

اعتبار بخشی روش اندازه گیری آفلاتوکسین M1 در ماست

مهسا تبری^{۱*}، خشایار تبری^۲، زهرا سالاری^۳

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لاهیجان، لاهیجان، ایران.

۲- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد لاهیجان دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

۳- گروه منابع طبیعی، واحد بافت، دانشگاه آزاد اسلامی، بافت، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۹/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۶)

چکیده

اعتبار بخشی اندازه گیری آفلاتوکسین در ماست بر اساس BS EN ISO 14501/2007 صورت گرفت. در این پژوهش از شیر خشک فاقد آفلاتوکسین (ساخت کشور هلند) برای تولید ماست استفاده گردید و با اضافه کردن آفلاتوکسین نمونه های پژوهش تهیه شد. اساس آزمایش، بر مبنای استخراج با ستون ایمونوآفینیتی و در تزریق به دستگاه HPLC با شناساگر FLD بود و تنظیمات دستگاهی طبق استاندارد انجام گردید. برای رسیدن به بهترین شرایط ممکن جهت شناسایی آفلاتوکسین و اطمینان از تفکیک آفلاتوکسین M1، کنترل های دستگاهی از جمله مهم ترین آن ها، کنترل جریان فاز متحرک و نسبت ترکیبات تشکیل دهنده فاز متحرک اعمال شد. جهت صحت گذاری روش آزمون های صحت و دقت، گزینش پذیری و تداخلات، حد تشخیص و حد تعیین، تکرارپذیری و تکثیرپذیری به منظور مناسب بودن داده ها، مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق این روش پس از جداسازی و خالص سازی حداکثر میزان بازیافت در غلظت ۰/۰۲۵ ppb معادل ۸۶/۷۷ درصد با RSD در رنج ۱/۸۴۱٪ - ۲/۵۶٪ بدست آمد. این روش نسبت به سایر روش ها سریعتر زمان بازداری کوتاهتر و از دقت و صحت بسیار بهتری برخوردار است و برای اندازه گیری دقیق مقادیر آفلاتوکسین M1 در ماست مناسب است.

واژگان کلیدی: اعتبار بخشی، آفلاتوکسین M1، ماست، HPLC، ستون ایمونوآفینیتی.

۱- مقدمه

برای شیر مصرفی نوزادان با محدودیت بیشتری روبرو است و حداکثر مجاز آن 100 ng/l تعیین شده است [۸]. از آنجایی که شیر یک غذای ضروری برای کودکان و سالمندان بوده و به دلیل حساسیت این گروه مصرف کننده به اثرات سمی آفلاتوکسین، لازم است تدابیر خاص جهت حفاظت جیره غذایی دامی از کپک‌های مولد آفلاتوکسین و همچنین تدابیری جهت حذف آفلاتوکسین M1 موجود در شیر به عمل آید. در بسیاری از کشورها برنامه بازرسی و کنترل روی مایکوتوکسین‌ها جهت حفظ و ارتقاء بهداشت عمومی صورت گرفته است. قابل ذکر است در بررسی‌های انجام شده بر روی نمونه‌های مختلف شیر در نقاط مختلف ایران در بعضی موارد مقادیر آفلاتوکسین بیش از حد مجاز اتحادیه اروپا ارزیابی شده است.

آفلاتوکسین‌ها وابسته به ترکیبات بیسفورانوکومارین بوده که دارای اثرات سمی، سرطان‌زایی، ناقص‌الخلقه‌زایی و جهش‌زایی هستند و به دلیل سمیت شدید یکی از نگرانی‌های بزرگ صنعت غذا به شمار می‌روند. آفلاتوکسین‌های M1 و M2 متابولیت‌های هیدروکسیله B1 و B2 هستند که در شیر حیوانات شیرده مانند گاوهای شیری دفع می‌شوند [۱،۲]. آفلاتوکسین‌ها و متابولیت‌های سمی آن‌ها، در غذا و محصولات غذایی ترکیبات پایداری بوده و در مقابل حرارت نسبتاً مقاوم می‌باشند به طوری که در دمای خشک 250°C درجه سیلیسیوس و نیز دمای 120°C درجه مرطوب پایداری دارند [۳-۷]. از دهه ۱۹۶۰ پس از کشف آفلاتوکسین تاکنون مقررات خاصی در کشورهای مختلف برای محافظت مصرف کنندگان وضع شده است. از آنجاییکه امکان حذف مایکوتوکسین از زنجیره غذایی وجود ندارد، کدکس میزان مجاز آفلاتوکسین در شیر را

Table 1 Aflatoxin M1 contamination in Iran

Sampels	Contamination content	Contamination%	
52 raw milk	23-300 $\mu\text{g/l}$	92.31%	Karim et al. [9]
111 raw milk	15-83 $\mu\text{g/l}$	76.6%	Kamkar et al. [10]
90 raw milk	79.4 $\mu\text{g/l}$	93.5%	Tabari et al. [11]
328 yoghurt	31-113 ng/l	80%	Tabari et al. [12]

و تهیه منحنی کالیبراسیون استفاده می‌شود. همچنین از ستون AlfaStar M1، (مدل M1 آفلاتوکسین، Romer factory)، پودر آفلاتوکسین M1 (ساخت کشور دانمارک و به شماره بچ ۷۸۸۹-۸۹۳۴۶) و دستگاه HPLC با مشخصات (پمپ HPLC مدل Waters, Separation Waters, Fluorescence Detector) و ستون C18 با طول ۲۵ سانتیمتر و قطر ۴ میلی‌متر با پارتنیکل‌هایی به سایز ۵ میکرومتر Zorbax, C18, 25*4 cm, 5 micro استفاده گردید.

۲-۱- تهیه محلول‌های استاندارد آفلاتوکسین

از آنجایی که غلظت دقیق محلول‌های آفلاتوکسین مورد

با توجه به اهمیت دقت روش آنالیز در اندازه گیری آفلاتوکسین در ماست، در این مطالعه، اعتباربخشی به روش اندازه گیری آفلاتوکسین در ماست و بالا بردن امکان سنجش حداقل مقدار آفلاتوکسین قابل اندازه گیری در فرآورده تخمیری شیر، ماست به عنوان یک روش موثرتر مورد مطالعه قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

در اندازه‌گیری آفلاتوکسین M1 مواد و تجهیزات مورد نیاز شامل مواد و تجهیزات مربوط به کار با دستگاه HPLC با دکتور فلورسنت و مواد مورد نیاز جهت تهیه محلول‌های استاندارد آفلاتوکسین M1 می‌باشد که جهت اسپایک گذاری

نزدیک به آن (مانند ایزومرها) یا تداخل یا ممانعت ترکیبات موجود در ماتریکس بسیار مهم می باشد. گزینش پذیری یکی از مسائل و مشکلات بسیار مهم می باشد که برای انجام آزمایش‌های دقیق باید این مشکل رفع گردد [۱۴].

۲-۵- معبر سازی روش اندازه گیری

دقت و بازیافت^۵ روش، بر اساس BS EN ISO 14501 مشخص گردید. به این ترتیب که سه سری آزمایش بر روی نمونه‌های ماست آلوده شده به آفلاتوکسین M1، در غلظت های ۰/۵ به ۱/۰ و ۱/۵ برابر MRL (معادل ۰/۰۲۵ μg/kg، ۰/۰۵ و ۰/۰۷۵)، در ۷ تکرار، مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۶۳ نمونه در سه روز مختلف، با تجهیزات مشابه و توسط سه اپراتور مختلف بررسی گردید. میزان بازیافت با بهینه سازی حجم شستشوی ستون ایمونوآفینیتی بهبود یافت. دقت بر حسب (R.S.Dr) یا (R.S.DR) صورت زیر محاسبه گردید:

تکرارپذیری^۶ (R.S.Dr): نوسان نتایج بدست آمده از انجام آزمایش‌های جداگانه با یک روش، در یک آزمایشگاه و به وسیله یک اپراتور با دستگاه‌های یکسان.

تکثیر پذیری^۷ داخل آزمایشگاه‌ها (R.S.DR): نوسان نتایج بدست آمده از آزمایش‌های جداگانه با یک روش، در یک آزمایشگاه، به وسیله اپراتورهای مختلف و در زمان‌های مختلف با استفاده از دستگاه‌های یکسان.

نتایج مربوط به آزمون دقت و باز یافت، در جدول ۳ نشان داده شده است که قبلاً با روش شاپیرو-ویلک^۸ برای اطمینان از توزیع نرمال و روش دیکسون^۹ برای حذف داده‌های انحرافی، مورد بررسی قرار گرفت. سپس تست کوچران^{۱۰} به منظور بررسی یکنواختی واریانس در محدوده غلظت اعمال شده انجام

استفاده نقش به‌سزایی در این پژوهش ایفا می کند در مرحله اول، ابتدا از پودر آفلاتوکسین M1 محلول ذخیره طبق استاندارد تهیه گردید [۱۴، ۱۳].

۲-۲- آماده سازی و تهیه نمونه

برای انجام این پژوهش، نیاز به نمونه ماست فاقد آلودگی بود. به جهت عدم دسترسی به نمونه فاقد آفلاتوکسین، به عنوان نمونه شاهد، ابتدا نمونه‌هایی از شیر خشک های موجود در بازار، مورد آزمون قرار گرفت و شیر خشک غیرآلوده (ساخت کشور هلند) برای تولید ماست استفاده گردید و از نمونه‌های تهیه شده به عنوان نمونه شاهد، در کلیه مرحله‌های پژوهش استفاده شد.

۲-۳- تنظیمات دستگاهی

تنظیمات اولیه دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، دارای تجهیزات زیر، مطابق استاندارد EN BS ISO 14501 انجام شد [۱۳]. پمپ: به وسیله پمپ جریان فاز متحرک، در داخل ستون کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ایجاد می شود. به وسیله پمپ جریان ثابت ۱/۲ میلی لیتر در دقیقه ایجاد شد. سیستم تزریق اتوماتیک یا دستی به حجم قابل کنترل ۲۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر، ستون C18: ۲۵ سانتی متری ۵ میکرومتری، پیش ستون C18: ۲ سانتی متری، آشکارساز فلورسانس با طول موج برانگیختگی ۱ برابر با ۳۶۰ نانومتر، طول موج نشری ۲ برابر با ۴۴۰ نانومتر، تقویت ۳ برابر با ۱۰۰۰ و زمان بازداری برابر با ۷ دقیقه به کارگرفته شد. ارزیابی دستگاهی، به کمک کامپیوتر و نرم افزار میلینیوم ۴ انجام شد. در این بخش، بررسی نتایج دستگاه، می تواند با استفاده از نرم افزار ACD LABs نیز صورت گیرد.

۲-۴- بررسی میزان گزینش پذیری و تداخلات

گزینش پذیری برای تمایز بین آنالیت مورد نظر و ترکیبات

5. Precision and Recovery
6. Repeadability
7. Reproducibility
8. Shapiro-Wilk
9. Dixon
10. Cochran

1. Excitation
2. Emission
3. Gain
4. Millinium

۲-۳- نتایج تنظیمات دستگاهی

فاز متحرک می‌تواند ترکیبی از آب-استونیتریل (۷۵،۲۵)، آب-استونیتریل-متانل (۶۵، ۲۵، ۱۰) و یا آب-ایزوپروپانل-استونیتریل (۸۰، ۱۲، ۸) باشد. شرایط بهینه براساس نوع ستون به‌کار گرفته شده تعیین گردید [۱۵،۱۶]. در این پژوهش، از ستون C18 و فاز متحرک به نسبت آب-استونیتریل-متانل (۵۵، ۳۰، ۱۵) استفاده شد. این اعتبار بخشی با رعایت کلیه اصول تایید و تاکید شده مطابق استانداردهای اروپا است. بر اساس استاندارد برخی ویژگی‌های اجرایی مانند گزینش پذیری^{۱۱} قبل از انجام معتبر سازی^{۱۲} باید تعیین گردد [۱۳، ۱۵].

۳-۳- نتایج حاصل از میزان گزینش پذیری و

تداخلات

از مشکلات دیگر، اثر حافظه بین تزریق های متوالی است. بهبود گزینش پذیری روش و پاک سازی ستون با عبور حجم مناسبی از فاز متحرک و تعادل دوباره پس از هر آزمایش، این مشکل را بر طرف می‌سازد. در مطالعات مقدماتی، در مقایسه-ی مهم‌ترین و شناخته شده‌ترین ایزومر آفلاتوکسین M1، یعنی آفلاتوکسین M2 و سایر مشتقات آفلاتوکسینی، مشخص گردید که تمامی این ترکیبات، دارای زمان بازداری متفاوتی با آفلاتوکسین M1 بودند. بررسی گزینش پذیری از نظر وجود ترکیبات طبیعی موجود (از نظر وجود متابولیت‌ها، ترکیبات درونی...)، با آنالیز ۱۰ نمونه شاهد از ماست بدست آمده از شیر فاقد آفلاتوکسین، ماست دارای ۳ ng/kg آفلاتوکسین M1 و نمونه ماست دارای ۵۰ ng/kg آفلاتوکسین M1. صورت گرفت و نتایج نشان داد که فاقد هر گونه تداخلی در آنالیز بود و تداخل ترکیبات ماتریکس در زمان بازداری آفلاتوکسین M1 در هیچ نمونه‌ای مشاهده نشد.

شد. در نهایت از تست ANOVA به منظور اطمینان از عدم وجود خطای دستگاهی استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج حاصل از محلول‌های استاندارد

آفلاتوکسین

نتایج حاصل از ترسیم منحنی کالیبراسیون و محدودیت های تشخیص و شناسایی رسم منحنی با تزریق‌های متوالی حجم-های مناسب ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ ppb انجام شد و انطباق بسیار مناسب در داده‌های ترسیم شده در منحنی مشاهده گردید. منحنی کالیبراسیون بر مبنای سطح پیک‌های حاصل از هر یک از تزریق‌های متوالی از هر نمونه‌ی استاندارد (که از حاصل ضرب میزان شدت جذب فلورئورسنت در واحد زمان به دست می‌آید و داده‌های سطوح محاسبه شده توسط دستگاه) و غلظت آفلاتوکسین‌های تزریق شده (محور افقی) رسم گردید. معادله خط بدست آمده از داده‌های ترسیم شده توسط دستگاه، $y = 0/582 x + 0/263$ با درجه خطی بودن $R^2 = 0/9999$ حاصل شد.

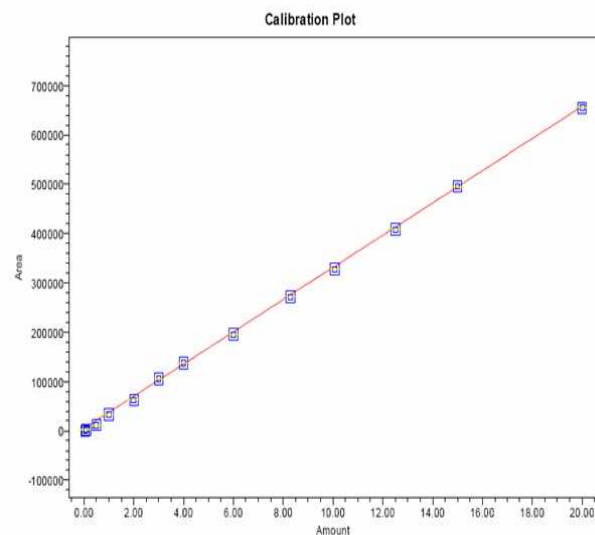


Fig 1 Standard curve of aflatoxin M1

تشخیص (LOD)^{۱۳} و حد تعیین (LOQ)^{۱۴} آفلاتوکسین M1 استفاده شد. این مقادیر، با استفاده از شیب خط (b) منحنی کالیبراسیون ماتریکس و خطای استاندارد باقی مانده^{۱۵} (SY/X) با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید:

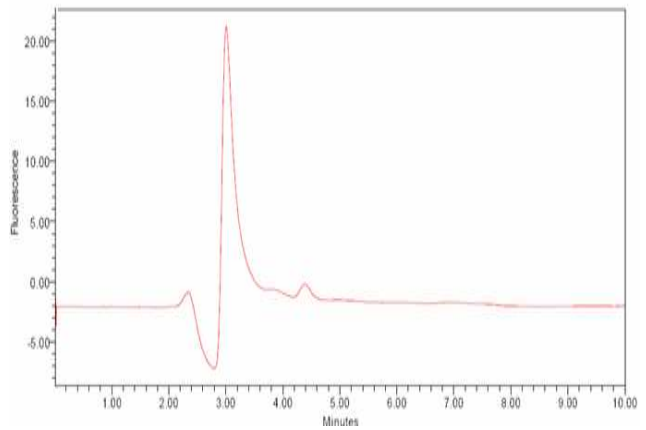
فرمول (۲ و ۳)

$$LOD=10 SY/X /b$$

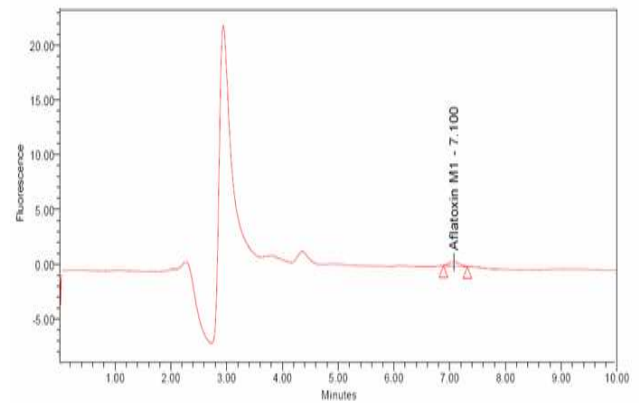
میزان LOD و LOQ به ترتیب برابر $0.12 \mu\text{g l}^{-1}$ و $1 \mu\text{g l}^{-1}$ در $0.15 \mu\text{g/kg}$ و $0.06 \mu\text{g/kg}$ معادل $0.30 \mu\text{l}$ ماتریکس بود. این حد تعیین در مقایسه با میزان تعیین شده آفلاتوکسین M1 در ماست ($0.05 \mu\text{g/kg}$) حد استاندارد اتحادیه اروپا قابل قبول است. حداکثر میزان بازیافت در غلظت 25 ppb معادل $74/28$ درصد و به طور متوسط $73/33$ درصد، حداکثر میزان بازیافت در غلظت 50 ppb معادل $80/89$ درصد و به طور متوسط $78/95$ درصد و حداکثر میزان بازیافت در غلظت 75 ppb معادل $86/77$ درصد و به طور متوسط $85/96$ درصد بدست آمد. میزان بازیافت نهایی $80/42$ درصد بدست آمد و در نهایت از تست ANOVA استفاده شد. نتایج حاصل از این تست نشان داد که خطای سیستماتیک وجود نداشته و بین داده‌های بدست آمده در روزهای مختلف، تفاوت معنی دار وجود ندارد ($p \geq 0.05$). هم‌چنین اثر متقابل روز و میزان آفلاتوکسین معنی دار نیست ($p \geq 0.05$).

بر اساس قوانین 401/2006/EC میزان مجاز تجاری R.D.S برای هر غلظت باید کم‌تر از دو برابر میزان بدست آمده از معادله هوریتز^{۱۶} باشد که با این معادله در R.S.D فقط بر اساس غلظت آنالیت (C) و بدون در نظر گرفتن ماتریکس و روش مورد استفاده بدست می‌آید. طبق فرمول Horwitz: فرمول (۴):

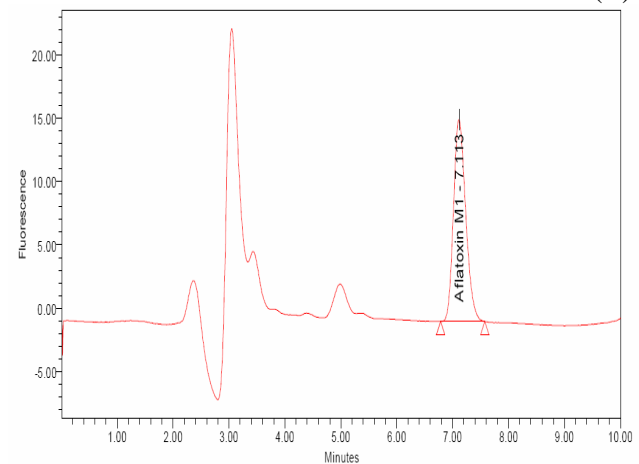
بازیافت تعیین شده در سه روز مختلف در غلظت های 0.25 ، 0.50 ، 0.75 ، 1.00 $\mu\text{g/kg}$ در محدوده $72/5-88/2$ درصد با R.S.D. بین $16/3-7/1$ درصد قرار داشت. متوسط میزان بازیافت بین روز ۱۷ و بین سطح ۱۸ که برای تصحیح نتایج آزمون‌ها استفاده شده است، 80 درصد بود.



(A)



(B)



(C)

Fig 2 Chromatogram of yoghurt (without aflatoxin M1) (A); Yoghurt spiked at 3ng/kg AflatoxinM1 (B); Yoghurt spiked at 50ng/kg AflatoxinM1 (C).

۳-۴- معبرسازی روش اندازه گیری آفلاتوکسین در ماست

به منظور تعیین میزان حساسیت، از دو فاکتور حد

13. Limit of Detection
14. Limit of Quantitation
15. Residual Standard Error
16. Horwitz
17. Inter-day
18. Inter-Level

Table 2 repeatability and recovery percentages

Fortification level (ng/kg)	Parameter	Op1	Op 2	Op3
25 (0.5 MRL)	Mean (ng kg ⁻¹)	18.57	18.28	18.14
	S.D. d (ng kg ⁻¹)	1.05	1.12	1.23
	R.S.D. (%)	6.6	8.41	7.33
50 (1.0 MRL)	Mean recovery (%)	74.28	72.57	73.14
	(ng kg ⁻¹) Mean	39.14	38.86	39.14
	(ng kg ⁻¹) S.D.	2.06	1.63	1.76
	Mean recovery (%)	80.85	78.28	77.71
	R.S.D. (%)	5.8	6.1	4.3
	(ng kg ⁻¹) Mean	64.71	63.71	65.00
75 (1.5 MRL)	(ng kg ⁻¹) S.D.	2.86	2.34	2.69
	Mean recovery (%)	86.28	84.95	86.66
	R.S.D. (%)	3.69	3	2.56

Abbreviations: MRL: maximum residue limit; SD: standard deviation.

1Op, operator: relative standard deviation under repeatability conditions (RSDr; seven replicates at each level).

2Relative standard deviation under inter-laboratory reproducibility conditions (with the same instrument

3Mean concentration calculated from the calibration curve.

and storage of telemes cheese. Food Additives and Contaminants, 18, 437-443.

[3] Philips, T.D. (1998). Isothermal Adsorption of Aflatoxin B1 on HSCAS Clay. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 59: 599-605.

[4] Creppy, E.E. (2002). 'Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe'. Toxicology Letter, 127:19-28.

[5] Gowda, N. K. S., Suganthi, R.U., Malathi, V. and A. Raghavendra. (2007). 'Efficacy of heat treatment and sun drying of aflatoxin-contaminated feed for reducing the harmful biological effects in sheep'. Animal Feed Science and Technology, 133: 167-175.

[6] Martins, M.L. and H.M. Martins. (2000). Aflatoxin M1 in raw and high temperature-treated milk commercialized in Portugal. Food Additional Contamination, 17 (10): 871-874.

[7] Prandini, A., G. Tansini, S. Sigolo, L. Filippi, M. Laporta, M. and G. Piva. (2008). 'On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products'. Food and Chemical Toxicology. 165-173.

[8] Codex Alimentarius Commission (2001). 'Comments submittad on the draft maximum level for Aflaxtoxin M1 in milk'. Codex

۴- نتیجه گیری نهایی

در این روش علی‌رغم مراحل آماده سازی کوتاه‌تر، میزان بازیافت بدست آمده با ضوابط اجرای تعریف شده توسط اتحادیه اروپا مطابقت داشت که میزان ۶۰-۱۲۰ درصد برای غلظت‌های بین ۰/۰۱۰-۰/۰۵۰ µg/kg و ۷۰-۱۱۰ درصد برای غلظت‌های بالای ۰/۰۵ µg/kg پیشنهاد می‌شود. مدت کوتاه پایداری^{۱۹} نتایج با تعیین بازیافت‌ها در سه روز مختلف ارزیابی گردید. همان‌طور که بازیافت‌ها و انحراف معیارهای مناسب مشخص است، روش در طول زمان آزمایش پایدار است.

۵- منابع

- [1] Cusumano, V., Rossano F. and R.A. Merendino. (1996). 'immunobiological activities of mould product: functional impairment of human'. monocytes exposed to aflatoxin B. 226:1065-1073.
- [2] Roussi, V., Koidis, P. A. and N. A. Botsoglou. (2001). Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing, ripening

19. Short term stability

- [13] BS EN ISO 14501: (2007). 'British standard of milk and milk powder – determine aflatoxin Clean-up immunoaffinity chromatography and determination by High-performance liquid chromatography'. BSi, ICS 67.100.10.
- [14] ISTISAN Report, (1996). SEIEVA Collaborative Group 1996, v, 30 p. Rapport ISTISAN 96/34.
- [15] Tabari, M., Karim, G., Ghavami, M. and M. Chamani. (2011) "Method validation for Aflatoxin M1 determination in yoghurt using immunoaffinity column clean-up prior to high- performance liquid chromatography". *Toxicology and Industrial Health*. Volume 27 Issue 7 August 2011 pp. 629 – 636.
- [16] Karim, G., Tabari, M., (2012) "An Experimental Study on Aflatoxin M1 Binding by Probiotic Bacteria in Yogurt". *Journal of Food Protection*, 31, 480-485.
- committee on food additives and cotaminants 33rd sessions, Hauge, The Netherlands.
- [9] Karim, G. (1982). Study on contamination of milk with aflatoxin in tehran, *Journal of Iranian Public Health*, 11(1-2): 19-23.
- [10] Kamkar, A. 2005. A study on the occurrence of aflatoxin M1 in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control* 16 (2005): 593-599.
- [11] Tabari, M. (2010). "Immunoaffinity column clean-up techniques for detection Aflatoxin M1 from Iran milk in Guilan province". *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science*. 8(6): 662-665.
- [12] Tabari, M., Tabari, Kh. And Tabari, O. Aflatoxin M1 determination in yoghurt produced in Guilan province of Iran using immunoaffinity column and high-performance liquid chromatography. *Toxicol Ind Health* 2012, 29, 72–76. DOI: 10.1177/0748233712446729

Validation of a method for determining Aflatoxin M1 in yoghurt

Tabari, M. ^{1*}, Tabari, Kh. ², Salari, Z. ³

1. Department of Food Science and Technology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

2. Young Researchers Club, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

3. Department of Natural Resources, Baft Branch, Islamic Azad University, Baft, Iran

(Received: 2016/12/16 Accepted: 2017/02/14)

Validating for detecting aflatoxin M1 in yoghurt according to Commission Decision BS EN ISO 14501:2007. In this study yoghurt samples prepared with milk powder without aflatoxin (Made in Holland) and then artificially contaminated by adding aflatoxin M1. Analytical method using immunoaffinity column for extraction and a high-performance liquid chromatography (HPLC) with FLD detector for quantification was performed according to the device settings. To achieve the best possible condition to identify and ensure the separation of aflatoxin M1, deploying some important device control such as, control the flow of the mobile phase and the mobile phase constituents was applied. The procedure for determining selectivity, recovery, precision, decision limit ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$) of the method has been reported. The method includes a preliminary clean-up and the average recoveries determined on three different days at the concentration levels of 0.025, 0.050 and 0.075 $\mu\text{g kg}^{-1}$ were in 74.28%, 80.89 and 86.77% respectively with RSD in the range of 2.56%-8.41%. The interday and interlevel mean recovery value, which has been used to correct routine analysis results, was 80%. The method is rapid, easily automatable with low retention time and high accuracy therefore useful for accurate and precise screening of aflatoxin M1 in yoghurt.

Key words: Validation, Aflatoxin M1, Yoghurt, HPLC, immunoaffinity column.

* Corresponding Author E-Mail Address: ma.tabari@gmail.com