

## **Lời nói đầu**

TCVN 8678:2011 hoàn toàn tương đương với ISO 30024:2009;

TCVN 8678:2011 do Cục Chăn nuôi biên soạn, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

## Giới thiệu

Tiêu chuẩn này đã được xây dựng để định lượng các sản phẩm phytaza trong các mẫu thức ăn chăn nuôi để Ủy ban châu Âu kiểm soát hàm lượng phytaza trong các sản phẩm thức ăn chăn nuôi. Tuy nhiên, phương pháp này không thể được dùng để đánh giá hiệu quả *in vivo* của các sản phẩm enzym phytaza.

# Thức ăn chăn nuôi – Xác định hoạt độ phytaza

## Animal feeding stuffs – Determination of phytaza activity

### 1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định hoạt độ phytaza trong các mẫu thức ăn chăn nuôi.

Phương pháp này không dùng để phân biệt giữa phytaza được bổ sung làm phụ gia cho thức ăn chăn nuôi và phytaza nội sinh có sẵn trong nguyên liệu thức ăn chăn nuôi.

Phương pháp này không sử dụng để đánh giá hoặc so sánh hiệu quả *in vivo* của sản phẩm phytaza. Phương pháp này không phải là phương pháp dự đoán hiệu quả *in vivo* của các phytaza có mặt trên thị trường vì chúng có thể có hiệu quả *in vivo* khác nhau trên một đơn vị hoạt độ.

Phương pháp này thích hợp và chỉ có giá trị cho việc xác định hoạt độ phytaza trong thức ăn hỗn hợp hoàn chỉnh cho vật nuôi.

**CHÚ THÍCH** Phương pháp hài hòa đã được xây dựng trên cơ sở các sản phẩm phytaza hiện có [E1600 (EC 3.1.3.8, 3-phytaza), E1614 (EC 3.1.3.26, 4-phytaza) và E1640 (EC 3.1.3.26, 4-phytaza)]. Do đó, phương pháp này có thể không thích hợp đối với các sản phẩm phytaza được phát triển trong tương lai. Phương pháp hài hòa này là một công cụ hữu ích chỉ để đánh giá hoạt độ của phytaza tổng số trong các mẫu thức ăn chăn nuôi.

### 2 Thuật ngữ và định nghĩa

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

#### 2.1

##### **Đơn vị phytaza (Phytaza unit)**

U

Lượng enzym giải phóng 1  $\mu\text{mol}$  phosphat vô cơ từ phytat trong một phút dưới các điều kiện phản ứng qui định trong tiêu chuẩn này.

### 3 Nguyên tắc

Phytaza giải phóng phosphat ra khỏi cơ chất *myo*-inositol hexakisphosphat (phytat). Các phosphat vô cơ giải phóng được xác định bằng cách tạo phức chất màu vàng với thuốc thử vanadat/molypdat trong axit. Mật độ quang (OD) của phức chất màu vàng được đo ở bước sóng 415 nm và phosphat vô cơ giải phóng được định lượng bằng đường chuẩn phosphat.

### 4 Thuốc thử

Chỉ sử dụng các thuốc thử tinh khiết phân tích và sử dụng nước cất hoặc nước đã loại khoáng hoặc nước có độ tinh khiết tương đương, trừ khi có qui định khác.

**CẢNH BÁO** Phương pháp này đòi hỏi phải sử dụng một số chất độc hại. Phải tuân thủ các qui định đối với các chất độc hại để giảm thiểu các nguy cơ, đảm bảo an toàn cho tổ chức, kỹ thuật viên và cá nhân thực hiện.

4.1 Dung dịch amoniac, 25 % phần khối lượng;  $\text{NH}_3$ .

4.2 Amoni heptamolybdat ngậm bốn phân tử nước,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .

4.3 Amoni monovanadat,  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ .

4.4 Axit clohydric (HCl), 25 % phần khối lượng;

4.5 Axit nitric ( $\text{HNO}_3$ ), 65 % phần khối lượng;

4.6 Kali dihydro phosphat,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

4.7 Phytat, axit phytic, muối dodecanatri,  $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_{12}\text{O}_{24}\text{P}_6 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , từ gạo, Sigma® P0109<sup>1)</sup>.

4.8 Natri axetat ngậm ba phân tử nước,  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ .

4.9 Polysorbat 20<sup>2)</sup>.

4.10 Axit nitric loãng. Pha loãng 1 thể tích axit nitric 65 % phần khối lượng (4.5) với hai thể tích nước. Bảo quản ở nhiệt độ phòng. Thời gian bảo quản tối đa là không xác định.

4.11 Thuốc thử amoni heptamolybdat. Hòa tan 100,0 g amoni heptamolybdat ngậm bốn phân tử nước (4.2) trong khoảng 800 ml nước. Thêm 10 ml dung dịch amoniac 25 % phần khối lượng (4.1) và thêm nước đến 1 000 ml. Bảo quản ở nhiệt độ phòng để ở nơi tối. Thời gian bảo quản tối đa là 2 tháng.

<sup>1)</sup> Ví dụ về một sản phẩm thích hợp có sẵn trong thương mại. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và ISO không ấn định phải sử dụng chúng.

<sup>2)</sup> Tween 20 là một ví dụ của một sản phẩm thích hợp có sẵn trong thương mại. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và ISO không ấn định phải sử dụng chúng.



**4.12 Thuốc thử amoni vanadat.** Hòa tan hoàn toàn 2,35 g amoni monovanadat (4.3) trong khoảng 400 ml nước (50 °C đến 60 °C). Thêm 20 ml axit nitric loãng (4.10) và thêm nước đến 1 000 ml. Bảo quản ở nhiệt độ phòng để ở nơi tối. Thời gian bảo quản tối đa là 2 tháng.

**4.13 Thuốc thử molybdat/vanadat STOP.** Trộn 1 thể tích thuốc thử amoni vanadat (4.12) với 1 thể tích thuốc thử amoni heptamolybdat (4.11) và thêm 2 thể tích axit nitric loãng (4.10). Trộn và bảo quản ở nhiệt độ phòng. Thời gian bảo quản tối đa là 1 ngày.

**4.14 Polysorbat 20, 10 % phần khối lượng.** Hòa tan 10,0 g polysorbat 20 (4.9) với nước và thêm nước đến 100 ml. Bảo quản ở nhiệt độ phòng. Thời gian bảo quản tối đa là 6 tháng.

**4.15 Dung dịch đệm axetat, pH 5,5; 0,25 mol/l.** Hòa tan 34,0 g natri axetat ngậm ba phân tử nước (4.8) trong khoảng 900 ml nước. Chỉnh độ pH bằng axit clohydric 25 % phần khối lượng (4.4) đến  $5,50 \pm 0,02$  và thêm nước đến 1 000 ml. Bảo quản ở nhiệt độ phòng. Thời gian bảo quản tối đa là 2 tuần.

**4.16 Dung dịch đệm axetat chứa polysorbat 20, 0,01 % phần khối lượng, pH 5,5; 0,25 mol/l.** Hòa tan 34,0 g natri axetat ngậm ba phân tử nước (4.8) trong khoảng 900 ml nước. Chỉnh độ pH bằng axit clohydric 25 % phần khối lượng (4.4) đến  $5,50 \pm 0,02$ . Thêm 1 ml polysorbat 20, 10 % phần khối lượng (4.14) và thêm nước đến 1 000 ml. Bảo quản ở nhiệt độ phòng. Thời gian bảo quản tối đa là 2 tuần.

**4.17 Dung dịch đệm axetat chứa polysorbat 20, 0,01 % phần khối lượng, pH 5,5; 0,50 mol/l.**

Hòa tan 68,0 g natri axetat ngậm ba phân tử nước (4.8) trong khoảng 900 ml nước. Chỉnh độ pH bằng axit clohydric 25 % phần khối lượng (4.4) đến  $5,50 \pm 0,02$ . Thêm 1 ml polysorbat 20, 10 % phần khối lượng (4.14) và thêm nước đến 1 000 ml. Bảo quản ở nhiệt độ phòng. Thời gian bảo quản tối đa là 2 tuần.

**4.18 Dung dịch cơ chất phytat, 7,5 mmol/l (5 mmol/l nồng độ cuối cùng trong phản ứng).** Hòa tan 2,00 g dodecanatri phytat (4.7) có hàm lượng phospho vô cơ không lớn hơn 0,1 % phần khối lượng (xem 9.3) trong khoảng 200 ml dung dịch đệm axetat (4.15). Chỉnh độ pH bằng axit clohydric 25 % phần khối lượng (4.4) đến  $5,50 \pm 0,02$  và thêm dung dịch đệm axetat (4.15) tới 250 ml. Thời gian bảo quản tối đa là 2 tuần tại 4 °C.

**4.19 Dung dịch chuẩn gốc phosphat, 50 mmol/l.** Sấy khô khoảng 10 g kali dihydro phosphat (4.6) ở 105 °C trong 2 h và bảo quản trong bình hút ẩm. Cân khoảng 682 mg kali dihydro phosphat khô, chuyển vào bình định mức 100 ml và thêm dung dịch đệm axetat 0,25 mol/l chứa polysorbat 20, 0,01 % phần khối lượng (4.16) đến 100 ml. Tính nồng độ chính xác của dung dịch chuẩn gốc phosphat. Bảo quản ở nhiệt độ phòng. Thời gian bảo quản tối đa là 2 tuần.

**4.20 Dung dịch chuẩn gốc phytaza.** Cân từ 100,0 mg đến 300,0 mg chuẩn phytaza đã được chứng nhận, chuyển vào bình định mức 100 ml và hòa tan trong 100 ml dung dịch đệm axetat 0,25 mol/l



chứa polysorbat 20, 0,01 % phần khối lượng (4.16). Khuấy đều trong khoảng từ 15 min đến 45 min. Bảo quản ở nhiệt độ phòng. Thời gian bảo quản tối đa là 1 ngày.

## 5 Thiết bị, dụng cụ

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

5.1 **Nồi cách thủy**, được khống chế nhiệt độ ổn định (có các giá giữ các ống nghiệm 2 ml).

5.2 **Máy đo pH**, có khả năng được đọc được đến hai chữ số thập phân.

5.3 **Máy khuấy từ** (công suất  $\geq 20$  W).

5.4 **Thanh khuấy hình quả trứng** (40 mm  $\times$  20 mm).

5.5 **Cân phân tích**, có khả năng đọc đến 0,1 mg.

5.6 **Cân**, có khả năng đọc đến 0,01 g.

5.7 **Máy trộn Vortex**.

5.8 **Máy ly tâm dùng cho các ống ly tâm micro** (5.12), có khả năng tạo gia tốc từ 11 000 g đến 20 000 g.

5.9 **Bộ phân phối bằng điện tử**.

5.10 **Pipet** (điện tử và thủ công), dung tích từ 10  $\mu$ l đến 2 000  $\mu$ l.

5.11 **Máy đo quang phổ**, chùm tia đôi hoặc máy đọc vi bản (microplate)

5.12 **Ống ly tâm micro**, dung tích 2 ml.

## 6 Lấy mẫu

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

Việc lấy mẫu không qui định trong tiêu chuẩn này. Nên lấy mẫu theo TCVN 4325 (ISO 6497) *Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu*<sup>[1]</sup>.

## 7 Chuẩn bị mẫu thử

Thực hiện hai lần cân cho từng mẫu thử.

Cân hai phần mẫu dạng viên hoặc bột, mỗi phần khoảng 50 g, cho vào các bình nón 500 ml. Thêm 500 ml nước và 0,5 ml polysorbat 20, 10 % phần khối lượng (4.14) vào mẫu thức ăn chăn nuôi và trộn mạnh trong 45 min trên máy khuấy từ (5.3) bằng thanh khuấy (5.4). Chuyển 2 ml dịch chiết mẫu cho vào ống ly tâm micro (5.12) và ly tâm (5.8) trong 3 min ở gia tốc từ 11 000 g đến 20 000 g.

Độ không đồng nhất trong mẫu thử có thể dẫn đến hệ số biến thiên cao ( $CV_s$ ). Đối với các mẫu thức ăn chăn nuôi cho các  $CV_s > 15\%$ , độ không đồng nhất này có thể xuất phát từ việc phân bố cỡ hạt không đồng đều trong sản phẩm hoặc việc chuẩn bị nguyên liệu không đồng nhất. Nếu các mẫu thức ăn chăn nuôi cho thấy các  $CV_s$  cao, thì nghiền mẫu thức ăn chăn nuôi bằng máy nghiền ly tâm Ultra<sup>3)</sup> có rây với kích thước lỗ danh nghĩa là 1 mm. Nghiền 150 g mẫu thức ăn chăn nuôi và chiết theo mô tả trong điều này.

## 8 Cách tiến hành

### 8.1 Dung dịch mẫu trắng

Phosphat vô cơ trong mẫu thử góp phần tạo nên màu sắc. Do đó, đối với mỗi phép thử cần thực hiện phép thử trắng, các mẫu trắng cần được so với mỗi mẫu thử. Để tính hoạt độ phytaza, lấy giá trị của mẫu thử trừ đi giá trị của mẫu trắng.

### 8.2 Chất chuẩn

#### 8.2.1 Dung dịch chuẩn phosphat

Dung dịch chuẩn gốc phosphat (4.19) được pha loãng với dung dịch đệm axetat 0,25 mol/l có chứa polysorbat 20, 0,01 % phần khối lượng (4.16) theo Bảng 1.

**Bảng 1 – Các bước pha loãng để có được các dung dịch màu chuẩn đối với đường chuẩn phosphat**

Dung dịch chuẩn	Thể tích dung dịch chuẩn gốc phosphat (4.19)	Thể tích dung dịch đệm axetat 0,25 mol/l có chứa polysorbat 20, 0,01 % phần khối lượng (4.16)	Hệ số pha loãng	Nồng độ $\mu\text{mol/ml}^a$
A	1	1	2	25
B	1	3	4	12,5
C	1	7	8	6,25
D	1	15	16	3,125

<sup>a</sup> Tính các nồng độ chính xác (4.19).

#### 8.2.2 Kiểm soát mức phytaza

Đối với việc ủ mỗi mẫu thử, cần bao gồm bước kiểm soát mức phytaza. Dung dịch chuẩn gốc phytaza

<sup>3)</sup> Ví dụ về một sản phẩm thích hợp có bán sẵn trong thương mại. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và ISO không ấn định phải sử dụng chúng.



(4.20) có hoạt độ đã biết, được pha loãng đến hoạt độ cuối cùng từ 0,15 U/ml đến 0,25 U/ml và hoạt độ chính xác được xác định như qui định trong 8.4.

### 8.3 Đường chuẩn

Thực hiện ba phép xác định đối với mỗi dung dịch phosphat đã pha loãng và hai mẫu trắng và tính trung bình các kết quả. Qui trình được quy định trong Bảng 2.

Đối với các dung dịch chuẩn phosphat, dùng pipet lấy 360  $\mu$ l dung dịch đệm axetat 0,25 mol/l có chứa polysorbat 20, 0,01 % phần khối lượng (4.16) cho vào ống nghiệm 2 ml (5.12). Thêm 40  $\mu$ l dung dịch chuẩn phosphat (Bảng 1).

Đối với các dung dịch trắng chuẩn phosphat, dùng pipet lấy 400  $\mu$ l dung dịch đệm axetat 0,25 mol/l có chứa polysorbat 20, 0,01 % phần khối lượng (4.16) cho vào ống nghiệm 2 ml (5.12).

Trong cả hai trường hợp, cho thêm 0,8 ml dung dịch cơ chất phytat (4.18) và 0,8 ml thuốc thử STOP (4.13). Trộn các lượng chứa trong các ống và duy trì các ống 10 min ở nhiệt độ phòng. Ly tâm (5.8) các ống cùng với mẫu trong 3 min với gia tốc từ 11 000 g đến 20 000 g và đo OD của phần nổi phía trên ở bước sóng 415 nm,  $D(415)$ .

**Bảng 2 – Qui trình đối với đường chuẩn**

Bước phân tích	Dung dịch màu chuẩn	Dung dịch trắng
Dung dịch đệm axetat 0,25 mol/l có chứa polysorbat 20, 0,01 % phần khối lượng (4.16)	360 $\mu$ l	400 $\mu$ l
Dung dịch chuẩn phosphat (8.2.1)	40 $\mu$ l	0 $\mu$ l
Dung dịch cơ chất phytat (4.18)	0,8 ml	0,8 ml
Thuốc thử STOP (4.13)	0,8 ml	0,8 ml
Trộn	có	có
Nhiệt độ phòng	10 min	10 min
Ly tâm	3 min trong khoảng từ 11 000 g đến 20 000 g	3 min trong khoảng từ 11 000 g đến 20 000 g
Máy đo quang phổ (5.11)	415 nm (so với nước)	415 nm (so với nước)

### 8.4 Kiểm soát mức phytaza

Thực hiện ba phép xác định đối với mỗi dung dịch đã pha loãng và hai dung dịch trắng và tính trung bình các kết quả. Qui trình được quy định trong Bảng 3.



Đối với các dung dịch trong phép xác định kiểm soát mức phytaza, dùng pipet lấy 360 µl dung dịch đệm axetat 0,25 mol/l có chứa polysorbat 20, 0,01 % phần khối lượng (4.16) cho vào ống nghiệm 2 ml (5.12). Thêm 40 µl dung dịch kiểm soát mức phytaza loãng (8.2.2). Trộn mẫu. Ủ trước các dung dịch trong 5 min ở 37 °C. Thêm 0,8 ml dung dịch cơ chất phytat (4.18) đã được làm nóng sơ bộ đến 37 °C. Ủ chính xác 30 min ở 37 °C. Sau 30 min, thêm 0,8 ml thuốc thử STOP (4.13) và trộn. Duy trì các dung dịch trong 10 min ở nhiệt độ phòng và sau đó ly tâm trong 3 min ở gia tốc trong khoảng từ 11 000 g đến 20 000 g. Đo D(415) của phần dung dịch trong nổi phía trên.

Đối với các dung dịch mẫu trắng kiểm soát mức phytaza, dùng pipet lấy 360 µl dung dịch đệm axetat (4.15) cho vào ống nghiệm 2 ml (5.12). Thêm 40 µl dung dịch kiểm soát mức phytaza loãng (8.2.2). Trình tự bổ sung các dung dịch khác với trình tự được sử dụng cho các phép xác định. Các mẫu trắng được ủ sơ bộ 5 min ở 37 °C. Sau đó, theo bước 1, thêm thuốc thử STOP (4.13); theo bước 2, thêm dung dịch cơ chất phytat (4.18) đã được làm nóng sơ bộ đến 37 °C. Sau đó tiến hành theo Bảng 3, cột 3, dòng 9 trở đi.

**Bảng 3 – Thủ tục kiểm soát mức**

Các bước tiến hành	Mẫu kiểm soát mức	Mẫu trắng
Dung dịch đệm axetat 0,25 mol/l có chứa polysorbat 20, 0,01 % phần khối lượng (4.16)	360 µl	360 µl
Dung dịch kiểm soát mức phytaza loãng (8.2.2)	40 µl	40 µl
Trộn	Có	Có
Ủ sơ bộ ở 37 °C	5 min	5 min
Dung dịch cơ chất phytat (4.18) ở 37 °C	0,8 ml	0,8 ml: Bước 2
Trộn	Không	Không
Ủ ở 37 °C	30 min	Không
Thuốc thử STOP (4.13)	0,8 ml	0,8 ml: Bước 1
Trộn	Có	Có
Nhiệt độ phòng	10 min	10 min
Ly tâm	3 min trong khoảng từ 11 000 g đến 20 000 g	3 min trong khoảng từ 11 000 g đến 20 000 g
Máy đo quang phổ (5.11)	415 nm (so với nước)	415 nm (so với nước)

### 8.5 Mẫu thức ăn chăn nuôi

Thực hiện ba phép xác định cho mỗi lần chiết (Điều 7) và hai mẫu trắng và tính trung bình các kết quả. Quy trình được quy định trong Bảng 4.



Đối với các phép xác định, dùng pipet lấy 300 µl dung dịch đệm axetat 0,25 mol/l có chứa polysorbat 20, 0,01 % phần khối lượng (4.16) cho vào ống nghiệm 2 ml (5.12). Thêm 100 µl dịch chiết mẫu (Điều 7) là phần mẫu thử. Trộn lượng chứa trong ống. Ủ sơ bộ 5 min ở 37 °C. Thêm 0,8 ml dung dịch cơ chất phytat (4.18) đã được làm nóng sơ bộ đến 37 °C. Ủ chính xác 30 min ở 37 °C. Sau 30 min, thêm 0,8 ml thuốc thử STOP (4.13) và trộn. Duy trì ống 10 min ở nhiệt độ phòng và sau đó ly tâm 3 min trong khoảng từ 11 000 g đến 20 000 g. Đo D(415) của dung dịch trong nổi phía trên.

Đối với các mẫu trắng, dùng pipet lấy 300 µl dung dịch đệm axetat 0,25 mol/l có chứa polysorbat 20, 0,01 phần khối lượng (4.16) cho vào ống nghiệm 2 ml (5.12). Thêm 100 µl dịch chiết mẫu thức ăn chăn nuôi (Điều 7). Trình tự bổ sung các dung dịch khác với trình tự được sử dụng đối với phần mẫu thử. Ủ sơ bộ các mẫu trắng 5 min ở 37 °C. Sau đó, theo bước 1, thêm thuốc thử STOP (4.13); theo bước 2, thêm dung dịch cơ chất phytat (4.18) được làm nóng sơ bộ đến 37 °C. Sau đó tiến hành theo Bảng 4, cột 3, dòng 9 trở đi.

**Bảng 4 – Qui trình đối với phần mẫu thử thức ăn chăn nuôi**

Các bước tiến hành	Mẫu thức ăn chăn nuôi	Mẫu trắng
Dung dịch đệm axetat 0,25 mol/l có chứa polysorbat 20, 0,01 % phần khối lượng (4.16)	300 µl	300 µl
Phần mẫu thử <sup>a</sup>	100 µl	100 µl
Trộn	Có	Có
Ủ sơ bộ ở 37 °C	5 min	5 min
Dung dịch cơ chất phytat (4.18) ở 37 °C	0,8 ml	0,8 ml: Bước 2
Trộn	Không	Không
Ủ ở 37 °C	30 min	Không
Thuốc thử STOP (4.13)	0,8 ml	0,8 ml: Bước 1
Trộn	Có	Có
Nhiệt độ phòng	10 min	10 min
Ly tâm	3 min trong khoảng từ 11 000 g đến 20 000g	3 min trong khoảng từ 11 000 g đến 20 000g
Máy đo quang phổ (5.11)	415 nm (so với nước)	415 nm (so với nước)

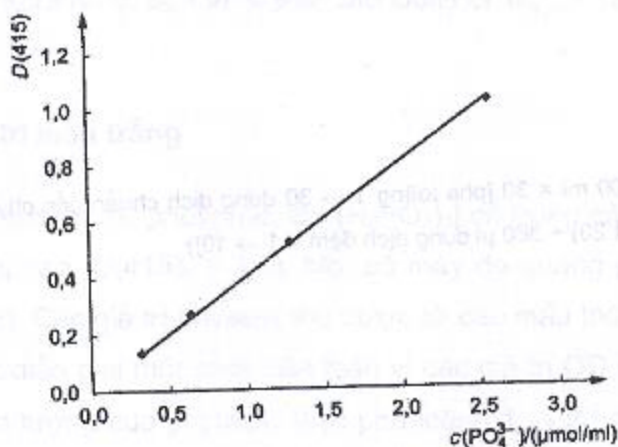
<sup>a</sup> Phần mẫu thử ≤ 200 U phytaza/kg thức ăn chăn nuôi, lấy 200 µl dịch chiết mẫu thử và 200 µl dung dịch đệm axetat 0,50 mol/l có chứa polysorbat 20, 0,01 % phần khối lượng (4.17) để phân tích (độ pha loãng 1 → 2). Các mẫu thử > 2 000 U phytaza/kg thức ăn phải được pha loãng thích hợp với dung dịch đệm axetat 0,25 mol/l có chứa 0,01 % phần khối lượng polysorbat 20 (4.16).



## 9 Tính kết quả

### 9.1 Dựng đường chuẩn

Dựng đường chuẩn với  $\Delta D(415) [D(415)_s - D(415)_b]$ , trong đó  $D(415)_s$  và  $D(415)_b$  là các mật độ quang trung bình của chất chuẩn và mẫu trắng, tương ứng, thu được với các chất chuẩn phosphat (8.2.1 và 8.3), trên trục tung và tính được nồng độ phosphat trên trục hoành (dung dịch pha loãng 1 → 10 trong ống ly tâm micro [40  $\mu$ l chất chuẩn pha loãng (Bảng 1) cộng với 360  $\mu$ l dung dịch đệm] cho phản ứng cần lấy nồng độ phosphat của chất chuẩn để tính toán}. Đường chuẩn tốt nhất được tính bằng hồi qui tuyến tính,  $\Delta D(415) = kc(PO_4^{3-})$  (giao nhau ở 0). Ví dụ được đưa ra trong Hình 1.



#### CHÚ DẪN

$D(415)$  mật độ quang ở bước sóng 415 nm

$$D(415) = 0,4008 c(PO_4^{3-})$$

$c(PO_4^{3-})$  nồng độ photphat

$$r^2_{c(PO_4^{3-})D(415)} = 0,9996$$

Hình 1 – Ví dụ về dựng đồ thị mật độ quang theo nồng độ các dung dịch đo màu chuẩn phosphat sử dụng chất đệm 0,25 mol/l axetat chứa polysorbat 0,01 % phần khối lượng 20 (4.16)

### 9.2 Tính hoạt độ phytaza

Hoạt độ phytaza,  $a_p$ , được tính như sau:

$$a_p = \frac{\Delta D(415)V_d}{kmt}$$

Trong đó:

$\Delta D(415)$  là mật độ quang thực tại bước sóng 415 nm thu được từ

$$D(415)_t - D(415)_b$$

Trong đó:

$D(415)_t$  và  $D(415)_b$  là mật độ quang trung bình của phần mẫu thử và mẫu trắng (8.5), tương ứng

$k$  là độ dốc của đường cong chuẩn, nghịch đảo của micromol mililit, tại  $D(415)$ ;

$V_d$  là thể tích được dùng để điều chỉnh độ pha loãng (các lần pha loãng dịch chiết), tính bằng mililit (ml);

$m$  là khối lượng của mẫu thử, tính bằng gam (g) hoặc kilogram (kg);

$t$  là thời gian ủ, tính bằng phút (min).

VÍ DỤ 1: Kiểm soát mức phytaza

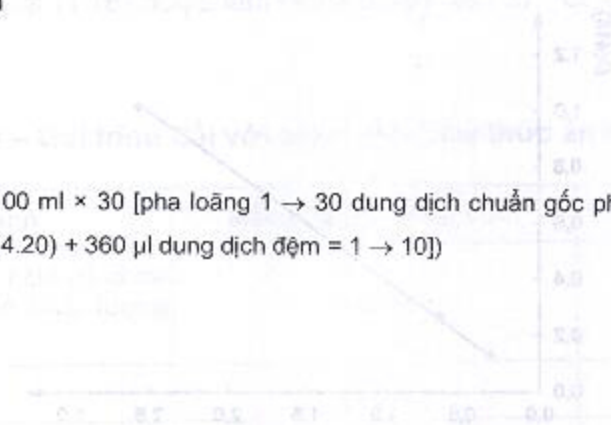
$$\Delta D(415) = 0,216$$

$$k = 0,3757 \mu\text{mol}^{-1} \text{ml}$$

$V_d = 30\,000$  ml (thể tích chiết 100 ml  $\times$  30 [pha loãng 1  $\rightarrow$  30 dung dịch chuẩn gốc phytaza (4.20)]  $\times$  10 [40  $\mu$ l dung dịch chuẩn gốc phytaza đã pha loãng (4.20) + 360  $\mu$ l dung dịch đệm = 1  $\rightarrow$  10])

$$m = 0,1074 \text{ g}$$

$$t = 30 \text{ min}$$



$$a_p = \frac{0,216 \times 30\,000}{0,3757 \times 0,1074 \times 30} = 5\,353 \mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1} = 5\,353 \text{ U g}^{-1} \quad (2)$$

VÍ DỤ 2: Phần mẫu thử thức ăn chăn nuôi

$$\Delta D(415) = 0,183$$

$$k = 0,3757 \mu\text{mol}^{-1} \text{ml}$$

$V_d = 2\,000$  ml (thể tích chiết 500 ml  $\times$  4 [100  $\mu$ l dịch chiết + 300  $\mu$ l dung dịch đệm = 1  $\rightarrow$  4])

$$m = 0,050 \text{ kg}$$

$$t = 30 \text{ min}$$

$$a_p = \frac{0,183 \times 2\,000}{0,3757 \times 0,050 \times 30} = 650 \mu\text{mol min}^{-1} \text{kg}^{-1} = 650 \text{ U kg}^{-1} \quad (3)$$

### 9.3 Hiệu chỉnh theo độ tinh khiết và hàm lượng nước của axit phytic

Độ tinh khiết và hàm lượng nước của axit phytic thay đổi theo từng mẻ, do đó cần được đưa vào trong tính toán khi chuẩn bị cơ chất.



VÍ DỤ Muối dodecanatri của axit phytic (phospho vô cơ 0,008 % phần khối lượng)<sup>4)</sup>.

Việc hiệu chỉnh như sau:

$$\frac{c(\text{phytat})M}{w_p(1 - w_{H_2O})} \quad (4)$$

Trong đó:

$M$  là khối lượng phân tử của dodecanatri phytat, tính bằng gam trên mol (g/mol);

$w_p$  là độ tinh khiết của dodecanatri phytat, tính theo phần khối lượng;

$w_{H_2O}$  là hàm lượng nước của dodecanatri phytat, tính theo phần khối lượng.

Nếu:  $c(\text{phytat}) = 7,5$  mmol/l;  $M_r = 923,8$  g/mol;  $w_p = 97$  % phần khối lượng và  $w_{H_2O} = 12,6$  % phần khối lượng, thì số hiệu chỉnh là 8,17 g/l.

## 9.4 Gây nhiễu do các giá trị mẫu trắng

Các mức cao, ví dụ, MCP [monocanxi phosphat,  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ] có trong các mẫu thức ăn chăn nuôi có thể dẫn đến các giá trị trắng cao [ $D(415)_b > 1,6$ ]. Một số máy đo quang phổ có thể không tuyến tính trong dải OD cao (gần đến 2). Các giá trị phytaza thu được từ các mẫu thức ăn chăn nuôi có các giá trị trắng cao như thế cần được diễn giải một cách cẩn thận vì các giá trị OD cao có thể dẫn đến đánh giá thấp hơn hoặc cao hơn hàm lượng của phytaza. Việc pha loãng 1 → 2 hoặc 1 → 4 dịch chiết thức ăn chăn nuôi có thể làm giảm giá trị OD. Tuy nhiên,  $\Delta D(415)$  cần phải  $> 0,04$ .

## 10 Độ chụm

### 10.1 Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Theo thuật ngữ của IUPAC [2], thì giới hạn phát hiện được xác định là  $L_D = 3s$  và giới hạn định lượng được xác định là  $L_Q = 10\sigma$ , trong đó  $s$  và  $\sigma$  là các độ lệch chuẩn ước tính và tuyệt đối, tương ứng.

Trong các thuật ngữ của  $\Delta D(415)$ , giới hạn phát hiện bằng

$$L_D = 0,011 \Delta D(415)$$

hoặc 20 U/kg thức ăn chăn nuôi; giới hạn định lượng bằng

$$L_Q = 0,036 \Delta D(415)$$

hoặc 60 U/kg thức ăn chăn nuôi.

<sup>4)</sup> P0109 từ Sigma® Lot 057K0049 là ví dụ về một sản phẩm thích hợp có bán sẵn trong thương mại. Thông tin này đưa ra tạo thuận tiện cho người sử dụng tiêu chuẩn này và ISO không ấn định phải sử dụng chúng.

## 10.2 Phép thử nghiệm liên phòng

Các giá trị thu được từ phép thử liên phòng thử nghiệm này có thể không áp dụng cho các dải nồng độ và các chất nền ngoài các dải nồng độ và các chất nền đã nêu.

## 10.3 Độ lặp lại

Hệ số biến thiên lặp lại,  $CV(r)$  là hệ số biến thiên trung bình từ hai kết quả độc lập thu được từ cùng một mẫu trong cùng một ngày, do cùng một người sử dụng, sử dụng cùng thiết bị và cùng phương pháp.

Hệ số biến thiên lặp lại dự đoán  $CV(r)$  là 10 %.

## 10.4 Độ tái lập

Hệ số biến thiên tái lập,  $CV(R)$  là hệ số biến thiên trung bình từ các kết quả thu được từ cùng một mẫu, sử dụng cùng phương pháp, nhưng từ các phòng thử nghiệm khác nhau, trong các ngày khác nhau, sử dụng các thiết bị khác nhau và do các người phân tích khác nhau thực hiện.

Hệ số biến thiên lặp lại dự đoán  $CV(R)$  là 12 %.

## 11 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải ghi rõ:

- mọi thông tin cần thiết để nhận biết đầy đủ về mẫu thử;
- phương pháp lấy mẫu đã sử dụng, nếu biết;
- phương pháp thử nghiệm đã dùng, viện dẫn tiêu chuẩn này;
- mọi chi tiết thao tác không được quy định trong tiêu chuẩn này hoặc những điều được coi là tùy ý cũng như các sự cố bất kỳ mà có thể ảnh hưởng đến kết quả thử;
- kết quả thử nghiệm thu được,
- thể hiện kết quả cuối cùng thu được, nếu độ lặp lại được kiểm tra.



## Phụ lục A

(Tham khảo)

### Các kết quả nghiên cứu liên phòng thử nghiệm

Một phép thử cộng tác quốc tế (Tài liệu tham khảo [3]) gồm có 14 phòng thử nghiệm tại sáu quốc gia tham gia (Áo, Đan Mạch, Pháp, Đức (2), Hungary), một quốc gia ngoài EU là Cơ quan Kiểm tra Thực phẩm (Ottawa, Canada), hai phòng thử nghiệm tư nhân ở Pháp và Thụy Sĩ và năm phòng thử nghiệm công ty đã được thực hiện trên năm mẫu thức ăn (dạng lỏng và dạng rắn). Các mẫu thức ăn hỗn hợp chứa các thành phần đặc trưng và sử dụng công thức có bổ sung các enzym phytaza từ các nguồn khác nhau và theo các dạng khác nhau, tức là các enzym phytaza do các công ty khác nhau sản xuất và được bổ sung vào dạng rắn hoặc dạng lỏng thức ăn chăn nuôi:

Tám mẫu thức ăn (từ mẫu A đến mẫu H) đã được phân tích, trong đó có một trong bốn sản phẩm phytaza khác nhau, ở dạng lỏng hoặc dạng rắn. Phân tích mẫu mù lặp lại hai lần.

Các số liệu về độ chụm đối với phương pháp thu được từ tài liệu tham khảo [3] nêu trong Bảng A.1. Các số liệu về độ chụm (10.3 và 10.4) được tính từ các kết quả của báo cáo nghiên cứu trong Tài liệu tham khảo [3].

**Bảng A.1 – Số liệu về độ chụm của phương pháp**

Thông số	Sản phẩm dạng lỏng 1	Sản phẩm dạng lỏng 2	Sản phẩm dạng lỏng 3	Sản phẩm dạng lỏng 4	Sản phẩm dạng rắn 1	Sản phẩm dạng rắn 2	Sản phẩm dạng rắn 3	Sản phẩm dạng rắn 4
	500 U/kg A	750 U/kg B	1 000 U/kg C	1 250 U/kg D	1 500 U/kg E	1 500 U/kg F	1 500 U/kg G	1 500 U/kg H
Trung bình, U/kg	519	726	772	1 219	1 498	1 621	1 364	1 199
Số phòng ngoại lệ	0	3	1	0	0	2	2	2
Số phòng thử nghiệm sau khi trừ ngoại lệ, $n$	14	11	13	14	14	12	12	12
Độ lệch chuẩn lặp lại, $s_r$ , U/kg	43	43	62	88	159	164	119	26
Hệ số biến thiên lặp lại, $CV(r)$ , %	8,3	6,0	8,0	7,2	10,6	10,1	8,8	2,2
Độ lệch chuẩn của độ chụm trung gian, $s_{ir}$ , U/kg	66	51	89	127	164	164	131	39
Hệ số biến thiên của độ chụm trung gian, $CV(ir)$ , %	12,7	7,0	11,5	10,4	11,0	10,1	9,6	3,3
Độ lệch chuẩn tái lập, $s_R$ , U/kg	78	59	115	155	182	164	153	65
Hệ số biến thiên tái lập, $CV(R)$ , %	15,0	8,1	14,9	12,8	12,2	10,1	11,2	5,4

## Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 4325:2007 (ISO 6497:2002), *Thức ăn chăn nuôi – Lấy mẫu.*
- [2] CURRIE, L.A. for the IUPAC ANALYTICAL CHEMISTRY DIVISION COMMISSION ON ANALYTICAL NOMENCLATURE. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure Appl. Chem.* 1995, 67, pp. 1699-1723. Available (2009-01-19) at <http://www.iupac.org/publications/pac/1995/pdf/6710x1699.pdf>
- [3] GIZZI, G., THYREGOD, P., VON HOLST, C., BERTIN, G., VOGEL, K., FAURSCHOU-ISAENSEN, M., BETZ, R., MURPHY, R., ANDERSEN, B.B. Determination of phytase activity in feed: Interlaboratory study. *J. AOAC Int.* 2008, 91, pp. 259-267.