

جستجو و تعیین میزان ملامین در شیر خشک نوزادان به روش الیزا

امیر شاکریان^{۱*}، گلی صوابی اصفهانی^۲

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، شهرکرد، ایران.
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده کشاورزی، دانش آموخته مهندسی علوم و صنایع غذایی، شهرکرد، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات: amshakerian@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۰/۱۲/۱۲ پذیرش نهایی: ۹۱/۷/۸)

چکیده

در سال ۱۳۹۱ تعداد ۳۶ نمونه شیر خشک نوزادان با نشان‌های تجاری مختلف و تاریخ‌های تولید متفاوت از نقاط مختلف شهر اصفهان خریداری شد و با استفاده از روش غربال‌گری ELISA جستجو و میزان ملامین در انواع شیر خشک نوزادان تعیین شد. بر اساس نتایج آزمایش، در هیچ کدام از نمونه‌های شیر خشک نوزادان مقادیر بالاتر از حد تشخیص کیت ($10 \mu\text{g/L}$) مشاهده نگردید. با توجه به نتایج به دست آمده در این بررسی، مصرف شیر خشک‌های نوزادان موجود در بازار اصفهان در سال جاری خطری از نظر آلودگی ملامین برای سلامتی نوزادان ندارد.

واژه‌های کلیدی: ملامین، شیر خشک نوزادان، الیزا

مقدمه

چسب مایع، ظروف غذا و ساختار قفسه‌ها به کار می‌رود (Dobson et al., 2008). درصد بالای نیتروژن موجب سوء استفاده از این ماده شیمیایی را فراهم آورده است، زیرا این مقدار نیتروژن خواص تجزیه‌ای مولکول‌های پروتئین را به این ماده می‌بخشد، در نتیجه افزایش ملامین به مواد غذایی از جمله شیر و فرآورده‌های آن به خصوص شیر خشک، سبب افزایش مقدار نیتروژن می‌شود. لذا مقدار پروتئین شیر به صورت کاذب بیشتر از مقدار واقعی آن استنباط

ملامین یک ماده شیمیایی آلی با فرمول $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_6$ و به شکل پودر کریستالی سفید رنگ است که به مقدار بسیار کمی در آب محلول می‌باشد و به صورت بلورهای پر از نیتروژن یافت می‌شود ملامین در واقع یک ترکیب با پایه آلی است با اسکلت ۱ و ۳ و ۵ تریازین-۲ و ۴ و ۶ تریامین که ۶۶٪ وزنی آن را نیتروژن تشکیل می‌دهد (Yin et al., 2010). این ماده به طور گسترده‌ای در تولید رزین‌های پلیمری، پلاستیک،

وقت گیر و نیاز به آزمایشگاه‌های بسیار مجهز می‌باشد. روش ایمنواسی که بر پایه واکنش آنتی ژن-آنتی بادی می‌باشد یک روش غربال‌گری بوده که از دقت و حساسیت بالایی برخوردار بوده و در مدت زمان کوتاهی با کمترین هزینه قادر به تعیین میزان ملامین در انواع مواد غذایی می‌باشد (Yin et al., 2010; Lei et al., 2010; Li et al., 2011; wang et al., 2011). از آنجائیکه اطلاعات اندکی در خصوص تعیین میزان ملامین در انواع شیر خشک نوزادان در ایران وجود دارد لذا در این بررسی به تعیین میزان ملامین در انواع شیر خشک‌های نوزادان موجود در فروشگاه‌ها و داروخانه‌های شهر اصفهان به روش الایزا پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آور نمونه‌ها

در این بررسی تعداد ۳۶ نمونه شیر خشک نوزادان با نشان‌های تجاری و تاریخ‌های مختلف تولید موجود در سطح داروخانه‌های اصفهان و شیر خشک‌های نوزادان تهیه شده از بیمارستان شهید بهشتی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مراکز بهزیستی استان اصفهان در تابستان ۱۳۹۰ خریداری گردید و به مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شد. در آزمایشگاه با استفاده از کیت الایزا (Melamine Elisa kit) ساخت کشور آمریکا، مورد آزمایش قرار گرفتند (جدول ۱). نمونه‌ها با محلول موجود در کیت به نام (LOT 11H7959) (Melamine extraction) مخلوط گردید و سوسپانسیون تهیه شد. سپس نمونه‌ها به میزان ۱ میلی لیتر به میکروتیوپ‌ها منتقل گردیدند و به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند، سپس محلول رقیق‌سازی به گوده‌ها

می‌شود. متأسفانه ملامین خورده شده در بدن تجمع می‌یابد. ملامین غالباً با اسید سیانوریک ترکیب می‌شود، اسید سیانوریک یک ناخالصی است که به صورت طبیعی در ملامین وجود دارد. زمانی که این مواد به داخل جریان خون راه یابند ملامین و سیانورات با هم تجمع می‌یابند و با میکروتیوپ‌های کلیوی واکنش داده که در اثر آن تعداد زیادی کریستال کروی زرد رنگ تشکیل می‌شود، این کریستال‌ها به سلول‌های کلیه و مجاری آن آسیب می‌رسانند، از آنجا که ملامین به خودی خود متابولیزه نمی‌شود و نیمه عمر کوتاهی دارد احتمالاً ترکیب آن با اسید سیانوریک باعث کریستالیزاسیون و تشکیل سنگ کلیه و مجاری ادراری در انسان و دام به خصوص سگ و گربه می‌گردد. این سنگ‌ها قادرند هر قسمت از مجاری را با انسداد مواجه سازند. در نتیجه دردهایی در ناحیه شکم و آسیب به سلول‌های کلیوی ایجاد می‌شود. خوردن ملامین ممکن است باعث آسیب به اندام‌های تولید مثلی و ایجاد سنگ کلیه یا مثانه نماید که به نوبه خود باعث سرطان مثانه می‌شود (Brown et al., 2007; Hau et al., 2009; Tran et al., 2010; Puschner et al., 2007).

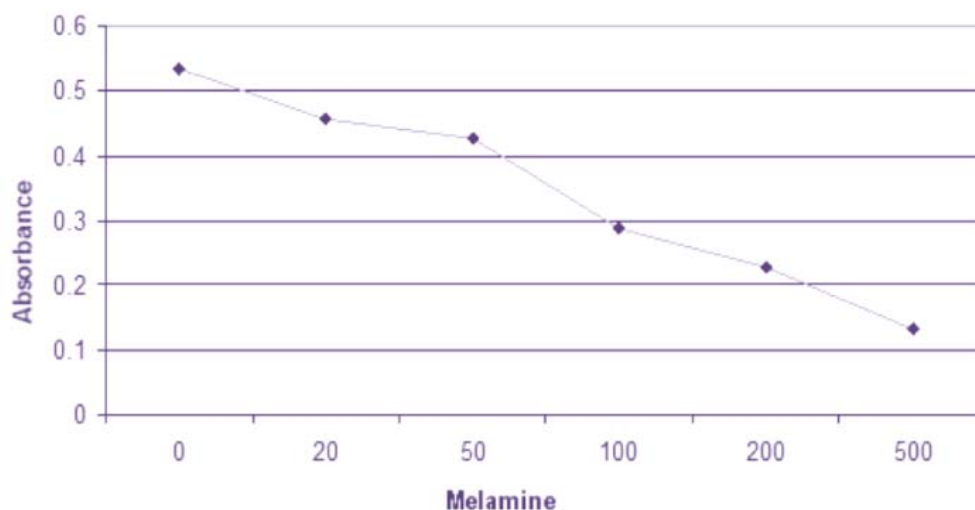
حد مجاز مصرف ملامین در شیر خشک نوزادان بر اساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی و کدکس بین‌المللی در سال ۲۰۱۱ برابر با ۱ میلی گرم بر کیلوگرم و در سایر مواد غذایی برابر با ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم می‌باشد (WHO, 2011). چندین روش دستگامی برای اندازه‌گیری میزان ملامین در مواد غذایی توسط محققین مختلف گزارش شده است از جمله روش‌های کروماتوگرافی با کارایی بالا، الکتروفورز، حس‌گرها و روش اسپکتروسکوپی می‌باشد؛ البته این روش‌ها از دقت خوبی برخوردار هستند ولی بسیار گران قیمت،

تأثیر خود را اعمال کند. پس از این مرحله با استفاده از محلول بافر عمل شستشو صورت گرفت. سپس سوپسترا را اضافه نموده تا با آنزیم وارد واکنش گردد و ترکیب رنگی را بوجود آورد. جهت این کار طبق دستورالعمل کیت به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. پس از این مدت، محلول متوقف کننده (stop solution) اضافه گردید تا واکنش متوقف گردد. در نهایت نوار حاوی گوده‌ها به دستگاه الیزا منتقل و میزان جذب در ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید.

اضافه گردید. آنگاه از میکروتیوپ تهیه شده به تعداد ۲ تکرار داخل پلیت اضافه شد که ۱۲ گوده اولی توسط استانداردهای ($20 \mu\text{g/L}$ ، 50 ، 100 ، 200 و 500) موجود در کیت (تصویر ۱) و بقیه توسط ۳۶ نمونه شیر خشک نوزادان تهیه شده با نشان‌های تجاری و تاریخ‌های مختلف پر گردید. پس از این مرحله محلول کونژوگه حاوی آنزیم به میزان ۵۰ میلی لیتر به نمونه‌ها اضافه گردید؛ در این مرحله پس از اضافه کردن آنزیم، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده و زمان لازم به آنزیم داده شد تا در صورت عدم وجود ملامین

جدول ۱: کنترل کیفی کیت اندازه‌گیری ملامین در شیر خشک نوزادان

ویژگی (Specificity)	ضریب همبستگی (Coefficients of Variation)	حد تشخیص کیت (Limit of Detection)	ترکیب
٪۹۰	< ٪۱۵	۱۰ $\mu\text{g/L}$	ملامین



نمودار ۱: منحنی کالیبراسیون کیت اندازه‌گیری ملامین بر حسب $\mu\text{g/L}$ به روش الیزا در شیر خشک نوزادان

یافته‌ها

براساس آزمایش‌های انجام شده طبق دستور العمل کیت الایزا، در هیچ کدام از نمونه‌های شیر خشک نوزادان ارسالی به آزمایشگاه مقادیر بالاتر از حد تشخیص کیت که برابر با $10 \mu\text{g/L}$ می باشد، مشاهده نگردید.

بحث و نتیجه‌گیری

طی بررسی‌های متعدد متعاقب آلوده شدن هزاران نوزاد چینی از طریق شیر خشک آلوده به ملامین نگرانی شدیدی در کشورهای مختلف ایجاد گردید، که این امر آنها را ملزم به آزمایش و کنترل شیر خشک‌های نوزادان وارداتی کشورشان نمود.

از آنجایی که شیر خشک، غذای مصرفی کودکان بوده و اطمینان از سلامت غذایی نوزاد مورد توجه بسیار می‌باشد، در نتیجه تشخیص وجود ملامین و تعیین میزان آن در شیر خشک‌های موجود در بازار کشورهای مختلف و همچنین ایران بسیار حائز اهمیت می باشد. در بررسی حاضر و تحقیق انجام شده در هیچ کدام از نمونه‌های شیرخشک نوزادان موجود در داروخانه‌ها و مراکز بهزیستی شهر اصفهان در تابستان ۱۳۹۰، نمونه مثبت به ملامین مشاهده نشد که با نتایج یک سری از محققین کمی اختلاف مشاهده می‌شود ولی با نتایج چندی از محققین مطابقت دارد.

در بررسی که Jorma در سال ۲۰۰۹ به روش الایزا میزان ملامین را در فرآورده‌های شیر مورد تحقیق قرار داد، میزان آن کمتر از حد تشخیص بود. همچنین Lie و همکاران در سال ۲۰۱۱ در کشور چین به بررسی فرآورده‌های شیر با استفاده از روش الایزا پرداختند که

مقادیر به دست آمده کمتر از حد تشخیص دستگاه بود. در بررسی Ruicheng و همکاران در سال ۲۰۰۹ از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جهت تعیین میزان ملامین در انواع شیر استفاده کردند که میزان ملامین کمتر از حد مجاز گزارش گردید.

Braekevelt و همکاران در سال ۲۰۱۱ در کانادا به روش اسپکترومتری جرمی و کروماتوگرافی مایع میزان ملامین و سیانوریک اسید در همه نمونه‌های تغذیه‌ای کودکان تشخیص داده شدند که بیشترین غلظت نمونه 0.32 mg/kg بوده است. Sheryl در سال ۲۰۱۰ نیز در کانادا فرآورده‌های شیر بر پایه سویا را به روش LC-MS/MS مورد بررسی قرارداد که در برخی نمونه‌ها ملامین تشخیص داده شد. Goscinnny و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ در بلژیک به بررسی میزان ملامین به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) در فرآورده‌های نانویی و شیر پرداخته بودند که ملامین تشخیص داده شده در فرآورده‌های شیر 0.84 mg/kg و فرآورده‌های آرد 0.88 mg/kg بود (Goscinnny et al., 2010). Yu و همکاران در سال ۲۰۱۰ به روش کروماتوگرافی مایع به بررسی میزان ملامین در ماهیچه و کبد گاو و گوسفند و همچنین شیر خشک پرداختند که در این روش نیز میزان متفاوتی ملامین گزارش شد (Yu et al., 2010). Chi Chen و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی تعیین ملامین به روش مادون قرمز در شیر خشک پرداختند که 1 ppm ملامین در شیر خشک نوزاد تشخیص داده شد (Chi Chen et al., 2010).

Braekevelt در سال ۲۰۱۱ به روش رقیق‌سازی ایزوتوپ بر پایه اسپکترومتری جرمی و کروماتوگرافی مایع جهت آنالیز ملامین ترکیبات تریازین اشاره می‌کند.

در بافت‌های مرغ کاهش یافته و پس از ۷ روز خروج کامل ملامین صورت می‌گیرد (Zongyi et al., 2010). به طور کلی علت این اختلاف‌ها به دلایل متعددی می‌باشد که از جمله تعداد نمونه‌ها، نوع نمونه، روش انجام آزمایش، دقت انجام آزمایش، نوع دستگاه سنجش ملامین از طرف دیگر احتمالاً به دلیل مشکلات ایجاد شده شاید در شیر خشک‌های نوزادان تولیدی در سال جاری دقت بیشتری از سوی کارخانه‌ها شده و این ماده دیگر اضافه نمی‌شود. قابل ذکر است که طبق گزارش‌های تعداد زیادی از محققین در سراسر دنیا استفاده از روش الایزا و کیت رنگی به دلیل دقت و حساسیت بالا و هزینه‌های کمتر به عنوان یک روش غربال‌گری مورد استفاده زیادی در سراسر دنیا قرار گرفته است. همچنین در چندین مطالعه دقت و حساسیت روش الایزا و سپس با استفاده از روش دستگاهی از جمله HPLC و G.C و I.CP مورد تأیید قرار گرفته است (WHO, 2011; Yin et al., 2010; Li et al., 2011). با توجه به نتایج این پژوهش پیشنهاد می‌گردد که آزمایش‌ها به صورت مداوم و دوره‌ای در شیر خشک‌هایی با نشان‌های تجاری مختلف (این آزمایش در مبادی ورودی شیر خشک و کنترل وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی قبل از توزیع آن در سراسر کشور) انجام گیرد، همچنین استاندارد میزان ملامین در سایر مواد غذایی توسط موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تهیه و تدوین گردد.

با این روش علاوه بر ملامین، آملین، آملید و اسید سیانوریک نیز در انواع شیر خشک نوزادان خریداری شده از کانادا در سال ۲۰۰۸ اندازه‌گیری شدند تا به صورت ترکیبی مورد بررسی قرار گرفته و ارزیابی خطر انجام شود. تقریباً در همه محصولات تغذیه‌ای کودکان، ملامین و سیانوریک اسید تشخیص داده شدند. بیشترین غلظت مشاهده شده ملامین 0.32 mg/kg و سیانوریک اسید 0.45 mg/kg بود (Braekevelt et al., 2011). Yu و همکاران در سال ۲۰۱۰ در هنگ کنگ به بررسی ترکیبات خارج شده از کلیه پس از مصرف ملامین با دوز پایین در کودکان هنگ کنگی پرداختند. طبق نتایج تأیید شده یک کودک سنگ کلیه داشت، هفت بچه نیز مشکوک به وجود رسوب‌های کلیوی بودند و ۲۰۸ کودک (۶/۶ درصد) در ادرار خود خون داشتند. نسبتی از این بچه‌ها در مرکز ارزیابی خاص پیگیری شدند اما تنها ۷/۴ درصد که خون مثبت داشتند با میکروسکوپ نیز مورد تأیید قرار گرفت که نشان دهنده شیوع کلی کمتر از ۱ درصد برای هماتوریای (خون در ادرار) میکروسکوپی بود (Yu et al., 2010). Zongyi و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی میزان ملامین به روش‌های الایزا و طیف‌سنجی در بافت و بدن حیوانات پرداختند. در این بررسی به تشخیص ملامین باقی مانده در گوشت خوک و بافت‌های مرغ پرداختند. این بررسی نشان می‌دهد که میزان سوخت و ساز ملامین در بدن حیوان بسیار سریع و غلظت ملامین

منابع

- Braekevelt, E., Lau, B. and Feng, S. (2011). Determination of melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid in infant formula purchased in Canada by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, 28: 698-704.
- Brown, C.A., Jeong, K.S., Poppenga, R.H., Puschner, B., Miller, D.M., Ellis, A.E., Kang, K.I., Sum, S., Cistola, A.M. and Brown, S.A. (2007). Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19: 525-531.
- Chi Chen, W., San-Yuan, W. and Hsin-Ping, L. (2010). Identification of Melamine/Cyanuric Acid-Containing Nephrolithiasis by Infrared Spectroscopy. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 24: 92-99.
- Dobson, R.L., Motlagh, S., Quijano, M., Cambron, R.T., Baker, T.R., Pullen, A.M., Regg, B.T., Bigalow-Kern, A.S., Vennard, T., Fix, A., Reimschuessel, R., Overmann, G., Shan, Y. and Daston, G.P. (2008). Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs. *Toxicological Sciences*, 106(1): 251-262.
- Gosciny, S., Hanot, V., Halbardier, J.F., Michelet, J.Y. and Van Loco, J. (2010). Rapid analysis of melamine residue in milk, milk products, bakery goods and flour by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry: from food crisis to accreditation. *Food Control*, 22: 226-230.
- Hau, K.C., Kwan, T.H. and Li, P.K. (2009). Melamine Toxicity and the Kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20: 245-250.
- Jorma, L. (2009). The detection of melamine in milk products. *Food Contamination*, 42: 22-25.
- Lei, H., Shen, Y., Song, L., Yang, J., Chevallier, O.P., Haughey, S.A., Wang, H., Sun, Y. and Elliott, C.T. (2010). Hapten synthesis and antibody production for the development of a melamine immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, 665(1):84-90.
- Li, X., Luo, P., Tang, S., Beier, R.C., Wu, X., Yang, L., Li, Y. and Xiao, X. (2011). Development of an immunochromatographic strip test for rapid detection of melamine in raw milk, milk products and animal feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11): 6064-6070.
- Puschner, B., Poppenga, R.H., Lowenstine, L.J., Filigenzi, M.S. and Pesavento, P.A. (2007). Assessment of melamine and cyanuric acid toxicity in cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(6): 616-624.
- Ruicheng, W., Ran, W. and Qingfei, Z. (2009). High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Cyromazine and Melamine Residues in Milk and Pork. *Chromatographic Science*, 47: 581-584.
- Sheryl, A., Benjamin, P. and Lay, Y. (2010). Baseline levels of melamine in food items sold in Canada. Dairy products and soy-based dairy replacement products. *Food Additives and Contaminants*, 3: 135-139.
- Tran, B.N., Okoniewski, R., Storm, R., Jansing, R. and Aldous, K.M. (2010). Use of methanol for the efficient extraction and analysis of melamine and cyanuric acid residues in dairy products and pet foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 101-107.
- Wang, Q., Haughey, S.A., Sun, Y.M., Eremin, S.A., Li, H.L., Xu, Z.L., Shen, Y.D. and Lei, H.T. (2011). Development of a fluorescence polarization immunoassay for the detection of melamine in milk and milk powder. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(6): 2275-2284.
- World Health Organization. (2011). International experts limit melamine levels in food: New guidance to help improve food safety provided by UN food standards commission. 20100706.
- Yin, W., Liu, J., Zhang, T., Li, W., Liu, W., Meng, M., He, F., Wan, Y., Feng, C., Wang, S., Lu, X. and Xi, R. (2010). Preparation of monoclonal antibody for melamine and development of an indirect competitive ELISA for melamine detection in raw milk, milk powder, and animal feeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14): 8152-8157.

-
- Yu, H., Tao, Y., Chen, D., Wang, Y., Liu, Z., Pan, Y., Huang, L., Peng, D., Dai, M., Liu, Z. and Yuan, Z. (2010). Development of a high performance liquid chromatography method and liquid chromatography tandem mass spectrometry method with pressurized liquid extraction for simultaneous quantification and confirmation of cyromazine, melamine and its metabolites in foods of animal origin. *Analytica Chemical Acta*, 682(1-2): 48-58.
 - Zongyi, W., Liying, Z., Wenjun, Y. and Limin, G. (2010). Screening and determination of melamine residues in tissue and body fluid samples. *Analytica Chimica Acta*, 662: 69-70.

Detection and determination of Melamine in infant formula by ELISA method

Shakerian, A.^{1*}, Savabi Esfahani, G.²

1- Associate Professor of Food Hygiene Department, Faculty of Veterinary Medicine, Shahre Kord Branch, Islamic Azad University, Shahre Kord, Iran.

2- Graduated of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shahre Kord Branch, Islamic Azad University, Shahre Kord, Iran.

*Corresponding author email: amshakerian@yahoo.com

(Received: 2012/3/2 Accepted: 2012/9/29)

Abstract

Thirty-six samples of infant formula with different production dates and various brands were purchased from Isfahan city during 2012. The samples were assayed for the presence and quantity of melamine by ELISA screening method. According to the results, in any infant formula melamine contamination was observed above the detection limit of the kit (10 µg/L). Therefore, it was concluded that the infant formula at Isfahan retail is not considered a health hazard from the melamine contamination point of view.

Key words: Melamine, Infant formula, ELISA.