

TCVN 6506-1:2015

ISO 11816-1:2013

Xuất bản lần 3

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA -
XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ PHOSPHATASA KIỀM -
PHẦN 1: PHƯƠNG PHÁP ĐO HUỖNH QUANG
ĐỐI VỚI SỮA VÀ ĐỒ UỐNG TỪ SỮA**

*Milk and milk products -- Determination of alkaline phosphatase activity --
Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drinks*

Lời nói đầu

TCVN 6506-1:2015 thay thế TCVN 6506-1:2007;

TCVN 6506-1:2015 hoàn toàn tương đương với ISO 11816-1:2013;

TCVN 6506-1:2015 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố;

Bộ tiêu chuẩn TCVN 6506 (ISO 11816) *Sữa và sản phẩm sữa – Xác định hoạt độ phosphatase* gồm các phần sau đây:

- TCVN 6506-1:2015 (ISO 11816-1:2013), *Phần 1: Phương pháp đo huỳnh quang đối với sữa và đồ uống từ sữa*;
- TCVN 6506-2:2009 (ISO 11816-2:2003), *Phần 2: Phương pháp đo huỳnh quang đối với phomat*.

Sữa và sản phẩm sữa - Xác định hoạt độ phosphatase kiềm - Phần 1: Phương pháp đo huỳnh quang đối với sữa và đồ uống từ sữa

Milk and milk products - Determination of alkaline phosphatase activity -

Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drinks

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp đo huỳnh quang để xác định hoạt độ phosphatase kiềm (ALP, EC 3.1.3.1) trong sữa tươi nguyên liệu, sữa nguyên chất đã qua xử lý nhiệt, sữa tách một phần chất béo, sữa gầy và sữa có bổ sung hương liệu. Phương pháp này có thể áp dụng cho sữa và đồ uống từ sữa bò, sữa cừu, sữa dê. Tiêu chuẩn này có thể áp dụng cho sữa bột sau khi hoàn nguyên.

Thiết bị có thể đọc được hoạt độ đến 7 000 mili đơn vị trên lít (mU/l). Nếu hoạt độ lớn hơn 7 000 mU/l thì pha loãng mẫu thử bằng sữa không chứa phosphatase kiềm (7.1) sao cho thu được kết quả không lớn hơn 7 000 mU/l.

2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

2.1

Hoạt độ phosphatase kiềm (ALP) (alkaline phosphatase activity)

Hoạt độ phosphatase kiềm có mặt trong sản phẩm, xác định được bằng quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH 1 Hoạt độ phosphatase kiềm được biểu thị bằng mili đơn vị hoạt độ enzym trên lít mẫu (mU/l).

2.2

Đơn vị hoạt độ phosphatase kiềm (unit of alkaline phosphatase activity)

Lượng enzym phosphatase kiềm xúc tác để biến đổi 1 μmol cơ chất trên phút.

3 Nguyên tắc

Hoạt độ phosphatase kiềm của mẫu được đo bằng cách phân tích động học trực tiếp huỳnh quang liên tục. Cơ chất este monophosphoric thơm không phát huỳnh quang, 2'-[2-benzothiazolyl]-6'-hydroxybenzothiazol phosphat, khi có mặt của bất kỳ phosphatase kiềm có nguồn gốc từ mẫu, thì sẽ thủy phân phân gốc phosphat tạo ra sản phẩm phát huỳnh quang cao. Việc đo huỳnh quang của hoạt độ phosphatase kiềm (ALP) được đo ở nhiệt độ 38 °C trong thời gian 3 min sử dụng cơ chất Fluorophos®. Việc này bao gồm ủ ấm sơ bộ cơ chất và mẫu, sau đó lấy số đọc liên tục của tốc độ phản ứng.

CHÚ THÍCH Mặc dù quy trình này kéo dài 3 min, nhưng ở phút đầu là thời gian cân bằng để đảm bảo cho mẫu đạt tới nhiệt độ 38 °C. Việc đo hoạt độ thực tế chỉ bắt đầu từ phút thứ hai đến hết phút thứ ba (nghĩa là chu kỳ 2 min).

4 Thuốc thử

Tất cả các thuốc thử được sử dụng phải thuộc loại tinh khiết phân tích và nước phải là nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

4.1 Cơ chất¹⁾ Fluorophos®, đựng trong chai, mỗi chai chứa 144 mg bột cơ chất Fluorophos®, khối lượng phân tử 580 g/mol.

Fluorophos® là loại cơ chất este monophosphoric thơm không phát huỳnh quang, 2'-[2-benzothiazolyl]-6'-hydroxybenzothiazol phosphat (Fluorophos®). Cơ chất Fluorophos® có thể bền trong 2 năm kể từ ngày sản xuất nếu được bảo quản trong chai đầy kín, ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng.

4.2 Dung dịch đệm cơ chất, dung dịch đệm dietanolamin (DEA), $c(\text{DEA}) = 2,4 \text{ mol/l}$ có pH 10,0, được đựng trong các chai 240 ml. Dung dịch đệm cho cơ chất này có thể bền trong 2 năm kể từ ngày sản xuất nếu được bảo quản trong chai đầy kín, ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C, tránh ánh sáng.

4.3 Cơ chất làm việc

Để cơ chất Fluorophos® (4.1) và dung dịch đệm cho cơ chất (4.2) đạt đến nhiệt độ phòng. Cho lượng dung dịch đệm cơ chất chứa trong một chai (240 ml) (4.2) vào một chai đựng cơ chất Fluorophos® (144 mg) (4.1) và lắc kỹ bằng cách đảo chiều vật chứa trong 3 min để tạo dung dịch 1,0 milimol (pH 10). Sử dụng chai màu nâu để bảo vệ tránh ánh sáng.

Để yên dung dịch thu được ở nhiệt độ phòng ít nhất 30 min trước khi sử dụng.

¹ Các thuốc thử quy định trong 4.1 đến 4.5 và các dụng cụ quy định trong 5.1 đến 5.4 (trừ 5.3) có sẵn như Hệ thống thử nghiệm Fluorophos của Hãng Advanced instruments Inc., Two technology Way, Norwood, MA 02062, USA. Nhà sản xuất có thể thay đổi hình dạng bao gói do Hệ thống thử nghiệm Fluorophos cung cấp. Người sử dụng cần tham khảo các chỉ dẫn của nhà sản xuất về chuẩn bị thuốc thử nếu nó khác với quy định trong tiêu chuẩn này. Fluorophos và Fluoroyellow là nhãn hiệu thương mại đã đăng ký của Hãng Advanced instruments Inc và là các ví dụ của sản phẩm thương mại phù hợp sẵn có. Thông tin này được đưa ra để tiện lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và Không ấn định phải sử dụng những sản phẩm này.

Dùng phép thử A/D (tương tự kỹ thuật số) trong 8.2 để kiểm tra tính ổn định của dung dịch cơ chất làm việc sẵn sàng để sử dụng. Không sử dụng dung dịch cơ chất làm việc có số đọc trên 1200 FLU (đơn vị huỳnh quang) thu được (8.2)

Cơ chất làm việc này có thể bền trong 60 ngày khi được bảo vệ tránh ánh sáng và được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C, hoặc 8 h khi bảo quản ở 38 °C.

CHÚ THÍCH: Thể tích cơ chất làm việc thu được (240 ml) là đủ cho khoảng 115 phép thử.

4.4 Dung dịch hiệu chuẩn, Fluoroyellow®(FY) [2'-(2-benzothiazolyl)-6'-hydroxybenzothiazol] trong dung dịch đệm cơ chất (4.2).

Các dung dịch hiệu chuẩn này có thể bền trong 18 tháng kể từ ngày sản xuất khi được bảo quản trong chai kín ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C. Lắc trộn nhẹ trước khi sử dụng để đảm bảo thu được kết quả tối ưu.

4.4.1 Dung dịch hiệu chuẩn A, chứa 0 µmol/l Fluoroyellow®.

4.4.2 Dung dịch hiệu chuẩn B, chứa $17,24 \times 10^{-3}$ µmol/l Fluoroyellow®.

4.4.3 Dung dịch hiệu chuẩn C, chứa $34,48 \times 10^{-3}$ µmol/l Fluoroyellow®.

4.5 Dung dịch kiểm soát thiết bị hàng ngày, chứa $34,48 \times 10^{-3}$ µmol/l Fluoroyellow®.

Các dung dịch kiểm soát thiết bị hàng ngày này có thể bền trong 18 tháng kể từ ngày sản xuất khi được bảo quản trong chai kín ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C. Lắc trộn nhẹ trước khi sử dụng để đảm bảo thu được kết quả thích hợp.

5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 Máy đo huỳnh quang có bộ lọc, có bộ đỡ cuvet kiểm soát được nhiệt độ ổn định, có thể hoạt động ở 38 ± 1 °C, bộ phận quang học góc vuông, kích thích ở bước sóng 440 nm và phát xạ ở 520 nm đến 560 nm [ví dụ: thiết bị Fluorophos®¹⁾].

5.2 Cuvet, dùng một lần, bằng thủy tinh không phát huỳnh quang.

5.3 Pipet

5.3.1 Bộ phận phân phối thể tích cố định, để phân phối 2,0 ml.

5.3.2 Pipet dạng xyranh hút hoặc loại tương tự, dung tích 0,075 ml.

Cần thực hiện theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất về kỹ thuật sử dụng pipet để thu được kết quả chính xác. Đảm bảo rằng pitông của pipet kín trước khi sử dụng.

TCVN 6506-1:2015

5.3.3 Pipet, dung tích 2 ml và 3 ml.

5.4 Tủ ấm, thích hợp để giữ cuvet và có khả năng duy trì nhiệt độ ở $38^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

5.5 Film, loại dùng cho phòng thử nghiệm.

5.6 Máy trộn Vortex.

5.7 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì nhiệt độ ở $63^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ và $95^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

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

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. Mẫu không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

7 Chuẩn bị

7.1 Sữa không chứa phosphatase kiềm

Chuẩn bị sữa không chứa phosphatase kiềm cùng dạng với mẫu cần phân tích, bằng cách chuyển cẩn thận một lượng sữa vào ống nghiệm hoặc vật chứa thích hợp, không để sữa chạm vào mép hoặc cạnh của vật chứa.

Đặt ống thử hoặc vật chứa phần mẫu sữa trên nồi cách thủy (5.7) để ở 95°C . Làm nóng sơ bộ phần mẫu sữa đến 95°C , trước khi bắt đầu giai đoạn đun nóng 5 min ở nhiệt độ này. Kiểm tra nhiệt độ bằng cách sử dụng nhiệt kế hoặc đầu dò nhiệt được đặt vào giữa ống hoặc vật chứa. Khi nhiệt độ của phần mẫu thử đạt đến 95°C , bắt đầu đun ngay trong 5 min. Làm nguội nhanh mẫu sau giai đoạn đun nóng.

Kiểm tra phần mẫu thử đã xử lý để chắc chắn rằng hoạt độ ALP của mẫu nhỏ hơn 10 mU/l.

7.2 Chuẩn bị mẫu thử

7.2.1 Yêu cầu chung

Trộn kỹ tất cả các mẫu thử trước khi sử dụng.

CHÚ THÍCH Thông thường, các mẫu thử nghiệm không cần phải làm ấm sơ bộ.

7.2.2 Mẫu thử thanh trùng

Sử dụng các lượng cần thiết của mẫu thử đã thanh trùng.

7.2.3 Pha loãng các mẫu thử có các giá trị ALP cao

Chuẩn bị các dịch pha loãng của mẫu sữa không có phosphatase (7.1) để đưa mức ALP nằm trong dải phân tích của phép thử ($< 7\,000\text{ mU/l}$). Trộn kỹ các dung dịch pha loãng.

8 Cách tiến hành

8.1 Đánh giá hiệu năng của thiết bị

8.1.1 Yêu cầu chung

Cần đánh giá hiệu năng của thiết bị về độ trôi, ánh sáng phân tán và độ ổn định trước khi phân tích các mẫu thử. Tuân theo các nguyên tắc Thực hành Phòng thử nghiệm Tốt khi vận hành máy đo huỳnh quang có bộ lọc (5.1).

Các phép thử kiểm soát chất lượng bao gồm:

- a) phép thử A/D (analog-to-digital) hàng ngày, dùng để kiểm tra chức năng của thiết bị
- b) phép thử kiểm soát thiết bị hàng ngày, sử dụng dung dịch kiểm soát thiết bị hàng ngày (4.5) để theo dõi độ trôi quang học hoặc điện tử trong máy đo huỳnh quang; và
- c) nên sử dụng các phép kiểm soát chuẩn, dương tính và âm tính bên ngoài, như trong 8.1.3, để theo dõi hàng ngày các thông số độ chụm của thiết bị.

8.1.2 Phép thử A/D

8.1.2.1 Khi sử dụng thiết bị Fluorophos®, thực hiện phép thử A/D hàng ngày trước khi bắt đầu thử nghiệm.

8.1.2.2 Thực hiện phép thử A/D qua bảng chọn "SETUP". Ấn phím "SETUP", chọn "phép thử A/D" bằng cách ấn <or>. Khi giá đỡ cuvet đang trống, ấn "START". Để cho các con số hiển thị ổn định. Số hiển thị phải là 302 ± 4 . Nếu số đọc nằm ngoài dải này, thì làm sạch bộ lọc kích thích và phát xạ và lặp lại phép thử A/D.

8.1.2.3 Chuyển 2,0 ml dung dịch kiểm soát thiết bị hàng ngày (4.5) vào cuvet đã dán nhãn. Đặt cuvet này vào tủ ấm (5.4) ở $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 20 min. Đặt cuvet đã làm ấm sơ bộ vào giá đỡ. Đậy nắp. Khi số hiển thị đã ổn định, ghi lại giá trị hiển thị, giá trị này phải ở 602 ± 12 . Nếu nằm ngoài dải này, thì sử dụng tua vít vặn từ từ vít của dụng cụ đo điện thế ở phía trên tay trái theo chiều kim đồng hồ hoặc ngược chiều kim đồng hồ của thiết bị, cho đến khi các số đọc hiển thị là 602, nếu cần. Để các số đo ổn định 15 min.

8.1.3 Kiểm soát

Tiến hành các phép kiểm soát dương tính, âm tính và PhosphaCheck-N²⁾ sử dụng nền sữa bột có phosphatase và chất bảo quản.

Các chất kiểm soát thanh trùng PhosphaCheck bền được 18 tháng khi được bảo quản trong chai kín ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C. Khi được hoàn nguyên, dung dịch này bền được 3 ngày khi được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C. Không làm đông lạnh.

Để các chất kiểm soát cân bằng đến nhiệt độ phòng. Hoàn nguyên chất kiểm soát thanh trùng PhosphaCheck® trước khi sử dụng. Mở nắp đậy bằng kim loại và cao su, thêm 3,0 ml nước đã loại ion ở nhiệt độ phòng.

Đậy nắp và lắc nhẹ bằng cách đảo chiều vật chứa 1 min và để yên 15 min. Không lắc vật chứa hoặc để chất kiểm soát tạo bọt. Trộn nhẹ vật chứa trước mỗi lần sử dụng để thu được kết quả tối ưu.

Sau khi hiệu chuẩn kênh chưa sử dụng bằng chất kiểm soát âm tính, phân tích ba dung dịch chất kiểm soát (dương tính, âm tính và PhosphaCheck-NTM) bằng cách cho 75 µl mỗi dung dịch kiểm soát vào 2 ml cơ chất đã làm ấm sơ bộ. Thực hiện phép thử ALP.

Số đọc đối với kiểm soát âm tính phải nhỏ hơn 10 mU/l, chất chuẩn PhosphaCheck-NTM phải trong khoảng từ 10 mU/l đến 40 mU/l và kiểm soát dương tính phải bằng (500 ± 100) mU/l. Hàng ngày có thể sử dụng các chất kiểm soát này để theo dõi độ chụm của thiết bị.

8.2 Kiểm soát thuốc thử để kiểm tra sự phù hợp của cơ chất làm việc sử dụng ngay

Phân phối 2,0 ml cơ chất làm việc (4.3) vào cuvet đã dán nhãn. Đặt cuvet này vào tủ ấm (5.4) ở 38 °C trong 20 min. Đặt cuvet đã làm ấm sơ bộ có chứa cơ chất làm việc vào giá đỡ cuvet. Đậy nắp. Khi số hiển thị đã ổn định, ghi lại giá trị hiển thị.

Dung dịch cơ chất vừa mới pha chế theo phương thức A/D thường cho số đọc hiển thị ở khoảng 650 FLU tăng dần theo thời gian. Không sử dụng cơ chất làm việc khi số đọc hiển thị thu được trên 1 200 FLU.

8.3 Hiệu chuẩn

Các đường chuẩn phải luôn ổn định. Tuy nhiên, cần phải hiệu chuẩn lại thiết bị khi bắt đầu lắp đặt máy đo huỳnh quang, khi bảo dưỡng (ví dụ: thay đèn hoặc bộ lọc) mà có thể ảnh hưởng đến việc hiệu chuẩn, khi các giá trị kiểm soát thử nghiệm cho các kết quả không chấp nhận được.

²⁾ Các hướng dẫn kiểm soát và đánh giá hiệu năng của thiết bị là sản phẩm được áp dụng của hãng Advanced Instruments, Inc., Two Technology Way, Norwood, Massachusetts 02062, USA. Thông tin này được đưa ra để tiện lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và Không ấn định phải sử dụng những sản phẩm này. Các sản phẩm tương tự có thể được sử dụng nếu có thể đưa ra các kết quả tương đương.

Nếu có các thay đổi trong đường chuẩn, thì hiệu chuẩn lại thiết bị sử dụng một dãy mới các dung dịch hiệu chuẩn A, B và C (4.4.1, 4.4.2 và 4.4.3). Dụng đường chuẩn cho mỗi loại sản phẩm cần thử nghiệm.

Trộn các dung dịch hiệu chuẩn A, B và C bằng cách đảo nhẹ vật chứa trước khi sử dụng. Dùng pipet (5.3.3) chuyển tương ứng 2,0 ml dung dịch hiệu chuẩn A, B và C (4.4.1, 4.4.2 và 4.4.3), mỗi lần lấy hai mẫu vào sáu cuvet đã dán nhãn trước (5.2). Đặt các cuvet này vào tủ ấm (5.4) để ở 38 °C và làm nóng sơ bộ trong 20 min.

Dùng pipet (5.3.2) chuyển 0,075 ml sữa không có phosphatase kiềm (7.1) vào tất cả sáu cuvet. Dùng film (5.5) đậy cuvet lại. Trộn bằng máy trộn Vortex (5.6) trong 5 s, hoặc bằng cách lắc đảo chiều nhẹ các cuvet. Đặt lại các cuvet vào tủ ấm (5.4). Hoàn tất việc hiệu chuẩn trong vòng 10 min sau khi cho mẫu thử vào máy hiệu chuẩn.

Bắt đầu tiến hành từ dung dịch hiệu chuẩn A, thực hiện quy trình hiệu chuẩn thông thường như sau. Dùng khăn mềm lau sạch phía ngoài từng cuvet trước khi đặt chúng vào máy đo huỳnh quang có bộ lọc (5.1). Khi sử dụng thiết bị Fluorophos®, thì ấn "CALIB" và chọn chế độ "APL Dairy". Kéo cuộn băng chọn và ấn "ENTER" khi sản phẩm cần hiệu chuẩn đã hiển thị. Bắt đầu bằng dung dịch hiệu chuẩn A (4.4.1), cho dung dịch này vào máy đo huỳnh quang và ấn "START". Khi kết thúc việc đo, đo dung dịch hiệu chuẩn A thứ hai.

Thực hiện quy trình tương tự đối với các dung dịch hiệu chuẩn B (4.4.2) và C (4.4.3) cho đến khi kết thúc quy trình. Thiết bị Fluorophos® tự động tính lượng huỳnh quang thu được với dung dịch B và C dựa theo dung dịch A để cho tỷ lệ hiệu chuẩn nằm trong dải của thiết bị.

Khi việc hiệu chuẩn kết thúc, tiến hành phân tích các mẫu thử.

8.4 Xác định

Dùng pipet hoặc bộ phân phối thể tích cố định (5.3.1) chuyển 2,0 ml cơ chất làm việc (4.3) vào cuvet đã dán nhãn. Đặt cuvet vào tủ ấm (5.4) và để ở 38 °C và gia nhiệt trong 20 min.

Dùng pipet (5.3.2) cho thêm 0,075 ml phần mẫu thử đã trộn đều (7.2.2 hoặc 7.2.3) vào cơ chất. Đậy cuvet lại bằng film (5.5). Trộn ngay lượng chứa trong cuvet bằng máy trộn Vortex (5.6) trong 5 s, hoặc bằng cách đảo chiều nhẹ cuvet. Lau khô thành ngoài của cuvet bằng giấy mềm rồi đặt cuvet vào máy đo huỳnh quang có bộ lọc (5.1). Thực hiện phép thử trong 20 s sau khi cho mẫu thử vào cơ chất.

Khi dùng thiết bị Fluorophos®, ấn phím "TEST", "APL Dairy" xuất hiện rồi ấn "ENTER". Kéo cuộn băng chọn và ấn "ENTER" khi sản phẩm cần hiệu chuẩn đã hiển thị. Rồi ấn phím "START" để bắt đầu thử nghiệm. Việc hiển thị sẽ đếm giảm dần trong 60 s trong khi cơ chất và mẫu vẫn giữ ấm đến 38 °C. Sau 60 s, máy huỳnh quang bắt đầu đo, hiển thị huỳnh quang của mẫu bằng đơn vị huỳnh quang (FLU). Việc hiển thị bắt đầu ở khoảng 200 FLU và tăng chậm dần trong 2 min tiếp theo. Ở cuối giai

TCVN 6506-1:2015

đoạn 3 min, thiết bị Fluorophos® thực hiện tự động các phép tính cần thiết và hiển thị số nhận biết mẫu, hoạt độ ALP tính theo mili đơn vị trên lít và giá trị trung bình tăng dần của huỳnh quang, nếu trước đó đã chọn. Thông tin này sau đó được in ra.

Nếu kết quả phải tính thủ công (9.2), thì chia chênh lệch giữa hai số đọc huỳnh quang cho khoảng thời gian (tính theo phút) để thu được trung bình tăng dần của huỳnh quang trên phút (F/min). Dùng giá trị F/min này để tính hoạt độ ALP của mẫu thử.

Nếu hoạt độ lớn hơn 7 000 mU/l, thì pha loãng mẫu bằng sữa không có phosphatase kiềm (7.1) sao cho thu được kết quả nhỏ hơn 7 000 mU/l.

Thiết bị Fluorophos® có thể hiển thị và in ra dòng thông báo "Sai số: Số đọc không ổn định, lặp lại phép thử". Đối với các kết quả rất thấp (thường nhỏ hơn 6 FLU/min), thường các số đọc không ổn định, để cuvet mẫu trong buồng của thiết bị Fluorophos® và thực hiện phép xác định khác. Sau đó thường thu được kết quả hợp lý. Tuy nhiên, nếu lại thu được sai số đọc không ổn định thì lặp lại toàn bộ phép xác định với mẫu thử mới.

8.5 Phép kiểm soát liên quan đến mẫu thử

8.5.1 Phép thử kiểm soát dương tính và âm tính

8.5.1.1 Phép thử kiểm soát âm tính

Bao gồm một phép thử kiểm soát âm tính với từng mẻ mẫu thử. Gia nhiệt mẫu thử như trong 7.1. Số đọc của thiết bị phải nhỏ hơn 10 mU/l.

8.5.1.2 Phép thử kiểm soát dương tính

Bao gồm một hoặc nhiều phép kiểm soát dương tính với từng mẻ mẫu thử. Chuẩn bị các mẫu thử ở mức hoặc ở gần các mức quyết định sử dụng các mẫu sữa nguyên liệu đã pha loãng với sữa không có phosphatase (7.1).

8.5.2 Phép thử chất gây nhiễu

Khi thu được các giá trị ALP lớn hơn giá trị mong đợi, thì dùng pipet (5.3.2) thêm 0,075 ml phần mẫu thử (7.2.2 hoặc 7.2.3) vào cuvet chứa 2,0 ml dung dịch hiệu chuẩn A (4.4.1), trước đó đã được làm ấm sơ bộ trong tủ ấm (5.4) để ở 38 °C trong 20 min và trộn.

Đặt cuvet chứa hỗn hợp này vào thiết bị Fluorophos® (5.1) và thử nghiệm theo 8.4. Nếu giá trị thu được vượt quá 20 mU/l, chúng tỏ có mặt chất gây nhiễu. Trong trường hợp này, lặp lại phép thử, sử dụng mẫu mới.

8.5.3 Phép thử kiểm soát phosphatase kiềm của vi khuẩn bền nhiệt

Nếu kết quả của phép xác định trong 8.4 cho kết quả cao hơn dự kiến thì thực hiện như sau: Cho một phần mẫu thử khác (7.2.2 hoặc 7.2.3) vào ống nghiệm. Đặt nhiệt kế hoặc đầu dò nhiệt vào ống và đặt tất cả vào nồi cách thủy (5.7) để ở 63 °C. Khi nhiệt độ của phần mẫu thử đạt đến 63 °C, giữ ở nhiệt độ này trong 30 min, rồi làm nguội nhanh. Xác định hoạt độ phosphatase còn sót lại theo 8.4. Vẫn còn hoạt độ là do sự có mặt phosphatase kiềm của vi khuẩn bền nhiệt.

9 Tính và biểu thị kết quả

9.1 Tỷ lệ hiệu chuẩn

Các kết quả được tính tự động bằng thiết bị Fluorophos®, bằng cách xây dựng thuật toán đưa vào trong thiết bị đo huỳnh quang có lọc (5.1). Nếu các kết quả được tính bằng tay thì tiến hành như sau:

Ghi lại giá trị huỳnh quang của dung dịch hiệu chuẩn B (4.4.2) và dung dịch hiệu chuẩn C (4.4.3), dựa vào dung dịch hiệu chuẩn A (4.4.1), chỉnh mức huỳnh quang của máy đo huỳnh quang có lọc (5.1) về zero.

Tính tỷ lệ hiệu chuẩn, K , bằng công thức (1):

$$K = \frac{F_c + 2F_B}{4} \quad (1)$$

trong đó

K là tỷ lệ hiệu chuẩn của đường chuẩn đã thiết lập;

F_c là giá trị huỳnh quang thu được bằng cách đo dung dịch hiệu chuẩn C (4.4.3) dựa vào dung dịch hiệu chuẩn A (4.4.1) đã đặt mức huỳnh quang về zero (xem 8.3);

F_B là giá trị huỳnh quang thu được bằng cách đo dung dịch hiệu chuẩn B (4.4.2) dựa vào dung dịch hiệu chuẩn A (4.4.1) đã đặt mức huỳnh quang về zero (xem 8.3).

9.2 Tính kết quả

Tính hoạt độ phosphatase kiềm, A_p , theo công thức sau đây:

$$A_p = \frac{F_{av} \times c_B}{K \times V} \times f$$

trong đó

A_p là hoạt độ phosphatase kiềm của mẫu thử (7.2.2 hoặc 7.2.3), tính bằng mili đơn vị hoạt tính enzym trên lít;

F_{av} là lượng huỳnh quang trung bình do phần mẫu thử (8.4) phát ra trong 1 min, được đo dựa vào dung dịch hiệu chuẩn A (xem 8.3) tại thời điểm bắt đầu phút thứ hai đến cuối phút thứ ba;

c_B là nồng độ Fluoroyellow® trong dung dịch hiệu chuẩn B (4.4.2), tính bằng micromol trên 2 ml dung dịch hiệu chuẩn;

f là giá trị hệ số chuyển đổi từ đơn vị trên mililit sang mili đơn vị trên lít; $f = 1 \times 10^6$; trong trường hợp mẫu thử được pha loãng để thu được hoạt độ nhỏ hơn 7 000 mU/l thì $f = (\text{hệ số pha loãng mẫu thử}) \times 10^6$

V là thể tích phần mẫu thử, tính bằng mililit (ml).

9.3 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả đến đơn vị số nguyên gần nhất của mili đơn vị.

10 Độ chụm

10.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các chi tiết của phép thử liên phòng thử nghiệm về độ chụm của phương pháp được đưa ra trong phụ lục A. Các giá trị giới hạn độ lặp lại và độ tái lập biểu thị ở mức xác suất 95 % và có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và các chất nền khác với các dải nồng độ và chất nền đã nêu.

10.2 Độ lặp lại

Đối với các giá trị nhỏ hơn 125 mU/l thì chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng một phương pháp thử, tiến hành trên cùng một nguyên liệu thử, trong cùng một phòng thử nghiệm, sử dụng cùng thiết bị, trong khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn 14 mU/l.

Đối với các giá trị bằng hoặc lớn hơn 125 mU/l nhưng nhỏ hơn 620 mU/l thì chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử độc lập riêng rẽ thu được khi sử dụng cùng một phương pháp thử, tiến hành trên cùng một nguyên liệu thử, trong cùng một phòng thử nghiệm, sử dụng cùng thiết bị, trong khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn 12 % trung bình của hai kết quả.

10.2 Độ tái lập

Đối với các giá trị nhỏ hơn 125 mU/l thì chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ thu được khi áp dụng cùng một phương pháp, tiến hành trên cùng mẫu thử, thực hiện trong các phòng thử nghiệm

khác nhau, do các kỹ thuật viên khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn lớn hơn 23 mU/l.

Đối với các giá trị bằng hoặc lớn hơn 125 mU/l nhưng nhỏ hơn 620 mU/l thì chênh lệch tuyệt đối giữa hai kết quả thử riêng rẽ thu được khi áp dụng cùng một phương pháp, tiến hành trên cùng mẫu thử, thực hiện trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do các kỹ thuật viên khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn 24 % trung bình của hai kết quả.

11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết về nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) tất cả các điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được xem là tùy ý, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.
- e) kết quả thử nghiệm thu được hoặc nếu đáp ứng yêu cầu về độ lặp lại thì ghi kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Phép thử liên phòng thử nghiệm

Một phép thử liên phòng thử nghiệm bao gồm 13 phòng thử nghiệm từ bảy quốc gia (Mỹ, Anh, Pháp, Na Uy, Italia, Hà Lan, Thụy Sĩ) đã tham gia thử nghiệm theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) do phòng thử nghiệm QuadraChem và Frank Harding tổ chức, thực hiện trên bốn loại mẫu sữa bò (sữa nguyên chất, sữa tách một phần chất béo, sữa gầy và sữa bổ sung hương liệu), sữa dê nguyên chất và sữa cừu nguyên chất. Phép thử này đã kết thúc vào tháng 3 năm 2004.

CHÚ THÍCH 1: Chỉ có các kết quả của sữa bổ sung hương liệu, sữa cừu nguyên chất và sữa dê thực hiện trong tháng 3 năm 2004 được báo cáo trong Phụ lục này. Các kết quả nghiên cứu trên sữa bò (sữa nguyên chất, sữa tách một phần chất béo, sữa gầy) được bổ sung vào năm 2008.

Một nghiên cứu cộng tác khác do ANSES và Marina Nicolas tổ chức, gồm có 19 phòng thử nghiệm của 18 quốc gia (Bắc Ailen, Pháp, Úc, Thụy Sĩ, Hungary, Ailen, Na Uy, Đức, Phần Lan, Bỉ, Tây Ban Nha, Síp, Bungari, Bồ Đào Nha, New Zealand, Séc và Hy Lạp) đã thực hiện theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) trên sữa bò (nguyên chất, tách một phần chất béo và sữa gầy). Phép thử kết thúc tháng 1 năm 2008. Dữ liệu thu được sau này thay thế cho dữ liệu năm 2004.

Một nghiên cứu cộng tác khác do ANSES và Marina Nicolas tổ chức thực hiện theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) trên sữa dê đã tách một phần chất béo được xử lý bằng UHT. Phép thử kết thúc tháng 12 năm 2010. Dữ liệu thu được như báo cáo dưới đây.

Các kết quả thu được đã được phân tích thống kê theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) để cho độ chụm của phương pháp nêu trong Điều 10. Các mức enzym trung bình thực tế của mẫu nghiên cứu được nêu trong Bảng A.1. Bảng A.2 và Bảng A.3 đưa ra các giá trị giới hạn lặp lại và tái lập. Bảng A.4 và Bảng A.5 đưa ra các hệ số biến thiên về độ lặp lại và độ tái lập tương ứng.

CHÚ THÍCH 2: Chuẩn có thể được tạo ra từ các dữ liệu của các Bảng A.2, A.3, A.4 và A.5 để kiểm soát hiệu năng của phòng thử nghiệm.

Báo cáo toàn diện của nghiên cứu ban đầu được xuất bản trong Tài liệu tham khảo [5] và báo cáo nghiên cứu bổ sung được Phòng thí nghiệm chuẩn của Liên minh Châu Âu về sữa và các sản phẩm sữa, ANSES (EX-AFSSA), Ủy ban An toàn Thực phẩm Pháp xuất bản.

Bảng A.1 – Giá trị enzym trung bình (mU/l) của mỗi mức nghiên cứu trong mỗi nền mẫu

Loại mẫu	Mức enzym đích				
	20	40	100	350	500
	(mU/l)	(mU/l)	(mU/l)	(mU/l)	(mU/l)
Sữa bò nguyên chất	24	40	120	350	488
Sữa bò tách một phần chất béo	27	40	124	345	479
Sữa bò tách chất béo	31	42	96	349	449
Sữa bò bổ sung hương vị ^a	-	54	108	436	618
Sữa cừu nguyên chất	31	47	110	428	608
Sữa dê nguyên chất	22	47	125	407	570
Sữa dê tách một phần chất béo	29	57	110	317	474
a Sữa bổ sung hương vị dâu					

Bảng A.2 – Các giá trị giới hạn lặp lại, r

Loại mẫu	Mức enzym đích ^b				
	20	40	100	350	500
	(mU/l)	(mU/l)	(mU/l)	(mU/l)	(mU/l)
Sữa bò nguyên chất	9	11	17	32	37
Sữa bò tách một phần chất béo	6	16	18	30	45
Sữa bò tách chất béo	17	11	12	25	20
Sữa bò bổ sung hương vị ^a	-	20	16	59	59
Sữa cừu nguyên chất	10	16	34	97	100
Sữa dê nguyên chất	9	8	26	43	29
Sữa dê tách một phần chất béo	9	9	12	26	22
a Sữa bổ sung hương vị dâu;					
b Các giá trị này liên quan đến giá trị trung bình nêu trong bảng A.1 và không phải giá trị đích.					

Bảng A.3 – Các giá trị giới hạn tái lập, R

Loại mẫu	Mức enzym đích ^b				
	20	40	100	350	500
	(mU/l)	(mU/l)	(mU/l)	(mU/l)	(mU/l)
Sữa bò nguyên chất	- 10	16	18	70	100
Sữa bò tách một phần chất béo	14	18	27	78	86
Sữa bò tách chất béo	28	21	19	86	75
Sữa bò bổ sung hương vị ^a	-	34	35	131	169
Sữa cừu nguyên chất	17	20	47	170	233
Sữa dê nguyên chất	11	21	29	128	88
Sữa dê tách một phần chất béo	18	26	20	64	62
a Sữa bổ sung hương vị dâu;					
b Các giá trị này liên quan đến giá trị trung bình nêu trong bảng A.1 và không phải giá trị đích.					

Bảng A.4 – Hệ số biến thiên lặp lại, C_{v,r}

Các giá trị tính bằng phần trăm

Loại mẫu	Mức enzym đích ^b				
	20	40	100	350	500
	(mU/l)	(mU/l)	(mU/l)	(mU/l)	(mU/l)
Sữa bò nguyên chất	13	10	5	3	2
Sữa bò tách một phần chất béo	8	14	5	3	3
Sữa bò tách chất béo	19	9	4	3	2
Sữa bò bổ sung hương vị ^a	-	13	5	5	3
Sữa cừu nguyên chất	12	12	11	8	6
Sữa dê nguyên chất	14	6	7	4	2
Sữa dê tách một phần chất béo	10	6	4	3	2
a Sữa bổ sung hương vị dâu;					
b Các giá trị này liên quan đến giá trị trung bình nêu trong bảng A.1 và không phải giá trị đích.					

Bảng A.5 – Hệ số biến thiên tái lập, $C_{V,R}$

Các giá trị tính bằng phần trăm

Loại mẫu	Mức enzym đích ^b				
	20	40	100	350	500
	(mU/l)	(mU/l)	(mU/l)	(mU/l)	(mU/l)
Sữa bò nguyên chất	15	14	5	7	7
Sữa bò tách một phần chất béo	18	16	8	8	6
Sữa bò tách chất béo	31	18	7	9	6
Sữa bò bổ sung hương vị ^a	-	22	11	10	10
Sữa cừu nguyên chất	19	15	15	14	13
Sữa dê nguyên chất	17	15	8	11	5
Sữa dê tách một phần chất béo	22	16	6	7	5
a Sữa bổ sung hương vị dâu;					
b Các giá trị này liên quan đến giá trị trung bình nêu trong bảng A.1 và không phải giá trị đích.					

CHÚ THÍCH: Hiện vẫn chưa có đủ dữ liệu đối với trường hợp sữa bò để tính các giá trị C_V và $C_{V,R}$ ở mức hoạt độ 20 mU/l do thiết bị Fluorophos® ghi lại giá trị < 10 mU/l đối với các giá trị ALP rất thấp và không được đưa vào phân tích thống kê. Điều này có nghĩa rằng tất cả các giá trị đúng được báo cáo là < 10 mU/l đều không được đưa vào phân tích thống kê.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.*
 - [2] TCVN 6910-1:2001 (ISO 5725-1:1994), *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 6910-2:2001 (ISO 5725-2:1994), *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] International Union of Biochemistry Nomenclature. JAMA. 1988, 260 (73).
 - [5] HARDING, F and GARRY, E. Collaborative evaluation of a fluorimetric method for measuring alkaline phosphatase activity in cow's, sheep's and goat's milk. *J. Food Prot.* 2005, **68** (5) pp. 1047-53.
-