INSO
259-2
5th. Revision
Mar.2013

جمهوری اسلامی ایران
Islamic Republic of Iran
سازمان ملی استاندارد ایران
Iranian National Standardization Organization

استاندارد ملی ایران
۲۵۹-۲
تجدید نظر پنجم
اسفند ۱۳۹۱

زعفران - روش‌های آزمون

Saffron - Test methods

ICS: 67.220.10

به نام خدا

آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب بند یک مادهٔ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسهٔ استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

نام موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به موجب یکصد و پنجاه و دومین جلسه شورای عالی اداری مورخ ۹۰/۶/۲۹ به سازمان ملی استاندارد ایران تغییر و طی نامه شماره ۲۰۶/۳۵۸۳۸ مورخ ۹۰/۷/۲۴ جهت اجرا ابلاغ شده است .

تدوین استاندارد در حوزه های مختلف در کمیسیون های فنی مرکب از کارشناسان سازمان ، صاحب نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می شود وکوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانهٔ صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و وارد کنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان های دولتی و غیر دولتی حاصل می شود .پیش نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی نفع و اعضای کمیسیون های فنی مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادها در کمیتهٔ ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می شود.

پیش نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان های علاقه مند و ذی صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می کنند درکمیتهٔ ملی طرح و بررسی و درصورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می شود .بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می شوند که بر اساس مفاد نوشته شده در استاندارد ملی ایران شمارهٔ ۵ تدوین و در کمیتهٔ ملی استاندارد مربوط که سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌دهد به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین المللی استاندارد (ISO)[1] ،کمیسیون بین المللی الکتروتکنیک (IEC)[2] و سازمان بین المللی اندازه شناسی قانونی (OIML)[3] است و به عنوان تنها رابط[4] کمیسیون کدکس غذایی (CAC)[5] در کشور فعالیت می کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی های خاص کشور ، از آخرین پیشرفت های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود .

سازمان ملی استاندارد ایران می تواند با رعایت موازین پیش بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری نماید. سازمان می تواند به منظور حفظ بازارهای بین المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری نماید. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده کنندگان از خدمات سازمان ها و مؤسسات فعال در زمینهٔ مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدورگواهی سیستم های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه ها و مراکز کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد ایران این گونه سازمان ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامهٔ تأیید صلاحیت به آن ها اعطا و بر عملکرد آن ها نظارت می کند. ترویج دستگاه بین المللی یکاها، کالیبراسیون (واسنجی) وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization
2 - International Electrotechnical Commission
3- International Organization of Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legale)
4 - Contact point
5 - Codex Alimentarius Commission

کمیسیون فنی تدوین استاندارد

« زعفران - روش‌های آزمون »

تجدید نظر پنجم

رئیس :	**سمت و/ یانمایندگی :**
اسحاقی – زرین	دانشگاه پیام نور
(دکترای شیمی تجزیه)	
دبیران:	
قلاسی مود- فرحناز	اداره کل استاندارد خراسان رضوی
(فوق لیسانس علوم تغذیه)	
وزیرزاده – بیتا	زعفران تسلی
(لیسانس مهندسی شیمی- صنایع غذایی)	
اعضا: (به ترتیب حروف الفبا)	
احمدی ، حمیده	اداره کل استاندارد خراسان جنوبی
(فوق لیسانس شیمی فیزیک)	
افضلیان، فرشید	اداره کل استاندارد خراسان رضوی
(فوق لیسانس شیمی فیزیک)	
اکبرنژاد ، مریم	شرکت تروند زعفران
(لیسانس علوم و صنایع غذایی)	
ایزدی ، خاطره	سازمان ملی استاندارد ایران
(لیسانس علوم و صنایع غذایی)	
برزگر ، معصومه	واحد تولیدی محمد نامی
(لیسانس مهندسی شیمی- صنایع غذایی)	
برومند ، زهره	شرکت چرمه فردوس
(فوق لیسانس شیمی تجزیه)	
براتیان ، زهره	شرکت نوین زعفران
(فوق لیسانس صنایع غذایی)	
پهلوان ، آیدین	شرکت جهان زعفران
(فوق لیسانس علوم صنایع غذایی)	
جلیل مژدهی ، فاطمه	صندوق توسعه صادرات
(فوق لیسانس علوم و صنایع غذایی)	

کمیسیون فنی تدوین استاندارد(ادامه)

اعضا :	**سمت و/ یانمایندگی**
حسینی ، علی (لیسانس اقتصاد کشاورزی)	شورای ملی زعفران
حجازی ، معصومه سادات (لیسانس شیمی)	شرکت زعفران ادمان
رزاقی ، رعنا (لیسانس علوم و صنایع غذایی)	شرکت تکنوپانکو
رییسی ، ریحانه (لیسانس علوم و صنایع غذایی)	شرکت زعفران یگانه
سحرخیز ، شادی (لیسانس مهندسی شیمی- صنایع غذایی)	شرکت زعفران سحرخیز
سالاری ، رزیتا (فوق لیسانس صنایع غذایی)	دانشگاه علوم پزشکی مشهد - معاونت غذا و دارو
سعیدی ، ایمان (فوق لیسانس شیمی تجزیه)	اداره کل استاندارد خراسان رضوی
شرایعی ، پروین (دکترای علوم و صنایع غذایی)	مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی
صالح آبادی ، محسن (لیسانس علوم و صنایع غذایی)	سازمان جهاد کشاورزی خراسان رضوی
طالبیان ، فریده (لیسانس علوم و صنایع غذایی)	اداره کل استاندارد خراسان رضوی
عابد ، زهره (لیسانس علوم و صنایع غذایی)	شرکت جهان زعفران
علمیردانی ، آراسته (فوق لیسانس علوم و صنایع غذایی)	شرکت نوین زعفران
غلام نیا ، سمیه (لیسانس علوم و صنایع غذایی)	شرکت مهر چین شاندیز
ملاکیان ، شهره (لیسانس علوم و صنایع غذایی)	اداره کل استاندارد خراسان رضوی
محمدی ، نادیا (لیسانس علوم و صنایع غذایی)	شرکت مشهدطب

کمیسیون فنی تدوین استاندارد(ادامه)

اعضا:	سمت و/ یانمایندگی
مشعوفی ، میترا (لیسانس علوم و صنایع غذایی)	شرکت بهرامن
محمدی ، مریم (لیسانس علوم و صنایع غذایی)	شرکت تروند زعفران
هاشمی ، مریم (لیسانس بیولوژی)	شرکت زعفران ادمان
همتی کاخکی ، عباس (فوق لیسانس علوم و صنایع غذایی)	پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
آشنایی با سازمان ملی استاندارد	ب
کمیسیون فنی تدوین استاندارد	ج
پیش گفتار	د
مقدمه	ه
۱ هدف	۱
۲ دامنه کاربرد	۱
۳ مراجع الزامی	۱
۴ اصطلاحات وتعاریف	۲
۵ نمونه آزمایشگاهی	۳
۶ آزمون شناسایی	۷
۷ آزمون میکروسکوپی زعفران	۸
۸ تعیین درصد جرمی رطوبت و مواد فرار	۱۲
۹ تعیین در صد جرمی خامه متصل به کلاله در زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده	۱۳
۱۰ تعیین در صد جرمی مواد خارجی در زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده	۱۵
۱۱ ساییدن و الک کردن	۱۵
۱۲ تعیین در صد جرمی عصاره محلول در آب سرد	۱۶
۱۳ تعیین خاکستر کل	۱۶
۱۴ تعیین خاکستر نامحلول در اسید	۱۷
۱۵ تعیین ویژگی‌های اصلی با استفاده از روش (طیف نورسنجی فرابنفش - مریی)	۱۷
۱۶ آلاینده ها	۱۹
۱۷ آزمون ویژگیهای میکروبیولوژی	۲۰
۱۸ شناسایی رنگ مصنوعی : شناسایی رنگ های مصنوعی اسیدی محلول در آب به روش کروماتوگرافی لایه-نازک	۲۰
۱۹ شناسایی رنگهای مصنوعی	۲۷
۱۱ پیوست ها	۵۵

پیش گفتار

استاندارد « زعفران - روش‌های آزمون » نخستین بار در سال ۱۳۸۰تدوین شد این استاندارد بر اساس پیشنهادهای رسیده و تایید کمیسیون‌های مربوط برای پنجمین بار مورد تجدید نظر قرار گرفت و در هزار و صد و هشتاد و سومین اجلاس کمیته ملی استاندارد خوراک و فرآورده‌های کشاورزی مورخ ۹۱/۸/۲۵ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک مادهٔ ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات سازمان ملی استاندارد ایران ، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ به عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود .

برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینهٔ صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در مواقع لزوم تجدید نظر خواهد شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود ، هنگام تجدید نظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت . بنابراین ، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی استفاده کرد.

این استاندارد جایگزین استاندارد های ملی ایران شماره ۲-۲۵۹ : سال ۱۳۸۲ می‌گردد.

منبع و ماخذی که برای تهیهٔ این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

ISO3632-2:2010 , saffron- test methods

زعفــران ـ روش‌های آزمــون

۱ هــدف

هدف از تدوین این استاندارد تعیین روش‌های آزمون انواع زعفران خشک شده حاصل از مادگی گل‌های گیاه زعفران می‌باشد .

۲ دامنه کاربرد

این استاندارد برای انواع زعفران خشک شده حاصل از مادگی گل‌های گیاه زعفران زراعی *crocus sativus linnaeus* در موارد ذیل کاربرد دارد :

الف) رشته‌ای [۱]

ب) رشته‌ای بریده[۲]

ج) پودر[۳]

یادآوری : ویژگی‌های انواع زعفران در استاندارد ملی ایران به شماره ۱- ۲۵۹ ارایه شده است .

۳ مراجع الزامی

مدارک زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آن‌ها ارجاع داده شده است . بدین ترتیب ان مقررات جزئی از این استاندارد ملی ایران محسوب می شود.

در صورتی که به مدرکی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد ، اصلاحیه ها و تجدید نظرهای بعدی ان مورد نظر این استاندارد ملی ایران نیست . در مورد مدارکی که بدون ذکر تاریخ انتشار به ان ها ارجاع داده شده است همواره آخرین تجدید نظر و اصلاحیه های بعدی آن ها مورد نظر است .

استفاده از مراجع زیر برای کاربر این استاندارد الزامی است :

۳-۱ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۲۵۹ ، زعفران ـ ویژگی‌ها

۳-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۹۶ ، روش اندازه‌گیری رطوبت و مواد فرار در ادویه و چاشنی

1- Saffron in filament
2 - Saffron in cut filament
3 -Saffron in powder form

۳-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۱۱۹۷ ،روش تعیین خاکستر کل در ادویه و چاشنی

۳-۴ استاندارد ملی ایران ۱۲۵۳ : سال ۱۳۸۸ اندازه‌گیری خاکستر نامحلول در اسید برای ادویه وچاشنی

۳-۵ استاندارد ملی ایران ۱۲۱۸۵ : سال ۱۳۸۸ عصاره محلول در آب سرد در ادویه و چاشنی

۳-۶ استاندارد ملی ایران ۵۶۸۹ : سال ۱۳۸۷ زعفران ویژگی‌های میکروبی و روش‌های آزمون

۳-۷ استاندارد ملی ایران ۱۷۲۸: سال ۱۳۸۱ آب - مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه - ویژگیها و روشهای آزمون

۳-۸ استاندارد ملی ایران ۳۶۵۹ : سال ۱۳۷۴ ادویه و چاشنی‌ها – نمونه‌گیری

۳-۹ استاندارد ملی ایران ۷۵۲۰ : سال ۱۳۸۳ ظروف شیشه ای آزمایشگاهی – بالن های حجم سنجی با یک خط نشانه - ویژگیها

۳-۱۰ استاندارد ملی ایران ۱۹۵۹ : سال ۱۳۹۰ لوازم آزمایشگاهی – پیپت های تک حجم

۳-۱۱ استاندارد ملی ایران ۹۰۳۰ : سال ۱۳۸۵ لوازم شیشه ای آزمایشگاهی - پی پت های پاستور یکبار مصرف - ویژگیها

۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد علاوه براصطلاحات و تعاریف مندرج در استاندارد ملی ایران به شماره ۱-۲۵۹ ، تعاریف ذیل کاربرد دارد:

۴-۱

مقدار رطوبت و مواد فرار

عبارتست از کاهش کسری از جرم نمونه تحت شرایط تعیین شده در بند ۸-۷ که بر حسب در صد جرمی بیان می‌گردد.

یادآوری : مقدار رطوبت و مواد فرار بصورت درصدی از کسر جرم نمونه بیان شده است.

۲-۴

قدرت رنگی

عبارتست از جذب کروسین در طول موج بیشینه حدود۴۴۰ نانومتر[1]برای محلول ۱گرم در۱۰۰ میلی‌لیتر از نمونه آزمون با استفاده از سل کوارتز ۱ سانتیمتری

یادآوری: قدرت رنگی مربوط به مقدار کروسین ها می باشد.

۳-۴

گستره طول موج ناحیه فرابنفش – مر ئی [2]عصاره آبی زعفران

عبارتست از طیف بدست آمده در ناحیه طیفی بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر

به مثال ارایه شده در پیوست اطلاعاتی ت مراجعه شود.

۴-۴

اندیس بازداری[3] R_f

عبارتست از نسبت مسافت طی شده توسط لکه از نقطه لکه گذاری به مسافت طی شده توسط جبهه حلال بر روی صفحه کروماتوگرافی

۵-۴

حد تشخیص[4] LOD

عبارتست از حداقل مقدار یا غلظت ماده مورد تجزیه ی قابل تشخیص در یک نمونه ی آزمون، نه به گونه‌ای که توسط یک آزمون مشترک یا سایر اعتبارسنجی‌های صحیح تعیین شده ، لزوما کمی باشد.

۶-۴

کمینه حد کارایی لازم[5] MRPL

کمینه مقدار ماده مورد تجزیه در نمونه که باید تعیین و تایید شود.

۵ نمونه آزمایشگاهی

۵-۱ کمینه جرم نمونه آزمایشگاهی

1 - Nano meter (nm)
2 -Ultraviolet-Visible (Uv-Vis)
3 -Retardation factor
4 -Limit of detection
5 -Minimum required performance limit

روش‌های نمونه برداری برای ادویه و چاشنی‌ها در استاندارد ملی ایران به شماره ۳۶۵۹ تعیین شده است.
کمینه جرم نمونه آزمایشگاهی ۲۴ گرم (۲×۱۲ گرم) برای زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده و ۱۲ گرم (۲×۶ گرم) برای پودر زعفران ، جهت انجام آزمون طبق این استاندارد برای دو تکرار می‌باشد.
از آنجایی که جرم نمونه لازم برای آزمون کم است ، توصیه شده است که از یک نمونه متجانس گرفته شده باشد.

۵-۲ جرم نمونه مورد نیاز برای هر یک از آزمون‌های زعفران

در جدول ۱ و ۲ نمونه مورد نیاز جهت هر یک از آزمون‌های زعفران رشته‌ای ، رشته‌ای بریده و پودر ارایه شده است .

یادآوری – در جدول ۱ و ۲ مقدار نمونه آزمون جهت آزمون تشخیص رنگدانه‌های زعفران محاسبه نگردیده است این آزمون تکمیلی بوده و در پیوست اطلاعاتی الف ارایه شده است .

جدول ۱- جرم نمونه مورد نیاز جهت آزمون زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده

ردیف	مراحل آزمون (آزمونه :گرم ۲۴= ۲×۱۲)	آزمایه[1] (گرم)	توضیحات	بند مرتبط
۱	آزمون شناسایی	۵	آزمایه جدید آزمون غیر تخریبی	۶
۲	بررسی میکروسکوپی	۰/۰۵	آزمایه از مرحله ۱	۷
۳	تعیین میزان مواد خارجی	۳	آزمایه از مرحله ۱	۱۰
۴	خامه متصل به کلاله	۳	آزمایه از مرحله ۱ آزمون غیر تخریبی	۹
۵	تعیین عصاره محلول در آب سرد	۲	آزمایه از مرحله ۴ پس از افزودن خامه‌های جدا شده	۱۲
۶	تعیین مقداررطوبت و مواد فرار	۲/۵	آزمایه جدید - آزمونه را برای تعیین خاکستر کل و خاکستر نامحلول در اسید نگهداری نمایید	۸
۷	تعیین خاکستر کل	۲	باقیمانده آزمایه از مرحله ۶	۱۳
۸	تعیین خاکستر نامحلول در اسید	-	آزمایه بدست آمده از مرحله ۷	۱۴
۹	ساییدن والک کردن	۴	آزمایه جدید نمونه را پس از سائیدن الک کنید تا پودری بدست آورید که ۹۵٪کسر جرمی آن از یک الک با روزنه‌های۵۰۰ میکرون عبور کند. باقیمانده روی الک را مجددا با نمونه زیر الک مخلوط کنید تا آزمونه یکنواختی بدست آید	۱۱
۱۰	تعیین خصوصیات اصلی	۰/۵	آزمایه مرحله ۹ بعد از الک کردن	۱۵
۱۱	کروماتوگرافی لایه نازک[2] (TLC): شناسایی رنگ های مصنوعی	۰/۵	آزمایه مرحله ۹، قبل از الک کردن ، HPLC ، (مرحله ۱۲) می‌تواند بصورت جایگزین یا بصورت اضافی اجرا شود. در این صورت ، از محلول استخراج شده برای هر دو روش استفاده کنید.	۱۹
۱۲	کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)[3]: شناسایی رنگ های مصنوعی	۰/۵	آزمایه از مرحله ۹، قبل از الک کردن، TLC ، (مرحله ۱۱) می‌تواند بصورت جایگزین یا بصورت اضافی اجرا شود. در این صورت ، از محلول استخراج شده برای هر دو روش استفاده کنید	۲۰
۱۳	آلاینده های فلزی	۰/۵		۱۷

یادآوری: ۴/۵۰ گرم نمونه آزمایشگاهی باقی می‌ماند که می تواند برای آزمون های بیشتر یا برای تکرار آزمون های معین در صورت نیاز مورد استفاده قرار گیرد.

1 -Test sample
2 -Thin- Layer –Chromatography
3 - High performance liquid chromatography

جدول ۲- جرم نمونه مورد نیاز جهت آزمون زعفران به شکل پودر

ردیف	مراحل آزمون (نمونه آزمایشگاهی:گرم ۱۲= ۲×۶ گرم) حدود ۱۰ گرم	آزمایه (گرم)	توضیحات	بند مرتبط
۱	آزمون شناسایی	۰/۲	آزمایه جدید اگر آزمایه در تجزیه رنگ سنجی مورد تایید قرار نگرفت آزمایش را ادامه ندهید	۶
۲	بررسی میکروسکوپی	۰/۰۵	آزمایه جدید	۷
۳	تعیین میزان مواد خارجی	۳	در کل بسته مورد آزمون وجود مواد خارجی مورد بررسی قرار می‌گیرد.	۱۰
۴	تعیین مقداررطوبت و مواد فرار	۲/۵	آزمایه جدید آزمونه را برای تعیین خاکستر کل و خاکستر نامحلول در اسید نگهداری نمایید	۸
۵	تعیین خاکستر کل	۲	باقیمانده آزمایه از مرحله ۴	۱۳
۶	تعیین خاکستر محلول در اسید	-	آزمایه بدست آمده از مرحله ۵	۱۴
۷	ساییدن والک کردن	۴	آزمایه جدید الک کردن را مطابق با بند ۸ انجام دهید تا پودری بدست آورید که ۹۵٪کسر جرمی آن از یک الک با روزنه های ۵۰۰ میکرون عبور کند. باقیمانده روی الک را مجددا با نمونه زیر الک مخلوط کنیدتا آزمونه یکنواختی بدست آید	۱۱
۸	تعیین محلول عصاره در آب سرد	۲	آزمایه از مرحله ۷	۱۲
۹	تعیین خصوصیات اصلی	۰/۵	آزمایه از مرحله ۷ بعد از الک کردن	۱۵
۱۰	کروماتوگرافی لایه نازک (TLC): شناسایی رنگ های مصنوعی	۰/۵	آزمایه مرحله ۷، قبل از الک کردن ، HPLC ،(مرحله ۱۱) می تواند بصورت جایگزین یا بصورت اضافی اجرا شود. در این صورت ، از محلول استخراج شده برای هر دو روش استفاده کنید.	۱۹
۱۱	کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) : شناسایی رنگ های مصنوعی	۰/۵	آزمایه از مرحله ۷، قبل از الک کردن، TLC ،(مرحله ۱۰) می تواند بصورت جایگزین یا بصورت اضافی اجرا شود. در این صورت ، از محلول استخراج شده برای هر دو روش استفاده کنید	۲۰
یادآوری: ۱گرم نمونه آزمایشگاهی باقی می‌ماند که می‌تواند برای آزمون‌های بیشتر یا برای تکرار آزمون‌های معین در صورت نیاز مورد استفاده قرار گیرد.				

۶ آزمون شناسایی

۶-۱ عمومی

اگر آزمون‌های مندرج در این بند نشان دهنده وجود ناخالصی در زعفران باشد انجام سایر آزمون‌ها ضرورتی ندارد.

۶-۱-۱ کلیات

اگر براساس آزمون‌های مندرج در این بند ویژگی های زعفران مورد آزمون با بند ۴-۷ استاندارد ملی ایران به شماره ۱-۲۵۹ مطابقت نداشته و بیانگر وجود ناخالصی در زعفران باشد ، ادامه آزمون‌ها ضرورتی ندارد.

۶-۲ زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده

۶-۲-۱ اساس روش

معاینه چشمی با درشت نمای شیشه‌ای (ذره بین)

۶-۲-۲ وسایل لازم

۶-۲-۲-۱ درشت نمای شیشه‌ای (ذره بین) با بیشینه بزرگ نمائی ۱۰ برابر

۶-۲-۲-۲ شیشه ساعت با اندازه مناسب

۶-۲-۳ روش آزمون

نمونه زعفران رشته‌ای ویا رشته‌ای بریده را روی شیشه ساعت مناسب (طبق بند ۶-۲-۲) پخش نموده و آن را با درشت نمای شیشه‌ای (طبق بند ۶-۲-۲-۱) بررسی کنید .

۶-۲-۴ تفسیر نتایج

تمام رشته‌ها باید متعلق به مادگی گل گیاه زعفران (C.S.L) باشد در غیر این صورت نمونه مردود است

۶-۳ پودر زعفران

۶-۳-۱ اساس روش

از یک واکنش رنگ سنجی استفاده شود

۶-۳-۲ واکنشگرها

در طی آزمون ، به غیر از مواردی که بیان شده است ، تنها از واکنشگرهای با درجه خلوص آزمایشگاهی تعیین شده و آب مقطر یا آب یون زدایی شده یا آب با کیفیت برابر استفاده کنید.

۶-۳-۲-۱ سولفوریک اسید با چگالی ۱/۸۴ گرم در میلی لیتر

۶-۳-۲-۲ ۰/۱گرم محلول دی فنیل آمین را با ۲۰ میلی لیتر سولفوریک اسید (طبق بند ۶-۳-۲-۱) و ۴ میلی لیتر آب مقطر مخلوط کنید. دی فنیل آمین نباید با سولفوریک اسید واکنش رنگی ایجاد کند.

۶-۳-۳ کپسول چینی، ته صاف

۶-۳-۴ روش آزمون

۰/۲ گرم آزمایه پودر زعفران (رجوع به جدول ۲) را برداشته و به تدریج آن را به کپسول چینی (طبق بند ۶-۳-۳) که حاوی حدود ۵ میلی لیتر محلول دی فنیل آمین (طبق بند ۶-۳-۲-۲) می‌باشد اضافه کنید .

۶-۳-۵ بیان نتایج

حضور زعفران بلافاصله ایجاد یک رنگ آبی می‌کند که رنگ مزبور سریعا به رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای تبدیل می شود . رنگ آبی ایجاد شده باید در حضور نیترات‌ها پایدار بماند.

۷ آزمون میکروسکوپی زعفران

۷-۱ کلیات

این روش برای آزمون زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده و پودر آن به منظور تعیین اینکه نمونه منحصرا" متعلق به گیاه زعفران زراعی می‌باشد یا خیر و همچنین مشـــخص نمودن هر گونه مواد خارجی کاربرد دارد.

۷-۲ اساس روش

اساس روش عبارتست از بررسی ماهیت وخلوص پودر زعفران و زعفران رشته ای خرد شده و تعیین مواد خارجی و بقایای گل در صورت وجود ، به وسیله مشاهده اجزا تشریحی توسط میکروسکوپ تحت شرایط توضیح داده شده در بند ۷-۵ می‌باشد. در صورت نیاز درصداجزای مشاهده شده در نمونه تعیین شود (به پیوست اطلاعاتی ب مراجعه شود.)

۷-۳ مواد و / یا واکنشگرها

در طی آزمون ، به غیر از مواردی که بیان شده است ، از واکنش‌گرهای با در جه آزمایشگاهی تعیین شده و آب مقطر یا آب یون زدایی شده یا آب با کیفیت برابر استفاده کنید.

۷-۳-۱ محلول ید یدوره

عبارتست از محلول آبی ید در پتاسیم یداید در داخل یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری درب سمباده‌ای ۲گرم ید و۴ گرم پتاسیم یداید و در حدود ۱۰ میلی لیتر آب مقطر بریزید . بگذارید تا کاملا حل شود سپس با آب مقطر به حجم برسانید درب آنرا ببندید .

۷-۳-۲ محلول شفاف کننده

عبارتست از سدیم یا پتاسیم هیدروکسید به غلظت ۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب و یا کلرال هیدرات به غلظت ۸۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب ، که به وسیله حرارت دادن حل شده است.

۷-۴ وسایل لازم

علاوه بر وسایل معمول آزمایشگاهی ، وسایل زیر مورد نیاز می‌باشد :

۷-۴-۱ لام

۷-۴-۲ لامل

۷-۴-۳ کاردک

۷-۴-۴ سوزن نوک تیز

۷-۴-۵ بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری (مطابق با ویژگی‌های مندرج در استاندارد ملی ایران به شماره ۷۵۲۰)

۷-۴-۶ میکروسرنگ با درجه‌بندی میکرولیتر جهت برداشتن حجم ۵۰ میکرولیتر

۷-۴-۷ میکروسکوپ با درشت نمائی‌های ۱۰۰ تا ۴۰۰ برابر و مجهز به سیستم مشاهده درنور پلاریزه

۷-۵ روش آزمون

۷-۵-۱ آزمونه

برای هریک از لام‌های بندهای (۷-۵-۲و۷-۵-۴) آزمونه‌ای در حدود ۰/۰۰۱تا ۰/۰۰۲ گرم از زعفران پودری (طبق بند **۱۱-۲-۲**) یا رشته‌ای یا رشته ای بریده (طبق بند **۱۱-۲-۱**) بردارید.

۷-۵-۲ آماده سازی نمونه برای مشاهده در حضورآب

دولام به شرح زیر تهیه کنید .

۵۰ میکرولیتر آب را روی لام بریزید . از نوک کاردک یا سوزن نوک تیز استفاده کنید ، نمونه (طبق بند۷-۵-۱) را روی آن بریزید و با آب مخلوط کنید . حداقل ۵ دقیقه صبر کنید تا پودر کاملا خیس شود سپس با لامل روی آن را بپوشانید.

۷-۵-۳ آماده سازی نمونه برای مشاهده در محلول آبی سدیم هیدروکسید ، پتاسیم هیدروکسید یا کلرال هیدرات.

دو لام (طبق بند۷-۵-۲) تهیه کنید با این تفاوت که به جای آب از سدیم هیدروکسید ، پتاسیم هیدروکسید یا کلرال هیدرات (طبق بند۷-۳-۲) استفاده شود .

چند دقیقه جهت شفاف شدن محیط صبر کنید و برای اجتناب از تغییر اجرای سلولی و اطمینان از اینکه آنها می‌توانند شناسایی شوند مشاهده را ظرف ۱۰ دقیقه پس از افزایش محلول شفاف شده انجام دهید.

یادآوری: این روش مشاهده اجازه میدهد که تمام یا بخش اعظم محتویات سلولی تخریب شوند و اجزا سلولی نیز واضح‌تر و ساده تر مشاهده شود ، به ویژه عناصر خشبی آوندها ،رگبرگ‌ها ، فیبرها و اپیدرم روشن‌تر می‌گردد و مشاهده آنها آسان‌تر است در این شرایط عناصر کانی تغییری نمی‌کنند .

۷-۵-۴ آماده سازی برای مشاهده در محلول آبی ید یدوره

یک لام (طبق بند ۷-۵-۲) تهیه نمائید ولی بجای آب محلول یدیدوره (طبق بند ۷-۳-۱) را استفاده کنید .

یادآوری : در این روش دانه های نشاسته به رنگ آبی مایل به سیاه یا بنفش تیره در می آیند و قابل رویت می باشند.

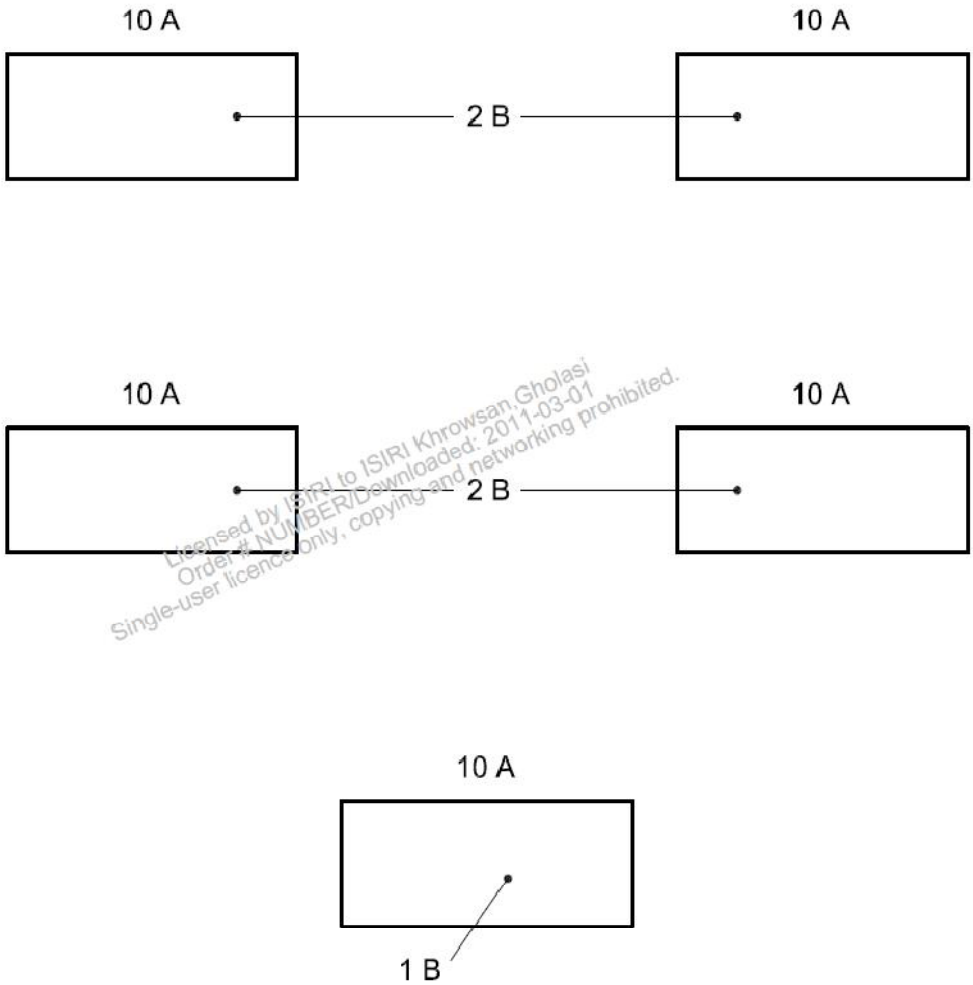
۷-۵-۵ مشاهده ، شناسایی و شمارش

هریک ازلام‌های آماده شده برابر (طبق بند ۷-۵-۲ تا ۷-۵-۴) را زیر میکروسکوپ (طبق بند ۷-۴-۷)قرار دهید . بزرگ نمائی را روی ۱۰۰ برابر تنظیم کرده و با بزرگ نمایی ۴۰۰ برابر اجزا را شناسایی و شمارش کنید (بند ۶-۷).

یادآوری : برای شناسایی و شمارش ساختار تشریحی و اجزاء خارجی برای هر لام باید از مشاهدات ۱۰ میدان دید استفاده نمود.

اگـر میکروسـکوپ مجهز به ابزاری است که امکان مشاهده در نور پلاریزه را فراهم می‌سازد (طبق بند ۷.۴.۷) یکی از دو لام آماده شـده (طبق بند ۷-۵-۲) را در نور پلاریزه مشاهده نمائید .

در شکل ۱ با یک مثال به طور خلاصه مراحل اجرایی شمارش نشان داده شده است .



Licensed by ISIRI to ISIRI Khrowsan,Gholasi
Order # NUMBER/Downloaded: 2011-03-01
Single-user licence only, copying and networking prohibited.

راهنمای شکل:

A :میدان دید

B : اسلاید

شکل ۱) مثالی از روش عملی شمارش

۷-۶ بیان نتایج

مثالی از نحوه بیان نتایج جهت اطلاع در پیوست اطلاعاتی ب شرح داده شده است .

۷-۷ آزمون میکروسکوپی

به عکس های مرجع ارائه شده جهت اطلاع در پیوست اطلاعاتی پ نگاه کنید.

در طی آزمون ، عناصر زیر می توانند مشاهده شوند:

الف) قسمت انتهایی کلاله دارای کرک‌های دراز که بعد از آسیاب کردن به صورت کرک جدا شده دیده می شوند (شکل ب.۱)

ب) بافت‌های سلولی اپیدرم کلاله که به صورت غلاف‌های کوچک غشا مشخص می‌شوند . (شکل ب.۲) .

پ) بافت‌های سلولی اپیدرم خامه که دارای جداره سینوسی می‌باشد (شکل ب۳)

ت) دانه‌های گرده با قطر بین ۸۰ تا۱۰۰میکرومتر که دارای جداره نرم و دانه‌های بسیار ریز است (شکل ب.۴)

ث) بخش‌هائی از آوندهای مارپیچی هدایت کننده (شکل ب.۵)

ج) بخش‌هایی از سلول‌های پرچم (شکل ب.۶)

چ) دانه‌های نشاسته (شکل ب.۷)

ح) مواد غیر آلی (شکل ب.۸)

خ) قطعات کرک (شکل ب.۹)

د) سلول‌هایی که علیرغم محلـول شفاف‌کننده ، محتویات آنها رنگی باقی‌مانده است (شکل ب.۱۰)

۷-۸ تفسیر مشاهدات میکروسکوپی

از طریق ارزیابی درصد نسبی هر ساختار که با استفاده ازجدول شمارش بدست آمده است می‌توان کنترل کرد که زعفران ساییده شده که عمدتا از اجزاء کلاله ساخته شده به کدام یک از اجزاء خامه یا دانه‌های گرده می تواند مرتبط باشد مشاهده باید مطابق جداول پ.۱ و پ.۲ در پیوست اطلاعاتی گزارش شده باشد.

یاد آوری: زعفران آسیاب شده نباید حاوی بافت خشبی ، فیبر ، پرزها و دانه‌های نشاسته باشد . در محلول آبی سلول‌ها باید رنگ نارنجی - زرد داشته باشد .

۸ تعیین درصد جرمی رطوبت و مواد فرار

۸-۱ کلیات

یادآوری : این روش برای زعفران رشته‌ای، رشته‌ای بریده و پودر قابل کاربرد است.

روش تعیین میزان رطوبت ادویه و چاشنی‌ها مندرج در استاندارد ملی به شماره ۱۱۹۶ به علت نیاز به حجم بالای نمونه ، در مورد زعفران توصیه نمی‌شود.

۸-۲ اساس روش

اساس روش عبارتست از خشک کردن نمونه در گرمخانه ۲±۱۰۳ درجه سانتی‌گراد در مدت ۱۶ ساعت

۸-۳ وسایل لازم

علاوه بر وسایل معمول آزمایشگاه ، وسایل زیر نیز مورد نیاز می باشد :

۸-۳-۱ ظرف شیشه‌ای توزین درب دار

۸-۳-۲ گرمخانه ، باحرارت ۲±۱۰۳ درجه سانتیگراد

۸-۳-۳ خشک کن آزمایشگاهی[1] ، حاوی ماده جاذب رطوبت موثر

۸-۳-۴ ترازوی آزمایشگاهی ، با دقت ۰/۰۰۱ گرم

۸-۴ روش کار

حدود ۲/۵ گرم نمونه با تقریب ۰/۰۰۱ گرم ، را (طبق بند ۶ جدول ۱ و بند ۳ جدول ۲) در ظرف شیشه‌ای توزین (بند ۸-۳-۱) که قبلا به وزن ثابت توزین نمایید.

ظرف حاوی آزمونه را بدون درب در گرمخانه (بند ۸-۳-۲)تنظیم شده در دمای ۲±۱۰۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت قرار دهید . سپس درب آن را ببندید و در خشک کن (بند ۸-۳-۳) قرار دهید تا سرد شود . در انتها آن را با تقریب ۰/۰۰۱ گرم توزین کنید.

یادآوری : نمونه خشک شده را جهت آزمون خاکستر کل و خاکسترنامحلول در اسید نگهداری کنید

دو اندازه‌گیری را بر روی همان نمونه آزمایشگاهی انجام دهید.

۸-۵ تفسیر نتایج

درصد جرمی رطوبت و مواد فرار در نمونه طبق رابطه زیر بدست می‌آید.

$$w = (m_0 - m_4) \times ۱۰۰ / m_{0\%}$$

که در آن :

m_0 = جرم نمونه آزمودنی بر حسب گرم

m_4 = جرم باقی مانده خشک به گرم (که عبارتست از اختلاف جرم ظرف تورین حاوی نمونه خشک و جرم ظرف تورین)

w = درصد جرمی رطوبت و مواد فرار بر حسب گرم درصد

جهت محاسبه نتیجه ، میانگین حسابی دو اندازه‌گیری را در نظر بگیرید به شرطی که تکرار پذیری برآورد شده باشد.

1 - Desicator

۹ تعیین در صد جرمی خامه متصل به کلاله در زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده

۹-۱ اساس روش

خامه متصل به کلاله در آزمونه به صورت فیزیکی جدا شده سپس توزین می‌شود.

۹-۲ وسایل لازم

۹-۲-۱ شیشه ساعت

۹-۲-۲ پنس آزمایشگاهی کوچک

۹-۲-۳ ترازو آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۱ گرم

۹-۳ روش کار

حدود ۳ گرم از آزمایه را با دقت ۰/۰۱ گرم وزن کنید.

از آنجایی که جرم آزمایه کم است ، توصیه شده است که نمونه برداری از یک محموله همگن صورت گیرد.

یادآوری ۱: در مورد زعفران رشته‌ای باید نمونه از رشته‌هائی که انشعابات کلاله از آنها جدا نشده باشد ، برداشته و توزین گردد .(در صورتی که خامه‌های جدا شده‌ای در نمونه اولیه وجود داشته باشد درصد جرمی آنها را نسبت به کل نمونه تعیین و آنها را جزء مواد خارجی مربوط به گیاه زعفران محاسبه نمایید).

یادآوری ۲ : برای انجام برخی از آزمون‌ها مطابق جدول ۱ ، کلاله های جدا شده در پایان فرآیند این مرحله از آزمون ، مجددا آزمون اضافه می شود .

۹-۳-۲ تعیین

آزمونه را بر یک سطح سفید یا خاکستری بی‌رنگ ریخته با پنس کوچک (بند۹-۲-۲) ، خامه‌های متصل به کلاله را جدا و تفکیک کنید . خامه‌های تفکیک شده را بر روی شیشه ساعت (بند ۹-۲-۱) که از قبل خشک شده است با تقریب ۰/۰۱ گرم با ترازو آزمایشگاهی (بند ۹-۲-۳) توزین نمایید.

۹-۴ تفسیر نتایج

در صد خامه بدست آمده، طبق رابطه زیر محاسبه می‌گردد.

$$w_{f=}(m_2 - m_1) \times ۱۰۰ / m_{0\%}$$

که در آن :

w_f درصد خامه متصل به کلاله برحسب گرم

m_0 جرم آزمونه برحسب گرم

m_1 جرم شیشه ساعت به گرم

m_2 جرم شیشه ساعت حاوی خامه به گرم

یادآوری : نتیجه را ، به عنوان میانگین حسابی دو اندازه‌گیری در نظر بگیرید (اگر شرایط تکرار پذیری فراهم باشد) .

۱۰ تعیین در صد جرمی مواد خارجی در زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده

۱۰-۱ مواد خارجی مربوط به گیاه زعفران

۱۰-۱-۱ اساس روش

مواد خارجی موجود در یک آزمونه بصورت فیزیکی جدا شده و سپس توزین می گردد.

۱۰-۱-۲ وسایل لازم

از وسایلی مشابه که در بند ۹ توصیف شده استفاده کنید.

۱۰-۱-۳ آزمونه

از آنجایی که جرم آزمونه کم می‌باشد ، توصیه می‌گردد که از یک نمونه یکنواخت استفاده شود .

و پس از توزین با دقت ۰/۰۱ آن را به عنوان آزمونه در این بند مورد استفاده قرار دهید.

۱۰-۱-۴ روش کار

آزمونه را بر روی یک سطح سفید یا خاکستری بگسترانید . با کمک پنس آزمایشگاهی یا سایر وسایل مناسب، مواد خارجی مربوط به گیاه زعفران را از آزمونه جدا کنید.

شیشه ساعت که قبلا به وزن ثابت رسیده را با تقریب ۰/۰۱ گرم وزن کنید.

مواد خارجی جدا شده را به شیشه ساعت انتقال داده و کل آن را با تقریب ۰/۰۱ گرم وزن کنید.

۱۰-۱-۵ تفسیر نتایج

در صد مواد خارجی مربوط به گیاه زعفران از رابطه زیر بدست می آید:

$$w_{FM=(}\ m_3 - m_1)\ \times ۱۰۰ / m_0$$

که در این رابطه :

w_{fm} درصد مواد خارجی مربوط به گیاه زعفران بر حسب گرم درصد

m_0 جرم آزمونه برحسب گرم

m_1 جرم شیشه ساعت به گرم

m_3 جرم شیشه ساعت حاوی مواد خارجی به گرم

۱۰-۲ مواد خارجی مربوط به محیط

۱۰-۲-۱ وجود مواد خارجی مربوط به محیط را درکل نمونه مورد بررسی قرار داده و مطابق با بند ۱۰-۱-۵ با استفاده از رابطه ارایه شده درصد مواد خارجی مربوط به محیط را گزارش نمایند.

۱۱ ساییدن و الک کردن

ساییدن و الک کردن نمونه جهت آماده سازی آن برای آزمون‌های مندرج در بند های ۸، ۱۵، ۱۸ و ۱۹ انجام می‌شود.

۱۱-۱ وسایل لازم

۱۱-۱-۱ آسیاب با مشخصات زیر

الف) به آسانی قابل جداسازی و تمیز کردن بوده ودارای کمینه نقطه کور باشد ؛

ب) با آن بتوان نمونه را به سرعت و یکنواخت آسیاب کرد بدون اینکه حرارت ایجاد کند مقدار رطوبت نمونه بکاهد یا بر روی نمونه تاثیر داشته باشد؛

پ) یک نمونه با اجزاء کاملا یکنواخت بدست آید؛

ت) هیچ گونه ماده خارجی به نمونه اضافه نکند.

۱۱-۱-۲ الک ، با چشمه ۵۰۰ میکرومتر

۱۱-۲ روش کار

۱۱-۲-۱ زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده

آزمایه را (مطابق با جدول ۱ و طبق بند ۱۱-۱-۱) تاحدی که ۹۵٪ جرم آن از الک (طبق بند ۱۱-۱-۲) عبور نمایید ، آسیاب کنید . سپس ، باقی‌مانده روی الک را با نمونه زیر الک مخلوط کنید تا آزمونه یکنواختی بدست آید.

۱۱-۲-۲ پودر زعفران

آزمایه را با استفاده از الک (مطابق بند ۱۱-۱-۲) الک کنید (مطابق با جدول ۲) تا مطمئن شوید که ٪۹۵ آن از الک عبور نماید.

در غیر این صورت ، پودر زعفران را دوباره آسیاب کنید تا اندازه ذره مورد نیاز بدست آید . سپس باقی‌مانده روی الک را مجدد با نمونه زیر الک مخلوط کنید تا آزمایه یکنواخت شود.

۱۲ تعیین در صد جرمی عصاره محلول در آب سرد

تعیین درصد جرمی عصاره محلول در آب سرد طبق روش ارائه شده در استاندارد ملی به شماره ۱۲۱۸۵ اندازه‌گیری می‌شود .

یادآوری : برای زعفران رشته‌ای ، رشته‌ای بریده و پودر ، یک آزمونه با وزن ۰/۰۱ ± ۲ گرم توزین نمایید.

۱۳ تعیین خاکستر کل

خاکستر کل نمونه مطابق با روش ارائه شده در استاندارد ملی به شماره ۱۱۹۷ اندازه‌گیری می‌گردد .

یادآوری : برای زعفران رشته‌ای ، رشته‌ای بریده و پودر از نمونه‌ای استفاده کنید که برای تعیین میزان رطوبت از آن استفاده گردیده است. (طبق بند ۸).

۱۴ تعیین خاکستر نامحلول در اسید

خاکستر نامحلول در اسید مطابق روش ارائه شده در استاندارد ملی به شماره ۱۲۵۳ اندازه‌گیری می‌شود .
برای زعفران رشته‌ای ، رشته‌ای بریده و پودری ، از نمونه‌ای استفاده کنید که برای تعیین خاکسترکل از آن استفاده شده است (مطابق با بند ۱۳).

۱۵ تعیین ویژگی‌های اصلی با استفاده از روش (طیف نورسنجی فرابنفش - مریی) UV-Vis

۱۵-۱ کلیات

این روش اندازه‌گیری خصوصیات اصلی زعفران را که مرتبط با مقدار پیکروکروسین ، سافرانال و کروسین است ، امکان پذیر می‌سازد. این روش بطور مستقیم برای زعفران پودر بشرطی که با الزامات **۱۱-۲-۲** مطابقت داشته باشد قابل اجرا است . در مورد زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده پس از ساییدن و الک نمودن مطابق با **۱۱-۲-۱** نمونه مورد آزمون قرار می‌گیرد.

۱۵-۲ اساس روش

اساس روش بر مبنای ثبت تغییرات چگالی نوری عصاره آبی زعفران در طول موج بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر در دمای محیط می‌باشد.

۱۵-۳ وسایل لازم

علاوه بر وسایل معمول آزمایشگاهی وسایل ویژه زیر مورد نیاز است.

۱۵-۳-۱ اسپکتروفتومتر[1] (طیف نورسنجی فرابنفش مرئی) ، مناسب برای ثبت چگالی نوری ناحیه فرابنفش مرئی در محدوده طول موج قابل مشاهده بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر

۱۵-۳-۲ سلول کوارتز ، با طول مسیر عبور نور ۱ سانتیمتر

۱۵-۳-۳ بالن‌های حجمی دارای خط نشانه ، با ظرفیت ۲۰۰ و ۱۰۰۰میلی‌لیتر، نوع آن از جنس شیشه ، غیر قابل نفوذ در مقابل نور. (مطابق با استاندارد ملی ۷۵۲۰)

۱۵-۳-۴ پی‌پت دارای خط نشانه (حبابدار) ، با ظرفیت ۲۰ میلی‌لیتر، مطابق با (استاندارد ملی ۱۹۵۹)

۱۵-۳-۵ صافی استات سلولزی یا پلی تترافلورواتیلن آبدوست[2] (PTFE) با منافذ ۰/۴۵ میکرو متر.

۱۵-۳-۶ قیف مناسب جهت استفاده برای صافی استات سلولزی یا پلی تترافلورواتیلن (بند ۱۵-۳-۵)

۱۵-۳-۷ هسته مغناطیس[3]

۱۵-۳-۸ همزن مغناطیسی با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه

۱۵-۴ روش کار

۱۵-۴-۱ آزمونه

۵۰۰ میلی‌گرم از نمونه (آزمایه) ساییده شده را در یک شیشه ساعت با دقت توزین کنید.

۱۵-۴-۲ روش آزمون

آزمونه را با دقت به یک بالن حجمی با خط نشانه ۱۰۰۰ میلی لیتر (طبق بند ۱۵-۳-۳) منتقل کنید. حدود ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر با درجه خلوص تجزیه ای به آن اضافه کنید.

آزمونه را با استفاده از یک هسته مغناطیسی و یک همزن مغناطیسی باسرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت یک ساعت دور از نور به هم بزنید . هسته مغناطیسی را بردارید،

بالن حجمی را تا خط نشانه با آب مقطر به حجم برسانید . درب آن را ببندید و بهم بزنید تا محلول یکنواختی بدست آید.

بوسیله پیپت ۲۰ میلی لیتری (مطابق بند ۱۵-۳-۴) محلول را به یک بالن حجمی ۲۰۰ میلی‌لیتری انتقال دهید . تا خط نشانه با آب مقطر به حجم برسانید . درب آن را ببندید و بهم بزنید تا محلول یکنواختی بدست آید.

محلول را توسط صافی (مطابق بند ۱۵-۳-۵) دور از نور بسرعت صاف کنید تا یک محلول شفاف بدست آورید.

---

1 -Spectrophotometer

2 - Polytetrafluoroethylene

3 - magnet Bar

دستگاه طیف نور سنج (مطابق بند ۱۵-۳-۱) را تنظیم کنید و تغییرات را جذب محلول صاف شده را در محدوده طول موج بین ۲۰۰ و ۷۰۰ نانومتر با استفاده از آب مقطر بعنوان مایع مرجع به شرح بند ۱۵-۵ ثبت کنید. یک طیف دستگاه طیف نورسنج فرابنفش - مرئی (UV-Vis) در پیوست اطلاعاتی ت به عنوان نمونه ارایه شده است.

یادآوری : در صورت نیاز و به منظور تسریع در فرآیند صاف کردن می توان ، از پمپ خلاء یا پمپ های آبی استفاده نمود .

۱۵-۵ بیان نتایج

نتایج حاصله از خواندن مستقیم میزان جذب در سه طول موج به شرح زیر میباشد :

$A^{\%1}_{1cm}$ (۲۵۷نانومتر) : جذب در حدود ۲۵۷ نانومتر (λmax پیکروکروسین) ؛

$A^{\%1}_{1cm}$ (۳۳۰ نانومتر): جذب در حدود ۳۳۰ نانومتر (λmax سافرانال)؛

$A^{\%1}_{1cm}$ (۴۴۰ نانومتر): جذب در حدود ۴۴۰ نانومتر (λmax کروسین).

$$A^{\%1}_{1cm}(\lambda max) = \frac{D \times ۱۰۰۰۰}{m \times (۱۰۰ - W_{MV})}$$

که در آن :

D میزان جذب هر یک از موارد ذکر شده ؛

M جرم آزمونه (برحسب گرم) (مطابق بند ۱۵-۴-۱)؛

w_{MV} میزان رطوبت نمونه.

۱۵-۶ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید حداقل حاوی اطلاعات ذیل می‌باشد:

الف) روش آزمون طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲-۲۵۹ ؛

ب) نتایج بدست آمده ؛

پ) تمام جزئیات عملکرد که مشخص نشده یا اندازه‌گیری آنها بدلخواه بوده است همچنین وقایعی که می تواند بر نتیجه آزمون تاثیر گذار باشد ؛

ت) میزان رطوبت و مواد فرار که توسط روش مندرج در بند ۸این استاندارد تعیین شده است؛

ث) تمام اطلاعات ضروری برای شناسایی کامل نمونه؛

ج) نوع کاغذ صافی (طبق بند ۱۵-۳-۵) مورداستفاده.

چ) نام و نام خانوادگی آزمونگر

ح) تاریخ انجام آزمون

۱۶ آلاینده ها

۱۶-۱ فلزات سنگین

۱۶-۱-۱ اساس روش

در این روش ، از طریق هضم و آماده‌سازی نمونه و سپس تزریق آن به دستگاه جذب اتمی میزان فلزات تعیین می‌گردد.

۱۶-۱-۲ هضم نمونه

۰/۵گرم از نمونه ساییده شده (مطابق بند ۱۱) را داخل بوته چینی به دقت توزین نموده و ابتدا روی گرمکن برقی و نهایتا" روی شعله بسوزانید . سپس نمونه حاصله را در کوره قرار داده و به تدریج دما را به ۵۵۰ درجه سیلسیوس برسانید تا خاکستر سفید رنگ و یا خاکستری مایل به سفید ایجاد شود . اگر پس از این مرحله هنوز نمونه کاملا " خاکستر نشده باشد ، بوته را از کوره خارج کرده پس از سرد شدن چند قطره آب به آن بیفزائید ، سپس بوته را داخل گرمخانه خشک نمائید و مجددا" به مدت یک ساعت داخل کوره قرار دهید . در صورت عدم حصول خاکستر سفید رنگ ، این بار نمونه را با آب اکسیژنه مرطوب کرده و در کوره قرار دهید تا سفید شود . سپس بوته را از کوره خارج کرده پس از سرد شدن ۲ میلی‌لیتر نیتریک اسید و ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه کرده ، روی آن را با شیشه ساعت بپوشانید و بمدت ۵ دقیقه روی حمام آب جوش حرارت دهید . محتویات بوته را وارد بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتری نموده و با آب مقطر به حجم برسانید . در صورت وجود مواد معلق محلول را توسط کاغذ صافی صاف کنید.

۱۶-۱-۳ روش آزمون

تعیین مقدار فلزات با استفاده از محلول آماده شده (طبق بند ۱۶-۱-۲) توسط دستگاه جذب اتمی و در صورت نیاز دستگاه جذب اتمی مجهز به سیستم تولید هایدارید انجام می‌گیرد.

۱۶-۲ باقی مانده سموم و آفت کش ها

برای اندازه‌گیری باقیمانده سموم و آفت‌کش‌ها در نمونه از روش HPLC وGC استفاده می‌شود.

۱۷ آزمون ویژگیهای میکروبیولوژی

طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۵۶۸۹ : سال ۱۳۸۷ (زعفران ـ ویژگی‌های میکروبی و روش‌های آزمون) انجام شود .

۱۸ شناسایی رنگ مصنوعی : شناسایی رنگ های مصنوعی اسیدی محلول در آب به روش کروماتوگرافی لایه-نازکTLC

۱-۱۸ کلیات

این روش بطور مستقیم برای پودر زعفران (بند **۱۱-۲-۲**) و زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده پس از ساییده شدن و الک‌شدن (بند **۱۱-۲-۱**) کاربرد دارد . این روش تشخیص وجود رنگ‌های مصنوعی اسیدی محلول در آب را در زعفران امکان پذیر می‌سازد .

۲-۱۸ اساس روش

رنگ‌های مصنوعی اسیدی محلول در آب استخراج شده ، رنگدانه‌های طبیعی زعفران، بخصوص کروسین‌ها، توسط شستشوهای متوالی یا با اسیدی کردن حذف می‌شوند ، رنگ‌های مصنوعی اسیدی محلول در آب به وسیله کروماتوگرافی بر روی یک میکروستون پلی آمید شسته (جدا) شده و توسط کروماتوگرافی لایه نازک TLC شناسایی می شود.

۳-۱۸ مواد و / یا واکنشگرها

در طی آزمون ، بجز مواردی که بیان شده است ، تنها از واکنش‌گرهای با درجه‌ی(خلوص تجزیه‌ای) تشخیص داده شده و آب مقطر یا آب یون‌زدایی شده یا آب با خلوص مشابه استفاده کنید.

۱-۳-۱۸ متانول

۲-۳-۱۸ استون

۳-۳-۱۸ فرمیک اسید ، ۹۸٪ درصد جرمی یا استیک اسید گلاسیال.

۴-۳-۱۸ آمونیاک، ۲۵٪ درصد جرمی.

۵-۳-۱۸ سولفوریک اسید ، ۹۸٪ درصد جرمی.

۶-۳-۱۸ محلول سدیم هیدروکسید ، ۴۰ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر.

۷-۳-۱۸ حلال شویش برای خالص‌سازی ستون (مخلوطی از آمونیاک و متانول)

۵ میلی‌لیتر محلول آمونیاک (بند ۱۸-۳-۴) را در یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتر ریخته و ۹۵ میلی لیتر متانول (بند ۱۸-۳-۱) به آن اضافه کنید.

۱۸-۳-۸ مخلوط حلال شویش.

۱۸-۳-۸-۱ شوینده شماره ۲:۱ گرم تری سدیم سیترات را در مخلوطی از ۸۰ میلی لیتر آب و ۲۰ میلی لیتر محلول آمونیاک (بند ۱۸-۳-۴) حل کنید.

۱۸-۳-۸-۲ شوینده شماره۲ : ۰/۴ گرم پتاسیم کلراید را در مخلوطی از ۵۰ میلی لیتر ترت-بوتانول، ۱۲ میلی لیتر پروپیونیک اسید و ۳۸ میلی لیتر آب حل کنید.

۱۸-۳-۹ رنگ‌های مصنوعی اسیدی (محلول در آب ، محلول مرجع[1] به نسبت ۱ گرم ماده رنگی دریک لیتر متانول) .

فهرست رنگ‌های ارایه شده کامل نیست.

در یک سری هشت تایی از بشرهای ۱۰۰ میلی‌لیتری (بند ۱۸-۴-۱۱) ، بطور جداگانه ۱۰۰ میلی‌گرم از رنگ های زیر اضافه کنید.

کینولین زرد[2] (C.I 47005)؛ زرد نارنجی[3] (C.I.15985)؛ تارترازین[4] (C.I.17140)؛

امارانت[5](C.I.15620) پونسیو4R[6] (C.I. 16255) آزوروبین;[7](C.I. 14720) نارنجی شماره ۲[8] (C.I. 15510)و روسلین[9] .C.I. 15620)رنگ ها را در مقداری متانول کاملا حل کنید . هر محلول را جداگانه دریکی از بالن های حجمی سری هشت تایی (بند ۱۸-۴-۹) بریزید و تا خط نشانه با متانول (بند ۱۸-۳-۱) به حجم رسانده و مخلوط کنید تا یکنواخت شود هر محلول غلظتی معادل ۱ گرم رنگدانه در یک لیتر متانول دارد .

یادآوری : به فهرست رنگ‌های ارایه شده می‌تواند رنگ‌های دیگری نیز افزوده شود.

۱۸-۳-۱۰ رنگ‌های مصنوعی اسیدی محلول در آب ، محلول‌هایی باغلظتی معادل ۰/۱ گرم رنگدانه در یک لیتر متانول .

در یک سری هشت تایی بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری (بند ۱۸-۴-۹) ، ۱۰ میلی‌لیتر از هر محلول (بند ۱۸-۳-۹) به وسیله پیپت (بند ۱۸-۴-۸) اضافه کنید. توسط متانول (بند ۱۸ -۳-۱) به حجم رسانده کاملا مخلوط نمایید تا محلول یکنواخت شود .

---

1 - stock
2 - quinoline yellow (C.I. 47005)
3 - Sanset yellow S (C.I. 15985);
4 - tartrazine (C.I. 19140);
5 - amaranth (C.I. 16185)
6 - ponceau 4R (C.I. 16255)
7 - azorubine (C.I. 14720)
8- *orange II (C.I. 15510)*
9 - rocelline (C.I. 15620)

یادآوری: این محلول ها بطور مجزا در اندیس بازداری Rf ، را مطابق با روش کار تعیین شده در بند ۱۸-۵-۵ بکار رفته‌اند.

۱۸-۳-۱۱ رنگ‌های مصنوعی اسیدی محلول در آب ، محلول‌های مرجع ، مخلوطی از رنگ‌ها باغلظت ۰/۰۱ گرم رنگدانه در یک لیتر متانول.

در یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری (بند ۱۸-۴-۹) ، ۱۰ میلی‌لیتر از هر محلول رنگی(بند ۱۸ -۳-۱۰) با استفاده از یک پیپت (بند ۱۸-۴-۸) اضافه کنید . توسط متانول (بند ۱۸-۳-۱) به حجم رسانده و مخلوط نمایید تا یکنواخت شود.

۱۸-۴ وسایل لازم

علاوه بر وسایل معمول آزمایشگاهی وسایل زیر مورد نیاز می‌باشد :

۱۸-۴-۱ ستون خالص سازی (استخراج فاز جامد)[1]SPE مخصوص کروماتوگرافی، کارتریج[2] استخراج فاز جامد پر شده از ۱۲۵ میلی گرم پلی آمید[3]۶.

برای آماده سازی ستون خالص سازی ، ستونی با یک خمیر شیشه‌ای به عنوان صافی در انتهای آن به شرح زیر تهیه نمائید :

سوسپانسیونی از پلی آمید (ژل پلی آمید ۶- برای ستون کروماتوگرافی با ابعاد ذرات ۰/۱ تا ۰/۳ میلی متر) را در آب تهیه کنید . به میزان کافی از سوسپانسیون پلی‌آمید به ستون خالص سازیSPE (مخصوص کروماتوگرافی با گنجایش ۳ میلی‌لیتر و قطر ۹ میلی‌لیتر با یک خمیر شیشه ای به عنوان صافی[4]) وارد کنید کنید ، به طوری که ۱۰ میلی لیتر از ارتفاع ستون را بگیرد . این میزان معادل حدود ۰/۱۴ تا ۰/۱۶ گرم از پودر پلی آمید می باشد .

یک فیلتر پشم شیشه کوچک (صافی) در ابتدای ستون قرار داده و ستون را با یک میلی لیتر آب مقطر بشوئید .

۱۸-۴-۲ تبخیر کننده چرخشی.

۱۸-۴-۳ سانتریفیوژ ، ۴۰۰۰ دور در دقیقه دارای لوله های ۲۵ میلی لیتری.

۱۸-۴-۴ لوله های سانتریفیوژ، با ظرفیت ۲۵ میلی لیتری.

۱۸-۴-۵ بالن ته گرد، با ظرفیت ۱۰ میلی لیتری.

---

1 - Solid Phase Extraction
2 - cartridge
3 - polyamid
4 - frit
5- Merck 5730, Merck5577

۱۸-۴-۶ دستگاه استخراج تحت خلاء (اختیاری).

۱۸-۴-۷ میکروپیپت، باحجم های ۱۰۰ میکرولیتر تا ۱ میلی لیتری.

۱۸-۴-۸ پیپت ، با ظرفیت ۱۰ میلی لیتر

۱۸-۴-۹ بالن حجمی با ظرفیت ۱۰۰ میلی لیتری

۱۸-۴-۱۰ لوله آزمایش، با ظرفیت ۱۰۰ میلی لیتری.

۱۸-۴-۱۱ بشر، از نوع بلند، با ظرفیت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌لیتر .

۱۸-۴-۱۲ سرنگ مدرج میکرولیتری، برای برداشتن حجم های تا ۱۰ میکرولیتر.

۱۸-۴-۱۳ پیپت پاستور، (مطابق با استاندارد ملی ۷۷۱۲)

۱۸-۴-۱۴ صفحات سلولزی[1]

۱۸-۴-۱۵ تانک کروماتوگرافی لایه نازک[2] ، همراه با یک درپوش شیشه‌ای، با ظرفیت ۲۰۰ × ۲۰۰میلی متر.

۱۸-۴-۱۶ سرنگ پلاستیکی، ساخته شده از پلی‌اتیلن یا پلی پروپیلن، با ظرفیت ۱۰ میلی لیتر و ۲ میلی لیتر.

۱۸-۴-۱۷ حمام آب.

۱۸-۴-۱۸ pH متر

۱۸-۵ روش آزمون

۱۸-۵-۱ تهیه آزمونه

۵۰۰ میلی‌گرم زعفران ساییده شده از زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده **۱۱-۲-۱** و پودر زعفران **۱۱-۲-۲** را به یک لوله سانتریفیوژ (مطابق بند ۱۸ -۴-۴) منتقل کنید.

۱۸-۵-۲ استخراج رنگ‌های مصنوعی

۱۸-۵-۲-۱ ۲۵میلی‌لیتر آب ۶۰ درجه سانتی‌گراد را بوسیله یک پیپت مدرج (مطابق بند ۱۸-۴-۸) به لوله سانتریفیوژ (مطابق بند ۱۸-۴-۴) حاوی آزمونه اضافه کنید . با دست به مدت یک دقیقه به هم بزنید مطمئن شوید که پودر زعفران بصورت معلق در جداره‌های لوله باقی نمانده است . اگر مقداری در کف لوله باقی ماند، زعفران را یکبار دیگر با یک اسپاتول کوچک هم بزنید. پس از هم زدن ، به مدت ۱۰ دقیقه به دور از نور قرار دهید و سپس دوباره به شدت هم بزنید.

۱۸-۵-۲-۲ لوله‌ها را هم وزن کنید و آنها را با دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰دقیقه سانتریفیوژ (بند ۱۸ -۴-۳) کنید.

---

1 -Thin-layer chromatography tank,

عصاره را با استفاده از یک پی‌پت پاستور (بند ۱۸-۴-۱۳) به یک بشر انتقال دهید . ۵۰۰ میکرولیتر فرمیک اسید یا ۲/۵ میلی لیتر استیک گلاسیال اسید (بند ۱۸-۳-۳) اضافه کنید تا محلول تقریباً به pH ۲ برسد.

۱۸-۵-۲-۳ اگر کروماتوگرام‌ها به شکل غیر قابل قبول توسط پیک‌هایی ناشی از رنگدانه‌های طبیعی زعفران مغشوش شده ، روش کار زیر به جای بند ۱۸-۵-۲-۲ جایگزین نمایید .

الف - لوله‌ها را هم وزن کنید و آنها را به مدت ۱۰ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کنید.

عصاره را با استفاده از یک پیپت پاستور (مطابق بند ۱۸-۴-۱۳) به یک بشر ۵۰ میلی‌لیتری (مطابق بند **۱۸-۴-۱۱**) انتقال دهید سولفوریک اسید (مطابق بند ۱۸-۳-۵) را با استفاده از یک میکروپیپت (مطابق بند ۱۸-۳-۵) به آن اضافه کنید تا محلولی با pH معادل ۰/۱ بدست آورید .

ب - محلول را ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم (مطابق بند ۱۸-۴-۱۷) قرار دهید. لوله‌های را هم وزن کنید و آنها را به مدت ۵ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (مطابق بند ۱۸-۴-۳) کنید.

عصاره را با استفاده از یک پیپت پاستور (مطابق بند ۱۸-۴-۱۳) به یک بشر ۵۰ میلی لیتر (مطابق بند ۱۸-۴-۱۱) منتقل کنید . pH محلول بدست آمده را با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید (مطابق بند ۱۸-۳-۶) بر روی ۲ تنظیم کنید .

لوله‌ها را هم وزن کنید و آنها را به مدت ۵ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (بند ۱۸-۴-۳) کنید.

۱۸-۵-۳ خالص سازی نمونه

۱۸-۵-۳-۱ آماده سازی ستون خالص‌سازی و جذب رنگدانه‌های مصنوعی

برای آماده سازی ستون خالص سازی از کارتریج استخراج فاز جامد (بند ۱۸-۴-۱) استفاده کنید.

کارتریج استخراج فازجامد را با ۱۰ میلی لیتر آب آماده کنید.

با استفاده از یک سرنگ ۱۰ میلی لیتر (بند ۱۸-۴-۱۶)، عصاره زعفران بدست آمده در (بند ۱۸-۵-۲-۲) یا (بند ۱۸-۵-۲-۳) را از میان ستون عبور دهید.

۱۸-۵-۳-۲ حذف ترکیبات غیر لازم

کارتریج SPE را به پی در پی با ۴۵ میلی‌لیتر متانول (بند ۱۸-۳-۱)، ۴۵ میلی‌لیتر استون (بند ۱۸-۳-۲) و ۴۵ میلی‌لیتر متانول (بند ۱۸-۳-۱) و اسیدی شده توسط ۵۰۰ میکرولیتر فرمیک اسید (بند ۱۸-۳-۳) با یک جریان ثابت تقریباً ۶ تا ۸ میلی لیتر بر دقیقه شستشو دهید.

یادآوری : اسیدی کردن متانول در مرحله پایانی شستشو اجازه بازیابی بیشتر را می‌دهد.

اگر روش کار تعیین شده در بند ۱۸-۵-۲-۱ استفاده شود ، برای شستشو به جای ۴۵ میلی لیتر از ۱۰ میلی لیتر استفاده کنید .

۱۸-۵-۳-۳ شویش رنگ های مصنوعی

رنگدانه را با حدود ۱۰ میلی‌لیتر حلال شویش (بند ۱۸-۳-۷) شستشو دهید و محلول رنگی حاصل از شستشو را در یک بالن ته گرد (بند ۱۸-۴-۵) جمع آوری کنید با ، در یک تبخیرکننده چرخشی (بند ۱۸-۴-۲) در فشار کم و دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا خشک شدن محلول تبخیر نمایید . باقی مانده را در ۳۰۰ میکرو لیتر متانول (بند ۱۸-۳-۱) با استفاده از یک میکروپیپت (بند ۱۹-۴-۷) مجدد حل کنید.

یادآوری: اگر از دستگاه استخراج تحت خلاء (بند ۱۸-۴-۶) استفاده شود مدت زمان سه مرحله شستشو بطور قابل توجهی کاهش می‌یابد. دستگاه استخراج تحت خلا استفاده از حجم‌های حلال بالا را تسهیل می‌کند اما سرعت جریان شوینده در حد ۶ تا ۸ میلی‌لیتر بر دقیقه برای اجتناب از کاهش غیر قابل قبول بازیابی ، باید در نظر گرفته شود.

۱۸-۵-۴ کروماتوگرافی وتشخیص

دیواره‌های تانک کروماتوگرافی (بند ۱۸-۴-۱۵) را با کاغذ صافی بپوشانید. شوینده شماره ۱ (بند ۱۸-۳-۸-۱) و شوینده شماره ۲ (بند ۱۸-۳-۸-۲) را در هر تانک تا عمق حدود ۱ سانتیمتر بریزید و درب آن را ببندید . حدود ۱ تا ۲ ساعت بگذارید تا فضای داخل تانک با بخار حلال اشباع شود.

با استفاده از سرنگ (بند ۱۸-۴-۱۲) ، ۱۰ میکرولیتر باقی مانده متانول (بند ۱۸-۵-۳-۳) و ۱۰ میکرولیتر محلول مرجع (بند ۱۸-۳-۱۱) را با فاصله ۱۵ میلی‌متر از لبه پایینی صفحه (بند ۱۸-۴-۱۴) با فاصله ۷ تا ۱۰ میلی متر از هم لکه‌گذاری کنید.

بوسیله یک مداد خطی به موازات لبه بالایی صفحه در فاصله۷۰ تا ۱۵۰ میلی متر از نقاط لکه گذاری برای شوینده شماره ۱ و ۲ بکشید.

هر صفحه را در یک تانک کروماتوگرافی قرار دهید. تا حلال به خط نشانه برسد.

صفحه ها را از تانک ها خارج کنید و در زیر هود بگذارید تا خشک شود.

صفحه ها را زیر نور سفید(نور مرئی) مشاهده کنید.

یادآوری : طول دوره کروماتوگرافی برای شوینده شماره ۱ حدود ۴۵ دقیقه و برای شوینده شماره ۲ حدود ۸ ساعت می باشد.دقت کنید درطی زمان کروماتوگرافی جبهه حلال از طول صفحه TLC تجاوز نکند.

۱۸-۵-۵ محاسبه

اندیس بازداری محلول شاهد (بند ۱۸-۳-۱۱) اجزا و نمونه استخراج شده را از فرمول زیر محاسبه کنید :

$R_f=L_1/L_2$

که در آن :

L_1 فاصله طی شده توسط لکه نمونه یا مرجع

L_2 فاصله طی شده توسط جبهه حلال

R_f اندیس بازداری محلول شاهد

۱۸-۵-۶ تفسیر نتایج

وجود رنگ مصنوعی در عصاره نمونه را از طریق مقایسه مقادیراندیس بازداری(R_f) بدست آمده از آزمونه با محلول مرجع مشخص کنید .

۱۸-۵-۷ بیان نتایج

نتیجه آزمون باید در دامنه حد تشخیص روش باشد.

۱۹ شناسایی رنگهای مصنوعی:

۱۹-۱ شناسایی رنگ‌های مصنوعی اسیدی محلول در آب – به روش کروماتوگرافی مایع باکارایی بالا(HPLC)

۱۹-۱-۱ کلیات

این روش آزمون برای تعیین میزان رنگ‌های مصنوعی اسیدی محلول در آب مانند : آمارانت [۱]، آزوربین [۲] (کارموزین)[۳]، نارنجی II [۴]، پونسیو 4R [۵]، کینولین زرد[۶] ، زرد نارنجیs [۷]، تارترازین [۸]، زرد 2G [۹] و روسلین [۱۰] در زعفران کاربرد دارد.

این روش مستقیماً برای زعفران پودر (مطابق بند**۱۱-۲-۲**) زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده پس از آسیاب کردن و الک کردن (مطابق بند**۱۱-۲-۱**) کاربرد دارد.

1- amaranth
2 - azovubiwe
3 - carmoisine
4 - orange II
5 - ponceau4R
6 - quinoline yellow
7 - sunset yellows
8 - tartrazine
9 - yellow2G
10 - rocellire

این روش تنها برای تشخیص و تعیین کمی رنگدانه‌های منتخب در سطوح غلظت فهرست شده در جدول ۳ کاربرد است.

۱۹-۱-۲ اساس روش

رنگ‌های مصنوعی اسیدی محلول در آب استخراج شده، رنگدانه‌های طبیعی زعفران ، بخصوص کروسین‌ها، توسط شستشوهای متوالی یا با اسیدی کردن حذف می‌شوند. رنگ‌های مصنوعی اسیدی محلول در آب به وسیله کروماتوگرافی بر روی یک میکروستون پلی‌آمید جدا شده و بوسیله HPLC در فاز معکوس با آشکارساز آرایه دایود[1] شناسایی می‌شوند.

۱۹-۱-۳ مواد و / یا واکنشگرها

در طی آزمون ، بجز مواردی که بیان شده است ، تنها از واکنش‌گرهای با درجه‌ی خلوص تجزیه‌ای تشخیص داده شده و آب مقطر یا آب یون‌زدایی شده یا آب با خلوص مشابه استفاده کنید.

۱۹-۱-۳-۱ متانول .

۱۹-۱-۳-۲ متانول ، درجه HPLC.

۱۹-۱-۳-۳ استون .

۱۹-۱-۳-۴ استونیتریل ، درجه HPLC.

۱۹-۱-۳-۵ محلول آمونیاک،٪۲۵ درصد وزنی .

۱۹-۱-۳-۶ فرمیک اسید ، ٪۹۸ درصد وزنی برای آنالیز یا استیک اسید گلاسیال

۱۹-۱-۳-۷ سولفوریک اسید ، ٪۹۸ درصد وزنی .

۱۹-۱-۳-۸ محلول سدیم هیدروکسید ، ۴۰ گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر .

۱۹-۱-۳-۹ پتاسیم دی هیدروژن فسفات ، ٪۹۸ درصد وزنی .

۱۹-۱-۳-۱۰ پتاسیم هیدروکسید ، ۱ مول بر لیتر .

۱۹-۱-۳-۱۱ حلال شویش .

۵ میلی‌لیتر محلول آمونیاک (بند۱۹-۱-۳-۵) را به یک بالن حجمی ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل نموده و با ۹۵ میلی‌لیتر متانول (بند۱۹-۱-۳-۱) به حجم برسانید .

۱۹-۱-۳-۱۲ محلول رنگ‌های مصنوعی اسیدی در آب

۱۹-۱-۳-۱۲-۱ رنگ‌ها .

۱۹-۱-۳-۱۲-۱-۱ کینولین زرد ، C.I.47005

۱۹-۱-۳-۱۲-۱-۲ زرد نارنجیS ، .C.I 15985

1 - diode array

۱۹-۱-۳-۱۲-۳ زرد G۳ ، C.I 18965

۱۹-۱-۳-۱۲-۴ تارترازین ، C.I. 17140

۱۹-۱-۳-۱۲-۵ آمارانت ، C.I. 16185

۱۹-۱-۳-۱۲-۶ پونسیو 4R ، C.I 16255

۱۹-۱-۳-۱۲-۷ آزوروبین ، C.I. 14720

۱۹-۱-۳-۱۲-۸ نارنجی II ، C.I. 15510.

۱۹-۱-۳-۱۲-۹ روسلین ، C.I 15620

۱۹-۱-۳-۱۲-۲ محلول‌های استاندارد مرجع ، غلظت جرمی معادل ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر.

تقریباً ۱۰۰ میلی‌گرم از هر رنگ (بند ۱۹-۱-۳-۱۲-۱) با دقت ۱ میلی‌گرم به طور جداگانه در یک بالن حجمی(بند ۱۹-۱-۴-۱۲) ۱۰۰ میلی‌لیتری وزن کنید . بعد از افزودن تقریباً ۸۰ میلی‌لیتر آب ، به دقت مخلوط کنید تا کامل حل شود . توسط آب به حجم رسانده و مخلوط نمایید . غلظت واقعی را به میلی‌گرم در میلی‌لیتر محلول برای هر رنگدانه حساب کنید .

۱۹-۱-۳-۱۲-۳ محلول‌های استاندارد رقیق شده ، غلظت جرم تقریبی ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر.

دریک سری نه تایی بالن حجمی(بند ۱۹-۱-۴-۱۲) ۱۰۰ میلی‌لیتری بوسیله یک پی‌پت ۱ میلی‌لیتر از هر محلول مرجع استاندارد (۱۹-۱-۳-۱۲-۲) ریخته و با آب به حجم برسانید . بدقت مخلوط کنید . غلظت واقعی را برای هر رنگدانه به میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر محاسبه کنید .

این محلول‌ها می‌تواند برای نشان دادن زمان‌های بازداری [1] استاندارد (بند۱۹-۱-۵-۳) مورد استفاده قرار گیرد.

۱۹-۱-۳-۱۲-۴ محلول رقیق مخلوط استاندارد مرجع ، تقریباً با غلظت جرمی ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر.

بوسیله پی‌پت‌های شیشه‌ای حجمی (بند۱۹-۱-۴-۹) ، ۱ میلی‌لیتر از هر محلول شاهد استاندارد (بند۱۹-۱-۳-۱۲-۲) در یک بالن حجمی ۵۰ میلی‌لیتر (بند۱۹-۱-۴-۱۲) انتقال دهید و با آب مقطر به حجم برسانید با دقت مخلوط کنید . غلظت واقعی را برای هر رنگدانه به میلی‌گرم در میلی‌لیتر محاسبه کنید .

این محلول برای آماده سازی محلول‌های کالیبره شده برای پوشش دامنه غلظت ۰ تا ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر مورد استفاده قرار می‌گیرد . اگر سطح مورد انتظار فراتر از این دامنه بود ، باید محلول‌های مرجع اضافی تهیه شود .

۱۹-۱-۴ وسایل لازم

علاوه بر وسایل معمول آزمایشگاهی وسایل زیر مورد نیاز است :

---

1 - retention time

۱۹-۱-۴-۱ ترازوی تجزیه‌ای ، با تقریب ۰/۰۰۰۱ گرم .

۱۹-۱-۴-۲ لوله‌های سانتریفیوژ ، با ظرفیت ۲۵ میلی‌لیتر .

۱۹-۱-۴-۳ سانتریفیوژ رومیزی ، ۴۰۰۰ دور در دقیقه و دارای لوله‌های ۲۵ میلی‌لیتری .

۱۹-۱-۴-۴ ستون استخراج فاز جامد ، پر شده از ۱۲۵ میلی‌گرم پلی آمید .

۱۹-۱-۴-۵ بالن ته گرد ، با ظرفیت ۱۰ میلی‌لیتری .

۱۹-۱-۴-۶ تبخیر کننده چرخشی .

۱۹-۱-۴-۷ میکروپیپت ، با حجم‌های ۱۰۰ میکرولیتر تا ۱ میلی‌لیتری .

۱۹-۱-۴-۸ بشر، نوع بلند ، با ظرفیت‌های ۲۵ ، ۱۰۰ ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر .

۱۹-۱-۴-۹ پی‌پت شیشه حجمی ، با ظرفیت‌های ۱ ، ۱۰ و ۲۵ میلی‌لیتر .

۱۹-۱-۴-۱۰ پی‌پت پاستور (مطابق با استاندارد ملی ۷۷۱۲)

۱۹-۱-۴-۱۱ ارلن مایر، ظرفیت ۱ لیتر.

۱۹-۱-۴-۱۲ بالن حجمی ، با ظرفیت‌های ۵۰ ، ۱۰۰ ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر .

۱۹-۱-۴-۱۳ صافی غشایی PTFE ، اندازه منافذ ۰/۴۵ میکرومتر ، قطر ۱۳ میلی‌متر .

۱۹-۱-۴-۱۴ pH متر با الکترود مناسب برای دامنه pH **۱۲**-۰ .

۱۹-۱-۴-۱۵ لوله آزمایشگاهی با ظرفیت ۱۰۰ میلی‌لیتر .

۱۹-۱-۴-۱۶ سرنگ پلاستیکی ، ساخته شده از پلی اتیلن یا پلی پروپیلن ، با ظرفیت‌های ۱۰و۲ میلی‌لیتر .

۱۹-۱-۴-۱۷ سرنگ ، مدرج میکرولیتری ، برای برداشتن حجم‌هایی تا ۵۰ میکرولیتر .

۱۹-۱-۴-۱۸ حمام آب .

۱۹-۱-۴-۱۹ دستگاه استخراج تحت خلاء (اختیاری) .

۱۹-۱-۴-۲۰ کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، همراه با یک آشکارساز آرایه دایود ، قادر به اندازه‌گیری جذب بین ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر ، همراه با پمپ برای اجرای روش گرادیانی (مطابق با۱۹-۱-۵-۴-۲-۱) ، محفظه کنترل دمایی ستون (بند۱۹-۱-۵-۴-۲-۱) که عملکرد آن قابل انطباق با تمام تجهیزات باشد .

۱۹-۱-۴-۲۱ ستون محافظ ، با ابعاد ۴/۶ × ۱۰ میلی‌متر دارای فاز ساکن ستون تجزیه‌ای (بند۱۹-۱-۴-۲۰) اما با اندازه ذرات ۴ میکرومتر .

۱۹-۱-۴-۲۲ ستون کروماتوگرافی برای HPLC ، نوع $C_{۱۸}$

فولاد ضدزنگ ۱۵۰ میلی متر در ۴/۶ میلی‌متر، پر شده با سیلیکای کروی ، اکتادسیل سیلان، با اندازه ذره ۳ میکرومتر و خلل و فرج ۱۲۰ نانومتر ، مساحت سطح ۳۲۰ متر مربع برگرم ، و ۱۶٪ جرمی کربن

۱۹-۱-۴-۲۳ ویال‌های درب دار [1]، با ظرفیت ۰/۶ میلی لیتر.

۱۹-۱-۵ روش آزمون

۱۹-۱-۵-۱ تهیه آزمونه

حدود ۵۰۰ میلی‌گرم زعفران ساییده شده از پودر بدست آمده مطابق بند**۱۱-۲-۲** برای زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده مطابق بند **۱۱-۲-۱** در یک لوله سانتریفیوژ (بند۱۹-۱-۴-۳) وزن کنید .

۱۹-۱-۵-۲ استخراج رنگ‌های مصنوعی اسیدی محلول در آب

۱۹-۱-۵-۲-۱ ۲۵ میلی‌لیتر آب ۶۰ درجه سانتی‌گراد را با استفاده از یک پی‌پت درجه بندی شده (بند۱۹-۱-۴-۹) به لوله سانتریفیوژ (بند۱۹-۱-۴-۳) اضافه کنید . با دست یک دقیقه هم بزنید ، مطمئن شوید که پودر زعفران در جداره‌های لوله باقی نمانده است . اگر مقداری در کف لوله باقی ماند ، زعفران را یک‌بار دیگر با استفاده از اسپاتول کوچک هم بزنید . پس از هم‌زدن ، به مدت ۱۰ دقیقه به دور از نور قرار دهید و سپس دوباره به شدت هم بزنید .

۱۹-۱-۵-۲-۲ لوله‌ها را هم وزن کنید و آنها را به مدت ۱۰ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کنید . با استفاده از یک پی‌پت پاستور (۱۹-۱-۴-۱۶) عصاره را به یک بشر (بند ۱۹-۱-۴-۱۱) انتقال دهید . ۵۰۰ میکرولیتر فرمیک اسید یا ۲/۵ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال (بند۱۹-۱-۳-۶) را اضافه کنید تا pH عصاره به ۲ برسد (بند۱۹-۱-۴-۱۴) .

۱۹-۱-۵-۲-۳ اگر کروماتوگرام به شکل غیر قابل قبولی توسط پیک‌های ناشی از رنگدانه‌های طبیعی زعفران مغشوش شده ، روش کار جایگزین زیر را انجام دهید .

لوله ها را هم وزن کنید و به مدت ۱۰ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (۱۹-۱-۴-۳) کنید .

عصاره را با استفاده از یک پیپت پاستور (بند۱۹-۱-۴-۱۰) به یک بشر ۵۰ میلی لیتر (بند۱۹-۱-۴-۸) انتقال دهید و سولفوریک اسید (۱۹-۱-۳-۷) را با استفاده از یک میکروپیپت (بند۱۹-۱-۴-۷) اضافه کنید تا pH محلول به ۰/۱برسد .

محلول را ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در یک حمام آب گرم (بند۱۹-۱-۴-۸) قرار دهید .

لوله ها را هم وزن کنید و به مدت ۵ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کنید .

با استفاده از یک پی‌پت پاستور (بند ۱۹-۱-۴-۱۰) عصاره را به یک بشر ۵۰ میلی لیتر (بند۱۹-۱-۴-۸) منتقل کنید.

---

1 -Top Vials

pH محلول بدست آمده را با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید (بند۱۹-۱-۳-۸) بر روی ۲ تنظیم کنید .
لوله را هم وزن کرده و به مدت ۵ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ کنید .
عصاره را دوباره با استفاده از یک پیپت پاستور به یک بشر منتقل کنید.

یادآوری : اگر ذره‌ای از زعفران در عصاره باقی بماند مرحله سانتریفیوژ را تکرار کنید .

۱۹-۱-۵-۳ خالص سازی نمونه

۱۹-۱-۵-۳-۱ . آماده سازی ستون خالص سازی و جذب رنگ های مصنوعی

کارتریج (بند۱۹-۱-۴-۴) را با ۱۰ میلی‌لیتر آب آماده کنید . با استفاده از یک سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری (بند۱۹-۱-۴-۱۶) عصاره‌ی زعفران به دست آمده (بند ۱۹-۱-۵-۲-۲یا۱۹-۱-۵-۲-۳) را از میان کارتریج عبور دهید.

۱۹-۱-۵-۳-۲ حذف مواد غیر لازم

کارتریج SPE را پی در پی با مقادیری از ۴۵ میلی لیتر متانول (بند۱۹-۱-۳-۱) ، ۴۵ میلی لیتر استون (بند۱۹-۱-۳-۱) و ۴۵ میلی‌لیتر متانول (بند۱۹-۱-۳-۱) اسیدی شده توسط ۵۰۰ میکرو لیتر فرمیک اسید (بند۱۹-۱-۳-۶) در یک جریان ثابت تقریبا ۶ تا ۸ میلی‌لیتر بر دقیقه شستشو دهید .

یادآوری: اسیدی کردن متانول در مرحله پایانی اجازه بازیابی بیشتر را می‌دهد .

اگر روش کار تعیین شده در بند ۱۹-۱-۵-۲-۳ استفاده شود ، برای شستشو به جای ۴۵ میلی لیتر از ۱۰ میلی لیتر استفاده کنید .

۱۹-۱-۵-۳-۳ شویش رنگ های مصنوعی

رنگ‌های باقی مانده در ستون را با حدود ۱۰ میلی‌لیتر حلال شویش (بند۱۹-۱-۳-۱۱) بشویید و محلول رنگی حاصل از شستشو را در یک بالن ته گرد جمع‌آوری کنید و با یک تبخیر کننده چرخشی (بند۱۹-۱-۴-۶) در فشارکم و دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا خشک شدن محلول تبخیر نمایید . دوباره باقی-مانده را در ۳۰۰ میکرولیتر آب با استفاده از یک میکروپیپت حل کنید و قبل از تزریق به سیستم HPLC آن را از یک صافی PTFE عبور دهید.

اگر از یک دستگاه استخراج تحت خلا (بند۱۹-۱-۴-۱۷) استفاده شود طول روند شستشو به طور چشمگیری افزایش می‌یابد. یک دستگاه استخراج تحت خلا استفاده از حجم‌های بالای حلال را سرعت می-

بخشد سرعت جریان شستشو ۶ تا ۸ میلی لیتر در دقیقه ، از کاهش غیر قابل قبول بازیابی ممانعت می-نماید .

۱۹-۱-۵-۴ کروماتوگرافی و تشخیص

۱۹-۱-۵-۴-۱ شوینده ها

فاز A : ۱/۳۶ گرم پتاسیم دی هیدوژن فسفات (بند۱۹-۱-۳-۹) را وزن کنید ، در یک بشر (بند۱۹-۱-۴-۸) قرار دهید و۹۰۰ میلی‌لیتر آب اضافه کنید و با محلول پتاسیم هیدروکسید (بند۱۹-۱-۳-۱۰) pH محلول را بر روی ۷ تنظیم کنید و در یک بالن حجمی یک لیتری (بند۱۹-۱-۴-۱۶) ریخته ، و تا خط نشانه آن را به حجم برسانید.

فاز B : متانول (بند۱۹-۱-۳-۲)

فاز C : استونیتریل (بند۱۹-۱-۳-۴)

۱۹-۱-۵-۴-۲ روش

۱۹-۱-۵-۴-۲-۱ شرایط کروماتوگرافی

سرعت جریان فاز متحرک : ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه

دمای ستون: ۳۰ درجه سانتیگراد

حجم تزریقی: ۵۰µl

کروماتوگرافی گرادیانی: (مطابق جدول ۳)

از فرایند کروماتوگرافی جدول ۳ استفاده کنید .

۵۰ میکرولیتر(بند۱۹-۱-۴-۱۷) از عصاره‌ی نمونه را به داخل ستون تزریق کنید.

جدول ۳- کروماتوگرافی گرادیانی و فرآیندکروماتوگرافی مرحله‌ای

مرحله	زمان به دقیقه	فاز A	فاز B	فاز C
نقطه شروع	۱۰	۹۰	۱۰	۰
۱	۰	۹۰	۱۰	۰
۲	۷	۴۸	۵۲	۰
۳	۱۰	۴۸	۵۲	۰
۴	۱۴	۰	۶۰	۴۰
۵	۲۴	۰	۶۰	۴۰
۶	۲۵	۹۰	۱۰	۰

اگر در ضمن کروماتوگرافی گرادیانی مشکلاتی بوجود آمد و جریان‌های مربوط به فشار بالا مشاهده شده راه حل‌های زیر می‌تواند باشد .

الف) ستون را به صورت زیرشستشو دهید :

۱) ۵۰ میلی‌لیتر آب گرم در دمای ۴۰ تا ۶۰ درجه سیلسیوس ؛

۲) ۵۰ میلی‌لیتر متانول ؛

۳) ۵۰ میلی‌لیتر استونیتریل ؛

۴) ۵۰ میلی‌لیتر تتراهیدروفوران[1]،

۵) ۲۵ میلی‌لیتر متانول،

۶) ۲۵ میلی‌لیتر فاز متحرک (شرایط اولیه)؛

ب) انجام چندین تزریق از مخلوط حجمی۱ به ۱ دی متیل سولفوکساید و آب .

کروماتوگرام‌ها را تحت شرایط آزمون درطول موج‌های ۴۳۵ نانومتر (زرد) و ۵۲۰ نانومتر (قرمز) رسم کنید.

۱۹-۱-۵-۴-۲-۲ تجزیه و تحلیل

از محلول رقیق مخلوط استانداردهای مرجع (بند ۱۹-۱-۳-۱۲-۴) استفاده کنید تا سیستم کالیبره شود و رنگدانه‌های تعیین شده را اندازه‌گیری کمی کنید . محلول‌های کالیبراسیون باید دامنه غلظت ۰ تا ۲۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر را پوشش دهد. اگر سطوح مورد انتظار فراتر از این دامنه بود ، محلول‌های مرجع اضافی تهیه می شود.

۱۹-۱-۵-۵ تفسیر نتایج

رنگدانه‌های مصنوعی را در عصاره با مقایسه زمان بازداری و طیف های UV-vis محلول‌های مرجع بین ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر تعیین و تایید کنید (بند۱۹-۱-۳-۱۲-۳) تعیین کمی با ید با استفاده از محلول‌های کالیبراسیون انجام شود.

برای کسب اطلاعات بیشتر به پیوست اطلاعاتی مراجعه کنید .

۱۹-۱-۵-۶ بیان نتایج

اگر یک رنگدانه شناسایی نشد ، نتیجه را در گزارش آزمون به صورت MRPL (حد عملکرد مورد نیاز حداقلی) برای رنگدانه‌های مصنوعی اسیدی محلول در آب (فهرست شده در جدول ۴) گزارش کنید .

1 - Tetrahydrofuran , (THF)

اگر رنگدانه در یک سطح فراتر از MRPL شناسایی و تایید شده با شد ، نتیجه را به میلی‌گرم در هر کیلوگرم زعفران با یک رقم اعشاری بیان کنید.

جدول ۴- حد عملکرد مورد نیاز حداقلی رنگدانه های مصنوعی اسیدی محلول در آب

رنگدانه	MRPL Mg/kg
آمارانت	۱
آزوربین	۱
نارنجی II	۲
پونسیو 4R	۱
روسلین	۲
کینولین زرد	۱
غروب زرد	۱
تارترازین	۱
زرد 2G	۱

۱۹-۱-۶ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید حاوی حداقل اطلاعات ذیل باشد :

الف) تمام اطلاعات مورد نیاز برای تعیین کامل نمونه ؛

ب) روش نمونه برداری مورد استفاده اگر مشخص باشد ؛

پ) روش آزمون استفاده شده ؛

ت) تمام جزئیات اجرایی که در این استاندارد مشخص نشده یا بصورت اختیاری در نظر گرفته شده همراه با جزئیات هر نوع اتفاقی که می‌تواند بر نتایج آزمون تاثیر گذار باشد ؛

ث) نتیجه آزمون بدست آمده .

ج) نام و نام خانوادگی آزمونگر

چ) تاریخ انجام آزمون

۱۹-۲ شناسایی رنگدانه ها و مواد رنگی غیر قطبی توسط کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)

استفاده از سایر رنگ‌ها مانند مواد رنگی قطبی و غیر قطبی نیز در زعفران محتمل می‌باشد . در این صورت با استفاده از روش HPLC تشخیص این رنگ‌ها را با روش‌های ارائه شده در بندهای ۱۹-۲ و ۱۹-۳ این استاندارد قابل انجام می‌باشد.

۱۹-۲-۱ کلیات

روش HPLC نه تنها برای تعیین خصوصیات کروماتوگرافی مواد تقلبی انجام می‌شود بلکه همچنین برای جستجوی نشان گر هایی بیو شیمیایی که برای تشخیص تقلب مفید هستند نیز به کار می‌رود .

این روش مستقیماً برای زعفران پودر (مطابق بند**۱۱-۲-۲**) زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده پس از آسیاب کردن و الک کردن (مطابق بند**۱۱-۲-۱**) کاربرد دارد. این روش حضور مواد رنگی غیر قطبی و رنگدانه‌ها را تشخیص داده و مقدار آن ها را تعیین می‌نماید .

۱۹-۲-۲ اساس روش

مواد رنگی و رنگ دانه‌های غیر قطبی با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با فاز معکوس و توسط آشکارساز با آرایه دیودی شناسایی می‌شوند .

۱۹-۲-۳ مواد و / یا واکنش‌گرها

در طی آزمون ، بجز مواردی که بیان شده است ، تنها از واکنش‌گرهای با درجه‌ی خلوص تجزیه‌ای تشخیص داده شده استفاده کنید.

۱۹-۲-۳-۱ آب دوبار تقطیر درجه HPLC

۱۹-۲-۳-۲ متانول ، درجه HPLC

۱۹-۲-۳-۳ استونیتریل ، درجه HPLC

۱۹-۲-۳-۴ تتراهیدروفوران

۱۹-۲-۴ وسایل لازم

علاوه بر وسایل معمول آزمایشگاهی وسایل زیر مورد نیاز می‌باشد :

۱۹-۲-۴-۱ فیلتر شیشه‌ای برای گاززدایی از حلال

۱۹-۲-۴-۲ ارلن مایر ، با ظرفیت ۱ لیتر

۱۹-۲-۴-۳ صافی‌های غشایی ، با منافذ ۰/۴۵ میکرومتری (از جنس سلولز استات)

۱۹-۲-۴-۴ ترازو آزمایشگاهی ، حداکثر ۱۰۱ گرم، d=0.1 mg

۱۹-۲-۴-۵ پیپت تحلیلی با حجم قابل تنظیم ۱۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر

۱۹-۲-۴-۶ پیپت تحلیلی با حجم قابل تنظیم ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر

۱۹-۲-۴-۷ سرنگ ، مدرج میکرولیتری برای HPLC ، برای برداشتن حجم‌هایی تا ۱۰۰میکرولیتری

۱۹-۲-۴-۸ بشر، با ظرفیت ۵ و ۱۰ میلی‌لیتر

۱۹-۲-۴-۹ بالن حجمی، با ظرفیت ۱۰ و ۲۰ میلی لیتر

۱۹-۲-۴-۱۰ اسپاتول

۱۹-۲-۴-۱۱ پیپت پاستور

۱۹-۲-۴-۱۲ نوک سمپلر آبی رنگ (۱۰۰۰ میکرولیتری) و زرد رنگ (۱۰۰ میکرولیتری)

۱۹-۲-۴-۱۳ ظروف شیشه‌ای ۲۵ میلی‌لیتری

۱۹-۲-۴-۱۴ لوله‌های سانتریفیوژ با ظرفیت ۳۰ میلی‌لیتری با درپوش

۱۹-۲-۴-۱۵ مخلوط کن ورتکس

۱۹-۲-۴-۱۶ حمام فراصوت

۱۹-۲-۴-۱۷ نیتروژن برای تبخیر

۱۹-۲-۴-۱۸ فیلتر سرنگ، ۲۵ میلیمتری ، ۰.۴۵ میکرومتر PTFE

۱۹-۲-۴-۱۹ سرنگ‌های ۱۰ میلی‌لیتری

۱۹-۲-۴-۲۰ دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، همراه با یک آشکارساز آرایه دایود ، قادر به اندازه-گیری جذب بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر (تنظیم شد در ۵۰۴ ، ۵۱۶ ، ۵۳۶ ، ۴۸۰ نانومتر) ، همراه با یک پمپ دوتایی ، یک محفظه تزریق با حلقه تزریق ۲۰ میکرولیتری یا معادل آن و یک سیستم داده پردازی .

۱۹-۲-۴-۲۱ ستون کروماتوگرافی برای HPLC ، نوع C18

- مواد : فولاد ضد زنگ
- طول : ۲۵ سانتیمتر
- قطر داخلی : ۴ میلیمتر
- فاز ساکن : سیلیس گرانول با کیفیت HPLC ، اکتادیسیل آب گریز منومری پیوند یافته با ذرات گرانولی با ابعاد ۵ میکرومتر و قطر منفذ ۱۰۰ Å

یادآوری :در این توضیحات فنی ، شرایط کروماتوگرافی و ترکیب فاز متحرک بر اساس یک ستون C18 HD Macherey Nagel Nucleosil 100.5 .می‌باشد . استفاده از یک ستون دیگر ممکن است نیازمند تغییراتی در فاز متحرک و شرایط کروماتوگرافی باشد .

۱۹-۲-۵ آماده سازی محلول‌ها

۱۹-۲-۵-۱ فاز متحرک A : استونیتریل/ متانل/ آب (۴:۴۰:۲۰) ، (درصد حجمی / حجمی)

در یک ارلن یک لیتری (بند **۱۹-۲-۴-۲**) ۴۰۰ میلی‌لیتر استونیتریل(بند ۱۹-۲-۳-۳) ، ۴۰۰ میلی‌لیتر متانول (بند ۱۹-۲-۳-۳) و ۲۰۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر اضافه کنید . مخلوط را همگن نموده و توسط صافی‌های غشایی ۰/۴۵ میکرومتری (بند۱۹-۲-۴-۳) از جنس سلولز استات در یک گاز زدای حلال شیشه‌ای (بند**۱۹-۲-۴-۱**) صاف کنید.

۱۹-۲-۵-۲ فاز متحرک B تتراهیدروفوران

۱۰۰ میلی لیتر تتراهیدروفوران در یک ارلن یک لیتری بریزید . توسط صافی های غشایی ۰/۴۵ میکرومتری توسط یک گاز زدای حلال شیشه ای صاف نمایید .

۱۹-۲-۵-۲ محلول‌های مرجع برای رنگدانه ها و مواد رنگی غیر قطبی

محلول‌های مرجع را مطابق جدول ۵ ، از هر یک از رنگ‌ها یا رنگدانه‌های مورد نظر۱ گرم یا ۰/۱ گرم در یک لیتر از حلال مناسب تهیه نمایید .

هر محلول مرجع را به صورت جداگانه توسط وزن کردن مقدار مناسب از مواد استاندارد ، و انتقال آن به بالن حجمی(بند **۱۹-۲-۴-۹**) و رقیق کردن تا حجمی با حلال مناسب آماده سازی نمایید . حلال‌ها در جدول شماره ۵ نشان داده شده‌اند .

جدول ۵- تهیه محلول های مرجع از رنگ ها یا رنگدانه های غیر قطبی مورد نظر

رنگدانه یا رنگ	وزن رنگدانه یا رنگ (mg)	حلال	حجم حلال (ml)	غلظت رنگ یا رنگدانه در محلول مرجع(mg/ml)
Sudan I	۲۰	استونیتریل	۲۰	۱
Sudan II	۲۰	THF	۲۰	۱
Sudan III	۲۰	THF	۲۰	۱
Sudan red 7B	۲۰	THF	۲۰	۱
Sudan IV	۲۰	THF	۲۰	۱
Sudan red B	۲۰	THF	۲۰	۱
Trans-b-apo-8 carotenal	۲۰	THF	۲۰	۱

در یک بشر ۱۰ میلی لیتری (۱۹-۲-۴-۸) ۲۰ میلی گرم سودان ۱ در استونیتریل (بند ۱۹-۲-۳-۳) حل نمایید . آن را به یک سری از چهار تایی بالن حجمی (بند **۱۹-۲-۴-۹**) ۲۰ میلی‌لیتری منتقل نمایید .

تاخط نشانه به حجم رسانده و مخلوط کنید. محلول غلظتی معادل ۱ گرم رنگدانه در یک لیتر استونیتریل می‌باشد .

در یک سری هفت تایی بشر (بند**۱۹-۲-۴-۸**) ، ۱۰ میلی‌لیتری ، به ترتیب ۲۰ میلی‌گرم سودان ۱، سودان ۲ ، سودان ۳ ، Sudan Red 7B ، سودان ۴ ، Sudan Red B و trans-b-apo-8-carotenal را در تتراهیدروفوران حل نمایید . آن‌ها را به طور جداگانه به هفت بالن حجمی (بند **۱۹-۲-۴-۹**) ۲۰ میلی-لیتری منتقل کرده ، به حجم رسانده و هم بزنید . هر محلول غلظتی معادل ۱ گرم از رنگدانه در یک لیتر تتراهیدروفوران می‌باشد .

۱۹-۲-۵-۴ محلول های کاری رنگدانه‌ها و مواد رنگی غیر قطبی

این محلول‌ها باید دارای ۱۰ میلی‌گرم از ماده رنگی یا رنگدانه در هر لیتر از استونیتریل باشد . مطابق راهنمای ارایه شده در جدول شماره ۶ این محلول‌ها را تهیه کنید .

جدول ۶ - راهنمای تهیه محلول های کاری از رنگ ها یا رنگدانه های غیر قطبی مورد نظر

رنگدانه یا رنگ	غلظت محلول کاری اولیه (mg/ml)	حجم محلول کاری اولیه (ml)	حلال	حجم حلال (ml)	غلظت رنگ یا رنگدانه در محلول کاری اولیه (µg/ml)
Sudan I	۱	۰/۱	استونیتریل	۱۰	۱۰
Sudan II	۱	۰/۱	استونیتریل	۱۰	۱۰
Sudan III	۱	۰/۱	استونیتریل	۱۰	۱۰
Sudan red 7B	۱	۰/۱	استونیتریل	۱۰	۱۰
Sudan IV	۱	۰/۱	استونیتریل	۱۰	۱۰
Sudan red B	۱	۰/۱	استونیتریل	۱۰	۱۰
Trans-b-apo-8 carotenal	۱	۰/۱	استونیتریل	۱۰	۱۰

در یک سری هشت تایی بالن حجمی (بند **۱۹-۲-۴-۹**) ، با استفاده از یک پیپت ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول مرجع سودان ۱، سودان ۲ ، سودان ۳ ، Sudan Red 7B ، سودان ۴، Sudan Red B و trans-b-apo-8-carotenal منتقل نمایید . به حجم رسانده و هم بزنید .

این محلول‌ها برای گزارش زمان بازداری مطابق با مراحل بندهای ۱۹-۲-۶-۳ و ۱۹-۲-۶-۴ به کار می‌روند .

۱۹-۲-۵-۵ محلول کاری مخلوط رنگدانه‌های و مواد رنگی غیر قطبی،

مخلوطی از رنگدانه ها و مواد رنگی با ۴۰ میلی گرم از رنگدانه یا ماده رنگی در یک لیتر از استونیتریل مطابق با راهنمای ارایه شده در جدول ۷ برای تهیه محلول کاری مخلوط رنگدانه‌ها و مواد رنگی ، در یک بالن حجمی (بند **۱۹-۲-۴-۹**) ۱۰ میلی‌لیتری ۰/۴ میلی‌لیتر از محلول شاهد سودان ۱، سودان ۲، سودان ۳، Sudan Red 7B، سودان ۴، Sudan Red B، trans-b-apo-8-carotenal و بتا کاروتن اضافه کنید ۴ میلی‌لیتر از محلول شاهد کاسپانتین را با استفاده از پیپت (بند **۱۹-۲-۴-۵**) اضافه کنید به حجم رسانده و هم بزنید .

جدول ۷- راهنمای تهیه محلول کاری مخلوط رنگ ها یا رنگدانه های غیر قطبی مورد نظر

رنگدانه یا رنگ	غلظت محلول کاری اولیه(mg/ml)	حجم محلول کاری اولیه(ml)	حلال	حجم حلال (ml)	غلظت مخلوط رنگ یا رنگدانه در محلول کاری مخلوط شده (µg/ml)
Sudan I	۱	۰/۴	استونیتریل	۱۰	۴۰
Sudan II	۱	۰/۴	استونیتریل	۱۰	۴۰
Sudan III	۱	۰/۴	استونیتریل	۱۰	۴۰
Sudan red 7B	۱	۰/۴	استونیتریل	۱۰	۴۰
Sudan IV	۱	۰/۴	استونیتریل	۱۰	۴۰
Sudan red B	۱	۰/۴	استونیتریل	۱۰	۴۰
Trans-b-apo-8 carotenal	۱	۰/۴	استونیتریل	۱۰	۴۰

۱۹-۲-۵-۶ محلول های کالیبراسیون

برابر با مخلوط رنگدانه ها یا مواد رنگی با غلظت های بین ۰/۱۵تا ۴ میکروگرم از رنگدانه یا مواد رنگی در یک میلی‌لیتر از استونیتریل مطابق با راهنمای ارایه شده در جدول ۸ محلول‌های کالیبراسیون را تهیه نمایید

جدول ۸- راهنمای تهیه محلول های کالیبراسیون

محلول اولیه	غلظت محلول اولیه (mg/ml)	حجم محلول اولیه (ml)	حلال	حجم محلول (ml)	غلظت نهایی محلول کالیبراسیون (µg/ml)	برچسب
مخلوط	۴۰	۱	استونیتریل	۱۰	۴	CAL1
مخلوط	۴۰	۰/۷۵	استونیتریل	۱۰	۳	CAL2
مخلوط	۴۰	۰/۳۷۵	استونیتریل	۱۰	۱/۵	CAL3
مخلوط	۴۰	۰/۲۵	استونیتریل	۱۰	۱	CAL4
CAL1	۴	۰/۷۵	استونیتریل	۱۰	۰/۳	CAL5
CAL1	۴	۰/۳۷۵	استونیتریل	۱۰	۰/۱۵	CAL6

۱۹-۲-۵-۷ محلول های بازیابی رنگدانه ها و مواد رنگی غیر قطبی

محلول‌های بازیابی عبارت است از مخلوطی از رنگدانه‌ها و مواد رنگی با غلظت‌های بین ۱/۳تا ۲/۵ میکروگرم از رنگدانه یا مواد رنگی در یک میلی لیتر از استونیتریل

۱۹-۲-۶ روش کار

۱۹-۲-۶-۱ تهیه آزمونه

۱۰۰ میلی‌گرم زعفران ساییده شده با دقت ا میلی‌گرم از پودر بدست آمده (مطابق بند**۱۱-۲-۲**) برای زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده مطابق (مطابق بند**۱۱-۲-۱**) وزن کنید .

۱۹-۲-۶-۳ استخراج مواد رنگی غیر قطبی

آزمونه را به درون یک لوله سانتریفیوژ بریزید . ۴ میلی‌لیتر کلروفرم (بند ۱۹-۲-۳-۴) اضافه کرده و مخلوط را برای ۱ دقیقه ورتکس نمایید . لوله را به مدت ۱۵ دقیقه در حمام فراصوت (بند ۱۹-۲-۴-۱۶) قرار داده و سپس توسط فیلتر سرنگ ۰/۴۵ میکرونی (بند ۱۹-۲-۴-۱۸)صاف نمایید . لوله سانتریفیوژ را توسط ۱ میلی‌لیتر تتراهیدروفوران THF بشویید. عصاره تتراهیدروفوران را تحت جریان نیتروژن تبخیر کرده و خشک نمایید . دوباره در ۹۰ میکرولیتر کلروفرم خیسانده و سپس ۲۱۰ میکرولیتر محلول فاز متحرک به آن اضافه کنید .

به دلیل حساسیت کم کاروتنوئیدها و تخریب آن‌ها پس از گذشت زمان ، باید دقت نمود که نمونه‌ها را توسط روکش آلومینیومی پوشانده و از تابش مستقیم نور محافظت نمایید و همچنین نمونه‌ها را در همان

روز استخراج ، تحلیل نمایید . نمونه‌ها باید تا زمان تحلیل در یخچال نگهداری شوند و خیساندن نمونه‌های استخراج شده باید درست پیش از تزریق انجام شود .

۱۹-۲-۶-۳ تحلیل HPLC

۱۹-۲-۶-۳-۱ تنظیم دستگاه

دستگاه کروماتوگرافی را سوار کرده و به صورت زیر تنظیم نمایید :

- سرعت جریان فاز متحرک : ۱/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه
- دمای ستون : دمای محیط

۱۹-۲-۶-۴ تجزیه و تحلیل

از روش گرادیان مطابق با جدول ۹ استفاده کنید .

جدول ۹- راهنمای روش گرادیان

زمان Min	حلال A %	حلال B %	سرعت جریان ml/min
۰	۹۸	۲	۱/۵
۲/۵	۹۸	۲	۱/۵
۱۶	۷۳	۲۷	۱/۵
۲۵	۷۳	۲۷	۱/۵
۲۵/۱	۹۸	۲	۱/۵
۳۰	۹۸	۲	۱/۵

زمانی که فاز متحرک (بند ۱۹-۲-۵-۱) با مشخصات ستون تنظیم شد و توازن ایجاد شد ، ۲۰ میکرولیتر از یک محلول استاندارد آزمایش و سپس یک حلال را به تنهایی به سیستم تزریق نمایید تا هر نوع اثر انتقالی (carry over effects) را تشخیص دهید و سپس یک حجم مساوی از عصاره خیسانده شده بدست آمده در ۱۷-۶-۲ را به ستون تزریق نمایید .

"آزمون مناسب بودن سیستم" یک محلول استاندارد در غلظت متوسط از منحنی کالیبراسیون می‌باشد که برای تعیین عملکرد دستگاه استفاده می‌شود . می توان از یک کالیبراتور یا یک استاندارد بازیابی استفاده کرد (مانند CAL 4 یا REC 2) .

هر زمان که شرایط کروماتوگرافی تغییر کرد باید یک منحنی کالیبراسیون تهیه شود . ۲۰ میکرولیتر از هر محلول کالیبراسیون را به دستگاه HPLC تزریق کنید و مقادیر نواحی پیک هر ماده رنگی را در مقابل جرم آن‌ها به صورت میکروگرم بر میلی‌لیتر مشخص کنید .

اگر مقدار مواد رنگی در نمونه‌ها خارج از محدوده کالیبراسیون قرار بگیرد ، رقیق‌سازی مناسب باید انجام شود . در این مورد ، محاسبات باید بر همین اساس دوباره انجام شوند .

۱۹-۲-۷ تفسیر و بیان نتایج

۱۹-۲-۷-۱ تفسیر

هر نوع ماده رنگی مصنوعی در عصاره را توسط مقایسه زمان بازیابی و طیف‌های پیک مربوط به نمونه با پیک ماده استاندارد در کروماتوگرام مشخص کنید .

تائید ساختار توسط حالت اسکن کردن از ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر صورت می‌گیرد .

۱۹-۲-۷-۲ تعیین

برای تعیین توسط روش استاندارد خارجی ، سطوح زیرپیک را ادغام کرده و از معادله منحنی کالیبراسیون استفاده کنید .

۱۹-۲-۷-۳ محاسبه

از منحنی کالیبراسیون میزان میکروگرم ماده رنگی در هر میلی لیتر از محلول آزمون تزریق شده به ستون HPLC را بخوانید .

غلظت جرمی ماده رنگی را به صورت میلی‌گرم در هر کیلوگرم با استفاده از معادله زیر محاسبه کنید :

$$C= (A * V *1000)/W$$

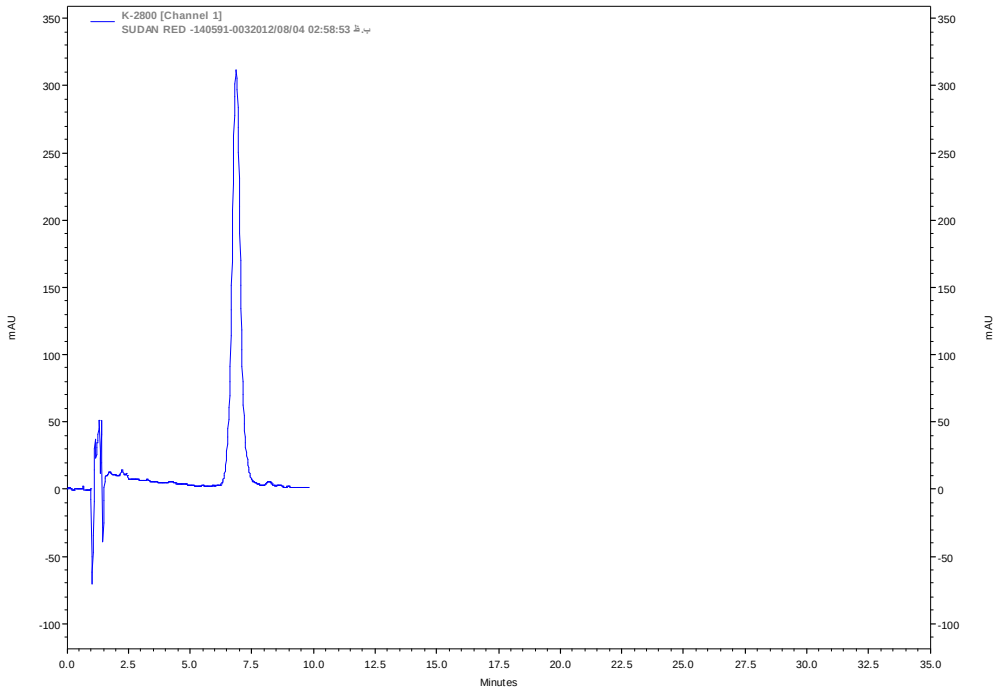
که در آن :

C : غلظت جرمی ماده رنگی برحسب میلی گرم در هر کیلوگرم

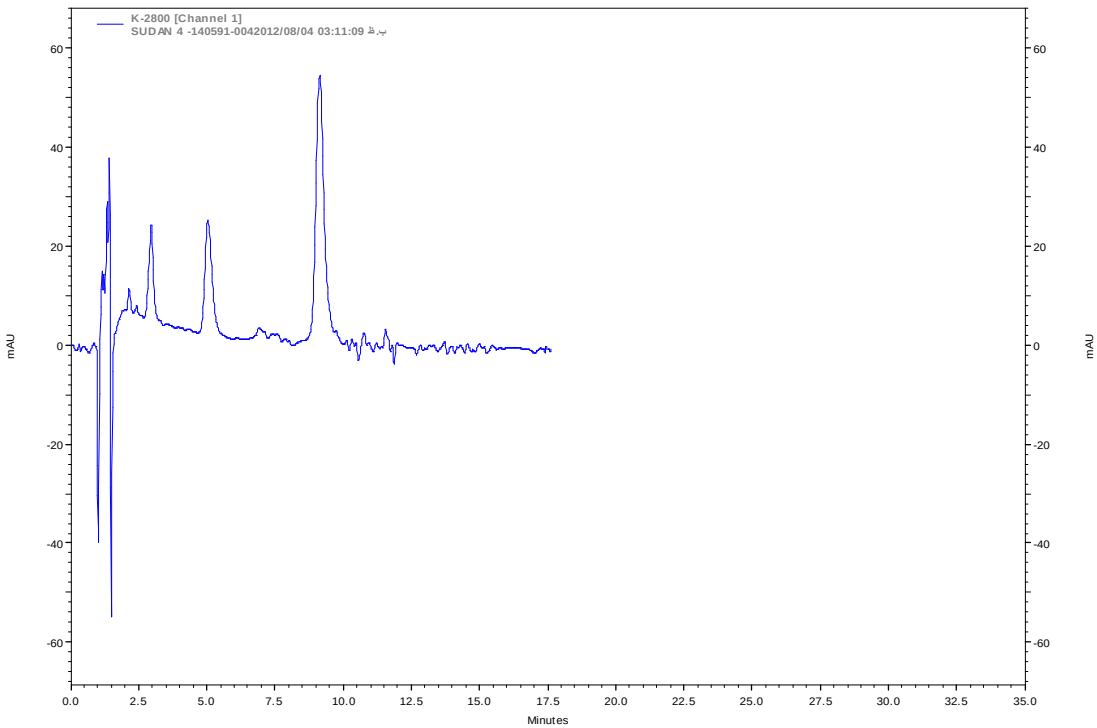
A : مقدار میلی‌گرم ماده رنگی در هر میلی‌لیتر از محلول آزمون

V : حجم بازداری بر حسب میلی‌لیتر (۰/۳ میلی‌لیتر)

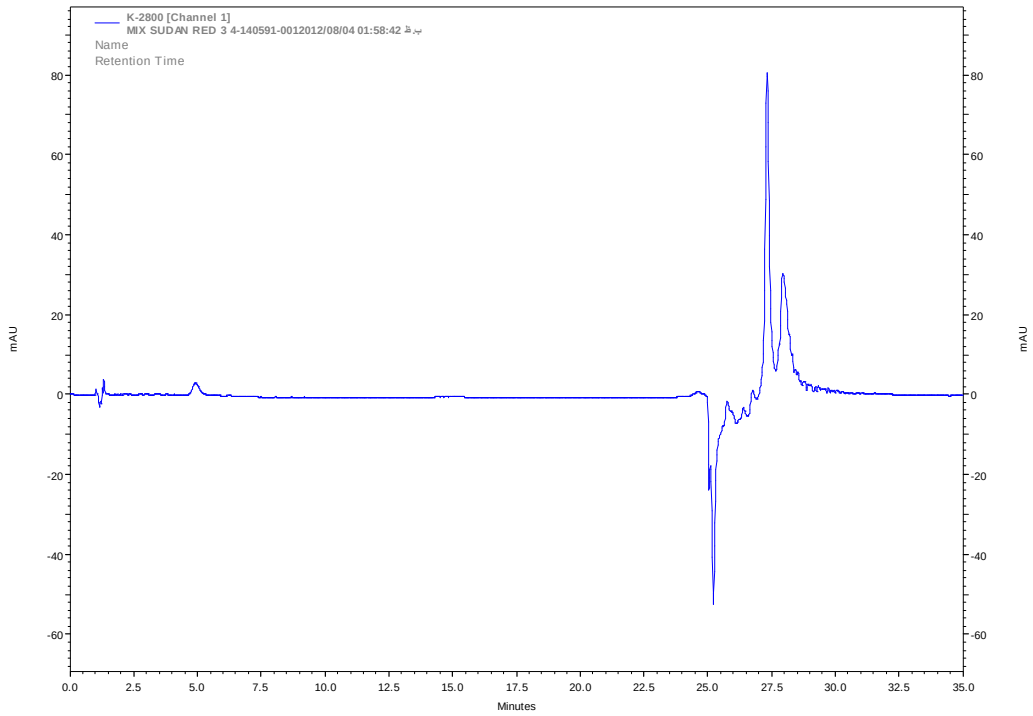
W : مقدار نمونه بر حسب میلی‌گرم (۱۰۰ میلی‌گرم)



نمودار ۱ - کروماتوگرام استاندارد رنگ sudan red



نمودار ۲ - کروماتوگرام استاندارد رنگ sudan 4



نمودار ۳ - کروماتوگرام استاندارد رنگ مخلوط شده

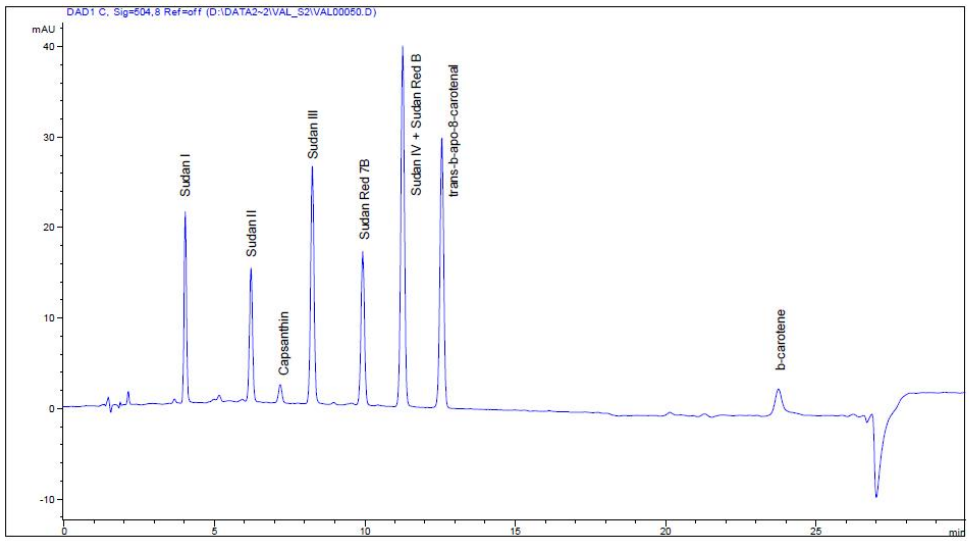
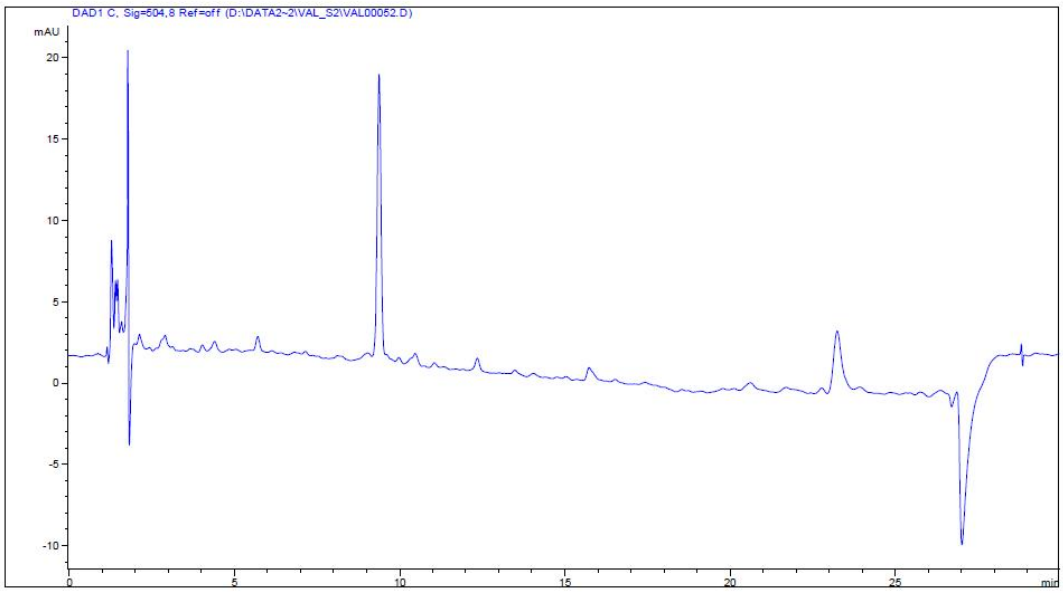


Figure 2 — Indicative chromatogram of a standard solution of non polar colorants at 504nm

نمودار ۴ - کروماتو گرام محلول استاندارد رنگ های غیرقطبی در ۵۰۴ نانومتر



نمودار۵- کروماتوگرام نمونه زعفران بلانک در ۵۴۰ نانومتر

۳-۱۹ شناسایی رنگدانه‌ها و مواد رنگی قطبی توسط کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)

۱-۳-۱۹ کلیات

این روش مستقیماً برای زعفران پودر (مطابق بند۱۱-۲-۲) زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده پس از آسیاب کردن و الک کردن (مطابق بند۱۱-۲-۱) کاربرد دارد. این روش وجود مواد رنگی و رنگدانه‌های قطبی را تشخیص می دهد و مقدار آن ها را تعیین می‌نماید .

۲-۳-۱۹ اساس روش

مواد رنگی و رنگ دانه‌های قطبی با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با فاز معکوس و توسط آشکارساز با آرایه دیودی شناسایی می‌شوند .

۳-۳-۱۹ واکنش‌گرها

در طی آزمون ، بجز مواردی که بیان شده است ، تنها از واکنش‌گرهای با درجه‌ی خلوص تجزیه‌ای استفاده نمایید .

۱-۳-۳-۱۹ آب دوبار تقطیر ، با درجه‌ی خلوص HPLC

۲-۳-۳-۱۹ متانول ، با درجه‌ی خلوص HPLC

۳-۳-۳-۱۹ استونیتریل ، با درجه‌ی خلوص HPLC

۴-۳-۳-۱۹ اتانول ، با درجه‌ی خلوص HPLC

۵-۳-۳-۱۹ استیک اسید ۱۰۰٪ ، با درجه‌ی خلوص HPLC

۱۹-۳-۳-۶ فرمیک اسید۹۸٪ ، با درجه‌ی خلوص HPLC

۱۹-۳-۳-۷ استون ، با درجه‌ی خلوص HPLC

۱۹-۳-۳-۸ آمونیاک ۲۵٪ ، با درجه‌ی خلوص HPLC

۱۹-۳-۴ وسایل لازم

علاوه بر وسایل معمول آزمایشگاهی وسایل زیر مورد نیاز می‌باشد :

۱۹-۳-۴-۱ فیلتر شیشه‌ای برای گاززدایی از حلال

۱۹-۳-۴-۲ ارلن مایر با ظرفیت ۱ لیتر

۱۹-۳-۴-۳ صافی‌های غشایی ، با منافذ ۰/۴۵ میکرومتر

۱۹-۳-۴-۴ ترازوی تجزیه‌ای ، حداکثر ۱۰۱ گرم، d=0.1 mg

۱۹-۳-۴-۵ پی‌پت تحلیلی با حجم قابل تنظیم ۱۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر

۱۹-۳-۴-۶ پی‌پت تحلیلی با حجم قابل تنظیم ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر

۱۹-۳-۴-۷ سرنگ ، مدرج میکرولیتری برای HPLC ، برای برداشتن حجم‌هایی تا ۱۰۰میکرولیتری

۱۹-۳-۴-۸ بشر با ظرفیت ۱۰ و۱۰۰ میلی‌لیتر

۱۹-۳-۴-۹ بالن حجمی با ظرفیت ۱۰ ، ۲۰ ، ۱۰۰ و ۲۵۰ میلی لیتر

۱۹-۳-۴-۱۰ اسپاتول

۱۹-۳-۴-۱۱ پی‌پت پاستور

۱۹-۳-۴-۱۲ نوک سمپلر آبی رنگ (۱۰۰۰ میکرولیتر) و زرد رنگ (۱۰۰ میکرولیتر)

۱۹-۳-۴-۱۳ ویال شیشه‌ای ۲۵ میلی‌لیتر

۱۹-۳-۴-۱۴ آون

۱۹-۳-۴-۱۵ لوله‌های سانتریفیوژ ۳۰ میلی‌لیتری با درپوش

۱۹-۳-۴-۱۶ پی‌پت شیشه‌ای دارای درجه بندی ۱۰میلی متر

۱۹-۳-۴-۱۷ سانتریفوژ

۱۹-۳-۴-۱۸ مخلوط کن ورتکس

۱۹-۳-۴-۱۹ pH متر

۱۹-۳-۴-۲۰ سیستم خلاء SPE

۱۹-۳-۴-۲۱ بالن ته گردی ۱۰ میلی لیتری

۱۹-۳-۴-۲۲ تبخیر کننده چرخشی

۱۹-۳-۴-۲۳ ستون SPE با جاذب C18

با ظرفیت ۳ میلی لیتر ، اکتا دسیل هیدروفوبیک ، اندازه ذرات ۱۰۵-۵۵ میکرومتر ، اندازه خلل و فرج ۱۲۵Å و وزن ماده جاذب ۵۰۰ میلی گرم

۱۹-۳-۴-۲۴ ۲۰ کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، همراه با یک آشکارساز آرایه دایود ، قادر به اندازه‌گیری جذب بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر (تنظیم شد در ۲۷۴، ۴۴۰ ، ۴۸۰ نانومتر) ، همراه با یک پمپ دوتایی ، یک محفظه تزریق با حلقه تزریق ۲۰ میکرولیتری یا معادل آن و یک سیستم داده پردازی

۱۹-۳-۴-۲۵ ستون کروماتوگرافی برای HPLC ، نوع C18

- جنس : فولاد ضد زنگ
- طول : ۲۵ سانتیمتر
- قطر داخلی : ۴ میلیمتر
- فاز ساکن : سیلیس دانه ای با کیفیت مناسب HPLC ، اکتادیسیل آب گریز منومری پیوند یافته با ذرات گرانولی با ابعاد ۵ میکرومتر و قطر منفذ ۱۰۰Å

۱۹-۳-۵ آماده سازی محلول‌ها

۱۹-۳-۵-۱ حلال استیک اسید ۰/۰۲ نرمال

۰/۲۹ میلی لیتر استیک اسید (بند**۱۹-۳-۳-۵**)را به یک بالن حجمی (بند **۱۹-۳-۴-۹**) ۲۵۰ میلی لیتری بریزید و با آب دو بار تقطیر به حجم برسانید.

۱۹-۳-۵-۲ محلول های کاری (متانول / آب درصد حجمی ۵۰/۵۰)

۵۰ میلی لیتر متانول و ۵۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر را در یک بشر ریخته و به هم بزنید

۱۹-۳-۵-۳ فاز متحرک A : محلول استیک اسید ۱٪در آب با درجه خلوص HPLC

۱۹-۳-۵-۴ فاز متحرک B : محلول استیک اسید ۱٪ در استونیتریل با در جه خلوص HPLC

۱۹-۳-۵-۵ حلال شویش

۵ میلی لیتر آمونیاک ۲۵٪ (بند**۱۹-۳-۳-۸**) را در یک بالن حجمی(بند**۱۹-۳-۴-۹**) ۱۰۰ میلی لیتری ریخته و به آن ۹۵ میلی لیتر متانول (بند**۱۹-۳-۳-۲**) اضافه کنید .

۱۹-۳-۵-۶ محلول‌های مرجع برای رنگدانه ها و مواد رنگی غیر قطبی

محلول‌های مرجع را مطابق جدول ۸ ، از هر یک از رنگ‌ها یا رنگدانه‌های مورد با غلظت ۱ گرم یا ۰/۱ گرم در یک لیتر از حلال مناسب تهیه نمایید .

هر محلول شاهد را به صورت جداگانه توسط وزن کردن مقدار مناسب از مواد استاندارد ، و انتقال آن به بالن حجمی (بند**۱۹-۳-۴-۹**) و رقیق کردن تا حجم مناسب با حلال مناسب آماده سازی نمایید . حلال‌ها در جدول شماره ۱۰ نشان داده شده‌اند .

جدول ۱۰ - تهیه محلول های مرجع از رنگ ها یا رنگدانه های قطبی مورد نظر

رنگدانه یا رنگ	وزن رنگدانه یا رنگ (mg)	حلال	حجم حلال (ml)	غلظت رنگ یا رنگدانه در محلول مرجع(mg/ml)
Ali zarin	۲۰	متانول(داغ)	۲۰	۱
Alizarin Red S	۲۰	آب	۲۰	۱
Carminic Acid	۲۰	آب	۲۰	۱
Chrysoidine G	۲۰	آب	۲۰	۱
Crocin	۲۰	آب	۲۰	۱
Curcumin	۲۰	اتانول	۲۰	۱
Riboflavin5-monophosphate sodium salt Hydrate	۱۰	استیک اسید ۰/۰۲نرمال	۱۰۰	۰/۱

در یک بشر (بند**۱۹-۳-۴-۸**) ۱۰ میلی لیتری ۲۰ میلی گرم Alizarin را در متانول داغ حل نمایید . آن را به یک بالن حجمی (بند **۱۹-۳-۴-۹**)۲۰ میلی‌لیتری منتقل نمایید ، پس از سرد شدن به حجم رسانده و هم بزنید . محلول غلظتی معادل ۱ گرم رنگدانه در لیتر از متانول می‌باشد .

در یک سری چهارتایی بشر ۱۰ میلی‌لیتری ، به ترتیب ۲۰ میلی‌گرم Alizarin Red S ، Carminic Acid ، Chrysoidine G و Crocin را در آب حل نمایید . آن‌ها را به طور جداگانه به چهار بالن حجمی (بند**۱۹-۳-۴-۹**) ۲۰ میلی‌لیتری منتقل کرده ، به حجم رسانده و هم بزنید . هر محلول غلظتی معادل ۱ گرم رنگدانه در یک لیتر آب می باشد .

در یک سری دوتایی بشر ۱۰ میلی‌لیتری ، ۱۰ میلی‌گرم Riboflavin-5-monophosphate Sodium Salt Hydrate را در استیک اسید ۰/۰۲ نرمال حل نمایید. آن‌ها را به دو تا بالن حجمی (بند**۱۹-۳-۴-۹**) ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل کرده ، به حجم رسانده و هم بزنید . هر محلول غلظتی معادل ۰/۱ گرم رنگدانه در یک لیتر استیک اسید ۰/۰۲ نرمال می باشد

۱۹-۳-۵-۷ محلول های کاری رنگدانه‌ها و مواد رنگی قطبی

این محلول‌ها دارای ۱۰ میلی‌گرم از رنگدانه در یک لیتر مخلوطی از آب و متانول **درصد حجمی ۵۰/۵۰)** (بند**۱۹-۳-۵-۲**) باشد . مطابق راهنمای ارایه شده در جدول شماره ۱۱ این محلول‌ها را تهیه کنید .

جدول ۱۱ - راهنمای تهیه محلول های کاری از رنگ ها یا رنگدانه های قطبی مورد نظر

رنگدانه یا رنگ	(mg/ml)	حجم (V_1) (ml)	حلال	حجم (V_2) (ml)	غلظت (C_2) (µg/ml)
Ali zarin	۱۰	۰/۱	متانول در آب	۱۰	۱۰
Alizarin Red S	۱۰	۰/۱	متانول در آب	۱۰	۱۰
Carminic Acid	۱۰	۰/۱	متانول در آب	۱۰	۱۰
Chrysoidine G	۱۰	۰/۱	متانول در آب	۱۰	۱۰
Crocin	۱۰	۰/۱	متانول در آب	۱۰	۱۰
Curcumin	۱۰	۰/۱	متانول در آب	۱۰	۱۰
Riboflavin5-monophosphate sodium salt Hydrate	۱۰	۱/۰	متانول در آب	۱۰	۱۰

در یک سری شش تایی بالن حجمی (بند **۱۹-۳-۴-۹**) ۱۰ میلی لیتری ، با استفاده از یک پیپت ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول مرجع **Alizarin** , **Alizarin Red S** ، **Carminic Acid** ، **Chrysoidine G,** **Curcumin** و **Crocin** منتقل نمایید ، محلول رابه حجم رسانده و هم بزنید .

در یک سری سه تایی از بالن های حجمی (بند **۱۹-۳-۴-۹**) ۱۰ میلی لیتری ، با استفاده از یک پیپت ۱ میلی لیتر از محلول مرجع بیکسین (Bixin) ، ریبوفلاوین ۱۰٪ و نمک سدیم ریبوفلاوین ۵-مونو فسفات هیدراته منتقل نمایید،محلول را به حجم رسانده و هم بزنید .

یادآوری : این محلول‌ها برای گزارش زمان بازداری مطابق با مراحل (بند **۱۹-۳-۶-۴**) به کار می‌روند .

۱۹-۳-۵-۸ محلول کاری مخلوط رنگدانه‌های و مواد رنگی قطبی

مطابق با راهنمای ارایه شده در جدول ۱۲ محلول کاری مخلوط رنگدانه‌ها و مواد رنگی ،۲۰ میلی‌گرم رنگدانه در یک لیتر مخلوطی از آب و متانول **درصد حجمی ۵۰:۵۰** (بند **۱۹-۳-۵-۲**) **می‌باشد** . با استفاده از یک پی‌پت، (بند**۱۹-۳-۴-۵ و ۱۹-۳-۴-۶**) در یک بالن حجمی(بند **۱۹-۳-۴-۹**) ۲۰ میلی‌لیتری ، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول مرجع Alizarin , Alizarin Red S ، Carminic Acid ، Chrysoidine G, Curcumin و Crocin و ۵ میلی لیتر از محلول مرجع نمک سدیم ریبوفلاوین ۵- مونو فسفات هیدراته اضافه کنید ، به حجم رسانده و هم بزنید .

جدول ۱۲- راهنمای تهیه محلول کاری مخلوط رنگ ها یا رنگدانه های قطبی مورد نظر

رنگدانه یا رنگ	غلظت C_1 (mg/ml)	حجم (V_1) (ml)	حلال	حجم (V_2) (ml)	غلظت (C_2) (µg/ml)
Alizarin	۱	۰/۵	متانول در آب	۲۵	۲۰
Alizarin Red S	۱	۰/۵	متانول در آب	۲۵	۲۰
Carminic Acid	۱	۰/۵	متانول در آب	۲۵	۲۰
Chrysoidine G	۱	۰/۵	متانول در آب	۲۵	۲۰
Crocin	۱	۰/۵	متانول در آب	۲۵	۲۰
Curcumin	۱	۰/۵	متانول در آب	۲۵	۲۰
Riboflavin5-monophosphate sodium salt Hydrate	۱	۵	متانول در آب	۲۵	۲۰

۱۹-۳-۵-۹ محلول های کالیبراسیون، رنگدانه های قطبی

محلول‌های کالیبراسیون حاوی مخلوط رنگدانه ها یا مواد رنگی با غلظت های بین ۰/۵تا ۱۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر در محلول آب/متانول ۵۰:۵۰ را مطابق با راهنمای ارایه شده در جدول ۱۳ تهیه نمایید

جدول ۱۳- راهنمای تهیه محلول های کالیبراسیون

محلول اولیه	غلظت C_1 (mg/ml)	حجم (V_1) (ml)	حلال	حجم (V_2) (ml)	غلظت نهایی (C_2) (µg/ml)	برچسب
مخلوط	۲۰	۶	متانول در آب	۱۰	۱۲	CAL1
مخلوط	۲۰	۵	متانول در آب	۱۰	۱۰	CAL2
مخلوط	۲۰	۲/۵	متانول در آب	۱۰	۵	CAL3
مخلوط	۲۰	۱/۵	متانول در آب	۱۰	۳	CAL4
مخلوط	۲۰	۰/۵	متانول در آب	۱۰	۱	CAL5
مخلوط	۲۰	۰/۲۵	متانول در آب	۱۰	۰/۵	CAL7

۱۹-۳-۵-۱۰ محلول های بازیابی رنگدانه ها و مواد رنگی قطبی

محلول‌های بازیابی عبارت اند از مخلوطی از رنگدانه‌ها و مواد رنگی با غلظت‌های بین ۱ تا ۷/۵ میکروگرم بر میلی لیتر آن ها در مخلوط آب/متانول ۵۰:۵۰(درصد حجمی/حجمی)

۱۹-۳-۶ روش کار

۱۹-۳-۶-۱ تهیه آزمونه

حدود ۵۰۰ میلی‌گرم زعفران ساییده شده از پودر بدست آمده (مطابق بند**۱۱-۲-۲**) برای زعفران رشته‌ای و رشته‌ای بریده (مطابق بند**۱۱-۲-۱**) را توزین نمایید.

۱۹-۳-۶-۲ استخراج مواد رنگی قطبی

آزمونه را درون یک لوله سانتریفیوژ(بند**۱۹-۳-۴-۱۵**) بریزید . ۱۰ میلی‌لیتر آب با دمای ۶۰ درجه سیلیسوس به آن افزوده ، به خوبی به هم بزنید و بگذارید به مدت ۱۰ تا ۱۲ دقیقه به حال خود باقی بماند . سپس محلول را سانتریفیوژ کرده و با حدود ۲۵۰ میکرولیتر فرمیک اسید(بند**۱۹-۳-۳-۶**) آن را اسیدی کنید .

لایه رویی باید عاری از هر گونه ذرات زعفران باشد بنا بر این در صورت ضرورت مجددا مرحله سانتریفوژ را تکرار کنید.

۱۹-۳-۶-۳ خالص سازی نمونه ها

ستون را با ۱ میلی لیتر آب شستشو دهید . با استفاده از یک پی پت کل محلول رویی حاصل از سانتریفوژ را به ستون اضافه کنید . و به ترتیب با آب ، متانول و استن شستشو دهید تا زمانی که حاصل شستشو بی رنگ باشد . در مواردی که رنگ پایدار است توالی شستشو را مجددا تکرار کنید . بعد از شستشو با آب باید pH ما آب خنثی باشد .

یادآوری : در صورت استفاده از سیستم خلاء ، سرعت شستشو افزایش می‌یابد . در این صورت حجم‌های بیشتری باید استفاده شود (حدود ۳۰ میلی لیتر)

رنگ‌های باقی مانده در ستون را با حدود۵ میلی‌لیتر حلال شویش (بند۱۹-۳-۵-۵) بشویید و رنگ‌های شستشو شده را در یک بالن ته گرد جمع‌آوری کنید و با یک تبخیر کننده چرخشی (بند۱۹-۳-۴-۲۲) دردرجه حرات محیط خشک شدن محلول تبخیر نمایید . دوباره باقی‌مانده را در ۵۰۰ میکرولیتر متانول با استفاده از یک میکروپیپت حل کنید.

۱۹-۳-۶-۴ آزمون های کروماتوگرافی مایعی HPLC

۱۹-۳-۶-۴-۱ تنظیم دستگاه

دستگاه کروماتوگرافی را سوار کرده و به صورت زیر تنظیم نمایید :

- سرعت جریان فاز متحرک : ۱/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه
- دمای ستون : دمای محیط

۱۹-۳-۶-۴-۲ تجزیه و تحلیل

از روش از روش شویش گرادیانی مطابق با جدول ۱۴ استفاده کنید .

جدول ۱۴- راهنمای روش از روش شویش گرادیانی

زمان Min	حلال A %	حلال B %	سرعت جریان ml/min
۰	۸۰	۲۰	۱
۴/۵	۸۰	۲۰	۱
۲۰	۴۰	۶۰	۱
۳۰	۵	۹۵	۱
۳۰/۱	۸۰	۲۰	۱
۳۵	۸۰	۲۰	۱

زمانی که فاز متحرک A با ستون به تعادل رسید ، ۲۰ میکرولیتر از محلول استاندارد نمونه و سپس حلال بلانک را به تنهایی به سیستم تزریق نمایید تا هر نوع اثر انتقال مواد باقیمانده (carry over effects) را حذف نمایید و سپس یک حجم مساوی از عصاره خیسانده شده بدست آمده در۱۹-۳-۶-۳ را به ستون تزریق نمایید .

"آزمون اعتبار سنجی سیستم" که برای تعیین عملکرد دستگاه به کار می رود استفاده از یک محلول استاندارد با غلظت متوسط از محلول های مورد استفاده در منحنی کالیبراسیون اجرا می گردد . می توان از یک کالیبراتور یا یک استاندارد بازیابی استفاده کرد (مانند CAL 4 یا REC 2) .

یادآوری می شود هر زمان که شرایط کروماتوگرافی تغییر کرد باید منحنی کالیبراسیون در شرایط جدید تهیه شود . ۲۰ میکرولیتر از هر محلول کالیبراسیون را به دستگاه HPLC تزریق کنید و سطح زیر پیک هر ماده رنگی را در مقابل جرم آن‌ها برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر مشخص کنید .

اگر مقدار مواد رنگی در نمونه‌ها خارج از محدوده خطی منحنی کالیبراسیون قرار بگیرد ، رقیق‌سازی مناسب باید انجام شود . در این مورد ، محاسبات باید بر همین اساس دوباره انجام شوند .

۱۹-۳-۷ تفسیر و بیان نتایج

۱۹-۳-۷-۱ تفسیرنتایج

حضور هر نوع ماده رنگی مصنوعی در عصاره را توسط مقایسه زمان بازیابی پیک مربوط به نمونه با پیک ماده استاندارد در کروماتوگرام مشخص کنید .

تائید ساختار توسط حالت اسکن کردن از ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر صورت می‌گیرد .

۱۹-۳-۷-۲ تعیین

برای تعیین توسط روش استاندارد خارجی ، ناحیه پیک را ادغام کرده و از معادله منحنی کالیبراسیون استفاده کنید .

۱۹-۳-۷-۳ محاسبه

از منحنی کالیبراسیون میزان میکروگرم ماده رنگی در هر میلی لیتر از محلول آزمون تزریق شده به ستون HPLC را قرائت کنید .

غلظت جرمی ماده رنگی را به صورت میلی‌گرم در هر کیلوگرم با استفاده از معادله زیر محاسبه کنید :

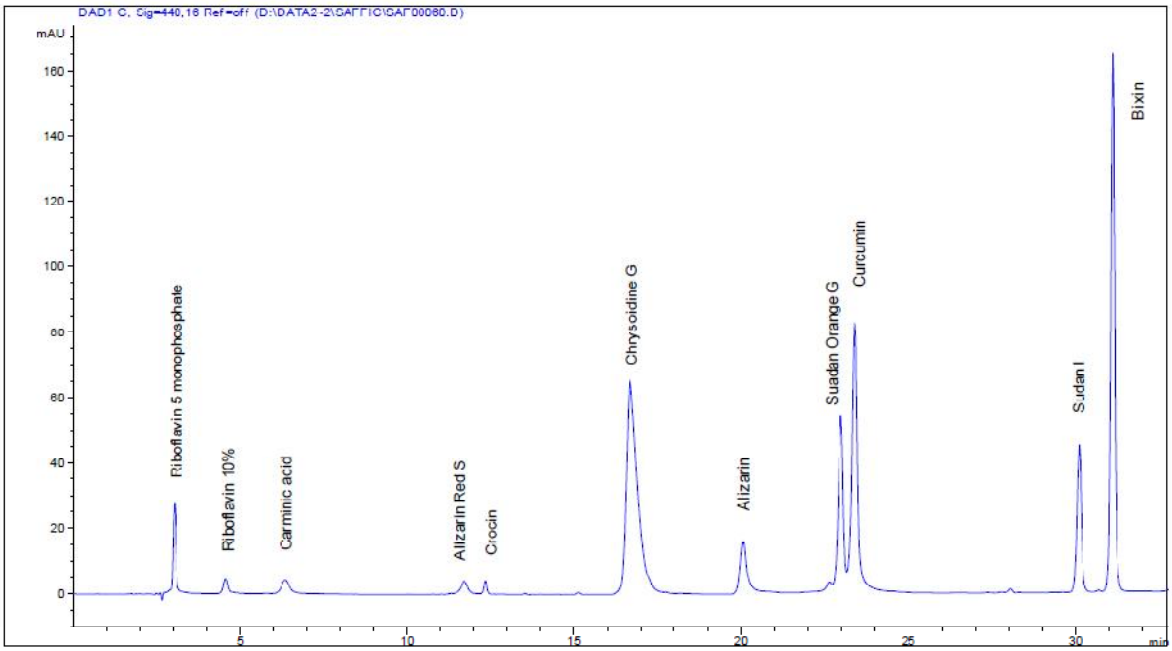
$$C= (A * V *1000)/W$$

که در آن :

A مقدار میلی‌گرم ماده رنگی در هر میلی‌لیتر از محلول آزمون

V حجم بازداری بر حسب میلی‌لیتر (۰/۳ میلی‌لیتر)

W مقدار نمونه بر حسب میلی‌گرم (۱۰۰ میلی‌گرم)



نمودار ۶-کروماتوگرام محلول استاندارد رنگ های قطبی در ۴۴۰ نانو متر

پیوست ـ الف

(اطلاعاتی)

تشخیص رنگدانه های زعفران

الف-۱ کلیات

تشخیص رنگدانه‌های زعفران می‌تواند به دو روش انجام پذیرد . نتایج این آزمون می‌تواند مشخص کننده اصالت زعفران باشد .

برای انجام آزمون‌ها از نمونه ساییده شده طبق بند ۱۱ استفاده می شود .

الف-۲ روش اول

الف-۲-۱ اساس روش

کروماتوگرافی لایه نازک نمونه پس از خیساندن آن در اتانل

هر روش معادل دیگری نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

الف-۲-۲ مواد لازم

الف -۲-۲-۱ محلول اتانل ۸۰ درصد حجمی

الف -۲-۲-۲ سیستم حلال شویش شامل مخلوط زیر:

الف -۲-۲-۳ بوتانل نرمال (۴حجم)

الف-۲-۲-۴ استیک اسید (۱حجم)

الف-۲-۲- ۵ آب مقطر (۱حجم)

الف-۲-۳ وسایل لازم

علاوه بر وسایل معمول آزمایشگاهی به وسایل ویژه زیر نیز نیاز است :

الف-۲-۳-۱ تانک مخصوص کروماتوگرافی که جدار داخلی آن از کاغذ صافی پوشانیده شده است تا فضای داخلی تانک را اشباع کند .

الف-۲-۳-۲ صفحات سیلیکاژل بدون شناساگر فلوئورسانس که با نگهداری به مدت یک ساعت درگرمخانه با دمای ۲± ۱۰۳ درجه سیلسیوس و سرد کردن در یک دستگاه خشک کن حاوی ماده جاذب الرطوبه موثر، فعال گردیده است .

الف-۲-۴ روش کار

در حدود ۰/۰۵ گرم از نمونه ساییده شده (طبق بند ۵-۶)را بادقت ۰/۰۱ گرم دقیقا توزین نمائید .

آزمایه را به مدت ۲ساعت در ۲ میلی لیتر اتانل (طبق بند**الف**-۲-۲-۱) بخیسانید و سپس یک میکرولیتر از این محلول اتانلی را روی صفحات سیلیکاژل (طبق بند **الف**-۲-۳-۲) قرار دهید و در تانک کروماتوگرافی (طبق بند**الف**-۲-۳-۱) بگذارید و عمل کروماتوگرافی را با حلال شویش (طبق بند **الف** -۲-۲-۲) ادامه دهید تا جبهه حلال از خط آغاز ،۱۰ سانتی‌متر پیشروی نماید (دقت کنید که جبهه حلال از طول صفحه تجاوز نکند) .

یادآوری : چنانچه آزمایه به مدت ۲۴ ساعت در اتانل باقی بماند ، لکه ها در نور روز هم مشاهده خواهند شد.

جدول الف - ۱- مشخصات لکه های ویژه زعفران

اندیس بازداری (Rf)	شدت لکه ها	رنگ لکه ها در روشنایی روز	رنگ لکه ها در اشعه فرابنفش
۰/۹۶	خیلی کمرنگ	زرد نارنجی	-
۰/۸۰	خیلی کمرنگ	زرد نارنجی	-
۰/۶۳	کمرنگ	زرد نارنجی	قهوه ای
۰/۵۶	روشن واضح	زرد نارنجی	قهوه ای
۰/۴۳	روشن واضح	زرد نارنجی	قهوه ای
۰/۲۹	پررنگ	زرد نارنجی	قهوه ای

الف-۲-۵ تفسیر نتایج

پس از گسترش کروماتوگرام لکه‌های ویژه زعفران با مشخصات ذکر شده در جدول شماره یک مشاهده می شوند .

سه لکه باپیش روی های ۰/۲۹ ،۰/۴۳ و۰/۵۶ لکه‌های عمده و مشخص کننده کلاله زعفران خالص است . آنها در نور روز به رنگ زرد نارنجی بوده و در صورتی که مقدار رنگینه زیاد باشد به رنگ نارنجی مشاهده می‌شود .

هر سه رنگ فوق در نور فرا بنفش دارای خاصیت فلورسانس بوده و قهوه‌ای به نظر می‌رسد..

ماده‌ای که دارای کمترین پیش روی (۰/۲۹) می‌باشد ، کروسین ترانس[1] است .

1 -Trans crocine

یادآوری : در صورتی که لکه هائی غیر از لکه های ویژه زعفران مشاهده گردد وجود آنها را در گزارش قید کنید .

الف-۳ روش دوم

الف-۳-۱ اساس روش

خیساندن زعفران در متانل ـ کروماتوگرافی این محلول متانولی روی لایه نازک ـ آزمایش صفحه کروماتوگرافی پس از گسترش و تشخیص رنگدانه‌ها و تعیین اینکه رنگدانه‌ها مربوط به زعفران می‌باشند یا خیر.

الف-۳-۲ مواد لازم

الف-۳-۲-۱ متانل

با نقطه جوش ۶۴ تا ۶۵ درجه سیلسیوس در فشار ۱۰۳/۳ کیلوپاسکال[1] (۷۶۰ میلی متر جیوه) با چگالی ۲۰/۲۰ = ۵/۷۹۱ تا ۵/۷۹۳

الف-۳-۲-۲ اتانل مطلق

حداقل با خلوص ۹۹/۵ در صد حجمی

الف-۳-۲-۳ کلروفرم

نقطه جوش کلروفرم مصرفی حدود ۶۰ درجه سیلسیوس در فشار ۱۰۳/۳ کیلو پاسکال (۷۶۰ میلی مترجیوه) و چگالی آن ۲۰/۲۰ = ۱/۴۷۵ تا۱/۰۸۱ باشد این حلال نباید بیش از ۲ درصد حجمی اتانل داشته باشد .

یادآوری : همچنین می توان از دی کلرومتان بجای کلروفرم استفاده کرد .

الف-۳-۲-۴ سولفوریک اسید غلیظ ۹۷-۹۵ در صد حجمی

الف-۳-۲-۵ ۴متوکسی بنزالدئید

الف-۳-۲-۶ نفتل زرد [2]

ملح سدیم ۲و۴ – دی نیترونفتل

الف-۳-۲-۷ قرمز سودان

۱- (۴- فنیل آزو) فنیل آزو نفتالن ۲- هیدروکسی

1– Naphthol yellow or Martius yellow(Colour index No 10315) ,Schultz NO.18
2- Sudan – red G or sudan red III (Colour index No.26100)

الف-۳-۲-۸ محلول مرجع

۵ میلی لیتر نفتل زرد (طبق بند ب-۳-۲-۶) را در ۵ میلی لیتر متانل (طبق بند الف-۳-۲-۱) حل کنید و به آن ۵ میلی گرم قرمزG سودان (طبق بند الف-۳-۲-۷) در ۵ میلی‌لیتر کلروفرم (طبق بند الف-۳-۲-۳) بیافزایید .

الف-۳-۲-۹ حلال شویش

عبارتست از بخش آلی مخلوط مواد زیر :

ـ اتیل استات (۶۵حجم) با نقطه جوش ۷۶ تا ۷۸ درجه سیلسیوس در فشار ۱۰۳/۳ کیلو پاسکال (برابر با۷۶۰ میلی‌متر جیوه)

ـ پروپان ۲- ال (۲۵حجم)

ـ آب (۱۰ حجم)

الف-۳-۲-۱۰ محلول ظهور که از اختلاط مواد زیر بدست می‌آید

الف-۳-۲-۱۰-۱ طرز تهیه

ـ ۱۰ میلی‌لیتر ۴- متوکسی بنز آلدیید (طبق بند ۵-۱۲-۳-۲-۵)

ـ ۹۰ میلی‌لیتر اتانل (طبق بند الف-۳-۲-۲)

ـ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک (طبق بند الف-۳-۲-۴)

الف-۳-۳ وسایل لازم

علاوه بر وسایل آزمایشگاهی معمولی وسایل ویژه زیر نیز مورد نیاز است :

الف-۳-۳-۱ لوله آزمایش با ابعاد ۶۰×۷ میلی متر

الف-۳-۳-۲ سرنگ یا پی‌پت بسیار کوچک ۵و۱۰ میکرولیتری

الف-۳-۳-۳ تانک کروماتوگرافی

الف-۳-۳-۴ صفحات سلیکاژل با شناساگر فلوئورسانس۲۵۴

الف-۳-۳-۵ گلوله پشم شیشه‌ای

الف-۳-۴ روش کار

الف-۳-۴-۱ آزمونه

در حدود ۰/۰۵ گرم ۰/۱ نمونه آماده شده (طبق بند۱۱) را با تقریب ۰/۰۱ گرم توزین نمائید .

الف-۳-۴-۲ آماده کردن محلول

آزمونه (طبق بند ب-۳-۴-۱) را در لوله آزمایش (طبق بند ب-۳-۳-۱) ریخته و آنرا با یک قطره آب مرطوب کنید . ۲ تا ۳ دقیقه صبر کنید و سپس به آن یک میلی لیتر متانل (طبق بند ب-۳-۲-۱) بیافزائید . مدت ۳۰ دقیقه دور از نور قرار دهید و آنرا با گلوله کوچکی از پشم شیشه (طبق بندب-۳-۳-۵) صاف کنید .

الف-۳-۴-۳ روش تهیه نگاره کروماتوگرافی [1]

با سرنگ یا پیپت بسیار کوچک (طبق بند الف-۳-۳-۲) نوارهائی بطول ۲ تا ۴ سانتی‌متر بطور جداگانه با۵ میکرولیتر محلول مورد آزمون (طبق بند الف-۳-۴-۲) و ۵ میکرولیتر محلول استاندارد مرجع (طبق بندالف-۳-۲-۸) روی صفحات سلیکاژل (طبق بند الف-۳-۳-۴) لکه گذاری کنید . صفحه غشاء نازک را درون تانک کروماتوگرافی (طبق بند الف-۳-۳-۳) قرار دهید و با حلال شویش (طبق بند ب-۳-۲-۹)تا هنگامی که جبهه حلال ۱۰ سانتی‌متر پیش روی کند گسترش دهید و بگذارید حلال تبخیر شود و کروماتوگرام را در نور ماورای بنفش در طول موج ۲۵۴ نانومتر سپس در نور روز بررسی کنید . سپس روی غشا را ۱۰ میلی لیتر محلول ظهور (طبق بند الف-۳-۲-۱۰) بپاشید . مدت ۵ تا۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۵ تا ۱۱۰ درجه سیلسیوس حرارت دهید . در ضمن این عمل ، کروماتوگرام را تحت مشاهده قرار دهید .

الف-۳-۵ تفسیر برآمدها

الف-۳-۵-۱ مشاهده در نور روز

در ثلث پائینی کروماتوگرام سه لکه زرد مشاهده می‌شود . رنگ لکه‌ای که در نوار تحتانی قرار دارد شدیدتر است و از نظر رنگ و اندازه لکه مربوط بنفتل زرد بوده و کروسین را مشخص می‌کند .

الف -۳-۵-۲ مشاهده در نور فرابنفش

کروماتوگرامی که در نور فرابنفش در طول موج ۲۵۴ نانومتر مورد مشاهده قرار می‌گیرد چهار لکه فلورسانتی اصلی را نشان می‌دهد که سه‌تای آنها مربوط به لکه‌هائی است که در نور روز مشاهده می‌گردد و لکه چهارم دارای مقدار پیش روی بالاتر بوده (درحدود ۰/۵۵) و پیکروکروسین را نشان می‌دهد . یک یا دو لکه روشن تر فلورسانی در سطح قرمز Gسودان مشاهده می‌شود و بتاهیدروکسی سیکلوسیترال [2] و سافرانال را نشان می‌دهد .

ـ پس از پاشش محلول ظاهر کننده (طبق بند ۱۶-۳-۲-۱۰)کروسین برنگ سبز متمایل به خاکستری در میاید .

1- chromatogram

2-β- hydroxycyclocitral

ـ پیکروکروسین بنفش رنگ می‌شود . قبل از پاشیدن محلول ظهور ، کروماتوگرام نباید به ویژه در نقطه آغاز هیچ‌گونه لکه رنگی بخصوص لکه زرد نارنجی یا قرمز نشان دهد . زیرا این گونه لکه‌ها مربوط به فساد کروسین و یا حضور ماده رنگی خارجی می‌باشد .

پیوست ــ ب

(اطلاعاتی)

مثالی برای تفسیر نتایج آزمون میکروسکوپی

برای هر (تعداد میدان دید (سلولی) / ساختمان سلولی تعداد عناصر مشاهده شده را یادداشت کنید . درصد هر عنصر برای ساختمان طبیعی یا غیر طبیعی به شرح زیر باید محاسبه شود :

تعداد عناصر مشاهده شده N_1 تا N_n

تعداد کل عناصر $\sum_{i=1}^{n} N_i$

به صورت درصد بیان شود .**یک مثال از جدول ثبت در جدول (الف – ۱) آورده شده است .**

جدول ب – ۱- مثالی از جدول ثبت نتایج آزمون میکروسکوپی

عناصر مشاهده شده	**مجموع میدان های دید ۵ لام : $N_1 \ldots N_n$**	**٪ درصد نسبی**
کلاله	N_1	$\sum_{i=1}^{n} N_i / N_1$
خامه	N_2	$\sum_{i=1}^{n} N_i / N_2$
گرده پرچم تخمدان گلبرگ برگ ساقه	N_3	$\sum_{i=1}^{n} N_i / N_3$
مو پر،کرک،کاه مواد غیر آلی نشاسته موادگیاهی دیگر کریستال ه‌ی رنگ شده سلولهای غیر طبیعی۱	N_n	$\sum_{i=1}^{n} N_i / N_n$
سلول‌های منتشر نشده می توانند به عنوان سلولهای غیر طبیعی محسوب شوند.		

سپس با استفاده از جدول ب - ۲ برای مشاهدات هر اسلاید با دید ۴۰۰ برابر را یادداشت کنید .

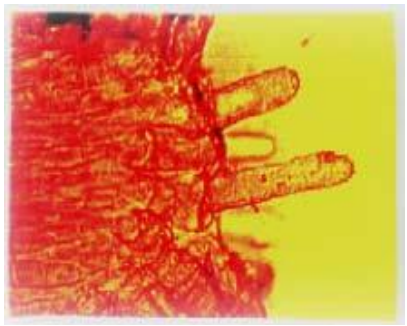
جدول ب- ۲ - جدول شمارش

ردیف	نوع نمونه	میدان ۱	میدان ۲	میدان ۳	میدان ۴	میدان ۵	میدان ۶	میدان ۷	میدان ۸	میدان ۹	میدان ۱۰
۱	کلاله										
۲	خامه										
۳	گرده										
۴	پرچم										
۵	تخمدان										
۶	گلبرگ										
۷	برگ										
۸	ساقه										
۹	مو										
۱۰	پر ، کرک ، کاه										
۱۱	مواد غیر آلی										
۱۲	نشاسته										
۱۳	مواد گیاهی دیگر										
۱۴	کریستالهای رنگ شده										
۱۵	سلولهای غیر طبیعی ۱										
۱ - سلولهای منتشر نشده می توانند به عنوان سلولهای غیر طبیعی محسوب شوند.											

پیوست پ

(اطلاعاتی)

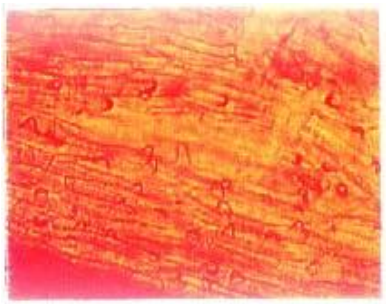
شکل های مرجع جهت آزمون میکروسکوپی



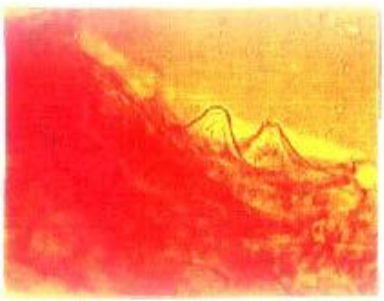
بزرگنمایی ۱۰۰ برابر

بزرگنمایی ۴۰۰ برابر

شکل پ- ۱ قسمت انتهایی کلاله برآمدگی کلاله ای



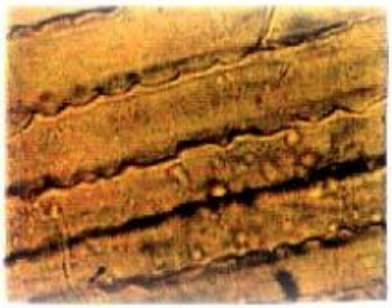
بزرگنمایی ۱۰۰ برابر



بزرگنمایی ۴۰۰ برابر

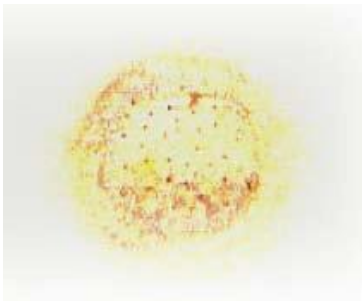
شکل پ- ۲ سلول‌های اپیدرم بالایی با برآمدگی گردکوچک

بزرگنمایی ۱۰۰ برابر

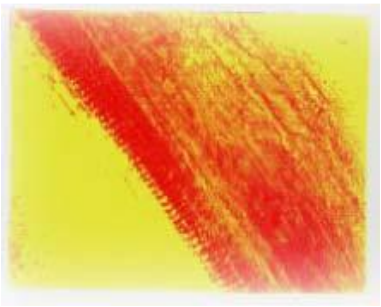


بزرگنمایی ۴۰۰ برابر

شکل پ-۳ سلول های خامه

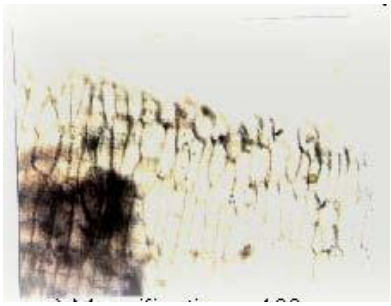


شکل پ- ۴ دانه های گرده



بزرگنمایی ۴۰۰ برابر **بزرگنمایی ۱۰۰ برابر**

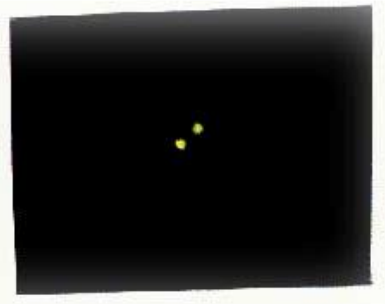
شکل پ - ۵آونده های هادی



بزرگنمایی ۴۰۰ برابر **بزرگنمایی ۱۰۰ برابر**

شکل پ – ۶ پرچم ها

بزرگنمایی ۱۰۰ برابر



بزرگنمایی ۴۰۰ برابر

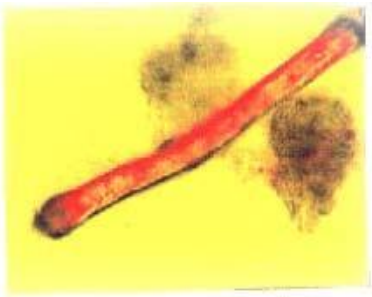
شکل پ – ۷ دانه های نشاسته درنورپلاریزه

بزرگنمایی ۱۰۰ برابر

بزرگنمایی ۴۰۰ برابر

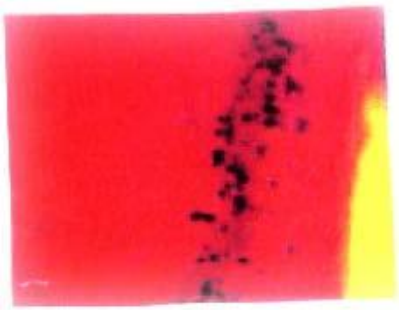
شکل پ - ۸ مواد غیرآلی

بزرگنمایی ۱۰۰ برابر



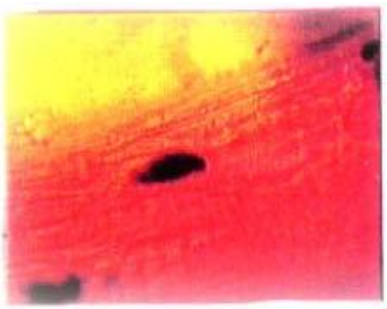
بزرگنمایی ۴۰۰ برابر

شکل پ – ۹ مواد خارجی



بزرگنمایی ۱۰۰ برابر

بزرگنمایی ۴۰۰ برابر



بزرگنمایی ۱۰۰ برابر **بزرگنمایی ۴۰۰ برابر**

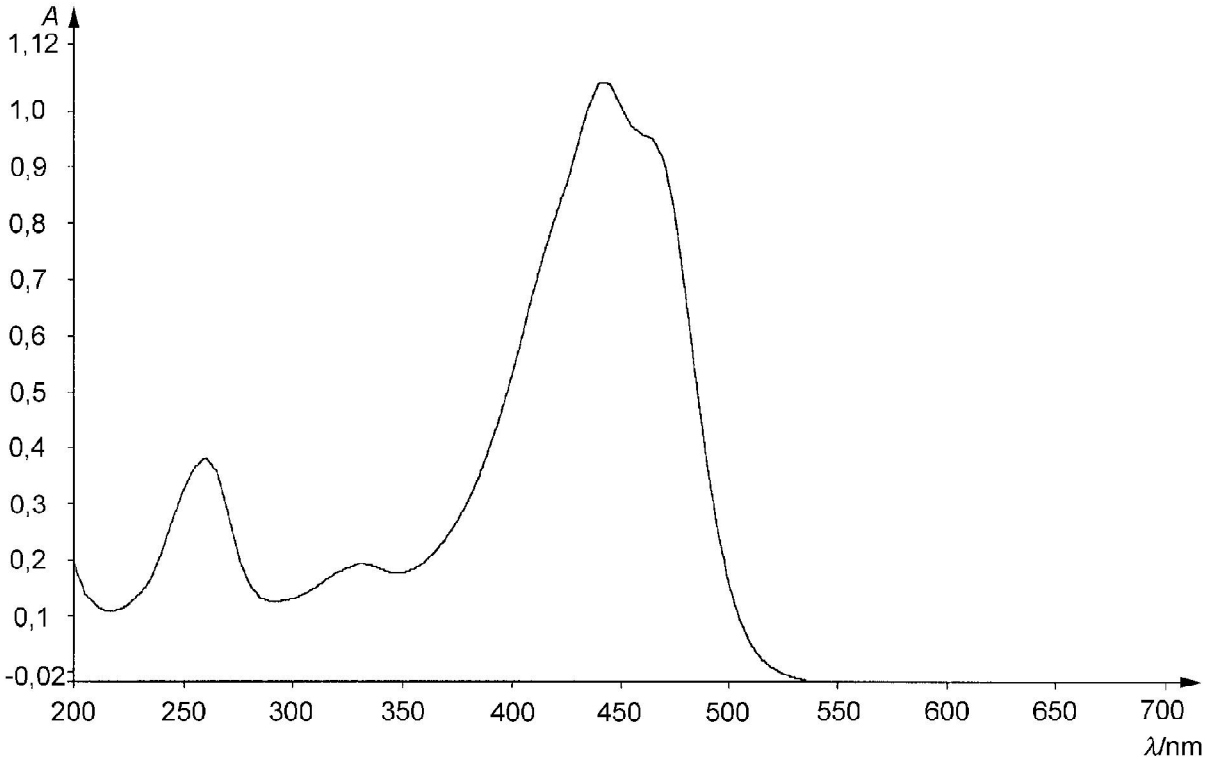
شکل پ – ۱۰ سلولهای رنگی علیرغم محلول شفاف کننده

یادآوری : درمورد اصل این سلول‌های رنگی هنوز توضیح علمی داده نشده است .

پیوست ت

نمونه نمودارهای حاصل تحت شرایط آزمون

(اطلاعاتی)

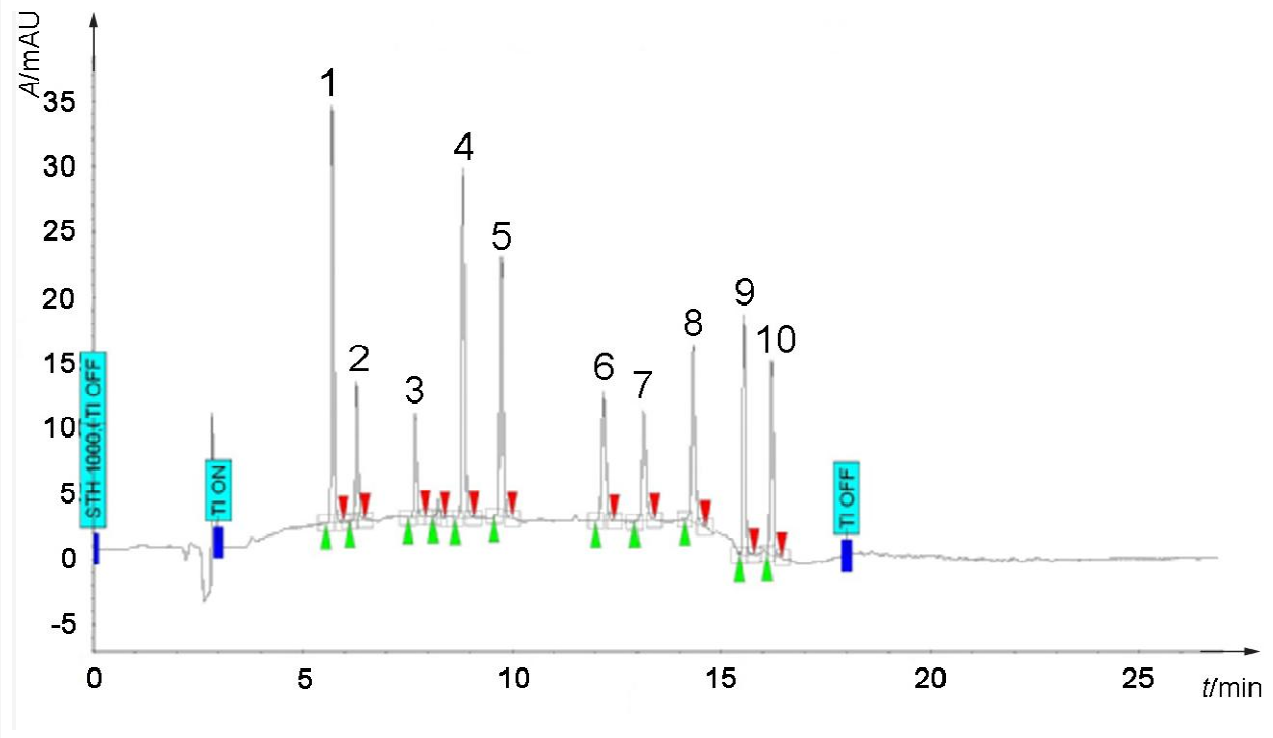


شکل ت - ۱ طیف گرفته شده در ناحیه فرابفش – مریی بین ۲۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر از عصاره آبی زعفران

پیوست ث

(اطلاعاتی)

مثالی از نمودارهای کروماتوگرام

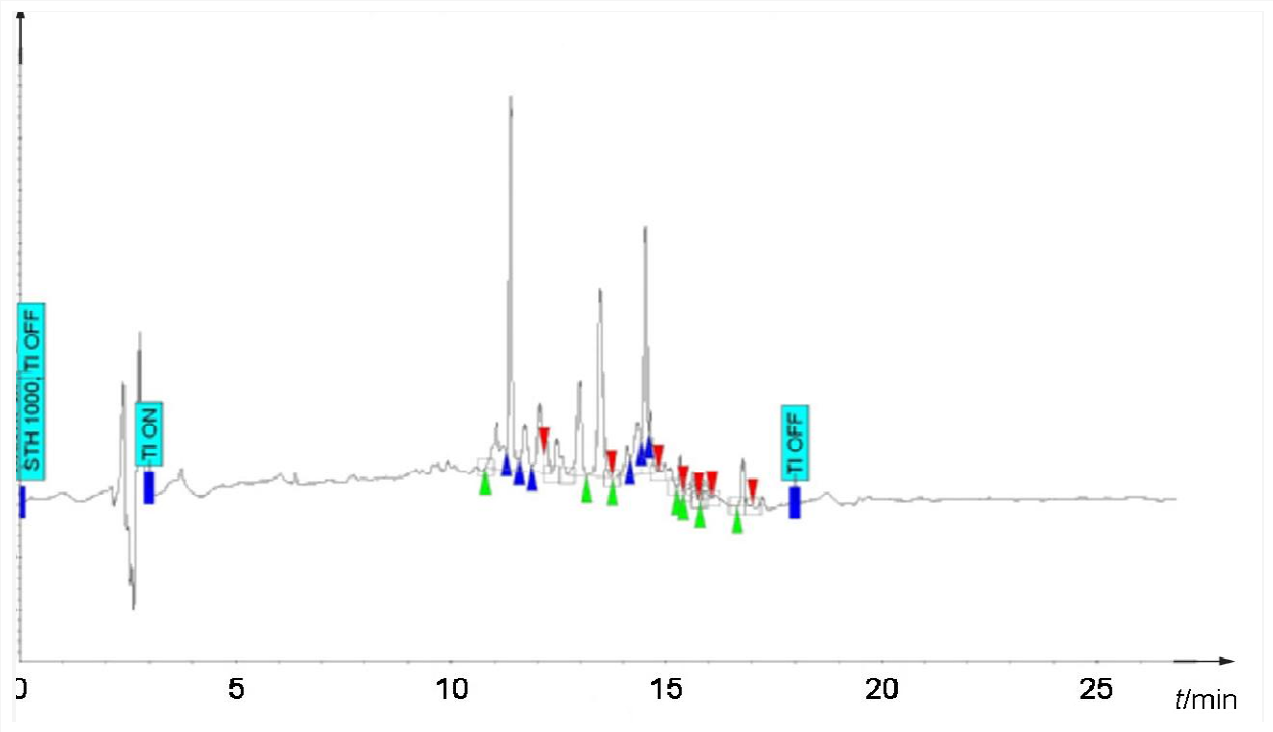


جذب A :

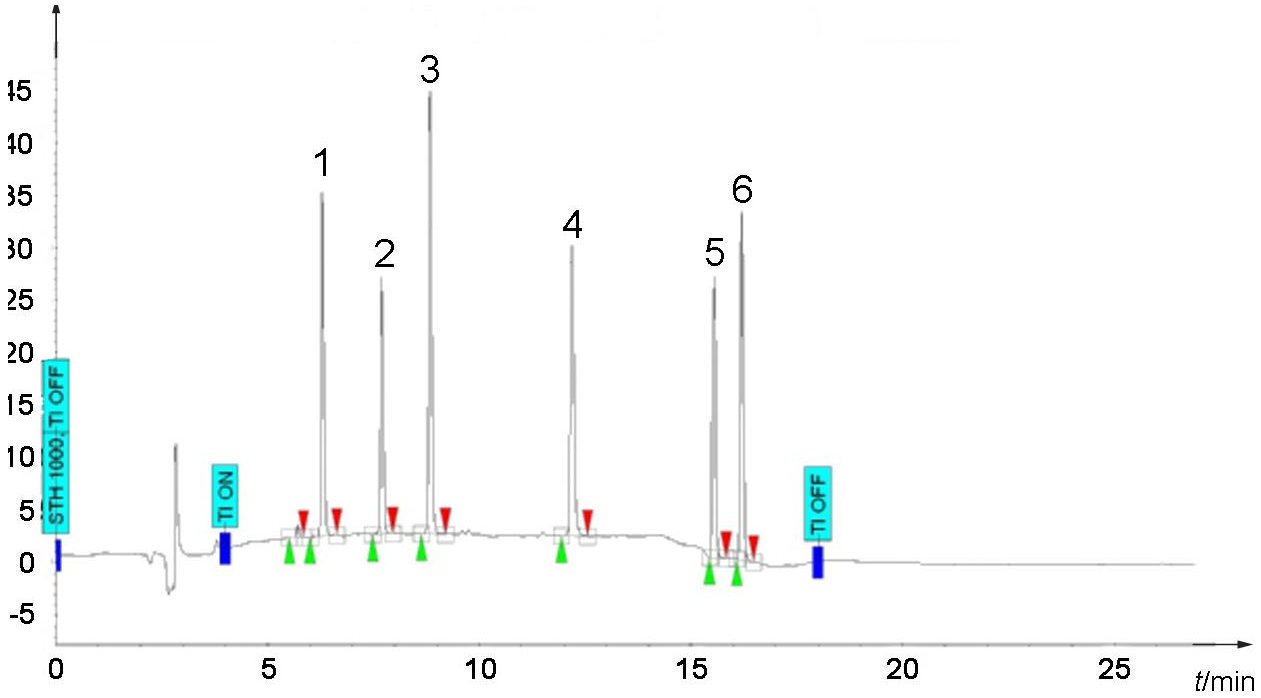
زمان t:

1 tartrazine	5,71
2 amaranth	6,29
3 ponceau 4R	7,69
4 sunset yellow	8,84
5 yellow 2G	9,75
6 azorubin	12,17
7 quinoline yellow (isomer 1)	13,15
8 quinoline yellow (isomer 2)	14,33
9 orange II	15,55
10 rocelline	16,20

شکل ث -۱ کروماتوگرام تحت شرایط آزمون استاندارد در محدوده ۴۴۰ نانومتر ۱ میلی گرم / کیلو گرم ا



شکل ث -۲ کروماتوگرام تحت شرایط آزمون استاندارد در محدوده ۴۴۰ نانومتر بلانک آن نمونه زعفران

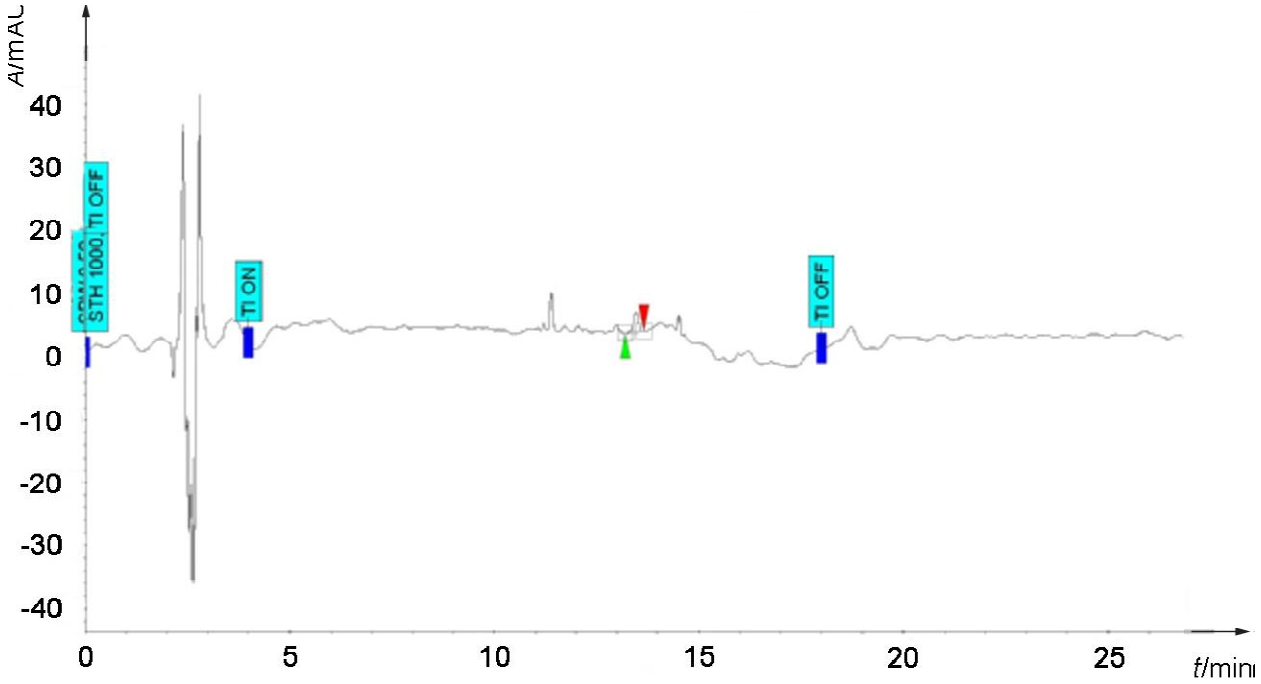


A جذب

t زمان min

1 amaranth	6,29	
2 ponceau 4R	7,69	
3 sunset yellow	8,84	
4 azorubin	12,17	
5 orange II	15,55	
6 rocelline	16,20	

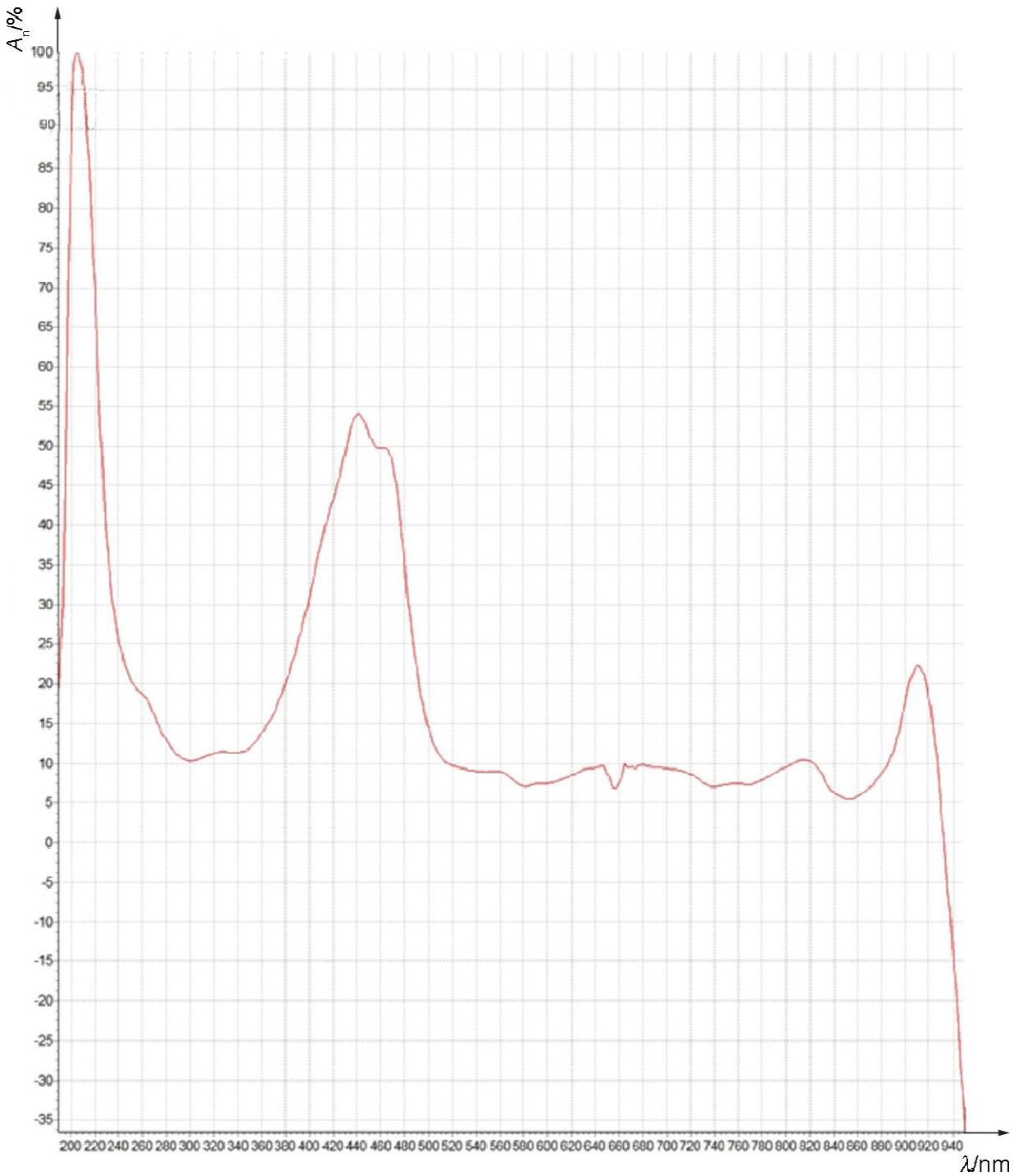
شکل ث -۳ کروماتوگرام تحت شرایط آزمون استاندارد در محدوده ۵۰۶ نانومتر ۱ میلی گرم / کیلو گرم



جذب : A

زمان T:

شکل ث -۴ کروماتوگرام تحت شرایط آزمون استاندارد در محدوده ۵۰۶ نانومتر بلانک آن نمونه زعفران



شکل ث -۵ قله طیف در ۱۱/۷۰ دقیقه در نمونه که بلانک آن زعفران در شکل پ- ۲ نشان داده شده است