



جمهوری اسلامی ایران  
Islamic Republic of Iran

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran



استاندارد ملی ایران

۶۶۴

تجدیدنظر اول

ISIRI

664

1st.revision

شیر- تعیین فسفاتاز قلیایی- روش آزمون

**Milk – Determination of alkaline  
phosphatase-Test method**

**ICS:67.100.10**

## به نام خدا

### آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بندیک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف توسط کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه<sup>۱</sup>، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل: تولیدکنندگان، مصرف کنندگان، صادر کنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادهای سازمانهای دولتی و غیر دولتی حاصل می شود. پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی برای مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می شود و پس از دریافت نظرات و پیشنهادات در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقمند و ذی صلاح با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند در کمیته ملی طرح و بررسی می شود و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می گردد. بدین ترتیب استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که مؤسسه استاندارد تشکیل می دهد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)<sup>۱</sup>، کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)<sup>۲</sup> و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)<sup>۳</sup> است و به عنوان تنها رابط<sup>۴</sup> کمیسیون کدکس غذایی (CAC)<sup>۵</sup> در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندیهای خاص کشور، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی بهره گیری می شود.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. مؤسسه می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این مؤسسه است.

\* مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

<sup>1</sup> – International Organization for Standardization

<sup>2</sup> – International Electrotechnical Commission

<sup>3</sup> – International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrologie Legal)

<sup>4</sup> – Contact Point

<sup>5</sup> – Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد  
" شیر- تعیین فسفاتاز قلیایی - روش آزمون- تجدید نظر اول "

رئیس:

سمت و/ یا نمایندگی  
دانشکده کشاورزی- دانشگاه ارومیه

علیزاده ، محمد  
(دکترای صنایع غذایی)

دبیر:

اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان آذربایجان غربی

اسلامی فرد ، فریده  
(لیسانس صنایع غذایی )

اعضاء:(اسامی به ترتیب حروف الفبا)

اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان آذربایجان غربی

امینی ، غلامرضا  
(فوق لیسانس مدیریت-لیسانس صنایع غذایی)

اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان آذربایجان غربی

اسلامی فرد ، جواد  
(لیسانس صنایع غذایی )

شرکت تولیدی آفتاب ارومیه

جلیل زاده رضایی ، پیمان  
(لیسانس علوم آزمایشگاهی دامپزشکی)

شرکت تولیدی فرآورده های لبنی اروم بنیان

خدادادی ، الناز  
(لیسانس صنایع غذایی )

معاونت غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی استان آذربایجان غربی

فهیمی ، سمیرا  
(لیسانس صنایع غذایی)

اداره کل دامپزشکی استان آذربایجان غربی

قنبرپور، فرامرز  
(لیسانس شیمی )

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

رشیدی ، لادن  
(فوق لیسانس شیمی- بیوتکنولوژی)

آزمایشگاه کنترل مواد غذایی ، آرایشی و بهداشتی استان

رحیمی راد ، امیر

(دکترای دامپزشکی)

آذربایجان غربی

شریعتی ، منیژه  
(لیسانس علوم تغذیه )

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مظفری ، فرید  
(لیسانس صنایع غذایی )

شرکت شیر پاستوریزه پگاه استان آذربایجان غربی

محمودی ، میرزاعلی  
(فوق لیسانس مدیریت-لیسانس صنایع غذایی)

انجمن مسولین فنی و کنترل کیفیت استان آذربایجان غربی

نیازی ، علیرضا  
(فوق لیسانس مدیریت)

اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان آذربایجان غربی

یگانه ، سامال  
(فوق لیسانس شیمی)

آزمایشگاه کنترل مواد غذایی، آرایشی و بهداشتی استان  
آذربایجان غربی

## فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ج	آشنایی با موسسه استاندارد
د	کمیسیون فنی تدوین استاندارد
ح	پیش گفتار
۱	۱ هدف
۱	۲ دامنه کاربرد
۱	۳ مراجع الزامی
۲	۴ اصطلاحات و تعاریف
۳	۵ اصول آزمون
۴	۶ مواد و/ یا واکنشگرها
۶	۷ وسایل
۷	۸ نمونه برداری
۸	۹ آماده سازی آزمایش
۸	۱۰ روش انجام آزمون
۱۱	۱۱ محاسبه و بیان نتایج
۱۲	۱۲ دقت
۱۲	۱۳ گزارش آزمون
۱۴	پیوست الف (اطلاعاتی) نتایج آزمون بین آزمایشگاهی

## پیش گفتار

استاندارد " شیر - تعیین فسفاتاز قلیایی - روش آزمون " ، نخستین بار در سال ۱۳۴۹ تهیه شد. این استاندارد بر اساس پیشنهاد های رسیده و بررسی توسط کمیسیون های مربوط برای اولین بار مورد تجدید نظر قرار گرفت و درنهایت و هفتمین اجلاس کمیته ملی استاندارد خوراک و فرآورده های کشاورزی مورخ ۱۳۸۸/۱۱/۱۹ تصویب شد. اینک به استناد بند ۱ ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ ، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت های ملی و جهانی در زمینه صنایع ، علوم و خدمات ، استاندارد های ملی ایران در صورت لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود ، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت . بنابراین باید همواره از آخرین تجدید نظر استاندارد های ملی ایران استفاده کرد. این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران شماره ۶۶۴ : سال ۱۳۴۹ می شود.

منبع و مأخذی که برای تدوین این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است :

ISO 3356 : 2009 / IDF 63 :2009 Milk \_ Determination of alkaline \_ Test method

## شیر- تعیین فسفاتاز قلیایی - روش آزمون

### ۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد ، تعیین روشی برای اندازه گیری مقدار فسفاتاز قلیایی در شیر می باشد.

### ۲ دامنه کاربرد

این استاندارد برای تعیین مقدار فسفاتاز قلیایی در شیرخشک ، دوغ کره ، پودردوغ کره ، آب پنیر و پودر آب پنیر کاربرد دارد و این روش فقط برای مواردی که مقدار فسفاتاز قلیایی کمتر از یک میکروگرم فنل در هر میلی لیتر نباشد ، قابل استفاده است.

یادآوری- استفاده از این استاندارد ممکن است مستلزم کار با مواد ، عملیات و تجهیزات خطر زا باشد که همه نکات ایمنی مرتبط با آن شرح داده نشده است ، بنابراین وظیفه کاربر این استاندارد است که با در نظر گرفتن محدودیت‌های قانونی ، روش های بی خطر و ایمن را پیش از استفاده مشخص کند.

### ۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می‌شود. در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد ، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست. در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن ها ارجاع داده شده است ، همواره آخرین تجدید نظر و اصلاحیه های بعدی آن ها مورد نظر است. استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است :

۱-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۳۲۶ : سال ۱۳۸۷ ، شیر و فرآورده های آن - راهنمای نمونه برداری

۲-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۵۶ : سال ۱۳۸۲ ، شیر و فرآورده های آن - تعاریف و واژه ها

۱

۳-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸ : سال ۱۳۸۱ ، آب مورد استفاده در آزمایشگاه تجزیه - ویژگی ها و روش های آزمون

۴-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۲۰۱۲ : سال ۱۳۸۱ ، شیر خشک - ویژگی ها

۵-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۱۶۴ : سال ۱۳۸۳ - شیر خام - ویژگی ها

۶-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۶۹۵۹ : سال ۱۳۸۲ ، پنیر و فرآورده های آن - پودر آب پنیر - ویژگی ها و روش های آزمون

۷-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۵۸۷۷ : سال ۱۳۸۱ ، شیر و فرآورده های آن - پودر پنیر - ویژگی ها

۸-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۷۵۲۰ : سال ۱۳۸۳ ، ظروف شیشه ای آزمایشگاهی - بالن های حجم سنجی با یک خط نشانه - ویژگی ها

۹-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۱- ۷۰۴۱ : سال ۱۳۸۳ ، شیر و فرآورده های آن - تعیین فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی با استفاده از روش فلورو متریک - قسمت اول : شیر و فرآورده های مایع شیر- روش آزمون

۳-۱۰ استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۷۱ : سال ۱۳۸۶، شیر ونوشیدنی های بر پایه شیر- اندازه گیری فعالیت فسفاتاز قلیایی به روش سامانه آنزیمی فعال شده نوری

۳-۱۱ استاندارد ملی ایران شماره ۱- ۷۴۴۲ : سال ۱۳۸۳، درستی (صحت و دقت) روش ها و نتایج اندازه گیری - قسمت اول: تعاریف و اصول کلی

۳-۱۲ استاندارد ملی ایران شماره ۲- ۷۴۴۲ : سال ۱۳۸۴، درستی (صحت و دقت) روش ها و نتایج اندازه گیری - قسمت دوم : روش پایه برای تعیین تکرار پذیری و تجدید پذیری روش اندازه گیری استاندارد

#### ۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد ، اصطلاحات و تعاریف زیر به کار می رود :

۴-۱

بهر

مقدار مشخصی از محصول است که در یک نوبت و در شرایط یکسان تهیه و تولید می شود.

۴-۲

آزمایه<sup>۱</sup>

نمونه ای است که از بهر مورد نظر طبق ضوابط نمونه برداری ، استاندارد ملی ایران شماره ۳۲۶ : سال ۱۳۸۷ ، شیر و فرآورده های آن - راهنمای نمونه برداری ، برای انجام آزمون تهیه می گردد .

۴-۳

آزمونه<sup>۲</sup>

مقدار معینی از آزمایه است که برای انجام آزمایش ، از آزمایه به طور وزنی / حجمی برداشته می شود.

۴-۴

فعالیت فسفاتاز قلیایی

فعالیت ALP<sup>۳</sup> (فسفاتاز قلیایی در شیر)

مقدار فنل آزاد شده توسط نمونه با استفاده از روشی که در این استاندارد ملی مشخص شده است.

یادآوری- فعالیت فسفاتاز قلیایی به عنوان مقدار فنل آزاد شده برحسب میکروگرم توسط یک میلی لیتر از نمونه یا نمونه بازساخته شده تحت شرایط مشخص در این استاندارد ملی می باشد. در استانداردهای دیگر فعالیت فسفاتاز قلیایی برحسب میلی واحد در هر لیتر بیان شده است. در منابع مختلف اطلاعاتی در رابطه با تبدیل این واحدها به یکدیگر موجود است.

#### ۵ اصول آزمون

نمونه توسط یک محلول بافر با  $pH = 10/6$  رقیق شده و در گرمخانه با دمای  $37^{\circ}C$  به مدت یک ساعت نگه داشته می شود، تحت این شرایط فسفاتاز قلیایی موجود در آزمونه ، از دی سدیم فنیل فسفات اضافه

1 - Test sample

2 - Test portion

3 - Alkaline phosphatase activity



شده ، فنل آزاد می کند. فنل آزاد شده با یک کینونیمید (دی برمokinون کلرومید)<sup>۱</sup> واکنش داده و تولید دی برمواپندو فنل (آبی رنگ) می کند که به روش رنگ سنجی در طول موج ۶۱۰ نانومتر اندازه گیری می شود.

#### ۶ مواد و/یا واکنشگرها

فقط از واکنشگرهایی با درجه خلوص آزمایشگاهی معین استفاده کنید و آب مورد استفاده باید آب مقطر یا آب با خلوص معادل آن باشد .

#### ۶-۱ محلول بافر هیدروکسید بورات باریم<sup>۲</sup>

۲۵ گرم هیدروکسید باریم بدون کربنات را در بالن حجمی ۵۰۰ ml (طبق بند ۷-۸) با آب حل کنید و تا خط نشانه به حجم برسانید و مخلوط کنید.  
۱۱ گرم اسید بوریک<sup>۳</sup> را در بالن حجمی ۵۰۰ ml (طبق بند ۷-۸) دیگری با آب حل کنید و تا خط نشانه به حجم برسانید و مخلوط کنید.

محلول هارا در دمای ۵۰ °C گرم کنید. یکی از محلول ها را به دیگری اضافه کنید و با همزن مخلوط کنید. محلول بدست آمده را سریعاً تا دمای ۲۰ °C سرد کنید. pH محلول را در صورت نیاز با اضافه کردن مقداری از محلول هیدروکسید باریم ، به  $10/6 \pm 0/1$  برسانید و محلول را با کاغذ صافی (طبق بند ۷-۱۰) صاف کنید. محلول بافر هیدروکسید بورات باریم صاف شده را در یک ظرف در پوش دار نگه داری کنید. قبل از استفاده محلول بافر را به نسبت یک به یک با آب رقیق کنید.

#### ۶-۲ محلول های بافر رنگ زا

#### ۶-۲-۱ محلول بافر رنگ زا - شماره ۱

۶ گرم متابورات سدیم<sup>۴</sup> یا ۱۲/۶ g متابورات سدیم چهار آبه و ۲۰ کلرید سدیم را در بالن حجمی ۱۰۰۰ ml ( طبق بند ۷-۸) با آب حل کنید و تا خط نشانه به حجم برسانید و مخلوط کنید.

#### ۶-۲-۲ محلول بافر رنگ زا - شماره ۲

۱۰ میلی لیتر محلول بافر رنگ شماره یک (طبق بند ۶-۲-۱) را به بالن حجمی ۱۰۰ ml انتقال دهید و با آب تا خط نشانه به حجم برسانید و مخلوط کنید.

#### ۶-۳ محلول سوبسترای بافر

۶-۳-۱ دی سدیم فنیل فسفات دی هیدرات<sup>۱</sup> که حداکثر دارای ۰/۰۱ در صد کسر جرمی فنل باشد.

۶-۳-۲ ۰/۱ گرم دی سدیم فنیل فسفات دی هیدرات (طبق بند ۶-۳-۱) را در ۱۰۰ ml محلول بافر هیدروکسید بورات باریم رقیق شده ، حل کنید.

#### ۶-۴ محلول رسوب دهنده مس- روی

1-Dibromoquinonechlorimide

2-[Ba(OH)<sub>2</sub>.8H<sub>2</sub>O]

3- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

4- NaBO<sub>2</sub>

1- Na<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O

۳ گرم سولفات روی و ۰/۶ g سولفات مس (طبق بند ۶-۶) را در بالن حجمی ۱۰۰ ml (طبق بند ۷-۸) با آب تا خط نشانه به حجم برسانید و مخلوط کنید.

۵-۶ محلول ۲ و ۶ دی برموکینون کلرومید (BQC)، معرف گیبس<sup>۲</sup> ۱ mg ± ۴۰ mg محلول BQC را در ۱۰ ml اتانول ۹۶ در صد کسر حجمی حل کنید. محلول را در یک بطری تیره رنگ و دمای °C (۲±۴) نگه داری کنید.

یادآوری - در صورت مشاهده تغییر رنگ یا نگه داری به مدت بیشتر از یک ماه، محلول نباید مورد استفاده قرار گیرد.

#### ۶-۶ محلول سولفات مس

۰/۰۵ گرم سولفات مس را در یک بالن حجمی ۱۰۰ ml با آب حل کنید و تا خط نشانه به حجم برسانید و مخلوط کنید.

۷-۶ محلول هیدروکسید سدیم، ۰/۵ مول بر لیتر

۸-۶ محلول های استاندارد فنل

۱-۸-۶ محلول استاندارد اولیه فنل

مقدار ۲ mg ± ۲۰۰ mg فنل بدون آب توزین شده با خلوص بالاتر از ۹۹/۵ در صد کسر جرمی را به یک بالن حجمی ۱۰۰ ml (طبق بند ۷-۸) انتقال دهید. فنل را در آب حل کنید. تا خط نشانه به حجم برسانید و مخلوط کنید.

یادآوری - محلول استاندارد اولیه فنل در دمای °C (۲±۴) به مدت ۶ هفته پایدار است.

#### ۲-۸-۶ محلول های کاری استاندارد فنل

با پی پت ۱۰ ml محلول استاندارد اولیه فنل (طبق بند ۶-۸-۱) را به بالن حجمی ۱۰۰ ml انتقال دهید. تا خط نشانه به حجم برسانید و مخلوط کنید (یک میلی لیتر شامل ۲۰۰ میکرو گرم فنل می باشد). از محلول استاندارد رقیق شده برای آماده سازی محلول های کاری استاندارد فنل مناسب که به ترتیب شامل ۲ میکرو گرم، ۵ میکرو گرم، ۱۰ میکرو گرم و ۲۰ میکرو گرم فنل در هر میلی لیتر می باشد، استفاده کنید.

#### ۷ وسایل

علاوه بر وسایل معمول آزمایشگاهی، تجهیزات زیر مورد نیاز است:

#### ۱-۷ ترازوی آزمایشگاهی

با قابلیت توزین حداقل ۱ mg ± ۰/۱ mg

---

2- Gibbs reagent

## ۲-۷ فتومتر

مناسب برای اندازه گیری در طول موج ۶۱۰ نانومتر

## ۳-۷ حمام آب

با قابلیت تنظیم دردمای  $37 \pm 1$  °C و مجهز به ترموستات

## ۴-۷ حمام آب جوش

## ۵-۷ مخلوط کن ورتکس<sup>۱</sup>

## ۶-۷ پی پت

با حجم ۰/۱ میلی لیتر ، یک میلی لیتر ، پنج میلی لیتر و ده میلی لیتر

## ۷-۷ لوله آزمایش شیشه ای

با حجم های مناسب و درپوش های عاری از فنل

## ۸-۷ بالن حجمی تک نشانه

با ظرفیت ۱۰۰ ml ، ۵۰۰ ml ، ۱۰۰۰ ml

## ۹-۷ قیف شیشه ای

با قطرهای تقریبا ۶۰ mm و ۱۰۰ mm

## ۱۰-۷ کاغذ صافی

از نوع سریع<sup>۲</sup> ، درجه بندی شده و با قطر ۱۱۰ mm و ۱۸۵ mm

## ۸ نمونه برداری

نمونه برداری باید مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۳۲۶ : سال ۱۳۸۷، شیر و فرآورده های آن – راهنمای نمونه برداری انجام گیرد.

یادآوری - نمونه باید نماینده واقعی از کل بهر باشد و در طی نگه داری و حمل و نقل دچار صدمه یا تغییر نگردد.

---

1- Vortex mixer

2- fast grade

## ۹ آماده سازی آزمایش

### ۱-۹ آماده سازی

قبل از استفاده با دقت نمونه را مخلوط کنید. معمولا برای خوب مخلوط شدن ، گرم کردن آزمایش ضروری نیست. ولی در صورتیکه گرم کردن ضروری باشد ، دما نباید از  $35^{\circ}\text{C}$  تجاوز نماید.

### ۲-۹ شیر خشک ، پودر دوغ کره و پودر آب پنیر

۱۰ گرم از آزمایش را در ۹۰ ml آب حل کنید و در صورت ضرورت برای تسریع انحلال از حرارت استفاده کنید ، ولی دما نباید از  $35^{\circ}\text{C}$  تجاوز نماید.

### ۳-۹ خنثی سازی اسید آزمایش ها

اگر آزمایش اسیدی ( $\text{pH} < 7$ ) است با محلول هیدروکسید سدیم (طبق بند ۶-۷) به  $\text{pH}$  خنثی برسانید.

## ۱۰ روش انجام آزمون

### ۱-۱۰ آماده سازی منحنی استاندارد

۱-۱۰-۱ در پنج لوله آزمایش (طبق بند ۷-۷) محلول های استاندارد را به شرح ذیل تهیه کنید. در یکی از لوله ها با پی پت یک میلی لیتر آب به عنوان نمونه کنترل یا شاهد و در بقیه لوله ها یک میلی لیتر از هر ۴ محلول کاری استاندارد فنل (طبق بند ۶-۸-۲) به ترتیب داخل هر لوله آزمایش بریزید. لوله های آزمایش استاندارد به ترتیب شامل صفر میکرو گرم (نمونه کنترل یا شاهد) ، ۲ میکروگرم ، ۵ میکروگرم ، ۱۰ میکروگرم و ۲۰ میکروگرم فنل می باشند.

۱-۱۰-۲ به هر لوله آزمایش (طبق بند ۱۰-۱-۱) یک میلی لیتر محلول سولفات مس (طبق بند ۶-۶) و ۵ میلی لیتر محلول بافر رنگ شماره ۲ (طبق بند ۶-۲-۲) و ۳ میلی لیتر آب و ۰/۱ میلی لیتر محلول BQC (طبق بند ۶-۵) اضافه کنید و مخلوط کنید. اجازه دهید رنگ در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه ظاهر شود.

۱-۱۰-۳ جذب نوری محلول های استاندارد را نسبت به محلول کنترل یا شاهد در طول موج ۶۱۰ نانومتر اندازه گیری کنید.

۱-۱۰-۴ جذب نوری را از طریق مقادیر فنل در میکرو گرم ها رسم کنید (طبق بند ۱۰-۱-۱). معادله منحنی استاندارد را محاسبه کنید.

### ۲-۱۰ اندازه گیری

۱-۲-۱۰ به هیچ وجه اندازه گیری را در برابر نور مستقیم آفتاب انجام ندهید ، از آلودگی حتی با مقادیر ناچیز بزاغ دهان یا عرق که ممکن است نتایج مثبت نادرست بدهد ، جلوگیری کنید.

۱-۲-۱۰ با پی پت داخل دو لوله آزمایش (طبق بند ۷-۷) یک میلی لیتر آزمايه یا نمونه باز ساخته شده اضافه کنید. یکی از لوله هارا برای کنترل یا آزمون شاهد استفاده کنید.

۲-۲-۱۰ در لوله آزمایش شاهد را ببندید. لوله آزمایش را در یک بشر با آب جوش قرار دهید. بشر را با فویل آلومینیم بپوشانید. لوله را در آب جوش برای مدت دو دقیقه نگه دارید ، سپس با آب سرد تا دمای اتاق خنک کنید. از این مرحله به بعد در مورد هر دو لوله آزمون محتوی نمونه شاهد و آزمايه یکسان عمل کنید.

۳-۲-۱۰ ۱۰ میلی لیتر محلول سوبسترای بافر (طبق بند ۶-۳) به هر دو لوله آزمايه (طبق بند ۱۰-۲-۱) و لوله آزمون شاهد (طبق بند ۱۰-۲-۱) اضافه کنید و مخلوط کنید.

۴-۲-۱۰ بلافاصله هر دو لوله آزمایش را در حمام آب با دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۶۰ دقیقه در حالیکه گاهگاهی به هم می زنید ، گرم کنید.

۵-۲-۱۰ هر دو لوله را در یک بشر با آب جوش قرار دهید و بشر را با فویل آلومینیم بپوشانید و در آب جوش برای مدت دو دقیقه نگه دارید ، سپس با آب سرد تا دمای اتاق خنک کنید.

۶-۲-۱۰ یک میلی لیتر محلول رسوب دهنده مس \_ روی (طبق بند ۶-۴) به هر لوله اضافه کنید و کاملاً مخلوط کنید.

۷-۲-۱۰ با کاغذ صافی (طبق بند ۷-۱۰) محتویات هر لوله را صاف کنید و چند میلی لیتر اول را دور بریزید. با پی پت ۵ ml از هر نمونه صاف شده را به داخل لوله آزمایش دیگر انتقال دهید.

۸-۲-۱۰ به هر لوله آزمایش (طبق بند ۱۰-۲-۷) ۵ ml محلول بافر رنگ شماره یک (طبق بند ۶-۲-۱) اضافه کنید و هم بزنید.

۹-۲-۱۰ ۰/۱ میلی لیتر محلول BQC (طبق بند ۶-۵) به هر لوله اضافه کرده و مخلوط کنید ، سپس اجازه دهید رنگ محلول ها در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه ظاهر شوند.

۱۰-۲-۱۰ جذب نوری محلول آزمون را در مقابل محلول آزمون شاهد در طول موج ۶۱۰ نانومتر اندازه بگیرید.

۱۱-۲-۱۰ اگر جذب نوری آزمايه ( طبق بند ۱۰-۲-۱۰) اندازه گیری شده از محلول استاندارد کاری فنل که دارای ۲۰ میکرو گرم فنل در هر میلی لیتر اندازه گیری شده و طبق بند ۱۰-۱-۳ تهیه شده است ،

تجاوز نماید ، اندازه گیری را با رقیق سازی مناسب آزمایش یا آزمایش باز ساخته شده به شرح زیر تکرار کنید. یک حجم آزمایش یا آزمایش باز ساخته شده را با حجم مناسب از همان آزمایش یا آزمایش باز ساخته شده که به منظور غیر فعال کردن فسفاتاز جوشانده اید ، مخلوط کنید. طبق بند ۱۰-۲-۲ ادامه دهید.

## ۱۱ محاسبه و بیان نتایج

### ۱-۱۱ محاسبه

۱-۱-۱۱ با استفاده از منحنی استاندارد (طبق بند ۱۰-۲-۱۰) جذب نوری تعیین شده در بند ۱۰-۱-۴ را به میکرو گرم های فنل تبدیل کنید.

۲-۱-۱۱ فعالیت فسفاتاز ( $ap$ ) را بر حسب میکرو گرم های فنل در هر میلی لیتر شیر ، مطابق فرمول شماره ۱ محاسبه کنید:

$$ap = 2/4 \times m \times f_d \quad \text{فرمول ۱}$$

که در آن :

$m$  وزن (بر حسب میکرو گرم) فنل بدست آمده ، (طبق بند ۱۱-۱-۱) ؛

$f_d$  فاکتور رقیق سازی برای آزمایش یا نمونه باز ساخته شده (طبق بند ۱۰-۲-۱۱) ، اگر مورد نیاز باشد (در غیر این صورت  $f_d=1$  می باشد).

### ۱۱-۲ بیان نتایج

نتایج آزمون را با یک رقم اعشار ثبت کنید.

## ۱۲ دقت

### ۱-۱۲ نتایج آزمون بین آزمایشگاهی

در یک آزمون بین آزمایشگاهی مقادیر تکرارپذیری و تجدیدپذیری طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱-۷۴۴۲ : سال ۱۳۸۳ و ۲-۷۴۴۲ : سال ۱۳۸۴ مشخص شده است. مقادیر در سطح احتمال ۹۵٪ بیان شده اند و برای غلظت ها و ابعاد غیر از موارد ارایه شده قابل اعمال نیستند.

### ۲-۱۲ تکرار پذیری

اختلاف مطلق بین دو نتیجه آزمون مستقل که توسط یک آزمایش کننده بر روی یک نمونه یکسان با همان تجهیزات و با همان روش ، در همان آزمایشگاه و در یک فاصله زمانی کوتاه انجام شده باشد ، نباید در ۵٪ موارد از ۱/۵ میکروگرم در هر میلی لیتر بیشتر باشد .

### ۳-۱۲ تجدیدپذیری

اختلاف مطلق بین دو نتیجه آزمون مستقل که توسط دو آزمایش کننده بر روی دو آزمونه یکسان با همان تجهیزات و با همان روش ، در دو آزمایشگاه مختلف و در یک فاصله زمانی کوتاه انجام شده باشد ، نباید در ۵٪ موارد از ۳/۹ میکروگرم در هر میلی لیتر بیشتر باشد .

### ۱۳ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد :

۱-۱۳ تمام آگاهی های لازم برای شناسایی نمونه

۲-۱۳ روش نمونه برداری طبق استاندارد ملی ایران شماره ۳۲۶ : سال ۱۳۸۷ ، شیر و فرآورده های آن – راهنمای نمونه برداری

۳-۱۳ روش آزمون طبق این استاندارد ملی ایران

۴-۱۳ هر گونه شرایطی که به طور اختیاری انجام شده و در این استاندارد ذکر نشده و همچنین هرگونه مشاهده غیر عادی در طول آزمون که ممکن است روی نتیجه آزمون موثر باشد ، ذکر گردد .

۵-۱۳ در صورتی که تکرارپذیری انجام شده باشد ، آخرین نتایج بدست آمده از آن باید مد نظر باشد.

۶-۱۳ نام و نام خانوادگی و امضاء آزمایش کننده

۷-۱۳ تاریخ انجام آزمون

**پیوست الف**  
**(اطلاعاتی)**  
**نتایج آزمون بین آزمایشگاهی**

یک آزمون بین المللی مشارکتی در ۹ آزمایشگاه با شرکت هفت کشور بر روی نمونه‌های آزمایشی، ۶ نوع شیر کامل گاو بسته بندی شده با مقادیر مختلف شیر خام گاو در سال ۲۰۰۵ انجام شد. برای نتایج بدست آمده آنالیز آماری مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱-۷۴۴۲: سال ۱۳۸۳ و ۲-۷۴۴۲: سال ۱۳۸۴ انجام شد و داده‌های دقیق در جدول الف-۱ آورده شده است.

**جدول الف-۱- نتایج آزمون بین آزمایشگاهی فسفاتاز قلیایی**

نمونه‌ها							پارامتر
متوسط	۶	۵	۴	۳	۲	۱	
	۳۵/۷	۱۱/۹	۹/۹	۶/۵	۴/۲	۲/۳	تعیین مقدار، میکرو گرم بر میلی لیتر
۸	۸	۸	۸	۸	۸	۸	تعداد آزمایشگاههای پذیرفته شده پس از حذف آزمایشگاههای دیگر
۱/۵	۳/۷۳	۰/۹۸	۰/۹۱	۱/۳۶	۰/۴۷	۰/۸۲	حدود تکرار پذیری، $r (=2/8 S_r)$ (میکرو گرم بر میلی لیتر)
۰/۵	۱/۳۲	۰/۳۵	۰/۳۲	۰/۴۸	۰/۱۷	۰/۲۹	انحراف استاندارد تکرار پذیری، $S_r$ (میکرو گرم بر میلی لیتر)
۴/۳	۳/۶۹	۲/۹۲	۳/۲۴	۷/۴۷	۳/۹۴	۱۲/۷۸	ضریب انحراف تکرار پذیری (درصد) $CV(r)$
۳/۹	۹/۷۰	۳/۲۲	۲/۶۲	۲/۵۲	۱/۵۱	۱/۵۹	حدود تجدید پذیری، $R (=2/8 S_R)$ (میکرو گرم بر میلی لیتر)
۱/۴	۳/۴۳	۱/۱۴	۰/۹۳	۰/۸۹	۰/۵۴	۰/۵۶	انحراف استاندارد تجدید پذیری $S_R$ (میکرو گرم بر میلی لیتر)
۱۱/۰	۹/۵۹	۹/۵۴	۹/۳۶	۱۳/۸۰	۱۲/۷۰	۲۴/۸۳	ضریب انحراف تجدید پذیری (درصد) $CV(r)$

**a** محدوده های تکرار پذیری و تجدید پذیری و انحراف استاندارد محاسبه شده شامل نتایج بدست آمده، مقدار ۲/۳ میکرو گرم بر میلی لیتر تعیین شده است.

**b** متوسط کل آزمایشگاهها بعد از حذف آزمایشگاههای دیگر



