

نقش قواعد تصمیم‌گیری و بیانیه انطباق برای تعیین کمی مقادیر اتانول در محصولات حلال با استفاده از کروماتوگرافی گازی

حامد صاحبی\*، امیر جويا طلايي، فرناز رحيمي

- مرکز تحقیقات حلال جمهوری اسلامی ایران، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.  
- گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
دریافت: ۱۰ آبان ۱۴۰۱	<p><b>سابقه و هدف:</b> امروزه با توجه به افزایش تقاضای مصرف محصولات حلال در جوامع مسلمان، تعیین مقادیر اتانول در این محصولات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. اتانول، که در برخی موارد می‌تواند به صورت طبیعی در محصولات غذایی تشکیل شود، می‌تواند از نظر شرعی مسائل بحث برانگیزی را در پی داشته باشد. در تحقیقات گذشته، چندین روش برای اندازه‌گیری مقادیر اتانول در مواد غذایی و آشامیدنی معرفی گردیده است، اما هر یک دارای معایبی از جمله استفاده از حلال‌های مضر در عمل استخراج، ریکاوری پایین در استخراج اتانول از ماتریس‌های جامد و تجهیزات جانبی گران قیمت بوده است. در این تحقیق، روشی جدید و سبز برای تعیین کمی اتانول در غذاها و نوشیدنی‌های مختلف مطابق با استاندارد بین‌المللی ایزو معرفی شده است.</p>
دآوری: ۲۵ بهمن ۱۴۰۱	
پذیرش: ۵ اسفند ۱۴۰۱	
<p><b>کلمات کلیدی:</b> اتانول عدم قطعیت قواعد تصمیم محصولات حلال</p>	
<p>* نویسنده مسئول: حامد صاحبی مرکز تحقیقات حلال جمهوری اسلامی ایران، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران. پست الکترونیکی: <a href="mailto:h.sahebi@fda.gov.ir">h.sahebi@fda.gov.ir</a></p>	
	<p><b>مواد و روش‌ها:</b> در این تحقیق از استخراج آبی به کمک هم زدن مغناطیسی همراه با کروماتوگرافی گازی با آشکارساز یونش شعله‌ای (GC-FID) استفاده شد. پارامترهای اعتبارسنجی نظیر گزینش‌پذیری، حد تشخیص، حد کمی، خطی بودن، درستی، دقت و صحت مورد بررسی قرار گرفتند. عدم قطعیت اندازه‌گیری با استفاده از روش پایین به بالا تخمین زده شد.</p> <p><b>یافته‌ها و نتیجه‌گیری:</b> پارامترهای اعتبارسنجی شامل گزینش‌پذیری، حد تشخیص (تقریباً ۰/۰۰۶ میلی‌گرم در گرم) و حد کمی (تقریباً ۰/۰۲ میلی‌گرم در گرم)، خطی بودن (<math>R^2</math> بزرگتر از ۰/۹۹۹)، درستی (بایاس‌های نسبی کمتر از ۳٪)، صحت (ریکاوری ۹۷-۱۰۲ درصد) و دقت (انحراف استاندارد نسبی کمتر از ۵ درصد) رضایت‌بخش بودند. روش پیشنهادی این مطالعه با روش رسمی AOAC 983.13 مقایسه گردید. نتایج نشان داد روش پیشنهادی در آنالیز ماتریس‌های جامد از دقت و صحت بالاتری نسبت به روش رسمی AOAC برخوردار است. روش تایید شده برای تعیین کمی اتانول در ۵۰ نمونه غذایی و نوشیدنی فرآوری شده تجاری مورد استفاده قرار گرفت. در چهار نمونه مقادیر اتانول بیش از حد مجاز ۰/۵ درصد یافت شد و در سه نمونه شامل دو نمونه سرکه و یک نمونه آب میوه مقادیر اتانول نزدیک به حد مجاز اندازه‌گیری شد. بر اساس قاعده تصمیم مبتنی بر باندهای محافظ، غلظت اتانول در هر سه نمونه اخیر بالاتر از حد تصمیم بود. بنابراین سطح اتانول در این نمونه‌ها بالاتر از حد مجاز اتانول با احتمال انطباق ۹۹ درصد تشخیص داده شد. این مطالعه روشی قابل اعتماد برای آنالیز کمی اتانول در غذاها و نوشیدنی‌ها فرآوری شده را جهت اطمینان از حلیت آن‌ها ارائه داده است.</p>

۱- مقدمه

ضروری و تسهیل فرایند صادرات به بازار جهانی، از سال ۱۹۹۷ کمیسیون مشترک FAO/WHO Codex Alimentarius دستورالعمل‌های کلی (دامنه، تعریف، معیارها و الزامات برچسب‌گذاری) را برای استفاده از واژه حلال تدوین کرده است (۱). غذا و نوشیدنی حلال به معنای غذا و

با توجه به جمعیت در حال رشد مسلمانان جهان پیش‌بینی می‌شود بازار جهانی حلال از جمله محصولات غذایی و آشامیدنی حلال همچنان به رشد گسترده خود ادامه دهد. برای جلوگیری از هرگونه تناقض در سیاست‌ها و موانع غیر

مواد حرام در غلظت‌های بسیار پایین در محصولات صادراتی مورد نیاز است. علاوه بر این، یک روش آنالیزی قابل اعتماد برای اندازه‌گیری دقیق محتوای اتانول مجاز در محصولات غذایی و آشامیدنی، به منظور اطمینان از یکپارچگی حلال آن‌ها بسیار ضروری است. با این حال، تا به امروز، روش‌های رسمی موجود برای آنالیز اتانول در نمونه‌های نوشیدنی محدود بوده و با هدف تأیید حلال ارائه نشده‌اند. چنین روش‌هایی عبارتند از روش رسمی AOAC 984.14 برای آبجو و روش رسمی AOAC 983.13 برای شراب (۶ و ۷).

روش‌های مختلف آزمایشگاهی برای تعیین محتوای اتانول در غذاها و نوشیدنی‌های فرآوری شده توسعه یافته‌اند که در درجه اول بر روی ماتریس‌های نمونه مایع مانند سس سویا، روغن زیتون، مکمل‌های غذایی مایع و نوشیدنی‌های الکلی تمرکز دارند. این روش‌ها طیف‌های مختلفی از ابزارها و رویکردهای آنالیزی را به کار می‌گیرند. در مطالعه گومز-کوکا و همکاران، استخراج فضای فوقانی با کروماتوگرافی گازی-آشکارساز یونیزاسیون شعله یا کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی ترکیب شد (۸). این تکنیک به ویژه برای ماتریس‌های آبی ساده مؤثر است و تجزیه و تحلیل نسبتاً ساده و سریعی را ارائه می‌دهد. با این حال، ممکن است برای ماتریس‌های پیچیده به اندازه کافی مؤثر نباشد (۹). پارک و همکارانش با استفاده از بینی الکترونیکی (e-nose) همراه با کروماتوگرافی گازی یک رویکرد نوآورانه را ارائه دادند که پروفایل دقیق نمونه‌ها را مشخص می‌کند (۱۰). با وجود قابلیت آنالیز دقیق، این روش ممکن است نیاز به کالیبراسیون گسترده داشته باشد و ممکن است به عوامل خارجی حساس بوده که این امر کاربردی بودن آن را برای برخی ماتریس‌های پیچیده محدود می‌کند. یک تکنیک غیرمبتنی بر کروماتوگرافی گازی شامل تجزیه و تحلیل دی‌الکترونیک مایکروویو نیز مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۱). این روش به دلیل عدم تکیه بر کروماتوگرافی گازی متمایز است و به طور بالقوه راه‌اندازی را ساده می‌کند. با این حال، ممکن است فاقد دقت یا کاربرد گسترده روش‌های مبتنی بر کروماتوگرافی گازی باشد. روش قابل توجه دیگر استخراج مایع-مایع با دی متیل سولفوکسید (DMSO) به دنبال آنالیز کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی است که توسط پارک و همکاران تأیید شده است (۱۲). این تکنیک برای تشخیص طیف وسیعی از ترکیبات الکلی از جمله الکل‌های محلول (متانول، اتانول،  $\pi$ -پروپانول) و الکل‌های

نوشیدنی مجاز یا حلال شرعی است. یکی از معیارهای اصلی محصولات غذایی و آشامیدنی حلال این است که چنین محصولاتی عاری از درصد الکل بالاتر از استاندارد تعیین شده باشند زیرا می‌تواند مست‌کننده و خطرناک باشد. افزودنی‌های غذایی حاوی الکل نیز شامل این قاعده می‌شوند. از نظر فقه اسلامی، اصطلاح غذاها/نوشیدنی‌های الکلی (خمر) به هر نوع غذا/نوشیدنی دارای درصد الکل مست‌کننده (آبجو، شراب، الکل و غیره) اطلاق می‌شود که حاوی اتانول به عنوان الکل اولیه و اصلی‌ترین علت مست‌کنندگی باشد. خمر برای مسلمان نجس و حرام شرعی است (۲). همچنین استفاده از اتانول حاصل از فرآیند خمرسازی حرام است حتی افزودن مقدار بسیار کم این اتانول در غذاها و نوشیدنی‌های حلال مصرف محصولات را غیر مجاز (حرام) می‌کند (۳).

طبق مقررات و استانداردهای بین‌المللی حلال، مقداری اتانول مجاز (غیر خمر) در محصولات غذایی و آشامیدنی می‌تواند وجود داشته باشد. چنین نمونه‌هایی عبارتند از اتانول طبیعی در غذاها/نوشیدنی‌ها (میوه‌ها، غلات، آبمیوه‌ها و غیره) و اتانولی که به طور طبیعی از طریق فرآیند تخمیر غذاها/نوشیدنی‌ها (سس سویا، سرکه و غیره) حاصل می‌شود. علاوه بر این، با توجه به سودمندی اتانول صنعتی غیرخمر برای فرآوری و نگهداری مواد غذایی، و همچنین استخراج محصولات طبیعی با ارزش از فرآورده‌های گیاهی و حیوانی، این میزان اتانول در تولید غذاها و نوشیدنی‌ها مجاز شمرده می‌شود (۴، ۵). با این حال، درصد این اتانول مجاز باید با استانداردهای تعیین شده توسط سازمان صادرکننده گواهی حلال مطابقت داشته باشد. برخی از سازمان‌های اصلی صادرکننده گواهی حلال توسط وزارت توسعه اسلامی مالزی (JAKIM)، موسسه ارزیابی مواد غذایی، داروها و لوازم آرایشی شورای علمای اندونزی (LPPOM MUI) و شورای اسلامی مذهبی سنگاپور (MUIS) تعیین شده‌اند. مقدار مجاز اتانول در غذاها و نوشیدنی‌های حلال و تعیین حد آستانه‌های آن بسته به نظر سازمان صادرکننده گواهی حلال، منبع اتانول و نوع محصول از کمتر از ۰/۱ درصد تا کمتر از ۱ درصد متفاوت است. از این رو، تأیید حلیت محصولات با آنالیز آزمایشگاهی جهت نشان دادن انطباق آنها با استانداردهای حلال قبل از صدور گواهی‌نامه حلال ضروری است (۳).

ظرفیت آنالیزی کافی (یک آزمایشگاه مجهز با پرسنل مجرب و دارای اعتبار مطابق با استاندارد ISO/IEC 17025) برای ایجاد یک کنترل کیفیت حلال مؤثر، به ویژه برای آنالیز کمی

مارکت‌های تهران خریداری شدند. تمام مواد بر اساس دستورالعمل سازنده نگهداری شدند. نمونه‌های مواد غذایی پیش از آنالیز با استفاده از آسیاب برقی به طور کامل به مدت ۲ دقیقه آسیاب شدند. محلول استوک اتانول (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با مخلوط کردن ۱ میلی‌لیتر استاندارد اتانول و ۹ میلی‌لیتر آب فوق خالص تهیه شد. محلول‌های کاری اتانول از رقیق‌سازی مقادیر مشخصی از محلول استوک اتانول با آب فوق خالص تهیه شدند.

#### ۲-۲- آماده‌سازی نمونه

به طور خلاصه،  $0.1 \pm 0.5$  گرم نمونه، ۱ میلی‌لیتر استاندارد درونی (۱-پروپانول ۰/۱ درصد) و ۸/۵ میلی‌لیتر آب به ویال شفاف ۲۰ میلی‌لیتری حاوی مگنت پوشش داده شده با پلی‌تترافلورو اتیلن (PTFE) (۱۳ میلی‌لیتر طول و ۶ میلی‌لیتر قطر داخلی)، تهیه شده از شرکت Cowie Technology (انگلستان) اضافه گردید. پس از بستن درب ویال، محتوای آن به مدت ۱ دقیقه ورتکس شد و در ادامه به مدت ۶۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه در دمای محیط همزده شد. بعد از استخراج، هر ویال به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد تا جداسازی بین فازها بهتر صورت گیرد. لایه میانی که شامل محلول آبی بود با استفاده از فیلتر سر سرنگی PTFE با منافذ ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد و به ویال کروماتوگرافی گازی انتقال داده شد.

#### ۲-۳- شرایط کروماتوگرافی گازی

اندازه‌گیری اتانول در نمونه‌ها با استفاده از کروماتوگرافی گازی-آشکارساز یونش شعله‌ای (مدل GC-2010 شرکت Shimadzu ژاپن) مجهز به ستون HP-INNOWAX (۳۰ متر طول، ۰/۲۵ میلی‌متر قطر داخلی، ۰/۲۵ میکرومتر ضخامت، شرکت Agilent Technology) انجام شد. حجم تزریق ۱ میکرولیتر، نسب اسپیلت ۱:۱۰، و گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱۰ میلی‌لیتر در دقیقه بود. دمای محل تزریق و آشکارساز به ترتیب  $180^{\circ}\text{C}$  و  $250^{\circ}\text{C}$  بود. دمای اولیه آن  $50^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه تعیین شد، سپس با نرخ ۵ درجه سانتی‌گراد در دقیقه از  $50^{\circ}\text{C}$  تا  $160^{\circ}\text{C}$  افزایش داده شد و به مدت ۲ دقیقه در دمای نهایی نگه داشته شد.

#### ۳- یافته‌ها و بحث

##### ۳-۱- اعتبارسنجی روش

نامحلول در آب (n-بوتانول و n-پنتانول) در نمونه‌های مختلف مواد غذایی کارا است. علیرغم اثربخشی آن، استفاده از DMSO در این روش می‌تواند منجر به مشکلات یونیزاسیون در طول آنالیز کروماتوگرافی گازی شود و نگرانی‌های زیست محیطی را ایجاد کند. در برابر این روش‌ها، یک تکنیک جایگزین شامل استخراج آبی به کمک هم زدن مغناطیسی پیشنهاد شده است. بر اساس یافته‌های مطالعات قبلی، این فرضیه وجود دارد که این روش برای آنالیز اتانول در ماتریس‌های پیچیده مانند مواد غذایی فرآوری شده و محصولات نوشیدنی مناسب است (۷، ۱۳). علاوه بر این، پیش‌بینی می‌شود که از مشکلات مرتبط با یونیزاسیون DMSO در طول آنالیز با کروماتوگرافی گازی جلوگیری شود و جایگزینی سبتری برای تکنیک‌های استخراج مبتنی بر DMSO ارائه دهد.

یک روش توسعه یافته در آزمایشگاه، مخصوصاً برای آزمایش حلال قبل از صدور گواهی‌نامه بین‌المللی حلال، باید بر اساس الزامات استاندارد ISO/IEC 17025 تأیید شود. رویکردهای کافی برای اعتبارسنجی روش می‌تواند یکی یا ترکیبی از اقدامات زیر باشد: (۱) کالیبراسیون یا ارزیابی بایاس و دقت با استفاده از استاندارد مرجع، (۲) ارزیابی نظام‌مند عوامل مؤثر بر نتایج، (۳) ارزیابی استحکام روش، (۴) مقایسه با سایر روش‌های معتبر/استاندارد، (۵) مقایسه بین آزمایشگاهی و (۶) ارزیابی عدم قطعیت اندازه‌گیری (۱۴). بر این اساس، هدف از این مطالعه توسعه و اعتبارسنجی یک روش آنالیز داخلی برای تعیین کمی محتوای اتانول در محصولات مختلف غذایی و آشامیدنی فرآوری شده است. روش پیشنهادی، استفاده از استخراج آبی به کمک هم زدن مغناطیسی همراه با آنالیز کروماتوگرافی گازی-آشکارساز یونش شعله‌ای مطابق با استاندارد ISO/IEC 17025 است. در صورت کارایی بالا، می‌توان از این روش به عنوان یک روش کنترل کیفیت برای تأیید حلیت غذاها و نوشیدنی‌های تجاری مختلف استفاده کرد.

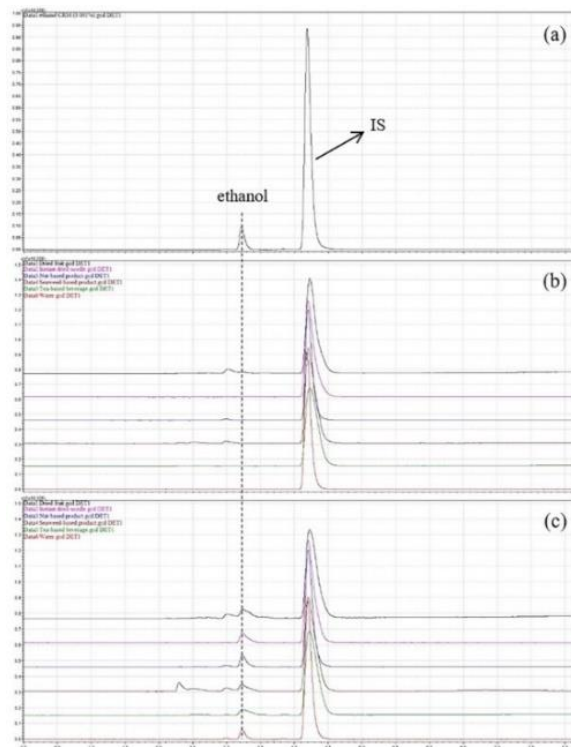
#### ۲- مواد و روش‌ها

##### ۲-۱- مواد شیمیایی

استاندارد گواهی شده اتانول با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از شرکت AccuStandard (آمریکا) تهیه شد. ۱- پروپانول و آب فوق خالص از شرکت CHEM-LAB (بلژیک) تهیه شدند. نمونه‌های مواد غذایی و آشامیدنی از سوپر

نشان داد که تقریباً هیچ جز دیگر با ترکیبات مورد نظر (اتانول و استاندارد داخلی) شویب نشده است. همچنین، هیچ پیک تداخلی در زمان‌های بازداری اتانول و استاندارد داخلی در هیچ یک از نمونه‌های شاهد یا اسپایک مشاهده نشد. بنابراین، روش پیشنهادی گزینش پذیری بالایی برای اتانول در نمونه‌ها نشان داد که این نتیجه حاکی از کفایت آن برای اندازه‌گیری کمی اتانول در ماتریکس‌های پیچیده مانند غذاهای فرآوری شده و نوشیدنی‌ها بود.

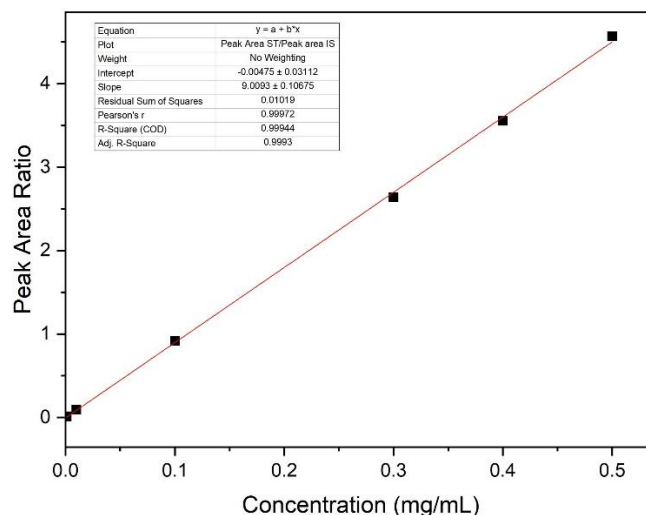
روش آنالیزی پیشنهادی با روش آنالیز رسمی/استاندارد ISO/IEC 17025 اعتبارسنجی شد. با توجه به تعداد محدود نمونه‌های شاهد (بدون اتانول)، گزینش پذیری روش آنالیز پیشنهادی با استفاده از شش نمونه شاهد انتخابی تعیین شد. کروماتوگرام نمونه‌های شاهد (شکل ۱b) و اسپایک شده (شکل ۱c) با کروماتوگرام محلول استاندارد اتانول گواهی شده (شکل ۱a) مقایسه شد. حضور پیک اتانول در نمونه با مقایسه زمان بازداری محلول استاندارد اتانول تایید شد. نتایج



شکل ۱- (a) کروماتوگرام محلول استاندارد اتانول، (b) کروماتوگرام نمونه‌های شاهد، (c) کروماتوگرام نمونه‌های اسپایک شده

با در نظر گرفتن عوامل مختلف مانند LOQ برآورد شده انتظار می‌رود مقادیر اتانول در اکثر ترکیبات آنالیز شده وجود داشته باشد. برای آنالیز اتانول در نمونه‌ها، از روش کالیبراسیون خارجی با محدوده خطی بین ۰/۰۰۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شد. در بررسی خطی بودن روش آنالیز پیشنهادی که با ضریب همبستگی ( $R^2$ ) بیان می‌شود، مقدار  $R^2$  بالاتر از ۰/۹۹۹ به دست آمد که رضایت‌بخش بود. خط کالیبراسیون به همراه پارامترهای آماری مرتبط با مدل خطی در شکل ۲ نشان داده شده است.

در این مطالعه، حد تشخیص (LOD) و حد کمی (LOQ) بر اساس انحراف استاندارد اتانول در نمونه شاهد مشخص شد و شیب منحنی کالیبراسیون در سطوح غلظت نزدیک به LOD برآورد شد. شیب با استفاده از منحنی کالیبراسیون شش نقطه‌ای (۰/۰۰۱۲-۰/۰۰۰۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) محاسبه شد. LOD و LOQ به ترتیب ۰/۰۰۰۳ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برآورد شدند. این نتایج با آنالیز نمونه‌های آب حاوی استاندارد داخلی اتانول در سطوح غلظتی نزدیک به LOD برآورد شده تأیید شد.



شکل ۲- منحنی کالیبراسیون در آنالیز اتانول در نمونه‌های غذایی با کروماتوگرافی گازی-آشکارساز یونش شعله‌ای

اندازه‌گیری مستقل می‌توان استفاده کرد. نتایج حاصل از مطالعات دقت و صحت در جدول ۱ نشان داده شده است. در اینجا، درستی روش آنالیز پیشنهادی بر حسب بایاس نسبی بیان شد. نتایج نشان می‌دهد که مقادیر کلی بایاس نسبی برای همه نمونه‌های ارزیابی شده کوچک (کمتر از ۳ درصد) بود که قابل قبول است. همچنین، روش آنالیز پیشنهادی ریکواری بالایی از اتانول را در تمام نمونه‌های اسپایک شده نشان داد که بین ۹۷ تا ۱۰۲ درصد متغیر بود و صحت بالای آن را نشان می‌داد. علاوه بر این، دقت درون و بین روز روش آنالیزی پیشنهادی به عنوان انحراف استاندارد نسبی (RSD) بیان شد. مقادیر کلی RSD که کمتر از ۵ درصد بود تکرارپذیری و تکثیرپذیری روش را تأیید کرد.

برای ارزیابی بایاس، صحت و دقت روش آنالیز پیشنهادی، مطالعات ریکواری/اسپایک کردن با استفاده از استاندارد اتانول گواهی شده انجام شد. با توجه به تعداد محدود نمونه های بدون اتانول، نمونه‌های حاوی اتانول نیز در طول مطالعات ریکواری/اسپایک کردن استفاده شدند. نمونه‌های اسپایک شده در سه سطح مختلف تهیه شدند و غلظت اسپایک برای نمونه‌های حاوی اتانول حدود ۲ تا ۱۰ برابر بیشتر از نمونه‌های بدون اتانول یا نمونه‌های حاوی مقدار بسیار کم اتانول بود. هر نمونه برای مطالعات ریکواری در سه تکرار تهیه و به مدت سه روز متوالی مورد آنالیز قرار گرفت. برای به حداقل رساندن تغییرات غلظت اتانول بین نمونه‌ها و دوره‌های نمونه‌برداری، در محاسبه درستی و دقت از غلظت اتانول ریکواری شده از نمونه‌های مشخص شده در هر

جدول ۱- درستی، صحت و دقت روش پیشنهادی در آنالیز نمونه‌های اسپایک شده با اتانول (غلظت کم: ۰/۰۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (میلی‌گرم در گرم)، غلظت متوسط: ۰/۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (میلی‌گرم در گرم)، غلظت زیاد ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (میلی‌گرم در گرم))

نمونه	دقت بین روز (%RSD)			ریکواری (%)			دقت در روز (%RSD)			درستی یا بایاس نسبی (%)		
	کم	متوسط	زیاد	کم	متوسط	زیاد	کم	متوسط	زیاد	کم	متوسط	زیاد
نوشیدنی‌های بر پایه چای	۱/۲۰	۱/۹۶	۱/۳۲	۱۰۰/۰۹	۱۰۰/۰۹	۱۰۰/۵۸	۰/۳۹	۱/۲۹	۰/۷۱	۰/۵۱	۰/۲۷	۱/۲۳
آب میوه	۱/۲۶	۱/۳۷	۱/۸۷	۹۹/۳۱	۹۹/۶۹	۹۹/۹۳	۱/۲۰	۰/۴۲	۰/۲۶	۰/۴۸	۰/۵	۰/۷۸
محصولات خشکبار	۱/۹۳	۱/۸۲	۰/۹۵	۱۰۰/۷۴	۱۰۲/۳۰	۱۰۰/۵۴	۰/۵۶	۰/۷۷	۰/۴۶	۱/۰۷	۰/۹	۱/۱۱
سس فلفلی	۱/۲۷	۲/۰۹	۱/۴۳	۱۰۰/۹۷	۱۰۱/۹۳	۱۰۰/۱۳	۰/۷۷	۰/۳۹	۱/۱۵	۱/۳۲	۰/۸۸	۰/۱۳
مایونز	۴/۷۳	۳/۱۸	۲/۸۴	۹۹/۴۵	۹۹/۵۰	۹۹/۱۲	۱/۸۹	۲/۴۶	۲/۲۶	۰/۴۱	۰/۶۶	۰/۳۹
سرکه	۱/۴۶	۱/۷۴	۱/۲۰	۹۹/۰۹	۱۰۰/۳۷	۱۰۰/۷۷	۰/۱۱	۰/۴۴	۰/۳۳	۰/۲۶	۰/۴۱	۰/۱۷
سس سویا	۱/۱۹	۲/۶۰	۲/۷۰	۹۹/۶۸	۱۰۱/۱۵	۱۰۲/۱۲	۰/۱۵	۰/۲۵	۰/۲۸	۰/۴۲	۰/۲۵۲	۰/۸۱
سس گوجه‌فرنگی	۱/۱۶	۱/۵۴	۲/۳۷	۹۹/۷۴	۱۰۰/۱۲	۱۰۲/۱۴	۱/۰۰	۰/۸۱	۱/۳۰	۰/۸۷	۰/۱۹۲	۰/۹۶
سیروپ	۱/۴۵	۱/۸۵	۲/۶۳	۹۹/۵۶	۹۹/۲۵	۹۹/۷۴	۰/۲۵	۰/۲۹	۱/۵۶	۰/۳۸	۰/۰۹	۱/۲۳
ماء‌الشعیر	۱/۳۰	۱/۴۲	۲/۲۹	۱۰۰/۹۲	۱۰۱/۳۸	۹۹/۳۲	۰/۰۹	۰/۱۵	۰/۰۵	۰/۵۵	۰/۷۱	۰/۷۱

۲-۳- مقایسه روش پیشنهادی با روش رسمی

(تقریباً ۰/۵ گرم) و رقت کمتر (حدوداً ۲۰ برابر) استفاده شد. این امر شناسایی پیک اتانول با شدت بیشتر در نمونه‌های دارای غلظت اتانول نزدیک به سطح LOQ گزارش شده در روش AOAC را میسر می‌سازد. علاوه بر این، LOQ برآورد شده در روش پیشنهادی بسیار پایین‌تر (تقریباً ۵ برابر کمتر) از مقدار گزارش شده در روش AOAC بوده است (۷). بر این اساس، روش پیشنهادی نسبت به روش رسمی AOAC 983.13 حساس‌تر بود که این امر آنالیز کمی اتانول در غلظت‌های بسیار پایین و حتی در مقادیر ۵۰ برابر کمتر از حد مجاز اتانول در غذاها و نوشیدنی‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد.

روش پیشنهادی با روش رسمی AOAC 983.13 برای آنالیز اتانول در نمونه‌های مختلف غذا و نوشیدنی مقایسه شد. نتایج آزمون‌های صحت و دقت نشان داد که روش پیشنهادی در آنالیز ماتریس‌های مایع به اندازه روش AOAC 983.13 صحیح و دقیق بوده است (جدول ۲). در آنالیز ماتریس‌های جامد، دقت و صحت بالاتری از روش پیشنهادی در مقایسه با روش AOAC مشاهده گردید. در مقایسه با روش AOAC که از نمونه‌های با وزن کمتر (بین ۰/۰۱ تا ۰/۰۲ گرم) و رقت بسیار بالا (حدوداً ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر) استفاده می‌کند، در روش پیشنهادی این مطالعه از نمونه‌هایی با وزن بیشتر

جدول ۲- مقایسه روش آنالیز پیشنهادی با روش رسمی AOAC 983.13

نمونه	روش AOAC 983.13		روش پیشنهادی	
	RSD (%)	ریکاوری (%)	RSD (%)	ریکاوری (%)
نوشیدنی‌های بر پایه چای	۰/۶۵	۱۰۰/۲۱	۰/۸۰	۱۰۰/۲۳
آب میوه	۰/۴۷	۱۰۰/۹۰	۰/۶۳	۹۹/۶۴
محصولات خشکبار	۳/۲۴	۸۷/۸۰	۰/۶۰	۱۰۱/۱۹
سس فلفلی	۲/۶۵	۹۰/۸۳	۰/۷۷	۱۰۱/۰۱
مایونز	۳/۰۲	۸۴/۱۲	۲/۲۰	۹۸/۸۵
سرکه	۱/۱۵	۹۹/۰۸	۰/۲۹	۱۰۰/۰۸
سس سویا	۳/۳۶	۸۲/۶۱	۰/۲۳	۱۰۰/۹۸
سس گوجه‌فرنگی	۲/۷۸	۸۸/۳۷	۱/۰۴	۱۰۰/۶۷
سیروپ	۱/۸۶	۹۱/۵۶	۰/۷۰	۹۹/۵۲
ماء‌الشعیر	۰/۱۸	۹۹/۴۸	۰/۱۰	۱۰۰/۵۴

۳-۳- آنالیز نمونه‌های غذایی و آشامیدنی و عدم قطعیت

گرفتن مقدار عدم قطعیت گسترش یافته، ۴ نمونه از ۵۰ نمونه حاوی اتانول در غلظتی بالاتر از مقادیر استاندارد تعیین شده (۰/۵ درصد وزنی-وزنی) بودند. محتوای بالای اتانول در برخی از محصولات نوشیدنی احتمالاً به دلیل وجود طعم‌دهنده‌ها و/یا عصاره‌های حاوی اتانول است، در حالی که محتوای موجود در سس فلفلی احتمالاً به دلیل وجود اتانول در مواد نگهدارنده یا مواد افزودنی بوده است.

روش آنالیز اعتبارسنجی شده برای اندازه‌گیری محتوای اتانول در ۵۰ محصول غذایی و آشامیدنی تجاری که دارای ماتریکس‌ها و مواد اصلی مشابه با نمونه‌های آنالیز شده در طول مطالعات اعتبارسنجی بودند استفاده شد. سپس محتوای اتانول اندازه‌گیری شده در محصولات با مقدار اتانول مجاز تعیین شده در استاندارد ملی ایران به شماره ۳۵۵ مقایسه شد. نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که بدون در نظر

جدول ۳- میانگین غلظت اتانول (درصد) در نمونه‌های غذایی و آشامیدنی آنالیز شده با روش اعتبارسنجی شده در این مطالعه

نمونه	RSD (%)	میانگین	RSD (%)	میانگین	RSD (%)	میانگین	RSD (%)	میانگین	RSD (%)
نوشیدنی‌های بر پایه چای	-	ND	۱/۰۸	۰/۱۱۱۵	۱/۵۶	۰/۱۰۲۲	۱/۹۴	۰/۰۰۸۹	۲/۱۳
آب میوه	۲/۴۵	۰/۰۰۲۳	۱/۷۴	۰/۱۰۶۹	۱/۶۱	۰/۰۵۲۷۱	۱/۲۹	۰/۰۶۴۱	۱/۶۹
محصولات خشکبار	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
سس فلفلی	۱/۸۴	۰/۲۳۰۲	۲/۳۵	۰/۳۰۴۸	۲/۲۱	۰/۴۰۲۵	۲/۸۳	۰/۲۸۳۹	۱/۵۶

۰/۰۲۹۵	۱/۶۱	ND	-	۰/۰۲۶۶	۱/۵۷	۰/۰۰۸۳	۱/۲۷	ND	-	مایونز
۰/۰۵۶۲۱	۱/۶۸	۰/۳۵۴۲	۱/۵۱	ND	-	۰/۵۹۶۵	۲/۳۲	ND	-	سس سویا
۰/۸۱۶۳	۳/۵۴	۰/۳۸۱۸	۲/۲۱	۰/۴۰۴۸	۲/۷۵	۰/۴۱۰۵	۲/۷۹	۰/۳۲۷۴	۱/۸۹	ماءالشعیر
۰/۲۸۲۶	۱/۸۷	۰/۱۱۲۶	۱/۹۹	۰/۱۹۸۵	۲/۴۹	۰/۰۸۲۳	۲/۲۹	۰/۱۶۹۲	۱/۷۹	سس گوجه‌فرنگی
۰/۳۶۵۲	۱/۵۷	۰/۵۶۳۴	۲/۱۷	۰/۴۱۲۳	۲/۸۴	۰/۴۱۶۵	۲/۳۲	۰/۳۵۵۲	۱/۶۸	سیروپ
۰/۷۱۴۲	۲/۴۴	۰/۴۷۵۶	۲/۳۳	۰/۳۲۹۸	۱/۸۸	۰/۴۷۲۳	۲/۳۷	۰/۲۹۷۳	۲/۲۲	سرکه

ND: شناسایی نشد

(UC) کمی‌سازی شدند. تمام منابع عدم قطعیت بالقوه به عنوان عدم قطعیت استاندارد به دست آمدند. معادله ۱ الگوریتم محاسبه عدم قطعیت استاندارد ترکیبی را برای اندازه‌گیری (W) نشان می‌دهد.

$$(W) = \sum_{i=1}^N \left( \frac{\theta f}{\theta x_i} \right)^2 u^2(x_i) = \frac{u_C(W)}{W} = \sqrt{\left( \frac{u(C_{ST})}{C_{ST}} \right)^2 + \left( \frac{u(C_{IS})}{C_{IS}} \right)^2 + \left( \frac{u(SP)}{CF} \right)^2 + \left( \frac{u(cal)}{C} \right)^2 + \left( \frac{u(P)}{P} \right)^2 + \left( \frac{u(R)}{R} \right)^2} \quad \text{معادله ۱}$$

kw برای تابع چگالی احتمال گاوسی با حل معادله ۲ به دست می‌آید.

$$1 - PFA_{max} = \int_{-\infty}^{kw} g(\eta; 0.1) d\eta \quad \text{معادله ۲}$$

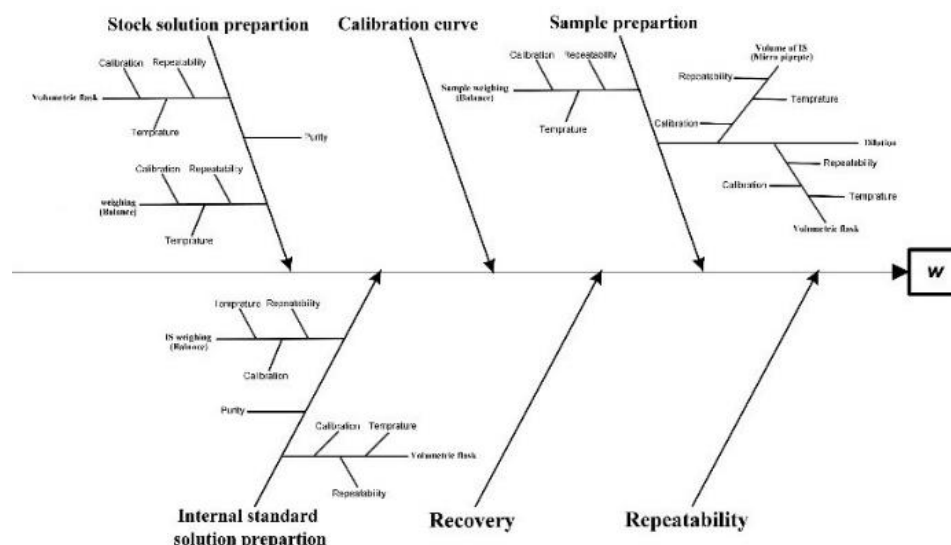
برای انتخاب مقدار g، احتمال رد کاذب برای نتیجه اندازه‌گیری بالاتر از  $Tu - Gb$  باید کمتر از  $\alpha$  باشد. به عبارت دیگر، نتیجه در ناحیه رد قاعده احتمال پایین را نشان می‌دهد که از حد مجاز تجاوز نکرده است.

در این مطالعه، غلظت اتانول در سه نمونه از ۵۰ نمونه آنالیز شده نزدیک به حد مجاز اتانول (۰/۵ درصد وزنی-وزنی) بود. محاسبه عدم قطعیت نسبی برای این نمونه‌ها، Gb، و حدود تصمیم در ( $\alpha = 0.01$ ) در جدول ۴ خلاصه شده است. نتایج نشان داد که غلظت اتانول در هر سه نمونه بالاتر از حد تصمیم بود. بنابراین می‌توان بیان کرد که سطح اتانول در این نمونه‌ها بالاتر از مقدار حد مجاز اتانول با احتمال انطباق ۹۹ درصد بوده است.

روش پایین به بالا برای محاسبات عدم قطعیت به کار گرفته شد. از نمودار ایشیکاوا (شکل ۳) برای مشخص کردن منابع بالقوه‌ای که بر عدم قطعیت کلی تأثیر می‌گذارند استفاده شد و این منابع برای ترکیب در یک عدم قطعیت استاندارد نسبی

$u(C_{ST})$  عدم قطعیت استاندارد مربوط به آماده‌سازی محلول استوک اتانول،  $u(C_{IS})$  عدم قطعیت استاندارد مربوط به آماده‌سازی استاندارد درونی،  $u(SP)$  عدم قطعیت استاندارد مربوط به آماده‌سازی نمونه،  $u(cal)$  عدم قطعیت استاندارد کالیبراسیون،  $u(P)$  عدم قطعیت استاندارد تکرارپذیری روش و  $u(R)$  عدم قطعیت استاندارد ریکاوری است.

قواعد تصمیم‌گیری برای ارزیابی انطباق با محدودیت‌های مشخصات ایجاد شد. به طور کلی، این قواعد برای رد یا پذیرش یک محصول بر اساس نتایج اندازه‌گیری‌ها، محدودیت‌های مشخصات آن و عدم قطعیت، و با در نظر گرفتن سطح احتمال قابل قبول تصمیم‌گیری به کار می‌روند (۱۵). مقداری به نام باند محافظ (Gb) می‌تواند برای کاهش فاصله پذیرش استفاده شود تا حداکثر خطر پذیرش کاذب ( $PFA_{max}$ ) تا حد مطلوب کاهش یابد. بنابراین، منطقه رد در حد آستانه ( $Tu$ ) منهای مقدار  $Gb = kw \cdot u$  شروع می‌شود، جایی که  $u$  نشان دهنده عدم قطعیت استاندارد ترکیبی و  $kw$  نشان دهنده ضریب Gb است.



شکل ۳- نمودار ایشیکاوا برای محاسبه عدم قطعیت

جدول ۴- منابع عدم قطعیت، باند محافظ و حد تصمیم برای اندازه‌گیری اتانول در سه نمونه آنالیز شده

عدم قطعیت							$u_{C(w)}$	باند محافظ (%v/v) <sup>a</sup>	حد تصمیم (%v/v)	مقدار یافت شده (%v/v)	نمونه
$\frac{u_{(ST)}}{C_{ST}}$	$\frac{u_{(IS)}}{C_{IS}}$	$\frac{u_{(SP)}}{CF}$	$\frac{u_{(cal)}}{\bar{C}}$	$\frac{u_{(P)}}{P}$	$\frac{u_{(R)}}{R}$	$\frac{u_{C(w)}}{w}$					
۰/۰۰۸۱	۰/۰۰۸۶	۰/۰۰۸۳	۰/۰۱۷۵	۰/۰۲۶۸	۰/۰۰۴۴	۰/۰۳۵۲	۰/۰۱۶۵	۰/۰۳۸۲	۰/۴۶۱۷	۰/۴۶۹۲	آب میوه-۳
۰/۰۰۸۱	۰/۰۰۸۶	۰/۰۰۷۹	۰/۰۱۶۹	۰/۰۳۱۱	۰/۰۰۳۶	۰/۰۳۸۳	۰/۰۱۸۲	۰/۰۴۲۴	۰/۴۵۷۵	۰/۴۷۵۶	سرکه-۲
۰/۰۰۸۱	۰/۰۰۸۶	۰/۰۰۷۹	۰/۰۱۶۹	۰/۰۲۵۹	۰/۰۰۵۲	۰/۰۳۴۴	۰/۰۱۶۳	۰/۰۳۷۵	۰/۴۶۲۱	۰/۴۷۲۳	سرکه-۴

a:  $G_b = kw \cdot u_{C(w)}$  (kw for  $PF_{Amax}=1\%$  is 2.33)

#### ۴- نتیجه‌گیری

در این تحقیق، روشی برای تعیین مقدار اتانول در مواد غذایی و نوشیدنی‌های مختلف با استفاده از استخراج آبی و هم‌زدن مغناطیسی جهت آماده‌سازی نمونه و در ادامه کروماتوگرافی گازی-آشکارساز یونش شعله‌ای برای اندازه‌گیری مقدار مطابق با استاندارد ISO/IEC 17025 معرفی گردید. پارامترهای اعتبارسنجی شامل گزینش‌پذیری، LOD، LOQ، خطی بودن، صحت، دقت و درستی ارزیابی شدند. در این روش، ریکواری بالایی از اتانول در تمام نمونه‌های اسپایک شده حاصل شد که بین ۹۷ تا ۱۰۲ درصد متغیر بود. همچنین، مقادیر RSD برای دقت درون و بین روز در روش آنالیز پیشنهادی کمتر از ۵ درصد بوده است. LOD و LOQ برآورد شده به ترتیب ۰/۰۰۰۳ و ۰/۰۰۱ میلی‌گرم در گرم به دست آمد. پس از اعتبارسنجی روش، مقادیر اتانول در ۵۰ نمونه غذایی و آشامیدنی تعیین گردید. در تمام نمونه‌های خشک‌بار مقدار اتانول کمتر از LOQ بود. طبق

نتایج به دست آمده، چهار نمونه اتانول بالاتر از حد مجاز ۰/۵ درصد داشتند. عدم قطعیت اندازه‌گیری بر اساس روش پایین به بالا برای نمونه‌هایی که مقادیر اتانول آن‌ها نزدیک به حد مجاز بود برآورد شد. بر پایه قاعده تصمیم با باند محافظ غلظت اتانول در این نمونه‌ها بالاتر از حد تصمیم تشخیص داده شد. نتایج کلی نشان می‌دهد که روش تایید شده برای آنالیز کمی اتانول در انواع مختلف محصولات غذایی و آشامیدنی فرآوری شده مناسب است و می‌تواند به طور معمول به عنوان یک تکنیک قابل اعتماد برای تأیید حلیت این محصولات استفاده شود. مطالعات آتی با استفاده از نمونه و/یا آزمایشگاه‌های بیشتر می‌تواند برای افزایش قابلیت اطمینان آن انجام شود.

#### ۵- تضاد منافع

نتایج حاصل از این مطالعه با منافع نویسندگان و محققان در تعارض نمی‌باشد.



## مراجع

1. Yaakob B, Sazili AQ. Food production from the halal perspective. Handbook of poultry science and technology. 2010: 183.
2. Alzeer J, Abou Hadeed K. Ethanol and its Halal status in food industries. Trends in Food Science & Technology. 2016; 58: 14-20.
3. Pauzi N, Man S, Nawawi MSAM, Abu-Hussin MF. Ethanol standard in halal dietary product among Southeast Asian halal governing bodies. Trends in Food Science & Technology. 2019; 86: 375-380.
4. da Cunha RMC, Brandao SCR, de Medeiros RAB, da Silva Junior EV, da Silva JHF, Azoubel PM. Effect of ethanol pretreatment on melon convective drying. Food Chemistry. 2020; 333: 127502.
5. Homaida MA, Yan S, Yang H. Effects of ethanol treatment on inhibiting fresh-cut sugarcane enzymatic browning and microbial growth. LWT. 2017; 77: 8-14.
6. Sharma K, Sharma SP, Lahiri S. Novel method for identification and quantification of methanol and ethanol in alcoholic beverages by gas chromatography-fourier transform infrared spectroscopy and horizontal attenuated total reflectancefourier transform infrared spectroscopy. Journal of AOAC International. 2009; 92(2): 518-526.
7. Ebersole B, Liu Y, Schmidt R, Eckert M, Brown PN. Determination of ethanol in kombucha products: Single-laboratory validation, first action 2016.12. Journal of AOAC International. 2017; 100(3): 732-736.
8. Gomez-Coca RB, Cruz-Hidalgo R, Fernandes GD, del Carmen Perez-Camino M, Moreda W. Analysis of methanol and ethanol in virgin olive oil. MethodsX. 2014; 1: 207-211.
9. Liu M, Li H, Zhan H. A novel method for the determination of the ethanol content in soy sauce by full evaporation headspace gas chromatography. Food Analytical Methods. 2014; 7: 1043-1046.
10. Park SW, Lee SJ, Sim YS, Choi JY, Park EY, Noh BS. Analysis of ethanol in soy sauce using electronic nose for halal food certification. Food Science and Biotechnology. 2017; 26: 311-317.
11. Abidin ZZ, Omar FN, Yogarajah P, Biak DRA, Man YBC. Dielectric characterization of liquid containing low alcoholic content for potential halal authentication in the 0.5-50 GHz range. American Journal of Applied Sciences. 2014; 11(7): 1104.
12. Park S, Kim JC, Lee HS, Jeong SW, Shim YS. Determination of five alcohol compounds in fermented Korean foods via simple liquid extraction with dimethyl-sulfoxide followed by gas chromatography-mass spectrometry for Halal food certification. LWT. 2016; 74: 563-570.
13. Liu Y, Chan M, Blake E, Sy H, Brown PN. Determination of ethanol content in kombucha products by gas chromatography with flame ionization detection: a multilaboratory study. Journal of AOAC International. 2019; 102(3): 878-882.
14. Anastasopoulos G. The new ISO/IEC 17025: 2017. CAL LAB the International Journal of Metrology. 2017: 30-35.
15. Zamengo L, Frison G, Tedeschi G, Frasson S, Zancanaro F, Sciarrone R. Variability of blood alcohol content (BAC) determinations: The role of measurement uncertainty, significant figures, and decision rules for compliance assessment in the frame of a multiple BAC threshold law. Drug Testing and Analysis. 2014; 6(10): 1028-1037.

## The role of decision rules and conformity assessment for quantitative determination of ethanol content in Halal products using gas chromatography-flame ionization detector

Hamed Sahebi\*, Amir Jouya Talaei, Farnaz Rahimi

- Halal Research Center of IRI, Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.

- Department of Chemistry, Islamic Azad University, Central Tehran Branch, Tehran, Iran.

### Article history

Received: 1 November 2022

Revised: 14 February 2023

Accept: 24 February 2023

### Keywords:

Decision rules

Ethanol

Halal products

Uncertainty

### Correspondance to:

\* Hamed Sahebi

Halal Research Center of IRI,  
Food and Drug

Administration, Ministry of  
Health and Medical

Education, Tehran, Iran.

Email: [h.sahebi@fda.gov.ir](mailto:h.sahebi@fda.gov.ir)

### Abstract

**Background and objective:** Today, determination of ethanol in Halal foods has become paramount due to the increasing demand for halal products. Ethanol may be present in some foods naturally which may lead to Shariah-related concerns. In previous studies, various techniques have been developed to quantify ethanol in food and beverages. However, these methods often come with drawbacks, including utilization of hazardous solvents during extraction, low recovery when extracting ethanol from solid substances, and the high cost associated with additional equipment. This study introduces a novel and eco-friendly approach for quantification of ethanol in a range of foods and beverages, in line with ISO/IEC 17025.

**Materials and methods:** This study was developed by aqueous extraction of ethanol aided by magnetic stirring from the matrix, and analysis was done by gas chromatography equipped with flame ionization detector (GC-FID). Validation parameters including selectivity, detection and quantification limits, linearity, trueness, precision, and accuracy were meticulously examined. Estimation of uncertainty was done by a bottom-up approach.

**Results and conclusion:** Validation parameters including selectivity, limit of detection (0.006 mg/g), limit of quantification (0.02 mg/g), linearity ( $R^2 > 0.999$ ), trueness (relative biases  $< 3\%$ ), accuracy or recoveries (97-102%), and precision (relative standard deviation  $< 5\%$ ) were satisfactory. The proposed method was compared with the official method of AOAC 983.13. According to the results, the proposed method had higher precision and accuracy than the official AOAC method in analysis of solid matrices. Our validated method was used for quantitative determination of ethanol in 50 commercially processed food and beverage samples, through which amount of ethanol exceeded the permissible limit of 0.5% in four samples. In addition, ethanol level was close to the permissible limit in two vinegar and one fruit juice samples. According to the decision rule based on guard bands, concentration of ethanol in all three samples was higher than the decision limit. Therefore, level of ethanol was higher than the permissible limit in these samples with compliance probability of 99%. This study has presented a reliable method for quantification of ethanol in processed foods and beverages to determine their Halal status.

