Journal of Health

Vol. 12, No. 4, Winter 2022, Pages 478-487

Survey of Aflatoxin M_1 in Pasteurized Milks of East Azarbaijan Province by HPLC Method

Afshar S[1], Sheikhloie H*[2]

1. Student of Master of Science of Food Engineering, Department of Chemistry and Food Engineering, Maragheh branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran.
2. Assistant Prof. of Analytical Chemistry, Department of Chemistry and Food Engineering, Maragheh branch, Islamic Azad University, Maragheh, Iran.
**** Corresponding author.*** Tel: +989143221014, Fax: +984137454504,E-mail: H.Sheikhloie@Iau-maragheh.ac.ir

Received: May 15, 2018 Accepted: Dec 27, 2020

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-04-22]

[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.4.2.9]

[DOI: 10.52547/j.health.12.4.478]

ABSTRACT

Background & objectives: Aflatoxins are secondary metabolites of fungi and one of the most important types of mycotoxins identified as a carcinogen for humans. The aim of this study was to determine the level of aflatoxin M1 in milk production of dairy factories in east Azerbaijan province by high performance liquid chromatography (HPLC).
Methods: In this study, 45 samples of pasteurized milk were randomly collected from dairy factories in East Azerbaijan province between August and October 2015. Then, the amount of aflatoxin M1 in each sample was determined by HPLC method equipped with fluorescence detection after immunoaffinity purification.
Results: The results showed that 47% of the tested samples were contaminated with aflatoxin M1 toxin. No detectable contamination was observed in 53% of the samples. The contamination range was between 1-43.27 ng/L, and none of the samples had contamination higher than the EU legal limit (50 ng/L). There was a significant difference in aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk samples of different dairy factories ($p<0.05$).
Conclusion: The low level of aflatoxin M1 in the studied samples can be satisfactory in terms of public health at present. However, contamination level close to the standard limit was observed in 3% of the samples and requires continuous monitoring and more detailed studies such as the type of animal feed. In addition to maintaining the hygiene of livestock and dairy factories, it is necessary to plan to reduce the amount of aflatoxin M1 in milk and dairy products.
Keywords*:* Aflatoxin M_1; Pasteurized Milk; High Performance Liquid Chromatography; Dairy Factories

ارزیابی میزان آفلاتوکسین M_1 در شیرهای پاستوریزه استان آذربایجان‌شرقی به روش HPLC

ساناز افشار[۱]، حسین شیخ‌لوئی[۲]*

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی صنایع غذایی، گروه شیمی و صنایع غذایی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران

۲. استادیار شیمی تجزیه، گروه شیمی و مهندسی صنایع غذایی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۴۳۲۲۱۰۱۴ فکس: ۰۴۱۳۷۴۵۴۵۰۴ ایمیل: H.Sheikhloie@Iau-maragheh.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه قارچی و گروهی از مایکوتوکسین‌ها می‌باشند که به عنوان یک ماده سرطان‌زا برای انسان شناخته شده‌اند. هدف از این پژوهش تعیین میزان آفلاتوکسین M1 در شیر پاستوریزه تولیدی کارخانجات لبنی استان آذربایجان‌شرقی به روش کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (HPLC) می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه ۴۵ نمونه شیر پاستوریزه به‌طور تصادفی در فواصل زمانی مرداد تا مهر ماه سال ۱۳۹۴ از کارخانه‌های لبنی استان آذربایجان‌شرقی جمع‌آوری گردید. سپس میزان آفلاتوکسین M_1 در هر نمونه با استفاده از دستگاه HPLC مجهز به دتکتور فلورسانس بعد از خالص‌سازی با ستون‌های ایمنوافینیتی تعیین شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که ۴۷ درصد نمونه‌های آزمایش شده آلوده به سم آفلاتوکسین M_1 بودند. در ۵۳ درصد نمونه‌ها آلودگی قابل تشخیص مشاهده نگردید. محدوده آلودگی بین ۴۳/۲۷-۱ نانوگرم در لیتر بود، هیچ‌کدام از نمونه‌ها نیز آلودگی بالاتر از حد قانونی اتحادیه اروپا (۵۰ نانوگرم در لیتر) نداشتند. در نمونه‌های شیر پاستوریزه کارخانه‌های لبنی مختلف از نظر میزان آلودگی به آفلاتوکسین M_1، تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: پائین بودن میزان آفلاتوکسین M_1 در نمونه های مورد مطالعه، در حال حاضر می‌تواند از نظر بهداشت عمومی رضایت‌بخش باشد. با این حال آلودگی نزدیک به حد مجاز استاندارد در ۳ درصد نمونه‌ها مورد توجه است و نیاز به پایش مداوم و بررسی‌های دقیق‌تر مانند نوع تغذیه دام دارد. در ضمن رعایت بهداشت دامداری‌ها و کارخانه‌های لبنی ضروری است تا برنامه‌ریزی لازم برای کاهش میزان آفلاتوکسین M1 در شیر و فرآورده‌های لبنی صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین M_1، شیر پاستوریزه، کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا، کارخانجات لبنی

دریافت: ۱۳۹۷/۲/۲۵ **پذیرش:** ۱۳۹۹/۱۰/۷

مقدمه

شیر به دلیل ارزش غذایی بالا و مصرف آن در تمامی سنین به‌خصوص برای نوزادان و کودکان بیشتر از سایر مواد غذائی مورد توجه قرار دارد (۱). شیر به‌خصوص شیر گاو و محصولات آن مهمترین منبع غذائی طبیعی است که حاوی ۲۰ نوع عنصر مانند مس، آهن، منگنز، کلسیم، روی و... بوده که نقش مهمی در فعالیت‌های بیولوژیکی انسان بر عهده دارند (۳،۲). امروزه تقاضای مصرف‌کنندگان برای شیر سالم، غنی از مواد غذائی با ارزش بیولوژیکی بالا و عاری از هرگونه مواد مضر و سمی مانند دی اکسین‌ها، آفت‌کش‌ها، مواد شیمیایی و سایر عوامل تهدیدکننده سلامت، رو به گسترش است. شیر در دوران نوزادی تنها منبع مواد مغذی برای رشد و تکامل نوزاد بوده و

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-04-22]

[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.4.2.9]

[DOI: 10.52547/j.health.12.4.478]

در بزرگسالان نیز منبع کلسیم برای حفظ استخوان‌ها و جلوگیری از شکستگی و پوکی استخوان شناخته شده است (٤). این ماده غذایی ارزشمند ممکن است به‌علت شرایط نامناسب تولید، به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و سموم مختلف آلوده گشته و زمینه‌ساز بیماری‌های مختلف در مصرف‌کننده گردد. یکی از این سمومی که در شیر و فرآورده‌های لبنی مساله‌ساز می‌باشد، آفلاتوکسین‌ها هستند. آفلاتوکسین‌ها سموم قارچی طبیعی هستند که از گونه‌های قارچ آسپرژیلوس مانند *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و *آسپرژیلوس نومینوس* منشاءِ می‌گیرند. این سموم اگر از راه مواد غذایی وارد بدن شوند می‌توانند سرطان‌زا باشند. انواع مختلفی از آفلاتوکسین‌ها وجود دارد مانند B1، B2، G1 و G2. آفلاتوکسین‌های B2 و G2 مشتقاتی از B1 و G1 بوده وآفلاتوکسین‌های M1 و M2 به‌ترتیب از B1 و B2 حاصل می‌گردند. آفلاتوکسین‌های M1 و M2 برای اولین بار از شیر دام‌هایی که با خوراک آلوده تغذیه شده بودند، جدا شدند (۵،۲).

مصرف غذاهای آلوده به آفلاتوکسین می‌تواند موجب بیماری در انسان یا دام شود. این سموم می‌توانند نکروزبافتی، سیروز و سرطان کبد ایجاد کنند. علائم بالینی مشاهده شده در انسان شامل استفراغ، درد شکم، ضایعات حاد کبد مثل تغییرات چربی، ادم ریوی، لرزش عضلانی، کُما، تشنج و مرگ همراه با ادم مغز و درگیری اندام‌هایی نظیر کبد، کلیه و قلب می‌باشد. بین ۰/۳ تا ۶/۲ درصد از آفلاتوکسین B1 خورده‌شده توسط دام به صورت آفلاتوکسین M1 وارد شیر می‌شود (۶). از طرفی این سم در شیر نسبت به عوامل مختلف مانند حرارت مقاوم بوده (۷) و میزان آن در شیر به عوامل مختلفی مانند شدت آلودگی شیرخام، میزان آلودگی غذای دام، پروسه تولید و نگهداری شیر بستگی دارد (۸). اتحادیه اروپا و سازمان کدکس حداکثر میزان آفلاتوکسین M1 در شیر را ۵۰ نانوگرم در لیتر تعیین نموده است. استاندارد FAO در این مورد ۵۰۰ نانوگرم در لیتر می‌باشد (۹،۸).

گزارشات بسیاری در مورد حضور آفلاتوکسین در شیر و فرآورده‌های لبنی در ایران و سایر کشورها به روش الایزا وجود دارد (۱۱،۱۰). الایزا سریع‌ترین روش برای غربالگری حضور آفلاتوکسین M1 در نمونه با حساسیت کم ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر است (۱۲). با این حال، هنوز نمی‌توان بر مزاحمت‌های واکنش متقابل و ناخواسته در الایزا غلبه کرد. همچنین برای اهداف قانونی، نتایج مثبت حاصل از روش غربالگری (الایزا) نیاز به تأیید بیشتر آفلاتوکسین M1 دارد. متداول‌ترین روش تجزیه‌ای برای مقاصد کمی روش HPLC با دتکتور فلورسانس است (۱۳). برای تعیین آفلاتوکسین M1 به روش HPLC آماده‌سازی نمونه یا پاک‌سازی نمونه ضروری است. برای خالص‌سازی و غنی‌سازی آفلاتوکسین M1 در شیر و محصولات لبنی C_{18}، Carbograph-4، ستون پاک‌سازی چند منظوره و ستون ایمنوافینیتی (IAC) مناسب هستند (١٤). امروزه ستون ایمنوافینیتی بهترین و متداول‌ترین روش پاک‌سازی است که امکان جداسازی بسیار انتخابی آنالیت از یک ماتریس پیچیده را فراهم می‌کند (۱۵). تحقیقات نشان داده است که میزان آفلاتوکسین در شیر خام با توجه به شرایط جغرافیائی و فصلی متغیر است. طبق تحقیق تاج کریمی و همکاران نوع تغذیه دام، زمان گرسنگی، دمای هوا و رطوبت نسبی هوا می‌تواند روی تولید سم آفلاتوکسین تاثیرگذار باشد (۱۶). بنابراین بررسی کلی در رابطه با شناسایی و اندازه‌گیری سم آفلاتوکسین در شیرهای پاستوریزه لازم و ضروری است. در این تحقیق نیز میزان آفلاتوکسین M1 در شیرهای پاستوریزه استان آذربایجان‌شرقی در ماه‌های مختلف سال ۱۳۹٤ به روش HPLC با دتکتور فلورسانس با استفاده از ستون ایمنوافینیتی مورد ارزیابی قرار گرفت تا بتوان به ارائه پیشنهادات در رابطه با نحوه صحیح تولید شیر سالم در دامداری‌ها و کارخانجات

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-04-22]
[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.4.2.9]
[DOI: 10.52547/j.health.12.4.478]

لبنی پرداخت و بدین ترتیب در حفظ بهداشت عمومی و سلامت مصرف کنندگان قدمی برداشت.

روش کار

برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین M_1 در نمونه‌های شیر، تعداد ۴۵ نمونه شیر پاستوریزه بصورت تصادفی از ۵ کارخانه تولید شیر پاستوریزه واقع در استان آ.شرقی (هر کارخانه ۹ نمونه) در سه بازه زمانی مرداد تا مهر ۱۳۹۴ جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل و تا زمان آنالیز در یخچال در دمای $4\pm1^{\circ}C$ نگهداری گردیدند. به‌طور کلی روش کار در این تحقیق مشتمل بر ۳ قسمت بود: ۱- نمونه‌گیری، ۲- آماده‌سازی نمونه‌ها، ۳- آنالیز با HPLC.

استخراج

استخراج و آماده‌سازی نمونه‌ها با ستون‌های ایمنوافینیتی VICAM انجام گردید. ابتدا ۱۰ گرم نمونه را وزن کرده و در ۸۰ سی‌سی آب مقطر ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد حل کرده به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده می‌شود. ۶۰ میلی‌لیتر از نمونه را سانتریفوژ (مدل GAMA TEB ساخت کشور ایران) کرده تا چربی آن جدا شود. سپس ستون‌های ایمنوافینیتی را به دمای اتاق رسانده و ۱۰ میلی لیتر از محلول بافر فسفات سالین (PBS) را در مخزن متصل به ستون ریخته و اجازه داده شد با سرعت ۱ تا ۲ قطره در ثانیه بدون فشار خارجی از ستون عبور کند. ۲۰ میلی‌لیتر از شیر بدون چربی را در مزور ریخته و از ستون ایمنوافینیتی عبور داده می‌شود. مزور محتوی نمونه را دو بار با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده و هر بار آب شستشو از ستون عبور داده می‌شود. سپس ستون با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو می‌شود. ۲/۵ میلی لیتر استونیتریل (مرک، آلمان) از ستون با سرعت ۳-۲ میلی‌لیتر در دقیقه عبور داده و در یک ویال جمع می‌شود. سپس ورتکس می‌گردد. محتویات ویال در انکوباتور (مدل بهداد ساخت ایران) با دمای ۵۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک می‌شود. به داخل ویال ۱ میلی‌لیتر از فاز متحرک شامل مخلوط آب: استونیتریل: متانول به نسبت ۶:۲:۳ (با درجه HPLC از شرکت مرک آلمان) اضافه کرده و آن را به مدت ۱ دقیقه توسط ورتکس (مدل SM90 ساخت کشور ایران) مخلوط و ۱ دقیقه توسط اولتراسونیک (مدل Dentine ساخت کشور ایران) گاززدایی می‌گردد. در صورت مشاهده کدورت محتویات ویال با فیلترهای سرسرنگی از جنس PTFE با قطر چشمه‌های ۰/۴۵ میکرومتر صاف می‌شود و سپس ستون با ۲۰ میلی‌لیتر PBS شستشو می‌گردد.

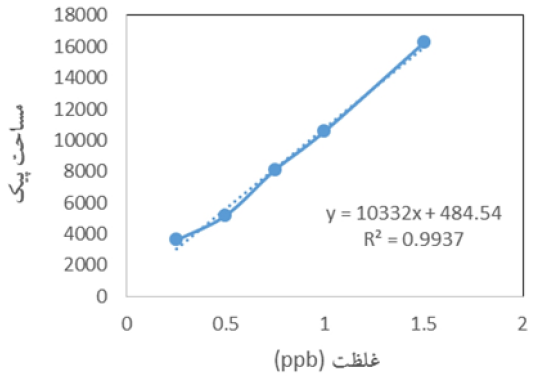
آنالیز با HPLC

از دستگاه HPLC مدل شیمادزو (SHIMADZU) ساخت کشور ژاپن شامل؛ سیستم تزریق دستی با حجم لوپ ۱۰۰ میکرولیتر جهت بارگذاری نمونه، ستون تجزیه فاز معکوس ODS (ستون C_{18}) با مشخصات 250 mm×4.6×5 µm، حفاظ ستون Novapak C18 Waters، آشکارساز فلورسانس شیمادزو مدل RF-X10A دارای فیلتر قابل تنظیم و سیستم پردازش اطلاعات استفاده گردید. جداسازی، تشخیص و تعیین مقدار آفلاتوکسین M_1 به ترتیب با استفاده از روش فاز معکوس، دتکتور فلورسانس با طول موج ۳۶۵ nm برانگیختگی و نشر ۴۳۵ nm و مقایسه سطح زیر پیک‌های استاندارد با پیک نمونه مجهول با احتساب ضریب رقت انجام شد. پیک‌های حاصل از نظر زمان بازداری با پیک‌های استاندارد مقایسه کرده، آلودگی را مشخص و میزان آلودگی با استفاده از منحنی کالیبراسیون محاسبه گردید. همچنین صحت، دقت و حساسیت روش پیشنهادی به ترتیب با انجام آزمون‌های بازیافت (R%)، تعیین درصد انحراف معیار استاندارد (RSD%) و حدتشخیص (LOD) و حدتعیین روش اندازه‌گیری (LOQ) بررسی گردید.

تهیه محلول استاندارد و ترسیم منحنی کالیبراسیون ۵۰ میلی‌لیتر محلول کالیبره آفلاتوکسین M_1 با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به ویال شیشه‌ای منتقل

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-04-22]
[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.4.2.9]
[DOI: 10.52547/j.health.12.4.478]

شد. جهت ترسیم منحنی کالیبراسیون و بدست‌آوردن معادله آن غلظت‌های متفاوت ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ و ۱/۵ میکروگرم در لیتر از محلول استاندارد آفلاتوکسین M_1 تهیه و به دستگاه HPLC تزریق شد و با توجه به سطح زیر نمودار، منحنی کالیبراسیون ترسیم شد (شکل ۱). جهت بدست‌آوردن منحنی کالیبراسیون، معادله و ضریب تصحیح (r^2) آن از نرم‌افزار اکسل (Excel, 2013) استفاده گردید. پس از بدست‌آوردن زمان بارداری، ترسیم منحنی کالیبراسیون و معادله آن آزمون HPLC برای نمونه‌های شیر جمع‌آوری‌شده انجام گرفت. برای انجام آزمون آفلاتوکسین M_1 توسط HPLC از هر نمونه آماده شده ۱۰۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق شد.



شکل ۱. نمودار منحنی کالیبراسیون اندازه‌گیری آفلاتوکسین M1 در نمونه‌های شیر به روش HPLC با دتکتور فلورسانس

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای آزمون وجود تفاوت معنی‌دار در غلظت آفلاتوکسین در نمونه‌های شیر مربوط به کارخانجات لبنی مورد مطالعه از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده گردید. سپس میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند. سطح اطمینان مورد استفاده جهت آنالیز آماری ۹۵٪ ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد و کلیه آنالیزها توسط نرم افزار SPSS-21 انجام پذیرفت.

یافته‌ها

صحت به معنی نزدیکی/ توافق بین نتایج آزمون با میزان واقعی است. محاسبه این کمیت در واقع بیانگر میزان خطای عمدی در نتایج می‌باشد. یکی از راه‌های اندازه‌گیری صحت، غنی‌سازی نمونه و اندازه‌گیری درصد بازیافت است. به‌این منظور ۵ نمونه از شیر پاستوریزه توسط استاندارد آفلاتوکسین M_1 با غلظت ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر (حدمجاز استاندارد اروپا) آلوده و به همراه نمونه‌هایی از همان شیر پاستوریزه که آلوده نشده بودند، همزمان و طی شرایط یکسان مورد آزمون قرار گرفتند. مطابق جدول ۱، محدوده درصد آفلاتوکسین M_1 در شیرهای مورد آزمون در محدوده ۹۶/۳۵-۹۱/۲۷ درصد قرار دارد که در محدوده قابل قبول بازیافت قرار گرفته است و این بدین معنی است که روش از صحت لازم برخوردار است و نتایج قابل اعتماد و صحیح است.

جدول ۱. مطالعه درصد بازیافت استخراج آفلاتوکسین M1 در نمونه های شیر به روش HPLC با دتکتور فلورسانس

نمونه	غلظت آفلاتوکسین M_1 (ng/l)	مقدار اضافه شده (ng/l)	مقدار یافت شده (ng/l)	درصد بازیافت
۱	۷/۲۴±۱/۰۱*	۵۰	۵۴/۰۴±۰/۰۲	۹۴/۴۱
۲	۱۱/۴۲±۱/۲۳	۵۰	۵۸/۴۴±۰/۰۳	۹۵/۱۴
۳	عدم تشخیص	۵۰	۴۵/۶۳±۰/۰۲	۹۱/۲۷
۴	عدم تشخیص	۵۰	۴۶/۲۸±۰/۰۲	۹۲/۵۶
۵	۱۸/۱۲±۱/۷۲	۵۰	۶۵/۶۴±۰/۰۳	۹۶/۳۵

* انحراف استاندارد ± میانگین (n=۳)

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-04-22]
[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.4.2.9]
[DOI: 10.52547/j.health.12.4.478]

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-04-22]

[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.4.2.9]

[DOI: 10.52547/j.health.12.4.478]

دقت نیز یکی از معیارهای مهم در ارزیابی اعتبار روش همه اندازه‌گیری‌های کمی است. بروز خطاهای تصادفی، در حین اجرای روش آزمون باعث کاهش دقت می‌شود. به‌عبارت دیگر دقت روش بیانگر میزان پراکندگی نتایج بدست آمده از یک سری آزمون مشابه انجام شده بر روی یک نمونه واحد می‌باشد. بنابراین برای محاسبه دقت روش ارائه شده در این تحقیق ۵ آزمون مشابه بر روی یک نمونه در سطح آلودگی ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر صورت گرفت و مقدار انحراف استاندارد نسبی محاسبه گردید. مطابق جدول ۲ مقدار انحراف استاندارد نسبی در اندازه‌گیری آفلاتوکسین M_1 در شیر به روش HPLC با دتکتور فلورسانس برابر ۳/۴۲ درصد است که با تکرارپذیری انحراف استاندارد نسبی تعیین شده توسط اتحادیه اروپا (کمتر از ۲۰٪) به‌عنوان یکی از معیارهای روش‌های تجزیه آزمایشگاهی متناسب، همسویی دارد. جهت ارزیابی حساسیت روش برنامه‌ریزی شده مقدار حد تشخیص دستگاه بصورت سه برابر سیگنال به نویز (LOD=3S/N) و حد تعیین روش آنالیز بصورت ۱۰ برابر سیگنال به نویز (LOQ=10S/N) محاسبه گردید. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است حد تشخیص دستگاه و حد تعیین روش آنالیز به ترتیب برابر ۰/۰۳ و ۰/۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر است و نشان می‌دهد که روش ارائه شده از حساسیت خوبی در اندازه‌گیری آفلاتوکسین M1 در شیر برخوردار است.

جدول ۲. ارقام شایستگی اندازه‌گیری آفلاتوکسین M1 در نمونه‌های شیر به روش HPLC با دتکتور فلورسانس

آنالیت	ضریب همبستگی	انحراف استاندارد نسبی [1](٪)	محدوده خطی (ng/l)	حد تشخیص [2](ng/l)	حد تعیین [3](ng/l)
آفلاتوکسین M1	۰/۹۹۳۷	۳/۴۲	۱-۱۰۰	۰/۳	۱/۰

[1] انحراف استاندارد نسبی (RSD%) در n= ۵ محاسبه شده است. [2] حد تشخیص (LOD) بصورت 3S/N محاسبه شده است.

[3] حد تعیین (LOQ) بصورت 10S/N محاسبه شده است.

نتایج میزان آفلاتوکسین M1 در ۴۵ نمونه شیر پاستوریزه در جدول ۳ آورده شده است. طبق نتایج حاصل شده ۴۷ درصد نمونه‌های مورد آزمون آلوده به سم آفلاتوکسین M1 بودند و در ۵۳ درصد نمونه‌ها آلودگی قابل تشخیص مشاهده نگردید. میانگین آلودگی نمونه‌ها ۱۰/۱۷ نانوگرم در لیتر با انحراف معیار نسبی ۲/۶۴ بود. محدوده آلودگی نیز بین ۱/۳۵-۴۳/۲۷ نانوگرم در لیتر بود. ۳ درصد از نمونه‌ها نیز آلودگی حد مرزی استاندارد یعنی ۴۱-۵۰ نانوگرم در لیتر داشتند ولی در هیچ‌کدام از نمونه‌ها آلودگی بالاتر از حدمجاز استاندارد اتحادیه اروپا یعنی بالاتر از ۵۰ نانوگرم در لیتر مشاهده نگردید. جدول ٤ تعداد و میانگین غلظت آفلاتوکسین M1 در نمونه‌های مثبت جمع‌آوری شده از کارخانجات مختلف را نشان می‌دهد. همانطور که می‌بینیم در نمونه‌های شیر پاستوریزه کارخانه‌های لبنی مختلف از نظر میزان آلودگی به آفلاتوکسین M1، تفاوت معنی‌دار وجود دارد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳. مقدار آفلاتوکسین M1 در نمونه‌های شیر پاستوریزه به روش HPLC با دتکتور فلورسانس

تعداد نمونه	مقادیر افلاتوکسین M1 (ng/l)	درصد	مجموع درصد	حداقل- حداکثر (ng/l)
۲٤	عدم تشخیص	۵۳	۵۳	۰
۱۳	کمتر از ۱۰	۲۷		
٤	۱۱ الی ۲۰	۱۱	٤۷	٤۳/۲۷-۱/۳۵
۳	۲۱ الی ٤۰	۶		
۱	٤۱ الی ۵۰	۳		
۰	بیشتر از ۵۰	۰	۰	
٤۵		۱۰۰	۱۰۰	

جدول ٤. میانگین آلودگی به آفلاتوکسین M1 در نمونه‌های شیر پاستوریزه کارخانه‌های لبنی مختلف

کارخانه	تعداد نمونه های مثبت	میانگین غلظت افلاتوکسین M1 (ng/l)
١	٥	١٩/٣٨^{b}±١/٦٦*
٢	٤	٢٨/٤١^{a}±١/٨٩
٣	٢	٣/٧٣^{d}±١/٠٥
٤	٦	١٢/١٨^{c}±١/٤٢
٥	٤	١٦/٠٥^{c}±١/٣٧

* انحراف استاندارد ± میانگین a-d: حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار (p<٠/٠٥) در بین کاخانجات لبنی می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که هیچ‌کدام از نمونه‌های شیر پاستوریزه بالاتر از استانداردهای توصیه شده بین‌المللی آلودگی ندارند. مطالعات مختلفی از جنبه‌های گوناگون بر روی شیر پاستوریزه صورت گرفته است. بر اساس مطالعات پیشین در سطح کشور میزان آلودگی شیرهای پاستوریزه به آفلاتوکسین M1 در محدوده ٦٠٠-٠ نانوگرم در لیتر است که کمترین و بیشترین آلودگی به‌ترتیب در شهرهای اهواز و شیراز با میانگین ٢/٧ و ٩٧٥ نانوگرم در لیتر گزارش شده است (١٨،١٧). در تحقیقی میزان آلودگی آفلاتوکسین M1 در ٩٠ نمونه شیر خام در استان اردبیل را در محدوده ٨٥-٢/٥ نانوگرم در لیتر گزارش کرده‌اند که در مجموع ٣٣ درصد از نمونه‌ها آلودگی بیش از حد مجاز ٥٠ نانوگرم در لیتر داشتند (١٩). در مطالعه‌ای میزان آلودگی نمونه‌های شیرخام گاو، بز و گوسفند در غرب کشور به ترتیب ٨٤/٣ درصد، ٤٤/٦ درصد و ٦٥/٣ درصد و آلودگی بیش از حد مجاز بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا، ٣٥/٩، ١١/١ و ٢٦/٩ درصد گزارش شده است (٢٠). در مطالعه دیگری در جنوب ایران، از ١٢٠ نمونه شیر خام گاو، ٢٨ درصد نمونه‌ها آلودگی بیش از حد مجاز اتحادیه اروپا داشتند (٢١). میزان آفلاتوکسین M1 در ٥٠ نمونه شیرپاستوریزه در سال ١٣٨٨ در طول ٦ ماه در شهر تبریز به روش الایزا اندازه‌گیری شد. ٦٢ درصد نمونه‌ها آلودگی بالاتر از حد مجاز استاندارد اتحادیه اروپا داشتند (٣). همچنین در فصول پاییز و زمستان سال ١٣٩٣ نیز مجدداً ٧٤ نمونه شیر پاستوریزه در شهر تبریز به روش الایزا اندازه‌گیری شد. ٨٣ درصد نمونه‌ها آلودگی به آفلاتوکسین M1 در محدوده ٨٠-٥ نانوگرم در لیتر داشتند. تنها در ١٢/٦ درصد نمونه‌ها (٩ نمونه) میزان آفلاتوکسین M1 بالاتر از حداکثر مقدار مجاز تعیین‌شده توسط اتحادیه اروپا بود (٢٢). مطالعه صادقی و همکاران در کرمانشاه نشان داد که از ٣٢٠ نمونه شیر، ٢٩٥ نمونه از استاندارد کدکس آلودگی بالاتری داشتند و بالاترین میزان در فصل بهار و کمترین در فصل پاییز بود (٢٣). بررسی ترکش و همکاران نیز در شهر اصفهان نشان داد که ٣٣ نمونه از ٥٠ نمونه پنیر مورد آزمایش آلوده به آفلاتوکسین بودند و ٦ نمونه بیش از حداکثر تعیین‌شده آفلاتوکسین داشتند (٢٤). در تحقیقی کامکار میزان آلودگی شیرهای خام در شهر سراب را ٧٦ درصد گزارش کرد. میزان متوسط آفلاتوکسین M_1 اندازه‌گیری شده به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) ٠/٢٨-٠/٠١٥ میکروگرم در هر لیتر شیر بود. در ٤٠ درصد نمونه‌های مورد بررسی میزان آلودگی بیش از حد مجاز استاندارد بود. میزان میانگین آفلاتوکسین M1 در زمستان، بهار، تابستان و پاییز به ترتیب ٠/٠٨٦، ٠/٠٤٣، ٠/٠٣٢ و ٠/٠٨٢ میکروگرم در لیتر بود (٢٥). در خارج از کشور نیز مطالعات زیادی در خصوص اندازه‌گیری آفلاتوکسین M1 در شیر و محصولات لبنی انجام شده است. در تحقیقی در کره جنوبی میزان آلودگی ١٠٠ نمونه شیر خام به آفلاتوکسین

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-04-22]
[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.4.2.9]
[DOI: 10.52547/j.health.12.4.478]

M1 به‌روش HPLC بررسی و نتایج حاصله نشان داد که هیچ‌کدام از نمونه‌های شیر آلودگی بالاتر از حد مجاز استاندارد اروپا نداشتند (۲۶). همچنین در مطالعه‌ای در جنوب ایتالیا میزان آلودگی به آفلاتوکسین M1 در ۸۰۴ نمونه شیر خام گاو و گاومیش طی یک دوره دوساله اندازه‌گیری گردید. نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که ۱۲/۳ درصد نمونه‌های شیر گاو و ۷/۲ درصد نمونه‌های شیر گاومیش آلوده به آفلاتوکسین M1 بودند ولی فقط یک نمونه شیر گاو آلودگی بالاتر از حد مجاز استاندارد اروپا داشت (۲۷). در مطالعه‌ای دیگر در مصر از ۱۲۰ نمونه شیرخام، میزان آلودگی به آفلاتوکسین M1 در دو سال متوالی به ترتیب ۲۱/۶ و ۱۸/۳ درصد بود (۲۸). در تحقیقی میزان آلودگی به آفلاتوکسین M1 در نمونه‌های شیر پاستوریزه و شیر مورد استفاده نوزادان ۹۳ درصد بود. در ۷۸ درصد نمونه‌های شیر خام و ۳۳ درصد نمونه‌های شیر نوزادان آلودگی، بیش از حد مجاز استاندارد اروپا بود (۲۹). در تحقیقی در چین از ۵۶۵۰ نمونه شیر خام تولیدشده در طی چهار فصل، فقط ۱/۱ درصد از نمونه‌ها آلودگی بالاتر از حد مجاز استاندارد اروپا داشتند (۳۰). در تحقیق دیگر با استفاده از HPLC، میزان آلودگی به آفلاتوکسین M1 در شیرهای فرادما (UHT) و پاستوریزه و پودر شیر بز در کشور برزیل ۶۹ درصد گزارش شده است؛ ولی میزان آفلاتوکسین M1 در تمامی نمونه‌های آلوده پایین‌تر از حد مجاز استاندارد اروپا بود (۳۱). در بررسی ساساهارا و همکاران میزان آلودگی به آفلاتوکسین M1 در شیرهای مورد مصرف ایالت پارانا برزیل ۱۰ درصد گزارش گردید (۳۲).

به‌طورکلی مقایسه نتایج این مطالعه با سایر تحقیقات انجام شده بر روی شیرهای پاستوریزه نشان می‌دهد که در سایر تحقیقات نیز شیرهای پاستوریزه از آلودگی کمتری برخوردار هستند با این وجود این طور به‌نظر می‌رسد که روند پاستوریزاسیون قادر به از بین‌بردن سم نمی‌باشد و نیاز به اعمال روش‌های جدید و تکنولوژی بهتر جهت رفع این معضل می‌باشد (۳۳). منشاءِ آفلاتوکسین M1، آلودگی اجزاءِ غذایی حیوانات شیرده به آفلاتوکسین B1 است که در بدن حیوان هیدروکسیله شده و از طریق شیر و ادرار دفع می شود (۳۵،۳۴). در حال حاضر به علت مشکلات زیاد در ارتباط با سم‌زدایی شیر پیشنهاد می‌گردد که فراهم‌آوردن یک جیره سالم و عاری از آلودگی قارچی به ویژه در فصول سرد سال بهترین راه پیشگیری است (۳۶). هرچند که تحقیق در مورد روش‌های سالم‌سازی غذایی حیوان از نظر رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین یا حذف سم از ضرورت برنامه‌های پژوهشی محسوب می‌گردد. یکی از گمانه‌های محققین در این بررسی وجود نان خشک کپک‌زده در جیره غذایی حیوانات شیرده بود در حالی که یافته‌ها نشان داد که کپک در شرایطی که غذا حاوی کربوهیدرات زیاد و فعالیت آبی باشد بسیار خوب می‌تواند رشد کند و تکثیر یابد و این منحصر به نان خشک نیست بلکه آرد ذرت، آرد ماهی و علوفه سیلوشده محیط‌های بسیار مناسبی برای ازدیاد کپک و تولید سم می‌باشند که با کنترل رطوبت و دمای محیط نگهداری آنها و نامساعدکردن شرایط رشد قارچ می‌توان از تولید آفلاتوکسین و آلودگی جلوگیری کرد (۳۷). اولین قدم عدم‌استفاده از نان خشک و خرید خوراک‌های عاری از مایکوتوکسین‌ها می‌باشد. دانه‌های خوراکی دام در رطوبت زیر ۱۴ درصد ذخیره و نگهداری شود. برنامه‌ای کارآمد جهت حذف فاکتورهای مساعدکننده رشد کپک‌ها در خوراک دام باید به‌کار برده شود و محصولات آلوده به آفلاتوکسین باید از جیره دام‌ها حذف گردد.

در مجموع می‌توان گفت که وجود آفلاتوکسین M1 در ۴۷ درصد نمونه‌های شیرپاستوریزه استان آذربایجان‌شرقی، می‌تواند از نظر بهداشت عمومی مخاطره‌آمیز باشد. لذا جهت مدیریت خوب و کنترل آلودگی مطالعات نظام‌مند و پایش مداوم آفلاتوکسین

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-04-22]
[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.4.2.9]
[DOI: 10.52547/j.health.12.4.478]

M1 در شیرهای مصرفی در نقاط مختلف کشور به‌دلیل شرایط و موقعیت خاص اکولوژیک هر منطقه و نیز آموزش کشاورزان و دامداران ضروری است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد بوده که در شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه با کد ۱۴۷۵۴۲۹۳۲۰۱۴ به تصویب رسیده است. همچنین از زحمات همکاران محترم آزمایشگاه نیکان پژوهان بناب تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1- Rahimi E, Bonyadin M, Rafei M, Kazemeini HR. Occurrence of aflatoxin M_1 in raw milk of five dairy species in Ahvaz, Iran. Food and chemical Toxicology. 2012; 48(1):129-31.
2- Cavaliere C, Foglia P, Pastorini E, Samperi R, Lagana A. Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization source. Journal of Chromatography A. 2006; 1101: 69-78.
3- Movassagh Ghazani MH. Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Tabriz (northwest of Iran). Food and Chemical Toxicology. 2009; 47(7): 1624-1625.
4- Wang Y, Liu X, Xiao Ch, Wang Zh, Wang J, Xiao H, Cui L, Xiang Q, Yue T. HPLC determination of aflatoxin M_1 in liquid milk powder using solid phase extraction on OASIS HLB. Food Control. 2012; 28: 131-134.
5- Lopez C, Ramos L, Ramadan S, Bulacio L, Perez J. Distribution of aflatoxin M1 in cheese obtained from milk artificially contaminated. International Journal of Food Microbiology. 2001; 64: 211-215.
6- Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicology Letters. 2002; 127:19-28.
7- Galvano F, Galofaro V, Galovano G. Occurrence and stability of aflatoxin M 1 in milk and dairy products, A worldwide review. Journal of Food Protection. 1996; 59: 1079-1090.
8- Kamkar A, Karim G, Shojaee Aliabadi F, Khaksar R. Fate of aflatoxin M1 in Iranian white cheese processing. Food and Chemical Toxicology. 2008; 46: 2236-2238.
9- Asghar MA, Ahmed A, Asghar MA. Aflatoxin M1 in fresh milk collected from local markets of Karachi, Pakistan. Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance. 2018; 11(3): 167-174.
10- Tajik H, M. Moradi M, S.M. Razavi Rohani SM, Hadian M. Determination of aflatoxin M1 in pasteurized and UHT milk in West-Azerbaijan province of Iran. Journal of Food Quality and Hazards Control. 2016; 3: 37-40.
11- Kazemi Darsanaki R, Mohammad Doost Chakoosari M, Azizollahi Aliabadi M, Aflatoxin M1 contamination in milk and milk products in Iran: A Review. Journal of Chemical Health Risks. 2013; 3(3): 13-20.
12- Rodriguez-Velasco ML, Calonge-Delso MM, Ordonez-Escudero D. ELISA and HPLC determination of the occurrence of aflatoxin M1 in raw cow's milk. Food Additives and Contaminants. 2003; 20: 276-280.
13- Manetta AC, Giuseppe LD, Giammarco M, Fusaro I, Simonella A, Gramenzi A, et al. High performance liquid chromatography with post-column derivatisation and fluorescence detection for sensitive determination of aflatoxin M1 in milk and cheese. Journal of Chromatography A. 2005; 1083: 219-222.
14- Chen CY, Li WJ, Peng KY. Determination of aflatoxin M1 in milk and milk powder using high-flow solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Agricultural Food Chemistry. 2005; 53(22): 8474-8480.
15- Lee JE, Kwak BM, Ahn JH, Jeon TH. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. Food Control. 2009; 20: 136-138.

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-04-22]
[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.4.2.9]
[DOI: 10.52547/j.health.12.4.478]

16- Tajkarimi M, Shojaee-Aliabadi F, Salah-Nejad M, Pursoltani H, Motallebi AA, Mahdavi H. Seasonal study of aflatoxin M1 contamination in milk in five regions in Iran. Journal of Food Microbiology. 2008; 116(3): 346-9.
17- Kamkar A, Fallah AA, Mozaffari Nejad AS. The review of aflatoxin M1 contamination in milk and dairy products produced in Iran. Toxin Reviews. 2014; 33(4): 160-168.
18- Jalili M, Scotter M. A review of aflatoxin M1 in liquid milk. Iranian Journal of Health, Safety and Environment. 2015; 2(2): 283-295.
19- Nemati M, Mehran MA, Hamed PK, Masoud A. A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in milk samples in Ardabil, Iran. Food Control. 2010; 21(7): 1022-1024.
20- Bahrami R, Shahbazi Y, Nikousefat Z. Aflatoxin M1 in milk and traditional dairy products from west part of Iran: occurrence and seasonal variation with an emphasis on risk assessment of human exposure. Food Control. 2016; 62: 250-256.
21- Kamkar A, Yazdankhah S, Mohammadi Nafchi A, Mozaffari Nejad AS. Aflatoxin M1 in raw cow and buffalo milk in Shush city of Iran. Food Additives & Contaminants: Part B. 2014; 7(1): 21-24.
22- Farshi P, Khakpour M, Tabibiazar M. A survey on aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk samples in Tabriz, Iran. Journal of Food Hygiene. 2017; 7(27): 89-111.
23- Sadeghi E, Almasi A, Bohloli-Oskoii S, Mohamadi M. The evaluation of aflatoxin m1 level in collected raw milk for pasteurized dairy factories of Kermanshah. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 2013; 15(3): 26-29.
24- Tarkesh Esfahani M, Madani G, Hosseini P. Study of Aflatoxin M1 levels in iranian white cheese produced by Isfahan dairy factories using ELISA technique. Journal of Health System Research. 2013; nutrition supplement: 1614-1620 (Full text in Persian).
25- Kamkar A. A study on the occurrence of aflatoxin Ml in raw milk produced in Sarab city of Iran. Food Control. 2005; 16: 593-599.
26- Lee JE, Kwak BM, Ahn JH, Jeon TH. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. Food Control. 2009; 20: 136-138.
27- Roma A, Rossini C, Ritieni A, Gallo P, Esposito M. A survey on the aflatoxin M1 occurrence and seasonal variation in buffalo and cow milk from Southern Italy. Food Control. 2017; 81: 30-33.
28- Ismaiel AA, Tharwat NA, Sayed MA, Gameh SA. Two-year survey on the seasonal incidence of aflatoxin M1in traditional dairy products in Egypt. Journal of Food Science and Technology. 2020; 57: 2182-2189.
29- Oveisi MR, Jannat B, Sadeghi N, Hajimahmoodi M, Nikzad A. Presence of aflatoxin M1 in milk and infant milk products in Tehran. Iran. Food Control. 2007; 18: 1216–1218.
30- Li S, Min L, Wang P, Zhang Y, Zheng N, Wang J. Aflatoxin M1 contamination in raw milk from major milk-producing areas of China during four seasons of 2016. Food Control. 2017; 82: 121-125.
31- Oliveira CA, Ferraz JCO. Occurrence of aflatoxin M1 in pasteurized, UHT milk and milk powder from goat origin. Food Control. 2007; 18:375-378.
32- Sassahara M, Pontes Netto D, Yanaka EK. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin Ml in raw milk in the North of Parana state. Food and Chemical Toxicology. 2005; 43(6):98l-4.
33- Deveci O, Sezgin E. Changes in concentration of aflatoxin M1 during manufacture and storage of skim milk powder. Journal of Food Protection. 2006; 69(3): 682-685.
34- Kumar P, Mahato DK, Kamle M, Mohanta TK, Kang SG. Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. Frontiers in Microbiology. 2017; 7: 2170.
35-Xiong J, Xiong L, Zhou H, Liu Y, Wu L. Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow feedstuff and aflatoxin M1 in UHT and pasteurized milk in central China. Food Control. 2018; 92: 386-390.
36- Turkoglu C, Keyvan E. Determination of aflatoxin M_1 and ochratoxin A in raw, pasteurized and UHT milk in Turkey. Acta Scientiae Veterinariae. 2019; 47: 1626.
37- Ersali A, Baho-Aldini Baigi F, Ghasemi R. Transmission of aflatoxins from animal feeds to raw and pasteurized milk in Shiraz city and its suburbs. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences. 2009; 17(3): 175-183.

[Downloaded from healthjournal.arums.ac.ir on 2025-04-22]
[DOR: 20.1001.1.23829710.1400.12.4.2.9]
[DOI: 10.52547/j.health.12.4.478]