



جمهوری اسلامی ایران  
Islamic Republic of Iran

سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران

۱۹۱۹۵

چاپ اول

۱۳۹۳

INSO

19195

1st. Edition

2015

روغن زیتون، روغن بادام زمینی و روغن  
کنجد - اندازه گیری آفلاتوکسین های گروه  
B و G به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی  
بالا و تخلیص با استفاده از ستون  
ایمونوآفینیتی - روش آزمون

**Olive, Peanut and Sesame oil –  
Determination of Aflatoxins B&G by HPLC  
method using Immunoaffinity column clean  
up-Test method**



مرجع آموزش و خرید و فروش زیتون رودبار و حومه

[www.zeytoonchi.ir](http://www.zeytoonchi.ir)

ICS:67.200

## به نام خدا

### آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود. پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادات در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند در کمیته ملی طرح و بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)<sup>۱</sup>، کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)<sup>۲</sup> و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)<sup>۳</sup> است و به عنوان تنها رابط<sup>۴</sup> کمیسیون کدکس غذایی (CAC)<sup>۵</sup> در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی بهره گیری می شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. سازمان می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization

2 - International Electrotechnical Commission

3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)

4 - Contact point

5 - Codex Alimentarius Commission

## کمیسیون فنی تدوین استاندارد

" روغن زیتون، روغن بادام زمینی و روغن کنجد - اندازه گیری آفلاتوکسین های گروه B و G به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی عالی و تخلیص با استفاده از ستون ایمونوآفینیتی - روش آزمون "

### رئیس:

مشکانی، اعظم  
(لیسانس زیست شناسی)

### سمت و / یا نمایندگی

شرکت خدماتی، آموزشی، تحقیقاتی مرجعان  
خاتم (سهامی خاص)

### دبیر:

مظاهری، منصوره  
(فوق لیسانس مهندسی شیمی-بیوتکنولوژی)

پژوهشگاه استاندارد- پژوهشکده غذایی و  
کشاورزی-گروه پژوهشی مواد غذایی

### اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفباء)

ابوحسین، گیتی  
(فوق لیسانس علوم تغذیه)

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی-اداره  
کل آزمایشگاه های مرجع کنترل غذا و دارو

رحیمی، معصومه  
(فوق لیسانس صنایع غذایی)

آزمایشگاه سیستم کیفیت فنون (سهامی خاص)

زبده فلاحتی، نسیم  
(فوق لیسانس شیمی)

شرکت روغن زیتون لویه (سهامی خاص)

عزیزی، خدیجه  
(لیسانس شیمی محض)

آزمایشگاه مروارید جنوب خاتم (سهامی خاص)

نودهی، منصوره  
(فوق لیسانس مهندسی مواد و اصول طراحی در صنایع غذایی)

شرکت زیتون گلستان نمونه (سهامی خاص)

هوشمند، ملودی  
(فوق لیسانس شیمی تجزیه)

آزمایشگاه خدماتی، آموزشی، تحقیقاتی مرجعان  
خاتم (سهامی خاص)

## فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ب	آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران
د	کمیسیون فنی تدوین استاندارد
و	پیش گفتار
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۱	۳ اصطلاحات و تعاریف
۴	۴ مواد و/یا واکنشگرها
۹	۵ وسایل
۱۱	۶ اصول آزمون
۱۱	۷ روش اجرای آزمون
۱۳	۸ روش محاسبه و بیان نتایج
۱۳	۹ تضمین کیفیت
۱۶	۱۰ گزارش آزمون

## پیش گفتار

استاندارد " روغن زیتون، روغن بادام زمینی و روغن کنجد - اندازه گیری آفلاتوکسین های گروه B و G به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و تخلیص با استفاده از ستون ایمونوآفینیتی - روش آزمون " که پیش نویس آن در کمیسیون های فنی تدوین مربوط تهیه و تدوین شده و در یک هزار و سیصد و هشتادمین اجلاس کمیته ملی استاندارد خوراک و فرآورده های کشاورزی مورخ ۱۶/۱۰/۱۳۹۳ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود .

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت . بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

منابع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

۱- استاندارد ملی ایران شماره ۶۸۷۲: سال ۱۳۹۱، خوراک انسان و دام - اندازه گیری آفلاتوکسین های گروه B و G به طریق کروماتوگرافی مایع با کارایی عالی و خالص سازی با ستون ایمونوآفینیتی - روش آزمون

2- AOAC official methods 2013.05 – Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in olive oil, peanut oil and sesame oil - Immunoaffinity Column clean up and Liquid Chromatographic quantitation.

# روغن زیتون، روغن بادام زمینی و روغن کنجد - اندازه گیری آفلاتوکسین های گروه B و G به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا و تخلیص با استفاده از ستون ایمونوآفینیتی - روش آزمون

## ۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش اندازه گیری مقدار آفلاتوکسین گروه های B و G به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای روغن زیتون، روغن بادام زمینی و روغن کنجد می باشد که در آن از ستون ایمونوآفینیتی برای تخلیص استفاده می شود.

این استاندارد، برای تعیین مقدار آفلاتوکسین گروه های B و G در روغن زیتون، روغن بادام زمینی و روغن کنجد کاربرد دارد.

**یادآوری ۱-** این استاندارد، برای سایر روغن ها نیز، در صورتی که اعتبار بخشی شود، می تواند مورد استفاده قرار گیرد.  
**یادآوری ۲-** این استاندارد، در محدوده ۲ تا ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم برای آفلاتوکسین کل، و ۱ تا ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم، برای آفلاتوکسین B<sub>1</sub>، اعتبار بخشی شده است.

## ۲ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن ها ارجاع داده شده است بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب میشود. در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه ها و تجدیدنظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه های بعدی آنها مورد نظر است.  
استفاده از مرجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۱-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸، ( تجدید نظر اول)، ویژگی ها و روش های آزمون آب برای مصارف آزمایشگاهی.

## ۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می رود:

### مایکوتوکسین ها

مایکوتوکسین ها، ترکیباتی با ساختمان های شیمیایی متفاوت و با وزن مولکولی کوچک می باشند. این سموم طبیعی، حاصل از متابولیک ثانویه گونه های مشخصی از برخی قارچ ها مانند: قارچ آسپرژیلوس<sup>۱</sup> و پنی سیلیوم، در مزارع یا انبار ها می باشند، که وارد محصولات غذایی شده و در نتیجه وارد رژیم غذایی انسان و دام می شوند.

### آفلاتوکسین ها

آفلاتوکسین ها، سمومی هستند که عمدتاً به وسیله تعدادی از گونه های مختلف آسپرژیلوس، مانند فلاووس<sup>۲</sup> و پارازیتیکوس<sup>۳</sup>، در شرایط خاص تولید شده و دارای انواع مختلفی می باشند که مهم ترین آن ها B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub>، G<sub>1</sub> و G<sub>2</sub> می باشد.

یادآوری - در این استاندارد، منظور از مجموع آفلاتوکسین ها، مجموع آفلاتوکسین های انواع B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub>، G<sub>1</sub> و G<sub>2</sub> می باشد.

### کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا<sup>۴</sup>

یکی از روش های کروماتوگرافی است، که در آن جداسازی اجزاء موجود در یک نمونه، بر اساس تمایل نسبی هر جزء به فاز ساکن (ستون کروماتوگرافی)، هنگام عبور فاز متحرک (حلال) در درون فاز ساکن انجام می شود. ماده ای که تمایل بیشتری به فاز متحرک دارد، با سرعت بیشتری حرکت می کند و برعکس، ماده ای که به فاز ساکن تمایل بیشتری دارد با سرعت کم تری در طول ستون حرکت می کند و موجب جداسازی اجزای مخلوط مورد آنالیز می شود.

### تخلیص<sup>۵</sup>

به عمل حذف ترکیبات مزاحم موجود در عصاره یک نمونه، تخلیص گفته می شود. وجود این ترکیبات مزاحم، می تواند موجب ایجاد مزاحمت و یا خطا در اندازه گیری ماده مورد نظر شود.

1 - *Aspergillus*

2 - *Flavus*

3- *Parasiticus*

4- High performance liquid chromatography (HPLC)

5- Clean up

**ستون ایمونوآفینیتی**

ستونی است که دارای آنتی بادی اختصاصی آفلاتوکسین ها می باشند و برای تخلیص عصاره استخراجی در اندازه گیری آفلاتوکسین ها مورد استفاده قرار می گیرند . در اثر عبور عصاره استخراج شده از ستون ایمونوآفینیتی، آفلاتوکسین های موجود در نمونه ( آنتی ژن ) به آنتی بادی های موجود در ستون، متصل می شود و ناخالصی ها از این ستون عبور می کند. در مرحله پس از این، با عبور دادن یک حلال مناسب، مانند : متانول از ستون مزبور، آنتی ژن از آنتی بادی جدا می شود. آنتی ژن جدا شده، که همان آفلاتوکسین های موجود در نمونه است در یک ویال، جمع آوری می شود.

**حد تعیین مقدار**

به کم ترین غلظتی از آفلاتوکسین موجود در نمونه، که با صحت و دقت قابل قبول اندازه گیری شود، گفته می شود و مفهوم ریاضی آن، میانگین سیگنال ایجاد شده به وسیله نمونه شاهد، به علاوه ۱۰ برابر انحراف معیار آن است.

**صحت**

به نزدیکی نتایج آزمون، با میزان واقعی آن (مورد انتظار)، که در نمونه وجود دارد، گفته می شود.

**اندازه گیری درصد بازیافت<sup>۱</sup>**

به نسبت مقدار به دست آمده از آفلاتوکسین پس از آنالیز آن برای هر یک از آنالیت ها<sup>۲</sup>، در نمونه غنی شده<sup>۳</sup> (نمونه ای است که به آن مقدار مشخصی از سم استاندارد مورد نظر به صورت دستی افزوده شده باشد)، به میزان قابل انتظار آن ها، گفته می شود.

یادآوری ۱- بازیافت به صورت درصد بیان می شود.

یادآوری ۲- اندازه گیری درصد بازیافت، یکی از راه های تعیین صحت روش آزمون می باشد.

**دقت<sup>۴</sup>**

به نزدیکی نتایج آزمون های مستقل<sup>۵</sup> و جداگانه بر روی یک نمونه یکنواخت، که در شرایط مشخص انجام

1- Recovery

۲- به جزء مورد اندازه گیری گفته می شود.

3- Fortified Sample

4- Precision

5- Independent



شده باشد، گفته می‌شود.

۱۰-۳

#### تکرار پذیری (r)<sup>۱</sup>

به نزدیکی نتایج حاصل از آزمایش مکرر بر روی یک نمونه، در یک آزمایشگاه، با استفاده از یک روش آزمون، در شرایط مشابه، از نظر آزمایش کننده و دستگاه، با فاصله زمانی کوتاه، گفته می‌شود.

۱۱-۳

#### تجدید پذیری (R)<sup>۲</sup>

به نزدیکی نتایج حاصل از آزمایش مکرر یک نمونه، که به وسیله یک روش آزمون، تحت شرایط مختلف از نظر آزمایش کننده، دستگاه و آزمایشگاه انجام شده باشد، گفته می‌شود. یادآوری-تکرار پذیری و تجدید پذیری، روش هایی برای تعیین دقت بر روش آزمون می‌باشد.

۱۲-۳

#### استخراج<sup>۳</sup>

به جدا سازی آنالیت از نمونه مورد آزمون، با استفاده از روش انحلال آنالیت در یک حلال و یا مخلوطی از حلال های مناسب، گفته می‌شود.

#### ۴ مواد و / یا واکنشگرها

۱-۴ در همه مراحل آزمون، فقط از مواد با درجه آزمایشگاهی<sup>۴</sup> و آب درجه یک مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸، استفاده کنید، مگر این که نوع دیگری مشخص و تعیین شده باشد. حلال های مورد استفاده در بخش کروماتوگرافی باید، مناسب برای کروماتوگرافی مایع<sup>۵</sup> باشند.

هشدار- از همه محلول ها و حلال ها، باید در زیر هود با عملکرد مناسب استفاده کرد. برای جلوگیری از تماس پوست بدن با این محلول ها و حلال ها از دستکش ها و روپوش آزمایشگاهی و همچنین عینک ایمنی، استفاده کنید.

---

1- Repeatability  
2- Reproducibility  
3- Extraction  
4-Analytical grade  
5-HPLC grade

حلال های تجارتي در دسترس با خواص معادل با موارد نوشته شده به شرح زیر نیز می توانند مورد استفاده قرار گیرند.

#### ۲-۴ محلول $0.1\text{ M, NaOH}$

روش تهیه: برای تهیه این محلول، ۴ مقدار ۰/۱ گرم  $\text{NaOH}$  را در در بالن حجمی، به حجم ۱۰۰ میلی لیتر برسانید و در ظرف پلاستیکی مناسب به طور در بسته، نگهداری کنید.

#### ۳-۴ محلول $0.1\text{ M, HCl}$

روش تهیه: مقدار ۰/۸۳ میلی لیتر از  $\text{HCl}(37\%)$  را به حجم ۱۰۰ میلی لیتر برسانید و در ظرف تیره و دور از نور آفتاب نگهداری کنید.

#### ۴-۴ کلرید سدیم

۵-۴ فسفات هیدروژن دی سدیم بدون آب ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) و یا فسفات هیدروژن دی سدیم با ۱۲ ملکول آب

#### ۶-۴ فسفات دی هیدروژن پتاسیم ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

#### ۷-۴ کلرید پتاسیم ( $\text{KCl}$ )

#### ۸-۴ بافر فسفات سالین ( $\text{PBS}^1$ )

روش تهیه: مقدار ۸۰ گرم از کلرید سدیم (طبق بند ۴-۴)، ۱۱/۶ گرم از فسفات هیدروژن دی سدیم بدون آب و یا ۲۹/۲ گرم از فسفات هیدروژن دی سدیم با ۱۲ ملکول آب (طبق بند ۴-۵)، ۲ گرم فسفات دی هیدروژن پتاسیم (طبق بند ۴-۶) و ۲ گرم کلرید پتاسیم (طبق بند ۴-۷) را در آب حل کنید و به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر برسانید. سپس، ۱۰۰ میلی لیتر از این محلول را برداشته و در یک بشر با ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر، رقیق کرده، آن گاه pH آن را با استفاده از محلول  $0.1\text{ M NaOH}$  (طبق بند ۴-۲) و یا محلول  $0.1\text{ M HCl}$  (طبق بند ۴-۳) به ۷/۴ برسانید.

قرص های تجاری بافر فسفات سالین و یا محلول های آماده آن نیز با خواص معادل نیز، می توانند استفاده شوند.

#### ۹-۴ متانول، مناسب برای کروماتوگرافی مایع

#### ۱۰-۴ استونیتریل، مناسب برای کروماتوگرافی مایع

#### ۱۱-۴ متانول، دارای درجه آزمایشگاهی

#### ۱۲-۴ آب درجه ۱ مناسب برای کروماتوگرافی مایع (مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸)

#### ۱۳-۴ آب درجه ۳ (مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸)

#### ۱۴-۴ برمید پتاسیم جامد، $\text{KBr}$ (در صورت استفاده از کبراسل<sup>۲</sup> برای مشتق سازی)

#### ۱۵-۴ پیریدینیوم هیدروبرمید پر برمید<sup>۳</sup> (در صورت مشتق سازی با استفاده از این محلول)

1- Phosphate Buffer Saline

2- Kobra Cell

3 - Pyridinium Hydrobromide Perbromide (PBPB)

۴-۱۶ اسید نیتریک ۴ مولار (در صورت استفاده از کبراسل برای مشتق سازی)

روش تهیه: مقدار ۲/۷۸ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ ۶۵٪ یا ۲/۵۹ میلی لیتر از اسید نیتریک ۷۰٪ را به حجم ۱۰ میلی لیتر برسانید.

۴-۱۷ حلال استخراج

روش تهیه: مخلوط متانول (طبق بند ۴-۱۱) و آب (طبق بند ۴-۱۳)، متانول و آب را به نسبت ۵۵ حجم متانول و ۴۵ حجم آب، مخلوط کرده و آن را به دمای محیط برسانید.

۴-۱۸ فاز متحرک HPLC

روش تهیه: مخلوط آب (طبق بند ۴-۱۲)، استونیتریل (طبق بند ۴-۱۰)، متانول (طبق بند ۴-۹) به نسبت ۶ حجم آب، ۲ حجم استونیتریل و ۳ حجم متانول تهیه کنید.

۴-۱۸-۱ در صورت استفاده از کبراسل (برم تولید شده به روش الکتروشیمیایی) برای مشتق سازی به ازای هر لیتر فاز متحرک (طبق بند ۴-۱۸)، ۳۵۰ میکرولیتر از  $HNO_3$  (طبق بند ۴-۱۶) و ۱۲۰ میلی گرم برمید پتاسیم (طبق بند ۴-۱۴) به آن بیافزایید و مخلوط را به خوبی به هم بزنید.

۴-۱۸-۲ در صورت مشتق سازی با استفاده از محلول پس ستون پیریدینیوم هیدروبرمید پر برمید، ۲۵ میلی گرم PBPB (طبق بند ۴-۱۵) را در ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. در صورتی که این محلول، در محل تاریک و در محیطی با درجه حرارت اتاق نگه داری شود، این محلول می تواند به مدت ۴ روز مورد استفاده قرار گیرد.

۴-۱۹ حلال شستشوی دستگاه کروماتوگرافی مایع

روش تهیه: متانول - استونیتریل - آب را به نسبت سه حجم آب (طبق بند ۴-۱۲)، یک حجم استونیتریل (طبق بند ۴-۱۰) و یک حجم متانول (طبق بند ۴-۹) مخلوط کنید.

یادآوری - پس از تهیه حلال های (طبق بند های ۴-۱۸ و ۴-۱۹)، هر یک از آن ها باید، به وسیله دستگاه فیلتراسیون حلال (طبق بند ۵-۱۷) و با استفاده از فیلتر (طبق بند ۵-۱۸) صاف شوند.

۴-۲۰ ستون ایمونوآفینیتی (دارای آنتی بادی علیه آفلاتوکسین های  $B_1$ ،  $B_2$ ،  $G_1$  و  $G_2$ )

۴-۲۱ محلول های استاندارد ذخیره آفلاتوکسین ها

سموم آفلاتوکسین اولیه به صورت تجارتي، از سوی بعضی از مراکز علمی تولید شده و در غلظت های مختلف به صورت فیلم خشک یا کریستال و یا محلول با کمیت و کیفیت متفاوت در دسترس قرار می گیرند. در صورت تهیه محلول استاندارد آفلاتوکسین ها از پودر خشک شده آن ها به شرح زیر عمل کنید:

۴-۲۱-۱ محلول های استاندارد ذخیره هر یک از آفلاتوکسین ها را در غلظت  $10 \mu g/ml$  در متانول به روش زیر آماده کنید:

مقدار ۱۰ میلی گرم از هر آفلاتوکسین را، به طور جداگانه، در بالن های حجمی ۱۰۰ میلی لیتری، ریخته و به هریک از آن ها، مقدار ۵۰ میلی لیتر متانول افزوده و آن ها را به خوبی مخلوط کنید. سپس، تا خط نشانه با متانول، آن ها را به حجم رسانیده و دوباره مخلوط کنید. مقدار ۱۰ میلی لیتر از این محلول را به ظرف حجمی ۱۰۰ میلی لیتری دیگری منتقل کرده و تا خط نشانه با افزودن متانول به حجم برسانید و

مخلوط کنید. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، طیف ماوراء بنفش هر یک از محلول آفلاتوکسین ها را ثبت کنید. غلظت محلول های آفلاتوکسین را با اندازه گیری مقدار جذب در طول موج جذب ماکزیمم نزدیک ۳۶۰ نانومتر، با استفاده از فرمول ۱ به شرح زیر محاسبه کنید.

فرمول ۱:

$$C=(A \times MW \times 1000) / \varepsilon$$

که در آن:

C غلظت هر یک از آفلاتوکسین ها به  $\mu\text{g/ml}$

A مقدار جذب در طول موج جذب ماکزیمم نزدیک ۳۶۰ نانومتر

MW جرم مولکولی هر یک از آفلاتوکسین ها

$\varepsilon$  ضریب جذب مولی هر یک از آفلاتوکسین ها.

غلظت های  $\varepsilon$  به دست آمده باید نزدیک به  $10 \mu\text{g/ml}$  باشد.

مقادیر  $\varepsilon$  و جرم مولکولی هر یک از آفلاتوکسین ها بر اساس جدول ۱ می باشد.

یاد آوری- بر حسب میزان مصرف، با حفظ نسبت وزن و حجم های نوشته شده می توان مقادیر کم تری از محلول های استاندارد ذخیره آفلاتوکسین ها را تهیه کرد.

جدول ۱- ضریب جذب مولی هر یک از انواع آفلاتوکسین ها در متانول در ماکزیمم جذب نزدیک به ۳۶۰ نانومتر

جرم مولکولی (گرم بر مول)	$\varepsilon$ (متر مربع در مول)	نوع آفلاتوکسین
۳۱۲	۲۱۵۰۰	B <sub>1</sub>
۳۱۴	۲۱۴۰۰	B <sub>2</sub>
۳۲۸	۱۷۷۰۰	G <sub>1</sub>
۳۳۰	۱۹۲۰۰	G <sub>2</sub>

یاد آوری ۱- پس از تعیین غلظت محلول های آفلاتوکسین، محلول ها را به ظروف اولیه خود برگردانید.

یاد آوری ۲- محلول های استاندارد ذخیره هر یک از آفلاتوکسین ها را در دمای  $18^\circ\text{C}$  - نگه داری کنید و پیش از مصرف آن ها را به دمای محیط برسانید.

۴-۲ محلول استاندارد ذخیره مخلوط آفلاتوکسین ها ( شامل ۱۰۰۰ نانوگرم از انواع آفلاتوکسین B<sub>1</sub> و G<sub>1</sub> و ۲۰۰ نانوگرم از انواع B<sub>2</sub> و G<sub>2</sub> محلول در یک میلی لیتر متانول ) (MSSS)

حجم مشخصی از هر یک از آفلاتوکسین ها را برداشته و به یک ظرف حجمی منتقل کنید، به طوری که، غلظت های ۱۰۰۰ نانوگرم از انواع آفلاتوکسین B<sub>1</sub> و G<sub>1</sub> و ۲۰۰ نانوگرم از انواع B<sub>2</sub> و G<sub>2</sub> محلول در یک میلی لیتر متانول به دست آید.

برای مثال: چنان چه غلظت هر یک از آفلاتوکسین ها برابر با  $10 \mu\text{g/ml}$  باشد، مقادیر ۱۰۰۰ میکرولیتر از آفلاتوکسین B<sub>1</sub>، ۱۰۰۰ میکرولیتر از آفلاتوکسین G<sub>1</sub>، ۲۰۰ میکرولیتر از آفلاتوکسین B<sub>2</sub> و ۲۰۰ میکرولیتر

نیز از آفلاتوکسین G<sub>2</sub> برداشته و به یک ظرف حجمی ۱۰ میلی لیتری منتقل کرده و با متانول به حجم برسانید.

**یادآوری ۱-** در صورتی که محلول استاندارد مخلوط آفلاتوکسین ها از بازار تهیه شده است و غلظت سموم در آن بیشتر از غلظت تعیین شده در بند ۴-۲۲ می باشد، آن ها را به گونه ای رقیق کنید که محلولی با غلظت نوشته شده در بند ۴-۲۲ به دست آید.

**یادآوری ۲ -** این محلول، برای غنی سازی نمونه در سطوح مختلف غنی سازی و تهیه محلول های استاندارد کاری (طبق بند ۴-۲۳) مورد استفاده قرار می گیرد.

#### ۴-۲۳ محلول استاندارد کاری آفلاتوکسین (WSS)<sup>۱</sup>

این محلول را با رقیق کردن ۴۰ میکرو لیتر محلول مخلوط استاندارد ذخیره مخلوط آفلاتوکسین ها (طبق بند ۴-۲۲)، با استفاده از ۷۶۰ میکرو لیتر متانول (طبق بند ۴-۹) و ۱۲۰۰ میکرو لیتر آب (طبق بند ۴-۱۲) تهیه کنید تا محلولی با حجم ۲ میلی لیتر و با غلظت ۲۰ ng/mL انواع آفلاتوکسین B<sub>1</sub> و G<sub>1</sub> و ۴ نانوگرم از انواع B<sub>2</sub> و G<sub>2</sub> به دست می آید.

**یادآوری -** برای رقیق سازی باید محاسبات به گونه ای انجام شود که محلول WSS حاوی ۴ حجم متانول (طبق بند ۴-۹) و ۶ حجم آب (طبق بند ۴-۱۲) باشد.

#### ۴-۲۴ محلول های استاندارد کالیبراسیون

با استفاده از محلول استاندارد کاری آفلاتوکسین (طبق بند ۴-۲۳)، مطابق جدول ۲، محلول های استاندارد کالیبراسیون را تهیه نمایید. حلال رقیق سازی، متانول ۴۰٪ (مخلوط متانول (طبق بند ۴-۹) و آب (طبق بند ۴-۱۲) به نسبت ۴ حجم متانول و ۶ حجم آب) می باشد.

**یادآوری -** غلظت های استانداردهای کالیبراسیون نوشته شده در این استاندارد، پیشنهادی بوده و هر آزمایشگاه می تواند در صورت لزوم و با توجه به آلودگی نمونه ها گستره دیگری را انتخاب نماید، منوط به این که:

الف- تعداد محلولهای استاندارد انتخاب شده از ۵ محلول کم تر نباشد.

ب- سطح زیر پیک برای محلول های استاندارد، در سطح حد تعیین مقدار و بالاتر از آن در گستره منحنی کالیبراسیون باشد.

پ- در صورتی که نمونه هایی با غلظت های بالاتر از محدوده خطی نمودار کالیبراسیون وجود داشته باشد، باید رقیق سازی روی محلول ویال نهایی به گونه ای انجام گیرد تا سیگنال نمونه در محدوده خطی قرار گرفته شود.

ت- فواصل بین غلظت محلول های مورد استفاده برای کالیبراسیون باید مناسب باشد.

جدول ۲- راهنمای آماده سازی محلول های استاندارد کالیبراسیون برای تهیه ۲ ml محلول استاندارد کالیبراسیون

غلظت های نهایی استانداردهای کالیبراسیون (ng/ml)				حجم متانول ۴۰٪ (µl)	حجم مورد نیاز از محلول WSS برحسب µl	ردیف
G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>			
۰/۰۸	۰/۴	۰/۰۸	۰/۴	۱۹۶۰	۴۰	B
۰/۲۴	۱/۲	۰/۲۴	۱/۲	۱۸۸۰	۱۲۰	C
۰/۴	۲	۰/۴	۲	۱۸۰۰	۲۰۰	D
۰/۵۶	۲/۸	۰/۵۶	۲/۸	۱۷۲۰	۲۸۰	E
۰/۷۲	۳/۶	۰/۷۲	۳/۶	۱۶۴۰	۳۶۰	F

یادآوری- برای مثال برای تهیه مخلوط سم آفلاتوکسین ها مطابق ردیف B در جدول ۲، باید ۴۰ میکرولیتر از محلول WSS با استفاده از متانول ۴۰٪ به حجم ۲ میلی لیتر رسانده شود.

## ۵ وسایل

علاوه بر تجهیزات معمولی آزمایشگاه شامل بشر، مزور، بالن، قیف و ویال، وسایل دیگر مورد نیاز با رعایت یادآوری ها به شرح زیر می باشند :

یادآوری ۱- کلیه ظروف شیشه ای نو پیش از استفاده باید با اسید شسته شوند.

۱-۵ ترازوی آزمایشگاهی، با حساسیت ۰/۰۰۰۱ گرم

۲-۵ ترازوی آزمایشگاهی، با حساسیت ۰/۱ گرم

۳-۵ دستگاه اسپکتروفتومتر، در صورت نیاز به تهیه استاندارد میکوتوکسین ها از پودر خشک

۴-۵ میکروپی پت، در حجم های متغیر ۱۰-۱۰۰ و ۱۰۰-۱۰۰۰ به همراه سر پی پت های مناسب

۵-۵ دستگاه خلا چند شاخه ای (منیفلد خلا)، برای استقرار ستون های ایمونو افینیتی، مجهز به پمپ هوای فشار مثبت

۶-۵ تکان دهنده<sup>۱</sup>، چرخشی و یا افقی و یا معادل آن، با قابلیت تنظیم در ۴۰۰ دور در دقیقه

۷-۵ لوله های سانتریفوژ ۵۰ میلی لیتری، از جنس پلی پروپیلن و دارای درب پیچ

۸-۵ pH متر

۹-۵ سانتریفوژ، با قابلیت تنظیم در ۷۰۰۰ دور در دقیقه (g value=۵۳۲۳ mm/s<sup>2</sup>)

۱۰-۵ ورتکس

۱۱-۵ مخزن از جنس پلی اتیلن، با ظرفیت ۷۵ میلی لیتر و آداپتور قابل اتصال به ستون ایمونوآفینیتی، برای اتصال به ستون های ایمونوآفینیتی

۱۲-۵ پمپ خلا

۱۳-۵ کاغذ صافی، با قطر چشمه ۳۰ μm یا کوچکتر (مانند واتمن شماره ۱ یا معادل آن)

۱۴-۵ کاغذ صافی با الیاف شیشه‌ای<sup>۱</sup>، با قطر چشمه‌های ۱/۶ میکرومتر یا کوچکتر (مانند واتمن ۹۳۴AH- GF/B یا معادل آن)

۱۵-۵ فیلتر سر سرنگی، از جنس PTFE با قطر چشمه‌های ۰/۴۵ میکرومتر

۱۶-۵ دستگاه فیلتراسیون حلال

۱۷-۵ فیلتر یک بار مصرف از جنس (PTFE)، با قطر چشمه‌های ۰/۴۵ میکرومتر برای فیلتراسیون حلال ها

۱۸-۵ سرنگ میکروولیتری برای تزریق های دستی

۱۹-۵ سیستم کروماتوگرافی مایع با کار آیی بالا<sup>۲</sup>، شامل:

۱-۱۹-۵ سیستم تزریق دستی و یا خودکار، با لوپ مناسب برای تزریق ۱۰۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر یا معادل آن<sup>۳</sup>

۲-۱۹-۵ پمپ، با شدت جریان حجمی<sup>۴</sup> یک میلی لیتر در دقیقه

۲۰-۵ ستون تجزیه فاز معکوس

مانند ستون C<sub>18</sub> اکتیل دسیل سیلان (ODS)، با ابعاد ۵ μm × ۲۵ Cm × ۴/۶mm یا معادل آن به طوری که توانایی جدا سازی و تشخیص آفلاتوکسین ها را داشته باشد

۲۱-۵ آشکارساز فلورسانس دارای فیلتر

قابل تنظیم برای طول موج تحریک در حدود ۳۶۵ نانومتر و طول موج نشر در حدود ۴۳۵ نانومتر.

۲۲-۵ سیستم پردازش اطلاعات

۲۳-۵ سیستم مشتق سازی پس ستون

از یکی از سیستم های مشتق سازی به شرح زیر استفاده کنید:

---

1- Glass fiber filter

2-HPLC

۳- ظرفیت لوپ تزریق می تواند بر حسب میزان تزریق، پس از اعتبار بخشی تغییر نماید.

4-Volume flow rate

۵-۲۳-۱ سیستم تولید برمین به روش الکتروشیمیایی (در صورت استفاده از کبراسل برای مشتق سازی)

۵-۲۳-۲ سیستم مشتق سازی پس ستون با<sup>۱</sup> PBPB (در صورت استفاده از محلول پس ستون PBPB برای مشتق سازی)، مجهز به پمپ ثانویه بدون پالس، دارای قطعه T شکل با حجم مرده صفر، لوله واکنش ۳۰-۴۵ Cm با قطر داخلی ۰/۲۵ تا ۰/۵ mm، از جنس PTFE، با استفاده از محلول ۵۰ گرم در لیتر PBPB

۵-۱۲-۶-۱ سیستم مشتق ساز پس ستون فتوشیمیایی<sup>۲</sup> UV

## ۶ اصول آزمون

آنالیت با استفاده از حلال استخراج (طبق بند ۴-۱۷) استخراج می شود. پس از تکان دادن و سانتریفوژ، عصاره صاف شده، با حجم مشخصی از آب تا رسیدن به یک غلظت معین رقیق می شود. عصاره رقیق شده از ستون های ایمونوآفینیتی دارای آنتی بادی های ویژه آفلاتوکسین های گروه های G و B عبور داده می شود. با عبور عصاره رقیق شده از ستون، آنالیت موجود در عصاره (آنتی ژن) به آنتی بادی های درون ستون متصل می شود. آنالیت متصل شده به آنتی بادی، در درون ستون، با عبور متانول از داخل ستون، شسته و درون ویال جمع آوری و با آب رقیق می شود. تعیین مقدار با استفاده از روش فاز معکوس کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام می گیرد. تعیین مقدار از مقایسه سطح زیر منحنی و یا ارتفاع منحنی های استاندارد با نمونه مجهول، با احتساب ضریب رقت انجام می شود.

## ۷ روش اجرای آزمون

### ۷-۱ مراحل آزمون

۷-۱-۱ مقدار ۵ گرم از نمونه را به اضافه ۱ گرم نمک (طبق بند ۴-۴) را با ترازوی آزمایشگاهی با حساسیت ۰/۱ گرم، در ظرف سانتریفوژ وزن کنید.

۷-۱-۲ مقدار ۲۵ میلی لیتر حلال استخراج (طبق بند ۴-۱۷) به آن بیافزایید و آن را به خوبی تا زمانی که ذرات نمونه و حلال استخراج کاملاً مخلوط شوند، ورتکس کنید.

۷-۱-۳ محلول فوق را به مدت زمان ۱۰ دقیقه با تکان دهنده افقی در ۴۰۰ دور در دقیقه تکان دهید.

۷-۱-۴ سپس محلول بالا را در ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفوژ نمایید.

۷-۱-۵ فاز بالایی را جدا کرده و دور ریخته و فاز متانولی با کاغذ صافی معمولی (طبق بند ۵-۱۳)، صاف کنید.

۷-۱-۶ مقدار ۱۵ میلی لیتر از عصاره صاف شده را بردارید و با ۳۰ میلی لیتر آب در یک ظرف شیشه ای در دار به خوبی به هم بزنید تا ۴۵ میلی لیتر عصاره رقیق شده به دست آید.

1- Pyridium Bromide perbromide

2- Photochemical Post-Column Derivatization (Photochemical Reactor for Enhanced Detector "PHRED"<sup>TM</sup> or UVE<sup>TM</sup>)



۷-۱-۷ عصاره رقیق شده را از کاغذ صافی (طبق بند ۵-۱۴) عبور دهید. سپس ۳۰ میلی لیتر از عصاره را (معادل ۲ گرم از نمونه) به منظور عبور از ستون ایمونوآفینیتی، بردارید.

۷-۱-۸ ستون ایمونوآفینیتی که دارای آنتی بادی های گروههای B و G باشد را آماده کنید، به این ترتیب که آن ها را حداقل به مدت زمان ۱۵ دقیقه پیش از استفاده به دمای اتاق رسانیده و سپس، سر آن ها را باز کرده و مخزن را به ستون، متصل کنید. سپس، ۱۰ میلی لیتر از PBS را به مخزن منتقل و از ستون ایمونوآفینیتی عبور دهید.

۷-۱-۹ عصاره صاف شده بند ۷-۱-۷ را از ستون آماده شده، با سرعت ۲-۳ ml/min یا یک قطره در ثانیه عبور دهید.

۷-۱-۱۰ ستون ایمونوآفینیتی را با حدود ۱۰ میلی لیتر آب (طبق بند ۴-۱۳)، شستشو دهید و سپس ستون ایمونوآفینیتی را با فشار هوای مثبت خشک کنید.

۷-۱-۱۱ از ستون، ۵۰۰ میکرولیتر متانول (طبق بند ۴-۹) را عبور داده و آن را در یک ویال تمیز جمع آوری کنید. توجه کنید که آخرین قطره از ستون خارج شود. سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر دیگر متانول (طبق بند ۴-۹) را از ستون عبور داده و آن را در همان ویال جمع آوری کنید.

۷-۱-۱۲ محتویات ویال را با ۱۵۰۰ میلی لیتر آب (طبق بند ۴-۱۲) رقیق نمایید و آن را با ورتکس (طبق بند ۵-۱۰) به هم بزنید.

۷-۱-۱۳ در صورت مشاهده کدورت، محتویات ویال را با استفاده از فیلتر سر سرنگی (طبق بند ۵-۱۵) عبور دهید.

## ۷-۲ تزریق، جداسازی، تشخیص و تعیین مقدار

تزریق، جداسازی، تشخیص و تعیین مقدار با روش فاز معکوس کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به ترتیب، با استفاده از ستون فاز معکوس، مشتق ساز و دتکتور فلورسانس، مقایسه سطح زیر منحنی استاندارد با نمونه مجهول و احتساب ضریب رقت، محاسبه می شود.

در صورت استفاده از کبرا سل برای مشتق سازی، ضمن رعایت توصیه کارخانه سازنده، سرعت جریان برای فاز متحرک ۱ ml/min و شدت جریان ۱۰۰ تا ۲۰۰  $\mu\text{A}$  در نظر گرفته شود.

در صورت استفاده از محلول پس ستون PBPB برای مشتق سازی، محلول ۵۰ گرم در لیتر آن باید در آب (طبق بند ۴-۱۲) تهیه شود. و توسط پمپ جداگانه ای پس از ستون وارد سیستم شده و پس از عبور از لوله واکنش وارد دتکتور شود.

۷-۴ محلول های استاندارد کالیبراسیون را به دستگاه HPLC تزریق کنید.

با توجه به تفاوت حساسیت دستگاه های HPLC در آزمایشگاه های مختلف، حجم تزریق نیز می تواند متفاوت باشد. سیگنال حاصل از حجم تزریق شده باید در محدوده ای پایین تر از اشباع شدن<sup>۱</sup> شدن سیستم باشد. بنابراین هر آزمایشگاه باید حجم مناسب را برای تزریق اعتبار بخشی نموده و سپس از آن استفاده کند.

منحنی کالیبراسیون را به گونه ای که روی محور طول ها، تغییرات مربوط به جرم استاندارد بر حسب نانوگرم و روی محور عرض ها تغییرات مربوط به سطح زیر منحنی باشد، رسم کنید

۷-۴-۱ عصاره نهایی نمونه طبق بند ۷-۱-۱۲ را تزریق کنید. کروماتوگرام های حاصل را از نظر زمان بازداری با کروماتوگرام های استاندارد مقایسه کرده، نوع آلودگی را مشخص و میزان آلودگی را با استفاده از منحنی کالیبراسیون محاسبه کنید.

**یادآوری-** پس از اتمام تزریق ها، در صورت استفاده از کبراسل، آن را با آب (طبق بند ۴-۱۳) شستشو دهید و پس از جدا کردن آن از دستگاه کروماتوگرافی، با استفاده از حلال شستشوی (طبق بند ۴-۱۹)، مسیر های دستگاه را شستشو دهید. در صورت استفاده از سایر روش های مشتق سازی، دستگاه کروماتوگرافی را با استفاده از حلال شستشوی (طبق بند ۴-۱۹)، شستشو دهید.

## ۸ روش محاسبه و بیان نتایج

نتایج را با استفاده از فرمول ۲ به شرح زیر محاسبه کنید.

$$W_{smp} = \frac{((signal_{smp} - b) / a) \times V_{ext} \times V_{dil} \times V_{elu}}{W_{sample} \times V_{ali} \times V_{pass} \times V_{inj}} \quad \text{فرمول ۲:}$$

که در آن:

$W_{smp}$ : میزان آلودگی نمونه، بر حسب  $\mu\text{g}/\text{kg}$

$Signal_{smp}$ : سیگنال مربوط به آنالیت در نمونه (مساحت پیک آنالیت)

$b$ : عرض از مبدا منحنی کالیبراسیون

$a$ : شیب منحنی کالیبراسیون

$V_{ex}$ : حجم محلول استخراج، بر حسب ml

$V_{dil}$ : حجم محلول برای رقیق سازی، بر حسب ml

$V_{elu}$ : حجم محلول جمع شده در ویال، بر حسب ml

$V_{ali}$ : حجم برداشته شده از عصاره پس از استخراج، بر حسب ml

$V_{pass}$ : حجم محلول عبوری از ستون ایمونوآفینیتی، بر حسب ml

$V_{inj}$ : حجم نهایی محلول تزریق شده به دستگاه، بر حسب ml

$W_{sample}$ : وزن نمونه، بر حسب گرم.

**یادآوری ۱-** نتایج نهایی پس از محاسبه درصد بازیافت (طبق بند ۹-۱-۱) و احتساب آن در نتیجه آزمون، گزارش شود.

**یادآوری ۲-** در صورتی که سیگنال نمونه مورد آزمون از محدوده منحنی کالیبراسیون خارج شود عصاره استخراج شده صاف شده باید با متانول ۵۰ درصد رقیق سازی شده و دوباره به دستگاه، تزریق شود. در این صورت، حجم های استفاده شده در فرمول ۲ تغییر می کند که باید در محاسبه مورد توجه قرار گیرد.

مجموع آفلاتوکسین ها از جمع کردن مقدار های به دست آمده از هر یک از آفلاتوکسین ها تعیین می شود.

## ۹ تضمین کیفیت

صحت یک روش به خطاهای سیستماتیک که در روش و یا شرایط اجرای آن به وجود می آید، بستگی دارد. خطاهای سیستماتیک نتایج آزمون را تحت تاثیر قرار می دهد.

تخمین درصد بازیافت راهی برای ارزیابی خطاهای سیستماتیک و حصول اطمینان از صحت نتایج آزمون می باشد.

### ۱-۱-۹ اندازه گیری درصد بازیافت

اندازه گیری درصد بازیافت به شیوه های مختلف قابل انجام می باشد. یکی از معمول ترین آن ها، افزودن مقدار مشخصی از محلول استاندارد به نمونه شاهد می باشد. تخمین درصد بازیافت باید در هر روز کاری، همراه با انجام آزمون های روزانه تعیین شود. به این منظور به شرح زیر عمل کنید.

۱-۱-۱-۹ نمونه شاهد را برای تهیه آزمون، وزن کنید. نمونه توزین شده را به مخزن مخلوط کن منتقل کنید.

مقدار محلول استاندارد ذخیره مخلوط آفلاتوکسین (طبق بند ۴-۲۲) مورد نیاز برای سطح غنی سازی مورد نظر، با توجه به مقدار نمونه تعیین می شود. برای تعیین حجم استاندارد غنی سازی مورد نیاز از فرمول ۳ استفاده کنید.

$$C \frac{ng}{ml} \times \frac{1ml}{1000ng} \times W_t \times \frac{1000\mu l}{1ml} = V(\mu l) \quad \text{فرمول ۳}$$

که در آن:

C: سطح غنی سازی مورد نظر (ng/ml)

Wt: وزن نمونه (g)

V: حجم محلول استاندارد با غلظت ۱۰۰۰ ppb (مورد نیاز  $\mu l$ )

آزمون را طبق همین استاندارد انجام دهید و میزان آلودگی را محاسبه نمایید.

درصد بازیافت را با استفاده از فرمول ۴ به شرح زیر محاسبه کنید.

فرمول ۴:

$$\text{درصد بازیافت} = \frac{\text{میزان بدست آمده}}{\text{میزان قابل انتظار}} \times 100$$

درصد بازیافت تخمین زده شده را با جدول ۳ مقایسه کنید. چنان چه میزان محاسبه شده در محدوده اعلام شده جدول قرار گیرد، نسبت به صحت آزمون اطمینان حاصل نموده و نتایج را اعلام کنید. در غیر این صورت، نسبت به تکرار آزمون اقدام کنید.

نتایج نهایی بر اساس درصد بازیافت و ضریب رقت، تصحیح و محاسبه می شود.

یادآوری ۱- به منظور تخمین درصد بازیافت مطلوب، در آماده سازی محلول استاندارد و روش اضافه نمودن آن به نمونه شاهد دقت‌های لازم را به کار برید.

یادآوری ۲- محلول‌ها و ستون‌های خالص سازی باید دور از نور مستقیم خورشید و یا نور فلورسانس نگه داری شوند.

یادآوری ۳- تخمین بازیافت باید حداقل در یک سطح از آلودگی و با هر سری از نمونه‌ها انجام شود. سطح اندازه‌گیری بهتر است حداقل برابر با حد تعیین مقدار یا بزرگ تر از آن باشد.

### جدول ۳ - درصد بازیافت قابل قبول بر حسب سطح آلودگی

محدوده غلظت ( $\mu\text{g/Kg}$ )	درصد بازیافت قابل قبول
کمتر از ۱	۵۰-۱۲۰
۱-۱۰	۷۰-۱۱۰
بیشتر از ۱۰	۸۰-۱۱۰

### ۲-۹ دقت

دقت یکی از معیارهای مهم در ارزیابی اعتبار روش همه اندازه‌گیری‌های کمی است. بروز خطاهای تصادفی، در حین اجرای روش آزمون موجب کاهش دقت می‌شود.

دقت یک روش به شرایطی که روش در آن اجرا می‌شود، بستگی دارد. این شرایط را می‌توان به دو دسته تقسیم نمود:

الف- اجرای آزمون تحت شرایط تکرار پذیری

ب- اجرای آزمون تحت شرایط تجدیدپذیری

### ۱-۲-۹ روش محاسبه و ارزیابی تکرارپذیری

در شرایط تکرارپذیری، نمونه شاهد را در یک سطح مشخصی از آلودگی، غنی سازی نموده و آزمون را حداقل با ۳ تکرار انجام داده و درصد بازیافت را برای هر یک از نمونه‌ها محاسبه کنید. سپس با استفاده از فرمول‌های ۵، ۶ و ۷، میانگین، انحراف معیار، انحراف معیار نسبی را محاسبه کنید. انحراف معیار نسبی محاسبه شده را با انحراف معیار نسبی قابل قبول که در جدول ۴ نوشته شده است در غلظت مورد نظر مقایسه کنید. عدد به دست آمده نباید از عدد اعلام شده در جدول بیشتر باشد.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_1 + x_2 + \dots + x_n)}{N} \quad \text{فرمول ۵:}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x - \bar{x})^2}{N-1}} \quad \text{فرمول ۶:}$$

$$RSD_r = \frac{S}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{فرمول ۷:}$$

که در آن‌ها:

$\bar{x}$ : میانگین نتایج حاصل از آزمون

N: تعداد آزمون

$x_1, x_2, \dots, x_n$ : نتایج مربوط به هر یک از آزمون ها

S: انحراف معیار

$RSD_r$ : انحراف معیار نسبی برای تکرار پذیری.

### ۹-۲-۲ روش محاسبه و ارزیابی تجدید پذیری

حداقل در سه روز کاری متوالی، برای هر سطح از بازیافت اندازه گیری شده، با استفاده از فرمول های ۷، ۸ و ۹ میانگین، انحراف معیار و انحراف معیار نسبی را محاسبه کنید.

انحراف معیار نسبی بدست آمده را با انحراف معیار نسبی قابل انتظار به دست آمده از فرمول ۱۰، با توجه به غلظت مورد نظر که در جدول ۴ نوشته شده است مقایسه کنید.

$$RSD_R = 2^{(1 - 0.5 \log C)}$$

فرمول ۸:

که در آن:

C: غلظت مورد اندازه گیری، مطابق با جدول ۴

جدول ۴ - انحراف معیار نسبی قابل انتظار در تکرار پذیری و تجدید پذیری بر حسب غلظت

RSD <sub>R</sub> %	RSD <sub>r</sub> %	غلظت
۱۶	۱۱	۱ mg/kg (۱ ppm)
۲۳	۱۵	۱۰۰ µg/kg (۱۰۰ ppb)
۳۲	۲۱	۱۰ µg/kg (۱۰ ppb)
۴۵	۳۰	۱ µg/kg (۱ ppb)
۶۴/۵	۴۳	۰/۱ µg/kg (۰/۱۰ ppb)

### ۱۰ گزارش نتایج

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد:

۱-۱۰ نام و آدرس متقاضی

۲-۱۰ نام و مشخصات نمونه

۳-۱۰ تاریخ دریافت نمونه

۴-۱۰ تاریخ انجام آزمون

۵-۱۰ روش آزمون طبق استاندارد ملی ایران، شماره ۱۹۱۹۵

۶-۱۰ نتایج آزمون، همراه با یکاهای اندازه گیری

۷-۱۰ هر گونه جزئیات، که در انجام آزمایش مورد استفاده قرار گرفته و در این استاندارد نوشته نشده و یا این که اختیاری تلقی شده است.

۸-۱۰ نام و نام خانوادگی و امضاء آزمون کننده