم المصنعون المختلفون ترتيبات مختلفة لهذه المكونات (الشكل 1).



الشكل 1: رسم تخطيطي لمطياف كتلة ذو قطاع مزدوج.

يتم تسريع الأيونات الناتجة من المصدر عن طريق تطبيق جهد كهربائي مناسب، ثم تدخل إلى محلل كهروستاتيكي ("قطاع E"). ونظراً للطبيعة الفيزيائية لعملية التأين، غالباً ما تُنتج أيونات لها نفس قيمة (m/z) بطاقات مختلفة. وإذا لم يتم تصحيح ذلك، فإن هذا يقلل بشكل ملحوظ من الدقة (resolution) ودقة الكتلة التي يمكن الحصول عليها. يقوم المحلل الكهروستاتيكي

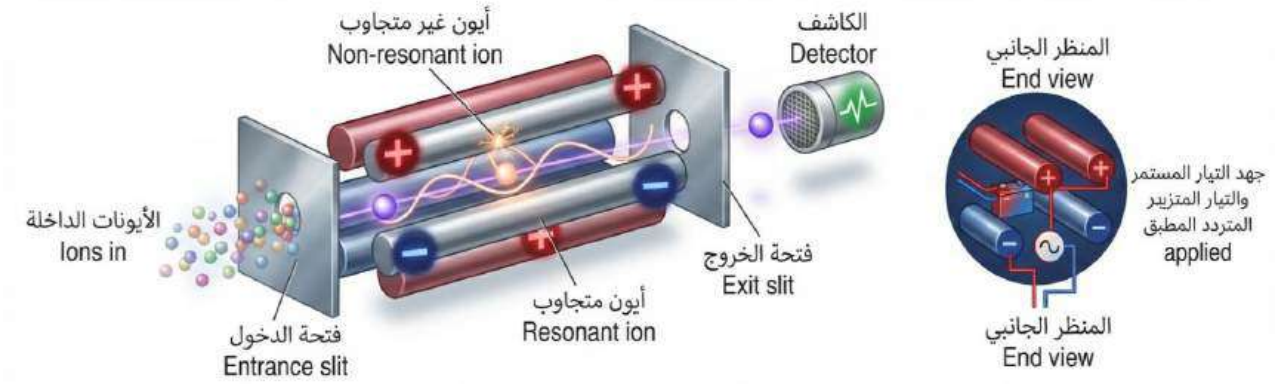
بتركيز الأيونات التي لها نفس قيمة (m/z) في مسار أكثر تماسكاً وصولاً إلى القطاع المغناطيسي ("قطاع B")، والذي يتكون من أنبوب طيران عريض يمر عبر مغناطيس متغير يمنح الأيونات زاوية انحراف تتراوح عادةً بين 60 و120 درجة وفقاً للمعادلة (1):

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V} \qquad (1)$$

حيث Bهي قوة المجال المغناطيسي، وr هو نصف قطر المسار عبر المغناطيس، وV هو جهد التسارع. يؤدي تغيير قوة المجال المغناطيسي إلى تركيز الأيونات ذات قيم (m/z) المختلفة عند "نقطة التركيز المزدوج". يبلغ زمن المسح النموذجي للمجال المغناطيسي عبر نطاق كتلي يتراوح بين 50 و800 وحدة كتلة ذرية حوالي ثانية واحدة، ولكن هناك حاجة لسرعات مسح أسرع إذا تم استخدام كروماتوغرافيا عالية الدقة لإدخال المواد التحليلية إلى المصدر. بعد فصل الأيونات، تدخل إلى كاشف، ويُرسل الخرج المضخم منه إلى حاسوب يقوم بتسجيل البيانات وتحويل النبضات الكهربائية إلى تنسيقات مناسبة للعرض.

الأجهزة رباعية الأقطاب (Quadrupole instruments)

كما يوحي اسمها، يتكون محلل الكتلة رباعي الأقطاب من أربعة قضبان متوازية (الشكل 2) مطبق عليها جهود ثابتة من التيار المستمر (DC) ومترددة من التردد الراديوي (RF) (تستخدم أنواع مختلفة من هذا النظام عدداً من الأجهزة أو القضبان يتراوح من واحد إلى ثمانية، ولكن الاسم ومبدأ التشغيل يظلان كما هما). يتم ضبط النطاق الكتلي ودقة الجهاز من خلال طول وقطر القضبان، حيث تمنح القضبان ذات القطر الأكبر حساسية متزايدة، بينما تزيد القضبان الأضيق أو الأطول من القدرة التحليلية (resolving power). بعبارات بسيطة، يتم تركيز الأيونات وتمريرها على طول منتصف المسافة بين القضبان. وتعتمد حركتها على المجالات الكهربائية بحيث لا تتوافق في الرنين إلا الأيونات ذات قيمة (m/z) معينة، وبالتالي تمر إلى الكاشف. أما جميع قيم (m/z) الأخرى فستكون غير رنينية وستصطدم بالقضبان، وبالتالي لا يتم الكشف عنها.



الشكل 2: رسم تخطيطي لمطياف كتلة رباعي الأقطاب

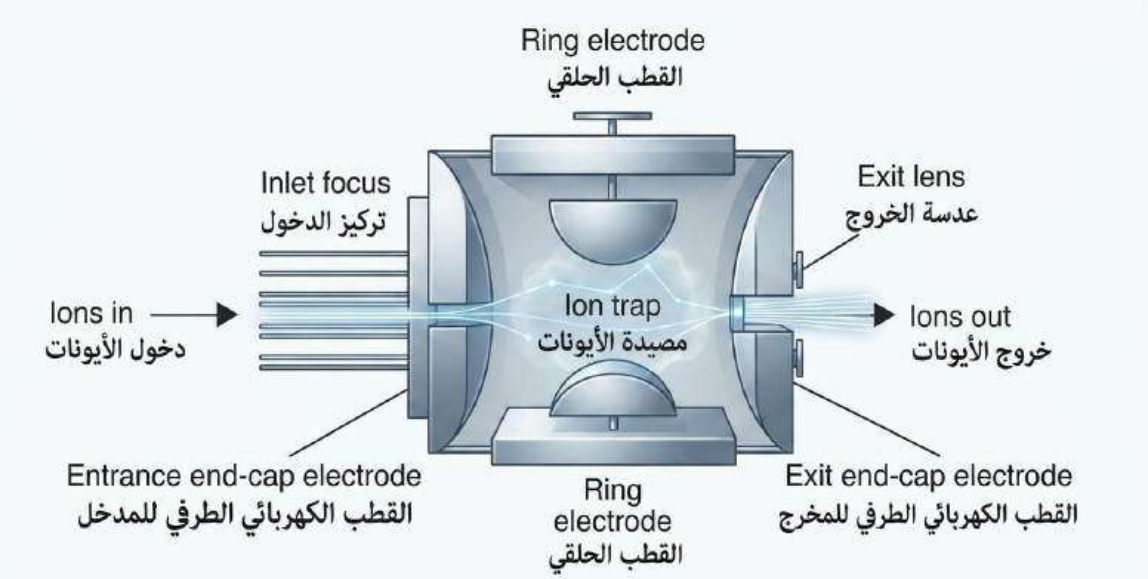
Figure 2: Schematic diagram of a quadrupole mass spectrometer.

لا تتطلب المحللات رباعية الأقطاب أن تمتلك جميع الأيونات التي تدخل إلى الجهاز نفس الطاقة الحركية، وبالتالي فإن الحساسية تكون بطبيعتها أعلى مما هي عليه في أجهزة القطاع المغناطيسي. يمكن تغيير التردد الراديوي (RF) لجعل الأيونات ذات قيم (m/z) مختلفة تركز على الكاشف في أوقات مختلفة، عادةً من قيم (m/z) الأدنى إلى الأعلى، وبالتالي بناء طيف كتلة. وبدلاً من ذلك، يمكن استخدام التردد الراديوي المطبق لاختيار أيونات ذات قيمة (m/z) معينة فقط. هذه العملية، التي تسمى عادة "مراقبة الأيون المختار" (SIM)، تتيح وقتاً أطول لمراقبة أيون واحد، وكذلك الانتقال السريع بين الأيونات المختارة الأخرى. والنتيجة هي زيادة الحساسية تجاه المادة (المواد) التحليلية المختارة وتقليل الضجيج، ولكن بالطبع تقل الكمية

الإجمالية لبيانات مطياف الكتلة التي يتم جمعها، حيث لا يتم الكشف عن الأيونات الأخرى. وبذلك، تُستخدم تقنية (SIM) في المقام الأول للتحليل الكمي عالي الحساسية، بدلاً من تحديد هوية المادة التحليلية.

أجهزة مصيدة الأيونات رباعية الأقطاب (Quadrupole ion-trap instruments)

تتكون مصيدة الأيونات من ثلاثة أقطاب كهربائية زائِدية (hyperbolic): قطب حلقي مركزي، وقطبين غطائيين عند النهاية (مدخل ومخرج) (الشكل 3). يُنتج جهد التردد الراديوي (RF) للقطب الحلقي -وهو جهد تيار متردد ذو تردد ثابت وسعة متغيرة- مجال جهد رباعي الأقطاب ثلاثي الأبعاد في المصيدة. هذا المجال يلتقط الأيونات الواردة في مسار متذبذب مستقر. وتعتمد الحركة الدقيقة للأيونات على الجهد المطبق وقيمة (m/z) الفردية للأيونات. يتم إخماد طاقة الأيونات داخل المصيدة بواسطة غاز الهيليوم عند ضغط 133 باسكال (1 مم زئبق) بحيث تتركز بالقرب من مركز المصيدة، أي أن طاقتها الطاردة المركزية تقل. وللكشف عن الأيونات، يتم تغيير الجهود تدريجياً لزعزعة استقرار حركة الأيونات، مما يؤدي إلى طردها عبر القطب الغطائي للمخرج، والذي يتم تطبيق جهد تيار مستمر (DC) عليه أيضاً. تُطرد الأيونات عادةً بترتيب تصاعدي لقيمة (m/z). يتم تركيز تيار الأيونات هذا على الكاشف، وهو أنبوب مضاعف إلكتروني أو ضوئي، لإنتاج طيف الكتلة.



الشكل 3: رسم تخطيطي لمطياف كتلة بمصيدة أيونات رباعية الأقطاب

Figure 3: Schematic diagram of an ion-trap quadrupole mass spectrometer.

بما أن المسافات التي تقطعها الأيونات داخل مصيدة الأيونات قصيرة، فإن الفراغ (vacuum) لا يحتاج إلى أن يكون عالياً جداً كما في الأنواع الأخرى من أجهزة مطياف الكتلة لتقليل مخاطر التصادمات. ومع ذلك، وبسبب حصر الأيونات، تصبح التفاعلات بين الأيونات والأيونات الأخرى أكثر احتمالاً مما هي عليه في الأجهزة رباعية الأقطاب التقليدية. وفي مصائد الأيونات الحديثة، ولأن مثل هذه التفاعلات (أيون-أيون) يمكن أن تولد أطيافاً غير نمطية، فإنه لا يتم الاكتفاء بإجراء التأين خارج المصيدة فحسب، بل يتم أيضاً التحكم في عدد الأيونات الموجودة في المصيدة في أي وقت، مما يقلل من حدوث تفاعلات (أيون-أيون).

رنين السيكلوترون الأيوني (Ion cyclotron resonance)

تعتبر مطيافية الكتلة برنين السيكلوترون الأيوني بتحويل فوريه (FTICR-MS) مماثلة لمطيافية الرنين المغناطيسي النووي بتحويل فوريه (FT-NMR). فعندما تمر الأيونات بالقرب من قطبين متقابلين، فإنها تحفز تياراً متردداً صغيراً في الدائرة

الكهربائية التي تحيط بالقطبين. وتتناسب سعة وتردد هذا التيار مع عدد الأيونات الدائرة وتردد السيكلوترون للأيونات، على التوالي. وعندما يتم إثارة الأيونات الدائرة بواسطة نبضة إشعاع بتردد راديوي (RF)، يتم تحويل اضمحلال التيار المستحث إلى طيف كتلة باستخدام تحويل فوريه (Fourier transformation). توفر هذه التقنية دقة عالية جداً في الكتلة (mass accuracy) وقدرة تحليلية فائقة.

التفتت المتحكم فيه (MS-MS)

يمكن زيادة قوة مطيافية الكتلة بشكل كبير عن طريق ربط محاللات الكتلة على التوالي (مطيافية كتلة متعددة المراحل - multistage MS). في بعض الأجهزة، يتم ربط المحاللات رباعية الأقطاب على التوالي. ففي أجهزة "رباعية الأقطاب الثلاثية" (triple quads)، على سبيل المثال، يتم استخدام ثلاثة محاللات من هذا النوع (الشكل 4). عادةً ما تولد هذه الأجهزة أيونات كاذبة جزيئية (pseudomolecular ions) عن طريق التأين الكيميائي (CI). يتم ضبط المحلل رباعي الأقطاب الأول (Q1) لتسريع أيونات ذات قيمة (m/z) مختارة باتجاه المحلل الثاني (Q2) حيث تتفتت عن طريق تصادمات عالية الطاقة مع الهيليوم أو غاز تصادم آخر. يُشار إلى الأيون المختار الذي يمر عبر (Q1) بـ "الأيون السلف" أو "الأيون الأصل" (precursor or parent ion). أما الأيونات المتكونة من تفتت الأيون السلف فتسمى "أيونات النتاج" أو "الأيونات الابنة" (product or daughter ions). وفي مثل هذه الحالات، يكون التفتت الناتج عادةً قابلاً للتكرار إلى حد كبير. يُستخدم المحلل رباعي الأقطاب الثالث (Q3) لمسح أيونات النتاج، أو السماح بشكل انتقائي لواحد أو أكثر من هذه الأيونات بالمرور إلى الكاشف. يمكن تغيير نمط التفتت عن طريق تغيير طبيعة غاز التصادم (الأرجون، الهيليوم، النيتروجين، أو الزينون)، وطاقة الأيونات المنبعثة من (Q1)، ودرجة الحرارة، والضغط.

يمكن إجراء (MS-MS) أو (MS^n) في أجهزة مصيدة الأيونات. أولاً، يتم طرد جميع الأيونات من المصيدة باستثناء الأيون السلف. يتم تطبيق جهد على القطب الغطائي للنهاية، بزاوية 180 درجة من المجال الناتج عن التردد الراديوي (RF) على القطب الحلقي. عندما يتوافق الجهد المطبق على القطب الغطائي مع طاقة قيمة (m/z) معينة، تصبح الأيونات ذات تلك القيمة غير مستقرة وتتفتت. يمكن تغيير مقدار الطاقة المستخدمة، مما يؤدي بالتالي إلى تغيير مقدار التفتت. بمجرد التفتت، يتم مسح أيونات النتاج خارج المصيدة باتجاه الكاشف. إن طبيعة احتجاز/طرد الأيونات تجعل مصيدة الأيونات رباعية الأقطاب (QIT) مناسبة بشكل خاص لتجارب (MS^n) في دراسات توضيح التركيب الجزيئي. يمكن تكرار خطوات العزل والتفتت عدة مرات، ولا يحد من العدد الدقيق للتكرارات سوى كفاءة الاحتجاز في الجهاز. أصبحت تجارب (MS^5) إجراءً روتينياً، وكذلك الحال بالنسبة لربط الكروماتوغرافيا السائلة لإجراء دراسات ($LC\text{-}MS^n$)(Hopfgartner et al., 2003) .

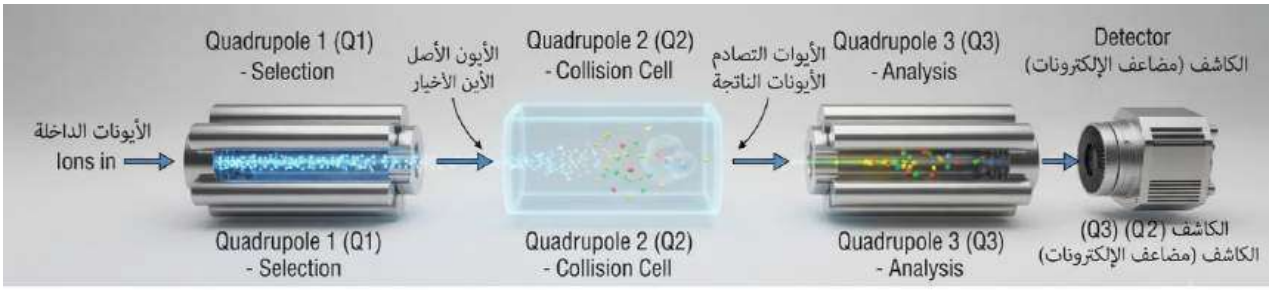


Figure.4 Schematic diagram of a triple-quadrupole mass spectrometer (tandem MS or MS-MS).
الشكل 4: رسم تخطيطي لمطياف كتلة رباعي الأقطاب ثلاثي (مطياف كتلة ترادفي أو MS-MS).

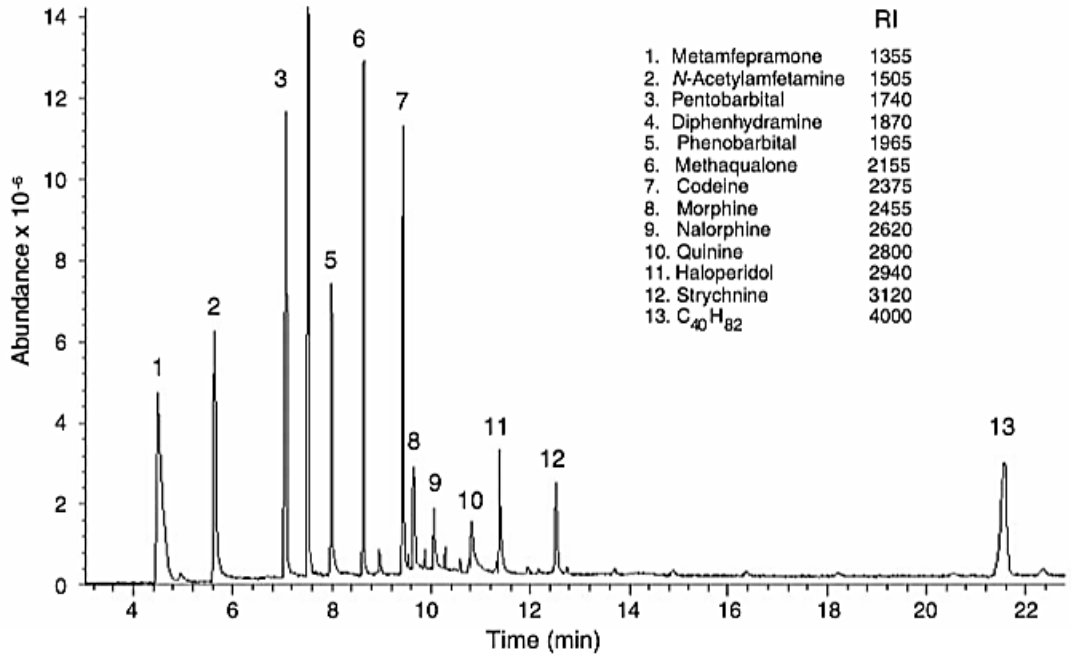
تعد تقنية (MS-MS) أداة تحليلية قوية للغاية. فإذا كان الأيون الأول الذي تم عزله هو الأيون الجزيئي، فإن احتمالية التداخل من مركبات أخرى (أي من القمم التي تخرج في وقت واحد إذا تم استخدام طريقة كروماتوغرافية لإدخال العينة) تنخفض

بشكل كبير. وهذا يزيد من يقين تحديد هوية المادة التحليلية، وفي الوقت نفسه يقلل الاعتماد على مراحل ما قبل مطيافية الكتلة في التحليل. كما تعزز طرق (MS^n) القدرة على توضيح التراكيب الجزيئية؛ فبدلاً من رؤية الطيف الكلي المتكون من تفتت الجزيء، يمكن عزل أيونات فردية وتقييم تفتتها أيضاً. ومع ذلك، من المؤسف أن التفتت الناتج في (MS-MS) نادراً ما يعيد إنتاج طيف التأين الإلكتروني (EI) الخاص بالجزيء، مما يجعل مكتبات الأطياف المعتمدة ذات فائدة محدودة.

عرض بيانات طيف الكتلة (Presentation of mass spectral data)

يتم إنشاء أطياف الكتلة عن طريق رسم شدة الأيونات (التي تعادل عددها) التي تم الكشف عنها مقابل قيمة (m/z) الخاصة بها. ومن المعتاد أن يتم تطبيع شدة الأيونات (normalization) كنسب مئوية من شدة الأيون الأكثر وفرة (القمة الأساسية - base peak). ومع التقنيات المزدوجة (hyphenated) مثل (GC-MS) و (LC-MS) و (CE-MS)، يتم جمع بيانات طيف الكتلة طوال فترة الفصل ويمكن عرضها كـ "كروماتوگرامات كتلة" (تسمى أحياناً مفرگمات الكتلة - mass fragmentograms). وهي رسوم بيانية لرقم المسح (الذي يماثل زمن الاستبقاء) مقابل إما شدة نسبة (m/z) مختارة (SIM)، أو مجموع شدة الأيونات الكلية (كروماتوگرام الأيونات الكلية المعاد بناؤه - RTIC). يمكن استخدام أي من نوعي الرسم البياني للقياسات الكمية. غالباً ما تبدو مخططات (RTIC) مشابهة لكروماتوگرامات (GC-FID). في المثال أعلاه (الشكل 5)، تم استخدام محلول قياسي من الأدوية يغطي زمن الاستبقاء المناسب يومياً للتحقق من أداء الجهاز. كانت معايير الجودة كما يلي: (1) يجب فصل جميع المركبات، (2) يجب أن تكون القمم حادة وذات وفرة كافية، و(3) يجب أن تكون نسبة مساحات قمم المورفين غير المشتق إلى الكودايين 1:10 على الأقل.

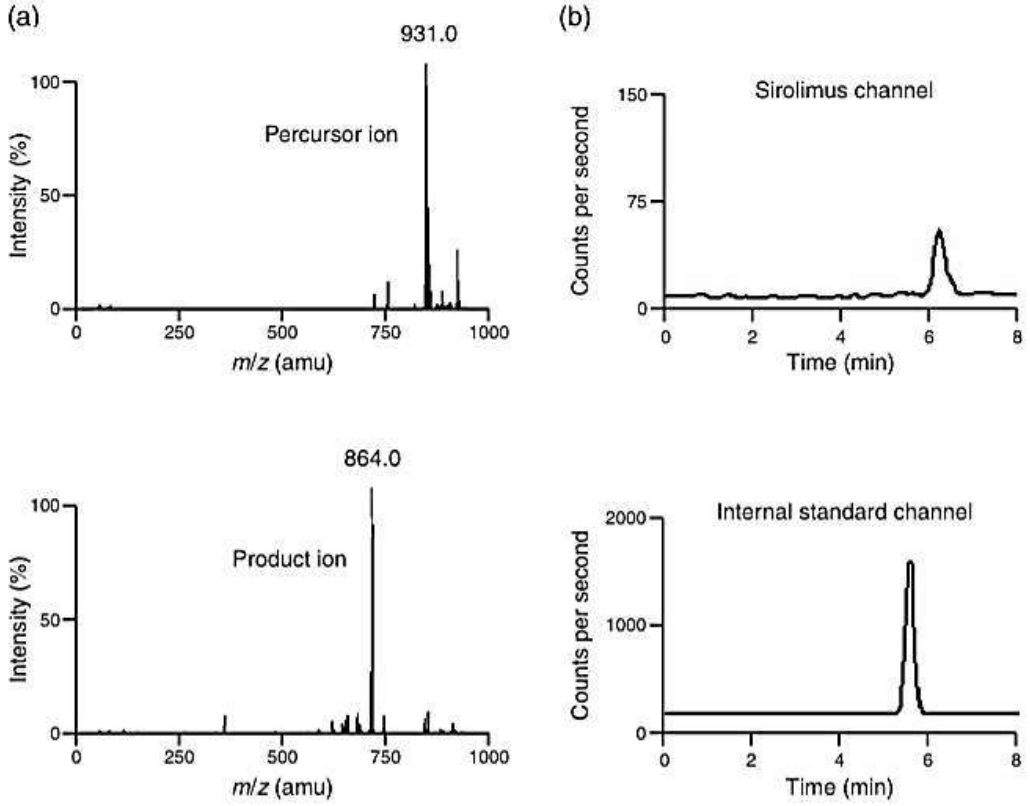
عند استخدام (SIM)، من المعتاد مراقبة أيونين أو أكثر، على سبيل المثال أيون مميز للمادة التحليلية وآخر مميز للمعيار الداخلي، في قنوات منفصلة (الشكل 6). هذا البعد المضاف يعد ميزة أخرى لـ (GC-MS) أو (LC-MS). ومع ذلك، يظل استخدام معايير التكامل المناسبة مثل العتبة (threshold) وعرض القمة أمراً مهماً.



الشكل 5: كروماتوگرام الأيونات الكلية المعاد بناؤه (RTIC) بطريقة (GC-MS) لمحلول اختبار قياسي. الحقن: 1 مل من محلول لكل مركب (50 مجم/لتر) في الميثانول. أعيد رسمه عن (Pfleger et al., 2007) بإذن من شركة John Wiley & Sons Ltd.

كروماتوغرافيا الغاز - مطيافية الكتلة (Gas chromatography-mass spectrometry)

تُستخدم تقنيتا التأين الإلكتروني (EI) والتأين الكيميائي (CI) بشكل روتيني في تحليل المركبات العضوية ذات الوزن الجزيئي (M_r) المنخفض نسبياً، والمتطايرة، والمستقرة حرارياً، خاصة عند اقترانها بكروماتوغرافيا الغاز (GC)، وتسمح كلتا التقنيتين باستخدام نفس الإعداد الأساسي وتصميم المصدر. ينتج التأين الإلكتروني (EI) أيونات موجبة الشحنة عبر إزالة إلكترون، بينما يمكن أن يؤدي التأين الكيميائي (CI) إلى إنتاج أنواع مشحونة إيجاباً أو سلباً (انظر الإطار 3). تقتصر هذه التقنيات، في الواقع، على تحليل المركبات ذات وزن جزيئي يصل إلى حوالي 1000، على الرغم من أن الحد العملي للكتلة في (GC) هو بحدود 750 وحدة كتلة ذرية. تتوفر مجموعة من تقنيات تأين الامتزاز الأخرى (مثل ESI)، وستتم مناقشتها تحت عنوان (LC-MS) أدناه.



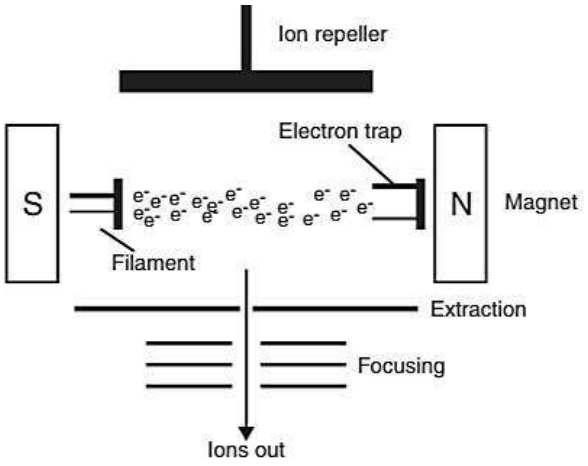
الشكل 6: تحليل عينة دم كاملة من مريض عولج بالسيروليموس (الراباميسين) باستخدام تقنية HPLC-MS-MS. الجهاز المستخدم: Sciex API2000. تم تقسيم التدفق بعد العمود بنسبة 10:1. المصدر: تأين بالرذاذ الكهربائي المسخن (heated ESI) عند 300 درجة مئوية. غاز الرذاذ: هواء (في وضع التأين الموجب). Q1: تم اختيار أيونات الأمونيوم المتصلة (ammonium adduct ions) للسيروليموس $(m/z\ 931.8 \pm 1)[M + \mathrm{NH_4}]^+$والمعيار الداخلي "نور-رابامايسين" $[(M - \mathrm{CH_2}) + \mathrm{NH_4}]^+(m/z\ 917.5 \pm 1)$. Q2: حجرة التصادم (نيتروجين). Q3: الأيونات الناتجة (ربما تكون $[(M - \mathrm{CH_3OH} - \mathrm{H_2O}) + \mathrm{NH_4}]^+$للسيروليموس، و $[(M - \mathrm{CH_2} - \mathrm{CH_3OH} - \mathrm{H_2O}) + \mathrm{NH_4}]^+$للنور-رابامايسين). تركيز السيروليموس هو 4.1 ميكروجرام/لتر. (أ) مسح أيوني للأيونات الأولية والناتجة للسيروليموس، (ب) كروماتوجرامات الكتلة عند m/z 864.5 $\pm$ 0.5وحدة (للسيروليموس) و m/z 850.0 $\pm$ 0.5وحدة (للمعيار الداخلي). أُعيد رسم هذا الشكل عن Holt et al. (2000) بإذن من الجمعية الأمريكية للكيمياء السريرية؛ وتركيب الأيونات الناتجة هو كما اقترحه Wallemacq et al. (2003).

الإطار 3: أنماط التأين في (GC-MS)

نمط التأين	النوع	الخصائص والملاحظات
التأين الإلكتروني *(EI)*	*تأين قاسٍ (Hard ionization)*	➢ *ينتج أيونات موجبة الشحنة (قد تتضمن الأيون الجزيئي - $M^{+\cdot}$ كاتيون جذري.* ➢ *•غالباً ما يؤدي إلى إنتاج نمط تفتت مميز (بصمة جزيئية).*
التأين الكيميائي *(CI)*	*تأين لين (Soft ionization)*	➢ *يتطلب وجود "غاز كاشف" (مثل الأمونيا، الإيزوبيوتان، أو الميثان) في حجرة الأيونات.* ➢ ***في نمط الأيون الموجب :(PICI/PCI)*** *ينتج عادة أيوناً شبه جزيئي (MH^+) مع تفتت ضئيل.* ➢ ***في نمط الأيون السالب :(NICI/NCI)*** *قد ينتج أنيونات جزيئية سليمة، ولكنه مقتصر على المواد التحليلية الفقيرة بالإلكترونات.*

التأين الإلكتروني (Electron ionization)

تمر المادة التحليلية المتبخرة (أو نواتج تحللها إذا حاولنا حقن مادة تحليلية غير مستقرة حرارياً باستخدام المجس) أولاً إلى حجرة التأين الإلكتروني (EI) (الشكل 7). يحدث هنا تفاعل مع حزمة متجانسة من الإلكترونات التي تُنتج عادةً من فتيلة مسخنة كهربائياً (سلك من الرينيوم أو التنجستن). عادةً ما تمتلك الإلكترونات طاقة قدرها 70 إلكترون فولت (eV)، وهي طاقة أعلى بكثير من قوة الروابط داخل مادة تحليلية نموذجية (تقريباً 10–20 إلكترون فولت). يتم توجيه الحزمة عبر حجرة المصدر باتجاه التأريض. يوضع مغناطيس ثابت، بأقطاب متقابلة خارج المحور قليلاً، عبر الحجرة لخلق حزمة لولبية لزيادة فرصة التفاعلات بين الإلكترونات والمادة التحليلية المتبخرة - ومع ذلك، لا يتم تأين سوى 0.1% من المادة التحليلية في العادة. لا توجد تصادمات فعلية بين جزيئات أو شظايا المادة التحليلية والإلكترونات.



الشكل 7: رسم تخطيطي جانبي لمصدر التأين الإلكتروني (EI).
Figure 7: Schematic side view of an EI source

تبدأ المسيرة المؤدية إلى جزيء مشحون بفقدان إلكترون واحد من المادة التحليلية أو عن طريق تحلل المادة التحليلية. يُسمى الجزيء الذي ينقصه إلكترون واحد "الأيون الجزيئي" ويُمثل بالرمز $M^{+\cdot}$(كاتيون جذري). القمة الناتجة في طيف الكتلة من هذا الأيون تعطي الكتلة الجزيئية للمادة التحليلية. يتم طرد الأيونات من المصدر عن طريق تطبيق جهد على قطب طارد (repeller electrode)، والذي يتم الحفاظ عليه بنفس شحنة الأيونات.

نظراً للكمية الكبيرة من الطاقة الممنوحة للأيون الجزيئي، فإنه غالباً ما يتفتت منتجاً أيونات أصغر ذات قيم (m/z) وفرة نسبية مميزة، حيث يوفر الرسم البياني لهذه القيم "البصمة" (fingerprint) لذلك التركيب الجزيئي. يمكن استخدام هذه

المعلومات لتحديد هوية المركبات ذات الأهمية حتى في غياب الأيون الجزيئي، وللمساعدة في توضيح هيكل المكونات غير المعروفة في المخاليط. مع مادة تحليلية AB، هناك عمليتان قد تحدثان كنتيجة مباشرة لنقل الطاقة إلى المادة التحليلية، مما يسبب تفتتاً أولياً [التفاعلان (1) و (2)]. هذا هو السبب الثاني (بعد التحلل الحراري) لوجود أيونات الشظايا في الطيف. العملية الثالثة هي قذف الإلكترون من المادة التحليلية لخلق الأيون الجذري المثار.

يمكن لهذا الأيون بعد ذلك فقدان الطاقة إما من خلال "تبريد الأيون" (ion cooling) والاستقرار ليعطي الأيون الجزيئي الجذري، أو عن طريق تفتت إضافي [التفاعل (3)]. تسمح بعض الأجهزة بضبط جهد التأين، حيث يعطي الجهد المنخفض تأيناً أقل وتفتتاً أقل، وهو ما قد يكون مفيداً في تحديد هوية المادة التحليلية. ومهما يكن من أمر، فإن الدرجة العالية نسبياً من تفتت المادة التحليلية في أطياف (EI) غالباً ما تؤدي إلى تسمية هذه التقنية بـ "التأين القاسي" (hard ionization).

$$AB + e^- \longrightarrow A^+ + B^{\cdot} + e^- \qquad \text{(Reaction 1)}$$

$$AB + e^- \longrightarrow A^+ + B^{\cdot} + 2e^- \qquad \text{(Reaction 2)}$$

تفتت ثانوي (Secondary fragmentation):

$$AB + e^- \longrightarrow [AB^{\cdot +}] + 2e^-$$

$$\downarrow$$

$$AB^{\cdot +} \text{ (Radical molecular ion)} \qquad \text{(Reaction 3)}$$

التأين الكيميائي (Chemical ionization)

في التأين الكيميائي بالأيونات الموجبة (PCI أو PICI)، يوجد غاز كاشف (عادة الأمونيا أو الإيزوبيوتان أو الميثان) في حجرة الأيونات بالإضافة إلى المادة التحليلية، ويتم تأين المادة التحليلية عن طريق التفاعل مع غاز كاشف متأين بدلاً من التفاعل المباشر مع حزمة الإلكترونات كما هو الحال في (EI). يتم إدخال الغاز الكاشف باستمرار بتركيز كافٍ للسماح للتفاعلات المطلوبة بالمضي قدماً، لكن الفراغ (vacuum) ليس عالياً كما هو مستخدم عادة في (EI)، مما يزيد من احتمالية تصادم جزيء المادة التحليلية مع غاز كاشف متأين. غالباً ما يكون تأين المادة التحليلية نتيجة انتقال بروتون من الغاز الكاشف المتأين إلى المادة التحليلية. وتُستخدم شحنة موجبة صغيرة لطرد الأيونات خارج حجرة التأين.

في (PCI)، على الرغم من أن التفاعل الأولي مع الغاز الكاشف هو عملية عالية الطاقة، إلا أن التأين يحدث عن طريق انتقال البروتون، وبالتالي فهو عملية أقل طاقة من (EI). ونظراً لأن الجزيئات المبرتنة (protonated molecules) تمتلك طاقة متبقية أقل، فإن التفتت يقل بشكل كبير، مما يعطي معلومات أقل عن التركيب الدقيق للجزيء. ومع ذلك، فإنه ينتج عموماً أيوناً شبه جزيئي (MH^+)، لذا يمكن الحصول على الوزن الجزيئي (M_r) للمادة التحليلية، وهو أمر لا يتحقق دائماً عند استخدام (EI). علاوة على ذلك، يعد (MH^+) عادةً أيوناً مناسباً لتقنية (SIM) وبالتالي للتحليلات الكمية. ومع ذلك، لا يزال التأين الكيميائي (CI) يتطلب وجود المادة التحليلية في الطور الغازي، لذا يمكن أن يؤدي التحلل الحراري إلى درجات متفاوتة من تفتت المادة التحليلية. وعلى الرغم من ذلك، يُعد (CI) عموماً طريقة تأين "ألين" (softer) بكثير من (EI)، وكان -حتى تطوير طرق تأين الامتزاز- هو الطريقة المفضلة لتحليل المواد التحليلية الصغيرة والقطبية مثل العديد من الأدوية ونواتج أيض الأدوية.

يتم توضيح تكوين الأيونات في (CI) باستخدام الميثان كغاز كاشف في التفاعلات (4)–(6). ففي التفاعل (4)، يتأين الميثان بواسطة حزمة إلكترونية بنفس الطريقة التي يحدث بها في (EI). قد تكون هناك العديد من التفاعلات اللاحقة [التفاعلان (5) و (6)]. يوضح التفاعل (7) الغاز الكاشف المتأين وهو يتفاعل مع غاز غير متأين لتكوين أيون الكربون (ميثان مبرتن). تتطلب

هذه الخطوة أن يكون الغاز الكاشف عند ضغط حرج؛ فإذا كان الضغط منخفضاً جداً، لن يحدث أي تأين للمادة التحليلية. يوضح التفاعل (8) انتقال البروتون من أيون الكربون إلى المادة التحليلية (AB) لتكوين المادة التحليلية المبرتنة (ABH^+). إذا كان ضغط الغاز الكاشف مرتفعاً جداً، فقد تحدث أيضاً تفاعلات ثانوية [التفاعلان (9) و (10)]، مما يؤدي إلى تكوين أيونات الإضافة (adduct ions) للمادة التحليلية - وتظهر هذه كقمم ($M + AB + 15$) و ($M + AB + 29$) في الطيف (أي بزيادة قدرها 14 و 28 وحدة m/zعن ABH^+).

$$CH_4 + e^- \longrightarrow CH_4^{\cdot+} + 2e^- \qquad \text{(Reaction 4)}$$

$$CH_4^{\cdot+} \longrightarrow CH_3^+ + H^{\cdot} \qquad \text{(Reaction 5)}$$

$$CH_3^+ + CH_4 \longrightarrow C_2H_5^+ + H_2 \qquad \text{(Reaction 6)}$$

$$CH_4^{\cdot+} + CH_4 \longrightarrow CH_5^+ + CH_3^{\cdot} \qquad \text{(Reaction 7)}$$

$$M + CH_5^+ \longrightarrow CH_4 + MH^+ \qquad \text{(Reaction 8)}$$

$$M + CH_3^+ \longrightarrow MCH_3^+ \qquad \text{(Reaction 9)}$$

$$M + C_2H_5^+ \longrightarrow MC_2H_5^+ \qquad \text{(Reaction 10)}$$

تُعد الأمونيا أيضاً غازاً كاشفاً شائع الاستخدام، وتتأين كما هو موضح في التفاعلات (111) و(12). ومع ذلك، تعتمد التفاعلات اللاحقة بشكل عام على طبيعة المادة التحليلية. فغالباً ما تتفاعل الجزيئات التي تحتوي على الأمين كما هو موضح في التفاعل (13)، بينما تكون الجزيئات القطبية غير القاعدية عادةً مركبات إضافة (adducts). ولا تتأين المواد التحليلية غير القطبية عادةً، وبذلك يضفي استخدام الأمونيا كغاز كاشف درجة من الانتقائية على عملية التأين. كما يمكن أحياناً دمج الغازات الكاشفة لتحسين تأين مادة تحليلية معينة.

$$NH_3 + e^- \longrightarrow NH_3^{\cdot+} + 2e^- \qquad \text{(Reaction 11)}$$

$$NH_3^{\cdot+} + NH_3 \longrightarrow NH_4^+ + NH_2^{\cdot} \qquad \text{(Reaction 12)}$$

$$NH_4^+ + RNH_2 \longrightarrow RNH_3^+ + NH_3 \qquad \text{(Reaction 13)}$$

يتضمن التأين الكيميائي للأيونات السالبة (NICI أو NCI) التقاط إلكترون ذي طاقة منخفضة نسبياً، مثل تلك الناتجة عن تأين الميثان [التفاعل (1)]، لتوليد أيون سالب الشحنة. يمكن لهذه العملية أن تسفر عن أنيونات جزيئية سليمة يسهل الكشف عنها. ونظراً لأن طاقة الإلكترونات المبدئية منخفضة، فإن المواد التحليلية ذات الألفة الإلكترونية العالية، أي الجزيئات التي تحتوي على ذرة هالوجين، أو مجموعة نيترو أو كربوكسيل، هي أفضل المرشحين لهذا العمل. في جوهر الأمر، يعد (NCI-MS) شكلاً من أشكال (ECD)، ويمكن تحضير مشتقات قادرة على التقاط الإلكترونات. العديد من الجزيئات البيولوجية ليست فقيرة إلكترونياً، وبالتالي لا تتأين بهذه الطريقة؛ ولهذا السبب، غالباً ما تكون هذه التقنية أكثر حساسية بـ 100 إلى 1000 مرة من (PCI)، لذا فهي تُستخدم على نطاق واسع في علم السموم التحليلي (Maurer, 2002).

التطبيق في علم السموم التحليلي (Application in analytical toxicology)

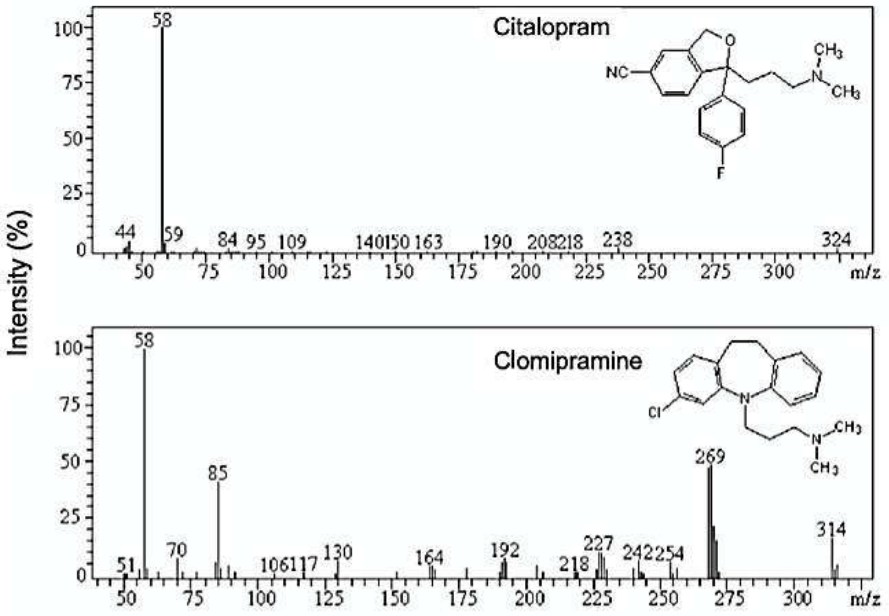
لكي يتم تحليل مركب بواسطة (GC-MS)، يجب أن يكون متطايراً بدرجة كافية ومستقراً حرارياً. وعادةً ما يتم تحليل العينات بعد الاستخلاص السائل-السائل (LLE)، أو الاستخلاص بالطور الصلب (SPE)، أو أي عملية أخرى لتحضير العينة (الفصل 3). قد تتطلب بعض المركبات "اشتقاقاً" (derivatization) مسبقاً للحصول على كروماتوغرافيا موثوقة أو لتعزيز جودة (انتقائية) المعلومات الطيفية التي تم الحصول عليها. فمثلاً، توفر مشتقات "ثلاثي ميثيل سيليل" (TMS) أيونات وفيرة ذات

قيمة (m/z [M–15]$^+$) بسبب فقدان مجموعة ميثيل، بينما تنتج عملية الاشتقاق بكواشف تحتوي على مجموعات ثلاثي فلورو أسيتيل، أو بنتا فلورو بروبيونيل، أو هيبتا فلورو بوتيريل مشتقات ذات ألفة إلكترونية عالية، مما يسهل عملية (NCI). تُستخدم أجهزة رباعيات الأقطاب أو مصائد الأيونات (QITs) على نطاق واسع، في حين جعل ظهور مطياف الكتلة "المكتبي" في شكل كاشف اختيار الكتلة (MSD؛ Agilent) وكاشف مصيدة الأيونات (ITD؛ Thermo-Finnigan) تقنية (GC-MS) وحتى (GC-MS-MS) في متناول العديد من المختبرات.

توفر كروماتوغرافيا الغاز الشعرية (capillary GC) نظاماً مثالياً لتوصيل العينة إلى مطياف الكتلة لأن أنظمة التفريغ الحديثة يمكنها التعامل بسهولة مع معدلات التدفق المنخفضة نسبياً المستخدمة. يتم تمرير نهاية العمود ببساطة عبر خط نقل مسخن لتنتهي عند مدخل مصدر الأيونات. وإذا تم استخدام نفس ظروف (GC) المتبعة في طرق غير المطيافية، فإن أزمنة الاستبقاء ستكون أقصر بسبب التفريغ الموجود في نهاية مطياف الكتلة من العمود.

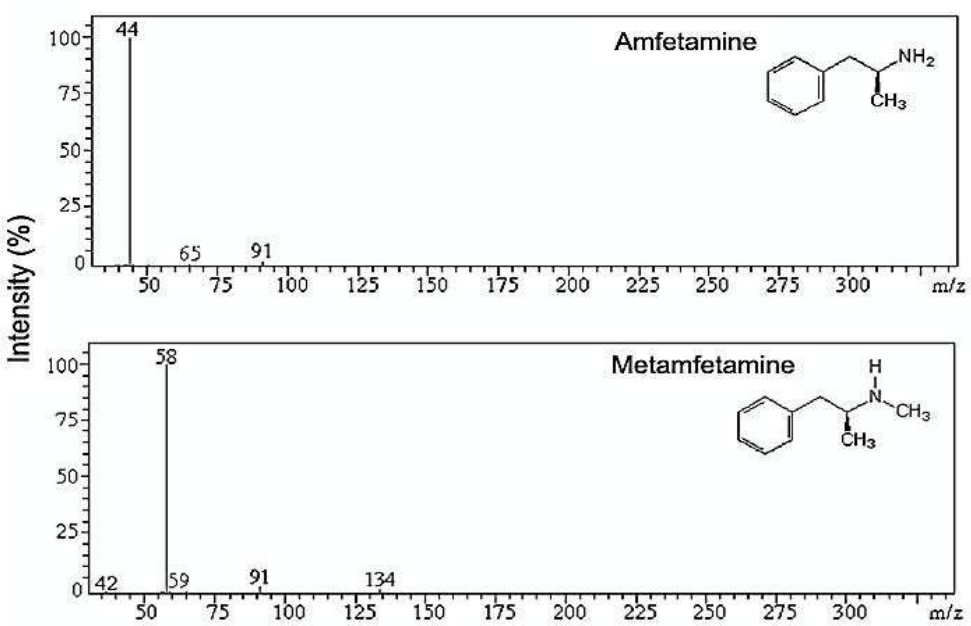
إذا تم استخدام نظام عمود معبأ أو عمود شعري ذو قطر واسع (معدل تدفق 10–30 مل/دقيقة)، فإن هناك حاجة إلى واجهة مناسبة قبل الدخول إلى مصدر الأيونات للحفاظ على التفريغ (الفراغ) اللازم. يُعد "فاصل النفاث" (jet separator) أحد هذه الأنظمة، ويعتمد على حقيقة أنه عند تمرير نواتج العمود عبر فجوة من نفاثة إلى نفاثة ثانية، تتم إزالة غاز الحمل (عادة الهيليوم) الأكثر حركة بشكل كبير، بينما يسمح زخم جزيئات المادة التحليلية الأثقل بعبورها عبر الفجوة (Webb, 1991). قد تشمل صيانة النظام تنظيف أو استبدال بطانة منفذ الحقن، أو تقصير (10–20 سم) أو حتى استبدال عمود الكروماتوغرافيا الغازية (GC)، وتنظيف مصدر الأيونات. يجب اختبار أداء النظام باستخدام معايرات وعينات تحكم "فارغة" (blanks). ويعد استخدام العينات الفارغة أمراً حيوياً، حيث إن تلوث العينات (carry over) يمثل مشكلة رئيسية في التحليل النزري. يمكن استخدام (GC-MS) في نمط التأين الإلكتروني (EI) لإنتاج معلومات قطعية فيما يتعلق بهوية القمة، إما عن طريق توفير أطياف كاملة، أو من خلال القمم الخمس أو الست الرئيسية في طيف الكتلة. وبدلاً من ذلك، يمكن استخدام نمط (CI) للتأكد من الوزن الجزيئي (M_r) للمادة التحليلية، وهو أمر مفيد بشكل خاص في التحليل السمومي المنهجي (STA) حيث يمكن استبعاد عدد كبير من الهياكل المرشحة المحتملة. يمكن أيضاً الحصول على معلومات كمية إذا استُخدم الجهاز في نمط (SIM) في حال توفر معايير معايرة مناسبة (Peters et al., 2003). تعد (GC-MS) قيمة بشكل خاص في تحليل غازات التخدير، والمذيبات، وغيرها من المواد التحليلية المتطايرة حيث لا تكون (LC-MS) مجدية بوضوح، وفي الكشف عن المركبات غير المعروفة عندما يمكن استخدام برمجة درجة حرارة (GC) جنباً إلى جنب مع مكتبات أطياف (EI) للكشف عن وجود نطاق واسع جداً من المركبات (Maurer, 2004; Smith, 2004).

يتم توضيح مثال على استخدام (GC-MS) في تحديد هوية المركبات في الشكل 8. فمضادات الاكتئاب "سيتالوبرام" (citalopram) و"كلوميبرامين" (clomipramine) لهما أزمنة استبقاء متقاربة في (GC) (مؤشر الاستبقاء RI للسيتالوبرام 2377، وللكلوميبرامين 2388 على SE-30/OV-1) واستجابة مشابهة لكاشف النيتروجين والفوسفور (NPD)، إذا لم يتم اشتقاقهما. وعلى الرغم من أن وجود المستقلبات قد يساعد في التمييز بين هذه المركبات، إلا أن أطياف (EI) مختلفة بوضوح (القمم الرئيسية للسيتالوبرام عند m/z58، 238، 208، 42، 324، و190 وحدة؛ والقمم الرئيسية للكلوميبرامين عند 58، 85، 269، 268، 270، 271، و242 وحدة). لاحظ، مع ذلك، أن القمة الرئيسية في كلا الطيفين تقع عند m/z58، والناشئة عن التفتت إلى $_2NCH_2^+(CH_3)$ أو أيونات أخرى لها نفس هذه القيمة.



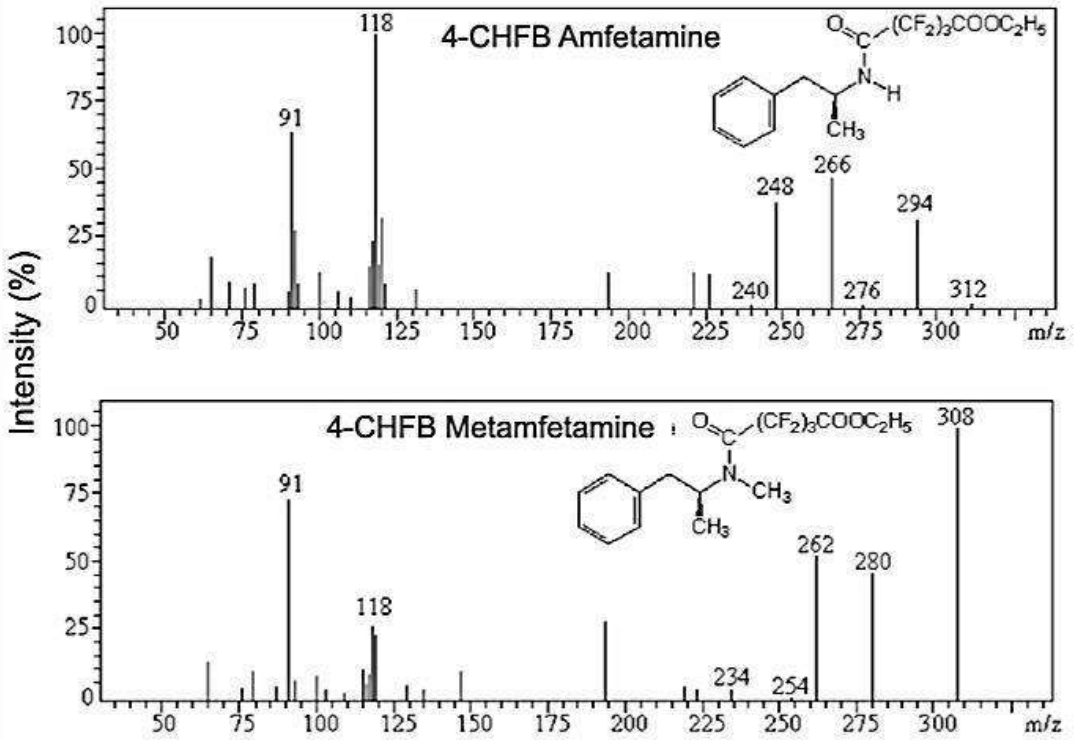
الشكل 8: أطياف الكتلة (EI) للسيتالوبرام (M_r 324.4) والكلوميبرامين (M_r 314.9).

لا يقتصر إنتاج الشظية $(C_2H_4NHCH_3^+)$ أو $_2NCH_2^+(CH_3)$ (أيضاً عند $58m/z$) على السيتالوبرام والكلوميبرامين فحسب، بل ينتجها العديد من الأدوية الأساسية والمستقلبات الأخرى؛ لذا فهي عموماً ذات فائدة ضئيلة في تحديد هوية المركب. بالإضافة إلى ذلك، في حالة السيتالوبرام، تحمل هذه الشظية تقريباً كل تيار الأيونات، مما يجعل من الصعب جداً رؤية الأيونات الأخرى، بما في ذلك الأيون الجزيئي (324 وحدة). شظية شائعة أخرى هي $44m/z$ المقابلة لـ $(CH_3NHCH_2^+)$؛ وهي تهيمن على طيف (EI) لمضاد اكتئاب آخر هو "فلوكسيتين" (fluoxetine). تهيمن هذه الأيونات ($44\ m/z$ و $58m/z$) على أطياف (EI) لاثنين من المواد التحليلية المهمة، وهما الأمفيتامين والميتامفيتامين (الشكل 9)، مما يوضح الحاجة إلى اشتقاق هذه المركبات لإعطاء تحديد موثوق بواسطة مطياف الكتلة (الشكل 10). تعد "الأسيلة" (acetylation) إجراءً آخر يُستخدم عادة لهذا الغرض.



الشكل 9: أطياف الكتلة (EI) للأمفيتامين (M_r 135.2) والميتامفيتامين (M_r 149.2).

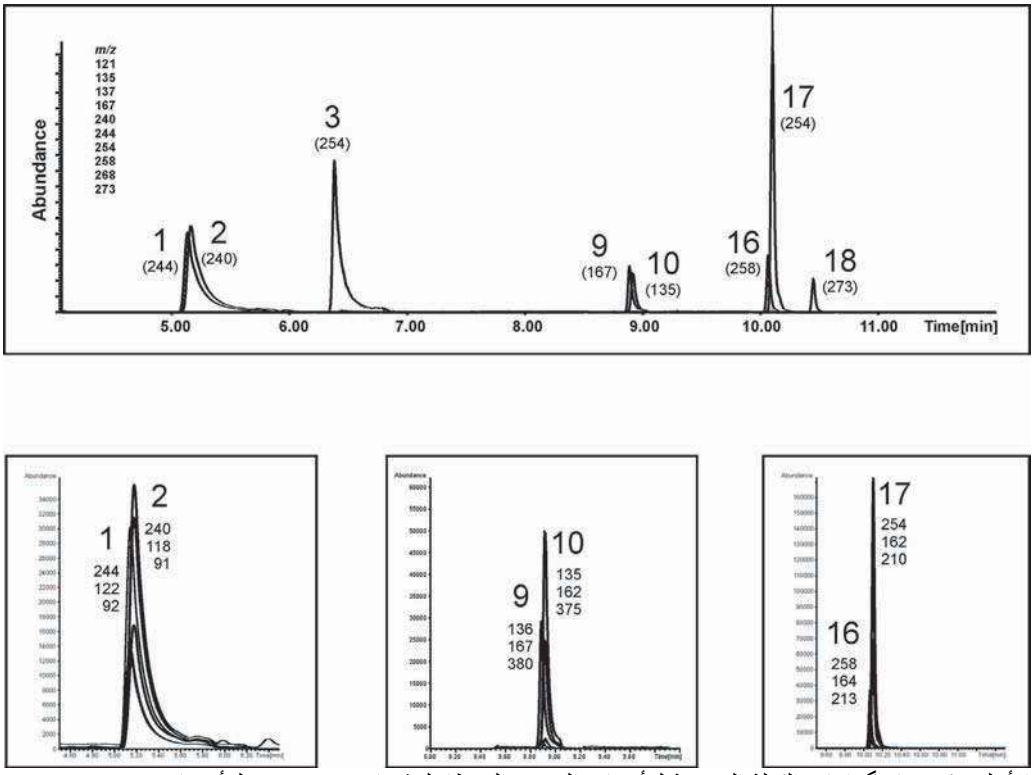
وبالطبع، يمكن الكشف عن العديد من الأدوية ونواتج أيض الأدوية والسموم الأخرى إذا كانت: (1) مستخلصة تحت الظروف المطبقة، (2) متطايرة تحت ظروف (GC) المستخدمة، و(3) إذا كانت أطياف كتلتها موجودة في قواعد البيانات المرجعية (على سبيل المثال: Pfleger et al., 2007; McLafferty and US Department of Commerce, 2005). ومن أجل توسيع نطاق المسح، يُوصى بإجراء تحليل شامل للبول باستخدام المسح الكامل عبر (GC-MS).



الشكل 10: أطياف الكتلة (EI) لمشتقات 4-كربوكسي سداسي فلورو بوتيريل (4-CHFB) للأمفيتامين (M_r 385) والميتامفيتامين (M_r 399).

كمثال على استخدام (GC-MS) في التحليل السمومي المنهجي (STA)، تظهر كروماتوگرامات الكتلة المدمجة للأيونات المميزة للأمفيتامين، و(MDA)، و(MDMA)، والمعايير الداخلية المسمومة بـ ($^2H_5$) المناسبة، بعد التحليل باستخدام الاستخلاص بالطور الصلب (SPE) والاشتقاق بـ (HFBA) (الشكل 11، الأعلى). تشير القمم 2 و10 و17 إلى الوجود المحتمل للأمفيتامين و(MDA) و(MDMA) على التوالي، بينما تشير القمم 1 و3 و9 و16 و18 إلى المعايير الداخلية. كما تظهر كروماتوگرامات الكتلة المدمجة لأيونات الهدف وأيونين تأهيليين (أيونات إضافية مميزة للمادة التحليلية المعينة) للأدوية الثلاثة ومعاييرها الداخلية (الشكل 11، الأسفل). تم استخدام وجود أيونات الهدف والأيونات التأهيلية في قمم هذه المواد التحليلية، مع انحرافات صغيرة في نسب مساحة القمة (أيونات الهدف مقابل الأيونات التأهيلية) عن تلك التي تم الحصول عليها للمواد المرجعية (تتراوح من ± 2.2 إلى ± 7.4%)، لإثبات وجود المركبات الأصل في العينة.

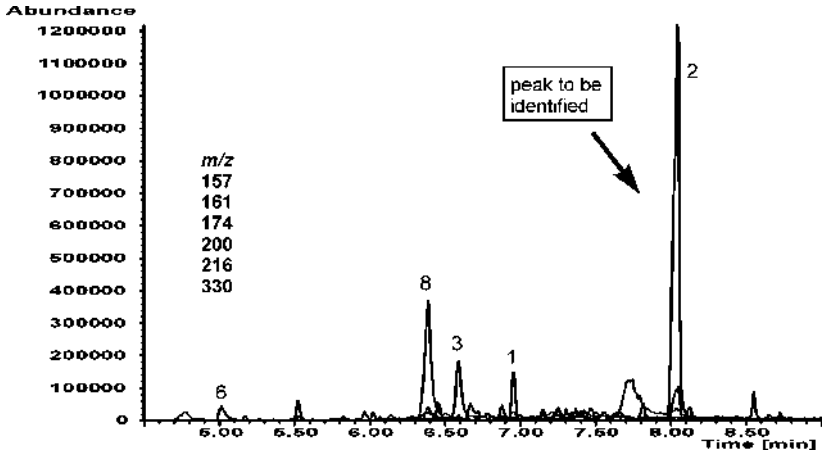
يمكن استخدام نهج مماثل لتحديد هوية "الأدوية المصممة" (designer drugs) المشتقة من البيبرازين، مثل بنزيل بيبرازين (BZP)، وميثيلين ديوكسي بنزيل بيبرازين (MDBP)، وثلاثي فلورو ميثيل فينيل بيبرازين (TFMPP)، و-m) (mCPP) (chlorophenylpiperazine، و(MeOPP) (p-methoxyphenylpiperazine). تم تأكيد وجود (BZP) في عينة بلازما حقيقية من خلال وجود أيونات الهدف والأيونات التأهيلية ونسب مساحة القمة، كما وُصف أعلاه. وفي حالة عدم توفر معايير داخلية مناسبة مسمومة بـ (^2H)، تم استخدام (Peters et al., 2003) (p-tolylpiperazine).



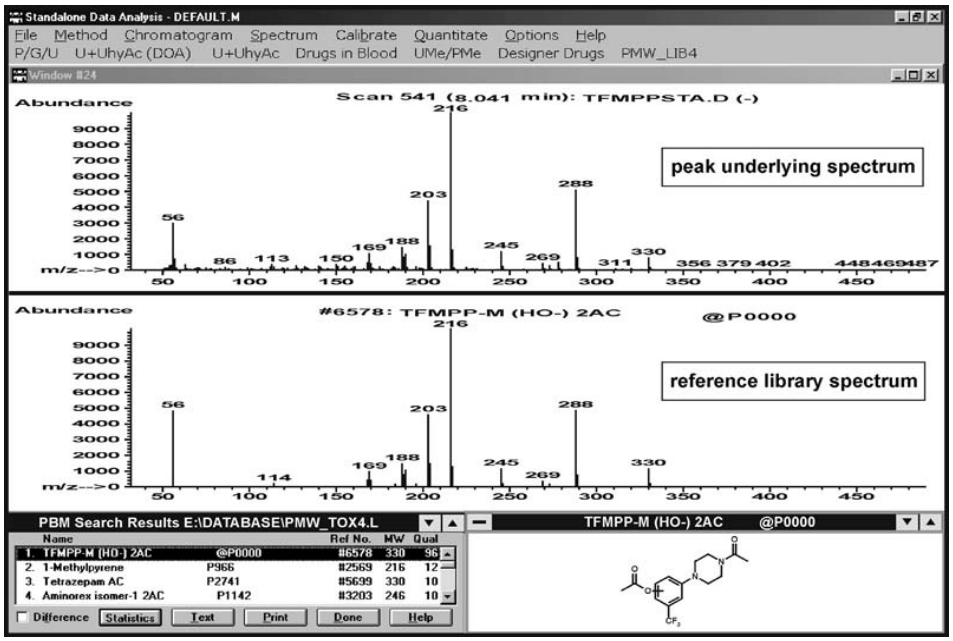
الشكل 11: الأعلى: كروماتوگرامات الكتلة المدمجة للأيونات المميزة المعطاة لمشتقات (HFBA) للأمفيتامين و(MDA) و(MDMA) والمعايير الداخلية التي تم الحصول عليها عند تحليل عينة بلازما لمريض. الأسفل: كروماتوگرامات الكتلة المدمجة لأيونات الهدف والأيونات التأهيلية للأمفيتامين (يسار)، و(MDA) (وسط)، و(MDMA) (يمين). القمم 2، 10، و17: أمفيتامين، MDA، و MDMA 111)، 99، و461 ميكروجرام/لتر على التوالي). القمم 1، 3، 9، و16: أمفيتامين-$^2H_5$، ميتامفيتامين-$^2H_5$، MDA-$^2H_5$، و$^2H_5$-MDMA (جميعها بتركيز 100 ميكروجرام/لتر على التوالي). أعيد إنتاجه عن Peters et al. (2003)، بإذن من شركة John Sons Ltd & Wiley.

كمثال إضافي، استُخدمت كروماتوغرافيا الكتلة بالأيونات $157m/z$، و161، و174، و200، و216، و330 في تحليل "الدواء المصمم" (1-piperazine (3-trifluoromethylphenyl)) المعروف اختصاراً بـ (TFMPP) ومستقلباته بواسطة (GC-EI-MS) بعد التحلل المائي الحمضي، والاستخلاص، والأسيلة (Staack et al., 2003).

تم تأكيد هويات القمم في كروماتوگرامات الكتلة **(الشكل 12)** عن طريق المقارنة الحاسوبية لأطياف الكتلة الأساسية مع أطياف مرجعية. استُخدمت الأيونات المختارة $174m/z$ و200 للكشف عن مركب (TFMPP) نفسه، بينما استُخدمت الأيونات $216m/z$ و330 للإشارة إلى وجود مستقلبه الرئيسي (hydroxy-TFMPP). كما تم اختيار الأيون $174m/z$ لمراقبة مركب (N-(3-trifluoromethylphenyl)ethylenediamine)، واستُخدمت الأيونات $161m/z$ و157 لمراقبة مستقلبات الأنيلين (3-trifluoromethylaniline) و(hydroxy-3-trifluoromethylaniline) على التوالي **(الشكل 13).** لم يكن الفحص للكشف عن مركب (N-(hydroxy-3-trifluoromethylphenyl)ethylenediamine) مفيداً؛ لأنه يُفرز فقط بكميات صغيرة ولا يمكن اكتشافه في البول إلا بعد إعطاء جرعات أعلى من (TFMPP).



الشكل 12: كروماتوگرامات كتلة معاد بناؤها لمستخلص مُسيل لعينة بول جرذ جُمعت خلال 24 ساعة بعد جرعة 1 مجم/كجم من وزن الجسم من (TFMPP). أعيد إنتاجه عن(Staack et al. (2003) .



الشكل 13: طيف الكتلة الكامن للقمة المحددة (الشكل 12)، الطيف المرجعي، التركيب البنائي، و"قائمة النتائج" لبحث المكتبة. أعيد إنتاجه عن(Pfleger et al. (2007

كروماتوغرافيا السائل ـ مطيافية الكتلة (Liquid chromatography-mass spectrometry)

الميزة الأساسية لـ (LC-MS) (أو HPLC-MS) مقارنة بـ (GC-MS) هي قدرتها على تحليل نطاق أوسع بكثير من المركبات. إذ يمكن إجراء الكروماتوغرافيا للمواد التحليلية القطبية وغير المستقرة حرارياً وذات الوزن الجزيئي المرتفع (M_r) جميعها باستخدام (LC-MS) دون الحاجة إلى اشتقاق. يمكن استخدام مضخة حقن بسيطة لتوصيل محلول المادة التحليلية إذا كان استخدام (LC) غير ضروري، على الرغم من أنه من المعتاد استخدام عمود قصير على الأقل. غالباً ما تزداد الانتقائية، وبالتالي الحساسية، مقارنة بـ (HPLC-UV)، مما يؤدي إلى إمكانية تقليل أحجام العينات وتبسيط تحضيرها. كما يمكن تقليل أزمنة تحليل (HPLC)، مما يقلل من استهلاك الطور المتحرك ويزيد من معدل معالجة العينات (الإطار 4).

الإطار 4: بعض مزايا وعيوب تقنية (LC-MS) المحتملة

المزايا:	العيوب المحتملة:
• **نطاق واسع من المواد التحليلية:** لا يقتصر التحليل على تطاير العينة أو استقرارها الحراري. • **انتقائية/حساسية عالية:** قد تتطلب كمية عينة أقل مقارنة بـ (HPLC) التقليدي. • **نطاق خطي واسع.** • **الحد الأدنى من تحضير العينة.** • **استخدام أعمدة قصيرة/تدرج في الإذابة (gradient elution):** لمنح أزمنة تحليل قصيرة وتقليل استهلاك الطور المتحرك (eluent). • **مرونة عالية.**	• **تكلفة رأسمالية عالية.** • **احتمالية حدوث قمع أو تعزيز للأيونات (ion suppression or enhancement).** • **احتمالية التداخل من المركبات التي تخرج معاً (co-eluting).** • **عدم وجود نمط/ظروف تأين موحدة:** لتسهيل بناء قواعد بيانات للأطياف.

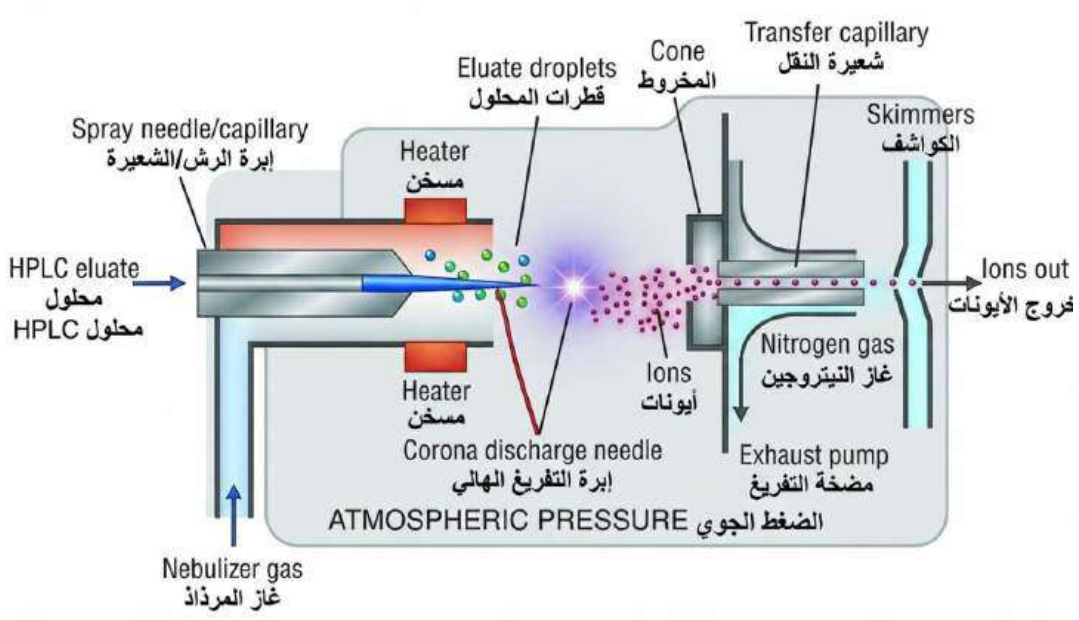
يجب إدخال المواد التحليلية الخارجة من عمود (HPLC) إلى مطياف الكتلة عبر واجهة متخصصة مصممة للتعامل مع وجود الطور المتحرك. وحتى مع وجودها، قد لا تكون العملية مباشرة؛ إذ أن وجود مكونات العينة التي تخرج في نفس الوقت قد يعيق تأين المادة التحليلية و/أو أي معيار داخلي (ما يُعرف بـ "قمع الأيونات")، مما يعطي نتائج كمية خاطئة. ولاختبار قمع الإشارة، فإن ضخ المادة التحليلية بعد العمود (post-column analyte infusion) -بشرط توفر مخزون كافٍ من المادة- يعطي خطاً أساسياً يمكن من خلاله اختبار تأثيرات أوضاع تحضير العينات المختلفة، حيث يظهر قمع الأيونات كقطرة (انخفاض) في هذا الخط الأساسي.

الواجهات الأكثر استخداماً لـ (LC-MS) هي "التأين الكيميائي بالضغط الجوي" (APCI) و"التأين بالرذاذ الكهربائي" (ESI) (الإطار 5). وتُستخدم هذه الواجهات مع نفس نوع المصدر. بشكل عام، يمكن استخدام معدلات تدفق للطور المتحرك تصل إلى 1 مل/دقيقة، على الرغم من أنه إذا تم استخدام طور متحرك ذو محتوى مائي مرتفع نسبياً، فقد يكون من الضروري استخدام معدل تدفق أقل. بالإضافة إلى ذلك، تميل الأملاح والإضافات غير المتطايرة إلى الترسيب على مخروط أخذ العينات، مما يؤدي إلى انخفاض سريع في حساسية الجهاز. لذا، فإن تنظيف العينة بشكل مناسب واستخدام أطوار متحركة متطايرة أمران ضروريان. يمكن استخدام أحماض الخليك، والفورميك، والتريفلوروأُسيتيك للأطوار المتحركة الحمضية، والأملاح الأمونية المتطايرة (أي التي تتسامى) مثل (أسيتات الأمونيوم، كربونات الأمونيوم، فورمات الأمونيوم) للأطوار المتحركة ذات الرقم الهيدروجيني (pH) الأعلى. أما الإضافات مثل تلك المستخدمة في "ازدواج الأيونات" (ion pairing) في (HPLC) أو العوامل النشطة سطحياً في (MEKC) فقد تسبب مشاكل، ويفضل تجنبها إن أمكن.

جميع أنماط التأين المستخدمة مع (LC) هي طرق "لينة" (soft methods)؛ أي أنه لا يوجد حالياً ما يعادل (EI) تماماً كما في (GC-MS). وهذا يمثل عيباً في علم السموم التحليلي لأن قواعد البيانات الطيفية تعتمد بشكل كبير على أطياف (EI)، التي تستفيد من التفتت الذي يحدث عادةً مع نمط التأين هذا. ومع ذلك، فإن استخدام تقنيات التفتت المتحكم فيه يعوض هذا النقص إلى حد ما (Maurer, 2005).

الإطار 5: بعض أوضاع التأين في (LC-MS)

وضع التأين	وصف التقنية وآلية العمل	الخصائص والملاحظات الهامة
التأين الكيميائي بالضغط الجوي(APCI)	يستخدم "التفريغ الهالي (Corona discharge) " كمصدر للتأين، مع الاعتماد على غاز الرذاذ وجزيئات المذيب المتبخرة بدلاً من الغاز الكاشف التقليدي.	ينتج أنواعاً جزيئية وأيونات إضافة(adduct ions) ، مع حد أدنى من التفتت الجزيئي.
التأين الضوئي بالضغط الجوي(APPI)	يستخدم مصباح تفريغ غازي لتوليد فوتونات فوق بنفسجية فراغية (vacuum-UV) تعمل على تأين جزيئات نواتج العمود المرذذة.	يمكن إضافة "مادة مشوبة (Dopant) "مثل الأسيتون أو الأنيسول إلى الغاز المساعد أو الغاز الغلافي للمساعدة في التأين غير المباشر.
التأين بالرذاذ الكهربائي (ESI)	تستخدم واجهة مشابهة لـ (APCI) مع الحفاظ على جهد إبرة الرش عند ± 2.5–4 كيلوفولت مقابل قطب مضاد. يتم مساعدة تبخر المذيب بواسطة غاز الرذاذ.	تُطرد جزيئات المادة التحليلية أحادية أو متعددة الشحنة باتجاه مخروط أخذ العينات، وعادة ما يحدث تفتت ضئيل أو لا يحدث على الإطلاق.
التأين برذاذ الأيونات (ISI)	مشابه تماماً لتقنية (ESI) من حيث المبدأ، لكنه يتميز بعدم استخدامه لأي مصدر خارجي للتأين.	يقتصر استخدامه على معدلات تدفق منخفضة جداً تبلغ بضعة ميكرولتر/دقيقة فقط.
تأين قذف الذرة السريعة (Flow FAB)	تُشتت المذابات في مصفوفة (مثل الجلسرين)، ثم تُقذف بذرات غاز الأرجون أو الزينون عالية السرعة لتحويلها إلى أيونات.	فعال جداً للمركبات غير المستقرة حرارياً، والقطبية، وذات التطاير المنخفض أو الوزن الجزيئي العالي. تقتصر معدلات التدفق على 10 ميكرولتر/دقيقة.
تأين حزمة الجسيمات (Particle-beam)	يُعرف بـ(MAGIC) ؛ حيث يعمل السخان والرذاذ والمقشط (skimmer) على تركيز المادة التحليلية وإزالة المذيبات تماماً عند الواجهة.	يختلف عن (TSP) في كونه يُزيل المذيب تماماً، وهو مفيد بشكل خاص للربط مع مصادر التأين الكيميائي (CI)وتأين الإلكترونات.(EI)
التذرية الحرارية (Thermospray - TSP)	يتم رش نواتج العمود في مصدر الأيونات على شكل قطرات صغيرة يتم تسخينها إلى حوالي 300 درجة مئوية، فتتبخر مكونة أيونات.	إذا كان المكون العضوي في الطور المتحرك مرتفعاً يُستخدم نمط (CI) بفتيلة، وإذا كان منخفضاً يُستخدم تفريغ توهجي (glow discharge) لتعزيز الاستقرار.



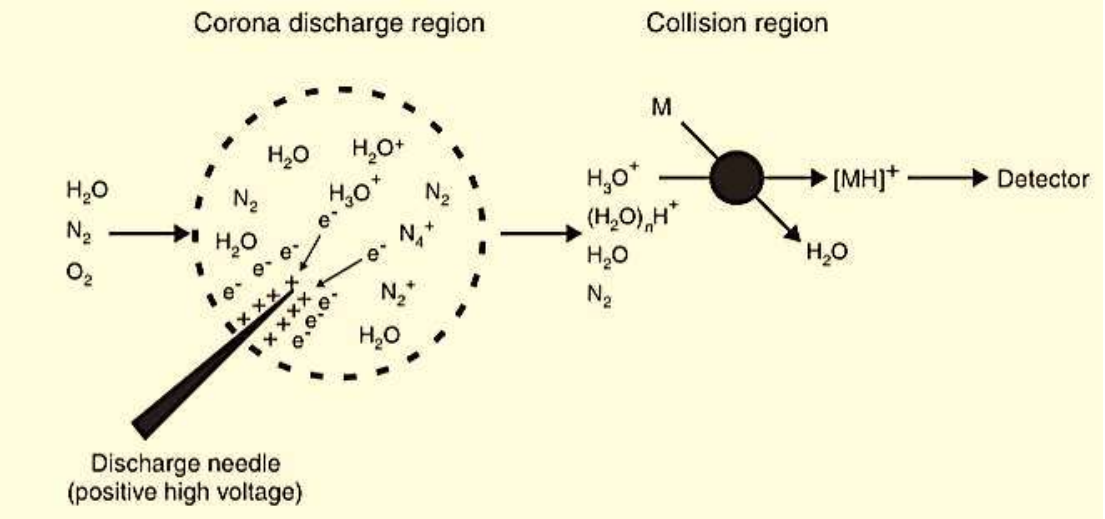
الشكل 14: رسم تخطيطي لمكونات مصدر التأين الكيميائي بالضغط الجوي (APCI).

التأين الكيميائي بالضغط الجوي (Atmospheric-pressure chemical ionization)

تعد تقنية (APCI) مماثلة للتأين الكيميائي (CI) باستثناء أن التأين -كما يوحي الاسم- يحدث عند الضغط الجوي. تكمن التطبيقات الأولية لـ (APCI) في تحليل المركبات ذات الكتلة المنخفضة والمستقرة حرارياً، مثل العديد من المواد الغريبة (xenobiotics). تتكون الواجهة من رذاذ، ومبخر، ومصدر تأين، وعادم، ونظام تحكم في المصدر الكهربائي (الشكل 14)،

وهي مماثلة لتلك المستخدمة في (ESI) باستثناء إدخال إبرة تفريغ هالي (corona discharge needle). يُدخل محلول المادة التحليلية (عادة ما يكون ناتج عمود HPLC) إلى رذاذ هوائي (pneumatic nebulizer) وتتم إزالة المذيب منه في أنبوب كوارتز مسخن. تصل المذابات المتبخرة إلى قطب إبرة، ويقوم تفريغ هالي عالي الجهد (حوالي 10 كيلو فولت) بتأين جزيئات الطور المتحرك. يحل التفريغ الهالي محل فتيلة الإلكترونات المستخدمة في (CI) للأيونات الموجبة، وينتج أيونات أولية N_2^+و N_4^+عن طريق التأين الإلكتروني (EI). تتصادم هذه الأيونات الأولية مع جزيئات المذيب المتبخرة لتكوين أيونات متفاعلة ثانوية مثل H_3O^+و $(H_2O)_nH^+$(الشكل 15). تخضع هذه الأيونات المتفاعلة الثانوية لتصادمات متكررة مع المادة التحليلية مما يؤدي إلى تكوين أيونات المادة التحليلية.

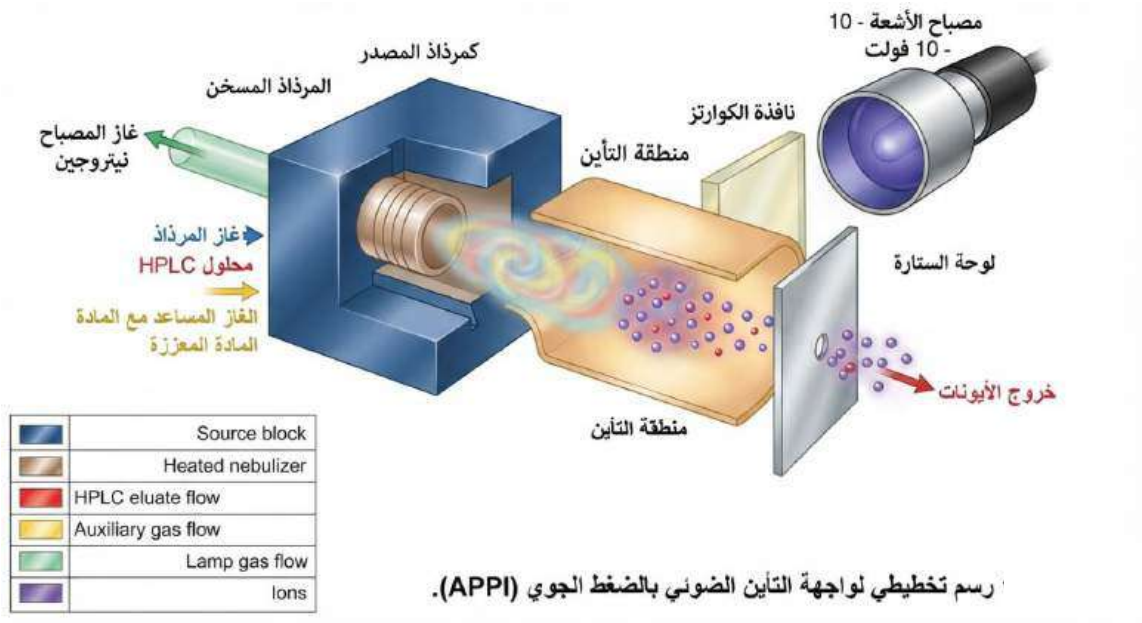
تؤدي الترددات العالية للتصادمات إلى كفاءة تأين عالية وتبخير لأيونات المادة التحليلية. بمجرد تكون الأيونات، فإنها تدخل مرحلة الضخ والتركيز بنفس الطريقة المتبعة في (ESI)، على الرغم من أن الحساسية تميل إلى أن تكون أقل. تسود الأنواع الجزيئية وأيونات الإضافة في الأطياف مع وجود تفتت ضئيل أو معدوم. ومن أجل موازاة الأيونات وتوجيهها بفعالية إلى الثقب الصغير الثاني، ومن ثم تفكيك أيونات العنقود (cluster ions)، يتم شحن جهد انحراف (drift voltage) يتراوح بين 50 و200 فولت بين الثقبين الصغيرين الأول والثاني. إذا كان هذا الجهد مرتفعاً جداً، تزداد طاقة التصادم ومن المحتمل حدوث تفتت.



الشكل 15: APCI: شرح لمنطقة التفريغ الهالي (البلازما) ومناطق التصادم.

التأين الضوئي بالضغط الجوي (Atmospheric-pressure photoionization)

تعد (APPI) تقنية تأين جديدة نسبياً لـ (LC-MS). يعتمد مصدر (APPI) على مصباح تفريغ غازي يولد فوتونات فوق بنفسجية فراغية (VUV) بطاقة 10–10.6 إلكترون فولت. تكون طاقة الفوتونات عادةً أكبر من جهد التأين الأول (IP) للمادة التحليلية؛ لأن العديد من المركبات العضوية لها جهود تأين في نطاق 7–10 إلكترون فولت. ومن ناحية أخرى، فإن جهود التأين لأكثر مذيبات طور متحرك شيوعاً في (LC) لها قيم أعلى (الماء، IP ≈ 12.6 إلكترون فولت؛ الميثانول، IP ≈ 10.8 إلكترون فولت؛ الأسيتونيتريل، IP ≈ 12.2 إلكترون فولت). وهذا يوفر تأيناً للعديد من المواد التحليلية ذات جهود التأين المنخفضة دون تداخل من مذيب الطور المتحرك. يظهر مثال لواجهة (APPI) في الشكل 16 (Robb et al., 2000). يمكن أحياناً تحقيق تعزيز إضافي لكفاءة التأين عن طريق إضافة "مادة مشوبة" (dopant)، مثل الأسيتون، أو الأنيسول، أو البنزين، أو التولوين، إلى الغاز المساعد أو الغاز الغلافي للمساعدة في التأين غير المباشر.



الشكل 16: رسم تخطيطي لواجهة التأين الضوئي بالضغط الجوي (APPI).

التأين بالرذاذ الكهربائي أو رذاذ الأيونات (Electrospray or ionspray ionization)

في هذه الطرق، يتم إنتاج قطرات متعددة الشحنات عن طريق الشحن بجهد عالٍ للرذاذ. وعندما تتبخر القطرات تحت الضغط الجوي، تُقذف أيونات المادة التحليلية. ونظراً لأن الطاقة المطلوبة لإنتاج أيونات المادة التحليلية ضئيلة، فإنه لا يتم إنتاج أيونات شظايا تقريباً. في تقنية رذاذ الأيونات (ISI)، يُستخدم ضغط الغاز عادةً كطاقة إضافية للرذاذ. إن معدل تدفق الطور المتحرك المفيد محدود؛ حيث يمكن لـ (Electrospray) إدخال ما يصل إلى 1 مل/دقيقة، بينما لا يمكن لـ (Ionspray) التعامل إلا مع بضعة ميكرولتر/دقيقة. لذلك، عادة ما تكون هناك حاجة إلى "فاصل نواتج" (effluent splitter) مع (ISI).

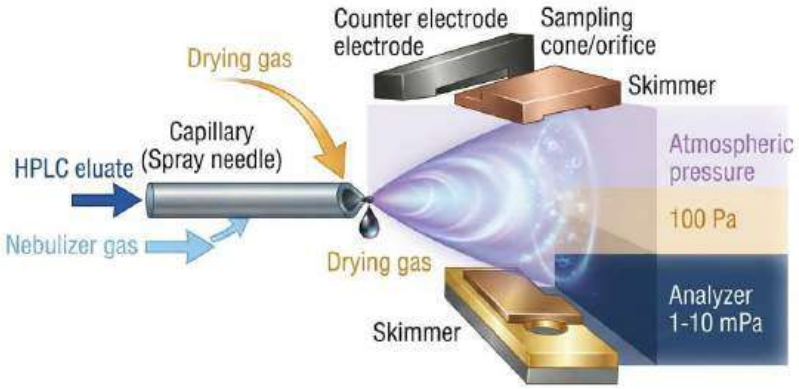
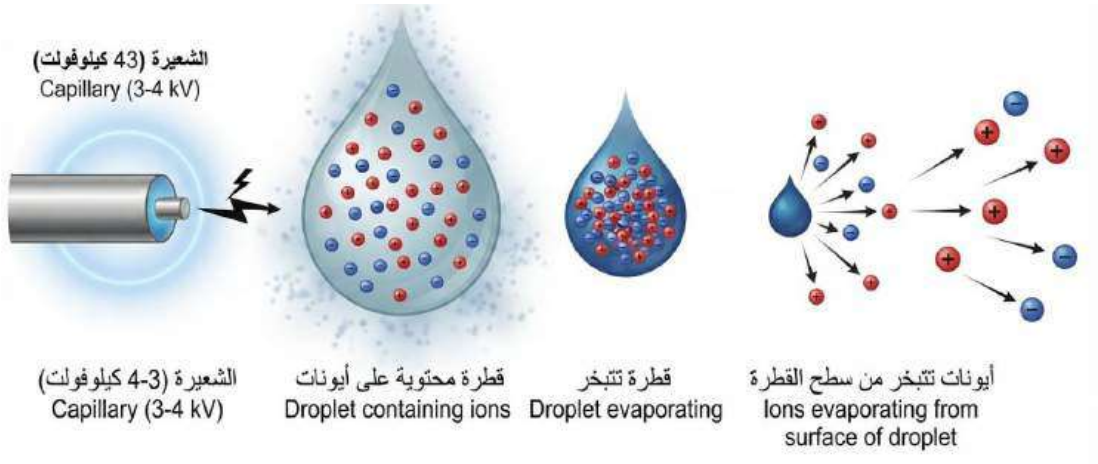


Figure 17 Schematic of an electrospray ionization (ESI) interface.

الشكل 17: رسم تخطيطي لواجهة التأين بالرذاذ الكهربائي (ESI).

في (ESI)، يمر تدفق محلول المادة التحليلية عبر إبرة الرذاذ الكهربائي التي يتم الحفاظ على جهدها عند مستوى عالٍ بالنسبة لقطب مضاد (عادة من 2.5 إلى 4 كيلو فولت). يتم رش القطرات المشحونة من الإبرة بشحنة سطحية لها نفس قطبية الشحنة الموجودة على الإبرة. ويتم المساعدة في تكوين القطرات بواسطة تدفق غاز الرذاذ، وهو عادة النيتروجين. تُطرد القطرات من الإبرة باتجاه مخروط أخذ عينات المصدر الموجود على القطب المضاد. ومع عبور القطرات للمساحة الموجودة بين طرف

الإبرة والمخروط، يحدث تبخر للمذيب بمساعدة تدفق غاز الرذاذ (الشكلين 17 و 18). ومع تبخر المذيب، تتقلص القطرات حتى تصل إلى النقطة التي لا تعود فيها التوتر السطحي قادراً على تحمل الشحنة (حد رايلي - Rayleigh limit)، وعند هذه النقطة تتفكك القطرات، منتجة قطرات أصغر يمكن أن تتفكك أكثر، بالإضافة إلى جزيئات المادة التحليلية المشحونة. هذه العملية تعتمد على الشحنة، ويجب أن يتواجد إلكتروليت في الطور المتحرك بتركيز لا يقل عن 0.05 ميلي مول/لتر لتعزيز عملية (ESI).



Figur18 Electrospray ionization: schematic of the mechanism of ion formation.
الشكل 18: التأين بالرذاذ الكهربائي: رسم تخطيطي لآلية تكوين الأيونات.

تُعد هذه طريقة تأين "لينة" (soft) للغاية، حيث تحتفظ المواد التحليلية بطاقة متبقية ضئيلة جداً. يمكن لجزيئات المادة التحليلية المشحونة (وهي ليست أيونات بالمعنى الحرفي) أن تكون أحادية أو متعددة الشحنة. إن توليد جزيئات متعددة الشحنة يمكّن من تحليل المركبات ذات الوزن الجزيئي (M_r) العالي مثل البروتينات، حيث يتم قياس نسبة (m/z) بدلاً من الكتلة بحد ذاتها. العيب الرئيسي لهذه التقنية هو وجود تفتت ضئيل جداً (وعادة ما يكون معدوماً) للمادة التحليلية، على الرغم من إمكانية التغلب على ذلك باستخدام تقنيات التفتت المتحكم فيه (MS-MS).

تأين قذف الذرة السريعة (Flow fast-atom bombardment ionization)

تعد تقنية تأين قذف الذرة السريعة (FAB) طريقة فعالة جداً لتحليل المركبات غير المستقرة حرارياً، والقطبية، وذات التطاير المنخفض/الكتلة الجزيئية العالية. يتم عادة تشتيت المذابات في مصفوفة مثل الجلسرين وتُؤين عن طريق القذف بذرات غاز الأرجون أو الزينون عالية السرعة. تتكون الواجهة من "مصفاة معدنية" (metal frit) عند طرف أنبوب شعري من السليكا المنصهرة. تخترق مادة تشتت المذاب-المصفوفة المصفاة لإتمام التأين، وتتبخر مذيبات الطور المتحرك بسرعة. تقتصر معدلات تدفق الطور المتحرك على حوالي 10 ميكرولتر/دقيقة، وبالتالي فإن هذه الواجهة قابلة للتطبيق على (HPLC) الشعري باستخدام أعمدة بقطر داخلي أقل من 0.5 مم، وكذلك (CE). كما تُستخدم أيضاً في مطيافية الكتلة بمسبار الإدخال المباشر (direct-insertion probe MS).

تأين حزمة الجسيمات (Particle-beam ionization)

تُسمى طريقة الربط هذه أيضاً "توليد الرذاذ أحادي التشتت لإدخال نواتج الكروماتوغرافيا السائلة" (MAGIC). وهي مشابهة للتذرية الحرارية (TSP)، وتستخدم سخاناً ورذاذاً ومقشطاً (skimmer) مما يؤدي إلى زيادة تركيز المادة التحليلية. تختلف

هذه التقنية عن (TSP) في أن المذابات تُزال منها المذيبات تماماً عند الواجهة بواسطة فوهة ومقشط، وهي مفيدة بشكل خاص للربط بمصادر (CI) و (EI).

التذرية الحرارية (Thermospray)

تتكون واجهة (TSP) من رذاذ، ومصدر أيونات، ونظام عادم (الشكل 19). يتم تسخين نواتج العمود أثناء مرورها عبر الرذاذ، وتُرش في مصدر الأيونات على شكل قطرات صغيرة بقطر حوالي 1 ميكرومتر. يتم تسخين القطرات بواسطة كتلة مصدر الأيونات عند حوالي 300 درجة مئوية وتتبخر مكونة أيونات. إذا كان الطور المتحرك يحتوي على محاليل منظمة (buffer solutions)، يمكن تحفيز تفاعلات معقدة، وبالتالي يتأثر الكشف بدرجة حرارة المسبار، والفراغ المطبق على حجرة الرذاذ، وتركيب الطور المتحرك (Vekey et al., 1989; Voyksner and Pack, 1989).

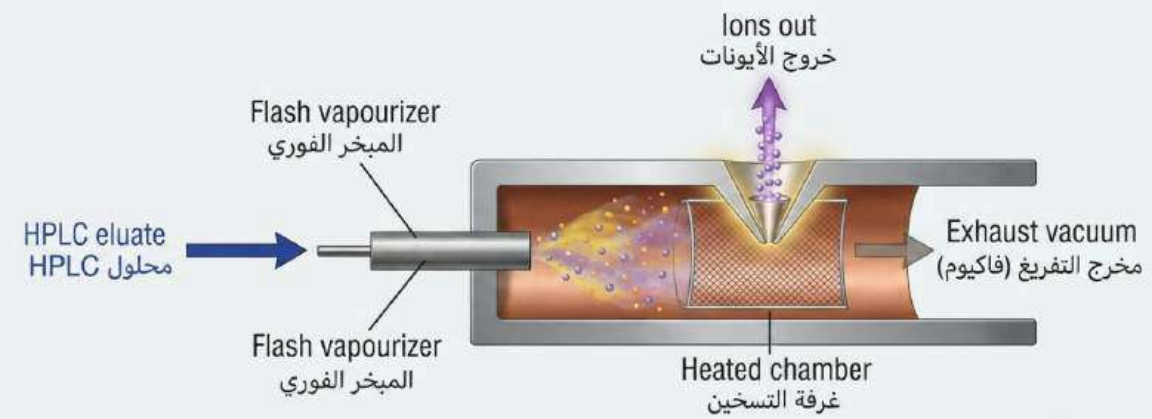


Figure 19 Schematic diagram of a thermospray interface.

الشكل 19: رسم تخطيطي لواجهة التذرية الحرارية (Thermospray).

تعتبر (TSP) مناسبة لعمليات الفصل باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة ذات الطور المعكوس (reversed-phase HPLC)، ويمكن الحصول على أطياف كتلة ذات تفتت ضئيل. عندما تكون نسبة المكون العضوي في الطور المتحرك مرتفعة، كما هو الحال في عمليات الفصل بالطور الطبيعي (normal-phase)، فإن النظام مصمم ليكون قابلاً للاستخدام في نمط (CI) التقليدي مع فتيلة إضافية. أما إذا كان الطور المتحرك يحتوي على نسبة عالية من الماء، فيحتوي النظام على قطب تفريغ لإنتاج تفريغ توهجي (glow discharge) من أجل تأين مستقر.

التطبيق في علم السموم التحليلي (Application in analytical toxicology)

على الرغم من أن (LC-MS) تقنية قوية جداً (الشكل 20)، إلا أن هناك مشاكل قد تواجه غير الحذرين (Maurer, 2004). فهناك احتمالية لقمع أو تعزيز الأيونات، وتداخل من المستقلبات، و"التداخل المتبادل" (cross talk - تداخل بين قنوات SIM) عند استخدام نظائر أو معايير داخلية موسومة بنظائر مستقرة. قد يحدث تداخل من المستقلبات، على سبيل المثال، إذا كانت المستقلبات ذات الكتلة الأعلى من المركب الأصل تخرج من العمود في نفس وقت خروج المركب الأصل وتتحلل لتعطي المركب الأصل في واجهة مطياف الكتلة. كما قد يحدث تداخل من مستقلبات دواء معين عند تحليل دواء ثانٍ. هذا النوع من المشاكل هو الأكثر احتمالاً للحدوث إذا كانت القدرة على الفصل الكروماتوغرافي ضعيفة. تتضمن المتطلبات التنظيمية الحاجة إلى تقييم وإزالة أي تأثير للمصفوفة (matrix effect) في الطرق المستخدمة لدعم الدراسات قبل السريرية والسريرية، على الرغم من أن الإجراءات التجريبية اللازمة لتقييم وجود أو غياب تأثيرات المصفوفة قد لا تكون محددة بدقة. في الصناعة

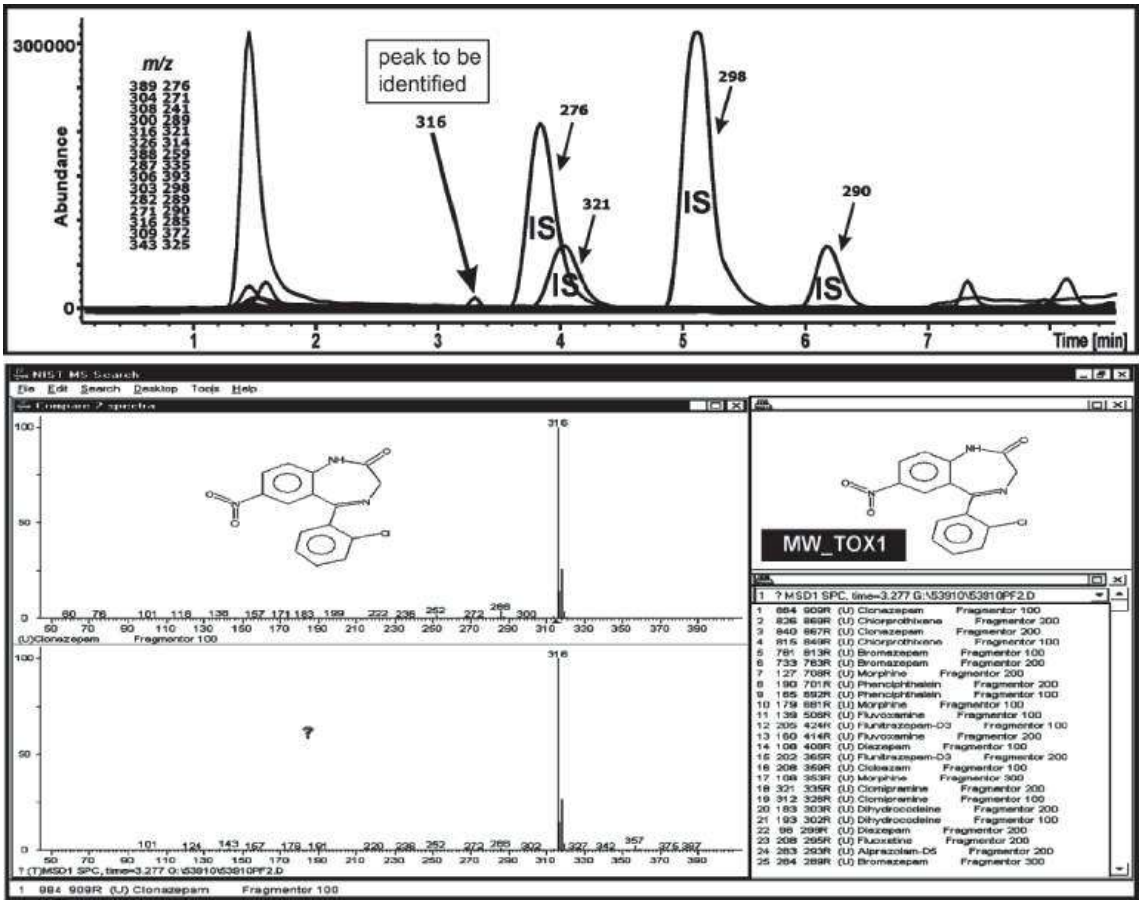
الدوائية، تعتبر أعمدة (HPLC) القصيرة جداً هي القاعدة، ولكن الاعتماد الكلي على نظام الكشف بـ (MS) قد يؤدي إلى مشاكل مع العينات السريرية والشرعية، حيث قد تتواجد مجموعة هائلة من الأدوية والمستقلبات، خاصة إذا تم استخدام نظام تحضير عينة غير انتقائي.

كمثال على المشاكل التي قد تحدث، في تحليل (LC-MS-MS) تم تطويره لقياس الأتروبين (atropine) في مصل مرضى كانوا قد زودوا بكوكايين يحتوي، في إحدى الحالات، على 10% وزن/وزن من الأتروبين، استُخدم عمود (LC) قصير جداً (50 × 2.1 مم قطر داخلي، ODS، 5 ميكرومتر). تم استخدام انتقال الأتروبين $289 > 124 \; m/z$ لمراقبة الأتروبين (Boermans et al., 2006). ومع ذلك، فإن "بنزويل إكغونين" (benzoylecgonine) (وزن جزيئي 289.3) يعطي أيضاً قمة رئيسية عند $124 \; m/z$، وكان موجوداً بتركيزات أعلى من الأتروبين في عينات المرضى الذين تناولوا الكوكايين المغشوش. لذلك، كان من الضروري توخي أقصى درجات الحذر لضمان الفصل الكروماتوغرافي للأتروبين عن البنزويل إكغونين، خاصة وأن كلا المركبين يعطيان أيضاً قمة ثانوية عند $82 \; m/z$.

ينتج "قمع أيونات المصفوفة" (فقدان الإشارة للأيون المراد مراقبته) عن المنافسة بين المادة التحليلية ومكونات المصفوفة على التأين، وهو منتشر بشكل خاص في (ESI). يمكن أن يمثل هذا مشكلة خاصة إذا تلا ترسيب البروتين زمن تحليل (HPLC) قصير جداً، على سبيل المثال دورات زمنية مدتها دقيقة واحدة أو أقل باستخدام أعمدة تحليلية بقطر داخلي 2 مم وطول 1 إلى 3 سم. وبعبارة أخرى، فإن مشكلة قمع الأيونات هي نتيجة لمحاولة تحقيق أقل قدر من تنظيف العينة مع أقصى إنتاجية ممكنة للعينات، باستخدام (SIM) لفصل المادة التحليلية عن مكونات المصفوفة.

غالباً ما تكون أيونات المصفوفة التي تسبب قمع الأيونات ذات وزن جزيئي منخفض. وقد لوحظ فقدان مؤقت للإشارة بنسبة 80–90% أثناء خروج المكونات المتداخلة من العمود. المكونات القطبية في البلازما التي تسبب تأثيرات مصفوفة، مثل الأملاح، غالباً ما تخرج بسرعة وعادة ما يمكن فصلها عن المواد التحليلية محل الاهتمام، لكن المكونات الكارهة للماء (hydrophobic) مثل الدهون الثلاثية التي قد تخرج في نفس وقت خروج المادة التحليلية تمثل مشكلة أكبر بكثير. يمكن أن تكون تأثيرات المصفوفة أيضاً ناتجة عن مواد خارجية، مثل البوليمرات الموجودة في أنواع مختلفة من الأنابيب البلاستيكية أو "هيبارين الليثيوم"، وقد تكون دالة على تصميم المصدر بالإضافة إلى نوع الواجهة المستخدمة. قد تنتج (APCI) تأثيرات ضارة أقل من (ESI)، لكن هذا ليس هو الحال دائماً (Mei et al., 2003).

تم وصف نهج عملية لدراسة وتحديد والقضاء على تأثير مصفوفة العينة على بيانات (HPLC-MS-MS) الكمية (Matuszewski et al., 2003). على سبيل المثال، يمكن إجراء مقارنة مباشرة لمدى أي تأثير للمصفوفة باستخدام واجهة مختلفة (APCI أو ESI أو TSP) في ظل نفس ظروف تحضير العينة و(HPLC). وبدلاً من ذلك، يمكن إجراء إضافة قياسية للمادة التحليلية والمعيار الداخلي إلى مستخلصات عينة خالية من المادة التحليلية، ومقارنة النتائج بتلك التي تم الحصول عليها من المحاليل المرجعية نفسها.



الشكل 20: مسح لتقنية LC-MS-APCI باستخدام تدرج في الإذابة (gradient elution) للكشف عن البنزوديازيبينات باستخدام عمود Merck LiChroCART Superspher 60 RP Select B مع طور ثابت (أعيد إنتاجه عن Kratzsch et al., 2004، بإذن من شركة Sons Ltd & John Wiley). كروماتوگرامات كتلة مدمجة ومصقولة (نمط المسح، 100 فولت) لمستخلص بلازما حقيقي (الجزء العلوي). طيف الكتلة الكامن للقمة المحددة (الطيف السفلي)، الطيف المرجعي (الطيف العلوي)، التركيب البنائي، وقائمة النتائج التي تم العثور عليها بواسطة بحث المكتبة الحاسوبية (الجزء السفلي). تركيز الكلونازيبام 0.02 مجم/لتر.

تفسير أطياف الكتلة (Interpretation of mass spectra)

على الرغم من توفر قواعد البيانات، إلا أنه يجب إجراء تفسير أطياف الكتلة مع المعرفة بنوع التأين المستخدم وعوامل أخرى مثل تحضير العينة، والاشتقاق، وتركيب الطور المتحرك لـ (LC). إن الوزن الجزيئي (M_r) لمعظم المواد التحليلية العضوية هو عدد زوجي ما لم يحتوي الجزيء على عدد فردي من ذرات النيتروجين (ثلاثية التكافؤ). إن وجود عناصر أخرى، مثل البورون على سبيل المثال، يمكن أن يعطي أيضاً وزناً جزيئياً فردياً، ولكن في علم السموم التحليلي نادراً ما يتم مصادفة مثل هذه العناصر. يمكن أن يساعد وجود النظائر الموجودة طبيعياً في تحديد الهوية (الجدول 1). فمع الكلور والبروم، ينتج عن وجود ^{35}Cl و ^{37}Cl، و ^{79}Br و ^{81}Br على التوالي أنماط نظائرية مميزة، ويمكن تحديد الشظايا التي تحتوي على هذه العناصر بسهولة. غالباً ما يتم ذكر الكتلة المتوسطة للجزيء الذي تساهم فيه النظائر بشكل كبير بدلاً من الكتلة الدقيقة. على سبيل المثال، لـ "كلوريد الهيدروجين" كتلة متوسطة قدرها 36.5 وحدة كتلة ذرية، لأنه يحتوي على 75% من ^{35}Cl و25% من ^{37}Cl.

يمكن أن يؤدي وجود نظائر مثل ^{13}C إلى ظهور قمم نظائرية ملحوظة إذا كانت المادة التحليلية تحتوي على عدد كبير نسبياً من ذرات العنصر المناسب.

جدول 1: الوفرة النسبية للنظائر الشائعة في علم السموم التحليلي.

أعيد إنتاجه عن Watson, D. (2004) Mass spectrometry, in Clarke's Analysis of Drugs and Poisons (eds A.C. Moffat, D. Osselton and B. Widdop), 3rd edn, Pharmaceutical Press, London, p. 380, with permission from RPS Publishing.

النظير	الوزن الجزيئي (M_r)	الوفرة الطبيعية (%)	النظير	الوزن الجزيئي (M_r)	الوفرة الطبيعية (%)
^{1}H	1.00782	99.985	^{29}Si	28.977	4.7
^{2}H	2.014	0.015	^{30}Si	29.974	3.1
^{12}C	12.0000000	98.9	^{31}P	30.974	100
^{13}C	13.003	1.1	^{32}S	31.972	95
^{14}N	14.0031	99.64	^{33}S	32.971	0.8
^{15}N	15.0001	0.36	^{34}S	33.968	4.2
^{16}O	15.9949	99.8	^{35}Cl	34.969	75.8
^{17}O	16.999	0.04	^{37}Cl	36.966	24.2
^{18}O	17.999	0.2	^{79}Br	78.918	50.5
^{19}F	18.998	100	^{81}Br	80.916	49.5
^{28}Si	27.977	92.2	^{127}I	126.904	100

يجب أن تتمتع أجهزة القطاع المغناطيسي (Magnetic-sector) بدقة كتلة تبلغ جزءاً واحداً في المليون (ppm) أو أفضل، بمعنى أن كتلة الشظية يجب أن تكون قابلة للقياس بدقة تصل إلى ستة أرقام معنوية على الأقل. وباستخدام هذه الدرجة من الدقة، يمكن تحديد الذرات الموجودة في الشظية بشكل قاطع بشرط معرفة الكتل الدقيقة للنظائر. يتم توحيد قيم الوزن الجزيئي (M_r) بدقة واعتباطياً بالنسبة لـ ^{12}C (12.000000). يمكن أن يكون قياس الكتلة الدقيقة مفيداً، على سبيل المثال، في تحديد مصدر الأدوية غير المشروعة، أو أصل المركبات المستخدمة في تصنيع مثل هذه المركبات.

يجب إجراء معايرة الكتلة للجهاز في وقت التحليل. وتُستخدم مواد معايرة (calibrants) مثل الجلسرين، وبيرفلورو كيروسين (PFK)، وبيرفلورو ثلاثي بيوتيل أمين (PFTBA)، وبولي إيثيلين جليكول (PEG)، و(Ultramark 1621) (بيرفلورو ألكيل فوسفازين)، وذلك حسب الحاجة. يُستخدم (PFTBA) بشكل شائع في عمل (GC-MS) لأنه يمكن استخدامه في نمطي (PCI) و (NCI)، ويغطي نمط تفتته نطاقاً واسعاً من الكتلة. بالإضافة إلى ذلك، فإن الوزن الجزيئي (M_r) للفلور قريب جداً من كتلته الاسمية البالغة 19 (الجدول 1). عادةً ما تُستخدم الأيونات عند $69m/z$، 219، و502 (في EI)، و219، 414، و652 (في PCI)، و302، 452، و633 (في NCI) كأيونات معايرة. مع أجهزة رباعيات الأقطاب (quadrupole)، أو مصائد الأيونات (QIT)، أو غيرها من الأجهزة ذات الدقة المنخفضة (± 1 وحدة)، يُستخدم أقرب عدد صحيح، بينما تُستخدم الكتل الدقيقة بأربع منازل عشرية في مطيافية الكتلة عالية الدقة. في (LC-MS)، تكون معايرة الأجهزة أقل تحديداً، وعادة ما يتم تطويرها لجهاز أو تطبيق معين.

يعد ضعف توفر المعايير المرجعية للأدوية المصممة، والمستقلبات، والمواد المستحدثة مشكلة مستمرة. يُعد قياس الكتلة الدقيقة لمكونات العينة والمقارنة مع قواعد بيانات الكتل أحادية النظير النظرية أحد الأساليب التي تم تبنيها (Ojanpera et al., 2005). باستخدام (LC-TOF-MS)، تم تطبيق نافذة بحث روتينية للكتلة تتراوح بين 20 إلى 30 جزء في المليون (ppm) على عينات البول. وكانت تقنية (LC-FT-MS) قادرة على تأكيد النتائج ضمن دقة كتلة قدرها 3 جزء في المليون. وبذلك، وباستخدام قاعدة بيانات مستهدفة تحتوي على 7640 مركباً، تراوح عدد الصيغ العنصرية المحتملة من واحد إلى ثلاثة مع (LC-TOF-MS)، لكنه كان دائماً صيغة واحدة مع (LC-FT-MS). وعلى العكس من التقنيات العادية التي تتطلب معايير

مرجعية أولية، يمكن تحديث قواعد البيانات القائمة على الصيغ فورياً ببيانات رقمية جديدة من المصادر الأدبية. وباستخدام أجهزة (LC-TOF-MS) الحالية، يمكن تطبيق تفاوت كتلة قدره 10 جزء في المليون (Ojanpera et al., 2006).

تُحصل بيانات تفتت (GC-MS) عادةً في ظل ظروف (EI) عند حوالي 70 إلكترون فولت (eV)، على الرغم من أن بعض هذه البيانات قد يتم الحصول عليها أيضاً عن طريق إدخال عينات نقية عبر مسبار الإدخال المباشر أو باستخدام حزمة جسيمات (LC-MS). من المتطلبات الأساسية لإنتاج أطياف كتلة (EI) أن يكون من الممكن إدخال المادة التحليلية إلى مطياف الكتلة في الطور الغازي تحت ضغط منخفض. يجب أن تكون الأيونات الناتجة وشظايا الأيونات، ونسبها النسبية، مميزة للمادة التحليلية ومستقلة عن الجهاز المستخدم وطريقة إدخال العينة.

تتوفر مكتبات مطيافية الكتلة العامة، مثل (Wiley Registry of Mass Spectral Data) وتلك التي ينتجها المعهد الوطني للمعايير والتكنولوجيا (NIST) بالتعاون مع وكالة حماية البيئة الأمريكية (EPA) والمعاهد الوطنية للصحة (NIH) (McLafferty and US Department of Commerce, 2005)، كاملة مع برامج قواعد البيانات التي تسهل مقارنة أطياف المواد غير المعروفة بتلك الخاصة بالمركبات المعروفة. تتوفر خوارزميات متنوعة للمساعدة في تحديد هوية المركب. كما توجد مكتبات تم إنشاؤها خصيصاً للاستخدام في علم السموم التحليلي (Pfleger et al., 2007; Kühnle, 2006; Rösner, 2006). إذا تم استيفاء متطلبات معينة، فإن مثل هذه المكتبات تسهل تحديد المواد غير المعروفة حتى في حالة عدم وجود مركبات مرجعية (Maurer, 2006; Maurer and Peters, 2006).

عندما تتوفر المادة المرجعية، تُقارن نسب العديد من الأيونات المختارة (عادةً من ثلاثة إلى خمسة) من المادة غير المعروفة مع نسب تلك الأيونات التي تم الحصول عليها من المعيار، والتي عادة ما يتم تحليلها في نفس الدفعة (الشكل 11). يُقبل عموماً أن وجود هذه الأيونات مجتمعة مع توافق جيد في نسب الأيونات مع النسب التي يعطيها المعيار المرجعي، كافياً لتحديد هوية المركب بشكل إيجابي، خاصة عند النظر إليها جنباً إلى جنب مع بيانات الاستبقاء الكروماتوغرافي. استخدام نسب الأيونات المختارة أقل فائدة في تحديد المركبات غير المعروفة، وفي مثل هذه الحالات عادة ما تتم مقارنة أطياف الكتلة للمسح الكامل (full-scan) مع بيانات المكتبة، على الأقل في المقام الأول. يمكن استخدام العديد من خوارزميات البحث المختلفة للمساعدة في تحديد المركبات عن طريق المقارنة مع أطياف المكتبة. إذا فشل هذا النهج، يتم دراسة نمط التفتت (الجدول 2) والأخذ في الاعتبار معلومات أخرى مثل أي خطوات استخلاص واشتقاق مستخدمة. وقد تكون معرفة مسارات الأيض المحتملة لمادة تحليلية معينة (مثل الهيدروكسيلة الفينولية، ونزع الميثيل من النيتروجين، إلخ) مفيدة أيضاً. ومع ذلك، فإن فقدان الشظايا الذي يمكن تفسيره بسهولة يحدث عادة فقط في نطاق 100 وحدة كتلة ذرية (u) من أيون الجزيء.

تنشأ مشاكل أيضاً مع مطيافية الكتلة في حالة المواد المتطايرة مثل الغازات والعديد من المذيبات. فبعض الأجهزة لديها حد قطع كتلي منخفض عند 50 وحدة (u)، بينما تتميز هذه المركبات بهياكل بسيطة نسبياً وبالتالي تنتج عدداً قليلاً جداً من الأيونات التشخيصية. على سبيل المثال، تعطي الهيدروكربونات الأليفاتية أطياف (EI) متشابهة جداً.

الأطياف التي يتم الحصول عليها باستخدام تقنيات التأين اللين مثل (CI) يمكن أن تؤدي إلى جزيئات مبرتنة (protonated) أو أيونات إضافة أخرى مشحونة. ويتم تفسير تفتت هذه الأيونات باستخدام نفس المبادئ العامة المستخدمة مع أطياف (EI). ونظراً لأن تقنيات التأين اللين هذه ألطف بكثير من (EI)، فمن المرجح أن يكون أيون الجزيء (أو ما يمثله) موجوداً في الطيف، لكن التفتت يكون عادة أقل بكثير، ومن ثم تكون المكتبات المنشورة لأطياف (CI) أقل فائدة عموماً من مكتبات (EI) في تحديد هوية المركبات.

جدول 2: تفسير أطياف الكتلة: فقدان الشظايا الشائع

أعيد إنتاجه عن Watson, D. (2004) Mass spectrometry, in Clarke's Analysis of Drugs and Poisons (eds A.C. Moffat, D. Osselton and B. Widdop), 3rd edn, Pharmaceutical Press, London, p. 386, with permission from RPS Publishing.

فقدان الكتلة(u)	الشظية الجذرية/المتعادلة	المصدر المحتمل
1	$H^{\cdot}$	أمين أو ألديهيد
15	$CH_3^{\cdot}$	ميثيل رباعي أو ميثيل مشتقات(TMS)
17	NH_3 أو $OH^{\cdot}$	—
18	H_2O	كحول ثانوي أو ثالثي
19/20	$F^{\cdot}/HF$	فلوريد
28	CO	كيتون/حمض كربوكسيلي
29	$C_2H_5^{\cdot}$	إيثيل
30	CH_2O	إيثر ميثيل أروماتي
31	$CH_3O^{\cdot}$	إستر ميثيل / ميثوكسيم
31	CH_3NH_2	أمين ثانوي
32	CH_3OH	إستر ميثيل
33	$CH_3^{\cdot} + H_2O$	—
35/36	$Cl^{\cdot}/HCl$	كلوريد
42	$CH_2 = C = O$	أسيتات
43	$C_3H_7^{\cdot}$	بروبيل (أيزو)
43	$CH_3CO^{\cdot}$	ميثيل كيتون أو أسيتات
44	$CO + CH_3^{\cdot}$ أو CO_2	إستر
45	$CO_2H^{\cdot}$	حمض كربوكسيلي
46	$CO + H_2O$	—
57	$C_4H_9^{\cdot}$	بيوتيل
59/60	$CH_3COO^{\cdot}/CH_3COOH$	أسيتات
73	$(CH_3)_3Si^{\cdot}$	إيثر(TMS)
90	$(CH_3)_3SiOH$	إيثر(TMS)

مطيافية الكتلة الكمية (Quantitative mass spectrometry)

بسبب التباين في درجة التأين في مطيافية الكتلة، يعد استخدام المعايير الداخلية (internal standards) أمراً حيوياً عند إجراء القياسات الكمية. تُستخدم النظائر المسمومة (stable isotope-labelled analogues) على نطاق واسع لهذا الغرض (مطيافية كتلة تخفيف النظائر). تتمتع المعايير الداخلية النظائرية بخصائص كيميائية وفيزيائية مطابقة عملياً للمادة التحليلية، وبالتالي فإن الاستخلاص، والاشتقاق إذا لزم الأمر، والكروماتوغرافيا، والتفتت، غالباً ما تكون متطابقة فعلياً. ومع ذلك، يجب اختيار موقع الوسم النظائري بحيث لا تنكسر الروابط التي تربط النظير أثناء التفتت؛ لأن الروابط التي تتضمن نظائر أثقل تكون أكثر استقراراً، وقد يختلف نمط تفتت المركب المسموم عن المادة التحليلية. قد يساهم المعيار الداخلي في زيادة درجة قمع الأيونات في (LC-MS)، ولكن بشكل عام يتأثر كل من المعيار الداخلي والمادة التحليلية بالتساوي بهذه الظواهر (Sojo et al., 2003). يجب أن يؤخذ في الاعتبار أن المركبات المسمومة وغير المسمومة قد يتم فصلها جزئياً أثناء التحليل الكروماتوغرافي (على سبيل المثال، قد تخرج النظائر الديوتيرية قليلاً قبل المادة التحليلية غير المسمومة في GC-MS)، ليس فقط فيما يتعلق باختيار معلمات التكامل الصحيحة، ولكن أيضاً لأن أي قمع للأيونات قد يختلف بين المعيار الداخلي والمادة التحليلية.

بالنسبة لتحليل مطيافية الكتلة، قد يُضاف المعيار الداخلي بتركيز أعلى (على سبيل المثال 100 ضعف) من المادة التحليلية. وهذا يؤدي إلى إجراء الفحص عبر نطاق تركيز "كلي" أضيق، مما يقلل من تأثير التأثيرات المحتملة المتعلقة بالتركيز مثل الامتصاص. في ظل هذه الظروف، ستحد النقاء النظائري للمادة من الكمية التي يمكن إضافتها لحد أدنى معين من التكميم (LLoQ). وبما أن كمية المادة غير المسمومة في المعيار الداخلي ثابتة، فإن رسم المعايرة مع تقاطع موجب كبير يكون مقبولاً بشرط أن يتم التمييز بين العينة الفارغة (blank) وأقل معيار معايرة . وبالمقابل، يمكن أن يتداخل وجود النظائر الموجودة طبيعياً في المادة التحليلية مع قياس المعيار الداخلي ("التداخل المتبادل" crosstalk). سيكون هذا أكثر شيوعاً عند تركيزات المادة التحليلية العالية، عندما تختلف كتل المادة التحليلية والمعيار الداخلي بمقدار 1 أو 2 وحدة فقط، وعندما تحتوي المادة التحليلية على عناصر ذات وفرة عالية من النظائر الأثقل (مثل الكبريت، الجدول 1).

يعد الديوتيريوم (Deuterium) أكثر ملصقات النظائر المستقرة استخداماً، وذلك ليس بسبب التكلفة فحسب، بل أيضاً لتوافر كواشف عالية النقاء. وجود كل ذرة ديوتيريوم في الجزيء يزيد من الوزن الجزيئي (M_r) للجزيء بمقدار 1. بالنسبة للتحليلات عالية الحساسية، يوصى بأن تكون كتلة المعيار الداخلي أكبر من المادة التحليلية بمقدار 3 وحدات على الأقل لتقليل التداخل من النظائر الموجودة طبيعياً. وقد اقترح أنه كلما أمكن، يجب استخدام مواد مسمومة بـ ^{13}Cمع الكشف بـ مطيافية الكتلة (Chang et al., 2002)، لكن من الواضح أن هذا سيضيف تكلفة كبيرة للفحص وقد يجعل من الصعب تحقيق فرق الكتلة المطلوب بين المادة التحليلية والمعيار الداخلي. وعندما لا تتوفر النظائر المسمومة، أو يمكن استخدام الإجراء لتكميم عدد كبير من المواد التحليلية في وقت واحد، تُستخدم معايير داخلية ذات خصائص كيميائية قريبة بما يكفي من المادة التحليلية لتقديم بيانات كمية موثوقة.

كان من المفترض عموماً أنه لا يمكن أن يحدث الكثير من الخطأ عند استخدام معايير داخلية مسمومة نظائرياً. المعايير الداخلية المديترة (deuterated) والمريتية (tritiated) أكثر عرضة للتأثر بالتأثيرات النظائرية مقارنة، على سبيل المثال، بتلك التي تحتوي على ^{13}C، لأن ذرات الهيدروجين هذه أثقل نسبياً بشكل أكبر بكثير. ترددات الاهتزاز لروابط الكربون-ديوتيريوم أقل من تلك الخاصة بروابط الكربون-هيدروجين المقابلة، بحيث تميل المركبات المديترة إلى أن تكون أكثر استقراراً من نظيراتها غير المسمومة. وقد تم الإبلاغ عن فصل جزئي أو كامل بواسطة (HPLC) لبعض المعايير الداخلية من النوع ^{2}H(de Ridder and van Hal, 1976). فعلى سبيل المثال، سمح الفصل الأساسي لمركب 1-هيدروكسي بيرين عن مركب $[^{2}H_9]$-1-هيدروكسي بيرين (المعيار الداخلي) باستخدام كشف الفلورة بدلاً من الكشف بمطيافية الكتلة (Chetiyanukornkul et al., 2002).

في عمل (MS-MS)، يمكن مراقبة الاستجابة من أيون ابنة (daughter ion) واحد من المادة التحليلية ومن المعيار الداخلي، أو يمكن مراقبة نسبة استجابة أيوني ابنة لكل مركب (مراقبة التفاعل المتعددة، MRM).

الدقة (Resolution) في مطيافية الكتلة مماثلة لفصل المواد التحليلية في الكروماتوغرافيا، وهي بنفس القدر من الأهمية إذا كان سيتم إجراء قياسات كمية. تعني الدقة الأحادية (Unit resolution) أن قمتين كتليتين منفصلتان تماماً (نسبة قمة:وادي 0%). يمكن لأجهزة القطاع المغناطيسي تحقيق دقة تصل إلى 20,000 عند نسبة 50% بين القمة والوادي، أي يمكن تحقيق دقة بين 20,000 و 20,001 وحدة كتلة ذرية (u) مع وجود 50% من ارتفاع القمة بين القمتين. ويمكن لأجهزة (ToF) في الوقت الحاضر تحقيق دقة كتلة مماثلة. ومع ذلك، فإن أجهزة رباعيات الأقطاب (quadrupole) البسيطة لا يمكنها توفير سوى دقة تبلغ حوالي 500.

ملخص (Summary)

تعتبر المعرفة الشاملة بـ (GC-MS) و (LC-MS) أساسية في علم السموم التحليلي الحديث. توفر تقنية (GC-EI-MS) الشعرية، عند استخدامها جنباً إلى جنب مع تحضير العينة المناسب وبرمجة درجة الحرارة، حساسية تضاهي في أفضل الأحوال (GC-FID)، ولكن هذا يقترن بانتقائية لا مثيل لها. ومع ذلك، هناك مشاكل للمستخدم غير الحذر. فعلى الرغم من أهميتها في تحديد هوية المادة التحليلية، تعطي بعض المواد أطياف (EI) ضعيفة ما لم يتم اشتقاقها. ومع ذلك، فإن العديد من المواد التحليلية غير قابلة للاشتقاق. تعد معايرة الكتلة اليومية ضرورية. يعطي التأين الكيميائي (CI) مع (SIM) حساسية أفضل مع المواد التحليلية المستهدفة، ولكن تظل جميع القيود المحيطة بـ (GC) قائمة. تكتسب تقنيات (LC-MS) أهمية متزايدة، جزئياً لأن الحاجة إلى الاستقرار الحراري و/أو الاشتقاق أصبحت غير ضرورية، ولكن هنا أيضاً هناك حاجة إلى اهتمام دقيق بالتفاصيل لتجنب العثرات مثل قمع الإشارة بسبب مكونات العينة التي تخرج من العمود في نفس الوقت. علاوة على ذلك، لا يوجد حتى الآن نظير لـ (EI) في (LC-MS).

قائمة المراجع(References)

Abian, J. (1999). The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry, 34(2), 157–168.

Barwick, V., Langley, J., Mallet, T., Stein, B., & Webb, K. (2007). Best practice guide for generating mass spectra. LGC. http://www.vam.org.uk/publications/publications_item.asp?intPublicationID=1328

Boermans, P. A. M. M., Go, H. S., Wessels, A. M. A., & Uges, D. R. A. (2006). Quantification by HPLC-MS/MS of atropine in human serum and clinical presentation of six mild-to-moderate intoxicated atropine-adulterated-cocaine users. Therapeutic Drug Monitoring, 28(2), 295–298.

Chang, W. T., Smith, J., & Liu, R. H. (2002). Isotopic analogs as internal standards for quantitative GC/MS analysis—molecular abundance and retention time difference as interference factors. Journal of Forensic Sciences, 47(4), 873–881.

Chen, J., Korfmacher, W. A., & Hsieh, Y. (2005). Chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometric methods for stereoisomeric pharmaceutical determinations. Journal of Chromatography B, 820(1), 1–8.

Chetiyanukornkul, T., Toriba, A., Kizu, R., Makino, T., Nakazawa, H., & Hayakawa, K. (2002). Determination of 1-hydroxypyrene in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using a deuterated internal standard. Journal of Chromatography B, 961(1–2), 107–112.

Cody, J. T. (1992). Determination of methamphetamine enantiomer ratios in urine by gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 580(1–2), 77–95.

Downard, K. (2004). Mass spectrometry: A foundation course. Royal Society of Chemistry.

Holt, D. W., Lee, T., Jones, K., & Johnston, A. (2000). Validation of an assay for routine monitoring of sirolimus using HPLC with mass spectrometric detection. Clinical Chemistry, 46(8), 1179–1183.

Hopfgartner, G., Husser, C., & Zell, M. (2003). Rapid screening and characterization of drug metabolites using a new quadrupole-linear ion trap mass spectrometer. Journal of Mass Spectrometry, 38(2), 138–150.

Kratzsch, C., Tenberken, O., Peters, F. T., Weber, A. A., Kraemer, T., & Maurer, H. H. (2004). Screening, library-assisted identification and validated quantification of 23 benzodiazepines, flumazenil, zaleplone, zolpidem and zopiclone in plasma by liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. Journal of Mass Spectrometry, 39(8), 856–872.

Kühnle, R. (2006). Mass spectra of pharmaceuticals and agrochemicals. Wiley-VCH.

Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., & Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. Analytical Chemistry, 75(13), 3019–3030.

Maurer, H. H. (2002). Role of gas chromatography-mass spectrometry with negative ion chemical ionization in clinical and forensic toxicology, doping control, and biomonitoring. Therapeutic Drug Monitoring, 24(2), 247–254.

Maurer, H. H. (2004). Position of chromatographic techniques in screening for detection of drugs or poisons in clinical and forensic toxicology and/or doping control. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 42(11), 1310–1324.

Maurer, H. H. (2005). Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. Clinica Chimica Acta, 38(4), 310–318.

Maurer, H. H. (2006). Hyphenated mass spectrometric techniques—indispensable tools in clinical and forensic toxicology and in doping control. Journal of Mass Spectrometry, 41(11), 1399–1413.

Maurer, H. H., & Peters, F. T. (2006). Analyte identification using library searching in GC-MS and LC-MS. In M. Gross & R. M. Caprioli (Eds.), Encyclopedia of mass spectrometry (pp. 115–121). Elsevier Science.

McLafferty, F. W., & US Department of Commerce. (2005). Wiley Registry of mass spectral data (7th ed.) with NIST/EPA/NIH 2005 spectral data. Wiley.

Mei, H., Hsieh, Y., Nardo, C., Xu, X., Wang, S., Ng, K., & Korfmacher, W. A. (2003). Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: Application to drug discovery. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 17(2), 97–103.

Ojanperä, I., Pelander, A., Laks, S., Gergov, M., Vuori, E., & Witt, M. (2005). Application of accurate mass measurement to urine drug screening. Journal of Analytical Toxicology, 29(1), 34–40.

Ojanperä, S., Pelander, A., Pelzing, M., Krebs, I., Vuori, E., & Ojanperä, I. (2006). Isotopic pattern and accurate mass determination in urine drug screening by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20(8), 1161–1167.

Peters, F. T., Schaefer, S., Staack, R. F., Kraemer, T., & Maurer, H. H. (2003). Screening for and validated quantification of amphetamines and of amphetamine- and piperazine-derived designer drugs in human blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry. Journal of Mass Spectrometry, 38(6), 659–676.

Pfleger, K., Maurer, H. H., & Weber, A. (Eds.). (2007). Mass spectral and GC data of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites (3rd ed.). Wiley-VCH.

de Ridder, J. J., & van Hal, H. J. M. (1976). Unexpected high-performance liquid chromatographic separation of Org CG 94 and [3,3,4,4–2H4]Org GC 94. Journal of Chromatography A, 121(1), 96–99.

Robb, D. B., Covey, T. R., & Bruins, A. P. (2000). Atmospheric pressure photoionization: An ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. Analytical Chemistry, 72(15), 3653–3659.

Rösner, P. (2006). Mass spectra of designer drugs 2006. Wiley-VCH.

Smith, R. M. (2004). Understanding mass spectra: A basic approach (2nd ed.). Wiley.

Sojo, L. E., Lum, G., & Chee, P. (2003). Internal standard signal suppression by coeluting analyte in isotope dilution LC-ESI-MS. Analyst, 128(1), 51–54.

Staack, R. F., Fritschi, G., & Maurer, H. H. (2003). New designer drug 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP): Gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/mass spectrometry studies on its phase I and II metabolism and on its toxicological detection in rat urine. Journal of Mass Spectrometry, 38(9), 971–981.

Van Bocxlaer, J. F., Clauwaert, K. M., Lambert, W. E., Deforce, D. L., Van den Eeckhout, E. G., & De Leenheer, A. P. (2000). Liquid chromatography-mass spectrometry in forensic toxicology. Mass Spectrometry Reviews, 19(3), 165–214.

Vekey, K., Edwards, D., & Zerilli, L. F. (1989). Liquid chromatography-mass spectrometry coupling and its application in pharmaceutical research. Journal of Chromatography A, 488(1), 73–85.

Voyksner, R. D., & Pack, T. W. (1989). Semi-quantitative method for high molecular weight neuropeptides by high-performance liquid chromatography/thermospray mass spectrometry. Biomedical and Environmental Mass Spectrometry, 18(10), 897–903.

Wallemacq, P. E., Vanbinst, R., Asta, S., & Cooper, D. P. (2003). High-throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis of sirolimus in whole blood. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 41(7), 921–925.

Watson, J. T. (Ed.). (1997). Introduction to mass spectrometry (3rd ed.). Lippincott-Raven.

Webb, K. S. (1991). The identification of drugs by mass spectrometry. In T. A. Gough (Ed.), The analysis of drugs of abuse (pp. 175–224). Wiley.

CHAPTER (14) الفصل الرابع عشر



العناصر الشحيحة والمعادن السامة

TRACE ELEMENTS AND TOXIC METALS

العناصر الشحيحة والمعادن السامة
TRACE ELEMENTS AND TOXIC METALS

مقدمة

يُعرف علم الطيف (Spectroscopy) بأنه دراسة التفاعلات بين المادة والإشعاع الكهرومغناطيسي. وعند تطبيق هذا العلم على التحليل الكمي، يُستخدم مصطلح "قياس الطيف" (Spectrometry). وتُعنى أنواع مختلفة من علم الطيف بمناطق محددة من الطيف الكهرومغناطيسي (مثل الأشعة السينية، والأشعة فوق البنفسجية، والأشعة تحت الحمراء، إلخ)، وبخصائص المادة التي تحدث معها التفاعلات، مثل الاهتزاز الجزيئي، والتحولات الإلكترونية، وغيرها، بالإضافة إلى التفاعلات الفيزيائية المعنية، أي تشتت الإشعاع أو امتصاصه أو انبعاثه (Haswell, 1991; Lobinski and Marczenko, 1996). هذا ويُنشر مراجعة سنوية للتطورات الحديثة في دورية "Journal of Analytical Atomic Spectrometry" (Taylor et al., 2007). وبفضل التقنيات التحليلية الحديثة، أصبح من الممكن قياس العناصر الفردية بتركيزات تصل إلى أجزاء من ألف مليون ($\mu g\ L^{-1}$ أو $\mu g\ kg^{-1}$) أو أقل، وذلك باستخدام ميكرولترات أو ملليغرامات فقط من العينة. ولعدة سنوات، كان "قياس الطيف بالامتصاص الذري" (AAS) هو التقنية المفضلة؛ حيث يمكنه إعطاء نتائج دقيقة بسرعة ودون الحاجة إلى معدات باهظة الثمن. ويمكن استخدامه لقياس أكثر من 60 عنصراً، لكنه يقتصر على قياس عنصر واحد في كل مرة. لقد تغير مجال تحليل العناصر الشحيحة بشكل جذري مع تطوير تقنية "قياس الطيف الكتلي بالبلازما المقترنة حثياً" (ICP-MS) (Gray and Date, 1983). فحدود الكشف (Detection limits) ومعدل تحليل العينات في هذه التقنية مساوٍ أو أفضل مما يمكن تحقيقه باستخدام تقنية AAS، بالإضافة إلى إمكانية قياس نظائر معظم العناصر في الجدول الدوري خلال تحليل واحد. ومع ذلك، فإن التكاليف المرتبطة بشراء وتشغيل أجهزة ICP-MS، والأهم من ذلك، التداخلات (Interferences) التي كانت تظهر بوضوح في تحليل العينات البيولوجية، حالت دون التطبيق الواسع لهذه التقنية في المجالات السريرية، والسموم، والطب الشرعي حتى وقت قريب.

التطور التاريخي

كانت الاختبارات الكيميائية الأولى التي طُورت للتحليل السمومي هي تلك المستخدمة للكشف عن وجود الزرنيخ وأكاسيد أو أملاح المعادن السامة الأخرى. وكان الزرنيخ هو السم القاتل الرئيسي المستخدم بشكل شائع من العصور الوسطى وحتى منتصف خمسينيات القرن التاسع عشر (s1850). وقبل عام 1836، لم تكن تتوفر سوى اختبارات لونية غير حساسة نسبياً وضعيفة النوعية (Male, 1816). فمثلاً، إضافة محلول نترات الفضة في هيدروكسيد الأمونيوم إلى محلول متعادل من الزرنيخ الأبيض (أكسيد الزرنيخ الثلاثي، أكسيد AsIII، As_4O_6) ينتج عنه راسب أصفر مما كان يسميه كيميائيو تلك الحقبة "زرنيخيت الفضة"؛ بينما في الأوساط الحمضية، ينتج عن نفس الكاشف راسب بني محمر من "زرنيخات الفضة".

بمصطلحات الكيمياء الحديثة، كانت هذه مركبات زرنيخ في حالتي أكسدة مختلفتين، هما AsIII (زرنيخيت) و AsV (زرنيخات). وإذا تم تمرير غاز كبريتيد الهيدروجين عبر محلول الزرنيخ الأبيض، يتكون كبريتيد الزرنيخ الأصفر (As_2S_3). بالإضافة إلى ذلك، عندما تم خلط محلول قاعدي من كبريتات النحاس مع الزرنيخ، نتج عنه راسب أخضر من زرنيخيت النحاس (أخضر شيل، $CuHAsO_3$). ومع ذلك، فإن إدخال جهاز "مارش" (Marsh, 1836)، الذي يتم فيه فصل الزرنيخ

المعدني عن مصفوفة العينة بواسطة التسامي (Sublimation)، جعل هذه الاختبارات وما شابهها غير ضرورية إلى حد كبير، باستثناء استخدامها كاختبارات تأكيدية على المواد المعزولة من عينة بيولوجية.

وقد ذُكرت الأعمال الرائدة لهنري بينس جونز، الذي استخدم علم الطيف لدراسة امتصاص وتوزيع الليثيوم (1865)، في الفصل الرابع. وقد تم تطوير المقايسات اللونية النوعية تدريجياً لتعطي نتائج كمية أو شبه كمية، على الرغم من أن الحساسية كانت محدودة بتأكيد التعرض الكبير. ومع ذلك، أُجريت بعض الأعمال المهمة، على سبيل المثال في قياس رصاص الدم الناتج عن التعرض المهني لهذا العنصر (Kehoe, 1961). وقد بدأ إدخال تقنية AAS (Walsh, 1955)، في البداية باستخدام لهب الهواء-الأسيتيلين ثم باستخدام أنبوب الجرافيت المسخن كهربائياً (Massman, 1968)، حقبة جديدة تميزت بانخفاض حدود الكشف (LoDs) وزيادة في نطاق العناصر التي يمكن قياسها (Taylor, 2006a). ومع ذلك، لتنفيذ تحاليل متعددة العناصر، كان من الضروري استخدام طرق أكثر تعقيداً وأقل حساسية مثل "قياس الطيف بالانبعاث الذري بالقوس الكهربائي للتيار المباشر" (AES et al., 1981). كما توفرت تقنيات أخرى متعددة العناصر (مثل تحليل التنشيط النيوتروني NAA، وومضان الأشعة السينية XRF) لعدة سنوات، لكنها تفتقر إلى حساسية AAS، أو تتطلب أجهزة متخصصة للغاية لا يمكن الوصول إليها بسهولة. لقد تغير الوضع مرة أخرى مع استخدام خلايا التصادم والتفاعل الديناميكي (Collision and dynamic reaction cells) مع تقنية ICP-MS. وتعمل هذه التكنولوجيا على إزالة العديد من مصادر التداخل، وقد صاحبها انخفاض كبير في تكلفة الجهاز. وتشمل التطورات المهمة الأخرى استخدام تقنيات تفصل بين التشكلات الجزيئية المختلفة للعنصر (Speciation) والتحليل في الجسم الحي (in vivo)، والذي بدأ بـ NAA، ولكن يُستخدم الآن باستخدام XRF.

جمع العينات وتخزينها

بحكم التعريف، توجد العناصر الشحيحة (Trace elements) بتركيزات منخفضة في العينات البيولوجية، كما أن العديد من التحاليل التي تحتاج إلى قياس تتواجد بشكل طبيعي ليس فقط في هذه العينات، بل أيضاً في البيئة. ونظراً لأن الطرق التحليلية المستخدمة تكون في الأساس انتقائية بطبيعتها، فإن الاعتبار الأكثر أهمية في عملية جمع العينات وتخزينها هو **تجنب تلوث العينة** (Taylor, 2006b). وكقاعدة عامة، يُفضل استخدام الحاويات البلاستيكية بدلاً من الزجاجية (جدول 1). كما يساعد إجراء "تحليل العينة الفارغة" (Blank analysis) في الوقاية من عدم التعرف على التلوث القادم من أنبوب العينة. وفي حالة استخراج الجثث (Exhumations)، يجب أيضاً جمع عينات من التربة المحيطة لتحليلها. وقد تكون مضادات التخثر والمواد الحافظة مصدراً للتلوث (Frank et al., 2001). يُعد (EDTA) هو مضاد التخثر المفضل لجمع الدم الكامل، حيث لا تصبح العينات لزجة بعد بضعة أيام، على عكس الدم المعامل بالهيبارين. ومع ذلك، إذا تُرك الدم ليتجلط ثم أُرسل إلى المختبر دون فصل، فلن يكون مناسباً لقياسات الحديد والزنك بسبب تسرب هذه التحاليل من كريات الدم الحمراء. وفيما يخص حاويات العينات، تشمل المصادر المحتملة للتلوث المطاط (الموجود في بعض السدادات) والحلقات المطاطية (O-rings) داخل سدادات بعض الأنابيب. تحتوي بعض أغطية الزجاجات على بطانة داخلية قد تتكون من مكون معدني. كما تمثل أنظمة جمع الدم المفرغة (Vacuum blood collection systems) مصدراً رئيسياً آخر للتلوث؛ فالأنظمة التي تحتوي على منشطات التجلط ومواد فصل الخلايا الهلامية غالباً ما تكون غير صالحة للاستخدام. هناك أنظمة لجمع العينات يتم تسويقها خصيصاً لتحليل العناصر الشحيحة، ولكن من الحكمة فحص دفعات (batches) هذه الأنابيب للتأكد من خلوها من التلوث قبل استخدامها مع العينات السريرية. قد تكون الإبر أيضاً مصدراً للتلوث (مثلاً بالكروم)، وقد يكون من الضروري جمع الدم عبر قنية بلاستيكية (Plastic cannula) بعد التخلص من المليلترات القليلة الأولى.

تعتبر عناصر الألمنيوم والحديد والمنغنيز والزنك هي الأكثر عرضة للتلوث من مصادر خارجية، ولكن لا ينبغي افتراض أن أي عنصر آخر هو غير مهم أو محصن ضد التلوث.

تخزين العينات

من غير المرجح أن تتغير تركيزات التحاليل (Analytes) أثناء التخزين باستثناء حالة الزئبق. ومع ذلك، لتجنب تدهور المصفوفة البيولوجية، يمكن حفظ العينات عند درجة حرارة 4 درجات مئوية لفترات قصيرة، وتخزينها عند درجات حرارة تتراوح بين -20 إلى -80 درجة مئوية للحفظ طويل الأمد. في المحاليل المخففة، قد تُمتز العناصر الشحيحة على جدران الحاوية. ولمنع حدوث ذلك في البول، الذي يحتوي عادة على القليل من المواد العضوية التي تربط العناصر الشحيحة، يُنصح بتحميض العينات في أقرب وقت ممكن بعد الجمع، على سبيل المثال بإضافة حمض النيتريك المركز للحصول على تركيز نهائي قدره 1% (حجم/حجم).

أما تحليل الأنسجة غير الدم، فيُفضل إجراؤه باستخدام مواد مجمعة طازجة، رغم أنه من الممكن فحص عينات محفوظة بالفورمالين أو حتى مغمورة في الشمع.

جدول 1: متطلبات العينة لقياس المعادن/العناصر الشحيحة

العنصر	متطلبات العينة	ملاحظات
الألمنيوم	5مل دم كامل في أنبوب بلاستيكي (بدون مضاد تخثر/خرز فصل)	استخدم أنابيب بلاستيكية وليس زجاجية. لا ينبغي فصل الدم.
الأنتيمون	5مل دم كامل (EDTA) أو 20 مل بول	يُفضل البول.
الزرنيخ	5مل دم كامل (EDTA) أو 20 مل بول	لتشخيص التسمم المزمن، يجب استبعاد المأكولات البحرية من النظام الغذائي لمدة 5 أيام قبل الجمع إذا كان سيتم قياس الزرنيخ الكلي.
البزموت	5مل دم كامل(EDTA)	
البروميد	5مل دم كامل(EDTA)	يعتمد تفسير النتيجة على ما إذا كان مصدر التعرض مركب بروم عضوي أو بروميد غير عضوي.
الكادميوم	2مل دم كامل (EDTA) أو 10 مل بول	يُفضل الدم.
الكروم	2مل دم كامل (EDTA) أو 20 مل بول (زجاجة بلاستيكية صلبة)	يُنصح باستخدام قنية بلاستيكية لجمع الدم.
النحاس	2 مل دم كامل (EDTA أو متجلط) أو 1 مل بلازما/مصل	في حالة الاشتباه بمرض ويلسون، أرسل أيضاً 10 مل بول.
الفلورايد	3مل دم كامل EDTA) أو متجلط (أو 1.5 مل بلازما/مصل أو 20 مل بول	
الحديد	2مل مصل (بدون انحلال دم)	لمراقبة استخدام عوامل التخلب، أرسل 20 مل بول.
الرصاص	2مل دم كامل(EDTA)	يجب ألا يُفصل الدم ويجب أن يكون خالياً من الجلطات.
الليثيوم	5مل دم متجلط أو 2 مل مصل	لا تستخدم مضاد التخثر "ليثيوم هيبارين."
المنغنيز	1مل دم كامل (EDTA) أو 0.5 مل بلازما	يُنصح باستخدام قنية بلاستيكية لجمع الدم.
الزئبق	5مل دم كامل (EDTA) أو 20 مل بول (زجاجة بلاستيكية صلبة)	أرسل العينات فوراً لتجنب فقدان الزئبق أثناء التخزين.
النيكل	20مل بول	
السيلينيوم	2مل دم كامل (EDTA) أو 1 مل بلازما/مصل	
العنصر	متطلبات العينة	ملاحظات
الفضة	2مل دم كامل (EDTA) أو 1 مل بلازما	
السترونتيوم	2مل دم كامل (EDTA) أو 1 مل بلازما	
الثاليوم	5مل دم كامل (EDTA) أو 20 مل بول	
الزنك	1مل بلازما/مصل (بدون انحلال دم)	لا تستخدم مضاد التخثرEDTA

ملاحظة: (a) أرسل حاوية عينة غير مستخدمة من نفس الدفعة (batch) المستخدمة لجمع العينة للتحقق من خلوها من التلوث.

ومع ذلك، هناك مشاكل محتملة تتعلق بكل من التلوث والفقدان المرتبط بعمليات التثبيت والتضمير؛ لذا فإن المراقبة الدقيقة للآثار الجانبية (Artifacts) الناشئة عن المعالجة ما قبل التحليلية للعينة أمر ضروري.

تحضير العينة (Sample preparation)

تهدف عملية تحضير العينة إلى:

1. تحويل العينة إلى شكل مناسب (سائل عادة) لإدخالها إلى جهاز التحليل، مع وجود التحاليل بتركيزات تنتج استجابة قابلة للقياس.
2. تقليل أو إزالة التداخلات المحتملة.

عندما تحتوي أنظمة أخذ العينات في الأجهزة على أنابيب شعرية (Capillary tubing) دقيقة، من المهم أن تكون معدلات انتقال العينات ومحاليل المعايرة متساوية. إن التركيزات العالية للخلايا، والبروتينات، وغيرها من المواد ذات الكتلة الجزيئية العالية (M_r) في عينات مثل المصل والدم تؤدي إلى لزوجة غير موجودة في محاليل المعايرة المائية. لذلك، قد تخضع المقايسات لتداخلات المصفوفة (Matrix interferences) ما لم تتم مطابقة لزوجة العينة ومحلول المعايرة.

عندما تكون تركيزات التحليل عالية، قد يكون التخفيف بالماء كافياً. وبدلاً من ذلك، يمكن إجراء ترسيب للبروتين عن طريق إضافة، على سبيل المثال، حمض ثلاثي كلورو أسيتيك بنسبة 10% (وزن/حجم) متبوعاً بالطرد المركزي .

هناك نهج مفيد بشكل خاص يتمثل في إضافة عامل مخلبي (Chelating agent) متبوعاً بالاستخلاص بالمذيب (Solvent extraction) للمركب الناتج. يتم الاحتفاظ بالمواد المتداخلة في الطور المائي، وإذا كان حجم المذيب أقل من حجم العينة، يتم أيضاً تحقيق **تخصيب للتحليل** (Analyte enrichment). لقد تم استخدام العديد من العوامل المخلبية والمذيبات، ولكن من التركيبات الشائعة ذات الأغراض العامة استخدام "بيروليدين ثنائي ثيوكربامات الأمونيوم" (APDC) و "4-ميثيل-2-بنتانون" (المعروف بـ ميثيل أيزوبوتيل كيتون، MIBK) (Lopez-Artiguez et al., 1993).

وكما هو الحال في مرحلة جمع العينات، لا يمكن المبالغة في التأكيد على أهمية تجنب التلوث طوال إجراءات تحضير العينة. يجب اختبار نظافة المعدات، كما يجب أن تكون الكواشف (Reagents) ذات أعلى جودة متاحة. يجب تنظيف جميع المواد القابلة لإعادة الاستخدام قبل استعمالها؛ حيث تُنقع الأواني الزجاجية أولاً في حمض مائي، مثل حمض الهيدروكلوريك أو حمض النيتريك بتركيز **2–10%** (حجم/حجم)، ثم تُشطف بكميات وفيرة من المياه المنقاة. يجب استخدام مياه فائقة النقاء ذات مقاومة كهربائية تزيد عن **18 MΩ** في جميع الأوقات. كما يجب إخضاع "العينات الفارغة" (Blank samples) لكامل إجراءات التحضير، مع تحليل عينات مراقبة الجودة الداخلية (IQC) بشكل روتيني. وإلى جانب الحماية من النتائج المرتفعة الزائفة، من الضروري التحقق من عدم ضياع التحاليل نتيجة التطاير، أو الامتزاز على أسطح الحاويات، أو ترسب المعقدات غير الذوابة.

تحليل الأنسجة

يجب هضم العينات الصلبة (Digest) للحصول على محلول مائي قبل التحليل. وتُعد عملية "الهضم الحمضي" (Acid digestion) الأكثر شيوعاً؛ حيث تُستخدم على نطاق واسع طرق تعتمد على إضافة حمض النيتريك، وحمض البيركلوريك، وبيروكسيد الهيدروجين بتوليفات مختلفة، وأحياناً مع إدراج حمض الكبريتيك، وتتوفر العديد من الإجراءات الممكنة لذلك (Bazzi et al., 2005). يجب توخي الحذر الشديد عند استخدام حمض البيركلوريك نظراً لطبيعته الانفجارية المحتملة.

يمكن إجراء التسخين في دوارق مخروطية أو كؤوس، أو في أنابيب تتناسب مع كتل تسخين الألومنيوم (Aluminium heating block). عادة ما يتم رفع درجة حرارة السخان تدريجياً إلى حوالي **250 °C**، على الرغم من أن بعض التطبيقات قد تتطلب درجات حرارة أعلى. من الضروري توخي الحذر لتجنب فقدان العناصر الأكثر تطايراً؛ فمن المؤكد تقريباً أن الزئبق سيتبخر باستخدام هذا النهج. عادة ما يكتمل الهضم خلال **2–6** ساعات. يُستخدم التسخين بالميكروويف في أوعية هضم

محكمة الإغلاق على نطاق واسع (Grinberg et al., 2005)، حيث صُممت أفران خاصة لهذا الغرض تتضمن ميزات أمان لمنع التلف الناتج عن أبخرة الأحماض والضغط المفرط داخل أوعية الهضم. يمكن هضم ما يصل إلى **40** أو **50** عينة في وقت واحد، غالباً في أقل من **30** دقيقة، ولأن كل وعاء مغلق بإحكام، فلا ينبغي أن يحدث فقدان للعناصر المتطايرة.

في نهج مختلف، يمكن وضع العينة والحمض في وعاء من مادة (PTFE) (قنبلة ضغط - pressure bomb)، والتي توضع داخل غلاف من الفولاذ المقاوم للصدأ. يُسخن الوعاء في الميكروويف أو في فرن تقليدي، ويتم تحطيم العينة فعلياً بعد حوالي ساعة، مع ضرورة ترك الوحدة لتبرد قبل فتحها. ونظراً لأن "قنابل الضغط" باهظة الثمن جداً، فإن معظم المختبرات تمتلك عدداً محدوداً منها، مما قد يحد من معدل إنتاج العينات؛ ومع ذلك، لا ينبغي أن يحدث أي فقدان للعناصر المتطايرة.

تتضمن تقنية ثانية إذابة العينة في محلول قلوي مركز مشابه لتلك المستخدمة لتحضير عينات الأنسجة لـ "عد الومضات السائل" (Liquid scintillation counting). يُستخدم هيدروكسيد تترا ميثيل الأمونيوم (TMAH) على نطاق واسع، حيث تُخلط العينات ببساطة مع الكاشف وتُسخن لبضع ساعات. ومن خلال أخذ **50 mg** من الأنسجة المجففة و **2 mL** من محلول **50 g L^{-1}** من TMAH في قارورة ذات غطاء لولبي، يتم تحقيق الإذابة الكاملة عن طريق التسخين عند **90 C°** لمدة **2** ساعة مع الرج المتقطع.

وفي نهج آخر، يمكن تحقيق تحطيم العينة عن طريق تسخينها في فرن دثر (Muffle furnace)، عادةً إلى **400–450 C°**، متبوعاً بالتبريد وإذابة الرماد في حمض النيتريك بتركيز **1%** (حجم/حجم). يجب مراعاة فقدان العناصر المتطايرة، ولا يمكن استخدام هذه التقنية إذا كان الهدف هو قياس الزئبق. يمكن أيضاً استخدام هذه التقنيات لتحضير العينات الصلبة مع العينات السائلة، وذلك للتخلص من تداخلات المصفوفة (Matrix interferences) وتحقيق **تخصيب للتحليل** (Analyte enrichment).

تخصيب التحليل (Analyte enrichment)

في إطار السعي للوصول إلى حدود كشف (LoDs) أدنى، أصبح تخصيب التحليل أمراً مهماً. ورغم ذكر بعض الأمثلة سابقاً، إلا أنه تم تطوير العديد من الطرق بهدف محدد وهو تركيز التحليل؛ وتتضمن هذه الطرق عملية الاحتجاز (Trapping) من عينة كبيرة نسبياً، يليها استخلاص (Elution) في حجم أصغر. تشمل الطرق المستخدمة ما يلي: (1) الامتزاز (Adsorption) على مواد مثل الفحم أو السيليكا، (2) استخدام راتنجات التبادل الأيوني (Ion-exchange resins) سواء مع أو بدون مجموعات وظيفية لاحتجاز عناصر محددة، و(3) استبعاد الحجم الكروماتوغرافي (SEC؛ Loreti and Bettmer, 2004). يمكن أن يتم التخصيب بهذه الطريقة خارج خط التحليل (Off-line)، ولكن العديد من الطرق تدمج معالجة العينة داخل خط التحليل (On-line).

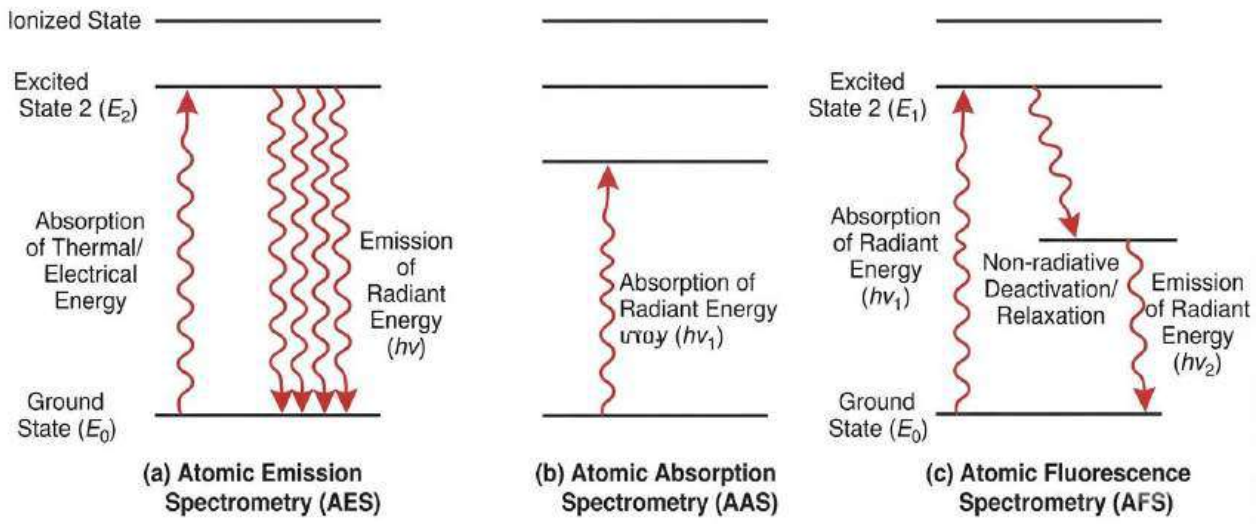
لقد أدت الخبرة المكتسبة من كروماتوغرافيا التبادل الأيوني و(SEC) إلى تطور مهم آخر في تحضير العينات، وهو **تحديد الأنواع الكيميائية (Speciation)**. ففي بعض الظروف، قد يكون قياس التركيز الكلي لعنصر ما مضللاً، لذا من الضروري قياس أنواع معينة، على سبيل المثال CrIII و CrVI، أو AsIII، وحمض أحادي ميثيل الزرنيخ (monomethylarsonic acid)، وحمض ثنائي ميثيل الزرنيخ (Mandal et al., 2004) (dimethylarsinic acid). وتُستخدم الطرق المخصصة لتحديد الأنواع الكيميائية، والتي تتضمن الفصل الكروماتوغرافي أو الاستخلاص التفاضلي بالمذيبات، بشكل روتيني (Taylor et al., 2007).

قياس الطيف الذري (Atomic spectrometry)

تشمل تقنيات قياس الطيف الذري التحليلي الكمي كل من: AAS (الامتصاص الذري)، وAES (الانبعاث الذري)، وAFS (الوميض الذري)، وMS غير العضوي، وXRF (ومضان الأشعة السينية). تستغل تقنيات AAS وAES وAFS التفاعلات بين الأشعة فوق البنفسجية/المرئية وإلكترونات الغلاف الخارجي للذرات الحرة، الغازية، وغير المشحونة. أما في تقنية XRF، فتصطدم جسيمات عالية الطاقة بإلكترونات الغلاف الداخلي للذرات لتبدأ تحولات تنتهي بانبعاث فوتونات الأشعة السينية. وبالنسبة لـ MS غير العضوي، يعمل مجال مغناطيسي على فصل ذرات التحليل المتأينة وفقاً لنسبة الكتلة إلى الشحنة (m/z).

المبادئ العامة لـ AES وAAS وAFS

قد توجد الذرات غير المشحونة في الحالة الأكثر استقراراً أو "الحالة الأرضية" (E_0)، والتي تمتلك أدنى طاقة، أو في أي من سلسلة حالات الإثارة (Excited states) اعتماداً على عدد الإلكترونات التي انتقلت إلى مستويات طاقة أعلى، على الرغم من أن المعتاد هو النظر فقط في الانتقال الأول (E_r). يمكن تصور ذلك في مخطط مستويات الطاقة (الشكل 1). وتُعد مستويات الطاقة، والفروق بينها (ΔE)، فريدة لكل عنصر.



الشكل 1: *مخططات مستويات الطاقة لتوضيح الانتقالات المرتبطة بـ (أ) AES، (ب) AAS، و(ج) AFS. تشير الأسهم الرأسية إلى امتصاص أو انبعاث الطاقة الإشعاعية (الضوء).*

إن فرق الطاقة (ΔE) لحركات إلكترونات الغلاف الخارجي في معظم العناصر يتوافق مع الطاقة المكافئة للإشعاع فوق البنفسجي/المرئي. وتتميز طاقة الفوتون بالمعادلة التالية:

$$E = h\nu \quad (1)$$

حيث h هو ثابت بلانك، و ν هو تردد الموجة المقابل لذلك الفوتون. علاوة على ذلك، يرتبط التردد بالطول الموجي بالعلاقة:

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (2)$$

حيث c هي سرعة الضوء و λ هو الطول الموجي. وبالتالي:

$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad (3)$$

وبناءً على ذلك، فإن كل انتقال محدد للطاقة (ΔE) يرتبط بطول موجي فريد.

في ظل ظروف مناسبة، يمكن إثارة إلكترونات الغلاف الخارجي لذرات مبخرة في الحالة الأرضية داخل نظام التحليل عن طريق التسخين. وبينما تعود هذه الذرات إلى الحالة الأرضية الأكثر استقراراً، تُفقد الطاقة؛ حيث ينبعث جزء من هذه الطاقة على شكل ضوء يمكن قياسه. وتتناسب شدة الضوء المنبعث مع عدد الذرات الموجودة، وتُسمى هذه العملية "قياس الطيف بالانبعاث الذري" (AES)، كما هو موضح في الشكل 1(أ).

وعندما يدخل ضوء ذو طول موجي محدد إلى نظام التحليل، تُثار إلكترونات الغلاف الخارجي للذرات المبخرة الموجودة في الحالة الأرضية داخل مسار الضوء مع امتصاص الطاقة. ونتيجة لذلك، تتضاءل كمية الضوء المنقولة عبر النظام إلى الكاشف. يتناسب فقدان الضوء مع عدد الذرات الموجودة، وتُعرف هذه الطريقة بـ "قياس الطيف بالامتصاص الذري" (AAS)، الشكل 1(ب).

أما في حالة "قياس الطيف بالوميض الذري" (AFS)، فإن جزءاً من الطاقة الإشعاعية التي تمتصها الذرات في الحالة الأرضية يمكن أن ينبعث كضوء عندما تعود الذرة إلى الحالة الأرضية. يُعرف هذا الانبعاث بالوميض الرنيني (Resonance fluorescence)، وهو يتناسب أيضاً مع عدد الذرات الموجودة في مسار الضوء، كما في الشكل 1(ج). ويستنتج من المعادلات (1) إلى (3) أن الأطوال الموجية للضوء الممتص والمنبعث هي نفسها، وتعتبر فريدة لكل عنصر. وهذا يمنح تقنيات AAS وAES وAFS خصوصية عالية، مما يسمح بقياس عنصر واحد بدقة حتى في وجود فائض كبير من عنصر آخر مشابه كيميائياً.

قياس الطيف بالامتصاص الذري (Atomic absorption spectrometry)

يمكن استخدام تقنية AAS لقياس أكثر من 60 عنصراً باستخدام أجهزة غير باهظة الثمن نسبياً وسهلة التشغيل. وتتمتع هذه الطريقة بحساسية كافية لقياس العديد من هذه العناصر بالتركيزات الموجودة في العينات السريرية (Haswell, 1991). يتكون مقياس الطيف من مصدر ضوئي، ومرذاذ (Atomizer)، وموحد لون (Monochromator)، وكاشف، ووحدة عرض/قراءة. الميزة الأساسية لمصدر ضوئي جيد في AAS هي توفير خرج أحادي اللون عالي الكثافة، وهو ما يتحقق باستخدام مصابيح الكاثود المجوف (Hollow cathode lamps) أو مصابيح التفريغ عديمة الأقطاب (Electrodeless discharge lamps). أما موحد اللون والكاشف وشاشة العرض فهي مشابهة لتلك الموجودة في أجهزة قياس الطيف الأخرى.

المرذاذ (Atomizer) هو أي جهاز يولد ذرات في الحالة الأرضية كبخار داخل المسار الضوئي للجهاز. في حالة كالسيوم المصل، على سبيل المثال، يوجد العنصر مرتبطاً بالبروتين، أو معقداً مع الفوسفات، أو كأيون حر (Ca^{2+}). تتطلب عملية التذرية (1) :(Atomization) إزالة المذيب (التجفيف)، (2) الفصل عن المكونات الأنيونية أو غيرها من مكونات المصفوفة للحصول على Ca^{2+}، و(3) الاختزال وفق المعادلة:

$$Ca^{2+} + 2e^- \rightarrow Ca^0$$

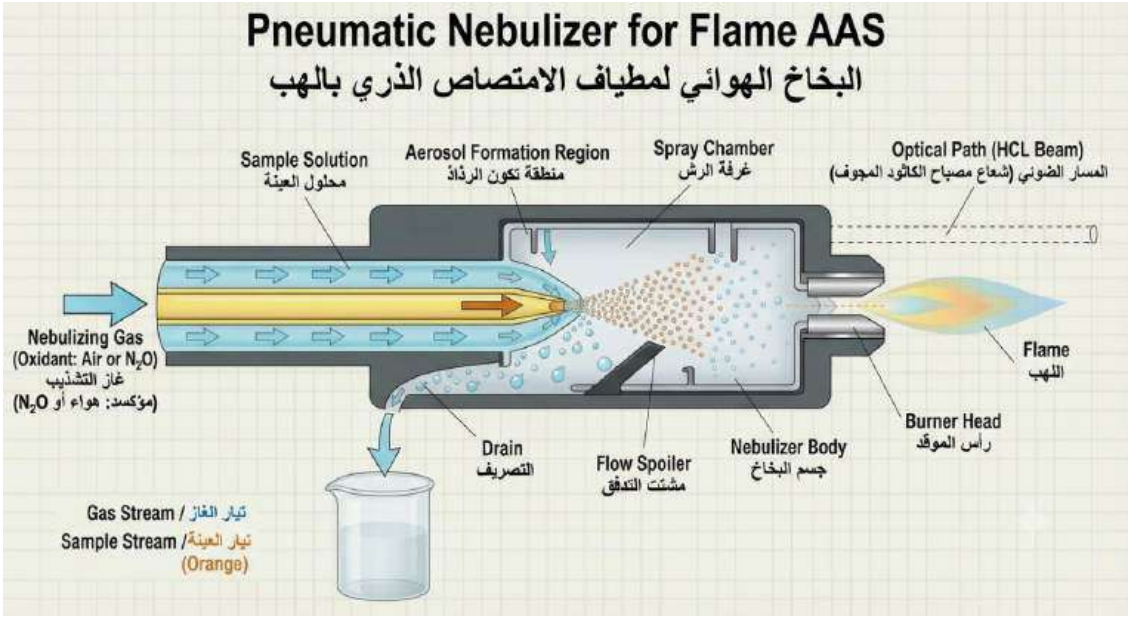
يتم توفير الطاقة اللازمة كحرارة إما من لهب أو من فرن مسخن كهربائياً.

التذرية باللهب (Flame atomization)

يتضمن الترتيب النموذجي مرذاذاً هوائياً (Pneumatic nebulizer)، وغرفة خلط، ولهب هواء-أسيتيلين طبقي بطول مسار يبلغ 10 سم (الشكل 2). يحترق الأسيتيلين في الهواء عند درجة حرارة 2000 درجة مئوية تقريباً. ويُستخدم لهب أكسيد

النيتروز-أسيتيلين، الذي يصل إلى حوالي 3000 درجة مئوية، لعناصر مثل الألمنيوم والكروم التي تكون أكاسيد حرارية (Refractory oxides) ولا يمكن تذريتها بفعالية في لهب الهواء-أسيتيلين.

يؤدي تدفق الهواء المساعد عالي السرعة إلى سحب محلول العينة باستمرار عبر الأنبوب الشعري بسبب تأثير "فينتوري" (Venturi effect). وعادة ما يكون معدل أخذ العينة عبر المرذاذ حوالي 5 مل/دقيقة، ويعد الشفط لعدة ثوانٍ ضرورياً لتحقيق إشارة مستقرة. تخرج العينة من المرذاذ كرذاذ بقطرات ذات أحجام متفاوتة، ثم تُخلط مع غازات الاحتراق وتُنقل إلى اللهب للتذرية. ومع ذلك، فإن القطرات التي يقل قطرها عن 10 ميكرومتر فقط هي التي تدخل اللهب فعلياً، بينما تسقط القطرات الأكبر على جوانب الغرفة وتُصرف كنفايات. وبذلك، لا يدخل أكثر من 15% من العينة إلى اللهب. ونتيجة لذلك، ومع المرذاذ الهوائي، تخضع العينة الأصلية للتخفيف بغازات اللهب، ويُفقد جزء منها في غرفة الخلط، كما يحدث تمدد حراري كبير (أي تخفيف إضافي) داخل اللهب. وبالإضافة إلى تشتت العينة عبر اللهب، هناك فقدان للذرات بسبب تكوين أكاسيد أو مركبات أخرى عند حواف اللهب.



شكل 2: *المرذاذ الهوائي لتقنية الامتصاص الذري باللهب (FAAS).*

تُعرض مزايا وعيوب نظام التذرية باللهب باستخدام المرذاذ الهوائي في "صندوق 1". ونظراً لبساطة هذا النهج وسرعته وخلوه من التداخلات، يجب استخدامه كلما أمكن ذلك. وتبلغ أدنى تركيزات للتحاليل التي يمكن قياسها بهذه الطريقة حوالي 1 $mg\ L^{-1}$.

يتم الحصول على حساسية محسنة باستخدام أجهزة تتغلب على قيود المرذاذات الهوائية، وتشمل هذه الأجهزة تلك التي تقوم بـ: (1) احتجاز الذرات لإعطاء كثافة أكبر داخل

صندوق 1: مزايا وعيوب التذرية الهوائية (المرذاذ الهوائي)

المزايا	العيوب
سريعة	حوالي 15% فقط من العينة تدخل اللهب

المسار الضوئي، (2) تجاوز المرذاذ بحيث يتم تذرية العينة بالكامل، و(3) إدخال العينة كنبضة واحدة سريعة بدلاً من التدفق المستمر. يستخدم البعض مزيجاً من هذه الميزات.

قابلة للتكرار (نتائج دقيقة)	نطاق واسع لأحجام القطرات
تداخلات قليلة	كثافة ذرية منخفضة للعينة في اللهب
إشارة في حالة مستقرة (Steady-state)	ظروف الموقد تفرض قيوداً على المرذاذ

وتعد الأجهزة المستخدمة في اللهب، مثل "أنبوب الكوارتز المشقوق" (slotted quartz tube) و"كأس ديلفز" (Delves' cup)، أكثر فعالية مع العناصر الأكثر تطايراً مثل الزنك والكادميوم والرصاص. كما تظهر هذه المناهج الثلاثة لتحسين الحساسية في أجهزة تذرية أخرى مستخدمة في تقنيات AAS وAES وAFS وICP-MS.

التذرية الكهروحرارية (Electrothermal atomization)

تستخدم معظم الأنظمة أنبوباً غرافيتياً مسخناً كهربائياً لتبخير التحليل، ولذا غالباً ما تسمى هذه التقنية "التذرية بفرن الغرافيت" (Graphite furnace atomization)، على الرغم من استخدام مواد مختلفة أحياناً. يتم توصيل التيار الكهربائي بأطراف الأنبوب وتطبيق جهد كهربائي، حيث تؤدي المقاومة لتدفق التيار إلى زيادة درجة حرارة الفرن. يُستخدم برنامج لدرجات الحرارة بحيث يتم تجفيف المحلول الموضوع داخل الفرن بعناية، وتُحطم المادة العضوية أثناء مرحلة "الرماد" (Ashing)، وتتفكك أيونات التحليل عن الأنيونات. ومع الزيادة السريعة في درجة الحرارة، تتبخر أيونات التحليل وتُختزل إلى ذرات في الحالة الأرضية قبل الكشف الطيفي. وتضمن زيادة إضافية في درجة الحرارة أن يكون أنبوب الغرافيت نظيفاً للتحليل التالي.

يمكن أن تصل درجات حرارة التذرية التي تحققها هذه التقنية إلى 3000 درجة مئوية، مما يسمح بقياس العناصر الحرارية (Refractory elements) مثل الألمنيوم والكروم. عادة ما يلزم فقط 10–50 µL من العينة للحقن في الفرن، ولأن العينة بأكملها تُذَرى ضمن حجم صغير، يتم إنتاج كثافة ذرية عالية. لذا، تعد هذه التقنية حساسة جداً ويمكن قياس تركيزات للتحاليل تصل إلى بضعة $\mu g\ L^{-1}$. ومع ذلك، فإن تقنية AAS بالذرية الكهروحرارية (ETAAS) تخضع لتداخلات محتملة أكبر من تقنية AAS باللهب (FAAS)، لذا فإن إجراءات إزالة أو تعويض مثل هذه التداخلات ضرورية. تُستخدم أشكال مختلفة من الغرافيت (الغرافيت الكهربائي، الغرافيت المطلي بالترسيب الحراري pyrolytically، والغرافيت ذو الترسيب الحراري الكامل)، كما يتم تحسين تصميم الفرن وطريقة تسخينه لتعزيز التذرية وتقليل التداخلات.

مصادر الخطأ (Sources of error)

الأجهزة التي تعتمد على تدفق المحاليل، مثل المرذاذات (Nebulizers) أو أنظمة حقن التدفق، ستعطي نتائج غير دقيقة إذا كانت العينات ومعايرات الجهاز (Calibrators) ذات لزوجة مختلفة، لأن ذلك يسبب اختلافاً في معدلات التدفق إلى المحلل. وفي حال حدوث ذلك، يمكن استخدام "المعايرة الداخلية" (Internal standardization)، أو "إضافة المعيار" (Standard addition)، أو إضافة كواشف لموازنة معدلات تدفق التحليل والمحلول المعاير لتحسين الدقة. مهما كانت طريقة تحضير العينة المستخدمة، من المهم قياس معدلات الشفط (Aspiration rates) للعينات ومحاليل المعايرة عبر غرفة الخلط الخاصة بالمرذاذ للتأكد من أنها متكافئة.

يمكن تقليل لزوجة العينة عن طريق التخفيف بالماء، لكن هذا النهج قد يؤدي إلى قراءات امتصاص منخفضة جداً. تم

الصندوق 2: إجراءات موازنة لزوجة العينة والمعاير في قياس نحاس وزنك المصل بـ FAAS

- تحضير محاليل المعايرة في غليسيرول بنسبة 2% (حجم/حجم).

توضيح استراتيجيات مختلفة للتغلب على هذه المشكلة في قياس نحاس وزنك المصل في **الصندوق 2**. تجدر الإشارة إلى أنه عندما تتضمن الطريقة عدة خطوات، فإن احتمالية حدوث التلوث، خاصة بالزنك، تزداد.

- إضافة جزء واحد من حمض ثلاثي كلورو أسيتيك (TCA) بنسبة 10% (وزن/حجم) إلى جزء واحد من المصل أو محلول المعايرة. يُخلط جيداً، ثم يُطرد مركزياً ويُؤخذ السائل الطافي (Supernatant).
- تخفيف العينات والمعايرات بـ 5% (حجم/حجم) من "البوتانول" المائي.

تخفيف الخليط بمقدار 5 إلى 10 أضعاف في مياه منقاة.

التفاعلات الكيميائية قد تؤثر على معدل التذرية (Atomization). فخلال FAAS، لا ينفصل الكالسيوم المرتبط بالفوسفات في المصل تماماً عند درجة حرارة 2000 درجة مئوية، مما يعطي نتيجة أقل من تركيز مكافئ في محلول معايرة مائي. إن إضافة "عامل إطلاق" (Releasing agent) مثل اللانثانوم (La^{3+})، الذي يرتبط بالفوسفات بشكل تفضيلي، يتجنب هذا التداخل.

قد تحدث مشاكل أيضاً داخل فرن الغرافيت؛ حيث يمكن لمكونات مصفوفة العينة أن تجعل التحليل متطايراً ويُفقد أثناء مرحلة "الرماد" (Ashing)؛ فعلى سبيل المثال، يمكن أن يُفقد الرصاص كـ كلوريد الرصاص ($PbCl_2$). ومع ذلك، فإن أصعب المشاكل هي تلك التي تتطور في الطور الغازي أثناء تسخين العينات. تتبخر ذرات الحالة الأرضية في بيئة حرارية متغيرة بسرعة حيث تكون درجة حرارة الطور الغازي أقل من درجة حرارة جدار الأنبوب، وتكون أطراف الأنبوب عند درجة حرارة أقل من المركز. ونتيجة لذلك، قد تتكثف الذرات المتبخرة على الأجزاء الأكثر برودة من الأنبوب ثم تتبخر مجدداً مع ارتفاع درجة حرارة الطور الغازي إلى درجة حرارة ظهور التحليل، مما يعطي "قمماً مزدوجة" (Double peaks). يحدث هذا لأن الأنواع الجزيئية المتكونة تعطي امتصاصاً غير ذري. يتم توفير التعويض عن الامتصاص غير الذري باستخدام **معدلات كيميائية** (Chemical modifiers) لتثبيت الذرات و/أو لتعزيز تدمير المصفوفة في مرحلة أبكر من التسخين (جدول 2)، واستخدام أجهزة لتثبيت ظروف التذرية المتساوية الحرارة، وتقنيات تصحيح الخلفية (BC) (جدول 3).

تستغل طريقة نموذجية لقياس رصاص الدم (**الصندوق 3**) كل هذه الميزات. حيث تُحضر محاليل معايرة مطابقة للمصفوفة في عينة دم ذات تركيز منخفض من الرصاص. يُخفف الدم بمقدار 15 ضعفاً بمحلول "فوسفات/تريتون" ويُدخل إلى فرن أنبوب الغرافيت في جهاز AAS. تُبرمج درجة حرارة الجهاز لتجفيف ورماد وتذرية العينات بمعدلات محكومة. ويتم تمرير الأكسجين إلى الفرن خلال مرحلة الرماد لتسهيل تدمير المادة العضوية. يُعد تصحيح الخلفية (Background correction) أمراً ضرورياً للتعويض عن الامتصاص غير الذري.

الصندوق 3: قياس الرصاص في الدم باستخدام تقنية ETAAS
يتم إضافة الدم الكامل (30 µL) إلى خليط مائي [0.05% (حجم/حجم) من "تريتون 0.5% + "X-100 (وزن/حجم) من هيدروجين أورثوفوسفات ثنائي الأمونيوم] (420 µL). يُخلط جيداً ويُحقن في الفرن.
برنامج التسخين (الجهاز المستخدم: Thermo 939):

المرحلة	درجة الحرارة (°C)	زمن التثبيت (s)	معدل الارتفاع ($°Cs^{-1}$)	الغاز	إعداد الغاز	ملاحظات
1	80	35	2	Ar	2	تجفيف
2	130	100	2	Ar	2	تجفيف
3	500	15	10	O_2	3	أكسدة بالرماد(Ashing)
4	600	2	0	Ar	3	إزالة الأكسجين من الفرن
5	1400	2	max	Ar	0	"التحكم في الحرارة" و "القراءة"
6	2800	3	max	Ar	0	تبريد

ملاحظات تقنية:

- **معدل الارتفاع (Ramp):** يشير إلى السرعة التي تزيد بها درجة الحرارة بين مرحلة وأخرى، وهو أمر حيوي لمنع حدوث غليان مفاجئ أو تطاير مبكر للعينة.
- **إعداد الغاز:** يتم استخدام الأرجون (Ar) كغاز خامل لمنع الأكسدة غير المرغوب فيها، بينما يُستخدم الأكسجين (O_2) في مرحلة الرماد (المرحلة 3) للمساعدة في التخلص من المصفوفة العضوية (الدم).
- **التبريد (Cool):** ضروري لضمان عودة الفرن إلى درجة الحرارة الابتدائية لبدء دورة تحليل جديدة.

جدول 2: المعدلات الكيميائية المستخدمة في تقنية ETAAS

المعدل (Modifier)	الوظيفة
النيكل؛ فوسفات الأمونيوم؛ البالاديوم؛ الروديوم	تكوين معقد حراري الاستقرار (Thermostable complex)مع أيونات التحليل للسماح باستخدام درجة حرارة "رماد (Ashing) "أعلى، وبالتالي إزالة الأنواع المتداخلة.
الأكسجين الغازي	المساعدة في عملية "الرماد" للمصفوفة العضوية. ووساطة تشكيل الذرات عبر تنشيط سطح الغرافيت.
حمض النيتريك؛ نترات الأمونيوم	تعزيز تطاير الهاليدات عند درجة حرارة منخفضة لمنع التداخلات في الطور الغازي الناتجة عن كلوريد التحليل.
نترات المغنيسيوم	تأخير عملية التذرية (Atomization)بحيث يمكن تثبيت ظروف متساوية الحرارة (Isothermal conditions)داخل الفرن.

جدول 3: الطرق المتبعة للقضاء على الامتصاص غير الذري في تقنية ETAAS

التقنية	الأساس المنطقي	أمثلة
المعدلات الكيميائية	تعزيز تدمير مصفوفة العينة، وتأخير تذرية التحليل.	الأكسجين، نترات المغنيسيوم، هيدروجين أورثوفوسفات ثنائي الأمونيوم.
التذرية متساوية الحرارة	تقليل تداخلات الطور الغازي عن طريق تأخير التذرية حتى يصل الفرن إلى درجة حرارة ثابتة.	منصة لوفوف (L'Vov platform)، مسبار الغرافيت، أفران حديثة.
تصحيح الخلفية (BC)	قياس الامتصاص الكلي وغير الذري بشكل منفصل؛ والفرق يمثل الامتصاص الذري.	تصحيح الدوتيريوم (Deuterium BC)، تأثير زيمان (Zeeman-effect BC)، تصحيح سميث-هيجفت (Smith-Heijfte BC).

قياس الطيف بالانبعاث الذري (Atomic emission spectrometry - AES)

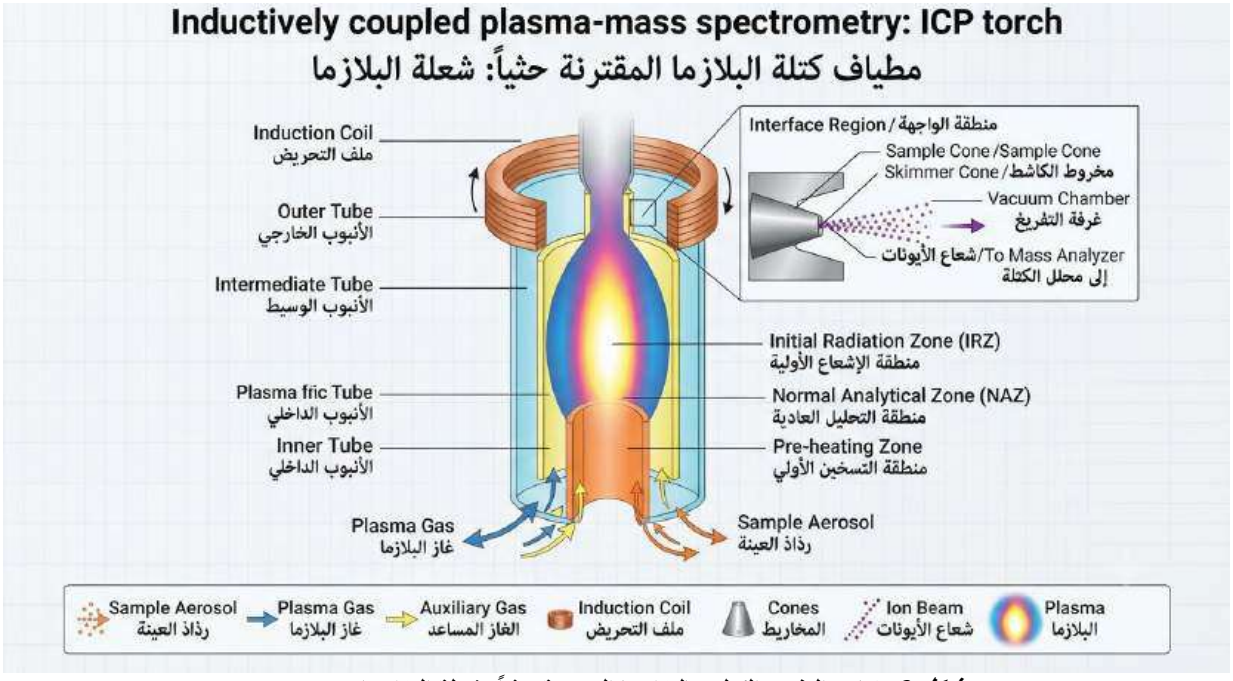
يُعد قياس الطيف بالانبعاث الذري باللهب (مقياس ضوئي لهبي) مناسباً للمعادن القلوية عند التركيزات العالية، ولكن تقنية AES تكون أكثر فائدة مع مصادر الطاقة ذات درجات الحرارة العالية عندما يمكن إجراء تحليل متعدد العناصر. يمكن أن يكون مصدر الحرارة للتذرية والإثارة إلى مستوى طاقة أعلى عبارة عن لهب. وتشمل البدائل التاريخية الأقواس والشرارات الكهربائية، لكن الأجهزة الحديثة تستخدم "البلازما" (الأرجون أو غاز آخر في حالة متأينة). يتم بدء البلازما عن طريق تحفيزها بشرارة ذات جهد عالٍ لتأين الذرات وفق المعادلة:

$$Ar + e^- \rightarrow Ar^+ + 2e^-$$

ويتم الحفاظ عليها بطاقة من ملف تحريضي (Induction coil) متصل بمولد تردد راديوي. ويُعرف هذا بـ "البلازما المقترنة حثياً" (Inductively Coupled Plasma - ICP).

توجد البلازما عند درجات حرارة تصل إلى 10,000 درجة مئوية، وتأخذ في الجهاز مظهر الشعلة (الشكل 3). يمكن إدخال العينات عبر مرذاذ، أو كما هو الحال في تقنية AAS، عن طريق توليد الهيدريد أو توليد البخار البارد ، أو عن طريق التبخير الكهروحراري من مرذاذ غرافيتي، أو عن طريق الاستئصال بالليزر (Laser ablation) للعينات الصلبة. تقوم الأنظمة البصرية بتوجيه الضوء المنبعث إما عبر "موحد لون" (Monochromator) إلى كاشف مفرد، أو إلى مجموعة من موحدات اللون والكواشف الموضوعة حول البلازما. في الترتيب الأول، يمكن أخذ سلسلة متتابعة من القراءات مع تحريك موحد اللون لإعطاء كل من الأطوال الموجية المطلوبة بالتناوب. أما في الترتيب الثاني، فيمكن أخذ قراءات متزامنة حيث يقوم كل موحد لون بنقل الضوء بأطوال موجية مختلفة مطلوبة. يعتبر الجهاز ذو القراءات المتتابعة أقل تكلفة من جهاز القراءات المتزامنة، ولكنه يتطلب كمية أكبر من العينة لأخذ سلسلة من القراءات. وبالنسبة لمعظم العناصر، تكون الحساسية التحليلية لتقنية (ICP-AES) مشابهة لتلك التي يتم الحصول عليها باستخدام (FAAS).

عند درجات حرارة التشغيل العالية للبلازما (ICP)، تحدث العديد من انتقالات الطاقة، مما يؤدي إلى احتمالية حدوث **تداخلات طيفية** (Spectral interferences) عندما يحدث انبعاث الضوء من عناصر مختلفة عند أطوال موجية متقاربة جداً بحيث لا يمكن فصلها بواسطة موحد اللون. معظم هذه التداخلات الطيفية معروفة، لذا عند الاشتباه في وجود تداخل، يمكن استخدام "خط رنين" (Resonance line) بديل للقياس.



شكل 3: *قياس الطيف الكتلي بالبلازما المقترنة حثياً: شعلة البلازما (ICP).*

قياس الطيف بالوميض الذري (Atomic fluorescence spectrometry - AFS)

تتوفر أجهزة تجارية قليلة لتقنية AFS، وتقتصر هذه الأجهزة على قياس العناصر المكونة للهيدريد والزئبق . تتشابه مكونات الجهاز مع تلك المستخدمة في تقنية AAS. يتطلب الوميض الذري الفعال مصادر ضوئية مكثفة ومستقرة، وهي صعبة التصنيع بشكل موثوق. وقد تحقق أكبر نجاح مع مصابيح التفريغ عديمة الأقطاب. يتم توجيه المسار البصري للضوء

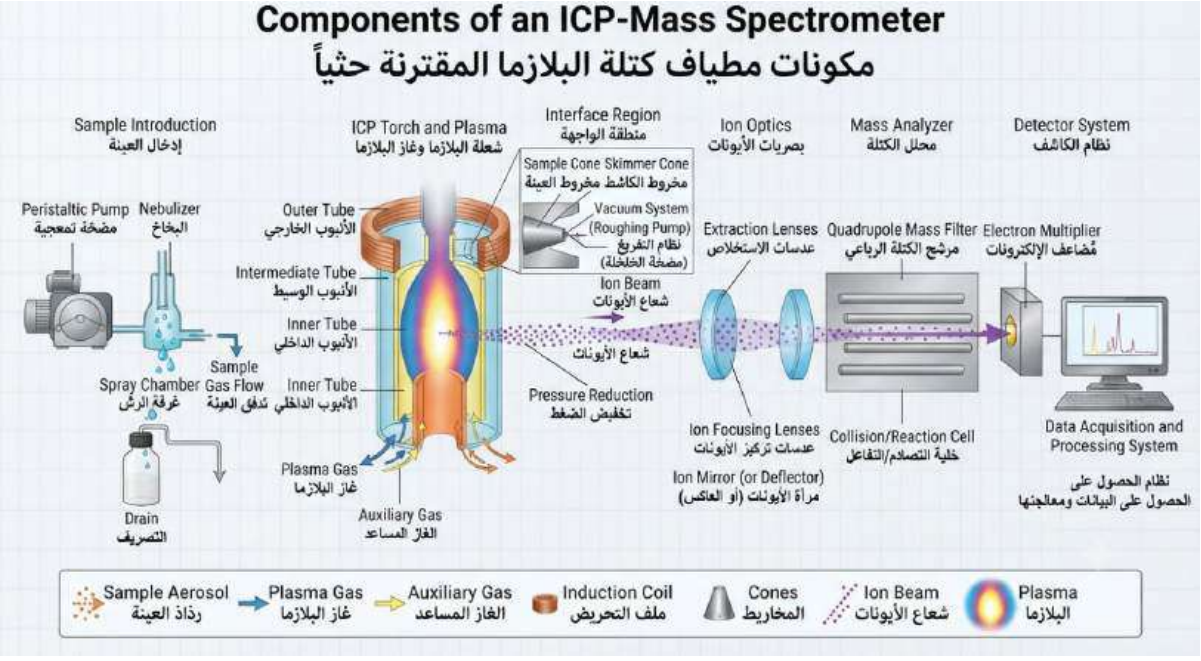
المنبعث بزاوية 90 درجة بالنسبة للضوء الساقط، بحيث يصل الضوء المنبعث (الفلوري) فقط إلى الكاشف. يمكن تحقيق حدود كشف منخفضة جداً لعناصر أشباه الفلزات (Metalloids) في المجموعات من 4 إلى 6 في الجدول الدوري.

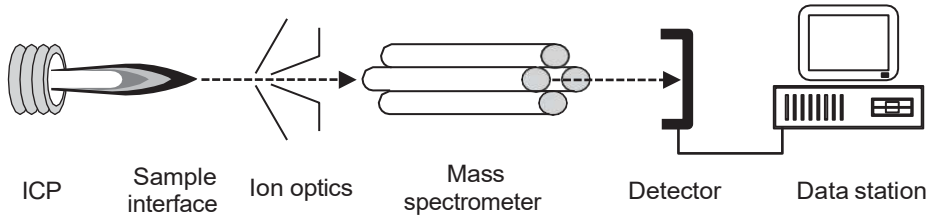
قياس الطيف الكتلي بالبلازما المقترنة حثياً (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)

عند رفع درجة حرارة العينات إلى درجات حرارة عالية، يتم تدمير أي مكون عضوي، وتتأين بعض أو كل العناصر غير العضوية. عندما تُوجه هذه الأيونات إلى مقياس الطيف الكتلي (MS)، يمكن فصلها بواسطة مجال مغناطيسي يتم إنشاؤه بواسطة "رباعي الأقطاب" (Quadrupole) أو أي مرشح كتلي آخر. يتم الكشف عن الأيونات المفصولة وفقاً لنسبة الكتلة إلى الشحنة (m/z) وعدُّها باستخدام مضاعف إلكتروني (Electron multiplier). تُوصف هذه العملية بشكل عام بـ "قياس الطيف الذري أو غير العضوي" (Hill, 1999; Nelms, 2005; Bacon et al., 2006).

تم استخدام مصادر أيونية متنوعة، ولكن بالنسبة للتحليل السريري، تستخدم معظم الأبحاث الحديثة تقنية ICP-MS. يمكن قياس العديد من العناصر في وقت واحد، وتكون حدود الكشف في نطاق بضعة ميكروغرامات لكل لتر (μgL^{-1}) أو أقل. كما أصبح من الممكن الآن قياس عناصر كان من المستحيل تقدير كميتها في السابق بشكل موثوق. وتعد الحساسية جيدة بشكل خاص للعناصر الثقيلة، بما في ذلك عناصر سلسلة الأكتينيدات (Actinide series) مثل اليورانيوم، والتي كان يتم تحديدها تقليدياً بواسطة "قياس طيف ألفا" (α-spectrometry) أو تقنيات ذات صلة، وغالباً ما تكون تقنية ICP-MS هي الطريقة المفضلة لقياس هذه العناصر. الميزة الرئيسية الأخرى لـ MS هي القدرة على قياس نظائر نفس العنصر (Al Saleh et al., 1993). لقد أصبحت هذه التقنية الآن راسخة لتحليل العينات البيولوجية (Heitland and Köster, 2004, 2006).

تتضمن الوحدات المطلوبة لـ MS غير العضوي: إدخال العينة، وتوليد الأيونات، وتركيز الأيونات (Ion focusing)، وفصل الأيونات، والكشف عن الأيونات، وجمع البيانات وعرضها (الشكل 4).





شكل 4: مكونات مقياس الطيف الكتلي بالبلازما المقترنة حثياً (ICP-MS).

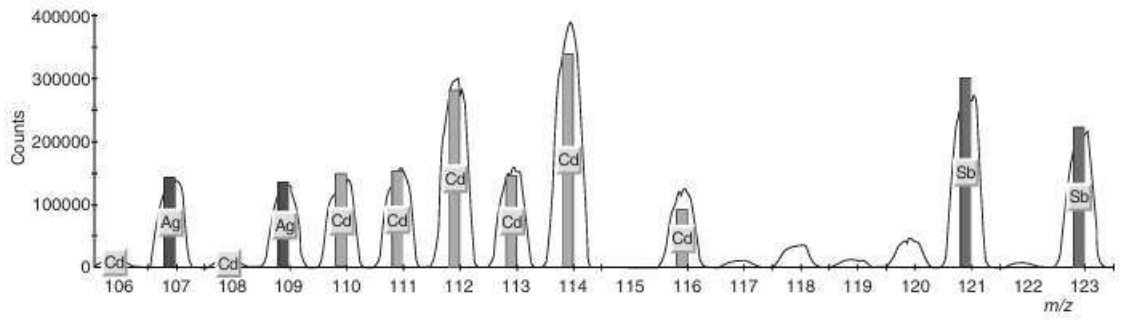
- ***البلازما المقترنة حثياً (ICP):*** *مصدر لتوليد الأيونات.*
- ***واجهة العينة (Sample interface):*** *لنقل الأيونات من منطقة الضغط الجوي (البلازما) إلى منطقة التفريغ العالي.*
- ***بصريات الأيونات (Ion optics):*** *لتركيز وتوجيه حزمة الأيونات.*
- ***مقياس الطيف الكتلي (Mass spectrometer):*** *لفصل الأيونات بناءً على نسبة الكتلة إلى الشحنة (m/z).*
- ***الكاشف (Detector):*** *لعد الأيونات التي تمر عبر المرشح الكتلي.*
- ***محطة البيانات (Data station):*** *لمعالجة النتائج وعرضها.*

مصادر الأيونات (Ion sources)

كما ذُكر أعلاه، هناك عدد من أجهزة توليد الأيونات، ولكن الأكثر استخداماً على نطاق واسع هو "البلازما المقترنة حثياً" (ICP). تُدخل العينات عادةً إلى البلازما عبر مرذاذ (Nebulizer) أو عن طريق التبخير الكيميائي . كما يمكن أيضاً استخدام التبخير الكهروحراري (Electrothermal vaporization) والتبخير عن طريق "الاستئصال بالليزر" (Laser ablation) للعينات الصلبة.

محللات الكتلة (Mass analyzers)

يتم ربط شعلة البلازما (ICP) بمحلل الكتلة عبر مخروطين معدنيين (مخروط الكاشط skimmer ومخروط العينة sampler) يتم من خلالهما استخلاص الأيونات إلى وحدة تركيز الأيونات. هنا، يقوم نظام من العدسات الأيونية بتوجيه الأيونات إلى المحلل. تتوفر تجارياً عدة تكوينات للمحللات؛ فالمحللات التي تحتوي على "نظام رباعي الأقطاب" (Quadrupole system) لها دقة محدودة تسمح بفصل الأنواع الكيميائية بناءً على نسبة الكتلة إلى الشحنة (m/z) (الشكل 5). ومع ذلك، لاستغلال الإمكانات الكاملة لهذه التقنية، يلزم وجود "محلل كتلة ذو مجال قطاعي" (Sector field mass analyzer) عالي الدقة. يمكن لهذه الأجهزة تحقيق دقة وحساسية أعلى بكثير من تقنية (Quadrupole ICP-MS). كما يُعد "مقياس الطيف الكتلي زمن الطيران" (ToF-MS) مفيداً بشكل خاص لتحليل الإشارات السريعة والعابرة، مثل تلك الناتجة عن التبخير الكهروحراري.



شكل 5: *مثال على طيف كتلي بتقنية ICP-MS.*

التداخلات (Interferences)

تخضع تقنية (ICP-MS) لتداخلات طيفية ناتجة عن وجود نظائر لعناصر مختلفة، أو أيونات متكونة من مكونات المصفوفة وغاز البلازما. ومن الأمثلة المهمة للتحاليل السريرية: $^{40}Ar^{+}$على ^{40}Ca، و $^{31}P^{16}O_2^{+}$على ^{63}Cu، و $^{40}Ar^{35}Cl$على ^{75}As، و $^{40}Ar_2^{+}$على ^{80}Se. لا تخضع تقنية (Sector field ICP-MS) لمعظم هذه التداخلات، على الرغم من احتمال حدوث فقدان في الحساسية عند الدقة العالية، مما قد يؤدي إلى مشاكل في بعض التطبيقات مثل قياس سيلينيوم الدم (Klaue and Blum, 1999).

يُعد استخدام **خلايا التصادم** (Collision cells) تطوراً جديداً نسبياً للاستخدام في أجهزة قياس الطيف الكتلي رباعي الأقطاب. فالتفاعلات بين الأيونات متعددة الذرات وغاز التصادم تسبب تفكك الأيونات الأولى، مما يقلل بشكل كبير من التداخلات الطيفية. وهناك نهج آخر يتضمن فصل أيونات التحليل عن تلك المشاركة في تكوين الأنواع متعددة الذرات؛ ويمكن تحقيق الفصل عن طريق تبخير العينة (على سبيل المثال عن طريق توليد الهيدريد أو التبخير الكهروحراري)، أو عن طريق استخدام خطوة فصل كروماتوغرافية أو أي خطوة فصل أخرى مثل الاستخلاص السائل-السائل (LLE). كما أن إضافة النيتروجين أو الهيليوم أو الميثان إلى الغاز الحامل، أو إضافة مذيب عضوي إلى المخفف، يقلل من بعض التداخلات القائمة على الأرجون (Branch et al., 1994).

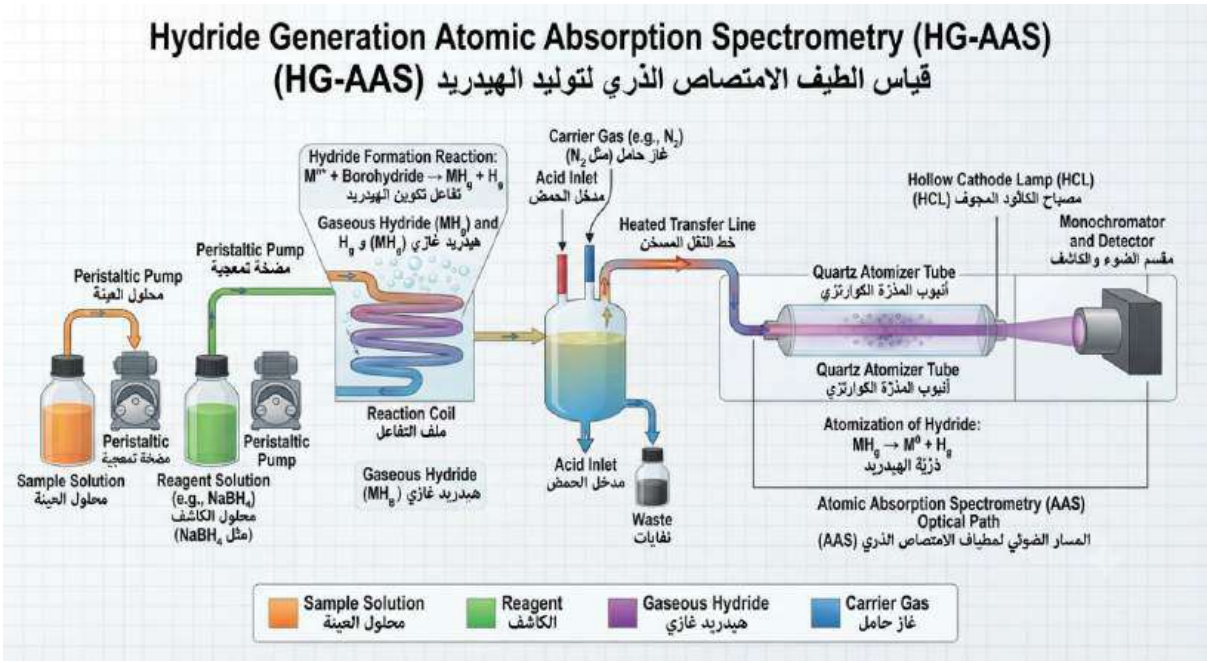
يتم القضاء بفعالية على **التداخلات غير الطيفية** (Non-spectral interferences)، المرتبطة بإدخال العينة والتقلبات في البلازما المقترنة حثياً، باستخدام "معيار داخلي" (Internal standard). يجب أن يكون هذا المعيار عنصراً غير موجود في العينة الأصلية، ولا يخضع لتداخلات طيفية، وله كتلة وطاقة تأين قريبتان من تلك الخاصة بالتحليل (التحاليل). المعايير الداخلية المستخدمة غالباً مع العينات البيولوجية هي السكانديوم، والإنديوم، والإيريديوم للكتل التي تقل عن 80، ومن 80 إلى 150، وتزيد عن 150 وحدة كتلة ذرية (u) على التوالي.

طرق توليد البخار (Vapour generation approaches)

تم وصف مجموعة من تقنيات توليد البخار الكيميائي (Tsalev, 1999)، ولكن معظم التطبيقات العملية تتضمن إما توليد الهيدريد المتطاير أو تكوين بخار الزئبق.

توليد الهيدريد (Hydride generation)

تكون عناصر مثل الزرنيخ، والسيلينيوم، والأنتيمون، والبزموت هيدريدات غازية، مثل "الأرسين" (AsH_3)، ويمكن استغلال ذلك في التحليل. باستخدام أجهزة بسيطة، يُضاف عامل مختزل مثل "بوروهيدريد الصوديوم" إلى دورق تفاعل يحتوي على عينة محمضة. يتكون الهيدروجين الذي يتفاعل مع التحليل، فيتحرر الهيدريد الغازي ويُنقل بواسطة تدفق غاز خامل إلى (ICP) من أجل (AES) أو (MS)، أو إلى أنبوب سيليكا مسخن يوضع في المسار الضوئي من أجل (AAS) أو (AFS) (Heilier et al., 2005). يُسخن الأنبوب إما بلهب هواء-أسيتيلين أو بتيار كهربائي إلى درجة حرارة كافية لإحداث تفكك الهيدريد وتذرية التحليل (الشكل 6). فيما يتعلق بـ (AAS)، لا يوجد فقدان للعينة في المرذاذ، حيث تدخل جميع الذرات إلى المسار الضوئي في غضون بضع ثوانٍ وتُحتجز داخل أنبوب السيليكا، مما يؤخر تشتتها. وقد أدى تطوير الأجهزة لتعمل بنظام التدفق المستمر إلى تبسيط الأتمتة.



شكل 6: *توليد الهيدريد لتقنية الامتصاص الذري (AAS).*

عادةً ما يكون العنصر المكون للهيدريد موجوداً في العينة كمجموعة من الأنواع (مثل AsIII، وAsV، وحمض أحادي ميثيل الزرنيخ، وحمض ثنائي ميثيل الزرنيخ، والزرنيخوبيتين). يعتمد معدل تكوين الهيدريد على النوع الكيميائي، لذلك لقياس التركيز الكلي للعنصر، من الضروري تحويل جميع الأنواع المختلفة الموجودة إلى الشكل الأكثر تفاعلاً. يتم تحقيق ذلك عادة عن طريق التسخين بأحماض مركزة ثم إضافة عامل مختزل للحصول على الأنواع التفاعلية (AsIII, SeIV, SbIII, إلخ) (الصندوق 4).

الصندوق 4: تحضير العينة لقياس السيلينيوم الكلي (Welz et al., 1987)

- ضع الدم، أو البول، أو الأنسجة (1 غرام) في أنبوب هضم. أضف 5 مل من حمض النيتريك وسخن (150 درجة مئوية، 30 دقيقة).
- أضف 0.2 مل من حمض البيركلوريك و0.5 مل من حمض الكبريتيك. سخن بالتتابع (15 دقيقة لكل درجة حرارة) عند 150 درجة مئوية، و200 درجة مئوية، و250 درجة مئوية.
- سخن (320 درجة مئوية، 20 دقيقة). اترك العينة لتبرد إلى درجة حرارة الغرفة.
- لاختزال Se^{VI} إلى Se^{IV}، أضف 5 مل من حمض الهيدروكلوريك بنسبة 50% (حجم/حجم). سخن (90 درجة مئوية، 20 دقيقة).
- برد العينة وأضف الماء (5 مل).

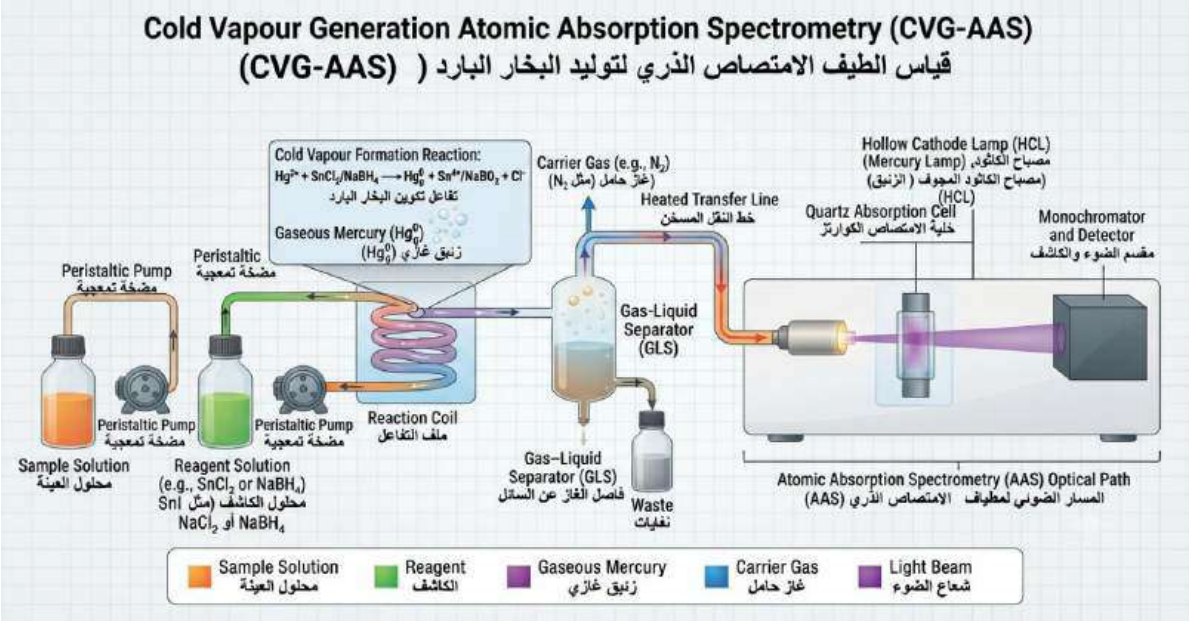
تعتبر المأكولات البحرية مصدراً غنياً لأنواع الزرنيخ العضوية غير السامة، وستكون تركيزات الزرنيخ الكلية في البول مرتفعة لعدة أيام بعد تناول الأسماك. من الممكن التمييز بين مركبات الزرنيخ الغذائية وغير الغذائية عن طريق حذف خطوة التسخين القوية واستخدام عامل مختزل خفيف مثل ملح اليوديد أو "L-سيستين" لتحويل أي نواتج أيض لـ As^{III} إلى الأنواع المكونة للهيدريد. في هذه الحالة، سيعكس التحليل التعرض لأنواع الزرنيخ السامة (Cava-Montesinos et al., 2005; Leermakers et al., 2006).

هناك تداخلات معينة شائعة في توليد الهيدريد بغض النظر عن الكاشف المستخدم. فإذا كان أحد العناصر المكونة للهيدريد موجوداً في العينة بكميات كبيرة، فإنه سيستهلك العامل المختزل بحيث قد لا يتم الكشف عن عناصر أخرى (Welz and Stauss, 1993). كما أن التركيزات العالية لأيونات العناصر الانتقالية تثبط أيضاً تكوين الهيدريد. إذا كانت هذه مشكلة،

يمكن استخدام عوامل الحجب (Masking agents)، أو الترسيب المشترك، أو التخلب (Chelation) للتحليل متبوعاً بالاستخلاص السائل-السائل (LLE) للمعقد المخلبي قبل إجراء التحليل (Welz and Melcher, 1984).

توليد بخار الزئبق (Mercury vapour generation)

يشكل الزئبق بخاراً في درجات الحرارة المحيطة، وهذه الخاصية هي الأساس لـ "توليد البخار البارد" (Cold vapour generation). يُضاف عامل مختزل مثل "كلوريد القصدير الثنائي" ($SnCl_2$) إلى محلول العينة لتحويل Hg^{2+}إلى زئبق عنصري (Hg^0). يؤدي الرج أو فقاعات الغاز عبر المحلول إلى تبخر سريع للزئبق الذري، الذي يُنقل إلى خلية تدفق موضوعة في مسار ضوئي (الشكل 7). لكسر رابطة الكربون-زئبق في أي مركبات زئبق عضوية موجودة، يمكن إضافة برمنغنات البوتاسيوم إلى البول المحمض وحضن العينة في درجة حرارة الغرفة طوال الليل. يتم التخلص من البرمنغنات الزائدة بإضافة "هيدروكلوريد الهيدروكسيل أمين". يُضاف العامل المختزل إلى العينة مباشرة قبل التوصيل بملحق توليد البخار (الصندوق 5). وكما هو الحال مع توليد الهيدريد، فإن حد الكشف (LoD) هو بضعة نانوغرامات، وقد تم تطوير أجهزة لأداء كلا الإجراءين.



شكل 7: *توليد البخار البارد.*

الصندوق 5: قياس الزئبق في البول عن طريق توليد البخار البارد (AAS)

- ضع البول (1 مل) في أنبوب (درجة حرارة 4 مئوية).
- أضف 0.2 مل من حمض الكبريتيك المركز و1.5 مل من برمنغنات البوتاسيوم بتركيز 6% (وزن/حجم).
- اتركه طوال الليل ثم أضف 0.3 مل من هيدروكلوريد الهيدروكسيل أمين بتركيز 20% (وزن/حجم).
- أضف 1 مل من كلوريد القصدير الثنائي ($SnCl_2$) بتركيز 20% (وزن/حجم) في حمض الهيدروكلوريك بنسبة 50% (حجم/حجم) لاختزال Hg^{2+}إلى Hg^0.
- صل العينة بالملحق الخاص (بجهاز توليد البخار) وقم بالتحريك (Purge) بالهواء أو غاز خامل لتبخير التحليل.

ومضان الأشعة السينية (X-ray fluorescence - XRF)

عندما تصطدم فوتونات عالية الطاقة، أو إلكترونات، أو بروتونات بعينة صلبة، قد يُزاح إلكترون من الأغلفة الداخلية (K أو L أو M) لذرة مكونة لها. تُملأ الفجوة المدارية الناتجة بواسطة إلكترون من غلاف خارجي، وينبعث فوتون أشعة سينية. طاقة (طول موجي) الفوتون المنبعث تساوي الفرق في مستويات الطاقة المعنية في انتقال الإلكترون.

تُعرف هذه الظاهرة بـ "ومضان الأشعة السينية" (XRF). الطول الموجي مميز للعنصر الذي نشأ منه، بينما ترتبط شدة الانبعاث بتركيز الذرات في العينة (Janssens and Adams, 1989; Potts et al., 2006). وفقاً لنوع مقياس الطيف المستخدم لقياس الانبعاث، تُصنف تقنية XRF إلى: "تشتت طولي موجي" (WDXRF) أو "تشتت طاقة" (EDXRF). وعادة ما يتم وصف "ومضان الأشعة السينية بالانعكاس الكلي" (TXRF) كتقنية منفصلة، على الرغم من أنه يمكن اعتبارها تنويعاً لـ EDXRF (Klockenkämper and von Bohlen, 1992).

لإجراء التحليل، يتم تعريض العينات لإشعاع فوتونات عالية الطاقة، وعادة ما تكون حزمة أولية متعددة الألوان من أنبوب أشعة سينية. ومع ذلك، فإن استخدام النظائر المشعة مثل ^{244}Cm، و ^{241}Am، و ^{55}Fe، و ^{109}Cdكمصادر له تطبيقات سريرية في أجهزة شبه محمولة طُورت للقياس الحي (in vivo) بتقنية XRF (Chettle, 2006).

يمكن أن تساهم مصفوفة العينة بشكل كبير في شدة الإشارة، مما يجعل المعايرة صعبة، ويستلزم استخدام مواد مرجعية، أو معايرة مطابقة للمصفوفة، و/أو معايرة داخلية. وتواجه مشاكل أقل مع العينات المحضرة كأغشية رقيقة جداً، وفي تقنية TXRF. بالإضافة إلى تأثير المصفوفة، تتأثر الحساسية أيضاً بالطول الموجي، وتعتبر العناصر ذات الكتلة الذرية المنخفضة أكثر صعوبة في القياس بدقة.

تُستخدم أشعة سينية عالية الشدة في تقنية WDXRF؛ حيث يتم تشتيت طاقة الوميض إلى خطوط طيفية فردية عن طريق الانعكاس باستخدام "بلورة محللة" (Analyzer crystal). تُجمع الحزم المحيدة وتُوجه إلى أنبوب مضاعف ضوئي (Photomultiplier tube). وكما هو الحال مع (ICP-AES)، قد تعمل أجهزة قياس الطيف بشكل متتابع، مع عدد من البلورات القابلة للتبديل للسماح بقياس النطاق الكامل للعناصر، أو في وضع متعدد القنوات (متزامن) يكون عادةً معداً مسبقاً لتحاليل محددة. حدود الكشف للعناصر الخفيفة (السيليكون وما دونه) تكون أقل بمقدار 10-100 مرة مقارنة بـ EDXRF. الدقة جيدة، على الرغم من أنها أقل عند الأطوال الموجية الأقصر. تتطلب الأجهزة المتتابعة أوقات تحليل طويلة لقياس عدة عناصر مقارنة بالأجهزة المتزامنة أو تقنية EDXRF.

في تقنية (EDXRF)، يتم توجيه الأشعة السينية المنبعثة من العينة إلى كاشف بلوري. تتولد نبضات تيار بشدات تتناسب مع طاقة فوتونات الأشعة السينية، ويتم فرز الطاقات المختلفة المرتبطة بالعناصر المتنوعة في العينة إلكترونياً. ومقارنة بـ (WDXRF)، يمكن استخدام مصادر طاقة أقل مثل أنبوب أشعة سينية منخفض الطاقة أو نظير مشع (^{244}Cm أو ^{241}Amأو ^{109}Cd). يجب الحفاظ على الكاشف في حالة تفريغ (فراغ) عند درجة حرارة النيتروجين السائل (77 كلفن). وتكون أوقات التحليل أطول بـ 10–30 مرة من تقنية (WDXRF)، ولكن نظراً لأن (EDXRF) تقنية متعددة العناصر بحق، فإن وقت التحليل الإجمالي لا يزداد بالضرورة.

عند توجيه حزمة متوازية من الأشعة السينية نحو سطح مستوٍ بصرياً بزاوية ضحلة (حوالي 5 دقائق قوسية)، يحدث انعكاس كلي. هذا هو مبدأ تقنية (TXRF) التي تتعرض فيها العينة لكل من الحزمة الأولية والحزمة المنعكسة كلياً، وتُثار لتومض (فلورة). يتم الكشف عن الإشعاع المنبعث وحله كطيف مشتت للطاقة. ونظراً لعدم وجود امتصاص فعلي بواسطة المصفوفة، فإن القياس والمعايرة أبسط بكثير، وتكون الحساسية أكبر مما هي عليه في تقنيات الأشعة السينية الأخرى (Klockenkämper and von Bohlen, 1992). وقد تمت مراجعة التطبيقات المفيدة لجميع أنواع تقنيات (XRF) (Potts et al., 2006).

القياس اللوني والفلوري (Colorimetry and fluorimetry)

تتفاعل العديد من المركبات مع الأيونات المعدنية لتعطي نواتج ملونة. وفي بعض هذه الحالات (جدول 4)، يمكن تطوير مقايسة كمية بالاستفادة من "قانون بير-لامبرت" (Beer–Lambert Law). وتعد التطبيقات على تحليل العينات السريرية محدودة لأن الحساسية والانتقائية عادة ما تكون ضعيفة. يعتبر القياس اللوني للكالسيوم والمغنيسيوم في المصل والبول، وهي تحاليل موجودة بتركيزات من مرتبة ($mmol\ L^{-1}$) في هذه السوائل، أمراً روتينياً. كما يمكن قياس الزنك والنحاس في المصل، وتتوفر مجموعات (Kits) تجارية يمكن استخدامها على أجهزة الكيمياء السريرية الحديثة (Makino, 1999). ومع ذلك، هناك تداخلات من مصفوفة المصل، وفي برامج تقييم الجودة الخارجية (EQA)، يكون أداء هذه الطرق ضعيفاً (Taylor, 2006c).

تتوفر طرق لونية لقياس الحديد (II)، ولكن يجب استخدامها بحذر إذا أُعطيت عوامل مخلبية مثل "ديفيروكسامين" (DFO) قبل الحصول على العينة، لأن معقد (DFO-Fe) لن يتفاعل مع الكاشف اللوني. يبلغ حد الكشف (LoD) لهذه الطريقة $0.5\ mg\ L^{-1}$.

تومض (تفلور) بعض المعقدات المتكونة بين المعادن ومركبات الصبغة. بالإضافة إلى ذلك، تم تطوير مركبات أخرى خصيصاً لاستغلال إمكانات القياس الفلوري (جدول 5).

عموماً، تتمتع المقايسات الفلورية بحساسية وانتقائية أكبر من الطرق اللونية. ومع ذلك، من الناحية العملية، فإن قياس السيلينيوم باستخدام "2.3-دي أمينو نافثيل أمين" هو الوحيد الذي يحظى بالاهتمام. هذه الطريقة حساسة مثل مقايسات (AAS) المفضلة عموماً، ولكنها تتطلب إجراء تحضير عينة أكثر تعقيداً يتضمن الهضم الحمضي. لذا، تُستخدم هذه الطريقة عموماً فقط عندما لا يكون هناك بديل.

جدول 4: بعض المركبات التي تتفاعل مع المعادن لتعطي نواتج ملونة

الكاشف(Reagent)	المعدن(Metal)
ديثيزون(Dithizone)	الرصاص(Pb) ، الزئبق(Hg)
2,2'-بيبريديل(2,2'-Bipyridyl)	الحديد(Fe)
o-كريسول فثالين كومبلكسون(o-Cresolphthalein complexone)	الكالسيوم(Ca) ، المغنيسيوم(Mg)
أزرق ميثيل ثيمول(Methylthymol blue)	الكالسيوم(Ca)
ثنائي إيثيل ثيوكربامات الصوديوم (Sodium diethyldithiocarbamate)	النحاس(Cu)
زينكون(Zincon)	الزنك(Zn)
1-(2-بيريديل أزو)-2-نافثول(PAN)	الزنك(Zn)
3,3'-دي أمينو بنزيدين(3,3'-Diaminobenzidine)	السيلينيوم(Se)
كاتيكول فيوليت(Catechol violet)	الألمنيوم(Al)
إريوكروم سيانين R (Eriochrome cyanine R)	الألمنيوم(Al)

جدول 5: بعض المركبات التي تتفاعل مع الأيونات المعدنية لتنتج نواتج فلورية (مشعة)

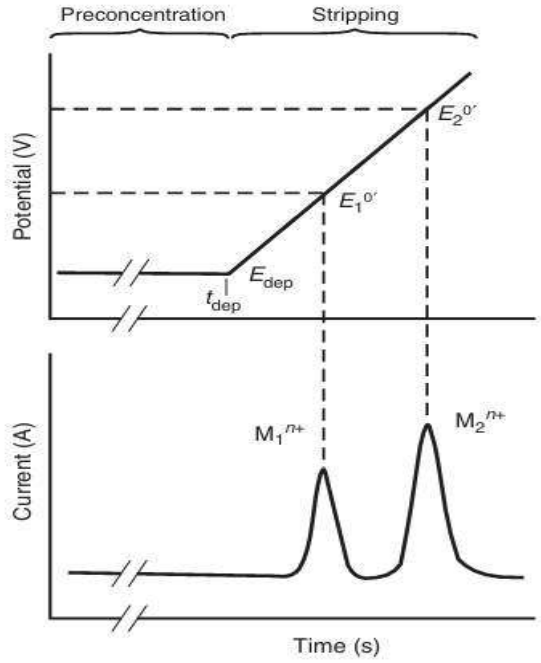
الكاشف(Reagent)	المعدن (Metal)
2,3-دي أمينو نافثيل أمين(2,3-Diaminonaphthylamine)	السيلينيوم (Se)
3,3'-دي أمينو بنزيدين(3,3'-Diaminobenzidine)	السيلينيوم (Se)
مورين(Morin)	البريليوم (Be)
8-هيدروكسي كينولين(8-Hydroxyquinoline)	المغنيسيوم (Mg)
لوموجاليون(Lumogallion)	الألمنيوم (Al)

تُستخدم هذه الكواشف لتكوين معقدات كيميائية ذات خصائص ضوئية مميزة (سواء امتصاص الضوء أو إصداره في حالة الفلورة)، مما يسمح بتقدير تركيز المعدن في العينة، على الرغم من القيود التي سبق ذكرها بخصوص الحساسية والانتقائية مقارنة بالتقنيات الطيفية الذرية.

الطرق الكهروكيميائية (Electrochemical methods)

قياس الجهد بالنزع الأنودي (Anodic stripping voltammetry - ASV)

تُعد تقنية "قياس الجهد بالنزع الأنودي" (ASV) مثالية لتحليل المحاليل المخففة حيث لا يعد حجم العينة عاملاً مقيداً. يوضع قطب مرجعي وقطب غرافيت مغطى بغشاء رقيق من الزئبق في العينة، ويُطبق جهد سالب على قطب الزئبق، عادة لفترات تتراوح من 2 إلى 30 ثانية. يؤدي هذا إلى تركز الكاتيونات الموجودة في العينة ("ترسيبها") على سطح قطب الزئبق (الأنود). بعد ذلك، يُعكس اتجاه الجهد ليعطي جهداً موجباً متزايداً على مدى 2–30 دقيقة. ومع وصول الجهد إلى "جهد نصف الموجة" (Half-wave potential) لعنصر ما، مثل الرصاص (Pb^{2+})، يتم تفريغ (نزع) كل هذه الأيونات من الأنود، مما ينتج تياراً يمكن قياسه (الشكل 8).



شكل 8: *رسم تخطيطي لقياس الجهد بالنزع الأنودي. تترسب الأيونات المعدنية على الأنود (بجهد E_{dep}) خلال خطوة التمركز المسبق (t_{dep}). ومع زيادة الجهد، يتم تفريغ الأيونات (M_1^{n+}, M_2^{n+}) عند جهود نصف موجة مميزة (E_{r1}^0, E_{r2}^0).*

يتناسب التيار الناتج مع عدد الأيونات التي تظهر عند ذلك الجهد، وتتم مقارنته بتلك الناتجة عن محاليل المعايرة. وعلى الرغم من أن تقنية ASV ليست واسعة الانتشار في تحليل العينات البيولوجية، فقد تطور لها تطبيق متخصص، خاصة في الولايات المتحدة، لقياس الرصاص في الدم. حيث يُضاف عامل مخلبي إلى العينة لتحرير الرصاص المرتبط بخلايا الدم الحمراء والبروتين، ويتم القياس باستخدام جهاز مصمم خصيصاً لهذا التطبيق (الشكل 9).

الجهاز مدمج ويمكن إعداده، على سبيل المثال، في غرفة الفحص الطبي. في الوقت الحاضر، تتوفر أجهزة محمولة يدوياً تكون فيها الأقطاب وحاوية العينة وحدات يمكن التخلص منها، ومُعايرة مسبقاً من قبل الشركة المصنعة لكل دفعة. يعتبر أداء هذه المنهجية، وفقاً لما قيمته "نظام اختبار الكفاءة لرصاص الدم في ولاية نيويورك"، مقبولاً بشكل عام (Parsons, 2006). وقد تم تحديد مشكلة مرتبطة بعملية المعايرة المسبقة، ولكن تم حلها منذ ذلك الحين (Stanton et al., 2006).

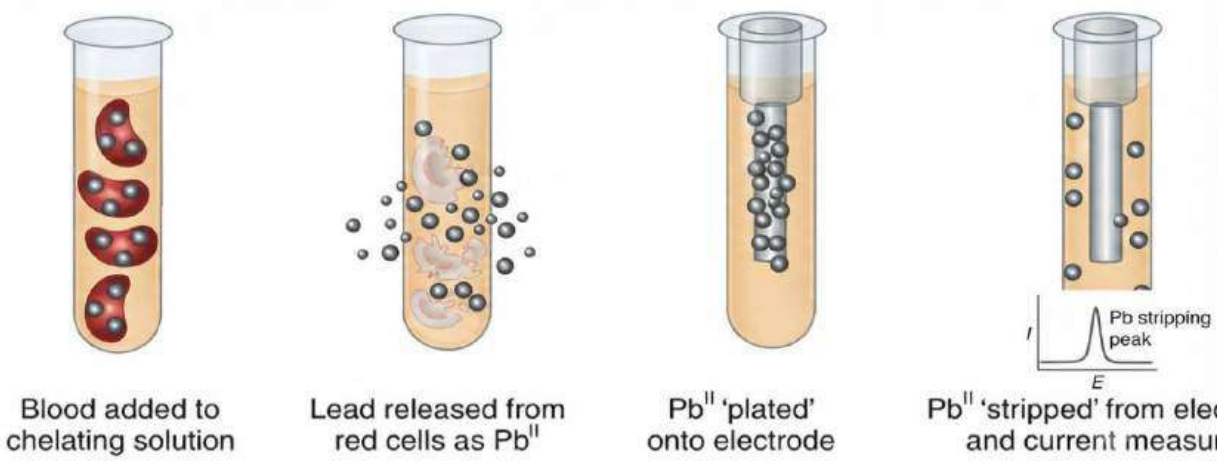


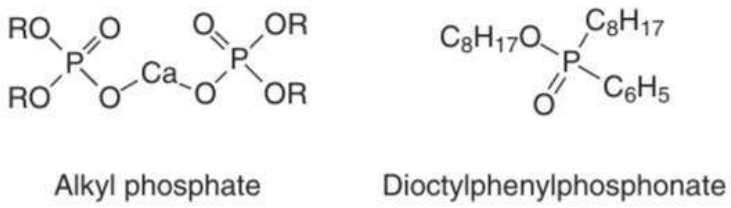
Figure 9 *Measurement of lead in blood by anodic stripping voltammetry.*
شكل 9: *قياس الرصاص في الدم بواسطة قياس الجهد بالنزع الأنودي.*

الأقطاب الانتقائية للأيونات (Ion-selective electrodes - ISEs)

تُستخدم الأقطاب الانتقائية للأيونات، والتي يعد مقياس الـ pH مجرد مثال واحد عليها، على نطاق واسع لقياس الكاتيونات الرئيسية (Na^+, K^+) في العينات البيولوجية (Burnett et al., 2000). وتتوفر أقطاب لأيونات معدنية أخرى وكذلك للأنيونات. يُقاس الليثيوم (Li^+) عادةً بهذه الطريقة، على سبيل المثال، في البلازما أو المصل وفي الدم الكامل (Greil and Steller, 1992; Greffe and Gouget, 1996). وبالطبع، يعد استخدام أنابيب جمع دم خالية من الليثيوم أمراً حيوياً. يمكن قياس الفلوريد (F^-) في العينات البيولوجية، ليس فقط لتقييم التعرض المحتمل لهذا السم أو المركبات التي تؤدي إلى إنتاج F^-عن طريق التمثيل الغذائي، ولكن أيضاً في العمل الطب الشرعي للتأكد من إضافة كمية كافية من الفلوريد لضمان تثبيط النمو الميكروبي (Kissa, 1987; Shajani, 1985).

تعد الأقطاب الانتقائية للأيونات (ISEs) أمثلة على "أقطاب الغشاء" (Membrane electrodes)، حيث يتمتع الغشاء بخصائص فيزيائية أو كيميائية تسمح بمرور نوع واحد فقط من الأيونات بين محلول التعبئة الداخلي ومحاليل الاختبار. إذا لم تكن أنشطة الأيونات في المحلولين متساوية، فهناك ميل للأيونات لعبور الغشاء نحو المحلول الأقل نشاطاً، وستعارض الشحنة الكهربائية المتولدة بذلك هجرة الأيونات حتى يتحقق التوازن. العدد الفعلي للأيونات المعنية صغير ولا ينطوي على انتشار تدريجي بين الحجرتين. يمكن قياس الجهد الناتج عن حركة الأيونات، وهو يرتبط لوغاريتمياً بالنشاط في محلول الاختبار - ومن المهم أن نتذكر أن الأقطاب الانتقائية للأيونات تقيس "النشاط" (Activity) وليس "التركيز" (Concentration).

أدى تحضير الأغشية ذات النفاذية الانتقائية إلى العديد من التطبيقات. قد تكون الأغشية صلبة ذات هيكل أيوني ثابت، مثل الزجاج الذي يستجيب لـ Na^+، أو سائلاً غير قابل للامتزاج بالماء يحتوي على مادة مذابة تتبادل الأيونات المحددة في المحلول بشكل نشط. أحد المبادلات الفعالة للكالسيوم هو ملح الكالسيوم لحمض ألكيل الفوسفات المذاب في "دي أوكتيل فينيل فوسفونات" (الشكل 10). يتم تحضير المبادِل على طبقة رقيقة من الـ PVC لتشكيل الغشاء.



شكل 10: *مثال على مبادل كالسيوم فعال.*

الطرق الحفزية (Catalytic methods)

يمكن قياس تركيز عنصر ما من خلال دوره الحفزي في تفاعل معين، حيث يتم مراقبة سرعة هذا التفاعل باستخدام القياس اللوني أو الفلوري (Nakano et al., 1983). كان إزالة لون "كبريتات السيريوم" بواسطة "حمض الزرنيخ"، الذي يتطلب اليود كحفاز، يُستخدم سابقاً لقياس اليود في المصل عند فحص وظائف الغدة الدرقية. تتضمن معظم الأمثلة الأخرى لهذا النوع من التفاعل أكسدة مادة متفاعلة (Substrate) بواسطة بيروكسيد الهيدروجين:

- H_2O_2 وKI: يتحول إلى I_3^-(محفز بواسطة الموليبدينوم Mo).
- **أكسدة "أو-ديانيسيدين" (o-Dianisidine) بواسطة H_2O_2:** (محفز بواسطة الكروم السداسي Cr^{VI}).
- **أكسدة "الأزرق الحمضي 45" (Acid blue 45) بواسطة H_2O_2:** (محفز بواسطة المنجنيز Mn).

يعد **التلألؤ الكيميائي** (Chemiluminescence) لقياس المعادن مثالاً خاصاً على التقنية الحفزية. فأكسدة "اللومينول" (Luminol) بواسطة بيروكسيد الهيدروجين عند أس هيدروجيني (pH) قاعدي يصاحبه انبعاث ضوء. وقد تم قياس الكروم والكوبالت والنحاس والحديد والمنجنيز جميعاً بهذه الطريقة (Klopf and Nieman, 1983). هذه الطرق حساسة جداً ويمكنها الكشف عن بضعة ميكروغرامات لكل لتر ($\mu g L^{-1}$) من المادة المحللة إذا أمكن استبعاد التداخل من معادن أخرى. ومع ذلك، نادراً ما استُغلت هذه التفاعلات في تحليل العينات البيولوجية.

تحليل التنشيط بالنيوترونات (Neutron activation analysis - NAA)

تعد تقنية (NAA) حساسة ويمكن استخدامها لقياس العديد من العناصر في وقت واحد. ومع ذلك، ولأنها تتطلب الوصول إلى مفاعل ذري، فإن التقنية تُستخدم فقط للمشاريع الخاصة. باختصار، يتم قصف العينة بالنيوترونات، مما يولد مجموعة من النظائر المشعة. ومع اضمحلال هذه النظائر، يمكن قياس الإشعاع المنبعث باستخدام عدادات "بيتا" (β) أو "غاما" (γ) التقليدية. ورغم أن الانبعاثات المميزة لكل نظير مشع فردي تضفي بعض الانتقائية، قد توجد تداخلات، خاصة من النظائر قصيرة العمر. لذلك، غالباً ما يُستخدم "كروماتوغرافيا التبادل الأيوني" بعد التنشيط للحصول على نتائج مقبولة.

تعد تقنية (NAA) مكلفة، حيث تتطلب معدات خاصة ومشغلين مدربين تدريباً عالياً، وللحصول على حدود كشف جيدة قد تتطلب أوقات تشعيع تصل إلى عدة أيام. تُستخدم التقنية، على سبيل المثال، في توصيف المواد المرجعية عند إجراء مقارنات مع طرق الطيف الذري. كما قد تكون ذات قيمة في دراسات علم الأوبئة والسموم المهنية (Porru et al., 2001; Spallholz et al., 2005)، وفي أعمال الطب الشرعي. ومن المزايا الخاصة في هذا المجال الأخير أن العينة لا تُستهلك أثناء التحليل.

الطرق الكروماتوغرافية (Chromatographic methods)

الكروماتوغرافيا (Chromatography)

لاستخدام الكروماتوغرافيا في قياس الأيونات المعدنية، كانت المشكلة الأساسية التي وجب معالجتها هي الكشف (Detection) باستخدام أنظمة HPLC وGC التقليدية. وُجد أنه يمكن قياس المعقدات المخلبية (Chelates) مع مركبات مثل "ثلاثي فلورو أسيتيل أسيتونات" (trifluoroacetylacetonate) باستخدام GC-ECD أو HPLC-UV. ومع ذلك، كانت الحساسية غير كافية لمعظم التطبيقات. ورغم ذلك، يستمر العمل على تطوير عوامل مخلبية جديدة توفر حدود كشف محسنة (Hu et al., 2005). استُخدمت استراتيجية مماثلة في "كروماتوغرافيا الأيونات" (Ion chromatography) (Pohl et al., 1997). ورغم أن هذه التقنية الأخيرة ترتبط عادةً بقياس الأنيونات، فمن الممكن قياس الأيونات المعدنية باستخدام أعمدة التبادل الأنيوني، والاشتقاق باستخدام كاشف مثل "4-(2-بيريديل أزو) ريزورسينول" (4-(2-pyridylazo)resorcinol)) والكشف اللوني. وقد سُجلت حدود كشف بلغت 0.02–0.5 نانوغرام باستخدام عينة مائية حجمها 50 ميكرولتر. يمكن أيضاً استخدام أنظمة كشف أخرى بما في ذلك AES وICP-MS (Heitkemper et al., 2001).

في الوقت الذي كانت فيه تقنية ICP-MS مكلفة وتخضع للتداخلات، اعتُمد نهج جديد في بعض المختبرات حيث يتم تحضير معقد مخلبي للعنصر المراد دراسته، مثل الموليبدينوم مع "ثنائي (ثلاثي فلورو إيثيل) ثيوكربامات الصوديوم"، وتحليله بواسطة GC-MS. باستخدام هذا الإجراء، يتم فصل أي أيونات قد تؤدي إلى تداخلات في MS على العمود، بينما يوفر الكاشف الحساسية اللازمة. كما تتضمن التطورات اللاحقة في الكروماتوغرافيا وICP-MS استخدام عمود لإزالة التداخلات، مثل فصل الأرجون عن الكلور، والذي يشكل بخلاف ذلك $^{40}Ar^{35}Cl$ ويشوه قراءة الزرنيخ ^{75}As (Sheppard et al., 1990).

تحليل التواجد الكيميائي (Speciation)

عادةً ما يوفر قياس التركيز الكلي لعنصر ما في عينة المعلومات المطلوبة للتحقيقات السمية، ولكن هناك حالات يكون فيها ذلك غير كافٍ أو مضللاً. لقد ذُكر سابقاً وجود مركبات زرنيخ غير سامة في الدم والبول مشتقة من المأكولات البحرية، وقد يكون من الضروري قياس أنواع الزرنيخ (Arsenic species) للتمييز بين المصادر الغذائية وغيرها من مصادر التعرض. مثال آخر هو "ميثيل الزئبق" والزئبق غير العضوي، حيث يمكن أن يعطي القياس الانتقائي لنوع الزئبق الموجود معلومات حول مصدر التعرض. تحليل التواجد الكيميائي (Speciation) هو أيضاً ميزة للأبحاث الأساسية للتحقيق في عملية التمثيل الغذائي لعنصر ما (Devos et al., 2002; Kremer et al., 2005). وبالتالي، فإن التواجد الكيميائي موضوع مهم للمحلل ويبرز في الأدبيات الحديثة، ومعظمه يتضمن استخدام الكروماتوغرافيا لإجراء عمليات الفصل قبل القياس (Taylor et al., 2007). قد يتضمن الكشف أي تقنية تحليلية، لكن AAS وAES وAFS وICP-MS هي الأكثر استخداماً. وعادة ما تكون أنظمة الكروماتوغرافيا والكشف مرتبطة على التوالي.

تتضمن التحاليل أيًا أو كل الخطوات التالية: الاستخلاص (مثلاً من عينات الأنسجة)، وتكوين مشتق متطاير (لـ GC)، والتحليل الكروماتوغرافي، والقياس. يجب أن تقوم إجراءات الاستخلاص باستخلاص كامل العنصر الموجود في العينة دون حدوث أي تحول في أنواعه الكيميائية. تتوفر مراجعات حول التواجد الكيميائي للزرنيخ والسيلينيوم (Francesconi and Kuehnelt, 2004; Francesconi and Pannier, 2004; Polatajko et al., 2006).

ضمان الجودة (Quality assurance)

على عكس العديد من المركبات العضوية، تكون التحاليل غير العضوية مستقرة بشكل عام. بالإضافة إلى ذلك، يمكن تحضير محاليل المعايرة بشكل موثوق وبنقاء عالٍ، وتتمكن المختبرات المرجعية المتخصصة من إجراء قياسات باستخدام تقنيات مثل "تحليل تخفيف النظائر" (Isotope dilution analysis)، والتي يمكن تتبعها وفقاً للمعايير المترولوجية الدولية. وهذا يعني بدوره أن المواد المرجعية المعتمدة متاحة بسهولة للتحكم في الدقة وللتحقق من صحة الطرق التحليلية.

بصرف النظر عن ميزات مثل الحساسية المتأصلة، وسرعة التشغيل، وتكلفة الطريقة التحليلية المستخدمة، فإن **التلوث** هو العامل الذي له أكبر تأثير على جودة النتائج. يمكن أن يحدث التلوث أثناء: (1) جمع العينات وتخزينها، (2) تحضير العينة، و(3) القياس الطيفي نفسه. إن الاهتمام الدقيق بالنظافة وبالتفاصيل المنهجية أمر ضروري للحصول على نتائج دقيقة وقابلة للتكرار. وتشير البيانات الصادرة عن برامج تقييم الجودة الخارجية (EQA) إلى أنه في حين يمكن لبعض المختبرات الروتينية الحصول على نتائج جيدة، فإن مراكز العناصر الشحيحة المتخصصة هي التي تميل إلى الحفاظ على أعلى معايير الأداء. كما تراكم مثل هذه المراكز الخبرة في الحالات السريرية والجنائية غير العادية، وهي في وضع جيد لتقديم المشورة والتفسير (Taylor and Walker, 1992).

ملخص (Summary)

يمتلك أخصائي السموم التحليلية مجموعة من التقنيات المتاحة للقياس الكمي للأيونات المعدنية والأنواع الأخرى في العينات البيولوجية وما يتصل بها. واعتماداً على الأسئلة المطروحة، يمكن للمحلل قياس عنصر معين بدقة عند تركيزات تصل إلى ($ng\ g^{-1}$) (جزء في المليار) أو حتى أقل، أو يمكنه إنتاج ملف تعريف متعدد العناصر للإشارة إلى ما إذا كان المعدن موجوداً أو غائباً بشكل غير متوقع.

لسنوات عديدة، كانت تقنية (AAS) هي التقنية الأكثر أهمية، ورغم استمرار استخدامها على نطاق واسع، أصبحت تقنية (ICP-MS) هي الطريقة المفضلة بشكل متزايد. بالإضافة إلى ذلك، يتم تطوير والتحقق من صحة تقنيات تعمل جنباً إلى جنب مع AAS وICP-MS لفصل وتحديد الجزيئات الموجودة في العينة والمرتبطة بالمعدن. ونظراً لأن المعادن موجودة في كل مكان في البيئة، فمن الضروري توخي حذر استثنائي لضمان عدم وجود أي تلوث في أي مرحلة، بدءاً من جمع العينة وحتى إصدار النتائج.

قائمة المراجعReferences

Al-Saleh, I. A., Fellows, C., Delves, H. T., & Taylor, A. (1993). Identification of sources of lead exposure among children in Arar, Saudi Arabia. Annals of Clinical Biochemistry, 30(2), 142–145.

Bacon, J. R., Linge, K. L., Parrish, R. R., & Van Vaeck, L. (2006). Atomic spectrometry update: Atomic mass spectrometry. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 21(8), 785–818.

Bazzi, A., Nriagu, J. O., Inhorn, M. C., & Linder, A. M. (2005). Determination of antimony in human blood with inductively coupled plasma-mass spectrometry. Journal of Environmental Monitoring, 7(12), 1251–1254. https://doi.org/10.1039/B509930G

Blacklock, E. C., & Sadler, P. A. (1981). A rapid screening method for heavy metals in biological materials by emission spectroscopy. Clinica Chimica Acta, 113(1), 87–94.

Branch, S., Ebdon, L., & O'Neill, P. (1994). Determination of arsenic species in fish by directly coupled high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 9(1), 33–37.

Burnett, R. W., Covington, A. K., Fogh-Andersen, N., Kulpmann, W. R., Lewenstam, A., Maas, A. H., Muller-Plathe, O., Van Kessel, A. L., & Zijlstra, W. G. (2000). Use of ion-selective electrodes for

blood-electrolyte analysis: Recommendations for nomenclature, definitions and conventions. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 38(4), 363–370.

Cava-Montesinos, P., Nilles, K., Cervera, M. L., & de la Guardia, M. (2005). Non-chromatographic speciation of toxic arsenic in fish. Talanta, 66(4), 895–901.

Chettle, D. R. (2006). Occupational nuclear medicine: Trace element analysis of living human subjects. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 268, 653–661.

Devos, C., Sandra, K., & Sandra, P. (2002). Capillary gas chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry (CGC-ICPMS) for the enantiomeric analysis of D,L-selenomethionine in food supplements and urine. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 27(3-4), 507–514.

Francesconi, K. A., & Kuehnelt, D. (2004). Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000–2003. Analyst, 129(5), 373–395.

Francesconi, K. A., & Pannier, F. (2004). Selenium metabolites in urine: A critical overview of past work and current status. Clinical Chemistry, 50(12), 2240–2253.

Frank, E. L., Hughes, M. P., Bankson, D. D., & Roberts, W. L. (2001). Effects of anticoagulants and contemporary blood collection containers on aluminum, copper, and zinc results. Clinical Chemistry, 47(6), 1109–1111.

Gray, A. L., & Date, A. R. (1983). Inductively coupled plasma source mass spectrometry using continuum flow ion extraction. Analyst, 108(1290), 1033–1050.

Greffe, J., & Gouget, B. (1996). Red cell effects on lithium measurements by ion-selective electrode. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 56(Suppl 224), 187–191.

Greil, W., & Steller, B. (1992). Lithium determination in outpatient clinics by an ion-selective electrode in venous and capillary whole blood. Psychiatry Research, 44(1), 71–77.

Grinberg, P., Goncalves, R. A., & de Campos, R. C. (2005). The determination of total Se in urine and serum by graphite furnace atomic absorption spectrometry using Ir as permanent modifier and in situ oxidation for complete trimethylselenonium recovery. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383(7), 1044–1051.

Haswell, S. J. (Ed.). (1991). Atomic absorption spectrometry: Theory, design and applications. Elsevier.

Heilier, J. F., Buchet, J. P., Haufroid, V., & Lison, D. (2005). Comparison of atomic absorption and fluorescence spectroscopic methods for the routine determination of urinary arsenic. International Archives of Occupational and Environmental Health, 78(1), 51–59.

Heitland, P., & Köster, H. D. (2006). Biomonitoring of 30 trace elements in urine of children and adults by ICP-MS. Clinica Chimica Acta, 365(1-2), 310–318.

Heitland, P., & Köster, H. D. (2004). Fast, simple and reliable routine determination of 23 elements in urine by ICP-MS. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 19(12), 1552–1558.

Heitkemper, D. T., Vela, N. P., Stewart, K. R., & Westphal, C. S. (2001). Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 16(4), 299–306.

Hill, S. J. (1999). Inductively coupled plasma spectrometry and its applications. Sheffield Academic Press.

Hu, Q., Yang, X., Huang, Z., Chen, J., & Yang, G. (2005). Simultaneous determination of palladium, platinum, rhodium and gold by on-line solid phase extraction and high performance liquid chromatography with 5-(2-hydroxy-5-nitrophenylazo)thiorhodanine as pre-column derivatization regents. Journal of Chromatography A, 1094(1-2), 77–82.

Janssens, K. H., & Adams, F. (1989). New trends in elemental analysis using X-ray fluorescence spectrometry. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 4(2), 123–135.

Kehoe, R. A. (1961). The Harben Lectures: The metabolism of lead in health and disease. Journal of the Royal Institute of Public Health and Hygiene, 24, 81–97.

Klockenkämper, R., & von Bohlen, A. (1992). Total reflection X-ray fluorescence—an efficient method for micro-, trace and surface layer analysis. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 7(3), 273–279.

Klopf, L. L., & Nieman, T. A. (1983). Effect of iron(II), cobalt(II), copper(II) and manganese(II) on the chemiluminescence of luminol in the absence of hydrogen peroxide. Analytical Chemistry, 55(6), 1080–1083.

Kissa, E. (1987). Determination of inorganic fluoride in blood with a fluoride ion-selective electrode. Clinical Chemistry, 33(2), 253–255.

Klaue, B., & Blum, J. D. (1999). Trace analysis of arsenic in drinking water by inductively coupled plasma mass spectrometry: High resolution versus hydride generation. Analytical Chemistry, 71(7), 1408–1414.

Kremer, D., Ilgen, G., & Feldmann, J. (2005). GC-ICP-MS determination of dimethylselenide in human breath after ingestion of 77Se-enriched selenite: Monitoring of in-vivo methylation of selenium. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 383(3), 509–515.

Leermakers, M., Baeyens, W., De Gieter, M., Smedts, B., Meert, C., De Bisschop, H. C., Morabito, R., & Quevauviller, Ph. (2006). Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 25(1), 1–10.

Lobinski, R., & Marczenko, Z. (1996). Spectrochemical trace analysis for metals and metalloids. Elsevier.

Lopez-Artiguez, M., Camean, A., & Repetto, M. (1993). Preconcentration of heavy metals in urine and quantification by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 17(1), 18–22.

Loreti, V., & Bettmer, J. (2004). Determination of the MRI contrast agent Gd-DTPA by SEC-ICP-MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 379(7-8), 1050–1054.

Makino, T. (1999). A simple and sensitive colorimetric assay of zinc in serum using cationic porphyrin. Clinica Chimica Acta, 282(1-2), 65–76.

Male, G. E. (1816). An epitome of judicial or forensic medicine for the use of medical men, coroners and barristers. E. Cox.

Mandal, B. K., Ogra, Y., Anzai, K., & Suzuki, K. T. (2004). Speciation of arsenic in biological samples. Toxicology and Applied Pharmacology, 198(3), 307–318.

Marsh, J. (1836). Account of a method of separating small quantities of arsenic from substances with which it may be mixed. Edinburgh New Philosophical Journal, 21, 229–236.

Massman, H. (1968). Vergleich von atomabsorption und atomfluoreszenz in der graphitküvette. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 23(3), 215–226.

Nakano, S., Tanaka, M., Fushihara, M., & Kawashima, T. (1983). Catalytic determination of nanogram amounts of Cu(II) by the oxidative coupling reaction of N-phenyl-p-phenyldiamine with N,N-dimethylaniline. Mikrochimica Acta, 1(5-6), 457–465.

Nelms, S. M. (Ed.). (2005). Inductively coupled plasma mass spectrometry handbook. Blackwell.

Parsons, P. (2006). Reports from the NY State Blood Lead Proficiency Testing Scheme. http://www.wadsworth.org/testing/lead/ptresults.htm

Pohl, C. A., John, R., Stillian, J. R., & Jackson, P. E. (1997). Factors controlling ion-exchange selectivity in suppressed ion chromatography. Journal of Chromatography A, 789(1-2), 29–41.

Polatajko, A., Jakubowski, N., & Szpunar, J. (2006). State of the art report of selenium speciation in biological samples. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 21(7), 639–654.

Porru, S., Placidi, D., Quarta, C., Sabbioni, E., Pietra, R., & Fortaner, S. (2001). The potential role of rare earths in the pathogenesis of interstitial lung disease: A case report of movie projectionist as investigated by neutron activation analysis. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 14(4), 232–236.

Potts, P. J., Ellis, A. T., Kregsamer, P., Streli, C., Vanhoof, C., West, M., & Wobrauschek, P. (2006). Atomic spectrometry update: X-ray fluorescence spectrometry. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 21(10), 1076–1107.

Shajani, N. K. (1985). Determination of fluoride in blood samples for analysis of ethanol. Canadian Society of Forensic Science Journal, 18(2), 49–52.

Sheppard, B. S., Shen, W. L., Caruso, J. A., Heitkemper, D. T., & Fricke, F. L. (1990). Elimination of the argon chloride interference on arsenic speciation in inductively coupled plasma mass spectrometry using ion chromatography. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 5(6), 431–435.

Spallholz, J. E., Boylan, L. M., Palace, V., Chen, J., Smith, L., Rahman, M. M., & Robertson, J. D. (2005). Arsenic and selenium in human hair: A comparison of five countries with and without arsenicosis. Biological Trace Element Research, 106(2), 133–144.

Stanton, N. V., Fritsch, T., Geraghty, C., Verostek, M. F., Weiner, B., & Parsons, P. J. (2006). The role of proficiency testing in the detection and resolution of calibration bias in the LeadCare® blood lead analyzer; limitations of peer-group assessment. Accreditation and Quality Assurance, 11(11), 590–592.

Taylor, A. (2006a). Atomic spectrometry and the clinical chemistry of trace elements. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 21(4), 381–383.

Taylor, A. (Ed.). (2006b). SAS Trace Element Laboratories Clinical and Analytical Handbook (4th ed.). Royal Surrey County Hospital.

Taylor, A. (2006c). Reports from the UK NEQAS for Trace Elements. School of Biomedical and Molecular Sciences, University of Surrey. http://www.surrey.ac.uk/sbms/eqas/pdf/TQreport.pdf

Taylor, A., & Walker, A. W. (1992). Measurement of aluminium in clinical samples. Annals of Clinical Biochemistry, 29(4), 377–389.

Taylor, A., Branch, S., Day, M., Patriarca, M., & White, M. (2007). Atomic spectrometry update: Clinical and biological materials, foods and beverages. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 22(4), 415–456.

Tsalev, D. L. (1999). Hyphenated vapour generation atomic absorption spectrometric techniques. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 14(2), 147–162.

Walsh, A. (1955). The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. Spectrochimica Acta, 7, 108–117.

Welz, B., & Melcher, M. (1984). Mechanisms of transition metal interferences in hydride generation atomic-absorption spectrometry. Part 3. Releasing effect of iron(III) on nickel interference on arsenic and selenium. Analyst, 109(5), 577–579.

Welz, B., & Stauss, P. (1993). Interferences from hydride-forming elements on selenium in hydride-generation atomic absorption spectrometry with a heated quartz tube atomiser. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 48(6-7), 951–976.

Welz, B., Wolynetz, M., & Verlinden, M. (1987). Determination of selenium in lyophilised human serum, blood and urine using hydride generation atomic absorption spectrometry. Pure and Applied Chemistry, 59(7), 927–936.

CHAPTER (15) الفصل الخامس عشر

المعادن والأنيونات

METALS AND ANIONS



الفصل الخامس عشر

المعادن والأنيونات

METALS AND ANIONS

مقدمة عامة General introduction

تُشكل المعادن والأنيونات مجموعة مهمة ولكنها متباينة من السموم الزراعية والمنزلية والصناعية، والتي تطرح العديد من الصعوبات في سياق تحليلها الكيميائي المنهجي (Baldwin and Marshall 1999; Yeoman 1985). وعلى الرغم من ندرة حالات التسمم الحاد الشديد بهذه العوامل في معظم الدول المتقدمة، إلا أنها لا تزال شائعة في العديد من مناطق العالم النامية. كما يحدث التسمم المزمن نتيجة للتعرض المهني أو البيئي للمعادن الثقيلة والمبيدات الحشرية في العديد من الدول، ويمكن أن يكون سبباً لاعتلال الصحة لدى كل من البالغين والأطفال. وتختلف علامات وأعراض التسمم الحاد عن تلك المرتبطة بالسمية المزمنة؛ إذ تخضع بعض المواد المعدنية (مثل الزرنيخ) والأنيونية (مثل السيانيد) لعمليات استقلاب واسعة النطاق بعد الابتلاع، مما يؤثر بشكل كبير على التحقيقات التحليلية المطبقة على المواد البيولوجية وتفسير نتائجها. لذا، من الضروري في الحالات الفردية معرفة ما إذا كان التسمم ناتجاً عن تعرض حاد، أو مزمن، أو حاد فوق مزمن، مع مراعاة أهمية توقيت جمع العينة بالنسبة للوقت المزعوم للابتلاع أو التعرض. إن النطاق الواسع للسموم المعدنية أو الأنيونية المحتمل تورطها في أي حالة تسمم مشتبه بها يستلزم عناية فائقة في جمع العينات المناسبة واختيار الاختبارات السمية وغيرها. ولا توجد طريقة منهجية بسيطة للتحقيق في الحالات التي يكون فيها التاريخ المرضي غير مؤكد وهوية السم مجهولة؛ حيث يتم التحقيق غالباً عبر عملية استبعاد للأسباب الأكثر احتمالاً للتسمم (مثل الأدوية الصيدلانية والمخدرات غير المشروعة)، يتبعها فحص دقيق للتاريخ المفصل للمريض أو المتوفى، لا سيما فيما يتعلق بأي وصول إلى مركبات مرتبطة بالاستخدام الصناعي والزراعي، أو منتجات منزلية محددة.

لقد شهدت التقنيات التحليلية لقياس المعادن في السوائل البيولوجية تطورات كبيرة منذ أوائل الثمانينيات، لا سيما في مطيافية الامتصاص الذري الكهروحراري (ETAAS) (Halls 1984; Slavin 1988) ومطيافية الكتلة للبلازما المقترنة حثياً (ICP-MS)، (Hsiung et al. 1997). وقد توسع استخدام تقنية ICP-MS بسرعة خلال السنوات الخمس الماضية، وأصبحت الآن التقنية المفضلة للتحليل الحساس متعدد العناصر، خاصة في التحقيق في حالات الاشتباه بالتسمم بـ "المعادن الثقيلة" أو السموم غير العضوية الأقل شيوعاً. وعند التحقيق في التعرض المزمن للمعادن السامة، يجب توخي الحذر الشديد للتحكم في دقة وإحكام التحاليل البيولوجية، وهو ما يتطلب سهولة الوصول إلى إمدادات موثوقة من مواد مراقبة الجودة الداخلية والمشاركة المنتظمة في برامج ضمان الجودة الخارجية. ورغم أن هذه الموارد قد لا تتوفر غالباً في الدول النامية، إلا أنه يمكن تحقيق الكثير بتكلفة منخفضة نسبياً من خلال التعاون بين المختبرات (Braithwaite and Girling 1988; Halls 1984). أما تطوير التقنيات التحليلية للأنيونات في السوائل البيولوجية فقد كان محدوداً تاريخياً، إلا أن زيادة توفر تقنيات مطيافية الكتلة بالكروماتوغرافيا السائلة (LC-MS) قد أدت إلى تحسن كبير في هذا المجال، مع بقاء عدد من الطرق

البسيطة لقياس سموم مختارة ذات دور فاعل في الحالات التي يكون فيها الوصول إلى معدات أكثر تطوراً مقيداً (Flanagan et al. 1995).

جمع العينات وتحليلها Specimen collection and analysis

في حالات الاشتباه بالتسمم التي تُنقل إلى المستشفى، يجب أخذ عينات من الدم، وكذلك من البول حيثما أمكن. يجب وضع ملصقات دقيقة على هذه العينات (الاسم الكامل للمريض، رقم الدخول، وتاريخ ووقت الجمع) وحفظها في ثلاجة (درجة حرارة 4 مئوية) في انتظار نقلها إلى المختبر. عند وصول عينات الدم إلى المختبر وعدم الحاجة لإجراء التحاليل فوراً، من المفيد فصل البلازما أو المصل عن خلايا الدم الحمراء قبل التجميد العميق؛ ومع ذلك، بالنسبة للسموم التي لها توزيع كبير في خلايا الدم الحمراء (مثل الرصاص، والكادميوم، والزئبق، والسيانيد)، فمن الضروري الاحتفاظ بعينات من الدم الكامل المانع للتجلط. وفي فحوصات ما بعد الوفاة (تشريح الجثث)، من المهم إجراء عملية جمع عينات أكثر منهجية، مع ضرورة توخي الحذر الشديد في اختيار مواقع أخذ العينات، وطريقة الجمع، واستخدام حاويات العينات المناسبة. وفي حال وقوع حادث صناعي، قد يكون من الممكن الوصول إلى "بقايا موقع الحادث" أو المواد المستخدمة في عملية كيميائية، حيث يمكن أن يوفر تحليل هذه المواد أدلة لا تقدر بثمن عند جهل الطبيعة الدقيقة للعامل الكيميائي؛ ومع ذلك، يُنصح بتغليف هذه المواد بشكل منفصل عن أي عينات بيولوجية قبل نقلها إلى المختبر لتجنب خطر التلوث.

محتويات المعدة Stomach contents

أصبحت عينات القيء، وشفاط المعدة، وسوائل الغسيل نادرة التوفر في حالات التسمم الحاد التي تُنقل للمستشفى؛ إذ تم استبدال إجراءات غسيل المعدة (باستثناء حالات نادرة) بإعطاء الفحم المنشط عن طريق الفم في معظم الدول المتقدمة. أما في الحالات المميتة، فيمكن إزالة المعدة بالكامل ومحتوياتها بعد الوفاة لإجراء فحص مفصل. عند التعامل مع الفحص الأولي لمحتويات المعدة أو القيء، من المفيد ملاحظة أي رائحة غير عادية، أو لون، أو أي مظهر آخر، مثل وجود دم طازج أو متغير (يشبه تفل القهوة). يجب توخي الحذر الشديد عند التعامل مع الحالات التي تنطوي على الابتلاع الفموي لأملاح السيانيد أو الفوسفيدات، حيث قد تشكل محتويات المعدة خطراً جسيماً واحتمالية لحدوث تسمم ثانوي (يجب استخدام خزانة طرد الغازات أو كابينة أمان في هذه الظروف). يجب تسجيل الحجم الكلي لمحتويات المعدة، ومن ثم تجانسها في خلاط للسماح بأخذ عينتين أو ثلاث عينات فرعية تمثيلية للتحليل النوعي والكمي. يمكن ترشيح العينات المتجانسة مباشرة باستخدام ورق ترشيح خشن المسام أو تخفيفها بالماء المقطر، كما يمكن استخدام المادة الطافية الصافية أو عينة تمثيلية من محتويات المعدة المتجانسة للتحليل. يُذكر أن التحليل الكمي لمحتويات المعدة لا يكون ذا أهمية عموماً إلا في القضايا القانونية الطبية، حيث قد توفر كمية السم الكيميائي الموجود في محتويات المعدة أدلة جنائية مفيدة.

الدم Blood

يجب جمع عينة دم وريدي (10 مل) في جميع حالات الاشتباه بالتسمم؛ وبالنسبة للمعادن والأنيونات، مثل السيانيد، تُعد حاوية "إيثيلين ثنائي أمين رباعي حمض الخليك والبوتاسيوم" (K-EDTA) هي الأنسب. تتوفر مجموعة واسعة من أنابيب جمع الدم تجارياً، ولكن لتجنب احتمالية التلوث، يوصى بشدة باستخدام المنتجات المعتمدة بأنها مناسبة لتحاليل العناصر النزرة (trace-element)، لا سيما عند التعامل مع التعرض البيئي أو دون السريري لعوامل مثل الرصاص والكادميوم. كما يجب عدم استخدام أنابيب جمع الدم التي تحتوي على حواجز فصل هلامية (gel separation barriers). وكبديل لذلك، يمكن للمختبر شراء دفعات كبيرة نسبياً من أنابيب جمع الدم القياسية (تحمل جميعها نفس رقم الدفعة)، واختبار بضع أنابيب منها بعناية

لضمان خلوها من تلوث المعادن ذات الأهمية السريرية (مثل الرصاص والكادميوم والألومنيوم). وعند استلام عينات دم في المختبر داخل حاوية غير معتادة، قد يكون من المفيد طلب حاوية "فارغة" (blank) لتحليلها والتأكد من عدم وجود أي مادة ملوثة بها.

من المهم أيضاً التأكد من استخدام حاويات عينات دم موثوقة لفحوصات ما بعد الوفاة؛ إذ يمكن تزويد أخصائي علم الأمراض بهذه الحاويات قبل أي فحص كجزء من مجموعة أدوات جمع العينات القياسية. ويوصى بأنه في أي فحص بعد الوفاة، يجب سحب الدم من موقع تشريحي محدد (يفضل الوريد الفخذي) للتحليل الكمي، نظراً لاحتمالية حدوث انتشار أو إعادة توزيع كبير للسموم بعد الموت ، بينما قد تكون المواقع الأخرى (مثل القلب) مفيدة لأغراض "الفحص" النوعي. يجب ألا يُؤخذ الدم أبداً من تجويف الجسم في نهاية فحص ما بعد الوفاة؛ فالمشكلة الرئيسية تكمن في أن عينات الدم المأخوذة من مواقع مختلفة (مثل الفخذي، وتحت الترقوة، والأبهر) خلال الفحص تُظهر تركيزات مختلفة. ففي حالات الوفاة السريعة، حيث قد توجد كميات كبيرة من السم غير الممتص في المعدة أو مستنشقة في الرئتين، يمكن أن تتعرض هذه السموم لانتشار كبير بعد الوفاة، مما يؤدي إلى تركيزات عالية جداً في الأوعية الدموية المجاورة.

البول Urine

يجب جمع عينة مبكرة من البول (20 مل في حاوية عادية من نوع Sterilin دون إضافة مواد حافظة)، مع الحرص على ضمان عدم تلوث العينة أثناء عملية الجمع. وإذا كان المرضى يخضعون لعلاج بالاستخلاب (chelation therapy)، فقد يكون من المفيد جمع عينات بول متتابعة لمدة 24 ساعة في حاويات بول بلاستيكية مغسولة بالحمض. يجب تسجيل الحجم الكلي للبول بعناية قبل أخذ عينات فرعية للتحليل لتحديد إفراز العناصر المستخلبة وفعالية العلاج.

عينات أخرى Other specimens

استُخدم تحليل الشعر للعناصر النزرة غالباً لأغراض تشخيصية في الحالات التي يشتكي فيها الفرد من أعراض لا يمكن العثور على سبب لها من خلال الفحوصات الطبية أو المرضية الروتينية. ومع ذلك، تُظهر الخبرات والدراسات المنشورة أن النتائج قد تكون مضللة أحياناً (Poon et al. 2004; Seidel et al. 2001; Taylor 1986). يمتلك تحليل الشعر تطبيقاً أوسع في مسوحات التعرض السكاني والتحقيقات في الوفيات المشبوهة، مثل تلك التي تنطوي على الزرنيخ أو الزئبق. إن البقاء الطويل للمعادن والعديد من السموم الكيميائية الأخرى في عينات الشعر والأظافر مقارنة بقصر مدة بقائها نسبياً في عينات الدم أو البول يمكن أن يمثل ميزة كبيرة في القضايا الجنائية (Daniel et al. 2004). كما أن تحليل مقاطع الشعر والأظافر قد يوفر أحياناً سجلاً جنائياً زمنياً مهماً يوضح توقيت إعطاء الجرعات.

أحياناً قد تُجمع عينات مثل الأنسجة والعظام أثناء فحص ما بعد الوفاة كجزء من التحقيق في القضايا القانونية الطبية المعقدة (Benes et al. 2000; Lechand Trela 2005; Warren et al. 2002). وكما هو الحال مع عينات الدم، يلزم توخي عناية فائقة في اختيار موقع الجمع وتجنب التلوث. بالإضافة إلى ذلك، قد يكون تفسير النتائج صعباً للغاية دون الوصول إلى عينات مرجعية قابلة للمقارنة.

ضمان الجودة Quality assurance

يُعد الوصول إلى مواد تحكم "داخلية" مناسبة أو مواد مرجعية أخرى أمراً بالغ الأهمية لتحليل المعادن النزرة. وتتوفر تجارياً مجموعة واسعة من المواد المرجعية المعتمدة، بما في ذلك الدم والمصل والبول والعظام. وفي الحالات التي يتعذر فيها الحصول على هذه المواد بسهولة، يتمثل البديل غير المكلف في تحضير مثل هذه المواد من دم الأبقار، أو أي حيوان كبير

مناسب، وذلك من خلال جهد تعاوني بين المختبرات ذات الخبرة (Braithwaite and Girling 1988). يستلزم ذلك تحضير دفعات كبيرة من العينات ذات تركيزات محددة من المعادن النزرة، على سبيل المثال: مستويات طبيعية، ومستويات حدية سامة، ومستويات سامة، حيث يمكن بعد ذلك تحليلها بشكل متكرر من قبل المختبرات بحيث يمكن استخدام النتائج المجمعة لتعيين نطاقات التركيز. وبنفس القدر من الأهمية، يجب على المختبرات الاشتراك في برامج ضمان الجودة الخارجية الوطنية أو الدولية حيثما توفرت.

المعادن Metals

طرق التحليل Methods of analysis

تتوفر للمختبرات مجموعة واسعة من التقنيات لتحليل المعادن (الجدول 1)، وهي موضحة في الفصل السابق. كما يمكن أن تكون بعض الاختبارات النوعية والكمية البسيطة (مثل اختباري "جوتزايت" Gutzeit و"رينش" Reinsch) مفيدة، خاصة في الحالات التي تكون فيها موارد المختبر محدودة للغاية (Flanagan et al. 1995).

الجدول 1: الطرق الشائعة لتحليل العناصر النزرة في السوائل والأنسجة البيولوجية

- قياس الألوان (Colorimetric)
- قياس الفلورة (Fluorimetric)
- التحليل الكهروكيميائي (قياس الفولتية التجريدي الأنودي والأقطاب الانتقائية للأيونات)
- مطيافية الامتصاص الذري باللهب (Flame atomic absorption spectrometry)
- مطيافية الامتصاص الذري الكهروحراري (Electrothermal atomic absorption spectrometry)
- مطيافية الانبعاث بالبلازما المقترنة حثياً (Inductively coupled plasma–emission spectrometry)
- مطيافية الكتلة بالبلازما المقترنة حثياً (Inductively coupled plasma–mass spectrometry)



الألومنيوم Aluminium

يُعد الألومنيوم أكثر العناصر غير الأساسية وفرة في القشرة الأرضية، ولكن دوره في صحة الإنسان وأمراضه لم يُفهم إلا مؤخراً (Krewski et al. 2007; Martin 1986). يبلغ المدخول الطبيعي من الألومنيوم عبر الغذاء والماء والمشروبات حوالي 2–3 مجم يومياً، ولكن امتصاصه من الأمعاء ضعيف نسبياً ويعتمد على نوع تخصص العنصر (speciation) ووجود مواد أخرى (مثل الفوسفات والسترات) في النظام الغذائي (Klein 2005). يُعتبر الألومنيوم سماً عصبياً قوياً، وقد ثبت جيداً أن التعرض الوريدي المفرط لدى المرضى الذين يخضعون لغسيل الكلى يؤدي إلى تراكمه بشكل كبير في الجسم، لا سيما في الدماغ، مما قد يسبب "خرف غسيل الكلى"، وهو نوع من اعتلال الدماغ الذي قد يتطور بسرعة ويؤدي إلى الوفاة في غضون بضعة أشهر (Alfrey et al. 1976). ويُعد استخدام كبريتات الألومنيوم كعامل تندف (flocculating agent) في إمدادات المياه المنزلية المصدر الرئيسي لهذا المعدن لدى هؤلاء المرضى، خاصة إذا لم تكن المياه المستخدمة في غسيل الكلى معالجة (منقية). كما أن الكميات الكبيرة من أملاح الألومنيوم الفموية التي قد تُعطى لبعض مرضى الكلى لتقليل امتصاص الفوسفات المعوي قد تسبب السمية أيضاً. علاوة على ذلك، قد يكون الألومنيوم عامل خطر مشتبهاً به في مرض الزهايمر (Flaten 2001; Miu and Benga 2006). وفي الآونة الأخيرة، تزايد القلق بشأن الآثار الضارة للتعرض المهني للألومنيوم (Akila et al. 1999; Iregren et al. 2001; Meyer-Baron et al. 2007; Polizzi et al. 2002; Rifat et al. 1990). كما تم تسليط الضوء على الآثار الضارة المحتملة للألومنيوم الموجود في تركيبات حليب الرضع (Freundlich et al. 1985; Sedman et al. 1985).

جمع العينات Specimen collection

يتم جمع العينات كما يلي:

- **الدم/المصل/البلازما:** 5 مل، في أنبوب عادي أو أنبوب يحتوي على الليثيوم-هيبارين.
- **الماء:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة (universal container).
- **سائل غسيل الكلى:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة.
- **البول:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة.

من المهم التحقق من أن جميع حاويات العينات "خالية من الألومنيوم" (aluminium free). ويجب عدم استخدام الحاويات الزجاجية مطلقاً لجمع العينات المخصصة لتحليل الألومنيوم.

التحليل Analysis

يتطلب الأمر يقظة مستمرة لتجنب تلوث العينات والكواشف والأنابيب والمعدات بالألومنيوم الموجود في الغبار داخل المختبرات. يجب استخدام الأوعية الزجاجية المنظفة فقط لتحضير محاليل المخزون المركزة لأملاح الألومنيوم، كما يلزم توخي عناية فائقة لتجنب التلوث عند فصل البلازما أو المصل عن عينات الدم. وتعد ظروف تخزين العينات أمراً بالغ الأهمية (Wilhelm and Ohnesorge 1990). يُقاس الألومنيوم عادةً في البلازما باستخدام تقنية "مطيافية الامتصاص الذري الكهروحراري" (ETAAS) مع تصحيح الخلفية، ويُعد استخدام معايير معايرة ومواد تحكم مطابقة للمصفوفة (matrix-matched) أمراً أساسياً (Taylor et al. 1994). وقد وُصفت طرق أخرى تعتمد على قياس الألوان والفلورة، لكنها أكثر ملاءمة لتحليل المياه. وفي الآونة الأخيرة، تزايد استخدام تقنيات "مطيافية الانبعاث بالبلازما المقترنة حثياً" (ICP-AES) و"مطيافية الكتلة بالبلازما المقترنة حثياً" (ICP-MS) لقياس الألومنيوم في البلازما، والمياه، وسوائل غسيل الكلى، أو غيرها من المصفوفات المعقدة (Murko et al. 2007; Zhang et al. 2000, 2002).

الجدول 2: التراكيز الموصى بها للألومنيوم في الماء وسوائل غسيل الكلى

المحلول	التركيز
الحد الأقصى المسموح به (MAC) لمياه الشرب	200ميكروجرام/لتر (7.4 ميكرومول/لتر)
التركيز الاسترشادي لمياه الشرب	50ميكروجرام/لتر (1.9 ميكرومول/لتر)
الحد الأقصى المسموح به (MAC) للماء المستخدم في تحضير سائل غسيل الكلى	10ميكروجرام/لتر (0.4 ميكرومول/لتر)
الحد الأعلى الموصى به لسائل غسيل الكلى	30ميكروجرام/لتر (1.1 ميكرومول/لتر)

التفسير Interpretation

تظهر القيم الاسترشادية (الأوروبية) الموصى بها لتراكيز الألومنيوم في المياه وسوائل غسيل الكلى في الجدول 2. بالنسبة لمرضى غسيل الكلى الذين يستخدمون نظام تنقية المياه (مثل التناضح العكسي)، من المهم مراقبة الألومنيوم في عينات المياه قبل وبعد التنقية لاكتشاف أي خلل في عملية التنقية قد يسمح بتلوث محلول الغسيل المستخدم لعلاج المريض (Berend et al. 2001).

يجب مراقبة تراكيز الألومنيوم في البلازما بشكل روتيني لدى جميع مرضى الفشل الكلوي في المرحلة النهائية الذين يتلقون علاج غسيل الكلى، لضمان إبقاء امتصاص الألومنيوم عند أدنى حد ممكن. بالإضافة إلى ذلك، يلزم إجراء فحص دوري للمياه الموردة للمرضى الذين يخضعون لغسيل الكلى المنزلي. وترد في الجدول 3 الإرشادات الأوروبية لتراكيز الألومنيوم في البلازما لدى المرضى الذين يتلقون علاج غسيل الكلى. يمكن تحديد عبء الألومنيوم في الجسم لدى مرضى غسيل الكلى من خلال قياس تركيز الألومنيوم في البلازما قبل وبعد إعطاء جرعة قياسية من عامل مخلب للألومنيوم مثل "ديسفيريوكسامين" (Chazan et al. 1989; Marumo et al. 1987).

في حالات وظائف الكلى الطبيعية، يُفرز الألومنيوم من الجسم بسرعة، ولا توجد إمكانية تذكر لتراكمه. تبلغ القيمة المرجعية لألومنيوم البول لدى البالغين الأصحاء غير المعرضين أقل من 15 ميكروجرام/لتر (0.5 ميكرومول/لتر). وفي حالات التعرض المهني أو البيئي الحاد أو المزمن للألومنيوم، يعد قياس ألومنيوم الدم (البلازما) و/أو البول وسيلة فعالة لتقييم درجة التعرض (Ljunggren et al. 1991; Pierre et al. 1995). وعندما يشمل التعرض المهني استنشاق جزيئات دقيقة أو غبار، قد يُخزن الألومنيوم في أنسجة الرئة ويتسرب ببطء شديد على مدى عدة أشهر؛ ونتيجة لذلك، يمكن أن تظل تراكيز الألومنيوم في البلازما والبول مرتفعة لعدة أسابيع أو أشهر (Ljunggren et al. 1991).

الجدول 3: حدود الإجراءات الموصى بها لتراكيز الألومنيوم في البلازما

الحالة	التركيز
طبيعي (لا يوجد تاريخ للفشل الكلوي المزمن)	<10 ميكروجرام/لتر (<0.4 ميكرومول/لتر)
المستويات المرغوبة في الفشل الكلوي المزمن	<60 ميكروجرام/لتر (<2.2 ميكرومول/لتر)
تراكم مفرط (مثير للقلق؛ خطر عالٍ للسمية لدى الأطفال)	>60 ميكروجرام/لتر (>2.2 ميكرومول/لتر)
إجراء عاجل مطلوب (خطر عالٍ للسمية لدى الجميع)	>100 ميكروجرام/لتر (>3.7 ميكرومول/لتر)
خطر شديد جداً	>200 ميكروجرام/لتر (>7.4 ميكرومول/لتر)

هناك أيضاً أدلة على وجود ارتباط يعتمد على الجرعة بين زيادة عبء الألومنيوم في الجسم والتأثيرات على الجهاز العصبي المركزي لدى هؤلاء العمال (Akila et al. 1999). وتُقترح عتبات لهذه التأثيرات لدى لحّامي الألومنيوم بـ 108–160

ميكروجرام/لتر (4–6 ميكرومول/لتر) في البول، و7–10 ميكروجرام/لتر (0.25–0.35 ميكرومول/لتر) في البلازما (Riihimaki et al. 2000). يتراكم الألومنيوم في عظام مرضى غسيل الكلى، ويمكن تحليل عينات خزعة العظام لتقدير عبء الجسم (Tang et al. 1996). وتتوفر بيانات واسعة حول محتوى الألومنيوم في عظام مرضى غسيل الكلى الذين يعانون من أمراض العظام المرتبطة بالألومنيوم؛ إذ تم الإبلاغ عن تراكيز ألومنيوم في العظام تصل إلى 300 مجم/كجم لدى هؤلاء المرضى، في حين أن التراكيز لدى المجموعات المرجعية غير المعرضة تكون منخفضة جداً (<13 مجم/كجم). وفي الآونة الأخيرة، أبلغ DeWolff et al. (2002) عن تراكيز الألومنيوم في الدم والأنسجة لدى أربعة مرضى توفوا نتيجة استخدام سوائل غسيل كلى ملوثة بالألومنيوم، مما أدى لاحقاً إلى ملاحقة جنائية لموظفي المستشفى المتورطين في الحادث (Berend et al. 2004). كما وقع حادث كيميائي كبير تضمن تلوث مياه الشرب العامة بالألومنيوم في شمال كورنوال بالمملكة المتحدة عام 1988؛ حيث تعرض حوالي 20,000 شخص لكميات مفرطة جداً من الألومنيوم خلال فترة زمنية قصيرة نسبياً. ورغم عدم وقوع وفيات أو سمية خطيرة ظاهرة، إلا أن العواقب طويلة المدى لهذا التعرض كانت غير مؤكدة؛ ومع ذلك، أظهر فحص ما بعد الوفاة أُجري مؤخراً لامرأة تعرضت للألومنيوم وطورت لاحقاً نوعاً نادراً من مرض الزهايمر، ارتفاعاً في تراكيز الألومنيوم في الدماغ (Exley and Esiri 2006).

الأنتيمون (Antimony)

للأملاح المختلفة للأنتيمون (مثل طرطير الأنتيمون، وطرطرات بوتاسيوم الأنتيمون) تاريخ طويل من الاستخدام الطبي (McCallum 1999)، ولا تزال تستخدم في علاج الأمراض الطفيلية الاستوائية مثل البلهارسيا (داء المنشقات) وداء الليشمانيات. تُستخدم مركبات الأنتيمون أيضاً صناعياً في تصنيع بطاريات الرصاص، وأشباه الموصلات، والدهانات، والسيراميك، والأواني المعدنية (البيوتر). وتشمل المركبات الصناعية الحديثة الأخرى أوكسي كلوريد الأنتيمون ($Sb_6O_6Cl_4$)، الذي يستخدم على نطاق واسع كمثبط للهب في الأقمشة والمراتب. في عام 1994، افترض ريتشاردسون (Richardson) أن تكوّن هيدريد الأنتيمون (الستيبين، SbH_3) قد يكون سبباً لمتلازمة موت الرضع المفاجئ (SIDS) لدى الأطفال الذين ينامون على مراتب مغطاة بكلوريد البوليفينيل (PVC) والمصنعة باستخدام مثبطات لهب قائمة على الأنتيمون. وقد زُعم أن نمو الفطريات (*Scopulariopsis brevicaulis*) على المراتب القديمة والمتسخة يقوم بتحويل مثبط لهب الأنتيمون إلى غاز الستيبين، الذي يستنشقه الأطفال ويؤدي إلى وفاتهم بشكل غير متوقع. وقد تم دحض هذه الفرضية لاحقاً من خلال تحقيق حكومي أثبت أن هذه الفرضية كانت قائمة على عمل تجريبي خاطئ (Cullen et al. 2000; Delves et al. 1997; Warnock et al. 1995).

تبلغ الجرعة المميتة من الأنتيمون في صورة طرطير الأنتيمون حوالي 1 جم للبالغين، ولكن هناك تباين كبير بين الأفراد. تشمل علامات وأعراض التسمم الحاد بالأنتيمون طعماً معدنياً، وعسر البلع، وألماً شرسوفياً، وقيئاً عنيفاً، وإسهالاً، وألماً في البطن، وانهياراً في الدورة الدموية (Stemmer 1976). هذه الأعراض لا يمكن تمييزها تقريباً عن أعراض التسمم الحاد بالزرنيخ، ولكن يلزم حدوث جرعات أكبر. وبالمثل، فإن آثار التعرض لغاز الستيبين تشبه آثار غاز الأرسين (AsH_3). أما الآثار المزمنة للتعرض المهني للأنتيمون فتشمل "بقع الأنتيمون" على الجلد وداء التغبر الرئوي (Stemmer 1976).

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 10 مل، في أنبوب K-EDTA.
- **البول:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة.

التحليل

وُصفت عدة طرق لقياس الأنتيمون في السوائل البيولوجية، بما في ذلك استخدام تقنية توليد الهيدريد وامتصاص الذرة الكهروحراري (ETAAS). كما طُبقت مطيافية الكتلة بالبلازما المقترنة حثياً (ICP-MS) لتحليل مجموعة واسعة من السوائل والأنسجة، خاصة تلك المأخوذة من الرضع وصغار الأطفال (Delves et al. 1997; Dezateux et al. 1997; Miekeley et al. 2002).

التفسير

القيم المرجعية للأنتيمون في سوائل الجسم وأنسجته أقل من 1 ميكروجرام/لتر (8 نانومول/لتر). وفي دراسة أجراها سميث (Smith et al. 1995) حول تحليل تراكيز الأنتيمون في بول عمال البطاريات المعرضين مهنياً، تم الإبلاغ عن قيم تصل إلى 150 ميكروجرام/لتر (1.2 ميكرومول/لتر). أما مريض الإيدز الذي تلقى بالخطأ 10 أضعاف الجرعة الموصوفة من ستيبوجلوكونات الصوديوم لعلاج داء الليشمانيات الحشوي (6.5 جم بدلاً من 650 مجم) ونجا، فقد كان تركيز الأنتيمون في دمه 1.38 ميكروجرام/لتر بعد 20 ساعة من إعطاء الجرعة (Reymond and Desmeules 1998). وبالنسبة لمريضة توفيت بعد 48 ساعة من ابتلاع محلول ثلاثي كلوريد الأنتيمون، فقد بلغت تراكيزه في الأنسجة: 4.6 ميكروجرام/لتر (دم)، 6 مجم/كجم (دماغ)، 6 مجم/كجم (رئة)، 45 مجم/كجم (كبد)، 404 مجم/كجم (مرارة)، و32 مجم/كجم (كلى) (Baselt 2005).

الزرنيخ (Arsenic)

يتوزع الزرنيخ على نطاق واسع في البيئة، لا سيما في الصخور والرواسب وبعض إمدادات المياه. وله عدد من مركبات الزرنيخ غير العضوية تاريخ استخدام طويل كأدوية وسموم. في القرن الثامن عشر، استُخدم محلول فاولر (1% وزن/حجم من زرنيت البوتاسيوم) كـ "علاج شامل" وظل قيد الاستخدام حتى القرن العشرين. تم تصنيع آلاف المركبات العضوية التي تحتوي على الزرنيخ في أواخر القرن التاسع عشر وأوائل القرن العشرين لاستخدامها كأصباغ (مثل الأخضر الزمردي أو أخضر باريس، أسيتو-زرنيت النحاس)، وعوامل كيميائية حربية (لويسيت، كلورو فينيل ثنائي كلورو أرسين)، ومستحضرات صيدلانية (سالفارسان، أرسفينامين؛ Gorby 1994). كان ثلاثي أكسيد الزرنيخ (الزرنيخ الأبيض أو سكر الزرنيخ) شائعاً بشكل خاص كسم للقتل حتى أواخر القرن التاسع عشر، لكن استخدامه تراجع بعد تطوير تقنيات حساسة للكشف عنه في سوائل الجسم والأنسجة مثل اختبارات مارش، ورينش، وجوتزايت (Rosenfeld 1985). في معظم الدول، نادراً ما تُصادف مركبات الزرنيخ الآن في حالات الاشتباه بالقتل أو الانتحار، لكنها لم تختفِ تماماً من الاستخدام (Duenas-Laita et al. 2005; Gorby 1988; Lech and Trela 2005; Mackell et al. 1985; Poklis and Saady 1990). وقد ثبت أنه من المفيد إجراء فحص للكشف عن وجود الزرنيخ وغيره من السموم غير العضوية عندما تكون هناك علامات وأعراض لمرض معدٍ معوي غير مبرر في حالات الوفاة غير المفسرة أو المشبوهة.

توجد الأشكال العضوية للزرنيخ (مثل سكريات الزرنيخ، وأرسينوبيتين، وأرسينوكولين) بشكل طبيعي في الأعشاب البحرية والأسماك والمحار، ولكنها غير سامة نسبياً (Francesconi et al. 2002; Le et al. 1994). يتم استقلاب الزرنيخ في الكبد إلى مركبات أحادية وثنائية الميثيل كوسيلة لإزالة السمية، ولكن الإنزيمات والمسارات المختلفة المشاركة في هذه العملية لا تزال غير مفهومة تماماً (Aposhian and Aposhian 2006). تختلف الأشكال المختلفة للزرنيخ اختلافاً كبيراً في سميتها على الإنسان، كما يتعامل الجسم معها بطرق متباينة، مما يسبب مشاكل في تحديدها وتفسير النتائج المخبرية، خاصة

عندما يكون مصدر الزرنيخ غير معروف (Aposhian and Aposhian 2006; Buchet et al. 1981; Johnson and Farmer 1991; Lovell and Farmer 1985; Pott et al. 2001; Vahter 1994).

للزرنيخ ثلاث حالات تكافؤ أو حالات أكسدة شائعة: 0 (شبه فلز)، 3+ (أرسينيت)، و5+ (أرسينات). تُعد الأملاح غير العضوية ثلاثية التكافؤ للزرنيخ (مثل أرسينيت الصوديوم؛ $NaAsO_2$) هي الأكثر سمية، وقد تسبب سمية خطيرة أو الوفاة بعد الابتلاع الحاد لجرعات صغيرة نسبياً (<200 مجم). قد يؤدي استنشاق غاز الأرسين (AsH_3) إلى انحلال دم هائل، وفشل كلوي وفشل في أعضاء أخرى، ووفاة سريعة، كما يحدث في الحوادث الصناعية (Pakulska and Czerczak 2006). في مثل هذه الحالات، يبدو أن تبديل البلازما هو الطريقة الوحيدة الفعالة للعلاج، ولكن يجب تطبيقها في أسرع وقت ممكن (Song et al. 2007). إن علامات وأعراض التسمم المزمن بالزرنيخ معقدة للغاية، وتؤثر على أنظمة أعضاء مختلفة (الجدول 4)، وتختلف عن تلك المرتبطة بالتسمم الحاد التي تتمثل في التهاب المعدة والأمعاء، والإسهال الدموي، والقيء، والألم البطني الشديد، وانهيار الدورة الدموية، والغيبوبة (Fowler and Weissberg 1974). بالإضافة إلى ذلك، قد لا تُلاحظ بعض العلامات الجلدية المبكرة، مثل التصبغ الميلانيني (Saha 2003). ويُعد سرطان الجلد والكبد والجهاز التنفسي ميزة رئيسية أخرى للتعرض المزمن للزرنيخ؛ حيث تتأثر شعوب ضخمة في أجزاء من الهند وبنغلاديش وفيتنام بسبب استهلاك مياه الآبار الملوثة (Ahsan et al. 2000; Berg et al. 2001; Chowdhury et al. 2000; Piamphongsant 1999; Smith et al. 2000; Yoshida et al. 2004). وتتمثل المصادر الرئيسية للمشكلة في الآبار المحفورة في أراضٍ تحتوي على صخور ذات محتوى عالٍ من أملاح الزرنيخ، مما يؤدي إلى تلوث المياه الجوفية، على الرغم من أن الآلية الدقيقة لتحرر الزرنيخ في الماء لا تزال غير مفهومة تماماً.

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 10 مل، في أنبوب K-EDTA.
- **البول:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة.

الجدول 4: علامات وأعراض التسمم المزمن بالزرنيخ (أكسيد الزرنيخ)

العلامة / العرض	الوصف
فقدان الشهية	Anorexia
فقدان الوزن	Weight loss
الوعكة الصحية	Malaise
فرط تصبغ الجلد	تصبغ ميلانيني منتشر أو بقعي
فرط التقرن	Hyperkeratosis
خطوط "مي(Mee's) "	خطوط بيضاء عرضية على الأظافر
اعتلال الأعصاب المحيطية	Peripheral neuropathy
تلف الكبد	Liver damage
تغيرات دمويّة	قلة الكريات الشاملة(Pancytopenia)
ارتفاع ضغط الدم	Hypertension
الغرغرينا الإقفارية	القدم السوداء(Black foot)
زيادة خطر الإصابة بالسرطان	الجلد، الكبد، الرئة

التحليل

يمكن للاختبارات البسيطة، مثل اختبار "رينش" (Reinsch)، تحديد وجود الزرنيخ في محتويات المعدة، أو نواتج هضم الأنسجة، أو "بقايا موقع الحادث". كما يمكن تطبيق اختبار "جوتزايت" (Gutzeit) للتحليل الكمي للزرنيخ في محتويات المعدة والمياه والغذاء والمواد الأخرى (Crawford and Tavares 1974; Kneip et al. 1977). وتعد هذه التقنية محددة نسبياً لأنها تعتمد على تحويل الزرنيخ إلى غاز الأرسين. وقد وُصفت طرق طيفية ضوئية بسيطة أخرى لقياس الزرنيخ في السوائل البيولوجية ومواد أخرى مثل الماء (Lakso et al. 1979; Pillai et al. 2000). ومع ذلك، فإن النهج الحديث الأكثر شيوعاً يتضمن توليد الهيدريد بعد الهضم الحمضي، يليه مطيافية الامتصاص الذري الكهروحراري (ETAAS)، والتي يمكن تطبيقها لقياس الزرنيخ في مجموعة متنوعة من المصفوفات.

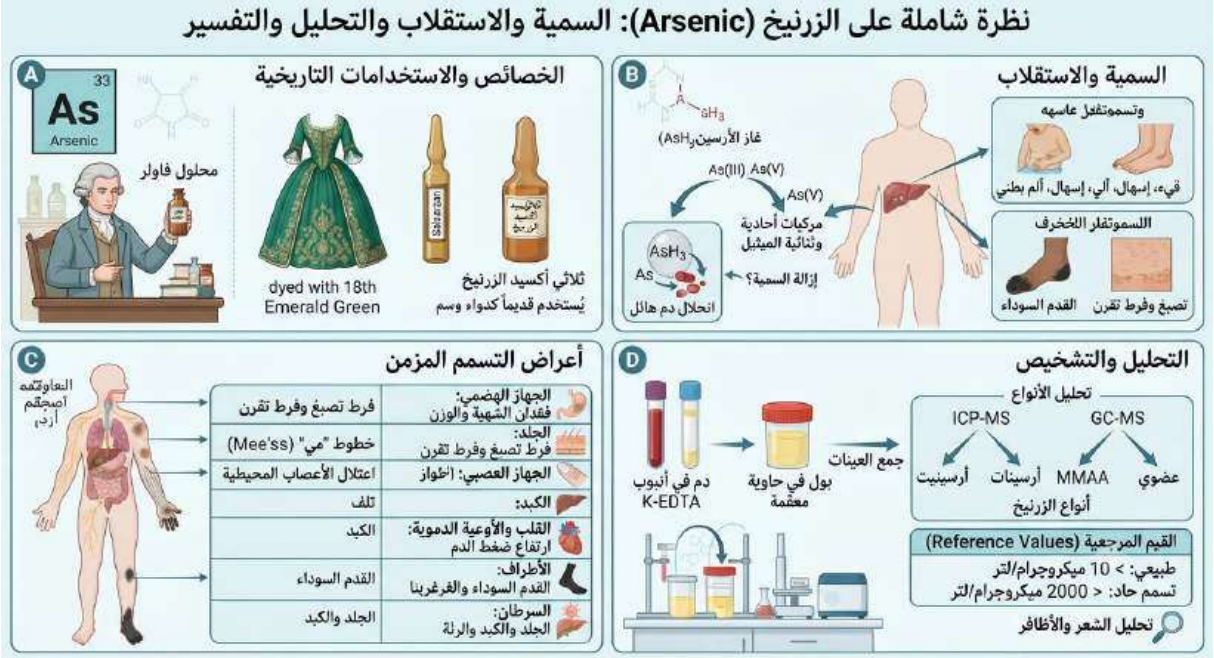
يعد تحليل الزرنيخ في البول أمراً ينطوي على تحديات نظراً لوجود العديد من الأنواع غير العضوية والعضوية المختلفة (Feldman 1991) (الجدول 5). وتتمثل المشكلة الرئيسية في إزالة المصادر الغذائية لمركبات الزرنيخ العضوية، خاصة تلك الناتجة عن تناول الأسماك أو المحار مؤخراً. يبلغ حد الكشف عن هذا الإجراء 5 ميكروجرام/لتر (67 نانومول/لتر) من الزرنيخ. وتشمل التقنيات الأكثر تطوراً استخدام مطيافية الكتلة بالبلازما المقترنة حثياً (ICP-MS)، أو فصل وقياس أنواع الزرنيخ الفردية باستخدام الكروماتوغرافيا الغازية المرتبطة بمطياف الكتلة (Claussen 1997) (GC-MS)، أو الكروماتوغرافيا التبادلية الأيونية المرتبطة بـ ICP-MS (Brima et al. 2006; Hughes 2006; Lindberg et al. 2007; Milstein et al. 2003). ومع ذلك، قد يكون فصل أنواع الزرنيخ المختلفة مستهلكاً للوقت في التحقيق في حالات التسمم الحاد أو المزمن بالزرنيخ، رغم توفر مواد مرجعية لتحليل البول (Yoshinaga et al. 2000).

الجدول 5: قياس أنواع الزرنيخ في السوائل البيولوجية

التسلسل	أنواع الزرنيخ	المجموعة
1	أرسينيت(As^{3+})	أنواع الزرنيخ غير العضوية
2	أرسينات(As^{5+})	
3	حمض ميثيل الأرسونيك(MMAA)	نواتج استقلاب الزرنيخ الممثيلة
4	حمض ثنائي ميثيل الأرسينيكDMAA ؛ حمض الكاكوديلك	
5	مركبات عضوية معقدة للزرنيخ (مثل أرسينوبيتين، أرسينوكولين)	أنواع عضوية غذائية (مثل الأسماك)

التفسير

تبلغ القيم الطبيعية للزرنيخ أقل من 10 ميكروجرام/لتر (0.1 ميكرومول/لتر) في الدم والبول. ويمكن الحصول على قيم مرتفعة اعتماداً على نوع المنهجية المتبعة، وتناول المأكولات البحرية قبل جمع العينات، أو التعرض المهني (Apostoli et al. 1999). يبلغ "مؤشر التعرض البيولوجي" (BEI) الحالي للزرنيخ وفقاً للمؤتمر الأمريكي لخبراء الصحة الصناعية الحكوميين (ACGHI) (في نهاية أسبوع العمل) 50 ميكروجرام/جم كرياتينين (كزرنيخ غير عضوي أو نواتج استقلابه؛ لاحظ أنه تم التخلي مؤخراً عن تصحيح الكرياتينين لأن الزرنيخ يُفرز عن طريق الانتشار). يلزم توخي عناية خاصة عند تفسير النتائج في حالات التعرض المهني أو البيئي المزمن. ومع ذلك، في حالات التسمم الحاد والأعراضي بالزرنيخ غير العضوي، قد تظهر تراكيز تزيد عن 2000 ميكروجرام/لتر (28 ميكرومول/لتر) في الدم والبول (Duenas-Laita et al. 2005; Lech and Trela 2005). كما استُخدم تحليل الشعر والأظافر في تشخيص وتقييم التسمم المزمن بالزرنيخ، لا سيما في حالات الاشتباه بالقتل (Poklis and Saady 1990). ومع ذلك، قد تكون هناك مشاكل في التمييز بين التلوث الخارجي والزرنيخ المبتلع (Hindmarsh 2002).



الباريوم (Barium)

تُستخدم المركبات غير العضوية للباريوم على نطاق واسع كتدفقات للحام (fluxes)، وأصباغ، وطلاءات في الصناعة، وفي تصنيع الطلاء والزجاج والمتفجرات والسيراميك. تُستخدم الأملاح القابلة للذوبان كمبيدات حشرية وعوامل مزيلة للشعر. ويُستخدم ملح الكبريتات غير القابل للذوبان على نطاق واسع كعامل تباين تصويري. معظم أملاح الباريوم (غير القابلة للذوبان) غير سامة نسبياً، ومع ذلك، فقد تم التعرف على داء التغبر الرئوي المرتبط باستنشاق غبار الباريوم (داء الباريتا) في صناعة التعدين. في المقابل، فإن أملاح الباريوم القابلة للذوبان، وخاصة الأسيتات والهيدروكسيد والكلوريد، شديدة السمية إذا ابتلعت عن طريق الفم أو أُعطيت وريدياً. ويمكن تحويل الأملاح الأقل ذوباناً، مثل الكربونات، إلى كلوريد عند درجة حموضة منخفضة في المعدة. ترتبط السمية بابتلاع ما لا يقل عن 200 مجم من أملاح الباريوم القابلة للذوبان، وقد تكون الجرعة المميتة عن طريق الفم من الأملاح القابلة للذوبان منخفضة لتصل إلى 800 مجم (Boehnert 1988; Deng et al. 1991). قد تظهر علامات وأعراض التسمم بالباريوم في غضون ساعة واحدة من الابتلاع، وتشمل ألم البطن، والإسهال، والقيء، والضعف العضلي، وتنملاً حول الفم (Johnson and VanTassell 1991; Schorn et al. 1991). قد يتطور أيضاً نقص بوتاسيوم الدم الحاد نتيجة لانتقال البوتاسيوم خارج الخلية إلى داخل العضلات، مما قد يسبب اضطرابات في إيقاع القلب، وهو ما يتطلب مراقبة دقيقة وإعطاء جرعات كبيرة من كلوريد البوتاسيوم وريدياً لتصحيح نقص بوتاسيوم الدم. وقد استُخدم غسيل الكلى (Haemodialysis) بنجاح في علاج التسمم بالباريوم (Bahlmann et al. 2005).

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 5 مل، في أنبوب K-EDTA.
- **البول:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة. *ملاحظة:* قد تكون بعض أنابيب جمع الدم المحتوية على هلام (gel) ملوثة بالباريوم.

التحليل

يمكن قياس الباريوم في البلازما والبول ونواتج هضم الأنسجة باستخدام مطيافية الامتصاص الذري الكهروحراري (ETAAS) أو مطيافية الكتلة بالبلازما المقترنة حثياً (ICP-MS) (De Boer et al. 2004; Dinya et al. 2005).

التفسير

تبلغ التراكيز المرجعية للباريوم في البلازما أقل من 1 ميكروجرام/لتر (<7 نانومول/لتر)، ويكون إفرازه في البول أقل من 10 ميكروجرام/24 ساعة (<0.70 ميكرومول/24 ساعة). في حالات التسمم غير المميت بالباريوم، تم الإبلاغ عن تراكيز باريوم في البلازما تصل إلى 8 ميكروجرام/لتر (58 ميكرومول/لتر) (Boehnert et al. 1985). تشمل التحقيقات المفيدة الأخرى في حالات التسمم الحاد بالباريوم التصوير الشعاعي للبطن للكشف عن وجود مادة ظليلة للأشعة في الأمعاء. وتعد المراقبة الدقيقة لتراكيز بوتاسيوم المصل في أي حالة اشتباه بالتسمم بالباريوم أمراً حيوياً. وقد ارتبطت حالة وفاة لصيدلي يبلغ من العمر 49 عاماً تعمد ابتلاع كلوريد الباريوم بتركيز باريوم في الدم بعد الوفاة بلغ 10 ميكروجرام/لتر (موقع الجمع غير معروف)، في حين كانت تراكيز الباريوم في الصفراء والبول 8.8 ميكروجرام/لتر و6.3 ميكروجرام/لتر على التوالي (Jourdan et al. 2001). تتوفر البيانات التحليلية من حالات تسمم أخرى في كتيب (monograph) الباريوم.

البريليوم (Beryllium)

يُستخدم البريليوم في تصنيع السبائك عالية القوة والمقاومة للتآكل. وتُستخدم هذه المنتجات عادةً في الصناعات النووية والفضائية وصناعة الأسلحة. كما تُستخدم سبائك البريليوم مع معادن أخرى، مثل الألومنيوم والنحاس والمغنيسيوم والنيكل، في منتجات متنوعة مثل النوابض، والتروس، والوصلات الكهربائية، ومكونات المحركات الأخرى.

يُعد البريليوم في حد ذاته عنصراً شديد السمية ويرتبط بمرض مهني مميز (Kolanz 2001). ومع ذلك، قد لا يتم التعرف على الأمراض المزمنة المرتبطة بالتعرض المهني للبريليوم (Infante and Newman 2004). العضو المستهدف الرئيسي هو الرئة، حيث يسبب مرضاً حبيبياً (داء البريليوم - berylliosis) ويزيد من خطر الإصابة بسرطان الرئة. قد تشبه السمات المرضية والسريرية لمرض البريليوم المزمن تلك الخاصة بمرض الساركويد (Infante and Newman 2004). كما قد تتأثر أنظمة أعضاء أخرى، بما في ذلك الجهاز اللمفاوي، والكبد، والقلب، والكلى، والجلد، والعظام (Stiefel et al. 1980). يُفرز معظم الجرعة الممتصة من البريليوم في البول على مدى عدة أيام، ولكن رواسب الرئة قد تُطلق البريليوم ببطء شديد لدرجة أن إفرازه في البول قد يستمر لعدة سنوات.

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 10 مل، في أنبوب K-EDTA.
- **البول:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة.
- **الرئة:** تؤخذ عينة من الرئة أثناء فحص ما بعد الوفاة في حالات الوفاة المرتبطة بالبريليوم.

التحليل

يُقاس البريليوم في الغالب في البول باستخدام تقنية ETAAS. وتُستخدم الإجراءات الأحدث القائمة على ICP-MS بشكل متزايد، خاصة عند التعامل مع التعرض منخفض المستوى (Apostoli and Schaller 2001; De Boer et al. 2004; Xia et al. 2004).

تفسير النتائج

تُقبل القيم الطبيعية للبريليوم في البول عموماً على أنها أقل من 1 ميكروجرام/لتر (0.1 ميكرومول/لتر). وقد أظهرت دراسة كبيرة حديثة حول تراكيز البريليوم في بول مجموعة من 65 عاملاً معرضاً، قيماً في النطاق 0.12–0.15 ميكروجرام/لتر (13–17 نانومول/لتر)، مع وجود قيم لدى أفراد المجموعة الضابطة (control subjects) أقل من 0.63 ميكروجرام/لتر

(70 نانومول/لتر) (Apostoli and Schaller 2001). كما تم قياس البريليوم في أنسجة الرئة لدى العمال الذين عُرف أنهم أصيبوا بأمراض الرئة المرتبطة بالبريليوم.

البزموت (Bismuth)

يُنتج البزموت، وهو معدن ثقيل، سمية يمكن أن تحاكي أحياناً تلك المرتبطة بالرصاص والزئبق؛ ولهذا السبب، قد يكون من المفيد إدراج البزموت في أي إجراء فحص للمعادن الثقيلة يُجرى للمرضى الذين يعانون من أعراض عصبية غير مبررة أو فشل كلوي حاد. استُخدمت أملاح البزموت في الطب لأكثر من 200 عام كمرهم موضعي وفي علاج اضطرابات الجهاز الهضمي، وهي متوفرة في المستحضرات التي تُصرف دون وصفة طبية. وبما أن معظم الأملاح غير العضوية للبزموت المعطاة عن طريق الفم غير قابلة للذوبان في الماء نسبياً ويتم امتصاصها بشكل ضعيف من الجهاز الهضمي، فإنها تسبب حداً أدنى من السمية. أما المركبات الأخرى، خاصة المركبات العضوية القابلة للذوبان في الدهون، فمن المعروف أنها تتراكم في الجسم بعد الجرعات المفرطة ويمكن أن تسبب سمية عصبية شديدة، مثل اعتلال الدماغ المترقي (Playford et al. 1990). كما أن مركبات البزموت القابلة للذوبان في الماء أكثر عرضة للتسبب في تلف الكلى، بما في ذلك قلة البول والفشل الكلوي الحاد (Huwez et al. 1992). وقد أُبلغ عن عدد من الوفيات بعد تناول جرعات زائدة حادة ومزمنة من منتجات البزموت الطبية المختلفة.

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 10 مل، في أنبوب K-EDTA.
- **البول:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة.

التحليل

تاريخياً، كانت هناك مشاكل في القياس الموثوق للبزموت في السوائل البيولوجية. وتعد تقنية "مطيافية الامتصاص الذري الكهروحراري" (ETAAS) هي الطريقة المفضلة، والتي يمكن إجراؤها بالتحديد المباشر أو بعد توليد الهيدريد (Froomes et al. 1988). كما وُصفت طرق تعتمد على مطيافية الكتلة بالبلازما المقترنة حثياً (ICP-MS) (Mauras et al. 1993; Vanhoe et al. 1993).

التفسير

القيم المرجعية للبزموت في الدم منخفضة للغاية (<1 ميكروجرام/لتر [5 نانومول/لتر]). وتصل "التراكيز العلاجية" المقبولة عموماً إلى 50 ميكروجرام/لتر (239 نانومول/لتر)، وترتبط التراكيز التي تتجاوز 100 ميكروجرام/لتر (480 نانومول/لتر) عموماً بالسمية (Serfontein and Mekel 1979; Slikkerveer and De Wolff 1989). قد توجد تراكيز عالية جداً من بزموت الدم (>1000 ميكروجرام/لتر [4.8 ميكرومول/لتر]) لدى المرضى الذين يعانون من أعراض عصبية شديدة مثل اعتلال الدماغ. وتعد مراقبة تراكيز بزموت الدم مفيدة للمرضى الذين يصابون بفشل كلوي حاد نتيجة لسمية البزموت. القيم المرجعية للبزموت في البول هي <1 ميكروجرام/لتر (5 نانومول/لتر). قد يكون قياس تراكيز بزموت البول مفيداً تشخيصياً أو بعد علاج التسمم باستخدام عوامل مخلبية فموية، والتي يمكن أن تزيد بشكل كبير من التصفية البولية للبزموت (Basinger et al. 1983; Slikkerveer et al. 1993).

الكادميوم (Cadmium)

يُستخدم الكادميوم وأملاحه وسبائكه في تصنيع بطاريات النيكل-كادميوم، والأصباغ، والطلاءات المضادة للتآكل، والسبائك الخاصة. إن الابتلاع الحاد أو المزمن لأملاح الكادميوم نادر للغاية، ولكن العلامات والأعراض المُبلغ عنها تشمل الغثيان، والقيء، والتهاب المعدة والأمعاء النزفي، وفشل الأعضاء العام. تُعد معظم المشاكل السمية المرتبطة بالكادميوم نتيجة للتعرض المهني والبيئي، وهي معروفة منذ سنوات عديدة. وتشمل هذه المشاكل التهاب الرئة وانتفاخ الرئة الناتج عن الاستنشاق الحاد لأبخرة الكادميوم، وعلى المدى الطويل، الاعتلال الكلوي (Jarup et al. 1988; Nordberg 2004). أدت إمدادات المياه الملوثة بالكادميوم الصناعي في اليابان إلى تراكم المعدن في الأرز والمصادر الغذائية الأخرى، مما أدى لاحقاً إلى تسمم بشري على نطاق واسع؛ حيث أصيب المتضررون بتلف كلوي، وتشوهات هيكلية ناجمة عن اضطرابات في استقلاب الكالسيوم والفوسفات، وآلام شديدة في الظهر والساقين (Friberg et al. 1971; Nordberg 2004). أصبحت هذه الحالة المؤلمة تُعرف بمرض "إيتاي-إيتاي" (آي-آي). وبالنسبة لغير المعرضين مهنياً، يظل الغذاء هو المصدر الرئيسي للكادميوم، رغم أنه يُمتص بشكل ضعيف من الأمعاء. ومع ذلك، يُعد استنشاق دخان التبغ مصدراً مهماً للتعرض للكادميوم، حيث أن التوافر الحيوي للكادميوم عبر الرئة مرتفع جداً. بعد الامتصاص الفموي أو الرئوي، يُخزن الكادميوم بشكل رئيسي في الكبد والكلى، حيث يرتبط بـ "الميتالوثيونين" (metallothionein) ويبقى في الجسم لعقود. التأثير السام الأهم هو على الكلى، مع حدوث نخر في الأنابيب الكلوية القريبة؛ ويمكن الكشف عن ذلك من خلال زيادة مميزة في إفراز البروتينات منخفضة الوزن الجزيئي (Lauwerys and Bernard 1986; Lauwerys et al. 1994). ويبدو الآن أن كلاً من التعرض المهني والبيئي للكادميوم عامل محدد للتطور اللاحق لأمراض الكلى في المرحلة النهائية (Hellstrom et al. 2001).

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 5 مل، في أنبوب K-EDTA.
- **البول:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة.

ملاحظة: من المهم جداً التأكد من أن أنابيب العينات خالية من تلوث الكادميوم؛ ويوصى بشدة باستخدام أنابيب معتمدة للعناصر النزرة، مع اتخاذ احتياطات صارمة ضد التلوث عند التعامل مع العينات ومعالجتها.

التحليل

تفتقر تقنيات "مطيافية الامتصاص الذري باللهب" (Flame AAS) الروتينية إلى الحساسية الكافية لتحليل الكادميوم في الدم والبول، لكن التقنيات التي تستخدم أجهزة إدخال عينات خاصة، مثل "كأس ديلفز" (Delves cup)، أثبتت نجاحها، لا سيما في تقييم التعرض المهني أو المستويات العالية من التعرض البيئي (Delves 1977). وتعتمد معظم الطرق الحالية على ETAAS مع تصحيح الخلفية بطريقة "زيمان" (Halls et al. 1987). كما أصبحت مطيافية الكتلة بالبلازما المقترنة حثياً (ICP-MS) نهجاً أكثر ملاءمة للتحليل، خاصة في تقييم التعرض المهني للكادميوم (Botta et al. 2006).

التفسير

القيم المرجعية للكادميوم في الدم والبول منخفضة للغاية. فتركيزات الكادميوم في دم غير المدخنين تكون عموماً أقل من 1 ميكروجرام/لتر (9 نانومول/لتر)، وفي المدخنين أقل من 6 ميكروجرام/لتر (53 نانومول/لتر). وتكون تركيزات الكادميوم في البول عموماً أقل من 1 ميكروجرام/لتر لدى كل من المدخنين وغير المدخنين. القيم الإرشادية المهنية الحديثة للكادميوم في تقييم التعرض له هي 5 ميكروجرام/لتر (45 نانومول/لتر) في كل من الدم والبول، أو 10 نانومول/ملليمول كرياتينين في البول. وبناءً عليه، قد يكون لدى المدخنين الشرهين تركيزات كادميوم في الدم عند حدود القيم الإرشادية المهنية الحالية. يرتبط

الاعتلال الكلوي الناجم عن الكادميوم عموماً بتركيزات كادميوم في البول تزيد عن 15 ميكروجرام/لتر (134 نانومول/لتر)، ولكن قد تكون هذه القيم أقل بكثير بالنسبة لأولئك الذين تعرضوا للكادميوم قبل سنوات عديدة (Bernard 2004).

تعد تركيزات الكادميوم في الدم مؤشراً للتعرض الحديث والماضي على حد سواء. فالأفراد الذين لديهم تاريخ طويل من التعرض المهني المفرط للكادميوم يمكن أن يكون لديهم عبء تراكمي عالٍ في الجسم، يستمر حتى الشيخوخة (Mason et al. 1999). ويمكن ملاحظة ارتفاع تركيزات الكادميوم في الدم والبول بعد سنوات عديدة من توقف التعرض لدى هؤلاء الأفراد. يتم تخزين كميات كبيرة من الكادميوم في الكبد والكلى، وهذا قد يؤدي إلى إعادة توزيع ملحوظ للكادميوم في الدم بعد الوفاة، مما ينتج عنه ارتفاع كبير في تركيزات الكادميوم في دم ما بعد الوفاة (اعتماداً على موقع جمع الدم)، وهو ما قد يُخطئ الباحث ويظنه وجود "تركيزات مرتفعة بشكل مريب" للكادميوم في الدم قبل الوفاة.

النحاس (Copper)

النحاس عنصر نزر أساسي ولكنه قد يكون شديد السمية، مع مدخول موصى به يبلغ حوالي 1.5–3.0 مجم يومياً لدى البالغين (Aggett 1999; Piscator 1979). قد تختلف تركيزات النحاس في مياه الشرب اختلافاً كبيراً اعتماداً على مصدر المياه واستخدام الأنابيب النحاسية، وعادة ما تكون التركيزات الموصى بها <1.0 ميكروجرام/لتر. يمكن تذوق النحاس في الماء عند تركيزات تزيد عن 1 ميكروجرام/لتر، وقد يظهر تلون أزرق-أخضر عند تركيزات تزيد عن 5 ميكروجرام/لتر في الماء. لا تزال أملاح النحاس، وخاصة الكبريتات القابلة للذوبان في الماء، تُستخدم كمبيدات للفطريات والطحالب، وقد توجد أحياناً في مجموعات كيمياء الأطفال. تكون تركيزات النحاس في الجسم منخفضة نسبياً، وتوجد أعلى كمية منها في الكبد الذي يتحكم في استتباب النحاس. يرتبط معظم النحاس الدائر في الدم (~95%) ببروتين محدد مرتبط بالنحاس يُسمى "سيرولوبلازمين" (ceruloplasmin). وبشكل عام، لا يُفرز سوى كميات صغيرة من النحاس في البول، ما لم تكن هناك إصابة بمرض.

يُعد داء ويلسون (التنكس الكبدي العدسي) اضطراباً وراثياً مهماً في استقلاب النحاس، حيث يوجد عجز في نقل وإفراز النحاس من الكبد إلى الصفراء (Aggett 1999)، مما يؤدي إلى "زيادة حمل النحاس" وما يصاحب ذلك من تلف كبدي وعصبي قد يسبب الوفاة ما لم يُعالج مبكراً. من المعروف أيضاً أن نقص النحاس في النظام الغذائي يرتبط بتركيزات "منخفضة" مرضياً للنحاس في البلازما، وهو ما قد يسبب فقر الدم وانخفاض تعداد خلايا الدم البيضاء، لا سيما لدى المرضى الذين يتلقون تغذية معوية طويلة الأمد، أو يتناولون كميات مفرطة من الزنك أو عوامل مخلبية للنحاس (Lang et al. 2004; Oliver et al. 2005; Todd et al. 2004). وبناءً على ذلك، قد تكون قياسات النحاس مفيدة في التحقيق في أنواع معينة من الوفيات غير المتوقعة لدى المرضى الذين يتلقون تغذية معوية أو يتناولون أدوية تقلل من امتصاص النحاس.

هناك بعض الأدلة على أن التعرض البيئي المفرط للنحاس في مياه الشرب أو الغذاء (من أواني الطهي النحاسية أو النحاسية الصفراء) قد يؤدي إلى أمراض كبدية مرتبطة بالنحاس لدى الرضع والأطفال الصغار (Müller et al. 1996; Sethi et al. 1993; Spaziano et al. 2002; von Mühlendahl and Lange 1994). كما وُجدت سمية النحاس لدى المرضى الذين خضعوا لغسيل الكلى باستخدام أغشية غسيل كلى معيبة تحتوي على النحاس (O'Donohue et al. 1993). أما التعرض المهني لمركبات النحاس فهو نادر نسبياً؛ إذ يرتبط الخطر الرئيسي بأبخرة النحاس في أفران الصهر التي تؤدي إلى أمراض الجهاز التنفسي وحمى أبخرة المعادن. كما أُبلغ عن أمراض كبدية وتنفسية مرتبطة بالنحاس لدى عمال مزارع الكروم الذين يرشون مبيدات الفطريات المحتوية على النحاس (مزيج بوردو). وأُبلغ أيضاً عن حدوث سمية بعد التعرض المهني أثناء تطبيق وإزالة الطلاءات المضادة للحشف في مرافق إصلاح السفن.

قد يُلاحظ التسمم الحاد بالنحاس أحياناً في حالات الابتلاع العرضي أو الانتحاري لأملاح ومحاليل النحاس، وخاصة الأملاح القابلة للذوبان في الماء مثل الكبريتات أو الكلوريد أو الأسيتات (Saravu et al. 2007). تشمل علامات وأعراض التسمم

الحاد (عن طريق الفم) بالنحاس: طعماً معدنياً، وتهيج الجهاز الهضمي، وألم البطن، والغثيان، والقيء، والإسهال، ونزيف الجهاز الهضمي (Chuttani et al. 1965; Patel et al. 1976; Saravu et al. 2007). وفي الحالات الشديدة، قد يؤدي ذلك إلى انخفاض ضغط الدم، والصدمة، وفشل الكبد، واليرقان، وفشل القلب والأعضاء المتعدد، والوفاة (Gulliver 1991; Walsh et al. 1977). ويُعتقد أن الجرعة المميتة من كبريتات النحاس تبلغ حوالي 0.2 جم/كجم من كتلة الجسم.

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 2 مل، في أنبوب K-EDTA.
- **البول:** عينة من تجميع 24 ساعة في حاوية بول مغسولة بالحمض، وذلك للتحقيق في الأمراض المرتبطة بالنحاس وتقييم العلاج بالاستخلاب.
- **محتويات المعدة:** قد تكون مفيدة في حالات الوفاة الناتجة عن التسمم العرضي أو الانتحاري، خاصة إذا كان لها لون أزرق.
- **الماء:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة للتحقيق في مياه الشرب المشتبه في تلوثها.

التحليل

في التحقيق في حالات التسمم الحاد بالنحاس، قد يكون قياس نحاس البلازما مفيداً لتقييم الشدة، على الرغم من أنه من غير المرجح أن يغير من التدبير السريري. يمكن إجراء التحليل باستخدام التحليل اللوني (colorimetric)، أو بـ "مطيافية الامتصاص الذري باللهب" (Flame AAS) (Taylor 1996)، أو "مطيافية الكتلة بالبلازما المقترنة حثياً" (ICP-MS) (De Boer et al. 2004; Venelinov et al. 2004). يمكن قياس نحاس البول بواسطة تقنيات ETAAS أو ICP-AES أو ICP-MS، وعادة ما يكون ذا قيمة فقط في التحقيق في أمراض الكبد المزمنة المرتبطة بالنحاس (da Costa et al. 1991; Taylor 1996). ومن الأفضل إجراء قياس النحاس في عينات خزعة الكبد باستخدام ICP-MS.

التفسير

النطاق المرجعي لنحاس البلازما واسع ويعتمد على العمر والحمل وأي حالة مرضية كامنة. في البالغين الأصحاء، يتراوح النطاق المرجعي بين 0.8–1.6 ميكروجرام/لتر (12–25 ميكرومول/لتر). وتُلاحظ قيم أقل لدى المواليد الجدد، وفي حالات نقص النحاس وداء ويلسون. وتُلاحظ قيم مرجعية أعلى قليلاً أثناء الحمل أو لدى المرضى الذين يعانون من أمراض التهابية أو أورام (تصل إلى 2.8 ميكروجرام/لتر [44 ميكرومول/لتر]) (Taylor 1996).

يبلغ الإفراز البولي للنحاس لدى البالغين الأصحاء أقل من 50 ميكروجرام/يوم (0.8 ميكرومول/24 ساعة). وترتبط القيم المرتفعة بشكل ملحوظ بالمرضى الذين يعانون من أمراض الكبد والقنوات الصفراوية (50–100 ميكروجرام/يوم) أو داء ويلسون (>100 ميكروجرام/يوم). وتُلاحظ قيم أعلى بكثير لإفراز النحاس بعد التحفيز بعامل مخلب (بنسيلامين) لدى كل من البالغين الأصحاء (<760 ميكروجرام/يوم) ومرضى داء ويلسون (<1600 ميكروجرام/يوم) (da Costa et al. 1991).

تشمل التحقيقات الأخرى لأمراض الكبد المزمنة المرتبطة بالنحاس اختبارات وظائف الكبد القياسية وقياس "سيرولوبلازمين" البلازما (Walshe 2003). كما يمكن قياس النحاس في عينات أنسجة الكبد بعد أخذ خزعة بالإبرة للتحقيق في أنواع معينة من أمراض الكبد. وفي حالات الوفاة الناتجة عن ابتلاع أملاح النحاس القابلة للذوبان، قد توجد فروق كبيرة بين تراكيز النحاس في الدم/البلازما قبل الوفاة (أو أثناءها) وبين تراكيزه في دم ما بعد الوفاة؛ وقد يكون هذا بسبب الانتشار بعد الوفاة للنحاس غير الممتص المتبقي في المعدة (Gulliver 1991).

الحديد (Iron)

تاريخياً، كان التسمم بالحديد يُشاهد غالباً لدى الأطفال الصغار بعد الابتلاع العرضي لأقراص الحديد، وكان حتى وقت قريب أحد الأسباب الرئيسية للوفاة لمن هم دون سن 6 سنوات (Bosse 1995; Robotham and Lietman 1980). وقد أدى إدخال تغليف الجرعة الواحدة (unit-dose packaging) لمكملات الحديد في عام 1997 إلى انخفاض كبير في الوفيات (Tenenbein 2005). أما الابتلاع العرضي أو الانتحاري لمستحضرات الحديد لدى البالغين فهو نادر نسبياً. تحتوي معظم المنتجات التي تُصرف دون وصفة طبية على أملاح حديد أيونية مختلفة (مثل الكبريتات، والفومارات، والجلوكونات) والعديد منها مستحضرات بطيئة التحرر. ومؤخراً، تم إدخال عدد من مستحضرات الحديد غير الأيونية (مثل حديد الكربونيل وحديد السكريات المتعددة) التي تحتوي على نسبة أكبر بكثير من الحديد، والتي تتحول ببطء فقط إلى حديدوز. يمكن أن تتراوح كمية الحديد العنصري في أي علامة تجارية معينة للأقراص من 12% إلى 98% (وزن/حجم)، مما يجعل تقييم الجرعة الفعلية للحديد المبتلع أمراً صعباً للغاية، خاصة إذا كانت التركيبة غير معروفة (Chyka and Butler 1993).

قد يكون من الصعب تقييم علامات وأعراض التسمم بالحديد إذا كان وقت الابتلاع غير مؤكد. تُلاحظ ذروة مستويات الحديد في البلازما عموماً في غضون 5 ساعات تقريباً من الابتلاع، ولكن هذا يتأثر بشدة بتركيبة الدواء. تشمل العلامات والأعراض الأولية الغثيان والقيء وألم البطن. وفي حالات الجرعات الزائدة الأكثر شدة، قد يؤدي ذلك إلى تقرح معوي، واحتشاء الأمعاء الدقيقة، وتقيؤ دموي، وبراز أسود (melaena). وفي أشد الحالات، قد يحدث لاحقاً تطور لحماض استقلابي وفشل كبدي وغيبوبة. ترتبط أعراض الجهاز الهضمي عموماً بابتلاع >10–20 مجم/كجم من كتلة الجسم من الحديد العنصري. وتُلاحظ السمية الخطيرة بعد الابتلاع الحاد عموماً عند جرعات تزيد عن 50 مجم من الحديد العنصري/كجم. وتكون العلامات والأعراض المهددة للحياة والوفيات أكثر شيوعاً عندما تتجاوز جرعة الحديد المبتلعة 100 مجم/كجم. إن المظهر السريري للتسمم بالحديد ومساره الزمني يمكن أن يكون معقداً للغاية ويمر بمراحل مختلفة، خاصة عند التعامل مع الأطفال الصغار إذا كانت الجرعة المبتلعة عالية جداً.

يعد قياس حديد المصل مفيداً في تشخيص وعلاج المرضى، ولكنه ليس دليلاً معصوماً. قد يكون من الصعب تقييم القياسات المفردة المبكرة، خاصة عندما لا يزال الحديد يُمتص من الأمعاء. تكمن القيمة القصوى لقياس حديد المصل عند التفكير في استخدام علاج الاستخلاب الوريدي بـ "ديسفيريوكسامين" (Cheney et al. 1995; Schauben et al. 1990). يُستخدم قياس الحديد في البول بشكل رئيسي لتقييم فعالية إزالة الحديد باستخدام علاج الاستخلاب، لكنه قد يكون ذا أهمية في التعامل مع حالات التسمم الحاد وفي إدارة حمل الحديد الزائد. وفي حالات الاشتباه بالوفاة نتيجة التسمم بالحديد، يمكن أن يكون قياس الحديد في سوائل وأنسجة الجسم مفيداً.

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 5 مل، في أنبوب عادي (plain tube).
- **البول:** عينة من تجميع 24 ساعة، وتكون ذات قيمة في تقييم علاج الاستخلاب.
- **القيء/محتويات المعدة:** تكون ذات قيمة عموماً في القضايا الجنائية فقط.

التحليل

يُقاس الحديد تقليدياً في المصل غير المنحل (unhaemolysed serum) عن طريق التحليل اللوني. النهجان الرئيسيان هما تكوين معقد ملون متبوعاً بمطيافية الضوء (spectrophotometry) أو "مطيافية الامتصاص الذري" (AAS). عادة ما تتوفر الإجراءات اللونية لتحديد كمية حديد المصل في أقسام علم الأمراض بالمستشفيات، وهي مناسبة للتحاليل الطارئة السريعة، على الرغم من أنها ليست موثوقة إذا تم إعطاء "ديسفيريوكسامين" (desferrioxamine). يمكن تطبيق إجراءات

أكثر حساسية وتحديداً مثل (ETAAS) و(ICP-MS) لتحليل الحديد في المصل والبلازما والدم الكامل والبول، لا سيما في حالات ما بعد الوفاة.

التفسير

تفسير تركيزات حديد المصل في التسمم الحاد يمكن أن يكون معقداً للغاية، لا سيما وأن امتصاص الحديد من الأمعاء قد يتأخر أو يطول بسبب ابتلاع تركيبة بطيئة التحرر. تعتمد النطاقات المرجعية لحديد المصل على العمر والجنس، ولكن القيم النموذجية هي:

- الذكور: 0.6–1.7 مجم/لتر (10–30 ميكرومول/لتر).
- الإناث: 0.5–1.5 مجم/لتر (9–27 ميكرومول/لتر).

عند العرض الأولي، يرتبط تركيز حديد المصل الذي يزيد عن 3 مجم/لتر (54 ميكرومول/لتر) بوجود أعراض في الجهاز الهضمي؛ وترتبط العلامات والأعراض الواضحة للسمية بتركيزات تتراوح بين 3 و5 مجم/لتر (54–90 ميكرومول/لتر)؛ وتُشاهد السمية الجهازية الواضحة عند تركيزات بين 5 و10 مجم/لتر (90–180 ميكرومول/لتر)؛ وترتبط المراضة والوفيات الكبيرة بتركيزات >10 مجم/لتر (>180 ميكرومول/لتر). ومع ذلك، إذا تم إجراء علاج الاستخلاب باستخدام "ديسفيريوكسامين"، فمن غير الممكن تفسير تركيزات حديد البلازما اللاحقة. وقد تم الإبلاغ عن نطاق من تركيزات حديد المصل يتراوح بين 2.8–25.5 مجم/لتر (50–457 ميكرومول/لتر) لدى الأطفال الذين نجوا من ابتلاع ما يصل إلى 10 جم من كبريتات الحديدوز (Baselt 2002). أما الأطفال الذين توفوا بعد 3–5 أيام من ابتلاع 6–15 جم من كبريتات الحديدوز فكانت لديهم تركيزات حديد مصل تتراوح بين 19–50 مجم/لتر (340–900 ميكرومول/لتر) في اليومين الأول والثاني (Baselt 2002).

الرصاص (Lead)

الآثار السامة للرصاص (غير العضوي) معروفة منذ القدم، لكن هذا المعدن لا يزال يمثل مشكلة صحية عامة كبيرة في أجزاء كثيرة من العالم (Laraque and Trasande 2005; Needleman and Gatsonis 1990; Tong et al. 2000). ولا تزال مركبات الرصاص (وغيرها من المعادن الثقيلة) تُستخدم كمكونات في بعض الأدوية التقليدية (Bayly et al. 1995; Fisher and Le Couteur 2000; Hardy et al. 1998; Moore and Adler 2000). يُعد التسمم الحاد بالرصاص غير شائع نسبياً، ومع ذلك، فإن معظم الحالات العرضية تنتج عن الابتلاع المزمن، أو استنشاق أبخرة أو غبار الرصاص أثناء التعرض المهني، أو استخدام الأدوية "التقليدية" المحتوية على الرصاص، وابتلاع رقائق طلاء الرصاص أو الغبار من المساكن القديمة أو دون المستوى في الأطفال الذين يعانون من اضطراب "بيكا" (Braithwaite and Brown 1988; Carton et al. 1987). تشمل المصادر الأخرى ابتلاع أجسام رصاصية مثل أثقال الصيد من قبل الأطفال أو البالغين الذين يعانون من صعوبات نفسية أو تعليمية (Newton et al. 2005; St Clair and Benjamin 2008; Treble and Thompson 2002). يمكن أن ينشأ التسمم بالرصاص أيضاً من الرصاص المحتبس أو شظايا الرصاص الناتجة عن الإصابات بطلقات نارية (McQuirter et al. 2001). نادراً ما يتورط الرصاص ومركباته في جرائم القتل المشتبه بها، والتي قد تظل غير معروفة، أو قد تختلط علاماتها وأعراضها مع تلك الخاصة بالأمراض الطبيعية (Lech 2006).

في البالغين، يتم امتصاص ما يقرب من 10% فقط من الرصاص المبتلع من الجهاز الهضمي؛ وفي الأطفال قد تكون هذه النسبة أعلى بكثير. ومع ذلك، قد تتأثر التوافر الحيوي للرصاص المبتلع بشكل كبير بالنظام الغذائي والحالة التغذوية للفرد (على سبيل المثال، نقص الحديد والكالسيوم سيزيد من امتصاص الرصاص من الجهاز الهضمي). الرصاص الممتص عن طريق الاستنشاق له توافر حيوي أكبر بكثير، ولكن هذا قد يعتمد على عوامل مثل معدل التنفس، وحجم الجسيمات، والتركيز

الجوي للرصاص، ومدة التعرض. وبالتالي يمكن أن يكون هناك خطر كبير للتسمم بالرصاص لدى عمال الهدم الذين يستخدمون أدوات القطع، أو أولئك الذين يجددون المنازل القديمة أو المباني الأخرى عن طريق حرق طلاء الرصاص، دون استخدام حماية مناسبة. يمكن أن يكون التشخيص السريري للتسمم بالرصاص صعباً عندما لا يكون هناك تاريخ واضح أو مصدر ظاهر للتعرض، لأن العديد من علامات وأعراض التسمم المزمن بالرصاص غير محددة نسبياً (مثل التعب، ألم البطن، فقدان الشهية) (Cullen et al. 1983; Newton et al. 2005; Visvanathan 2001). لذا، تلعب التحقيقات المختبرية الأوسع دوراً أساسياً في تشخيص وعلاج التسمم بالرصاص وكذلك في تقييم التعرض المهني والبيئي للرصاص (Delves 1998).

جمع العينات

جمع العينات الموصى به لتحليل الرصاص هو:

- **الدم:** 5 مل، في أنبوب K-EDTA (2 مل في الأطفال)؛ تأكد من أن الأنبوب خالٍ من الرصاص (تتوفر أنابيب معتمدة خالية من الرصاص تجارياً).
- **البول:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة (مفيدة فقط بعد التعرض للرصاص العضوي).
- **البول:** تجميع 24 ساعة (عينة فرعية) فقط في حالة علاج الاستخلاب.
- **الماء:** 20 مل، في حاوية شاملة عادية (plain universal container).

التحليل

- توجد العديد من الإجراءات المنشورة لتحديد الرصاص في الدم والبول والسوائل الأخرى، مثل مياه الصنبور أو الأنسجة (العظام، الأسنان). إحدى أنجح الطرق التاريخية لقياس رصاص الدم استخدمت "مطيافية الامتصاص الذري باللهب" (flame AAS) مع إدخال عينة الدم في لهب الهواء-أسيتيلين باستخدام كأس نيكل صغير (كأس ديلفز - Delves cup)، ولا تزال هذه الطريقة قيد التشغيل الروتيني في عدة أجزاء من العالم (Delves 1970). وقد حلت محلها طرق (ETAAS)، التي يمكنها تحديد تركيزات رصاص الدم بدقة (<100 ميكروجرام/لتر [0.5 ميكرومول/لتر]) في المجموعات السكانية "غير المعرضة" (Bannon et al. 1994; Shuttler and Delves 1986). ومؤخراً، تم توظيف مطيافية الكتلة بالبلازما المقترنة حثياً (ICP-MS) لقياس الرصاص في حالات التعرض منخفض المستوى. تقنيات (ICP-MS) قادرة على تحديد تركيزات رصاص الدم أقل من 10 ميكروجرام/لتر (0.05 ميكرومول/لتر)؛ كما أنه من خلال قياس نسب نظائر الرصاص في العينات البيولوجية، يمكن ربط هذه النتائج بمصادر التعرض المحتملة التي قد توجد في حادث كيميائي أو تسمم من مصدر غير معتاد للرصاص (Delves and Campbell 1988, 1993).

التفسير

- كما ذُكر سابقاً، أعراض التسمم بالرصاص غير محددة نسبياً، مما يجعل تشخيصها السريري صعباً للغاية، خاصة عندما لا يكون مصدر التعرض للرصاص معروفاً (Braithwaite and Brown 1988). قد يحدث فقر الدم (هيموغلوبين <110 جم/لتر) عند تركيزات عالية من رصاص الدم (<1 ميكروجرام/لتر [50 ميكرومول/لتر]). كما قد تظهر لدى الأطفال الذين لديهم قيم رصاص في الدم بهذا المستوى نتيجة ابتلاع طلاء الرصاص أو استخدام الأدوية التقليدية أعراض شديدة لاعتلال الدماغ، على الرغم من أن هذا غير شائع.
- التأثير السام للرصاص الأكثر فهماً هو تأثيره على تخليق الهيموغلوبين، مما يؤدي إلى فقر الدم؛ حيث يثبط الرصاص إنزيم "فيروكيلاتاز" (ferrochelatase)، الذي يشارك في نقل الحديد في نخاع العظم ويحفز إدخال الحديدوز (Fe^{2+}) في حلقة البورفيرين لتكوين الهيم (Sakai 2000) (وهذه هي المرحلة الأخيرة من تخليق

الهيموغلوبين). يؤدي التعرض المزمن للرصاص إلى دمج الزنك (بدلاً من الحديد) في حلقة البورفيرين لإنتاج "بروتوبرفيرين الزنك" في كريات الدم الحمراء (ZPP). يعد اختبار (ZPP) بسيطاً نسبياً ويُستخدم كاختبار فحص غير مكلف للتعرض المزمن للرصاص؛ ومع ذلك، قد توجد مستويات مرتفعة من (ZPP) أيضاً لدى المصابين بفقر الدم الناجم عن نقص الحديد (Sole et al. 2000). وتساعد مراقبة انخفاض هيموغلوبين الدم وارتفاع (ZPP) في كريات الدم الحمراء في تقييم التسمم المزمن بالرصاص (Braithwaite and Brown 1988).

- يرتبط حوالي 98% من الرصاص في الدم بكريات الدم الحمراء، وله عمر نصفي يبلغ بضعة أشهر. يؤدي التعرض المستمر إلى تراكم الرصاص في الدم والأنسجة حتى الوصول إلى "حالة الاستقرار". وبشرط أن تكون درجة ونوع التعرض ثابتين نسبياً، فقد تكون تركيزات رصاص الدم لدى الأفراد المعرضين بيئياً، وبعض المعرضين مهنياً، مستقرة على مدى فترات طويلة. وعلى الرغم من إمكانية وجود الرصاص في معظم أنسجة الجسم، فإن أكثر من 90% من عبء الجسم يترسب في الهيكل العظمي على شكل فوسفات رصاص غير قابلة للذوبان. بعد التعرض المزمن على مدى سنوات عديدة، كما يحدث لدى بعض العمال الصناعيين، تصبح مخازن الأنسجة مثل العظام كبيرة؛ وهذا يمكن أن يكون له تأثير عميق على الحرائك السمية للرصاص والمخاطر الصحية طويلة المدى المرتبطة به. ونتيجة لذلك، بعد التوقف عن التعرض، قد تنخفض تركيزات الدم ببطء مع عمر نصفي للتخلص يصل إلى عام. هذا يسبب مشاكل في برامج المراقبة المهنية، حيث قد يتم التقليل من فوائد تقليل تعرض عمال الرصاص، كما يتم رصده من خلال انخفاض تركيزات رصاص الدم، بسبب المساهمة المستمرة من مخازن العظام والأنسجة (Mason and Williams 2005). يُفرز الرصاص بشكل ضعيف من الجسم، وأهم مسار هو عبر الكلى؛ إذ يبلغ الإخراج البولي الطبيعي للرصاص أقل من 10 ميكروجرام/يوم (50 نانومول/يوم)، ولكن يمكن زيادته بشكل كبير عن طريق علاج الاستخلاب. ومع ذلك، تشير الدراسات التي أُجريت على الجرذان إلى أن العوامل المخلبية لا يمكنها الوصول إلى مخازن رصاص العظام؛ وبالتالي قد يصبح الهيكل العظمي مخزناً داخلياً دائماً للرصاص الذي يتحرر ببطء إلى الأنسجة الرخوة، مسبباً السمية طوال حياة الفرد.
- أثبتت دراسات موسعة التأثير الضار للتعرض للرصاص على نمو الطفل وسلوكه وذكائه (Needleman 2006; Needleman and Gatsonis 1990; Shannon et al. 2005; Woolf et al. 2007). على الصعيد الدولي، يُوصى حالياً بحد أقصى لتركيز رصاص الدم قدره 100 ميكروجرام/لتر (حوالي 0.5 ميكرومول/لتر) للبالغين والأطفال (Bellinger et al. 1992). ومع ذلك، تشير أدلة حديثة إلى احتمال وجود ضعف فكري لدى الأطفال (من التعرض قبل أو بعد الولادة) بتركيزات رصاص في الدم أقل من 100 ميكروجرام/لتر (Canfield et al. 2003; Shnaas et al. 2006). قد تكون مستويات أعلى قليلاً مقبولة لدى البالغين المعرضين مهنياً للرصاص، لكن المراقبة الدقيقة للتعرض ضرورية. تُطبق حدود التعرض المهني في العديد من البلدان؛ وترد إرشادات المملكة المتحدة الحالية في الجدول 6، ومع ذلك، هناك قلق من أن الحدود المهنية الحالية مرتفعة للغاية (Schwartz and Hu 2007)، خاصة فيما يتعلق بالحدود المهنية للعاملات الإناث. هناك أدلة تُظهر أن الحمل والرضاعة قد يسببان تعبئة الرصاص من مخازن العظام، مما يؤدي إلى زيادة خطر سمية الرصاص لكل من الأم وطفلها حديث الولادة.

الجدول 6: تركيزات رصاص الدم بعد التعرض المهني كما هو مطبق في المملكة المتحدة (لوائح التحكم في الرصاص في العمل 1998)

الحالة	التركيز (أ)
القيم المرجعية لدى البالغين (والأطفال) غير المعرضين مهنياً	<10 ميكروجرام/لتر (<0.5 ميكرومول/لتر)
مستوى الإجراء لدى الإناث المعرضات مهنياً القادرات على الإنجاب	250 ميكروجرام/لتر (1.2 ميكرومول/لتر)
مستوى التعليق (عن العمل) لدى الإناث المعرضات مهنياً القادرات على الإنجاب	300ميكروجرام/لتر (1.5 ميكرومول/لتر)
مستوى الإجراء لدى الذكور المعرضين مهنياً (400 ميكروجرام/لتر لمن هم دون سن 18)	500ميكروجرام/لتر (2.4 ميكرومول/لتر)
مستوى التعليق (عن العمل) لدى الذكور المعرضين مهنياً (500 ميكروجرام/لتر لمن هم دون سن 18)	600ميكروجرام/لتر (2.9 ميكرومول/لتر)

(أ) القيم المرجعية غير مذكورة في اللوائح، ولكنها معروضة للمقارنة.

الليثيوم (Lithium)

تُستخدم أملاح الليثيوم في العلاج الحاد للهوس وفي الوقاية من الاضطرابات النفسية ثنائية القطب (الهوس الاكتئابي). وعادة ما تُحضر هذه الأملاح من كربونات أو سترات الليثيوم، ومعظمها يكون في صورة مستحضرات بطيئة التحرر. يُمتص الدواء جيداً من الأمعاء، وتُلاحظ ذروة تركيز الليثيوم في البلازما في غضون ساعتين للمستحضرات سريعة التحرر، وما بين 6 إلى 12 ساعة للتركيبات بطيئة التحرر. لا يرتبط الليثيوم ببروتينات البلازما ويُطرح فقط عن طريق الكلى، لذا يمكن أن تتراكم تركيزات البلازما إلى مستويات سامة في حال حدوث قصور كلوي. يُوصى بأن يخضع المرضى الذين يتلقون علاجاً بالليثيوم لمراقبة دورية للحفاظ على تركيزات الليثيوم في البلازما ضمن النطاق العلاجي. ومع ذلك، فإن الجرعات الزائدة من الليثيوم، سواء كانت حادة أو حادة فوق مزمنة أو مزمنة، شائعة نسبياً (Bailey and McGuigan 2000). في حالة الجرعة الزائدة الحادة، تكون الأعراض الأولية غالباً اضطرابات معوية؛ ثم قد تتطور علامات وأعراض اضطراب الجهاز العصبي المركزي خلال الـ 24 ساعة التالية مع توزيع الليثيوم ببطء في الدماغ. وبسبب التأخير في وصول تركيزات الليثيوم في البلازما إلى ذروتها بعد ابتلاع المستحضرات بطيئة التحرر، قد لا يتم التعرف على السمية في بعض الأحيان (Borras-Blasco et al. 2007). تعود معظم حالات الجرعة الزائدة المزمنة إلى القصور الكلوي أو التداخل مع أدوية أخرى، وتكون السمات الرئيسية هي اضطراب الجهاز العصبي المركزي. تشمل علامات وأعراض السمية الرنح (ataxia)، والرعاش، وعسر التلفظ، وثقل اللسان، والنعاس، والغيبوبة. عند تقييم أي حالة اشتباه في تسمم بالليثيوم، من المهم الحصول على تاريخ طبي كامل، بما في ذلك نظام الجرعات، واستخدام أدوية أخرى، ونتائج أي قياسات سابقة لليثيوم (Tyrer 1996).

- **جمع العينات:** دم (5 مل) - في أنبوب عادي أو أنبوب K-EDTA. من المهم التأكد من عدم سحب العينات في أنبوب "ليثيوم-هيبارين".

التحليل

يمكن تحديد كمية الليثيوم في السوائل البيولوجية بتقنيات مختلفة تشمل قياس الضوء باللهب البسيط، والتحاليل اللونية، والأقطاب الانتقائية للأيونات، وامتصاص الذرة باللهب (AAS)، و(ETAAS). العينات المفضلة هي البلازما أو المصل. قياسات الدم الكامل ممكنة باستخدام "مطيافية الانبعاث الذري باللهب" (flame AES)، رغم أن وجود البوتاسيوم في العينات المنحلة دموياً قد يسبب قيماً مرتفعة بشكل خاطئ.

التفسير

يمكن أن تصل التراكيز العلاجية الموصى بها لليثيوم في البلازما أو المصل في علاج الهوس الحاد إلى حد أقصى قدره 1.3 مليمول/لتر؛ وفي الوقاية من الاضطرابات ثنائية القطب، تكون القيم الموصى بها عموماً 0.5–0.8 مليمول/لتر. قد ترتبط هذه القيم ببعض الآثار الجانبية مثل اضطرابات الجهاز الهضمي، وكثرة التبول، والعطش، والتعب. غالباً ما يكون تفسير تركيزات الليثيوم في البلازما في حالات التسمم الحاد والمزمن صعباً سريرياً؛ إذ ترتبط علامات وأعراض السمية عموماً بقيم تزيد عن 1.4 مليمول/لتر، وتتطلب القيم الأكبر من 2 مليمول/لتر عناية طبية عاجلة. يمكن أن تكون تركيزات الليثيوم التي تزيد عن 3 مليمول/لتر، لا سيما في حالات السمية المزمنة، مهددة للحياة وقد تتطلب استخدام علاج إزالة نشط مثل غسيل الكلى، الذي يبدو أنه العلاج المفضل (Eyer et al. 2006; Leblanc et al. 1996). لا ترتبط علامات السمية بعد الجرعة الزائدة المزمنة أو الحادة فوق المزمنة دائماً بكمية الليثيوم المبتلعة، أو بتركيزات ليثيوم المصل عند دخول المستشفى، أو بالنتائج المميتة (Waring et al. 2007).

الزئبق (Mercury)

استُخدم الزئبق في تصنيع موازين الحرارة ومجموعة من الأدوات العلمية والطبية الأخرى لمئات السنين، لكن هذا الاستخدام تراجع الآن. لا يزال الزئبق العنصري يُستخدم على نطاق واسع في جميع أنحاء العالم في عدد من البلدان النامية من قبل عمال المناجم الصغار الذين يستخدمون عملية "ملغمة الزئبق" (Spiegel et al. 2005). كما استُخدم الزئبق ومركباته على نطاق واسع في الصناعة الكيميائية وفي تصنيع الأدوية والمبيدات الحشرية. استُخدمت بعض المركبات، مثل مشتقات إيثيل الزئبق، تاريخياً كمواد حافظة (ثيومرسال) في تصنيع اللقاحات المستخدمة للأطفال الرضع وصغار الأطفال. وقد خضع هذا لتدقيق مكثف، لا سيما فيما يتعلق بمسببات بعض الاضطرابات النفسية العصبية مثل التوحد. ومع ذلك، فإن دراسات المتابعة التفصيلية لدى الأطفال لا تدعم أي رابط سببي (Clements and McIntyre 2006; Hviid et al. 2003; Pichichero et al. 2002; Thompson et al. 2007). لا تزال حشوات "ملغم الأسنان" المحتوية على الزئبق تُستخدم في العديد من البلدان، وعلى الرغم من ذلك، لا يبدو أن استخدامها، لا سيما عند الأطفال، مرتبط بخطر الإصابة بالسمية العصبية (Bellinger et al. 2006; DeRouen et al. 2006; Needleman 2006).

تتأثر سمية الزئبق ومركباته بشكل كبير بالشكل الكيميائي وحالة التكافؤ (Broussard et al. 2002; Clarkson et al. 2003; Nuttall 2004). وتعتبر الأملاح ثنائية التكافؤ (Hg^{2+}) القابلة للذوبان في الماء هي أكثر أشكال الزئبق غير العضوي سمية، وخاصة "كلوريد الزئبقيك"، الذي كان يُستخدم سابقاً كمطهر. تبلغ الجرعة (الفموية) المميتة من كلوريد الزئبقيك أقل من 5 جم لدى البالغين، مما أدى إلى شهرته كسم للقتل والانتحار واكتسابه اسمه الشعراء "التسامي الأكال" (corrosive sublimate). هناك سمية كبيرة مرتبطة بكل من الاستنشاق الحاد والمزمن لأبخرة الزئبق (العنصري)، والذي يتميز بضغط بخاري مرتفع جداً في درجة حرارة الغرفة العادية (Broussard et al. 2002; Clarkson et al. 2003; Houeto et al. 1994; McNeil et al. 1984). يمكن أن تشكل موازين الحرارة الزئبقية المكسورة خطراً جسيماً على الأطفال من خلال استنشاق الأبخرة، خاصة في البيئة المنزلية مثل غرفة النوم (Velzeboer et al. 1997). تُعد الأشكال العضوية للزئبق، مثل ميثيل الزئبق، سامة جداً للأعصاب، وبما أنها قابلة للذوبان في الدهون نسبياً، يمكن أن تتراكم في الأنسجة الدهنية للجسم مثل الدماغ (Aschner and Syversen 2005; Bakir et al. 1973). وقد وقعت كوارث بيئية واسعة النطاق، مثل تلك التي شهدتها منطقة خليج "مينماتا" في اليابان، حيث توفي آلاف الأشخاص أو أصيبوا بعجز شديد. كان السبب في ذلك هو تصريف المصانع للنفايات الصناعية التي تحتوي على الزئبق، والتي استقرت في رواسب الخليج والنهر وتمت ميثلتها بواسطة الكائنات الحية الدقيقة. اندمج ميثيل الزئبق في النظام الغذائي للأسماك التي كان يعتمد عليها سكان "مينماتا"، وهي قرية صيد في اليابان، بشكل أساسي، مما أدى إلى ما يسمى بمرض "مينماتا" (Ekino et al. 2007;

Hachiya 2006). يمكن أيضاً رؤية التسمم بالزئبق بعد استخدام الأدوية التقليدية ومستحضرات التجميل (Ho et al. 2003; Kang-Yum and Oransky 1992; Soo et al. 2003; Weldon et al. 2000).

تشمل علامات وأعراض التسمم الحاد والمزمن بالزئبق بشكل رئيسي الجهاز العصبي المركزي، أو الكلى، أو الجلد (Clarkson et al. 2003; Winship 1985). تشمل الأعراض المميزة لدى الأطفال "أكرودينيا" (داء الوردي)، والتي تتضمن علامات مثل اليدين والقدمين الورديتين، وهو مرض ارتبط تاريخياً باستخدام "كلوريد الزئبقوز" في علاجات التسنين (Velzeboer et al. 1997; Warkany 1966). قد تظل أنواع الزئبق محتبسة في الجسم لفترة طويلة بعد التوقف عن التعرض، وتُظهر معدلات التخلص من الدم والإفراز البولي أعماراً نصفية طويلة (Barregard et al. 1992; Nuttall 2004; Roels et al. 1987). قد يُفرز الزئبق في البول لمدة تتراوح بين 6 إلى 12 شهراً بعد التوقف عن التعرض، مما يجعل قياسات البول وسيلة جذابة لتقييم التعرض التاريخي، وتتمتع بميزات مقارنة باستخدام مصفوفات أخرى مثل الشعر أو الأظافر (Ritchie et al. 2004).

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 10 مل، في أنبوب K-EDTA.
- **البول:** 20 مل؛ عينة عشوائية في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة، أو عينة فرعية من تجميع 24 ساعة (يجب جمعها في حاوية بلاستيكية صلبة بدون مادة حافظة)، وتعد ذات قيمة قصوى في تقييم علاج الاستخلاب. يتطلب حفظ الزئبق في العينات المخزنة التحميض والتجميد.
- **الشعر:** قد يكون مفيداً في الدراسات البيئية أو الحالات السريرية غير المعتادة.

التحليل

في التحقيق في أي تسمم مشتبه به أو تعرض للزئبق، يمكن أن يكون جمع عينات الدم والبول مفيداً. في حالة التسمم العرضي الحاد أو التعرض الحديث، يعد جمع عينات الدم مفيداً بشكل خاص. أما في حالة "التسمم التاريخي" أو تقييم التعرض المهني أو لدى المرضى الذين لا تظهر عليهم أعراض، فإن عينة البول "العشوائية" هي العينة الأولية المفضلة، على الرغم من أن استقرار الزئبق في عينات البول ضعيف عند التخزين لفترة طويلة. غالباً ما يتم تحديد الزئبق في العينات البيولوجية (البول والدم والشعر) باستخدام تقنية "البخار البارد" (cold vapour) لـ AAS، وقد نُشر عدد كبير من الطرق الموثوقة (Ngim et al. 1988; Pineau et al. 1990). وفي السنوات الأخيرة، تم تطوير عدد من الأنظمة التجارية التي تستخدم خلايا التدفق التي تزيد الحساسية بشكل كبير. وقد أدى التوفر الأوسع لـ (ICP-MS) إلى استخدامه لتحليل الزئبق في السوائل البيولوجية، وخاصة الدم، عند مستويات تعرض منخفضة جداً (White 1999).

التفسير

القيم المرجعية للزئبق في الدم لدى السكان غير المعرضين أقل من 4 ميكروجرام/لتر (20 نانومول/لتر)، وأقل من 5 ميكروجرام/لتر (25 نانومول/لتر) في البول. مع التعرض المزمن، يوجد عموماً ارتباط جيد بين التعرض لأبخرة الزئبق والتركيز في البول، خاصة عندما يكون هناك تعرض كبير. قد يكون من الصعب تفسير تركيزات الزئبق في الدم والبول عند مستويات منخفضة من التعرض المزعوم، حيث قد تساهم مصادر أخرى للزئبق من الغذاء أو حشوات "ملغم الزئبق" بشكل كبير. إن "مؤشر التعرض البيولوجي" (BEI) الحالي الموصى به من قبل ACGHI (الولايات المتحدة الأمريكية) لتقييم التعرض المهني هو تركيز زئبق (إجمالي) في البول قبل نوبة العمل يبلغ 35 ميكروجرام/جم كرياتينين، أو تركيز زئبق في الدم في نهاية نوبة العمل وفي نهاية أسبوع العمل يبلغ 15 ميكروجرام/لتر (75 نانومول/لتر).

لدى الأفراد الذين لديهم حشوات "ملغم الزئبق"، نادراً ما تزيد تركيزات زئبق البول عن 8 ميكروجرام/لتر (40 نانومول/لتر). ومع ذلك، فقد أبلغت دراسات ما بعد الوفاة عن تركيزات أعلى بكثير من الزئبق في أنسجة مثل الدماغ لدى الأفراد الذين لديهم عدد أكبر من حشوات الملغم (Guzzi et al. 2006). يساهم الزئبق الغذائي (خاصة الأسماك) في تركيز الزئبق الموجود في الدم، ولكنه عادة ما يكون ضمن الحدود المرجعية. قد تتراكم لدى المجموعات السكانية التي تستهلك كميات كبيرة بشكل غير عادي من أنواع معينة من الأسماك (مثل سمك أبو سيف) أو لحوم الحيتان تركيزات عالية من (ميثيل) الزئبق (Kales and Goldman 2002). هناك بعض الأدلة على أن مثل هذا التعرض يمثل خطراً جسيماً أثناء الحمل وفي النمو المبكر للطفل (Grandjean et al. 2003)، أو في حالات معينة، فقدان حدة البصر أو ضعف الرؤية اللونية (Saldana et al. 2006). تكون تركيزات الزئبق في الشعر عموماً <1 ميكروجرام/جم لدى الأفراد الذين لا يتناولون الأسماك، ولكن غالباً ما يصعب تفسير التركيزات المرتفعة في الشعر، ولا ترتبط دائماً بتركيزات الزئبق في الدم أو بأعراض السمية (Nuttall 2006). في حالات التسمم الشديد، من المفيد مراقبة تركيزات الزئبق في الدم والبول، خاصة عند إعطاء علاج الاستخلاب. يمكن استخدام قياس إفراز الزئبق خلال 24 ساعة كدليل على كفاءة إزالة المعدن المخلبي. ومع ذلك، فإن استخدام اختبارات "تحدي الاستخلاب" (chelation challenge tests) لتقييم عبء الزئبق في الجسم لدى المرضى الذين يعانون من أعراض غير محددة لسمية الزئبق المزعومة قد يكون غير موثوق به أو مرتبطاً بآثار جانبية خطيرة (Archbold et al. 2004).

السيلينيوم (Selenium)

استقر وضع السيلينيوم الآن كعنصر نزر أساسي، على الرغم من أنه كان يرتبط تاريخياً بالسمية فقط نتيجة التعرض المهني أو البيئي (Glover 1970; Yang et al. 1983). يوجد السيلينيوم في الطبيعة بشكل رئيسي في صورة "سيلينيدات" معدنية في خامات الكبريتيد، وأحياناً بالاشتراك مع الزرنيخ.

ترتبط معظم التقارير المبكرة عن سمية السيلينيوم بالتسمم لدى الماشية الرعوية، وهو سبب ما يُعرف بـ "مرض القلويات" (alkali disease) و"الترنح الأعمى" (Wilber 1980) (blind staggers). وتتمثل مصادر السيلينيوم في مثل هذه الحالات في نباتات معينة تركز السيلينيوم عند نموها في تربة غنية به. كما توجد تقارير مبكرة موثقة جيداً عن سمية السيلينيوم المزمنة (selenosis) في الشعوب التي تعيش في مناطق يوجد فيها كميات مفرطة من السيلينيوم في التربة ومصادر المياه، مثل أجزاء من ريف الصين.

هناك العديد من الاستخدامات الصناعية للسيلينيوم، بما في ذلك تصنيع الخلايا الشمسية والكهروضوئية، والزجاج الملون، والسيراميك. كما تُستخدم مركبات السيلينيوم (مثل كبريتيد السيلينيوم) كعوامل مضادة للقشرة في الشامبو، وفي مركبات تلوين الأسلحة (gun-blueing)، التي تحتوي على حمض السيلينيوز. في العقد الماضي، زاد الاهتمام والترويج لقيمة المكملات الغذائية المحتوية على السيلينيوم في الوقاية من مجموعة واسعة من الاضطرابات بما في ذلك الأمراض التنكسية، والعدوى الفيروسية، وأشكال مختلفة من السرطان. قد تحتوي بعض المكملات على تركيزات عالية نسبياً من السيلينيوم، والتي قد تسبب السمية إذا تم تناولها بإفراط (Clark et al. 1996).

السيلينيوم هو شبه فلز يقع في المجموعة السادسة من الجدول الدوري. حالات الأكسدة الشائعة للسيلينيوم هي 2+ (سيلينيد)، 4+ (سيلينيت)، و6+ (سيلينات). وهناك أيضاً عدد من مركبات السيلينيوم العضوية المهمة التي يستطيع فيها السيلينيوم الحلول محل الكبريت (مثل سيلينوسيستين وسيلينوميثيونين). شهدت السنوات الأخيرة زيادة كبيرة في فهمنا للدور البيولوجي الأساسي للسيلينيوم، حيث توجد بروتينات سيلينية مهمة و"جلوتاثيون بيروكسيداز" (GSHPx) في معظم أنسجة الجسم (Thompson 1998). لقد ثبت أن للسيلينيوم دوراً مهماً في وظائف الغدة الدرقية، والخصوبة (لا سيما حركة الحيوانات المنوية)، وتنظيم المزاج، والمناعة ضد الأمراض المعدية، وكـ "مضاد أكسدة" خلوي، يعمل بالاشتراك مع فيتاميني E و C (Rayman

(Reilly 1993 ;2000. يرتبط نقص السيلينيوم بعدد من الاضطرابات، مثل مرض "كيشان" (في الصين)، ومؤخراً بزيادة خطر الإصابة بالسرطان (Bjelakovic et al. 2004). يمكن أن يكون للسيلينيوم أيضاً دور وقائي في تخفيف التعرض البشري للزئبق (Hansen 1988).

في حالات التعرض المهني أو البيئي المزمن، يرتبط السيلينيوم بعلامات وأعراض مثل تهيج الجلد، ورائحة الثوم في النفس، والأظافر المؤلمة والمتغيرة اللون، وهشاشة الشعر، والثعلبة. قد تحدث السمية بعد ابتلاع أو استنشاق مركبات سيلينيوم مختلفة. ومع ذلك، فإن السيلينيوم العنصري ذو توافر حيوي ضعيف، ومركبات السيلينيوم العضوية، رغم أنها ذات توافر حيوي عالٍ جداً، إلا أنها غير سامة نسبياً. بالمقابل، فإن مركبات السيلينيوم غير العضوية القابلة للذوبان، لا سيما السيلينيت، وحمض السيلينيوز، وأكسيد وثنائي أكسيد السيلينيوم (بعد تحولها داخل الجسم إلى حمض السيلينيوز) شديدة السمية إذا ابتلعت، وترتبط بحالات تسمم حادة أو وفيات (Alderman and Bergin 1986; Brighthope 2007; Gasmi et al. 1997; Handsacker et al. 2005; Köppel et al. 1986; Lombeck et al. 1987; Matoba et al. 1986; Quadrani et al. 2000; Schellmann et al. 1986; Spiller and Pfiefer 2007).

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 5 مل، في أنبوب K-EDTA.
- **البول:** عينة فرعية من تجميع 24 ساعة في حالات التسمم الحاد الشديد.
- **محتويات المعدة:** مفيدة في حالات الوفاة.
- **بقايا موقع الحادث:** مفيدة لأغراض التعريف.

التحليل

اعتمدت معظم الطرق المبكرة لقياس السيلينيوم في الدم على قياس الفلورة. تشمل التقنيات الموصوفة حديثاً الكروماتوغرافيا السائلة (LC) والغازية (GC)، و(ETAAS) بالتحليل المباشر أو بعد توليد الهيدريد، و(ICP-MS)، والتي يمكنها أيضاً قياس السيلينيوم في الأنسجة (Sheehan and Halls 1999). تتوفر تجارياً مواد مرجعية مناسبة للتحكم في الدقة الداخلية، ويدرج عدد من برامج تقييم الجودة الخارجية تحليل السيلينيوم في البلازما والدم.

التفسير

تختلف النطاقات المرجعية للسيلينيوم في الدم الكامل والبلازما من بلد لآخر بسبب الاختلافات في المصادر الغذائية للسيلينيوم. في المملكة المتحدة، تتراوح النطاقات المرجعية لبلازما البالغين عموماً بين 70 و130 ميكروجرام/لتر (0.9 و1.7 ميكرومول/لتر)، مع قيمة وسيطة للسكان تبلغ حوالي 90 ميكروجرام/لتر (1.2 ميكرومول/لتر).

النطاق المرجعي للأطفال أقل بكثير من نطاق البالغين، خاصة عند الرضع والأطفال الأصغر سناً (سيلينيوم المصل حوالي 35–115 ميكروجرام/لتر). القيم المرجعية لسيلينيوم الدم الكامل أعلى قليلاً وتكون عموماً ضمن النطاق 80–180 ميكروجرام/لتر لدى البالغين. تتأثر قيم سيلينيوم البلازما والدم بشكل كبير بالنظام الغذائي، لا سيما تناول الأطعمة الغنية بالسيلينيوم، مثل الجوز البرازيلي، أو استخدام المكملات التي تحتوي على السيلينيوم. قد يختلف إفراز السيلينيوم في البول اختلافاً كبيراً، اعتماداً على المدخول، ولكنه عادة ما يكون ضمن النطاق 20–200 ميكروجرام/لتر. يمكن أن يكون قياس سيلينيوم البول مفيداً في مراقبة التعرض المهني لمركبات السيلينيوم.

في حالات التسمم الحاد، يمكن الكشف عن تركيزات عالية جداً من السيلينيوم في الدم الكامل والبلازما والبول. تشير قيم سيلينيوم الدم الأقل من 1000 ميكروجرام/لتر (12 ميكرومول/لتر) إلى سمية ضئيلة، بينما تتنبأ القيم الأعلى من 2000 ميكروجرام/لتر (25 ميكرومول/لتر) بمضاعفات خطيرة (Gasmi et al. 1997).

الثاليوم (Thallium)

أُدخلت أملاح الثاليوم، وخاصة الكبريتات، في الطب في أواخر القرن التاسع عشر لعلاج العديد من الاضطرابات، بما في ذلك مرض الزهري، ولكن سرعان ما تم التخلي عنها بسبب سميتها. ومن التطبيقات العلاجية التي استمرت لفترة أطول قليلاً، استخدامها كعامل مزيل للشعر في علاج سعفة فروة الرأس، لا سيما عند الأطفال. استمر هذا حتى أربعينيات القرن العشرين، رغم المشاكل المتكررة المرتبطة بسمية الثاليوم، والتي تضمنت العديد من الوفيات. كما أُدخلت أملاح الثاليوم كمبيدات للقوارض في عشرينيات القرن العشرين ولا تزال تُطبق في بعض الدول. تشمل الاستخدامات الصناعية الحديثة لأملاح الثاليوم تصنيع المجوهرات التجميلية، والأصباغ، وأشباه الموصلات، والألعاب النارية، والعدسات البصرية، وإنتاج سبائك خاصة لبطاريات مياه البحر.

معظم مركبات الثاليوم عديمة اللون والطعم والرائحة. تشمل أملاح الثاليوم القابلة للذوبان في الماء الكبريتات والأسيتات والكربونات، وجميعها شديدة السمية (Aoyama et al. 1986; Moore et al. 1993; Saddique and Peterson 1983). وتُقدر الجرعة المميتة عن طريق الفم لدى البالغين بنحو 1–2 جم. الصورة السريرية لتسمم الثاليوم معقدة للغاية، وقد يكون تشخيص التسمم صعباً جداً في مراحله الأولى، وقد يختلط مع تسمم الكولشيسين، أو التسمم الغذائي، أو متلازمة غيلان باريه (Hoffman 2003; Matthews and Dubowitz 1977). قد لا تكون العلامات والأعراض الأولية لتسمم الثاليوم الحاد شديدة بشكل خاص، ولكنها عادة ما تشمل ألم البطن، والغثيان، والقيء، والإسهال، ويليها أحياناً إمساك (Hoffman 2003; Villanueva et al. 1990; Wainwright et al. 1988). قد تتطور الأعراض العصبية على مدى حوالي أسبوع إلى أسبوعين وتشمل تغيرات عصبية محيطية ومركزية (Cavanagh 1991; Cavanagh et al. 1974). السمة الأكثر تميزاً هي اعتلال الأعصاب المحيطية الصاعد المترقي بسرعة. كما قد تتطور تغيرات قلبية وعائية، مثل ارتفاع ضغط الدم وتسرع القلب، بعد أسبوع أو أسبوعين. العلامات الأكثر تميزاً المرتبطة بسمية الثاليوم هي التغيرات الجلدية، التي قد تستغرق ما يصل إلى 4 أسابيع لتتطور بالكامل، وتشمل خلال الأسبوع الأول تصبغاً أولياً بنياً داكناً أو أسود لجذور الشعر (لا يرى إلا تحت المجهر) يليه فقدان تدريجي لشعر الجسم (شعر فروة الرأس بشكل رئيسي)، مما قد يؤدي إلى ثعلبة كاملة بعد حوالي شهر. كما قد يتأثر نمو الأظافر، مع ظهور خطوط بيضاء عرضية، تشبه تلك التي تُرى في التسمم بالزرنيخ. تتمتع أملاح الثاليوم بتوافر حيوي فموي عالٍ، لكن الحرائك الدوائية للمعدن معقدة للغاية، مع حجم توزيع عالٍ وعمر نصفي نهائي للتخلص يتراوح بين أسبوع و4 أسابيع (Hoffman 2003). إن آلية سمية الثاليوم غير مفهومة جيداً؛ وبما أن للثاليوم نصف قطر أيوني مشابه لنصف قطر البوتاسيوم، يُعتقد أن أغشية الخلايا غير قادرة على التمييز بين العنصرين. ونتيجة لذلك، يستطيع الثاليوم أن يتراكم في مناطق الجسم ذات المحتوى العالي من البوتاسيوم، مثل الجهاز العصبي المركزي والمحيطي. عند التركيزات العالية، يثبط الثاليوم أيضاً أنظمة الإنزيمات المعتمدة على البوتاسيوم، بما في ذلك تلك المشاركة في إنتاج الطاقة ضمن دورة السترات. التسمم العرضي بالثاليوم غير شائع نسبياً في الدول التي لم تعد تسمح باستخدامه كمبيد للقوارض. ومع ذلك، أُبلغ عن تسمم بالثاليوم في بعض الحالات التاريخية التي تنطوي على غش المخدرات غير المشروعة مثل ثنائي المورفين والكوكايين، ومؤخراً في حالات الاشتباه بالقتل، بما في ذلك الاغتيالات السياسية.

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 5 مل، في أنبوب K-EDTA.

- **البول:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة (تجميع 24 ساعة له قيمة فقط في مراقبة العلاج الفموي المضاد للسموم بـ "أزرق برلين"). العينات الإضافية التي قد تكون ذات أهمية جنائية تشمل الشعر والأظافر.

التحليل

تاريخياً، النهج الأكثر استخداماً لتحليل الثاليوم في الدم أو البول يتضمن استخدام (ETAAS). ومؤخراً، أصبحت (ICP-MS) التقنية المفضلة، حيث يمكن تطبيقها بسهولة لتحليل الثاليوم في نطاق أوسع من المصفوفات بما في ذلك الشعر والأظافر (Hann et al. 2005; Yoshinaga et al. 1993).

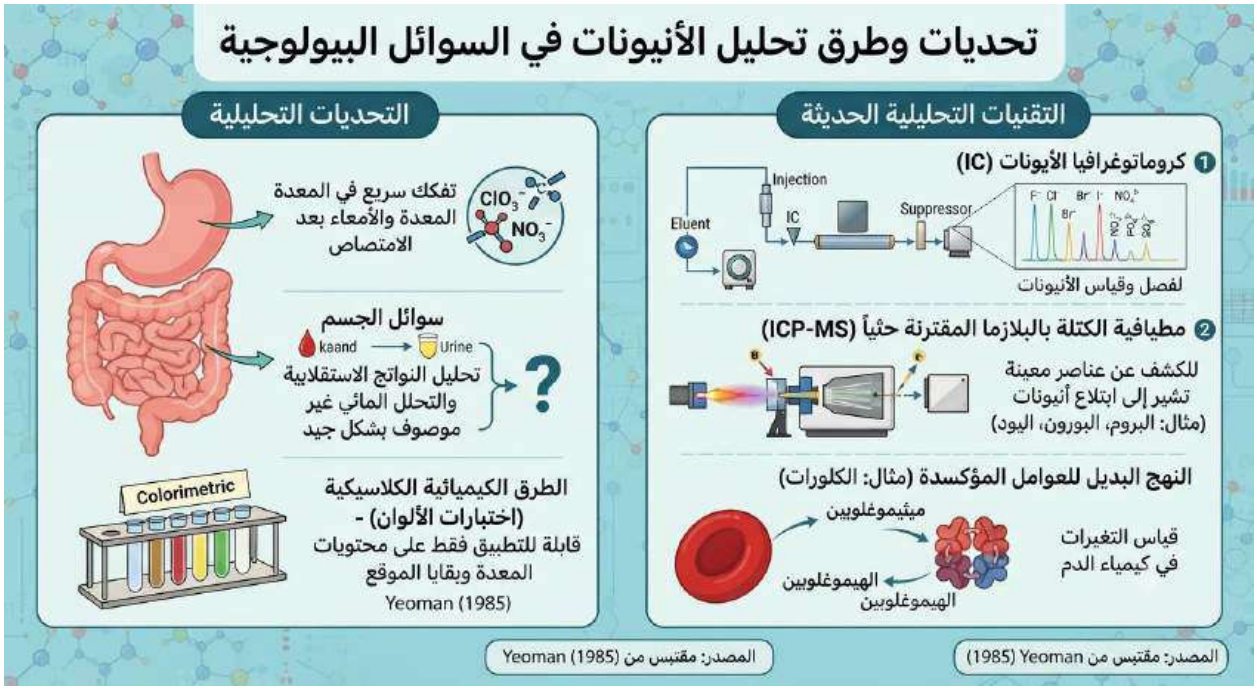
التفسير

القيم المرجعية للثاليوم في الدم والبول أقل من 1 ميكروجرام/لتر (5 نانومول/لتر)، وترتبط التراكيز التي تتجاوز 100 ميكروجرام/لتر (0.5 ميكرومول/لتر) في الدم و200 ميكروجرام/لتر (1 ميكرومول/لتر) في البول بالسمية. في حالات التسمم بالثاليوم الشديدة بشكل خاص، قد تُسجل مستويات عالية جداً من الثاليوم في الدم (<300 ميكروجرام/لتر) والبول (<600 ميكروجرام/لتر) خلال الأيام القليلة الأولى بعد الابتلاع. ترتبط الوفيات بتركيزات ثاليوم في الدم تتجاوز 2500 ميكروجرام/لتر (Hologgitas et al. 1980). أشارت دراسة حديثة إلى أنه في حالات التسمم بالثاليوم قصير المدى، يبدو أن النتائج الجلدية ترتبط بتركيزات الثاليوم. يعد قياس إفراز الثاليوم في البول مفيداً في الحالات التي يتم فيها البدء بالعلاج الفموي المضاد للسموم بـ "أزرق برلين" (سداسي سيانو فيرات البوتاسيوم الحديدي) (Heath et al. 1983; Hoffman 2003; Pedersen et al. 1978). يشكل هذا الصباغ معقداً غير قابل للذوبان مع الثاليوم في الأمعاء، مما يؤدي إلى زيادة إفرازه في البراز. أُبلغ عن تركيزات الثاليوم في الأنسجة في حالات الوفاة الناتجة عن تسمم الثاليوم، والتي تصل إلى 178 ميكروجرام/جم (الوزن الرطب) (Davis et al. 1981).

الأنيونات (Anions)

يُشكل التحليل المنهجي للأنيونات في سوائل الجسم تحدياً تحليلياً كبيراً. تاريخياً، كان النهج الرئيسي هو تحليل محتويات المعدة وبقايا موقع الحادث باستخدام طرق تحليل لونية كلاسيكية (Yeoman 1985). ومع ذلك، فإن العديد من الأنيونات غير مستقرة وتخضع لتفكك سريع في المعدة والأمعاء بعد الامتصاص. كما أن تحليل النواتج الاستقلابية ونواتج التحلل المائي المختلفة في الدم أو البول باستخدام الطرق الحديثة ليس موصوفاً بشكل جيد. في بعض الحالات، يُفضل إجراء التحقيق في التسمم الناتج عن الأنيونات التي تعمل كعوامل مؤكسدة (مثل الكلورات) من خلال قياس التغيرات في كيمياء الدم، مثل تكوين الهيموغلوبين المؤكسد (ميثيموغلوبين).

لقد كان تطوير التقنيات التحليلية مثل "كروماتوغرافيا الأيونات" لفصل وقياس الأنيونات في السوائل البيولوجية بطيئاً. ومع ذلك، فإن التطبيق المتزايد لتقنيات (ICP-MS) قد عزز بشكل كبير القدرة على الكشف عن وجود تركيزات مرتفعة من عناصر معينة (مثل البروم والبورون واليود) في السوائل والأنسجة البيولوجية التي قد تشير إلى ابتلاع أنيونات معينة. لا تزال الطرق الكيميائية التحليلية الكلاسيكية (اختبارات الألوان) قابلة للتطبيق أحياناً في الحالات التي تتوفر فيها محتويات المعدة أو بقايا موقع الحادث (Yeoman 1985).



البورات (Borates)

استُخدم حمض البوريك كمطهر للاستخدام الخارجي لأكثر من 100 عام، لكنه استُبدل عموماً بالعوامل الحديثة. ولا يزال "بورات الصوديوم" (البوراكس) يُستخدم في عوامل التنظيف، ومحاليل العدسات اللاصقة، ومواد حفظ الخشب، والمبيدات الحشرية ومبيدات الفطريات. كما استُخدم حمض البوريك كمادة حافظة في عينات البول التي تتطلب فحصاً بكتريولوجياً.

يتوزع البورون على نطاق واسع في البيئة وهو مكون طبيعي في النظام الغذائي، بما في ذلك مياه الشرب (Murray 1995). البورون عنصر أساسي في النباتات، لكن دوره كعنصر نزر أساسي في الحيوانات أقل ترسيخاً. تشير عدد من الدراسات السريرية إلى أن نقص البورون لدى البشر قد يكون مهماً في مجموعة واسعة من الحالات المرضية مثل هشاشة العظام والتهاب المفاصل والخرف. وقد روج قطاع الصحة التكميلية للمكملات المحتوية على البورون، مما أدى إلى احتمال حدوث مداواة ذاتية مفرطة وسمية.

تتمتع مركبات البورون بسمية منخفضة نسبياً، وتشير التقارير إلى أن الأعراض بعد ابتلاع حاد لمرة واحدة غالباً ما تكون خفيفة جداً. ومع ذلك، أُبلغ عن عدد من حالات التسمم الحاد والمزمن بالبورون لدى الأطفال والبالغين (Hamilton and Wong et al. 1964; Linden et al. 1986; O'Sullivan and Taylor 1983; Wolf 2007). شملت العلامات والأعراض عموماً الغثيان والقيء والإسهال وألم البطن. في بعض الحالات، قد يصاب المرضى باحمرار جلدي عام يوصف أحياناً بأنه يبدو مثل "جراد البحر المسلوق". كما وُصفت نوبات صرع، وغيبوبة، وخلل وظيفي كلوي في الحالات الأكثر شدة.

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 5 مل، في أنبوب K-EDTA.
- **البول:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة.
- **محتويات المعدة:** مفيدة في فحص ما بعد الوفاة.
- **الشعر:** قد يكون جمع عينات الشعر مفيداً في حالات الإعطاء المزمن غير العرضي.

التحليل

تُجرى التجربة بنقل جزء من العينة إلى حوض تبخير، وإضافة 1 مل من حمض الكبريتيك و3 مل من الإيثانول، ثم الإشعال. يشير وجود حدود خضراء حول اللهب إلى وجود البورات.

الطرق الكمية: تاريخياً، تم قياس البورات في السوائل والأنسجة البيولوجية بواسطة إجراءات لونية باستخدام "حمض الكارمينيك" ككاشف. ومؤخراً، استُخدمت (ETAAS) للتحقيق في حالات الاشتباه بالتسمم الحاد حيث تكون تركيزات البورون في الدم عالية بما يكفي لتعويض ضعف حساسية الطرق. تعد (ICP-MS) أكثر حساسية بكثير وقد استُخدمت بنجاح لقياس تركيز البورون في الدم والأنسجة لدى المرضى الذين يتلقون علاجاً بأدوية محتوية على البورون مثل "بورون فينيل ألانين" (BPA) كجزء من علاج التقاط النيوترونات بالبورون لبعض أنواع السرطان (Morten and Delves 1999; Goule et al. 2005).

التفسير

تم الكشف عن تركيزات عالية جداً من البورون في حالات التسمم الحاد بالبورات، خاصة عند الأطفال (Linden et al. 1986). وقد أُبلغ عن تركيزات بورون في البلازما تتراوح من 200 إلى 1600 ميكروجرام/لتر في الحالات المميتة. كما تم الإبلاغ عن النجاة في حالات التسمم لدى البالغين رغم أن تركيزات البورون عند الدخول تجاوزت 1000 ميكروجرام/لتر. القيم المرجعية لدى البالغين الأصحاء تظهر تركيزات بورون في الدم بين 14 و44 ميكروجرام/لتر، وتركيزات في البلازما بين 19 و79 ميكروجرام/لتر، وتركيزات في البول بين 282 و2072 ميكروجرام/لتر، وقيم في الشعر بين 0.26 و1.87 ميكروجرام/لتر (Goule et al. 2005). لا توجد بيانات عن الأطفال أو الشعوب التي تستهلك إمدادات غذاء أو مياه ذات محتوى عالٍ من البورون يمكن أن تؤثر بشكل كبير على إفراز البورون في البول.

البروميد (Bromide)

أُدخلت أملاح البروميد (مثل بروميدات الأمونيوم والبوتاسيوم والصوديوم) لأول مرة في الطب في القرن التاسع عشر، واستُخدمت على نطاق واسع كمضادات للاختلاج ومهدئات. وباستثناء البروميدات العضوية مثل "كاربـرومال" (مهدئ)، أصبح استخدامها الآن محدوداً. ومع ذلك، لا يزال من الممكن العثور على بروميد البوتاسيوم في الأدوية التقليدية المستخدمة في علاج الصرع. استُخدمت البرومات كمواد حافظة وصواعق متفجرة. أما "بروميد الميثيل" فهو غاز عديم اللون يُستخدم غالباً كمبيد حشري لتبخير مخازن الحبوب والتربة، ولكنه استُخدم تاريخياً أيضاً كغاز تبريد وفي طفايات الحريق. من المفترض التخلص من استخدامه تدريجياً بموجب بروتوكول مونتريال بشأن المواد المستنفدة لطبقة الأوزون، ولكنه لا يزال مستخدماً حالياً في أجزاء كثيرة من العالم. يُطلق بروميد الميثيل أيون البروميد كناتج استقلابي، ويرتبط بحالات التسمم العرضي، لا سيما في الأوساط المهنية (Yamano and Nakadate 2006).

بعد ابتلاع أملاح البروميد، يحدث امتصاص أيون البروميد بسرعة من المعدة والأمعاء الدقيقة القريبة عن طريق الانتشار السلبي. تسلك أيونات البروميد سلوك أيونات الكلوريد وتتوزع بشكل رئيسي في السوائل خارج الخلايا. المسار الأكثر أهمية للتخلص منه هو عن طريق الكلى. العمر النصفي للتخلص منها طويل نسبياً، حيث يبلغ حوالي 10 أيام بعد الجرعة الحادة، أو عدة أسابيع بعد التوقف عن التناول المزمن، لا سيما في حالات التسمم بالبروميد.

قد يسبب التسمم بالبروميد أعراضاً عصبية معقدة (مثل الرعاش، والرنح، والاضطراب اللاإرادي، والضعف الإدراكي)، وقد يكون التشخيص السريري صعباً إذا لم يتم الاشتباه في استخدام أملاح البروميد. ارتبط تسمم بروميد الميثيل بآفة قابلة للعكس في جذع الدماغ والمخيخ تظهر في التصوير بالرنين المغناطيسي، مما يشير إلى أن التعرض للبروميد يمكن أن ينتج "متلازمة حرمان طاقة سامة" حادة ترتبط عادة بالاضطرابات الغذائية والوراثية مثل اعتلال دماغ فيرنيكه (Geyer et al. 2005). في المقابل، يرتبط تسمم البرومات بتطور فقدان سمع غير قابل للعكس بسبب تلف القوقعة.

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 5 مل، في أنبوب مهيبَر (heparinised) أو أنبوب K-EDTA.
- **البول:** 2 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة.
- **محتويات المعدة:** مفيدة في فحص ما بعد الوفاة للحالات المميتة.
- **بقايا موقع الحادث:** مفيدة لأغراض التعريف.

التحليل

لتحليل أيونات البروميد في الدم أو البلازما أو البول، وُصفت إجراءات لونية، وأقطاب انتقائية للأيونات، و(GC)، أو (ICP-MS) (Corina et al. 1979; Quinones et al. 2006; Sunshine 1975). يمكن أن تُظهر طرق الكيمياء الحيوية السريرية الروتينية لتحليل كلوريد البلازما قيماً مرتفعة بشكل زائف عند وجود مستويات عالية من أيون البروميد (Wenk et al. 1976). إحدى الطرق اللونية الأقدم القائمة على التفاعل مع كلوريد الذهب (Sunshine 1975) لا تزال تقنية مفيدة للقياس السريع لأيونات البروميد في المصل في حالات التسمم الحاد. يبلغ حد الكشف لهذه الطريقة 50 ميكروجرام/لتر باستخدام 1 مل من العينة. نطاق المعايرة المناسب هو 100–2000 ميكروجرام/لتر من أيون البروميد. ومؤخراً، تم تطوير عدد من طرق الكروماتوغرافيا الأيونية لفصل البروميد والبرومات في مياه التطهير الناتجة عن الأوزنة (Schminke and Seubert 2000). إن التوفر الأوسع لـ (ICP-MS) يجعل تحليل أيون البروميد في السوائل والأنسجة البيولوجية سهلاً نسبياً، مع حد كشف منخفض جداً.

الجدول 7: تركيزات بروميد البلازما فيما يتعلق بالاستخدام "العلاجي" والتسمم

الحالة	أيون بروميد البلازما (ميكروجرام/لتر)	أيون بروميد البلازما المكافئ (مليمول/لتر)
القيم المرجعية "الطبيعية"	<5	0.05
ذروة التركيز بعد جرعة فموية مفردة 100 مجم Br/كجم	230	2.9
تراكيز "علاجية" لدى البالغين المصابين بالصرع	750–1000	9.3–12.5
علامات التسمم	>1000	12.5
علامات وأعراض التسمم الشديد	>3000	37.5

التفسير

على الرغم من وجود علاقة معقدة بين تركيز أيون البروميد وعلامات وأعراض السمية، إلا أن قياس البروميد مفيد في تشخيص وإدارة حالات التسمم. يوضح الجدول 7 القيم المرجعية للبروميد والتركيزات النموذجية بعد الاستخدام العلاجي ولحالات التسمم بالبروميد (Maes et al. 1985; Vaiseman et al. 1986). قد يكون التخلص من البروميد من الجسم بطيئاً للغاية في حالات التسمم دون استخدام علاج الإزالة النشط (مثل إدرار البول، أو غسيل الكلى، أو الترشيح الدموي).

الكلورات (Chlorate)

يُعد كلورات الصوديوم ($NaClO_3$) مبيداً للأعشاب فعالاً وغير مكلف وغير انتقائي. ويُستخدم كلورات البوتاسيوم في تصنيع أعواد الثقاب وبعض المتفجرات. كلا المركبين عاملان مؤكسدان قويان. تشمل العلامات والأعراض المبكرة لتسمم الكلورات

الغثيان والقيء وألم البطن (Steffen and Seitz 1981; Vaiseman et al. 1986). يؤدي الامتصاص الجهازي إلى أكسدة جوهرية للهيموغلوبين لتكوين "ميثيموغلوبين"، مما قد يسبب زرقة، وضيقاً في التنفس، وانقطاع البول، وغيبوبة (Ellenhorn 1997). كما قد يحدث انحلال دم داخل الأوعية وحماض استقلابي شديد (Ellenhorn 1997). وقد يسبب ابتلاع كلورات البوتاسيوم فرط بوتاسيوم الدم.

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 5 مل، في أنبوب ليثيوم-هيبارين.
- **البول:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة.
- **محتويات المعدة:** مفيدة في التحقيق في حالات الوفاة.
- **بقايا موقع الحادث:** مفيدة لأغراض التعريف.

التحليل

في الحالات السريرية لتسمم الكلورات، يعتمد التشخيص على قياس "الميثيموغلوبين"، والذي يتم بسهولة كجزء من التحليل الكيميائي الحيوي الروتيني. وقد وُصفت طريقة تتضمن الكروماتوغرافيا الأيونية للتحليل المباشر للكلورات في سوائل وأنسجة الجسم من قبل (Eysseric et al. 1999). يمكن للكروماتوغرافيا الأيونية فصل الكلورات عن الأنيونات ذات الصلة الوثيقة مثل النترات والبرومات والفوسفات.

التفسير

يمكن أن يحدث تسمم خطير وأحياناً مميت بعد ابتلاع 15 جم أو أكثر من كلورات الصوديوم أو البوتاسيوم. تضمنت الحالة التي وصفها (Eysseric et al. 1999) رجلاً يبلغ من العمر 49 عاماً أُدخل إلى المستشفى بخصائص شديدة مرتبطة بتسمم الكلورات؛ فقد كان يعاني من انحلال دم حاد مع هيموغلوبين بلازما 3.9 جم/لتر وتكوين 30% من الميثيموغلوبين. وُجدت تركيزات عالية من أيون الكلورات في بلازما الدخول (54 مجم/لتر)، ومحتويات المعدة (1300 مجم/لتر)، والبول (4300 مجم/لتر). توفي المريض بعد 12 ساعة من دخوله.

السيانيد (Cyanide)

يُعد التسمم الشديد أو المميت بالسيانيد نادراً نسبياً، ومعظمه ينطوي على الابتلاع الانتحاري لأملاح السيانيد. "سيانيد الهيدروجين" (HCN؛ حمض البروسيك) سائل متطاير شديد السمية. تنبعث أبخرة سيانيد الهيدروجين عند خلط أملاح السيانيد مع الأحماض أو عند إنتاجها في المعدة بعد الابتلاع الفموي. على الرغم من أن لـ HCN رائحة مميزة تشبه اللوز، إلا أن ما يصل إلى 50% من السكان غير قادرين على شمها. والمثير للدهشة أنها لم تكن سمة مميزة بعد الوفاة في سلسلة كبيرة من حالات الانتحار بالسيانيد، على الرغم من أن هذا قد يكون مرتبطاً بأنظمة تهوية تدفق الهواء في غرف التشريح (Gill et al. 2004). تشمل الأملاح القابلة للذوبان للسيانيد سيانيد البوتاسيوم والصوديوم، والتي تُستخدم صناعياً في الطلاء الكهربائي ومعالجة المعادن وككواشف مخبرية. تشمل الأملاح الأقل ذوباناً للسيانيد سيانيد الفضة والذهب، وسيانيد الزئبق، والتي تطلق أيضاً HCN عند ملامستها للأحماض القوية. كقاعدة عامة، يتم الإبلاغ عن معظم حالات الانتحار بالسيانيد بين الأفراد، ومعظمهم من الذكور، الذين لديهم وصول مهني إلى أملاح السيانيد. قد يتكون HCN أيضاً كناتج احتراق في الحرائق من مواد محتوية على النيتروجين مثل الصوف والحرير أو البوليمرات الاصطناعية مثل البولي يوريثان والبولي أميد والبولي أميدات

(Barillo et al. 1994; Baud et al. 1991; Chaturvedi et al. 2001). تشمل المصادر الأقل شيوعاً للسيانيد الابتلاع العرضي أو المتعمد للنباتات السيانوجينية أو بذورها.

تظهر علامات وأعراض سمية السيانيد بسرعة بعد استنشاق HCN أو ابتلاع أملاح السيانيد؛ وتُقدر الجرعات المميتة بحوالي 100 مجم من HCN أو 300 مجم من سيانيد البوتاسيوم (Ellenhorn 1997). تشمل العلامات العصبية المبكرة الصداع، والدوخة، والقلق، والارتباك. في الحالات الشديدة، قد يحدث فقدان سريع للوعي، وفشل تنفسي، وتشنجات تؤدي إلى توقف القلب والتنفس والوفاة. آلية سمية السيانيد هي سد نقل الإلكترون في معقد "سيتوكروم a-a3"؛ وهذا يؤدي إلى انخفاض حاد في الاستقلاب التأكسدي ونقص الأكسجة الخلوي، مما يؤثر بشكل مباشر على الدماغ والقلب. يتم استقلاب السيانيد بسرعة في الكبد بواسطة إنزيم (rhodanase) إلى "ثيوسيانات" (SCN)، وهي غير سامة إلى حد كبير. ونتيجة لذلك، تنخفض تركيزات سيانيد الدم بسرعة بعد التعرض أو الابتلاع، مع عمر نصفي تقديري للتخلص يبلغ 1–2 ساعة.

تعد العديد من الترياقات مفيدة في علاج تسمم السيانيد (مثل كوبالت EDTA وهيدروكسي كوبالامين). نادراً ما يكون قياس تركيزات سيانيد الدم مفيداً في حالات الطوارئ الطبية عند التعامل مع الإدارة الحادة للمريض، لكنه قد يكون مفيداً في التقييم الاسترجاعي لشدة ابتلاع السيانيد وفي تقييم فعالية الترياقات المختلفة. يُعد قياس سيانيد الدم مفيداً أكثر في التحقيق في حالات الاشتباه بالتسمم بالسيانيد وفي الوفيات المرتبطة بالحرائق، بما في ذلك حوادث الطائرات.

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 10 مل، في حاوية ليثيوم-هيبارين أو K-EDTA.
- **محتويات المعدة:** مفيدة كجزء من فحص ما بعد الوفاة، ولكن يجب توخي الحذر الشديد بسبب خطر التعرض الثانوي للسيانيد.
- **ثبات العينة:** يكون السيانيد في الدم ثابتاً إذا حُفظ في درجة حرارة 4 مئوية لمدة تصل إلى أسبوع واحد، ولكنه غير مستقر إذا تم تجميده أو حفظه في درجة حرارة الغرفة. ومع ذلك، غالباً ما أُبلغ عن نتائج متناقضة فيما يتعلق بثبات السيانيد في الدم الكامل (Lindsay et al. 2004).

التحليل

وُصفت طرق عديدة لتحليل السيانيد في السوائل البيولوجية، تشمل تقنيات لونية أو فلورية أو كروماتوغرافية. بعض هذه الطرق قد تكون شاقة وغير مناسبة للتشخيص والإدارة الطارئة للمرضى (Lindsay et al. 2004). وتكرس العديد من الطرق الموصوفة للفحص الجنائي لدم ما بعد الوفاة ومحتويات المعدة. هناك طرق تعتمد على تكوين المعقد الملون الأرجواني "2-نيتروفينيل هيدروكسيلامين" (Guilbart and Kramer 1966)، وقد تم تكييف هذا التفاعل لطرق "كونواي للانتشار" الكمية. نظراً لأن هذه الطريقة لها نقطة نهاية غير مستقرة، يلزم عناية كبيرة في توحيد الإجراء التحليلي لضمان نتائج دقيقة. ومع ذلك، قدم (Vesey et al. 1999b) ابتكاراً هاماً أحدث تحسينات كبيرة؛ حيث أن الإجراء الجديد أسرع بكثير (<30 دقيقة) وله نقطة نهاية مستقرة تجعله مناسباً للتحليل السريع لسيانيد الدم في الحالات السريرية.

كما وُصفت طريقة فلورية مفيدة من قبل (Suzuki et al. 1982)، تعتمد على تفاعل السيانيد مع "بيريدوكسال 5 فوسفات" لإنتاج "حمض 4-بيريدوكسيك 5-فوسفات" شديد الفلورة في محلول حمضي. يمكن تطبيق هذه الطريقة على الحالات السريرية والجنائية على حد سواء، ولا تتطلب سوى 50 ميكرولتر من الدم، ويبلغ حد الكشف فيها 0.1 مجم/لتر. قد يساعد تحليل "ثيوسيانات" البلازما أو البول في تقييم التعرض "المزمن" للسيانيد، بما في ذلك استخدام المركبات السيانوجينية. قد يكون هذا مهماً لدى المرضى الذين يعانون من قصور كلوي، حيث قد تتراكم الثيوسيانات إلى مستويات عالية وتسبب السمية. وجود الثيوسيانات والثيوسلفات بتركيزات تصل إلى 50 مجم/لتر لا يتداخل مع تحديد السيانيد.

التفسير

توجد كميات صغيرة جداً من السيانيد في الدم نتيجة العمليات الاستقلابية الطبيعية وأيضاً من التدخين. القيم المرجعية متغيرة نوعاً ما؛ فقد أظهرت مراجعة حديثة للدراسات المنشورة أن القيم المرجعية لدى غير المدخنين تراوحت بين <0.01 و0.08 مجم/لتر، بينما تراوحت لدى المدخنين بين <0.01 و0.18 مجم/لتر (Lindsay et al. 2004). ترتبط العلامات والأعراض الطفيفة لسمية السيانيد بتركيزات سيانيد دم تصل إلى 1 مجم/لتر، بينما ترتبط الأعراض الشديدة عموماً بتركيزات أعلى، قد تصل إلى 20 مجم/لتر عند دخول المستشفى بعد الابتلاع الانتحاري أو التعرض الصناعي (Singh et al. 1989).

في حالات ما بعد الوفاة بعد الابتلاع الانتحاري لأملاح السيانيد، تُلاحظ عموماً تركيزات سيانيد في الدم تزيد عن 10 مجم/لتر. ومع ذلك، من المهم التأكد من أخذ عينات الدم من مواقع محيطية موثوقة، مثل الوريد الفخذي. في حالات الابتلاع الفموي لأملاح السيانيد، قد تُوجد أحياناً تركيزات مرتفعة (>50 مجم/لتر) من سيانيد الدم في عينات مأخوذة من القلب أو مواقع مركزية أخرى؛ والسبب هو الانتشار بعد الوفاة للسيانيد غير الممتص من المعدة. وفي دراسة لـ 17 حالة انتحار بالسيانيد، تراوحت تركيزات سيانيد دم ما بعد الوفاة بين <1 و185 مجم/لتر، بمتوسط 38 مجم/لتر. قد تولد الحرائق أيضاً كميات كبيرة من HCN(بالإضافة إلى أول أكسيد الكربون ومجموعة من الغازات السامة الأخرى)، مما قد يؤدي إلى تركيزات عالية نسبياً من السيانيد في دم ضحايا الحرائق. في دراسة لضحايا حرائق نجوا، تراوحت تركيزات سيانيد الدم من "غير مكتشف" إلى 3.9 مجم/لتر، بينما وصلت الحالات المميتة إلى 7.4 مجم/لتر. يبدو من الواضح وجود تأثير تآزري بين أول أكسيد الكربون والسيانيد في التسبب في السمية والنجاة المحتملة في الحوادث. هناك دليل على أن إعطاء ترياق السيانيد مثل "هيدروكسي كوبالامين" في موقع الحريق، قبل دخول المستشفى، قد ينقذ الأرواح وأن الفوائد تفوق المخاطر.

في حالة وجود أدلة على التعفن، خاصة في عينات ما بعد الوفاة، يمكن للتلوث البكتيري أو الفطري تفكيك أو توليد السيانيد في الجسم أو في العينات. يمكن تقليل ذلك بجمع الدم في أنابيب مضادة للتخثر تحتوي على "فلوريد الصوديوم".

الفلوريد (Fluoride)

يوجد الفلوريد بكميات متفاوتة في التربة وإمدادات المياه الطبيعية، كما يوجد في جميع المنتجات الغذائية النباتية والحيوانية تقريباً ويُعتبر عنصراً نزراً أساسياً. قد يُضاف الفلوريد أيضاً إلى إمدادات المياه المنزلية كوقاية ضد تسوس الأسنان، وعموماً بتركيز 1 مجم/لتر حيث يكون محتوى المياه "الطبيعي" منخفضاً. للأملاح غير العضوية للفلوريد استخدامات واسعة في الصناعة، مثل صهر الألومنيوم، وتُستخدم أيضاً كمبيدات حشرية وقوارض. الفلوريد مثبط إنزيمي فعال وجد استخداماً واسعاً في حفظ العينات البيولوجية. يُستخدم "حمض الهيدروفلوريك" (HF) شديد التآكل على نطاق واسع صناعياً، مثل عمليات التنظيف (إزالة الصدأ) وتقنيات حفر الأسطح. يمكن استخدام درجات قوة مختلفة من HFصناعياً، وتُعد الصيغة اللامائية للحمض خطيرة بشكل خاص، حتى بعد التعرض البسيط للجلد. بعد الابتلاع، يُمتص HFبسرعة من المعدة، مما يسبب ضرراً داخلياً واسعاً للأنسجة. كما يمكن أن تكون الحروق الحمضية السطحية مؤلمة بشكل خاص بعد الاختراق العميق للأنسجة. التسمم الحاد والمزمن الناجم عن ابتلاع أملاح الفلوريد موثق جيداً. تتوفر مركبات الفلوريد على شكل أقراص لمنع تسوس الأسنان لدى الرضع والأطفال، كما تُوصف في علاج هشاشة العظام واضطرابات العظام الأخرى. تشمل علامات وأعراض التسمم الحاد بالفلوريد عبر طرق امتصاص مختلفة: الغثيان، والقيء، والإسهال، وألم البطن. في حالات الابتلاع الفموي لتركيزات مخففة من HF، قد يكون هناك ضرر طفيف فقط للغشاء المخاطي للفم ولكن ضرر واسع للجهاز الهضمي السفلي. في الحالات الشديدة، قد يكون هناك تآكل كبير للأنسجة وتطور "نقص كلس الدم" و"نقص مغنيسيوم الدم" و"فرط بوتاسيوم

الدم". قد يرتبط هذا أيضاً بعلامات سمية القلب بما في ذلك اضطرابات نظم القلب. ارتبط التعرض المزمن لمركبات الفلوريد بتطور "تسمم العظام بالفلور" (osteofluorosis).

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 5 مل، في أنبوب عادي أو أنبوب K-EDTA (تجنب الحاويات التي تحتوي على مضادات التخثر من الفلوريد و/أو الأوكسالات).
- **البول:** 10 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة.
- **الماء:** 10 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة.

التحليل

وُصفت العديد من الطرق اللونية ومطيافية الضوء لتحليل الفلوريد في السوائل البيولوجية (Cowell 1975). بعض هذه الطرق شاقة جداً في الأداء، خاصة إذا كان يجب فصل الفلوريد أولاً عن طريق عملية الانتشار. النهج الأكثر ملاءمة هو استخدام قطب كهربائي خاص بأيونات الفلوريد (Ekstrand 1977; Kissa 1987; Ohlson and Sheridan 1991; Speaker 1976). ومع ذلك، يجب توخي الحذر الشديد في استخدام ومعايرة هذه الأقطاب (Kissa 1987; Martinez et al. 2007).

التفسير

تختلف النطاقات المرجعية للمصل والدم والبول على نطاق واسع، اعتماداً على المدخول الغذائي، والوصول إلى المياه المفلورة، واستخدام منتجات الأسنان المفلورة. وقد أُبلغ عن نطاقات مرجعية تبلغ 6–42 ميكروجرام/لتر (مصل) و20–60 ميكروجرام/لتر (دم). بالنسبة للبول، أُبلغ عن نطاق مرجعي يتراوح بين 0.2–3.2 ميكروجرام/لتر، اعتماداً على المدخول الغذائي. يؤدي إعطاء جرعات متعددة من 3–4.5 مجم من الفلوريد إلى تركيزات مستقرة للفلوريد في البلازما بين 54 و145 ميكروجرام/لتر (Ekstrand et al. 1977). النطاق العلاجي لتركيزات فلوريد البلازما في علاج هشاشة العظام يتراوح بين 100 و200 ميكروجرام/لتر، مع ظهور آثار جانبية عند تركيزات >300 ميكروجرام/لتر. في حالات الوفاة، أُبلغ عن نطاق واسع من تركيزات الفلوريد في الدم والبول قبل وبعد الوفاة. تراوحت تركيزات الفلوريد في الدم بين 0.5 و85 ميكروجرام/لتر، بينما تراوحت تركيزات البول بين 5 و320 ميكروجرام/لتر (Martinez et al. 2007). في حالة حديثة لابتلاع انتحاري لمزيل صدأ من قبل مريض نفسي يبلغ من العمر 33 عاماً توفي في غضون 3 ساعات من الابتلاع، كان تركيز الفلوريد في الدم المحيطي 19 ميكروجرام/لتر، وفي البول 670 ميكروجرام/لتر، وفي الكبد 40 ميكروجرام/كجم، وفي الكلية 60 ميكروجرام/كجم. قُدرت جرعة الفلوريد المبتلعة بنحو 2.5–5 جم (Martinez et al. 2007).

النيتريت والنيترات (Nitrites and Nitrates)

تُستخدم نترات الصوديوم في الأسمدة الاصطناعية والمواد الحافظة للأغذية والمتفجرات (وكذلك أملاح البوتاسيوم). كما تُستخدم نيتريت الصوديوم كمادة حافظة للأغذية وفي تصنيع المتفجرات، ولكن لها خاصية إضافية تتمثل في التسبب في توسيع الأوعية الدموية، مما أدى إلى استخدامها في علاج الذبحة الصدرية. تطلق النترات العضوية (مثل ثلاثي نترات الجليسيريل، وأحادي وثنائي نترات الإيزوسوربيد) أيون النيتريت عند ابتلاعها وتُستخدم أيضاً كموسعات للأوعية. استُخدم الحقن الوريدي لنيتريت الصوديوم لتحفيز تكوين "ميثيموغلوبينية الدم" لعلاج التسمم بالسيانيد. يتم تحويل أيون النيتريت بسرعة إلى أيون النترات بواسطة الجسم. تشمل أعراض التسمم بالنترات و/أو النيتريت الغثيان والقيء والإسهال وألم البطن والارتباك

والغيبوبة. يمكن لهذه العوامل المؤكسدة القوية أن تسبب ميثيموغلوبينية دموية تهدد الحياة، والتي يكون الرضع عرضة لها بشكل خاص. يُعد قياس الميثيموغلوبين الاختبار الأكثر فائدة في تشخيص وإدارة الحالات السريرية للتسمم. يمكن أن يكون العلاج بالأكسجين والأزرق الميثيليني (methylene blue) لتقليل الميثيموغلوبين علاجاً فعالاً.

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 10 مل، في أنبوب K-EDTA.
- **البول:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة.
- **محتويات المعدة وبقايا موقع الحادث:** قد تكون مفيدة أيضاً.

التحليل

تُستخدم عدة طرق لتحديد كمية النترات والنيتريت في السوائل البيولوجية، بناءً على تقنيات مطيافية الضوء أو الكروماتوغرافيا (El Menyawi et al. 1998; Giovannoni et al. 1997; Kage et al. 2002b; Moshage et al. 1995).

التفسير

تبلغ تركيزات النيتريت والنترات في البلازما لدى الأشخاص غير المعرضين حوالي 0.2 ميكروجرام/لتر و1.2 ميكروجرام/لتر على التوالي. قِيسَت مستويات نيتريت المصل عند 0.5 و0.6 ميكروجرام/لتر لدى رجلين أصيبا بالزرقة بعد الابتلاع العرضي لنحو 1 جم من نيتريت الصوديوم، لكنهما نجيا بعد العلاج (Sevier and Berbatis 1976). طفل امتص نيتريت الصوديوم من محلول دهني (liniment) طُبق على الجلد أصيب بزرقة شديدة وتوفي بعد أيام قليلة بتركيز نيتريت في المصل بلغ 1.0 ميكروجرام/لتر ومستوى ميثيموغلوبين في الدم 76% (Saito et al. 1996). في حالة انتحار مميتة، كانت تركيزات النيتريت 0.5 ميكروجرام/لتر (دم)، و0.3 ميكروجرام/كجم (كلية)، و8.7 ميكروجرام/لتر (بول)، و3.9 ميكروجرام/لتر (محتويات المعدة) (De Beer et al. 1975).

الفوسفين والفوسفيدات (Phosphine and Phosphides)

الفوسفين (فوسفيد الهيدروجين؛ PH_3) هو غاز عديم اللون شديد السمية ذو رائحة قوية تشبه الثوم أو السمك؛ ويُستخدم في عدد من العمليات الصناعية (مثل إنتاج غاز الأسيتيلين وتصنيع أشباه الموصلات). كما يتولد عن طريق تأثير الرطوبة على الفوسفيدات. يُستخدم "فوسفيد الألومنيوم" على نطاق واسع كمبيد حشري رخيص وفعال للحبوب ومبيد للقوارض في البلدان النامية. يتميز تسمم فوسفيد الألومنيوم بمعدل وفيات مرتفع، وقد شهدت تسعينيات القرن العشرين زيادة كبيرة في عدد حالات التسمم والوفيات الناجمة عن الابتلاع الانتحاري، خاصة في الهند (Christophers et al. 2002). كما وقعت حالات تسمم تنطوي على استنشاق غاز الفوسفين أو ابتلاع الفوسفيدات في العديد من الدول الأوروبية (Anger et al. 2000; Bayazit et al. 2000; Gregorakos et al. 2002; Memis et al. 2007; Popp et al. 2002).

تشمل علامات وأعراض التسمم الصداع، والغثيان، والقيء، والزرقة، والغيبوبة، ووذمة الرئة غير القلبية، واضطراب نظم القلب، والتي قد تتطور إلى فشل كبدي وكلوي (Guale et al. 1994; Lakshmi 2002; Popp et al. 2002; Singh et al. 1996). كما أُبلغ عن تكوين الميثيموغلوبين (Lakshmi 2002). وقد أُبلغ مؤخراً عن تغيرات نسيجية في الكبد والدماغ بعد فحص ما بعد الوفاة للوفيات المرتبطة بالفوسفين (Saleki et al. 2007; Tripathi and Pandey 2007).

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 10 مل، في حاوية ليثيوم-هيبارين أو K-EDTA (يُوصى باستخدام أنابيب العناصر النزرة الخاصة إذا كان سيتم إجراء تحليل للألومنيوم؛ ويجب عدم استخدام الحاويات الزجاجية).
- **البول:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة.
- **محتويات المعدة:** مفيدة في حالات ما بعد الوفاة.
- **بقايا موقع الحادث:** قد تكون مفيدة لأغراض التعريف.

التحليل

يمكن إجراء اختبار كمي للفوسفين في محتويات المعدة باستخدام أنبوب كاشف تجاري (Guale et al. 1994). يمكن قياس الفوسفين في سوائل الجسم وأنسجة ما بعد الوفاة عن طريق "تحليل الفراغ الرأسي" (headspace analysis) والكروماتوغرافيا الغازية (GC) إما بالكشف عن النيتروجين-الفوسفور أو الكشف الانتقائي للكتلة (Anger et al. 2000; Chan et al. 1983; Chugh et al. 1996). تشمل النهج البديلة قياس الألومنيوم في الدم باستخدام (ETAAS) أو -ICP (ICP-MS) (Anger et al. 2000; Garry et al. 1993). كما يمكن قياس الفوسفور بواسطة MS) (Anger et al. 2000).

التفسير

تتعلق حالة تفصيلية أوردها (Anger et al. 2000) بابتلاع انتحاري لفوسفيد الألومنيوم من قبل رجل يبلغ من العمر 39 عاماً، حيث وُجد الفوسفين في الدماغ (94 ميكروجرام/جم)، والكبد (24 ميكروجرام/جم)، والكلى (41 ميكروجرام/جم)، ولكنه كان غائباً في الدم والبول. احتوى الدم على تركيز عالٍ من الفوسفور (76.3 ميكروجرام/لتر) و8.22 ميكروجرام/جم في الكبد. كان تركيز الألومنيوم في الدم 1538 ميكروجرام/لتر، مقارنة بالقيم المرجعية الأقل من 15 ميكروجرام/لتر. كما وُجدت تركيزات مرتفعة من الألومنيوم في الدماغ (36 ميكروجرام/جم) والكبد (75 ميكروجرام/جم). في حالات استنشاق غاز الفوسفين بدلاً من الابتلاع الفموي للفوسفيدات، قد يكون من الصعب أحياناً الكشف عن وجود الفوسفين في الدم أو في أنسجة ما بعد الوفاة مثل الدماغ، وذلك بسبب التخلص السريع من الفوسفين، خاصة إذا تم نقل المرضى إلى المستشفى قبل الوفاة.

الكبريتيد (Sulfide)

تُستخدم العديد من مركبات الكبريتيد العضوية وغير العضوية في الصناعة، ولكن السبب الأكثر شيوعاً للتسمم بالكبريتيد هو استنشاق غاز كبريتيد الهيدروجين (غاز المجاري)، خاصة في المواقع الصناعية أو مواقع التخلص من النفايات، ومصانع الأسماك، والمدابغ، ومصانع الأصباغ، وشبكات الصرف الصحي (Christia-Lotter et al. 2007; Guidotti 1994; Jappinen and Tenhunen 1990; Kage et al. 2002a; Knight and Presnell 2005). للغاز رائحة كريهة مميزة جداً تشبه البيض الفاسد وله عتبة شم منخفضة جداً (0.03 جزء في المليون). ومع ذلك، فإن تركيزات الكبريتيد العالية جداً (>100 جزء في المليون) قد تسبب شللاً في الأعصاب الشمية وفشلاً في اكتشاف الرائحة المميزة التي تكون عادة تحذيراً واضحاً من الخطر (Guidotti 1994). عند تركيزات كبريتيد أعلى (>700 جزء في المليون) قد يحدث فقدان سريع للوعي، وتوقف التنفس، وفشل تنفسي يؤدي إلى وفاة سريعة (Knight and Presnell 2005).

كبريتيد الهيدروجين غير مستقر ويتم استقلابه بسرعة في الجسم، لدرجة أنه قد يكون من الصعب اكتشافه في العينات البيولوجية من حالات التسمم المشتبه بها. يُستقلب إلى "ثيوسلفات"، مما يقدم نهجاً مفيداً للتحقيق في تسمم الكبريتيد الحاد أو المزمن.

جمع العينات

تُجمع العينات كما يلي:

- **الدم:** 10 مل، دم مضاد للتخثر (K-EDTA).
- **البول:** 20 مل، في حاوية بلاستيكية شاملة ومعقمة.
- **محتويات المعدة:** مفيدة في فحص ما بعد الوفاة للحالات المميتة.
- **بقايا موقع الحادث:** مفيدة لأغراض التعريف.

التحليل

استخدمت الطرق المبكرة "الانتشار الدقيق" متبوعاً بالقياس اللوني. كما استُخدمت الأقطاب الانتقائية للأيونات (Jappinen and Tenhunen 1990). ومؤخراً، وُصفت طرق (GC) باستخدام تكوين المشتقات والكشف الطيفي الكتلي (Kage et al. 2002a, 2004). أُبلغ عن عدد من الطرق لقياس المستقلب الرئيسي "الثيوسلفات" في الدم والبول، بما في ذلك (GC) و(LC) و(GC-MS) (Kage et al. 1991, 1997, 2004; Kangas and Savolainen 1987).

التفسير

القيم المرجعية لتركيزات الكبريتيد في السوائل البيولوجية منخفضة جداً (<10 ميكروجرام/لتر). في سلسلة من حالات التسمم بكبريتيد الهيدروجين من مصنع لب الورق الكبريتي أبلغ عنها (Jappinen and Tenhunen 1990)، تراوحت تركيزات الكبريتيد من 30 ميكروجرام/لتر إلى 130 ميكروجرام/لتر في عينات دم مأخوذة بعد 0.5–2 ساعة من التعرض. أبلغ (Kage et al. 2002a) عن تركيزات مماثلة في حالات التسمم المميتة وغير المميتة. في حالات الاشتباه بالتعرض الحاد أو المزمن لكبريتيد الهيدروجين، يجب جمع عينات الدم في أسرع وقت ممكن بسبب سرعة استقلابه. قد يكون قياس تركيز الثيوسلفات في الدم أو البول هو التحقيق الأكثر جدوى في بعض الحالات (Durand and Weinstein 2007; Kage et al. 1991, 1997).

أظهرت تقارير حالات ما بعد الوفاة بعد حوادث صناعية تركيزات كبريتيد في الدم تتراوح بين 0.9–3.8 ميكروجرام/لتر (Goodwin et al. 1989). في تقرير حديث عن أربع وفيات حادة للبالغين وقعت في مصنع أصباغ ياباني، تراوحت تركيزات كبريتيد الدم بعد الوفاة بين 0.3 و9.4 ميكروجرام/لتر، وتراوحت تركيزات الثيوسلفات بين 0.1 و0.2 مليمول/لتر (Kage et al. 2004).

المراجع

Aggett, P. J. (1999). An overview of the metabolism of copper. European Journal of Medical Research, 4(5), 214–216.

Ahsan, H., Perrin, M., Rahman, A., Parvez, F., Stute, M., Zheng, Y., ... & Graziano, J. H. (2000). Associations between drinking water and urinary arsenic levels and skin lesions in Bangladesh. Journal of Occupational and Environmental Medicine, 42(12), 1195–1201.

Akila, R. V. (1999). Decrements in cognitive performance in metal inert gas welders exposed to aluminium. Occupational and Environmental Medicine, 56(9), 632–639.

Alarie, Y. (2002). Toxicity of fire smoke. Critical Reviews in Toxicology, 32(4), 259–289.

Alderman, L. C., & Bergin, J. J. (1986). Hydrogen selenide poisoning: an illustrative case with review of the literature. Archives of Environmental Health, 41(6), 354–358.

Alfrey, A. C., LeGendre, G. R., & Kaehny, W. D. (1976). The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. New England Journal of Medicine, 294(4), 184–188.

Anger, F., Capolaghi, B., Raphalen, J. P., & Morel, G. (2000). Fatal aluminum phosphide poisoning. Journal of Analytical Toxicology, 24(2), 90–92.

Aoyama, H., Yoshida, M., Yamamura, Y., & Hirayama, H. (1986). Acute poisoning by intentional ingestion of thallous malonate. Human Toxicology, 5(6), 389–392.

Aposhian, H. V., & Aposhian, M. M. (2006). Arsenic toxicology: five questions. Chemical Research in Toxicology, 19(1), 1–15.

Apostoli, P., Maranelli, G., Doria, M., & Geronazzo, A. (1999). Biological monitoring of occupational exposure to inorganic arsenic. Occupational and Environmental Medicine, 56(12), 825–832.

Apostoli, P., & Schaller, K. H. (2001). Urinary beryllium–a suitable tool for assessing occupational and environmental beryllium exposure? International Archives of Occupational and Environmental Health, 74(3), 162–166.

Archbold, G. P., Iheagwaram, G. O., & Kiani, M. (2004). Dimercaptosuccinic acid loading test for assessing mercury burden in healthy individuals. Annals of Clinical Biochemistry, 41(3), 233–236.

Aschner, M., & Syversen, T. (2005). Methylmercury: recent advances in the understanding of its neurotoxicity. Therapeutic Drug Monitoring, 27(3), 278–283.

Augenstein, W. L., Spoerke, D. G., Spoerke, S. E., & Rumack, B. H. (1991). Fluoride ingestion in children: a review of 87 cases. Pediatrics, 88(5), 907–912.

Bahlmann, H., Hempel, G., & Diefenbach, M. (2005). Acute barium nitrate intoxication treated by hemodialysis. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 49(1), 110–112.

Bailey, B., & McGuigan, M. (2000). Lithium poisoning from a poison control center perspective. Therapeutic Drug Monitoring, 22(6), 650–655.

Bakir, F., Damluji, S. F., Amin-Zaki, L., Murtadha, M., Khalidi, A., Al-Rawi, N. Y., ... & Clarkson, T. W. (1973). Methylmercury poisoning in Iraq. Science, 181(4096), 230–241.

Baldwin, D. R., & Marshall, W. J. (1999). Heavy metal poisoning and its laboratory investigation. Annals of Clinical Biochemistry, 36(3), 267–300.

Bannon, D. I., Chisolm, J. J., Jensen, R. A., Pappas, J., & Theppe, B. C. (1994). Graphite furnace atomic absorption spectroscopic measurement of blood lead in matrix-matched standards. Clinical Chemistry, 40(9), 1730–1734.

Barillo, D. J., Goode, R., & Esch, V. (1994). Cyanide poisoning in victims of fire: analysis of 364 cases and review of the literature. Journal of Burn Care & Rehabilitation, 15(1), 46–57.

Barregard, L., Sällsten, G., & Järvholm, B. (1992). Kinetics of mercury in blood and urine after brief occupational exposure. Archives of Environmental Health, 47(3), 176–184.

Baselt, R. C. (2002). Disposition of toxic drugs and chemicals in man (6th ed.). Biomedical Publications.

Baselt, R. C. (2005). Disposition of toxic drugs and chemicals in man (7th ed.). Chemical Toxicology Institute.

Basinger, M. A., Jones, M. M., Holscher, M. A., & Vaughn, W. K. (1983). Antidotes for acute bismuth intoxication. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 20(2), 159–165.

Baud, F. J., Barriot, P., Toffart, V. F., Riou, B., Vicaut, E., & Lecocq, A. (1991). Elevated blood cyanide concentrations in victims of smoke inhalation. New England Journal of Medicine, 325(25), 1761–1766.

Bayazit, A. K., Noyan, A., & Ozel, A. (2000). A child with hepatic and renal failure caused by aluminum phosphide. Nephron, 86(4), 517.

Bayly, G. R., Mearns, A. J., & Rutter, N. (1995). Lead poisoning from Asian traditional remedies in the West Midlands—report of a series of five cases. Human & Experimental Toxicology, 14(1), 24–28.

Bellinger, D. C., Leviton, A., Waternaux, C., Needleman, H. L., & Rabinowitz, M. (1992). Low-level lead exposure, intelligence and academic achievement: a long-term follow-up study. Pediatrics, 90(6), 855–861.

Bellinger, D. C., Trachtenberg, F., Barregard, L., Tavares, M., Cernichiari, E., Daniel, D., & McKinlay, S. (2006). Neuropsychological and renal effects of dental amalgam in children: a randomized clinical trial. JAMA, 295(15), 1775–1783.

Benes, B., Cernohorsky, T., & Spevackova, V. (2000). Determination of thirty-two elements in human autopsy tissue. Biological Trace Element Research, 75, 195–203.

Berend, K., de Beer, J., & Rauwerda, J. A. (2001). Acute aluminum encephalopathy in a dialysis center caused by a cement mortar water distribution pipe. Kidney International, 59(2), 746–753.

Berend, K., van Hulsteijn, L. T., & Rietveld, A. P. (2004). Prosecution after an outbreak of subacute aluminum intoxication in a hemodialysis center. Legal Medicine, 6(1), 1–10.

Berg, M., Tran, H. C., Nguyen, T. C., Pham, H. V., Schertenleib, R., & Giger, W. (2001). Arsenic contamination of groundwater and drinking water in Vietnam: a human health threat. Environmental Science & Technology, 35(13), 2621–2626.

Bernard, A. (2004). Renal function induced by cadmium: biomarker of critical effects. Biometals, 17(5), 519–523.

Bjelakovic, G., Nikolova, D., Simonetti, R. G., & Gluud, C. (2004). Antioxidant supplements for prevention of gastrointestinal cancers: a systematic review and meta-analysis. The Lancet, 364(9441), 1219–1228.

Boehnert, M., Lewander, W. J., & Gaudreault, P. (1985). Measurement of serum levels in acute barium chloride overdose. Veterinary and Human Toxicology, 27, 291.

Boehnert, M. (1988). Soluble barium salts. Clinical Toxicology Review, 10(12), 1–2.

Boron, S. W., Minns, A. B., & Palmer, R. B. (2007). Hydroxocobalamin for severe acute cyanide poisoning by ingestion or inhalation. American Journal of Emergency Medicine, 25(5), 551–558.

Borras-Blasco, J., Codoñer-Franch, P., & Piles, E. (2007). Unrecognized delayed toxic lithium peak concentration in an acute poisoning with sustained release lithium product. Southern Medical Journal, 100(3), 321–323.

Bosse, G. M. (1995). Conservative management of patients with moderately elevated serum iron levels. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 33(2), 135–140.

Botta, C., Iarmarcovai, G., Chaspoul, F., Sari-Minodier, I., Pompili, J., De Méo, M., & Gallice, P. (2006). Assessment of occupational exposure to welding fumes by inductively coupled plasma-mass spectroscopy and by the alkaline Comet assay. Environmental and Molecular Mutagenesis, 47(4), 284–295.

Braithwaite, R. A., & Brown, S. S. (1988). Clinical and sub-clinical lead poisoning: a laboratory perspective. Human Toxicology, 7(6), 503–513.

Braithwaite, R., & Girling, A. J. (1988). Bovine reference materials for accuracy control of blood lead analysis. Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie, 332(7), 704–708.

Brighthope, I. (2007). Accidental death from acute selenium poisoning. Medical Journal of Australia, 186(9), 487.

Brima, E. I., Haris, P. I., Jenkins, R. O., Polya, D. A., Harrington, C. F., & Gault, A. G. (2006). Understanding arsenic metabolism through a comparative study of arsenic levels in the urine, hair and fingernails of healthy volunteers from three unexposed ethnic groups in the United Kingdom. Toxicology and Applied Pharmacology, 216(1), 122–130.

Broussard, L. A., Hammett-Stabler, C. A., & Winecker, R. E. (2002). The toxicology of mercury. Laboratory Medicine, 33(8), 614–625.

Buchet, J. P., Lauwerys, R., & Roels, H. (1981). Comparison of the urinary excretion of arsenic metabolites after a single oral dose of sodium arsenite, monomethylarsonate, or dimethylarsinate in man. International Archives of Occupational and Environmental Health, 48(1), 71–79.

Canfield, R. L., Henderson, C. R., Cory-Slechta, D. A., Cox, C., Jusko, T. A., & Lanphear, B. P. (2003). Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. New England Journal of Medicine, 348(16), 1517–1526.

Canfield, D. V., Kupiec, T., & Lewis, R. (2005). Carboxyhemoglobin and blood cyanide concentrations in relation to aviation accidents. Aviation, Space, and Environmental Medicine, 76(10), 978–980.

Carton, J. A., Arribas, J. M., & Arribas, J. R. (1987). Acute-subacute lead poisoning. Clinical findings and comparative study of diagnostic tests. Archives of Internal Medicine, 147(4), 697–703.

Cavanagh, J. B. (1991). What have we learnt from Graham Frederick Young? Reflections on the mechanism of thallium neurotoxicity. Neuropathology and Applied Neurobiology, 17(1), 3–9.

Cavanagh, J. B., Fuller, N. H., Johnson, H. R., & Rudge, P. (1974). The effects of thallium salts, with particular reference to the nervous system changes. A report of three cases. Quarterly Journal of Medicine, 43(170), 293–319.

Chan, L. T., Mahadevan, R., & Pillay, P. K. (1983). Phosphine analysis in post mortem specimens following ingestion of aluminium phosphide. Journal of Analytical Toxicology, 7(4), 165–167.

Chandler, H. A., & Scott, M. (1984). Determination of low levels of thallium in urine using chelation with sodium diethyldithiocarbamate, extraction into toluene and atomic absorption spectrophotometry with electrothermal atomisation. Atomic Spectroscopy, 5(6), 230–233.

Chaturvedi, A. K., Cardona, G. M., & Whinnery, J. E. (2001). Blood carbon monoxide and hydrogen cyanide concentrations in the fatalities of fire and non-fire associated civil aviation accidents, 1991–1998. Forensic Science International, 121(3), 183–188.

Chazan, J. A., Lew, N. L., & London, G. (1989). Plasma aluminum levels (unstimulated and stimulated): clinical and biochemical findings in 185 patients undergoing chronic hemodialysis for 4 to 95 months. American Journal of Kidney Diseases, 13(4), 284–289.

Cheney, K., Groleau, G., & Thompson, P. (1995). Survival after a severe iron poisoning treated with intermittent infusions of deferoxamine. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 33(1), 61–66.

Chowdhury, U. K., Biswas, B. K., Chowdhury, T. R., Samanta, G., Mandal, B. K., Basu, G. C., ... & Chakraborti, D. (2000). Groundwater arsenic contamination in Bangladesh and West Bengal, India. Environmental Health Perspectives, 108(5), 393–397.

Christia-Lotter, A., Piguet, C., & Giroud, C. (2007). Fatal occupational inhalation of hydrogen sulfide. Forensic Science International, 169(2–3), 206–209.

Christophers, A. J., & Rance, G. (2002). Dangerous bodies: A case of fatal aluminium phosphide poisoning. Medical Journal of Australia, 176(8), 403.

Chugh, S. N., Ram, S., Chugh, K., & Malhotra, K. C. (1996). Serial blood phosphine levels in acute aluminium phosphide poisoning. Journal of the Association of Physicians of India, 44, 184–185.

Chuttani, H. K., Gupta, P. S., Gulati, S., & Gupta, D. N. (1965). Acute copper sulfate poisoning. The American Journal of Medicine, 39(6), 849–854.

Chyka, P. A., & Butler, A. Y. (1993). Assessment of acute iron poisoning by laboratory and clinical observations. American Journal of Emergency Medicine, 11(1), 99–103.

Clark, R. F., Strukle, E., Williams, S. R., & Vance, M. V. (1996). Selenium poisoning from a nutritional supplement. JAMA, 275(14), 1087–1088.

Clarkson, T. W., Magos, L., & Myers, G. J. (2003). The toxicology of mercury–current exposures and clinical manifestations. New England Journal of Medicine, 349(18), 1731–1737.

Claussen, F. (1997). Arsenic speciation of aqueous environmental samples by derivatisation with thioglycolic acid methylester and capillary gas–liquid chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatographic Science, 35(12), 568–572.

Clements, C. J., & McIntyre, P. B. (2006). When science is not enough–a risk/benefit profile of thiomersal-containing vaccines. Expert Opinion on Drug Safety, 5(1), 17–29.

Corina, D. L., Ballard, S. A., & Auld, J. (1979). Bromide measurement in serum and urine by an improved gas chromatographic method. Journal of Chromatography A, 162(3), 382–387.

Cowell, D. C. (1975). The determination of fluoride ion concentration in biological fluids and in the serum and urine of fluoride-treated patients with Paget's disease and osteoporosis. Medical Laboratory Technology, 32(2), 73–89.

Crawford, G. M., & Tavares, O. (1974). Simple hydrogen sulfide trap for the Gutzeit arsenic determination. Analytical Chemistry, 46(8), 1149.

Cruz-Landeira, A., Ares-Pena, F. J., López-Rivadulla, M., & Concheiro-Carro, L. (2000). A new spectrophotometric method for the toxicological diagnosis of cyanide poisoning. Journal of Analytical Toxicology, 24(4), 266–270.

Cullen, A., Evans, N. J., & Jaffe, J. S. (2000). Concentrations of antimony in infants dying from SIDS and infants dying from other causes. Archives of Disease in Childhood, 82(3), 244–247.

Cullen, M. R., Robins, J. M., & Eskenazi, B. (1983). Adult inorganic lead intoxication: Presentation of 31 new cases and a review of recent advances in the literature. Medicine, 62(4), 221–247.

Curry, A. S., Cannon, J. R., & Mallott, P. (1967). The production of cyanide in post mortem material. Acta Pharmacologica et Toxicologica, 25(3), 339–344.

da Costa, C. M., Baldwin, D., Portmann, B., Lolin, Y., Mowat, A. P., & Mieli-Vergani, G. (1991). Value of urinary copper excretion after penicillamine challenge in the diagnosis of Wilson's disease. Hepatology, 15(4), 609–615.

Daniel, C. R., III, Norton, L. A., & Scher, R. K. (2004). The nail and hair in forensic science. Journal of the American Academy of Dermatology, 50(2), 258–261.

Davis, L. E., Standefer, J. C., Kornfeld, M., Abercrombie, D. M., & Butler, C. (1981). Acute thallium poisoning: Toxicological and morphological studies of the nervous system. Annals of Neurology, 10(1), 38–44.

De Beer, J., Verbeke, R., & Vandaele, R. (1975). Suicidal poisoning by nitrite. European Journal of Toxicology and Environmental Hygiene, 8, 247–251.

De Boer, J. L., Van Der Voet, G. B., & De Wolff, F. A. (2004). Practical and quality-control aspects of multi-element analysis with quadrupole ICP-MS with special attention to urine and whole blood. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 379(6), 872–880.

De Wolff, F. A., De Beer, J., & Van Der Voet, G. B. (2002). Subacute fatal aluminum poisoning in dialyzed patients: Post-mortem toxicological findings. Forensic Science International, 128(1–2), 41–43.

Delves, H. T. (1970). A micro-sampling method for the rapid determination of lead in blood by atomic-absorption spectrophotometry. Analyst, 95(1130), 431–438.

Delves, H. T. (1977). A simple matrix modification procedure to allow the direct determination of cadmium in blood by flame micro-sampling atomic-absorption spectrophotometry. Analyst, 102(1216), 403–405.

Delves, H. T. (1998). Overview of UK and International studies on trends in blood lead and use of lead isotope to identify environmental sources. In D. Gompertz et al. (Eds.), IEH Report on Recent UK Blood Lead Surveys. Institute of Environment and Health.

Delves, H. T., & Campbell, M. J. (1988). Measurements of total lead concentrations and of lead isotope ratios in whole blood by use of inductively coupled plasma source mass spectrometry. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 3, 343–348.

Delves, H. T., & Campbell, M. J. (1993). Identification and apportionment of sources of lead in human tissue. Environmental Geochemistry and Health, 15, 75–84.

Delves, H. T., Campbell, M. J., & Dalton, H. (1997). Determination of antimony in urine, blood and serum and in liver and lung tissues of infants by inductively coupled plasma mass spectrometry. Analyst, 122(11), 1323–1329.

Deng, J. F., Feng, S. Y., & Ger, J. (1991). The essential role of a poison center in handling an outbreak of barium carbonate poisoning. Veterinary and Human Toxicology, 33, 173–175.

DeRouen, T. A., Martin, M. D., Leroux, B. G., Townes, B. D., Woods, J. S., Leitão, J., ... & Bernardo, M. (2006). Neurobehavioral effects of dental amalgam in children: A randomized clinical trial. JAMA, 295(15), 1784–1792.

Dezateux, C., Walters, S., & Murch, S. (1997). Urinary antimony in infancy. Archives of Disease in Childhood, 76(5), 432–436.

Dinya, M., Varga, B., Szilágyi, M., & Nagy, A. (2005). Major and trace elements in whole blood of phlebotomized patients with porphyria cutanea tarda. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 19(2–3), 217–220.

Duenas-Laita, A., Nogué, S., & Burillo-Putze, G. (2005). Acute arsenic poisoning. The Lancet, 365(9475), 1982.

Dunn, W. A., & Siek, T. J. (1990). A rapid, sensitive, and specific screening technique for the determination of cyanide. Journal of Analytical Toxicology, 14(4), 256.

Durand, M., & Weinstein, P. (2007). Thiosulfate in human urine following minor exposure to hydrogen sulfide: Implications for forensic analysis of poisoning. Forensic Toxicology, 25(2), 92–95.

Ekino, S., Susa, M., Ninomiya, T., Imamura, K., & Kitamura, T. (2007). Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. Journal of the Neurological Sciences, 262(1–2), 131–144.

Ekstrand, J. (1977). A micromethod for the determination of fluoride in blood plasma and saliva. Calcified Tissue Research, 23, 225–228.

Ekstrand, J., Alvan, G., Boréus, L. O., & Norlin, A. (1977). Pharmacokinetics of fluoride in man after single and multiple oral doses. European Journal of Clinical Pharmacology, 12(4), 311–317.

El Menyawi, I., El-Masry, A., & El-Khatib, A. S. (1998). Measurement of serum nitrite/nitrate concentrations using high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 706(2), 347–351.

Ellenhorn, M. J. (1997). Ellenhorn's medical toxicology: Diagnosis and treatment of human poisoning (2nd ed.). Williams & Wilkins.

Exley, C., & Esiri, M. M. (2006). Severe cerebral congophilic angiopathy coincident with increased brain aluminium in a resident of Camelford, Cornwall, UK. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 77(7), 877–879.

Eyer, F., Felgenhauer, N., Graw, M., & Zilker, T. (2006). Lithium poisoning: Pharmacokinetics and clearance during different therapeutic measures. Journal of Clinical Psychopharmacology, 26(3), 325–330.

Eysseric, H., Richard, C., & Rieux, D. (1999). A fatal case of chlorate poisoning: Confirmation by ion chromatography of body fluids. Journal of Forensic Sciences, 45(2), 474–477.

Feldman, J. (1991). Sample preparation and storage can change arsenic speciation in human urine. Clinical Chemistry, 45(11), 1988–1997.

Felscher, D., & Wulfmeyer, M. (1998). A new specific method to detect cyanide in body fluids, especially whole blood, by fluorimetry. Journal of Analytical Toxicology, 22(5), 363–366.

Fisher, A. A., & Le Couteur, D. G. (2000). Lead poisoning from complementary and alternative medicine in multiple sclerosis. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 69(5), 687–689.

Flanagan, R. J., Johnston, A., & Linnett, S. L. (1995). Basic analytical toxicology. World Health Organization.

Flaten, T. P. (2001). Aluminium as a risk factor in Alzheimer's disease, with emphasis on drinking water. Brain Research Bulletin, 55(2), 187–196.

Fortin, J. L., Giocanti, J. P., & O'Mahony, I. (2006). Prehospital administration of hydroxocobalamin for smoke inhalation-associated cyanide poisoning: 8 years of experience in the Paris Fire Brigade. Clinical Toxicology, 44(Suppl 1), 37–44.

Fowler, B. A., & Weissberg, J. B. (1974). Arsine poisoning. New England Journal of Medicine, 291(22), 1171–1174.

Francesconi, K. A., Tang, S., & Cullen, W. R. (2002). Arsenic metabolites in human urine after ingestion of an arsenosugar. Clinical Chemistry, 48(1), 92–101.

Freundlich, M., Abelson, K., & Simpson, K. (1985). Infant formula as a cause of aluminium toxicity in neonatal uraemia. The Lancet, 326(8454), 527–529.

Friberg, L., Piscator, M., & Nordberg, G. F. (1971). Cadmium in the environment. CRC Press.

Froomes, P. R., Wan, A. T., Harrison, P. M., & McClean, A. J. (1988). Improved assay for bismuth in biological samples by atomic absorption spectrophotometry with hydride generation. Clinical Chemistry, 34(2), 382–384.

Gambaro, V., Verga, A., & Ciallella, C. (2007). Blood cyanide determination in two cases of fatal intoxication: Comparison between headspace gas chromatography and a spectrophotometric method. Journal of Forensic Sciences, 52(6), 1401–1404.

Garry, V. F., Jenks, J., & Wang, M. (1993). Investigation of a fatality from nonoccupational aluminum phosphide exposure: Measurement of aluminum in tissue and body fluids as a marker of exposure. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 122(6), 739–747.

Gasmi, A., & Piquet, J. (1997). Acute selenium poisoning. Veterinary and Human Toxicology, 39, 304–308.

Gessner, B. D., Beller, M., Middaugh, J. P., & Whitford, G. M. (1994). Acute fluoride poisoning from a public water system. New England Journal of Medicine, 330(2), 95–99.

Geyer, H. L., & Tepper, S. J. (2005). Methyl bromide intoxication causes reversible symmetric brainstem and cerebellar MRI lesions. Neurology, 64(7), 1279–1281.

Gill, J. R., & Sullivan, B. R. (2004). Suicide by cyanide: 17 deaths. Journal of Forensic Sciences, 49(4), 826–828.

Giovannoni, G., Heales, S. J., & Land, J. M. (1997). Adaptation of the nitrate reductase and Griess reaction methods for the measurement of serum nitrate plus nitrite levels. Annals of Clinical Biochemistry, 34(2), 193–198.

Glover, J. R. (1970). Selenium and its industrial toxicology. Industrial Medicine & Surgery, 39(1), 50–54.

Goodwin, L. R., Francom, D., Dieken, F. P., Taylor, J. D., & Sullivan, R. J. (1989). Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: Postmortem studies and two case reports. Journal of Analytical Toxicology, 13(2), 105–109.

Gorby, M. S. (1988). Arsenic poisoning. Western Journal of Medicine, 149, 308–315.

Gorby, M. S. (1994). Arsenic in human medicine. In J. O. Nriagu (Ed.), Arsenic in the environment, Part II: Human health and ecosystem effects (pp. 1–34). Wiley.

Goulle, J. P., Mahieu, L., Castermant, J., Neveu, N., Bonneau, L., Lainé, G., ... & Lacroix, C. (2005). Metal and metalloids multielementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair. Reference values. Forensic Science International, 153(1), 39–44.

Grandjean, P., Satoh, H., Murata, K., & Eto, K. (2003). Neurotoxic risk caused by stable and variable exposure to methylmercury from seafood. Ambulatory Pediatrics, 3(1), 18–23.

Gregorakos, L., Markantonis, S., Papalois, A., & Fligou, F. (2002). Recovery from severe inhalational phosphine poisoning. Report of two cases. Clinical Intensive Care, 13(4), 177–179.

Guale, F. G., Shah, S. M., & Carter, J. H. (1994). Laboratory diagnosis of zinc phosphide poisoning. Veterinary and Human Toxicology, 36, 517–519.

Guidotti, T. L. (1994). Occupational exposure to hydrogen sulfide in the sour gas industry: Some unresolved issues. International Archives of Occupational and Environmental Health, 66(3), 153–160.

Guilbault, G. G., & Kramer, D. N. (1966). Ultra sensitive, specific method for cyanide using p-nitrobenzaldehyde and o-dinitrobenzene. Analytical Chemistry, 38(7), 834–836.

Gulliver, J. M. (1991). A fatal copper sulfate poisoning. Journal of Analytical Toxicology, 15(6), 341–342.

Guzzi, G., La Porta, C. A., & Severi, G. (2006). Dental amalgam and mercury levels in autopsy tissues: Food for thought. American Journal of Forensic Medicine and Pathology, 27(1), 42–45.

Hachiya, N. (2006). The history and the present of Minamata disease—entering the second half a century. Japan Medical Association Journal, 49(3), 112–118.

Halls, D. J. (1984). Speeding up determinations by electrothermal atomic-absorption spectrometry. Analyst, 109(8), 1081–1084.

Halls, D. J., & Routh, M. W. (1987). Direct determination of cadmium in urine by electrothermal atomisation atomic absorption spectrometry. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2(4), 305–309.

Hamilton, R. A., & Wolf, B. C. (2007). Accidental boric acid poisoning following the ingestion of household pesticide. Journal of Forensic Sciences, 52(3), 706–708.

Handsaker, D. M., & Watterson, J. H. (2005). Acute selenium poisoning: Suicide by ingestion. Journal of Forensic Sciences, 50(1), 1–5.

Hanns, S., & Sperling, M. (2005). Reconstruction of a case of thallium poisoning using LA-ICP-SFMS. International Journal of Legal Medicine, 119(1), 35–39.

Hansen, J. C. (1988). Has selenium a beneficial role in human exposure to inorganic mercury? Medical Hypotheses, 25(1), 45–53.

Haque, M. R., & Bradbury, J. H. (1999). Simple method for determination of thiocyanate in urine. Clinical Chemistry, 45(9), 1459–1464.

Hardy, A. D., Walton, R. I., & Vaishnav, R. (1998). Composition of eye cosmetics (kohls) used in Oman. Journal of Ethnopharmacology, 60(3), 223–234.

Heath, A., Ahlmen, J., & Branegard, B. (1983). Thallium poisoning—toxin elimination and therapy in three cases. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 20(5), 451–463.

Hellstrom, L., Elinder, C. G., Dahlander, B., Lundgren, G., & Persson, B. (2001). Cadmium exposure and end-stage renal disease. American Journal of Kidney Diseases, 38(5), 1001–1008.

Hillier, S., Inskip, H., & Coggon, D. (2000). Fluoride in drinking water and risk of hip fracture in the UK: A case–control study. The Lancet, 355(9200), 265–269.

Hindmarsh, J. T. (2002). Caveats in hair analysis in chronic arsenic poisoning. Clinical Biochemistry, 35(1), 1–11.

Ho, B. S., & Chan, S. H. (2003). Mercury vapor inhalation from Chinese red (cinnabar). Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 41(1), 75–78.

Hoffman, R. S. (2003). Thallium toxicity and the role of Prussian blue in therapy. Toxicology Reviews, 22(1), 29–40.

Hologgitas, J., Ullucci, P., & Driscoll, J. (1980). Thallium elimination kinetics in acute thallotoxicosis. Journal of Analytical Toxicology, 4(2), 68–75.

Houeto, P., Mountassir, M., & Garnier, R. (1994). Elemental mercury vapour toxicity: Treatment and levels in plasma and urine. Human & Experimental Toxicology, 13(12), 848–852.

Hsiung, C. S., & Wang, M. C. (1997). Minimizing interferences in the quantitative multielement analysis of trace elements in biological fluids by inductively coupled plasma mass spectrometry. Clinical Chemistry, 43(12), 2303–2311.

Hughes, M. F. (2006). Biomarkers of exposure: A case study with inorganic arsenic. Environmental Health Perspectives, 114(11), 1790–1796.

Huisman, L. C., & Van Der Ploeg, R. J. (2001). An atypical chemical burn. The Lancet, 358(9292), 1510.

Huwez, F., & Sivasambu, B. (1992). Acute renal failure after overdose of colloidal bismuth subcitrate. The Lancet, 340(8820), 1298.

Hviid, A., Stellfeld, M., Wohlfahrt, J., & Melbye, M. (2003). Association between thimerosal-containing vaccine and autism. JAMA, 290(13), 1763–1766.

Infante, P. F., & Newman, L. S. (2004). Beryllium exposure and chronic beryllium disease. The Lancet, 363(9406), 415–416.

Iregren, A., Sjögren, B., & Eliasson, K. (2001). Effects on the nervous system in different groups of workers exposed to aluminium. Occupational and Environmental Medicine, 58(7), 453–460.

Jappinen, P., & Tenhunen, R. (1990). Hydrogen sulphide poisoning: Blood sulphide concentration and changes in haem metabolism. British Journal of Industrial Medicine, 47(4), 283–285.

Jarup, L., Berglund, M., Elinder, C. G., Nordberg, G., & Vahter, M. (1998). Health effects of cadmium exposure—a review of the literature and risk estimate. Scandinavian Journal of Work, Environment & Health, 24(Suppl 1), 7–51.

Johnson, C. H., & Van Tassell, V. J. (1991). Acute barium poisoning with respiratory failure and rhabdomyolysis. Annals of Emergency Medicine, 20(10), 1138–1142.

Johnson, L. R., & Farmer, J. G. (1991). Use of human metabolic studies and urinary arsenic speciation in assessing arsenic exposure. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 46(1), 53–61.

Jourdan, S., Welsch, C., & Hurlimann, G. (2001). Suicidal poisoning with barium chloride. Forensic Science International, 119(2), 263–265.

Kage, S., Kudo, K., & Ikeda, N. (1991). Determination of thiosulfate in body fluids by GC and GC/MS. Journal of Analytical Toxicology, 15(3), 148–150.

Kage, S., Nagata, T., Kudo, K., & Ikeda, N. (1997). The usefulness of thiosulfate as an indicator of hydrogen sulfide poisoning: Three cases. International Journal of Legal Medicine, 110(4), 220–222.

Kage, S., Inagaki, S., Kudo, K., & Ikeda, N. (2002a). Fatal and nonfatal poisoning by hydrogen sulfide at an industrial waste site. Journal of Forensic Sciences, 47(3), 652–655.

Kage, S., Kudo, K., & Ikeda, N. (2002b). Simultaneous determination of nitrate and nitrite in human plasma by gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 26(6), 320–324.

Kage, S., Kudo, K., & Ikeda, N. (2004). Fatal hydrogen sulfide poisoning at a dye works. Legal Medicine, 6(3), 182–186.

Kales, S. N., & Goldman, R. H. (2002). Mercury exposure: Current concepts, controversies, and a clinic's experience. Journal of Occupational and Environmental Medicine, 44(2), 143–154.

Kang-Yum, E., & Oransky, S. H. (1992). Chinese patent medicine as a potential source of mercury poisoning. Veterinary and Human Toxicology, 34, 235–238.

Kangas, J., & Savolainen, H. (1987). Urinary thiosulphate as an indicator of exposure to hydrogen sulphide vapour. Clinica Chimica Acta, 164(1), 7–10.

Kissa, E. (1987). Determination of inorganic fluoride in blood with a fluoride ion selective electrode. Clinical Chemistry, 33(2), 253–255.

Klein, G. L. (2005). Aluminum: New recognition of an old problem. Current Opinion in Pharmacology, 5(6), 637–640.

Kneip, T. J., & Crable, J. V. (1977). Arsenic, selenium and antimony in urine and air. Analytical method by hydride generation and atomic absorption spectroscopy. Health Laboratory Science, 14, 53–58.

Knight, L. D., & Presnell, S. E. (2005). Death by sewer gas: Case report of a double fatality and review of the literature. American Journal of Forensic Medicine and Pathology, 26(2), 181–185.

Kolanz, M. E. (2001). Introduction to beryllium: Uses, regulatory history, and disease. Applied Occupational and Environmental Hygiene, 16(5), 559–567.

Koppel, C., Baudisch, H., & Ibe, K. (1986). Fatal poisoning with selenium dioxide. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 24(1), 21–35.

Krewski, D., Yokel, R. A., Nieboer, E., Borchelt, D., Cohen, J., Harry, J., ... & White, G. (2007). Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 10(Suppl 1), 1–269.

Lakshmi, B. (2002). Methemoglobinemia with aluminum phosphide poisoning. American Journal of Emergency Medicine, 20(2), 130–132.

Lakso, J. U., & Peoples, S. A. (1979). A colorimetric method for the determination of arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid in biological and environmental samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 27(6), 1229–1233.

Lang, T. F., & Edwards, C. R. (2004). Iatrogenic copper deficiency following information and drugs obtained over the Internet. Annals of Clinical Biochemistry, 41(5), 417–420.

Laraque, D., & Trasande, L. (2005). Lead poisoning: Successes and 21st century challenges. Pediatrics in Review, 26(12), 435–443.

Lauwerys, R. R., & Bernard, A. M. (1986). Cadmium and the kidney. British Journal of Industrial Medicine, 43, 433–435.

Lauwerys, R. R., Bernard, A. M., & Roels, H. A. (1994). Cadmium: Exposure markers as predictors of nephrotoxic effects. Clinical Chemistry, 40(8), 1391–1394.

Le, X. C., Cullen, W. R., & Reimer, K. J. (1994). Human urinary arsenic excretion after one-time ingestion of seaweed, crab, and shrimp. Clinical Chemistry, 40(4), 617–624.

Leblanc, M., Poulin, S., & Jobin, J. (1996). Lithium poisoning treated by high-performance continuous arteriovenous and venovenous hemodiafiltration. American Journal of Kidney Diseases, 27(3), 365–372.

Lech, T. (2006). Exhumation examination to confirm suspicion of fatal lead poisoning. Forensic Science International, 158(2–3), 219–223.

Lech, T., & Trela, F. (2005). Massive acute arsenic poisonings. Forensic Science International, 151(3), 273–277.

Lindberg, A. L., Goessler, W., Skytt, A., Grandér, M., Liden, C., & Vahter, M. (2007). Evaluation of the three most commonly used analytical methods for determination of inorganic arsenic and its metabolites in urine. Toxicology Letters, 168(3), 310–318.

Linden, C. H., Hall, A. H., Kulig, K. W., & Rumack, B. H. (1986). Acute ingestions of boric acid. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 24(4), 269–279.

Lindsay, A. E., Sharma, S., & Baskin, S. I. (2004). Analytical techniques for cyanide in blood and published blood cyanide concentrations from healthy subjects and fire victims. Analytica Chimica Acta, 511(2), 185–195.

Ljunggren, K. G., Norberg, K., & Wall, S. (1991). Blood and urine concentrations of aluminium among workers exposed to aluminium flake powders. British Journal of Industrial Medicine, 48(2), 106–109.

Lokan, R. J., James, R. A., & Harding, P. E. (1987). Apparent post-mortem production of high levels of cyanide in blood. Journal of the Forensic Science Society, 27(4), 253–259.

Lombeck, I., Kasparek, K., Feinendegen, L. E., & Bremer, H. J. (1987). Acute selenium poisoning of a 2-year-old child. European Journal of Pediatrics, 146(3), 308–312.

Lovell, M. A., & Farmer, J. G. (1985). Arsenic speciation in urine from humans intoxicated by inorganic arsenic compounds. Human Toxicology, 4(2), 203–214.

Lundquist, P., Rosling, H., & Sorbo, B. (1987). Cyanide concentrations in blood after cigarette smoking, as determined by a sensitive fluorimetric method. Clinical Chemistry, 33(7), 1228–1230.

Mackell, M. A., Smith, R. D., & Purdy, W. C. (1985). An unsuspected arsenic poisoning murder disclosed by forensic autopsy. American Journal of Forensic Medicine and Pathology, 6(4), 358–361.

Maes, V., D'Hont, F., & Somer, P. (1985). Acute and chronic intoxication with carbromal preparations. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 23(4–5), 341–346.

Martin, B. R. (1986). The chemistry of aluminium as related to biology and medicine. Clinical Chemistry, 32(10), 1797–1806.

Martinez, M. A., Ballesteros, S., & Almarza, E. (2007). The tissue distribution of fluoride in a fatal case of self poisoning. Journal of Analytical Toxicology, 31(8), 526–533.

Marumo, F., Miura, Y., & Oshiro, T. (1987). The desferrioxamine loading test as a non-invasive method for diagnosing Al-related bone disease in hemodialysis patients: desferrioxamine therapy for the alleviation of pain. Trace Elements in Medicine, 4, 149–153.

Mason, H., & Williams, N. (2005). The decay of blood lead levels in workers suspended under the control of lead at work regulations. Occupational Medicine, 55(5), 371–374.

Mason, H. J., Wilson, H. K., & White, M. A. (1999). Follow up of workers previously exposed to silver solder containing cadmium. Occupational and Environmental Medicine, 56(8), 553–558.

Matoba, R., Kimura, H., & Uchida, H. (1986). An autopsy case of acute selenium (selenious acid) poisoning and selenium levels in human tissues. Forensic Science International, 31(2), 87–92.

Matthews, T. G., & Dubowitz, V. (1977). Diagnostic mousetrap. British Journal of Hospital Medicine, 17, 607–608.

Mauras, Y., & Allain, P. (1993). Simultaneous determination of lead, bismuth and thallium in plasma and urine by inductively coupled plasma mass spectrometry. Clinica Chimica Acta, 218(2), 201–205.

McCallum, R. I. (1999). Antimony in medical history. Pentland Press.

McNeil, N. I., et al. (1984). Domestic metallic mercury poisoning. The Lancet, 323(8371), 269–271.

McQuirter, J. L., et al. (2001). The effects of retained lead bullets on body lead burden. Journal of Trauma, 50(5), 892–899.

Memis, D., et al. (2007). Fatal aluminium phosphide poisoning. European Journal of Anaesthesiology, 24(3), 292–293.

Meyer-Baron, M., et al. (2007). Occupational aluminum exposure: Evidence in support of its neurobehavioral impact. Neurotoxicology, 28(6), 1068–1078.

Miekeley, N., et al. (2002). Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 372(3), 495–502.

Milstein, L. S., et al. (2003). Development and application of a robust speciation method for determination of six arsenic compounds present in human urine. Environmental Health Perspectives, 111(3), 293–296.

Miu, A. C., & Benga, O. (2006). Aluminum and Alzheimer's disease: A new look. Journal of Alzheimer's Disease, 10(2–3), 179–201.

Moore, C., & Adler, R. (2000). Herbal vitamins: Lead toxicity and developmental delay. Pediatrics, 106(3), 600–602.

Moore, D., et al. (1993). Thallium poisoning: Diagnosis maybe elusive but alopecia is the clue. BMJ, 306(6890), 1527–1529.

Moriya, F., & Hashimoto, Y. (2003). Chemical factors affecting the interpretation of blood cyanide concentrations in fire victims. Legal Medicine, 5(Suppl 1), S113–S117.

Morten, J. A., & Delves, H. T. (1999). Measurement of total boron and 10B concentration and the detection and measurement of elevated 10B levels in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry using the determination of 10B:11B ratios. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 14(10), 1545–1556.

Moshage, H., et al. (1995). Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation. Clinical Chemistry, 41(6), 892–896.

Müller, T., et al. (1996). Endemic Tyrolean infantile cirrhosis: An ecogenetic disorder. The Lancet, 347(9005), 877–880.

Murko, S., et al. (2007). Speciation of Al in human serum by convective-interaction media fast-monolithic chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection. Journal of Inorganic Biochemistry, 101(8), 1234–1241.

Murray, F. J. (1995). A human health risk assessment of boron (boric acid and borax) in drinking water. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 22(3), 221–230.

Needleman, H. L. (2006). Mercury in dental amalgam—a neurotoxic risk? JAMA, 295(15), 1835–1836.

Needleman, H. L., & Gatsonis, C. A. (1990). Low-level lead exposure and the IQ of children: A meta-analysis of modern studies. JAMA, 263(5), 673–678.

Newton, K. E., et al. (2005). A problem with her lead weight. Annals of Clinical Biochemistry, 42(2), 145–148.

Ngim, C. H., et al. (1988). Atomic absorption spectrophotometric microdetermination of total mercury in undigested biological samples. Journal of Analytical Toxicology, 12(3), 132–135.

Nordberg, M. (2004). Environmental exposure and preventive measures in Sweden and EU. Biometals, 17(5), 589–592.

Nuttall, K. L. (2004). Interpreting mercury in blood and urine of individual patients. Annals of Clinical & Laboratory Science, 34(3), 235–250.

Nuttall, K. L. (2006). Interpreting hair mercury levels in individual patients. Annals of Clinical & Laboratory Science, 36(3), 248–261.

O'Donohue, J. W., et al. (1993). Micronodular cirrhosis and acute liver failure due to chronic copper self-intoxication. European Journal of Gastroenterology & Hepatology, 5(7), 561–562.

O'Sullivan, K., & Taylor, M. (1983). Chronic boric acid poisoning in infants. Archives of Disease in Childhood, 58(9), 737–739.

Odoul, M., et al. (1994). Specific determination of cyanide in blood by headspace gas chromatography. Journal of Analytical Toxicology, 18(4), 205–207.

Ohlson, G., & Sheridan, F. (1991). Blood fluoride by ion-specific potentiometer. TIAFT Bulletin, 21, 36–78.

Oliver, A., et al. (2005). Trace element concentrations in patients on home enteral feeding: Two cases of severe copper deficiency. Annals of Clinical Biochemistry, 42(2), 136–140.

Pakulska, D., & Czerczak, S. (2006). Hazardous effects of arsine: A short review. International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health, 19(1), 36–44.

Patel, K. C., et al. (1976). Acute renal failure and methaemoglobinaemia due to copper sulphate poisoning. Journal of Postgraduate Medicine, 22(4), 180–184.
Pedersen, R. S., et al. (1978). Thallium intoxication treated with long-term hemodialysis, forced diuresis and Prussian blue. Acta Medica Scandinavica, 204(5), 429–432.
Piamphongsant, T. (1999). Chronic environmental arsenic poisoning. International Journal of Dermatology, 38(6), 401–410.
Pichichero, M. E., et al. (2002). Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thiomersal: A descriptive study. The Lancet, 360(9347), 1737–1741.
Pierre, F., et al. (1995). Effect of different exposure compounds on urinary kinetics of aluminium and fluoride in industrially exposed workers. Occupational and Environmental Medicine, 52(6), 396–403.
Pillai, A., et al. (2000). A new system for the spectrophotometric determination of arsenic in environmental and biological tissues. Analytica Chimica Acta, 408(1–2), 111–115.
Pineau, A., et al. (1990). Determination of total mercury in human hair samples by cold vapor atomic absorption spectrometry. Journal of Analytical Toxicology, 14(4), 235–238.
Piscator, M. (1979). Copper. In L. Friberg, et al. (Eds.), Handbook on the toxicology of metals (pp. 411–420). Elsevier Biomedical Press.
Playford, R. J., et al. (1990). Bismuth induced encephalopathy caused by tri potassium dicitrato bismuthate in a patient with chronic renal failure. Gut, 31(3), 359–360.
Poklis, A., & Mackell, M. A. (1989). Disposition of fluoride in a fatal case of unsuspected sodium fluoride poisoning. Forensic Science International, 41(1–2), 55–59.
Poklis, A., & Saady, J. J. (1990). Arsenic poisoning: Acute or chronic? Suicide or murder? American Journal of Forensic Medicine and Pathology, 11(3), 226–232.
Polizzi, S., et al. (2002). Neurotoxic effects of aluminium among foundry workers and Alzheimer's disease. Neurotoxicology, 23(6), 761–774.
Poon, W. T., et al. (2004). Use of hair analysis in the diagnosis of heavy metal poisoning: Report of three cases. Hong Kong Medical Journal, 10(3), 197–200.
Popp, W., et al. (2002). Phosphine poisoning in a German office. The Lancet, 359(9316), 1574.
Pott, W. A., et al. (2001). Pharmacokinetics, metabolism, and carcinogenicity of arsenic. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 169, 165–214.
Quadrani, D. A., et al. (2000). A fatal case of gun blue ingestion in a toddler. Veterinary and Human Toxicology, 42(2), 96–98.
Quinones, O., et al. (2006). Analysis of bromate and bromide in blood. Toxicology, 221(2–3), 229–234.
Rayman, M. P. (2000). The importance of selenium to human health. The Lancet, 356(9225), 233–241.
Reilly, C. (1993). Selenium in health and disease. Australian Journal of Nutrition and Dietetics, 50, 136–144.
Reymond, J. M., & Desmeules, J. (1998). Sodium stibogluconate (pentostan) overdose in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. Therapeutic Drug Monitoring, 20(6), 714–716.
Richardson, B. A. (1994). Sudden infant death syndrome: A possible primary cause. Journal of the Forensic Science Society, 34(3), 199–204.
Rifat, S. L., et al. (1990). Effect of exposure of miners to aluminium powder. The Lancet, 336(8724), 1162–1165.
Riihimaki, V., et al. (2000). Body burden of aluminum in relation to central nervous system function among metal inert-gas welders. Scandinavian Journal of Work, Environment & Health, 26(2), 118–130.
Ritchie, K. A., et al. (2004). Mercury vapour levels in dental practices and body mercury levels of dentists and controls. British Dental Journal, 197(10), 625–632.
Robotham, J. L., & Lietman, P. S. (1980). Acute iron poisoning: A review. American Journal of Diseases of Children, 134(9), 875–879.
Roels, H., et al. (1987). Relationships between the concentrations of mercury in air and in blood or urine in workers exposed to mercury vapour. Annals of Occupational Hygiene, 31(1), 135–145.
Rosenfeld, L. (1985). Alfred Swaine Taylor (1806-1880), pioneer toxicologist—and a slight case of murder. Clinical Chemistry, 31(7), 1235–1236.
Saddique, A., & Peterson, C. D. (1983). Thallium poisoning: A review. Veterinary and Human Toxicology, 25(1), 16–22.
Saha, K. C. (2003). Diagnosis of arsenicosis. Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 38(1), 255–272.

Saito, T., et al. (1996). Fatal methemoglobinemia caused by liniment solutions containing sodium nitrite. Journal of Forensic Sciences, 41(1), 169–171.
Sakai, T. (2000). Biomarkers of lead exposure. Industrial Health, 38(2), 127–142.
Saldana, M., et al. (2006). Diet-related mercury poisoning resulting in visual loss. British Journal of Ophthalmology, 90(11), 1432–1434.
Saleki, S., et al. (2007). Liver histopathology of fatal phosphine poisoning. Forensic Science International, 166(2–3), 190–193.
Sandy, J. J., & Rose, C. S. (1988). A case of non-fatal sodium fluoride ingestion. Journal of Analytical Toxicology, 12(5), 270–271.
Saravu, K., et al. (2007). Acute ingestion of copper sulphate: A review on its clinical manifestations and management. Indian Journal of Critical Care Medicine, 11(2), 74–80.
Schauben, J. L., et al. (1990). Iron poisoning: Report of three cases and a review of therapeutic intervention. Journal of Emergency Medicine, 8(3), 309–319.
Schellmann, B., et al. (1986). Acute fatal selenium poisoning: Toxicological and occupational medical aspects. Archives of Toxicology, 59(1), 61–63.
Schminke, G., & Seubert, A. (2000). Comparison of ion chromatographic methods based on conductivity detection, post-column-reaction and on-line-coupling IC-ICP-MS for the determination of bromate. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 366(4), 387–391.
Schorn, T. F., et al. (1991). Barium carbonate intoxication. Intensive Care Medicine, 17(1), 60–62.
Schwartz, B. S., & Hu, H. (2007). Adult lead exposure: Time for change. Environmental Health Perspectives, 115(3), 451–454.
Sedman, A. B., et al. (1985). Evidence of aluminum loading in infants receiving intravenous therapy. New England Journal of Medicine, 312(21), 1337–1343.
Seidel, S., et al. (2001). Assessment of commercial laboratories performing hair mineral analysis. JAMA, 285(1), 67–72.
Serfontein, W. J., & Mekel, R. (1979). Bismuth toxicity in man II: Review of bismuth blood and urine levels in patients after administration of therapeutic bismuth formulations in relation to the problem of bismuth toxicity in man. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, 26(2), 391–411.
Sethi, S., et al. (1993). Role of copper in Indian childhood cirrhosis. Annals of Tropical Paediatrics, 13(1), 3–5.
Sevier, J. N., & Berbatis, C. G. (1976). Accidental sodium nitrite ingestion. Medical Journal of Australia, 1(22), 847.
Shannon, M. W., et al. (2005). Lead exposure in children: Prevention, detection and management. Pediatrics, 116(4), 1036–1046.
Sheehan, T. M., & Halls, D. J. (1999). Measurement of selenium in clinical specimens. Annals of Clinical Biochemistry, 36(3), 301–315.
Shnaas, L., et al. (2006). Reduced intellectual development in children with prenatal lead exposure. Environmental Health Perspectives, 114(5), 791–797.
Shuttler, I. L., & Delves, H. T. (1986). Determination of lead in blood by atomic absorption spectrometry with electrothermal atomisation. Analyst, 111(6), 651–656.
Singh, B. M., et al. (1989). The metabolic effects of fatal cyanide poisoning. Postgraduate Medical Journal, 65(769), 923–925.
Singh, S., et al. (1996). Aluminum phosphide ingestion—a clinico-pathologic study. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 34(6), 703–706.
Slavin, W. (1988). Graphite furnace AAS for biological materials. Science of The Total Environment, 71(1), 17–35.
Slikkerveer, A., & De Wolff, F. A. (1989). Pharmacokinetics and toxicity of bismuth compounds. Medical Toxicology and Adverse Drug Experience, 4(5), 303–323.
Slikkerveer, A., et al. (1993). Development of a therapeutic procedure for bismuth intoxication using chelating agents. Human & Experimental Toxicology, 12(1), 77–78.
Smith, A. H., et al. (2000). Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: A public health emergency. Bulletin of the World Health Organization, 78(9), 1093–1103.
Smith, M. M., et al. (1995). Determination of antimony in urine by solvent extraction and electrothermal atomization atomic absorption spectrometry for the biological monitoring of occupational exposure. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 10(5), 349–352.

Sole, E., et al. (2000). Zinc-protoporphyrin determination as a screening test for lead exposure in childhood. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 65(3), 285–292.
Song, Y., et al. (2007). Severe acute arsine poisoning treated by plasma exchange. Clinical Toxicology, 45(6), 721–727.
Soo, Y. O., et al. (2003). A whitened face woman with nephrotic syndrome. American Journal of Kidney Diseases, 41(1), 250–253.
Spaziano, M., et al. (2002). Chronic liver disease in two children exposed to moderately high levels of copper in drinking water. Italian Journal of Pediatrics, 28, 72–74.
Speaker, J. H. (1976). Determination of fluoride by specific ion electrode and report of a fatal case of fluoride poisoning. Journal of Forensic Sciences, 21(1), 121–126.
Spiegel, S. J., et al. (2005). Reducing mercury and responding to the global gold rush. The Lancet, 366(9503), 2070–2072.
Spiller, H. A., & Pfiefer, E. (2007). Two fatal cases of selenium toxicity. Forensic Science International, 171(2–3), 67–72.
St Clair, W. S., & Benjamin, J. (2008). Lead intoxication from ingestion of fishing sinkers: A case study and review of the literature. Clinical Pediatrics, 47(1), 66–70.
Steffen, C., & Seitz, R. (1981). Severe chlorate poisoning: Report of a case. Archives of Toxicology, 48(4), 281–288.
Stemmer, K. L. (1976). Pharmacology and toxicology of heavy metals: Antimony. Pharmacology & Therapeutics, 1, 157–160.
Stiefel, T., et al. (1980). Toxicokinetic and toxicodynamic studies of beryllium. Archives of Toxicology, 45(2), 81–92.
Sunshine, I. (1975). Bromide type 'A' procedure. In I. Sunshine (Ed.), Methodology for analytical toxicology (pp. 54–55). CRC Press.
Suzuki, O., et al. (1982). Direct fluorometric determination of cyanide in human materials. Forensic Science International, 19(2), 189–195.
Svantesson, E., et al. (2002). Determination of boron-containing compounds in urine and blood plasma from boron neutron capture therapy patients: The importance of using coupled techniques. Analytical Chemistry, 74(20), 5358–5363.
Tang, S., et al. (1996). Rapid and reliable method for the determination of aluminium in bone by electrothermal atomic absorption spectrometry. Analyst, 121(2), 195–200.
Taylor, A. (1986). Usefulness of measurements of trace elements in hair. Annals of Clinical Biochemistry, 23(4), 364–378.
Taylor, A. (1996). Detection and monitoring of disorders of essential trace elements. Annals of Clinical Biochemistry, 33(6), 486–510.
Taylor, A., et al. (1994). Findings of an external quality assessment scheme for determining aluminum in dialysis fluids and water. Clinical Chemistry, 40(8), 1517–1521.
Tenenbein, M. (2005). Unit-dose packaging of iron supplements and reduction of iron poisoning in young children. Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine, 159(6), 557–560.
Thompson, C. D. (1998). Selenium speciation in human body fluids. Analyst, 123(5), 827–831.
Thompson, W. W., et al. (2007). Early thimerosal exposure and neuropsychological outcomes at 7 to 10 years. New England Journal of Medicine, 357(13), 1281–1292.
Todd, L. M., et al. (2004). Iatrogenic copper deficiency causing anaemia and neutropenia. Annals of Clinical Biochemistry, 41(5), 414–416.
Tong, S., et al. (2000). Environmental lead exposure: A public health problem of global dimensions. Bulletin of the World Health Organization, 78(9), 1068–1077.
Treble, R. G., & Thompson, T. S. (2002). Elevated blood lead levels resulting from the ingestion of air rifle pellets. Journal of Analytical Toxicology, 26(6), 370–373.
Tripathi, S. K., & Pandey, S. K. (2007). The effect of aluminium phosphide on the human brain: A histological study. Medicine, Science and the Law, 47(2), 141–146.
Tyrer, S. P. (1996). Lithium intoxication: Appropriate treatment. CNS Drugs, 6, 439.
Vahter, M. (1994). What are the chemical forms of arsenic in urine, and what can they tell us about exposure? Clinical Chemistry, 40(4), 679–680.
Vaiseman, N., et al. (1986). Pharmacokinetics of oral and intravenous bromide in normal volunteers. Clinical Toxicology, 24(5), 403–413.
Vanhoe, H., et al. (1993). Bismuth in human serum: Reference interval and concentrations after intake of a therapeutic dose of colloidal bismuth subcitrate. Clinica Chimica Acta, 219(1–2), 79–91.

Velzeboer, S. C., et al. (1997). A hypertensive toddler. The Lancet, 349(9068), 1810.
Venelinov, T. I., et al. (2004). Dialysis-Chelex method for determination of exchangeable copper in human plasma. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 379(5–6), 777–780.
Vesey, C. J., et al. (1999a). A safer method for the measurement of plasma thiocyanate. Journal of Analytical Toxicology, 23(2), 134–136.
Vesey, C. J., et al. (1999b). A simple, rapid and sensitive semimicro method for the measurement of cyanide in blood. Annals of Clinical Biochemistry, 36(6), 755–758.
Villanueva, E., et al. (1990). Poisoning by thallium: A study of five cases. Drug Safety, 5(5), 384–389.
Visvanathan, R. (2001). Is it truly dementia? The Lancet, 357(9256), 684.
von Muhlendahl, K. E., & Lange, H. (1994). Copper and childhood cirrhosis. The Lancet, 344(8936), 1515–1516.
Wainwright, A. P., et al. (1988). Clinical features and therapy of acute thallium poisoning. Quarterly Journal of Medicine, 69(259), 939–944.
Walsh, F. M., et al. (1977). Acute copper intoxication: Pathophysiology and therapy with a case report. American Journal of Diseases of Children, 131(2), 149–151.
Walshe, J. M. (2003). Wilson's disease: The importance of measuring serum caeruloplasmin non-immunologically. Annals of Clinical Biochemistry, 40(2), 115–121.
Waring, W. S., et al. (2007). Pattern of lithium exposure predicts poisoning severity: Evaluation of referrals to a regional poisons unit. Quarterly Journal of Medicine, 100(5), 271–276.
Warkany, J. (1966). Acrodynia—postmortem of a disease. American Journal of Diseases of Children, 112(2), 147–156.
Warnock, D. W., et al. (1995). Toxic gas generation from plastic mattresses and sudden infant death syndrome. The Lancet, 346(8989), 1516–1520.
Warren, M. W., et al. (2002). Elemental analysis of bone: Proton-induced X-ray emission testing in forensic cases. Forensic Science International, 125(1), 37–41.
Weldon, M. M., et al. (2000). Mercury poisoning associated with a Mexican beauty cream. Western Journal of Medicine, 173(1), 15–18.
Wenk, R. E., et al. (1976). Serum chloride analysis, bromide detection, and the diagnosis of bromism. American Journal of Clinical Pathology, 65(1), 49–57.
White, M. A. (1999). A comparison of inductively coupled plasma mass spectrometry with electrothermal atomic absorption spectrophotometry for the determination of trace elements in blood and urine from non occupationally exposed populations. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 13(1–2), 93–101.
Wilber, C. G. (1980). Toxicology of selenium: A review. Clinical Toxicology, 17(2), 171–230.
Wilhelm, M., & Ohnesorge, F. K. (1990). Influence of storage conditions on aluminum concentrations in serum, dialysis fluid, urine, and tap water. Journal of Analytical Toxicology, 14(4), 206–210.
Winship, K. A. (1985). Toxicity of mercury and its inorganic salts. Adverse Drug Reactions and Acute Poisoning Reviews, 4(3), 129–160.
Wong, L. C., et al. (1964). Boric acid poisoning: Report of 11 cases. Canadian Medical Association Journal, 90(17), 1018–1023.
Woolf, A. D., et al. (2007). Update on the clinical management of childhood lead poisoning. Pediatric Clinics of North America, 54(2), 271–294.
Xia, L., et al. (2004). Single-drop microextraction combined with low-temperature electrothermal vaporization ICPMS for the determination of trace Be, Co, Pd, and Cd in biological samples. Analytical Chemistry, 76(10), 2910–2915.
Yamano, Y., & Nakadate, T. (2006). Three occupationally exposed cases of severe methyl bromide poisoning: Accident caused by a gas leak during the fumigation of a folklore museum. Journal of Occupational Health, 48(2), 129–133.
Yang, G. Q., et al. (1983). Endemic selenium intoxication of humans in China. American Journal of Clinical Nutrition, 37(5), 872–881.
Yeoh, M. J., & Braitberg, G. (2004). Carbon monoxide and cyanide poisoning in fire-related deaths in Victoria, Australia. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 42(6), 855–863.
Yeoman, B. (1985). Metals and anions. In A. C. Moffat (Ed.), Clarke's isolation and identification of drugs (2nd ed., pp. 55–69). Pharmaceutical Press.
Yoshida, T., et al. (2004). Chronic health effects in people exposed to arsenic via the drinking water: Dose-response relationships in review. Toxicology and Applied Pharmacology, 198(3), 243–252.

Yoshinaga, J., et al. (1993). Trace elements determined along single strands of hair by inductively coupled plasma mass spectrometry. Clinical Chemistry, 39(8), 1650–1655.

Yoshinaga, J., et al. (2000). Human urine certified reference material for arsenic speciation. Clinical Chemistry, 46(11), 1781–1786.

Zhang, F., et al. (2000). Differential pulse voltammetric indirect determination of aluminium in drinking waters, blood, urine, hair, and medicament samples using L-dopa under alkaline conditions. Analyst, 125(7), 1299–1302.

Zhang, F., et al. (2002). Application of dopamine as an electroactive ligand for the determination of aluminum in biological fluids. Analytical Sciences, 18(3), 293–299.

CHAPTER (16) الفصل السادس عشر

المواد المتطايرة

VOLATILE SUBSTANCES



الفصل السادس عشر

المواد المتطايرة

VOLATILE SUBSTANCES

الإطار الفلسفي والأنثروبولوجي لظاهرة الاستنشاق المتعمد

تنطوي ممارسات استنشاق المواد المتطيرة غير الطبية على أبعاد أنثروبولوجية وفلسفية عميقة ترتبط بسعي الكيان البشري نحو إعادة تشكيل وعيه وتجاوز عتبات الإدراك الواعي للواقع المعيش. فمن منظور فلسفة الوعي، يُفسر هذا السلوك كرغبة مؤقتة في هدم حدود الأنا والهروب من وطأة الوجود اليومي عبر تحقيق حالة اصطناعية من **الانتشاء (Euphoria)** والنشوة العابرة. وعلمياً، يُعرف هذا السلوك باضطراب **إساءة استخدام المواد المتطايرة (Volatile Substance Abuse - VSA)**، وهو نمط يستهدف الجهاز العصبي المركزي عبر مواد تتوافر في بيئة الإنسان المعاصر، وتحديداً بين الفئات العمرية الحرجة كالمراهقين من سن 13 إلى 18 عاماً، والمجتمعات المعزولة، أو الأفراد ذوي الاحتكاك المهني بهذه المواد.

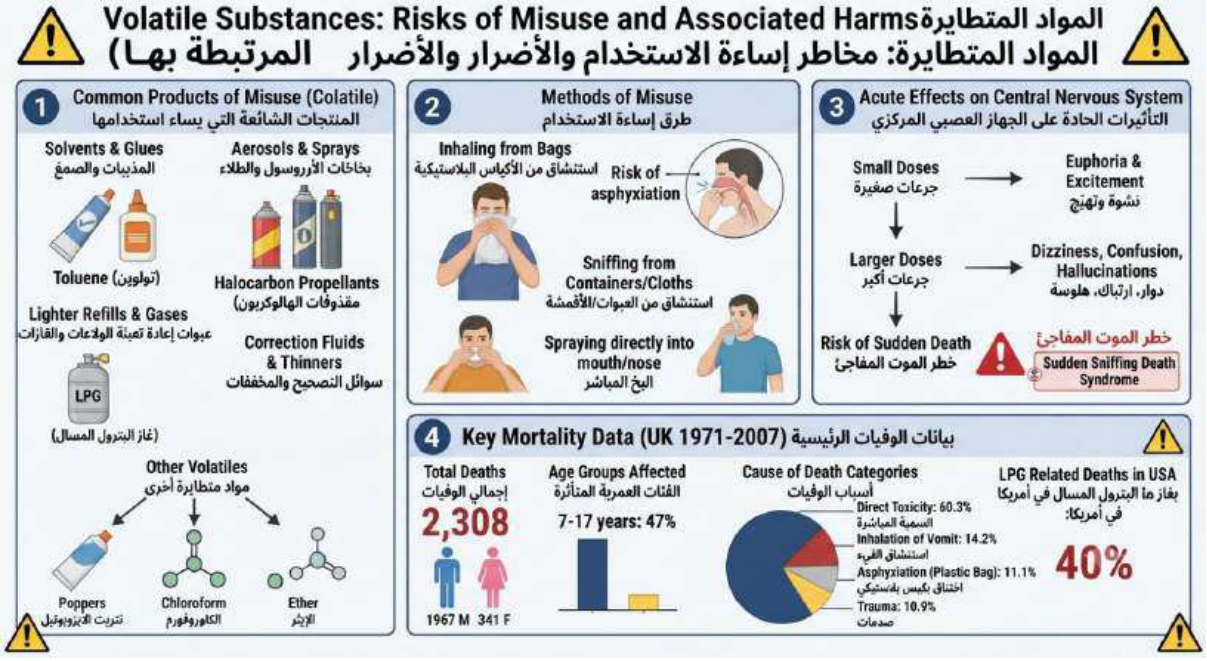
التصنيف الصيدلاني والسموميات العصبية للمركبات المتطايرة

من الناحية الكيميائية والسريرية، تتعدد المركبات المسيء استخدامها وتشمل:

1. **المذيبات العضوية والهيدروكربونات:** مثل **التولوين (Toluene)** الموجود في المواد اللاصقة ومخففات الطلاء (Thinners) وسوائل تصحيح الطباعة، وغاز البترول المسال **(Liquefied Petroleum Gas - LPG)** المستخدم في عبوات إعادة تعبئة ولاعات الساعات، ومقذوفات الهالوكربون في بخاخات الأيروسول وطفايات الحريق ونفاثات تنظيف الهواء **(Compressed Air Dusters)**. وقد أشارت التقارير إلى أن 40% من إجمالي الوفيات ذات الصلة في الولايات المتحدة اقترنت بإساءة استخدام عبوات إعادة تعبئة ولاعات الساعات بغاز البترول المسال.
2. **المركبات المخدرة والمنومة:** كاستخدام الكلوروفورم **(Chloroform)** وثنائي إيثيل الإيثر **(Diethyl Ether)** أحياناً في ارتكاب جرائم الجنايات كالاغتصاب والقتل (*Flanagan, Fisher 2008*). كما أصبح ابتلاع مذيب غاما-بيوتيرولاكتون **(Gamma-Butyrolactone - GBL)** و1,4-بيوتانيديول **(Butanediol-1,4)**—اللذين يتحولان بسرعة داخل الجسم إلى حمض غاما-هيدروكسي بوتيريك **(Gamma-Hydroxybutyric Acid - GHB)**—أمراً شائعاً في السنوات الأخيرة. إضافة إلى استخدام الكلوروبوتانول **(Chlorobutanol)** كمخدر ومادة حافظة في منشطات الكلاب السلوقية (*Greyhounds*)، ولجوء البعض لاستنشاق غازات خانقة كالهيليوم **(Helium)** كأداة للانتحار (*Field-Smith et al. 2009*).
3. **مركبات ذات تأثيرات خاصة:** كاستنشاق أبخرة كرات النفتالين أو الغازات السامة كالكلور (وهي ممارسات نادرة)، واستنشاق نتريت الإيزوبوتيل والإيزوبنتيل (المعروفة بـ **"البوبرز" - Poppers / Snappers**) بغرض اختبار خصائصها الموسعة للأوعية الدموية **(Vasodilators)**، حيث يُصنف نتريت الإيزوبوتيل حالياً ضمن المواد

المسرطنة من الفئة 2 (**Class 2 Carcinogens**)، وتُناقش إساءة استخدام هذه المركبات في الولايات المتحدة تحت مصطلح **إساءة استخدام المواد المستنشقة (Inhalant Abuse)** (*Williams et al. 2007*).

تحدث هذه المواد تأثيرات عصبية مركزية تضاهي تأثيرات الإيثانول (**Ethanol-like Central Nervous System Effects**)، حيث تقود الجرعات الصغرى إلى نشوة واضطرابات سلوكية، بينما تحفز الجرعات الأعمق أوهاماً وهلوسات. وقد تقترن أحياناً بتحقيق متعة جنسية ذاتية متزايدة مرتبطة بالاختناق الجزئي (**Partial Asphyxia / Hypoxemia**) (*Musshoff et al. 2006*). ورغم حدوث تعافي سريع عقب توقف التعرض (وهو ما يُفسر استمرار شعبية الظاهرة بين المراهقين)، إلا أن **الاعتماد النفسي المزمن (Chronic Psychological Dependence)** يظل مأزقاً حقيقياً للمستخدمين المزمنين.



المنظور المنطقي والإحصائي لمخاطر الوفيات والسمية المزمنة

من منظور الاستدلال الإحصائي والوبائي، تتجلى المخاطر القصوى لظاهرة (VSA) في متلازمة **الموت المفاجئ الناتج عن الاستنشاق (Sudden Sniffing Death Syndrome - SSDS)**.

- ففي المملكة المتحدة (باعتبارها الدولة الوحيدة التي تجمع بيانات الوفيات بصورة منهجية)، وخلال الفترة بين (1971-2007)، سجلت نحو 2308 حالة وفاة مرتبطة بإساءة استخدام المواد المتطايرة (منها 1967 للذكور)، حيث شكّل الشباب بين سن 7 و17 عاماً نحو 47% منها، ونحو 5% منها حُددت كحالات انتحار (*Field-Smith et al. 2009*).
- توزعت أسباب الوفيات بين **السمية المباشرة (Direct Toxicity)** التي نسبت إليها 60.3% من الحالات، وأسباب **غير مباشرة** شملت: استنشاق القيء بنسبة 14.2%، والاختناق المرتبط بالأكياس البلاستيكية بنسبة 11.1%، والصدمات أو الإصابات بنسبة 10.9% (وهي مرتبطة غالباً بمنتجات التولوين ولا سيما المواد اللاصقة) (*Field-Smith et al. 2009*).

أما على مستوى **السمية المزمنة (Chronic Toxicity)** والتعرض المهني أو البيئي، فقد لوحظ ترسب حبيبات حاوية على التيتانيوم في الرئتين جراء الاستنشاق المفترض لبخاخ طلاء قائم على التولوين (*Byard et al. 2007*)، إلى جانب التسمم

بالرصاص الناتج عن إساءة استخدام البنزين المحتوي على الرصاص في المجتمعات الأقل نمواً. وإلى جانب مخاطر الحرائق والانفجار لغاز (LPG)، سُجلت حالات حروق خطيرة بمحمض الهيدروفلوريك ناتجة عن اشتعال 1,2-ديفلوروإيثان المنبعث من منظفات الهواء المضغوط (*Foster et al. 2003*). جدير بالذكر أنه رغم حظر الاتحاد الأوروبي لبيع المواد اللاصقة وبخاخات الطلاء المحتوية على أكثر من 0.1% من التولوين للجمهور العام (اعتباراً من يونيو 2007)، إلا أن الاستخدام الصناعي استمر ودون تأثر باللوائح.

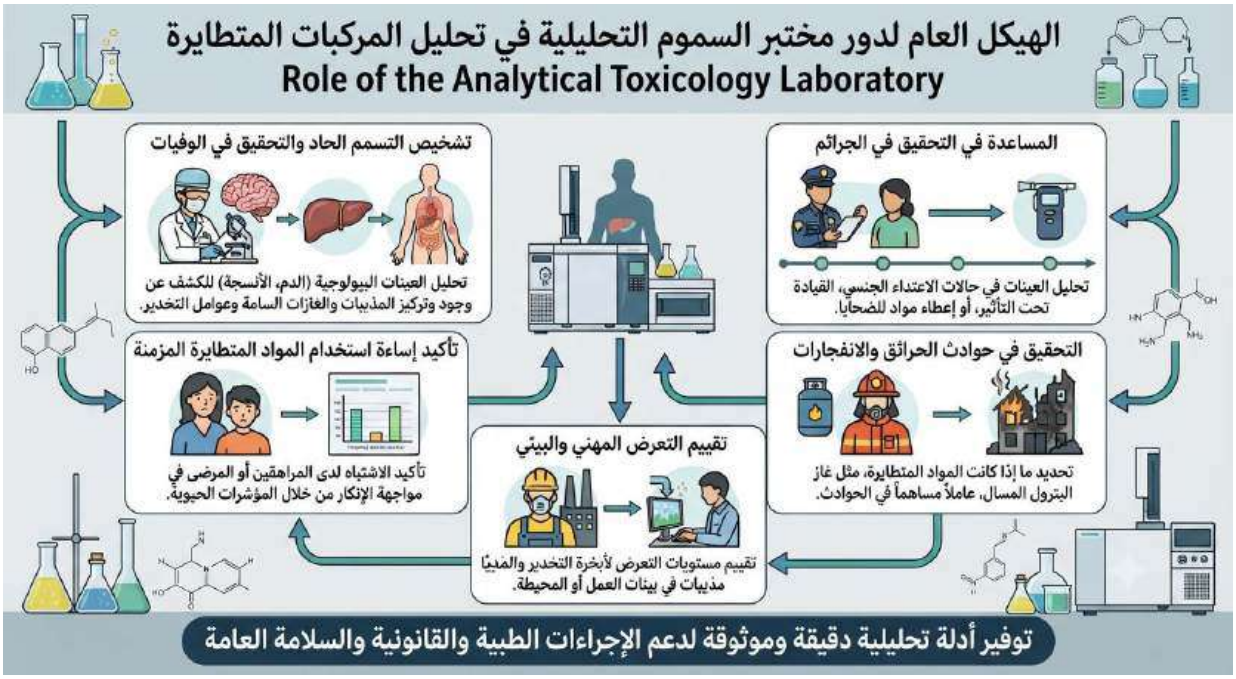
دور مختبر السموم التحليلية Role of the analytical toxicology laboratory

قد يُطلب من مختبر السموم التحليلية إجراء تحليلات للمذيبات وغيرها من المركبات المتطايرة في العينات البيولوجية والعيّنات ذات الصلة للأغراض التالية:

1. للمساعدة في تشخيص التسمم الحاد بما في ذلك التحقيق في حالات الوفاة التي يُحتمل فيها وجود تسمم بمركب متطاير (بما في ذلك عوامل التخدير والغازات الخانقة).
2. لتأكيد الاشتباه في إساءة استخدام المواد المتطايرة المزمنة في مواجهة إنكار المريض و/أو الشخص المسؤول عن رعاية المريض مثل الأب أو الوصي القانوني.
3. للمساعدة في التحقيق في حالات الاغتصاب أو الاعتداءات الأخرى، أو المخالفات الأخرى مثل قيادة المركبات الآلية أو تشغيل الآلات، والتي ربما تم ارتكابها تحت تأثير المواد المتطايرة، أو التي ربما تم فيها إعطاء مواد متطايرة للضحية.
4. للمساعدة في التحقيق في حوادث الحريق أو الانفجار حيث ربما كانت إساءة استخدام المواد المتطايرة عاملاً مساهماً.
5. لتقييم التعرض المهني أو البيئي لأبخرة التخدير أو المذيبات. ومع ذلك، قد تكون تقنيات أخرى مثل رصد الهواء المحيط أو الهواء الزفير، أو في بعض الحالات قياس إفراز مستقلبات البول، أكثر ملاءمة في هذا السياق.



صورة توضح دور مختبر السموم في تحليل الغازات المتطايرة



يمثل تحليل المواد المتطايرة مشكلات خاصة؛ فأولاً، يجب التحكم في جمع وتخزين ونقل العينات البيولوجية قدر الإمكان من أجل تقليل فقد المادة المراد تحليلها، إذ يُعد العمل الكمي عديم الجدوى إذا تم مواجهة مركبات شديدة التطاير مثل البروبان ما لم تُتخذ الاحتياطات اللازمة لمنع الخسائر من العينة قبل التحليل. وثانياً، تتواجد العديد من المركبات محل الاهتمام بشكل شائع في المختبرات، مما يستوجب اتخاذ احتياطات ضد التلوث أو التداخل. وثالثاً، يُفرز العديد من المركبات المتطايرة دون تغير عبر الرئتين، وبالتالي فإن الدم (و/أو الأنسجة الأخرى في حالات الوفاة)، وليس البول، هو عادة العينة المفضلة. وأخيراً، يمكن أن يكون تفسير النتائج صعباً، لا سيما إذا كان التعرض المشروع لأبخرة المذيبات أمراً محتملاً.

الجدول(1): بعض المنتجات/المركبات التي قد يتم إساءة استخدامها عن طريق الاستنشاق (أ)

المنتج	المكونات المتطايرة الرئيسية
المواد اللاصقة	
أسمنت خشب البلسا	إيثيل أسيتات
مواد اللصق بالضغط (Contact adhesives)	بوتانون، هكسان (ب)، تولوين وإسترات
أسمنت إصلاح إطارات الدراجات	تولوين وزيلينات (ج)
أسمنت بولي فينيل كلورايد(PVC)	أسيتون، بوتانون، سيكلوهكسانول، ثلاثي كلورو إيثيلين
مواد لاصقة للأخشاب	زيلينات (ج)
البخاخات (الأيروسولات)	
معطر الجو	غاز بترول مسال مُنقى (د)، ثنائي ميثيل الإيثر (DME) و/أو فلوروكربونات (هـ)
مزيلات العرق، مضادات التعرق	غاز بترول مسال مُنقى (د)، ثنائي ميثيل الإيثر (DME) و/أو فلوروكربونات (هـ)
بخاخ الحشرات	غاز بترول مسال مُنقى (د)، ثنائي ميثيل الإيثر (DME) و/أو فلوروكربونات (هـ)
مثبت الشعر	غاز بترول مسال مُنقى (د)، ثنائي ميثيل الإيثر (DME) و/أو فلوروكربونات (هـ)
الطلاء	غاز بترول مسال مُنقى (د)، ثنائي ميثيل الإيثر (DME) و/أو فلوروكربونات (هـ) وإسترات
المخدرات / المسكنات	
استنشاقية	أكسيد النيتروز، سيكلوبرافين (و)، ثنائي إيثيل الإيثر (و)، هالوثان، إنفلوران، ديسفلوران، إيزوفلوران، ميثوكسي فلوران (و)، سيفوفلوران، زينون

المنتج	المكونات المتطايرة الرئيسية
موضعية	كلوريد الإيثيل، فلوروكربونات (هـ)
عبوات إعادة تعبئة ولاعات السجائر	غاز بترول مسال مُنقى (د)
عوامل التنظيف الجاف وإزالة الشحوم التجارية	رباعي كلوريد الكربون (ز)، ثنائي كلورو ميثان، ميثانول، 1,1,2-ثلاثي كلورو ثلاثي فلورو الإيثان(FC 113) ، 1,1-ثنائي كلورو-1-فلورو الإيثان(FC 141b) ، ميثانول، بروبيلين داي كلورايد (ز)، 1,1,1-ثلاثي كلورو إيثان (ز)، رباعي كلورو إيثيلين، تولوين، ثلاثي كلورو إيثيلين
مزيلات البقع المنزلية والتنظيف الجاف؛ مزيل اللصقات الجراحية/العلكة	رباعي كلوريد الكربون (ز)، ثنائي كلورو ميثان، 1,1,1-ثلاثي كلورو إيثان (ز)، رباعي كلورو إيثيلين، ثلاثي كلورو إيثيلين
مزيلات الأتربة ("فرش الهواء"، "منظفات الهواء")	ثنائي ميثيل الإيثر(DME) ، فلوروكربونات (هـ)، (ز)
طفايات الحريق	بروموك@وروثنائي فلورو ميثان (FC 12B1، BCF) (و)، ثلاثي كلورو فلورو ميثان (FC 11) (و)، ثنائي كلورو ثنائي فلورو ميثان (FC 12) (و)
الوقود الهيدروكربوني / المذيبات	أستيلين، "بوتان" (ح)، بنزين (جولين/جازولين) (ط)، إيثرات بترولية (ي)، "بروبان" (ك)
المذيبات الصناعية / المختبرية	كلوروفورم (و)، ميثيل أسيتات، ميثيل إيزوبوتيل كيتون(MIBK) ، ميثيل ثالثي بوتيل إيثر (MTBE)
مؤكسد محقون (سباق السيارات، مواقد اللحام)	أكسيد النيتروز
الطلاء / مخففات الطلاء	أسيتون، بوتانون، إسترات، هكسان (ب)، تولوين، ثلاثي كلورو إيثيلين، زيلينات (ج)
مزيل الطلاء	ثنائي كلورو ميثان، ميثانول، تولوين
سائل البدء (التشغيل)	ثنائي إيثيل الإيثر، هيدروكربونات (هبتان، غاز بترول مسال (د))، ثنائي ميثيل الإيثر(DME)
سوائل/مخففات تصحيح الآلة الكاتبة (البعض منها)	1,1,1-ثلاثي كلورو إيثان (و)
موسعات الأوعية الدموية	بوتيل نتريت، إيزوبوتيل نتريت ("بوتيل نتريت")، إيزوبنتيل نتريت (إيزوأميل نتريت، "أميل نتريت") (ل)
لمبات/أسطوانات موزعات الكريمة المخفوقة	أكسيد النيتروز

(أ) تختلف تركيبات بعض المنتجات باختلاف الوقت وبلد المنشأ. (ب) "الهكسان" التجاري هو خليط من الهكسان والهبتان مع كميات صغيرة من الهيدروكربونات الأليفاتية الأعلى. (ج) بشكل أساسي م-كسيلين (1,3-ثنائي ميثيل بنزين). (د) غاز البترول المسال (LPG؛ بوتان، إيزوبوتان، بروبان؛ وإذا كان غير نقي، فيشمل أيضاً البيوتينات، البروبينات، مركبات الكبريت، إلخ). (هـ) في الوقت الحاضر غالباً ما يكون 1,1,1,2-تترافلوروإيثان (FC 134a)، ولكن قد توجد أيضاً مركبات كلورو ديفلوروإيثان (FC 22)، و1,1-ديفلوروإيثان (FC 152a)، وديفلوروإيثان (FC 32)، وبنتافلوروإيثان (FC 125)، وبيرفلوروبروبان (FC 218)، و1,1,1-ثلاثي فلوروإيثان (FC 143a). (و) نادراً ما يُستخدم لهذا الغرض في الوقت الحاضر. (ز) قد يحتوي أيضاً على ديناتونيوم (Denatonium). (ح) غاز البترول المسال (LPG). (ط) خليط من الهيدروكربونات الأليفاتية والعطرية بمدى غليان يتراوح بين 40 و200 درجة مئوية. (ي) مخاليط من البنتانات، والهكسانات، إلخ، بمدى غليان محدد (مثل 40 إلى 60 درجة مئوية). (ك) بروبان، بوتانات، إلخ. (ل) "أميل نتريت" التجاري، وهو بشكل رئيسي إيزوبنتيل نتريت ولكن توجد نتريتات أخرى أيضاً.

يجب أن يُبنى تشخيص إساءة استخدام المواد المتطايرة (VSA) على مجموعة من الأدلة الظرفية والسريرية والتحليلية بدلاً من الاعتماد على أي عامل بمفرده. ومن المهم بشكل خاص مراعاة جميع الأدلة الظرفية في حالات الموت المفاجئ المحتمل المرتبط بإساءة استخدام المواد المتطايرة، نظراً لتعذر استبعاد الانتحار أو حتى القتل لمجرد الاعتماد على الفحص السمّي. وقد ظهر عدد من التقارير حول استخدام المخدرات الاستنشاقية لأغراض انتحارية، وكانت هناك حالة واحدة في المملكة المتحدة لمغتصب متسلسل مثلي الجنس قام بقتل ضحاياه والتخلص من جثثهن عن طريق إشعال النيران فيهن في أكواخ الحدائق في ظروف أوحت بأن الضحية هي من تسببت في الحريق عن طريق الخطأ أثناء انغماسها في إساءة استخدام المواد المتطايرة (Flanagan, Fisher 2008). كما ينبغي وضع احتمالية إساءة استخدام المواد المتطايرة في الاعتبار لدى الأفراد الذين يُظهرون قراءات عالية جداً على أجهزة قياس الكحول في نفس الشخص أو في اختبارات التنفس الإثباتية (Gill et al.

1991). وقد تم تسجيل نتيجة بلغت 333 ملجم من الكحول في 100 مل من التنفس في إحدى الحالات بعد تناول الكحول واستنشاق البوتان؛ بينما لم تكن عينة معاصرة لقياس إيثانول الدم متاحة للتحليل (Flanagan, Fisher 2008). ومع ذلك، قد تكون الأجهزة الحديثة أقل عرضة لمثل هذا التداخل.

الطرق التحليلية Analytical methods

تتشابه تحليل العينات البيولوجية للمذيبات وغيرها من المواد المتطايرة التي قد يتم إساءة استخدامها عن طريق الاستنشاق مع تحليل الميثانول والإيثانول و2-بروبانول. وغالباً ما يوفر جهاز كروماتوغرافيا الغاز ذو الحيّز الرأسي الثابت (Static headspace GC) طريقة تحليل ملائمة ومؤتمتة بسهولة للدم وغيره من العينات البيولوجية التي يمكن الحصول عليها دون استخدام جهاز خاص لجمع العينة (Kolb, Ettre 1997). ويمكن إنجاز العديد من التحليلات باستخدام كشف التأين اللهبي و/أو كشف التقاط الإلكترون (FID و/أو ECD). ويعطي أكسيد النيتروز ومعظم المركبات المهلجنة استجابة مع كشف التقاط الإلكترون (ECD)، على الرغم من أنه يمكن استخدام كشف التوصيل الحراري (TCD) كبديل إذا يُشتبه في وجود تسمم بأكسيد النيتروز.



الشكل1 : جهاز لالتقاط عينات هواء الزفير لتحليل المذيبات: (أ) تخطيطي؛ (ب) المكونات. (Dyne et al. 1997)

وتتطلب طرق كروماتوغرافيا الغاز (GC) للزينون استخدام كشف التوصيل الحراري (TCD) أو قياس الطيف الكتلي (MS) (Miyano et al. 1993). إن استخدام هواء الزفير المُجمّع إما في كيس تيدلار (Tedlar - بولي فينيل فلورايد، PVF) أو عبر جهاز خاص مصنوع من بوليمر يشبه polytetrafluoroethylene (PTFE) (الشكل 1) (Dyne et al. 1997) مع تحليل لاحق بواسطة كروماتوغرافيا الغاز (GC) أو كروماتوغرافيا الغاز-قياس الطيف الكتلي (GC-MS) يمكن أن يسهل تحليل عدد من المركبات. يمكن قياس الطيف الكتلي المباشر لهواء الزفير أيضاً من اكتشاف العديد من المركبات بعد عدة أيام من التعرض. ومع ذلك، فإن استخدام هذه التقنيات يقتصر على الحاجة إلى أخذ النفس مباشرة من المريض والمعدات المتخصصة المطلوبة. ومع ذلك، فقد تم اكتشاف الهيليوم في عينات الغاز من رئتي شخص انتحر باستخدام الهيليوم بواسطة كروماتوغرافيا الغاز-قياس الطيف الكتلي (GC-MS) باستخدام النيتروجين كغاز حامل (Auwaerter et al. 2007). قد يكون قياس الطيف اللوني للأشعة تحت الحمراء في طور البخار (IR) مفيداً في تحليل المنتجات المسيء استخدامها أو الأجواء المحيطة. وتعتبر كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (HPLC) مفيدة في تحليل المتأبيل (المتخلفات) القطبية لبعض المذيبات.

جمع العينات ونقلها وتخزينها

إذا كانت المادة المراد تحليلها شديدة التطاير (مثل الهيليوم، البروبان، البوتان)، فقد يُشار إلى أخذ العينات مباشرة، على سبيل المثال الهواء في الرئتين. وإذا كان التحليل الكمي مطلوباً، فيجب جمع عينة الدم مباشرة في القارورة التي سيتم إجراء التحليل فيها (Gill et al. 1992). والعديد من المركبات المتطايرة الأخرى مستقبيّة نسبياً في الدم والأنسجة الأخرى إذا اتُّخذت الاحتياطات البسيطة. في حالة الدم، يجب أن تكون الحاوية المستخدمة للعينة من الزجاج، ويفضل أن تكون بغطاء مبطن بغلاف معدني؛ فقد تحدث خسائر أكبر إذا تم استخدام حاويات بلاستيكية. يجب أن يكون الأنبوب ممتلئاً قدر الإمكان ويجب فتحه فقط عند الحاجة للتحليل وبعد أن يبرد فقط (4 درجات مئوية) (Gill et al. 1988). وإذا كان حجم العينة محدوداً، فمن المستحسن اختيار حاوية تتناسب مع حجم الدم بحيث يكون هناك الحد الأدنى من الحيّز الرأسي (headspace). يجب استخدام مضاد للتخثر (إيثيلين ديامين رباعي حاسوب الصوديوم (EDTA) أو هيبرارين الليثيوم). يوصى بتخزين العينات بين 2 و8 درجات مئوية مع إضافة 1% (وزن/حجم) من فلوريد الصوديوم تقليلاً للنشاط الإنزيمي. إذا كان سيتم إجراء تشريح للجثة، فيجب الحصول على الأنسجة (حوالي 10 جرامات لكل من الدماغ، الرئة، الكبد، الكلى، والدهون تحت الجلد) بالإضافة إلى العينات السمية القياسية (دم الفخذ، البول، محتويات المعدة، الخلط الزجاجي). يجب تخزين الأنسجة قبل التحليل بنفس طريقة تخزين الدم. ولا ينبغي إضافة أي مواد حافظة. يجب تعبئة ونقل وتخزين المنتجات المتورطة في الحادث (ومحتويات المعدة إذا يُشتبه في الابتلاع) بشكل منفصل تماماً عن العينات البيولوجية (الأخرى) لتجنب التلوث المتبادل. يجب أن يتضمن التحقيق في الوفيات التي تحدث أثناء التخدير أو بعده بقليل تحليل مخدر (أو مخدرات) الاستنشاق المستخدمة من أجل استبعاد خطأ الإدارة (Uyanik 1997). وقد تمت دراسة استقرار الكلوروفورم، وثنائي إيثيل الإيثر، والإيثانول، والتولوين في أنسجة الأرانب المثبتة بالفورمالين (الدماغ، والرئة، والكبد، والكلى، والعضلات الهيكلية) (Takayasu et al. 1994). وخلص إلى أنه يمكن اكتشاف هذه المركبات لمدة تصل إلى 14 يوماً بعد التثبيت على الرغم من وجود فقد ملحوظ في التولوين، لا سيما من الدماغ (84%)، حتى بعد يوم واحد.

كروماتوغرافيا الغاز

تُقدَّم التفاصيل الملخصة لبعض طرق كروماتوغرافيا الغاز (GC) الخاصة بالمركبات المتطايرة في العينات البيولوجية في الجدول 14.2. لقد جرى استخدام الأعمدة المعبأة، على سبيل المثال أعمدة بطول $2m$ وقطر داخلي $2mm$ ومحملة بـ 0.3%(وزن/وزن) من كاربوباكس C المبرمج من درجة حرارة $35°m$ إلى $175°m$، جنباً إلى جنب مع إعداد العينات بنظام الحيّز الرأسي (Ramsey, Flanagan 1982). وتشمل عيوب هذه الطريقة ضعف فصل بعض المواد شديدة التطاير، وطول الوقت الإجمالي للتحليل، والاختلاف في شكل القمة (peak shape) التي تنتجها الكحولات بين دفعات تعبئة الأعمدة. وتتوفر بيانات مؤشر الاحتفاظ (Retention index) لمجموعة من المذيبات وغيرها من المركبات المتطايرة محل الاهتمام على كل من نسبتي 0.3% و6.6% (وزن/وزن) من كاربوباكس 20M (De Zeeuw et al. 1992).

توفر الأعمدة الأنبوبية المفتوحة ذات الطبقة المسامية (PLOT) احتفاظاً جيداً وبالتالي فصلاً ممتازاً للمركبات ذات الكتلة الجزيئية النسبية المتقاربة، إلا أن أشكال القمم الخاصة بالمركبات القطبية تكون ضعيفة، كما يصعب الكشف عن مركبات تختلف تطايراتها بشكل كبير في تحليل واحد. ومع ذلك، تتيح الأعمدة الشعيرية واسعة التجويف ذات الطور المترابط (bonded-phase wide-bore capillary columns) حقن حجوم كبيرة نسبياً عبر الحاجز المطاطي، ويمكن أن توفر مزايا الكفاءة المحسنة، وقابلية التكرار، والموثوقية. إن استخدام عمود شعيري من السيليكا المنصهرة بطول $60m$ وقطر داخلي $0.53mm$ ومطلي بثنائي ميثيل بولي سيلوكسان SPB-1 (بثكاوة أو طبقة سمكها $5\mu m$) والمبرمج من $40°m$ إلى $200°m$ يقدم مزايا عديدة مقارنة بالأنظمة ذات الأعمدة المعبأة وأنظمة PLOT (Flanagan et al. 1997). ويتم الحصول

على دقة فصل محسنة للمركبات شديدة التطاير، وحتى مع درجة حرارة ابتدائية تبلغ $40°m$، يمكن تقليص الوقت الإجمالي للتحليل إلى $26min$، مع إمكانية الحصول على أشكال قمم جيدة حتى بالنسبة للكحولات. علاوة على ذلك، يمكن إجراء حقن الحيز الرأسي بدون تجزئة (splitless septum injections) بحجوم تصل إلى $300\mu L$دون أي تأثير ملحوظ على كفاءة العمود؛ وبالتالي تكون الحساسية جيدة على الأقل مثل تلك التي يمكن تحقيقها باستخدام عمود معبأ. وتُعرض بيانات الاحتفاظ على هذا النظام لبعض المركبات الشائعة الاستخدام في الجدول 3.

إن استخدام عمود شعيري جنباً إلى جنب مع كاشفين مختلفين (FID وECD) يضفي درجة عالية من الانتقائية، لا سيما للمركبات منخفضة الكتلة الجزيئية حيث توجد هياكل بديلة قليلة نسبياً. وإذا تطلب الأمر تعرّفاً أكثر دقة، فيمكن استخدام كروماتوغرافيا الغاز مقترنة بقياس الطيف الكتلي (GC-MS) أو قياس الطيف بالأشعة تحت الحمراء محول فوريه (FTIR). ومع ذلك، قد تكون تقنية GC-MS صعبة عند مستويات الحساسية العالية عندما تكون الشظايا الناتجة أقل من m/z 40، وخصوصاً إذا كان الجهاز يُستخدم لأغراض أخرى إلى جانب تحليلات المذيبات. وبشكل خاص، فإن الحساسية المتاحة وطياف الألكانات منخفضة الوزن الجزيئي تجعل من الصعب جداً تأكيدها بواسطة GC-MS. يتيح قياس الطيف الكتلي بالرذاذ القصور الذاتي (Inertial spray MS) إدخال السوائل البيولوجية مباشرة إلى مطياف الكتلة دون تحليل كروماتوغرافي مسبق، وقد تم استخدامه في تحليل الهالوثان في الدم أثناء التخدير.

قد تكون تقنية GC-FTIR أكثر ملاءمة من GC-MS في تحليل المواد المتطايرة، إلا أن الحساسية تكون ضعيفة وخاصة عند مقارنتها بكاشف التقاط الإلكترون (ECD). علاوة على ذلك، يُعد الجهاز مكلفاً وغير متوفر على نطاق واسع. بالإضافة إلى ذلك، يمكن أن يشكل التداخل، لا سيما من الماء وثاني أكسيد الكربون في حالة العينات البيولوجية، أمراً مزعجاً. وتوفر تقنيات "التطهير والاصطياد" (Purge and trap) واستخراج الحيز الرأسي المتعدد طرقاً لزيادة الحساسية، وعلى الرغم من عدم الحاجة إليها في معظم التطبيقات السريرية والجنائية، فقد تم استخدام "التطهير والاصطياد" بالتزامن مع GC-FTIR وFID في العمل القضائي والجنائي (Ojanpera et al. 1996, 1998). كما تم توظيف التسخين النبضي (Pulse heating) في تحليل المواد المتطايرة في العينات البيولوجية (انظر الجدول 2). تتضمن هذه الطريقة استخدام محلل حراري بنقطة كوري (Curie point pyrolyser) يستخدم سبيكة مغناطيسية حديدية يمكنها بلوغ درجات الحرارة بدقة في النطاق من 150إلى $1040°m$بسرعة كبيرة (حوالي $4s$) (Nagano et al. 1989; Saito et al. 1995; Takayasu et al. 1995).

وتتضمن مزايا هذه التقنية الأخيرة استخدام حجم عينة صغير $(0.5 - 5\mu L)$، ووقت استخراج قصير، وغياب تأثيرات المصفوفة. كما تم استخدام الاستخراج الدقيق طور الصلب للحيز الرأسي (HS-SPME) في تحليل المركبات المتطايرة في العينات البيولوجية (Junting et al. 1998; Walker et al. 2006).

تتوفر طرق كروماتوغرافيا الغاز اللاتناظرية أو الدلائل الحيرالية (Chiral GC methods) إذا أثبت فصل المتصاوغات المرآتية للمخدرات أهميته (Schurig, Grosenick 1994; Shitangkoon et al. 1993).

الجدول2: ملخص لبعض طرق كروماتوغرافيا الغاز (GC) للمركبات المتطايرة في السوائل البيولوجية المنشورة خلال الفترة 1989–1998 (مقتبس من Pihlainen, Ojanpera 1998)

التطبيق	العينة	الاستخلاص (أ)	عمود كروماتوغرافيا الغاز و/أو الظروف	الكشف	حد الكشف (LoD) (ب)	المرجع
علم السموم	دم، نسيج	HS	DB-1701، بطول $40m$ ، قطر داخلي $0.25mm$ ، سُمك الفيلم $1.0\mu m$، درجة الحرارة 30 – $120°C$	MS مصيدة أيونات	$1mg/L$	Weller, Wolf (1989)
المخدرات	دم$(1mL)$	HS	Porapak S، بحجم شبكي 100/80، بطول $1.9m$ ، قطر داخلي $2mm$ ، درجة الحرارة $165°C$	FID	$-2mg/L$	Watts et al. (1992)
بيئي	دم$(10mL)$	PT	DB-624، بطول $30m$ ، قطر داخلي $0.32mm$، سُمك الفيلم $1.8\mu m$ ، درجة الحرارة $0 - 190°C$	MS	$0.05mg/L$(ج)	Ashley et al. (1992)
علم السموم	دم$(1mL)$ ، نسيج$(1g)$	HS	Carbowax 1500بنسبة0.2% ، بحجم شبكي 100/80، Carbopack C، بطول $1.8m$ ، درجة الحرارة $100°C$	FID	—	Kuhlman et al. (1993)
علم السموم	دم$(1.5mL)$	HS	DB-1، بطول $30m$ ، قطر داخلي $0.25mm$، سُمك الفيلم $1.0\mu m$ ، درجة الحرارة $40 - 250°C$	MS مصيدة أيونات(	—	Schuberth (1994)
رصد بيئة العمل	بول– (0.5 $1mL$)	HS	Porapak Q، بحجم شبكي 80–100، بطول $2m$ ، قطر داخلي $1.8mm$ ، درجة الحرارة $100°C$	MS	$0.7mg/L$(د)	Imbriani et al. (1995)
			HP-5، بطول $25m$ ، قطر داخلي $0.2mm$، درجة الحرارة $25°C$	MS	$0.1mg/L$	Imbriani et al. (1995)
علم السموم	دم، سائل مخغي شوكي CSF $(1mL)$	HS	Porapak Q، بحجم شبكي 100/80، بطول $1m$ ، قطر داخلي $2.5mm$ ، درجة الحرارة $50 - 170°C$	MS	$0.02mg/L$(هـ)	Maruyama et al. (1995)
رصد بيئة العمل	بول$(50mL)$	HS	DB-5، بطول $30m$ ، قطر داخلي $0.25mm$، درجة الحرارة $40°C$	MS	—	Schaffernicht et al. (1995)
علم السموم	دم، بلازما	PH	GS-Q، بطول $30m$ ، قطر داخلي $0.53mm$ ، درجة الحرارة $70 - 230°C$(للفحص)	MS	—	Takayasu et al. (1995)
	سيروم– (1 $3mL$)	PH	Porapak Q، بطول $1m$ ، قطر داخلي $2.6mm$ ، درجة الحرارة $180°C$(للفحص)	FID	—	Takayasu et al. (1995)
		PH	DB-17، بطول $15m$ ، قطر داخلي $0.53mm$ ، سُمك الفيلم $1.0\mu m$ ، درجة الحرارة $50°C$(للتقدير الكمي)	MS	$0.02mg/L$(هـ)	Takayasu et al. (1995)
المخدرات	دم$(3mL)$	PH	GS-Q، بطول $30m$ ، قطر داخلي $0.53mm$، درجة الحرارة $160°C$	MS	$0.2mg/L$	Saito et al. (1995)
	دم$(0.5mL)$	HS	DB-1، بطول $30m$ ، قطر داخلي $0.53mm$، سُمك الفيلم $5\mu m$ ، درجة الحرارة $60°C$	MS	—	Saito et al. (1995)
علم السموم	دم$(0.5mL)$	HS-SPME	DB-WAX، بطول $30m$ ، قطر داخلي $0.32mm$ ، سُمك الفيلم $0.25\mu m$، درجة الحرارة 35 – $230°C$	FID	$2mg/L$	Lee et al. (1995)

التطبيق	العينة	الاستخلاص (أ)	عمود كروماتوغرافيا الغاز و/أو الظروف	الكشف	حد الكشف (ب) (LoD)	المرجع
علم السموم	دم (0.5 – 5mL)	PT	PoraPLOT Q، بطول25m ، قطر داخلي0.32mm ، سُمك الفيلم 10μm، درجة الحرارة 30 – 240°C	FTIR, FID	0.05mg/L (و)	Ojanperä et al. (1996)
علم السموم	دم، دماغ (2 – 32mg)	HS-FE	DB-1، بطول30m ، قطر داخلي 0.25mm، سُمك الفيلم1.0μm ، درجة الحرارة40 – 250°C	MS مصيدة أيونات	0.01mg/L (ز)	Schuberth (1996)
علم السموم	دم	HS-SPME	HP-1، بطول30m ، قطر داخلي 0.53mm، سُمك الفيلم2.65μm ، درجة الحرارة50°C	FID	1mg/L	Tytgat, Daenens (1996)
علم السموم	دم (0.5 – 5mL)	PT	PoraPLOT Q، بطول25m ، قطر داخلي0.32mm ، سُمك الفيلم 10μm، درجة الحرارة30 – 250°C	FTIR, FID	0.01mg/L	Ojanperä et al. (1998)
علم السموم	دم، بول (0.5mL)	HST	DB-624، بطول30m ، قطر داخلي 0.32mm، سُمك الفيلم1.8μm ، درجة الحرارة5 – 110°C	FID	1mg/L	Lee et al. (1998)
المخدرات	دم(0.1mL)	HS	DB-5، بطول60m ، قطر داخلي 0.25mm، سُمك الفيلم0.25μm ، درجة الحرارة35 – 120°C	MS	20mg /L (و)	Yang et al. (2001)

(أ) HS: الحيز الرأسي (headspace)؛ HS-FE: التبخر الكامل للحيز الرأسي (headspace full evaporation)؛ HS-SPME: الاستخراج الدقيق طور الصلب للحيز الرأسي (headspace solid-phase microextraction)؛ HST: اصطياد الحيز الرأسي في درجات الحرارة المنخفضة (headspace low-temperature trapping)؛ PH: التسخين النبضي (pulse heating)؛ PT: "التطهير والاصطياد" (purge and trap).
(ب) LoD: حد الكشف (في بعض الحالات حد التعرف أو حد القياس الدقيق). (ج) 1,1,1-ثلاثي كلورو إيثان. (د) أكسيد النيتروز. (هـ) التولوين (عينة بحجم 3mL). (و) إيزوفلوران. (ز) ميثيل ثالثي بوتيل إيثر (عينة بحجم 30mg).

التحليل النوعي

تستند الإجراءات الموضحة أدناه إلى تلك التي أوردها Flanagan وآخرون (1997)، باستخدام عمود شعيري من السيليكا المنصهرة بطول 60mوقطر داخلي 0.53mmمطلي بثنائي ميثيل بولي سيلوكسان SPB-1 (بسُمك طبقة 5μm) مع كشف مشترك بتقطير تفكك الشعلة/التقطير الإلكتروني (FID/ECD) وإعداد العينة يدوياً وحقن الحيز الرأسي. تجدر الإشارة إلى أنه يمكن استخدام كاشف التفريغ النبضي (Forsyth2004) (PD) كبديل لكاشف التقاط الإلكترون (ECD)؛ حيث يتم إضافة نسبة ضئيلة من غاز إضافي ("مُشوب" أو dopant)، والذي يتأين ويوفر إلكترونات لإنتاج تيار ثابت. وقد تم اختبار العديد من المواد المشوبة، وبدا أن أفضلها هما الميثان والزينون. ويتميز كاشف التفريغ النبضي (PD-ECD) بحساسية (بحد أدنى للكميات القابلة للكشف يتراوح بين 10^{-15}إلى $10^{-12}g$) مشابهة أو تفوق تلك الخاصة بكاشف $^{63}Ni - ECD$، ولكنه لا يتطلب تراخيص أو اختبارات مسح أو متطلبات إدارية أو أمنية أخرى.

تحضير محلول المعيار الداخلي

يتم قياس حوالي 50mgمن إيثيل البنزين و50mg من 1,1,2-ثلاثي كلورو إيثان (وتم التحقق من نقاوتهما بواسطة كروماتوغرافيا الغاز قبل الاستخدام، حيث تتمثل الشوائب الشائعة في التولوين داخل إيثيل البنزين و1,1,1-ثلاثي كلورو إيثان داخل 1,1,2-ثلاثي كلورو إيثان) في دورق حجمي زجاجي سعة 50mLيحتوي على دم كامل قديم وخالٍ من المواد المتطايرة من بنك الدم. وبعد الخلط جيداً، يُخفف 1.0mLمن محلول 1,1,2-ثلاثي كلورو إيثان و2.5mL من محلول إيثيل البنزين إلى 100mLباستخدام دم كامل من بنك الدم (قديم) والماء منزوع الأيونات بنسبة (1 + 24) لإنتاج محلول المعيار الداخلي

العامل. وتكون التركيزات النهائية لإيثيل البنزين و1,1,2-ثلاثي كلورو إيثان حوالي 25و$10 mg/L$ على التوالي. ويظل هذا المحلول صالحاً للاستخدام لمدة لا تقل عن عامين إذا تم تخزينه في حصص سعة $3mL$في درجة حرارة تتراوح بين $5°C$و20 في قوارير زجاجية ذات أغطية ملولبة (سعة $3.5mL$، شركة Merck برقم 23/0073/215) أو ما يعادلها.

تحضير العينات

- **الدم والبول:** يُضاف محلول المعيار الداخلي ($200\mu L$) إلى قارورة زجاجية ذات حاجز مطاطي بسعة $12mL$(Chromacol 12-CV أو ما يعادلها) باستخدام ماصة إزاحة الهواء. ثم تُغلق القارورة بغطاء محكم مزود بحاجز من مطاط السيليكون مبطن بالتفلون (Chromacol 20-ST3 أو ما يعادلها) وغطاء قارورة ألومنيوم يُستعمل لمرة واحدة. تُحضن القارورة عند درجة حرارة ($65°C$، على كتلة تسخين)، وبعد مرور $15min$، يتم سحب جزء يتراوح بين 100و$300\mu L$ من الحيز الرأسي باستخدام حقنة زجاجية محكمة الغلق للغازات بسعة $0.5mL$(Supelco 500F-GT أو ما يعادلها) والتي تم تدفئتها مسبقاً بوضعها على كتلة التسخين لمدة ($10min$)، ثُم يُحقن الحجم في عمود كروماتوغرافيا الغاز خلال مدة تتراوح بين 2إلى $3s$.
- لاحقاً، تُضاف العينة (دم كامل، بلازما، سيروم أو بول) ($200\mu L$) عبر الحاجز المطاطي إلى نفس القارورة باستخدام حقنة بلاستيكية صلبة (بوليستيرين) تُستعمل لمرة واحدة سعة $1.0mL$ومزودة بإبرة لور (Luer) بطول $2.5cm$(بوصة واحدة) ومقياس 25، وبعد مدة لا تقل عن $15min$، يُسحب جزء إضافي من الحيز الرأسي باستخدام حقنة الغاز المحكمة المذكورة أعلاه ويُحقن في عمود كروماتوغرافيا الغاز. وبعد كل عملية حقن، يجب إزالة المكبس من الحقنة المحكمة للغازات ووضع الوحدة على كتلة التسخين حتى عملية الحقن التالية لضمان تبخر أي مادة تحليلية متبقية. كما يجب شطف الحقنة من حين لآخر بالمتانول لإزالة الرواسب وتجفيفها عن طريق تمرير هواء مضغوط.
- **الأنسجة:** يجب إجراء تحليل "فارغ" (Blank) للمعيار الداخلي بالطريقة الموضحة أعلاه. ويجب تحليل عينات الأنسجة الصلبة في قارورة منفصلة بعد إضافة إنزيم محلل للبروتين إلى خليط الحضنة لهضم العينة. وبالتالي، يتم تشريح 20إلى $50mg$من الوزن الرطب للنسيج من مركز العينة المجمدة. وتُحضن أجزاء مكررة من العينة ($65°C$، $15min$) مع محلول المعيار الداخلي ($200\mu L$) وحوالي $1mg$من بروتياز صلب (Sigma Type VIII (Subtilisin Carlsberg; Subtilopeptidase A; EC 3.4.21.62)، برقم P5380) أو ما يعادلها، وذلك قبل تحليل 100إلى $300\mu L$من الحيز الرأسي بالطريقة الموضحة أعلاه.
- **المنتجات:** يمكن تحليل البخاخات (الأيروسولات) وغازات الوقود بعد إطلاق جزء من المنتج في قارورة الحيز الرأسي، ثم نقل بضع ميكرولترات من البخار إلى قارورة أخرى للتحليل. ويمكن تحليل السوائل بالطريقة ذاتها، إلا أنه غالباً ما يمكن سحب جزء (5 إلى $50\mu L$) من الحيز الرأسي مباشرة من الحاوية نفسها. ومع ذلك، قد لا تكون النتيجة في هذه الحالة ممثلة لتركيبة السائل ككل. ويمكن إدخال المواد اللاصقة وغيرها من المنتجات السائلة أو شبه السائلة في قارورة زجاجية؛ بحيث تُغلق القارورة، وبعد الحضنة ($65°C$، $15min$)، يُنقل جزء (50 إلى $100\mu L$) من الحيز الرأسي إلى قارورة مغلقة ومحضنة مسبقاً ($65°C$، $15min$) تحتوي على محلول المعيار الداخلي. وبعد إعادة الاتزان ($65°C$، $5min$)، يُسحب 100إلى $200\mu L$من الحيز الرأسي للتحليل.

الجدول3 : بيانات الاحتفاظ والاستجابة النسبية للكاشف على نظام عمود SPB-1 (Flanagan et al. 1997) (أ)

CAS	BP	Mr	Lit.	Calc.	ECD	RRT	RT	مؤشر الاحتفاظ (RT)	المركب
	75-07-0	21	44.1	372	352	0	0.192	3.59	أسيتالدهيد
	67-64-1	57	58.1	469	460	1	0.303	5.66	أسيتون (ثنائي ميثيل كيتون، بروبانون)
	75-05-8	82	41.1	455	443	0	0.279	5.22	أسيتونتريل (سيانيد الميثيل)
	74-86-2	81	26.0	—	165	0	0.141	2.63	أسيتيلين
	71-43-2	80	78.1	660	655	0	0.770	14.39	بنزين
	100-47-0	191	103.1	—	965	0	1.347	25.16	بنزونتريل
	353-59-3	3	165.4	405	398	2	0.217	4.07	بروموكلوورثنائي فلورو ميثان(BCF) ؛ FC12B1)
	74-83-9	94	94.9	—	414	2	0.239	4.47	برومو ميثان (بروميد الميثيل)
	106-97-8	1	58.1	400	400	0	0.219	4.09	بوتان
	71-36-3	117	74.1	651	650	0	0.754	14.08	1-بيوتانول
	78-92-2	100	74.1	624	585	0	0.578	10.80	2-بيوتانول
	78-93-3	80	72.1	579	572	1	0.545	10.18	بوتانون) ميثيل إيثيل كيتون، (MEK
	106-98-9	6	56.1	390	386	0	0.211	3.94	1-بيوتين
	111-76-2	171	118.2	—	889	0	1.244	23.39	2-بوكسي إيثانول (بيوتيل سيلوسولف)
	123-86-4	125	116.2	794	795	0	1.090	20.36	بيوتيل أسيتات
	544-16-1	78	103.1	608	617	2	0.663	12.41	بيوتيل نتريت
	75-15-0	47	76.1	524	527	1	0.429	8.03	ثنائي كبريتيد الكربون
	56-23-5	77	153.8	659	661	2	0.785	14.70	رباعي كلوريد الكربون (تيتراكلورو ميثان)
	302-17-0	98	165.4	705	698	2	0.887	16.60	كلورال هيدرات
	57-15-8	167	177.5	949	976	2	1.359	25.44	الكلوروبوتانول (الكلوربوتول)
	75-68-3	10	100.5	—	335	1	0.182	3.41	2-كلورو-1,1-ديفلوروإيثان
	359-10-4	18	98.5	—	339	1	0.185	3.46	2-كلورو-1,1-ديفلوروإيثيلين
	75-45-6	41	86.5	—	258	1	0.155	2.90	كلورو‌ديفلورو ميثان(FC22)
	67-66-3	61	119.4	605	603	2	0.622	11.65	كلوروفورم (ثلاثي كلورو ميثان)
	75-88-7	7	118.5	375	365	1	0.199	3.73	2-كلورو-1,1,1-ثلاثي فلوروإيثان
	110-82-7	81	84.2	664	666	0	0.798	14.91	سيكلوهكسان
	108-93-0	161	100.2	899	874	0	1.219	22.77	سيكلوهكسانول
	108-94-1	156	98.1	875	878	1	1.226	22.90	سيكلوهكسانون
	75-19-4	33	42.1	—	533	0	0.444	8.29	سيكلوبوبان (ثلاثي ميثيلين)
	75-61-6	25	209.8	—	477	2	0.327	6.12	ثنائي بروموديفلورو ميثان
	75-71-8	30	120.9	305	313	2	0.170	3.18	ثنائي كلورو‌ديفلورو ميثان(FC12)
	75-34-3	58	99.0	563	559	2	0.511	9.57	1,1-ثنائي كلورو إيثان
	107-06-2	83	99.0	631	630	2	0.699	13.09	1,2-ثنائي كلورو إيثان
	156-59-2	61	96.9	—	512	2	0.389	7.28	1,1-ثنائي كلورو إيثيلين
	540-59-0	60	96.9	556	552	2	0.491	9.19	1,2-ثنائي كلورو إيثيلين (كلا المتصاوغين)
	75-09-2	40	84.9	515	515	2	0.398	7.45	ثنائي كلورو ميثان (كلوريد الميثيلين)
	78-87-5	96	113.0	—	684	1	0.848	15.87	1,2-ثنائي كلورو بروبان
	142-28-9	122	113.0	—	765	2	1.026	19.20	1,3-ثنائي كلورو بروبان
	76-14-2	4	170.9	361	352	2	0.192	3.59	1,2-ثنائي كلورو تترافلورو إيثان (FC114)

CAS	BP	Mr	Lit.	Calc.	ECD	RRT	RT	مؤشر الاحتفاظ (RT)	المركب
	60-29-7	35	74.1	515	499	0	0.358	6.69	ثنائي إيثيل الإيثر
	75-37-6	25	66.1	—	242	1	0.152	2.84	1,1-ديفلوروإيثان(FC152a)
	76-11-9	92	203.8	785	702	2	0.896	16.77	1,1-ديفلورو تتراكلورو إيثان
	76-12-0	93	203.8	730	704	2	0.903	16.90	1,2-ديفلورو تتراكلورو إيثان(FC112)
	108-20-3	69	102.2	594	598	0	0.612	11.43	ثنائي إيزوبروبيل الإيثر
	115-10-6	24	46.1	—	328	0	0.179	3.34	ثنائي ميثيل الإيثر(DME)
	68-12-2	153	73.1	—	746	0	0.989	18.47	N,N-ثنائي ميثيل فورماميد(DMF)
	67-68-5	191	78.1	—	784	0	1.069	19.97	ثنائي ميثيل سلفوكسيد(DMSO)
	123-91-1	101	88.1	696	690	0	0.865	16.16	ديوكسان
	13838-16-9	57	184.5	462	478	2	0.328	6.14	إنفلوران
	74-84-0	88	30.1	200	200	0	0.144	2.69	إيثان
CAS	BP	Mr	Lit.	Calc.	ECD	RRT	RT	مؤشر الاحتفاظ (RT)	المركب
	64-17-5	79	46.1	421	427	0	0.257	4.80	إيثانول
	110-80-5	135	90.1	701	694	0	0.877	16.38	2-إيثوكسي إيثانول (إيثيل سيلوسولف)
	111-15-9	156	132.2	874	876	0	1.222	22.83	أسيتات 2-إيثوكسي إيثيل
	141-78-6	77	88.1	596	598	0	0.611	11.42	إيثيل أسيتات
	100-41-4	136	106.2	860	861	0	1.198	22.38	إيثيل بنزين
	74-85-1	104	28.1	—	165	0	0.141	2.63	إيثيلين
	107-21-1	198	62.1	772	670	0	0.811	15.15	إيثيلين جليكول (ب)
	75-69-4	24	137.4	484	478	2	0.327	6.13	فلوروتلاثي كلورو ميثان(FC11)
	151-67-7	50	197.4	533	543	2	0.468	8.76	هالوثان
	142-82-5	98	100.2	700	700	0	0.894	16.70	هبتان
	110-43-0	152	114.2	880	874	0	1.220	22.79	2-هبتانون
	66-25-1	130	100.2	—	781	0	1.061	19.82	هكسانال
	110-54-3	69	86.2	600	600	0	0.616	11.51	هكسان
	110-13-4	188	114.1	894	890	1	1.242	23.25	2,5-هكسانيديون
	111-27-3	157	102.2	860	852	0	1.184	22.12	1-هكسانول
	626-93-7	140	102.2	786	784	0	1.068	19.95	2-هكسانول
	591-78-6	127	100.2	787	771	0	1.041	19.45	2-هكسانون (ميثيل بيوتيل كيتون)
	75-28-5	12	58.1	370	354	0	0.193	3.61	إيزوبوتان (2-ميثيل بروبان)
	542-56-3	67	103.1	—	576	2	0.555	10.37	إيزوبوتيل نتريت
	26675-46-7	49	184.5	—	454	2	0.295	5.52	إيزوفلوران
	110-46-3	98	117.2	680	684	2	0.848	15.87	إيزوبنتيل نتريت ("أميل نتريت")
	1712-64-7	103	105.1	693	664	2	0.793	14.84	إيزوبروبيل نترات
	74-82-8	161	16.0	100	100	0	0.135	2.52	ميثان
	67-56-1	65	32.0	491	353	0	0.192	3.60	ميثانول
	109-86-4	124	76.1	616	617	0	0.663	12.38	2-ميثوكسي إيثانول (ميثيل سيلوسولف)
	76-38-0	105	165.0	701	617	2	0.910	17.04	ميثوكسي فلوران
	79-20-9	57	74.1	513	512	0	0.391	7.30	ميثيل أسيتات

CAS	BP	Mr	Lit.	Calc.	ECD	RRT	RT	مؤشر الاحتفاظ (RT)	المركب
	1634-04-4	55	88.2	—	560	0	0.514	9.60	ميثيل ثالثي بوتيل إيثر(MTBE)
	108-10-1	118	100.2	724	723	1	0.942	17.60	ميثيل إيزوبوتيل كيتون(MIBK)
	563-80-4	93	86.0	650	642	1	0.734	13.71	ميثيل إيزوبروبيل كيتون
	107-83-5	60	86.2	610	566	0	0.530	9.90	-2ميثيل بنتان
	96-14-0	64	86.2	—	581	0	0.568	10.61	-3ميثيل بنتان
	590-36-3	124	102.2	725	719	0	0.934	17.45	-2ميثيل-2-بنتانول
	77-75-8	121	98.1	715	695	0	0.879	16.42	-3ميثيل بنت-1-ين-3-ول (ميثيل بينتينول)
	78-83-1	108	74.1	619	614	0	0.654	12.22	-2ميثيل-1-بروبانول (إيزوبوتانول)
	75-65-0	82	74.1	512	509	0	0.382	7.14	-2ميثيل-2-بروبانول (ثالثي بوتانول)
	75-00-3	12	64.5	447	426	2	0.255	4.77	مونوهالوكلوروإيثان (كلوريد الإيثيل)
	10024-97-2	88	44.0	—	182	2	0.142	2.66	أكسيد النيتروز
	111-65-9	126	114.2	800	800	0	1.101	20.57	أوكتان
	123-63-7	124	132.2	771	767	0	1.032	19.28	بارالدهايد
	109-66-0	36	72.2	500	500	0	0.360	6.72	بنتان
	76-19-7	39	188.0	—	476	2	0.325	6.08	بيرفلوروبروبان(FC218)
	74-98-6	42	44.1	300	300	0	0.163	3.05	بروبان
	57-55-6	187	76.1	745	710	0	0.915	17.09	-1,2بروبانيديول (ب)
	504-63-2	214	76.1	820	793	0	1.086	20.29	-1,3بروبانيديول (ب)
	71-23-8	97	60.1	571	539	0	0.461	8.61	-1بروبانول
	67-63-0	83	60.1	530	474	0	0.323	6.04	-2بروبانول (إيزوبروبانول)
	100-42-5	145	104.1	890	887	0	1.241	23.18	ستارين (ستايرين)
	28523-86-6	24	200.1	—	409	1	0.231	4.32	سيفوفلوران
	79-27-6	229	345.7	—	978	2	1.362	25.50	-1,1,2,2تيترا برومو إيثان
	630-20-6	131	167.9	870	843	2	1.167	21.85	-1,1,1,2تيتراكلوروإيثان
	79-34-5	146	167.9	905	892	2	1.246	23.33	-1,1,2,2تيتراكلوروإيثان
	127-18-4	121	165.9	807	811	2	1.116	20.89	تيتراكلوروإيثيلين (بيركلوروإيثيلين)
	811-97-2	27	102.0	—	219	1	0.148	2.76	-1,1,1,2تيترافلوروإيثان(FC134a)
	109-99-9	66	72.1	638	615	0	0.659	12.31	تيتراهيدروفوران(THF)
	108-88-3	111	92.1	768	763	0	1.025	19.14	تولوين
	71-55-6	74	133.4	634	639	2	0.724	13.56	-1,1,1ثلاثي كلوروإيثان (ميثيل كلوروفورم)
	79-00-5	113	133.4	727	752	2	1.000	18.72	-1,1,2ثلاثي كلوروإيثان
	115-20-8	151	149.4	859	858	2	1.191	22.29	-2,2,2ثلاثي كلورو إيثانول
	79-01-6	87	131.4	710	691	2	0.868	16.25	ثلاثي كلورو إيثيلين
	354-58-5	46	187.4	530	527	2	0.428	8.01	-1,1,1ثلاثي كلورو ثلاثي فلورو إيثان (FC113)
	76-13-1	48	187.4	555	526	2	0.425	7.96	-1,1,2ثلاثي كلورو ثلاثي فلورو إيثان
	75-89-8	75	100.0	580	441	1	0.276	5.17	-2,2,2ثلاثي فلورو إيثانول
	108-38-3	138	106.2	871	869	0	1.211	22.62	م-كسيلين
	95-47-6	144	106.2	895	892	0	1.250	23.32	أو-كسيلين

CAS	BP	Mr	Lit.	Calc.	ECD	RRT	RT	مؤشر الاحتفاظ (RT)	المركب
	106-42-3	138	106.2	870	870	0	1.213	22.66	بي-كسيلين
	630-20-6	131	167.9	870	843	2	1.167	21.85	1,1,1,2-تيتراكلوروإيثان
	79-34-5	146	167.9	905	892	2	1.246	23.33	1,1,2,2-تيتراكلوروإيثان
	127-18-4	121	165.9	807	811	2	1.116	20.89	تيتراكلوروإيثيلين (بيركلوروإيثيلين)
	811-97-2	27	102.0	—	219	1	0.148	2.76	1,1,1,2-تيترافلوروإيثان(FC134a)
	109-99-9	66	72.1	638	615	0	0.659	12.31	تيتراهيدروفوران(THF)
	108-88-3	111	92.1	768	763	0	1.025	19.14	تولوين
	71-55-6	74	133.4	634	639	2	0.724	13.56	1,1,1-ثلاثي كلوروإيثان (ميثيل كلوروفورم)
	79-00-5	113	133.4	727	752	2	1.000	18.72	1,1,2-ثلاثي كلوروإيثان
	115-20-8	151	149.4	859	858	2	1.191	22.29	2,2,2-ثلاثي كلورو إيثانول
	79-01-6	87	131.4	710	691	2	0.868	16.25	ثلاثي كلورو إيثيلين
	354-58-5	46	187.4	530	527	2	0.428	8.01	1,1,1-ثلاثي كلورو ثلاثي فلورو إيثان (FC113)
	76-13-1	48	187.4	555	526	2	0.425	7.96	1,1,2-ثلاثي كلورو ثلاثي فلورو إيثان
	75-89-8	75	100.0	580	441	1	0.276	5.17	2,2,2-ثلاثي فلورو إيثانول
	108-38-3	138	106.2	871	869	0	1.211	22.62	م-كسيلين
	95-47-6	144	106.2	895	892	0	1.250	23.32	أو-كسيلين
	106-42-3	138	106.2	870	870	0	1.213	22.66	بي-كسيلين

(أ) RT: زمن الاحتفاظ (بالدقائق)؛ RRT: زمن الاحتفاظ النسبي مقارنة بـ 1,1,2-ثلاثي كلوروإيثان (على قناة ECD للمركبات التي تستجيب على تلك القناة)؛ ECD: الاستجابة النسبية للكاشف ECD (0 = لا توجد، 1 = ضعيفة، 2 = جيدة)؛ Calc.: مؤشر الاحتفاظ المحسوب على نظام SPB-1؛ Lit.: مؤشر الاحتفاظ المرجعي على SE30/OV-1/OV-101؛ Mr: الكتلة الجزيئية النسبية؛ BP: درجة الغواية/الغليان (بالدرجة المئوية، عند الضغط الجوي)؛ CAS: رقم تسجيل خدمة المستخلصات الكيميائية. (ب) المركبات المحقونة كسوائل.

التحليل الكمي

يجب إجراء المقايسات (التحاليل) الكمية في نسختين (مزدوجتين) إما بطريقة تماثل درجات الحرارة (isothermally) أو باستخدام برنامج درجة الحرارة (temperature programme) مع الكاشف المناسب. وإذا كانت تراكيز المركبات المستجيبة لكاشف التقاط الإلكترون (ECD) عالية جداً، فإنه يكون من الملائم أحياناً استخدام كشف التأين اللهبي (FID). وينبغي أن تتم معايرة المقايسات من خلال تحليل محاليل قياسية مُحضرة بالطريقة الموضحة أدناه؛ حيث تُستخدم المحاليل نفسها في تحليل الدم ومستحضرات الأنسجة. وعادة ما تكون تراكيز المادة المحللة في النطاقات من 0.1إلى 10أو من 0.5إلى $50 mg/L$ملائمة في حالات التسمم الحاد. وغالباً ما تُستخدَم منحنيات معايرة تعتمد على نسبة ارتفاع القمة أو مساحتها إلى المعيار الداخلي، على الرغم من أن المعايرة المطلقة من حيث كمية المادة المحللة المحقونة يجب أن تكون ممكنة، لا سيما إذا تم استخدام جهاز تحليل حيز رأسي ألي (مؤتمت). ومثل هذا الجهاز لا يتيح التشغيل دون مراقبة فحسب، بل يوفر أيضاً قابلية تكرار أفضل بكثير في العمل الكمي.

حركية الدواء وتفسير النتائج

- **المواد المحللة السائلة والصلبة:** تُحضّر محاليل المعايرة عن طريق إضافة حجم معلوم من المادة المحللة السائلة إلى دورق حجمي يحتوي على دم "خالٍ من المواد المتطايرة" باستخدام ماصة ذات إزاحة موجبة (positive

displacement pipette) والتأكد من الكمية الدقيقة المضافة عن طريق الوزن. بينما يتم وزْن المواد المحللة الصلبة مباشرة. وبعد إتاحة الوقت الكافي لتحقيق الاتزان، يتم إجراء التخفيفات المناسبة، مع توخي الحذر لتقليل فقد المادة المحللة من خلال التعامل مع الكواشف والأدوات الزجاجية عند درجة حرارة $4°C$وتخزين العينات والمعايير عند درجة حرارة $4°C$مع الحد الأدنى من الحيز الرأسي. وتعد القوارير الزجاجية الصغيرة (سعة 3.5أو $7.0mL$) (مثل منتجات Merck برقم 23/0073/215 أو 25، أو ما يعادلها) ذات الأغطية الملولبة المبطنة برقائق الألومنيوم ملائمة لإجراء التخفيفات القياسية. ويتم نقل أجزاء من المعايير إلى قوارير الحيز الرأسي للتحليل بالطريقة الموضحة أعلاه، وإعداد منحنى معايرة يمثل العلاقة بين نسبة ارتفاع القمة أو مساحتها للمادة المحللة إلى المعيار الداخلي في مقابل تركيز المادة المحللة. وغالباً ما يمكن استخدام إما 1,1,2-ثلاثي كلوروإيثان أو إيثيل البنزين كمعيار داخلي.

- **المواد المحللة الغازية:** تم تحضير محاليل المعايرة للمواد المحللة الغازية من محلول المادة المحللة في الميثانول مع تخفيف لاحق في الدم (Broussard et al. 2001). وبدلاً من ذلك، يمكن تحضير مخاليط المعايرة للمواد المحللة الغازية مباشرة داخل قوارير الحيز الرأسي (Gill et al. 1992). ويتم معايرة قوارير الحجز ذات الحاجز المطاطي ذات السعة الاسمية التي تبلغ حوالي 30و50 و$100mL$ (Supelco 33106, 33108-U, 33110-U؛ أو ما يعادلها) عن طريق الوزن عندما تكون ممتلئة بالماء منزوع الأيونات. ثم يُجفف كل قارورة ويُملأ بالنيتروجين. تُضاف قطعة من رقائق الألومنيوم (حوالي $1cm^2$) للمساعدة في الخلط، وتُغلق القارورة بغطاء محكم مزود بحاجز من مطاط السيليكون مبطن بالتفلون مطابق لتلك المستخدمة في تحليل العينات. ويتم ملء بصيلة أخذ عينات غازية سعة $125mL$مزودة بصمامين من التفلون خاليين من الشحوم وحاجز اسطواني مركزي (Supelco 2-2146 أو ما يعادلها) بالمادة المحللة النقية، والتي تُشتري عادة في أسطوانة صغيرة ("أنبوبة محاضر" أو lecture bottle)، عند الضغط الجوي. بعد ذلك، يتم سحب الحجم المختارة من البخار من بصيلة أخذ عينات الغاز عبر الحاجز باستخدام حقنة محكمة الغلق للغازات وإضافته عبر حاجز قارورة الحيز الرأسي المعايرة والممتلئة بالنيتروجين والمغلقة. وينبغي توخي الحذر لضمان بقاء محتويات هذا الوعاء الأخير عند الضغط الجوي؛ لذا، إذا كان حجم الغاز المنقول أكبر من $0.1mL$، فيجب إدخال إبرة تنفيس قصيرة عبر الحاجز بعيداً عن موضع إبرة الحقنة المحكمة للغازات. وبعد الخلط التام للغاز المنقول إلى قارورة الحاجز، يمكن تحضير تخفيفات إضافية في قوارير حجز إضافية معايرة وممتلئة بالنيتروجين ومغلقة حسب الحاجة. وأخيراً، يتم نقل الحجوم المقاسة من بخار المادة المحللة المخفف باستخدام حقنة محكمة الغلق للغازات إلى قوارير الحيز الرأسي التي تحتوي على نفس حجم الدم "الفارغ" المستخدم في تحليل العينات. كما يُضاف حجم ثابت من بخار المعيار الداخلي المخفف بشكل مناسب (2,2-ثلاثي ميثيل بروبان في حالة البوتان) المُحضر كما هو موضح أعلاه إلى قارورة الحيز الرأسي للعينات وإلى قوارير الحيز الرأسي التي تحتوي على مخاليط المعايرة قبل التحليل.

يوفر الحد الأقصى للتعرض (MEL) في المملكة المتحدة أو معيار التعرض المهني (OES؛ الجدول 4) معلومات حول السميات النسبية للمركبات المختلفة بعد التعرض المزمن لتراكيز منخفضة نسبياً من الأبخرة. وقد تبلغ المركبات المستنشقة تراكيز عالية بسرعة في الأعضاء جيدة التروية الدموية (الدماغ، القلب)، في حين قد تكون التراكيز في العضلات والأنسجة الدهنية منخفضة للغاية. وفي حال حدوث الوفاة، يتم "تجميد" هذا الوضع إلى حد ما، ولكن إذا استمر التعرض، فسوف يتراكم المركب في الأنسجة الأقل إتاحة وضعيفة التروية، ليتم إطلاقه ببطء بمجرد توقف التعرض. وبالتالي، فإن تراكيز البلازما لبعض المركبات قد تنخفض بصيغة أسية أحادية (monoexponentially)، بينما قد تظهر مركبات أخرى معدلين (أو أكثر) منفصلين للتراجع (نصف عمر التخلص).

تُعد ذوبانية المركب المتطاير في الدم عاملاً مؤثراً هاماً على معدل الامتصاص، والتوزيع النسجي، والتخلص من المركب. وقد تم قياس معاملات التوزيع لعدد من المركبات بين الهواء والدم والأنسجة المختلفة مخبرياً (in vitro) باستخدام أنسجة حيوانية، كما تم الحصول على بعض بيانات التوزيع الحية (in vivo) من قياسات الأنسجة بعد الوفاة في البشر (الجدول 4). ومع ذلك، يجب استخدام هذه البيانات الأخيرة بحذر نظراً لوجود العديد من الصعوبات الكامنة في مثل هذه القياسات (اختلافات أخذ العينات، استقرار المادة المحللة، المعايرة الخارجية، إلخ). كما أن البيانات المنشورة حول أعمار النصف في البلازما للمواد المتطايرة (الجدول 4) ليست قابلة للمقارنة بسهولة، إما لعدم كفاية العينات التي تم أخذها أو لعدم امتلاك الطرق التحليلية المستخدمة للحساسية الكافية لقياس عمر النصف النهائي بدقة.

الجدول 4: الخصائص الفيزيائية وبيانات حركية الدواء لبعض المركبات المتطايرة (البيانات ملخصة من Baselt 2004; (Pihlainen, Ojanperä 1998

المركب	حد التعرض الأقصى (MEL) / معيار التعرض المهني (OES) (أ) (mg m-3)	ضغط البخار (ب) 20 °C، mmHg)	الجرعة المستنشقة الممتصة (%)	نسبة الجرعة الممتصة (%)	نصف العمر (ج) (h)	نسبة توزيع الدماغ:الدم (الوفيات)	معامل التوزيع (الدم:الغاز) (37 °C)	التخلص دون تغيير	الاستقلاب
أسيتون	1210	183	—	—	—	3–5 (د)	—	243–300	—
بنزين	16	75	46	12	80	9–24	3–6	6–9	—
بوتان	1450	(1554)	30–45	—	—	—	—	—	—
إيزوبوتان	1750 (هـ)	(2282)	—	—	—	—	—	—	—
بوتانون	600	75	70	99+	0.1	0.5	—	116	—
ثنائي كبريتيد الكربون	32	294	40	<30	50–90	<1	—	2.4	—
رباعي كلوريد الكربون	13	90	—	50?	50?	48	—	1.6	—
كلورو‌ديفلورو ميثان	3590	(6701)	—	—	—	—	1.9	—	—
كلوروفورم	9.9	157	—	20–70 (8h)	>30	—	4	8	—
سيكلوبوبان	—	(4701)	—	99	0.5	—	1.5–3.6	0.55	—
ديسفلوران	—	669	—	—	0.02	—	1.29 (و)	0.42	—
ثنائي كلورو‌ديفلورو ميثان	5030	(3639)	35	99	<0.2	—	1.4	0.15	—
ثنائي كلورو ميثان	350	350	—	50?	<40	0.7	0.5–1	5–10	—
ثنائي إيثيل الإيثر	310	438	—	>90	—	—	1.1	12	—
إنفلوران	383	172	90+	>80 (5 أيام)	2.5	36	1.4 (و)	1.9	—
إيثيل أسيتات	1460	72	—	—	—	—	—	—	—
هالوثان	82	244	90+	60–80 (24h)	<20	2–3	2–3	2.57	—

المركب	حد التعرض الأقصى (MEL) / معيار التعرض المهني (OES) (أ) (mg m-3)	ضغط البخار (ب) (20 °C، mmHg)	الجرعة المستنشقة الممتصة (%)	نسبة الجرعة الممتصة (%)	نصف العمر (ج) (h)	نسبة توزيع الدماغ:الدم (الوفيات)	معامل التوزيع (الدم:الغاز) (37 °C)	التخلص دون تغيير	الاستقلاب
هكسان	72	122	—	—	—	—	—	—	—
إيزوفلوران	383	240	—	—	0.2	—	1.57 (و)	1.38	—
ميثوكسي فلوران	—	23	—	19 (10 أيام)	>44	—	2–3	13	—
ميثيل إيزوبوتيل كيتون	208	15	—	—	—	—	—	—	—
أكسيد النيتروز	183	(39800)	—	>99	—	—	1.1	0.47	—
بروبان	1750 (هـ)	(6269)	—	—	—	—	—	—	—
سيفوفلوران	—	157	—	—	3	20	1.7 (و)	0.68	—
ستارين (ستايرين)	430	4	—	1–2	>95	13	—	32	—
تيتراكلوروإيثيلين	345	14	60+	>90	1–2	72	9–15	9–19	—
تولوين	191	22	53	<20	80	7.5	1–2	8–16	—
1,1,1-ثلاثي كلوروإيثان	555	98	—	60–80 (أسبوع)	2	10–12	2	1–3	—
ثلاثي كلوروإيثيلين	550	58	50–65	16	>80	30–38	2	9.0	—
ثلاثي كلورو فلورو ميثان	5710	667	92	89	<0.2	1.5	2.5	0.87	—
"زيلين"	220	6	64	5	>90	20–30	—	42.1	—

(أ) الحد الأقصى للتعرض / معيار التعرض المهني في المملكة المتحدة (متوسط مقجّد زمنياً لمدة 8 ساعات؛ Safety Executive & Health 2002). (ب) الأرقام بين قوسين تشير إلى أن المركب غاز عند 20 درجة مئوية. (ج) نصف عمر البلازما في المرحلة النهائية. (د) أطول بعد الجرعات العالية. (هـ) كمكونات لغاز البترول المسال (LPG). (و) تجريبي: عند 37 درجة مئوية.

العديد من المواد المتطايرة، بما في ذلك البوتان، وثنائي ميثيل الإيثر، ومعظم مبردات/مقذوفات الفلوروكربونات للأيروسول، والإيزوبوتان، وأكسيد النيتروز، والبروبان، وتيتراكلوروإيثيلين، و1,1,1-ثلاثي كلوروإيثان، يتم التخلص منها إلى حد كبير دون تغيير في الهواء الزفير. بينما يتم التخلص من البعض الآخر جزئياً في الهواء الزفير كما يتم استقلابها جزئياً في الكبد وأماكن أخرى، بحيث تُطرح المستقلبات في الهواء الزفير أو في البول، أو تندمج في عملية الأيض الوسيط. وبعد الابتلاع، يمكن للأيض الكبدي الواسع أن يقلل من الإتاحة الجهازية (أيض "المرور الأول") لبعض المركبات. ويقدم الجدول 5 تفاصيل عن أمثلة تم فيها استخدام قياسات مستقلبات الدم أو البول لتقييم التعرض للمواد المتطايرة.

تفسير النتائج النوعية

يتأثر احتمال اكتشاف التعرض للمواد المتطايرة عن طريق كروماتوغرافيا الغاز للحيز الرأسي (HS-GC) للدم بالجرعة ومدة التعرض، ووقت أخذ العينات بالنسبة للوقت المنقضي منذ التعرض، والاحتياطات المتخذة في جمع العينة وتخزينها (Broussard 2000; Gill et al. 1988; Willie, Lambert 2004). وفي حالة الاشتباه بوفاة مرتبطة بإساءة استخدام

المواد المتطايرة (VSA) أو بمخدرات التخدير، قد يكون تحليل الأنسجة (لا سيما الأنسجة الدهنية مثل الدماغ) مفيداً نظراً لاحتمالية وجود تراكيز عالية من المركبات المتطايرة حتى لو كان القابل للاكتشاف في الدم ضئيلاً للغاية.



يمكن أن يؤدي تحليل المستقلبات في البول إلى تمديد الفترة الزمنية التي يمكن خلالها اكتشاف التعرض، ولكن من بين المركبات التي يتم إساءة استخدامها بشكل شائع، فإن التولوين، والزيلينات، وبعض المذيبات المهلجنة، لا سيما ثلاثي كلوروإيثيلين، هي وحدها التي تمتلك مستقلبات مناسبة (الجدول 5). وقد تم تشخيص "استنشاق" البنزين المزمن من خلال قياس تراكيز الرصاص في الدم أو اكتشاف المكونات العطرية مثل التولوين وإيثيل البنزين. ومع ذلك، ففي بعض أنواع البنزين والمخاليط المعقدة الأخرى مثل الإيثرات البترولية (انظر الجدول 1)، غالباً ما تكون تراكيز الدم للمكونات الفردية أقل من حد الكشف لطرق HS-GC حتى بعد التعرض الاستنشاقي الكبير. كما تم اكتشاف إساءة استخدام ميثوكسي فلوران عن طريق قياس تراكيز أيون الفلوريد في السيروم والبول.

لا يشير اكتشاف مركب متطاير في الدم دائماً إلى إساءة استخدام المواد المتطايرة أو التعرض المهني/البيئي لأبخرة المذيبات؛ إذ قد يظهر الأسيتون وبعض مركباته المتجانسة بتراكيز عالية لدى المرضى الذين يعانون من الحماض الكيتوني. كما قد تظهر كميات كبيرة من الأسيتون والبوتانون في الدم والبول لدى الأطفال المصابين بنقص إنزيم أسيتواسيتيل-كوإنزيم A ثيوليز (acetoacetyl-coenzyme A thiolase deficiency)، على سبيل المثال، وقد تشير إلى التشخيص. بالإضافة إلى ذلك، يُعد الأسيتون المستقلب الرئيسي لـ 2-بروبانول لدى البشر. وعلى العكس من ذلك، تم العثور على 2-بروبانول في دم المرضى الذين يعانون من الكيتون. وقد تؤدي كيتونات أخرى أيضاً إلى ظهور كحولات في الجسم الحي (الجدول 5). كما يمكن استخدام مركبات متطايرة أخرى مثل الهالوثان أو الكلوروبوتانول في العلاج أو إضافتها عن غير قصد إلى العينة كمادة حافظة.

الجدول 5: مستقلبات بعض المذيبات وغيرها من المواد المتطايرة التي يمكن قياسها لتقييم التعرض

المركب	الكتلة الجزيئية (Mr)	المركب الأساسي	السائل الحيوي (أ)	"الطبيعي" (ب)	"المرتفع" (ج)	التعليق
أسيتالدهيد	44.1	إيثانول	الدم	$0.2mg/L$	(غير معروف)	—
أسيتون	58.1	2-بروبانول	الدم البول	$10mg/L$ $10mg/L$	— $80mg/L$	يمكن أن ترتفع تراكيز الأسيتون في الدم/البول إلى $2g/L$ في حالات الحماض الكيتوني. ويُعد 2-بروبانول أيضاً من مستقلبات الأسيتون.
4-أمينوفينول	109.1	أنيلين	البول	—	$10mg/L$	—
أيون البروميد	79.9	بروموميثان، مركبات بروموبيوض عضوية أخرى	السيروم	$10mg/L$	$40mg/L$	تكون تراكيز البروميد المرتبطة بالسمية أقل بعد التعرض للمركبات العضوية البرومية مقارنة بإعطاء أملاح البروميد عن طريق الفم.
بوتوكسي أسيتات	132.2	2-بوتوكسي إيثانول	البول	—	$100mg/L$	—
أول أكسيد الكربون	28.0	ثنائي كلورو ميثان	الدم	$< 5\%HbCO$	$> 20\%HbCO$	نصف عمر كاربوكسي هيموجلوبين الدم $13h$ عند تنفس الهواء تحت الضغط الجوي (نصف عمر كاربوكسي هيموجلوبين الدم $5h$ بعد استنشاق أول أكسيد الكربون). يُعد كاربوكسي هيموجلوبين الدم مؤشراً مفيداً للتعرض المزمن.
أيون السيانيد	26.0	أسيتونتريل، أكريلونيتريل، مركبات سيانيد عضوية أخرى	الدم	$0.2mg/L$ (لغير المدخنين)	$2mg/L$	يتم استقلاب السيانيد إلى ثيوسيانات؛ وقد يتراكم كلا المركبين أثناء التعرض المزمن.
سيكلوهكسانول	100.2	سيكلوهكسان، سيكلوهكسانون	البول	—	$5mg/L$	مستقلبات سيكلوهكسان إضافية : $-1,2-t$سيكلوهكسانيديول، $-1,4-t$سيكلوهكسانيديول (تُطرح مستقلبات الكحولات أساساً في صورة جلوكورونيدات لدى البالغين).
سيكلوهكسانون	98.2	سيكلوهكسان، سيكلوهكسانول	البول	—	$0.5mg/L$	انظر إدخال سيكلوهكسانول أعلاه.
2,5-ديكلوروبينول	163.0	1,4-ديكلوروبنزين	البول	—	$100mg/L$	—
ثنائي ميثيل سلفون	94.1	ثنائي ميثيل سلفوكسيد (DMSO)	البول	—	(غير معروف)	—
إيثانول	46.1	إيثيل أسيتات	الدم	$0.1g/L$	$0.8g/L$	حد القيادة القانوني في المملكة المتحدة هو $0.8g/L$.
إيثوكسي أسيتات	104.1	إيثوكسي إيثانول، أسيتات 2-إيثوكسي إيثيل	البول	—	$50mg/L$	—
بيتا-هيدروكسي إيثوكسي أسيتات (HEAA)	120.1	1,4-ديوكسان	البول	—	$0.5g/L$	تم العثور على ديوكسان-2-ون في البول أيضاً.

المركب	الكتلة الجزيئية (Mr)	المركب الأساسي	السائل الحيوي (أ)	"الطبيعي" (ب)	"المرتفع" (ج)	التعليق
الفلوريد	19.0	ميثوكسي فلوران وبعض المركبات الفلورية العضوية الأخرى	السيروم البول	$0.2mg/L$ $1mg/L$	$2mg/L$ $2mg/L$	—
فورمات	46.0	فورمالديهيد، ميثانول، ميثيل فورمات	البول	$20mg/L$	$30mg/L$	—
2,5-هكسانيديون + 4,5-ديهيدروكسي-2-هكسانون	—	هكسان، 2-هكسانون (MBK)	البول	—	$5mg/L$	يُعد كل من 2-هكسانول و2-هكسانون من مستقلبات الهكسان الإضافية.
هيبورات	179.2	تولوين	البول	$0.2g/L$	$2g/L$	ليس مؤشراً مثالياً للتعرض للتولوين نظراً لوجود مصادر أخرى (غذائية، دوائية) لكحول البنزيل/البنزوات تؤدي إلى تكوين الهيبورات.
ماندیلات	152.1	إيثيل بنزين، ستايرين	البول	$0.005g/L$	$2g/L$	يُعد حمض فينايل جلايوكسيليك أيضاً من المستقلبات البولية.
ميثانول	32.0	ميثيل أسيتات، ميثيل فورمات	البول	—	$30mg/L$	—
N-ميثيل أسيتاميد (NMA)	73.1	N,N-ثنائي ميثيل أسيتاميد (DMAC)	البول	—	$65mg/L$	—
N-ميثيل فورماميد (NMF)	59.1	N,N-ثنائي ميثيل فورماميد (DMF)	البول	—	$15mg/L$	يُعد هيدروكسي ميثيل فورماميد والفورماميد من المستقلبات الإضافية.
4-ميثيل-2-بيوتانون	100.2	ميثيل إيزوبوتيل كيتون	البول	—	$3.5mg/L$	—
2-ميثيل فينول (أورثو-كريسول)	108.1	تولوين	البول	—	$3mg/L$	يُعد الهيبورات وميثيل فينولات أخرى من مستقلبات التولوين الإضافية.
حمض ترانس، ترانس-ميكونيك (t,t-MA)	142.1	بنزين	البول	—	$2mg/L$	يُعد الفينول وحمض S-فينيل ميركابتوريك من مستقلبات البنزين الإضافية.
أيون النتريت	46.0	بوتيل نتريت، إيزوبنتيل نتريت، نتريتات عضوية أخرى	البلازما البول	$2.5mg/L$ —	(معروف غير) $10mg/L$	—
أكسالات	90.0	إيثيلين جليكول	البول	$2.5mg/L$	$4mg/L$	يُعد الجليكولات والجليوكسيلات أيضاً من مستقلبات إيثيلين جليكول في البلازما والبول.
فينول	94.1	بنزين	البول	$0.1mg/L$	$50mg/L$	يُطرح في صورة متكونات كبريتات وجلوكورونيد. وتشمل المستقلبات الأخرى الكاتيكول والهيدروكينون. ولا يُعد إفراز الفينول البولي مؤشراً موثوقاً للتعرض للبنزين. كما تم استخدام إفراز حمض ترانس، ترانس-

المركب	الكتلة الجزيئية (Mr)	المركب الأساسي	السائل الحيوي (أ)	"الطبيعي" (ب)	"المرتفع" (ج)	التعليق
						ميكونيك وحمض-S فينيل ميركابتوريك لتقييم التعرض.
S-فينيل ميركابتورات (SPMA)	239.2	بنزين	البول	—	$45mg/L$	يُعد حمض ترانس، ترانس-ميكونيك والفينول من مستقلبات البنزين الإضافية.
2-بروبانول	60.1	أسيتون	الدم	—	$2.5g/L$	يُعد الأسيتون أيضاً من مستقلبات 2-بروبانول.
أيون الثيوسيانات	58.1	أسيتونتريل، أكريلونيتريل، مركبات سيانيد عضوية أخرى	البلازما	$4mg/L$ (لغير المدخنين)، $20mg/L$ (للمدخنين الشرهين)	$120mg/L$	قد يتراكم السيانيد/الثيوسيانات أثناء التعرض المزمن.
2-ثيوثيازوليدين-4-كاربوكسيلات (TTCA)	163.2	ثنائي كبريتيد الكربون	البول	—	$8mg/L$	يُعد TTCA متكون الجلوتاθيون ثنائي كبريتيد الكربون. ويُعد إفراز TTCA البولي مؤشراً موثوقاً للتعرض.
تولورات (ميثيل هيبورات)	193.2	زيلينات	البول	$0.01mg/L$	$1.5g/L$	—
تريفلوروأسيتات	114.0	هالوثان وبعض مخدرات التخدير المفلورة الأخرى	البول	—	$2.5mg/L$	—
تريكلوروأسيتات	163.4	ثلاثي كلوروإيثيلين	البول	—	$100mg/L$	مستقلب لـ 2,2,2-تريكلوروإيثانول.
2,2,2-تريكلوروإيثانول	149.4	ثلاثي كلوروإيثيلين	البلازما	$10mg/L$	$50mg/L$	يُعد أيضاً من مستقلبات كلورال هيدرات، وديكلورال فينازون، وتريكلوفوس.

(أ) السائل الحيوي الذي يُقاس فيه المستقلب. (ب) المستويات الطبيعية أو الخلفية لدى الأفراد غير المعرضين مهنياً. (ج) المستويات المرتبطة بالتعرض المهني المرتفع أو التسمم. غالباً ما يُعبّر عن الإفراز البولي كنسبة إلى الكرياتينين. الحد الأعلى للتركيز المتوقع عادةً أو "غير السام". الحد الأدنى للتركيز المرتبط بالسمية / حد إجراء التعرض المهني.

قد يؤدي استخدام مستحضرات مطهرات الأيروسول عند جمع العينات إلى تلوث العينة إذا تم استخدام مادة دافعة للأيروسول (propellant). كما يمكن أن يحدث تلوث لعينات الدم بالإيثانول أو 2-بروبانول إذا تم استخدام مسحة مغموسة في الكحول لتطهير الجلد قبل بزل الوريد (venepuncture). ففي دراسة شملت 20 متطوعاً بعد تناولهم للكحول، تم اكتشاف 2-بروبانول (0.13 جم/لتر) في عينة واحدة باستخدام تقنية HS-GC، بينما ارتفعت تركيزات الإيثانول المقاسة في حالتين أخريين من 0.58 جم/لتر (باستخدام مسحة قطنية جافة أو مسحة 2-بروبانول بنسبة 70%) إلى 1.2 جم/لتر (باستخدام مسحة إيثانول نقي) ومن 0.12 جم/لتر (باستخدام مسحة جافة ومسحة 2-بروبانول) إلى 1.26 جم/لتر على التوالي، وذلك عند استخدام المسحة للضغط على موقع بزل الوريد عند سحب الإبرة (Carter, McConnell 1990). كما أبلغ Higuchi وآخرون (2005) عن خطر مؤكد لتلوث العينات نتيجة استخدام المسحات المحتوية على الإيثانول أثناء جمع العينات من مرضى المستشفيات، حيث تم تسجيل تركيز إيثانول في الدم بلغ معدلاً مرتفعاً جداً يبلغ 9.6 جم/لتر إذا تم استخدام المسحة لمسح إبرة المحقنة بعد أخذ العينة. ومع ذلك، وجدت دراسات أخرى أجريت على متطوعين أن التلوث كان في أسوأ الأحوال ضئيلاً للغاية عند استخدام مسحات مغموسة في الإيثانول أو 2-بروبانول (Goldfinger, Schaber 1982; Malingre et al. 2005; McIvor, Cosbey 1990; Peek et al. 1990). ويبدو من المرجح أن الاختلاف في تقنية أخذ العينات يكمن وراء هذه التفاوتات،

حيث يكمن الخطر في احتمالية استخدام الدم الذي لم يُسحب أصلاً لقياس إيثانول الدم ومع اتخاذ الاحتياطات الواجبة لهذا الغرض في وقت لاحق.

لقد لوحظ تلوث جسيم بالزيلين التقني (وهو خليط من أورثو، وميتا، وبارا-زيلين بالإضافة إلى إيثيل البنزين) في دم جُمع داخل أنابيب جمع الدم Sarstedt Monovette Serum Gel؛ كما وُجد تلوث بالتولوين (بما يصل إلى 22 ملجم/لتر)، و1-بيوتانول، وإيثيل البنزين، والزيلين في دفعات أحدث من نفس هذه الأنابيب (Dyne et al. 1996). ويحدث التلوث بـ 1-بيوتانول أو 2-ميثيل-2-بروبانول بشكل شاع في الدم المجمع داخل أنابيب مطلية بمادة EDTA. وقد تم اكتشاف ثنائي كبريتيد الكربون في الدم المجمع في أنابيب مغلقة بسدادات من المطاط الرخو (Weller, Wolf 1989). وينبغي توخي الحذر عند التعامل مع الأنسجة المجمدة قبل التحليل نظراً لأن أي مركبات موجودة في الهواء المحيط قد تتكاثف على السطح البارد وتؤدي إلى نتائج إيجابية كاذبة؛ ويمكن التحكم في هذا الاحتمال من خلال معالجة نسيج مجمد "فارغ" (Blank).

تُعد تفسيرات بيانات الحالات التي تتضمن الكلوروفورم صعبة بشكل خاص، لا سيما وأن هذا المركب لا يزال يُستخدم أحياناً بنوايا إجرامية (Flanagan, Pounder 2010). وإلى جانب وجوده أحياناً في مياه الشرب بتراكيز منخفضة نتيجة لعملية الكلورة، يوجد الكلوروفورم في مجموعة متنوعة من المستحضرات الدوائية، وفي دخان السجائر، والمشروبات الغازية، والسمن النباتي (المارجارين)، وفي حمامات السباحة في حال تشغيل محطة كلورة. وهناك مصدر محتمل آخر للكلوروفورم عند التحليل بـ HS-GC يتمثل في التحلل الحراري لحمض ثلاثي كلورو أسيتيك (Aggazzotti et al. 1987). يُعد حمض ثلاثي كلورو أسيتيك مستقلباً لعدة مركبات، بما في ذلك مذيب ثلاثي كلورو إيثيلين وأدوية كلورال هيدرات، وديكلورال فينازون، وتريكلوفوس. يبلغ عمر النصف لحمض ثلاثي كلورو أسيتيك في الدم من 3 إلى 5 أيام، وبالتالي يمكن اكتشافه لفترة زمنية طويلة نسبياً بعد التعرض لمادة سابقة أو ابتلاعها. وقد تم الإبلاغ عن تراكيز لحمض ثلاثي كلورو أسيتيك في البلازما تصل إلى 40 ملجم/لتر بعد التعرض المهني لأبخرة ثلاثي كلورو إيثيلين.

وفي 25 امرأة بالغة من ذوات البشرة البيضاء في فلوريدا بالولايات المتحدة الأمريكية، وخلال فترة 6 أشهر، كانت متوسط تراكيز الكلوروفورم في البلازما أقل عموماً من 25 ميكروجرام/لتر، ولكن وُجدت تراكيز كلوروفورم في البلازما بلغت 2.9 و4.0 ملجم/لتر على التوالي في حالتين أثناء أخذ العينات الروتيني (Pfaffenberger, Peoples 1982). وقد خضع جميع الأفراد لفحص دقيق لاستبعاد التعرض المهني والترفيهي للكلوروفورم وغيره من المركبات التي قد تؤدي إلى ظهور الكلوروفورم عند التحليل بـ HS-GC. ومع ذلك، لابد أنه قد حدث تعرض حاد عرضي للكلوروفورم أو لمادة سابقة لحمض ثلاثي كلورو أسيتيك أدى إلى ظهور هذه النتائج. وعلى النقيض تماماً، تم الإبلاغ عن تراكيز الكلوروفورم في دم ما بعد الوفاة في الحالات المتضمنة لهذا العامل لتتراوح بين 5 و800 ملجم/لتر (Baselt 2004).

من المعروف جيداً أن الإيثانول يمكن أن يُنتج ويُستقلب بفعل النشاط الميكروبي في العينات البيولوجية. كما يمكن أن يُنتج البروبانول والبيوتانول أيضاً بفعل النشاط الميكروبي. وقد تنشأ "الكحولات المتجانسة (Congener alcohols)" مثل الميثانول، والبروبانول، والبيوتانول، و2-بيوتانول، و2-ميثيل بروبانول، و2-ميثيل بيوتانول، و3-ميثيل بيوتانول (بالإضافة إلى مستقلبات الكيتون الخاصة بالكحولات الثانوية) عن ابتلاع المشروبات الكحولية (Bonte 2000). ويمكن استخدام الميثانول أو 2-ميثيل-2-بروبانول (ثالثي بوتانول) جنباً إلى جنب مع البيريدين أو بنزوات الديناتونيوم (Bitrex، Aversion) لتشوية الكحول، على الرغم من أن ذلك قد لا يوقف إساءة استخدام المنتجات التي تحتوي على الكحول المشوّه (Carnahan et al. 2005). وقد تنشأ البيوتيرالدهيد، وثنائي ميثيل السلفيد، وإيزوفاليرالدهيد، والفاليرالدهيد نتيجة التعفن (Weller, Wolf 1989). قد تنشأ كميات صغيرة من الهكسانال عن تحلل الأحماض الدهنية في الدم عند التخزين طويل الأجل حتى في درجات حرارة تتراوح بين $5°C$ و20 (Gill et al. 1988) . وقد يتزامن ظهور الهكسانال مع التولوين في الفصل على بعض

أنظمة كروماتوغرافيا الغاز، إلا أن التداخل من هذا المصدر لا يُرجح أن يكون هاماً إلا إذا كان المراد قياس تراكيز منخفضة للغاية من التولوين ($0.1mg/L$ أو أقل).

وفي بعض حالات الوفاة المنسوبة إلى إساءة استخدام غاز البترول المسال (LPG)، لا يتم اكتشاف سوى البوتان، والإيزوبوتان، والبروبان عند تحليل الحيز الرأسي بكروماتوغرافيا الغاز لعينات ما بعد الوفاة. وفي حالات أخرى، يتواجد أيضاً 2-بروبانول، والأسيتون، و2-ميثيل-2-بروبانول، و2-بيوتانول، و/أو البوتانون. وربما تنشأ هذه المركبات الأخيرة من استقلاب البوتانات والبروبان؛ وباستخدام تقنية HS-SPME تم اكتشاف البوتانول، و2,3-بيوتانيديول، و3-هيدروكسي-2-بيوتانون، و2,3-بيوتانيديون في عينات ما بعد الوفاة المأخوذة من مسيئي استخدام غاز البترول المسال (Walker et al. 2006).

تُعد نتريتات الأكيل التي يمكن إساءة استخدامها عن طريق الاستنشاق (إيزوبوتيل نتريت، إيزوبنتيل نتريت) حالة خاصة من حيث: (1) أنها غير مستقرة للغاية وتتفكك بسرعة داخل الجسم الحي إلى الكحولات المقابلة (Kielbasa et al. 1999; Tytgat, Daenens 1996)، و(2) أنها تحتوي عادةً أيضاً على متصاوغات أخرى (بوتيل نتريت، بنتيل نتريت) (Baselt 2004; Osterloh 1984). وعادة ما تحتوي أي منتجات يتم تقديمها للتحليل على الكحولات المقابلة بالإضافة إلى النتريتات. ويمكن اكتشاف الحالة الشديدة من ومرض الميموهيموغلوبينامية (الهيموغلوبين المؤكسد) الناتجة خاصة عن ابتلاع هذه المركبات بسهولة.

تفسير النتائج الكمية

بشكل عام جداً، ولفترة قصيرة بعد التعرض الحاد، قد ترتبط تراكيز المواد المتطايرة في الدم البالغة من 5إلى $10mg/L$وما فوق بالسمات السريرية للسمية. وبعبارة أخرى، فإن التراكيز الفعالة دوائياً للمواد المتطايرة تشبه تلك الخاصة بمخدرات التخدير الاستنشاقية (Baselt 2004; Flanagan 1998)، وبالتالي فهي تقل بمقدار رتبةmagnitude عن تلك الملاحظة في التسمم بالمركبات القابلة للذوبان في الماء نسبياً مثل الإيثانول.

قد يكون هناك تداخل كبير في تراكيز الدم للمركبات المتطايرة التي يتم الوصول إليها بعد التعرض في مكان العمل ونتيجة للاستنشاق المتعمد للأبخرة. ففي بيئة العمل، تراوحت تراكيز التولوين في الدم بعد التعرض لتولوين يصل إلى $127ppm$(كان حد التعرض المهني في المملكة المتحدة في ذلك الوقت $100ppm$) لمدة $8h$بين 0.4و$6.7mg/L$ (Campbell et al. 1987). وبعد التعرض لفترة قصيرة، اقترنت علامات التسمم المعتدل فقط (مثل تلعثم الكلام، وعدم استقرار الحركات) بتراكيز للتولوين في الدم تصل إلى $30mg/L$(Garriott et al. 1981). ومع ذلك، اقترنت تراكيز التولوين في الدم التي تزيد عن $9.2mg/L$بالضعف أو الضعف المحتمل لدى سائقي السيارات الذين تم القبض عليهم في النرويج في الفترة 1983-87 (Gjerde et al. 1990).

تراوحت تراكيز التولوين في الدم في عينات مأخوذة من 132 مريضاً يُعتقد أنهم شاركوا في إساءة استخدام المواد المتطايرة بين $0.2mg/dL$و$70mg/dL$، وكانت أعلى من $5mg/L$في 22 حالة من أصل 25 حالة وفاة (Meredith et al. 1989). ومن ناحية أخرى، كان 13 مريضاً لديهم تراكيز تولوين في الدم تزيد عن $10mg/L$إما بدون أعراض أو يعانون من تسمم خفيف فقط (صداع، غثيان، قيء و/أو نعاس)، على الرغم من أن مظاهر السمية هذه تثبت أحياناً أنها قاتلة. وقد تم الإبلاغ عن نتائج مماثلة من اليابان (Miyazaki et al. 1990). وبغض النظر عن الاختلافات الفردية في التحمل والفقد المحتمل للتولوين من العينة قبل التحليل، أو تلوث العينات، وما إلى ذلك، فإن غياب الارتباط القوي بين تراكيز الدم والسمات السريرية للتسمم يرجع على الأرجح إلى التوزيع النسجي الأولي السريع.

يتم تحويل حوالي 80% من جرعة التولوين إلى حمض الهيبوريك، الذي يُطرح في البول. وبالمثل، يتم استقلاب أكثر من 90% من جرعة الزيلين إلى أحماض الميثيل هيبوريك (التولويريك). ويُعد المتصاوغ الأساسي الموجود في البول هو 3-ميثيل هيبورات نظراً لأن الميتا-زيلين هو المكون الأساسي للزيلين التجاري (انظر الجدول 1).

لا تُعد أحماض الميثيل هيبوريك مكونات بولية طبيعية، ولكن حمض الهيبوريك قد ينشأ من استقلاب البنزوات المستخدمة كمواد حافظة في الأغذية والأدوية. وغالباً ما يُعبَّر عن إفراز الهيبورات وميثيل هيبورات كنسبة إلى الكرياتينين نظراً لأن ذلك يلغي الحاجة إلى جمع بول لمدة 24 ساعة. يمكن أن يؤدي التعرض المهني للتولوين إلى نسب تصل إلى 1 جرام من الهيبورات لكل 1 جرام من الكرياتينين أو أكثر؛ وفي المرضى المشتبه في إساءتهم استخدام المواد المتطايرة، تشير نسبة تزيد عن 1 جرام من الهيبورات لكل 1 جرام من الكرياتينين بقوة، ولكنها لا تثبت، التعرض للتولوين (Meredith et al. 1989).

الخلاصة

ينقسم تحليل المواد المتطايرة إلى مجالين رئيسيين: تشخيص التسمم الحاد ورصد التعرض المهني/البيئي للمذيبات وغيرها من المواد المتطايرة. وكان لمبروتوكول مونتريال والتشريعات اللاحقة التي تهدف إلى الحد من استخدام بعض الهيدروكربونات المهلجنة والمبرومة تأثير ملحوظ على نطاق المواد المتطايرة المتاحة في العديد من البلدان الغربية. ومن المرجح أن تشهد السنوات القليلة القادمة تغولات أقل بكثير. فيما يتعلق بتقييم التعرض المهني/البيئي، يُعد استخدام تحليل هواء الزفير عبر أجهزة جمع بسيطة مثل تلك التي ابتكرها Dyne وآخرون (1997) و/أو إفراز المستقلبات في البول (انظر الجدول 5) بالتزامن مع رصد الهواء المحيط هو الطريقة الأفضل للمضي قدماً. ومع ذلك، سيظل تحليل الدم، والأنسجة الأخرى إن وجدت، هاماً في التطبيقات الأخرى. وتُعد تقنية HS-GC أو مشتقاتها المستخدمة مع الكواشف المناسبة ملائمة تماماً لتحليل المواد المتطايرة دون تغيير، ومن المرجح أن تظل هي السائدة إلا عندما يشير تحليل المستقلبات القطبية التي تمتلك مجموعة حاملة للون مناسبة (chromophore) إلى استخدام كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (HPLC).

المراجع(References)

Aggazzotti, G., Predieri, G., Vivoli, G., Fantuzzi, G., & Roti, G. (1987). Headspace gas chromatographic analysis for determining low levels of chloroform in human plasma. *Journal of Chromatography*, 416, 125–130.

Ashley, D. L., Bonin, M. A., Cardinali, F. L., McCraw, J. M., & Wooten, J. V. (1992). Determining volatile organic compounds in human blood from a large sample population by using purge and trap gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 64(9), 1021–1029.

Auwaerter, V., Pragst, F., Herzler, M., Sporkert, F., & Thieme, D. (2007). Toxicological analysis after asphyxial suicide with helium and a plastic bag. *Forensic Science International*, 170(2–3), 139–141.

Baselt, R. C. (2004). *Disposition of Toxic Drugs and Chemicals in Man* (7th ed.). Biomedical Publications.

Bonte, W. (2000). Congener analysis. In J. A. Siegel, P. J. Saukko, & G. C. Knupfer (Eds.), *Encyclopedia of Forensic Sciences* (Vol. 1, pp. 93–102). Academic Press.

Broussard, L. A. (2000). The role of the laboratory in detecting inhalant abuse. *Clinical Laboratory Science*, 13(4), 205–209.

Broussard, L. A., Knight, E. D., & Rood, K. K. (2001). Headspace gas chromatographic method for the measurement of difluoroethane in blood. *Clinical Laboratory Science*, 14(1), 3–5.

Byard, R. W., Gilbert, J. D., & James, R. (2007). Death associated with volatile substance inhalation: Histologic, scanning electron microscopic and energy dispersive X-ray spectral analyses of lung tissue. *Forensic Science International*, 171(2–3), 118–121.

Campbell, L., Wilson, H. K., & Taylor, M. A. (1987). Towards a biological monitoring strategy for toluene. *Annals of Occupational Hygiene*, 31(2), 121–133.

Carnahan, R. M., Lund, B. C., & Perry, P. J. (2005). Acute ethanol intoxication after consumption of hair spray. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 25(11), 1646–1650.

Carter, P. G., & McConnell, A. A. (1990). Alcohol in drink driving swabs: Does it make any difference? *Medicine, Science and the Law*, 30(2), 90.

De Zeeuw, R. A., Carigger, J., & Franke, J. P. (1992). *Gas Chromatographic Retention Indices of Solvents and Other Volatile Substances for Use in Toxicological Analysis* (Report XIX of the DFG Commission for Clinical-Toxicological Analysis). VCH.

Dyne, D., Flanagan, R. J., & Ramsey, J. D. (1996). Toluene, 1-butanol, ethylbenzene and xylene from Sarstedt Monovette serum gel blood collection tubes. *Annals of Clinical Biochemistry*, 33(4), 355–356.

Dyne, D., Cocker, J., & Flanagan, R. J. (1997). A novel device for capturing breath samples for solvent analysis. *Science of the Total Environment*, 199(1–2), 83–89.

Field-Smith, M. E., Bland, J. M., Taylor, J. C., & Flanagan, R. J. (2007). *Trends in Deaths Associated with Abuse of Volatile Substances 1971–2005* (Report 20). St George's Hospital Medical School.

Flanagan, R. J. (1998). Guidelines for the interpretation of analytical toxicology results and unit of measurement conversion factors. *Annals of Clinical Biochemistry*, 35(2), 261–267.

Flanagan, R. J., & Fisher, D. S. (2008). Volatile substance abuse and crime: Data from UK press cuttings 1996–2007. *Medicine, Science and the Law*, 48(4), 295–306.

Flanagan, R. J., & Pounder, D. (2010). A chloroform-related death: Analytical and forensic aspects. *Forensic Science International*, 195(1–3), e1–e4.

Flanagan, R. J., Ramsey, J. D., & Jane, I. (1997). *Volatile Substance Abuse* (United Nations International Drug Control Programme Technical Series Number 5). UNIDCP.

Forsyth, D. S. (2004). Pulsed discharge detector: Theory and applications. *Journal of Chromatography A*, 1050(1), 63–68.

Foster, K. N., Caruso, D. M., & Battistella, F. D. (2003). Hydrofluoric acid burn resulting from ignition of gas from a compressed air duster. *Journal of Burn Care & Rehabilitation*, 24(4), 234–237.

Garriott, J. C., Petty, C. S., & Mims, M. E. (1981). Measurement of toluene in blood and breath in cases of solvent abuse. *Clinical Toxicology*, 18(4), 471–479.

Gill, R., Abbot, R. W., Trapp, B. D., & Moffat, A. C. (1988). Sample handling and storage for the quantitative analysis of volatile compounds in blood: The determination of toluene by headspace gas chromatography. *Journal of Analytical Toxicology*, 12(3), 141–146.

Gill, R., Broster, C. G., Hunt, L. M., Osselton, M. D., Ramsay, J. D., & Flanagan, R. J. (1991). The response of evidential breath alcohol testing instruments with subjects exposed to organic solvents and gases. I. Toluene, 1,1,1-trichloroethane and butane. *Medicine, Science and the Law*, 31(3), 187–200.

Gill, R., Ramsey, J. D., & Flanagan, R. J. (1992). The Quantitative Analysis of Volatile Solvents and Gases in Blood Samples–Problems and Solutions. In *Proceedings of the 26th International Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists* (pp. 372–382). Scottish Academic Press.

Gjerde, H., Beylich, K. M., & Mørland, J. (1990). Driving under the influence of toluene. *Forensic Science International*, 44(1), 77–83.

Goldfinger, T. M., & Schaber, D. (1982). A comparison of blood alcohol concentration using non-alcohol- and alcohol-containing skin antiseptics. *Annals of Emergency Medicine*, 11(12), 665–667.

Higuchi, A., Takano, T., & Ishida, K. (2005). Problems in blood alcohol testing of severely injured drivers brought to emergency departments in Japan. *Legal Medicine*, 7(5), 299–305.

Imbriani, M., Ghittori, S., Pezzagno, G., & Capodaglio, E. (1995). Anesthetic in urine as biological index of exposure in operating-room personnel. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 46(2), 249–260.

Junting, L., Daneng, L., & Xi, P. (1998). Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples. *Forensic Science International*, 97(2–3), 93–100.

Kielbasa, W. B., Okerholm, R. A., & Nolen, H. W. (1999). Analysis of isobutyl nitrite inhalant in rat and human blood: Application for pharmacokinetic investigations. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 734(1), 83–89.

Kolb, B., & Ettre, L. S. (1997). *Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice*. Wiley-VCH.

Kuhlman, J. J., Jr., Magluilo, J., Jr., & Levine, B. (1993). Two deaths involving isoflurane abuse. *Journal of Forensic Sciences*, 38(4), 968–971.

Lee, X. P., Kumazawa, T., Sato, K., & Seno, H. (1995). A simple analysis of 5 thinner components in human body fluids by headspace solid-phase microextraction (SPME). *International Journal of Legal Medicine*, 107(6), 310–313.

Lee, X. P., Kumazawa, T., Sato, K., Seno, H., & Suzuki, O. (1998). Determination of solvent thinner components in human body fluids by capillary gas chromatography with trapping at low oven temperature for headspace samples. *Analyst*, 123(1), 147–150.

Malingre, M., Meijering, A., & Groenier, K. H. (2005). Alcohol swabs and venipuncture in a routine hospital setting: No effect on blood ethanol measurement. *Therapeutic Drug Monitoring*, 27(3), 403–404.

Maruyama, K., Takatsu, M., & Araki, T. (1995). The quantitative analysis of inhalational anaesthetics in forensic samples by gas chromatography/mass spectrometry/selected ion monitoring. *Biomedical Chromatography*, 9(4), 179–182.

McIvor, R. A., & Cosbey, S. H. (1990). Effect of using alcoholic and non-alcoholic skin cleansing swabs when sampling blood for alcohol estimation using gas chromatography. *British Journal of Clinical Practice*, 44(6), 235–236.

Meredith, T. J., Ruprah, M., & Flanagan, R. J. (1989). Diagnosis and treatment of acute poisoning with volatile substances. *Human Toxicology*, 8(4), 277–286.

Miyano, K., Tawara, K., & Fujii, Y. (1993). The determination of a new inhalational anaesthetic, sevoflurane, using an internal standard, xenon, by gas chromatography/mass spectrometry/selected ion monitoring. *Biomedical Chromatography*, 7(2), 116–117.

Miyazaki, T., Kojima, T., Yashiki, M., Chikaoka, Y., & Une, I. (1990). Correlation between 'on admission' blood toluene concentrations and the presence or absence of signs and symptoms in solvent abusers. *Forensic Science International*, 44(2–3), 169–177.

Musshoff, F., Madea, B., & Kernbach-Wighton, G. (2006). Accidental autoerotic death by volatile substance abuse or nonsexually motivated accidents? *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 27(3), 188–192.

Nagano, T., Oda, M., & Nakano, K. (1989). A new method for the determination of ethanol in the blood and urine by pulse heating. *Japanese Journal of Legal Medicine*, 43(4), 315–321.

Ojanperä, I., Pelander, A., & Vuori, E. (1996). Identification of volatile organic compounds in blood by purge and trap PLOT-capillary gas chromatography coupled with Fourier transform infrared spectroscopy. *Forensic Science International*, 80(3), 201–209.

Ojanperä, I., Pelander, A., & Vuori, E. (1998). Identification limits for volatile organic compounds in the blood by purge-and-trap GC-FTIR. *Journal of Analytical Toxicology*, 22(4), 290–295.

Osterloh, J. (1984). Butyl nitrate: Analytical techniques and toxicology. In R. C. Baselt (Ed.), *Advances in Analytical Toxicology* (pp. 159–197). Biomedical Publications.

Peek, G. J., Taylor, D. J., & Ramsay, L. E. (1990). The effects of swabbing the skin on apparent blood ethanol concentration. *Alcohol and Alcoholism*, 25(6), 639–640.

Pfaffenberger, C. D., & Peoples, A. J. (1982). Long-term variation study of blood plasma levels of chloroform and related purgeable compounds. *Journal of Chromatography*, 239, 217–226.

Pihlainen, K., & Ojanperä, I. (1998). Analytical toxicology of fluorinated inhalation anaesthetics. *Forensic Science International*, 97(2–3), 117–133.

Ramsey, J. D., & Flanagan, R. J. (1982). Detection and identification of volatile organic compounds in blood by headspace gas chromatography as an aid to the diagnosis of solvent abuse. *Journal of Chromatography*, 240(2), 423–444.

Saito, K., Ishigami, A., Takayasu, T., Chiba, T., & Miyazaki, T. (1995). Determination of the volatile anesthetics halothane, enflurane, isoflurane, and sevoflurane in biological specimens by pulse-heating GC-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 19(2), 115–119.

Schaffernicht, H., Angerer, J., & Schaller, K. H. (1995). Determination of halothane in the urine of exposed persons as a method for biological exposure monitoring. *Zentralblatt für Arbeitsmedizin, Arbeitsschutz und Ergonomie*, 45(12), 508–510.

Schuberth, J. (1994). Joint use of retention index and mass spectrum in post-mortem tests for volatile organics by headspace capillary gas chromatography with ion-trap detection. *Journal of Chromatography A*, 674(1–2), 63–71.

Schuberth, J. (1996). A full evaporation headspace technique with capillary GC and ITD: A means for quantitating volatile organic compounds in biological samples. *Journal of Chromatographic Science*, 34(7), 314–319.

Schurig, V., & Grosenick, H. (1994). Preparative enantiomer separation of enflurane and isoflurane by inclusion gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 666(1–2), 617–625.

Shitangkoon, A., Vigh, G., & Armstrong, D. W. (1993). Gas chromatographic separation of the enantiomers of volatile fluoroether anaesthetics using derivatised cyclodextrin stationary phases: Part I. *Journal of Chromatography A*, 657(2), 387–394.

Takayasu, T., Ishigami, A., Chiba, T., Saito, K., & Miyazaki, T. (1994). Toxicological analysis of drugs and poisons in formalin-fixed organ tissues: 2. Volatile substances. *International Journal of Legal Medicine*, 107(1), 7–12.

Takayasu, T., Ishigami, A., Chiba, T., Saito, K., & Miyazaki, T. (1995). Screening of volatile substances and determination of toluene (a thinner component) in the blood and urine in emergency medical care and autopsy cases by the pulse heating method. *Journal of Clinical Forensic Medicine*, 2(2), 65–72.

Tytgat, J., & Daenens, P. (1996). Solvent-free sample preparation by headspace solid-phase microextraction applied to the tracing of n-butyl nitrite abuse. *International Journal of Legal Medicine*, 109(3), 150–154.

Uyanik, A. (1997). Gas chromatography in anaesthesia: I. A brief review of analytical methods and gas chromatographic detector and column systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 693(1), 1–9.

Walker, R., Forney, R. B., Jr., & Tebbett, I. R. (2006). Solid-phase microextraction: Investigation of the metabolism of substances that may be abused by inhalation. *Journal of Chromatographic Science*, 44(6), 387–393.

Watts, M. T., Giese, R. W., & Kelleher, R. J. (1992). Gas chromatographic headspace analysis of sevoflurane in blood. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, 577(2), 289–298.

Weller, J. P., & Wolf, M. (1989). Mass spectroscopy and headspace gas chromatography. *Beiträge zur Gerichtlichen Medizin*, 47, 525–532.

Williams, J. F., & Stork, C. M. (2007). American Academy of Pediatrics Committee on Substance Abuse; American Academy of Pediatrics Committee on Native American Child Health. Inhalant abuse. *Pediatrics*, 119(5), 1009–1017.

Willie, S. M., & Lambert, W. E. (2004). Volatile substance abuse: Post-mortem diagnosis. *Forensic Science International*, 142(2–3), 135–136.

Yang, N. C., Chen, H. L., & Wang, Y. T. (2001). Simultaneous determination of fluorinated inhalation anesthetics in blood by gas chromatography–mass spectrometry combined with a headspace autosampler. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 759(2), 307–318.

CHAPTER (17) الفصل السابع عشر



السموم الطبيعية

NATURAL TOXINS

الفصل السابع عشر

السموم الطبيعية (NATURAL TOXINS)

المقدمة (Introduction)

تمثل السموم الطبيعية (Natural Toxins) في جوهرها الفلسفي الوجه الآخر لعملية التطور البيولوجي وصراع البقاء، حيث تجسد الطبيعة صياغة كيميائية دقيقة تعبر عن آليات الدفاع والهجوم التي تطورت عبر ملايين السنين عبر شبكة معقدة من التفاعلات الحيوية. علمياً وكيميائياً، تنبثق هذه المركبات السامة من الأيض الثانوي (Secondary Metabolism) للكائنات الحية، وتتنوع بنيتها الجزيئية بين ببتيدات حلقية معقدة، وقلويدات (Alkaloids) نيتروجينية حادة التأثير، وسموم خارجية (Exotoxins) بروتينية فائقة القوة، وسموم فطرية (Mycotoxins) ذات ثبات حراري وكيميائي عالٍ. صحياً وسريرياً، تتجلى خطورة هذه المواد في قدرتها فائقة التخصص على التدخل في العمليات الحيوية الدقيقة للجسم البشري، حيث تعمل كمثبطات إنزيمية قوية، أو سموم عصبية (Neurotoxins) تعطل النقل العصبي عبر المشابك (Synapses)، أو سموم خلوية (Cytotoxins) تدمر الأغشية وتسبب النخر المبرمج أو الموت الخلوي (Apoptosis). من بكتيريا المطثيات (Clostridia) وفطريات الرشاشيات (Aspergillus) والأفلاتوكسينات، مرورا بنباتات مثل الخروع (Ricinus communis) والقات (Catha edulis)، وصولا إلى سموم اللافقاريات كاللاسعات (Cnidaria) والرخويات (Molluscs) ومفرزات الفقاريات السامة، تشكل هذه المنظومة طيفاً واسعاً من التحديات البيوكيميائية التي تتطلب فهماً عميقاً لآليات الفعل السمي (Mechanism of Action) والخصائص الحركية الدوائية والسمية (Toxicokinetics and Toxicodynamics)، لتوفير التدخل العلاجي الأنسب ودرء المخاطر الصحية الجسيمة.

يُشير مصطلح "السموم الطبيعية" عادةً إلى المركبات العضوية ذات الأصول الطبيعية والتي تحتمل الخطورة والسمية، وذلك على عكس السموم المعدنية والأدوية الاصطناعية. وتتراوح مصادر هذه السموم بين الكائنات الدقيقة البسيطة وصولاً إلى الفقاريات عالية التطور، وبناءً على ذلك تتنوع تراكيبها الكيميائية بشكل كبير. قد يُؤدي التعرض للسموم الطبيعية إلى ظهور أعراض حادة وكذلك طويلة الأمد تؤثر على أي نظام عضوي تقريباً. إن الطبيعة الكيميائية والبيولوجية والسريرية شديدة التنوع لهذا الصنف من السموم تعني أن مساهمة أخصائي علم السموم التحليلي في تشخيص وعلاج ومتابعة المرضى "المسمومين طبيعياً" تظل محدودة.

لقد تم استخدام عدد كبير من المواد التي تتوافق مع تعريف السموم الطبيعية لأغراض علاجية، ومن الأمثلة الكلاسيكية على ذلك الإيرغوتامين (ergotamine)، وحمض الساليسيليك (salicylic acid)، والجليكوسيدات القلبية مثل الديجوكسين (digoxin)، بالإضافة إلى البنسلين (penicillin). ومن الأمثلة الأكثر حداثة السيكلوسبورين (ciclosporin) وسم البوتولينوم (botulinum toxin). ولا تُناقش معظم هذه المواد في هذا الفصل. وبالمثل، فإن المواد شائعة الإساءة ذات الأصل الطبيعي، مثل القنب (cannabis)، والكوكايين (cocaine)، والمورفين (morphine)، يتم تناولها في مكان آخر من هذا الكتاب.

إن التنوع في التركيب الكيميائي للسموم الطبيعية يحول دون ترتيبها وفقاً للتراكيب الكيميائية؛ ولهذا السبب، تم اختيار تصنيف بيولوجي، حيث تتم مناقشة المواد التي تنشأ من:

البكتيريا (Bacteria)

الفطريات (Fungi)

النباتات العليا (Higher plants)

اللافقاريات (Invertebrates)

الفقاريات (Vertebrates)



البكتيريا (Bacteria)

يُعزى تأثير البكتيريا الممرضة على صحة الإنسان غالباً إن لم يكن دائماً إلى قدرتها على إنتاج السموم الميكروبية. ولهذا الفصل، تم اختيار ثلاثة سموم بكتيرية قوية وشائعة وهي: سم التكزز (tetanus toxin)، وسم البوتولينوم (botulinum toxin)، والفيروتوكسين (verotoxin). وهذان السمومان الأبيضان هما بروتينات سامة للأعصاب مرتبطة ببعضها ومُنتَجة بواسطة عدة سلالات من المطثيات (Clostridium spp.)، بينما يُنتَج الفيروتوكسين بواسطة سلالات معينة من الإشريكية القولونية (Escherichia coli).

قد تكون البكتيريا أيضاً مصدراً لسموم مُنسوبة سابقاً كائنات أخرى، مثل التترودوتوكسين (TTX)، والذي يُوجد في سمكة القنفذ (puffer fish) ولكنه على الأرجح مُنتَج بواسطة كائنات دقيقة متعايشة. ولأسباب اصطلاحية، يُناقش التترودوتوكسين في قسم التسمم بالأسماك، وينطبق الشيء نفسه على البكتيريا الزرقاء (cyanobacteria) العذبة التي تنتج الساكسيتوكسينات (saxitoxins) والتي توصف في قسم التسمم بالمحار.

المطثيات: البوتولينوم والتكزز (Clostridia: botulinum and tetanus)

تُنتَج السموم العصبية للبوتولينوم والتكزز بواسطة بكتيريا لاهوائية صارمة تنتمي إلى جنس المطثية (Clostridium)، وتُسبب متلازمات الشلل العصبي للتسمم السجقي (botulism) والتكزز (tetanus). تتألف سموم البوتولينوم من أربعة ببتيدات على الأقل بأحجام جزيئية تتراوح من 150" kDa" إلى 900" kDa" . ويحتوي سم التكزز على سلسلتين ببتيديتين مرتبطتين بثنائي السلفيد بحجم جزيئي قدره 50" kDa" و100" kDa" . وتعتبر السموم العصبية للمطثيات أقوى السموم المعروفة، مع جرعة مميتة وسيطة مُقدّرة بحوالي 1" ng/kg" عن طريق الوريد. وتُعد سموم البوتولينوم سموماً غذائية، بينما

لا يُعد سم التكزز كذلك؛ إذ يتبع التكزز تلوث الجروح النخرية بأبواغ المطثية الكزازية (Clostridium tetani). ويُعد التكزز نادراً في البلدان التي لديها برامج تطعيم، ولكنه يمتلك معدل إماتة للحالات مرتفعاً يبلغ 24%. ويُقدّر أن 800000 مولود جديد يتوفون بسبب التكزز الوليدي عالمياً كل عام. ويُمكن أن يؤدي العلاج بمضادات السموم والإعطاء الوريدي للبنسلين بعد فترة قصيرة من الإصابة إلى تقليل الوفيات. ولم تُنشر طرق تحليلية قابلة للتطبيق عموماً لتحديد وقياس كمية سم التكزز (Cherington et al. 1995).

يحدث التسمم الغذائي الكلاسيكي (Food-borne botulism) بعد تناول طعام ملوث بسم مُتَشَكّل مسبقاً من بكتيريا المطثية السجقية (C. botulinum). وتكون العروض السريرية نمطية؛ ففي غضون 12 إلى 36 ساعة من تناول الطعام، يُصاب المريض ازدواجية الرؤية (diplopia) وتهدل الجفون (ptosis)، يتبع ذلك نمط هابط من الضعف يؤثر على الأطراف العلوية ثم السفلية، وشلل تنفسي في الحالات الشديدة. لا يوجد علاج محدد للتسمم السجقي، وغالباً ما يكون الشفاء ممكناً ولكنه يتطلب تجدد صفيحات حركية عصبية جديدة، وهو ما يستغرق أسابيع. لا يزال التسمم الغذائي السجقي يمثل مصدر قلق، ويعتمد العلاج الفعال على توفير الرعاية المركزة والإعطاء السريع لمضاد سم البوتولينوم بناءً على العرض السريري، ولا ينبغي انتظار نتائج التشخيص المخبري المستهلك للوقت (Sobel 2005). ونظراً لسميتها العصبية الشديدة وسهولة إنتاجها، تم اقتراح سم البوتولينوم كعامل محتمل في الإرهاب البيولوجي (Villar et al. 2006).

يتطلب الإثبات المخبري للتسمم السجقي الكشف عن السم أو الحمض النووي الريبي الدي أوكسي ريبوزي (DNA) البكتيري في دم المريض أو برازه. وإذا كان لا يزال متاحاً، فيجب أيضاً اختبار الطعام المشتبه به بحثاً عن السم. وباستخدام طريقة قديمة لتحديد السم باستخدام اختبار سمية الفئران مع تحييد المضاد السمي، فإن النتائج المخبرية لا تكون مؤكدة دائماً. وقد تم الإبلاغ عن عدد من طرق المقايسة المناعية للكشف عن سموم البوتولينوم؛ إذ استُبدلت المقايسة المناعية الإشعاعية بطريقة مقايسة الامتصاص المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA) "المزدوجة الشطيرة" الأكثر حساسية والتي تعتمد على تطبيق ثلاثة أجسام مضادة. قد تُولد تقنية تضخيم اختبار (ELISA) زيادة بمقدار 10 أضعاف في الحساسية، مما يجعلها مناسبة لأغراض التشخيص (Hatheway and Ferreira 1996). وهناك طريقة جديدة واعدة للكشف عن الأبواغ والسموم البكتيرية تستخدم مستشعراً حيوياً يعتمد على التلألؤ الكهربائي الكيميائي (electrochemiluminescence)؛ حيث يتم التقاط السموم والأبواغ البكتيرية على خرزات مغناطيسية بحجم الميكرومتر مترافقة مع أجسام مضادة، يتبع ذلك ارتباط أجسام مضادة مراسلة مُوسومة بمخلب روثينيوم (II)-تريس بيبيريديل. ثم يتم تجميع المواد المستهدفة الملتقطة مغناطيسياً على مغناطيس، ويتم استحثاث التلألؤ الكهربائي الكيميائي من الأجسام المضادة المراسلة الموسومة بالروثينيوم عن طريق تطبيق جهد كهربائي. وبإستخدام محلول تجاري متاح (ORIGEN)، يتم الحصول على مستوى حساسية بمقياس الفمتوجرام لعدد من السموم، بما في ذلك سم البوتولينوم. وبالنسبة لعصوية الجمرة الخبيثة (Bacillus anthracis)، تنتج هذه الطريقة حد اكتشاف قدره 100 بويضة (Gatto-Menking et al. 1995). والأكثر وعداً هي الطرق المخبرية القائمة على قياس حمض DNA الخاص بالمطثيات عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) جنباً إلى جنب مع الرحلان الكهربائي الشعبي أو الهلامي أو طرق الكشف الأخرى. وعند دمجها مع اختبار (ELISA) أو تهجين المجسات، تم الإبلاغ عن حدود اكتشاف منخفضة تصل إلى 0.1 بويضة لكل غرام من البراز أو الطعام (Lindström and Korkeala 2006).

الإشريكية القولونية (Escherichia coli)

قد تُسبب عدة سلالات من بكتيريا الأمعاء الشائعة الإشريكية القولونية (E. coli) أمراض الإسهال لدى البشر. وتنتج إحدى هذه السلالات، التي توجد بشكل طبيعي في أمعاء الماشية وغيرها من الحيوانات، سُمّاً خلوياً قوياً: الفيبروتوكسين (verotoxin) أو السُمّ الخلوى الفيروسي (verocytotoxin). تُعرف هذه السلالة من الإشريكية القولونية، وعادةً ما يُشار إليها بـ (VTEC)،

بأنها واسعة الانتشار جغرافياً وتترابط مع أمراض بشرية تهدد الحياة تتراوح من الإسهال الدموي إلى متلازمة الانحلال اليوريمي وفُرْبُصَة قلة الصفيحات. وتُعد الأطفال الصغار، وخاصة أولئك القادمين من المناطق الحضرية، فئة معرضة للخطر بشكل خاص بسبب سنهم وسذَجَتِهم المناعية تجاه عدوى المزارع (Chattopadhyay et al. 2001; Parma et al. 2000; Pritchard et al. 2000). لم تتم بعد توضيح الطبيعة الكيميائية للفيبروتوكسين. وتتميز سلالات الإشريكية القولونية المنتجة للفيبروتوكسين من خلال تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) وتهجين الحمض النووي (DNA)، وبواسطة اختبار السمية الخلوية لخلايا فيرو (Leung et al. 2001) (Vero-cell cytotoxicity assay).

تنتج سلالات أخرى من الإشريكية القولونية (O157:H7) وأنواع بكتيرية أخرى سموم شيغا (Shiga toxins)، والتي قد تسبب المرض لدى البشر بعد استهلاك لحوم البقر الملوثة غير المطهية جيداً. قد تسبب هذه السموم لدى البشر التهاب القولون النزفي ومتلازمة الانحلال اليوريمي. وتتوفر مقايسات مناعية إنزيمية تكتشف سموم شيغا في عينات البراز الإسهالي من البشر وفي لحوم البقر الملوثة (Atalla et al. 2000; Hyatt et al. 2001).

الفطريات (Fungi)

السموم الفطرية (Mycotoxins) هي مجموعة من المواد التي تحتمل السُمّية والتي تنتجها أنواع من طائفة الفطريات (Fungi). وممّا يثير الدهشة أن عددًا قليلاً جدًا من أنواع الفطر مميت بعد ابتلاعه. والعديد من الفطريات الأخرى التي تنمو على الطعام يمكن أن تنتج سمومًا لا تسبب، عمومًا، أعراض تسمم حاد، ولكنها قد تسبب آثارًا ضارة بعد الابتلاع المزمن لكميات صغيرة. في هذا القسم، تم اختيار السموم الفطرية من أجناس الرشاشيات (Aspergillus)، والفيوزاريوم (Fusarium - Gibberella zeae)، والداهيس (Claviceps) التي لها تأثير محتمل على صحة الإنسان، حيث قد يكون لأخصائي علم السموم التحليلي دور مهم في الوقاية من الأمراض المنقولة بالغذاء. بالإضافة إلى ذلك، يتم وصف المبادئ السامة من بعض أكثر أنواع الفطر السام شيوعًا.

الرشاشيات (Aspergillus)

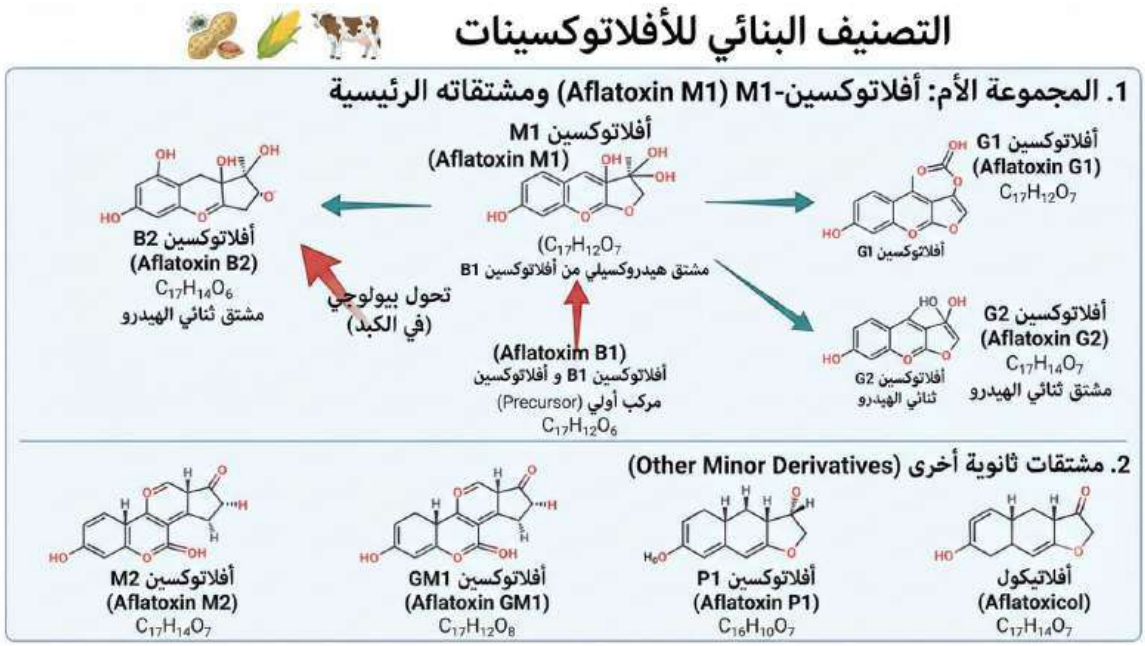
الأفلاتوكسين (Aflatoxin)

الأفلاتوكسين (شكل 1) هو عائلة من السموم الفطرية التي تنتجها عفنة الرشاشية الصفراء (Aspergillus flavus)، والتي توجد كملوثات في كل من المواد الغذائية البشرية وأعلاف الحيوانات، لا سيما في الذرة والفول السوداني والمكسرات الأخرى مثل الفستق. تعتبر أنواع الرشاشيات المنتجة للأفلاتوكسين منتشرة في كل مكان في المناطق ذات المناخ الحار والرطب. قد تلوث المواد الغذائية بالأفلاتوكسين قبل وبعد الحصاد. يحدث التعرض من خلال استهلاك الطعام الملوث وأيضاً أثناء التعامل ومعالجة المحاصيل الملوثة بالأفلاتوكسين. وقد تم اكتشاف الأفلاتوكسينات في عينات حليب البشر والبول والدم (IARC 1993a).



شكل 1: أفلاتوكسين-(Aflatoxin-M1) M1.

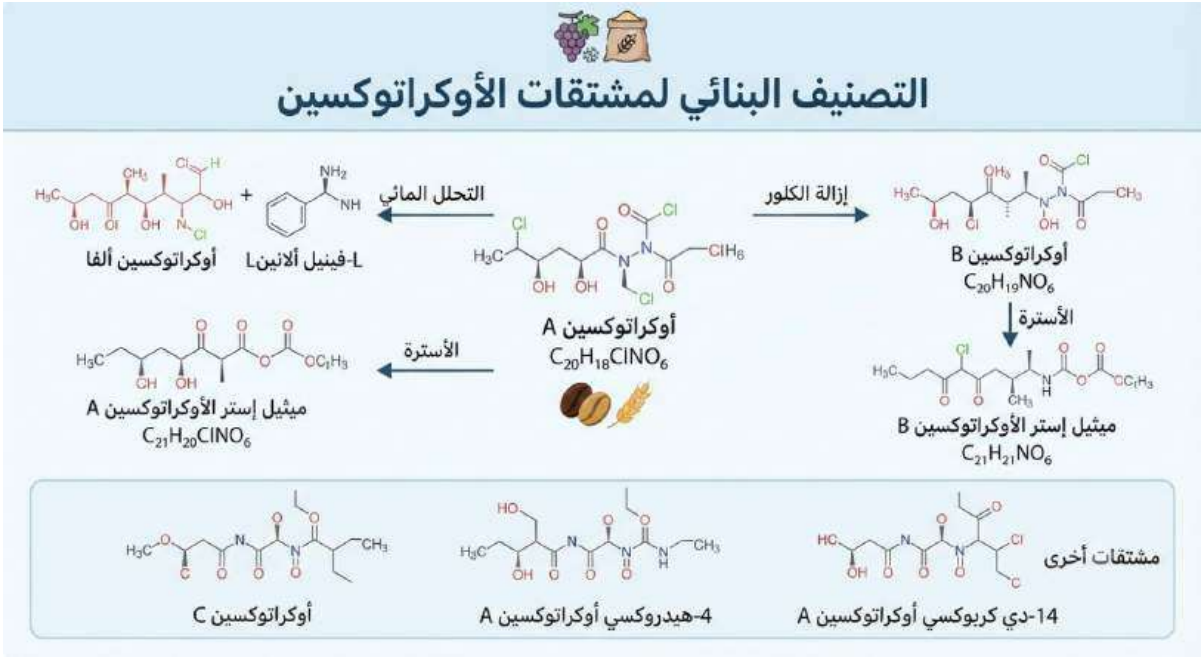
يُعد أفلاتوكسين-B1 مادة مسرطنة بشرية قوية للغاية تتفاعل مع الحمض النووي (DNA) بمجرد تنشيطها حيويًا إلى الإيبوكسيد، ويُعتقد أنها تسبب سرطان الخلايا الكبدية (hepatocellular carcinoma).



تم قياس الأفلاتوكسينات في دم الإنسان بواسطة اللوني السائل عالي الأداء (HPLC) مع الكشف الفلوري (Abdulrazzaq et al. 2002). وفي 201 عينة من دم الحبل السري، تم اكتشاف الأفلاتوكسينات في 110 عينة وكان هناك ارتباط سلبي كبير بين وزن الولادة وتركيزات الأفلاتوكسين التي تم العثور عليها. طبق كوزاك وآخرون (Kussak et al. 1995) نظام اللوني السائل - مطياف الكتلة الترادفي (LC-MS/MS) لقياس الأفلاتوكسينات في عينات البول المرتكزة وحققوا حدود اكتشاف تتراوح بين 2-10 بيكوغرام. تم وصف عدد من الطرق التحليلية لتحليل الأفلاتوكسينات G1 و G2 و B1 و B2 في المواد الغذائية. تم وصف إجراءات اللوني الطبقي الرقيق عالي الأداء (HPTLC) واختبار (ELISA)، ولكن يُعتبر اللوني السائل عالي الأداء (HPLC) مع الكشف الفلوري بمثابة الطريقة المفضلة (Boenke 1998; Gilbert 1993; Holcomb et al. 1992; Kok 1994). يتم تقديم مراجعة لهذه الطرق في (Jaimez et al. 2000). يعتمد إعداد العينة واستخلاصها بشكل كبير على الخصائص الفيزيائية والكيميائية للمصفوفة المصابة؛ فالأفلاتوكسينات قابلة للذوبان في مذيبات قطبية قليلاً، مثل مزيج من الأسيتون أو الكلوروفوم أو الميثانول. يمكن تطبيق المذيبات غير القطبية لاستخلاص الدهون. يمكن إنجاز تنقية إضافية عن طريق الاستخلاص الصلب يليه التركيز للتحليل اللوني. يؤدي اللوني السائل عالي الأداء ذو الطور العكسي مع مزيج الميثانول والماء أو الأسيتونتريل والماء إلى فصل جيد للأفلاتوكسينات؛ وعيب هذه الوسائط المائية هو أن التألق الطبيعي، الذي يجعلها قابلة للاكتشاف بسهولة عن طريق اللوني الطبقي الرقيق (TLC)، يتعرض للإخماد. ويمكن التغلب على ذلك عن طريق الاشتقاق بعد العمود باستخدام اليود، وهو إجراء تم اعتماده أخيرًا كطريقة رسمية من قبل رابطة مجتمعات التحليل (AOAC) والاتحاد الدولي للكيمياء البحتة والتطبيقية (IUPAC) في عام 1991 (AOAC 1991). على الرغم من معرفة الكثير عن الأفلاتوكسينات، إلا أن الأوكراتوكسين (ochratoxin) يُعترف به تدريجياً كسم فطري ذي أهمية مكافئة (Bayman and Baker 2006).

الأوكراتوكسين (Ochratoxin)

الأوكراتوكسين-A (OTA، شكل 2) هو سم فطري واسع الانتشار يُنتَج بشكل أساسي بواسطة فطريات الرشاشية المسببة للمغص (A. ochraceus) وبنسليوم فيروكولوسوم (Penicillium verruculosum) أثناء تخزين الحبوب، ومنتجات الحبوب، والأعشاب، والتوابل (IARC 1993b; Petzinger and Ziegler 2000)، وغيرها من المنتجات المشتقة من النباتات مثل القهوة (Viani 1996). يُعد الأوكراتوكسين-A مكلوراً، وهو أمر غير معتاد بالنسبة للمنتج الطبيعي. أما الأوكراتوكسين-B، غير المكلور، والأوكراتوكسين-C (الإستر الإيثيلي لـ OTA) فهما أقل سمية. وقد تم الإبلاغ عن أن الأوكراتوكسين-A سام للكلى، ومثبط للمناعة، ومسرطن، ومسخ في دراسات الحيوانات. ومع ذلك، وكما هو الحال مع الأفلاتوكسينات، فإنه غالباً ما يكون غير واضح إلى أي مدى تنطبق دراسات الحيوانات على السمية لدى البشر.



شكل 2: أوكراتوكسين-A (Ochratoxin-A) , ومشتقاته

تم العثور على الأوكراتوكسين-A أساساً في مناطق زراعة الشعير والقمح المعتدلة الشمالية، ولكن وجود الأوكراتوكسين-A في القهوة الخضراء والمعالجة حظي بالكثير من الاتمام مؤخراً. ومع اتساع قائمة الفطريات المنتجة للأوكراتوكسين-A، اتسعت أيضاً قائمة الأطعمة التي يمكن أن تلوث بالأوكراتوكسينات (Bayman and Baker 2006).

قد يؤدي استهلاك الخنازير لعلف الخنازير المتعفن إلى مستويات قابلة للكشف من الأوكراتوكسين-A في المنتجات المشتقة من لحم الخنزير. وبما أن الأوكراتوكسين-A يتحلل بسرعة بواسطة النباتات الكرشية، فمن غير المرجح أن يُوجد في الحليب أو اللحوم من الماشية (Scudamore 1996). وعندما يتم ابتلاعه من قبل البشر، يكون الأوكراتوكسين-A شديد الثبات، مع نصف عمر للقضاء عليه يبلغ حوالي 35 يوماً يُعزى إلى الارتباط القوي جداً ببروتينات البلازما. وخلال خمسينيات القرن الماضي، تم تحديد مرض كلوي مزمن مميت في عدة دول في البلقان وأصبح يُعرف باسم اعتلال الكلية المتوطن في البلقان (BEN). يتميز اعتلال الكلية المتوطن في البلقان بتشابه مذهل مع اعتلال الكلية الخنازيري الناجم عن الأوكراتوكسين-A. ويُعتقد أن العامل المسبب هو مستويات الأوكراتوكسين-A العالية في النظام الغذائي. ويُعد السم أيضاً مسرطناً محتملاً، ومسخاً، وعاملاً ساماً للمناعة. ويبدو أنه يمارس تأثيراته السامة عن طريق تعزيز مستوى متزايد من بيروكسيد الليبيدات، وعن طريق تثبيط تفاعل الألكلة الأمينية، ومن المحتمل عن طريق التحول إلى نواتج أيضية قادرة على الارتباط بالحمض النووي (Marquardt et al. 1990).

لتحليل الأوكراتوكسين-A في عينات الدم والسروم والحليب، استخدم زيمري وديح (Zimmerli and Dick 1995) تنقية عمود الألفة المناعية واللوني السائل عالي الأداء مع الكشف الفلوري وتمكنا من الحصول على حد تعيين (LOQ) قدره 5" pg/g" . وفي تقرير أكثر حديثاً، طبق فاتينو وآخرون (Vatinno et al. 2007) الاستخلاص الدقيق طور الصلب (SPME) على عينات من بول الإنسان وتحلل المستخلصات بواسطة اللوني السائل عالي الأداء مع الكشف الفلوري. كانت قيم حد التعين وحد الاكتشاف (LOD) على التوالي 0.05" mg" و 0.01" mg" .

تم اقتراح العديد من الإجراءات التحليلية لتحديد وقياس الأوكراتوكسين-A في المنتجات الغذائية، كما تمت مراجعتها بواسطة فان إغموند (Van Egmond 1991) و فالينتا (Valenta 1998). وعلى الرغم من أن تحليل اللوني الطبقي الرقيق يعطي نتائج مرضية في غياب الأجهزة المتطورة، إلا أن اللوني السائل عالي الأداء ذو الطور العكسي "18_ "Cمع الكشف الفلوري هو الطريقة المفضلة، مع طول موجة إثارة يبلغ 330" nm" وطول موجة انبعاث يبلغ 460" nm" . ومؤخراً، وصف نوبل وآخرون (Noba et al. 2009) طريقة تعتمد على تنقية الألفة المناعية تليها مطياف الكتلة الترادفي للوني السائل (LC-MS/MS) لتحليل الأوكراتوكسين-A في القهوة الجاهزة للشرب. وقد تم الإبلاغ عن حد التعيين كـ 0.0065" ng/mL" . وتم الكشف عن الأوكراتوكسين-A في 30 عينة من القهوة المتاحة تجارياً في اليابان. وقد قدم زولنر ومايرـهيلم (Zollner and Mayer-Helm 2006) مراجعة لطرق مطياف الكتلة للوني السائل لتحليل الأوكراتوكسين-A والمواد ذات الصلة، ومن المحتمل أن يكون مطياف الكتلة للوني السائل هو الطريقة المفضلة للأوكراتوكسينات في المستقبل القريب.

الفيوزاريوم (Fusarium)

الديوكسينيفالينول (Deoxynivalenol)

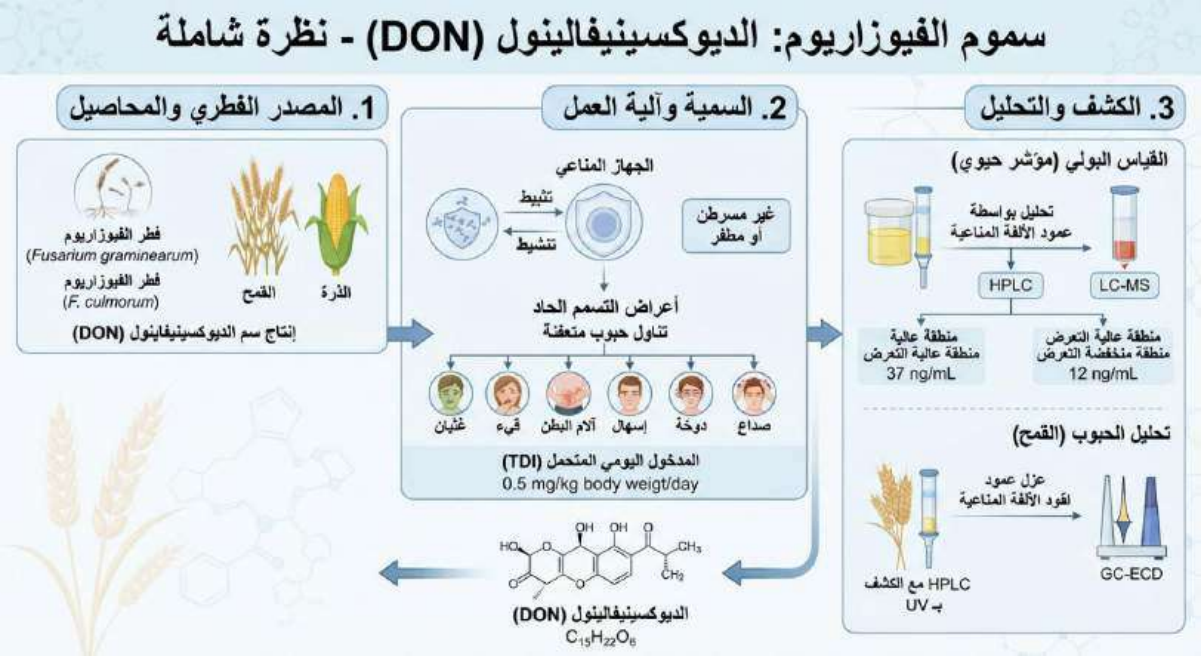
الديوكسينيفالينول (DON) هو سم فطري ينتمي إلى نوع التريكوثيسين من السموم التي تنتجها أنواع الفيوزاريوم الحبوبي (Fusarium graminearum / Gibberella zeae) والفيوزاريوم الكلورومي (F. culmorum). تنمو هذه الفطريات على المحاصيل الحبوبية، وبشكل أساسي القمح والذرة (IARC 1993c). ونظراً لأن منتجات القمح والذرة تشكل جزءاً كبيراً من النظام الغذائي في العديد من المناطق، فإن السمية ومحتوى الديوكسينيفالينول تُعد من القضايا المهمة في مراقبة سلامة الأغذية. ويمكن أن يؤثر الديوكسينيفالينول على الجهاز المناعي، وتم الإبلاغ عن كل من التثبيط والتنشيط، ولكن لا يُعتبر السم مطفراً أو مسرطناً.

تم الإبلاغ عن تفشيين لمرض بشري يتعلق بالتريكوثيسينات، أحدهما في الصين في الفترة من 1984 إلى 1985 والآخر في الهند في عام 1987. ويؤدي استهلاك القمح أو الذرة المتعفنة في غضون 5 إلى 30 دقيقة إلى الغثيان، والقيء، وآلام البطن، والإسهال، والدوخة، والصداع. وقد تم الكشف عن الديوكسينيفالينول في الحبوب في نطاق من 0.34إلى 92.8" mg/kg" ، جنباً إلى جنب مع 0.004إلى 0.587" mg/kg" من الزيرالينون (IARC 1993c) (انظر لاحقاً). ويُعتبر المدخول اليومي المتحمل (TDI) لدى البشر 0.5" mg/kg" من كتلة الجسم في اليوم (مجلس الصحة في هولندا 2001). وتم تقديم نظرة عامة على بعض السموم الفطرية الرئيسية، بما في ذلك الديوكسينيفالينول، بواسطة ريتشارد (Richard 2007).

طور بلاك وآخرون (Black et al. 1986) إجراءً لقياس الطيف الكتلي للغاز اللوني (GC-MS) لقياس الكميات الأثرية من سموم التريكوثيسين الفطرية في عينات الدم والبول. تضمنت الطريقة التنقية بواسطة خراطيش 18_ "C" Sep-Pakذات الطور العكسي والاشتقاق إلى إسترات الهيبتافلورو بوبيل. تراوحت حدود الاكتشاف لمجموعة من السموم الفطرية من 2" ppb" إلى 7" ppb" . واستكشف ميكي وآخرون (Meky et al. 2003) القياس البولي للديوكسينيفالينول كمؤشر حيوي محتمل للتعرض البشري؛ حيث عالجت عينات البول بإنزيمات بيتاـغلوكورونيداز والسلفاتاز لإطلاق الديوكسينيفالينول المقترن، والذي تم تحليله بعد ذلك بواسطة تقنية عمود الألفة المناعية مع اللوني السائل عالي الأداء (HPLC). وتم تأكيد

النتائج الإيجابية بواسطة مطياف الكتلة للوني السائل (LC-MS). وتمت مقارنة عينات البول المجمعة من الإناث اللاتي يعشن في منطقة معرضة للخطر المحتمل في الصين ومنطقة منخفضة التعرض. وكانت متوسطات المستويات في العينات من المناطق المشتبه في تعرضها المرتفع والمنخفض 37" ng/mL" (النطاق 14إلى 94" ng/mL") و 12" ng/mL" (النطاق 4إلى 18" ng/mL") على التوالي.

تم نشر طريقة لتقدير كمية الديوكسينيفالينول في القمح باستخدام عزل عمود الألفة المناعية واللوني السائل (HPLC) مع الكشف بالأشعة فوق البنفسجية (UV) بواسطة كاهيل وآخرون (Cahill et al. 1999). وتتقارن هذه الطريقة جيداً مع طريقة التقاط الإلكترون الغازي اللوني (GC-ECD) المنشورة بواسطة تاكي وكاسبر (Tacke and Casper 1996). في الوقت الحاضر، يُعد اللوني السائل مع الكشف بالأشعة فوق البنفسجية الطريقة الموصى بها لتحليل المخلفات في الغذاء (Stroka et al. 2006). ومع ذلك، تم مؤخراً وصف طريقة أكثر تطوراً تجمع بين مطياف الكتلة للوني السائل (LC-MS) والتأيون الضوئي بالضغط الجوي بواسطة تاناكا وآخرون (Tanaka et al. 2009) للكشف عن النيفالينول والديوكسينيفالينول في القمح. أدى ذلك إلى تقليل تأثيرات المصفوفة التي لوحظت مع الطرق الأخرى وأعطى حدود اكتشاف بلغت 0.2و0.39" ng/g" للنيفالينول والديوكسينيفالينول على التوالي.



سم T-2 (T-2 toxin)

يُنتَج سم فطري حبوبي آخر، وهو نظير التريكوثيسين سم T-2، بواسطة فطريات الفيوزاريوم الاسبوروتريخيوديس (F. sporotrichiodes). وقد تم اقتراح سم T-2 كعامل محتمل للحرب الكيميائية (Hodgson et al. 1998). وترتبط بسم T-2 مرض يُعرف باسم اللابقعية السامة الغذائية (alimentary toxic aleukia). وفي حالات التسمم الشديدة، يبلغ معدل الإماتة لهذا المرض ما يصل إلى 50%. وتتميز اللابقعية بفرط دم الغشاء المخاطي للفم، والضعف، والحمى، والغثيان، والقيء، وفي الحالات الشديدة بالتهاب المعدة والأمعاء. وفي المراحل اللاحقة من المرض تحدث قلة كريات الدم البيضاء، وقلة الخلايا الحبيبية، وكثرة اللمفاويات التدريجية، يتبعها تأهب نزفي شديد، والتهاب البلعوم والحنجرة النخري، فقر الدم. وفي حالة تفشي المرض في كشمير في عام 1987، وجد أن تركيزات سم T-2 في عينات الدقيق تتراوح بين 0.55إلى 0.8" mg/kg"

(IARC 1993d). وتتم مناقشة الجوانب التحليلية لسم T-2 في القسم التالي، الذي يصف الطرق العامة لتحليل التريكوثيسينات.

الزيرالينون (Zearalenone)

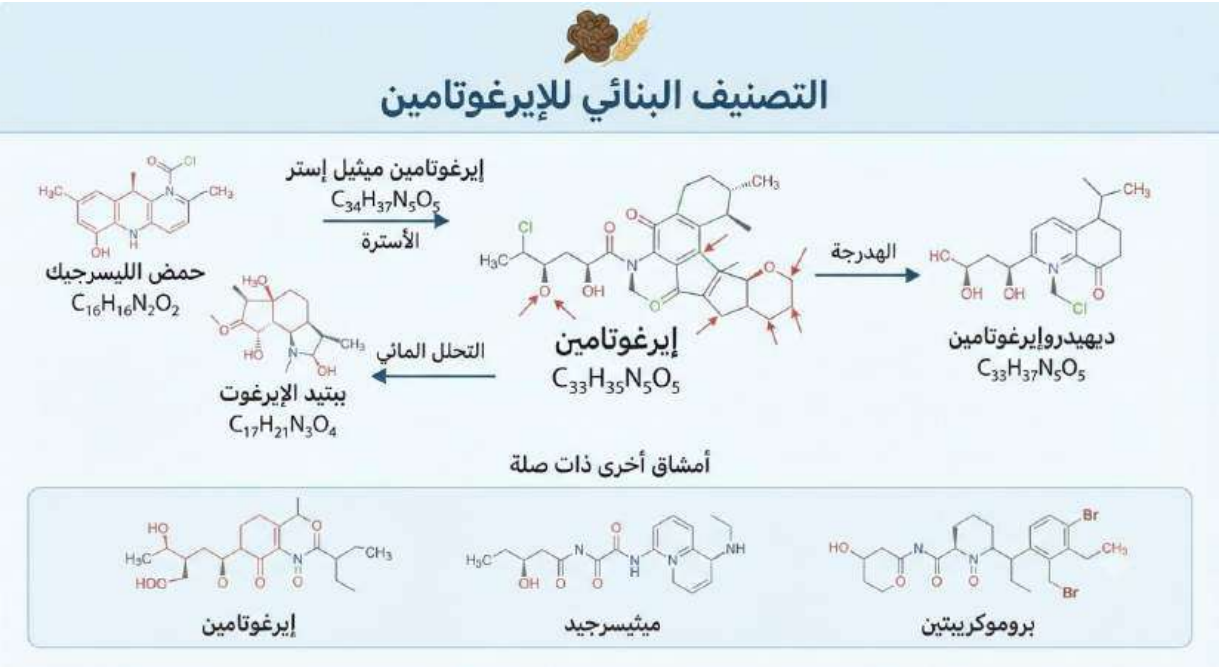
الزيرالينون هو مشتق من البنزوكساسيكلوتيترايسيدين يُنتَج في الفيوزاريوم الحبوبي (/ Fusarium graminearum Gibberella zeae) والأنواع ذات الصلة، ويقترن أساساً بالذرة (Zea mais). وهو من أكثر السموم الفطرية انتشاراً على نطاق واسع. ويصعب للغاية تقييم التأثيرات السامة لدى البشر، حيث إنه في حالات الحبوب الملوثة، توجد عدة سموم فطرية في وقت واحد. وتحدث تأثيرات مُخلّة بالغدد الصماء في الحيوانات، ولكن لم يتم الإبلاغ عن ذلك في حالات التفشي المذكورة أعلاه، والتي تضمنت كلاً من الديوكسينيفالينول والزيرالينون (IARC 1993c). وتم نشر مراجعة حديثة حول سمية الزيرالينون بواسطة زين الدين وآخرون (Zinedine et al. 2007).

يُعد الزيرالينون نايضاً لـلـ سيرونال (zeronal)، وهو محفز نمو استروجيني غير ستيرويدي محظور استخدامه في الحيوانات المنتجة للغذاء في الاتحاد الأوروبي. ونتيجة لذلك، تم ابتكار طرق لتحديد المركب الأصلي ونايضه في بول الأبقار. طبق ششميت وآخرون (Schmidt et al. 2008) مطياف الكتلة للوني السائل (LC-MS/MS) للفحص عن الستلبينات والسيرونال والزيرالينون في البول، وكانوا قادرين على اكتشاف وتقدير هذه المواد بمستويات أقل من 1.5" mg/L" . ونظراً لأن البشر يتعرضون عادةً لعدد من سموم الفيوزاريوم من خلال الحبوب الملوثة، فقد تم تطوير معظم الطرق التحليلية للاستخدام على هذه المواد الغذائية لتحديد وقياس عدد من السموم الفطرية في إجراء واحد. وتمت مراجعة تطبيق اللوني الطبقي الرقيق (TLC) في تحليل السموم الفطرية (Lin et al. 1998). ويُعد اللوني الطبقي الرقيق مفيداً للفحص السريع للسموم الفطرية في الغذاء مع حدود اكتشاف منخفضة تصل إلى 1" ng/kg" لأفلاتوكسين-B1 في الأعلاف، و0.3" mg/kg" لأوكراتوكسين-A في كلى الخنزير، و20" mg/kg" للزيرالينون في الحبوب. وقُمّت معظم الطرق الكمية على أساس الكشف عن التقاط الإلكترون الغازي اللوني (GC-ECD)، ولكن تم تطبيق اللوني السائل (HPLC) أيضاً. وصف كرشْكا (Krska 1998) إجراءات التنقية لتحليل الزيرالينون في الذرة والتريكوثيسينات في القمح في نطاق الميكروغرام لكل كيلوغرام، بناءً على الألفة المناعية وأعمدة التنقية متعددة الوظائف. وتم وصف طريقة لتحليل مطياف الكتلة للغاز اللوني (GC-MS) المباشر النوعي والكمي لثمانية سموم فطرية مختلفة، بما في ذلك الديوكسينيفالينول، وسم T-2، والزيرالينون، بواسطة أونجي وآخرون (Onji et al. 1998)، مع حدود اكتشاف منخفضة تبلغ 0.1إلى 0.5" mg/kg" ومستويات استرداد تبلغ حوالي 90%. وتمت مراجعة الطرق التحليلية لسموم الفيوزاريوم الديوكسينيفالينول وسم T-2 بواسطة كوخ (Koch 2004). ومع التطورات الكبيرة في تكنولوجيا مطياف الكتلة للوني السائل منذ ذلك الحين، أصبحت الأخيرة التقنية الرئيسية للتحليل المتعدد للسموم الفطرية في المواد الغذائية. على سبيل المثال، استطاع سوليوك وآخرون (Sulyok et al. 2006) تطوير طريقة مطياف الكتلة للوني السائل (LC-MS/MS) لتحديد 39 سمّاً فطرياً في القمح والذرة، بما في ذلك الزيرالينون والمشتقات ذات الصلة. وبسبب التنوع الكيميائي للمواد التحليلية، تم تطبيق وضعي التأيون بالرش الكهربائي للإيونات الموجبة والسالبة (ESI) في شوطين كروماتوجرافيين متتاليين. وكان ممكناً عن طريق استخلاص العينات بمزيج من الأسيتونتريل والماء وحمض الخليك (79:20:1) حقن المستخلصات الخام المخففة بنسبة 1+1دون مزيد من التنقية. ومؤخراً، أبلغ ديانا دي مافونغو وآخرون (Diana Di Mavungu et al. 2009) عن استخدام مطياف الكتلة للوني السائل (LC-MS/MS) مع تأيون الرش الكهربائي للإيونات الموجبة للتحليل المتعدد للسموم الفطرية في المواد الغذائية مثل إيسوفلافونات الصويا، ونبتة سانت جون، والثوم، والجنكة بيلوبا، والفجل الأسود. ووجدوا أن مذيب الاستخلاص الأمثل هو مزيج من أسيتات الإيثيل

وحمض الفورميك (95:5) وقاموا بتنقية المستخلصات بواسطة مجموعة من التوزيع السائل-السائل مع الهكسان وخراطيش الاستخلاص الصلب. وكانت حدود الاكتشاف وحدود التعيين في نطاق 0.3إلى 30و1 إلى 100" ng/g" على التوالي.

الإرغوت (Claviceps purpurea)

يُشار إلى التسمم بقلويدات الإرغوت (ergot alkaloids) التي تنتجها عفنة الأرغوت (Claviceps purpurea) عادةً باسم التسمم بالإرغوت (ergotism)، وهو على الأرجح أقدم مرض منقول بالغذاء مسجل ذو أصل فطري. تنمو الأرغوت (Cl. purpurea) على حبوب الطعام، ولا سيما الجودار (القمح الأسود)، أثناء المواسم الرطبة. وتشمل أعراض التسمم بالإرغوت الاحمرار، والإسهال، والقيء، والشعور بالحرقان في الأطراف، وفي النهاية الغرغرينا. وتتمثل تأثيرات الجهاز العصبي المركزي (CNS) في التشنجات، والكتاليبسي (الجمود التخشبي)، والبلادة أو الإثارة الهوسية. ويمكن تفسير هذه الأعراض من خلال الخصائص الدوائية لقلويدات الإرغوت، والتي قد تسبب حصاراً لأستات ألفا الأدرينالية، فضلاً عن مناهضة السيروتونين. وقد تم استخدام قلويدات الإرغوت مثل الإيرغوتامين (وهو الأكثر شهرة، شكل 3) والإيرغوميترين (أو الإيرغونوفين) لقرون كعوامل علاجية لتحفيز تقلصات الرحم وفي علاج نوبات الصداع النصفي. ويمكن علاج الجرعات الزائدة من هذه العوامل، والتسمم بقلويدات الإرغوت من مصادر أخرى، بشكل أعراضي باستخدام أدوية موسعة للأوعية الدموية قوية مثل نيتروبروسيّد الصوديوم، ومن خلال الحفاظ على دورة دموية ملائمة.



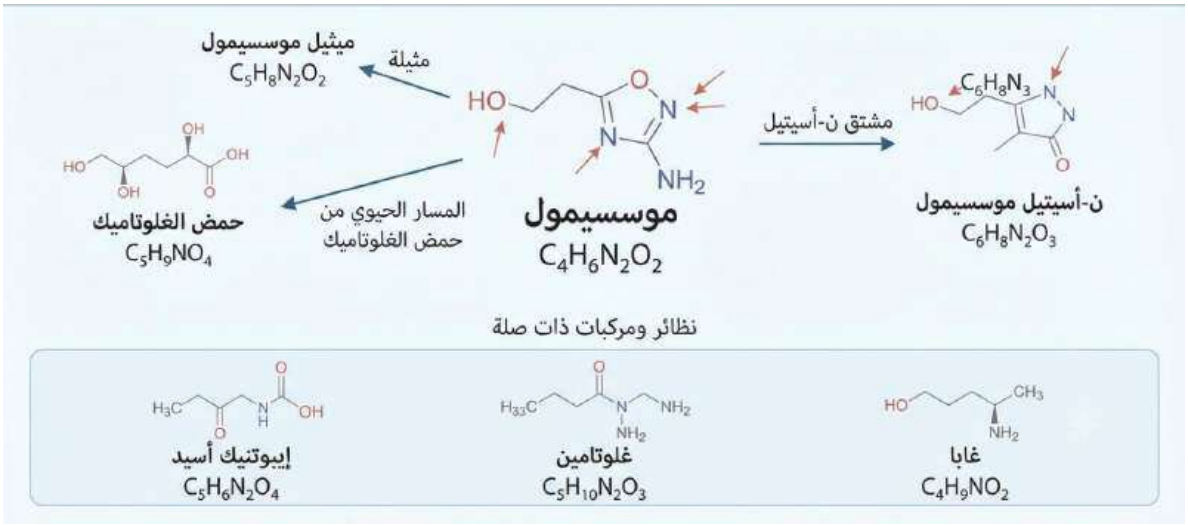
شكل 3: إيرغوتامين (Ergotamine) , ومشتقاته

تُعد الطريقة المفضلة لتحليل قلويدات الإرغوت في المصل هي اللوني السائل عالي الأداء (HPLC) مع الكشف الفلوري بعد الاستخلاص السائل-الصلب (Moubarak et al. 1996). تمت مراجعة الكيمياء الهيكلية ومقارنة التقنيات التحليلية المتاحة لقلويدات الإرغوت بشكل مكثف بواسطة فليغر وآخرون (Flieger et al. 1997). وقد نشر كُرشْكا وآخرون (Krska et al. 2008) مراجعة حول تحليل قلويدات الإرغوت في عينات الحبوب عن طريق اللوني السائل مع كشف مصفوفة الثنائي (diode array detection) ومطياف الكتلة للوني السائل (LC-MS/MS).

الفطر السام (Mushrooms)

أمانيتا موسكاريا (Amanita muscaria)

يحتوي عدد من البازيديات (basidiomycetes) على مبادئ هلوسة، وأفضل الأمثلة المعروفة هي أنواع الأمانيتا موسكاريا (Amanita muscaria) والسيليوسيب (Psilocybe). يُعد فطر غراب الموت أو غراب الطيور (Am. muscaria) الفطر الأوروبي النموذجي "أم كل الفطريات" في الأساطير والقصص الخيالية، وله قلنسوة حمراء وبقع بيضاء. وهو متوطن في نصف الكرة الشمالي، ولكنه يوجد أيضاً في بعض أجزاء جنوب إفريقيا وأمريكا الجنوبية وأستراليا ونيوزيلندا. وعلى عكس الاعتقاد السائد، لم يتم الإبلاغ عن أي حالات وفاة بين البشر. وأهم سم في فطر (Am. muscaria) ليس المسكارين (الذي يظهر بكميات ضئيلة) بل حمض الإيبوتينيك (ibotenic acid) ونتيجته من نزع الكربوكسيل المسمى موسسيمول (muscimol). عادةً ما ينتج التسمم بفطر (Am. muscaria) عن الابتلاع المتعمد للحصول على استجابة نفسية مياعة وتحدث الأعراض في غضون 20 إلى 180 دقيقة. ويُعد موسسيمول (شكل 4) ناهضاً لمستقبلات حمض غاما-أمينوبوتيريك ("GABA"). وهو يسبب اكتئاب الجهاز العصبي المركزي مما يؤدي إلى النعاس والدوزة، يليه الابتهاج، وزيادة النشاط الحركي، والرعاش، والاضطراب، والهلوسة. لا توجد مضادات محددة، ويكون الشفاء تاما عند الاستيقاظ.



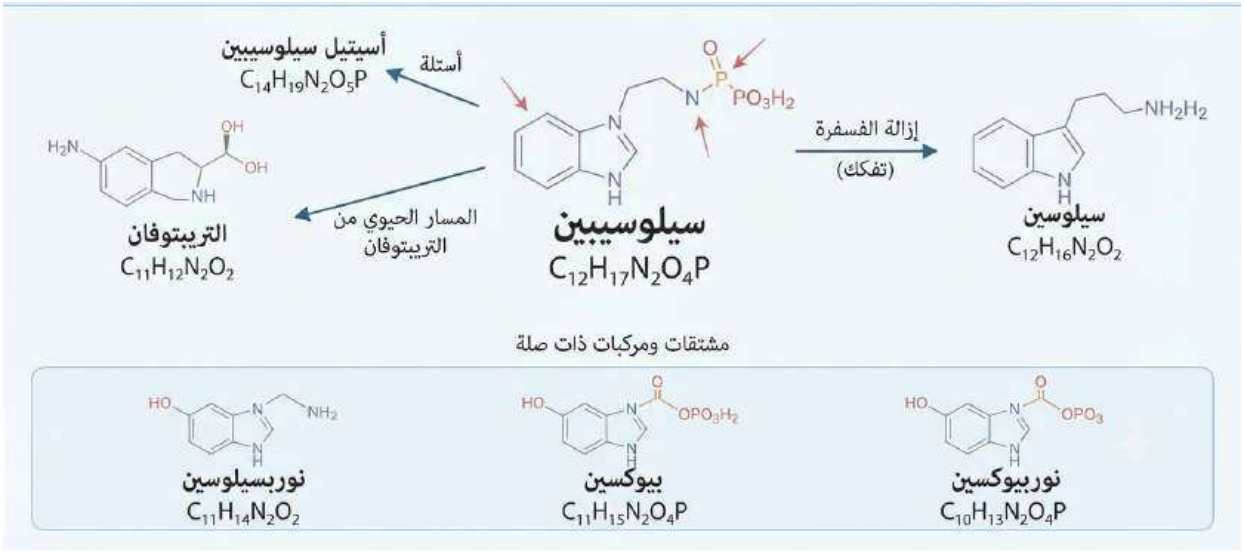
شكل 4: موسسيمول (Muscimol).

لا توجد إجراءات مصدقة متاحة لتحليل حمض الإيبوتينيك والموسسيمول في الدم أو البول. أما لتحديدها في الفطر، فقد تم وصف طريقة اللوني السائل عالي الأداء الأزواج الأيونية (ion-pair HPLC) مع الكشف بالأشعة فوق البنفسجية بعد الاستخلاص بالميثانول (Tsunoda et al. 1993). وفي الآونة الأخيرة، تم نشر طرق لتحليل حمض الإيبوتينيك في الفطر المجفف باستخدام مطياف الكتلة للغاز اللوني (GC-MS) (Tsujikawa et al. 2006) ومطياف الكتلة للوني السائل (LC-MS) (Tsujikawa et al. 2007).

نوع السيليوسيب (Psilocybe type)

يُنتج "متلازمة السيليوسيب" (psilocybe syndrome) عن استهلاك واحد من العديد من أنواع الأجناس واسعة الانتشار مثل السيليوسيب (Psilocybe)، أو البانيولوس (Panaeolus)، أو كوبيلانديا (Copelandia)، أو غيمنوفيلوس (Gymnophilus)، أو ستروفاريا (Stropharia). تحتوي هذه الفطريات على عقار الهلوسة إندول-ألكيل أمين سيلوسيبين (psilocybin، شكل 5) وناظره منزوع الفسفور سيلوسين (psilocin)، والذي يُعد أقوى بنحو 1.5 مرة من السيلوسيبين.

وتعتبر هذه المواد المهلوسة أقل قوة بنحو 100 مرة من ثنائي إيثيل أميد حمض الليسرجيك (LSD، ليسيرجيد). وعادةً ما يكون التسمم بالفطريات المحتوية على السيلوسيبين متعامداً. تشبه بعض التفاعلات الجسدية للسيلوسيبين التأثيرات مضادة الكولين، على سبيل المثال اتساع الحدقة (mydriasis) واحتباس البول، والتي قد يتم عكسها بنجاح باستخدام الفيزوستيغليوم (De Wolff and Pennings 1995). وقد أدى شاب يبلغ من العمر 18 عاماً استهلك فطر السيليوسيب نصف القتلي (Psilocybe semilanceata) إلى الإصابة بنوبات صرع، ومتلازمة وولف-باركنسون-وايت، وعدم انتظام ضربات القلب، واحتشاء عضلة القلب (Borowiak et al. 1998).

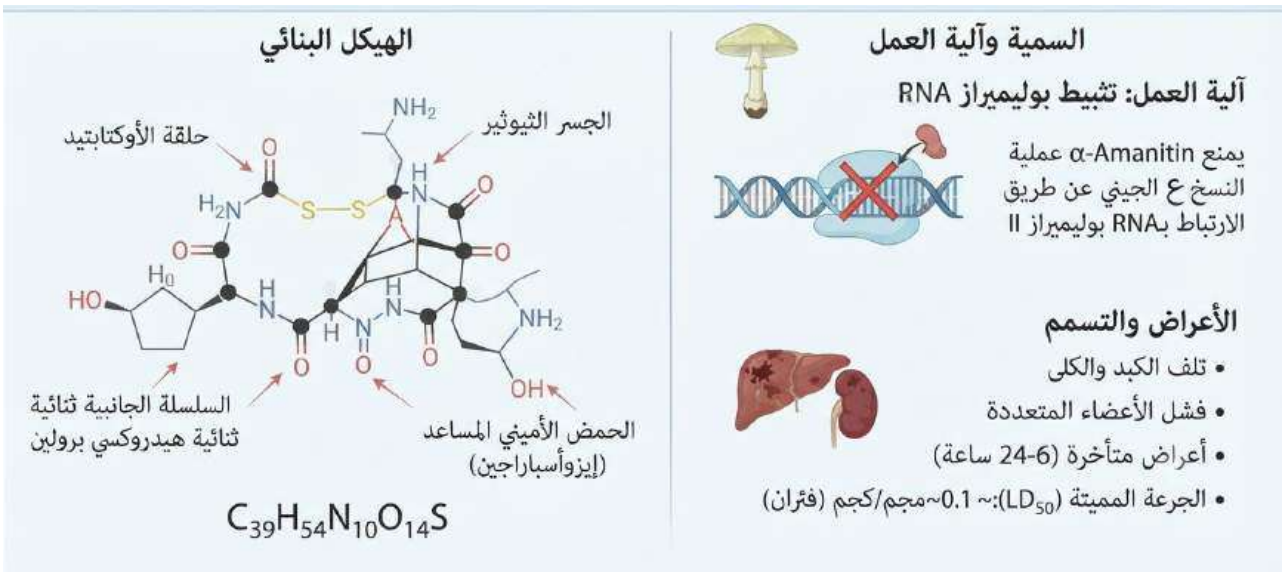


شكل 5: سيلوسيبين (Psilocybin).

قد يُساعد قياس السيلوسيبين وقلويدات الإندول ذات الصلة في عينات الفطر أو مواد المريض في تشخيص وعلاج المرضى المشتبه في إصابتهم بالتسمم. وقد تم وصف طريقة لوني طبقي رقيق (TLC) (Stienstra et al. 1981)؛ حيث يتم جعل عينة بول حجمها 20" mL" قلوية بـ 25% من الأمونيا إلى درجة حموضة 10، وتتركيزها على عمود إكسترلوت (Extrelut)، واستخلاصها بـ 30" mL" من إيثيل الأثير. ويتم إذابة الراسب الجاف في 50" mL" من الإيثانول، وتُجرى عملية الفصل اللوني على صفائح هلام السيليكا "254_ "Fباستخدام الميثانول-الأمونيا 25%. ويتم تصور السيلوسيبين والسيلوسين تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية بطول موجي 254" nm" وبعد الرش بكاشف فان أورك (Van Urk's reagent) لمجموعات الإندول (رمادي-بنفسجي وأزرق باهت، على التوالي). وقد تم وصف إجراءات كمية باستخدام اللوني السائل عالي الأداء (HPLC) (Christiansen and Rasmussen 1983; Hasler et al. 1997; Koike et al. 1981; Kysilka and Wurst 1989; Lindenblatt et al. 1998) أو قياس الطيف التنقلي للأيونات ومطياف الكتلة للغاز اللوني (Keller et al. 1999). وفي الممارسة السريرية والشرعية، تبدو طريقة اللوني السائل عالي الأداء مع الكشف الكهروكيميائي، كما وصفها هاسلر وآخرون (Hasler et al. 1997)، هي الأكثر فائدة. يتطلب عدم الاستقرار العالي للمواد التحليلية اتخاذ تدابير خاصة لمنع الأكسدة أثناء إجراء التنقية. ويعطي الاستخلاص الطور الصلب بمواد الطور العكسي نتائج غير مرضية، بينما ينتج عن غسيل الدقيقة (microdialysis) استردادات أقل ولكن مع تحسين التكرار. ويمكن قياس تتركيز السيلوسين في بلازما البشر في نطاق الميكروغرام لكل لتر.

أمانيتا فالويدس (Amanita phalloides)

تُعد السموم المستمدة من فطر أمانيتا فالويدس (Amanita phalloides) وأنواع الغاريقونية (Agaricales) ذات الصلة من أكثر المواد الطبيعية فتكاً. وفي البلدان التي يفتقر فيها استهلاك الفطر البري إلى الشعبية، كما هو الحال في وسط وشرق أوروبا وبعض دول البحر الأبيض المتوسط، يُبلغ عن مئات الوفيات كل صيف وخريف. وتتمثل المبادئ السامة في عديد الببتيدات الحلقية: فالبالوتوكسينات (phallotoxins) هي سباعي ببتيد ثنائي الحلقة؛ والويروتوكسينات (virotoxins) هي سباعي ببتيد أحادي الحلقة؛ والأماتوكسينات (amatoxins) هي ثماني ببتيد ثنائي الحلقة (شكل 6).



شكل 6: ألفا-أمانيتين (α-Amanitin).

يتمثل التأثير البيوكيميائي الأهم للأماتوكسينات في التثبيط غير العكوس لبوليميراز الحمض النووي الريبي (RNA) الثاني؛ بينما تحفز البالوتوكسينات بلمرة الأكتين-G وتثبت خيوط الأكتين-F(De Wolff and Pennings 1995; Vetter 1998).

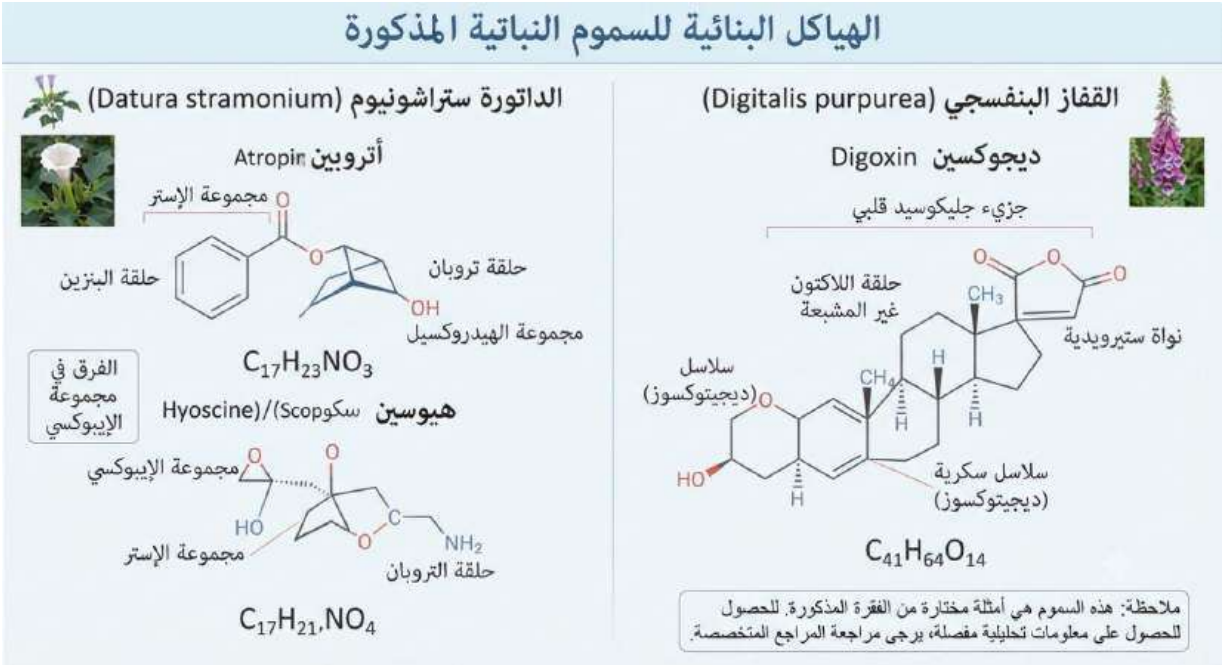
يمكن تقسيم أعراض التسمم بفطر (Am. phalloides) تقريباً إلى ثلاث مراحل: تظهر الأولى بعد أكثر من 6 ساعات من استهلاك الفطر وتتميز بالقيء العنيف وإسهال شبيه بالكوليرا، وتُعزى هذه المرحلة إلى تأثير البالوتوكسينات، وعادةً ما يمكن علاجها بنجاح عن طريق تعويض السوائل والإلكتروليتات. وتحدث المرحلة الثانية بعد 2 إلى 3 أيام كهدأة مؤقتة، وهي مع ذلك مخادعة، حيث تبدأ المرحلة الثالثة الأكثر خطورة في الحدوث، وتتميز بأعراض كبدية كلوية ناتجة عن تأثير الأماتوكسينات على بوليميراز الحمض النووي الريبي (RNA). وتتضح إصابة الكبد بارتفاع هائل في أنشطة أمينوترانسفيراز المصل. وقد تم اقتراح العديد من الترياق ضد الأماتوكسينات، ولكن لم يثبت نجاح أي منها، حيث تظهر الأعراض الكبدية الكلوية فقط بعد الارتباط غير العكوس للسموم بإنزيمه المستهدف. ويبدو أن زراعة الكبد هي الخيار الوحيد للعلاج الأعراضي الفعال (De Wolff and Pennings 1995).

لقد ثبت أن تحديد وقياس السموم في الدم لأغراض تشخيصية يمثل تحدياً كبيراً بسبب تراكيبها الكيميائية المعقدة وتراكيز البلازما المنخفضة. وقد نُشر مقايسة مناعية إشعاعية سريعة بحد اكتشاف يبلغ 3" ng/mL" بواسطة فولستيش وآخرون (Faulstich et al. 1982). ومنذ ذلك الحين، تم وصف عدد من طرق اللوني السائل عالي الأداء (HPLC)، كما تمت مراجعتها بواسطة دوريزي وآخرون (Dorizzi et al. 1992)، ولكن غالباً مع إجراءات معالجة مسبقة معقدة للعينة. ويمكن أن يحقق الكشف الكهروكيميائي حساسية قدرها 2" mg/L" . ويحتوي إجراء مطياف الكتلة للوني السائل (LC-MS) للألفا

والبيتا أمانيتين الذي وصفه مورر (Maurer 1998) على حد اكتشاف يبلغ 10" mg/L" . وأبلغ فيليغينزي وآخرون (Filigenzi et al. 2007) عن طريقة لتقدير كمية ألفا-أمانيتين في المصل وعينات الكبد المتجانسة والتي تتضمن ترسيب البروتينات بالأسيتونتريل وتليها تبادل كاتيوني للاستخلاص الطور الصلب (SPE) والتحليل على نظام مطياف الكتلة للوني السائل ذي مصيدة الأيونات الخطية (linear ion trap LC-MS). وتتمتع الطريقة بحد اكتشاف قدره 0.26" mg/kg" في المصل و0.50" mg/kg" في الكبد. وفي 11 حالة من سلسلة تضم 45 مريضاً تم إدخالهم إلى المستشفى بسبب التسمم بفطر (Am. phalloides)، تراوحت مستويات البلازما من 8" mg/L" إلى 190" mg/L" لألفا-أمانيتين ومن 15.9" mg/kg" إلى 162" mg/kg" لبيتا-أمانيتين. وكانت الأاماتوكسينات قابلة للاكتشاف بشكل عام في عينات البلازما المأخوذة في غضون 36 ساعة من القبول، ولكنها ظلت موجودة في عينات البول لمدة تصل إلى 4 أيام (Jaeger et al. 1993).

النباتات العليا (Higher plants)

في هذا القسم، تم اختيار عدد محدود من السموم النباتية الأقل شهرة. أما بالنسبة للسموم الأكثر شهرة، مثل الأتروبين (atropine) والهيوسين (hyoscine) المستمدين من نبات الداتورة ستراشونيوم (Jimson weed / Datura stramonium)، أو الديجوكسين (digoxin) من نبات القفاز البنفسجي (Digitalis purpurea)، يُحَال القارئ إلى قسم الدراسات الأحادية (monographs) في هذا الكتاب وإ إلى الأدبيات العقاقيرية المتخصصة. ولنظرة عامة شاملة حول تحليل السموم النباتية، يُرجى مراجعة (Gaillard and Pepin 1999).



خروع الحراشف (Ricinus communis)

تُعد حبوب نبات خروع الحراشف (Ricinus communis) مصدر زيت الخروع وتتكون أساساً من ثلاثي غليسريد حمض الريسينولييك (12-هيدروكسي أوليك). يُعرف زيت الخروع جيداً بتأثيره المسهل، وهو قوي لدرجة أنه قد يؤدي إلى مغص والجفاف. كما يحتوي نبات (R.communis) على ببتيد الريسين (ricin) شديد السُمّية، والذي يتواجد في قشور البذور. الريسين هو لكوتين (lectin) يتكون من سلسلتين ببتيديتين تبلغ زنة كل منهما 34" kDa" ، متصلتين عبر رابطة ثنائي السلفيد. إحدى السلسلتين (السلسلة A) سامة لأنها تثبط تخليق البروتين. أما السلسلة B فهي لكوتين يرتبط بالغالاكتوز أو بـ N-

أستيل غالاكتوزامين، وهي مسؤولة عن ارتباط الريسين بمستقبلات سطح الخلية (Narang et al. 1997; Wellner et al. 1995). لا يذوب الريسين في الدهون، ولهذا السبب لا يتواجد في زيت الخروع الطبي. قد يكون للريسين استخدام علاجي كسم مناعي (immunotoxin) في علاج الانبثاث السرطاني السحائي (leptomeningeal carcinomatosis) (Muraszko et al. 1993; Woo et al. 1998, 2001).

تشير تجارب الحيوانات إلى أن الكبد هو العضو المستهدف الأساسي في التسمم بالريسين (Balint and Halasz 1972). كما تم توضيح التجمع داخل الأوعية الدموية لكريات الدم الحمراء، والقصور الحاد في قشرة الكظر والكلى (Balint 1978).

لفتت السمية الشديدة للريسين انتباه الجمهور لأول مرة بعد قضية ماركوف في عام 1978 في المملكة المتحدة. ففي تلك القضية، طعن جورجي ماركوف، وهو صحفي بلغاري في المنفى، في فخذه بمظلة، وفي غضون ساعات قليلة أصيب بحمى عالية وارتفاع في عدد كريات الدم البيضاء، يتبع ذلك انخفاض في ضغط الدم ودرجة حرارة الجسم، وتوفي في اليوم الثالث. وفي الفحص بعد الزم، تم العثور على كرة صغيرة من البلاتين والإيريديوم تحتوي على ثقوب دقيقة في الأنسجة تحت الجلد. وعلى الرغم من أن وجود الريسين في الرصاصة لم يتم تأكيده تحليلياً، إلا أن الأعراض أدت إلى استنتاج أن الريسين هو السم المسؤول.

يُعد الابتلاع الفموي للريسين خطيراً للغاية وقد يسبب تراص كريات الدم الحمراء، وتهيج الجهاز الهضمي النزفي، والقيء، وإسهال مائي أو دموي غزير، وحمى، وتشنجات، والوفاة. وقد تم الإبلاغ عن الوفاة بعد استهلاك حبة خروع واحدة (Knight 1979)، على الرغم من أن آخرين نجوا من ابتلاع ما يصل إلى 10 إلى 15 حبة (Aplin and Eliseo 1997). وهناك أدلة على أن الريسين قد تم التوصية باستخدامه في الهجمات الإرهابية. إن حقيقة أن الريسين يمكن امتصاصه عبر الرئتين وقدرة سميته الاستنشاقية المميتة المقدرة بنحو 5" إلى " 10" mg/kg" تعني أن الريسين يمثل تهديداً خطيراً في هذا الصدد. تمت مراجعة سمية الريسين بواسطة برادبيري وآخرون (Bradberry et al. 2003) وأودي وآخرون (Audi et al. 2005). ويتم حالياً تطوير لقاحات لعلاج التسمم بالريسين؛ حيث تمثل النهج الأكثر واعدة في الهندسة الوراثية للوحدة الفرعية A للقضاء على نشاطها الإنزيمي وقدرتها على إحداث تسرب وعائي. ويُذكر أن الوحدة الفرعية غير السامة تحفز الأجسام المضادة في الحيوانات، مما يحميها لاحقاً ضد تأثيرات الجرعات الكبيرة من الريسين.

من المخطط أن يتم إعطاء اللقاح عن طريق الفم أو الأنف (Doan 2004). وابتكر غودال وآخرون (Godal et al. 1981) مقايسة مناعية إشعاعية للريسين تم تطبيقها لاحقاً في مريض ابتلع 30 حبة خروع في محاولة انتحار؛ حيث كان الحد الأقصى لمستوى البلازما في اليوم الأول 1.5" mg/L" ، مع نصف عمر بيولوجي يبلغ حوالي 8 أيام. وفي البول، أصبح الريسين قابلاً للاكتشاف فقط في اليوم الثالث بتراكيز منخفضة تبلغ حوالي 0.3" (Kopferschmitt et al. 1983) "mg/L. كما تم الإبلاغ عن طرق لتحديد وقياس الريسين في الأنسجة بناءً على اختبار (ELISA) (Griffiths et al. 1986; Leith et al. 1988). ومع تضخيم مركب الإفريدين-بيوتين المناعي البيروكسيداز، يمكن الوصول إلى حد اكتشاف منخفض يصل إلى 0.2" mg/L" من مستخلص الأنسجة. وباستخدام إجراء مناعي مشابه مع كشف التلألؤ اللمعاني (chemiluminescence)، حقق بولي وآخرون (Poli et al. 1994) حد تعيين في نطاق 0.1" إلى " 1.0" mg/L" .

تُعد طريقة نارينغ وآخرون (Narang et al. 1997) طريقة حساسة ودقيقة لقياس الريسين في السوائل، وذلك باستخدام مستشعر بصري أليفي فلوري ونظام مقايسة مناعية شطيرية للإفريدين-بيوتين. ويبلغ نطاق التعيين الخطي 0.1" إلى " 200" mg/L" . وقد تم نشر مراجعة حديثة حول تحليل عوامل الحرب المحتملة بما في ذلك الريسين، وسم المكورات العنقودية B، وسم T-2 بواسطة لير وآخرون (Ler et al. 2006). وتمت مراجعة الجوانب الميكانيكية والتاريخية والتحليلية للريسين بواسطة موسهوف ومادیا (Musshoff and Madea 2009).

الحناء (Lawsonia inermis - henna)

الحناء هي صبغة نباتية لونهَا أخضر مائل للبني تُصنع من أوراق نبات الحناء (*Lawsonia inermis*)، وهو نبات مزهر ينتمي إلى الفصيلة الخدرية (Lythraceae). الصبغة الرئيسية هي المركب العطري 2-هيدروكسي-4،1-نافثوكينون (2-hydroxy-1,4-naphthoquinone)، المعروف أيضاً باسم لوسون (lawsone) أو حمض الهينوتانيك، ويمكن أن يسبب هذا المركب تفاعلات ضارة بعد تطبيق الحناء على الجلد. تم الإبلاغ عن انحلال دم حاد داخل الأوعية الدموية بعد التطبيق الموضعي للحناء لدى الأطفال الذين يعانون من نقص إنزيم جلوكوز-6-فوسفات ديهيدروجينيز (G6PD)(Katar et al. 2007).

ومع ذلك، تُعد تفاعلات اللوسون غير شائعة، وغالبًا ما تنجم معظم الآثار الضارة الناتجة عن تطبيق الحناء عن التفاعلات مع مادة بارا-فينيليين ديامين (*p*-phenylenediamine أو PPD)، والتي يتم إضافتها أحيانًا إلى الحناء لزيادة كثافة ومدة الوشم ولتسريع جفافه. وتتمثل التفاعلات الأكثر شيوعًا في فرط الحساسية الجلدي من النوع الرابع (type IV cutaneous hypersensitivity) مسببًا حساسية التلامس. وتعتبر الحساسية تجاه مادة PPD مدى الحياة، وقد تتفاعل هذه المادة تصالبيًا مع عدد من المركبات الدوائية، مثل السلفونيل يوريا والثيازيدات. يمكن تحديد حساسّية PPD عن طريق اختبار الرقعة (patch testing). وكانت هناك مطالبات بتقييد استخدام PPD في منتجات الحناء (Jacob et al. 2008). ويؤدي الابتلاع الفموي إلى وذمة مخاطية شديدة، وانحلال العضلات الخططية (rhabdomyolysis)، وانحلال الدم (Anuradha et al. 2004). ويمكن تحليل اللوسون في الحناء بواسطة اللوني الطبقي الرقيق عالي الأداء (HPTLC) (ElShaer et al. 2007)؛ أما بالنسبة لتحليل PPD، فيُحَال القارئ إلى قسم الدراسات الأحادية (monographs).

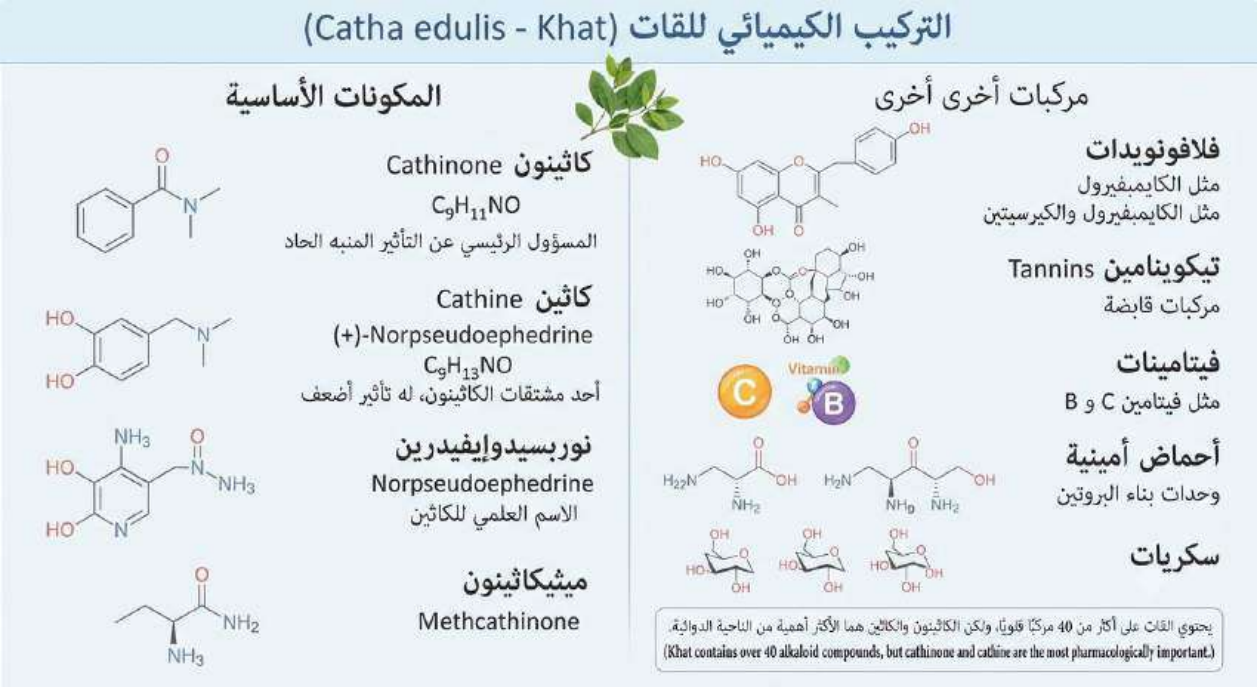
القات (Catha edulis - khat)

القات هو شجيرة دائمة الخضرة صغيرة تنتمي إلى منطقة القرن الإفريقي وفي غرب شبه الجزيرة العربية. يُمارَس مضغ أوراق القات في إفريقيا والصومال واليمن وكذلك في مجتمعات المهاجرين في أماكن أخرى من العالم (Pennings et al. 2008). ولا تتسق الرقابة التنظيمية في جميع أنحاء العالم. المركبان النشطان السائدان في القات هما القلويدات: 2-(2S)-أمينو-1-فانيل بروبان-1-ون (كاثينون / cathinone) و2-(1S,2S)-أمينو-1-فانيل بروبان-1-ول (نوربسودوافدرين أو كاثين / norpseudoephedrine أو cathine)؛ وكلاهما يحمل علاقة هيكلية بالأمفيتامين وله تأثيرات محاكاة الودي (sympathomimetic) بشكل أساسي. يُنتج الكاثينون المزيد من التأثيرات الإيجابية، بينما تعزى التأثيرات الجهازية السلبية إلى الكاثين (Cox and Rampes 2003). وُيرتبط استخدام القات بتأثير مثبط للشهية يشبه تأثير الأمفيتامينات (Pennings et al. 2008).

ارتبط استخدام القات بأمراض جسدية وعقلية؛ فقد وجد كوكس ورمبيس (Cox and Rampes 2003) زيادة خطر الإصابة بالذهان الشبيه بالفصام والهوس، وعادة في نوبات قصيرة، وكان الاكتئاب أكثر شيوعًا بعد التوقف عن الاستخدام المتكرر. ولدى القات أيضًا عدد من التأثيرات الجهازية، والتي تشمل اضطرابات نظم القلب، وارتفاع ضغط الدم، والإمساك، وزيادة خطر الإصابة بسرطان الرأس والعنق وكذلك سرطان الجهاز الهضمي العلوي. ويزداد خطر الإصابة باحتشاء عضلة القلب بشكل ملحوظ لدى المستخدمين بكثافة (Pennings et al. 2008). وبشكل مطلق، تُعد مخاطر القات الصحية منخفضة إلى حد ما (Pennings et al. 2008).

يمكن اكتشاف نواتج الأيض للقات في البول على شكل نورإيفيدرين حتى 48 ساعة بعد الاستهلاك، عن طريق المقايسة المناعية أو اللوني الغازي (GC) (Cox and Rampes 2003). وقد تم وصف تقدير كمية الكاثينون إلى جانب ثمانية أمينات فينيل ألكيل نباتية أخرى في البلازما بواسطة باير وآخرون (Beyer et al. 2007) باستخدام الاستخلاص الطور الصلب

(SPE) والتحليل بواسطة نظام مطياف الكتلة للوني السائل الترادفي (LC-MS/MS). وكان حد التعين (LOQ) هو 10 mg/Lلجميع المواد التحليلية.



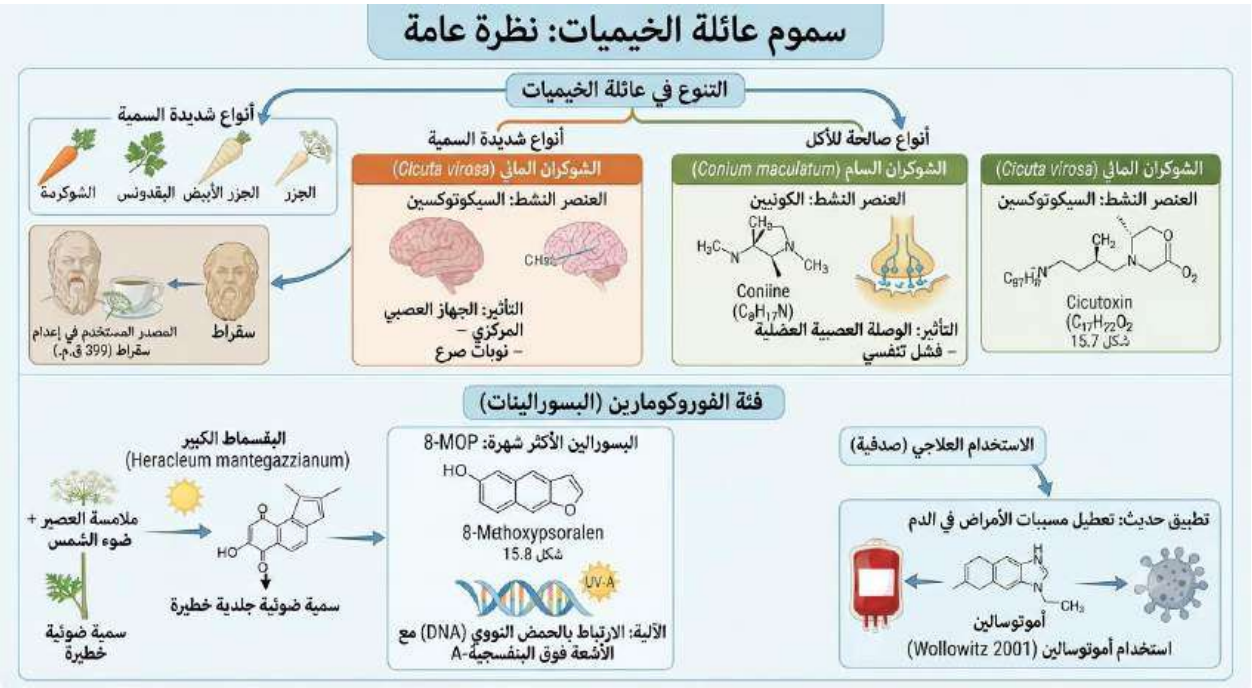
الخيميات (Umbelliferae)

تضم عائلة الخيميات أو الخيمية (Umbelliferae or Apiaceae - سُميت بهذا الاسم نسبة إلى نوراتها التي تشبه المظلة) عددًا كبيرًا من الأنواع شديدة السمية، إلى جانب العديد من الأنواع الصالحة للاستهلاك البشري، مثل الجزر، والبقدونس، والجزر الأبيض. وتعتبر الأنواع السامة الأكثر شهرة هي الشوكران المائي (Cicuta virosa) والشوكران السام (Conium maculatum). يحتوي الأول على مادة السيكوتوكسين (cicutoxin) متعددة الأين كعنصر نشط، بينما يحتوي الثاني على قلويد البيريدين الكونيين (coniine) (شكل 7). وكان نبات الشوكران السام ($C. maculatum$) مصدر السم المستخدم في إعدام سقراط في عام 399 قبل الميلاد. يؤثر السيكوتوكسين بشكل أساسي على الجهاز العصبي المركزي مسببًا نوبات صرع، بينما يؤثر الكونيين على الوصلة العصبية العضلية وقد يؤدي إلى الفشل التنفسي. كلا النباتين لهما معدل وفيات مرتفع للغاية بعد الابتلاع. وفي كلتا الحالتين، يكون العلاج عرضيًا ولا يعتمد على نتيجة التحليل السمومي. نشر باير وآخرون (Beyer et al. 2009) مراجعة لطرق تحليل عدد من القلويدات، بما في ذلك الكونيين، في العينات البيولوجية.

فئة أخرى من السموم تنتجها الخيميات وهي الفوروكومارين (furocoumarins) أو البسورالينات (psoralens)، وهي المبادئ النشطة لنبات البقسماط الكبير أو بشتنغ المشترك (Heracleum sphondylium) والتي قد تسبب سمية ضوئية جلدية خطيرة بعد ملامسة الجلد لعصير هذا النبات والتعرض لأشعة الشمس. والبسورالين الأكثر شهرة من نبات البقسماط هو 8-ميثوكسي بسورالين (8-methoxypsoralen أو 8-MOP؛ شكل 8)، والذي يُستخدم أيضًا في علاج الصدفية مع التعرض للأشعة فوق البنفسجية-A (De Wolff and Thomas 1986).

يمكن قياس البسورالينات في المصفوفات البيولوجية باستخدام اللوني السائل عالي الأداء (HPLC) (Herfst et al. 1980; Stolk et al. 1987). ويعتمد كل من الفعل السام والعلاجي على ارتباط المنتجات التفاعلية من 8-MOP، الناتجة عن التشعيع بالأشعة فوق البنفسجية، بالحمض النووي (DNA) في الخلايا القاعدية للبشرة.

من التطبيقات الحديثة للغاية للسمية الضوئية للبسورالين هي تعطيل مسببات الأمراض في الدم المتبرع به كمعالجة مسبقة لنقل منتجات الدم. والفوروكومارين المستخدم لهذا التطبيق هو أموتوسالين (Wollowitz 2001) (amotosalen).



شكل 8: 8-ميثوكسي بسورالين (8-Methoxypsoralen).

اللاتيرس ساتيفوس (Lathyrus sativus)

يحتوي نبات اللاتيرس ساتيفوس (*Lathyrus sativus*) على الحمض الأميني المحفز بيتا-*N*-أوكساليل أمينو-L-ألانين (L-BOAA)، والذي يُعد مسبب اضطراب التنكس العصبي المعروف باللاتيرزم (lathyrism)، والذي يظهر في العديد من أنحاء العالم. والآلية المحتملة لتأثير L-BOAAهي أنه كحمض أميني محفز للخلية العصبية الحركية فإنه يسبب السمية العصبية عن طريق فرط تحفيز مستقبلات الغلوتامات. وهذا الفعل نوعي مجسم؛ حيث تبدو متماكبات D-BOAA والمتماكب ألفا من BOAA خالية من التأثير السام للأعصاب.

يؤدي استهلاك البشر لـ 400 غرام من بذور *L. sativus*يومياً المطحونة إلى دقيق لصنع الخبز لفترة طويلة إلى ظهور أعراض مرض اللاتيرزم، والذي يُتميز بالخزل التشنجي للأطراف السفلى، وفي مرحلة أكثر تقدماً، بفقدان السيطرة على المثانة والمستقيم، وبالعجز الجنسي. ويُشكل الذكور الشباب الجزء الأكثر حساسية من السكان. ويقتصر العلاج على تقليل التشنج العضلي، مع بعض النجاح. للاطلاع على مراجعات حول مرض اللاتيرزم، انظر سبنسر (Spencer 1995) وبرسلوكس (Barceloux 2009)، والذي يتضمن بيانات حول تحليل السم.

السيكاس سيرسياليس (Cycas circinalis)

ترتبط السموم المستمدة من نخيل الساغو الكاذب السيكاس سيرسياليس (*Cycas circinalis*) باضطراب التنكس العصبي الذي يحدث في جزيرة غوام في غرب المحيط الهادئ، وفي شبه جزيرة كي اليابانية، وفي إيريان جايا (بابوا الغربية). وقد استُخدمت المخاريط الأنثوية لهذه الشجرة كمصدر غذائي للنشاء لقرون، ويُعتقد أن الاستهلاك مرتبط بحدوث مرض عصبي غريب يُعرف بمرض الخلايا العصبية الحركية الغوامية (GMND)، والذي يحدث في شكلين سريريين. يشبه الشكل الأول التصلب الجانبي الضموري ويتميز الشكل الثاني بالخرف والمظاهر خارج الهرمية. يحتوي بذر السيكاد على فئتين من المواد

ذات القدرة السامة للأعصاب - الأحماض الأمينية وغليكوسيدات الآزوكسي (azoxyglycosides). ونتيجة لتشابهها الكيميائي مع BOAA(انظر أعلاه) والمواصفات السريرية المشتركة بين اللاتيرزم والسيكاديزم، فقد كان يُعتقد لفترة طويلة أن الحمض الأميني بيتا-*N*-ميثيل أمينو-L-ألانين (BMAA) هو المسبب في مرض GMND، ولكن تم التشكيك في ذلك في السنوات الأخيرة. الأحماض الأمينية المثيرة السامة مثل BOAAلها هيكل ثنائي الكربوكسيل مشترك، والذي لا يظهر في BMAA. المرشح الأكثر ترجيحاً للسم العصبي الفعال هو السيكاسين (cycasin، ميثيل أزوكسي ميثانول-بيتا-D-غلوكوسيد)، والذي يتم تحويله أيضياً إلى ميثيل أزوكسي ميثانول بواسطة إنزيم بيتا-غلوكوسيديز. يُعد ميثيل أزوكسي ميثانول عاملاً مؤلكلاً مباشراً له خصائص سامة للكبد، ومطفرة، ومسرطنة، ومسخة. قد يغير أيضاً وظيفة الخلايا العصبية ما بعد الانقسام وبالتالي يُعجل بالتنكس البطيء التدريجي للخلايا (Spencer et al. 1991). وهناك دعم وبائي قوي لدور السيكاسين في إمراضية GMND، ربما بالاشتراك مع القابلية الموروثة (Roman 1996). وقد تم نشر طرق لتحليل كل من BMAAوالسيكاسين في دقيق السيكاد (Kisby et al. 1992). للاطلاع على مراجعة لمرض السيكاديزم، انظر دي وولف وبروين (De Wolff and Bruyn 1995).

بليجيا سابيدا (Blighia sapida)

يؤثر مرض القيء الجامايكي (Jamaican vomiting sickness) بشكل رئيسي على الأطفال الصغار وهو شكل من أشكال التهاب الكبد السام المرتبط بتناول أريل الفاكهة غير المتقنة لنبات الأكي، بليجيا سابيدا (*Blighia sapida*) (Sherratt 1995). تم استيراد شجرة الأكي إلى جزر الهند الغربية، ولكنها موطنها الأصلي غرب إفريقيا، وقد تم الإبلاغ عن حالات وفاة بين الأطفال في ساحل العاج (Foungbe et al. 1986) وفي بوركينا فاسو (Meda et al. 1999). يظهر المرض بقمة قيء شديد ونقص سكر الدم يليه أعراض عصبيّة، والتي تشمل التشنجات، والغيبوبة، والوفاة (Tanaka 1979). السم المسؤول هو الهيبوغليسين (hypoglycin)، وهو حمض 2-(S)-L-أمينو-3-ميثيلين سيكلوبروبيل بروبيونيك. تحتوي بذور الشوح الشائع (*Acer pseudoplatanus*) وفاكهة الليتشي (*سينينسيس Litchi*) أيضاً على الهيبوغليسين. تنتج معظم التأثيرات الأيضية للهيبوغليسين عن نايضه، ميثيلين سيكلوبروبيل أسيتيل-إنزيم المرافق-A (MCPA-CoA). فهو يثبط أكسدة الحمض الدهني بيتا، ويحفز بيلة الأحماض العضوية، ويثبط تكوين السكر في الدم. وقد قام شيرات (Sherratt 1995) بمراجعة الآلية البيوكيميائية للهيبوغليسين بالتفصيل.

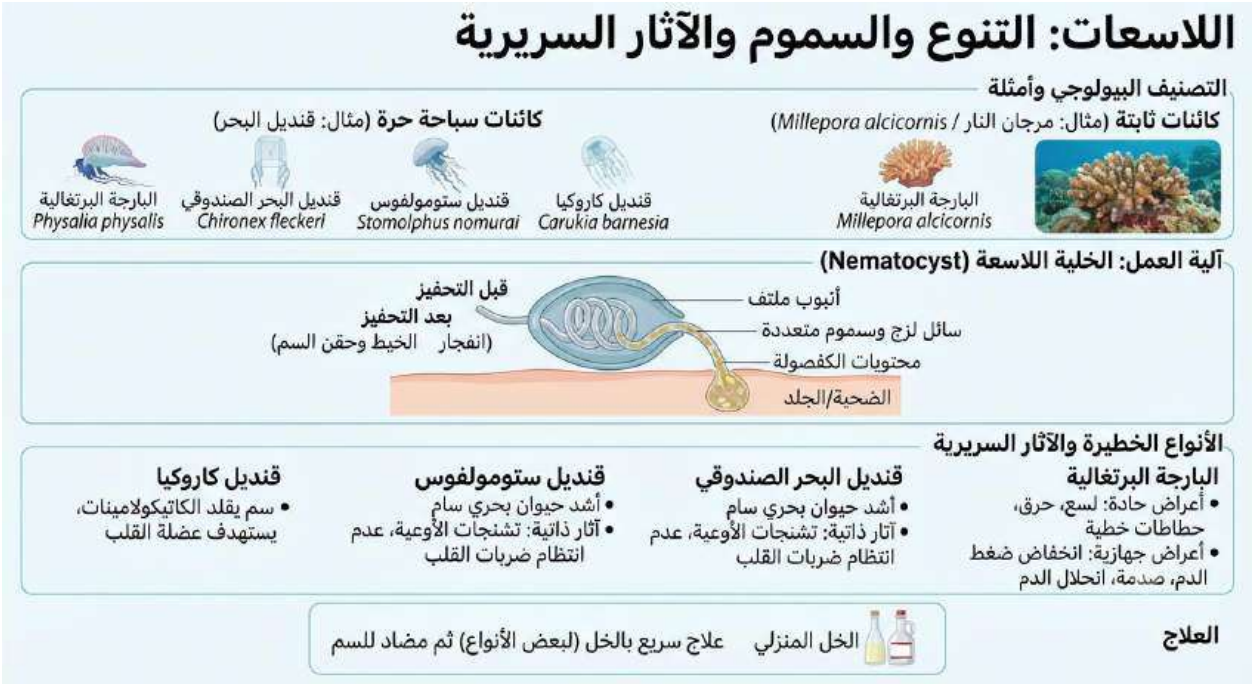
قد يُساعد إعطاء الغلوكوز عن طريق الوريد فور التشخيص في منع النتيجة المميتة، كما أن إعطاء الريبوفلافين، والغلايسين، وL-كارنيتين قد يكون فعالاً أيضاً (Sherratt 1995). واقترح كوبفر وإيدل (Kupfer and Idle 1999) الأزرق الميثيلين كدواء مضاد لتسمم الهيبوغليسين. لا توجد طرق متاحة لتكتشف الهيبوغليسين في سوائل الجسم لتأكيد التسمم المشتبه به. ومع ذلك، يمكن تأكيد التعرض للهيبوغليسين بشكل غير مباشر عن طريق قياس الأحماض ثنائية الكربوكسيل في البول (الأحماض الإيثيل مالونية، والغلوتارية، والأديبيكية) بواسطة اللوني الغازي (GC) مع كشف التأين لهب (FID) بعد الاشتقاق باستخدام مركب بيس(ثلاثي ميثيل سيل) تريفلوروأسيتاميد (Meda et al. 1999). وتم وصف طريقة لوني سائل عالي الأداء (HPLC) سريعة لتحليل الهيبوغليسين-A في فاكهة الأكي بواسطة غولدن وآخرون (Golden et al. 2002).

اللافقاريات (Invertebrates)

تُنتج العديد من أنواع الحيوانات التي لا تملك فقريات سموماً أو تحتوي على مواد سامة قد تكون ضارة للبشر، إما بشكل خارجي عن طريق اللسع أو بعد الابتلاع (Mebs 2002). وقد تم اختيار الأنواع الأكثر صلة من السموم هنا، مع التركيز على أنواع الرخويات التي تسبب عادة التسمم الغذائي البشري عن طريق نقل السموم المتراكمة التي تنتجها الكائنات الأولية. قد يكون علم السموم التحليلي أداة أساسية في الوقاية من هذه الأمراض المنقولة بالغذاء وإدارتها. كما يتم ذكر الحيوانات التي يُبلغ عن تسببها في التسمم باللسع (مثل ممثلي اللاسعات والمفصليات) باختصار.

اللاسعات (Cnidaria - يُعرف سابقاً بـ Coelenterata)

قد تكون اللاسعات كائنات ثابتة (مثل "مرجان النار" أو المليبرا ألسيكورنيس / *Millepora alcicornis*، المرتبط بالشعاب المرجانية في، على سبيل المثال، الكاريبي وأستراليا) أو سباحة حرة (مثل قنديل البحر، مثل البارجة البرتغالية أو فيزاليا فيزاليس / *Physalia physalis*). وهي تحتوي على خلايا لاسعة أو كيسات خيطية (nematocysts - كرات بحجم 40 μm تحتوي على سائل لزج يتكون من سموم متعددة) وأنبوب ملتف طويل يشبه الخيط (nema). وعندما تؤدي المحفزات الفيزيائية أو الاسموزية أو الكيميائية إلى تحفيز الكيس الخيطي، فإن ضغطها الداخلي ينتج انعكاساً متفجراً للخيط ويتم حقن محتويات الكيس السامة في الضحية (Schwartz and Meinking 1997).



يُعد قنديل البحر المعروف بالبارجة البرتغالية خطيراً بشكل خاص ويمكن أن يسبب الوفاة. وتحتوي كيساته الخيطية على مجموعة واسعة من المواد النشطة بيولوجياً، بما في ذلك الهيستامين، والسموم الحالة للدم، والفوسفوليبيز، والبروتياز، وسم عصبي قوي يُسمى الهيبنوتوكسين (hypotoxin). وتشمل الأعراض الحادة اللسع والحرق، يتبعها تطور حطاطات ونتوءات خطية مؤممة ومثيرة للحكة. وقد تشمل الأعراض الجهازية الحادة للتسمم بـالفيزاليا انخفاض ضغط الدم، والصدمة، والتشنجات، والرنح، وانحلال الدم، والفشل الكلوي الحاد. ومن قناديل البحر الأخرى التي قد تكون مميتة قنديل *Stomolphus nomurai*، الذي يتواجد في المياه المحيطة بالصين؛ وقد تم تسجيل ثماني حالات وفاة ناجمة عن الوذمة

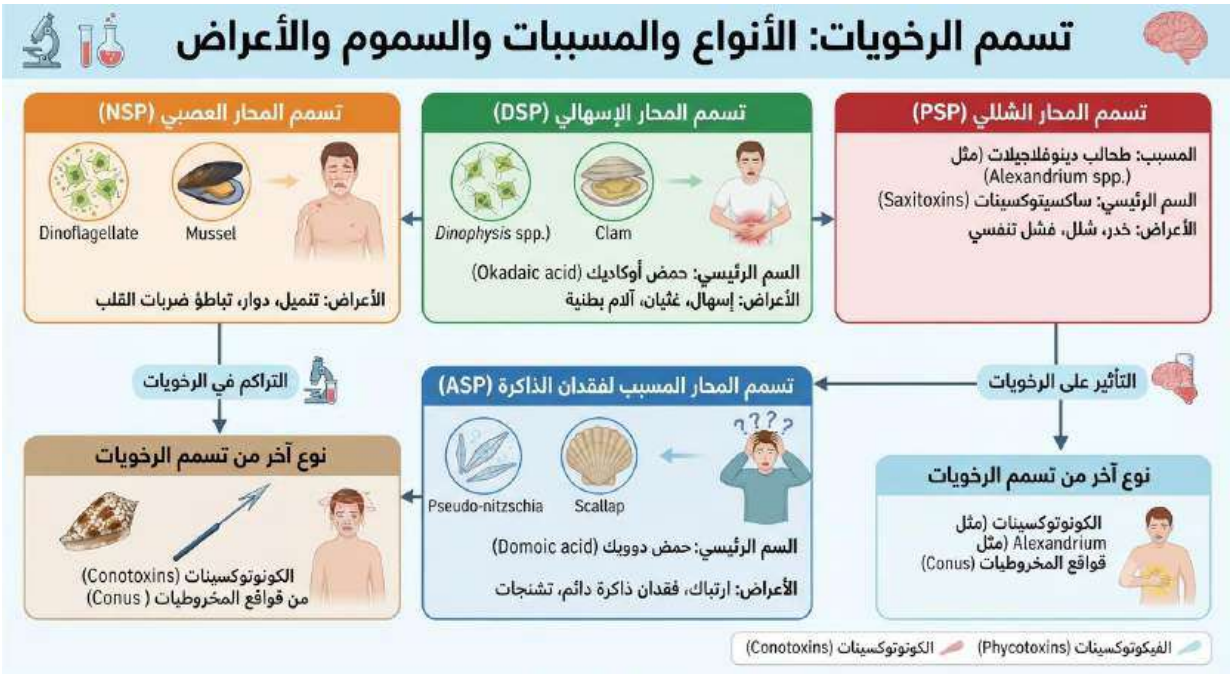
الرئوية أو السكتة القلبية بعد التسمم بهذا النوع (Burnett et al. 1996). ويُعد قنديل البحر الصندوقي *Chironex fleckeri*، المتواجد في منطقة الإندو-باسيفيك، أشد حيوان بحري سام في العالم، وهو مسؤول عن ما لا يقل عن 80 حالة وفاة مسجلة في أستراليا. وللسم مجموعة من التأثيرات الذاتية، مثل تشنجات الأوعية الدموية، وعدم انتظام ضربات القلب، الاعتلال العصبي المحيطي، وفقدان الصوت (aphonia)، والتشوهات العينية، والخلل في الجهاز العصبي اللاإرادي نظير الودي. وتنتج الأنواع ذات الصلة، مثل *Carukia barnesia*، سمّاً يقلد إطلاق الكاتيكولامينات الواسع ويستهدف عضلة القلب (Burnett et al. 1998). ولتنقية سموم الجوفمعويات، يُعد الرحلان الكهربائي الشعبي (CE)، متبوعاً بالارتباط بمصل فائق المناعة بيضاوي تجاري عالي العيار، هو التقنية المفضلة (Burnett et al. 1996). وبالنسبة لبعض لسعات قناديل البحر، يُوصى بالعلاج السريع للمنطقة المصابة بالخل المنزلي، والذي يبتل السموم، متبوعاً بإعطاء مضاد للسم (Tibballs 2006).

الرخويات (Molluscs)

يُنتج تسمم الرخويات أو "تسمم المحار" عن استهلاك الرخويات ذات المصراعين التي تتراكم فيها سموم ذات أصل أولي أو طحلبي. ويُشار إلى السموم الناتجة عن مصادر طحلبية أيضاً باسم السموم الطحلبية أو الفيكوتوكسينات (phycotoxins) (Quilliam 1999)، نظيراً للسموم الفطرية من المصادر الفطرية (انظر أعلاه). وعادة ما يُصنّف تسمم الرخويات الناجم عن السموم الطحلبية وفقاً للأعراض التي تسببها لدى البشر (Baden 1983, 1995; Daranas et al. 2001; Sierra-Beltran et al. 1998):

- تسمم المحار الشللي (PSP، الساكسيتوكسينات / saxitoxins)
- تسمم المحار الإسهالي (DSP، مثل حمض أوكاديك / okadaic acid)
- تسمم المحار العصبي (NSP، بريفيتوكسين / brevetoxin)
- تسمم المحار المسبب لفقدان الذاكرة (ASP، حمض دوموبك / domoic acid)

ويُعد التسمم بالسموم العصوية (الكونوتوكسينات / conotoxins) من القواقع التي تنتمي إلى جنس المخروطيات (*Conus*) شكلاً آخر من أشكال تسمم الرخويات.



تسمم المحار الشللي (Paralytic shellfish poisoning)

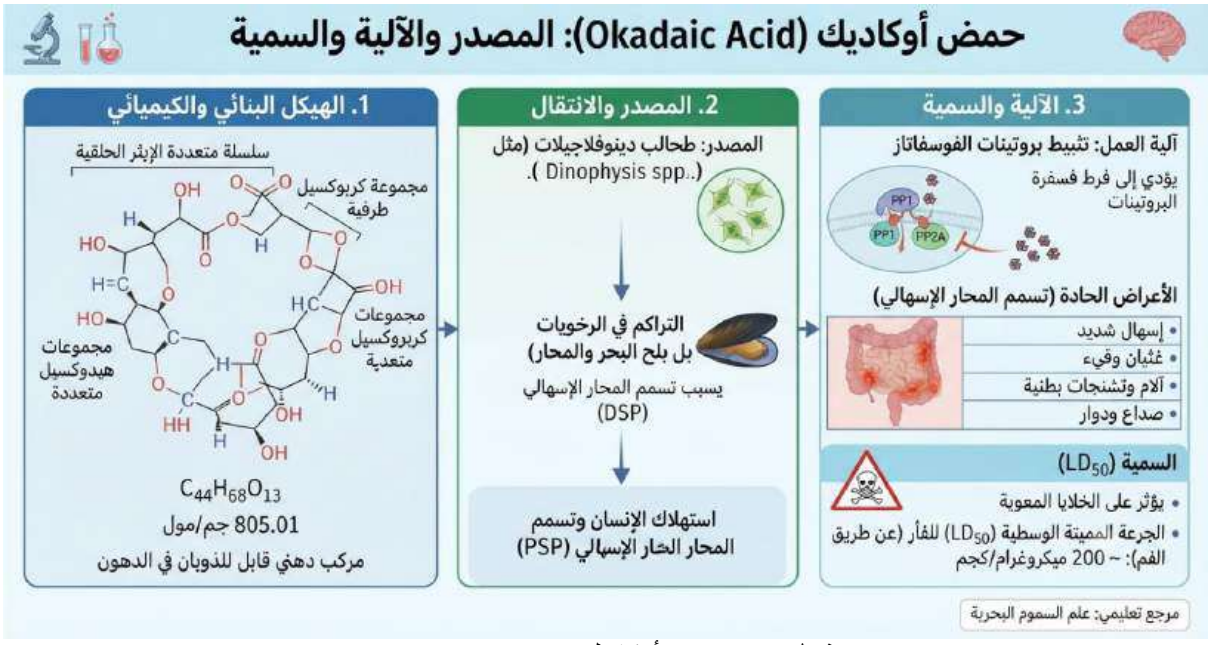
يُنتج تسمم المحار الشللي (PSP) عن طريق الساكسيتوكسينات (STX؛ شكل 9) التي تنتجها سوطيات "المد الأحمر" البحرية والطحالب الزرقاء الخضراء العذبة مثل أنواع ألكساندريوم (*Alexandrium spp*.)، وجيمنوديniوم كاتيناتوم (*Gymnodinium catenatu*)، وبايرودينيوم باهامينسي (*Pyrodinium bahamense*). وتم وصف كيمياء وحيوية تخليق مجموعة سموم STXبواسطة مور (Moore 1999) وداراناس وآخرون (Daranas et al. 2001). تُعد الساكسيتوكسينات عوامل قوية يمكنها حظر قنوات الصوديوم في الأعصاب والعضلات في الجانب الخارجي للقناة، مما يؤدي إلى اضطرابات التوصيل والشلل. ويُقدر حدوث حوالي 1600 حالة تسمم كل عام. وفي الحالات الشديدة، تنتشر الأعراض العصبية إلى الأطراف وعضلات التنفس، وبدون دعم تهوية، يموت المرضى في غضون 2 إلى 12 ساعة بعد الابتلاع. وقد أصبح الساكسيتوكسين أداة بحث لا تقدر بثمن وسلاحاً كيميائياً منظماً دولياً. وبغض النظر عن نشاطه كمثبط لقنوات الكالسيوم، فقد تم العثور في الآونة الأخيرة على STXليرتبط أيضاً بقنوات البوتاسيوم، وإنزيم أكسيد النريك العصبي، والإنزيمات الأيضية للـ STX، وبروتينين من سوائل الدورة الدموية، وهما عائلة من البروتينات تشبه الترانسفيرين وبروتين فريد يوجد في دم سمكة القنفذ (Llewellyn 2006). ووصف لورانس وآخرون (Lawrence et al. 1996) طريقة تحليلية سريعة وموثوقة للكشف عن STXفي الرخويات، استناداً إلى اللوني السائل عالي الأداء (HPLC) مع الكشف الفلوري بعد الأكسدة قبل الفصل اللوني. تم استخلاص عينات المحار عن طريق الغليان بـ 0.1 mol/Lمن حمض الهيدروكلوريك وتنقيتها عن طريق الاستخلاص الطور الصلب على أعمدة C_{18}وتبادل الأيونات القوي، على التوالي. ثم أكسدت العينات بـالبرويودات وفصلت على عمود سوبيلوسيل LC_{18}(*Supelcosil LC18*). ويمكن اكتشاف وتقدير عدد من سموم الـ PSP، بما في ذلك STX، باستخدام الكشف الفلوري عند أطوال موجية 330 nm(إثارة) و400 nm (انبعاث). وطبيق غارسيا وآخرون (Garcia et al. 2004) طريقة HPLCمع اشتقاق بعد العمود والكشف الفلوري على التحليل الكمي للـ STXفي مجموعة واسعة من الأنسجة والسوائل البيولوجية المأخوذة من صيادين توفيا بعد 3 إلى 4 ساعات من استهلاك عدد صغير من بلح البحر السام. ويمكن العثور على قائمة شاملة للنتائج في دراسة أحادية STX.



شكل 9: ساكسيتوكسين (Saxitoxin).

تسمم المحار الإسهالي (Diarrhoetic shellfish poisoning)

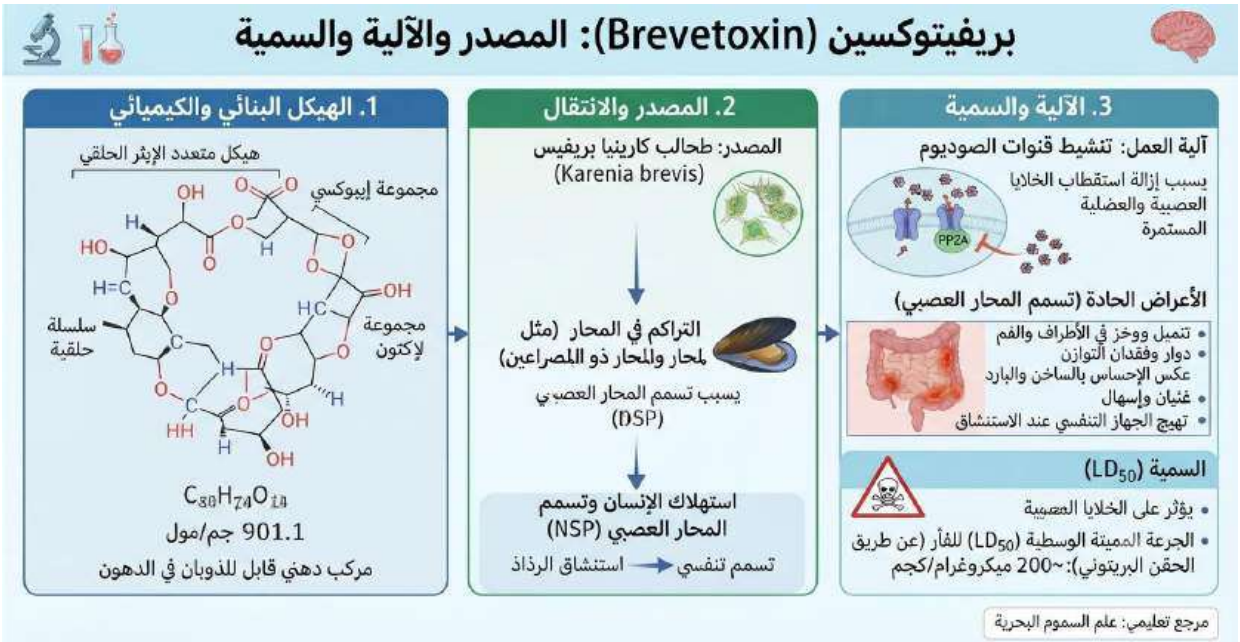
يُعد العامل المسبب الرئيسي لتسمم المحار الإسهالي (DSP) هو حمض أوكاديك (okadaic acid، شكل 10)، والذي يُنتج أساساً بواسطة سوطيات "المد الأحمر" التي تنتمي إلى أجناس دينوفايسيس (*Dinophysis*) وبروروسنتروم (*Prorocentrum*) (Aune 1997; Daranas et al. 2001). تُعد سموم التسمم الإسهالي محبة للدهون وتتراكم في الغدة الهضمية لبلح البحر. وحمض أوكاديك هو مثبط قوي لفوسفاتازات البروتين 1 و A2. وفي البشر، يؤدي استهلاك الرخويات الملوثة حصرياً تقريباً إلى أعراض معدية معوية - الإسهال، الغثيان، القيء، وآلام البطن - والتي تظهر بين 30 دقيقة وبضع ساعات بعد الوجبة ويمكن أن تنتج عن كمية قليلة تصل إلى 40 μgمن السم. يكون العلاج داعماً ويكون التعافي كاملاً بعد بضعة أيام. وقد تم الإبلاغ عن عدة طرق لتحليل حمض أوكاديك في المحار، على سبيل المثال، بواسطة اللوني السائل عالي الأداء (HPLC) (Quilliam 1995)، ومطياف الكتلة للوني السائل (LC-MS) (Paz et al. 2007)، والرحلان الكهربائي الشعبي (CE) (Consoli and Damerval 2001). ومع ذلك، لا توجد طرق تحليلية بسيطة متاحة حتى الآن للكشف عن حمض أوكاديك في هذه المواد (Quilliam 1999).



شكل 10: حمض أوكاديك (Okadaic acid).

تسمم المحار العصبي (Neurotoxic shellfish poisoning)

يُنتج تسمم المحار العصبي (NSP) عن سم تنتجه سوطيات "مد أحمر" أخرى، وهي *Gymnodinium breve*، والتي تم ملاحظتها على الساحل الغربي لفلوريدا، وفي خليج المكسيك، واليابان، ونيوزيلندا. فالمبدأ النشط هو بولي إيثر ذائب في الدهون يُسمى بريفيتوكسين (brevetoxin، شكل 11)، والذي يبلغ وزنه الجزيئي حوالي 900 ويُعد واحداً من أقوى السموم العصبية المعروفة. يشبه نمط عمل البريفيتوكسين عمل سيغواتوكسين (CTX؛ انظر لاحقاً). وهو مادة مزيلة للاستقطاب في النظام الكوليني تفتح قنوات غشائية نفاذة لأيونات الصوديوم. وهذا يغير التدفق الغشائي لأنواع الخلايا القابلة للاستثارة، ويؤدي إلى زيادة في التدفق الداخلي لأيونات الصوديوم، والتي يمكن حظرها بواسطة التترودوتوكسين (TTX؛ انظر لاحقاً).

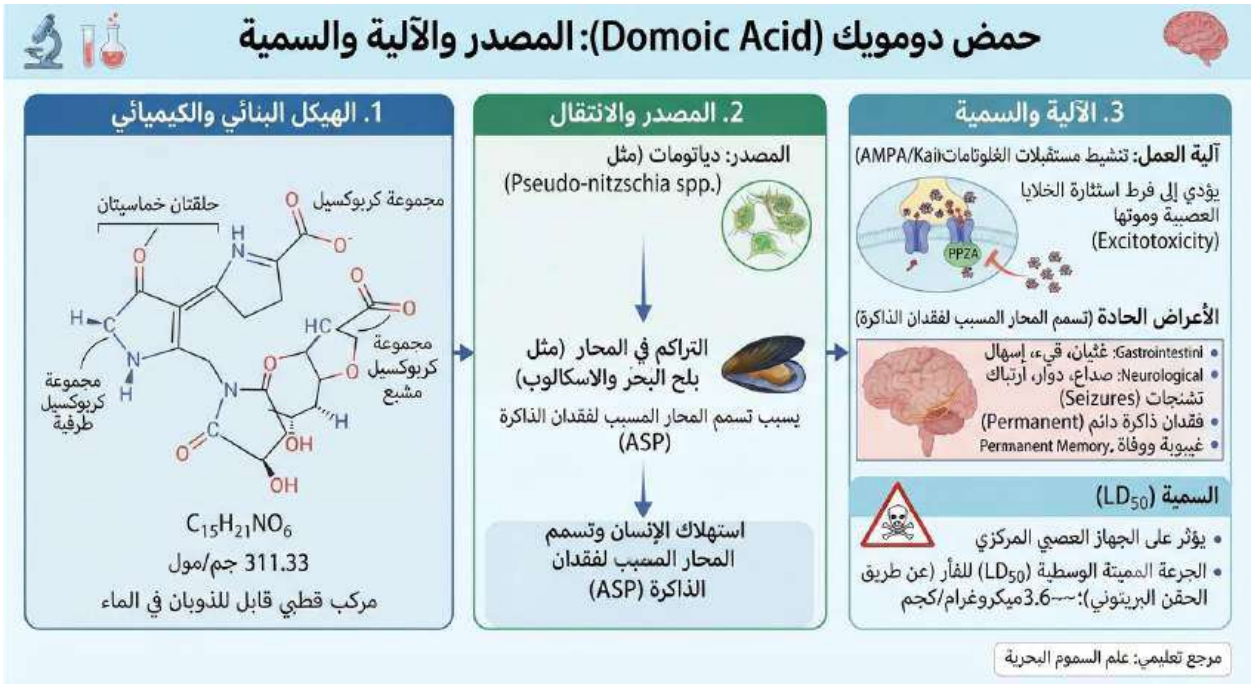


شكل 11: بريفيتوكسين (Brevetoxin).

في البشر، يمكن أن يؤدي استهلاك المحار الملوث بالبريفيتوكسين إلى التهاب المعدة والأمعاء مع أعراض عصبية. في غضون 3 ساعات، قد تحدث الغثيان والقيء، وتشوش الحس، وعكس الإحساس بالحرارة/البرودة، وضيق الحلق، والرنح. لا يوجد شلل. ويحدث التعافي التام من هذه الأعراض في غضون يومين دون علاج محدد. ولم يتم الإبلاغ عن أي حالات وفاة بشرية بسبب التسمم بالبريفيتوكسين. ولم يتم وصف تقنيات تحليلية بسيطة وسريعة للكشف عن السموم من *G. breve*، على الرغم من أن طرق مقايسة الامتصاص المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA) توفر بعض الأمل (Quilliam 1999). يمكن أيضاً اكتشاف البريفيتوكسين باستخدام طريقة مطياف الكتلة للوني السائل ((LC-MS(-MS) لـ CTXالتي وصفها لويس وآخرون (Lewis et al. 1999) (انظر لاحقاً). وتمت مراجعة التطورات الحديثة في علم السموم وتحليل البريفيتوكسينات بواسطة واتكينز وآخرون (Watkins et al. 2008).

تسمم المحار المسبب لفقدان الذاكرة (Amnestic shellfish poisoning)

تم تحديد تسمم المحار المسبب لفقدان الذاكرة (ASP) كمرض سمي بحري في عام 1987 في كندا، عندما تأثر أكثر من 150 شخصاً نتيجة استهلاك بلح البحر الأزرق المستزرع، مما أدى إلى وفاة ثلاثة مرضى. السم المسؤول هو حمض دوموبك (domoic acid)، وهو حمض ثلاثي الكربوكسيل تتكونه أنواع معينة من جنس الدياتوم *Pseudonitzschia*. وحمض الدوموبك (شكل 12) هو عامل سام للأعصاب يرتبط تنافسياً بمستقبلات الغلوتامات من نوع حمض الكاينيك وحمض ألفا-أمينو-3-هيدروكسي-5-ميثيل-4-إيسوكسازول بروبيونيك (AMPA) في الجهاز العصبي المركزي، مما يؤدي إلى ارتفاع الكالسيوم الحر داخل الخلايا ويؤدي إلى تلف الخلايا.



شكل 12: حمض دوموبك (Domoic acid).

قد ينتج عن تركيز مقدر بـ 200 μgمن حمض الدوموبك لكل غرام من لحم الرخويات أعراض لدى البشر. وتشمل الأعراض الحادة القيء والإسهال، وفي بعض الحالات يتبعها الارتباك، وفقدان الذاكرة، والتشوش الذهني، أو الغيبوبة، أو الوفاة. وتكون

الآثار العصبية الدائمة، وخاصة الخلل المعرفي، مرجحة بشكل أكبر لدى المرضى الذين تظهر عليهم أعراض عصبية في غضون 48 ساعة (Baden et al. 1995).

تم وصف عدد كبير من الطرق التحليلية المختلفة لحمض الدوموبك، ويرجع ذلك على الأرجح إلى بنيته الكيميائية البسيطة نسبياً. قام كويليام وآخرون (Quilliam et al. 1998) بتحليل حمض الدوموبك بشكل شبه كمي في المحار باستخدام اللوني الطبقي الرقيق (TLC)؛ حيث تم استخلاص الأنسجة وتركيزها باستخدام راتنج تبادل الأيونات القوي، وتطبيقات المستخلصات على صفائح هلام السيليكا وتطويرها بمزيج من البوتانول وحمض الخليك والماء (3: 1: 1، بقيمة $R_f =$ 0.45لحمض الدوموبك). ويمكن اكتشاف ما لا يقل عن 10 μgمن حمض الدوموبك لكل غرام من الأنسجة بهذه الطريقة. وتم وصف عدة طرق للوني السائل عالي الأداء (HPLC) لحمض الدوموبك؛ حيث قارن لورانس وآخرون (Lawrence et al. 1994) بين طريقة HPLC ذات الطور العكسي ومقايسة مناعية إشعاعية موجودة، وبدت كلتا الطريقتين مفيدتين لقياس حمض الدوموبك في المأكولات البحرية، ومصل الفئران المحصن، والبول. وتم تطبيق كاشف اشتقاق جديد قبل العمود، وهو 6-أمينوكينوليل-*N*-هيدروكسي سكسينيميديل كاربامات، بواسطة سن وونغ (Sun and Wong 1999) قبل HPLC ذي الطور العكسي مع الكشف الفلوري، وهذه الطريقة التي استخدمت في عينات العوالق النباتية، لها حد كتلة اكتشاف منخفض يصل إلى 0.001 ng. ووصف جيمس وآخرون (James et al. 2000) طريقة HPLC فلورية أخرى لتحديد حمض الدوموبك في المأكولات البحرية والعوالق النباتية البحرية، حيث تم اشتقاق المادة التحليلية بـ 4-فلورو-7-نيترو-2,1,3-بنزوكساديازول (NBD-F) قبل HPLC ذي الطور العكسي المتماثل مع الكشف الفلوري عند طول موجة إثارة 470 nmوانبعاث 530 nm. وباستخدام عمود استخلاص طور صلب بتبادل أيوني قوي للتنقية، يبلغ حد اكتشاف الطريقة 6 ngمن حمض الدوموبك لكل غرام من نسج بلح البحر. ويبدو حد الاكتشاف هذا مرتفعاً عند مقارنته بالمقايسة المناعية للإنزيم التنافسي غير المباشر التي نشرها كاواتسو وآخرون (Kawatsu et al. 2000)؛ فبهذا الإجراء القائم على جسم مضاد وحيد النسيلة ضد حمض الدوموبك، وجدت تراكيز حمض الدوموبك في بلح البحر الأزرق الياباني في نطاق 0.11إلى 1.81 ngلكل غرام من الأنسجة.

كما تم وصف الرحلان الكهربائي الشعبي مع كشف الامتصاص للأشعة فوق البنفسجية لتحليل حمض الدوموبك (Zhao et al. 1997)، وهذا له مزايا على HPLC في أنه بالإضافة إلى حمض الدوموبك، يمكن فصل العديد من متماكباته. ومع ذلك، فإن حد اكتشاف الطريقة البالغ 150 ngلكل غرام من الأنسجة أعلى من تلك التي يتم الحصول عليها بواسطة HPLC والمقايسة المناعية للإنزيم (EIA). ووصف مافرا وآخرون (Mafra et al. 2009) طريقة جديدة وحساسة لقياس حمض الدوموبك في مياه البحر والعوالق استناداً إلى HPLC، مع حدود اكتشاف منخفضة تصل إلى 42 ng/Lبالكشف بالأشعة فوق البنفسجية و15 ng/L بواسطة مطياف الكتلة للوني السائل (LC-MS). وتم قياس حمض الدوموبك في المصل بواسطة اللوني السائل (Blanchard and Tasker 1990).

قواقع الكونوتوكسين (Conotoxin snails)

تتغذى بطنيات الأرجل (القواقع) التي تنتمي إلى جنس المخروطيات (*Conus*) على رخويات أو أسماك أو ديدان أخرى، والتي تصطادها عن طريق حقن السموم عبر حربة وخرطوم. ومن المعروف أن لسعات بعض أنواع هذه الرخويات تسبب وفيات بشرية. ويوجد حوالي 50000 كونوتوكسين مختلف موجود في أنواع جنس المخروطيات (*Conus*)، وتم توصيف حوالي 1% منها دوائياً. يحتوي سم *Conus geographus* على عدة ببتيدات؛ فألفا-كونوتوكسين هو ببتيد مكون من 13

حمضاً أمينياً مع رابطتي ثنائي السلفيد، والذي له نشاط مضاد قوي لمستقبلات النيكوتين؛ وميو-كونوتوكسين هو مثبط لقنوات الصوديوم، مثل التترودوتوكسين. وتمت مراجعة السموم العصبية من *Co. textile neovicarus*، الذي يتغذى بشكل خاص على الرخويات، بواسطة سبيرا وآخرون (Spira et al. 1993). وببتيد يسبب رعشة مميزة في الحيوانات التجريبية (ω-conotoxin GVIA) يُستخدم الآن كأداة دوائية في علم الأعصاب (Olivera and Cruz 2001).

يمكن عزل سموم ببتيد الكونوتوكسين من مستخلصات القواقع بواسطة استخلاص عمود سيفادكس G-50 يليه تنقية HPLC على أعمدة C_{18}(Spira et al. 1993). والكونوتوكسين زيكونوتيد معتمد الآن من قبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA) لعلاج الألم المزمن الشديد عن طريق الإعطاء القرابي (Williams et al. 2008).

المفصليات (Arthropods)

تُعد القراد، والعناكب، والعقارب (العنكبيات - Arachnids) والنحل، والدنابير، والنمل (غشائيات الأجنحة - Hymenoptera) جزءاً من هذه المجموعة؛ وعادةً ما تنقل سمومها عن طريق اللسع. وتُشكل سمومها مجموعة متنوعة من المواد الكيميائية ذات نطاق واسع من الآليات السمية؛ للاطلاع على مراجعة، انظر بيك وليوين (Piek and Leeuwin 1995). دور أخصائي علم السموم التحليلي في إدارة حوادث اللسع محدود، ولذلك تم تضمين اختيار صغير فقط من أهم المفصليات السامة في هذا القسم.

غشائيات الأجنحة (Hymenoptera)

لا تُعد اللسعات المعزولة من النحل والدنابير والنمل مهددة للحياة عادةً، على الرغم من أن الوفاة قد تحدث بسبب الصدمة التأقية (anaphylactic shock). ومع ذلك، تحدث حوادث اللسع الجماعي وتكون مهددة للحياة عبر التأثير السام للسم المحقون بكميات كبيرة. إن الانتشار السريع للسلالة العدوانية للغاية من نحل العسل الإفريقي (*Apis mellifera*) - والتي تُحمل مسؤولية مئات الوفيات البشرية - قد يصبح مسؤولاً عن زيادة حالات اللسع الجماعي. تتكون أجزاء سم النحل الرئيسية من ببتيدات (ببتيد-401، والأبامين، والميليتين) وأنزيمات (فوسفوليبيز A_2والهيالورونيداز). ويُعد الميليتين (mellitin)، القادر على تحلل غشايات الخلايا، السبب الأساسي للألم بعد لسعة نحل العسل. وتكون التفاعلات التحسسية، التي تحدث بشكل رئيسي عبر فوسفوليبيز A_2كمستضد، بوساطة الغلوبولين المناعي IgE. وتُعد فترة اللسع التي تقل عن شهرين عامل خطر لتطور حساسية غشائيات الأجنحة. يحتوي سم الدبابير على أنزيمات مشابهة لسم النحل، ولكن مع كولينستراز إضافية وفوسفوليبيز A_1بدلاً من A_2. الببتيدات الرئيسية في سم الدبابير هي الماستوبارانز (mastoparans)، والتي تحفز إطلاق الهيستامين. ومع ذلك، فإن الأزيمات مسؤولة بشكل أساسي عن التفاعلات التحسسية؛ وعادة لا تتفاعل تقاطعيًا مع مستضدات سم النحل. يحتوي سم نمل النار (*Solenopsis invicta*) أيضاً على فوسفوليبيز A_1ومستضدات أخرى مرتبطة بسم الدبابير.

تشمل العلامات السريرية الجهازية الناتجة عن لسعات غشائيات الأجنحة المتعددة الفشل الكلوي الحاد، وانحلال العضلات الخططية (rhabdomyolysis)، والتهاب العصب البصري، والرفرفة الأذينية، والخلل الوظيفي الكبدي، والتخثر المنتشر داخل الأوعية، والضيق التنفسي. قد تسبب لسعات الدبابير والنمل أعراضاً عصبيّة أيضاً. ويُعتقد أن حوالي 150 إلى 1000 لسعة نحل و 20 إلى 200 لسعة دبور تحفز حالة حرجة. وفي جميع حالات التفاعلات التحسسية وحوادث اللسع الجماعي،

يجب نقل الضحية إلى قسم الطوارئ في أقرب مستشفى (Ewan 1998; Gelder et al. 1996; King and Spangfort 2000; Vetter et al. 1999).

العنكبيات (Arachnids)

على الرغم من أن لدغات القراد تُعرف في الوقت الحاضر بأنها أكثر ناقلات العدوى البكتيرية شهرة (فالبورليا تسبب مرض لايم)، إلا أن العديد من أنواع القراد، مثل *Ixodus holocyclus* (أستراليا) و *Dermacentor andersoni* (أمريكا الشمالية)، تنتج سموم الهولوسيكلوتوكسين (holocyclotoxins)، والتي يمكن أن تؤدي إلى شلل مميت من خلال تثبيط أستيل كولينستراز في الوصلة العصبية العضلية.

تنتج لدغة خطيرة من العنكبوت الأرملة السوداء (*Latrodectus mactans*) سموم ألفا-لاتروتوكسين (latrotoxins-α). وهي بروتينات بحوالي 1000 حمض أميني ترتبط بشكل لا عكوس بغشايات الخلايا قبل المشبكية، لإنتاج قنوات حساسة للكاتيونات وتتداخل مع الإدخال الخلوي لأغراض الحويصلات. العلامات السريرية المحلية تكاد تكون معدومة؛ وتتراوح العلامات السريرية الجهازية من الألم وتشنجات العضلات إلى ارتفاع ضغط الدم، والوذمة الرئوية، وتورط الجهاز العصبي المركزي. ويتم إعطاء مضاد السم المحدد ومرخيات العضلات في العلاج (Piek and Leeuwin 1995; ME Peterson 2002, personal communication). وتخضع مكونات سم عنكبوت الأرملة السوداء حالياً للتحقيق لاستخدامها المحتمل كمبيدات حشرية (Rohou et al. 2007).

يُعد عنكبوت شبكة القمع الأسترالي (*Atrax robustus*)، الذي يوجد حول سيدني، أكثر خطورة بكثير، حيث لديه لدغة قادرة على التسبب في الوفاة في غضون 15 دقيقة. يعمل السم، روبوستروتوكسين (robustotoxin)، عن طريق فتح قنوات الصوديوم في محاور الضحية. وقد ثبت أن إعطاء مضاد السم منقذ للحياة ومنذ إدخاله لم يتم الإبلاغ عن أي وفيات أخرى. والنوع ذو الصلة *Hadronynche versutus*، والذي يوجد في المناطق الجنوبية من كوينزلاند بأستراليا، ينتج فيرسوتوكسين (versutoxin)، والذي يمكن علاج آثاره أيضاً بمضاد سم *At. robustus* (Hawdon and Winkel 1997).

تحدث أعراض مختلفة بسبب عنكبوت الناسك البني (*Loxosceles spp.*)، والذي تُعرف منه خمسة أنواع في جنوب الولايات المتحدة. يحتوي سمها على مجموعة من الأنزيمات المسؤولة عن العنكبوتية النخرية (necrotic arachnidism) في موقع اللدغة ومجموعة واسعة من الأعراض الجهازية، من الحمى وآلام المفاصل إلى التخثر المنتشر داخل الأوعية والفشل الكلوي (ME Peterson 2002, personal communication).

العقارب

تشكل العقارب مصدر قلق خطير للصحة العامة في المناخات الدافئة. وفي جميع أنحاء العالم، تنتج 30 نوعاً سموماً قد تكون مميتة؛ والعدد السنوي المقدر للوفيات البشرية الناتجة عن لسعات العقارب هو 5000. ومن أمثلة أنواع العقارب: *Centruroides infamatus*، وهو المسؤول عن أعلى معدل للتسمم باللسع في المكسيك؛ و *Tityus serrulatus*، الذي يسبب آلاف حالات التسمم كل عام في البرازيل؛ و *Buthus occitanus*، وهو العقرب الأكثر سمية وشائع في شمال إفريقيا. يحتوي سم العقرب على ما لا يقل عن 85 سموم ببتيدية عصبية مختلفة. وهذه تعطل وظيفة قنوات الصوديوم (Becerril et al. 1997; Possani et al. 1999)، مما يسبب زيادة نشاط الوصلة العصبية العضلية قبل المشبكية، وبالتالي يؤثر على

النظام العصبي اللاإرادي نظير الودي، والودي، ولب الكظر. وهذا يفسر النطاق الواسع للأعراض السريرية لدى الضحايا البشر. وعادة ما يكون موقع اللسع مؤلماً للغاية؛ وقد يهاجر الألم نحو المركز وقد تحدث فرط الحساسية. وبشكل جهازي، يتأثر الجهاز cardiovascular بشكل أساسي، مما يؤدي إلى ارتفاع ضغط الدم، واضطرابات نظم القلب، وتلف عضلة القلب، والوذمة الرئوية، وفشل التنفس. وتشمل الأعراض الأخرى فرط الحرارة، واتساع الحدقة، واللعاب، وتقوس الظهر (opisthotonus)، وحركات العين المتجولة. ويُلاحظ خلل الجهاز العصبي المركزي لدى الأطفال، ولكن نادراً عند البالغين، وقد يكون ثانوياً لارتفاع ضغط الدم المخي (Gueron et al. 1992; Ismail 1995). ويُعد إعطاء مضاد السم وعلاج ارتفاع ضغط الدم هو العلاج الموصى به (Ismail 1995). واقترح مورثي وهاسي (Murthy and Hase 1994) ضرورة إعطاء الأنسولين والجلوكوز لمواجهة تثبيط إفراز الأنسولين الناجم عن الإطلاق الهائل للكاتيكولامينات أثناء التسمم باللسع.

الفقاريات (Vertebrates)

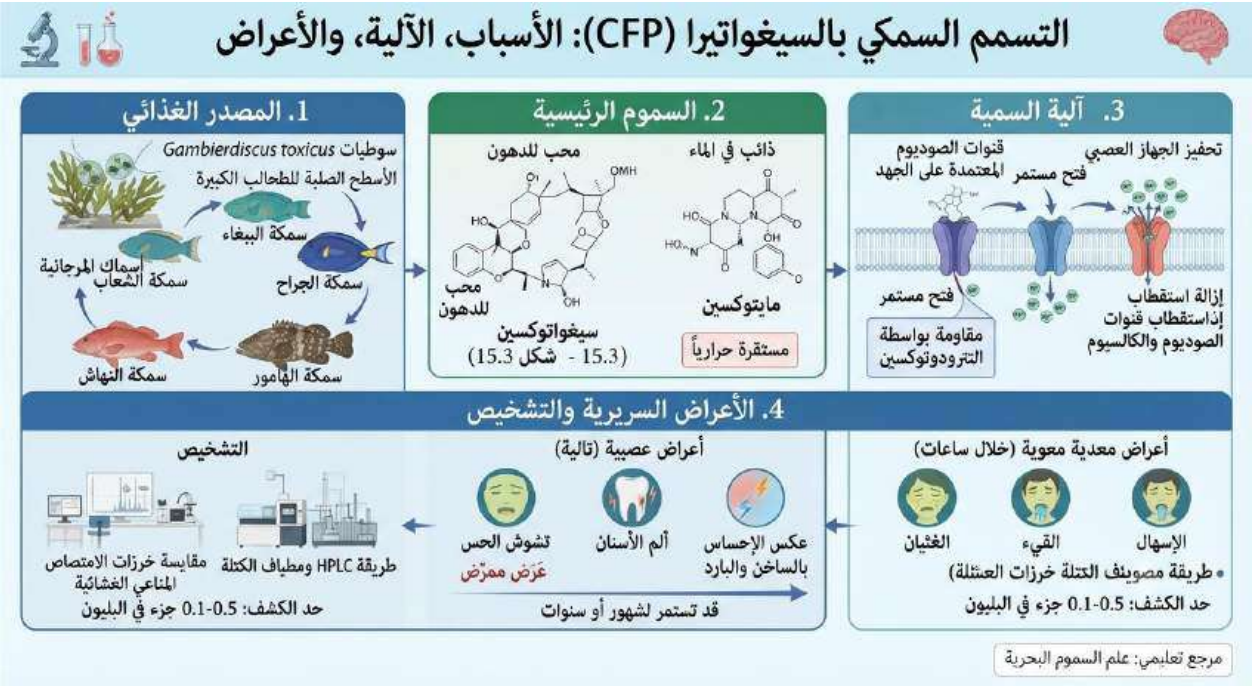
الأسماك (Fish)

يُعد التسمم الناتج عن استهلاك لحوم الأسماك (التسمم بلحوم الأسماك أو ichthyosarcotoxism) يحدث عادة في المناخات الدافئة، ولكنه يلاحظ أيضاً في مناطق المناخ المعتدل عندما يتم تجاهل تدابير النظافة (Lipp and Rose 1997). ويحدث التسمم السمكي بالتترودوتوكسين والسيغواتوكسين نتيجة ابتلاع الأسماك التي تتراكم فيها الكائنات المنتجة للسموم، مثل البكتيريا أو الكائنات الأولية، دون أن تتأثر هي نفسها. ويُعد التسمم بالاسقمريات (Scombroid poisoning) مثالاً على سم تنتجه التخزين غير السليم بعد الموت، وتنتج الأسماك الأخرى لسعات سامة؛ للاطلاع على مراجعة، انظر ميبس (Mebs 2002).

التسمم السمكي بالسيغواتيرا (Ciguatera fish poisoning)

يُنتج التسمم السمكي بالسيغواتيرا (CFP) عن مجموعتين من السموم، تشمل الرئيسية منها سيغواتوكسين (CTX) المحب للدهون والغامبييرول، اللذين تنتجهما سوطيات الفروع الوبائية *Gambierdiscus toxicus*. وتضم المجموعة الأخرى المايتوكسين الذائب في الماء. و CTXهو مجموعة من جزيئات البولي إيثر الحلقية عالية الأكسدة والمستقرة حرارياً والمحبة للدهون، والتي تظهر في السلسلة الغذائية من خلال أسماك الشعاب المرجانية التي أصبحت سامة من خلال نظامها الغذائي (Baden 1995; Daranas et al. 2001; Lehane 2000; Lewis 2001; Rein and Borrone 1999). تعيش سوطيات السيغواتوكسين على الأسطح الصلبة للطحالب الكبيرة ويتم استهلاكها أثناء رعي الأسماك. وتتمثل آلية سمية CTXمن خلال تأثيراتها المباشرة على الأغشية القابلة للاستثارة؛ ويعتمد فعلها المزيل للاستقطاب القوي، الناجم عن زيادة انتقائية في نفاذية الصوديوم في خلايا الأعصاب والعضلات الهيكلية، على تقاربها مع "موقع ارتباط سم بولي إيثر سلمي" لمستقبلات القنوات الأيونية، ومن خلاله يتم تنشيط قنوات الصوديوم والكالسيوم. ويمكن مقاومة نشاط CTXبواسطة أيونات الكالسيوم والتترودوتوكسين (انظر أدناه). وتُعتبر متلازمة التسمم بالسيغواتيرا نتيجة مباشرة لتحفيز الجهاز العصبي الودي ونظير الودي من خلال فتح قنوات الصوديوم المعتمدة على الجهد في أغشية الخلايا العصبية. ويؤدي استهلاك الأسماك الملوثة إلى اضطرابات معدية معوية (الغثيان، والقيء، والإسهال) في غضون بضع ساعات، يتبعها أعراض عصبية، وتشمل الأخيرة تشوش الحس، وألم الأسنان، وعكس الإحساس بدرجة الحرارة الساخنة/الباردة. وتُعد الأعراض الثالثة ممرضة لـ CFP. وقد

تستمر تشوش الحس والضعف لشهور بعد المرض الحاد (Baden 1995)، وفي بعض حالات، قد تستمر الآثار العصبية لسنوات (Lewis 2006).



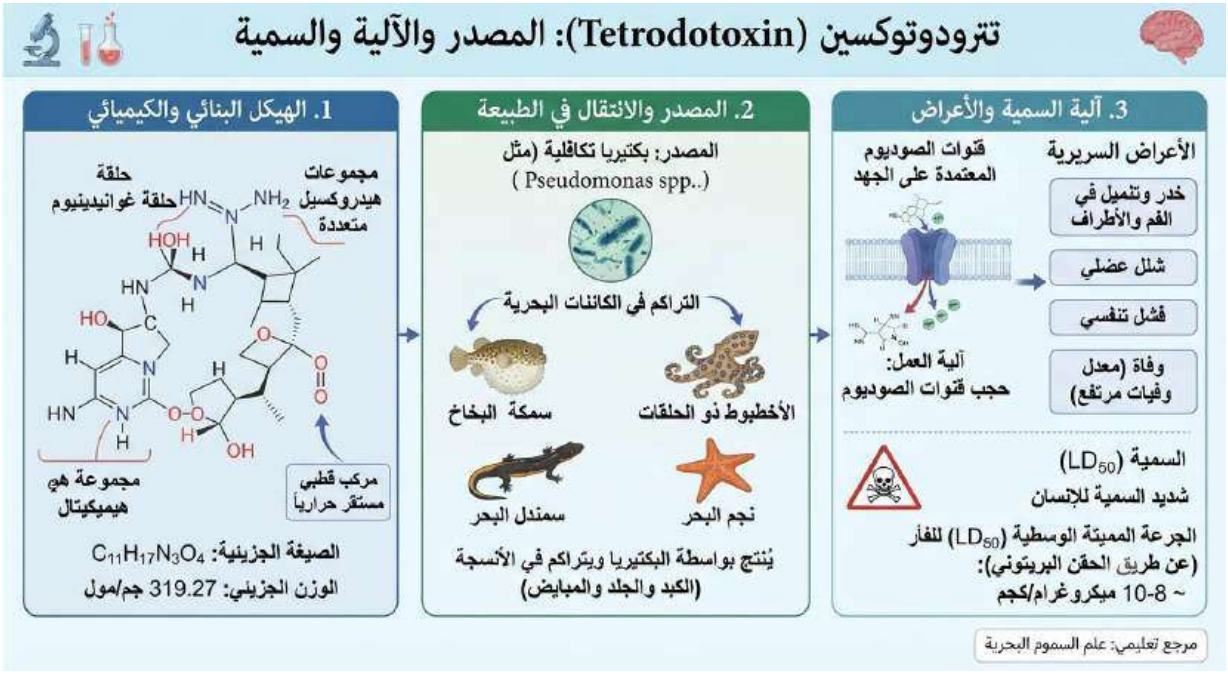
الشكل (13): التسمم السمكي بالسغواترا

يُعد التسمم السمكي بالسيغواتيرا السبب الأكثر شيوعاً للتسمم بالسموم البحرية؛ فمن بين أولئك الذين يعيشون في أو يزورون المناطق شبه الاستوائية والمدارية، يُقدر أن ما بين 10000 إلى 50000 شخص سنوياً يعانون من السيغواتيرا. ومع ذلك، فإن معدل الوفيات يقل على الأرجح عن 1%.

لا يوجد علاج محدد لـ CFP، ويُعد منع استهلاك الأسماك الملوثة أمراً أساسياً، وستكون المقايسة البسيطة والحساسة لـ CTXمفيدة في هذا السياق. ويعتبر التحليل صعباً بسبب انخفاض مستوى السم في الأسماك والتركيب المعقد لمجموعة سموم CTX. وتوفر الطريقة القائمة على HPLC ومطياف الكتلة بالرش الكهربائي الترادفي الحساسية المطلوبة (أقل من أجزاء في البليون؛ Lewis et al. 1999). وقد قامت هذه المقايسة بقياس نوع الكاريبي من CTX(C-CTX) في لحم الأسماك بتراكيز تحوم حول 2.0 ngلكل غرام من الأنسجة. وأعطت عينات اللحم غير السامة والمطعمة بـ C-CTX، و-Pacific-CTX (P-CTX)، والبريفيتوكسين حدود اكتشاف بلغت 0.2و0.1 و0.5 ng لكل غرام من الأنسجة، على التوالي. ومع ذلك، من غير المرجح أن تكون هذه الطريقة فعالة من حيث التكلفة للفحص الروتيني. وتبدو مقايسة خرزات الامتصاص المناعي الغشائية طريقة اكتشاف بسيطة وسريعة وحساسة ومحددة لـ CTXوبولي إيثراته ذات الصلة، ولكن يلزم إجراء مزيد من التحقق من صحة هذا الاختبار (Hokama et al. 1998; Lehane and Lewis 2000; Lewis 2001)؛ للاطلاع على مراجعة، انظر كويليام (Quilliam 1999).

تسمم سمكة القنفذ (Puffer fish poisoning)

يُسبب تسمم سمكة القنفذ (PFP)، أو التسمم بالتترودوتوكسين (TTX؛ شكل 4)، التهاب المعدة والأمعاء مع مظاهر عصبيّة حادة تشبه تلك الخاصة بـ PSP أو التسمم بالساكسيتوكسين. ويُشكل التسمم بـ TTX مشكلة صحية عامة في المناطق شبه الاستوائية والمدارية. وهو لا يقتصر على اليابان، حيث يحظى استهلاك الفوغو - وهي سمكة قنفذ محلية - بشعبية كبيرة؛ فالفوغو غير ضار إذا تم إعداده بواسطة طاهٍ مؤهل يتخلص من الأعضاء التي تتراكم فيها TTX(المبايض، والبطارخ، والكبد، والأمعاء، والجلد). ويمكن العثور على TTXأيضاً في أنواع *Tetraodontiformes spp.*، ولكن يمكن تمييزها عادةً من خلال مورفولوجيتها الغريبة وقدرتها على نفخ نفسها عندما تكون في خطر (Baden 1995; de Kom 2001). وفي السنوات الأخيرة، ثبت أن مجموعة كبيرة ومتنوعة من الكائنات الحية إلى جانب سمكة القنفذ تمتلك TTX(Noguchi and Arakawa 2008). ويُنتج TTXبواسطة بكتيريا تستعمر طبقات الأمعاء والجلد المخاطية للأسماك، ويتم عزل السم في الغدد التناسلية والكبد وفي بعض الأنواع في العضلات. قد تحتوي الكائنات البحرية الأخرى، مثل المحار الياباني العاجي، وقوقعة البوق، والأخبوط ذو الدوائر الزرقاء، على TTX، كما توجد السموم في جلد بعض الضفادع.



شكل 14: التترودوتوكسين (Tetrodotoxin)

التترودوتوكسين هو عامل سام للأعصاب يحجب الاستثارة المحورية عن طريق تقليل التدفق الداخلي لأيونات الصوديوم، تماماً مثل الساكسيتوكسينات (انظر أعلاه). وهو يعمل على توصيل الأعصاب الجسدية والحسية ويؤثر على مستقبلات القيء الكيميائية. وعكس الساكسيتوكسين، فهو يسبب انخفاض ضغط الدم من خلال شلل الأوعية الدموية. يُعد TTXواحداً من أقوى السموم الطبيعية؛ والجرعة المميتة المبتلعة للبشر هي $\mu g/kg$ إلى 30 5من الأنسجة الرطبة. وتكون أعراض التسمم بـ TTXقابلة للمقارنة لتلك الخاصة بـ PSP (انظر أعلاه)، باستثناء انخفاض ضغط الدم الملحوظ، وتظهر في غضون 5 إلى 30 دقيقة بعد الاستهلاك. وتشمل التأثيرات المعدية المعوية، وتشوش الحس، والشلل الحركي، وانخفاض ضغط الدم، والشلل التنفسي. وفي اليابان، يُبلغ أن معدل الوفيات يبلغ حوالي 60%. وتتكون العلاجات من تدابير داعمة، مثل التهوية الاصطناعية وإدارة انخفاض ضغط الدم.

تم الإبلاغ عن مقايسات حيوية لـ PSP و (Yasumoto 1991, cited in de Kom 2001) PFP. بالإضافة إلى ذلك، تم وصف طريقة HPLC مع الكشف الفلوري (Yotsu et al. 1989)؛ حيث يتم فصل TTXومتماكباته بعد التنقية على عمود Develosil ODS-5 مع 0.06 mol/Lمن حمض الهيبتافلورو بوتيريك في 0.006 mol/Lمن مخفوق خلات الأمونيوم (بدرجة حموضة 5.0). ويتم خلط السائل الراشح مع محلول NaOHمائي 4 mol/Lويمر عبر عمود من الفولاذ المقاوم للصدأ في حمام زيت عند حرارة 135°C. ويتم قياس انبعاث التألق لمنتجات التفاعل عند 50 nm، بعد الإثارة عند 375 nm. ويُذكر أن حد الاكتشاف من رتبة 2 μg/g، وهو ما يُدعي بأنه حساس بدرجة كافية لقياس TTXومتماكباته في كبد سمكة القنفذ. وقام تساي وآخرون (Tsai et al. 2006) بقياس TTXفي الدم بواسطة GC-MS ومطياف الكتلة للوني السائل (LC-MS)؛ وكانت الطريقة الأخيرة ذات حد حساسية قدره 15.6 nmol/L. وباستخدام HPLC مع اشتقاق بعد العمود باستخدام هيدروكسيد الصوديوم والكشف الفلوري، استطاع أوليراي وآخرون (O'Leary et al. 2004) تقدير كمية TTXفي المصل مع حد تعيين (LOQ) قدره 5 μg/L.

وصف يو وآخرون (Yu et al. 2010) طريقة سريعة لقياس TTXفي عينات البول والبلازما من المرضى المسمومين باستخدام خراطيش الاستخلاص الصلب التجارية (C_{18} وأعمدة تبادل الكاتيون الضعيف) تليه التحليل بواسطة HPLC مع الكشف بالأشعة فوق البنفسجية. وكان حد الاكتشاف لكل من البول والبلازما 10 μg/L. وخلصوا إلى الملاحظة المثيرة للاهتمام وهي أن مستويات TTXفي البول المُقاسة خلال أول 24 ساعة من القبول في المستشفى أظهرت ارتباطاً أفضل مع شدة التسمم عندما تم ضبطها وفقاً للاختلافات في إفراز الكرياتينين المصاحب. كما قياس TTXفي عينات المصل والبول وكذلك في أنسجة سمكة القنفذ بواسطة LC-MS(-MS). وكان حد الاكتشاف في كل من البول والمصل 0.1 μg/L(Akaki and Hatano 2006). وتتم مناقشة أمثلة لحالات تسمم سمكة القنفذ حيث تم قياس TTXفي عينات الدم والمصل والبول بالتفصيل في دراسة أحادية التترودوتوكسين.

الأسماك الاسقمريات (Scombroid fish)

يُعد التسمم بالاسقمريات (Scombrotoxin poisoning) أكثر تسممات الأسماك المبلغ عنها شيوعاً ويحدث في العديد من أنحاء العالم. يتشكل السم الاسقمري في الأسماك المخزنة بشكل غير سليم، ويستمد اسمه من نوع السمك الذي تم وصفه فيه أصلاً. الأسماك الاسقمريات (Scombridae) هي أنواع مهاجرة ذات لحوم داكنة، مثل الإسقمري (الماكريل) والتونة. كما تم وصف حالات التسمم بعد استهلاك أنواع غير اسقمريات، مثل الرنجة، والسردين، وسمك السلمون.

يُعتقد عموماً أن "السم الاسقمري" متطابق مع الهيستامين. يحتوي لحم السمك الاسقمري على محتوى عالٍ من الهيستيدين، والذي يتم نزع الكربوكسيل منه بسهولة إلى هيستامين بواسطة البكتيريا المعوية (*Proteus morgani, P. vulgaris, Clostridium spp., Escherichia coli, Salmonella spp. and Shigella spp*.) عندما يتم تخزين الأسماك لفترة قصيرة تصل إلى 2 إلى 3 ساعات في درجات حرارة أعلى من 20°C. وعلى الرغم من الارتباط المبلغ عنه على نطاق واسع بين الهيستامين والتسمم الغذائي الاسقمري، إلا أن الهيستامين وحده يبدو غير كافٍ لإحداث السمية الغذائية. وقد تم اقتراح البيوترسين (putrescine) والكادافيرين (cadaverine) لتعزيز سمية الهيستامين (Al Bulushi et al. 2009). الطهي المطول لا يدمر السمو الاسقمري بشكل فعال، وبالتالي، قد يتواجد أيضاً في المنتجات المعلبة.

تحدث المظاهر السريرية للمرض بسرعة (10 إلى 30 دقيقة) بعد الاستهلاك، وتشمل أعراضاً حادة في الجهاز الهضمي (القيء، التشنجات، الإسهال) المرتبطة بالاحمرار، والبقع الشرى (urticarial patches)، والوذمة. يُعد المرض مزعجاً

ولكنه نادراً - إن حدث - ما يكون مميتاً ويكون الشفاء عفوياً في غضون 24 ساعة. ويعمل العلاج باستخدام السيميتيدين عن طريق الوريد على حل معظم الأعراض بسرعة كبيرة. في عينات الأسماك المشتبه بها، يمكن قياس تراكيز الهيستامين باستخدام الطرق القياسية لتحليل الهيستامين في الغذاء (Clark et al. 1999; Grant 1997; Trevino 1998).

متلازمة المرتبطة بـفايستيريا (Pfiesteria-associated syndrome)

تم ملاحظة مرض يؤثر على الأسماك والبشر مؤخراً في منطقة منتصف الأطلسي وتبيّن أنه ناتج عن سوطي يُدعى *Pfiesteria piscicida*. وهو مميت للأسماك؛ وفي البشر، يسبب عيوباً في التعلم والذاكرة، وتهييجاً حاداً في الجهاز التنفسي والعيون، ومتلازمة الارتباك الحاد (Grattan et al. 1998; Morris1999). وقد تم تحديد السموم من *P. piscicida* على أنها مركبات نحاسية مرتبطة (Moeller et al. 2007).

سمكة الصخر وسمكة الويفر (Stonefish and weeverfish)

تم الإبلاغ عن عدة أنواع من الأسماك ذات الأشواك المحتوية على السم والتي تسبب الوفيات. فسمكة الصخر (*Synanceja horrida, S. trachynis and S. verrucosa*)، التي تنتمي إلى عائلة العقربيات (*Scorpaenidae*)، توجد في البحار المعتدلة والمدارية التي تمتد عبر جنوب إفريقيا، واليابان، والمحيط الهادئ والهندي، وأستراليا، ونيوزيلندا. وتستوي سمومها على الكولينستراز، الفوسفاتاز القلوي، والفوسفوديسترايز. وتكون لسعات سمكة الصخر مؤلمة بشدة وقد يعاني المرضى من الانهيار، أو الزرقة (cyanosis)، أو الوذمة الرئوية (Burnett 1998). وتتواجد سمكة الويفر (*Trachinus draco, T. vipera, T. radiatus and T. araneus*) في مياه السواحل الأوروبية. ويحتوي سمها على السيروتونين، ومادة شبيهة بالكنين، والأدرينالين (الإبينفرين)، والهيستامين، بالإضافة إلى عدة أنزيمات. وتسبب لسعة سمكة الويفر ألم حرقان شديد ويمكن أن تحدث الوفاة بسرعة من خلال الوذمة الرئوية الشديدة (Borondo et al. 2001).

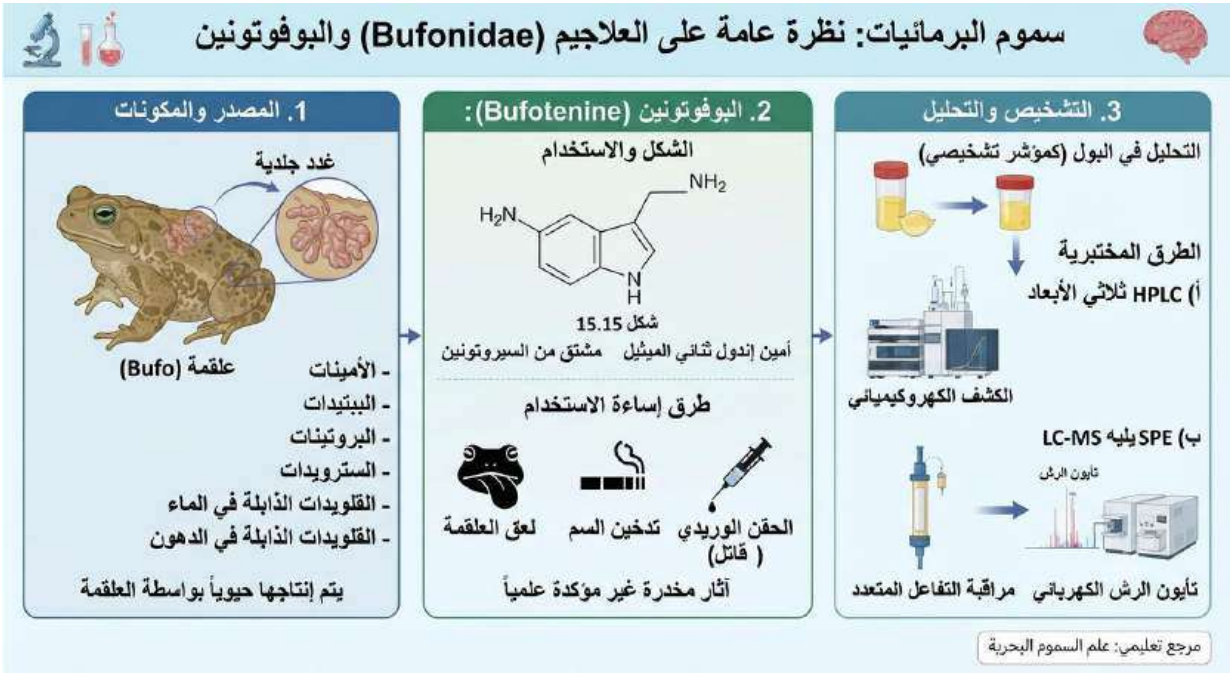
مرض هاف (Haff disease)

تم وصف مرض هاف (Haff disease)، وهو حالة عضلية، لأول مرة في ألمانيا في عام 1924؛ حيث وصف لينتس (Lentz) التصلب العضلي وبعض الميزات الكلاسيكية لانحلال العضلات الخططية (rhabdomyolysis) لدى الأشخاص الذين استهلكوا أسماكاً من ساحل هاف قبالة بحر البلطيق (Lentz 1925). وعلى مدار السنوات اللاحقة، تم وصف حوالي 1000 حالة. ومنذ ذلك الحين، كانت هناك تقارير قليلة عن مرض هاف، على الرغم من أن العلماء في مراكز مكافحة الأمراض والوقاية منها بالولايات المتحدة وصفوا مجموعة صغيرة من ست حالات تم اكتشافها في عام 1997، وتمكنوا من تتبع المصدر إلى سمك الجاموس (*Ictiobus cyprinellus*) من لويزيانا أو ميسوري. ولم يتم عزل السم، ولم يتم تعطيله بالطهي، وكان قابلاً للذوبان في الهكسان، وأعطت الأسماك من نفس المصدر التي أُعطيت للفئران اعتلال عضلي (Buchholz et al. 2000).

البرمائيات (Amphibians)

من بين البرمائيات، تحظى العناقيد (العلاجيم / toads) باهتمام كبير لدى أخصائي علم السموم لأن عدداً من الأنواع تنتج مواد ضارة في غددها الجلدية. وتشمل هذه المركبات الأمينات، والببتيدات، والبروتينات، والستيرويدات، والقلويدات الذابلة في الماء والذابلة في الدهون. باستثناء الأخيرة، يتم إنتاج هذه المواد بواسطة العلقمة نفسها بدلاً من تراكمها حيوياً؛ للاطلاع على

مراجعات، انظر دالي (Daly 1995) وميبس (Mebs 2002). يُفرز جنس البوفو (*Bufo*) قلويد البوفوتونين (N,N-dimethyl-5-hydroxytryptamine؛ شكل 15)، وكانت هناك تقارير عن محاولات للحصول على تأثيرات مخدرة عن طريق لعق العلقمة أو تدخين سمها، على الرغم من أن ليتل وآخرون (Lyttle et al. 1996) يشيرون إلى أن التأثيرات المخدرة للبوفوتونين لا يمكن تأكيدها بالدراسات الموضوعية. قد تُساء معاملة المادة أيضاً عن طريق الحقن الوريدي، مما أدى إلى الوفاة (Kostakis and Byard 2009). والبوفوتونين هو أيضاً منتج لمسار تحلل 5-هيدروكسي تريبتامين (السيروتونين)، وقد تم اقتراح وجوده في البول مؤشراً تشخيصياً للاضطرابات النفسية (Takeda et al. 1995)؛ حيث ابتكر هؤلاء الباحثون طريقة HPLC ثلاثية الأبعاد مع الكشف الكهروكيميائي لقياس البوفوتونين في البول. كما تم وصف طريقة لتحديد البوفوتونين وغيره من أمينات الإندول ثنائية الميثيل المحتمل إحداثها للهلوسة في بول الإنسان بواسطة فورستروم وآخرون (Forsström et al. 2001)، والتي استخدمت الاستخلاص الطور الصلب (SPE) يليه مطياف الكتلة للوني السائل (LC-MS)، مع تحديد بناءً على بيانات الاحتباز واثنين من أيونات الشظايا المنتجة بواسطة مطياف الكتلة الثلاثي الرباعي. وكان التقدير الكمي قائماً على تأيون الرش الكهربائي (ESI) ومراقبة التفاعل المتعدد (MRM) لتحسين الحساسية.



شكل 15: بوفوتونين (Bufotenine).

الزواحف (Reptiles)

سحالي غيلا (Gila monsters)

تنتمي هذه السحالي السامة إلى عائلة *Helodermatidae* (سحالي غيلا *Heloderma suspectum*، والسحلية المكسيكية ذات اللحية *H. horridum* وأنتواعها الفرعية) وهي متوطنة في جنوب غرب الولايات المتحدة ومكسيك. ولديها غدد سمية على الفك السفلي وتوصل السم على طول الأسنان الأخدودية في لدغة. يحتوي السم على الهيالوريداز والبروتياز، بالإضافة إلى غيلاتوكسين (gilatoxin)، وهو بروتين سكري بحجم 35 kDa مع نشاط بروتياز السيرين والكاليكيرين. يمكن أن تؤدي اللدغة إلى متلازمة تأقية شبيهة (anaphylactoid syndrome) (Hooker et al. 1994).

الثعابين (Snakes)

توجد ثلاث عائلات رئيسية من الثعابين السامة - العرابيد (*Elapidae*، الكوبرا)، والفعاليات (*Viperidae*، الأفاعي الحقيقية)، والأفاعي الحفرية (*Crotalidae*). تشكل العرابيد حوالي نصف أنواع الثعابين السامة في العالم وتضم الكوبرا والممبا. وتوجد أجناس عائلة العرابيد في آسيا والمحيط الهادئ والأمريكتين وإفريقيا (Mebs 2002). أما الأفاعي الحقيقية (*Viperidae*)، وأفضلها معروفاً الأفعى الشائعة، فتسكن أوروبا وآسيا وإفريقيا. بينما توجد الأفاعي الحفرية (*Crotalidae*) بشكل أساسي في أمريكا الشمالية والوسطى والجنوبية وتشمل أجناس الأفاعي المجلجلة *Crotalus* و *Sistrurus*.

يُقدر حدوث 30000 حالة وفاة ناجمة عن لدغات الثعابين سنوياً في آسيا و1000 في إفريقيا وأمريكا الجنوبية (WHO 1995). دور أخصائي علم السموم التحليلي في تشخيص وإدارة لدغات الثعابين محدود، ويهدف اختيار المعلومات المقدمة هنا إلى توفير بعض البيانات الأساسية لتسهيل المهام الاستشارية.

يمكن تقسيم تأثيرات سموم الثعابين تقريباً إلى مجموعتين رئيسيتين - سامة للأعصاب وسامة للتخثر. تعمل السموم العصبية من العرابيد والفعاليات إما على المستوى ما بعد المشبكي (neurotoxins-α) عن طريق منع ارتباط الأستيل كولين بمستقبله، أو على المستوى قبل المشبكي عن طريق التأثير على إطلاق الناقل العصبي. وهذه إما مثبات غير تعزيمية لقنوات البوتاسيوم أو neurotoxins-β، والتي تتميز بنشاط فوسفوليبيز A_2(Bon et al. 1994)؛ انظر أيضاً غشائيات الأجنحة أعلاه.
والديندروتوكسينات هي بروتينات صغيرة من سم المامبا ذات خصوصية عالية لقنوات البوتاسيوم لدرجة أنها أصبحت أداة لدراسة الوظيفة الفسيولوجية لهذه القنوات (Harvey 2001). وقد ثبت أيضاً أن سم المامبا يحتوي على سموم ذات تقارب نوعي عالٍ لمستقبلات الأستيل كولين المسكارينية (Bradley 2000).

قد تتداخل المواد الفعالة السامة للدم في سموم الأفاعي مع عدد من مكونات نظام الإرقاء (تجلط الدم). توجد هذه البروتينات والببتيدات عادةً في سموم الأفاعي الحنشية (Viperidae) وأفاعي الحفر (Crotalidae). وهناك إنزيمات تسبب تخثر الفيبرينوجين، وأخرى تحلل الفيبرين أو الفيبرينوجين، فضلاً عن منشطات العامل الخامس والعامل العاشر، ومواد ذات نشاط نزفي، ومحفزات ومثبطات لتجمع الصفائح الدموية. وتكتسب المواد المسببة للنزف أهمية خاصة؛ فهي عبارة عن إنزيمات بروتينية فلزية تحتوي على الزنك، وتعمل عن طريق تحليل البروتينات المكونة الغشاء القاعدي المبطن خلايا البطانة الشعيرية. وهناك مراجعتان علميتان بارزتان حول سُمّية الدم الناتجة عن الأفاعي قدمهما كل من **Markland (1997)** و**Hati et al. (1999)**.

تختلف أعراض لدغات الأفاعي لدى البشر بشكل كبير اعتماداً على نوع الأفعى، ولكنها تتمثل عموماً في الألم المحلي، والوذمة (الانتفاخ)، وتكون التفقاعات (الفقاعات الجلدية)، والنخر. وتشمل التأثيرات الجهازية للأنواع السامة للأعصاب تشوش الرؤية، وتهدل الجفن، والشلل التنفسي. أما سموم الجهاز الإرقائي، مثل المواد المسببة للنزف، فتسبب نزيفاً تلقائياً في اللثة، والأنف، والجهاز الهضمي. وتنتج حالات الوفاة عن النزيف المخي أو النزيف خلف الغشاء البريتوني الهائل (**Warrell and Fenner 1993**). وتتضمن الآفات الكلوية اعتلال الكبيبات، واعتلال الأوعية الدموية، والنخر الأنبوبي، والتهاب الكلية الخلالي، وغالباً ما ترافق لدغات الأفاعي ذات السموم السامة للدم والأعصاب (**Sitprija and Chaiyabutr 1999**).

إن العلاج النوعي والفعال الوحيد لحالات التسمم الجهازية والشديدة موضعياً هو إعطاء مضاد السم، وهو عبارة عن جسم غلوبولين مناعي فائق المناعة (**Moroz 1998**؛ **Warrell and Fenner 1993**). ولإعطاء مضاد السم المناسب، يجب معرفة نوع الأفعى التي قامت باللدغ، حيث لا يتوفر حالياً ولن يتوفر مستقبلاً مضاد سموم شامل لجميع الأنواع. ولا يقتصر

أهمية تنقية وتوصيف سموم الأفاعي على توضيح آلية عملها فحسب، بل يمتد ليشمل إعداد وتحضير مضادات السموم هذه (**Bhat et al. 1991**؛ **Chang et al. 1997**؛ **Gasanov et al. 1997**؛ **Stiles et al. 1994**). وقد تتمثل إحدى التطورات المستقبلية للحد من وفيات لدغات الأفاعي في التطعيم (التحصين) النشط للفئات السكانية المعرضة للخطر (**Chippaux and Goyffon 1998**). وقد نُشرت حديثاً مراجعة شاملة وحديثة للغاية حول مضادات السموم المتاحة، لا تلك الموجهة ضد لدغات الأفاعي فحسب، بل ضد لدغات العناكب والعقارب أيضاً، وذلك بواسطة **Espino-Solis et al.** **(2009)**.

الطيور

يُعد التسمم بلحم السمان نوعاً غريباً من التسمم يؤدي إلى الإصابة بانحلال العضلات الخططي (انحلال الربد) والفشل الكلوي الحاد بعد تناول طائر السمان (Coturnix coturnix). وقد عرفت التفاعلات الناتجة عن استهلاك السمان منذ العصور القديمة، لا سيما في الشرق الأوسط. ويعزو بعض المؤلفين وفاة بني إسرائيل في قصة الكتاب المقدس إثر تناولهم السمان إلى التسمم بلحمه (**Rizzi et al. 1991**). ويُفترض أن توكسيناً (سماً) ابتلعته الطيور أثناء هجرتها يكون ساماً بشكل مباشر للعضلات المخططة. وقد فُرض أن يكون هذا السم هو الكونيين المستخلص من نبات الشوكران الأبقع (Conium maculatum) (**Rizzi et al. 1991**) أو نبات القراص القنب الأحمر (Galeopsis ladanum) (**Tsironi et al. 2004**).

المراجع References

Abdulrazzaq, Y. M., et al. (2002). Fetal exposure to aflatoxins in the United Arab Emirates. Annals of Tropical Paediatrics, 22(1), 3–9.

Akaki, K., & Hatano, K. (2006). Determination of tetrodotoxin in puffer-fish tissues, and in serum and urine of intoxicated humans by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 47(1), 46–50. [in Japanese]

Al Bulushi, I., et al. (2009). Biogenic amines in fish: Roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation–a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 49(5), 369–377.

Anuradha, S., et al. (2004). Acute renal failure following para-phenylenediamine (PPD) poisoning: A case report and review. Renal Failure, 26(3), 329–332.

AOAC. (1991). Changes in Official Methods of Analysis (15th ed., 2nd suppl., method 991.31). AOAC.

Aplin, P. J., & Eliseo, T. (1997). Ingestion of castor oil plant seeds. Medical Journal of Australia, 167(5), 260–261.

Atalla, H. N., et al. (2000). Use of a Shiga toxin (Stx)-enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot for detection and isolation of Stx-producing Escherichia coli from naturally contaminated beef. Journal of Food Protection, 63(9), 1167–1172.

Audi, J., et al. (2005). Ricin poisoning: A comprehensive review. JAMA, 294(18), 2342–2351.

Aune, T. (1997). Health effects associated with algal toxins from seafood. Archives of Toxicology. Supplement, 19, 389–397.

Baden, D. G. (1983). Marine food-borne dinoflagellate toxins. International Review of Cytology, 82, 99–150.

Baden, D. G., et al. (1995). Marine toxins. In F. A. De Wolff (Ed.), Handbook of Clinical Neurology: Intoxications of the nervous system (Part II, pp. 141–175). Elsevier Science.

Balint, G. A. (1978). Experimentally induced contributions to the therapy of ricin intoxication. Tokushima Journal of Experimental Medicine, 25(3–4), 91–98.

Balint, G. A., & Halasz, N. (1972). Ricin-induced injury of the liver ultrastructure. Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 42(2), 169–175.

Barceloux, D. G. (2009). Grass pea and neurolathyrism (Lathyrus sativus L.). Disease-a-Month, 55(6), 365–372.

Bayman, P., & Baker, J. L. (2006). Ochratoxins: A global perspective. Mycopathologia, 162(3), 215–223.

Becerril, B., et al. (1997). Toxins and genes isolated from scorpions of the genus Tityus. Toxicon, 35(6), 821–835.

Beyer, J., et al. (2007). Detection and validated quantification of nine herbal phenalkylamines and methcathinone in human blood plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization. Journal of Mass Spectrometry, 42(2), 150–160.

Beyer, J., et al. (2009). Analysis of toxic alkaloids in body samples. Forensic Science International, 185(1–3), 1–9.

Bhat, M. K., et al. (1991). Purification and characterization of a neurotoxic phospholipase A2 from Indian cobra (Naja naja naja) venom. Toxicon, 29(11), 1345–1349.

Black, R. M., et al. (1986). Detection of trace levels of trichothecene mycotoxins in human urine by gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography, 367(1), 103–115.

Blanchard, J. R., & Tasker, R. A. (1990). High-performance liquid chromatographic assay for domoic acid in serum of different species. Journal of Chromatography, 526(2), 546–549.

Boenke, A. (1998). Method validation for mycotoxin determinations in food and feedstuffs. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 17(1), 10–17.

Bon, C., et al. (1994). Different evolution of phospholipase A2 neurotoxins (beta neurotoxins) from Elapidae and Viperidae snakes. Annals of the New York Academy of Sciences, 710(1), 142–148.

Borondo, J. C., et al. (2001). Fatal weeverfish sting. Human & Experimental Toxicology, 20(2), 118–119.

Borowiak, K. S., et al. (1998). Psilocybin mushroom (Psilocybe semilanceata) intoxication with myocardial infarction. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 36(1–2), 47–49.

Bradberry, S. M., et al. (2003). Ricin poisoning. Toxicological Reviews, 22(2), 65–70.

Bradley, K. N. (2000). Muscarinic toxins from the green mamba. Pharmacology & Therapeutics, 85(2), 87–109.

Buchholz, U., et al. (2000). Haff disease: From the Baltic Sea to the U.S. shore. Emerging Infectious Diseases, 6(2), 192–195.

Burnett, J. W. (1998). Aquatic adversaries: Stonefish. Cutis, 62(6), 269–270.

Burnett, J. W., et al. (1996). Coelenterate venom research 1991–1995: Clinical, chemical and immunological aspects. Toxicon, 34(11–12), 1377–1383.

Burnett, J. W., et al. (1998). Autonomic neurotoxicity of jellyfish and marine animal venoms. Clinical Autonomic Research, 8(2), 125–130.

Cahill, L. M., et al. (1999). Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 859(1), 23–28.

Chang, L. S., et al. (1997). A novel neurotoxin, cobrotoxin b, from Naja naja atra (Taiwan cobra) venom: Purification, characterization, and gene organization. Journal of Biochemistry, 122(6), 1252–1259.

Chattopadhyay, U. K., et al. (2001). Verotoxin-producing Escherichia coli–an environment-induced emerging zoonosis in and around Calcutta. International Journal of Environmental Health Research, 11(2), 107–112.

Cherington, M., et al. (1995). Microbial toxins. In F. A. De Wolff (Ed.), Handbook of Clinical Neurology: Intoxications of the nervous system (Part II, pp. 209–250). Elsevier Science.

Chippaux, J. P., & Goyffon, M. (1998). Venoms, antivenoms and immunotherapy. Toxicon, 36(7), 823–846.

Christiansen, A. L., & Rasmussen, K. E. (1983). Screening of hallucinogenic mushrooms with high-performance liquid chromatography and multiple detection. Journal of Chromatography, 270, 293–299.

Clark, R. F., et al. (1999). A review of selected seafood poisonings. Undersea & Hyperbaric Medicine, 26(3), 175–184.

Consoli, L., & Damerval, C. (2001). 2-D electrophoresis of zeins and automatic quantification. Electrophoresis, 22(16), 3583–3588.

Cox, G., & Rampes, H. (2003). Adverse effects of khat: A review. Advances in Psychiatric Treatment, 9(6), 456–463.

Daly, J. W. (1995). The chemistry of poisons in amphibian skin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92(1), 9–13.

Daranas, A. H., et al. (2001). Toxic marine microalgae. Toxicon, 39(8), 1101–1132.

de Kom, J. F. M. (2001). Tetrodotoxin poisoning due to consumption of the brackwater fish 'Bosrokoman' [Doctoral dissertation, Leiden University].

De Wolff, F. A., & Bruyn, G. W. (1995). Cycad toxicity. In F. A. De Wolff (Ed.), Handbook of Clinical Neurology: Intoxications of the nervous system (Part II, pp. 21–24). Elsevier Science.

De Wolff, F. A., & Pennings, E. J. M. (1995). Mushrooms and hallucinogens: Neurotoxicological aspects. In F. A. De Wolff (Ed.), Handbook of Clinical Neurology: Intoxications of the nervous system (Part II, pp. 35–60). Elsevier Science.

De Wolff, F. A., & Thomas, T. V. (1986). Clinical pharmacokinetics of methoxsalen and other psoralens. Clinical Pharmacokinetics, 11(1), 62–75.

Diana Di Mavungu, J., et al. (2009). LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 26(6), 885–895.

Doan, L. G. (2004). Ricin: Mechanism of toxicity, clinical manifestations, and vaccine development. A review. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 42(2), 201–208.

Dorizzi, R., et al. (1992). Methods for chromatographic determination of amanitins and related toxins in biological samples. Journal of Chromatography, 580(1–2), 279–291.

El Shaer, N. S., et al. (2007). Determination of lawsone in henna powders by high performance thin layer chromatography. Journal of Separation Science, 30(18), 3311–3315.

Espino-Solis, G. P., et al. (2009). Antidotes against venomous animals: State of the art and prospectives. Journal of Proteomics, 72(2), 183–199.

Ewan, P. W. (1998). Venom allergy. BMJ, 316(7139), 1365–1368.

Faulstich, H., et al. (1982). A rapid radioimmunoassay, using a nylon support, for amatoxins from Amanita mushrooms. Toxicon, 20(5), 913–924.

Filigenzi, M. S., et al. (2007). Determination of alpha-amanitin in serum and liver by multistage linear ion trap mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(8), 2784–2790.

Flieger, M., et al. (1997). Ergot alkaloids–sources, structures and analytical methods. Folia Microbiologica, 42(1), 3–29.

Forsström, T., et al. (2001). Determination of potentially hallucinogenic N-dimethylated indoleamines in human urine by HPLC/ESI-MS-MS. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 61(7), 547–556.

Foungbé, S., et al. (1986). [Experimental study of the toxicity of arils from Blighia sapida (Sapindaceae) in relation to the poisoning of children of Katiola (Ivory Coast)]. Annales Pharmaceutiques Françaises, 44(6), 509–515.

Gaillard, Y., & Pepin, G. (1999). Poisoning by plant material: Review of human cases and analytical determination of main toxins by high-performance liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 733(1–2), 181–229.

García, C., et al. (2004). Paralytic shellfish poisoning: Post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords. Toxicon, 43(2), 149–158.

Gasanov, S. E., et al. (1997). Cobra venom cytotoxin free of phospholipase A2 and its effect on model membranes and T leukemia cells. Journal of Membrane Biology, 155(2), 133–142.

Gatto-Menking, D. L., et al. (1995). Sensitive detection of biotoxoids and bacterial spores using an immunomagnetic electrochemiluminescence sensor. Biosensors and Bioelectronics, 10(5), 501–507.

Gelder, C., et al. (1996). Allergy to bee and wasp venom. British Journal of Hospital Medicine, 55(6), 349–352.

Gilbert, J. (1993). Recent advances in analytical methods for mycotoxins. Food Additives & Contaminants, 10(1), 37–48.

Godal, A., et al. (1981). Radioimmunoassays of abrin and ricin in blood. Journal of Toxicology and Environmental Health, 8(3), 409–417.

Golden, K. D., et al. (2002). High-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in ackee fruit with emphasis on the toxic amino acid hypoglycin A. Journal of Chromatographic Science, 40(8), 441–446.

Grant, I. C. (1997). Ichthyosarcotoxism: Poisoning by edible fish. Journal of Accident & Emergency Medicine, 14(4), 246–251.

Grattan, L. M., et al. (1998). Learning and memory difficulties after environmental exposure to waterways containing toxin-producing Pfiesteria or Pfiesteria-like dinoflagellates. Lancet, 352(9127), 532–539.

Griffiths, G. D., et al. (1986). Identification and quantification of ricin toxin in animal tissues using ELISA. Journal of the Forensic Science Society, 26(5), 349–358.

Gueron, M., et al. (1992). The cardiovascular system after scorpion envenomation. A review. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 30(2), 245–258.

Harvey, A. L. (2001). Twenty years of dendrotoxins. Toxicon, 39(1), 15–26.

Hasler, F., et al. (1997). Determination of psilocin and 4-hydroxyindole-3-acetic acid in plasma by HPLC-ECD and pharmacokinetic profiles of oral and intravenous psilocybin in man. Pharmaceutica Acta Helvetiae, 72(3), 175–184.

Hatheway, C. L., & Ferreira, J. L. (1996). Detection and identification of Clostridium botulinum neurotoxins. Advances in Experimental Medicine and Biology, 391, 481–498.

Hati, R., et al. (1999). Snake venom hemorrhagins. Critical Reviews in Toxicology, 29(1), 1–19.

Hawdon, G. M., & Winkel, K. D. (1997). Spider bite. A rational approach. Australian Family Physician, 26(12), 1380–1385.

Health Council of The Netherlands. (2001). Deoxynivalenol (DON) (Publication No. 2001–23). Health Council of The Netherlands.

Herfst, M. J., et al. (1980). Determination of 8-methoxypsoralen in suction-blister fluid and serum by liquid chromatography. Clinical Chemistry, 26(13), 1825–1828.

Hodgson, E., et al. (1998). Dictionary of Toxicology (2nd ed.). Macmillan.

Hokama, Y., et al. (1998). Simplified solid-phase membrane immunobead assay (MIA) with monoclonal anti-ciguatoxin antibody (MAb-CTX) for detection of ciguatoxin and related polyether toxins. Natural Toxins, 7(1), 1–21.

Holcomb, M., et al. (1992). Determination of aflatoxins in food products by chromatography. Journal of Chromatography, 624(1–2), 341–352.

Hooker, K. R., et al. (1994). Gila monster envenomation. Annals of Emergency Medicine, 24(4), 731–735.

Hyatt, D. R., et al. (2001). Usefulness of a commercially available enzyme immunoassay for Shiga-like toxins I and II as a presumptive test for the detection of Escherichia coli O157:H7 in cattle feces. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 13(1), 71–73.

International Agency for Research on Cancer. (1993a). Aflatoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 56, 245–395.

International Agency for Research on Cancer. (1993b). Ochratoxin A. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 56, 489–521.

International Agency for Research on Cancer. (1993c). Toxins derived from Fusarium graminearum, F. culmorum and F. crookwellense: Zearalenone, deoxynivalenol, nivalenol and fusarenone X. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 56, 397–444.

International Agency for Research on Cancer. (1993d). Toxins derived from Fusarium sporotrichioides: T-2 toxin. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 56, 467–488.

Ismail, M. (1995). The scorpion envenoming syndrome. Toxicon, 33(7), 825–858.

Jacob, S. E., et al. (2008). p-Phenylenediamine in black henna tattoos: A practice in need of policy in children. Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine, 162(8), 790–792.

Jaeger, A., et al. (1993). Kinetics of amatoxins in human poisoning: Therapeutic implications. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 31(1), 63–80.

Jaimez, J., et al. (2000). Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. Journal of Chromatography A, 882(1–2), 1–10.

James, K. J., et al. (2000). New fluorimetric method of liquid chromatography for the determination of the neurotoxin domoic acid in seafood and marine phytoplankton. Journal of Chromatography A, 871(1–2), 1–6.

Katar, S., et al. (2007). Henna causes life-threatening hyperbilirubinaemia in glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. Clinical and Experimental Dermatology, 32(3), 235–236.

Kawatsu, K., et al. (2000). Determination of domoic acid in Japanese mussels by enzyme immunoassay. Journal of AOAC International, 83(6), 1384–1386.

Keller, T., et al. (1999). Analysis of psilocybin and psilocin in Psilocybe subcubensis Guzman by ion mobility spectrometry and gas chromatography–mass spectrometry. Forensic Science International, 99(2), 93–105.

King, T. P., & Spangfort, M. D. (2000). Structure and biology of stinging insect venom allergens. International Archives of Allergy and Immunology, 123(2), 99–106.

Kisby, G. E., et al. (1992). Content of the neurotoxins cycasin (methylazoxymethanol beta-D-glucoside) and BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) in cycad flour prepared by Guam Chamorros. Neurology, 42(7), 1336–1340.

Knight, B. (1979). Ricin–a potent homicidal poison. BMJ, 1(6160), 350–351.

Koch, P. (2004). State of the art of trichothecenes analysis. Toxicology Letters, 153(1), 109–112.

Koike, Y., et al. (1981). Isolation of psilocybin from Psilocybe argentipes and its determinations in specimens of some mushrooms. Journal of Natural Products, 44(3), 362–365.

Kok, W. T. (1994). Derivatization reactions for the determination of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, 659(1–2), 127–137.

Kopferschmitt, J., et al. (1983). Acute voluntary intoxication by ricin. Human Toxicology, 2(2), 239–242.

Kostakis, C., & Byard, R. W. (2009). Sudden death associated with intravenous injection of toad extract. Forensic Science International, 188(1–3), e1–e5.

Krska, R. (1998). Performance of modern sample preparation techniques in the analysis of Fusarium mycotoxins in cereals. Journal of Chromatography A, 815(1), 49–57.

Krska, R., et al. (2008). Determination of ergot alkaloids: Purity and stability assessment of standards and optimization of extraction conditions for cereal samples. Journal of AOAC International, 91(6), 1363–1371.

Kupfer, A., & Idle, J. R. (1999). Methylene blue and fatal encephalopathy from ackee fruit poisoning. Lancet, 353(9165), 1622–1623.

Kussak, A., et al. (1995). Determination of aflatoxins in dust and urine by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 9(13), 1234–1237.

Kysilka, R., & Wurst, M. (1989). High-performance liquid chromatographic determination of some psychotropic indole derivatives. Journal of Chromatography, 464(2), 434–437.

Lawrence, J. F., et al. (1994). Comparison of high-performance liquid chromatography with radioimmunoassay for the determination of domoic acid in biological samples. Journal of Chromatography A, 662(1), 173–177.

Lawrence, J. F., et al. (1996). Determination of decarbamoylsaxitoxin and its analogues in shellfish by prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of AOAC International, 79(5), 1111–1115.

Lehane, L. (2000). Ciguatera update. Medical Journal of Australia, 172(4), 176–179.

Lehane, L., & Lewis, R. J. (2000). Ciguatera: Recent advances but the risk remains. International Journal of Food Microbiology, 61(2–3), 91–125.

Leith, A. G., et al. (1988). Quantification of ricin toxin using a highly sensitive avidin/biotin enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of the Forensic Science Society, 28(4), 227–236.

Lentz, O. (1925). Über die Haffkrankheit. Medizinische Klinik, 21(1), 4–8.

Ler, S. G., et al. (2006). Trends in detection of warfare agents. Detection methods for ricin, staphylococcal enterotoxin B and T-2 toxin. Journal of Chromatography A, 1133(1–2), 1–12.

Leung, P. H., et al. (2001). The prevalence and characterization of verotoxin-producing Escherichia coli isolated from cattle and pigs in an abattoir in Hong Kong. Epidemiology and Infection, 126(2), 173–179.

Lewis, R. J. (2001). The changing face of ciguatera. Toxicon, 39(1), 97–106.

Lewis, R. J. (2006). Ciguatera: Australian perspectives on a global problem. Toxicon, 48(7), 799–809.

Lewis, R. J., et al. (1999). HPLC/tandem electrospray mass spectrometry for the determination of Sub-ppb levels of Pacific and Caribbean ciguatoxins in crude extracts of fish. Analytical Chemistry, 71(1), 247–250.

Lin, L., et al. (1998). Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. Journal of Chromatography A, 815(1), 3–20.

Lindenblatt, H., et al. (1998). Quantitation of psilocin in human plasma by high performance liquid chromatography and electrochemical detection: Comparison of liquid-liquid extraction with

automated on-line solid-phase extraction. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 709(2), 255–263.

Lindström, M., & Korkeala, H. (2006). Laboratory diagnostics of botulism. Clinical Microbiology Reviews, 19(2), 298–314.

Lipp, E. K., & Rose, J. B. (1997). The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. Revue Scientifique et Technique, 16(2), 620–640.

Llewellyn, L. E. (2006). Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors. Natural Product Reports, 23(2), 200–222.

Lyttle, T., et al. (1996). Bufo toads and bufotenine: Fact and fiction surrounding an alleged psychedelic. Journal of Psychoactive Drugs, 28(3), 267–290.

Mafra, L. L., Jr., et al. (2009). Analysis of trace levels of domoic acid in seawater and plankton by liquid chromatography without derivatization, using UV or mass spectrometry detection. Journal of Chromatography A, 1216(31), 6003–6011.

Markland, F. S., Jr. (1997). Snake venoms. Drugs, 54(Suppl. 3), 1–10.

Marquardt, R. R., et al. (1990). Ochratoxin A: An important western Canadian storage mycotoxin. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 68(7), 991–999.

Maurer, H. H. (1998). Liquid chromatography–mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 713(1), 3–25.

Mebs, D. (2002). Venomous and poisonous animals. Medpharm Scientific Publishers (CRC).

Meda, H. A., et al. (1999). Epidemic of fatal encephalopathy in preschool children in Burkina Faso and consumption of unripe ackee (Blighia sapida) fruit. Lancet, 353(9152), 536–540.

Meky, F. A., et al. (2003). Development of a urinary biomarker of human exposure to deoxynivalenol. Food and Chemical Toxicology, 41(2), 265–273.

Moeller, P. D., et al. (2007). Metal complexes and free radical toxins produced by Pfiesteria piscicida. Environmental Science & Technology, 41(4), 1166–1172.

Moore, B. S. (1999). Biosynthesis of marine natural products: Microorganisms and macroalgae. Natural Product Reports, 16(6), 653–674.

Moroz, C. (1998). Vipera palaestinae antivenin. Public Health Reviews, 26(3), 233–236.

Morris, J. G., Jr. (1999). Pfiesteria, 'the cell from hell,' and other toxic algal nightmares. Clinical Infectious Diseases, 28(6), 1191–1196.

Moubarak, A. S., et al. (1996). HPLC method for detection of ergotamine, ergosine, and ergine after intravenous injection of a single dose. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44(1), 146–148.

Muraszko, K., et al. (1993). Pharmacokinetics and toxicology of immunotoxins administered into the subarachnoid space in nonhuman primates and rodents. Cancer Research, 53(16), 3752–3757.

Murthy, K. R., & Hase, N. K. (1994). Scorpion envenoming and the role of insulin. Toxicon, 32(9), 1041–1044.

Musshoff, F., & Madea, B. (2009). Ricin poisoning and forensic toxicology. Drug Testing and Analysis, 1(4), 184–191.

Narang, U., et al. (1997). Fiber optic-based biosensor for ricin. Biosensors and Bioelectronics, 12(9–10), 937–945.

Noba, S., et al. (2009). Determination of ochratoxin A in ready-to-drink coffee by immunoaffinity cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(14), 6036–6040.

Noguchi, T., & Arakawa, O. (2008). Tetrodotoxin–distribution and accumulation in aquatic organisms, and cases of human intoxication. Marine Drugs, 6(2), 220–242.

O'Leary, M. A., et al. (2004). Use of high performance liquid chromatography to measure tetrodotoxin in serum and urine of poisoned patients. Toxicon, 44(5), 549–553.

Olivera, B. M., & Cruz, L. J. (2001). Conotoxins, in retrospect. Toxicon, 39(1), 7–14.

Onji, Y., et al. (1998). Direct analysis of several Fusarium mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 815(1), 59–65.

Parma, A. E., et al. (2000). Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic Escherichia coli isolated from cattle and foods in Argentina. Importance in public health. European Journal of Epidemiology, 16(8), 757–762.

Paz, B., et al. (2007). Characterisation of okadaic acid related toxins by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Toxicon, 50(2), 225–235.

Pennings, E. J., et al. (2008). Risk assessment of khat use in the Netherlands: A review based on adverse health effects, prevalence, criminal involvement and public order. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 52(2), 199–207.

Petzinger, E., & Ziegler, K. (2000). Ochratoxin A from a toxicological perspective. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 23(2), 91–98.

Piek, T., & Leeuwin, R. S. (1995). Neurotoxic arthropod venoms. In F. A. De Wolff (Ed.), Handbook of Clinical Neurology: Intoxications of the nervous system (Part II, pp. 193–207). Elsevier Science.

Poli, M. A., et al. (1994). Detection of ricin by colorimetric and chemiluminescence ELISA. Toxicon, 32(11), 1371–1377.

Possani, L. D., et al. (1999). Scorpion toxins specific for Na+-channels. European Journal of Biochemistry, 264(2), 287–300.

Pritchard, G. C., et al. (2000). Verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 on a farm open to the public: Outbreak investigation and longitudinal bacteriological study. Veterinary Record, 147(10), 259–264.

Quilliam, M. A. (1995). Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. Journal of AOAC International, 78(3), 555–570.

Quilliam, M. A. (1999). Phycotoxins. Journal of AOAC International, 82(4), 773–781.

Quilliam, M. A., et al. (1998). Analysis of domoic acid in shellfish by thin-layer chromatography. Natural Toxins, 6(3–4), 147–152.

Rein, K. S., & Borrone, J. (1999). Polyketides from dinoflagellates: Origins, pharmacology and biosynthesis. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 124(2), 117–131.

Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses–an overview. International Journal of Food Microbiology, 119(1–2), 3–10.

Rizzi, D., et al. (1991). Clinical spectrum of accidental hemlock poisoning: Neurotoxic manifestations, rhabdomyolysis and acute tubular necrosis. Nephrology Dialysis Transplantation, 6(12), 939–943.

Rohou, A., et al. (2007). Insecticidal toxins from black widow spider venom. Toxicon, 49(4), 531–549.

Roman, G. C. (1996). Neuroepidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: Clues to aetiology and pathogenesis. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 61(2), 131–137.

Schmidt, K., et al. (2008). Development and in-house validation of an LC-MS/MS method for the determination of stilbenes and resorcylic acid lactones in bovine urine. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391(4), 1199–1210.

Schwartz, S., & Meinking, T. (1997). Venomous marine animals of Florida: Morphology, behavior, health hazards. Journal of the Florida Medical Association, 84(7), 433–440.

Scudamore, K. A. (1996). Ochratoxin A in animal feed–effects of processing. Food Additives & Contaminants, 13(Suppl.), 39–42.

Sherratt, H. S. A. (1995). Jamaican vomiting sickness. In F. A. De Wolff (Ed.), Handbook of Clinical Neurology: Intoxications of the nervous system (Part II, pp. 79–113). Elsevier Science.

Sierra-Beltrán, A. P., et al. (1998). An overview of the marine food poisoning in Mexico. Toxicon, 36(11), 1493–1502.

Sitprija, V., & Chaiyabutr, N. (1999). Nephrotoxicity in snake envenomation. Natural Toxins, 8(6), 271–277.

Sobel, J. (2005). Botulism. Clinical Infectious Diseases, 41(8), 1167–1173.

Spencer, P. S. (1995). Lathyrism. In F. A. De Wolff (Ed.), Handbook of Clinical Neurology: Intoxications of the nervous system (Part II, pp. 1–20). Elsevier Science.

Spencer, P. S., et al. (1991). Slow toxins, biologic markers, and long-latency neurodegenerative disease in the western Pacific region. Neurology, 41(2_Pt_2), 62–66.

Spira, M. E., et al. (1993). Chemical and electrophysiological characterization of new peptide neurotoxins from the venom of the molluscivorous snail Conus textile neovicarius: A review. Israel Journal of Medical Sciences, 29(8–9), 530–543.

Stienstra, R., et al. (1981). [Psilocybine poisoning resulting from eating mushrooms]. Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde, 125(21), 833–835.

Stiles, B. G., et al. (1994). Characterization of monoclonal antibodies against Naja naja oxiana neurotoxin I. Biochemical Journal, 303(1), 163–170.

Stolk, L. M., et al. (1987). Determination of psoralen in serum by reversed-phase high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography, 423, 383–386.

Stroka, J., et al. (2006). Liquid chromatographic determination of deoxynivalenol in baby food and animal feed: Interlaboratory study. Journal of AOAC International, 89(4), 1012–1020.

Sulyok, M., et al. (2006). Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 20(18), 2649–2659.

Sun, T., & Wong, W. H. (1999). Determination of domoic acid in phytoplankton by high performance liquid chromatography of the 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate derivative. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47(11), 4678–4681.

Tacke, B. K., & Casper, H. H. (1996). Determination of deoxynivalenol in wheat, barley, and malt by column cleanup and gas chromatography with electron capture detection. Journal of AOAC International, 79(2), 472–475.

Takeda, N., et al. (1995). Bufotenine reconsidered as a diagnostic indicator of psychiatric disorders. NeuroReport, 6(17), 2378–2380.

Tanaka, H., et al. (2009). Determination of nivalenol and deoxynivalenol by liquid chromatography/atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 23(20), 3119–3124.

Tanaka, K. (1979). Jamaican vomiting sickness. In P. J. Vinken (Ed.), Handbook of Clinical Neurology: Intoxications of the nervous system (Part II, pp. 511–539). North-Holland.

Tibballs, J. (2006). Australian venomous jellyfish, envenomation syndromes, toxins and therapy. Toxicon, 48(7), 830–859.

Trevino, S. (1998). Fish and shellfish poisoning. Clinical Laboratory Science, 11(5), 309–314.

Tsai, Y. H., et al. (2006). Determination of tetrodotoxin in human urine and blood using C18 cartridge column, ultrafiltration and LC-MS. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 832(1), 75–80.

Tsironi, M., et al. (2004). The patient with rhabdomyolysis: Have you considered quail poisoning? CMAJ, 171(4), 325–326.

Tsujikawa, K., et al. (2006). Analysis of hallucinogenic constituents in Amanita mushrooms circulated in Japan. Forensic Science International, 164(2–3), 172–178.

Tsujikawa, K., et al. (2007). Determination of muscimol and ibotenic acid in Amanita mushrooms by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 852(1–2), 430–435.

Tsunoda, K., et al. (1993). Simultaneous analysis of ibotenic acid and muscimol in toxic mushroom, Amanita muscaria, and analytical survey on edible mushrooms. Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 34(1), 12–17.

Valenta, H. (1998). Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. Journal of Chromatography A, 815(1), 75–92.

Van Egmond, H. P. (1991). Methods for determining ochratoxin A and other nephrotoxic mycotoxins. IARC Scientific Publications, (115), 57–70.

Vatinno, R., et al. (2007). Determination of ochratoxin A in human urine by solid phase microextraction coupled with liquid chromatography–fluorescence detection. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 44(4), 1014–1018.

Vetter, J. (1998). Toxins of Amanita phalloides. Toxicon, 36(1), 13–24.

Vetter, R. S., et al. (1999). Mass envenomations by honey bees and wasps. Western Journal of Medicine, 170(4), 223–227.

Viani, R. (1996). Fate of ochratoxin A (OTA) during processing of coffee. Cooperative work by PEC (Physiological Effects of Coffee committee). Food Additives & Contaminants, 13(Suppl.), 29–33.

Villar, R. G., et al. (2006). Botulism: The many faces of botulinum toxin and its potential for bioterrorism. Infectious Disease Clinics of North America, 20(2), 313–327.

Warrell, D. A., & Fenner, P. J. (1993). Venomous bites and stings. British Medical Bulletin, 49(2), 423–439.

Watkins, S. M., et al. (2008). Neurotoxic shellfish poisoning. Marine Drugs, 6(3), 431–455.

Wellner, R. B., et al. (1995). Ricin: Mechanism of action, detection, and intoxication. JAT: Journal of Toxicology: Toxin Reviews, 14(4), 483–522.

World Health Organization. (1995). Poisonous animal bites and stings. Weekly Epidemiological Record, 70(43), 315–316.

Williams, J. A., et al. (2008). Ziconotide: An update and review. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 9(9), 1575–1583.

Wollowitz, S. (2001). Fundamentals of the psoralen-based Helinx technology for inactivation of infectious pathogens and leukocytes in platelets and plasma. Seminars in Hematology, 38(4, Suppl. 7), 4–11.

Woo, B. H., et al. (1998). Purification of Sepharose-unbinding ricin from castor beans (Ricinus communis) by hydroxyapatite chromatography. Protein Expression and Purification, 13(2), 150–154.

Woo, B. H., et al. (2001). Sepharose-unbinding ricin E as a source for ricin A chain immunotoxin. Journal of Immunological Methods, 249(1–2), 91–98.

Yasumoto, T. (1991). Tetrodotoxin mouse bioassay method. In Standard Methods of Analysis in Food and Safety Regulations, Chemistry Volume (pp. 296–300). Environmental Health Bureau, Ministry of Health and Welfare, Japan Food Hygiene Association.

Yotsu, M., et al. (1989). An improved tetrodotoxin analyzer. Agricultural and Biological Chemistry, 53(3), 893–895.

Yu, C. H., et al. (2010). Rapid screening of tetrodotoxin in urine and plasma of patients with puffer fish poisoning by HPLC with creatinine correction. Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 27(1), 89–96.

Zhao, J. Y., et al. (1997). Analysis of domoic acid and isomers in seafood by capillary electrophoresis. Electrophoresis, 18(2), 268–276.

Zimmerli, B., & Dick, R. (1995). Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: Methodology and Swiss data. Journal of Chromatography B: Biomedical Applications, 666(1), 85–99.

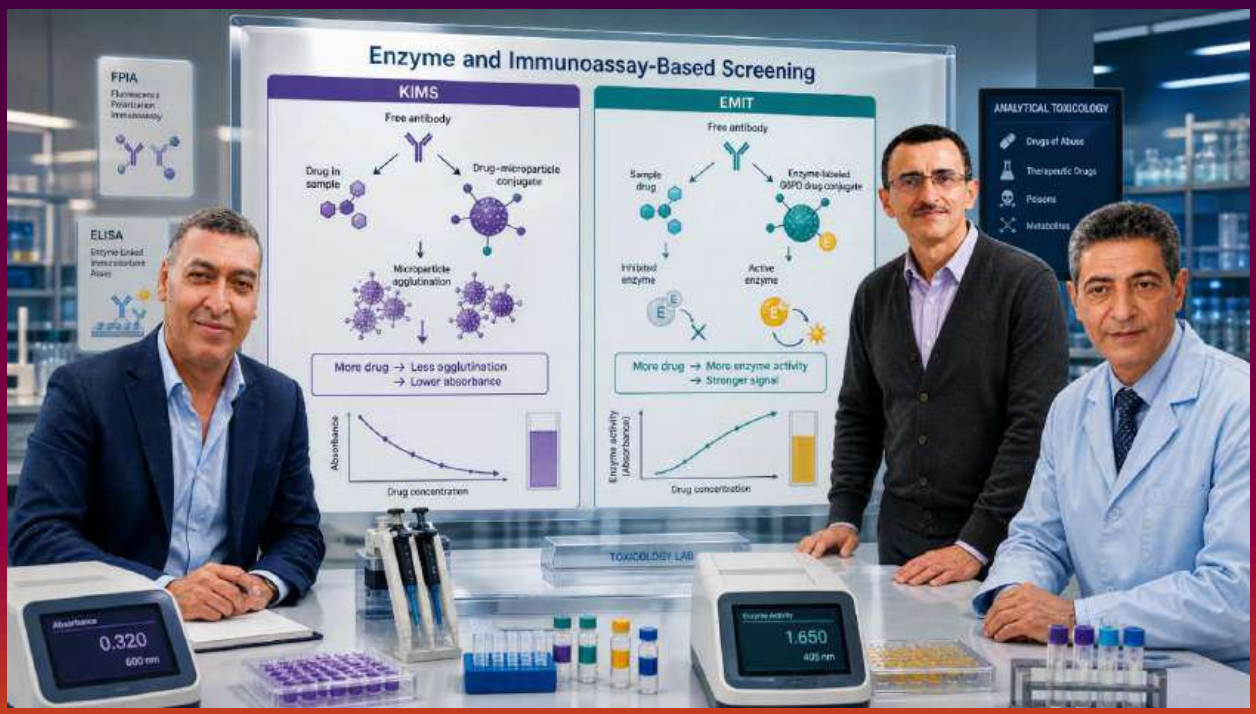
Zinedine, A., et al. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. Food and Chemical Toxicology, 45(1), 1–18.

Zollner, P., & Mayer-Helm, B. (2006). Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography–atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1136(2), 123–169.

CHAPTER (18) الفصل الثامن عشر

التحليل الحديث للأدوية في المختبرات السريرية: مراجعة سردية للطرق العملية والتكنولوجيات الناشئة

MODERN DRUG TESTING IN CLINICAL LABORATORIES: A NARRATIVE REVIEW OF PRACTICAL APPROACHES AND EMERGING TECHNOLOGIES



الفصل الثامن عشر

التحليل الحديث للأدوية في المختبرات السريرية: مراجعة سردية للطرق العملية والتكنولوجيات الناشئة

MODERN DRUG TESTING IN CLINICAL LABORATORIES: A NARRATIVE REVIEW OF PRACTICAL APPROACHES AND EMERGING TECHNOLOGIES

المقدمة (Introduction)

تُشكل اختبارات السموم السريرية (Clinical Toxicology Testing) ركيزة إبستمولوجية وأنطولوجية لا غنى عنها في بنية طب المختبرات المعاصر (Laboratory Medicine)، إذ تتجاوز الحدود الوظيفية البسيطة لتلعب دوراً محورياً في دعم الممارسة الإكلينيكية الرامية إلى تحسين رعاية المرضى وإدارة الأدوية (Patient Care and Pharmacotherapy Management). ترتكز هذه المنظومة التشخيصية على تحديد و/أو قياس الأدوية (Drugs)، والمستقلبات الحيوية (Metabolites)، والعناصر النزرة والسامة (Trace and Toxic Elements)، والمواد غير المشروعة (Illicit Substances) ضمن المصفوفات البيولوجية المختلفة (Biological Matrices). وتتفرع هذه التطبيقات لتشمل مراقبة الأدوية العلاجية (Therapeutic Drug Monitoring - TDM)، واختبارات السموم الخاصة بالمواليد الجدد (Neonatal Toxicology Testing)، فضلاً عن التحليل الدقيق للعناصر السامة والنزرة.

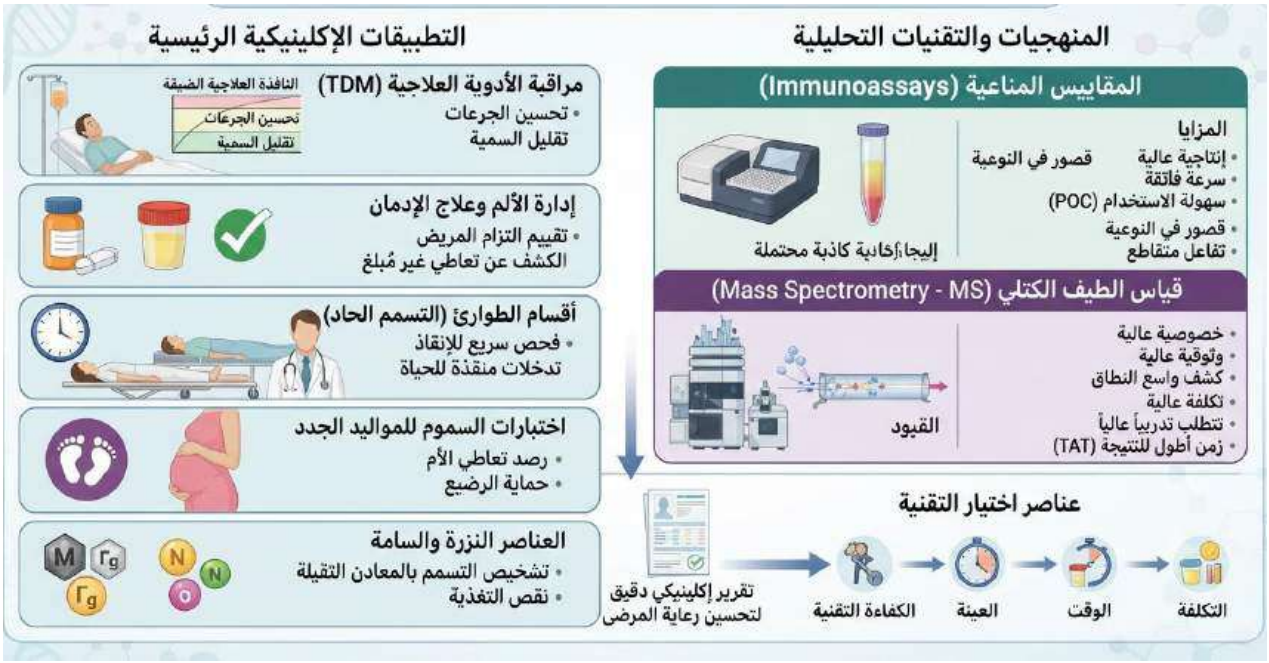
تستطب مراقبة الأدوية العلاجية (TDM) بشكل أساسي للأدوية ذات النافذة العلاجية الضيقة (Narrow Therapeutic Windows)، بهدف تحسين أنظمة الجرعات (Dosing Regimens) للوصول إلى الفعالية الدوائية القصوى مع تقليل مخاطر السمية (Toxicity Risks) إلى أدنى حد ممكن. وفي السياق الإكلينيكي ذاته، تعتمد عيادات إدارة الألم (Pain Management Clinics) وعيادات علاج اضطرابات تعاطي المواد المخدرة (Substance Use Disorder Treatment Clinics) على تقنيات تحليلية حاسمة (Definitive Testing Methodologies) لتقييم مدى التزام المرضى بالمواد الخاضعة للرقابة (Patient Adherence to Controlled Substances)، والكشف عن أي تعاطٍ غير مُبلغ عنه (Unreported Drug Use). أما في أقسام الطوارئ (Emergency Departments)، حيث يتوافد المرضى محملين بأعراض وعلامات تسممية حادة، فإن الفحص السريع للسموم والأدوية يتيح اتخاذ تدخلات إسعافية ومنقذة للحياة (Life-Saving Interventions) (Kaufman et al., 2025). وغالباً ما يستوجب المريض المُسمَّم تقييماً شمولياً متعدد الأبعاد لتشخيص المسببات المرضية بدقة، وهو ما يتحقق عبر تكامل فحوصات الأدوية المبدئية، والتأكيد المُستهدف للعوامل المُشتبه بها (Targeted Confirmation)، والتحليلات الاستكشافية غير المُستهدفة (Untargeted Analysis) لكشف الكيانات المجهولة. وفي ذات السياق، يسهم اختبار المواليد الجدد للكشف عن التعرض للأدوية في رصد تعاطي الأم للمخدرات أثناء فترة الحمل، مما يوجه التدخلات الإكلينيكية وخدمات الدعم الاجتماعي لحماية الرضيع (Wood et al., 2017). إضافة إلى ذلك، يضطلع تقييم العناصر النزرة والسامة بدور حيوي في تشخيص حالات القصور التغذوي أو التسمم الحاصل نتيجة التعرض البيئي أو المهني للمعادن الثقيلة (Tchounwou et al., 2012).



صورة للمؤلفين وهم يناقشون أهمية الاختبارات السريرية

تتداخل في هندسة اختبارات السموم منهجيات تكنولوجية متباينة، أبرزها المقاييس المناعية (Immunoassays) وتقنيات قياس الطيف الكتلي (Mass Spectrometry - MS). تتميز المقاييس المناعية بقدرتها العالية على الإنتاجية (High-Throughput) وسرعتها الفائقة مع الحد الأدنى من متطلبات تحضير العينات (Minimal Sample Preparation)، مما يجعلها مثالية للاستخدام في نقاط الرعاية (Point of Care - POC). غير أن هذه المقاييس تعاني أحياناً من قصور في النوعية التحليلية (Analytical Specificity)، وتكون عرضة لظاهرة التفاعل المتبادل (Cross-Reactivity) مع الجزيئات المتشابهة هيكلياً، الأمر الذي يفضي إلى نتائج إيجابية كاذبة (False-Positive Results) تتطلب الحذر الإكلينيكي (Saitman, 2025; Saitman et al., 2014). في المقابل، وعلى الرغم من التحديات التشغيلية، يوفر قياس الطيف الكتلي خصوصية متزايدة ووثوقية تحليلية عالية تتيح الكشف عن نطاق واسع من المواد المُحلَّلة (Analytes) بدقة تفوق المقاييس المناعية التقليدية. ومع ذلك، تفرض هذه التكنولوجيا على المختبرات ضرورة إجراء تقييمات استراتيجية شاملة تشمل: تكلفة الاستحواذ والصيانة، طبيعة مصفوفة العينة (Sample Matrix)، متطلبات تحضير العينات، الزمن اللازم لظهور النتيجة (Turnaround Time - TAT)، الكفاءة التقنية المطلوبة للتشغيل والصيانة، وتطوير أو التحقق من صحة الطرق (Method Validation/Development)، إلى جانب المساحة الفيزيائية للمختبر السريري، لضمان ملائمة النظام للاحتياجات الإكلينيكية الفعلية.

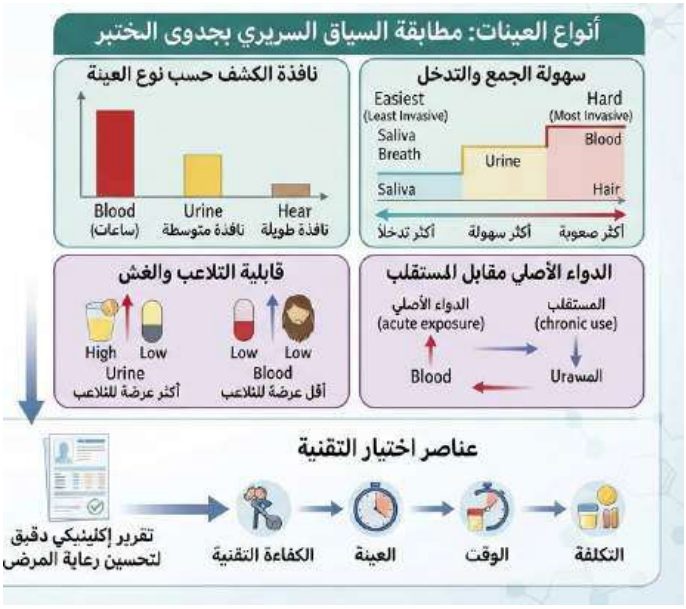
نسعى في هذه المراجعة إلى تقديم إطار تحليلي شامل للتقنيات المعاصرة المستخدمة في اختبارات تعاطي الأدوية، مع تسليط الضوء على الابتكارات الحديثة والإشكاليات المنهجية المستمرة في هذا الحقل. نقوم بدراسة نقدية لمزايا وقيود المصفوفات البيولوجية (Biological Matrices) الشائعة الاستخدام، فضلاً عن استكشاف القيمة المضافة للمصفوفات الحديثة في التشخيص السمومي. كما نأخذ بعين الاعتبار الممارسات الراسخة والنهج الناشئة على حد سواء، مع تفكيك تحديات التفسير الإكلينيكي التي تعترض الممارسة الروتينية. وأخيراً، نحدد المحددات المعيارية والتقنية الرئيسية في عملية اختيار الأجهزة لتوجيه مسار صنع القرار الإكلينيكي والمختبري نحو الكفاءة والتميز.



شكل (1): نظرة عامة على طرق اختبارات السموم السريرية وتطبيقاتها

اعتبارات اختبارات السموم (Toxicology testing considerations)

أنواع العينات (Specimen types)



يعتمد اختيار نوع العينة في اختبارات السموم على عوامل مثل نافذة الكشف، وسهولة الجمع، ومدى القابلية للتلاعب والغش. بالإضافة إلى ذلك، فإن ما إذا كان الدواء الأصلي أو مستقلبه هو السائد في عينة معينة يحدد مدى توفر المعايير التحليلية المناسبة، وهاتيك الاعتبارات تؤكد على ضرورة مطابقة اختيار العينة مع كل من السياق السريري وجدوى العمل المخبري.

البول (Urine)

تاريخياً، كان البول هو نوع العينة المُفضل لاختبارات السموم نظراً لسهولة جمعه (دون الحاجة للوخز بالإبرة) ونافذة الكشف الأطول نسبياً مقارنة بالدم (Saitman et al., 2014; Moeller et al., 2017). يتطلب البول بروتوكولات أبسط لتحضير العينات مقارنة بالدم قبل التحليل بواسطة كروماتوغرافيا السائل المرتبطة بمقياس الكتلة الترادفي (LC-MS/MS) (Fernández-Peralbo & Luque de Castro, 2012). وعلى الرغم من أن البول يُعد عينة مفيدة للسموم، إلا أن هذه المصفوفة لها عدة محاذير؛ أولاً، لا تعكس تركيز الدواء في البول الديناميكا الدوائية، ويمكن أن تأثر بعوامل مثل حالة الترطيب، أو الصيدلة الجينية، أو أمراض الكبد، أو خلل وظائف الكلى (Klaassen et al., 2019)، مما يقلل من فائدة البول

في تتبع مستويات الأدوية بمرور الوقت. ثانياً، لا يمكن مشاهدة عملية جمع البول دون انتهاك الخصوصية. وأخيراً، تُعد هذه المصفوفة عرضة بشكل خاص للتلاعب بسبب سهولة الغش؛ حيث يمكن استبدال البول بعينة بديلة أو تعديله عن طريق التخفيف أو إضافة مواد بهدف اجتياز اختبار المخدرات. على سبيل المثال، يمكن للمواد المغشوشة التي تحتوي على النتريت أكسدة مستقلب حمض دلتا-9-تيتراهيدروكانابينول (THC)، مما يجعل المستويات غير قابلة للاكتشاف لاختبارات التأكيد (Klaassen et al., 2019).

الدم (Blood)

يمتاز الدم كَمصفوفة لاختبارات السموم بجمعه المباشر، لذا فإن خطر الغش والتلاعب منخفض للغاية؛ وبالإضافة إلى ذلك، ترتبط تراكيز الأدوية في الدم بشكل أفضل والديناميكا الدوائية، ولهذا السبب غالباً ما يكون هو المصفوفة المفضلة لمراقبة الأدوية العلاجية (Klaassen et al., 2019) (TDM). وتشمل عيوب استخدام الدم الحاجة إلى الوخز بالإبرة ونافذة كشف أقصر مقارنة بالبول؛ على سبيل المثال، تُرصد نافذة الكشف عن بنزويل أكجونين في الدم بالساعات، في حين يمكن اكتشافه في البول لمدة تتراوح بين 1 إلى 3 أيام (أو لفترة أطول لدى المستخدمين المزمنين) (Verstraete, 2004). وتحليلياً، غالباً ما يتطلب الدم تنظيفاً شاملاً للعينات مقارنة بالبول، نظراً لضرورة إزالة الدهون، والحطام الخلوي، ومكونات المصفوفة الأخرى قبل التحليل، مما قد يترتب عليه تكاليف إضافية للمستلزمات ووقت الفنيين.

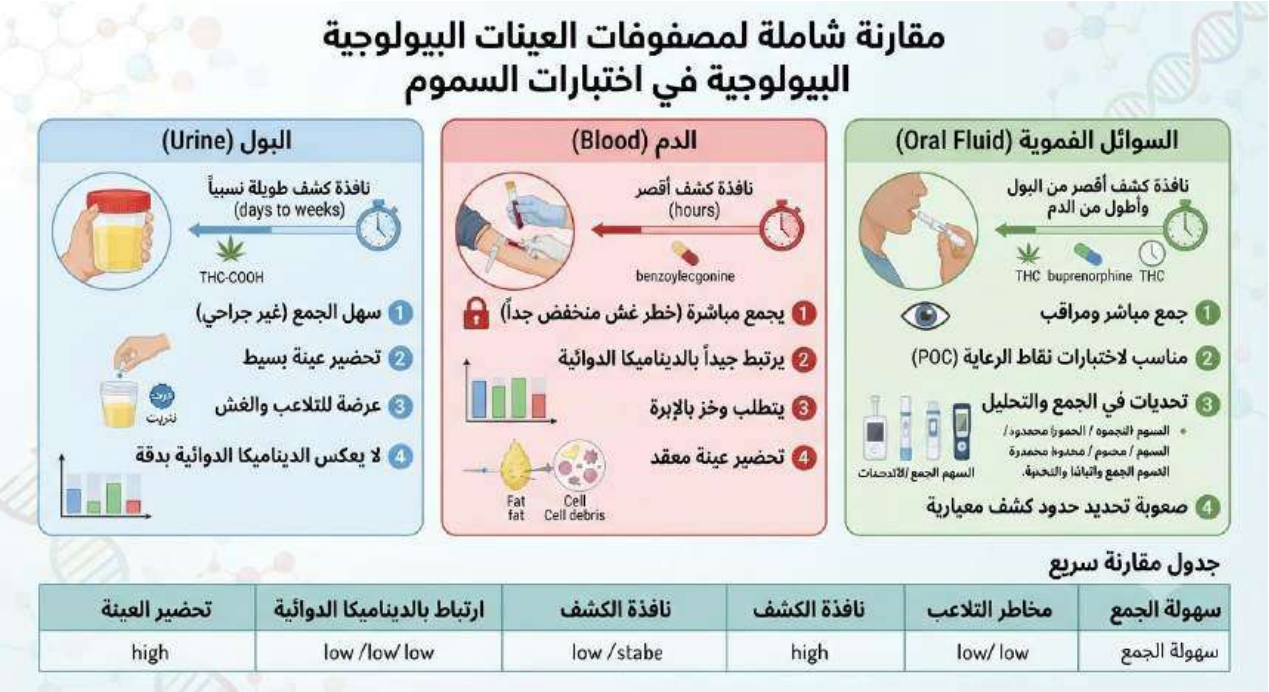
السوائل الفموية (Oral fluid)

اكتسبت السوائل الفموية مؤخراً شعبية واسعة كمصفوفة لاختبارات السموم نظراً لسهولة جمعها، وخلافاً للبول، يمكن مشاهدة عملية الجمع بشكل مباشر دون انتهاك الخصوصية، مما يجعلها خياراً جذاباً لاختبارات نقاط الرعاية (POC) والاختبارات الميدانية (Lee, 2020). ومع ذلك، فإن الطبيعة الحمضية قليلاً للسوائل الفموية قد تؤدي إلى حبس الأيونات (ion trapping) وارتفاع تراكيز الأدوية الأساسية غير المرتبطة بالبروتين مقارنة بالدم (Lee, 2020). وعلى العكس من ذلك، توجد الأدوية الحمضية غالباً بتراكيز أقل مقارنة بالدم؛ كما تظهر السوائل الفموية تراكيز أقل ونوافذ كشف أقصر عند مقارنتها بالبول، مما يقتصر استخدامها غالباً على حالات التعرض الحديثة جداً (Casati et al., 2023). قد تكون نافذة الكشف القصيرة مرغوبة لمواد تحليلية معينة، مثل مستقلب (THCCOOH)، والذي يمكن أن يظل عالقاً في البول لأسابيع لدى المستخدمين المزمنين (Lowe et al., 2009)، كما قد تكون مفيدة أيضاً لمراقبة مدى الالتزام بتناول الأدوية الموصوفة يومياً، مثل البوبرينورفين.

تتنامى البيانات المتعلقة بتفسير الأدوية ومستقلباتها في السوائل الفموية، لكنها لا تزال محدودة، وتتعارض عدة عوامل مع تفسير النتائج؛ فمثلاً، غالباً ما يُكشف عن الأدوية الأصلية بسهولة أكبر مقارنة بالمستقلبات، وهو ما يتناقض مع البول والدم حيث تسود المستقلبات عادةً. وتُعد السوائل الفموية عرضة بشكل خاص للتلوث بالمركبات البيئية (مثل الدخان أو الأدوية غير المغلفة) (Lee, 2020). وأخيراً، يؤثر طريق إعطاء الدواء (مثل الاستنشاق الذي يغطي تجويف الفم مقابل الدواء المغلف والمستهلك عن طريق الفم) بشكل جذري على التركيز الذي سيتم اكتشافه في السوائل الفموية (Casati et al., 2023).

توجد عدة عوامل تجعل من السوائل الفموية مصفوفة صعبة التحليل؛ أولاً، توجد تقنيات جمع مختلفة تتراوح بين أجهزة الجمع المتوفرة تجاريًّا والجمع المباشر اللعبي، مع أو بدون استخدام المحفزات، وقد يعيق عملية الجمع حالات طبية متعددة واستخدام أدوية محددة مثل القنب والتي تؤدي إلى جفاف الفم، وهذه العوامل مجتمعة يمكن أن تؤدي إلى اختلافات في محتوى البروتين، واللزوجة، ودرجة الحموضة عند خطوة الجمع وحدها (Lee, 2020; Casati et al., 2023). ثانياً، يفرض حجم

العينة المحدود والمحاليل المثبتة الموجودة في أجهزة الجمع تحديات تحليلية (Coulter & Moore, 2019)؛ إذ تتطلب المواد السطحية والمواد الحافظة والأصباغ طرق تنظيف عينة أكثر تعقيداً، مما يؤدي إلى آثار مصفوفة ويقلل من العمر الافتراضي للعمود الكروماتوغرافي (Lamboley & Herbick, 2025; Mercier et al., 2022; Rottinghaus et al., 2013). وأخيراً، فإن التباين الذي يفرضه جمع وتحليل السوائل الفموية يجعل من الصعب تحديد حدود كشف معيارية كما نرى مع البول، مما يجعل من الصعب توفير نوافذ كشف موثوقة بعد تعاطي المخدرات، وقد تقتصر فائدة السوائل الفموية على مراقبة الامتثال للأدوية التي يتم اكتشافها بسهولة في السوائل الفموية ومن المتوقع تناولها يومياً على الأقل.



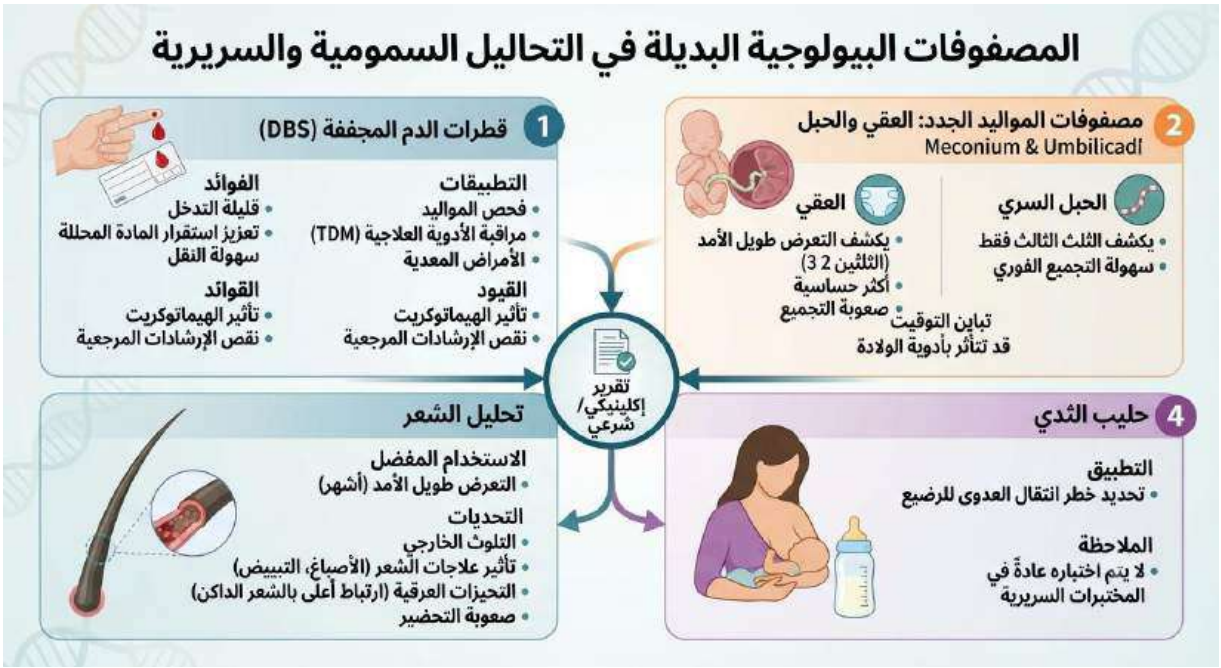
سهولة الجمع	مخاطر التلاعب	نافذة الكشف	نافذة الكشف	ارتباط بالديناميكا الدوائية	تحضير العينة
سهولة الجمع	low/ low	high	low /stabe	low /low/ low	high

المصفوفات البديلة (Alternative matrices)

لا يزال البول والدم (الدم الكامل، أو المصل، أو البلازما) هما العينات الأساسية المستخدمة في اختبارات السموم ومراقبة الأدوية العلاجية (TDM) على التوالي، ولكن تُستخدم المصفوفات البيولوجية البديلة أحياناً اعتماداً على السياق السريري أو الشرعي. تُعد قطرات الدم المجففة (DBS) مصفوفة مفيدة لجمع العينات عن بُعد وتستخدم سريرياً لفحص المواليد الجدد للاضطرابات الأيضية؛ ومع ذلك، فإن لهذه المصفوفة تطبيقات سريرية في الكيمياء السريرية، ومراقبة الأدوية العلاجية (TDM)، ومراقبة الأمراض المعدية، والدراسات الوبائية، وعلوم الطب الشرعي (Rottinghaus et al., 2013; Caggana et al., 2013; Zailani & Ho, 2023). تتمثل فوائد استخدام قطرات الدم المجففة (DBS) في كونها قليلة التدخل لأخذ عينات دقيقة، ويمكنها تعزيز استقرار المادة المحللة، وتقليل مخاطر المخاطر البيولوجية أثناء نقل العينات (Freeman et al., 2018). أما قيود التطبيق الواسع النطاق لـ (DBS) في الممارسة السريرية فهي: أن تراكيز المادة المحللة يمكن أن تختلف بين الدم الكامل والمصل/البلازما، مما قد يؤثر على اعتماد النطاق المرجعي أو النطاق العلاجي/السام للمصفوفات الثلاث جميعها. علاوة على ذلك، يمكن أن يؤثر الهيماتوكريت على حجم الدم المجمع على بطاقة (DBS)، كما أن الطرق التي تم التحقق من صحتها لـ (DBS) غير متوفرة حالياً لكل مادة محللة، وهناك إرشادات محدودة لعينات مراقبة الجودة (QC) لـ (DBS) وتجارب التحقق من صحة الطرق للاختبارات السريرية (Freeman et al., 2018).

تتميز الفئة العمرية للمواليد الجدد باستخدام أنسجة الحبل السري والعقي لتحديد التعرض للأدوية داخل الرحم؛ حيث يمثل العقي التعرض للأدوية خلال الثلثين الثاني والثالث من الحمل ويوفر حساسية أكبر من الحبل السري، إلا أن جمع العقي يُعد أمراً شاقاً وقد يستغرق عدة أيام حتى يتم إخراجه (Colby, 2017). من ناحية أخرى، يغطي الحبل السري فقط التعرض للأدوية خلال الثلث الثالث من الحمل، ولكن يمكن جمعه بسهولة فور الولادة. تُظهر مصفوفات المواليد الجدد تباولاً كبيراً عند استخدامها لتفسير التوقيت التقريبي للتعرض للأدوية، وقد تُظهر نتائج إيجابية للأدوية التي يتم إعطاؤها أثناء المخاض والولادة (McMillin et al., 2024). ولا يتم عادةً اختبار حليب الثدي في المختبر السريري، ولكنه قد يكون عينة مفيدة عند محاولة تحديد خطر انتقال العدوى إلى الرضيع.

أما بالنسبة للتعرض طويل الأمد، يُعد الشعر هو المصفوفة المفضلة؛ إذ تندمج الأدوية في الشعر عبر إمدادات الدم، أو العرق، أو التلوث الخارجي، وتكون مستقرة في الشعر تحت معظم الظروف. ومع ذلك، فإن الأصباغ، ومواد التبييض، وغيرها من علاجات الشعر قد تزيل الأدوية من الشعر بينما تجعله أيضاً أكثر عرضة للتلوث الخارجي (Hubbard, 2025). بالإضافة إلى ذلك، يرتبط صباغ الشعر ارتباطاً مباشراً بمدى ارتباط الدواء بالشعر، حيث يُظهر الشعر الأنسب تراكيز أعلى من الدواء مقارنة بالشعر الأفتح (Hubbard & Johnson-Davis, 2024). ولهذا السبب، يجب تفسير استخدام الشعر لاختبار المخدرات بحذر، مع وضع التحيزات العرقية المحتملة في الاعتبار، واستخدامه فقط في حالات مختارة. كما يُعد الشعر مصفوفة صعبة التحليل نظراً لتعقيد الخطوات التحليلية اللازمة لتحضير هذه المصفوفة للاختبار، بما في ذلك إزالة التلوث لإزالة التلوث البيئي (Hubbard, 2025).



المصفوفات المستقبلية (Future matrices)

يستمر مجال علم السموم السريري في التطور، بما في ذلك التطورات في مصفوفات العينات؛ فقد تركزت الجهود الأخيرة على تطوير المقاييس القائمة على التنفس للكشف السريع والدقيق عن القنب، مع تطبيقات تمتد عبر المجالات السريرية، والطب الشرعي، ومكافحة المنشطات (Beck et al., 2012; Giannoukos et al., 2018; Jeerage et al., 2023; Thevis et al., 2003; Trefz et al., 2017). يُعد جمع هواء التنفس إجراءً غير جراحي يتطلب الحد الأدنى من المعالجة القبلية للتحليل، على الرغم من بقاء التحديات في تحسين أجهزة الجمع، وفهم الحركية الدوائية، وتحسين الحساسية التحليلية.

عرق بصمة الإصبع هو مصفوفة حديثة أخرى قيد البحث، والتي توفر جمعاً غير جراحي وسريع للعينات؛ فقد أثبتت الدراسات المبكرة جدوى الكشف عن أدوية مثل الكوكايين، والـ THC، والمواد الأفيونية، والأمفيتامينات بتوافق جيد مع المصفوفات التقليدية، مما يدعم دورها المحتمل في كل من الإعدادات السريرية والشرعية (Brunelle et al., 2019; Costa et al., 2017; Hudson et al., 2019). ومع تزايد الطلب على اختبارات المخدرات السريعة وغير الجراحية والمناسبة للسياق، سيكون التطوير المستمر والتحقق من صحة المصفوفات البديلة أمراً بالغ الأهمية لتوسيع الفائدة السريرية لاختبارات السموم.



تقنيات الفحص (Screening technologies)

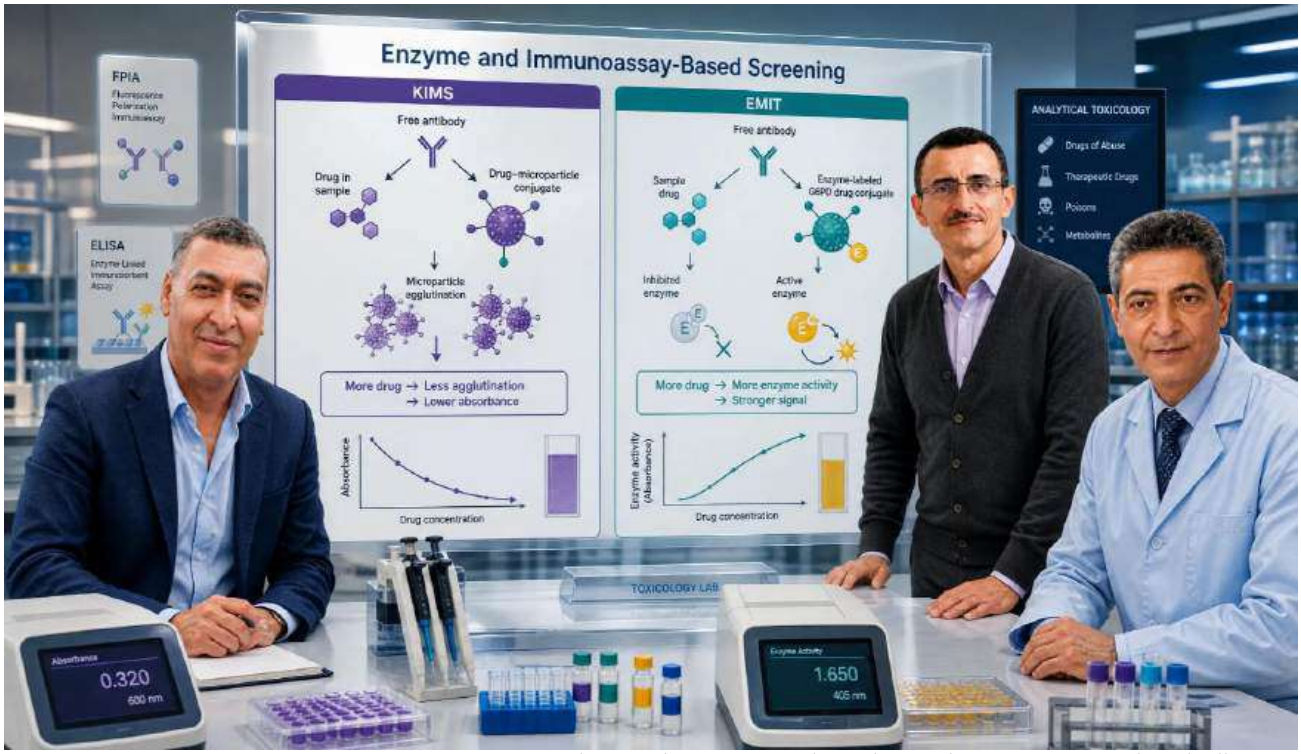
تُعد فحوصات البول للأدوية جزءاً شائعاً من تقييم المريض الأولي، لا سيما في بياعات مثل إدارة الألم، وطب الإدمان، وقسم الطوارئ. وفي المستشفيات الأكبر سناً، تُجرى الفحوصات غالباً بواسطة المقاييس المناعية، ولكن اختبارات التدفق الجانبي لنقاط الرعاية (POC) تُعد بديلاً شائعاً في العيادات الأصغر. ومع ذلك، فإن تقنيات الفحص هذه عرضة لنتائج إيجابية كاذبة وسلبية كاذبة على حد سواء، لذا يتم استكشاف بدائل أكثر حساسية وخصوصية بشكل متزايد.

فحص نقاط الرعاية (POC screening)

مبدأ طريقة كوب فحص الأدوية في نقاط الرعاية هو مقياس مناعي تنافسي بين الدواء الذي قد يكون موجوداً في البول وكاشف اقتران الدواء بالبروتين على شريط الاختبار (Gozdzialski et al., 2023). قد يستخدم الكوب أغشية شرائط من السليلوز النتروني المغلفة باقتران الدواء بالبروتين ولوحة تحتوي على اقتران الجسم المضاد الملون. وعندما يمتلئ الكوب بالبول، يُستخدم التدفق الجانبي لانتقال البول إلى اقتران الجسم المضاد، ثم إلى بروتين الدواء غير المتحرك في منطقة الاختبار. وعندما يكون بول المريض سلبياً للدواء أو عندما يكون الدواء أقل من الحد الفاصل للمقاييس، سيتعاقب اقتران الجسم المضاد الملون وبروتين الدواء المثبت معاً ويشكلان خطاً ملوناً في منطقة الاختبار. وإذا كان هناك دواء موجود في بول المريض، فسيكون هناك تنافس بين بروتين الدواء والدواء على مواقع الأجسام المضادة على شريط الاختبار. يشير خط التحكم إلى أنه قد تم إجراء الاختبار بشكل صحيح. وستحتوي النتيجة السلبية على خطين موجودين، أحدهما في مناطق الاختبار والتحكم. وستحتوي النتيجة الإيجابية على خط واحد فقط في منطقة التحكم (Lin et al., 2013). توفر أكواب فحص الأدوية في نقاط الرعاية نتائج فحص سريعة للأدوية خلال 5 إلى 10 دقائق من جمع العينة.

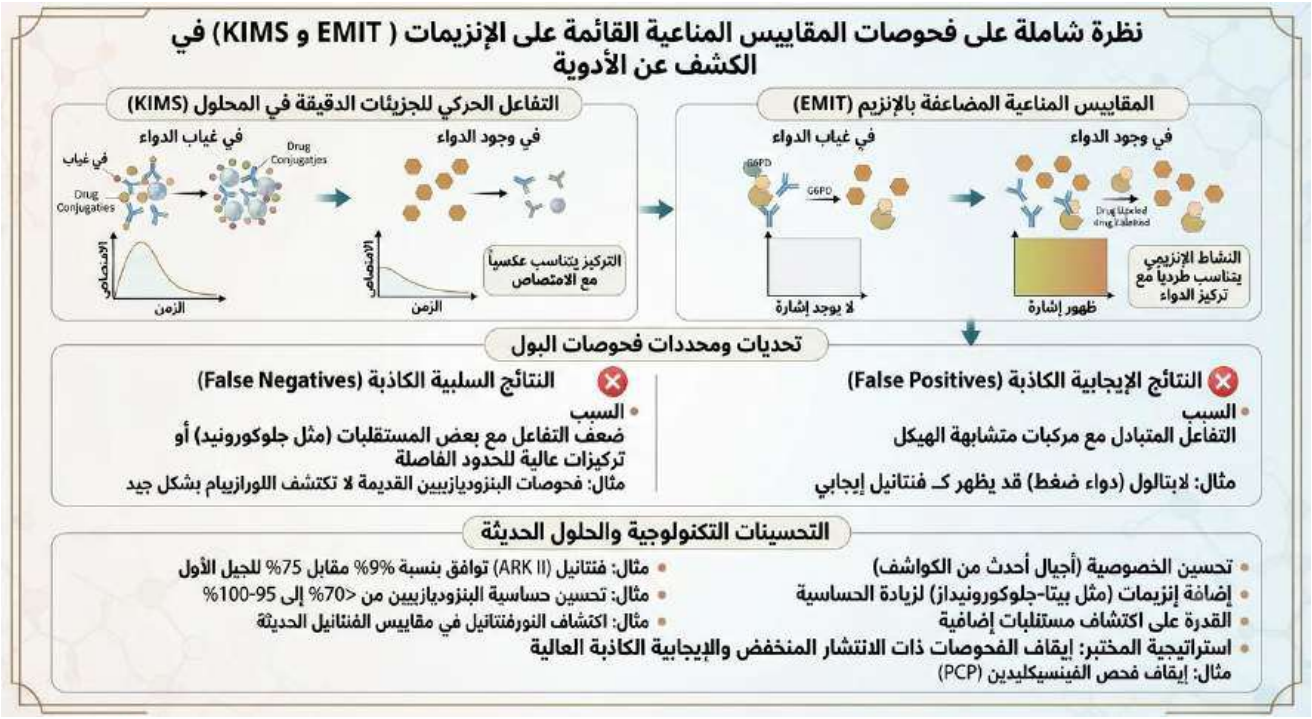
الفحص القائم على الإنزيمات والمقاييس المناعية (Enzyme and immunoassay-based screening)

تعتمد فحوصات الأدوية بالمقاييس المناعية على مجموعة متنوعة من التقنيات، بما في ذلك مقياس المناعة المانح للإنزيم المستنسخ، ومقاييس الاستقطاب الفلوري (FPIA)، ومقاييس الامتصاص المناعي للإنزيم المرتبط (ELISA)(Coulter & Moore, 2019). ومن بين أكثر التقنيات استخداماً هما التفاعل الحركي للجزيئات الدقيقة في المحلول (KIMS) وتقنية المقاييس المناعية المضاعفة بالإنزيم (EMIT). ففي مقياس (KIMS)، يرتبط الجسم المضاد الحر تنافسياً إما بمترافقات الأدوية مع الجزيئات الدقيقة أو بالدواء الداخلي؛ وفي غياب الدواء، ترتبط الأجسام المضادة بمترافقات الأدوية مع الجزيئات الدقيقة، مما يشكل تكتلات جزيئية ويزيد من الامتصاص. وعندما يكون الدواء موجوداً في العينة، فإنه يتنافس مع الدواء المترافق على ارتباط الجسم المضاد؛ وكلما زاد تركيز الدواء الداخلي، قلت الأجسام المضادة المرتبطة بالدواء المترافق مع الجزيئات الدقيقة، مما ينتج عنه تكتل أقل للجزيئات وانخفاض في الامتصاص، وبالتالي فإن تركيز الدواء يتناسب عكسياً مع الامتصاص (Coulter & Moore, 2019). وفي المقابل، تتضمن تقنية (EMIT) ارتباطاً تنافسياً بين الدواء الداخلي والدواء المُوسوم بإنزيم ديهيدروجيناز الجلوكوز-6-فوسفات (G6PD) على الجسم المضاد الحر. وفي غياب الدواء الداخلي، ترتبط الأجسام المضادة بالدواء المُوسوم بـ (G6PD)، مما يثبط نشاط الإنزيم ويمنع توليد الإشارة؛ وعندما يتواجد الدواء الداخلي، يتنافس مع الدواء المُوسوم على ارتباط الجسم المضاد، وكلما زاد ارتباط الجسم المضاد بالدواء الداخلي، بقي المزيد من الدواء المُوسوم بـ (G6PD) غير المرتبط، مما يسمح بنشاط إنزيمي. وبناءً على ذلك، يتناسب نشاط الإنزيم طردياً مع تركيز الدواء الداخلي في العينة (Rifai, 2022).



صورة للمؤلفين الثلاثة وهم يناقشون الفحص القائم على الإنزيمات والمقاييس المناعية، مع مقارنة بصرية واضحة بين:

- ← KIMS:
  - زيادة تركيز الدواء ← انخفاض التكتل ← انخفاض الامتصاص.
- ← EMIT:
  - زيادة تركيز الدواء ← زيادة نشاط الإنزيم ← إشارة أقوى.
  - الإشارة إلى تقنيتي FPIA وELISA.
- ← عرض الأجسام المضادة، مترافقات الدواء مع الجزيئات الدقيقة، مترافقات G6PD، منحنيات الامتصاص والنشاط الإنزيمي، وأدوات المختبر.



من الثابت جيداً أن أحد القيود الرئيسية لفحوصات البول للأدوية هو ارتفاع معدل النتائج الإيجابية الكاذبة بسبب التفاعل المتبادل مع المركبات متشابهة الهيكل (Brahm et al., 2010; Battini et al., 2023; Callaghan & Rappaport, 2021; Możdżeń et al., 2023; Pope et al., 2023). ومن الأمثلة المعروفة جيداً فحص الفنتانيل الإيجابي المفترض بسبب تناول دواء لابتالول المستخدم لعلاج مرض ارتفاع ضغط الدم أثناء الحمل، مما قد يؤدي إلى تفسيرات خاطئة ذات عواقب وخيمة (Wanar et al., 2022). وقد بذلت الشركات المصنعة جهوداً لتقليل معدلات النتائج الإيجابية الكاذبة باستخدام الأجيال الأحدث من كل مقياس؛ على سبيل المثال، أظهر فحص الفنتانيل (ARK) توافقاً بنسبة 75% مع تقنية (LC-MS/MS)، بينما بلغ توافق فحص (ARK II) نسبة 93% بسبب تحسن الخصوصية (Tang et al., 2021). ولتقليل النتائج الإيجابية الكاذبة، يُنصح المختبرات بالتوقف عن إجراء فحوصات البول للأدوية ذات الانتشار المنخفض، لا سيما إذا كانت تتمتع بمعدل مرتفع للنتائج الإيجابية الكاذبة (Saitman, 2025). ومن الأمثلة الشائعة على ذلك إيقاف فحص عقار الفينسيكليدين (PCP) في العديد من المختبرات بسبب انخفاض انتشاره وارتفاع معدلات النتائج الإيجابية الكاذبة الناتجة عن الأدوية الموصوفة بشكل شائع مثل الفينلافاكسين واللاموتريجين (Cole, 2022; Farley et al., 2017; Geraci et al., 2010; Kim et al., 2023).

كما يُلاحظ تكرار حدوث النتائج السلبية الكاذبة نتيجة ضعف التفاعل المتبادل مع جميع الأدوية ضمن فئة معين أو بسبب التركيزات العالية للحدود الفاصلة؛ حيث لا تتفاعل العديد من فحوصات البنزوديازبيين بشكل جيد مع المستقلبات المرتبط بالجلوكورونيد للأدوية الموصوفة بانتظام، مثل اللورازيبام، وغالباً ما تؤدي إلى نتائج سلبية كاذبة. وتشمل التحسينات الحديثة في أحد مقاييس البنزوديازبيين المناعية إضافة إنزيم الجلوكورونيداز لتحسين الحساسية السريرية من أقل من 70% في مقاييس الأجيال القديمة إلى 95-100% في المقياس المحسّن (Ge et al., 2024). ومثال آخر على تقليل النتائج السلبية الكاذبة يظهر في مقاييس الفنتانيل المناعية؛ إذ تمتلك مقاييس الجيل الأحدث حساسية محسّنة بسبب القدرة على اكتشاف

النورفنتانيل (Uljon et al., 2024). وستستمر فائدة فحص البول للأدوية في التحسن مع معالجة الشركات المصنعة لهذه المشكلات باستخدام أجيال أحدث من كل مقياس.

الفحص القائم على قياس الطيف الكتلي (Mass spectrometry-based screening)

يُعد القيد الرئيسي لفحوصات الأدوية هذه، بالإضافة إلى المعدل المرتفع للنتائج الخاطئة، هو عدم القدرة على رصد الأدوية الحديثة مع ظهورها، بما في ذلك نظائر الفنتانيل، والقنب التصنعي، والكسيلازين. وقد تغلبت بعض المختبرات على هذا القيد باستخدام تكنولوجيا متقدمة مثل قياس الطيف الكتلي «للفحص» عن الأدوية؛ وفي حين تستخدم بعض المختبرات مقاييس كروماتوغرافيا السائل المرتبطة بمقياس الكتلة التر(LC-MS/MS) adfi المُستهدفة للكشف عن عدد كبير من الأدوية (Smith et al., 2023)، فإن العديد من المختبرات الأخرى تستخدم التحليل غير المُستهدف من خلال محللات قياس الكتلي عالية الدقة لإبلاغ الكشف عن الأدوية نوعياً (Badea, 2025; Maurer, 2021; Wu & Colby, 2016). وغالباً ما توصف هذه الفحوصات بأنها «فحوصات» لأنها نوعية، ولكن نظراً لموثوقية التكنولوجيا، فهي أقرب إلى «التأكيدات النوعية». وتشمل فوائد هذه الطرق وجود سير عمل واحد للكشف عن جميع الأدوية والقضاء على الحاجة إلى تشغيل عينة واحدة على مقاييس أو منصات مختلفة متعددة؛ وبالإضافة إلى ذلك، فإن استخدام طريقة واحدة يعد أسهل للموظفين، ويزيل تحديات سير العمل (مثل كيفية إرسال العينات التي أظهرت نتائج إيجابية في الفحص إلى مختبر قياس الطيف الكتلي)، ولا يتطلب سوى مجموعة واحدة من قواعد نظام معلومات المختبرات (LIS). ومما يؤسف له أن استخدام هذه الطرق لاستبدال فحص المقاييس المناعية يؤدي إلى زيادة وقت إنجاز النتائج ويتطلب طاقم عمل تقنياً أكثر مهارة.

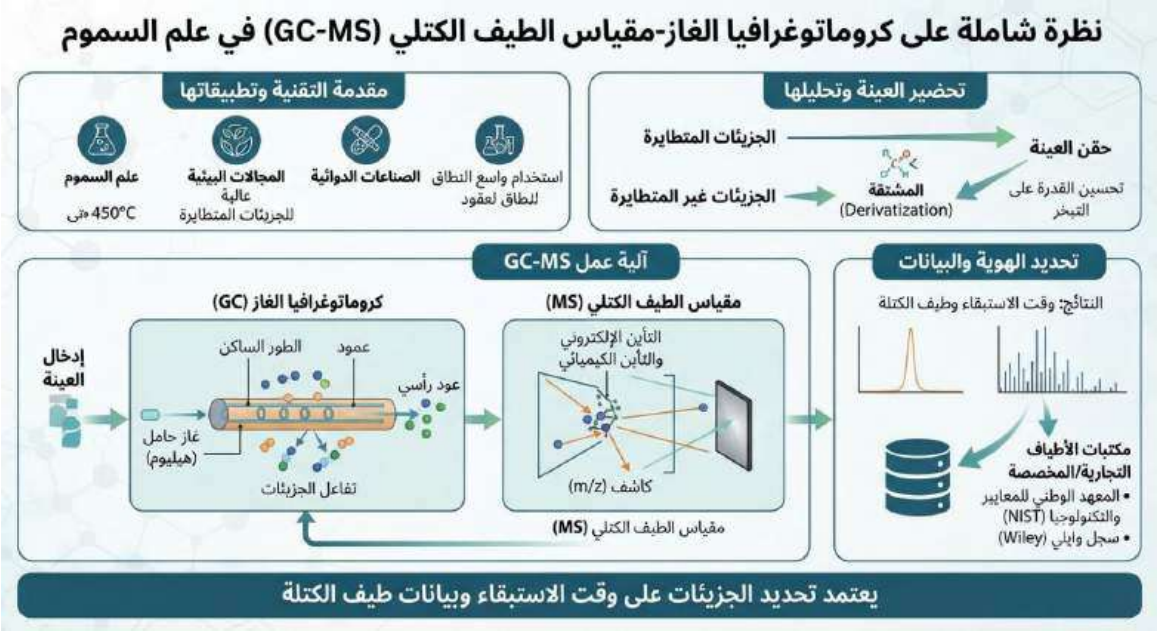


تقنيات التأكيد (Confirmation technologies)

يُوصى عموماً بتأكيد أي عينة تظهر نتيجة إيجابية في الفحص باستخدام تكنولوجيا حاسمة؛ ونظراً لطبيعتها الحساسة والنوعية، يُعد قياس الطيف الكتلي هو المقياس المفضل، والذي قد يتم ربطه بكروماتوغرافيا الغاز أو كروماتوغرافيا السائل، مع إمكانية استخدام مجموعة متنوعة من الكواشف (US Department of Transportation, 2025).

كروماتوغرافيا الغاز-مقياس الطيف الكتلي (GC-MS)

استُخدمت تقنية (GC-MS) على نطاق واسع في مجالات السموم، والبيئة، والصناعات الدوائية لعقود من الزمن، وهي توفر خصوصية عالية للجزيئات المتطايرة والقادرة على تحمل درجات حرارة تصل إلى 450 درجة مئوية. توفر تقنية (GC-MS) تحديد المركبات بناءً على بيانات طيف الكتلة المستمدة من مكتبات الأطياف التجارية أو المخصصة، ووقت الاستبقاء على العمود التحليلي (Rifai, 2022). أما بالنسبة للجزيئات غير المتطايرة، فيمكن تعديلها كيميائياً من خلال المشتقة (derivatization) لتعزيز قدرتها على التبخر من أجل الكشف التحليلي. يتم إدخال جزء مقتطع من العينة إلى جهاز (GC-MS) عبر عمود كروماتوغرافيا رأسي، يحتوي على طور ساكن وغاز حامل خامل (مثل الهيليوم) (Rifai, 2022). وعندما تخرج المركبات من العمود، فإنها تدخل إلى مقياس الطيف الكتلي، حيث تصبح مشحونة من خلال التأثير الإلكتروني أو التأثير الكيميائي، ويتم الكشف عنها بواسطة نسبة الكتلة إلى الشحنة (m/z). ويمكن أن يحدث تأين الجزيئات أيضاً من خلال التأين الكيميائي الموجب والسالب (Rifai, 2022). والجزيئات التي تتفاعل مع الطور الساكن سيكون لها وقت استبقاء أطول قبل الوصول إلى الكاشف، وتعتمد هوية الجزيئات على وقت الاستبقاء وبيانات طيف الكتلة (Pharma Sciences, 2025; Phenomenex, 2025). يمكن إجراء فحص الأدوية بواسطة (GC-MS) باستخدام مكتبات متوفرة تجارياً، أو باستخدام قواعد بيانات طيف الكتلة ذات التأثير الإلكتروني (مثل مكتبة المعهد الوطني للمعايير والتكنولوجيا، أو سجل وايلي لأطياف الكتلة)، أو يمكن للمستخدم النهائي إنشاء قاعدة بيانات مخصصة.



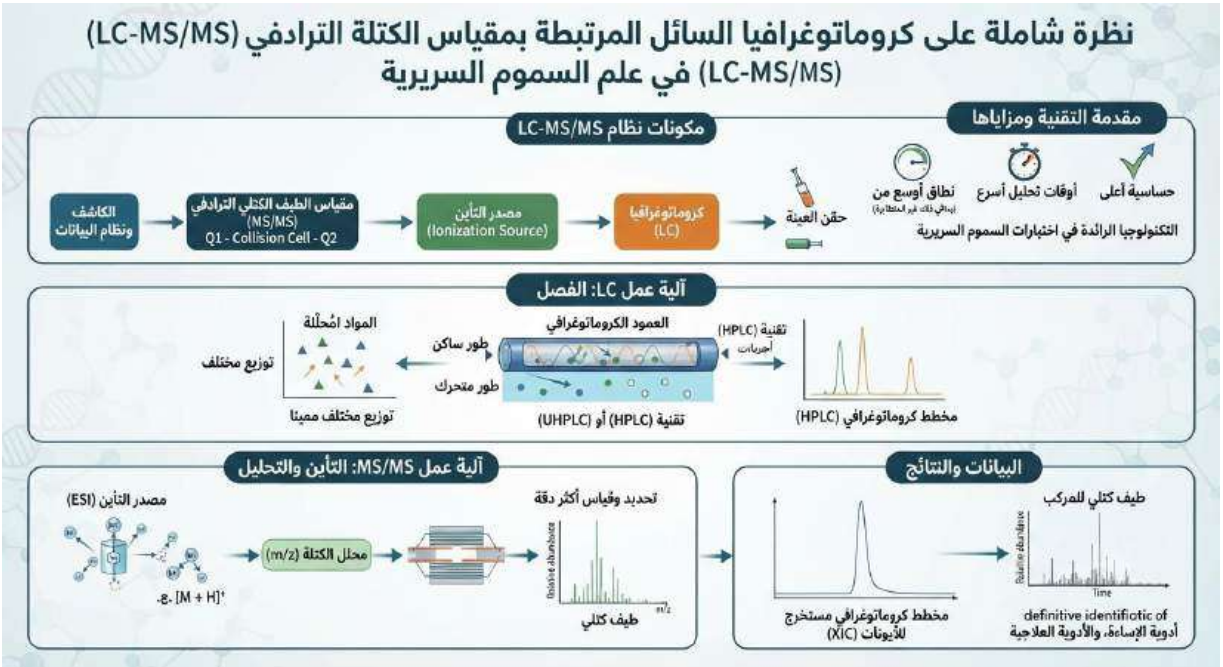
كروماتوغرافيا السائل المرتبطة بمقياس الكتلة الترادفي (LC-MS/MS)

أصبحت تقنية (LC-MS/MS) التكنولوجيا الرائدة في اختبارات السموم السريرية؛ فهي توفر عدة مزايا مقارنة بتقنية (GC-MS)، مثل الحساسية الأعلى، وأوقات تحليل أسرع، والقدرة على فحص نطاق أوسع من المركبات، بما في ذلك تلك غير المتطايرة. يتيح مكون قياس الكتلة الترادفي إجراء تحديد وقياس أكثر دقة للمواد المُحلَّلة من خلال مراحل متعددة لتحليل الكتلة (Rifai, 2022). وتُعد هذه التكنولوجيا فعالة بشكل خاص للكشف عن أدوية الإساءة، والأدوية العلاجية، والمركبات الطبيعية الموجودة في العينات البيولوجية.

كروماتوغرافيا السائل (LC) هي طريقة تُستخدم لفصل المواد المُحلَّلة في مخلط بناءً على توزيعاتها المختلفة بين طور ساكن (صلب أو سائل مثبت على دعامة صلبة داخل العمود) وطور متحرك (مذيب أو مخلط مذيبات يتدفق عبر العمود) (Rifai,

2022). تتضمن كروماتوغرافيا السائل عالية الأداء (HPLC) استخدام مضخة لتوصيل الطور المتحرك بمعدل تدفق ثابت وحقن العينة على العمود الكروماتوغرافي تحت ضغط إيجابي. تلعب عوامل مثل نوع الطور الساكن، وتركيبة الطور المتحرك، ومعدل التدفق، ودرجة الحرارة أدواراً حاسمة في فصل المواد المُحلَّلة. ونظراً لتوافقها مع الأتمتة وإمكانية التكرار المتسقة، تُعد تقنية (HPLC) واحدة من أكثر تقنيات (LC) استخداماً في تطبيقات (LC-MS)، سواء في المختبرات الطبية أو الكيمياء التحليلية. وتشمل تنويعات (HPLC) التقليدية تقنية (HPLC) منخفضة التدفق (النانوية أو الدقيقة) وكروماتوغرافيا السائل فائقة الأداء (UHPLC).

عند إقرانه بنظام (LC)، يعمل مقياس الطيف الكتلي ككاشف للأيونات. يتم شحن المادة المحللة (تأينها) في مصدر مقياس الطيف الكتلي من خلال آليات مختلفة (Morato & Cooks, 2023). بمجرد التأين، تنتقل أيونات المادة المحللة إلى مكون محلل الكتلة، حيث يتم اختيارها بناءً على نسبة الكتلة إلى الشحنة (m/z). وعادة ما تحمل أيونات المواد المُحلَّلة ذات الجزيئات الصغيرة (أقل من 1000 دالتون) شحنة واحدة، مما يجعل نسبة الكتلة إلى الشحنة (m/z) مكافئة لكتلة الأيون. وغالباً ما يُمثل هذا كـ [M + H]+ للأيونات البروتونية (الموجبة) و[M – H]– للأيونات منزوعة البروتون (السالبة). أما الجزيئات الأكبر، مثل الببتيدات والبروتينات، فيمكن أن تحمل شحنات متعددة، لذا فإن نسبة (m/z) الخاصة بها هي كتلة الأيون مقسومة على عدد الشحنات. بعد ذلك، تنتقل الأيونات المختارة إلى الكاشف، ويظهر الناتج البياني في شكل طيف كتلي، مع وضع نسبة (m/z) على المحور الأفقي ووفرة الإشارة على المحور الرأسي. وعند دمجها مع نظام (LC)، يمكن إنشاء مخطط كروماتوغرافي يرسم وفرة الأيونات النسبية لقيم (m/z) محددة بمرور الوقت (Rifai, 2022). تتمتع تقنية (LC-MS/MS) بالعديد من المزايا، مثل الحساسية الأعلى، ووقت إنجاز أسرع للنتائج، والكشف عن نطاق أوسع من المركبات، مقارنة بتقنية (GC-MS).

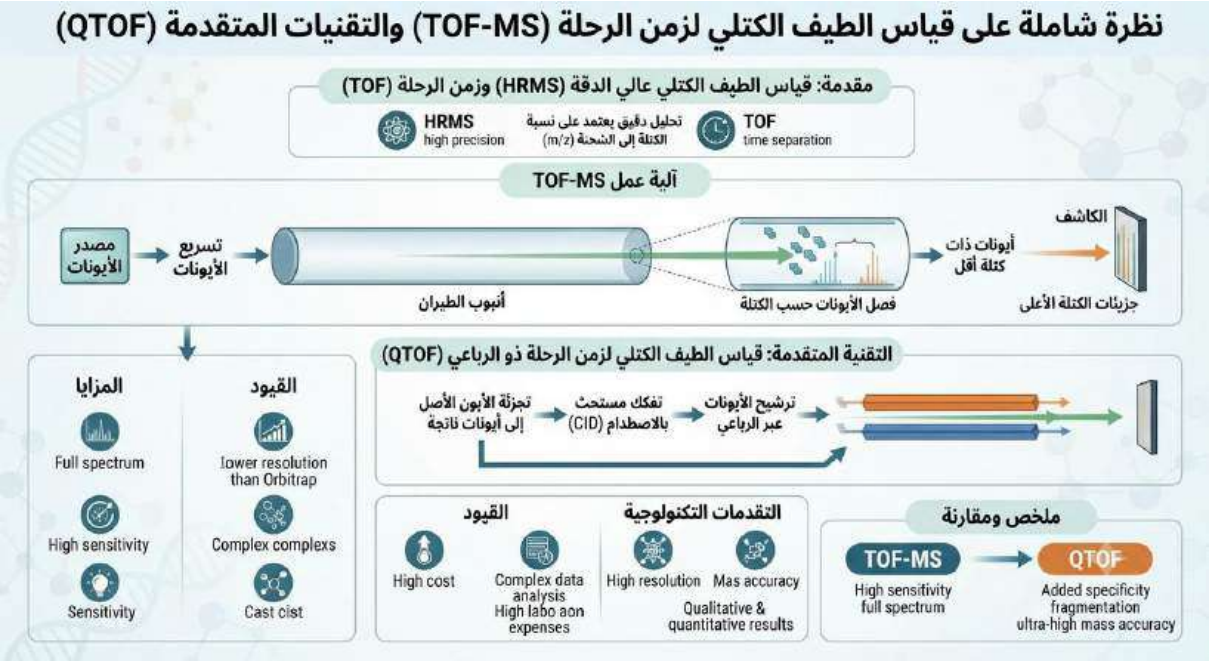


قياس الطيف الكتلي لزمن الرحلة (TOF-MS)

يقيس قياس الطيف الكتلي لزمن الرحلة (TOF-MS) نسبة (m/z) للأيونات التي يتم تسريعها بواسطة مجال كهربائي. تنتقل الأيونات عبر أنبوب طيران، وتتسارع الأيونات ذات الكتلة الأقل نحو الكاشف قبل جزيئات الكتلة الأعلى التي تستغرق وقتاً أطول للوصول إلى الكاشف (Rifai, 2022). تعتمد هوية الجزيئات على نسبة (m/z) ووقت الاستبقاء. تتمثل فوائد (TOF-

MS) في أن التقنية تكتسب طيف كتلي كاملاً، مما يسمح بالتحليل السريع. ويمكن للكاشف تحليل نطاق من الكتل من الجزيئات الصغيرة إلى الكبيرة ولديه حساسية عالية للكشف عن الجزيئات منخفضة الوفرة. وتشمل قيود (TOF-MS) دقة أقل مقارنة بجهاز (Orbitrap)، وتفسير البيانات المعقدة، وارتفاع النفقات الرأسمالية للمعدات.

يضيف مقياس الطيف الكتلي لزمن الرحلة ذو الرباعي (QTOF) مستوى آخر من الخصوصية من خلال ترشيح الأيونات ذات نسبة الكتلة إلى الشحنة (m/z) المرغوبة عبر الرباعي، ثم تخضع الأيونات لتفكك مستحث بالاصطدام لتجزئة الأيون الأصل إلى أيونات ناتجة. يتم تسريع الأيونات الناتجة داخل أنبوب زمن الرحلة (TOF)، حيث يتم فصلها بناءً على نسبة (m/z) الخاصة بها. وتتمثل التقدمات التكنولوجية لجهاز (QTOF) في طيف كتلي عالي الدقة، ودقة الكتلة، والحساسية التحليلية العالية، والقدرة على تقديم نتائج نوعية وكمية؛ بينما تتمثل قيوده في ارتفاع النفقات الرأسمالية، وتحليل البيانات المعقدة، ونفقات العمالة لتشغيل الجهاز وصيانته. ويوفّر قياس الطيف الكتلي عالي الدقة (HRMS) حساسية عالية ودقة كتلة تصل إلى عدة منازل عشرية، ويمكنه اكتساب طيف كتلي كامل، وتتشابه نقاط القوة والقيود فيه مع تقنيتي (TOF) و(QTOF) (Negrusz & Cooper, 2013).



مستقبل قياس الطيف الكتلي (Future of mass spectrometry)

في الوقت الذي تتقدم فيه تكنولوجيا (LC-MS/MS) باستمرار، كانت هناك رغبة قديمة في وجود منصات أوتوماتيكية تعتمد على قياس الطيف الكتلي وتتيح الوصول العشوائي في مساحة المختبرات السريرية. ففي عام 2017، أصبح أول مقياس لـ (LC-MS) معتمد من قِبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA) متاحاً لفيتامين د (VanZandt, 2017)، وتم إتاحة منصة أوتوماتيكية ثانية بعد فترة وجيزة (Medical Product Outsourcing, 2020)، إلا أنه تم إيقاف كليهما منذ ذلك الحين. وكان أحد القيود الرئيسية لهذه المنصات هو محدودية قائمة الاختبارات، حيث قدم كلاهما فحوصات لفيتامين د فقط. وفي الوقت الحالي وخلال السنوات القليلة القادمة، سيتم إدخال مقياس جديد يعتمد على (LC-MS/MS) على مستوى العالم والذي سيتألف من أكثر من 60 مادة محللة (Mirasol, 2024). وبمجرد توفر أدوية الإساءة على هذه المنصة، سيتيح ذلك وقتاً أسرع لإنجاز النتائج مع الحد الأدنى من التداخلات، مما يقلل الحاجة إلى فحص وتأكيد منفصلين. المستقبل المتصور لقياس الطيف الكتلي هو انخفاض التكلفة (النفقات الرأسمالية والصيانة) وحجم البصمة المكانية للسماح بالتحليل بالقرب من سرير

المرضى؛ وستتوفر تجارياً مكتبات مُستهدفة وغير مُستهدفة للتوحيد القياسي بين المختبرات، وستمتد مواد المعهد الوطني للمعايير والتكنولوجيا (NIST) لتشمل الأدوية والجزيئات المستمدة من مكتبات قياس الطيف الكتلي [مثل الكاثينونات ومشتقات البيروفاليرون (مثل أملاح الحمام)، والمهدئات-المنومات (مثل البنزوديازيبينات المصممة، ومظائر حمض الغاما-أمينوبوتيريك)، والأدوية الانفصالية (مثل الكيتامين)، والمخدرات النفسية والمخدرات الاصطناعية (مثل الفينيليثلامينات، والسيلوسيبين)، ومناهضات مستقبلات القنب الاصطناعية (مثل JWH-018)، والمواد الأفيونية الاصطناعية (مثل نظائر الفنتانيل، والنيتازينات)، والمنشطات (مثل الأمفيتامينات المصممة)، وغيرها من المواد المؤثرة عقلياً الجديدة (NPS) (مثل الكراتوم)، والمضافات السامة (مثل الكسيلازين، والميساميزول)]. وعلاوة على ذلك، سيتم استخدام التعلم الآلي والذكاء الاصطناعي (AI) للتنبؤ بأطياف الكتلة (Hong et al., 2025).



ستكون الأجهزة سهلة الاستخدام، على غرار الأجهزة الجاهزة للتشغيل الفوري (plug-and-play)، وتحتوي على واجهات لدمج أدوات تحليل البيانات بغرض إدارة البيانات لتسهيل التكامل في مختبرات المستشفيات والعيادات (Liu et al., 2025). وسيتم تطبيق تحضير العينات الآلي عبر الإنترنت (French, 2015a)، ليس فقط للبول والمصل/البلازما، بل للمصفوفات المعقدة مثل الشعر، والسوائل الفموية، والعقي، وأنسجة الحبل السري، والعرق، والتنفس، وما إلى ذلك (Kanao & Ishihama, 2025; Kozlova et al., 2022). وسيكون وقت إنجاز النتائج أقل من 10 دقائق للوحات الأدوية واسعة النطاق مع إمكانية الوصول العشوائي للسماح بالعينات الطارئة والفورية (STAT). وسيستوعب سير عمل قياس الطيف الكتلي علم البروتينات وعلم التمثيل الغذائي كاختبارات روتينية في المختبر السريري (Zhu, 2024). وأخيراً، سيحل قياس الطيف الكتلي محل فحوصات الأدوية في نقاط الرعاية (POC) والمقاييس المناعية، وستكون هناك رموز مصطلحات الإجراءات الحالية (CPT) لتلك التكنولوجيا الجديدة والأدوية الأحدث.

الجدول 1: مقارنة بين اختبارات المقاييس المناعية واختبارات قياس الطيف الكتلي

الميزة	المقاييس المناعية(Immunoassay)	قياس الطيف الكتلي(Mass spectrometry)
تكلفة الاستحواذ	منخفضة إلى معتدلة	عالية
كمية المعدات المساعدة	منخفضة	معتدلة إلى عالية
الفئة التنظيمية†	معتمدة من إدارة الغذاء والدواء-FDA) cleared)	اختبار مطور مخبرياً(LDT)
الصيانة ووقت التعطل	ضئيلة	واسعة النطاق مع وقت تعطل معتدل
تكرار المعايرة النموذجي (يعتمد على الفحص)	دورية	مع كل دفعة تحليلية
عقد خدمة المورد	رخيص نسبياً	مكلف نسبياً
التوظيف والخبرة	تدريب عام	طاقم عمل مدرب بدرجة عالية
سهولة التنفيذ	عالية: مجموعات معتمدة منFDA ؛ تتطلب التحقق فقط	معتدلة إلى منخفضة: تتطلب التحقق الكامل والتوثيق التنظيمي
وقت إنجاز النتائج	سريع: من دقائق إلى ساعات	معتدل: من ساعات إلى أيام
مرونة قائمة الاختبارات	تقتصر على فحوصات فئات الأدوية المتاحة؛ اختبار واحد لكل فئة	اكتشاف واسع ومتعدد المواد المحللة في تشغيل واحد؛ قابلة للتكيف مع الأدوية الناشئة
تكلفة الاستثمار الأولي	منخفضة	عالية
تكلفة الاختبار الواحد (بعد الاستثمار الأولي)	معتدلة	منخفضة
الأنسب لـ	المختبرات الصغيرة/المتوسطة؛ الفحص السريع والروتيني؛ البيئات الأقل تعقيداً	المراكز الأكاديمية الكبيرة، مختبرات المراجع؛ الاختبارات واسعة النطاق وعالية الحجم؛ البيئات ذات الخبرة التقنية

† غالبية المقاييس المناعية المستخدمة في المختبرات السريرية معتمدة من إدارة الغذاء والدواء (FDA)، ولكن قد يكون بعضها اختبارات مطورة مخبرياً (LDT)؛ وبالمثل، قد تكون الفحوصات القائمة على قياس الطيف الكتلي معتمدة من (FDA) ولكن هذا أمر غير شائع اعتباراً من عام 2025. FDA، إدارة الغذاء والدواء الأمريكية؛ LDT، اختبار مطور مخبرياً؛ MS، قياس الطيف الكتلي.

اعتبارات الفحص وطرق الدقة العالية (Considerations for screening and high-resolution methods)

عند تقييم منصات السموم، يجب على المختبرات موازنة تكاليف الاستحواذ والصيانة، ومتطلبات التوظيف، والاعتبارات التنظيمية، والجدوى التقنية (الجدول 1). توفر المقاييس المناعية والفحوصات القائمة على الإنزيمات عموماً تكاليف أولية أقل، وصيانة ضئيلة، وتنفذاً مباشراً، لا سيما عندما تكون المجموعات المعتمدة من إدارة الغذاء والدواء (FDA) متاحة. تتطلب هذه الفحوصات تدريباً أقل تخصصاً للموظفين ويمكن دمجها بسرعة في سير العمل الروتيني، مما يجعلها مفيدة للمختبرات الصغيرة أو تلك التي تتمتع بخبرة تقنية محدودة. ومع ذلك، فإن نفقات الكاشف المتكررة والحاجة إلى فحوصات منفصلة لكل فئة دوائية يمكن أن تؤدي إلى تكاليف أعلى لكل عينة بمرور الوقت، خاصة في البيئات عالية الحجم.

وعلى النقيض من ذلك، تتطلب الطرق القائمة على قياس الطيف الكتلي استثماراً كبيراً أولياً في الأجهزة، وعقود الخدمة، والبنية التحتية، إلى جانب صيانة أكثر شمولاً وطاقم عمل مدرب بدرجة عالية. وباعتبارها اختبارات مطورة مخبرياً (LDT)، تتطلب هذه الفحوصات أيضاً تحقّقاً صارماً قبل الاستخدام السريري. وعلى الرغم من هذه العوائق، يوفر قياس الطيف الكتلي تغطية واسعة للمواد المُحلَّلة، والمرونة لتكييف اللوحات مع تغير اتجاهات الأدوية، وتكاليف هامشية أقل لكل اختبار بمجرد إنشائه. وبالنسبة لمختبرات المراجع الكبيرة أو المراكز الطبية الأكاديمية ذات الحجم الكافي والخبرة، قد يقدم قياس الطيف الكتلي كفاءات من حيث التكلفة على المدى الطويل وقابلية للتوسع تفوق تكاليف الدخول الأعلى. أما في المختبرات الصغيرة أو المحدودة الموارد، فتظل المقاييس المناعية نهجاً عملياً خطّاً أولياً، مع إحالة اختبارات التأكيد إلى المراكز المتخصصة.

اختيار قياس الطيف الكتلي (Mass spectrometry selection)

هناك العديد من العوامل التي يجب مراعاتها عند بناء مختبر لقياس الطيف الكتلي؛ وفي حين أن بعضها مذكور أدناه، إلا أن البعض الآخر يشمل، على سبيل المثال لا الحصر، العائد على الاستثمار، خطط الدفع التي تقدمها كل شركة مصنعة (الشراء الرأسمالي مقابل تأجار الكاشف مقابل الدفع على مدى عدة سنوات)، والمساحة المتاحة في مؤسستك، وتعدد استخدامات الفحوصات التي يمكن إجراؤها على جهاز واحد. للحصول على مراجعة أكثر شمولاً حول كيفية تبرير جلب قياس الطيف الكتلي داخلياً (French, 2015b; Reisfield et al., 2007).

ما هي المادة (المواد) المحللة التي ترغب في قياسها؟

بالنسبة للمختبرات التي تبحث عن نتائج كمية ومستهدفة و/أو القدرة على تأكيد العينات التي تظهر نتيجة إيجابية في الفحص، يُعد مقياس الطيف الكتلي ثلاثي الرباعي حساساً ومحدداً بما فيه الكفاية ومن المرجح أن يفي بالغرض. أما إذا كان المختبر يرغب في استخدام فحص يعتمد على قياس الطيف الكتلي («التأكيد النوعي»)، فيجب التفكير في استخدام جهاز (Orbitrap) أو (TOF-MS). وأخيراً، تبرز الحاجة إلى استخدام كروماتوغرافيا الغاز (GC)، سواء مقترنة بقياس الطيف الكتلي أو دونه. وهناك اعتبار آخر يتمثل في ما إذا كانت هذه الأجهزة ستُستخدم لأغراض أخرى؛ حيث ستكون هناك حاجة إلى أجهزة مختلفة للقياس الكمي للهرمونات منخفضة التركيز مقابل علم البروتينات من القاعدة إلى أعلى (bottom-up proteomics)، وقد يؤدي ذلك إلى تشكيل اختيار الشراء الخاص بك.

كم عدد الأجهزة التي تحتاج إلى شرائها؟

لا يُقصد بمقاييس الطيف الكتلي أن توفر وقت تشغيل بنسبة 100% تقريباً مثل أجهزة المختبرات المركزية المؤتمتة بالكامل؛ وبدلاً من ذلك، فهي تتطلب بانتظام تنظيفاً واستبدالاً للأجزاء المستهلكة. بالإضافة إلى ذلك، قد تستغرق صيانة الوقاية التي يوفرها المورد (PM) من يوم إلى يومين. وإذا كان تقديم الاختبارات بشكل يومي أمراً بالغ الأهمية، فسيلزم وجود جهازين على الأقل. وقد يفرض وقت إنجاز النتائج المطلوب لفئة المرضى لديك تحديد عدد الأجهزة وطاقم العمل المطلوب، خاصة إذا كان متوقعاً أن يعمل المختبر على مدار الساعة طوال أيام الأسبوع (7/24).

يجب مراعاة نمو المختبر والرغبة في جلب المزيد من الفحوصات داخلياً مسبقاً؛ فإذا كانت جميع الأجهزة قيد الاستخدام باستمرار، فقد تكون هناك حاجة إلى أجهزة إضافية لتطوير طرق فحص جديدة.

ما مقدار خبرة قياس الطيف الكتلي لدى طاقم عمل المختبر؟

يُعد هذا اعتباراً هاماً عند اتخاذ قرار بشأن نوع مقياس الطيف الكتلي المراد شراؤه وأي الموردين سيتم التعامل معه. وعموماً، يُعتبر تعليم المستخدم المبتدئ كيفية استخدام نظام (LC-MS/MS) أسهل مقارنة بجهاز (Orbitrap) أو (TOF-MS). بالإضافة إلى ذلك، يُعد نظام (LC-MS/MS) شائعاً في المختبرات السريرية وقد يكون التدريب عليه أكثر سهولة. وبالنسبة لاختيار المورد، قد تكون الأجهزة القابلة للتخصيص بشكل أكبر وبالتالي الأكثر تعقيداً أفضل للمستخدمين ذوي الخبرة مقارنة بالأجهزة الأقل نمطية والتي قد تكون أبسط ويفضلها المستخدمون المبتدؤون. وفي كلا الحالتين، من الضروري أيضاً مراجعة التدريب بعناية، إن وجد، والمضمن مع شراء الجهاز.

هل يُعتبر استخدام لوحات أصغر متعددة أو لوحة أكبر شاملة للجميع أكثر فعالية من حيث التكلفة لاختبارات التأكيد؟

غالباً ما تكون لوحات التأكيد الأصغر الخاصة بفئة دوائية معينة أسهل في التطوير، مما يقلل الوقت الذي يقضيه التحليل في مرحلة التطوير قبل أن يصبح جاهزاً للاستخدام الفعلي. كما أنها تتطلب عددًا أقل من المواد المحللة في المعايرة، وضبط الجودة

(QC)، والمعيار الداخلي، مما يوفر في تكاليف الكواشف. ومع ذلك، إذا أظهرت العينة نتائج إيجابية في الفحص لعدة فئات دوائية، فسيتم تحضير تلك العينة الفردية وتحليلها عدة مرات، مما يتطلب وقتاً أطول من طاقم العمل التقني (والذي غالباً ما يكون المكون الأغلى في تكاليف التحليل).

أما لوحة التأكيد الأكبر والشاملة للجميع فتُقلل من وقت العمل اليدوي التقني لأن كل عينة تخضع لتحضير العينات مرة واحدة فقط، ولكن كل عينة ستتطلب وقتاً أطول لمراجعة البيانات، في حال تم مراجعة المخططات الكروماتوغرافية يدوياً. كما ستكون تكلفة الكواشف لكل عينة أعلى نظراً لوجود عدد أكبر من المواد المحللة في المعايرات، وضبط الجودة، والمعيار الداخلي.

يجب موازنة هذه الاعتبارات مقابل معدلات الاسترداد التأميني، والتي يتم دفعها مرة واحدة فقط لكل عينة، بغض النظر عن عدد مرات تشغيلها بغرض التأكيد.

تفسير النتائج (Result interpretation)

قد يبدو تفسير نتائج السموم بسيطاً للوهلة الأولى، ولكنه يُصبح معقداً بسبب مسارات الأيض المتداخلة، والشوائب، والتعرف على الأيضات الثانوية، وسوء فهم دور الفحص التمهيدي مقابل الفحص الحاسم، ونقص تدريب السموم. للأسف، غالباً ما يفتقر الأطباء إلى قاعدة المعرفة اللازمة لتفسير نتائج السموم بشكل صحيح (Gozdzialski et al., 2022). أظهرت مراجعة استرجاعية للسجلات عبر خمس عيادات خارجية أن 55% فقط من اختبارات مخدرات البول تضمنت تفسيراً موثقاً لنتائج السموم، ومن بين تلك النتائج، كان 28% منها متناقضاً مع تفسير أخصائي السموم المخبرية (Gale et al., 2017).

حتى داخل المختبر، يُقدر أن ما يقرب من واحد من كل عشرة تفسيرات لنتائج السموم كانت غير صحيحة في مسوحات اختبار الكفاءة لكلية علم الأمراض الأمريكية (CAP) عندما أجراها موظفو المختبر، بما في ذلك فنيو المقاعد والمشرفون (Jones et al., 2022). ويسلط هذا الضوء على أهمية وجود أخصائي سموم سريرية مدرب يعمل في المختبر للمساعدة في تفسير النتائج.

غالباً ما تبالغ الطواقم الطبية في تقدير دقة والقدرة على اكتشاف تعاطي المخدرات من خلال الفحوصات التقليدية، بينما يتم التقليل من شأن التأكيد بواسطة التكنولوجيا الحاسمة. هناك مفاهيم خاطئة شائعة حول ما يمكن أن تكشفه فحوصات المقاييس المناعية؛ على سبيل المثال، فحص المواد الأفيونية، المصمم للكشف عن المورفين، لن يكشف عن المواد الأفيونية الاصطناعية مثل الفنتانيل، أو الميثادون، أو الترامادول (Langman et al., 2019). وبالمثل، فإن فحص البنزوديازيبين، الذي غالباً ما يُصمم للكشف عن الأكسازيبام، لن يكشف عن جميع البنزوديازيبينات ضمن الفئة بالتساوي، وقد يؤدي تركيز الحد الفاصل المرتفع إلى تفويت أولئك الذين يتناولون جرعات منخفضة.

وعلى العكس من ذلك، غالباً ما يتم التقليل من شأن معدل النتائج الإيجابية الكاذبة والنتائج السلبية الكاذبة؛ فمثلاً، عادةً ما تتمتع فحوصات المقاييس المناعية للأمفيتامينات بأعلى معدل للنتائج الإيجابية الكاذبة (Brahm et al., 2010; Battini et al., 2023; Callaghan & Rappaport, 2021; Logan, 2019)، وغالباً ما تظل دون تأكيد. تم تصميم مقياس الأوكسيكودون المناعي للكشف عن الأوكسيكودون وليس مستقلباته الرئيسية، لذا فإن النتيجة الإيجابية لا تأكد الابتلاع، بل يجب استخدام اختبار التأكيد مع المستقلبات بدلاً من ذلك للتأكد من عدم حدوث غش عن طريق إضافة الدواء إلى البول.

وأخيراً، غالباً ما يتم الاستخفاف بدقة اختبارات التأكيد، حتى عندما يتم تفسيرها بواسطة خبراء في طب الإدمان (Reisfield et al., 2019).

تتخذ المختبرات السريرية مجموعة واسعة من النهج للمساعدة في تفسير نتائج سموم البول. كحد أدنى، يجب على المختبرات النظر في إضافة تعليقات تفسيرية إلى فحوصات مخدرات البول، وتسليط الضوء على قيودها، واقتراح اختبارات التأكيد عندما يكون ذلك مناسباً سريرياً. يمكن للوحات الفحص الهجين وتأكيد الطلب المباشر تبسيط هذه العملية؛ فإذا كان المريض يتناول دواءً موصوفاً ومن المتوقع أن تكون نتيجته إيجابية (على سبيل المثال، الكلونازيبام)، فسيكون من الأفضل الإرسال مباشرة للتأكيد لهذا الاختبار (البنزوديازيبينات) والفحص لبقية الفئات الدوائية. يُستخدم هذا النهج الهجين بشكل شائع لمرضى إدارة الألم الذين يخضعون لمراقبة الامتثال لاستخدام المواد الأفيونية. توفر كلية علم الأمراض الأمريكية (CAP) إرشادات حديثة ونصائح عمليّة حول اختبارات السموم والإبلاغ عنها (Dempsey et al., 2020).

وعند المشابهة للفحوصات، يجب على المختبرات النظر في إضافة تعليقات إلى نتائج التأكيد توضح المصدر الذي قد تنشأ منه مادة محللة معينة؛ على سبيل المثال: «قد ينتج المورفين عن تعاطي الكوديين، أو الهيروين، أو الأدوية التي تحتوي على المورفين، أو المنتجات التي تحتوي على بذور الخشخاش». ونظراً لأنماط الأيض المعقدة للعديد من الأدوية، ولا سيما المواد الأفيونية والبنزوديازيبينات، فمن المفيد أيضاً تزويد الأطباء بقائمة من الأ metabolites المتوقعة لكل دواء (كما هو موضح في الجدول 2). ويكمن أحد قيود هذا النهج في أن التركيز النسبي للأدوية يمكن أن يكون دلالة واضحة للغاية، وهو أمر قد لا يتم التقاطه. وتُعد التقارير التفسيرية لكل نتيجة من قِبل خبير في السموم أمراً مفيداً بشكل لا يصدق (Gershman et al., 2020)، إلا أنها غالباً ما تستغرق وقتاً طويلاً وغير عملي للمختبرات ذات حجم العمل الكبير.

مع تقدم التكنولوجيا، تتطور أيضاً قدرتنا على أتمتة كل جانب من جوانب الاختبارات السريرية؛ وللساعدة في تفسير النتائج دون الحاجة إلى مراجعة وتوقيع يستغرقان وقتًا طويلاً، يمكن توظيف الذكاء الاصطناعي (AI). وفي الآونة الأخيرة، قامت إحدى المؤسسات بتطوير تطبيق مستند إلى الويب لتحسين طلب الفحوصات، وتفسيرها، وإصدار نتائج تأكيد الأدوية بدقة (Girdhar et al., 2021). ومع الاستخدام السريع التطور للذكاء الاصطناعي، يمكن تطوير برامج متطورة لتفسير النتائج تلقائياً والإجابة على الأسئلة السريرية. ومع ذلك، يجب توخي الحذر عند استخدام هذه الأدوات؛ فبينما يمكنها توفير الوقت، يجب أن تظل التفسيرات مراجعة من قِبل أخصائي سموم سريرية مدرب للتأكد من دقتها قبل تنفيذها على نطاق واسع. وإذا نجحت هذه الأدوات، يمكنها تحسين الكفاءة وتقليل الإرهاق لموظفي المختبر.

الجدول 2: مسارات الأيض للبنزوديازيبينات والمواد الأفيونية الموصوفة بشكل شائع (Table 3 Metabolic profiles of (commonly prescribed benzodiazepines and opiates

الدواء(Drug)	مسار الأيض(Metabolism pattern)	الدواء باللغة العربية	مسار الأيض باللغة العربية
Alprazolam	Alprazolam, alpha-hydroxyalprazolam	ألبرازولام	ألبرازولام، ألفا-هيدروكسي ألبرازولام
Buprenorphine	Buprenorphine, norbuprenorphine, buprenorphine glucuronide, norbuprenorphine glucuronide	بوبرينورفين	بوبرينورفين، نوربوبرينورفين، بوبرينورفين جلوكورونيد، نوربوبرينورفين جلوكورونيد
Chlordiazepoxide	Nordiazepam, oxazepam	كلورديازيبوكسيد	نورديازيبام، أكسازيبام
Clonazepam	Clonazepam, 7-aminoclonazepam	كلونازيبام	كلونازيبام، 7-أمينوكلونازيبام
Clorazepate	Nordiazepam, oxazepam	كلورازيبات	نورديازيبام، أكسازيبام
Cocaine	Cocaine, benzoylecgonine, m-hydroxybenzoylecgonine	كوكايين	كوكايين، بنزويل إيكغونين، إم-هيدروكسي بنزويل إيكغونين
Cocaine and ethanol	Cocaine, cocaethylene	الكوكايين والإيثانول	كوكايين، كوكا إيثيلين

الدواء(Drug)	مسار الأيض(Metabolism pattern)	الدواء باللغة العربية	مسار الأيض باللغة العربية
Codeine	Codeine, morphine, hydromorphone	كوديين	كوديين، مورفين، هيدرومورفون
Diazepam	Diazepam, nordiazepam, temazepam, oxazepam	ديازيبام	ديازيبام، نورديازيبام، تيمازيبام، أكسازيبام
Fentanyl	Fentanyl, norfentanyl	فنتانيل	فنتانيل، نورفنتانيل
Heroin	6-monoacetylmorphine, morphine, hydromorphone	هيروين	6-مونو أيسيتيل مورفين، مورفين، هيدرومورفون
Hydrocodone	Hydrocodone, norhydrocodone, hydromorphone	هيدروكودون	هيدروكودون، نورهيدروكودون، هيدرومورفون
Lorazepam	Lorazepam, lorazepam glucuronide	لورازيبام	لورازيبام، لورازيبام جلوكورونيد
Methadone	Methadone, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP)	ميثادون	ميثادون، 2-إيثيليدين-5،1-ثيماثيل-3،3-ديفينيل بيرروليدين (EDDP)
Methamphetamine	Methamphetamine, amphetamine	ميثامفيتامين	ميثامفيتامين، أمفيتامين
Methylphenidate	Methylphenidate, ritalinic acid	ميثيل فينيدات	ميثيل فينيدات، حمض الريتالينيك
Morphine	Morphine, hydromorphone	مورفين	مورفين، هيدرومورفون
Oxycodone	Oxycodone, noroxycodone, oxymorphone, noroxymorphone	أوكسيكودون	أوكسيكودون، نورأوكسيكودون، أوكسيمورفون، نورأوكسيمورفون
Oxymorphone	Oxymorphone, noroxymorphone	أوكسيمورفون	أوكسيمورفون، نورأوكسيمورفون
Tapentadol	Tapentadol, tapentadol-O-sulfate, N-desmethyltapentadol	تابينتادول	تابينتادول، تابينتادول-أو-سلفات، إن-ديسميثيل تابينتادول
Temazepam	Temazepam, oxazepam	تيمازيبام	تيمازيبام، أكسازيبام

نظم التحقق وضبط الجودة (Validation and QC systems)

يجب أن تقترن اختيار المنهجية المناسبة في اختبارات السموم بالتحقق الصارم وضبط الجودة (QC) المستمر لضمان نتائج موثوقة ذات مغزى سريري. وفقاً لكلية علم الأمراض الأمريكية (CAP)، يُعرف التحقق التحليلي بأنه العملية التي يحدد من خلالها المختبر أن الاختبار يعمل وفقاً لمواصفات الشركة المصنعة (College of American Pathologists, 2023). أما إذا تم تعديل فحص معتمد من إدارة الغذاء والدواء (FDA)، أو تم تطوير اختبار بواسطة مختبر فردي، فأنه يتطلب عملية تحقق شاملة (Validation). والتحقق هو العملية المستخدمة لإنشاء أدلة موضوعية تثبت أن الاختبار المطور مخبرياً (LDT) يقدم نتائج موثوقة للغرض المقصود. والفرق بين الاثنين كبير، ولكن كلاهما يوفر الثقة في أن الاختبار يمكنه قياس المادة المحللة باستمرار بتراكيز ذات صلة سريرية تحت ظروف محددة.

عند التحقق من أداء فحص معتمد من إدارة الغذاء والدواء (FDA)، يجب على المختبر المعتمد من قبل (CAP) تقييم الدقة، والانضباط (الإحكام)، والنطاق القابل للإبلاغ، وأي خصائص أداء تحليلية أخرى مطلوبة لتحديد ما إذا كان الاختبار مناسباً للاختبار السريري. من ناحية أخرى، بالنسبة للاختبار المطور مخبرياً (LDT)، يجب على المختبر إنشاء الدقة التحليلية، والانضباط، والحساسية، والنوعية، والنطاق القابل للإبلاغ، وتحمل الترحيل (carryover)، وخصائص الأداء الأخرى ذات الصلة لضمان كفايتها لاختبارات المرضى. ويُعد هذا عبئاً أكبر بكثير على المختبر السريري، ولكن لحسن الحظ توفر التوجيهات من جمعيات مثل معهد معايير المختبرات السريرية (CLSI) إرشادات هامة؛ وأبرزها وثائق التوجيه الخاصة بالفحوصات القائمة على قياس الطيف الكتلي (CLSI, 2021)، والتي تُعتبر دائمًا تقريبًا اختبارات مطورة مخبرياً في الوقت

الحالي. للحصول على معلومات إضافية، نقترح الرجوع إلى الكتاب المدرسي «دليل عملي لتنفيذ كروماتوغرافيا السائل وطيف الكتلة في المختبرات السريرية» (Clarke & Marzinke, 2017).

References المراجع

Kaufman, D. P., Basit, H., & Knohl, S. J. (2025). Physiology, Glomerular Filtration Rate. StatPearls Publishing.

Magnani, B., Kwong, T., Wu, A. H. B., et al. (2020). Clinical Toxicology Testing: A Guide for Laboratory Professionals (2nd ed.). https://estore.cap.org/OA_HTML/xxCAPibeCCtpItmDspRte.jsp?section=10044&item=603355&sitex=10020:22372:US

Wood, K. E., Smith, P., & Krasowski, M. D. (2017). Newborn drug testing practices in Iowa birthing hospitals. J Neonatal Perinatal Med, 10, 445–450.

Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., et al. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. Exp Suppl, 101, 133–164.

Saitman, A. (2025). Clinical Drug Testing Supporting Patients with Substance Use Disorder: A Review. J Appl Lab Med, 10, 1311–1326.

Saitman, A., Park, H. D., & Fitzgerald, R. L. (2014). False-positive interferences of common urine drug screen immunoassays: A review. J Anal Toxicol, 38(6), 387–396.

Moeller, K. E., Kissack, J. C., Atayee, R. S., et al. (2017). Clinical Interpretation of Urine Drug Tests: What Clinicians Need to Know About Urine Drug Screens. Mayo Clin Proc, 92(5), 774–796.

Fernández-Peralbo, M. A., & Luque de Castro, M. D. (2012). Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry analysis. TrAC Trends Anal Chem, 41, 75–85.

Klaassen, C. D., Casarett, L. J., & Doull, J. (Eds.). (2019). Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons (9th ed.). McGraw Hill Education.

Verstraete, A. G. (2004). Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid. Ther Drug Monit, 26(2), 200–205.

Lee, D. (2020). Oral Fluid Testing. In B. Levine & S. Kerrigan (Eds.), Principles of forensic toxicology (5th ed.). Springer International Publishing.

Casati, S., Binda M., Dongiovanni, P., et al. (2023). Recent advances of drugs monitoring in oral fluid and comparison with blood. Clin Chem Lab Med, 61(11), 1978–1993.

Lowe, R. H., Abraham, T. T., Darwin, W. D., et al. (2009). Extended urinary Delta9-tetrahydrocannabinol excretion in chronic cannabis users precludes use as a biomarker of new drug exposure. Drug Alcohol Depend, 105(1–2), 24–32.

Rifai, N. (2018). Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (8th ed.). Saunders.

Coulter, C. A., & Moore, C. M. (2019). Analysis of Drugs in Oral Fluid Using LC-MS/MS. Methods Mol Biol, 1872, 237–259.

Lamboley, C., & Herbick, S. (2025). The analysis of drugs of abuse (DoA) and Novel Psychoactive Substances (NPS) in oral fluids by LC-MS/MS. Toxicologie Analytique et Clinique, 3, S57–S58.

Mercier, B., Scala-Bertola, J., Pape, E., et al. (2022). Online SPE UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 33 psychoactive drugs from swab-collected human oral fluid samples. Anal Bioanal Chem, 414(14), 4203–4215.

Rottinghaus, E., Bile, E., Modukanele, M., et al. (2013). Comparison of Ahlstrom grade 226, Munktell TFN, and Whatman 903 filter papers for dried blood spot specimen collection and subsequent HIV-1 load and drug resistance genotyping analysis. J Clin Microbiol, 51(1), 55–60.

Caggana, M., Jones, E. A., Shahied, S. I., et al. (2013). Newborn screening: From Guthrie to whole genome sequencing. Public Health Rep, 128(Suppl 2), 14–19.

Zailani, N. N. B., & Ho, P. C. (2023). Dried Blood Spots-A Platform for Therapeutic Drug Monitoring (TDM) and Drug/Disease Response Monitoring (DRM). Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 48(5), 467–494.

Freeman, J. D., Rosman, L. M., Ratcliff, J. D., et al. (2018). State of the Science in Dried Blood Spots. Clin Chem, 64(4), 656–679.

Colby, J. M. (2017). Comparison of umbilical cord tissue and meconium for the confirmation of in utero drug exposure. Clin Biochem, 50(13–14), 784–790.

McMillin, G. A., Morad, A. W., Boyd, J. M., et al. (2024). Biological Testing and Interpretation of Laboratory Results Associated with Detecting Newborns with Substance Exposure. Clin Chem, 70(7), 934–947.

Hubbard, J. A. (2025). Review on Toxicology Testing in Hair. J Appl Lab Med, 10, 983–1000.

Hubbard, J. A., & Johnson-Davis, K. L. (2024). Racism in Drug Testing. Clin Lab Med, 44(4), 607–617.

Beck, O., Stephanson, N., Sandqvist, S., et al. (2012). Detection of drugs of abuse in exhaled breath from users following recovery from intoxication. J Anal Toxicol, 36(9), 638–646.

Giannoukos, S., Agapiou, A., & Taylor, S. (2018). Advances in chemical sensing technologies for VOCs in breath for security/threat assessment, illicit drug detection, and human trafficking activity. J Breath Res, 12(2), 027106.

Jeerage, K. M., Beuning, C. N., Friss, A. J., et al. (2023). THC in breath aerosols collected with an impaction filter device before and after legal-market product inhalation—A pilot study. J Breath Res, 17(3), 037103.

Thevis, M., Opfermann, G., & Schänzer, W. (2003). Urinary concentrations of morphine and codeine after consumption of poppy seeds. J Anal Toxicol, 27(1), 53–56.

Trefz, P., Kamysek, S., Fuchs, P., et al. (2017). Drug detection in breath: Non-invasive assessment of illicit or pharmaceutical drugs. J Breath Res, 11(2), 024001.

Brunelle, E., Thibodeau, B., Shoemaker, A., et al. (2019). Step toward Roadside Sensing: Noninvasive Detection of a THC Metabolite from the Sweat Content of Fingerprints. ACS Sens, 4(12), 3318–3324.

Costa, C., Webb, R., Palitsin, V., et al. (2017). Rapid, Secure Drug Testing Using Fingerprint Development and Paper Spray Mass Spectrometry. Clin Chem, 63(11), 1745–1752.

Hudson, M., Stuchinskaya, T., Ramma, S., et al. (2019). Drug screening using the sweat of a fingerprint: Lateral flow detection of Δ9-tetrahydrocannabinol, cocaine, opiates and amphetamine. J Anal Toxicol, 43(2), 88–95.

Gozdzialski, L., Wallace, B., & Hore, D. (2023). Point-of-care community drug checking technologies: An insider look at the scientific principles and practical considerations. Harm Reduct J, 20, 39.

Lin, C. N., Nelson, G. J., & McMillin, G. A. (2013). Evaluation of the NexScreen and DrugCheck Waive RT urine drug detection cups. J Anal Toxicol, 37(1), 30–36.

Rifai, N. (2022). Tietz textbook of laboratory medicine (7th ed.). Saunders.

Battini, V., Cirnigliaro, G., Giacovelli, L., et al. (2023). Psychiatric and non-psychiatric drugs causing false-positive amphetamines urine test in psychiatric patients: A pharmacovigilance analysis using FAERS. Expert Rev Clin Pharmacol, 16(5), 453–465.

Brahm, N. C., Yeager, L. L., Fox, M. D., et al. (2010). Commonly prescribed medications and potential false-positive urine drug screens. Am J Health Syst Pharm, 67(16), 1344–1350.

Callaghan, K., & Rappaport, D. I. (2021). False-Positive Urine Drug Screen for Benzodiazepines in a Child Taking Fluoxetine. Pediatr Emerg Care, 37(12), e283.

Możdżeń, K., Kaleta, K., Murawska, A., et al. (2023). Guilty or not guilty? - False positive results of common medicines in drug tests: Review and practical guide. Folia Med Cracov, 63(3), 107–134.

Pope, J. D., Drummer, O. H., & Schneider, H. G. (2023). False-Positive Amphetamines in Urine Drug Screens: A 6-Year Review. J Anal Toxicol, 47(3), 263–270.

Wanar, A., Isley, B. C., Saia, K., et al. (2022). False-positive Fentanyl Urine Detection after Initiation of Labetalol Treatment for Hypertension in Pregnancy: A Case Report. J Addict Med, 16(5), e417–e419.

Tang, M. S., Lloyd, M., Williams, M., et al. (2021). Performance Evaluation of an Automated Fentanyl Immunoassay. J Appl Lab Med, 6(5), 1192–1201.

Cole, J. (2022). Case report of a phencyclidine false positive due to lamotrigine use with confirmatory testing. Am J Emerg Med, 61, 234.e5–234.e6.

Farley, T. M., Anderson, E. N., & Feller, J. N. (2017). False-positive phencyclidine (PCP) on urine drug screen attributed to desvenlafaxine (Pristiq) use. BMJ Case Rep, 2017, bcr2017222106.

Geraci, M. J., Peele, J., McCoy, S. L., et al. (2010). Phencyclidine false positive induced by lamotrigine (Lamictal) on a rapid urine toxicology screen. Int J Emerg Med, 3(4), 327–331.

Kim, H. S., Jain, A., & Kablinger, A. S. (2023). False-Positive Phencyclidine (PCP) Result on 11-Panel Urine Drug Screen (UDS) in a 17-Year-Old Adolescent with Long-Term Venlafaxine Use. Case Rep Psychiatry, 2023, 6666197.

Ge, M., Alabi, A., Kelner, M. J., et al. (2024). Evaluation of a Benzodiazepine Immunoassay for Urine Drug Testing in Clinical Specimens. J Appl Lab Med, 9(6), 964–976.

Uljon, S., Tolan, N. V., Mahowald, G. K., et al. (2024). Performance of a Norfentanyl Immunoassay in Specimens with Low Concentrations of Fentanyl and/or Norfentanyl. J Appl Lab Med, 9(5), 895–904.

Smith, K., Johnson-Davis, K. L., & Shahrokh, K. (2023). A New Broad-Spectrum Drug Screen for 127 Analytes by LC-MS/MS. J Appl Lab Med, 8(2), 240–250.

Badea, A. (2025). Untargeted Mass Spectrometry Applications for Clinical Toxicology. Clin Lab Med, 45(1), 177–186.

Maurer, H. H. (2021). Hyphenated high-resolution mass spectrometry—The "all-in-one" device in analytical toxicology? Anal Bioanal Chem, 413(9), 2303–2309.

Wu, A. H., & Colby, J. (2016). High-Resolution Mass Spectrometry for Untargeted Drug Screening. Methods Mol Biol, 1383, 153–166.

US Department of Transportation. (2025). DOT Rule 49 CFR Part 40 Section 40.85. https://www.transportation.gov/odapc/part40/40-85

Pharma Sciences. (2025). Gas Chromatography Detector. PharmaSciences. https://pharmasciences.in/gas-chromatographydetector/

Phenomenex. (2025). Types of Detectors Used in GC Systems. Phenomenex Knowledge Center. https://www.phenomenex.com/knowledge-center/gc-knowledge-center/various-types-of-detectors-used-in-gc

Morato, N. M., & Cooks, R. G. (2023). Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry: 20 Years. Acc Chem Res, 56(18), 2526–2536.

Negrusz, A., & Cooper, G. (2013). Clarke's Analytical Forensic Toxicology (2nd ed.). Pharmaceutical Press.

VanZandt, L. (2017). SCIEX Announces the First FDA-Cleared Vitamin D Assay Kit for Mass Spectrometry. SCIEX. https://sciex.com/about-us/press-releases/2017/vitamin-d-clearance

Medical Product Outsourcing. (2020). Thermo Fisher Scientific Launches the Cascadion SM Clinical Analyzer. MPO. https://www.mpo-mag.com/breaking-news/thermo-fisher-scientific-launches-the-cascadion-sm-clinical-analyzer/

Mirasol, F. (2024). Roche Launches Mass Spectrometry Analyzer. BioPharm International. https://www.biopharminternational.com/view/roche-launches-mass-spectrometry-analyzer

Hong, Y., Ye, Y., & Tang, H. (2025). Machine Learning in Small-Molecule Mass Spectrometry. Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif), 18, 193–215.

Liu, C., Meng, Q., Li, Y., et al. (2025). RapidMass: A Graphical Data Processing Application for Automated Species Authentication in High-Throughput Mass Spectrometry. Anal Chem, 97(14), 8231–8240.

Papp, L. A., Imre, S., Bálint, I., et al. (2024). Is it Time to Migrate to Liquid Chromatography Automated Platforms in the Clinical Laboratory? A Brief Point of View. J Chromatogr Sci, 62(2), 191–200.

Peters, F. T., & Wissenbach, D. (2023). Current state-of-the-art approaches for mass spectrometry in clinical toxicology: An overview. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 19(8), 487–500.

Rankin-Turner, S., & Heaney, L. M. (2023). Mass spectrometry in the clinical laboratory. A short journey through the contribution to the scientific literature by CCLM. Clin Chem Lab Med, 61(5), 873–879.

Kanao, E., & Ishihama, Y. (2025). StageTip: A little giant unveiling the potential of mass spectrometry-based proteomics. Anal Sci, 41(5), 667–675.

Kozlova, A., Shkrigunov, T., Gusev, S., et al. (2022). An Open-Source Pipeline for Processing Direct Infusion Mass Spectrometry Data of the Human Plasma Metabolome. Metabolites, 12(8), 768.

Zhu, Y. (2024). Plasma/Serum Proteomics based on Mass Spectrometry. Protein Pept Lett, 31(3), 192–208.

French, D. (2015). Implementing Mass Spec Part One. ADLM. https://myadlm.org/cln/articles/2015/february/implementing-mass-spec-part-one

French, D. (2015). Implementing Mass Spectrometry in the Clinical Lab. ADLM. https://myadlm.org/cln/articles/2015/may/implementing-mass-spectrometry-in-the-clinical-lab

Reisfield, G. M., Bertholf, R., Barkin, R. L., et al. (2007). Urine drug test interpretation: What do physicians know? J Opioid Manag, 3(2), 80–86.

Chua, I., Petrides, A. K., Schiff, G. D., et al. (2020). Provider Misinterpretation, Documentation, and Follow-Up of Definitive Urine Drug Testing Results. J Gen Intern Med, 35(1), 283–290.

Snozek, C. L. H., Langman, L. J., Dizon, A., et al. (2024). Laboratorian Interpretation of Drug Testing Results in Pain Management: Lessons From College of American Pathologists Proficiency Testing. Arch Pathol Lab Med, 148(11), 1292–1298.

McNeil, S. E., Chen, R. J., & Cogburn, M. (2025). Drug Testing. StatPearls Publishing.

Snozek, C. L. H., Yee, C. I., Bryksin, J., et al. (2025). Assessing knowledge gaps and educational needs in urine drug test interpretation among health care professionals. Am J Clin Pathol, 163(1), 69–79.

Rosenfeld, B., Budescu, D. V., Han, Y., et al. (2020). Does the perceived accuracy of urine drug testing impact clinical decision-making? Subst Abus, 41(1), 85–92.

Yang, Y. K., Johnson-Davis, K. L., Kelly, B. N., et al. (2020). Demand for Interpretation of a Urine Drug Testing Panel Reflects the Changing Landscape of Clinical Needs; Opportunities for the Laboratory to Provide Added Clinical Value. J Appl Lab Med, 5(5), 858–868.

Pablo, A., Laha, T. J., Breit, N., et al. (2023). A web application to support the coordination of reflexive, interpretative toxicology testing. J Pathol Inform, 14, 100303.

College of American Pathologists. (2024). All Commons Checklist (e-LAB Solutions Suite). https://elss.cap.org/lap-reports-ui/#/accreditation-checklists

الفصل التاسع عشر (19) CHAPTER



المقايسات المناعية

IMMUNOASSAYS

الفصل التاسع عشر

المقايسات المناعية (IMMUNOASSAYS)

المقدمة (Introduction)

نُشرت مبادئ المقايسات المناعية الأولى منذ عقود (Yalow, Berson 1959). ومنذ ذلك الوقت، أصبحت المقايسات المناعية جزءاً روتينياً من الحياة اليومية للعلماء في مختلف التخصصات، فضلاً عن المستهلكين عموماً. على سبيل المثال، تعتمد كل اختبارات الحمل والخصوبة التي تُباع دون وصفة طبية على نتائج المقايسة المناعية. وقد كان التأثير أكبر في المجالات الأوسع حيث يستخدم المحللون المقايسات المناعية للفحص الروتيني للعينات بحثاً عن مجموعة كبيرة من التحاليل المستهدفة. فمجالات مثل الطب البيطري، والاختبارات البيئية، ومكافحة الإرهاب، والتشخيص السريري البشري تستخدم جميعها أنواعاً مختلفة من المقايسات المناعية (Huckle, Wild 2005).

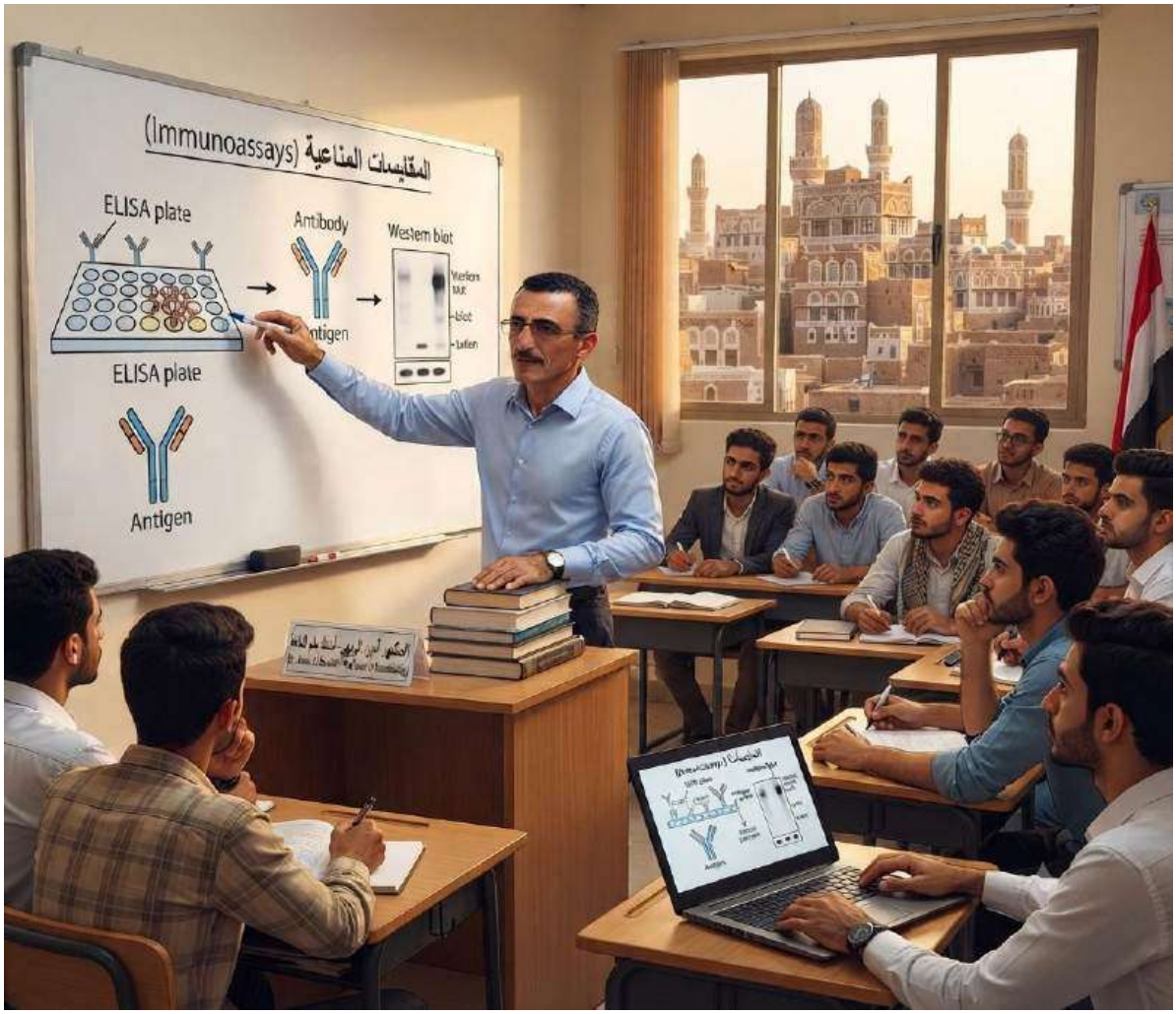
وعلى الرغم من جميع التطبيقات الموجودة، فإن للمقايسات المناعية قيوداً تنشأ عموماً عن الأجسام المضادة المستخدمة. فقد تتميز الأجسام المضادة بضعف النوعية مما ينتج عنه تفاعل متصالب مع مركبات متشابهة هيكلياً، مما يؤدي إلى نتائج إيجابية كاذبة. كما قد تتأثر الأجسام المضادة بالمصفوفة المستخدمة؛ فمثلاً، يواجه اختبار الشعر للمخدرات تحديات بسبب المعالجات التي يستخدمها المستهلكون على شعورهم وفروة رؤوسهم. ومن الصعب أيضاً إنتاج أجسام المضادة بشكل موثوق ضد المركبات المستهدفة، إذ يتطلب ذلك سيناريو "الصنع والاختبار" الذي قد يستغرق سنوات. مع ذلك، أصبحت المقايسات المناعية جزءاً لا يتجزأ من الاختبارات السريرية الروتينية. وعند تطويرها بعناية، يمكن للمقايسات المناعية اكتشاف كميات ضئيلة من التحليل المستهدف في عينات معقدة. كما يمكن أن تكون قادرة على الصمود والعمل في ظروف قاسية على جانب الطريق أو في المناطق النائية. وستبقى المقايسات المناعية أداة مهمة لأي شخص يحتاج إلى الكشف عن التحاليل بشكل موثوق بطريقة فعالة من حيث التكلفة وسريعة.

سيكون تركيز هذا الفصل على شرح مبادئ المقايسات المناعية والاعتبارات العملية في تطبيقها في مجال علم السموم (Toxicology).

يمكن عموماً بناء المقايسات المناعية لجزيئات مستهدفة ذات أوزان جزيئية منخفضة تصل إلى 250، وكذلك للبروتينات الكبيرة المعقدة والمكونات الخلوية. وقد جرى تنسيق كل مقايسة مناعية لتناسب موقف الاستخدام ومتطلباته التحليلية. صُمم بعضها ليكون عالي الحساسية في الكشف عن كميات ضئيلة للغاية من التحليل المستهدف وقياسها كمياً، بينما صُمم البعض الآخر للتحليل النوعي فقط للكشف عن وجود أو غياب التحاليل. وهكذا، قام الباحثون والمطوّرون بتحسين المقايسات المناعية لتصبح اختبارات موثوقة وقوية ودقيقة يمكن تصنيعها على نطاق واسع.

بالتوازي مع تطويرها، واستجابةً له، تبنت المجتمعات استخدام تقنيات المقايسة المناعية. على سبيل المثال، سنّت العديد من البلدان تشريعات تحدد المستويات الحدية (Cut-offs) فضلاً عن الأهداف المحددة للمقايسات المناعية التي تهدف إلى الكشف عن مخدرات إساءة الاستخدام في مختلف المواقف التي قد يكون فيها الأفراد أو عامة الناس في خطر (US Department of Health and Human Services 2006; US Department of Transportation 2000). تنظم بارامترات

الاختبار المقننة هذه تنفيذ ملايين الاختبارات التي تستخدم البول أو اللعاب أو الشعر أو الدم كمصفوفات. ويمكن استخدام نتائج اختبار المقايسة المناعية المتبوعة بالتأكيد باستخدام تقنيات بديلة كأدلة جنائية في محكمة قانونية. وفي عدة بلدان، يتم اختبار الأفراد بحثاً عن تعاطي المخدرات قبل بدء وظيفة جديدة، أو عند الاشتباه في التعاطي أثناء العمل ، أو بعد العلاج أو السجن. وتطمح بلدان أخرى للسماح للشرطة بإجراء اختبارات على جانب الطريق للسائقين المشتبه بهم الذين قد تكون عقولهم تحت تأثير مخدرات إساءة الاستخدام (Parliament of Victoria, Australia 2003). وتجري الجهود حالياً لتطوير والتحقق من صحة مقايسات مناعية قوية في الموقع يمكنها تلبية المتطلبات المحددة للقانون والأداء التقني. وعلى الرغم من أنها ليست متاحة بعد لجميع أدوية الهدف المرغوبة، فقد تم إحراز تقدم كبير (Maes et al. 1999; Moeller et al. 1999; Samyn et al. 1999b; Verstraete, Puddu 2000; Walsh et al. 2004).



قد تتخذ المقايسات المناعية أشكالاً متنوعة، على الرغم من أن جميعها تحتوي على عناصر مشتركة بغض النظر عن تصميمها (الجدول 1).

- العنصر الأول هو **الجسم المضاد (Antibody)** الذي تم استهدافه ضد تحليل معين. يمكن أن يكون التحليل المستهدف جزيئاً كبيراً، أو عاملاً معدياً، أو جزيئاً صغيراً قادراً على تحفيز استجابة مناعية. ستحدد جودة الجسم المضاد في النهاية الأداء المحتمل لأي مقايسة مناعية؛ إذ يُعتمد على الجسم المضاد ليكون نوعياً تجاه التحليل

المستهدف المرغوب، وغير حساس لمصفوفة الاختبار المستخدمة، ومستقراً لفترات تخزين طويلة عند تعبئته في مجموعة اختبار المقايسة المناعية.

- العنصر الثاني في المقايسة المناعية هو **المُبلغ أو الكاشف (Reporter)** الذي سينتج إشارة يمكن استخدامها لتحديد نتائج المقايسة المناعية. تتوفر مجموعة متنوعة من الأنظمة القائمة على العلامات المشعة والإنزيمية والضيائية الكيميائية وكذلك الجسيمات الغروية لهذه المهمة (الجدول 2). لكل منها مزايا وعيوب في تصميم المقايسة المناعية واستخدامها، وسيتم مناقشة نقاط القوة والضعف هذه لاحقاً في هذا الفصل.

بمجرد تحديد جسم مضاد عالي الجودة ومبلغ مناسب، يمكن اختيار المنصة (Platform) لإجراء المقايسة المناعية. هناك العديد من المنصات التجارية الخاصة بالشركات، ومع ذلك، يمكن للباحثين الأساسيين استخدام صفائح المعايرة الدقيقة (Microtitre plates) أو أشكال الاختبار السريع مثل التدفق الجانبي (Lateral flow) (Peace 2000; Niedbala et al. 2000; Perrigo, Joynt 1995; The Walsh Group 2002; Verheijen 2002; Volkov et al. 2009).

أخيراً، يجب أن تلبي المخازن المؤقتة (Buffers) والتعبئة والتغليف لأي مقايسة مناعية متطلبات الاستقرار والتخزين للاختبار. تخدم المخازن المؤقتة أيضاً غرضاً رئيسياً آخر، ألا وهو إعداد مصفوفة العينة المراد اختبارها لتكون متوافقة مع الجسم المضاد وشكل الاختبار المستخدم.

تواجه مطور اختبار المقايسة المناعية مشكلات مختلفة عند محاولة استخدام عينات متنوعة مثل البول أو اللعاب. فكل مصفوفة لها خصائص فريدة يمكن أن تتداخل مع المقايسة المناعية مما يتسبب في نتائج سلبية كاذبة أو إيجابية كاذبة. يواجه مطورو المقايسات المناعية تحدي التطوير أولاً، ثم التحقق الشامل من صحة أي اختبار قبل أن يتم استخدامه من قبل الباحثين المتعاونين أو عامة الناس.

عند تقييم أداء اختبار علم السموم ، يجدر فحص ما يجعل اختبار المقايسة المناعية جيداً. أولاً وقبل كل شيء، يجب النظر في الغرض من الاختبار؛ على سبيل المثال، هل سيُستخدم الاختبار للفحص النوعي أم لمراقبة تركيزات دواء معين في السوائل البيولوجية؟ يمكن أن يكون الفرق في المتطلبات التحليلية بين -على سبيل المثال- اختبار لأغراض مراقبة الأدوية العلاجية (TDM) واختبار الفحص النوعي كبيراً جداً. يُجرى اختبار مراقبة الأدوية العلاجية لتحسين مستوى العلاج الدوائي، ونتيجة لذلك يجب أن تكون نتيجة اختبار المقايسة المناعية دقيقة للغاية. في بعض الحالات، يمكن أن يؤدي تغيير جرعة الدواء بشكل غير صحيح إلى نتائج خطيرة أو مميتة (Baselt 2005; Hardman et al. 2001; Porter 2006; Uhlenhuth et al. 1990).

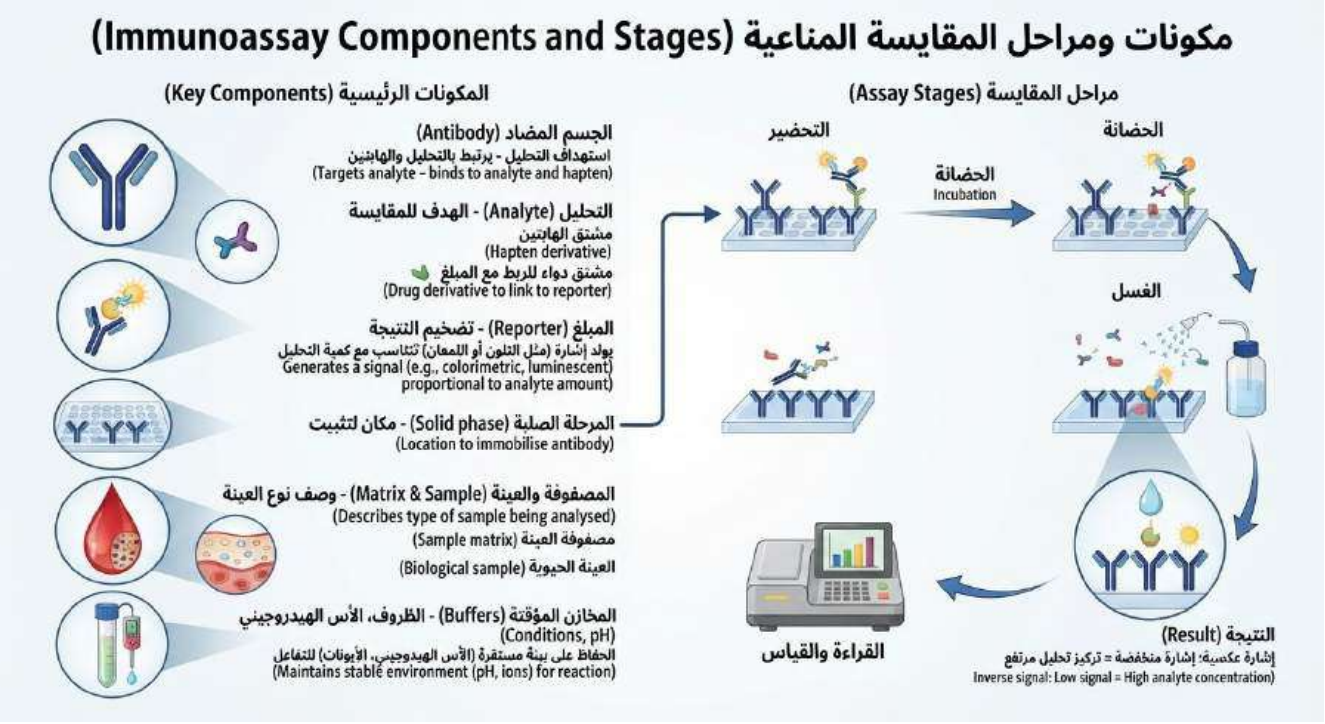
على النقيض من ذلك، يجب أن يكتفي اختبار الفحص ببساطة بالكشف عن وجود أو غياب مركب مستهدف أو فئة من المركبات بشكل موثوق أعلى أو أقل من تركيز حدي (Cut-off concentration) مخصص. وفي مثل هذه الاختبارات، يتم تحديد التركيز الحدي، ومع ذلك، فإن الأداء الفعلي للاختبار سيشهد بعض التباين حول هذا الحد. ومن الجدير مناقشة جانبي تصميم المقايسة المناعية والأداء؛ فغالباً ما يُستخدم مصطلحا الحساسية (Sensitivity) والنوعية (Specificity) ويتطلبان بعض التوضيح، حيث ترتبط هذان المصلحان بالحساسية/النوعية التحليلية أو الحساسية/النوعية السريرية. يُستخدم مصطلح **الحساسية التحليلية (Analytical sensitivity)** لوصف قدرة المقايسة على اكتشاف أدنى مستوى من دواء الهدف، بينما توصف **النوعية التحليلية (Analytical specificity)** مدى دقتها في استهداف مركب معين. من ناحية أخرى، تصف **الحساسية السريرية (Clinical sensitivity)** مدى موثوقية اختبار في تحديد الحالات الإيجابية بين السكان المختبرين، في حين أن **النوعية السريرية (Clinical specificity)** هي مقياس لما إذا كانت الحالات الإيجابية المحددة إيجابية حقاً أم لا. على سبيل المثال، في حالة اختبار الفحص لمخدرات إساءة الاستخدام، فإن الاختبار الذي يتميز بحساسية ونوعية سريرية تبلغ

100% كان سيحدد بشكل صحيح جميع الحالات الإيجابية المفترضة وكان سيتم تأكيد إيجابية جميعها للدواء المستهدف بواسطة تقنية بديلة ومحددة تماماً.

الجدول 1: عناصر المقايسة المناعية (Table 1 Elements of an immunoassay)

العنصر(Element)	الغرض(Purpose)
الجسم المضاد(Antibody)	استهداف التحليل(Targets analyte)
المبلغ(Reporter)	تضخيم النتيجة(Amplifies result)
مشتق الهابتين (Hapten derivative)	مشتق دواء للربط مع المبلغ(Drug derivative to link to reporter)
التحليل(Analyte)	الهدف للمقايسة(Target for assay)
المخازن المؤقتة(Buffers)	الظروف، الأس الهيدروجيني(Conditions, pH) ، العينة
المرحلة الصلبة(Solid phase)	مكان لتثبيت الجسم المضاد(Location to immobilise antibody)
المصفوفة(Matrix)	وصف نوع العينة التي يتم تحليلها (Describes type of sample being analysed)

الواقع هو أن أي اختبار فحص بالمقايسة المناعية ليس دقيقاً بنسبة 100% في تحديد الحالات الإيجابية أو السلبية. وفي حالة مقايسات مخدرات إساءة الاستخدام، يتم تأكيد النتائج الإيجابية بواسطة تقنيات أخرى مثل كروماتوغرافيا الغاز - مطياف الكتلة (GC-MS). وغالباً ما تكون هذه الطريقة مكلفة، لكنها ضرورية نظراً لأن المقايسات المناعية القائمة على الأجسام المضادة غالباً ما تكون عرضة للتداخلات أو تفتقر إلى نوعية التحليل المستهدف. لذلك، سيكون لاختبار الفحص المصمم جيداً درجة عالية من النوعية السريرية، مما يعني أن نتائج المقايسة المناعية الإيجابية يُرجح تأكيدها بسرعة وبتكلفة زهيدة بواسطة طريقة GC-MS، مما يقلل التكاليف عن طريق تحديد العينات التي لا تحتوي على التحليل محل الاهتمام.



هناك اعتبار أخير قبل استكشاف تفاصيل المقايسة المناعية، وهو استقلاب (Metabolism) وتوزيع أي دواء تحليل مستهدف والمصفوفة التي سيتم الكشف عنه أو قياسه كمياً فيها. تُجرى مقايسات علم السموم بشكل متزايد على مجموعة متنوعة من المصفوفات بما في ذلك الشعر، أو اللعاب، أو الدم، أو البول. وقد يكون سبب اختيار المصفوفة هو سهولة الجمع (اللعاب)، أو نافذة اكتشاف واسعة (الشعر)، أو الامتثال للوائح (البول)، أو لأغراض طب شرعي (البراز أو الدم). وقبل تطوير المقايسة، من بالغ الأهمية معرفة المستقلبات الأكثر انتشاراً وموثوقية كتحاليل مستهدفة في نوع معين من العينات. وتتوفر المراجع لمساعدة أي مطور للمقايسات المناعية في رسم استراتيجيته للتطوير (Baselt 2005).

ومع توسع استخدام المقايسات المناعية، توسعت أيضاً الأدوات وفهم مبادئ تطويرها. وينبغي أن يتيح تطبيق المبادئ الموضحة أدناه للباحثين تحقيق الأداء الأمثل لأي مقايسة مناعية قد يقومون بتطويرها أو تقييمها.

الجدول 2: المُبلّغات المختلفة المستخدمة في المقايسات المناعية
Table 2 Various reporters used in immunoassays

المُبلّغ(Reporter)	الحساسية المحققة في المقايسة المناعية (عدد الجزيئات المكتشفة) (Sensitivity achieved in immunoassay - molecules detected)
الإنزيمات(Enzymes)	10^7
التألق(Fluorescence)	10^6
الضيائية الكيميائية (Chemiluminescence)	10^5
المقايسة المناعية الإشعاعية (Radioimmunoassay)	10

المبادئ الأساسية وقضايا المقايسات المناعية (Basic principles and issues of immunoassays)

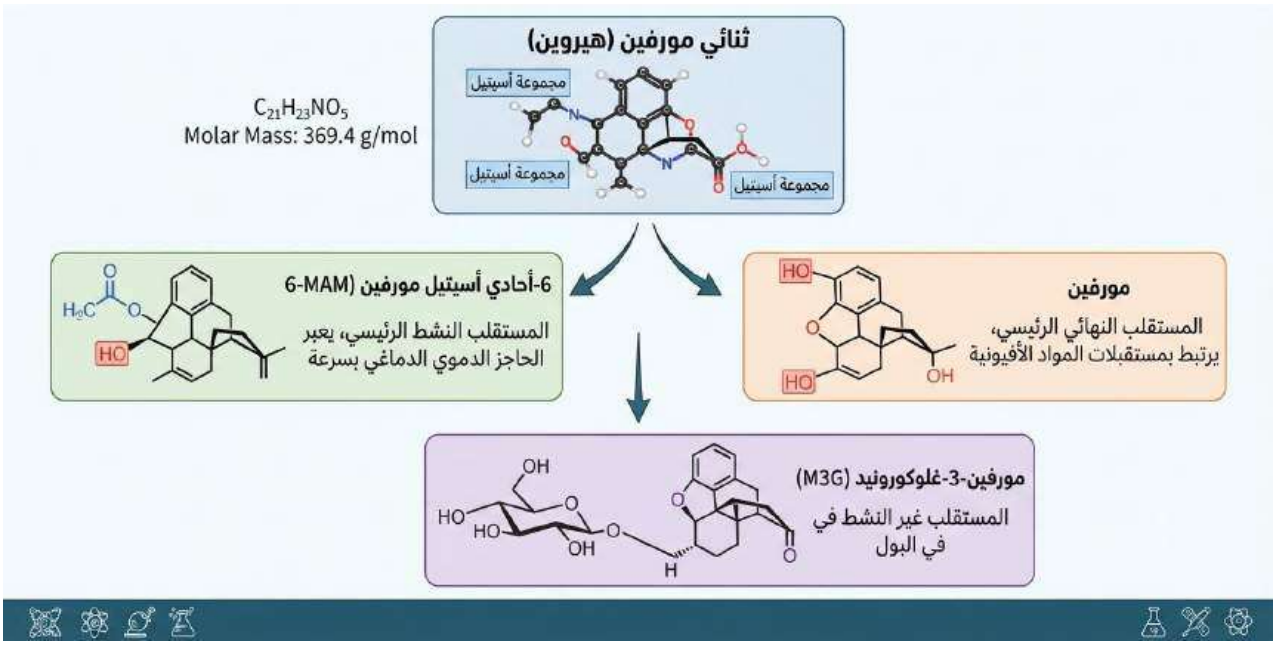
تطوير وإنتاج الأجسام المضادة (Antibody development and production)

يُعد تطوير مقايسة مناعية للمواد الأفيونية (مثل الديامورفين، والمورفين، وغيرها) مثالاً جيداً لوصف مبادئ وقضايا تطوير المقايسات المناعية بالتفصيل. يُستخدم الديامورفين والمورفين والمواد الأفيونية المرتبطة بها في جميع أنحاء العالم، كما أن فوائدها وآثارها الضارة على الصحة معروفة جيداً (Baselt 2005; Hermes 1993). ومع ذلك، فإن تطوير مقايسة مناعية لتحديد مواد أفيونية محددة يمكن أن يكون شاقاً ويتطلب استراتيجية مناسبة.

تتمثل الخطوة الأولى عند تطوير مثل هذا الاختبار في مراعاة الجزيء المستهدف والمصفوفة البشرية التي سيتم اختبارها. لقد دُرست جزيئات الديامورفين والمورفين بدقة وفُهمت حركيتها الدوائية جيداً (Moore et al. 1984). يوضح **الشكل 1** استقلاب الديامورفين والمستقلبات الرئيسية المتكونة. ويمكن ملاحظة أن المورفين هو مستقلب أساسي في البول واللعاب والدم. كما أن له نصف عمر طويلاً نسبياً ومن المعروف أنه مستقر في المصفوفات البيولوجية. ونتيجة لذلك، يصبح المورفين هو التحليل المستهدف الذي ستكون هناك حاجة لأجسام مضادة ضده.

الأجسام المضادة هي بروتينات في الثدييات غرضها الأساسي مكافحة العدوى. يتم إنتاجها بواسطة الخلايا الليمفاوية البائية (beta-lymphocytes) إثر التعرض لمولد مضاد (immunogen). والمولدات المضادة هي مواد مثل البروتينات الغريبة أو الخلايا التي تحفز الاستجابة المناعية. وهناك عدة أنواع فرعية من الأجسام المضادة تشمل IgG، وIgA، وIgM، وIgE، وIgD. يعمل كل منها داخل حجرات مختلفة من الجسم البشري وقد يعمل على مهاجمة الالتهابات الجديدة أو العمل كحراس إذا ظهرت العدوى مرة أخرى. ولأغراضنا، يتم توليد الأجسام المضادة عموماً عن طريق إدخال مولد مضاد مصمم (أو مستضد)

في خلية مضيفة أو حيوان. تستجيب الخلايا البائية داخل المضيف للمستضد عن طريق إنتاج أجسام مضادة لها تقارب تجاه المستضد المستهدف.

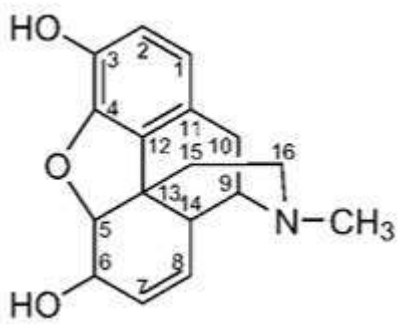


الشكل 1: بنية الديامورفين (الهيروين) ومستقلباته الرئيسية (Figure 1 Structure of diamorphine (heroin) and its major metabolites).

يمكن توليد الأجسام المضادة باستخدام عدد من الطرق. تنتج التقنيتان الرئيسيتان أجساماً مضادة أحادية النسيلة (monoclonal) أو متعددة النسيلة (polyclonal) (Howard, Kaser 2007; Levine 2003). غالباً ما تُنتج الأجسام المضادة متعددة النسيلة في الأرانب، والأغنام، والدجاج، وحتى اللاما (Frenken et al. 2000). لكل نوع خصائص مميزة؛ فالأغنام، على سبيل المثال، يمكن نزع دمها للحصول على كميات كبيرة من الدم لتلبية الاحتياجات واسعة النطاق. أما الدجاج فهو سهل الاستخدام نظراً لإمكانية عزل الأجسام المضادة من البيض. بغض النظر عن اختيار النوع، تتمثل عيوب الأجسام المضادة متعددة النسيلة في احتمال وجود مزيج من أنواع الأجسام المضادة الفرعية المعزولة بأداء متفاوت. وعلى عكس الأجسام المضادة متعددة النسيلة، تُنتج الأجسام المضادة أحادية النسيلة بعد اندماج خلية متعددة النسيلة مع خطوط خلايا بكتيرية (Kohler, Milstein 1975). سينتج الخط المدمج جسماً مضاداً عالي النوعية ومخلداً في خط الخلايا. وبالتالي، لا يُعد التوريد مشكلة أبداً طالما يتم الحفاظ على خط الخلايا بعناية. تشمل الطرق الأحدث التي تُعد بدائل لإنتاج الأجسام المضادة التقليدية أحادية ومتعددة النسيلة تقنية عرض العاثيات (phage display)، فضلاً عن الهندسة المستهدفة لنطاقات البروتينات ذات السمات الشبيهة بالأجسام المضادة (Binz et al. 2005; Chiswell, McCafferty 1992; Ryan 2003).

استُخدمت هذه التقنيات الأحدث في المقام الأول ضد البروتينات الكبيرة ولم يتم تطويرها بشكل كافٍ حتى الآن للاستخدام ضد جزيئات الأدوية الصغيرة. باتباع مثال المورفين، يجب أولاً تطوير مولد مضاد (immunogen) سيُستخدم لتحفيز إنتاج الأجسام المضادة. المورفين هو جزيء صغير، وفي حد ذاته ليس مولداً مناعياً. عادةً ما يجب أن يكون المركب ذو وزن جزيئي أكبر من 2000 قبل أن يحفز الاستجابة المناعية. ولحل مشكلة مولدية المناعة (immunogenicity)، يتم ربط مشتق المورفين أولاً بروتين ناقل بعملية تُعرف بـ **الَهَبْتَنة (haptenisation)**. الهدف من عملية الهبتنة هذه هو اقتران جزيئات دوائية متعددة ومعدلة كيميائياً ومشتقة (الهابتين) بالبروتين الناقل.

يوضح **الشكل 2** بنية المورفين. ومن خلال فحص التركيب الكيميائي، يمكن ملاحظة أن المورفين يحتوي على مجموعات أمينية أو هيدروكسيلية يمكن استخدامها كمواقع للاتحاد والاقتران. ويمكن تحديد نوعية الأجسام المضادة المتولدة بواسطة الموضع الموجود على الجزيء المستخدم للاتحاد. وعادة ما يكون موقع الاتحاد مخفياً عن الجهاز المناعي، بحيث لا يكون للتغييرات التي تُجري على الجزيء في هذا الموضع أي تأثير على ارتباط الجسم المضاد. في حالة المورفين، إذا تم إنتاج مولد مضاد عن طريق الاتحاد مع مجموعة الهيدروكسيل في الموضع 3، فإن هذا يتوقف عن كون محدد يتم توليد أجسام مضادة ضده. ونتيجة لذلك، فمن المرجح أن تتمتع الأجسام المضادة بتفاعل متصالب تجاه المستقلب البولي الرئيسي لكل من الديامورفين والمورفين، وهو مورفين-3-غلوكورونيد (morphine-3-glucuronide)، كما أنها ستتعرف أيضاً على الكودين (O-methylmorphine-3). عادة ما تستخدم مقايسات فحص البول للكشف عن سوء استخدام الديامورفين أو المورفين أجساماً مضادة أُنتجت بهذه الطريقة. على العكس من ذلك، فإن الاقتران عبر مجموعة الهيدروكسيل في الموضع 6 سيؤدي إلى إنتاج أجسام مضادة لها نوعية أكبر تجاه المورفين مقارنة بمورفين-3-غلوكورونيد، والتي تظهر أيضاً تفاعلاً متصالبًا جيداً تجاه 6-مونوأنازيل مورفين ومورفين-6-غلوكورونيد. تعتبر هذه الأجسام المضادة مناسبة تماماً لصياغة مقايسات اللعاب للكشف عن إساءة استخدام الديامورفين، نظراً لأن هذه العينة تحتوي على كميات كبيرة من 6-مونوأنازيل مورفين بالإضافة إلى المورفين نفسه. تتوفر طرق مختلفة للربط التساهمي من خلال هذه المجموعات أو لإضافة رابط امتداد قبل ربطه ببروتين ناقل (Van Regenmortel et al. 1988).



شكل (2): بنية المورفين

تشمل النواقل بروتينات كبيرة مثل ألبومين مصل البقر (BSA)، أو غلوبولين مصل البقر، أو سيانين الخلايا الليمفاوية الثقوبية. يوجد عدد كبير من البروتينات الناقلة المحتملة الأخرى، ولكن بشكل عام، تكون البروتينات الناقلة المختارة مختلفة في تركيبها عن المُبليغ المراد استخدامه في المقايسة وكبيرة بدرجة تكفي لتحفيز الاستجابة المناعية. بمجرد توليد الأجسام المضادة، يتم تنقيتها عادةً باستخدام تقنيات ترسيب بسيطة أو عن طريق العزل باستخدام بروتين-أ (Protein-A). وبروتين-أ هو لكتين يرتبط على وجهحديد بالأجسام المضادة ويسمح بالعزل السريع للبروتينات المنقاة (Hober et al. 2007).

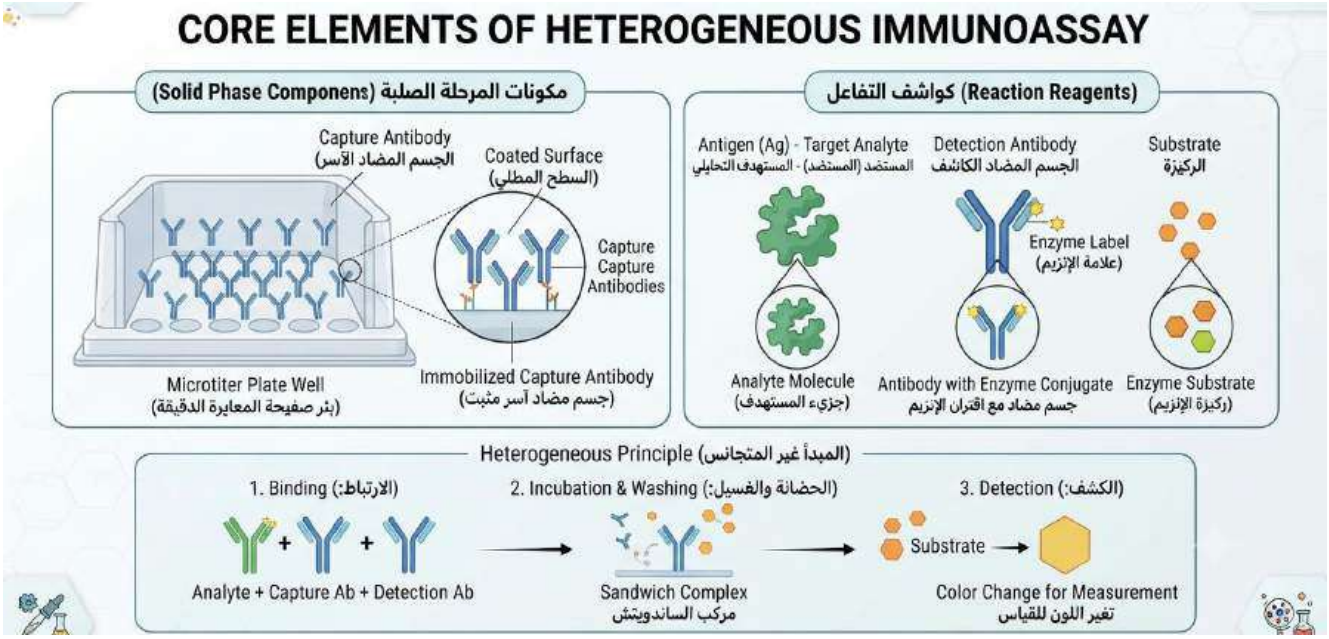
تصميم المقايسة المناعية (Immunoassay design)

يُعد الجسم المضاد عنصراً أساسياً في بناء أي مقايسة مناعية ويتطلب دراسة تفصيلية. وبمجرد توفر الجسم المضاد، يجب تقييمه بالشكل الذي سيُستخدم فيه. تنقسم أشكال المقايسات عموماً إلى فئتين: الأولى تُسمى **المقايسة المناعية غير المتجانسة (Heterogeneous immunoassay)**، والتي تتميز بوجود خطوة لفصل المواد المرتبطة عن المواد الحرة. أما البديل فيُسمى **المقايسة المناعية المتجانسة (Homogeneous immunoassay)**، وتتميز عن المقايسات غير المتجانسة بكونها لا تتطلب خطوة فصل.

المقايسة المناعية غير المتجانسة: أمثلة (Heterogeneous immunoassay / examples)

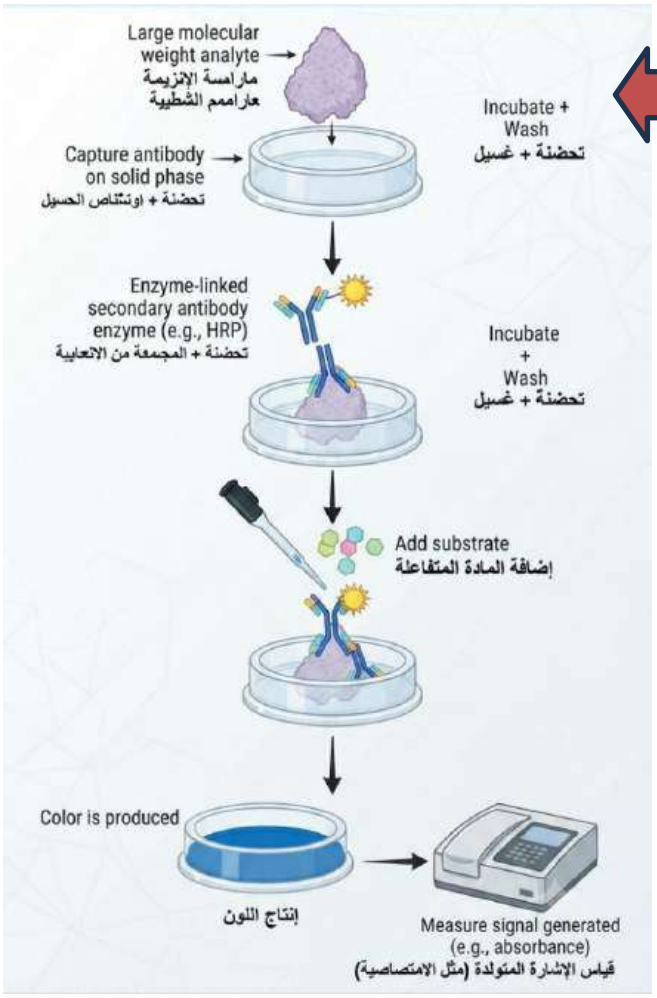
تتضمن أبسط شكل من أشكال المقايسات المناعية غير المتجانسة مقايسة تنافسية باستخدام مرحلة صلبة (Solid phase). وغالباً ما يُستخدم صفيحة معايرة دقيقة (Microtitre plate) مطلية بأجسام مضادة مثبتة ضد دواء الهدف. وفي هذا الشكل من المقايسات، يتم إضافة العينة، والمخزن المؤقت (Buffer)، ومقترن الهابتين والدواء والمبلغ (–Hapten–drug

reporter conjugate) إلى بئر صفيحة المعايرة الدقيقة. يتم حضن الخليط لفترة من الوقت تتنافس خلالها المادة المقترنة والدواء الحر للارتباط بالمرحلة الصلبة. بعد ذلك، تُغسل المرحلة الصلبة لإزالة المواد غير المرتبطة. ثم يُضاف الركيزة (Substrate)، وبعد ذلك يتم قياس الإشارة في كل بئر تفاعل. وتكون الإشارة الناتجة تتناسب عكسياً مع تركيز الدواء الحر في العينة.



الشكل 3: العناصر الأساسية للمقايسة المناعية غير المتجانسة.

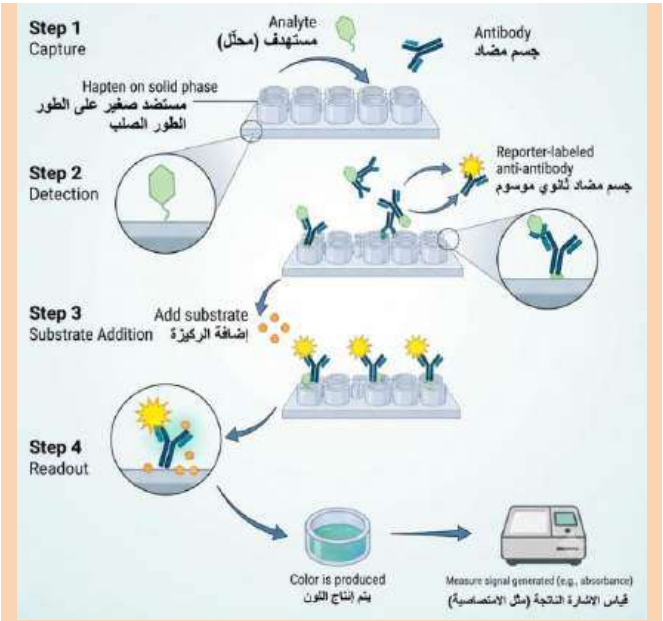
تُعد المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم (ELISA) الشكل الأكثر شيوعاً المستخدم للكشف عن الجزيئات الكبيرة أو البروتينات، ولكن تم تكييفها أيضاً للكشف عن أدوية الجزيئات الصغيرة. تُسمى هذه الأنواع من المقايسات غير المتجانسة أحياناً مقايسات "شطيرة" (Sandwich assays) لأن التحليل المستهدف يتم التقاطه بين جسمين مضادين. يوضح **الشكل 4** رسماً تخطيطياً لمقايسة شطيرة نموذجية غير متجانسة. في الخطوة الأولى، يتم خلط جزء من العينة أو المعاير (Calibrator) مع المخزن المؤقت وحضنه مع جسم مضاد التقاطي (Capture antibody) تم اقترانه أو امتصاصه على سطح صلب مثل صفيحة المعايرة الدقيقة. بعد الحضانة، يُغسل السطح لإزالة أي مادة لم ترتبط بشكل محدد بالأجسام المضادة على السطح الصلب. وفي الخطوة الثانية، يُضاف محلول آخر يحتوي على جسم مضاد ثانوي، وغالباً ما يكون معلماً بمبلغ. وعقب هذه الحضانة، يُغسل السطح مرة أخرى لإزالة المواد غير المرتبطة. بعد ذلك، يُضاف محلول ركيزة أو محلول مطور لتوليد الإشارة. وبمجرد توليد إشارة كافية، يتوقف التفاعل ويتم قياس الإشارة. كمية الإشارة الناتجة تتناسب طردياً مع كمية المادة المستهدفة التي تم التقاطها على السطح. غالباً ما تكون المقايسات غير المتجانسة حساسة للغاية ويمكن معايرتها عن طريق ضبط تركيز الكواشف والعينة. تشمل عيوب المقايسات غير المتجانسة فترات الحضانة الطويلة وخطوات الغسيل المتعددة. في مجال علم السموم، أصبحت مجموعة من تقنيات المقايسات غير المتجانسة متاحة وفي الاستخدام الروتيني. وتشمل هذه التقنيات: مقايسة ELISA، والمقايسة المناعية الإشعاعية (RIA)، والمقايسة المناعية الضيائية الكيميائية (CIA)، والمقايسة المناعية التألقية (FIA)، وأخيراً مقايسة التدفق الجانبي (LFA).



الشكل 4: المخطط الأساسي لمقايسة ELISA. لاحظ عملية الغسيل بين الخطوات، وهي الميزة المميزة للمقايسة غير المتجانسة (Figure 4 The basic scheme for an ELISA assay. Note the wash between steps. This is the distinctive feature of a heterogeneous assay).

يوضح **الشكل 5** مخططاً لمقايسة نموذجية غير متجانسة تستهدف دواءً صغير الجزيء. في الخطوة الأولى، يتم خلط العينة والمخزن المؤقت مع أجسام مضادة مضادة للدواء. إذا غاب دواء الهدف، فسيرتبط الجسم المضاد بالدواء المرتبط بالمرحلة الصلبة. يمكن أن تكون المرحلة الصلبة صفيحة معايرة دقيقة، أو حبيبات، أو غشاء مصنوع من النيتروسيليلوز، أو بوليمرات، أو زجاج. بمجرد اكتمال هذه الحضانة الأولية، يُغسل السطح ويُضاف كاشف ثاني يحتوي على أجسام مضادة معلمة بالمبلغ ضد الجسم المضاد الأول الذي يستهدف دواء الاهتمام. تتشكل بنية شطيرة بين مقترن الدواء على المرحلة الصلبة ومقترن الجسم المضاد الثانوي والمبلغ. بعد الحضانة، يُغسل الجسم المضاد الثانوي غير المرتبط ويتم قياس الركيزة أو الإشارة في خليط التفاعل. الإشارة المكتشفة تتناسب عكسياً مع تركيز الدواء في العينة.

هناك عدد من الاختلافات على مخططي المقايسة الموصوفين أعلاه. في معظم الحالات، تكون الاختلافات إما في المبلغ المستخدم أو السطح الصلب (انظر الجدول 2). تشمل المبلّغات المختلفة المستخدمة علامات مشعة (RIA)، وتألقية (FIA)، وضيائية كيميائية (CIA). المفتاح لأي مقايسة غير متجانسة هو خطوة الغسيل التي تزيل الكاشف الزائد وتخفض إشارة الخلفية من العينة أو المتداخلات الأخرى. وبهذه الطريقة تحقق المقايسات غير المتجانسة أقصى حساسيات تحليلية.



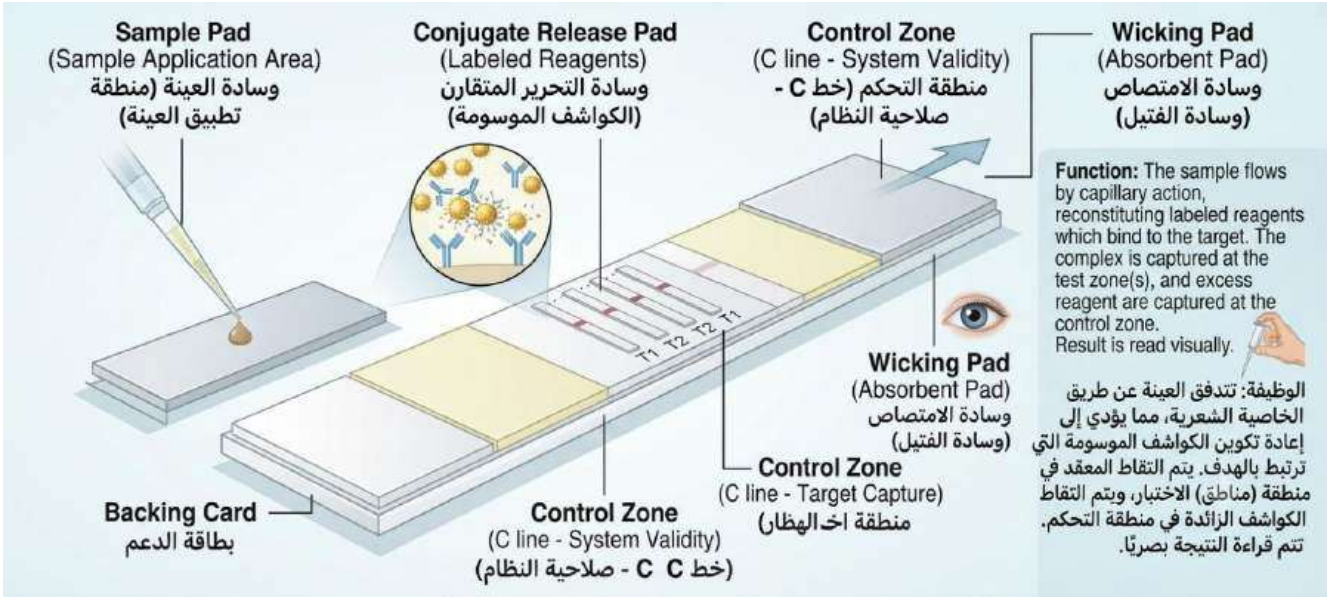
الشكل 5: يوضح المخطط مقايسة مناعية تنافسية نموذجية ذات مرحلة صلبة تُستخدم عادة للكشف عن مخدرات إساءة الاستخدام. وهو شكل غير متجانس يستخدم خطوات الغسيل لإزالة المواد التي لم ترتبط مناعياً. الإشارة تتناسب عكسياً مع تركيز الدواء الحر في العينة

يُعد التدفق الجانبي (Lateral flow) نوعاً من المقايسات غير المتجانسة التي أصبحت منتشرة على نطاق واسع في غرف الطوارئ والمختبرات وفي إنفاذ القانون للاختبار في الموقع لمخدرات إساءة الاستخدام (Ulti-Med 2002). هذه الاختبارات قادرة على الكشف المتعدد لمجموعة من مخدرات إساءة الاستخدام من جزء صغير واحد من البول أو الدم أو اللعاب (Inoue, Seta 1992; The Walsh Group 2002).

تتركب مقايسة التدفق الجانبي من مواد مختلفة يتم تجميعها لتشكيل شريط اختبار. وتُعد وسادة العينة (Sample pad) المكون الأول، وهي المكان الذي توضع فيه كمية صغيرة -عادة **50 إلى 100 ميكرولتر (50–100 uL)**- من العينة على الشريط. غالباً ما تحتوي وسادة العينة على أملاح المخزن المؤقت لتهيئة العينة لتصل إلى الأس الهيدروجيني الصحيح وفي بعض الأحيان لإزالة الخلايا أو الحطام. غالباً ما تكون هذه الوسادات مصنوعة من الألياف الزجاجية أو السليلوز (Verheijen 2002; Volkov et al. 2009).

المادة التالية بعد وسادة العينة هي وسادة المقرن (Conjugate pad)، والتي تحتوي عادةً على مقرن المبلغ والجسم المضاد الذي يستهدف كل دواء محل اهتمام. والمبلغ الأكثر استخداماً هو الذهب الغروي (Colloidal gold). جسيمات الذهب صغيرة، وعادة ما يتراوح حجمها بين **10 إلى 100 نانومتر (10–100 nm)**، ولكن يمكن رؤيتها بسهولة بالعين المجردة عندما تتراكم في منطقة الكشف على الشريط. ويمكن بسهولة امتصاص الأجسام المضادة النقية على السطح (Verheijen 2002; Volkov et al. 2009). بمجرد إضافة العينة إلى شريط الاختبار، فإنها تتدفق عبر وسادة العينة، ووسادة المقرن، ثم إلى شريط النيتروسيليلوز. يعمل النيتروسيليلوز كمادة خام على ربط كواشف الالتقاط والسماح للسوائل بالتدفق عن طريق العمل الشعري على طول شريط الاختبار.

يمكن أن يختلف شريط النيتروسيليلوز في الطول وفقاً للأهداف المرغوبة للاختبار؛ على سبيل المثال، سيسمح الشريط الأطول بخطوط اختبار متعددة للتحاليل (انظر الشكل 6). ومع ذلك، سيستغرق تحرك السوائل على طول الشريط وقتاً أطول، مما يزيد من وقت المقايسة. والنيتروسيليلوز هو أيضاً المكان الذي يحدث فيه التفاعل المناعي. يتم إنشاء مناطق الالتقاط عند خط التحكم وخطوط الاختبار عن طريق رش محلول من مشتق بروتين الالتقاط على النيتروسيليلوز. ثم تُمَصَّص البروتينات على النيتروسيليلوز وتصبح مثبتة (انظر الشكل 6).



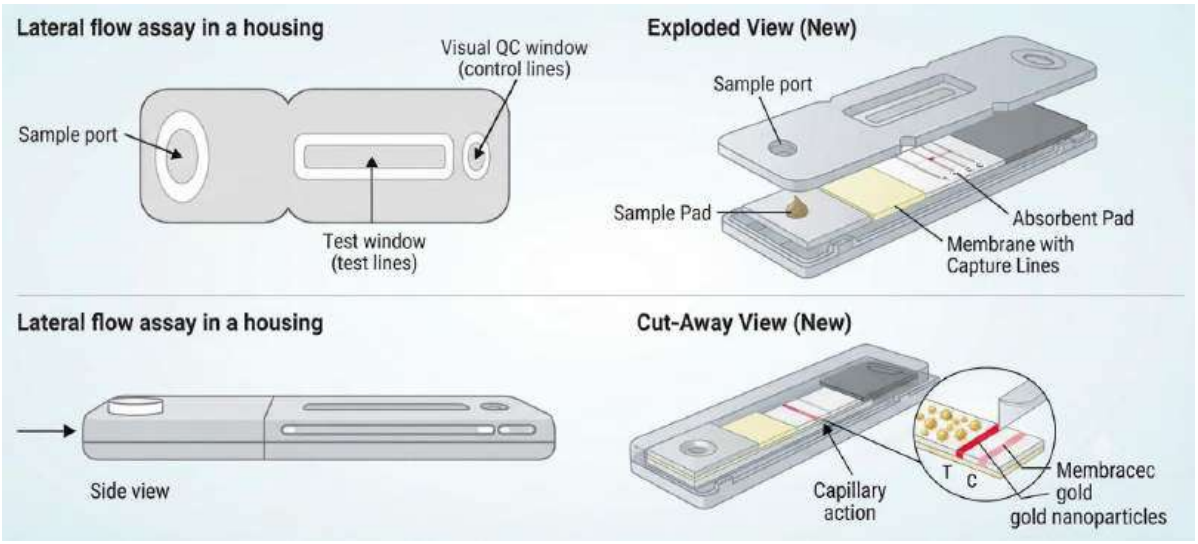
الشكل 6: المخطط الأساسي لمقايسة التدفق الجانبي المتعددة.

Figure 6 The figure shows the basic design of a lateral flow assay.

تتمثل المادة المعتادة لمنطقة الالتقاط في هابتين الهدف المشتق والمقترن ببروتين ناقل مثل ألبومين مصل البقر (BSA). عندما تصل العينة المخزنة مؤقتاً والجسم المضاد للمبلغ إلى منطقة التفاعل، يحدث تنافس بين الدواء الموجود في العينة ومقرن الهابتين على الشريط للارتباط بالجسم المضاد للمبلغ. إذا كان هناك تركيز عالٍ من الدواء، فسيكون هناك القليل من مقرن المبلغ المتاح للارتباط بمنطقة التفاعل ولن يكون للخط أي لون. أما إذا كانت العينة خالية من الدواء، فسيكون الخط الموجود في منطقة الالتقاط شديد الوضوح ويمكن رؤيته بسهولة بالعين المجردة. لقد نمت استخدامات مقايسات التدفق الجانبي بشكل هائل في العقد الماضي.

بمجرد تطوير الكيمياء الأساسية، يجب تعبئة النظام في غلاف أو هيكل (الشكل 7). قد يتم دمج هذا الغلاف في كوب بول، أو عصا غمس، أو جامع لعاب (Draeger Safety UK Ltd 2008; Orasure Technologies 2008).

يكمن التحدي الذي تواجهه مقايسات التدفق الجانبي المستخدمة في علم السموم في أنه يجب عليها الكشف بشكل موثوق عن مجموعة من الأدوية المستهدفة باستخدام التدفق الديناميكي، حيث يُحكَم ارتباط الكواشف المتحركة عبر سلسلة من المواد المخططة بالكامل بواسطة القوى الشعرية وحدها. ومن منظور تحليلي بحت، غالباً ما تكون مقايسات التدفق الجانبي غير دقيقة وغير حساسة. وليس من غير المألوف أن تتبلور لدى مقايسات التدفق الجانبي انحرافات معيارية نسبية (RSDs) تتراوح بين **15 إلى 30%** عند اختبار مكررات العينة أو المعايير. بالإضافة إلى ذلك، سلطت العديد من التقييمات الميدانية الضوء على أوجه القصور في الأداء (Peace 2000; The Walsh Group 2002). ورغم ذلك، يُعد التدفق الجانبي طريقة مقبولة يستخدمها أولئك الذين يقومون بإجراء اختبارات لمخدرات إساءة الاستخدام في الموقع. ومن المتوقع أنه مع استمرار نمو الاستخدام التجاري، فإن الطرق الجديدة التي تفسرها الأجهزة ستعمل على تحسين أداء مقايسات التدفق الجانبي (Alverix Inc. 2010; Faulstich et al. 2007).



الشكل 7: مقايسة التدفق الجانبي داخل غلاف (Figure 7 Lateral flow assay in a housing).

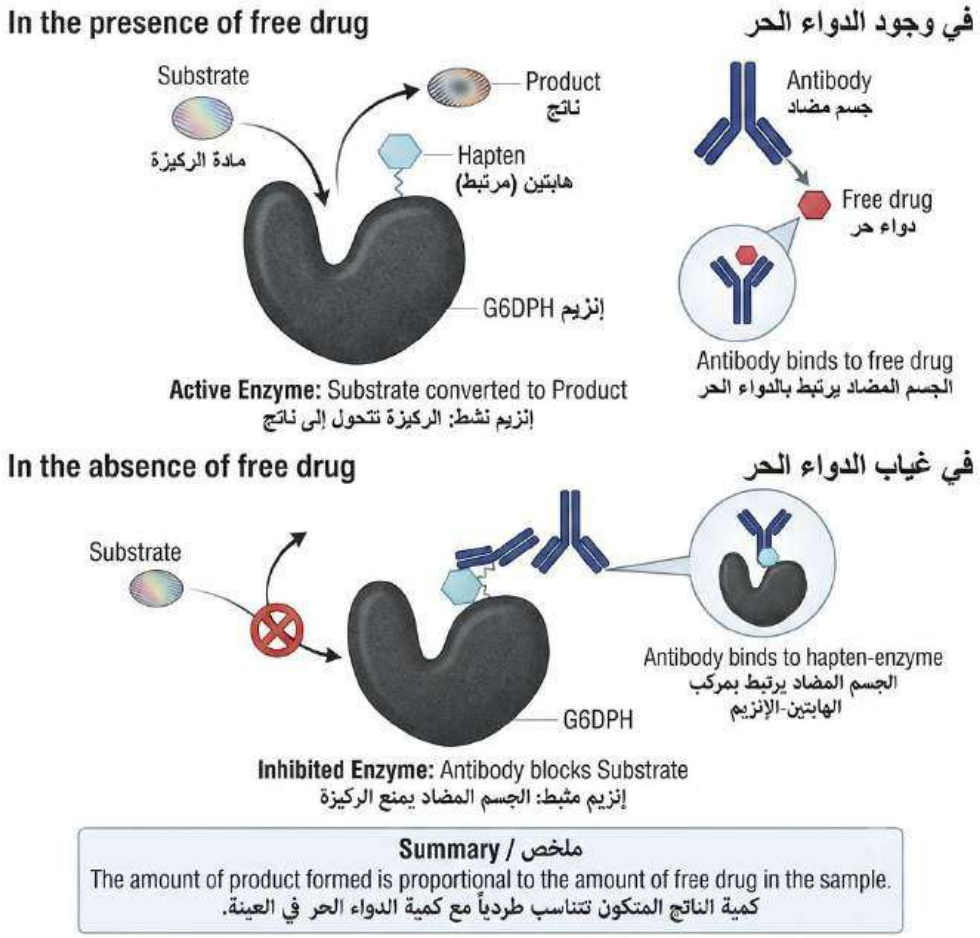
المقايسات المناعية المتجانسة / الأمثلة (Homogeneous immunoassay/examples)

لا تتطلب المقايسات المناعية المتجانسة، بحسب تعريفها، خطوة لفصل المواد المستهدفة (Analytes) والمؤشرات الحرة عن تلك المرتبطة. وفي معظم الحالات، تُستخدم المقايسات المتجانسة على منصات آلية لا تتطلب سوى تدخل طفيف من المشغل. وتُعد هذه النقطة بمثابة عيب نوعي نظراً لعدم سهولة نقل مثل هذه المعدات. ونتيجة لذلك، تُستخدم المقايسات المتجانسة بشكل

روتيني على منصات أجهزة مختبرية ضخمة قادرة على تحليل مئات أو آلاف العينات يومياً. وقد أحدث توفر هذه المقايسات بتكاليف منخفضة للغاية ثورة في اختبارات الكشف عن مخدرات الإساءة المعتمدة على المقايسات المناعية.

غالباً ما تكون مقايسات المخدرات المتجانسة عبارة عن مقايسات تنافسية، حيث يتنافس المخدر الحر الموجود في مادة المعايرة (Calibrator) أو العينة مع مترافق مؤشر (Reporter conjugate) للارتباط بجسم مضاد محدد على الهدف. وبعد حضانة لفترة قصيرة، يُقاس التغير في الإشارة بالطيف الضوئي (Spectrophotometrically)، أو عبر التألق (Fluorescently)، أو من خلال التألق الكيميائي (Chemiluminescence). وفيما يلي وصف لبعض طرق المقايسات المتجانسة المتاحة لاختبارات مخدرات الإساءة:

- **تقنية المقايسة المناعية مضاعفة الإنزيم (EMIT):** أصبحت تقنية **EMIT** عنصراً أساسياً في اختبارات المخدرات منذ سبعينيات القرن العشرين عندما طُوّرت لأول مرة (Kabakoff, Greenwood 1981; Rubenstein et al. 1972; Ullman 1994; Ullman, Maggio 1980). ويعتبر اختبار **EMIT** ذا تنسيق تنافسي، حيث يتنافس إنزيم نازعة هيدروجين الجلوكوز-6-فوسفات (G6PDH) المرتبط بالهابين (Hapten-labelled) مع المخدر الحر في العينة أو مادة المعايرة للارتباط بجسم مضاد محدد مُنتَج ضد الهدف الهابيني. وإذا ارتبط هابين الـ **G6PDH** بالجسم المضاد، يحدث تغير فراغي في الإنزيم يؤدي إلى انخفاض في نشاطه (شكل 8). ويتناسب هذا التغير في النشاط طردياً مع تركيز المخدر الحر الموجود في العينة.

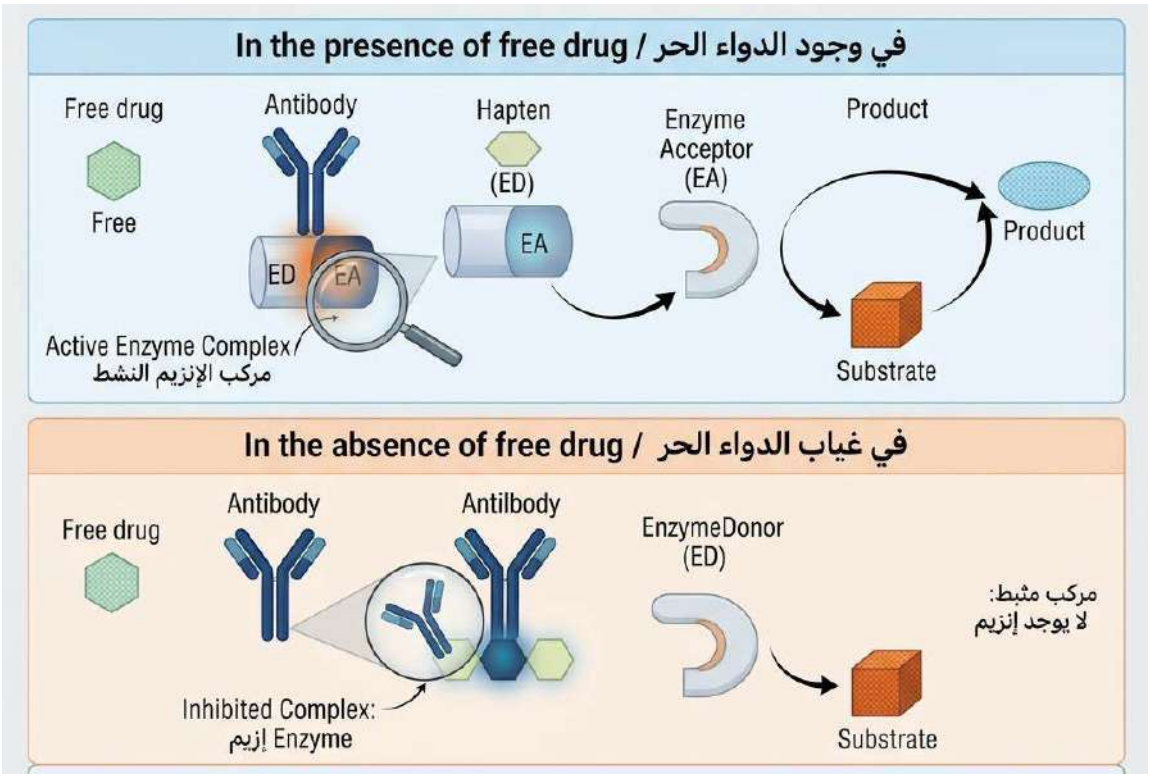


شكل 8: مخطط مقايسة **EMIT**؛ الإشارة تتناسب طردياً مع تركيز المادة المستهدفة (Analyt).

وقد طُوّرت اختبارات **EMIT** لعدد كبير من مخدرات الإساءة والمواد المستهدفة في مراقبة الأدوية العلاجية (TDM). ومع مرور الوقت، توفرت أيضاً مجموعة واسعة من الأجهزة للعاملين في المختبرات، مما مكن **EMIT** من أن تصبح بسرعة الطريقة المفضلة. ومع ذلك، تجدر الإشارة إلى أنه مثل جميع المقايسات المناعية، فإن أداء اختبار **EMIT** يعتمد على الجسم المضاد المستخدم. بالإضافة إلى ذلك، تكون اختبارات **EMIT** عرضة للتداخل الناتج عن غش العينات والتفاعل التصالبي غير المحدد (Colbert 1994; Rollins et al. 1990; Rossi et al. 2006).

- **مقايسة مانح الإنزيم المستنساخ (CEDIA):** تعتمد تقنية **CEDIA** -وهي قابلة للمقارنة إلى حد ما في مبادئ تشغيلها- على النشاط المُعدَّل لأنزيم بيتا-جالاكتوسيديز (Beta-galactosidase) المتحور. فقد طور الباحثون (Henderson et al. 1986) شكلاً مهندساً وراثياً من إنزيم بيتا-جالاكتوسيديز يتواجد في صورة مكونين: يُعرف أحد الجزأين بمستقبل الإنزيم (**EA**) ويُعرف الجزء الآخر بمنح الإنزيم (**ED**). ويصبح الإنزيم المتحور نشطاً إنزيمياً عندما يتواجد كل من **ED** و **EA** معاً.

ويمكن تطوير مقايسة متجانسة عن طريق اقتران هابين بـ **ED**؛ حيث سيتنافس هابين الـ **ED** مع المخدر الحر في وجود جسم مضاد موجه ضد الهابين (شكل 9). وعندما تتوفر تراكيز عالية من الهابين-المخدر المستهدف، يصبح هابين الـ **ED** متاحاً للارتباط بـ **EA**، وحينها يتم اكتشاف زيادة في إنزيم بيتا-جالاكتوسيديز. وبالتالي، تماماً مثل **EMIT**، فإن كمية النشاط الإنزيمي تتناسب طردياً مع تركيز المخدر الحر في العينة. بالإضافة إلى ذلك، يمكن تشغيل اختبارات **CEDIA** على نفس معدات القياس الطيفي الآلية التي تشغل اختبارات **EMIT**.



شكل 9: مخطط مقايسة **CEDIA**؛ الإشارة تتناسب طردياً مع تركيز المادة المستهدفة.

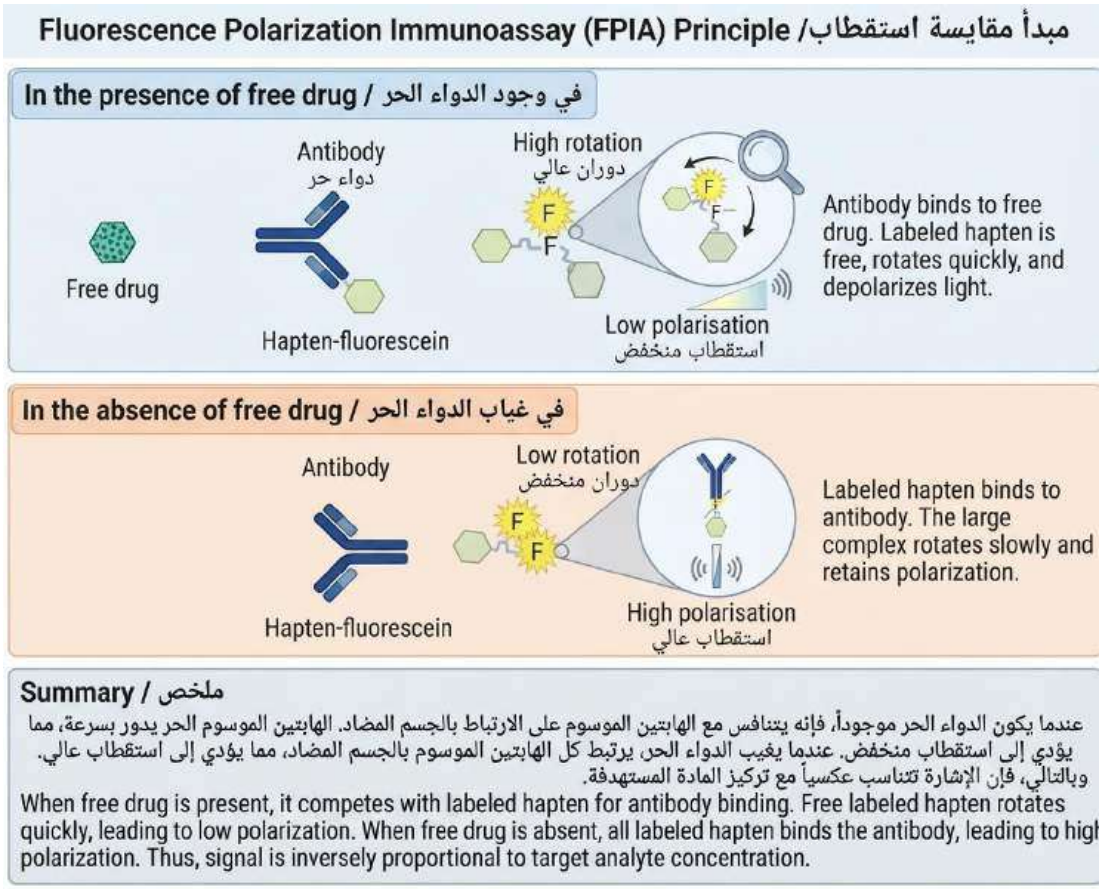
أنواع أخرى من المقايسات المتجانسة: توجد أنواع أخرى من المقايسات المتجانسة تعتمد على مؤشرات غير لونية. وفي هذه الفئة، أثبتت تقنيات مثل استقطاب التألق (Fluorescence polarisation)، وتراص الجسيمات الدقيقة (Microparticle

agglutination)، والتقنيات الحديثة مثل مقايسات المناعة ذات القنوات الأكسجينية المتألقة (**LOCI**) (Ullman 2005) كفاءتها واستُخدمت بشكل روتيني في المختبرات التجارية.

يُعد استقطاب التألق تقنية بسيطة نسبياً تستخدم الارتباط التنافسي بالأجسام المضادة بين مترافق هابين-فلوروسين (Hapten–fluorescein conjugate) والمخدر الحر (الهابين؛ شكل 10) (Abbott Laboratories 2005; Colbert et al. 1985; Dandliker et al. 1973). يدور مترافق هابين-فلوروسين بسرعة عندما لا يكون مرتبطاً بجسم مضاد. أما عند ارتباطه بالجسم المضاد، تبطأ سرعة الدوران بشكل دراماتيكي مقارنة بالجزيء الحر. ولتوليد إشارة المقايسة، يسلط مقياس التألق ضوءاً بطول موجي محدد للإثارة الخاصة بالفلوروسين عبر مرشح استقطاب عمودي.

تصدر جزيئات هابين-فلوروسين الحرة التي تدور بسرعة ضوءاً في مستوى مختلف عن الضوء الساقط. في المقابل، تعكس جزيئات هابين-فلوروسين المرتبطة بالجسم المضاد والتي تتسم بالثبات النسبي ضوءاً في مستوى مشابه، ويتم اكتشاف ذلك عبر مرشح الاستقطاب.

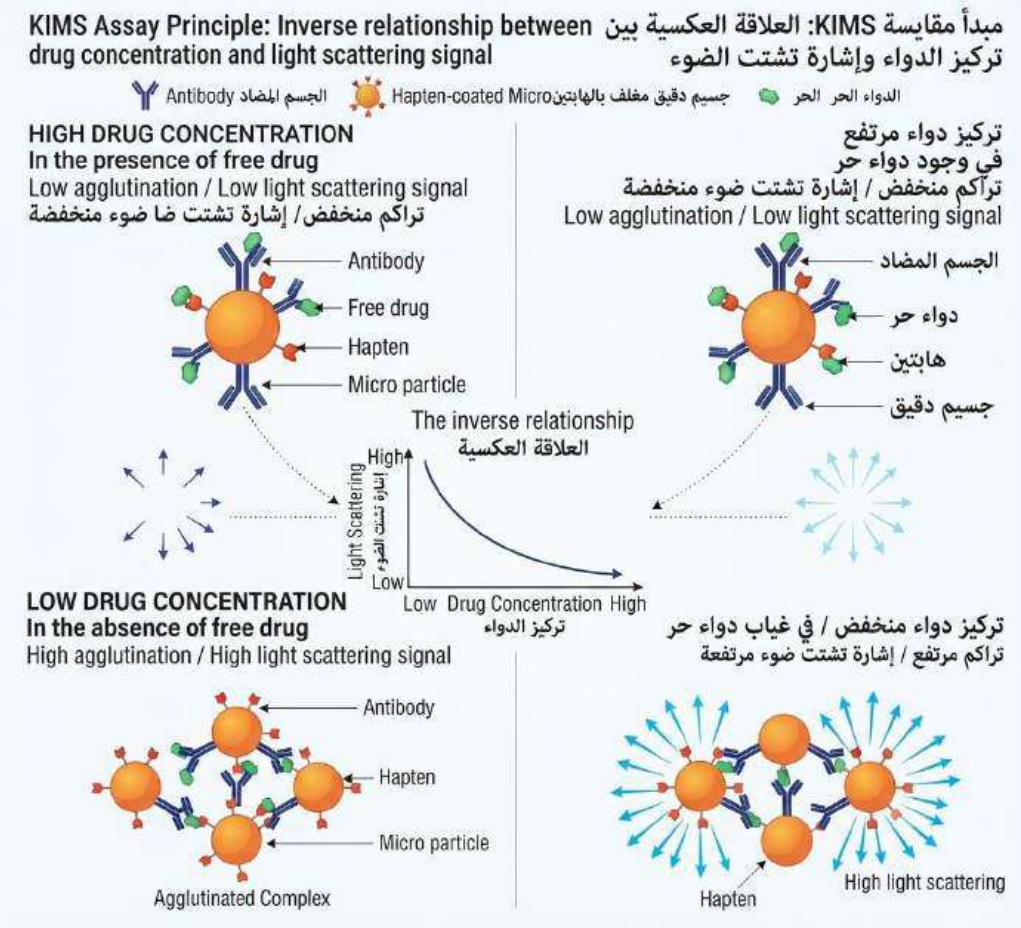
يتنافس المخدر المضاف عبر العينة على الارتباط بالجسم المضاد مع الهابين المرتبط بالفلوروسين، مما يقلل من كمية الفلوروسين المرتبط بالجسم المضاد، وينتج عن ذلك اكتشاف تألق منبعث أقل عبر المرشح المستقطب. تتطلب مقايسات استقطاب التألق معدات متخصصة وهي تمثل أساس نظام **Abbott ADx**. ويعني التألق الخلفي الموجود في العديد من العينات البيولوجية أنه من الضروري أخذ قراءة فارغة (Blank reading) للعينة والمواد المتفاعلة قبل إضافة المتتبع الفلوري (Fluorescent tracer) إلى الخليط.



شكل 10: مخطط مقايسة استقطاب التألق المناعي؛ الإشارة تتناسب عكسياً مع تركيز المادة المستهدفة.

تعتمد تقنية شائعة أخرى تُستخدم في مقايسات مخدرات الإساءة على تراص الجسيمات الدقيقة (Microparticle agglutination). وتعتمد مقايسة **KIMS** (التفاعل الحركي للجسيمات الدقيقة في المحلول) على المبادئ القديمة والموثوقة لتراص جزيئات اللاتكس (شكل 11) (De Giovanni, Fucci 2006; Feldman et al. 2004). ففي تقنية **KIMS**، تُطلى جسيمات اللاتكس البوليسترين الدقيقة بمترافق مخدر. وتكون هذه الجسيمات معلقة في المحلول، وبعد ذلك يُضاف عينة والأجسام المضادة الموجهة ضد مترافق المخدر (الهابين).

في حضور تراكيز عالية من المخدر، تكون مواقع ارتباط الأجسام المضادة مشغولة بالمخدر الحر وتحدث كمية منخفضة من التراص. أما في حضور تراكيز منخفضة من المخدر المستهدف، فإن الأجسام المضادة تقوم بربط الجسيمات ببعضها وتبدأ في تجميع الجسيمات داخل تجمعات كبيرة. وتعمل هذه التجمعات على تشتيت الضوء؛ ولهذا السبب، فإن التغير في الإشارة يتناسب عكسياً مع تركيز المخدر المستهدف الحر في العينة. وتُعد **KIMS** الأساس لنظام **Roche Abuscreen Online**، والذي يتضمن مراقبة معدل التراص بطرق قياس الطيف الضوئي.



شكل 11: مخطط مقايسة **KIMS**؛ الإشارة تتناسب عكسياً مع تركيز المادة المستهدفة.

تتمثل التحديات التي تواجه أي تقنية مقايسة متجانسة في الحساسية؛ حيث عادةً ما تستغرق هذه المقايسات ثوانٍ إلى دقائق لإجرائها وغالباً ما تكون محددة بحركية التفاعل أو جودة الأجسام المضادة. وتعتبر تقنية **LOCI** نظاماً تألقياً كيميائياً يتغلب على العديد من قيود مؤشرات المقايسات الأخرى (Ullman 2005). وتكون الكواشف المستخدمة لإنتاج الإشارة في المقايسة مغلفة داخل كرات من اللاتكس مما يمنع التداخل الناتج عن مصفوفات العينات.

تحتوي إحدى مجموعات كرات اللاتكس على مادة مُضيئة كيميائياً (Chemiluminescer)، بينما تحتوي المجموعة الثانية على مادة حساسة للضوء (Photosensitiser) قادرة على إثارة الأكسجين عند تعريضها لضوء بطول موجي **nm680**. وعندما تقترب الحبيبات معاً، ينتشر الأكسجين المُثار خارج الحبيبة ليدخل إلى حبيبة المادة المُضيئة كيميائياً، منتجاً فوتونات قابلة للاكتشاف. وقد خضعت مقايسة **LOCI** للاختبار مع مجموعة متنوعة من المواد المستهدفة وأظهرت كل منها حساسية فائقة مقارنة بالتقنيات المنافسة الأخرى (Ullman 2005).

تحسين المقايسة المناعية (Immunoassay optimisation)

تمت مراجعة الطرق المستخدمة لتطوير جسم مضاد ضد هابين مخدر مستهدف في وقت سابق من هذا الفصل. وبافتراض أنه تم إنتاج مرشح جسم مضاد قابل للتطبيق واختيار تنسيق المقايسة، تتمثل الخطوة التالية في البدء بتطوير وتحسين المقايسة المناعية. ويهدف هذا القسم إلى تحديد بعض التجارب الرئيسية يتبعها شرح لأهم معلمات المقايسة التي يجب أخذها في الاعتبار.

ومجدداً، ستكون المادة المستهدفة المستخدمة كمثال في هذا القسم هي المورفين (Morphine)، ويظهر هيكل المورفين في **شكل 2**. يُعد المورفين واحداً من فئة كبيرة من مركبات المواد الأفيونية التي غالباً ما يتم إساءة استخدامها؛ وعليه، فإن الغرض من هذا الاختبار الافتراضي هو الكشف عن فئة واسعة من المركبات في عينة واحدة. والتنسيق المخطط لتطويره هو الفحص الجانبي (Lateral flow)، وستكون مصفوفة العينة هي اللعاب (Saliva).

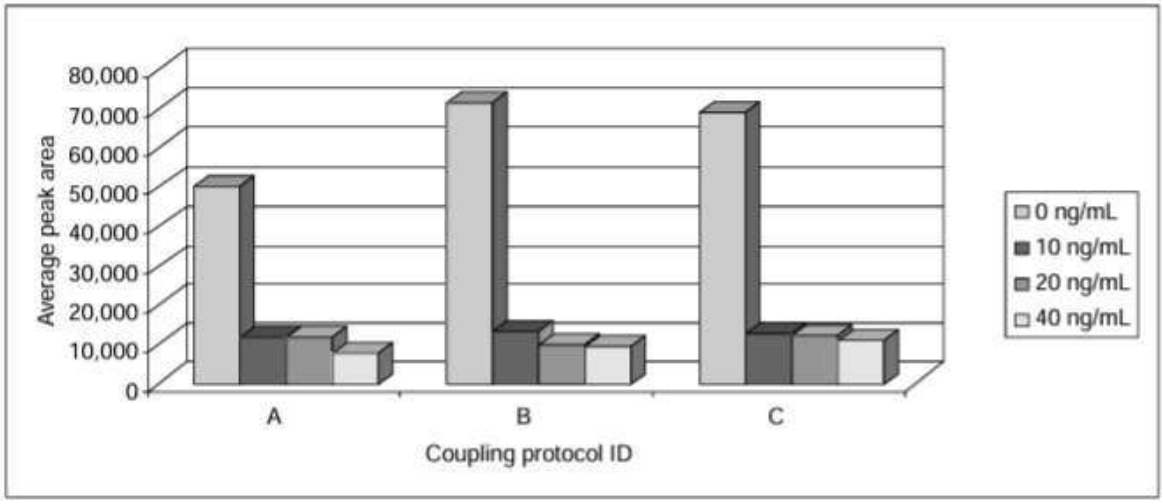
أظهرت دراسات استقلاب المواد الأفيونية أن كلاً من الدواء الأصلي ومنتجات الأيض المرتبطة الرئيسية تظهر في سوائل الفم، وقد أُثبت مسبقاً إمكانية الكشف عن ذلك باستخدام مقايسة مناعية معملية (Niedbala, Kardos 2005)، مما يشير إلى أن مقايسة التدفق الجانبي تُعد خياراً منطقياً. وللبدء في تطوير مقايسة التدفق الجانبي، يتم اشتقاق المورفين (Derivatised) من خلال مجموعة الهيدروكسيل قبل اقترانه ببروتين مصل البقر **BSA** (Verheijen 2002; Volkov et al. 2009). باستخدام جهاز ترسيب قطرات من نوع **Kinematic Linomat striper**، يمكن امتصاص مترافق المورفين-**BSA** على سطح غشاء من النيتروسيليلوز بحجم مسام يبلغ **mm10** عن طريق توزيع كميات صغيرة بشكل متتالي لتشكيل منطقة التقاط (Capture zone)(Verheijen 2002; Volkov et al. 2009) .

بالإضافة إلى ذلك، يمكن وضع علامات على مؤشر مثل الذهب الغروي (Colloidal gold)، أو جزيئات اللاتكس الفلورية، أو الفوسفور المحول للأعلى (Up-converting phosphors) باستخدام أجسام مضادة نقية مضادة للمورفين كما هو موضح في مكان آخر (Niedbala et al. 2000, 2001). وأخيراً، يمكن اختيار المحلول الملحي المخفف بالفوسفات (PBS)، أو حمض **N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N0-2-ethanesulfonic acid (Hepes)**، أو محلول منظم بديل طالما أنه يتحكم بشكل ملائم في الرقم الهيدروجيني (**pH**) لمخليط المقايسة النهائي دون التأثير سلباً عليها.

بمجرد إعداد جميع الكواشف وإجراء منحنى قياسي يظهر استجابة عبر تراكيز مختلفة من المورفين، يمكن إجراء تجارب لتحسين تركيز كل مكون من مكونات المقايسة. وعادةً ما تتمثل المكونات التي يتم تغييرها في تحميل الكواشف على منطقة التقاط، ومستوى مترافق المؤشر للتحكم في الإشارة القابلة للاكتشاف، وأخيراً حجم العينة للحصول على أفضل دقة ونطاق ديناميكي أمثل.

فعلى سبيل المثال، يوضح **شكل 12** تأثير ثلاثة بروتوكولات مختلفة لتخطيط (Striping) منطقة التقاط على شريط النيتروسيليلوز. ومع زيادة تحميل مترافق مورفين-**BSA**، وُجد أن هناك حداً أقصى لكمية الإشارة التي يمكن توليدها. ومع

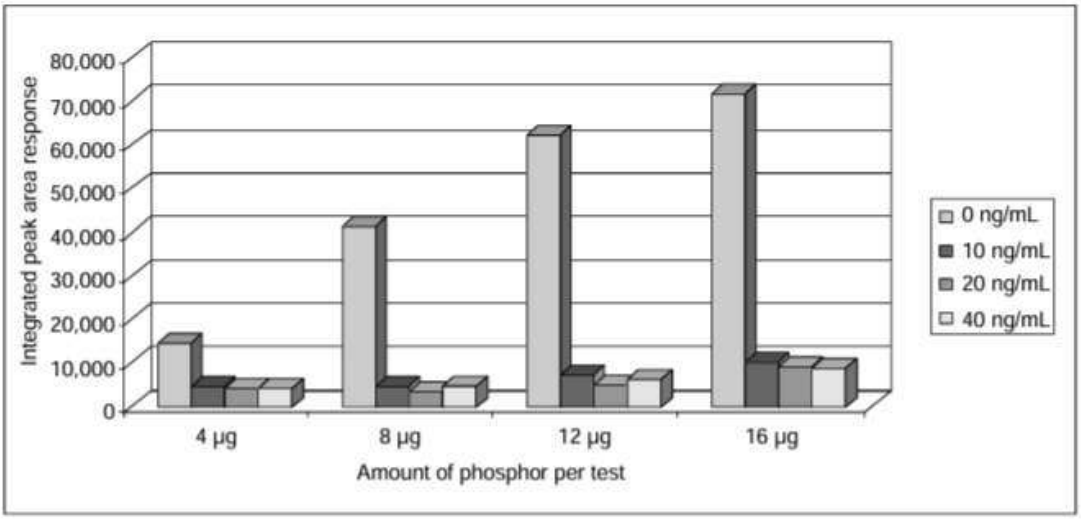
ذلك، تجدر الإشارة إلى أن الإزاحة الإجمالية (Displacement) بين الصفر والتراكيز المختلفة للمخدر الحر ظلت كما هي تقريباً.



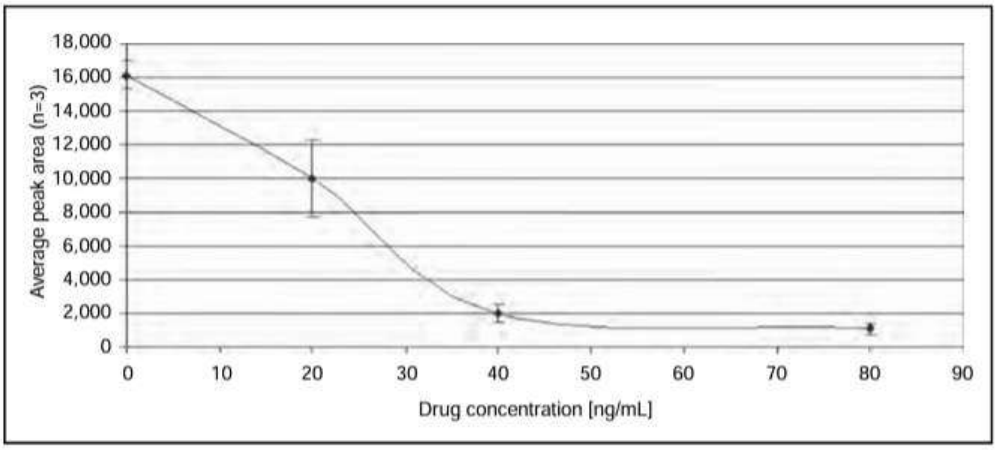
شكل 12: يعرض هذا الرسم البياني نتائج ثلاث تجارب لتحميل تراكيز مختلفة من مترافق مورفين-**BSA** على شريط التدفق الجانبي. وقد تم الوصول إلى المستوى الأمثل عندما كانت الإشارة عند تركيز صفر من المورفين هي الأعلى.

بعد ذلك، يمكن تحسين تركيز مترافق المؤشر. يوضح **شكل 13** مثالاً لمقايسة تدفق جانبي تستخدم مترافقات الفوسفور المحول للأعلى (Up-converting phosphor conjugates) كمؤشر. وتجدر الإشارة إلى أنه كلما زاد مستوى المؤشر، زادت الإشارة أيضاً عند تركيز **ng/mL0** من المورفين الحر. ويساعد هذا الفصل الكبير على ضمان التمييز الفعال بين العينات السلبية والإيجابية.

وأخيراً، تم تعديل حجم عينة المقايسة واختبار دقتها عن طريق إجراء عينات مكررة (Replicates) عند عدة مستويات من المورفين. وكما هو موضح في **شكل 14**، كانت المقايسة المطورة قادرة على التمييز بسهولة بين **0** و **ng/mL40** من المورفين، وهي التراكيز المستهدفة المناسبة للاختبار القائم على سوائل الفم.



شكل 13: يوضح هذا الرسم البياني نتائج تغيير مؤشر المترافق في مقايسة التدفق الجانبي المصممة للكشف عن المورفين. ازدادت الإشارة كلما تمت إضافة المزيد من المترافق، مما أدى إلى منحنى أكثر انحداراً وتحسين أداء المقايسة.



شكل 14: بمجرد تحسين مقايسة التدفق الجانبي للمورفين، تم اختبار دقتها. يوضح هذا الرسم البياني أن المقايسة المحسنة أظهرت تبايناً طفيفاً حول كل تركيز من تراكيز المعايرة، مع وجود فصل كبير في الإشارة بين مواد المعايرة.

معايير أداء المقايسة المناعية (Immunoassay performance parameters)

بعد مناقشة الجوانب الرئيسية لكواشف الاختبار وتطويره، أصبح من المناسب الآن الانتقال إلى المعايير المستخدمة لتقييم أداء المقايسة المناعية. ومن المهم ملاحظة وجود عدة طرق لتحديد كل معيار من المعايير التي يتم النظر فيها؛ وتلك التي تُناقش هنا ذات صلة بالعلماء الذين يطورون أو يقيّمون المقايسات المناعية التجارية للتحقيقات السمية (Green, Isenchmid 1995; Kwong et al. 1988; Linnet, Brandt 1986).

المعيار الأول: الدقة (Precision)

الدقة هي مقياس للتباين الذي يحدث إما عند اختبار عينات مكررة في تشغيل واحد (دقة ضمن التشغيل - Intra-assay precision)، أو عند اختبار عينات مكررة ومقارنتها بين عمليات تشغيل مختلفة (دقة بين التشغيلات - Inter-assay precision). وسواء تعلق الأمر بدقة ضمن التشغيل أو بينه، يتم التعبير عن القيمة دائماً كنسبة مئوية للانحراف المعياري النسبي (**RSD**).

ومن المهم رسم نسب الانحراف المعياري النسبي لأي اختبار والبحث عن الانحراف حول كل نقطة يتم اختبارها. وفي مختبر المؤلف، من المعتاد رسم المتوسط مضافاً إليه انحرافين معيارين فوق وتحت كل نقطة اختبار على المنحنى؛ فإذا تداخل ذلك مع الانحراف المعياري لمادة المعايرة التي تعلوها، يتم الاستمرار في تحسين المقايسة لرفع مستوى الأداء.

ومن الهام فحص بيانات الدقة إما باعتبارها دقة للإشارة المتولدة في المقايسة أو كأرقام محولة على المنحنى القياسي. معظم مقايسات علم السموم تكون نوعية (Qualitative) وبالتالي تعتمد على الإشارة وحدها. ومع ذلك، تعتبر الأرقام المحولة أكثر صرامة وتُعد طريقة ممتازة لإظهار كفاءة وقوة أداء المقايسة.

المعيار الثاني: حد الكشف (Limit of detection)

تتطلب العديد من مقايسات الفحص السموي مستويات قطع (Cut-off) تمثل تحدياً في تطوير أي مقايسة مناعية. يجب الكشف عن مواد مستهدفة مثل عقار الـ **LSD**، أو البوبرينورفين (Buprenorphine)، أو رباعي هيدروكانابينول (**THC**) بتراكيز منخفضة للغاية في سوائل الفم. ومعيار المقايسة الذي يشير إلى أدنى مستوى يمكن اكتشافه هو حد الكشف (**LOD**).

غالبًا ما يُحدد حد الكشف للمقايسة المناعية بإحدى طريقتين:

- **الطريقة الأولى:** تشمل تشغيل عينات مكررة لمعيار الصفر في المقايسة، ثم أخذ المتوسط مضافاً إليه انحرافين أو ثلاثة انحرافات معيارية ورسمه على المنحنى القياسي للمقايسة، ليُصار بعد ذلك إلى تعيين هذا التركيز كحد للكشف.
- **الطريقة الثانية (وهي الأكثر قوة):** تتضمن تشغيل عينات مكررة لتراكيز متنوعة على طول منحنى المقايسة، ومثلما يحدث عند تحديد الدقة، يتم رسم انحرافين معياريين فوق وتحت كل نقطة. ويُعتبر أدنى تركيز يمكنه فصل انحرافين معياريين فوق الصفر عن انحرافين معياريين تحت تركيز المكررات هو ما يُطلق عليه حد الكشف (**LOD**).

المعيار الثالث: النوعية / التفاعل التصالبي (Specificity/cross-reactivity)

يُعد هذا المعيار غاية في الأهمية لمقايسات علم السموم. وكما ذكر مسبقاً، تستهدف بعض المقايسات مركبات معينة مثل **THC**، بينما تستهدف مقايسات أخرى -من الناحية المثالية- فئة واسعة من المركبات مثل البنزوديازيبينات (Benzodiazepines). بالإضافة إلى ذلك، يجب أن تكون المقايسات خالية من التداخل الناتج عن الأدوية الشائعة التي تُصرف بدون وصفة طبية.

باستخدام مثال مقايسة المورفين، وإلى جانب التفاعل التصالبي، يوضح الجدول أيضاً حسابات مكافئات المورفين والتركيز الذي قد ينتج عنه نتيجة إيجابية. وكل قيمة من هذه القيم الخاصة بالتفاعل التصالبي، والمكافئات، والتركيز الذي قد ينتج عنه نتيجة إيجابية، يتم اشتقاقها عن طريق تشغيل تراكيز مختلفة من المتفاعلات التصالبية المحتملة في المقايسة المعنية ومقارنة النتائج مقابل معيار القطع، والذي يمثله المورفين في هذه الحالة. ويمكن تحديد كل من هذه المعايير من خلال مقارنة التراكيز بحد القطع.

المعيار الرابع: التداخلات / الغش (Interferences/adulteration)

حتى لو تم إجراؤها بشكل صحيح، يمكن أن تعطي المقايسة المناعية نتيجة غير صحيحة إذا تعرضت العينة بطريقة ما للغش أو احتوت على مادة متداخلة. وغالباً ما تحذر الأدبيات أو النشرات المرفقة بمنتجات المقايسات التي تستخدم الدم أو البول من أن انحلال الدم (Haemolysis)، أو فرط شحميات الدم (Lipaemia)، أو المستويات العالية من البروتين في العينة يمكن أن تتداخل مع المقايسات المناعية المتجانسة.

وفي الآونة الأخيرة، نظرت اختبارات التشخيص القائمة على اللعاب في الأطعمة أو المشروبات التي يمكن أن تتداخل مع المقايسات، بينما بحث اختبار الشعر في تأثيرات المعالجات المختلفة، أو الصابون، أو صبغات الشعر. وفي جميع هذه الحالات، يجب أن يكون مصممو المقايسات مستعدين لتقييم مثل هذه التداخلات بشكل واقعي. وعلى حد أدنى، يجب على مطوري المقايسات المناعية توثيق وإبلاغ مستخدمي مقايساتهم بالمواد المتداخلة المحتملة.

تتعلق المواد المغشوشة (Adulterants) بالمركبات المتداخلة ولكنها تختلف عنها؛ فالمواد المتداخلة تُرادُف المواد الطبيعية اليومية التي يستخدمها الأفراد والتي يمكن أن تتسبب في نتائج شاذة. أما المواد المغشوشة فهي مواد تُضاف عمداً إلى العينة بغرض تعطيل المقايسة المناعية السمية. وقد استُخدمت مثل هذه المواد في السنوات الأخيرة لاستهداف العديد من المقايسات المتجانسة المستخدمة لفحص عينات البول مبدئياً بحثاً عن مخدرات الإساءة (Wu et al. 1999). وقد قيل إن مواد مثل المبيض (هيبوكلوريت الصوديوم)، أو الأملاح، أو المنظفات فعالة للغاية، ولذا ينبغي تقييم احتمالية تعطيلها في أي مقايسة حديثة التطوير.

جدول 3: المواد المتفاعلة تصالبيّاً في مقايسة المورفين المناعية

المركب(Compound)	التركيز (ng/mL)	مكافئات المورفين (ng/mL)	نسبة التفاعل التصالبي(%CV)	التركيز الذي قد ينتج عنه نتيجة إيجابية(ng/mL)
6-أستيل مورفين(6-Acetylmorphine)	40	34.8	87.0	46
الكودايين(Codeine)	40	24.1	60.3	66
ثياسيتيل مورفين / دياستيل مورفين (Diacetylmorphine)	100	>73.7	>73.7	54
هيدروكودون(Hydrocodone)	100	60.5	60.5	66
هيدرومورفون(Hydromorphone)	100	>55.9	55.9	72
ميبيريدين(Meperidine)	10000	68.8	0.7	5,714
بيتا-مورفين-3-جلوكورونيد-(β) Morphine-3-glucuronide)	100	80.0	80.0	50
نالورفين(Nalorphine)	1	36.8	>100	1
نورمورفين(Normorphine)	100	34.3	34.3	117
أوكسيكودون(Oxycodone)	100	43.1	43.1	93
أوكسي مورفون(Oxymorphone)	100	36.3	36.3	110

المعيار الخامس: الثبات (Stability)

يُتوقع لأي مقايسة مناعية أن تؤدي وظيفتها لفترة زمنية طويلة نسبياً. وعادة ما تكون مجموعات المقايسات المناعية التجارية ثابتة لفترة تتراوح من **6 أشهر إلى عدة سنوات**. ويسهل نسبياً الحفاظ على الفحوصات المخبرية والتحكم بها نظراً لعدم وجود مشكلة في تخزينها بغرفة البارد (Cold-room storage). أما اختبارات نقطة الرعاية (**Point-of-care**) المستخدمة في أماكن نائية تفتقر إلى التحكم في درجة حرارة الغرفة أو ربما تفتقر إلى أي مرافق تماماً، فتواجه بعضاً من أكبر التحديات المتعلقة بالثبات. وفي هذه الحالات، يجب ربط ثبات الاختبار دائماً بنطاق درجة حرارة التشغيل الذي يمكن تحمله. ويجب على أي مطور لمقايسات مناعية إجراء اختبارات ميدانية لمقايساتهم في ظل ظروف مختلفة من الرطوبة، ودرجة الحرارة، وحتى الارتفاع؛ ليتم بعد ذلك الإبلاغ عن القيود للمستخدمين المحتملين للاختبار. وتُعد مثل هذه الدراسات صعبة وغالباً ما تسلط الضوء على حدود المقايسة المناعية، إلا أنها ضرورية لتقليل معدل النتائج الإيجابية الكاذبة في الميدان أو المختبر.

المعيار السادس: مراقبة الجودة (Quality control)

توجد طرق مختلفة للتعامل مع مراقبة الجودة لأي مقايسة مناعية؛ فبعض الطرق المخبرية تبحث في دقة عناصر التحكم (Controls) من عملية تشغيل إلى أخرى، بينما تستخدم مقايسات مناعية أخرى المنحنى القياسي الناتج لمعرفة ما إذا كان الانتشار بين نقاط المعايرة ملائماً. وكل عناصر التحكم الداخلية للمقايسة هذه تُعد مقايسات جيدة تضمن صحة النتيجة النهائية.

يجب أن تتضمن خطوات مراقبة الجودة الإضافية عناصر تحكم خارجية (External controls)؛ حيث يبيع بعض الموردين عينات بول أو دم أو لعاب تم تدعيمها (Spiked) بتراكيز مختلفة.

وتُعد برامج اختبار الكفاءة (Proficiency testing programmes) وسيلة مفيدة للغاية يضمن من خلالها أي مختبر فردي أداء مقايساته بشكل صحيح وللتعقّب والكشف عن أي مشكلات تواجه طريقة معينة. وترسل هذه البرامج بانتظام عينات إلى عدد كبير من المختبرات المشاركة ليتم اختبارها على أساس أعمى (Blind basis). وتتوفر مجموعة من المنظمات القادرة على توفير عينات كفاءة للبول، أو اللعاب، أو الشعر، أو العرق؛ ومن أمثلة ذلك: معهد **RTI** الدولي (**RTI International**)، أو كلية علماء الأمراض الأمريكيين (**College of American Pathologists**)، أو خدمات

كارديف للتحليل الحيوي المحدودة (**Cardiff Bioanalytical Services Ltd**). وبمجرد اختبارها، تُعاد نتائج كل عينة كفاءة إلى منسقي البرنامج، وتتلقى كل مختبرة مشاركة تقريراً يوضح مدى توافق نتائجها مع نتائج المختبرات الأخرى (Cone 1992).

أتمتة المقايسات المناعية (Immunoassay automation)

شهدت العقود القليلة الماضية خطوات هائلة في أتمتة المقايسات المناعية. وقد تم وصف استخدام المقايسات المتجانسة مثل **EMIT**، أو **CEDIA**، أو **KIMS** للتحليل السريع لأعداد كبيرة من عينات مخدرات الإساءة فيما سبق. بالإضافة إلى ذلك، طورت الشركات التجارية أجهزة متخصصة للاستفادة من مؤشرات مثل التألق، والعلامات المشعة، والتألق الكيميائي. وفي كل حالة، تتيح أجهزة منصات المقايسات المناعية هذه إجراء عمليات السحب بالماصة والحضانة للعينات بدقة متناهية؛ ويُعد هذا المستوى من التحكم أمراً ضرورياً لضمان نتائج ثابتة وموثوقة. ومن المثير للاهتمام ملاحظة الحساسية الإجمالية لكل نظام (انظر الجدول 2). وستكون الأنظمة المستقبلية مطالبة لا بإجراء تحليلات سريعة لأعداد كبيرة من العينات فحسب، بل وأيضاً باختبار أنواع مختلفة من العينات، وهو تحدٍ هائل لتصميم المقايسات المناعية والأجهزة المتوافقة معها. وقد تصبح الأنظمة المستقبلية أكثر حساسية بما يصل إلى **1000 مرة** مقارنة بالتقنيات الحالية.

السوائل البديلة لمقايسات علم السموم المناعية (Alternative fluids for toxicology immunoassays)

ارتبط أحدث مجال لابتكار المقايسات المناعية للمخدرات بالتطبيقات التي تستخدم مصفوفات بديلة. وتقليدياً، طُور فحوصات علم السموم الخاصة بمخدرات الإساءة للاستخدام مع البول، بينما تستخدم اختبارات مراقبة الأدوية العلاجية (**TDM**) الدم، أو المصل، أو البلازما دائماً تقريبا. يظل اختبار البول هو المصفوفة السائدة لفحص مخدرات الإساءة، على الرغم من الإقرار حالياً بأن هذه العينة يمكن غشها بسهولة، وتتطلب مرافق جمع خاصة، وتتأثر بالإفراط في ترطيب الجسم (**Overhydration**) (Cone et al. 2003). وفي السنوات الأخيرة، أصبح إجراء المزيد من المقايسات يتم باستخدام سوائل أو مصفوفات مثل الشعر، والعرق، وسوائل الفم. وعلى الرغم من طرح هذه الفكرة قبل عدة سنوات، إلا أنه لم يظهر الاتمام باستخدام سوائل بديلة للفحص الروتينى لمخدرات الإساءة إلا مؤخراً (Cone 1992; Malamud, Niedbala 2007; Samyn et al. 1999a; Schramm et al. 1992; Wong 2008).

وهناك عدة أسباب وراء هذا الاتجاه وتختلف باختلاف البلدان؛ ففي بعض الدول، توجد رغبة لدى سلطات إنفاذ القانون لفحص مخدرات الإساءة على جانب الطريق (Parliament of Victoria, Australia 2003)، وهو أمر غير عملي باستخدام أي عينة باستثناء عينة الفم (Verstraete et al. 1999c). وفي حالات أخرى، يجب أن يكون لتركيز الدواء في العينة المجمعة ارتباط ما بتركيزه في الدم بحيث يمكن إثبات وجود درجة ما من الخلل أو التراجع الوظيفي (**Impairment**)، وهو ما أدى مجدداً إلى زيادة استخدام اختبارات اللعاب (Cone et al. 2002; Thompson et al. 1987; Toennes et al. 2005). وحيثما كان الغهدف هو الحصول على أطول نافذة كشف لتحديد تعاطي المخدرات، فإن الشعر يمثل العينة المفضلة.

الاستنتاجات (Conclusions)

تُستخدم المقايسات المناعية للكشف عن أو قياس المخدرات ومستقلباتها بشكل روتيني في المختبرات التجارية حول العالم. وأصبحت أجهزة المقايسات المناعية الآلية القادرة على تحليل آلاف العينات في الساعة أمراً روتينياً الآن. وعلى الرغم من وجود جوانب قد يشوبها قصور في المقايسات المناعية، إلا أن الغالبية العظمى منها تؤدي وظائفها بشكل موثوق عند استخدامها بالطريقة الصحيحة.

ومن المتوقع أن تعمل الاتجاهات المستقبلية في تطوير المقايسات المناعية على تحسين طرق إنتاج الأجسام المضادة وتنسيق المقايسات، ومع ذلك، ستظل هذه التحسينات مستخدمة للمبادئ الأساسية الموضحة في هذا الفصل.

References المراجع

Abbott Laboratories. (2005). Abbott AxSYM System: Cocaine metabolite product insert sheet. Abbott Park: Abbott Laboratories.

Alverix Inc. (2010). San Jose, CA, USA. www.alverix.com.

Baselt, R. C. (2005). Disposition of toxic drugs and chemicals in man (7th ed.). Foster City, CA: Chemical Toxicology Institute.

Binz, H. K., Amstutz, P., & Plückthun, A. (2005). Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains. Nature Biotechnology, 23(10), 1257–1268.

Chiswell, D. J., & McCafferty, J. (1992). Phage antibodies: will new 'coliclonal' antibodies replace monoclonal antibodies? Trends in Biotechnology, 10(3), 80–84.

Colbert, D. L. (1994). Drug abuse screening with immunoassays: unexpected cross-reactivities and other pitfalls. British Journal of Biomedical Science, 51(2), 136–146.

Colbert, D. L., Sidki, A. M., & Smith, D. S. (1985). Single-reagent polarization fluoroimmunoassay for amphetamine in urine. Clinical Chemistry, 31(7), 1193–1195.

Cone, E. J. (Ed.). (1992). Saliva testing for drugs of abuse. New York: New York Academy of Sciences.

Cone, E. J., Presley, L., LeBeau, M., Johanson, C. E., Flessner, M. F., Lord-McGrath, C., ... & Walsh, J. M. (2002). Oral fluid testing for drugs of abuse: positive prevalence rates by Intercept immunoassay screening and GC-MS-MS confirmation and suggested cutoff concentrations. Journal of Analytical Toxicology, 26(8), 541–546.

Cone, E. J., Caplan, Y. H., Moser, F., Robert, T., Shelby, M. K., & Black, D. L. (2003). Urine testing for cocaine abuse: metabolic and excretion patterns following different routes of administration and methods for detection of false-negative results. Journal of Analytical Toxicology, 27(6), 386–401.

Dandliker, W. B., Kelly, R. J., Dandliker, J., Farshi, J., & Levin, J. (1973). Fluorescence polarization immunoassay: Theory and experimental method. Immunochemistry, 10(4), 219–227.

De Giovanni, N., & Fucci, N. (2006). Hypothesis on interferences in kinetic interaction of microparticles in solution (KIMS) technology. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 44(7), 894–897.

Draeger Safety UK Ltd. (2008). Draeger Drug Check. Blyth: Draeger Safety.

Faulstich, K., Wild, D., & Huckle, D. (2007). Developing rapid mobile POC systems. IVD Technology, 13(4), 47–53.

Feldman, M., Pollak, S., & Ben-Arye, Y. (2004). Evaluation of Roche diagnostics ONLINE DAT II, a new generation of assays for the detection of drugs of abuse. Journal of Analytical Toxicology, 28(7), 593–598.

Frenken, L. G., van der Linden, R. H., Hermans, P. W., Bos, J. W., Ruuls, R. C., de Geus, B., & Verrips, C. T. (2000). Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by Saccharomyces cerevisiae. Journal of Biotechnology, 78(1), 11–21.

Green, K. B., & Isenschmid, D. S. (1995). Medical review officer interpretation of urine drug testing results. Forensic Science Review, 7(1), 41–60.

Hardman, J. G., Limbird, L. E., & Gilman, A. G. (Eds.). (2001). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics (10th ed.). New York: McGraw-Hill Professional.

Henderson, D. R., Friedman, S. B., Harris, J. D., Manning, W. B., & Zoccoli, M. A. (1986). CEDIA, a new homogeneous immunoassay system. Clinical Chemistry, 32(9), 1637–1641.

Hermes, W. J. (1993). Substance abuse. In The encyclopedia of health. New York: Chelsea House.

Hober, S., Nord, K., & Linhult, M. (2007). Protein A chromatography for antibody purification. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 848(1), 40–47.

Howard, G. C., & Kaser, M. R. (2007). Making and using antibodies. Boca Raton, FL: CRC Press.

Huckle, D., & Wild, D. (2005). Market trends. In D. Wild (Ed.), The immunoassay handbook (3rd ed.). New York: Elsevier.

Inoue, T., & Seta, S. (1992). Analysis of drugs in unconventional samples. Forensic Science Review, 4(2), 90–107.

Kabakoff, D. S., & Greenwood, H. M. (1981). Homogenous enzyme immunoassay. In K. G. M. M. Alberti & C. P. Price (Eds.), Recent advances in clinical biochemistry. Edinburgh: Churchill Livingstone, pp. 1–30.

Köhler, G., & Milstein, C. (1975). Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 256(5517), 495–497.

Kwong, T. C., Ryan, J. R., & Jain, A. (1988). Critical issues in urinalysis of abused substances: Report of the substance-abuse testing committee. Clinical Chemistry, 34(3), 605–632.

Levine, B. (Ed.). (2003). Principles of forensic toxicology (2nd ed.). Washington, DC: AACC Press.

Linnet, K., & Brandt, E. (1986). Assessing diagnostic tests once an optimal cutoff point has been selected. Clinical Chemistry, 32(7), 1341–1346.

Maes, V., Verstraete, A., De Gucht, V., & Claeys, N. (1999). Drugs and medicines that are suspected to have a detrimental impact on road user performance. Roadside Testing Assessment (ROSITA) D1, DG VII PL98-3032. www.rosita.org.

Malamud, D., & Niedbala, R. S. (Eds.). (2007). Oral-based diagnostics. New York: New York Academy of Sciences.

Moeller, M., Krüger, M., & Maurer, H. H. (1999). Operational user and legal requirements across EU member states for roadside drug testing equipment. Roadside Testing Assessment (ROSITA) D3, DG VII 98-SC.3032. www.rosita.org.

Moore, R. A., Carson, I. W., & Dundee, J. W. (1984). Sensitive and specific morphine radioimmunoassay with iodine label: Pharmacokinetics of morphine in man after intravenous administration. Annals of Clinical Biochemistry, 21(4), 318–325.

Niedbala, R. S., Feiler, L., Kardos, K., Morey, T., & Rauh, J. S. (2001). Detection of analytes by immunoassay using up-converting phosphor technology. Analytical Biochemistry, 293(1), 22–30.

Niedbala, R. S., & Kardos, K. (2005). Oral fluid drug testing using the Intercept device. In R. Wong & H. Tse (Eds.), Drugs of abuse: Body fluid testing. Totowa, NJ: Humana Press.

Niedbala, R. S., Kardos, K., & Rauh, J. S. (2000). Multiphoton up-converting phosphors for use in rapid immunoassays. Proceedings of SPIE, Vol. 3913, pp. 7th edn. Bellingham, WA: SPIE.

Orasure Technologies. (2008). OraQuick Advance. Bethlehem, PA: Orasure Technologies.

Parliament of Victoria, Australia. (2003). Road Safety (Drug Driving) Act 2003.

Peace, M. R., Mayers, R. T., & Wolfe, D. G. (2000). Performance evaluation of four on-site drug-testing devices for detection of drugs of abuse in urine. Journal of Analytical Toxicology, 24(7), 589–594.

Perrigo, B. J., & Joynt, B. P. (1995). Use of ELISA for the detection of common drugs of abuse in forensic whole blood samples. Canadian Society of Forensic Science Journal, 28(4), 261–269.

Porter, W. H. (2006). Clinical toxicology. In C. A. Burtis, E. R. Ashwood, & D. E. Bruns (Eds.), Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics (4th ed., pp. 1287–1369). St. Louis, MO: Elsevier Saunders.

Rollins, D. E., Jennison, T. A., & Jones, G. (1990). Investigation of interference by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in urine tests for abused drugs. Clinical Chemistry, 36(4), 602–606.

Rossi, S., Stolbach, A. I., & Heether, G. (2006). Characterization of interference with 6 commercial delta9-tetrahydrocannabinol immunoassays by efavirenz (glucuronide) in urine. Clinical Chemistry, 52(5), 896–897.

Rubenstein, K. E., Schneider, R. S., & Ullman, E. F. (1972). "Homogeneous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. Biochemical and Biophysical Research Communications, 47(4), 846–851.

Ryan, T. A. (2003). Fluorescent proteins with ties that bind. Nature Biotechnology, 21(12), 1447–1479.

Samyn, N., Verstraete, A. G., van Haeren, C., & Kint, M. (1999a). Analysis of drugs of abuse in saliva. Forensic Science Review, 11(1), 1–19.

Samyn, N., Verstraete, A., & Maes, V. (1999b). Inventory of state-of-the-art road side drug testing equipment. Roadside Testing Assessment (ROSITA) D2, DG VII PL98-3032. www.rosita.org.

Schramm, W., Smith, R. H., & Craig, P. A. (1992). Drugs of abuse in saliva: A review. Journal of Analytical Toxicology, 16(1), 1–9.

Thompson, L. K., Cone, E. J., & Darwin, W. D. (1987). Confirmation of cocaine in human saliva after intravenous use. Journal of Analytical Toxicology, 11(1), 36–38.

Toennes, S. W., Ramaekers, J. G., Theunissen, E. L., Kauert, G. F., & Moeller, M. R. (2005). Screening for drugs of abuse in oral fluid–correlation of analysis results with serum in forensic cases. Journal of Analytical Toxicology, 29(1), 22–27.

Uhlenhuth, E. H., Balter, M. B., Mellinger, G. D., Cisin, I. H., & Clinthorne, J. (1990). International study of expert judgement on therapeutic use of benzodiazepines and other psychotherapeutic medications IV: Therapeutic dose dependence and abuse liability of benzodiazepines in the long-term treatment of anxiety disorders. Journal of Clinical Psychopharmacology, 10(1 Suppl), 23S–29S.

Ullman, E. F. (1994). Homogenous immunoassays. In D. Wild (Ed.), The immunoassay handbook (pp. 212–230). New York: Stockton Press.

Ullman, E. F. (2005). Homogenous immunoassays. In D. Wild (Ed.), The immunoassay handbook (3rd ed.). New York: Elsevier.

Ullman, E. F., & Maggio, E. T. (1980). Principles of homogenous enzyme-immunoassay. In E. T. Maggio (Ed.), Enzyme immunoassay (pp. 105–134). Boca Raton, FL: CRC Press.

Ulti-Med. (2002). Assay for the qualitative detection of drug of abuse in saliva. St. Paul, MN: Ulti-Med.

US Department of Health and Human Services. (2006). National Survey on Drug Use and Health: National findings. Office of Applied Studies NSDUH Series H-32. DHHS publication No. SMA 07-4293.

US Department of Health and Human Services, Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA). (2008). Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs. Federal Register, 73(228), 71858–71907.

US Department of Transportation. Procedures for transportation workplace drug and alcohol programs: Final rule 49 CFR Part 40. Federal Register, 65(246), 79462–75579.

Van Regenmortel, M. H. V., Briand, J. P., Muller, S., & Plaué, S. (1988). Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: Synthetic polypeptides as antigens. Amsterdam: Elsevier.

Verheijen, R. (2002). Immunological strip tests. Methods and Tools in Biosciences and Medicine, 4, 134–166.

Verstraete, A., & Puddu, M. (2000). General conclusions and recommendations. Roadside Testing Assessment (ROSITA) D5, DG VII 98-SC.3032. www.rosita.org.

Volkov, A., Rasooly, R., & Rasooly, A. (2009). Rapid prototyping of lateral flow assays. In A. Rasooly & K. Herold (Eds.), Methods in molecular biology: Biosensors and biodetection (Vol. 504, pp. 217–235). New York: Humana Press.

Walsh, J. M., Flegel, R., & Cangianelli, L. (2004). Developing global strategies for identifying, prosecuting and treating drug-impaired drivers. Bethesda, MD: The Walsh Group, sponsored by the US Office of National Drug Control Policy.

The Walsh Group. (2002). An evaluation of oral fluid point of collection testing devices. Bethesda, MD: The Walsh Group.

Wong, D. T. (2008). Salivary diagnostics. American Scientist, 96(1), 37–43.

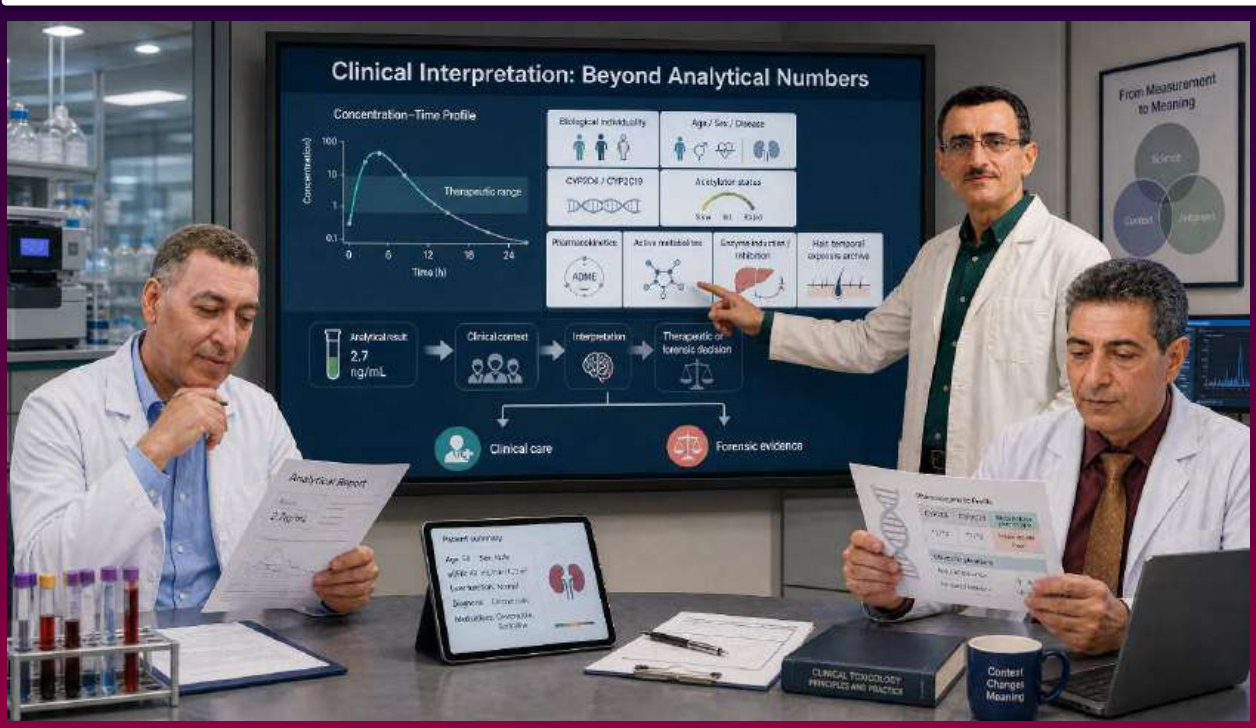
Wu, A. H., Bristol, S. S., & Sexton, K. G. (1999). Adulteration of urine by "Urine Luck". Clinical Chemistry, 45(7), 1051–1057.

Yalow, R. S., & Berson, S. A. (1959). Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature, 184(Suppl 21), 1648–1649.

CHAPTER (20) الفصل العشرون

التفسير السريري والسمومي للنتائج التحليلية

CLINICAL AND TOXICOLOGICAL INTERPRETATION OF ANALYTICAL RESULTS



الفصل العشرون

التفسير السريري والسمومي للنتائج التحليلية

CLINICAL AND TOXICOLOGICAL INTERPRETATION OF ANALYTICAL RESULTS

مقدمة: فلسفة التفسير السريري وما وراء الأرقام التحليلية

لا يمثل "التفسير السريري للنتائج التحليلية" (Clinical Interpretation of Analytical Results) مجرد خطوة نهائية في سلسلة الفحوصات المخبرية، بل هو **النقطة المركزية** التي يتقاطع فيها العلم التجريبي الصلب مع المتغيرات الحيوية الديناميكية. فإذا كان التحليل المخبري يمنحنا "الرقم"، فإن التفسير السريري هو الذي يمنح هذا الرقم "معناه" و"سياقه"، محولاً البيانات الكمية المجردة إلى قرارات علاجية أو جنائية مصيرية.

تتأسس هذه الوحدة الدراسية على رؤية **فينومينولوجية** (Phenomenological) للجسم البشري؛ حيث لا يُنظر إلى الإنسان كنظام مغلق، بل ككيان يتسم بـ **التفرد البيولوجي** (Biological Individuality). ويظهر هذا بوضوح في مبحث **الوراثة الصيدلانية** (Pharmacogenetics)، حيث تحكم "الأنا الجينية" استجابة الفرد للدواء، بدءاً من **حالة الأستلة** (Acetylator status) التي تحدد مصير عقاقير مثل **الأيزونيازيد**، وصولاً إلى **تعدد أشكال السيتوكروم P450** (Cytochrome P450 polymorphisms) مثل CYP2D6 و CYP2C19. إن هذه التباينات الجينية تفرض علينا منطقاً طبياً يتجاوز "الجرعة الموحدة" إلى مفهوم **الطب الشخصي** (Personalized Medicine). علاوة على ذلك، يقتضي التفسير الرصين فهماً عميقاً لـ **القدرية البيولوجية** المتمثلة في تأثيرات **العمر والجنس والمرض** على **توزع الدواء** (Drug disposition). فالسياق الزمني (العمر) والوظيفي (المرض) يغيران من **حركية الدواء** (Pharmacokinetics)، خاصة عند دراسة **تأثير العمر على الوظيفة الكلوية**. كما لا يمكن إغفال التفاعل الديناميكي بين المواد الكيميائية داخل الجسم، وهو ما يتجسد في ظاهرتي **تحفيز وتثبيط الإنزيمات** (Enzyme induction and inhibition)، اللتين تمثلان صراعاً كيميائياً حيوياً يؤثر على التوافر البيولوجي للسموم والأدوية.

كما يُعد **التفسير السريري للنتائج التحليلية** (Clinical interpretation of analytical results) مجالاً معقداً. فالهدف من التحليل هو المساعدة في فهم سيناريو سريري أو جنائي، أو تقديم أدلة للمحاكم. ومن الأهمية بمكان امتلاك معرفة تفصيلية ليس فقط بحدود **الطريقة التحليلية** (Analytical method) المستخدمة، بل أيضاً بـ **علم الصيدلة السريري** (Clinical pharmacology)، و**علم السموم** (Toxicology)، و**الحركية الدوائية** (Pharmacokinetics) للمركبات المعنية. غالباً ما يستجيب المرضى بشكل مختلف لجرعة معينة من مركب معين، لا سيما فيما يتعلق بـ **التأثيرات السلوكية** (Behavioural effects). ومن العوامل الإضافية التي تزيد الأمر تعقيداً دور **النواتج الأيضية النشطة صيدلانياً أو السامة** (Pharmacologically active/toxic metabolites) (Fraser et al., 2002)، والتأثيرات السامة المحتملة للأدوية على الكبد (Buratti and Lavine, 2002). وقد لُخصت بعض الاعتبارات الإضافية في الجدول 1.

جدول 1: بعض العوامل التي قد تؤثر على تفسير نتائج علم السموم

Table 1 Some factors that may affect interpretation of toxicology results

العامل(Factor)	التعليق(Comment)
الحماض/القلاء(Acidosis/alkalosis)	يؤثر على **حجم التوزع** (Volume of distribution) للسموم المتأينة القابلة للذوبان في الماء إذا كان ثابت التفكك (pKa) ضمن وحدتين من الرقم الهيدروجيني للدم.
العمر(Age)	الصغار جداً وكبار السن لديهم سعة أيضية أقل؛ كبار السن لديهم تدفق دم كبدي أقل؛ الأطفال لديهم حجم توزع منخفض.
كتلة الجسم(Body mass)	مرتبطة بالعمر؛ يمتلك الذكور تكويناً جسمانياً مختلفاً عن الإناث.
الحروق(Burns)	حالة الإماهة(Hydration) ؛ الاستجابة الأيضية للإصابة.
العلاج الدوائي المتزامن (Concomitant drug therapy)	على المدى الطويل والحديث: التأثير على الامتصاص، والارتباط بالبروتين، والتوزع و/أو **التصفية**.(Clearance)
المرض(Disease)	أمراض الكبد أو الكلى قد تقلل السعة الأيضية؛ قد يتغير الارتباط ببروتين البلازما؛ انخفاض التصفية الكلوية يؤثر على الأدوية التي تُفرز كلويا
مدة/شدة التعرض (Duration/intensity of exposure)	التأثير المحتمل على **التحمل**(Tolerance) ، والعبء الجسماني، وتحفيز أو تثبيط الأيض
استهلاك الإيثانول (Ethanol consumption)	تأثيرات قصيرة وطويلة المدى على التصفية، وتعزيز التأثير وما إلى ذلك (Lane et al., 1985; Tanaka, 2002, 2003).
الصيغة الدوائية(Formulation)	التحرر المستمر، **الراسمات** (Racemate) وما إلى ذلك. في حالة المبيدات، قد تكون المادة الحاملة (Vehicle) أكثر سمية من المادة الفعالة.
الوراثة/الاستجابة الذاتية (Genetics/idiosyncrasy)	حالة **الأستلة**(Acetylator status) ، تعدد أشكال CYP وما إلى ذلك
انحلال الدم(Haemolysis)	تغير التوزع بين البلازما وخلايا الدم الحمراء.
الهوايات(Hobbies)	الوصول/التعرض لسموم غير معتادة.
العدوى(Infection)	زيادة النفاذية الخلوية، تغيرات في آليات التصفية
وجود أكثر من سم (More than one poison present)	تعزيز التأثير، تغير التوزع/التصفية.(Koski et al., 2003)
التغذية(Nutrition)	تغير محتمل في الارتباط بالبروتين وتوزع **المواد الغريبة عن الجسم** (Xenobiotic disposition).
المهنة(Occupation)	الوصول/التعرض للسموم في مكان العمل.
الحمل(Pregnancy)	قد يغير من توزع الدواء
طريق التعرض(Route of exposure)	العديد من المركبات لها سمية حادة أعلى إذا أعطيت وريدياً (i.v.) أو بالاستنشاق بدلاً من الفم.
الجنس(Sex)	يمتلك الذكور كتلة جسم أكبر، ولكن نسبة دهون أقل من الإناث: يؤثر على توزع بعض المواد الغريبة، لا سيما الإيثانول
الصدمة(Shock)	قد ينخفض امتصاص الأدوية التي تعطى عن طريق الفم.
موقع أخذ العينات(Site of sampling)	مهم بشكل خاص إذا كان المريض يخضع للتسريب الوريدي (Chiou, 1989a; 1989b)، وفي أعمال ما بعد الوفاة
الجراحة/الرضوض(Surgery/trauma)	قد ينخفض امتصاص الأدوية التي تعطى عن طريق الفم؛ حالة الإماهة؛ الاستجابة الأيضية للإصابة.
العامل(Factor)	التعليق(Comment)
وقت أخذ العينة بالنسبة للتعرض و/أو الوفاة (Time of sampling relative to exposure and/or death)	كلما زاد الوقت بين التعرض وأخذ العينة: (1) زادت صعوبة الكشف عن السم (باستثناء الشعر/الأظافر) في العينات السريرية، (2) زادت احتمالية حدوث تغيرات في أعمال ما بعد الوفاة
العلاج(Treatment)	قد يحدث إزاحة من مواقع الارتباط بما في ذلك المستقبلات؛ شظايا الأجسام المضادة (Fab antibody fragments) وعوامل المخلبية (Chelating agents)ستزيد من إجمالي تركيز البلازما مؤقتاً.
التحمل(Tolerance)	قد يكون التعرض السابق قد أحدث تحملاً صيدلانياً (Pharmacological tolerance)أو تحملاً متصالبًا(Cross-tolerance) ؛ تحفيز الأيض.

في شق التحقيقات، ينتقل الفصل من المختبر إلى الميدان عبر **التحقيق في التسمم الحاد** و**علم سموم ما بعد الوفاة** (Postmortem toxicology). هنا، يصبح المنطق التحليلي استقصائياً بامتياز، حيث تصبح **انتقائية وموثوقية الطرق التحليلية** هي المعيار الأخلاقي والقانوني للفصل في القضايا. إن تحليل أنسجة غير تقليدية مثل **تحليل الشعر** (Hair analysis) يقدم لنا "أرشيفاً زمنياً" للتعرض، مما يكسر حاجز اللحظة الراهنة ليعطي عمقاً تاريخياً للحالة السريرية.



الصورة للمؤلفين الثلاثة حول موضوع فلسفة التفسير السريري وما وراء الأرقام التحليلية.

توضح الصورة:

- ← الانتقال من النتيجة التحليلية إلى السياق السريري ثم التفسير والقرار.
- ← منحنى التركيز–الزمن والمدى العلاجي.
- ← التفرد البيولوجي والعمر والجنس والمرض.
- ← تعدد أشكال CYP2D6 / CYP2C19 وحالة الأستلة.
- ← الحركية الدوائية والنواتج الأيضية الفعالة.
- ← تحفيز وتثبيط الإنزيمات.
- ← تحليل الشعر بوصفه أرشيفًا زمنيًا للتعرض.
- ← الفصل بين القرار العلاجي والدليل الجنائي.

ويهدف هذا الفصل الختامي إلى تقديم بعض المعلومات للمساعدة في تفسير النتائج فيما يتعلق بـ:

1. **العلاجات** (Therapeutics)
2. **التحقيق في التسمم الحاد** (Investigation of acute poisoning)
3. وأخيراً **علم سموم ما بعد الوفاة** (Postmortem toxicology). ومن الواضح أن هناك احتمالية للتداخل بين جميع هذه المجالات.

ختاماً، إن هذا الفصل ليس مجرد استعراض لمركبات مثل **مضادات الاكتئاب، القنب،** أو **الإيثانول،** بل هو دراسة في **النسبية السريرية**. فالسؤال ليس "كم يوجد من المادة؟" بل "ماذا يفعل هذا التركيز في هذا الجسم تحديداً، وفي ظل هذه الظروف؟". إنه الانتقال من **المعرفة المعلوماتية** إلى **الحكمة السريرية**.

الوراثة الصيدلانية (Pharmacogenetics)

قد تنشأ الاختلافات الجينية في الاستجابة للدواء من اختلافات في **الديناميكية الدوائية** (Pharmacodynamics) (تغيرات في استجابة المستقبلات) أو في **توزع الدواء** (Drug disposition). تتعلق معظم **تعددات الأشكال** (Polymorphisms) المسجلة بالاختلافات في تعبير **الإنزيمات الأيضية للدواء** (Drug metabolizing enzymes) والناقلات، وبالتالي توزع الدواء. عندما تعود الاختلافات الجينية في توزع الدواء إلى طفرة جينية واحدة ويكون معدل حدوثها شائعاً نسبياً (> 1%)، فإنه يمكن اكتشاف هذه الاختلافات في الدراسات السكانية كـ **توزيعات تكرارية ثنائية أو ثلاثية المنوال** (Bi- or tri-modal frequency distributions) (الشكل 1).

يمكن إجراء **التنميط المظهري** (Phenotyping) باستخدام دواء اختبار مناسب، أو يمكن في الوقت الحاضر إجراء **التنميط الجيني** (Genotyping) مباشرة. ومع ذلك، قد تكون درجة التعبير، أي **النمط المظهري** (Phenotype)، أكثر فائدة من **النمط الجيني** (Genotype). إذا كان المركب نشطاً صيدلانياً، فإن الأشخاص الذين يفتقرون إلى سعة إنزيم استقلاب الدواء "الطبيعية" قد يكونون أكثر عرضة للمعاناة من **آثار ضارة مرتبطة بالجرعة** (Dose-related adverse effects)، بينما قد لا يظهر أولئك الذين لديهم نسخ متعددة من الجين السليم أي استجابة ما لم يتم زيادة الجرعة. والعكس قد يكون صحيحاً بالنسبة لـ **الأدوية الأولية** (Prodrugs).

يُستخدم التنميط المظهري لـ **ناقلة ميثيل ثيوبورين** (Thiopurine methyltransferase - TPMT) لتوجيه العلاج بـ **الأزاثيوبرين** (Azathioprine) لتجنب **ندرة المحببات** (Agranulocytosis) المهددة للحياة (Lennard and Lilleyman, 1996). ومع ذلك، إذا تلقى المريض منتجات دم، فقد يؤدي ذلك إلى تحريف نتائج التنميط المظهري. أما التنميط الجيني فسيقوم بالكشف عن مجموعتين من الخلايا ويسمح بتجنب عدم تطابق خطير محتمل.

حالة الأستلة (Acetylator status)

الأيزونيازيد (Isoniazid)

لقد أُثبت أن تركيزات **الأيزونيازيد** في البلازما تتوزع بشكل **ثنائي المنوال** (Bimodally distributed) عندما أُعطي 483 شخصاً جرعات متطابقة (Evans, et al. 1960). يخضع الدواء لعملية **الأستلة-N** (N-acetylation)، وعُرّف الأشخاص الذين كانت تركيزات الأيزونيازيد في بلازماهم أقل من 2 ملغ/لتر بأنهم **مؤستلون سريعون** (Fast acetylators). الجين السريع (R) هو صفة **جسدية سائدة** (Autosomal dominant)، وبالتالي فإن **متماثلي الزيجوت** (Homozygotes rr -) فقط هم **المؤستلون البطيئون** (Slow acetylators). يبلغ توزيع المؤستلين السريعين إلى البطيئين حوالي 50:50 بين البيض والأمريكيين السود، بينما يعتبر الإنويت واليابانيون مؤستلين سريعون (95%)، لكن بعض يهود البحر المتوسط هم في الغالب (80%) مؤستلون بطيئون.

قد يحتاج المؤستلون السريعون إلى جرعات أعلى من الأيزونيازيد لتحقيق **الفعالية العلاجية** (Therapeutic efficacy). أما المؤستلون البطيئون فقد يصابون بـ **اعتلال عصبي محيطي** (Peripheral neuropathy) نتيجة استنفاد **البيريدوكسال** (Pyridoxal) عن طريق تكوين **الإيمين** (Imine formation) مع الأيزونيازيد. يمكن إعطاء مكملات فيتامين B6 حيث لا يؤثر ذلك على النشاط المضاد للميكروبات. وُصفت **السمية الكبدية المرتبطة بالأيزونيازيد** (Isoniazid-related hepatotoxicity) لأول مرة في اليابان، ويُعتقد أنها ناتجة عن **الأسيتيل هيدرازين-N** (N-acetylhydrazine) المتحرر

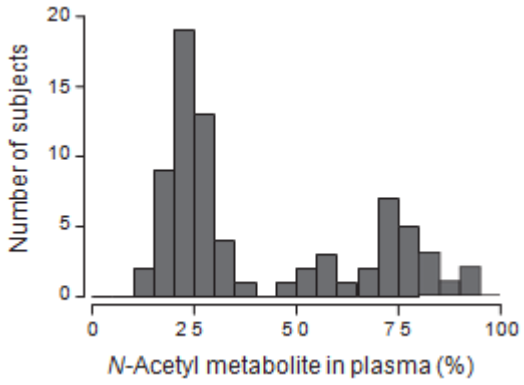
من ناتج الأيض الأسيتيلي، والذي يوجد طبعاً بتركيزات أعلى بكثير لدى المؤستلين السريعين. كما يظهر مضاد الاكتئاب **إيبرونيازيد** (Iproniazid - N-isopropylisoniazid) سمية كبدية مماثلة.

تعد أدوية الفينيلزين، والهيدرالازين، والبروكيناميد، والدابسون من بين الأدوية التي تخضع لعملية **الأستلة-N**، على الرغم من أن توزيع المؤستلين السريعين والبطيئين قد لا يتطابق تماماً مع توزيع الأيزونيازيد.

السلفوناميدات (Sulfonamides)

تظهر بعض السلفوناميدات نفس نمط التوزيع متعدد الأشكال مثل الأيزونيازيد، وقد استُخدم **السلفاديميدين** (Sulfadimidine) لتقييم حالة الأستلة (الشكل 1). تُعد طريقة **براتون-مارشال اللونية** (Bratton–Marshall colorimetric method) بسيطة نسبياً، رغم أنها لا تستطيع قياس إلا السلفوناميدات التي تمتلك جزءاً من **الأمين الأولي** (Primary amine moiety)، وبالتالي يجب تحلل نواتج الأيض **أسيتيل-N** (N-acetyl metabolites) مائياً إلى المركب الأصلي قبل التحليل.

باستخدام تقنية **الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء** (HPLC)، يمكن قياس كل من الدواء وناتجه الأيضي مباشرة. يتم قياس نسبة **أسيتيل سلفاديميدين-N** في البلازما أو البول بعد 6-8 ساعات من جرعة اختبار (0.5-1 جم). وتؤخذ نقطة الفصل (Cut-off) عند 40% من الأسيتيل سلفاديميدين في البلازما أو 70% في البول.



شكل 1: التوزيع التكراري لتركيز "أسيتيل سلفاديميدين-N" في البلازما بعد 6 ساعات من جرعة اختبار من السلفاديميدين.

تعدد أشكال السيتوكروم P450(Cytochrome P450 polymorphisms)

تم تحديد العديد من أشكال التعدد الجيني الهامة في إنزيمات أيض الدواء، وعلى رأسها **CYP2D6** و**CYP2C9** و**CYP2C19**. وبحسب العرف العلمي، تُكتب الجينات (الأليلات - Alleles) التي ترمز لإنزيمات معينة بخط مائل، فعلى سبيل المثال، يرمز الأليل *CYP2D6* لإنزيم **CYP2D6**.

تُصنف فئات الأيض كالتالي:

- **المؤستلون البطيئون/ضعاف الأيض (Poor metabolizers - PMs):** هم متماثلو الزيجوت (Homozygous) الذين يمتلكون نسختين من الجين المعيب ويفتقرون إلى إنزيم وظيفي.

- **الأيض الشامل/الطبيعي (Extensive metabolizers - EMs):** هم متماثلو الزيجوت الذين يمتلكون الإنزيمات "الطبيعية".
- **الأيض المتوسط (Intermediary metabolizers - IMs):** هم متباينو الزيجوت (Heterozygous) الذين يمتلكون أليلاً واحداً معيباً وآخراً طبيعياً.
- **الأيض فائق السرعة (Ultrarapid metabolizers - UMs):** يمتلكون عدة نسخ من الجين "الطبيعي".

تعدد أشكال CYP2D6 (CYP2D6 polymorphism)

يفتقر حوالي 5-10% من العرق القوقازي (Caucasians) لإنزيم **CYP2D6**، وهم يُعتبرون "ضعاف أيض" لعدة أدوية، بما في ذلك عقار **ديبريسوكوين** (Debrisoquine) المضاد لضغط الدم (الذي توقف استخدامه)، وهو أحد أوائل المركبات التي لوحظ فيها هذا التعدد. للتأكد من حالة **CYP2D6**، يتم قياس تركيزات الديبريسوكوين والـ **4-هيدروكسي ديبريسوكوين** في عينة بول جُمعت على مدار 8 ساعات بعد إعطاء جرعة اختبار من الدواء:

$$\text{metabolic ratio} = \frac{\%\ \text{dose as debrisoquine}}{\%\ \text{dose as 4-hydroxymetabolite}}$$

يُعرَّف "ضعاف الأيض" (PMs) بأنهم أولئك الذين لديهم قيمة log(ratio metabolic)>1.1، وهو ما يعادل نسبة تقريبية قدرها 12.6≈101.1. وتختلف حالة **CYP2D6** بشكل كبير بين المجموعات العرقية المختلفة.

تظهر العديد من الأدوية تعدد أشكال متعلق بـ **CYP2D6**، لا سيما الميتوبرولول، والبروبرانولول، والديكستروميثورفان، والعديد من الأدوية التي تعمل على الجهاز العصبي المركزي، بما في ذلك بعض مضادات الاكتئاب ثلاثية الحلقات، ومثبطات استرداد السيروتونين الانتقائية (SSRIs)، ومضادات الذهان (Caraco, 2004). وتعد تعددات أشكال **CYP2D6** مسؤولة جزئياً عن التباينات الواسعة في الاستجابة السريرية لأدوية مثل **نورتريبتيلين** (Nortriptyline)، حيث يمكن أن تختلف الجرعات المطلوبة لتحقيق نفس تركيزات البلازما بمقدار 10-20 ضعفاً بين الأفراد. أما "الأيض فائق السرعة" (UMs) فقد لا يحصلون أبداً على جرعة كافية من الدواء، وكان يتم تصنيفهم سابقاً كـ "غير مستجيبين" أو يُظن خطأً أنهم غير ملتزمين بالعلاج (Ingelman-Sundberg, 2004).

هناك أدلة على أن **الكودين** (Codeine) وبعض المسكنات الأخرى (مثل الترامادول) يتم تنشيطها بواسطة **CYP2D6**، وبالتالي يجب اعتبارها **أدوية أولية** (Prodrugs). وقد عُزيت سمية الكودين إلى الإنتاج المفرط للمورفين لدى أصحاب الأيض فائق السرعة لـ **CYP2D6** (Gasche et al., 2004; Koren et al., 2006)، بينما اقتُرح أن ضعاف الأيض (PMs) لا يستفيدون من التأثير المسكن للكودين لأنهم لا ينتجون المورفين. أدى تثبيط **CYP2D6** باستخدام الكينيدين إلى تقليل احتمالية إساءة استخدام الكودين (Kathiramalainathan et al., 2000)، مما يشير أيضاً إلى دور المورفين. ومع ذلك، في العديد من الدراسات تم إحداث الألم تجريبياً وكان عدد الأشخاص قليلاً نسبياً. وبالمقابل، ظهرت وجهة نظر بديلة تقترح أن التسكين يعود إلى **كودين-6-غلوكورونيد** (Vree et al., 2000).

نظراً لأن: (1) **CYP2D6** يُعبر عنه في الدماغ، (2) لكل من المورفين والكودين نواتج أيضية نشطة، و(3) المورفين هو ركيزة لبروتين PGP، فإنه من الصعب التوصل إلى استنتاج نهائي. كما يُعد **التاموكسيفين** (Tamoxifen) دواءً أولياً آخر

يعتمد على تنشيط **CYP2D6**؛ ولا يستجيب ضعاف الأيض (PMs) للعلاج بهذا الدواء بشكل جيد مقارنة بالأيض الشامل (EMs).

تعدد أشكال CYP2C9 وCYP2C19 (CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms)

تُشير التقديرات إلى أن **CYP2C9** يحفز ما يقرب من 10% من عمليات أيض الدواء التي تتم بواسطة P450. تشمل ركائز هذا الإنزيم الفينيتوين، والتولبوتاميد، والفالبروات، والوارفارين. وقد عُزيت التفاعلات الدوائية الضارة للفينيتوين إلى امتلاك المرضى لأليلات **CYP2C9** معيبة. تشمل ركائز **CYP2C19** الكاربامازيبين ومثبط مضخة البروتون أوميبرازول. وقد اعتمدت درجة زيادة الرقم الهيدروجيني (pH) لمحتويات المعدة ونجاح علاج القرحة بالأوميبرازول بشكل كبير على النمط المظهري، مع نجاح بنسبة 100% لدى ضعاف الأيض (PMs)، مقابل 25% فقط لدى الأيض الشامل (EMs). وأقترح أن التنميط الجيني لـ **CYP2C19** فعال من حيث التكلفة في التنبؤ بالاستجابة للأوميبرازول والأموكسيسيلين في علاج عدوى الملوية البوابية (Helicobacter pylori) والقرحة الهضمية (Furuta et al., 1998).

تعدد أشكال CYP أخرى (Other CYP polymorphisms)

يُعد **السيكلوفوسفاميد** (Cyclophosphamide) دواءً أولياً (Prodrug) ذا مسارات تنشيط وتعطيل معقدة، بعضها غير إنزيمي. الخطوة الأولى، وهي الأكسدة إلى **4-هيدروكسي سيكلوفوسفاميد**، يحفزها الإنزيم **CYP2B6**، والأفراد الذين لديهم أليل معين (CYP2B6*6) يستقلبون الدواء بمعدل أسرع. كما عُزي تعدد الأشكال في أكسدة النيكوتين إلى أليل متغير غير نشط من **CYP2A6**. وهناك تفسير بديل يتمثل في أنه لدى بعض الأشخاص الآسيويين قد يكون جين **CYP2A6** محذوفاً، مما قد يكون مسؤولاً عن انخفاض أيض النيكوتين. وقد يمتلك بعض الأفراد نسخاً متعددة من **CYP2A6** (Rao et al., 2000).

نظرًا لأنه قد قُدّر أن **CYP3A4/5** يستقلب نحو 50% من الأدوية الشائعة الاستخدام وله دور مهم في **أيض المرور الأول** (First-pass metabolism)، فإن تعدد الأشكال قد يكون له تأثيرات رئيسية على **التوافر الحيوي** (Bioavailability)، وبالتالي على النشاط الصيدلاني/السمي. ومع ذلك، وبسبب تشابه خصوصية الركائز بين **CYP3A4/5** و**بروتين PGP**، ليس من الممكن دائماً التأكد مما إذا كانت الاختلافات الفردية في التوافر الحيوي ناتجة عن تعدد الأشكال في الإنزيمات أو في الناقل. على سبيل المثال، أظهر ييتس وزملاؤه (Yates et al., 2003) أن زيادة التصفية الفموية لـ **السيكلوسبورين** (Ciclosporin) كانت ناتجة عن زيادة التعبير عن PGP، لكنهم لم يتمكنوا من التقييم المستقل لما إذا كانت أي من معاملات الحركية الدوائية مرتبطة بالتعبير عن **CYP3A5**.

الكولين استريز غير النمطي (Atypical cholinesterase)

تُعرف عدة أنماط جينية لـ **الكولين استريز الكاذب** (Pseudocholinesterase) في البلازما. يبلغ تكرار الشكل المعتاد 94%. وينتشر بشكل واسع (بنسبة 1:2800) شكل غير نمطي يؤدي إلى إطالة مدة مفعول **السكساميثونيوم** (Suxamethonium). تبلغ مدة مفعول السكساميثونيوم في المعتاد حوالي 6 دقائق، ولكن أولئك الذين لديهم الإنزيم غير النمطي قد يصابون بالشلل لأكثر من ساعتين وسيحتاجون إلى دعم تنفسي حتى يتم التخلص من الدواء عبر مسارات أخرى.

يمكن تحديد الأفراد المعرضين للخطر من خلال تاريخ عائلاتهم ومدى حساسية الكولين استريز لديهم للمخدر الموضعي **ديبوكائين** (Dibucaine)، والذي لا يثبط الشكل غير النمطي بقدر ما يثبط الشكل الطبيعي. يحمل الأفراد في المملكة المتحدة

الذين تم تحديد إصابتهم بالشكل غير النمطي للإنزيم بطاقات تعريفية لحالتهم منذ سنوات عديدة. وكما هو الحال مع تعدد الأشكال الجيني المهم الآخر، يجب فحص حالة أفراد الأسرة إذا لم تكن معروفة بالفعل.

جلوكوز-6-فوسفات دي هيدروجيناز (G6PD)

يُحمل الجين الذي يرمز لشكل غير طبيعي من إنزيم **G6PD** على **الكروموسوم X**، وينتشر بشكل بارز بين اليهود السفارديم والأفارقة. تم تحديد أكثر من 80 متغيراً من G6PD. التفاعل الذي يحفزه هذا الإنزيم هو أكسدة **جلوكوز-6-فوسفات** إلى **6-فوسفوجلوكونات** مع اختزال متزامن لـ NADP إلى NADPH. وهذا بدوره يختزل الجلوتاثيون المؤكسد (GSSG) إلى جلوتاثيون مختزل (GSH).

يُعد **GSH** مهماً في الحفاظ على الهيموجلوبين في شكله المختزل (Fe^{+2}). ويؤدي انخفاض نشاط G6PD (أقل من 30% من الطبيعي) إلى زيادة **ميتيموغلوبينية الدم** (Methaemoglobinaemia) وزيادة خطر الإصابة بـ **انحلال الدم** (Haemolysis) عند التعرض للمؤكسدات. يمكن لعدة أدوية، بما في ذلك الأسبرين والبريماكين وبعض السلفوناميدات، أن تسبب انحلال الدم لدى المرضى الذين يعانون من نقص G6PD.

نزع هيدروجين الكحول ونزع هيدروجين الألدهيد (Alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase)

إن إنزيم **نزع هيدروجين الكحول** (Alcohol dehydrogenase - ADH) هو إنزيم ثنائي القسيمات (Dimeric enzyme) يتكون من ست وحدات فرعية منفصلة، مشفرة بواسطة ثلاثة جينات هي *ADH3* و *ADH2* و *ADH1*. توجد تركيبات عديدة من **الإنزيمات المتشابهة** (Isoenzymes)، مما يؤدي إلى اختلاف معدلات الأيض بين المجموعات السكانية البيضاء والسوداء الأفريقية والآسيوية.

أما إنزيم **نزع هيدروجين الألدهيد** (Aldehyde dehydrogenase - ALDH) فهو إنزيم ميتوكوندري (Mitochondrial enzyme). يمتلك بعض الآسيويين إنزيم ALDH يختلف عن ذلك الموجود لدى القوقازيين، وحوالي 50% من الآسيويين (الصينيين بشكل أساسي) لديهم إنزيم ALDH غير نشط، مما يؤدي إلى حدوث **توهج** (Flushing) وتأثيرات أخرى غير سارة عندما يستهلك هؤلاء الأفراد الإيثانول. تشبه هذه التأثيرات تلك التي تظهر مع عقار **ديسولفيرام** (Disulfiram).

تأثيرات العمر والجنس والمرض على توزع الدواء (Effects of age, sex and disease on drug disposition)

العمر (Age)

تكون قيم الرقم الهيدروجيني (pH) في المعدة مرتفعة لدى حديثي الولادة ونسبة كبيرة نسبياً من كبار السن (**فقد حمض المعدة** - Achlorhydria)، مما قد يجعل **التوافر الحيوي** (Bioavailability) للأدوية غير المستقرة في الوسط الحمضي مثل **بنسلين جي** (Penicillin G) أعلى بكثير مما هو متوقع. كما قد لا تكون بعض عمليات النقل متطورة تماماً لدى الصغار؛ فعلى سبيل المثال، يكون امتصاص **الريبوفلافين** (Riboflavin) بطيئاً في أول 5-6 أيام من الحياة. ويجب التذكير أيضاً بأن الزيادات في التوافر الحيوي الفموي للأدوية التي تخضع لـ **أيض المرور الأول** (First-pass metabolism) بشكل كبير قد تعود إلى انخفاض الأيض في الجهاز الهضمي أو الكبد.

تكون نسبة مياه الجسم لدى حديثي الولادة، وخاصة المياه خارج الخلوية (Extracellular water)، مرتفعة، بينما تكون نسبة الدهون منخفضة. ستؤثر هذه العوامل على توزع الأدوية **المحبة للدهون** (Lipophilic) و **المحبة للماء** (Hydrophilic) على حد سواء. كما يمتلك حديثي الولادة قيم رقم هيدروجيني للبلازما أقل من البالغين، مما يؤثر على توزع **الإلكتروليتات الضعيفة** (Weak electrolytes) مثل **الساليسيلات** (Salicylate). في المقابل، تكون نسبة دهون الجسم أعلى لدى كبار السن، وقد تكون التغيرات في **تروية الأنسجة** (Tissue perfusion) — الناتجة ربما عن تصلب الشرايين وانخفاض نتاج القلب — مسؤولة عن التغيرات في التوزع النسيجي. وقد يكون **الارتباط ببروتين البلازما** (Plasma protein binding) أقل لدى كل من حديثي الولادة وكبار السن، مما قد يؤدي إلى انخفاض في تركيزات الدم الإجمالية، ولكن مع زيادة في **الجزء غير المرتبط** (Non-bound fraction) في البلازما، وبالتالي زيادة النشاط .

في حديثي الولادة، لا تكون العديد من أنظمة إنزيمات أيض الدواء متطورة بالكامل، بما في ذلك **الارتباط بالجلوكورونيد** (Glucuronidation)، و **الأستلة** (Acetylation)، ونشاط **إستريز البلازما** (Plasma esterase). قد تؤدي تركيزات **البيليروبين** (Bilirubin) العالية في بلازما حديثي الولادة إلى حدوث يرقان مع خطر الإصابة بـ **اليرقان النووي** (Kernicterus) وتلف الدماغ اللاحق. يمتلك **المورفين** عمر نصف طويلاً لدى حديثي الولادة ولا يُستخدم عادةً في طب التوليد. ويُعد **الكلورامفينيكول** (Chloramphenicol) (الذي يُستقلب عن طريق الأستلة) آمناً طالما كانت الجرعة مناسبة، وإلا فقد يحدث انهيار قلبي وعائي (**متلازمة الطفل الرمادي** - 'grey-baby' syndrome'). كما أن عمر النصف لـ **الديازيبام** (Diazepam) أطول لدى حديثي الولادة، وخاصة الخدج، منه لدى الأطفال، بسبب انخفاض القدرة الاستقلابية للدواء. أما لدى البالغين، فإن **عمر النصف النهائي** (20-90) (Terminal half-life ساعة) يزداد خطياً مع العمر (20-80 سنة) (Klotz et al., 1975).

تأثير العمر على الوظيفة الكلوية (Effect of age on renal function)

بعد فترة حديثي الولادة، ينخفض **تدفق الدم الكلوي** (Renal blood flow) و**معدل الترشيح الكبيبي** (Glomerular filtration rate - GFR) مع تقدم العمر، مما يؤثر على **عمر النصف** (Half-lives) للأدوية التي يتم تصفيتها أساساً عن طريق الكلى. في الرجال الأصحاء الصغار، يبلغ معدل الترشيح الكبيبي 125 مل/دقيقة، ولكنه يكون أقل لدى حديثي الولادة (20mL m^{-2} min^{-1}) وكبار السن. وبحلول سن الخمسين، ينخفض معدل الترشيح الكبيبي بنسبة 25% (و50% بحلول سن 75). يمكن حساب **تصفية الكرياتينين** (Creatinine clearance) الطبيعية كدالة للعمر (بالسنوات) والوزن (بالكيلوجرام) من المعادلة:

$$Cl_{\text{Creatinine}} = (140 - \text{Age}) \frac{\text{Weight}}{\text{Factor}} \qquad (1)$$

يُستخدم "العامل" (Factor) لمراعاة الاختلافات بين الرجال (70) والنساء (85). تعطي تصفية الكرياتينين مؤشراً على الوظيفة الكلوية، حيث أن **ثابت معدل الإخراج** (k) للدواء الذي يُفرز عبر الكلى يتناسب طردياً مع تصفية الكرياتينين. ومع ذلك، فإن استخدام **كرياتينين المصل** (Serum creatinine) بهذه الطريقة معقد بسبب حقيقة أن كرياتينين المصل لا يعتمد فقط على معدل الترشيح الكبيبي، كما أن قيم الكرياتينين تعتمد على الطريقة التحليلية المستخدمة. ومؤخراً، تم إدخال صيغة "تعديل النظام الغذائي في أمراض الكلى" (MDRD) لحساب **معدل الترشيح الكبيبي التقديري** (eGFR). ورغم أنها قيلت لتكون مناسبة للمرضى الذين يعانون من أمراض كلى متوسطة إلى متقدمة واعتلال الكلية السكري (GFR<60 mL min^{-1} لكل

$1.73m^2$ من مساحة سطح الجسم)، إلا أنه لم يوصَ بها للأصحاء الذين لديهم قيم GFR أعلى (Poggio et al., 2005). كما أن الحساب يكون غير دقيق، على سبيل المثال، لدى من تقل أعمارهم عن 18 عاماً، وفي حالات الحمل، وللمعدلات التي تزيد عن $90mL\ min^{-1}$.

المرض (Disease)

يمكن أن يسبب المرض تغيرات في كل من **الحركية الدوائية** (Pharmacokinetics) و**الديناميكية الدوائية** (Pharmacodynamics) في الاستجابة للأدوية والسموم. الأنظمة الرئيسية التي يُتوقع أن يؤثر فيها المرض على معاملات الحركية الدوائية هي الجهاز الهضمي، والكبد، والكلى؛ ومع ذلك، لا ينبغي إغفال الجهاز القلبي الوعائي.

تؤدي **لاكلوربيدرية المعدة** (Achlorhydria)، الناشئة عن فقر الدم الخبيث أو سرطان المعدة، إلى تقليل امتصاص بعض الأدوية الحمضية مثل الأسبرين والساليسيلأميد والسيفاليكسين. كما يؤدي **الركود المعدي** (Gastric stasis) و**تضيق البواب** (Pyloric stenosis) إلى تأخير امتصاص الباراسيتامول، وبالفعل استُخدم هذا الدواء كعلامة لـ **تفريغ المعدة** (Gastric emptying). ويؤخر **الداء البطني/الزلاقي** (Coeliac disease) امتصاص بعض الأدوية (مثل الريفامبيسين)، لكنه يزيد من امتصاص أدوية أخرى مثل الكليندامايسين والإريثروميسين والسلفاميثوكسازول. وأظهر **داء كروهن** (Crohn's disease) أنه يقلل من امتصاص التريميثوبريم، بينما يزيد من امتصاص السلفاميثوكسازول.

على الرغم من أنه قد يبدو من المنطقي افتراض أن أمراض الكبد ستقلل من أيض الأدوية، وتزيد من أعمار نصف الإخراج وتؤدي إلى ارتفاع تركيزات البلازما، إلا أن الوضع أكثر تعقيداً. فحتى بالنسبة للأدوية التي تُستقلب بشكل مكثف، يجب تذكر ما يلي: (1) قد يكون هناك **أيض خارج كبدي** (Extrahepatic metabolism)، و(2) يبدو أن هناك **سعة أيضية فائضة** (Excess metabolic capacity) للعديد من الأدوية في الظروف العادية، لدرجة أن الفشل الكبدي قد يضطر لأن يكون حاداً جداً قبل أن يظهر تأثير واضح. علاوة على ذلك، فإن عمر نصف الإخراج هو دالة لكل من **حجم التوزع** و**التصفية** ، وبالتالي فإن التغيرات في تركيز بروتين البلازما في أمراض الكبد قد تغير توزع الدواء وبالتالي إخراجه.

يجب توخي الحذر (سريرياً وعند تفسير النتائج) إذا كانت الوظيفة الكلوية معتلة. سيتأثر إخراج الأدوية التي يتم تصفيتها عادةً دون تغيير بواسطة الكلى بشكل أكبر إذا انخفض تدفق البول بشكل ملحوظ. وإذا كان الدواء يُستقلب عادةً قبل الإفراز، فقد تتراكم النواتج الأيضية كما هو الحال مع **مورفين-6-غلوكورونيد** .

يمكن للتغيرات في تركيز **بروتينات الارتباط** (Binding proteins) أن تؤثر بشكل ملحوظ على الحركية والديناميكية الدوائية للأدوية عالية الارتباط. في الأشخاص الأصحاء، قد ترتبط تركيزات **الكينين** (Quinine) الإجمالية في البلازما (الحرة والمرتبطة بالبروتين) التي تبلغ 10-15 ملغ/لتر بسمية خطيرة، ولكن في حالات الملاريا الحادة، يزداد بروتين **AAG** في البلازما ويتم الوصول إلى نفس النطاق من تركيزات الكينين الإجمالية خلال العلاج الفعال دون ظهور أعراض السمية (Krishna and White, 1996). كما ترتبط **مثبطات البروتياز** (Protease inhibitors) المستخدمة في علاج مرضى الإيدز (AIDS) بقوة ببروتين AAG، ومن هنا جاء الاهتمام المتجدد بهذا المجال (Israili and Dayton, 2001).

الجنس (Sex)

على الرغم من كونه ظاهرة جينية، إلا أن تأثيرات الجنس على **توزع الدواء** (Drug disposition) تُعتبر عادةً منفصلة عن الوراثة الصيدلانية بحد ذاتها. الرجال عموماً أثقل وزناً ولديهم كتلة عضلية أكبر وتدفق دم أعضاء أكبر من النساء، وهي

عوامل يمكن أن تؤثر في توزع الدواء. تمتلك النساء نسبة أعلى من دهون الجسم مقارنة بالرجال، لذا فإن **حجم التوزع** (Volume of distribution) للأدوية **المحبة للدهون** (Lipophilic) مثل الديازيبام والترازودون قد يكون أعلى لدى النساء. ومن ناحية أخرى، فإن حجم توزع الإيثانول أقل لدى النساء. يتناسب **معدل الترشيح الكبيبي** (GFR) طردياً مع وزن الجسم، لذا قد تُعزى الاختلافات في **التصفية الكلوية** (Renal clearance) إلى الاختلافات في متوسط الوزن. يمتلك الرجال تركيزات أعلى من كرياتينين المصل (بسبب الكتلة العضلية الأكبر)، لذا إذا استُخدم كرياتينين المصل لتقدير معدل الترشيح الكبيبي، يجب تطبيق تصحيح [كما في المعادلة (1)].

على الرغم من أن النساء لم يخضعن للدراسة بتكرار دراسة الرجال، إلا أن هناك أدلة تشير إلى أن النساء لديهن نشاط أعلى لإنزيم **CYP3A4** مقارنة بالرجال، لكن نشاط إنزيم **ناقلة الغلوكورونيل** (Glucuronyltransferase) أكبر لدى الرجال منه لدى النساء. قد تفسر هذه النتائج الاختلافات المتعلقة بالجنس والتي تم الإبلاغ عنها في تصفية بعض الأدوية (الجدول 2). ويزداد الوضع تعقيداً بسبب الاختلافات المحتملة في تعبير **بروتين PGP الكبدي** (Hepatic PGP expression) (Cummins et al., 2002). وقد اقُترح أن النساء لديهن نشاط منخفض لبروتين PGP، وبالتالي تبقى الأدوية في **الخلايا الكبدية** (Hepatocytes) لفترة أطول، مما يسمح بمزيد من الأيض. ومع ذلك، يُعد الإريثروميسين أحد المركبات القليلة التي أظهرت الدراسات باستمرار تصفية أعلى لها لدى النساء مقارنة بالرجال.

هناك بعض الأدلة على أنه باستثناء CYP3A4 (الذي قد يتم تحفيزه بواسطة تركيزات عالية من البروجسترون)، يمتلك الرجال أنشطة أعلى لإنزيمات السيتوكروم الأخرى المستقلبة للدواء مقارنة بالنساء. وقد اقُترح أن أيض الثيوفيلين والكافيين والثيوثيكسين ينخفض لدى النساء. كما تصل النساء إلى تركيزات بلازمية من **الكلوزابين** (Clozapine) أعلى من الرجال عند إعطائهن جرعة محددة (Rostami-Hodjegan et al., 2004).

جدول 2 : الاختلافات المسجلة المتعلقة بالجنس في تصفية الأدوية

Table 2 Reported sex-related differences in drug clearance

أعلى لدى النساء(Greater in Women)	أعلى لدى الرجال(Greater in Men)	لا يوجد فرق(No difference)
ديازيبام(Diazepam)	ديجوكسين(Digoxin)	أماتادين(Amatadine)
إريثروميسين(Erythromycin)	فلوروبوراسيل(Fluorouracil)	ليدوكائين(Lidocaine)
ميدازولام(Midazolam)	أوكسازيبام(Oxazepam)	نيترازيبام(Nitrazepam)
بريدنيزولون(Prednisolone)	باراسيتامول(Paracetamol)	-
ثيوفيلين(Theophylline)	حمض الساليسيليك(Salicylic acid)	-
فيراباميل(Verapamil)	تمازيبام(Temazepam)	-

يمكن للدورة الشهرية، والحمل، وسن اليأس، والعلاج بالهرمونات البديلة، واستخدام حبوب منع الحمل الفموية أن تؤثر جميعها في توزع المواد الغريبة عن الجسم. قد تتذبذب تركيزات الدواء مع الدورة الشهرية؛ فعلى سبيل المثال، تكون **التصفية الأيضية** (Metabolic clearance) للميثاكوالون أعلى بمرتين تقريباً في منتصف الدورة. وبالمثل، فإن عمر نصف الإخراج للباراسيتامول يكون أقصر في منتصف الدورة. يختلف **زمن العبور المعوي** (GI transit time) خلال الدورة، حيث ترتبط تركيزات البروجسترون المرتفعة في البلازما بارتخاء العضلات الملساء وانخفاض أزمنة العبور. وقد يتباطأ امتصاص الكحول والساليسيلات في منتصف الدورة.

على الرغم من وجوب تجنب الأدوية أثناء الحمل قدر الإمكان، إلا أنه لا يمكن سحب بعض الأدوية. قد تنخفض تركيزات البلازما للفينيتوين والفينوباربيتال والكاربامازيبين في الحمل ما لم يتم تعديل الجرعة. وتزداد تصفية مضادات البنسلين الحيوية

أثناء الحمل، بينما يزداد عمر نصف الكافيين في البلازما. أما تأثير حبوب منع الحمل الفموية فهو في الواقع **تفاعل دوائي محدد للجنس** (Sex-specific drug interaction) (Harris et al., 1995). قد يعود فشل منع الحمل الفموي بسبب الإدارة المتزامنة للمضادات الحيوية جزئياً إلى **تحفيز الإنزيمات** (Enzyme induction) (مثل الريفامبيسين) وجزئياً إلى تدمير الكائنات الدقيقة في الجهاز الهضمي مما يؤدي إلى تقليل **الدوران المعوي الكبدي** (Enterohepatic recirculation) وبالتالي انخفاض تركيزات البلازما. كما تعمل وسائل منع الحمل التي تحتوي على "الإيثينيل" (Ethynyl) على تعطيل إنزيمات السيتوكروم P450 ويمكن أن تقلل من التصفية الكبدية لعدد من الأدوية الأخرى، بما في ذلك السيكلوسبورين والثيوفيلين.

تحفيز وتثبيط الإنزيمات (Enzyme induction and inhibition)

تحفيز الإنزيمات (Enzyme induction)

إن تعرض الإنزيمات الأيضية للمواد الغريبة عن الجسم (Xenobiotic-metabolizing enzymes) لمواد معينة، وعادة ما تكون مركبات **محبة للدهون** (Lipophilic) تُستقلب ببطء، يمكن أن يؤدي إلى **تحفيز** (Induction) تخليق هذه الإنزيمات نفسها. قد لا يؤدي نشاط الإنزيم المتزايد إلى خفض تركيز البلازما للعامل المحفز فحسب، بل وأيضاً تركيزات الركائز الأخرى لنفس الإنزيم (أو الإنزيمات). وتعد هذه آلية هامة تكمن وراء بعض **التفاعلات الدوائية-الدوائية** (Drug–drug interactions). يحفز الفينوباربيتال عدداً من السيتوكرومات الأيضية للدواء (الجدول 3) كما يزيد من نشاط **ناقلة الغلوكورونيل** (Glucuronyl transferase)، وهو ما يظهر من خلال زيادة اقتران البيليروبين. ويُعد الريفامبيسين (Rifampin) محفزاً إنزيمياً قوياً، وقد وُصفت عدة تفاعلات دوائية بسببه، بما في ذلك حالات حدوث حمل بعد فشل وسائل منع الحمل الفموية كما نوقش سابقاً.

إن تحفيز الإنزيم **CYP2E1** بواسطة الإيثانول قد يفسر سبب ارتباط استهلاك الكحول المزمن بزيادة سمية الباراسيتامول بعد الجرعات الزائدة، حيث أن إنتاج الوسيط التفاعلي **NAPQI** يتم تحفيزه بواسطة هذا الإنزيم ، إلا أن انخفاض مستويات الجلوتاثيون (GSH) الكبدي لدى مدمني الكحول المزمنين يعد عاملاً إضافياً هنا. ومن ناحية أخرى، قد يكون تناول الكحول الحاد (Acute alcohol ingestion) وقائياً، ويفترض أن ذلك يعود إلى التنافس على الإنزيم.

تعود أنشطة الإنزيمات الأيضية للدواء إلى مستويات ما قبل العلاج، عادةً خلال بضعة أيام، عند سحب العامل المحفز. بناءً على ذلك، قد يلزم خفض جرعة الأدوية الأخرى التي تُستقلب بواسطة الإنزيم (أو الإنزيمات) المتأثرة. يُستقلب **الكلوزابين** (Clozapine) بواسطة عدة إنزيمات بما في ذلك **CYP1A2**، الذي يتم تحفيزه بواسطة دخان السجائر ودخان القنب (Cannabis). عند التوقف عن التدخين، قد ترتفع تركيزات الكلوزابين إذا لم يتم تعديل الجرعة، وقد تم الإبلاغ عن آثار ضارة خطيرة (McCarthy, 1994).

تثبيط الإنزيمات (Enzyme inhibition)

تعتمد آلية عمل بعض الأدوية على **تثبيط الإنزيمات** (Enzyme inhibition)، وبالتالي فإن التفاعلات مع الأدوية التي تُستقلب بواسطة نفس الإنزيم يجب أن تكون متوقعة. **الألوبورينول** (Allopurinol) هو مثبط لإنزيم **أكسيداز الزانثين** (Xanthine oxidase) ويستخدم لعلاج النقرس، لذا فمن المتوقع أن يعزز عمل الميركابتوبورين والأزاثيوبرين . وبالمثل، يتحلل السكساميثونيوم بواسطة **كولين استريز البلازما**، وتفاعله مع مضادات الكولين استريز أمر متوقع. ومع ذلك، قد لا يكون بعض المثبطات محددة للإنزيم المستهدف؛ فعلى سبيل المثال، عقار **ديسولفيرام** (Disulfiram)، المستخدم لتثبيط نزع

هيدروجين الألدهيد (ALDH) في العلاج التنفيري لإدمان الكحول، يثبط أيضاً **CYP2C9** مما يؤدي إلى تفاعلات مع أدوية أخرى، بما في ذلك الوارفارين. وقد زُعم أن عقار ميترونيدازول المضاد للميكروبات ينتج تأثيراً يشبه الديسولفيرام مع الكحول، ولكن قد لا يكون هذا ناتجاً عن ارتفاع الأسيتالدهيد في البلازما (Visapaa et al., 2002). ومع ذلك، فإن الميترونيدازول يثبط **CYP2C9**.

تُعزز **مثبطات مونوامين أكسيداز** (MAOIs) مثل ترانيلسيبرومين وفينيلزين التي تُستخدم لعلاج الاكتئاب، من آثار الأدوية المحاكية للسمبثاوي ذات التأثير غير المباشر مثل الإفيدرين والفينيل بروبانولامين. ويُعد تفاعل مثبطات MAOIs مع **التيرامين** (Tyramine)، الموجود في الجبن وغيره من الأطعمة المتخمرة، مهدداً للحياة بشكل محتمل. يخضع التيرامين عادةً لـ **أيض المرور الأول** بواسطة إنزيم MAO المعوي والكبدي. ومع ذلك، عندما يتم تثبيط هذه الإنزيمات، يُمتص التيرامين ويُزيح **النورأدرينالين الحويصلي**، الذي تكون تركيزاته مرتفعة أصلاً بسبب مثبطات MAOIs. يمكن أن يؤدي هذا إلى **"نوبة ارتفاع ضغط الدم"** (Hypertensive crisis) مع خطر حدوث سكتة دماغية لاحقاً. ورغم أن هذا التفاعل عُرف باسم **"تفاعل الجبن"** (Cheese reaction)، إلا أن المرضى غالباً ما يبلغون أن تناول كمية صغيرة حتى من العديد من الأطعمة ينتج عنه صداع نابض.

لوحظت تفاعلات أخرى؛ حيث تقوم عدة أدوية، بما في ذلك الإريثروميسين والكيتوكونازول وأيضاً بعض مكونات **عصير الجريب فروت**، بتثبيط **CYP3A4**. يعمل هذا الإنزيم بالشراكة مع **بروتين PGP** لتقليل التوافر الحيوي للعديد من المواد الغريبة عن الجسم، وبالتالي فإن انخفاض النشاط قد يؤدي إلى تفاعلات خطيرة محتملة مع عدد كبير من الأدوية (Bailey et al., 1998). ويقوم عقار **سيميتيدين** (Cimetidine)، وهو محصر لمستقبلات H2، بتثبيط عدة سيتوكرومات أيضية للدواء. ويزيد عقار **أميودارون** المضاد لاضطرابات نظم القلب من تركيزات الديجوكسين في البلازما (وهو ركيزة معروفة لبروتين PGP)، ولكن التثبيط الحيوي لبروتين النقل الكبدي **OATP2** قد يكون مهماً أيضاً في هذا التفاعل.

التحقيق في التسمم الحاد (Investigation of acute poisoning)

يُعد الكشف عن عقار أو سم آخر كافياً في بعض الأحيان لإثبات التعرض، على الرغم من وجود اعتبارات كمية دائماً (مثل **حد الكشف** - LoD) لأي تحليل نوعي. وفي الجانب الآخر، قد يتم تبسيط تفسير القياسات الفردية عن طريق اللوائح التنظيمية؛ ومن الأمثلة على ذلك في المملكة المتحدة والعديد من البلدان الأخرى قياسات الإيثانول في الدم الكامل فيما يتعلق بقيادة المركبات، وقياسات الرصاص في الدم التي تُجرى لتقييم التعرض المهني.

أما بالنسبة للأدوية، فإن تركيزات البلازما أو المصل "العلاجية" (Therapeutic)، أو "الطبيعية" (Normal)، أو "المتوقعة عادةً" (Normally expected)، أو "المستهدفة" (Target) للأدوية الأصلية ونواتج أيضها، غالباً ما توفر أساساً لتفسير القياسات الكمية فيما يتعلق بتقدير حجم التعرض. ومع ذلك، في جميع الحالات، يعتمد تفسير النتائج لدى المرضى الأفراد — وهو ما يقع غالباً على عاتق المختبر أو المحلل الذي يقدم التقرير، على الأقل في المقام الأول — اعتماداً كلياً على السياق الذي ستُعرض فيه النتائج. ولا يمكن إجراء تفسير موثوق للنتائج التحليلية إلا بمقارنة النتائج بالمعلومات المتعلقة بتركيزات المادة المراد تحليلها (Analyte)، والاستجابة السريرية والنتائج النهائية، والظروف التي حدث فيها التعرض لدى مرضى آخرين.

قد يكون التحقيق في التسمم بالأدوية النفسية وغيرها معقداً بسبب:

1. تطوير **التحمل** (Tolerance) لسمية الأدوية المأخوذة بشكل مزمن.
2. نقص المعلومات حول تركيزات الأدوية في الدم، وفي بعض الحالات نواتج الأيض التي يتم الوصول إليها أثناء العلاج المزمن.
3. أن بعض الأدوية لها **سمية ذاتية/غريبة** (Idiosyncratic toxicity) على القلب و/أو الدماغ.

بالإضافة إلى ذلك، قد يكون الأشخاص الذين يتناولون أدوية نفسية أكثر عرضة لخطر إيذاء النفس، خاصة إذا أصبح التزامهم بالعلاج ضعيفاً أو انقطع تماماً، كما أن المرض الأساسي قد يحمل خطراً أعلى للموت المفاجئ. تنطبق هذه الاعتبارات أيضاً في حالة استخدام العقاقير غير المشروعة (Illicit drugs)، مع تعقيدات إضافية تتعلق بطريقة الإعطاء ونقاء المستحضر (أو المستحضرات). وغالباً ما يكون الإيثانول عاملاً معقداً. وقد أُدرجت في الجدول 3 بعض المعلومات التي يجب أن تكون متاحة قبل محاولة تفسير نتائج التحقيقات السمومية. ومن الواضح أن الظروف ذات الصلة، مثل الوقت المنقضي منذ التعرض، هي عوامل حاسمة.

جدول 3: المعلومات الهامة عند تفسير نتائج التحقيقات السمومية

Table .3 Information important when interpreting the results of toxicological investigations

الفئة	المعلومات المطلوبة
لكل عينة:	▶ اسم المريض أو وسيلة تحديد هوية أخرى ▶ طبيعة العينة التي تم جمعها ▶ وقت وتاريخ أخذ العينة ▶ موقع أخذ العينة (إذا كان ذلك مناسباً) ▶ نوع الحاوية المستخدمة للعينة ▶ حفظ العينة ونقلها وتخزينها ▶ اسم الشخص الذي قام بجمع العينة
لكل تقرير تحليلي:	▶ وقت وتاريخ التحليل ▶ طبيعة العينة التي تم تحليلها (بلازما، دم كامل، إلخ) ▶ تسمية علمية غير غامضة(Unambiguous nomenclature) ▶ الوحدات المستخدمة للإبلاغ عن النتائج ▶ اسم وحالة اعتماد المختبر والمحلل الذي أجرى التحليل وأعد التقرير ▶ السموم الأخرى أو مجموعات السموم التي تم البحث عنها في العينة أو عينة ذات صلة ▶ الطريقة التحليلية (أو الطرق) المستخدمة ▶ •المركب المرجعي (أو المركبات) المستخدم (المصدر، النقاء، ظروف التخزين، تاريخ انتهاء الصلاحية)

إن وقت التناول/التعرض وعدد السموم المختلفة المعنية تعد عوامل هامة. كما أن التاريخ الطبي أو المهني الحديث، والعمر، والحالة الصحية للمتوفى، من بين عوامل أخرى، قد يكون لها جميعاً تأثير على تفسير النتائج التحليلية. وغالباً ما يكون التفسير الصحيح صعباً في غياب المعلومات الخلفية الكافية، أو في الحالات التي كان فيها جمع العينات غير كافٍ. ومن الصعب بشكل خاص التعليق على أهمية القياسات الكمية التي أُجريت على عينة دم واحدة جُمعت من موقع غير محدد في جثة. كما يمكن أن يكون تفسير النتائج صعباً أيضاً في حالتين: (1) إذا كان الدواء المعني موصوفاً طبياً، و(2) لدى مدمني المخدرات لأن درجة **التحمل** (Tolerance) المحتملة للآثار السامة للدواء تكون غير واضحة. وفي حالة بعض المركبات التي يتم مواجهتها في مكان العمل، تتوفر حالياً قيم توجيهية للمراقبة البيولوجية (Health and Safety Executive, 2005). وبعد التعرض الحاد، قد يتم أحياناً الوصول إلى تركيزات عالية من سموم معينة مع وجود أدلة ضئيلة على التسمم. ومن ناحية أخرى، قد يؤدي الاستخدام المتعمد للمذيبات (Solvents) إلى الوفاة على الرغم من أن تركيزها في الدم لا يتجاوز قليلاً ما قد يتم مواجهته بعد التعرض المشروع في مكان العمل (Flanagan et al., 1997).

انتقائية وموثوقية الطرق التحليلية (Selectivity and reliability of analytical methods)

من العوامل التي يجب عدم إهمالها هي **انتقائية وموثوقية الطريقة التحليلية** (Selectivity and reliability of the analytical method). تتطلب نتائج **الاختبارات المناعية** (Immunoassays) على وجه الخصوص تأكيداً باستخدام **طريقة فيزيائية** (Physical method) لكي يكون للبيانات أي قيمة ثبوتية/قانونية (Drummer and Gerostamoulos, 2002). كما يجب تذكر أوجه القصور المحتملة في المنهجية وكذلك في جمع العينات وما إلى ذلك، عند دراسة التقارير المنشورة (القديمة) أو مجموعات البيانات التحليلية للمساعدة في توجيه التفسير، لا سيما فيما يتعلق بالسموم النادرة أو المواقف غير المعتادة. وهناك اهتمام كبير بدور **التماكب المرآتي** (Chirality) في عمل الدواء. ومع ذلك، وعلى الرغم من أنه قد قُدّر أن نحو 25% من الأدوية والمبيدات تُسوق كـ **راسمات** (Racemates)، إلا أنه بشكل عام لا توجد حاجة تذكر لقياس **المتشاكلات** (Enantiomers) بشكل منفصل فيما يتعلق بعلم السموم التحليلي (Williams and Wainer, 2002).

تعتبر **استقرارية المادة المحللة** (Analyte stability) ذات أهمية أكبر بكثير. وقد أُدرجت بعض المركبات غير المستقرة في الدم الكامل أو البلازما . وتُعد الأدوية العشبية مجالاً آخر للقلق؛ حيث كانت الأدوية التقليدية تُستخدم دائماً على نطاق واسع في البلدان النامية، وأصبحت تُستخدم الآن بشكل أوسع في أماكن أخرى. ويتم التعرف بشكل متزايد على السمية المرتبطة باستخدام الأدوية التقليدية (Bogusz et al., 2002). كما يتعرض مستخدمو هذه المستحضرات في الدول الغربية للخطر، حيث قد تحتوي العلاجات العشبية والأدوية العرقية وغيرها من هذه المستحضرات على مواد صيدلانية غير معلنة أو سموم غير عضوية مثل مركبات المعادن السامة (Corns, 2003).

طريق ومدة التعرض وآلية السمية (Route and duration of exposure and mechanism of toxicity)

من المهم أن نضع في الاعتبار المسار الزمني لنوبة التسمم أو التسمم المشتبه به عند تقديم التفسير. على سبيل المثال، قد تكون النتائج المستخلصة من عينات مأخوذة قبل اكتمال امتصاص و/أو توزع الدواء المتناول مضللة، كما في حالة الباراسيتامول ومع المستحضرات ذات التحرر المستمر (Sustained release) مثل تلك التي تحتوي على الثيوفيلين (Bernstein et al., 1992).

مع السموم التي يمكن أن تؤدي إلى **سمية متأخرة** (Delayed toxicity) مثل الإيثيلين جليكول، والميثانول، والباراسيتامول، والباراكوات، قد يكون التفسير غير موثوق به دون معرفة وقت التناول. وقد أُدرجت أمثلة على المركبات التي تؤدي إلى سمية متأخرة أو غير عكسية في الجدول.4. وفي حالة **الباراكوات** (Paraquat)، لا تزال قياسات البلازما ذات قيمة فقط في تقييم **الإنذار الطبي** (Proudfoot et al., 1979) (Prognosis). وفي حالات التسمم الأخرى، فإن استمرار الأيض بعد فترة من **نقص التأكسج** (Hypoxia) أو **انقطاع التأكسج** (Anoxia)، على سبيل المثال، قد يعني أن السم الفعلي قد تم التخلص منه إلى حد كبير من الجسم قبل الحصول على العينة.

جدول 4: بعض الأمثلة على السمية المتأخرة/غير العكسية المرتبطة بسموم معينة

Table .4 Some examples of delayed/irreversible toxicity associated with particular poisons

المركب/مجموعة المركبات (Compound/Group)	أمثلة(Examples)	مظاهر السمية (Manifestation of toxicity)
مثبطات أستيل كولين إستريز (Acetylcholinesterase inhibitors)	المبيدات الحشرية الفسفورية العضوية(OP) ، وعوامل الأعصاب	فشل تنفسي(Respiratory failure)
ألفا-أمانيتين(α-Amanitin)	-	سمية كبدية كلوية (Hepatorenal toxicity)
أمفيتامين، ميثامفيتامين (Amfetamine, metamfetamine)	-	سمية كبدية(Hepatic toxicity)
مضادات التخثر(Anticoagulants)	الوارفارين والكومارين الأخرى والإنداندیونات	اختلال الإرقاء (Impaired haemostasis)
العوامل المضادة للأورام (Antineoplastic agents)	سيكلوفوسفاميد	اختلال الإرقاء (Impaired haemostasis)
أسبرين(Aspirin)	-	سمية كبدية(Hepatic toxicity)
بروموميثان(Bromomethane)	-	وذمة رئوية(Pulmonary oedema)
رابع كلوريد الكربون (Carbon tetrachloride)	-	سمية كبدية كلوية (Hepatorenal toxicity)
كلوروفورم(Chloroform)	-	سمية كبدية كلوية (Hepatorenal toxicity)
كلوروكين(Chloroquine)	-	سمية شبكية العين(Retinal toxicity)
1,2-ثنائي كلوروبروبان-1,2- (Dichloropropane)	-	سمية كبدية كلوية (Hepatorenal toxicity)
إيثيلين جليكول(Ethylene glycol)	-	سمية كلوية وفي الجهاز العصبي المركزي (Renal and CNS toxicity)
المعادن الثقيلة(Heavy metals)	الكادميوم، الرصاص، الزئبق، الثاليوم	-
الأدوية العشبية(Herbal medications)	الجعدة، عروق الصباغ الكبير، الكافا، قلنسوة العذراء، النارديين	سمية كبدية(Hepatotoxicity)
الهكسان و2-هكسانون (Hexane and 2-hexanone)	-	اعتلال عصبي محيطي (Peripheral neuropathy)
أملاح الحديد(Iron salts)	-	سمية كبدية كلوية (Hepatorenal toxicity)
ميثادون(Methadone)	-	تثبيط تنفسي (Respiratory depression)
ميثانول(Methanol)	-	سمية في الشبكية والجهاز العصبي المركزي (Retinal and CNS toxicity)
MDMA (إكستاسي)	-	سمية كبدية(Hepatic toxicity)
مثبطات مونوامين أكسيداز(MAOIs)	-	تشنجات، توقف القلب، حادثة وعائية دماغية (سكتة)
باراسيتامول(Paracetamol)	-	سمية كبدية وأحياناً كلوية (Hepatic and sometimes renal toxicity)
باراكوات(Paraquat)	-	سمية رئوية(Lung toxicity)
بيمولين(Pemoline)	-	سمية كبدية(Hepatic toxicity)
فوسجين(Phosgene)	-	وذمة رئوية(Pulmonary oedema)
كينين(Quinine)	-	سمية شبكية العين(Retinal toxicity)
المستحضرات ذات التحرر المستمر (Sustained release preparations)	ديلتيازيم، ليثيوم، ثيوفيلين، مورفين	-

(أ) مجرد أمثلة في بعض الحالات.

قد يشير العثور على بقايا أقراص في عينة من محتويات المعدة إلى التناول الفموي. وفي أعمال ما بعد الوفاة، قد يساعد قياس كمية السم في عينة من محتويات المعدة في إثبات التناول الحاد لـ "جرعة زائدة". وقد يُستدل على الحقن بوجود آثار إبر على الجسم. ويرتبط الحقن، خاصة الحقن داخل القراب (Intrathecal) والحقن الوريدي (i.v.)، أو الاستنشاق، بسمية شديدة حتى لو كانت تركيزات الدم منخفضة، حيث يكون السم قد انتقل بسرعة إلى الدماغ. على سبيل المثال، يمكن أن تصل تركيزات **الميثامفيتامين** (Metamfetamine) في دم ما بعد الوفاة إلى حوالي $0.8mg\ L^{-1}$، بينما تم تسجيل تركيز قدره $9.5mg\ L^{-1}$ في دم مريض بعد ساعة واحدة من التناول وبقي على قيد الحياة بفضل العلاج الداعم (Logan et al., 1996). أما بعد الحقن العضلي (i.m.) أو الحقن داخل الصفاق (i.p.)، يكون الانتقال إلى الدماغ أبطأ، وقد تتبقى كميات ملموسة من المركب في موقع الحقن.

أحياناً، يوفر قياس نواتج الأيض (Metabolites) معلومات قيمة ليس فقط عن التعرض لمركب معين، بل وأيضاً عن طريق الإعطاء، ووقت أخذ العينة بالنسبة للجرعة، وما إذا كان قد تم إعطاء جرعة واحدة كبيرة. فعلى سبيل المثال، يُنزع الميثيل من **الديازيبام** (Diazepam) ليتحول إلى **نورديازيبام** (Nordazepam) أو يُهدركس إلى **تيمازيبام** (Temazepam)، ثم يتكون **أوكسازيبام** (Oxazepam) من هذه النواتج. يصل الإفراز البولي للنورديازيبام والتيمازيبام إلى ذروته بين 6-12 و12-24 ساعة على التوالي بعد جرعة الديازيبام، بينما يكون معدل إفراز الأوكسازيبام في أقصى حد له عند 1-3 أيام. وفي أول 24 ساعة، تكون نسبة **الأوكسازيبام : النورديازيبام** في البول أقل من أو تساوي 1 (≤1). وفي البشر، تُستقلب العديد من الأدوية المزيلة للقلق والمضادة للاكتئاب مثل الديازيبام والإيميبيرامين والأميتريبتيلين عن طريق **نزع الميثيل-N** (N-demethylation). تمتلك نواتج الأيض الأمينية الثانوية أحجام توزع ظاهري مماثلة، ولكن تصفية أقل من الأدوية الأصلية. وبالتالي، تتراكم هذه النواتج عند الجرعات المزمنة لتصل إلى تركيزات تقترب من أو تتجاوز تركيزات الدواء المعطى. لذا، فإن نسب **الدواء : ناتج الأيض** لهذه المركبات أثناء العلاج المزمن تكون عادةً أقل من 1. أما النسب التي تزيد عن 2 (>2)، فتشير عادةً إلى أنه قد تم إعطاء جرعة واحدة كبيرة مؤخراً. وكمثال على ذلك، في 101 حالة جرعة زائدة من الديازيبام، كان متوسط نسبة **الديازيبام : النورديازيبام** هو 3 (Jatlow et al., 1979).

تحليل الشعر (Hair analysis)

يمكن لتحليل الشعر أحياناً أن يساعد في التمييز بين التعرض العرضي (Episodic) أو المستمر. وبما أن شعر الرأس ينمو بمعدل 1 سم شهرياً تقريباً، فإن التحليل القطعي (Segmental analysis) يمكن أن يعطي معلومات عن التعرض لأسابيع أو أشهر قبل الجمع، في حين لا توفر عينات الدم والبول إلا دليلاً على التعرض الحديث (لبضعة أيام سابقة على الأكثر). وبشكل عام، يصعب اكتشاف الأدوية ونواتج الأيض الحمضية والمتعادلة، مثل **THC** و **THC-COOH** في الشعر مقارنة بالأدوية القاعدية. لتحليل الشعر عيوبه؛ حيث يعتمد تفسير النتائج على معرفة:

1. تشريح وفيزيولوجيا وكيمياء حيوية الشعر النامي.
2. الحركية الدوائية وأيض المركب المعني.
3. العوامل المؤثرة في إدماج وتخزين وإزالة الأدوية والسموم الأخرى من الشعر.

يعد التلوث السطحي محتملاً، رغم أن الغش المتعمد للعينة غير مرجح. وتتطلب عملية تحضير العينة حالياً جهداً كبيراً، كما يصعب الحصول على مواد كافية لضمان الجودة (QA) باستثناء العناصر الشحيحة والمعادن السامة. وتوجد اختلافات في معدل نمو الشعر اعتماداً على المنطقة التشريحية، والعمر، والجنس، والعرق، والتباين الفردي؛ لذا فإن تفسير تركيزات الدواء الأصلي و/أو نواتجه في الشعر ليس بالأمر السهل (Wennig, 2000). كما لا يمكن حتى الآن تحديد قيمة دقيقة للجرعة أو

وقت التعرض بدقة. وقد تؤثر العلاجات التجميلية، ولون الشعر الطبيعي والاصطناعي، والاختلافات في بنية الشعر، وانتقائية الطرق التحليلية المستخدمة على النتائج التي يتم الحصول عليها (الجدول 5).

جدول 5: بعض العوامل التي قد تؤثر على تفسير تحليل الشعر

Table .5 Some factors that might influence the interpretation of hair analysis

العامل(Factor)	التوصية / التأثير على التفسير (Recommendation/Effect on interpretation)
جمع العينة (شعر الرأس)	يتم النتف (مع تضمين الجذور) أو الربط ثم القص؛ مع ضرورة وضع علامة على الطرف المقصوص (جهة الجلد)
لون الشعر، موقعه في فروة الرأس، القطر، ومعدل النمو	تُجمع حوالي 200 ملغ من **القمة الخلفية** (Posterior vertex) لفروة الرأس، وتُقص في أقرب نقطة ممكنة من الجلد، وتُربط الخصلة معاً.
التخزين	في درجة حرارة الغرفة مع التغليف بورق الألومنيوم.
التلوث السطحي) الدخان، إجراءات الجمع، جو المختبر)	يجب استخدام طريقة معتمدة (Validated) للمعالجة المسبقة للعينة (الغسل)
العلاجات التجميلية) الشامبو، التبييض، الأصباغ، التجعيد الدائم، منعمات الشعر، بخاخات التصفيف، المجففات الساخنة)	تتحلل العديد من الأدوية بواسطة هذه الإجراءات، ومع ذلك قد تظل النتائج النوعية (Qualitative) مفيدة.
موثوقية المقايسة(Assay reliability)	استخدام تقنيات GC-MS أو LC-MS أو ICP-MS مع إجراءات تحضير عينات معتمدة. والمشاركة في برامج تقييم الجودة الخارجية (EQA) قبل التحليل وأثناءه.
طبيعة المادة المحللة(Nature of analyte)	الأدوية القاعدية (Basic drugs) تُظهر حساسية كشف أفضل من الأدوية الحمضية أو المتعادلة.
معلومات النطاقات "الطبيعية" و"غير الطبيعية" / "السامة"	يجب أن يبنى التفسير على منهجية تحليلية مماثلة (قابلة للمقارنة)
الجنس، العرق، النظام الغذائي، العمر، الموقع الجغرافي، الموسم	قد تؤثر هذه العوامل على **حد الكشف**.(Limit of detection)

ملاحظات إضافية حول التفسير (Insights on Interpretation):

- **النمو الزمني:** يعتمد المختبر الجنائي عادةً معدل نمو قدره **1 سم شهرياً**. لذا، فإن تحليل خصلة طولها 3 سم يعطي تقريباً تاريخ التعرض للأشهر الثلاثة الماضية.
- **العوامل العرقية والجينية:** تلعب كمية **الميلانين** (Melanin) في الشعر دوراً حاسماً؛ فالأدوية القاعدية (مثل الكوكايين والأمفيتامينات) ترتبط بقوة أكبر بالشعر الداكن (الغني بالميلانين)، مما قد يجعل تركيزاتها تظهر أعلى لدى الأفراد ذوي الشعر الأسود أو البني مقارنة بذوي الشعر الفاتح عند تناول نفس الجرعة.
- **أهمية غسل العينة:** الخطوة الحاسمة في التحليل هي "بروتوكول الغسل" للتأكد من أن الدواء المكتشف موجود داخل **ساق الشعرة** (Hair shaft) نتيجة لتعرض داخلي، وليس مجرد تلوث خارجي من الدخان أو اللمس.

مصادر المعلومات الإضافية (Sources of further information)

يمكن العثور غالباً على طرق تحليل مواد معينة (**Analytes**) وكذلك طرق تفسير النتائج التحليلية في المؤلفات العلمية والمصادر الثانوية مثل تلك المدرجة في الجدول 6 (أو الطبعات اللاحقة لها). كما يمكن الحصول على معلومات حول الجرعة، والبنية الكيميائية، وثابت التأين (pKa)، ووجود نواتج الأيض من هذه المصادر نفسها. قد يتمكن مصنعو مركبات معينة أيضاً من تقديم تفاصيل حول طرق المقايسة (Assay methods)، والمؤلفات الحالية، و**المعايير الداخلية** (Internal standards) المحتملة، رغم أن طرقهم الموصى بها قد تصبح "جامدة" أو قديمة بسبب المتطلبات التنظيمية. تُدرج المواقع الإلكترونية التي يمكن من خلالها الحصول على مزيد من المعلومات حول جوانب علم السموم التحليلي في الجدول 7. (ملاحظة: كانت عناوين

المواقع في هذا الجدول صحيحة اعتباراً من 4 أغسطس 2007). يمكن استخدام موقع **Assayfinder** لتحديد مزود خدمة في المملكة المتحدة للمقايسات غير العادية أو النادرة. و تشمل المصادر الرقمية الرئيسية ما يلي:

- **PubMed:** محرك البحث القياسي للمكتبة الوطنية للطب (NLM) لقاعدة بيانات (Index Medicus/Medline) الخاصة باستشهادات وملخصات المجلات العلمية.
- **NLM Databases:** توفر قواعد بيانات عديدة؛ فعلى سبيل المثال، يمكن العثور على البنى الكيميائية والمرادفات وغيرها عبر **ChemIDplus**.
- **INTOX (برعاية منظمة الصحة العالمية):** مصدر عالمي للمعلومات السمومية ومعلومات السموم.
- **Toxbase:** قاعدة البيانات الأساسية لمعلومات السموم في المملكة المتحدة (NPIS)، وهي متاحة مجاناً لموظفي هيئة الخدمات الصحية الوطنية البريطانية.
- **Clinical Evidence (BMJ Group):** يحتوي الموقع على مسرد للمصطلحات ونماذج إحصائية وميزات أخرى.

ملاحظة تقنية للمحلل: عند استخدام هذه المصادر، يجب الانتباه دائماً إلى "تاريخ تحديث البيانات"، خاصة في علم السموم الجنائي حيث تظهر **المواد النفسية الجديدة** (New Psychoactive Substances - NPS) باستمرار، مما يتطلب العودة إلى أحدث الأوراق البحثية (Current Literature) وليس فقط الكتب المرجعية الكلاسيكية.

جدول 6 علم السموم التحليلي: المصادر المرجعية الأساسية

Table 6 Analytical toxicology: basic reference sources

المؤلف/المحرر (Author/editor)	العنوان/المجلد/الطبعة (Title/volume/edition)	تفاصيل النشر (Publication details)
Baselt, R.C.	*Disposition of toxic drugs and chemicals in man.* Edition 7	Foster City, CA: Biomedical Publications, 2004
Dart, R.C., ed.	*Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and Treatment of Human Poisoning.* Edition 3	Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2003
Dollery, C., Boobis, A., Rawlins, M., Thomas, S., Wilkins, M., ed.	*Therapeutic Drugs.* Volumes I and II. Edition 2	Edinburgh: Churchill Livingstone, 1999
Drummer, O.	*The Forensic Pharmacology of Drugs of Abuse*	London: Arnold, 2001
Hathaway, G.J., Proctor, N.H., ed.	*Proctor and Hughes' Chemical Hazards of the Workplace.* Edition 4	New York: Wiley, 2004
McEvoy, G.K., ed.	*AHFS Drug Information 2003*	Bethesda, Maryland: American Society of Health-System Pharmacists, 2003
Moffat, A.C., Osselton, M.D., Widdop, B., ed.	*Clarke's Analysis of Drugs and Poisons* Edition 3	London: Pharmaceutical Press, 2004
O'Neil, M.J., ed.	*The Merck Index.* Edition 13	Whitehouse Station, New Jersey: Merck, 2001
Sweetman, S.C., ed.	*Martindale: The Complete Drug Reference.* Edition 34	London: Pharmaceutical Press, 2004

علم سموم ما بعد الوفاة (Postmortem toxicology)

يهدف علم سموم ما بعد الوفاة عادةً إلى تحديد الدور الذي لعبته العقاقير أو السموم الأخرى في الوفاة، أو في الأحداث التي سبقت الوفاة مباشرة. بالإضافة إلى ذلك، قد يكون من المفيد أحياناً محاولة تقييم مدى الالتزام بالأدوية الموصوفة أو التعرض المهني، على سبيل المثال. ويجب عرض أي حالة وفاة تحدث أثناء الاحتجاز أو بعده بفترة وجيزة (بما في ذلك الاحتجاز بموجب قانون الصحة العقلية) في إنجلترا وويلز أمام هيئة محلفين في تحقيق قضائي (Coroner's inquest). إن تجميع كافة المعلومات التي قد تكون مطلوبة لتقديم تفسير سليم للنتائج التحليلية في الحالات الفردية ليس بالأمر السهل، خاصة وأن التحقيقات تميل إلى أن تكون مجزأة إلى:

1. **الظروف:** (مسؤول التحقيق في الوفيات/ خدمات الطوارئ/ أطباء الحوادث والطوارئ).
2. **الخلفية الطبية:** (الممارس العام/ الطبيب الاستشاري).
3. **فحص ما بعد الوفاة:** (طبيب شرعي).
4. **علم السموم:** (المحلل المخبري).

وقد لا تتضح أهمية العناصر الفردية إلا بعد تجميع كافة الأدلة. يجب أن تأخذ التحليلات بعد الوفاة في الاعتبار الظروف التي حدثت فيها الوفاة، وعمر المتوفى، والاحتمالية المحتملة لوجود عقاقير أخرى أو كحول **(Leikin and Watson, 2003)**. وهناك متغيرات إضافية محتملة وهي:

1. مدى ملاءمة الاستقصاءات التحليلية المستخدمة.
2. استقرار المادة (أو المواد) المراد تحليلها (Analyte stability).
3. طبيعة العينة (أو العينات) المرسلة للتحليل.
4. حقيقة أن التغيرات قد تحدث بعد الوفاة في تركيب سوائل الجسم، وخاصة الدم **(Skopp, 2004)**.

جدول 7: مصادر المعلومات حول علم السموم التحليلي والتخصصات ذات الصلة
Table 7 Sources of information on analytical toxicology and related disciplines

- الأكاديمية الأمريكية لعلم السموم السريري: American Academy of Clinical Toxicology (AACT) — http://www.clintox.org/
- الجمعية الأمريكية للكيمياء السريرية، قسم مراقبة الأدوية العلاجية وعلم السموم السريري: American Association of Clinical Chemistry, TDM/Clinical Toxicology Division (AACC TDM/CT) — http://www.aacc.org/AACC/members/divisions/tdm/
- جمعية الكيمياء الحيوية السريرية: Association for Clinical Biochemistry (ACB) — http://www.acb.org.uk
- الجمعية الأوروبية لمراكز السموم وعلماء السموم السريريين: European Association of Poisons Centres and Clinical Toxicologists (EAPCCT) — http://www.eapcct.org/
- هيئة الصحة والسلامة، مختبر الصحة والسلامة: Health and Safety Executive, Health and Safety Laboratory (HSE HSL) — http://www.hsl.gov.uk/
- الجمعية الدولية لمراقبة الأدوية العلاجية وعلم السموم السريري: International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology (IATDM-CT) — http://www.iatdmct.org
- الاتحاد الدولي للكيمياء السريرية وطب المختبرات: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) — http://www.ifcc.org/
- البرنامج الدولي للسلامة الكيميائية (برنامج إنوكس): International Programme on Chemical Safety INTOX Programme (IPCS INTOX) — http://www.who.int/ipcs/poisons/en/
- مجموعة لندن لعلم السموم: London Toxicology Group (LTG) — http://www.ltg.uk.net/
- المعهد الوطني للسلامة والصحة المهنية: National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) — http://www.cdc.gov/niosh/about.html
- الجمعية الفرنسية لعلم السموم التحليلي: Société Française de Toxicologie Analytique (SFTA) — http://www.sfta.org/
- جمعية علماء السموم الشرعيين: Society of Forensic Toxicologists (SOFT) — http://www.soft-tox.org/

- الرابطة الدولية لعلماء السموم الشرعيين: The International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) — http://www.tiaft.org/

(أ) تتوفر قاعدة بيانات على الويب لمساعدة أعضاء TIAFT في تفسير النتائج التحليلية.

اختيار العينة وموقع جمعها (Choice of sample and sample collection site)

تعتبر الدماء التي يتم الحصول عليها بعد الوفاة عينة متغيرة للغاية؛ حيث إن حدوث درجة من التحلل الدموي (Haemolysis) يعد أمراً معتاداً، ولهذا السبب يتم عادةً تحليل الدم الكامل مباشرة (ويُفضل الحصول عليه قبل فتح الجثة، عن طريق السحب بالإبرة من الوريد الفخذي أو أي وريد طرفي آخر بعد ربط الوريد في نقطة تسبق موقع الجمع). ومع ذلك، قد يكون قد حدث ترسيب للخلايا و/أو تشكل جلطات قبل جمع العينة.

رغم ذلك، يُستخدم الدم الكامل (أي غير المفصول) بشكل شائع في علم سموم ما بعد الوفاة لأن:

1. جمعه سهل نسبياً.
2. متجانس نسبياً، مما يسهل عملية صرفه وتوزيعه في المختبر.
3. غالباً ما تتوفر بيانات حول تركيزات العديد من المواد في البلازما أو المصل (أو حتى الدم الكامل في بعض الأحيان) التي يتم الوصول إليها أثناء العلاج الطبيعي وبعد التعرض الحاد، مما يوفر على الأقل أساساً ما لتفسير النتائج.

إذا أُدخل المريض إلى المستشفى قبل الوفاة، فقد تتوفر عينات ما قبل الوفاة (Ante-mortem) أو عينات قريبة من وقت الوفاة (Peri-mortem) للتحليل. كما تتوفر مجموعة بيانات لتركيزات الدم الفخذي بعد الوفاة التي لوحظت في حالات التسمم القاتلة للمساعدة في تفسير النتائج **(Druid and Holmgren, 1997)**، لكن الاعتماد ببساطة على الأرقام المستمدة من حالات أخرى لا يراعي دائماً حجم التغييرات المحتملة التي قد تحدث بعد الموت.

وعلى الرغم من أن تحليل الأنسجة أصبح غير شائع إلى حد ما، ويرجع ذلك جزئياً إلى الرغبة في خفض التكاليف، وأيضاً بسبب النقص النسبي في المعلومات حول تركيزات الأنسجة المحققة أثناء الحياة، إلا أنه لا ينبغي إهمال احتمالية أن يساعد قياس تركيزات العقاقير ومستقلباتها في الأنسجة في تفسير الحالات الصعبة أو المهمة بشكل خاص. وقد لفت **Apple (1989)** الانتباه إلى استخدام أنسجة الكبد بالإضافة إلى تحليلات دم ما بعد الوفاة في المساعدة على التمييز بين الجرعة الزائدة الحادة من مضادات الاكتئاب ثلاثية الحلقات وبين التعرض المزمن لهذه العقاقير؛ حيث توفر نسبة العقار إلى المستقلب المرتفعة نسبياً في الكبد بعد الجرعة الزائدة الحادة معلومات تفسيرية إضافية. وقد يكون تحليل الأنسجة الأخرى، مثل الشعر أو الأظافر أو نخاع العظم أو العظام، هو الخيار الوحيد إذا تحللت جميع الأنسجة الرخوة، ولكن قد يكون أقصى ما يمكن تأكيده هو حدوث التعرض فقط **(McIntyre et al., 2000)**.

ومن الواضح أنه عندما يتسبب: (1) تطور التحمل (Tolerance) للسمية الحادة للعقار، و(2) احتمالية حدوث تغيرات ما بعد الوفاة في تركيزات المواد في الدم، في جعل تفسير النتائج صعباً، فإن توفر معلومات إضافية مثل نتائج تحليلات الأنسجة قد يوفر أدلة إضافية على طبيعة وحجم التعرض. ومع ذلك، يجب تذكر أنه تم الإبلاغ عن تباين في تركيزات العقاقير بعد الوفاة من موقع إلى آخر في العضلات الهيكلية المختلفة. كما وُجدت تركيزات مختلفة للعقاقير في العينات التي جُمعت من مناطق مختلفة من الكبد والرئة **(Pounder et al., 1996b)**. وبطبيعة الحال، يوفر تحليل الشعر أو الأظافر خياراً إضافياً إذا كان عدم الالتزام بالعلاج أو استخدام العقاقير غير المشروعة في الأيام أو الأسابيع التي سبقت الوفاة موضوعاً للنقاش.

إن قياس الإلكتروليتات (الأملاح) مثل الصوديوم والبوتاسيوم ليس له قيمة بعد الوفاة. وقد يكون وجود الأسيتون في الدم والبول مؤشراً على الحماض الكيتوني (Ketoacidosis) أو السكري غير المشخص. ويعد قياس الهيموجلوبين السكري (HbA1c) دليلاً أكثر موثوقية لمرض السكري غير المشخص، حيث يعكس هذا القياس ارتفاع تركيزات جلوكوز الدم على مدى فترة زمنية قبل الوفاة. كما يمكن أن يكون الخلط الزجاجي للعين (Vitreous humour) مفيداً أحياناً لقياس الجلوكوز واللاكتات، وكذلك اليوريا والكرياتينين **(Forrest, 1993)**.

معايرة المقايسة (Assay calibration)

تستهدف العديد من المقايسات المخصصة لمراقبة الأدوية العلاجية (TDM) أو علم السموم السريري البلازما أو المصل، وغالباً ما يتم استخدام هذين السائلين بالتبادل، وبالتالي يتم معايرتها باستخدام بلازما أو مصل خالٍ من المادة المراد تحليلها من مصدر مناسب. ومع ذلك، بعد الوفاة، قد يحدث تجلط داخل الأوعية، وترسيب للخلايا، وتحلل دموي، ومجموعة متنوعة من العمليات الأخرى، وكلها تشير إلى وجوب تحليل دم كامل متحلل وممزوج جيداً في محاولة للحصول على عينة ممثلة لمحتويات الوعاء الدموي. يستخدم بعض المحللين الدم الكامل المتحلل لإعداد محلول المعايرة، ولكن الدم المعالج بالسترات (Citrated blood) ليس مثالياً عادةً لهذا الغرض.

ثمة نهج بديل يتمثل في استخدام فحوصات ومعايير معايرة (**assays and calibration standards**) مخصصة لتحليلات مراقبة الأدوية العلاجية (**TDM analyses**)، ولكن مع تخفيف عينات الدم الكامل (بعد التجميد/الإذابة لضمان حدوث التحلل الدموي **haemolysis**) بنسبة 1:4 أو 1:9 باستخدام المادة الخلالية (**matrix**) المستخدمة لتحضير محلول المعايرة، وذلك في محاولة لتقليل آثار المادة الخلالية (**matrix effects**) المحتملة. وبالمثل، غالباً ما يتم التقليل من أهمية مشكلات ضبط الجودة (**QC**) ومعايرة الفحوصات في تحليلات الأنسجة. وأحد الحلول هو استخدام الهضم بواسطة إنزيم بروتيني مثل "سوبتيلسين كارلسبرغ" (**Subtilisin Carlsberg**) ، مع التخفيف اللاحق بالمادة الخلالية المستخدمة لتحضير محاليل المعايرة، وذلك أيضاً لتقليل التأثير المحتمل للمادة الخلالية على استرداد المادة التحليلية (**analyte recovery**).

تفسير النتائج التحليلية (Interpretation of analytical results)

إذا توفي مريض كان خاضعاً للعلاج أو يُشتبه في تعاطيه للمخدرات، فقد يُثار التساؤل حول دور هذه العقاقير في الوفاة. ومن القضايا التي قد تؤخذ في الاعتبار: الاستجابة غير النمطية للعقار (**idiosyncrasy**)، والسمية المرتبطة بالجرعة (**dose-related toxicity**)، والجرعات الزائدة العرضية (الحادة أو المزمنة)، والتسمم الذاتي المتعمد.

في مثل هذه الحالات، يكون قياس تركيزات الأدوية المعنية في عينة دم مأخوذة بعد الوفاة (**postmortem**) أمراً بالغ الأهمية، إلا أن تفسير النتائج التي يتم الحصول عليها قد لا يكون مباشراً (Drummer, 2004). ويرجع ذلك جزئياً إلى أن تركيزات المواد الغريبة عن الجسم (**xenobiotics**) في الدم—لا سيما المركبات المحبة للدهون (**lipophilic**) ذات أحجام التوزيع (**volumes of distribution**) الكبيرة نسبياً—قد تزداد بعد الوفاة نتيجة لانتشارها من الأنسجة المحيطة أو من الجهاز الهضمي (**GI tract**).

إذا تأخر اكتشاف الجثة، فإن مدى التحلل (**decomposition**) يمكن أن يجعل عملية جمع العينات وتفسير النتائج الكمية أمراً في غاية الصعوبة. إن ضمان حفظ الجثة عند درجة حرارة 4 درجات مئوية قبل التشريح وإجراء الصفة التشريحية في

أقرب وقت ممكن بعد الوفاة سيقلل من مخاطر التغيرات في تركيزات المواد التحليلية في الدم قبل أخذ العينات. كما قد يساعد أيضاً جمع الدم عن طريق السحب بالإبرة من موقع محيطي (**peripheral site**)، ويفضل أن يكون ذلك بعد سد الوريد قريباً من موقع أخذ العينة (Table 8). ومع ذلك، لا يتم اتخاذ مثل هذه الاحتياطات دائماً (حتى التوثيق السليم لموقع جمع الدم قد يكون غائباً)، بل قد يتم جمع الدم من موقع مركزي مثل القلب، أو حتى جمع "دم التجويف" (**cavity blood**) (الدم المتبقي في تجويف الجسم عند إزالة الأعضاء). وهذه الممارسة الأخيرة تنطوي بالطبع على خطر تلوث عينة "الدم" بمحتويات المعدة، على سبيل المثال، بالإضافة إلى قطع صغيرة من الأنسجة.

إن العديد من السموم قوية جداً (**potent**)، بمعنى أن تركيزات الدم المرتبطة بالسمية الشديدة (التي قد تكون قاتلة) منخفضة للغاية، وعادة ما تُقاس بـ $mg\ L^{-1}$ (أي أجزاء في المليون) أو حتى $\mu g\ L^{-1}$ (أي أجزاء في الألف مليون)، وبالتالي فإن تلوث عينة دم محيطية بآثار طفيفة يمكن أن يفسد أدق عمل تحليلي. في مثل هذه الحالات، لا يمكن للتحليل السمومي في كثير من الأحيان أن يفعل أكثر من تقديم دليل على التعرض لمادة معينة.

لا توجد حالياً مؤشرات حيوية (**biochemical markers**) مقبولة يمكن استخدامها للإشارة إلى حجم التغيرات التي تحدث بعد الوفاة والتي من المحتمل أن تؤثر على إعادة توزيع الدواء في الدم (Langford and Pounder, 1997). وبالمثل، لا توجد نماذج تجريبية محددة جيداً لدراسة التغيرات في تركيزات الدم بعد الوفاة. ونظراً للحاجة إلى الحصول على دم من مواقع مركزية مثل الوريد الأجوف (**vena cava**) ومن مواقع محيطية مثل الوريد الفخذي (**femoral vein**) في أوقات مختلفة بعد الوفاة، فإن الحيوانات الصغيرة (مثل القوارض والأرانب) غير مناسبة لهذا الغرض.

تمتلك الخنازير بعض التشابهات المورفولوجية والفيزيولوجية والأيضية مع الإنسان والرئيسيات الأخرى، ويُذكر أنها تصل إلى النضج فيما يتعلق بنشاط إنزيمات استقلاب الدواء الكبدية عند بلوغ شهرين. ومع ذلك، باستخدام الخنازير الصغيرة، كان من الممكن فقط الحصول على عينات دم محيطية صغيرة حتى 48 ساعة بعد الوفاة (Flanagan et al., 2003). كما استُخدم نموذج جثث البشر لدراسة توزيع الدواء بعد الوفاة، حيث تم إثبات انتشار عقارات الأميتريبتيلين (**amitriptyline**)، والليثيوم، والباراسيتامول من المعدة (في ظروف حمضية أو قاعدية) إلى قاعدة الرئة اليسرى والفص الأيسر من الكبد (Pounder et al., 1996a).

جدول 8: العوامل المؤثرة على احتمالية تغير تركيزات المواد الغريبة عن الجسم في الدم بعد الوفاة

Table 8 Factors influencing the likelihood of postmortem change in blood xenobiotic concentrations

العامل(Factor)	التعليق(Comment)	المراجع(References)
موقع الجمع (Site of collection)	المواقع المركزية (القلب، الوريد الأجوف، أو دم "تحت الترقوة") أكثر عرضة للتغيرات من المواقع المحيطية (مثل الوريد الفخذي بعد عزله بشكل مناسب). دم البطين الأيسر للقلب أكثر عرضة للتغير من دم البطين الأيمن.	Dalpe-Scott et al. (1995); Moriya and Hashimoto (1999)
الوقت بين الوفاة وجمع العينة	كلما طال الوقت المنقضي، زادت فرصة حدوث التغيرات مع انخفاض أس الهيدروجيني (pH) للأنسجة واستمرار التحلل الذاتي (autolysis).	-
وضعية الجثة عند العثور عليها	قد تؤدي إلى تصريف الدم من المواقع المركزية إلى المواقع المحيطية.	-
درجة حرارة تخزين الجثة	كلما ارتفعت درجة الحرارة، زادت احتمالية حدوث التغيير.	-
طريقة أخذ العينات	السحب بالإبرة (Needle aspiration) أقل عرضة للتسبب في تلوث العينة بسوائل الأنسجة، على سبيل المثال.	-

حفظ العينة	هناك حاجة للفلوريد (Fluoride) للمساعدة في استقرار بعض المواد التحليلية (مثل الإيثانول، الكوكايين، 6-مونوأسيتيل مورفين)—وهذا لا يعكس التغييرات التي حدثت قبل الجمع.	-
الفراغ العلوي في أنبوب العينة(Headspace)	المواد التحليلية المتطايرة ستتوازن بين العينة والفراغ العلوي؛ فتح الأنبوب وهو بارد (4 درجات مئوية) يقلل من الفقد.	Gill et al. (1988)
حجم الدم المجموع	حجم العينة الأكبر أقل عرضة للتأثر بالتغيرات الموضعية في تركيب الدم.	-
طبيعة المادة الغريبة (Nature of xenobiotic)	المركبات المحبة للدهون (Lipophilic) أكثر عرضة للزيادة من المركبات الكارهة للدهون (Lipophobic).	-
وجود المادة في الجهاز الهضمي	قد يؤدي الانتشار بعد الوفاة إلى تغيير التركيزات في الأنسجة المجاورة وكذلك في الدم (يُنصح بأخذ عينة الكبد من عمق الفص الأيمن لكونه الأبعد عن المعدة)	Pounder and Davies (1994); Fuke et al. (1996)

قد يطرأ الحد الأدنى من التغييرات بعد الوفاة على تركيزات الدم لبعض الأدوية ذات حجم التوزيع (**volume of distribution**) الصغير نسبياً، ومن الأمثلة على ذلك: الليثيوم (Yonemitsu and Pounder, 1993)، والترازودون (Martin and Pounder, 1992)، والزوبيكلون (Pounder and Davies, 1994). ومع ذلك، قد يستمر الامتصاص من الجهاز الهضمي بعد الوفاة حتى مع هذه المركبات.

وثمة مشكلة أخرى تتمثل في أن بعض المواد التحليلية، ولا سيما الإيثانول والمركبات المتطايرة الأخرى، والكوكايين، والسيانيد، والأنسولين ، قد تُفقد من دم ما بعد الوفاة، أو في حالة الإيثانول والكحوليات العليا (البروبانول، البيوتانول)، قد يتم إنتاجها فيه. يستمر النشاط الإنزيمي بعد الوفاة، وخاصة نشاط "الإستريز" (**esterase activity**)، ولذلك لا يتم اكتشاف الإسترات مثل الهيروين غالباً في عينات ما بعد الوفاة. كما يؤدي الأيض اللاهوائي لـ "7-نيتروبنزوديازيبينات" (مثل نيترازيبام، كلونازيبام، فلونيترازيبام) إلى إنتاج مركبات "7-أمينو" المقابلة لها.

يمكن أن تؤدي الآثار المجتمعة للانتشار بعد الوفاة من الأنسجة وعدم استقرار المادة التحليلية إلى صورة مربكة، كما هو الحال مع الكوكايين (Hearn et al., 1991) والترانيلسيبرومين (Yonemitsu and Pounder, 1993). وقد تتفاقم كل من التغيرات في تركيب الدم وعدم استقرار المواد التحليلية بعد الوفاة إذا حُفظت الجثة في درجة حرارة عالية نسبياً قبل أخذ العينات. ومن الواضح أنه كلما طالت مدة العلاج بدواء محب للدهون ويعمل مركزياً وزادت الجرعة، زادت احتمالية التغير بعد الوفاة لأن تركيزات الأنسجة من المحتمل أن تكون مرتفعة نسبياً. وأخيراً، هناك اهتمام متزايد بالتحليل الجيني (**genetic analysis**) للمساعدة في تفسير بيانات ما بعد الوفاة بهدف الكشف عن الأشخاص الذين قد يكون لديهم استعداد وراثي لتراكم تركيزات سامة محتملة من دواء أو مستقلب ما (Jannetto et al., 2002; Levo et al., 2003).

دليل المواد (Gazetteer)

مضادات الاكتئاب (Antidepressants)

تعتبر الوفيات الناجمة عن التسمم بمضادات الاكتئاب ثلاثية الحلقات (**TCA**) شائعة، ويطرح تفسير نتائج سموم ما بعد الوفاة مشاكل مماثلة للوفيات المرتبطة بمضادات الذهان وغيرها من الأدوية ذات أحجام التوزيع (**volumes of distribution**) الكبيرة نسبياً؛ ومن المرجح أن عينة الدم المحيطية، بدلاً من عينة دم القلب، ستعكس بشكل أدق تركيزات الدم في الفترة المحيطة بالوفاة (**perimortem**). أما مضادات الاكتئاب الأحدث، ولا سيما مثبطات إعادة امتصاص

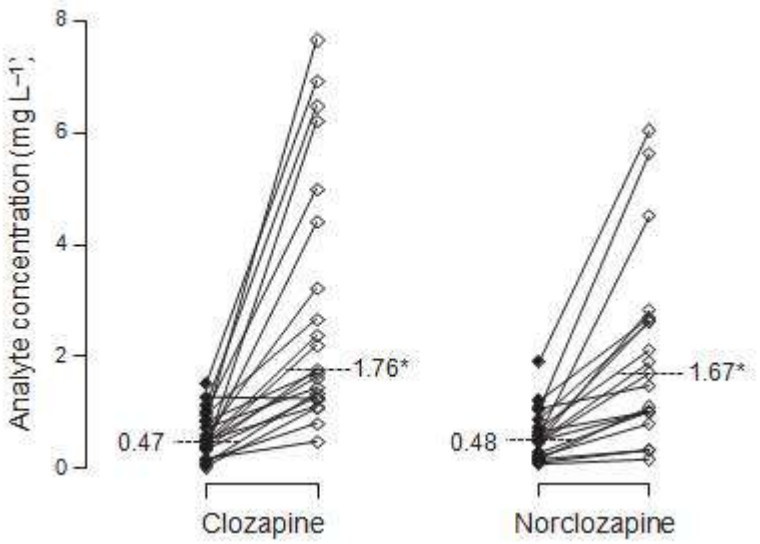
السيروتونين الانتقائية (**SSRIs**)، فهي أقل سمية من ثلاثية الحلقات في حالات الجرعات الزائدة الحادة، ولكنها مع ذلك قد تظهر في حالات التسمم الذاتي.

مضادات الصرع ومضادات الذهان (Antiepileptics and antipsychotics)

قد يكون قياس وتفسير نتائج تركيزات "الفينوثيازين" (**phenothiazine**) في الدم أمراً صعباً؛ ليس فقط لأن هذه الأدوية (بما في ذلك الكلوربرومازين) غير مستقرة في المحاليل المائية، ولكن أيضاً لوجود العديد من المستقلبات (**metabolites**) ذات الاستقرار الضعيف والنشاط الفارماكولوجي غير المعروف.

كما أن قياس "الهالوبيريدول" (**Haloperidol**) معقد بسبب وجود صنوّه (تاوتومر) "الهالوبيريدول المختزل" ومستقلب آخر (CPHP)، واللذين يجب أخذهما في الاعتبار عند الإبلاغ عن قياسات الهالوبيريدول في الدم. ومع أدوية الذهان الأحدث "غير النمطية" (**atypical**)، يعد استقرار المادة التحليلية أقل إشكالية بشكل عام، رغم وجود مخاوف بشأن عقار "الأولانزابين" المحتوي على الكبريت.

ومع ذلك، فإن المعرفة المحدودة بالتركيزات التي يتم الوصول إليها أثناء العلاج المزمن للعديد من الأدوية الجديدة، والتأثير المحتمل لعوامل مثل التحمل (**tolerance**)، والتفاعلات الضارة للعلاج نفسه، وزيادة خطر الموت المفاجئ في حالات الصرع والفصام، واحتمالية حدوث تغيرات ما بعد الوفاة (الشكل 2)، قد تجعل تفسير نتائج سموم ما بعد الوفاة أمراً غير مباشر على الإطلاق.



شكل 2: متوسط تركيزات "الكلوزابين" (**clozapine**) و"النوركوزابين" (**norclozapine**) في الدم قبل (◆) وبعد ( ) الوفاة في المرضى الذين توفوا لأسباب أخرى غير التسمم الذاتي بالكلوزابين (* $p < 0.0001$).

أول أكسيد الكربون والسيانيد (Carbon monoxide and cyanide)

إذا اشتبه في استنشاق غازات العادم، فقد يكون من المفيد معرفة نوع السيارة وسنة صنعها وطرازها، حيث أن المحول الحفاز (**catalytic converter**)، إذا كان مركباً ومصاناً بشكل صحيح، يقلل من كمية أول أكسيد الكربون الناتجة. وغالباً ما

يؤثر التسمم العرضي بأول أكسيد الكربون (الناتج مثلاً عن مدفأة غاز غير مهواة بشكل صحيح) على أكثر من شخص، والأطفال معرضون لخطر خاص.

يمكن أن يكون قياس تشبع الكاربوكسي هيموجلوبين في الدم (الجدول 9) وتركيز السيانيد مفيداً عند التحقيق في الوفيات الناجمة عن الحرائق. ومع ذلك، يجب إجراء التحليل دون تأخير لأن تركيز أول أكسيد الكربون يميل إلى الانخفاض بعد جمع العينة، بينما يميل تركيز السيانيد إلى الارتفاع.

في حالات الاشتباه في التسمم بالسيانيد بحد ذاته، يجب جمع عينات دم من أكثر من موقع محيطي، بالإضافة إلى محتويات المعدة. ويعد تحديد مصدر التعرض للسيانيد أمراً حيوياً؛ فإذا كان المصدر غير معروف، فقد يكون من المفيد الحصول على عينة صغيرة من الدماغ (حوالي 20 جم) من موقع عميق داخل الدماغ لتأكيد وجود السيانيد. يُفضل تخزين عينات الدم والأنسجة عند درجة حرارة 4 درجات مئوية وتحليلها في أسرع وقت ممكن.

جدول 9: نسبة تشبع الكاربوكسي هيموجلوبين في الدم والأعراض السريرية للسمية

Table .9 .Blood carboxyhaemoglobin saturation and clinical features of toxicity

نسبة تشبع الكاربوكسي هيموجلوبين (%)	المظاهر السريرية(Clinical features)
أقل من 1%	إنتاج أول أكسيد الكربون الداخلي(Endogenous)
3–8%	مدخنو السجائر
أقل من 15%	المدخنون الشرهون (30–50 سيجارة/يوم)
أكبر من 20%	صداع، ضعف، دوار، ضعف الرؤية، إغماء، غثيان، قيء، إسهال (مرضى القلب معرضون لخطر خاص)
أكبر من 50%	غيبوبة، تشنجات، بطء ضربات القلب، انخفاض ضغط الدم، تثبيط تنفسي، الوفاة

القنب (Cannabis)

يمكن لجرعة واحدة من القنب لدى مستخدم غير متمرس، أو جرعة زائدة لدى مستخدم معتاد، أن تسبب أحياناً مجموعة متنوعة من الآثار غير السارة بما في ذلك القلق، والذعر، والبارانويا، ومشاعر الهلاك الوشيك.

هناك عدد من التقارير حول حالات الوفاة المفاجئة وغير المتوقعة لدى الشباب المرتبطة باستخدام القنب وحده (**Bachs and Morland, 2001; Gupta et al., 2001**). ومن العوامل التي تزيد الأمر تعقيداً التوافر المتزايد للقنب عالي القوة نسبياً (المعروف بـ **'skunk'**) في المملكة المتحدة وأماكن أخرى؛ حيث يتم استزراعه عمداً، عادةً في أماكن مغلقة، لكي يحتوي على كميات أكبر بكثير من مادة الـ **THC** (المكون النشط الرئيسي في القنب) مقارنة بالنباتات التي تُزرع في الحقول. وبينما يتوقع أن يحتوي القنب القياسي على نسبة **THC** تتراوح بين 2-8% (وزن/وزن)، فإن نوع **'skunk'** قد يحتوي على أكثر من 20% (وزن/وزن) (**Drummer, 2004**). ومن الواضح أن احتمالية التسمم العرضي بالجرعات الزائدة تكون أعلى بكثير عند استخدام هذا النوع. لا يُنصح بإجراء الحسابات العكسية (**Back-calculation**) لوقت تعاطي القنب بناءً على تركيزات "الكانابينويد" في دم ما بعد الوفاة .

الأدوية المؤثرة على القلب (Cardioactive drugs)

عُرف منذ سنوات عديدة أن قياسات "الديجوكسين" (**digoxin**) في دم القلب المجموع بعد الوفاة قد تكون مضللة عند محاولة تقييم تركيزات الديجوكسين في البلازما قبل الوفاة، وذلك بسبب تسرب الديجوكسين من عضلة القلب بعد الموت

(**Vorpahl and Coe, 1978**). كما أن استخدام الدم المحيطي ليس أكثر موثوقية. وقد تظهر أيضاً أدوية مثل "ديسإيثيل أميوداورون"، و"فليكاينيد"، و"سوتالول" تغيرات في تركيزها في الدم بعد الوفاة.

الكوكايين (Cocaine)

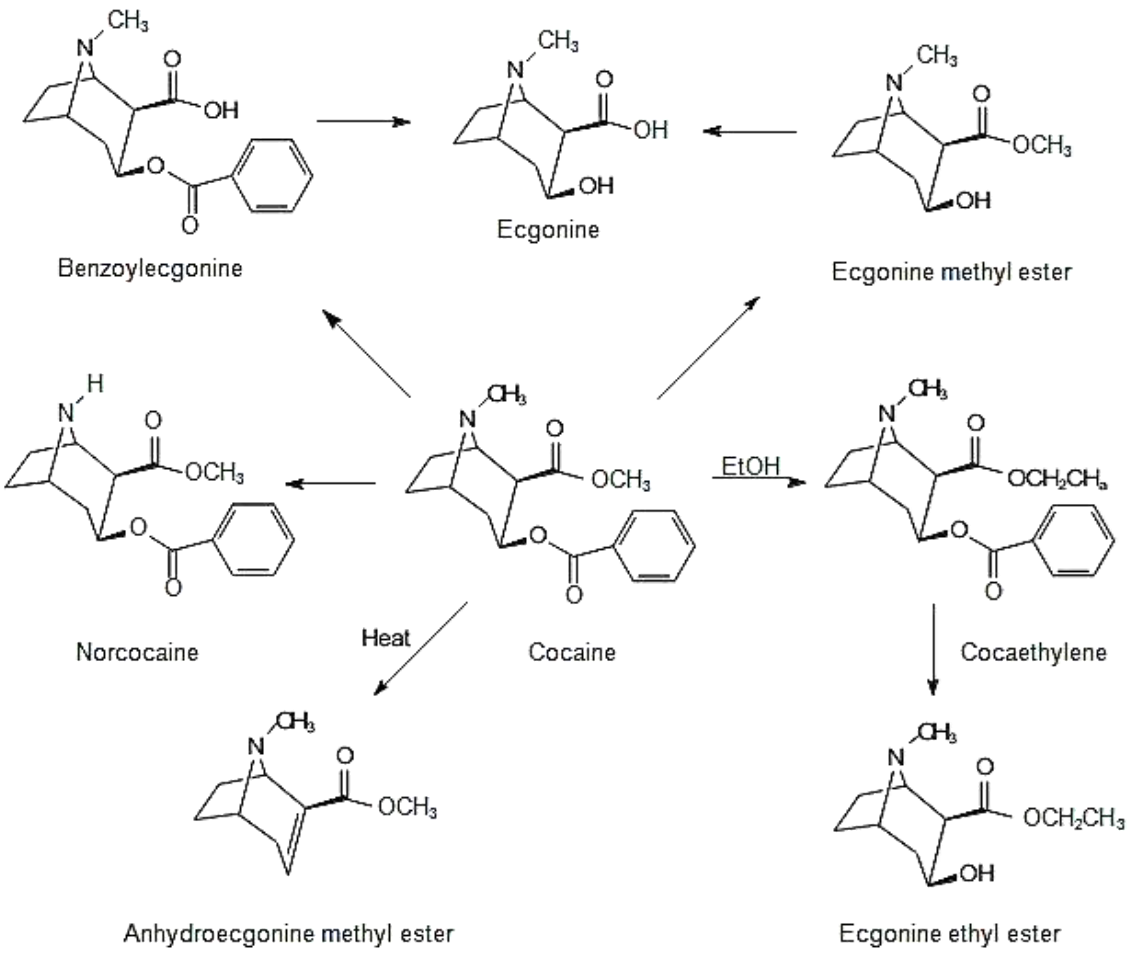
الكوكايين هو ثنائي إستر (**diester**) ويتحلل مائياً بسرعة في الجسم وفي المختبر بواسطة إنزيمات "الإستريز" في البلازما والأنسجة، وفي المحاليل القلوية، إلى "بنزويل إيكغونين" (**BE**) و"إيكغونين ميثيل إستر" (**EME**) (**Toennes and Kauert, 2001**؛ الشكل 3). يمكن أن يستمر التحلل المائي للكوكايين بعد الموت، حتى في الدماغ (**Moriya and Hashimoto, 1996**).

إن إضافة فلوريد الصوديوم بنسبة 2% (وزن/حجم) إلى عينة الدم المحيطية وتخزينها عند درجة حرارة 20- مئوية يقلل من نشاط إستريز البلازما، مما يزيد من احتمالية أن يعكس تركيز الكوكايين المقاس التركيز الجهازي وقت أخذ العينة. ومع ذلك، إذا كان هناك تأخير كبير قبل إجراء الصفة التشريحية، فإن تفسير تركيزات الكوكايين يصبح صعباً للغاية، ومن المهم قياس "البنزويل إيكغونين" بشكل مستقل.

تشمل العوامل الإضافية المهمة في تفسير النتائج: طريق التعاطي، وشكل الكوكايين المستخدم (ملح أم قاعدة حرة)، ومدة وكثافة التعرض السابق، وبالطبع وجود سموم أخرى. يُستقلب بعض الكوكايين بواسطة "الكولين استريز"، وقد يثبط المستخدمون هذا الأيض بتناول مثبطات الكولين استريز مثل مركبات الفوسفور العضوية (**OP**)، وهو أمر يجب مراعاته في حالات الوفاة غير المفسرة لدى مستخدمي الكوكايين. قد يكون الكوكايين المغشوش عاملاً آخر؛ حيث وُجد في الكوكايين غير المشروع مواد مثل "ديلتيازيم"، و"فيناستين"، ومستقلب الترازودون والنيفازودون المعروف بـ **m-CPP**.

تحتوي عينات اللعاب والعرق والشعر على كميات عالية نسبياً من الكوكايين، بينما يحتوي البول على كميات صغيرة نسبياً من الدواء الأم ولكن نسباً كبيرة من مستقلباته (**BE** و **EME**) (**Selavka and Rieders, 1995**). غالباً ما يُؤخذ الكوكايين مع الكحول، ويمكن تأكيد ذلك بوجود "كوكاي إيثيلين" (**cocaethylene**) الناتج عن عملية التبادل الإستري . يمتلك الكوكاي إيثيلين نصف عمر بلازمي أطول من الكوكايين وهو أكثر قوة وتأثيراً. أما "أنهيدرو إيكغونين" فهو منتج ناتج عن التحلل الحراري (**pyrolysis**) يتكون عند تدخين الكراك (**crack**).

لا يوجد تباين واضح يعتمد على موقع جمع العينة في تركيزات الكوكايين أو البنزويل إيكغونين أو الكوكاي إيثيلين بعد الوفاة (**Logan et al., 1997**)، ربما بسبب العمليات المتنافسة بين تحرر المادة من الأنسجة وتحللها. وفي بعض الأفراد، تبدو السمية الحادة للكوكايين غير مرتبطة بالجرعة (استجابة غير نمطية **idiosyncratic**). وقد اقتُرح أن قياس الكوكايين في الدماغ مهم في التحقيق في بعض الوفيات المرتبطة بالكوكايين، مثل تلك التي تسبقها فترة من "الهذيان المثار" (**excited delirium**) (**Hernandez et al., 1994**). ومع ذلك، فإن التقييم النسيجي لعضلة القلب لاستبعاد التهاب عضلة القلب الناجم عن الكوكايين كسبب للوفاة هو أمر مهم أيضاً. قد تزداد تركيزات الكوكايين في الخلط الزجاجي للعين (**Vitreous humour**) بعد الوفاة.



الشكل 3: بعض المستقلبات ونواتج التحلل للكوكايين.

الاعتداء الجنسي المسهل بالعقاقير (Drug-facilitated sexual assault)

تشمل "عقاقير اغتصاب المواعدة" (**Date-rape drugs**) الإيثانول، والبنزوديازيبينات (مثل الديازيبام، والتيماريبام، والكلونازيبام)، والقنب، والكوكايين، والهيروين، والأمفيتامينات. وتشمل الأدوية المستخدمة مؤخراً "فلونيترازيبام" (روفينول)، و"جاما هيدروكسي بيوتيريت" (**GHB**) وسليفه "جاما بيوتيرولاكتون" (**GBL**)، والهيوسين (سكوبولامين)، والكيتامين.

يعد جمع العينات المبكر أمراً بالغ الأهمية. غالباً ما يكون التحديد النوعي (**Qualitative identification**) في البول كافياً، باستثناء مادة **GHB** حيث يلزم القياس الكمي لكونها مركباً داخلي المنشأ في الجسم. يُوصى بحد فاصل في البول قدره **10 ملجم/لتر** للتمييز بين الإفراز الطبيعي لـ **GHB** والتعاطي المتعمد له أو لسليفه **GBL** (**Kerrigan, 2002**).

في الدم أو البلازما، يمكن اكتشاف معظم مخدرات الإساءة (**drugs of abuse**) بتركيزات منخفضة بوحدة (ملجم/لتر) لمدة تتراوح بين يوم إلى يومين بعد التعرض. أما في البول، فإن "نافذة الكشف" (**detection window**) بعد جرعة واحدة تتراوح بين 1.5 إلى 4 أيام. وفي حالة المستخدمين المزمنين، يمكن اكتشاف هذه المخدرات في البول لمدة أسبوع تقريباً بعد الاستخدام، وأحياناً لفترة أطول لدى مستخدمي الكوكايين والقنب. وفي السائل الفموي (**oral fluid**)، يمكن اكتشافها بتركيزات منخفضة لمدة 5 إلى 48 ساعة بعد التعرض.

تعد نافذة الكشف عن مادة **GHB** أقصر بكثير، إلا أن تحليل "مستقلبات الدواء" (**drug metabolites**) يمكن أن يطيل نافذة الكشف في بعض الحالات؛ فعلى سبيل المثال، بعد جرعة واحدة من 1 أو 2 ملجم من "الفلونيترازيبام"، يمكن للطرق التحليلية الحساسة اكتشاف مادة "7-أمينوفلونيترازيبام" في البول لمدة تصل إلى أربعة أسابيع بعد التعرض (**Verstraete, 2004**).

طورت خدمة العلوم الجنائية البريطانية (**UK Forensic Science Service**) مجموعة أدوات "الأدلة المبكرة" (**K106**) لتسهيل جمع العينات في حالات الاعتداء الجنسي المزعومة. حيث يتمكن المشتكون من جمع عينات البول ومسحات الفم بأنفسهم قبل الفحص الطبي الكامل. ومع ذلك، فإن "وقت المكث" (**dwell-time**) القصير لبعض هذه الأدوية، مقترناً بتردد الضحايا في الإبلاغ الفوري، يعمل ضد فعالية استخدام البول والسائل الفموي كوسائط لجمع العينات. ومن ناحية أخرى، استُخدم تحليل الشعر الجزئي (**Segmental hair analysis**) للكشف عن تعاطي المخدرات بعد عدة أسابيع من وقوع الحدث (**Kintz et al., 2006**).

الإيثانول (كحول الإيثيل، "الكحول")

يعد تحليل الإيثانول في الدم الطلب الأكثر شيوعاً في السموم الجنائية، ومع ذلك فإن تفسير النتائج محفوف بالمشكلات (**Kugelberg and Jones, 2007**). قد تعطي بعض الطرق الإنزيمية المستخدمة في المختبرات السريرية نتائج مرتفعة كاذبة في المرضى ذوي الحالات الحرجة أو عينات ما بعد الوفاة. يجب إجراء تحليل الكحوليات باستخدام الكروماتوغرافيا الغازية (**GC**)، والتي توفر قياساً موثوقاً للإيثانول ويمكن استخدامها لتقدير الأسيتون، والميثانول، والأيزوبروبانول، والكحوليات الأخرى (**Jones and Pounder, 1998**). ومع ذلك، يمكن أن يُفقد الإيثانول من عينات الدم أو يتولد فيها إذا تلوثت بالبكتيريا أو الفطريات، أو يُفقد بالتبخر إذا كان لأنبوب العينة فراغ هوائي كبير أو لم يكن محكم الغلق. كما يوجد احتمال لانتشار الإيثانول من بقايا المعدة أو الممرات الهوائية الملوثة بالقيء إلى الدم، خاصة الدم في الأوعية المركزية مثل الوريد الأجوف.

في حالات التعفن (**putrefaction**) أو الإصابة الشديدة للجسم أو تأخر الصفة التشريحية لعدة أيام، يُنصح بتحليل الدم المأخوذ من وعاء محيطي، وعينات البول، والخلط الزجاجي للعين (**vitreous humour**) (**Pounder, 1998**). كما تم تأييد استخدام العضلات الهيكلية كعينة إضافية.

يوفر الجلوكوز واللاكتات في الدم ركيزة (**substrates**) لإنتاج الإيثانول ميكروبياً، بينما لا تتوفر هذه المركبات عادةً في الخلط الزجاجي أو البول (إلا في بول مرضى السكري)، كما أن الخلط الزجاجي محمي جيداً من التسلل البكتيري بعد الوفاة. لذا، فإن تحليل هذه السوائل الأخيرة يمكن أن يوفر معلومات مؤكدة هامة. ومع ذلك، أظهرت الدراسات أن نسب توزيع الإيثانول (الخلط الزجاجي/دم الوريد الفخذي) تظهر تبايناً واسعاً، لذا يجب الحذر عند محاولة تقدير تركيز الإيثانول في الدم بناءً على الخلط الزجاجي؛ ويعتبر تقسيم تركيز الخلط الزجاجي على اثنين تقديراً متحفظاً لتركيز دم الوريد الفخذي.

يمكن أيضاً إجراء قياس للبيوتانول ونواتج التخمير الأخرى، وإجراء تحليل ميكروبيولوجي للعينة للمساعدة في تقييم أي تغيرات تعفنية. وقد أُوصي باستخدام "2-ميثيل-2-بروبانول" (**tert-butanol**) كمعيار داخلي (**internal standard**) في مقايسة الإيثانول بواسطة **GC** لأنه من غير المحتمل إنتاجه عن طريق التعفن (**Wigmore, 1993**).

إن إضافة تركيزات عالية من الفلوريد (على الأقل 0.5% وزن/حجم) إلى الدم أثناء الحياة سيثبط الأيض الميكروبي ويمنع أي تغيير إضافي في عينات ما بعد الوفاة. تتوفر في المملكة المتحدة أنابيب تحتوي على الفلوريد مصممة خصيصاً للعمل الجنائي، وتشمل حاويات للبول والدم تضمن وصول تركيز فلوريد الصوديوم إلى 0.7-1.0% عند ملئها. ومع ذلك، يجب تذكر العواقب التحليلية المحتملة للفلوريد المضاف، مثل ظاهرة "التمليح" (**salting out**) عند استخدام تقنية (**HS-GC**) وتثبيط المقايسات الإنزيمية للإيثانول.

يعد **إيثيل غلوكورونيد** (**Ethyl glucuronide**) مستقلباً غير متطاير، وقابلاً للذوبان في الماء، ومستقراً للإيثانول، ويمكن اكتشافه وقياسه في سوائل الجسم لفترة من الوقت بعد أن يصبح الإيثانول غير قابل للكشف (**Wurst et al., 2000**). كما أنه يترسب في الشعر ويمكن استخدامه لمراقبة الامتناع عن الشرب (**abstinence**)، على سبيل المثال. تم قياس إيثيل غلوكورونيد في سوائل وأنسجة ما بعد الوفاة، على الرغم من عدم وجود تطبيق واضح لهذا التحليل الأخير حتى الآن.

الهيروين والمورفين (Heroin/morphine)

إن استقلاب الهيروين معقد، ومن المهم أن نكون واضحين بشأن ما تم قياسه في عينات الدم أو البول أو العينات البيولوجية الأخرى، لأن ذلك يؤثر بشكل مباشر على تفسير النتائج. يستقلب الهيروين بسرعة كبيرة إلى **6-مونوأسيتيل مورفين** (**6-MAM**)، والذي يمتلك نصف عمر بلازمي يتراوح بين 5 إلى 25 دقيقة فقط، ويتم اكتشافه أحياناً في العينات البيولوجية.

يوفر الكشف عن **6-MAM** دليلاً قاطعاً على استخدام الهيروين، لأنه لا ينتج عن المورفين (**Beck and Böttcher, 2006**). أما **المورفين**، وهو ناتج استقلاب **6-MAM**، فلديه نصف عمر بلازمي أطول بكثير (2-3 ساعات) من **6-MAM**، وعادة ما يكون هو المركب الذي يتم اكتشافه بعد تعاطي الهيروين. وتجدر الإشارة إلى أن المورفين متاح أيضاً كمستحضر صيدلاني للاستخدام الفموي أو الحقني، وللهيروين و **6-MAM** والمورفين سمية متماثلة.

يحتوي الهيروين غير المشروع عادة على بعض **3-أسيتيل كودايين** (**3-acetylcodeine**) المشتق من الكودايين الموجود في الأفيون. يستقلب **3-أسيتيل كودايين** إلى كودايين في الجسم، لكن الكميات الموجودة في الدم بعد استخدام الهيروين عادة ما تكون ضئيلة مقارنة بكميات **6-MAM** والمورفين الموجودة.

يُستقلب المورفين والكودايين بشكل أساسي عن طريق الاقتران (**conjugation**) لإنتاج مشتقات غير نشطة (**morphine-3-glucuronide** و **codeine-3-glucuronide**)، والتي تفرز في البول. كما تُستقلب نسبة صغيرة نسبياً من جرعة الهيروين/المورفين إلى **مورفين-6-غلوكورونيد** (**morphine-6-glucuronide**)، وهو نشط فارماكولوجياً، ولكن يُعتقد أنه يساهم في سمية المورفين فقط عندما يُعطى الدواء لمرضى يعانون من فشل كلوي. كما يمكن تحويل كمية صغيرة من الكودايين إلى مورفين داخل الجسم.

تنعكس مشكلات إثبات استخدام الأفيونات غير المشروعة في عدد من المناهج المختلفة التي تم تأييدها، وتشمل هذه المناهج نسبة المورفين إلى الكودايين في الدم، ووجود مركبات إضافية مشتقة من الأفيون مثل:

1. أسيتيل كودايين (**acetylcodeine**).
2. ميكونين (**meconin**).
3. مستقلبات النوسكابين (**noscapine metabolites**).

4. مستقلبات البابافيرين (**papaverine metabolites**).
5. ريتيكولين (**reticuline**).

بعيداً عن الفشل الكلوي، تعتمد السمية الحادة للهيروين/المورفين بشكل كبير على:

- **الجرعة.**
- **التعرض السابق المباشر للمريض للمنبهات الأفيونية:** حيث يمكن للأشخاص تحمل جرعات أعلى بكثير إذا كانوا يتناولون مثل هذه الأدوية خلال الأيام القليلة الماضية (ظاهرة التحمل).
- **طريقة التعاطي:** حيث تعد الجرعات الوريدية (**i.v.**) أخطر بكثير من استنشاق الأبخرة أو الحقن العضلي (**i.m.**).
- **نقاء الخليط المحقون.**
- **وجود أدوية أخرى تعمل مركزياً:** مثل الإيثانول أو الميثادون.

يجب على أي تفسير لبيانات المورفين بعد الوفاة أن يضع هذه العوامل في الاعتبار. ولأن سمية المورفين ترجع إلى تثبيط مركز التنفس، فإن المريض الذي يتم الإبقاء عليه عبر التهوية الميكانيكية (**mechanical ventilation**) قد يتحمل جرعة كانت ستكون قاتلة لولا ذلك. قد يؤدي هذا إلى اشتباه خاطئ في وجود جرعة زائدة من المورفين إذا توفي المريض لاحقاً ولم يكن السبب المباشر للوفاة واضحاً في البداية.

تقليدياً، تتوفر المقايسات المناعية (**immunoassays**) التي تقيس "المورفين الكلي" (أي مستقبات المورفين، وأساساً مشتق "3-غلوكورونيد" غير النشط). وتكمن ميزة ذلك في أنه إذا استُخدمت مع نتيجة المورفين "الحر" (غير المقترن **unconjugated**)، يمكن الحصول على تصور عن حجم جرعة الهيروين/المورفين. فإذا كان المورفين الكلي منخفضاً نسبياً مقارنة بالمورفين الحر، فقد يشير ذلك إلى أن الوفاة حدثت بسرعة كبيرة بعد تعاطي الهيروين/المورفين. بينما إذا كان المورفين الكلي مرتفعاً والمورفين الحر منخفضاً، فقد يشير ذلك إلى أن الوفاة لم تكن بسبب تعاطي المورفين مباشرة، ما لم تكن هناك عوامل ثانوية مثل تلف الدماغ الناجم عن نقص الأكسجين (**hypoxic brain damage**) قد تداخلت في الأمر.

بالطبع هناك العديد من السيناريوهات المحتملة، ولكن بشكل عام، يجب قياس كل من المورفين الحر والكلي. بالإضافة إلى ذلك، ينبغي إجراء القياسات في الدم والبول (إذا كان متاحاً) وربما في سوائل أخرى، حيث أن النتائج من هذه العينات المختلفة غالباً ما توفر معلومات تكميلية تساعد في التفسير السريري. فعلى سبيل المثال، وجود تركيزات منخفضة من المورفين الحر (أقل من **1 ملجم/لتر**) في بول ما بعد الوفاة في حالة يُشتبه بارتباطها بالهيروين يشير بقوة إلى أن الوفاة حدثت بعد فترة وجيزة من جرعة الهيروين. وتجدر الإشارة إلى أن تركيزات المورفين الحر في دم القلب (البطيني) تكون دائماً أعلى منها في المواقع المحيطية، خاصة عند التركيزات التي تزيد عن **0.3 ملجم/لتر**، ولكن يبدو أن هناك تغيراً طفيفاً مع مرور الوقت بين الوفاة والحصول على عينة الدم سواء من المواقع المركزية أو المحيطية (**Logan and Smirnow, 1996**).

العوامل الخافضة لسكر الدم (Hypoglycaemic agents)

إذا اشتُبه في حقن جرعة زائدة من الأنسولين أو إعطائه لغير مرضى السكري، فيجب سحب الدم في أسرع وقت ممكن بعد الوفاة، وفصل المصل وتجميده تجميداً عميقاً للتحليل اللاحق للأنسولين و**ببتيد C** (**C-peptide**). ومع ذلك، غالباً ما يكون التفسير ذو المعنى لتركيزات الأنسولين في المصل لدى مرضى السكري المعتمدين على الأنسولين غير ممكن. كما أن تركيزات الجلوكوز في الدم تنخفض عموماً بسرعة بعد الوفاة، وهي مؤشر غير موثوق به لحالة الجلوكوز قبل الوفاة.

الميثادون (Methadone)

كما هو الحال مع الهيروين والمورفين، قد يصعب تفسير تركيزات الميثادون في دم ما بعد الوفاة، خاصة إذا كان هناك تاريخ من الاستخدام السابق للميثادون أو الأفيونات الأخرى و/أو وجود أدوية أخرى (**Milroy and Forrest, 2000**). وتعتبر السمية المتأخرة، خاصة أثناء الليل، سمة من سمات التسمم بهذا المركب، مما قد يزيد من تعقيد تفسير النتائج (**Wolff, 2002**).

إن الوفيات الناجمة عن الميثادون لدى الأطفال ولدى الأشخاص الذين سبق لهم التعرض للأفيونات ولكنهم فقدوا "التحمل" (**tolerance**) ليست غير شائعة. إن مراقبة المستقلب الرئيسي للميثادون، وهو **EDDP**، في البول لا يوفر دليلاً على الالتزام بالعلاج بالميثادون فحسب، بل يحمي أيضاً من قيام الأفراد غير الملتزمين بإضافة الميثادون إلى عينة بول "خالية" من أجل الاستمرار في الحصول على وصفة طبية للدواء بقصد تزويد أشخاص آخرين به.

الإكستاسي (MDMA) والمركبات ذات الصلة

لا ترتبط الوفيات المرتبطة باستخدام الـ **MDMA** (المعروف بـ "إكستاسي" أو "XTC") بشكل واضح بالجرعة، وغالباً ما ترتبط بتناول الكحول و/أو عقاقير أخرى غير مشروعة. أما الوفيات المنسوبة إلى مركبات **MDA** و **MDEA** وغيرها من المركبات ذات الصلة فهي نادرة نسبياً (**Schifano et al., 2003**). ومن المهم في حالات الوفاة المشتبه بارتباطها بالـ **MDMA** تحليل ليس فقط الدم، بل والبول ومحتويات المعدة أيضاً إذا كانت متاحة، والبحث عن عقاقير أخرى بجانب الـ **MDMA**.

إساءة استخدام المواد المتطايرة (VSA)

(Volatile substance abuse) من الأهمية بمكان مراعاة كافة الأدلة الظرفية وغيرها في حالات الوفاة المفاجئة المرتبطة باحتمال إساءة استخدام المواد المتطايرة (مثل "استنشاق الغراء" أو تعاطي المذيبات)، خاصة إذا كان التعرض المشروع لأبخرة المذيبات أمراً وارداً (**Flanagan et al., 1997**). يجب جمع عينة الدم في أنبوب زجاجي مزود بغطاء مبطن بورق الألومنيوم ومع تقليل الفراغ العلوي (**headspace**) إلى أدنى حد ممكن.

يمكن أن يشير قياس المستقلبات البولية للتولوين (**toluene**)، والزايلين (**xylene**)، وثلاثي كلورو إيثيلين (**trichloroethylene**) إلى حدوث التعرض. كما قد تكون عينات الأنسجة (5 جم من الدماغ، الرئة، الدهون، الكبد، الكلية، الطحال) مفيدة أيضاً، لا سيما إذا كان التعفن قد بدأ. يجب نقل العينات في درجة حرارة 4 أو 20- مئوية. ومع المواد شديدة التطاير مثل "البيوتان" المستخلص من عبوات إعادة ملء ولاعات السجائر (وهو خليط من البروبان والبيوتان والأيزوبيوتان)، والتي تكون غازات في درجة حرارة الغرفة، يمكن إجراء تحديد الهوية وبالتالي تأكيد التعرض، ولكن القياس الكمي غالباً ما يكون غير عملي، حتى في الدم، ما لم تُتخذ احتياطات خاصة جداً.

ملخص (Summary)

يجب أخذ جميع الأدلة المتاحة في الاعتبار عند التحقيق في أي وفاة أو حادثة أخرى يُشتبه فيها بوقوع تسمم. إن المعرفة الشاملة بالظروف المحيطة، والتسلسل الزمني، والملاحظات السريرية أو ملاحظات ما بعد الوفاة، والسموم المحتمل تداخلها، وخصائصها السمومية وأيضها، هي أمور بالغة الأهمية. يمكن للتحليل السمومي أن يقدم دليلاً موضوعياً على التعرض وحجم هذا التعرض.

تتمثل العوامل التي قد تساعد في تفسير نتائج سموم دم ما بعد الوفاة في توفر:

1. عينات ما قبل الوفاة (**antemortem samples**) (دم كامل أو بلازم/مصل).
2. بيانات مراقبة الأدوية العلاجية الروتينية (**TDM data**).

وحتى في حالة توفر هذه البيانات "الأساسية" (**baseline**)، يجب إجراء المقارنة مع بيانات ما بعد الوفاة مع العلم بالتأثيرات المحتملة للوقت المنقضي منذ الوفاة، وموقع جمع عينة الدم، واستقرار المادة التحليلية، من بين عوامل أخرى. علاوة على ذلك، غالباً ما تُقاس عينات الـ **TDM** قبل الجرعة مباشرة (تركيزات "القاع" **trough concentrations**)، بينما تُؤخذ عينات التحليل السمومي عادةً دون اعتبار للوقت المنقضي منذ آخر جرعة.

إن قياس المستقلبات الرئيسية في الدم أمر مهم، ولو لضمان عدم قياسها كمياً مع الدواء الأم بالخطأ، كما أن نسبة "الدواء إلى المستقلب" (**drug:metabolite ratio**) في الدم قد تشير إلى ما إذا كان التعرض حاداً أم مزمنًا. وأخيراً، فإن تحليل السوائل و/أو الأنسجة الأخرى قد يوفر معلومات مفيدة إضافية للوصول إلى النتيجة النهائية.

المراجع (References)

Apple, F. S. (1989). Postmortem tricyclic antidepressant concentrations: Assessing cause of death using parent drug to metabolite ratio. Journal of Analytical Toxicology, 13(3), 197–198.

Bachs, L., & Morland, H. (2001). Acute cardiovascular fatalities following cannabis use. Forensic Science International, 124(2-3), 200–203.

Bailey, D. G., Malcolm, J., Arnold, O., & Spence, J. D. (1998). Grapefruit juice-drug interactions. British Journal of Clinical Pharmacology, 46(2), 101–110.

Beck, O., & Böttcher, M. (2006). Paradoxical results in urine drug testing for 6-acetylmorphine and total opiates: Implications for best analytical strategy. Journal of Analytical Toxicology, 30(2), 73–79.

Bernstein, G., Jehle, D., Bernaski, E., & Braen, G. R. (1992). Failure of gastric emptying and charcoal administration in fatal sustained-release theophylline overdose: Pharmacobezoar formation. Annals of Emergency Medicine, 21(11), 1388–1390.

Bogusz, M. J., al Tufail, M., & Hassan, H. (2002). How natural are 'natural herbal remedies'? A Saudi perspective. Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews, 21(4), 219–229.

Buratti, S., & Lavine, J. E. (2002). Drugs and the liver: Advances in metabolism, toxicity, and therapeutics. Current Opinion in Pediatrics, 14(5), 601–607.

Burns, M. J. (2001). The pharmacology and toxicology of atypical antipsychotic agents. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 39(1), 1–14.

Caraco, Y. (2004). Genes and the response to drugs. The New England Journal of Medicine, 351(27), 2867–2869.

Chiou, W. L. (1989a). The phenomenon and rationale of marked dependence of drug concentration on blood sampling site. Implications in pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicology and therapeutics (Part I). Clinical Pharmacokinetics, 17(3), 175–199.

Chiou, W. L. (1989b). The phenomenon and rationale of marked dependence of drug concentration on blood sampling site. Implications in pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicology and therapeutics (Part II). Clinical Pharmacokinetics, 17(4), 275–290.

Corns, C. M. (2003). Herbal remedies and clinical biochemistry. Annals of Clinical Biochemistry, 40(5), 489–507.

Cox, D. E., Sadler, D. W., & Pounder, D. J. (1997). Alcohol estimation at necropsy. Journal of Clinical Pathology, 50(3), 197–201.

Cummins, C. L., Wu, C. Y., & Benet, L. Z. (2002). Sex-related differences in the clearance of cytochrome P450 3A4 substrates may be caused by P-glycoprotein. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 72(5), 474–489.

Dalpe-Scott, M., Degouffe, M., Garbutt, D., & Drost, M. (1995). A comparison of drug concentrations in postmortem cardiac and peripheral blood in 320 cases. Canadian Society of Forensic Science Journal, 28(2), 113–121.

Druid, H., & Holmgren, P. (1997). A compilation of fatal and control concentrations of drugs in postmortem femoral blood. Journal of Forensic Sciences, 42(1), 79–87.

Drummer, O. H. (2004). Postmortem toxicology of drugs of abuse. Forensic Science International, 142(2-3), 101–113.

Drummer, O. H., & Gerostamoulos, J. (2002). Postmortem drug analysis: Analytical and toxicological aspects. Therapeutic Drug Monitoring, 24(2), 199–209.

Evans, D. A. P., Manley, K. A., & McKusik, K. V. (1960). Genetic control of isoniazid metabolism in man. British Medical Journal, 2(5197), 485–491.

Flanagan, R. J., Amin, A., & Seinen, W. (2003). Effect of postmortem changes on peripheral and central whole blood and tissue clozapine and norclozapine concentrations in the domestic pig (Sus scrofa). Forensic Science International, 132(1), 9–17.

Flanagan, R. J., Spencer, E. P., Morgan, P. E., Barnes, T. R. E., & Dunk, L. (2005). Suspected clozapine poisoning in the UK/Eire, 1992–2003. Forensic Science International, 155(2-3), 91–99.

Flanagan, R. J., Streete, P. J., & Ramsey, J. D. (1997). Volatile substance abuse: Practical guidelines for analytical investigation of suspected cases and interpretation of results. United Nations International Drug Control Programme. http://www.undcp.org/odccp/technical_series_1997-01-01_1.html

Forrest, A. R. W. (1993). Obtaining samples at postmortem examination for toxicological and biochemical analysis. Journal of Clinical Pathology, 46(4), 292–296.

Fraser, A. D., Coffin, L., & Worth, D. (2002). Drug and chemical metabolites in clinical toxicology investigations: The importance of ethylene glycol, methanol and cannabinoid metabolite analyses. Clinical Biochemistry, 35(7), 501–511.

Fuke, C., Berry, C. L., & Pounder, D. J. (1996). Postmortem diffusion of ingested and aspirated paint thinner. Forensic Science International, 78(3), 199–207.

Furuta, T., Ohashi, K., Kamata, T., Takashima, M., Kosuge, K., Kawasaki, T., Hanai, H., Kubota, T., Ishizaki, T., & Kaneko, E. (1998). Effect of genetic differences in omeprazole metabolism on cure rates for Helicobacter pylori infection and peptic ulcer. Annals of Internal Medicine, 129(12), 1027–1030.

Gasche, Y., Daali, Y., Fathi, M., Chiappe, A., Cottini, S., Dayer, P., & Desmeules, J. (2004). Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 metabolism. The New England Journal of Medicine, 351(27), 2827–2831. (Erratum in N Engl J Med, 352, 638).

Gill, R., Hatchett, S. E., Osselton, M. D., Wilson, H. K., & Ramsey, J. D. (1988). Sample handling and storage for the quantitative analysis of volatile compounds in blood: The determination of toluene by headspace gas chromatography. Journal of Analytical Toxicology, 12(3), 141–146.

Gupta, B. D., Jani, C. B., & Shah, P. H. (2001). Fatal 'Bhang' poisoning. Medicine, Science and the Law, 41(4), 349–352.

Harris, R. Z., Benet, L. Z., & Schwartz, J. B. (1995). Gender effects in pharmacokinetics and pharmacodynamics. Drugs, 50(2), 222–239.

Health and Safety Executive. (2005). EH40/2005: Occupational exposure limits 2005. HSE Books.

Hearn, W. L., Keran, E. E., Wei, H. A., & Hime, G. (1991). Site-dependent postmortem changes in blood cocaine concentrations. Journal of Forensic Sciences, 36(3), 673–84.

Hernandez, A., Andollo, W., & Hearn, W. L. (1994). Analysis of cocaine and metabolites in brain using solid phase extraction and full-scanning gas chromatography/ion trap mass spectrometry. Forensic Science International, 65(3), 149–156.

Ingelman-Sundberg, M. (2004). Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: The past, present and future. Trends in Pharmacological Sciences, 25(4), 193–200.

Israili, Z. H., & Dayton, P. G. (2001). Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. Drug Metabolism Reviews, 33(2), 161–235.

Jannetto, P. J., Wong, S. H., Gock, S. B., Laleli-Sahin, E., Schur, B. C., & Jentzen, J. M. (2002). Pharmacogenomics as molecular autopsy for postmortem forensic toxicology: Genotyping cytochrome P450 2D6 for oxycodone cases. Journal of Analytical Toxicology, 26(7), 438–447.

Jatlow, P., Dobular, K., & Bailey, D. (1979). Serum diazepam concentrations in overdose: Their significance. American Journal of Clinical Pathology, 72(4), 571–577.

Jones, A. W., & Holmgren, P. (2001). Uncertainty in estimating blood ethanol concentrations by analysis of vitreous humour. Journal of Clinical Pathology, 54(9), 699–702.

Jones, A. W., & Pounder, D. J. (1998). Measuring blood alcohol concentration for clinical and forensic purposes. In S. Karch (Ed.), Drug Abuse Handbook (pp. 327–356). CRC Press.

Kathiramalainathan, K., Kaplan, H. L., Romach, M. K., Busto, U. E., Li, N. Y., Sawe, J., Tyndale, R. F., & Sellers, E. M. (2000). Inhibition of cytochrome P450 2D6 modifies codeine abuse liability. Journal of Clinical Psychopharmacolology, 20(4), 435–444.

Kerrigan, S. (2002). In vitro production of gamma-hydroxybutyrate in antemortem urine samples. Journal of Analytical Toxicology, 26(8), 571–574.

Kintz, P., Villain, M., & Cirimele, V. (2006). Hair analysis for drug detection. Therapeutic Drug Monitoring, 28(3), 442–446.

Klotz, U., Avant, G. R., Hoyumpa, A., Schenker, S., & Wilkinson, G. R. (1975). The effects of age and liver disease on the disposition and elimination of diazepam in adult man. The Journal of Clinical Investigation, 55(2), 347–359.

Koren, G., Cairns, J., Chitayat, D., Gaedigk, A., & Leeder, S. J. (2006). Pharmacogenetics of morphine poisoning in a breastfed neonate of a codeine-prescribed mother. The Lancet, 368(9536), 704.

Koski, A., Ojanperä, I., & Vuori, E. (2003). Interaction of alcohol and drugs in fatal poisonings. Human & Experimental Toxicology, 22(5), 281–287.

Krishna, S., & White, N. J. (1996). Pharmacokinetics of quinine, chloroquine and amodiaquine: Clinical implications. Clinical Pharmacokinetics, 30(4), 263–299.

Kugelberg, F. C., & Jones, A. W. (2007). Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: A review of the literature. Forensic Science International, 165(1), 10–29.

Lane, E. A., Guthrie, S., & Linnoila, M. (1985). Effects of ethanol on drug and metabolite pharmacokinetics. Clinical Pharmacokinetics, 10(3), 228–247.

Langford, A. M., & Pounder, D. J. (1997). Possible markers for postmortem drug redistribution. Journal of Forensic Sciences, 42(1), 88–92.

Leikin, J. B., & Watson, W. A. (2003). Post-mortem toxicology: What the dead can and cannot tell us. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 41(1), 47–56.

Lennard, L., & Lilleyman, J. S. (1996). Individualizing therapy with 6-mercaptopurine and 6-thioguanine related to the thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. Therapeutic Drug Monitoring, 18(4), 328–334.

Levo, A., Koski, A., Ojanperä, I., Vuori, E., & Sajantila, A. (2003). Post-mortem SNP analysis of CYP2D6 gene reveals correlation between genotype and opioid drug (tramadol) metabolite ratios in blood. Forensic Science International, 135(1), 9–15.

Logan, B. K., & Smirnow, D. (1996). Postmortem distribution and redistribution of morphine in man. Journal of Forensic Sciences, 41(2), 221–229.

Logan, B. K., Smirnow, D., & Gullberg, R. G. (1997). Lack of predictable site-dependent differences and time-dependent changes in postmortem concentrations of cocaine, benzoylecgonine, and cocaethylene in humans. Journal of Analytical Toxicology, 21(1), 23–31.

Logan, B. K., Weiss, E. L., & Harruff, R. C. (1996). Case report: Distribution of methamphetamine in a massive fatal ingestion. Journal of Forensic Sciences, 41(2), 322–323.

Martin, A., & Pounder, D. J. (1992). Post-mortem toxico-kinetics of trazodone. Forensic Science International, 56(2), 201–207.

McCarthy, R. H. (1994). Seizures following smoking cessation in a clozapine responder. Pharmacopsychiatry, 27(5), 210–211.

McIntyre, L. M., King, C. V., Boratto, M., & Drummer, O. H. (2000). Post-mortem drug analyses in bone and bone marrow. Therapeutic Drug Monitoring, 22(1), 79–83.

McKinney, P. E., Phillips, S., Gomez, H. F., Brent, J., MacIntyre, M., & Watson, W. A. (1995). Vitreous humor cocaine and metabolite concentrations: Do postmortem specimens reflect blood levels at the time of death? Journal of Forensic Sciences, 40(1), 102–107.

Milroy, C. M., & Forrest, A. R. (2000). Methadone deaths: A toxicological analysis. Journal of Clinical Pathology, 53(4), 277–281.

Moriya, F., & Hashimoto, Y. (1996). Postmortem stability of cocaine and cocaethylene in blood and tissues of humans and rabbits. Journal of Forensic Sciences, 41(4), 612–616.

Moriya, F., & Hashimoto, Y. (1999). Redistribution of basic drugs into cardiac blood from surrounding tissues during early-stages postmortem. Journal of Forensic Sciences, 44(1), 10–16.

Poggio, E. D., Wang, X., Greene, T., Van Lente, F., & Hall, P. M. (2005). Performance of the modification of diet in renal disease and Cockcroft-Gault equations in the estimation of GFR in health and in chronic kidney disease. Journal of the American Society of Nephrology, 16(2), 459–466.

Pounder, D. J. (1998). Dead sober or dead drunk? British Medical Journal, 316(7125), 87.

Pounder, D. J., Adams, E., Fuke, C., & Langford, A. M. (1996b). Site to site variability of postmortem drug concentrations in liver and lung. Journal of Forensic Sciences, 41(6), 927–932.

Pounder, D. J., & Davies, J. I. (1994). Zopiclone poisoning: Tissue distribution and potential for postmortem diffusion. Forensic Science International, 65(3), 177–183.

Pounder, D. J., Fuke, C., Cox, D. E., Smith, D., & Kuroda, N. (1996a). Postmortem diffusion of drugs from gastric residue: An experimental study. The American Journal of Forensic Medicine and Pathology, 17(1), 1–7.

Proudfoot, A. T., Stewart, M. J., Levitt, T., & Widdop, B. (1979). Paraquat poisoning: Significance of plasma paraquat concentrations. The Lancet, 314(8138), 330–332.

Prouty, R. W., & Anderson, W. H. (1987). A comparison of postmortem heart blood and femoral blood ethyl alcohol concentrations. Journal of Analytical Toxicology, 11(5), 191–197.

Rao, Y., Hoffmann, E., Zia, M., Bodin, L., Zeman, M., Sellers, E. M., & Tyndale, R. F. (2000). Duplications and defects in the CYP2A6 gene: Identification, genotyping, and in vivo effects on smoking. Molecular Pharmacology, 58(4), 747–755.

Rostami-Hodjegan, A., Amin, A. M., Spencer, E. P., Lennard, M. S., Tucker, G. T., & Flanagan, R. J. (2004). Influence of dose, cigarette smoking, age, sex, and metabolic activity on plasma clozapine concentrations: A predictive model and nomograms to aid clozapine dose adjustment and to assess compliance in individual patients. Journal of Clinical Psychopharmacology, 24(1), 70–78.

Schifano, F., Oyefeso, A., Corkery, J., Cobain, K., Jambert-Gray, R., Martinotti, G., & Ghodse, A. H. (2003). Death rates from ecstasy (MDMA, MDA) and polydrug use in England and Wales 1996–2002. Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental, 18(7), 519–524.

Selavka, C. M., & Rieders, F. (1995). The determination of cocaine in hair: A review. Forensic Science International, 70(1-3), 155–164.

Skopp, G. (2004). Preanalytic aspects in postmortem toxicology. Forensic Science International, 142(2-3), 75–100.

Tanaka, E. (2003). Toxicological interactions involving psychiatric drugs and alcohol: An update. Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics, 28(2), 81–95.

Tanaka, E. (2002). Toxicological interactions between alcohol and benzodiazepines. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 40(1), 69–75.

Toennes, S. W., & Kauert, G. F. (2001). Importance of vacutainer selection in forensic toxicological analysis of drugs of abuse. Journal of Analytical Toxicology, 25(5), 339–343.

Verstraete, A. G. (2004). Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid. Therapeutic Drug Monitoring, 26(2), 200–205.

Visapää, J. P., Tillonen, J. S., Kaihovaara, P. S., & Salaspuro, M. P. (2002). Lack of disulfiram-like reaction with metronidazole and ethanol. Annals of Pharmacotherapy, 36(6), 971–974.

Vorpahl, T. E., & Coe, J. I. (1978). Correlation of antemortem and postmortem digoxin levels. Journal of Forensic Sciences, 23(2), 329–334.

Vree, T. B., van Dongen, R. T., & Koopman-Kimenai, P. M. (2000). Codeine analgesia is due to codeine-6-glucuronide, not morphine. International Journal of Clinical Practice, 54(6), 395–398.

Wennig, R. (2000). Potential problems with the interpretation of hair analysis results. Forensic Science International, 107(1-3), 5–12.

Wigmore, J. G. (1993). The distribution of ethanol in postmortem blood samples. Journal of Forensic Sciences, 38(5), 1019–1021.

Williams, M. L., & Wainer, I. W. (2002). Role of chiral chromatography in therapeutic drug monitoring and in clinical and forensic toxicology. Therapeutic Drug Monitoring, 24(2), 290–296.

Wolff, K. (2002). Characterization of methadone overdose: Clinical considerations and the scientific evidence. Therapeutic Drug Monitoring, 24(4), 457–470.

Wurst, F. M., Kempter, C., Metzger, J., Seidl, S., & Alt, A. (2000). Ethyl glucuronide: A marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications. Alcohol, 20(2), 111–116.

Yates, C. R., Zhang, W., Song, P., Li, S., Gaber, A. O., Kotb, M., Honaker, M. R., Alloway, R. R., & Meibohm, B. (2003). The effect of CYP3A5 and MDR1 polymorphic expression on cyclosporine oral disposition in renal transplant patients. The Journal of Clinical Pharmacology, 43(6), 555–564.

Yonemitsu, K., & Pounder, D. J. (1993). Postmortem changes in blood tranylcypromine concentration: Competing redistribution and degradation effects. Forensic Science International, 59(2), 177–184.

دار السعيد للطباعة والنشر
Al-Saeed Publishing & Printing House

نبذة عن الكتاب

جاء إعداد هذا الكتاب استجابةً للحاجة إلى مرجع عربي أكاديمي يجمع بين الأسس النظرية والتطبيقات المختبرية والتقنيات التحليلية الحديثة. ويضم الكتاب عشرين فصلًا تتناول سلامة العينات وسلاسل الحيازة، وطرائق استخلاص السموم وعزلها، وتقنيات الكروماتوغرافيا والرحلان الكهربائي، والتحليل الطيفي ومطيافية الكتلة، فضلًا عن تحليل المعادن والمواد المتطايرة والسموم الطبيعية والأدوية والمقايسات المناعية والتفسير السريري للنتائج.

About the Book

This book was prepared in response to the need for an academic Arabic reference that integrates theoretical foundations, laboratory applications, and modern analytical techniques. It comprises twenty chapters covering sample integrity and chains of custody; methods for toxin extraction and isolation; chromatography and electrophoresis techniques; spectroscopy and mass spectrometry; as well as the analysis of metals, volatile substances, natural toxins, and pharmaceuticals, alongside immunoassays and the clinical interpretation of results.

حقوق الطبع محفوظة لدى دار السعيد للطباعة والنشر – جامعة السعيد، تعز – اليمن.
Copyrights Preserved at Al-Saeed Printing & Publishing House, Al-Saeed University, Taiz – Yemen

967-9543-1-2314-10

سلسلة الكتب والمناهج الأكاديمية