



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

Institute of Standards and Industrial Research of Iran



استاندارد ملی ایران

۱۱۴۱-۱

چاپ اول

ISIRI

11141-1

1st. edition

عسل - تعیین فعالیت ساکاراز

قسمت اول: روش ساینثالر

**Honey-Determination of saccharase activity
Part 1: Siegenthaler method**

ICS: 87.180.10

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)^۱ کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ 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 - تعیین فعالیت ساکاراز
قسمت اول: روش ساینتر

رئیس:

سیف هاشمی، سعیده
(دکترای دامپزشکی)

سمت و/ یا نمایندگی

سازمان نظام دامپزشکی جمهوری اسلامی ایران

دبیر:

صدغی، ناصر
(لیسانس صنایع غذایی)

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

تاج دولتشاهی، فرشید
(دکترای دامپزشکی)

آزمایشگاه ویرومد

شاه حسینی، مهناز

(فوق لیسانس علوم و صنایع غذایی)

شرکت پارس مینو

جمالی، زهره

(لیسانس تغذیه)

وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی

آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو

مجتبایی، سید حمید

(لیسانس صنایع غذایی)

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

محمدی، حسین

(لیسانس علوم آزمایشگاهی)

وزارت بازرگانی

شرکت بازرسی بین المللی کالای تجاری

پیش‌گفتار

استاندارد "عسل - تعیین فعالیت ساکاراز به روش ساینترال" که پیش‌نویس آن در کمیسیون های مربوط توسط مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تهیه و تدوین شده و در هشتصد و هفتمین اجلاس کمیته ملی استاندارد خوراک و فرآورده های کشاورزی مورخ ۱۳۸۷/۱۱/۵ 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 می‌شود.

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.

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

1-DIN 10759-1, 1998. Determination of saccharase activity in honey by the Siegenthaler method.

2-Harmonized Methods of the International honey commission (2002)-Determination of invertase activity

عسل - تعیین فعالیت ساکاراز به روش ساینتر

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین فعالیت ساکاراز در عسل می باشد. این استاندارد برای تعیین فعالیت ساکاراز (الفا گلوکوزیداز) عسل کاربرد دارد.

یادآوری- تعیین فعالیت ساکاراز باین روش، وابستگی مهمی با روش هادورن که در قسمت دوم این استاندارد ملی بطور مجزا تدوین می شود، وجود ندارد.

۲ 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 موردنظر 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 مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۱-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۱۱۱۴۱ سال ۱۳۸۸، عسل- تعیین فعالیت ساکاراز - قسمت دوم: روش هادورن

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۹۲، عسل- ویژگی ها و روش های آزمون

۳-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۷۴۴۲، درستی (صحت ودقت) روش ها ونتایج اندازه گیری قسمت اول: تعاریف و اصول کلی

۳ اصطلاحات و تعاریف

دراین استاندارد اصطلاح و تعریف زیر به کار می رود:

واحد فعالیت ساکاراز

واحد فعالیت ساکاراز بر حسب کیلو گرم عسل است، که در آن هر واحد ساکاراز در شرایط خاص آنزیم در سوبسترا (pH، دما) در مدت یک دقیقه یک میکرومول از سوبسترا را تبدیل می کند.

۴ اساس روش

در این روش پی-نیترو-آلفا-گلوکوپیرانوزید موجود در سوبسترا، به پی-نیترو فنل تجزیه می شود. یک حجم از محلول آزمون و یک حجم سوبسترا کاملاً مخلوط می شوند، انکوباسیون به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 40 ± 0.2 درجه سلسیوس، توقف واکنش با افزودن محلول توقف، پس از آن محلول عسل به شاهد اضافه می شود. جذب محلول آزمون در مقابل شاهد برای محاسبه فعالیت ساکاراز به کار می رود.

۵ مواد و یا واکنشگرها

مواد شیمیایی باید دارای درجه خلوص آزمایشگاهی و آب مورد مصرف آب مقطر یا معادل بادرجه خلوص آن باشد.

۱-۵ محلول بافر فسفات یکدهم مول در لیتر (pH=6)

۱۱/۶۶ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات KH_2PO_4 و ۲/۵۶ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ را در آب حل و به حجم یک لیتر برسانید.

۲-۵ محلول سوبسترا ۰۲/۰۲ مول (pH=6)

۶/۰۲۵۲ گرم پی-نیترو فنیل- α -دی گلوکو پیرانوزید (P-NPG) با محلول بافر فسفات (ممکن است تا دمای ۶۰ درجه سلسیوس جهت کمک به حل کردن گرم، و فوراً تا دمای محیط سرد شود) در بالن حجمی ۱۰۰۰ میلی لیتری حل و به حجم برسانید. محلول ممکن است سریعاً مصرف شود، و یا در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت یک هفته دور از نور نگهداری شود.

۳-۵ محلول توقف ۳ مول (pH=9.5)

۳۶۳/۴۲ گرم تریس (هیدروکسی متیل) آمینومتان را در بالن اندازه دار یک لیتری با آب حل کنید و pH آنرا با محلول اسید کلریدریک ۳ مول تنظیم کنید و با آب به حجم یک لیتر برسانید.

۶ وسایل

وسایلی که برای تعیین و نگهداری واکنشگرها استفاده می شود، باید بدون دترجنت ها باشد. علاوه بر وسایل معمولی آزمایشگاهی، وسایل زیر مورد نیاز است:

۱-۶ الک ، از جنس فولاد زنگ نزن، با اندازه چشمه های ۰/۵ میلی متری

۲-۶ شیکر لوله آزمون

۳-۶ حمام آب دارای کنترل دما، قابل تنظیم در (40 ± 0.2) درجه سلسیوس

۴-۶ اسپکتروفتومتر، برای اندازه گیری در ۴۰۰ نانومتر

۵-۶ زمان سنج (تایمر آنزیم)

۶-۶ پی پت

۷-۶ بالن حجمی، با ظرفیت اسمی ۲۵ و ۱۰۰۰ میلی لیتر

۸-۶ لوله آزمایش ، با ظرفیت اسمی ۱۰ میلی لیتر

۹-۶ سل پلاستیکی یا شیشه ای، با طول مسیر عبور نور ۱۰ میلی متر

۱۰-۶ بشر شیشه ای

۷ نمونه برداری

نمونه برداری باید مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۹۲ انجام شود.

۸ روش کار

۱-۸ آماده سازی آزمایش

۱-۱-۸ عسل مایع یا کریستال شده بدون ناخالصی

آزمایه را حداقل سه دقیقه به هم بزنید، چنانچه آزمون HMF هم انجام می گیرد، از مخلوط شدن هوا تا حد امکان جلوگیری کنید.

۲-۱-۸ عسل مایع یا کریستال شده دارای ناخالصی

ابتدا ناخالصی ها را حذف کنید. سپس عسل را در دمای محیط از الک رد کنید. برای عسل کریستال شده از قاشقک استیل استفاده کنید.

۸-۱-۳ غسل شان

عسل را با استفاده از الک و بدون گرم کردن کاملاً از شان جدا سازید.

۸-۲ آماده سازی محلول آزمون

۴ گرم از آزمايه را با دقت ۰/۰۱ گرم در بشر کوچکی وزن کنید و در حدود ۱۵ میلی لیتر محلول بافر فسفات حل کنید. آن را به بالن حجمی ۲۵ میلی لیتری انتقال دهید. بالن را با محلول بافر فسفات تا خط نشانه پر کنید. ودر بالن را محکم ببندید و کاملاً" به هم بزنید. محلول را در یخچال تا ۲۴ ساعت می توانید نگهداری و مصرف کنید.

۸-۳ انجام آزمون

۵ میلی لیتر محلول سوبسترا در یک لوله آزمایش بریزید. لوله را در حمام آب (۴۰±۰/۲) درجه سلسیوس به مدت حدود ۵ دقیقه (پیش گرم کن) قرار دهید، ۰/۵ میلی لیتر محلول نمونه را با پیپت اضافه کنید. شروع زمان را از این لحظه بگیرید. محتوی لوله را سریعاً ۱۰ ثانیه با شیکر لوله مخلوط کنید. لوله را به حمام برگردانید و تا مدت ۲۰ دقیقه ± ۵ ثانیه بماند. سپس ۰/۵ میلی لیتر محلول قلیایی توقف واکنش آنزیمی اضافه کنید و با شیکر لوله آن را کاملاً مخلوط کنید. افزودن محلول قلیایی به واکنش آنزیمی خاتمه می دهد. ماده P نیترو فنل تشکیل P نیترو فنلات می دهد.

آزمون شاهد را بدون نمونه بطور موازی با آزمون با ۵ میلی لیتر محلول سوبسترا در لوله آزمایش انجام دهید پیش گرم کردن در حمام آب (۴۰±۰/۲) درجه سلسیوس و آنکوبه کردن به مدت ۲۰ دقیقه انجام شود. سپس ۰/۵ میلی لیتر محلول متوقف کننده فعالیت آنزیم بیافزاید و کاملاً مخلوط کنید. فقط ۰/۵ میلی لیتر محلول نمونه را به شاهد اضافه کنید و مجدداً مخلوط کنید. درخاتمه آنکوباسیون، لوله های آزمایش را از حمام بردارید و تا دمای محیط خنک کنید و در برابر شاهد جذب نمونه را در طول موج ۴۰۰ نانومتر اندازه گیری کنید.

۹ بیان نتایج

۹-۱ محاسبه

فعالیت ساکاراز، بر حسب واحد (U) در کیلوگرم با استفاده از معادله (۱) محاسبه می شود:

$$S_{Z(\text{siegenthaler})} = \frac{E_{400} \cdot V_f \cdot V \cdot t \cdot K}{m_E} \quad \text{معادله (۱)}$$

که در آن :

E400 جذب محلول نمونه در ۴۰۰ نانومتر

V_f فاکتور رقت براساس کیلوگرم عسل (در اینجا، $V_f=50000$)
 V حجم محلول نمونه، میلی لیتر (در اینجا، $V=6\text{ml}$)
 t ضریب تبدیل زمان واکنش به یک دقیقه (در اینجا، $t = 0.05$)
 K فاکتور غلظت مولار p-nitrophenol (در اینجا ، $K=0.05298$)
 m_E جرم آزمون به گرم (در اینجا، $m_E=4$)

حاصل آن:

$$S_{Z(\text{siegenthaler})} = E_{400} . 198.68$$

نتیجه را تا یک رقم اعشار گزارش کنید.

۲-۹ دقت

یک آزمون بین آزمایشگاهی مطابق با استاندارد ملی ۱-۷۴۴۲ درستی (صحت ودقت)^۱ انجام شده است. نتایج به دست آمده را در پیوست اطلاعاتی الف مشاهده کنید.

۱۰ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد:

- ۱-۱۰ شناسایی نمونه
- ۲-۱۰ تاریخ نمونه برداری
- ۳-۱۰ روش نمونه برداری
- ۴-۱۰ تاریخ دریافت نمونه
- ۵-۱۰ تاریخ انجام آزمون
- ۶-۱۰ بیان فعالیت ساکاراز طبق این استاندارد
- ۷-۱۰ دلایل هر گونه انحراف از این استاندارد
- ۸-۱۰ نام و نام خانوادگی وامضاء آزمون کننده

^۱ ISO 5725 -1

پیوست الف
اطلاعاتی

جدول ۱- نتایج آزمون بین آزمایشگاهی

فعلیت ساکاراز S_z واحد در کیلو گرم					نمونه
S_R	R	S_r'	r	\bar{x}	
$\pm 3/16$	۸/۹۵	۱/۶۰	۴/۵۲	۹۰/۳۶	عسل گل کوهستان
$\pm 7/53$	۲۱/۳۰	$\pm 2/20$	۶/۲۲	۱۹۱/۸۹	عسل کاج ترکی
$\pm 1/72$	۴/۸۷	$\pm 0/80$	۲/۲۷	۵۱/۶۳	عسل گل رومانی
$\pm 1/33$	۳/۷۶	$\pm 0/62$	۷۶/۱	۲۴/۷۷	عسل اقایوگل تابستانی
$\pm 5/06$	۱۴/۳۲	$\pm 1/47$	۴/۱۵	۱۴۲/۹۴	عسل درخت صنوبر جنگلی
					\bar{x} میانگین کل r حد تکرار پذیری S_r انحراف استاندارد تکرار پذیری R حد تکثیر پذیری S_R انحراف استاندارد تکثیر پذیری