ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

СТБ ISO 11816-1-2009

Молоко и молочные продукты

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ

Часть 1

Флуориметрический метод для молока и молочных напитков

Малако і малочныя прадукты

ВЫЗНАЧЭННЕ АКТЫЎНАСЦІ ШЧОЛАЧНАЙ ФАСФАТАЗЫ

Частка 1

Флуарыметрычны метад для малака і малочных напіткаў

(ISO 11816-1:2006, IDT)

Издание официальное

БЗ 12-2009



Госстандарт
Минск

gost.e-ecolog.ru

УДК 637.1.07:543.635.4(083.74)(476) МКС 67.100.10 КП 01 IDT

Ключевые слова: молоко, молочные продукты, щелочная фосфатаза, напиток молочный

Предисловие

Цели, основные принципы, положения по государственному регулированию и управлению в области технического нормирования и стандартизации установлены Законом Республики Беларусь «О техническом нормировании и стандартизации».

1 ПОДГОТОВЛЕН научно-производственным республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)

ВНЕСЕН Госстандартом Республики Беларусь

2 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 8 декабря 2009 г. № 67

3 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 11816-1:2006 Milk and milk products – Determination of alkaline phosphatase activity – Part 1: Fluorimetric method for milk and milk-based drinks (Молоко и молочные продукты. Определение активности щелочной фосфатазы. Часть 1. Флуориметрический метод для молока и молочных напитков).

Международный стандарт разработан подкомитетом SC 5 «Молоко и молочные продукты» технического комитета по стандартизации ISO/TC 34 «Пищевые продукты» Международной федерации молочных продуктов (IDF).

Перевод с английского языка (en).

Официальный экземпляр международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий государственный стандарт, имеется в Национальном фонде ТНПА.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

© Госстандарт, 2010

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Издан на русском языке

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Молоко и молочные продукты
ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ
Часть 1
Флуориметрический метод для молока и молочных напитков

Малако і малочныя прадукты
ВЫЗНАЧЭННЕ АКТЫЎНАСЦІ ШЧОЛАЧНАЙ ФАСФАТАЗЫ
Частка 1
Флуарыметрычны метад для малака і малочных напіткаў

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

Дата введения 2010-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает флуориметрический метод для определения активности щелочной фосфатазы (ALP, EC 3.1.3.1) в пастеризованном цельном молоке, полужирном и обезжиренном. Метод применим для молока коров, овец, коз и для молочных напитков.

Метод также пригоден для определения высокой активности щелочной фосфатазы в сыром и термообработанном молоке с активностью более 2 000 мЕ/л после определенного разбавления образца.

2 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют следующие термины с соответствующими определениями:

2.1 активность щелочной фосфатазы; ALP-активность (alkaline phosphatase activity; ALP activity): Активность щелочной фосфатазы, присутствующей в продукте, определенная методом, установленным в настоящем стандарте.

Примечание – Активность щелочной фосфатазы выражена в миллиединицах активности фермента на литр (мЕ/л).

2.2 единица активности щелочной фосфатазы (unit of alkaline phosphatase activity): Объем фермента щелочной фосфатазы, который катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в минуту.

3 Сущность метода

Активность щелочной фосфатазы образца измеряется путем непрерывного флуориметрического прямого кинетического анализа. В субстрате нефлуоресцентного ароматического монофосфорного эфира 2′-[2-бензотиазолил]-6′-гидроксибензотиазол фосфата в присутствии любой щелочной фосфатазы, выделенной из этого образца, происходит гидролиз его фосфатного радикала, производя продукт с интенсивной флуоресценцией. Флуориметрическое измерение активности щелочной фосфатазы (ALP) проводят при 38 °С в течение трех минут, используя субстрат. Сюда включена преинкубация субстрата и образца с последующим многократным кинетическим считыванием скорости реакции.

Примечание – Хотя испытание длится 3 мин, первая минута является равновесным периодом для обеспечения температуры образца при 38 °С. Измерения активности фактически начинаются со второй минуты и продолжаются до конца третьей минуты (т. е. за 2-минутный период).

Издание официальное

4 Реактивы

Используются только реактивы признанной аналитической чистоты, если нет других указаний, и дистиллированная или деминерализованная вода или вода аналогичной чистоты.

4.1 Субстрат флуорофоса® [1)] в пробирках, каждая из которых содержит 144 мг порошка флуорофоса®.

Это субстрат нефлуоресцентного ароматического монофосфорного эфира 2′-[2-бензотиазолил]-6′гидроксибензотиазол фосфата (флуорофос®). Субстрат флуорофоса® остается стабильным в течение двух лет, если его хранить в закрытых пробирках при температуре от 2 °С до °8 С.

4.2 Буферный раствор субстрата, буферный раствор диэтаноламина (DEA), c(DEA) = 2,4 моль/л, с pH 10,0 в пробирках вместимостью 240 мл каждая.

Буферный раствор субстрата остается стабильным в течение 2 лет, если его хранить в закрытых пробирках при температуре от 2 °С до 8 °С.

4.3 Рабочий субстрат

Выдерживают субстрат флуорофоса® (4.1) и буферный раствор субстрата (4.2) до достижения комнатной температуры. Добавляют содержимое одной пробирки с буферным раствором субстрата (240 мл) (4.2) к содержимому одной пробирки с флуорофосом® (144 мг) (4.1) и хорошо перемешивают, переворачивая, в течение 3 мин. Используют желтое стекло для защиты от света.

Перед использованием полученный раствор выдерживают при комнатной температуре как минимум 30 мин.

Используют аналого-цифровой тест, описанный в 8.4.1.1, для проверки устойчивости готового к использованию рабочего субстрата.

Рабочий субстрат остается стабильным в течение 60 дн, если он защищен от света и хранится при температуре от 2 °С до 8 °С, или в течение 8 ч, если хранится при 38 °С. Не следует использовать рабочий субстрат, если получено показание выше 1 200 (см. 8.4.1.1.5).

Примечание – Полученный объем рабочего субстрата (240 мл) является достаточным приблизительно для 115 тестов.

4.4 Рабочие калибровочные растворы, флуорожелтый®(FY) 2′-[2-бензотиазолил]-6′гидроксибензотиазол] в буферном растворе DEA (4.2).

Рабочие калибровочные растворы остаются стабильными в течение 18 мес, когда их хранят при температуре от 2 °С до 8 °С.

4.4.1 Калибровочный раствор А, содержащий 0 мкмоль/л флуорожелтого®.

4.4.2 Калибровочный раствор В, содержащий $17{,}24 \cdot 10^{-3}$ мкмоль/л флуорожелтого®.

4.4.3 Калибровочный раствор С, содержащий $34{,}48 \cdot 10^{-3}$ мкмоль/л флуорожелтого®.

4.5 Раствор для ежедневного контроля прибора, содержащий $34{,}48 \cdot 10^{-3}$ мкмоль/л флуорожелтого®.

5 Аппаратура

Обычное лабораторное оборудование и в частности следующее.

5.1 Фильтровальный флуориметр с термостатически регулируемым держателем кюветы при поддержании рабочей температуры от (38 ± 1) °С и прямоугольной оптической системой, допускающей возбуждение при длине волны 440 нм и испускание при 520 – 560 нм [например, прибор Флуорофос® [1)]]. Измерения должны быть оптимизированы согласно инструкциям изготовителей.

5.2 Кюветы сменные из нефлуоресцентного стекла диаметром 12 мм и длиной 75 мм.

[1)] Реактивы, установленные в 4.1 – 4.5, и аппаратура, установленная в 5.1 – 5.4 (кроме 5.3.3), доступны для приобретения как «Флуорофосная испытательная система» у фирмы Advanced Instruments, Inc., Two Technology Way, Norwood, Massachusetts 02062, USA. Изготовитель может изменять конфигурации упаковок, поставляемых с Флуорофосной испытательной системой. Пользователь должен обращаться к инструкциям изготовителя для приготовления реагентов, если они отличаются от реагентов, установленных здесь. Флуорофос и флуорожелтый являются зарегистрированными торговыми марками фирмы Advanced Instruments, Inc. и примерами подходящих продуктов, имеющихся на промышленном рынке.

Эта информация дается для удобства пользователей данного документа и не является рекламой ISO или IDF этих продуктов.

5.3 Пипетки

5.3.1 Дозатор фиксированного объема, дозирующий по 2,0 мл.

5.3.2 Пипетка вытеснительного типа или нагнетательная вместимостью 0,075 мл.

5.3.3 Пипетка вместимостью 2 мл.

5.4 Инкубаторный блок, поддерживающий температуру (38 ± 1) °С, подходящий для помещения в них кювет.

5.5 Парафильм [2] или другая подходящая пленка лабораторного класса.

5.6 Вихревая мешалка

5.7 Водяная баня, поддерживающая температуру (63 ± 1) °С и (95 ± 1) °С.

5.8 Мерные колбы с одной меткой вместимостью 100 мл.

6 Отбор проб

В лабораторию должна быть отправлена представительная проба. Ее следует оберегать от повреждений или изменений во время транспортирования или хранения.

Отбор проб не является частью метода, установленного в настоящем стандарте. Рекомендованный метод отбора проб приведен в ISO 707.

7 Приготовление

7.1 Молоко, не содержащее щелочной фосфатазы

Приготовляют молоко без фосфатазы того типа, который будет испытываться, тщательно дозируя требуемую порцию молока в пробирку или подходящий контейнер, следя, чтобы молоко не касалось краев или стенок контейнера.

Помещают пробирку или контейнер с образцом молока в водяную баню (5.7), установленную на 95 °С. Предварительно нагревают образец молока до 95 °С и затем продолжают его подогрев в течение 5 мин при этой температуре. Температуру контролируют термометром или термисторным зондом, помещенным в центр пробирки или контейнера. 5-минутный период подогрева начинают сразу же, как только образец молока достигнет 95 °С. Все быстро охлаждают после периода нагрева.

Таким образом обработанный образец молока тестируют, чтобы удостовериться, что ALP-активность меньше 10 мЕ/л.

7.2 Приготовление образца для испытаний

7.2.1 Общие вопросы

Перед использованием все испытуемые образцы тщательно перемешивают.

Примечание – В предварительном нагреве испытуемых образцов обычно нет необходимости.

7.2.2 Пастеризованные испытуемые образцы

Пастеризованные испытуемые образцы используют после поставки в требуемых количествах.

7.2.3 Разбавление испытуемых образцов с высокими значениями ALP

Приготовляют разбавленные образцы молока, используя молоко без фосфатазы (7.1), для того чтобы их уровни активности щелочной фосфатазы (ALP) соответствовали аналитическому диапазону испытания (< 2 000 мЕ/л). Разбавленные растворы хорошо перемешивают.

8 Методика определения

8.1 Верификация рабочих характеристик прибора

Важно, чтобы до проведения испытания образцов была проведена проверка рабочих характеристик прибора на отклонение, рассеянное световое излучение и стабильность. При работе с фильтровальным флуориметром (5.1) рекомендуется следовать стандартам надлежащей лабораторной практики.

---

[2] Парафильм является примером подходящего продукта, выпускаемого в промышленности. Эта информация дается для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO или IDF этого продукта.

Контрольные тесты качества включают:

a) ежедневный тест A/D (аналого-цифровое преобразование), выполняемый для проверки правильности функционирования оборудования путем измерения точности канала преобразования A/D и мониторинга канала A/D на отклонение по времени или температуре, и

b) ежедневный контрольный тест прибора с использованием ежедневного контрольного раствора в приборе (4.5) для мониторинга любого электронного или оптического отклонения флуориметра.

Использование внешних положительных, отрицательных и нормальных контрольных проверок, описанных в 8.4, рекомендуется для ежедневного мониторинга параметров точности прибора.

8.2 Калибровка

Калибровочные кривые обычно стабильны. Однако следует повторно калибровать прибор, который уже был калиброван, когда флуориметр устанавливается впервые, если процедуры обслуживания могут влиять на сохраненную калибровку, если проверенные контрольные значения показывают неприемлемые результаты, или каждые 3 мес.

Если есть изменения в калибровочной кривой, прибор следует калибровать повторно, используя новый набор калибровочных растворов A, B и C (4.4.1, 4.4.2 и 4.4.3). Калибровочную кривую устанавливают для каждого типа продукта, который будет испытываться.

Перед использованием калибровочные растворы A, B и C перемешивают, плавно переворачивая. С помощью пипетки (5.3.3) переносят по 2,0 мл калибровочных растворов A, B и C (4.4.1, 4.4.2 и 4.4.3), каждого в двух экземплярах, в шесть предварительно маркированных кювет (5.2). Помещают кюветы в инкубаторный блок (5.4), установленный на 38 °C, и предварительно нагревают в течение 10 мин.

С помощью нагнетательной или вытеснительной пипетки (5.3.2) добавляют 0,075 мл молока, не содержащего щелочной фосфатазы (7.1), в шесть кювет. Закрывают кюветы парафильмом (5.5). Перемешивают их содержимое с помощью вихревой мешалки (5.6) в течение 5 с или путем мягкого переворачивания кювет. Возвращают кюветы в инкубаторный блок (5.4). Выполняют калибровку в течение 10 мин после добавления испытуемого образца в калибровочный раствор.

Начиная с калибровочного раствора A, выполняют следующие установившиеся процедуры калибровки. Перед помещением кювет в фильтровальный флуориметр (5.1) каждую кювету протирают снаружи мягкой тканью. При использовании прибора «Флуорофос®» нажимают CALIB и выбирают меню ALP Dairy (щелочная фосфатаза в молочных продуктах). Прокручивают меню и нажимают ENTER, когда отображается продукт, который должен калиброваться. Начиная с калибровочного раствора A (4.4.1), помещают этот раствор во флуориметр и нажимают START. Когда измерение закончено, измеряют второй калибровочный раствор A.

Такую же процедуру выполняют для калибровочных растворов B (4.4.2) и C (4.4.3), пока все процедуры не будут закончены. Прибор «Флуорофос®» автоматически вычисляет величину флуоресценции, полученную путем измерения калибровочных растворов B и C в сравнении с калибровочным раствором A, чтобы установить калибровочный коэффициент прибора.

Когда калибровка выполнена, приступают к анализу испытуемых образцов.

8.3 Определение

С помощью дозатора фиксированного объема (5.3.1) переносят 2,0 мл рабочего субстрата (4.3) в маркированную кювету. Помещают кювету в инкубаторный блок (5.4), установленный на 38 °C, и нагревают в течение 15 мин.

С помощью пипетки (5.3.2) добавляют 0,075 мл хорошо перемешанного испытуемого образца (7.2.2 или 7.2.3) к субстрату. Накрывают кювету парафильмом (5.5). Сразу же перемешивают ее содержимое в вихревой мешалке (5.6) в течение 5 с или плавно переворачивая кювету. Вытирают кювету снаружи мягкой тканью и помещают ее в фильтровальный флуориметр (5.1).

Нажимают клавишу TEST, появляется ALP Dairy, затем нажимают ENTER. Прокручивают меню и нажимают ENTER, когда отображается продукт, который должен анализироваться. Затем нажимают клавишу START, чтобы начать испытание. На дисплее будет идти обратный отсчет 60 с, пока субстрат и образец нагреваются до 38 °C. Через 60 с флуориметр начинает измерение, показывая флуоресценцию образца в единицах флуоресценции (FLU). Отображение начинается с 200 FLU и медленно возрастает в течение следующих 2 мин. В конце 3-минутного периода прибор «Флуорофос®» автоматически выполняет необходимые вычисления и отображает идентификационный номер образца, активность ALP в миллиединицах на литр и среднее увеличение флуоресценции, если это было предварительно задано. Затем эта информация будет напечатана.

Делят разность между двумя показаниями флуоресценции на время интервала (записанное в минутах), чтобы получить среднее увеличение флуоресценции в минуту (F/мин). Используют значение F/мин, чтобы вычислить активность ALP для испытуемого образца.

Прибор может отобразить на дисплее и распечатать сообщение: «Error: Unstable Reading, Repeat Test» (Ошибка. Нестабильное показание. Повторить испытание). В случае очень высоких результатов нужно разбавить испытуемый образец термообработанным молоком, не содержащим фосфатазы (7.1), и провести другое определение.

Для очень низких результатов (обычно ниже 6 FLU/мин), когда нестабильные показания получаются чаще, оставляют кювету с образцом в приборе «Флуорофос®» и проводят другое определение. Тогда обычно получается действительный результат. Однако, если снова возникает ошибка из-за нестабильных показаний, повторяют все определение с новым испытуемым образцом.

8.4 Контрольные тесты

8.4.1 Контрольные проверки системы и реактивов

8.4.1.1 Тест A/D

8.4.1.1.1 При использовании прибора «Флуорофос®» проводят тест A/D ежедневно перед испытаниями.

8.4.1.1.2 Отмеряют 2,0 мл ежедневного контрольного раствора для прибора (4.5) в маркированную кювету. Помещают кювету в инкубаторный блок (5.4), установленный на 38 °C, на 10 мин.

8.4.1.1.3 Получают доступ к тесту A/D через меню SETUP. Нажимают клавишу SETUP, затем выбирают пункт меню A/D Test, нажимая < or >. При пустом держателе кюветы нажимают START. Ждут, когда цифры, появляющиеся на экране дисплея, стабилизируются.

Показание дисплея должно быть 302 ± 4. Если показание вне этого диапазона, очищают фильтры возбуждения и испускания и повторяют тест A/D.

8.4.1.1.4 Вставляют предварительно нагретую кювету (8.4.1.1.2) в держатель кюветы. Закрывают крышкой. Когда показание дисплея стабильно, записывают отображаемое значение, которое должно быть 602 ± 12. Если значение вне этого диапазона, используют маленькую отвертку из поставки и медленно поворачивают винт потенциометра с левой стороны прибора по часовой стрелке или против, как необходимо, пока показание дисплея не будет 602.

8.4.1.1.5 Тест A/D можно также использовать для проверки пригодности готового к использованию рабочего субстрата (4.3). Только что приготовленный субстрат в режиме A/D обычно дает показание около 650 FLU, которое увеличивается со временем.

Не следует использовать рабочий субстрат, когда на дисплее получено показание выше 1 200 FLU.

8.4.1.2 Позитивный, негативный и PhosphaCheck-N™ (контроль фосфатазы) механизмы контроля [3)]

После калибровки канала, используемого для коровьего молока, анализируют три контрольных раствора (т. е. позитивный, негативный и PhosphaCheck-N™) путем добавления 75 мкл каждого контрольного раствора к 2 мл предварительно нагретого субстрата. Выполняют тест ALP.

Показание для негативного контроля должно быть < 10, а для PhosphaCheck-N™ – < 40.

8.4.2 Испытуемый образец и механизмы контроля, связанные с прибором

8.4.2.1 Тест негативного контроля

Включают тест негативного контроля с каждой партией испытуемых образцов. Нагревают испытуемый образец, как описано в 7.1. Показание прибора должно быть меньше 10 мЕ/л, т. е. флуоресцентная активность не детектируется. Если значение превышает 10 мЕ/л, повторяют действие 8.4.1.2.

8.4.2.2 Тест позитивного контроля [3)]

Включают один или больше механизмов позитивного контроля с каждой партией испытуемых образцов. Приготовляют образцы аналогичного или почти аналогичного состава, используя образцы сырого молока, разбавленные молоком без фосфатазы (7.1).

[3)] Инструкции для проверки установленных механизмов контроля и рабочих характеристик прибора доступны для приобретения у фирмы Advanced Instruments Inc., Two Technology Way, Norwood, MA 02062, USA.

Эта информация дается для удобства пользователей настоящего стандарта и не является рекламой ISO или IDF этих продуктов.

8.4.3 Тест на интерферирующие вещества

Если значения ALP получены выше ожидаемых, добавляют в кювету с помощью пипетки (5.3.2) 0,075 мл испытуемого образца (7.2.2 или 7.2.3) и 2,0 мл калибровочного раствора А (4.4.1), который предварительно нагревали в инкубаторном блоке (5.4), установленном на 38 °С, в течение 10 мин, и перемешивают.

Помещают кювету с этой смесью в прибор «Флуорофос®» (5.1) и испытывают, как в 8.2. Если полученное значение превышает 20 мЕ/л, значит, присутствует интерферирующее вещество. В этом случае повторяют испытание со свежим образцом.

8.4.4 Контрольный тест на теплостойкую щелочную фосфатазу

Добавляют другой испытуемый образец (7.2.2 или 7.2.3) в пробирку. Вставляют термометр или термисторный зонд в пробирку и все помещают на водяную баню (5.7), установленную на 63 °С. Когда испытуемый образец достигает 63 °С, его выдерживают при этой температуре 30 мин, затем быстро охлаждают. Определяют остаточную активность фосфатазы согласно 8.3. Любая остаточная активность обусловлена присутствием теплостойкой микробной щелочной фосфатазы.

9 Вычисление и выражение результатов

9.1 Калибровочный коэффициент

Результаты вычисляют автоматически прибором «Флуорофос®» посредством алгоритма, встроенного в фильтровальный флуориметр (5.1). Если результаты будут вычисляться вручную, действуют следующим образом.

Записывают значения флуоресценции калибровочного раствора В (4.4.2) и калибровочного раствора С (4.4.3), сравнивают с калибровочным раствором А (4.4.1), установленным на нулевую флуоресценцию на фильтровальном флуориметре (5.1).

Вычисляют калибровочный коэффициент K, используя уравнение (1):

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

где K – числовое значение калибровочного коэффициента установленной калибровочной кривой;

F_C – числовое значение флуоресценции, полученное путем измерения калибровочного раствора С (4.4.3) в сравнении с калибровочным раствором А (4.4.1), установленным на нулевую флуоресценцию (см. 8.2);

F_B – числовое значение флуоресценции, полученное путем измерения калибровочного раствора В (4.4.2) в сравнении с калибровочным раствором А (4.4.1), установленным на нулевую флуоресценцию (см. 8.2).

9.2 Вычисление

Вычисляют активность щелочной фосфатазы A_p, используя уравнение (2):

$$A_p = \frac{F_{av} \times c_B}{K \times V} \times f, \quad (2)$$

где A_p – числовое значение активности щелочной фосфатазы испытуемого образца (7.2.2 или 7.2.3), мЕ/л;

F_{av} – числовое значение средней величины флуоресценции, производимой в минуту (8.3), измеренное в сравнении с калибровочным раствором А (см. 8.2) от начала второй минуты до конца третьей;

c_B – концентрация флуорожелтого® в калибровочном растворе В (4.4.2) на 2 мл калибровочного раствора, мкмоль;

f – коэффициент разбавления 1×10^6 для пастеризованных образцов (7.2.2); для испытуемых образцов сырого молока (7.2.3) f равно 1×10^8; для испытуемых образцов термообработанного молока (7.2.3) умножают $f = 1 \times 10^6$ на коэффициент разбавления f_t испытуемого образца $f = f_t \times 10^6$;

V – числовое значение объема испытуемого образца, мл.

9.3 Выражение результатов испытания

Результаты испытания выражают с точностью до ближайшего целого знака миллиединицы.

10 Прецизионность

10.1 Межлабораторное испытание

Детали межлабораторного испытания приведены в приложении А. Значения, полученные из этого испытания, можно применять для других диапазонов и матриц.

10.2 Повторяемость

Абсолютная разность между двумя независимыми результатами единичных испытаний, полученными одним и тем же методом на идентичном испытываемом материале в одной и той же лаборатории одним и тем же оператором, использующим одно и то же оборудование, в течение короткого интервала времени, должна не более чем в 5 % случаев превышать значения для *r*, приведенные в таблице 1.

Таблица 1 – Значения предела повторяемости *r*

Продукт	Уровень активности щелочной фосфатазы, мЕ/л				
	20	40	100	350	500
Коровье молоко	–	21,50	22,10	89,60	93,30
Овечье молоко	10,43	16,26	33,67	96,82	99,76
Козье молоко	8,63	7,98	26,20	42,83	28,56

10.3 Воспроизводимость

Абсолютная разность между двумя результатами единичных испытаний, полученными одним и тем же методом на идентичном испытываемом материале в разных лабораториях разными операторами, использующими разное оборудование, должна не более чем в 5 % случаев превышать значения для *R*, приведенные в таблице 2.

Таблица 2 – Значения предела воспроизводимости *R*

Продукт	Уровень активности щелочной фосфатазы, мЕ/л				
	20	40	100	350	500
Коровье молоко	–	31,80	51,00	136,40	211,10
Овечье молоко	16,63	20,34	46,63	170,24	233,10
Козье молоко	10,69	20,55	28,71	127,89	87,51

11 Протокол испытания

Протокол испытания должен включать:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации образца;

b) метод отбора проб и приготовления образцов, если известно;

c) используемый метод испытания и ссылку на настоящий стандарт;

d) все рабочие детали, не установленные в настоящем стандарте или рассматриваемые как факультативные, а также детали всех инцидентов, которые могли повлиять на результат (ы) испытания (й);

e) полученный результат (ы) или, если проверялась повторяемость, окончательно указанный полученный результат.

Приложение А
(справочное)

Межлабораторное испытание

Межлабораторное испытание, включающее 13 лабораторий из семи стран (США, Великобритания, Франция, Норвегия, Италия, Нидерланды и Швейцария), проводилось согласно ISO 5725-1 и ISO 5725-2 на четырех типах коровьего молока, а также на овечьем и козьем молоке. Испытание было закончено в марте 2004 г.

Полученные результаты были подвергнуты статистическому анализу согласно ISO 5725-1 и ISO 5725-2, из которого получены данные прецизионности, приведенные в таблицах А.1 и А.2. Данные выражены как значения относительного стандартного отклонения в процентах и представляют сводные статистические результаты межлабораторного исследования. Общий отчет об исследовании опубликован в [5].

Таблица А.1 – Относительное стандартное отклонение повторяемости

В процентах

Продукт		Уровень активности щелочной фосфатазы, мЕ/л				
		20	40	100	350	500
Коровье молоко	Цельное	16,20	22,51	6,79	4,60	8,37
	Полужирное	13,15	13,19	7,53	12,72	2,97
	Обезжиренное	–	13,08	7,94	5,32	5,84
	Ароматизированное [a)]	–	12,86	5,12	4,68	3,33
	Коровье молоко (все)	–	18,66	7,69	8,89	6,48
Овечье молоко		11,68	12,04	10,68	7,86	5,69
Козье молоко		13,81	5,94	7,29	3,65	1,74

[a)] Для испытания ароматизированного молока использовали клубничное молоко.

Таблица А.2 – Относительное стандартное отклонение воспроизводимости

В процентах

Продукт		Уровень активности щелочной фосфатазы, мЕ/л				
		20	40	100	350	500
Коровье молоко	Цельное	16,20	25,44	15,96	6,60	17,29
	Полужирное	24,30	17,19	16,45	16,86	9,79
	Обезжиренное	–	27,21	19,01	9,81	12,37
	Ароматизированное [a)]	–	22,13	11,26	10,47	9,50
	Коровье молоко (все)	–	27,60	17,69	13,53	14,66
Овечье молоко		18,62	15,07	14,79	13,82	13,30
Козье молоко		17,11	15,31	7,98	10,91	5,33

[a)] Для испытания ароматизированного молока использовали клубничное молоко.

Примечание – В некоторых случаях было недостаточно данных для коровьего молока, чтобы вычислить значения *r* и *R* при уровне активности 20 мЕ/л. Причина в том, что прибор «Флуорофос®» записывает значение < 10 мЕ/л для очень низких значений ALP и нет принятого статистического механизма для обработки такого результата. Это означает, что все результаты, правильно записанные как < 10 мЕ/л, пришлось исключить из статистических вычислений.

Библиография

[1] ISO 707/IDF 50:2008 Milk and milk products – Guidance on sampling
(Молоко и молочные продукты. Руководящие указания по отбору проб)

[2] ISO 5725-1:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1. General principles and definitions
(Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Общие принципы и определения)

[3] ISO 5725-2:1994 Accuracy (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 (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод для определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерения)

[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

Ответственный за выпуск *В. Л. Гуревич*

Сдано в набор 16.04.2010. Подписано в печать 29.04.2010. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 1,39 Уч.- изд. л. 0,70 Тираж экз. Заказ

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
ЛИ № 02330/0549409 от 08.04.2009.
ул. Мележа, 3, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru