

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 11673:2016

Xuất bản lần 1

**SỮA CÔNG THỨC DÀNH CHO TRẺ SƠ SINH -
XÁC ĐỊNH COBALAMIN (HOẠT ĐỘ VITAMIN B12) -
PHƯƠNG PHÁP ĐO ĐỘ ĐỤC**

*Milk-based infant formula -
Determination of cobalamin (vitamin B12 activity) - Turbidimetric method*

HÀ NỘI - 2016

Lời nói đầu

TCVN 11673:2016 được xây dựng trên cơ sở tham khảo AOAC 986.23, *Cobalamin (vitamin B₁₂ activity) in milk-based infant formula. Turbidimetric method*;

TCVN 11673:2016 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F13 *Phương pháp phân tích và lấy mẫu* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh - Xác định cobalamin (hoạt độ vitamin B₁₂) - Phương pháp đo độ đục

Milk-based infant formula - Determination of cobalamin (vitamin B₁₂ activity) -

Turbidimetric method

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp đo độ đục để xác định hàm lượng cobalamin (hoạt độ vitamin B₁₂) trong sữa công thức dành cho trẻ sơ sinh.

2 Nguyên tắc

Mẫu thử được tạo huyền phù trong dung dịch đệm phosphat, sau đó được làm nóng để chiết cobalamin. Dịch chiết cobalamin được pha loãng bằng môi trường cơ bản có chứa tất cả các chất dinh dưỡng cần thiết cho sự phát triển của vi sinh vật thử nghiệm *L. leichmannii*, ngoại trừ cobalamin. Tốc độ phát triển của *L. leichmannii* so với cobalamin đã chiết được thể hiện bởi độ đục. Hàm lượng vitamin B₁₂ trong dịch chiết mẫu được xác định bằng cách so sánh tốc độ phát triển của vi sinh vật thử nghiệm trong môi trường dịch chiết với tốc độ phát triển trong dung dịch hiệu chuẩn có nồng độ đã biết.

3 Thuốc thử và môi trường

Chỉ sử dụng các thuốc thử loại tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước có chất lượng tương đương, trừ khi có quy định khác.

Trong tất cả các bước tránh để các dung dịch tiếp xúc quá mức với ánh sáng, trừ khi có quy định khác.

3.1 Etanol, 25 % (thể tích).

3.2 Dung dịch axit clohydric (HCl), (1 + 1) (tỷ lệ thể tích).

Pha loãng một phần thể tích axit clohydric đặc (nồng độ từ 36,5 % đến 38 %) với một phần thể tích nước.

3.3 Dung dịch axit clohydric (HCl) loãng

Pha loãng 236 ml axit clohydric đặc (nồng độ từ 36,5 % đến 38 %) bằng nước đến 1 l.

3.4 Dung dịch axit axetic (CH₃COOH), 0,02 M.

3.5 Dung dịch natri hydroxit (NaOH).

3.6 Dung dịch natri clorua (NaCl), 0,9 % (khối lượng/thể tích).

3.7 Dinatri hydrophosphat (Na₂HPO₄) khan.

3.8 Axit xitric ngậm một phân tử nước [C₃H₄(OH)(COOH)₃.H₂O] .

3.9 Natri metabisulfit (Na₂S₂O₅) khan.

3.10 Chất chống tạo bọt.

3.11 Dung dịch amoniac (NH₄OH), (2 + 3) (tỷ lệ thể tích).

Pha loãng hai phần thể tích dung dịch amoniac (nồng độ từ 28 % đến 30 %) với ba phần thể tích nước.

3.12 Dung dịch gốc dùng cho môi trường cơ bản

3.12.1 Dung dịch adenin-guanin-uracil

Hòa tan 1,0 g adenin sulfat, 1,0 g guanin ngậm một phân tử axit clohydric và 1,0 g uracil vào 50 ml axit clohydric (3.2) ấm đựng trong bình định mức 1 l (4.1), để nguội và thêm nước đến vạch.

3.12.2 Dung dịch L-asparagin

Hòa tan 10 g L-asparagin ngậm một phân tử nước vào nước đựng trong bình định mức 1 l (4.1) và thêm nước đến vạch.

3.12.3 Dung dịch polyoxyetylen sorbitan monooleat (polysorbat 80)

Hòa tan 25 g polysorbat 80 vào etanol 25 % (3.1) đựng trong bình định mức 250 ml (4.1) và thêm etanol đến vạch.

3.12.4 Dung dịch muối A

Hòa tan 50 g kali dihydrophosphat (KH₂PO₄) khan và 50 g dikali hydrophosphat (K₂HPO₄) khan vào nước đựng trong bình định mức 1 l (4.1), thêm 10 giọt axit clohydric (3.3) và pha loãng bằng nước đến vạch.

3.12.5 Dung dịch muối B

Hòa tan 20 g magie sulfat ngậm bảy phân tử nước ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), 1 g natri clorua, 1 g sắt (II) sulfat ngậm bảy phân tử nước ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) và 1 g mangan sulfat ngậm một phân tử nước ($MnSO_4 \cdot H_2O$) vào nước đựng trong bình định mức 1 l (4.1), thêm 10 giọt axit clohydric (3.3) và pha loãng bằng nước đến vạch.

3.12.6 Dung dịch vitamin I

Hòa tan 25 mg riboflavin, 25 mg thiamin ngậm một phân tử axit clohydric, 0,25 mg biotin và 50 mg niacin vào dung dịch axit axetic (CH_3COOH) 0,02 M (3.4) đựng trong bình định mức 1 l (4.1), thêm axit axetic đến vạch.

3.12.7 Dung dịch vitamin II

Hòa tan 50 mg axit *p*-aminobezoic, 25 mg canxi pantothenat, 100 mg pyridoxin ngậm một phân tử axit clohydric, 100 mg pyridoxal ngậm một phân tử axit clohydric, 20 mg pyridoxamin ngậm hai phân tử axit clohydric và 5 mg axit folic vào etanol 25 % (3.1) đựng trong bình định mức 1 l (4.1), thêm etanol đến vạch.

3.12.8 Dung dịch xanthin

Tạo huyền phù 1,0 g xanthin trong khoảng 150 ml đến 200 ml nước đựng trong bình định mức 1 l (4.1), gia nhiệt đến khoảng 70 °C, thêm 30 ml dung dịch amoniac (3.11) và khuấy cho đến khi tan hết. Để nguội và thêm nước đến vạch.

3.12.9 Casein thủy phân bằng axit

Sử dụng các nguồn casein thủy phân bằng axit không chứa vitamin có bán sẵn.

3.12.10 Dung dịch gốc môi trường cơ bản

Cho 20 ml dung dịch adenin-guanin-uracil (3.12.1), 20 ml dung dịch asparagin (3.12.2), 20 ml dung dịch muối A (3.12.4), 20 ml dung dịch muối B (3.12.5), 40 ml dung dịch vitamin I (3.12.6), 40 ml dung dịch vitamin II (3.12.7), 20 ml dung dịch xanthin (3.12.8) và 20 ml dung dịch polysorbat 80 (3.12.3) vào mỗi lít môi trường cơ bản nồng độ kép không chứa vitamin B₁₂ đã chuẩn bị. Thêm nước để có tổng thể tích khoảng 800 ml và trộn kỹ để tránh các chất rắn tạo thành từ kết tủa khi thêm nước. Sau đó thêm 10 g casein thủy phân bằng axit (3.12.9), 0,4 g L-cystin và 0,4 g D-L-tryptophan đã hòa tan bằng lượng tối thiểu axit clohydric loãng (3.2), 40 g dextrose, 33,2 g natri trihydrat axetat và 4 g axit ascorbic. Không khuấy mạnh dung dịch sau khi thêm axit ascorbic. Lắc nhẹ cho đến khi tất cả chất rắn được hòa tan. Chính đến pH 6,0 bằng axit clohydric hoặc natri hydroxit, sử dụng máy đo pH (4.3). Pha loãng bằng nước đến vạch. Thêm dung dịch polysorbat sau khi chỉnh pH khi sử dụng chất chỉ thị màu vì polysorbat hấp thụ chất chỉ thị màu. Một số môi trường có bán sẵn trên thị trường.

3.13 Dung dịch chuẩn cyanocobalamin

3.13.1 Dung dịch chuẩn gốc, 100 ng/ml

Cân chính xác chất chuẩn đối chứng cyanocobalamin đã làm khô đến khối lượng không đổi, tương đương với 50 µg đến 60 µg cyanocobalamin và bảo quản nơi tối trong bình hút ẩm (4.6) có chứa phosphopentoxit (P_2O_5). Hoà tan vào etanol 25 % (3.1) và pha loãng bằng etanol 25 % để được nồng độ cyanocobalamin chính xác là 100 ng/ml. Bảo quản nơi tối ở nhiệt độ khoảng 10 °C.

3.13.2 Dung dịch chuẩn làm việc

Pha loãng dung dịch chuẩn trung gian đến 500 ml bằng nước. Nồng độ dung dịch chuẩn làm việc thứ nhất này tương đương với 0,01 ng/ml đến 0,04 ng/ml và bằng nồng độ dung dịch mẫu thử. Tương tự, chuẩn bị hai dung dịch chuẩn thứ hai, một dung dịch có nồng độ cao hơn và một dung dịch có nồng độ thấp hơn dung dịch chuẩn thứ nhất (ví dụ, 0,010 ng/ml và 0,020 ng/ml) để có được dải làm việc rộng hơn đối với các nồng độ vitamin B₁₂ trong các mẫu thử.

3.14 Môi trường nuôi cấy và môi trường huyền phù

3.14.1 Môi trường nuôi cấy dạng lỏng

Hòa tan 15 g sữa đã pepton hóa, 5 g chất chiết nấm men tan trong nước, 10 g glucose khan và 2 g kali dihydrophosphat khan vào khoảng 600 ml nước đựng trong bình định mức 1 l (4.1). Thêm 100 ml dịch cà chua đã lọc và chỉnh pH đến khoảng 6,5 đến 6,8 bằng dung dịch natri hydroxit. Thêm và trộn 10 ml dung dịch polysorbat 80 (3.12.3) rồi thêm nước đến vạch.

Pha loãng lượng môi trường đã chuẩn bị bằng cùng một lượng nước có nồng độ vitamin B₁₂ 1 ng/ml. Cho các phần thể tích 10 ml môi trường vào các ống nghiệm (4.7), tiệt trùng 15 min trong nồi hấp (4.4) ở nhiệt độ từ 121 °C đến 123 °C, làm nguội nhanh và bảo quản trong tủ lạnh (4.12).

3.14.2 Môi trường thạch nuôi cấy

Cho từ 5,0 g đến 7,5 g thạch vào 500 ml môi trường nuôi cấy dạng lỏng (3.14.1), gia nhiệt trong khi vẫn khuấy trên nồi hơi (4.5) cho đến khi thạch tan. Thêm các phần thể tích khoảng 10 ml dung dịch đã làm nóng vào các ống nghiệm, đậy các ống để tránh bị nhiễm bẩn, tiệt trùng 15 min trong nồi hấp (4.4) ở nhiệt độ 121 °C đến 123 °C và làm nguội nhanh các ống ở tư thế thẳng đứng để giảm thiểu sự tạo màu. Bảo quản nơi tối ở nhiệt độ khoảng 10 °C.

3.14.3 Môi trường huyền phù

Pha loãng một lượng thích hợp dung dịch gốc môi trường cơ bản (3.12.10) đã chuẩn bị bằng cùng một lượng nước. Thêm các phần thể tích 10 ml môi trường đã pha loãng vào các ống nghiệm, đậy các ống

để tránh nhiễm bẩn, tiệt trùng 15 min trong nồi hấp (4.4) ở nhiệt độ từ 121°C đến 123 °C và làm nguội nhanh các ống để giảm thiểu sự tạo màu. Bảo quản nơi tối ở nhiệt độ khoảng 10 °C.

4 Thiết bị, dụng cụ

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

- 4.1 Bình định mức, dung tích 250 ml và 1 l.
- 4.2 Cốc có mỏ.
- 4.3 Máy đo pH.
- 4.4 Nồi hấp, có thể cài đặt ở nhiệt độ từ 121°C đến 123 °C.
- 4.5 Nồi hơi.
- 4.6 Bình hút ẩm, chứa các chất hút ẩm hiệu quả.
- 4.7 Ống nghiệm, có nắp vặn kích thước 20 mm×150 mm.
- 4.8 Máy đo quang phổ.
- 4.9 Máy ly tâm.
- 4.10 Mặt kính đồng hồ.
- 4.11 Tủ sấy chân không.
- 4.12 Tủ lạnh.
- 4.13 Giấy lọc.

5 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707) ^[1].

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

6 Cách tiến hành

6.1 Chuẩn bị chủng gốc của sinh vật thử nghiệm

Đối với *L. leichmannii* chuẩn bị chủng cấy đâm sâu trong một hoặc nhiều ống môi trường thạch nuôi cấy (3.14.2). Ủ từ 6 h đến 24 h ở nhiệt độ 37 °C ± 0,5 °C và bảo quản nơi tối ở nhiệt độ khoảng 10 °C.

TCVN 11673:2016

Trước khi sử dụng chủng mới trong phân tích, cấy chuyển một vài lần chủng cấy trong khoảng 1 tuần đến 2 tuần. Chuẩn bị chủng cấy đậm sâu mới ít nhất một tuần một lần và không sử dụng để chuẩn bị dịch cấy nếu để chủng cấy lâu hơn 1 tuần.

Có thể làm tăng hoạt độ của chủng phát triển chậm bằng cách cấy chuyển chủng cấy đậm sâu hàng ngày hoặc hai lần một ngày và được coi là thích hợp khi có thể quan sát được độ đục trong dịch cấy dạng lỏng từ 2 h đến 4 h sau khi cấy. Chủng cấy phát triển chậm ít khi cho đường chuẩn đáp ứng thích hợp và có thể cho kết quả không ổn định.

6.2 Chuẩn bị dịch cấy

Chuyển các tế bào của chủng gốc *L. leichmannii* (6.1) vào hai ống nghiệm vô trùng chứa 10 ml môi trường nuôi cấy dạng lỏng (3.14.1). Thực hiện việc cấy chuyển vô trùng các tế bào. Ủ từ 6 h đến 24 h ở nhiệt độ $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Trong điều kiện vô trùng, ly tâm trong máy ly tâm (4.9) và gạn lấy huyền phù. Rửa các tế bào ba lần mỗi lần khoảng 10 ml dung dịch natri clorua 0,9 % (3.6) vô trùng hoặc môi trường huyền phù (3.14.3) vô trùng. Các tế bào được đưa trở lại dạng huyền phù trong 10 ml dung dịch natri clorua 0,9 % vô trùng hoặc môi trường huyền phù vô trùng. Pha loãng huyền phù bằng dung dịch natri clorua 0,9 % vô trùng hoặc môi trường huyền phù vô trùng để thu được giá trị độ truyền qua T , tương đương với lượng tế bào khô (xem 6.5) có hàm lượng 0,50 mg/ống đến 0,75 mg/ống, khi đọc theo môi trường huyền phù, cài đặt ở giá trị T 100 %. Cũng thu được huyền phù tế bào trong dịch cấy.

6.3 Chuẩn bị dung dịch thử

Chuẩn bị 100 ml dịch chiết chứa 1,3 g dinatri hydrophosphat khan (3.7), 1,2 g axit xitric ngậm một phân tử nước (3.8) và 1,0 g natri metabisulfit khan (3.9) ngay trước khi sử dụng. Lấy lượng mẫu thử chứa từ 50 ng đến 100 ng vitamin B_{12} chuyển vào cốc có mỏ (4.2) chứa dịch chiết có nồng độ natri metabisulfit không quá 0,03 mg/ml, ở nồng độ phân tích cuối cùng nồng độ vitamin B_{12} từ 0,01 ng/ml đến 0,04 ng/ml. *L. leichmannii* để bị ức chế phát triển ở nồng độ lớn hơn 0,03 mg/ml.

Phân tán đều dung dịch thử trong chất lỏng. Rửa đáy cốc có mỏ bằng nước và đập bằng mặt kính đồng hồ (4.10). Hấp hỗn hợp 10 min ở nhiệt độ từ $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ đến $123\text{ }^{\circ}\text{C}$ và làm nguội. Nếu bị vón cục, thì khuấy hỗn hợp cho đến khi các hạt được phân tán đều. Chỉnh pH của hỗn hợp đến 4,5 trong khi vẫn khuấy mạnh. Pha loãng hỗn hợp bằng nước đến thể tích xác định để thu được nồng độ vitamin B_{12} khoảng 0,2 ng/ml và lọc qua giấy lọc (4.13).

Lấy dịch lọc và kiểm tra các protein hòa tan bằng cách thêm từng giọt axit clohydric loãng và nếu không tạo thêm kết tủa, thì thêm dung dịch natri hydroxit (3.3) và khuấy mạnh. Tiến hành như sau với dịch lọc:

a) Nếu không xuất hiện thêm kết tủa, thêm dung dịch natri hydroxit trong khi vẫn khuấy đến pH 6,0, pha loãng bằng nước đến thể tích xác định cuối cùng chứa nồng độ vitamin B_{12} ở khoảng 0,014 ng/ml.

b) Nếu xuất hiện thêm kết tủa, thì chỉnh hỗn hợp đến điểm kết tủa tối đa (khoảng pH 4,5), pha loãng bằng nước đến khối lượng xác định và lọc. Lấy dịch lọc trong và tiến hành như (a).

6.4 Chuẩn bị các ống nghiệm phân tích

Làm sạch kỹ các ống nghiệm và dụng cụ thủy tinh cần thiết khác bằng cách thích hợp.

CHÚ THÍCH Sinh vật thử nghiệm rất nhạy với một lượng nhỏ các chất tăng trưởng và nhiều chất tẩy rửa. Do đó, tốt nhất làm sạch các dụng cụ thủy tinh bằng cách sấy từ 1 h đến 2 h ở nhiệt độ khoảng 250 °C.

Chuẩn bị các ống nghiệm chứa dung dịch chuẩn làm việc cyanocobalamin (3.13.2) như sau: Cho lặp lại (hoặc cho hai lần), lần lượt 0,0 ml (đối với mẫu trắng không được cấy), 0,0 ml (đối với mẫu trắng được cấy), 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml và 5,0 ml dung dịch chuẩn vào các ống nghiệm.

Chuẩn bị các ống nghiệm chứa dung dịch thử như sau: Cho lặp lại (hoặc cho hai lần) lần lượt 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, và 4,0 ml dung dịch thử vào các ống nghiệm.

Thêm nước vào từng ống dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Sau đó thêm 5,0 ml dung dịch gốc môi trường cơ bản (3.12.10) đến 5,0 ml và trộn đều. Đặt các ống bằng cách thích hợp để tránh bị nhiễm bẩn tế bào và tiệt trùng hơn 10 min trong nồi hấp ở nhiệt độ từ 121 °C đến 123 °C, duy trì nhiệt độ này không quá 10 min. Làm nguội nhanh để giảm thiểu sự tạo màu. Thực hiện các biện pháp phòng ngừa để không làm thay đổi các điều kiện tiệt trùng và làm nguội trong quá trình phân tích. Đặt các ống quá khít trong nồi hấp hoặc nồi hấp quá tải có thể làm thay đổi tốc độ gia nhiệt.

Cấy vô trùng 1 giọt dịch cấy vào từng ống cấy, trừ một bộ các ống được cho lặp lại (hoặc cho hai lần) chứa 0,0 ml dung dịch chuẩn (mẫu trắng không được cấy). Ủ từ 16 h đến 24 h, ở nhiệt độ $37 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$. Các ống nghiệm bị nhiễm sinh vật ngoại lai bất kỳ làm mất hiệu lực của quá trình phân tích.

6.5 Hiệu chuẩn máy đo quang phổ

Thêm vô trùng 1 ml dịch cấy (6.2) vào khoảng 300 ml môi trường huyền phù (3.14.3) vô trùng chứa 1,0 ml dung dịch chuẩn gốc cyanocobalamin (3.13.1), rồi ủ hỗn hợp trong cùng thời gian và ở cùng nhiệt độ được sử dụng trong phép xác định (6.6). Sau khi ủ, ly tâm, rửa các tế bào ba lần mỗi lần khoảng 50 ml dung dịch natri clorua 0,9 % (3.6), sau đó huyền phù lại các tế bào trong dung dịch natri clorua để thu được 25 ml hỗn hợp.

Cho bay hơi 10 ml huyền phù tế bào trên nồi hơi (4.5) và làm khô đến khối lượng không đổi ở 110 °C trong tủ sấy chân không (4.11). Hiệu chỉnh khối lượng natri clorua, tính lượng tế bào khô của huyền phù, tính bằng miligam trên mililit (mg/ml).

Pha loãng huyền phù tế bào đã chuẩn bị thứ hai bằng dung dịch natri clorua 0,9 % sao cho mỗi mililit tương đương với 0,5 mg tế bào khô. Cho ba lần, lần lượt 0,0 ml (đối với mẫu trắng), 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, 2,5 ml, 3,0 ml, 4,0 ml và 5,0 ml huyền phù tế bào đã pha loãng vào các ống nghiệm. Thêm dung dịch natri clorua 0,9 % vào từng ống đến vạch 5 ml. Sau đó, thêm 5,0 ml dung dịch gốc môi trường cơ bản (3.12.10), trộn đều [có thể thêm 1 giọt chất chống tạo bọt (3.10) thích hợp] và chuyển vào cuvet đo quang. Cài đặt các mẫu trắng ở độ truyền qua (T) 100 %, đo giá trị T của từng ống trong cùng điều kiện được sử dụng trong phép phân tích. Dụng cụ chuẩn các giá trị T đối với từng mức huyền phù tế bào pha loãng đã dùng so với hàm lượng tế bào tính theo lượng chất khô (tính bằng miligam) của các ống tương ứng.

Lặp lại bước hiệu chuẩn máy đo quang phổ (4.8) ít nhất hai lần trong điều kiện phân tích. Dụng cụ chuẩn hỗn hợp, tốt nhất là dụng cụ ba hoặc nhiều hơn ba đường chuẩn riêng rẽ của giá trị T theo lượng tế bào khô, tính bằng miligam, dùng cho máy đo quang phổ trong điều kiện phân tích. Khi dụng cụ chuẩn đối với thiết bị cụ thể, tất cả các mối tương quan tiếp theo giữa giá trị T và lượng tế bào được xác định trực tiếp từ đường chuẩn này. Cũng xác định được giới hạn phân tích tính theo miligam lượng tế bào khô/ống.

6.6 Xác định

Ủ các ống nghiệm trong 6.4 từ 16 h đến 24 h cho đến khi thu được độ đục lớn nhất, điều này được nhận biết khi không có sự thay đổi đáng kể nào trong suốt quá trình ủ thêm 2 h trong các ống chứa mức dung dịch chuẩn cao nhất. Xác định độ truyền qua T của các ống như sau: Trộn kỹ lượng chứa trong từng ống (có thể thêm vào 1 giọt dung dịch chất chống tạo bọt thích hợp) và chuyển vào cuvet đo quang. Khuấy mạnh các lượng chứa, đặt cuvet vào máy đo quang phổ (4.8) cài đặt ở bước sóng quy định từ 540 nm đến 660 nm và đọc giá trị T khi máy đạt trạng thái ổn định. Trạng thái ổn định được quan sát từ 3 s đến 4 s sau khi khuấy, khi giá trị trên điện kế không đổi trong hơn 30 s. Sử dụng một khoảng thời gian như nhau để đọc từng ống.

Cài đặt mức mẫu trắng không được cấy ở độ truyền qua (T) 100 %, đọc giá trị T của mức mẫu trắng được cấy. Nếu số đọc tương ứng với lượng tế bào khô này lớn hơn 0,6 mg/ống, thì loại bỏ các kết quả phân tích. Sau đó, cài đặt lại mức mẫu trắng được cấy ở T 100 %, đọc giá trị T đối với từng ống còn lại. Loại bỏ các kết quả phân tích nếu giá trị T quan sát ở mức dung dịch chuẩn 5,0 ml (so với mẫu trắng được cấy) tương đương với lượng tế bào khô có hàm lượng nhỏ hơn 1,25 mg/ống.

Dụng cụ chuẩn nồng độ dung dịch chuẩn-độ đáp ứng bằng cách vẽ các giá trị T đối với từng mức dung dịch chuẩn đã dùng so với lượng chất chuẩn đối chứng chứa trong các ống tương ứng.

Xác định lượng vitamin đối với từng mức dung dịch thử bằng phương pháp nội suy từ đường chuẩn. Loại bỏ tất cả các giá trị T tương đương quan sát được nhỏ hơn 0,5 ml hoặc lớn 4,5 ml dung dịch chuẩn, tương ứng.

7 Tính kết quả

Đối với từng mức dung dịch thử đã dùng, tính hàm lượng vitamin trong mỗi mililit dung dịch thử. Tính giá trị trung bình của các giá trị thu được từ các ống, sao cho các giá trị thu được từ các ống không lớn hơn 10 % giá trị trung bình này. Nếu số lượng các giá trị chấp nhận được còn lại nhỏ hơn hai phần ba số lượng các ống ban đầu đã dùng trong bốn mức dung dịch thử, thì dữ liệu là không đủ để tính đến hiệu lực của mẫu. Nếu số lượng các giá trị chấp nhận được còn lại bằng hoặc lớn hơn hai phần ba số lượng các ống ban đầu, thì tính hiệu lực của mẫu từ trung giá trị trung bình nêu trên .

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm:

- a) mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được xem là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm;
- e) kết quả thử nghiệm thu được.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400:2010 (ISO 707:2008), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.*
 - [2] TCVN 8976:2011 (EN 14166:2009), *Thực phẩm – Xác định vitamin B₆ bằng phép thử vi sinh.*
 - [3] TCVN 8978:2011 (EN 14131:2003), *Thực phẩm – Xác định folat bằng phép thử vi sinh.*
-