الشروط المثلى لتحديد مُركبي التايلوزين والسبيراميسين في لحم الدجاج باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء المزودة بكاشف المصفوفة الديودية

عصام محمد [1] دارم طباع[2]
تميم عليا[3] لبينة الرحية[4]

الملخص

تناول هذا البحث دراسة الشروط المثلى لاستخلاص مُركبي التايلوزين والسبيراميسين وفصلها وتحديدهما في لحم الدجاج باستخدام تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء المزودة بكاشف المصفوفة الديودية.

سُجلت أفضل نسبة استرجاع لمُركبي التايلوزين والسبيراميسين 90.0%,93.0% عند تركيز 0.10ppm و 91.90, 92.90% عند تركيز 1.0ppm على التوالي من عينات لحم الدجاج باستخدام مُذيب الاستخلاص Mcllvaine-EDTA عند pH:2.6.

أظهرت الدراسة نسبة استرجاع ممتازة لمُركبي التايلوزين والسبيراميسين 96.50%, 97.50% عند تركيز 0.10ppm و 98.10, 100.50% عند تركيز 1.0ppm على التوالي عند استخلاصهما من عينات لحم الدجاج في حمام مائي مزود بالأمواج فوق الصوتية بانحراف معياري نسبي مئوي أقل من 1.1% خلال نصف ساعة. كما أبدت خراطيش الاستخلاص بالطور الصلب asis HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance Copolymer) (500mg, 5mℓ) استجابة ممتازة أيضاً لاسترجاع مُركبي التايلوزين والسبيراميسين 96.50, 97.50% عند تركيز 0.10ppm و 100.10, 100.40% عند تركيز 1.0ppm على التوالي من عينات لحم الدجاج بالمقارنة بالخراطيش الأخرى، كما لم يُلحظ تأثر نسبة استرجاع مُركبي التايلوزين والسبيراميسين عند زيادة حجم الميثانول المستخدم في التمليص عن 3.5mℓ، وتجدر الإشارة أن

(1) أستاذ في قسم الكيمياء – كلية العلوم – جامعة تشرين– اللاذقية –سوريا issam.moh58@yahoo.com.
(2) أستاذ في كلية الطب البيطري – جامعة البعث – حمص – سوريا.
(3) أستاذ مساعد في المعهد العالي لبحوث البيئة – جامعة تشرين – اللاذقية – سوريا.
(4) طالبة دكتوراه – قسم الكيمياء – كلية العلوم – جامعة تشرين – اللاذقية – سوريا.

الزمن اللازم في التحديد الكمي للمركبين من ست عينات لحم دجاج استغرق نحو أربع ساعات، وهو زمن جيد لتطبيق هذه الطريقة في مخابر المراقبة (القسم الغذائي). تميز منحني المُعايَرة لمُركبي التايلوزين والسبيراميسين بخطية ممتازة ومُعاملي ارتباط 0.99997 ,0.99990 =R^2 على التوالي ضمن مجال من التراكيز راوح بين (0.080-1.20ppm).

الكلمات المفتاحية: التايلوزين والسبيراميسين (ماكروليدات)، كروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء مزودة بكاشف المصفوفة الديودية، لحم دجاج.

Optimal Conditions for the Determination of Tylosin & Spiramycin in Poultry, using High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector (HPLC-DAD)

Issam Mohamad[(1)] **Darem Tabaa[(2)]**
Tamem Alya[(3)] **Lobaina Alrhia[(4)]**

ABSTRACT

This research studies the optimal conditions for extraction, separation and determination of Tylosin & Spiramycin compounds in poultry samples, using High Performance Liquid Chromatography technique with Diode Array Detector (HPLC-DAD).

The best recovery ratios for Tylosin and Spiramycin were 90.0, 93.0% respectively at 0.10ppm, and 91.90, 92.90% respectively at 1.0ppm; using an extraction solvent of Mcllvaine-EDTA at pH:2.6. The study revealed an excellent recovery ratios of 96.50, 97.50% respectively for Tylosin and Spiramycin at 0.10ppm and 98.10, 100.50% respectively at 1.0ppm, at the extraction by ultrasonic water bath with a percentage relative standard deviation less than 1.1% during half an hour. On the other hand, Cartridges solid phase extraction Oasis HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance Copolymer) (500mg, 5mℓ) showed also an excellent response for the recovery of Tylosin and Spiramycin: 96.50, 97.50% respectively at 0.10ppm and 100.10, 100.40% respectively at 1.0ppm in comparison with other cartridges. The results showed that the recovery ratios of Tylosin and Spiramycin were not affected by increasing the volume of methanol used in elution more than 3.5mℓ. The study showed that the holding time needed for the quantitative determination of both compounds from six poultry samples was about four hours, which considered

(1) Professor, Department of Chemistry - Faculty of Sciences -Tishreen University- Lattakia-Syria issam.moh58@yahoo.com.

(2) Professor, Faculty of Veterinary- Al-Baath University- Homs-Syria.

(3) Associated Professor, High Institute of Environmental Research -Tishreen University- Lattakia-Syria.

(4) Post Graduate student, Department of Chemistry- Faculty of Science -Tishreen University- Lattakia-Syria.

as a good time for the application of this method in the control laboratories (Food Section). The calibration curves of Tylosin and Spiramycin were found to have an excellent linearity and correlation coefficients; R^2= 0.99990, 0.99997 respectively within a range of concentrations between 0.080-1.20ppm.

Keywords : Tylosin and Spiramycin (Macrolides), HPLC-DAD, Poultry.

مقدمة: Introduction

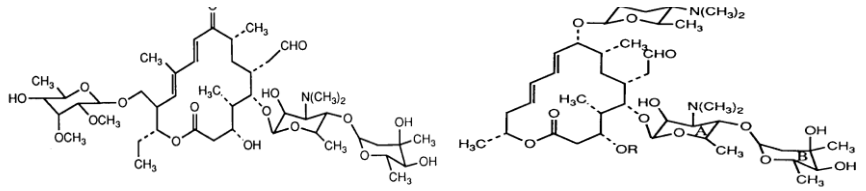
تحتل الصادات الماكروليدات (Macrolides) موقعاً مُتميزاً في أهميتها كونها تُستخدم استخداماً واسعاً في مجال الطب البيطري، وذلك لأسباب علاجية ووقائية ضد الجراثيم المعدية التي تصيب الحيوانات المنتجة للغذاء [1-6]، كما تُسْتَخْدَمُ أيضاً كمحفزات نمو (Growth Promoting)، تُضاف مُباشرةً إلى غذاء الحيوانات [2, 7- 9]، وتجدر الإشارة إلى أن الاستخدام المغلوط به لهذه الصادات يُخلف وراءه _في كثير من الأحيان_ نزراً مُتبقي من هذه الصادات في المادة الغذائية؛ ممَّا يترك تأثيراً سمياً [2, 4]، ينعكس بطريقة أو بأخرى عبر ظهور تأثيرات غير مرغوب بها في صحة المستهلكين [10]، تتجلى إما بظهور ردود فعل تحسسيه لهذه الصادات ونواتج استقلابها (Metabolites) عند بعض الأفراد [1, 2, 4, 11]، أو تأثيرات سمية مباشرة على المستهلكين [7, 12]، أو ظهور سلالات بكترية مقاومة لهذه الصادات [2, 6, 13].

يُمكن لكثير من المركبات التي توجد في قوالب(Matrices) الأغذية الحيوانية مثل العضلات والكبد أن تتداخل مع مكونات العينة المدروسة، مما يحتّم ضرورة البحث عن طريقة انتقائية لإزالة مثل هذه التداخلات. تناولت الدراسات المرجعية طرائق استخلاص وتنقية شائعة الاستخدام للماكروليدات من قوالب عدة، شملت عملية ترسيب البروتين (Protein Precipitation)، وطريقة الاستخلاص سائل – سائل (Liquid-Liquid Extraction, LLE)، وجرى في معظم الحالات اللجوء إلى طريقة الاستخلاص بالطور الصلب (Solid-Phase Extraction, SPE)، وفي بعض الحالات طريقة الاستخلاص بالطور الصلب مسبوقة بعملية استخلاص للسائل مع التكيف بالضغط pressurized liquid extraction أو استخلاص المذيب بالأمواج فوق الصوتية ultrasonic solvent extraction [9].

تنوعت خراطيش الاستخلاص بالطور الصلب (Solid Phase Extraction) المستخدمة في البحوث العلمية، كخراطيش التبادل الكاتيوني (Cation Exchange) وخراطيش السيلكا جيل (Silica Gel) التي تكون مُكلفة أحياناً عند دراسة عدد كبير من العينات؛ إذ تعدُّ الخرطوشة الواحدة صالحة للاستخدام لعينة واحدة فقط [13].

استخدمت في هذا البحث تقانة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء وفق كاشف المصفوفة الديودية الضوئية (High Performance Liquid Ghromatography - Diode Array Detector - HPLC-DAD). تُعدُّ هذه التقانة من الطرائق التحليلية الحساسة والانتقائية

والمناسبة لتحليل مُركبي التايلوزين والسبيراميسين. يمثل الشكل (1-a, b) الصيغة المُفصلة لجزيئي مُركبي التايلوزين والسبيراميسين.



a **b**

الشكل (1): a: جزيء مركب التايلوزين ، b: جزيء مركب السبيراميسين

هدف البحث وطريقته: Goal and Method of the Research

هَدَفَ البحث إلى تحديد الشروط المثلى (أفضل مُذيب استخلاص، pH محلول الاستخلاص، طريقة الاستخلاص، أفضل خرطوشة استخلاص بالطور الصلب، وأفضل حجم ميثانول لازم لتمليص مُركبي التايلوزين والسبيراميسين الممُتزين على أفضل خرطوشة استخلاص بالطور الصلب المُستخدمة) بغية الوصول إلى طريقة انتقائية يمكن اعتمادها في استخلاص مُركبي التايلوزين والسبيراميسين وتحديدها في لحم الدجاج باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C8 وفق تقانة HPLC-DAD.

تكمن أهمية البحث في إمكانية التوصل إلى إجراءات تحليلية انتقائية يُمكن استخدامها في المرافق الخدمية بغية توفير الجهد والزمن اللازمين لتحليل عدد من عينات لحم دجاج تحتوي على مُركبي التايلوزين والسبيراميسين باستخدام التقانة سابقة الذكر.

مواد البحث وطرائقه: Materials and methods

المواد والمحاليل المستخدمة: Materials and Solvents

مركب سبيراميسين Spiramycine (98%)، إنتاج شركة (Sigma USA).

- مركب التايلوزين Tylosin (98%)، إنتاج شركة (Sigma USA).
- ميثانول (Methanol, CH_3OH) (HPLC-grad) 99.8%، إنتاج شركة (Merck-Germany).
- أسيتونتريل (Acetonitrile, CH_3CN) (HPLC-grad) 99.8%، إنتاج شركة Merck-Germany.
- أسيتون (Aceton, CH_3OCH_3) 99.8%، إنتاج شركة Merck-Germany.
- فوسفات ثنائية الصوديوم الهيدروجينة اللامائية (Disodium Hydrogen Phosphate, Na_2HPO_4) 98%، إنتاج شركة Merck-Germany.

- حمض الفوسفور (Phosphoric Acid, H_3PO_4) 99.5%، إنتاج شركة Merck-Germany.
- فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين اللامائية (Potassium Dihydrogen Phosphate, KH_2PO_4) 99.7%، إنتاج شركة Merck-Germany.
- خلات الصوديوم ثلاثية جزيئات الماء (Sodium Acetate-Tri-hydrate, $CH_3COONa.3H_2O$) 99.5%، إنتاج شركة Merck-Germany.
- حمض الخل الثلجي (Acetic Acid Glacial, CH_3COOH) 95%، إنتاج شركة SCP.
- حمض الليمون (Citric Acid, $C_6H_8O_7.H_2O$) 99.7%، إنتاج شركة Prolabo-CE.
- هيدروكسيد البوتاسيوم (Potassium Hydroxide, KOH)99.8%، إنتاج شركة Merck-Germany.
- هيدروكسيد الصوديوم (Sodium Hydroxide, NaOH) 1N، إنتاج شركة Carlo Erba.
- ملح ثنائي الصوديوم للـEDTA 99.5% إنتاج شركة Poch SA-Poland: (Disodium ethylene diamine tetraacetate, $[CH_2N(CH_2.COOH)\ CH_2.COONa]_2.2H_2O$).
- ماء ثنائي التقطير منزوع الشوارد (de-ionized).

تتمتع المركبات والمحاليل المستخدمة جميعها بدرجة عالية من النقاوة.

الأجهزة والأدوات المُستخدمة **Apparatus and Tools**

- ميزان تحليلي حساس بدقة ±0.0001g إنتاج شركة Genius- Germany.
- آلة طحن ومجانسة للعينة متعددة السرعات ماركة (Ultra turrax, IKA T18 basic).
- رجاج مزود بمنغاطيس إنتاج شركة BUCHI- Japan.
- جهاز طرد مركزي (Rotavoper) إنتاج شركة Buchi- Japan.
- حمام مائي يعمل بالأمواج فوق الصوتية (Ultrasonic water - bath) ماركة Transsonice T700.
- جهاز pH متري ماركة (Crison).
- مثفلة (5000rpm) ماركة Tomy LC-100.
- ورق ترشيح إنتاج شركة Zelpa- Belgium.
- جهاز استخلاص بالطور الصلب إنتاج شركة Supelco- USA.
- خرطوشة استخلاص وتنقية بالطور الصلب إنتاج شركة (Waters, USA) من النوع: [Cartridges SPE Oasis HLB{(100mg, 1mℓ) (500mg, 5mℓ)} + Carboxylic acid].
- خرطوشة استخلاص وتنقية بالطور الصلب إنتاج شركة (Saplco, USA) من النوع: [Cartridges SPE C18 {(100mg, 1mℓ) (500mg, 5mℓ)}].

- خرطوشة استخلاص وتنقية بالطور الصلب إنتاج شركة (Waters, USA) نوع: Florisil (500mg, 3mℓ).
- خرطوشة استخلاص وتنقية بالطور الصلب إنتاج شركة (Waters, USA) نوع: Silica (500mg, 3mℓ).
- خرطوشة استخلاص وتنقية بالطور الصلب إنتاج شركة (Supelco, USA) نوع: $LC\text{-}NH_2$(100mg, 1mℓ).
- عمود فصل كرموتوغرافي من النوع C8 (250 x 4.6mm, id., 5µm) ماركة Agilent Zorbax XDB Eclipse.
- فلاتر غشائية (Milliporemembrance-filters) 25mm, 0.45µm إنتاج شركة Albet-Germany.

تحضير المحاليل والمذيبات **Preparation of Solutions and Solvents**

- محاليل الطور المتحرك Mobile-phase: محلول فوسفات ثنائية الصوديوم الهيدروجينة اللامائية (0.04M)، واسيتونتريل.
- مُذيب استخلاص McIlvain-EDTA المُنظَّم McIlvain-EDTA buffer solvent: يُحضَّر محلوله طازجاً بإذابة 11.80g من حمض الليمون و13.72g من فوسفات ثنائية الصوديوم الهيدروجينية المائية و33.62g من Na_2-EDTA في ليتر ماء ثنائي التقطير، يُضبط الرقم الهيدروجيني للمُذيب عند pH:3.5 باستخدام حمض الفوسفور. يُحفظ في عبوة عاتمة في الثلاجة في درجة حرارة (-20°C) إلى حين الاستخدام [14].
- مُذيب استخلاص حمض الفوسفور – ميثانول: يُحضر محلوله بمزج حمض الفوسفور 0.5% مع الميثانول بنسب (2:8) على التوالي عند pH:2 [1, 10, 15].
- مُذيب استخلاص حمض الليمون – أسيتون: يُحضر في البداية المحلول A بمزج محلول حمض الليمون 0.2M مع حجم مماثل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم 0.5M. يُمزج كل من المحلول A ومُذيب الأسيتون العضوي مع الماء بنسب (30:35:35) على التوالي عند pH:5.5 [10].
- محلول الفوسفات المُنظِّم (0.2M): يُحضر محلول الفوسفات المُنظِّم بإذابة 21.75g من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين اللامائية و 8.5g من فوسفات ثنائية الصوديوم الهيدروجينة اللامائية في دورق 1000ml عند pH:8 [10].
- محلول الفوسفات المُنظِّم (0.06M): يُحضر محلول A بإذابة 9g من فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين اللامائية في دورق 1000mℓ، ومحلول B بإذابة 8.5g من فوسفات

ثنائية الصوديوم الهيدروجينة اللامائية في دورق 1000mℓ. يُحضر محلول الفوسفات المُنظِّم عند pH:8 بمزج A, B بالنسب (5.5, 94.5) [7, 16].

- محلول الخلات المُنظِّم: يُحضر محلول الخلات المُنظِّم بإذابة 12.3gr من خلات الصوديوم في دورق 1000mℓ، يُضبط pH: 5.5 باستخدام حمض الخل الثلجي [7, 16].
- اختير التركيزان العياران لكل من مُركبي التايلوزين والسبيراميسين 0.10, 1.0ppm بغية تحديد النسب المئوية لاسترجاع مُركبي التايلوزين والسبيراميسين من عينة لحم الدجاج وفق تقانة HPLC- DAD.

تربية الدجاج: **Growthing of Poultry**

طبق نظام غذائي خالي من الصادات على مجموعة من الصيصان المُعدَّة للتربية، إذْ اِعْتُمِدَ في تغذيتها على حبوب القمح فقط مدة شهرين، بعد ذلك اختير أكبر صوصين للذبح. أُستخدمت عينة اللحم المأخوذة من كل صوص كعينة بلانك (لحم خالي من الصادات). غُلفت عينات لحم الدجاج بورق ألمونيوم وخُزنت في مجمدة بدرجة حرارة -18^0C إلى حين إجراء التحاليل المخبرية.

إجراءات تحضير العينة: **Sample preparation procedures**

حُضرَّت العينة المدروسة على النحو الآتي:

- يوزن 2g من عينة لحم الدجاج (لحم خالي من الصادات).
- تُطحن عينة لحم الدجاج وتُجانس باستخدام آلة طحن مخبرية. يُضاف 2mℓ من مُذيب الاستخلاص المُحدَّد لاحقاً إلى عينة اللحم في أثناء طحنها، تُجانس العينة المطحونة بعد الانتهاء من عملية الطحن مع 30mℓ من مُذيب الاستخلاص نفسه مدة دقيقة واحدة.
- يضاف 1mℓ من محلولي التايلوزين والسبيراميسين العيارين بتركيز 0.10, 1.0ppm، ثم تجانس العينة مدة دقيقة واحدة.
- يُثفل ناتج الاستخلاص وفق البند السابق في مُثفلة مدة ربع ساعة.
- تُفصل الطبقة السائلة بعد الانتهاء من عملية التثفيل وتُرشح باستخدام ورق ترشيح.
- تُمرَّر الطبقة السائلة المستخلصة والمُثفلة (منزوعة البروتين) ضمن خراطيش استخلاص بالطور الصلب مُتعددة ومُختلفة، بغية عزل الصاد عن باقي مكونات ناتج الاستخلاص.
- يُملص الصاد من خرطوشة الاستخلاص بالطور الصلب بـ 5mℓ ميثانول.
- تُرشح الخلاصة النهائية باستخدام فلتر ترشيح مساميته 0.45µm، لتُصبح بعدها جاهزة للحقن في جهاز HPLC-DAD.

أُستخدمت تقانة (HPLC-DAD) في التحديد الكمي لمُركبي التايلوزين والسبيراميسين بغية تحديد نسبة استرجاع كلٍّ منهما من عينات لحم الدجاج. يبيّن الجدول(1) الشروط التحليلية المثلى لفصل مُركبي التايلوزين والسبيراميسين في الجدول(1).

الجدول (1): الشروط التحليلية المثلى لفصل مُركبي التايلوزين والسبيراميسين وفق تقانة HPLC-DAD [17].

نسب الطور المتحرك المثلى	$A[Na_2HPO_4(0.04M)pH:2.4/ACN(80:20v/v)]/B(ACN)$		
درجة حرارة فرن العمود المثلى	40^oC		
طول الموجة الأعظمي الأمثل	λ_{max} (ty.) =280nm, λ_{max} (sp.) =232nm		
تدفق الطور المتحرك الأمثل	$1m\ell$ /min		
العمود الكروماتوغرافي	C8-250x4.6mm, id.,5µm		
زمن الاحتفاظ الأمثل	R_t (Ty.): 7.013, R_t (sp.): 4.214		
حجم الحقنة	20µ*l*		
البرنامج الزمني لتدرج النسب المثلى للطور المتحرك	الزمن(min)	A	B
	0.01	100	0
	0.5	60	40
	10	60	40
	12	100	0

النتائج والمناقشة Results and Discussion

التحديد الكمي Quantitative Determination

حُدِّد تركيز كل من مركبي التايلوزين والسبيراميسين المسترجعين كمياً عبر حقن نواتج استخلاص أربع عينات مكررة لكل عينة لحم مستقلة، فضلاً عن حقن كل عينة أربع مرات متتالية. حُسب بعد ذلك متوسط تركيز المُركب في كل عينة، ثُمَّ متوسط التركيز في العينات الأربع. تمَّ حساب تركيز المركبين المُسترجعين في ناتج الاستخلاص من العلاقة الآتية:

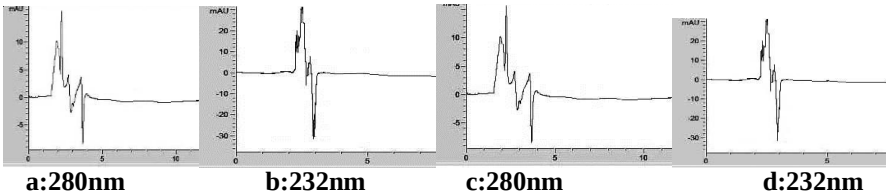
$$\text{تركيز المركب المسترجع (ppm)} = \frac{\text{مساحة قمة محلول الخلاصة}}{\text{مساحة قمة المحلول العياري}} \times \text{تركيز المحلول العياري (ppm)}$$

اختبار قالب العينة Test of Sample Matrix

يُقصد بقالب العينة مكونات العينة جميعها عدا الصاد المدروس، وجرى ذلك على مرحلتين:

1- التأكد عبر اختبار المقارنة الموضح في الشكل (2-a, b) عدم تلوث الكواشف والأدوات المستخدمة في إجراءات عمليات الاستخلاص بواسطة مذيب McIlvain-EDTA، والتنقية عبر عمود SPE HLB Oasis (500mg, 5mℓ)، والفصل عبر عمود C8 المتبعة في تحديد نزر مُركبي التايلوزين والسبيراميسين؛ إذ تبيّن خلو كل من الكواشف والأدوات

المستخدمة من نزر مُركبي التايلوزين والسبيراميسين عند زمني الاحتفاظ 7.013, min 4.214 على التوالي.



a:280nm b:232nm c:280nm d:232nm

الشكل(2): كروماتوغرامات قالب العينة، (a, b) اختبار المقارنة، (c, d) اختبار البلانك

2- التأكد عبر اختبار البلانك الموضح في الشكل (2-c, d) عدم حدوث تداخل بين قمم المركبات المرافقة Co-Extractive (في حال وجودها) مع قمة الصاد في عينة لحم الدجاج غير المعالجة بالصاد نفسه في حال وجوده عند زمن الاحتفاظ للصاد نفسه، ولتحقيق ذلك، أُخذت عينات لحم دجاج غير معالجة بالصاد المدروس، وأجريت عليها تباعاً عمليات الاستخلاص والتنقية والفصل وفق تقانة HPLC-DAD الموصوفة سابقاً؛ إذ تبيّن عدم الكشف عن وجود أية قمة للصادين المدروسين التايلوزين والسبيراميسين عند زمني الاحتفاظ 7.013, 4.214min على التوالي.

اختبار نسبة الاسترجاع المئوية Test of Recovery Percentage

تمَّ التأكد من كفاءة الاستخلاص عبر تكرارية استخلاص كل عينة من عينات لحم دجاج خالية من الصادات (بلانك) أربع مرات متتالية. حُدِّدَتْ نزر مُركبي التايلوزين والسبيراميسين في حال وجودهما في خلاصة كل عينة من عينات لحم باستخدام تقانة HPLC-DAD، التي تبيّن خلوها من نزر المُركبين. أجريت عملية التعزيز (Fortification) بإضافة التركيزين 0.10, 1.0ppm وبأربعة مكررات لكل تركيز من العينات المستقلة، وفق الخطوات الآتية:

- حُضِّرت عينة اللحم وفق الطريقة الموصوفة.
- أُجريت عملية التعزيز بإضافة تركيز مُحدَّد وفق التراكيز المذكورة سابقاً إلى العينة المراد استخلاصها.
- جرت عمليات الاستخلاص لهذه العينة وفق الطريقة الموصوفة.
- قُدِّرت النسبة المئوية للاسترجاع وفق العلاقة الآتية:

$$\text{نسبة الاسترجاع (\%)} = \frac{\text{تركيز المركب المسترجع (ppm)}}{\text{تركيز المركب المُضاف (ppm)}} \times 100$$

تحضير المحاليل العيارية: **Preparation of Standard Solutions**

- **المحلول العياري الأم** (Stock Standard Solution)**:** تمَّ وزن 25.0mg لكلٍّ من صادي التايلوزين والسبيراميسين في دورق عياري سعة 25.0mℓ. أُذيبت وزنة الصادين البالغة 50.0mg في كمية مُناسبة من الميثانول عالي النقاوة، ومُدِّد الحجم بدقة حتى إشارة التدريج فتم الحصول على محلول عياري تركيزه (1000.0ppm). وضع الدورق في حمام مائي للأمواج فوق الصوتية بدرجة حرارة الغرفة مدة 5min للمساعدة في تمام ذوبان المُركبين وطرد الغازات المُذابة، زود الدورق ببطاقة تعريف بعد لفه بورق ألمنيوم في مكان مظلم في المجمدة عند درجة حرارة $(-20^{o}C)$.
- **المحلول العياري الوسطي** (Middle Standard Solution)**:** نقل 1.0ml من المحلول العياري الأم إلى دورق مُعايَرة سعة 100mℓ، ومُدِّد الحجم حتى إشارة التدريج بالميثانول، بغية الحصول على محلول عياري وسطي تركيزه 10.0ppm. زود الدورق الجديد ببطاقة تعريف، وحُفظ بعد لفه بورق ألمنيوم في مكان مظلم في المجمدة في درجة حرارة $(-20^{o}C)$ إلى حين استخدامه في تحضير سلسلة المحاليل العيارية.
- **سلسلة المحاليل العيارية** (Standard Solutions)**:** حُضِّرت انطلاقاً من المحلول العياري الوسطي سلسلة محاليل عيارية للمركبين بتراكيز 0.080, 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.0, 1.20ppm.

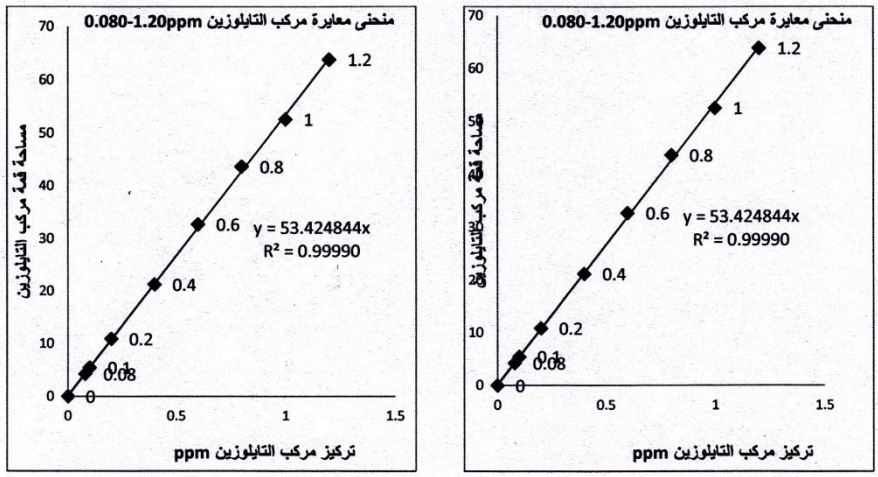
منحنى المُعايَرة: **the Calibration Curve**

أُنْشِئَ منحنى مُعايَرة لكل من مركبي التايلوزين والسبيراميسين وفق طريقة المعيار الخارجي External Standard عند تراكيز مختلفة للصادين. دُرست خطية المُنحنى العياري عند طول موجة λ_{max}=232nm لمركب السبيراميسين و λ_{max}=280nm لمركب التايلوزين باستخدام سلسلة تراكيز مُتدرجة من المحاليل العيارية 0.080, 0.10, 0.20, 0.40, 0.60, 0.80, 1.0, 1.20ppm لكل من المُركبين؛ إذْ حُقِنَ 20µℓ من كل محلول عياري أربع مرات متتالية، ورُسِمَّ منحنى المُعايَرة اعتماداً علىتابعية مساحة القمة (Y) مقابل التركيز (X) لكل مركب. بيّنت نتائج الجدول (2) ظهور قمم عائدة لكل من المركبين بمساحات جيدة عند زمن احتفاظ 7.016min لمركب التايلوزين و4.216min لمركب السبيراميسين.

الجدول(2): مساحة قمم وزمن احتفاظ كل من مركبي التايلوزين والسبيراميسين الموافقة لتراكيز راوحت بين 0.080- 1.20ppm.

التركيز (ppm)	1.20	1.0	0.80	0.60	0.40	0.20	0.10	0.080
مساحة قمة التايلوزين*	63.837	52.578	43.664	32.748	21.279	10.916	5.458	4.245
زمن احتفاظ التايلوزين	R_t:7.016min							
مساحة قمة السبيراميسين*	71.475	59.266	47.176	35.556	23.825	11.794	5.897	4.769
زمن احتفاظ السبيراميسين	R_t:4.216min							

*n=4: تكرارية مساحة كل تركيز من المحاليل العيارية لمُركبي التايلوزين والسبيراميسين.



الشكل (3): منحنى المُعايَرة لمركبي التايلوزين والسبيراميسين ضمن مجال 0.080-1.20ppm.

يوضح الشكل (3) منحنى المُعايَرة لمركب التايلوزين الذي تميز بخطية جيدة ضمن مجال التراكيز 0.080-1.20ppm، وبمعامل ارتباط correlation coefficient R^2=0.99990 عند زمن احتفاظ 7.016min. لُحظ من جهة ثانية، تميز منحنى المُعايَرة لمركب السبيراميسين بخطية جيدة ضمن المجال ذاته وبمعامل ارتباط R^2=0.99997 عند زمن احتفاظ 4.216min.

اختيار أفضل مُذيب الاستخلاص: Test of the best Extraction Solvents

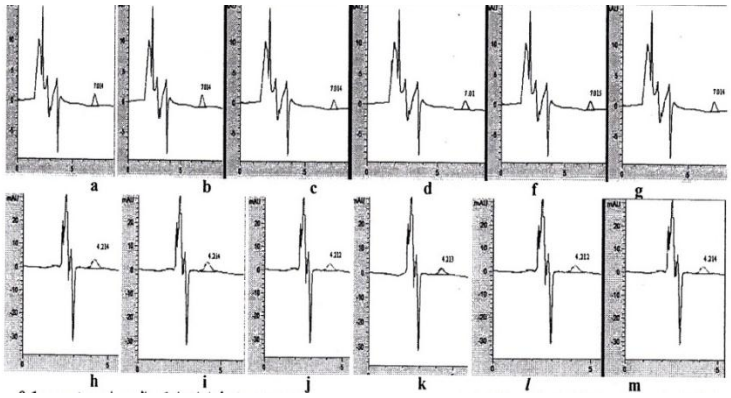
يُعدُّ استخلاص الصاد وتنقيته من مزيج مُعقَّد للأغذية ذات المنشأ الحيواني مرحلة من أصعب مراحل تحليل مثل هذه العينات. تُستخلص الماكروليدات عموماً من العينات بعد التخلص من البروتين والدهن باستخدام مذيبات عضوية [1]. إلا أنّه لابدَّ من ترسيب البروتين استخلاص الصادات من المزائج البيولوجية بغية إزالة التداخلات المحتملة عن ارتباط الصاد بالبروتين، مع ضرورة أن يكون الإجراء المتبع ذا نسب استرجاع جيدة.

أضيفت إلى عينات لحم دجاج خالية من أي نوع من الصادات (بلانك) تراكيز عيارية لمُركبي التايلوزين والسبيراميسين 0.10, 1.0ppm، واتبعت إجراءات تحضير العينة المذكورة

سابقاً في استخلاص التايلوزين والسبيراميسين بمجموعة مختارة من مُذيبات الاستخلاص، كما هو موضّح في الجدول (3).

يبيّن الجدول (3) أن أفضل نسب استرجاع لمُركبي التايلوزين والسبيراميسين من عينات لحم الدجاج، سُجلت باستخدام مُذيب الاستخلاص المُنظَّم Mcllvaine-EDTA في وسط حمضي الشكل (4-a, h)؛ إذ بلغ متوسط نسبة الاسترجاع 85.637% ,83.583 لمركب التايلوزين و87.999% ,85.288 لمركب السبيراميسين عند التركيزين 1.0ppm ,0.10 على التوالي وبانحراف معياري نسبي مئوي أقل من 1%.

أظهرت نتائج استخدام محاليل مُنظِّمة مع مُذيبات استخلاص عضوية كالميثانول والاسيتونتريل أنَّ متوسط مردود استرجاع ضعيف للمُركبين المستخلصين من عينات لحم الدجاج بالمقارنة بالمُذيب المُنظَّم Mcllvaine-EDTA؛ إذ بلغ أقصى مردود استخلاص 62.902% ,61.398 و 76.292% ,75.834 لمُركبي التايلوزين والسبيراميسين 1.0ppm ,0.10 على التوالي عند استخدم مُذيب الخلات المُنظِّم مع الميثانول. لُحظ من جهة ثانية ارتفاع متوسط نسب الاستخلاص لمُركبي التايلوزين والسبيراميسين في وسط حمضي عند استخدام مُذيبات مُنظَّمة من حمض الفوسفور– ميثانول عند (pH:2)، وMcllvaine-EDTA عند (pH:3.5)، ومُذيب الخلات المُنظِّم مع الميثانول (pH:5.5) بالمقارنة بالمُذيبات المُنظَّمة القلوية كمُذيبات الفوسفات– ميثانول عند (pH:8). يُظهر الشكل (4) كروماتوغرامات مُركبي التايلوزين والسبيراميسين المستخلصين من عينات لحم الدجاج بمُذيبات مختلفة.



الشكل(4): (a-g) كروموتوغرامات مُركب التايلوزين. (h-m) كروموتوغرامات مُركب السبيراميسين 0.1ppm.
a, h: Mcllvaine- EDTA المُنظَّم، b, i: حمض الفوسفور– ميثانول، j ,: حمض الليمون– أسيتون، d, k: الفوسفات المُنظَّم 0.2M– ميثانول 1:1v/v، f, l: الفوسفات المُنظَّم 0.06M– ميثانول1:1v/v، g, m: الخلات المُنظَّم - ميثانول 1:1v/v.

الجدول(3): متوسط تراكيز مُركبي التايلوزين والسبيراميسين المسترجعة باستخدام مُذيبات استخلاص مختلفة

مذيب الاستخلاص Extraction Solvent		التايلوزين 0.10ppm		التايلوزين 1.0ppm		السبيراميسين 0.10ppm		السبيراميسين 1.0ppm	
		متوسط تركيز العينة* (2)	متوسط تركيز العينة** (1)	متوسط تركيز العينة* (2)	متوسط تركيز العينة** (1)	متوسط تركيز العينة* (2)	متوسط تركيز العينة** (1)	متوسط تركيز العينة* (2)	متوسط تركيز العينة** (1)
		متوسط تركيز العينتين المستقلتين (" ± RSD% Conc)		متوسط تركيز العينتين المستقلتين (" ± RSD% Conc)		متوسط تركيز العينتين المستقلتين (" ± RSD% Conc)		متوسط تركيز العينتين المستقلتين (" ± RSD% Conc)	
		متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين (%"" Rec)	""" حد الثقة $\overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$	متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين (%"" Rec)	""" حد الثقة $\overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$	متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين (%"" Rec)	""" حد الثقة $\overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$	متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين (%"" Rec)	""" حد الثقة $\overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$
McIlvain-EDTA pH:3.5		0.084±0.652	0.084±0.678	0.857±0.103	0.856±0.079	0.085±0.717	0.085±0.482	0.880±0.102	0.880±0.074
		83.583	0.084±0.617	85.637	0.856±0.090	85.288	0.085±0.615	87.999	0.880±0.079
حمض الفوسفور - ميثانول 2:8v/v pH:2		0.073±0.001	0.073±0.001	0.735±0.001	0.735±0.001	0.072±0.001	0.072±0.001	0.732±0.013	0.740±0.003
		0.058±0.539	0.058±0.432	0.586±0.243	0.585±0.130	0.057±0.589	0.057±0.529	0.584±0.099	0.584±0.292
		72.851	0.073±0.381	73.531	0.735±0.103	72.384	0.072±0.468	73.597	0.736±0.974
حمض النيمون - أسيتون pH:5.5		0.073±0.535	0.073±0.077	0.735±0.084	0.735±0.133	0.072±0.582	0.072±0.417	0.842±1.242	0.842±0.255
		0.058±0.001	0.058±0.001	0.586±0.002	0.588±0.001	0.057±0.001	0.057±0.001	0.584±0.001	0.584±0.002
		57.924	0.058±0.665	58.573	0.586±0.206	57.221	0.057±0.718	58.408	0.584±0.202
الفوسفات المنظم 0.2M- ميثانول 1:1v/v pH:8		0.036±1.347	0.036±1.137	0.363±2.377	0.367±0.356	0.036±1.334	0.036±1.039	0.368±0.182	0.368±0.448
		35.980	0.036±1.165	36.510	0.365±1.673	35.803	0.036±1.117	36.815	0.368±0.317
		0.036±0.001	0.036±0.001	0.365±0.012	0.369±0.001	0.036±0.001	0.036±0.001	0.368±0.002	0.368±0.001
فوسفات منظم 1:1v/v - ميثانول 0.06M- pH:8		0.033±1.464	0.032±1.253	0.335±0.206	0.335±0.164	0.034±2.383	0.034±1.811	0.382±0.227	0.383±0.121
		32.440	0.032±1.306	33.491	0.335±0.185	33.783	0.034±1.986	36.815	0.382±0.195
		0.033±0.001	0.032±0.001	0.335±0.001	0.335±0.001	0.034±0.001	0.034±0.001	0.382±0.001	0.383±0.001
خلات منظم 0.15M- ميثانول 1:1v/v pH:5.5		0.061±0.554	0.062±1.327	0.629±0.096	0.629±0.062	0.076±0.718	0.076±0.928	0.763±0.133	0.763±0.079
		61.398	0.062±0.969	62.902	0.629±0.077	75.834	0.076±0.813	76.292	0.763±0.110
		0.061±0.001	0.062±0.001	0.629±0.001	0.629±0.001	0.076±0.001	0.076±0.001	0.763±0.001	0.763±0.001

***: متوسط تركيز المركب لأربعة مكررات استخلاص لحم الدجاج للعينة الواحدة**

****: متوسط تركيز عينتي لحم دجاج مستقلتين وفق أربعة مكررات استخلاص لكل منهما**

*****: متوسط نسبة الاسترجاع المئوية للمركب من عينتي لحم دجاج مستقلتين وفق أربعة مكررات استخلاص *لكل منهما***

*******: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.***

pH محلول الاستخلاص الأمثل : **Optimal Extraction solvent pH**

أُضْـيِفَتْ محاليـل عياريـة مـن مُركبـي التـايلوزين والسبيراميسـين بتراكيـز 0.10,1.0ppm إلـى عينـات لحـم دجـاج خاليـة تمامـاً مـن أي نـوع مـن الصـادات، واتبعـت خطـوات الإجـراءات التحليليـة سـابقة الـذكر المُسـتخدمة فـي اسـتخلاص المُـركبين مـع تغييـر فـي قيمـة pH وسـط مُـذيب الاسـتخلاص المُـنظَّم Mcllvaine-EDTA وتثبيـت الإجـراءات السـابقة، جُمعـت نتـائج تراكيز التايلوزين والسبيراميسين المُسترجعة من عينات لحم الدجاج في الجدول (4).

أُستخدم حمض الفوسفور فـي هذه الدراسـة بغيـة ضـبط pH مُـذيب الاسـتخلاص المُنظَّم. لُحـظ عـدم ظهـور أيـة تراكيـز مُسـترجعة لمُركبـي التـايلوزين والسبيراميسـين سـواءً فـي وسـط حمضـي ضـعيف أو قلـوي ضـعيف ضـمن مجـال pH:5-8، فـي حـين سُـجل متوسـط نسـبة اسـترجاع جيـد للمـركبين فـي الأوسـاط الحمضـية ضـمن مجـال pH:2.8-3,5، وسُـجل أفضـل متوسـط نسـبة اسـترجاع لتركيـزي المـركبين المدروسـين 0.10, 1.0ppm فـي الوسـط الحمضـي القوي (pH:2.2-2.6) بانحراف معياري نسبي مئوي أقل من 1.1%.

الجدول(4): تأثير pH مُذيب الاستخلاص EDTA- Mcllvaine في متوسط نسبة استرجاع المُركبي المدروسين من عينات لحم الدجاج.

pH	التايلوزين 0.10ppm		التايلوزين 1.0ppm		السبيراميسين 0.10ppm		السبيراميسين 1.0ppm	
	متوسط تركيز العينة*(1)	متوسط تركيز العينة *(2)	متوسط تركيز العينة*(1)	متوسط تركيز العينة *(2)	متوسط تركيز العينة*(1)	متوسط تركيز العينة *(2)	متوسط تركيز العينة*(1)	متوسط تركيز العينة *(2)
	متوسط تركيز العينتين المستقلتين ($\overline{Conc}$ ** ± RSD%)		متوسط تركيز العينتين المستقلتين ($\overline{Conc}$ ** ± RSD%)		متوسط تركيز العينتين المستقلتين ($\overline{Conc}$ ** ± RSD%)		متوسط تركيز العينتين المستقلتين ($\overline{Conc}$ ** ± RSD%)	
	متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين ($\overline{Rec}$ %***)		متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين ($\overline{Rec}$ %***)		متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين ($\overline{Rec}$ %***)		متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين ($\overline{Rec}$ %***)	
	****حد الثقة ± $\overline{X}$ $\overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$		****حد الثقة ± $\overline{X}$ $\overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$		****حد الثقة ± $\overline{X}$ $\overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$		****حد الثقة ± $\overline{X}$ $\overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$	
2	0.088±0.584	0.089±0.607	0.913±0.164	0.924±0.079	0.092±2.019	0.092±1.033	0.926±0.091	0.936±0.063
	0.089±0.596		0.919±0.122		0.092±1.526		0.931±0.077	
	88.500		91.850		92.000		93.100	
	0.088±0.001	0.089±0.001	0.913±0.002	0.924±0.001	0.092±0.003	0.092±0.002	0.926±0.001	0.936±0.001
2.2	0.089±0.836	0.090±0.498	0.913±0.344	0.924±0.122	0.092±1.903	0.093±0.144	0.927±0.017	0.937±0.149
	0.090±0.667		0.919±0.233		0.093±1.024		0.932±0.083	
	90.000		91.900		92.500		93.200	
	0.089±0.001	0.090±0.001	0.913±0.004	0.942±0.002	0.092±0.002	0.093±0.001	0.927±0.001	0.937±0.003
2.4	0.089±0.692	0.091±0.481	0.912±0.103	0.926±0.153	0.093±0.877	0.094±0.468	0.926±0.070	0.936±0.210
	0.090±0.587		0.919±0.128		0.094±0.673		0.931±0.140	
	90.000		91.900		93.500		93.100	
	0.089±0.001	0.091±0.001	0.0912±0.001	0.926±0.003	0.093±0.001	0.094±0.001	0.926±0.001	0.936±0.004
2.5	0.089±0.660	0.091±0.176	0.912±0.040	0.925±0.080	0.092±0.595	0.094±0.666	0.926±0.122	0.934±0.576
	0.090±0.418		0.919±0.060		0.093±0.631		0.930±0.349	
	90.000		91.900		93.000		93.000	
	0.089±0.001	0.091±0.001	0.912±0.001	0.925±0.001	0.092±0.001	0.094±0.001	0.926±0.002	0.934±0.010
2.6	0.089±0.582	0.091±0.835	0.912±0.040	0.925±0.006	0.092±1.989	0.094±0.108	0.925±0.177	0.933±0.323
	0.090±0.709		0.919±0.023		0.093±1.049		0.929±0.250	
	90.000		91.900		93.000		92.900	
	0.089±0.001	0.091±0.001	0.912±0.001	0.925±0.001	0.092±0.003	0.094±0.001	0.925±0.002	0.933±0.006
2.8	0.088±0.597	0.089±0.240	0.893±0.067	0.899±0.582	0.090±0.653	0.091±0.656	0.912±0.778	0.921±1.023
	0.089±0.419		0.896±0.325		0.091±0.655		0.917±0.901	
	88.500		89.600		90.500		91.700	
	0.088±0.001	0.089±0.001	0.893±0.001	0.899±0.010	0.090±0.001	0.091±0.001	0.912±0.001	0.921±0.017
3	0.087±0.744	0.087±1.492	0.875±0.077	0.898±0.127	0.089±0.846	0.091±0.707	0.895±0.090	0.904±0.186
	0.087±1.118		0.887±0.102		0.090±0.777		0.900±0.138	
	87.000		88.650		90.000		89.950	
	0.087±0.001	0.087±0.002	0.875±0.007	0.898±0.002	0.089±0.001	0.091±0.001	0.895±0.001	0.904±0.003
3.5	0.083±0.555	0.084±0.471	0.856±0.397	0.884±0.499	0.085±0.658	0.087±0.238	0.880±0.630	0.898±0.071
	0.084±0.513		0.870±0.448		0.086±0.448		0.889±0.351	
	83.500		87.000		86.000		88.900	
	0.083±0.001	0.084±0.001	0.856±0.007	0.884±0.008	0.085±0.001	0.087±0.001	0.880±0.011	0.898±0.003
4	0.068±1.110	0.067±0.502	0.689±0.076	0.694±0.256	0.078±0.591	0.077±0.521	0.791±0.148	0.809±0.080
	0.068±0.806		0.692±0.166		0.078±0.556		0.800±0.114	
	67.500		69.200		77.500		80.000	
	0.068±0.001	0.067±0.001	0.689±0.001	0.694±0.003	0.078±0.001	0.077±0.001	0.791±0.002	0.809±0.001
4.5	0.056±1.214	0.058±0.523	0.573±0.213	0.580±0.143	0.057±2.616	0.059±0.703	0.584±1.062	0.602±0.833
	0.057±0.869		0.577±0.178		0.058±1.660		0.593±0.948	
	57.000		57.700		58.000		59.300	
	0.056±0.001	0.058±0.001	0.573±0.002	0.850±0.002	0.057±0.002	0.059±0.001	0.584±0.009	0.602±0.009
5- 8	-----							

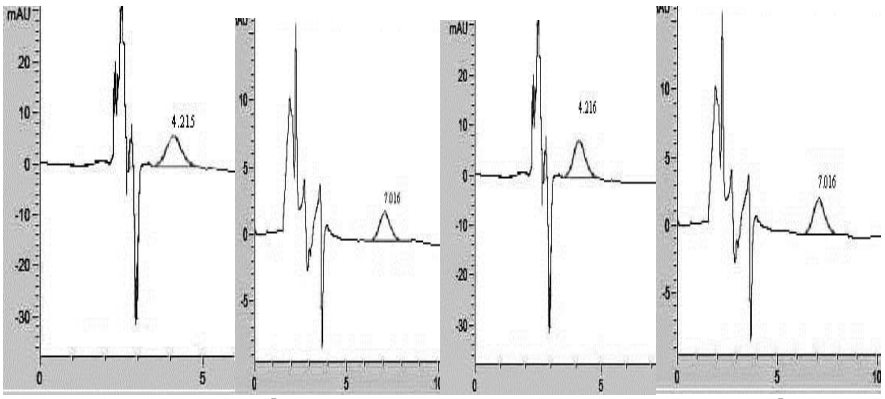
***: متوسط تركيز المركب لأربعة مكررات استخلاص لحم الدجاج للعينة الواحدة.**

****: متوسط تركيز عينتي لحم دجاج مستقلتين وفق أربعة مكررات استخلاص لكل منهما.**

*****: متوسط نسبة الاسترجاع المئوية للمركب من عينتي لحم دجاج مستقلتين وفق أربعة مكررات استخلاص لكل منهما.**

******: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.**

يُظهر الشكل (5) كروماتوغرامات مُركبي التايلوزين والسبيراميسين المستخلصين من عينات لحم الدجاج بمذيب Mcllvaine-EDTA عند pH:2.6, 4.5.



a:pH:2.6 b:pH:2.6 c:pH:4.5 d:pH:4.5

الشكل(5): (a, c) كروموتوغرامي مُركب التايلوزين، (b, d) كروموتوغرامي مُركب السبيراميسين المسترجعة عند0.10ppm pH:2.6, 4.5

تحديد الاستخلاص الأمثل Determination of Optimal Extraction

أُضيف إلى عينات لحم دجاج خالية من أي نوع من الصادات محلولان عياريان لكلٍّ من مُركبي التايلوزين والسبيراميسين العيارين بتركيزي 0.10, 1.0 ppm لكل منهما. زودت مرحلة استخلاص المركبين من عينات لحم الدجاج بمرحلة ميكانيكية؛ وذلك بعد إضافة 30mℓ من مُذيب الاستخلاص McIlvain-EDTA عند pH:2.6 بغية تحسين مردود استخلاص المركبين وفق إحدى المراحل الثلاث المُستقلة الآتية:

- **استخلاص بالمُبخر الدوار** (Extraction by Rotavapor): تُجرى عملية استخلاص المركبين في درجة حرارة 38ºC بغياب الضغط وبعد مجانسة العينة وإضافة 30mℓ من مُذيب الاستخلاص McIlvain-EDTA. تُعالج الخلاصة بالمُبخر الدوار مدة أربع ساعات، ثُمَّ تُثفل بعد ذلك في مُثفلة مدة ربع ساعة، تُرشَّح الطبقة السائلة المستخلصة (منزوعة البروتين)، لتُمرَّر بعد ذلك ضمن خراطيش الاستخلاص بالطور الصلب، بغية عزل الصاد عن باقي مكونات ناتج الاستخلاص، ومن ثمَّ تملصيه بـ 5mℓ ميثانول.
- **استخلاص بالرج المغناطيسي** (Extraction by Magnetic Shake): تُزَّج الخلاصة المتجانسة والمستخلصة بـ 30mℓ من مُذيب الاستخلاص McIlvain-EDTA رجاً ميكانيكياً

بوجود محرك مغناطيسي في درجة حرارة 38ºC مدة أربع ساعات. تُثفل الخلاصة في مُثفلة مدة ربع ساعة، لتخضع بعد ذلك للإجراءات التحليلية السابقة الذكر.

- **استخلاص بالأمواج فوق الصوتية** (Extraction by Ultrasonic Bath): تخضع الخلاصة المتجانسة والمستخلصة بـ 30mℓ من مُذيب الاستخلاص McIlvain-EDTA للأمواج فوق الصوتية؛ وذلك بوضعها في حمام مائي مزود بالأمواج فوق الصوتية في الدرجة 30^0C مدة نصف ساعة، ثُمَّ تُثفل في مُثفلة مدة ربع ساعة، لتخضع بعد ذلك للإجراءات التحليلية السابقة الذكر. يوضّح الجدول (5) النتائج المُترتبة عن هذه الدراسة.

الجدول(5): متوسط نسب استرجاع مُركبي التايلوزين والسبيراميسين 0.10, 1.0ppm من عينات لحم الدجاج وفق طرائق الاستخلاص المُتبعة

نوع الاستخلاص	التايلوزين 0.10ppm		التايلوزين 1.0ppm		السبيراميسين0.10ppm		السبيراميسين1.0ppm	
	متوسط تركيز العينة* (1)	متوسط تركيز العينة* (2)	متوسط تركيز العينة* (1)	متوسط تركيز العينة* (2)	متوسط تركيز العينة* (1)	متوسط تركيز العينة* (2)	متوسط تركيز العينة* (1)	متوسط تركيز العينة* (2)
	متوسط تركيز العينتين المُستقلتين ($\overline{Conc}$ ** ± RSD%)		متوسط تركيز العينتين المُستقلتين ($\overline{Conc}$ ** ± RSD%)		متوسط تركيز العينتين المُستقلتين ($\overline{Conc}$ ** ± RSD%)		متوسط تركيز العينتين المُستقلتين ($\overline{Conc}$ ** ± RSD%)	
	متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين ($\overline{Rec}$ %***)		متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين ($\overline{Rec}$ %***)		متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين ($\overline{Rec}$ %***)		متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين ($\overline{Rec}$ %***)	
	$\overline{X}$ ± حد الثقة**** $\overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$		$\overline{X}$ ± حد الثقة**** $\overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$		$\overline{X}$ ± حد الثقة**** $\overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$		$\overline{X}$ ± حد الثقة**** $\overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$	
مُنخفر دوار	0.090±0.615	0.091±0.276	0.916±0.260	0.922±0.085	0.093±1.451	0.094±0.357	0.930±0.146	0.947±0.062
	0.091±0.446		0.919±0.173		0.094±0.904		0.939±0.104	
	90.500		91.900		93.500		93.900	
	0.090±0.001	0.091±0.001	0.916±0.001	0.922±0.001	0.093±0.002	0.094±0.001	0.930±0.001	0.947±0.001
مُبرّد مغناطيسي	0.091±1.044	0.092±1.098	0.927±0.104	0.939±0.912	0.093±0.368	0.094±0.712	0.932±0.368	0.949±0.649
	0.092±1.071		0.933±0.508		0.094±0.540		0.941±0.509	
	91.500		93.300		93.500		94.100	
	0.091±0.001	0.092±0.001	0.927±0.348	0.939±0.002	0.093±0.001	0.094±0.002	0.932±0.005	0.949±0.001
تج بالأمواج فوق الصوتية	0.096±0.955	0.097±0.481	0.974±1.123	0.988±0.953	0.097±0.826	0.098±0.484	0.998±0.975	1.012±1.010
	0.097±0.718		0.981±1.038		0.098±0.655		1.005±0.993	
	96.500		98.100		97.500		100.500	
	0.096±0.001	0.097±0.001	0.0974±0.015	0.988±0.001	0.097±0.001	0.098±0.001	0.998±0.014	1.012±0.002

***: متوسط تركيز المركب لأربعة مكررات استخلاص لحم الدجاج للعينة الواحدة**

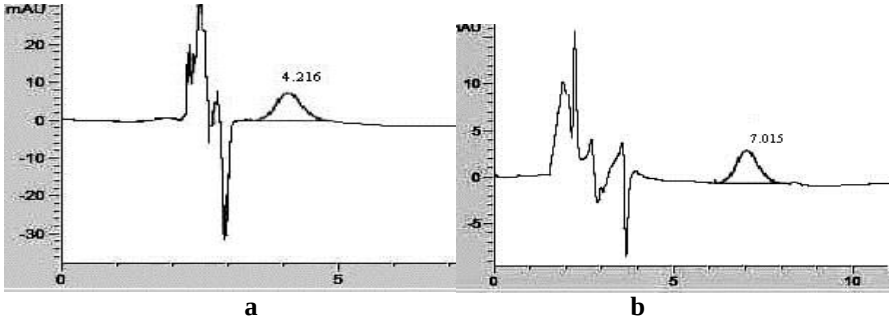
****: متوسط تركيز عينتي لحم دجاج مستقلتين وفق أربعة مكررات استخلاص لكل منهما**

*****: متوسط نسبة الاسترجاع المئوية للمركب من عينتي لحم دجاج مستقلتين وفق أربعة مكررات استخلاص لكل منهما**

******: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.**

تبيّن من النتائج المخبرية المُدرجة في الجدول (5) زيادة في نسبة استرجاع كل من مُركبي التايلوزين والسبيراميسين باستخدام مُذيب الاستخلاص McIlvain-EDTA بنسبة تراوح

بين 5-7% عند الاستخلاص في حمام مائي مزود بالأمواج فوق الصوتية بالمقارنة بطريقتي الاستخلاص بالمُبخر الدوار أو الرج المغناطيسي؛ إذ سُجلت نسبة استرجاع لمُركبي التايلوزين والسبيراميسين 0.10ppm عند استخدام الاستخلاص بالمبخر الدوار 90.50, 93.50% والرج المغناطيسي 91.50, 93.50% على التوالي، في حين سُجلت نتائج أفضل 96.50, 97.50% لمُركبي التايلوزين والسبيراميسين 0.10ppm على التوالي عند الاستخلاص باستخدام حمام مائي مزود بالأمواج فوق الصوتية وخلال مدة زمنية أقل من الخيارات السابقة. يُظهر الشكل (6) كروماتوغرامات مُركبي التايلوزين والسبيراميسين المستخلصين بمذيب McIlvain-EDTA من عينات لحم الدجاج عند pH:2.6 باستخدام حمام مائي مزود بالأمواج فوق الصوتية.



a **b**

الشكل(6): (a) كروموتوغرام مُركب التايلوزين، (b) كروموتوغرام مُركب السبيراميسين 0.10ppm باستخدام حمام الأمواج فوق الصوتية.

يُعدّ الحمام المائي المزود بالأمواج فوق الصوتية من الوسائل البسيطة وغير المكلفة والمتوافرة في مخابر المُراقبة الغذائية جميعها؛ إذ يؤمن استخدامه نسبة استرجاع جيدة للصادات، إلى جانب اختزال في الوقت اللازم لإنجاز عملية الاستخلاص، واستهلاك أقل للمذيبات والمواد الكيمائية المُستخدمة.

الاستخلاص بالطور الصلب: solid-phase extraction

يحتوي الطعام على نزر مواد كيمائية (طبيعية وصنعية) تؤثر في صحة الإنسان. تحتاج هذه النزر في تحديدها إلى طرائق تحليلية سريعة واقتصادية، وتمتع بحدود كشف من مرتبة pg, ng, µg, mg [18]. ترتبط نزر هذه العناصر أحياناً بمعقدات المنتجات الغذائية نفسها، مما يتطلب اتباع إجراءات استخلاص وتنقية لعزلها عن مزيج الغذاء المُعقَّد. تُستخدم خراطيش الاستخلاص بالطور الصلب SPE مع تكلفتها المرتفعة استخداماً واسعاً في عزل وتنقية الصادات من مستخلصات المنتجات الغذائية، كونها تتمتع بانتقائية عالية.

أضيفت إلى عينات لحم دجاج خالية من أي نوع من الصادات كلٍّ من مُركبي التايلوزين والسبيراميسين العيارين بتركيزي 1.0ppm ,0.10، واتبعت المراحل السابقة من الإجراءات التحليلية المثلى المذكورة أعلاه. أُستخدمت في هذه الدراسة مجموعة من خراطيش الاستخلاص بالطور الصلب SPE مثل خراطيش فلوريسيل، سيليكا، Oasis HLB, C18, LC-NH_2، تنوعت فيما بينها لجهة نوع المادة الصلبة وكميتها في العمود المستخدم بغية مقارنة نسبة استرجاع المركبين تبعاً لكل خرطوشة من هذه الخراطيش بعد عزله وتنقيته وفق المراحل الموصوفة لاحقاً.

نُشطت خراطيش الاستخلاص بالطور الصلب المُستخدمة في هذه الدراسة والموضّحة في الجدول (6) بتمرير 2mℓ ميثانول يتبعها 2mℓ ماء ثنائي التقطير منزوع الشوارد. مُررت خلاصة الـ McIlvain-EDTA ضمن كل خرطوشة من خراطيش الاستخلاص بالطور الصلب بغية امتزاز مُركبي التايلوزين والسبيراميسين من الخلاصة المارة ضمن خرطوشة الاستخلاص المُستخدمة، تغسل العينة بعد تحميلها على العمود بـ2ml ماء ثنائي التقطير منزوع الشوارد بغية إزالة تداخلات قالب العينة [19]. يُملص المركبين بعد ذلك من خرطوشة الاستخلاص بالميثانول، الذي اِعْتَمَدَ على قوته كمذيب عضوي.

يوضّح الجدول (6) أفضل متوسط نسبة استرجاع لمُركبي التايلوزين والسبيراميسين التابع لكل نوع مدروس من خراطيش الاستخلاص بالطور الصلب. تبيّن من نتائج العمل المخبري عدم قدرة كلٍّ من الفلوريسيل و LC-NH_2 على امتزاز المُركبين، في حين يكون امتزاز المركبين على السيليكا مقبولاً وفق نسبة استرجاع أقل من 73% بالمقارنة بمتوسط نسبة استرجاع % 95.80 ,93.50 لمُركب التايلوزين و 94.80% ,92.50 لمُركب السبيراميسين ,0.10 1.0ppm على التوالي باستخدام خرطوشة الاستخلاص بالطور الصلب C18(500mg, 5mℓ) بانحراف معياري نسبي مئوي أقل من 1.5% كحد أعظمي، ومتوسط نسبة استرجاع ,96.50 100.10% لمُركب التايلوزين و 100.40% ,97.50 لمُركب السبيراميسين 1.0ppm ,0.10 على التوالي باستخدام خرطوشة الاستخلاص بالطور الصلب (Oasis HLB(500mg, 5mℓ بانحراف معياري نسبي مئوي أقل من 1.2% كحد أعظمي. لُحظ أيضاً عدم تأثير كمية حشوة خراطيش الاستخلاص بالطور الصلب C18 و Oasis HLB في متوسط نسبة الاستخلاص إلا بنسبة لا تتجاوز 1% عند التركيز 1.0ppm فقط.

الجدول (6): متوسط نسبة استرجاع مُركبي التايلوزين والسبيراميسين المُملصين على أعمدة الاستخلاص بالطور الصلب.

عمود الاستخلاص بالطور الصلب		التايلوزين 0.10ppm			التايلوزين 1.0ppm			السبيراميسين 0.10ppm			السبيراميسين 1.0ppm		
		متوسط تركيز العينة (1)*	متوسط تركيز العينة (2)*	متوسط تركيز العينتين المستقلتين ($\overline{Conc}$ ± RSD%)**	متوسط تركيز العينة (1)*	متوسط تركيز العينة (2)*	متوسط تركيز العينتين المستقلتين ($\overline{Conc}$ ± RSD%)**	متوسط تركيز العينة (1)*	متوسط تركيز العينة (2)*	متوسط تركيز العينتين المستقلتين ($\overline{Conc}$ ± RSD%)**	متوسط تركيز العينة (1)*	متوسط تركيز العينة (2)*	متوسط تركيز العينتين المستقلتين ($\overline{Conc}$ ± RSD%)**
	متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين ($\overline{Rec}$ %)***	$\overline{X} \pm$ حد الثقة $= \overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$****			$\overline{X} \pm$ حد الثقة $= \overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$****			$\overline{X} \pm$ حد الثقة $= \overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$****			$\overline{X} \pm$ حد الثقة $= \overline{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$****		
Florisil (100mg, 1mℓ)	-	-											
LC-NH_2 (100mg, 1mℓ)													
Silica (500mg, 3mℓ)	0.069±0.558	0.068±0.632	0.069±0.484	0.068±0.001	0.714±0.212	0.708±0.155	0.719±0.423	0.071±1.037	0.070±1.106	0.072±0.968	0.721±0.244	0.717±0.077	0.724±0.410
	68.500			0.069±0.001	71.400		0.719±0.003	71.000		0.072±0.001	72.100		0.724±0.002
C18 (100mg, 1mℓ)	0.093±0.752	0.093±0.728	0.092±0.775	0.092±0.001	0.958±0.282	0.951±0.190	0.964±0.384	0.093±0.486	0.093±0.306	0.093±0.666	0.950±0.349	0.942±0.373	0.957±0.576
	92.500			0.094±0.001	95.800		0.964±0.001	93.000		0.094±0.001	95.000		0.957±0.010
	0.093±0.661	0.093±0.661	0.094±0.731	0.094±0.696	0.958±0.023	0.951±0.253	0.964±0.506	0.093±1.088	0.092±1.757	0.093±0.418	0.948±0.206	0.945±0.189	0.951±0.223
	93.500				95.800			92.500			94.800		
C18 (500mg, 5mℓ)	0.094±0.001	0.093±0.001	0.094±0.001		0.964±0.001	0.951±0.003		0.093±0.001	0.092±0.002		0.951±0.004	0.945±0.003	
	0.096±0.704	0.095±0.676	0.096±0.731		0.994±0.582	0.993±1.188		0.098±1.181	0.097±1.706		1.017±0.823	1.005±0.653	
Oasis HLB (100mg, 1mℓ) + Carboxylic acid	95.500				99.400			97.500			101.100		
	0.096±0.955	0.095±0.001	0.096±0.001		0.899±0.010	0.993±0.016		0.098±0.001	0.097±0.002		1.017±0.004	1.005±0.009	
Oasis HLB (500mg, 5mℓ) + Carboxylic acid	0.097±0.724	0.096±0.001	0.097±0.492		1.008±1.227	0.994±1.123		0.098±0.787	0.097±0.826		1.009±0.986	0.998±0.975	
	96.500				100.100			97.500			100.400		
	0.097±0.001	0.096±0.001	0.097±0.001		1.008±0.002	0.991±0.015		0.098±0.002	0.097±0.001		1.009±0.001	0.998±0.014	

***: متوسط تركيز المركب لأربعة مكررات استخلاص لحم الدجاج للعينة الواحدة.**
****: متوسط تركيز عينتي لحم دجاج مستقلتين وفق أربعة مكررات استخلاص لكل منهما.**
*****: متوسط نسبة الاسترجاع المئوية للمركب من عينتي لحم دجاج مستقلتين وفق أربعة مكررات استخلاص لكل منهما.**
******: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.**

اِعْتُمِدَتْ خرطوشة الاستخلاص Oasis HLB (500mg, 5mℓ) + Carboxylic acid في هذه الدراسة؛ إذ يوضّح الجدول (7) نتائج دراسة مخبرية اِعْتُمِدَتْ بغية تحديد حجم الميثانول الملائم لتمليص مُركبي التايلوزين والسبيراميسين المُمتزين على خرطوشة الاستخلاص

بالطور الصلب (Oasis HLB (500mg, 5mℓ امتزازاً تاماً. يبيّن الجدول (7) إمكانية تمليص مُركبي التايلوزين والسبيراميسين 0.10ppm في حجم 1mℓ ميثانول باستخدام خرطوشة الاستخلاص بالطور الصلب (Oasis HLB (500mg, 5mℓ وفق نسبة استرجاع 64.50%, 65.50% بانحراف معياري نسبي مئوي أقل من 1.5%، وفي حجم 3.5mℓ ميثانول باستخدام النوع نفسه من خرطوشة الاستخلاص وفق نسبة استرجاع 97.50% ,96.50% بانحراف معياري نسبي مئوي أقل2%. تجدر الإشارة إلى عدم تأثر متوسط نسبة الاستخلاص بزيادة حجم الميثانول المستخدم في التمليص عن 3.5mℓ.

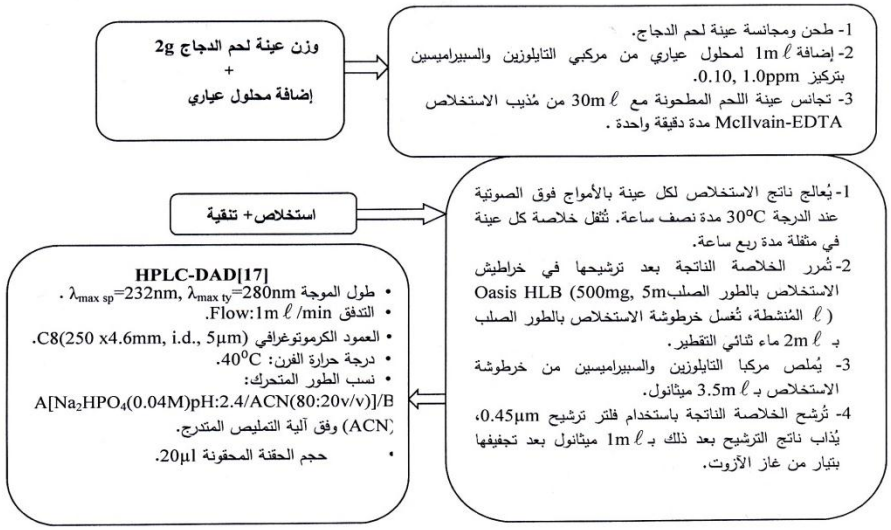
الجدول (7): تغير متوسط نسبة استرجاع مُركبي التايلوزين والسبيراميسين 0.10, 1.0ppm تبعاً لحجم الميثانول المُستخدم في تمليصه باستخدام خرطوشة الاستخلاص (Oasis HLB (500mg,5mℓ.

عمود الاستخلاص بالطور الصلب		التايلوزين 0.10ppm			التايلوزين 1.0ppm			السبيراميسين 0.10ppm			السبيراميسين 1.0ppm		
		متوسط تركيز العينة (1)*	متوسط تركيز العينة (2)*	متوسط تركيز العينتين المستقلتين (*± RSD% Conc)	متوسط تركيز العينة (1)*	متوسط تركيز العينة (2)*	متوسط تركيز العينتين المستقلتين (*± RSD% Conc)	متوسط تركيز العينة (1)*	متوسط تركيز العينة (2)*	متوسط تركيز العينتين المستقلتين (*± RSD% Conc)	متوسط تركيز العينة (1)*	متوسط تركيز العينة (2)*	متوسط تركيز العينتين المستقلتين (*± RSD% Conc)
		متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين (%**± حد الثقة***) $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$			متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين (%**± حد الثقة***) $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$			متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين (%**± حد الثقة***) $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$			متوسط نسبة الاسترجاع للعينتين (%**± حد الثقة***) $\bar{X} \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$		
Florisil (100mg, 1mℓ)		0.068±0.632	0.069±0.484	0.068±0.001	0.708±0.155	0.719±0.423	0.070±0.003	0.070±1.106	0.072±0.968	0.071±0.000	0.717±0.077	0.724±0.410	0.721±0.000
LC-NH_2 (100mg, 1mℓ)		-											
Silica (500mg, 3mℓ)		0.069±0.558		0.069±0.001	0.714±0.212		0.719±0.003	0.071±1.037		0.072±0.001	0.721±0.244		0.724±0.002
		68.500		0.069±0.001	71.400		0.719±0.003	71.000		0.072±0.001	72.100		0.724±0.002
C18 (100mg, 1mℓ)		0.068±0.001	0.069±0.001	0.708±0.002	0.708±0.002	0.719±0.003	0.071±0.001	0.072±0.001	0.072±0.001	0.717±0.001	0.724±0.002	0.724±0.002	0.724±0.002
		0.093±0.728	0.092±0.775	0.951±0.190	0.964±0.384	0.964±0.384	0.093±0.306	0.093±0.666	0.093±0.666	0.942±0.373	0.957±0.576	0.957±0.576	0.957±0.576
		0.093±0.752		0.958±0.282			0.093±0.486			0.950±0.349			
		92.500		95.800			93.000			95.000			
		0.093±0.001	0.092±0.001	0.951±0.003	0.964±0.001	0.964±0.001	0.093±0.0003	0.094±0.001	0.094±0.001	0.942±0.005	0.957±0.010	0.957±0.010	0.957±0.010
		0.093±0.661	0.094±0.731	0.951±0.253	0.964±0.506	0.964±0.506	0.092±1.757	0.093±0.418	0.093±0.418	0.945±0.189	0.951±0.223	0.951±0.223	0.951±0.223
		0.094±0.696		0.958±0.023			0.093±1.088			0.948±0.206			
C18 (500mg, 5mℓ)		93.500		95.800			92.500			94.800			
		0.093±0.001	0.094±0.001	0.951±0.003	0.964±0.001	0.964±0.001	0.092±0.002	0.093±0.001	0.093±0.001	0.945±0.003	0.951±0.004	0.951±0.004	0.951±0.004
		0.095±0.676	0.096±0.731	0.993±1.188	0.994±0.382	0.994±0.382	0.097±1.706	0.098±0.656	0.098±0.656	1.005±0.653	1.017±0.823	1.017±0.823	1.017±0.823
Oasis HLB (100mg, 1mℓ) + Carboxylic acid		0.096±0.704		0.994±0.885			0.098±1.181			1.011±0.738			
		95.500		99.400			97.500			101.100			
		0.095±0.001	0.096±0.001	0.993±0.016	0.899±0.010	0.899±0.010	0.097±0.002	0.098±0.001	0.098±0.001	1.005±0.009	1.017±0.004	1.017±0.004	1.017±0.004
Oasis HLB (500mg, 5mℓ) + Carboxylic acid		0.096±0.955	0.097±0.492	0.994±1.123	1.008±1.227	1.008±1.227	0.097±0.826	0.098±0.747	0.098±0.747	0.998±0.975	1.009±0.986	1.009±0.986	1.009±0.986
		0.097±0.724		1.001±1.175			0.098±0.787			1.004±0.981			
		96.500		100.100			97.500			100.400			
		0.096±0.001	0.097±0.001	0.991±0.015	1.008±0.002	1.008±0.002	0.097±0.001	0.098±0.002	0.098±0.002	0.998±0.014	1.009±0.001	1.009±0.001	1.009±0.001

***: متوسط تركيز المركب لأربعة مكررات استخلاص لحم الدجاج للعينة الواحدة.**
****: متوسط تركيز عينتي لحم دجاج مستقلتين وفق أربعة مكررات استخلاص لكل منهما.**
*****: متوسط نسبة الاسترجاع المئوية للمركب من عينتي لحم دجاج مستقلتين وفق أربعة مكررات استخلاص لكل منهما.**
******: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.**

تكرارية الطريقة وانتقائيتها: Reproducibility and Selectivity of the Method

أُجريت دراسة تكرارية وانتقائية الطريقة وفق الشروط التحليلية المثلى لاستخلاص مركبي التايلوزين والسبيراميسين من عينات لحم الدجاج التي توصلت إليها هذه الدراسة والمدرجة في الشكل (7)؛ وذلك بأخذ عشرين عينة (مُكرراً) من عينات لحم دجاج خالية من الصادات وزن كلٍّ منها 2.0g. يُضاف إلى كلٍّ منها 0.10ppm من محلول عياري لمركبي التايلوزين والسبيراميسين مع 30mℓ من مُذيب الاستخلاص McIlvain-EDTA عند (pH:2.6)؛ وذلك بالتزامن مع عمليات الطحن والخلط والمجانسة مدة دقيقة واحدة في آلة الطحن المُعتمدة. يُعالج ناتج الاستخلاص لكل عينة بالأمواج فوق الصوتية عند الدرجة 30^0C مدة نصف ساعة. تُثفل خلاصة كل عينة في مثفلة مدة ربع ساعة. تُمرَّر الخلاصة الناتجة بعد ترشيحها في خراطيش الاستخلاص بالطور الصلب (500mg, 5mℓ) Oasis HLB المُنشطة بوساطة 2mℓ ميثانول يتبعها 2mℓ ماءً مقطراً منزوع الأيونات، تُغسل خرطوشة الاستخلاص بالطور الصلب بـ 2mℓ ماءً مقطراً كما هو وارد سابقاً، ثمّ يُملص مُركبا التايلوزين والسبيراميسين من خرطوشة الاستخلاص بـ 3.5mℓ ميثانول. تُرشح الخلاصة الناتجة باستخدام فلتر ترشيح 0.45µm وتجفف بتيار من غاز الآزوت، ثمَّ يُذاب الناتج في 1mℓ ميثانول لتُصبح العينة بعد ذلك جاهزة للتحليل في جهاز HPLC-DAD. تُحفظ العينات في المجمدة في درجة حرارة -20^0C إلى حين فصلها وفق تقانة HPLC-DAD.



الشكل (7): مراحل تحضير العينة

يوضح الجدول (8) تكرارية استخلاص مُركبي التايلوزين والسبيراميسين وتنقيتهما وفصلهما بتركيز 0.10ppm وفق الشروط التحليلية المثلى التي تمَّ التوصل إليها وفق تقانة HPLC-DAD.

لُحظ من نتائج جدول (8) والشكل (8) أن متوسط النسبة المئوية لاسترجاع مركبي التايلوزين والسبيراميسين من عينات لحم الدجاج المدروسة باعتماد الشروط المثلى التي توصلت إليها هذه الدراسة 97.042%, 97.629% بانحراف معياري نسبي مئوي أقل من 3%.

بيّنت نتائج تكرارية تحديد مركبي التايلوزين والسبيراميسين في 20 عينة لحم الدجاج انتقائية الشروط التحليلية المثلى المُعتمدة في التحديد وفق تقانة HPLC-DAD، ويُلحظ ذلك من خلال متوسط نسبة الاسترجاع الجيدة.

الجدول(8): قيم تكرارية طريقة استخلاص مركبي التايلوزين والسبيراميسين 0.10ppm من 20 عينة لحم دجاج وتنقيتها وفصلها وتحديدها.

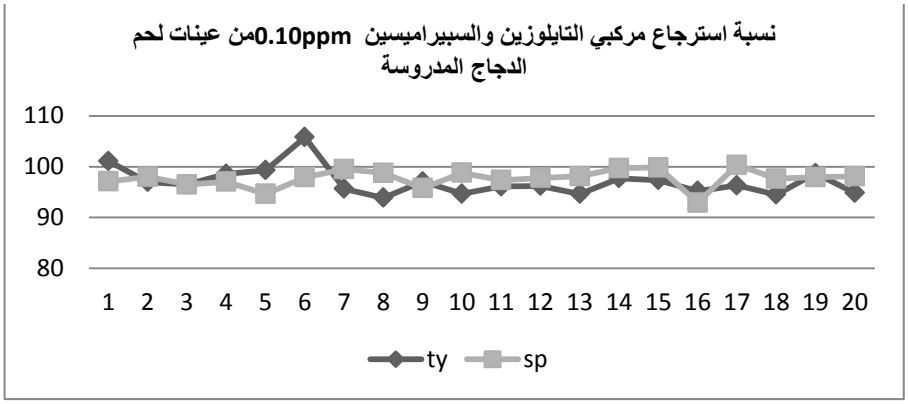
التايلوزين 0.10ppm																				
العينة	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
التركيز*	0.095	0.096	0.099	0.095	0.095	0.097	0.098	0.095	0.096	0.096	0.095	0.097	0.094	0.096	0.106	0.099	0.099	0.096	0.097	0.101
استرجاع%	94.82	98.69	94.50	96.31	95.18	97.33	97.73	94.61	96.20	96.11	94.65	97.05	93.87	95.63	105.79	99.29	98.57	96.50	96.95	101.09
$\overline{Conc} = 0.097^{**}$																				
$\overline{Rec} \pm RSD\% = 97.042^{***} \pm 2.787$																				
السبيراميسين 0.10ppm																				
التركيز*	0.098	0.098	0.098	0.10	0.093	0.10	0.10	0.098	0.098	0.097	0.098	0.096	0.099	0.10	0.098	0.095	0.097	0.096	0.098	0.097
استرجاع%	98.11	97.94	97.61	100.32	92.89	99.82	99.70	98.14	97.77	97.33	98.78	95.76	98.75	99.51	97.91	94.64	97.03	96.49	98.0	97.07
$\overline{Conc} = 0.098^{**}$																				
$\overline{Rec} \pm RSD\% = 97.629^{***} \pm 1.769$																				

***: متوسط تركيز المركب لأربعة مكررات من لحم الدجاج للعينة الواحدة.**

****: متوسط التركيز في عشرين عينة لحم دجاج مستقلة.**

*****: متوسط النسبة المئوية لاسترجاع المركب في عشرين عينة لحم دجاج مستقلة.**

يرتبط نجاح التحديد النوعي والكمي لنزر الصادات في مزيج معقد بنجاح شروط الاستخلاص المُعتمدة والزمن اللازم لإنجاز التحليل؛ إذ تؤثر زيادة المدة الزمنية اللازمة لإنجاز الإجراءات التحليلية سلباً في نسبة الاسترجاع، وتؤثر في الوقت نفسه سلباً في حساسية الطريقة التحليلية [19]، وبذلك تقتضي الدراسة ضرورة إنجاز كامل إجراءات تحضير العينة (طحن، مجانسة، تثفيل، استخلاص وتمليص المركبين المدروسين من خرطوشة الفصل المُعتمدة) والتحديد الكمي وفق تقانة HPLC- DAD في يوم واحد.



الشكل (8): مخطط يبين متوسط النسبة المئوية لاسترجاع مركبي التايلوزين والسبيراميسين 0.10ppm من عينات لحم الدجاج المدروسة.

استغرقت إجراءات تحضير ست عينات لحم دجاج وفق هذه الدراسة باعتماد الإجراءات التحليلية السابقة ساعتين فقط، يضاف إليهما ساعتان من الوقت لازمة لتحديد المركبين المدروسين في الخلاصات الناتجة وفق تقانة HPLC-DAD.

الاستنتاجات والتوصيات **Conclusions and Recommendations**

لُحظ عند دراسة تأثير pH مُذيب الاستخلاص McIlvain -EDTA في استرجاع مُركبي التايلوزين والسبيراميسين من عينات لحم الدجاج ارتفاع نسبة استرجاع المركبين المدروسين من عينات لحم الدجاج عند pH:2.2-2.6.

- ✓ سَجل متوسط نسبة الاسترجاع عند استخدام حمام مائي مزود بالأمواج فوق الصوتية نتائج جيدة؛ إذ راوحت نسبة استرجاع مُركبي التايلوزين والسبيراميسين من عينات لحم الدجاج 97.50% ,96.50 بانحراف معياري نسبي مئوي أقل من 1.0% للتركيز 0.1ppm و 100.50% ,98.10 بانحراف معياري نسبي مئوي أقل من 1.1% للتركيز 1.0ppm.
- ✓ لُحظ عدم تأثير كمية الحشوة في خراطيش الاستخلاص بالطور الصلب C18 و Oasis HLB في متوسط نسبة الاستخلاص.
- ✓ يحتاج مُركبا التايلوزين والسبيراميسين المُمتزين على خرطوشة الاستخلاص Oasis HLB (500mg, 5mℓ) حجماً مقداره 3.5mℓ ميثانول لتمليصهما.
- ✓ أبدت خراطيش الاستخلاص بالطور الصلب Oasis HLB استجابة أفضل لامتزاز مُركبي التايلوزين والسبيراميسين على جزيئاتها بالمُقارنةً بالخراطيش الأخرى.
- ✓ تُبيّن نتائج تكرارية تحديد مُركبي التايلوزين والسبيراميسين 0.10ppm في 20 عينة لحم الدجاج انتقائية الشروط التحليلية المُعتمدة في التحديد وفق تقانة HPLC-DAD، ويُلحظ

ذلك من خلال متوسط نسبة الاسترجاع 97.042% للتايلوزين و 97.629% للسبيراميسين بانحراف معياري نسبي مئوي أقل من 3%.

- ✓ تُعدّ أربع ساعات مدة زمنية قياسية لتحديد نزر مُركبي التايلوزين والسبيراميسين من ست عينات لحم الدجاج، مما يجعل من الإجراءات التحليلية وفق هذه الدراسة خطوة مهمة في رصد نزر هذين الصادين في المنتجات الغذائية ذات المنشأ الحيواني المُقدمة للمستهلكين في مخابر المراقبة (القسم الغذائي).
- ✓ تُعدُّ هذه الدراسة من الدراسات الأكاديمية والتطبيقية في مجال الكيمياء التحليلية كونها تهدف أكاديمياً إلى تحديد الشروط التحليلية المثلى في استخلاص النزر المتبقي من صادي التايلوزين والسبيراميسين وتنقيته وتحديده، وتهدف تطبيقياً إلى تحديده في الكائنات الحية الحيوانية ومنتجاتها الغذائية المختلفة كون هذين الصادين يُستخدمان كمُحفزي نمو، وفي مُعالجة بعض الأمراض عند الحيوانات المُستخدمة في التغذية البشرية.
- ✓ ضرورة القيام ببحوث مماثلة بغية التوصل إلى إجراءات تحليلية حساسة وسريعة توفر الجهد والزمن اللازمين في تحاليل مخابر المراقبة (القسم الغذائي) المُهتمة بتحديد النزر المُتبقي لصادات أخرى مُماثلة.

References

[1] BERRADA, H., BORRULL, F., FONT, G., MOLTÒ, J. C., MARCÈ, R. M., (2007). Validation of a confirmatory method for the determination of macrolides in liver and kidney animal tissues in accordance with the European Union regulation 2002/657/EC. Journal of Chromatography A, 1157, pp.281–288.

[2] GONZALEZ DE LA HUEBRA, M. J., VINCENT, U., HOLST, C. V., (2007). Sample preparation strategy for the simultaneous determination of macrolide antibiotics in animal feeding stuffs by liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 43, pp.1628–1637.

[3] CODONY, R., COMPANO, R., GRANADOS, M., GARCIA-REGUEIRO, J. A., PRAT, M. D., (2002). Residue analysis of macrolides in poultry muscle by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 959, pp.131–141.

[4] GONZLEZ DE LA HUEBRA, M. J., BORDIN, G., RODRIGUEZ, A. R. A., (2004). mult- iresidue method for the simultaneous determination of ten macrolide antibiotics in human urine based on gradient elution liquid chromatography coupled to coulometric detection (HPLC–ECD). Analytica Chimica Acta, pp.517, 53–63.

[5] GONZALEZ DE LA HUEBRA, M. J., VINCENT, U., (2005). Review Analysis of macrolide antibiotics by liquid chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 39, pp.376–398.

[6] GONZALEZ DE LA HUEBRA, M, J., BORDIN, U. V. G., RODRÀGUEZ, A. R., (2005). Determination of macrolide antibiotics in porcine and bovine urine by high-performance liquid chromatography coupled to coulometric detection. Anal. Bioanal. Chem., 382, pp.433–439.

[7] CIVITAREALE, C., FIORI, M., BALLERINI, A., BRAMBILLA, G., (2004). Identification and quantification method of spiramycin and tylosin in feeding stuffs with HPLC–UV/DAD at 1 ppm level. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 36, pp.317–325.

[8] POUCKE, C, V. KEYSER, K, D. BALTUSNIKIENE, A. MCEVOY, J, D, G. VANETEGHEM, C., (2003). Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric detection of banned antibacterial growth promoters in animal feed. Analytica Chimica Acta, 483, pp.99–109.

[9] MCGLINCHEY, T. A., RAFTER, P. A., REGAN, F., MCMAHON, G. P., (2008). A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. Analytica chimica acta, pp.624, 1–15.

[10] LEE, J. B., CHUNG, H. H., LEE, K. G., (2007). Development of an analytical protocol for detecting antibiotic residues in various foods. Food Chemistry, 105, pp.1726-1731.

[11] BERRADA, H., BORRULL, F., FONT, G., MARCÉ, R. M., (2008). Determination of macrolide antibiotics in meat and fish using pressurized liquid extraction and liquid chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1208, pp.83–89.

[12] Yu, H., Mu, H., Hu, Y. M., (2012). Determination of fluoroquinolones, sulfonamides, and tetracyclines multiresidues simultaneously in porcine tissue by MSPD and HPLC-DAD. Journal of Pharmaceutical Analysis, 2(1), pp.76–81.

[13] PRATS, C., FRANCESCH, R., ARBOIX, M., PEREZ, B., (2001). Determination of tylosin residues in different animal tissues by high performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B, 766, pp.57-65.

[14] KOESUKWIWAT, U., JAYANTA, S., LEEPIPATPIBOON, N., (2007). Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrim- ethamine in Bovine's milk, Journal of Chromatography A, 1149 , pp.102–111.

[15] CODONY, R., COMPANO, R., GRANADOS, M., GARCIA-REGUEIRO, J. A., PRAT, M. D., (2002). Residue analysis of macrolides in poultry muscle by liquid chromatography–electrspray mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 959, pp.131–141.

[16] TSAI, H. W., HUANG, C. T., HUANG, J. J., HSUE, H. Y., CHUANG, Y. H., (2009). Dispersive solid- phase micro-extraction method for sample extraction in the analysis of four tetracycline in water and milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. Journal of Chromatography A, 1216, pp.2263-2269.

[17] محمد، عصام؛ طباع، دارم؛ عليا، تميم؛ الرحية، لبينة؛ (2014). دراسة تحليلية حول مقارنة الشروط المثلى لفصل وتحديد السبيراميسين والتايلوزين باستخدام عمودي الفصل الكروماتوغرافيين C8 و C18 وفق تقانة HPLC- DAD، مجلة جامعة تشرين موافقة نشر رقم 2053/ ص م ج تاريخ 10/12/2014.

[18] BABIĆ, S., HORVAT, A. J. M., KAŠTELAN-MACAN, M., (2007). Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. Trends in Analytical Chemistry,Vol. 26, Issue 11, pp.1062-1075.

[19] YU, H., TAO, Y., CHEN, D., WANG , Y., YUAN, Z., (2011). Development of an HPLC-UV method for the simultaneous determination of tetracyclines in muscle and liver of porcine, chicken and bovine with accelerated solvent extraction. Food Chemistry, Vol. 124, Issue 3, pp.1131-1138.