تعیین اعتبارکروماتوگرافیHPLC برای اندازه گیری آفلاتوکسین M1 در شیر

دکتر مهرداد تاج کریمی[۱]*، دکتر گیتی کریم[۲]، دکتر فریبرز علی آبادی[۳]

چکیده

براي انجام صحيح و قابل اعتماد يك آزمون مربوط به تعيين كمي ميزان آلاينده هاي شيميائي موجود دريك ماده غذائي، نياز به انجام مراحلي است كه به اين مراحل تعيين اعتبار آزمايشگاهي گويند و در آن كار صحت، دقت، تكرار پذيري و تكثير پذيري آزمون كمي مورد بررسي قرار مي گيرد. در اين مقاله به مراحل تعيين اعتبار روش HPLC براي انجام آزمون تعيين باقيمانده آفلاتوكسينM1 در شير، پرداخته شده است.

بازيافت آزمون بر اساس درصد در بيش از ده مرحله آزمون در ميزان شناسائي غلظت ۰/۵ PPb، ميانگين۶۸/۸۰۷۳، انحراف معيار۷/۵۹۱۰۱۷ و ضريب همبستگي۱۱/۰۳۲۲۸ بوده است. ميزان درصد بازيافت در حدود شناسائي ۰/۰۵ ppb ميانگين۸۱/۵۸۱۴۳، انحراف معيار۲۰/۵۲۲۶۱و ضريب همبستگي ۲۵/۱۵۵۹۸ بوده است. علاوه بر آن انجام آزمون مرجع بين المللي در چهار مرحله انجام آزمون با مقدار آلوده شده۰/۲۶ و حدود قابل پذيرش ۰/۱۵ تا ۰/۳۸ بترتيب مقادير ۰/۲۹۳، ۰/۲۹۸، ۰/۲۸۳، ۰/۲۷۸ با ميانگين ۰/۲۸۸ و انحراف معيار ۰/۰۰۹۱۲ و ضريب همبستگي ۳/۱۶۹۶۹۱ بوده است. نتايج مشاركت اين آزمون در آزمون بين المللي آزمايشگاهي Food Analysis Performance) (Assessment Scheme در ميان ۶۵ آزمايشگاه شركت كننده در طرح آزمون يكي از۱۰ آزمايشگاه داراي قابليت تعيين دقيق مقدار آلودگي بوده است.

واژه های کلیدی:*آفلاتوکسین M1 ، شیر ،تعیین اعتبار روش ،کروماتوگرافی مایع*

مقدمه

انواع زیادی از غلات به ویژه ذرت، در مزرعه و بعد از ذخیره سازی در انبار، نسبت به هجوم قارچ ها حساس می باشند. این قارچ ها می توانند مایکوتوکسین ها را بعنوان متابولیت ثانویه خود ایجاد نمایند. آفلاتوکسین M1 از هیدروکسیله شدن یکی از متابولیت های ثانویه قارچی به نام آفلاتوکسین B1 تولید می گردد(۸و۳ و۱).اندازه گیری اجزای آلاینده مواد غذائی تا حد بسیار زیادی وابسته به نحوه انجام آزمون های شیمیائی می باشد و بر اساس نوع آلاینده و قابلیت یافت و شناسائی این مواد با استفاده از فن آوری های پیش رفته ،روش های آماری و نیز محاسبات عدم قطعیت با استفاده از روش های استاندارد انجام آزمون ، صورت می پذیرد (۷و۳و۱).

Determination of validity of HPLC(High performance Liquid Chromatography) for the measurement of Aflatoxin M1 in milk

Tajkarimi. M[1], Karim. G[2], Aliabadi. F[3]

1-Graduated of Food Hygine,Islamic Azad University,Science & Research Branch,Tehran,Iran
2-Department of Food Hygine,Faculty of Specialised Veterinary Sciences, Islamic Azad University,Science & Research Branch,Tehran,Iran
3- Marjaane khatam Laboratory,Tehran,Iran

Validity of the toxic chemical substances analysis in the food, milk and milk products are largely depend on the analysis operating system , that is laboratory method validity. In such procedures precision, accuracy, repeatability and reproduceability are investigated.Aflatoxin M1 is one of the toxic and carcinogenic substances, which may find in milk and milk products. In this study, the results with assigned value of 0.5 ppb were 68.8073± 7.591017and Coefficient variations of 11.03228.In fourteen experiments with the respect of 0.05 as adiagnostic concentration, the results were 81.5 ± 20.52261 and coefficient variant of 25.15598.The results of Certified Reference material (CRM) for the detection of Aflatoxin M1 with assigned Value of 0.26 (µg/kg) and satisfactory Range of 0.15 - 0.38 in four steps were: 0.293, 0.298, 0.283 and 0.278 respectively.The mean and variation coefficient were 0.29± 0.009 and 3.17 respectively.The inter-laboratory testing results showed that among 65 analytical laboratories with different method of analysis and System operating procedures, our analysis results was one of the ten laboratories, which had accurate analysis.

Key word: *Aflatoxin M1, Milk, Method validation, HPLC*

۱-دانش آموخته دوره تخصصي بهداشت مواد غذائي،دانشگاه آزاد اسلامي واحد علوم و تحقيقات
۲-گروه بهداشت مواد غذائی،دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات ،تهران ،ایران
۳- آزمایشگاه مرجعان خاتم

بر همین اساس کمیسیون تخصصی اتحادیه اروپا استاندارد آزمون شیمیائی برای تضمین کیفیت آنالیز مایکو توکسینها را تدوین و اعلام نموده است (١٤و٤و٢).

در این استاندارد انجام مراحل تضمین کیفی روش آزمایشگاهی برای شناسائی مقادیر بین یک تا پانزده میکرو گرم در کیلو گرم از ماده غذائی از درصد بازیافت ۷۰ تا۱۱۰ درصد پیروی می شود(جدول ۱).

جدول ۱-نیازمندی های خاص مورد نظر برای روشهای تجزیه ای اندازه گیری آفلاتوکسین

ضوابط	حدود غلظت	مقدار توصیه شده برای انحراف معیار(درصد)	مقدار حداکثر مجاز
نمونه های بلانک	تمامی	اندک	-
در صد بازیافت در آفلاتوکسین تام	۱-۱۵ میکرو گرم در کیلو	۷۰ تا ۱۱۰	-
در صد بازیافت در آفلاتوکسین تام	بیش از ۱۵ میکرو گرم در کیلو	۸۰ تا ۱۱۰	
انحراف معیار دقت RSDR	تمامی	بر اساس معادله هورویتز	دو برابر مقدار معادله هورویتز

یکی از روش های موجود برای اندازه گیری آفلاتوکسین M1 در شیر و فرآورده های آن روش HPLC(High Performance Liquid Chromatography) می باشد. در اغلب این روش ها ، از روش فاز معکوس برای اندازه گیری، استفاده می شود. تعداد زیادی از این روش ها برای اندازه گیری در برنامه های پایش کاربرد دارند (۷ و ٦). استفاده از این سیستم در شناسائی آفلاتوکسین M1، تا حد زیادی جایگزین LC(Thin layer chromatography) گردیده است. با توجه به این موضوع، روش HPLC را جهت این مطالعه انتخاب گردید.

تحول دیگری که در سالهای اخیر شاهد آن بوده ایم، ایجاد تغییرات گسترده در زمینه ارتقاء دقت آزمون مربوط به اندازه گیری مایکوتوکسین ها از طریق کاربرد ستون های ایمونو افینیتی با استفاده از مونو کلونال آنتی‌بادی است.استفاده از ستون های دارای آنتی بادی در سالهای اخیر، دستخوش تحولات بسیار زیادی گردیده است.

از جمله مهمترین این تحولات می توان به کاربرد ستون های ایمونو افینیتی برای تخلیص و جداسازی هر چه بیشتر مایکو توکسین ها از مواد غذائی و مایعات بیولوژیک به ویژه آفلاتوکسین ها، اوکراتوکسین **A** و فامینوسین اشاره نمود (۱۵و۱٤و ۵).

این ستون ها برای اتصال آنتی بادیهای اختصاصی مایکو توکسین ها در یک فاز جامد اختصاصی و متصل نمودن ماده مورد آزمایش با محلول بافر درون هر پلیت آنتی بادی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۷).

مایکو توکسین ها با آنتی بادی مربوط، اتصال برقرار نموده و ناخالصی های دیگر در این روش از آنها جدا می شوند و در مرحله بعدی آفلاتوکسین ها توسط یک حلال مانند متانول مجدداً جذب می گردند(نگاره۱).

استفاده از روش کاربرد ستون های فوق که روش عمل شده در این تحقیق می باشد، در استاندارد Association) AOAC (of Official Analytical Chemists، بنام روش تخلیص ستونی با استفاده از کروماتوگرافی مایع برای شناسائی آفلاتوکسین در شیر مایع تعریف شده است (۱۰و۹).

این ستون ها بصورت تجارتی برای جداسازی آفلاتوکسین، اوکراتوکسین A، فامینوسین، زیرالنون و داکسی نیوالنول در دسترس می باشد. در مورد مراحل مربوط به انجام تعیین اعتبار نیاز به تعیین قابلیت دقت و نیز صحت سیستم آزمایشگاهی در حدود قابل قبول بین المللی وجود دارد.

بر اساس اصول و مبانی صحه گذاری روش های آزمون موجود در منابع معتبر از جمله اتحادیه اروپا، میزان انحراف از مقادیر ارائه شده می تواند از منفی۵۰ ٪ تا مثبت۲۰ ٪ در مورد مقادیر کمتر از ۱ میکروگرم در کیلوگرم و از منفی۳۰٪ تا مثبت ۱۰٪ در مقادیر بیشتر از یک میکروگرم در هرکیلوگرم تغییر کند. روش کار و تعیین این مقادیر را می

توان با استفاده از آزمونهای مربوط به درصد بازیافت انجام داد (۸ و٦).

از جمله موارد مورد تاکید در مورد تعیین میزان دقت، در صد ضریب همبستگی مربوط به تکرار پذیری آزمون ها و یا Coefficient Variation می باشد.

حدود مقادیر قابل قبول برای محاسبه ضریب همبستگی در مقادیر مختلف بازیافت مربوط به اندازه گیری آلاینده ها به شرح ذیل می باشد(۹).

محتوا	CV
مقادیر کمتر از ۱ میکروگرم در کیلوگرم	٪۳۵
مقادیر بیش از ۱ و کمتر از ۱۰ میکروگرم	٪۳۰
مقادیر بیش از ۱۰ و کمتر از ۱۰۰ میکروگرم	٪۲۰
مقادیر بیش از ۱۰۰ میکروگرم	٪۱۵

در مطالعه انجام شده توسط Markaki و Melissari با استفاده از هر دو سیستم ELISA و HPLC، میزان درصد بازیافت در مقادیر نقطه گذاری مابین ۵ تا ۵۰۰ پیکوگرم در میلی لیتر، مابین ۸۸ تا۵ /۱۰٦ درصد برای شیر پاستوریزه و ۸۷تا ۹۳ درصد برای ماست بدست آمده است.

حد تشخیص برای الایزا در این مطالعه ۲ پیکوگرم در میلی لیتر و برای HPLC ، ۱۰ پیکوگرم در میلی لیتر ارزیابی گردیده است. بر اساس نتایج این مطالعه، اعداد مشاهده شده در هردو روش برای شناسائی میزان آفلاتوکسین M1 ، دارای ارتباط زیادی می باشند(r2=0.97830) (۱۵و ١٤).

با توجه به مشکل بودن و در برخی موارد غیر قابل انجام بودن کالیبراسیون و تعیین عدم قطعیت سیستم های آزمایشگاهی و بنا بر الزامات فنی اشاره شده در اجرای سیستم ISO17025، در مواقع نیاز به استفاده از کالیبراسیون می توان از آزمون های بین آزمایشگاهی مانند FAPAS علاوه براستفاده صحیح و قانون مند از سیستم تعیین اعتبار بعنوان جایگزینی مناسب استفاده کرد (۱۳و ۱۲و۱۱).

مواد و روش کار

برای انجام آزمون روی نمونه ها ابتدا ۱۲/۵ میلی لیتر از شیر مایع را به لوله مناسب آزمایش منتقل و سپس نمونه ها در سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه و دو بار متوالی سانتریفوژ شدند.

سپس لایه چربی را از روی شیر جدا نموده و از شیر بدون چربی حاصل برای انجام مراحل بعدی آزمایش استفاده شد.

در مرحله بعدی ابتدا ۲۰ میلی لیتر از محلول PBS بطور کامل از ستون ایمونو افینیتی آفلاتوکسین M1 عبور داده شده و سپس ۲۰ میلی لیتر از شیر بدون چربی حاصل از ستون عبور داده شده و محلول حاصل از این ستون را با سرعت ۱ تا۲ قطره در هر ثانیه تا هنگام خروج هوا از ستون جمع آوری نمودیم.

سپس بالای ستون را از آب پر نموده و ۱۰ میلی لیتر از محلول را که با سرعت یک تا دو قطره در ثانیه جمع آوری شده بود، در یک سرنگ تمیز شیشه ای جمع آوری کردیم. این عمل برای باردوم تا خروج هوا از سرنگ انجام شد. سپس ۱ میلی لیتر از استو نیتریل با سرعت یک قطره درهر ۲ تا ۳ ثانیه از این ستون عبور داده شد تا ۱/۵ میلی لیتر از این محلول جمع آوری شود.

این ویال در زیر بخار نیتروژن در ٤٠درجه سانتی گراد خشک شد. ماده خشک شده در یک میلی لیتر از فاز متحرک آفلاتوکسین M1 بازسازی گردید. از این محلول ۲۰۰ میکرولیتر ازمحلول آخر به HPLC تزریق شد.

انجام آزمون های مربوط در طی دو سال بررسی با استفاده از روش معتبر و مشخصات کیفی زیر بوده است :

***مواد مورد استفاده*:**

برای اندازه گیری آفلاتوکسین M1 در نمونه ها از روش HPLC با استفاده از ستون ایمونو افینیتی استفاده گردید. روش انجام آزمایش به شرح ذیل بوده است :

سیستم HPLC مورد استفاده :

۱- ۱ ستون : فاز معکوس ODS ، ۵ میکرو متر ،٤/٦ × ۲۵۰ mm C18 و نوع Column TSK-GEL® (TosoHas)

۱- ۲ حفاظ ستون : Guard Column NovaPak® C18 Waters

۱-۳ فاز متحرک : استونیتریل : متانول: آب (۲۰ :۲۰ : ٦۰)

۱- ٤ سرعت جریان : یک میلی لیتر در دقیقه

۱- ۵ حجم تزریق :۱۰۰ میکرو لیتر

۱- ٦ شناساگر فلورسانس : Waters 2475 fluorescence detector, excitation 360 nm , emission 440nm

۱- ۷ Gain : ۱

۱- ۸ EUFS:۱۰۰۰

۱- ۹ سیستم HPLC : Waters Breeze 1525 HPLC Pump

۱- ۱۰ استونیتریل

۱- ۱۱ تهیه محلول ۲۵٪ (حجم+حجم) استونیتریل برای فاز متحرک

۱- ۱۲ نیتروژن

۱- ۱۳ کلروفرم

۱- ۱٤ اتانول

۱- ۱۵ محلول کالیبراسیون آفلاتوکسین M1

۱- ۱٦ فاز متحرک: استو نیتریل ، متانول ، آب(۲۰:۲۰: ٦۰)

۱- ۱۷ محلول استاندارد آفلاتوکسین M1

۱- ۱۸ نمونه شیر آلوده شده برای اندازه گیری بین آزمایشگاهی از FAPAS

۱- ۱۹ نمونه محلول تایید شده مرجع از FAPAS

۱- ۲۰ در طی انجام موارد آزمایش ، بجز شرائط خاص ، می باید از حلالهای دارای برچسب و نیز از آب مقطر و یا آب درجه یک بر اساس استاندارد ENISO3696 استفاده شود.

۱- ۲۱ سیستم خلاء

۱- ۲۲ سانتریفوژبا قابلیت حداقل ۲۰۰۰ دور

۱- ۲۳ پیپت های حجمی

۱- ۲٤ میکروسرنگ های مشابه هامیلتون

۱- ۲۵ بیکرهای شیشه ای

۱- ۲٦ فلاسکهای حجمی

۱- ۲۷ حمام آب گرم

۱- ۲۸ کاغذ صافی

۱- ۲۹ لوله های ته مخروطی با ظرفیتهای ۵ و ۱۰ میلی لیتری همراه با در

۱ - ۳۰ اسپکترومتر

۱- ۳۱ ستون های ایمونو افینیتی

محاسبات و اندازه گیری های مربوط به در صد بازیافت با استفاده از انجام آزمون در شیر های با چربی کامل اسپایک شده صورت پذیرفته است و مقادیر اندازه گیری شده در حدود ۰/۰۵و۰/۵ ppb و در طی مدت یکسال مورد اندازه گیری قرار گرفته است.

تهیه محلول کالیبراسیون آفلاتوکسین

- حلال کالیبرانت

- محلول استاندارد آفلاتوکسین M1 در کلروفرم با غلظت پائین ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه گردید(به نحوی که ۱۰ میکروگرم از آفلاتوکسین در هر میلی لیتر کلروفرم موجود باشد.)

تعیین غلظت این محلول با اندازه گیری میزان جذب امواج به شرح ذیل صورت پذیرفت :

با استفاده از اسپکترومتر کالیبرانت برای ثبت میزان جذب محلول کالیبراسیون استفاده گردید به این صورت که ارزیابی

در مقابل کلروفرم بعنوان بلانک ودر طول موج های ۳۰۰ و ٤۰۰ نانومتر انجام گرفت .

محلول کالیبراسیون درون یک ظرف در بسته که در آن از تاثیر مستقیم نور جلوگیری می شود ، قرار داشت .

این محلول در دمای زیر صفر و در تاریکی نگهداری میشود و میتوان از آن تا مدت یکسال بعد از تهیه استفاده نمود.

علاوه بر انجام روش های مربوط، استفاده از معادله زیر برای اندازه گیری کمی ضروری است .

تنظیم پمپ :

با استفاده از معادله زیر، میزان غلظت آفلاتوکسین محاسبه می گردد :

$$(L/Vs).(Wf/Vi).\ Wm=Wa$$

در این معادله:

Wm: مقدار حجمی جرم در هر لیتر نمونه به نانو گرم در میلی لیتر (یا میکروگرم در لیتر)

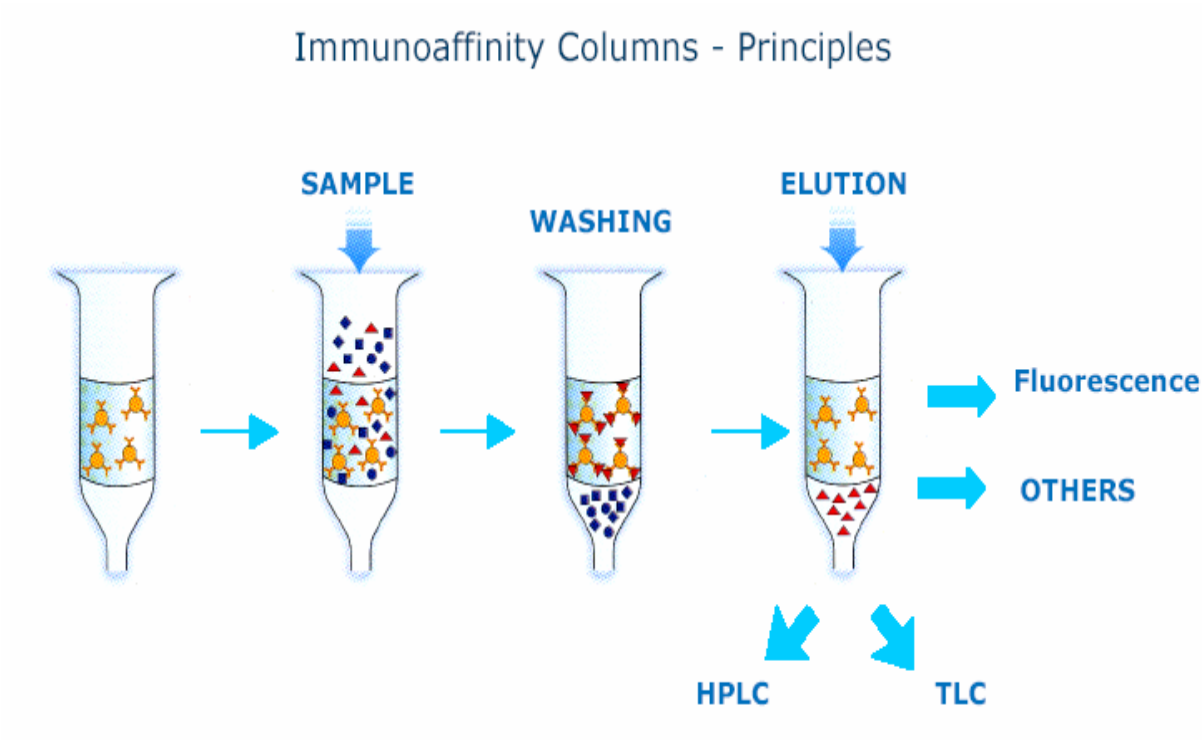
Wa: مقدار حجمی جرم در هر نمونه برای نواحی ارتفاع منحنی پیکهای مربوط به نمونه ها برحسب نانو گرم

Vf: مقدار حجمی نهائی نمونه

Vi: مقدار حجم تزریقی به دستگاه

Vs: مقدار حجمی نمونه های عبور کرده از ستون به میلی لیتر

L: طول ستون با توجه به انجام محاسبات فوق ،سرعت حرکت حلال و نمونه تزریق شده به دستگاه HPLC باید ۰/۸ تا یک میلی لیتر در ثانیه باشد.(۱۳)



نگاره ۱- شماتیک نحوه انجام تخلیص با استفاده از ستون های ایمونو افینیتی (منبع Mycotoxin Analysis R- Biofarm CO. 2003)

نتایج

با توجه به انجام مراحل تعیین اعتبار در مورد اندازه گیری آفلاتوکسین M1 در شیر در آزمایشگاه، تعیین اعتبار روش مطابق با دستورالعمل های سازمان های بین المللی و نیز اتحادیه اروپائی، با موفقیت کامل انجام شد .

همان گونه که قبلاً ذکر گردید، با توجه به مندرجات مربوط به حدود قابل قبول ذکر شده در جدول شماره ۱، درصد بازیافت آزمون در بیش از ده مرحله انجام آن با غلظت ۰/۵ PPb در حدود قابل قبول بوده است. در این ده مرحله از انجام آزمون میانگین در صد بازیافت ٦٨/٨٠٧٣، انحراف معیار ۷/۵۹۱۰۱۷ و ضریب همبستگی ۱۱/۰۳۲۲۸ بوده است.

میزان درصد بازیافت در حدود شناسائی ۰/۰۵ ppb میانگین۵۸۱٤۳ /۸۱، انحراف معیار ۲۰/۵۲۲٦۱ و ضریب همبستگی ۲۵/۱۵۵۹۸ بوده است. نکته مهم انجام این اندازه گیری این موارد در طی ١٤ روز متفاوت بوده است.

با توجه به حدود قابل قبول اشاره شده در جدول شماره ۱، در تمامی اندازه گیری ها درغلظت استاندارد ۰/۵ ppb، درصد بازیافت در حد قابل قبول استاندارد بین المللی مربوط بوده است (جدول ۲) و در غلظت استاندارد ۰/۰۵ ppb به غیر از مورد شماره ۷ ، در تمامی موارد در حدود قابل قبول بوده است (جدول ۳).

بر این اساس و با توجه به استفاده از آزمون ماده مرجع بین المللی چهار بار آزمون صورت پذیرفته، تماماً در حدود قابل قبول بوده است.

این آزمون نیز از اهمیت بسیار زیادی در مباحث مربوط به تعیین عدم قطعیت و کالیبراسیون، برخوردار است.

نتایج بدست آمده در این آزمونها در میزان شناسائی غلظت۰/۵ PPB درجدول مربوطه آمده است.

در جدول ۳ مقادیر اندازه گیری شده درصد بازیافت در میزان ۰/۰۵ ppb ارائه گردیده است. با توجه به این جدول «متوسط در صد بازیافت ۸۱/۵٪ با انحراف معیار ۲۰/۵ ارزیابی گردیده است. این آزمایشات در ١٤ زمان مختلف صورت پذیرفته است. انجام مطابق با استاندارد در انجام آزمون در صد بازیافت در زمان های مختلف، نشانگر قابلیت بالای شاخص های تعیین آزمون دقت در این زمینه می باشد.

جدول ۲- نتایج مربوط به ایجاد آلودگی ۰/۵ ppb و تعیین درصد بازیافت در ۱۲ روز مختلف

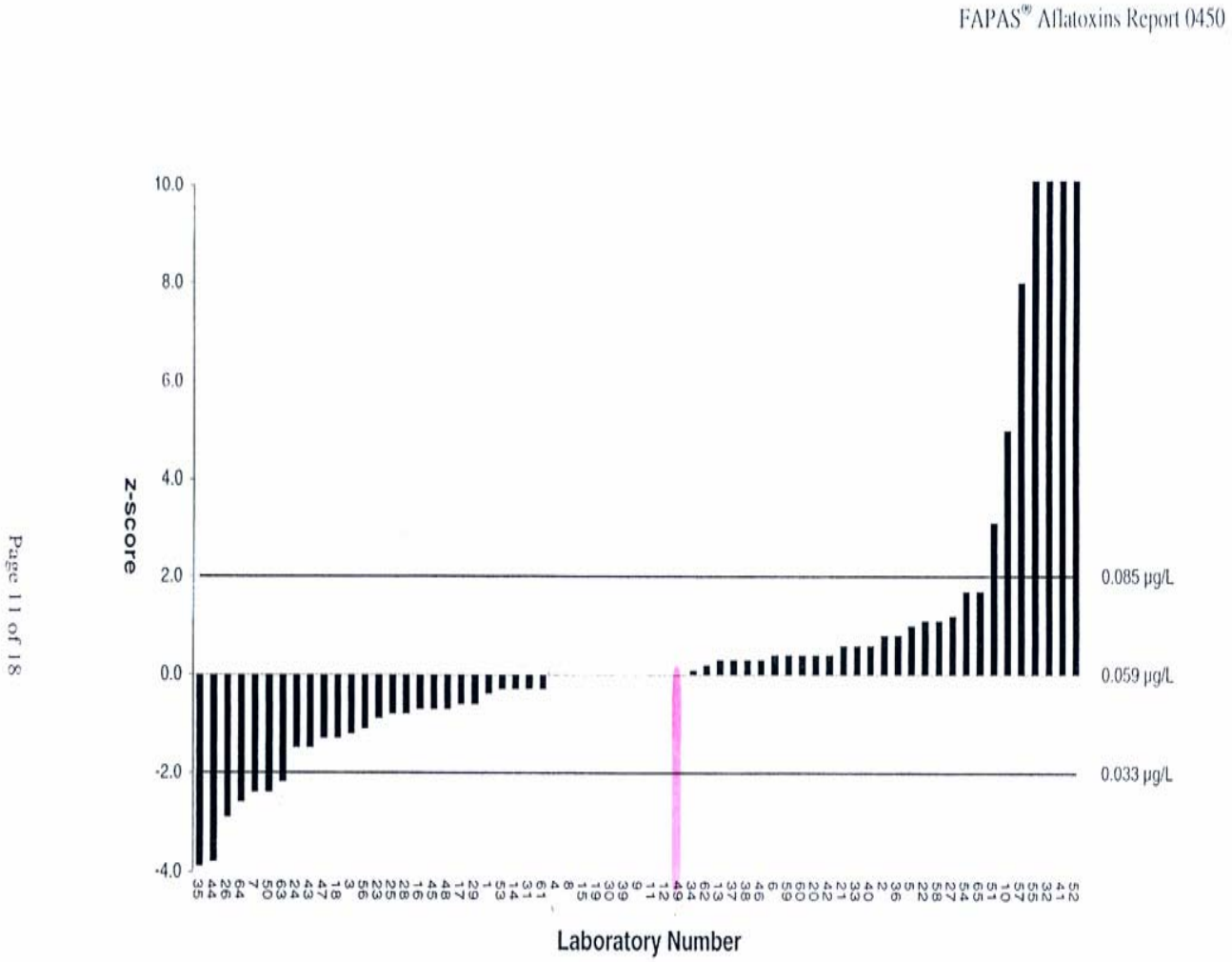
ردیف	کد نمونه	تاریخ آزمون	میزان آلودگی PPB	بازیافت %
۱	2M1487/3RC(0.5)	۲۰۰۲/۱۰/۱۲	۰/۵	۷۹
۲	2MI4487/2RC(0.5)	۲۰۰۲/۱۰/۱۲	۰/۵	۷۲/٦۵
۳	1M1- 556312RC(0.5)	۲۰۰۲/۱۰/۱۲	۰/۵	۸۷/۳۷
٤	1M1 5891/RC(0.5)	۲۰۰۲/۱۲/۱۰	۰/۵	۸۵
۵	1DM-634811RC(0.5)	۲۰۰۳/۲/۳	۰/۵	۸۲/۵
٦	2M1230/8RC(0.5)	۲۰۰۳/۳/۵	۰/۵	۷۷/۸
۷	2DMI670/1RC(0.5)	۲۰۰۳/٤/۱۵	۰/۵	۸٤/٤
۸	2M1582/1RC(0.5)	۲۰۰۳/۵/۲۷	۰/۵	۸۵/۲
۹	2M1855/1RC(0.5)	۲۰۰۳/٦/۱۵	۰/۵	۸٤
۱۰	2M11270/1RC(0.5)	۲۰۰۳/۷/۸	۰/۵	۸٦
۱۱	2M11858/1RC(0.5)	۲۰۰۳/۸/۲۷	۰/۵	۸۸/۹
۱۲	2M12251/7RC(0.5)	۲۰۰۳/۱۱/۱۱	۰/۵	۱۰٤/۱
		Mean		٦٨/٨٠٧٣
		SD		/۵۹۱۰۱۷ ۷
		CV		/۰۳۲۲۸ ۱۱

جدول۳– نتایج مربوط به ایجاد آلودگی۰/۰۵ ppb و تعیین درصد بازیافت در ۱٤ روز مختلف

ردیف	کد نمونه	تاریخ آزمون	میزان آلودگی PPB	بازیافت %
۱	M1487/3RC(0.05)	۲۰۰۲/۱۲/۱۰	۰/۵	۷۹
۲	1M1-5550/1RC(0.05)	۲۰۰۳/۲/۱	۰/۵	۹٦
۳	1M1-5563/1RC(0.05)	۲۰۰۳/۲/۳	۰/۵	۷۵/٦٤
٤	2M1230/7RC(0.05)	۲۰۰۳/٤/۱۵	۰/۵	۷۳
۵	1M1448/2RC(0.05)	۲۰۰۳/٤/۳۰	۰/۵	۱۰۱/۲
٦	2M1582/2RC(0.05)	۲۰۰۳/۵/۱۵	۰/۵	٦۰/۹
۷	2DM67O/2RC(0.05)	۲۰۰۳/۵/۲۷	۰/۵	٤۰
۸	1DM670/1RC(0.05)	۲۰۰۳/۵/۲۸	۰/۵	۱۰۱/۸
۹	2M1855/1RC(0.05)	۲۰۰۳/۷/۸	۰/۵	٦٦/٤
۱۰	2M1047/3RC(0.05)	۲۰۰۳/۷/۳۱	۰/۵	۹۷
۱۱	2M1185/2RC(0.05)	۲۰۰۳/۸/۱۸	۰/۵	۹۸/٤
۱۲	2M11270/2RC(0.05)	۲۰۰۳/۸/۲۷	۰/۵	٦۰/۵
۱۳	2M11858/1RC(0.05)	۲۰۰۳/۹/۲۷	۰/۵	۱۱۳/۲
۱٤	2M12251/7RC(0.05)	۲۰۰۳/۱۱/۱۱	۰/۵	۷۹/۱
		Mean		۸۱/۵۸۱٤۳
		SD		۲۰/۵۲۲٦۱
		CV		۲۵/۱۵۵۹۸

جدول ٤–نتایج ارزیابی CRM بین المللی در مورد تعیین اعتبار روش کروماتوگرافی آفلاتوکسین M1

نتایج حاصل از انجام آزمون Certified Reference Material								
مقدار آلوده شده (بر حسب ppb)	حدود قابل پذیرش (بر حسب ppb)	بار اول (برحب ppb)	باردوم (بر حسب ppb)	بار سوم (بر حسب ppb)	بار چهارم (بر حسب ppb)	میانگین (برحسب ppb)	انحراف معیار (بر حسب ppb)	ضریب همبستگی (بر حسب ppb)
۰/۲٦	۰/۳۸تا۰/۱۵	۰/۲۹۳	۰/۲۹۸	۰/۲۸۳	۰/۲۷۸	۰/۲۸۸	۰/۰۰۹۱۲	۰/۱٦۹٦۹۱



نگاره ۲- نتایج ارزیابی آزمون بین المللی FAPAS در مورد نمونه های شیر ارسالی و موقعیت آزمایشگاه انجام دهنده

در نهایت با توجه به انجام آزمون بین المللی آزمایشگاهی FAPAS(اندازه گیری با روشهای متفاوت تجزیه ای و مراحل عملکرد سیستم) در میان ٦٥ آزمایشگاه شرکت کننده در طرح آزمون، آزمایشگاه انجام دهنده این طرح یکی از ۱۰ آزمایشگاه مجهز به تشخیص دقیق مقدار مرجع ارائه شده بوده است.

نتایج ارائه شده توسط آزمایشگاه انجام دهنده در نگاره ۲ دیده می شود.

بحث

در حال حاضر کاربرد صحیح آزمون های اندازه گیری آلاینده ها در مواد غذایی یکی از مسائل مهم می باشد. در کشور ما امکانات بسیاری در زمینه تجهیزات اندازه گیری آلاینده های مواد غذایی وجود دارد اما متاسفانه استفاده از این امکانات بدلیل مشکلات مربوط به انجام صحیح و دقیق یک آزمون کاملاً امکان پذیر نیست. کاربرد تعیین اعتبار یک آزمون، قبل از انجام و در حین انجام آن تاثیر زیادی در ارائه

نتایج صحیح تجزیه شیمیایی مواد آلاینده در مواد غذایی خواهد داشت. لذا توصیه های زیر برای ارتقاء بیشتر صحت و دقت آزمون های آزمایشگاهی مواد غذایی ارائه می گردد.

۱- استفاده از سیستم های اندازه گیری دقیق از جمله HPLC، نیاز به آموزش های تخصصی کاربرد سیستم، آموزش های مربوط به کالیبراسیون، آزمون های مربوط به شناسائی آلاینده های مواد غذائی و عوامل تاثیر گذار بر روی آن دارد.

بدیهی است بدون انجام مراحل تعیین اعتبار، آزمون های اندازه گیری مایکو توکسین ها و سایر آلاینده ها دارای ارزش و اعتبار نخواهد بود.

۲- انجام آزمونهای دقیق و معتبر مربوط به کنترل مایکو توکسین ها با استفاده از انجام الزامات فنی اشاره شده در استاندارد ISO 17025 قابلیت کاربرد بسیار مناسبی دارد.

۳- علی رغم عدم قابلیت انجام محاسبات مربوط به عدم قطعیت مورد اشاره در استاندارد روش آزمون، با استفاده از آزمون تخصصی بین آزمایشگاهی می توان به نتایج مناسب دست یافت.

٤- با توجه به کاربرد نسبتاً بالای کیت های ایمونو اسی و سایر کیت های کیفی، به تایید آزمون، به ویژه در مواردی که نمونه ها با استفاده از کیت ها، آلوده شناخته می شود، نیاز ضروری به تایید آزمون وجود دارد .

۵- با توجه به عدم انجام آزمون های کالیبراسیون مربوط به اندازه گیری و تعیین اعتبار روش در کشور، انجام آزمونهای بین آزمایشگاهی مانند روشهای مربوط به FAPAS بر اساس قوانین مربوط به اجرای سیستم ISO 17025 قابلیت کاربرد دارد.

٦- در مورد کارهای تحقیقاتی موضوع دقت پاسخ ارائه شده از اهمیت بسیار بالائی بر خوردار بوده و میزان هزینه و زمان انجام از اهمیت کمتری برخوردار می باشد و در این مورد بسیاری از ناشناخته ها و یا کاربرد ناصحیح روش های آزمون وجود دارد.

در این زمینه، در کشورمان بیشتر شاهد رویه تهیه سخت افزارهای مربوط به انجام آزمون ها می باشیم در حالیکه همانگونه که در گذشته اشاره گردید، بدون انجام مراحل تعیین اعتبار در ابتدا و نیز در طی انجام آزمون، نمی توان به پاسخ های مناسب دست یافت.

انجام مراحل کلی انجام آزمون تعیین اعتبار، وابستگی بسیار زیادی به نحوه انجام مراحل تعیین اعتبار بطور مناسب دارد. در حال حاضر در کشور امکانات انجام آزمون نسبتاً مناسبی وجود دارد ولی متاسفانه عمده این امکانات بدلیل مشکلات مربوط مراحل مربوط به نحوه انجام آزمون و مشکلات صحت و دقت در ارائه نتایج نمیتواند پاسخگوی نیازمندی های روز کنترل بهداشت مواد غذائی در کشور ما باشد.

این مشکلات به ویژه در هنگام اندازه گیری های میزان مواد آلاینده در مواد غذائی که نیاز به مراحل جداسازی و شناسائی در حدود تشخیص پایین می باشند، از اهمیت بسیار بیشتری برخوردار خواهد بود.

فهرست منابع

1. Adams Richard S; Kenneth B. Kephart; Virginia A. Ishler; Lawrence J. Hutchinson; Gregory W.Roth. (1993). Mold and mycotoxin problems in livestock feeding. College of Agricultural science, Penn State University. www.das.psu.edu/teamdairy
2. Andreou VG; Nikolelis DP. (1998). Flow injection monitoring of aflatoxin M1 in milk and milk preparation using supported bilayer lipid membranes. Analytical Chemistry .70(11): 2366-71
3. Andrew Yu Zhadanov. (1999). Catalogue of the manufacturers and suppliers of analytical testing and measurement. www.instruments.ru/

4. Codex Alimentarius Commission. (2003). Proposed draft revised guidelines on good laboratory practice in residue analysis at step 5 of the procedure. Alinorm 03/24 appendix VI
5. Dragacci sylviane. (2001). Immunoaffinity column clean up with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk: collaborative study. Journal of AOAC international. 84(2) 437-443
6. European Community Comment for the Codex Committee on food additives and contaminants. (2000). Draft sampling plan for Aflatoxins. Paragraph 102 of alinorm 99/37-CX02 FAC –Agenda item 3. Beijing, People's Republic of China, 20-24 March 2000
7. FAO publications. (1991). Manuals of food quality control training in mycotoxin analysis .14 (10) 60-99
8. FAO publication. (1999). Mycotoxins, Aflatoxins. www.fao.org/Agrippa/publications/ToC3.html
9. FAO publications. (1997) Validation of Analytical Methods for food control. A report of a joint FAO/IAEA Expert Consultation Vienna, Austria food and Agricultural Organization Food and nutrition paper 68
10. FAO/IAEA/AOAC/IUPAC. (1999). International workshop on principles and practices of method validation. www.fao.org/waicet/faoinfo/economic/esn/validateda.gov/required.html
11. Herman L. John; Nobumasa Nakashima. (1999). Conference on international food trade beyond 2000: validity of the process and dealing with uncertainty www.fao.org/docrep/meeting/x2621e.htm
12. International standard Organization. (1998). ISO 14501. Milk and milk powder – determination of aflatoxin M1 content – Clean up by immunoaffonity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography. www.iso.org/publications/std/ISO14501
13. International standard Organization. (2000). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO/DS/EN 17025:2000 www.iso.org/publications/std/Iso17025
14. Kim EK; Shon DH; Ryu D; Park JW; Hwang HJ; Kim YB. (2000). Occurrence of aflatoxin m1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. Food Additives and Contaminant 17(1): 59-64
15. Markaki P, Melissari E. (1997). Occurrence of aflatoxin M1 in commercial pasteurized milk determined with ElISA and HPLC Food additive and contaminant Journal 14(5): 451-6
16. Scott P.M.; Trucksess MW. (1997). Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis Journal AOAC International 80(5): 941-9www.aoac.org/publications/title/September/october.htm