البـــاب الرابـــع

تحـــــليل الرمـــــــاد

أ.د/ إبراهيم محمد حسن
أستاذ علوم وتكنولوجيا الأغذية
كلية الزراعة جامعة عين شمس

البـــــاب الرابـــــــــع

4. تحليل الرمـــــــاد *Ash Analysis*

1.4. مقدمـــــــــة :

الرماد ***Ash*** هو الجزء غير العضوى المتبقى بعد الحرق أوالأكسدة الكاملة للمواد العضوية فى المادة الغذائية . وبرغم بساطة وسهولة تقدير الرماد إلا أنه للحصول على نتائج دقيقة ومؤكدة لنسبته فى المواد الغذائية يجب أن يكون الشخص القائم بالتحليل على دراية كاملة بالطرق المختلفة لتقدير الرماد ، وأسباب إستخدام طريقة تقدير معينة دون الأخرى ، وكذلك أنواع أجهزة التحليل المختلفة ، وأسلوب الممارسة العملية السليمة أثناء التقدير. وهناك ثلاث طرق أساسية مختلفة لتقدير الرماد فى المواد الغذائية ، فالطريقة الجافة ***dry ashing*** يصلح إستخدامها فى أغلب أنواع العينات الغذائية لتعطى نتائج تقريبية ، ويفضل إستخدام الطريقة الرطبة ***wet ashing*** فى المواد الغذائية ذات المحتوى المرتفع من الدهون (كاللحوم ومنتجاتها) ، أما طريقة البلازما لإنتاج الرماد على درجات حرارة منخفضة فتستخدم أساسا فى عينات المواد الغذائية التى تحتوى على عناصر معدنية سريعة التطاير نسبيا . وهناك أيضا طرقا حديثة لتقدير الرماد مثل طريقة أفران الموجات القصيرة (الميكروويف ***microwave***) .

وبالنسبة لإعداد العينات لتقدير الرماد فيها فلا تحتاج العينات الجافة (كالحبوب والخضروات الجافة) لأى إعداد قبل حرقها ، أما الأغذية المرتفعة فى نسبة الدهون فيفضل أن تجفف مبدئيا ويستخلص منها الدهون قبل حرقها . وعادة يقدر فى الفواكه والخضروات ومنتجاتهم صور الرماد المختلفة سواء القابل للذوبان فى الماء أو الأحماض ، كما يفضل حساب درجة قلويته . وقد يتم التعبير عن نسبة الرماد فى المواد الغذائية على أساس الوزن الرطب أو الجاف . وبالإضافة للتقييم التغذوى لنسب الرماد والعناصر المعدنية فى المواد الغذائية ، يمكن الإستفادة من تقدير الرماد فى حساب نسب الفاكهة فى المنتجات مع السكر (المربى ، الجيلى ، المرملاد والفواكه المسكرة) وكذلك كمقياس للمكونات ، وللكشف عن غش الأغذية بمواد أخرى تتباين معها فى نسب المعادن ، وكذلك قد تكون الـ % للرماد بندا إلزاميا فى مواصفات بعض المواد الغذائية .

2.4. تعـــــاريف *Definitions* :

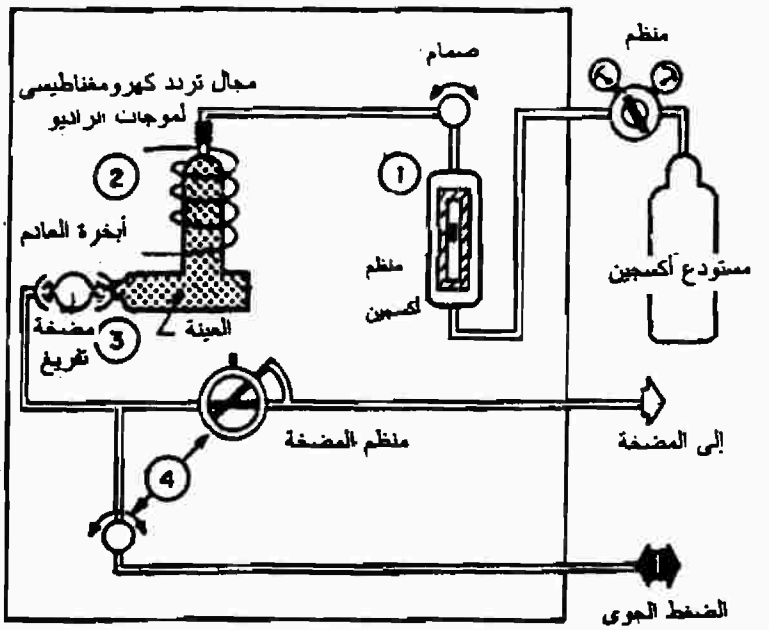
1.2.4. تقدير الرماد بالحرق الجاف *Dry ashing* : حيث يتم حرق العينات فى فرن إحتراق ***muffle furnace*** على درجات حرارة تتراوح بين 500 إلى 600°م ، فيتبخر الماء والمواد الطيارة وتحترق المواد العضوية فى وجود الأكسجين مكونة غازات ثانى أكسيد الكربون وأكاسيد نيتروجينية متطايرة . وتتحول معظم المعادن إلى أكاسيدها ، وكبريتاتها ، وكلوريداتها ، وسليكاتها . هذا وقد تتطاير ، عند إستخدام هذه الطريقة ، بعض المعادن ، جزئيا ، كالحديد ***Fe*** ، السلينيوم ***Se*** ، الرصاص ***Pb*** ، الزئبق ***Hg*** ، ولذلك قد تستخدم طرقا أخرى لإنتاج الرماد إذا ماكانت عملية إنتاج الرماد خطوة إبتدائية للتقدير الكمى للعناصر المعدنية .

2.2.4. تقدير الرماد بالطريقة الرطبة *Wet ashing* : وهى طريقة لأكسدة المواد العضوية بإستخدام الأحماض والمواد المؤكسدة أو مخلوط منهما فتذوب المعادن فى تلك الأحماض دون حدوث تطاير لها . ودائما ما يفضل إنتاج الرماد بالطريقة الرطبة عند الرغبة فى تحليل العناصر المعدنية فى المواد الغذائية . ويفضل عادة إستخدام حامضى النيتريك والبيركلوريك وعندئذ يجب أن تجرى تلك العملية تحت خزانة محكمة تمنع نفاذ الغازات ، كما يجب توخى الحذر عند إستخدام هذه الطريقة فى الأغذية الدهنية نظرا للفوران المحتمل حدوثه للمخلوط .

3.2.4. طريقة البلازما لتقدير الرماد على درجة حرارة منخفضة *Low temperature plasma ashing* : وهى طريقة خاصة من طرق تقدير الرماد بالحرق الجاف ولكن على درجة حرارة منخفضة نسبيا ، وفى تلك الطريقة تؤكسد المادة الغذائية المزمع تقدير الرماد فيها تحت تفريغ جزئى ولكن فى وجود الأكسجين حديث التوليد ***Nascent oxygen*** يتكون فى مجال كهرومغناطيسى . وتتميز هذه الطريقة بتجنب حدوث تطاير لأغلب المعادن التى تتطاير بالحرق الجاف كما تظل التركيبات البللورية لتلك المعادن على حالتها دون تغير يذكر .

ويبين شكل (1.4) رسم تخطيطى لجهاز تقدير الرماد على درجة حرارة منخفضة . حيث يسمح بدخول الأكسجين من وحدة تحدد سرعة سريانه (1) ويمـــر خـــلال مجـــال

كهرومغناطيسى (2) فينتج أكسجين نشط ***excited*** يهاجم العينة موضع التقدير فى غرفة الأكسدة (3) ثم تزال الأبخرة الناجمة عن الأكسدة بواسطة مضخة تفريغ يتم التحكم فيها بصمامات معينة (4) .



شكل (1.4): شكل تخطيطى لجهاز تقدير الرماد على درجة حرارة منخفضة

4.2.4. الرماد غير القابل للذوبان فى الحامض *Acid insoluble ash* : وهى عادة معادن غير ذائبة تأتى من ملوثات الأغذية مثل معادن التربة (كالسليكات) وتذوب تلك المعادن فى بروميد الهيدروجين أو فلوريد الهيدروجين فقط .

5.2.4. قلوية الرمـــــاد *Alkalinity of ash* : وهو مقياس يفيد فى تقدير الإتزان بين الحامض- القلوى فى الأغذية ، وكذلك للكشف عن غش الأغذية بمواد معدنية (أو بمواد أخرى تركيبها المعدنى مختلف) .

3.4. أهمية الرماد فى تحليل الأغذية *Importance of Ash in Food Analysis:*

يمثل الرماد مجموع ما يحتويه الغذاء من مختلف العناصر المعدنية ، وتتلخص أهمية تقدير الرماد فى الأغذية فى الأسباب التالية :

1.3.4. يعتبر الرماد جزءا من مكونات الغذاء وله أيضا قيمته الغذائية .

2.3.4. يمثل تقدير الرماد الكلى خطوة أولى عند إعداد عينات المواد الغذائية لتحليل العناصر المعدنية .

3.3.4. هناك بعض الأغذية المرتفعة فى تركيز بعض العناصر المعدنية بصفة خاصة (كالفوسفور والكالسيوم فى اللبن ، الحديد فى اللحوم ومنتجاتها) لذلك يعتبر محتوى تلك الأغذية من الرماد فى غاية الأهمية .

4.3.4. عادة يكون محتوى المنتجات الحيوانية من العناصر المعدنية ثابتا ، أما المصادر النباتية فقد يكون محتواها من العناصر المعدنية متباينا .

4.4. محتوى الأغذية من الرماد *Ash Contents in Foods :*

يوضح جدول (1.4) محتوى مجموعات الأغذية المختلفة من الرماد ونادرا ما يتجاوز محتوى الأغذية الطازجة من الرماد عن 5% . وعادة لا تحتوى الزيوت والدهون النقية على رماد أو قد تحتوى على تركيزات ضئيلة جدا منه . هذا وقد تحتوى بعض المنتجات مثل السجق المملح ، والأسماك المملحة على نسب رماد تصل إلى 6 % أو ما يربو على ذلك . كما قد تصل نسبة الرماد فى اللحم البقرى المجفف لحوالى 11.6 % (على أساس الوزن الرطب) . وبالإضافة للبيانات التى يوضحها جدول (1.4) عن نسب الرماد فى بعض مجموعات الأغذية نود أن نضيف فى هذا الصدد أن مجموعات الدهون والزيوت والسمن سواء النباتى منها أو الحيوانى تتراوح نسب الرماد فيها ما بين 0.00 إلى 4.09 % ، بينما تتراوح نسب الرماد فى منتجات الألبان المختلفة من 0.5 إلى 5.1 % . أما أنواع الفواكه المختلفة وعصائرها ، وأنواع البطيخ والشمام ، فتتراوح نسب الرماد فيها بين 0.2 إلى 0.6 % بينما تحتوى الفواكه المجففة على نسب أعلى تتراوح بين 2.4 إلى 3.5 % . ويتراوح محتوى الدقيق ومساحيق أنواع الحبوب المختلفة (القمح، الذرة ، الشعير ،...إلخ) ما بين 0.3 إلى 1.4 % فى جنين القمح . وعلى ذلك فإن منتجات

الحبوب المرتفعة فى نسب الردة تزداد فيها نسب الرماد. أما النقليات ومنتجاتها فيتراوح محتواها من الرماد من 0.8 إلى 3.4 % .

جدول (1.4) : محتوى بعض الأغذية من الرماد (محسوبا على أساس الوزن الرطب).

نوع الغذاء	% للرماد	نوع الغذاء	% للرماد
الحبوب ، الخبز ، المكرونة:		منتجات الألبان :	
الأرز (البنى ، الطويل ، الخام)	1.5	اللبن الكامـــــل	0.7
مسحوق الذرة ، الحبة الكاملة ، الذرة الصفراء	1.1	اللبن المكثـــف	1.6
الأرز الأبيض ، الحبوب المطبوخة ، العادى ، الخام ، المدعم	0.6	زبـــد مملـــح	2.1
دقيق القمح ، الحبة الكاملة	1.6	كشدة سائلة ، نصف سائلة	0.7
المكرونة ، الجافة ، المدعمة	2.5	البوجهورت السادة ، ومنخفض الدهن	0.7
اللحوم ، والدواجن ، والأسماك :		الفواكه والخضروات :	
البيـــــض	0.9	تفـــاح	0.3
شرائح السمك ، شرائح السمك المغطاه بالبيض ومسحوق الخبز	2.5	المـــــوز	0.8
الهامبورجر	1.7	الزبيـــب	0.5
لحم الدواجن ، الدواجن المعدة للشى ، لحم صدور الدواجن	1.0	البطاطس غير المقشورة	1.8
لحـــــم بقـــــرى	0.9	الطماطـــــم	1.6

المصدر : قاعدة بيانات العناصر الغذائية التى أصدرتها USDA (أغسطس 1997م).

5.4. طرق تقدير الرماد *Ash determination*

1.5.4. إعداد العينة للتحليل *Sample preparation* :

من الأساسيات التى يجب التأكيد عليها دائما أن تكون العينة المعدة للتحليل ممثلة تماما للمادة الغذائية المزمع تحليلها . وعادة يتراوح وزن العينة المناسب لتقدير الرماد من 2 إلى 10 جم . ولا يجب أن تؤثر عمليات إعداد العينات كالجرش ، الطحن على محتواها من الرماد ، وفى هذا الصدد تجدر الإشارة إنه إذا كان إنتاج الرماد خطوة من خطوات تقدير العناصر المعدنية – يجب أن نتجنب تماما حدوث أى تلوث بعناصر معدنية أخرى .

هذا وقد يكون تكرار إستخدام الزجاجيات من مصادر تلوث العينة أو رمادها بعناصر معدنية أخرى . كذلك ، قد يكون إستخدام الماء فى تخفيف العينات مصدرا للتلوث ولذلك يفضل إستخدام ماء مقطر منزوع الأيونات ***Distilled-deionized water***

2.5.4. المواد النباتية *Plant materials* :

عادة ما تجفف المواد النباتية بالطرق الروتينية العادية قبل تقدير الرماد فيها . وعندئذ لا تكون هناك أهمية لدرجة حرارة تجفيف المواد النباتية ويمكن تجفيفها فى زمن قصير على درجة حرارة عالية (130 - 150°م) . ويمكن تقدير الرماد مباشرة فى المواد النباتية التى يقل محتواها الرطوبى عن 15 % دون حاجة لتجفيفها .

3.5.4. المنتجات الدهنية والسكرية *Fat and Sugar Products* :

تتطلب المنتجات الحيوانية المرتفعة فى نسب الدهون ، أنواع الحلوى المختلفة وكذلك التوابل معاملات خاصة قبل تقدير الرماد فيها ، فإرتفاع محتوى المواد الغذائية من الدهون أو الرطوبة قد يسبب حدوث طرطشة أو إنتفاخ ، وإرتفاع محتواها من السكريات يؤدى لتكوين رغاوى أثناء تقدير الرماد مما قد يسبب حدوث فقدا معنويا فى العينة أثناء التقدير.

فاللحوم ، ومنتجات الحلوى والتوابل يفضل تبخير رطوبتها حتى جفافها سواء فى حمام ماء ساخن أو بمصباح أشعة تحت الحمراء ، هذا وقد تضاف نقطة أو نقطتين من زيت الزيتون الخالى من الرماد للسماح بهروب بخار الماء وتجنب تكون قشرة صلبة على سطح هذه المنتجات أثناء تجفيفها أو تقدير الرماد فيها .

6.4. تقدير الرماد بالطريقة الجافة *Dry ashing*

1.6.4. بعض الأسس والأجهزة والأدوات المستخدمة

Principles and Instrumentation

يتم تقدير الرماد **بالطريقة الجافة** في المواد الغذائية بحرقها على درجة حرارة 525°م أو أعلى في أفران الحرق ***muffle furance*** . وتتباين سعة أفران الحرق بين الوحدات الكبيرة والتي تعمل بفرق جهد من 208 إلى 240 فولت ، والوحدات الصغيرة التي تستخدم في المختبرات الصغيرة وتعمل بفرق جهد 110 فولت فقط .

ويحتاج إختيار البواتق ***Crucibles*** المستخدمة في تقدير الرماد لمعرفة ودراية **بخواصها وصفاتها ودرجة مناسبتها** لتقدير الرماد في مادة غذائية معينة . فبواتق **الكوارتز** مقاومة **للأحماض والهالوجينات** إلا أنها **غير** مقاومة للقلويات وقد تتفاعل معها خاصة عند درجات الحرارة العالية . وهناك أنواع من البواتق مثل النوع ***Vycor*** تتحمل درجات حرارة حتى 900°م ، بينما لايمكن إستخدام أنواع البواتق **البيركس** ***Pyrex Gooch*** إذا ما زادت درجة حرارة تقدير الرماد عن 500°م . ويؤدى إنتاج الرماد على درجات حرارة منخفضة نسبيا (بين 500 – 525°م) إلى **إرتفاع** قيم التقدير وذلك بسبب إنخفاض معدل تحلل الكربونات وتجنب تطاير بعض الأملاح. وتتماثل بواتق **البورسلين** ***Porcelain*** مع بواتق **الكوارتز في** كثير من صفاتها إلا أنها قد تتعرض **للكسر** عند حدوث تغير فجائى (صدمة حرارية) في درجات الحرارة . وعادة يكثر إستخدام بواتق البورسلين لإنخفاض سعرها نسبيا . أما بواتق الصلب ***Steel*** فتقاوم الأحماض والقلويات وتتميز بإنخفاض سعرها إلا أنها تتكون من **الكروم والنيكل** مما يجعلها مصدرا محتملا **لتلوث** الرماد وتغير من تركيبه . أما بواتق **البلاتين** فتتميز بالخمول وتعتبر من أفضل أنواع البواتق إلا أنها تكون مكلفة جدا خاصة إذا كان عدد العينات المرغوب تحليلها كبيرا. ويجب أن يؤخذ في الإعتبار مايلى :

- يجب تعليم أو ترقيم البواتق لتحديد كنه العينة الموضوعة بها ولا يتم تعليم البواتق بأقلام عادية لأنها ستتعرض للمحو أثناء حرق العينات في الفرن . وقد

يتم تعليم البواتق بحبر خاص مع أقلام صلب أو قد يتم خدشها بأقلام أطرافها من الألماس ويكتب عليها بحبر (عبارة عن محلول 0.5 مول كلوريد حديد مذاب فى 20 % حامض هيدروكلوريك).

• يجب تنظيف البواتق جيدا ووضعها فى الأفران قبل إستخدامها فى تقدير الرماد.

ومن أهم مزايا تقدير الرماد بطرق الحرق الجاف ما يلى :

1- تعتبر طريقة آمنة ولا تحتاج لإحتياطات خاصة بعد بدء الحرق .

2- يمكن تداول عدد كبير من البواتق سويا وبذلك يتم تقدير الرماد فى عدد كبير من العينات فى آن واحد .

3- يمكن الإستفادة من الرماد الناتج فى تحليلات أخرى كتقدير العناصر المعدنية المكونة للرماد ، أو بتقدير الرماد غير الذائب فى الأحماض أو بتقدير الرماد الذى يذوب أو لا يذوب فى الماء .

أما أهم عيوب تقدير الرماد بطرق الحرق الجاف فنوجزها فيما يلى :

1- طول الفترة الزمنية اللازمة للحرق الجاف والتى تتراوح بين 12 – 18 ساعة.

2- السعر المرتفع لأفران الحرق ***Muffle furance*** .

3- قد يحدث تطاير لبعض العناصر المعدنية ، كما قد تحدث تفاعلات بين بعض المعادن وبواتق التقدير .

4- من أهم العناصر المحتمل تعرضها للتطاير أثناء الحرق الجاف ما يلى : البورون ***B*** ، الكادميوم ***Cd*** ، الكروم ***Cr*** ، النحاس ***Cu*** ، الحديد ***Fe*** ، الرصاص ***Pb*** ، الزئبق ***Hg*** ، النيكل ***Ni*** ، الفوسفور ***P*** ، الفاناديوم ***V*** ، الزنك ***Zn*** .

7.4. طـــــرق تقدير الرمـــاد *Procedures* :

نشرت الهيئة الرسمية للمحللين الكيميائيين ***AOAC*** عدة طرق لتقدير الرماد فى مرجعها (1995م) تحمل أرقاما ***A ; B*** 900.02 ، 920.117 ، 923.03 تستخدم فى تقدير الرماد بأنواع أغذية مختلفة .

1.7.4. تقدير الرماد بطريقة الحرق الجاف :

ويمكن إيجاز الخطوات العامة لتقدير الرماد فيما يلى :

1- زن من 5 – 10 جم من العينة فى بوتقة رماد ، ويفضل تجفيف العينة خاصة إذا كانت رطوبتها مرتفعة .

2- ضع البواتق فى فرن إحتراق بارد .

3- إحرق عينات المواد الغذائية المزمع تقدير الرماد فيها لمدة تتراوح بين 12 – 18 ساعة على درجة حرارة 550°م .

4- إفصل التيار الكهربائى عن فرن الإحتراق ، وإنتظر حتى تنخفض درجة الحرارة إلى 250°م على الأقل . ثم إفتح باب الفرن ببطئ وعناية لتجنب فقد الرماد لخفة وزنه وسهولة تناثره .

5- بإستخدام ماسك طويل ، إنقل البواتق بما تحويه من رماد بسرعة إلى مجفف بقاعدة من البورسلين توضع عليها الأطباق ويتحتم وجود مادة مجففة فى هذه المجففات .

6- تغطى البواتق ثم غطى المجفف بإحكام وإترك البواتق لتبرد قبل وزنها .

تحسب % للرماد كما يلى :

$$\% \text{ للرماد (على أساس الوزن الجاف)} = \frac{(\text{الوزن بعد تقدير الرماد} - \text{وزن البوتقة فارغة}) \times 100}{\text{وزن العينة} \times \text{معامل الوزن الجاف}}$$

حيث :

معامل الوزن الجاف = % للمواد الصلبة /100

فإذا كان بدقيق القمح 87 % مواد صلبة فإن معامل الوزن الجاف = 100/87=0.87 ، هذا ويمكن حساب % للرماد على أساس الوزن الرطب وفى تلك الحالة يستبعد معامل الوزن الجاف من مقام المعادلة .

وفيما يلى بعض أهم الإعتبارات الواجب مراعاتها عند تقدير الرماد بطريقة الحرق الجاف :

1- إذا ظل جزء من الكربون فى العينات بعد الحرق المبدئى يفضل إضافة بضع نقط من الماء المقطر الخالى من الأيونات أو حامض نيتريك مركز ، ثم يجرى حرق العينة فى الفرن على 550°م .

2- إذا ظلت هناك آثار من الكربون بعد المعاملة السابقة ينصح بإتباع الآتى :

1.2. ضع كمية من الماء المقطر على الرماد.

2.2. رشح الرماد خلال ورق ترشيح خالى من الرماد ***Ashless filter paper*** .

3.2. جفف الراشح .

4.2. ضع ورقة الترشيح بما عليها والراشح فى فرن الحرق وأعد عملية الحرق.

3- يجب إستخلاص الدهون من عينات المواد الغذائية المرتفعة الدهن بالمذيب المناسب .

4- يسرع كل من الجليسرين ، والكحول ، والهيدروجين من عملية إنتاج الرماد بطريقة الحرق الجاف .

5- قد تحدث عينات الجيلى طرطشة ***splattering*** داخل أفران الحرق لذلك يفضل خلطها بصوف قطنى لمنع ذلك .

6- قد تحتاج عينات الأغذية المرتفعة فى الأملاح إلى خطوتى حرق منفصلتين للمكونات الذائبة وغير الذائبة فى الماء . ويفضل إستخدام غطاء للبوتقة لتجنب التناثر والطرطشة .

7- يمكن إضافة محلول كحولى من خلات المغنيسيوم للإسراع من حرق الحبوب وفى تلك الحالة يجب عمل بلانك . وتكون حينئذ نسبة الرماد =

نسبة الرماد فى العينة – البلانك

ويوضح الجدول رقم (2.4) التالى ملخصا لأهم أسباب فقد بعض العناصر المعدنية أثناء تقدير الرماد بالحرق الجاف .

جدول (2.4):أهم أسباب فقد بعض العناصر المعدنية أثناء تقدير الرماد بالطريقة الجافة.

المعـــــدن	ظروف وأسباب الفقـــــــــد
الزرنيخ ***Arsenic***	سهل إرتباطه كما يحدث مع الدم ، وقد يتطاير في صورة مركب غير معروف على 56°م .
البورون ***Boron***	يتطاير مع البخار من محاليل الأحماض .
الكادميوم ***Cadmium***	يتطاير بسهولة ، إحتمال على صورة كلوريدات ، أو كمعدن . على درجة حرارة بين 400 إلى 500°م.
الكروم ***Chromium***	يتطاير ككلوريد الكروميل على درجات حرارة منخفضة نسبيا تحت ظروف مؤكسدة .
النحاس ***Copper***	يتطاير كمركب بورفيرينى عند حرق عينات بترولية ، يتطاير من الخل (يحتمل كخلات نحاس على درجات حرارة منخفضة) ، ويختزل إلى معدن النحاس الذى لا يذوب فى حامض الهيدروكلوريك.
الحديد ***Iron***	يتطاير ككلوريد حديديك على 450°م ، يتطاير كمركبات بورفيرين عند حرق عينات بترولية . عند حرق عينات محتواها من نسبة الفوسفور/للحديد عالى تتكون مركبات تقاوم الذوبان فى المحاليل أو التحلل فينتج عنها نتائج أقل من الحقيقة .
الرصاص ***Lead***	يتطاير من الدم أو البترول إلا إذا وجدت كبريتات .
الزئبق ***Mercury***	يتطاير كمعدن على 450°م .
النيكل ***Nickel***	يتطاير كمركبات بورفيرين عند حرق عينات بترولية.
الفوسفور ***Phosphorous***	يتطاير ، يحتمل كأحد الأحماض الأكسيدية ، خاصة فى وجود الكبريتات ، إلا فى حالة وجود تركيز زائد من المغنيسيوم .
الفاناديوم ***Vanadium***	يتطاير كمركبات بورفيرين عند إحتراق عينات بترولية ، يتطاير كمركبات كلوريد على درجة حرارة أقل من 450°م.
الزنك ***Zinc***	يتطاير ، يحتمل ككلوريد ، على درجة حرارة أعلى من 450°م

• المصدر : ***Thiers (1957)*** .

* ***Thiers, R.E. (1957). Contamination in trace element analysis and its control. Methods Biochem. Anal. 5, 273 – 335.***

2.7.4. تقدير الرماد بالطريقة الرطبة *Wet Ashing* :

يطلق على الطريقة الرطبة فى تقدير الرماد أحيانا " **بالأكسدة الرطبة** " أو " **الهضم الرطب** " . وأهم غرض لهذه الطريقة هو إنتاج الرماد لتحليل **عناصره المعدنية** والمواد السامة المعدنية . وهناك مزايا عديدة لتقدير و/أو لإنتاج الرماد بالطريقة الرطبة أهمها :

1- تظل المعادن دائما فى محلول أثناء التقدير ولذلك فليست هناك فرصة لفقدها نتيجة تطايرها خاصة وأن هذا التقدير يتم على درجة حرارة منخفضة .

2- تتميز هذه الطريقة بزمن للأكسدة منخفض نسبيا ، وتتطلب وجود خزانة غازات ، وسطح ساخن ، ومواسك طويلة ، وأجهزة أمان أخرى .

ويعيب هذه الطريقة ما يلى :

1- تحتاج ليقظة وإنتباه تام من الشخص القائم بالتقدير .

2- تستخدم فيها مركبات كيميائية آكلة ***Corrosive*** .

3- لايمكن إستخدام تلك الطريقة فى تقدير الرماد بعدد كبير من العينات فى آن واحد .

4- يجب إجراء كل العمل أثناء التقدير بخزانة الغازات والتى يتحتم غسلها جيدا بعد كل تقدير حتى لا تلوث العينات . وتعرف تلك الخزانة بخزانة حامض البيركلوريك ***Perchloric acid hood*** . ولا يفضل أن تحتوى هذه الخزانة على أية مواد بلاستيكية حتى لا تتآكل أثناء عملية تقدير الرماد بالطريقة الرطبة .

5- لسوء الحظ لا يكفى حامض واحد لتقدير الرماد بالطريقة الرطبة حيث لا يؤدى حامض منفرد للأكسدة الكاملة والمرغوبة لسرعة التخلص من كافة المواد العضوية .

وعادة يستخدم حامض النيتريك مع حامض الكبريتيك أو حامض البيركلوريك وكذلك كلوريدات أو سلفات البوتاسيوم بخلطات مختلفة لإتمام عملية الأكسدة . وعادة ما تتباين كميات الأحماض اللازمة لأكسدة عينات الأغذية المختلفة . هذا وينتج أثناء عملية الأكسدة ، أكاسيد السلفات والنيترات . ويتميز مخلوط حامضى النيتريك والبيركلوريك بسرعة أكسدته للمواد العضوية بمقارنته بمخلوط حامضى النيتريك والكبريتيك .

1.2.7.4. طـــرق التقديـــر *Procedures* :

نستعرض فى الخطوات التالية إحدى الطرق الرطبة لتقدير الرماد فى النباتات وتلك الطريقة منشورة فى مرجع الهيئة الرسمية للمحللين الكيميائيين ***AOAC*** تحت رقم 975.03 :

1- يوزن بدقة 1 جم من العينة الجافة المطحونة وتوضع فى كأس جريفين ***Griffin*** سعة 150 مل .

2- يضاف للعينة 10 مل من حامض النيتريك بحيث يغطى العينة كلية ، وإذا كانت المادة التى يقدر فيها الرماد تحتوى على نسبة مرتفعة من الدهون ، تترك العينة مغمورة فى حامض النيتريك فترة الليل ***Overnight*** .

3- يضاف لمخلوط العينة وحامض النيتريك ، 3 مل من حامض البيركلوريك $HClO_4$ بتركيز 60 % (ضع كأس تحت طرف سحاحة حامض البيركلوريك) ثم سخن ببطئ على سطح ساخن ***hot plate*** حتى تصل درجة الحرارة إلى 350°م ويتوقف تكون الرغاوى فى الكأس ويتبخر تقريبا حامض النيتريك .

4- إستمر فى الغليان حتى يحدث تفاعل حامض البيركلوريك بتصاعد أبخرة كثيفة، ثم ضع زجاجة ساعة على الكاس ليستمر التفاعل إلى أن تصبح العينة عديمة اللون . (لاتجعل السوائل تقل فى الكأس حتى الجفاف).

5- إرفع الكأس من على سطح التسخين ، وإتركه حتى يبرد .

6- إغسل زجاجة الساعة ، بأقل كمية ممكنة من الماء المقطر منزوع الأيونات ثم ضف 10 مل من حامض الهيدروكلوريك بتركيز 50 % .

7- إنقل كل ما فى الكأس إلى دورق معيارى (عادة بحجم 50 مل) ثم خفف وأكمل حتى العلامة بالماء المقطر منزوع الأيونات .

8- لا تغفل غسيل خزانة الغازات بعد الإنتهاء من العينة الأخيرة .

ولتحليل " الحديد " فى عينات لحوم ، توزن 2 جم كعينة ممثلة ويتم إضافة 30 مل حامض النيتريك فى كأس جريفين وتسخن على سطح ساخن حتى درجة حرارة 350°م ويستمر الغليان حتى يتبقى فى الكأس 10 مل فقط من حامض النيتريك. يضاف عندئذ 10 مل من حامض البيركلوريك (60 %) ثم تستكمل باقى خطوات التقدير بدءا من الخطوة 4

كما أوضحنا سابقا. بعد إتمام الأكسدة يخفف محلول الأكسدة وينقل كميا إلى دورق معيارى سعة 100 مل .

وتجدر الإشارة فى هذا الصدد إلى خطورة الغازات الناتجة من عملية إنتاج الرماد بالطريقة الرطبة على الصحة العامة ، هذا وقد تم وصف خطوات الحيطة والحذر فى مرجع الهيئة الرسمية للمحللين الكيميائيين تحت عنوان " **التداول الآمن للمواد الكيميائية الخطرة** ***Safe Handling of Chemical Hazards*** " ويتداخل حامض البيركلوريك فى تقدير الحديد بتفاعله مع الحديد فى العينة لتكوين بيركلورات الحديدوز ، والذى يكون معقدا غير ذائب مع مركب ***O-phenanthrolene*** .

وهناك طريقة معدلة أخرى لإنتاج الرماد بالأكسدة الرطبة والجافة ، هذا وقد نشرت هذه الطريقة تحت عنوان " **المعادن فى تركيبات اللبن الجاهز لطعام الأطفال** ***Minerals in Ready-to Feed Milk-Based Infant Formula*** " فى مرجع ***AOAC (1995)*** تحت رقم " 985.35 " . وتتلخص تلك الطريقة فى الخطوات التالية :

1- بخر العينات الرطبة (التى تتراوح بين 25 – 5 مل) على درجة حرارة 100°م طوال الليل ***overnight*** أو بالتجفيف بالميكروويف (الموجات القصيرة).
2- سخن العينة على سطح ساخن حتى يتوقف الدخان .
3- إحرق العينة فى فرن إحتراق على 525°م لمدة 3 – 5 ساعات فقط .
4- برد ثم رطب العينة بماء مقطر منزوع الأيونات بالإضافة إلى 0.5 إلى 3.0 مل من حامض النيتريك .
5- جفف على سطح ساخن أو فى حمام بخار ثم إحرق العينة مرة ثانية على 525 °م لمدة 1 – 2 ساعة.
6- برد العينة فى مجفف ***Dessicator*** ثم زنها .
7- أعد الخطوتان 4 ، 5 إذا تبقى كربون فى العينات (تحذير: قد يفقد بعض البوتاسيوم أثناء إعادة حرق العينات).

ويبين جدول (3.4) مقارنة بين طريقتى الأكسدة الرطبة والحرق الجاف لتقدير الرماد.

جدول (3.4): مقارنة بين طريقتى الأكسدة الرطبة والحرق الجاف لتقدير الرماد.

الأكسدة الرطبة	الحرق الجاف
• أكثر سرعة فى أجراءها	• أبطأ (12 – 18 ساعة أو أكثر)
• تجرى على درجة حرارة أقل	• تجرى على درجة حرارة أعلى
• إحتمالات أقل لتطاير العناصر المعدنية	• يحدث تطاير لبعض العناصر المعدنية
• أقل حساسية لنوع العينات	• أكثر حساسية لنوع العينات
• تحتاج لمراقبة أكثر أثناء خطوات العمل	• أقل إحتياجا لإحتياطات التشغيل
• تحتاج لبلانك	• أقل إحتياجا للبلانك
• يفضل أن يكون حجم العينة صغيرا	يمكن أن يكون حجم العينة كبيرا (حتى 10 جم)

3.7.4. طريقة بلازما لتقدير الرماد على درجة حرارة منخفضة

Low temperature plasma ashing

1.3.7.4. المبادئ العامة للطريقة والأجهزة المستخدمة فيها :

يتكون الجهاز المستخدم فى طريقة بلازما لتقدير الرماد من نظام زجاجى يستخدم فيه عدد متباين من الغرف توضع فيها العينات المزمع تحليلها ثم يسحب الهواء من تلك الغرفة أو الغرف بواسطة مضخة تفريغ . بعد تفريغ الهواء ، يتم إدخال كميات ضئيلة من الأكسجين النشط الذى يجرى توليده بواسطة مولد لمجال كهرومغناطيسى ويتم ضبط معدل الإحتراق بضبط معدل دخول الهواء . هذا ويتم إدخال الهواء برفق للمحافظة على التركيب الميكروسكوبى للمكونات مثل بللورات أكسالات الكالسيوم الموجودة فى مختلف أنسجة الأوراق .

2.3.7.4. طـــرق التقـــدير *Procedures* :

قد تتباين الأجهزة المستخدمة فى طريقة بلازما لتقدير الرماد على درجة حرارة منخفضة طبقا لنوع العينة المراد تحليلها .وعادة ما تحتوى وحدات إنتاج الرماد (على درجة حرارة منخفضة) على غرفتين زجاجيتين أو أكثر مع وحدات زجاجية بشكل القوارب ***glass boats*** لحجز العينات . توضع المادة الغذائية المطحونه فى الوحدة الزجاجية بشكل القارب وتوضع كل منها فى غرفة زجاجية منفصلة ثم تغلق ويتم تفريغها.

وعندما يكون التفريغ كافيا (1 تور أو أقل) نبدأ فى إدخال تيار طفيف من الهواء أو الأكسجين فى النظام مع المحافظة على حد أدنى من التفريغ . يتم تنشيط مولد الذبذبة عند تردد أقل من 14 ميجاهرتز (*MHz*) ثم يضبط معدل حرق العينات ***rate of incineration*** بواسطة التيار الكهربائى الداخل والذى يتراوح بين 50 – 200 وات (*watt*) .

وهناك بعض أنواع هذه الأجهزة التى تحتوى على وحدات هزازة ***shaking devices*** لتقليب العينات لإسراع ولتجانس عملية الحرق . هذا ويتم مراقبة تطور حرق العينات بمشاهدة العينات والنظر إليها بالغرف الزجاجية .

ومن أهم المشاكل التى تحدث أثناء تشغيل هذه الأجهزة حدوث تسرب فى نظام التفريغ ، وقد يكون ذلك بسبب حدوث تسرب فى الشنابر الجلدية المحيطة بالغرف الزجاجية لإحكام قفلها أثناء إجراء التفريغ ، وفى تلك الحالة يجب إستبدال تلك الشنابر الجلدية . كما قد تحدث تشققات فى وصلات *T* المصنوعة من البلاستيك وفى تلك الحالة يفضل لو تم إستبدالها بوصلات زجاجية.

هذا ويعتبر أهم ما يميز طريقة بلازما لتقدير الرماد درجة الحرارة المنخفضة المستخدمة فى تلك الطريقة (150°م أو أقل) مما يؤدى لعدم تغيير التركيب الميكروسكوبى والبللورى للمعادن المزمع تحليلها ، كما يؤدى أيضا لإحتمال أقل لفقد العناصر المعدنية . أما أهم ما يعيب تلك الطريقة فهو الحجم الضئيل والعدد القليل للعينات التى يمكن تحليلها فى آن واحد ، وكذلك إرتفاع تكلفة الأجهزة المستخدمة فى التقدير .

4.7.4. تقدير الرماد بإستخدام طريقة الموجات القصيرة (ميكروويف)

Microwave ashing

يمكن تقدير الرماد بإستخدام أجهزة إنتاج الموجات القصيرة (الميكروويف) المبرمجة بحيث تجفف العينة أولا ثم تحرقها . وقد أثبتت الدراسات أن الحرق الجاف لمدة 40 دقيقة بنظام الموجات القصيرة يعطى نفس التأثير والنتيجة عما لو تم الحرق فى الأفران العادية ***muffle furnace*** لمدة 4 ساعات . هذا وقد وجد أنه يمكن تقدير الرماد فى الأنسجة

النباتية بطريقة الموجات القصيرة فى زمن يقدر بعشرين دقيقة فقط إلا عند الرغبة فى تقدير عنصر النحاس " *Cu* " فيستغرق زمن التقدير حينئذ 40 دقيقة .

وموجز القول أنه يمكن بإستخدام أفران الميكروويف إختزال زمن التحليل بصورة كبيرة ، إلا أنه لايمكن تقدير عدد كبير من العينات بهذا النظام فى نفس الوقت .

5.7.4. تقدير الرماد الذائب وغير الذائب فى الماء
Soluble and Insoluble Ash in Water

يستخدم هذا الإختبار كدلالة على نسبة الفواكه فى المربات والجيليات حيث يدل إنخفاض نسبة الرماد الذائب فى الماء على زيادة نسبة الفاكهة فى منتجاتها المحفوظة بالتركيزات العالية من السكر . وتستخدم الطريقة التالية لقياس نسب الرماد الذائب وغير الذائب فى الماء :

1- زن الرماد الكلى فى البوتقة .
2- ضف 10 مل من الماء المقطر للرماد فى البوتقة .
3- غطى البوتقة وسخن مخلوط الرماد والماء حتى درجة حرارة الغليان تقريبا.
4- رشح المحلول بإستخدام ورقة ترشيح خالية من الرماد ***Ashless filter paper*** وإغسل ورقة الترشيح عدة مرات بالماء الساخن المقطر لإزالة آثار الأملاح الذائبة منها .
5- جفف ورقة الترشيح وما تبقى عليها من رماد وأعد حرقها لمدة حوالى 30 دقيقة على 525°م .
6- زن شق الرماد المتبقى (غير الذائب) فى البوتقة وإحسب النسبة المئوية للرماد غير الذائب.
7- إحسب الرماد الذائب فى الماء بطرح الرماد غير الذائب من الرماد الكلى أو جفف الراشح وأعد حرقه ، وزنه ، لتحصل على نسبة الرماد الذائب فى الماء مباشرة .

6.7.4. الرمـــــاد غير الذائب فى الأحماض

Ash Insoluble in Acids

يعتبر هذا التقدير مقياسا لتلوث أسطح الفواكه والخضروات وأغلفة القمح والأرز بملوثات التربة كالسليكات والتى لاتذوب فى الأحماض عدا بروميد الهيدروجين .

وتستخدم لتقدير الرماد غير الذائب فى الأحماض الطريقة التالية :

1- يضاف للرماد الكلى أو للرماد غير الذائب فى الماء 25 مل من حامض الهيدروكلوريك 10 %.

2- تغطى البوتقة بزجاجة ساعة أو بغطاءها ويغلى المخلوط لمدة 5 دقائق .

3- رشح المخلوط بإستخدام ورقة ترشيح خالية من الرماد ، ثم إغسل الورقة عدة مرات بالماء الساخن المقطر .

4- أعد حرق ورقة الترشيح بما تبقى عليها من رماد غير ذائب فى الأحماض لمدة 30 دقيقة على الأقل .

5- زن وإحسب % للرماد غير الذائب فى الأحماض .

7.7.4. قلويـــــــة الرمـــــــاد

Alkalinity of Ash

يتميز رماد **الفواكه والخضروات** بقلويته لإحتوائه على عناصر **الكالسيوم والمغنيسيوم والبوتاسيوم والصوديوم** ، أما رماد اللحوم وبعض الحبوب فيكون حامضيا لإحتوائه على عناصر الفوسفور والكبريت والكلوريد . وتتخذ درجة قلوية الرماد كدليل على **جودة الفواكه وعصائرها** ، فأملاح أحماض **الستريك والماليك والطرطريك** تنتج **كربونات (قلوية التأثير)** عند حرقها . وتستخدم الطريقة التالية لتقدير قلوية الرماد :

1- ضع الرماد الكلى أو الرماد غير الذائب فى الماء فى طبق بلاتينى ثم ضف عليه 10 مل بالضبط من حامض الهيدروكلوريك 0.1 ع.

2- يمكن إضافة كمية أخرى من الماء المقطر المغلى أو سخن المخلوط فى حمام مائى.

3- برد ثم إنقل المخلوط كميا إلى دورق مخروطى.

4- عادل الزيادة من حامض الهيدروكلوريك (0.1 ع) بمحلول صودا كاوية قياسى 0.1 ع وإستخدم دليل الميثيل البرتقالى لتحديد نقطة التعادل .

5- عبر عن قلوية الرماد بعدد ملليلترات الحامض 0.1 ع/100 جم من العينة

هذا ويمكن تقدير قلوية الرماد بالمعايرة المباشرة بمحلول حامض الهيدروكلوريك 0.1 ع بإستخدام نفس الدليل (المثيل البرتقالى). وعبر عن النتيجة كما سبق .

8.4. بعض الإعتبارات العامة لطرق تقدير الرماد :

* يتطلب تقدير الرماد أجهزة مكلفة للطرق الثلاث السابق تناولها وتزداد تكلفة هذه الأجهزة إذا كانت من الأنواع ذات السعة الكبيرة التى تستخدم فى تقدير الرماد فى عدد كبير من العينات .
* يفضل عادة فى المختبرات وضع أفران تقدير الرماد وكذلك الرطوبة فى غرف منفصلة يطلق عليها الغرف الساخنة .
* عادة ما تكون مواسير (أنابيب) التسخين فى أفران حرق الرماد مكشوفة ولذلك يجب الحذر والحيطة الكاملة تماما عند إدخال أو إخراج بواتق التقدير فى تلك الأفران وتستخدم لذلك مواسك طويلة .
* عند إستخدام طريقة الموجات القصيرة (الميكروويف) فى تقدير الرماد يجب إجراء معايرة لتلك الطريقة بتقدير رماد نفس العينات بالطرق الأخرى القياسية ومقارنة النتائج وحساب معامل التصحيح .
* تحتاج أجهزة تقدير الرماد على درجة حرارة منخفضة بطريقة البلازما (يستخدم فيها غاز O_2 مؤين) لمضخة تفريغ كبيرة بالإضافة لتكلفة جهاز التقدير مما يزيد من تكاليف الأجهزة ويقلل من الطلب عليها.
* بينما يؤدى تقدير الرماد سواء بطريقة الأكسدة الرطبة أو بطريقة البلازما لتطاير محدود جدا لبعض العناصر فإن الطريقة الجافة لتقدير الرماد بالحرق (على درجات حرارة بين 500 - 600°م) تؤدى بالضرورة إلى فقد وتطاير نسبة من العناصر المعدنية .

9.4. أسئـــــــلة عامـــــــــــــــة

1- تحدث عن أربعة مصادر للأخطاء فى إعداد العينات لتحليل الرماد ، وبين كيف يمكن تجاوز هذه الأخطاء ؟

2- كنت دائما تقوم بتقدير الرماد فى عينات المواد الغذائية بالطريقة الجافة . وقد طلب منك أحد السادة المشرفين على رسالتك لتغيير التقدير بالطريقة الجافة إلى طريقة الأكسدة الرطبة ، فما هو رأيك ؟

أ- هل أنت تتفق مع مشرفك على تغيير الطريقة ؟ ولماذا ؟

ب-بغض النظر عن إختصار الزمن عند تحولك لطريقة الأكسدة الرطبة لتقدير الرماد ، لماذا قد تصر على إستمرارك فى إستخدام طريقة الحرق الجافة ؟ ولماذا قد تغيرها إلى طريقة الأكسدة الرطبة ؟

3- قام الفنى الذى يعاونك بالمعمل بتقدير الرماد فى الزبد بطريقة الحرق الجاف كما يلى:

أ- وزن الفنى 5 جرامات من الزبد فى بوتقة من البلاتين .

ب-وضع الفنى البوتقة فى فرن الإحتراق بإستخدام ماسك من الصلب .

ج- ثم حرق العينات فى الفرن لمدة 48 ساعة على 800°م .

د- أزيلت البوتقة بعد ذلك من الفرن وتم وضعها على حامل فى الهواء الجوى حتى تمام التبريد ، ثم أعيد وزنها .

وضح أهم الإرشادات التى يجب عليك أن تؤكد عليها للأخ الفنى لتجنب الأخطاء الفنية التى شاهدتها أثناء قيامه بالتقدير السابق .

4- قارن بين طريقة بلازما لتقدير الرماد على درجة حرارة منخفضة ، وطريقة الحرق الجاف .

5- وضح أهم التوصيات التى تؤكد عليها للفنى القائم بتحليل الرماد فى عينات مواد غذائية مختلفة ، بطريقة الحرق الجاف ، للتغلب على المشاكل التالية:

أ- إحتمالات حدوث تطاير للفوسفور ، أثناء تقديرك له فى عينة مادة غذائية غنية فيه .

ب-لم يحدث إحتراق كامل للعينات المرتفعة فى نسبة السكر بعد حرقها بالطريقة الجافة ***Dry ashing*** (أى لم يكن الرماد أبيض اللون أو رمادى شاحب).

ج- طريقة الحرق الجاف التى قدرت بها الرماد إستغرقت وقتا طويلا . فكيف تسرع من تلك الطريقة دون أن تستخدم طريقة الأكسدة الرطبة بدلا منها؟

د- هناك من الأسباب التى تدعوك للإعتقاد أن العنصر المعدنى الذى ستقوم بتقدير نسبته فى الرماد بعد الحرق الجاف قد تفاعلت نسبة منه مع بواتق البورسلين المستخدمة .

هـ- إذا كنت تريد تقدير الحديد فى بعض الأغذية ولكنك لم تستطع الحصول على حديد ذائب بعد طريقة الحرق الجاف .

6- إشرح مقياسين من مقاييس تقدير الرماد يمكن أن تستفيد منهما فى تقييم جودة الفواكه ومنتجاتها .

مســـــــــائل :

1- حبوب تحتوى على 11.5 % رطوبة . وضع 5.2146 جم منها فى بوتقة رماد وزنها الفارغ 28.5053 جم وبعد إتمام عملية الحرق الجاف كان وزن البوتقة والرماد 28.5939 جم . إحسب % للرماد على أساس (أ) الوزن الرطب ، (ب) والوزن الجاف .

2- كانت كمية الرماد غير الذائب فى الأحماض فى عينة فاصوليا (تزن 23.500 جم) 0.0940 . فما هى % للرماد غير الذائب فى الأحماض .

3- إذا كنت ترغب فى الحصول على 100 مجم من الرماد من عينة حبوب كان متوسط نسبة الرماد بها 2.5 % . فكم جراما من الحبوب تستخدمها فى إنتاج هذه الكمية من الرماد .

4- إذا أردت الحصول على معامل تباين (CV) أقل من 5 % أثناء تحليلك للرماد وكانت نتائج تقديرك للرماد كالتالى : 2.15 % ، 2.12 % ، 2.07 % فهل هذه النتائج مقبولة وتعطى معامل التباين المطلوب ؟

5- تم الحصول على النتائج التالية فى تجربة أجريت على عينة هامبورجر : وزن العينة = 2.034 جم ، وزن العينة بعد تجفيفها =1.0781 جم ، وزن العينة بعد إستخلاص الدهن منها = 0.479 جم ، وزن الرماد = 0.0233 جم . فما هى النسبة المئوية للرماد ؟ (أ) على أساس الوزن الرطب ، (ب) على أساس الوزن الجاف .

• الإجابات : (1) أ- 1.70 % ، ب- 1.92 % ; (2) = 0.04 % ; (3) = 4 جم ; (4) نعم ، 1.9 % (5) أ = 1.1 % ، ب = 1.57 % .

10.4. المراجـــــــع *REFERENCES*

AOAC International. 1995. Official Methods of Analysis , 16th ed. AOAC International , Gaithersburg, MD .

Aurand , L.W. , Wood , A.E. and Wells , M.R. 1987. Food Composition and Analysis. Van Nostrand Reinhold, New York.

Fennema , O.R. 1976. Principle of Food Science . Part 1, Food Chemistry . Marcel Dekker, Inc.

Thiers, R.E. (1957). Contamination in trace element analysis and its control. Methods Biochem. Anal. 5, 273 – 335 .

Pomeranz , Y. and Meloan , C. 1994. Food analysis : Theory and Practice , 3rd ed. Chap an and Hall , New York.

Wong , D.W.S. 1989. Mechanism and Theory in Food Chemistry. AVI. , Van Nostrand Reinhold, New York.