

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 6506-1:2007**

**ISO 11816-1:2006**

Xuất bản lần 2

**SỮA VÀ SẢN PHẨM SỮA –  
XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH PHOSPHATAZA 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 6506-1:2007 thay thế TCVN 6506-1:1999;

TCVN 6506-1:2007 hoàn toàn tương đương với ISO 11816-1:2006;

TCVN 6506-1:2007 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F12 Sữa và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

TCVN 6506 (ISO 11816) với tên chung là "Sữa và sản phẩm sữa – Xác định hoạt tính phosphatasa kiềm", bao gồm các phần như sau:

TCVN 6506-1:2007 (ISO 11816-1:2006) Phần 1: Phương pháp đo huỳnh quang đối với sữa và đồ uống từ sữa;

Bộ tiêu chuẩn ISO 11816 còn có phần như sau:

- ISO 11816-2:2003, Milk and milk products – Determination of alkaline phosphatase activity – Part 2: Fluorometric method for cheese.

# **Sữa và sản phẩm sữa – Xác định hoạt tính phosphataza 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 qui định phương pháp xác định hoạt tính phosphataza kiềm trong sữa nguyên chất, sữa tách một phần chất béo, sữa gầy và sữa có bổ sung hương liệu đã thanh trùng bằng đo huỳnh quang. Phương pháp này có thể áp dụng cho sữa bò, sữa cừu, sữa dê và đồ uống từ sữa.

Phương pháp này cũng thích hợp cho việc xác định hoạt tính phosphataza kiềm cao trong sữa nguyên liệu và sữa xử lý nhiệt có hoạt tính lớn hơn 2 000 mU/l sau khi pha loãng theo qui định.

## **2 Thuật ngữ và định nghĩa**

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

### **2.1**

**Hoạt tính phosphataza kiềm** (alkaline phosphatase activity)

**Hoạt tính APL** (APL activity)

Hoạt tính phosphataza kiềm có mặt trong sản phẩm, xác định được bằng qui trình qui định trong tiêu chuẩn này.

**CHÚ THÍCH 1** Hoạt tính phosphataza kiềm được biểu thị bằng mili đơn vị hoạt tính enzym trên lít (mU/l).

### **2.2**

**Đơn vị hoạt tính phosphataza kiềm** (unit of alkaline phosphatase activity)

Lượng enzym phosphataza kiềm xúc tác để biến đổi 1  $\mu\text{mol}$  cơ chất/min.

### 3 Nguyên tắc

Hoạt tính phosphatasa kiềm của mẫu đo được bằng cách đo 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 men phosphatasa kiềm nào có nguồn gốc từ mẫu, thì sẽ bị thủy phân phần gốc phosphat tạo ra sản phẩm phát huỳnh quang cao. Việc đo huỳnh quang của hoạt tính phosphatasa kiềm (ALP) được thực hiện ở nhiệt độ 38 °C trong thời gian 3 min khi có sử dụng cơ chất. Việc này bao gồm ủ ấm sơ bộ cơ chất và mẫu, tiếp theo bằng cách đọc liên tục tốc độ phản ứng.

**CHÚ THÍCH** Tuy rằng qui trình đo kéo dài 3 min, nhưng 1 min đầu là thời gian hiệu chỉnh để đảm bảo cho mẫu đạt tới nhiệt độ 38 °C. Việc đo hoạt tính thực tế chỉ bắt đầu từ phút thứ hai đến hết phút thứ ba (nghĩa là thời kỳ ở phút thứ hai).

### 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 qui định khác.

**4.1 Cơ chất<sup>1)</sup> Fluorophos®** đựng trong chai, mỗi chai chứa 144 mg bột cơ chất Fluorophos®.

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 nếu được bảo quản trong chai đậy kín ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

**4.2 Dung dịch đệm cho cơ chất**, dung dịch đệm dietanolamin (DEA),  $c(\text{DEA}) = 2,4 \text{ mol/l}$  có pH 10,0, được đựng trong các chai, mỗi chai chứa 240 ml.

Dung dịch đệm cho cơ chất này có thể bền trong 2 năm nếu được bảo quản trong chai đậy kín ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

#### 4.3 Cơ chất làm việc

Để dung dịch cơ chất Fluorophos® (4.1) và dung dịch đệm cho cơ chất (4.2) đạt đến nhiệt độ phòng. Cho lượng dung dịch đệm cho cơ chất chứa trong một bình (240 ml) (4.2) vào một bình đựng dung dịch

---

<sup>1)</sup> Các thuốc thử qui định trong 4.1 đến 4.5 và các dụng cụ qui 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 qui 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 ISO không ấn định phải sử dụng những sản phẩm này

cơ chất Fluorophos® (144 mg) (4.1) và lắc kỹ trong 3 min. Sử dụng chai màu hổ phách để bảo vệ khỏi ánh sáng.

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

Dùng phép thử trong 8.4.1.1 để kiểm tra tính ổn định của dung dịch cơ chất làm việc.

Dung dịch đệm 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 ở 38 °C. Không sử dụng dung dịch cơ chất làm việc nếu thu được số đọc trên 1200 (xem 8.4.1.1.5).

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

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

Các dung dịch hiệu chuẩn làm việc này có thể bền trong 18 tháng khi được bảo quản ở nhiệt độ từ 2 °C đến 8 °C.

**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®.

## 5 Thiết bị, dụng cụ

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

**5.1 Máy đo huỳnh quang có lọc**, có giá giữ cuvet kiểm soát được sự ổn định nhiệt độ ở  $38 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ , bộ phận quang vuông góc, cho ánh sáng kích thích ở bước sóng 440 nm và ánh sáng phát xạ ở 520 nm đến 560 nm [ví dụ: dụng cụ Fluorophos®<sup>1)</sup>]. Các phép đo cần được tối ưu hoá theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

**5.2 Cuvet**, loại dùng một lần, bằng thủy tinh không phát huỳnh quang, có đường kính 12 mm và có chiều dài 75 mm.

**5.3 Pipet.**

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

## TCVN 6506-1:2007

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

5.3.3 Pipet, dung tích 2 ml.

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

5.5 Parafilm<sup>2)</sup> hoặc màng mỏng khác thích hợp, thuộc loại thử nghiệm.

5.6 Máy trộn Vortex.

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

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

## 6 Lấy mẫu

Điều quan trọng là mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải là mẫu đại diện và không bị thay đổi hoặc suy giảm chất lượng trong quá trình bảo quản hoặc vận chuyển.

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

## 7 Chuẩn bị

### 7.1 Sữa không chứa phosphataza kiểm

Lấy một phần sữa không có phosphataza cho vào ống thử hoặc hộp đựng thích hợp, đảm bảo là không để sữa chạm vào mép hoặc cạnh của hộp đựng.

Đặt ống thử hoặc hộp đựng cùng với phần mẫu thử trên nồi cách thủy (5.7) để ở  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Làm nóng sơ bộ phần mẫu thử đến  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , trước khi bắt đầu giai đoạn đun nóng ở nhiệt độ này. Kiểm tra nhiệt độ bằng cách sử dụng nhiệt kế hoặc đầu dò nhiệt được đặt vào tâm của ống hoặc hộp đựng. Khi nhiệt độ của phần mẫu thử đạt đến  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bắt đầu đun 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 tính ALP của mẫu nhỏ hơn 10 mU/l.

### 7.2 Chuẩn bị mẫu thử

#### 7.2.1 Khái quát

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

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

<sup>2)</sup> Parafilm là một ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn và ISO không ấn định phải sử dụng sản phẩm này

## 7.2.2 Mẫu thử đã thanh trùng

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

## 7.2.3 Dịch pha loãng của các mẫu thử có các giá trị ALP cao

Chuẩn bị các dịch pha loãng của mẫu sữa không có phosphatasa (7.1) để đưa mức ALP nằm trong dải phân tích của phép thử (< 2 000 mU/l). Trộn kỹ các dung dịch đã pha loãng.

## 8 Cách tiến hành

### 8.1 Kiểm tra xác nhận tính năng của thiết bị

Điều quan trọng là phải kiểm tra tính năng của thiết bị về độ trệch, ánh sáng tản mạn và độ ổn định trước khi phân tích các mẫu thử. Tuân theo các chuẩn Thực hành Phòng thử nghiệm Tối khi vận hành máy đo huỳnh quang có lọc (5.1).

Các phép thử kiểm soát chất lượng bao gồm:

- thử nghiệm A/D (analog-to-digital) hàng ngày, dùng để kiểm tra chức năng của thiết bị bằng cách đo độ chính xác của kênh chuyển đổi A/D và theo dõi kênh A/D về độ trệch qua thời gian hoặc nhiệt độ, và
- thử kiểm soát thiết bị hàng ngày, sử dụng dung dịch kiểm soát thiết bị hàng ngày (4.5) để theo dõi độ trệch quang hoặc điện tử trong máy đo huỳnh quang.

Nên sử dụng các kiểm chứng chuẩn và các kiểm chứng dương tính, âm tính bên ngoài, như mô tả trong 8.4, để theo dõi hàng ngày các thông số về độ chụm của thiết bị.

### 8.2 Hiệu chuẩn

Các đường chuẩn thường ổn định. Tuy nhiên, cần phải hiệu chuẩn lại thiết bị khi bắt đầu lắp đặt máy đo huỳnh quang, khi bảo dưỡng mà có thể ảnh hưởng đến việc hiệu chuẩn, khi các giá trị thử nghiệm cho các kết quả không chấp nhận được, hoặc định kỳ 3 tháng.

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 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 10 min.

## TCVN 6506-1:2007

Dùng pipet (5.3.2) chuyển 0,075 ml sữa không có phosphataza kiềm (7.1) vào tất cả sáu cuvet. Dùng parafilm (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 qui 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 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 qui trình tương tự đối với các dung dịch hiệu chuẩn B (4.4.2) và C (4.4.3) cho đến khi kết thúc qui trình. Thiết bị Fluorophos® tự động tính lượng huỳnh quang thu được với dung dịch B và C dựa theo dung dịch A để chó tỷ lệ hiệu chuẩn nằm trong dải của thiết bị.

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

### 8.3 Xác định

Dùng pipet cố định thể tích (5.3.1) chuyển 2,0 ml dung dịch cơ chất làm việc (4.3) vào cuvet đã dán nhãn. Đặt cuvet vào hộp nuôi ấm (5.4) và làm ấm sơ bộ đến 38 °C trong 15 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 parafilm (5.5). Trộn ngay lượng chứa trong cuvet bằng máy trộn Vortex (5.6) trong 5 s, hoặc bằng cách lắc đảo nhẹ chiều cuvet. Lau khô thành ngoài của cuvet bằng giấy mềm rồi đặt cuvet vào máy đo huỳnh quang có lọc (5.1).

Ấn phím "TEST", "ALP 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 đoạn 3 min, máy đo Fluorophos thực hiện tự động các phép tính cần thiết và hiển thị số lượng nhận dạng mẫu, hoạt tính ALP tính theo mili đơn vị trên lít và trung bình tăng dần của huỳnh quang, nếu trước đó đã chọn. Thông tin này sau đó được in ra

Chia sự 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 tính ALP của mẫu thử.

Thiết bị có thể hiển thị và in ra dòng thông báo "Sai số: Số đọc không ổn định, lặp lại phép thử". Trong trường hợp cho các kết quả rất cao, thì pha loãng mẫu thử với sữa không có phosphataza đã xử lý nhiệt (7.1) và thực hiện phép xác định khác.



Đối với các kết quả rất thấp, (thường nhỏ hơn 6 FLU/min), nhìn chung các số đọc không ổn định, thì 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.

## 8.4 Phép thử kiểm chứng

### 8.4.1 Phép thử kiểm chứng hệ thống và thuốc thử

#### 8.4.1.1 Phép thử A/D

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

**8.4.1.1.2** Chuyển 2,0 ml dung dịch kiểm chứng thiết bị hàng ngày (4.5) vào cuvet đã dán nhãn. Đặt cuvet này vào tủ ấm (5.4) để ở 38 °C trong 10 min.

**8.4.1.1.3** Truy cập 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.

Việc hiển thị cần đọc  $302 \pm 4$ . Nếu số đọc nằm ngoài dải này, thì làm sạch bộ lọc kích thích và phát xạ và lặp lại phép thử A/D.

**8.4.1.1.4** Đặt cuvet đựng dung dịch kiểm chứng (8.4.1.1.2) đã làm ấm sơ bộ vào giá đỡ cuvet. Đậy nắp. Khi việc hiển thị đã ổn định, ghi lại giá trị hiển thị, giá trị này phải ở  $602 \pm 12$ . Nếu nằm ngoài dải này, thì sử dụng tua vít vặn từ từ vít của cái đo điện thế 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.

**8.4.1.1.5** Phép thử A/D cũng có thể được dùng để kiểm tra độ ổn định của dung dịch chất đệm làm việc (4.3). Dung dịch cơ chất vừa mới pha chế theo phương thức A/D thường cho số đọc hiển thị ở khoảng 650 FLU mà tăng dần theo thời gian.

Không sử dụng dung dịch cơ chất làm việc khi số đọc hiển thị thu được trên 1 200 FLU.

#### 8.4.1.2 Kiểm chứng Phosphacheck-N™, âm tính và dương tính<sup>3)</sup>

Sau khi hiệu chuẩn kênh dùng cho sữa bò, phân tích ba dung dịch kiểm chứng (nghĩa là Phosphacheck-N™, âm tính và dương tính) bằng cách thêm 75 µl của từng dung dịch kiểm chứng vào 2 ml dung dịch đệm làm việc đã làm ấm sơ bộ. Tiến hành phép thử ALP.

<sup>3)</sup> Các kiểm chứng qui định và hướng dẫn kiểm tra tính năng thiết bị có sẵn từ Hãng Advanced instruments Inc., Two technology Way, Norwood, MA 02062, USA.

Thông tin này được đưa ra để tiện lợi cho người sử dụng tiêu chuẩn và ISO không ấn định phải sử dụng những sản phẩm này

## TCVN 6506-1:2007

Số đọc đối với kiểm chứng âm tính phải < 10 và đối với kiểm chứng Phosphacheck-N™ phải < 40.

### 8.4.2 Kiểm chứng mẫu thử và các kiểm chứng liên quan đến thiết bị

#### 8.4.2.1 Phép thử kiểm chứng âm tính

Bao gồm một phép kiểm chứng âm tính với từng mẻ mẫu thử. Gia nhiệt mẫu thử như mô tả trong 7.1. Số đọc của thiết bị phải nhỏ hơn 10 mU/l, cho thấy rằng không phát hiện được hoạt tính huỳnh quang. Nếu giá trị này vượt quá 10 mU/l, thì lặp lại bước 8.4.1.2.

#### 8.4.2.2 Phép thử kiểm chứng dương tính<sup>3)</sup>

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

### 8.4.3 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 10 min và trộn.

Đặt cuvet chứa hỗn hợp này vào thiết bị Fluorophos® (5.1) và thử nghiệm theo 8.2. 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.

### 8.4.4 Phép thử kiểm chứng phosphatase kiểm của vi khuẩn bền nhiệt

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 tính phosphatase còn sót lại theo 8.3. Hoạt tính còn sót lại là do sự có mặt phosphatase kiểm 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 (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 giá trị tính bằng số tỷ lệ hiệu chuẩn của đường chuẩn đã thiết lập;

$F_C$  là 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 8.2);

$F_B$  là 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 8.2).

## 9.2 Tính toán

Tính hoạt tính phosphatasa 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 tính men phosphatasa kiềm của mẫu thử (7.2.2 hoặc 7.2.3), tính bằng mili đơn vị hoạt tính enzym trên lit;

$F_{av}$  là huỳnh quang trung bình do phần mẫu thử (8.3) phát ra trong 1 min, được đo dựa vào dung dịch hiệu chuẩn A (xem 8.2) tại thời điểm bắt đầu phút thứ hai và ở 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 hệ số pha loãng ( $1 \times 10^6$ ) trong trường hợp mẫu thanh trùng (7.2.2); trong trường hợp các mẫu sữa nguyên liệu (7.2.3), thì  $f = 1 \times 10^8$ ; trong trường hợp mẫu thử là sữa xử lý nhiệt (7.2.3) thì nhân hệ số  $f = 1 \times 10^6$  với hệ số pha loãng  $f_1$  của mẫu thử ( $f = f_1 \times 10^6$ );

$V$  là thể tích phần mẫu thử, tính bằng mililit.

## 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 thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này 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**

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 các giá trị  $r$  nêu trong bảng 1.

**Bảng 1 – Giới hạn lặp lại**

Sản phẩm	Mức hoạt tính phosphataza kiềm mU/l				
	20	40	100	350	500
Sữa bò	–	21,50	22,10	89,60	93,30
Sữa cừu	10,43	16,26	33,67	96,82	99,76
Sữa dê	8,63	7,98	26,20	42,83	28,56

**10.2 Độ tái lập**

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 các giá trị  $R$  nêu trong bảng 2.

**Bảng 2 – Giới hạn tái lập,  $R$** 

Sản phẩm	Mức hoạt tính phosphataza kiềm mU/l				
	20	40	100	350	500
Sữa bò	–	31,80	51,00	136,40	211,10
Sữa cừu	16,63	20,34	46,63	170,24	233,10
Sữa dê	10,69	20,55	28,71	127,89	87,51

## 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 qui 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 trên bốn loại sữa bò, sữa cừu và sữa dê thực hiện theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2). Phép thử này đã kết thúc vào tháng 3 năm 2004.

Các kết quả thu được đã đưa vào phân tích thống kê theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1) và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2) đưa ra các dữ liệu về độ chụm trong bảng A.1 và A.2. Các dữ liệu này được biểu thị theo giá trị độ lệch chuẩn tương đối tính bằng phần trăm và thu được bản tổng hợp các số thống kê của nghiên cứu liên phòng. Báo cáo tổng hợp được nêu trong [5].

**Bảng A.1 – Độ lệch chuẩn tương đối lặp lại (RSDr)**

Giá trị tính bằng phần trăm

Sản phẩm		Mức hoạt tính phosphataza kiềm				
		mU/l				
		20	40	100	350	500
Sữa bò	Nguyên chất	16,20	22,51	6,79	4,60	8,37
	Tách một phần chất béo	13,15	13,19	7,53	12,72	2,97
	Gầy	–	13,08	7,94	5,32	5,84
	Bổ sung hương liệu *	–	12,86	5,12	4,68	3,33
	Sữa bò (tất cả các loại)	–	18,66	7,69	8,89	6,48
Sữa cừu		11,68	12,04	10,68	7,86	5,69
Sữa dê		13,81	5,94	7,29	3,65	1,74

\* Sữa bổ sung hương liệu đã được thử nghiệm trong phép thử này là sữa bổ sung hương của quả dâu tây.

**Bảng A.2 – Độ lệch chuẩn tương đối tái lập (RSDr)**

Giá trị tính bằng phần trăm

Sản phẩm		Mức hoạt tính phosphataza kiềm mU/l				
		20	40	100	350	500
Sữa bò	Nguyên chất	16,20	25,44	15,96	6,60	17,29
	Tách một phần chất béo	24,30	17,19	16,45	16,86	9,79
	Gầy	-	27,21	19,01	9,81	12,37
	Bổ sung hương liệu *	-	22,13	11,26	10,47	9,50
	Sữa bò (tất cả các loại)	-	27,60	17,69	13,53	14,66
Sữa cừu		18,62	15,07	14,79	13,82	13,30
Sữa dê		17,11	15,31	7,98	10,91	5,33

\* Sữa bổ sung hương liệu đã được thử nghiệm trong phép thử này là sữa bổ sung hương của quả dâu tây.

**CHÚ THÍCH** Trong một vài trường hợp chưa có đủ số liệu cho sữa bò để tính các giá trị RSDr và RSDs ở mức hoạt tính 20 mU/l. Điều này là do thiết bị Fluorophos® ghi lại giá trị < 10 mU/l đối với các giá trị ALP rất thấp và ở đây không có cơ chế thống kê thông qua liên quan đến kết quả như vậy. Điều này có nghĩa là tất cả các kết quả đã được hiệu chỉnh về < 10 mU/l phải để ngoài tính toán 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*, 260 (73), 1988
- [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.*, **68** (5), 2005, pp. 1047-1053.
-