



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran

سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران

۱۶۳۲۳

چاپ اول

اردیبهشت ۱۳۹۲

INSO

16323

1st.Edition

May.2013

روغن زیتون - شناسایی و تعیین بیوفنل‌ها به
وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا
(HPLC) - روش آزمون

Olive oil- Determination of biophenols by
HPLC – Test method



مرجع آموزش و خرید و فروش زیتون رودبار و حومه

www.zeytoonchi.ir

ICS:67.200.10

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد 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.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است. تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، 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 واردکنندگان، 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 ذی صلاح 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 شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد 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 پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین المللی بهره گیری می شود.

سازمان ملی استاندارد 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. سازمان 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 سازمان ها 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) و وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد ایران 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 آن ها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) و وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization

2 - International Electrotechnical Commission

3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)

4 - Contact point

5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

"روغن زیتون - شناسایی و تعیین بیوفنل‌ها به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) - روش آزمون"

رئیس: سمت و/یا نمایندگی

شورای ملی زیتون ایران

صفاقر، حامد

(فوق لیسانس صنایع غذایی)

پیرای و نک، زهرا

دبیر:

(دکتری مهندسی صنایع غذایی)

سازمان ملی استاندارد ایران -
پژوهشکده غذایی و کشاورزی

اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفباء)

امیدی، طیبه

(فوق لیسانس صنایع غذایی)

سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران

بهار شانجانی، مریم

(فوق لیسانس صنایع غذایی)

سازمان ملی استاندارد ایران -
اداره کل نظارت بر اجرای استانداردهای غیرفلزی

خوش طینت، خدیجه

(فوق لیسانس علوم و صنایع غذایی)

انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور

رئوفی، هومن محمد

(لیسانس صنایع غذایی)

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی -
سازمان غذا و دارو

رشیدی، لادن

(فوق لیسانس مهندسی

شیمی - بیوتکنولوژی)

سازمان ملی استاندارد ایران -
پژوهشکده غذایی و کشاورزی

زینت بخش، لیلا

(فوق لیسانس تغذیه)

سازمان ملی استاندارد ایران -
دفتر تدوین استاندارد

کمیسیون فنی تدوین استاندارد (ادامه)

" روغن زیتون - شناسایی و تعیین بیوفنل‌ها به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) - روش آزمون "

اعضاء:

عشرت آبادی، پروین دکتری مهندسی صنایع غذایی)	سازمان ملی استاندارد ایران - پژوهشکده غذایی و کشاورزی
غفاری، فرحناز (فوق لیسانس تغذیه)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی - سازمان غذا و دارو
کلانتری، فرانک (فوق لیسانس مهندسی شیمی)	شرکت صافولا بهشهر (سهامی خاص)
مالک، فرشته (فوق لیسانس مهندسی صنایع غذایی)	شرکت فرآیند ابزار روغن (سهامی خاص)
محلاتی، حامد (فوق لیسانس میکروبیولوژی)	شرکت پارس قو (سهامی خاص)
نانوازاده، سارا (لیسانس مهندسی صنایع غذایی)	سازمان ملی استاندارد ایران - پژوهشکده غذایی و کشاورزی
نیکزاده، نسیم (فوق لیسانس صنایع غذایی)	کارشناس صنایع غذایی
یوسف زاده، هنگامه (لیسانس صنایع غذایی)	سازمان ملی استاندارد ایران - اداره کل نظارت بر اجرای استانداردهای غیر فلزی

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ب	آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران
ج	کمیسیون فنی تدوین استاندارد
د	پیش گفتار
ز	مقدمه
۱	۱ هدف
۱	۲ دامنه کاربرد
۱	۳ مراجع الزامی
۱	۴ اصول روش
۲	۵ مواد و/ یا واکنشگرها
۳	۶ وسایل لازم
۴	۷ نمونه برداری
۴	۸ روش آزمون
۵	۹ بیان نتایج
۸	۱۰ گزارش آزمون
۹	۱۱ پیوست الف (اطلاعاتی) نتایج آزمون بین آزمایشگاهی

پیش‌گفتار

استاندارد "روغن زیتون- شناسایی و تعیین بیوفنل‌ها به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)- روش آزمون" که پیش‌نویس آن در کمیسیون‌های مربوط تهیه و تدوین شده است و در یک هزار و صد و نودمین اجلاس کمیته ملی استاندارد خوراک و فرآورده‌های کشاورزی مورخ ۱۳۹۱/۰۸/۲۸ مورد تصویب قرار گرفته است. 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 می‌شود.

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدیدنظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

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

1- COI/T.20/Doc No 29: 2009. Determination of biophenols in olive oils by HPLC

روغن زیتون - شناسایی و تعیین بیوفنل‌ها^۱ به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا^۲ (HPLC) - روش آزمون

۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد، استخراج، شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات جزئی بیوفنولی قطبی (BMP)^۳، مانند مشتقات طبیعی و اکسیده شده اولئوروپین و لیگستروساید^۴، لیگنان‌ها^۵، فلاونوئیدها و اسیدهای فنولیک^۶ به روش HPLC در انواع روغن زیتون می باشد.

۲ دامنه کاربرد

این استاندارد برای انواع روغن زیتون کاربرد دارد و بازه اندازه‌گیری این روش از ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم تا ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد.

۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد ملی ایران به آن‌ها ارجاع 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 تجدید نظرهای 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 تجدید نظر و اصلاحیه های بعدی آن ها مورد نظر است . استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است :

- ۱-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۳۲۲۶ روغن‌ها و چربی‌ها - تهیه نمونه.
۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۴۹۳ : روغن‌ها و چربی‌های خوراکی - نمونه برداری.

۴ اصول روش

این روش بر پایه استخراج مستقیم ترکیبات جزئی بیوفنولی قطبی از روغن زیتون با استفاده از محلول متانول بوده که توسط HPLC با کمک آشکار ساز UV در طول موج ۲۸۰ نانومتر شناسایی و اندازه‌گیری می شود. اسید سیرینژیک^۷ به عنوان استاندارد داخلی در این روش مورد استفاده قرار می گیرد. مقدار اولئوروپین طبیعی و اکسید شده و مشتقات لیگستروساید، لیگنان‌ها، فلاونوئیدها و فنولیک اسیدها برحسب میلی‌گرم بر کیلوگرم تیروزول بیان می‌شود.

-
- 1- Biophenol
 - 2- High performance liquid chromatography
 - 3- Biophenolic minor polar
 - 4- Natural and oxidised oleuropein and ligstroside
 - 5- Lignans
 - 6- Flavonoids and phenolic acids
 - 7- Syrinjic acid

۵ مواد و / یا واکنشگرها

هشدار: این روش ممکن است نیاز به استفاده از تجهیزات و مواد شیمیایی خطرناک داشته باشد و تمام نکات ایمنی در رابطه با این روش ممکن است بیان نشده باشد. بنابراین رعایت تمامی نکات ایمنی در طول آزمایش ضروری است

تمامی مواد شیمیایی و واکنشگرهای مورد استفاده باید خلوص مناسب برای استفاده در دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا داشته باشند.

۱-۵ اورتوفسفریک اسید، ۰.۸۵٪ (V/V)

۲-۵ متانول، مناسب برای کروماتوگرافی

۳-۵ استونیتریل، مناسب برای کروماتوگرافی

۴-۵ آب، مناسب برای کروماتوگرافی

۵-۵ جهت شستشوی گرادیان از سه حلال آب دارای ۰.۲٪ H_3PO_4 (V/V) (A)، متانول (B)، استونیتریل (C) استفاده می شود. محلول های شستشو باید بدون گاز باشد.

برنامه شستشو باید به صورت ارائه شده در جدول ۱ باشد.

جدول ۱- برنامه شستشو گرادیان HPLC

C (%)	B (%)	A (%)	جریان (ml/min)	زمان (دقیقه)
۲	۲	۹۶	۱/۰۰	۰
۲۵	۲۵	۵۰	۱/۰۰	۴۰
۳۰	۳۰	۴۰	۱/۰۰	۴۵
۵۰	۵۰	۰	۱/۰۰	۶۰
۵۰	۵۰	۰	۱/۰۰	۷۰
۲	۲	۹۶	۱/۰۰	۷۲
۲	۲	۹۶	۱/۰۰	۸۲

۶-۵ ۲- (۴- هیدروفنیل) اتانول (تیروزول) با خلوص مساوی و بیشتر از ۹۸ درصد

۷-۵ ۳۵ دی متوکسی ۴ هیدروکسی بنزوئیک اسید (اسید سیرینجیک) با خلوص مساوی و بیشتر از ۹۷٪

۸-۵ محلول استخراج: متانول/آب با نسبت ۸۰ به ۲۰ (حجمی / حجمی)

۹-۵ محلول استاندارد کالیراسیون خارجی (تیروزول و اسید سیرینژیک)

۰.۳۰ گرم از تیروزول (مطابق با بند ۵-۶) و ۰.۱۵ گرم از اسید سیرینجیک (مطابق با بند ۵-۷) در بالن ۱۰ میلی لیتری (مطابق با بند ۵-۲)

۱۰۰ میکرولیتر از محلول را به درون بالن ۱۰ میلی‌لیتری انتقال دهید. محلول متانول / آب ۸۰/۲۰ (V/V) را به حجم برسانید.

غلظت محلول کالیبراسیون خارجی به صورت زیر است: تیروزول ۰/۰۳۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر، اسید سیرینژیک ۰/۰۱۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر.

محلول فوق را می توان برای مدت سه ماه در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگه داری کرد.

۱۰-۵ محلول استاندارد داخلی (سیرینژیک اسید)

۰/۰۱۵ گرم از اسید سیرینژیک (مطابق با بند ۵-۷) را در بالن ۱۰ میلی لیتری وزن و با محلول متانول/آب ۸۰/۲۰ (V/V) (مطابق با بند ۵-۸) به حجم برسانید. با پیپت (مطابق با بند ۶-۳) یک میلی لیتر از محلول حاصل را درون بالن ۱۰۰ میلی لیتری (مطابق با بند ۶-۲) ریخته و با محلول متانول/آب ۸۰/۲۰ (V/V) (مطابق با بند ۵-۸) به حجم برسانید. غلظت نهایی به دست آمده ۰/۰۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر می باشد.

محلول فوق را می توان برای مدت سه ماه در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگه داری کرد.

۶ وسایل لازم

علاوه بروسایل معمول آزمایشگاهی، وسایل و تجهیزات زیر مورد نیاز است:

۱-۶ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، مجهز به ستون فاز معکوس C18 (۲۵ سانتی متر × ۴/۶ میلی‌متر)، نوع اسفروزورب ODS-2 ۵ میکرومتری، 100 A°، دارای دتکتور UV اسپکتروفوتومتری با طول موج ۲۸۰ نانومتر و قابلیت انتگرال گیری، در دمای اتاق، تعیین رکورد طیفی به منظور شناسایی، با دتکتور فتودیود ۲ در طول موج ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر انجام می‌شود تسهیل می گردد.

۲-۶ **بالن حجمی**، در اندازه‌های ۱۰ میلی‌لیتری و ۱۰۰ میلی‌لیتری نوع A

۳-۶ پیپت، در اندازه‌های ۱۰۰ میکرولیتری، ۱۰۰۰ میکرولیتری و ۵۰۰۰ میکرولیتری

۴-۶ **لوله آزمایش** در دار، در اندازه ۱۰ میلی لیتر

۵-۶ **هم زن**، برای لوله‌های آزمایش

۶-۶ **حمام استخراج** اولتراسونیک

۷-۶ **فیلتر سر سرنگ** ۱۳ میلی‌متر، نوع PVDF ۰/۴۵ میکرومتر

۸-۶ **سانتریفوژ مناسب** با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه

۹-۶ **ترازوی آزمایشگاهی**، با دقت ۰/۰۰۱ ± گرم

۱۰-۶ **سرنگ پلاستیکی**، ۵ میلی لیتری

۷ نمونه برداری

نمونه ای که از سوی آزمایشگاه دریافت می شود، باید به طور واقعی نمایان گر جامعه مورد نمونه برداری باشد و در طی حمل و نقل و انبارداری آسیب ندیده و یا تغییر نکرده باشد. این استاندارد روش نمونه برداری را در بر نمی گیرد. از روش نمونه برداری ارائه شده در استاندارد ملی ایران شماره ۴۹۳ استفاده کنید.

۸ روش انجام آزمون

۸-۱ آماده سازی نمونه

در لوله آزمایش ۱۰ میلی لیتری در دار (مطابق با بند ۵-۴)، ۲/۰ گرم از روغن زیتون را با دقت وزن کنید. ۱ میلی لیتر از محلول استاندارد داخلی (مطابق با بند ۱۰-۵) را به نمونه وزن شده اضافه کنید. درب بالن را بسته و برای مدت زمان حداقل ۳۰ ثانیه آن را تکان (مطابق با بند ۵-۵) دهید. ۵ میلی لیتر (مطابق با بند ۳-۶) محلول متانول/آب ۸۰/۲۰ (V/V) (مطابق با بند ۵-۵) را به آن افزوده، دقیقاً^۱ برای ۱ دقیقه آن را تکان دهید. در حمام اولتراسونیک (مطابق با بند ۶-۶) برای ۱۵ دقیقه در دمای اتاق عمل استخراج را انجام دهید. در سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفوژ (مطابق با بند ۶-۸) کنید. فاز رویی را با استفاده از سرنگ پلاستیکی ۵ میلی لیتری (مطابق با بند ۶-۱۰) برداشته و با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری PVDF، صاف کنید.

۸-۲ آنالیز HPLC

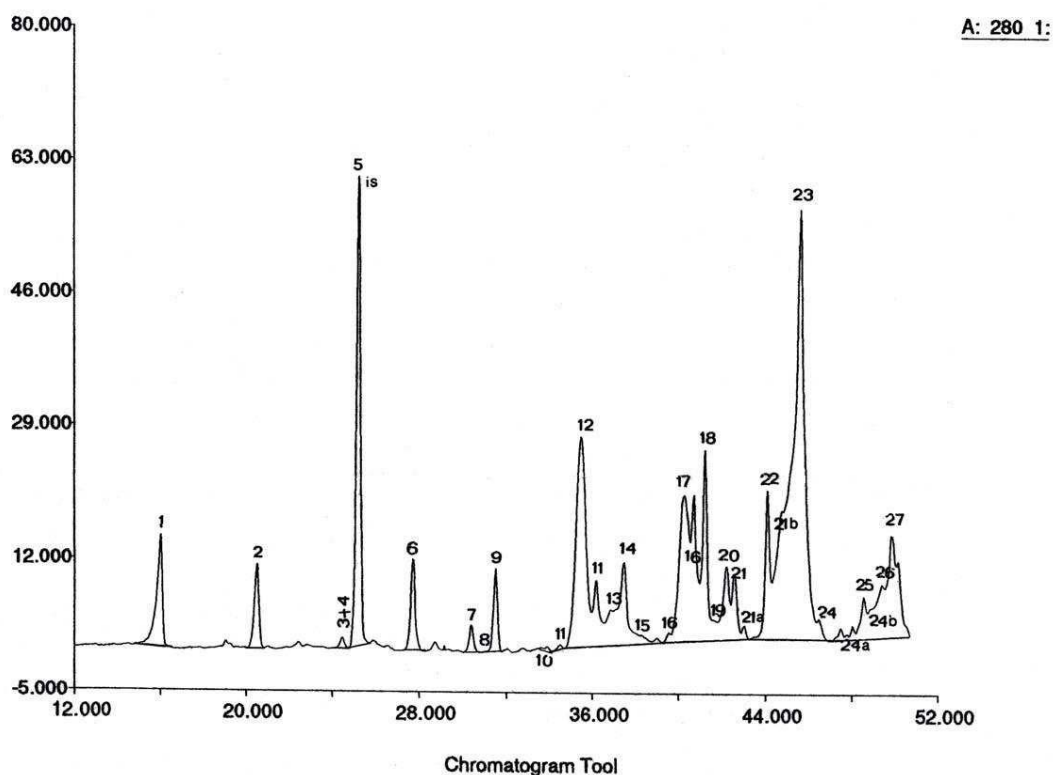
دکتور UV را یک ساعت قبل از آنالیز روشن کنید. ستون کروماتوگرافی باید به مدت ۵ دقیقه با محلول شستشو (ترکیب آغازی) (آب ۰/۲٪ H_3PO_4 (V/V) / متانول / استونیتریل ۹۶/۲/۲ (V/V/V) شستشو دهید. تزریق اولیه را بدون استفاده از نمونه مورد آزمایش تنها با تزریق ۲۰ میکرولیتر از محلول متانول/آب (V/V) (مطابق با بند ۵-۸) انجام دهید. ۲۰ میکرولیتر از محلول استاندارد کالیبره خارجی (مطابق با بند ۵-۹) را تزریق کرده و کروماتوگرام را در طول موج ۲۸۰ نانومتر ثبت کنید. فاکتور پاسخ^۱ (RF) را برای ۱ میکروگرم از تیروزول و ۱ میکروگرم از اسید سیرینجیک (مطابق با بند ۹-۱) محاسبه کنید. نسبت RF اسید سیرینجیک به تیروزول را محاسبه کنید که $RF_{Syr/tyr}$ نامیده می شود. عدد بدست آمده را یادداشت کنید (مطابق با بند ۹-۲).

۲۰ میکرولیتر از محلول نمونه نهایی را به دستگاه HPLC تزریق کنید و کروماتوگرام را در ۲۸۰ نانومتر ثبت کنید. دو بار شناسایی را برای نمونه یکسان به طور جداگانه انجام دهید و دقت نتایج را بررسی کنید تا نتایج در حد دقت روش مورد نظر باشد.

شکل ۱ یک کروماتوگرام معمولی از بیوفنلها در روغن زیتون بکر با ترکیبات مجزا را نشان می دهد. از مجموع پیکهای مجزا، مقدار کل به دست می آید.

1- Response factor

در انتهای روز ستون کروماتوگرافی را با محلول متانول/استونیتریل ۱/۱ (V/V) با سرعت ۱/۰ میلی لیتر بر دقیقه برای مدت زمان ۱۵ دقیقه بشویید و ستون را در متانول/استونیتریل ۱/۱ (V/V) نگه دارید.



شکل ۱: کروماتوگرام HPLC مربوط به شناسایی پیک مربوط به بیوفنل ها در روغن زیتون فرا بکر در طول موج ۲۸۰ نانومتر

۹ بیان نتایج

۱-۹ محاسبه استاندارد های کالیبراسیون خارجی (RF)

محاسبه فاکتور پاسخ استاندارد های کالیبراسیون خارجی طبق فرمول ۱ به شرح زیر محاسبه می شود:

فرمول ۱ $RF_{1\mu g}$ (سیرینجیک اسید) = ناحیه سیرینجیک اسید / سیرینجیک اسید تزریق شده بر

حسب میکروگرم

$RF_{1\mu g}$ (تیروزول) = ناحیه تیروزول / تیروزول تزریق شده بر حسب میکروگرم.

۲-۹ محاسبه نسبت بین دو فاکتور پاسخ (RRF^1)

محاسبه نسبت بین دو فاکتور پاسخ طبق فرمول ۲ به شرح زیر محاسبه می شود:

فرمول ۲ $RF_{syr/tyr} = RF_{1\mu g}$ (سیرینجیک اسید) / $RF_{1\mu g}$ (تیروزول)

مقدار $RF_{syr/tyr}$ باید ثابت باشد و باید در محدوده 0.4 ± 0.1 قرار گیرد. نتایج نهایی باید بر حسب تیروزول بیان شود. سیرینجیک اسید به عنوان استاندارد داخلی استفاده می شود.

1- Ratio response factor

۳-۹ روش محاسبه مقدار بیوفنل در روغن زیتون بکر

مقدار بیوفنل (اولئوروپین طبیعی و اکسید شده و مشتقات لیگستروسید، لیگنان‌ها، فلاونوئیدها و فنولیک اسیدها)، برحسب میلی گرم بر کیلوگرم به وسیله اندازه‌گیری مجموع نواحی پیک‌های کروماتوگرافیک بیان می‌شود (مطابق با جدول ۱) طبق فرمول ۳، نتایج بدون اعشار به دست می‌آید:

فرمول ۳

$$(\text{mg/kg}) = \frac{(\Sigma A) \times 1000 \times \text{RRF}_{\text{syr/tyr}} \times (W \text{ syr. acid})}{(A \text{ syr. acid}) \times (W)}$$

که در آن:

ΣA = مجموع نواحی پیک بیوفنل‌ها (هیدروکسی تیروزول، تیروزول، اولئوروپین طبیعی و اکسید شده و مشتقات لیگستروسید، لیگنان‌ها، فلاونوئیدها و فنولیک اسیدها) در ۲۸۰ نانومتر

$A \text{ syr. acid}$ = ناحیه استاندارد داخلی سیرینژیک در ۲۸۰ نانومتر

۱۰۰۰ = فاکتور استفاده شده برای بیان نتایج برحسب میلی گرم بر کیلوگرم

W = وزن روغن استفاده شده برحسب گرم

$\text{RRF}_{\text{syr/tyr}}$ = ضریب تکثیر برای بیان نتایج نهایی برحسب تیروزول

$W \text{ syr. acid}$ = سیرینژیک اسید استفاده شده به عنوان استاندارد داخلی در ۱ میلی لیتر محلول

اضافه شده برای نمونه بر حسب میلی گرم.

جدول ۲- شناسایی پیک بیوفنل ها

مقادیر بیشینه جذب (بیشینه جذب UV) و زمان احتباس نسبی*

بیشینه جذب (UV)	PRT	بیوفنل	شماره پیک
۲۳۰-۲۸۰	۰/۶۲	هیدروکسی تیروزل	۱
۲۳۰-۲۷۵	۰/۸۰	تیروزل	۲
۲۶۰	۰/۹۶	اسید والینیک	۳
۳۲۵	۰/۹۹	اسید کافئیک	۴
۲۸۰	۱/۰۰	اسید سیرینژیک (استاندارد داخلی)	۵
۳۱۰	۱/۱۰	وانیلین	۶
۳۱۰	۱/۱۲	اسید پارا کوماریک	۷
۲۳۲-۲۸۵	۱/۲۰	استات هیدروکسی تیروزل	۸
۳۲۵	۱/۲۶	اسید فرولیک	۹
۳۲۵	۱/۳۱	ارتو اسید کوماریک	۱۰
۲۳۵-۲۸۰	-	دکربوکسی متیل اولئوروپئین آگلیکون، فرم دی آلدئیدی اکسید شده	۱۱، ۱۱a
۲۳۵-۲۸۰	۱/۴۵	دکربوکسی متیل اولئوروپئین آگلیکون، فرم دی آلدئیدی	۱۲
۲۳۰-۲۸۰	۱/۴۸	اولئوروپئین	۱۳
۲۳۵-۲۸۰	۱/۵۲	اولئوروپئین آگلیکون، فرم دی آلدئیدی	۱۴
۲۳۰-۲۸۰	۱/۵۴	تیروزل استات	۱۵
۲۳۵-۲۷۰	۱/۶۳	دکربوکسی متیل لیگستروسید آگلیکون، فرم دی آلدئیدی اکسید شده	۱۶، ۱۶a
۲۳۵-۲۷۵	۱/۶۵	دکربوکسی متیل لیگستروسید آگلیکون، فرم دی آلدئیدی	۱۷
۲۳۲-۲۸۰	۱/۶۹	پینورسینول، ۱ استوکسی- پینورسینول	۱۸
۲۷۰	۱/۷۳	اسید سینامیک	۱۹
۲۳۵-۲۷۵	۱/۷۴	لیگستروسید آگلیکون، فرم دی آلدئیدی	۲۰
۲۳۵-۲۸۰	-	اولئوروپئین آگلیکون، فرم آلدئیدی اکسید شده و هیدروکسلی	۲۱، ۲۱a، ۲۱b
۲۵۵-۳۵۰	۱/۷۹	لوتئین	۲۲
۲۳۵-۲۸۰	۱/۸۷	اولئوروپئین آگلیکون، فرم آلدئیدی و هیدروکسلی	۲۳
۲۳۵-۲۷۵	-	لیگستروسید آگلیکون، فرم آلدئیدی اکسید شده و هیدروکسلی	۲۴، ۲۴a، ۲۴b
۲۳۰-۲۷۰-۳۴۰	۱/۹۸	آپجنین	۲۵
۲۵۵-۳۵۰	-	متیل لوتئین	۲۶
۲۳۵-۲۷۵	۲/۰۳	لیگستروسید آگلیکون، فرم آلدئیدی و هیدروکسلی	۲۷

* زمان بازداری نسبی با توجه به زمان بازداری اسیدسیرینژیک، محاسبه می شود. شناسایی با HPLC-MS انجام گرفته است.

۱۰ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی‌های زیر باشد:

- ۱-۱۰ تمام اطلاعات لازم برای شناسایی کامل نمونه
- ۲-۱۰ روش نمونه برداری به کاربرده شده
- ۳-۱۰ روش آزمون طبق این استاندارد ملی
- ۴-۱۰ شرایط دیگری که در این استاندارد آورده نشده و بر روی نتیجه اثرگذار است
- ۵-۱۰ نتایج آزمایش به دست آمده، بر حسب میلی گرم بر کیلوگرم روغن بیان شود. (اعداد نباید اعشاری باشند)
- ۶-۱۰ RRF استفاده شده در محاسبات
- ۷-۱۰ در صورتی که تکرارپذیری بررسی شده است، در پایان گزارش، نتایج بدست آمده را اعلام کنید.
- ۸-۱۰ تاریخ انجام آزمون
- ۹-۱۰ محل انجام آزمون
- ۱۰-۱۰ نام و نام خانوادگی و امضاء آزمایش کننده

پیوست الف
(اطلاعاتی)
نتایج آزمون بین آزمایشگاهی

دقت روش با استفاده از آزمون مشترک بین آزمایشگاهی در ۱۷ آزمایشگاه از سوی دبیرخانه اجرایی IOC در سال ۲۰۰۸ انجام شد. آزمایشگاه‌ها از هشت کشور مختلف بودند.

آزمایش روی پنج نمونه به شرح زیر انجام شد:

نمونه A- روغن زیتون فرا بکر (ایتالیا)

نمونه B- روغن زیتون فرا بکر (اسپانیا)

نمونه C- روغن زیتون فرا بکر (تونس)

نمونه D- روغن زیتون فرا بکر (اسلوانی)

نمونه E- روغن زیتون فرا بکر (یونان)

نمونه R- روغن زیتون فرا بکر (ایتالیا)

نتایج آزمایش مشارکتی توسط دبیرخانه اجرایی IOC به صورت آماری مطابق با استانداردهای بین‌المللی ایزو ۵۷۲۷ تهیه شدند. نتایج خارج از محدوده به دست آمده با استفاده از آزمون‌های Cochran و Grubb برای تعیین هر یک از نتایج آزمایشگاهی و هر نمونه مورد آزمایش قرار گرفتند.

فهرست جداول:

N: تعداد آزمایشگاه‌های شرکت کننده

Outliers: تعداد آزمایشگاه‌ها با مقادیر خارج از محدوده

Mean: میانگین نتایج پذیرفته شده

t: عددی که اختلاف تفاوت مطلق بین دو نتیجه آزمون که با روش و مواد آزمایشگاهی یکسان در یک آزمایشگاه با آزمایش کننده و تجهیزات یکسان در بازه کوتاهی از زمان با سطح احتمال ۹۵٪ کمتر از آن باشد.

S_r: تکرار پذیری انحراف معیار

S_r: تکرار پذیری انحراف معیار

(%) RSD_r: ضریب تغییر تکرار پذیری (100/mean × S_r)

R: عددی که اختلاف مطلق بین دو نتیجه آزمون غیر وابسته منفرد که حاصل از روش و مواد آزمایشگاهی یکسان در آزمایشگاه‌های متفاوت با آزمایش کننده‌ها و تجهیزات غیر یکسان، در سطح احتمال ۹۵٪ کمتر از آن باشد.

S_R: قابلیت تکثیر انحراف معیار

(%) RDS_R: تجدید پذیری ضریب تغییر (100/mean × S_R)

HORRAT: مقدار HORRAT برای تجدید پذیری، $[RSD_{R \text{ actual}} / RSD_{R \text{ theor}}] = 2^{(1 - 0.5 \log C)}$ و C غلظت ترکیبات بیان شده با قدرت ۱۰ (معادله Horwitz) می‌باشد.

جدول الف-۱ نتایج تجزیه و تحلیل آماری برای مقدار پلی فنل، (mg/1000g)

نمونه	نمونه	نمونه	نمونه	نمونه	نمونه	شاخص های آماری
R	E	D	C	B	A	
۳۰۱	۲۹۷	۳۴۳	۱۵۳	۵۷۳	۶۹۴	میانگین (mg/kg)
۱۷	۱۷	۱۷	۱۷	۱۷	۱۷	N
۲	۲	۲	۱	۳	۳	تعداد آزمایشگاه ها دارای نتایج خارج از محدوده
۱۵	۱۵	۱۵	۱۶	۱۴	۱۴	تعداد آزمایشگاه ها دارای نتایج در محدوده
۳۰	۳۰	۳۰	۳۲	۲۸	۲۸	تعداد آزمون ها
۱۷	۲۲	۲۴	۱۸	۳۶	۲۹	R
۶/۲	۷/۷	۸/۷	۶/۴	۱۲/۷	۱۰/۴	S _r
۲	۳	۳	۴	۲	۲	RSD _r (%)
۳۲	۷۷	۶۳	۶۰	۸۴	۱۰۱	R
۱۱/۵	۲۷/۵	۲۲/۴	۲۱/۳	۲۹/۹	۳۶/۰	S _R
۴	۹	۷	۱۴	۵	۵	RSD _R (%)
۰/۶	۱/۴	۱/۰	۱/۹	۰/۸	۰/۹	HO _R