
**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 11816-1:2013

<https://standards.itech.ai/catalog/standards/sist/1ef6c555-1c72-4f1c-83bd-2171fd9565e3/iso-11816-1-2013>

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



Ссылочный номер
ISO 11816-1:2013(R)
IDF 155-1:2013(R)

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 11816-1:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1ef6c555-1c72-4f1c-83bd-2171fd9565e3/iso-11816-1-2013>



ДОКУМЕНТ ЗАЩИЩЕН АВТОРСКИМ ПРАВОМ

© ISO/IDF 2013

Все права сохраняются. Если не задано иначе, 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 офиса ISO по адресу, указанному ниже, или членов ISO в стране регистрации пребывания.

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
Silver Building • Boulevard Auguste Reyers 70/B • 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	1
4 Реактивы	2
5 Аппаратура.....	3
6 Отбор проб.....	3
7 Приготовление	3
7.1 Молоко, не содержащее щелочной фосфатазы	3
7.2 Приготовление испытательного образца	4
8 Процедура	4
8.1 Верификация рабочих характеристик прибора	4
8.2 Контрольные реактивы для проверки пригодности готового к использованию рабочего субстрата (4.3)	6
8.3 Калибровка.....	6
8.4 Определение	6
8.5 Контрольные проверки, связанные с испытательным образцом.....	7
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 Совместное испытание	9
10.2 Повторяемость.....	9
10.3 Воспроизводимость.....	9
11 Протокол испытаний.....	9
Приложение А (информативное) Совместные испытания	10
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).

Процедуры, использованные для разработки этого документа, и процедуры, предназначенные для его дальнейшего ведения, описаны в Директивах ISO/IEC, Часть 1. В частности, обращается внимание на разные критерии, необходимые для одобрения разных типов документов ISO. Проект этого документа был разработан согласно редакционным правилам, указанным в Директивах ISO/IEC, Часть 2. www.iso.org/directives

Обращается внимание на возможность того, что некоторые элементы данного международного стандарта могут быть объектом патентных прав. ISO не несет ответственности за идентификацию какого-либо или всех таких патентных прав. Детали всех патентных прав, идентифицированных в процессе разработки данного документа, будут указаны во Введении и/или в списке патентных деклараций, полученных ISO. www.iso.org/patents

Любое торговое название, использованное в этом документе, дается в качестве информации для удобства пользователей и не является рекомендацией.

Этот документ был разработан Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*, и Международной молочной федерацией (IDF). Он публикуется совместно ISO и IDF.

Настоящее третье издание ISO 11816-1|IDF 155-1 отменяет и заменяет второе издание (ISO 11816-1:2006), которое было технически пересмотрено.

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*

Предисловие

Международная молочная федерация (IDF) является некоммерческой организацией, представляющей молочный сектор в мировой экономике. Членами IDF являются национальные комитеты в каждой стране-члене, а также региональные молочные ассоциации, подписавшие официальное соглашение о сотрудничестве с IDF. Все члены IDF имеют право быть представленными в постоянных комитетах IDF, выполняющих техническую работу. IDF сотрудничает с ISO в разработке стандартных методов анализа и отбора проб молока и молочных продуктов.

Главной задачей постоянных комитетов является разработка международных стандартов. Проекты международных стандартов, принятые рабочими группами и постоянными комитетами, рассылаются национальным комитетам на голосование. Для их опубликования в качестве международных стандартов требуется одобрение не менее 50% национальных комитетов IDF, принимающих участие в голосовании.

Следует иметь в виду, что некоторые элементы настоящего международного стандарта могут быть объектом патентных прав. IDF не несет ответственности за идентификацию какого-либо одного или всех таких патентных прав.

Любое торговое название, использованное в этом документе, дается в качестве информации для удобства пользователей и не является рекомендацией.

ISO 11816-1|IDF 155-1 был разработан Международной молочной федерацией (IDF) и Техническим комитетом ISO/TC 34, *Пищевые продукты*, Подкомитетом SC 5, *Молоко и молочные продукты*. Он публикуется совместно IDF и ISO.

Вся работа была проведена Совместной проектной группой ISO-IDF по *Определению активности щелочной фосфатазы – флуориметрический метод* Постоянного комитета по *Аналитическим методам для технологических добавок и индикаторов* под эгидой руководителя этого проекта госпожи Eileen Garry (США).

Это третье издание ISO 11816-1|IDF 155-1 отменяет и заменяет IDF 155-1:2006, который был технически пересмотрено technically revised.

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|IDF 155 устанавливает флуориметрический метод для определения активности щелочной фосфатазы (ALP, EC 3.1.3.1) в сыром и термообработанном цельном молоке, а также в полужирном, обезжиренном и ароматизированном молоке. Данный метод применяется для молока коров, овец и коз и для молочных напитков. Он также применим для сухого молока после восстановления.

Применяемый прибор позволяет считывать активности вплоть до 7000 миллиединиц на литр (мЕ/л). Если активность выше 7000 мЕ/л, образец разбавляют молоком, не содержащим щелочную фосфатазу (7.1), чтобы получить уровень не выше 7000 мЕ/л.

2 Термины и определения

Применительно к настоящему документу используются следующие термины и определения.

2.1 <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1ef6c555-1c72-4f1c-83bd-2171fd9565e3/iso-11816-1-2013>
активность щелочной фосфатазы (ALP)
alkaline phosphatase (ALP) activity

активность щелочной фосфатазы, присутствующей в продукте, определенная установленным методом

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

2.2

единица активности щелочной фосфатазы

unit of alkaline phosphatase activity

количество фермента щелочной фосфатазы, которое катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в минуту

3 Принцип

Активность щелочной фосфатазы 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 сильно флуоресцирующий продукт. Флуориметрические измерения активности щелочной фосфатазы (ALP) проводят при 38 °C в течение 3 минут, используя Флуорофос®. 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 38 °C. Измерения активности фактически начинаются со второй минуты и продолжаются до конца третьей минуты (т.е. 2 мин).

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 Субстрат Флуорофоса® 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 от даты изготовления, если его хранить в закрытых пробирках при температуре от 2 °C до 8 °C; защищать от света.

4.2 Буферный раствор субстрата, буферный раствор диэтаноламина (DEA), с(DEA) = 2,4 моль/л, с pH 10,0, в пробирках емкостью 240 мл каждая. Буферный раствор субстрата остается стабильным в течение двух лет с момента изготовления, если его хранить в закрытых пробирках при температуре от 2 °C до 8 °C; также его следует защищать от света.

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) к содержимому одной пробирки с субстратом Флуорофоса® (144 мг) (4.1) и хорошо перемешивают, переворачивая в течение 3 мин для получения ~1,0 миллимолярного раствора (pH 10). Используют бутылочное стекло для защиты от света.

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

Применяют A/D (аналого-цифровой) тест, описанный в 8.2, для проверки пригодности готового к использованию рабочего субстрата. Не следует использовать рабочий субстрат, если получено показание выше 1200 FLU (единицы флуоресценции) (8.2).

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.

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

4.4 Калибровочные растворы, Флуорожелтый®(FY) [2'-(2-бензотиазолил)-6'-гидроксibenзотиазол] в буферном растворе субстрата (4.2).

Калибровочные растворы остаются стабильными в течение 18 месяцев с момента изготовления, если их хранить в закрытых пробирках при температуре от 2 °C до 8 °C. Для получения оптимальных результатов их следует плавно перемешать перед использованием.

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®.

¹ Реактивы, установленные в 4.1 до 4.5, и аппаратура, установленная в 5.1 до 5.4 (кроме 5.3.3), входят в испытательную систему Флуорофос, которая является торговым названием продукта, поставляемого фирмой Advanced Instruments, Inc., Two Technology Way, Norwood, Massachusetts 02062, USA. Изготовитель может изменять конфигурации упаковок, поставляемых с испытательной системой Флуорофос. Пользователь должен обращаться к инструкциям изготовителя для приготовления реактивов, если они отличаются от реактивов, установленных здесь. Флуорофос и Флуорожелтый являются торговыми марками фирмы Advanced Instruments, Inc. Эта информация дается только для удобства пользователей данного документа и не является рекомендацией ISO или IDF для этих продуктов. Можно использовать аналогичные продукты, если есть данные, что они дадут такие же результаты.

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

4.5 Раствор для ежедневного контроля прибора, содержащий $34,48 \times 10^{-3}$ ммоль/л Флуорожелтого ®.

Раствор для ежедневного контроля прибора остается стабильным в течение 18 месяцев с момента изготовления, если его хранить в закрытых пробирках при температуре от 2 °C до 8 °C. Перед использованием его следует плавно перемешать для получения оптимальных результатов.

5 Аппаратура

Обычное лабораторное оборудование и, в частности, следующее.

5.1 Фильтровальный флуориметр, с термостатически регулируемым держателем кюветы при поддержании температуры (38 ± 1) °C и прямоугольной оптической системой, допускающей возбуждение при длине волны 440 нм и испускание при 520-560 нм (например, прибор Флуорофос®).

5.2 Кюветы, сменные, из нефлуоресцентного стекла.

5.3 Пипетки

5.3.1 Дозатор фиксированного объема, обеспечивающий дозирование по 2,0 мл.

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

Необходимо строго соблюдать инструкции по технике пипетирования, так как оно является особенно важным для получения точных результатов. Перед использованием необходимо удостовериться, что герметичность поршня пипетки обеспечена.

5.3.3 Пипетки, вместимостью 2 мл и 3 мл.

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

5.5 Подходящая лабораторная пленка парафильм.

5.6 Вихревая мешалка.

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

5.8 Мерные колбы с одной меткой, вместимостью 100 мл.

6 Отбор проб

Отбор проб не является частью метода, установленного в этой части ISO 11816|IDF 155. рекомендованный метод отбора проб дан в ISO 707|IDF 50.

В лабораторию следует отправлять репрезентативную пробу. Она не должна быть повреждена или изменена во время транспортировки или хранения.

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 оно не касалось краев или стенок контейнера.

Помещают пробирку или контейнер с порцией молока в водяную баню (5.7.), установленную на 95 °C. Предварительно нагревают эту порцию молока до 95 °C и затем продолжают её подогрев в течение 5 мин при этой температуре. Температуру контролируют термометром или термисторным зондом, помещенным в центр пробирки или контейнера. Когда температура молока достигает 95 °C, сразу же начинают 5-мин период подогрева. После периода нагрева всю порцию быстро охлаждают.

Обработанную таким образом порцию молока проверяют для гарантии, что активность щелочной фосфатазы меньше 10 мЕ/л.

7.2 Приготовление испытательного образца

7.2.1 Общие вопросы

Перед использованием все испытательные образцы тщательно перемешивают

ПРИМЕЧАНИЕ В предварительном нагреве испытательных образцов обычно нет необходимости.

7.2.2 Пастеризованные испытательные образцы

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

7.2.3 Разбавление испытательных образцов с высокими значениями ALP

Для приготовления разбавленных образцов используют молоко без фосфатазы (7.1), чтобы их уровни активности щелочной фосфатазы ALP соответствовали аналитическому диапазону испытания (< 7000 мЕ/л). Разбавленные растворы хорошо перемешивают.

8 Процедура

8.1 Верификация рабочих характеристик прибора

8.1.1 Общие вопросы

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

Контрольные тесты качества включают

- a) ежедневный тест A/D, используемый для проверки правильного функционирования оборудования,
- b) ежедневный контрольный тест прибора с использованием ежедневного контрольного раствора в приборе (4.5) для мониторинга любого электронного или оптического отклонения флуориметра, и
- c) использование внешних положительных, отрицательных и нормальных контрольных проверок, описанных в 8.1.3, которые рекомендуются для ежедневного мониторинга параметров прецизионности прибора.

8.1.2 Тесты A/D

8.1.2.1 При использовании прибора Флуорофос® тесты A/D проводят ежедневно перед началом испытания.

8.1.2.2 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 будет вне этого диапазона, очищают фильтры возбуждения и испускания и повторяют тест A/D.

8.1.2.3 С помощью дозатора переносят 2,0 мл раствора для ежедневного контроля прибора (4.5) в маркированную кювету. Помещают кювету в инкубаторный блок (5.4), установленный на 38°C, на 20 мин. Вставляют предварительно нагретую кювету 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. Оставляют на 15 мин для уравнивания чисел.

8.1.3 Контрольные тесты

Выполняют позитивные, негативные и PhosphaCheck-N (контроль фосфатазы) контрольные тесты², используя порошковый молочный субстрат с фосфатазой и консервантом.

Контрольные реактивы PhosphaCheck®, применяемые для тестирования эффективности пастеризации, остаются стабильными 18 месяцев с момента приготовления, если их хранить в закрытых и невостановленных пробирках при температуре от 2 °C до 8 °C. После вскрытия и восстановления пробирок контрольные реактивы стабильны в течение трех дней при температуре от 2 °C до 8 °C. Не следует замораживать контрольные реактивы.

Оставляют контрольные реактивы до достижения комнатной температуры. Контрольные реактивы PhosphaCheck®, применяемые для тестирования эффективности пастеризации, восстанавливают перед использованием. Извлекают металлическую или резиновую пробку. Добавляют 3,0 мл деионизированной воды при комнатной температуре.

Возвращают пробку на место и мягко перемешивают, переворачивая пробирку в течение 1 мин, и затем оставляют на 15 мин. Не следует встряхивать контрольные реактивы или вызывать их вспенивание. Для обеспечения оптимальных результатов плавное перемешивание необходимо перед каждым использованием.

После калибровки неиспользованного канала с отрицательным контролем анализируют три контрольных раствора (т.е. положительный, отрицательный и PhosphaCheck-N™), добавляя 75 мкл каждого контрольного раствора к 2 мл предварительно нагретого субстрата. Выполняют тест на ALP.

Показание для отрицательного контроля должно быть < 10 мЕ/л, среднее показание для Phosphacheck-N™ должно быть между 10 и 40 мЕ/л, а положительный тест должен быть 500 ± 100 мЕ/л. Эти контрольные реактивы можно использовать ежедневно для мониторинга прецизионности прибора.

² Инструкции для проверки рабочих характеристик контрольных реактивов и прибора доступны для приобретения у фирмы Advanced Instruments Inc., Two Technology Way, Norwood, MA 02062, USA. Эта информация дается для удобства пользователей этой части ISO 11816|IDF 155 и не является рекомендацией ISO или IDF для этих продуктов. Можно использовать аналогичные продукты, если известно, что они дают такие же результаты.