



中华人民共和国国家标准

GB/T 22324.2—2017/ISO 3632-2:2010
代替 GB/T 22324.2—2008

藏红花 第2部分：试验方法

Saffron—Part 2: Test methods

[ISO 3632-2:2010, Spices—Saffron(*Crocus sativus* L.)—
Part 2: Test methods, IDT]

2017-09-07 发布

2018-04-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

目 次

前言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 检验和样品量	2
5 鉴别试验	3
6 藏红花的显微检验	4
7 水分和挥发物含量的测定	7
8 花丝和无花丝藏红花中花附属物(异物)含量的测定	8
9 花丝和无花丝藏红花中外来物含量的测定	8
10 试样研碎及过筛	9
11 冷水可溶性抽提物的测定	9
12 总灰分的测定	9
13 酸不溶性灰分的测定	10
14 特征参数的测定——紫外/可见光谱法	10
15 人造色素的检出——水溶酸性人造色素的鉴定:薄层色谱法	11
16 人造色素的检出——水溶酸性人造色素的鉴定:高效液相色谱法(HPLC)	14
附录 A(资料性附录) 显微检查结果表示示例	19
附录 B(资料性附录) 显微鉴定参考图片	21
附录 C(资料性附录) 藏红花水提物的紫外/可见光谱	22
附录 D(资料性附录) 液相色谱示例	23

前 言

GB/T 22324《藏红花》分为以下两个部分：

- 第 1 部分：规格；
- 第 2 部分：试验方法。

本部分为 GB/T 22324 的第 2 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替 GB/T 22324.2—2008《藏红花 第 2 部分：试验方法》。本部分与 GB/T 22324.2—2008 相比，除编辑性修改外主要技术差异如下：

- 增加了术语“最低检出下限”(见 3.5)；
- 修改了“花附属物”的属性，花附属物属“异物”(见表 1 和第 8 章)；
- 修改了表 1 和表 2 的“试验步骤”先后顺序(见表 1 和表 2)；
- 删除了“藏红花中色素的鉴别”一章(见 2008 年版的第 15 章)；
- 优化了“人造色素”的鉴别方法(见第 15 章和第 16 章)；
- 增加了“显微鉴定参考图片”(见附录 B)。

本部分使用翻译法等同采用 ISO 3632-2:2010《香辛料 藏红花 第 2 部分：试验方法》

与本部分中规范性引用的国际文件有一致性对应关系的我国文件如下：

- GB/T 12729.2—2008 香辛料和调味品 取样方法(ISO 948:1980,NEQ)；
- GB/T 12729.7—2008 香辛料和调味品 总灰分的测定(ISO 928:1997,NEQ)；
- GB/T 12729.9—2008 香辛料和调味品 酸不溶性灰分的测定(ISO 930:1997,MOD)；
- GB/T 12729.11—2008 香辛料和调味品 冷水可溶提取物的测定(ISO 941:1980,MOD)；
- GB/T 22324.1—2017 藏红花 第 1 部分：规格(ISO 3632-1:2011,IDT)。

本部分做了下列编辑性修改：

- 修改了标准名称。

本部分由中华全国供销合作总社提出。

本部分由全国辛香料标准化技术委员会(SAC/TC 408)归口。

本部分起草单位：淮阴师范学院、南京野生植物综合利用研究院。

本部分主要起草人：罗玉明、胡卫成、张卫明、陈仕荣。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB/T 22324.2—2008。

藏红花 第2部分:试验方法

1 范围

GB/T 22324 的本部分规定了藏红花(*Crocus sativus* L.)试验方法。
本部分适用于花丝、无花丝藏红花和藏红花粉的质量检验。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

ISO 928 香辛料和调味品 总灰分的测定(Spices and condiments—Determination of total ash)

ISO 930 香辛料和调味品酸 不溶性灰分的测定(Spices and condiments—Determination of acid-insoluble ash)

ISO 941 香辛料和调味品 冷水可溶提取物的测定(Spices and condiments—Determination of cold water-soluble extract)

ISO 948 香辛料和调味品 取样(Spices and condiments—Sampling)

ISO 3632-1 香辛料 藏红花 第1部分:规格[Spices—Saffron(*Crocus sativus* L.)—Part 1: Specification]

3 术语和定义

ISO 3632-1 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

水分和挥发物含量 moisture and volatile matter content

在本部分规定条件下测得的失重(质量分数)。

3.2

色度 colouring strength

$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$

1%(1 g/100 mL)的试样溶液,在最大吸收波长(约 440 nm)处,用 1 cm 石英池测得的藏红花素的吸收值。

注:色度主要与藏红花素有关。

3.3

藏红花提取物的紫外/可见光谱 UV-Vis profile

藏红花水提物在 200 nm~700 nm 波长范围的吸收光谱。

注:图 C.1 为藏红花紫外/可见光谱图示例。

3.4

检出极限 limit of detection; LOD

通过环试或其他合适验证,能可靠检出(不要求定量)的试样中被测物最低浓度或最小量。

3.5

最低检出下限 minimum required performance limit; MRPL

样品中能测得并确认的被测物最小含量。

4 检验和样品量

4.1 实验室样品的最小量

取样方法按 ISO 948 的规定执行。

由于藏红花价格高,实验室得到的样品有限,实验室样品的最小质量:花丝和无花丝藏红花为 23 g,藏红花粉为 13.5 g,以便能完成两次平行标准试验。

建议实验室留有略多点的样品,以应对可能的争议。因试样少,建议从均匀样品中取样。

4.2 应做的检验及样品量

花丝和无花丝藏红花见表 1,藏红花粉见表 2。

表 1 花丝和无花丝藏红花

试验步骤	项目	试样量 g	说明	试验方法
1	鉴别试验	5	新试样,非破坏性试验	第 5 章
2	显微检查	0.05	试样来自步骤 1	第 6 章
3	花附属物(异物)含量测定	3	试样来自步骤 1、非破坏性试验	第 8 章
4	外来物测定	3	试样来自步骤 3、合并花附属物后,重新组成样品	第 9 章
5	冷水可溶性抽提物的测定	2	试样来自步骤 4	第 11 章
6	水分和挥发物含量的测定	2.5	新试样,留样用于测定总灰分和酸不溶性灰分	第 7 章
7	总灰分的测定	2	用步骤 6 的留样	第 12 章
8	酸不溶性灰分的测定	—	试样由步骤 7 中得到	第 13 章
9	研碎、过筛	4	新样品,按第 10 章过筛,95%的粉末样品能通过 500 μm 的筛,合并筛上和筛下样品	第 10 章
10	特征参数的测定	0.5	样品来自过筛后的步骤 9	第 14 章
11	薄层色谱(TLC)法: 人造色素的鉴定	0.5	样品来自过筛前的步骤 9,可选择或外加 HPLC 法测定(步骤 12),两种方法都用抽提物	第 15 章
12	高效液相色谱法(HPLC): 人造色素的鉴定	0.5	样品来自过筛前的步骤 9,可选择或外加 TLC 法测定(步骤 11),两种方法都用抽提物	第 16 章

注:剩 4.50 g 样品可用于后续测定或重复必要的分析步骤。

表 2 藏红花粉

试验步骤	项目	试样量 g	说明	试验方法
1	鉴别试验	0.2	新试样;若比色分析结果不符合要求,不进行此项试验	第 5 章
2	显微检查	0.05	新试样	第 6 章
3	水分和挥发物含量的测定	2.5	新试样;保留试样,用于测定总灰分和酸不溶性灰分	第 7 章
4	总灰分的测定	2	用步骤 3 试样的残留物	第 12 章
5	酸不溶性灰分的测定	—	用步骤 4 试样的残留物	第 13 章
6	研磨、过筛	4	新试样;确认 95% 的粉末能过 500 μm 的筛,合并筛上和筛下样品	第 10 章
7	冷水可溶提取物的测定	2	试样来自步骤 6	第 11 章
8	特征参数的测定	0.5	试样来自过筛后的步骤 6	第 14 章
9	薄层色谱法(TLC): 人造色素的鉴定	0.5	样品来自过筛前的步骤 6,可选择或外加进行 HPLC 法测定(步骤 10),两种方法都用抽提物	第 15 章
10	高效液相色谱法(HPLC): 人造色素的鉴定	0.5	样品来自过筛前的步骤 6,可选择或外加进行 TLC 法测定(步骤 9),两种方法都用抽提物	第 16 章

注:剩 1 g 样品可用于后续测定或重复必要的分析步骤。

5 鉴别试验

5.1 通则

若初步分析表明藏红花不纯,则停止进行后续试验。

5.2 花丝藏红花和无花丝藏红花

5.2.1 原理

用放大镜对藏红花做外观检查。

5.2.2 仪器

5.2.2.1 放大镜:最大倍数为 10。

5.2.2.2 表玻璃:合适大小。

5.2.3 鉴别方法

将花丝藏红花或无花丝藏红花(表 1)试样平摊于表玻璃(5.2.2.2)上,用放大镜(5.2.2.1)检查。

5.2.4 结果说明

所有花丝藏红花应源自植物 *Crocus sativus* L.,若发现有藏红花以外的植物性物质,拒收试样。

5.3 藏红花粉

5.3.1 原理

用显色反应进行鉴别。

5.3.2 试剂

5.3.2.1 硫酸： $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4)=1.19\text{ g/L}$ 。

5.3.2.2 二苯胺溶液：将 0.1 g 二苯胺加至 20 mL 硫酸(5.3.2.1)和 4 mL 水中，二苯胺不应与硫酸发生显色反应。

5.3.3 瓷坩埚

平底瓷坩埚。

5.3.4 方法

称取 0.2 g 藏红花样品(参见表 2)。将试样缓缓加入盛有二苯胺溶液(5.3.2.2)的瓷坩埚(5.3.3)中。

5.3.5 结果说明

纯藏红花立刻变成蓝色，蓝色迅速变成红棕色，有硝酸盐存在时，蓝色持久不变。

6 藏红花的显微检验

6.1 通则

本法用于检验花丝和无花丝藏红花及藏红花粉是否具有藏红花(*Crocus sativus* L.)柱头的特征，以了解附属物和外来物的大体状况。

6.2 原理

对藏红花粉和磨碎花丝藏红花的鉴别确认。按 6.5 所述条件，用显微镜观察解剖结构，辨别外来物和花附属物(异物)；若必要，可对观察到的解剖组分含量进行测定(参见附录 A 和附录 B)。

6.3 试剂

6.3.1 碘-碘化钾溶液

在 100 mL 单标线容量瓶(6.4.5)中，加 2 g 碘、4 g 碘化钾和约 10 mL 水，完全溶解后，用水稀至刻度，盖紧。

6.3.2 增透液

5 g/100 mL 的氢氧化钠(或氢氧化钾)溶液或 8 g/100 mL 的三氯乙醛溶液。

6.4 仪器

实验室通用仪器，以及下列仪器。

6.4.1 载玻片。

6.4.2 盖玻片。

- 6.4.3 解剖刀。
- 6.4.4 探针。
- 6.4.5 单标线容量瓶：100 mL。
- 6.4.6 注射器：50 μL （微升分度）。
- 6.4.7 显微镜：100 倍、400 倍，配偏光观察装置（可选）。

6.5 方法

6.5.1 试样

在每一载玻片上（6.5.2~6.5.4），依序放置 0.001 g~0.002 g 藏红花粉（10.3）或研碎的花丝藏红花（10.2）样品。

6.5.2 用纯水的观察准备

按如下方法准备 2 个载玻片：

在载玻片上置 50 μL 水，用解剖刀或探针取样（6.5.1），使其与水混合，放置 5 min，确认粉末完全湿润后，盖上盖玻片。

6.5.3 用氢氧化钠（氢氧化钾）或三氯乙醛溶液的观察准备

如 6.5.2 所示，准备 2 个载玻片，用氢氧化钠（氢氧化钾）或三氯乙醛溶液（6.3.2）代替水。加入澄清的增透液（以免改变细胞组织、确保鉴别进行），放置几分钟，待其透明后观察 10 min。

注：此项操作除去了部分或全部细胞成分，使被测物更透明，细胞组织尤其是硬质成分、导管、纤维和表皮组分易于观察。

6.5.4 用碘-碘化钾溶液的观察准备

准备如 6.5.2 所述的载玻片，以碘-碘化钾溶液（6.3.1）代替水。

注：可观察到染成黑蓝色或黑紫色的淀粉粒。

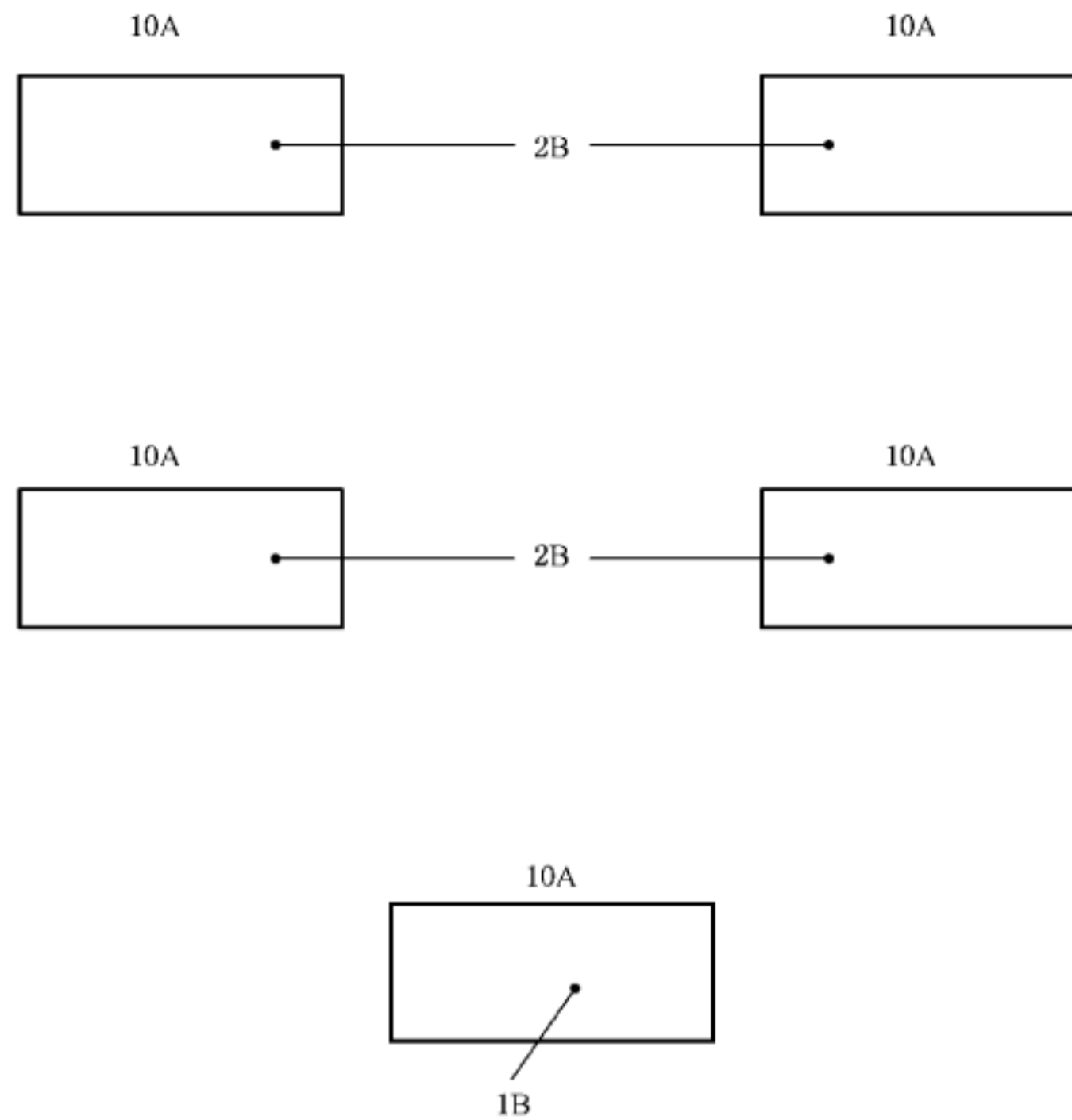
6.5.5 观察、鉴别和计数

将 6.5.2~6.5.4 中准备好的载玻片分别置于显微镜（6.4.7）下，先设定放大倍数为 100 倍，然后在 400 倍下鉴定，对观察到的组分进行计数（参见 6.7）。

注：对每一个载玻片，进行 10 次观察，鉴别解剖结构和外来组分，并进行计数。

若显微镜配有偏光观察装置，6.5.2 中准备的两个载玻片中的一个应按本条所述，在偏光下观察。

图 1 列出应计数的全部操作示例。



说明：

A —— 视场；

B —— 载玻片。

图 1 计数方法示例

6.6 结果表示

附录 A 给出了显微检查结果表示示例。

6.7 显微检查

显微检查参考图片见附录 B。

检查中,可观察到如下成分：

- a) 柱头碎片(图 B.1)；
- b) 柱头表皮细胞残骸(图 B.2)；
- c) 花柱表皮残骸,具有曲弯细胞壁的特征(图 B.3)；
- d) 直径 $80\ \mu\text{m}\sim 100\ \mu\text{m}$ 的圆花粉粒(图 B.4)；
- e) 由螺旋状导管集成的传导组分碎片(图 B.5)；
- f) 雄蕊碎片(图 B.6)；
- g) 淀粉粒(图 B.7)；
- h) 无机物(图 B.8)；
- i) 草的碎片(图 B.9)；
- j) 透明溶液中的彩色细胞(图 B.10)。

6.8 显微观察说明

根据计数表所列的检查项目,评估每一显微结构的相对含量(磨碎过的藏红花主要由柱头、花柱和

花粉粒碎片组成)。

按表 A.1 和表 A.2 格式报告观察结果。

注：磨碎的藏红花不得含有硬化细胞、纤维、发丝或淀粉粒，溶于水的细胞物质呈橙黄色。

7 水分和挥发物含量的测定

7.1 通则

本法适用于花丝、无花丝藏红花和藏红花粉水分和挥发物含量的测定。

注：ISO 939 的测定方法需较多样品，不适用于藏红花。

7.2 原理

样品在 103 °C ± 2 °C 烘箱中干燥 16 h。

7.3 仪器

7.3.1 称瓶或蒸发皿：带盖。

7.3.2 烘箱：103 °C ± 2 °C。

7.3.3 干燥器：内置充足的干燥剂。

7.3.4 分析天平：精度 ± 0.001 g。

7.4 方法

7.4.1 试样

7.4.1.1 花丝和无花丝藏红花

用预先干燥并称皮重的称瓶或蒸发皿(7.3.1)称取约 2.5 g 样品(见表 1, 精确至 ± 0.001 g)。

7.4.1.2 藏红花粉

用预先干燥并称皮重的称瓶或蒸发皿称取约 2.5 g 样品(见表 2, 精确至 ± 0.001 g)。

7.4.2 测定

将盛有试样(7.4.1.1 或 7.4.1.2)的称瓶(或蒸发皿)开盖后, 放入 103 °C 烘箱中干燥 16 h, 取出盖好后, 置干燥器中冷却, 称重, 精确至 ± 0.001 g。

保留测定了水分和挥发物含量的样品, 以便用于总灰分(第 12 章)和酸不溶性灰分的测定(第 13 章), 每份样品做两次平行测定。

7.5 结果表示

水分和挥发性物质含量(w_{MV}), 以初始样品质量分数计, 数值以 % 表示, 按式(1)计算:

$$w_{MV} = (m_0 - m_1) \times \frac{100}{m_0} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

m_0 ——试样质量, 单位为克(g);

m_1 ——干燥后残留物质量, 单位为克(g)。

若重复性符合要求, 取两次测定的算术平均值作为测定结果。

8 花丝和无花丝藏红花中花附属物(异物)含量的测定

8.1 原理

将样品中的异物用物理方法分离后称重。

8.2 仪器

8.2.1 表玻璃。

8.2.2 实验用小镊子。

8.2.3 分析天平:精度±0.01 g。

8.3 方法

8.3.1 试样

称取约 3 g 样品(精确至±0.01 g)。

8.3.2 测定

将试样平铺于一张中灰纸上,用小镊子拣出花附属物(异物),置于预先干燥的表玻璃(8.2.1)上,用分析天平称量(精确至±0.01 g)。

8.4 结果表示

样品花附属物(异物)含量(w_F)以质量分数计,数值以%表示,按式(2)计算:

$$w_F = (m_2 - m_1) \times \frac{100}{m_0} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

m_2 ——表玻璃和异物质量,单位为克(g);

m_1 ——表玻璃质量,单位为克(g);

m_0 ——试样质量,单位为克(g)。

若重复性符合要求,取两次测定的算术平均值作为测定结果。

9 花丝和无花丝藏红花中外来物含量的测定

9.1 原理

将试样中的外来物用物理方法分离后称重。

9.2 仪器

与第 8 章相同。

9.3 方法

9.3.1 试样

将已测定过花附属物(异物)含量的试样(第 8 章)合并成新试样(约 3 g),充分混匀,然后称样(精确至±0.01 g)。

9.3.2 测定

将试样平摊于中灰纸上,用镊子拣出外来物。先将已干燥过的表玻璃称重,精确至±0.01 g。再将分离出来的外来物转移至表玻璃上,称其总质量,精确至±0.01 g。

9.4 结果表示

样品中外来物含量(w_{FM}),以质量分数计,数值以%表示,按式(3)计算:

$$w_{FM} = (m_3 - m_1) \times \frac{100}{m_0} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

m_3 ——表玻璃和外来物质量,单位为克(g);

m_1 ——表玻璃质量,单位为克(g);

m_0 ——试样质量,单位为克(g)。

10 试样研碎及过筛

10.1 仪器

10.1.1 研磨器

应符合如下要求:

- a) 易拆装和清洗,具有最小的死体积;
- b) 能快速、均匀研磨、不易发热或水分损失;
- c) 尽可能避免与周围空气接触;
- d) 能做到全部回收所有样品碎片;
- e) 不带入任何外来物。

10.1.2 分样筛

500 μm 孔径。

10.2 花丝和无花丝藏红花

用研磨器(10.1.1)磨碎样品(见表 1)至 95%的粉末样品能过筛(10.1.2),然后再合并筛上和筛下样品,混合均匀。

10.3 藏红花粉

95%的样品(见表 2)能过筛,否则,应在研磨器研磨以达到所要求的粒度。然后再合并筛上和筛下样品,全部混合均匀。

11 冷水可溶性抽提物的测定

按 ISO 941 的规定执行。

花丝、无花丝藏红花和藏红花粉取样 2.00 g±0.01 g。

12 总灰分的测定

按 ISO 928 的规定执行。

花丝、无花丝藏红花和藏红花粉使用已测定过水分含量的样品(7.4.2),取 2 g 试样。

13 酸不溶性灰分的测定

按 ISO 930 的规定执行。

花丝、无花丝藏红花和藏红花粉用测定总灰分(第 12 章)得到的灰分作试样。

14 特征参数的测定——紫外/可见光谱法

14.1 通则

本法可测定与藏红花苦素、藏红花醛和藏红花素有关的特征参数;本法可直接用于符合 10.3 要求的藏红花粉以及符合 10.2 要求且已研碎过筛后的花丝藏红花和无花丝藏红花特征参数的测定。

14.2 原理

在室温下、200 nm~700 nm 波长范围,记录藏红花水抽提物的光密度变化曲线。

14.3 仪器

14.3.1 光度计:可用于 200 nm~700 nm 的光度测定。

14.3.2 石英池:1 cm。

14.3.3 容量瓶:200 mL、1 000 mL。

14.3.4 移液管:20 mL。

14.3.5 滤膜:醋酸纤维或 0.45 μm 多孔亲水聚四氟乙烯(PTFE)。

14.4 方法

14.4.1 试样

准确称取 500 mg 样品(见表 1 或表 2)精确至 ± 1 mg,置于表玻璃上。

14.4.2 测定

将试样定量转移至 1 000 mL 容量瓶(14.3.3)中,加 900 mL 蒸馏水,用磁搅拌器(1 000 r/min)搅拌 1 h,避光,取出搅拌棒。用蒸馏水稀至刻度,盖紧后摇匀。用 20 mL 移液管(14.3.4)吸取整数份数的溶液,移入 200 mL 容量瓶(14.3.3)中,用蒸馏水稀至刻度,盖紧后摇匀。避光下,用滤膜(14.3.5)迅速过滤,以便得到清澈溶液。

调节光度计(14.3.1),在 200 nm~700 nm 波长范围,以蒸馏水作参比,记录滤液的吸收值变化曲线。

附录 C 给出藏红花水抽提物的紫外/可见光谱图示例。

14.5 结果表示

直接读取三个波长下的特定吸收值(A),作为测定结果,如式(4)所示:

$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (257 nm): 藏红花苦素在 257 nm 的吸收值;

$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (330 nm): 藏红花素在 330 nm 的吸收值;

$A_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (440 nm): 藏红花醛在 440 nm 的吸收值。

$$A_{1\text{ cm}}^{1\%} = \frac{D \times 10\,000}{m \times (100 - \omega_{\text{MV}})} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

D ——特征吸收;

m ——试样质量(14.4.1),单位为克(g);

ω_{MV} ——样品的水分和挥发物含量(质量分数),%。

14.6 检验报告

检验报告应包括以下信息:

- a) 所用方法;
- b) 测得的结果;
- c) 本部分未规定或可选的操作细节以及可能影响测定结果的偶然因素;
- d) 水分含量、按第 7 章规定方法测得的挥发物含量;
- e) 藏红花颗粒大小(若为藏红花粉);
- f) 全面鉴别样品所需的所有必要信息;
- g) 所用滤膜。

15 人造色素的检出——水溶酸性人造色素的鉴定:薄层色谱法

15.1 总则

本法可直接用于鉴定藏红花粉(符合 10.3 要求的)和花丝及无花丝藏红花(按 10.2 的规定研碎过筛)中是否含有水溶酸性人造色素。

15.2 原理

萃取水溶酸性人造色素。经连续洗涤或酸处理后,除去了藏红花中的天然色素尤其是藏红花醛,水溶酸性人造色素经聚酰胺微色谱柱洗脱、分离,最后用 TLC 法鉴定。

15.3 试剂

除特别说明外,所用试剂为分析纯,水为蒸馏水或相当纯度的水。

15.3.1 甲醇。

15.3.2 丙酮。

15.3.3 甲酸或冰乙酸:98%(质量分数)。

15.3.4 氨水溶液:25%(质量分数)。

15.3.5 硫酸:98%(质量分数)。

15.3.6 氢氧化钠溶液:40 g/100 mL。

15.3.7 洗脱剂(用于纯化甲醇-氨柱)。

在 100 mL 试管中加入 5 mL 氨水溶液(15.3.4),然后加 95 mL 甲醇(15.3.1)。

15.3.8 混合洗脱剂

15.3.8.1 洗脱剂 1

将 2 g 柠檬酸三钠溶于 80 mL 水和 20 mL 氨水溶液(15.3.4)的混合液中。

15.3.8.2 洗脱剂 2

将 0.4 g 氯化钾溶于 50 mL 叔丁醇、12 mL 丙酸和 38 mL 水的混合液中。

15.3.9 水溶性人造色素储备溶液:浓度为每升甲醇约含 1 g 色素。

在 8 个 100 mL 高型烧杯(15.4.11)组成的系列中,分别用甲醇溶解 100 mg 喹啉黄、日落黄 S、柠檬黄、苋菜红、丽春红 4R、偶氮玉红、(酸性)二号橙、绕色灵。将其分别转入 8 个 100 mL 容量瓶(15.4.9)中,用甲醇稀释至刻度,摇匀。

注:仅列出部分人造色素(供参考)。

15.3.10 水溶性人造色素工作溶液:浓度为每升甲醇约含 0.1 g 色素。

用单刻线移液管(15.4.8),在 8 个 100 mL 容量瓶(15.4.9)中,分别对应加 10 mL 储备溶液(15.3.9),用甲醇稀释至刻度,摇匀。

注:这些溶液逐一被用于测量 R_f 值(15.5.5)。

15.3.11 水溶性人造色素参比溶液:浓度为每升甲醇约含 0.01 g 色素。

用移液管,从每瓶工作液(15.3.10,共 8 瓶)中各取 10 mL,加到 1 个 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀至刻度,摇匀。

15.4 仪器

15.4.1 SPE 色谱提纯柱:填充 125 mg 聚酰胺的固相萃取柱。

15.4.2 旋蒸仪。

15.4.3 台式离心机:转速 4 000 r/min,转筒可放入 25 mL 试管。

15.4.4 离心管:25 mL。

15.4.5 梨形瓶:10 mL。

15.4.6 真空萃取器(可选)。

15.4.7 微量移液管:100 μ L~1 mL。

15.4.8 单刻线移液管:10 mL。

15.4.9 容量瓶:100 mL。

15.4.10 试管:100 mL。

15.4.11 高型烧杯:100 mL。

15.4.12 注射器:10 μ L(微升分度)。

15.4.13 巴斯德吸管。

15.4.14 薄层板。

15.4.15 玻璃层析缸:带磨砂玻璃盖,可放 200 mm \times 200 mm 薄层板。

15.4.16 塑料吸管:2 mL、10 mL。

15.4.17 水浴。

15.4.18 pH 计。

15.5 方法

15.5.1 试样

来自 10.2 的花丝、无花丝藏红花粉或 10.3 的藏红花粉中,称取 500 mg(精确至 mg)藏红花样品置于离心管(15.4.4)中。

15.5.2 人造色素的萃取

15.5.2.1 用刻度吸管加入 25 mL 60 $^{\circ}$ C 的热水,手动搅拌 1 min,确保藏红花粉不悬浮在管壁;若有些留

在底部,用小刮刀再次搅拌使其悬浮,搅动后避光放置 10 min,然后再次充分搅拌。

15.5.2.2 平衡放置离心管,转速为 4 000 r/min,离心 10 min。用巴斯德吸管(15.4.13)将上层清液移入 50 mL 高型烧杯(15.4.11)中,加 500 μ L 甲酸或 2.5 mL 冰乙酸(15.3.3)使其 pH 值为 2(15.4.18)。

15.5.2.3 若藏红花中的天然色素导致色谱结果不理想,可选用以下方法代替 15.5.2.2 所述方法。平衡放置离心管,转速为 4 000 r/min,离心 10 min。

用巴斯德吸管将上层清液移入 50 mL 烧杯,用微量移液管(15.4.7)滴加硫酸(15.3.5)直至 pH 值为 0.1。

在 100 $^{\circ}$ C 水浴上加热溶液 30 min,平衡放置离心管,转速 4 000 r/min,离心 5 min。

用巴斯德吸管将上层清液移入 50 mL 烧杯,用氢氧化钠溶液(15.3.6)调节至 pH 为 2。

平衡放置离心管,转速为 4 000 r/min,离心 5 min。

15.5.3 样品的纯化

15.5.3.1 纯化柱的准备与人造色素的吸附

用 10 mL 水湿润固相萃取柱(15.4.1)。

用 10 mL 注射器,将 15.5.2.2 或 15.5.2.3 中得到的藏红花提取物过固相萃取柱。

15.5.3.2 除去其他组分

用 45 mL 甲醇(15.3.1)、45 mL 丙酮(15.3.2)和 45 mL 甲醇(15.3.1)连续洗脱 SPE 柱,在 6 mL/min~8 mL/min 的恒速下,用 500 μ L 甲酸酸化。

注:本次洗脱操作中,允许甲醇酸化体积大于回收体积;若使用 15.5.2.1 规定方法,淋洗剂体积由 45 mL 改为 10 mL。

15.5.3.3 人造色素的洗脱

用 10 mL 洗脱剂(15.3.7)洗脱附着的人造色素,收集有色溜出物于梨形瓶(15.4.5)中,在 40 $^{\circ}$ C 以下减压,旋蒸至干。

用微量移液管(15.4.7)注入 300 μ L 甲醇将残渣再溶解;如果用真空提取器,耗时将大大减少,真空提取器便于使用更大体积的溶剂,但 6 mL/min~8 mL/min 的溜出速率应避免回收组分的异常损失。

15.5.4 层析和检出

在层析缸(15.4.15)内垫一层滤纸,将洗脱剂 1(15.3.8.1)和洗脱剂 2(15.3.8.2)倒入每个层析缸至液面高度约 1 cm,盖上盖子,放置 1 h~2 h 以便缸内溶剂蒸汽达到饱和。

用注射器(15.4.12)将 10 μ L 甲醇残渣(15.5.3.3)和 10 μ L 参比溶液(15.3.11)加至距薄层板(15.4.14)下沿 15 mm 处,点样点彼此相距 7 mm~10 mm。

在距薄层板上沿 70 mm~150 mm 处划一条平行线,作为洗脱剂 1 和洗脱剂 2 的溶剂前沿终点。

将每个薄层板分别放入层析缸,展开至溶剂前沿到达平行线,从层析缸中取出薄层板于通风厨中放置至干,日光下观察薄层板。

注:洗脱剂 1 的层析时间约 45 min,洗脱剂 2 的层析时间约 8 h。

15.5.5 计算

计算色素参比溶液(15.3.11)和样品提取成分的 R_f 值,如式(5)所示:

$$R_f = \frac{l_1}{l_2} \dots\dots\dots (5)$$

式中:

l_1 ——参比或样品斑点移动距离;

l_2 ——溶剂前沿移动距离。

15.5.6 结果说明

通过比较试样与参比溶液得到的 R_f 值,可鉴别样品提取物中是否含有人造色素。

15.5.7 结果表示

试验结果应包括方法的检出极限。

16 人造色素的检出——水溶酸性人造色素的鉴定:高效液相色谱法(HPLC)

16.1 通则

本试验方法适用于测定藏红花中下列可能存在的水溶酸性人造色素含量:

- a) 苋菜红;
- b) 偶氮玉红;
- c) (酸性)二号橙;
- d) 丽春红 4R;
- e) 喹啉黄;
- f) 日落黄 S;
- g) 柠檬黄;
- h) 油溶黄 2G;
- i) 绕色灵。

本法可直接用于符合 10.3 要求的藏红花粉,以及磨碎过筛符合 10.2 要求的花丝、无花丝藏红花的测定。本法仅用于表 4 所列浓度、给定人造色素的检出和定量。

16.2 原理

将水溶酸性人造色素萃取,藏红花中的天然色素尤其是藏红花素经连续洗脱或酸处理,经聚酰胺微柱分离、洗脱,用带二极管阵列检测器的反相高效液相色谱鉴定。

16.3 试剂

16.3.1 甲醇。

16.3.2 甲醇(色谱级)。

16.3.3 丙酮。

16.3.4 乙氰(色谱级)。

16.3.5 氨溶液:25 %(质量分数)。

16.3.6 甲酸或冰乙酸:98 %(质量分数)。

16.3.7 硫酸:98 %(质量分数)。

16.3.8 氢氧化钠溶液:40 g/100 mL。

16.3.9 磷酸二氢钾:98 %(质量分数)。

16.3.10 氢氧化钾:1 mol/L。

16.3.11 洗脱剂

在 100 mL 试管中,加入 5 mL 氨溶液(16.3.5)和 95 mL 甲醇(16.3.1)。

16.3.12 水溶酸性人造色素溶液。

16.3.12.1 人造色素。

16.3.12.1.1 喹啉黄。

16.3.12.1.2 日落黄 S。

16.3.12.1.3 油溶黄 2G。

16.3.12.1.4 柠檬黄。

16.3.12.1.5 苋菜红。

16.3.12.1.6 丽春红 4R。

16.3.12.1.7 偶氮玉红。

16.3.12.1.8 (酸性)二号橙。

16.3.12.1.9 绕色灵。

16.3.12.2 标准储备溶液:浓度约 1 mg/mL。

将人造色素(16.3.12.1)各称取约 100 mg(精确至±0.1 mg),分别置于 100 mL 单标线容量瓶(16.4.12)(共 9 个容量瓶)中,加入约 80 mL 水后,使其完全溶解,用水稀至刻度,混匀,计算每种人造色素溶液的实际浓度(mg/mL)。

16.3.12.3 稀标准溶液:浓度约 10 μg/mL。

用玻璃吸管(16.4.9)将(9 个容量瓶)标准储备溶液(16.3.12.2)1 mL 分别对应移入 9 个 100 mL 单标线容量瓶(16.4.12)系列中,用水稀至刻度,计算每种人造色素的实际浓度(mg/mL)。

这些溶液用于按 16.5.3 规定的方法,测定标准保留时间。

16.3.12.4 稀的混合标准溶液:浓度约 20 μg/mL。

用玻璃吸管,将每种标准储备液(16.3.12.2)各 1 mL 移入一个 50 mL 单标线容量瓶(16.4.12)中,用水稀至刻度,计算每种人造色素的实际浓度(mg/mL)。

此溶液用于制备浓度范围 0 μg/mL~20 μg/mL 的校正溶液,如预期的浓度范围不在此区间,可另行制备标准溶液。

16.4 仪器

16.4.1 分析天平:精度±0.000 1 g。

16.4.2 离心管:25 mL。

16.4.3 台式离心机:4 000 r/min,可容 25 mL 离心管。

16.4.4 固相萃取柱:填充 125 mg 聚酰胺。

16.4.5 梨形瓶:10 mL。

16.4.6 旋蒸仪。

16.4.7 微量吸管:100 μL~1 mL。

16.4.8 高形烧杯:25 mL、100 mL、500 mL、1 L。

16.4.9 玻璃吸管:1 mL、10 mL、25 mL。

16.4.10 巴斯德吸管。

16.4.11 厄伦美厄烧瓶:1 L。

16.4.12 单标线容量瓶:50 mL、100 mL、500 mL、1 L。

16.4.13 PTFE 膜过滤器:孔径 0.45 μm、直径 13 mm。

16.4.14 pH 计及电极:适合 pH 0~12 的测定。

16.4.15 试管:100 mL。

16.4.16 塑料针筒:2 mL、10 mL。

16.4.17 注射器:50 μL (微升分度)。

16.4.18 水浴。

16.4.19 真空萃取装置(可选)。

16.4.20 高效液相色谱仪:带二极管阵列检测器,可测定 300 nm~700 nm 的吸收,泵能按 16.5.4.2.1 要求进行梯度洗脱,柱单元(16.5.4.2.1)能自动恒温控制,以及与之兼容的记录仪。

16.4.21 保护柱:10 mm \times 4.6 mm,固定相与分析柱(16.4.22)相同,但粒度为 4 μm 。

16.4.22 HPLC 色谱柱(C_{18})。

不锈钢 150 mm \times 4.6 mm,十八烷基硅烷球形二氧化硅,不封端,粒度 3 μm ,多孔性 120 nm,表面积 320 m^2/g ,碳含量 16%(质量分数)。

16.4.23 小顶瓶:0.6 mL。

16.5 方法

16.5.1 试样

称取 500 mg(精确至 ± 1 mg)由 10.2 得到的花丝或无花丝藏红花粉或由 10.3 得到的藏红花粉,置于离心管中。

16.5.2 人造色素的萃取

16.5.2.1 用玻璃吸管(16.4.9)加入 25 mL 水,加热至 60 $^{\circ}\text{C}$ 。手动搅拌 1 min,确保管壁无附着悬浮的藏红花粉,如果部分沉底,则用小刮刀搅拌使其分散,摇动后避光下放置 10 min,然后再充分搅拌。

16.5.2.2 平衡放置离心管,4 000 r/min 离心 10 min(16.4.3)。用巴斯德吸管(16.4.10)将上层清液转移至高型烧杯(16.4.8),加 500 μL 甲酸或 2.5 mL 冰乙酸(16.3.6)使其 pH ≈ 2 。

16.5.2.3 如果由于藏红花的天然色素导致色谱峰不理想,则用以下方法代替 16.5.2.2 规定的试验方法。

平衡放置离心管,4 000 r/min 离心 10 min。

用巴斯德吸管将上层清液转移至 50 mL 高型烧杯(16.4.8),用微量吸管滴加硫酸(16.3.7)直至溶液的 pH 为 0.1。将溶液在 100 $^{\circ}\text{C}$ 下的水浴加热 30 min,平衡放置离心管,4 000 r/min 离心 5 min。

用巴斯德吸管将上层清液转移至 50 mL 烧杯中,用氢氧化钠溶液(16.3.8)调节溶液 pH 为 2,平衡放置离心管,4 000 r/min 离心 5 min。

再次用巴斯德吸管将上层清液转移至烧杯。清液不得带有藏红花颗粒,以免堵塞 16.5.3 中使用的固相萃取柱,若有必要可再次离心。

16.5.3 样品的纯化

16.5.3.1 纯化柱的制备和人造色素的吸附

用 10 mL 水湿润固相萃取柱(16.4.4),用 10 mL 注射器,将 16.5.2.2 或 16.5.2.3 得到的藏红花萃取物过柱。

16.5.3.2 除去其他成分

用 45 mL 甲醇(16.3.1)、45 mL 丙酮(16.3.3)、45 mL 甲醇持续洗 SPE 柱,在恒流速 6 mL/min~8 mL/min 下。用 500 μL 甲酸进行酸化。

注 1: 本洗脱操作中允许甲醇的酸化大于回收。

注 2: 若采用 16.5.2.3 的方法,淋洗剂的体积为 10 mL 而非 45 mL。

16.5.3.3 人造色素的洗脱

用 10 mL 洗脱剂(16.3.11)将吸附的色素洗脱,收集有色溜出物于梨形瓶(16.4.5)中,负压和 40 °C 以下,旋蒸至干。

残渣用 300 μ L 水再次溶解,导入色谱系统之前,用 PTFE 滤纸(16.4.13)过滤。

若用真空提取器(16.4.19),洗脱过程会显著缩短。真空提取器使用大量溶剂,但 6 mL/min~8 mL/min 的洗脱速率仍然可以避免组分的回收损失。

16.5.4 色谱与检测

16.5.4.1 洗脱

16.5.4.1.1 流动相 A:称取 1.36 g 磷酸二氢钾(16.3.9),置高型烧杯(16.4.8)中,加 900 mL 水,用氢氧化钾(16.3.10)调节 pH 至 7,然后移入 1 L 的单标线容量瓶中,用水稀至刻度。

16.5.4.1.2 流动相 B:甲醇(16.3.2)。

16.5.4.1.3 流动相 C:乙氰(16.3.4)。

16.5.4.2 方法

16.5.4.2.1 液相色谱条件

流速:0.8 mL/min。

柱温:30 °C。

进样体积:50 μ L。

色谱梯度:见表 3。

采用列于表 3 的色谱方法,将 50 μ L 样品提取物注入色谱系统。

表 3 液相色谱梯度及色谱方法

梯级	保留时间 min	流动相 A	流动相 B	流动相 C
平衡	10	90	10	0
1	0	90	10	0
2	7	48	52	0
3	10	48	52	0
4	14	0	60	40
5	24	0	60	40
6	25	90	10	0

如果高压下流速和梯度出现问题,下列两种方法可提供帮助:

a) 用下列方法洗柱:

- 1) 50 mL 40 °C~60 °C 的热水;
- 2) 50 mL 甲醇;
- 3) 50 mL 乙氰;
- 4) 50 mL 四氢呋喃;
- 5) 25 mL 甲醇;

- 6) 25 mL 流动相(初始条件)。
- b) 多次重复将二甲亚砷与水(1:1)的等体积混合物注入色谱柱。
在 435 nm 和 520 nm 处,上述试验条件下记录色谱图。

16.5.4.2.2 分析

用稀的混合标准溶液(16.3.12.4)进行系统校正,并定量测定人造色素。校正溶液应覆盖 0 μg/mL~20 μg/mL 浓度范围,如果实际浓度超出此范围,应另行制备标准。

16.5.5 结果说明

通过与参比溶液的保留时间和 300 nm~700 nm 范围紫外/可见光谱进行比较,可鉴别并确认提取物中是否存在人造色素;利用校正溶液进行定量。更多信息参见附录 D。

16.5.6 结果表示

如果人造色素没有检出或确认,检验报告按表 4 水溶酸性人造色素的最低检测下限(MRPL)进行表示。

如果检出人造色素,并确认处于最低检测下限(MRPL)之上,检验报告按毫克每千克藏红花(mg/kg)表示,保留小数点后 1 位。

表 4 最低检测下限

序号	人造色素名称	MRPL mg/kg
1	苋菜红	1
2	偶氮玉红	1
3	(酸性)二号橙	2
4	丽春红 4R	1
5	绕色灵	2
6	喹啉黄	1
7	日落黄	1
8	柠檬黄	1
9	油溶黄 2G	1

16.6 检验报告

检验报告应包括以下信息:

- a) 完全鉴别样品需要的全部信息;
- b) 采用的取样方法(若知道);
- c) 采用的检验方法,以及本部分参考信息;
- d) 本部分未规定或可选的操作信息及可能影响测定结果的偶然因素;
- e) 测得的结果。

附 录 A
(资料性附录)
显微检查结果表示例

A.1 记录表格式

对每个剖面(细胞集合区数/纤维结构数),留意观察到的组分数,按以下方法计算每种组分(正常及异常结构)百分含量。观察到的组分数目($N_1 \sim N_i$)除以组分总数($\sum N_i$),以百分比表示。表 A.1 给出了记录表格式示例。

表 A.1 记录表

序号	观察到的组分	5个载玻片细胞集合区总数 ($N_1 \cdots N_n$)	相对含量 %
1	柱头	N_1	$N_1 / \sum_{i=1}^n N_i$
2	花柱	N_2	$N_2 / \sum_{i=1}^n N_i$
3	花粉	N_3	$N_3 / \sum_{i=1}^n N_i$
	雄蕊		
	子房		
	花瓣		
	叶		
	茎		
4	毛发	N_n	$N_n \sum_{i=1}^n N_i$
	草		
	无机物		
	淀粉		
	外来物		
	染色体		
	异常细胞 ^a		
^a 若细胞内容物未扩散,可视为干态物。			

用表 A.2 记录每个载玻片在 400 倍下观察到的组分。

A.2 计数表

表 A.2 计数表

样品状态：

序号	观察到的组分	区域 1	区域 2	区域 3	区域 4	区域 5	区域 6	区域 7	区域 8	区域 9	区域 10
1	柱头										
2	花柱										
3	花粉										
4	雄蕊										
5	子房										
6	花瓣										
7	叶										
8	茎										
9	毛发										
10	草										
11	淀粉										
12	无机物										
13	外来物										
14	染色体										
15	异常细胞 ^a										

^a 若细胞内容物未扩散,可视为异常。

附录 B
(资料性附录)
显微鉴定参考图片

显微鉴定参考图片(100 倍),如图 B.1~图 B.10 所示。

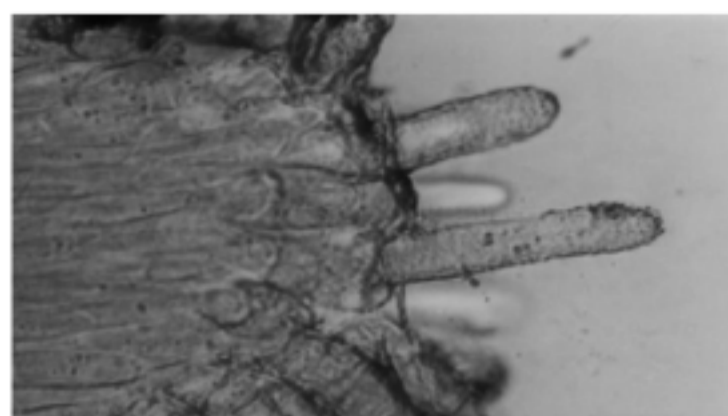


图 B.1 柱头乳突毛

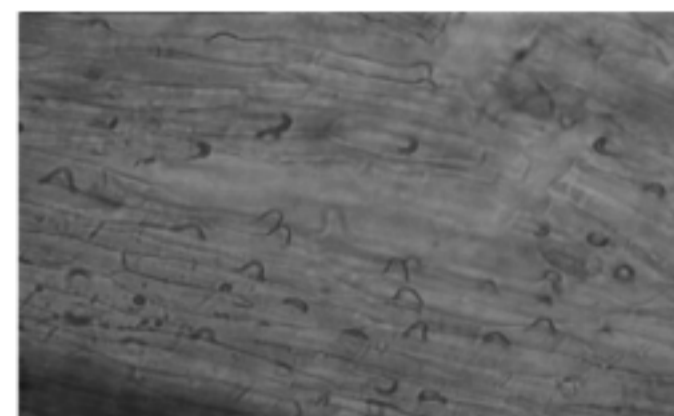


图 B.2 上表皮细胞

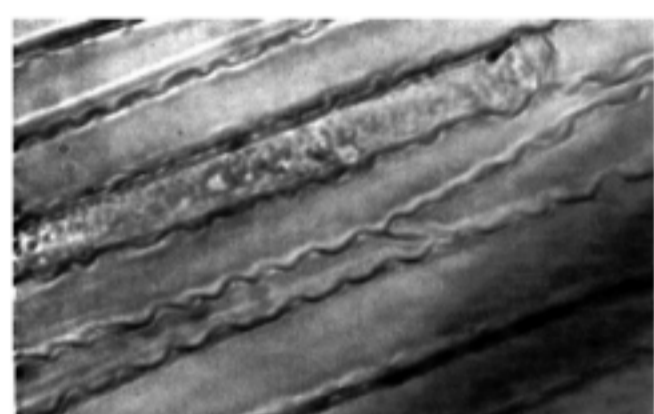


图 B.3 花柱细胞

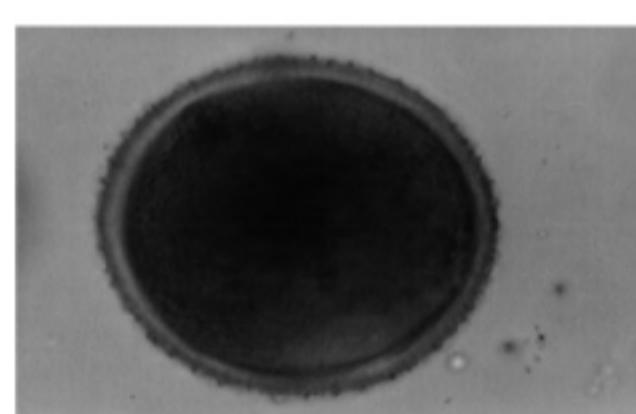


图 B.4 花粉

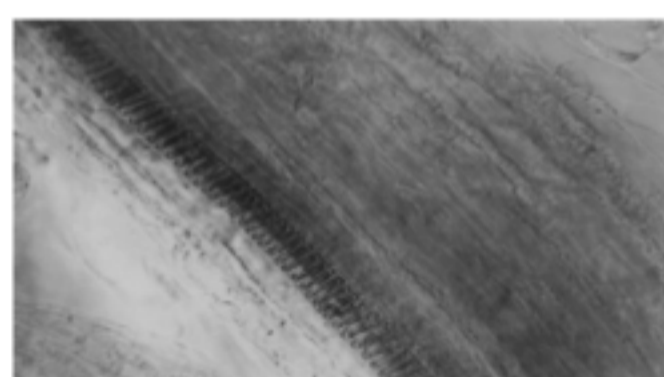


图 B.5 导管

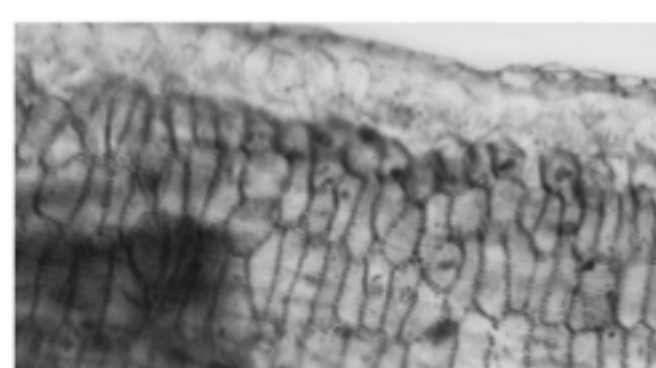


图 B.6 雄蕊

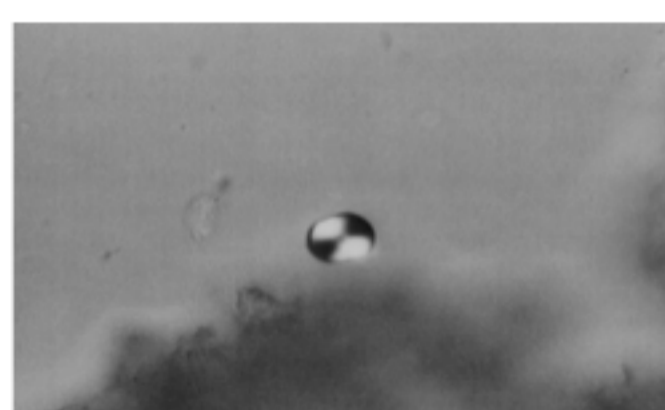


图 B.7 偏光下的淀粉粒

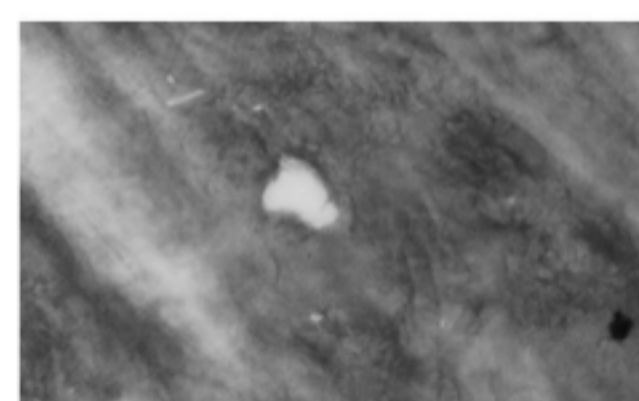


图 B.8 无机物

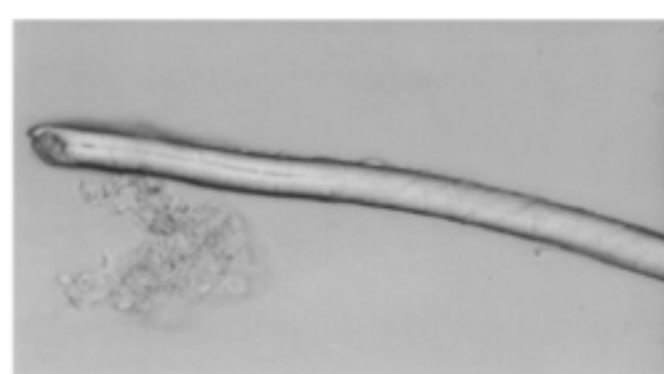


图 B.9 外来物

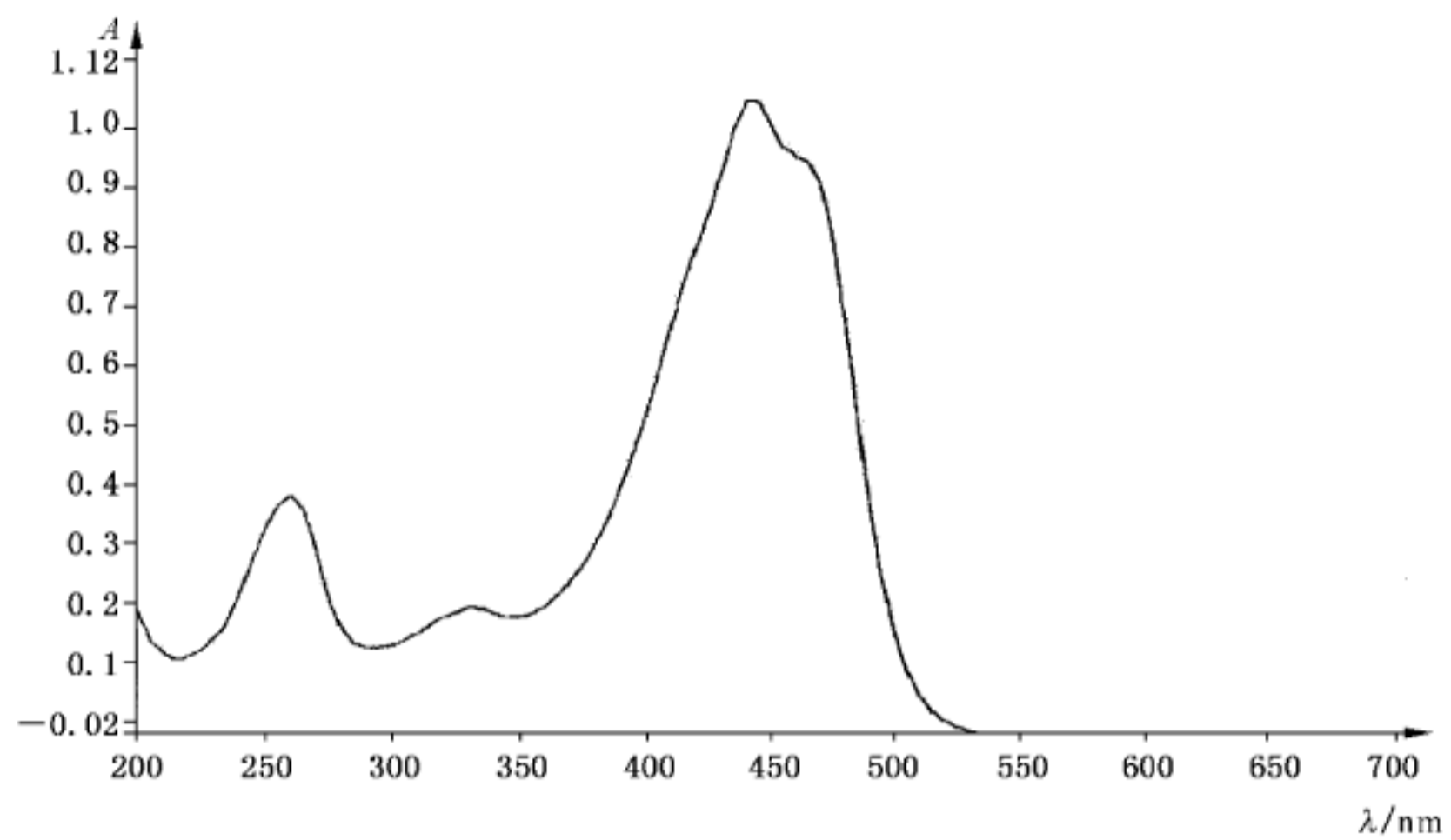


图 B.10 透明溶液中的彩色细胞

附录 C
(资料性附录)

藏红花水提物的紫外/可见光谱

藏红花水提物的紫外/可见光谱如图 C.1 所示。



说明:

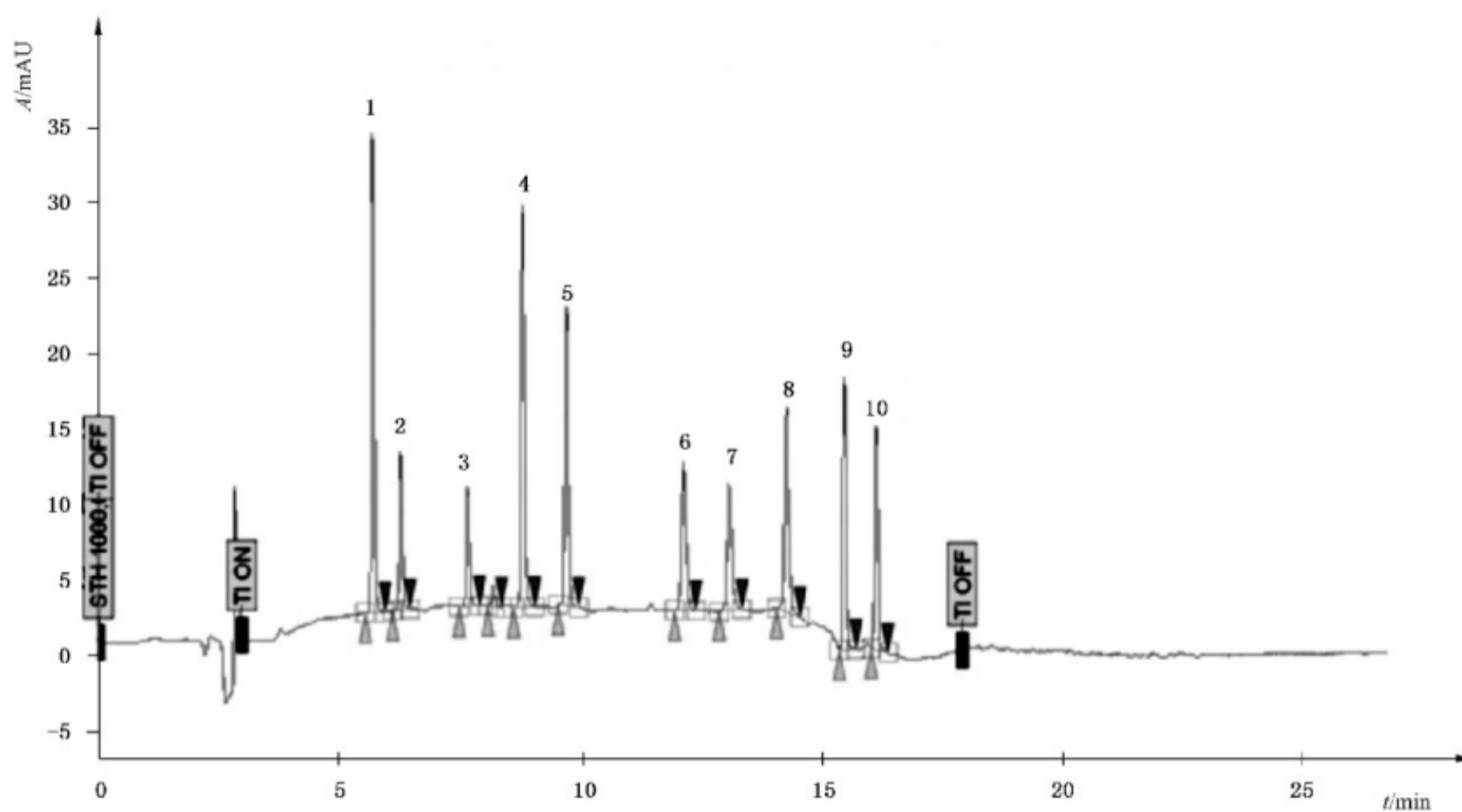
A —— 吸收;

λ —— 波长。

图 C.1 藏红花水提物的紫外/可见光谱(200 nm~700 nm)

附录 D
(资料性附录)
液相色谱示例

液相色谱示例如图 D.1~图 D.5 所示。



说明:

A —— 吸收;

t —— 时间;

1 —— 柠檬黄 5.71;

2 —— 苋菜红 6.29;

3 —— 丽春红 4R 7.69;

4 —— 日落黄 8.84;

5 —— 溶黄 2G 9.75;

6 —— 偶氮玉红 12.19;

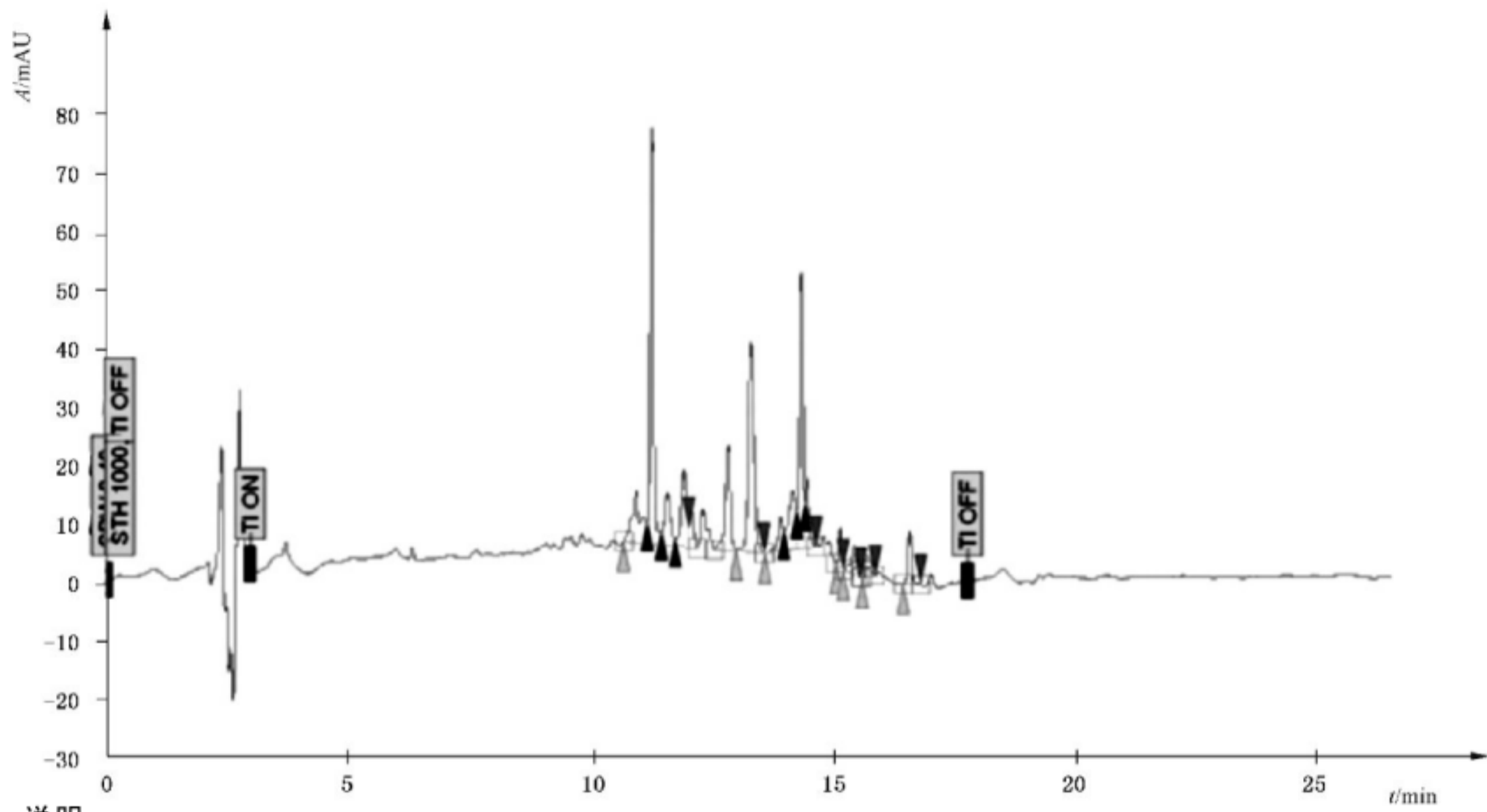
7 —— 喹啉黄(异构体 1) 13.15;

8 —— 喹啉黄(异构体 2) 14.33;

9 —— (酸性)二号橙 15.55;

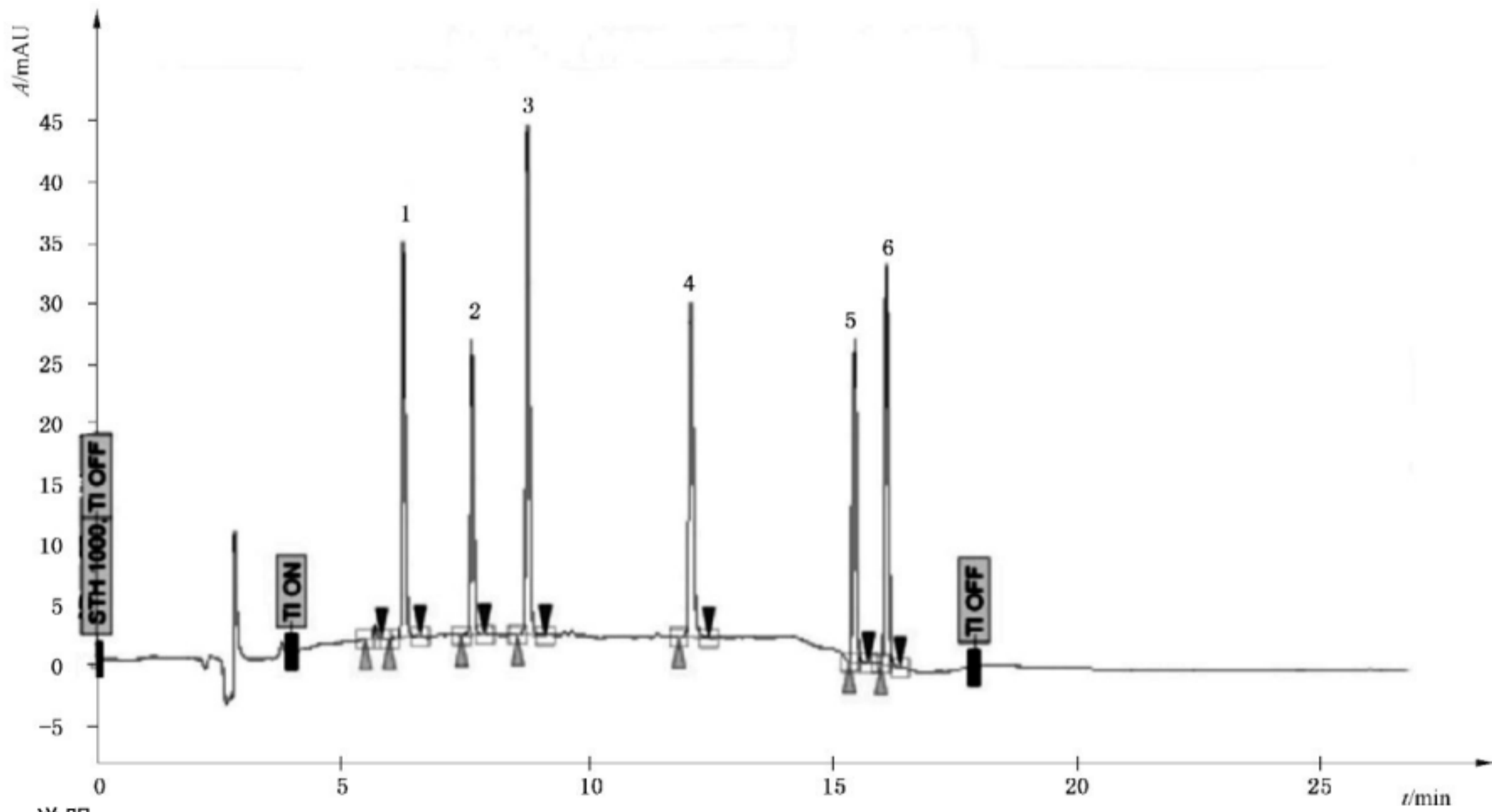
10 —— 绕色灵 16.20。

图 D.1 标准样品(1 mg/kg)液相色谱图(440 nm)



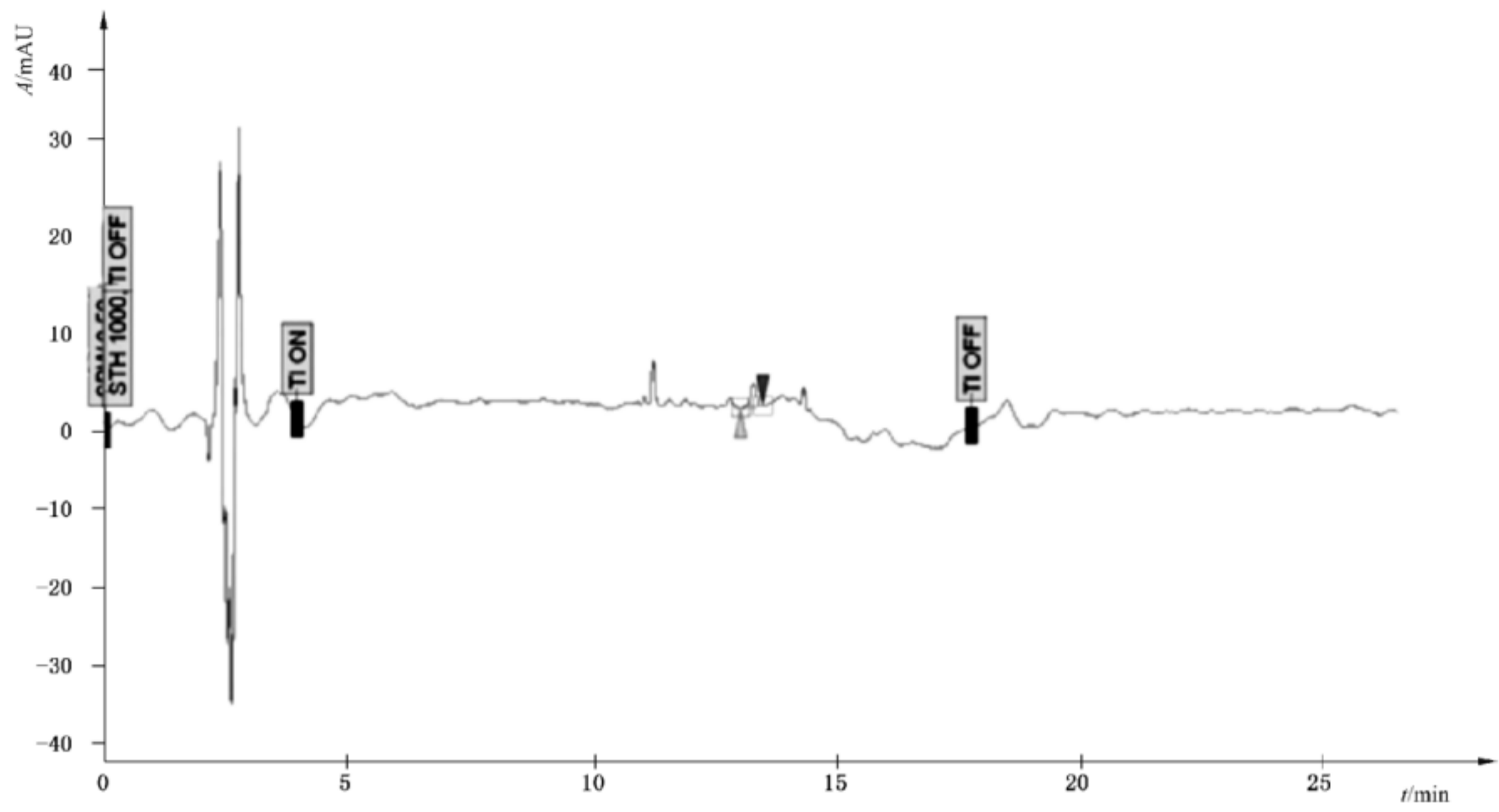
说明：
 A —— 吸收；
 t —— 时间。

图 D.2 藏红花空白样品液相色谱图(404 nm)



说明：
 A —— 吸收；
 t —— 时间；
 1 —— 苋菜红 6.29；
 2 —— 丽春红 4R 7.69；
 3 —— 日落黄 8.84；
 4 —— 偶氮玉红 12.19；
 5 —— 酸性 2 号橙 15.55；
 6 —— 绕色灵 16.20。

图 D.3 1 mg/kg 标准品液相色谱图(506 nm)

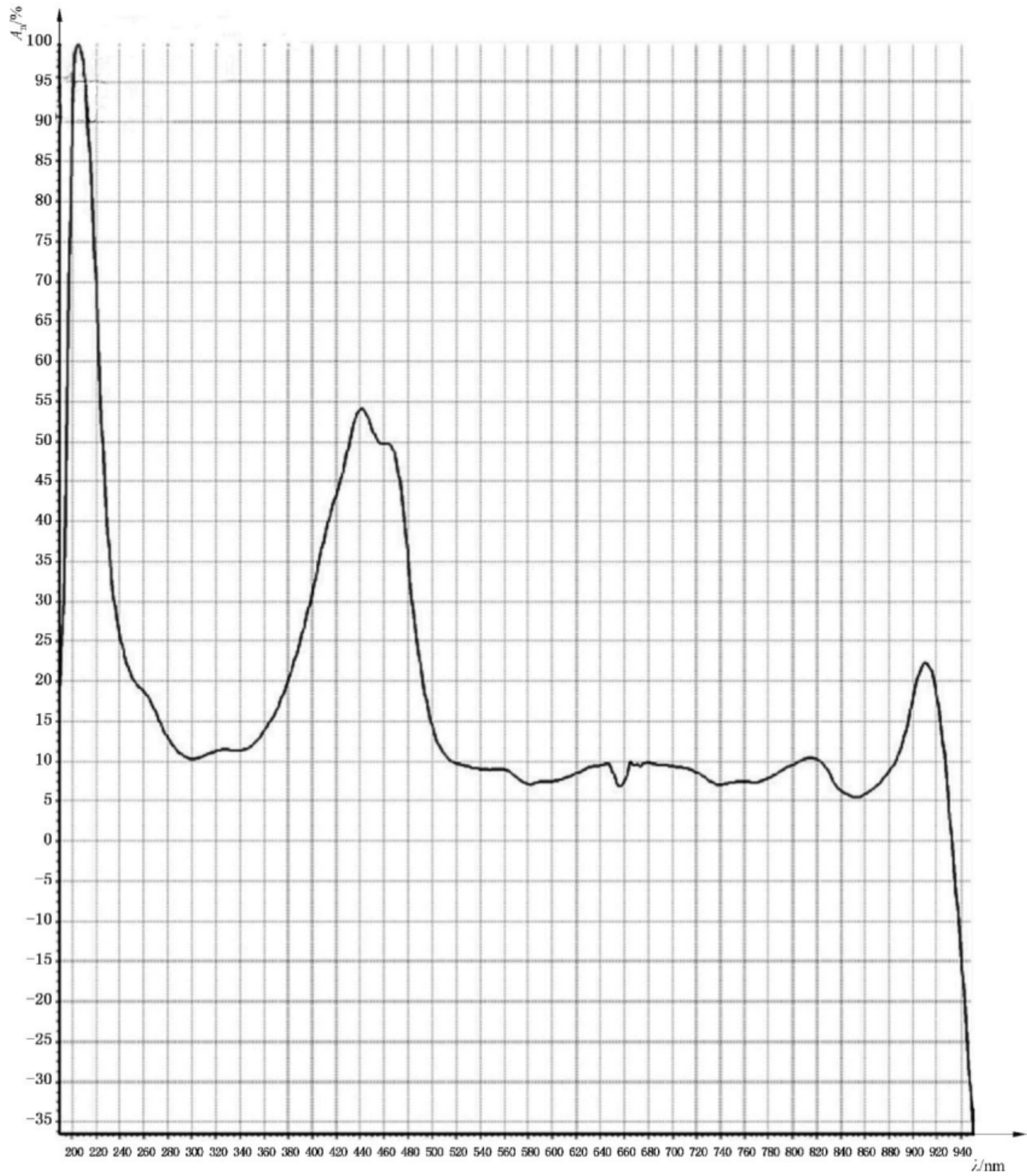


说明：

A —— 吸收；

t —— 时间。

图 D.4 藏红花空白样品的液相色谱图(506 nm)



说明：

- A_n —— 标准吸收；
- λ —— 波长；
- t_r —— 11.700 min。

图 D.5 藏红花空白样品(图 D.2)在 11.700 min 处的液相色谱峰

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
藏 红 花 第 2 部 分 : 试 验 方 法
GB/T 22324.2—2017/ISO 3632-2:2010

*

中 国 标 准 出 版 社 出 版 发 行
北 京 市 朝 阳 区 和 平 里 西 街 甲 2 号 (100029)
北 京 市 西 城 区 三 里 河 北 街 16 号 (100045)

网 址 : www.spc.org.cn

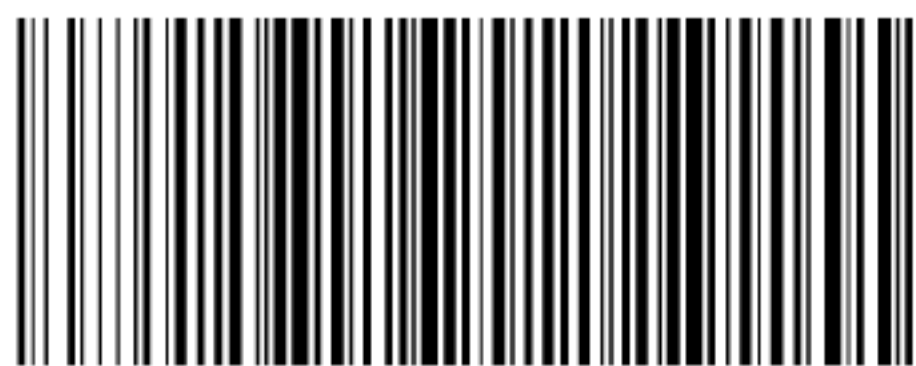
服 务 热 线 : 400-168-0010

2017 年 9 月 第 一 版

*

书 号 : 155066 · 1-57224

版 权 专 有 侵 权 必 究



GB/T 22324.2-2017