



جمهوری اسلامی ایران  
Islamic Republic of Iran

سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران

۱۶۳۲۴

چاپ اول

اردیبهشت ۱۳۹۲

INSO

16324

1st.Edition

May.2013

روغن زیتون - تعیین مقدار استرولها و تری  
ترپن دی الکلها به روش کروماتوگرافی گازی با  
استفاده از ستون موئین - روش آزمون

**Olive oil- Determination of the  
composition and content of sterols and  
triterpene dialcohols by capillary column  
gas chromatography- Test method**

ICS:67.200.10



مرجع آموزش و خرید و فروش زیتون رودبار و حومه

[www.zeytoonchi.ir](http://www.zeytoonchi.ir)

## 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 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 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)<sup>۱</sup>، کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)<sup>۲</sup> و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)<sup>۳</sup> است و به عنوان تنها رابط<sup>۴</sup> کمیسیون کدکس غذایی (CAC)<sup>۵</sup> در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور، از آخرین 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 استانداردهای 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) 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) 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 - تعیین مقدار استرولها و تری تریپن دی الکلها به روش کروماتوگرافی گازی با استفاده از ستون موئین - روش آزمون "

### سمت و /یا نمایندگی

### رئیس:

شورای ملی زیتون ایران

صفافر، حامد

(فوق لیسانس صنایع غذایی)

### دبیر:

سازمان ملی استاندارد ایران -

پیراوی ونک، زهرا

پژوهشکده غذایی و کشاورزی

(دکتری مهندسی صنایع غذایی)

### اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفباء)

سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران

امیدی، طیبه

(فوق لیسانس صنایع غذایی)

سازمان ملی استاندارد ایران -

بهارشانجانی، مریم

اداره کل نظارت بر اجرای استانداردهای غیر فلزی

(فوق لیسانس صنایع غذایی)

انستیتو تحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور

خوش طینت، خدیجه

(فوق لیسانس علوم و صنایع غذایی)

سازمان ملی استاندارد ایران -

رشیدی، لادن

پژوهشکده غذایی و کشاورزی

(فوق لیسانس مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی)

سازمان ملی استاندارد ایران -

زینت بخش، لیلا

دفتر تدوین استاندارد

(فوق لیسانس تغذیه)

کمیسیون فنی تدوین استاندارد (ادامه)

" روغن زیتون - اندازه گیری مقدار استرول ها و تری تریپن دی الکل ها به روش کروماتوگرافی گازی با

استفاده از ستون موئین "

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

فرهودی، مهدی  
(فوق لیسانس صنایع غذایی)

شرکت کنجدسمن (سهامی خاص )

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

نیکزاد، نسیم  
کارشناس

(فوق لیسانس 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
۱	۱ هدف
۱	۲ دامنه کاربرد
۱	۳ مراجع الزامی
۱	۴ اصول روش
۱	۵ نمونه برداری
۲	۶ مواد و/ یا واکنشگرها
۳	۷ وسایل لازم
۴	۸ روش آزمون
۱۱	۹ پیوست الف(اطلاعاتی) شناسایی سرعت خطی گاز
۱۴	۱۰ پیوست ب(اطلاعاتی) نتایج آزمون بین آزمایشگاهی

## پیش گفتار

استاندارد " روغن زیتون- اندازه گیری مقدار استرولها و تری ترین دی الکلها به روش کروماتوگرافی گازی با استفاده از ستون موئین " که پیش نویس آن در کمیسیون های مربوط تهیه و تدوین شده است و در یک هزار و صد و نودمین اجلاس کمیته ملی استاندارد خوراک و فرآورده های 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 می شود.

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

COI/T.20/DOC. NO 30: 2011, Determination of the composition and content of sterols and triterpene dialcohols by capillary column gas chromatography.

## روغن زیتون - تعیین مقدار استرولها و تری ترپن دی الکلها به روش کروماتوگرافی گازی با استفاده از ستون موئین - روش آزمون

### ۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش برای شناسایی و اندازه گیری مقدار استرولها به صورت مجزا، استرول کل و تری ترپن دی الکلها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی، می باشد.

### ۲ دامنه کاربرد

این استاندارد، برای انواع روغن زیتون، کاربرد دارد.

### ۳ مراجع الزامی

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن 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 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 تجدیدنظر و اصلاحیه های بعدی آن ها مورد نظر است. استفاده از مراجع زیر برای این استاندارد الزامی است:

۱-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۳۲۲۶ ، روغن ها و چربی ها - تهیه آزمون

۲-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۴۹۳ ، روغن ها و چربی های خوراکی - نمونه برداری

۳-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸ : سال ۱۳۷۷ ، آب - مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه

### ۴ اصول روش

در این روش ابتدا به آزمون<sup>۱</sup> کلستانول به عنوان استاندارد داخلی، اضافه می شود و با پتاس اتانولی صابونی شده و ترکیبات غیرقابل صابونی با اتیل اتر استخراج می شوند. سپس استرولها و تری ترپن الکلها از روی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک<sup>۲</sup> بر پایه سیلیکاژل جدا می شوند. بخش های جدا شده به صورت سیلیله درآمده و با کروماتوگرافی گازی با ستون موئین آنالیز می شوند.

---

1-Alphacholesterol

2-Tin layer Chromatography( TLC)

## ۵ نمونه برداری

نمونه برداری باید مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۴۹۳، روغن ها و چربی های خوراکی - نمونه برداری انجام شود.

یادآوری - نمونه های دریافتی آزمایشگاه باید نشان دهنده ویژگی واقعی بهر باشند و نباید در طی انتقال یا انبارداری آسیب دیده یا تغییر یافته باشند.

## ۶ مواد و / یا واکنشگرها

تمامی مواد شیمیایی و واکنشگرهای مورد استفاده باید دارای خلوص تجزیه ای مشخص باشند. آب مصرفی باید آب مقطر با خلوص درجه ۳، مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸، ویژگی ها و روش های آزمون آب برای مصارف آزمایشگاهی باشد.

۱-۶ هیدروکسید پتاسیم با کمینه خلوص ۸۵ درصد وزنی

۲-۶ اتانول

۳-۶ محلول پتاس اتانولی تقریباً ۲ نرمال

۱۳۰ گرم هیدروکسید پتاسیم (مطابق با بند ۱-۶) را در ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر همراه با سرد کردن حل کرده و سپس با اتانول (مطابق با بند ۶ - ۲) تا حجم یک لیتر در بالن حجمی یک لیتری به حجم رسانید. محلول به دست آمده را می توان در شیشه های تیره، با در کاملاً بسته، برای حداکثر دو روز نگه داری کرد.

۴-۶ اتیل اتر

۵-۶ محلول پتاس اتانولی، تقریباً ۰/۲ نرمال

۱۳ گرم از هیدروکسید پتاسیم (مطابق با بند ۵-۱) را در ۲۰ میلی لیتر از آب مقطر حل کنید و با و اتانول به حجم یک لیتر برسانید.

۶-۶ سولفات سدیم بدون آب

۷-۶ صفحات شیشه ای پوشیده شده با سیلیکاژل، بدون اندیکاتور فلورسانس، با ضخامت ۰/۲۵ میلی متر یادآوری - نوع تجاری آماده برای مصرف در دسترس است.

۸-۶ تولوئن با خلوص کروماتوگرافی

۹-۶ استون با خلوص کروماتوگرافی

۱۰-۶ هگزان با خلوص کروماتوگرافی

۱۱-۶ اتیل اتر با خلوص کروماتوگرافی

۱۲-۶ اتانول با خلوص تجزیه ای

۱۳-۶ اتیل استات با خلوص تجزیه ای

۱۴-۶ محلول مرجع برای کروماتوگرافی لایه نازک: کلسترول یا فیتواسترول، و محلول اریترودیول ۰/۵٪ (وزنی/ حجمی) در اتیل استات (مطابق با بند ۱۲-۶)



- ۶-۱۵ ۷۲ دی کلروفلورسین، ۰/۲٪ (حجمی / حجمی) در محلول اتانولی با اضافه کردن چند قطره محلول هیدروکسید پتاسیم الکلی ۲ نرمال به محلول، آن را کمی قلیایی کنید.
- ۶-۱۶ پیریدین بدون آب، با خلوص کروماتوگرافی
- ۶-۱۷ هگزامتیل دیسیلان
- ۶-۱۸ تری متیل کلروسیلان
- ۶-۱۹ محلول نمونه استرول تری متیل سیلیل اترها این محلول باید در زمان استفاده آماده شود.
- ۶-۲۰ آلفا- کلستانول، با درجه خلوص بیشتر از ۹۹٪ (خلوص آن باید با دستگاه کروماتوگرافی گازی بررسی شود)
- ۶-۲۱ محلول استاندارد داخلی آلفا کلستانول، محلول ۰/۲٪ m/V در اتیل استات (مطابق با بند ۶-۱۲)
- ۶-۲۲ محلول فنل فتالین، ۱۰ گرم بر لیتر در اتانول
- ۶-۲۳ گاز حامل: هیدروژن یا هلیوم، با خلوص کروماتوگرافی گازی
- ۶-۲۴ گازهای کمکی: هیدروژن، هلیوم، نیتروژن و هوا، با خلوص کروماتوگرافی گازی
- ۶-۲۵ هگزان (مطابق با بند ۶-۱۰/ اتیل اتر (مطابق با بند ۶-۱۱) مخلوط V/V ۳۵:۶۵ ( ۶۵ میلی لیتر هگزان و ۳۵ میلی لیتر اتیل اتر )
- ۶-۲۶ واکنشگر سیلیلاسیون، شامل مخلوط V/V/V ۹:۳:۱ از پیریدین / هگزامتیل دیسیلان / تری متیل کلروسیلان.

## ۷ وسایل

- علاوه بر وسایل معمول آزمایشگاهی، وسایل و تجهیزات لازم زیر مورد نیاز است:
- ۷-۱ فلاسک ۲۵۰ میلی لیتر، با یک کندانسور برگشتی با دهانه قابل اتصال به کندانسور
- ۷-۲ قیف جداسازی با گنجایش ۵۰۰ میلی لیتر
- ۷-۳ فلاسک با گنجایش ۲۵۰ میلی لیتر
- ۷-۴ تجهیزات تکمیلی برای ورق TLC
- ۷-۵ لامپهای ماوراء بنفش با طول موج ۳۶۶ یا ۲۵۴ نانومتر
- ۷-۶ میکروسرنج ۱۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر
- ۷-۷ قیف استوانه ای صافی دار با سپتوم روزنه دار G3 ( درجه تخلخل ۱۵ تا ۴۰ میکرومتر ) با ضخامت تقریباً ۲ سانتی متر و عمق ۵ سانتی متر، مناسب برای فیلتراسیون تحت خلاء همراه با اتصال شیشه ای سمباده ای نر
- ۷-۸ فلاسک مخروطی تحت خلاء ۵۰ میلی لیتری با اتصال مادگی شیشه ای سمباده ای که می تواند به قیف استوانه ای صافی دار ( مطابق با بند ۷-۸) وصل شود.
- ۷-۹ لوله آزمایش ۱۰ میلی لیتری با انتهای مخروطی شکل و یک در کاملاً "جذب (آب بندی شده)

- ۷-۱۰ **کروماتوگرافی گازی** مناسب دارای ستون مویینی با سیستم تزریق اسپلیت که تشکیل شده از:
- ۷-۱۰-۱ **اتاقک** تنظیم حرارتی برای ستون‌ها (آون ستون‌ها) به منظور حفظ دمای مطلوب با دقت  $\pm 1$  درجه سلسیوس
- ۷-۱۰-۲ **واحد تزریق شکافت** ( دو قسمتی ) قابل تنظیم دمایی همراه با یک قطعه شیشه ای از قبل سیلانیزه شده ، یا یک واحد تزریق سر ستون
- ۷-۱۰-۳ **آشکار ساز** یونش شعله
- ۷-۱۰-۴ **ثبات- انتگرال گیر**
- ۷-۱۱ **ستون مویینه** شیشه ای یا سیلیکای مذاب با طول ۲۰ تا ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ تا ۰/۳۲ میلی متر، پوشش داده شده با ۵٪ دی فنیل- ۹۵٪ دی متیل پلی سیلوکسان(با فاز مایع SE-52 یا SE-54 یا معادل آن ) با ضخامت لایه بین ۱۰/۱۰ میکرو متر تا ۰/۳۰ میکرو متر .
- ۷-۱۲ **میکرو سرنگ** برای کروماتوگرافی گازی، با ظرفیت ۱۰ میکرو لیتر همراه با سوزن مقاوم شده
- ۷-۱۳ **دسیکاتور** کلرید کلسیم.

## ۸ روش انجام آزمون

- ۸-۱ آماده سازی ماده غیرقابل صابونی شونده
- ۸-۱-۱ با میکرو سرنگ ۵۰۰ میکرولیتری ( مطابق با بند ۶-۷)، حجمی از استاندارد داخلی آلفا-کلستانول (مطابق با بند ۶-۲۰) را برداشته و به فلاسک ۲۵۰ میلی لیتری (مطابق با بند ۷-۳) اضافه نمایید، به صورتی که تقریباً " ۱۰٪ مقدار استرول در نمونه باشد. برای مثال، برای ۵ گرم از نمونه روغن زیتون ۵۰۰ میکرولیتر از محلول آلفا-کلستانول (مطابق با بند ۶-۲۰) و برای روغن تفاله زیتون، ۱۵۰۰ میکرولیتر استاندارد داخلی آلفا-کلستانول (مطابق با بند ۶-۲۰) اضافه شود. تبخیر محلول استاندارد را تا خشکی با جریان آرامی از نیتروژن در حمام آب گرم انجام دهید، بعد از خنک شدن فلاسک، از نمونه صاف و خشک شده مقدار  $0.1 \pm 5$  گرم را توزین نمایید.
- یادآوری-** روغن‌ها و چربی‌های حیوانی یا گیاهی شامل مقدار قابل توجهی کلسترول هستند، ممکن است یک پیک دارای زمان بازداری<sup>۱</sup> مشابه با آلفا-کلستانول نشان دهند. در چنین وضعیتی، بخش استرولی باید دو بار به دستگاه تزریق شود(یکبار همراه با استاندارد داخلی و بار دیگر بدون استاندارد داخلی).

- ۸-۱-۲ ۵۰ میلی لیتر از محلول هیدروکسید پتاسیم اتانولی ۲ نرمال ( مطابق با بند ۶-۳ ) و تعدادی پرل اضافه کنید. رفلاکس کندانسور را تنظیم کرده و حرارت را به صورت جوشیدن ملایم تازمانی که محلول شفاف شود، ادامه دهید. سپس به مدت زمان ۲۰ دقیقه دیگر حرارت را ادامه داده و ۵۰ میلی لیتر آب مقطر را از بخش

---

1-Retention time

بالایی کندانسور به منظور شستشو اضافه کنید. پس از آن کندانسور را جدا کرده و فلاسک را تا دمای ۳۰ درجه سلسیوس سرد کنید.

۳-۱-۸ محتویات فلاسک را به قیف جداکننده ۵۰۰ میلی لیتر (مطابق با بند ۷-۱) انتقال دهید و حدود ۵۰ میلی لیتر آب مقطر به آن بیافزایید. حدود ۸۰ میلی لیتر اتیل اتر (مطابق با بند ۶-۱۱) اضافه کنید و برای ۶۰ ثانیه آن را به شدت تکان داده و اجازه دهید تا شکل گیری دو فاز به طور کامل انجام شود (به یادآوری ۲ مراجعه شود).

سپس فاز زیری را به قیف جداکننده دوم جدا منتقل کنید و به آن ۶۰ تا ۷۰ میلی لیتر اتیل اتر افزوده و آن را به آرامی تکان دهید و فاز زیری را به قیف جدا کننده سوم منتقل و فاز رویی آن را به قیف جدا کننده اول اضافه نمایید. عملیات استخراج را بر روی قیف جدا کننده سوم نیز انجام داده و فاز زیری را دور ریخته و فاز رویی را به قیف جدا کننده اول منتقل نمایید.

یادآوری- در صورت تشکیل امولسیون مقدار کمی اتانول (مطابق با بند ۶-۱۲) برای از بین بردن آن اضافه کنید.

۴-۱-۸ سه استخراج بدست آمده از اتیل اتر را هر بار با ۵۰ میلی لیتر آب شستشو داده و عملیات شستشو را تا خنثی شدن با استفاده از محلول فنل فتالئین (مطابق با بند ۶-۲۱) تا از بین رفتن رنگ صورتی، ادامه دهید. وقتی آب شستشو جدا شد، محلول را با عبور از سدیم سولفات بدون آب در داخل بالن ۲۵۰ میلی لیتری که از قبل وزن شده، صاف کنید. قیف و فیلتر را با مقدار کمی اتیل اتر بشوئید و حلال را با تقطیر در تبخیر کننده دوار دمای ۳۰ درجه سلسیوس در شرایط خلاء تبخیر کنید. به باقیمانده ۵ میلی لیتر استون اضافه کرده و محلول را در یک جریان ملایم از هوا تبخیر نمایید. باقیمانده را در  $10.3 \pm 2$  درجه سلسیوس برای ۱۵ دقیقه خشک کنید. آن را در دسیکاتور خنک کرده و با دقت ۰/۱ میلی گرم توزین کنید.

#### ۲-۸ جداسازی استرول و بخش تری ترپن دی الکلها (اریترودیول + اوئول)

۱-۲-۸ آماده سازی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک قلیایی شده

صفحات سیلیکاژل (مطابق با بند ۶-۷) را حدود ۴ سانتی متر در محلول هیدروکسید پتاسیم اتانولی ۰/۲ نرمال (مطابق با بند ۶-۳) برای ۱۰ ثانیه غوطه ور کنید. سپس اجازه دهید تا در زیر هود آزمایشگاهی برای مدت زمان دو ساعت خشک شود و بعد در آن با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس برای یک ساعت قرار دهید. سپس آن را از آن خارج کرده و در دسیکاتور دارای کلرید کلسیم (مطابق با بند ۷-۱۳) نگه داری کنید تا زمانی که که برای استفاده نیاز شود (صفحات تیمار شده به این روش، باید در مدت ۱۵ روز استفاده شوند).

یادآوری - زمانی که صفحات قلیایی سیلیکاژل برای جداسازی استرول استفاده می شوند، نیازی نیست که بخش غیرقابل صابونی شونده با آلومینا تیمار شوند. در این حالت، تمام ترکیبات با ماهیت اسیدی (اسیدهای چرب و سایر ترکیبات) روی خط بار گذاری می شوند و باندهای استرول به روشنی از باندهای آلیفاتیک و تری ترپن دی الکلها جدا می شوند.

۸-۲-۲ مخلوط هگزان/ اتیل اتر (مطابق با بند ۶-۲۴) را در تانک ظهور تا عمق حدود ۱ سانتی متر بریزید. در محفظه را بسته و اجازه دهید که به مدت زمان نیم ساعت ایجاد تعادل مایع و بخار ایجاد شده صورت گیرد. نوارهای کاغذی صاف را می توان در داخل ماده شوینده غوطه ور ساخت و به سطوح داخلی تانک چسباند این کار باعث می شود زمان ظهور تقریبا به یک سوم کاهش یابد و تفکیک منظم و یکنواخت تری از ترکیبات انجام پذیرد.

یادآوری - مخلوط ظهور باید برای هر آزمایش مجدد تهیه شود تا شرایط بهتر تجدید پذیری بدست آید. به طور جایگزین محلول ۵۰:۵۰ (V/V) هگزان / اتیل اتر می تواند مورد استفاده قرار گیرد.

۸-۲-۳ محلول تقریبا " ۵٪ (وزنی/حجمی) غیرقابل صابونی شونده ( مطابق با بند ۸-۱-۴) در اتیل استات (مطابق بند ۶-۱۲) را آماده کنید. با استفاده از میکروسرنج ۱۰۰ میکرولیتر، ۰/۳ میلی لیتر از محلول را روی خط باریک و یکنواخت در قسمت انتهایی (۲ سانتی متر) صفحات کروماتوگرافی قرار می دهید. در این خط، ۲ تا ۳ میکرولیتر از محلول مرجع (مطابق با بند ۶-۱۳) را قرار دهید تا باندهای استرول و تری ترپن دی الکل ها بعد از توسعه شناسایی شوند.

۸-۲-۴ صفحه را در محفظه توسعه آماده شده (مطابق با ۸-۲-۲) آماده کنید. دما باید بین ۱۵ تا ۲۰ درجه سلسیوس باشد (به یادآوری مراجعه شود). فوراً محفظه را با پوشش بسته و اجازه دهید تا محلول به ۱ سانتی متری لبه بالایی صفحه برسد. صفحه را از محفظه توسعه خارج کرده و در یک جریان از هوای گرم ، برای مدت کوتاهی صفحه را زیر هود آزمایشگاهی تبخیر کنید. یادآوری - دمای بالا برای جداسازی نامناسب است.

۸-۲-۵ به طور آرام و یکنواخت محلول ۲ و ۷- دی کلروفلورسن را روی صفحه اسپری (مطابق با بند ۶-۱۵) و سپس خشک کنید. زمانی که صفحه زیر نور ماوراء بنفش جذب قرار دهید، باندهای استرول ها و تری ترپن دی الکل ها می توانند از طریق هم تراز شدن با نقطه به دست آمده از محلول مرجع ( مطابق با بند ۶-۱۴ ) شناسایی شوند. محدوده باندهای فلورسنس را با مداد مشکی خط بکشید (شکل شماره ۳ صفحات TLC را مشاهده کنید).

۸-۲-۶ با استفاده از اسپاچول فلزی، سیلیکاژل را از قسمت خط کشیده بتراشید. مواد پودری را به قیف صافی دار انتقال دهید (مطابق با بند ۷-۷). ۱۰ میلی لیتر از استات اتیل داغ (مطابق با بند ۶-۱۳) را اضافه کنید. با اسپاچول فلزی به دقت مخلوط کنید و تحت خلاء صاف نمایید. مواد صاف شده را در یک فلاسک مخروطی شکل (مطابق با بند ۶-۸) وصل شده به قیف فیلتر جمع آوری کنید.

باقیمانده موجود در فلاسک را سه بار با اتیل اتر و هر بار تقریباً "با ۱۰ میلی لیتر بشویید، مواد صاف شده را در همان فلاسکی که به به قیف متصل شده جمع آوری شده است، جمع آوری کنید. ماده صاف شده را تا حجم ۴ تا ۵ میلی لیتر تبخیر کنید، محلول باقی مانده را به لوله آزمایش ۱۰ میلی لیتری که قبلاً وزن شده انتقال دهید (مطابق بند ۶-۹)، با حرارت ملایم تبخیر کنید تا خشک شود، در یک جریان ملایم از نیتروژن، دوباره چند قطره استون (مطابق با بند ۶-۹) را اضافه نموده و دوباره تبخیر کنید تا خشک شدن صورت گیرد. باقیمانده در لوله آزمایش شامل، بخش استرول و تری ترین دی الکلها هستند.

#### ۳-۸ تری متیل سیلیل اترها را آماده کنید.

۱-۳-۸ واکنشگر سیلیل کننده را آماده نمایید (مطابق با بند ۶-۲۶) (به یادآوری مراجعه شود). این واکنشگر به نسبت ۵۰ میکرولیتر برای هر میلی گرم از استرولها و تری ترین دی الکلها، در لوله آزمایش که شامل بخش استرول و تری ترین دی الکل است اضافه شود، از جذب هرگونه رطوبت جلوگیری به عمل آید (به یادآوری مراجعه شود).

**یادآوری** - محلول آماده مصرف به صورت تجاری در دسترس است. واکنشگرهای سیلیلی کردن از قبیل، بیس- تری متیل سیلیل، تری فلور استامید به اضافه یک درصد تری متیل کلروسیلان هستند که باید با یک حجم مساوی از پیریدین بدون آب رقیق شوند. پیریدین می تواند با مقدار یکسان از استونیتریل جایگزین شود.

۲-۳-۸ درب لوله آزمایش را بسته و با دقت تکان دهید (بدون واژگون کردن) تا زمانی که ترکیبات کاملاً حل شوند. برای ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید و سپس برای مدت زمان دو دقیقه سانتریفوژ کنید. محلول شفاف برای آنالیز گاز کروماتوگرافی آماده است.

**یادآوری ۷-** رنگ شیری ملایمی کدری که ممکن است به طور طبیعی تشکیل شود، موجب تداخل نمی شود. تشکیل یک توده سفید یا ظهور رنگ صورتی، بیانگر وجود رطوبت یا خرابی واکنشگر است. اگر این اتفاق در آزمایش رخ دهد، آزمون باید دوباره تکرار شود. (فقط اگر هگزامتیل دی سیلان / تری متیل کلرو سیلان مصرف شود)

#### ۴-۸ جدا سازی با کروماتوگرافی گازی

##### ۱-۴-۸ عملیات مقدماتی پر کردن ستون

۱-۴-۸ ستون را در دستگاه کروماتوگرافی نصب کنید (مطابق با بند ۷-۱۱-۵)، انتهای ورودی ستون را به تزریق کننده متصل به سامانه دو قسمتی و انتهای خروجی را به آشکارساز وصل کنید. کنترل کلی از دستگاه کروماتوگرافی گازی (استحکام مناسب اتصالات گازی، کارایی آشکارساز، کارایی سامانه دو قسمتی و سامانه ثبت کننده وسایر موارد) را انجام دهید.

۲-۱-۴-۸ اگر ستون برای اولین بار است که استفاده می شود، توصیه می شود آن را در شرایط کاری مورد نظر تنظیم نمائید. مقدار کمی از گاز حامل را از میان ستون مویینه عبور دهید و سپس سامانه کروماتوگرافی گازی

را روشن کنید و به طور تدریجی دما را افزایش دهید تا به میزانی که کمتر از ۲۰ درجه سانتیگراد بالاتر از دمای عملیات نیست برسد. ستون برای حد اقل ۲ ساعت در این دما نگه داشته شود و دستگاه به شرایط کاری مورد نظر برسد (تنظیم سرعت جریان گاز حامل، احتراق شعله منشعب (دو قسمتی)، اتصال به ثبات الکترونیکی، تنظیم دمای آون ستون مویین، آشکار ساز و تزریق کننده وغیره) و سیگنال در حساسیتی تنظیم می شود که کمینه دو برابر بیشتر از حد مورد نظر برای انجام آزمون باشد. مسیر خط پایه باید خطی باشد، بدون هیچ انحراف یا پیک مشاهده شود. انحراف مسیر در جهت مثبت بیانگر نامناسب بودن شرایط کاری ستون و انحراف مسیر در جهت منفی نشان دهنده نشت از اتصالات ستون است.

یادآوری - دمای مطلوب باید حداقل ۲۰ درجه سلسیوس کمتر از بیشینه دمای در نظر گرفته شده برای فاز مایع باشد.

#### ۸-۴-۲ انتخاب شرایط عملیاتی

۸-۴-۲-۱ راهنمای شرایط عملیات برای سامانه کروماتوگرافی دارای یک تزریق دو قسمتی به شرح زیر می باشد:

الف- دمای ستون:  $260 \pm 5$  درجه سانتیگراد

ب- دمای محل تزریق: ۲۸۰-۳۰۰ درجه سانتیگراد

پ- دمای آشکار ساز: ۲۸۰-۳۰۰ درجه سانتیگراد

ت- سرعت خطی گاز حامل: هلیوم ۲۰ تا ۳۵ سانتی متر بر ثانیه، هیدروژن ۳۰ تا ۵۰ سانتی متر بر ثانیه

ث- نسبت انشعاب: از ۱:۵۰ تا ۱:۱۰۰

ج- حساسیت دستگاه: ۴ تا ۱۶ برابر حداقل آستانه

چ- حساسیت ثبات: ۱ mVf.s تا ۲ mVf.s

ح- سرعت کاغذ: ۳۰ سانتی متر بر ساعت تا ۶۰ سانتی متر بر ساعت

خ- ماده تزریق شده: ۰/۵ تا ۱ میکرولیتر از محلول TMSE

د- شرایط فوق را می توان بر طبق ویژگی های ستون تغییر داد تا کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرام های مطلوبی را طبق شرایط زیر بدهد:

ذ- زمان بازداری برای پیک بتا-سیتواسترول باید  $20 \pm 5$  دقیقه باشد

ر- پیک کمپسترول باید برای روغن زیتون  $20 \pm 5$  درصد (میانگین ۳ درصد) از مقیاس کل و برای روغن سویا

$10 \pm 8$  درصد (به طور متوسط ۲۰ درصد) از مقیاس کل باشد

۸-۴-۲-۲ تمام استرومل های موجود باید جدا شوند. علاوه بر جداسازی، تفکیک پیک ها باید به صورت کامل باشد، به عبارت دیگر مسیر پیک باید به خط پایه برگردد قبل از اینکه پیک بعدی خط پایه را ترک کند. در هر

حال برای تفکیک نسبی، اگر پیک زمان بازداری نسبی سیتوستانول (۱/۰۲) با استفاده از عمود کردن تعیین شود، روداری وجود دارد.

#### ۳-۴-۸ روش شناسایی

۱-۳-۴-۸ با استفاده از میکروسرنگ باریک ۱۰ میکرولیتری، ۱ میکرولیتر از هگزان را کشیده، متعاقب آن ۰/۵ میکرولیتر هوا و سپس ۰/۵ تا ۱ میکرولیتر از محلول نمونه را به داخل سرنگ بکشید، پیستون سرنگ را بیشتر بالا بکشید تا سر سوزن خالی شود. سر سوزن را داخل غشای تزریق کننده بگذارید و بعد از یک تا دو ثانیه، به سرعت تزریق کنید، سپس بعد از ۵ ثانیه به آهستگی سر سوزن را خارج سازید. در این رابطه می توان از تزریق کننده اتوماتیکی نیز استفاده شود.

۲-۳-۴-۸ ثبات به کار خود ادامه می دهد تا زمانی که TMSE تری ترین دی الکلها به طور کامل خارج شوند. خط پایه باید مطابق با الزامات بند ۲-۱-۴-۸ باشد.

#### ۴-۴-۸ شناسایی پیک

شناسایی پیکهای مجزا، بر طبق زمانهای بازداری و از طریق مقایسه با مخلوط استرول و تری ترین دی الکلهای TMSE شناسایی شده تحت شرایط مشابه انجام می شود. استرولها و تری ترین الکلهای شناسایی شده عبارتند از: کلسترول، براسیکااسترول، ارگسترول، ۲۴-متیلن-کلسترول، کمپسترول، کمپستانول، استیگمااسترول، دلتا-۷-کمپسترول، دلتا ۵ و ۲۳-استیگمادینول، دلتا-۷-استیگمااستنول، دلتا-۷-اوناسترول، اریترودیول و اوائل. زمان بازداری برای بتا-استیگمااسترول، برای ستونهای SE-۵۲ و SE-۵۴ در جدول ۱ نشان داده شده است. اشکال ۱ و ۲ کروماتوگرامهای معمولی را برای تعدادی روغن نشان داده است.

#### ۵-۴-۸ ارزیابی کمی

۱-۵-۴-۸ نواحی پیکهای آلفا-کلستانول و استرول و تری ترین دی الکلها با استفاده از انتگرال گیری الکترونیکی محاسبه می شوند. پیکهای ترکیبات دیگر که در لیست جدول ۱ نیستند نادیده گرفته می شود (ارگسترول نباید محاسبه شود). فاکتور پاسخ<sup>۱</sup> برای آلفا-کلستانول باید برابر ۱ باشد.

۲-۵-۴-۸ غلظت هر استرول مجزا را بر حسب میلی گرم بر کیلوگرم چربی، با استفاده از فرمول ۱ به روش زیر محاسبه می شود:

---

1- Response factor

فرمول ۱:

$$\text{sterol } x = \frac{A_x \cdot m_s \cdot 1000}{A_s \cdot m}$$

که در آن:

$A_x$  = مساحت سطح زیر پیک برای استرول  $x$ .

$A_s$  = مساحت سطح زیر پیک آلفا-کلستانول.

$m_s$  = مقدار آلفا-کلستانول اضافه شده، بر حسب میلیگرم.

$m$  = مقدار نمونه برداشته شده بر حسب گرم.

## ۹ بیان نتایج

۹-۱ غلظت استرول‌های مجزا بر حسب میلی گرم بر کیلوگرم چربی و مجموع کل آن به نام استرول کل گزارش می شود.

ترکیب هر استرول مجزا بوده و اریترودیول و اوائل باید به صورت یک عدد اعشاری بیان شود. ترکیب استرول کل نباید به صورت اعشار بیان شود.

۹-۲ درصد استرول از نسبت پیک مربوطه به پیک کل برای استرول‌ها و اریترودیول و اوائل با استفاده از فرمول ۲ به روش زیر محاسبه می شود:

فرمول ۲

$$\text{sterol } x = \frac{A_x}{\Sigma A} \cdot 100$$

که در آن:

$A_x$  = ناحیه پیک برای  $x$ .

$\Sigma A$  = ناحیه کل پیک برای استرول‌ها.

بتاسیتوسترول ظاهری: دلتا-۵-۲۳-استیگماستادی انول + کلسترول + بتا-سیتواسترول + سیتوستانول + دلتا-۵-آوناسترول + دلتا-۵-۲۴-استیگماستادی انول.

۹-۳ درصد اریترودیول و اوائل به روش زیر محاسبه می شود.



### فرمول ۳

$$\text{Erythrodiol + Uvaol} = \frac{\text{Er.} + \text{Uv.}}{\text{Er.} + \text{Uv.} + \Sigma A} \times 100$$

که در آن:

$\Sigma A$  = جمع ناحیه استرول در سیستم کامپیوتری.

$E_r$  = ناحیه اریترودیول در سیستم کامپیوتری.

$U_v$  = ناحیه اوئول در سیستم کامپیوتری.

### ۱۰ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی های زیر باشد:

۱-۱۰ تمام اطلاعات لازم برای شناسایی کامل نمونه

۲-۱۰ در صورت مشخص بودن روش نمونه برداری به کار برده شده

۳-۱۰ روش آزمون، طبق این استاندارد ملی ایران

۴-۱۰ شرایط دیگری که در این استاندارد آورده نشده و بر روی نتیجه اثرگذار است

۵-۱۰ نتیجه آزمون

۶-۱۰ در صورتی که تکرارپذیری بررسی شده است، در پایان گزارش، نتایج بدست آمده را اعلام کنید.

۱-۱۰ تاریخ انجام آزمون

۸-۱۰ محل انجام آزمون

۹-۱۰ نام و نام خانوادگی و امضای آزمایش کننده

## پیوست الف

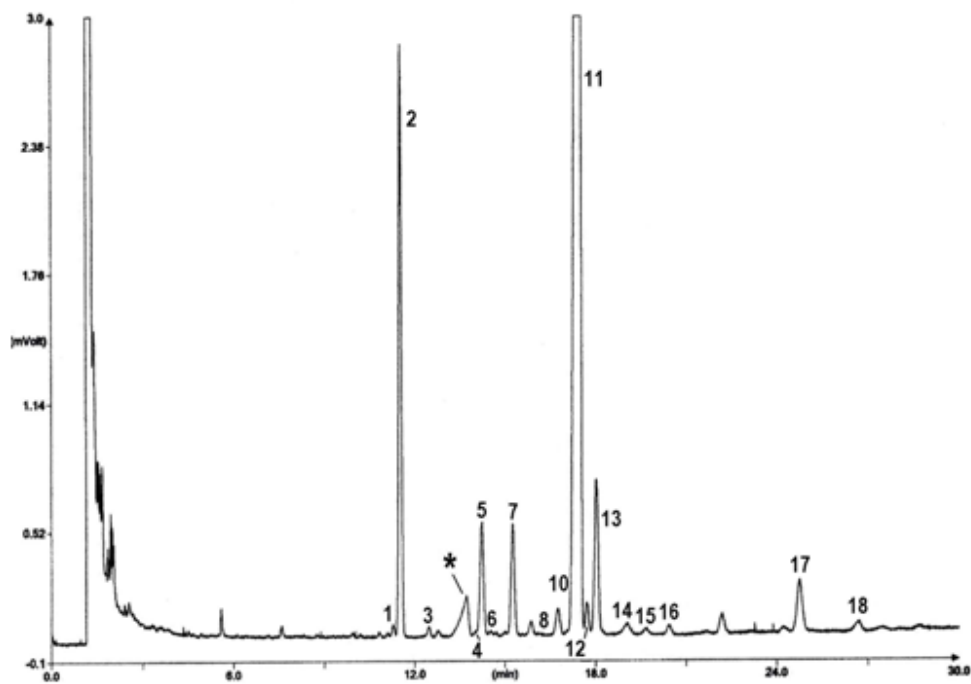
### (اطلاعاتی)

#### شناسایی سرعت خطی گاز

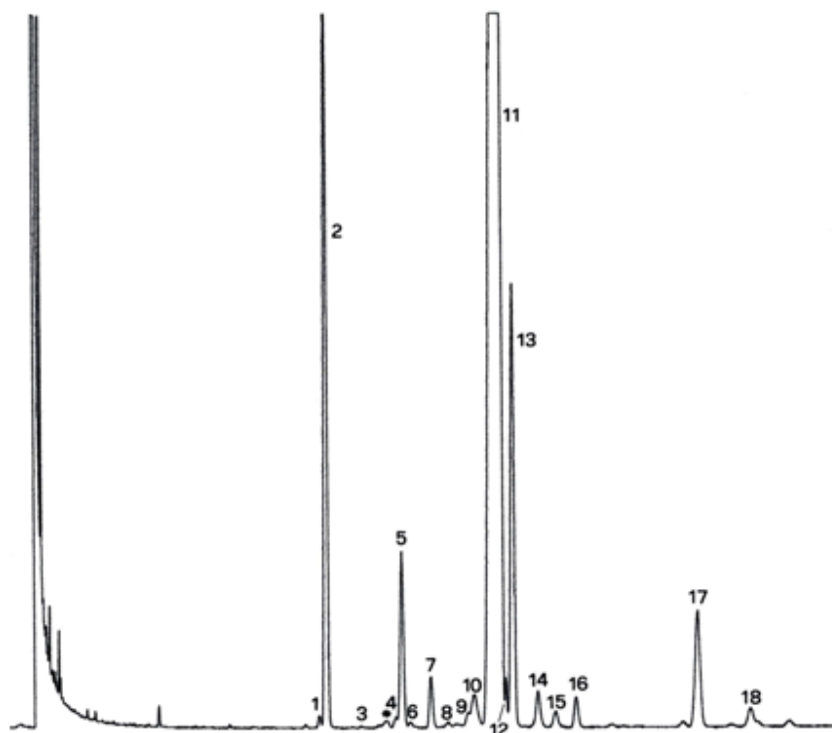
با تنظیم گاز کروماتوگرافی با شرایط معمولی، ۱ تا ۳ میکرولیتر از متان (یا پروپان) را تزریق کرده و زمانی که گاز از ستون عبور می‌کند را اندازه می‌گیرند، از زمان تزریق تا زمانی که پیک ظاهر می‌شود (tM).  
 سرعت خطی با واحد سانتی متر بر ثانیه داده شده برای L/tM، درحالی‌که L طول ستون برحسب سانتی متر و tM زمان اندازه گرفته شده برحسب ثانیه است.

#### جدول الف-۱- زمان بازداری نسبی استروئول‌ها

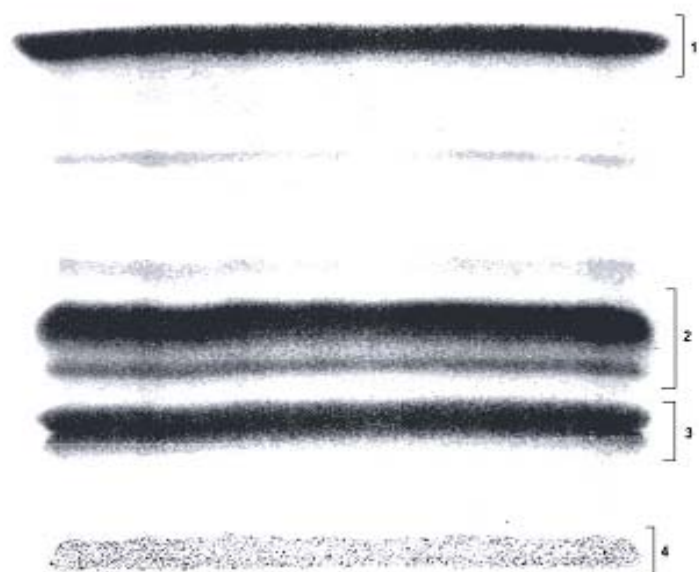
شماره پیک	شناسایی		زمان بازداری نسبی	
	SE 54	SE 52	ستون SE 54	ستون SE 52
۱	کلسترول	$\Delta$ -5-cholesten-3 $\beta$ -ol	۰/۶۷	۰/۶۳
۲	کلستانول	5 $\alpha$ -cholestan-3 $\beta$ -ol	۰/۶۸	۰/۶۴
۳	براسیکاسترول	[24S]-24-methyl- $\Delta$ 5,22-cholestadien-3 $\beta$ -ol	۰/۷۳	۰/۷۱
*	ارگسترول	[24S] 24 methyl- $\Delta$ 5-7-22cholestatrien3 $\beta$ ol	۰/۷۸	۰/۷۶
۴	۲۴-متیلن-کلسترول	24-methylene- $\Delta$ 5,24-cholestadien-3 $\beta$ -ol	۰/۸۲	۰/۸۰
۵	کمپسترول	(24R)-24-methyl- $\Delta$ 5-cholesten-3 $\beta$ -ol	۰/۸۳	۰/۸۱
۶	کمپستانول	(24R)-24-methyl-cholestan-3 $\beta$ -ol	۰/۸۵	۰/۸۲
۷	استیگماسترول	(24S)-24-ethyl- $\Delta$ 5,22-cholestadien-3 $\beta$ -ol	۰/۸۷	۰/۸۸
۸	دلتا-۷-کمپسترول	(24R)-24-methyl- $\Delta$ -7-cholesten-3 $\beta$ -ol	۰/۹۳	۰/۹۲
۹	دلتا-۵ و ۲۳-استیگماستادی انول	(24R,S)-24-ethyl- $\Delta$ -5,23-cholestadien-3 $\beta$ -ol	۰/۹۵	۰/۹۵
۱۰	کلرسترول	(24S)-24-ethyl- $\Delta$ 5,25-cholestadien-3 $\beta$ -ol	۰/۹۶	۰/۹۶
۱۱	بتا-سیتوسترول	(24R)-24-ethyl- $\Delta$ -5-cholesten-3 $\beta$ -ol	۱/۰۰	۱/۰۰
۱۲	سیتوستانول	24-ethyl-cholesten-3 $\beta$ -ol	۱/۰۲	۱/۰۲
۱۳	دلتا-۵-اوناسترول	(24Z)-24-ethylidene- $\Delta$ -cholesten-3 $\beta$ -ol	۱/۰۳	۱/۰۳
۱۴	دلتا-۵-۲۴-استیگماستادی انول	(24R,S)-24-ethyl- $\Delta$ -5,24-cholestadien-3 $\beta$ -ol	۱/۰۸	۱/۰۸
۱۵	دلتا-۷-استیگماستونول	(24R,S)-24-ethyl- $\Delta$ -7-cholesten-3 $\beta$ -ol	۱/۱۲	۱/۱۲
۱۶	دلتا-۷-اوناسترول	(24Z)-24-ethylidene- $\Delta$ -7-cholesten-3 $\beta$ -ol	۱/۱۶	۱/۱۶
۱۷	اریترودیول	5 $\alpha$ olean-12en-3 $\beta$ 28 diol	۱/۴۱	۱/۴۱
۱۸	اوانول	$\Delta$ 12-ursen-3 $\beta$ 28 diol	۱/۵۲	۱/۵۲



شکل الف-۱ - کروماتوگرام بخش استرول و تری ترین دی الکل های روغن زیتون لامپانت (با استاندارد داخلی)



شکل الف-۲ - کروماتوگرام بخش استرول و تری ترین دی الکل های روغن زیتون تصفیه شده (با استاندارد داخلی)



راهنمای شکل:

- ۱- اسکوالن
- ۲- تری ترپن و الکل‌های آلیفاتیک
- ۳- استرول‌ها و تری ترپنیک دی الکل‌ها
- ۴- اسیدهای چرب آزاد و اولیه

شکل الف-۳- TLC روغن تفاله زیتون همراه با نواحی استرول‌ها و تری ترپن دی الکل‌های نشان داده شده، که باید از روی صفحه تراشیده شوند.

**پیوست ب**  
**(اطلاعاتی)**  
**نتایج آزمون بین آزمایشگاهی**

دقت روش با استفاده از آزمون مشترک بین آزمایشگاهی که در نوزده آزمایشگاه در سال ۲۰۰۹ از سوی دبیرخانه اجرایی انجام شد در جدول های ب-۱ تا ب-۱۴ نشان شده است.

آزمایش ها روی پنج نمونه انجام شد که شامل:

استرول<sup>۱</sup> -۱- روغن تفاله خام زیتون

استرول<sup>۲</sup> -۲- روغن تصفیه شده زیتون

استرول<sup>۳</sup> -۳- روغن زیتون فرا بکر

استرول<sup>۴</sup> -۴- مخلوط ۲۰٪ روغن آفتابگردان با درصد اولئیک بالا، ۷۰٪ روغن زیتون فرابکر و ۱۰٪ روغن کلزا

استرول<sup>۵</sup> -۵- مخلوط ۱۵٪ روغن سویا و ۸۵٪ روغن زیتون.

تجزیه و تحلیل نتایج آزمون های بین آزمایشگاهی مطابق با استانداردهای بین المللی ایزو ۵۷۲۷-۱ و ۵۷۲۷-۲ توسط دبیرخانه اجرایی IOC انجام شد. نتایج خارج از محدوده با استفاده از آزمون های Cochran و Grubb برای هر آزمون (تکرار الف و ب) و هر نمونه انجام گرفت.

فهرست جداول:

$n_p$ : تعداد آزمایشگاه های شرکت کننده

outliers: تعداد آزمایشگاه ها با نتایج 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

$RDS_r$  (%): تکرار پذیری ضریب تغییر  $(S_r \times 100 / \text{average})$

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

$S_R$ : تجدیدپذیری انحراف معیار

$RDS_R$  (%): تجدیدپذیری ضریب تغییر  $(S_R \times 100 / \text{mean})$

---

۱- منظور بخش استرولی روغن زیتون است.

جدول ب-۱- نتایج تجزیه و تحلیل آماری برای کلسترول

نمونه	استرول-۱	استرول-۲	استرول-۳	استرول-۴	استرول-۵
تعداد آزمایشگاه های شرکت کننده، $n_p$	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹
تعداد آزمایشگاه ها بعد از حذف آزمایشگاه های دارای نتایج خارج از محدوده، $n_p$	۱۹	۱۴	۱۶	۱۸	۱۸
تعداد نتایج آزمون در تمامی آزمایشگاه ها، $n_t$	۳۸	۲۸	۳۲	۳۶	۳۶
میانگین (/)	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۶	۰/۲۱
تکرارپذیری انحراف معیار، $S_r$	۰/۰۲۴	۰/۰۱۸	۰/۰۱۶	۰/۰۲۵	۰/۰۱۵
ضریب تغییر تکرارپذیری، $CV(r)$ ، %	۱۸/۸	۱۴/۰	۱۲/۳	۱۵/۱	۷/۲
حد تکرارپذیری، $r$	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۰۴	۰/۰۷	۰/۰۴
تجدید پذیری انحراف معیار، $S_R$	۰/۰۴۱	۰/۰۲۳	۰/۰۳۸	۰/۰۴۷	۰/۰۵۸
تجدیدپذیری انحراف معیار، $CV(R)$ ، %	۳۱/۹	۱۷/۸	۲۹/۵	۲۹/۱	۲۷/۷
حد تجدیدپذیری، $R$	۰/۱۲	۰/۰۷	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۱۶

جدول ب-۲- نتایج تجزیه و تحلیل آماری برای براسیکا استرول

نمونه	استرول-۱	استرول-۲	استرول-۳	استرول-۴	استرول-۵
تعداد آزمایشگاه های شرکت کننده، $n_p$	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹
تعداد آزمایشگاه ها بعد از حذف آزمایشگاه های دارای نتایج خارج از محدوده، $n_p$	۱۹	۱۵	۱۷	۱۹	۱۸
تعداد نتایج آزمون در تمامی آزمایشگاه ها، $n_t$	۳۸	۳۰	۳۴	۳۸	۳۶
میانگین (/)	۰/۰۵	۰/۰۲	۰/۰۰۰	۱/۴۶	۰/۰۲
تکرارپذیری انحراف معیار، $S_r$	۰/۰۱۳	۰/۰۰۴	-	۰/۰۳۹	۰/۰۰۷
ضریب تغییر تکرارپذیری، $CV(r)$ ، %	۲۵/۹	۲۱/۱	-	۲/۷	۳۲/۷
حد تکرارپذیری، $r$	۰/۰۴	۰/۰۱	-	۰/۱۱	۰/۰۲
تجدید پذیری انحراف معیار، $S_R$	۰/۰۳۹	۰/۰۲	-	۰/۰۵۲	۰/۰۲۴
تجدیدپذیری انحراف معیار، $CV(R)$ ، %	۷۵/۱	۱۱۵/۲	-	۳/۶	۱۰۷/۲
حد تجدیدپذیری، $R$	۰/۱۱	۰/۰۶	-	۰/۱۵	۰/۰۷

جدول ب-۳- نتایج تجزیه و تحلیل آماری برای کمپسترویل

نمونه	استرول-۱	استرول-۲	استرول-۳	استرول-۴	استرول-۵
تعداد آزمایشگاه های شرکت کننده، $n_p$	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹
تعداد آزمایشگاه ها بعد از حذف آزمایشگاه های دارای نتایج خارج از محدوده، $n_p$	۱۸	۱۸	۱۷	۱۸	۱۸
تعداد نتایج آزمون در تمامی آزمایشگاه ها، $n_t$	۳۶	۳۶	۳۴	۳۶	۳۶
میانگین (/.)	۳/۳۲	۳/۱۳	۲/۹۸	۱۰/۷۴	۶/۹۹
تکرارپذیری انحراف معیار، $S_r$	۰/۰۴۴	۰/۰۴۵	۰/۰۲۹	۰/۱۰۰	۰/۰۶۱
ضریب تغییر تکرارپذیری، $CV(r)$ ، %	۱/۳	۱/۴	۱/۰	۱/۰	۰/۹
حد تکرارپذیری، $r$	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۰۸	۰/۲۸	۰/۱۷
تجدید پذیری انحراف معیار، $S_R$	۰/۰۸۵	۰/۰۸۷	۰/۰۸۶	۰/۲۵۹	۰/۱۶۷
تجدیدپذیری انحراف معیار، $CV(R)$ ، %	۲/۶	۲/۸	۲/۹	۲/۴	۲/۴
حد تجدیدپذیری، $R$	۰/۲۴	۰/۲۴	۰/۲۴	۰/۷۳	۰/۴۷

جدول ب-۴- نتایج تجزیه و تحلیل آماری برای استیگما استرول

نمونه	استرول-۱	استرول-۲	استرول-۳	استرول-۴	استرول-۵
تعداد آزمایشگاه های شرکت کننده، $n_p$	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹
تعداد آزمایشگاه ها بعد از حذف آزمایشگاه های دارای نتایج خارج از محدوده، $n_p$	۱۷	۱۶	۱۸	۱۸	۱۹
تعداد نتایج آزمون در تمامی آزمایشگاه ها، $n_t$	۳۴	۳۲	۳۶	۳۶	۳۸
میانگین (/.)	۱/۲۳	۱/۰۵	۰/۴۱	۲/۸۳	۵/۴۰
تکرارپذیری انحراف معیار، $S_r$	۰/۰۲۷	۰/۰۴۰	۰/۰۴۶	۰/۰۴۳	۰/۰۸۷
ضریب تغییر تکرارپذیری، $CV(r)$ ، %	۲/۲	۳/۸	۱۱/۱	۱/۵	۱/۶
حد تکرارپذیری، $r$	۰/۰۸	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۱۲	۰/۲۴
تجدید پذیری انحراف معیار، $S_R$	۰/۰۳۹	۰/۰۵۹	۰/۰۶۴	۰/۱۱۱	۰/۱۵۸
تجدیدپذیری انحراف معیار، $CV(R)$ ، %	۳/۲	۵/۷	۱۵/۶	۳/۹	۲/۹
حد تجدیدپذیری، $R$	۰/۱۱	۰/۱۷	۰/۱۸	۰/۳۱	۰/۴۴

جدول ب-۵- نتایج تجزیه و تحلیل آماری برای بتاسیتواستروول ظاهری

نمونه	استروول-۱	استروول-۲	استروول-۳	استروول-۴	استروول-۵
تعداد آزمایشگاه های شرکت کننده، $n_p$	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹
تعداد آزمایشگاه ها بعد از حذف آزمایشگاه های دارای نتایج خارج از محدوده، $n_p$	۱۶	۱۷	۱۷	۱۸	۱۷
تعداد نتایج آزمون در تمامی آزمایشگاه ها، $n_t$	۳۲	۳۴	۳۴	۳۶	۳۴
میانگین (%)	۹۳/۹	۹۳/۸	۹۵/۲	۷۸/۶	۸۴/۸
تکرارپذیری انحراف معیار، $S_f$	۰/۱۴۱	۰/۲۲۳	۰/۰۹۱	۰/۱۹۵	۰/۲۲۰
ضریب تغییر تکرارپذیری، $CV(r)$ ، %	۰/۱۵	۰/۲۴	۰/۱	۰/۲۵	۰/۲۶
حد تکرارپذیری، $r$	۰/۴	۰/۶	۰/۳	۰/۶	۰/۶
تجدید پذیری انحراف معیار، $S_R$	۰/۳۵۵	۰/۴۷۱	۰/۳۴۰	۱/۳۷۲	۰/۸۱۹۸
تجدیدپذیری انحراف معیار، $CV(R)$ ، %	۰/۳۸	۰/۵	۰/۳۶	۱/۷۵	۱/۰۰
حد تجدیدپذیری، $R$	۱/۰	۱/۳	۱/۰	۴/۰	۲/۲

جدول ب-۶- نتایج تجزیه و تحلیل آماری برای دلتا ۷ استیگماستونول

نمونه	استروول-۱	استروول-۲	استروول-۳	استروول-۴	استروول-۵
تعداد آزمایشگاه های شرکت کننده، $n_p$	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹
تعداد آزمایشگاه ها بعد از حذف آزمایشگاه های دارای نتایج خارج از محدوده، $n_p$	۱۸	۱۹	۱۹	۱۷	۱۸
تعداد نتایج آزمون در تمامی آزمایشگاه ها، $n_t$	۳۶	۳۸	۳۸	۳۴	۳۶
میانگین (%)	۰/۷	۰/۹۴	۰/۲۷	۳/۵۲	۱/۱
تکرارپذیری انحراف معیار، $S_f$	۰/۰۲۸	۰/۰۵۶	۰/۰۲۵	۰/۰۹۰	۰/۰۴۰
ضریب تغییر تکرارپذیری، $CV(r)$ ، %	۴/۱	۶/۰	۹/۵	۲/۶	۳/۶
حد تکرارپذیری، $r$	۰/۰۸	۰/۱۶	۰/۰۷	۰/۲۵	۰/۱۱
تجدید پذیری انحراف معیار، $S_R$	۰/۰۸۶	۰/۰۸۴	۰/۰۶۷	۰/۱۷۱	۰/۰۸۷
تجدیدپذیری انحراف معیار، $CV(R)$ ، %	۱۲/۳	۸/۹	۲۵/۳	۴/۹	۷/۹
حد تجدیدپذیری، $R$	۰/۲۴	۰/۲۴	۰/۱۹	۰/۴۸	۰/۲۴



جدول ب-۷- نتایج تجزیه و تحلیل آماری برای تری ترین دی الکل (اریترودیول + اووانول)

نمونه	استرول-۱	استرول-۲	استرول-۳	استرول-۴	استرول-۵
تعداد آزمایشگاه های شرکت کننده، $n_p$	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹	۱۹
تعداد آزمایشگاه ها بعد از حذف آزمایشگاه های دارای نتایج خارج از محدوده، $n_p$	۱۷	۱۵	۱۹	۱۸	۱۵
تعداد نتایج آزمون در تمامی آزمایشگاه ها، $n_t$	۳۴	۳۰	۳۸	۳۶	۳۰
میانگین (mg/kg)	۲۲/۳۸	۲۷/۱۷	۱/۸۰	۱/۰۶	۲/۹
تکرارپذیری انحراف معیار، $S_T$	۰/۲۱۴	۰/۳۳۳	۰/۲۱۵	۰/۱۶۲	۰/۱۰۸
ضریب تغییر تکرارپذیری، $CV(r)$ ، %	۱/۰	۱/۲	۱۱/۹	۱۵/۳	۳/۸
حد تکرارپذیری، $r$	۰/۶۰	۰/۹۳	۰/۶۰	۰/۴۶	۰/۳۰
تجدید پذیری انحراف معیار، $S_R$	۱/۰۲۸	۱/۲۵۷	۰/۴۵۰	۰/۳۴۲	۰/۲۱۰
تجدیدپذیری انحراف معیار، $CV(R)$ ، %	۴/۶	۴/۶	۲۵/۰	۳۲/۲	۷/۳
حد تجدیدپذیری، $R$	۲/۸۸	۳/۵۲	۱/۲۶	۰/۹۶	۰/۵۹

جدول ب-۸- نتایج تجزیه و تحلیل آماری برای استرول تام

نمونه	استرول-۱	استرول-۲	استرول-۳	استرول-۴	استرول-۵
تعداد آزمایشگاه های شرکت کننده، $n_p$	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸	۱۸
تعداد آزمایشگاه ها بعد از حذف آزمایشگاه های دارای نتایج خارج از محدوده، $n_p$	۱۷	۱۸	۱۸	۱۷	۱۷
تعداد نتایج آزمون در تمامی آزمایشگاه ها، $n_t$	۳۴	۳۶	۳۶	۳۴	۳۴
میانگین (mg/kg)	۴۴۸۷/۰	۳۱۶۹/۸	۱۳۵۹/۸	۲۰۶۶/۵	۱۵۵۲/۱
تکرارپذیری انحراف معیار، $S_T$	۷۱/۷۶	۴۹/۱۵	۴۵/۱۹	۳۰/۱۴	۳۱/۷۵
ضریب تغییر تکرارپذیری، $CV(r)$ ، %	۱/۶	۱/۶	۳/۳	۱/۵	۲/۱
حد تکرارپذیری، $r$	۲۰۰/۹	۱۳۷/۶	۱۲۶/۵	۸۴/۴	۸۸/۹
تجدید پذیری انحراف معیار، $S_R$	۳۷۸/۸۹	۲۳۴/۶۵	۸۲/۹۳	۱۳۱/۴۷	۸۹/۵۴
تجدیدپذیری انحراف معیار، $CV(R)$ ، %	۸/۴	۷/۴	۶/۱	۶/۴	۵/۸
حد تجدیدپذیری، $R$	۱۰۶۰/۹	۶۵۷/۰	۲۳۲/۲	۳۶۸/۱	۲۵۰/۷