ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

СҮТ
Фосфатаза сілтілігін анықтау

МОЛОКО
Определение фосфатазы щелочи

ҚР СТ ISO 3356-2013

(ISO3356:2009, IDT)

Ресми басылым

Қазақстан Республикасы Индустрия және жаңа технологиялар министрлігінің
Техникалық реттеу және метрология комитеті
(Мемстандарт)

Астана

gost.e-ecolog.ru

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

СҮТ

Фосфатаза сілтілігін анықтау

ҚР СТ ISO 3356-2013

(ISO3356:2009, IDT)

Ресми басылым

**Қазақстан Республикасы Индустрия және жаңа технологиялар министрлігінің
Техникалық реттеу және метрология комитеті
(Мемстандарт)**

Астана

Алғысөз

1 «Қазақстан стандарттау және сертификаттау инсти
туты» Республикалық мемлекеттік кәсіпорны мен стандарттау жөніндегі 44 «Технолог» техникалық комитеті **ӘЗІРЛЕП ЕНГІЗДІ**

2 Қазақстан Республикасы Индустрия және жаңа технологиялар министрлігі Техникалық реттеу және метрология комитеті Төрағасының 2013 жылғы 13 қарашадағы № 526-од бұйрығымен **БЕКІТІЛІП ҚОЛДАНЫСҚА ЕНГІЗІЛДІ**

3 Осы стандарт ISO 3356:2009 Milk – determination of alkaline phosphatase (Сүт. Фосфотаза сілтілігін анықтау) халықаралық стандартына қатынасы бойынша бірдей.

ISO 3356:2009 Milk – determination of alkaline phosphatase халықаралық стандартын ISO/TC 34 «Тамақ өнімдері» техникалық комитеті, SC 5 «Сүт және сүт өнімдері» ішкі комитеті дайындады. Ол ISO және IDF бірлесе жарияланады.

Аударма ағылшын тілінен (en)

Сәйкестік дәрежесі – бірдей (IDT)

4 БІРІНШІ ТЕКСЕРУ МЕРЗІМІ 2019 жыл
ТЕКСЕРУ КЕЗЕҢДІЛІГІ 5 жыл

5 АЛҒАШ РЕТ ЕНГІЗІЛДІ

Осы стандартқа енгізілетін өзгерістер туралы ақпарат «Стандарттау жөніндегі нормативтік құжаттар» ақпараттық көрсеткіштерінде жыл сайын, сондай-ақ мәтін өзгерістер мен түзетулер ай сайын басылатын «Ұлттық стандарттар» ақпараттық көрсеткішінде жария етіледі. Осы стандартты қайта қарау (өзгертілу) жою жағдайында, тиісті хабарлар ай сайын басылатын «Ұлттық стандарттар» ақпараттық көрсеткішінде жария етіледі».

Осы стандарт Қазақстан Республикасы Индустрия және жаңа технологиялар министрлігінің Техникалық реттеу және метрология комитетінің рұқсатынсыз ресми басылым ретінде толықтай және бөлшектеліп басылып шығарыла, көбейтіле және таратыла алмайды.

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ ҰЛТТЫҚ СТАНДАРТЫ

СҮТ

Фосфатаза сілтілігін анықтау

Енгізілген күні 2014-07-01

1 Қолданылу саласы

Осы стандарт сүттің фосфатаза сілтілік белсенділігін анықтау әдістерін белгілейді..

Осы әдіс бір миллилитрге фосфатаза сілтілік белсенділігіне 1 мкг фенолдан кем емес болып қолданылады .

Осы әдіс құрғақ сүттің, іркіт немесе құрғақ іркіттің, сарысу немесе құрғақ сарысудың фосфатаза сілтілік белсенділігін анықтауға қолайлы.

ЕСКЕРТУ Осы стандартты қолдану өзіне қауіпті материалдарды, операцияларды және жабдықты қосуы мүмкін. осы стандарт оны қолдануға байланысты қауіпсіздікке жататын барлық проблемаларды қарастыру мақсатын көздемейді. Еңбекті қорғау және қауіпсіздік техникасы жөніндегі талаптарды белгілеу, сондай-ақ нормативтік шектеулерді қолдануды анықтау қолданушының жауапкершілігі болып табылады.

2 Терминдер мен анықтамалар

Осы стандартта тиісті анықтамаларымен келесі терминдер қолданылады:

2.1 Фосфатаза сілтілік белсенділігі Осы стандартта белгіленген процедурамен сәйкес анықталған белсенділік СФСБ (сүттегі фосфатаза сілтілік белсенділігі) (alkalinephosphatase activity ALPactivity (alkalinephosphatase activity in milk)) – сынамен бөлінген фенол мөлшері.

ЕСКЕРТПЕ Осы стандартта белгіленген фосфатаза сілтілік белсенділігі фенолдың , 1 мл сынаның босатылған немесе қалпына келтірілген микрограммдағы мөлшері ретінде көрінеді. Басқа стандартарда (мысалы, [6], [7]) фосфатаза сілтілік белсенділігі бір литрге миллиедидицадан келеді. әдебиетте әртүрлі бірлік эквивалентінде фосфатаза сілтілік белсенділігі үшін қолданылатын ақпарат келтірілген.

3 Әдістің ішкі мәні

Сынаны буферлі ерітіндімен pH 10,6 арқылы сұйылту керек және 37 °С температурасында 1 сағат көлемінде ұстау керек. Осындай жағдайда сынадағы кез-келген фосфатаза сілтісі қосылған фенилфосфат натрий әсерінен фенол бөледі. Бөлінген фенол хинонимидпен (дибромхинонхлоримидпен) реакцияға түседі 610 нм дибромоиндофенол (көк түсті) береді.

4 Реактивтер

«Анализ үшін таза» квалификациясы реактивтерін қолдану керек басқаша көрсетілмесе тек тазартылған суды немесе тазалықтың баламалы дәрежесін ғана,.

4.1 Гидроксид пен борат барий буферлік ерітінді

Құрамында карбонаты жоқ 25,0 барий гидроксидін [Ba(OH)28H2O] 500 мл-ға бір белгісі бар өлшеуіш құтыдағы суға ерітеді (5.8 қараңыз). Белгіге дейін сумен жеткізіп құяды және араластырады

500 мл (5.8 қараңыз) басқа бір белгісі бар өлшеуіш құтыда. 11,0 грамм бор қышқылын (H_3BO_3) суда ерітеді. Белгіге дейін сумен жеткізіп құяды және араластырады.

Екі ерітіндіні 50 °С. температураға дейін қыздырады. Біріне бірін құйып сілкіп араластырады.Алынған ерітіндіні 20 °С температураға дейін тез арада суытады. Гидроксид барий ерітіндісінің қосымша мөлшерімен қажет болғанда (10,6 ± 0,1) дейін pH ерітіндісіне жеткізеді. Ерітіндіні сүзгіш қағаздан сүзіп алады (5.10 қараңыз).

Гидроксид пен борат барийдің сүзілген ерітіндісін нығыз жабылатын тығыны бар контейнерде сақтайды. Қолданар алдында буфер ерітіндісін бірдей мөлшерлі сумен араластырады.

4.2 Түсті буфер ерітінділері

4.2.1 Түсті буфер ерітіндісі I

.6,0 г натрий метаборат ($NaBO_2$) және 12,6 г $NaBO_2 \cdot 4H_2O$ және 20,0 грамм натрий хлоридін (NaCl) 1000 мл-ға бір белгісі бар өлшеуіш құтыда ерітеді(5.8 қараңыз). Белгіге дейін сумен жеткізіп құяды және араластырады.

4.2. Түсті буфер ерітіндісі II 1000 мл-ға бір белгісі бар өлшеуіш құтыға(5.8 қараңыз) 10 мл буфер I ерітіндісін ауыстырады (4.2.1 қараңыз). Белгіге дейін сумен жеткізіп құяды және араластырады.

4.3 Субстратты буфер ерітіндісі

4.3.1 Құрамында 0,01 % артық емес фенолдың массалық үлесі бар қос натрийлі фенил фосфатының дигидраты ($Na_2C_6H_5PO_4 \cdot 2H_2O$).

4.3.2 Ерітілген гидроксид және борат барий (4.1 қараңыз) 100 мл-не 0,1 г қос натрийлі фенил фосфатының дигидратын (4.3.1 қараңыз) ерітеді.

4.4 Мырыш-мыс ерітінді тұнбасы

1000 мл-ға бір белгісі бар өлшеуіш құтыға(5.8 қараңыз) 3,0 г мырыш сульфатын ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) және 0,6 г мыс сульфатын ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ерітеді). Белгіге дейін сумен жеткізіп құяды және араластырады.

4.5 2,6-дибромхинонхлоримид ерітіндісі (ары қарай – БХХИ), Гиббс реактиві

10 мл этанолдың 96 % көлемді шоғырлануына (40 ± 1) мг БХХИ ($C_6H_2Br_2ClNO$) ерітеді.

(4 ± 2) °С температурадағы күңгірт шыны бөтелкеде сақтайды. Бір ай мерзім өткенде немесе түссізденгенде бракқа шығарады.

4.6 Мыш сульфатының ерітіндісі

1000 мл-ға бір белгісі бар өлшеуіш құтыға(5.8 қараңыз) 0,05 г мырыш сульфатын ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) ерітеді. 100 мл белгіге дейін сумен жеткізіп құяды және араластырады.

4.7 с(NaOH) = 0,5 моль/л гидроксид натрий ерітіндісі.

4.8 Фенолдың стандартты ерітіндісі

4.8.1 Фенолдың бастапқы стандартты ерітіндісі

100 мл белгісі бар өлшеуіш құтыға (5.8 қараңыз) (200 ± 2) мг сусыз таза 99,5% фенолдың өлшенген көлемін ауыстырады. Фенолды суда ерітеді. Белгіге дейін сумен жеткізіп құяды және араластырады.

Фенолдың бастапқы стандартты ерітіндісі қалыпты жағдайда (4 ± 2) °С температурасында 6 апта тұрады.

4.8.2 Фенолдың жұмыстық стандартты ерітінділері

100 мл белгісі бар өлшеуіш құтыға (5.8 қараңыз) 10 мл фенолдың бастапқы стандартты ерітіндісін (4.8.1 қараңыз) тамызғышқа сорып алады. Белгіге дейін сумен жеткізіп құяды және араластырады. (1 мл құрамында 200 мкг фенол бар).

Араласқан стандартты ерітіндіні бір милилитрге сәйкес 2; 5; 10 и 20 мкг фенолдан келетін фенолдың жұмыстық стандартты ерітінділерін даярлау үшін пайдаланады.

5 Аппаратура

Қарапайым зертхана жабдықтары және дербес жағдайда төменде айтылғандар:

5.1 Аналитикалық таразылар, арнайы I класты.

5.2Толқынның 610 нм ұзындығында өлшеуге келетін фотометр, толқынның дәлмедәл ұзындығы ± 1 нм.

5.3 Термостаттық бақылауда (37±1) °С температура тұрақталатындай су моншасы.

5.4 Қайнау температурасы (100 ± 1) °С болатындай су моншасы.

5.5 Құйын тәрізді араластырғыш.

5.6 Сыйымдылығы 0,1; 1; 5 және 10 мл, [1], А класты тамызғыштар

5.7 Сыйымдылықтарына сәйкес шыны түтіктер, фенолды төсемсіз жасалынған тығындар.

5.8 Бір белгісі бар өлшеу құтылары, сыйымдылығы100; 500 және 1000 мл, [3], А класты.

5.9 Диаметрлері 60 мм және 100 мм болатын шыны құйғылар.

5.10 Диаметрлері 110 мм және 185 мм болатын тез сүзетін сүзгіш қағаз.

6 Сынаманы іріктеу.

Таңдалған сынаны зертханаға жөнелтеді. Тасымалдауда және сақтауда ол бүлінбеген немесе өзгермеген болуы тиіс.

Осы стандартта көрсетілгендей сынаманы іріктеу әдістің бөлігі болып табылмайды . Ұсынылған сынаманы іріктеу әдісі [2] көрсетілген.

Сынаққа арналған сынаманы сына құрамында төмендеу мен өзгерулер болмайтындай етіп сақтау керек.

7 Сыналатын сынаманы дайындау.

7.1 Араластыру

Қолданар алдында сыналатын сынаманы абайлап араластырады. Әдетте тиісінше араластыру үшін сыналатын сынаманы алдын-ала қыздыру қажеттігі жоқ.. Егер алдын-ала қыздыру қажет болатын болса температура 35 °С тан аспауы тиіс.

7.2 Ұнтақталған сүт, құрғақ іріткі және құрғақ сарысу.

Қажет болса қыздырған уақытта 10 г сыналатын сынаманы 90 мл суға ерітеді. Сыналатын сынаманың тұтастай еріп кетуі үшін қолданылатын температура 35°С тан аспауы тиіс..

7.3 Қышқыл сыналатын сынаманың бейтараптануы.

Егер сыналатын сынама қышқыл болса (pH < 7,0), гидроксид натрий (4.7 қараңыз) ерітіндісімен бейтараптануға pH жеткізеді.

8 Әдістеме

8.1 Градуирлеу қисығының құрылымы.

8.1.1 Стандарттық ерітінділердің көлемін бес шыны түтікке дайындайды (5.7 қараңыз), 1 мл суды бақылаушы немесе бос сынамаға және 1 мл төрт фенолдың жұмысты стандартты ерітінділерінің әрқайсысын (4.8.2 қараңыз) қалған төрт түтікшеге сәйкес түтікке сорып алады.Стандартты сынамалы түтікшелерде 0(бақылаушы немесе бос); 2; 5 және 20 мкг сәйкес фенол болады..

8.1.2 Әр түтікшеге (8.1.1 қараңыз) 1 мл мыс сульфат ерітіндісін (4.6 қараңыз), 5 мл II түсті буфер ерітіндісін (4.2.2 қараңыз), 3 мл су және 0,1 мл БХХИ ерітіндісін (4.5 қараңыз) қосады және араластырады. Түс айқындалу үшін (жетілу) бөлме температурасында 30 мин уақыт аралығына қояды.

8.1.3 Стандартты ерітінділердің оптикалық тығыздығын бақылаушы немесе бос ерітіндінің 610 нм толқын ұзындығындағы оптикалық тығыздығына салыстырып анықтау.

8.1.4 Микрограмдағы (8.1.1 қараңыз) фенол мөлшеріне байланысты оптикалық тығыздық тәуелдігінің кестесін құру. Градуирлеу қисығының теңесуін анықтау.

8.2 Анықтау.

8.2.1 Анықтау кезінде күн сәулесінің тікелей түсуінен қорғану. Сілекей және тер іздерімен ластану кезінде жалған оң нәтижелер беруі мүмкін және одан аулақ болуы тиіс.

8.2.2 1 мл сыналатын немесе қалпына келтірілген сынама бар екі түтікшенің әрқайсысынан (5.7 қараңыз) тамызғышпен сорып алады. Түтікшенің біреуін бақылаушы немесе бос сынама ретінде пайдаланады.

8.2.3 Бос сынамасы бар түтікшені тығынмен жабады. Қайнап тұрған суы бар химиялық стақанға орналастырады. Алюминді жұқалтырмен стақанды жабады.Түтікшенің барлығы қыздырылуы үшін химиялық стақан жұқалтырмен жабулы күйінде түтікшені 2 мин қайнаған суда қыздырады. Одан соң түтікшені салқын суда бөлме температурасына дейін салқындатады.

Осыдан кейін бос сынама бар түтікше мен сыналатын сынама бар түтікшені ұқсас амалмен жасайды.

8.2.4 Сыналатын сынама салынған түтікше (8.2.2 қараңыз) мен бос сынама салынған түтікше тәрізді (8.2.2 қараңыз) 10 мл субстратты буферлі ерітіндіні (4.3 қараңыз) қосады және араластырады.

8.2.5 Мезгіл-мезгіл араластыра отырып екі түтікшені де дереу су моншасында (5.3 қараңыз) 37 °С температурада 60 минут қыздырады.

8.2.6 Екі түтікшені қайнап тұрған суы бар стақанға салады. Алюминді жұқалтырмен стақанды жабады. екі түтікшені қайнаған суда 2 минут қыздырады және суық суда бөлме температурасына дейін салқындатады.

8.2.7 Әр түтікшеге мырыш-мыс ерітінді тұнбасының (4.4 қараңыз) 1 мл қосады және мұқият араластырады.

8.2.8 Алғашқы бірнеше миллилитрін төгіп әр түтікшенің ішіндегісін сүзгіш қағаздан сүзіп алады.(5.10 қараңыз). Тамызғышпен әр су сүзбеден 5 мл сорып алады да басқа шыны түтікшеге құяды.(5.7 қараңыз).

8.2.9 Әр түтікшеге (8.2.8 қараңыз) 5 мл I түсті буферлі ерітіндіні қосады (4.2.1 қараңыз) және араластырады.

8.2.10 Әр түтікшеге 0,1 мл БХХИ (4.5 қараңыз) ерітіндісін қосады және араластырады. Екі ерітіндінің түсі айқындалу үшін бөлме температурасында 30 мин уақыт аралығына қояды.

8.2.11 Стандартты ерітінділердің оптикалық тығыздығын бақылаушы немесе бос ерітіндінің 610 нм толқын ұзындығындағы оптикалық тығыздығына салыстырып анықтау.

8.2.12 Егер 8.1.3 сәйкес өлшенген 8.2.11 өлшенген сынаққа арналған сынаманың оптикалық тығыздығы, бір миллилитрге 20 мкг фенолдан келетін фенолдың жұмыстық стандартты ерітіндісінің оптикалық тығыздығынан артып кетсе онда сыналатын сынама немесе қалпына келтірілген сынаманы төменде келтірілген әдіс бойынша анықтауды қайталайды.

Сыналатын сынаманың бір көлемін немесе қалпына келтірілген сынаманы сәйкес көлемімен абайлап қайнауға дейін апарады сондай сыналатын сынаманы немесе қалпына келтірілген сынаманы қайнату арқылы фосфатаза әсерін жояды. 8.2.2. мен жалғастырады.

9 Нәтижелердің есебі мен мағынасы

9.1 Есептеу

9.1.1 8.2.11 анықталғандай оптикалық тығыздықта фенол мөлшерін микрограмда градуирлеу қисығы арқылы(8.1.4). анықтау.

9.1.2 1 формуланы қолдана отырып сүттің милилитріндегі айқындалған фенол мөлшерімен фосфатаза белсенділігін есептеу:

$$\alpha_ф = 2{,}4 \times m \times f_р, \quad (1)$$

m – 9.1.1 алынған микрограммдағы фенол массасы;

$f_р$ – сұйылту коэффициенті сыналатын немесе қалпына келтірілген сынамада (8.2.12), қажет болғанда (егер $f_р$ = 1 болмаса).

9.1.1 Градуирлеу қисығы (8.1.4) көмегімен 8.2.11 анықталғандай оптикалық тығыздық арқылы микрограммдағы фенол көлемін анықтау.

9.2 Нәтижелерді есептеу және өрнектеу

Сынақ нәтижелерін дәлме-дәлдікпен бірінші ондық белгіге дейін өрнектейді.

10 Дәлдік

10.1 Зертхана аралық сынақтар

[4] және [5] сәйкес өткізілген қайталанушылық және қайталанғыштық шектерінің мәні зертхана аралық сынақтар нәтижесінде алынған. Ықтималдық деңгейі үшін 95 % дейін мәндер өрнектеледі және концентрация мен матрица диапазоны үшін қолданылмайды, берілген мәннен ерекшеленеді..

10.2 Қайталанушылық (ықтималдық)

Бір әдіспен ұқсас сыналатын материалдармен әртүрлі зертханада әртүрлі құрал қолданған әртүрлі зертханашымен, 1,5 мкг/мл.арту кезіндегі 5 % жағдайдан артық емес екі бөлек тәуелсіз нәтижелер арасындағы абсолюттік айырма.

10.3 Қайталанғыштық

Бір әдіспен ұқсас сыналатын материалдармен әртүрлі зертханада әртүрлі құрал қолданған әртүрлі зертханашымен, 3,9 мкг/мл.арту кезіндегі 5 % жағдайдан артық емес екі бөлек тәуелсіз нәтижелер арасындағы абсолюттік айырма.

11 Сынақ хаттамасы

Сынақ хаттамасында ең аз дегенде келесі ақпараттар болуы керек:

a) сынаманы толық идентификациялау үшін қажетті барлық ақпарат;

b) пайдаланылған сынаманы іріктеу әдісі;

c) осы стандартқа сілтемелерімен пайдаланылған сынақ әдісі;

d) сынақ нәтижелеріне әсер еткен осы стандартта көрсетілмеген барлық жұмыс егжей-тегжейлері немесе көмекші деп саналатын қақтығыстар;

e) егер ықтималдық тексерілген болса алынған соңғы келтірілген нәтиже алынған сынақ нәтижелері болып табылады

А қосымшасы
(ақпараттық)

Зертхана аралық сынақтар

2005 жылы алты сынамадағы тұтас сиыр сүті мен әртүрлі көлемдегі сиырдың шикі сүтіне әртүрлі жеті елдің тоғыз зертханасын қосатын зертхана аралық бірлескен сынақтар жасалды. Алынған нәтижелер ISO 5725-1[4] и ISO 5725-2[5] сәйкес А.1.кестесінде көрсетілгендей дәлдік деректер алу үшін статистикалық сараптамаға ұшырады.

Бұл тәжірибені Франция азық-түлік сапасын және қауіпсіздігін бақылау қызметі ұйымдастырды.

Кесте А.1 Фосфатаза сілтілігінің зертхана аралық сынақ нәтижелері

Параметр	Сынамалар						Орта [a]
	1	2	3	4	5	6	
Берілген мәндер[b], мкг/мл	2,3	4,2	6,5	9,9	11,9	35,7	
Жоюдан кейінгі қатысушылар саны	8	8	8	8	8	8	
Қайталану шегі, r (= 2,8s_r), мкг/мл	0,82	0,47	1,36	0,91	0,98	3,73	1,5
Қайталанудың орта квадратты ауытқуы s_r, мкг/мл	0,29	0,17	0,48	0,32	0,35	1,32	0,5
Қайталану вариациясының коэффиценті CV(r), %	12,78	3,94	7,47	3,24	2,92	3,69	4,3
Қайталанғыштық шегі, r (= 2,8 s_r), мкг/мл	1,59	1,51	2,52	2,62	3,22	9,70	3,9
Қайталанғыштың орта квадратты ауытқуы, s_r, мкг/мл	0,56	0,54	0,89	0,93	1,14	3,43	1,4
қайталанғыштық вариациясының коэффиценті, CV(r), %	24,83	12,70	13,80	9,36	9,54	9,59	11,0

[a] барлық түскен мәндерді шеттеткеннен кейінгі барлық зертханадағы ең орташа.
[b] Берілген мәннен 2,3 мкг/мл алынған қайталану және қайталанғыштық шектері және орта квадратты ауытқулар нәтижелердің алынуымен есептеледі .

Библиография

[1] ISO 648:2008 Laboratoryglassware – Single-volumepipettes (Зертханалық шыны ыдыс. Бір таңбалы тамызғыштар).

[2] ISO 707:2008 | IDF 50 Milk and milk products – Guidance on sampling (Сүт және сүт өнімдері. Сынамаларды іріктеу жөніндегі нұсқаулық).

[3] ISO 1042:1998Laboratory glassware – One-mark volumetric flasks ((Зертханалық шыны ыдыс. Бір таңбалы өлшейтін құтылар).

[4] ISO 5725-1:1994Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1.Generalprinciplesanddefinitions (Өлшеу нәтижелері мен әдістерінің дәлме-дәлдігі.(туралығы мен дәлдік) 1.Бөлім Жалпы қағидалар мен анықтамалар).

[5] ISO 5725-2:1994Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2.Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method () өлшеу әдістері мен нәтижелерінің дәлме дәлдігі (туралығы мен дәлдік 2 Бөлім. Қайталануды анықтаудың негізгі әдісі мен өлшеудің стандартты әдісінің қайталанғыштығы).

[6] ISO 11816-1:2006 | IDF 155-1 Milk and milk products – Determination of alkaline phosphatase activity – Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drinks (Сүт және сүт өнімдері. Фосфатаза сілтілік белсенділігін анықтау. 2 Бөлім. Сүт және сүт сусындарына арналған флуориметрикалық әдіс).

[7] ISO 22160:2007 | IDF 209 Milk and milkbased drinks – Determination of alkaline phosphatase activity – Enzymatic photo-activated system (EPAS) method (Сүт және сүт сусындары. Фосфатаза сілтісінің әсерін анықтау. Энзиматикалық және фото белсенділік жүйелерін қолдану әдісі).

ӘОЖ 637.054-637.04 **МСЖ 67.100.10**

Түйін сөздер:сүт, фосфатаза сілтілік белсенділігі , реактивтер, құрал жабдықтар,сына іріктемесі, сынақ жүргізу, нәтижелерді есептеу және өрнектеу, дәлме-дәлдік, сынақ хаттамасы

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

МОЛОКО

Определение фосфатазы щелочи

СТ РК ISO 3356-2013

(ISO3356:2009, IDT)

Издание официальное

**Комитет технического регулирования и метрологии
Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан
(Госстандарт)**

Астана

Предисловие

1 ПОДГОТОВЛЕН И ВНЕСЕН Республиканским государственным предприятием «Казахстанский институт стандартизации и сертификации» и Техническим комитетом по стандартизации 44 «Технолог»

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Председателя Комитета технического регулирования и метрологии Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан от 13 ноября 2013 года за № 526-од

3 Настоящий стандарт идентичен по отношению к международному стандарту ISO 3356:2009 Milk – determination of alkaline phosphatase (Молоко. Определение фосфатазы щелочи)

Международный стандарт ISO 3356:2009 Milk – determination of alkaline phosphatase подготовлен Техническим комитетом ISO/TC 34 «Пищевые продукты», подкомитетом SC 5 «Молоко и молочные продукты». Он публикуется совместно ISO и IDF.

Перевод с английского (en)

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 СРОК ПЕРВОЙ ПРОВЕРКИ 2019 год
ПЕРИОДИЧНОСТЬ ПРОВЕРКИ 5 лет

5 ВВЕДЕН ВПЕРЫЕ

Информация об изменениях к настоящему Стандарту публикуется в указателе «Нормативные документы по стандартизации», а текст изменений – в ежемесячных информационных указателях «Национальные стандарты». В случае пересмотра (отмены) или замены настоящего Стандарта соответствующая информация будет опубликована в информационном указателе «Национальные стандарты»

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Комитета технического регулирования и метрологии Министерства индустрии и новых технологий Республики Казахстан

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

МОЛОКО

Определение фосфатазы щелочи

Дата введения 2014-07-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения активности щелочной фосфатазы молока.

Метод применяется к активности щелочной фосфатазы не менее 1 мкг фенола на миллилитр.

Метод также применим для определения активности щелочной фосфатазы в порошковом молоке, пахте и в сухой пахте, сыворотке и сухой сыворотке.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Использование настоящего стандарта может включать в себя опасные материалы, операции и оборудование. Настоящий стандарт не имеет целью рассмотрение всех проблем, касающихся безопасности, связанных с его использованием. Установление требований по охране труда и технике безопасности, а также определение применимости нормативных ограничений является ответственностью пользователя.

2 Термины и определения

В настоящем Стандарте применяются следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 Активность щелочной фосфатазы Активность АЩФМ(активность щелочной фосфатазы в молоке) (alkalinephosphataseactivity AL Pactivity (alkalinephosphataseactivityinmilk))– количество фенола, высвобождаемого пробой, определяемое в соответствии с процедурой, устанавливаемой в настоящем стандарте.

ПРИМЕЧАНИЕ Активность щелочной фосфатазы выражается как количество фенола в микрограммах, высвобожденное 1 мл пробы или восстановленной пробы, при условиях, указанных в настоящем стандарте. Другие стандарты (например, [6], [7]) выражают активность щелочной фосфатазы в миллиединицах на литр. В литературе приведена информация по эквивалентности разных единиц, используемых для выражения активности щелочной фосфатазы.

3 Сущность метода

Пробу разбавить буферным раствором при pH 10,6 и выдерживать при температуре 37 °С в течение 1 часа. При таких условиях любая щелочная фосфатаза, присутствующая в пробе, высвобождает фенол добавляемого из фенилфосфата натрия. Высвобождаемый фенол вступает в реакцию с хинонимидом (дибромхинонхлоримидом), даваядибромоиндофенол (синего цвета), который определяется фотометрически при 610 нм.

4 Реактивы

Использовать только реактивы квалификации «чистый для анализа», если только не указано иное, и только дистиллированную воду или воду эквивалентной степени чистоты.

4.1 Буферный раствор гидроксида и бората бария

Растворить 25,0 г гидроксида бария [$Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$], не содержащего карбонат, в воде в мерной колбе с одной меткой на 500 мл (см. 5.8). Довести до метки водой и перемешать.

Растворить 11,0 грамм борной кислоты (H_3BO_3) в воде в другой мерной колбе с одной меткой на 500 мл (см. 5.8). Довести до метки водой и перемешать.

Нагреть оба раствора до 50 °С. Добавить один к другому и перемешать встряхиванием. Быстро охладить полученный раствор до температуры 20 °С. Довести pH раствора, при необходимости, до (10,6 ± 0,1) дополнительным количеством раствора гидроксида бария. Фильтровать раствор через фильтровальную бумагу (см. 5.10).

Хранить профильтрованный буферный раствор гидроксида и бората бария в плотно закрываемом пробкой контейнере. Перед использованием разбавить буферный раствор равным объемом воды.

4.2 Цветные буферные растворы

4.2.1 Цветной буферный раствор I

Растворить 6,0 г метабората натрия ($NaBO_2$) или 12,6 г $NaBO_2 \cdot 4H_2O$ и 20,0 грамм хлорида натрия (NaCl) в воде в мерной колбе с одной меткой на 1000 мл (см. 5.8). Довести до метки водой и перемешать.

4.2.2Цветной буферный раствор II

Перенести 10 мл буферного раствора I (см. 4.2.1) в мерную колбу с одной меткой на 100 мл (см. 5.8). Довести до метки водой и перемешать.

4.3 Раствор субстратного буфера

4.3.1Дигидратдвунатриевогофенилфосфата ($Na_2C_6H_5PO_4 \cdot 2H_2O$), содержащий массовую долю фенола не более 0,01 %.

4.3.2 Растворить 0,1 г дигидратадвунатриевогофенилфосфата (см. 4.3.1) в 100 мл разбавленного буферного раствора гидроксида и бората бария (см. 4.1).

4.4 Осаждающий раствор цинка-меди

Растворить 3,0 г сульфата цинка ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) и 0,6 г сульфата меди ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) в воде в мерной колбе с одной меткой на 100 мл (см. 5.8). Довести до метки водой и перемешать.

4.5 Раствор 2,6-дибромхинонхлоримида (далее – БХХИ), реактив Гиббса

Растворить(40 ± 1) мг БХХИ ($C_6H_2Br_2ClNO$) в 10 мл этанола с объемной концентрацией 96 %.

Хранить раствор в бутылке из темного стекла при (4 ± 2) °С. Отбраковать при обесцвечивании или по истечении 1 месяца.

4.6 Раствор сульфата меди

Растворить 0,05 г сульфата меди ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) в воде в мерной колбе с одной меткой на 100 мл (см. 5.8). Довести до метки 100 мл водой и перемешать.

4.7 Раствор гидроксида натрия, с(NaOH) = 0,5 моль/л.

4.8 Стандартные растворы фенола

4.8.1 Исходный стандартный раствор фенола

Перенести отвешенное количество (200 ± 2) мг безводного фенола чистотой не менее,чем 99,5% в мерную колбу с меткой на 100 мл (см. 5.8). Растворить фенол в воде. Довести до метки водой и перемешать.

Исходный стандартный раствор фенола остается устойчивым при(4 ± 2) °Св течение 6 недель.

4.8.2 Рабочие стандартные растворы фенола

Отобрать пипеткой 10 мл исходного стандартного раствора фенола (см. 4.8.1) в мерную колбу с одной меткой на 100 мл (см. 5.8). Довести до метки водой и перемешать (1 мл содержит 200 мкг фенола).

Использовать разбавленный стандартный раствор для приготовления соответствующих рабочих стандартных растворов фенола, содержащих 2; 5; 10 и 20 мкг фенола на миллилитр соответственно.

5 Аппаратура

Обычное лабораторное оборудование и, в частности, нижеследующее:

5.1 Аналитические весы, специального класса I.

5.2 Фотометр, подходящий для измерения при длине волны 610 нм,точность длины волны ± 1 нм.

5.3 Водяная баня, в которой может поддерживаться температура (37±1) °С при термостатическом контроле.

5.4Водяная баня, с температурой кипения (100 ± 1) °С.

5.5 Вихревая мешалка.

5.6 Пипетки, емкостью 0,1; 1; 5 и 10 мл, [1], класс А.

5.7 Стеклянные пробирки, соответствующих объемов, с пробками, изготовленными из безфенольных прокладок.

5.8 Мерные колбы с одной меткой, емкостями 100; 500 и 1000 мл, [3], класс А.

5.9 Стеклянные воронки, диаметрами 60 мм и 100 мм.

5.10 Фильтровальная бумага, быстрого фильтрования, диаметрами 110 мми 185 мм.

6 Отбор проб

Представительную пробу следует отправить в лабораторию. Во время транспортировки и хранения она не должна быть повреждена или изменена.

Отбор проб не является частью метода, указанного в настоящем стандарте. Рекомендованный метод отбора проб представлен в [2].

Пробу для испытаний хранить таким образом, чтобы предотвратить ухудшение и изменение состава пробы.

7 Подготовка испытуемой пробы

7.1 Перемешивание

Перед использованием испытуемую пробу осторожно перемешать. Обычно, для надлежащего перемешивания, нет необходимости в предварительном нагреве испытуемой пробы. Если требуется предварительное нагревание, температура не должна превышать 35 °С.

7.2 Порошковое молоко, сухая пахта и сухая сыворотка

Растворить 10 г испытуемой пробы в 90 мл воды при нагревании, если это необходимо. Тем не менее, температура, применяемая для полного растворения испытуемой пробы, не должна превышать 35°С.

7.3 Нейтрализация кислых испытуемых проб

Если испытуемая проба является кислой (pH < 7,0), довести до нейтрального pH раствором гидроксида натрия (см. 4.7)

8 Методика

8.1 Построение градуировочной кривой

8.1.1Приготовить диапазон стандартных растворов в пяти стеклянных пробирках (см. 5.7), отбирая пипеткой 1 мл воды на пробирку с контрольной или холостой пробой и 1 мл каждого из четырех рабочих стандартных растворов фенола (см. 4.8.2) в каждую из оставшихся четырех пробирок соответственно. Пробирки со стандартными пробами содержат 0(контрольная или холостая проба); 2; 5 и 20 мкг фенола соответственно.

8.1.2 Добавить в каждую пробирку (см. 8.1.1) 1 мл раствора сульфата меди (см. 4.6), 5 мл цветного буферного раствора II (см. 4.2.2), 3 мл воды и 0,1 мл раствора БХХИ (см. 4.5) и перемешать. Дать цвету проявиться (сформироваться) при комнатной температуре в течение 30 минут.

8.1.3 Определить оптическую плотность стандартных растворов относительно оптической плотности контрольного или холостого раствора при длине волны 610 нм.

8.1.4Построить график зависимости оптической плотности от количествафенола в микрограммах (см. 8.1.1). Определить уравнение градуировочной кривой.

8.2 Определение

8.2.1 Во время определения избегать воздействия прямого солнечного света. Загрязнение со следами слюны или пота может давать ложноположительные результаты и его следует избегать.

8.2.2 Пипеткой отобрать в каждую из двух пробирок (см. 5.7) 1 мл испытуемой пробы или восстановленной пробы. Использовать одну из пробирок в качестве контрольной или холостой пробы.

8.2.3Закрыть пробкой пробирку с холостой пробой. Поместить ее в химический стакан с кипящей водой. Накрыть химический стакан алюминиевой фольгой. Нагреть пробирку в кипящей воде в течение 2 минут, оставляя химический стакан накрытым

фольгой для гарантии нагрева всей пробирки. Затем пробирку охладить до комнатной температуры в холодной воде.

После этого аналогичным образом поступить с пробиркой с холостой пробой и пробиркой с испытуемой пробой.

8.2.4 Добавить 10 мл субстратного буферного раствора (см. 4.3) как в пробирку с испытуемой пробой (см. 8.2.2), так и в пробирку с холостой пробой (см. 8.2.2) и перемешать.

8.2.5 Нагретьсразу обе пробирки на водяной бане (см. 5.3) при 37 °С в течение 60 минут, время от времени перемешивая содержимое.

8.2.6 Поместить обе пробирки в химический стакан с кипящей водой. Накрыть химический стакан алюминиевой фольгой. Нагреть обе пробирки в кипящей воде в течение 2 минут и охладить их до комнатной температуры в холодной воде.

8.2.7 Добавить 1 мл осаждающего раствора цинка-меди (см. 4.4) в каждую пробирку и тщательно перемешать.

8.2.8 Профильтровать содержимое каждой пробирки через фильтровальную бумагу (см. 5.10), сливая первые несколько миллилитров. Пипеткой отобрать 5 мл каждого фильтрата в другую стеклянную пробирку (см. 5.7).

8.2.9 Добавить в каждую пробирку (см. 8.2.8) 5 мл цветного буферного раствора I (см. 4.2.1) и перемешать.

8.2.10 Добавить 0,1 мл раствора БХХИ (см. 4.5) в каждую пробирку и перемешать. Дать цвету обоих растворов проявиться при комнатной температуре в течение 30 минут.

8.2.11 Определить оптическую плотность раствора испытуемой пробыотносительно оптической плотности раствора холостой пробы при длине волны 610 нм.

8.2.12 Если оптическая плотность пробы для испытаний, измеренная в 8.2.11, превышает оптическую плотность рабочего стандартного раствора фенола, содержащего 20 мкг фенола на миллилитр, в соответствии с измеренным в 8.1.3, то повторить определение с соответствующим разбавлением испытуемой пробы или восстановленной пробы нижеследующим образом.

Перемешатьодин объем испытуемой пробы или восстановленной пробы с соответствующим объемом той же самой испытуемой пробы или восстановленной пробы, которую осторожно нагревают до кипения для того, чтобы инактивировать фосфатазу. Продолжитьпо 8.2.2.

9 Расчет и выражение результатов

9.1 Расчет

9.1.1По оптической плотности, определенной в 8.2.11 определить количество фенола в микрограммах,используя градуировочную кривую (8.1.4).

9.1.2 Рассчитать активность фосфатазы $\alpha_ф$, выраженную в микрограммах фенола на миллилитр молока, используя формулу 1:

$$\alpha_ф = 2{,}4 \times m \times f_р, \quad (1)$$

гдеm – масса, в микрограммах, фенола, полученная в 9.1.1;

$f_р$ – коэффициент разбавления для испытуемой пробы или восстановленной пробы (8.2.12), при необходимости (если $f_р$ не = 1).

9.2 Выражение результатов испытаний

Результаты испытаний выражают с точностью до первого десятичного знака.

10 Точность

10.1 Межлабораторное испытание

Значения пределов повторяемости и воспроизводимости были получены из результатов межлабораторных испытаний, проводимых в соответствии с [4]и [5]. Значения выражаются для уровня вероятности 95 % и не могут быть применимы для диапазонов концентрации и матриц, отличающихся от заданных.

10.2 Повторяемость (Сходимость)

Абсолютная разность между двумя отдельными результатами испытаний, полученная одним и тем же методом на идентичном испытуемом материале в одной и той же лаборатории одним и тем же лаборантом с помощью одного и того же оборудования в пределах короткого интервала времени может не более, чем в 5 % случаев, превышать 1,5 мкг/мл.

10.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между двумя отдельными независимыми результатами, полученная одним и тем же методом на идентичном испытуемом материале в разных лабораториях разными лаборантами с использованием разного оборудования, может не более, чем в 5 % случаев, превышать 3,9 мкг/мл.

11 Протокол испытаний

В протоколе испытаний должна содержаться, как минимум, следующая информация:

a) вся информация, необходимая для полной идентификации пробы;

b) использованный метод отбора проб;

c) использованный метод испытаний, со ссылкой на настоящий стандарт;

d) все рабочие детали, не указанные в настоящем стандарте, или считающиеся вспомогательными, вместе с деталями каких-либо инцидентов, которые могли повлиять на результат (-ы) испытаний;

e) полученный результат (-ы) испытаний и, если была проверена сходимость, полученный конечный приведенный результат.

Приложение А
(информационное)

Межлабораторное испытание

Межлабораторное совместное испытание, включающее девять лабораторий из семи разных стран, проводилось на шести пробах цельного коровьего молока с разными количествами коровьего сырого молока, май 2005 г. Полученные результаты были подвергнуты статистическому анализу в соответствии с ISO 5725-1[4] и ISO 5725-2[5] для получения данных по прецизионности, представленных в Таблице А.1.

Служба Франции по контролю за качеством продуктов питания и продовольственной безопасности организовала этот опыт.

Таблица А.1 – Результаты межлабораторного испытания по щелочной фосфатазе

Параметр	Пробы						Среднее[a)]
	1	2	3	4	5	6	
Заданное значение[b)], мкг/мл	2,3	4,2	6,5	9,9	11,9	35,7	
Число участников после устранения	8	8	8	8	8	8	
Предел повторяемости, r (= $2,8s_r$), мкг/мл	0,82	0,47	1,36	0,91	0,98	3,73	1,5
Среднеквадратическое отклонение повторяемости, s_r, мкг/мл	0,29	0,17	0,48	0,32	0,35	1,32	0,5
Коэффициентвариации повторяемости, CV(r), %	12,78	3,94	7,47	3,24	2,92	3,69	4,3
Предел воспроизводимости, r (= 2,8 s_r), мкг/мл	1,59	1,51	2,52	2,62	3,22	9,70	3,9
Среднеквадратическое отклонение воспроизводимости, s_r, мкг/мл	0,56	0,54	0,89	0,93	1,14	3,43	1,4
Коэффициент вариации воспроизводимости, CV(r), %	24,83	12,70	13,80	9,36	9,54	9,59	11,0

[a)] Среднее всех лабораторий после устранения всех выпадающих значений.

[b)] Пределы повторяемости и воспроизводимости и среднеквадратические отклонения рассчитывались с исключением результатов, полученных при заданном значении 2,3 мкг/мл.

Библиография

[1] ISO 648:2008 Laboratoryglassware – Single-volumepipettes (Посудалабораторнаястеклянная. Пипеткисоднометкой).

[2] ISO 707:2008 | IDF 50 Milk and milk products – Guidance on sampling (Молокоимолочныепродукты. Руководствопоотборупроб).

[3] ISO 1042:1998Laboratory glassware – One-mark volumetric flasks (Посудалабораторнаястеклянная. Мерныеколбысоднометкой).

[4] ISO 5725-1:1994Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 1.Generalprinciplesanddefinitions (Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общиепринципыиопределения).

[5] ISO 5725-2:1994Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2.Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method (Точность (правильностьипрецизионность) методовирезультатовизмерений.Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения).

[6] ISO 11816-1:2006 | IDF 155-1 Milk and milk products – Determination of alkaline phosphatase activity – Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drinks (Молокоимолочныепродукты. Определение активности щелочной фосфатазы. Часть 1. Флуориметрический метод для молока и молочных напитков).

[7] ISO 22160:2007 | IDF 209 Milk and milkbased drinks – Determination of alkaline phosphatase activity – Enzymatic photo-activated system (EPAS) method (Молокоимолочныенапитки. Определение действия щелочной фосфатазы. Метод с применением энзиматическихфотоактивированных систем).

УДК 637.054-637.04 **МКС 67.100.10**

Ключевыеслова:молоко, активность щелочной фосфатазы, реактивы, оборудование, отбор проб, проведение испытаний, расчет и выражение результатов, точность, протокол испытаний.

Басуға _____ ж. қол қойылды Пішімі 60х84 1/16
Қағазы офсеттік. Қаріп түрі «KZ Times New Roman»,
«Times New Roman»
Шартты баспа табағы 1,86. Таралымы ____ дана. Тапсырыс ____

«Қазақстан стандарттау және сертификаттау институты»
республикалық мемлекеттік кәсіпорны
010000, Астана қаласы, Орынбор көшесі, 11 үй,
«Эталон орталығы» ғимараты
Тел.: 8 (7172) 79 33 24

gost.e-ecolog.ru