

## بررسی آفاتوکسین M1 در کشک پاستوریزه توزیع شده در شهر تهران

منصوره امیرپور<sup>۱</sup>، محسن امینی<sup>۲\*</sup>، داریوش خادمی شورمستی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۲/۱۴

## چکیده

**زمینه و هدف:** آفاتوکسین های M1 و M2 متابولیت های ثانویه سمی از کپک ها هستند که هنگام مصرف غذای آلوده به آفاتوکسین B1 و B2 توسط دام، در شیر و محصولات لبنی ظاهر می گردد. با توجه به اهمیت مصرف محصولات لبنی در تغذیه انسان، مطالعه حاضر به منظور بررسی آفاتوکسین M1 (AFM1) در کشک های پاستوریزه (مایع صنعتی) شهر تهران انجام پذیرفت.

**روش بررسی:** ۳۲ نمونه کشک مایع صنعتی (۸ برند و از هر کدام ۴ تاریخ تولید متفاوت) از سوپر مارکت های شهر تهران خریداری شدند و به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و با استفاده از ستون های ایمونوآفینیتی مورد بررسی قرار گرفتند. **یافته ها:** در این مطالعه ۹۰/۶۲٪ کشک ها با میانگین  $75/48 \pm 17/10$  ppt آلوده به AFM1 بودند. در ۲۰/۶۸٪ نمونه ها آلودگی بالاتر از حد مجاز استاندارد ایران (۱۰۰ ppt) بوده است. مقایسه برندهای مختلف نشان داد که برند B با میانگین آلودگی  $158/47 \pm 99/09$  ppt و برند G با میانگین آلودگی  $16/91 \pm 21/27$  ppt، به ترتیب بیشترین و کمترین میزان آلودگی را داشتند. اختلاف میان میزان آلودگی برندها معنی دار نبوده است ( $P > 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** با توجه به وجود آلودگی در بیش از نیمی از نمونه ها و با توجه به اینکه آلودگی به آفاتوکسین ها حتی در مقادیر کم نیز می تواند یک مشکل جدی برای سلامت انسان محسوب گردد لذا کنترل مداوم محصولات لبنی و اقدامات پیشگیرانه از جمله عدم استفاده علوفه کپک زده جهت دام، پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: کشک، آفاتوکسین M1، HPLC، تهران

۱- کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی-علوم و صنایع غذایی، گروه کشاورزی، واحد سوادکوه، دانشگاه آزاد اسلامی، سوادکوه، ایران

۲- معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران  
banafsh.amirpour@yahoo.com

۳- (نویسنده مسئول): دکترای تخصصی شیمی دارویی، گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- دکترای تغذیه دام، گروه کشاورزی، واحد سوادکوه، دانشگاه آزاد اسلامی، سوادکوه، ایران

## مقدمه

شیر و محصولات آن از مهمترین منابع مغذی برای انسان هستند. تحقیقات مستمر انجام گرفته در مورد مصرف محصولات لبنی نشان داده است که ارتباط نزدیک و مستمری بین مصرف این فراورده ها و سطح سلامت افراد جامعه وجود دارد. کیفیت شیر تحت تاثیر عوامل متعددی است که خوراک دام از مهمترین آنهاست، از اینرو استفاده از خوراک دام ناسالم سبب ایجاد اختلال در چرخه سلامت دام، شیر و محصولات لبنی می گردد (۱).

یکی از مشکلات عمده ای که شیر و سایر محصولات لبنی را تهدید می کند آلودگی با میکوتوکسین ها است. میکوتوکسین ها آلاینده های طبیعی و متابولیت های ثانویه سمی از کپک هایی هستند که عمدتاً توسط گونه های خاص مانند آسپرژیلوس، پنی سیلیوم و فوزاریوم تحت شرایط مناسب دما و رطوبت تولید می شوند (۲، ۳). تحت شرایط کنترل نشده در اثر مصرف غذا و علوفه آلوده به میکوتوکسین ها، این سموم به حیوان شیرده و در نتیجه به انسان منتقل می شوند (۲، ۴). آفلاتوکسین ها اصلی ترین گروه از میکوتوکسین ها هستند و توسط کپک هایی مانند آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس نومیوس تولید می شوند (۱، ۲، ۵). این سموم بسیار سمی، سرطان زا، جهش زا و تراژون بوده و همچنین به عنوان عامل هپاتیت کبدی و سرطان مجرای صفراوی خارج کبدی شناخته شده اند (۶).

آفلاتوکسین ها عمدتاً شامل چهار دسته B1, B2, G1, G2 هستند (۲، ۵). در صورت تغذیه دام با علوفه آلوده به آفلاتوکسین B1 (AFB1)، این آفلاتوکسین در بدن حیوان هیدروکسیله و به نوع M1 (AFM1) تبدیل می شود که در شیر و سایر محصولات لبنی یافت می گردد. یکی از مواردی که AFM1 را حائز اهمیت می کند باقیماندن آن در طول فرایندهای سالم سازی حرارتی مانند پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون است (۷-۹). با توجه به اثرات مخرب AFM1 بر بدن انسان و با توجه به سرانه مصرف شیر و سایر محصولات

لبنی، کشورهای مختلف حدود مجاز مختلفی برای AFM1 محصولات لبنی مختلف قرار داده اند. به عنوان مثال حداکثر AFM1 مجاز در انواع شیر خام و حرارت دیده توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (US FDA) و کمیته غذایی کدکس (Codex alimentarius) ۵۰۰ ppt و توسط اتحادیه اروپا (European union)، ۵۰ ppt تعیین شده است (۱۰). در استاندارد ملی ایران بالاترین حد مجاز در خصوص AFM1 انواع شیر خام و حرارت دیده، ماست، دوغ، بستنی، خامه و کشک ۱۰۰ ppt در نظر گرفته شده است (۱۱).

کشک یکی از فراورده های فرعی شیر و یک محصول لبنی خاص در ایران است که با جوشاندن طولانی مدت ماست یا دوغ تهیه می شود. کشک مایع سنتی در کارخانه از رقیق نمودن کشک خشک تولید می شود در حالی که کشک مایع صنعتی به طور مستقیم در کارخانه پس از تبدیل شیر به ماست و سپس تغلیظ آن، افزودن نمک و سایر افزودنی ها و پاستوریزاسیون تولید می شود (۶، ۱۲).

روش های مختلفی جهت شناسایی و اندازه گیری آفلاتوکسین ها در مواد غذایی وجود دارد. کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، کروماتوگرافی گازی (GC) و کیت های ایزا از روش های متداول برای شناسایی و اندازه گیری میزان AFM1 در شیر و سایر محصولات لبنی هستند (۱۳، ۱۴). روش HPLC با توجه به حساسیت بالای دستگاه که قادر به اندازه گیری مقادیر ناچیز است، کارآمدتر و ایده آل تر از سایر روش ها است (۱۴). با توجه به جستجو در منابع علمی در دسترس، تحقیقات بر روی بررسی حضور AFM1 در کشک بسیار نادر است و تنها تحقیق انجام شده توسط Fallah و همکاران در سال ۲۰۱۱ و با روش TLC انجام شده است. لذا هدف از این تحقیق اندازه گیری میزان AFM1 در کشک های پاستوریزه (مایع صنعتی) و مقایسه با حد مجاز اصلاح شده توسط سازمان ملی استاندارد ایران (استاندارد ۵۹۲۵-a) است. در این تحقیق از روش حساس HPLC و شناساگر فلورسانس استفاده شده است که روش دقیق تری نسبت به TLC است.

## مواد و روش ها

## نمونه برداری:

در این مطالعه مقطعی توصیفی تعداد ۳۲ نمونه کشک پاستوریزه مایع صنعتی از کلیه برندهای در دسترس موجود در بازار (۸ برند) و از هر کدام ۴ تاریخ تولید متفاوت) در فاصله زمانی تیر - مهر ۱۳۹۳ از سوپرمارکت های مناطق مختلف شهر تهران خریداری و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه ها حداکثر ۲۴ h بعد از ورود به آزمایشگاه مورد آزمون قرار گرفتند.

## مواد و تجهیزات مورد استفاده:

مواد مورد نیاز شامل متانول، استونیتریل (HPLC Grade)، فسفات هیدروژن دی سدیم بدون آب، فسفات دی هیدروژن پتاسیم، کلرید سدیم، کلرید پتاسیم و محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ M بوده است. کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. استاندارد AFM1 با غلظت ۰/۵ ppm از شرکت سیگما خریداری شد.

برای اندازه گیری AFM1 در نمونه ها از دستگاه HPLC (ساخت شرکت Agilent آمریکا سری ۱۲۰۰ با دکتور فلورسانس) و ستون ZORBAX Eclipse-XDB, C18 (ساخت شرکت Agilent آمریکا استفاده گردید. جهت استخراج AFM1، از ستون ایمونوآفینیتی Aflatest تهیه شده از شرکت VCAM آمریکا استفاده شد. از دستگاه vacuum Manifolds ساخت شرکت Teknokroma کشور اسپانیا جهت سهولت فرایند آماده سازی نمونه با ستون های ایمونوآفینیتی استفاده شد.

## روش کار

آنالیز AFM1 در نمونه ها با استفاده از روش قید شده در استاندارد ملی ایران شماره ۷۱۳۳ همراه با تغییرات جزئی انجام شده است (۱۵). جهت خالص سازی سم از ستون های ایمونوآفینیتی و جهت شناسایی و تعیین مقدار از دستگاه HPLC با دکتور فلورسانس استفاده شده است. ابتدا آزمون های اعتبارسنجی روش مورد استفاده از طریق آلوده سازی عمدی نمونه کشک با AFM1 انجام شد و

شاخص های کارایی روش نظیر محدوده خطی بودن، ضریب همبستگی ( $R^2$ )، صحت، حد تشخیص (LOD) و حد تعیین مقدار (LOQ)، محاسبه گردید. پس از حصول اطمینان در خصوص مناسب بودن روش، آنالیز نمونه های اصلی آغاز شد. استخراج AFM1 از نمونه های کشک:

۵g از نمونه توزین شد. سپس در یک بالن ژوژه با آب مقطر به حجم ۵۰ mL رسانیده شد و به مدت ۳۰ min با ۸۰۰۰ g و در دمای ۴ °C سانتریفیوژ گردید. مایع رویی توسط فیلتر سلولز استات ۴۵ μm / ساخت شرکت Millipore فیلتر شد و ۲۰ mL از محلول فیلتر شده، از ستون ایمونوآفینیتی دارای آنتی بادی های ویژه آفلاتوکسین M1 عبور داده شد. سپس ستون با آب مقطر شسته شد و در نهایت AFM1 موجود در ستون با حلال استونیتریل خارج شده و تغلیظ گردید. سپس ۲۰۰ μL از نمونه جهت تزریق به دستگاه مورد استفاده قرار گرفت.

شرایط کار با دستگاه HPLC به شرح زیر بود:

فاز متحرک: آب - استونیتریل (۷۵:۷۵ v/v)

فاز ساکن: ستون C18 (150 mm×4.6 mm, 5 μm)

حجم محفظه تزریق: ۲۰۰ μL

آشکارساز فلورسانس: طول موج برانگیختگی ۳۶۵ nm و

طول موج نشر ۴۳۵ nm

سرعت جریان (flow rate) ۰/۸ mL/min و در این شرایط

زمان بازداری (Retention Time) ۷-۸ min مشاهده گردید.

## رسم منحنی کالیبراسیون:

استانداردها با غلظت های ۰/۰۱، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ ppb به دستگاه HPLC تزریق شد، سطح زیر منحنی پیک ها بدست آمد و منحنی کالیبراسیون رسم شد و غلظت نمونه های مجهول با استفاده از منحنی کالیبراسیون محاسبه گردید.

## تجزیه و تحلیل آماری:

کلیه داده های به دست آمده، با استفاده از آزمون واریانس (ANNOVA) توسط نرم افزار SPSS 16 تحت ویندوز مورد ارزیابی قرار گرفت. اختلاف آماری در سطح  $P < 0/05$  معنی دار قلمداد گردید. در نهایت داده ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار حاصل از سه بار تکرار گزارش شد.

### یافته ها

بیشترین میزان آلودگی و برند G با میانگین آلودگی ppt ۱۶/۹۱ ± ۲۱/۲۷، کمترین میزان آلودگی را داشتند. اختلاف میان میزان آلودگی برندها معنی دار نبوده است (P > ۰/۰۵) (جدول ۲).  
حد تشخیص (Limit Of Detection یا LOD) ppt ۵/۹ و حد تعیین مقدار (Limit Of Quantification یا LOQ) ppt ۱۸/۰۱ بدست آمده است که نشان دهنده حساسیت خوب روش به کار رفته است.

در این مطالعه AFM1 در ۹۰/۶۲٪ کشک ها مشاهده شد (میانگین ppt ۶۰/۱۷ ± ۷۵/۴۸). محدوده آلودگی ها بین ppt ۳۳۶/۵۸ - ۲/۶ بوده است. ۳۲٪ (۷۹/۳۲) نمونه ها مطابق با استاندارد ملی ایران بوده اند و ۲۰/۶۸٪ (۴۷/۳۲) نمونه ها آلودگی بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی ایران (ppt ۱۰۰) داشته و غیر قابل مصرف بوده اند (جدول ۱). با مقایسه برندهای مختلف، مشاهده شد که برند B با میانگین آلودگی ppt ۱۵۸/۴۷ ± ۹۹/۰۹،

جدول ۱- آلودگی به AFM1 در کشک های مایع صنعتی

میانگین ± انحراف معیار	محدوده آلودگی	نمونه های آلوده (NO, percent)			نمونه های آلوده (تعداد و درصد کل)	تعداد نمونه	نوع کشک
		>۱۰۰	LOQ - ۱۰۰	LOD - LOQ			
۶۰/۱۷ ± ۷۵/۴۸	۶/۲ - ۳۳۶/۵۸	(۶) ۲۰/۶۸%	(۱۸) ۶۲/۰۶%	(۵) ۱۷/۲۴%	(۲۹) ۹۰/۶۲%	۳۲	مایع صنعتی

p-value < ۰/۰۵

جدول ۲- مقایسه میانگین میزان آلودگی برندهای مختلف کشک صنعتی

میانگین ± انحراف معیار	AFM1 (ppt)		نوع برند	ردیف
	محدوده آلودگی	درصد آلودگی		
۴۴/۸۳ ± ۱۵/۱۵	۲۶/۵۲ - ۵۸/۵۰	۱۰۰	A	۱
۹۹/۰۹ ± ۱۵۸/۴۷	۱۰/۳۱ - ۳۳۶/۵۷	۱۰۰	B	۲
۵۳/۲۸ ± ۶۲/۹۸	۱۱/۷۸ - ۱۴۴/۹۳	۷۵	C	۳
۸۲/۱۹ ± ۹۶/۵۷	۲۲/۱۰ - ۱۹۳/۶۰	۱۰۰	D	۴
۹۱/۱۲ ± ۶۷/۹۲	۳۹/۱۰ - ۱۸۶/۴۶	۱۰۰	E	۵
۵۰/۷۷ ± ۷۷/۰۸	۶/۲ - ۱۶۶/۱۴	۱۰۰	F	۶
۲۱/۲۷ ± ۱۶/۹۱	۶/۶۳ - ۳۹/۷۸	۷۵	G	۷
۲۲/۱۰ ± ۲/۰۸	۱۹/۱۵ - ۲۵/۰۵	۷۵	H	۸

p-value > ۰/۰۵

داشتند (۱۹).

تحقیقات khushi و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داد که از ۸۴ نمونه شیر خام جمع آوری شده از شهر لاهور پاکستان، ۸۱٪ نمونه‌ها آلودگی بالاتر از حد مجاز اتحادیه اروپا و آمریکا داشتند (۲۰).

در تحقیقی که توسط Lee و همکاران در سال ۲۰۰۹ در کشور کره بر روی ۱۰۰ نمونه شیر خام انجام شد ۴۸ نمونه آلوده به AFM1 گزارش شد که در هیچ کدام از نمونه‌ها آلودگی بالاتر از حد مجاز استاندارد کره (۵۰ ppt) مشاهده نشد (۲۱).

در تحقیق صورت گرفته در کشور صربستان مشاهده شد که ۹۸٪ انواع شیر گاوخام، پاستوریزه و استریلیزه حاوی AFM1 بوده‌اند و ۸۶٪ آنها آلودگی بیشتر از حد مجاز اتحادیه اروپا (۵۰ ppt) داشتند (۲۲). اگرچه مطالعات مختلفی برای تعیین سطح AFM1 با روش‌های گوناگون در شیر و فرآورده‌های لبنی در دنیا انجام شده است اما تحقیقات در این خصوص بر روی کشک بسیار نادر بوده و تنها تحقیق انجام شده توسط Fallah و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی ۶۴ نمونه کشک صنعتی و ۶۱ مورد کشک سنتی و با روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) انجام شده است. در آن مطالعه نمونه‌برداری از سوپرمارکت‌های شهرهای تبریز، اصفهان، تهران و شیراز انجام گرفت. نتایج حاکی از آن بود که ۵۳٪ نمونه‌های صنعتی و ۳۱٪ نمونه‌های سنتی آلوده به AFM1 بودند که از آن میان ۱۱ مورد از نمونه‌های صنعتی (۱۷٪) و ۱ مورد از نمونه‌های سنتی (۱۶٪) آلودگی بالاتر از حد مجاز استاندارد سابق ایران (۵۰ ppt) داشته‌اند (۶). نتایج پژوهش حاضر در تائید گزارش فوق حضور AFM1 را در کشک‌های صنعتی نشان می‌دهد. در انجام این تحقیق از روش دقیق HPLC و ستون‌های ایمونوفینیتری استفاده شده است که به علت دارا بودن آنتی‌بادی علیه AFM1 از روش‌های مناسب و اختصاصی خالص سازی نمونه است. میزان بازیافت به دست آمده با توجه به استاندارد شماره ۷۱۳۳ و با توجه به غلظت آلودگی عمدی که ۱۰۰ ppt بوده است در محدوده ۱۲۰-۵۰٪ تعیین شده است که درصد بازیافت ۱۰۷٪ در این

تشکیل مایکوتوکسین‌ها از کپک‌ها در غذا یک مشکل جهانی محسوب می‌شود. خطرزا بودن آفلاتوکسین برای سلامتی انسان در اثر مصرف شیر و سایر محصولات لبنی آلوده توسط چندین محقق به اثبات رسیده است (۴). با توجه به اینکه فرایندهای حرارتی نظیر پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون بر کاهش میزان AFM1 بی‌تاثیر است بنابراین سلامت شیر تاثیر مستقیمی بر سلامت سایر محصولات لبنی خواهد داشت (۱۶). شیر، ماست و دوغ که از مواد اولیه تهیه کشک هستند در مطالعات زیادی آلوده به AFM1 گزارش شده‌اند. به عنوان مثال Movasagh و همکار در سال ۱۳۹۱ تعداد ۹۰ شیر خام گاو اطراف شهر تبریز را با روش الیزا مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند که ۱۰۰٪ نمونه‌ها آلوده به AFM1 بودند و از آن میان ۳۷٪ آلودگی بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی ایران (۱۰۰ ppt) داشتند (۱۷). Pournourmhamadi و همکاران در سال ۱۳۸۸ با بررسی شیرهای پاستوریزه استان کرمان به روش HPLC گزارش کردند که تقریباً نیمی از شیرهای مصرفی استان کرمان (۴۴٪) حاوی AFM1 بیشتر از حد مجاز توصیه شده توسط اتحادیه اروپا (۵۰ ppt) بوده‌اند (۱۸). نتایج تحقیق Fallah و همکاران در سال ۲۰۱۱ در خصوص ماست‌های سنتی تهیه شده از شیر بز یا گوسفند و ماست‌های پاستوریزه تهیه شده از شیر گاو نشان داد که ۴۹٪ نمونه‌های صنعتی و ۲۳٪ نمونه‌های سنتی آلوده به AFM1 بودند (۶). Issazadeh و همکاران در سال ۲۰۱۲ ضمن بررسی ۶۰ نمونه ماست محلی استان گیلان به روش الیزا مشاهده کردند که ۹۸٪ نمونه‌ها آلوده به AFM1 بودند که ۶۳٪ از نمونه‌ها آلودگی بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی ایران (۵۰ ppt) داشتند (۴). مطالعه Tabari و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی ۱۱۰ نمونه دوغ سنتی و ۱۱۰ نمونه دوغ پاستوریزه شهر تهران نشان داد که AFM1 در ۷۲٪ دوغ‌های سنتی و ۶۱٪ دوغ‌های پاستوریزه دیده شد و از آن میان ۱۲٪ دوغ‌های سنتی و ۱۰٪ نمونه‌های پاستوریزه آلودگی بالاتر از حد مجاز استاندارد ایران (۵۰ ppt)

### نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این مطالعه بیانگر اینست که میزان آلودگی به AFM1 در اکثر نمونه ها پایین تر از حد مجاز استاندارد ملی ایران بوده و این نمونه ها قابل مصرف بوده اند. ولی با توجه به مضرات آفلاتوکسین ها و اینکه آلودگی به این سموم حتی در مقادیر کم نیز می تواند یک مشکل جدی برای سلامتی انسان محسوب گردد، لذا کنترل مداوم خوراک دام از لحاظ AFB1، کنترل مواد اولیه تهیه کشک مانند شیر، ماست و دوغ و محصول نهایی کشک به جهت عدم حضور AFM1 بسیار مهم است.

### تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه با عنوان "اندازه گیری میزان آفلاتوکسین M1 در کشک های سنتی و صنعتی با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۳ و کد ۲۵۰۵۰۴۰۲۹۳۱۰۲۰ است که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی، خدمات بهداشتی، درمانی تهران اجرا شده است.

### منابع

- 1- Ranjbar S, Noori M, Nazari R. Study of milk aflatoxin M1 and its relationship with feed fungi flora in Markazi Province. *Journal of Cell & Tissue*. 2010;9-18 (in Persian).
- 2- Fallah AA. Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(3):988-91.
- 3- Lee JE, Kwak B-M, Ahn J-H, Jeon T-H. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *Food Control*. 2009;20(2):136-38.
- 4- Issazadeh K, Kazemi Darsanaki R, Majid Khoshkholgh Pahlaviani M. Occurrence of aflatoxin M1 levels in local yogurt samples in Gilan Province, Iran. *Annals of Biological Research*. 2012;3(8):3853-55.
- 5- Fallah AA. Aflatoxin M 1 contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer. *Food Control*. 2010;21(11):1478-81.
- 6- Fallah AA, Rahnama M, Jafari T, Saei-Dehkordi SS. Seasonal variation of aflatoxin M1 contamination in industrial and traditional Iranian dairy products. *Food Control*. 2011;22(10):1653-56.
- 7- Amoli-Diva M, Taherimaslak Z, Allahyari M,

مطالعه نشان دهنده صحت خوب روش آنالیز است. همچنین نتایج حاصل از آنالیز محلول های استاندارد کاری نشان دهنده ارتباط خطی بسیار خوب بین غلظت های مختلف AFM1 و سطح زیر منحنی پیک ها است ( $R^2=0/9999$ ). تحقیق حاضر اولین مطالعه در ایران است که از دستگاه HPLC و ستون های ایمونوآفینیتی به منظور تعیین میزان AFM1 در کشک استفاده نموده است. با توجه به اصلاحیه استاندارد شماره ۵۹۲۵ و تغییر حد مجاز میزان AFM1 در کشک از ۵۰ به ۱۰۰ ppt، این مطالعه اولین تحقیقی است که وضعیت آلودگی کشک ها را نسبت به استاندارد جدید گزارش می کند. غلظت بالای AFM1 مشاهده شده در برخی از نمونه ها می تواند نتیجه کنترل کیفیت ضعیف در طول تولید محصولات لبنی و آلودگی شیر خام اولیه باشد. بنابراین بهبود کنترل کیفیت در طول تولید و توزیع این محصولات، امری بسیار مهم است. در این راستا و با توجه به مناسب بودن روش مورد استفاده در این مطالعه، می توان از آن به عنوان روشی دقیق، آسان و کارآمد جهت تعیین میزان AFM1 در کشک و محصولات لبنی مشابه استفاده نمود.

- Pourghazi K, Manafi MH. Application of dispersive liquid-liquid microextraction coupled with vortex-assisted hydrophobic magnetic nanoparticles based solid-phase extraction for determination of aflatoxin M1 in milk samples by sensitive micelle enhanced spectrofluorimetry. *Talanta*. 2015;134:98-104.
- 8- Cadirci O, Gucukoglu A, Ozpinar N, Terzi G, Alisarli M. Aflatoxin M1 Contamination of Ice-cream in Samsun, Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2011;10(15):2047-50.
- 9- Berg T. How to establish international limits for mycotoxins in food and feed?. *Food Control*. 2003;14(4):219-24.
- 10- El-kest MM, El-Hariri M, Khafaga NI, Refai MK. Studies on contamination of dairy products by aflatoxin M1 and its control by probiotics. *Journal of Global Biosciences*. 2015;4(1):1294-312.
- 11- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Food and feed- mycotoxins - Maximum tolerated level (Amendment No 1). Karaj: Institute of Standards and Industrial Research of Iran; 2010 Aug. Report No.: ISIRI 5925 (in Persian).
- 12- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Industrial liquid kashk specifications )1st Revision(. Karaj: Institute of Standards and Industrial Research of Iran; 2009 Feb. Report No.: ISIRI 6127 (in Persian).
- 13- Nilchian Z, Rahimi E. Aflatoxin M1 in yoghurts, cheese and ice-cream in Shahrekord-Iran. *World Applied Sciences Journal*. 2012;19(5):621-24.
- 14- Pirestani A, Tabatabaei SN, Fazeli MH, Antikchi M, Baabaei M. Comparison of HPLC and ELISA for determination of aflatoxin concentration in the milk and feeds of dairy cattle. *Journal of Research in Agricultural Science*. 2011;7(1):71-78.
- 15- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Milk and milk products- Determination of aflatoxin M1 by HPLC method and immunoaffinity column clean up- Test method )1st Revision(. Karaj: Institute of Standards and Industrial Research of Iran; 2011 Mar. Report No.: ISIRI 7133 (in Persian).
- 16- Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47(5):984-91.
- 17- Movassagh MH, Adinehvand S. Study of aflatoxin M1 level in the collected raw cow milk from milk collection centers in Tabriz. *Journal of Food Hygiene*. 2013;3(10):63-70 (in Persian).
- 18- Pournourmohammad S, Ansari M, Alfata LN, Kazemipour M, Hasibi M. Determination of aflatoxin M1 in pasteurized milk consumed in Kerman Province. *Journal of Kerman University of Medical Sciences*. 2009;16(3):271-80 (in Persian).
- 19- Tabari M, Tabari K, Tabari O. Occurrence of aflatoxin M1 in pasteurized Doogh commercialized in Tehran, Iran. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2011;5(12): 1734-37.
- 20- Muhammad K, Tipu MY, Abbas M, Khan AM, Anjum AA. Monitoring of aflatoxin M1 in market raw milk in Lahore City, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*. 2010;42(6):697-700.
- 21- Lee JE, Kwak B-M, Ahn J-H, Jeon T-H. Occurrence of aflatoxin M1 in raw milk in South Korea using an immunoaffinity column and liquid chromatography. *Food Control*. 2009;20(2):136-38.
- 22- Kos J, Lević J, Đuragić O, Kokić B, Miladinović I. Occurrence and estimation of aflatoxin M1 exposure in milk in Serbia. *Food Control*. 2014;38:41-46.

## **Determination of Aflatoxin M1 in pasteurized Kashk distributed in Tehran Metropolitan**

M. Amirpour<sup>1,2</sup>, M. Amini<sup>2,3\*</sup>, D. Khademi Shurmasti<sup>4</sup>

<sup>1</sup>M.Sc, Agricultural Engineering- Food Sciences and Technology, Department of Agriculture, Savadkooh Branch, Islamic Azad University, Savadkooh, Iran

<sup>2</sup>Food and Drug Administration, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup>Ph.D, pharmaceutical chemistry, Department of pharmaceutical chemistry, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Ph.D, Animal Feed nutrition, Department of Agriculture, Savadkooh Branch, Islamic Azad University, Savadkooh, Iran

Received: 2 March 2015.; Accepted: 4 May 2015

### **ABSTRACT**

**Background & objectives:** Aflatoxin M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> (AFM1 and AFM2) are secondary toxic metabolite of molds excreted into livestock milk and dairy products when animal consume feedstuffs contaminated with AFB1 and AFB2. Considering the importance of taking dairy products in human diet, the present study was carried out to determine AFM1 of pasteurized Kashk (industrial liquid) in Tehran Metropolitan.

**Materials & Methods:** Totally, 32 industrial liquid Kashk samples (eight brands with four different dates of production) were purchased from supermarkets of Tehran and were analyzed using High Performance Liquid chromatography (HPLC) and immunoaffinity columns.

**Results:** In this study, 90.62% of samples (mean: 60.17 ± 75.48 ppt) were contaminated with AFM1. The concentration of AFM1 in 20.68% of samples were higher than Iranian national standard limits (100 ppt). Comparison of different brands showed that brand B with the mean 99.09 ± 158.47 ppt and brand G with the mean 21.27 ± 16.91 ppt had the highest and lowest level of contamination respectively, however, the difference was not statistically significant ( $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** Considering contamination of more than half of the samples with AFM1 and the point that even low level of aflatoxin can be a serious problem for human health, therefore, continuous control of dairy products and preventive proceedings such as avoidance of using moldy feedstuffs for livestock is suggested.

**Keywords:** Kashk, Aflatoxin M1, HPLC, Tehran

---

\*Corresponding Author: [banafsh.amirpour@yahoo.com](mailto:banafsh.amirpour@yahoo.com)

Tel: +98 912 2182581