

МЕЖДУНАРОДНЫЙ СТАНДАРТ

**ISO
11816-1**

**IDF
155-1**

Второе издание
2006-04-15

Молоко и молочные продукты. Определение активности щелочной фосфатазы.

Часть 1.

Флуориметрический метод для молока и молочных напитков

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

ISO 11816-1:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bcaaba58-0ad2-404b-966e-c0bd1918db98/iso-11816-1-2006>

Ответственность за подготовку русской версии несёт GOST R
(Российская Федерация) в соответствии со статьёй 18.1 Устава ISO



Ссылочные номера
ISO 11816-1:2006(R)
IDF 155-1:2006(R)

© ISO и IDF 2006

Отказ от ответственности при работе в PDF

Настоящий файл PDF может содержать интегрированные шрифты. В соответствии с условиями лицензирования, принятыми фирмой Adobe, этот файл можно распечатать или вывести на экран, но его нельзя изменить, пока не будет получена лицензия на загрузку интегрированных шрифтов в компьютер, на котором ведется редактирование. В случае загрузки настоящего файла заинтересованные стороны принимают на себя ответственность за соблюдение лицензионных условий фирмы Adobe. Центральный секретариат ISO не несет никакой ответственности в этом отношении.

Adobe торговый знак фирмы Adobe Systems Incorporated.

Подробности, относящиеся к программным продуктам, использованным для создания настоящего файла PDF, можно найти в рубрике General info файла; параметры создания PDF были оптимизированы для печати. Были приняты во внимание все меры предосторожности с тем, чтобы обеспечить пригодность настоящего файла для использования комитетами-членами ISO. В редких случаях возникновения проблемы, связанной со сказанным выше, просьба проинформировать Центральный секретариат по адресу, приведенному ниже.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 11816-1:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bcaaba58-0ad2-404b-966e-c0bd1918db98/iso-11816-1-2006>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO и IDF 2006

Все права сохраняются. Если не указано иное, никакую часть настоящей публикации нельзя копировать или использовать в какой-либо форме или каким-либо электронным или механическим способом, включая фотокопии и микрофильмы, без предварительного письменного согласия ISO или IDF по соответствующему адресу, указанному ниже.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

International Dairy Federation
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 80 • B-1030 Brussels
Tel. + 32 2 733 98 88
Fax + 32 2 733 04 13
E-mail info@fil-idf.org
Web www.fil-idf.org

Опубликовано в Швейцарии

Содержание

Страница

Предисловие	iv
1 Область применения	1
2 Термины и определения	1
3 Принцип	2
4 Реагенты	2
5 Аппаратура	3
6 Отбор проб	4
7 Приготовление	4
7.1 Молоко, не содержащее щелочной фосфатазы	4
7.2 Приготовление образца для испытаний	4
8 Процедура	5
8.1 Верификация рабочих характеристик прибора	5
8.2 Калибровка	5
8.3 Определение	6
8.4 Контрольные тесты	6
9 Вычисление и выражение результатов	8
9.1 Калибровочный коэффициент	8
9.2 Вычисление	8
9.3 Выражение результатов испытания	9
10 Прецизионность	9
10.1 Межлабораторное испытание	9
10.2 Повторяемость	9
10.3 Воспроизводимость	10
11 Протокол испытания	10
Приложение А (информативное) Межлабораторное испытание	11
Библиография	13

Предисловие

Международная организация по стандартизации (ISO) является всемирной федерацией национальных организаций по стандартизации (комитетов-членов ISO). Разработка международных стандартов обычно осуществляется техническими комитетами ISO. Каждый комитет-член, заинтересованный в деятельности, для которой был создан технический комитет, имеет право быть представленным в этом комитете. Международные правительственные и неправительственные организации, имеющие связи с ISO, также принимают участие в работах. Что касается стандартизации в области электротехники, ISO работает в тесном сотрудничестве с Международной электротехнической комиссией (IEC).

Проекты международных стандартов разрабатываются по правилам, указанным в Директивах ISO/IEC, Часть 2.

Главная задача технических комитетов состоит в разработке международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые техническими комитетами, рассылаются комитетам-членам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения, по меньшей мере, 75 % комитетов-членов, принимающих участие в голосовании.

Обращается внимание на возможность патентования некоторых элементов данного международного стандарта. ISO не несет ответственности за идентификацию какого-либо или всех таких патентных прав.

Международный стандарт ISO 11816-1|IDF 155-1 был подготовлен Техническим комитетом ISO/TK 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом ПК 5, *Молоко и молочные продукты*, и Международной федерацией молочных продуктов (IDF). Он публикуется совместно ISO и IDF.

Это издание ISO 11816-1|IDF 155-1 отменяет и заменяет ISO 11816-1:1997, которое было технически пересмотрено.

ISO 11816|IDF155 состоит из следующих частей, под общим названием *Молоко и молочные продукты. Определение активности щелочной фосфатазы*:

- *Часть 1. Флуориметрический метод для молока и молочных напитков*
- *Часть 2. Флуориметрический метод для сыра*

Предисловие

Международная федерация производства молочных продуктов (IDF) является всемирной федерацией молочного сектора в национальных комитетах каждой страны-члена IDF. Каждый национальный комитет имеет право быть представленным в постоянных комитетах IDF, выполняющих техническую работу. IDF сотрудничает с ISO в разработке стандартных методов анализа и отбора образцов молока и молочных продуктов.

Проекты международных стандартов, принятые рабочими группами и постоянными комитетами рассылаются национальным комитетам на голосование. Их опубликование в качестве международных стандартов требует одобрения не менее 50% национальных комитетов, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего международного стандарта могут быть объектом патентных прав. ISO не может нести ответственность за идентификацию какого-либо одного или всех патентных прав.

Международный стандарт ISO 11816-1 | IDF 155-1 подготовлен Международной федерацией молочных продуктов (IDF) и Техническим комитетом ISO/ТС 34 *Пищевые продукты*, Подкомитетом ПК 5 *Молоко и молочные продукты*. Этот стандарт публикуется совместно ISO и IDF.

Вся работа проделана совместной группой экспертов ISO-IDF по *Исследованию свойств под действием термообработки*. Постоянного комитета по *Второстепенным компонентам и исследованию их свойств* при поддержке руководителя этого проекта, господина F.Harding (UK).

Это издание ISO 11816-1 | IDF 155-1 отменяет и заменяет IDF 155A:1999, который был технически пересмотрен.

ISO 11816 | IDF 155 состоит из следующих частей, под общим названием *Молоко и молочные продукты. Определение активности щелочной фосфатазы*:

- *Часть 1. Флуориметрический метод для молока и молочных напитков*
- *Часть 2. Флуориметрический метод для сыра*

Молоко и молочные продукты. Определение активности щелочной фосфатазы.

Часть 1.

Флуориметрический метод для молока и молочных напитков

1 Область применения

Эта часть ISO 11816|IDF155 устанавливает флуориметрический метод для определения активности щелочной фосфатазы (ALP, EC 3.1.3.1) в пастеризованном цельном молоке, полужирном и, обезжиренном молоке. Метод применим для молока коров, овец, коз и для молочных напитков.

Метод также годится для определения высокой активности щелочной фосфатазы в сыром и термообработанном молоке с активностями более 2000 МЕ/л после заданного разбавления образца.

2 Термины и определения

Для целей этого документа применяются следующие термины и определения.

2.1

активность щелочной фосфатазы

ALP активность

alkaline phosphatase activity

ALP activity

активность щелочной фосфатазы, присутствующей в продукте, определенная методом, установленным в этой части ISO 11816|IDF 155

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 Принцип

Активность щелочной фосфатазы для образца измеряется путем непрерывного флуориметрического прямого кинетического анализа. В субстрате нефлуоресцентного ароматического монофосфорного эфира, 2'-[2-бензотиазолил]-6'-гидроксibenзотиазол фосфат, в присутствии любой щелочной фосфатазы, образованной из этого образца, происходит гидролиз его фосфатного радикала, производя продукт с интенсивной флуоресценцией. Флуориметрическое измерение активности щелочной фосфатазы (ALP) проводят при 38 °C 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 °C. Измерения активности фактически начинаются со второй минуты и продолжаются до конца третьей минуты (т.е. за 2-х мин период)

4 Реагенты

Используются только реагенты 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'-гидроксibenзотиазол фосфат (Флуорофос®). Субстрат Флуорофоса® остается стабильным в течение двух лет, если его хранить в закрытых пробирках при температуре от 2 °C до 8 °C.

4.2 Буферный раствор субстрата, буферный раствор диэтаноламина (DEA), $c(\text{DEA}) = 2,4$ моль/л, с pH 10,0, в пробирках емкостью 240 мл каждая.

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

4.3 Рабочий субстрат

Оставляют 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 против света.

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

1) Реагенты, 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, имеющих на промышленном рынке.

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

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 дней, если он защищен от света и хранится при температуре от 2 °C до 8 °C, или в течение 8 ч, если хранится при 38 °C. Не следует использовать рабочий субстрат, если получено показание выше 1200 (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'-гидроксibenзотиазол] в буферном растворе DEA (4.2).

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

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

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

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

4.5 Раствор для ежедневного контроля прибора, содержащий $34,48 \times 10^{-3}$ 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 $38 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ и прямоугольной оптической системой, допускающей возбуждение при длине волны 440 нм и испускание при 520 нм – 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.

5.3 Пипетки.

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

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

5.3.3 Пипетка, емкостью 2 мл.

5.4 Инкубаторный блок, поддерживающий температуру $38 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, подходящий для помещения в них кювет.

5.5 Парафильм ²⁾, или другая подходящая пленка лабораторного класса.

2) Парафильм является примером подходящего продукта, выпускаемого в промышленности. Эта информация дается для удобства пользователей данного международного стандарта и не является рекомендацией ISO или IDF для этого продукта.

5.6 Вихревая мешалка.

5.7 Водяная баня, поддерживающая температуру $63\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $95\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.8 Мерные колбы с одной меткой, емкостью 100 мл.

6 Отбор проб

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

Отбор проб не является частью метода, установленного в данном международном стандарте. Рекомендованный метод отбора проб дан в ISO 707/IDF 50.

7 Приготовление

7.1 Молоко, не содержащее щелочной фосфатазы

Приготавливают 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 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Предварительно нагревают образец молока до $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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-мин период подогрева начинают сразу же, как только образец молока достигнет $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Все быстро охлаждают после периода нагрева.

Таким образом обработанный образец молока тестируют, чтобы удостовериться, что активность щелочной фосфатазы меньше 10 МЕ/л.

7.2 Приготовление образца для испытаний

7.2.1 Общие вопросы

Перед использованием все испытываемые образцы тщательно перемешивают.

NOTE В предварительном нагреве испытываемых образцов обычно нет необходимости.

7.2.2 Пастеризованные испытываемые образцы

Пастеризованные испытываемые образцы используют в состоянии после поставки, в требуемых количествах.

7.2.3 Разбавление испытываемых образцов с высокими значениями ALP

Приготавливают разбавленные образцы молока, используя молоко без фосфатазы (7.1), для того чтобы их уровни активности щелочной фосфатазы ALP соответствовали аналитическому диапазону испытания ($< 2000\text{ МЕ/л}$). Разбавленные растворы хорошо перемешивают.

8 Процедура

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 рекомендуется следовать стандартам по добросовестной лабораторной практике (5.1).

Контрольные тесты качества включают

- a) ежедневный тест A/D (аналого-цифровое преобразование), выполняемый для проверки правильности функционирования оборудования путем измерения точности канала A/D преобразования и мониторинга A/D канала 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, настоятельно 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, вероятно, будут влиять на сохраненную калибровку, если проверенные контрольные значения показывают неприемлемые результаты, или каждые 3 месяца.

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

Перед использованием калибровочные растворы А, В и С смешивают, плавно переворачивая. С помощью пипетки (5.3.3) переносят по 2,0 мл калибровочных растворов А, В и С (4.4.1, 4.4.2 и 4.4.3) соответственно, 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 А, выполняют следующие установившиеся процедуры калибровки. Перед помещением кювет в фильтровальный флуориметр (5.1) протирают снаружи каждую кювету 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 А (4.4.1), помещают этот раствор во флуориметр и нажимают "START". Когда измерение закончено, измеряют второй калибровочный раствор А.

Такую же процедуру выполняют для калибровочных растворов В (4.4.2) и С (4.4.3), пока все процедуры не будут закончены. Прибор Флуорофос® автоматически вычисляет величину флуоресценции, полученную с калибровочным раствором В и С в сравнении с калибровочным раствором А, чтобы установить калибровочный коэффициент прибора.