

## تطوير طريقة كروماتوغرافية لتحديد مادة الميلايين في حليب الأطفال

### المُجفف باستخدام تقانة RP-HPLC

د. جمعة العمر\*، د. أحمد حليبي\*\*، محمد أمجد أبو حجر\*\*\*

\*قسم التقانة الحيوية والغذائية، كلية الطب البيطري، جامعة ادلب

\*\*قسم الكيمياء التحليلية، كلية العلوم، جامعة ادلب

\*\*\*طالب دراسات عليا (ماجستير كيمياء)، كلية العلوم، جامعة ادلب

### الملخص

طورنا طريقة كروماتوغرافية لتحديد الميلايين في حليب الأطفال المُجفف باستخدام تقانة RP-HPLC، حيث استُخدم مزيج مكون من الميثانول والماء المقطر (20:80V/V) لاستخلاص الميلايين، ومن ثم تمت فلترة العينات بواسطة فلاتر ميكرونية  $0.45\mu\text{m}$ ، تم الفصل على عمود  $\text{C}_{18}\text{ODS}(250\times 4.6)\text{mm}, 5\mu\text{m}$  باستخدام الماء كطور متحرك بمعدل تدفق  $1\text{ml}/\text{min}$ ، وقياس الامتصاصية عند الطول الموجي  $\lambda_{\text{max}}=210\text{nm}$  باستخدام كاشف (Photodiode array (PDA، تراوح المجال الخطي للتراكيز ضمن المجال  $(0.1-30)\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  كما امتازت الطريقة التحليلية بالدقة والحساسية العاليتين حيث لم تتجاوز قيم  $\text{RSD}\%=3.98$  والتكرارية الممتازة مع معامل ارتباط لنقاط الخط العياري من مرتبة  $\text{R}^2=0.9999$ ، وتم حساب حد الكشف النوعي  $\text{LOD}=0.0026\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  وحد التحديد الكمي  $\text{LOQ}=0.0078\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ، تم تطبيق طريقة RP-HPLC وفق الشروط الكروماتوغرافية المقترحة على 64 عينة حليب مجفف مُستورد لتحديد فيما إذا كانت تحتوي على الميلايين أم لا، وقد وُجد الميلايين في ثمانية عينات كانت خمسة منها تحوي الميلايين بكميات أدنى من الحد المسموح بتواجده في حليب الأطفال المُجفف (1ppm) بحسب إدارة الأغذية والعقاقير الأميركية وثلاثة منها احتوت على الميلايين بكميات كانت فوق الحد المسموح به بشكل قليل.

الكلمات المفتاحية: الميلايين، حليب الأطفال المجفف، RP-HPLC ،  
Photodiode array (PDA).

## 1. المقدمة

الميلايين مركب كيميائي له العديد من الاستخدامات الصناعية مثل إنتاج الغراء وأواني الطعام والمواد اللاصقة والطلاء ومثبطات اللهب، كما تم استخدامه كسماد بسبب محتواه العالي من النيتروجين على الرغم من أن فعاليته كسماد يعتمد على وجود الكائنات الحية الدقيقة في التربة مثل *Klebsiella terrigena* التي يمكن أن تستقلبه إلى مركبات النيتروجين المتوفرة بسهولة مثل اليوريا [1]. ومن الجدير بالذكر أنه لا توجد له أي استخدامات غذائية مباشرة معتمدة للميلايين، ولا توجد أي توصيات لاستخدامه ضمن الدستور الغذائي [2]. إلا أن ارتفاع محتوى النيتروجين في الميلايين (66% من الكتلة) يعتبر سبباً كافياً لإضافته عمداً إلى المواد الغذائية أو المنتجات ذات الصلة لأن المحتوى البروتيني عادةً ما يقدر بتحديد محتوى النيتروجين الذي تقيسه اختبارات تحليل البروتين القياسية مثل كيلداهل (Kjeldahl) أو دوماس (Dumas)، ولا يتم تمييز المركبات ذات المحتوى النيتروجيني عن البروتين. وبناءً على ذلك فإن الميلايين المضاف يمكن أن يُعزز المحتوى النيتروجيني في المنتجات وذلك لجعلها تبدو أنها تحتوي كمية أكبر من البروتين وهذا يحقق مردود ربحي كبير [3].

جاءت تسمية الميلايين حسب IUPAC (1,3,5-triazine-2,4,6-triamine)،

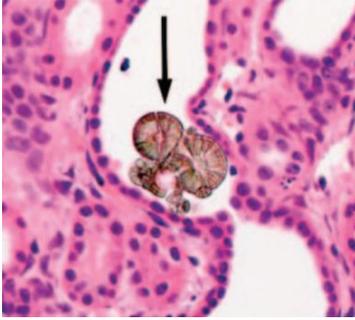
ويوضح الجدول رقم (1) الصيغة الكيميائية المفصلة للميلايين وبعض خواصه [4][5].

الجدول رقم (1): الصيغة الكيميائية المفصلة للميلايين وبعض خواصه

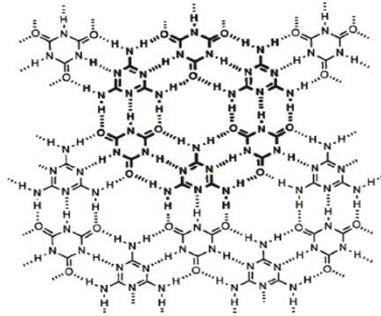
$C_3H_6N_6$	الصيغة الجزيئية المجملة
126.12	الكتلة g/mol المولية
مسحوق أبيض	المظهر الخارجي
1.574	الكثافة kg/m <sup>3</sup>

345	C° نقطة الانصهار
3.240	g/L الذوبان في الماء (20°C)

لُوحظ أن جسم الإنسان أكثر عرضة لتشكيل بلورات سيانورات الميلايين قليلة الذوبان في الماء وذلك بتفاعل الميلايين مع حمض السيانور الموجود في الجسم، ويوضح الشكل رقم (1-a) الروابط الهيدروجينية المتشكلة بين الميلايين وحمض السيانور [6]. وقد بينت الدراسات أن هذه البلورات مسؤولة بشكل مباشر عن حدوث الفشل الكلوي أو السمية الكلوية المبينة في الشكل رقم (1-b) المرتبطة بتراكم بلورات سيانورات الميلايين [7][8].



الشكل رقم (1-b): التشخيص النسيجي  
الكلوي المرتبط بتراكم سيانورات



الشكل رقم (1-a): يبين الصيغة الكيميائية  
لبلورات سيانورات الميلايين

للفشل  
الميلايين

انتشرت في السنوات الماضية حالات غش الحليب المُجفف بمادة الميلايين، ففي العام 2008 تم الإبلاغ عن أكثر من 50 ألف طفل يعانون من مشاكل كلوية وأدخلوا إلى المستشفى بعد حادثة الغش في الصين [9]. كما أبلغت منظمة الصحة العالمية عن إصابة 294000 رضيع، تطلب أكثر من 51900 حالة منهم دخول المشفى في حين توفي ستة أشخاص منهم [10]. لذلك أصبح الكشف عن المستويات المنخفضة من الميلايين والتي من المحتمل أن توجد في حليب الأطفال أو المنتجات القائمة على الحليب أمراً بالغ الأهمية في العالم أجمع لذا أجرت الإدارة العامة الصينية للرقابة على الجودة والتفتيش والحجر الصحي دراسة استقصائية وطنية خلُصت بموجبها إلى تحديد تراكيز من

الميلامين تراوحت من  $0.1\text{mg/kg}$  إلى  $2500\text{mg/kg}$  وذلك ضمن منتجات حليب الأطفال المُجفف التي تنتجها 22 شركة صينية [11]. كما حددت إدارة الأغذية والعقاقير الأمريكية (FDA) حداً أعلى للميلامين  $1\text{ppm}$  يُسمح بتواجده في حليب الأطفال المُجفف والأغذية المخصصة أساساً للأطفال الذين تقل أعمارهم عن 3 سنوات والنساء الحوامل أو المرضعات و  $2.5\text{ppm}$  للأطعمة المعدة للبالغين وذلك وفق دراسة أُجريت على الفئران لمدة 13 أسبوعاً، كما وضعت بلدان أخرى أيضاً حداً مشابهاً للميلامين في المنتجات الغذائية [14][13][12][2].

لا توجد طريقة دستورية مُعتمدة لتحديد الميلامين في حليب الأطفال المُجفف لذلك توجهت العديد من الأبحاث العلمية العالمية لدراسة وتحديد الميلامين في حليب الأطفال المُجفف بطرائق تحليلية مختلفة مثل التحليل باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء [18][17][16][15]، أو الكروماتوغرافيا الغازية [20][19][3]، أو باستخدام تقانة ELISA [22][21].

يهدف هذا البحث إلى تطوير بعض الشروط الكروماتوغرافية لتحديد الميلامين في حليب الأطفال المُجفف باستخدام تقانة RP-HPLC وفق طريقة بسيطة وسريعة وذات دقة عالية واقتصادية، كما يهدف إلى إيجاد طريقة لاستخلاص الميلامين من الحليب بغية قياسه بحيث تتمتع بالسرعة والسهولة في العمل مع مراعاة الاسترجاعية للميلامين، وبالتالي اعتمادها في المخابر المتخصصة لتحديد الميلامين في التحليل الروتيني للحليب المُجفف.

## 2. القسم العملي

### 1.2. الأجهزة

استُخدم في هذا البحث جهاز HPLC إنتاج شركة Thermo Scientific الأمريكية نموذج UltiMate 3000 RS مزود بكاشف (PDA) photodiode array موصول مع حاسب لمعالجة البيانات عن طريق برنامج Chromeleon وجهاز مطيافية الأشعة ما فوق البنفسجية والمرئية UV-VIS,Spectrophotometer إنتاج شركة PG Instruments Limited البريطانية نموذج T80 موصول مع حاسب لمعالجة



توزن كمية من الحليب (2g) ثم تُنقل إلى أنبوب اختبار سعة 15mL ويُضاف إليها 10mL من مزيج مكون من الميثانول والماء المقطر وفق النسب (20:80)، يُعلق أنبوب الاختبار ثم يُرج بشكل رأسي لمدة دقيقة حتى تمام انحلال مسحوق الحليب والحصول على محلول متجانس المظهر، يُوضع بعدها أنبوب الاختبار ضمن جهاز الأمواج فوق الصوتية (Ultrasonic) لمدة 5 دقائق عند الدرجة 25°C وبعدها يُنقل إلى المُثقلة (Centrifuge) وتضبط عند 3200rpm لمدة 4 دقائق، وبعدها يُسحب السائل الطافي من العينة بواسطة سيرنك ويُرشح باستخدام فلتر ميكروني حَجْم المسام فيه 0.45µm وبذلك تكون عينة الحليب جاهزة للحقن ضمن جهاز HPLC.

#### 4.2. القياسات الكروماتوغرافية (طريقة العمل)

تم اعتماد الشروط الكروماتوغرافية المُبينة في الجدول رقم (2) من أجل تحديد الميلايين بطريقة RP-HPLC في محاليله العيارية وعينات الحليب.

الجدول رقم (2): يبين أهم الشروط الكروماتوغرافية التي ستطبق في هذا البحث من أجل تحديد

الميلايين ضمن عينات الحليب المجفف بتقانة RP-HPLC

C <sub>18</sub> ODS (250X4.6) mm, 5 µm	العمود التحليلي
ماء HPLC (100%)	الطور المتحرك
25°C	درجة حرارة العمود
1mL/min	معدل التدفق
20 µL	حجم الحقنة
210 nm	طول موجة الكاشف

### 3. النتائج والمناقشة

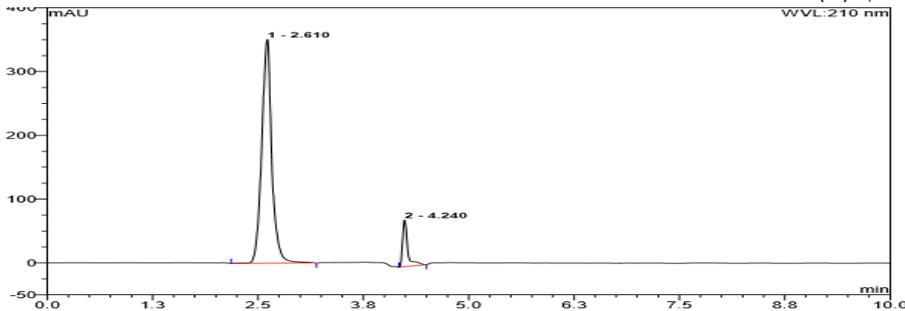
#### 1.3 دراسة تأثير طريقة تحضير العينة على تحديد الميلايين باستخدام تقانة

##### RP-HPLC

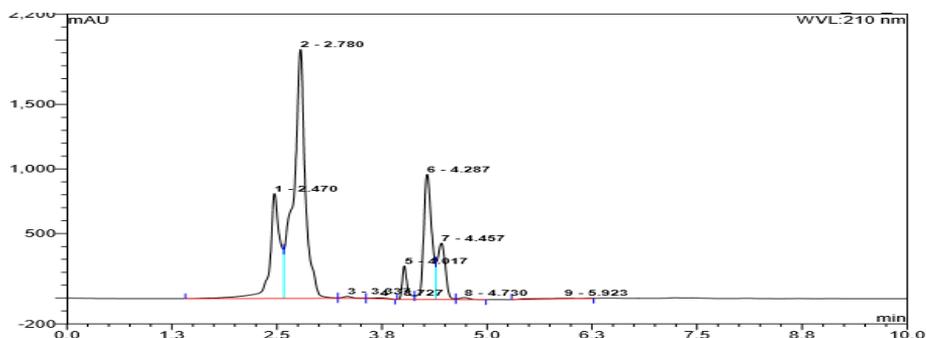
استُخدمت في هذا البحث ثلاثة طرائق لتحضير عينات الحليب واستخلاص الميلايين منها بغية قياسه باستخدام تقانة RP-HPLC، حيث يتم في الطريقة الأولى استخدام مزيج من الماء والأسيتونتريل (50:50) لاستخلاص الميلايين من عينات الحليب

واعتمدت الطريقة الثانية على تخثير البروتين باستخدام الأحماض المخففة بجعل درجة حموضة المحلول عند  $\text{pH}=4.6$  مع التسخين للدرجة  $60^\circ\text{C}$  لمدة  $10\text{min}$ ، أما الطريقة الثالثة اعتمدت على استخدام مزيج مكون من الماء والميثانول (80:20) بهدف استخلاص الميلامين من عينات الحليب، ومن الجدير بالذكر أن هذه الطرائق الثلاثة طبقت على محلول عياري للميلامين وذلك لتوضيح مدى تأثيرها على زمن وشكل القمة الكروماتوغرافية الخاصة بالميلامين.

يبين الشكل رقم (2) الكروماتوغرام الموافق لمحلول الميلامين العياري ذي التركيز  $10\mu\text{g.mL}^{-1}$  والمُحضر باستخدام مزيج من الماء والأسيتونتريل (50:50) وباستخدام الشروط الكروماتوغرافية سابقة الذكر، حيث يُظهر المنحني قمة كروماتوغرافية حادة للميلامين عند زمن  $2.6\text{min}$  مع قمة كروماتوغرافية مرافقة عند  $4.2\text{min}$ ، ونستنتج أنه لا يمكن استخدام مزيج الماء والأسيتونتريل (50:50) لتحضير عينات الحليب لأن الكروماتوغرام العياري أعطى قمتين للميلامين العياري بالإضافة لتداخل القمة الرئيسية للميلامين عند الزمن  $2.6\text{min}$  مع باقي القمم التي تعود لمكونات الحليب كما هو موضح في الشكل رقم (3).

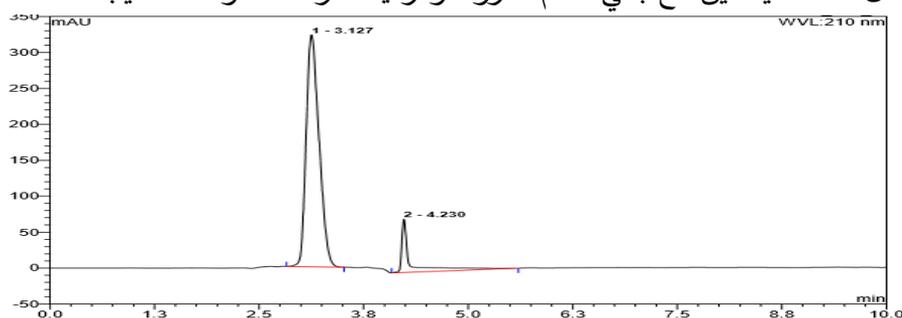


الشكل رقم(2): الكروماتوغرام الموافق للميلامين العياري ذي التركيز  $10\mu\text{g.mL}^{-1}$  المُحضر بنسبة مزج الأسيتونتريل والماء (50:50) بتطبيق الشروط الكروماتوغرافية المُتلى



الشكل رقم (3): الكروماتوغرام الموافق لعينة الحليب باستخدام طور متحرك مؤلف من الماء فقط

كما يبين الشكل رقم (4) الكروماتوغرام الموافق لمحلول الميلايين ذي التركيز  $10\mu\text{g.mL}^{-1}$  المحضر بطريقة التخثير الحمضي باستخدام الشروط الكروماتوغرافية المذكورة، حيث يظهر الميلايين العياري على شكل قمة كروماتوغرافية حادة وواضحة عند زمن احتفاظ  $3.1\text{min}$  مع قمة كروماتوغرافية مرافقة عند الزمن  $4.2\text{min}$  وبالتالي لا يمكن اعتماد طريقة التخثير الحمضي من أجل تحضير عينات الحليب كونها تعطي قمتين للميلايين العياري وقد يعزى ذلك لتخرب الميلايين في الوسط الحمضي بالإضافة لأن القمة الأساسية للميلايين تكون متداخلة مع باقي قمم مكونات الحليب مما يعني حدوث تداخل لقمة الميلايين مع باقي القمم الكروماتوغرافية المرافقة لمكونات الحليب.

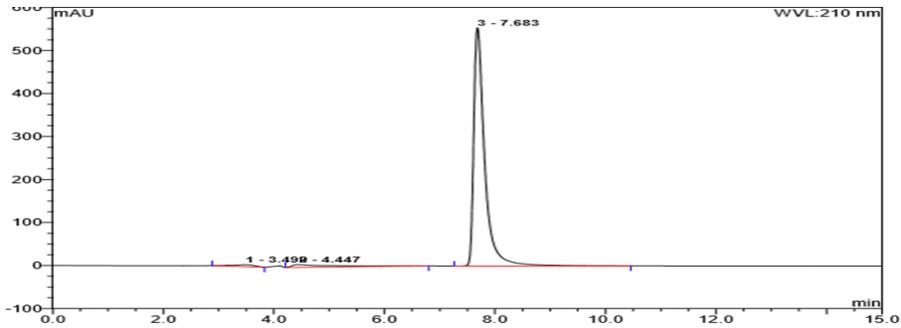


الشكل رقم (4): الكروماتوغرام الموافق للميلايين العياري ذي التركيز  $10\mu\text{g.mL}^{-1}$  المحضر باستخدام

الماء عند  $\text{pH}=4.6$  بتطبيق الشروط الكروماتوغرافية المثلى

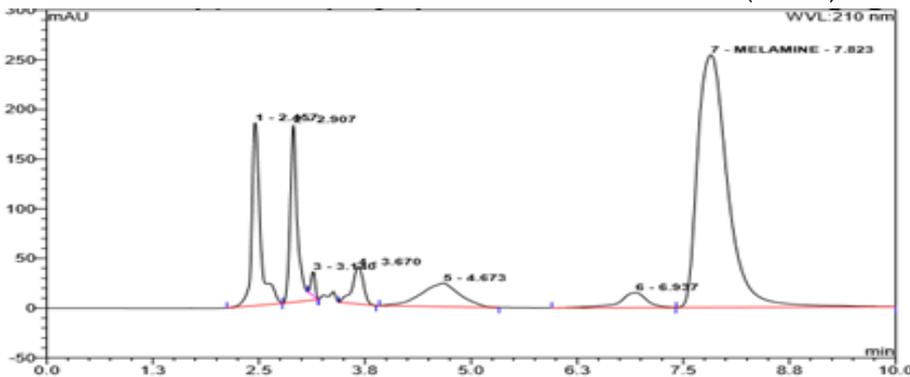
في حين يبين الشكل رقم (5) الكروماتوغرام الموافق لمحلول الميلايين ذي التركيز  $20\mu\text{g.mL}^{-1}$  المحضر بمزيج الميثانول والماء (20:80) وبتطبيق نفس

الشروط الكروماتوغرافية، يُظهر المنحني قمة كروماتوغرافية حادة وواضحة عند الزمن **7.68min** دون وجود أي قمة أخرى.



الشكل رقم(5): الكروماتوغرام الموافق للميلامين العياري ذي التركيز  $20\mu\text{g.mL}^{-1}$  المُحضر بنسبة مزج الميثانول والماء (20:80) بتطبيق الشروط الكروماتوغرافية المثلى

كما يبين الشكل رقم (6) الكروماتوغرام الموافق لمحلول الميلامين العياري المُضاف إلى عينة الحليب والمُحضر بمحلول التمديد الميثانول والماء (20:80)، حيث نلاحظ أنه يُظهر قمم عديدة موافقة لمكونات الحليب المختلفة بين الأزمنة من **1.5min** إلى **7min** كما أنه يُظهر قمة حادة وواضحة ومنفصلة موافقة لقمة للميلامين عند زمن قريب جداً **7.8min** مما يؤكد قدرة الطريقة المُقترحة على فصل الميلامين وتحديد شكل دقيق وسريع جداً، وبالتالي سيتم اعتماد طريقة التحضير السابقة باستخدام محلول التمديد الميثانول والماء (20:80) لتحديد الميلامين.



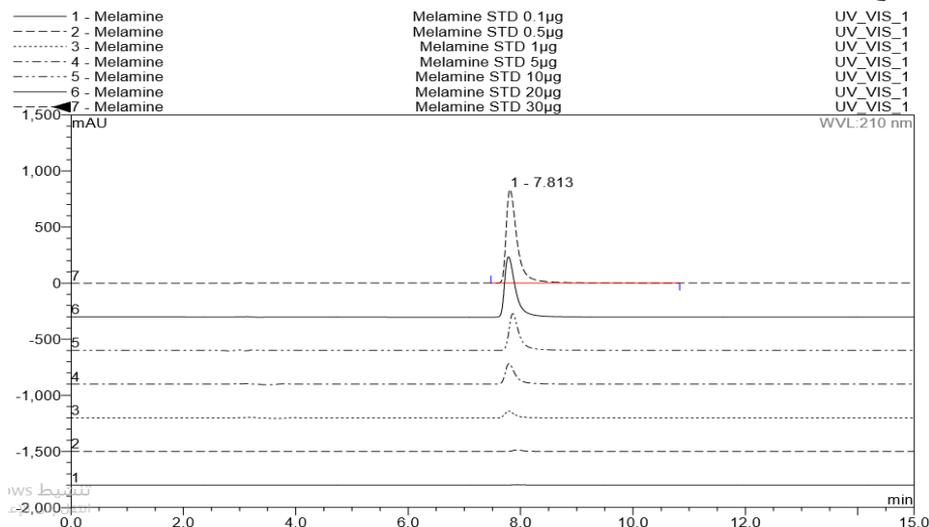
الشكل رقم (6) الكروماتوغرام الموافق لعينة الحليب المجفف والتي تحوي الميلامين المُضاف بتركيز  $20\mu\text{g.mL}^{-1}$

### 3.3 الدراسة التحليلية للميلامين العياري بتقانة RP-HPLC

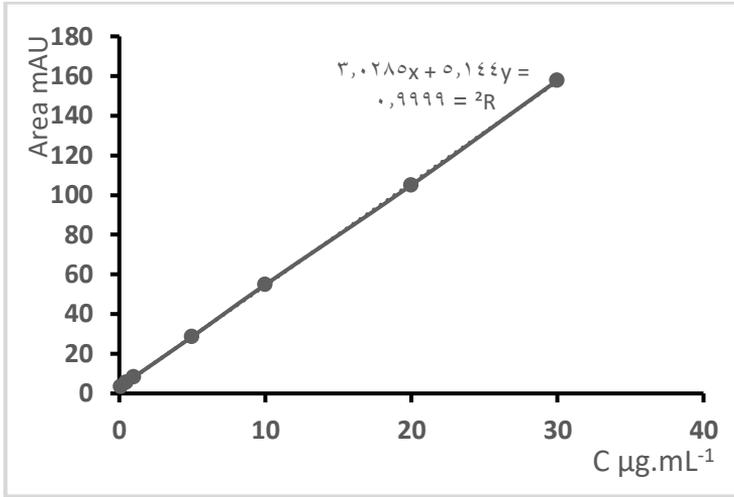
تم رسم المنحنيات الكروماتوغرافية لمنحنيات السلسلة العيارية المُحضرة سابقاً بتطبيق الشروط الكروماتوغرافية المثلى وتكرارية قياس  $n=5$ ، ثم رُسمت العلاقة بين استجابة الكاشف بدلالة تركيز الميلامين مقدراً بوحدة  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

يبين الشكل رقم (7) الكروماتوغرامات العيارية لمحاليل السلسلة العيارية حيث نلاحظ أن جميعها أعطت قمة كروماتوغرافية حادة وواضحة عند زمن احتفاظ  $t_r=7.7\text{min}$  مع ازدياد في مساحة القمة بازدياد تركيز الميلامين في المحلول.

كما يبين الشكل رقم (8) المنحني العياري لسلسلة محاليل الميلامين المُحضرة وفق التراكيز المذكورة، حيث نلاحظ من هذا الشكل أن استجابة الكاشف تكون متناسبة طردياً خطياً مع ازدياد تركيز الميلامين ضمن المجال  $(0.1 - 30) \mu\text{g.mL}^{-1}$ .



الشكل رقم (7): الكروماتوغرامات الموافقة لسلسلة المحاليل العيارية للميلامين



الشكل رقم (8): المنحني العياري للميلامين عند  $\lambda_{\max} = 210 \text{ nm}$  من أجل التراكيز الخطية وبطريقة أصغر المربعات المبرمجة حاسوبياً وفقاً لبرنامج Excel وباستخدام معطيات المنحني العياري الخطي تم تحديد قيم معامل الارتباط بين النقاط والتقاطع مع محور الامتصاصية والميل للمعطيات العيارية، حيث كانت معادلة المنحني العياري الخطي  $Y = 5.144X + 3.0285$  علماً أن  $Y$  تمثل مساحة القمة الكروماتوغرافية و  $X$  تمثل تركيز الميلامين مقدراً بوحدة  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ، مع معامل ارتباط خطي للنقاط  $R^2 = 0.9999$  وهذا يدل على خطية ممتازة للمجال المحدد، ولم تتجاوز قيمة الانحراف العياري النسبي المئوي  $RSD\%$  لأدنى تركيز تم تحديده ( $3.98\%$ )، تم حساب قيمة حد الكشف النوعي فكانت  $LOD = 0.0026 \mu\text{g.mL}^{-1}$  وكذلك تم حساب قيمة حد التحديد الكمي فكانت  $LOQ = 0.0078 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ، مما يدل على الحساسية العالية لتحديد الميلامين بتقانة RP-HPLC، ويبين في الجدول رقم (3) بعض السمات التحليلية للمنحنيات العيارية للميلامين.

الجدول رقم (3): السمات التحليلية للميلامين عند  $\lambda_{\max} = 210 \text{ nm}$

0.1 - 30	مجال التراكيز الخطية $\mu\text{g.mL}^{-1}$
$A = 5.144C + 3.0285$	علاقة المنحني العياري الخطي
0.0026	حد الكشف ( $LOD$ ) $\mu\text{g.mL}^{-1}$

0.0078	حد التحديد الكمي (LOQ) $\mu\text{g.mL}^{-1}$
210	طول موجة الامتصاص الأعظمي $\text{nm} (\lambda_{\text{max}})$
3.98	الانحراف العياري النسبي المئوي RSD %
0.9999	معامل الارتباط $R^2$

### 1.3 تحديد دقة وصحة الطريقة التحليلية المقترحة

لتحديد دقة وصحة الطريقة التحليلية المتبعة في هذا البحث من أجل تحديد الميلايين في محاليله العياريّة، تم تحضير سلسلة من المحاليل العياريّة للميلايين تقع ضمن المجال الخطي وذلك انطلاقاً من المحلول العياري الأم، ثم رُسمت الكروماتوغرامات الموافقة بتطبيق الشروط الكروماتوغرافية المثلّي، تم تعويض قيم مساحة القمة الكروماتوغرافية للمحاليل العياريّة في معادلة الخط البياني العياري المستقيم من أجل تحديد التراكيز العياريّة للميلايين، وأُجريت بعض الحسابات الإحصائية مثل الانحراف المعياري والانحراف المعياري النسبي المئوي والاسترجاعية النسبية للتراكيز المحددة من المنحني العياري وكذلك تم حساب خطأ القياس التحليلي، ويعرض الجدول رقم (4) النتائج الإحصائية لتحديد الميلايين باستخدام تقانة RP-HPLC وبتطبيق الشروط المثلّي حيث أن عدد مرات القياس كان  $n=5$ ، تميزت النتائج التحليلية بالدقة الجيدة وذلك من خلال قيم الانحراف المعياري النسبي المئوي RSD% المنخفضة والتي لم تتجاوز القيمة 3.98% بالنسبة لأدنى تركيز ضمن السلسلة  $0.1\mu\text{g.mL}^{-1}$  والقيمة 1.06% بالنسبة لأعلى تركيز ضمن السلسلة  $30\mu\text{g.mL}^{-1}$ ، كما أنها تميزت بالصحة حيث تراوحت قيم الاسترجاعية بين (99.1-101.5)%.

الجدول رقم (4): النتائج الإحصائية لتحديد الميلايين باستخدام تقانة RP-HPLC بتطبيق

الشروط الكروماتوغرافية المثلّي

خطأ القياس التحليلي $\frac{SD}{\sqrt{n}}$	الاسترجاعية Recovery%	RSD%	$\bar{x} \pm SD$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (n=5)	التركيز المأخوذ من الميلايين $X \mu\text{g.mL}^{-1}$
0.0018	100.4	3.98	0.1004 ± 0.004	0.100
0.0054	101.2	2.37	0.506 ± 0.012	0.500
0.0098	101.5	2.17	1.01 ± 0.022	1.00
0.033	99.6	1.4	4.98 ± 0.073	5.00
0.058	100.7	1.29	10.07 ± 0.13	10.00
0.107	99.1	1.21	19.82 ± 0.24	20.00
0.143	100.3	1.06	30.09 ± 0.32	30.00

### 3.3 تكرارية النتائج التحليلية خلال يوم وخلال عدة أيام

للتأكد من تكرارية النتائج التحليلية التي تم الحصول عليها، تم تحديد تركيز الميلايين للمحاليل العيارية السبعة المحضرة سابقاً بتقانة **RP-HPLC** وضمن الشروط التجريبية المثلى، وذلك خلال خمسة أيام متتالية وهي موافقة لعدد مرات القياس  $n=5$  التي أخذت في اليوم الأول، استُخدمت معادلة الخط البياني العياري المستقيم من أجل تحديد التراكيز العيارية للميلايين، كما أُجريت بعض الحسابات الاحصائية مثل **SD** النسبي و**RSD** النسبي المئوي، ويبين الجدول رقم (5) مدى التطابق (التكرارية) في النتائج التحليلية وذلك من خلال التقارب الكبير بين قيم الانحراف المعياري النسبي المئوي (**RSD%**) خلال يوم واحد وخلال خمسة أيام متتالية مما يدل على دقة الطريقة المتبعة وكذلك من خلال قيم الاسترجاعية **Recovery%** خلال يوم واحد وخلال خمسة أيام متتالية وهذا يدل على صحة النتائج التحليلية.

الجدول رقم (5): تقدير تكرارية النتائج التحليلية لتحديد الميلايين باستخدام تقانة RP-HPLC ضمن الشروط التحليلية المثلى

الدقة والصحة خلال عدة أيام (n=5)			الدقة والصحة خلال يوم واحد (n=5)			التركيز المأخوذ من الميلايين X $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Recovery%	RSD%	$\bar{X} \pm \text{SD}$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	Recovery%	RSD%	$\bar{X} \pm \text{SD}$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$	
97	5.15	0.097 ± 0.005	100.4	3.98	0.1004 ± 0.004	0.100
98	3.47	0.49 ± 0.017	101.2	2.37	0.506 ± 0.012	0.500
99	2.83	0.99 ± 0.028	101.5	2.17	1.01 ± 0.022	1.00
99.20	1.65	4.96 ± 0.082	99.6	1.4	4.98 ± 0.073	5.00
100.00	1.2	10 ± 0.12	100.7	1.29	10.07 ± 0.13	10.00
99.30	1.05	19.86 ± 0.21	99.1	1.21	19.82 ± 0.24	20.00
100.20	0.96	30.06 ± 0.29	100.3	1.06	30.09 ± 0.32	30.00

#### 4.3 دراسة استرجاعية الطريقة المقترحة لتحديد الميلايين ضمن عينات الحليب

بهدف التأكد من حساسية ودقة الطريقة التحليلية المقترحة لتحديد الميلايين في حليب الأطفال المجفف قمنا بتحضير عينات من الحليب تحتوي على الميلايين المضاف بحيث نحصل على نفس تراكيز السلسلة الخطية  $1^{-1}\mu\text{g.mL}^{-1}$  (0.1-0.5-1-5-10-20-30) حيث طبقت الطريقة التحليلية المقترحة لتحديد الميلايين في أنواع الحليب المجفف المستخدم للمراحل العمرية كافة وسيُرمز لها بـ:

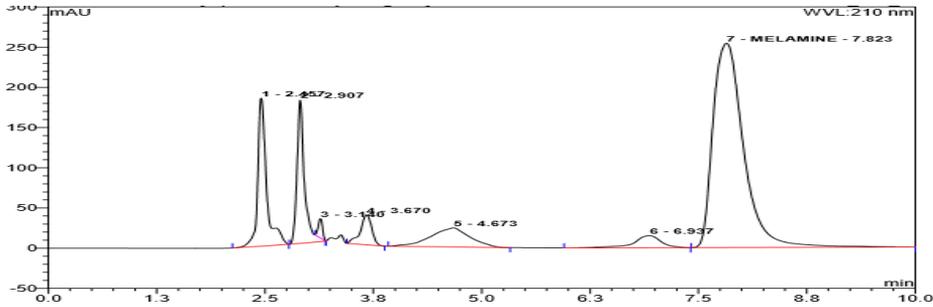
(A) للفترة العمرية من عُمر يوم واحد وحتى عُمر ستة أشهر

(B) للفترة العمرية من عُمر ستة أشهر وحتى عُمر سنة

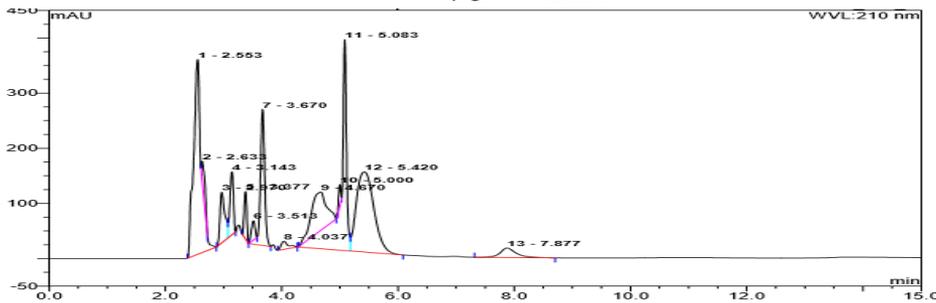
(C) الحليب المُجفف كامل الدسم.

رُسمت المنحنيات الكروماتوغرافية لمحاليل الميلايين العيارية المضافة إلى عينات الحليب المذكورة وذلك بتطبيق الشوط الكروماتوغرافية المثلى السابقة.

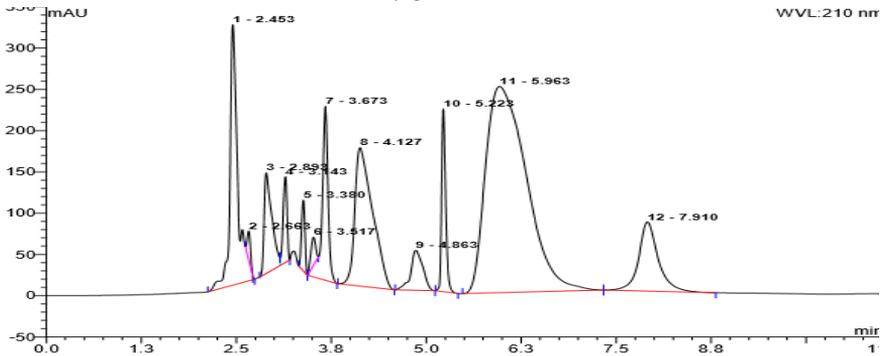
يبين الشكل رقم (9) الكروماتوغرام الموافق لعينة الحليب (A) والتي تحوي الميلايين المضاف بتركيز  $20\mu\text{g.mL}^{-1}$  حيث تظهر قمم كروماتوغرافية عديدة لمكونات الحليب عند أزمنة احتفاظ تتراوح من  $1.5\text{min}$  إلى  $7\text{min}$ ، كما تظهر قمة كروماتوغرافية حادة ومنفصلة للميلايين عند الزمن  $7.82\text{min}$ . كما يبين الشكل رقم (10) الكروماتوغرام الموافق للعينة (B) والتي تحوي الميلايين المضاف بتركيز  $0.1\mu\text{g.mL}^{-1}$  وعند نفس الشروط الكروماتوغرافية، حيث تظهر قمة كروماتوغرافية صغيرة للميلايين عند الزمن  $7.87\text{min}$  ومنفصلة تماماً عن باقي القمم الكروماتوغرافية الناتجة عن مكونات عينة الحليب. في حين يبين الشكل رقم (11) الكروماتوغرام الموافق للعينة (C) والتي تحوي الميلايين المضاف بتركيز  $5\mu\text{g.mL}^{-1}$  وعند نفس الشروط الكروماتوغرافية، حيث تظهر قمة كروماتوغرافية واضحة للميلايين عند الزمن  $7.91\text{min}$ ، ومنفصلة تماماً عن باقي القمم الكروماتوغرافية لمكونات عينة الحليب.



الشكل رقم (9) الكروماتوغرام الموافق لعينة الحليب المجفف (A) والتي تحوي الميلامين  
المُضاف بتركيز  $20\mu\text{g.mL}^{-1}$



الشكل رقم (10) الكروماتوغرام الموافق لعينة الحليب المجفف (B) والتي تحوي الميلامين  
المُضاف بتركيز  $0.1\mu\text{g.mL}^{-1}$



الشكل رقم (11) الكروماتوغرام الموافق لعينة الحليب المجفف (C) والتي تحوي الميلامين  
المُضاف بتركيز  $5\mu\text{g.mL}^{-1}$

تبين الجداول رقم (6-7-8) قيم الاسترجاعية للميلامين المُضاف بتركيز مختلفة  
للأنواع الثلاثة من حليب الأطفال المُجفف A,B,C، حيث استطاعت الطريقة التحليلية  
المقترحة تحقيق استرجاعية تصل إلى % (95.9-98.6-96.3) عند التركيز  $0.1\mu\text{g.mL}^{-1}$

للعينات الثلاثة على التوالي وهو أصغر بعشر مرات من الحد الأعلى المسموح به لتواجد الميلايين في الحليب المُجفف والأغذية المخصصة أساساً للأطفال، أي يمكن التقصي عن تلوث حليب الأطفال المُجفف بالميلامين بدقة وحساسية عاليتين عند التراكيز المنخفضة.

الجدول رقم (6): النتائج التحليلية لتحديد الميلايين المضاف للعينة (A) باستخدام تقانة RP-HPLC ضمن الشروط التحليلية المثلى.

الاسترجاعية Recovery%	RSD%	$\bar{x} \pm SD$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (n=5)	التركيز المضاف من الميلايين $X \mu\text{g.mL}^{-1}$
96	3.13	$0.096 \pm 0.003$	0.100
96	2.92	$0.48 \pm 0.014$	0.500
99	2.02	$0.99 \pm 0.02$	1.00
98.8	1.64	$4.94 \pm 0.081$	5.00
99.9	1.70	$9.99 \pm 0.17$	10.00
99	1.06	$19.8 \pm 0.21$	20.00
99.6	1.00	$29.9 \pm 0.30$	30.00

الجدول رقم (7): النتائج التحليلية لتحديد الميلايين المضاف للعينة (B) باستخدام تقانة RP-HPLC ضمن الشروط التحليلية المثلى.

الاسترجاعية Recovery%	RSD%	$\bar{x} \pm SD$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (n=5)	التركيز المضاف من الميلايين $X \mu\text{g.mL}^{-1}$
98	5.1	$0.098 \pm 0.005$	0.100
98	3.26	$0.49 \pm 0.016$	0.500
98	2.65	$0.98 \pm 0.026$	1.00
98	1.86	$4.90 \pm 0.091$	5.00
99.7	1.1	$9.97 \pm 0.11$	10.00

98.5	0.96	19.7 ± 0.19	20.00
99.7	0.84	29.9 ± 0.25	30.00

الجدول رقم (8): النتائج التحليلية لتحديد الميلايين المضاف للعينه (C) باستخدام تقانة RP- HPLC ضمن الشروط التحليلية المثلى.

الاسترجاعية Recovery%	RSD%	$\bar{x} \pm SD$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (n=5)	التركيز المضاف من الميلايين $X \mu\text{g.mL}^{-1}$
95	4.74	0.095 ± 0.0045	0.100
94	3.19	0.47 ± 0.015	0.500
100	2.1	1.00 ± 0.021	1.00
96	1.96	4.80 ± 0.094	5.00
99.6	1.61	9.96 ± 0.16	10.00
99.00	1.16	19.8 ± 0.23	20.00
99	0.98	29.7 ± 0.29	30.00

## 6.2. التطبيق العملي:

تم جمع (64) عينة لحليب الأطفال المُجفف المتوافرة في السوق المحلية ضمن مدينة إدلب وما حولها بشكل عشوائي ولمختلف المراحل العمرية، حيث يتم استيراد هذه الأصناف من عدد من البلدان المنتجة للحليب المُجفف، علماً أن جميع العينات كانت ضمن فترة الصلاحية وقد تم حفظها في مكان ملائم بالنسبة لدرجة الحرارة والرطوبة، تم تحضير عينات الحليب بنفس الطريقة المذكورة سابقاً بغية قياسها بتقانة RP- HPLC وفق الشروط الكروماتوغرافية المثلى، ثم رُسمت المنحنيات الكروماتوغرافية للعينات المُحضرة ومن ثم عوضت قيم مساحة القمة الكروماتوغرافية في معادلة المنحني العياري وحسبت التراكيز مقدرة بالـ  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  ثم حسبت تراكيز الميلايين في حال وجودها في عينات الحليب على أساس الحليب المُحضر السائل.

### 3. الخلاصة

تم في هذا البحث تطوير طريقة تميزت بالسهولة والسرعة من أجل تحضير عينات الحليب المُجفف بغية تحديد الميلايين فيها بتقانة RP-HPLC، حيث اعتمدت على استخدام مزيج مكون من الميثانول والماء المقطر (20:80) من أجل تخثير عينات الحليب المُجفف المُقدم لكافة الفئات العمرية، ومن أجل إتمام عملية التخثير تم وضعها ضمن جهاز الأمواج فوق الصوتية لمدة 5min ومن ثم تثقيل العينات لمدة 4min عند (3200rpm)، والمُلاحظ أن طريقة التحضير سريعة حيث أنها لم تستغرق أكثر من 10min في حين أن طريقة التحضير في بعض الأبحاث العلمية السابقة تجاوزت 30min.

وبهدف الحصول على قمة كروماتوغرافية متناظرة وحادة ومفصولة للميلايين بحال وجوده ضمن عينات الحليب تم تطوير بعض الشروط الكروماتوغرافية من اختيار طور متحرك مناسب وهو الماء (100%) وعمود C<sub>18</sub> ODS (250X4.6) mm, 5 µm وتدفق 1ml/min، وقد أبدت المنحنيات الكروماتوغرافية قمة حادة متناظرة مفصولة للميلايين عن باقي قمم مكونات الحليب عند الزمن 7.8min حيث يُعتبر زمن قصير نسبياً وبالتالي السرعة في انجاز التحليل.

تم إجراء دراسة تحليلية شاملة بهدف تحديد المجال الخطي للتراكيز والذي تراوح بين  $0.1-30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  مع تحديد حد الكشف وحد التحديد الكمي فكانت قيمهم  $0.0026 \mu\text{g.mL}^{-1}$  و  $0.0078 \mu\text{g.mL}^{-1}$  على التوالي، كما أُجريت مقارنة للنتائج التي تم التوصل إليها خلال يوم واحد بمعدل تكرار (n=5) مع النتائج لخمس أيام متتالية وكانت جميع النتائج متقاربة، وأيضاً بهدف تأكيد إمكانية الطريقة على تحديد الميلايين في عينات الحليب المُجفف تمت دراسة الاسترجاعية لمحاليل عيارية للميلايين أُضيفت إلى عينات الحليب، وقد بينت النتائج قدرة الطريقة على تحديد الميلايين في عينات الحليب بحال وجوده بكميات أقل بعشرة مرات من الحد المسموح به 1ppm.

أخيراً وبهدف ربط البحث بالواقع العملي تم تطبيق الطريقة المقترحة لتحديد الميلامين في عينات الحليب المجفف المستورد، تبين النتائج أن غالبية العينات المُحضرة لم تحتوي أي كمية من الميلامين في حين وُجدت كميات قليلة من الميلامين حول الحدود المسموح بها في 8 عينات حليب، والمُلاحظ أن جميع عينات التي تجاوزت الحدود بكميات ضئيلة من الميلامين كانت حليب مُجفف كامل الدسم. قد لا يكون وجود هذه الكميات من الميلامين بسبب الغش لأنه لا يحقق غاية ربحية وإنما قد يعزى إلى تلوث الحليب بهذه الكميات الضئيلة أثناء مراحل التصنيع حيث أنه وكما ذُكر فإن الميلامين يدخل في صناعة أواني التصنيع.

### المراجع

- [1] D. R. Shelton, J. S. Karns, G. W. McCarty, and D. R. Durham, "Metabolism of Melamine by *Klebsiella terrigena*," Appl. Environ. Microbiol., vol. **63**, no. **7**, pp. **2832–2835**, **1997**.
- [2] W. H. Organization, "Toxicological and health aspects of melamine and cyanuric acid: report of a WHO expert meeting in collaboration with FAO, supported by Health Canada, Ottawa, Canada, 1-4 December **2008**," **2009**.
- [3] I. Gâjâilă, "Determination of Melamine Residue in Food Using Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry," Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca. Vet. Med., vol. **67**, no. **2**, **2010**.
- [4] R. K. Owusu-apenten, "Melamine-Tracing the contaminant," no. August, **2015**.
- [5] S. A. Miller, "MELAMINE AND DERIVATIVES OF MELAMINE," Br. Oxyg. Res. Dev. Ltd, vol. S.W.19, pp. **131–135**.
- [6] C. A. Brown et al., "Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in **2004** and **2007**," J. Vet. Diagnostic Investig., vol. **19**, no. **5**, pp. **525–531**, **2007**.
- [7] R. L. M. Dobson et al., "Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs," Toxicol. Sci., vol. **106**, no. **1**, pp. **251–262**, **2008**.
- [8] A. K. Hau, T. H. Kwan, and P. K. Li, "Melamine toxicity and the kidney," J. Am. Soc. Nephrol., vol. **20**, no. **2**, pp. **245–250**, **2009**.
- [9] B. M. Kuehn, "Melamine scandals highlight hazards of increasingly globalized food chain," JAMA, vol. **301**, no. **5**, pp. **473–475**, **2009**.

- [10] WHO (2008a), "Melamine-contaminated powdered infant formula in China." **14** Noveber, **2010**.
- [11] W. Yin et al., "Preparation of monoclonal antibody for melamine and development of an indirect competitive ELISA for melamine detection in raw milk, milk powder, and animal feeds," *J. Agric. Food Chem.*, vol. **58**, no. **14**, pp. **8152–8157**, **2010**.
- [12] D. P. H. Hsieh, C. F. Chiang, P. H. Chiang, and C. P. Wen, "Toxicological analysis points to a lower tolerable daily intake of melamine in food," *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. **55**, no. **1**, pp. **13–16**, **2009**.
- [13] W. H. Organization, "Report of the first global meeting of the International Food Safety Authorities Network (INFOSAN), Abu Dhabi, United Arab Emirates, **14-16** December **2010**," **2011**.
- [14] C. G. Skinner, J. D. Thomas, and J. D. Osterloh, "Melamine toxicity," *J. Med. Toxicol.*, vol. **6**, no. **1**, pp. **50–55**, **2010**.
- [15] A. Filazi, U. T. Sireli, H. Ekici, H. Y. Can, and A. Karagoz, "Determination of melamine in milk and dairy products by high performance liquid chromatography," *J. Dairy Sci.*, vol. **95**, no. **2**, pp. **602–608**, **2012**.
- [16] H. Journals, "Identification & Estimation of Melamine Residue in Powdered Milk by RP-HPLC," no. **4**, pp. **4–10**, **2015**.
- [17] G. Venkatasami and J. R. Sowa Jr, "A rapid, acetonitrile-free, HPLC method for determination of melamine in infant formula," *Anal. Chim. Acta*, vol. **665**, no. **2**, pp. **227–230**, **2010**.
- [18] M. Salman, E. S. S. Abdel Hameed, M. S. Al-Amoudi, L. Salman, M. T. Alghamdi, and S. A. Bazaid, "Identification and determination of melamine in milk by high performance liquid chromatography - UV detector," *Der Pharma Chem.*, vol. **4**, no. **2**, pp. **737–748**, **2012**.
- [19] Y.-L. Wong and C. Mok, "A single analytical procedure for the simultaneous and confirmatory determination of melamine and related compounds in various food matrices by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry (ID-GC-MS)," *Anal. Methods*, vol. **5**, no. **9**, pp. **2305–2314**, **2013**.
- [20] M. Hong et al., "Simultaneous determination of melamine, ammelide, ammeline, and cyanuric acid in milk and milk products by gas chromatography-tandem mass spectrometry," *Biomed. Environ. Sci.*, vol. **22**, no. **2**, pp. **87–94**, **2009**.
- [21] W. Yin et al., "Preparation of monoclonal antibody for Melamine and development of an indirect competitive ELISA for Melamine

- detection in raw milk, milk powder, and animal feeds,” J. Agric. Food Chem., vol. **58**, no. **14**, pp. **8152–8157**, **2010**.
- [22] F. Sun, L. Liu, H. Kuang, and C. Xu, “Development of ELISA for melamine detection in milk powder,” Food Agric. Immunol., vol. **24**, no. **1**, pp. **79–86**, **2013**.

Accepted //2020