ISIRI
5807-1
1st.edition

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

استانداردملی ایران
۱- ۵۸۰۷
چاپ اول

شیر خشک ، مخلوط‌های یخی خشک (پودر خشک فرآورده‌های یخی) و پنیر فرآوری شده – تعیین‌مقدار لاکتوز – قسمت اول – تعیین گلوکز بدست آمده از لاکتوز به روش آنزیمی– روش آزمون

Dried milk , dried ice - Mixes and processed cheese – Determination of lactose content-

Part 1 : enzymatic method utilizing the glucose moiety of the lactose- Test method

نشانی مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران : کرج ـ شهر صنعتی، صندوق پستی ۱۶۳-۳۱۵۸۵

دفتر مرکزی : تهران ـ ضلع جنوبی میدان ونک – صندوق پستی : ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵

تلفن مؤسسه در کرج: ۸-۲۸۰۶۰۳۱-۰۲۶۱

تلفن مؤسسه در تهران: ۵-۸۸۷۹۴۶۱-۰۲۱

دورنگار: کرج ۲۸۰۸۱۱۴-۰۲۶۱ ـ تهران ۸۸۸۷۱۰۳-۸۸۸۷۰۸۰ -۰۲۱

بخش فروش ـ تلفن: ۲۸۰۷۰۴۵-۰۲۶۱ دورنگار: ۲۸۰۷۰۴۵-۰۲۶۱

پیام نگار: Standard @ isiri.or.ir

بهاء:۳۳۷۵ ریال

Headquarters :Institute Of Standards And Industrial Research Of IRAN

P.O.Box: 31585-163 Karaj – IRAN

Tel.(Karaj): 0098 (261) 2806031-8

Fax.(Karaj): 0098 (261) 2808114

Central Office : Southern corner of Vanak square , Tehran

P.O.Box: 14155-6139 Tehran - IRAN

Tel.(Tehran): 0098(21)8879461-5

Fax.(Tehran): 0098 (21) 8887080,8887103

Email: Standard @ isiri.or.ir

Price: 3375 RLS

« بسمه تعالی»

آشنایی با مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب قانون، تنها مرجع رسمی کشور است که عهده دار وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) میباشد.

تدوین استاندارد در رشته های مختلف توسط کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان مؤسسه، صاحبنظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی واقتصادی آگاه ومرتبط با موضوع صورت میگیرد. سعی بر این است که استانداردهای ملی، در جهت مطلوبیت ها و مصالح ملی وبا توجه به شرایط تولیدی، فنی و فن آوری حاصل از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع شامل: تولیدکنندگان ،مصرف کنندگان، بازرگانان، مراکز علمی و تخصصی و نهادها و سازمانهای دولتی باشد.پیش نویس استانداردهای ملی جهت نظرخواهی برای مراجع ذینفع واعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال میشود و پس از دریافت نظرات وپیشنهادها در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح ودر صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که توسط مؤسسات و سازمانهای علاقمند و ذیصلاح و با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می شود نیز پس از طرح و بـررسی در کمیته ملی مربوط و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی چاپ ومنتشرمی گردد. بدین ترتیب استانداردهایی ملی تلقی می شود که بر اساس مفاد مندرج در استاندارد ملی شماره ((۵)) تدوین و در کمیته ملی مربوط که توسط مؤسسه تشکیل میگردد به تصویب رسیده باشد.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد میباشد که در تدوین استانداردهای ملی ضمن تـوجه به شرایط کلی ونیازمندیهای خاص کشور، از آخرین پیشرفتهای علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهـای بین المـللی استفـاده می نماید.

مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون به منظور حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی وعمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردها را 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 آنرا اجباری نماید.

همچنین بمنظور اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمانها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و گواهی کنندکان سیستم های مدیریت کیفیت ومدیریت زیست محیطی، آزمایشگاهها و کالیبره کنندگان وسایل سنجش، مؤسسه استاندارد اینگونه سازمانها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران مورد ارزیابی قرار داده و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آنها اعطا نموده و بر عملکرد آنها نظارت می نماید. ترویج سیستم بین المللی یکاها ، کالیبراسیون وسایل سنجش تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی از دیگر وظایف این مؤسسه می باشد.

کمیسیون استاندارد "شیر خشک ، مخلوط‌های یخی خشک (پودر خشک فرآورده‌های یخی) و پنیر فرآوری شده - تعیین‌مقدار لاکتوز - قسمت اول - تعیین گلوکز بدست آمده از لاکتوز به روش آنزیمی- روش آزمون "

رئیس	سمت یا نمایندگی
حسینی، مهدی (دکترای دامپزشکی)	اداره دامپزشکی استان سیستان و بلوچستان
اعضاء	
اصغری ، مراد علی (فوق دیپلم دامپزشکی)	اداره نظارت بر مواد غذایی ، بهداشتی و آرایشی استان سیستان و بلوچستان
پودینه ، کلثوم (لیسانس دامپزشکی)	اداره دامپزشکی استان سیستان و بلوچستان
حیدری ، مرضیه (لیسانس صنایع)	سازمان صنایع و معادن استان سیستان و بلوچستان
زارعان ، فاطمه (لیسانس دامپزشکی)	اداره دامپزشکی استان سیستان و بلوچستان
سیرغانی، مسعود (لیسانس صنایع غذایی)	کارخانه فراورده های گوشتی براسان
شهرکی ، علیرضا (لیسانس صنایع غذایی)	اداره نظارت بر مواد غذایی ، بهداشتی و آرایشی استان سیستان و بلوچستان
صفاری ، فریبا (فوق لیسانس شیمی)	آزمایشگاه کنترل مواد غذایی ، بهداشتی و آرایشی استان سیستان و بلوچستان
عرفانی فرد ، محمد (لیسانس صنایع غذایی)	شرکت فراورده های لبنی دهکده زاهدان

فیروزکوهی، مسعود (لیسانس علوم تغذیه)	آزمایشگاه کنترل مواد غذایی ، بهداشتی و آرایشی استان سیستان و بلوچستان
میری قلعه نوی، مینا (فوق لیسانس صنایع غذایی)	اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان سیستان و بلوچستان

دبیر

هرمزی،فریبا (لیسانس علوم تغذیه)	اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان سیستان و بلوچستان

فهرست اعضاء شرکت کننده در پانصد و چهل و ششمین اجلاسیه کمیته ملی استاندارد خوراک و فرآورده های غذایی و کشاورزی مورخ ۸۴/۱۰/۶

رئیس	**سمت یا نمایندگی**
مولوی- فاطمه (فوق لیسانس علوم بهداشتی در تغذیه)	کارشناس استاندارد
اعضاء	
پورحسن - محمد رضا (لیسانس صنایع غذایی)	مسئول کنترل کیفیت و فنی محصولات غذایی صیتی
جوانشیر- ربکا (لیسانس)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
خانشدی- نادر (کارشناس)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی – آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو
شکرالهی- فتانه (فوق لیسانس)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
صفویان- سید عیسی (فوق لیسانس)	وزارت بازرگانی - سازمان توسعه تجارت ایران
فرحناک – فهیمه (فوق لیسانس تغذیه)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی – آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو
فرهی – فرج الله (دکترا)	دانشگاه علوم پزشکی تهران - دانشکدهٔ داروسازی
قبانوری- شیرزاد (لیسانس تغذیه)	شرکت گلین لواشک

کاظمی شیرازی- جواد (فوق لیسانس صنایع غذایی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی - ادارهٔ کل نظارت بر مواد غذایی، بهداشتی و آرایشی
منزوی- هاشمه (لیسانس شیمی)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران
نوروزی – سعید (دکترای دامپزشکی)	مشاور و نماینده ریاست محترم موسسه استاندارد
هرمزی- فریبا (لیسانس علوم تغذیه)	اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی زاهدان

دبیر کمیته ملی

شریعتی – منیژه (لیسانس علوم تغذیه)	موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران

	فهرست مندرجات	صفحه
	پیش گفتار	ب
۱	هدف	۱
۲	دامنه کاربرد	۱
۳	مراجع الزامی	۱
۴	اصطلاحات و تعاریف	۲
۵	اساس روش	۳
۶	مواد لازم	۳
۷	وسایل‌لازم	۷
۸	نمونه برداری	۹
۹	روش اجرای آزمون	۹
۹-۱	آزمایش و کنترل روش کار	۹
۹-۲	آماده کردن آزمایه	۱۱
۹-۳	آزمونه	۱۱
۹-۴	آزمون محلول شاهد	۱۲
۹-۵	پروتئین زدایی	۱۲
۹-۶	اندازه گیری	۱۳
	جدول برنامه اندازه گیری	۱۴
۱۰	محاسبه و بیان نتایج	۱۶
۱۱	دقت	۱۷
۱۲	گزارش آزمون	۱۸
	پیوست الف- عملیات مناسب ساخت برای انجام‌تجزیه آنزیمی- (الزامی)	۲۰

پیش گفتار

استاندارد "شیر خشک ، مخلوط یخی خشک (پودر خشک فرآورده های یخی) و پنیر فرآوری شده – تعیین‌مقدار لاکتوز – قسمت اول : تعیین گلوکز بدست آمده از لاکتوز به روش آنزیمی– روش آزمون " که به وسیله کمیسیون‌های فنی مربوطه تهیه و تدوین شده و در پانصد و چهل و ششمین جلسه کمیته ملی استاندارد خوراک و فراورده های غذایی و کشاورزی مورخ۸٤/۱۰/٦ تصویب شد. اینک به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با پیشرفت های ملی و جهانی در زمینه صنایع ، علوم و خدمات ، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر گونه پیشنهادی که برای اصلاح یا تکمیل این استانداردها ارائه شود ، در تجدید نظر بعدی مورد توجه قرار خواهد گرفت . بنابراین برای مراجعه به استانداردهای ایران باید همواره از آخرین تجدید نظر آنها استفاده کرد.

در تهیه و تدوین این استاندارد سعی شده است که ضمن توجه به شرایط موجود و نیازهای جامعه، درحد امکان بین این استاندارد و استاندارد ملی کشورهای صنعتی و پیشرفته هماهنگی ایجاد شود.

منابع و مآخذی که برای تهیه این استاندارد به کار رفته به شرح زیر است :

1– ISO 5765-1-(2002)Dried milk , dried ice - mixes and processed cheese "Determination of lactose content

Part 1 : Enzymatic method utilizing the glucose moiety of the lactose

۲– استاندارد ملی ایران ۵۸۰۷ : سال ۱۳۸۲ " شیر خشک – مخلوط های یخی خشک (پودر خشک فرآورده های یخی) و پنیر فرآوری شده – تعیین مقدار لاکتوز – قسمت دوم : تعیین گالاکتوز مشتق شده از لاکتوز به روش آنزیمی – روش آزمون "

۳– استاندارد ملی ایران ۳۹۶۴: سال ۱۳۷۶ "استاندارد فرآورده یخی خوراکی- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون "

شیرخشک، مخلوط های یخی خشک[1] (پودر خشک فرآورده‌های یخی) و پنیر فرآوری شده – تعیین مقدار لاکتوزقسمت اول:
تعیین گلوکز[2] بدست آمده از لاکتوز[3] به روش آنزیمی- روش آزمون.

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش برای اندازه‌گیری مقدار لاکتوز موجود در شیر خشک، مخلوط های یخی خشک و پنیر فرآوری شده با اندازه‌گیری گلوکز بدست آمده از لاکتوز به روش آنزیمی، می‌باشد.

۲ دامنه کاربرد

این استاندارد، درباره انواع شیر خشک و مخلوط‌های یخی خشک (در حضورقندهای دیگر و مواد احیاء کننده) و پنیرهای فرآوری شده، کاربرد دارد.

۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها ارجاع داده شده است.
بدین ترتیب آن مقررات جزئی از این استاندارد محسوب می شود. در مورد مراجع الزامی دارای تاریخ چاپ و / یا تجدید نظر، اصلاحیه‌ها و تجدید نظرهای بعدی آن مدارک مورد نظر نیست.معهذا بهتر است کاربران ذینفع این استاندارد، امکان کاربرد آخرین اصلاحیه‌ها و تجدید نظرهای مدارک الزامی زیر را مورد بررسی قرار دهند. در مورد مراجع بدون تاریخ چاپ و / یا تجدید نظر، آخرین چاپ و / یا تجدید نظر آن مدارک الزامی ارجاع داده شده مورد نظر است .
استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است :

۳-۱ استاندارد ملی ایران ۳۲۶: سال ۱۳۸۰ "روش های نمونه برداری شیر و فرآورده‌های آن."

1- Dried ice-mixes
2- Glocose
3- Lactose

۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد اصطلاحات و/ یا واژه‌ها با تعاریف زیر به کار می‌رود:

۴-۱ لاکتوز موجود

منظور، مقدار لاکتوزی است که به روش تعیین شده در این استاندارد اندازه‌گیری می‌شود، و به صورت درصد وزنی، بیان می‌گردد.

۴-۲ آزمایه [1]

نمونه‌ای است که از نمونه آزمایشگاهی، برابر اصول نمونه برداری، جهت انجام آزمایش، تهیه می‌گردد.

۴-۳ آزمونه [2]

مقدار معینی از آزمایه است، که برای انجام آزمایش، از آزمایه به طور وزنی یا حجمی برداشته می‌شود.

۴-۴ گرمخانه [3]

گرم خانه ، عبارت است از، بن ماری تنظیم شده در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس .

۴-۵ مخلوط یخی خشک

فرآورده خشکی است ، که مقدار رطوبت آن برابر یا کمتر از ۴ درصد بوده و پس از افزودن مقدار معینی آب، تبدیل به مخلوط آماده برای تهیه فرآورده یخی می‌گردد.

1- Test sample
2- Test portion
3- Incubation

۵ اساس روش

عبارت است از :

۵-۱ آبکافت (هیدرولیز) لاکتوز با با β- گالاکتوزیداز[1] به گلوکز و گالاکتوز.

۵-۲ فسفریله کردن گلوکز به گلوکز – ۶ – فسفات توسط هگزوکیناز و آدنوزین تری فسفات (*ATP*)

۵ – ۳ اکسیداسیون گلوکز- ۶ – فسفات در حضور کاتالیزور β- گالاکتوزیداز دی هیدروژناز[2] به اسید ۶ – فسفوگلوکونات که همراه آن[3] (*NADP*+) به *NADPH* احیا می گردد.

۵ – ۴ *اندازه گیری میزان جذب محلول* NADPH *با بیناب سنج در طول موج ۳۴۰ نانومتر.*

۵ -۵ محاسبه مقدار لاکتوز فرآورده از روی این جذب.

۶ مواد لازم

در این استاندارد، تمامی واکنش گرهای مورد استفاده باید خالص آزمایشگاهی باشد، مگر اینکه در این استاندارد به موارد خاص دیگری اشاره شده باشد.

آبی که برای آماده سازی و تهیه محلول های آنزیمی استفاده می‌شود، بایستی کمینه دوبار تقطیر شده باشد و آبی که برای اهداف دیگری استفاده می‌شود، باید آب مقطری باشد، که دارای کمینه خلوص معادل با آب مقطر باشد.

یادآوری – واکنش گر های سفارش شده در بندهای ۶-۳ و ۶ – ۵ و ۶ – ۷ ، ممکن است به صورت کیت آماده در دسترس باشد .

1-β- Galactosidase
2-β- Galactosidase dehydrogenase
3- Nicotinamide adenine dinucleotide

۶-۱ محلول فروسیانور پتاسیم

۳/۶ گرم از پتاسیم هگزا سیانوفرات [1](*II*) دارای سه مولکول آب (سه آبه) را در آب مقطر حل کنید و در بالن حجمی به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و آن را خوب مخلوط نمایید.

۶-۲ محلول سولفات روی

۷/۲ گرم از سولفات روی[2] دارای هفت مولکول آب (هفت آبه) را در آب مقطر حل کنید و در بالن حجمی به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و آن را خوب مخلوط نمایید.

۶-۳ محلول هیدروکساید سدیم ۰/۱ نرمال

۴ گرم از هیدروکسید سدیم [3]را در آب مقطر حل کنید و در بالن حجمی به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده و آن را خوب مخلوط نمایید.

۶-۴ محلول بافر سیترات با *pH* برابر ۶/۶

۲/۸ گرم ازتری سدیم سیترات[4] با دو مولکول آب (دو آبه) و ۰/۰۴۲ گرم از اسید سیتریک [5] یک آبه و ۰/۶۲۵ گرم از منیزیم سولفات[6] هفت آبه را در حدود ۴۰ میلی لیتر آب حل نمایید.سپس، با افزودن محلول اسیدسولفوریک ۲ مولار و یا محلول هیدروکساید سدیم ۰/۱ مولار در دمای ۲۰ درجه سلسیوس، *pH* را برابر ۰/۱ ± ۶/۶ تنظیم کنید و با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده و آن را خوب مخلوط نمایید.

این محلول را می توانید در یخچال با دمای بین صفر تا ۵ درجه سلسیوس، به مدت۳ ماه نگهداری کنید.

۶-۵ محلول بافر تری اتانول آمین(*TEA*) با *pH* برابر ۷/۶

۱۴/۰ گرم محلول بافر تری اتانول آمین هیدروکلراید [7] را با ۰/۲۵ گرم منیزیم سولفات هفت آبه در حدود ۸۰ میلی لیتر آب مقطر حل کنید و سپس *pH* را در ۲۰ درجه سلیسوس با حدود ۵ میلی

1- $K_4Fe(CN)_6.3H_2O$
2- $ZnSo_4.7\ H_2o$
3- *NaOH*
4- *C6H5O7.Na3.2H2O*
5- *C6H8O7 .H2O*
6- $MgSO_2PO_4$
7- *C6H15NO3.HCL*

لیتر محلول سدیم هیدروکساید پنج مولار، برابر ۰/۱ ± ۷/۶ تنظیم کنید و با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و آن را خوب مخلوط نمایید.

این محلول را می‌توانید در یخچال با دمای بین صفر تا ۵ درجه سلسیوس، به مدت هشت هفته نگهداری کنید.

۶-۶ محلول بافر $TEA/ATP/NAD\ P^+$

۶۵ میلی گرم از نیکوتینامید آدنین دی نوکلئوتیدفسفات دی سدیم[1] (با خلوص تقریبی ۹۹ – ۹۸ درصد) را با ۱۷۰ میلی گرم آدنوزین ″۵- تری فسفات دی سدیم [2] (با خلوص تقریبی ۱۰۰ – ۹۹ درصد) در ۳۰ میلی لیتر از محلول بافر تری اتانول آمین (طبق بند ۶-۵)، حل نمایید.

این محلول را می‌توانید در یخچال با دمای بین صفر تا ۵ درجه سلسیوس، به مدت ۲ هفته نگهداری کنید.

۷-۶ سوسپانسیون بتا- گالاکتوزیداز (با منشاءاشرشیاکلی)[3]در محلول سولفات آمونیوم[4] ۳/۲ مول در لیتر با pH تقریبی ۶ .

فعالیت سوسپانسیون بتا – گالاکتوزیداز ، کمینه ۶۰ واحد[4]در میلی لیتر (لاکتوز به عنوان سوبسترا [5] در دمای ۲۵ درجه سلسیوس) خواهد بود .

این محلول سوسپانسیون را می‌توانید در یخچال با دمای بین صفر تا ۵ درجه سلسیوس، به مدت ۱۲ ماه نگهداری کنید. زمانی که این سوسپانسیون مورد استفاده قرار می‌گیرد، ظرف حاوی این محلول را در داخل یخ خرد شده، قرار دهید.

یادآوری – یک سوسپانسیون بتاگالاکتوزیداز حاوی بیشینه ۰/۰۰۱ درصد از بتا – فروکتوزیداز[6] α –

1- $C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_2$
2- $C_{10}H_{14}N_5O_{13}P_3Na_2$
3- *ß – Galactosidase (from Esherichia colli)*
4- *Ammonium sulfate solution*
5- *Substrate*
6- *ß - Fructosidase*

گالاکتوزیدار[1] ، گلوکزدی هیدروژناز[2] آلفا - گلوکوزیداز[3] *NADH* - اکسیداز[4] که بر حسب فعالیت ویژه بتا گالاکتوزیداز محاسبه شده است نیز مناسب می باشد.

۶-۸ سوسپانسیون *HK/G6P-DH* (با منشاء مخمرها) [5] در محلول سولفات آمونیوم ۳/۲ مولار با *pH* تقریبی ۶.

فعالیت سوسپانسیون هگزوکیناز [6] کمینه ۲۸۰ واحد در میلی لیتر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس خواهد بود و فعالیت گلوکز –۶- فسفات دهیدروژناز کمینه ۱۴۰ واحد بر میلی لیتر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس خواهد بود .

این سوسپانسیون را می‌توانید در یخچال با دمای بین صفر تا ۵ درجه سلسیوس، به مدت یکسال نگهداری کنید. زمانی که این سوسپانسیون را استفاده می‌کنید، ظرف حاوی این محلول را در داخل یخ خرد شده، قرار دهید .

یادآوری - یک سوسپانسیون HK/G6P-DH که بیشینه دارای ۰/۰۱ درصد از ۶- فسفوگلوکونات دهیدروژناز و فسفو گلوکوموتاز حاوی بیشینه ۰/۰۰۲ درصد فسفوگلوکو - ایزومراز و حاوی بیشینه ۰/۰۲ درصد از گلوتاتیون ردوکتاز که برحسب فعالیت ویژه HK/G6P-DH محاسبه شده است نیزمناسب می باشد.

۶-۹ محلول استاندارد لاکتوز

با غلظت ۰/۸ میلی گرم لاکتوز[7] دارای یک مولکول آب در میلی لیتر آب مقطر.

۴۰۰ میلی گرم از لاکتوز منوهیدرات را در آب مقطر، حل کنید و سپس به حجم ۵۰۰ میلی لیتر رسانده و آن را خوب مخلوط نمایید.

1- ά - Glactocosidase
2- Glucose dehydrogenase
3- α- glucosidase
4- NADH-Oxidase
5- HK/G6P-DH
6-(EC.1.1.1.48)
7- $C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O$

این محلول را می‌توانید در یخچال با دمای بین صفر تا ۵ درجه سلسیوس ، به مدت ۲ روز نگهداری کنید.

پیش از استفاده، دمای این محلول را به ۲۰ درجه سلسیوس برسانید.

یادآوری ۱ - لاکتوز منوهیدرات باید پیش از آن در دمای ۸۷ درجه سلسیوس، خشک شده و به وزن ثابت رسیده باشد.

یادآوری ۲ - از تاریخ تولید و انقضاء قابلیت مصرف واکنش گرها که توسط تولیدکننده تعیین و ارائه می‌شود، آگاهی داشته باشید.

یادآوری ۳ - اگر یک سوسپانسیون آنزیمی غیر از فعالیت ویژه خود به کار برده شود، حجم سوسپانسیون نوشته شده در جدول ۱ (طبق بند ۹-۶-۱) ، باید به طور نسبی افزایش یا کاهش یابد.

یادآوری ۴ - واکنش گرهای نوشته شده در بندهایی شامل: (بند ۶-۴)، (بند ۶-۶) و (بند ۶-۸)، به صورت ترکیبات آماده ممکن است در دسترس باشد.

۷ وسایل لازم

وسایل و لوازم آزمایشگاهی معمول در آزمایشگاه ، به ویژه وسائل مشروحه زیر است:

۷-۱ ترازوی دقیق آزمایشگاهی

با قابلیت توزین تا یک میلی گرم، با دقت تقریبی ۰/۱ میلی‌گرم.

۷-۲ ظروف شیشه ای

ارلن و بشرهای ۵۰ و ۲۵۰میلی لیتری .

۷-۳ پی پت‌های مدرج

پی پت‌های مدرج ۵ و ۱۰ میلی لیتری با تقسیمات ۰/۱ میلی لیتر.

۷-۴ پی پت‌های حجمی

پی پت‌های حجمی۰/۰۵، ۰/۲، ۱ ، ۵، و ۱۰ میلی لیتر.

۷-۵ بالن حجمی(ژوژه)[1]

بالن های با حجم۱۰۰ میلی لیتر.

۷-۶ کاغذ صافی

کاغذ صافی متوسط به قطر تقریبی ۱۵ سانتی متر.

۷-۷ قیف صافی [2]

باقطر حدود ۷ سانتی متر.

۷-۸ بیناب سنج [3]

بیناب سنج مناسب جهت اندازه‌گیری در طول موج ۳۴۰ نانومتر، مجهز به نمایه،[4] به پهنای یک سانتی متر برای عبور نور.

۷-۹ هم زن پلاستیکی [5]

مناسب جهت مخلوط کردن نمونه و آنزیم در داخل نمایه‌های بیناب سنج .

۷-۱۰ میله شیشه‌ای [6]

با قطر ۶ میلی متر و طول ۱۵۰ میلی متر، جهت خیساندن و له کردن نمونه .

۷-۱۱ حمام آب

با قابلیت نگهداری آب در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس و مناسب برای قراردادن جالوله‌ای مخصوص نمایه‌های بیناب سنج (طبق بند ۷-۸) .

یادآوری- گرم خانه‌گذاری نمایه‌ها تنها در صورتی لازم است، که دمای اتاق زیر ۲۰ درجه سلسیوس باشد .

1- One – Markvolumetric flasks
2- Filter funnles
3- Spectrometer
4- Cell
5- Plastic paddles
6- Glass rods

۷-۱۲ دستگاه هم زن [1]

دستگاه هم زن مناسب جهت درست کردن سوسپانسیون پنیر فرآوری شده مورد آزمون (باید مخلوط کن به آسانی قابل تمیز شدن باشد) .

۷-۱۳ گرم خانه

گرم خانه ترموستات دار و قابل کنترل در دمای ۲ ± ۸۷ درجه سلسیوس .

۷-۱۴ آسیاب و خرد کن

آسیاب و خرد کن باید دارای قابلیت آسیاب نمودن و خرد کردن پنیر بوده و به آسانی قابل تمیز شدن باشد.

۸ نمونه برداری [2]

۸-۱ نمونه برداری باید مطابق با استاندارد ملی ایران ۳۲۶ :سال ۱۳۸۰ "روش های نمونه برداری شیر و فرآورده‌های آن، "باشد .

۸-۲ نمونه‌ای که آزمایشگاه دریافت می‌کند، باید معرف و نماینده یک بهر بوده، صدمه ندیده و یا اینکه در حین حمل و نقل و نگهداری تغییر کیفی نکرده باشد، باید توجه داشت که همه این موارد در صحت و درستی نتیجه آزمون موثر می باشد .

۹ روش اجرای آزمون

۹-۱ آزمایش و کنترل روش کار

۹-۱-۱ برای تشخیص وجود لاکتوز ، در صورتی که یک یا چند شرط مشروحه در زیر وجود داشته باشد، آزمون کنترلی زیر باید انجام گیرد :

۹-۱-۱-۱ در صورت استفاده از محلول های بافر تازه تهیه شده $NADP^{+}/ATP/TEA$ [3] (طبق بند ۶

1- Mixer
2- Sampling
1- NADP+ /ATP/TEA

-۶)، سوسپانسیون بتاگالاکتوزیداز [1] (طبق بند ۶-۷) و یا سوسپانسیون *HK/G6p-DH* [2] (طبق بند ۶-۸).

۹-۱-۱-۲ اگرمحلول بافر *NADP⁺/ATP/TEA* (طبق بند ۶-۶)و/ یا سوسپانسیون بتاگالاکتوزیداز (طبق بند ۶-۷) و یا سوسپانسیون *HK/G6p-DH* (طبق بند ۶-۸)که در یخچال به مدت بیش از دو هفته، بدون استفاده نگهداری شده باشد .

۹-۱-۱-۳ پس از یک دوره عدم فعالیت آزمایشگاهی که کار آنالیز مجددا" آغاز شده باشد .

۹-۱-۱-۴ هرگاه شرایط موجود انجام چنین آزمونی را ایجاب نماید .

۹-۱-۲ بوسیله پی پت به داخل دو بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری، به ترتیب ۵ و ۱۰ میلی لیتر از محلول استاندارد لاکتوز (طبق بند ۶-۹) و در حدود ۵۰ میلی لیتر آب مقطر، اضافه کنید و سپس کار را طبق روشی که در بندهای ۹-۵ و۹-۶ تعیین شده است، ادامه دهید .

۹-۱-۳ مقدار لاکتوز منوهیدرات [3] را در محلول استاندارد [4] (طبق بند ۶-۹) را با استفاده از فرمول ۳ مشروحه در بند۱۰-۱ ، با استفاده از مقادیر زیر محاسبه نمایید:

$V۳$ = ۵۰۰ میلی لیتر { حجم محلول استاندارد لاکتوز (طبق بند ۶-۹) }

$V۴$ = ۵ و ۱۰ میلی لیتر { حجم محلول استاندارد لاکتوز مصرفی (طبق بند ۹-۱-۲) }

$V۵$ = ۱۰۰ میلی لیتر { حجم کل محلول استاندارد رقیق شده[5] (طبق بند ۹-۱-۲) }

۹-۱-۴ با به دست آوردن مقدار خلوص لاکتوز منوهیدرات، درصد به دست آمده برای هر دو محلول رقیق شده، در حدود ۲ ± ۱۰۰ درصد خواهد بود .

اگر نتایج، بین این محدوده نباشد، واکنش گرها را کنترل نمایید، روش مورد استفاده را بررسی کرده و دقت پی پت‌ها و شرایط بیناب سنج را بازبینی نمایید .

اقدام لازم را جهت به دست آوردن نتایج مناسب و درست بعمل آورید .

آزمایش را تکرار کرده و روش کار را کنترل نمایید تا نتایج رضایت بخش به دست آید .

2-ß – glactose suspension
3- HK/G6p-DH
4- $C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O$
5- standard solution
6- diluted standard solution

۹-۲ آماده کردن آزمایه [1]

۹-۲-۱ شیرخشک و مخلوط های یخی خشک

نمونه آزمایشگاهی را به یک ظرف درپوش دار و نفوذناپذیر نسبت به هوا، منتقل کنید، به گونه ای که ظرفیت آن حدود دو برابر حجم آزمایه باشد، سپس در پوش ظرف را بلافاصله محکم کرده و آزمایه را با تکان دادن و وارونه کردن ظرف، مکرراً مخلوط نمایید.

۹-۲-۲ پنیر پروسس شده (فرآوری شده)

لایه رویی پنیر را جدا کرده و مقداری از نمونه را توسط آسیاب یا خرد کن (طبق بند ۷-۱۴) خرد و آسیاب نموده ، به سرعت آن را مخلوط کنید . اگر نمونه خوب یکنواخت نشده باشد، می توانید با شدت بیشتری یا با مخلوط کن قویتری، این کار را تکرار نمایید .

نمونه آزمایشگاهی را به یک ظرف درپوش دار و نفوذناپذیر نسبت به هوا، منتقل کنید به گونه ای که، ظرفیت آن حدود دو برابر حجم آزمایه باشد، سپس در پوش ظرف را بلافاصله محکم کرده و آزمایه را با تکان دادن و وارونه کردن ظرف، مکرراً مخلوط نمایید.

نمونه را به یک ظرف شیشه ای (بشر/ ارلن مایر)، منتقل نمایید. مقداری آب به آن اضافه نموده و خوب مخلوط کنید تا سوسپانسیون یکنواختی حاصل شود .

۹-۳ آزمونه [2]

یک گرم یا بیشتر از آزمایه (طبق بندهای ۹-۲-۱ و ۹-۲-۲) را با تقریب یک میلی گرم وزن کرده و به داخل ارلن مایر (طبق بند ۷-۲)، منتقل نمایید. نمونه مورد آزمون را حدوداً در ۲۰ میلی لیتر آب مقطری که پیش از آن به دمای ۴۰ تا ۵۰ سلسیوس رسیده است، حل کنید. سپس با استفاده از یک میله شیشه‌ای (طبق بند۷-۱۰) یا مخلوط کن (طبق بند ۷-۱۲) به هم زده و مخلوط کنید پس از آن محتویات آنرا به یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری، منتقل نمایید .

در هنگام برداشت آزمونه جهت اندازه‌گیری به موارد مشروحه در زیر توجه نمایید :

- آزمونه باید نشان دهنده آزمایه باشد .
- مقدار لاکتوز در نمای‌ه بیناب سنج باید ترجیحاً بین ۵ تا ۱۰ میکروگرم باشد .

1-Test sample
2-Test portion

– جذب [1] محلول (۲ A)در نمای‌ه بیناب سنج، که برای آزمون گلوکز نمونه اندازه‌گیری‌می‌شود [رجوع شده به بند۱۰–۱]، باید ترجیحا" بین ۰/۱ تا ۰/۴ باشد.

– اگر در عمل تجزیه نمونه، مقدار لاکتوز ۰/۲ درصد یا کمتر باشد، بیش از یک گرم آزمایه مورد نیاز است . در چنین مواردی حجم رسوب مربوط به چربی، پروتئین و مواد دیگر (طبق بند ۹–۵–۱)، ممکن است تاثیر قابل توجهی بر حجم محلول داشته باشد [رجوع شود به ۳ V (طبق بند ۱۰–۱)].

۹–۴ آزمون محلول تهی [2]

آزمون تهی را دوبار انجام دهید. این کار با استفاده از محلول ها و واکنش گرهای مشروحه در بندهای ۹–۵ و ۹–۶ و بدون آزمونه، انجام می‌گیرد.

۹–۵ پروتئین زدایی [3]

۹–۵–۱ به سوسپانسیون یا محلول آزمون [4] (طبق بند ۹–۳)، به ترتیب درون بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری:

۵ میلی لیتر فروسیانور پتاسیم (طبق بند ۶–۱) و ۵ میلی لیتر محلول سولفات روی (طبق بند ۶–۲) و ۱۰ میلی لیتر محلول هیدروکساید سدیم (طبق بند ۶–۳) اضافه کنید. پس از افزودن هر یک از این محلول‌ها، آن را خوب مخلوط کنید و با آب مقطر حجم محلول را به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و کاملا" مخلوط نمایید و بگذارید به مدت زمان ۳۰ دقیقه، در همان حالت ساکن بماند. محتویات بالن را پیش از صاف کردن دوباره مخلوط نکنید .

۹–۵–۲ مایع شفاف رویی را از یک کاغذ صافی عبور دهید. اولین قسمت از محلول صاف شده را دور بریزید (مورد استفاده قرار ندهید) .

1-Absorbance
2-Reagent blank test
3-Deproteination
4-Test solution

۹-۶ اندازه‌گیری

۹-۶-۱ برنامه اندازه گیری

اندازه‌گیری را مطابق جدول ۱، انجام دهید وپیش از استفاده دمای محلول بافر NAD^+ - سیترات، محلول بافرفسفات و آب را پیش از اندازه‌گیری به دمای اطاق (دمای بین ۲۵ تا ۲۰ درجه سلسیوس) برسانید. با استفاده از پی پت ، مقادیرمشروحه زیر را به داخل نمایه‌ها، اضافه نمائید:

جدول ۱ – برنامه اندازه‌گیری[1]

	نمونه یا آزمون استاندارد برای		محلول آزمون شاهد برای :	
	لاکتوزگلوکز	گلوکز	لاکتوزگلوکز	گلوکز
محلول های زیر را با پی پت به داخل نمایه های بیناب سنج، منتقل نمایید:				
– محلول بافر سیترات– + NAD (طبق بند ۶–۶).	۰/۲ میلی لیتر	۰/۲ میلی لیتر	۰/۲ میلی لیتر	۰/۲ میلی‌لیتر
– سوسپانسیون بتا – گالاکتوزیدار (طبق بند ۶–۷).	۰/۰۵ میلی لیتر	—	۰/۰۵ میلی لیتر	—
– آب (طبق بند ۶).	—	۰/۰۵ میلی لیتر	—	۰/۰۵میلی‌لیتر
– صاف شده نمونه یامحلول استاندارد (طبق بند ۹–۵–۲)	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	—	—
– صاف شده محلول شاهد (طبق بند ۹–۵–۲).	—	—	۱ میلی لیتر	۱ میلی‌لیتر
محتویات نمایه‌های بیناب سنج را با استفاده از هم زن پلاستیکی (طبق بند ۷–۹)، مخلوط نمایید و اگر لازم باشد درداخل حمام آب با دمای بیش از ۲۰ درجه سلسیوس، به‌مدت زمان ۱۵ دقیقه، قرار دهید :				
– محلول بافر فسفات (طبق بند ۵–۶)	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر
– آب (طبق بند ۶)	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر	۱ میلی لیتر
محتویات نمایه‌های را مخلوط نمایید و پس از مدت زمان دو دقیقه، مقادیر جذب محلول ۰ A را در هر نمایه در مجاورت هوا و در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری نمایید :				
با استفاده از پی پت، مقادیرمشروحه زیر را به داخل نمایه‌ها اضافه نمایید:				
– سوسپانسیون بتاگالاکتوزدی هیدروژناز [$HK/G6P$ -DH] (طبق بند ۶–۸)	۰/۰۵ میلی لیتر	۰/۰۵ میلی لیتر	۰/۰۵ میلی لیتر	۰/۰۵ میلی لیتر
محتویات نمایه های بیناب سنج را مخلوط نمایید و اگر لازم باشد آنرا در حمام آب با دمای بیش از ۲۰ درجه سیلسیوس به مدت زمان ۱۵ دقیقه، قرار دهید .				
مقادیر جذب محلول ۱۵ A را در هر نمایه، در مجاورت هوا اندازه‌گیری نمایید.				
بعد از کمینه ۵ دقیقه، یکبار دیگر، مقادیر جذب هر کدام از محلول ها را اندازه‌گیری کنید، اگر واکنش متوقف نشده بود قرائت مقادیر جذب هر کدام از محلول ها را در فواصل ۵ دقیقه ادامه دهید.				
این زمان به طور متوالی در فواصل زمانی ۵ دقیقه‌ای، تکرار می‌شود تا مقادیر جذب افزایش پیدا نکند.				

1- Determination Scheme

۹-۶-۲ محاسبه جذب

۹-۶-۲-۱ اگر پس از مدت زمان ۱۵ دقیقه گرم خانه گذاری، افزایش جذب صورت نگرفت، مقدار جذب هر نمایه از فرمول مشروحه در زیر به دست می‌آید :

$$A = A_t - A_0$$

که در آن :

A_0 = که در آن ارزش عددی جذب اندازه‌گیری پیش از افزودن سوسپانسیون *HK/G6P-DH* از

A_t (A_{15}) = ارزش عددی جذب اندازه‌گیری شده پس از مدت زمان ۱۵ دقیقه گرم خانه گذاری

۹-۶-۲-۲ اگر واکنش پس از مدت زمان ۱۵ دقیقه متوقف نشد، محاسبه جذب از فرمول مشروحه در زیر به دست می‌آید :

$$A = (A_t - A_0) - \frac{1}{5}(A_t - A_{T-5})$$

که در آن :

A_0 = ارزش عددی جذب[1] که‌پیش از افزودن سوسپانسیون *HK/G6p-DH*، اندازه‌گیری شده است .

A_t = ارزش عددی جذب که پس از زمان t دقیقه گرم خانه گذاری، اندازه‌گیری شده است .

A_{t-5} = ارزش عددی جذب که پس از زمان t-۵ دقیقه گرم خانه گذاری، اندازه‌گیری شده است .

۹-۶-۳ تصدیق[2]

اگر افزایش جذب بیش از۰/۵۰۰ باشد، باید روش مشروحه در بندهای۹-۶-۱ و ۹-۶-۲، تکرار شود و همچنین از یک محلول رقیق شده و صاف شده مناسب (طبق بند ۹-۵-۲)، استفاده شود .

1- The numerical value
2 - Verification

۱۰ محاسبه و بیان نتایج

۱۰-۱ روش محاسبه

میزان لاکتوز با استفاده از فرمول ۱ به شرح زیر به دست می‌آید :

فرمول (۱)

$$w_L = \frac{[(A_1 - A_3) - (A_2 - A_4)] \times M_r}{K\,L} \times \frac{V_1 \times V_3 \times V_5}{V_2 \times V_4} \times \frac{۱۰۰}{m}$$

که در آن:

W_L = میزان لاکتوز، که بر حسب درصد وزنی بیان می‌گردد .

$A_۱$ = ارزش عددی جذب محاسبه شده در بند (۹-۶-۲) آزمایه یا آزمون استاندارد برای لاکتوز و گلوکز.

$A_۲$ =ارزش عددی جذب محاسبه شده در بند (۹-۶-۲) آزمایه یا آزمون استاندارد برای گلوکز.

$A_۳$ = ارزش عددی جذب محاسبه شده در بند (۹-۶-۲) آزمون شاهد برای لاکتوز و گلوکز.

$A_۴$ = ارزش عددی جذب محاسبه شده در بند (۹-۶-۲) آزمون شاهد برای گلوکز.

M_r = ارزش عددی جرم مولکولی لاکتوز : برای لاکتوز خشک [1] بدون آب ، M_r برابر ۳۴۲/۳ و برای لاکتوز دارای یک مولکول آب [2] ، M_r برابر ۳۶۰/۳۱ می‌باشد .

K = ضریب جذب مولی [3] $NADPH$ در طول موج ۳۴۰ نانومتر (سانتی متر مربع بر مول $i.e. 6.3 \times 10^6$

L = ضخامت نمایه‌های بیناب سنج ۰ بر حسب سانتی متر (یک سانتی متر).

$V_۱$ = مقدار حجم کل مایع نمایه‌های بیناب سنج ۰ بر حسب میلی لیتر (۳/۳ میلی لیتر).

$V_۲$ = مقدار حجم رقیق شده(صاف شده) در نمایه‌های بیناب سنج بر حسب میلی لیتر (یک میلی لیتر).

$V_۳$ = مقدار حجم محلول آماده شده در بند (۹-۵-۱) بر حسب میلی لیتر (۱۰۰ میلی لیتر).

1- Anhydrous latose
2- Lactose manohydrate
3- The,olar absorption coeffcient

$V_۴$ = مقدار حجم مایع صاف شده (بند ۹-۵-۲) که از محلول رقیق شده به دست آمده (طبق بند ۹-۶-۳) بر حسب میلی‌لیتر .

$V_۵$ = مقدار حجم به دست آمده از محلول رقیق شده (بند ۹-۶-۳) بر حسب میلی‌لیتر.

m = مقدار جرم آزمونه (طبق بند ۹-۳-۲) بر حسب گرم .

اگر برای $A_۴ - A_۲$ عدد منفی به دست آمده، آنرا در محاسبه منظور کنید .

یادآوری - اگر جرم نمونه، بیش از یک گرم باشد، $V_۳$ با استفاده از فرمول ۲ به شرح زیر به دست می آید:

فرمول (۲)

$$V_۳ = ۱۰۰ - P$$

که درآن :

P = مقدارحجم رسوب[1] بر حسب میلی لیتر.

که می‌تواند از ترکیب تقریبی آزمونه که از راه فرمول زیر محاسبه می‌شود، به دست آید :

(خاکستر نامحلول[2] بر حسب گرم ۰/۵۵ + نشاسته بر حسب گرم) ۰/۶۵ + (پروتئین بر حسب گرم) ۰/۷۳+ (چربی بر حسب گرم)۱/۱ = P.

۱۰-۲ بیان نتایج

نتایج را تا سه رقم اعشار، گزارش نمایید .

1- precision
2- Insoluble ash

۱۱ دقت [1]

۱-۱۱ تکرار پذیری [2]

اختلاف جذب بین دو نتیجه آزمون مستقل که توسط یک آزمایش کننده، بر روی یک آزمونه با تجهیزات ، روش یکسان، دریک آزمایشگاه و در یک فاصله زمانی کوتاه انجام شده باشد، نباید از ۵ درصد بیشتر باشد.

این مقدار برای شیر خشک و مخلوط یخی خشک ۳ درصد و برای پنیرفرآوری شده ۶ درصد میانگین عددی نتایج آزمون، می‌باشد .

۲-۱۱ تجدیدپذیری [3]

اختلاف جذب بین دو نتیجه آزمون مستقل که توسط دو آزمایش کننده ، بر روی یک آزمونه با تجهیزات و روش یکسان ، در دو آزمایشگاه مختلف و در یک فاصله زمانی کوتاه انجام شده باشد، نباید از ۵ درصد بیشتر باشد.

این مقدار برای شیر خشک و مخلوط یخی خشک ۶ درصد و برای پنیر فرآوری شده ۱۴ درصد میانگین عددی نتایج آزمون، می‌باشد .

۱۲ گزارش آزمون [4]

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد :

۱-۱۲ تمام جزئیات و اطلاعات ضروری برای شناسایی کامل نمونه مورد آزمون.

۲-۱۲ روش نمونه برداری .

۳-۱۲ روش آزمون طبق استاندارد ملی ایران ۱- ۵۸۰۷: سال ۱۳۸۵.

۴-۱۲ منابع و مراجع الزامی.

۵-۱۲ نتایج حاصل از انجام آزمون .

1- Precision
2- Repeatability
3-Reproducibility
4-Test report

۱۲-۶ هر شرایطی که بر روی نتایج آزمون تاثیر گذاشته است .

۱۲-۷ در صورت تکرار پذیری، نتیجه نهایی به دست آمده، گزارش گردد .

۱۲-۸ تاریخ انجام آزمون.

۱۲-۹ نام و نام خانوادگی و امضاء آزمایش کننده.

پیوست الف

عملیات مناسب ساخت [1] برای انجام تجزیه آنزیمی

(الزامی)

الف -۱ کلیات

عملیات مناسب ساخت برای انجام تجزیه آنزیمی غالباً نسبت به سایر روش های تجزیه شیمیایی ناشناخته تر است .

سفارش می‌گردد، برای به دست آوردن نتایج دقیق و با صراحت کافی، به هر کدام از قواعد، توجه بیشتری اعمال شود. بنابراین، پیش از آزمایش، قواعد و اصول روش های آزمایشگاهی مناسب را که در زیر شرح داده شده است، مطالعه کنید .

الف -۲ واکنش گر ها [2]

الف -۲-۱ تنها از آنزیم هائی با درجه مشخص (فعالیت ویژه، غلظت، آلوده کننده که در فعالیت آنزیمی دخالت دارند و حلال)، استفاده گردد.

الف -۲-۲ تنها از کوآنزیم هائی[3] با درجه مشخص (درجه خلوص، شکل نمکی یا اسیدی و ناخالصی ها)، استفاده گردد .

الف -۲-۳ سایر واکنش گر ها ، باید از درجه تجزیه‌ای‌آزمایشگاهی برخوردار باشند .

الف -۲-۴ آبی که برای تهیه و آماده سازی محلول های آنزیمی و سایرواکنش گر های دیگر به کار می رود باید دوبار تقطیر[4] شده باشد .

الف -۲-۵ آبی که برای تهیه و آماده سازی محلول های نمونه بکار می رود٠ باید تقطیر شده باشد یا عاری از هر گونه یون[5](دیونیزه) باشد.

---

1 - Good laboratory practice (GLP)
2-Reagents
3- Coenzymes
4- Doubly glass –distilled

۵- آبی که توسط یک دستگاه آب مقطرگیری با جنس شیشه یاپیرکس تهیه شده باشد.(*De-ionized*)

الف -۲-۶ نگهداری واکنش گر ها و سوسپانسیون یا محلول آنزیم ها باید بر اساس دستور العمل مربوط باشد، که معمولاً در دمای ۲ تا ۸ درجه سلسیوس، نگهداری می‌شوند .

الف -۲-۷ سوسپانسیون‌های آنزیمی نباید منجمد شوند .

الف -۲-۸ هنگامی که تاریخ مصرف یک واکنش گر گذشته باشد، از مصرف آن خوداری نموده و یا اینکه اثرات این واکنش گر ها را که بوسیله محلول های استاندارد با مقادیر مختلف نمونه آزمایش می‌شود، کنترل کنید. جذب‌های به دست آمده، باید متناسب با غلظت آنها باشد.

الف -۲-۹ محلول های بافر خارج شده از یخچال، پیش از استفاده، باید تا دمای اتاق گرم شود

. الف-۳ نمایه‌های بیناب سنجی و فتومتری [1]

الف -۳-۱ ازنمایه‌های شیشه‌ای یا پلاستیکی با طول مسیر عبور نور به ضخامت یک سانتی متر استفاده شود .

یادآوری - نمایه‌های پلاستیکی نسبت به نمایه‌های شیشه‌ای دارای مزایای زیر می‌باشد :

الف - یکبار مصرف و ارزان قیمت می‌باشند .

ب - انجام تعداد بیشتری از آنالیزها را ممکن می‌سازد .

پ- بین یک سری نمونه ، نمایه‌های پلاستیکی با توجه به خصوصیات جاذب آنها سازگاری(تطابق) بیشتری دارند .

الف -۳-۲ وقتی یک سری جدیدی از نمایه‌ها در دستگاه قرارداده می شوند، طول مسیر عبور نور نمایه‌ها در مقابل نمایه‌های شاهد (نمایه هایی از جنس کوارتز[2]) به شرح زیر بررسی می گردد :

نمایه دقیق (نمایه کوارتز) و نمایه‌های پلاستیکی را با آب پر نموده و جذب (A_1) هر یک از آنها را در مقابل هوا ، اندازه‌گیری کنید .

پس از آبکشی، نمایه‌ها را با محلول $NADH$ (تقریباً ۰/۱۵ میلی گرم در میلی لیتر) پر نموده و دوباره با این محلول، جذب (A_2) را در مقابل هوا، اندازه‌گیری نمایید .

1-photometric
2-(e.g.quartz cell)

مقدار $A_2 - A_1$ را برای هر دو نمایه (نمایه شاهد و نمایه‌های پلاستیکی)، محاسبه نمایید .

اختلاف $A_2 - A_1$ بین دو گونه از نمایه‌ها، نباید اختلاف [1] معنی دار[2] داشته باشد .

اگر اختلاف $A_2 - A_1$ بیشتر از ۰/۵ درصد از جذب خالص نمایه شاهد باشد، درصد میانگین اختلاف را محاسبه نموده و طول مسیر جذب (L) را در محاسبه ، اعمال نمایید (به بند ۸-۱ مراجعه کنید) .

الف -۳-۳ همیشه از نمایه‌های تمیز و بدون خراش [3] استفاده کنید، و اطراف نمایه‌های نوری را تنها به وسیله یک دستمال نرم، خشک و تمیز نمایید .

الف -۳-۴ سفارش می‌شود، جذب نمایه آزمون نمونه را در مقابل نمایه آزمون شاهد اندازه‌گیری نکنید، چون اطلاعات به دست آمده از مقدار جذب خود آزمون شاهد[4]درست نخواهد بود . میزان جذب نمایه‌های آزمون نمونه و شاهد را در برابر هوا، اندازه‌گیری کنید و میزان اختلاف را محاسبه نمایید .

الف -۳-۵ جذب یک نمایه آزمون شاهد یا نمونه را در برابر یک نمایه خالی، اندازه‌گیری نکنید (به علت انتشار نور[5]).

الف -۳-۶ محتویات یک نمایه را با یک هم زن پلاستیکی، مخلوط نمایید. یا اینکه بوسیله پارافیلم[6] ، نمایه را محکم در بندی کرده و به آرامی تکان دهید .

الف -۳-۷ به وسیله هم زن، حباب‌های هوا [7] را از دیواره نمایه‌ها، خارج نمایید .

از خراش دار کردن اطراف نمایه‌های نوری، اجتناب گردد .

الف -۳- ۸ همیشه از یک نوع نمایه ، جهت اندازه‌گیری آزمون نمونه و شاهد ، استفاده نمایید .

الف -۳- ۹ همیشه نمایه‌های شیشه‌ای[8] یا کوارتزی[1]را در جهت مشخص در جای نمایه[2] قرار

1- deviate
2- significantly
3- unscratched
4- Blank
5- Light diffusion
6- Parafilm
7- Air bubbles
1- Glass cells

دهید ، به این منظور یک طرف نمایه نوری را علامت گذاری [3] کنید.

الف -۴ بیناب سنج ها و فتومترها

الف -۴-۱ از یک بیناب سنج با پهنای باند[4] ۱۰ نانومتر یا کمتر (nm ۱۰ ≥) [، فتومتر به شرط همراه داشتن صافی داخلی] با پهنای باند ۱۰ نانومتر یا کمتر (nm ۱۰ ≥ یا یک بیناب خطی [5] فتومتر مجهز به یک لامپ بخار جیوه[6] ، استفاده نمایید .

اندازه‌های به دست آمده از بیناب سنج یا فتومتر فیلتر دار، باید با بیشینه جذب *NADH* یا *NADPH* در طول موج ۳۴۰ نانومتر، استفاده شود .

این مقادیر حاصل از یک فتومتر با یک بیناب خطی بوسیله یک لامپ بخار جیوه، باید در طول موج ۳۶۵ یا ۳۳۴ نانومتر، استفاده شود .

یادآوری - ضریب جذب مولی *NADH* و *NADPH* در طول موج‌های ۳۳۴، ۳۴۰ و ۳۶۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود، که به شرح زیر می باشد :

الف - *NADH* و *NADPH* در ۳۳۴ نانومتر (جیوه) : $۶/۱۸\times۱۰^{۶}$ سانتیمتر مربع بر مول.

ب- *NADH* و *NADPH* در ۳۴۰ نانومتر : $۶/۳\times۱۰^{۶}$ سانتیمتر مربع بر مول.

پ- *NADPH* در ۳۶۵ نانومتر (جیوه) : $۳/۵\times۱۰^{۶}$ سانتیمتر مربع بر مول.

ت- *NADH* در ۳۶۵ نانومتر : $۳/۴\times۱۰^{۶}$ سانتیمتر مربع بر مول.

الف -۴-۲ کنترل خطی

باید یک نسبت خطی بالاتر از جذب ۲/۰ بین جذب و غلظت *NADPH* یا *NADH* وجود داشته باشد. موارد زیر را کنترل کنید :

الف- ۲ میلی لیتر از آب مقطر را به داخل یک نمایه منتقل نموده و جذب *A*۰ را در برابر هوا

2- Quartz cells
3- Cell holder
4- Mark
5- Band width < 10nm
6- Spectrum line
7- Mercury vapor lamp

اندازه‌گیری کنید .

ب- ۰/۱ میلی لیتر از محلول $NADH$ (۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر) را به داخل نمایه انتقال داده و محتویات نمایه را مخلوط نمایید و سپس جذب A_1 را اندازه‌گیری کنید .

میزان کاهش جذب (A_{rn}) را با استفاده از فرمول ۳ به شرح زیرمحاسبه نمایید :

فرمول (۳)

$$A_{r1} = (A_1 - A_0) \times \frac{2.1}{3.5}$$

که در آن:

A_1 = ارزش عددی بدست آمده از جذب اندازه گیری شده محلول $NADH$ در بند (ب)

A_0 = ارزش عددی بدست آمده از جذب اندازه گیری شده آب در بند (الف)

پ- ۱۴ دفعه روش شرح داده شده در قسمت (ب)، را تکرار نمایید .

پس از هر دو بار اندازه‌گیری، کاهش جذب [1] (A_{rn}) را با استفاده از فرمول ۴ به شرح زیر محاسبه نمایید :

فرمول (۴)

$$A_{rn} = (A_n - A_0) \times \frac{V}{3.5}$$

که در آن :

A_n = ارزش عددی جذب به دست آمده در اندازه‌گیری n

V = حجم محتویات نمایه در اندازه‌گیری n

ت- برای هر اندازه‌گیری، نمودار مقدار در صد محلول $NADH$ موجود در نمایه را در برابر نمودار هم تراز [2] کاهش جذب‌ها رسم نمایید. باید یک خط مستقیم به دست آید .

1- Reduced absorbance
2- Corresponding

الف -۵ پی پت‌های خودکار و دیگر دستگاه های برداشت نمونه [1]

الف -۵-۱ از پی پت‌های خودکار و دیگر دستگاه های برداشت نمونه، طبق دستورالعمل سازنده دستگاه، استفاده نمایید .

الف -۵-۲ از پی‌پت هایی با نوک مناسب، استفاده نمایید .

الف -۵-۳ ویژگی های حجمی و تکرارپذیری پی‌پت های خودکار و دیگر دستگاه های برداشت نمونه را به طور مرتب، به شرح زیر کنترل نمایید :

الف- یک بشر حاوی آب را در مدت زمان t ، توزین نمایید .

ب- بوسیله پی پت یا دستگاه های برداشت نمونه، آب را به داخل بشر منتقل کرده و به دقت در مدت‌زمان ۱+ t دقیقه پس از اولین توزین، وزن کنید .

پ- با پی پت یا دیگر وسایل برداشت نمونه، ۹ مرتبه، روش شرح داده شده در قسمت (ب) را تکرار نمایید .

ت- بدون پی پت یا دیگر وسایل برداشت نمونه، بشر را در مدت زمان های ۱۱+ t دقیقه، ۱۲+ t دقیقه، ۱۳+ t دقیقه، ۱۴+ t دقیقه ، ۱۵+ t دقیقه توزین نمایید. وزن های تبخیر شده ازدست رفته [2]را در دقیقه، محاسبه نمایید .

ث- کاهش حجم های برداشتی توسط پی پت یا دستگاه های برداشت نمونه را بوسیله آب، محاسبه نمایید .

الف -۵-۴ حجم بعضی پی پت‌های خودکار بوسیله حرارت منتقل شده از کف دست[3] ، در مدت زمان طولانی می‌تواند تاثیر گذار باشد .

این پدیده را بوسیله روش شرح داده شده در بند (الف -۵-۳) کنترل کنید و از استعمال این گونه پی پت ها، خودداری نمایید.

الف-۵-۵ پیش از استفاده از پی پت، چندین بار نوک پی پت[4] را در محلول یا سوسپانسیون

1- dispensers
2- evaporation loss
3- evaporation loss
4- Tip of the hand

مورد نظر فرو برده تا آغشته گردد و برای محلول هر انتقال شود برای هر نمونه یا محلول ، یک نوک پی پت جدید به کار ببرید .

الف -۵-۶ پی پت آب ، بافر، آنزیم، کوآنزیم و محلول نمونه را به گوشه‌های مختلف نمایه منتقل کنید (نوک پی پت را تا پایین‌ترین قسمت ممکن وارد کنید).

یادآوری ۱ - مقدار جزیی از سوسپانسیون / محلول آنزیم[1] (۱۰ تا ۵۰ میکرولیتر) ممکن است بر روی هم زن، به داخل نمایه برده شده و بامحتویات داخل نمایه، بوسیله هم زن مخلوط گردد .

الف -۵-۷ از آلوده کردن [2] دوری کنید .

الف -۶ سایر اطلاعات مفید [3]

الف -۶-۱ تداخل‌های ممکن و اشتباهات آشکار را به وسیله اندازه‌گیری جذب دو محلول با غلظت‌های مختلف تجزیه‌ای، کنترل نمایید. جذب‌های به دست آمده، باید متناسب با غلظت تجزیه‌ای باشد .

الف -۶-۲ از یک استاندارد برای کنترل واکنش‌های آنزیمی، استفاده کنید. این استاندارد بایستی به عنوان یک استاندارد کاری[4] در نظر گرفته شود .

یادآوری - مرجع موادی که تائیدیه خلوص [5] دارند، می‌تواند از مراجع قانونی و ذیصلاح کشور مانند موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران و مراجع معتبر بین المللی مانند سازمان بین المللی استاندارد و تکنولوژی (اداره استانداردهای بین المللی سابق) یااداره مرجع جامعه اروپا[6]، باشد .

الف-۶-۳ یک آزمون کنترلی را در حضور محلول نمونه انجام دهید، مقدارتجزیه‌ای اضافه شده، باید در حدود همان مقداری باشد که پیش از آن در محلول نمونه موجود بوده است .

1- Solution/suspension
2- Contamination
3- Other useful information
4- Working standard
5- Certified purity
6- European Community Bureau of Reference (B.C.R) .

الف -۶-۴ برای هر نمایه از یک هم زن پلاستیکی، استفاده کنید و از استفاده مجدد آن خودداری نمایید.

یادآوری *- مقدار مایع باقیمانده بر روی هم زن ناچیز است و بنابراین در نظر گرفته نمی شود .*

ICS: 67.100.40

صفحه: ۲۷