



جمهوری اسلامی ایران  
Islamic Republic of Iran

سازمان ملی استاندارد ایران

Iran National Standards Organization



استاندارد ملی ایران

۲۳۶۰۷

چاپ اول

۱۴۰۲

INSO

23607

1st Edition

2023

زعفران - اندازه‌گیری سافرانال،  
پیکروکروسین، کروسین کل و کروسین  
به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا -  
روش آزمون

**Saffron –Determination of safranal,  
picrocrocin, total crocins and crocetin by  
High Performance Liquid Chromatography  
(HPLC)-Test method**

ICS:67.220.10

استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۶۰۷ (چاپ اول): سال ۱۴۰۲

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران-ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۱۰۳ و ۸۸۸۸۷۰۸۰

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۲۸۰۶۰۳۱ (۰۲۶)

دورنگار: ۳۲۸۰۸۱۱۴ (۰۲۶)

رایانامه: [standard@inso.gov.ir](mailto:standard@inso.gov.ir)

وبگاه: <http://www.inso.gov.ir>

### **Iran National Standards Organization (INSO)**

No. 2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: [standard@inso.gov.ir](mailto:standard@inso.gov.ir)

Website: <http://www.inso.gov.ir>

## به نام خدا

### آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک ماده ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، وظیفه تعیین، تدوین، به روز رسانی و نشر استانداردهای ملی را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)<sup>۱</sup>، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)<sup>۲</sup> و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)<sup>۳</sup> است و به عنوان تنها رابط<sup>۴</sup> کمیسیون کدکس غذایی (CAC)<sup>۵</sup> در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استاندارد کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. همچنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، 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 Legals)

4- Contact point

5- Codex Alimentarius Commission

## کمیسیون فنی تدوین استاندارد

« زعفران - اندازه‌گیری سافرانال، پیکروکروسین، کروسین کل و کروسین  
به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا - روش آزمون »

### رئیس:

رضادوست، حسن  
(دکتری فیتوشیمی)

دانشگاه شهید بهشتی - پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه  
دارویی

### دبیر:

احمدی، نادیا  
(دکتری علوم و مهندسی صنایع غذایی)

پژوهشگاه استاندارد - پژوهشکده صنایع غذایی و فرآورده‌های  
کشاورزی

### اعضاء: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

آریامنش، خوشنود  
(کارشناسی‌ارشد شیمی تجزیه)

آزمایشگاه پرتوبشاش (سهامی خاص)

افضلیان، فرشید  
(کارشناسی‌ارشد شیمی)

اداره کل استاندارد استان خراسان رضوی

الله‌وردی‌زاده دوست‌محمد، سارا  
(کارشناسی‌ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی)

شرکت زعفران مصطفوی مهر ایرانیان (سهامی خاص)

بیگلری، سمیه  
(کارشناسی مهندسی کشاورزی - علوم و صنایع غذایی)

آزمایشگاه واحد زعفران ویرامان (سهامی خاص)

تقتمش، آنا  
(کارشناسی علوم و مهندسی صنایع غذایی)

شرکت زعفران اسفندان (گلیران) (سهامی خاص)

تقی هروی، ندا  
(کارشناسی‌ارشد مهندسی کشاورزی - اصلاح نباتات)

شرکت شهر بابانا (سهامی خاص)

درستی، صدیقه  
(کارشناسی‌ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی)

سازمان ملی استاندارد ایران - دفتر نظارت بر استاندارد صنایع  
غذایی، آرایشی، بهداشتی و حلال

دهجی، مه‌ری  
(کارشناسی علوم و مهندسی صنایع غذایی)

شرکت تک‌چین الماس سحر (سهامی خاص)

**اعضا:** (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

**سمت و /یا محل اشتغال:**

ذکائیان، سحر (کارشناسی ارشد مهندسی شیمی)	شرکت زعفران مصطفوی مهر ایرانیان (سهامی خاص)
رشیدی، معصومه (کارشناسی ارشد شیمی تجزیه)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی - سازمان غذا و دارو - اداره کل آزمایشگاه‌های مرجع غذا، دارو و تجهیزات پزشکی
رضایی، مریم (دکتری داروسازی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی - سازمان غذا و دارو - اداره کل آزمایشگاه‌های مرجع غذا، دارو و تجهیزات پزشکی
رضوی آذرخیای، کمال (دکتری داروسازی)	وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی - سازمان غذا و دارو - اداره کل آزمایشگاه‌های مرجع غذا، دارو و تجهیزات پزشکی
رهنما، سعیده (کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی)	آزمایشگاه زعفرانچی آزمون (سهامی خاص)
زمان‌زاده، فرشته (کارشناسی علوم و مهندسی صنایع غذایی)	شرکت یاقوت گستر فردوس (سهامی خاص)
سلیمانی دینانی، پرویز (کارشناسی ارشد شیمی - محیط زیست)	شرکت پژوهشی کیمیا سنگرف پارس (سهامی خاص)
شکوری، عطاءاله (دکتری داروسازی)	دانشگاه شهید بهشتی
صفایی، آزاده (کارشناسی علوم و مهندسی صنایع غذایی)	شرکت زعفران مسعود عدلی (سهامی خاص)
علی‌اکبرزاده، غزاله (دکتری شیمی تجزیه)	پژوهشگاه استاندارد - پژوهشکده صنایع غذایی و فرآورده‌های کشاورزی
علیمردانی، آراسته (کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی)	شرکت نوین زعفران (سهامی خاص)
عین‌افشار، سودابه (دکتری علوم و مهندسی صنایع غذایی)	مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی

اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

سمت و / یا محل اشتغال:

فتوحی، لیلا  
(دکتری بیوفیزیک)

شرکت شیمی دانان ویرا (سهامی خاص)

فرجی، محمد  
(دکتری شیمی تجزیه)

پژوهشگاه استاندارد- پژوهشکده صنایع غذایی و فرآورده‌های  
کشاورزی

فرنام‌نیا، میلاد  
(کارشناسی‌ارشد برنامه‌ریزی)

مرکز همکاری‌های تحول و پیشرفت ریاست جمهوری

قاسم‌پور، علیرضا  
(دکتری شیمی تجزیه)

دانشگاه شهید بهشتی - پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی

قلاسی مود، فرحناز  
(دکتری علوم و مهندسی صنایع غذایی)

سازمان ملی استاندارد ایران - دفتر مطالعات تطبیقی و  
استانداردهای بین‌المللی

کامیار، مرضیه  
(کارشناسی‌ارشد شیمی تجزیه)

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی - سازمان غذا و دارو -  
اداره کل آزمایشگاه‌های مرجع غذا، دارو و تجهیزات پزشکی

کامکار قربان‌زاده، انسیه  
(کارشناسی مهندسی شیمی - صنایع غذایی)

شرکت زعفران مصطفوی مهر ایرانیان (سهامی خاص)

محسنی، عاطفه  
(کارشناسی‌ارشد شیمی تجزیه)

شرکت بازرسی کالای تجارت (سهامی خاص)

محمدخانی، الهام  
(کارشناسی‌ارشد شیمی تجزیه)

شرکت زردبند (سهامی خاص)

محمودی، فهیمه  
(دکتری علوم و مهندسی صنایع غذایی)

موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی

مشعوفی، میترا  
(کارشناسی علوم و مهندسی صنایع غذایی)

شرکت زعفران بهرامن (سهامی خاص)

ملاکیان، شهره  
(کارشناسی‌ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی)

اداره کل استاندارد استان خراسان رضوی

**اعضا:** (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

نوجوان، فرشته

(کارشناسی مهندسی شیمی - صنایع غذایی)

نورمحمدی، مهدی

(کارشناسی ارشد برنامه ریزی)

نعمتی، سارا

(کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی)

نیکونژاد، مریم

(دکتری داروسازی)

وزیرزاده، بیتا

(کارشناسی ارشد مهندسی شیمی - صنایع غذایی)

هدایتی، وحیده

(دکتری زیست شناسی)

**ویراستار:**

رحمانی، کوروش

(دکتری علوم و مهندسی صنایع غذایی)

**سمت و / یا محل اشتغال:**

شرکت توس زعفران برادران (سهامی خاص)

مرکز همکاری های تحول و پیشرفت ریاست جمهوری

شرکت نوین زعفران (سهامی خاص)

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی - سازمان غذا و دارو -

اداره کل آزمایشگاه های مرجع غذا، دارو و تجهیزات پزشکی

شرکت بازرگانی صباغ زاده (سهامی خاص)

شرکت داناژن پژوه (سهامی خاص)

سازمان ملی استاندارد ایران - مرکز ملی تایید صلاحیت ایران

## فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ط	پیش گفتار
۱	۱ هدف و دامنه کاربرد
۱	۲ مراجع الزامی
۱	۳ اصطلاحات و تعاریف
۲	۴ روش آزمون
۷	۵ گزارش آزمون
۹	پیوست الف (آگاهی دهنده) کروماتوگرام‌های مربوط به اندازه‌گیری اجزای کروسیتین، کروسین کل، سافرانال، پیکروکروسین
۱۰	پیوست ب (آگاهی دهنده) کروماتوگرام‌های روی هم افتاده مربوط به اندازه‌گیری اجزای کروسیتین، کروسین کل، سافرانال و پیکروکروسین
۱۱	پیوست پ (آگاهی دهنده) کروماتوگرام‌های الگوی جذب مولکول‌های کروسین ایزومر ترانس، کروسین ایزومر سیس، پیکروکروسین و سافرانال در ناحیه ۲۰۰nm الی ۷۰۰nm
۱۲	پیوست ت (آگاهی دهنده) ترتیب شویش اجزای اصلی کلاله خشک شده زعفران
۱۳	پیوست ث (آگاهی دهنده) نتایج معتبرسازی روش آزمون



## پیش‌گفتار

استاندارد «زعفران - اندازه‌گیری ساfranال، پیکروکروسین، کروسین کل و کروسین به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا-روش آزمون» که پیش‌نویس آن بر اساس پژوهش انجام شده تهیه و تدوین شده است، پس از بررسی در کمیسیون‌های مربوط، در یک‌هزار و نهصد و پنجاه و دومین اجلاس کمیته ملی صنایع غذایی مورخ ۱۴۰۲/۰۵/۲۹ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۷ قانون تقویت و توسعه نظام استاندارد، ابلاغ شده در دی ماه ۱۳۹۶، به‌عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۵ (استانداردهای ملی ایران - ساختار و شیوه نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون فنی مربوط مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

نتیجه پژوهشی که برای تهیه و تدوین این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

- رضادوست، حسن و همکاران، طرح تحقیقاتی کنترل کیفیت متابولیتی عصاره کلالة زعفران نقاط مختلف کشور، سال‌های ۱۳۹۸ تا ۱۴۰۰، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، قرارداد شماره ۴۶۷/۶۰۰/ص

## زعفران - اندازه‌گیری سافرانال، پیکروکروسین، کروسین کل و کروسین به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا - روش آزمون

### ۱ هدف و دامنه کاربرد

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روشی برای اندازه‌گیری ترکیبات سافرانال، پیکروکروسین، کروسین کل و کروسین در زعفران به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا است.

این استاندارد برای انواع زعفران خشک‌شده حاصل از کلاله‌ی گل‌های زعفران زراعی با نام علمی *Crocus sativus* L. به‌صورت رشته‌ای<sup>۱</sup>، رشته‌ای بریده<sup>۲</sup>، پودر<sup>۳</sup> و عصاره کاربرد دارد.

### ۲ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به‌صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

۱-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱-۲۵۹، زعفران - ویژگی‌ها

۲-۲ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸، آب مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه - ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

### ۳ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، علاوه بر اصطلاحات و تعاریف استاندارد ملی ایران شماره ۱-۲۹۵، تعاریف زیر نیز کاربرد دارند:

- 
- 1- Filament
  - 2 - Cut filament
  - 3 - Powder form

۱-۳

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

HPLC

### High Performance Liquid Chromatography

یکی از روش‌های کروماتوگرافی است که در آن فاز ساکن، در یک ستون فلزی پر شده و فاز متحرک (مایع) با فشار از آن عبور می‌کند. تمایل متفاوت ترکیبات مختلف نسبت به فازهای ساکن و متحرک، منجر به جداسازی اجزای مخلوط می‌شود.

۲-۳

کروماتوگرام

### chromatogram

خروجی دستگاه کروماتوگرافی مایع با آشکار ساز ناحیه مرئی-ماورای بنفش طیفی در بعد زمان و شدت جذب است که جداسازی ترکیبات یا اجزای تشکیل‌دهنده عصاره حاصل از عصاره‌گیری کلالة زعفران را نشان می‌دهد.

۴ روش آزمون

۱-۴ مواد و/یا واکنشگرها

تمام محلول‌ها و مواد مورد استفاده باید دارای کیفیت مناسب برای آزمون بوده و آب مورد استفاده مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸، باشد.

۱-۱-۴ محلول استاندارد کروسیتین با خلوص ۹۵٪

۲-۱-۴ محلول استاندارد کروسین کل با درصد خلوص ۹۰٪

۳-۱-۴ محلول استاندارد کروسین ۱ با خلوص ۹۵٪

۴-۱-۴ محلول استاندارد پیکروکروسین با خلوص ۹۵٪

۵-۱-۴ محلول استاندارد سافرانال با خلوص ۷۵٪

۶-۱-۴ متانول با درجه خلوص HPLC

۷-۱-۴ استونیتریل با درجه خلوص HPLC

۸-۱-۴ دی متیل سولفوکساید<sup>۱</sup> (DMSO) با درجه خلوص HPLC

۹-۱-۴ آب مقطر با درجه خلوص HPLC

۱۰-۱-۴ محلول استاندارد ذخیره کروسیتین با غلظت ۱۰۰ mg/L

۱ mg از پودر استاندارد کروسیتین (طبق زیربند ۴-۱-۱) را وزن کرده و به بالن حجمی ۱۰ mL منتقل کرده و با حلال دی متیل سولفوکساید (طبق زیربند ۴-۱-۸) به حجم برسانید.

۱۱-۱-۴ محلول استاندارد ذخیره کروسین کل با غلظت ۵۰۰ mg/L

۵ mg از پودر استاندارد کروسین کل (طبق زیربند ۴-۱-۲) را وزن کرده و به بالن حجمی ۱۰ mL منتقل کرده و با حلال متانول-آب (با نسبت ۸۰ به ۲۰) به حجم برسانید.

۱۲-۱-۴ محلول استاندارد ذخیره کروسین ۱ با غلظت ۵۰۰ mg/L

۵ mg از پودر استاندارد کروسین ۱ (طبق زیربند ۴-۱-۳) را وزن کرده و به بالن حجمی ۱۰ mL منتقل کرده و با حلال متانول-آب (با نسبت ۸۰ به ۲۰) به حجم برسانید.

۱۳-۱-۴ محلول استاندارد ذخیره پیکروکروسین با غلظت ۵۰۰ mg/L

۵ mg از پودر استاندارد پیکروکروسین (طبق زیربند ۴-۱-۴) را وزن کرده و به بالن حجمی ۱۰ mL منتقل کرده و با حلال متانول-آب (با نسبت ۸۰ به ۲۰) به حجم برسانید.

۱۴-۱-۴ محلول استاندارد ذخیره سافرانال با غلظت ۱۰۰۰ mg/L

۱۴ μL از محلول استاندارد سافرانال (طبق زیربند ۴-۱-۵) را وزن کرده و به بالن حجمی ۱۰ mL منتقل کرده و با حلال متانول-آب (با نسبت ۸۰ به ۲۰) به حجم برسانید.

۱۵-۱-۴ محلول استاندارد مخلوط استانداردها

۱ mg کروسیتین، ۱۴/۵ mg کروسین ۱، ۱۰ mg پیکروکروسین و ۲۵ mg سافرانال را وزن کرده و به بالن حجمی ۱۰ mL منتقل کرده و با حلال متانول-آب (با نسبت ۸۰ به ۲۰) به حجم برسانید.

۱۶-۱-۴ محلول‌های استاندارد جهت رسم منحنی کالیبراسیون

رقت‌های مناسبی از محلول‌های استاندارد در گستره‌های ۵ μg/mL تا ۵۰۰ μg/mL برای پیکروکروسین، ۰/۵ μg/mL تا ۱۰۰ μg/mL برای سافرانال و ۱۰ μg/mL تا ۵۰۰ μg/mL برای کروسین ۱ در حلال متانول-آب (با نسبت حجمی ۸۰ به ۲۰) و ۰/۵ μg/mL تا ۱۰۰ μg/mL برای کروسیتین در حلال دی‌متیل سولفوکساید تهیه کنید.

1 -Dimethyl sulfoxide (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS)

استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۶۰۷ (چاپ اول): سال ۱۴۰۲

۴-۱-۱۷ فاز متحرک A (آب مقطر با درجه خلوص HPLC)

در صورتی که دستگاه کروماتوگرافی مجهز به سیستم گاز زدایی نیست، فاز متحرک را حداقل به مدت زمان ۳۰ min در حمام اولتراسونیک، گاز زدایی کنید.

۴-۱-۱۸ فاز متحرک B (استونیتریل با درجه خلوص HPLC)

۴-۲ وسایل

۴-۲-۱ ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۰۱ g

۴-۲-۲ حمام اولتراسونیک

۴-۲-۳ فیلتر سرسرنگی یکبار مصرف از جنس نایلون یا استات سلولز با قطر بدنه ۱۳mm و قطر منافذ ۰/۴۵μm

۴-۲-۴ دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با حداقل ملحقات زیر:

۴-۲-۴-۱ پمپ دو کاناله

۴-۲-۴-۲ آشکارساز آرایه دیودی<sup>۱</sup>

۴-۲-۴-۳ سیستم گاز زدایی<sup>۲</sup>

۴-۲-۴-۴ ستون کروماتوگرافی فاز معکوس C<sub>18</sub> با ابعاد ۲۵۰mm × ۴/۶mm × ۵μm

جهت افزایش طول عمر و کاهش احتمال آلودگی ستون‌ها، از ستون محافظ استفاده کنید. استفاده از سایر ستون‌های مشابه در صورت داشتن قدرت تفکیک مناسب نیز قابل کاربرد است.

۴-۲-۴-۵ لوپ تزریق با حجم ۲۰μl

۴-۲-۴-۶ سیستم تزریق خودکار یا دستی

۴-۲-۴-۷ شرایط دستگاه جهت تزریق به شرح زیر:

۴-۲-۴-۷-۱ سرعت جریان فاز متحرک ۱/۰ mL/ min

۴-۲-۴-۷-۲ طول موج اندازه‌گیری ۲۵۰ nm ، ۳۰۸ nm ، ۴۴۰ nm

۴-۲-۴-۷-۳ زمان اجرا<sup>۳</sup> ۵۰ min

---

1-Diod array detector  
2-Degasser  
3-Run time

۴-۲-۴-۷-۴ شویس گرادایانی

جداسازی اجزای اصلی زعفران با شویس گرادایانی با استفاده از فاز متحرک A (به زیربند ۴-۱-۱۷ مراجعه شود) و فاز متحرک B (به زیربند ۴-۱-۱۸ مراجعه شود) مطابق با جدول ۱ انجام شود.

جدول ۱- برنامه شستشوی گرادایانی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

ردیف	زمان (min)	سرعت جریان فاز متحرک (mL /min)	فاز آبی (%)	فاز آلی (%)
۱	۰	۱	۹۰	۱۰
۲	۵	۱	۹۰	۱۰
۳	۲۵	۱	۲۰	۸۰
۴	۳۰	۱	۲۰	۸۰
۵	۳۵	۱	۰	۱۰۰
۶	۴۰	۱	۰	۱۰۰
۷	۴۵	۱	۹۰	۱۰
۸	۵۰	۱	۹۰	۱۰

۴-۳ روش اجرای آزمون

۴-۳-۱ آماده‌سازی آزمایش

ابتدا مقدار کافی کلاله خشک‌شده زعفران در یک هاون چینی بسایید و سپس آزمایش‌ای با وزن ۶۰ mg به‌وسیله ترازو (طبق زیربند ۴-۲-۱) وزن کنید.

محلول را پس از سانتریفوژ، صاف کرده و از آن به‌ترتیب برای اندازه‌گیری اجزای کروسستین و سافرانال و از محلول ۵ بار رقیق‌شده آن برای اندازه‌گیری اجزای کروسین کل و پیکروکروسین استفاده کنید.

به‌منظور عصاره‌گیری، آزمایش را به بالن حجمی ۱۰ mL منتقل کرده و مقدار ۸ mL حلال متانول - آب (با نسبت حجمی ۹۰ به ۱۰) به آن اضافه کنید. سپس آزمایش را به مدت زمان ۱۵ min تا ۲۰ min با استفاده از دستگاه اولتراسونیک مورد استخراج قرار داده تا در نهایت پودر کلاله زعفران بی‌رنگ شود. در این مرحله محلول را به بالن حجمی ۱۰ mL منتقل کرده و با حلال متانول-آب (با نسبت ۹۰ به ۱۰) به حجم برسانید.

محلول را پس از سانتریفوژ کردن با فیلتر سرسرنگی صاف کرده و از آن به‌ترتیب برای اندازه‌گیری اجزای کروسستین و سافرانال و از محلول ۵ بار رقیق‌شده آن با حلال متانول-آب (با نسبت ۹۰ به ۱۰) برای اندازه‌گیری اجزای کروسین کل و پیکروکروسین استفاده کنید.

۴-۳-۲ آماده‌سازی ستون پیش از تزریق

قبل از تزریق محلول‌های استاندارد، به مدت زمان کمینه ۱۰ min ترکیب درصدی از فاز متحرک A (طبق زیربند ۴-۱-۱۷) و فاز متحرک B (طبق زیربند ۴-۱-۱۸) را با سرعت جریان ۱٫۰ mL / min از ستون عبور دهید.

#### ۴-۳-۳ تزریق محلول‌های استاندارد

رقت‌های مناسب تهیه شده از محلول‌های استاندارد پیکروکروسین، سافرانال، کروسین کل و کروستین (طبق زیربند ۴-۱-۱۶) و / یا محلول استاندارد مخلوط استانداردها (طبق زیربند ۴-۱-۱۵) را جهت رسم منحنی کالیبراسیون به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق کنید. محلول‌های استاندارد پیکروکروسین، سافرانال، کروسین کل و کروستین را به ترتیب از غلظت کمتر به غلظت بیشتر به دستگاه کروماتوگرافی تزریق کنید.

#### ۴-۴-۴ شستشوی ستون پس از آزمون

ستون را با آب مقطر (طبق زیربند ۴-۱-۹) کمینه به مدت زمان ۱۵ min و سپس به مدت زمان ۱۵ min با استونیتریل (طبق زیربند ۴-۱-۷) با سرعت جریان ۱٫۰ mL / min شستشو دهید.

#### ۴-۴-۵ شناسایی کروماتوگرام اجزاء

شناسایی هر کدام از اجزای مورد آزمون را با انطباق زمان بازداری آن‌ها با زمان بازداری استاندارد مربوط به هر جزء در طول موج ماکزیمم ( $\lambda_{max}$ ) مربوط به همان جزء و با توجه به الگوی جذبی آن‌ها در ناحیه مرئی-فرابنفش انجام دهید (به پیوست ب مراجعه شود). به منظور اندازه‌گیری کمی کروستین و کروسین کل، کروماتوگرام باید در طول موج ۴۴۰ nm و برای اندازه‌گیری پیکروکروسین و سافرانال کروماتوگرام به ترتیب در طول موج‌های ۲۵۰ nm و ۳۰۸ nm ثبت شوند. پس از مشخص کردن پیک‌های مربوط به هر کدام از اجزای مورد آزمون با استفاده از روش انتگرال‌گیری سطح زیرمنحنی هر کدام از پیک‌ها را مشخص کنید. برای کسب آگاهی در مورد کروماتوگرام‌های مربوط به اندازه‌گیری اجزای کروستین، کروسین کل، سافرانال و پیکروکروسین به پیوست الف و در مورد کروماتوگرام‌های روی هم افتاده مربوط به اندازه‌گیری اجزای کروستین، کروسین کل، سافرانال و پیکروکروسین در زعفران به منظور مشخص شدن محدوده‌های جداسازی به پیوست ب مراجعه شود.

#### ۴-۴-۶ محاسبه

با استفاده از سطح زیرمنحنی به دست آمده برای رقت‌های مناسب تهیه شده از محلول‌های استاندارد پیکروکروسین، سافرانال، کروسین کل و کروستین (طبق زیربند ۴-۱-۱۶)، منحنی‌های کالیبراسیون مربوط را رسم کنید. با استفاده از معادلات خط هر یک از اجزای مورد آزمون، غلظت اجزای مورد نظر در زعفران را مطابق با فرمول ۱ محاسبه کنید.

$$C = \frac{(Y-b)}{a} \quad (1)$$

که در آن:

$C$  مقدار عددی غلظت اجزای موردنظر در نمونه برحسب  $\text{mg/L}$ ؛

$Y$  مقدار عددی سطح زیر پیک مربوط به اجزای موردنظر در نمونه مورد آزمون؛

$b$  مقدار عددی عرض از مبدأ منحنی کالیبراسیون ترکیب استاندارد؛

$a$  مقدار عددی شیب منحنی کالیبراسیون ترکیب استاندارد.

در مورد اندازه‌گیری کروستین کل، به‌جای مقدار  $Y$  مجموع سطح زیر تمام پیک‌هایی که به کروستین‌ها نسبت داده می‌شوند، در رابطه محاسبه می‌شود.

درصد نهایی هرکدام از ترکیب‌های کروستین کل، کروستین، پیکروکروستین و سافرانال در زعفران را مطابق با فرمول ۲ محاسبه کنید.

$$m\% = \frac{C \times V}{\% St.purity \times M} \times 100 \quad (2)$$

که در آن:

$m$  مقدار درصد اجزای موردنظر در نمونه برحسب  $\%$ ؛

$C$  مقدار غلظت اجزای موردنظر در عصاره زعفران مورد آزمون برحسب  $\mu\text{g/mL}$ ؛

$V$  مقدار حجم بالن مورد استفاده برای عصاره‌گیری برحسب  $\text{mL}$ ؛

$St.purity$  مقدار درصد خلوص ترکیب استاندارد برحسب  $\%$ ؛

$M$  مقدار جرم عصاره زعفران مورد آزمون بر حسب  $\text{mg}$ .

لازم به‌ذکر است که ضریب همبستگی نقاط منحنی کالیبراسیون باید بزرگ‌تر از ۰/۹۹ باشد.

## ۵ گزارش آزمون

گزارش آزمون باید حداقل دارای آگاهی‌های زیر باشد:

۱-۵ مشخصات کامل نمونه؛

۲-۵ تاریخ دریافت نمونه؛

۳-۵ تاریخ انجام آزمون؛

۴-۵ مقادیر کمی اندازه‌گیری شده همراه با واحد اندازه‌گیری؛

۵-۵ روش آزمون به‌کار رفته با ارجاع به این استاندارد؛

۶-۵ نام و نام خانوادگی و امضای آزمون‌کننده و تاییدکننده؛

۷-۵ نتیجه به‌دست آمده از آزمون؛



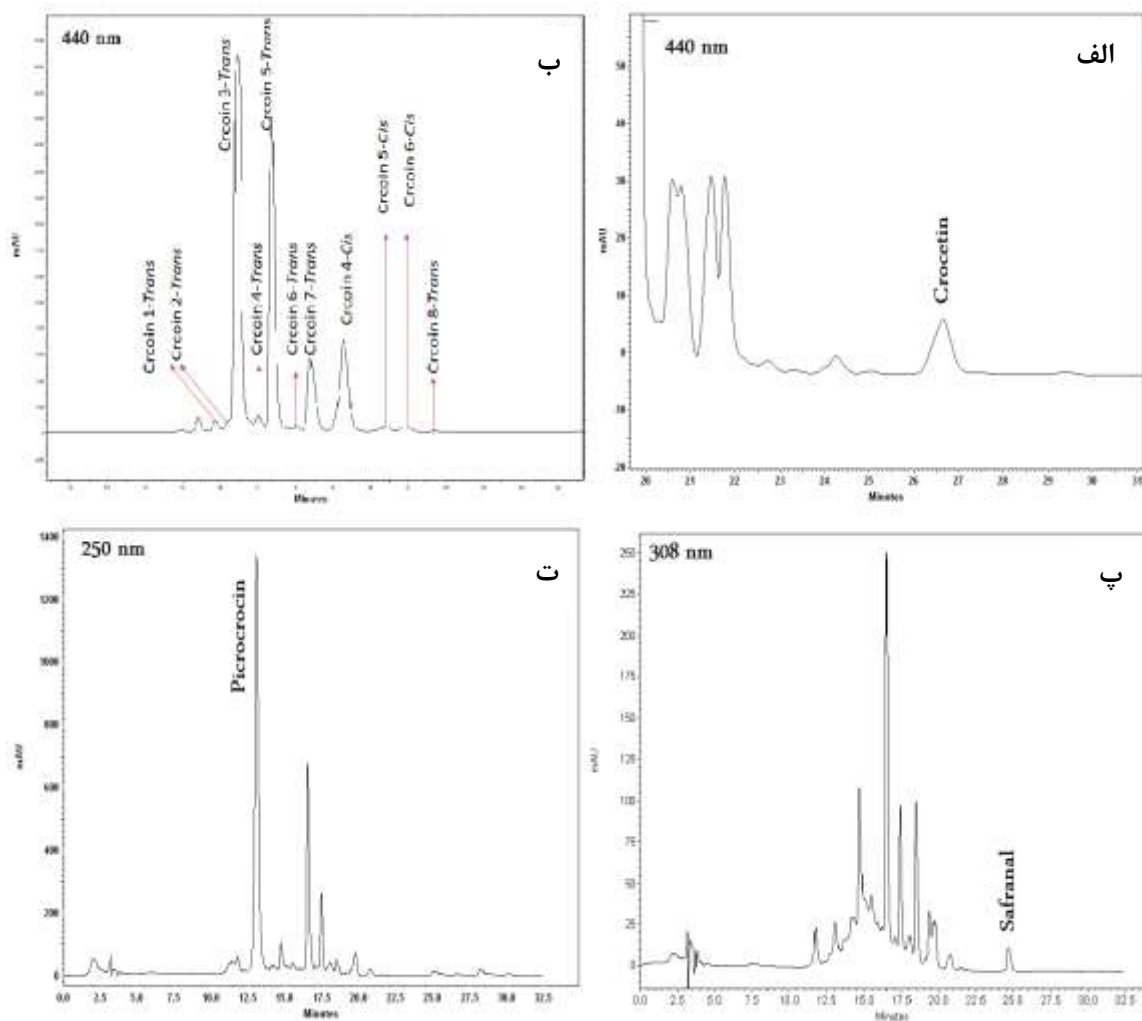
۸-۵ همه جزئیاتی که در این استاندارد مشخص نشده و از سوی آزمایشگاه به کار گرفته شده است و هر آن چه ممکن است روی نتایج آزمون تأثیر داشته باشد.

## پیوست الف

(آگاهی دهنده)

### کروماتوگرام‌های مربوط به اندازه‌گیری اجزای کروسیتین، کروسین کل، سافرانال و پیکروکروسین

کروماتوگرام‌های مربوط به اندازه‌گیری اجزای کروسیتین، کروسین کل، سافرانال و پیکروکروسین در زعفران مطابق با شکل الف-۱ است.



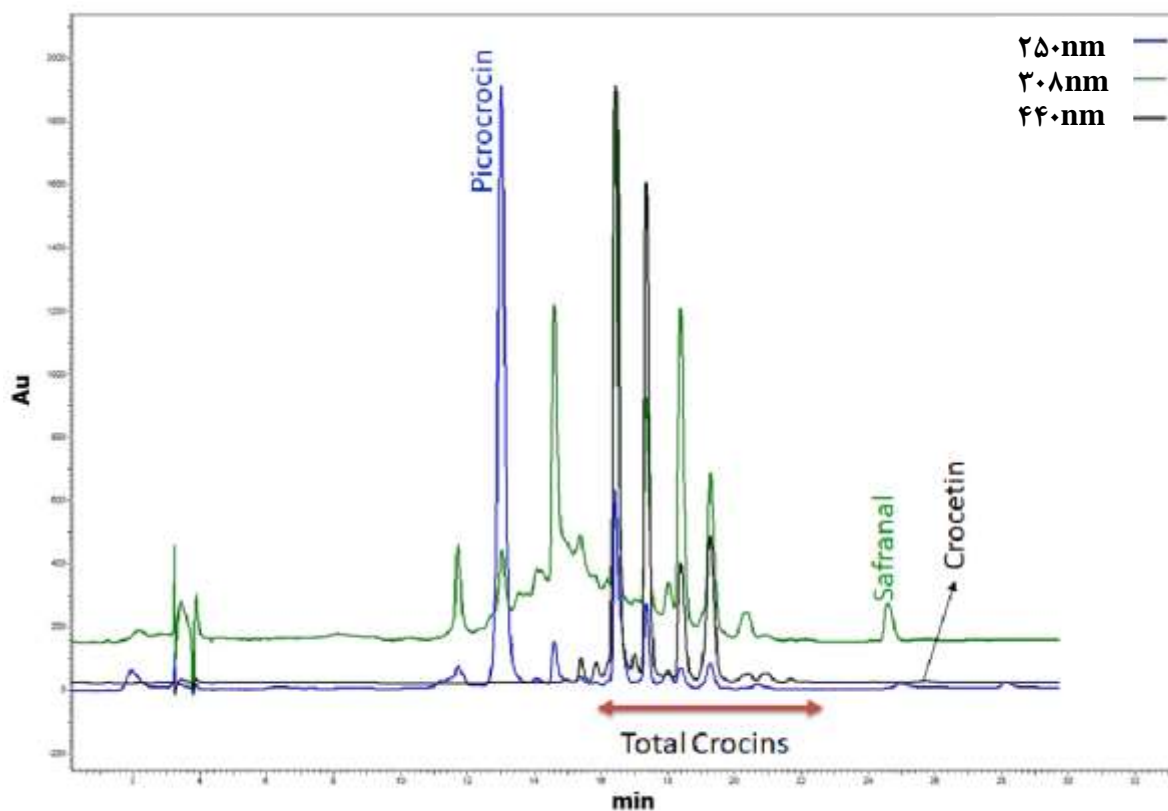
شکل الف-۱- کروماتوگرام‌های مربوط به اندازه‌گیری اجزای کروسیتین (الف)، کروسین کل (ب)، سافرانال (پ)، پیکروکروسین (ت)

پیوست ب

(آگاهی دهنده)

کروماتوگرام‌های روی هم افتاده مربوط به اندازه‌گیری اجزای کروسیتین، کروسین، سافرانال و پیکروکروسین

کروماتوگرام‌های روی هم افتاده مربوط به اندازه‌گیری اجزای کروسیتین، کروسین کل، سافرانال و پیکروکروسین در زعفران به منظور مشخص شدن محدوده‌های جداسازی مطابق با شکل ب-۱ است.



شکل ب-۱- کروماتوگرام‌های روی هم افتاده مربوط به اندازه‌گیری اجزای کروسیتین (الف)، کروسین کل (ب)، سافرانال (پ) و پیکروکروسین (ت)

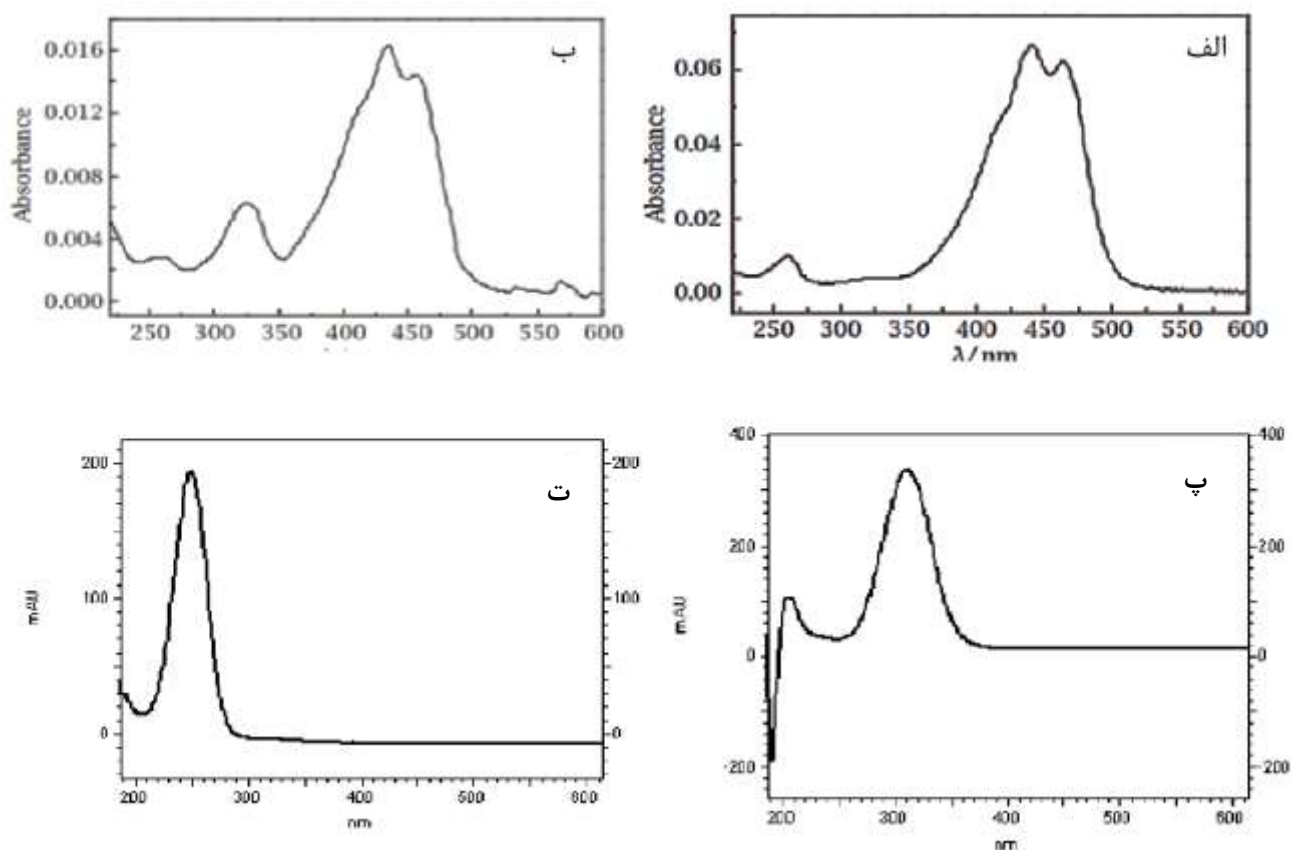
### پیوست پ

#### (آگاهی دهنده)

کروماتوگرام‌های الگوی جذب مولکول‌های کروسین ایزومر ترانس، کروسین ایزومر سیس،

پیکروکروسین و سافرانال در ناحیه ۲۰۰ nm تا ۷۰۰ nm

کروماتوگرام‌های الگوی جذب مولکول‌های کروسین ایزومر ترانس، کروسین ایزومر سیس، پیکروکروسین و سافرانال در ناحیه ۲۰۰ nm تا ۷۰۰ nm مطابق با شکل پ-۱ است.



شکل پ-۱- کروماتوگرام‌های الگوی جذب مولکول‌های کروسین ایزومر ترانس(الف)، کروسین ایزومر سیس(ب)، پیکروکروسین(پ) و سافرانال(ت) در ناحیه ۲۰۰ nm الی ۷۰۰ nm

پیوست ت

(آگاهی دهنده)

ترتیب شویبش اجزای اصلی کلاله خشک شده زعفران

ترتیب شویبش اجزای اصلی کلاله خشک شده زعفران برحسب زمان بازداری آن‌ها مطابق با جدول ت-۱ است.

جدول ت-۱- ترتیب شویبش اجزای اصلی کلاله خشک شده زعفران برحسب زمان بازداری آن‌ها

ردیف	نام ترکیب	زمان بازداری (دقیقه)	طول موج اندازه‌گیری (نانومتر)	توضیحات
۱	پیکروکروسین	$13,1 \pm 0,2$	۲۵۰	-
۲	سافرانال	$24,6 \pm 0,2$	۳۰۸	-
۳	کروسین ۱ <sup>a</sup>	$15,85 \pm 0,2$	۴۴۰	ممکن است به علت غلظت کم، پیک آن دیده نشود.
۴	کروسین ۲	$16,28 \pm 0,2$	۴۴۰	مکن است به علت غلظت کم، پیک آن دیده نشود.
۵	کروسین ۳	$16,43 \pm 0,2$	۴۴۰	ممکن است به علت غلظت کم، پیک آن دیده نشود.
۶	کروسین ۴	ایزومر ترانس	$19,66 \pm 0,2$	پیک این ترکیب از شدت بیشتری برخوردار است.
		ایزومر ترانس	$17,00 \pm 0,2$	-
۷	کروسین ۵	ایزومر سیس	$20,68 \pm 0,2$	-
		ایزومر ترانس	$17,37 \pm 0,2$	-
۸	کروسین ۶	ایزومر سیس	$21,34 \pm 0,2$	-
		ایزومر ترانس	$18,01 \pm 0,2$	-
۹	کروسین ۷	$18,40 \pm 0,2$	۴۴۰	-
۱۰	کروسین ۸	$22,11 \pm 0,2$	۴۴۰	-
۱۱	کروستین	$25,4 \pm 0,2$	۴۴۰	-

<sup>a</sup> این جزء کروستین آلفا نیز نامیده می‌شود و به عنوان جز اصلی کروستین کلاله زعفران می‌باشد.

<sup>b</sup> R1 و R2 تعداد گلوکزهای متصل به گروه‌های عاملی کربوکسیلیک اسیدی دو انتهای کروستین می‌باشند.

پیوست ث

(آگاهی دهنده)

نتایج معتبرسازی روش آزمون

نتایج معتبرسازی روش آزمون مطابق با جدول ث-۱ و ث-۲ است.

جدول ث-۱- نتایج معتبرسازی روش آزمون

اجزاء	معادله کالیبراسیون	گستره خطی (µg/mL)	ضریب همبستگی R <sup>2</sup>	حد تشخیص (µg/mL)	حد کمی (µg/mL)
پیکرو کروسین	Y=26959X+13829	۵-۵۰۰	۰٫۹۹۸	۰٫۰۶	۰٫۱۸
سافرانال	Y=132512X+23662	۰٫۵-۱۰۰	۰٫۹۹۴	۰٫۰۱	۰٫۰۳
کروسین کل	Y=91789X+1E+06	۱۰-۵۰۰	۰٫۹۹۶	۰٫۰۲	۰٫۰۶
کروستین	Y=179676X+20622	۰٫۵-۵۰	۰٫۹۹۶	۰٫۰۵	۰٫۱۵

جدول ث-۲- اطلاعات تکمیلی نتایج معتبرسازی روش آزمون

آماره	اجزاء	سافرانال	پیکروکروسین	کروستین	کروسین ۱	کروسین کل برحسب کروسین ۱
	میانگین غلظت (mg/l)	۰٫۲	۱۷	۰٫۰۵	۲۰	۳۰
	انحراف استاندارد تکرارپذیری Sr (mg/l)	۰٫۰۳	۲	۰٫۰۰۴	۱٫۵	۱٫۸
	ضریب تکرارپذیری واریانس CVr (mg/l)	۹	۴	۷	۹	۸
	حد تکرارپذیری $r = 2.8 \times S_r$ (mg/l)	۰٫۸۴	۵٫۶	۰٫۰۱	۴٫۲	۵
	انحراف استاندارد تجدیدپذیری SR (mg/l)	۰٫۰۴	۱٫۱	۰٫۰۰۳	۲٫۶	۳٫۳
	ضریب تجدیدپذیری واریانس CVR (mg/l)	۲۱	۵	۱۱	۱۴	۱۰
	حد تجدیدپذیری $R = 2.8 \times SR$ (mg/l)	۰٫۱۱	۳٫۱	۰٫۰۱	۷٫۸	۹٫۲