

TCVN TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

TCVN 9665:2013
ISO 26462:2010

Xuất bản lần 1

**SỮA – XÁC ĐỊNH HÀM LƯỢNG LACTOSE –
PHƯƠNG PHÁP ENZYM ĐO CHÊNH LỆCH ĐỘ pH**

Milk – Determination of lactose content – Enzymatic method using difference in pH

HÀ NỘI - 2013

Lời nói đầu

TCVN 9665:2013 hoàn toàn tương đương với ISO 26462:2010;

TCVN 9665:2013 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC/F12 *Sữa và sản phẩm sữa* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo Lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Sữa - Xác định hàm lượng lactose - Phương pháp enzym đo chênh lệch độ pH

Milk - Determination of lactose content - Enzymatic method using difference in pH

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này quy định phương pháp enzym để xác định hàm lượng lactose trong sữa và sữa hoàn nguyên bằng cách đo chênh lệch độ pH (phép đo pH vi sai).

2 Thuật ngữ và định nghĩa

Trong tiêu chuẩn này áp dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau:

2.1

Hàm lượng lactose trong sữa (lactose content in milk)

Nồng độ chất của các hợp chất xác định được theo quy trình quy định trong tiêu chuẩn này.

CHÚ THÍCH: Hàm lượng lactose của sữa được biểu thị bằng milimol trên lit. Để quy đổi kết quả sang các đơn vị khác xem Bảng 1.

2.2

Đơn vị của hoạt độ enzym (unit of enzyme activity)

Đơn vị quốc tế (international unit)

Đơn vị chuẩn (standard unit)

U (U)

Lượng enzym xúc tác để chuyển một micromol cơ chất trong một phút dưới các điều kiện chuẩn.

3 Nguyên tắc

β -galactosidase được bổ sung vào để tách lactose thành glucose và galactose. Ở pH 7,8 glucose được phosphoryl hóa bởi glucokinase, do đó proton được giải phóng ra sẽ làm thay đổi pH. Sự thay đổi của độ pH sẽ biến thiên như một hàm số của hàm lượng lactose trong mẫu thử và được đo bằng máy phân tích pH vi sai.

4 Thuốc thử

Trong quá trình phân tích chỉ sử dụng thuốc thử loại phân tích và nước cất hoặc nước đã khử khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có quy định khác.

4.1 Dung dịch đệm, pH 7,8

Hòa tan 0,242 g tris(hydroxymethyl)methylamine (tris), 0,787 g muối dinatri adenosine 5'-triphosphat (ATP), 0,304 g trinatri phosphat ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 0,009 g natri hydroxit (NaOH), 0,203 g magie clorua ngậm sáu phân tử nước ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 2 g octylphenoxypolyethoxyethanol [ví dụ Triton X100¹⁾], 0,820 g kali clorua (KCl) và 0,010 g 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol [ví dụ Bronopol¹⁾] trong cốc có mỏ dung tích 100 ml có chứa 50 ml nước đồng thời khuấy liên tục. Chính pH cuối cùng đến $7,8 \pm 0,1$, nếu cần. Chuyển hỗn hợp sang bình định mức một vạch 100 ml (5.4), thêm nước đến vạch và trộn.

Khi được bảo quản ở nhiệt độ 4 °C thì dung dịch này có thể bền trong 2 tháng.

4.2 Dung dịch enzym

4.2.1 Dung dịch enzym glucokinase

Hòa tan 2,57 mg glucokinase-1 đông khô (GK1; 1 mg = 350 U; EC 2.7.1.2) vào 3 ml glyxerol 50 % phân thể tích. Hoạt độ của dung dịch glucokinase thu được phải là 290 U/ml \pm 30 U/ml (xem 2.2).

Khi được bảo quản ở 4 °C, dung dịch enzym glucokinase có thể bền trong 6 tháng.

4.2.2 Dung dịch enzym β -Galactosidase

Hòa tan dịch chiết enzym β -galactosidase đậm đặc (EC 3.2.1.23) đã tinh sạch ra khỏi các enzym bị nhiễm bằng glyxerol 50 % thể tích. Hoạt độ của dung dịch enzym β -galactosidase thu được phải là 1500 U/ml \pm 200 U/ml.

Khi được bảo quản ở 4 °C, dung dịch enzym β -galactosidase có thể bền trong 6 tháng.

4.3 Dung dịch chuẩn lactose (150 mmol/l)

Trước khi sử dụng, xác định hàm lượng nước của bột lactose ngậm một phân tử nước bằng phương pháp chuẩn độ Karl Fischer, để hiệu chỉnh lượng lactose ngậm một phân tử nước được dùng cho dung dịch chuẩn lactose. Việc hiệu chỉnh phải dựa trên tỷ lệ phần trăm hàm lượng nước xác định được để chuẩn bị dung dịch chuẩn lactose chứa 5,404 g lactose ngậm một phân tử nước trong 100 ml dung dịch.

¹⁾ Ví dụ về sản phẩm thích hợp có bán sẵn. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và không ấn định phải sử dụng chúng.

Hòa tan 5,404 g bột lactose ngậm một phân tử nước, 0,745 g kali clorua (KCl) và 0,01 g 2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol [ví dụ Bronopol¹⁾] vào dung dịch đệm pH 7,8 (4.1) đựng trong bình định mức một vạch 100 ml (5.4). Thêm nước đến vạch và trộn.

Khi được bảo quản ở 4 °C thì dung dịch chuẩn lactose có thể bền trong 6 tháng.

4.4 Dung dịch rửa

Hòa tan 1,742 g dikali monohydrogenphosphat (K_2HPO_4), 1,361 g kali dihydrogenphosphat (KH_2PO_4), 7,455 g kali clorua (KCl), 1,00 g natri azit (NaN_3), 2 g octylphenoxypolyethoxyethanol, 2 g polyoxyethyleneglycol dodecylether [ví dụ Brij 35¹⁾] và 3 g lauryl maltoside [e.g. LM¹⁾] vào bình định mức một vạch 1 000 ml (5.4). Thêm nước đến vạch và trộn.

Khi được bảo quản ở nhiệt độ phòng thì dung dịch rửa có thể bền trong 1 năm.

4.5 Dung dịch phục hồi sơ bộ

Sử dụng dung dịch axit clohydric (HCl) 0,1 mol/l làm dung dịch phục hồi.

Khi được bảo quản ở nhiệt độ phòng, dung dịch phục hồi có thể bền trong 1 năm.

4.6 Dung dịch phục hồi toàn bộ

CẢNH BÁO – Việc sử dụng dung dịch natri florua (NaF) riêng rẽ hoặc kết hợp với HCl có thể ảnh hưởng đến sức khỏe do có thể hít phải và/hoặc hấp thụ qua da. Tiêu chuẩn này không đề cập đến tất cả các vấn đề an toàn, nếu có thì chỉ liên quan đến việc áp dụng. Trách nhiệm của người áp dụng tiêu chuẩn này là thiết lập các thao tác an toàn và bảo đảm phù hợp với mọi quy định của quốc gia.

Hòa tan 30 g axit nitric có $w(HNO_3) \approx 69\%$ khối lượng, 30 g axit clohydric (HCl) có $w(HCl) \approx 37\%$ khối lượng, 30 g natri florua (NaF) và 1 g octylphenoxypolyethoxyethanol vào bình định mức một vạch 1 000 ml (5.6). Thêm nước đến vạch và trộn.

Nếu được bảo quản trong bình chứa không ăn mòn ở nhiệt độ phòng thì dung dịch này có thể bền trong 1 năm.

5 Thiết bị, dụng cụ

Sử dụng các thiết bị, dụng cụ thông thường của phòng thử nghiệm và cụ thể các thiết bị, dụng cụ sau:

5.1 Cân phân tích, có khả năng cân chính xác đến 1 mg.

5.2 Micropipet, dung tích 20 μ l, phù hợp với quy định của ISO 7550^[5], có thể thay đổi dung tích lấy.

TCVN 9665:2013

5.3 Nồi cách thủy, có khả năng duy trì nhiệt độ $38\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.4 Bình định mức một vạch, dung tích 100 ml và 1 000 ml, phù hợp với loại A trong TCVN 7153 (ISO 1042)^[2].

5.5 Thiết bị đo pH vi sai, sơ đồ khối được nêu trong Hình A.1.

Thiết bị đo pH vi sai gồm có bơm nhu động để bơm tuần hoàn dung dịch, khoang trộn, hai điện cực mao quản dòng chảy bằng thủy tinh (E1 và E2) và hệ thống thiết bị đo bằng điện tử.

5.6 Bình định mức một vạch, dung tích 1 000 ml và làm bằng chất liệu chống ăn mòn để bảo quản dung dịch phục hồi toàn bộ có tính ăn mòn mạnh (4.6).

6 Lấy mẫu

Việc lấy mẫu không được quy định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 6400 (ISO 707)^[1].

Mẫu gửi đến phòng thử nghiệm phải đúng là mẫu đại diện. Mẫu không bị hư hỏng hoặc không bị thay đổi trong suốt quá trình vận chuyển hoặc bảo quản.

7 Chuẩn bị mẫu thử

Đun nóng mẫu thử đến $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong nồi cách thủy (5.3), có khuấy liên tục. Để mẫu thử nguội đến $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, trước khi chuẩn bị phần mẫu thử.

8 Cách tiến hành

8.1 Yêu cầu chung

Vì có nhiều kiểu thiết bị đo pH vi sai (5.5) khác nhau về thiết kế và vận hành, nên người thao tác phải tuân thủ nghiêm ngặt hướng dẫn của nhà sản xuất về cài đặt, hiệu chuẩn và vận hành thiết bị. Bật máy và để cho các điều kiện hoạt động ổn định.

Nếu thời gian giữa hai lần đo liên tiếp bằng hoặc lớn hơn 5 min thì thay dung dịch đệm mới (4.1) trong khoang trộn của thiết bị.

8.2 Phép thử mẫu trắng

Sử dụng micropipet (5.2), thêm 20 μl dung dịch enzym glucokinase (4.2.1) vào khoang trộn của thiết bị đo pH vi sai (5.5).

Pha loãng dung dịch enzym bằng dung dịch đệm (4.1) để có tổng thể tích đạt 1 200 μl và trộn.

Đổ đầy dung dịch đệm và hỗn hợp enzym glucokinase thu được vào hai điện cực mao quản dòng chảy thủy tinh E1 và E2 của thiết bị đo pH vi sai (5.5) (xem Hình A.1). Đo độ chênh lệch pH, D_1 , giữa hai điện cực. Sự chênh lệch giữa hai điện cực phải nằm trong khoảng $0 \text{ mV} \pm 150 \text{ mV}$, trong đó mV là đơn vị milli-pH.

Sử dụng micropipet khác, thêm 20 μl dung dịch enzym β -galactosidase (4.2.2) vào dung dịch đệm và hỗn hợp glucokinase chứa trong khoang trộn và trộn. Chỉ đổ đầy điện cực E2 bằng hỗn hợp của dung dịch đệm, glucokinase và β -galactosidase. Đo lại độ chênh lệch pH, D_2 , giữa hai điện cực.

Tính độ chênh lệch pH đối với mẫu trắng, ΔD_0 , theo công thức (1):

$$\Delta D_0 = D_2 - D_1 \quad (1)$$

Trong đó:

D_1 là độ chênh lệch pH giữa hai điện cực chứa đầy dung dịch đệm và hỗn hợp glucokinase;

D_2 là độ chênh lệch pH giữa điện cực E1 chứa đầy dung dịch đệm và hỗn hợp glucokinase và điện cực E2 chứa hỗn hợp gồm dung dịch đệm, glucokinase, và β -galactosidase.

Độ chênh lệch, ΔD_0 , phải nằm trong dải từ -20 đơn vị mV đến 4 đơn vị mV, trong khi độ chênh lệch giữa hai lần đo liên tục phải $\leq 1,0$ đơn vị mV.

Nếu không thu được những kết quả như thế, thì kiểm tra dung dịch đệm và thực hiện lại quy trình nêu trên. Nếu sau khi đã thực hiện lại mà kết quả vẫn không đáp ứng yêu cầu, thì rửa sạch các điện cực (xem 8.7) và thực hiện lại phép thử mẫu trắng quy định trong 4 đoạn đầu của Điều này.

8.3 Dụng đường chuẩn

8.3.1 Chênh lệch pH của dung dịch hiệu chuẩn

Dùng micropipet (5.2) lấy 20 μl dung dịch chuẩn lactose (4.3) và dùng một micropipet khác lấy 20 μl dung dịch enzym glucokinase (4.2.1) cho vào khoang trộn của thiết bị đo pH vi sai (5.5). Pha loãng bằng dung dịch đệm (4.1) để đạt tổng thể tích là 1 200 μl . Đổ đầy hỗn hợp dung dịch đệm, dung dịch chuẩn lactose và glucokinase thu được vào hai điện cực E1 và E2. Đo chênh lệch pH, D_3 , giữa hai điện cực.

Dùng micropipet lấy 20 μl dung dịch enzym β -galactosidase (4.2.2) cho vào hỗn hợp của các dung dịch đệm, dung dịch chuẩn lactose và glucokinase có sẵn trong khoang trộn và trộn. Đổ đầy điện cực E2 hỗn hợp của dung dịch đệm, dung dịch chuẩn lactose, glucokinase và β -galactosidase. Sau khi phản ứng enzym kết thúc, đo độ chênh lệch pH, D_4 , giữa hai điện cực.

Tính độ chênh lệch pH đối với dung dịch hiệu chuẩn, ΔD_c , theo công thức (2):

$$\Delta D_c = (D_4 - D_3) - \Delta D_0 \quad (2)$$

Trong đó:

D_3 là độ chênh lệch pH giữa hai điện cực khi cả hai điện cực chứa đầy hỗn hợp dung dịch đệm, dung dịch chuẩn lactose và glucokinase (8.3.1);

D_4 là độ chênh lệch pH giữa các điện cực khi một điện cực chứa đầy hỗn hợp của dung dịch đệm, dung dịch chuẩn lactose, glucokinase và điện cực khác chứa đầy hỗn hợp của dung dịch đệm, dung dịch chuẩn lactose, glucokinase và β -galactosidase (8.3.1).

8.3.2 Độ dốc của đường chuẩn

Tính độ dốc, s_c , của đường chuẩn, biểu thị bằng millimol trên lit đơn vị mPH, theo công thức (3):

$$s_c = \frac{c_L}{\Delta D_c} \quad (3)$$

trong đó c_L là nồng độ của dung dịch chuẩn lactose (4.3), tính bằng millimol trên lit (mmol/l).

8.4 Kiểm tra đường chuẩn

Kiểm tra đường chuẩn bằng cách phân tích 20 μ l dung dịch chuẩn lactose (4.3) theo quy trình trong 8.5. Kết quả xác định lactose thu được phải nằm trong khoảng từ 148,5 mmol/l đến 151,5 mmol/l. Nếu các giá trị này không đáp ứng thì dựng lại đường chuẩn.

8.5 Tiến hành xác định

Vận hành thiết bị và đưa phần mẫu thử vào theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Dùng một micropipet (5.2), lấy 20 μ l mẫu thử (Điều 7) và dùng một micropipet khác lấy 20 μ l dung dịch enzym glucokinase (4.2.1) cho vào khoang trộn của thiết bị đo pH vi sai (5.5). Pha loãng bằng dung dịch đệm (4.1) để đạt tổng thể tích là 1 200 μ l. Đổ đầy hỗn hợp dung dịch đệm, phần mẫu thử và glucokinase thu được vào hai điện cực E1 và E2. Đo độ chênh lệch pH, D_5 , giữa hai điện cực.

Dùng một micropipet khác, lấy 20 μ l dung dịch enzym β -galactosidase (4.2.2) cho vào hỗn hợp của dung dịch đệm, phần mẫu thử và glucokinase chứa trong khoang trộn và trộn. Đổ đầy điện cực E2 hỗn hợp của dung dịch đệm, phần mẫu thử, glucokinase và β -galactosidase.

Sau khi phản ứng enzym kết thúc, đo độ chênh lệch pH, D_6 , giữa hai điện cực.

CHÚ THÍCH: Phản ứng enzym kết thúc khi độ chênh lệch pH không vượt quá 1 đơn vị mPH trong 1 min cuối.

8.6 Kiểm tra độ ổn định

Sau khi phân tích xong không quá 30 mẫu thử và tại thời điểm kết thúc của mỗi dãy phân tích, cần phân tích hai dung dịch mẫu trắng để kiểm tra điểm zero và phân tích 20 μl dung dịch chuẩn lactose (4.3) sử dụng quy trình trong (8.5) để kiểm tra hiệu chuẩn.

Giá trị điểm zero của lần thứ hai phải nằm trong phạm vi $0 \text{ mmol/l} \pm 1,5 \text{ mmol/l}$ và giá trị chuẩn phải nằm trong phạm vi từ 148,5 mmol/l đến 151,5 mmol/l. Nếu các giá trị thu được nằm ngoài phạm vi này thì cần tiến hành lại cả hai quy trình: xác định mẫu trắng (8.2) và quy trình hiệu chuẩn (8.3).

8.7 Quy trình rửa

Rửa các điện cực và khoang trộn của thiết bị đo pH vi sai (5.5), thay dung dịch đệm (xem thêm Phụ lục A) bằng dung dịch rửa (4.4). Nếu thiết bị hoạt động hàng ngày thì để các điện cực ngâm trong dung dịch rửa đến lần sử dụng sau, đồng thời cứ sau 120 min thay mới dung dịch rửa. Nếu thiết bị không hoạt động hàng ngày thì xử lý các điện cực theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

9 Bảo dưỡng các điện cực

9.1 Phục hồi sơ bộ

Ít nhất mỗi tuần rửa các điện cực và khoang trộn của thiết bị đo pH vi sai (5.5), thay dung dịch đệm (xem thêm Phụ lục A) bằng dung dịch phục hồi sơ bộ (4.5), sau đó thực hiện quy trình rửa trong 8.7, lần này thay dung dịch phục hồi bằng dung dịch rửa (4.4).

9.2 Phục hồi toàn bộ

Tối thiểu ba tháng một lần (hoặc sau mỗi 500 mẫu phân tích với tần suất thiết bị hoạt động thấp) hoặc trước thời hạn này, nếu cần, phải rửa các điện cực và khoang trộn của thiết bị đo pH vi sai (5.5), thay dung dịch đệm mới (xem thêm Phụ lục A) bằng dung dịch phục hồi toàn bộ (4.6).

Sau khi phục hồi toàn bộ, tráng thiết bị bằng cách thay dung dịch phục hồi toàn bộ bằng nước trước khi bắt đầu quy trình rửa tại 8.7 khi đó thay nước bằng dung dịch rửa (4.4). Trong khi dung dịch rửa hoạt động, thêm một phần mẫu thử sữa vào khoang trộn và thực hiện thêm ba lần quy trình rửa để tráng phủ các điện cực.

10 Tính và biểu thị kết quả

10.1 Tính kết quả

Tính hàm lượng lactose, $c_{L,1}$, biểu thị bằng millimol trên lit mẫu thử, theo Công thức (4):

$$c_{L,t} = s_c [(D_6 - D_5) - \Delta D_0] \quad (4)$$

Trong đó:

D_5 là độ chênh lệch pH giữa hai điện cực khi cả hai điện cực chứa đầy hỗn hợp dung dịch đệm, mẫu thử và glucokinase (8.5);

D_6 là độ chênh lệch pH giữa hai điện cực khi một điện cực chứa đầy hỗn hợp dung dịch đệm, phần mẫu thử và glucokinase và điện cực thứ hai chứa đầy hỗn hợp của dung dịch đệm, phần mẫu thử và glucokinase và β -galactosidase (8.5).

10.2 Biểu thị kết quả

Biểu thị kết quả đến hai chữ số thập phân.

Bảng 1 dùng để quy đổi trên các cơ sở khác nhau để biểu thị hàm lượng lactose.

Bảng 1 – Bảng quy đổi

Loại	Hàm lượng lactose, $c_{L,t}$		
	Tính theo nồng độ chất mmol/l	Tính theo nồng độ khối lượng g/100 ml	Tính theo phần khối lượng g/100 g
Lactose ngậm một phân tử nước	c_L	$\rho = c_L \times 0,036\ 03$	$w = (c_L \times 0,036\ 03)/d^a$
Lactose khan	$c_L \times 0,95$	$\rho = c_L \times 0,036\ 03 \times 0,95$	$w = (c_L \times 0,036\ 03 \times 0,95)/d^a$

^a Trong đó d là tỷ trọng tương đối của sữa.

11 Độ chụm

11.1 Phép thử liên phòng thử nghiệm

Các giá trị về giới hạn lặp lại và giới hạn tái lập được biểu thị ở mức xác suất 95 % và có thể không áp dụng được cho các dải nồng độ và các chất nền khác với các dải nồng độ và chất nền đã nêu.

11.2 Độ lặp lại

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập, riêng rẽ, thu được khi sử dụng cùng một phương pháp thử, tiến hành trên vật thử giống hệt nhau, trong cùng một phòng thử nghiệm, do một người phân tích, sử dụng cùng thiết bị, trong khoảng thời gian ngắn, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn 2,96 mmol lactose ngậm một phân tử nước trên lít.

11.3 Độ tái lập

Chênh lệch tuyệt đối giữa các kết quả của hai phép thử độc lập, riêng rẽ, thu được khi áp dụng cùng một phương pháp, tiến hành trên cùng mẫu thử, thực hiện trong các phòng thử nghiệm khác nhau, do các kỹ thuật viên khác nhau thực hiện, sử dụng các thiết bị khác nhau, không được quá 5 % các trường hợp lớn hơn 3,13 mmol lactose ngậm một phân tử nước trên lít.

12 Báo cáo thử nghiệm

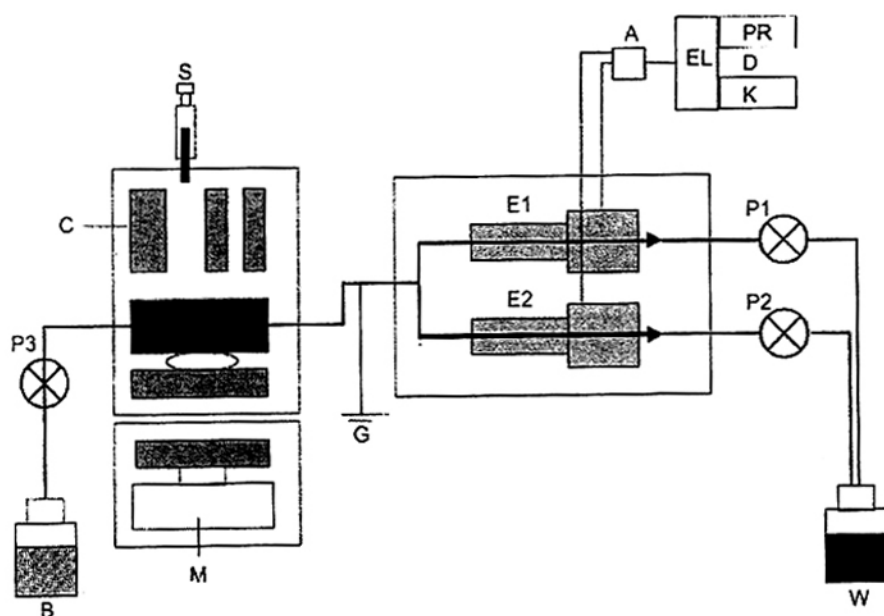
Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- a) mọi thông tin cần thiết về nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- b) phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- c) phương pháp thử đã sử dụng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- d) mọi điều kiện thao tác không quy định trong tiêu chuẩn này, hoặc được coi là tùy chọn, cùng với mọi tình huống bất thường có thể ảnh hưởng đến kết quả.
- e) kết quả thử nghiệm thu được;
- f) nếu kiểm tra về độ lặp lại thì ghi kết quả cuối cùng thu được.

Phụ lục A

(Tham khảo)

Sơ đồ khối của thiết bị đo pH vi sai



CHÚ DẪN:

A	khuếch đại vi sai
B	dung dịch đệm
C	khoang trộn
D	màn hình
E1	điện cực mao quản thủy tinh
E2	điện cực mao quản thủy tinh
EL	cụm điện tử - Máy vi tính - CPU
G	dây (điện) tiếp đất
K	bàn phím
M	máy khuấy từ
P1	bơm nhu động 1
P2	bơm nhu động 2
P3	bơm nhu động 3
PR	máy in
S	micropipet để bơm mẫu và enzym huyền phù
W	nước thải

Hình A.1 – Thiết bị đo pH vi sai

Phụ lục B

(Tham khảo)

Nghiên cứu cộng tác

Nghiên cứu cộng tác quốc tế với sự tham gia của 11 phòng thử nghiệm, thực hiện trên sáu mẫu thử mù lặp lại hai lần. Các kết quả thu được từ các phòng thử nghiệm được biểu thị bằng gam lactose ngậm một phân tử nước trên 100 ml; chuyển đổi giá trị sang milimol lactose ngậm một phân tử nước trên lit cũng được liệt kê.

Các mẫu thử dùng trong nghiên cứu này được CECALAIT, Poligny, Pháp, chuẩn bị và kết quả đã được xử lý thống kê theo TCVN 6910-1 (ISO 5725-1)^[1] và TCVN 6910-2 (ISO 5725-2)^[4] để có được các dữ liệu về độ chụm nêu trong Bảng B.1.

Bảng B.1 – Kết quả của nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Thông số	Mẫu						Trung bình
	1	2	3	4	5	6	
Số lượng phòng thử nghiệm còn lại sau khi trừ ngoại lệ ^a	11	11	11	10	11	10	—
Giá trị trung bình, g/100 ml	4,948	5,072	4,813	5,234	4,700	4,525	—
Giá trị trung bình, mmol/l	137,33	140,76	133,58	145,28	130,45	125,58	—
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , g/100 ml	0,038	0,043	0,046	0,029	0,038	0,028	0,038
Độ lệch chuẩn lặp lại, s_r , mmol/l	1,06	1,20	1,27	0,81	1,06	0,78	1,05
Giới hạn lặp lại, r ($2,8 \times s_r$), g/100 ml	0,108	0,122	0,130	0,083	0,108	0,080	0,107
Giới hạn lặp lại, r ($2,8 \times s_r$), mmol/l	3,00	3,40	3,61	2,30	2,99	2,21	2,96
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , g/100 ml	0,041	0,043	0,046	0,030	0,041	0,036	0,040
Độ lệch chuẩn tái lập, s_R , mmol/l	1,13	1,20	1,28	0,84	1,13	1,00	1,11
Giới hạn tái lập, R ($2,8 \times s_R$), g/100 ml	0,115	0,122	0,131	0,086	0,116	0,102	0,113
Giới hạn tái lập, R ($2,8 \times s_R$), mmol/l	3,19	3,40	3,63	2,38	3,21	2,83	3,13
Hệ số biến thiên lặp lại, $C_{v,r}$, %	0,772	0,853	0,954	0,561	0,811	0,623	—
Hệ số biến thiên tái lập, $C_{v,R}$, %	0,821	0,853	0,960	0,580	0,870	0,797	—

^a Sau khi loại trừ 1 % theo Grubbs và Cochran.

Phụ lục C
(Tham khảo)

So sánh giữa phương pháp đo pH và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)

Để thu được dữ liệu chứng tỏ có hay không sự khác nhau giữa kết quả thu được bằng phương pháp đo pH quy định trong tiêu chuẩn này và phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) quy định trong TCVN 8107 (ISO 22662)^[6], phép thử so sánh đã được thực hiện năm 2006 với sự tham gia của chính các phòng thử nghiệm đã nghiên cứu cộng tác nêu trong Phụ lục B.

Phép thử so sánh với sự tham gia của 11 phòng thử nghiệm, đã thực hiện trên sáu mẫu thử sử dụng phương pháp đo pH. Năm phòng thử nghiệm thực hiện bằng phương pháp HPLC trên sáu mẫu tương tự. Kết quả thu được nêu trong Bảng C.1.

Bảng C.1 – Kết quả của phép thử so sánh

Thông số	Mẫu						Trung bình
	1	2	3	4	5	6	
Hàm lượng lactose bằng phương pháp đo pH, ρ_{pH} , g/100 ml	4,948	5,072	4,813	5,234	4,700	4,525	—
Hàm lượng lactose bằng phương pháp HPLC, ρ_{HPLC} , g/100 ml	5,021	5,140	4,878	5,289	4,745	4,581	—
Chênh lệch, $\Delta\rho = \rho_{pH} - \rho_{HPLC}$	-0,073	-0,068	-0,065	-0,054	-0,045	-0,056	-0,060

Kết quả thử so sánh cho thấy sự chênh lệch trung bình là $-0,060$ g/100 ml giữa hai phương pháp.

Các giá trị thử nghiệm thu được cũng được tính lại dựa vào đường chuẩn (tất cả các phòng thử nghiệm cùng phân tích một dung dịch lactose) nhằm giảm sai số hiệu chuẩn, nhưng các kết quả thu được như vậy cũng cho thấy sự khác nhau tương tự.

CHÚ THÍCH: Năm 2007 đã tiến hành thêm một phép thử so sánh lần thứ hai với sự tham gia của ba phòng thử nghiệm thực hiện bằng cả 2 phương pháp trên cùng các mẫu thử. Các kết quả thu được của phép thử so sánh này cũng cho thấy sự khác nhau trung bình rất sát với kết quả thử nghiệm thu được năm 2006.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6400 (ISO 707), *Sữa và sản phẩm sữa – Hướng dẫn lấy mẫu.*
 - [2] TCVN 7153 (ISO 1042), *Dụng cụ thí nghiệm bằng thủy tinh – Bình định mức*
 - [3] TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 1: Nguyên tắc và định nghĩa chung*
 - [4] TCVN 6910-1 (ISO 5725-1), *Độ chính xác (độ đúng và độ chụm) của phương pháp đo và kết quả đo – Phần 2: Phương pháp cơ bản xác định độ lặp lại và độ tái lập của phương pháp đo tiêu chuẩn*
 - [5] ISO 7550, *Laboratory glassware – Disposable micropipettes*
 - [6] TCVN 8107 (ISO 22662), *Sữa và sản phẩm sữa – Xác định hàm lượng lactoza bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (Phương pháp chuẩn).*
-