



جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran

سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران

۹۷۱۱

تجدید نظر اول

۱۳۹۵

INSO

9711

1st. Revision

2017

Identical with

COI/T.20/Doc. no. 26:

2015

روغن زیتون - اندازه گیری محتوای الکل های

آلیفاتیک و تری ترپنیک به روش

کروماتوگرافی گازی - روش آزمون

Olive oil- Determination of aliphatic and
triterpenic alcohols content by gas
chromatography-Test method

ICS: 67.200.10



مرجع آموزش و خرید و فروش زیتون رودبار و حومه

www.zeytoonchi.ir

استاندارد ملی ایران شماره ۹۷۱۱ (تجدیدنظر اول): سال ۱۳۹۶

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران-ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: standard@isiri.org.ir

وبگاه: <http://www.isiri.gov.ir>

Iranian National Standardization Organization (INSO)

No.1294 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: standard@isiri.org.ir

Website: <http://www.isiri.gov.ir>

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود 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، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود 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 می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)^۱، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)^۲ و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)^۳ است و به عنوان تنها رابط^۴ کمیسیون کدکس غذایی (CAC)^۵ در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، 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 for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)

4- Contact point

5- Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«روغن زیتون - اندازه‌گیری محتوای الکل‌های آلیفاتیک و تری‌ترپنیک به روش

کروماتوگرافی گازی - روش آزمون»

(تجدیدنظر اول)

رئیس:

ربیعی، زهره
(دکتری تخصصی علوم و صنایع غذایی، بیوتکنولوژی)

عضو هیئت علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری - وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دبیر:

رشیدی، لادن
(دکتری تخصصی مهندسی شیمی، بیوتکنولوژی)

عضو هیئت علمی پژوهشکده غذایی و کشاورزی - پژوهشگاه استاندارد - سازمان ملی استاندارد ایران

اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

احمدی، نادیا
(کارشناسی ارشد شیمی دریا)

کارشناس پژوهشکده غذایی و کشاورزی - پژوهشگاه استاندارد - سازمان ملی استاندارد ایران

ایران‌بخش، علی‌رضا
(دکتری تخصصی زیست‌شناسی، سلولی تکوینی)

مدیرکل اداره توسعه آزمایشگاهی سازمان مرکزی واحد تهران مرکز - سازمان مرکزی دانشگاه آزاد اسلامی

حامدی، سپیده
(دکتری تخصصی مهندسی شیمی، بیوتکنولوژی)

عضو هیئت علمی دانشکده فنی و مهندسی علی‌آباد - دانشگاه گلستان - وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

ربیعی، زهره
(دکتری تخصصی علوم و صنایع غذایی، بیوتکنولوژی)

عضو هیئت علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری - وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

رضایی، کرامت‌الله
(دکتری تخصصی علوم و صنایع غذایی)

عضو هیئت علمی دانشکده علوم و صنایع غذایی - دانشگاه تهران - وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

طهماسبی انفرادی، ستار
(دکتری تخصصی ژنتیک گیاهی)

عضو هیئت علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری - وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

عبادی، نفیسه
(کارشناسی مهندسی علوم و صنایع غذایی)

کارشناس دفتر نظارت بر استاندارد صنایع غذایی، آرایشی، بهداشتی و حلال - سازمان ملی استاندارد ایران

اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

سمت و /یا محل اشتغال:

عرب، جهان گیر (کارشناسی ارشد امور باغبانی)	عضو مستقل - بازنشسته وزارت جهاد کشاورزی
عزیزی، نغمه (کارشناسی ارشد باغبانی)	کارشناس دفتر طرح زیتون - معاونت امور باغبانی - وزارت جهاد کشاورزی
غفاری، فرحناز (کارشناسی ارشد علوم بهداشتی در تغذیه)	رئیس آزمایشگاه مرجع کنترل غذا و دارو - سازمان غذا و دارو - وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
غلامی، زهرا (کارشناسی ارشد مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی)	کارشناس پژوهشکده غذایی و کشاورزی - پژوهشگاه استاندارد - سازمان ملی استاندارد ایران
فدوی، قاسم (دکتری تخصصی علوم و صنایع غذایی)	مدیر گروه پژوهشی مواد غذایی - پژوهشکده غذایی و کشاورزی - پژوهشگاه استاندارد - سازمان ملی استاندارد ایران
قیصری، محمد مهدی (دکتری تخصصی سم شناسی)	عضو هیئت علمی واحد خوراسگان - دانشگاه آزاد اسلامی
کلانتری، فرانک (کارشناسی ارشد مهندسی شیمی)	کارشناس تحقیقات - شرکت سهامی خاص روغن نباتی بهشهر
محلای، حامد (کارشناسی میکروبیولوژی)	مدیر تحقیقات - شرکت سهامی عام پارس قو
هماپور، مسعود (دکتری تخصصی علوم و صنایع غذایی)	عضو هیئت علمی واحد صفا دشت - دانشگاه آزاد اسلامی
یوسف زاده فعال دقتی، هنگامه (کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی غذایی)	معاون دفتر نظارت بر استاندارد صنایع غذایی، آرایشی، بهداشتی و حلال - سازمان ملی استاندارد ایران

ویراستار:

نصیری صحنه، بنفشه (کارشناسی علوم تغذیه)	کارشناس پژوهشکده غذایی و کشاورزی - پژوهشگاه استاندارد - سازمان ملی استاندارد ایران
--	--

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ح	پیش‌گفتار
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۲	۳ نمونه برداری
۲	۴ روش آزمون
۲	۴-۱ اصول آزمون
۲	۴-۲ مواد و/یا واکنشگرها
۳	۴-۳ وسایل
۴	۴-۴ آماده‌سازی مواد غیرقابل صابونی
۶	۴-۵ جداسازی اجزاء الکلی
۶	۴-۵-۱ آماده‌سازی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک
۸	۴-۶ آماده‌سازی تری‌متیل‌سیلیل‌اترها
۸	۴-۷ جداسازی و شناسایی با کروماتوگرافی گازی
۸	۴-۷-۱ عملیات مقدماتی، نصب و راه اندازی ستون
۹	۴-۸ انتخاب شرایط عملیاتی
۱۰	۴-۹ روش تجزیه و تحلیل (آنالیز)
۱۰	۴-۱۰ شناسایی پیک
۱۰	۴-۱۱ ارزیابی کمی
۱۱	۵ بیان نتایج
۱۱	۶ گزارش آزمون
۱۲	پیوست الف (آگاهی دهنده) مثالی از جداسازی TLC و مثال‌هایی از کروماتوگرام

پیش‌گفتار

استاندارد «روغن زیتون - اندازه‌گیری محتوای الکل‌های آلیفاتیک و تری‌ترپنیک به روش کروماتوگرافی گازی - روش آزمون» که نخستین بار در سال ۱۳۸۶ تدوین و منتشر شد، بر اساس پیشنهادهای دریافتی و بررسی و تأیید کمیسیون‌های مربوط بر مبنای پذیرش استانداردهای بین‌المللی/منطقه‌ای به عنوان استاندارد ملی ایران به روش اشاره شده در مورد الف، بند ۷، استاندارد ملی ایران شماره ۵ برای اولین بار مورد تجدیدنظر قرار گرفت و در یک هزار و پانصد و هشتادمین اجلاس کمیته ملی استاندارد خوراک و فرآورده‌های کشاورزی مورخ ۱۳۹۵/۱۲/۲۳ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۵ (استانداردهای ملی ایران - ساختار و شیوه نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت 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 ایران استفاده کرد.

این استاندارد جایگزین استاندارد ملی ایران شماره ۹۷۱۱: سال ۱۳۸۶ می‌شود.

این استاندارد ملی بر مبنای پذیرش استاندارد بین‌المللی/منطقه‌ای زیر به روش «معادل یکسان» تهیه و تدوین شده و شامل ترجمه تخصصی کامل متن آن به زبان فارسی می‌باشد و معادل یکسان استاندارد بین‌المللی/منطقه‌ای مزبور است:

COI/T.20/Doc. no.26: 2015, Determination of aliphatic and triterpenic alcohols content by capillary gas chromatography

روغن زیتون - اندازه‌گیری محتوای الکل‌های آلیفاتیک و تری‌ترپنیک به روش کروماتوگرافی گازی - روش آزمون

۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش آزمون اندازه‌گیری محتوای الکل‌های آلیفاتیک و تری‌ترپنیک در روغن زیتون با استفاده از کروماتوگرافی گازی است. این استاندارد برای انواع روغن‌های زیتون کاربرد دارد.

۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

۱-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۴۹۳: سال ۱۳۸۳، روغن‌ها و چربی‌های خوراکی - نمونه‌برداری.

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۳۲۲۶: سال ۱۳۹۰، روغن‌ها و چربی‌های خوراکی - تهیه آزمون از چربی‌ها و روغن‌های حیوانی و نباتی.

۳-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۷۴۴۲: سال ۱۳۸۳، درستی (صحت و دقت) روش‌ها و نتایج اندازه‌گیری قسمت ۱: تعاریف و اصول کلی.

۴-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۲-۷۴۴۲: سال ۱۳۸۳، درستی (صحت و دقت) روش‌ها و نتایج اندازه‌گیری قسمت ۲: روش پایه برای تعیین تکرارپذیری و تجدیدپذیری روش اندازه‌گیری استاندارد.

۵-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۳-۷۴۴۲: سال ۱۳۸۳، درستی (صحت و دقت) روش‌ها و نتایج اندازه‌گیری قسمت ۳: اندازه‌های دقت مبانی یک روش اندازه‌گیری.

۳ نمونه برداری

نمونه برداری از فرآورده، باید طبق استاندارد ملی ایران شماره ۴۹۳، سال ۱۳۸۳: روغن‌ها و چربی‌های خوراکی - نمونه برداری، انجام شود، به طوری که نمونه‌ها نماینده تمام بهر باشند. نمونه‌ای که توسط آزمایشگاه دریافت می‌شود، باید به طور حقیقی نمایان‌گر یک نمونه واقعی باشد و در طی مراحل حمل و نقل یا نگه‌داری آسیب نبیند و تغییری پیدا نکند.

۴ روش آزمون

۱-۴ اصول آزمون

استاندارد داخلی ۱- ایکوزانول به ماده چربی اضافه، به وسیله هیدروکسیدپتاسیم اتانولی صابونی شده و سپس ماده غیرقابل صابونی به وسیله دی اتیل اتر استخراج می‌شود. جزء الکی به روش کروماتوگرافی بر روی صفحه سیلیکاژل قلیایی از ماده غیرقابل صابونی جدا می‌شود. الکل‌ها از سیلیکاژل بازیافت شده و به تری‌متیل‌سیلیل اترها تبدیل شده و با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی شناسایی و تعیین مقدار می‌شود.

۲-۴ مواد و/یا واکنشگرها

۱-۲-۴ محلول پتاسیم هیدروکسید اتانولی ۲ نرمال، ۱۳۰g هیدروکسیدپتاسیم ٪ ۸۵ را به بالن ۱۰۰۰ml منتقل و ۲۰۰ml آب مقطر به آن بیافزایید، سپس همراه با خنک‌سازی محلول، پتاسیم هیدروکسید را در آب مقطر حل کرده و با اتانول به حجم برسانید؛

یادآوری - محلول تهیه شده باید در یک ظرف شیشه‌ای تیره درب دار ذخیره شود.

۲-۲-۴ دی اتیل اتر خالص، مناسب کروماتوگرافی (به زیربند ۴-۵-۱ مراجعه شود)؛

۳-۲-۴ سدیم سولفات بدون آب؛

۴-۲-۴ صفحه شیشه‌ای پوشش داده شده با سیلیکاژل، بدون شناساننده فلئورسانسی، با ضخامت ۰,۲۵mm؛

۵-۲-۴ محلول پتاسیم هیدروکسید اتانولی ۰,۲ نرمال، ۱۳g هیدروکسیدپتاسیم ٪ ۸۵ را به بالن ۱۰۰۰ml منتقل و ۲۰ml آب مقطر به آن بیافزایید، سپس همراه با خنک‌سازی محلول، پتاسیم هیدروکسید را در آب مقطر حل کرده و با اتانول به حجم برسانید؛

- ۶-۲-۴ بنزن، مناسب کروماتوگرافی (به زیربند ۴-۵-۱ رجوع شود)؛
- ۷-۲-۴ استون، مناسب کروماتوگرافی (به زیربند ۴-۵-۱ رجوع شود)؛
- ۸-۲-۴ هگزان، مناسب کروماتوگرافی (به زیربند ۴-۵-۱ رجوع شود)؛
- ۹-۲-۴ اتیل اتر، مناسب کروماتوگرافی (به زیربند ۴-۵-۱ رجوع شود)؛
- ۱۰-۲-۴ کلروفرم، مناسب کروماتوگرافی؛
- ۱۱-۲-۴ محلول مرجع برای کروماتوگرافی لایه نازک، الکل‌های C20 تا C28 در کلروفرم با غلظت ۰٫۵٪
- ۱۲-۲-۴ محلول ۲ و ۷-دی کلروفلوئورسین در اتانول، محلول را به وسیله افزودن چند قطره محلول هیدروکسیدپتاسیم اتانلی ۲ نرمال تا حدی قلیایی کنید؛
- ۱۳-۲-۴ پیریدین بدون آب، مناسب کروماتوگرافی؛
- ۱۴-۲-۴ هگزا متیل‌دی‌سیلازن^۱؛
- ۱۵-۲-۴ تری‌متیل‌کلروسیلان^۲؛
- ۱۶-۲-۴ محلول‌های استاندارد اترهای تری‌متیل‌سیلیل الکل‌های آلیفاتیک^۳ از C20 تا C28؛
- ۱۷-۲-۴ محلول استاندارد داخلی ۱-ایکوزانول^۴ در کلروفرم ۰٫۱٪ (وزنی/حجمی)؛
- ۱۸-۲-۴ گاز حامل، هیدروژن یا هلیم مناسب کروماتوگرافی؛
- ۱۹-۲-۴ گاز کمکی، نیتروژن مناسب کروماتوگرافی.
- ۳-۴ وسایل
- ۱-۳-۴ بالن ته‌گرد، با حجم ۲۵۰ ml مجهز به کندانسور دارای اتصالات شیشه‌ای سر سمباده‌ای؛
- ۲-۳-۴ قیف جدا کننده، با حجم ۵۰۰ ml؛
- ۳-۳-۴ ارلن مایر ته‌گرد، با حجم ۲۵۰ ml؛
- ۴-۳-۴ تانک کروماتوگرافی، با ابعاد ۲۰ cm × ۲۰ cm؛

1-Hexa methyl disilazane

2-Trimethyl chlorosilane

3-Standard solutions of trimethyl silyl ethers of aliphatic alcohols from C₂₀ to C₂₈

4- 1- Eicosanol

۵-۳-۴ لامپ فرابنفش، با محدوده طول موج ۲۵۴ nm یا ۳۶۶ nm؛

۶-۳-۴ سرنگ میکرو لیتری، با حجم‌های ۱۰۰ μ l تا ۵۰۰ μ l؛

۷-۳-۴ کیف استوانه‌ای صافی‌دار، با یک سپتوم روزنه‌دار G3 (با درجه تخلخل ۱۵ μ m تا ۴۰ μ m)، دارای قطر تقریبی ۲ cm و عمق ۵ cm همراه با یک اتصال مناسب برای صاف کردن تحت خلأ و اتصال شیشه‌ای سمباده‌ای ۱۲/۲۱؛

۸-۳-۴ ارلن مخروطی ۵۰ ml، همراه با اتصال مادگی شیشه‌ای سمباده‌ای ۱۲/۲۱ که می‌تواند با کیف صافی‌دار (به زیربند ۴-۳-۷ رجوع شود) متناسب باشد؛

۹-۳-۴ لوله آزمایش ۱۰ ml، با درب و انتهای باریک؛

۱۰-۳-۴ کروماتوگرافی گازی، برای کار با ستون‌های مویینه، مجهز به:

۱-۱۰-۳-۴ محفظه دارای تنظیم دما برای ستون‌ها (آون ستون)، برای حفظ دمای مطلوب با دقت $C (\pm 1)$ ؛

۲-۱۰-۳-۴ واحد تزریق مجهز به تقسیم‌کننده با قابلیت تنظیم دما، همراه با یک قطعه تبخیرکننده شیشه‌ای از قبل سیلانیزه^۱ شده یا یک واحد تزریق سرستون؛

۳-۱۰-۳-۴ آشکارساز یونش شعله و تقویت‌کننده - تبدیل‌کننده؛

۴-۱۰-۳-۴ دستگاه انتگرال‌گیری - ثبت‌کننده^۲؛

۵-۱۰-۳-۴ ستون مویینه سیلیکای گداخته یا شیشه‌ای، با طول ۲۰ m تا ۳۰ m، قطر داخلی ۰/۲۵ mm الی ۰/۳۲ mm و فاز مایع SE-52 یا SE-54 یا معادل آن، با ضخامت لایه بین ۰/۱۰ μ m تا ۰/۳۰ μ m؛

۱۱-۳-۴ میکروسرنج برای کروماتوگرافی گازی، با حجم ۱۰ μ l همراه با سرسوزن مقاوم؛

۱۲-۳-۴ ترازوی حساس آزمایشگاهی، با دقت ۰/۱ mg.

۴-۴ آماده‌سازی مواد غیرقابل صابونی

با استفاده از یک سرنج ۱۰۰۰ میکرو لیتری، ۵۰۰ μ l از محلول ۰/۱٪، ۱-ایکوزانول در کلروفرم (به زیر-بند ۴-۲-۱۷ رجوع شود)، را درون یک ارلن ۲۵۰ ml ته صاف بریزید، به طوری که این حجم از محلول فوق حاوی مقداری از ۱-ایکوزانول شود که تقریباً معادل با ۱۰٪ از محتوای الکل‌های آلیفاتیک موجود در قسمتی از نمونه‌ای (آزمونه) باشد که برای آزمون در نظر گرفته شده است.

1- Persilanised
2- Integration- recorder

به طور مثال، برای ۵ g نمونه روغن زیتون، ۲۵۰ ml از محلول ۰٫۱٪ از ۱-ایکوزانول را اضافه کنید، و برای ۵ g روغن تفاله زیتون، ۱۵۰۰ ml از محلول ۰٫۱٪ از ۱-ایکوزانول اضافه شود. حلال آن را تحت جریان گاز نیتروژن خشک کنید و سپس ۵ g از نمونه خشک و صاف شده را در این ارلن با دقت توزین کنید.

سپس ۲۵۰ ml از محلول اتانولی پتاسیم هیدروکسید ۲ نرمال (به زیربند ۴-۲-۱ رجوع شود) را به محتویات ارلن بیافزایید و لوله تقطیرکننده برگشتی را به آن متصل نمایید و ارلن و ملحقات آن را روی یک حمام بخار قرار داده تا در هنگام حرارت دادن به آرامی بجوشد، و طی فرایند گرمادهی، محتویات ارلن را به طور مداوم هم بزنید تا ظرف به طور یکنواخت حرارت داده شود و صابونی شدن رخ دهد (محلول شفاف می‌شود).

حرارت دهی را برای ۲۰ min دیگر ادامه داده و سپس ۵۰ ml آب مقطر را از بالای لوله تقطیر وارد ارلن کنید. سپس لوله تقطیر را از ارلن جدا کرده و ارلن را تقریباً تا دمای ۳۰°C خنک کنید.

در مرحله بعد محتوای ارلن را به یک قیف جداکننده ۵۰۰ ml انتقال داده، و با کمک آب مقطر چندین بار مواد باقی مانده در ارلن را شستشو دهید و به محتوای قیف جداکننده انتقال دهید به طوری که کل آب مقطر مورد استفاده برای انتقال مواد ته ارلن به قیف، ۵۰ ml باشد. به طور تقریبی ۸۰ ml دی اتیل اتر^۱ را به محتویات قیف جداکننده اضافه نمایید و به شدت قیف جداکننده را به مدت ۳۰s تکان داده و قیف را به حالت ساکن قرار داده تا دوفاز ایجاد شود (به یادآوری ۱ رجوع شود).

فاز آبی زیرین را جدا کرده و در قیف جداکننده دوم جمع‌آوری کنید. با استفاده از ۶۰ ml الی ۷۰ ml دی اتیل اتر، استخراج را دو بار دیگر روی فاز آبی موجود در قیف جداکننده دوم انجام دهید.

یادآوری ۱- امولسیون‌های ایجاد شده را می‌توان با پاشش مقادیر اندکی الکل اتیل یا متیل با استفاده از یک اسپری، از بین برد.

استخراج‌های دی اتیل اتری در قیف جداکننده (قیف جداکننده اول) مخلوط شده و با استفاده از آب مقطر شسته شده (در هر بار شستشو ۵۰ ml) تا آب مورد استفاده برای شستشو (طی تیترا با یک قلیا) خنثی شود (در هر بار شستشو با آب، به آب شستشوی جدا شده و دور ریز، چند قطره فنل فتالین اضافه کنید، در صورتی که آب شستشو بی‌رنگ شد، شستشو با آب را متوقف کنید).

آب شستشو را دور ریخته، و استخراج دی اتیل اتری را از کاغذ صافی که حاوی مقدار کافی از سدیم سولفات بدون آب (به زیربند ۴-۲-۳ رجوع شود) است، عبور دهید تا خشک شود (در این مرحله آب یا رطوبت باقی مانده از مرحله شستشوی با آب حذف می‌شود) و مایع صاف شده را در یک ارلن ۲۵۰ ml که از قبل توزین شده است، جمع‌آوری کنید.

قیف و صافی باید با مقادیر اندکی از دی اتیل اتر شسته شوند که این نیز باید به محتویات ارلن اضافه شود.

۱- در صورتی که عمل صابونی شدن به طور کامل انجام شده باشد، می‌توان به جای دی اتیل اتر از پترولیوم بنزن نیز استفاده کرد.

سپس دی‌اتیل‌اتر درون ارلن را تبخیر کرده تا حجم آن به چند میلی‌لیتر برسد، چند قطره باقی‌مانده دی‌اتیل‌اتر را تحت خلاء یا تحت جریان گاز نیتروژن قرار داده تا کاملاً خشک شود.

خشک کردن محتویات ارلن را با قرار دادن آن در آون با دمای 100°C به مدت پانزده دقیقه کامل کنید و سپس ارلن را داخل دسیکاتور قرار داده تا خنک شود و بعد توزین کنید.

۴-۵ جداسازی اجزاء الکی

۴-۵-۱ آماده‌سازی صفحات کروماتوگرافی لایه نازک

صفحات سیلیکاژل (به زیربند ۴-۲-۴ رجوع شود) را به مدت ۱۰s، به طور کامل در محلول پتاسیم هیدروکسید 0.2N (به زیربند ۴-۲-۵ رجوع شود) غوطه‌ور کرده و سپس صفحات را به مدت ۲h در زیر هود قرار دهید تا خشک شوند. در نهایت صفحات را در دمای 100°C به مدت ۱h در آون قرار دهید (به یادآوری ۲ رجوع شود). صفحات را از آون در آورده و در دسیکاتور حاوی کلرید کلسیم نگه‌دارید تا در زمان مورد نیاز استفاده شوند (صفحات تیمار^۱ شده به این روش باید حداکثر ظرف ۱۵ روز مورد استفاده قرار گیرند).

یادآوری ۲ - هنگامی که صفحات سیلیکاژل قلیایی برای جداسازی جزء الکی مورد استفاده قرار می‌گیرند، نیازی به تیمار مواد غیرقابل صابونی با آلومینا نیست. در نتیجه، تمامی ترکیبات اسیدی (اسیدهای چرب و سایر ترکیبات) از طریق به‌دست آوردن نوارهای الکل تری‌ترپنیک و الکل آلیفاتیکی که هر دو به شکل مشخصی از نوار استرول جدا شده‌اند، در ابتدا باقی می‌مانند.

در مرحله بعد مخلوطی از دی‌اتیل‌اتر و هگزان به نسبت ۳۵ ml به ۶۵ ml را تهیه کرده و در تانک توسعه کروماتوگرافی لایه نازک، تا عمق ۱cm بریزید (به یادآوری ۳ رجوع شود).

یادآوری ۳ - در موارد خاص، هنگامی که جداسازی مناسب نیست، باید از مخلوط حلال شستشو دهنده بنزن و استون به نسبت ۹۵ ml به ۵ ml، به منظور دستیابی به تمایز مشخص نوار جدا شده، مورد استفاده قرار گیرد.

با استفاده از یک پوشش مناسب درب تانک توسعه را ببندید و به مدت 0.5h اجازه دهید تا تعادل بخار و مایع رخ دهد. نوارهای کاغذ صافی غوطه‌ور در حلال شویش را می‌توان به درون سطوح داخلی تانک چسبانده تا زمان توسعه (پیشروی^۲) را تقریباً تا یک-سوم کاهش داد تا ترکیبات شسته شده یکنواخت و منظمی به دست آید.

یادآوری ۴ - به منظور آنکه شرایط توسعه تجدیدپذیر به دست آید، محلول توسعه (مخلوط دی‌اتیل‌اتر و هگزان به نسبت ۳۵ ml به ۶۵ ml) را باید برای هر آزمون تعویض نمود.

1- Treatment
2- Developmet time

به طور تقریبی محلول ۵٪ از ماده غیرقابل صابونی (به زیربند ۴-۴ رجوع شود) در کلروفورم را تهیه کرده و ۰/۳ ml از محلول را با استفاده از سرنگ میکرولیتری، ۱۰۰ µl روی صفحه TLC، در فاصله تقریباً ۲cm از انتهای صفحه TLC، به صورت یک نوار یکنواخت با ضخامت حداقل، لکه گذاری کنید، به طوری که به صورت خطی پرننگ و یکنواخت درآید.

به منظور آن که نشان داده شود که نوار الکل‌های آلیفاتیک بعد از خروج TLC از تانک توسعه، پیشروی کامل داشته‌اند، هم‌تراز با مبدا، ۲ µl تا ۳ µl از محلول مرجع الکل‌های آلیفاتیک (به زیربند ۴-۲-۱۱ رجوع شود) نیز بر روی صفحه TLC لکه گذاری می‌شود.

صفحه TLC را داخل تانک توسعه، همانطور که در زیربند ۴-۵-۱ اشاره شد، قرار دهید. دمای محیط باید بین ۱۵ °C تا ۲۰ °C باقی بماند. سریعاً درب تانک توسعه را ببندید و اجازه دهید تا حلال شویش تقریباً به فاصله ۱ cm از لبه صفحه (از انتهای صفحه که در حلال قرار ندارد) برسد. سپس صفحه TLC را از تانک توسعه خارج ساخته و حلال را تحت جریان هوای داغ تبخیر کنید یا صفحه را برای مدتی زیر هود قرار داده تا خشک شود.

پس از خشک شدن صفحه TLC، محلول ۷۲-دی کلروفلوروسین را به آرامی و به طور یکنواخت روی صفحه اسپری کنید و سپس زیر نور لامپ ماوراء بنفش بررسی کنید. نوار الکل‌های آلیفاتیک را می‌توان از طریق نوار هم‌تراز شده حاصل از لکه محلول مرجع شناسایی کرد. حدود پیرامون و خطوط کلی نوار الکل‌های آلیفاتیک و نواری که بلافاصله بالای آن قرار گرفته است نمایانگر نوار الکل‌های تری‌ترپنیک می‌باشد، آن‌ها را با یک مداد سیاه علامت گذاری کنید (به یادآوری ۵ رجوع شود).

یادآوری ۵ - نوار الکل‌های آلیفاتیک و نوار الکل‌های تری‌ترپنیک باید با هم جمع‌آوری شوند، زیرا احتمال مهاجرت برخی از الکل‌های آلیفاتیک به داخل نوار الکل‌های تری‌ترپنیک وجود دارد. یک مثال از جداسازی TLC در پیوست الف ارائه شده است.

در مرحله بعد با استفاده از یک اسپاچول^۱ یا کاردک آزمایشگاهی ناحیه علامت‌گذاری شده در سیلیکاژل روی صفحه TLC را بتراشید. سیلیکاژل تراشیده شده را در درون کاغذ صافی قرار داده و در یک قیف بریزید. ۱۰ ml از کلروفورم داغ (در حال جوش) را به آن اضافه کنید، با دقت توسط اسپاچول حلال و مواد ریز روی کاغذ صافی را مخلوط کرده و تحت خلاء ماده را صاف کنید، ماده صاف شده را در یک ارلن مخروطی متصل به قیف صافی جمع‌آوری کنید.

سیلیکاژل باقی‌مانده بر روی کاغذ صافی را سه بار با اتیل‌اتر (هر بار تقریباً ۱۰ ml) شستشو دهید و ماده صاف شده را در همان ارلن متصل به قیف جمع‌آوری کنید. مایع صاف شده را تا حجم ۴ ml تا ۵ ml تبخیر کنید، محلول باقی‌مانده را به لوله آزمایش ۱۰ ml از قبل توزین شده، انتقال دهید، و به وسیله حرارت ملایم در جریان آرام از گاز نیتروژن تبخیر کنید تا خشک شود. چند قطره حلال استون به ماده

1-Spatul

خشک شده اضافه کرده و دوباره استون را تبخیر کنید تا خشک شود. لوله حاوی مواد خشک شده را در آونی به دمای 105°C به مدت تقریبی ۱۰s قرار دهید و اجازه دهید تا ارلن در یک دسیکاتور خنک شود و سپس آن را توزین نمایید. مواد باقی مانده درون لوله آزمایش، حاوی جزء الکلی است.

۴-۶ آماده سازی تری متیل سیلیل اترها

معرف سیلیله مخلوطی از پیریدین^۱، هگزامتیل دی سیلان و تری متیل کلروسیلان، به نسبت حجمی ۹ : ۳ : ۱ (به یادآوری ۶ رجوع شود) است که به نسبت ۵۰μl برای هر میلی گرم از الکل های آلیفاتیک، بدون جذب رطوبت (به یادآوری ۷ رجوع شود)، به لوله آزمایش حاوی جزء الکلی اضافه می شود.

یادآوری ۶- محلول های سیلیله به طور آماده و به صورت تجاری در دسترس هستند. سایر شناساگرهای سیلیله کردن از قبیل، بیس- تری متیل سیلیل، تری فلئوراستامید به انضمام ۱٪ تری متیل کلروسیلان بوده که به طور تجاری در دسترس است و باید به وسیله یک حجم معادل از پیریدین بدون آب رقیق شود.

یادآوری ۷- کدورت اندکی که ممکن است در اثر افزودن ترکیب سیلیله ایجاد شود، طبیعی است و هیچ نوع تداخل یا مزاحمتی ایجاد نمی کند. تشکیل رسوب سفید یا پیدایش رنگ صورتی نمایانگر وجود رطوبت یا خرابی شناساگر است. اگر در هنگام آزمون چنین حالتی رخ داد، آزمون باید دوباره تکرار شود.

درب لوله آزمایش را ببندید و با دقت (بدون آنکه لوله را وارونه کنید) تکان دهید تا اینکه الکل های آلیفاتیک به طور کامل حل شوند. لوله آزمایش را حداقل ۱۵ min در دمای محیط نگه دارید و سپس برای چند دقیقه سانتریفوژ نمایید. محول شفاف، برای تجزیه و تحلیل با کروماتوگرافی گازی آماده است.

۴-۷ جداسازی و شناسایی با کروماتوگرافی گازی

۴-۷-۱- عملیات مقدماتی، نصب و راه اندازی ستون

ستون کروماتوگرافی گازی را نصب کنید، انتهای ورودی ستون را به تزریق کننده متصل به سامانه تقسیم کننده وصل کنید و انتهای خروجی ستون را به آشکارساز متصل نمایید. یک کنترل کلی از نصب ستون کروماتوگرافی گازی (درست بودن نصب ها و اتصالات گازی، کارایی آشکارساز، کارایی سامانه تقسیم کننده و سامانه ثبت کننده و غیره) را انجام دهید.

اگر ستون برای اولین بار مورد استفاده قرار می گیرد، پیشنهاد می شود که ستون به وضعیت دلخواه شرایط کاری در آید. جریان کمی از گاز حامل را از درون ستون موئینه عبور داده و سپس ستون کروماتوگرافی به تدریج حرارت داده می شود تا اینکه دما به کمتر از 20°C از بالاترین دمای عملیاتی ستون (به یادآوری ۸ رجوع شود) برسد و در این دما برای بیش از ۲h باقی بماند و سپس شرایط عملیاتی را برای دستگاه اجراء نمایید (تنظیم جریان گاز، روشن کردن شعله تقسیم، اتصال به ثبات الکترونیکی، تنظیم دمای آون ستون موئینه، آشکارساز، تزریق کننده و غیره). سیگنال در حساسیتی که کمتر از دو برابر بیشترین مقدار

۱- به جای پیریدین می توان از استونیتریل استفاده کرد.

در نظر گرفته شده برای انجام آزمون است، تنظیم می‌شود. مسیر خط پایه باید به طور خطی، و بدون هر نوع پیکی و بدون انحراف باشد. انحراف منفی خط - مستقیم، نشان دهنده نشتی اتصالات ستون است، و انحراف مثبت، نشان دهنده آن است که ستون هنوز به وضعیت دلخواه شرایط کاری نرسیده است.

یادآوری ۸ - دمای مناسب برای به وضعیت مطلوب در آوردن ستون باید کمتر از 20°C از حداکثر دمای در نظر گرفته شده، برای فاز مایع به کار رفته در داخل ستون باشد.

۸-۴ انتخاب شرایط عملیاتی

شرایط عملیاتی برای سامانه کروماتوگرافی گازی دارای یک تجهیز تزریق کننده مقسم (تقسیم‌کننده) به شرح زیر است:

۴-۸-۱ دمای ستون: دمای اولیه ستون 180°C به مدت ۸ min در شرایط هم دمایی و سپس با برنامه‌ریزی دمایی با سرعت $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ به دمای 260°C برسد و در این دما به مدت زمان ۱۵ min باقی بماند؛

۴-۸-۲ دمای تزریق‌کننده: 280°C ؛

۴-۸-۳ دمای آشکارساز: 290°C ؛

۴-۸-۴ سرعت خطی گاز حامل: گاز هلیوم با سرعت 20 cm/s الی 35 cm/s و هیدروژن با سرعت 30 cm/s الی 50 cm/s ؛

۴-۸-۵ نسبت تقسیم‌کننده: ۱ به ۵۰ تا ۱ به ۱۰۰؛

۴-۸-۶ حساسیت دستگاه: ۴ تا ۱۶ برابر حداقل میرایی (آستانه)؛

۴-۸-۷ حساسیت ثبات: 1 fsmV تا ۲؛

۴-۸-۸ سرعت کاغذ: 30 cm/h تا 60 cm/h ؛

۴-۸-۹ مقدار ماده تزریق شده: $0.5\text{ }\mu\text{l}$ تا $1\text{ }\mu\text{l}$ از محلول TMSE (محلول سیلیله).

شرایط بالا را می‌توان مطابق با ویژگی‌های ستون و دستگاه کروماتوگرافی گازی تغییر داد تا کروماتوگرام‌های مناسبی طبق شرایط زیر به دست آید:

- زمان بازداری الکل C26 باید 18 ± 5 باشد.

- پیک الکل C22 باید $80 \pm 20\%$ مقدار مقیاس کل برای روغن زیتون و $40 \pm 20\%$ مقدار مقیاس کل برای روغن تفاله زیتون باشد.

الزامات بالا به وسیله تکرار تزریق مخلوط TMSE از الکل‌ها، کنترل و شرایط عملیاتی مناسب برای کسب بهترین نتایج ممکن، تنظیم می‌شود. به منظور آن که ارزیابی صحیحی از نواحی پیک‌های مورد نظر به دست آید سنج‌ها (پارامترها) برای انتگرال‌گیری پیک‌ها باید تنظیم شود.

۹-۴ روش تجزیه و تحلیل (آنالیز)

با استفاده از سرنگ میکرولیتری با حجم ۱۰ μl، حدود ۱ μl از هگزان و به دنبال آن ۰٫۵ μl هوا و سپس ۰٫۵ μl تا ۱ μl از محلول نمونه را به داخل سرنگ بکشید، پیستون سرنگ را بیشتر بالا کشیده تا درون سرسوزن خالی شود. سوزن را در محل تزریق فروبرده و بعد از یک تا دو ثانیه به سرعت تزریق کنید، سپس سر سوزن را بعد از ۵ s بیرون بکشید.

ثبات دستگاه تا زمانی که TMSE الکل‌های آلیفاتیک موجود در نمونه به طور کامل شسته شود، به کار خود ادامه می‌دهد. خط پایه همیشه باید مطابق با زیر بند ۴-۷-۱ باشد.

۱۰-۴ شناسایی پیک

شناسایی پیک‌ها، به طور جداگانه، مطابق با زمان‌های بازداری و با مقایسه با مخلوط استاندارد TMSE انجام شده و تحت شرایط مشابه آزمون می‌شود.

مثال‌هایی از کروماتوگرام‌های جزء الکی روغن زیتون پالایش شده در پیوست الف نشان داده شده است.

۱۱-۴ ارزیابی کمی

نواحی پیک ۱-ایکوزانول و الکل‌های آلیفاتیک C22، C24، C26 و C28 به وسیله انتگرال‌گیری با استفاده از نرم‌افزار رایانه به صورت خودکار محاسبه می‌شود.

محتوای هر الکل آلیفاتیک، بر حسب mg در ازاء هر ۱۰۰۰ g ماده چرب بیان می‌شود و از فرمول یک محاسبه می‌شود:

$$alcohol X = \frac{A_x \times m_s \times 1000}{A_s \times m} \quad (1) \text{ فرمول}$$

که در آن:

A_x مساحت سطح زیر پیک الکل x؛

A_s مساحت سطح زیر پیک ۱-ایکوزانول؛

m_s جرم ۱-ایکوزانول بر حسب mg؛

m جرم نمونه اولیه برای اندازه‌گیری برحسب g.

۵ بیان نتایج

محتوای الکل‌های آلیفاتیک به طور جداگانه برحسب mg در ازاء 1000g از ماده چرب و مجموع الکل‌های آلیفاتیک کل، گزارش می‌شود.

۶ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید دارای آگاهی‌های زیر باشد:

۱-۶ تمام داده‌های ضروری برای شناسایی کامل نمونه؛

۲-۶ روش نمونه‌برداری به کار برده شده با مرجعیت این استاندارد ملی، اگر تعیین شده باشد؛

۳-۶ روش آزمون مورد استفاده مطابق با این استاندارد ملی ایران به شماره ۹۷۱۱: سال ۱۳۸۶؛

۴-۶ همه جزئیات انجام آزمون که در این استاندارد ملی ایران مشخص نشده، یا به صورت اختیاری مورد توجه قرار داده شده است، همراه با جزئیات هر پدیده‌ای که در هنگام اجرای روش آزمون رخ داده و می‌تواند بر نتیجه آزمون اثرگذار باشد؛

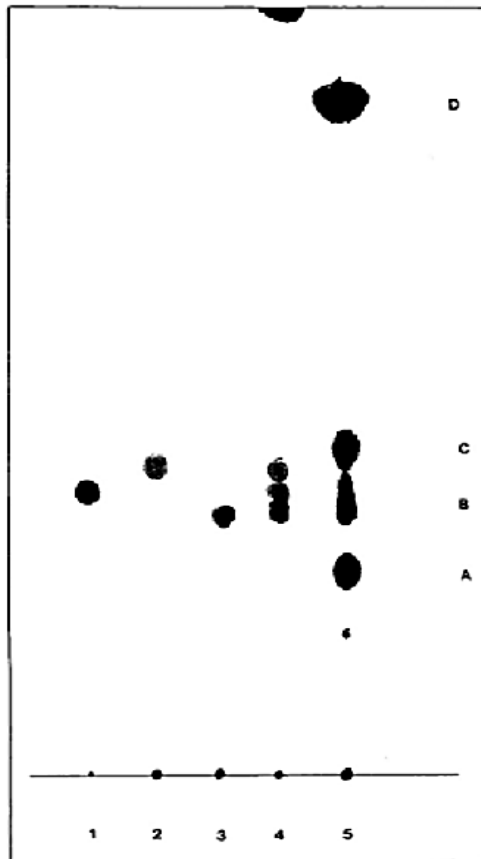
۵-۶ نام و نام خانوادگی و امضاء آزمایش‌کننده؛

۶-۶ تاریخ و محل انجام آزمون.

پیوست الف

(آگاهی دهنده)

مثالی از جداسازی TLC و مثال‌هایی از کروماتوگرام

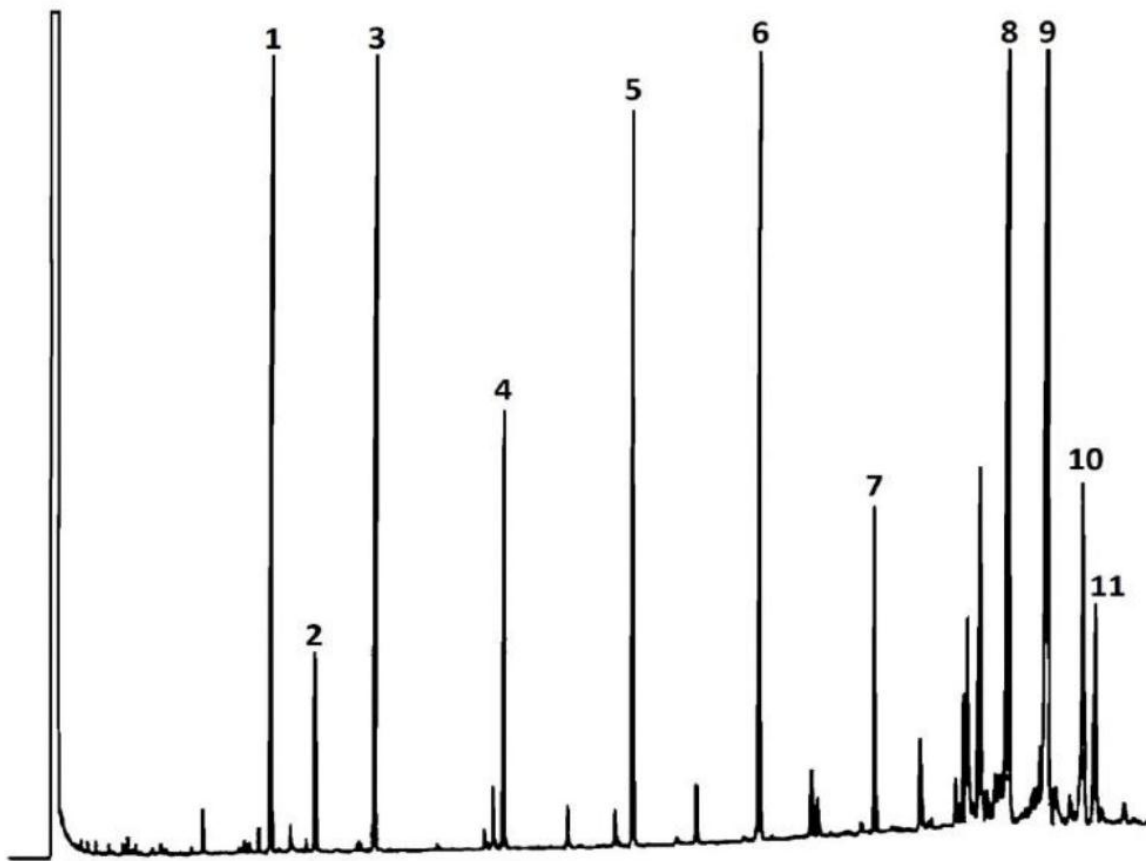


راهنما:

A	استرول‌ها	۱	الکل C ₂₆
B	الکل‌های آلیفاتیک	۲	الکل C ₃₀
C	الکل‌های تری‌ترپنیک	۳	الکل C ₂₀
D	اسکوالن	۴	مخلوط الکل‌های C ₂₀ -22-26-30
		۵	ماده غیرقابل صابونی روغن زیتون فراپکر

شکل ۱- صفحه کروماتوگرافی لایه نازک جزء غیرقابل صابونی روغن زیتون شسته شده با هگزان: دی‌اتیل‌اتر

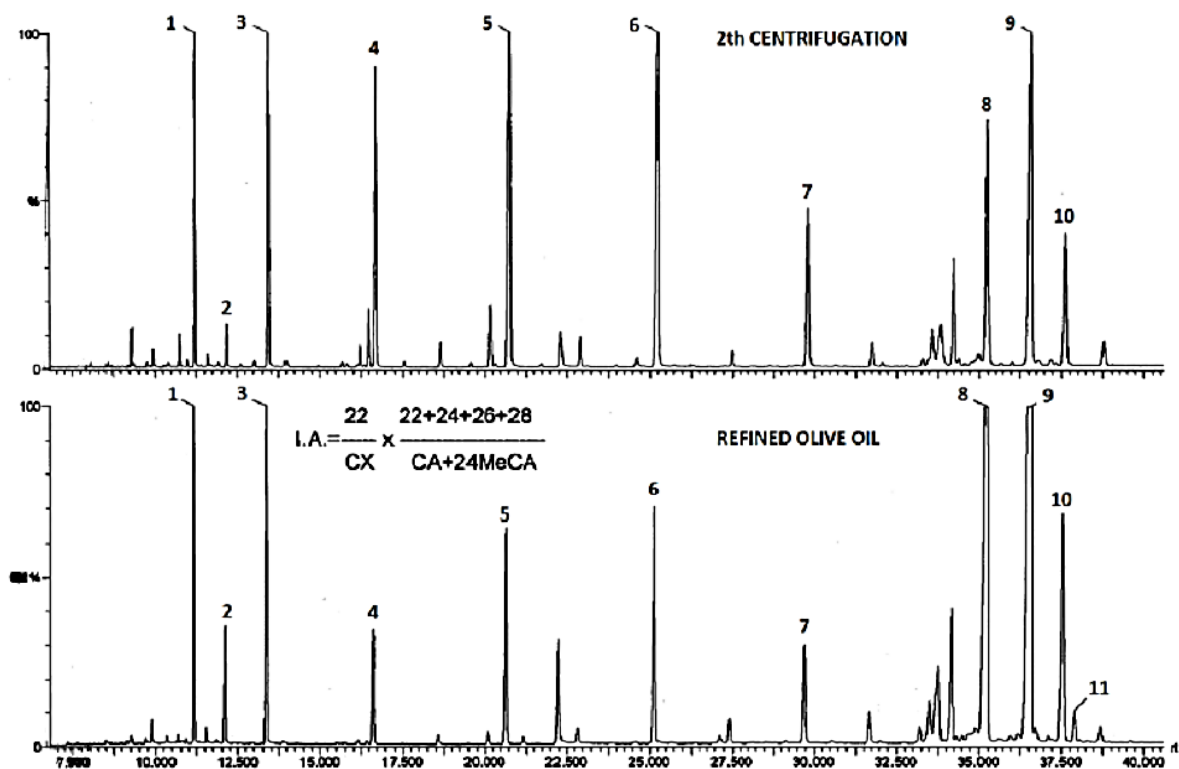
(۳۵:۶۵)



راهنما:

۹	۲۴- متیلن سیکلوآرتنول	۵	الکل C ₂₄	۱	فیتول
۱۰	سیترواستادینول	۶	الکل C ₂₆	۲	ژرانیل ژرانیول
۱۱	سیکلوبرانول	۷	الکل C ₂₈	۳	الکل C ₂₀
		۸	سیکلوآرتنول	۴	الکل C ₂₂

شکل ۲- کروماتوگرام جزء الکی روغن زیتون پالایش شده



راهنما:

۹	۲۴- متیلن سیکلوآرتنول	۵	الکل C ₂₄	۱	فیتول
۱۰	سیترواستادینول	۶	الکل C ₂₆	۲	ژرانیل ژرانیول
۱۱	سیکلوبرانول	۷	الکل C ₂₈	۳	الکل C ₂₀
		۸	سیکلوآرتنول	۴	الکل C ₂₂

شکل ۳- الکل های تری ترپنیک و آلیفاتیک یک روغن زیتون پالایش شده و روغن زیتون حاصل از سانتریفوژ

دوم