



TÜRK STANDARDI TASARISI

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi:
Kalın

Biçimlendirilmiş: Yazı tipi:
9,5 nk, Kalın

tst EN ISO 14501

Mayıs 2008
TS EN ISO 14501: 2002 yerine

ICS 67.100.10

Süt ve süt tozu- Aflatoksin m1 muhtevası tayini- İmmunoafiniti kromatografi ile temizleme ve yüksek performanslı sıvı kromatografi ile tayini (ISO 14501:2007)

Milk and milk powder - Determination of aflatoxin M1 content - Clean-up by
immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid
chromatography
(ISO 14501:2007)

Lait et lait en poudre - Détermination de la
teneur en aflatoxine M1 - Purification par
chromatographie d'immunoaffinité et
détermination par chromatographie en phase
liquide à haute performance
(ISO 14501:2007)

Milch und Milchpulver - Bestimmung des
Gehalts an Aflatoxin M1- Reinigung durch
Immunoaffinitäts-
Chromatographie und Bestimmung mit
Hochleistungs- Flüssigchromatographie
(ISO 14501:2007)

I. MÜTALAA
2014/96860

EN ISO 14501: 2007 Standardının Türkçe Tercümesidir

TÜRK STANDARDLARI ENSTİTÜSÜ
Necatibey Caddesi No.112 Bakanlıklar/ANKARA

Milli Önsöz

Bu standard, CEN/TC 302 "Milk and milk products - Methods of sampling and analysis Süt ve süt ürünleri - Numune alma ve analiz yöntemleri" Teknik Komitesi tarafından hazırlanmış, CEN tarafından 13.10.2007 tarihinde onaylanmış ve Türk Standardları Enstitüsü Teknik Kurulu'nun 22.05.2008 tarihli toplantısında Türk Standardı olarak kabul edilerek yayımına karar verilmiştir .

Bu standardda kullanılan bazı kelimeler ve/veya ifadeler patent haklarına konu olabilir. Böyle bir patent hakkının belirlenmesi durumunda TSE sorumlu tutulamaz.

Bu standard yayımlandığında TS EN ISO 14501:2002 standardının yerini alır.

CEN üyeleri sırasıyla, Almanya, Avusturya, Belçika, Birleşik Krallık, Bulgaristan, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Estonya, Finlandiya, Fransa, Hollanda, İrlanda,İspanya, İsveç, İsviçre, İtalya, İzlanda, Kıbrıs, Letonya, Litvanya, Lüksemburg, Macaristan, Malta, Norveç, Polonya, Portekiz, Romanya, Slovakya, Slovenya ve Yunanistan'ın millî standard kuruluşlarıdır.

TS EN ISO 14501:2008 standardı, EN ISO 14501:2007 standardı ile birebir aynı olup, Avrupa Standardizasyon Komitesi'nin (Avenue Marnix 17 B-1000 Brussels) izniyle basılmıştır.

Avrupa Standardlarının herhangi bir şekilde ve herhangi bir yolla tüm kullanım hakları Avrupa Standardizasyon Komitesi (CEN) ve üye ülkelerine aittir. TSE kanalıyla CEN'den yazılı izin alınmaksızın çoğaltılamaz.

**Süt ve süt tozu - Aflatoksin m1 muhtevası tayini - İmmunoafiniti
kromatografi ile temizleme ve yüksek performanslı sıvı kromatografi
ile tayini
(ISO 14501:2007)**

Milk and milk powder - Determination of aflatoxin M1 content - Clean-up by
immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid
chromatography
(ISO 14501:2007)

Lait et lait en poudre - Détermination de la
teneur en aflatoxine M1 - Purification par
chromatographie d'immunoaffinité et
détermination par chromatographie en phase
liquide à haute performance
(ISO 14501:2007)

Milch und Milchpulver - Bestimmung des
Gehalts an Aflatoxin M1- Reinigung durch
Immunoaffinitäts-
Chromatographie und Bestimmung mit
Hochleistungs- Flüssigchromatographie
(ISO 14501:2007)

Bu Avrupa standardı CEN tarafından 13 Ekim 2007 tarihinde onaylanmıştır.

CEN/CENELEC üyeleri, bu Avrupa Standardına hiçbir değişiklik yapmaksızın ulusal standard statüsü veren koşulları öngören CEN/CENELEC İç Tüzüğü'ne uymak zorundadırlar. Bu tür ulusal standartlarla ilgili güncel listeler ve bibliyografik atıflar, CEN Yönetim Merkezi'ne veya herhangi bir CEN üyesine başvurarak elde edilebilir.

Bu Avrupa Standardı, üç resmi dilde (İngilizce, Fransızca, Almanca) yayınlanmıştır. Başka herhangi bir dile tercümesi, CEN ve CENELEC üyesinin sorumluluğundadır ve resmi sürümleri ile aynı statüde olduğu CEN Yönetim Merkezi'ne bildirilir.

CEN/CENELEC üyeleri sırasıyla, Almanya, Avusturya, Belçika, Birleşik Krallık, Bulgaristan, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Estonya, Finlandiya, Fransa, Hollanda, İrlanda, İspanya, İsveç, İsviçre, İtalya, İzlanda, Kıbrıs, Letonya, Litvanya, Lüksemburg, Macaristan, Malta, Norveç, Polonya, Portekiz, Romanya, Slovakya, Slovenya ve Yunanistan'ın milli standard kuruluşlarıdır.



Biçimlendirilmiş: Yazı tipi:
Times New Roman, 7,5 nk,
Türkçe, Yazım veya dilbilgisi
denetimi yapma

AVRUPA STANDARDİZASYON KOMİTESİ
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION
EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG

Yönetim Merkezi: Avenue Marnix 17, B-1000 Brussels

İçindekiler

Sayfa

Önsöz.....	3
------------	---

Önsöz

Bu standard (EN ISO 14501:2007) ISO/TC 34 “Tarımsal Gıda Ürünleri” Teknik Komitesi tarafından, sekretaryası NEN tarafından yürütülen CEN/TC 302 “Süt ve süt ürünleri- Numune alma ve analiz yöntemleri” Teknik Komitesi ile birlikte hazırlanmıştır.

Bu Avrupa Standardına en geç Nisan 2008 tarihine kadar aynı metni yayınlayarak ya da onay duyurusu yayınlayarak ulusal standard statüsü verilmeli ve çelişen ulusal standartlar en geç Nisan 2008 tarihine kadar yürürlükten kaldırılmalıdır.

Bu standard bazı unsurlarının patent haklarına konu olabileceğine dikkat edilmelidir. Böyle herhangi bir patent hakkının belirlenmesi durumunda CEN [ve/veya CENELEC] sorumlu tutulamaz.

Bu standard EN ISO 14501:1998 standardının yerini alır.

CEN/CENELEC İç Yönetmeliklerine göre, bu Avrupa Standardının ulusal standart olarak uygulamaya alınmasından sorumlu ulusal standart kuruluşlarının ülkeleri sırasıyla; Almanya, Avusturya, Belçika, Birleşik Krallık, Bulgaristan, Çek Cumhuriyeti, Danimarka, Estonya, Finlandiya, Fransa, Hollanda, İrlanda, İspanya, İsveç, İsviçre, İtalya, İzlanda, Kıbrıs, Letonya, Litvanya, Lüksemburg, Macaristan, Malta, Norveç, Polonya, Portekiz, Romanya, Slovakya, Slovenya ve Yunanistan’dır.

Onay bilgisi

ISO 14501:2007 metni CEN tarafından hiçbir değişiklik yapmadan EN ISO 14501:2007 olarak Kabul edilmiştir

ULUSLARARASI
STANDARD
INTERNATIONAL
STANDARD

ISO
14501
IDF
171

İkinci Baskı
2007-10-15

**Süt ve süt tozu - Aflatoksin m1 muhtevası tayini
İmnunoafiniti kromatografi ile temizleme ve
yüksek performanslı sıvı kromatografi ile tayini**

Milk and milk powder - Determination of aflatoxin M1 content
- Clean-up by immunoaffinity chromatography and
determination by high-performance liquid chromatography

*Lait et lait en poudre - Détermination de la teneur en aflatoxine M1 -
Purification par chromatographie d'immunoaffinité et détermination par
chromatographie en phase liquide à haute performance*



Referans Numarası
ISO 14501::2007(E)
IDF 171:2007 (E)

Yasal Uyarı

Bu PDF dosyası gömülü yazıyüzleri içerebilir. Adobe'nin lisans politikası uyarınca bu dosyalar yazdırılabilir ya da izlenebilir ancak gömülü yazıyüzlerinin düzenlenmesi izin alınmadıkça ve metin düzenlemesi yapan bir bilgisayara yüklenmedikçe yapılamaz. Bu dosyaları indirirken, taraflar Adobe'nin lisans politikalarını ihlal etmeme sorumluluğunu kabul ederler. ISO Merkez Sekreteryası bu alanda hiçbir sorumluluk kabul etmez.

Adobe, Adobe Systems Incorporated'in tescilli markasıdır.

Bu PDF dosyasını oluşturmak için kullanılan yazılım ürünleriyle ilgili detaylar, dosyanın Genel Bilgiler kısmında bulunabilir; PDF oluşturma parametreleri yazdırmak için optimize edilmiştir. Bu dosyanın ISO üyesi kuruluşların kullanımına uygun olmasını sağlamak için her türlü özen gösterilmiştir. Düşük bir ihtimal de olsa dosya ile ilgili bir sorunla karşılaşıldığında, lütfen aşağıda adresi verilen Merkez Sekreteryayı bilgilendiriniz.

© ISO 2007

Tüm hakları saklıdır. Aksi belirtilmedikçe, bu yayının herhangi bir bölümü herhangi bir şekilde ya da fotokopi ve mikrofilm dâhil aşağıda adresi verilen ISO'dan yazılı izin alınmaksızın ya da dokümanı talep edenin ülkesindeki ISO üyesinin yazılı izni olmaksızın elektronik veya mekanik herhangi bir yolla çoğaltılamaz ya da kullanılamaz.

ISO Telif Ofisi

Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20

Tel. + 41 22 749 01 11

Faks + 41 22 749 09 47

e-posta: copyright@iso.org

Web www.iso.org

İsviçre'de basılmıştır.

© ISO 2006 – Tüm hakları saklıdır.

İçindekiler**Sayfa**

Önsöz.....	iv
Önsöz.....	v
1 Kapsam.....	1
2 Terimler ve tarifler.....	1
2.1 Aflatoksin M ₁ muhtevası.....	1
3 Prensipte.....	1
4 Reaktifler.....	2
4.1 İmmunoafinitite kolonu.....	2
4.2 Asetonitril, saf, HPLC kalitesinde.....	2
4.3 Azot gazı.....	2
4.4 Aflatoksin M ₁ standard çözeltileri.....	2
5 Cihaz ve malzemeler.....	3
6 Numune alma.....	5
7 İşlem.....	5
7.1 Deney numunelerinin hazırlanması.....	5
7.2 İmmunoafinitite kolonunun hazırlanması.....	5
7.3 Numunenin ekstraksiyonu ve saflaştırılması.....	5
7.4 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi.....	6
8 Sonuçların hesaplanması ve gösterilmesi.....	7
8.1 Süt.....	7
8.2 Süt tozu.....	7
9 Kesinlik.....	7
9.1 Laboratuvarlar arası test.....	7
9.2 Tekrarlanabilirlik.....	7
9.3 Uyarılık.....	7
10 Deney raporu ¹	8
Ek A - (Bilgi amaçlı) - Laboratuvarlar arası deney sonuçları.....	10
Kaynaklar.....	11

Silinmiş: 4

Silinmiş: 4

Silinmiş: 4

Silinmiş: 4

Silinmiş: 4

Silinmiş: 5

Silinmiş: 6

Silinmiş: 6

Silinmiş: 6

Silinmiş: 6

Silinmiş: 6

Silinmiş: 6

Silinmiş: 6

Silinmiş: 7

Silinmiş: 8

Silinmiş: 9

Önsöz

ISO (Uluslararası Standardizasyon Kuruluşu) ulusal standard kuruluşlarının (ISO ülke kuruluşları) dünya çapında federasyonudur. Uluslararası Standard hazırlama çalışması normalde ISO teknik komiteleri aracılığı ile yapılır. Teknik komitenin kurulmasını sağlayan konu ile ilgilenen her bir üyenin o teknik komitede temsil edilme hakkı vardır. ISO ile işbirliği içindeki resmi ya da hükümet dışı uluslararası kuruluşlar da, çalışmalarda yer alabilir. ISO, elektroteknik standardizasyonla ilgili tüm konularında Uluslararası Elektroteknik Komisyonu (IEC) ile yakın işbirliği içinde çalışır.

Uluslararası Standardlar, ISO/IEC Direktifleri Bölüm 3'te verilen kurallara uygun olarak kaleme alınır.

Teknik komitelerin ana görevi, Uluslararası Standard hazırlamaktır. Teknik komitelerin kabul ettiği Taslak Uluslararası Standardlar, oylama için üye ülke kuruluşlarına gönderilir. Bir Uluslararası Standardın yayınlanması için oy veren üye ülkelerin en az % 75'inin onayı gerekir.

Bu dokümanın bazı kısımlarının patent haklarına konu olabileceğine dikkat edilmelidir. Bu tür herhangi bir ya da tüm patent haklarının belirlenmesi durumunda ISO sorumlu tutulamaz.

ISO 14501 IDF 171; ISO/TC 34, *Gıda ürünleri*, Teknik Komitesi, SC 5, *Süt ve süt ürünleri* Alt Komitesi ve Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF) tarafından hazırlanmıştır. ISO ve IDF tarafından ortaklaşa yayınlanmıştır.

ISO 14501 IDF 171'in bu ikinci baskısı teknik olarak gözden geçirilmiş olan ilk baskısını (ISO 14501:1998) iptal eder ve ilk baskının yerine geçer.

Önsöz

IDF (Uluslararası Sütçülük Federasyonu) her üye ülkede bir Ulusal Komite ile sütçülük sektörünün dünya çapında bir federasyonudur. Her Ulusal Komite teknik çalışmaları gerçekleştiren IDF Daimi Komitesinde temsil edilme hakkına sahiptir. IDF, süt ve süt ürünleri için analiz ve numune alma yöntemlerinin geliştirilmesinde ISO ile işbirliği yapar.

Aksiyon Takımları ve Daimi Komiteler tarafından kabul edilen Taslak Uluslararası Standartlar, oylama için Ulusal Komitelere gönderilir. Uluslararası Standart olarak basım, oy veren IDF Ulusal Komitelerinin en az %50'sinin onayının alınmasını gerektirir.

Bu dokümanın bazı unsurlarının patent hakkına konu olabileceğine dikkat edilmelidir. Böyle bir patent hakkının belirlenmesi durumunda, IDF sorumlu tutulamaz.

ISO 14501 IDF 171; ISO/TC 34, *Gıda ürünleri*, Teknik Komitesi, SC 5, *Süt ve süt ürünleri* Alt Komitesi ve Uluslararası Sütçülük Federasyonu (IDF) tarafından hazırlanmıştır. ISO ve IDF tarafından ortaklaşa yayınlanmıştır.

Tüm çalışma, Birleşmiş IDF-ISO *Katkı maddeleri ve atıklar için analitik yöntemler* Daimi Komitesinin *Organik atıklar* Aksiyon Takımı tarafından proje lideri Mr. L. Sørensen (DK) himayesinde yürütülmüştür.

ISO 14501 IDF 171'in bu baskısı teknik olarak gözden geçirilmiş IDF 171:1995'i iptal eder ve onun yerine geçer.

ULUSLARARASI STANDARD**ISO 14501: 2007(E)****Süt ve süt tozu - Aflatoksin M₁ muhtevası tayini- İmmunoafiniti kromatografi ile temizleme ve yüksek performanslı sıvı kromatografi ile tayini****1 Kapsam**

Bu standard, sütün ve süt tozunun, aflatoksin M₁ muhtevasının tayini için bir yöntemi kapsar. Yöntemin en düşük geçerlilik seviyesi, tam yağlı süt tozları için 0,08 µg/kg iken, süt tozundan hazırlanmış süt için bu değer, 0,008 µg/L'dir. Bu yöntem, yağ muhtevası düşük sültere, yağ alınmış sültere, düşük yağ muhtevalı süt tozuna ve yağ alınmış süt tozlarının tamamına uygulanabilir.

Uyarılar

1. Bu dokümanda tanımlanan yöntem aflatoksin M₁ çözeltilerinin kullanımını gerektirmektedir. Aflatoksinler insanlar için kanserojendir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından yapılan bilgilendirmelere dikkat edilmelidir.^{[4], [5]}.
2. Analizlerin yapıldığı laboratuvarı gün ışığından yeterince koruyunuz ve aflatoksin standart çözeltilerini, örneğin alüminyum folyo kullanarak ışıktan koruyunuz.
3. Sulu aflatoksin çözeltileri için asitle yıkanmamış (asitsiz yıkanmış) cam malzemelerin (meselâ, tüpler, ampuller, balonlar, beherler, şırıngalar) kullanımı, aflatoksin kaybına sebep olabilir. Bunlara ilâveten, yeni bir takım lâboratuvar cam malzemeleri aflatoksinin sulu çözeltileri ile temas ederse bu malzemelerin, birkaç saat süreyle seyreltik asit içine (meselâ, sülfürik asit 2 mol/L) daldırılıp bekletilmesi gerekir. Bunlar daha sonra asit kalıntılarının tamamının giderilmesi için damıtık su ile iyice çalkalanmalıdır (pH'nın 6 - 8 arasında kaldığından emin olmak için kontrol edilmelidir).
4. Katı bileşikler, organik çözücüdeki çözeltiler, su ile hazırlanmış çözeltiler ve dökülmeler gibi laboratuvar atıkları için ve kanserojen malzemelerle temas etmiş cam malzemeler için arıtma (dekontaminasyon) prosedürünü kullanınız. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından uygun arındırma prosedürleri geliştirilmiş ve doğrulanmıştır^{[4], [5]}.

2 Terimler ve tarifler

Bu standardın amaçları bakımından ISO 10993-1'de verilenlerle birlikte aşağıdaki terimler ve tarifler geçerlidir.

2.1 Aflatoksin M₁ muhtevası

Bu standardda belirtilen işleme göre tayin edilen maddelerin derişimi veya kütle kesri.

Not - Aflatoksin M₁ derişimi litrede mikrogram ve kütle kesiri kilogramda mikrogram olarak ifade edilir.

3 Prensip

Deney numunesi bir immunoafiniti kolonundan geçirilerek, aflatoksin M₁ ekstrakte edilir. Kolon, katı bir destek madde üzerine bağlanmış belirli antikorları ihtiva eder. Numune, söz konusu kolondan geçerken, antikorlar, seçimli olarak ortamda mevcut herhangi bir aflatoksin M₁'e (antijen) bağlanır ve bir antikor-antijen kompleksi oluşur.

Numune matrisinin diğer bütün bileşenleri su ile kolondan yıkanır. Daha sonra aflatoksin M₁, kolondan elue edilir ve eluat toplanır. Bu eluattaki mevcut aflatoksin M₁ miktarı, florimetrik dedektörlü yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC) ile tayin edilir.

4 Reaktifler

Aksi belirtilmedikçe, deneylerde analitik saflıktaki reaktiflerle, damıtık su veya demineralize su ya da eşdeğer saflıktaki su kullanılır.

4.1 İmmunoafinitite kolonu

İmmunoafinitite kolonu, aflatoksin M₁'e karşı antikor içermelidir. Kolonun en yüksek kapasitesi 100 ng aflatoksin M₁'den daha az olmamalı (bu değer 50 mL deney numunesi tatbik edildiğinde, 2 µg/L'ye karşılık gelir) ve 4 ng toksin ihtiva eden bir standard çözelti kolona uygulandığında aflatoksin M₁'in geri kazanımı % 80'den daha az olmamalıdır (bu değer 50 mL numune uygulandığında 80 ng/L'ye karşılık gelir). Yukarıda belirtilen nitelikleri sağlayan herhangi bir immunoafinitite kolonu kullanılabilir. Kolonların performansı, kolonların her partisi için en az bir kere olmak üzere düzenli olarak kontrol edilmelidir (Madde 4.1.1 ve Madde 4.1.2).

4.1.1 Kapasite kontrolü

1,0 ml aflatoksin M₁ standart stok çözeltisi (4.4.2) su ile 50 ml'ye seyreltilir. İyice karıştırılır ve üretici tarafından kolonun kullanımı için verilen talimatlara göre bütün hacim immuno-affinite kolonuna dikkatlice uygulanır. Kolon yıkanır ve toksin ayrıştırılır. Son süzütünün uygun bir derişimi hazırlandıktan sonra kolondan ayrıştırılan aflatoksin M₁ miktarı HPLC ile tayin edilir.

Aflatoksin için kapasite hesaplanır. Sonuçlar 4,1'de verilen gerekliliklerle karşılaştırılır.

4.1.2 Geri kazanımın kontrolü

0,005 µg/mL'lik aflatoksin M₁ çalışma çözeltisinden (Madde 4.5.3) 0,8 mL, bir pipet yardımıyla alınarak, suyla 10 mL'ye seyreltilir. İyice karıştırılır ve toplam hacim, immunoafinitite kolonuna uygulanır. Kolonun kullanımında, imalatçının verdiği tavsiyelere uyulmasına dikkat edilmelidir. Kolon yıkanır ve toksin elue edilir ve nihai eluatın uygun şekilde seyreltilmesinden sonra, kolonda tutulan toksin miktarı HPLC yardımıyla belirlenir. Aflatoksin geri kazanım değeri hesaplanır. Sonuç, Madde 4.1'de verilen değerlerle karşılaştırılır.

4.2 Asetonitril, saf, HPLC kalitesinde

4.2.1 Asetonitril % 25

750 ml suya 250 ml asetonitril (4.2) eklenir ve karıştırılır. Aynı orandaki diğer hacimler de kullanılabilir. Çözelti (eluent) kullanılmadan önce gazı giderilmelidir.

4.2.2 Asetonitril, % 10

900 ml suya 100 ml asetonitril (4.2) eklenir ve karıştırılır. Aynı orandaki diğer hacimler de kullanılabilir. Çözelti kullanılmadan önce gazı giderilmelidir.

4.3 Azot gazı

4.4 Aflatoksin M₁ standard çözeltileri

4.4.1 Aflatoksin M₁ standart Kalibrasyon çözeltisi

Aflatoksin M₁'in kloroformdaki standard çözeltisi, 10 µg/mL'lik anma derişiminde olan.

Derişim, en yüksek absorpsiyon için ilgili dalga boyunda, absorbansının aşağıdaki şekilde ölçülmesiyle belirlenir.

Spektrometre (Madde 5.14) kullanılarak, tanık olarak kloroforma karşı 330 nm ve 370 nm dalga boyları arasında kalibrasyon çözeltisinin absorbansı kaydedilir. 350 nm dalga boyuna yakın en büyük absorbansın λ_{max} olduğu dalga boyunda absorbans, A, ölçülür.

Derişim, C₁, mililitrede mikrogram olarak, aşağıdaki eşitlikten (1) hesaplanır:

$$C_1 = A \times M \times \frac{100}{d \times \epsilon} \quad (1)$$

Değiştirilmiş Alan Kodu

A : λ_{\max} 'daki absorpsiyon katsayısının sayısal değeri;

M : Aflatoksin M_1 'in mol kütlesi, gram/mol ($M=328$ g/mol);

d : Optik yol uzunluğu, cm ($d=1$ cm);

ε : Asetonitrildeki toksinin absorpsiyon katsayısının sayısal değeri, m^2/mol ($\varepsilon = 1\,985\, m^2 \cdot mol^{-1}$)

4.4.2 Aflatoksin M_1 standart stok çözeltisi

Yoğunluğu kontrol edildikten sonra, aflatoksin M_1 standart kalibrasyon çözeltisi (4.4.1) asetonitril (4.2) ile seyreltilerek 0,1 $\mu g/mL$ aflatoksin M_1 standart stok çözeltisi hazırlanır. Standart stok çözeltisi iyice ağzı kapatılmış ve ışıktan korumak için alüminyum folyo ile sarılmış olmalıdır.

Aflatoksin M_1 standart stok çözeltisi buzdolabında 1°C ile 5°C arasında, karanlıkta saklanmalıdır. Bu koşullar altında stok çözeltisi en az 2 ay dayanıklıdır. Standart stok çözeltisi 2 aydan daha eski ise, kullanmadan önce aflatoksin M_1 yoğunluğu belirlenir. Herhangi bir değişiklik varsa, çözelti imha edilmeli ve taze bir standart stok çözeltisi hazırlanmalıdır.

4.4.3 Aflatoksin M_1 standard çalışma çözeltileri

Aflatoksin M_1 standart çalışma çözeltileri hazırlanmadan önce standart stok çözeltisinin (4.4.2) ortam sıcaklığına gelmesi beklenir. Standart çalışma çözeltileri günlük olarak hazırlanmalıdır.

Aflatoksin M_1 standart stok çözeltisi (4.4.2) %10 asetonitril çözeltisi (4.2.2) ile aflatoksin M_1 derişimi 0,005 $\mu g/mL$ olacak şekilde seyreltilir.

Stok çözeltisinden parçalar ayrılır ve bu parçalar %10 asetonitril çözeltisi (4.2.2) ile seyreltilerek 0,05 ng/ml, 0,10 ng/ml, 0,20 ng/ml, ve 0,40 ng/ml aflatoksin M_1 içeren bir seri standart çalışma çözeltileri hazırlanır. Enjeksiyon hacmine bağlı olarak diğer son derişimler de seçilebilir.

5 Cihaz ve malzemeler

Genel lâboratuvar cihaz ve malzemeleri ile özellikle aşağıda belirtilenler :

5.1 Tek kullanımlık şırıngalar, 10 mL ve 50 mL kapasiteli.

5.2 Vakum sistemi (meselâ Büchner balonu, Vac-Elute sistemi¹⁾ veya peristaltik pompa).

5.3 Santrifüj, 2000 g radyal ivmeyi oluşturabilen.

5.4 Pipetler, 1,0 mL, 2,0 mL ve 50,0 mL kapasiteli.

5.5 Cam beher, 250 mL kapasiteli.

5.6 Ölçülü balon, 100 mL kapasiteli.

5.7 Su banyoları, 30°C ± 2°C, 50°C ± 2°C ve 35°C ile 37°C arasında çalışılabilen.

5.8 Süzgeç kâğıdı (Whatman No.4¹⁾ veya eş değeri).

5.9 Ölçülü konik cam tüpler, tıraşlı cam boyunlu ve kapaklı, sırasıyla 5 mL, 10 mL ve 20 mL kapasiteli.

5.10 HPLC cihazı, yaklaşık 1 mL/min sabit hacimsel debi üretme kapasiteli bir pompa ve sabit veya değişken enjeksiyon hacim döngüsü ile birlikte 20 µL'den 500 µL'ye kadar enjeksiyon hacim kapasiteli bir enjeksiyon sistemi ile donatılmış.

5.11 Ters farz HPLC analitik kolonu, 3 µm veya 5 µm oktadesil silika dolgulu ve ters faz koruyucu kolon ile birlikte

5.12 Floresans dedektör, 365 nm uyarı ve 435 nm yayılım dalga boyu sağlama ve uygun kromatografik koşullarda enjekte edilen 0,02 ng aflatoksin M₁'i saptama (sinyal/gürültü oranı:5) kapasiteli.

1) Vac-Elute sistemi ve Whatman, piyasadan temin edilebilir ürünlere örnektir. Bu bilgiler kullanıcıya kolaylık amacıyla verilmiştir. ISO'nun ve TSE'nin bu ürünleri onayladığı anlamı taşımaz.

5.13 Şeritli kayıt cihazı, yazıcı veya çizici ile veya elektronik entegratör ile veya bilgisayar tabanlı veri işleme sistemi ile birlikte.

5.14 Spektrofotometre, 200 nm'den 400nm'deki dalga boylarında ölçme kapasiteli ve 1 cm ışık yoluna sahip quartz spektro küveti ile birlikte.

5.15 Hassas terazi, 0,01 g ölçme kapasiteli.

6 Numune alma

Laboratuvara temsili bir örnek gönderilmiş olmalıdır. Taşıma veya depolama sırasında zarara uğramış veya değişmiş olmamalıdır.

Numune alma bu Uluslararası Standartta bahsedilen metodun bir parçası değildir. Tavsiye edilen bir numune alma metodu ISO 707 IDF 50'de verilmiştir.

7 İşlem

İşlem sırasında mümkün olduğunca gün ışığından korunmaya çalışılmalıdır.

Süt tozunun sıvı hale getirilmesi, afiniti kolonuna uygulanması, kolonun yıkanması ve elüsyon yöntemleri, kolon imalatçıları arasında çok az farklılık göstermektedir. Kolonlarla birlikte verilen özel talimatlar kesin olarak takip edilmelidir.

7.1 Deney numunelerinin hazırlanması

7.1.1 Süt

Süt numunesi, su banyosunda (Madde 5.7) 35°C - 37°C arasında ısıtılır. Süt, ya süzgeç kağıdından (Madde 5.8) süzülür (gerekirse birkaç süzgeç kullanılır) veya 15 dakika süreyle 2000 g'lik radyal ivmede santrifüjlenir. Hazırlanan süttten en az 50 mL toplanır. Madde 7.3'de belirtildiği şekilde işlemlere devam edilir.

7.1.2 Süt tozu

10 g'lık numune, 250 mL'lik bir behere (Madde 5.5) 0,01 g yaklaşımla tartılarak alınır. 50°C'a ön ısıtılmış sudan 50 mL alınır ve süt tozu üzerine azar azar ilâve edilir. Karıştırma bageeti kullanarak, homojen bir karışım elde edilene kadar, karıştırılır.

Süt tozu tamamıyla çözünmez ise, beher su banyosu (Madde 5.7) üzerine konur, 50°C sıcaklıkta en az 30 dakika bekletilir. Dikkatlice karıştırılır.

Süt tozu çözeltisinin 20°C - 25°C'a kadar soğuması için bekletilir ve daha sonra çok az miktarda su kullanarak 100 mL'lik ölçülü balona (Madde 5.6) tamamıyla aktarılır. Suyu, 100 mL işaret çizgisine kadar seyreltilir. Süt tozundan elde edilen süt, süzgeç kağıdından (larından) (Madde 5.8) yeterince süzülür veya 15 dakika süreyle 2000 g'lik ivmede santrifüjlenir. Hazırlanan süttten en az 50 mL alınır. Madde 7.3'deki işlemlerle deneye devam edilir.

7.2 İmmunoafiniti kolonunun hazırlanması

İmmunoafiniti kolonunun (Madde 4.1) üst kısmına tek kullanımlık 50 mL'lik şırınga (Madde 5.1) haznesi takılır. İmmuno-affinite kolon vakum sistemine (Madde 5.2) bağlanır.

7.3 Numunenin ekstraksiyonu ve saflaştırılması

Hazırlanan deney numunesinden (Madde 7.1.1 veya Madde 7.1.2) 50 mL'lik kısım bir pipetle alınarak 50 mL'lik şırınga haznesine konur (Madde 5.2) ve vakum sistemi (Madde 5.2) yardımıyla hacimsel akış hızı kontrol edilmek suretiyle, 2 mL/min - 3 mL/min yavaş ve kararlı bir akış hızında immunoafiniti kolonundan geçirilir.

50 mL'lik şırınga haznesi çıkarılır, yerine 10 mL'lik bir şırınga haznesi takılır. Kolon 10 mL su ile yıkanır. Su, kolondan kararlı, hacimsel akış hızında geçirilir. Kolon yıkandıktan sonra, tamamıyla kuruyana kadar içinden hava geçirilir.

Kolon, vakum sisteminden ayrılır. 10 mL'lik şırınga kullanılarak kolondan 4 mL asetonyitril (Madde 4.2) geçirilerek aflatoksin M₁ yavaşça elue edilir. Asetonyitrilin kolondan geçişi 60 s'de olmalıdır. Akış hızı, şırınga pistonu ile ayarlanır. Eluat, konik tüpte (Madde 5.9) toplanır. Çok yavaş bir azot (Madde 4.3) akışı kullanılarak, 30°C'da eluat hacmi, V_e, 20 µL - 500 µL'ye azaltılır.

Uyarı - Tamamiyle kuruluğa kadar buharlaştırılma halinde, madde kayıpları olabilir.

V_f = 10V_e, olacak şekilde seyreltilir (yani, suyla 500 µL - 5000 µL'ye; bakınız Not).

Not - Enjekte edilen aflatoksin M₁ ihtiva eden ekstraktın asetonyitril muhtevası, % 10 (v/v) sınır değeri aşarsa, HPLC kromatogramında pik genişlemesi görülür. Bununla beraber % 90 (v/v) üzerindeki su muhtevasının pikin görünümünde etkisi yoktur [8].

7.4 Yüksek performanslı sıvı kromatografi

7.4.1 Pompanın ayarlanması

Eluent (Madde 4.2.1) sabit hacim akış hızında, HPLC kolonuna pompalanır. Gerekirse (kullanılan kolonun tipine bağlı olarak) HPLC eluentinin (Madde 4.2.1) asetonyitril-su oranı; aflatoksin M₁'in diğer ekstrakte edilen bileşiklerden en uygun şekilde ayırımını sağlamak üzere ayarlanabilir.

Not - Eluentin (Madde 4.2.1) hacimsel akış hızı, kolona da (Madde 5.11) bağlıdır. Klâsik kolonlar için (yaklaşık olarak 25 cm uzunlukta ve yine yaklaşık olarak 4,6 mm iç çapında olanlar) kılavuz mahiyetinde yaklaşık 1 mL/dakikalık hacimsel akış hızı uygun sonuçlar verirken, iç çapı 3 mm olan HPLC kolonları için ise, bu değer 0,5 mL/dakikadır.

Ayrı ve aflatoksin M₁ standard çözeltisi (Madde 4.4.3) ile birlikte enjekte edilen numune ekstraktı (tercihan aflatoksin M₁ ihtiva etmeyen) kullanılarak, uygun şartların belirlenmesi tavsiye edilir.

7.4.2 Kromatografik performans

Standard çözeltinin (Madde 4.4.3) enjeksiyonunun doğruluğu ve kromatografik sistemin kararlılığı, kontrol edilmelidir. Kararlı pik alanları veya kararlı pik yükseklikleri elde edilene kadar, aflatoksin M₁ standard çözeltisi (sabit miktarda) tekrar tekrar enjekte edilir. Ardışık enjeksiyonlarda, pik alanında veya pik yüksekliğinde %5'den daha fazla farklılık olmamalıdır.

Aflatoksin M₁'in alıkonma süresine tepkisi, sıcaklığa bağlıdır. Bu nedenle, teşhis sistemindeki sapmalar telafi etmek için, sabit miktarda aflatoksin M₁ standart çalışma çözeltisi (Madde 4.4.3) düzenli aralıklarla enjekte edilir. Gerekirse, standart çalışma çözeltisi için elde edilen sonuçlar gözlenen kayma için doğrulanabilir.

7.4.3 Aflatoksin M₁'in kalibrasyon eğrisi

Enjeksiyon halkasına bağlı olarak, sırasıyla 0,05 ng, 0,1 ng, 0,2 ng ve 0,4 ng aflatoksin M₁ ihtiva eden, aflatoksin M₁ standard çözeltileri (Madde 4.4.3), uygun hacimlerde art arda enjekte edilir. Enjekte edilen aflatoksin M₁'in kütlesine karşı, pik alanı veya pik yüksekliğinin işaretlenmesiyle bir kalibrasyon eğrisi çizilir.

7.4.4 Safılaştırılmış ekstraktların analizi ve enjeksiyon şeması

Eluatın (Madde 7.3) uygun, V_i, hacmi, enjeksiyon halkası yardımıyla HPLC cihazına enjekte edilir. Standard çözeltiler için olan şartların aynısı uygulanarak mevcut aflatoksin M₁'in tamamı ayrılır. Belirlenen enjeksiyon şemasına göre ekstrakt örnekleri ve standard çözeltilerin enjeksiyonu yapılır.

Bir seri eluat numunesi birbiri arkasından enjekte edilecekse, eluat numunesinin her beş enjeksiyonu sonrasında standard aflatoksin M₁ çözeltisinin enjeksiyonunun yapılması tavsiye edilir.

Eluat numunesinin aflatoksin M₁ pik yüksekliği veya alanı belirlenir. Kalibrasyon grafiğinden, ekstrakte edilen numunenin enjekte edilen hacmindeki aflatoksin M₁ kütlesi, nanogram olarak belirlenir.

Eluat numunesindeki aflatoksin M₁'in pik alanı veya pik yüksekliği en yüksek derişimli standard çözeltisinin pik alanı veya pik yüksekliğinden daha büyükse eluat, kantitatif olarak suyla seyreltilir ve HPLC cihazına seyreltilmiş eluat çözeltisi yeniden enjekte edilir.

8 Sonuçların hesaplanması ve gösterilmesi

8.1 Süt

8.1.1 Hesaplama

Deney numunesinin aflatoksin M₁ içeriği yoğunluk olarak, c, mikrogram/litre cinsinden eşitlik (2) kullanılarak hesaplanır:

$$c = m_a \times \left(\frac{V_f}{V_i} \right) \times \left(\frac{1}{V_s} \right) \quad (2)$$

Değiştirilmiş Alan Kodu

m_a = Örnek süzüntünün aflatoksin M₁ pik alanına veya yüksekliğine karşılık gelen aflatoksin M₁ kütlesi, nanogram

Değiştirilmiş Alan Kodu

V_i = Enjekte edilen örnek süzüntünün hacmi, mikrolitre

Değiştirilmiş Alan Kodu

V_f = Örnek süzüntünün son hacmi, mikrolitre

Değiştirilmiş Alan Kodu

V_s = Kolondan geçen hazırlanmış deney çözeltisinin hacmi, mililitre

Değiştirilmiş Alan Kodu

8.1.2 Sonuçların gösterilmesi

Sonuçlar, virgülden sonra üç basamaklı olarak litrede mikrogram cinsinden gösterilir.

8.2 Süt tozu

8.2.1 Hesaplama

Numunenin aflatoksin M₁ içeriği kütle kesiri olarak, w, mikrogram/kilogram cinsinden Denklem (3) kullanılarak hesaplanır:

$$w = m_a \times \left(\frac{V_f}{V_i} \right) \times \left(\frac{1}{m_v} \right) \times f \quad (3)$$

Değiştirilmiş Alan Kodu

m_a = Hazırlanan deney örneğinin (7.3) 50 ml'sindeki süt tozu miktarı, gram

Değiştirilmiş Alan Kodu

f = Deney örneğinin seyreltme faktörü (seyreltilmemiş çözeltiler için f=1)

Değiştirilmiş Alan Kodu

8.2.2 Sonuçların gösterilmesi

Sonuçlar, virgülden sonra üç basamaklı olarak kilogramda mikrogram cinsinden gösterilir.

9 Kesinlik

9.1 Laboratuvarlar arası test

Laboratuvarlar arası testlerden elde edilen tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik değerleri ISO 5725-1 ve ISO 5725-2'e uygun olarak belirlenir. Testin detayları Ek A'da özetlenmiştir. Elde edilen değerler, verilen yoğunluk aralığı ve matrislerin dışında uygun olmayabilir.

9.2 Tekrarlanabilirlik

Özdeş deney maddeleri üzerinde aynı metot kullanılarak, aynı laboratuvar, aynı kişi tarafından, aynı cihaz kullanılarak, kısa bir zaman aralığı içinde elde edilmiş iki bağımsız test sonucu arasındaki mutlak fark, durumların en fazla %5'inde Tablo A.1.'de verilen değerlerden büyük olabilir.

9.3 Uyarılık

Özdeş deney maddeleri üzerinde aynı metot kullanılarak, farklı laboratuvarlarda, farklı kişiler tarafından, farklı cihazlar kullanılarak elde edilmiş iki bağımsız test sonucu arasındaki mutlak fark, durumların en fazla %5'inde Tablo A.1.'de verilen değerlerden büyük olabilir.

10 Deney raporu¹

Deney raporu şunları belirtmelidir:

- a) Numunenin tam tanımı için gerekli tüm bilgiler;
- b) Eğer biliniyorsa numune alma metodu;
- c) Kullanılan deney metodu, bu Uluslararası Standarda atıf yapılarak;
- d) Bu Uluslararası Standartta belirtilmeyen tüm çalışma detayları, ya da tercihen, sonuçları etkileyebilecek herhangi bir olayın tüm detayları ile birlikte;
- e) Elde edilen deney sonuçları ve eğer tekrarlanabilirlik kontrol edildiyse, belirtilen son elde edilmiş sonuçlar

¹⁾ **TSE Notu:** Deney raporu, burada istenilen bilgilere ilâveten, TS EN ISO/IEC 17025'de verilen bilgileri de ihtiva edecek şekilde düzenlenebilir.

Ek A (Bilgi amaçlı)

Lâboratuvarlar arası deney sonuçları

16 lâboratuvarın katıldığı uluslararası laboratuvarlar arası deneyler, düşük yağlı (kütle kesri %1) ve yüksek yağlı (kütle kesri % 28) süt tozu numunelerinde yapılmıştır. İkinci numuneler, referans malzemelerin [6] hazırlanmasında kullanılan süt tozu parti kalıntıları olup, bunların alfatoksin M₁ muhtevaları bilinmekteydi.

Süt tozu için kirlilik seviyeleri, 0,08 µg/kg'dan 0,6 µg/kg'a kadar değişmektedir. Bu aralık, süt tozundan hazırlanan süt için 8 ng/L - 60 ng/L'dir.

ISO 5725-1 ve ISO 5725-2'ye [2, 3] uygun şekilde kesinlik verileri elde etmek için, istatistiksel analize tabi tutulan sonuçlar, Çizelge A.1'de gösterilmiştir.

Not - Bu deneyden elde edilen veriler, kaynak [7] ve [8]'de yayınlanmıştır.

Çizelge A.1 - Kesinlik verileri

Örnek	1	2	3	4	5
Katılan laboratuvarlar ^a	12	14	13	11	14
Ortalama, \bar{x} (µg/kg)	0,081	0,150	0,080	0,202	0,580
Tekrarlanabilirliğin standart sapması, s_r (µg/kg)	0,008	0,022	0,005	0,010	0,073
Tekrarlanabilirlik değeri, $r = 2,8s_r$, µg/kg	0,023	0,060	0,015	0,027	0,203
Tekrarlanabilirliğin değişim katsayısı, $CV(r)$, %	9,9	14,0	6,8	4,7	12,5
Uyarlık standart sapması, s_R , µg/kg	0,019	0,035	0,015	0,022	0,110
Uyarlık değeri, $R = 2,8s_R$, µg/kg	0,052	0,098	0,041	0,061	0,310
Uyarlık değişim katsayısı, $CV(R)$, %	23	22,7	18,3	10,8	19,1
^a Laboratuvarlar Cochran testi ve/veya Grubbs outlier testi kullanılarak elenmiştir.					

Değiştirilmiş Alan Kodu

Kaynaklar

- [1] ISO 707:1997, *Milk and milk products - Guidance on sampling*.
- [2] ISO 5725-1:1994, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions*.
- [3] ISO 5725-2:1994, *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results _ Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*.
- [4] Laboratory decontamination and destruction of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in laboratory wastes. Castegnaro M., Hunt D.C., Sansone E.B., Schuller P.L., Siriwardana M.G., Telling G.M., Van Egmond H.P. and Walker E.A. *IARC Scientific Publication* N. 37, Int. Agency for Research on Cancer (WHO), Lyon (France), 1980. 59 p.
- [5] Laboratory decontamination and destruction of carcinogens in laboratory wastes: som mycotoxins. Castegnora M., Barek J., Fremy J.M., Lafontaine M., Miraglia M., Sansone E.B. and Telling G.M., *IARC Scientific Publication* No. 113, Int. Agency for Research on Cancer (WHO), Lyon (France), 1991, 63 p.
- [6] Commission of the European Community. Community Bureau of Reference, BCR. The certification of aflatoxin M₁ in three milk powder samples, CRM No. 282, 284, 285. van Egmond H.P and Wagstaffe P.J., *Report and Addendum report, EUR* 10412, 1986.
- [7] IDF collaborative study on the determination of aflatoxin M₁ in milk powder, using immunoaffinity columns. L.G.M.T. Tuinstra, Roos A.H., and van Trijp J.M.P., *RIKILT Report*, 92, 1992, p. 14
- [8] Liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk powder using immunoaffinity columns for cleanup: Interlaboratory study. Tuinstra L.G.M.t., Roos A.H. and van Trijp J.M.P., *J. A.O.A.C. Int.*, 1993, 76 (6), pp. 1248-1254.