الفصل الثامن

الإضافات الغذائية

وتشتمل على كل ما يضاف للأغذية بغرض إثرائها غذائية ، أو تحسين رائحتها وطعمها وشكلها وقوامها ، أو لضرورتها في تسهيل التصنيع ، أو لوقايتها وحفظها ، وعلى ذلك تشمل الڤيتامينات والأملاح المعدنية والأحماض الأمينية والأحماض الدهنية والهرمونات والمستحلبات وموانع الأكسدة والملونات ومكسبات الطعم والرائحة إضافة إلى العقاقير أو ما يضاف بغرض الغش .

١ ـ التوكوفيرولات ومضادات الأكسدة المختلفة :

(Ethoxyquin ، BHA ، BHT)

تستخلص العينات بمخلوط من الميثانول ودي إيثيل إيثير (٤٠/٦٠) ٣ مرات ، (١٠٠ ، ١٠٠ ، ٥٠ مل) ، وتجمع المستخلصات وترج مع ٢٠ مل ماء مرتين للغسيل ، وتبخر تحت تفريغ على حمام مائي . أذب المتبقي في ١٠ مل أسيتون ، بخر للجفاف وأذب المتبقي في مخلوط هكسان حلقي مع ثالث إيثيل أمين (١/٩) ، تبقع رقائق كروماتوجرافي (سليكاجيل منشطة لمدة ساعة على ١١٠م) بهذا المستخلص ، مع تبقيع محاليل قياسية من التوكوفيرول وخلات التوكوفيرول ومضادات الأكسدة (٢٥ مجم / ١٠ مل مخلوط سيكلو هكسان مع تري إيثيل أمين ١/٩) . تطور الرقائق في تانكات بها مذيب ن – هكسان / إيثيل ميثيل كيتون / دي– ن– بيوتيل إيثير (٦/٧/٤٣). تزال الرقائق من التنك، وتجفف بتيار هوائي، وترش بدليل قياسي حديد وسيانيد بوتاسيوم (أذب ١,٣ جم كلوريد حديديك في ١٠٠ مل حمض هيدروكلوريك ٢ مولر ثم ٠,٧ جم حديد وسيانيد بوتاسيوم في ١٠٠ مل ماء واخلط المحلولين بنسبة ١ : ١ قبل الاستخدام مباشرة ، ويؤخذ من ذلك حجمان + حجم من حمض هيدروكلوريك مركزا للاستعمال) ، وتسخن على ٤٠م لمدة ١٥ دقيقة للتعرف على البقع ، وبرش رقيقة أخرى (عليها بقع العينات بعد تطويرها وتثبيتها) بدليل دي بيريديل (٠,٥ جم ٢–٢– دي بيريديل تذاب في ١٠٠ مل إيثانول ، ويذاب ٠,٢ جم كلوريد حديديك فى ١٠٠ مل إيثانول ، وقبل الاستعمال يخلط المحلولان بنسبة ١:١) فيظهر ڤيتامين هـ ومضادات الأكسدة كبقع حمراء بعد الرش ، كما يمكن فحصها تحت لمبة أشعة فوق بنفسجية على موجتي ٢٥٤، ٣٦٠ نانومتر . ويمكن استخلاص الڤيتامين من الرقائق بالإيثانول وقياس كثافته الضوئية على ٢٩٢ نانومتر .

٢ ـ الفيورازوليدون Furazolidon :

رغم أن الفيورازوليدون يستعمل أحياناً للمقاومة أو دافعاً للنمو ، إلا أن بعض الدول تحرم قوانين أعلافها من استخدامه ، إلا أنه يستعمل في بديلات اللبن ومكملات الأعلاف، والتركيزات العالية التي تتحملها الخنازير لا تتحملها العجول بل تظهر حالات سمية حادة أو مزمنة عليها ؛ لذا فإنه من المهم التعرف على هذا المركب وتقديره . فقد تمكن من تقديره على الكروماتوجرافي بحد أدنى وصل إلى ٦٠–٩٠ مجم / كجم .

وفيما يلي طريقة لتقديره على الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط (HPLC) .

استخلاص العينة :

يؤخذ ٢٠ جرام عينة مطحونة في دورق معياري سعة ١٠٠ مل ، ويكمل للعلامة بالأسيتون ، ويجنس لمدة ٢ دقيقة في مجنس Homogeniser ثم في حمام موجات فوق صوتية Ultrasonic bath لمدة ساعتين ، ثم يترك ليلة بالثلاجة. رشح ثم بخر الراشح على حمام مائي تحت تفريغ على ٥٠م حتى الجفاف ، ثم يذاب الراسب في ٥ مل أسيتون (باستعمال الحمام فوق الصوتي) للتنقية على العمود الكروماتوجرافي .

التنقية :

على عمود طوله ٢٠ سم ملىء بأوكسيد الألومنيوم (٣٠ جم / عمود) . بعد غسل أوكسيد الألومنيوم بالماء المقطر ١٠ مرات، وتجفيفه حتى ثبات الوزن على ١٠٥م، يعلق في أسيتون (بعد أن يبرد) باستعمال الحمام فوق الصوتي، ثم يعبأ في العمود (٢٠سم× ٢٠مم) الزجاجي . يصب مستخلص العينة (٥ مل) على العمود ، ثم يغسل بمقدار ١٠٠ مل أسيتون ، ويبخر الغسول على حمام مائي تحت تفريغ على ٥٠م . وكخطوة أخرى للتنقية ينقل الراسب بكحول الإميل (بمقدار ٢ مل × ثلاث مرات) إلى أنبوبة طرد مركزي سعة ١٠ مل ، ويضاف إليه ٢ مل محلول يوريا (٤,٥ جم / ٥ مل ماء مقطراً) ، ويخض على هزاز أنابيب للاستحلاب ، ثم يطرد مركزيا على ٣٥٠٠ لفة / دقيقة . ينقل محلول اليوريا (السفلى) مباشرة إلى عمود HPLC .

ظروف الفصل على HPLC :

يستعمل مخلوط التطوير (غسيل) من الميثانول/ ماء مقطراً (٧٠/٣٠ حجم/حجم) ، بسرعة سريان ١ مل / دقيقة ، وضغط حتى ١٦٠٠ جوي ، وحرارة العمود ٥٠م ، وطول موجة الامتصاص ٣٦٥ نانومتر ، وسرعة سير الكروماتوجرام ٥ م / دقيقة ، وجهد الرسام ٥ أو ٥٠ ملي فولت . العمود ملىء بمادة Lichrosorb RP8 وهي Reverse Phase .

التعرف على الفيورازوليدون :

من خلال معرفة الزمن بالثانية الذي يظهر عنده أعلى ارتفاع (قمة) لمنحنى المركب

ومقارنته للزمن الذي تظهر عنده قمة منحنى المحلول القياسي يتم التعرف على المركب ، ولتقدير كميته تقارن ارتفاعات (أو مساحات) المنحنيات للعينات ضد المحاليل القياسية (خارجية أو داخلية) مع عمل حساب حجم المستخلص والتخفيف ، فيتم استنتاج تركيز المركب في مادة العلف بالجزء / مليون ppm (مجم / كجم) . وقد تم إعادة اكتشاف Recovered حوالي ٧٨٪ من الكمية المضافة للعلف كمحلول قياسي داخلي Internal Standard Method . وقد أجرى هذا التكنيك على العلف المصنع (المخلوط) وبديلات اللبن وبادئ عجول ومخلوط معادن للبقر . وتم اكتشاف حتى ٦٠ جزء / بليون ppb (ميكروجرام / كجم) كحد أدنى .

هذا ويمكن التعرف على هذا المركب نوعيا بالميكروسكوب ، إلا أن التحليل الكيماوي الطبيعي وإن صعب إلا أنه أدق . ويمكن استخدام رقائق كروماتوجرافي سليكاجيل لتفريد هذا المركب ، إلا أن المعاد اكتشافه في حدود ٤٠-٥٠٪ فقط ، ونحتاج لقياس المركب بعد ذلك سبكتروفوتومتريا لتقديره كميا .

٣ ـ مضادات الكوكسيديا Coccidiostats :

أ ـ الأمبروليوم Amprolium :

من أشهر مضادات الكوكسيديا ، ويتم تقديره باستخلاص العينات بالماء والميثانول (٢/١) بمقدار ١٠٠ مل. أضف إلى ١٠ مل من المستخلص ٠,٥ جم كلوريد صوديوم + ٣٠ مل محلولاً منظفاً (٠,٥ جم صوديوم دي أوكتيل سلفوسكسينات تذاب في ٣٠ مل إيثانول ٩٦٪ وخفف إلى لتر بالماء) واضبط PH المحلول إلى ٨ بقلوي . استخلص المحلول بالداي كلوروإيثان (١٠ مل ثم ٤ مرات × ٢٠ مل) ، واجمع المستخلصات ، ورشحها على صوف زجاجي يحتوي عدة بلورات من كبريتات الصوديوم اللامائية ، وبخر على ٤٠°م إلى ٥ مل . طور المستخلص على عمود كروماتوجرافي حامضي ضعيف (٤-٥ جم أكسيد ألومنيوم) ، واغسل بالدي كلوروميثان ، واسحب الأمبروليوم بغسيل العمود بالميثانول (١٥ مل) ، وبخر الغسول إلى الجفاف . أذب المتبقيات في ١٠ مل ميثانول . خذ ٥ مل من المستخلص + ١٠ مل دليلاً ملوناً (من إذابة ٢-٧- نافثالين ديول ، سيانيد بوتاسيوم ، حديدي سيانيد بوتاسيوم في وسط قلوي : ٢٥ مل ٢-٧- نافثالين ديول في لتر ميثانول ، ٢٥٠ مجم سيانيد بوتاسيوم في ٢٥ مل ماء ، ٥٠ مجم حديدي سيانيد بوتاسيوم في ٢٥ مل ماء ، وتخلط المحاليل بنسب ٥/٥/٩٠ ، وتترك نصف ساعة ، ثم يضاف إليها ١٠٠ مل من هيدروكسيد صوديوم (١١,٢ جم / لتر ماء)) . يترك المخلوط يستقر ٢٠ دقيقة ويقاس الامتصاص على ٥٣٠ نانومتر ضد مقارنة . يقدر امتصاص المحلول القياسي (٠,١٢٥ - ٠,٩٣٧ مجم / ٥ مل) بإذابة ٢٥ مجم أمبروليوم في ٢٠٠ مل ميثانول في ماء (٢/١) .

ب ـ بوشينولات Buchinolate :

تستخلص العينات بالكلوروفورم (١٠٠ مل) بالتقليب المستمر ثم الترشيح ، ويبخر ٨٠ مل من المستخلص ، وتذاب المتبقيات في حجم صغير من الكلوروفورم ، ثم يخفف إلى ١٠ مل في دورق معياري . يعد محلول قياسي بإذابة ٥٠ مجم مادة نقية في ١٠٠ مل كلوروفورم ، والتخفيف إلى تركيز ١٠٠ ميكروجرام / مل . تبقع مستخلصات العينات والمحلول القياسي على رقائق كروماتوجرافي من السليكاچيل سبق تنشيطها على ١١٠°م لمدة ساعتين . تطور الرقائق في كلوروفورم لفصل الشوائب ، ثم تجفف الرقائق ، وتطور ثانية في مخلوط كلوروفورم / إيثانول (١/١٠) ، وتفحص تحت أشعة فوق بنفسجية ، فتظهر البوشينولات كبقعة عند Rf ٤,٠-٦,٠٠ تقشط بقع العينات والمحلول القياسي ، وتستخلص في ١٠ مل إيثانول ٨٠٪ ، وتقاس الكثافة الفلورسنتية لهما على ٣٧٥ نانومتر ، بعد الإثارة على موجة طولها ٢٦٥ نانومتر باستخدام جهاز فلوروسبكترو فوتومتر .

جـ ـ ميتيكلوربندول (كلوبيدول Clopidol) Metichloropindol :

زن عينة (٣٠-٥٠ جم) ، واستخلصها بميثانول أمونيومي (٩٥/٥) ٤٠٠ مل لمدة ٢٠ دقيقة . وطور المستخلص على عمودين ، الأسفل به مبادل أنيوني ، والأعلى به أكسيد ألمونيوم قاعدي (٢٥ جم منشطاً على ١٠٥°م) دون فاصل بينهما . فيوضع ١٠ مل مستخلص عينة على العمود القلوي تغسل على العمود بالميثانول ٨٠٪ (١٢ مل) ، ويترك الغسول يتساقط على العمود السفلي . أزل العمود العلوي واغسل العمود السفلي بحمض خليك ٤٠٪ (٤ مل) ، واجمع الغسول في دورق معياري ٢٥ مل ، وخفف إلى العلامة. وقدر الكثافة الضوئية على مدى من أطوال الموجات ٢٩٥-٣٥٠ نانومتر ، وتطرح القيمة عند ٢٦٧ نانومتر من الخط الأساسي المقدر بتوصيل النقطتين عند ٣٢٧ ، ٢٩٧ نانومتر . يحسب التركيز بالمقارنة بمحلول قياسي (١٢٥ مجم كلوبيدول نقي في ٢٥ مل ٢٪ صودا كاوية ، وخفف إلى ٥٠٠ مل بالماء) مقدراً في ٤٠٪ حمض خليك ، ويعبر عن التركيز كجزء / مليون .

د ـ روبندين (روبنزيدين Robenzidene) Robenidine :

زن ٢٠ جم عينة ، واستخلصها بأسيتون محمض ١٠٠ مل (٨,٣ مل حمض هيدروكلوريك مركز / لتر أسيتون) . رشح المستخلص ، ينقل منه ١١ مل على عمود من ١٠ جم أكسيد ألمونيوم ، ويغسل بالأسيتونيتريل (١٠٠ مل ٢- ميثوكسي إيثانول / لتر أسيتونيتريل) ثم احصل على مضاد الكوكسيديا بتطوير العمود بمقدار ٢٠ مل أسيتونيتريل أمونيومي (٤٠ مل أمونيا مركزة / لتر محلول) ، واجمع الغسول الأخير في دورق معياري ٥٠ مل ، وأضف إليه ١ مل بوتاسا كاوية كحولية (٣٪) ، وقدر الكثافة الضوئية على

موجتي ٤٤٠ ، ٥٥٠ نانومتر ثم أضف ٠,٥ مل حمض ثلاثي كلوروخليك (٢ جم / ٤ مل محلول) ، واخلط وأعد تقدير الكثافة الضوئية على نفس الموجتين .قدر بنفس الأسلوب الكثافة الضوئية في الوسط القلوي والحامضي لمحلول قياسي (٠,١ جم روبنزيدين/ ٢٥٠ مل ميثانول) ، وقدر الفرق للامتصاص (A) بين الوسط الحامضي عند الموجتين ($A_{440} - A_{550}$) والوسط القاعدي عند نفس الموجتين ($B_{440} - B_{550}$) حيث

$$A = B_{440} - B_{550} - (A_{440} - A_{550})$$

وذلك للعينات وللمحلول القياسي لحساب تركيز مضاد الكوكسيديا في العينة .

وفي طريقة مطورة وأبسط من السابقة ، تستخلص ٢٥ جم عينة بمقدار ٢٠٠ مل أسيتون محمض ، ثم ينقل منها ١,٦ مل إلى دورق معياري ٥ مل ويخفف ، تبقع رقائق كروماتوجرافي سيليكاجيل بالعينات والمحلول القياسي (١٠ ميكروجرام / مل) ، وتطور الرقائق في مخلوط كلوروفورم / ميثانول (٥/٩٥) ، ثم تجفف فيظهر الروبنزيدين تحت الأشعة فوق البنفسجية (٢٦٥ نانومتر) عند Rf ٠,٧٥ ، تقشط بقع الروبنزيدين ، وتنقل إلى أنبوبة اختبار وتستخلص بمقدار ٢٠ مل دي ميثيل فورماميد ، وترشح إلى دورق مخروطي ٢٥ مل ، ويضاف إليها ٠,١ مل صودا كاوية ١ مولر ، وبعد ١٥ دقيقة تقدر الكثافة للون الأصفر على ٤٦٤ نانومتر ضد مقارنة من نفس محاليل المحتوية ٠,١ مل صودا كاوية ١ مولر لكل ٢٠ مل دي ميثيل فورماميد .

هـ ـ نيكاربازين Nicarbazine :

يشترط في تقديره حجب جميع المحاليل عن الضوء المباشر .

اغل ١٠ جم عينة مع ١٠٠ مل دي ميثيل فورماميد ، ثم برد واطرد مركزياً . طور على عمود كروماتوجرافي من ١٠ جم أكسيد ألمونيوم متعادلاً ، بوضع ٢٥ مل من المستخلص على العمود ، وغسيله ٣ مرات × ١٠ مل دي ميثيل فورماميد ، ثم الحصول على مضاد الكوكسيديا بغسيل العمود ٩ مرات × ٥ مل إيثانول . استبعد أول ١٥ مل ثم اجمع ٢٥ مل التالية في دورق معياري ، وخفف إلى العلامة . تجرى نفس الخطوات على ٢٥ مل محلولاً قياسياً .

وللتقدير ينقل ٢٥ مل من المستخلص في دورقين معياريين ٥٠ مل ويضاف للأول ٥ مل صودا كاوية كحولية (بتخفيف ٢ مل ٥٠٪ هيدروكسيد صوديوم إلى ١٠٠ مل بالإيثانول) ويملأ الدورقان بالإيثانول إلى العلامة . ويتم القياس ضد إيثانول على ٣٤٤ نانومتر مع إجراء تقدير لمحلول قياسي ٢٥ مجم مادة نقية تذاب في ١٥٠ مل دي ميثيل فورماميد بالتسخين والتخفيف إلى ٥٠٠ مل .

و ــ زوالين Zoalene :

يستخلص ١ جم عينة بالداي ميثيل فورماميد (٢٠٠ مل) الساخن لمدة ٥ دقائق. ينقل المستخلص إلى دورق معياري لتر ، وخفف إلى العلامة . خفف المستخلص ١٠ أضعاف ، وانقل ١٠ مل إلى دورق معياري ٢٥ مل ، وخفف إلى العلامة بمحلول ٤٠ ٪ ١-٣-بروبان دي أمين ، وبعد ٣ دقائق من الخلط قس الامتصاص على ٥٦٠ نانومتر ، وقدر كذلك الامتصاص لمحلول قياسي (٢٥٠ مجم مادة نقية في لتر دي ميثيل فورماميد وخفف ١٠ أضعاف) بنقل ١٠ مل محلولاً قياسيا في دورق معياري ٢٥ مل وعاملها كما سبق مع العينة .

ز ــ مونسين (رومنسين Rumencin) Monensin :

مضاد للكوكسيديا حديث الاكتشاف (١٩٦٧) عزل من بيئة Streptomyces cinamonensis ، ويتم تقديره بوزن ٢٠ جم عينة ، وأضف إليها ٢٥ مل ماء + ٢٥٠ مل كلوروفورم ، واستخلص بالخلط الجيد ، ثم انقل الطبقة المائية ، وأضف إليها ٢٠٠ مل ميثانول ، واخلط ثم رشح ، وجفف بالتبخير تحت تفريغ ، وأذب المتبقيات في أقل كمية ميثانول . بقع رقائق كروماتوجرافي بمستخلص العينة وبمحلول قياسي (١٠٠ ميكروجرام رومنسين نقي في ميثانول) ، ثم طور الرقائق في دي إيثيل إيثير ، ثم جففها وطورها ثانية في كلوروفورم / أسيتون / بروبانول (٨٥/١٠/٥) ، ثم جفف الرقائق ورشها للإظهار بمحلول ٥ ٪ فانيللين Vanillin في ميثانول (١٠ ٪) ، ثم رش ثانية بحمض كبريتيك ميثانولي ١٠ ٪ ، وسخن الرقائق بتيار هواء ساخن ، فيظهر الرومنسين بلون أحمر لامع ثم أخيراً بلون بني ، وإذا باتت الرقائق ليلة تختفي الأشرطة الحمراء ويستبقى شريط الرومنسين على الرقائق ، فيمكن قشط مناطقه واستخلاصها بالميثانول وقراءة كثافتها الضوئية على طول موجة مناسب .

وينصح بالرجوع إلى المراجع التالية لمزيد من التفاصيل :

- AOAC (1980) Association of Official Agricultural Chemists 13 th Ed .Washington .

- Hazato , t . et al . (1979) Anal Biochem ., 94 : 29

- Knobloch , E & Cerna - Heyrovska, J . (1979) Fodder Biofactors .

- Schwedt , G. (1978) Anad Biochem ., 24 : 29 .

Their Metheds of Determina tion Academia , Praha .

- Schweighardt , H. & Leibetseder , J . (1979) Wien tierarztl . Mschr., 66 : 325 .