

**TCVN 6835 : 2001**

**ISO 9622 : 1999**

**SỮA NGUYÊN CHẤT – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG  
MILKFAT, PROTEIN VÀ LACTOZA – HƯỚNG DẪN  
VẬN HÀNH THIẾT BỊ ĐO VÙNG HỒNG NGOẠI GIỮA**

*Whole milk – Determination of milkfat, protein and lactose content –  
Guidance on the operation of mid-infrared instruments*

## Lời nói đầu

TCVN 6835 : 2001 hoàn toàn tương đương với ISO 9622 : 1999;

TCVN 6835 : 2001 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn TCVN/TC/F12 Sữa và sản phẩm sữa biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường ban hành.

# Sữa nguyên chất – Xác định hàm lượng milkfat, protein và lactoza – Hướng dẫn vận hành thiết bị đo vùng hồng ngoại giữa

*Whole milk – Determination of milkfat, protein and lactose content – Guidance on the operation of mid-infrared instruments*

## 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này mô tả các điều kiện thao tác thiết bị đo để xác định hàm lượng chất béo, protein và lactoza của sữa ngoài nông trại, trên cơ sở đo hấp thụ bức xạ vùng hồng ngoại giữa ở các bước sóng đại diện cho từng thành phần cần phân tích.

Chú thích 1 – Trong thực tế, để thực hiện các phép đo này thường sử dụng các thiết bị tự động hoặc bán tự động bán sẵn như qui định trong điều 5 và trong tiêu chuẩn này được gọi là "thiết bị đo hồng ngoại".

Bất kỳ loại thiết bị đo nào không phù hợp với nguyên tắc phân tích được qui định trong tiêu chuẩn này hoặc các thiết bị đo có lắp các bộ sửa đổi mà có thể làm thay đổi các đặc trưng nguyên lý của thiết bị (độ lặp lại, độ chính xác, các điều kiện sử dụng), cũng như dùng phương tiện điều chỉnh chuẩn, thì phải cần đến tiêu chuẩn cụ thể.

Chú thích 2 – Không phải tất cả các thiết bị đều cho phép xác định hàm lượng lactoza. Hơn nữa, một số thiết bị cho phép đo trực tiếp hàm lượng nước. Hàm lượng tổng chất khô hoà tan có thể đánh giá được bằng cách bổ sung chất béo, protein, lactoza, đồng thời sử dụng một hằng số để hiệu chỉnh hàm lượng muối.

Phương pháp mô tả trên có thể áp dụng để xác định hàm lượng chất béo, protein và nếu thích hợp để xác định lactoza của sữa ngoài nông trại. Phương pháp này cũng dùng để phân tích các loại sữa khác (sữa dê, sữa cừu, sữa trâu...) và sữa đã chế biến với điều kiện là thiết bị phải được hiệu chuẩn (điều 7).

## 2 Tiêu chuẩn viện dẫn

TCVN 6508 : 1999 (ISO 1211) Sữa – Xác định hàm lượng chất béo – Phương pháp khối lượng (phương pháp chuẩn).

ISO 5765-1 Sữa bột, hỗn hợp sữa bột dùng để làm kem lạnh và phomat chế biến – Xác định hàm lượng lactoza – Phần 1 : Phương pháp enzym sử dụng glucoza nửa lactoza.

ISO 5765-2 Sữa bột, hỗn hợp sữa bột dùng để làm kem lạnh và phomat chế biến – Xác định hàm lượng lactoza – Phần 2 : Phương pháp enzym sử dụng galactoza nửa lactoza.

ISO 8968-1 Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 1 : Phương pháp Kjeldahl.

ISO 8968-2 Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 2 : Phương pháp thủy phân khối (phương pháp vĩ mô).

ISO 8968-4 Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 4 : Xác định hàm lượng nitơ phi protein.

ISO 8968-5 Sữa – Xác định hàm lượng nitơ – Phần 4 : Xác định hàm lượng nitơ - protein.

### **3 Thuật ngữ và định nghĩa**

Trong tiêu chuẩn này áp dụng định nghĩa sau đây :

**3.1 Thiết bị đo hồng ngoại :** Thiết bị đặc thù được sử dụng dưới các điều kiện qui định trong tiêu chuẩn này để đánh giá phần khối lượng chất béo, protein và lactoza trong sữa nguyên chất.

**3.2 Hàm lượng chất béo, protein và lactoza :** Phần khối lượng của các chất xác định được bằng phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này.

Chú thích – Hàm lượng chất béo, protein và lactoza được biểu thị bằng phần trăm khối lượng [% (m/m)].

### **4 Nguyên tắc**

Sau khi đông hoá mẫu sữa, dùng thiết bị đo hồng ngoại để đo lượng bức xạ được hấp thụ bởi :

- nhóm cacbonyl của các liên kết este của glyxerit ở bước sóng 5,7  $\mu\text{m}$  (thường được đối chiếu với bộ lọc A), và / hoặc các nhóm CH ở bước sóng 3,5  $\mu\text{m}$  (thường được đối chiếu với bộ lọc B ) để xác định hàm lượng chất béo;
- nhóm amit thứ hai của các liên kết peptit ở bước sóng 6,5  $\mu\text{m}$  để xác định hàm lượng protein;
- nhóm hidroxyl của lactoza ở bước sóng 9,6  $\mu\text{m}$  để xác định hàm lượng lactoza.

Việc đánh giá hàm lượng của mỗi thành phần trên được thực hiện bằng cách đối chiếu với lượng ánh sáng hồng ngoại hấp thụ do nước ở cùng bước sóng hoặc do sữa ở bước sóng khác mà ở đó chỉ hấp thụ nhẹ hợp chất đang đo.

Chú thích – Vì những lý do thực tế, các mẫu có thể được bảo quản, thí dụ : bằng dung dịch kali dicromat 0,1%, natri azit 0,03% hoặc bronopol 0,02% đến 0,06%. Cần thiết phải kiểm tra mức đáp ứng của thiết bị đo đối với tất cả các kênh.

## 5 Các đặc trưng chủ yếu của thiết bị đo hồng ngoại

Các thiết bị đo bán sẵn có thể có một hoặc hai cuvet đo, có một hoặc hai băng sóng trên một kênh (một thành phần), và có thể sử dụng hệ thống quang học chùm tia đơn hoặc kép, có hệ thống truyền số điện tử hoặc hệ thống phụ để đánh giá bức xạ truyền qua và có thể tạo ra các bước sóng tương ứng nhờ cách tử nhiễu xạ, bộ lọc quang giao thoa, hoặc nhờ giao thoa biến đổi Fourier. Thiết bị đo cũng có thể khác nhau do số lượng các dải bước sóng được qui định để dự đoán nồng độ của thành phần đã định.

Chú thích – Trong trường hợp đo giao thoa, tiêu chuẩn này chỉ có thể áp dụng được các dải sóng được đề cập trong điều 4.

## 6 Các yếu tố ảnh hưởng đến độ chính xác của phép đo

### 6.1 Yếu tố thiết bị

#### 6.1.1 Độ tuyến tính

Nếu các thiết bị đo được hiệu chuẩn để biểu thị kết quả theo khối lượng / khối lượng, thì các dung dịch dùng để điều chỉnh và đánh giá độ tuyến tính nên được chuẩn bị theo khối lượng / khối lượng. Mặt khác, nếu thiết bị đo được hiệu chuẩn dựa vào các phương pháp đối chứng thể tích hoặc được hiệu chuẩn để biểu thị kết quả bằng khối lượng/thể tích, thì độ tuyến tính nên đặt và đánh giá theo khối lượng/ thể tích để có được sự tương quan tối ưu đối với phép thử đối chứng. Các thí dụ về đánh giá khối lượng / thể tích được nêu trong phụ lục A. Điều này chỉ đưa ra để đánh giá khối lượng / khối lượng.

Để kiểm tra độ tuyến tính đối với mỗi thành phần, tạo ra sáu dung dịch với nồng độ cho trước như trong bảng 1. sử dụng :

- a) váng kem chưa đồng hoá có hàm lượng chất béo 8%, được pha loãng với sữa gầy để kiểm tra độ tuyến tính ở bước sóng 5,7  $\mu\text{m}$  (Bộ lọc A) và 3,5  $\mu\text{m}$  (Bộ lọc B) để xác định hàm lượng chất béo.
- b) sữa gầy đã xử lý UF, được pha loãng với chất siêu lọc để kiểm tra độ tuyến tính ở bước sóng 6,5  $\mu\text{m}$  khi xác định hàm lượng protein. Cách khác, có thể sử dụng whey protein cô đặc, sữa bột gầy hoặc sữa gầy cô đặc được pha loãng bằng nước cất. Dung dịch gốc nên chứa khoảng 5,5% protein.
- c) nên dùng dung dịch 60 g/l lactoza ngâm 1 phân tử nước đã được pha loãng bằng nước để kiểm tra độ tuyến tính ở bước sóng 9,6  $\mu\text{m}$  khi xác định hàm lượng lactoza.

Bảng 1

Các phần dung dịch gốc (kem, sữa đã xử lý UF hoặc dung dịch lactoza 6%)	Các phần của chất pha loãng (sữa gầy hoặc nước )	Nồng độ tương đối
100	0	1,0
80	20	0,8
60	40	0,6
40	60	0,4
20	80	0,2
0	100	0

Nên tăng đều nồng độ của những dung dịch này từ zero đến các giới hạn trên mong muốn của các số đọc của thiết bị đo.

Nếu có thể, sử dụng tín hiệu sơ cấp để kiểm tra độ tuyến tính. Phân tích mỗi mẫu ba lần và tính phương trình hồi qui tuyến tính như sau :

$$y = bx + a$$

và số dư  $\varepsilon_i$ .

$$\varepsilon_i = y_i - (ax_i + b)$$

Vẽ số dư  $\varepsilon_i$  (trục y) nghịch đảo với nồng độ của từng thành phần có trong dung dịch (trục x) lên biểu đồ ứng với một trong các thành phần. Kiểm tra bằng mắt các điểm số liệu là đủ thông tin về độ tuyến tính của tín hiệu.

Nếu cần thêm nhiều chuẩn cứ khách quan về độ tuyến tính, thì tính tỷ số giữa dải số dư với dải các giá trị tín hiệu :

$$\Delta\varepsilon / \Delta s = (\varepsilon_{\max} - \varepsilon_{\min}) / (s_{\max} - s_{\min})$$

trong đó

$\varepsilon_{\max}$  và  $\varepsilon_{\min}$  là các số dư trên và số dư dưới tương ứng;

$s_{\max}$  và  $s_{\min}$  là các giá trị tín hiệu trên và giá trị tín hiệu dưới tương ứng.

Dải điển hình đối với tỷ số  $\Delta\varepsilon / \Delta s$  từ 0,01 đến 0,02.

Cách khác, có thể tiến hành phân tích một chiều về độ biến thiên để khẳng định độ không tuyến tính.

Nếu các tỷ số giữa các nồng độ và các số đọc của thiết bị không hoàn toàn tuyến tính trên toàn bộ dải đo thì điều chỉnh độ tuyến tính của đáp tuyến thiết bị đối với thành phần theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Chú thích – Các loại sữa không phải là sữa bò có thể chứa hàm lượng chất béo và protein cao. Đối với các loại sữa đó có thể thu được kết quả tốt hơn, nếu độ tuyến tính được điều chỉnh và được kiểm tra đặc biệt đối với dải nồng độ liên quan.

### 6.1.2 Hiệu quả làm sạch cuvet

Sau mỗi lần bơm mẫu qua cuvet đo, thể tích của mẫu đo trước còn sót lại không được vượt quá 1% tổng thể tích của cuvet.

Để kiểm tra hiệu quả của việc tráng rửa, phân tích 20 mẫu liên tục của nước và sữa nguyên chất đã được đồng hoá, sử dụng thứ tự : nước, nước, sữa, sữa, nước, nước v.v..., và ghi lại các số đọc của từng mẫu nước và sữa ở tất cả các bước sóng đã dùng. Tính hiệu quả làm sạch cuvet, E, đối với từng bước sóng dùng công thức sau :

$$E = (\sum M_1 - \sum W_2) 100 / (\sum M_2 - \sum W_2)$$

trong đó

$M_1$  là số đọc đầu tiên đối với sữa;

$M_2$  là số đọc thứ hai đối với sữa;

$W_2$  là số đọc thứ hai đối với nước ở cùng bước sóng;

Tỷ lệ này không được nhỏ hơn 99%.

### 6.1.3 Đồng hoá mẫu

6.1.3.1 Để kiểm tra hiệu quả của bộ đồng hoá, tiến hành hai phép phân tích liên tục, phép phân tích thứ nhất sử dụng mẫu sữa nguyên chất chưa đồng hoá và phép phân tích thứ hai sử dụng cùng loại mẫu sữa nguyên chất đó sau khi đã được đồng hoá. Chênh lệch hai số đọc về chất béo không vượt quá 0,05% đối với mẫu sữa chứa 3,5% khối lượng milkfat. Để tính chuẩn cứ thích hợp đạt / không đạt đối với các nồng độ milkfat khác với 3,5%, thì nhân hàm lượng chất béo thực với 0,0143 để thu được chuẩn cứ mới.

Chú thích – Quy trình này có thể không áp dụng được cho một số loại thiết bị.

**Chú ý – Các kết quả của phép thử này có thể gây nhầm lẫn, khi bộ đồng hoá mẫu không làm việc sẽ cho các kết quả khác nhau rất ít giữa lần phân tích thứ nhất và thứ hai. Có một phương pháp thay thế an toàn hơn nhưng khó hơn được mô tả trong 6.1.3.2 (xem tài liệu tham khảo [2]).**

6.1.3.2 Cách khác, thu phần mẫu sữa chưa đồng hoá cũng như phần mẫu sữa đã đồng hoá của cùng một loại sữa, hoặc là bằng cách thu thập sữa nguyên liệu và sữa chế biến từ một thùng chứa tại nhà máy sữa hoặc là bằng cách tạo ra khối lượng ít hơn bằng cách sử dụng bộ đồng hoá bench-top hoặc



pilot-plant. Sau đó đo cả hai mẫu sữa, chưa đồng hoá và chính mẫu sữa đó đã đồng hoá và so sánh sự khác nhau của kết quả theo chuẩn cứ đạt/ không đạt như đã nêu ở trên.

Khi coi hiệu quả làm việc của bộ đồng hoá là tốt, thì việc đó có thể được kiểm tra bằng cách phân tích cỡ hạt của sữa đã đồng hoá. Giới hạn chấp nhận được đối với đường kính,  $d$ , của các hạt chất béo trong sữa đã được đồng hoá chuẩn là  $0,75 \mu\text{m}$  đến  $0,85 \mu\text{m}$ , với  $d(0,9)$  của  $1,4 \mu\text{m}$  đến  $1,5 \mu\text{m}$  [ $d(0,9)$  có nghĩa là 90 % milkfat có các hạt chất béo với đường kính nhỏ hơn  $d$ ]. Ở cỡ hạt cụ thể này, ánh sáng lan toả sẽ nhỏ nhất ở cả hai bước sóng tương ứng dùng để xác định chất béo bằng bộ lọc A và bằng bộ lọc B.

#### **6.1.4 Hơi nước bên trong dụng cụ đo**

Dao động độ ẩm không khí bên trong bộ phận quang học của thiết bị đo dẫn đến thay đổi trạng thái quang học zero và hiệu chuẩn. Thay chất hấp thụ (silicagel) trước khi nó bị đổi màu, tốt nhất là ở những khoảng thời gian đều đặn xác định được bằng thực nghiệm. Thực tế cho thấy mỗi tuần nên thay chất hấp thụ một lần trước ngày nghỉ cuối tuần để có đủ thời gian làm khô thiết bị đo.

### **6.2 Các yếu tố lý-hoá và sinh học**

#### **6.2.1 Thành phần sữa**

Tín hiệu thu được ở mỗi bước sóng là kết quả hấp thụ đặc trưng bởi thành phần cần xác định, và ở chừng mực nào đó thì đó là kết quả hấp thụ đặc trưng bởi sự thay đổi nồng độ của các thành phần chính khác kể cả nước và muối.

Sự ảnh hưởng do biến động các thành phần chất béo, protein và lactoza của sữa được hiệu chỉnh bằng hiệu chỉnh chéo hoặc bằng các hệ số tương tác đặc trưng cho mỗi bước sóng và cho mỗi loại thiết bị đo.

Các số tương tác này đã được nhà sản xuất hoặc được người sử dụng tính toán và được cài đặt tự động vào phép đo.

Tiến hành đo và hiệu chỉnh tương ứng như sau:

- xác định hàm lượng protein ở bước sóng  $6,5 \mu\text{m}$  đồng thời với việc xác định hàm lượng chất béo và hiệu chỉnh số đọc của protein đối với hàm lượng chất béo;
- xác định hàm lượng chất béo ở bước sóng  $3,5 \mu\text{m}$  đồng thời với việc xác định hàm lượng protein và lactoza và hiệu chỉnh số đọc của chất béo đối với protein và lactoza.

Tuy không bắt buộc phải chấp nhận nội hiệu chỉnh khác, nhưng chúng vẫn được khuyến cáo thực hiện, vì chúng làm tăng đáng kể độ chính xác của phép đo.

Kiểm tra hệ số hiệu chỉnh của thiết bị đo ba tháng một lần, thí dụ, bằng các phương pháp mô tả trong phụ lục B. Các tương tác biểu hiện phải càng gần mức zero càng tốt và không vượt quá mức giới hạn  $\pm 0,02$ . Nếu nằm ngoài các giới hạn này thì phải hiệu chỉnh chéo theo khuyến cáo của nhà chế tạo.



Nên kiểm tra hệ số hiệu chỉnh sau khi bảo dưỡng hoặc thay thế bất kỳ bộ phận chính nào của thiết bị đo, thí dụ như bộ lọc giao thoa.

## 6.2.2 Chất béo

### 6.2.2.1 Thành phần axit béo

Sự dao động của thành phần axit béo của sữa (phân tử lượng trung bình và độ không no) ảnh hưởng đáng kể đến mối tương quan giữa các kết quả của phương pháp chuẩn và phép đo hồng ngoại ở bước sóng 5,7  $\mu\text{m}$  và, ảnh hưởng mức nhỏ hơn ở bước sóng 3,5  $\mu\text{m}$ .

Khi có dao động về thành phần thông qua mật độ tổng thể của sữa (thí dụ, sự thay đổi theo mùa, sự khác nhau theo vùng, các loài động vật khác nhau), có thể cần phải cải biến hiệu chuẩn của thiết bị đo.

### 6.2.2.2 Phân giải lipit

Việc giải phóng axit béo do tác động của men lipaza làm thay đổi số đo đọc được trên thiết bị đo. Việc tăng chỉ số phân giải lipit 1 mili đương lượng trên 100 g chất béo, đo được bằng phương pháp BDI, làm thay đổi tín hiệu của thiết bị đo đối với chất béo là - 0,022 % ở bước sóng 5,7  $\mu\text{m}$  (bộ lọc A), và + 0,006 % ở bước sóng 3,5  $\mu\text{m}$  (bộ lọc B), đối với các mẫu chứa 3,5 % chất béo.

### 6.2.2.3 Hàm lượng chất béo cao

Khi phân tích các mẫu sữa có phần khối lượng chất béo lớn hơn 7,0 %, có thể thu được độ tái lập và độ lệch chuẩn kém (xem điều 7). Khi đó cùng với nhà sản xuất tiến hành kiểm tra xem bộ đồng hoá được trang bị kèm theo thiết bị đo có thích hợp với loại sữa này không.

### 6.2.2.4 Điều kiện vật lý của milkfat

Nếu có một phần milkfat nổi trên bề mặt trong điều kiện đã khử dầu, thì mẫu thử được bơm bằng thiết bị sẽ không đại diện cho hàm lượng chất béo của mẫu. Do đó phải loại bỏ các mẫu đã khử dầu. Chú ý thu thập hết các lớp kem bám ở thành và nắp bình.

## 6.2.3 Protein

### 6.2.3.1 Sự biến đổi về nitơ phi protein (NPN)

Việc xác định protein bằng quang phổ hồng ngoại (IR) dựa vào việc hấp thụ năng lượng hồng ngoại bởi các mối liên kết peptit của phân tử protein, trong khi các thành phần của NPN lại góp phần tích cực vào tín hiệu của thiết bị đo tại những bước sóng đo protein. Thiết bị đo phải được hiệu chỉnh để đưa ra lượng nitơ protein (xem ISO 8968-5) hoặc lượng protein của nitơ toàn phần (xem ISO 8968-1 hoặc ISO 8968-2) xác định được theo phương pháp Kjeldahl.

Khi kỹ thuật viên vận hành thiết bị đo chọn cách hiệu chuẩn protein dựa vào nitơ toàn phần thì đã thừa nhận rằng lượng NPN của các mẫu sữa dùng để hiệu chuẩn thiết bị đo là không đổi từ mẫu này đến mẫu khác trong phạm vi từng dãy hiệu chuẩn từ dãy này đến dãy khác. Nếu NPN thay đổi từ mẫu này đến mẫu khác trong phạm vi mỗi dãy hiệu chuẩn, thì những sai lệch trong việc điều chỉnh độ dốc của tín hiệu hiệu chỉnh trên kênh protein sẽ gây độ lệch chuẩn lớn giữa các kết quả phương pháp chuẩn xác định được nitơ tổng số (TN) theo phương pháp Kjeldahl và kết quả xác định được bằng thiết bị đo này.

Sự biến đổi về hàm lượng nitơ phi protein (NPN) trong phạm vi từng dãy và giữa các dãy sữa hiệu chuẩn sử dụng trong các phòng thí nghiệm khác nhau sẽ làm tăng sự chênh lệch trung bình và độ lệch chuẩn của sự khác biệt giữa các kết quả protein đo được bằng thiết bị đo ở những phòng thí nghiệm khác nhau khi việc hiệu chuẩn dựa trên TN. Khi TN được dùng làm chuẩn thì điều quan trọng là hàm lượng NPN trung bình của các sữa dùng để hiệu chuẩn càng gần bằng với giá trị trung bình tổng thể càng tốt và sự dao động trong tỷ lệ NPN/TN từ mẫu này đến mẫu khác trong phạm vi mỗi dãy càng nhỏ càng tốt. Người phân tích phải nắm được nguồn gốc sai số này trong việc hiệu chuẩn protein.

### **6.2.3.2 Sự biến đổi về axit xitric**

Axit xitric hấp thụ năng lượng ở 6,5  $\mu\text{m}$ , nghĩa là cũng ở bước sóng để xác định protein. Sự dao động của hàm lượng axit xitric cần được hoàn bù bằng cách cải biến việc hiệu chuẩn protein.

### **6.2.3.3 Sự phân giải lipit**

Việc tăng chỉ số phân giải lipit của 1 mili-đương lượng trên 100 g chất béo, như xác định được bằng phương pháp BDI, sẽ làm thay đổi tín hiệu của thiết bị đo đối với protein là + 0,013 % ở bước sóng 6,5  $\mu\text{m}$ , đối với mẫu thử chứa 3,0% khối lượng protein.

### **6.2.4 Chất bảo quản**

Các chất bảo quản có thể ảnh hưởng đến đáp ứng của thiết bị đo bằng hồng ngoại cũng như đến phương pháp chuẩn. Các ảnh hưởng này có thể khác nhau đối với các thành phần khác nhau và có thể dao động giữa các thiết bị đo riêng lẻ. Do đó, các ảnh hưởng đặc thù này phải được kiểm tra trong chu trình hiệu chuẩn trước khi áp dụng bất kỳ phương thức bảo quản mẫu nào.

## **7 Hiệu chuẩn thiết bị đo**

### **7.1 Mục đích**

Tốt nhất là điều chỉnh tín hiệu thiết bị đo ở mỗi bước sóng, sao cho đối với mỗi hàm lượng của thành phần cần đo thì số đọc trên thiết bị đo cũng gần bằng với giá trị đo được bằng phương pháp chuẩn.

Sử dụng các phương pháp chuẩn đã được quốc tế chấp nhận để xác định chất béo, protein và lactoza; nghĩa là TCVN 6508 : 1999 (ISO 1211), và phần 1, 2, 4 và phần 5 của ISO 8968, và phần 1 và 2 của TCVN 4550-88 (ISO 5765) tương ứng. Vì những lý do thực tiễn, hoặc dưới những hoàn cảnh nào đó có thể áp dụng các phương pháp thay thế khác, chẳng hạn như: phương pháp dùng butyrometer của Gerben để xác định hàm lượng chất béo và phương pháp Amido Black để xác định hàm lượng protein với điều kiện là phải thường xuyên được kiểm tra bằng cách so sánh với các phương pháp chuẩn.

Vì các thiết bị đo đo hồng ngoại có các hệ thống hiệu chuẩn khác nhau, nên không thể đưa ra một qui trình đặc trưng. Nhà sản xuất sẽ cung cấp các phương tiện cho các phòng thí nghiệm để điều chỉnh thiết bị đo cho phù hợp với các yêu cầu nêu trong 7.2.

## 7.2 Kiểm tra hiệu chuẩn ban đầu đối với chất béo, protein và lactoza

### 7.2.1 Mẫu sữa

Lấy một lượng mẫu nhất định đại diện cho toàn bộ quần thể gia súc trong khu vực thí nghiệm và thành phần của chúng thay đổi đều trên khoảng nồng độ của từng thành phần được xác định, nghĩa là, hàm lượng chất béo khoảng 2,5% đến 5,0 % và protein khoảng 2,5% đến 4,0%. Để đo các mẫu của những con bò riêng biệt, phần khối lượng chất béo nên ở khoảng 7,0% và protein nên ở khoảng 5,0%. Thông thường, số lượng mẫu như thế nên từ 15 mẫu và hiếm khi quá 50 mẫu.

Nếu cần, có thể cho thêm chất bảo quản mà phòng thí nghiệm thường dùng vào mẫu thử. Mẫu không nên có dấu hiệu hư hỏng về phương diện vật lý; nên loại bỏ các mẫu chứa nhiều hơn  $10^6$  tế bào soma trên 1 mililit.

Chú thích – Các mẫu đại diện là một loạt mẫu hiệu chuẩn, đại diện của quần thể được chọn, có tính đến tất cả các hiện tượng sinh học và môi trường đã được biết hoặc chưa biết mà gây ảnh hưởng đến độ nhạy của thiết bị đo đối với nồng độ chất béo, protein và lactoza. Danh mục các hiện tượng đã biết sẽ tạo cơ sở phân thiết kế kiểm soát loạt mẫu. Các mẫu được chọn ngẫu nhiên mô hình hoá cho hiện tượng chưa được biết; chúng tạo nên phần tự nhiên của loạt mẫu.

### 7.2.2 Phân tích

Phân tích hai mẫu đồng thời đối với từng mẫu riêng lẻ dùng phương pháp chuẩn để có các kết quả  $y_i$ , và phân tích ba mẫu đồng thời dùng thiết bị đo đang được hiệu chuẩn để có các kết quả  $x_i$ .

### 7.2.3 Tính toán

Tính giá trị trung bình của  $x$  và của  $y$  đối với mẫu kép cho từng mẫu riêng biệt và dựng biểu đồ của các giá trị thu được ( $x$  và  $y$ ) trên biểu đồ để kiểm tra xem có giá trị ngoại lai không; nếu cần, lặp lại phép phân tích.

Đối với mỗi thành phần, xác định phương trình hồi qui:  $y = bx + a$  và độ lệch chuẩn dư ( $s_{yx}$ ) từ phép hồi qui. Giá trị  $s_{yx}$  không được vượt quá 0,06% đối với mỗi thành phần.

Sau đó, hiệu chuẩn thiết bị đo theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Quy trình tiêu chuẩn hoá này được thừa nhận là cho mức tin cậy rất cao trong hiệu chuẩn thiết bị đo, nhưng giá thành tương đối cao. Có thể dùng các phương pháp đơn giản hơn sau đây, mặc dù có thể hiệu chuẩn sẽ kém chính xác hơn.

a) Phòng thí nghiệm trung tâm có thể tiến hành hiệu chuẩn sử dụng một số mẫu sữa chuẩn có thành phần đã được xác định từ thiết bị đo chính mà chúng đã được chuẩn hoá tại phòng thí nghiệm trung tâm theo qui trình đã định. Các mẫu hiệu chuẩn "chuyển tiếp" này nên bao trùm toàn bộ phạm vi dao động của hàm lượng chất béo, protein và lactoza và tốt nhất là không có sự liên quan nào giữa các thành phần. Các mẫu có thể chuẩn bị theo qui trình mô tả trong phụ lục C.

b) Thay vì phân tích từng mẫu riêng rẽ của đàn bò, có thể tập trung chúng thành 6 mẫu đến 8 mẫu với các nồng độ khác nhau.

c) Từ mẫu sữa rời đại diện, có thể chuẩn bị 10 mẫu đến 12 mẫu ở các nồng độ khác nhau bằng cách điều chỉnh hàm lượng chất béo và protein theo các tỷ lệ khác nhau của sữa gầy, vàng kem, dịch siêu lọc, và chất siêu lọc (xem phụ lục C).

### 7.3 Duy trì hiệu chuẩn và khẳng định tính hiệu lực của hiệu chuẩn

Vì sử dụng nhiều loại hiệu chuẩn thiết bị đo khác nhau, do sở thích, lựa chọn hoặc bắt buộc, nên điều quan trọng để khẳng định tính chính xác của hiệu chuẩn đối với thiết bị đo thường được thực hiện bằng các phép thử hoá học chuẩn trên các mẫu đã chọn một cách ngẫu nhiên.

Mỗi tuần một lần, hoặc thường xuyên hơn khi có thay đổi thức ăn của gia súc thì lấy một lượng nhỏ mẫu sữa rời đại diện (thí dụ 4 đến 5) và tiến hành xác định bằng phương pháp chuẩn và bằng thiết bị đo đối với từng thành phần.

Nếu trung bình của chênh lệch đại số giữa kết quả xác định bằng thiết bị đo và kết quả xác định bằng phương pháp chuẩn cao hơn so với độ chính xác dự kiến của thiết bị đo (xem 12.3) thì điều chỉnh lại hiệu chuẩn. Đây là cách duy nhất để khẳng định việc hiệu chuẩn theo cách đã chọn áp dụng đối với thiết bị đo bằng các mẫu hiệu chuẩn là đúng như dự kiến so với kết quả thu được trên các mẫu được thử thông thường.

Ba tháng một lần dùng phương pháp qui định trong 7.2 để kiểm tra hiệu chuẩn của thiết bị đo. Việc hiệu chuẩn phải được kiểm tra mỗi khi bảo dưỡng hoặc thay thế bất kỳ bộ phận chính nào của thiết bị (như cuvet, bộ đồng hoá, bộ lọc giao thoa).

## 8 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không phải là một phần của phương pháp qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo phương pháp qui định trong TCVN 6400 : 1998 (ISO 707).

Quan trọng là phòng thí nghiệm nhận được đúng mẫu đại diện và không bị hư hỏng hoặc thay đổi trong quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

## 9 Độ đồng nhất của các mẫu thử

Để kiểm tra độ đồng nhất của các phần mẫu thử, chuẩn bị các phần mẫu thử để kiểm tra hiệu chuẩn, thử nghiệm vòng tròn các mẫu sữa hoặc các mẫu kiểm soát theo cách sau đây. Từ cùng một mẫu chọn ngẫu nhiên 5% các phần mẫu thử. Đo các phần mẫu thử theo chuỗi xác định đơn trên thiết bị đo hồng ngoại (IR). Tính độ lệch tiêu chuẩn trên các kết quả xác định chất béo. Nếu giá trị này nhỏ hơn 0,02 thì độ đồng nhất là chấp nhận được.

## 10 Tiến hành xác định

Tiến hành đo hàm lượng chất béo, protein và lactoza của các mẫu sữa theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Trước khi phân tích (đồng hoá), mẫu thử nên được làm nóng đến  $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  và trộn kỹ bằng cách đảo chiều hộp đựng.

## 11 Kiểm tra hàng ngày độ ổn định của thiết bị đo

### 11.1 Qui định chung

Giả sử các đặc tính hoá lý chính của sữa kiểm soát (chuẩn chứng) không thay đổi trong quá trình bảo quản, thì việc kiểm tra bằng cách phân tích đều đặn một hay nhiều mẫu sữa kiểm soát (chuẩn chứng) đều cho kết quả nằm trong dung sai chấp nhận được. Thử nghiệm này có tác dụng không chỉ đối với việc kiểm tra độ ổn định của thiết bị đo trong một ngày làm việc mà còn kiểm tra độ ổn định từ ngày này đến ngày khác giữa hai lần chuẩn hoá thiết bị đo theo phương pháp chuẩn.

### 11.2 Chuẩn bị và bảo quản các mẫu con

Chọn một mẫu sữa có thành phần trung bình và chuẩn bị một cách cẩn thận trong khi vẫn khuấy liên tục, mẫu này có đủ số lượng mẫu con cần thiết cho một hoặc nhiều ngày làm việc. Giữ mẫu con có chất bảo quản thích hợp ở  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sữa tiệt trùng được bảo quản có chất lượng tốt hoặc sữa xử lý UHT có thể bảo quản an toàn được trong 2 tuần. Chỉ sử dụng sữa đã được đồng hoá khi hiệu quả của việc đồng hoá đã được kiểm tra.



### 11.3 Phân tích các mẫu kiểm soát

Phân tích các mẫu kiểm soát theo cách thông thường.

#### 11.4 Giám sát qui trình phân tích

11.4.1 Để giám sát chất lượng của toàn bộ qui trình phân tích, kể cả độ ổn định của thiết bị, dựng biểu đồ kiểm soát theo thí dụ dưới đây.

- a) Xác định cẩn thận giá trị trung bình ( $m_0$ ) của các giá trị đọc được trên thiết bị đo của sữa kiểm soát.
- b) Chuẩn bị biểu đồ kiểm soát (xem hình 1) với:
  - đường thẳng ở giữa biểu đồ tương ứng với giá trị chuẩn  $m_0$ ;
  - “dải tin cậy” trên và dưới 99% tại  $m_0 \pm M_C$  (khoảng tin cậy trung bình);
  - “đường đặc biệt” trên và dưới 99% tại  $m_0 \pm I_C$  (khoảng tin cậy đặc biệt).
- c) Vẽ trên biểu đồ kiểm soát từng kết quả đặc biệt đối với mẫu kiểm soát và các kết quả trung bình lũy tích ( $m$ ) của các kết quả của các mẫu được phân tích.
- d) Thiết bị được coi là ổn định với điều kiện:
  - Các kết quả đặc biệt nằm trong khoảng tin cậy đặc biệt  $I_C$ ;
  - Trung bình lũy tích ( $m$ ) nằm trong khoảng tin cậy trung bình  $M_C$ .
- e) Chọn các giá trị  $I_C$  và  $M_C$  dựa trên độ lệch chuẩn của độ lặp lại  $s_r$ ; độ lệch chuẩn của độ tái lập  $s_R$  trong ngày được tính gần bằng hai lần  $s_r$  (xem 11.2):  $s_R = 2 \times s_r$ .

Sau đó, dựa trên xác suất tin cậy được chấp nhận xác định  $I_C$  từ  $s_R$ , bằng công thức:

$$I_C = t \times s_R$$

trong đó  $t$  là hệ số phụ thuộc vào mức tin cậy, như sau:

Mức tin cậy	$t$
99 %	2,58
98 %	2,33
95 %	1,96
90 %	1,65
80 %	1,28