استاندارد ملی ایران
۱۱۱۳۲
چاپ اول

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
مؤسسه استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران
Institute of Standards and Industrial Research of Iran

ISIRI
11132
1st. edition

عسل- اندازه گیری میزان اتانل- روش آنزیمی

Honey- Determination of ethanol content- Enzymatic method

ICS: 67.180.10

به‌نام خدا

آشنایی با مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ 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 وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، 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 می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ 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 درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت 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 شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که مؤسسه استاندارد تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] 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 بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

مؤسسهٔ 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 کشو ر 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 درجه‌بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سا زمانها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش ، مؤسسهٔ استاندارد این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ 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.

---

* موسسهٔ 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 میزان اتانل- روش آنزیمی»

رئیس:	سمت یا نمایندگی
سیف هاشمی، سعیده (دکترا ی دامپزشکی)	شرکت بازرگانی مواد غذایی شکلی
دبیر:	
انصاری، فرزانه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در رشته تغذیه)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران- پژوهشکده غذایی و کشاورزی
اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)	
بیابانکی، محمد صادق (لیسانس صنایع غذایی)	آزمایشگاه کیمیا تست فام
تاج دولتشاهی، فرشید (دکترای دامپزشکی)	آزمایشگاه تخصصی ویرومد
جمالی، زهره (لیسانس تغذیه)	وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی- اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو
حاتم بیگی، نادر (فوق لیسانس شیمی تجزیه)	آزمایشگاه کیمیا تست فام
دستمالچی، فرناز (فوق لیسانس علوم بهداشتی در رشته تغذیه)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران- پژوهشکده غذایی و کشاورزی
شاه حسینی، مهناز (فوق لیسانس صنایع غذایی)	شرکت صنعتی پارس مینو (سهامی عام)
مجتبایی، سید حمید (لیسانس صنایع غذایی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران-پژوهشکده غذایی و کشاورزی
مظاهری، منصوره (فوق لیسانس بیو تکنولوژی)	موسسه استانداردوتحقیقات صنعتی ایران-پژوهشکده غذایی و کشاورزی
نقدی، لیلا (دکترا ی دامپزشکی)	شرکت بازرگانی مواد غذایی شکلی

پیش گفتار

استاندارد" عسل- اندازه گیری میزان اتانل- روش آنزیمی" که پیش نویس آن توسط کمیسیون های مربوط تهیه و تدوین شده و در هشصد و بیستمین اجلاس کمیتهٔ ملی استانداردخوراک و فرآورده های غذایی و کشاورزی مورخ۱۳۸۷/۱۲/۵ مورد تصویب قرار گرفته است، اینک به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ ، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود .

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت های ملی و جهانی در زمینهٔ 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 ماخذی که برای تهیهٔ این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

1-DIN 10762: 2004, Analysis of honey- Determination of ethanol content- Enzymatic method.

عسل- اندازه گیری میزان اتانل- روش آنزیمی

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش آنزیمی اندازه گیری میزان اتانل می باشد. این استاندارد برای انواع عسل کاربرد دارد.

۲ مراجع الزامی

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

۲-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۲۸۳۶، نمونه برداری فرآورده های کشاورزی بسته بندی شده که مصرف غذایی دارند.

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸، آب مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه– ویژگی ها و روش های آزمون

2-3 DIN 12699: 1975, class AS fast delivery enzyme assay pipettes with a waiting time of 15 seconds, for laboratory use

2-4 ISO 5725-1: 1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- Part 1: General principles and definitions

2-5 ISO 5725-2: 1994, Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results- Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method

۳ اصطلاحات و تعاریف

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

۳-۱

میزان اتانل

عبارت است از مقدار اتانل موجود در عسل که به روش شرح داده شده در این استاندارد ملی اندازه گیـری و بر اساس میلی گرم در کیلوگرم ماده نمونه[1] گزارش می شود.

۳-۲

اختصاصی بودن[2]

عبارت است از توانایی آشکارسازی ماده مورد تجزیه[3] و تشخیص آن از مواد مشابه، ناخالصی ها و فرآورده های تجزیه شده، می باشد.

۳-۳

حساسیت[4]

عبارت است از توانایی آشکارسازی تغییرات اندک غلظت یک ماده در آزمونه[5] می باشد.

۳-۴

حدآشکارسازی[6]

عبارت است از حداقل مقدار ماده مورد تجزیه موجود در نمونه مورد آزمایش که قابل آشکار سازی است ولی لزوما" قابل اندازه گیری کمی نمی باشد.

۳-۵

خطی بودن[7]

دامنه خطی عبارت است از محدوده غلظت هایی از ماده مورد تجزیه، که در آن نتایج به دست آمده از روش، متناسب با غلظت باشد.

4 اصول آزمون

---

[1] Sample material
[2] Specificity
[3] Analyt
[4] Sensitivity
[5] Test material
[6] Limit of detection
[7] Linearity

بر طبق واکنش زیر، اتانل به وسیله نیکوتین آمید آدنین دی نوکلوتید (NAD^+) و کاتالیزور آنزیم الکل دهیدروژناز(ADH)، به استالدئید اکسیده می شود:

$$\text{Ethanol} + \text{NAD}^+ \xrightleftharpoons{ADH} \text{acetaldehyde} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

هرچند که تعادل و موازنه این واکنش به سمت اتانل وNAD می باشد، در واکنشی با یک حد واسط آلکالین ، می تواند استالدهید به صورت کمی، به کمک کاتالیزور آلدهید دهیدروژناز (AL-DH)، به اسید استیک اکسیده شده و موازنه واکنش به سمت راست جابجا شود.

$$\text{Acetaldehyde} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{AL-DH} \text{acetic acid} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

مقدار NADH تولید شده، معادل مقدار اتانل است و به روش اسپکتروفوتومتری اندازه گیری می شود.

۵ مواد و / یا واکنشگر ها

۵-۱ کلیات

اگر دستور دیگری داده نشده باشد، برای آزمون فقط از واکنشگرهای تجزیه ای[1] خالص بهره بگیرید، و آب مصرفی برای آزمایش باید حداقل آب مقطر نوع ۳ بر طبق " استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸، آب مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه– ویژگی ها و روش های آزمون" باشد.

واکنشگرهای زیررا باید مورد استفاده قرار دهید:

۵-۲ آب مقطر دو بار تقطیر

۵-۳ محلول کارز[2] شماره ۱

۳/۶۰ گرم پتاسیم هگزاسیانوفرات (II)[3] را در آب حل کنید و تا حجم ۱۰۰ میلی لیتر آن را رقیق نمایید.

۵-۴ محلول کارز شماره ۲

---

[1] Analytical grade

[2] Carrez soulution

[3] Potassium hexacyanoferrate $(II)(K_4[Fe(CN)_6].3H_2O)$

۷/۲۰ گرم سولفات روی[1] را در آب حل کنید و تا حجم ۱۰۰ میلی لیتر آن را رقیق نمایید.

۵-۵ محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ مول در لیتر، NaOH

۵-۶ محلول بافر دی فسفات[2]

۳/۳۳ گرم پتاسیم دی فسفات[3] را در ۶۰ میلی لیتر آب حل کنید، با کمک اسید کلریدریک ۱ مول درلیتر مقدار pH محلول را در ۹ تنظیم کنید و آن را با آب تا حجم ۱۰۰ میلی لیتر برسانید. در صورتی که این محلول را در دمای ۴ + درجه سلسیوس نگهداری کنید، به مدت حداقل ۲ ماه پایدار خواهد بود.

۵-۷ **β- نیکوتین آمید آدنین دی نوکلوتید[4]** ، β-NAD ، به عنوان اسید آزاد، ۹۸ درصد وزنی/ وزنی

۵-۸ **آلدهید دهیدروژناز**[5]، AL-DH ، خشک شده به روش انجمادی[6]، به دست آمده از مخمر، دارای فعالیت آنزیمی[7] حدود 15 U/mg، در صورتی که این ماده را به صورت خشک شده، در دمای ۴ + درجه سلسیوس نگهداری کنید، به مدت حداقل ۶ ماه پایدار خواهد بود.

۵-۹ **مخلوط واکنش،** ۱۱۴ میلی گرم β-NAD (۵-۷) و ۳/۳۳ میلی گرم AL-DH (۵-۸) دارای فعالیت آنزیمی حدود 50 U را در ۱۰۰ میلی لیتر محلول بافر دی فسفات در حالی که آن را هم می زنید حل کنید. در صورتی که این محلول را در دمای ۴ + درجه سلسیوس نگهداری کنید، به مدت یک روز پایدار خواهد بود.

۵-۱۰ **سوسپانسیون الکل دهیدروژناز**[8]، ADH ، به دست آمده از مخمر، با غلظت (ρ_{ADH}) ۳۰ میلی گرم در میلی لیتردر محلول سولفات آمونیوم[9] ۳/۲ مول در لیتر، و دارای فعالیت آنزیمی حدود 9 000 U/ml . محلول الکل دهیدروژنازرا در صورتی که در دمای ۴ + درجه سلسیوس نگهداری کنید ، به مدت حداقل ۴ ماه پایدار خواهد بود.

---

[1] $ZnSO_4 . 7 H_2O$

[2] Diphosphate buffer solution

[3] $K_4P_2O_7$

[4] β –nicotinamide adenine dinucleotide

[5] Aldehyde dehydrogenase

[6] Freeze dried

[7] در این استاندارد فعالیت آنزیمی بر اساس واحد های بین المللی (U) بیان شده است که 1U عبارت است از: مقدار فعالیت آنزیم برای تبدیل یک میکرومول (1µmol)سوبستراتحت شرایط مناسب و دمای ۲۵ درجه سلسیوس در یک دقیقه.

[8] Alcohol dehydrogenase suspension

[9] Ammonium sulfate solution $(NH_4)_2SO_4$

یادآوری: واکنشگر های آماده مصرف به صورت تجارتی در دسترس می باشند. در صورت استفاده از آن ها روش پی پت کردن و حجم تعیین شده توسط سازنده باید در نظر گرفته شود.

۶ وسایل

۶-۱ کلیات

افزون بر وسایل معمولی آزمایشگاه، وسایل ویژه زیر نیز مورد نیاز است:

۶-۲ الک استیل، دارای روزنه ۰/۵ میلی متری

۶-۳ بشر، دارای ظرفیت اسمی ۱۰۰ میلی لیتر، یا **ارلن مخروطی،** با ظرفیت اسمی ۱۰۰ میلی لیتر

۶-۴ ارلن مخروطی، با درپوش، دارای ظرفیت اسمی ۲۵۰ میلی لیتر

۶-۵ پی پت های سنجش آنزیم، دارای ظرفیت اسمی۰/۰۵ میلی لیتر ، ۰/۵ میلی لیتر ،۳/ ۰ میلی لیتر(برای مثال: مطابق DIN 12699) یا استفاده از پی پت های پیستونی[1]به طور اختیاری

۶-۶ صافی چین دار[2]

۶-۷ قیف، با قطر اسمی ۷۰ میلی متر

۶-۸ سل های(کووت های) شیشه ای[3]، با طول مسیر ۱۰ میلی متر. سل های قابل دسترس به صورت تجارتی نیز مناسب می باشند.

۶-۹ هم زن پلاستیکی[4]، برای مخلوط کردن محلول داخل سل ها

۶-۱۰ بالن حجمی، با ظرفیت اسمی ۱۰۰ میلی لیتر

---

[1] Piston-operated pipett

[2] Fluted filter

[3] Glass cells

[4] Plastic stirrer

۱۱-۶ **اسپکتروفتومتر**، یا یک specteral line photometer مجهز به یک لامپ بخار جیوه

۱۲-۶ ترازوی آزمایشگاهی

۷ روش انجام آزمون

۱-۷ آماده سازی نمونه

۷-۱-۱ عسل صاف شده[1]

میزان مناسبی از نمونه آزمایشگاهی را به مدت حداقل ۳ دقیقه به شدت بهم بزنید تا همگن و یکنواخت شود. مراقب باشید تا مقدار هوا ی وارد شده در نمونه حداقل باشد.

۷-۱-۲ عسل صاف نشده[2]

پس از جدا کردن ناخالصی های زبر، عسل را در دمای محیط بهم بزنید تا نرم شده و آن را با استفاده از قاشقک (اسپاچول)، از الک (طبق زیر بند ۶-۲) عبور دهید.

۷-۱-۳ عسل شان (موم دار)[3]

پوشش یا پولک سر خانه های مومی(حجره ها) را (در صورت وجود) بردارید، سپس بدون گرم کردن با استفاده از الک(طبق زیر بند ۶-۲) عسل را کاملا" از شانه ها جدا کنید.

۲-۷ آماده سازی محلول نمونه

۲۰ گرم از نمونه آماده شده مطابق زیر بند ۷-۱ را با دقت ۱ میلی گرم در داخل بشر ۱۰۰ میلی لیتری یا ارلن مخروطی ۱۰۰ میلی لیتری (طبق زیر بند۶-۳) وزن کنید و در حال هم زدن حدود ۶۰ میلی لیتر آب به آن اضافه کنید. محتوی بشر یا ارلن مخروطی را به طور کمی، به بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری منتقل

---

[1] Pure liquid or set honey
[2] Impure liquid or set honey
[3] Comb honey

نمایید، عمل انتقال را به وسیله شست و شوی ظرف با آب به طور کامل انجام دهید. سپس ۱/۰ میلی لیتر محلول کارز شماره ۱ (طبق زیر بند۵-۳) و به دنبال آن ۱/۰ میلی لیتر محلول کارز شماره ۲ (طبق زیر بند۵-۴) اضافه کنید. محتوی بالن را کاملا" مخلوط و با آب تا خط نشانه برسانید.

یادآوری: در صورت بروز کدورت ، با استفاده از محلول هیدروکسید سدیم (طبق زیر بند ۵-۵)، خنثی سازی کنید.

محتوی بالن را با صافی چین دار (طبق زیر بند ۶-۶) به داخل ارلن مخروطی (طبق زیر بند ۶-۴) صاف کنید. از محلول نمونه صاف شده، برای اندازه گیری اتانل (اندازه گیری مطابق زیر بند ۷-۳) استفاده کنید.

۷-۳ آماده سازی محلول های آزمون و اندازه گیری

با استفاده از روش پیپت کردن نشان داده شده در جدول ۱، محلول شاهد (بلانک) و محلول نمونه(مطابق زیر بند ۷-۲) را آماده کنید و آنالیز را تحت شرایط زیر انجام دهید:

طول موج: ۳۴۰ نانومتر، ۳۶۵ یا ۳۳۴ نانومتر جیوه
سل(کووت): با طول مسیر ۱/۰۰ سانتی متر
دما: ۲۰ درجه سلسیوس تا ۲۵ درجه سلسیوس
حجم آزمون: ۳/۵۵ میلی لیتر
اندازه گیری در مجاور هوا (سل در مسیر عبور نور نباشد)، آب یا شاهد
محلول نمونه: ۰/۳ میلی لیتر تا ۱۲ میکروگرم اتانل در هر سل (در ۰/۱ تا ۰/۵ میلی لیتر حجم نمونه)

در طی اندازه گیری درپوش سل ها را (برای مثال: با فویل آزمایشگاهی) محکم ببندید. مشکل تشکیل حباب در دیواره داخلی سل را می توانید با ضربه زدن به به دیواره سل یا فرو بردن گوشه سل در داخل حمام فراصوتی[1] از بین ببرید.

از آنجایی که اتانل بسیار فرار می باشد، هنگام جابجایی نمونه، آماده سازی رقت ها و زمانی که محلول نمونه به داخل سل پی پت می شود، اقدامات زیرباید انجام پذیرد:

الف) محلول صاف شده را نباید به صورت قطره قطره به داخل ظرف جمع آوری منتقل کنید اما می توانید اجازه دهید تا از دیواره های ظرف به پایین انتقال یابد.

---

[1] Ultrasonic bath

ب) هنگام انتقال محلول های دارای الکل باید آن ها را به وسیله پی پت در سطح زیرین آب (هنگام آماده سازی رقت ها) یا بافر (در مورد مخلوط مورد استفاده برای آنالیز) منتقل کنید.

پ) هنگامی که محلول های خیلی رقیق نمونه را به داخل محلول آزمون به وسیله پی پت منتقل می کنید، باید از قبل پی پت سنجش آنزیم (طبق زیر بند ۶-۵)را حداقل شش بار و سرپی پت[1] پی پت پیستونی (طبق زیر بند ۶-۵) راحداقل سه بار شست و شو دهید.

ت) هرگز نباید از همان پی پت پیستونی که برای رقیق کردن نمونه های حاوی الکل استفاده می شود برای افزودن واکنشگر ها نیز استفاده کنید.

س) هم هوای محل آزمون و هم آب مورد استفاده، باید فاقد الکل باشند.

جدول ۱- روش انتقال به وسیله پی پت

پی پت کردن به داخل سل ها	شاهد به میلی لیتر	محلول آزمون به میلی لیتر
مخلوط واکنش(طبق زیر بند ۵-۹)	۳/۰۰	۳/۰۰
آب (طبق زیر بند ۵-۲)	۰/۵۰	-
محلول نمونه(طبق زیر بند۷-۲)	-	۰/۵۰
بعد از بستن با فویل آزمایشگاهی، آن را با قاشقک هم زن یا به وسیله حرکت چرخشی مخلوط کنید. قبل از افزودن محلول نمونه، پی پت سنجش آنزیم یا سرپی پت پیستونی را با محلول نمونه شست و شو دهید. بعد از حدود سه دقیقه جذب (E_1) را اندازه بگیرید و سپس واکنش را با افزودن محلول زیر آغاز کنید:		
محلول الکل دهیدروژناز(طبق زیر بند ۵-۱۰)	۰/۰۵	۰/۰۵
محلول را مخلوط کنید و بعد از حدود ۵ تا ۱۰ دقیقه فورا" جذب محلول ها را یکی بعد از دیگری (E2) اندازه بگیرید.		

میزان اتانل در محلول نمونه باید بین ۰/۵ و ۱۲ میکروگرم (برای اندازه گیری در طول موج ۳۶۵ نانومتر) یا ۰/۳ و ۶ میکرو گرم (برای اندازه گیری در طول موج ۳۴۰ یا ۳۳۴ نانومتر) باشد. برای رسیدن به اختلاف بیشتر در جذب، محلول نمونه را به نحوی رقیق کنید تا غلظت اتانل به ترتیب بین ۰/۰۲ و ۰/۱۲ گرم در لیتر یا ۰/۰۱ و ۰/۰۶ گرم در لیتر شود.

---

[1] Pipett tip

۸ روش محاسبه

اختلاف جذب، ΔE، را با استفاده از فرمول (۱) از اختلاف جذب بین نمونه (محلول آزمون) و شاهد محاسبه کنید:

فرمول (۱)

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{test solution}} - (E_2 - E_1)_{\text{blank}}$$

برای به دست آوردن نتایج صحیح، اختلاف جذب اندازه گیری شده ΔE، معمولا" باید حداقل ۰/۱۰۰ واحد جذب باشد.

با استفاده از فرمول (۲)، غلظت وزنی اتانل را برای مقدار سوبسترایی که معادل دوبرابر مقدار NADH می باشد محاسبه کنید:

فرمول(۲)

$$\rho = \frac{V_T \times M \times 1000}{\varepsilon \times d \times V_p \times 2 \times 1000} \times \Delta E$$

که در آن:

ρ غلظت وزنی اتانل، به میلی گرم در لیتر

V_{T} حجم آزمون، به میلی لیتر

V_{p} حجم نمونه، به میلی لیتر

M مقدار مولار اتانل (۴۶/۰۷ گرم)

d طول مسیر سل، به سانتی متر (در اینجا : ۱/۰۰ سانتی متر)

ε عبارت است از جذب NADH:

(6.31. mmol^{-1}. cm^{-1} at 340 nm, 6.181. mmol^{-1} .cm^{-1} at Hg 334 nm and 3.41. mmol^{-1}. cm^{-1} at Hg 365 nm)

با استفاده از فرمول (۳)، غلظت وزنی اتانل را در محلول نمونه محاسبه کنید:

فرمول (۳)

$$\rho = \frac{3.55 \times 46.07 \times 1000}{\varepsilon \times 1.00 \times 0.500 \times 2 \times 1000} \times \Delta E = \frac{163.5}{\varepsilon} \times \Delta E$$

که در آن:

ρ غلظت وزنی اتانل در محلول نمونه، به میلی گرم در لیتر
ε عبارت است از جذب NADH (به فرمول۳ مراجعه کنید)
ΔE اختلاف جذب به دست آمده از فرمول (۱)

در صورتی که محلول نمونه در طی آماده سازی رقیق شده است نتایج را در فاکتور رقیق سازی، F ، ضرب کنید.

با استفاده از فرمول (۴)، نسبت وزنی اتانل، w ، به میلی گرم در کیلوگرم را محاسبه کنید:

فرمول (۴)

$$w = \frac{\rho}{m} \times 1000$$

که در آن:

ρ غلظت وزنی اتانل در محلول نمونه، به میلی گرم در لیتر
m مقدار نمونه، به گرم

برای مقادیر بیش از ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم، نتیجه را با سه رقم اعشار گزارش کنید.

۹ اطمینان بخشی روش[1]

۹-۱ اختصاصی بودن

هرگونه تداخل ناشی ازآلدهیدها و کتون ها به وسیله افزودن واکنشگر ها حذف می شوند. متانل به دلیل اندیس K_M [2] نا مناسب آنزیم مورداستفاده، تبدیل نمی شود. **n**-پروپانل و **n**-بوتانل به طور کمی تحت آزمون تبدیل می شوند اما الکل های سنگین تر نوع اول وابسته به نمونه، به دلیل واکنش خزش[3] تبدیل نمی شوند. الکل های درجه دوم، سوم و آروماتیک واکنش نمی دهند و گلیسرول حتی با غلظت نسبتا" بالا مزاحمت در واکنش ایجاد نمی کند.

در صورتی که اتانل خالص مورد آزمون قرار گیرد، نتایج مورد انتظار حدود صد درصد خواهد بود.

---

[1] Reliability oh method

[2] ثابت میکائیلیس(Michaelis constant, K_M) عبارت است از: غلظت سوبسترایی که در آن سرعت واکنش به حداکثر ۱۲ (V_{max} 12) می رسد.

[3] Creep reaction

یادآوری: در اندازه گیری آنزیمی بازیافت کمتر از صد درصد لزوما" به معنای تبدیل ناقص نمی باشد، اما بیشتر نشان دهنده اتلاف ماده مورد تجزیه در طی حمل و نقل، آماده سازی محلول اتانل و پی پت کردن محلول رقیق اتانل به داخل محلول آزمون است.

۹-۲ حساسیت و حدتشخیص (حد آشکارسازی)

در این روش کوچکترین اختلاف جذب می تواند در واحد جذب ۰/۰۰۵ شناسایی شود. برای حداکثر حجم نمونه، V_P، ۰/۵۰۰ میلی لیتر، حجم آزمون، V_T، ۳/۵۵۰ میلی لیتر واندازه گیری در طول موج ۳۴۰ نانومتر، مقدار غلظت اتانل در حدود ۰/۱ میلی گرم در لیتر به دست می آید (یا ۰/۶ میلی گرم در لیتر از محلول نمونه برای یک حجم نمونه، V_P ، ۰/۱۰۰ میلی لیتر و حجم نمونه V_T، ۳/۱۵ میلی لیتر).
اختلاف جذب ۰/۰۲۰، حداکثر حجم نمونه، V_P، ۰/۵۰۰ میلی لیتر و حجم آزمون، V_T، ۳/۵۵۰ میلی لیتردر حد آشکارسازی ۰/۵ میلی گرم در لیتر حاصل می شود.

۹-۳ خطی بودن

در این آزمون محدوده غلظت از حدود ۰/۳ میکروگرم اتانل (۰/۵ میلی گرم اتانل در لیتر از محلول نمونه، با حجم نمونه، V_P، ۰/۵ میلی لیتر و حجم آزمون، V_T، ۳/۵۵۰ میلی لیتر) تا ۱۲ میکرو گرم اتانل (۰/۱۲ گرم اتانل در لیتر از محلول نمونه با حجم نمونه، V_P، ۰/۱۰۰ میلی لیتر و حجم آزمون، V_T، ۳/۱۵۰ میلی لیتر) خطی می باشد.

۱۰ دقت

۱۰-۱ کلیات

دقت آزمون بین آزمایشگاهی بر روی سه نمونه عسل دارای مقدار اتانل متفاوت، مطابق استاندارد های بین المللی به شماره های ISO 5725-1 و ISO 5725-2 اندازه گیری شده است. نتایج در پیوست الف آورده شده است.

۱۰-۲ تکرارپذیری[1]

(به وسیله یک آزمایشگر، با به کارگیری همان تجهیزات)

---

[1] Repeatability

اختلاف مطلق بین دو نتیجه موفق یک آزمایش که تحت شرایط تکرارپذیری به دست آمده باشد، نباید در بیشتر از 5 درصد[1] موارد از حد تکرار پذیری r بیشتر باشد. مقادیر r و انحراف معیارتکرارپذیری، s_r، در پیوست آورده شده است.

۳-۱۰ تجدیدپذیری[2]

(به وسیله آزمایشگرهای متفاوت، با به کارگیری تجهیزات متفاوت)

اختلاف مطلق بین نتایج دو فرد که تحت شرایط تجدیدپذیری به دست آمده باشد، نباید در بیشتر از 5درصد موارد از حد تجدید پذیری R بیشتر باشد. مقادیر R و انحراف معیارتکرارپذیری، s_R، در پیوست آورده شده است.

۹ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد:

۸-۱ کلیه آگاهی های مورد نیاز برای شناسایی کامل نمونه برای مثال: نوع، منشاء و شرح نمونه
۸-۲ روش انجام آزمون طبق استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۱۳۲ سال ۱۳۸۸
۸-۳ مقدار الکل، به میلی گرم در کیلوگرم
۸-۴ تاریخ و روش نمونه برداری(در صورت اطلاع)
۸-۵ تاریخ دریافت نمونه توسط آزمایشگاه
۸-۶ نام و نام خانوادگی و امضای آزمون کننده
۸-۷ تاریخ انجام آزمون
۸-۸ هرگونه نکته ویژه مشاهده شده در جریان آزمون
۸-۹ هر گونه کارهای دیگری که در استاندارد مل شماره فوق ذکر نشده یا به طور اختیاری انجام گرفته و ممکن است روی نتایج آزمون موثر باشد.

---

[1] در این استاندارد تکرار پذیری زمانی قابل قبول است که اختلاف تکرار آزمایش ، بیشتر از ۵ درصد نباشد.

[2] Reproducibility

پیوست الف

(اطلاعاتی)

نتایج آزمون بین آزمایشگاهی

آزمون بین آزمایشگاهی توسط کمیته فنی آزمایش عسل[1] انجام و از سوی استانداردهای بین المللی به شماره های ISO 5725-1 و ISO 5725-2 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آماری در جدول الف–۱ نشان داده شده است.

جدول الف – ۱ : نتایج آزمون بین آزمایشگاهی (مقادیر به میلی گرم در کیلو گرم اتانل)

پارامتر	نمونه شماره ۱	نمونه شماره ۲	نمونه شماره ۳
مقدار میانگین، $\bar{x}$	۴/۶۲	۳۵/۴	۱۵۰/۷
حد تکرارپذیری، r	۱/۴۰	۲/۳۷	۷/۹۷
انحراف معیار تکرارپذیری، s_r	۰/۵۰	۰/۸۴	۲/۸۲
حد تجدید پذیری، R	۱/۷۳	۵/۸۱	۳۳/۲۸
انحراف معیار تجدید پذیری، s_R	۰/۶۱	۲/۰۵	۱۱/۷۶

---

[1] Technical Committee Honiguntersuchung