الفصل التاسع

المواد الضارة والسامة

فى مواد العلف وغيرها

قد تحتوي الأغذية المختلفة على مصادر للمواد الضارة والسامة بشكل أو بآخر ، فقد تكون هذه المواد ضمن التركيب الطبيعي للغذاء أو قد تنشأ من خلط الغذاء بمواد ضارة ، إما عن عمد كغش أو للوقاية والعلاج أو الحفظ ، أو بدون عمد كخطأ في التصنيع أو لتلوث أيا كان مصدره . فهناك نباتات تنتمي لعائلات نباتية معروف عنها أنها سامة ، أو قد تحدث إصابة بفطريات أو بيكتريا (وسمومهما) أو أن تتلوث الأغذية بشوائب معدنية أو بمبيدات مختلفة ، أو قد تتركز فيها الإضافات المختلفة نتيجة زيادة الجرعة أو عدم تجانس خلطها أو نتيجة سوء التخزين والتلف . وتصل هذه المواد الضارة إلى الإنسان مباشرة (في الغذاء والماء) أو بطريق غير مباشر (عن طريق متخلفاتها في أنسجة الحيوانات التي تناولتها في غذائها وماء شربها) ، فهي بالتالي تؤثر على الحيوان والإنسان .

لذلك اهتمت كثير من الدول المتقدمة في وضع قوانين لمواد العلف المتداولة في كل منها ، وتضمنت هذه القوانين كذلك الحدود القصوى المسموح بتواجدها في مواد العلف المنفردة المختلفة بالمليجرام / كجم مادة جافة (٨٨٪ مادة جافة) كالتالي :

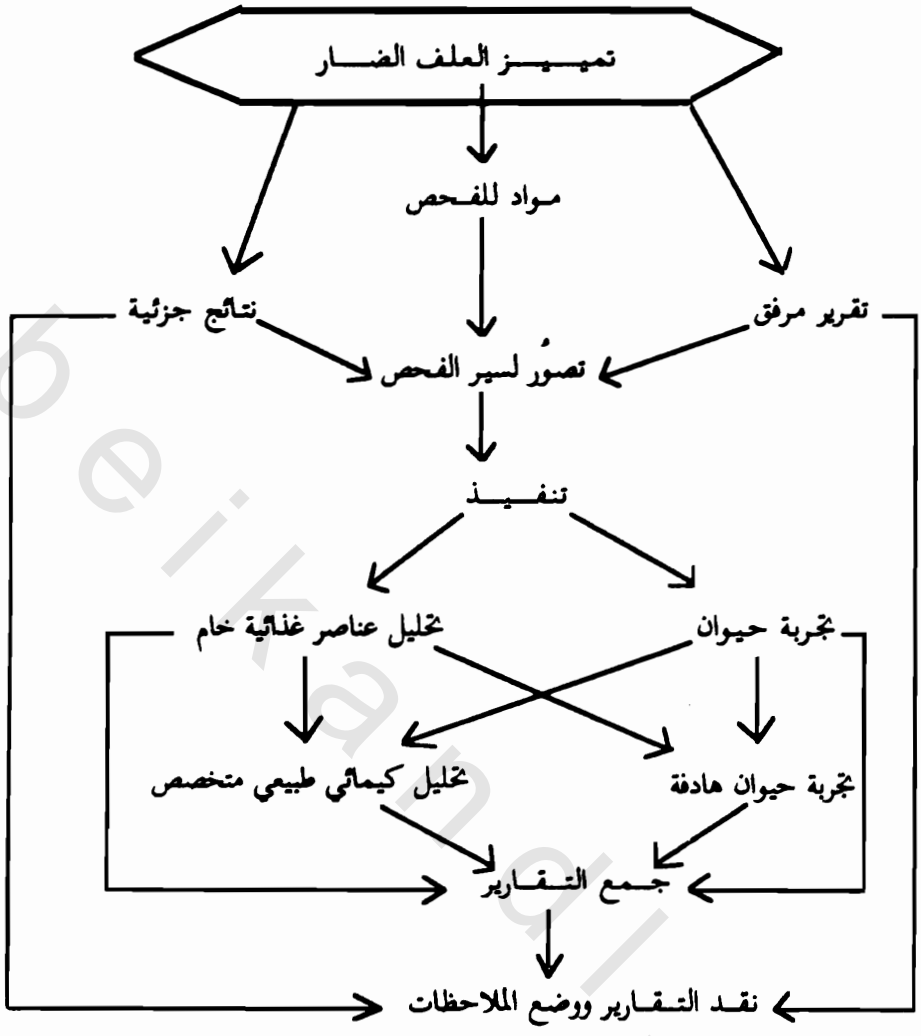
المادة السامة	أقصى حد سماح لتواجدها (جزء / مليون)
أفلاتوكسين ب١	٠,٠١ ـ ٠,٠٥
إرجوت	١٠٠٠
جوسيبول حر	٢٠ ـ ٥٠٠
بذور حشائش	٣٠٠٠
زيت خردل	١٥٠ ـ ١٠٠٠
قشور خروع	١٠
زرنيخ	٢
رصاص	٥ـ١٠

المادة السامة	أقصى حد سماح لتواجدها (جزء / مليون)
فلور	٥٠ ـ ٣٥٠
زئبق	٠,١
نيتريت صوديوم	١٥
حمض هيدروسيانيك	١٠ ـ ٥٠
كلوردان	٠,٠٥
DDT, DDE, DDD	٠,٠٥ ـ ٠,٣٠
الدرين ، دى الدرين	٠,٠٢ ـ ٠,٠٥
أندرين	٠,٠٢
هبتا كلور ، هبتا كلوروبوكسيد	٠,٠٣ ـ ٠,٠٥
هكسا كلور بنزول	٠,٠٢٥ ـ ٠,٠٦٠
ثيو برومين	٣٠٠ ـ ٧٠٠
فنيل ثيوأوكسازوليدون	٥٠٠ ـ ١٠٠٠

الحدود الصغري تكون للحيوانات الحساسة وصغيرة السن والحلابة والضعيفة ، بينما الحدول العظمى لباقي الحيوانات .

فالعلف التالف لا يصلح كمادة علف ، وليس من السهل الحكم بتلف مادة علف بفحص عينة واحدة ، سواء من حيث تركيبها أو مظهرها ولونها وخلافه ، بل يلزم زيارة واحدة لموقع المزرعة وملاحظة مواد العلف على طبيعتها في مخازنها ونوع أرضية المخزن ، وإذا ما كانت رطبة أو مخزناً عليها الأعلاف مباشرة بلا أرضيات خشبية ، أو إن وجدت الأعلاف مكتلة ، فأخذ عينة من هذه المواقع قد توضح الإصابة بالقراد وتشخص الإصابة الراجعة لمادة العلف التالفة الضارة . ظهور السوس Mites علامة لبداية تلف مادة العلف؛ إذ إن الإصابة بالسوس مرتبطة بارتفاع محتوى الماء بمواد العلف المخزنة ، والتي تعد كذلك شروطاً ملائمة لبقاء البكتريا أو الفطر . وقد يلجأ لتحليل الأمونيا الحرة (التي لا يجب أن ترتفع عن ٠,٢٥ ٪) لتقدير درجة فساد مادة علف .

ولتشخيص العلف الضار يلزم الإحاطة بما يمكن معرفته وذلك كالتالي :



وعليه ، فإنه تلتقي وترتبط التحاليل الكيماوية وتجارب الحيوان الهادفة في منتصف الطريق لتشخيص العلف الضار . فتجربة الحيوان تعطي فكرة عن أسباب الضرر وشدته ، أما تجربة الحيوان الهادفة فهي لملاحظة الأضرار التي قد لا تظهر في الواقع العملي ، وهنا قد لا تتشابه دائماً أعراض الضرر في التجربة بما هو في الطبيعة .

ويفيد التقرير المرفق بالعينة في كل من وضع خطة فحص العينة ، وكذا في الحكم الأخير على النتائج ، فيكون الفحص موضوعيا ومنطقيا وأسهل في الإجراء ، وتمنع من وقوع المحكمين أو المحللين في خطأ الحكم . ويشمل التقرير أعراض المرض بالضبط ، وحجم نقص الإنتاج ، وتصوراً لسير الضرر ، وعليه يتوقف نجاح أو عدم نجاح وسائل

العلاج والنتائج الأولية . وعلى أساس ما يثبت من أسباب الضرر أو إثبات صلاحية العلف للتغذية ، يتوقف ذلك على أسلوب أخذ العينة ، خاصة لو كان الحكم على العلف متعلقاً بالقضاء ، فيلزم أخذ العينة بواسطة خبير عدل ، أو إذا لم يتوفر فتؤخذ في حضور شهود (زراعي ، بيطري ، مورد) وهنا تؤخذ كمية كبيرة (٥٠-١٠٠ كيلو) في عبوات أصلية للتحليل في جهات محايدة . ومع التقرير تذكر بيانات عن الشركة المنتجة ، وتركيب العلف ، ونوع العليقة ، وكذلك وصف المشروع من حيث نوع وعدد الحيوانات ، ونوع التسكين للحيوانات وكثافة الحيوانات ونظام الشرب والأكل ، وحكم على النواحي الصحية والإدارية . ويجب معرفة أن الحكم على صلاحية علف اليوم من الصعوبة بمكان ، إذ إن إمكانيته محدودة وتنجح في حالة توفر حاسة بوليسية .

ويتطلب الأمر أحياناً إجراء فحص خارجي قبل التحليل للعينة ، وذلك حيث تؤدي الحشرات والقوارض إلى مهاجمة المحاصيل المختلفة في الحقل والمخزن ، وتؤدي إلى تلوثات . وفحص مواد العلف للحشرات وأجزائها يتطلب معرفة وتدريباً وخبرة في مجال الحشرات ، للتعرف عليها بالفحص البصري أو المجهري .

أما التلوث بالرمل والتربة والزجاج فيتم فحصه بالفصل في سائل كثافته تقارب ١,٤٩ ، ففيه تستقر الأجزاء الثقيلة بينما تطفو الأنسجة النباتية ، فيفصل الأجزاء المترسبة ، وتفحص بالغربلة بمناخل .

وفيما يلي وصف للتعرف على بعض السموم ومنها :

١ ـ الجلوكوزيدات السيانيدية Cyanogenetic Glycosides :

توجد في كثير من مواد العلف ، ويجرى لها اختبار نوعي Qualitative Test ، فيعد ورق بيكرات بغمس شرائط من ورق الترشيح ٦×٢ سم في محلول ١ ٪ من حامض البيكريك ، ثم تجفف هوائيا ثم تغمس ثلثها في محلول ١٠ ٪ كربونات صوديوم ، ثم تجفف ، ويحفظ هذا الورق في برطمان مغلق . قطع ٢٥ جم من أجزاء المادة النباتية لأجزاء صغيرة واطحنها جيداً وضعها في دورق مخروطي سعة ١٥٠ مل مع ٦٠ مل ماء مقطراً وسده بسدادة بها قطعة من ورق بيكرات صوديوم مبللة ، واحترس ألا تلمس هذه الورقة أي جزء من العينة النباتية . أضف بضع نقط كلورفورم وسد وحضن على ٣٧°م . يتحول لون الورقة تدريجيا إلى البرتقالي ، ثم إلى الأحمر الطوبي وذلك إذا كانت المادة النباتية تحتوي على الجلوكوزيدات السيانيدية . هذا الاختبار حساس ، وتعتمد سرعة تغيير اللون فيه على وجود كمية من حمض الهيدروسيانيك HCN الحر . ويعتمد هذا الاختبار على المواد النباتية الطازجة ، فيعطي نتائج ممتازة إلا أنه يعطي نتائج نسبية مع المواد الجافة ، وإذا استخدمت البذور فلابد من طحنها وبللها بالماء ، ثم تحلل مائيا في أنبوبة اختبار مغلقة محتوية على

ورق بيكرات الصوديوم . وقد يضطر لإضافة كمية ضئيلة من مادة مستحلبة Emulsion . اختبر التفاعل بعد ، ١ ، ٢ ، ٤ ساعات . ويكون الاختبار موجباً بعد ٥ ساعات تفاعل إذا احتوى العلف على ١ مجم سيانيد / ١٠٠ مجم علف. الجرعة السامة ٢ مجم / كجم وزن حي من البقر .

٢ ـ حمض الهيدروسيانيك Hydrocyanic Acid :

يتكون بتحليل الجلوكوزيدات في البقول وبذور الكتان ومسحوق التابيوك ، ويقدر بطريقتين :

أ ـ المعايرة بالحامض ، أو :

ب ـ المعايرة بالقلوي .

أ ـ طريقة المعايرة بالحامض :

وفيها ينقع ١٠–٢٠ جم عينة مطحونة (لتمر من منخل نمرة ٢٠) في دورق كلداهل (٨٠٠ مل) مع ١٠٠ مل ماء على درجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين ، ثم يضاف ١٠٠ مل ماء ، وتقطر ويجمع البخار في ٢٠ مل نترات فضة $AgNO_3$ ٠,٠٢ عياري محمضة بواسطة ١ مل من حمض النيتريك HNO_3 . قبل التقطير يضبط الجهاز ، بحيث يكون طرف المكثف أسفل سطح السائل في القابلة . عند تجميع ١٥٠ مل يرشح المتقطر خلال قمع جوتش Gooch ، وتغسل القابلة والقمع بقليل من الماء ، ثم يعاير فائض نترات الفضة في المتقطر والغسيل بواسطة محلول سيانيد بوتاسيوم KCN تركيز ٠,٠٢ عياري باستخدام دليل شب الحديد ، واستنتج تركيز حمض الهيدروسيانيك كالتالي :

$$1ml\ 0.02\ N\ Ag\ NO_3 = 0.54\ mg\ HCN$$

ب ـ طريقة المعايرة بالقلوى :

وفيها يوضع ١٠–٢٠ جم عينة (مطحونة لتمر من منخل رقم ٢٠) في دورق كلداهل سعة ٨٠٠ مل ، أضف ٢٠٠ مل ماء ، واتركه ساكناً ٢–٤ ساعات ، قطر واجمع ١٥٠–١٦٠ مل متقطراً في محلول صودا كاوية NaOH (٠,٥ جم / ٢٠ مل ماء) ، وخفف الحجم حتى حجم معلوم وليكن ٢٥٠مل ، خذ منه ١٠٠مل ليضاف إليها ٨ مل هيدروكسيد أمونيوم ٦ عياريا + ٢مل يوديد بوتاسيوم ٥٪ ، وعاير بواسطة نترات الفضة تركيز ٠,٠٢ عياريا ، نقطة الانتهاء خافتة لكن تظل عكارة يسهل التعرف عليها خاصة في وجود خلفية سوداء .

استنتج تركيز حمض الهيدروسيانيك حيث إن :

$$1ml\ 0.02\ N\ Ag\ NO_3 = 1.08\ mg\ HCN$$

في وجود حمض الهيدروسيانيك بشدة تكون التغذية جافة فقط أو بعد الطبخ .

كما يمكن تقدير حامض الهيدروسيانيك كالتالي :

١ ـ يوضع ٢٥٠ مل ماء مقطراً في دورق مخروطي سعة لتر ، ويسخن على درجة حرارة ٣٨°م .

٢ ـ يوزن ٢٥–٥٠ جم مادة علف وتضاف إلى الماء .

٣ ـ يحضن الدورق بمحتوياته على ٣٨°م لمدة ١٢ ساعة .

٤ ـ يضاف ٥٠ مل محلول بيكربونات صوديوم مشبعة وتقطر المحتويات بالبخار لمدة ٠,٥ ساعة .

٥ ـ تعاير المتقطر بمحلول اليود (٠,٠١ عياري) في وجود دليل النشا .

٦ ـ كل ١ مل (٠,٠١ عياريا) يود ≡ ٠,٠٠٠٢٧ جم حامض هيدروسيانيك فمن حساب حجم محلول اليود الذي عادل حامض الهيدروسيانيك يمكن حساب تركيزه في العينة .

٣ ـ التانينات Tanins :

توجد التانينات في حبوب السورجم، وكثير من البقوليات ، وأوراق الأشجار والشجيرات، وتؤدي هذه التانينات إلى خفض معاملات هضم هذه الأعلاف .

ويقدر التانين كنسبة مئوية في العينة كما يلي :

١ ـ يؤخذ ١ جم عينة مطحونة في دورق ١٢٥ مل مع ٥٠ مل ميثانول .

٢ ـ سد الدورق واخلط جيداً بالتقليب ثم اتركه .

٣ ـ بعد ٢٠–٢٨ ساعة قلب ثانية واتركه يستقر .

٤ ـ اسحب بماصة ١ مل من الرائق إلى أنبوبة مع ٥ مل دليل ڤانيلين (حجم من حمض هيدروكلوريك ٨ ٪ في ميثانول مع حجم من الڤانيلين ٤ ٪ في ميثانول (محضر يومياً) تخلط قبل الاستعمال مباشرة) .

٥ ـ اقرأ الكثافة الضوئية على ٥٠٠ نانومتر بعد ٢٠ دقيقة ضد محلول مقارنة من دليل الڤانيلين .

٦ ـ يعمل تقدير لمحلول قياسي من ٥٠ مجم كاتيشين Catechin في ٥٠ مل ميثانول (بأن يجرى عليه كما في خطوتي ٤ ، ٥) ، فالكثافة الضوئية لهذا المحلول تعادل الكثافة الضوئية لمستخلص العينة المحتوية على ٥ ٪ تانين في ١ جم عينة .

وإذا أريد تقدير الفينولات الكلية والتانين فيمكن ذلك بإجراء التالي :

١ ـ توزن عينة مطحونة (٥ جم) وتستخلص في الماء (٤٠٠ مل) لمدة ٠,٥ ساعة ، ثم تبرد وتنقل إلى دورق معياري ٥٠٠ مل ، وأكمل إلى العلامة ، وهز جيداً ثم رشح .

٢ ـ اسحب ١٠ ١/٢ مل من الراشح + ٥ مل دليلاً Folin Ciocalteu Phenol Reagent (١٠ جم تنجستات صوديوم + ٢,٥ جم موليبدات صوديوم + ٧٠ مل ماء في دورق ١٠٠ مل + ٥ مل حمض فوسفوريك + ١٠ مل حمض هيدروكلوريك ، واغل تحت مكثف عاكس ١٠ دقائق ثم أضف ١٥ جم كبريتات ليثيوم + ٥ مل ماء ونقط من البرومين ثم اغل ١٥ دقيقة بدون مكثف . برد وأكمل إلى ١٠٠ مل ثم رشح) + ١٠ مل محلول كربونات صوديوم (١٠٠ مل ماء + ٣٥ جم كربونات صوديوم لامائية تذاب على ٧٠-٨٠م ، برد ليلة واسحب الرائق للاستعمال) وأكمل في دورق معياري إلى ١٠٠ مل ، واخلط وقس الكثافة الضوئية بعد ٣٠ دقيقة على ٧٦٠ نانومتر ضد مقارنة من نفس المحاليل دون عينة .

٣ ـ خذ ١٠ مل من محلول قياسي (١٠٠ مجم حمض تانيك في لتر ماء يحضر طازجاً لكل تقدير،كل ١ مل ≡ ٠,١ مجم تانيك) وأجر عليه كما في خطوة رقم (٢).

٤ ـ احسب الفينولات الكلية كحمض تانيك ٪ =

$$\frac{\text{مجم حمض تانيك (من المحلول القياسي)} \times \text{التخفيف} \times \text{الكثافة الضوئية للعينة} \times ٤٠٠٠}{\text{وزن العينة (جم)} \times \text{الكثافة الضوئية للمحلول القياسي} \times ١٠٠٠}$$

٥ ـ جزء آخر من المستخلص للعينة يضاف إليه جزء من مسحوق جلد حيوان ، ثم يرشح ويعامل الراشح بالدليل كما سبق في خطوة رقم (٢) ، وتقدر الكثافة الضوئية لتقدير الفينولات غير التانينية غير المرتبطة ، وبطرحها من الفينولات الكلية من خطوة رقم (٤) تنتج الفينولات التانينية .

٤- الجوسيبول Gossypol :

مركب فينولي سام محدود الانتشار ، إذ يرتبط انتشاره بجنس القطن Gossypium ، وهو صبغة صفراء ، تتحول بالتسخين إلى ثلاث صبغات ، وهي :

ـ Gossypurpurin وهي صبغة قرمزية .

ـ Gossyfulvin وهي صبغة برتقالية .

ـ Gossycaeruculin وهي صبغة زرقاء .

ويتم تقدير الجوسيبول بوزن ١٠ جم عينة مطحونة جيداً ، وتحمض بواسطة حمض هيدروكلوريك تركيز ٢ عياريا حتى PH ٢-٤ ، وترج جيداً مع ١٠٠ مل إيثير ، واسكبه ثم حول الوسط للعينة لقلوي باستخدام الصودا الكاوية حتى PH ٩ ، ورج جيداً مع ١٠٠ مل أخرى من الإيثير. خذ المحلول في قابلة مغلفة بورق الألومنيوم Foil وبخره (بدون تسخين)

تحت جو من النتروچين حتى يتركز إلى ١ مل . بقع من هذا المستخلص على رقائق الكروماتوجرافي TLC وحمضه في الظلام في مخلوط مذيب مكون من ٩٠ : ١٠ : ٤ من كل من بنزين ٩٥٪ ، بيوتين ٤٪ ، حمض خليك ١٪ على الترتيب .

وتحتوي بذور القطن على ٠,٤ – ١,٧٪ جوسيبول .وكل صور المركبات التي يدخل في تركيبها الجوسيبول تنشأ أثناء التسخين . وأثر هذه المركبات في الإنسان غير معروف . ويؤدي التسمم بالجوسيبول إلى نقص معدل النمو ، وقلة الاستفادة الغذائية ، وأوديما بالرئة والكبد والكلى والطحال . المجترات تبدى مناعة ضد الجوسيبول لفعل الكائنات الحية بالكرش ، بينما العجول تتأثر بالجوسيبول لعدم اكتمال انتشار الكائنات الدقيقة بكرشها .

ولا ينبغي أن يتعدى الحد الأقصى للجوسيبول في مخلفات استخلاص الزيت من بذور القطن (نواتج الاستخلاص) عن ٠,٠١٪ .

وقد يفيد إضافة كبريتات الحديد للعلائق المحتوية على جوسيبول ، وذلك لمنع تأثير الجوسيبول على رداءة تلوين صفار البيض (التحول للون الزيتوني) .

ويقدر الجوسيبول الحر والكلى بطريقة ضوئية على طول موجة ٤٤٠ نانومتر بدقة تصل إلى ٢٠ مجم / كجم على أن تكون الخطوات على درجة حرارة ٢٠°م ، وأن يكون حجم العينة (تتوقف وزنتها على محتواها من الجوسيبول) بالضبط حوالي ٠,٥ – ٥ جم حسب نوع الجوسيبول المراد تقديره .

تقدير الجوسيبول الحر :

١ ـ ضع العينة الموزونة بالضبط في دورق ٢٥٠ مل مع ٥٠ مل مذيب أ (٥٠٠ مل مخلوط بروبانول / هكسان (٤٠/٦٠) + ٢ مل ٣–أمينو بروبانول + ٨ مل حمض خليك ثلجي + ٥٠ مل ماء وأكمل إلى لتر بمخلوط بروبانول / هكسان (٤٠/٦٠) . هذا المذيب يظل صالحاً للاستعمال لمدة أسبوع) وسد الدورق ، ورجه ساعة على محرك ميكانيكي .

٢ ـ رشح واجمع الراشح في دورق صغير مع تغطية القمع بزجاجة ساعة أثناء الترشيح . انقل من الراشح حجماً معلوماً إلى دورق مدرج ٢٥ مل + ٢ مل أنيلين وسخن ٣٠ دقيقة على حمام بخار لإحداث اللون .

٣ ـ برد إلى حرارة الغرفة ، وأكمل إلى العلامة بمخلوط البروبانول / هكسان (٤٠/٦٠) ، واخلط واتركه يستقر ساعة ثم قس الامتصاص على ٤٤٠ نانومتر ، ضد مقارنة ، أجر عليها نفس الخطوات بدون عينة .

تقدير الجوسيبول الكلى :

١ ـ تنقل العينة إلى دورق مدرج ٥٠ مل مع ١٠ مل مذيب ب (٢ مل ٣–أمينوبروبانول + ١٠ مل حمض خليك ثلجي . برد إلى حرارة الغرفة ، ثم أكمل إلى ١٠٠

مل بالدي ميثيل فورماميد . هذا المذيب ثابت لمدة أسبوع) . سخن لمدة ٣٠ دقيقة على حمام بخار . برد إلى حرارة الغرفة ، وأكمل إلى العلامة بمخلوط البروبانول / هكسان (٤٠/٦٠) . اتركه يستقر ١٠-١٥ دقيقة .

٢ ـ رشح وانقل ٢ مل من الراشح إلى دورق مدرج ٢٥ مل + ٢ مل أنيلين وسخن ٣٠ دقيقة على حمام بخار لإحداث اللون .

٣ ـ برد إلى حرارة الغرفة ، وأكمل إلى حجم ٢٥ مل بمخلوط البروبانول / هكسان (٤٠/٦٠) ، واتركه يستقر ساعة بعدها يقدر الامتصاص .

يلاحظ عمل تجارب خاوية (دون عينة) بنفس الخطوات لكل من الجوسيبول الحر والجوسيبول الكلى ، وعمل منحنى قياسي لكل من الجوسيبول الحر (٢٧,٩ مجم خلات جوسيبول تذاب في مذيب أ ، وتكمل به إلى ٢٥٠ مل ينقل منه ٥٠ مل وتكمل إلى ٢٥٠ بنفس المذيب (١ مل ≡ ٠,٠٢ مجم جوسيبول) تترك ساعة على حرارة الغرفة قبل استخدامه) والجوسيبول الكلى (٢٧,٩ مجم خلات جوسيبول تذاب في مذيب ب وتكمل به إلى ٥٠ مل تركيز الجوسيبول في هذا المحلول ٠,٥ مجم / مل) مع ملاحظة أن محاليل الجوسيبول تظل ثابتة يوماً واحداً إذا حفظت من الضوء ، بإضافة الأنيلين إلى تركيزات مختلفة من كل محلول قياسي والتسخين فالتبريد فالتخفيف لنفس الحجم كما في العينات ، ثم تركها ساعة فالقياس كما ذكر مع العينة ، علماً بأن الامتصاص النوعي للجوسيبول الحر = ٦٢٥ وللجوسيبول الكلى هو ٦٠٠ فيمكن حساب تركيز الجوسيبول إما من المنحنى القياسي أو بمعلومية الامتصاص النوعي حيث إن :

$$\text{٪ جوسيبول} = \frac{\text{الامتصاص المقدر} \times ١٢٥٠}{\text{الامتصاص النوعي} \times \text{وزن العينة جم} \times \text{حجم المستخلص من الراشح مل}}$$

٥ ـ القلويدات :

١ ـ تستخلص القلويدات بالميثانول من العينة المطحونة جيداً ، والمجففة Freeze dried ، وتبقع على رقائق سليكاجيل كروماتوجرافي بدون دليل فلورسنتي .

٢ ـ تبقع كذلك رقائق الكروماتوجرافي بقلويدات نقية (محاليل قياسية) .

٣ ـ تطور رقائق الكروماتوجرافي في خليط من البنزين / دي كلورميثان / دي إيثير / دي إيثيل أمين (٢/٥/٥/٥) .

٤ ـ تجفف الرقائق على ١٣٠°م لمدة ١٧ ساعة .

٥ ـ تفحص تحت ضوء فوق بنفسجي على طول موجة ٣٦٠ نانومتر ، فتظهر القلويدات بفلورسنت أزرق يظل لمدة عدة أسابيع ثابتاً . وقد يكون التسخين لمدة ٣٥ ساعة

أو أكثر أفضل لظهور فلورسنت أوضح .

٦ ـ تقارن معدلات سريان Rate of Flow (R_F) العينات مع تلك للمحاليل القياسية ، ثم تفحص الرقائق على جهاز قياس الكثافة الضوئية للبقع الفلورسنتية لرسم منحنيات تمثل تركيزات هذه القلويدات . وقد تستخلص البقع الفلورسنتية وتقاس كثافتها الضوئية على ٤٠٠ نانومتر .

٧ ـ أمكن بهذه الطريقة تقدير قلويدات عديدة مثل سبارتيئين Sparteine ، ليوبانين Lupanine ، ليوبينين Lupinine ، أنجوستيفولين Angustifoline ، ١٣-هيدروكسي ليوبانين 13-Hydroxylupanine .

٦ ـ القواعد الطيارة الكلية Total Volatile Bases :

١ ـ أضف في دورق التقطير لوحدة كلداهل ١٠ جم عينة مفرومة + ٢ جم أكسيد ماغنسيوم + ٣ نقط سائل مانع للفوران (سيليكون أو إيزوأكتان) + ٣٥٠مل ماء مقطراً + قطع حجر خفاف لمنع الفرقعة .

٢ ـ ضع في قابلة الجهاز ٢٥ مل حمض بوريك ٢٪ + نقط من دليل (٠,٠٢ ٪ أحمر ميثيل ، ٠,٠١ ٪ أخضر بروموكريزول في إيثانول) .

٣ ـ شغل وحدة كلداهل بحيث تبدأ عملية الغليان في ظرف ١٠ دقائق ، واستمر في التقطير مع ثبات معدل التسخين لمدة ٢٥ دقيقة .

٤ ـ نقط المتقطر وحمض البوريك بحمض كبريتيك ٠,٠٥ عياري .

٥ ـ خذ ٢٥ مل حمض بوريك ٢٪ ونقط من الدليل ونقط بنفس الحامض كمقارنة .

٦ ـ احسب القواعد الطيارة الكلية بضرب الفرق بين حجمي حمض الكبريتيك المستخدمين للتنقيط في خطوتي رقم ٤ ، ٥ في ١٤ لاستنتاج التركيز بالمليجرام نيتروجين / ١٠٠ جم عينة .

وهذه القواعد الطيارة الكلية تشمل الأمينات الطيارة كثلاثي ميثيل أمين ، وثنائي ميثيل أمين ، والأمونيا الموجودة في اللحم ، وقد قدرت في لحوم الأسماك الطازجة بأقل من ٢٥-٣٠ مجم أزوت / ١٠٠ جم ، وزيادتها دليل فساد السمك .

٧ ـ الأحماض الدهنية الحلقية Cyclopropenoid Fatty Acids (CPFA) :

توجد الأحماض الدهنية الحلقية في بعض الزيوت وتؤدي إلى أضرار بيولوجية . ويتم تقديرها كالتالي :

١ ـ يتم ذوبان الزيت أو الدهن في دي إيثيل إيثير ، ويخفف بالإيثير إلى حجم معلوم .

٢ ـ ينقل ١ مل من مستخلص العينة أو من المحلول القياسي (يحضر طازجاً بإذابة

كمية معلومة من ميثيل ستيركيولات Methyl Sterculate حديث التحضير في دي إيثيل إيثير . وهذا الميثيل ستيركيولات يحضر أساساً من زيت Sterculia Foetida Oil) إلى أنبوبة اختبار .

٣ ـ يضاف إلى أنابيب الاختبار ١ مل دليل تلوين (٤ ٪ بلورات كبريت مونوكلينيك مذابة في ثاني كبريتيد كربون ، وتحضر بلورات كبريت مونوكلينيك بتسخين البيريدين إلى ٨٥°م ويضاف إليه كمية كافية من كبريت زهر لتشبيع المحلول ، ويبرد المحلول ويترك ليلة في ثلاجة على ٤°م للترسيب لفصل الراسب بالترشيح ، وتجفيف البلورات المرسبة ٢٤ ساعة هوائياً لإزالة البيريدين ، يطحن الكبريت إلى مسحوق ويخزن في آنية بنية اللون على حرارة الغرفة) + ٨ مل بيريدين للأسبكتروفوتومتر .

٤ ـ يجرى عمل مقارنة من نفس المحاليل .

٥ ـ تقلب الأنابيب بعد سدها وتخلط جيداً ، ثم توضع في حمام جليسرين على ٤٨°م لمدة ١٥ دقيقة ، ثم ترفع درجة الحرارة إلى ٩٥°م (يتطلب ذلك ٢٥ دقيقة) ويستمر عليها ٥ دقائق ، ثم ترفع درجة حرارة الحمام إلى ١٠٥°م ويستمر عليها ساعة .

٦ ـ برد الأنابيب ، وأكمل حجومها إلى ١٠ مل بالبيريدين واخلطها .

٧ ـ قس الكثافة الضوئية على ٥٠٥ نانومتر بعد ساعة بالضبط من إزالة الأنابيب من الحمام .

٨ ـ النيترات :

هناك تكنيك سريع نصف كمي Semiquantitative باستخدام ورق دليل (Merckoquant) في المستخلص المائي ، فتكون النيترات في هذا الاختبار مادة ملونة أزوتية حمراء بنفسجية . ويجرى تقدير النيترات / نيتريت في الأعلاف الخضراء كالتالي :

يوضع ٥٠ جم نباتات طازجة مجزأة + ٨٠ مل ماء مقطراً وتعجن في خلاط عادي بالخلط ، ثم تنقل العجينة الناتجة من الخلط بقليل من الماء المقطر إلى كأس زجاجي ، ويغسل الخلاط بالماء ويكمل الحجم الكلي إلى ٢٠٠ مل . يضاف إلى الكأس ٢٠ مل حامض ثلاثي كلورو الخليك تركيز ١٠ ٪ ، ويكمل بماء مقطر فاتر إلى ٥٠٠ مل . ويقلب جيداً ويترك ١٠ دقائق ثم يرشح ، يغمس ورق الدليل في الراشح ، ويستخرج ورق الدليل ليقرأ بعد دقيقتين ليقارن بتدريج لوني قياسي (مجم / لتر) وتحسب كمية النيترات بالمليجرام NO_3 لكل جرام عينة جافة .

٩ ـ النقاوة :

لحساب نقاوة الأملاح أو المعادن وأكاسيدها تعامل بحمض كبريتيك معلوم العيارية ، للتفاعل مع الأكاسيد ، ومعادلة باقي الحمض بقلوي معلوم العيارية ، ومنها تحسب النسبة

المئوية للأكاسيد ودرجة نقاوتها . وتكون عدد مكافئات الأكاسيد مساوية لعدد مكافئات الحمض المضاف أولاً مطروحاً منها عدد مكافئات الحمض المتبقية (المتعادلة مع القلوي).

ففي الحجر الجيري تؤخذ عينة وتعامل بحمض HCl ، وتعادل الزيادة من الحمض بمحلول NaOH وفيما يلي مثال على حساب نسبة النقاوة .

عينة من الحجر الجيري وزنها ٠,٥ جم ، عوملت بحجم قدره ١٠٠ مل HCl ٠,١ عياري ولزم لمعادلة الزيادة من الحمض ٥٠ مل Na OH ٠,١ عياري ، فتكون عدد مكافئات HCl = عدد مكافئات الحجر الجيري + عدد مكافئات NaOH .

$$\text{ـ } ٠,١ \times ٠,١٠٠ = \frac{\text{و}}{٥٠} + ٠,١ \times ٠,٠٥٠$$

ـ حيث و = $CaCo_3$ وزن النقية في الحجر الجيري

٥٠ = الوزن المكافئ للكربونات

∴ و = ٠,٢٥ جم

– وتكون النسبة المئوية للنقاوة = $\frac{\text{وزن الكربونات النقية} \times ١٠٠}{\text{وزن العينة}} = \frac{٠,٢٥ \times ١٠٠}{٠,٥} = ٥٠\,٪$

– أو نسبة الشوائب المئوية = ٥٠ ٪ كذلك .

١٠ ـ فساد اللحوم :

يتم تتبع عمليات فساد اللحوم بالفحص الميكروبيولوچي لجودة اللحوم ، وكذلك من التقديرات الكمية الكيماوية المختلفة التي تشمل :

أ ـ تقدير النيتروچين الطيار الكلي (القواعد الطيارة الكلية وثلاثي ميثيل أمين) :

زن ١٠٠ جم عينة لحماً أو سمكاً مع ٣٠٠ مل حمض ثلاثي كلورو خليك ٥ ٪ وجنس في مجنس ، اطرد مركزياً أو رشح . انقل ٥ مل من المستخلص إلى جهاز تقطير الميكروكلداهل وأضف إليها ٥ مل صودا كاوية ٢ عياري ، وقطر ، واجمع على ١٥ مل حمض هيدروكلوريك ٠,٠١ عياري ، أضف دليلاً ١ ٪ حمض روسوليك في إيثانول وعاير بالصودا الكاوية ٠,٠١ عياري ، أضف ١ مل فورمالدهيد متعادل ١٦ ٪ لكل ١٠ مل سائل في قابلة المعايرة ، وأكمل المعايرة بالصودا الكاوية ٠,٠١ عياري . احسب تركيز القواعد الأزوتية مجم / ١٠٠ جم = $\frac{١٤ (٣٠٠ + ر) \times ح_١}{٥٠٠}$

وأزوت ثلاثي ميثيل أمين / ١٠٠ جم = $\frac{١٤ (٣٠٠ + ر) \times ح_٢}{٥٠٠}$

حيث إن ر = الرطوبة في العينة مجم / ١٠٠ جم .

ح١ = حجم الحامض القياسي المستهلك في المعايرة الأولى .

ح٢ = حجم الحامض القياسي المتحرر في المعايرة الثانية .

والأزوت الطيار الكلى في معظم لحوم الماشية يعتبر مقبولاً لو لم يرتفع عن ١٦,٥ مجم أزوت / ١٠٠ جم .

ب ـ الأحماض الدهنية الحرة للدهن المستخلص :

تستخلص العينة بالكلوروفورم ، وترشح على كبريتات صوديوم لامائية . قدر محتوى الدهن في جزء من الراشح معلوم الحجم ، اخلط ٢٥ مل راشحاً مع ٢٥ مل كحولا متعادلاً ، وعاير الأحماض الدهنية الحرة بالصودا الكاوية ٠,١ عياري مع وجود دليل فينولفثالين . معظم عينات اللحوم البقرية تعتبر مقبولة إذا لم ترتفع نسبة الأحماض الدهنية الحرة عن ١,٢ ٪ كحمض أوليك في الدهن المستخلص .

جـ ـ رقم بيروكسيد الدهن المستخلص :

يؤخذ جزء من راشح الكلوروفورم (من التقدير السابق) ويقدر فيه رقم البيروكسيد الذي تتراوح قيمته في عينات اللحوم البقرية بين صفر و ١ ملي مول / كجم دهناً مستخلصاً ، ولا تعتبر العينة مقبولة لو زاد رقم البيروكسيد فيها عن ٥ .

١١ ـ اختبار الكبريتيد ، لإبر ، Eber's Sulphide Test :

يجرى هذا الاختبار لتقدير مدى تلف مساحيق السمك أو اللحم ، وذلك على النحو التالي :

١ ـ ضع ٥ جم مسحوق سمك أو مسحوق لحم في دورق مخروطي سعة ٢٥٠ مل .

٢ ـ عدّ سدادة فلين لإحكام غلق فوهة الدورق تماماً ، وثبت في الفلين شريط من ورق الترشيح الأبيض بطول ٥ سم وعرض ٧٥ م ، مع غمس أحد أطرافها في السدادة بشقها من الجهة البطنية للسدادة ، بحيث إنه عند غلق الدورق يكون الشريط مدلى باستقامة في مركز الدورق ولا يلامس أي جانب للدورق .

٣ ـ خفف ٥ مل من حامض الكبريتيك المركز بالماء المقطر حتى تصل إلى حجم كلي ٥٠ مل ، ويوضع هذا الحامض المخفف في الدورق مع عدم ملامسة الحامض لجوانب الدورق .

٤ ـ حرّك الدورق حتى تبتل كل العينة، مع عدم بلل شريط الورق أو جوانب الدورق.

٥ ـ رطب شريط ورق الترشيح بمحلول مشبع من خلات الرصاص ، مع عدم زيادة الرطوبة حتى لا تجعل الشريط ينقط في الدورق ، حيث إن وصول خلات الرصاص مباشرة بحامض الكبريتيك يؤدي إلى تلف الاختبار .

٦ ـ أدخل سدادة الفلين بشريط الورق المبلل بالخلات إلى الدورق وأحكم الغلق ، واتركه في حجرة دافئة لمدة ١٦ ساعة . عادة في نهاية الساعات (الخمس أو الست ساعات الأخيرة) تتلون شرائط الورق بلون بني Tan إذ يتغير اللون من الأصفر الفاتح Light Buff إلى البني Brown إلى الأسمر Black ، وكلما ازداد اللون غمقة وأسرع في ظهوره كلما أظهر دلالة وجود تلف بالمنتجات المختبرة . فإن تلون الشريط باللون البني في ظرف ١-٣ ساعات دل على خطورة المشاكل الناجمة عن تلف مكونات العينة . وإذا تلون الشريط فقط بلون أصفر Slightly Tan أو Tinted في نهاية الساعات الستة عشر فإنه عادة يكون دليلاً على أمان استخدام هذه المادة المختبرة في التغذية الحيوانية .

ووجود دليل على تلف مادة العلف المختبرة يكفي لاستبعادها من تغذية الحيوان ، وإلا أدت لاضطرابات ومشاكل .

١٢ ـ الأضرار الميكانيكية للحبوب :

قد يتسبب الحصاد المبكر جداً أو التجفيف الشديد جداً إلى أضرار ميكانيكية للحبوب تؤدي لخطر من الإصابة الفطرية الثانوية . وللكشف عن الأضرار الميكانيكية نوعياً توضع الحبوب في محلول يود – يوديد بوتاسيوم (٠,٢ جم يود + ٠,٤ جم يوديد بوتاسيوم / ١٠٠ مل ماء) ، وترج جيداً وبعد ١-٥ دقائق يصب المحلول . في حالة الحبوب التالفة يظهر تلون في الشقوق وأماكن الكسور (تلون أسمر مزرق من تفاعل النشا من اليود) باستخدام عدسة مكبرة .

١٣ ـ السموم الفطرية :

رغم استخدام الطرق البيولوجية في الكشف عن السموم الفطرية ، فإن الكروماتوجرافي بأنواعه هو أساس التقدير الكمي لهذه السموم فاستخدمت الأعمدة والرقائق والنظم السائلة والصلبة والغازية والمناعية (Enzime Linked Immunosorbent Assay, ELISA) .

وتباع مستحضرات سابقة التجهيز Kits الآن لتقدير بعض السموم الفطرية .

أ ـ سموم فطر Pithomyces chartarum :

يطلق على هذا الفطر كذلك اسم Sporodesmium bakeri ، ويسبب إكزيما الوجه Facial eczema المرتبطة بأمراض الكبد وحساسية الغنم والبقر من الضوء ، فتعرف بإكزيما الوجه . ويجرى اختبار يعرف باختبار الكأس Beaker Test لمعرفة إمكانية سمية المراعي كالتالي :

٥٠ جم عينة حشائش مطحونة تستخلص بحوالي ١٠٠ مل أسيتون . يوضع الأسيتون على عمود كروماتوجرافي Column Chromatography يحتوي من أسفل كربون ممتص ومن أعلى ألومنيا ، ويضاف كثير من الأسيتون ويستبعد أول ٧٥ مل ، ويجمع ثاني ٧٥ مل في

كأس ويبخر للجفاف ، فالاختبار الموجب يعرف بالراسب الأبيض على جدران الكأس . هذه المادة ليست هى التوكسين لكنها دليل على وجود الفطر لأنها والتوكسين ناتجان من الفطر، ولكن وجود هذه المادة ليس دليلاً على سمية الحشائش ، ولكن سمية الحشائش تختبر بتغذيتها لخنازير غينيا . فيستخلص ١ ك حشائش سامة / خنزير غينيا بالإثير ، ويضاف هذا الإثير على عليقة ٣ أسابيع عادية ، وبعد تطاير الإثير تغذى عليها ٣ أسابيع ، وفي الرابع عليقة عادية ، ثم تفحص الخنازير للتغييرات المرضية بالكبد وقنوات الصفراء .

وتفحص سمية هذه الفطريات بتنميتها على ٢٠٠ مل بيئة بطاطس / جزر لمدة ٧ أيام على ٢٥°م ، وتستخلص البيئة بالإثير كما استخلصت الحشائش من قبل ويغذى المستخلص كذلك لخنازير غينيا . هذا السم (سبورو ديسمين) ذائب في الماء .

ب ـ قلويدات الإرجوت Ergot Alkaloids :

تجمع الإرجوت من الحبوب الملوثة ويتم طحنها . يخلط ٢,٥ جم مسحوق إرجوت مع ٠,٣ جم بيكربونات صوديوم ، ويضاف إليها ماء لعمل عجينة ، تستخلص بمقدار ١٠٠ مل إيثير إيثيلي وبرج لمدة ساعة ، ويكرر الاستخلاص ٣ مرات . تجمع المستخلصات وتجزأ مع ١٠ مل حمض طرطريك ١٪ ، ويكرر هذا التجزىء ٣ مرات . اجمع مستخلصات حمض الطرطريك وأكمل الحجم إلى ٥٠ مل بنفس الحمض للتحليل النوعي بتغيير اللون أو على رقائق الكروماتوجرافي كالتالي :

أ ـ يؤخذ ٥ مل من المستخلص الأخير مع ١٠ مل دليل فان يوركس ذو كلوريد الحديدوز (٠,١٢٥٪ بارادي ميثيل أمينو بنزالدهيد في ٦٥٪ حمض كبريتيك ، أضف ٠,١ مل محلول كلوريد حديدوز ٥٪ لكل ١٠٠ مل دليل فان يوركس) . فإذا وجدت قلويدات الإرجوت يتحول لون المحلول إلى الأزرق في ٣ أيام .

ب ـ خذ ١٠ مل مستخلص حمض طرطريك واضبط حموضته على ٨,٥ بهيدروكسيد الأمونيوم . استخلص بحجم مساو من الكلوروفورم . جفف طبقة الكلوروفورم بالتبخير . أذب في ٠,٥ مل كلوروفورم . بقع على رقائق سليكاچيل ، وكذلك بقع بمحلول إرجوت قياسي . طور الرقائق في خلات إيثيل / دي ميثيل فورمايد / إيثانول ١/١,٩/١٣ . افحص الرقائق تحت ضوء الأشعة فوق البنفسجية قصير الموجة فيظهر فلورسنت أزرق لقلويدات الإرجوت . وإذا لم يظهر الفلورسنت فترش الرقائق بدليل ٣,٥٪ بارادي ميثيل أمينو بنزالدهيد في حمض هيدروكلوريك مركز .

جـ ـ حمض التريك Terreic Acid :

تستخلص العينة بخلات الإيثيل ، وتركز المستخلصات بالتبخير تحت تفريغ ، ثم ينقى ويفصل حمض التريك على رقائق كروماتوجرافي سليكاچيل منشطة لمدة ساعة على

١٢٠م، مع تبقيع محلول قياسي كذلك للمقارنة .

طور الرقائق في مخلوط تولوين / خلات إيثيل / حمض فورميك ١/٤/٥ ، ثم جففها هوائيا ، وافحصها تحت أشعة فوق بنفسجية . علم حول البقع البنية الداكنة ، واقشطها واستخلص منها حمض التريك بالماء (١ مل) واطرد مركزيا ، ثم خذ ٠,٥ مل من الرائق للتقدير الضوئي بعد المعاملة بأي من دليلي اللون :

١ ـ دليل الفولين Folin's Reagent : بأخذ ٠,٥ مل مستخلصاً + ١ مل دليل اللون + ٢ مل محلول كربونات صوديوم ١٥٪ وخفف إلى ١٠ مل بالماء ، وبعد ١٥ دقيقة قدر الكثافة الضوئية على طول موجة ٦٢٠ نانومتر .

٢ ـ دليل ٢-٤- دي نيتروفينيل هيدرازين : ٠,٥ مل مستخلصاً + ٣,٥ مل ماء + ١ مل دليل لون (١٠٠ مجم في ١٠٠ مل حمض هيدروكلوريك ٢ عياري) + ٥ مل صودا كاوية ١,٥ عياري ، قدر الكثافة الضوئية خلال ٥ دقائق على طول موجة ٥٤٠ نانومتر .

د ـ الروبراتوكسين Rubratoxin :

استخلص ١٠٠ جم عينة بمقدار ٣٠٠ مل خلات إيثيل بالهز ليلة بسرعة ٣٥٠ لفة / دقيقة . رشح وبخر المترشح إلى ٢٠ مل . بقع على رقائق كروماتوجرافي تحت تيار نيتروجين لمنع الأكسدة . بقع ٥ ميكروجرام روبراتوكسين في محلول قياسي للمقارنة . طور الرقائق في مخلوط كلوروفورم / ميثانول / حمض خليك ثلجي / ماء ٨٠/٢٠/١/١ . جفف الرقائق هوائيا ثم في فرن على ٢٠٠م لمدة ١٠ دقائق . افحص الرقائق أسفل أشعة فوق بنفسجية طويلة الموجة ، فيظهر الروبراتوكسين بفلورسنت مخضر . يمكن رش الرقائق بمحلول ٢-٧- دي كلوروفلورسين فيظهر الروبراتوكسين بفلورسنت أخضر مصفر تحت الأشعة فوق البنفسجية طويلة الموجة .

هـ ـ السيترينين Citrinin :

في طريقة Abdelhamid, 1981 لتقدير السيترينين في مختلف مواد العلف ، تطحن العينة ويؤخذ منها ٢٥ جم + ١٠٠ مل كحول ميثايل / ماء مقطر (٧٠/٣٠) وتخلط ٥ دقائق في خلاط عادي ، ثم تضاف كربونات صوديوم عيارية حتى PH ٨-٩ ، ويضاف ٦٠ مل إثير بترولي ، ويخلط ٥ دقائق أخرى ، وتطرد مركزيا ٥ دقائق ، ويرشح الرائق على ٠,٥ جم Celite لمساعدة الترشيح ، وبدون حجم الراشح ، ويخلط مع ١٠٠ مل كلوروفورم للترويق وإزالة الدهون في دورق فصل بالرج ، ويؤخذ السائل العلوي + يد كل ٢ عياري حتى PH ١,٨-٢,٤ + ١٠٠ مل كلوروفورم للاستخلاص ويرج للفصل ، وترشح طبقة الكلوروفورم السفلى على ١ جم كبريتات صوديوم لامائية ، وتستقبل في دورق سعة ٢٥٠مل ، ويجفف

على حمام مائي تحت تفريغ على ٤٠°م ، ثم ينقى على عمود قصير Sep Pak C_{18} بحوالي ٢ مل ميثانول ، تستقبل في قنينة صغيرة ، ويغسل العمود بحوالي ١ مل أخرى ، ويبخر الميثانول للجفاف على ٥٠°م تحت تفريغ ، وتنتقل بحوالي ٢٠ ميكرولتر على رقائق كروماتوجرافي . يعد العمود بغسيله بحوالي ٥ مل ميثانول ، ثم ٥ مل ماء مقطراً ، ولمعادلته بعد استخدامه يغسل بواسطة ٥ مل من كل من الميثانول ، ديوكسان ، ميثانول .

وتطور الرقائق في كلورفورم / أسيتون / إيثانول / ماء مقطر (٦٠/٤٠/١٠/١) ، وتفحص الرقائق أسفل أشعة فوق بنفسجية (٢٥٤ نانومتر) ، أو على جهاز مقياسى كثافة الفلورسنت لرقائق الكروماتوجرافي TLC - densitometer على طول موجة ٢٥٤ نانومتر (فلتر رقم ٥٧) .

ويحسب تركيز السيترينين من المعادلتين :

(في حالة استخدام محلول قياسي خارجي) $Cs = \frac{Cst \times D}{R}$

(في حالة استخدام محلول قياسي داخلي) $= Cst \times D$

حيث إن Cs = تركيز الستيرينين في العينة جزء / بليون ، Cst = تركيز المحلول القياسي من السيترينين جزء / بليون للمحلول الداخلي أو نانوجرام / بقعة للمحلول الخارجى ، D = معامل التخفيف ، R = ما يمكن إعادة اكتشافه وهو ٨٥٪ في مدى ١٠٠-٦٠٠ جزء / بليون .

هذا ويمكن قياس السيترينين كذلك على جهاز الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط (الأداء) .

و ـ الباتيولين Patulin :

تستخلص وزنة من الحبوب ٥٠ جم بأسيتونيتريل / هكسان (١/٤) ، وبالتبخير نتخلص من معظم المذيب حتى الجفاف ، فيؤخذ التوكسين في ١ مل كلوروفورم ثم تنقى على رقائق كروماتوجرافي سيليكاچيل ، وتقدر كميا بعد ذلك بالتبقيع ثانية على رقائق كروماتوجرافي سيليكاچيل بتطويرها في بنزين / ميثانول / حامض خليك (٩٠/٥/٥) ، وتقارن بصريا مع محلول قياسي تركيز ٤٠ جزء / بليون ، ويمكن رش الرقائق لعمل مشتق فينيل هيدرازين لتأكيد النتائج .

وفي عصير الفواكه يمكن اكتشاف الباتيولين بحساسية ٥ أو ٢٠ جزء / بليون بالكروماتوجرافي الغازي أو رقيق الطبقات على الترتيب . فيمكن استخلاص ٥٠ مل من عصير التفاح أو الجريب بمقدار ٥٠ مل من خلات الإيثايل (٣ مرات) وتغسل المستخلصات بمقدار ٢٠ مل كربونات صوديوم ١,٥٪ وتجفف على ٢٠ جم كبريتات صوديوم وتركز إلى ١-٢ مل على حمام مائي في وجود النيتروجين وتنقل إلى قنينة أصغر

وتجفف ثم يذاب الراسب في ٠,٥ مل خلات إيثايل / ميثانول (٩٠/١٠) للتحليل على الكروماتوجرافي السائل عالى الأداء ذي عمود Partisil - 10 ODS فيمكن اكتشاف حتى ١ جزء / بليون بإعادة اكتشاف أعلى من ٨٠٪ .

ز ـ استريجماتوسيستين Sterigmatocystin :

يجرى الكشف عنه باستخلاص وزنة معلومة من العينة المطحونة ، وذلك بالكلورفورم ، أو مخلوط أسيتونيتريل / ماء مقطراً (١/٩) ، ويرشح وينقى بالهكسان ، ويبخر المستخلص لأقل حجم مكن ، ثم ينقى ويفصل على رقائق كروماتوجرافي سليكاچيل ، وبعد التطوير ترش الرقائق بهيدروكسيد بوتاسيوم ، أو كلوريد ألمونيوم ، أو حمض كبريتيك والتي تعطي تغييرات لونية واضحة .

ويمكن تمييز حتى ٣٠ جزءاً / بليون . وقد تتداخل الصبغات المرافقة للعينة وذات الفلورسنت الأحمر مع التوكسين وتضلل النتائج .

والتحليل بجهاز مطياف الكتلة Mass - Spectrometer يؤكد نتائج التحليل بواسطة رقائق الكروماتوجرافي ، ويستخدم للتقدير الكمي بنجاح . وإذا أذيب التوكسين في البنزين فتطور رقائق الكروماتوجرافي في مخلوط بنزين / حمض خليك / ميثانول ٥/٥/٩٥ ، وتجفف وترش بكلوريد ألمونيوم ٢٠٪ ، وتجفف ١٠ دقائق على ٨٠م وتفحص تحت أشعة فوق بنفسجية قصيرة الموجة فيظهر فلورسنت أصفر .

ولقد ذكر Kingston & Chen, 76 طريقة باستخدام الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط لفصل الاستريجماتوسيستين وغيره من نواتج ميتابوليزم الاسبرجيلس فرزيكلور (ميثوكسي ستريجماتوسيستين ، دي ميثيل ستريجماتوسيستين ، فرزيكلورين A ، فرزيكلورين C ، أفروفين، أفرموتين) باستخدام عمود سليكاچيل (Partisil 10) ووسط متحرك من الهكسان/ كلوروفورم / حمض خليك (١/٣٥/٦٥) .

حـ ـ التوكسين PR (وحمض الميكوفينوليك) :

ذكر Amend & MUller, 84 طريقة للتقدير فيها تطحن ٢٥ جم عينة ثم تستخلص بالماء المقطر (١٠٠ مل) وتحمض بحمض الهيدروكلوريك ٠,٢ ع حتى 1 PH ثم تستخلص بمقدار ١٠٠ مل كلورفورم أو خلات إيثايل أو خليطهما (١/١) لمدة نصف ساعة وتكرر ٣ مرات ثم تسحب الطبقة العضوية وتجفف على كبريتات صوديوم ثم تبخر تحت تفريغ على ٤٥م حتى حجم ٥ مل للتقدير المباشر أو تنقى على عمود من السليكاچيل باستخدام هكسان / خلات إيثيل (٣٠/٧٠) ثم (٤٠/٦٠) ثم (٥٠/٥٠) بمقدار ٥٠ مل من كل مخلوط ويستبعد أول ١٠٠ مل من الغسول ويجمع ما بعد ذلك إذ يحتوي التوكسين PR ، وللحصول على حمض الميكوفينوليك يغسل العمود بمقدار ٢٠٠ مل كلورفورم / ميثانول

حمض خليك (٠,٢/٢/٩٧) ويجفف المستخلص تحت نيتروجين ثم يذاب الراسب في ١ مل من المذيب للتقدير الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء . فكانت نسبة المعاد اكتشافه من التوكسين PR ٢-٢٠٪ ومن حمض الميكوفينوليك ٣٥-٨٥٪ .

والكروماتوجرافي السائل عالي الأداء مكون من عمود من وسط ثابت RP8 ووسط متحرك من الماء / أسيتونيتريل (٤٠/٦٠) للتوكسين PR بينما يتكون من الماء / أسيتونيتريل/ حمض خليك (٢/٤٠/٦٠) لحمض الميكوفينوليك .

وللتقدير النوعي يمكن استخدام الكروماتوجرافي رقيق الطبقات من السليكاجيل وتطور في تولول / خلات إيثايل / ٩٠٪ حمض فورميك (١٠/٤٠/٥٠) في الاتجاه الأول ثم في دي إيثيل إيثير / ن ـ هكسان / ٩٠٪ حمض فورميك (٠,٤/٤٠/٦٠) ثم ترش بحمض الكبريتيك ٥٠٪ فتظهر التوكسينات بفلورسنت أخضر تحت الأشعة فوق البنفسجية (٣٦٦ نانومتر) وبالتسخين على ١٠٠م ٢-٣ دقائق يتلون بالبني المصفر بحدود كشف ٠,٥-١,٥ جزء / مليون من كل من التوكسينين .

ط ـ حمض البنسليك :

يتم الاستخلاص بثاني كلوريد الميثان والميثانول (١/١) ثم الترشيح ، جفف أول ١٠٠ مل على ٢٠ جم كبريتات صوديوم وأعد الترشيح ، بخر على ٤٠م تحت تفريغ ، أذب المتبقيات في أسيتونيتريل واغسله بالهكسان ، ثم جفف الأسيتونيتريل على ١٠ جم كبريتات صوديوم مع الترشيح ، بخر على ٤٠م تحت تفريغ ، أذب في كلوروفورم للتبقيع على رقائق الكروماتوجرافي ، بالرش بالداي فينيل حمض بوريك ٢- أمينو إيثيل استر ينتج مشتق قوى الفلورسنس إذ تتناسب شدة الفلورسنس مع تركيز التوكسين . ومعدل الاكتشاف بهذه الطريقة حوالي ٩٥٪ وأقل حد يمكن اكتشافه من التوكسين حوالي ٥ نانوجرام / بقعة .

ي ـ الأوكراتوكسين Ochratoxin :

تستخلص ٢٠ جم عينة بمخلوط كلوروفورم / ميثانول ١/١ (١٠٠ مل) لمدة ١٠ دقائق في خلاط ، تطرد مركزيا ويؤخذ ٥٠ مل رائقاً + ٥٠ مل بيكربونات صوديوم ١,٠ عياري لضبط PH إلى ٩ ، ويرج في قمع فصل ، وتهمل الطبقة السفلى (كلوروفورم) . الطبقة المائية يضاف إليها ٧٥ مل كلوروفورم ، وترج في قمع فصل ، تهمل طبقة الكلوروفورم السفلى ، وتؤخذ الطبقة المائية مع حوالي ١٢ مل حمض هيدروكلوريك ٢ عياري لضبط PH على حوالي ٢ ، ثم يضاف ١٠٠ مل كلوروفورم وترج في قمع فصل ، وتهمل الطبقة المائية العليا . تؤخذ طبقة الكلوروفورم السفلى ، وترشح على ١ جم كبريتات صوديوم لامائية ، وتجفف بالتبخير على ٥٠م ، ثم تذاب المتبقيات في ٢٠٠ ميكروليتر

ميثانول للفصل للتوكسين على رقائق كروماتوجرافي أو على الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء (HPLC) .

وبعد تبقيع رقائق الكروماتوجرافي ، يتم تطويرها في مخلوط تولوين / حمض خليك / حمض فورميك ١/٣/٦ ، ثم ترش الرقائق بحمض كبريتيك ٣٠٪ في ميثانول ، ثم تسخن الرقائق ٢ دقيقة على ١٠٥°م ، وتفحص تحت ضوء فوق بنفسجي ٣٦٦ نانومتر ، فيعطي الأوكراتوكسين فلورسنت أزرق مخضراً ، ويمكن اكتشاف حتى ٤ جزء / بليون ، والمعاد اكتشافه بهذه الطريقة يبلغ حوالي ٥٠٪ .

أما ظروف الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء فهي الضغط ٢٠٠٠ رطل على البوصة المربعة ، العمود ٢٥ سم × ٤ مم مملوءاً بأسفير بسورب حجم جزيئاته ٥ ميكرومتر ، الغسيل بميثانول / ماء مقطر (٣٠/٧٠) + ١٪ حمض خليك مركز ، واكتشاف التوكسين على إثارة ٣٦٦ نانومتر وانبعاث ٤٦٨ نانومتر . وبهذه الطريقة يمكن اكتشاف حتى ٢ جزء / بليون أوكراتوكسين أ .

هذا ويمكن فصل الأوكراتوكسين على عمود قصير من السليكاچيل أو السبيليت فيظهر التوكسين في نهاية العمود السفلى بلون أزرق تحت أشعة فوق البنفسجية طويلة الموجة ، وبهذا التكنيك يمكن اكتشاف حتى ١٢ جزء / بليون .

أوكراتوكسين البول Urine Ochratoxin :

إذا لم يستخلص البول مباشرة عقب جمعه فيجب حفظه بالتجميد . حمض ٥٠ مل بول بحمض الهيدروكلوريك المركز إلى PH ٢ ، ثم استخلص في قمع فصل بالكلوروفورم (٧٥ مل × ٢ مرة) . بخر مستخلص الكلوروفورم إلى الجفاف ، أعد إذابة المتبقيات في ٢ مل بنزين / أسيتونيتريل ٢/٩٨ . بقع على رقائق الكروماتوجرافي ، ثم طور في كلوروفورم / ميثانول / حمض فورميك ١/٢/٩٧ ، ثم عرض الرقائق بعد جفافها إلى بخار الأمونيا فيظهر الأوكراتوكسين فلورسنت أزرق تحت الأشعة فوق البنفسجية .

هذا وطورت طريقة مناعية – إنزيمية ELISA لتقدير أوكراتوكسين A بدقة اكتشاف ٨٥– ٩٠٪ في مدى ١ ـ ٣٠ جزء / بليون .

ك ـ الأفلاتوكسينات Aflatoxins :

ذكرت ما يزيد عن ٤٠٠ طريقة لقياس الأفلاتوكسينات في مواد العلف والأغذية المختلفة في بذور القطن يستخلص أولاً الجوسيبول باستخدام چيل هيدروكسيد الحديديك (١٥٪ كلوريد حديديك + ٤٪ أيدروكسيد صوديوم حتى PH ٤,٦–٤,٨) ثم استخلاص الأفلاتوكسين بمخلوط أسيتون / ميثانول / ماء (١/٢/٢) . أو قد يستخلص الأفلاتوكسين مباشرة بمخلوط أسيتون / ماء / حامض خليك (٨٥٠ مل / ١٥٠ مل / ٨ مل) ،

وينقى بخلات الرصاص أو خلات الزنك ، ثم ينقل إلى كلوروفورم وينقى على عمود كروماتوجرافي ، ويفصل ويقدر بالكروماتوجرافي رقيق الطبقات أو السائل عالي الأداء ، ويتحقق من الأفلاتوكسين بالرش بحمض الكبريتيك الميثانولي أو بواسطة مطياف الكتلة Mass Spectrometry .

وقد يستخلص الأفلاتوكسين بالميثانول ، ويعامل المستخلص بمحلول كبريتات زنك – كلوريد صوديوم حامضي (١٥٠ جم كبريتات زنك + ١٥٠ جم كلوريد صوديوم + ٣,٧٥ مل حمض خليك ثلجي ويكمل إلى لتر بالماء) ثم يرشح ويخفف بالماء ويقاس الفلورسنس بجهاز Electronic Photofluorometer .

وفي الذرة يؤخذ ٥٠ جم عينة مطحونة + ١٠ جم رمل مغسول بالحامض (Diatomaceous earth أو Celite) وتستخلص بالأسيتون / ماء (١٥/٨٥) ١٥٠ مل بالخلط ٣ دقائق والترشيح ، ثم نقل ٥٠ مل من الراشح إلى قمع فصل وترج مع بنزين ، ثم تجفف على كبريتات صوديوم ، بنقل طبقة البنزين (٣ مل) إلى قنينة صغيرة من خلال كبريتات صوديوم ، وينقع فيها العمود القصير Minicolumn (أنابيب ٥ مم × ٢٠ سم مسدودة بقطن نقي ومملوءة بأكسيد ألومنيوم بارتفاع ١,٥ سم + سيليكاچيل بارتفاع ٩ سم ثم تغطى بقطعة قطن) من الطرف القصير المسدود ، ويترك العمود يمتص المستخلص حتى يصل المستخلص إلى ١ سم أعلى منطقة أكسيد الألومنيوم ، فيزال العمود ويجفف البنزين من السطح الخارجي للعمود ، ويدخل مباشرة في ٥ مل محلول تطوير من كلوروفورم / أسيتونيتريل / إيزوبروبانول (٢/٥/٩٣) في أنبوبة اختبار صغيرة ، وطور لمدة ٥ دقائق . افحص العمود المطور أسفل ضوء UV طويل الموجة فيظهر الأفلاتوكسين كشريط فلورسنتي أزرق شديداً أعلى منطقة أكسيد الألومنيوم بحوالي ١ سم . وحدود الكشف حوالي ١٠ ميكروجرام / كيلو (جزءاً / بليون) .

وقد طور Abdelhamid, 1981 طريقة لقياس الأفلاتوكسينات في العديد من مواد العلف بأن تستخلص ١٠ جم عينة مطحونة مع ٧٨ مل أسيتون / ماء (٣٥/٦٥) + ٢ مل ٢٠٪ خلات رصاص في حمض خليك بالخلط ٥ دقائق ، والطرد المركزي ٥ دقائق ، ثم يؤخذ ٢٠ مل من الرائق العلوي بماصة على عمود كروماتوجرافي سابق التجهيز Extrelut ، ويترك للتشرب ١٠ دقائق، ثم يغسل العمود من الشوائب بإثير / ن ـ هكسان (٢٠/٤٠) ٤٠مل، ثم ٤٠ مل ن ـ هكسان ، ثم تستخلص الأفلاتوكسينات بالكلوروفورم / ن ـ هكسان (٥٠/٥٠) ١٥٠ مل ، ويستقبل المستخلص هذا في دورق سعة ٢٥٠ مل ، ويبخر تحت تفريغ على ٤٠م ، ثم ينقل كميا بالكلوروفورم إلى قنينة صغيرة ، وتجفف تحت تفريغ على ٤٠م في حمام مائي Rotary Vacuum Evaporator ، ثم يذاب التوكسين في ١٠٠

ميكرولتر للفصل على الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) ، أو في ٢٠ ميكروليتر (كلوروفورم) للفصل على الكروماتوجرافي رقيق الطبقات Thin Layer Chromatography (TLC) .

ظروف الكروماتوجرافي السائل : على حرارة الغرفة ، سرعة سريان سائل التطوير ١ مل / دقيقة ، ضغط حوالي ٨٠٠ رطل / بوصة مربعة (P. S. I.) ، العمود معبأ بمادة Lichrosorb Si_{60} ٧ ميكرومتر ، سائل التطوير كلوروفورم / إيزو أوكتان (٢٥/٧٥) + ٢٪ ميثانول وجميعهم من درجة Lichrosolv ، طول موجة الكاشف فوق البنفسجي UV-Detector ٣٦٥ نانومتر ، بينما طول موجتي الكاشف الفلورسنتي Fluorescence Detector ٣٦٥ ، ٤٣٣ نانومتر .

ويتم حساب تركيز التوكسين من المعادلتين:

(في حالة المحلول القياسي الخارجي) $Cs = \frac{Ps \times Cst \times D}{Pst \times R}$

(في حالة المحلول القياسي الداخلي $Cs = \frac{Ps \times Cst}{Pst}$

حيث إن Cs = تركيز الأفلاتوكسين بالعينة جزء / بليون ،

Ps = مساحة مسطح منحنى التوكسين للعينة ،

Cst = تركيز الأفلاتوكسين للمحلول القياسي ميكروجرام/ مل للمحلول الخارجي أو جزء / بليون للمحلول الداخلي ،

Pst = مساحة مسطح منحنى التوكسين للمحلول القياسي ،

D = معامل التخفيف (٠,٨) ،

R = المعاد اكتشافه (٨٥٪) ،

ظروف Tlc : محلول التطوير تولول / حامض خليك / حامض فورميك (١/٣/٦) ، وللتثبيت استخدم دليل الرش حامض كبريتيك ٣٠٪ في ميثانول ، تسخين ٢ دقيقة على ١٠٥م ، والفحص تحت الأشعة البنفسجية ٣٦٦ نانومتر .

ويتم الحساب لتركيز التوكسين من المعادلتين :

(للمحلول القياسي الخارجي) $Cs = \frac{Ps \times Cst \times D}{Pst \times R}$

(للمحلول القياسي الداخلي) $Cs = \frac{Ps \times Cst}{Pst}$

حيث إن Cs = تركيز الأفلاتوكسين بالعينة جزء / بليون ،

Cst = تركيز الأفلاتوكسين بالمحلول القياسي الخارجي (نانوجرام / بقعة)

أو الداخلي (جزء / بليون) ،

D = معامل التخفيف (٠,٤) ،

R = المعاد اكتشافه (٨٥٪) .

ويظهر أفلاتوكسين ب١ ، ب٢ ، جـ١ ، جـ٢ عند Ratio of Flow (Rf) ٠,٤٤ ، ٠,٤٠ ، ٠,٣٥ ، ٠,٣٠ على الترتيب بفلورسنت أزرق (ب) وأخضر (جـ) ، وحدود الكشف على HPLC ٥ جزء / بليون من كل أفلاتوكسين ، بينما على TLC ٢ جزء / بليون في مدى ١٠-٢٠٠ جزء / بليون .

وقد لوحظ اختلافات في تركيزات الأفلاتوكسين في نفس العينة عند تحليلها في معامل متعددة ، وهذه الاختلافات تكون كبيرة (± ٥٠٪) في القيم المتوسطة للتركيزات المنخفضة من أفلاتوكسين ب١ (١٠-٢٠ ميكروجرام / كجم) ، وتبلغ الاختلافات ± ١٠ ميكروجرام / كجم بزيادة تركيز الأفلاتوكسين (٢٠-٥٠ ميكروجرام / كجم) ، بينما تكون الاختلافات بين المعامل المختلفة متوسطة (± ٢٠٪) للتركيزات الأعلى من ٥٠ ميكروجرام / كجم .

(شكل ٤٤)

تقدير الأفلاتوكسين بأعمدة التجاذب (أفلاتست Aflatest 10) ذات الأجسام المضادة في دقائق قليلة

الحدود المسموح بتواجدها في الأعلاف من أفلاتوكسين ب (مجم / كجم)

العلف	التركيز المسموح بتواجده (مجم/كجم)
لماشية التسمين	٠,٠٥٠
للأغنام	٠,٠٥٠
للعجول	٠,٠٢٠
للدجاج البياض	٠,٠١٢
للماشية الحلابة	٠,٠١٠
لكتاكيت تسمين	٠,٠٠٨
للرومي	٠,٠٠٨

تقدير الأفلاتوكسينات في الحبوب واللبن :

يؤخذ ٢٥ جم دقيقاً أو مطحون حبوب ، ويستخلص ٨ ساعات في جهاز سوكسلت للتنقية ، يبخر الإثير البترولي على حرارة الغرفة ، ثم تنقل العينة إلى إناء مع ٢٥ مل ماء ، ثم تستخلص مرتان بالكلوروفورم (١٢٥ مل × ٢ مرة) على هزاز لمدة ٣٠ ثانية . اجمع الكلوروفورم ورشحه على ١٠ جم كبريتات صوديوم لامائية . كثف الكلوروفورم تحت تفريغ إلى ٢ مل [قد تتطلب بعض العينات تنقية مرة أخرى على عمود كروماتوجرافي] . تفصل الأفلاتوكسينات على رقائق كروماتوجرافي منشطة ساعتان على ١٠٥م ، فتبقع وتطور في كلوروفورم / أسيتون ١٠/٩٠ ، أو بنزين / إيثانول / ماء ١٩/٣٥/٤٦ (الطبقة العليا) ، يبخر المذيب ، ترش الرقائق بمحلول حمض كبريتيك ٢٥ ٪ . تفحص الرقائق على دنسيتوميتر لتحديد تركيز الأفلاتوكسينات $B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, M_2$.

ولقد استخدم الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء لفصل الأفلاتوكسينات (B, G, M) في النقل والألبان باستخدام عمود سليكاچيل بحدود اكتشاف ٠,٠٥ – ٠,٢ نانوجرام، واستخدم كذلك لفصل نواتج أكسدة أفلاتوكسين B_1 (Q ، M_1 ، B_{2a} ، H_1 (أفلاتوكسيكول)) كما استخدم الكروماتوجرافي رقيق الطبقات لفصل نواتج أكسدة B_1 كذلك .

أفلاتوكسين M_1 في منتجات الألبان :

تخلط العينة (٥٠ مل لبنا ، أو ٥ جم مسحوق لبن ، أو ٥٠ جم جبناً) مع ١٢٠ مل كلوروفورم + ١٠ مل محلولاً مشبعاً من كلوريد صوديوم في قمع فصل (+ ٥٠ مل ماء في حالة مسحوق اللبن) . رشح طبقة الكلوروفورم على مخبار وسجل حجمها.

تجرى تنقية هذا المستخلص على عمود كروماتوجرافي من السليكاچيل ، ويغسل العمود بمخلوط حمض الخليك / تولوين ٩/١ (٣٠ مل) ثم ١٠ مل هكسان ثم بمخلوط أسيتونيتريل / إيثير / هكسان ٥/٣/٢ مع إهمال الغسول . يغسل أفلاتوكسين M_1 من

العمود بالأسيتون / كلوروفورم ٤/١ (٣٠ مل) ، ويبخر هذا المذيب ، وتذاب متبقياته في كلوروفورم للتبقيع على رقائق الكروماتوجرافي ، ويبقع ٠,٠٢٥ ميكروجرام أفلاتوكسين M_1 كمحلول قياسي للمقارنة .

كما يمكن الاستخلاص بالميثانول / ماء (٢٠/٨٠) وينقى المستخلص بالإثير البترولي ثم تنقل أفلاتوكسينات اللبن (M) من الميثانول المائي إلى كلوروفورم وينقى على عمود سليكاچيل ويحصل على التوكسينات من العمود بمحلول ٣٪ ميثانول في كلوروفورم للفصل والتقدير على رقائق كروماتوجرافي التي تطور في ٥٪ ميثانول في كلوروفورم وتستقطع وتستخلص من الرقائق للقياس الكمي على سبكتروفوتومتر على طول موجة ٣٥٧ نانومتر أو تقارن بصرياً أو بالدنسيتومتر تحت ضوء فوق بنفسجي .

تقدير أفلاتوكسين M في البول :

تقدر في بول الحيوانات النافقة أثر الشك في تسمم بالأفلاتوكسين . فيخلط ٣٠ مل بولا مع ٤٥ مل كحول ميثانول مطلق في قمع فصل ، استخلص ٣ مرات × ٥٥ مل كلوروفورم . اجمع مستخلصات الكلوروفورم ، وبخرها إلى الجفاف ، ثم أذب الرواسب في ٠,٥ مل أسيتونيتريل / بنزين ٩٨/٢ . بقع على رقائق كروماتوجرافي في سليكاچيل بالمقارنة بمحلول قياسي من أفلاتوكسين M .

أفلاتوكسين البيض :

يستخلص الأفلاتوكسين من البيض بالماء والأسيتون ثم الترشيح والترويق بخلات الرصاص وإعادة الترشيح والتنقية بالإيثير البترولي ثم نقل الأفلاتوكسينات إلى كلوروفورم ، ينقى المستخلص الكلوروفورمي على عمود سليكاچيل ويستقبل للتبخير حتى الجفاف ثم تذاب المتبقيات في أقل كمية كلوروفورم لتبقيع رقائق الكروماتوجرافي .

أفلاتوكسين الأنسجة الحيوانية :

تستخلص بالميثانول ثم الكلوروفورم ، تنقى على عمود سليكاچيل ويقاس كميا على رقائق كروماتوجرافي بالفلور دنسيتومتر .

واستخدم فى تقدير الأفلاتوكسينات كذلك الأعمدة القصيرة ورقائق الكروماتوجرافى عالى الأداء HPTLE والطرق المناعية ELISA .

ل ــ الزيار الينون Zearalenone :

يظهر الزيارالنيون تحت الميكروسكوب الفلورسنتى بفلورسنس أزرق لامع فى ميسليوم الفطر، ولتقديره تطحن ٢٠ جم عينة ، وتستخلص بخلات الإيثيل (١٠٠ مل) ٥ دقائق ثم تطرد مركزياً ٥ دقائق ، وينقل الرائق كمياً بالترشيح ، ويتم تجفيفه بالتبخير تحت تفريغ

على ٤٠°م . تذاب المتبقيات الزيتية في ٥ مل كلوروفورم ، وتضبط PH على ١٣-١٤ بإضافة حوالي ٢,٥ مل صودا كاوية عيارية ، اخلط جيداً ثم اطرد مركزياً لفصل الطبقات. تسحب أكبر كمية ممكنة من الطبقة العليا الرائقة إلى أنبوبة أخرى ، ويضاف إليها ٠,٥ مل حمض فوسفوريك ٠,٦ عياريا ونقط فينولفثالين ، وتعاير حتى زوال اللون بحمض الفوسفوريك حوالي (١,٢٥ مل) . أضف ١ مل كلوروفورم واستحلب واطرد مركزيا . تستخدم طبقة الكلوروفورم الرائقة مباشرة للتحليل الكروماتوجرافي السائل عالي الأداء (HPLC) على عمود كناور ٢٥ سم × ٤,٦ مم مليء بمادة بولارية حجم جزئياتها ٧ ميكرومتر، وغسيل العمود بمخلوط كلوروفورم / إيزو أكتان ٢٥/٧٥ ، مضافاً إليه ١,٥ ٪ ميثانول ، وذلك على حرارة الغرفة ، وضغط ٦٠٠ رطل / بوصة مربعة ، والكشف فلورسنتيا على أطوال موجات ٢٧٤ إثارة و ٤٤٥ انبعاث . يمكن إعادة اكتشاف حتى ٧٥٪ من التوكسين بهذه الطريقة ، والحد الأدنى للكشف حوالي ٢ جزء / بليون زيارالينون .

ولتقدير الزيارالينون ونواتج ميتابوليزمة في الدم والبول كروماتوجرافياً طورت طريقة ، وفيها تجمع البلازما أو البول وتجمد على -٢٠°م لحين التحليل ، يؤخذ ٥ مل من العينة في أنبوبة اختبار مع ٥ مل خلات صوديوم (٠,٢ مولر) للوصول إلى PH ٥,٥ ، ويضاف ٥٠ ميكروليتر بيتا جلوكورونيداز مع السلفاتاز (نوع H-2) وتحضن العينات ١٦ ساعة على ٣٧°م ، يوقف التفاعل بعد ذلك بإضافة ١ مل حمض فوسفوريك (٣ مولر) ويؤدي هذا التحضين لتحليل الزيارالينون في صورتية المرتبطة وغير المرتبطة . تستخلص العينات مرتين بمقدار ٢٥ مل كلوروفورم ، استقبل المستخلص وبخره حتى الجفاف باستخدام حمام ماء بمقلب تحت تفريغ ، أذب الراسب في ١ مل تولوين وانقله إلى بطرون Cartridge سليكاجيل يغسل بالتولوين ثم يطور بالتولوين / أسيتون (١٢/٨٨) وناتج التطوير يبخر ويذاب المتبقي في كلوروفورم ويستخلص بالصودا الكاوية ٠,١٨ مولر ثم يعادل بحمض الفسفوريك ويعاد استخلاصه بالكلوروفورم ثم يبخر المستخلص ويذاب المتبقى فى الطور المتحرك للكروماتوجرافى السائل ويحقن لعمود الكروماتوجرافى الذى طوره المتحرك من ثانى كلورومیثان مشبع بالماء محتوى ١,٢٠٪ ـ بروبانول ، باستخدام كاشف فلورسنتى وطول موجة إثارة ٢٣٦ نانومتر وفلتر قطع انبعاث ٤١٨ نانومتر فتصل نسبة المعاد اكتشافه من الزيارالينون ونواتج ميتابوليزمه من بلازما الدم والبول ٨٠ - ٨٩٪ فى مدى ٢ - ١٠ نانوجرام / مل للبلازما و ٨١ - ٩٠٪ فى مدى ١٠ - ٣٠ نانوجرام / مل بول .

م ـ الفوميتوكسين (Vomitoxin (deoxynivalenol :

تطحن ٥٠ جم عينة وتستخلص بالخلط مع ٦٠ مل إيثير بترولى + ٦٠ مل ميثانول /

ماء ٥٥ / ٤٥ لمدة ١٠ دقائق ، ثم يضاف ١٣٧ مل أخرى من مخلوط الميثانول / ماء + ٣ مل محلول خلات رصاص ٢٠٪ فى حمض خليك ، وتخلط ١٠ دقائق أخرى . اطرد مركزياً واستبعد طبقة الإيثير البترولى . رشح المذيب البولارى ونقه مرة أخرى بواسطة ٦٠ مل إيثير بترولى فى قمع فصل ، وأضف للطبقة الباقية ١٥٠ مل كلوروفورم . رشح طبقة الكلوروفورم المحتوية على ألفوميتوكسين على ٢ جم كبريتات صوديوم لامائية . ركز على ٥٠م تحت تفريغ . تخفف العينة المركزة بمخلوط ميثانول / ماء ٣/٢ (٣ مل) ، ونق على عمود صغير Sep - Pak . جفف المستخلص بالتبخير تحت تفريغ على ٥٠م ، ويعاد الذوبان فى ٦٠ ميكروليتر ميثانول للتنقية على الكروماتوجرافى السائل عالى الأداء (عمود سفير يسورب حجم جزيئاته ٥ ميكرومتر ويغسل بميثانول / ماء ٤٠ / ٦٠ ، تحت ضغط ١٨٠٠ رطل / بوصة مربعة ، على حرارة الغرفة ، على طول موجة امتصاص ٢٢٥ نانومتر) . يؤخذ الخارج من الجهاز لحظة ظهور منحنى ألفوميتوكسين ويجفف تحت تفريغ على ٥٠م ويعاد ذوبانه فى ٠,٥ مل كلوروفورم ، وتجفف فى مجفف ، ثم يضاف ١٠ ميكروليتر أسيتونيتريل / Tri - Sil _ TBT ١/٢ لعمل مشتق طيار (بالحفظ فى حمام مائى ١٥ دقيقة على ٥٠م) للحقن فى جهاز كروماتوجرافى غازى للتقدير الكمى .

يمكن اكتشاف ٢٥ – ٣٥ ٪ من التوكسين وذلك لكثرة عمليات التنقية والتى يصاحبها فقد فى التوكسين . والحد الأدنى للكشف عن الفوميتوكسين بهذه الطريقة يبلغ ٢٥ جزءاً فى البليون .

كما قد تم تطوير طريقة للتقدير الكمى باستخدام الأسبكتروفلورميتر بدلاً من الكروماتوجرافى الغازى ، فبعد استخلاص ألفوميتوكسين تتم إذابته فى ميثانول وتفاعله مع الإيثيلين دي أمين في ميثانول ٥٪ في وجود نيترات الزيركونيل ٦٪ في أنبوبة اختبار ، والرج والتسخين على ٤٠م في حمام مائي لمدة ٤٠ دقيقة ، وبعد التبريد على حرارة الغرفة يقاس الفلورسنس لناتج هذا التفاعل على طول موجة إثارة ٣٦٠ نانومتر وانبعاث ٤٥٤ نانومتر ، والفلورسنس ثابت على حرارة الغرفة لمدة ٤ ساعات على الأقل .

ن ــ السم تم :

يطحن ١٠٠ جم من العينة وترج مع ٥٠٠ مل خلات إيثايل لمدة ساعة ويكرر الاستخلاص ٣ مرات ، ثم يرشح المستخلص ويبخر (حتى يتبقى منه الجزء الزيتي) تحت تفريغ على حمام مائي ، تذاب المتبقيات الزيتية في ١٠٠ مل ميثانول ٨٠٪ ، وينزع الدهن بالاستخلاص مرتين بمقدار ٧٥ مل (٢×) من الهكسان . تخفف طبقة الميثانول بمقدار ٦٠ مل ماء ويضبط PH على ٩ بمحلول كربونات صوديوم مشبع ، ثم استخلص مرتين ، كل مرة بمقدار ١٠٠ مل كلوروفورم / خلات إيثايل (٥٠/٥٠) ، ويبخر المستخلص تحت

تفريغ حتى تتبقى طبقة زيتية يتم إذابتها في أقل حجم من التولوين / خلات إيثايل (١/٣) وتنقى على عمود سليكاچيل يغسل التوكسين منه بالتولوين / خلات إيثايل (١/٣) بمقدار ٢٥٠ مل ، ويبخر لأقل حجم وينقل لقنينة دقيقة ويبخر للجفاف ثم يذاب الراسب في ٠,٥ مل خلات إيثايل للتبقيع على رقائق كروماتوجرافي من السليكاچيل وتطور في خلات إيثايل / تولوين (١/٣) ، وتجفف الرقائق هوائيا وتفحص تحت الأشعة فوق البنفسجية طويلة الموجة بعد الرش بحمض الكبريتيك الميثانولي ٣٠٪ والتسخين على ١٢٠م لمدة ١٥–٢٠ دقيقة . ولهذه الطريقة معدل إعادة اكتشاف في حدود ٥٠٪ بحساسية ٢,٥ جزء / مليون تقريباً .

س ـ الكشف عن سمين من السموم الفطرية :

الكشف عن الساتراتوكسينات (تريكو ثيسينات) Satratoxins G & H :

تستخلص العينة بالميثانول ويبخر المستخلص حتى الجفاف ثم تذاب المتبقيات في ١٠٠ مل ماء مع ٥٠ مل إيثير بترولي ، وتنقل الطبقة المائية (بعد الفصل) إلى عمود XAD-2 ويغسل بالماء ثم يستخلص منه التوكسين بالميثانول الذي يبخر حتى الجفاف ، ثم يذاب المتبقى في كلوريد ميثيلين ثم يطور على عمود سليكا ويحصل منه على التوكسين بكلوريد الميثيلين وخلات الإيثايل (١/١) الذي يبخر حتى الجفاف ثم يذاب المتبقى في كلوريد ميثيلين ويبقع على رقائق سليكاچيل وتطور في كلوريد ميثيلين / أسيتون (٢/٨) لفصل مركبات الساترا توكسينات (ج ، هـ) . وتحلل هذه السموم على الكروماتوجرافي السائل عالي الضغط بعمود Polygosil 60-D10 C8 ويطور بميثانول / ماء (٣٥/٦٥) .

دي أستوكسي سكيربينول والسم ت٢ Diacetoxyscirpenol & T-2 :

تطحن ٢٥ جم عينة وتستخلص بالخلط مع ٦٠ مل هكسان + ١٠٠ مل كلوروفورم / ماء ٢٠/٨٠ لمدة ٥ دقائق ، ثم تطرد مركزيا ٥ دقائق . يؤخذ ٥٠ مل من الرائق مع ٦٠ مل هكسان أخرى في قمع فصل، وترج للتنقية. الطبقة السفلى يضاف إليها ٣٠مل ماء + محلول كربونات صوديوم ١٪ حتى PH ٩ ، ثم يضاف ١٢٠ مل كلوروفورم وترج . تؤخذ طبقة الكلوروفورم السفلى وترشح على ١جم كبريتات صوديوم لامائية ، وتركز على ٥٠م ، ويؤخذ ٢ مل منها لينقى على عمود قصير Sep-Pak من السليكا بواسطة ٥ مل كلوروفورم/ هكسان ١/١ ، ويهمل الغسول ويغسل العمود بالكلوروفورم (٨ مل) لجمع التوكسينات. تجفف بالتبخير على ٥٠م ، ثم يعاد إذابتها في ٢٠ ميكروليتر كلوروفورم للفصل الكروماتوجرافي رقيق الطبقات ، والتي تطور في تولوين / حمض خليك / حمض فورميك ١/٣/٦ ، وبعد تجفيفها ترش بحمض كبريتيك ٣٠٪ في ميثانول ، وتسخن ٣ دقائق على ١١٠م ، وتفحص تحت أشعة فوق بنفسجية (٣٦٦ نانومتر) ، فيكون الحد الأدنى

للكشف ٠,١ جزء / مليون ت٢ و ٠,٢ جزء / مليون دي أستوكسي سكيربينول .

وبالاستخلاص في الميثانول المائي (١/١) ثم ترسيب البروتينات بمحلول كبريتات أمونيوم (٣٠٪) ، وإعادة الاستخلاص بالكلوروفورم ، ثم غسيل الكلوروفورم بهيدروكسيد بوتاسيوم (٠,٠٢ ع) وكلوريد بوتاسيوم (١٪) لإزالة المركبات الحمضية ، ترشح طبقة الكلوروفورم على كبريتات صوديوم لامائية ثم تنقى على عمود سليكاچيل واستخلاص التوكسينين بالإيثيل إيثيد من العمود ويبخر الإيثير ، يشتق من التوكسينين بإذابة الرواسب في بنزين والتفاعل مع هبتافلورو بيوتر يليميدازول في وجود بيكربونات الصوديوم لعمل إسترات للتحليل على الكروماتوجرافي الغازي ، فتعطي هذه الطريقة حد اكتشاف حوالي ١٠٠ نانوجرام من السم ت٢ و ٢٥ نانوجرام من الداي أسيتوكسي اسكيربينول لكل جرام من العينة ، والمعاد اكتشافه ١٠٥ ، ٩٧٪ على الترتيب من التوكسينين .

وطورت طرق أخرى لتقدير التوكسينين الأفلاتوكسين والأوكراتوكسين بالاستخلاص في ميثانول مائي والتنقية بخلات الرصاص أو كبريتات الزنك أو حمض الفوسفوتنجستيك ثم الاستخلاص في كلوروفورم أو بنزين للتطوير الكروماتوجرافي رقيق الطبقات أو العمودي بحساسية اكتشاف ٤ جزء / بليون أفلاتوكسين و ٢٠-٤٠ جزء / بليون أوكراتوكسين .

ع ـ الكشف عن عدة سموم فطرية :

Methods of Multimycotoxin Detection

لقد تعددت طرق الكشف عن السموم الفردية ، كما تعددت كذلك طرق الكشف عن عدة سموم معاً في طريقة واحدة ، كما تنوعت الطرق باختلاف مواد العلف ، أو السلع الغذائية ، كما تنوعت طبقاً للمذيبات المستعملة في الاستخلاص ، وطرق التنقية سواء بالمذيبات ، أو باستخدام وسائل الفصل الكروماتوجرافي من TLC ، أو LC ، أو أعمدة كروماتوجرافي ، ثم تباينت في وسيلة تقدير التوكسين والتعرف عليه من TLC، Lc أو GCأو أعمدة كروماترجرافي باستخدام اللمبات ذات الأشعة فوق البنفسجية ، أو أجهزة القياس الضوئية مثل TLC - Densitometer ، UV - Detector ، Fluorescence Detector ، Flame Ionizator ، Mass - Spectrophotometer ، وكلها من أجهزة قياس الكثافة الضوئية Spectrophotometers .

ونظراً لصعوبة إجراء التقديرات المختلفة للتوكسينات ، كل على حدة (وذلك لتعدد هذه التوكسينات ، إذ بلغ عددها حوالي ١٠٠٠ توكسين) ، فقد نشر عديد من الطرق كل منها ، أو بعض منها يختص بالكشف عن عدة توكسينات معاً ، لكن كلها اقتصرت على ما لايزيد عن خمسة توكسينات، وكلها اشتركت معاً في الكشف عن الأفلاتوكسينات والأوكراتوكسينات وإن استحدثت طرقاً لقياس ٩ - ٢٢ سم فطرى باستخدام TLC .

تقدير الأفلاتوكسين (ب١) والأوكراتوكسين (أ) والزيارالينون :

يتم استخلاص الأفلاتوكسينات من العينة بالأسيتونيتريل والماء ثم يستخلص الأوكراتوكسين من الزيارالينون والأفلاتوكسين ب١ بواسطة بيكربونات الصوديوم ، كما يمكن فصلها جميعها بالكلوروفورم والماء ، وبالاستخلاص الكلوروفورمي تضاف الصودا الكاوية (١ ع) لفصل الزيارالينون وأفلاتوكسين ب١ ، ثم تبقع التوكسينات المستخلصة على رقائق كروماتوجرافي وتطور في تولوين / خلات إيثايل / حمض فورميك (١٠/٤٠/٥٠) وتفحص أسفل الأشعة فوق البنفسجية فيمكن اكتشاف ٧١٪ من أفلاتوكسين ب١ ، ٨٧٪ من أوكراتوكسين (أ) و ٨٥٪ من الزيارالينون بدقة ٢ ، ٤٠ ، ٢٠٠ جزء / بليون على الترتيب.

تقدير الأفلاتوكسينات والأوكراتوكسينات والزيارالينون والاستريجماتوسيستين والباتيولين معًا باستخدام رقائق كروماتوجرافي :

١ ـ استلخص ٥٠جم عينة في دورق مخروطي ذي غطاء بواسطة ١٨٠ مل أسيتونيتريل + CH_3CN ٢٠ مل كلوريد بوتاسيوم (لمنع تكوين مستحلب) ٤٪ . سد الدورق وضعه على هزّاز Shaker ليهتز بشدة لمدة ١٠ دقائق . رشح وانقل ١٠٠ مل من الراشح إلى قمع فصل سعة ٢٥٠ مل . أضف ٥٠ مل إيزوأوكتان (لإزالة الدهون) ، ورج واترك لفصل الطبقات . اسحب الطبقة السفلى إلى قمع فصل آخر ، وكرر إضافة الإيزو أوكتان (٥٠مل) . أهمل طبقة الإيزو أكتان ، ثم أضف ٢٥ مل ماء إلى طبقة الأسيتونيتريل + ٥٠ مل كلوروفورم $CHCl_3$. هز واترك القمع لفصل الطبقات ، ثم اسحب طبقة الكلوروفورم (السفلى) إلى دورق مخروطي، وكرر إضافة الكلوروفورم مرتين أخريين (٢×١٠ مل). بخر الكلوروفورم على حمام مائي ثم انقل الراسب كميا بالكلوروفورم إلى قنينة صغيرة ، وبخر أسفل تيار من النيتروجين . أضف ٢٠٠ ميكروليتر بنزين / أسيتونيتريل (٢/٩٨) ليتكون عندك المستخلص (أ) . هز بشدة للذوبان باستخدام هزاز ميكانيكي ، وإذا لم تذب الرواسب تماماً فاطرد مركزيا لتجنب انسداد السرنجات وإبرها . انقل ١٠٠ ميكروليتر إلى قنينة ثانية ، وخفف إلى ٥٠٠ ميكروليتر بالبنزين / أسيتونيتريل (٢/٩٨) لتكوين المستخلص (ب) ويحفظ لتبقيعه على TLC .

٢ ـ بقع من المستخلص (ب) على رقائق TLC من السيليكاجيل بدون فلورسنس بكميات ٢,٥ ، ٥ ، ١٠ ميكروليتر (مرتان لكل تركيز) ، وضع على حجم من الحجمين (لكل كمية من الثلاث كميات) حجم معلوم من محلول قياسي معلوم التركيز من كل من الأفلاتوكسينات ، والزيارالينون ، والأوكراتوكسينات رقيقة .

بقع من نفس المستخلص (ب) بنفس الطريقة السابقة لكن على رقائق سيليكاچيل بدون فلورسنس مع إضافة محلول قياسي من الأوكراتوكسينات ، والزيارالينون ، والأستريجماتوسيستين ، ← رقيقة II .

رقيقتا سيليكاچيل ذات فلورسنس تبقع كلاهما بمقدار ٥ ميكرولتر محلول قياسي باتيولين ، ١٠ ميكرولتر مستخلص (أ) ← رقيقة III .

٣ ـ تطور الرقيقة I في محلول تطوير بنزين / ميثانول / حامض خليك (١/١/١٨) ، والرقيقة II في هكسان / أسيتون / حامض خليك (١/١/١٨) ، والرقيقتان III في كلوروفورم / حامض خليك / إثير إيثيلي (٣/١/١٧) في الاتجاه الأول ، ثم تجفف الرقيقتان III على ٨٠م لمدة ٢٠ دقيقة أو تطاير رائحة الخليك ثم تطور في الاتجاه الثاني في كلوروفورم / أسيتون (١/٩) .

٤ ـ افحص الرقائق كلها أسفل الأشعة فوق البنفسجية طويلة وقصيرة الموجة .

الرقيقة الأولى I تظهر تحت طول موجة طويل كل من الأفلاتوكسينات وأوكراتوكسين A وأوكراتوكسين إيثيل إستر A بفلورسنت أزرق ، بينما أوكراتوكسين B وأوكراتوكسين إيثيل إستر B بفلورسنت خافت ، وتحت الموجة القصيرة يظهر الزيارالينون والأوكراتوكسينات بفلورسنت أزرق . والرقيقة الثانية II تحت الموجة القصيرة تظهر الأوكراتوكسين والزيارالينون بفلورسنت أزرق ، والاستريجماتوسيستين بفلورسنت أصفر .

ويظهر الباتيولين على الرقيقة الثالثة III على طول الموجة القصيرة ٢٥٤ نانومتر للأشعة فوق البنفسجية كبقعة غامقة على أرضية فلورسنتية بيضاء . وأمكن بهذا التكنيك اكتشاف حدود دنيا في الأعلاف المختلفة كالتالي (جزء / بليون أي ميكروجرام / كيلو) :

السم الفطري	ذرة	قمح	شعير	شوفان
أفلاتوكسين G,B	٢٠	٢٠	٢٠	٢٠
أوكراتوكسين B,A	٤٥	٩٠	٩٠	٩٠
إيثيل إثير أوكراتوكسين B,A	٥٠	١٠٠	١٠٠	١٠٠
زيارالينون	٢٠٠	٤٠٠	٥٠٠	٥٠٠
ستريجماتوسيستين	٦٠	٦٠	٦٠	٦٠
باتيولين	٤٥٠	٤٠٠	٥٠٠	١٠٠٠

تقدير عديد من السموم الفطرية (أفلاتوكسينات ، أوكراتوكسين ، زيارالينون ، السم ت٢) في الحبوب Multi - Mycotoxins :

يؤخذ ٥٠ جم عينة مطحونة في دورق مخروطي سعة ٥٠٠ مل مع ٢٥ مل ماء + ٢٥٠ مل كلوروفورم، رج لمدة ساعة ، رشح ، خذ أول ٥٠ مل راشح كلوروفورم ، وأضف إليها ١٥٠مل هكسان، وضع المخلوط على عمود سليكاچيل ، اغسل العمود بمقدار ١٥٠مل بنزين، اجمع الزيارالينون بغسيل العمود بمقدار ٢٥٠ مل أسيتون / بنزين ٩٥/٥، اجمع السم ت٢ والأفلاتوكسينات بغسيل العمود بمقدار ١٥٠ مل إيثير جاف ، ثم ١٥٠ مل ميثانول / كلوروفورم ٩٧/٣ ، اجمع الأوكراتوكسين بغسيل العمود بمخلوط ٢٥٠ مل حمض خليك ثلجي / بنزين ٩/١ .

ركز كل غسول إلى الجفاف ، ثم أعد إذابة المتبقيات في ٠,٥ مل أسيتو نيتريل / بنزين ٩٨/٢ . بقع السموم الفطرية على رقائق كروماتوجرافي سليكاچيل ، وكذلك بقع محاليل قياسية ، طور الرقائق في كلوروفورم / ميثانول / حمض فورميك ١/٢/٩٧ . افحص الأفلاتوكسين والأوكراتوكسين تحت موجة طويلة من الأشعة فوق البنفسجية فتظهر بفلورسنت أصفر ، والزيارالينون يظهر بفلورسنت أصفر تحت موجة قصيرة من الأشعة فوق البنفسجية . وبالرش بالإنيزالدهيد (٧٠مل ميثانول + ١٠مل حمض خليك ثلجي + ٥ مل حمض كبريتيك + ٠,٥ مل بارا ـ إنيزالدهيد) والتسخين ١٠ دقائق على ١٠٠°م يظهر الزيارالينون بلون بني برتقالي ، بينما ت٢ يظهر بلون قرنفلي . تعريض الأوكراتوكسين لبخار الأمونيا يظهر فلورسنت أزرق تحت الأشعة فوق البنفسجية .

الكشف عن الأفلاتوكسينات والأوكراتوكسين والباتيولين والستريجما توسيستين والزيارالينون :

كما يمكن استخلاص العينة بحمض فوسفوريك (٠,١ مولر) وكلوروفورم بالرج نصف ساعة ثم الترشيح على سيليت ويبخر المستخلص في وجود النيتروچين ، ثم تنقى المستخلصات على عمود كروماتوجرافي Sephadex LH-20 ، وتنزع منه التوكسينات بالكلوروفورم / ميثانول (١/٢) ثم تبقع على رقائق الكروماتوجرافي للفصل فيمكن اكتشاف حوالي ٥ جزء / بليون من الأفلاتوكسينات ، ١٠ جزء / بليون أوكراتوكسين أ ، ٥٠ جزء / بليون من الباتيولين ، ١٠ جزء / بليون ستيريجماتوسيستين ، ٣٥ جزء / بليون زيارالينون .

وبالكروماتوجرافي السائل عالي الضغط ذي عمود من Bondapak / C_{18} ووسط متحرك من أسيتونيتريل / ماء / حمض خليك ثلجي (٢/٤٥/٥٥) أمكن فصل ٥ نانوجرام روبراتوكسين ب ، أنانوجرام زيارالينون ، ٠,٤ نانوجرام أوكراتوكسين أ على طول موجة

الكاشف ٢٥٤ نانومتر ، 1 نانوجرام أفلاتوكسين ب١ أو جـ١ على ٣٦٥ نانومتر .

تقدير التريكوثسينات Trichothecenes :

تستخلص ١٠٠ جم عينة مع ٣٠ مل ماء + ٢٥٠ مل خلات إيثيل لمدة ٥ دقائق . رشح المستخلص وجففه . أعد إذابته في ٥٠ مل أسيتونيتريل ، ورجه مع ٥٠ مل إيثير بترولي ، أعد استخلاص طبقة الإيثير البترولي بكمية ٢٥ مل أسيتونيتريل أخرى ، اجمع طبقات الأسيتونيتريل واخلطها مع ١٠٠ مل چل كلوريد حديديك (١٠٠ مل ماء + ١٠ مل محلول ثالث كلوريد حديديك سداسي الماء تركيز ١٥ ٪ مع إضافة ١٤-١٦ مل محلول صودا كاوية ٤ ٪ للوصول بالحموضة إلى ٤,٦) . رشح واجمع المترشح ، واستخلصه بالكلوروفورم (٣ مرات × ٣٠ مل) ، رشح الكلوروفورم على كبريتات صوديوم لامائية ثم جففه ، وأعد إذابته في حجم صغير من خلات الإيثيل للتبقيع على رقائق كروماتوجرافي لتقدير الداي أسيتوكسي سكير بينول ، السم ت٢ ، الفوميتوكسين .

هذا ويمكن استخدام المستخلص النهائى من خلات الإيثيل في اختبار نكرزة الجلد في الحيوانات ، كاختبار بيولوجي للكشف عن التريكوثسينات ، وذلك بحقن حوالي ٥ ميكرولتر خلات في جلد (سبق حلاقته) الجرذ أو الأرانب ، فقد أظهرت الأرانب تسمماً جلديا من جرعة ٠,٠٠٥ أو ٠,٠١ ميكروجرام سم ت٢ في ٢ ميكروليتر خلات إيثيل .

والأدق من رقائق الكروماتوجرافي ، واختبار الجلد في الحيوانات هو تقدير التريكوثسينات على الكروماتوجرافى الغازي ذي الطيف الكتلي - Gas Chromatography Mass Spectra ، إذا كانت حساسية الاختبار البيولوچي (اختبار جنين الدجاج) ١ جزءاً / مليون من كل توكسين ، بينما حساسية الكروماتوجرافي الغازي ١٠ نانوجرام من كل توكسين ، وحساسية الكروماتوجرافي رقيق الطبقات ١٠٠ نانوجرام من كل توكسين .

وعموماً لتقدير التريكوثيسينات يفضل الاستخلاص في الميثانول المائي ، ثم التنقية بالتجزىء (سائل/سائل) ثم على عمود سليكاچيل أو على كروماتوجرافي رقيق الطبقات، كما يتم الكشف عن هذه السموم وتقديرها كميا بوسائل الكروماتوجرافي سواء الغازي أو رقيق الطبقات ، وعموماً حد الكشف للسم ت٢ ، دي أسيتوكسي سكير بينول ، فوميتوكسين ، نيوسولانيول في مدى ٢٥-١٠٠ نانوجرام / جرام .

كما استخدم فى تقدير التريكوثيسينات وسائل HPTLC و GC و GC – FID (إضافة إلى الطرق البيولوجية على أوراق النباتات والكائنات الحية الدقيقة البحرية بظاهرة الإضاءة الحيوية Bioluminescence) .

سموم الفيوزاريوم :

لتقدير ستة سموم من سموم الفيوزاريوم (دي أوكسي نيفالينول ، دي أسيتوكسي سكيربينول ، السم HT-2 ، السم ت٢ ، فيوزارينون X ، زيارالينون) تستخلص بخلات الإيثايل ثم بمخلوط ماء وميثانول ، تخلط المستخلصات وتنقى على عمود كروماتوجرافي من السليكاچيل ، يتم تفاعل المستخلص النقي مع بيس ترى ميثيل سيليل ترى فلوروأسيتاميد لتكوين مشتقات يمكن فصلها وتقديرها كميا على الكروماتوجرافي الغازي بحدود إعادة اكتشاف ٧٠-٨٠٪ من هذه السموم .

ومن السموم الفطرية حديثة الاكتشاف هى **الفيومونيسينات** Fumonisins والتى طورت لتقديرها طرق كيمو طبيعية باستخدام كل من HPLC و TLC وكذلك ELISA . وهذه المجموعة من السموم الفطرية تنال الآن اهتماماً عالمياً لانتشارها على مستوى العالم ومسئوليتها عن مرض مميت فى مختلف أنواع الحيوانات .

والفيومونيسين B نشط بيولوجيا وشبيهاته وتنتجها أنواع الفيوزاريا ، ومنها الفيوزاريوم مونيليفورم والذى كثيرا ما يلوث الذرة كغذاء للإنسان . ويتم فصل الفيومونيسين على Re-versedphase C_{18} . وبسبب الفيومونيسين ورم مخ الخيول وأدريما رئوية للخنازير ومسرطن كبديا فى الجزذان ، ويسبب سرطان المرىء فى الإنسان .

ويؤدى التوكسين إلى تثبيط تخليق الإنزيم المسئول عن التخليق الحيوى للسفنجوليبيد ، مما يؤدى إلى تراكم سفنجانين وزيادة نسبة سفنجانين / سفنجوسين Sphinganine / Sphin-gosine فى خلايا كبد الجرذان ، وكذلك فى البلازما والبول والأنسجة لمختلف أنواع الحيوانات المعرضة للتوكسين ، مما دعى لإعتبار هذه النسبة كدليل حيوى حساس لتعرض الإنسان للفيومونيسين . وتقدر السفنجو ليبيدات باستخلاص اللبيدات من الأنسجة وتنقيتها بالتحلل القلوى ثم تكوين مشتقات فلورسنتيه يتم فصلها باستخدام HPLC مع كاشف فلورتسنتى .

أما المونيليفورمين Moniliformin فيستخلص من العينات فى سوكسلت بالميثانول ويقدر على TLC ورش الرقائق بواسطة ن ـ ميثيل بنزتيازولون ـ ٢ ـ هيدروازون (MBTH) فيشتق مركب مونيليفور من لونه طوبى يقدر كميا على ٥١٨ نانومتر ، وكانت هناك علاقة خطية بين تركيز لتوكسين ومساحة ممنحناه ما بين ١٠٠ ـ ٤٠٠ نانو جرام / بقعة ، بحدود اكتشاف حتى ٧٥ نانوجرام / بقعة .

وحمض السيكوبيازونيك Cylopiazonic Acid يقدر كذلك باستخدام TLC والذى فيه تعامل الرقائق مسبقا بالميثانول ، ويتم الاستخلاص بخليط أسيتونيتريل / ٤٪ كلوريد

بوتاسيوم (٢٠/١٨٠) والتطوير للرقائق فى اتجاهين ، والرش بالدى ميثيل أمينو بنز الدهيد، ويقدر الناتج الملون على ٥٤٠ نانوتر ، إذ إن هنالك علاقة خطية بين التركيز والكثافة الضوئية فى مدى ٥٠ ـ ٥٠٠ نانو جرام ، ونسبة المعاد اكتشافه ٧٨ ـ ٩٠ ٪ .

ولتقدير **الفوموبسين** تعلق العينة فى صودا كاوية مخففة على PH ٨,٥ – ٩ ، وتحفظ ليلة على ٣ – ٥م . رشح واضبط PH على ٧,٣ – ٧,٥ بحمض Hcl مخففاً ويخفف إلى ١٠٠ مل . خذ ٢٥ مل من المستخلص على عمود بولى ستيرين ويغسل (بعشرة أضعاف حجم العمود المملوء) بالماء المقطر ، للحصول على التوكسين يغسل العمود بنفس الحجم من الميثانول . جفف طبقة الميثانول بالتبخير ثم أذب فى ٠,٢ مل محلول منظم بورات صوديوم PH ٩,٢ ، ويفصل ويقدر على اليكتروفوريسيس ورقى بنفس المحلول المنظم ويجفف الورق (وات مان رقم ٤) على ١٠٠م ويفحص تحت ضوء UV ٢٥٤ نانومتر ويقارن بمحلول قياسى .

١٤ ـ المبيدات الكلورية العضوية Organochlorine Pesticides :

تؤدي التغذية على أعلاف ملوثة بالمبيدات الحشرية إلى خروج جزء من متبقياتها في اللبن ؛ لذا قد يحتوي اللبن على DDE ، ديلدرين ، BHC ، ميثوكسي كلور ، هبتاكلور أبوكسيد ، DDT ، هكساكلوروبنزين HCB ، TDE وغيرها . ولتقدير هذه المتبقيات من المبيدات عديدة الكلور ثنائية الفينيل PCBs ، والكلورية العضوية في اللبن أو العلف يجرى التالي :

١ ـ استخلاص الدهن والمبيدات من ١٠٠ مل لبن سائل (أو وزنة علف أو عينة تعطي ٣جم دهن) بإضافتها في إناء طرد مركزي سعة ٥٠٠مل + ١٠٠مل كحولا أو ميثانول + ١ جم أوكسالات صوديوم أو بوتاسيوم ، واخلط ثم أضف ٥٠ مل إيثير إيثيلي ، ورج بشدة لمدة دقيقة ، ثم أضف ٥٠ مل إيثير بترولي ، ورج بشدة دقيقة أخرى ، ثم اطرد مركزيا على ١٥٠٠ لفة / دقيقة لمدة ٥ دقائق . انقل طبقة المذيبات إلى قمع فصل سعة لتر يحتوي على ٥٠٠ – ٦٠٠ مل ماء + ٣٠ مل محلول كلوريد صوديوم مشبعا. أعد استخلاص المتبقيات المائية مرتين بمقدار ٥٠ مل مخلوط إيثير إيثيلي وبترولي (١/١) ، واطرد مركزيا . واجمع طبقات المذيبات في قمع الفصل واخلطها بالماء ، ثم استبعد طبقة الماء وأعد غسيل طبقة المذيبات مرتين بالماء ، واستبعد الماء في كل مرة . إذا حدث استحلاب فأضف ٥ مل محلولاً مشبع كلوريد صوديوم. مرر مخلوط المذيبات على عمود (٢×٥سم) من كبريتات صوديوم لامائية ، مع غسيل العمود بكميات من الإيثير البترولي ، وبخر المذيب المتجمع على حمام بخار لتجميع الدهن .

٢ ـ التجزيء مع الأسيتونيتريل Acetonitrile بنقل حوالي ٣ جم من الدهن المستخلص إلى قمع فصل ١٢٥ مل ، ويضاف إليه إيثيربترولي ليصير الحجم ١٥ مل ، ثم يضاف ٣٠ مل أسيتونيتريل مشبع بالإيثير البترولي ، ويرج بشدة لمدة دقيقة ، واترك لفصل الطبقات ، واسحب الأسيتونيتريل إلى قمع فصل يحتوي ٦٥٠ مل ماء + ٤٠ مل محلولاً مشبع كلوريد صوديوم + ١٠٠ مل إيثير بترولي . استخلص طبقة الإيثير البترولي في قمع فصل ١٢٥ مل بالأسيتونيتريل (٣ مرات × ٣٠ مل) المشبع بالإيثير البترولي ، ورج بشدة دقيقة كل مرة . اجمع المستخلصات في قمع فصل سعة لتر مع وضعه أفقيا ويخلط كل ٣٠ ثانية . اترك لفصل الطبقات ثم اسحب الطبقة المائية إلى قمع فصل آخر سعة لتر . أضف ١٠٠ مل إيثير بترولي إلى القمع الثاني ، ورج بشدة ١٥ ثانية ، واترك لفصل الطبقات . أهمل الطبقة المائية ، واجمع طبقة الإيثير البترولي مع الإيثير البترولي في القمع الأصلي واغسل بالماء (٢ مرة × ١٠٠ مل) . اهمل الغسيل واسحب طبقة الإيثير البترولي على عمود (٢× ٥ سم) من كبريتات صوديوم لامائية إلى دورق وبخر للتركيز .

٣ ـ التنقية على عمود فلوريسيل Florisil قطر ٢ سم وطول ١٠ سم من الفلوريسيل المنشط يعلوه ١سم كبريتات صوديوم لامائية . يبلل العمود أولا بالإيثير البترولي (٤٠–٥٠ مل) . انقل مركز الإيثير البترولي إلى العمود ، مع غسيل الدورق مرتين × ٥ مل إيثير بترولي ، وضعها على العمود ، واغسل العمود بمذيب ٦٪ (٢٠٠ مل) ، واجمع الغسول ثم اغسل بمذيب ١٥٪ (٢٠٠ مل) ، واجمع الغسول في قابلة أخرى . ركز كل غسول . يحتوي الغسول الأول على الألدرين ، BHC ، DDE ، TDE (DDD) ، DDT ، هبتاكلور ، هبتاكلور أبوكسيد ، ليندان ، ميثوكسي كلور ، PCBs وهو مناسب للكروماتوجرافي . والغسول الثاني يحتوي ديلدرين ، أندرين .

قد يحتاج إلى التنقية مرة أخرى على عمود آخر من الفلوريسيل أو أكسيد الماغنسيوم أو بالتصبن .

٤ ـ التقدير يجرى على وسائل كروماتوجرافية ، مثل الكروماتوجرافي الغازي أو رقيق الطبقات . فمن ناتج تنقية ٣ جم دهن تذاب في ٥ مل محلول يحقن منها ٥ ميكروليتر للجهاز ، فهي تعادل ٣ مجم من عينة الدهن . ويستخدم عمود من OV-101 (DC-200) ، أو خليط من OV-101 + OV-210 لفصل ليندان ، هبتاكلور ، الدرين ، هبتاكلور أبوكسيد، ديلدرين، أندرين ، DDT على الكروماتوجرافي الغازي ، والعمود ١,٨م × ٤ مم، ويعمل على حرارة ٢٠٠م ، بمعدل تدفق ١٢٠ مل / دقيقة ، وحرارة الحقن ٢٢٥م .

وقد تفصل المبيدات على كروماتوجرافي رقيق الطبقات ، وفي كلا الجهازين تقارن العينة بمحاليل قياسية من المبيدات ، لحساب تركيز المبيدات في العينات بمعلومية ارتفاع أو

مساحة المنحنيات الممثلة لتركيز المبيد في العينة وفي المحلول القياسي .

يلاحظ :

١ ـ الأسيتونيتريل المشبع بالإيثير البترولي يحضر بتشبيع الأسيتونيتريل النقي بالإيثير البترولي المقطر .

٢ ـ مذيب ٦٪ مكون من ٦٠ مل إيثير إيثيلى مخفف إلى لتر بالإيثير البترولي معاد تقطيره .

٣ ـ مذيب ١٥٪ مكون من تخفيف ١٥٠ مل إيثير إيثيلى إلى لتر بالإيثير البترولي معاد تقطيره .

٤ ـ الإيثير الإيثيلي يعاد تقطيره على ٣٤–٣٥°م ، ويخزن تحت نيتروجين ، ويجب أن يحتوي ٢٪ كحول إيثايل .

٥ ـ الفلوريسيل ينشط على ٦٥٠°م ، ويخزن في زجاجات محكمة الغلق في ظلام . سخن ٥ ساعات على الأقل على ١٣٠°م قبل الاستخدام ، ويخزن على ١٣٠°م في زجاجات، أو في مجففات على حرارة الغرفة ، وأعد تسخينه على ١٣٠°م بعد يومين .

وهناك كثير من المراجع التى يمكن الرجوع إليها فى هذا الشأن ومن بينها :

- Adelhamid , A. M . (1981) Diss. Univ . F. Boku ., Wien.
- Amend , Von R. & Muller , H.- H. (1984) Land. Wirtschaftiche Forschung Sep , S. 606 .
- Anon . (1979) Technical Reports Series No. 193 , International Atomic Energy Agency , Vienna .
- AOAC(1975)Natural Poisons . Aoac , 462. - Balzer, I. et al (1978) J . AOAC , 16 : 854 .
- Bata A.et al . (1983) J.AOAC , 66 : 577 .
- Baxter , J.A et al (1985) Bull . Environ Contam . Taxicol , 34 : 645.
- Brown , N.L. et al . (1973) J . AOAC , 56 : 1437 .
- Burns , R.E (1971) Agron . J, 63: 511 .
- Davis , N.D. et al . (1980) J. AOCA , 57 : 109.

- Diaga Yete , M. (1980) Landwirtsch. Forsch ., 37 : 416 .
- Ehnert , M . et al . (1981) Z . Lebensm . Unters Forsch , 172 : 110 .
- Elmer, H.M. (1978) Standard Methods for the Examination of Dairy Products 014 th Ed American Public Health Association Washington D c .
- Engstrom , G. W. et al . (1977) Agric . Food Chem ., 25 : 833 .
- Eppley , R.M. (1968) J. AOCS. 51 : 74 .
- Eppley , R.M. (1979) J.AOCS , Sept ., 824 .
- Fremy, J.M. et al . (1990) Abst . Book of Int . Symp . & Workshep on Food Contamination - Mycotoxins & phycotoxins Cairo .
- Garner , R.C (1975) J . Chromatography , 103 : 186 .
- Gilbert , J. (1990) Abst Book of Int . Symp . & Workshop on Food Contamination - Mycotoxins & Phycotoxins . Cairo .
- Haddon , W.F. et al (1977) J . AOAC , 60: 107 .
- Hald , B . & Krogh, P. (1975) J. AOAC , 58 : 156 .
- Hanssen , E. & Waibel , J. (1978) Alimenta, 17:139 .
- Harrach , B. & Bata, A . (1982) Symp . on Mycotoxins & phycotoxins , Vienna .
- Holaday , C.E. (1976) J. AOCS , 35 : 603 .
- Hostettmann , K. et al (1978 & 1979) Helvetica Chimica Acta , 61:1990 & 62 : 2079 .
- Hostett manm , K . et al .(1979) J. Chromatography , 170 :355 .
- Hsieh, D.p.H et al . (1976) J . Chromatography , 117: 474 .
- Jackson , l..k & Ciegler, A. (1975) Acta Alimentaria Polonica , I (xxv) : 207 .
- Janicki , J. et al . (1975) Acta Alimentaria Polonica , I (xxv) : 207.
- Janicki, J. et al. (1979) Appl . Environ . Microbiol., 36 : 408 .
- Jansen , C. & Dose , k . (1984) Fres . Z. Anal Chem . 318 : 60 .
- Karlsson , E.M. & Chen P.N (1976) J. Chromatage 0.55 : 218.
- Kingston , D.G.I. & Chen , P.N (1976) J . Chromator . 118:414
- Kmieciak , S. (1976) Z. Lebensm . Unters Forsch ., 21:164 .
- Knapsteil, H. (1968) Landwirtsch. Forsch., 160 : 321 .
- Letutour B et al . (1983) J . AOCS , 60:835 .

- Leuenberger , U et al (1978) J . Chromategr , 161 : 303 .
- Marti,L et al . (1978) J . AOAC . 61 : 1353 .
- Masri , M.S. et al (1968) J. AOAC , 51 : 594 .
- Mckinney , J. D . (1975) J.AOCS . 52 : 377 A .
- Meyer H. et at (1980) Supplemente zu Vorlesungen and Ubungen in der Tierernahrung 5 Auflage, Sprungmann Verlag, Hannover .
- Minson,D.J. & Lancaster , R.J (1963) N.Z.J . Agric Res , 6: 140 .
-Moller , J.M.(1972) Kraftfutter ,55 : 1.
- Muller H. M et al (1984) Land Wirtsch . Forsch, 37 : 116 .
- Nesheim S . (1973) J . AOAC . 52 : 975 & 56 : 822 .
- Nesheim, S. & Trucksess M.W. (1978) J. AOAC, 61 : 569.
- Nowotny P . et al . (1983) Chem Mikrobiol Technol Lebensm . 8: 24
- Otsuka , H. et al (1977& 1978) Plant Medice , 32:9 & 33:152.
-Panalaks , T.& Scott, P.M.(1977) J. AOAC , 60:583 .
- Park , D.L et al . (1990) Abst Book of Int . Symp . & Work Shop on Food Contamination - Mycotoxins & Phycotoxins Coiro .
- Peterson , R.E. & Ciegler A. (1978) Appl . Environ . Miero-bio.36:613
- Pohland , A.E.& Allen , R. (1970) J . AOAC , 53: 686 .
- Pons , Jr . W.A. (1969) J. AOAC , 52 : 61.
- Pons , Jr . W.A. (1976) J. AOAC , 59 : 101.
- Pons, Jr. W. A. & Franz, Jr. A. O. (1977) J. AOAC , 60 : 89 .
- Popken , A.M. & Dose , k (1983) Z . Anal . Chem . 316 :47 .
- Puls, R. & Greenway , J.R . (1975) Can . J . Comp . Med ., 40 :A1.
- Ranftt , K. & Bassler R. (1984) Kraftfutter 6: 212 .
- Rangama,s. (1979) Manual of anadlysis of Fruit and vegetable products . Tata Me Graw - Hill , New Delhi .
- Rao, G. H . R. & Anders M.W (1973) J . Chromatogr . , 84 : 402 .
- Robb , J. & Norval , M . (1983) Appl Environ . Microbiol , 46 :948
- Romer , T. et al . (1978) J. AOAC , 61 : 801 .
- Roy , D . N. & Roa , P . S . (1971) J. Agric. Fd . Chem ., 19 : 257.

- Schuller , P. L.l. et al (1976) J. AOAS, 59:1315 .
- Schweighardt , H et al (1978) Ernahrung , 2 : 1 .
- Schweighardt , H. et al (1978) Z . Tierphysiol . Tierernahrung u Futtermittelkde . 41: 39 .
- Schweighardt , H. et al . (1980) Chromatographia ,13 : 447 .
- Schweighardt,H. et al.(1980) Z. Lebens. Unters .Forsch., 170 :355.
- Scott , P.M (1973) J. AOAC , 56 : 1028 .
- Scott . P.M. & Hand , T.B. (1967) J.AOAC , 50 : 366 .
- Seiber ,J.N. & Hsieh , D.P.H. (1973) J.AOAC . 56 : 827 .
- Seidler , D et al (1984) Fleischwirtsch ., 64 : 1499 .
- Shamon, G.M. & Shotwell , O.L (1976) J.AOAC , 59:963 .
- Sheehan, E.T.et al . (1972) J.Agr. Food Chem ., 20 : 119 .
- Siriwardana , T.M.G & Lafent , P. (1978) Appl . Environ . Microbiol ., 35 : 206 .
- Stack, M.E et al (1976) J.AOAC , 59 : 966 .
- Stahr, H.M. et al (1979) Appl. Spectroscopy , 33 : 294 .
- Stoloff .L. et al (1971) J.AOAC , 54 : 91 .
- Stray , H. (1978) J. AOAC , 61 : 1359 .
- Stubblefield , R.D. (1979) J. AOAC , 62 : 201 .
- Stubblefield , R.D. (1979) J. AOCS , 56 : 800 .
- Stubblefield . R.D. & Shotwell , O.L. (1977) J.AOAC , 60 : 784 .
- Subramanian, T. et al . (1978) J. AOAC , 61 : 581 .
- Sydenham E. & Stockenstrom , S . (1995) Mycotoxins Conf., South Africa (Tygerlery) .
- Shephard , G.S. & Van der Westhuizen , L (1995) Mycotoxins Conf . , South Africa (Tygerberg)
- Thaler , M . (1980) Sonder druck aus Landwirtsch . Forsch ., Sept. .S. 677 .
-Truck sess , M.W. et al . (1977) J. AOAC, 60 : 795 .
- Zimmerli, B. (1977) Mitt. Gebiete Lebe nsm. Hyg., 68 : 36.