

TCVN

TIÊU CHUẨN QUỐC GIA

**TCVN 10529:2014
ISO 12243:2003**

WITH AMENDMENT 1:2012

Xuất bản lần 1

**GĂNG TAY Y TẾ LÀM TỪ LATEX CAO SU
THIÊN NHIÊN – XÁC ĐỊNH PROTEIN CHIẾT XUẤT ĐƯỢC
VỚI NƯỚC BẰNG PHƯƠNG PHÁP LOWRY CẢI BIẾN**

*Medical gloves made from natural rubber latex –
Determination of water-extractable protein using the modified Lowry method*

HÀ NỘI – 2014

Mục lục

Trang

Lời nói đầu	4
Lời giới thiệu.....	5
1 Phạm vi áp dụng	7
2 Nguyên lý.....	7
3 Thuật ngữ và định nghĩa.....	8
4 Thiết bị, dụng cụ.....	8
5 Thuốc thử.....	9
6 Cách tiến hành	11
7 Tính kết quả	15
8 Báo cáo thử nghiệm	17
Phụ lục A (qui định) Kiểm tra xác nhận.....	18
Phụ lục B (qui định) Sự hấp phụ của protein trên ống polypropylen và polyetylen.....	20
Phụ lục C (tham khảo) Các phương pháp phân tích khác	22
Phụ lục D (tham khảo) Sự trừ nền.....	24
Phụ lục E (tham khảo) Độ chụm.....	25
Thư mục tài liệu tham khảo	29

Lời nói đầu

TCVN 10529:2014 hoàn toàn tương đương ISO 12243:2003 và Sửa đổi 1:2012.

TCVN 10529:2014 do Ban kỹ thuật tiêu chuẩn quốc gia TCVN/TC45 *Cao su thiên nhiên* biên soạn, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng đề nghị, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Lời giới thiệu

Đã từng có những vấn đề về phản ứng dị ứng ở một số người sử dụng găng tay y tế được sản xuất từ latex cao su thiên nhiên. TCVN 10529 (ISO 12243) quy định phương pháp xác định protein chiết xuất được với nước của các găng tay y tế.

Găng tay y tế làm từ latex cao su thiên nhiên – Xác định protein chiết xuất được với nước bằng phương pháp Lowry cải biến

Medical gloves made from natural rubber latex –

Determination of water-extractable protein using the modified Lowry method

CẢNH BÁO: Người sử dụng tiêu chuẩn này phải có kinh nghiệm làm việc trong phòng thử nghiệm thông thường. Tiêu chuẩn này không đề cập đến tất cả các vấn đề an toàn liên quan khi sử dụng. Người sử dụng tiêu chuẩn phải có trách nhiệm thiết lập các biện pháp an toàn và bảo vệ sức khỏe phù hợp với các quy định.

1 Phạm vi áp dụng

Tiêu chuẩn này qui định phương pháp xác định lượng protein chiết xuất được với nước trong găng tay cao su thiên nhiên (NR) để sử dụng trong y tế. Phương pháp có khả năng thích hợp để xác định protein chiết xuất được đối với các vật phẩm khác được làm từ latex cao su thiên nhiên; tuy nhiên các quy trình và thời gian chiết tách chưa được phê chuẩn và sẽ khác nhau với dạng vật phẩm được thử nghiệm. Đã có những phương pháp xác định protein đặc thù cho găng tay y tế khác (xem Phụ lục C) nhưng chúng không có khả năng áp dụng chung.

Tiêu chuẩn này chỉ liên quan đến phương pháp thử nghiệm, không liên quan đến việc lấy mẫu cũng như không đề cập đến các biện pháp an toàn của các giá trị nhận được hoặc các yêu cầu đối với việc ghi nhãn.

2 Nguyên lý

Các protein tan trong nước được chiết vào dung dịch đệm và sau đó được kết tủa để cô đặc và tách chúng ra khỏi các chất tan khác trong nước có thể gây nhiễu cho việc xác định (xem các Phụ lục A và D). Các protein kết tủa được hòa tan lại và được định lượng bằng cách đo màu bằng phương pháp Lowry cải biến sử dụng protein tiêu chuẩn (Nguyên lý của phương pháp, xem tài liệu tham khảo [1] trong Thư mục tài liệu tham khảo).

3 Thuật ngữ và định nghĩa

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

3.1

Hệ số nồng độ (concentration factor)

F

Mức độ mà dịch chiết protein được cô đặc bằng cách kết tủa, tiếp đó được tái hòa tan trong một thể tích nhỏ hơn của dung dịch natri hydroxyt.

CHÚ THÍCH: Theo đó, nếu protein trong 4 cm³ dung dịch được kết tủa và tái hòa tan thành 0,8 cm³, thì hệ số nồng độ F sẽ là 4/0,8 (= 5).

3.2

Protein (protein)

Các protein và các hợp chất tương tự protein (ví dụ các polypeptit) xuất hiện trong các vật phẩm được làm từ latex cao su thiên nhiên và chiết xuất được bằng nước.

3.3

Phương pháp Lowry cải biến (modified Lowry method)

Sự cải biến của phương pháp thử nghiệm Lowry gốc, bao gồm việc kết tủa và tách các protein để giảm lượng các hợp chất khác chiết xuất được với nước có thể ảnh hưởng đến phép xác định.

4 Thiết bị, dụng cụ

Nếu không có quy định khác, tất cả các dụng cụ thí nghiệm (nghĩa là các bình, ống, v.v...) phải được làm bằng polypropylen hoặc polyetylen.

CHÚ THÍCH: Dụng cụ bằng polypropylen hoặc polyetylen được sử dụng nhiều hơn dụng cụ bằng thủy tinh để giảm thiểu sự hấp phụ bề mặt. Phương pháp xác định khả năng liên kết protein được mô tả trong Phụ lục B.

4.1 Găng tay không có protein, được làm từ latex cao su tổng hợp hoặc chất dẻo mà không có vật liệu bột và các vật liệu khác có khả năng truyền được sang các mẫu thử nghiệm hoặc các dung dịch chiết.

4.2 Máy ly tâm, có khả năng đạt được gia tốc ít nhất là 60 000 m/s² (6 000 × g).

CHÚ THÍCH: Nên dùng máy ly tâm có làm lạnh do nhiệt độ có thể tăng đáng kể khi ly tâm được thực hiện trong thời gian dài.

4.3 Ống ly tâm, dung tích 200 cm³, 50 cm³, 10 cm³, 2 cm³ và 1,5 cm³, được làm bằng polypropylen hoặc polyetylen (nếu có sẵn) với khả năng liên kết protein thấp.

4.4 Bình nón, dung tích 250 cm³.

4.5 Micropipet.

4.6 Máy lắc ống nghiệm, vận hành từ 3 Hz đến 6 Hz.

5.7 Máy trộn Vortex hoặc bồn siêu âm.

4.8 Màng lọc dùng một lần, có khả năng liên kết protein thấp và kích cỡ lỗ tối đa là 0,45 μm.

4.9 Kẹp, để bịt găng tay kín nước trong khi chiết xuất. Các cặp thanh nhôm được bọc bằng cao su xốp, có thể được bắt vít với nhau, hoặc làm bằng chất dẻo dài 170 mm như được sử dụng trong thăm tách máu.

4.10 Thiết bị quang phổ

4.10.1 Máy đo quang phổ, với các cuvet dùng một lần bằng polystyren (cuvet thạch anh có thể được sử dụng nhưng yêu cầu phải làm sạch cẩn thận).

Hoặc

4.10.2 Bộ đọc vi đĩa, với đĩa vi chuẩn độ (phiến vi) đáy phẳng làm bằng polystyren có 96 lỗ dung tích từ 0,25 cm³ đến 0,5 cm³.

CHÚ THÍCH: Tốt nhất là các lỗ có dung tích 0,5 cm³. Lỗ có dung tích nhỏ hơn có thể được sử dụng nhưng sẽ làm giảm độ nhạy của thử nghiệm.

4.11 Cân, có độ chính xác đến 0,0001 g .

4.15 Máy lắc.

5 Thuốc thử

Trong thử nghiệm, chỉ sử dụng thuốc thử cấp tinh khiết phân tích và nước cất hoặc nước đã khử ion.

5.1 Dung dịch nhuộm: Bromophenol xanh (blue), muối natri, được chuẩn bị bằng cách hòa tan 0,1 g xanh bromophenol trong 1 L nước. Dung dịch sử dụng được trong bốn tuần.

5.2 Dung dịch chiết: Dung dịch đệm có khả năng duy trì độ pH 7,4 ± 0,4 trong suốt quá trình chiết.

CHÚ THÍCH 1: Chất đệm thích hợp bao gồm dung dịch muối đệm phosphat (PBS) (0,01 mol/L) và dung dịch muối hemisodium acid N-tris-(hydroxymetyl)-metyl-2-amino-etanesulfonic (TES) (0,1 mol/L). Chất đệm PBS được chuẩn bị bằng cách hòa tan viên PBS trong nước cất theo hướng dẫn của nhà

TCVN 10529:2014

sản xuất. Trong trường hợp, tại cuối giai đoạn chiết không đạt được pH $7,4 \pm 0,4$, cần phải sử dụng một dung dịch đệm đặc hơn. Dung dịch TES được chuẩn bị bằng cách hòa tan 24 g TES trong 500 cm^3 nước và định mức đến 1 L.

CHÚ THÍCH 2: Các viên PBS và TES là luôn có sẵn.

5.3 Thuốc thử protein cho phương pháp Lowry cải biến

5.3.1 Thuốc thử A: Đồng xitrat kiềm, được chuẩn bị mới hàng ngày bằng cách trộn 10 phần thuốc thử C với 0,2 phần thuốc thử D.

Đồng tartrat kiềm cũng được coi là phù hợp và phải được chuẩn bị mới hàng ngày. Vật liệu có sẵn trong bộ kit có thể chứa chất bảo quản không công bố, có thể ảnh hưởng đến việc xác định.

5.3.2 Thuốc thử B: Pha loãng thuốc thử Folin chuẩn bị bằng cách pha loãng 72 cm^3 thuốc thử Folin 2 N với 28 cm^3 nước.

CHÚ THÍCH: Thuốc thử Folin 2 N sẵn có trên thị trường. Nồng độ của một số thuốc thử Folin thương mại có thể không phải là 2 N.

5.3.3 Thuốc thử C: Dung dịch 6 g natri cacbonat trong 100 cm^3 nước.

5.3.4 Thuốc thử D: Dung dịch chứa 1,5 g đồng sulfat và 3 g natri xitrat trong 100 cm^3 nước.

5.3.5 Dung dịch natri hydroxit, $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/L}$.

5.3.6 Dung dịch natri deoxycholat (DOC), chuẩn bị bằng cách hòa tan 0,15 g natri deoxycholat trong nước và dùng nước pha loãng đến 100 cm^3 . Bảo quản các dung dịch trong tủ lạnh, loại bỏ sau 4 tuần.

5.3.7 Dung dịch axit tricloacetic (TCA), chuẩn bị bằng cách pha loãng 72 g axit tricloacetic đến 100 cm^3 với nước và lắc kỹ. Bảo quản các dung dịch trong tủ lạnh. Dung dịch ổn định trong thời gian dài.

5.3.8 Dung dịch axit phosphotungstic (PTA), được chuẩn bị bằng cách pha loãng 72 g axit phosphotungstic vào 100 cm^3 nước và khuấy kỹ. Bảo quản dung dịch trong tủ lạnh, loại bỏ dung dịch sau 4 tuần.

Có thể là thuận tiện khi trộn trước các dung dịch TCA và PTA theo cùng thể tích và bổ sung chúng một cách đồng thời trong 7.4.2. Hỗn hợp như vậy phải được chuẩn bị hàng ngày khi không có các dữ liệu về thời gian lưu trữ của nó.

5.4 Dung dịch gốc protein lòng trắng trứng

Việc sử dụng lòng trắng trứng được chuẩn bị bằng cách cất phân đoạn amoni sulfat và kết tinh nhiều lần ở pH 4,5..

Chuẩn bị dung dịch từ 100 mg lòng trắng trứng trong 100 cm³ của dung dịch chiết thích hợp (5.2) để có nồng độ là 1 mg/cm³. Lọc dung dịch qua màng lọc có liên kết protein thấp với kích cỡ lỗ 0,45 µm hoặc nhỏ hơn và xác định độ hấp thụ ở 280 nm sử dụng máy đo quang phổ UV với cuvet có chiều dài đường đo 1 cm và sử dụng dung dịch chiết (5.2) là dung dịch trắng. Chia độ hấp thụ cho 0,64¹⁾ để thu được nồng độ chính xác của dung dịch gốc lòng trắng trứng. Dung dịch bền trong 2 ngày khi được bảo quản tại nhiệt độ không lớn hơn 7 °C hoặc trong 2 tháng đông lạnh ở -10 °C. Việc rã đông cần gia nhiệt đến 45 °C trong 15 min.

CHÚ THÍCH: Thời gian làm lạnh có tính tích lũy. Để tránh việc rã đông và đông lạnh lặp đi lặp lại, khuyến cáo rằng dung dịch gốc phải được bảo quản theo từng phần nhỏ ở dạng lỏng, mỗi phần đủ để xây dựng một đường chuẩn đơn hoặc để sử dụng trong quy trình kiểm tra xác nhận (xem Phụ lục A).

6 Cách tiến hành

6.1 Nguyên lý

Quy trình bao gồm việc chiết xuất toàn bộ găng tay, sau đó là làm sạch và cô đặc dịch chiết. Nồng độ của protein ở trong dịch chiết được xác định bằng cách tham chiếu đến đường chuẩn tiêu chuẩn được xây dựng bằng cách sử dụng các dung dịch loãng của dung dịch gốc protein (5.4 và 6.3) đã được cô đặc theo cùng cách. Kỹ thuật phân tích của người phân tích phải được kiểm tra xác nhận trước theo qui định trong Phụ lục A.

Việc chiết xuất được tiến hành ba lần bằng cách sử dụng ba găng tay hoặc ba đôi găng tay từ lô định trước; việc làm sạch và cô đặc từng dịch chiết và phép xác định kế tiếp được tiến hành riêng rẽ.

6.2 Quy trình chiết xuất

6.2.1 Tổng quan

Toàn bộ bề mặt của găng tay phải được tiếp xúc với dung dịch chiết tại nhiệt độ 25 °C ± 5 °C trong thời gian là 120 min ± 5 min.

Hai quy trình chiết xuất được cho phép, gọi là quy trình “găng cắt” và quy trình “găng lồng găng”. Trong trường hợp có tranh chấp, quy trình “găng cắt” được ưu tiên vì quy trình này dễ thực hiện và mất ít thời gian hơn.

¹⁾ Giá trị độ chụm của hệ số “tiêu hủy” của lòng trắng trứng phụ thuộc vào sự xác nhận.

TCVN 10529:2014

Trong quy trình “găng lòng găng”, nếu có những lỗ kim châm thì phải loại bỏ mẫu và lặp lại quy trình chiết với đôi găng mới.

Quy trình được sử dụng phải được ghi lại trong báo cáo thử nghiệm và tất cả các mẫu trong bộ mẫu cho trước phải được chiết bởi cùng quy trình. Việc chiết xuất phải được tiến hành ba lần và thực hiện một phép xác định riêng rẽ trên mỗi dịch chiết.

Sử dụng găng tay không có protein (5.1) để xử lý các mẫu găng tay được sử dụng để chiết xuất.

CHÚ THÍCH: Tần suất lấy mẫu và găng tay trái hoặc phải không thuộc phạm vi áp dụng của tiêu chuẩn này.

6.2.2 Quy trình A – Quy trình găng cắt

6.2.2.1 Báo cáo khối lượng của găng tay (m) với độ chính xác không nhỏ hơn 0,001 g.

6.2.2.2 Cắt găng tay dọc theo đường biên. Để thuận lợi cho việc chiết xuất, có thể cắt găng tay thành những mẫu nhỏ hơn (nhưng xem 6.2.2.3).

6.2.2.3 Nếu kết quả được ghi lại tính bằng microgam trên đơn vị diện tích của găng tay (ví dụ $\mu\text{g}/\text{dm}^2$), xác định diện tích bề mặt của găng tay như sau:

Cắt một mẫu hình chữ nhật từ mặt sau của găng tay với kích thước khoảng 0,5 dm x 0,5 dm và đo các kích thước chính xác đến 0,01 dm. Tính diện tích A_1 .

Xác định khối lượng (m_p) của mẫu hình chữ nhật chính xác đến 0,001 g.

Tổng diện tích bề mặt A hai mặt của găng tay được cho bởi $A = 2A_1 \times m/m_p$.

6.2.2.4 Chuyển tất cả các mẫu của găng tay vào bình tam giác thích hợp (4.4).

6.2.2.5 Thêm chính xác thể tích V của dung dịch chiết (5.2). Tổng thể tích V của dung dịch chiết được sử dụng phải nằm trong khoảng từ 10 cm^3 đến 15 cm^3 trên gam găng tay và đủ để phủ kín các mẫu.

6.2.2.6 Chiết mẫu thử nghiệm tại nhiệt độ $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ trong $120\text{ min} \pm 5\text{ min}$, lắc lần đầu trong 15 s và các lần sau đó theo các khoảng thời gian không lớn hơn 30 min. Nếu có thể, tốt nhất là lắc chậm và liên tục ở tốc độ khoảng 200 vòng/min.

6.2.2.7 Gạn dịch chiết và loại bỏ mọi vật chất dạng hạt bằng cách ly tâm ở tốc độ tối thiểu là 20 000 m/s^2 ($2000 \times g$) trong 15 min. Dịch chiết thường được sử dụng ngay nhưng có thể được lưu giữ trong thời gian nhiều nhất là 48 h tại nhiệt độ không lớn hơn $7\text{ }^\circ\text{C}$ hoặc đông lạnh trong thời gian nhiều nhất là 15 ngày tại nhiệt độ dưới $-10\text{ }^\circ\text{C}$.

6.2.3 Quy trình B – Quy trình “găng lỏng găng”

6.2.3.1 Lấy hai găng tay và xác định khối lượng của mỗi chiếc với độ chính xác không nhỏ hơn 0,001 g (m_1 và m_2). Đánh dấu từng găng tay tại điểm trên cổ cách đầu ngón tay giữa 20 cm. Lấy một găng tay và lồng nó vào bên trong chiếc kia sao cho chúng khít với nhau (việc này có thể được thực hiện một cách thuận lợi bằng cách sử dụng những que để lồng ngón cái vào ngón cái, v.v...; tuy nhiên, cách thức để thực hiện việc này không quan trọng miễn là găng tay được thao tác ở mức tối thiểu). Lặp lại quá trình với hai đôi găng tay tiếp theo có cùng kích thước.

6.2.3.2 Rót lượng dung dịch nhuộm vừa đủ (5.1) vào trong găng tay để làm đầy tất cả các ngón tay. Rót 25 cm³ dung dịch chiết (5.2) vào giữa găng tay trong và găng tay ngoài. Thao tác nhẹ nhàng để loại bỏ mọi bọt khí và đóng kín găng tay bằng kẹp (4.9) tại vị trí đánh dấu 20 cm.

6.2.3.3 Cố định găng tay vào máy lắc và lắc ở tốc độ khoảng 200 vòng/min trong 120 min \pm 5 min tại nhiệt độ 25 °C \pm 5 °C. Nếu xuất hiện các giọt chất lỏng nhỏ trên bề mặt ngoài, khả năng đó là do các lỗ châm kim ở găng tay ngoài, loại bỏ các mẫu và lặp lại việc chiết xuất với đôi găng tay mới.

6.2.3.4 Loại bỏ kẹp và thận trọng tách găng tay, cẩn thận không làm bắn dịch chiết bởi dung dịch nhuộm ở găng tay bên trong.

6.2.3.5 Gạn dịch chiết từ găng tay ngoài vào ống ly tâm (4.3). Nếu nó có màu xanh (blue), đó là biểu lộ của lỗ châm kim hoặc nhiễm bẩn chéo. Trong các trường hợp như vậy, loại bỏ dung dịch và lặp lại việc chiết với đôi găng tay mới. Làm trong dịch chiết bằng cách quay ly tâm ở tốc độ tối thiểu là 20 000 m/s² (2 000 \times g) trong 15 min.

Dịch chiết thường được sử dụng ngay nhưng có thể được lưu giữ trong thời gian nhiều nhất là 48 h tại nhiệt độ không lớn hơn 7 °C hoặc đông lạnh trong thời gian nhiều nhất là 15 ngày tại nhiệt độ dưới -10 °C.

6.2.3.6 Cắt cả hai găng tay tại điểm đánh dấu 20 cm để loại bỏ cổ găng. Loại bỏ chất lỏng dư thừa từ cổ găng bằng cách thấm và để khô tại nhiệt độ phòng. Xác định khối lượng của các cổ găng (m_c) với độ chính xác không nhỏ hơn 0,001 g. Tính khối lượng trung bình (m_s) của phần găng tay được chiết: $m_s = (m_1 + m_2 - m_c)/2$, trong đó: m_1 và m_2 là các khối lượng ban đầu của găng tay và m_c là tổng khối lượng của phần các cổ găng không được chiết.

6.2.3.7 Nếu kết quả được ghi lại tính bằng microgam trên đơn vị diện tích của găng tay (ví dụ $\mu\text{g}/\text{dm}^2$), tiến hành theo 6.2.2.3.

6.3 Chuẩn bị các dung dịch protein tiêu chuẩn

Chuẩn bị các dung dịch protein tiêu chuẩn bằng cách làm loãng dung dịch protein gốc (5.4) bằng

dung dịch chiết (5.2), để tạo ra các dung dịch với các nồng độ, ví dụ: 40 µg/cm³, 20 µg/cm³, 10 µg/cm³, 5 µg/cm³, và 2,5 µg/cm³. Sử dụng dung dịch chiết (5.2) là dung dịch trắng. Các dung dịch ổn định trong 2 ngày được làm lạnh (xem Chú thích).

CHÚ THÍCH: Các nồng độ thấp có thể được chuẩn bị dễ dàng bằng cách pha loãng hai lần liên tiếp dung dịch đặc hơn thích hợp. Các dung dịch tiêu chuẩn phải bao trùm khoảng rộng của các giá trị nồng độ đã biết vì nồng độ của dung dịch gốc đã được xác định chính xác (xem 5.4). Các dung dịch này cũng cần thiết cho việc kiểm tra quy trình được mô tả trong Phụ lục A.

6.4 Kết tủa và cô đặc protein

6.4.1 Qui định chung

Thực hiện phép xác định riêng rẽ tại nhiệt độ 25 °C ± 5 °C.

6.4.2 Chuyển chính xác 4 cm³ mỗi loại dung dịch chiết (5.2) (là dung dịch trắng), các dung dịch protein tiêu chuẩn (xem 6.3) và các dịch chiết của ba găng tay vào các ống ly tâm dung tích 10 cm³ (4.3). Thêm 0,4 cm³ DOC (5.3.6), trộn và để yên trong 10 min, sau đó thêm 0,4 cm³ TCA (5.3.7) và trộn. Thêm 0,4 cm³ PTA (5.3.8), trộn (xem Chú thích) và để yên trong 30 min nữa.

CHÚ THÍCH: Phải lấy lượng cân sao cho đảm bảo đủ dùng cho cuvet được sử dụng trong phân tích. Nếu bộ đọc vi đĩa được sử dụng, các khối lượng có thể được giảm đi theo tỷ lệ. Nếu gồm có số lượng mẫu lớn, điều quan trọng đặc biệt là bảo đảm rằng các ống ly tâm được nhận dạng rõ ràng.

6.4.3 Quay ly tâm ở tốc độ tối thiểu 60 000 m/s² (6 000 x g) trong thời gian 30 min. Điều quan trọng là protein được ép chặt đúng mức. Nếu cần thiết, kéo dài thời gian ly tâm. Gạn chất lỏng trên bề mặt và làm khô bằng cách úp ngược các ống ly tâm trên tờ giấy thấm. Thêm 0,8 cm³ dung dịch natri hydroxit nồng độ 0,2 mol/L (5.3.5) vào mỗi ống, kể cả mẫu trắng, để tái hòa tan các protein kết tủa. Sử dụng máy trộn vortex hoặc bồn siêu âm (4.7) nếu cần.

Bảo đảm rằng protein tái hòa tan hoàn toàn thành dung dịch trong. Nếu vẫn còn một số kết tủa protein, đong một lượng nhất định dung dịch natri hydroxit để bổ sung tiếp, nhiều nhất là 3,2 cm³ (nghĩa là tổng cộng bằng 4,0 cm³). Phải sử dụng lượng natri hydroxit như nhau đối với mỗi dung dịch. Lượng dung dịch natri hydroxit được khuyên dùng (0,8 cm³) cho hệ số nồng độ F là 5. Nếu không sử dụng lượng natri hydroxit như nhau đối với mỗi mẫu, thì dẫn đến F của các mẫu sẽ khác nhau:

$$F = \frac{\text{Thể tích của dịch chiết trước khi kết tủa}}{\text{Thể tích của NaOH được sử dụng để tái hòa tan protein}}$$

Dung dịch protein tái hòa tan thường phải được sử dụng trong cùng ngày. Nếu phép xác định không thể thực hiện được ngay, viên protein có thể được lưu giữ trong thời gian không quá 24 h tại nhiệt độ không quá 7 °C.

Trong các trường hợp không đạt được sự hòa tan hoàn toàn sau khi thêm 4,0 cm³ NaOH, quay ly tâm ở tốc độ 60 000 m/s² (6 000 × g) trong 15 min để cho dung dịch protein trong.

6.5 Sự phát triển màu

6.5.1 Bật máy đo quang phổ và điều chỉnh về “0” theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

6.5.2 Thêm 0,3 cm³ thuốc thử A (5.3.1) vào 0,8 cm³ các dung dịch protein tái hòa tan, kể cả mẫu trắng từ 6.4.2, và khuấy kỹ. Thêm 0,1 cm³ thuốc thử B (5.3.2), trộn, và để yên trong ít nhất là 15 min nhưng không lâu quá 1 h trước khi đo độ hấp thụ.

CHÚ THÍCH: Chỉ 0,8 cm³ dung dịch protein tái hòa tan được sử dụng để tạo màu, không cần quan tâm đến thể tích cuối cùng của dung dịch protein tái hòa tan.

Nếu kết tủa xuất hiện khi để yên do sự có mặt của một số chất gây nhiễu, quay ly tâm để có dung dịch trong suốt trước khi đo màu.

6.5.3 Phép đo quang phổ

Chuyển các dung dịch được chuẩn bị trong 6.5.2 vào các cuvet và đo độ hấp thụ so với mẫu trắng tại bước sóng 750 nm (ưu tiên) hoặc tại bước sóng cụ thể nằm trong khoảng từ 600 nm đến 750 nm trong thời gian 1 h với sự bổ sung thuốc thử B. Để có các kết quả nhất quán, các mức thời gian, thiết bị và bước sóng được chọn phải luôn nhất quán. Xác định hàm lượng protein, tính bằng microgam trên gam găng tay, như được mô tả trong 7.3.

Hoặc

6.5.4 Phép đo sử dụng bộ đọc vi đĩa

Chuyển 0,49 cm³ các dung dịch được chuẩn bị trong 6.5.2 vào đĩa vi chuẩn độ (phiên vi) đáy phẳng (xem 4.10.2) và đo độ hấp thụ so với mẫu trắng tại bước sóng cụ thể nằm trong khoảng từ 600 nm đến 750 nm trong thời gian 1 h với sự bổ sung thuốc thử B. Xác định hàm lượng protein, tính bằng microgam trên gam găng tay, như được mô tả trong 7.3.

7 Tính kết quả

7.1 Đường chuẩn

Chuẩn bị đường chuẩn bằng cách vẽ đồ thị nồng độ của các dung dịch protein ban đầu (xem 6.3) phụ thuộc vào mức hấp thụ của chúng sau khi đã kết tủa và được tái hòa tan (xem 6.5.3 hoặc 6.5.4).

CHÚ THÍCH: Một số protein bị mất đi trong quá trình cô đặc. Phương pháp này giả định rằng các mẫu chuẩn và các mẫu thử nghiệm cùng mất đi lượng phần trăm như nhau trong khi cô đặc.

7.2 Tính nồng độ

Xác định nồng độ c của mỗi mẫu trong ba mẫu được chiết, tính bằng microgam trên centimét khối dung dịch chiết, bằng cách sử dụng độ hấp thụ để đọc trực tiếp từ đường chuẩn. Báo cáo giá trị trung bình.

CHÚ THÍCH: Trong trường hợp đường chuẩn không tuyến tính, giá trị có thể được tính bằng hồi quy đa thức. Việc sử dụng phần mềm máy tính thương mại để điều chỉnh đường chuẩn và tính các nồng độ chưa biết sẽ thiết thực hơn.

7.3 Tính hàm lượng các protein chiết xuất được

7.3.1 Quy trình A – Quy trình găng cắt

Hàm lượng các protein chiết xuất được E , tính bằng microgam trên gam găng tay, theo công thức sau:

$$E = \frac{V \times c \times 5}{F \times m}$$

trong đó

- V là thể tích của dung dịch chiết được sử dụng, tính bằng centimét khối;
- c là protein nồng độ ở trong dung dịch protein tái hòa tan, tính bằng microgam trên centimet khối;
- F là hệ số nồng độ;
- m là khối lượng, tính bằng gam, của cả găng tay.

CHÚ THÍCH: Giá trị $5/F$ sẽ bằng 1 trừ khi cần phải sử dụng lượng natri hydroxyt khác với lượng được khuyến dùng – xem dẫn giải trong 7.4.3.

Protein chiết xuất được từ mỗi găng tay, tính bằng microgam, nhận được bằng cách nhân kết quả nhận được ở trên với m :

$$\text{Protein chiết xuất được từ mỗi găng tay} = E \times m$$

7.3.2 Quy trình B — Quy trình “găng lòng găng”

Hàm lượng các protein chiết xuất được E , tính bằng microgam trên gam găng tay, theo công thức sau:

$$E = \frac{V \times c \times 5}{F \times m_s}$$

trong đó

- V là thể tích của dung dịch chiết được sử dụng, tính bằng centimét khối;
- c là protein nồng độ ở trong dung dịch protein tái hòa tan, tính bằng microgam trên centimet khối;
- F là hệ số nồng độ;
- m_s là khối lượng, tính bằng gam, của mẫu găng tay được chiết (xem 6.2.3.6).

CHÚ THÍCH: Giá trị $5/F$ sẽ bằng 1 trừ khi cần phải sử dụng lượng natri hydroxyt khác với lượng được khuyến dùng – xem dẫn giải trong 7.4.3.

Protein chiết xuất được từ mỗi găng tay, tính bằng microgam, nhận được bằng cách nhân kết quả nhận được ở trên với m :

$$\text{Protein chiết xuất được từ mỗi găng tay} = E \times m$$

trong đó:

m là khối lượng, tính bằng gam, của cả găng tay [= $(m_1 + m_2)/2$]

m_1 và m_2 lần lượt là các khối lượng của đôi găng tay ban đầu.

7.3.3 Chuyển đổi thành khối lượng trên diện tích bề mặt đơn vị

Các qui định hiện hành có thể yêu cầu các kết quả được biểu thị theo các thuật ngữ về diện tích bề mặt, ví dụ: microgam trên đơn vị diện tích. Chuyển đổi thành các giá trị này như sau:

$$\text{Protein chiết xuất được tính bằng } \mu\text{g}/\text{dm}^2 = \frac{V \times c \times 5}{F \times A}$$

trong đó: A là tổng diện tích bề mặt của găng tay (xem 6.2.2.3), tính bằng decimet vuông.

8 Báo cáo thử nghiệm

Báo cáo thử nghiệm phải bao gồm ít nhất các thông tin sau đây:

- a) viện dẫn tiêu chuẩn này;
- b) thông tin đầy đủ để nhận biết hoàn toàn mẫu được thử nghiệm;
- c) ngày và kết quả thử nghiệm;
- d) xuất xứ và nhận dạng protein tiêu chuẩn được sử dụng;
- e) bản chất của chất đệm được sử dụng;
- f) theo quy trình chiết xuất nào (quy trình A hoặc quy trình B);
- g) tên và địa chỉ của phòng thử nghiệm thử nghiệm, nếu khác với nhà sản xuất găng tay;
- h) mọi ứng xử bất thường được ghi nhận và mọi sai khác với quy trình quy định trước.

Phụ lục A

(qui định)

Kiểm tra xác nhận

A.1 Tổng quan

Các hóa chất như các chất hoạt động bề mặt, chất xúc tiến và chất chống oxi hóa được bổ sung vào latex cao su thiên nhiên trong quá trình sản xuất găng tay có thể ảnh hưởng đến sự tiến triển màu khi tiến hành xác định; một số hóa chất có thể làm giảm sự tiến triển màu trong khi các chất khác có thể làm tăng nó.

Mục đích của quá trình cô đặc protein bằng cách kết tủa và tái hòa tan là để làm sạch protein bằng cách làm cho nó thoát khỏi các chất gây nhiễu này. Điều không tránh khỏi là trong quá trình này một lượng protein nhất định bị mất đi và giả thiết rằng đối với các mục đích của thử nghiệm, các dung dịch protein tiêu chuẩn cũng như các dịch chiết mẫu thử nghiệm cùng bị mất đi số phần trăm như nhau.

Để bảo đảm rằng việc xử lý được thực hiện với những thất thoát tối thiểu, trình độ kỹ thuật của phòng thử nghiệm mới hoặc thao tác viên mới phải được kiểm tra xác nhận bằng cách xác định mức thu hồi phục thực tế đạt được khi kết tủa và tái hòa tan các protein tiêu chuẩn, như được mô tả dưới đây.

A.2 Nguyên lý

Các dung dịch protein tiêu chuẩn được cô đặc hai lần và các dung dịch thu tạo thành sau đó được thử nghiệm hai lần để đánh giá tính ổn định trong công việc của người vận hành.

A.3 Cách tiến hành

A.3.1 Chuẩn bị các dung dịch protein tiêu chuẩn không bị kết tủa

Sử dụng protein dung dịch gốc (6.4), chuẩn bị các dung dịch loãng bằng 0,2 mol/l dung dịch natri hydroxyt (6.3.5) để cho các dung dịch protein tiêu chuẩn có các nồng độ là 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ và 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

A.3.2 Chuẩn bị các dung dịch protein tiêu chuẩn để kết tủa

Tương tự, sử dụng dung dịch protein gốc (6.4), chuẩn bị các dung dịch loãng sử dụng dung dịch chiết (6.2) để cho các dung dịch protein tiêu chuẩn có các nồng độ là 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$, 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ và 2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

A.3.3 Kết tủa và cô đặc protein

Thực hiện quy trình hai lần.

Sử dụng quy trình được mô tả trong 7.4, kết tủa các dung dịch protein tiêu chuẩn được làm loãng bằng dung dịch chiết (xem A.3.2). Tái hòa tan protein kết tủa trong natri hydroxyt 0,2 mol/l (6.3.5) để thu được hai dung dịch đối với mỗi nồng độ có hệ số nồng độ $F = 5$.

A.3.4 Sự tiến triển màu và phép xác định

Thực hiện quy trình hai lần.

Sử dụng quy trình được mô tả trong 7.5, thực hiện phép xác định trên các dung dịch protein không bị kết tủa (xem A.3.1) và trên mỗi dung dịch trong các dung dịch thu được từ protein được kết tủa và tái hòa tan (xem A.3.3).

A.3.5 Tính toán

Chuẩn bị đường chuẩn bằng cách vẽ đồ thị các mức hấp thụ trung bình của các dung dịch protein tiêu chuẩn không được kết tủa phụ thuộc vào nồng độ (xem A.3.1) và sử dụng đường chuẩn được hình thành như vậy để xác định nồng độ c của các dung dịch protein sau khi kết tủa và cô đặc (xem A.3.3). Giá trị c trung bình đối với mỗi nhóm gồm bốn phép xác định (mỗi protein tiêu chuẩn được kết tủa hai lần và phần cô đặc thu được cũng được thử nghiệm hai lần để nhận được bốn kết quả đối với mỗi protein tiêu chuẩn).

A.3.6 Phần trăm thu hồi

Phần trăm thu hồi là c/F , được biểu thị bằng phần trăm nồng độ dung dịch protein tiêu chuẩn ban đầu (xem A.3.2) trước khi kết tủa. Vẽ đồ thị phần trăm thu hồi phụ thuộc vào các nồng độ ban đầu.

VÍ DỤ: Protein từ dung dịch loãng ban đầu $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ được kết tủa và tái hòa tan để có được nồng độ $5x$ ($F = 5$) và c xác định được là $200 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Như vậy $c/F = 40 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ và chênh lệch với nồng độ ban đầu $50 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ phản ánh sự hao hụt vật liệu trong quá trình. Việc diễn đạt giá trị mới dưới dạng phần trăm của giá trị thực, $(40/50) \times 100 = 80 \%$, đưa ra phần trăm thu hồi.

A.3.7 Yêu cầu

Phần trăm thu hồi không được nhỏ hơn 80 % ở các mức nồng độ nhỏ hơn $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Nếu không đạt được giá trị này, lặp lại quy trình, đặc biệt chú ý vào kỹ thuật. Kỹ thuật của người thao tác phải được thẩm định trước khi thực hiện xác định trên các mẫu gắng tay.

Phụ lục B

(qui định)

Sự hấp phụ của protein trên ống polypropylen và polyetylen

B.1 Tổng quan

Các ống bằng polypropylen hoặc polyetylen được sử dụng suốt quá trình do có khả năng liên kết protein thấp. Để kiểm tra sự hấp phụ thực tế, phương pháp sau đây là thích hợp.

Thử nghiệm phải được bắt đầu và hoàn thành không quá một ngày.

B.2 Cách tiến hành

B.2.1 Chuẩn bị 50 cm³ dung dịch tiêu chuẩn chứa 10 µg/cm³ lòng trắng trứng bằng cách làm loãng dung dịch tiêu chuẩn (6.4) với dung dịch chiết (6.2).

B.2.2 Chuyển 10 cm³ các phần thử nghiệm của dung dịch lòng trắng trứng được chuẩn bị trong B.2.1 vào từng ống trong hai ống polypropylen hoặc ống polyetylen mới (5.3) và lắc các ống trên máy lắc ống nghiệm (5.6), bảo đảm rằng toàn bộ bề mặt của ống được làm ướt. Sau 30 min, chuyển các dung dịch đến hai ống tiếp theo và lắc chúng. Lặp lại quy trình cho đến khi mỗi phần 10 cm³ được tiếp xúc với năm ống. Bảo quản các dung dịch thử nghiệm còn lại.

B.2.3 Xác định nồng độ của protein ở trong dung dịch tiêu chuẩn được chuẩn bị theo B.2.1 và hai dung dịch thử nghiệm được chuẩn bị theo B.2.2 trong ba lần sử dụng phương pháp được nêu tại 7.5.

B.3 Tính toán

Tính khối lượng trung bình của lòng trắng trứng được hấp phụ trên một ống, tính bằng microgam, theo công thức:

$$\begin{aligned} \text{Lòng trắng trứng được hấp phụ trên một ống} &= \frac{10 \times (R - T)}{5} \\ &= 2 \times (R - T) \end{aligned}$$

trong đó:

- R* là giá trị trung bình của ba phép xác định hàm lượng lòng trắng trứng của dung dịch tiêu chuẩn;
- T* là hàm lượng lòng trắng trứng trung bình của dung dịch thử nghiệm sau khi chuyển qua các ống (nghĩa là trung bình của sáu giá trị).

B.4 Yêu cầu

Giá trị nhận được đối với albumin được hấp phụ phải nhỏ hơn 10 µg/ống. Nếu giá trị nhận được vượt quá giá trị này, các ống không thích hợp đối với phép xác định.

Phụ lục C

(tham khảo)

Các phương pháp phân tích khác

C.1 Tổng quan

Phải thừa nhận rằng việc xác định các protein chiết xuất được bằng nước theo phương pháp Lowry cải biến có những khó khăn cố hữu. Các chất hoạt động bề mặt và một số các chất xúc tiến có thể làm nhiễu quá trình xác định, dẫn đến làm sai các kết quả cao hoặc, đôi khi, làm sai các kết quả thấp. Tiêu chuẩn này, bao gồm quy định việc kết tủa và tái hòa tan các protein chiết được, nhằm mục đích giảm nhẹ vấn đề này, mặc dù điều đó không phải lúc nào cũng thỏa đáng, đặc biệt là với một số chất xúc tiến^[4]. Cũng có khả năng thất thoát trong khi kết tủa và thu hồi phân đoạn protein, mặc dù quy trình phân tích đã kết hợp với việc kiểm tra kỹ thuật nhằm mục đích bù đắp sự thất thoát này. Một phương pháp khả quan để giảm vấn đề gây nhiễu là "trừ nền" (xem Phụ lục D).

Còn có các phương pháp khác để cô lập và/hoặc xác định các protein và có thể sử dụng một trong các phương pháp đó để kiểm tra chéo trong trường hợp các kết quả nhận được theo tiêu chuẩn này bị nghi là sai. Hai trong số các phương pháp này được mô tả vắn tắt dưới đây. Một trong các phương pháp đó có thể là cơ sở cho phương pháp phân tích ưu việt trong tương lai, nhưng hiện tại chúng cũng còn có những thiếu sót.

C.2 ELISA (Thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym(Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay))

Phương pháp này phụ thuộc vào phản ứng của các protein đặc thù với các kháng thể đặc trưng kết hợp với tác động dị ứng.

Các vấn đề với phương pháp này là nó tương đối chậm và dù sao thì quá đặc trưng.

Cách lý tưởng để tiến hành thử nghiệm là cho dòng protein với phân tử lượng đặc trưng phản ứng với kháng thể đơn bào (tức đơn dòng). Tuy nhiên, mặc dù nhiều phân đoạn protein gây nên tác động dị ứng có thể được phân lập từ latex cao su thiên nhiên cô đặc, không phải tất cả những người dễ nhạy cảm đều phản ứng với các phân đoạn giống nhau. Do vậy, mặc dù người này có thể biểu lộ phản ứng rất ít, nhưng đối với người khác có thể là nghiêm trọng.

Cách tiếp cận ngược lại, nghĩa là sử dụng hỗn hợp không đồng nhất của các kháng thể từ các serum gộp lại, cũng không thỏa mãn, vì các tỷ lệ với nhau của các dòng protein có phân tử lượng khác nhau không nhất thiết phải cố định. Tỷ lệ này có thể khác nhau không những do những khác biệt trong mức độ dễ dàng của việc chiết xuất mà còn do những khác biệt giữa các dòng cây

cao su khác nhau. Điều đó cũng hàm chứa rằng cần phải kết hợp các kết quả phản ứng của các kháng thể khác nhau với các dòng protein có phân tử lượng khác nhau.

C.3 HPLC (Sắc ký lỏng hiệu năng cao)

Phương pháp này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng sự phân tách gel các protein chiết được, hoặc chúng có thể được thủy phân và được xác định dưới dạng các axit amin. Trong cả hai trường hợp, kỹ thuật này chậm và tốn kém. Phương pháp có thể tách tất cả các chất gây nhiễu cũng như các dòng protein có phân tử lượng khác nhau. Tuy nhiên, cần phải nhận dạng mỗi dòng tách được để có thể hợp nhất các phân đoạn phù hợp. Nếu các protein được thủy phân và được xác định dưới dạng các axit amin, không thể biểu thị được chúng liên quan đến các protein nào.

Phụ lục D

(tham khảo)

Sự trừ nền

D.1 Tổng quan

Một phương pháp đang được phát triển có vẻ như sẽ tạo ra sự tương quan ở mức cao với sự có mặt của các chất gây nhiễu trong dịch chiết găng tay. Thử nghiệm dựa trên quan sát đầu tiên của Lowry và các cộng sự^[5] rằng sự tiến triển màu có liên quan với các protein trong sự có mặt của thuốc thử Folin phần lớn phụ thuộc vào sự có mặt của đồng, nhưng ngược lại các vật liệu gây nhiễu tiến triển màu với thuốc thử Folin khi không có đồng. Phương pháp được đưa vào đây có ích cho những người muốn xác định định lượng của các chất gây nhiễu trong găng tay.

D.2 Nguyên lý

Dịch chiết protein tái hòa tan từ găng tay kết tủa được chia ra thành hai phần riêng biệt. Một trong hai phần này, việc tiến triển màu được thực hiện như được mô tả trong 7.5. Ở phần thứ hai, sự tiến triển màu được thực hiện bằng cách bỏ đi đồng sunfat khỏi thuốc thử D (6.3.4). Giá trị hấp thụ nhận được từ dung dịch này được gọi là "nền" và được trừ từ giá trị của phép xác định đầy đủ bao gồm cả đồng ở trong dung dịch.

D.3 Thuốc thử

D.3.1 Thuốc thử DA: Natri xitrat kiềm, được chuẩn bị mới hằng ngày bằng cách trộn 10 phần thuốc thử C với 0,2 phần thuốc thử DD.

D.3.2 Thuốc thử B, theo qui định trong 6.3.2.

D.3.3 Thuốc thử C, theo qui định trong 6.3.3.

D.3.4 Thuốc thử DD: dung dịch chứa 3 g natri xitrat trong 100 cm³ nước.

D.4 Quy trình

D.4.1 Phân tích được tiến hành hai lần một cách đồng thời với tiêu chuẩn xác định được mô tả trong 7.5. Lượng dung dịch protein tái hòa tan phải đủ cho bốn phép xác định (hai lần đúp). Phụ thuộc vào thiết bị được sử dụng, có thể cần phải tăng lượng dịch chiết protein đã được kết tủa, với hệ quả là tăng lượng dung dịch natri hydroxyt sử dụng để tái hòa tan protein.

D.4.2 Thực hiện quy trình trên các dung dịch protein tiêu chuẩn được chuẩn bị trong 7.3 ở cùng lúc, sử dụng phương pháp được mô tả trong 7.5.

D.4.3 Để xác định nền, làm theo quy trình trong 7.5 nhưng thay thuốc thử DA (D.3.1) cho thuốc thử A (6.3.1). Đo hấp thụ ở cùng một bước sóng cụ thể nằm trong khoảng từ 600 nm đến 750 nm trong thời gian 1 h. Tính giá trị trung bình đối với mỗi phép xác định đúp.

D.5 Biểu thị kết quả

D.5.1 Đường chuẩn

Chuẩn bị đường chuẩn bằng cách vẽ đồ thị các nồng độ của các dung dịch protein tiêu chuẩn được chuẩn bị trong 7.3 phụ thuộc vào mức hấp thụ của chúng trừ đi mức hấp thụ của đường nền của chúng.

D.5.2 Tính toán

Trừ đi giá trị của giá trị hấp thụ nền từ giá trị xác định được trên dịch chiết protein với sự có mặt của đồng và ghi lại giá trị được điều chỉnh, tính bằng microgam trên centimet khối, trực tiếp từ đường chuẩn.

Bằng cách sử dụng giá trị hấp thụ của dung dịch không chứa đồng (D.3.4) với đường chuẩn, có thể nhận được giá trị đương lượng protein của các chất gây nhiễu.

Phụ lục E
(tham khảo)

Độ chụm

E.1 Khái quát

Chương trình thử nghiệm liên phòng (ITP) để đánh giá độ chụm của phương pháp được tiến hành năm 2002 sử dụng các quy trình độ chụm và hướng dẫn được mô tả trong ISO/TR 9272:1986.

Cả hai quy trình chiết xuất được đánh giá: quy trình “găng cắt” và quy trình “găng lồng găng”. ITP được tiến hành với bốn vật liệu với các mức đo tăng dần. Bảy phòng thử nghiệm tham gia trong ITP, và độ chụm kiểu 1 được đánh giá. Kết quả thử nghiệm là giá trị trung bình của ba phép đo lặp lại vào mỗi ngày trong hai ngày thử nghiệm riêng biệt, và độ chụm được đưa ra cùng với các kết quả thử nghiệm, ví dụ giá trị trung bình đối với mỗi ngày trong hai ngày thử nghiệm.

Kết quả độ chụm được xác định bởi ITP này không được áp dụng cho thử nghiệm chấp nhận hoặc loại bỏ đối với nhóm các vật liệu hoặc sản phẩm bất kỳ mà không đưa ra tài liệu chứng tỏ rằng các kết quả đánh giá độ chụm này thực tế áp dụng được cho các sản phẩm hoặc các vật liệu đã thử nghiệm.

E.2 Kết quả độ chụm

E.2.1 Tổng quan

Đối với mỗi loại trong bốn vật liệu, kết quả độ chụm đối với cả hai quy trình được nêu ở Bảng 1. Các kết quả này đã nhận được bằng cách sử dụng các quy trình thay thế giá trị ngoại biên và các quy trình loại bỏ giá trị ngoại biên như được mô tả trong ISO 9272. Các báo cáo tổng quát đối với việc sử dụng kết quả độ chụm được nêu dưới đây. Chúng được đưa ra theo cả độ chụm tuyệt đối, r và R , và độ chụm tương đối, (r) và (R) . Xem các dẫn giải bổ sung dưới đây.

E.2.2 Độ lặp lại

Độ lặp lại, hay độ chụm ở phạm vi cục bộ, đối với mỗi quy trình trong các quy trình này đã được thiết lập bởi các giá trị có trong Bảng 1, đối với mỗi mức đo (đối với các vật liệu) như được liệt kê ở trong bảng. Hai kết quả thử nghiệm trung bình đơn lẻ (nhận được bằng việc sử dụng đúng cách tiêu chuẩn này) mà khác với kết quả ở trong bảng trên đối với r , tính theo đơn vị của phép đo, và (r) , tính bằng phần trăm, sẽ được coi là đáng ngờ, ví dụ bị lẫn từ tập hợp khác. Việc phân xử như vậy cho thấy rằng cần phải tiến hành sự kiểm tra thích hợp.

E.2.3 Độ tái lập

Độ tái lập, hay độ chụm ở phạm vi toàn cục, đối với mỗi quy trình trong các quy trình này đã được thiết lập bởi các giá trị có trong Bảng 1, đối với mỗi mức đo (đối với các vật liệu) như được liệt kê ở trong bảng. Hai kết quả thử nghiệm trung bình đơn lẻ nhận được trong các phòng thử nghiệm khác nhau (do việc sử dụng đúng cách tiêu chuẩn này) mà khác với kết quả ở trong bảng trên đối với R , tính theo đơn vị của phép đo, và (R) , tính bằng phần trăm, sẽ được coi là đáng ngờ, ví dụ bị lẫn từ tập hợp khác. Việc phân xử như vậy cho thấy rằng cần phải tiến hành sự kiểm tra thích hợp.

Bảng E.1 – Dữ liệu độ chụm

Quy trình găng cắt (quy trình A)								
Vật liệu	Giá trị trung bình $\mu\text{g/g}$	Trong phòng thử nghiệm			Liên phòng thử nghiệm			Số phòng thử nghiệm
		s_r	r	(r)	s_R	R	(R)	
1	14,3	3,48	9,7	68,3	7,57	21,2	148,5	5
2	68,3	6,46	18,1	26,5	12,6	35,2	51,5	5
3	162,2	6,79	19,0	11,7	25,1	70,3	43,3	5
4	200,6	13,6	37,9	18,9	28,2	78,9	39,3	5
Quy trình “găng lòng găng” (quy trình B)								
Vật liệu	Giá trị trung bình $\mu\text{g/g}$	Trong phòng thử nghiệm			Liên phòng thử nghiệm			Số phòng thử nghiệm
		s_r	r	(r)	s_R	R	(R)	
1	13,8	1,66	4,64	33,6	4,70	13,2	95,2	6
2	53,1	4,97	13,93	26,3	16,3	45,6	86,0	6
3	140,0	5,25	14,70	10,5	21,7	60,9	43,5	6
4	164,2	11,21	31,40	19,1	32,6	91,4	55,6	6

Ký hiệu được sử dụng:

s_r là độ lệch chuẩn trong cùng phòng thử nghiệm (tính theo đơn vị của phép đo);

r là độ lặp lại, nghĩa là độ chụm trong phòng thử nghiệm (tính theo đơn vị của phép đo);

(r) là độ lặp lại (tính bằng phần trăm của mức trung bình);

s_R là độ lệch chuẩn liên phòng thử nghiệm (đối với toàn bộ sự thay đổi liên phòng thử nghiệm tính theo đơn vị của phép đo);

R là độ tái lập, nghĩa là độ chụm liên phòng thử nghiệm (tính theo đơn vị của phép đo);

(R) là độ tái lập (tính bằng phần trăm của mức trung bình);

Số phòng thử nghiệm là số sau khi loại bỏ các phòng thử nghiệm có giá trị ngoại biên quá nhiều.

E.3 Các dẫn giải bổ sung

Đối với quy trình găng cắt, phân tích cho thấy rằng hai phòng thử nghiệm đã có các giá trị ngoại biên quá nhiều. Mặc dù giá trị ngoại biên đã thực hiện các phép thay thế, sử dụng các quy trình trong ISO/TR 9272:1986, độ lặp lại và độ tái lập vẫn khá tồi tệ. Các kết quả được thể hiện trong Bảng E.1 đối với quy trình “găng cắt” là từ phân tích khi cả hai phòng thử nghiệm có quá nhiều giá trị ngoại biên được xóa khỏi cơ sở dữ liệu, nghĩa là cho năm phòng thử nghiệm tham gia. Đối với quy trình “găng lồng găng”, một trong hai phòng thử nghiệm trên cũng đã có các giá trị ngoại biên quá nhiều, nên cũng lại tạo ra độ chụm kém. Các kết quả được nêu trong Bảng E.1 đối với quy trình “găng lồng găng” là kết quả phân tích khi một phòng thử nghiệm này bị xóa khỏi cơ sở dữ liệu, nghĩa là cho sáu phòng thử nghiệm tham gia.

E.4 Độ chệch

Độ chệch là sự khác biệt giữa kết quả thử nghiệm trung bình đo được và giá trị đối chứng hoặc giá trị thật của phép đo đang tiến hành. Các giá trị đối chứng không hiện hữu đối với các quy trình này và do vậy Độ chệch không thể được đánh giá.

Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] Markell, *Anal. Biochem.* (*Phân tích sinh hóa*), 87, trang 206, (1978).
 - [2] ISO 9272, *Rubber and rubber products — Determination of precision for test method standards (in preparation)* (*Cao su và sản phẩm cao su — Xác định độ chụm đối với các tiêu chuẩn về phương pháp thử (đang biên soạn)*).
 - [3] ISO/TR 9272:1986, *Rubber and rubber products — Determination of precision for test method standards* (*Cao su và sản phẩm cao su — Xác định độ chụm đối với các tiêu chuẩn về phương pháp thử*).
 - [4] Chen, S.F., và cộng sự, *J. Allergy Clin. Immunol.* (*Tạp chí Dị ứng Miễn dịch học lâm sàng*), 100 (3), pp. 713-4 (1997).
 - [5] Lowry và cộng sự, *J. Biol. Chem.* (*Tạp chí Hóa sinh*), 199, p. 265 (1951).
-