



جمهوری اسلامی ایران  
Islamic Republic of Iran

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran



استاندارد ملی ایران

۱۳۰۵۹

چاپ اول

**ISIRI**

13059

**1st. Edition**

عسل - اندازه گیری قندها به روش  
کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

**Honey-determination of sugars by HPLC**

ICS: 67.180.

## به نام خدا

### آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک 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) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه\* 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، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود. پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای 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 علاقه مند و ذیصلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند در کمیته ملی طرح و بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود. 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 ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای 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 سا زمانها 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 آنها 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

- 1- International organization for Standardization
- 2 - International Electro technical Commission
- 3- International Organization for Legal Metrology (Organization International de Metrology Legal)
- 4 - Contact point
- 5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد  
«عسل-اندازه گیری قندها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا»

رئیس:

سیف هاشمی ، سعیده  
(دکترای دامپزشکی)

سمت و/ یا نمایندگی

سازمان نظام دامپزشکی جمهوری اسلامی ایران

دبیر:

صدغی ، ناصر  
(لیسانس صنایع غذایی)

سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران  
پژوهشکده غذایی و کشاورزی

اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

باقری ، محمود  
(دکترای صنایع غذایی)

شرکت بازرسی کالای تجاری ایران

جمالی ، زهره  
(لیسانس تغذیه)

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی  
اداره کل آزمایشگاه کنترل غذا و دارو

حسن ، جلال  
(دکتری شیمی تجزیه)

شرکت بازرسی کالای تجاری ایران

محمدی، حسین  
(لیسانس علوم آزمایشگاهی )

شرکت بازرسی کالای تجاری ایران

## پیش گفتار

استاندارد. " عسل-اندازه گیری قندها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا " که پیش نویس آن در کمیسیون های مربوط تهیه و تدوین شده و در نهمین اجلاس کمیته ملی استاندارد خوراک و فرآورده های کشاورزی مورخ ۱۳۸۹/۸/۲۲ مورد تصویب قرار گرفته است ، اینک به استناد بند یک 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، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر 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 تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

منبع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

1-International Honey Commission (2009), Harmonized methods of the international honey commission, Determination of sugars by HPLC.

## عسل-اندازه گیری قندها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

### ۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد، اندازه گیری مقدار قند های عسل ، می باشد.

### ۲ دامنه کاربرد

این استاندارد ، برای تعیین مقدار دقیق فروکتوز ، گلوکز ، ساکارز ، تورانوز، و مالتوز ، همچنین سایر ساکاریدها مانند: ملزیتوز<sup>۱</sup>، ارلوز<sup>۲</sup>، ایزومالتوز، رافینوز در عسل کاربرد دارد.

### 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 می شود. در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه ها 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 تجدیدنظر و اصلاحیه های بعدی آنها مورد نظر است.

استفاده از مرجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۱-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۹۲، عسل- ویژگیها و روشهای آزمون .

### ۴ اصول آزمون

در این روش پس از صاف کردن محلول ، مقدار قند به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ، با آشکار ساز ضریب شکست<sup>۳</sup> تعیین می شود. شناسایی پیکها بر اساس زمان بازداری آن ها است. تعیین مقدار مطابق با روش استاندارد خارجی بر روی پیک یا منطقه پیک انجام می شود. یادآوری- باید توجه داشت این روش توسط بوگدانف و باومن<sup>۴</sup> منتشر شده است جهت کسب آگاهی بیشتر به پیوست الف (کتابنامه) مراجعه فرمایید.

### ۵ مواد و/یا واکنشگرها

واکنشگرهای شیمیایی باید دارای درجه خلوص آزمایشگاهی باشند.

<sup>1</sup> -Melezitose

<sup>2</sup> Erlöse

<sup>3</sup> RI-detection

<sup>4</sup> Bogdanov & Baumann

آب مورد مصرف باید آب مقطر یا معادل درجه خلوص آن باشد.

۱-۵ متانول مناسب برای کار با HPLC<sup>۱</sup>

۲-۵ استونیتریل برای HPLC

یادآوری-هنگام کار با استونیتریل و متانول هشدارهای ایمنی را رعایت کنید.

محلول شستشو برای HPLC: ۸۰:۲۰ حجم استونیتریل را با ۲۰ حجم آب مخلوط سازید قبل از مصرف با استفاده از حمام التراسونیک هوای آن را بگیرید.

۳-۵ محلولهای استاندارد، (فروکتوز ، گلوکز ، ساکارز ، تورانوز و مالتوز همچنین ملزیتوز، رافینوز و ایزومالتوز)

۲۵ میلی لیتر محلول متانول را در بالن ژوژه کالیبره ۱۰۰ میلی لیتری بریزید بسته به فندهای مورد آزمون مقادیر زیر را در ۴۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید. و آنرا به طور کمی به بالن انتقال دهید و تا خط نشانه با آب پر کنید.

فروکتوز ۲/۰۰۰ گرم

گلوکز ۱/۵۰۰ گرم

ساکارز ۰/۲۵۰ گرم

ترانوز ۰/۱۵۰ گرم

مالتوز ۰/۱۵۰ گرم

به کمک سرنگ و صافی غشایی<sup>۲</sup> محلول را به ویال نمونه انتقال دهید.

محلول های استاندارد را در دمای ۴ درجه سلسیوس برای چهار هفته و در دمای ۱۸- درجه سلسیوس برای مدت شش ماه قابل نگهداری می باشند.

## ۶ وسایل

۱-۶ ویال

۲-۶ حمام اولترا سونیک

۳-۶ بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری

۴-۶ پی پت ۲۵ میلی لیتری

۵-۶ صافی غشایی برای محلولهای آبی با منافذ ۰/۴۵ میکرومتر.

۶-۶ محافظ صافی غشایی با سرنگ مناسب

۷-۶ دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، شامل پمپ ، اپلیکاتور نمونه، تنظیم کننده دمای آشکار ساز ضریب شکست در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، اون تنظیم دمای ستون در ۳۰ درجه سلسیوس ،

<sup>۱</sup> -High performance liquid chromatography

<sup>۲</sup> -Pre-mounted membrane filter

محاسبه گر<sup>۱</sup>، ستون آنالیز از جنس فولاد ضدزنگ مثلاً با قطر ۴/۶ میلی متر و به طول ۲۵۰ میلی متر، دارای سیلیکاژل آمینی اصلاح شده با اندازه ذرات ۵ تا ۷ میکرو متر. قبل از استفاده، مناسب بودن سیستم را جهت اطمینان از توان جدا سازی تمامی قندهامورد آزمون و بررسی قرار دهید.

**یادآوری**-در این روش کروماتوگرافی، دمای محیط برنتایج قندها تاثیری ندارد. در هر صورت در این شرایط جدا سازی قند ارلوز و ملیزیتوز امکان پذیر نیست.

## ۷ روش کار

### ۱-۷ آماده سازی آزمایه<sup>۲</sup>

در صورت لزوم، نمونه را طبق استاندارد ملی ایران شماره ۹۲، عسل- ویژگیها و روشهای آزموناآماده سازی کنید.

### ۲-۷ آماده سازی محلول آزمونه<sup>۳</sup>

۵ گرم از آزمایه را در یک بشر وزن، و در ۴۰ میلی لیتر آب حل کنید. ۲۵ میلی لیتر متانول را در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری بریزید و محلول عسل را به طور کمی به آن انتقال دهید. سپس با آب مقطر تا خط نشانه آن را پر کنید. محلول را با استفاده از صافی غشایی (طبق بند ۶-۵) صاف کنید. محلول صاف شده را در ویال های نمونه جمع آوری، و به عنوان محلول استاندارد آن ها را نگهداری کنید.

### ۳-۷ آماده سازی دستگاه HPLC

اگر ستون کروماتوگرافی مطابق شرایط مندرج در بند ۶-۷ به کار می برید، جهت جدا سازی قابل قبول شرایط زیر را رعایت کنید.

سرعت جریان ۱/۳ میلی لیتر در دقیقه

فاز متحرک استونیتریل در آب به نسبت حجمی ۸۰ به ۲۰

دمای ستون و آشکار ساز ۳۰ درجه سلسیوس

حجم نمونه ۱۰ میکرولیتر

**یادآوری ۱-** اگر آزمون را در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نمی توانید انجام دهید و اگر آشکار ساز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس تنظیم نمی شود، آزمون را در دمای محیط انجام دهید در این صورت جدا سازی ملیزیتوز و ارلوز امکان پذیر نمی باشد.

**یادآوری ۲-** حجم های مشخصی از نمونه و محلول استاندارد باید به دستگاه تزریق شود.

<sup>3</sup> -Integrator  
<sup>2</sup> Test sample  
<sup>3</sup> Test portion

## ۸ محاسبه و بیان نتایج

از مقایسه زمان بازداري و سطح زیر منحنی قندهای عسل ، با قندهای استاندارد مربوطه ، قندهای عسل شناسایی و تعیین مقدار می شوند. در هر بار یک قند محاسبه می شود. در صد جرمی قندها (W)، گلوکز ، فروکتوز و مالتوز و نظایر آن ، در ۱۰۰ گرم عسل مطابق با فرمول به شرح زیر محاسبه می شود:

$$W = \frac{A_1 \times V_1 \times m_1 \times 100}{A_2 \times V_2 \times m_0} \quad \text{فرمول}$$

که در آن

- $A_1$  = سطح زیر پیک یا ارتفاع آن در محلول نمونه، بر حسب واحد سطح ، طول یا بهم پیوستگی .
  - $A_2$  = ارتفاع پیک ترکیب قند در محلول استاندارد، بر حسب واحد سطح ، طول یا بهم پیوستگی.
  - $V_1$  = حجم کل محلول نمونه ، بر حسب میلی لیتر.
  - $V_2$  = حجم کل محلول استاندارد، بر حسب میلی لیتر.
  - $m_1$  = جرم قند در حجم کل استاندارد ( $V_2$ ) ، بر حسب گرم .
  - $m_0$  = وزن نمونه ، بر حسب گرم.
- نتیجه را با یک رقم اعشار گزارش کنید.

## ۹ دقت روش

نتایج محاسبه تکرار پذیری (r) و تجدید پذیری (R) بر روی سه نمونه عسل در آزمون همکاری بین آزمایشگاهی استاندارد آلمان (DIN) به شرح زیر است:

شماره نمونه	فروکتوز گرم در ۱۰۰ گرم	تکرار پذیری (r)	تجدید پذیری (R)
۱	۳۱/۲	۰/۸	۱/۶
۲	۴۲/۴	۰/۹	۲/۳
۳	۳۷/۹	۱	۱/۵

شماره نمونه	گلوکز گرم در ۱۰۰ گرم	تکرار پذیری (r)	تجدید پذیری (R)
۱	۲۳	۰/۹	۲/۱
۲	۲۸/۵	۰/۸	۱/۸
۳	۳۲	۱/۱	۱/۴



دقت روش (ادامه)

شماره نمونه	ساکارز گرم در ۱۰۰گرم	تکرار پذیری (r)	تجدید پذیری (R)
۱	-	-	-
۲	-	-	-
۳	۲/۸	۰/۴	۰/۹

شماره نمونه	نورانوز گرم در ۱۰۰گرم	تکرار پذیری (r)	تجدید پذیری (R)
۱	۲/۱	۰/۴	۰/۸
۲	۱/۷	۰/۳	۰/۵
۳	۱/۳	۰/۳	۰/۸
شماره نمونه	مالتوز گرم در ۱۰۰گرم	تکرار پذیری (r)	تجدید پذیری (R)
۱	۴/۸	۰/۵	۲/۵
۲	۲/۰	۰/۶	۱/۳
۳	۲/۳	۰/۵	۰/۷

## پیوست الف

(اطلاعاتی)

( کتابنامه )

1. S. Bogdanov, S. E. Baumann, Bestimmung von Honigzucker mit HPLC. Mitt.Gebiete Lebensm.Hyg., 79, 198-206. (1988).
2. DIN Norm 10758 , Bestimmung des Gehaltes an Sacchariden. HPLC Verfahren. (1992).