



## تشخیص تقلب افزودن روغن‌های گیاهی (پالم، سویا و ذرت) به روغن زیتون با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و پروفایل توکوفرول‌ها و توکوتری‌انول‌ها

الهام بنفشه‌چین<sup>۱</sup>، سجاد پیرسا<sup>۲\*</sup>، صابر امیری<sup>۳</sup>

- ۱- کارشناس آزمایشگاه معاونت غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.  
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.  
۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

### اطلاعات مقاله

### چکیده

تاریخ‌های مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۶

### کلمات کلیدی:

توکوفرول،

توکوتری‌انول،

روغن پالم،

روغن سویا،

روغن ذرت،

روغن زیتون.

DOI: 10.52547/fsct.18.117.229

\* مسئول مکاتبات:

pirsa7@gmail.com

روغن زیتون به دلیل خواص و ویژگی‌های منحصر به فرد از نظر تغذیه‌ای جایگاه بسیار بالا و شناخته شده‌ای را در جوامع مختلف به خود اختصاص داده است، ولی با توجه به قیمت بالای این محصول همواره مورد تهدید برای انواع تقلبات است. توکوفرول‌ها و توکوتری‌انول‌ها در چربی‌ها و روغن‌ها به مقدار کمی (حدود ۰/۳۵ درصد) وجود دارند. در این تحقیق تقلب افزودن روغن‌های گیاهی (پالم، سویا و ذرت) به روغن زیتون به روش مقایسه پروفایل توکوفرول‌ها و توکوتری‌انول‌ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مورد بررسی قرار گرفت. از طرح آماری مخلوط<sup>۱</sup> برای طراحی آزمایشات مربوط به اندازه‌گیری توکوفرول‌ها استفاده شد. نمونه‌های روغن تقلب شده پس از حل شدن در n-هگزان به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با ستون کروماتوگرافی NH<sub>2</sub> و دتکتور فلورسانس طول موج ۲۹۴ و ۳۲۰ نانومتر به ترتیب برای تحریک و نشر جهت شناسایی و آنالیز توکوفرول‌ها و توکوتری‌انول‌ها تزریق شد. در بین تمامی توکوفرول‌ها و توکوتری‌انول‌ها، آلفاتوکوفرول در روغن زیتون غالب بود. لذا در صورت ترکیب با سایر روغن‌ها ترکیب اولیه توکوفرول‌ها تغییر می‌یابد. از بین روغن‌هایی که به روغن زیتون اضافه شده اند، روغن پالم تأثیر بسیار چشمگیر و قابل توجهی در مساحت پیک توکوتری‌انول‌ها داشت. روغن پالم و ذرت تأثیر بسزایی بر روی پیک بتاتوکوفرول داشت. در مخلوط روغن زیتون با روغن ذرت و سویا، مقدار گاما-توکوفرول به طور قابل توجهی افزایش یافت. روغن سویا تأثیر بسزایی بر روی پیک دلتاتوکوفرول داشت. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که دلتاتوکوفرول شاخص شناسایی تقلب افزودن روغن سویا در روغن زیتون است. نتایج به دست آمده نشان داد که ارتباط معنی‌دار بین میزان توکوفرول‌ها و توکوتری‌انول‌ها و تقلب افزودن روغن‌های پالم، سویا و ذرت به روغن زیتون وجود دارد. بنابراین روش ارائه شده روش مناسبی برای شناسایی و تعیین تقلبات روغن زیتون می‌باشد.

1. mixture design Design Expert 10.0 software

## ۱- مقدمه

روغن‌ها و چربی‌ها دارای کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی و تولید محصولات و فرآورده‌هایی غذایی هستند. به دلیل اهمیت اقتصادی آن‌ها گاهی افراد سودجو برای کسب درآمد بیشتر به تقلب‌های مختلف دست می‌زنند. تقلب در مواد غذایی به اشکال مختلفی انجام می‌گیرد. نظیر جایگزین کردن و تغییر کلی مواد اصلی با مواد دیگر، مخلوط کردن مواد غذایی با مواد ارزان‌تر، پنهان کردن کیفیت، فروختن مواد غذایی فاسد، تعویض برچسب در روغن‌ها، تقلب‌ها به دو صورت مخلوط کردن روغن‌های دارای ارزش اقتصادی بالا با انواع ارزان‌تر و یا تقلب به صورت اشتباه در اطلاع‌رسانی برچسب از لحاظ منشأ جغرافیایی، نوع واریته و روش تولید هستند [۱-۳].

با توجه به اهمیت و جایگاه زیتون به عنوان میوه‌ای روغنی و ارزشمند از لحاظ اقتصادی، در سال‌های اخیر تحقیقات انجام گرفته در زمینه فواید تغذیه‌ای آن باعث افزایش تمایل مردم نسبت به مصرف و در نتیجه رشد تولید این محصول در ایران و جهان شده است. روغن زیتون به علت داشتن اسیدهای چرب غیراشباع در معرض انواع فساد از جمله واکنش‌های آنزیمی و اکسایش لیپیدی است [۴]. نوع و میزان ترکیبات شیمیایی موجود در روغن زیتون (از جمله ترکیب اسیدهای چرب، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و رنگدانه‌ها) نشان دهنده کیفیت آن است که خود به چندین عامل مانند رقم، شرایط اقلیمی، روش استخراج و مرحله رسیدگی میوه زیتون بستگی دارد [۵]. تحقیقات نشان داده است که میزان توکوفرول‌ها به نوع رقم، میزان پلی‌فنول‌ها به منطقه کشت گیاه و میزان اسیدهای چرب به هر دوی این عوامل بستگی دارد [۶، ۷]. بنا به این دلایل، روغن‌های زیتون ایرانی دارای ساختار شیمیایی و پایداری اکسایشی متفاوتی هستند. زیتون و روغن آن منبع غنی از اسیدهای چرب غیراشباع و ترکیباتی که بیش‌ترین آن‌ها عبارتند از: آلفاتوکوفرول<sup>۱</sup>، گاماتوکوفرول<sup>۲</sup>، اسکوالن<sup>۳</sup>، کاروتنوئیدها<sup>۴</sup>، الکل‌های آلیفاتیک<sup>۵</sup>، کلروفیل‌ها<sup>۶</sup>، استرول‌ها<sup>۷</sup>، هیدروکسی تیروزول<sup>۸</sup>، تیروزول<sup>۹</sup>،

اسیدهای فنولیک<sup>۱۱</sup> (اسید کافئیک<sup>۱۲</sup>، اسید وانیلیک<sup>۱۳</sup> و اسید سیرینجیک<sup>۱۴</sup>)، لیگنان‌ها<sup>۱۵</sup>، اولئوروپین آگلیکون<sup>۱۶</sup>، اولئوروپین<sup>۱۷</sup>، دی‌متیل اولئوروپین<sup>۱۸</sup> و لیگ استروئید<sup>۱۹</sup>. در سال‌های اخیر، ماده اولئوکانتال<sup>۲۰</sup> در روغن زیتون شناخته شده، که مسئول خواص ضدالتهابی روغن زیتون است [۸-۱۱]. روغن زیتون تنها روغنی است که بلافاصله پس از استخراج قابل مصرف بوده و به عملیات ثانویه نیاز ندارد. پایداری اکسایشی و ارزش تغذیه‌ای روغن زیتون نسبت به روغن‌های گیاهی دیگر به دلیل وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی، بیشتر است. روغن زیتون تصفیه شده، روغنی است که به روش شیمیایی تصفیه شده تا هم طعم تند آن که به عنوان یک نقص و ایراد محسوب می‌شود و هم مقدار اسید آن (اسیدهای چرب آزاد آن) خنثی گردد. فرآیند تصفیه معمولاً شامل تصفیه روغن زیتون بکر با کیفیت پایین و یا تصفیه روغن زیتون لامپانت همراه با هیدروکسیدسدیم می‌باشد تا اسیدیته آزاد آن خنثی گردد. در طی مراحل مختلف تصفیه، روغن زیتون تحت تاثیر دماهای بالا قرار می‌گیرد. هنگامی که دما از نقطه دود بالاتر رود، در مورد تغییرات ناخواسته نگرانی پیش می‌آید و تشکیل اسیدهای چرب ترانس، به ویژه ایزومرهای ترانس لینولئیک و لینولنیک اسید از حد استاندارد فراتر می‌رود. از طرف دیگر فرآیند تصفیه، بیشتر ترکیبات آنتی‌اکسیدانی روغن زیتون را حذف می‌کند و پلی‌فنل‌های آن را از بین می‌برد [۱۲-۱۵].

روغن پالم با روغن هسته پالم متفاوت است. روغن پالم روغنی خوراکی است که از قسمت گوشتی میوه درخت نخل روغنی استخراج شده و اما روغن هسته پالم از مغز هسته‌های میوه پالم استخراج و از نظر ترکیب و خصوصیات فیزیکی با روغن پالم متفاوت و مضار و بازار جداگانه‌ای دارد. این دو روغن دارای ترکیب شیمیایی و ویژگی‌های فیزیکی متفاوت هستند [۱۶].

9. Hydroxytyrosol
10. Tyrosol
11. Phenolic acids
12. Caffeic acid
13. Vanilic acid
14. Syringic acid
15. Lignans
16. Oleuropein aglycone
17. Oleuropin
18. Dimethyl oleuropein
19. Steroid Lig
20. Oleocanthal

2. Alpha-Tocopherol
3. Gamma-Tocopherol
4. squalene
5. Carotenoid
6. Aliphatic Alcohols
7. Chlorophyll
8. Sterols

افزایش خطر بیماری قلبی عروقی می‌شود. روغن‌های مورد استفاده در سید غذایی افراد باید زیر ۲ درصد اسید چرب اشباع و ترانس داشته باشند [۲۳].

روغن ذرت دارای پایداری زیادی نسبت به اکسیداسیون بوده و برای مصارف مختلفی از جمله: پخت، سرخ کردن و روغن سالاد مناسب می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی نحوه توزیع اسیدهای چرب نشان می‌دهد که در حدود ۹۸ درصد اسیدهای چرب غیراشباع در وضعیت بتا و اسیدهای چرب اشباع بیشتر در موقعیت آلفا تری‌گلیسرید قرار گرفته‌اند که این امر پایداری روغن را در برابر حرارت افزایش می‌دهد [۲۴]. از دیگر دلایل پایداری روغن ذرت در برابر اکسیداسیون، وجود مواد آنتی‌اکسیدان طبیعی در آن مانند اسید فولیک و توکوفرول‌ها است. از نظر میزان توکوفرولها، روغن ذرت پس از روغن جوانه گندم در مقام دوم قرار دارد. روغن ذرت منبع خوبی از ویتامین E بوده و ۱۰-۲۰ درصد این ویتامین را در هر وعده غذایی که معادل ۱۴ گرم است، تامین می‌نماید. همچنین روغن ذرت فاقد کرومیل می‌باشد. این رنگ‌دانه‌ها اکسیداسیون روغن را در خصوص نور تسریع می‌نمایند [۲۵]. این روغن دارای بالاترین سطح موادغیر قابل صابونی (۱/۳ تا ۲/۳ درصد) نسبت به سایر روغن‌های گیاهی است. سه جزء اصلی شیمیایی در مواد غیر قابل صابونی شدن روغن ذرت عبارتند از: فیتواسترول، توکوفرول و اسکوالن روغن ذرت از دیرباز به عنوان یک منبع غنی توکوفرول شناخته شده است [۲۶]. گاماتوکوفرول فراوان ترین توکوفرول موجود در روغن ذرت است، به دنبال آن آلفاتوکوفرول و سپس دلتاتوکوفرول در روغن ذرت مشاهده می‌شود. شواهد اخیر نشان می‌دهد که گاماتوکوفرول در جلوگیری از اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های کم تراکم و در تاخیر در تشکیل ترومبوز از آلفاتوکوفرول موثرتر می‌باشد [۲۷].

روغن سویا نوعی روغن گیاهی خوراکی است که از سویا (با گلیسیرین بالا) با استفاده از عملیات حرارتی با دانه‌های ترک خورده و حلال‌های مختلف استخراج می‌شود. روغن خام مخلوط و تصفیه شده است تا خوراکی آن درست شود [۲۸]. روغن سویا یک روغن گیاهی است که از سویا به دست می‌آید و از لحاظ علمی به عنوان گلیسین ماکس<sup>۲۲</sup> شناخته می‌شود. این روغن یکی

روغن پالم مثل همه چربی‌ها از اسیدهای چرب و گلیسرول تشکیل شده‌است و اسیدهای چرب اشباع فراوانی دارد که در دمای اتاق جامد هستند. روغن پالم اسم خود را از پالمیتیک اسید گرفته‌است. روغن پالم خام قسمت اعظمی از منابع طبیعی توکوتری‌انول است [۱۷]. به گفته سازمان بهداشت جهانی شواهد قانع‌کننده‌ای وجود دارد که نشان می‌دهد مصرف پالمیتیک اسید احتمال ابتلا به بیماری‌های قلبی و عروقی را افزایش می‌دهد؛ بنابراین آن را به عنوان اسیدهای چرب ترانس طبقه‌بندی می‌نمایند. مصرف روغن پالم موجب افزایش چربی خون و کلسترول و در نهایت گرفتگی و انسداد عروق می‌شود [۱۸]. حدود ۵۰٪ اسیدهای چرب موجود در روغن نخل اشباع شده و حدود ۵۰ درصد غیراشباع هستند. این تعادل بین اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع اندیس ید روغن (حدود ۵۳) و مقاومت در برابر اکسیداسیون در مقایسه با سایر روغن‌های گیاهی توجیه می‌کند [۱۹]. روغن پالم خلص حاوی توکوفرول و توکوتری‌انول در محدوده ۶۰۰ تا ۱۰۰۰ ppm می‌باشد. روغن پالم تصفیه شده حدود ۵۰ درصد از این محصولات را حفظ می‌کند. توکوفرول‌ها و توکوتری‌انول‌ها آنتی‌اکسیدان‌ها هستند و برخی از محافظت‌های اکسیدکننده طبیعی را به روغن می‌دهند. آلفاتوکوفرول و گاماتوکوفرول بخش عمده ای از توکوفرول‌های کل و توکوتری‌انول‌های موجود در روغن پالم را تشکیل می‌دهند. مقالات و تحقیقات حضور توکوفرول‌ها و توکوتری‌انول‌ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا را تایید می‌کند و همچنین حضور احتمالی اشکال استریسی<sup>۲۱</sup> را نشان می‌دهد [۲۰]. اثر ترکیبی خواص کاروتنوئیدها، توکوفرول‌ها، توکوترینول‌ها و ۵۰ درصد اسیدهای چرب غیراشباع روغن پالم، پایداری اکسیداتیو آن نسبت به سایر روغن‌های گیاهی را توجیه می‌کند [۲۱]. کاربرد روغن پالم در غذاها شامل استفاده از آن در مواد غذایی حاوی امولسیون، پودر و مواد غذایی آماده است. خامه لبنی به طور سنتی در بستنی استفاده می‌شود، اما روغن پالم و روغن هسته پالم ممکن است برای جایگزینی آن استفاده شود. به همین ترتیب، روغن پالم ممکن است جایگزین چربی شیر در تولید شیر بازسازی شده شود [۲۲]. مصرف زیاد روغن پالم در رژیم غذایی باعث افزایش سطح کلسترول سرم و به تبع آن

و فرآیند پیری را کند می‌کند. این ویتامین دارای خواص آنتی اکسیدان و ضد اشعه قدرتمند خورشید است. اثرات مفید توکوفرول بر سیستم عصبی، کبد، چشم، عروق خونی، پوست و سایر اندام‌ها شده است. ویتامین E توانایی سیستم ایمنی را افزایش می‌دهد. همچنین ویتامین ضروری برای ریه‌ها در کنار ویتامین A بوده و سیستم تنفسی را از هوای آلوده محافظت می‌کند. خواص سودمند ویتامین E برای پوست در توانایی تسریع بهبود زخم‌ها، کاهش زخم پس از سوختگی و جلوگیری از ظهور پیری می‌باشد [۳۴، ۳۵]. علاوه بر این، توانایی ویتامین E برای تأثیر بر تشکیل کلاژن و الاستین اثبات شده است، که اجازه می‌دهد بافت همبندی در شرایط مناسب حفظ شود. در پایان قرن گذشته، دانشمندان توانایی منحصر به فردی از ویتامین E - توکوفرول را کشف کردند، ویتامین E سرعت پیشرفت بیماری آلزایمر را کاهش دهد [۳۶].

توکوفرول‌ها اجزاء مهم مواد غیرقابل صابونی شونده در روغن‌های خوراکی هستند که فعالیت ضداکسندگی دارند و به عنوان ویتامین E برای سلامتی انسان مهم هستند ولی اهمیت آن‌ها در موادغذایی بیش‌تر به واسطه خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها است. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مانند توکوفرول‌ها و ترکیبات پلی‌فنولی به دلیل خاصیت شناخته‌شده آن‌ها برای غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد و خاصیت سرطان‌زایی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی رو به افزایش است. توکوفرول‌ها و توکوتری‌انول‌ها جزء ویژگی‌های ترکیبی و شناسایی روغن‌های گیاهی هستند. بنابراین همراه با سایر آزمون‌ها، شاخص مناسبی برای تشخیص تقلب در روغن محسوب می‌شوند، زیرا مقدار آن‌ها در دانه‌های روغنی مختلف متفاوت است. وجود توکوفرول‌ها در روغن علاوه بر دارا بودن خاصیت تغذیه‌ای (ویتامین E) دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی نیز می‌باشد. آلفا توکوفرول بیش‌ترین خاصیت ویتامینی و دلناتوکوفرول بیش‌ترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را دارا هستند. روغن‌های گیاهی از ۱۰ تا ۶۰ میلی‌گرم در صد گرم توکوفرول دارا می‌باشند [۳۷].

مقدار حد مجاز توکوفرول‌ها از نظر استانداردهای ملی و بین‌المللی کدکس در روغن‌های تهیه شده به روش پرس سرد و / یا سایر روش‌ها (روش‌های مکانیکی و استخراج با حلال) یکسان است. بنابراین، احتمالاً روش استخراج روغن اثر چندانی بر میزان

از روغن‌های گیاهی شناخته شده در جهان است که شهرت آن احتمالاً به دلیل کشت گسترده و بهره برداری از سویا، به ویژه در دهه‌های اخیر است. سویا بومی شرق آسیا است و به عنوان یک گیاه خوردنی به شمار می‌رود، با این حال، با وجود منشاء محدود آن؛ به دلیل قابلیت خوردنی که دارد بسیار ارزشمند است. بیشتر روغن سویا تصفیه شده، ترکیب شده و گاهی اوقات هیدروژنه شده است و می‌تواند به سطوح مختلف درجه بندی شود و بسته به کاربرد مورد نظر طبقه‌بندی می‌شود [۳، ۲۹]. روغن سویا به دلیل وجود انواع مختلفی از اسیدهای چرب ضروری موجود در آن، که برای حفظ سلامت بدن ضروری هستند، نسبت به سایر روغن‌های گیاهی سالم‌تر در نظر گرفته می‌شود. همچنین شماری از استرول‌های گیاهی در روغن سویا وجود دارند که می‌تواند مزایای سلامتی فراوانی را در افرادی که به طور منظم از روغن سویا در رژیم غذایی خود بهره می‌برند، داشته باشند. محتوای ویتامین و مواد معدنی سویا، چیزی است که این گیاه خوردنی را خوشمزه و بسیار مفید ساخته است [۳۰].

ارزش بیولوژیکی توکوفرول‌ها بر اساس ایزومر متفاوت است. اهمیت آن‌ها در فعالیت ویتامین E به شرح زیر است:  $\delta < \gamma < \beta < \alpha$ . ویتامین E عمدتاً به عنوان یک آنتی‌اکسیدان عمل می‌کند، به ویژه در جلوگیری از اکسیداسیون و پراکسیداسیون واحدهای اسید چرب اشباع نشده غشاء فسفولیپید (در داخل و بر روی غشای پلازما سلولی [۳۱، ۳۲]). ویتامین E به دسته ای از ترکیبات محلول در چربی اطلاق می‌گردد که حاوی حلقه ۶- هیدروکسی کرومانی بوده و در روغن‌ها و چربی‌ها به طور طبیعی وجود دارد. ویتامین E شامل توکوفرول‌ها و توکوتری‌انول‌ها می‌باشند. توکوفرول‌ها شامل ۴ نوع ایزومر  $\alpha$ ،  $\beta$ ،  $\gamma$  و  $\delta$  می‌باشند. تعداد گروه‌های متیل متصل به بخش هتروسیکلیک آن‌ها متفاوت بوده و نام‌گذاری بر اساس آن صورت می‌گیرد. توکوتری‌انول‌ها از لحاظ ساختمانی شبیه به توکوفرول‌ها و همانند آن‌ها دارای ایزومرهای  $\alpha$ ،  $\beta$ ،  $\gamma$  و  $\delta$  بوده ولی در زنجیر جانبی آن‌ها سه پیوند دوگانه وجود دارد. همه این ۸ فرم شامل یک حلقه کرومانی و یک زنجیر جانبی آب‌گریز، یک فیتیل<sup>۳۳</sup> در توکوفرول و یک ایزوپرنیل با ۳ پیوند دوگانه در توکوتری‌انول می‌باشند [۳۳]. توکوفرول عملکرد سیستم تولید مثل را کنترل کرده

## ۲-۳- آماده سازی نمونه برای آنالیز

به منظور آماده سازی روغن های ذرت و سویا، دانه های ذرت و سویا تهیه و پودر شدند. سپس، پودرها با حلال متانول+کلروفرم با نسبت (۱۰۰ میلی لیتر متانول+۵۰ میلی لیتر کلروفرم) به مدت یک ساعت به خوبی مخلوط شدند. نهایتاً مخلوط به منظور جداسازی بخش جامد از مایع فیلتر شد. بخش مایع توسط دستگاه روتاری در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد تبخیر گشت تا حلال (متانول+کلروفرم) جدا گردند. بعد از جداسازی حلال، مایع باقی مانده به عنوان روغن گیاهی خالص مورد استفاده قرار گرفت. روغن زیتون نیز از محصولات شرکت درنیکا (پیرانشهر، ایران) و روغن پالم از محصولات شرکت آفتاب (تهران، ایران) خریداری شدند.

## ۲-۴- آنالیز توکوفرول ها و توکوتری انول ها با

### کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

جهت آزمون، نمونه های روغنی (براساس طرح آماری) که تا زمان انجام آزمایشها در یخچال نگهداری شده بود، درون بن ماری ۴۰ درجه سانتی گراد به حالت مایع تبدیل شده و پس از همگن کردن آنها توسط شیکر، ۱۰ میلی گرم از هر نمونه روغن درون ویال ۱/۵ میلی لیتری وزن شده و سپس ۱۰۰۰ میلی لیتر n-هگزان HPLC به آن افزوده و سپس دوباره توسط شیکر لوله ای مخلوط و یکنواخت شد و ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق شد [۴۸، ۴۹]. اندازه گیری محتوای توکوفرول در نمونه های روغن، با استفاده از دستگاه HPLC ساخت شرکت Agilent کشور آمریکا انجام شد. بدین منظور ستون LiChroCART 250-4 و اندازه ذرات ۵ میکرومتر، اتوسمپلر G1329B، پمپ G1311C و دتکتور فلورسنس G1316A مورد استفاده قرار گرفت. فاز متحرک مخلوطی از n-هگزان: ترت بوتیل متیل اتر: تتراهیدروفوران: متانول (۸۵: ۱۴: ۰/۹۸: ۰/۰۲) انتخاب و استفاده شد. سرعت جریان فاز متحرک یک میلی لیتر/ دقیقه بود. برای تشخیص توکولها از دتکتور فلورسنس و طول موج ۲۹۴ و ۳۲۰ نانومتر به ترتیب برای تحریک و نشر استفاده می شود [۳۹، ۵۰].

توکوفرولها ندارد و در نتیجه براساس این ویژگی نمی توان در مورد روش تهیه روغن اظهار نظر نمود. پرکاربردترین شیوه جداسازی مواد تجزیه ای کروماتوگرافی است که در تمام شاخه های علوم کاربردهایی دارد. کروماتوگرافی گروه گوناگون و مهمی از روش های جداسازی مواد را شامل می شود و امکان می دهد تا اجزای سازنده نزدیک به هم مخلوط های کمپلکس را جدا، منزوی و شناسایی کند [۳۸-۴۱]. بسیاری از این جداسازیها به روش های دیگر ناممکن است. از کروماتوگرافی جهت تشخیص تقلبات در مواد غذایی استفاده فراوان شده است [۴۲-۴۵]. توکوفرولها و توکوتری انولها در چربیها و روغنها به مقدار کمی (حدود ۰/۳۵ درصد) وجود دارند. در بعضی شرایط آنالیز توکوفرولها می تواند برای تشخیص تقلبات روغن استفاده شوند [۴۶، ۴۷].

در این تحقیق با مقایسه پروفایل کروماتوگرافی توکوفرولها و توکوتری انولهای روغن زیتون مخلوط شده با درصدهای مختلف روغن پالم و روغن سویا و روغن ذرت، تقلبات روغن زیتون بررسی شده است.

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- مواد مورد استفاده

هگزان (Merck, 104391, Germany)، ترت بوتیل متیل اتر (Merck, 101845, Germany)، تتراهیدروفوران (Merck, 108101, Germany)، متانول (Merck, 106007, Germany) و کلروفرم (Merck, 102445, Germany) در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

### ۲-۲- آماده سازی روغن های تقلبی

جهت بررسی درصد تقلبات در روغن زیتون و به دست آوردن رابطه بین نوع و مقدار توکوفرولها و توکوتری انولها و درصد تقلبات، روغن زیتون با درصدهای مختلف از روغن های پالم، سویا و ذرت مخلوط شده و سپس توسط همزن در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد به خوبی همگن شده و تا قبل از آزمون نمونه های آماده شده در دمای یخچال نگهداری شد.

## ۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش از طرح آماری مخلوط (Mixture design) برای بررسی اثر تقلبات روغن زیتون توسط روغن‌های پالم، ذرت و سویا استفاده شد. بر اساس این طرح ۲۰ نمونه روغن زیتون با

درصد‌های مختلف تقلبات روغن‌های مختلف تهیه شد و با آنالیز آماری پروفایل کروماتوگرافی آن‌ها، سهم و درصد هر روغن در نمونه‌های تقلبی مشخص شد. برای طراحی آزمایش و آنالیز نتایج آماری از نرم افزار Design Expert 10.0 استفاده شد [۴۰].

Table 1 Matrix of statistical design

Run	A: Olive oil (%)	B: Palm oil (%)	C: Soybean oil (%)	D: Corn oil (%)
1	80	20	0	0
2	100	0	0	0
3	70	10	10	10
4	60	0	20	20
5	60	20	10	10
6	80	0	10	10
7	70	10	10	10
8	70	10	10	10
9	60	10	10	20
10	80	10	0	10
11	60	20	20	0
12	80	10	10	0
13	40	20	20	20
14	70	10	10	10
15	70	10	10	10
16	70	10	10	10
17	60	10	20	10
18	80	0	0	20
19	80	0	20	0
20	60	20	0	20

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- نتایج آنالیز توکوفرول‌ها با کروماتوگرافی

#### مایع با کارایی بالا

در روغن زیتون میزان آلفا توکوفرول از سایر اجزاء توکوفرولی بیش‌تر است. معمولاً نمونه روغن‌هایی که میزان کل توکوفرول آن‌ها بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ ppm می‌باشد از نظر کیفیت، روغن‌های زیتون خوب و مناسبی می‌باشند [۱۰]. از روش سطح پاسخ جهت بررسی تاثیر روغن زیتون (A)، پالم (B)، سویا (C) و ذرت (D) بر پروفایل‌های کروماتوگرافی ترکیبات توکوفرولی و توکوترینولی استفاده گردید [۵۴، ۵۵]. بر اساس مدل آماری

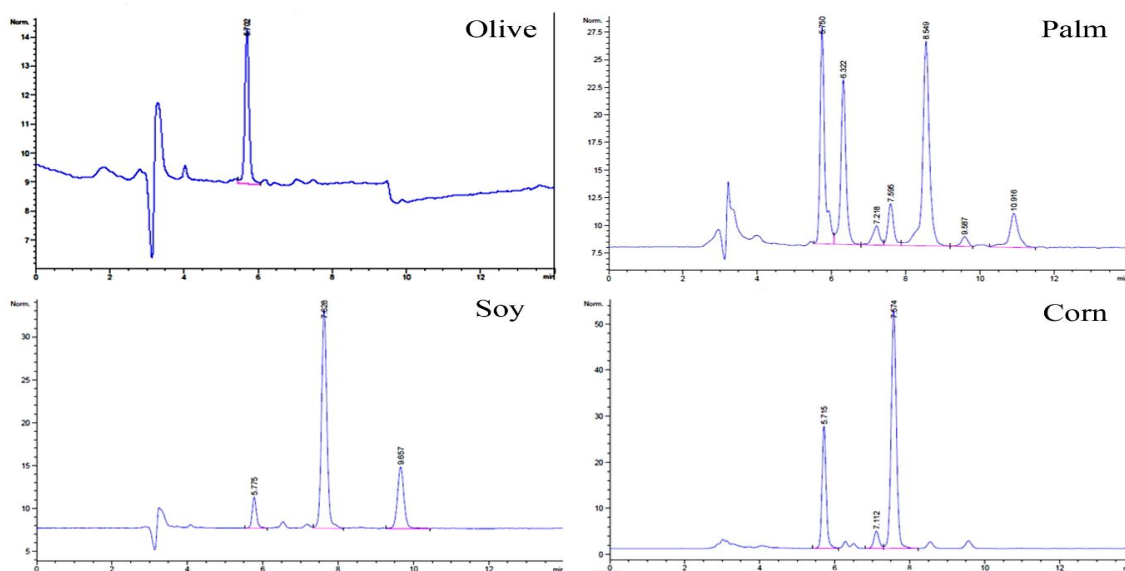
ارائه شده در این تحقیق فهرست نتایج به دست آمده از آنالیز و مساحت زیر پیک هر یک از توکوفرول‌ها و توکوترینول‌ها و مجموع کل آنها در جدول (۱-۴) ارائه شده است. در این جدول پاسخ‌های به دست آمده گزارش شده است. پاسخ‌های به دست آمده شامل ۱- TPA (مجموع سطح زیر منحنی کل پیک‌ها) ۲- Alfa-T (سطح زیر منحنی آلفاتوکوفرول) ۳- Alfa-T3 (سطح زیر منحنی آلفاتوکوترینول) ۴- Beta-T (سطح زیر منحنی بتاتوکوفرول) ۵- Gama-T (سطح زیر منحنی گاماتوکوفرول) ۶- Beta T3+Gama T3 (مجموع سطح زیر منحنی بتاتوکوترینول و گاماتوکوترینول) ۷- Delta-T (سطح زیر منحنی دلتاتوکوفرول) ۸- Delta-T3 (سطح زیر منحنی دلتاتوکوترینول) می‌باشد. با بررسی

منحنی‌های Trace (Cox) می‌توان تقلبات صورت گرفته را به صورت دقیق به دست آورد.

منحنی‌های رسم شده می‌توان تقلبات استفاده از روغن‌های پالم و سویا و ذرت در روغن زیتون را تشخیص داد. با استفاده از

**Table 2** Peak area of tocopherols and tocotrienols in each sample

No.Sample	TPA	Alpha-tocopherol	Alpha-tocotrienol	Beta-tocopherol	Gama-tocopherol	Beta tocotrienol +Gama tocotrienol	Delta-tocopherol	Delta-tocotrienol
1	161.04	59.07	28.04	5.46	9.23	47.12	2.39	9.72
2	33.43	33.43	0	0	0	0	0	0
3	160.07	49.09	14.05	3.79	43.36	36.64	8.52	4.61
4	146.15	41.69	0	4.33	81.84	2.11	16.17	0
5	211.08	59.85	24.5	6.64	51.54	51.55	10.22	6.77
6	87.95	37.13	0	2.95	38.77	0.89	8.2	0
7	183.67	48.14	12.28	4.43	42.59	63.68	9.25	3.3
8	150.12	48.91	13.36	4.72	47.33	21.73	9.16	4.89
9	172.32	52.12	11.32	5.94	61.73	29.03	7.71	4.46
10	135.18	47.81	12.47	4.36	22.54	42.2	2.21	3.6
11	203.75	52.23	23.81	4.53	46.52	53.09	16.08	7.48
12	118.87	40.34	9.45	3.48	23.53	30.79	7.41	3.87
13	289.85	63.66	26.86	6.26	88.35	78.64	17.19	8.88
14	154.02	48.45	13.56	4.16	43.84	31.52	8.97	3.5
15	199.31	48.93	14.29	4.35	47.6	70.46	9.72	3.96
16	164.2	46.48	11.19	4.57	41.93	46.06	9.47	4.5
17	188.86	45.87	10	5.26	67.24	41.38	15.44	3.65
18	81.68	41.23	0	3.78	36.67	0	0	0
19	86.51	30.18	0	1.94	40.2	0	14.18	0
20	184.33	62.72	24.61	6.92	44.94	34.66	3.14	7.33



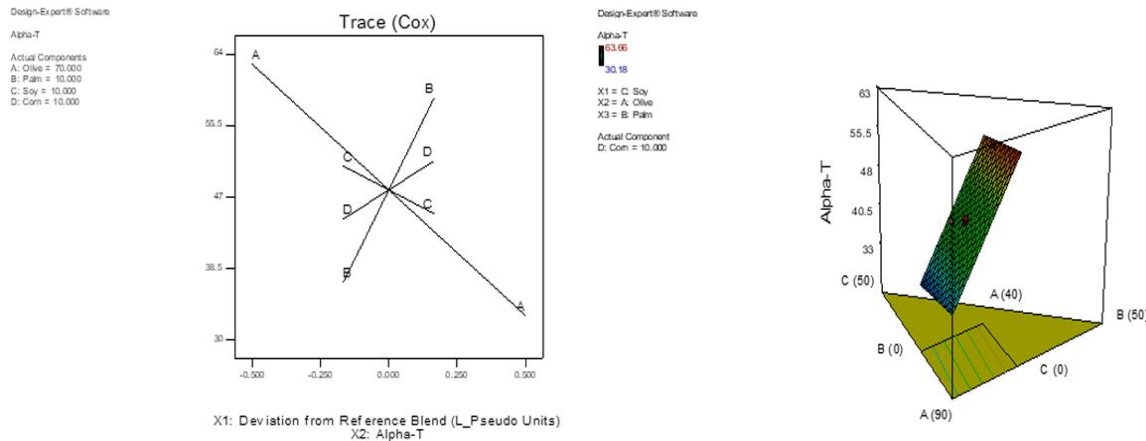
**Fig 1** Chromatogram of pure olive, palm, soybean and corn oils

### ۲-۳- مطالعه مساحت پیک آلفا-توکوفرول

نتایج آنالیز واریانس مدل سطح پاسخ نشان داد که اثرات خطی پارامترهای روغن زیتون (A)، پالم (B)، سویا (C) و ذرت (D) دارای تاثیر معنادار بر پروفایل کروماتوگرافی آلفا-توکوفرول بودند ( $P < 0.05$ ). اما اثرات متقابل متغیرهای مورد بررسی تاثیر

معناداری را بر پروفایل‌های کروماتوگرافی آلفا-توکوفرول نداشتند. پروفایل کروماتوگرافی آلفا-توکوفرول به عنوان تابعی از عوامل مورد مطالعه با استفاده از معادله زیر برای متغیرهای روغن زیتون (A)، پالم (B)، سویا (C) و ذرت (D) به دست آمد.

$$\text{Alpha-Tocopherol} = 0.33 * A + 1.47 * B + 0.22 * C + 0.79 * D \quad R^2 = 0.97, \text{ Adj } R^2 = 0.97$$



**Fig 2** Three-dimensional curve and tracking scheme (Cox) of surface changes below the alpha tocopherol curve based on changes in olive oil (A), palm (B), soybean (C) and corn (D).

Grilo و همکاران (۲۰۱۴) انجام گرفت، مقدار آلفا توکوفرول و گاما توکوفرول در روغن‌های گیاهی اندازه‌گیری شد. میزان گزارش شده برای آلفا توکوفرول  $173/0 \pm 82/3$  میلی‌گرم در کیلوگرم است [۱۰].

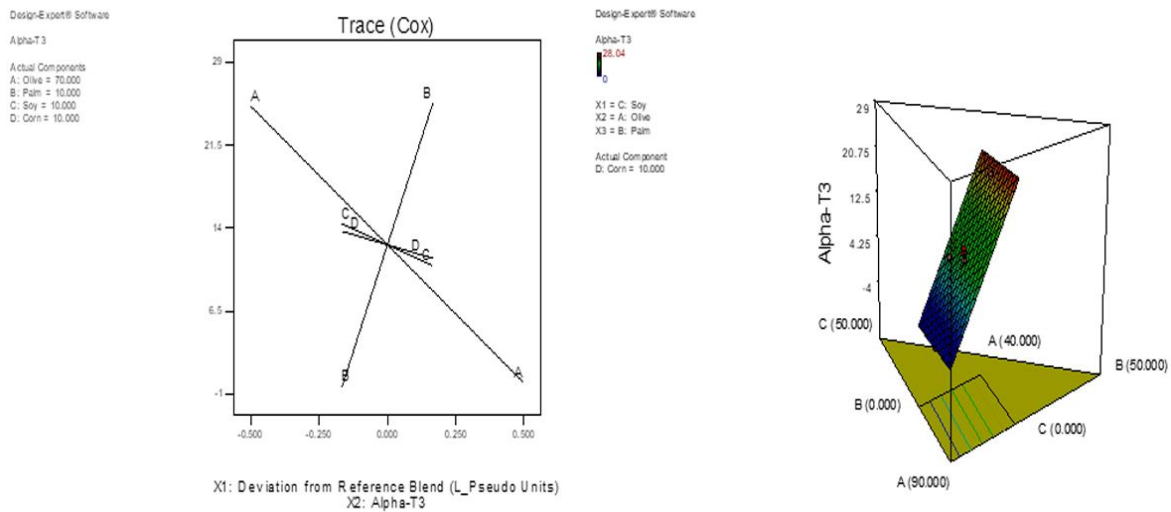
### ۳-۳- مطالعه مساحت پیک توکوتری‌انول‌ها

نتایج آنالیز واریانس مدل سطح پاسخ نشان داد که اثرات خطی پارامترهای روغن زیتون (A)، پالم (B)، سویا (C) و ذرت (D) دارای تاثیر معنادار بر پروفایل کروماتوگرافی آلفا-توکوتری‌انول بودند ( $P < 0.05$ ). اما اثرات متقابل متغیرهای مورد بررسی تاثیر معناداری را بر پروفایل‌های کروماتوگرافی آلفا-توکوتری‌انول نداشتند. پروفایل کروماتوگرافی آلفا-توکوتری‌انول به عنوان تابعی از عوامل مورد مطالعه با استفاده از معادله زیر برای متغیرهای روغن زیتون (A)، پالم (B)، سویا (C) و ذرت (D) به دست آمد.

$$\text{Alpha-Tocopherol} = 3.5 \times 10^{-5} * A + 1.27 * B - 0.04 * C + 0.01 * D \quad R^2 = 0.98, \text{ Adj } R^2 = 0.97$$

همان طور که مشخص است هرچه مقدار تقلب افزودن روغن‌های پالم، سویا و ذرت به روغن زیتون بیشتر شود، سطح زیر منحنی آلفا توکوفرول افزایش می‌یابد. در بین تمامی توکوفرول‌ها و توکوتری‌انول‌ها، آلفاتوکوفرول در روغن زیتون غالب است. لذا در صورت ترکیب با سایر روغن‌ها ترکیب اولیه توکوفرول‌ها تغییر می‌یابد. برای مثال در ترکیب با روغن‌های پالم، سویا و ذرت مقدار آلفا توکوفرول روغن زیتون بالاتر می‌رود. اما از روی نمودارها مشخص است که تاثیر افزودن روغن پالم بر پیک آلفا-توکوفرول بیشتر است. به این ترتیب تقلب ترکیب روغن زیتون با روغن پالم تشخیص داده می‌شود. آلفا توکوفرول، گیرنده چربی‌های رادیکالی است و از این طریق به واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های چربی خاتمه می‌دهد و بعنوان آنتی‌اکسیدان اثر خود را اعمال می‌کند. Verhe و همکاران به بررسی اثر تصفیه روغن‌های گیاهی بر ترکیبات جزئی و تفاوت در تصفیه شیمیایی و فیزیکی آن پرداختند. نتایج نشان داد که کاهش مقادیر توکوفرول‌ها در روغن تصفیه شده عمدتاً به دلیل اکسیداسیون توکوفرول‌ها می‌باشد [۵۳]. در مطالعه‌ای که توسط



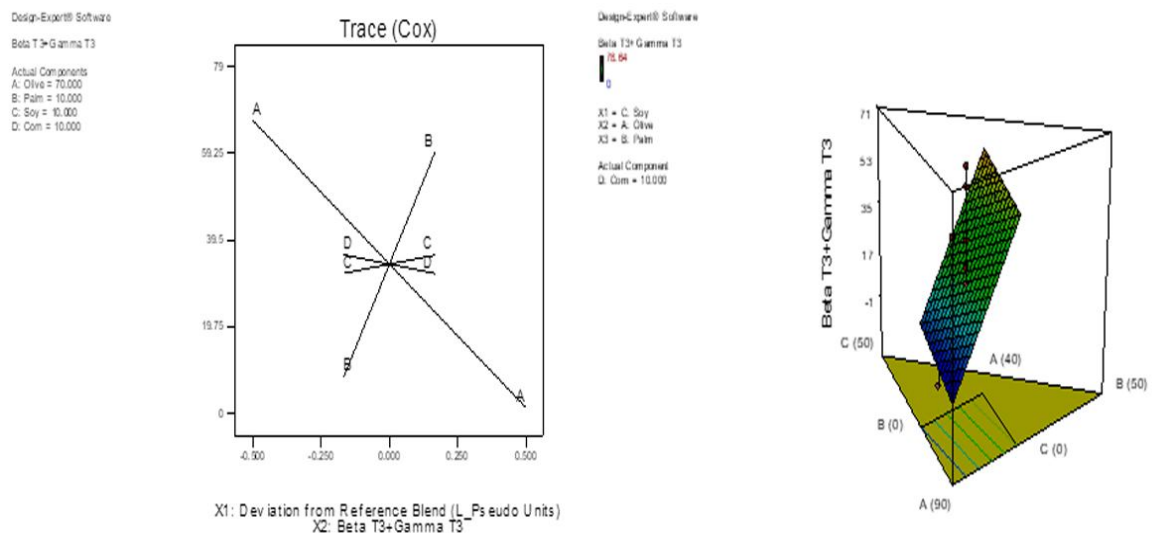


**Fig 3** Three-dimensional curve and tracking scheme (Cox) of surface changes below the alpha-tocopherol curve of enol based on changes in olive oil (A), palm (B), soybean (C) and corn (D).

کروماتوگرافی بتا-توکوترینول + گاما-توکوترینول به عنوان تابعی از عوامل مورد مطالعه با استفاده از معادله زیر برای متغیرهای روغن زیتون (A)، پالم (B)، سویا (C) و ذرت (D) به دست آمد.

$$\text{Beta tocotrienol} + \text{Gamma tocotrienol} = 0.01 * A + 2.63 * B + 0.53 * C + 0.15 * D \quad R^2 = 0.64, \text{Adj } R^2 = 0.58$$

نتایج آنالیز واریانس مدل سطح پاسخ نشان داد که اثرات خطی پارامترهای روغن زیتون (A)، پالم (B)، سویا (C) و ذرت (D) دارای تاثیر معنادار بر پروفایل کروماتوگرافی بتا-توکوترینول + گاما-توکوترینول بودند ( $P < 0.05$ ). اما اثرات متقابل متغیرهای مورد بررسی تاثیر معناداری را بر پروفایل های کروماتوگرافی بتا-توکوترینول + گاما-توکوترینول نداشتند. پروفایل



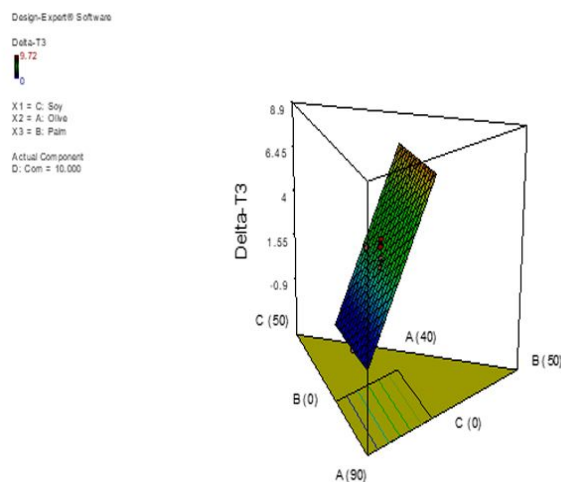
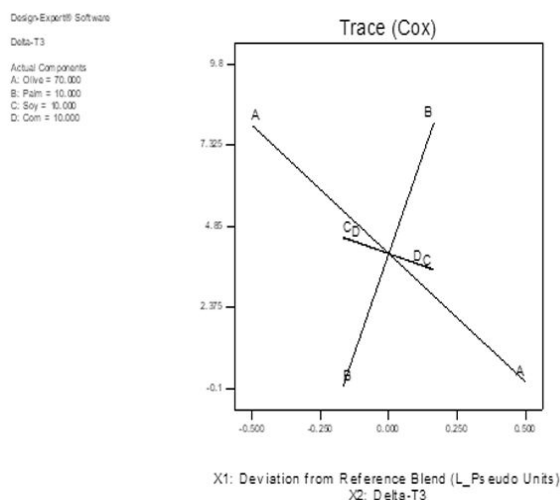
**Fig 4** Three-dimensional curve and tracking scheme (Cox) of surface changes below the beta curve of beta-tocotrienol+ gamma tocotrienol based on changes in olive oil (A), palm (B), soybean (C) and corn (D).

سطح پاسخ نشان داد که اثرات خطی پارامترهای روغن زیتون (A)، پالم (B)، سویا (C) و ذرت (D) دارای تاثیر معنادار بر پروفایل کروماتوگرافی بتا-توکوترینول بودند ( $P < 0.05$ ). اما

لازم به ذکر است که شرایط کروماتوگرافی توانایی جداسازی بتا-توکوترینول + گاما-توکوترینول را دارا نیست، بنابراین این دو توکوترینول با هم گزارش می شوند. نتایج آنالیز واریانس مدل

مطالعه با استفاده از معادله زیر برای متغیرهای روغن زیتون (A)، پالم (B)، سویا (C) و ذرت (D) به دست آمد.

$$\text{Delta-Tocotrienol} = 0.001 * A + 1.4 * B - 0.005 * C - 0.002 * D \quad R^2 = 0.95, \text{ Adj } R^2 = 0.94$$



**Fig 5** Three-dimensional curve and tracking scheme (Cox) of surface changes below the delta-tocotrienol curve based on changes in olive oil (A), palm (B), soybean (C) and corn (D).

طبیعی محافظت می‌کنند. Gupta و Srivastava (۲۰۰۶) وجود توکوفرول‌ها و توکوتری‌انول‌ها را با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) در روغن پالم تأیید نمودند [۲۰ و ۵۴].

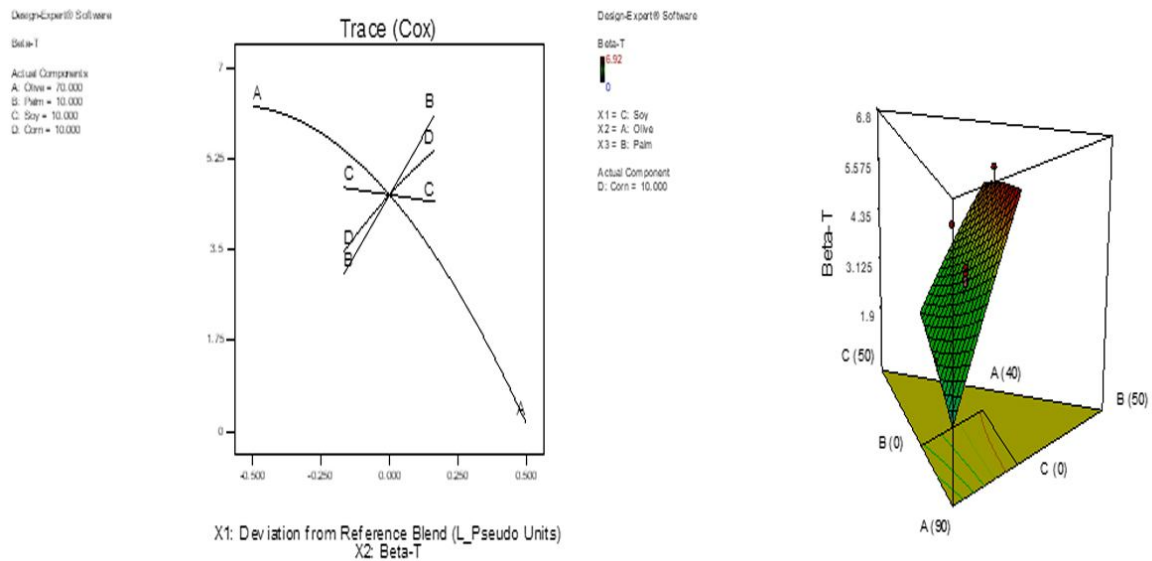
### ۳-۴- مطالعه مساحت پیک بتا-توکوفرول

نتایج آنالیز واریانس مدل سطح پاسخ نشان داد که اثرات خطی پارامترهای روغن زیتون (A)، پالم (B)، سویا (C) و ذرت (D) و اثرات متقابل مدل دارای تاثیر معنادار بر پروفایل کروماتوگرافی بتا-توکوفرول بودند ( $P < 0.05$ ). پروفایل کروماتوگرافی بتا-توکوفرول به عنوان تابعی از عوامل مورد مطالعه با استفاده از معادله زیر برای متغیرهای روغن زیتون (A)، پالم (B)، سویا (C) و ذرت (D) به دست آمد.

$$\text{Beta-Tocopherol} = 0.002 * A + 0.19 * B + 0.03 * C + 0.03 * D + 8.32 \times 10^{-4} * AB + 6.82 \times 10^{-4} * AC + 1.68 \times 10^{-3} * AD - 3.59 \times 10^{-3} * BC + 9.64 \times 10^{-4} * CD \quad R^2 = 0.96, \text{ Adj } R^2 = 0.92$$

اثرات متقابل متغیرهای مورد بررسی تاثیر معناداری را بر پروفایل‌های کروماتوگرافی دلتا-توکوتری‌انول نداشتند. پروفایل کروماتوگرافی دلتا-توکوتری‌انول به عنوان تابعی از عوامل مورد

همانطور که در شکل‌های فوق نشان داده شده است، هرچه مقدار تقلب در افزودن روغن پالم، روغن سویا و ذرت به روغن زیتون بیشتر باشد، مساحت پیک توکوتری‌انول‌ها افزایش می‌یابد. همان طور که مشخص است هرچه مقدار تقلب افزودن روغن‌های پالم، سویا و ذرت به روغن زیتون بیشتر شود، سطح زیر منحنی آلفا توکوتری‌انول، مجموع بتا و گاما توکوتری‌انول‌ها و نیز دلتا توکوتری‌انول افزایش می‌یابد. از بین روغن‌هایی که به روغن زیتون اضافه شده اند، روغن پالم تأثیر بسیار چشمگیر و قابل توجهی در مساحت پیک توکوتری‌انول‌ها دارد. بنابراین می‌توان گفت که اوج منطقه توکوتری‌انول‌ها شاخص تقلب در افزودن روغن پالم به زیتون است. در مخلوط روغن زیتون با روغن پالم، از آنجا که روغن پالم دارای هر هشت نوع توکوفرول و توکوتری‌انول است، همه آن‌ها در کروماتوگرام مشاهده می‌شود. اما از آنجا که غلظت توکوتری‌انول‌های روغن پالم بالاتر از توکوفرول‌ها آن هستند، مساحت پیک توکوتری‌انول‌ها شاخصی از وجود روغن پالم در روغن‌های دیگر از جمله روغن زیتون است. روغن پالم خالص حاوی توکوفرول و توکوتری‌انول در محدوده ۶۰۰-۱۰۰۰ ppm است. توکوفرول‌ها و توکوتری‌انول‌ها آنتی‌اکسیدان‌هایی هستند که از روغن در برابر عوامل اکسنده



**Fig 6** Three-dimensional curve and tracking scheme (Cox) of surface changes below the beta-tocopherol curve based on changes in olive oil (A), palm (B), soybean (C) and corn (D).

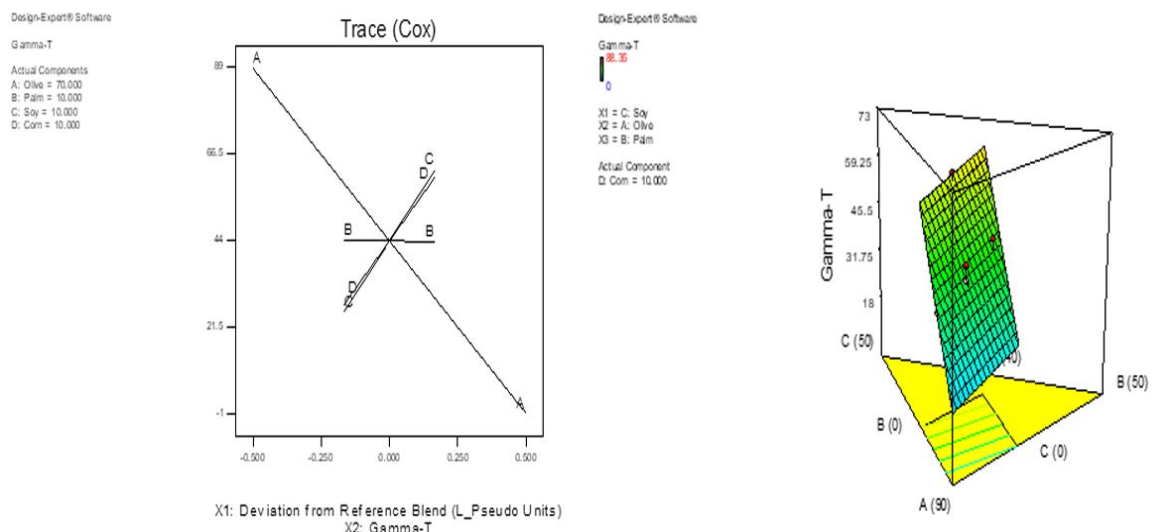
دارای تاثیر معنادار بر پروفایل کروماتوگرافی گاما-توکوفرول بودند ( $P < 0.05$ ). اما اثرات متقابل متغیرهای مورد بررسی تاثیر معناداری را بر پروفایل‌های کروماتوگرافی گاما-توکوفرول نداشتند. پروفایل کروماتوگرافی گاما-توکوفرول به عنوان تابعی از عوامل مورد مطالعه با استفاده از معادله زیر برای متغیرهای روغن زیتون (A)، پالم (B)، سویا (C) و ذرت (D) به دست آمد.

$$\text{Gamma-Tocopherol} = -0.008 * A + 0.42 * B + 2.1 * C + 1.93 * D \quad R^2 = 0.98, \text{Adj } R^2 = 0.97$$

همانطور که در شکل ۶ نشان داده شده است، افزودن روغن پالم، سویا و ذرت به روغن زیتون باعث افزایش مساحت پیک بتا توکوفرول می‌شود. اما واضح است که روغن سویا تاثیر زیادی بر روی آن ندارد، در حالی که روغن پالم و ذرت تاثیر بسزایی بر روی پیک بتاتوکوفرول دارد.

### ۳-۵- مطالعه مساحت پیک گاما-توکوفرول

نتایج آنالیز واریانس مدل سطح پاسخ نشان داد که اثرات خطی پارامترهای روغن زیتون (A)، پالم (B)، سویا (C) و ذرت (D)



**Fig 7** Three-dimensional curve and tracking scheme (Cox) of surface changes below the gamma tocopherol curve based on changes in olive oil (A), palm (B), soybean (C) and corn (D).

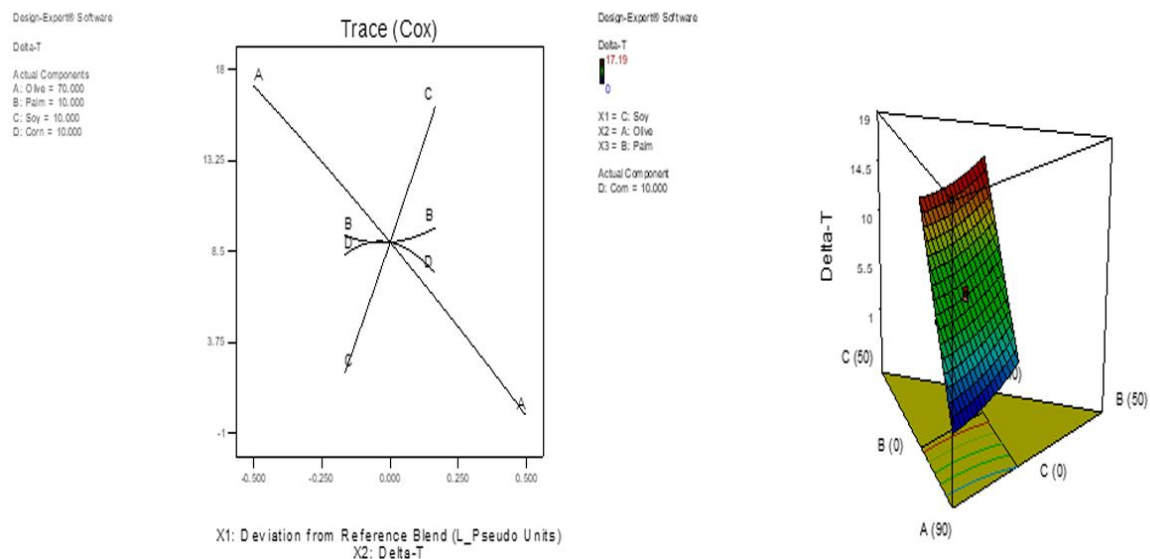
شده برای گاما توکوفرول  $43/8 \pm 259/7$  میلی‌گرم در کیلوگرم است (Grilo et al., 2014). گاما توکوفرول و دلتا توکوفرول به طور قابل توجهی آنتی‌اکسیدان‌های بهتری نسبت به آلفا توکوفرول هستند، به گونه‌ای که در غلظت مساوی دو برابر بیشتر از آلفا توکوفرول از روغن محافظت می‌کنند، اما آلفا توکوفرول بالاترین فعالیت ویتامین E را دارد [55]

### ۳-۶- مطالعه مساحت پیک دلتا-توکوفرول

نتایج آنالیز واریانس مدل سطح پاسخ نشان داد که اثرات خطی پارامترهای روغن زیتون (A)، پالم (B)، سویا (C) و ذرت (D) و اثرات متقابل مدل دارای تاثیر معنادار بر پروفایل کروماتوگرافی دلتا-توکوفرول بودند ( $P < 0.05$ ). پروفایل کروماتوگرافی دلتا-توکوفرول به عنوان تابعی از عوامل مورد مطالعه با استفاده از معادله زیر برای متغیرهای روغن زیتون (A)، پالم (B)، سویا (C) و ذرت (D) به دست آمد.

$$\text{Delta-Tocopherol} = -7.6 \times 10^{-4} * A + 0.57 * B + 0.84 * C - 0.87 * D - 5.42 \times 10^{-3} * AB + 1.57 \times 10^{-3} * AC + 1.1 \times 10^{-2} * AD - 0.01 * BC + 5.5 \times 10^{-3} * BD + 0.01 * CD \quad R^2 = 0.99, \text{ Adj } R^2 = 0.99$$

همانطور که در شکل ۷ نشان داده شده است، افزودن روغن پالم، سویا و ذرت به روغن زیتون باعث افزایش مساحت پیک گاما توکوفرول می‌شود. اما واضح است که روغن پالم تأثیر زیادی بر روی آن ندارد، در حالی که روغن سویا و ذرت تأثیر بسزایی بر روی پیک گاما توکوفرول دارد. لازم به ذکر است که روغن ذرت و سویا در مساحت پیک گاما توکوفرول تأثیر بسیار بیشتری نسبت به روغن پالم دارند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که گاما توکوفرول شاخص شناسایی تقلب‌های روغن ذرت و سویا در روغن زیتون است. به عبارت دیگر، روغن زیتون خالص فاقد گاما توکوفرول است. بنابراین، وقتی روغن زیتون با روغن ذرت و سویا مخلوط می‌شود، از آنجایی که روغن ذرت و سویا دارای گاما-توکوفرول بالایی هستند، در مخلوط روغن زیتون با روغن ذرت و سویا، مقدار گاما-توکوفرول به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. به این ترتیب تقلب در اختلاط روغن ذرت و سویا با روغن زیتون کشف می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط Grilo و همکاران (۲۰۱۴) انجام گرفت، مقدار آلفا توکوفرول و گاما توکوفرول در روغن‌های گیاهی اندازه‌گیری شد. میزان گزارش



**Fig 8** Three-dimensional curve and tracking scheme (Cox) of surface changes below the delta tocopherol curve based on changes in olive oil (A), palm (B), soybean (C) and corn (D).

شود، سطح زیر منحنی دلتا توکوفرول افزایش می‌یابد. اما واضح است که روغن سویا تأثیر بسزایی بر روی پیک دلتا توکوفرول دارد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که دلتا توکوفرول شاخص شناسایی تقلب‌های روغن سویا در روغن زیتون است. به عبارت

همانطور که در شکل ۸ نشان داده شده است، افزودن روغن پالم، سویا و ذرت به روغن زیتون باعث افزایش مساحت پیک دلتا توکوفرول می‌شود. همان طور که مشخص است هرچه مقدار تقلب افزودن روغن‌های پالم، سویا و ذرت به روغن کره بیشتر

- Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: Frantoio and Leccino', grown in Andalusia. *Food chemistry*. 2005 Feb 1;89(3):387-91.
- [5] Uncu O, Ozen B. Importance of some minor compounds in olive oil authenticity and quality. *Trends in Food Science & Technology*. 2020 Apr 25.
- [6] Pirsá S, Alizadeh M, Ghahraman Nn. Determination Of Soybean Oile Adulteration In Sesame Oile By Volatile Organic Compounds Profile By Polypyrrole-Cuo Nanocomposite Modified Polyesterfiber As A Solid Phase Microextraction Agent/Gas Chromatography.
- [7] Azadmard-Damirchi S. Review of the use of phytosterols as a detection tool for adulteration of olive oil with hazelnut oil. *Food Additives and Contaminants*. 2010 Jan 1;27(1):1-0.
- [8] Jabraili A, Pirsá S, Pirouzifard MK, Amiri S. Biodegradable nanocomposite film based on gluten/silica/calcium chloride: physicochemical properties and bioactive compounds extraction capacity. *Journal of Polymers and the Environment*. 2021 Jan 29:1-5.
- [9] Lazzez A, Perri E, Caravita MA, Khlif M, Cossentini M. Influence of olive maturity stage and geographical origin on some minor components in virgin olive oil of the Chemlali variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008 Feb 13;56(3):982-8.
- [10] Grilo EC, Costa PN, Gurgel CS, Beserra AF, Almeida FN, Dimenstein R. Alpha-tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetable oils. *Food Science and Technology*. 2014 Jun;34(2):379-85.
- [11] Brunetti G, Di Rosa G, Scuto M, Leri M, Stefani M, Schmitz-Linneweber C, Calabrese V, Saul N. Healthspan Maintenance and Prevention of Parkinson's-like Phenotypes with Hydroxytyrosol and Oleuropein Aglycone in *C. elegans*. *International journal of molecular sciences*. 2020 Jan;21(7):2588.
- [12] Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia pharmaceutica*. 2010 Jun;78(2):133-54.
- [13] Uylaser V. Fatty acid profile and mineral content of commercial table olives from Turkey. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2013 Dec 6;41(2):518-23.

دیگر، روغن زیتون خالص فاقد دلتاتوکوفرول است. بنابراین، وقتی روغن زیتون با روغن سویا مخلوط می‌شود، از آنجایی که روغن سویا دارای دلتاتوکوفرول بالایی است، در مخلوط روغن زیتون با روغن سویا، مقدار دلتاتوکوفرول به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. به این ترتیب تقلب در اختلاط روغن سویا با روغن زیتون کشف می‌شود.

#### ۴- نتیجه گیری کلی

مطالعات زیادی در زمینه تشخیص روغن‌های گیاهی و تقلبات آن‌ها صورت گرفته است. دلیل اصلی برای تقلب روغن‌های گیاهی کسب سود بیشتر و مزایای تجاری می‌باشد. در نتیجه بررسی‌های زیادی بر تشخیص تقلب و جایگزینی یک روغن با روغن ارزان‌تر یا تشخیص منشأ جغرافیایی اصلی انجام گرفته و به روش‌های مفیدی نیز رسیده‌اند. از روش‌های تشخیصی پرکاربرد می‌توان به روش‌های کروماتوگرافی برای ترکیب اسید چرب، ترکیب تری‌گلیسریدها، ترکیبات جزئی مانند استرول‌ها و ترکیبات فنولی و رنگدانه‌ها، الکل‌های چرب و هیدروکربن‌ها اشاره کرد.

#### ۵- منابع

- [1] Amiry S, Esmaili M, Alizadeh M. Classification of adulterated honeys by multivariate analysis. *Food Chemistry*. 2017 Jun 1;224:390-7.
- [2] Chavoshizadeh S, Pirsá S, Mohtarami F. Sesame oil oxidation control by active and smart packaging system using wheat gluten/chlorophyll film to increase shelf life and detecting expiration date. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2020 Mar;122(3):1900385.
- [3] Ghasemi F, Alizadeh M, Pirsá S, Mohtarami F. Study of the Physicochemical Properties/Gas Chromatography Profile of Adulterated Pomegranate Juice by Nano-Composite-Fiber. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 2019 Oct 10;21(6):1447-58.
- [4] Aguilera MP, Beltrán G, Ortega D, Fernández A, Jiménez A, Uceda M.

- [24] Obudi N, Alizadeh M, Pirsa S. Study on the physicochemical/microbial properties and gas chromatography profile of synbiotic yogurt. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 2019 Jul 23:45.
- [25] Aksoz E, Korkut O, Aksit D, Gokbulut C. Vitamin E ( $\alpha$  - ,  $\beta$ +  $\gamma$  - and  $\delta$  - tocopherol) levels in plant oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 2020 Sep;35(5):504-10.
- [26] Yuan C, Xie Y, Jin R, Ren L, Zhou L, Zhu M, Ju Y. Simultaneous analysis of tocopherols, phytosterols, and squalene in vegetable oils by high-performance liquid chromatography. *Food Analytical Methods*. 2017 Nov;10(11):3716-22.
- [27] Saldeen T, Li D, Mehta JL. Differential effects of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol on low-density lipoprotein oxidation, superoxide activity, platelet aggregation and arterial thrombogenesis. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999 Oct;34(4):1208-15.
- [28] Hammond EG, Johnson LA, Su C, Wang T, White PJ. Soybean oil. *Bailey's industrial oil and fat products*. 2005 Jul 15.
- [29] Dourado LR, Pascoal LA, Sakomura NK, Costa FG, Biagiotti D. Soybeans (*Glycine max*) and soybean products in poultry and swine nutrition. *IntechOpen*; 2011 Oct 28.
- [30] Pirsa S, Alizadeh N. A selective DMSO gas sensor based on nanostructured conducting polypyrrole doped with sulfonate anion. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2012 Jun 20;168:303-9.
- [31] Valenzuela A, Sanhueza J, Nieto S. Differential Inhibitory Effect of  $\alpha$  - ,  $\beta$  - ,  $\gamma$  - , and  $\delta$  - Tocopherols on the Metal - Induced Oxidation of Cholesterol in Unilamellar Phospholipid - Cholesterol Liposomes. *Journal of food science*. 2002 Aug;67(6):2051-5.
- [32] Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*. 2015 Oct 1;18:820-97.
- [33] Azzi A, Stocker A. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progress in lipid Research*. 2000 May 1;39(3):231-55.
- [14] Romero N, Saavedra J, Tapia F, Sepúlveda B, Aparicio R. Influence of agroclimatic parameters on phenolic and volatile compounds of Chilean virgin olive oils and characterization based on geographical origin, cultivar and ripening stage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2016 Jan 30;96(2):583-92.
- [15] Fragaki G, Spyros A, Siragakis G, Salivaras E, Dais P. Detection of extra virgin olive oil adulteration with lampante olive oil and refined olive oil using nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate statistical analysis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005 Apr 20;53(8):2810-6.
- [16] Rupilius W, Ahmad S. Palm oil and palm kernel oil as raw materials for basic oleochemicals and biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2007 Apr;109(4):433-9.
- [17] Goh SH, Choo YM, Ong SH. Minor constituents of palm oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1985 Feb;62(2):237-40.
- [18] Ismail SR, Maarof SK, Siedar Ali S, Ali A. Systematic review of palm oil consumption and the risk of cardiovascular disease. *PLoS One*. 2018 Feb 28;13(2):e0193533.
- [19] Ebong PE, Owu DU, Isong EU. Influence of palm oil (*Elaeis guineensis*) on health. *Plant Foods for Human Nutrition*. 1999 Sep;53(3):209-22.
- [20] Srivastava JK, Gupta S. Tocotrienol-rich fraction of palm oil induces cell cycle arrest and apoptosis selectively in human prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006 Jul 28;346(2):447-53.
- [21] Tan CH, Ghazali HM, Kuntom A, Tan CP, Ariffin AA. Extraction and physicochemical properties of low free fatty acid crude palm oil. *Food Chemistry*. 2009 Mar 15;113(2):645-50.
- [22] Dian NL, Hamid RA, Kanagaratnam S, Isa WA, Hassim NA, Ismail NH, Omar Z, Sahri MM. Palm oil and palm kernel oil: Versatile ingredients for food applications. *Journal of Oil Palm Research*. 2017 Dec 1;29(4):487-511.
- [23] Odia OJ, Ofori S, Maduka O. Palm oil and the heart: a review. *World journal of cardiology*. 2015 Mar 26;7(3):144.



- [43] Pirsa S, Alizadeh M, Ghahreman Nezhad N. Extraction optimization of volatile organic compounds from sesame oil by nanostructure polypyrrole modified polyester fiber as a solid phase microextraction agent/gas chromatography. *Food Science and Technology*. 2016 Jun 10;14(64):19-9.
- [44] Incheh KG, Hassanzadazar H, Forouzan SH, I Banafshehchin E, I Mozafarian E, Aminzare M, Hashemi M. A survey on the quality of traditional butters produced in West Azerbaijan province, Iran. *International Food Research Journal*. 2017;24(1):327.
- [45] Amiry S, Esmaili M, Alizadeh M. Classification of honeys adulterated with date and invert syrups. *Food Chemistry*. 2017;1:390-7.
- [46] Pirsa S, Banafshehchin E, Amiri S, Rahimirad A, Ghafarzadeh J. Detection of fraud of palm, sunflower, and corn oil in butter using HPLC profile of tocopherols and tocotrienols by response surface method. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 2020 Nov 16:1-1.
- [47] Damirchi SA, Savage GP, Dutta PC. Sterol fractions in hazelnut and virgin olive oils and 4, 4'-dimethylsterols as possible markers for detection of adulteration of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2005 Oct 1;82(10):717-25.
- [48] Pirsa S, Alizadeh N. Nanoporous conducting polypyrrole gas sensor coupled to a gas chromatograph for determination of aromatic hydrocarbons using dispersive liquid-liquid microextraction method. *IEEE Sensors Journal*. 2011 Jun 20;11(12):3400-5.
- [49] Pirsa S, Mohtarami F, Kalantari S. Preparation of biodegradable composite starch/tragacanth gum/nanoclay film and study of its physicochemical and mechanical properties. *Chemical Review and Letters*. 2020 May 1;3(3):98-103.
- [50] Pirsa S, Alizadeh N. Rapid determination of pyridine derivatives by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography/gas sensor based on nanostructured conducting polypyrrole. *Talanta*. 2011 Dec 15;87:249-54.
- [51] Moore JC, Spink J, Lipp M. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated
- [34] Anandan R. Marine lipophilic compounds. ICAR-Central Institute of Fisheries Technology, Cochin.
- [35] Anarjan N, Jaberi N, Yeganeh-Zare S, Banafshehchin E, Rahimirad A, Jafarizadeh-Malmiri H. Optimization of mixing parameters for  $\alpha$ -tocopherol nanodispersions prepared using solvent displacement method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2014 Aug 1;91(8):1397-405.
- [36] Pirsa S, Alizadeh N. Design and fabrication of gas sensor based on nanostructure conductive polypyrrole for determination of volatile organic solvents. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2010 Jun 3;147(2):461-6.
- [37] Hhodisan Y, Ccasoni D, Beldean-Ggalea MS, Cimpoiu C. Identification and quantification of tocopherols in vegetable oil by thin-layer chromatography. *J Planar Chromatogr*. 2008;21:213-5.
- [38] Pirsa S, Asadi S. Innovative smart and biodegradable packaging for margarine based on a nano composite polylactic acid/lycopene film. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2021 Mar 14:1-4.
- [39] Pirsa S, Alizadeh M, Ghahremannejad N. Application of nano-sized poly N-phenyl pyrrole coated polyester fiber to headspace microextraction of some volatile organic compounds and analysis by gas chromatography. *Current Analytical Chemistry*. 2016 Oct 1;12(5):457-64.
- [40] Pirsa S, Nejad FM. Simultaneous analysis of some volatile compounds in food samples by array gas sensors based on polypyrrole nano-composites. *Sensor Review*. 2017 Mar 20.
- [41] Saidfar A, Alizadeh M, Pirsa S. Application of Nano-sized Poly (N-methyl pyrrole-pyrrole) Fiber to the Headspace Solid-Phase Microextraction of Volatile Organic Compounds from Yogurt. *Journal of Chemistry Letters*. 2020 Feb 1;1(1):39-46.
- [42] Alizadeh M, Pirsa S, Faraji N. Determination of lemon juice adulteration by analysis of gas chromatography profile of volatile organic compounds extracted with nano-sized polyester-polyaniline fiber. *Food analytical methods*. 2017 Jun 1;10(6):2092-101.

- and Food Chemistry. 2001 Mar 19;49(3):1508-11.
- [54] Srivastava S, Phadke RS, Govil G, Rao CN. Fluidity, permeability and antioxidant behaviour of model membranes incorporated with  $\alpha$ -tocopherol and vitamin E acetate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1983 Oct 12;734(2):353-62.
- [55] Parkhurst RM, Skinner WA, Sturm PA. The effect of various concentrations of tocopherols and tocopherol mixtures on the oxidative stability of a sample of lard. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1968 Oct;45(10):641-2.
- adulteration from 1980 to 2010. *Journal of food science*. 2012 Apr;77(4):R118-26.
- [52] Pirsa S, Karimi Sani I, Pirouzifard MK, Erfani A. Smart film based on chitosan/*Melissa officinalis* essences/pomegranate peel extract to detect cream cheeses spoilage. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2020 Apr 2;37(4):634-48.
- [53] Verleyen T, Verhe R, Huyghebaert A, Dewettinck K, De Greyt W. Identification of  $\alpha$ -tocopherol oxidation products in triolein at elevated temperatures. *Journal of Agricultural*





## Detection of adding vegetable oils (palm, soybean and corn) adulteration in olive oil by using High Performance Liquid Chromatography and tocopherols and tocotrienols profile

Banafshechin, E. <sup>1</sup>, Pirsas, S. <sup>2\*</sup>, Amiri, S. <sup>3</sup>

1. Food and Drug Administration, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

2. Associate professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

3. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.

### ARTICLE INFO

### ABSTRACT

#### Article History:

Received 2021/04/14

Accepted 2021/06/27

#### Keywords:

Tocopherol,  
Tocotrienol,  
Palm oil,  
Soybean oil,  
Corn oil,  
Olive oil.

DOI: 10.52547/fst.18.117.229

\*Corresponding Author E-Mail:  
pirsa7@gmail.com

Olive oil due to its unique properties and characteristics in terms of nutrition has a very high and well-known position in various societies, but due to the high price of this product is always threatened by all kinds of fraud. Tocopherols and tocotrienols are present in small amounts (about 0.35%) in fats and oils. In this study, the fraud of adding vegetable oils (palm, soybean and corn) to olive oil was investigated by comparing the profiles of tocopherols and tocotrienols using HPLC (High Performance Liquid Chromatography). The mixture statistical design was used to design experiments related to the measurement of tocopherols. After dissolving in n-hexane, the counterfeit oil samples were injected into HPLC with NH<sub>2</sub> column chromatography and 294 and 320 nm fluorescence detectors, respectively, for stimulation and diffusion to identify and analyze tocopherols and tocotrienols. Among all tocopherols and tocotrienols, alpha-tocopherol was predominant in olive oil. Therefore, if combined with other oils, the initial composition of tocopherols changes. Among the oils added to olive oil, palm oil had a very significant effect on the peak area of the tocotrienols. Palm and corn oil had a significant effect on the beta-tocopherol peak. In the mixture of olive oil with corn and soybean oil, the amount of gamma-tocopherol increased significantly. Soybean oil had a significant effect on the peak of delta-tocopherol. Therefore, it can be concluded that delta-tocopherol is an indicator of fraud in adding soybean oil to olive oil. The results showed that there is a significant relationship between the amount of tocopherols and tocotrienols and the fraudulent addition of palm, soybean and corn oils to olive oil. Therefore, the proposed method is a suitable method for identifying and determining fraudulent olive oil.