

**TCVN 9051-2:2012**

**ISO 5765-2:2002**

Xuất bản lần 1

**SỮA BỘT, HỖN HỢP KEM LẠNH DẠNG BỘT VÀ  
PHOMAT CHẾ BIẾN – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG LACTOZA –  
PHẦN 2: PHƯƠNG PHÁP ENZYM SỬ DỤNG  
NHÓM CHỨC GALACTOZA CỦA LACTOZA**

*Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese – Determination of lactose content –  
Part 2: Enzymatic method utilizing the galactose moiety of the lactose*

**HÀ NỘI – 2012**

## Lời nói đầu

TCVN 9051-2:2012 hoàn toàn tương đương với ISO 5765-2:2002;

TCVN 9051-2:2012 do Cục An toàn vệ sinh thực phẩm tổ chức biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố;

Bộ tiêu chuẩn TCVN 9051 (ISO 5765), *Sữa bột, hỗn hợp kem lạnh dạng bột và phomat chế biến – Xác định hàm lượng lactoza* gồm các phần sau đây:

- TCVN 9051-1:2012 (ISO 5765-1:2002), *Sữa bột, hỗn hợp kem lạnh dạng bột và phomat chế biến – Xác định hàm lượng lactoza – Phần 1: Phương pháp enzym sử dụng nhóm chức glucoza của lactoza*;
- TCVN 9051-2:2012 (ISO 5765-2:2002), *Sữa bột, hỗn hợp kem lạnh dạng bột và phomat chế biến – Xác định hàm lượng lactoza – Phần 2: Phương pháp enzym sử dụng nhóm chức galactoza của lactoza*.

## **Sữa bột, hỗn hợp kem lạnh dạng bột và phomat chế biến – Xác định hàm lượng lactoza –**

### **Phần 2: Phương pháp enzym sử dụng nhóm chức galactosa của lactoza**

*Dried milk, dried ice-mixes and processed cheese – Determination of lactose content –  
Part 2: Enzymatic method utilizing the galactose moiety of the lactose*

#### **1 Phạm vi áp dụng**

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp enzym để xác định hàm lượng lactoza trong các loại sữa bột, hỗn hợp kem lạnh dạng bột khi có mặt các loại cacbohydrat khác và các chất khử trong phomat chế biến

#### **2 Thuật ngữ và định nghĩa**

Trong tiêu chuẩn này sử dụng thuật ngữ và định nghĩa sau đây:

##### **2.1**

##### **Hàm lượng lactoza (lactose content)**

Phần khối lượng của các chất xác định được theo quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH Hàm lượng lactoza được biểu thị bằng phần trăm khối lượng.

#### **3 Nguyên tắc**

**3.1** Dung dịch hoặc huyền phù từ phần mẫu thử được tách protein để thu được dịch chiết tinh sạch.

**3.2** Dịch chiết đã tinh sạch của phần mẫu thử được cho phản ứng với các enzym và các hợp chất sinh hóa sau đây:

a)  $\beta$ -galactosidaza để tách lactoza thành glucoza và galactosa;

## TCVN 9051-2:2012

b)  $\beta$ -galactosidaza dehydrogenaza khi có mặt nicotinamid adenin dinucleotid phosphat ( $\text{NAD}^+$ ) để xúc tác sự oxi hóa galactosa thành axit galactonic,  $\text{NAD}^+$  được khử thành NADH.

3.3 Lượng NADH xác định được bằng cách đo độ hấp thụ của dung dịch thử ở bước sóng 340 nm.

3.4 Hàm lượng lactosa tạo thành tỷ lệ thuận với lượng NADH và có thể tính được bằng cách hiệu chỉnh hàm lượng galactosa có mặt trong mẫu thử khi bắt đầu phân tích.

## 4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích, trừ khi có quy định khác. Nước sử dụng để chuẩn bị các dung dịch enzym phải là nước được chưng cất hai lần bằng dụng cụ thủy tinh. Nước sử dụng cho các mục đích khác là nước được chưng cất bằng dụng cụ thủy tinh hoặc có độ tinh khiết tương đương.

Cần chú ý ngày sản xuất và hạn sử dụng của các thuốc thử.

Nếu huyền phù enzym có hoạt độ khác với quy định này thì thể tích của huyền phù nêu trong (7.6.1) phải được tăng lên hoặc giảm đi tương ứng.

CHÚ THÍCH: Các thuốc thử nêu trong 4.4 và 4.6 đến 4.8 có thể có bán sẵn trên thị trường làm hỗn hợp thử, ví dụ bộ kit thử Boehringer<sup>1)</sup>.

### 4.1 Dung dịch kali hexacyanoferrat(II), $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$

Hòa tan trong nước 3,6 g kali hexacyanoferrat(II) ngậm ba phân tử nước. Pha loãng bằng nước đến 100 ml và trộn.

### 4.2 Dung dịch kẽm sulfat, $\text{ZnSO}_4$

Hòa tan trong nước 7,2 g kẽm sulfat ngậm bảy phân tử nước. Pha loãng bằng nước đến 100 ml và trộn.

### 4.3 Dung dịch natri hydroxit, $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

Hòa tan 4,0 g natri hydroxit trong nước. Thêm nước đến 1 000 ml và trộn.

### 4.4 Dung dịch đệm xitrat, $\text{pH } 6,6 \pm 0,1$

Hòa tan 2,8 g trinatri xitrat ngậm hai phân tử nước ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 0,042 g axit xitric ngậm một phân tử nước ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) và 0,625 g magie sulfat ngậm bảy phân tử nước ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) trong khoảng 40 ml nước.

---

<sup>1)</sup> Bộ kit thử Boehringer là một ví dụ về sản phẩm có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, còn tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng.

Chỉnh pH đến  $6,6 \pm 0,1$  ở  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bằng axit sulfuric ( $2\text{ mol/l}$ ) hoặc dung dịch natri hydroxit ( $0,1\text{ mol/l}$ ). Pha loãng bằng nước đến  $50\text{ ml}$  và trộn.

Khi dung dịch này được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ trong khoảng từ  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  thì có thể bền được 3 tháng.

#### 4.5 Dung dịch đệm phosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), pH $8,6 \pm 0,1$

Hòa tan  $16,6\text{ g}$  kali dihydro phosphat trong khoảng  $80\text{ ml}$  nước. Chỉnh pH đến  $8,6 \pm 0,1$  ở  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  bằng dung dịch natri hydroxit ( $1\text{ mol/l}$ ). Pha loãng bằng nước đến  $100\text{ ml}$  và trộn.

Khi dung dịch này được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ trong khoảng từ  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  thì có thể bền được 8 tuần.

#### 4.6 Dung dịch đệm NAD/xitrat

Hòa tan  $25\text{ mg}$  nicotinamid adenin dinucleotid ( $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_2$  có độ tinh khiết khoảng  $98\%$ ) trong  $5\text{ ml}$  dung dịch đệm xitrat (4.4).

Khi dung dịch này được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ trong khoảng từ  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  thì có thể bền được 3 tuần.

#### 4.7 Huyền phù $\beta$ -galactosidaza (từ *Escherichia coli*), tạo huyền phù trong dung dịch amoni sulfat $3,2\text{ mol/l}$ , có pH bằng $6 \pm 0,1$ .

Hoạt tính của huyền phù  $\beta$ -galactosidaza ( $\text{EC } 3.2.1.23$ )<sup>[5]</sup> phải bằng hoặc lớn hơn  $60\text{ đơn vị/ml}$  (lactoza làm cơ chất ở  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Khi huyền phù này được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ trong khoảng từ  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  thì có thể bền được 12 tháng. Khi sử dụng, phải ngâm lọ đựng huyền phù trong đá nghiền.

CHÚ THÍCH: Huyền phù  $\beta$ -galactosidaza chứa nhỏ hơn  $0,001\%$  của mỗi loại:  $\beta$ -fructosidaza,  $\alpha$ -galactosidaza, glucoza dehydrogenaza,  $\alpha$ -glucosidaza và NADH-oxidaza, tính theo hoạt độ đặc trưng của  $\beta$ -galactosidaza là thích hợp.

#### 4.8 Huyền phù $\beta$ -Galactosidaza dehydrogenaza (từ *Pseudomonas fluorescens*), tạo huyền phù trong dung dịch amoni sulfat $3,2\text{ mol/l}$ , có pH $6 \pm 0,1$ .

Hoạt độ của huyền phù  $\beta$ -Galactosidaza dehydrogenaza ( $\text{EC } 1.1.1.48$ )<sup>[5]</sup> phải bằng hoặc lớn hơn  $8\text{ đơn vị/ml}$ .

Khi huyền phù này được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ trong khoảng từ  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  đến  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  thì có thể bền được ít nhất 6 tháng. Khi sử dụng, phải ngâm lọ đựng huyền phù trong đá nghiền.

CHÚ THÍCH: Huyền phù  $\beta$ -galactosidaza dehydrogenaza chứa nhỏ hơn  $0,01\%$  alcol dehydrogenaza và nhỏ hơn  $0,01\%$   $\beta$ -galactosidaza, nhỏ hơn  $0,1\%$  NADH-oxidaza và enzym khử glucoza và nhỏ hơn  $0,5\%$  lactat dehydrogenaza là thích hợp.

## TCVN 9051-2:2012

### 4.9 Dung dịch chuẩn lactoza, $c(C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O) = 0,8 \text{ mg/ml}$

Trước khi sử dụng, sấy lactoza ngậm một phân tử nước đến khối lượng không đổi trong tủ sấy đặt ở nhiệt độ 87 °C.

Hòa tan trong nước 400 mg lactoza ngậm một phân tử nước đã sấy khô. Pha loãng bằng nước đến 500 ml và trộn. Dung dịch này có thể bền được 2 ngày nếu được bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ trong khoảng từ 0 °C đến 5 °C. Ngay trước khi sử dụng, làm ấm dung dịch đến khoảng 20 °C.

## 5 Thiết bị dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ của phòng thử nghiệm thông thường và cụ thể như sau:

5.1 Cân phân tích, có thể cân chính xác đến 1 mg và có thể đọc được đến 0,1 mg.

5.2 Cốc thủy tinh có mỏ, dung tích 50 ml, 100 ml và 250 ml.

5.3 Pipet chia độ, có thể phân phối được 5 ml, 10 ml, được chia các vạch 0,1 ml.

5.4 Pipet, có thể phân phối được 10 ml, 5 ml, 1 ml, 0,2 ml và 0,05 ml.

5.5 Bình định mức một vạch, dung tích 100 ml.

5.6 Giấy lọc gấp nếp, loại trung bình, đường kính khoảng 15 cm.

5.7 Phễu lọc, đường kính khoảng 7 cm.

5.8 Máy đo phổ, thích hợp để đo ở bước sóng 340 nm, được trang bị cuvet đường quang 1 cm.

5.9 Que khuấy bằng chất dẻo, thích hợp để trộn hỗn hợp mẫu/enzym trong cuvet đo phổ.

5.10 Đũa thủy tinh, đường kính khoảng 6 mm, dài 150 mm để làm ướt mẫu

5.11 Nồi cách thủy, có thể duy trì nhiệt độ trong khoảng từ 20 °C đến 25 °C, có giá đỡ thích hợp để giữ cuvet đo phổ (5.8) (tùy chọn, xem 7.6).

CHÚ THÍCH: Ngâm cuvet trong nồi cách thủy chỉ khi nhiệt độ phòng thấp dưới 20 °C.

5.12 Thiết bị trộn, thích hợp để chuẩn bị huyền phù phân mẫu thử là phomat chế biến (ví dụ: Ultra Turrax<sup>2)</sup>).

---

<sup>2)</sup> Ultra Turrax là một ví dụ về sản phẩm có bán sẵn trên thị trường. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn, còn tiêu chuẩn này không ấn định phải sử dụng chúng.

**5.13 Tủ sấy**, khống chế nhiệt độ ổn định, có thể duy trì được nhiệt độ  $87^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

**5.14 Dụng cụ nghiền hoặc xay**, có thể nghiền hoặc xay phomat và dễ dàng làm sạch.

## 6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707).

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc không bị biến đổi chất lượng trong quá trình vận chuyển hay bảo quản.

## 7 Cách tiến hành

### 7.1 Phép thử để kiểm tra quy trình

**7.1.1** Tiến hành phép thử sau đây để kiểm tra độ thu hồi lactoza nếu áp dụng một hoặc một số điều kiện dưới đây:

- a) nếu sử dụng mẻ mới của dung dịch đệm  $\text{NAD}^+$ /xitrat (4.6), huyền phù  $\beta$ -galactosidaza (4.7) hoặc huyền phù  $\beta$ -galactosidaza dehydrogenaza (4.8);
- b) nếu dung dịch đệm  $\text{NAD}^+$ /xitrat (4.6), huyền phù  $\beta$ -galactosidaza (4.7) và/hoặc huyền phù  $\beta$ -galactosidaza dehydrogenaza (4.8) đã được bảo quản trong tủ lạnh quá 2 tuần mà chưa sử dụng;
- c) nếu bắt đầu lại công việc phân tích sau một khoảng thời gian nghỉ;
- d) nếu có điều chỉnh trong khi thực hiện phép thử.

**7.1.2** Dùng pipet lấy 5,0 ml và 10,0 ml dung dịch chuẩn lactoza (4.9) cho vào 2 bình định mức 100 ml (5.5) tương ứng. Thêm khoảng 50 ml nước vào mỗi bình. Tiến hành theo 7.5 và 7.6.

**7.1.3** Tính hàm lượng lactoza ngậm một phân tử nước của dung dịch chuẩn lactoza (4.9) theo công thức (3) (xem 8.1), nhưng sử dụng các giá trị sau đây:

$V_3$  là thể tích dung dịch chuẩn lactoza (4.9),  $V_3 = 500$  ml;

$V_4$  là thể tích dung dịch chuẩn lactoza đã sử dụng (7.1.2),  $V_4 = 5$  ml và 10 ml tương ứng;

$V_5$  là thể tích dung dịch chuẩn lactoza đã pha loãng (7.1.2),  $V_5 = 100$  ml.

**7.1.4** Khi tính độ tinh khiết của lactoza ngậm một phân tử nước thì độ thu hồi thu được đối với cả hai dung dịch pha loãng (7.1.2) phải nằm trong dải  $100\% \pm 2\%$ .

Nếu độ thu hồi nằm ngoài dải này thì kiểm tra lại thuốc thử, kỹ thuật thao tác, độ chính xác của pipet và điều kiện của máy đo phổ. Cần thực hiện chính xác để thu được kết quả thích hợp. Lặp lại phép thử để kiểm tra quy trình cho đến khi thu được các kết quả thích hợp.

## **7.2 Chuẩn bị mẫu thử**

### **7.2.1 Sữa bột và hỗn hợp kem lạnh dạng bột**

Chuyển mẫu thử sang hộp đựng có nắp đậy kín khí, có dung tích lớn gấp đôi thể tích mẫu. Đậy ngay nắp hộp. Trộn kỹ mẫu bằng cách lắc và đảo chiều hộp đựng mẫu.

### **7.2.2 Phomat chế biến**

Loại bỏ phần cùi, đốm bẩn hoặc lớp mốc trên bề mặt của phomat sao cho phần mẫu thử đúng là đại diện cho phomat thường dùng. Nghiền hoặc xay mẫu thử bằng dụng cụ thích hợp (5.14). Trộn nhanh phần khối lượng mẫu thử đã nghiền hoặc xay và nghiền hoặc xay lần thứ hai, nếu có thể. Trộn kỹ lại. Nếu phần mẫu thử không thể nghiền được thì trộn kỹ mẫu bằng cách khuấy và trộn mạnh.

Nếu chưa sử dụng ngay thì chuyển phần mẫu thử vào hộp đựng kín khí có dung tích lớn gấp đôi thể tích mẫu chờ cho đến khi phân tích. Đậy ngay nắp hộp đựng mẫu. Chú ý để bảo toàn mẫu thử và tránh hơi ẩm tích tụ trên bề mặt phía trong hộp đựng.

Ngay sau khi nghiền, xay hoặc khuấy và trộn bằng dao, chuyển phần mẫu thử thu được vào cốc thủy tinh có mỏ 250 ml (5.2). Thêm cùng một lượng nước, dùng thiết bị trộn (5.12) để tạo hỗn hợp huyền phù.

## **7.3 Phần mẫu thử**

Cân khoảng 1 g hoặc một lượng lớn hơn của mẫu thử đã chuẩn bị (7.2.1) hoặc huyền phù của mẫu thử (7.2.2), chính xác tới 1 mg, cho vào cốc có mỏ 100 ml (5.2). Hòa hoặc tạo huyền phù mẫu thử trong ít nhất 20 ml nước đã được làm ấm trước đến khoảng từ 40 °C đến 50 °C, sử dụng đĩa thủy tinh (5.10) hoặc thiết bị trộn (5.12). Chuyển định lượng lượng chứa trong cốc có mỏ sang bình định mức 100 ml (5.5). Pha loãng bằng nước đến khoảng 60 ml và trộn.

Khi xác định khối lượng phần mẫu thử cần lấy, phải xem xét đến các yếu tố sau đây:

- phần mẫu thử phải đại diện cho toàn bộ mẫu thử;
- hàm lượng lactoza trong cuvet đo phổ tốt nhất là trong khoảng từ 5 µg đến 100 µg;
- độ hấp thụ ( $A_2$ ) của dung dịch trong cuvet đo phổ đối với glucoza trong mẫu thử (xem 8.1), nên trong khoảng từ 0,1 đến 0,4;
- nếu phần khối lượng lactoza trong phần mẫu thử nhỏ hơn 0,2 % thì cần nhiều hơn 1 g phần mẫu thử. Khi đó, thể tích chất béo, protein và các chất khác kết tủa trong 7.5.1 có thể có ảnh hưởng đáng kể đến thể tích phần mẫu thử (xem  $V_3$  trong 8.1).



#### 7.4 Phép thử mẫu trắng

Tiến hành phép thử mẫu trắng lặp lại hai lần. Tiến hành theo quy định trong 7.5 và 7.6 sử dụng tất cả các thuốc thử thay cho phần mẫu thử.

#### 7.5 Loại protein

**7.5.1** Thêm theo thứ tự dưới đây, vào dung dịch thử hoặc huyền phù mẫu thử (7.3) đựng trong bình định mức một vạch 100 ml:

- 5,0 ml dung dịch kali hexacyanoferrat(II) (4.1);
- 5,0 ml dung dịch kẽm sulfat (4.2) và
- 10,0 ml dung dịch natri hydroxit (4.3), khuấy kỹ sau mỗi lần thêm.

Thêm nước đến vạch 100 ml và trộn kỹ.

Sau khi thu được hỗn hợp, để yên hỗn hợp 30 min. Không làm xáo trộn lượng chứa trong bình định mức trước khi lọc.

**7.5.2** Lọc phần nổi phía trên qua giấy lọc (5.6), loại bỏ phần dịch lọc đầu tiên.

#### 7.6 Tiến hành xác định

##### 7.6.1 Sơ đồ cách tiến hành

Tiến hành xác định theo sơ đồ trong Bảng 1, chú ý để đưa  $\text{NAD}^+$ /dung dịch đệm xitrat (4.6), dung dịch đệm phosphat (4.5) và nước về nhiệt độ phòng (từ 20 °C đến 25 °C) trước khi sử dụng.

**Bảng 1 – Sơ đồ xác định**

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Phép thử đối với mẫu hoặc chất chuẩn |           | Phép thử mẫu trắng   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------|----------------------|-----------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | lactoza và galactoza                 | galactoza | lactoza và galactoza | galactoza |
| Dùng pipet lấy cho vào cuvet đo phổ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                      |           |                      |           |
| Dung dịch đệm $\text{NAD}^+$ /xitrat (4.6)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 0,20 ml                              | 0,20 ml   | 0,20 ml              | 0,20 ml   |
| Huyền phù $\beta$ -galactosidaza (4.7)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 0,05 ml                              | –         | 0,05 ml              | –         |
| Nước                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | –                                    | 0,05 ml   | –                    | 0,05 ml   |
| Dịch lọc của mẫu hoặc chất chuẩn (7.5.2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 1,00 ml                              | 1,00 ml   | –                    | –         |
| Dịch lọc của mẫu trắng (7.5.2)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | –                                    | –         | 1,00 ml              | 1,00 ml   |
| Trộn lượng chứa trong cuvet đo phổ, dùng que khuấy bằng chất dẻo (5.9) rồi ủ 15 min ở nhiệt độ trên 20 °C trong nồi cách thủy (5.11), nếu cần.<br>Sau đó dùng pipet (5.4) thêm vào cuvet đo phổ như sau:                                                                                                                                                                                                            |                                      |           |                      |           |
| Dung dịch đệm phosphat (4.5)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 1,00 ml                              | 1,00 ml   | 1,00 ml              | 1,00 ml   |
| Nước                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 1,00 ml                              | 1,00 ml   | 1,00 ml              | 1,00 ml   |
| Trộn lượng chứa trong cuvet đo phổ; 2 min sau khi trộn, đo độ hấp thụ $A_0$ của dung dịch trong từng cuvet dựa vào không khí khi đo ở bước sóng 340 nm.<br>Sau đó dùng pipet (5.4) thêm vào cuvet đo phổ như sau:                                                                                                                                                                                                   |                                      |           |                      |           |
| Huyền phù $\beta$ -Galactosidaza dehydrogenaza (4.8)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 0,05 ml                              | 0,05 ml   | 0,05 ml              | 0,05 ml   |
| Trộn lượng chứa trong cuvet đo phổ, rồi ủ 15 min ở nhiệt độ trên 20 °C trong nồi cách thủy (5.11), nếu cần.<br>Đo độ hấp thụ $A_{15}$ của dung dịch trong từng cuvet so với không khí.<br>Sau 5 min, đo lại độ hấp thụ của từng dung dịch. Nếu phản ứng chưa kết thúc thì tiếp tục đọc độ hấp thụ của từng dung dịch sau các khoảng thời gian 5 min, cho đến khi độ hấp thụ ổn định sau các khoảng 5 min liên tiếp. |                                      |           |                      |           |

## 7.6.2 Tính các độ hấp thụ

**7.6.2.1** Nếu sau 15 min ủ mà độ hấp thụ không tăng thì tính độ hấp thụ  $A$  của lượng chứa trong từng cuvet để sử dụng trong phép tính (xem 8.1), dùng công thức sau:

$$A = A_t - A_0 \quad (1)$$

Trong đó:

$A_0$  là độ hấp thụ đo được trước khi thêm huyền phù  $\beta$ -galactosidaza dehydrogenaza;

$A_t$  là độ hấp thụ đo được sau khi ủ trong khoảng thời gian 15 min.

**7.6.2.2** Nếu sau 15 min mà phản ứng vẫn chưa dừng thì tính độ hấp thụ  $A$  của lượng chứa trong từng cuvet để sử dụng trong phép tính (xem 8.1), dùng công thức sau:

$$A = (A_t - A_0) - \frac{t}{5} (A_t - A_{t-5}) \quad (2)$$

Trong đó:

$A_0$  là độ hấp thụ đo được trước khi thêm huyền phù  $\beta$ -galactosidaza dehydrogenaza;

$A_t$  là độ hấp thụ đo được sau khi ủ trong khoảng thời gian  $t$  min;

$A_{(t-5)}$  là độ hấp thụ đo được sau khi ủ trong khoảng thời gian  $(t-5)$  min.

### 7.6.3 Kiểm tra xác nhận

Nếu độ hấp thụ  $A$  vượt quá 0,500 thì lặp lại quy trình quy định trong 7.6.1 và 7.6.2, sử dụng dung dịch pha loãng thích hợp của dịch lọc (7.5.2).

## 8 Tính và biểu thị kết quả

### 8.1 Tính

Hàm lượng lactoza,  $w_L$  tính được theo công thức sau:

$$w_L = \frac{[(A_1 - A_3) - (A_2 - A_4)] \times M_r}{K \times l} \times \frac{V_1 \times V_3 \times V_5}{V_2 \times V_4} \times \frac{100}{m}$$

Trong đó:

$w_L$  là hàm lượng lactoza, được biểu thị bằng phần trăm khối lượng;

$A_1$  là độ hấp thụ (tính được trong 7.6.2) của phép thử mẫu hoặc chất chuẩn về lactoza và galactoza;

$A_2$  là độ hấp thụ (tính được trong 7.6.2) của phép thử mẫu hoặc chất chuẩn về galactoza;

$A_3$  là độ hấp thụ (tính được trong 7.6.2) của phép thử mẫu trắng về lactoza và galactoza;

$A_4$  là độ hấp thụ (tính được trong 7.6.2) của phép thử mẫu trắng về galactoza;

$M_r$  là khối lượng phân tử của lactoza, đối với lactoza dạng khan thì  $M_r = 342,30$  và lactoza ngâm một phân tử nước thì  $M_r = 360,31$ ;

$K$  là hệ số hấp thụ phân tử của NADPH ở bước sóng 340 nm ( $K = 6,3 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ );

$l$  là chiều dài đường quang lý thuyết của cuvet đo phổ, tính bằng centimet (1 cm);

$V_1$  là tổng thể tích của chất lỏng trong cuvet đo phổ (7.6.1), tính bằng mililit (3,30 ml);

## TCVN 9051-2:2012

$V_2$  là thể tích dịch lọc (7.5.2) hoặc dung dịch pha loãng của dịch lọc (7.6.3) được cho vào cuvet đo phổ (1,00 ml), tính bằng mililit (ml);

$V_3$  là thể tích của dung dịch được chuẩn bị trong 7.5.1 (100 ml), tính bằng mililit (ml);

$V_4$  là thể tích của dịch lọc (7.5.2) được lấy để pha loãng (7.6.3), tính bằng mililit (ml);

$V_5$  là thể tích dung dịch thử được lấy để pha loãng (7.6.3), tính bằng mililit (ml);

$m$  là khối lượng phần mẫu thử (7.3), tính bằng gam (g).

Nếu giá trị ( $A_2 - A_4$ ) là giá trị âm thì mới được tính đến.

CHÚ THÍCH: Nếu khối lượng phần mẫu thử lớn hơn 1 g thì thể tích  $V_3$  có thể được tính như sau:

$$V_3 = 100 - P$$

Trong đó  $P$  là thể tích phần kết tủa, tính bằng mililit. Có thể tính giá trị  $P$  từ thành phần gần đúng của phần mẫu thử theo công thức:

$$P = 1,1 \times (\text{gam chất béo}) + 0,73 \times (\text{gam protein}) + 0,65 \times (\text{gam tinh bột}) + 0,55 \times (\text{gam tro hòa tan}).$$

## 8.2 Biểu thị kết quả

Báo cáo kết quả đến ba chữ số có nghĩa.

## 9 Độ chụm

### 9.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các chi tiết về phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được công bố trong [6].

Các giá trị về độ lặp lại và độ tái lập thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này được xác định phù hợp với TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng được cho dải nồng độ và chất nền khác với các dải nồng độ và chất nền đã nêu.

CHÚ THÍCH: IDF 135 đưa ra các hướng dẫn chi tiết về các phép thử liên phòng quốc tế đối với các phương pháp phân tích và các sản phẩm sữa. Hướng dẫn này được dựa vào TCVN 6910 (ISO 5725).

### 9.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ thu được, khi sử dụng cùng một phương pháp, trên cùng một loại vật liệu thử, trong cùng phòng thử nghiệm, do cùng một người thao tác và sử dụng cùng một thiết bị trong cùng một khoảng thời gian ngắn như nhau, không được quá 5 % trường hợp vượt quá các giá trị sau:

- đối với sữa bột và hỗn hợp kem lạnh dạng bột: 3 % trung bình của các kết quả;
- đối với phomat chế biến: 6 % trung bình của các kết quả.

### 9.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập, riêng rẽ thu được, khi sử dụng cùng một phương pháp, trên cùng một loại vật liệu thử, trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do những người thao tác khác nhau thực hiện và sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp vượt quá các giá trị sau:

- đối với sữa bột và hỗn hợp kem lạnh dạng bột: 6 % trung bình của các kết quả;
- đối với phomat chế biến: 14 % trung bình của các kết quả.

## 10 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết về việc nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi chi tiết thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được cho là tùy chọn, cùng với các chi tiết bất thường khác có thể ảnh hưởng tới kết quả;
- e) kết quả thử nghiệm thu được, hoặc nếu kiểm tra độ lặp lại thì nêu kết quả cuối cùng thu được.

## **Phụ lục A**

(Quy định)

### **Các nguyên tắc về Thực hành phòng thử nghiệm tốt (GLP) để tiến hành các phép phân tích enzym**

#### **A.1 Giới thiệu**

Các nguyên tắc về Thực hành phòng thử nghiệm tốt (GLP) để tiến hành các phép phân tích enzym thông thường ít được biết đến hơn so với các phép phân tích hóa học.

Đặc biệt chú ý đến các nguyên tắc để thu được các kết quả chính xác và độ chụm thích hợp.

Do đó, trước khi phân tích cần đọc kỹ các nguyên tắc về Thực hành phòng thử nghiệm tốt (GLP) để tiến hành các phép phân tích enzym nêu dưới đây.

#### **A.2 Thuốc thử**

**A.2.1** Chỉ sử dụng các enzym thuộc loại quy định (hoạt tính cụ thể, nồng độ, chất nhiễm bẩn với hoạt tính enzym, dung môi).

**A.2.2** Chỉ sử dụng các coenzym quy định (loại tinh khiết, dạng muối hoặc axit, chất nhiễm bẩn).

**A.2.3** Tất cả các thuốc thử không kể enzym và coenzym phải là loại tinh khiết phân tích.

**A.2.4** Nước dùng để pha chế các dung dịch enzym và các thuốc thử khác phải là nước được cất hai lần bằng dụng cụ thủy tinh.

**A.2.5** Nước dùng để pha chế các dung dịch mẫu phải là nước được cất bằng dụng cụ thủy tinh hoặc đã loại ion.

**A.2.6** Bảo quản các thuốc thử, các dung dịch/huyền phù enzym theo chỉ dẫn (thường khoảng từ 2 °C đến 8 °C).

**A.2.7** Không làm đông lạnh các huyền phù enzym.

**A.2.8** Khi đã quá hạn sử dụng của các loại thuốc thử thì phải loại bỏ hoặc kiểm tra hiệu quả của thuốc thử bằng cách kiểm tra các dung dịch chuẩn có các hàm lượng chất phân tích khác nhau. Các độ hấp thụ thu được phải tỷ lệ thuận với các nồng độ.

**A.2.9** Các dung dịch đệm được lấy ra từ tủ lạnh phải được làm ấm đến nhiệt độ phòng trước khi bổ sung vào các hỗn hợp phân tích.

### A.3 Cuvet đo quang và cuvet đo phổ

**A.3.1** Sử dụng các cuvet bằng thủy tinh hoặc chất dẻo có chiều dài đường quang là 1 cm.

CHÚ THÍCH: Các cuvet bằng chất dẻo có các ưu điểm hơn so với cuvet thủy tinh như sau:

- rẻ (dùng một lần);
- có thể tiến hành nhiều phép phân tích hơn;
- trong một mẻ, các cuvet bằng chất dẻo cho độ hấp thụ thống nhất với nhau.

**A.3.2** Mỗi khi đưa một mẻ cuvet mới vào sử dụng, cần kiểm tra chiều dài đường quang của cuvet chính xác (ví dụ: cuvet thạch anh) như sau:

Đổ đầy nước vào cuvet chính xác và các cuvet bằng chất dẻo rồi đo độ hấp thụ ( $A_1$ ) của từng cuvet dựa vào không khí. Sau khi tráng rửa, đổ đầy dung dịch NADH (khoảng 0,15 mg/ml) và đo lại độ hấp thụ ( $A_2$ ) dựa vào không khí.

Đối với cả hai cuvet chính xác và cuvet bằng chất dẻo, tính ( $A_2 - A_1$ ). Chênh lệch ( $A_2 - A_1$ ) giữa hai loại cuvet phải không đáng kể. Nếu chênh lệch ( $A_2 - A_1$ ) vượt quá 0,5 % của giá trị hấp thụ thực đối với cuvet chính xác thì tính độ chênh lệch trung bình theo phần trăm và cần tính đến giá trị này đối với chiều dài đường quang,  $l$ , trong phần tính kết quả (xem 8.1).

**A.3.3** Luôn sử dụng cuvet sạch và không có vết xước. Làm khô hoặc lau sạch bên ngoài cuvet bằng khăn mềm.

**A.3.4** Không đo độ hấp thụ của cuvet mẫu thử dựa theo độ hấp thụ của cuvet thử trắng, vì sẽ không thu được thông tin về cường độ hấp thụ của phép thử mẫu trắng. Đo độ hấp thụ của cả hai mẫu thử và cuvet mẫu trắng dựa vào không khí và tính độ chênh lệch.

**A.3.5** Không đo độ hấp thụ của mẫu thử hoặc cuvet thử trắng dựa theo cuvet trống (vì khuếch tán ánh sáng).

**A.3.6** Dùng que khuấy bằng chất dẻo để trộn lượng chứa trong cuvet hoặc đậy kín cuvet bằng parafin rồi xoay nhẹ cuvet.

**A.3.7** Sử dụng que khuấy để loại bọt khí ra khỏi thành cuvet. Tránh làm xước thành cuvet.

**A.3.8** Luôn sử dụng cùng một loại cuvet để đo mẫu thử và phép thử mẫu trắng.

**A.3.9** Luôn đặt các cuvet theo cùng tư thế và cùng hướng trong giá đỡ cuvet. Đối với mục đích này, đánh dấu một mặt của cuvet quang học.

#### A.4 Máy đo quang và máy đo phổ

**A.4.1** Sử dụng máy đo phổ (chiều rộng dải  $\leq 10$  nm), có trang bị bộ lọc nhiễu (chiều rộng dải  $\leq 10$  nm) hoặc máy đo quang phổ, được trang bị đèn hơi thủy ngân. Các phép đo sử dụng máy đo phổ hoặc máy đo quang có bộ lọc, phải được thực hiện ở độ hấp thụ tối đa của NADH hoặc NADPH, nghĩa là ở bước sóng 340 nm, còn các phép đo sử dụng máy đo quang có đèn hơi thủy ngân phải được thực hiện ở 365 nm hoặc 334 nm.

CHÚ THÍCH: Các hệ số hấp thụ phân tử của NADH và NADHP được đo ở bước sóng 334 nm, 340nm và 365 nm như sau:

- NADH và NADHP ở bước sóng 334 nm (Hg):  $6,18 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ ;
- NADH và NADHP ở bước sóng 340 nm:  $6,3 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ ;
- NADPH ở bước sóng 365 nm (Hg):  $3,5 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ ;
- NADH ở bước sóng 365 nm (Hg):  $3,4 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ ;

**A.4.2** Giữa độ hấp thụ và nồng độ của NADH hoặc NADPH phải có mối quan hệ tuyến tính đến độ giá trị 2,0. Kiểm tra như sau:

- a) Dùng pipet lấy 2,00 ml nước cất cho vào cuvet. Đo độ hấp thụ  $A_0$  so với không khí.
- b) Dùng pipet lấy 0,10 ml dung dịch NADH (0,5 mg/ml) cho vào cuvet và trộn. Đo độ hấp thụ  $A_1$ .

Tính độ hấp thụ giảm,  $A_{r1}$ , theo công thức sau:

$$A_{r1} = (A_1 - A_0) \times \frac{2,1}{3,5}$$

Trong đó:

$A_1$  là độ hấp thụ thu được trong phép đo dung dịch NADH (b);

$A_0$  là độ hấp thụ thu được trong phép đo của nước (a);

- c) Lặp lại quy trình trong b) ở trên 14 lần.

Sau mỗi cặp phép đo, tính sự giảm của độ hấp thụ,  $A_m$ , theo công thức sau:

$$A_m = (A_n - A_0) \times \frac{V}{3,5}$$

Trong đó:

$A_n$  là độ hấp thụ thu được tại phép đo thứ  $n$ ;

$V$  là thể tích lượng chứa trong cuvet tại phép đo thứ  $n$ .



d) Đối với mỗi phép đo, vẽ đồ thị của thể tích dung dịch NADH có trong cuvet theo các độ hấp thụ giảm tương ứng. Đường đi qua các điểm giao nhau phải là đường thẳng.

## **A.5 Pipet tự động và các bộ phân phối khác**

**A.5.1** Sử dụng các pipet tự động và các bộ phân phối khác theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

**A.5.2** Sử dụng các đầu tip thích hợp cho mỗi loại pipet.

**A.5.3** Định kỳ kiểm tra các quy định về thể tích và độ lặp lại của các pipet tự động và các bộ phân phối khác (ví dụ như mỗi tháng một lần) như sau:

- a) cân cốc thủy tinh có mỏ với nước ở thời điểm  $t$ ;
- b) dùng pipet hoặc bộ phân phối đong nước cho vào cốc có mỏ và cân chính xác ở thời điểm  $t + 1$  min sau khi cân lần thứ nhất;
- c) lặp lại chín lần quy trình sử dụng pipet hoặc bộ phân phối như trong b);
- d) cân cốc có mỏ tại các thời điểm  $t + 11$  min,  $t + 12$  min,  $t + 13$  min,  $t + 14$  min và  $t + 15$  min không có pipet hoặc bộ phân phối, tính hao hụt khối lượng do bay hơi trên một phút giữa các lần cân này;
- e) tính thể tích và độ lặp lại của pipet hoặc bộ phân phối, có tính đến hao hụt khối lượng do nước bị bay hơi.

**A.5.4** Thể tích của một số pipet tự động có thể bị ảnh hưởng bởi sự truyền nhiệt từ lòng bàn tay khi sử dụng lâu.

Kiểm tra hiện tượng này bằng quy trình trong A.5.3 và tránh sử dụng các pipet này.

**A.5.5** Ngay trước khi sử dụng, tráng đầu tip của pipet vài lần bằng dung dịch/huyền phù cần được lấy. Đối với mỗi dung dịch mẫu, sử dụng một đầu tip mới.

**A.5.6** Dùng pipet lấy nước, dung dịch đệm, enzym, coenzym và dung dịch mẫu (nhúng đầu tip càng thấp càng tốt) vào các góc khác nhau của cuvet.

**CHÚ THÍCH:** Có thể dùng pipet lấy các lượng nhỏ (từ 10  $\mu$ l đến 50  $\mu$ l) dung dịch enzym/huyền phù cho lên que khuấy, được đưa vào cuvet và dùng que khuấy để trộn lượng chứa trong cuvet.

**A.5.7** Tránh nhiễm bẩn.

**A.6 Thông tin bổ sung**

**A.6.1** Kiểm tra về các khả năng gây nhiễu và về sai số tổng thể bằng cách xác định các độ hấp thụ của hai dung dịch có các nồng độ khác nhau của chất phân tích. Các độ hấp thụ thu được phải tỷ lệ với nồng độ của chất phân tích.

**A.6.2** Sử dụng chất chuẩn để kiểm tra các phản ứng enzym. Chất chuẩn này là chuẩn làm việc.

CHÚ THÍCH: Các chuẩn đối chứng có độ tinh khiết xác nhận có thể có được từ các Viện chuẩn quốc gia.

**A.6.3** Tiến hành phép thử độ thu hồi khi có mặt của dung dịch mẫu. Lượng chất phân tích được bổ sung phải gần bằng lượng có mặt trong dung dịch mẫu.

**A.6.4** Sử dụng một que khuấy cho mỗi cuvet hoặc dùng que khuấy sử dụng một lần.

CHÚ THÍCH: Lượng chất lỏng còn lại trên que khuấy phải được coi như không đáng kể.

### Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu*
- [2] TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung*
- [3] TCVN 6910-2 (ISO 5725-2), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn*
- [4] IDF 135B:1991, *Milk and milk products – Precision characteristics of analytical methods – Outline of collaborative study procedure*
- [5] Comité de Nomenclature de l'Union Internationale de Biochimie, *Recommandations en matière de Nomenclature des Enzymes*. Academic Press, New York, 1984
- [6] Interlaboratory Collaborative Studies, second series. *Bulletin International Dairy Federation*, 285, 1993, annex A, annex B and annex C