

الكشف عن غش بعض منتجات الحليب المحلية باليوريا

د. ديمة الدياب*

فاطمة زيود**

(تاريخ الإيداع 27 / 8 / 2018. قُبل للنشر في 31 / 10 / 2018)

□ ملخص □

يعتبر الحليب غذاءً متوازناً فهو يحتوي على كل المغذيات الضرورية للإنسان. يوجد العديد من الطرائق والمواد التي يتم غش الحليب بها كغش الحليب بإضافة الماء، اليوريا، النشاء والجيلاتين وغيرها. يؤدي غش الحليب ومنتجاته إلى تقليل قيمتها الغذائية كما أن لبعض المواد المستخدمة في الغش تأثيرات ضارة على الجسم. تعتبر اليوريا مكوناً طبيعياً للحليب حيث تنتج عن استقلاب البروتين في الجسم لكن يمكن غش الحليب بها ويتم إضافتها إلى منتجات الحليب كبديل عن البروتين إثر تمديد الحليب بالماء كونها غنية بالآزوت، إلا أنها تؤدي إلى تأثيرات ضارة عند التعرض المزمن لها خاصة على الكلى. يهدف هذا البحث إلى تحديد اليوريا كمياً في بعض منتجات الحليب المتوافرة في السوق المحلية عن طريق تطبيق الطريقة الطيفية اللونية باستخدام كاشف (Para Di Methyl Amino) Erlich (Benzaldehyde). شملت الدراسة 66 عينة توزعت ما بين 17 عينة حليب سائل مجموعة من محلات البقالة المحلية، 10 عينات حليب مسوق من قبل بعض الشركات المحلية والمستوردة، 9 عينات لبن مجموعة من محلات البقالة وعينتين لبن مسوق من إنتاج شركة محلية، 16 عينة حليب مسحوق خاص بعمر فوق السنة و12 عينة حليب مسحوق للرضع. أظهرت الدراسة أن قيم اليوريا في جميع العينات المدروسة كانت ضمن الحدود المسموح بها مما يدعو للاستنتاج أن عملية غش الحليب ومنتجاته باليوريا مازالت طريقة غير شائعة في بلادنا.

الكلمات المفتاحية: الحليب، منتجات الحليب، غش، اليوريا، الطريقة الطيفية.

* مدرسة - قسم الكيمياء التحليلية والغذائية - كلية الصيدلة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية
** طالبة ماجستير - قسم الكيمياء التحليلية والغذائية - كلية الصيدلة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

Detection of adulteration with urea in some local milk products

Dr. Dima Al-Diab*
Fatema Zayoud**

(Received 27 / 8 / 2018. Accepted 31 / 10 / 2018)

□ ABSTRACT □

Milk is a balanced food contains all the nutrients necessary for human. Many methods and substances are used in milk adulteration like adding water, urea, starch, gelatin, etc. Milk adulteration reduces the nutritional value and some substances have harmful effects in human. Urea is a natural component of milk, and final product of protein in humans' body. Urea can be used in milk adulteration as an alternative to protein after the dilution of milk with water since urea is rich in nitrogen. Urea has adverse effects mainly on the kidneys at the chronic exposure. This study aimed to determine urea in some milk products available in the local market by applying the spectrophotometric method using Erlich reagent (Para Dimethyl Amino Benzaldehyde). This study included 66 samples: 17 liquid milk samples collected from local grocery stores, 10 liquid milk samples produced by some local and imported companies, 9 yogurt samples collected from local grocery stores, 2 yogurt samples produced by a local company, 16 powdered milk samples, and 12 infant's powdered samples. The results showed that urea values were within the permissible limits in all of the studied samples. That means milk adulteration with urea might not be common in Syria.

Key words: milk, milk products, adulteration, urea, Spectroscopic methods.

*Assistant Professor in Analytical and Food Chemistry Department, Faculty of Pharmacy- Tishreen University, Lattakia, Syria.

**Postgraduate Student, Analytical and Food Chemistry Department, Faculty of Pharmacy- Tishreen University, Lattakia, Syria.

مقدمة

الحليب هو السائل المفرز من الغدد الثديية لإنثى الثدييات وعادة ما يشير مصطلح حليب إلى حليب الأبقار تحديداً أما حليب باقي الأنواع فيشار إليه عند توزيعه تجارياً باسم الحيوان الذي ينتجه أي يقال مثلاً حليب الأغنام وحليب الماعز. استخدم الإنسان حليب الأبقار والماعز كغذاء منذ أقدم الأزمان فهو يحتوي تقريباً على كل العناصر الضرورية لاستمرار الحياة حيث يعتبر مصدراً للدسم، البروتينات، الحموض الأمينية، الفيتامينات والمعادن ويظهر الجدول (1) نسب المواد المغذية الموجودة في الحليب (Belitz et al., 2009). يحتوي الحليب أيضاً على الغلوبولينات المناعية، الهرمونات، عوامل النمو، الساييتوكينات، نكليوتيدات، ببتيدات، بولي أمينات، أنزيمات وغيرها (Haug et al., 2007). يستهلك الحليب ومشتقاته في سورية بشكل واسع في المدن والأرياف ولقد بلغ متوسط استهلاك الفرد السوري حوالي 111.43 kg سنوياً بحسب دراسة أجرتها منظمة الـ (FAO, 2007) عام 2007.

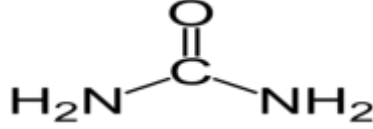
الجدول (1): نسب المواد المغذية في الحليب (Belitz et al., 2009).

النسبة المئوية	المكون
87	الماء
3.2	البروتين
2.6	كازئين
0.6	بروتينات مصل
3.9	الدسم
4.6	لاكتوز
0.7	الرماد

يختلف تركيب الحليب تبعاً لعدة عوامل مثل: مرحلة الإرضاع، العمر، التوالد، التغذية، توازن الطاقة، إضافة إلى الحالة الصحية للضرع. تكون تغيرات تركيب الحليب خلال فترة الإرضاع متوافقة مع الحاجات المتغيرة لنمو الرضيع، كما تتوافق مع آليات الدفاع النوعية وغير النوعية. مثلاً تشارك بروتينات محددة من بروتينات الحليب في تطوير الاستجابة المناعية المبكرة، بينما تأخذ أخرى دوراً في الدفاعات غير المناعية (مثل اللاكتوفيرين)، كما يحتوي الحليب على أنواع مختلفة من الحموض الدسمة سواء حموض دسمة مشبعة مثل حمض الزبدة وغير مشبعة مثل حمض الزيت وكل هذه المكونات تجعل الحليب غذاءً غنياً بالعناصر الغذائية (Haug et al., 2007). نظراً لغلغلاء سعر الحليب ومشتقاته فمن الممكن غشه بعدة أساليب حيث يمكن تمديده بالماء أو مصل الحليب وهذا يؤدي إلى تغير تراكيز مكوناته وتغير كثافته، كما يمكن غش الحليب عبر إضافة بعض المواد إليه مثل اليوريا، السكر، النشاء، وغيرها.

غش الحليب بإضافة اليوريا: اليوريا مركب عضوي يحتوي على مجموعة كربونيل مرتبطة بجذري أمين، تم استخدامه سابقاً في علاج الأمراض الجلدية منذ أكثر من قرن (Pan et al., 2013). تعتبر اليوريا ناتج لاستقلاب البروتين في الجسم ويتم إطراح معظم اليوريا الموجودة في الدم عن طريق البول (Spek et al., 2012). تعتمد تراكيز اليوريا الموجودة في الدم على الوارد الغذائي من الأزوت، قدرة الجسم على استقلاب البروتين، ومن ثم القدرة على الإطراح عن

طريق الكلية حيث تشكل غالبية الآزوت غير البروتيني المطروح من الجسم (من 80-90%). نظراً لاعتماد الجسم على الكلية في إطراح اليوربا فيمكن استخدامها لتقييم وظيفة الكلى حيث تشير زيادتها في الدم إلى زيادة الوارد الغذائي من البروتين أو إلى نقص الإطراح الكلوي (Salazar, 2014).



الشكل 1: الصيغة الكيميائية لليوربا

أما في حليب البقر فيتأثر تركيز اليوربا بمجموعة من العوامل مثل الوارد الغذائي من البروتين، الموسم، الشهر التي يجمع فيها الحليب، ومرحلة الرضاعة، الوارد من الماء، وزن جسم الأبقار، والإطراح الكلوي لليوربا (Godden et.al., 2001; Spek et.al., 2012). تختلف الدراسات حول القيم الطبيعية لمستويات اليوربا في حليب البقر حيث قدرت بعض الدراسات أن متوسط مستويات اليوربا في حليب البقر 40 mg/100ml (Paradkar et.al., 2000)، بينما ذكر الباحث Jonker وزملاؤه أن القيم الطبيعية لليوربا تتراوح ما بين 10 – 16 mg/ 100 ml (Jonker et.al., 1998). تذكر دراسات أخرى بأن القيم الطبيعية لليوربا في الحليب قد تصل حتى 70 mg/100ml (Manual Of Hilding– Ohlsson, 2010). كما ذكر الباحث (Methods Of Analysis Of Foods, 2015; Kumar et.al., 2000) عام 2010 بأن القيم الطبيعية لليوربا تتراوح بين 18– 40 mg/100ml بينما القيمة الحدية المسموحة من اليوربا تكون 70 mg/100ml والقيم الأعلى من ذلك تسبب مشاكل صحية حادة عند الانسان مثل عسر هضم، حموضة، قرحات وغيرها (Hilding–Ohlsson et.al., 2012). فيما يتعلق بعينات الحليب المغشوشة فيمكن أن يصل تركيز اليوربا فيها إلى عشرين ضعفاً من القيم السابقة (Kumar et.al., 2000). لا يوجد في المواصفة القياسية السورية أية إشارة إلى القيم الطبيعية ولا للحد الأعلى المسموح تواجد له لذلك وبناءً على القيم المختلفة لليوربا والمذكورة في الدراسات المرجعية فقد اعتمدنا في هذا البحث أن الحد الأعلى المسموح لليوربا في الحليب يجب ألا يتجاوز 70 mg/100 ml وأن زيادته عن هذا الحد تشير إلى غش الحليب بإضافة اليوربا.

يتم غش الحليب باليوربا لعدة أسباب منها زيادة عمر الرف للحليب الطبيعي، وزيادة كثافته من خلال زيادة المواد الصلبة غير الدسمة بعد تمديد الحليب بالماء (SNF) solid-not-fat. بالإضافة لما سبق وبسبب محتوى اليوربا العالي من الآزوت الذي يصل إلى 46%، تضاف اليوربا لتحسين مستوى الآزوت في الحليب وإظهار مستويات بروتين عالية غير حقيقية عند القياس بطريقة كيلدال كون طريقة كيلدال غير قادرة على التمييز ما بين الآزوت من مصادر بروتينية أو غير بروتينية ((Yu et.al., 2015; Singuluri et.al., 2014; Hilding–Ohlsson et.al., 2012)). يوجد ما يسمى Synthetic Milk الذي يحضر باستحلاب الزيوت النباتية (كبديل عن دسم الحليب) مع الماء بوجود المنظفات كعامل استحلابي ويضاف له اليوربا كبديل عن البروتين والسكر كبدائل عن اللاكتوز. إن Synthetic Milk قليل القيمة الغذائية وذلك لخلوه من المغذيات الأساسية، كما أن بعض مكوناته لها تأثيرات سمية بشكل خاص على الحوامل، الأجنة، وذوي الأمراض القلبية والكلى. يباع Synthetic milk إما كبديل عن الحليب الطبيعي أو يمكن أن يمزج مع الحليب الطبيعي لزيادة الربح. عادة ما يتم الكشف عن Synthetic milk من خلال التحري عن سوياات اليوربا في الحليب الطبيعي (Kumar et al., 2000; Bhatt et al., 2008; Kandpal et al., 2012). لذلك، وبناءً على ما سبق فقد كان الهدف من هذه الدراسة هو التحديد الكمي لسوياات اليوربا في الحليب.

في هذه الدراسة تم تحديد سويات اليوريا في بعض من منتجات الحليب المتوافرة في السوق المحلية بواسطة الطريقة الطيفية التي تعتمد على إضافة كاشف Erlich (Para Di Methyl Amino BenzeAldehyde) الذي يعطي مع اليوريا معقد ملون تقاس امتصاصيته بجهاز السبيكتروفوتومتر عند طول موجة 420 nm. تم إنجاز هذا البحث في كلية الصيدلة بجامعة تشرين في الفترة الممتدة ما بين شهر كانون ثاني عام 2017 وشهر أيار 2018.

أهمية البحث وأهدافه

أهمية البحث

يقل غش الحليب باليوريا من قيمته الغذائية وتؤدي هذه الإضافة إلى مستويات آزوت عالية توجي بمستويات بروتين طبيعية كون تحديد المحتوى العام في البروتين يعتمد على طريقة كيلدال التي لا تستطيع أن تميز بين الأزوت البروتيني وغير البروتيني. بالإضافة لذلك تمتلك اليوريا تأثيرات سمية وبشكل خاص على الكلى حيث تسبب حصى كلوية وقصور كلوي (Anita et.al., 2011) وقد اعتبرت مؤخراً مادة مسرطنة (Abdallah et.al., 2008)، لذلك يكون من المهم تحديد وجود غش لمنتجات الحليب المتوافرة محلياً باليوريا.

أهداف البحث

يهدف البحث إلى مراقبة جودة بعض منتجات الحليب المحلية من خلال التحديد الكمي لسويات اليوريا فيها.

طرائق البحث ومواده

• المواد والتجهيزات المستخدمة

استخدمت في الدراسة مجموعة من التجهيزات المخبرية المتوافرة في مخابر كلية الصيدلة والمذكورة في الجدول (2) كما استخدمت مجموعة من المواد والمحلات المذكورة في الجدول (3):

الجدول (2): التجهيزات المستخدمة في الدراسة

الطراز	الجهاز
RADWAG, AS 220/C/2	ميزان ذو حساسية 0.0001 g
Jasco v-530 UV	مقياس الطيف الضوئي spectrophotometer
Labofuge 200 Heraeus, REMI Laboratory centrifuge R4C	مقلاة Laboratory centrifuge
Labkit (Chemelex, S.A., Spain)	ميكروبيبيت (100 -1000 µl) micropipette
K & H industries	حمام مائي water bath ultrasound
Dragon LAB MX-F	Vortex محرك ميكانيكي

الجدول (3): المواد والمحلات المستخدمة في الدراسة

الشركة	المادة
Riedel-De Haen AG, Germany	حمض الخل ثلاثي الكلور (TCA) Trichloroacetic acid
Merck, Germany	فوسفات ثنائية الصوديوم Di-Sodium hydrogn Phosphate -12- Hydrate
Riedel-De Haen AG, Germany	فوسفات أحادية الصوديوم Sodium Dihydrogn Phosphate -2- Hydrate

Riedel-De Haen AG, Germany	حمض كلور ماء (HCl) Hydrochloric Acid
Sari, Syria	كحول إيثيلي 95% Ethanol
---	ماء مقطر حديثاً
Acros-Organics, Belgium	كاشف إيرلش Erlich Reagent (4-Dimethylamino-benzealdehyde,98%)
Merck, Germany	يوريا عيارية Standard Urea

• تحضير المحاليل والكواشف

- محلول كاشف **1.6% Erlich (Para Di Methyl Amino BenzeAldehyde)**: ويحضر بجل 1.6 g من كاشف باراديميتيل أمينوبنزالدهيد في 100 ml إيتانول ومن ثم إضافة 10 ml من حمض كلور الماء المركز والمزج.
- محلول وقاء فوسفاتي **0.1 M, pH=7**: ويحضر بوزن 0.7427 g من فوسفات أحادية الصوديوم و 0.5409 g من الفوسفات الثنائية في بالون معايرة سعة 250 ml وإكمال الحجم بالماء المقطر حتى خط العيار. حيث تم حساب الكميات اللازمة لتحضير الوقاء بحسب معادلة هاندرسن هازل باخ والتأكد من الـ pH بواسطة ورق الـ pH.
- محلول إيتانول **70%**: ويحضر بتمديد الإيتانول 95% بالكمية المناسبة من الماء المقطر.
- محلول **0.5 M NaCl** في الماء المقطر: ويحضر بوزن 2.9 g من NaCl في بالون معايرة سعة 100 ml وإكمال الحجم بالماء المقطر حتى خط العيار.
- محلول **0.5 M NaCl** في إيتانول **70%**: ويحضر بوزن 2.9 g من NaCl في بالون معايرة سعة 100 ml وإكمال الحجم بالإيتانول 70% حتى خط العيار.
- محلول ثلاثي كلور حمض الخل **24% TCA (Tri Chloro Acetic Acid)**: ويحضر بوزن 24 g من TCA في بالون معايرة سعة 100 ml وإكمال الحجم بالماء المقطر حتى خط العيار.
- سلسلة اليوريا العيارية: تم تحضير محاليل يوريا بتركيز (10-20-30-40-50 mg/100ml) بدءاً من محلول أم 100 mg/100ml.

• طرائق البحث

1- الاعتيان

شملت الدراسة عدد من منتجات الحليب المتوافرة في السوق المحلية توزعت ما بين: حليب بقر سائل من محلات البقالة، حليب بقر سائل مسوق من قبل شركات محلية ومستوردة، حليب بقر مسحوق، لبن، لبن، لبن تعبئة شركة محلية. تم جمع 17 عينة حليب بقر سائل و 9 عينات لبن من مختلف أحياء محافظة اللاذقية، كما درس منتج لبن مسوق من قبل شركة حيث درست طبختين منه. كما درست 4 شركات حليب سائل مسوق (طبختين أو ثلاثة من كل شركة)، و 8 شركات حليب مسحوق خاص بعمر فوق السنة (طبختين من كل شركة)، و 4 شركات حليب رضع عمر أول (طبختين من كل شركة)، وشركتي حليب رضع عمر ثاني (طبختين من كل شركة). تم حفظ العينات السائلة بدرجة حرارة 20- مئوية ريثما تم تحديد سويات اليوريا فيها وذلك بالاعتماد على ما ذكره الباحث Dhali عام 2001 والباحث Roy وزملاؤه عام 2011 بأن تراكيز اليوريا لا تتأثر بالتجميد العميق (Roy et.al., 2011; Dhali, 2001).

2- ترسيب البروتين بمحلول 24% TCA

استخدمت الطريقة المرجعية لترسيب البروتين من الحليب وذلك بإضافة 5 ml محلول من 24% TCA إلى 5 ml حليب والتثقيب لمدة 3 دقائق بسرعة 3500 دورة في الدقيقة (A.O.A.C, 17th edn 2002; Manual Of Methods Of Analysis Of Foods, 2015). جرى ترسيب البروتين في عينات اللبن والحليب السائل بشكل مباشر أما عينات الحليب المسحوق فقد تم حل الحليب بالماء المقطر تبعاً للكمية المذكورة بها على عتبة كل صنف ومن ثم أجريت عملية الترسيب بمحلول 24% TCA.

3- ترسيب البروتين بطرائق أخرى غير الترسيب بمحلول 24% TCA

تمت تجربة طرائق أخرى لترسيب البروتين لمعرفة مدى إمكانية استبدالها بالطريقة المرجعية وذلك للتخفيف من التكلفة ولقد أجريت التجارب التالية:

1. الترسيب بواسطة إيتانول 70% حيث تم أخذ 5 ml من الحليب مع 5 ml من محلول الترسيب ومن ثم التثقيب.
2. الترسيب بواسطة محلول ملحي من 0.5 M NaCl محضر بواسطة الماء المقطر حيث تم أخذ 5 ml من الحليب مع 5 ml من محلول الترسيب ومن ثم التثقيب.
3. الترسيب بواسطة محلول ملحي من 0.5 M NaCl محضر بواسطة إيتانول 70% حيث تم أخذ 5 ml من الحليب مع 5 ml من محلول الترسيب ومن ثم التثقيب.

4- تحضير سلسلة عيارية من اليوريا

تم تحضير سلسلة عيارية من اليوريا تراكيزها (10- 20- 30- 40- 50 mg/100ml) بدءاً من محلول أم 100 mg/100ml، حيث تم تحضير كل تركيز 3 مرات وإجراء التفاعل مع كاشف Erlich. تم أخذ المتوسط الحسابي للمكررات الثلاثة وتمثيل السلسلة العيارية بخط بياني والحصول على معادلته ودراسة خطيتها. تم حساب كمية اليوريا في العينات المدروسة وكذلك أثناء دراسة مصدوقية الطريقة التحليلية بالرجوع للسلسلة المذكورة، وكان التعبير بعدد ميلليغرامات اليوريا في 100 ml منتج حليب.

5- دراسة مصدوقية الطريقة التحليلية

- دراسة تكرارية الطريقة التحليلية ضمن اليوم الواحد: قسمت عينة حليب تم الحصول عليها بعد الحلب مباشرة إلى 5 أقسام متساوية، ثم تم تحديد تركيز اليوريا في كل قسم باستخدام الطريقة الطيفية ومن ثم حساب المتوسط الحسابي \bar{x} والانحراف المعياري (SD) والانحراف المعياري النسبي Relative Standard Deviation (RSD) أو معامل التباين Coefficient Of Variation (CV) للتركيز.
- دراسة تكرارية الطريقة التحليلية خلال عدة أيام: قسمت عينة حليب تم الحصول عليها بعد الحلب مباشرة إلى 6 أقسام متساوية، ثم تم تحديد تركيز اليوريا خلال ستة أيام متتالية باستخدام الطريقة الطيفية، بعد ذلك حسب المتوسط الحسابي \bar{x} والانحراف المعياري (SD) والانحراف المعياري النسبي (RSD) أو معامل التباين (CV) للتركيز المقاسة.
- تحديد حد الكشف الكيفي (DL) Detection Limit: حدد حد الكشف الكيفي للطريقة التحليلية بالاعتماد على القانون التالي:

$$DL = \frac{3.3\sigma}{S}$$

حيث:

σ = الانحراف المعياري لاستجابة المحلول الناصع Blank.

S = ميل الخط البياني المستقيم لسلسلة اليوريا العيارية (Guideline, 2005).

- تحديد حد الكشف الكمي (Quantification Limit (QL): حدد حد الكشف الكمي للطريقة التحليلية بالاعتماد على القانون التالي:

$$QL = \frac{10\sigma}{S}$$

حيث:

σ = الانحراف المعياري لاستجابة المحلول الناصع Blank.

S = ميل الخط البياني المستقيم لسلسلة اليوريا العيارية (Guideline, 2005).

- دراسة النسبة المئوية للاسترداد للطريقة التحليلية: تم تحديد النسبة المئوية للاسترداد وذلك بتحديد سويات اليوريا في عينة حليب سائل، بعد ذلك أخذ 3 أقسام من هذه العينة حجم كل منها 100 ml، ثم أضيف لهذه الأقسام الثلاثة 50 mg أو 100 mg ، أو 150 mg ، يوريا عيارية. أخيراً تم اتباع الطريقة الطيفية باستخدام كاشف Erlich لتحديد اليوريا. حسبت النسبة المئوية للاسترداد في (الأقسام الثلاثة بعد الإضافة) بتطبيق القانون التالي:

$$recovery = \frac{\bar{x}}{xr} * 100\%$$

حيث:

\bar{x} : المتوسط الحسابي للقيمة المقاسة من اليوريا في العينة التي أضيف لها 50 أو 100 أو 150 mg يوريا عيارية
 xr : القيمة الحقيقية والتي حسبت بجمع سوية اليوريا في العينة الأصلية (دون إضافة) مع 50 mg ، أو 100 mg ، أو 150 mg على الترتيب.

كررت التجربة ثلاث مرات. بعد تحديد سويات اليوريا في العينة الأصل والأقسام التي أضيفت إليها كميات من اليوريا العيارية وتطبيق قانون النسبة المئوية للاسترداد، تمت مقارنة نتائج استرداد الأقسام الثلاثة مع القيم المقبولة للاسترداد التي تتراوح ما بين 90-110%.

6- تحديد سويات اليوريا بالطريقة الطيفية باستخدام كاشف (Para Di Methyl Amino Erlich) (BenzeAldehyde):

بعد ترسيب البروتين وفقاً للطريقة المرجعية باستخدام محلول 24% TCA (الفقرة رقم 2) تم أخذ 2 ml من الطبقة المائية الطافية ومعالجتها بواسطة 2 ml من كاشف (Para Di Methyl Amino BenzeAldehyde) Erlich، والانتظار لمدة 10 دقائق حتى تمام التفاعل وظهور لون أصفر واضح، ثم قيس الامتصاصية عند طول موجة 420 nm. تم تحضير محلول ناصع Blank بمزج 2 ml كاشف إيرلش مع 1 ml وقاء فوسفاتي ذو pH=7 والانتظار مدة 10 دقائق حتى تمام التفاعل ثم طرح امتصاصيته من امتصاصية العينات (A.O.A.C, 2002; Manual Of Methods Of Analysis Of Foods, 2015). تم تطبيق التجربة بثلاث مكررات لكل عينة وحساب التراكيز بالرجوع إلى المعادلة الخطية لسلسلة اليوريا العيارية ومن ثم التعبير عن النتائج بالمتوسط الحسابي للمكررات الثلاثة.

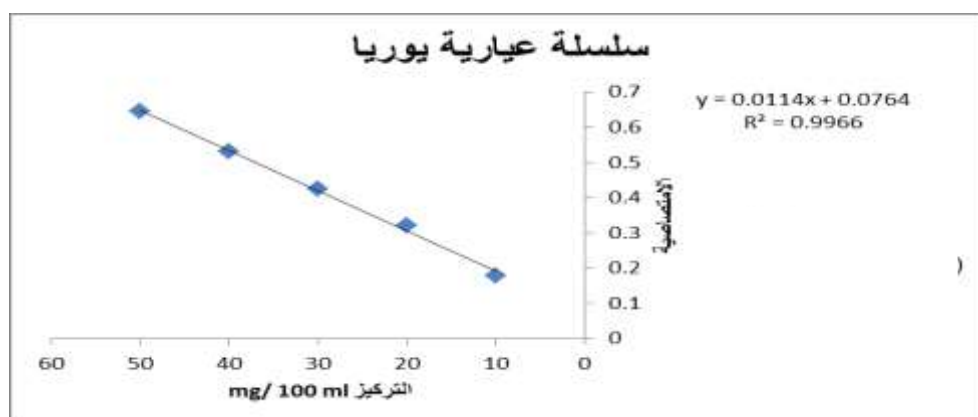
النتائج والمناقشة

1- ترسيب البروتين

لوحظ حدوث ترسب واضح للبروتين عند الترسيب بمحلول 24% TCA المقترح في الطريقة المرجعية، بينما لوحظ حدوث ترسب خفيف للبروتين عند استخدام كل من محلول ملحي من 0.5 M NaCl محضر بواسطة إيتانول 70%، ومحلول ملحي من 0.5 M NaCl محضر في الماء المقطر، أما عند استخدام إيتانول 70% فقد لوحظ حدوث ترسب للبروتين لكن بقيت جزيئات البروتين معلقة وموزعة ضمن السائل الطافي. في النهاية تم اعتماد الطريقة المرجعية لترسيب البروتين كونها أقصر زمن، وأكثر فعالية، رغم أنها أكثر كلفة.

2- دراسة مصدوقية الطريقة التحليلية

تم حساب تركيز اليوريا أثناء دراسة مصدوقية الطريقة التحليلية وفي منتجات الحليب استناداً إلى المعادلة الخطية للسلسلة العيارية لليوريا بتركيز تتراوح ما بين (10-50 mg/100ml) موضحة في الشكل 2. حيث كانت المعادلة الخطية ($y = 0.0114x + 0.0764$) وكانت قيمة معامل التحديد R^2 تساوي 0.9966.



الشكل 2: السلسلة العيارية لليوريا المستخدمة في تحديد تركيز اليوريا في عينات منتجات الحليب.

عند دراسة تكرارية الطريقة التحليلية ضمن اليوم الواحد كان متوسط تراكيز اليوريا في 5 أقسام من العينة 12.93 ± 1.06 mg/100ml ومعامل التباين $CV = 8.18\%$ وبما أن معامل التباين أقل من 10% إذاً توجد تكرارية للطريقة ضمن اليوم الواحد. أما عند دراسة تكرارية الطريقة التحليلية خلال عدة أيام كان متوسط تراكيز اليوريا في 6 أقسام 13.48 ± 0.51 mg/100 ml، أما معامل التباين فكان $CV = 3.75\%$ أي أقل من 10% وهذا يعني وجود تكرارية للطريقة خلال عدة أيام.

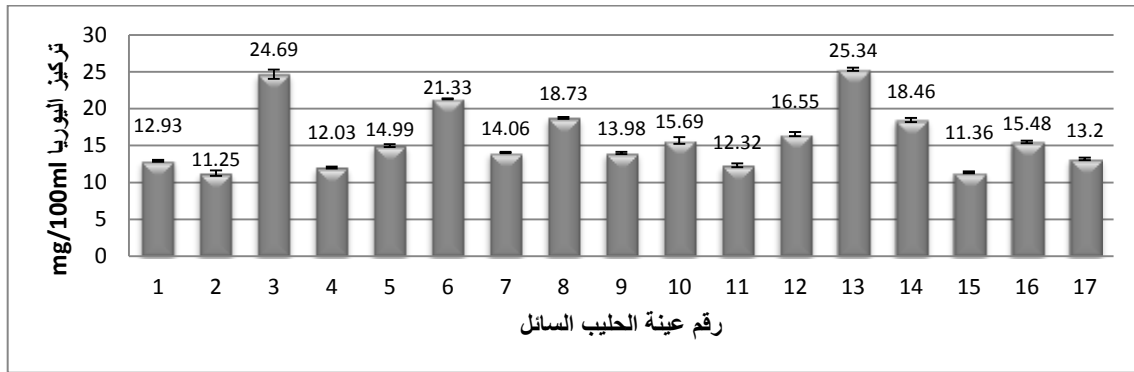
عند دراسة كل من حدي الكشف الكيفي DL والكمي QL للطريقة التحليلية كانت النتائج:

كل إضافة فكانت: استرداد بقيمة 97.76% بعد إضافة 50 mg يوريا عيارية إلى 100 ml حليب، استرداد بقيمة 96.66% بعد إضافة 100 mg يوريا عيارية إلى 100 ml حليب، واسترداد بقيمة 92.98% بعد إضافة 150 mg يوريا عيارية إلى 100 ml حليب. هذا ويتراوح المجال المقبول للاسترداد ما بين 90-110% أي أن قيم الاسترداد المحسوبة بعد كل إضافة كانت تقع ضمن المجال المقبول لذلك يمكن القول بأن استرداد الطريقة التحليلية جيد، كما لوحظ بأن استرداد الطريقة يتناقص بتزايد تركيز اليوريا في عينات الحليب. إن المعايير التي درست لمصدوقية الطريقة

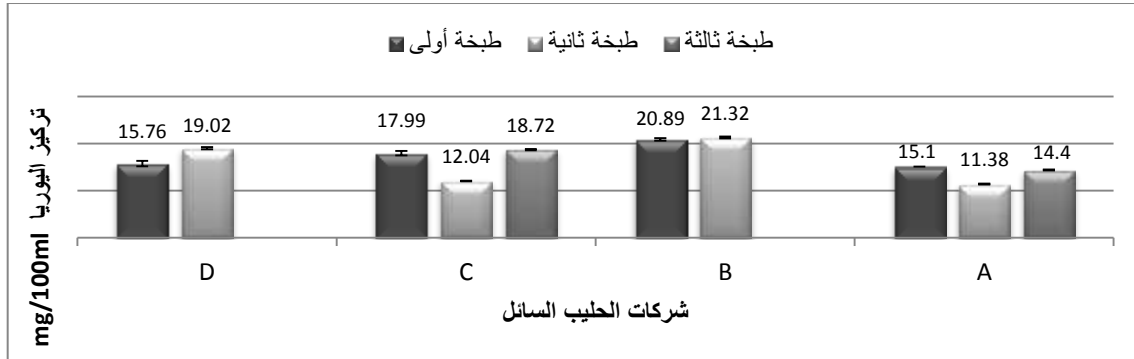
التحليلية وهي التكرارية، حدي الكشف الكيفي والكمي، بالإضافة إلى النسبة المئوية للاسترداد تشير إلى مصدوقية جيدة للطريقة التحليلية.

3- تحديد اليوربا في منتجات الحليب

تم تحديد اليوربا في منتجات الحليب استناداً إلى السلسلة العيارية المحضرة باستخدام اليوربا العيارية بتركيز تتراوح ما بين (10 – 50 mg / 100 ml). يبين المخطط 1 تراكيز اليوربا في عينات الحليب السائل المجموعة من محلات البقالة في مدينة اللاذقية، بينما يبين المخطط 2 تراكيز اليوربا في عينات الحليب السائل المسوقة من قبل شركات محلية ومستوردة. تراوحت تراكيز اليوربا في عينات الحليب المجموعة من محلات البقالة ما بين 11.25 mg/100ml إلى 25.34 mg/100ml. أما تراكيز اليوربا في عينات الحليب المسوقة من قبل بعض الشركات المحلية والمستوردة فقد تراوحت ما بين 11.38 mg/100ml إلى 20.89 mg/100ml وكانت في الحالتين ضمن الحدود الطبيعية.



المخطط 1: تراكيز اليوربا في عينات الحليب السائل المجموعة من محلات بقالة محلية



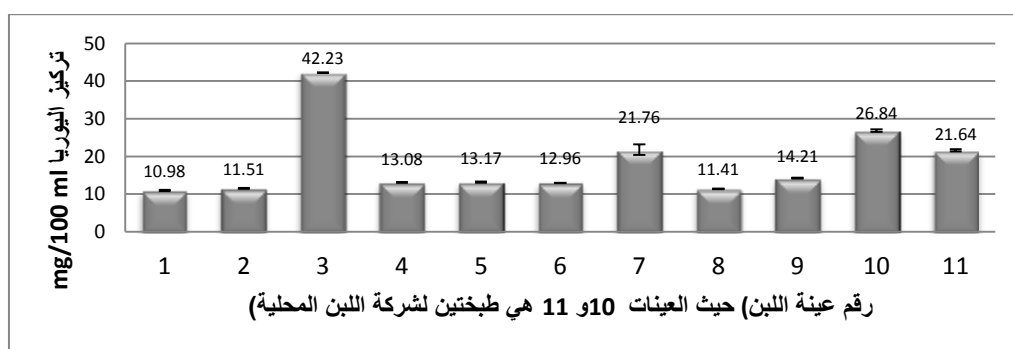
المخطط 2: تراكيز اليوربا في عينات الحليب السائل المعبأة من قبل شركات محلية ومستوردة

يعود اختلاف تراكيز اليوربا بين محل بقالة وآخر وبين شركة وأخرى وحتى بين طبخات الشركة الواحدة إلى العوامل المختلفة المؤثرة على تراكيز اليوربا ومنها: الوارد من البروتين والماء، الإطراح الكلوي لليوربا عند الأبقار، وزن جسم الأبقار وتأثير الموسم، الشهر الذي جمع فيه الحليب ومرحلة الرضاعة للبقرة، وغيرها من العوامل (SPEK et al., 2012).

كانت هذه القيم قريبة من القيم التي توصل إليها الباحث Abdallah وزملاؤه عام 2008 في مصر باستخدام الطريقة الطيفية بكاشف Erlich وتراوحت ما بين 15.8 mg/100 ml إلى 20.56 mg/100 ml عند تطبيق الطريقة على 50 عينة مجموعة من محلات بقالة (Abdallah et al., 2008)، كما توصلت الباحثة Elmoossalami في مصر أيضاً وباستخدام الطريقة الطيفية إلى قيم يوربا تراوحت ما بين 10 mg/100 ml إلى 20 mg/100 ml

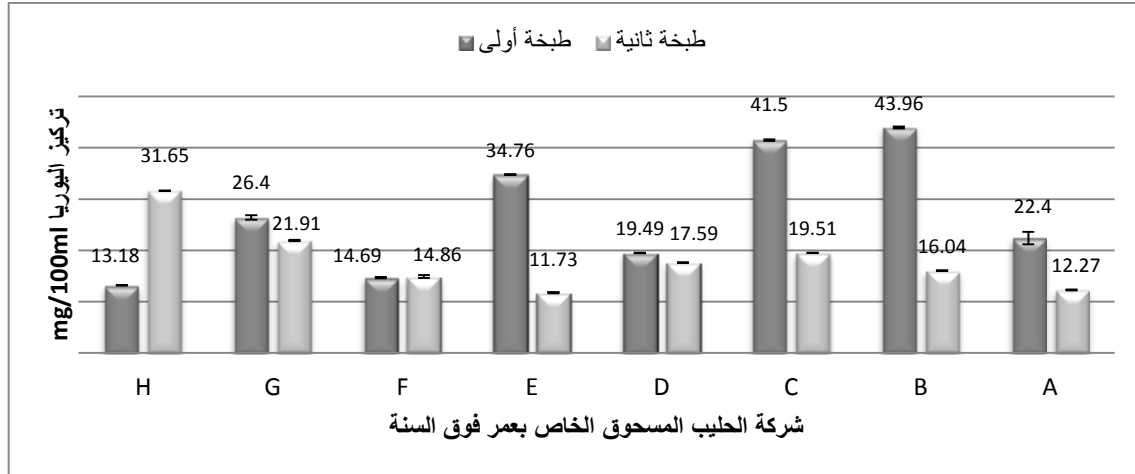
(Elmossalami et.al., 2012). أما الباحث Miglior وزملاؤه فقد قاموا باستخدام طريقة differential pH لتحديد اليوريا في عينات حليب نوعين من الأبقار فتراوحت ما بين 7.68 mg/100 ml إلى 16.6 mg/100 ml لأبقار Ayrshires بينما كانت 6.39 mg/100 ml إلى 14.23 mg/100 ml لأبقار (Miglior et.al., 2006) Holsteins. في دراسة أخرى أجريت في الأرجنتين باستخدام الطريقة الكهركيميائية المعتمدة على الأقطاب، قام الباحث Hilding–Ohlsson بتحديد سويات اليوريا فكانت تراكيزها متراوحة بين 12.1 mg/100ml إلى 24.3 mg/100ml (Hilding–Ohlsson et.al., 2012).

تراوحت تراكيز اليوريا في عينات اللبن المجموعة من محلات البقالة بين 10.98 mg/100 ml و 42.23 mg/100 ml، كما تم تحديد تراكيز اليوريا في طبختين عائدتين لشركة تسويق محلية وكانت القيمة حوالي 21.64 mg/100 ml و 26.84 mg/100 ml كما يبين المخطط 3. هذا وقد كانت دراستنا الدراسة الأولى التي قامت بتحديد اليوريا في منتجات اللبن على المستوى المحلي والعالمي.

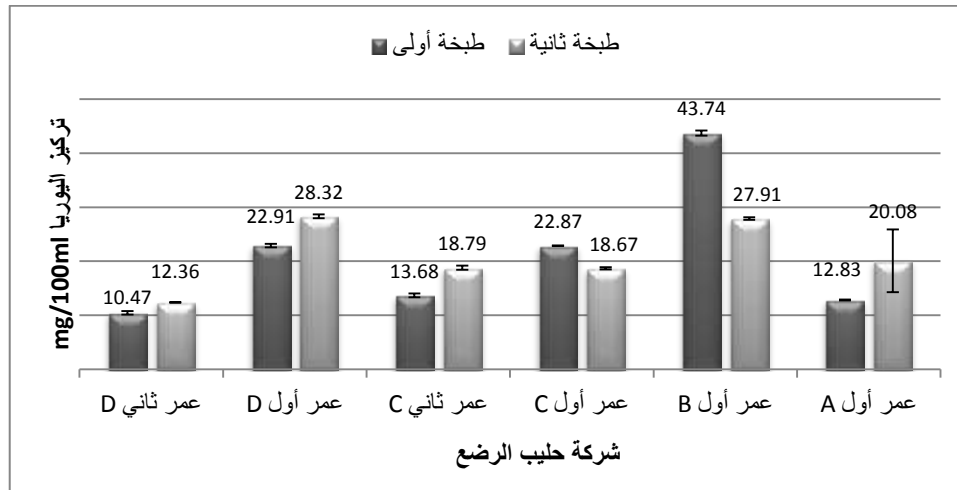


المخطط 3: تركيز اليوريا في عينات اللبن المدروسة

أما بالنسبة للحليب المسحوق تراوحت تراكيز اليوريا في الحليب الخاص بعمر فوق السنة بين 11.73 mg/100 ml و 43.96 mg/100 ml في الشركات الثمانية التي شملتها الدراسة الحالية أي أنها جميعها كانت ضمن المجال المسموح الذي اعتمده الدراسة الحالية، (أقل من 70 mg/100 ml) كما يوضح المخطط 4، بينما تراوحت تراكيز اليوريا في عينات حليب الرضع بين 10.47 mg/100 ml و 43.74 mg/100 ml كما يظهر في المخطط 5 وجميعها أيضاً ضمن المجال المسموح. قامت إحدى الدراسات بتحديد تراكيز اليوريا في الحليب المسحوق باستخدام طريقة التحديد الحركي حيث كانت تراكيز اليوريا 1.82 mg/g في عينة لم يضاف لها يوريا ومن 14.15 mg/g إلى 37.3 mg/g في أقسام أضيف لها من 13–36 mg/g يوريا (Ma et.al., 2016).



المخطط 4: تراكيز اليوريا العائدة لعينات الحليب المسحوق الخاص بعمر فوق السنة.



المخطط 5: تراكيز اليوريا العائدة لعينات حليب الرضع.

لوحظ عدم ترسب البروتين في بعض العينات بعد التفتيل بالإضافة إلى صعوبة في سحب حجوم من عينات أخرى بواسطة الميكروبييت مما قد يكون ناتج عن غشها بالنشاء أو مواد أخرى. هذا ويجب إعادة التتويه بأن المراجع اختلفت في تحديد القيم الطبيعية لليوريا، فإذا اعتمدت الدراسة الحالية أن القيم الطبيعية لليوريا تتراوح ما بين 10-16 mg/dl كما ذكر الباحث Jonker وزملاؤه عام 1998 فهذا يعني أن 29 عينة من أصل 66 عينة مدروسة في هذه الدراسة تعتبر مغشوشة باليوريا، أما إذا اعتمدنا أن القيم الطبيعية هي تلك المذكورة من قبل الباحث Paradkar وزملاؤه عام 2000 والباحث Hilding- Ohlsson وزملاؤه عام 2010 (حتى 40 mg/100ml) فهذا يعني أن ثلاث عينات تعتبر مغشوشة باليوريا. بينما إذا اعتمدنا القيم الطبيعية المذكورة من قبل كل من Kumar وزملاؤه عام 2000 والكتيب الصادر عن وزارة الصحة الهندية لمراقبة جودة الحليب عام 2015 بأن القيم الطبيعية لليوريا تصل حتى 70 mg/100ml ففي هذه الحالة تعتبر جميع العينات ذات قيم يوريا طبيعية. لذلك فإنه من الضروري أن تحتوي المواصفات القياسية السورية لمنتجات الحليب لما يشير إلى الحد الأعلى الطبيعي المسموح لليوريا في منتجات الحليب (Jonker et.al., 1998; Paradkar et.al., 2000; Kumar et.al., 2000; Hilding-Ohlsson et.al., 2012; Manual Of Methods Of Analysis Of Foods, 2015)

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات

- أظهرت نتائج تحديد اليوريا في عدد من منتجات الحليب المتوافرة في السوق المحلية (حليب سائل، لبن، لبننة، حليب بودرة) حيث كانت قيم اليوريا ضمن الحدود المسموحة في جميع العينات المدروسة.
- لوحظ عدم ترسب البروتين في بعض العينات بعد التثقيب بالإضافة إلى صعوبة في سحب حجوم من عينات أخرى بواسطة الميكروبييت مما قد يكون ناتج عن غشها بالنشاء أو مواد أخرى.

التوصيات

- ضرورة احتواء المواصفات القياسية السورية على قيمة للحد الأعلى لليوريا المسموح تواجدتها في الحليب ومشتقاته.
- متابعة الدراسة على منتجات حليب أخرى متوافرة محلياً.
- متابعة الدراسة لكشف غش منتجات الحليب المتوافرة محلياً بمواد أخرى كالنشاء وغيره.
- متابعة الدراسة بتطبيق طرائق مرجعية ودقيقة للتحري عن غش الحليب بالتمديد بالماء.

المراجع

- ABDALLAH, M.I.M.I. *Determination Of Urea In COW'S Milk Sold In Damietta GOVERNORATE*. Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association, Egypt, Vol.68, N°.2, 2008, 620-627.
- ANITA, S.; JUHI, S. And BHATT, S.R. *Detection of ill-effects of urea adulterated milk in Varanasi*. Food Science Research Journal, India, Vol.2, N°.1, 2011, 46-49.
- AOAC. *International, Official methods of analysis*, 17th ed., 2002.
- BELITZ, H.D.; GROSCH, W. And SCHIEBERLE, P. *Food Chemistry*. 4th revised and extended edition, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 2009, Vol. 53, 1114.
- BHATT, S.R.; SINGH, A. And BHATT, S.M. *Assessment of synthetic milk exposure to children of selected population in Uttar Pradesh, India*. Indian J Med Res, India, Vol. 7, 2008, 22-34.
- DHALI, A. *Studies on the effect of feeding management systems on blood and milk urea concentration in dairy cattle*. Ph.D. Thesis, National Dairy Research Institute Deemed University, Karnal, India, 2001, 160.
- ELMOSSALAMI, E.; HASSAN, H.; AND HASSOUBA, M.M. *The Detection Of Urea In Refrigerated Raw Milk And Its Effect On The Physical And Chemical Properties*. Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association, Egypt, Vol.72, N°.4, 2012, 613-621.
- FAO, *Food and drug Organization*, 2007.
- FOOD SAFETY AND STANDARDS AUTHORITY OF INDIA. *Manual Of Methods Of Analysis Of Foods: milk and milk product*, Lab. Manual 1, Ministry Of Health And Family Welfare, Government Of India New Delhi, 2015, 191.
- GIRALDO, J.D. And RIVAS, B.L. *Determination Of Urea Using Pn, N-Dimethylaminobenzaldehyde: Solvent Effect And Interference Of Chitosan*. Journal of the Chilean Chemical Society, Chile, Vol.62, N°.2, 2017, 3538 – 3542.
- Guideline, I.H.T. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. In International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland, VOL.4, 2005, 11-12.
- HARRIS, L.J. *A new formula for the calculation of added water in milk*. Analyst, United Kingdom, VOL.43 N°.511, 1918, 345-347.

- HAUG, A.; HØSTMARK, A.T. And HARSTAD, O.M. *Bovine milk in human nutrition—a review*. Lipids in health and disease, Vol.6, N°.1, 2007, 25-41.
- HILDING-OHLSSON, A.; FAUERBACH, J.A.; SACCO, N.J.; BONETTO, M.C. And CORTÓN, E. *Voltamperometric discrimination of urea and melamine adulterated skimmed milk powder*. Sensors, Argentina, Vol.12, N°.9, 2012, 12220-12234.
- JONKER, J.S.; KOHN, R.A. And ERDMAN, R.A. *Using Milk Urea Nitrogen to Predict Nitrogen Excretion and Utilization Efficiency in Lactating Dairy Cows*. Journal of dairy science, Vol.8, N°.10, 1998, 2681-2692.
- KANDPAL, S.D.; SRIVASTAVA, A.K. And NEGI, K.S. *Estimation of quality of raw milk (open & branded) by milk adulteration testing kit*. Indian Journal of Community Health, India, Vol.24, N°.3, 2012, 188-192.
- KUMAR, H.; KUMAR, A.; KUMARI, P.; JYOTIRMAI, S. And TULSANI, N.B. *A Rapid Estimation Of Urea In Adulterated Milk Using Dry Reagent Strip*. Indian Journal of chemical technology, India, Vol.7, N°.5, 2000, 146-147.
- MA, Y.; DONG, W.; BAO, H.; FAN, C.; FANG, Y. And WANG, S., *Kinetic Determination of Urea in Milk Powder by Nonlinear Chemical Fingerprint Technique*. Food and Nutrition Sciences, China, Vol.7, N°. 7, 2016, 495-503
- MIGLIOR, F.; SEWALEM, A.; JAMROZIK, J.; LEFEBVRE, D.M. And MOORE, R.K.,. *Analysis of milk urea nitrogen and lactose and their effect on longevity in Canadian dairy cattle*. Journal of dairy science, Canada, Vol. 89, N°. 12, 2006, 4886-4894.
- PAN, M.; HEINECKE, G.; BERNARDO, S.; TSUI, C. And LEVITT, J. *Urea: a comprehensive review of the clinical literature*. Dermatology online journal, U.S.A, Vol.19, N°. 11, 2013, 1-15.
- PARADKAR, M.M.; SINGHAL, R.S. and KULKARNI, P.R. *An approach to the detection of synthetic milk in dairy milk: 1. Detection of urea*. International journal of dairy technology, India, Vol.53, N°.3, 2000, 87-91.
- ROY, B.; BRAHMA, B.; GHOSH, S.; PANKAJ, P.K. and MANDAL, G. *Evaluation of milk urea concentration as useful indicator for dairy herd management: A review*. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, U.S.A, Vol.6, N°.1, 2011, 1-19.
- SALAZAR, J.H. *Overview of urea and creatinine*. Laboratory Medicine, U.S.A, Vol. 45, N°.1, 2014, e19-e20.
- SINGULURI, H. And SUKUMARAN, M.K. *Milk adulteration in Hyderabad, India-a comparative study on the levels of different adulterants present in milk*. Journal of Chromatography & Separation Techniques, India, Vol.5, N°.1, 2014, 1-3.
- SPEK, J.W.; DIJKSTRA, J.; VAN DUINKERKEN, G. And BANNINK, A. *A review of factors influencing milk urea concentration and its relationship with urinary urea excretion in lactating dairy cattle*. The Journal of Agricultural Science, The Netherlands, vol.151, N°.3, 2012, 407-423.
- YU, Y.; ZHAO, H.; DONG, G.; YANG, R.; LI, L.; LIU, Y.; WU, H. And ZHANG, W. *Discrimination of Milk Adulterated with Urea Using Voltammetric Electronic Tongue coupled with PCA-LSSVM*. International Journal of Electrochemical Science, China, Vol.10, N°.12, 2015, 10119-10131