



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 22324.2—2008/ISO/TS 3632-2:2003

---

## 藏红花 第2部分：试验方法

Saffron—Part 2: Test methods

[ISO/TS 3632-2:2003, Saffron (*Crocus sativus* L.)—  
Part 2: Test methods, IDT]

2008-08-22 发布

2008-12-01 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 .....                   | 1  |
| 5 鉴别试验 .....                     | 3  |
| 6 藏红花的显微检查 .....                 | 4  |
| 7 水分和挥发物含量的测定 .....              | 5  |
| 8 花丝藏红花和无花丝藏红花中花附属物含量的测定 .....   | 6  |
| 9 花丝藏红花中外来物含量的测定 .....           | 6  |
| 10 试样研磨及过筛 .....                 | 7  |
| 11 冷水可溶性抽提物的测定 .....             | 7  |
| 12 总灰分的测定 .....                  | 7  |
| 13 酸不溶性灰分的测定 .....               | 7  |
| 14 特征参数的测定——紫外/可见光谱法 .....       | 7  |
| 15 藏红花中色素的鉴别 .....               | 8  |
| 16 人造着色剂的检出和鉴定——薄层色谱法(TLC) ..... | 10 |
| 17 人造着色剂的检出——高效液相色谱法(HPLC) ..... | 12 |
| 附录 A (资料性附录) 显微检查结果表示示例 .....    | 15 |
| 附录 B (资料性附录) 藏红花水提物紫外/可见光谱 ..... | 17 |
| 附录 C (资料性附录) 实验条件下色谱图示例 .....    | 18 |

## 前 言

GB/T 22324《藏红花》由下列两部分组成：

- 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。

本部分等同采用 ISO/TS 3632-2:2003《藏红花 第 2 部分：试验方法》(英文版)。本部分等同翻译 ISO/TS 3632-2:2003。

为便于使用，本部分做了下列编辑性修改：

- a) “本国际标准”一词改为本部分；
- b) 用小数点“.”代替作为小数点的逗号“,”；
- c) 删除 ISO/TS 3632-2 的附录 B；
- d) ISO/TS 3632-2 的附录 C、附录 D 对应本部分的附录 B、附录 C。

本部分的附录 A、附录 B、附录 C 为资料性附录。

本部分由中华全国供销合作总社提出。

本部分由中华全国供销合作总社南京野生植物综合利用研究院归口。

本部分起草单位：中华全国供销合作总社南京野生植物综合利用研究院。

本部分主要起草人：陈仕荣、张卫明。

## 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.)的试验方法。  
本部分适用于花丝藏红花、藏红花粉的质量检验。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 22324 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 12729.6 香辛料和调味品 水分含量的测定(蒸馏法)(GB/T 12729.6—2008,ISO 939:1980,NEQ)

GB/T 12729.7 香辛料和调味品 总灰分的测定(GB/T 12729.7—2008,ISO 928:1997,NEQ)

GB/T 12729.9 香辛料和调味品 酸不溶性灰分的测定(GB/T 12729.9—2008,ISO 930:1997,MOD)

GB/T 12729.11 香辛料和调味品 冷水可溶性抽提物的测定(GB/T 12729.11—2008,ISO 941:1980,MOD)

GB/T 22324.1—2008 藏红花 第1部分:规格(ISO/TS 3632-1:2003, IDT)

### 3 术语和定义

GB/T 22324.1 确立的以及下列术语和定义适用于 GB/T 22324 的本部分。

#### 3.1

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

在本部分规定的条件下测得的失重。

#### 3.2

**色度( $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ ) colouring strength**

用1%试样溶液,在最大吸收波长(约440 nm)下,用1 cm比色池测得的藏红花素的 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 。

#### 3.3

**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。

#### 3.4

**检出极限 detection limit**

在测定方法规定条件下,能检测到的被测物最低浓度或最低含量。

### 4 检验和样品量

#### 4.1 试样的最小量

由于藏红花价格高,实验室得到的样品有限,实验室样品的最小量为14 g,以便能完成两次平行试验。

## 4.2 需做检验和样品量

花丝藏红花和无花丝藏红花需做的检验和样品量见表1,藏红花粉需做的检验和样品量见表2。

表1 花丝藏红花和无花丝藏红花需做的检验和样品量

| 试验序号 | 项 目                        | 试样量/g | 说 明                                                   | 试验方法        |
|------|----------------------------|-------|-------------------------------------------------------|-------------|
| 1    | 鉴别试验                       | 5     | 非破坏性试验,若发现藏红花( <i>Crocus sativus</i> L.)以外的植物性物质,拒收样品 | 第5章         |
| 2    | 花附属物含量测定                   | 3     | 非破坏性试验                                                | 第8章         |
| 3    | 外来物测定                      | 3     | 合并花附属物后,重新组成样品                                        | 第9章         |
| 4    | 重新研碎并混合检验中分离出的组分           | 5     | 复原为最初的5g试样                                            | 第5章、第8章和第9章 |
| 5    | 显微检查                       | 0.05  | —                                                     | 第6章         |
| 6    | 水分和挥发物含量的测定                | 2.5   | 保留样品,用于测定总灰分和酸不溶性灰分                                   | 第7章         |
| 7    | 冷水可溶性抽提物的测定                | 2     | —                                                     | 第11章        |
| 8    | 总灰分的测定                     | 2     | 从试验6的留样中取样                                            | 第12章        |
| 9    | 酸不溶性灰分的测定                  | —     | 从试验8的总灰分中取样                                           | 第13章        |
| 10   | 研碎、过筛                      | 5     | 按第10章过筛,95%的粉末样品能过500 $\mu$ m的筛,合并筛上和筛下样品             | 第10章        |
| 11   | 特征参数的测定                    | 0.5   | —                                                     | 第14章        |
| 12   | 薄层色谱(TLC)法:<br>藏红花色素的鉴别    | 0.05  | —                                                     | 第15章        |
| 13   | 薄层色谱法:人造着色剂的鉴定             | 0.5   | 可选择或外加进行HPLC法,试验13和试验14需用抽提物                          | 第16章        |
| 14   | 高效液相色谱(HPLC)法:<br>人造着色剂的鉴定 | 0.5   | 可选择或外加进行TLC或HPLC,两种方法需用抽提物                            | 第17章        |

注:剩1.4g样品可用于后续测定或重复必要的分析步骤。

表2 藏红花粉需做的检验和样品量

| 试验序号 | 项 目         | 试样量/g | 说 明                            | 试验方法 |
|------|-------------|-------|--------------------------------|------|
| 1    | 鉴别试验        | 0.5   | 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  | —                              | 第6章  |
| 3    | 水分和挥发物含量的测定 | 2.5   | 保留样品,用于测定总灰分和酸不溶性灰分            | 第7章  |
| 4    | 冷水可溶抽提物的测定  | 2     | —                              | 第11章 |
| 5    | 总灰分的测定      | 2     | 从试验3的留样中取样                     | 第12章 |
| 6    | 酸不溶性灰分的测定   | —     | 从试验5的总灰分中取样                    | 第13章 |
| 7    | 研磨、过筛       | 4.5   | 95%粉末能过500 $\mu$ m的筛,合并筛上和筛下样品 | 第10章 |

表 2 (续)

| 试验序号                            | 项 目                  | 试样量/g | 说 明                                        | 试验方法   |
|---------------------------------|----------------------|-------|--------------------------------------------|--------|
| 8                               | 特征参数的测定              | 0.5   | —                                          | 第 14 章 |
| 9                               | 薄层色谱法:藏红花中色素的鉴定      | 0.05  | —                                          | 第 15 章 |
| 10                              | 薄层色谱法:人造着色剂的鉴定       | 0.5   | 可选择或外加进行 HPLC (试验 11); 试验 10 和 试验 11 需用抽提物 | 第 16 章 |
| 11                              | 高效液相色谱法:<br>人造着色剂的鉴定 | 0.5   | 可选择或外加进行 TLC(试验 10); 试验 10 和试验 11 需用抽提物    | 第 17 章 |
| 注: 剩 0.9 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

所有花丝藏红花应来自植物 *Crocus sativus* L.,若发现藏红花(*Crocus sativus* L.)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

所用试剂为分析纯试剂,水为蒸馏水、去离子水或相当纯度的水。

##### 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:不与硫酸产生显色反应。

##### 5.3.2.3 二苯胺溶液:将 0.1 g 二苯胺(5.3.2.2)加至 20 mL 硫酸(5.3.2.1)和 4 mL 水中。

#### 5.3.3 仪器

平底瓷坩埚。

#### 5.3.4 鉴别方法

称取 0.5 g 藏红花样品(参见表 2)。将试样放入盛有二苯胺溶液(5.3.2.3)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 藏红花的显微检查

### 6.1 通则

本法用于检验花丝藏红花和藏红花粉是否具有 *Crocus sativus* L. 的特征,以了解花附属物和外来物大体状况。

### 6.2 原理

藏红花粉和无花丝藏红花的鉴别:若有外来物和花附属物,可用显微镜按 6.5 观察其解剖学组成予以鉴别;若必要,也可对观察到的组分进行定量测定。

### 6.3 试剂

除特别说明外,所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水、去离子水或纯度相当的水。

#### 6.3.1 碘-碘化钾溶液

在 100 mL 单标线容量瓶中,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

显微检查通用仪器,如载玻片、盖玻片,探针及下列仪器。

6.4.1 容量瓶:100 mL。

6.4.2 注射器:50  $\mu$ L,以“ $\mu$ L”为分度。

6.4.3 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),依次放置约 0.001 g 藏红花粉(10.3)或研碎的花丝藏红花(10.2)样品。

#### 6.5.2 使用纯水的观察准备

按如下方法准备 2 个载玻片:

在载玻片上置 50  $\mu$ L 水,用解剖刀或探针取样,使其与水混合,放置 5 min 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 所述,准备 2 个载玻片,用氢氧化钾(氢氧化钠)或三氯乙醛溶液(6.3.2)代替水。加入澄清增透液,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(6.4.3)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)。

若显微镜(6.4.3)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。

### 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

检查过程中,可观察到如下组分:

- 柱头碎片;
- 柱头表皮细胞残骸;
- 花柱表皮残骸,具有曲弯细胞壁的特征;
- 直径 80  $\mu\text{m}$ ~100  $\mu\text{m}$  的圆花粉粒;
- 由螺旋状导管集合成的传导组分碎片;
- 雄蕊碎片;
- 淀粉粒;
- 无机物;
- 草的碎片;
- 透明溶液中的彩色细胞。

## 6.8 显微观察说明

用表 A.2 计算每一组分的相对百分含量,以鉴别藏红花的主要成分:柱头、碎片以及与柱头有关的花柱、花粉粒碎片。

花附属物含量较低,几乎不存在外来物成分。

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

本法适用于花丝藏红花、无花丝藏红花和藏红花粉水分和挥发物含量的测定。

注:GB/T 12729.6 规定的测定方法需要较多样品,不适用于藏红花。

### 7.2 原理

样品在 103  $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  2  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中干燥 16 h。

### 7.3 仪器

常用实验仪器,其他仪器如下。

- 7.3.1 称盘或蒸发皿:带盖。
- 7.3.2 烘箱:103  $^{\circ}\text{C}$   $\pm$  2  $^{\circ}\text{C}$ 。
- 7.3.3 干燥器:内置充足的干燥剂。
- 7.3.4 分析天平:精度  $\pm$  0.001 g。

### 7.4 方法

#### 7.4.1 试样

##### 7.4.1.1 花丝藏红花和无花丝藏红花

将已测定了花附属物和外来物含量的样品合并成用于本测定的样品(见表 1),用预先干燥并称皮重的称瓶或蒸发皿(7.3.1)称取 2.5 g 样品(精确至  $\pm$  0.001 g)。

##### 7.4.1.2 藏红花粉

称取约 2.5 g 样品(精确至  $\pm$  0.001 g)(见表 2)置于干燥并称皮重的称瓶或蒸发皿中。

#### 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  $^{\circ}\text{C}$  烘箱中干燥 16 h,取出盖好后,置于干燥器中冷却,称重,精确至  $\pm$  0.001 g。

保留测定了水分和挥发物含量的样品,以便用于总灰分的测定(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

水分和挥发物含量  $w_{\text{MV}}$ ,以初始样品质量分数计,数值以 % 表示,如式(1):



$$w_{MV} = (m_0 - m_4) \times \frac{100}{m_0} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

$m_0$ ——试样质量,单位为克(g);

$m_4$ ——干燥后残留物质量,单位为克(g)。

若重复性符合要求,取两次测定的平均值作为测定结果。

## 8 花丝藏红花和无花丝藏红花中花附属物含量的测定

### 8.1 原理

将样品中的花附属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 3g 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,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

样品的花附属物含量  $w_1$ ,以质量分数计,数值以%表示,如式(2):

$$w_1 = (m_2 - m_1) \times \frac{100}{m_0} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

$m_2$ ——表玻璃和花附属物质量,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)。

## 9 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含量(第 8 章)的试样合并成新试样(约 3 g),充分混匀,然后称样(精确至±0.01 g)。

#### 9.3.2 测定

把试样平摊于中灰纸上,用镊子拣出外来物。先将已干燥的表玻璃称重,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  $w_2$ ,以质量分数计,数值以%表示,如式(3):

$$w_2 = (m_3 - m_1) \times \frac{100}{m_0} \dots\dots\dots(3)$$

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 试样研磨及过筛

### 10.1 仪器

#### 10.1.1 研磨器

应符合如下要求:

- 易拆装和清洗,具有最小的死体积;
- 能快速、均匀研磨、不易发热或水分损失;
- 尽可能避免与周围空气接触;
- 不带来任何外来物。

#### 10.1.2 筛:500 μm 孔径。

### 10.2 花丝藏红花和无花丝藏红花

用研磨器(10.1.1)磨碎样品至 95% 粉末样品能过筛(10.1.2),然后合并筛上和筛下样品,混合均匀。

### 10.3 藏红花粉

95% 的样品能过筛(10.1.2)(见表 2),否则,应在研磨器(10.1.1)研磨以达到所要求的粒度。然后合并筛上和筛下样品,混合均匀。

## 11 冷水可溶性抽提物的测定

按 GB/T 12729.11 的规定执行。

花丝藏红花、无花丝藏红花和藏红花粉均取样 2 g。

## 12 总灰分的测定

按 GB/T 12729.7 的规定执行。

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

## 13 酸不溶性灰分的测定

按 GB/T 12729.9 的规定执行。

花丝藏红花、无花丝藏红花和藏红花粉用测定总灰分得到的灰分作试样。

## 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藏红花特征参数;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

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

### 14.3 仪器

实验室常用仪器,其他仪器如下。

- 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:乙酸纤维或 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

将试样定量转移到 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。

附录 B 给出了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  $D$ ,作为测定结果,如式(4)所示:

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$  257 nm——在 257 nm 的吸收值(藏红花苦素的最大吸收);

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$  330 nm——在 330 nm 的吸收值(藏红花素的最大吸收);

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$  440 nm——在 440 nm 的吸收值(藏红花醛的最大吸收)。

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

式中:

$D$ ——特定吸收值;

$m$ ——藏红花样品质量,单位为克(g);

$H$ ——样品的水分和挥发物含量(质量分数),%。

##### 14.6 检验报告

检验报告应说明所用方法和测定结果,还应涉及本部分未规定或可选的细节以及可能影响结果的偶然因素。

应特别表明:

——按第 7 章所述方法测定水分含量;

——如果是藏红花粉,应注明颗粒度。

检验报告应包括全面鉴别样品所需的其他信息。所用滤膜(14.3.5)也应说明。

#### 15 藏红花中色素的鉴别

##### 15.1 总则

符合 10.3 要求的藏红花粉和按 10.2 的规定研碎过筛后的花丝藏红花、无花丝藏红花可直接用本法测定。藏红花中含有色素,这些特定成分可作为鉴别产品真伪的依据。

##### 15.2 原理

藏红花经甲醇浸提后,用薄层色谱法分析甲醇溶液,展开后对薄层板进行检验,鉴别所含色素是否为藏红花所特有。

##### 15.3 试剂

除特别说明外,所用试剂均为分析纯、水为蒸馏水或相当纯度的水。

- 15.3.1 甲醇:沸点 64 °C~65 °C。
- 15.3.2 乙醇:99.5%(体积分数)。
- 15.3.3 三氯甲烷:沸点约 60 °C。
- 15.3.4 硫酸:95%~97%(质量分数)。
- 15.3.5 4-甲氧基苯甲醛。
- 15.3.6 萘酚黄(2,4-二硝基萘酚单钠盐)。
- 15.3.7 苏丹红 G 或苏丹红 III。
- 15.3.8 参比液:溶解 5 g 萘酚黄(15.3.6)于 5 mL 甲醇(15.3.1)中,再加浓度为 1 mg/mL 的苏丹红 G 的三氯甲烷溶液。
- 15.3.9 展开剂:乙酸乙酯+异丙醇+水(65+25+10)。
- 15.3.10 显色剂

按下列顺序混合后制得:

- 10 mL 4-甲氧基苯甲醛(15.3.5);
- 9 mL 乙醇(15.3.2);
- 10 mL 硫酸(15.3.4)。

#### 15.4 仪器

常用实验室仪器,其他仪器如下。

- 15.4.1 试管:60 mm×7mm。
- 15.4.2 微量注射器:5 μL、10 μL。
- 15.4.3 层析缸。
- 15.4.4 硅胶板:含荧光指示剂 GF254。
- 15.4.5 玻璃棉塞。

#### 15.5 方法

##### 15.5.1 试样

花丝藏红花和无花丝藏红花:称取粉末样品(10.2)约 50 mg。

藏红花粉:称取藏红花粉(10.3)约 50 mg。

##### 15.5.2 试液的制备

将试样(15.5.1)移入试管(15.4.1)中,用 1 滴水湿润,放置 2 min~3 min,然后加 1 mL 甲醇(15.3.1)避光下放置 30 min,用玻璃棉过滤。

##### 15.5.3 操作技巧

用微量注射器,在硅胶板(15.4.4)上分别将 5 μL 被测试液(15.5.2)和 5 μL 参比液点成 2 cm~4 cm 长的色带,置于层析缸(15.4.3)中,用展开剂(15.3.9)展开,直至溶剂前沿推进 10 cm 为止,待溶剂挥发后。

先在 254 nm 紫外光下检查谱带,再用可见光检查。

然后在薄层板上喷洒显色剂(15.3.10)10 mL,在 105 °C~110 °C 下边加热(5 min~10 min)边观察。

#### 15.6 结果说明

##### 15.6.1 日光下观察

下方第三条谱带显示三个黄色斑点,它是藏红花色素的特征斑点。

##### 15.6.2 紫外灯下观察

在 254 nm 紫外灯下观察到的谱线显示四个主要荧光斑,其中三个与日光下观察到的斑点相对应,而另一个具有较大比移值( $R_f \approx 0.55$ )的斑点是藏红花苦素的特征斑点。

与苏丹红 G 平齐处可见 1 个~2 个较暗的荧光斑点,它是  $\beta$ -羟基环橙花醛和藏红花醛的特征斑点;

喷洒显色剂(15.3.10)后,藏红花素斑点呈灰色,而藏红花苦素斑点呈紫色。在喷显色剂之前,特别是在展开剂展开的起始点处,谱带不应呈现任何有色斑点(尤其是黄橙色或红色斑点),这些有色斑点说明藏红花素质量欠佳或有外来显色物质。

## 16 人造着色剂的检出和鉴定——薄层色谱法(TLC)

### 16.1 通则

本法可直接用于符合 10.3 要求的藏红花粉和按 10.2 规定研磨、过筛的花丝藏红花和无花丝藏红花的测定,可以检出水溶酸性人造着色剂的存在。

### 16.2 原理

将人造着色剂萃取,在聚酰胺柱上进行色谱分离并馏出,用薄层色谱法鉴别(参见第 5 章)。

### 16.3 试剂

除特别说明外,所用试剂为分析纯,水为蒸馏水或去离子水或纯度相当的水。

16.3.1 SC-6 聚酰胺(柱色谱用):粒径 0.10 mm~0.3 mm。

16.3.2 甲醇。

16.3.3 丙酮。

16.3.4 甲酸:98%(质量分数)或冰乙酸。

16.3.5 淋洗剂:在 100 mL 试液中加入 25%(质量分数)氨水 5 mL,然后加 95 mL 甲醇。

16.3.6 混合展开剂

16.3.6.1 展开剂 1:将 2 g 柠檬酸三钠溶于 80 mL 水和 20 mL 30%(质量分数)氨水中,制得展开剂 1。

16.3.6.2 展开剂 2:将 0.4 g 氯化钾溶于 50 mL 叔丁醇、12 mL 藏红花酸和 38 mL 水的混合物中,制得展开剂 2。

16.3.7 浓度为 1 g/L 的着色剂储备液:在 9 个 100 mL 烧杯组成的系列中,用水分别溶解 100 mg 喹啉黄、日落黄 S、酒磺、苋菜红、丽春红 4R、偶氮玉红、(酸性)二号橙,赤鲜红和绕色灵。将其分别转入 9 个 100 mL 容量瓶(16.4.10)中,稀至刻度,摇匀。

16.3.8 浓度为 1 g/L 的着色剂工作液:用移液管(16.4.9),在 9 个容量瓶(16.4.10)中,分别加 10 mL 储备溶液(16.3.7),并用甲醇稀至刻度,摇匀。

注:这些溶液用于测量  $R_f$  值(16.5.4)。

16.3.9 浓度为 1 g/L 的着色剂混合物(甲醇)参比溶液:在一个 100 mL 容量瓶(16.4.10)中,用玻璃移液管(16.4.9)分别加入 10 mL 工作液(16.3.8),用甲醇稀至刻度,摇匀。

### 16.4 仪器

常用实验室仪器,其他仪器如下。

16.4.1 SPE 色谱提纯柱:玻璃柱,容量 3 mL,直径 9 mm(底部带玻璃珠填料)。

16.4.2 玻璃棉。

16.4.3 旋转蒸发器。

16.4.4 离心管:15 mL。

16.4.5 台式离心机。

16.4.6 梨形瓶:10 mL。

16.4.7 真空提取设备(可选)。

16.4.8 微量移液管:可转移 100  $\mu$ L~1 mL。

16.4.9 玻璃移液管:10 mL。

16.4.10 单标线容量瓶:100 mL。

16.4.11 试验样本容量:100 mL。

16.4.12 烧杯:高型,100 mL。

16.4.13 注射器:微升分度,最大体积 10  $\mu\text{L}$ 。

16.4.14 纤维素薄层板。

16.4.15 层析缸:玻璃做成,带磨砂盖,可放置 200 mm $\times$ 200 mm 薄层板。

16.4.16 滤纸。

## 16.5 方法

### 16.5.1 试样

取约 500 mg 粉状试样(10.2 或 10.3)。

### 16.5.2 人造着色剂的萃取

将试样(16.5.1)导入离心管(16.4.4),加入 10mL 约 60 $^{\circ}\text{C}$ 的水,摇匀。待 10 min~12 min 后,充分摇匀,离心分离并用 250  $\mu\text{L}$  甲酸(16.3.4)酸化。

### 16.5.3 样品的纯化

#### 16.5.3.1 纯化柱的制备

准备一根底部带有玻璃填料(16.4.1)的玻璃柱,按如下方法制备:

制备聚酰胺的水悬浮液,于玻璃柱中加入足量的聚酰胺悬浮液,排去溶剂后,得到 10 mm (需 0.14 g~0.16 g 聚酰胺)的柱,将少量玻璃棉堵住柱头,用 1 mL 水洗柱。

#### 16.5.3.2 人造着色剂的吸附

用移液管将 16.5.2 中的全部离心液加到柱中,让液体滴出。

#### 16.5.3.3 除去不需要的成分

依次用水、甲醇(16.3.2)、丙酮(16.3.3),最后用甲醇(16.3.2)连续淋洗,直至流出的溶剂无色为止。如果洗涤后,萃取物仍然有色,应再次淋洗。水洗后,确认 pH 值为中性。

注:若用真空系统,洗涤过程较快,需用大量溶剂(每种洗脱剂约 30 mL)。

#### 16.5.3.4 人造着色剂的馏出

用约 5 mL 淋洗剂(16.3.5)洗脱被吸附的色素,然后将有色馏出物收集于梨形瓶(16.4.6)中。室温下在旋转蒸发器上挥干,用微量移液器和 500  $\mu\text{L}$  甲醇将残留物吸出。

### 16.5.4 层析和检测

用滤纸(16.4.16)围住层析缸(16.4.15)四周,一个层析缸内倒入展开剂 1(16.3.6.1)、另一个倒入展开剂 2(16.3.6.2)至液面高 1 cm,盖住,放置 1 h~2 h 使缸内溶剂蒸气达到饱和。

用微量注射器(16.4.13)将 10  $\mu\text{L}$  甲醇残渣(16.5.3.4)和 10  $\mu\text{L}$  参比液(16.3.9)分别点于距薄层板(16.4.14)下沿 15 mm 处,点样点彼此相距约 7 mm~10 mm。

与展开剂 1 和展开剂 2 对应的薄层板上各划一条与薄层板上沿平行、距点样点 70 mm~150 mm 的直线。

将每个薄层板放入层析缸中,展开至溶剂前沿到达划线处为止。

从层析缸中取出薄层板,在通风柜中干燥。在日光下观察。

注:展开剂 1 的展开时间约 45 min,展开剂 2 的展开时间约 8 h。

### 16.5.5 计算与结果表示

#### 16.5.5.1 计算

计算标准着色剂溶液和样品抽提成分的  $R_f$  值。

$R_f$  值为参比或样品斑点展开的距离除以溶剂前沿移动的距离。

#### 16.5.5.2 结果解释

通过比对参比溶液的  $R_f$  值就可鉴定存在于样品抽提物中的人造着色剂。

#### 16.5.5.3 结果表示

检验结果应注明检验方法的检测极限。

## 17 人造着色剂的检出——高效液相色谱法(HPLC)

### 17.1 通则

本方法直接用于符合 10.3 要求的藏红花粉和按 10.2 研磨、过筛后的花丝藏红花和无花丝藏红花的测定,可检出水溶酸性人造着色剂的存在。

### 17.2 原理

萃取水溶酸性人造着色剂,用聚酰胺柱分离,洗脱,用 HPLC 法进行鉴定。

### 17.3 试剂

除特别说明外,所用试剂为分析纯,水为蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

17.3.1 SC-6 聚酰胺(柱色谱用):粒径 0.10 mm~0.30 mm。

17.3.2 甲醇。

17.3.3 丙酮。

17.3.4 甲酸:98%(质量分数)或冰乙酸。

17.3.5 淋洗剂(纯化甲醇-氨柱):将 5 mL 25%(质量分数)氨水加入 100 mL 试样中,再加 95 mL 甲醇。

17.3.6 磷酸二氢钾。

17.3.7 四正丁硫酸氢铵。

17.3.8 氢氧化钾:1 g 溶于 100 mL 水。

17.3.9 乙腈:色谱级。

17.3.10 浓度为 1 g/L 的着色剂储备液:在由 9 个 100 mL 烧杯(17.4.13)组成的系列中,分别用水溶解 100 mg 喹黄、日落黄、苋菜红、丽春红 4R,偶氮玉红,(酸性)二号橙、赤藓红和绕色灵,并将其移入由 9 个 100 mL 容量瓶(17.4.11)组成的系列中,用水稀至刻度,并摇匀。

17.3.11 浓度为 1 g/L 的着色剂工作液:在由 9 个 100 mL 容量瓶(17.4.11)组成的系列中,用移液管(17.4.10)分别加入 1 mL 储备液(17.3.10),用水稀至刻度,并摇匀。

注:这些溶液将按 17.5.4.2 的规定,用于测定单个组分的保留时间。

17.3.12 浓度为 1 g/L 的着色剂混合物参比溶液:在一个 100 mL 容量瓶(17.4.11)中,用移液管(17.4.10)加入工作液(17.3.11)(系列工作液,共 9 种)各 1 mL,用水稀至刻度,并摇匀。

17.3.13 缓冲液 A:pH 为 4.5 的四正丁硫酸氢铵和磷酸二氢钾水溶液,浓度均为 0.001 mol/L。

于 1 000 mL 烧杯中,用水溶解 0.34 g 四正丁硫酸氢铵和 0.14 g 磷酸二氢钾,加入约 900 mL 水,借助 pH 计用氢氧化钾(17.3.8)调节 pH 为 4.5,定量转移至容量瓶(17.4.11)中,用水稀至刻度。

17.3.14 缓冲液 B:pH 为 4.5 的四正丁硫酸氢铵和磷酸二氢钾水溶液,浓度均为 0.001 4 mol/L。

于 500 mL 烧杯(17.4.13)中,用水溶解 0.24 g 四正丁硫酸氢铵和 0.098 g 磷酸二氢钾,加入约 400 mL 水,借助 pH 计用氢氧化钾(17.3.8)调节 pH 为 4.5,定量转移至 500 mL 容量瓶(17.4.11)中,用水稀至刻度。

17.3.15 流动相 A:缓冲液 A+乙腈(70+30)。

将 700 mL 缓冲液 A 加至锥瓶(17.4.9)中,再加入 300 mL 乙腈(17.3.9),摇匀,用 0.45 μm 的滤膜过滤。

17.3.16 流动相 B:缓冲液 B+乙腈(50+50)。

将 500 mL 缓冲液 B 加至锥瓶(17.4.9)中,再加入 530 mL 乙腈(17.3.9),摇匀,用 0.45 μm 的滤膜过滤。

注:调节流动相 A 中乙腈的比例,可使丽春红 4R 和偶氮红之间的分辨率大于等于 1.25。

### 17.4 仪器

17.4.1 SPE 纯化柱:玻璃色谱柱,容量 3 mL,带玻璃填料。

- 17.4.2 玻璃棉。
- 17.4.3 旋转蒸发器。
- 17.4.4 台式离心机。
- 17.4.5 离心管。
- 17.4.6 梨形瓶:10 mL。
- 17.4.7 真空提取装置(可选)。
- 17.4.8 微量吸液器:100  $\mu\text{L}$ ~1 mL。
- 17.4.9 锥瓶:1 L。
- 17.4.10 玻璃移液管:10 mL。
- 17.4.11 单标线容量瓶:100 mL、500 mL、1 L。
- 17.4.12 试验样本容量:100 mL。
- 17.4.13 烧杯:100 mL、50 mL、1 L。
- 17.4.14 注射器:10  $\mu\text{L}$ (微升分度)。
- 17.4.15 亲水尼龙滤膜:0.45  $\mu\text{m}$  孔径。
- 17.4.16 分析天平:精度 $\pm 0.0001$  g。
- 17.4.17 pH计。
- 17.4.18 高效液相色谱仪:配二极管阵列检测器,适用于300 nm~600 nm波长范围的测定,并带有兼容的记录仪。
- 17.4.19 高效液相色谱柱  $\text{C}_{18}$ :
- 材质:不锈钢;
  - 柱长:250 mm;
  - 内径:4 mm;
  - 固定相:色谱级颗粒硅胶,十八烷基疏水担体键合颗粒,粒径0.5  $\mu\text{m}$ ,孔径100  $\text{\AA}$ 。

## 17.5 方法

### 17.5.1 试样

花丝藏红花和无花丝藏红花:从10.2得到的粉末中取样约500 mg。

藏红花粉:从10.3得到的粉末中取样约500 mg。

### 17.5.2 人造着色剂的萃取

将试样(17.5.1)加至离心管(17.4.5)中,加入10 mL约60  $^{\circ}\text{C}$ 的水,搅拌,放置10 min~12 min,充分搅拌,然后离心分离,用250  $\mu\text{L}$ 甲酸或2 mL乙酸(17.3.4)酸化。

### 17.5.3 样品的纯化

#### 17.5.3.1 纯化柱的制备

准备一根底部带有玻璃填料(17.4.1)的玻璃柱,按下法制备:

先准备聚酰胺(17.3.1)的水悬浮液。将足量的聚酰胺悬浮液加入玻璃柱中,排去溶剂后,得到10 mm(约需0.14 g~0.16 g聚酰胺)的柱。将少许玻璃棉堵住柱头,用1 mL水淋洗。

#### 17.5.3.2 人造着色剂的吸附

用移液管将上层清液(17.5.2)全部加注到柱上,让溶液渗透滴出。

#### 17.5.3.3 除去不需要的成分

依次用水、甲醇(17.3.2)、丙酮(17.3.3),最后用甲醇(17.3.2)连续洗脱,洗脱结束时流出的溶剂应无色,上述洗脱完成后,如果提取物还有颜色,应再次进行淋洗。用水淋洗后,确认pH为中性。

注:若使用真空(17.4.7)系统,洗脱进程快,需要溶剂较多(每种溶剂约30 mL)。

#### 17.5.3.4 人造着色剂的洗脱

用5 mL淋洗剂(17.3.5)将吸附了的着色剂洗脱,将有色馏出物保存在梨形瓶(17.4.6)中,室温下



用旋转蒸发器蒸发至干,用微量注射器和 500  $\mu\text{L}$  甲醇将残渣吸出。

#### 17.5.4 HPLC 分析

##### 17.5.4.1 仪器参数的设定

色谱参数设定如下:

——流动相(17.3.15 和 17.3.16)流速:1 mL/min;

——柱温(17.4.19):30  $^{\circ}\text{C}$ 。

##### 17.5.4.2 分析

下列两种方法,可根据实验室条件任选一种:

###### a) 恒流法

将流动相 A(17.3.15)的流速调节至与柱特性匹配,并达到平衡时,进 20  $\mu\text{L}$  试样溶液(17.5.3.4),再进同体积的人造着色剂参比液(17.3.12)。

所有成分馏出至少需要 70 min。

###### b) 溶剂梯度法

将流动相 A(17.3.15)的流速调节至与柱特性匹配,并达到平衡时,进 20  $\mu\text{L}$  试样溶液(17.5.3.4),再进同体积的人造着色剂参比液(17.3.12),先用流动相 A 洗脱 14 min,然后用流动相 B(17.3.16)洗脱 16 min,再用流动相 B 洗脱 10 min。

#### 17.5.5 说明和结果表示

##### 17.5.5.1 说明

通过与参比液(17.3.12)色谱峰比较,可鉴别所有人造着色剂;通过 300 nm~600 nm 波长范围的扫描进行结构确认。

附录 C 为供参考的色谱图示例。

##### 17.5.5.2 结果表示

如果不注明检测极限,检验结果不能表示为“存在”或“不存在”。

附 录 A  
(资料性附录)  
显微检查结果表示示例

## A.1 记录表格式

对每个剖面(细胞集合区数/显微结构数),注意观察到的组分数,按以下方法计算每种组分百分含量。观察到的组分数目( $X_1 \sim X_i$ )除以组分总数( $X$ ),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 | 相对含量    |
|----|-------------------|--------------|---------|
| 1  | 柱头                | $X_1$        | $X_1/X$ |
| 2  | 花柱                | $X_2$        | $X_2/X$ |
| 3  | 花粉                | $X_3$        | $X_3/X$ |
|    | 雄蕊                |              |         |
|    | 子房                |              |         |
|    | 花瓣                |              |         |
|    | 叶                 |              |         |
|    | 茎                 |              |         |
| 4  | 毛发                | $X_i$        | $X_i/X$ |
|    | 草                 |              |         |
|    | 无机物               |              |         |
|    | 淀粉                |              |         |
|    | 外来物               |              |         |
|    | 染色体               |              |         |
|    | 异常细胞 <sup>a</sup> |              |         |

<sup>a</sup> 若细胞内容物未扩散,可视为干态物。

利用表 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

样品特性:

| 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     |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |

表 A.2 (续)

| 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 |
|----|-------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| 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 <sup>a</sup> |      |      |      |      |      |      |      |      |      |       |

<sup>a</sup> 若细胞内容物未扩散,可视为干态物。

附录 B  
(资料性附录)  
藏红花水提物紫外/可见光谱

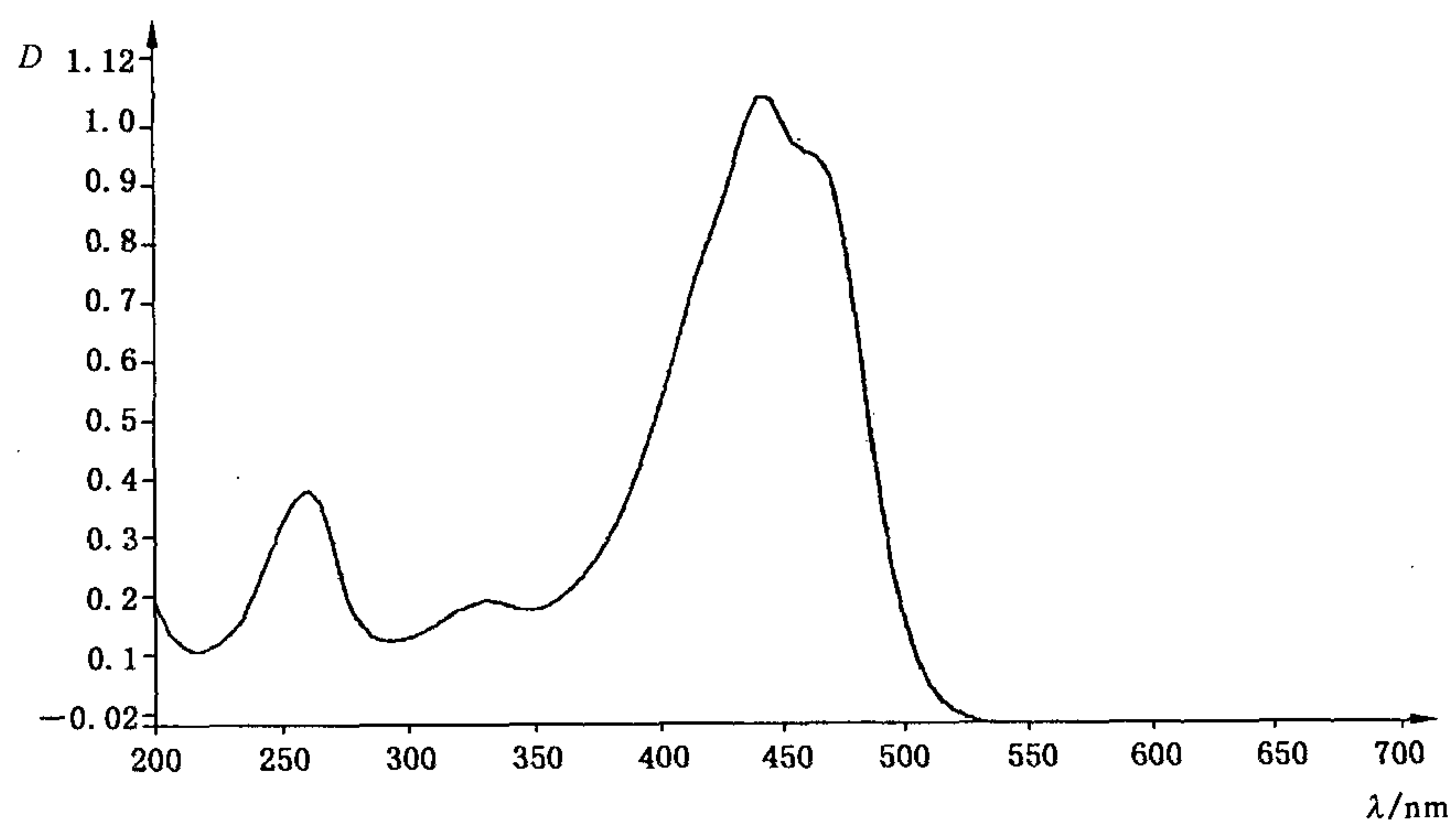
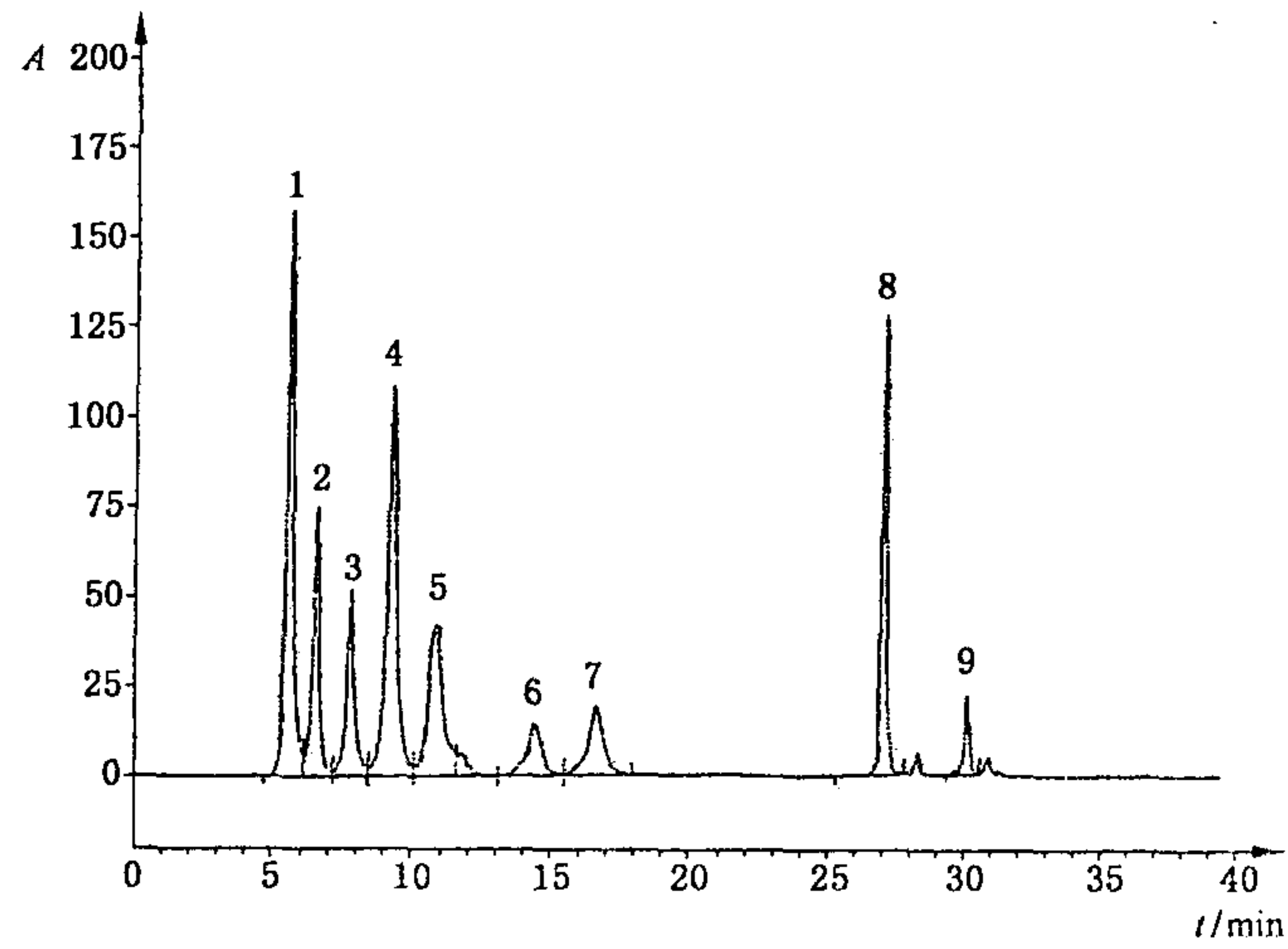


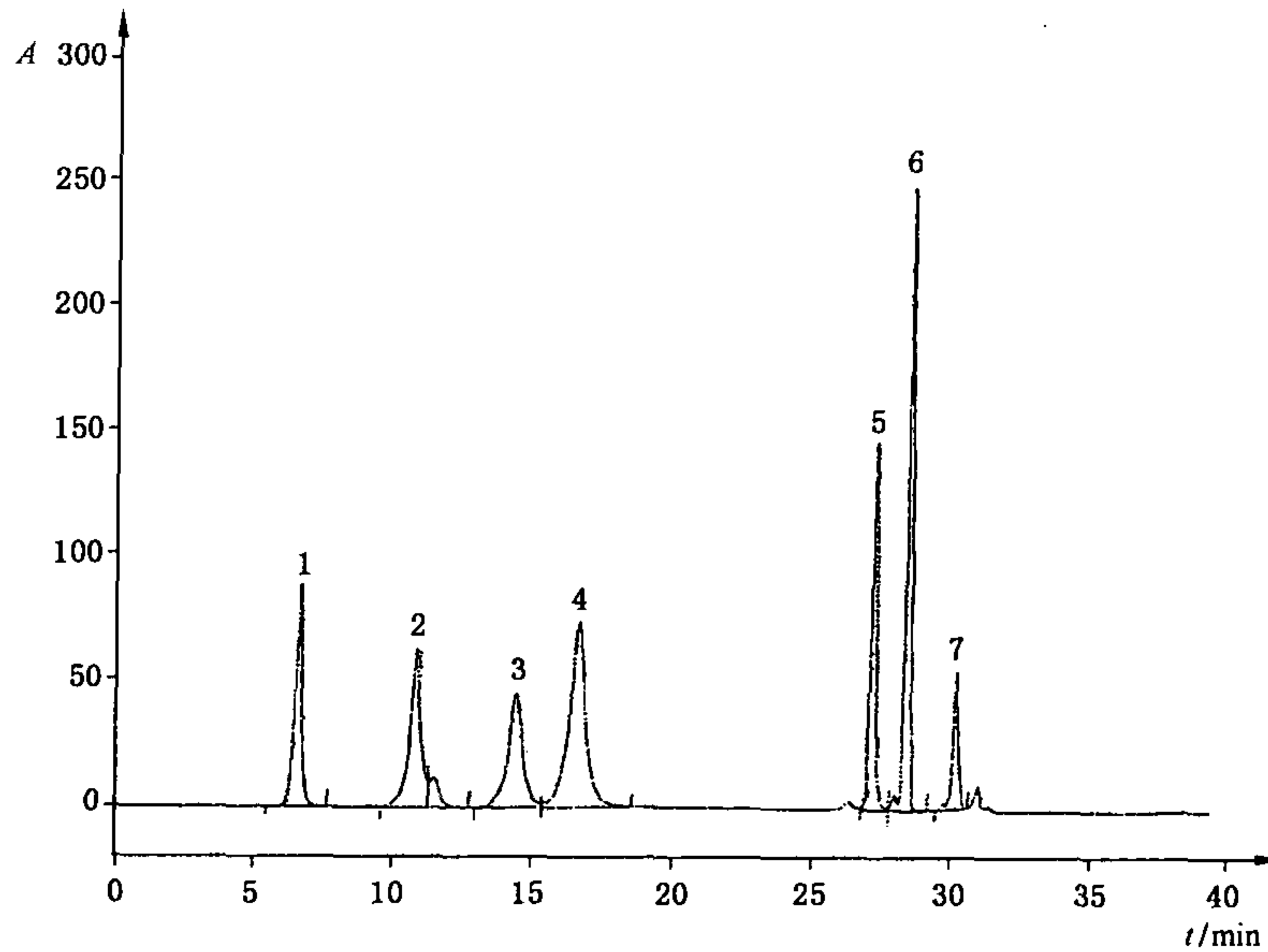
图 B.1 藏红花水提物紫外/可见光谱(200 nm~700 nm)

附录 C  
(资料性附录)  
实验条件下色谱图示例



- |         |            |
|---------|------------|
| 1——喹黄;  | 6——丽春红 4R; |
| 2——日落黄; | 7——偶氮玉红;   |
| 3——喹黄;  | 8——二号橙;    |
| 4——酒石黄; | 9——绕色灵。    |
| 5——苋菜红; |            |

图 C.1 着色剂色谱图(435 nm)



- |            |             |
|------------|-------------|
| 1——日落黄;    | 5——(酸性)二号橙; |
| 2——苋菜红;    | 6——藻红;      |
| 3——丽春红 4R; | 7——绕色灵。     |
| 4——偶氮玉红;   |             |

图 C.2 着色剂色谱图(520 nm)