



中华人民共和国国家标准

GB/T 32732—XXXX
代替 GB/T 32732-2016

香荚兰 试验方法

Vanilla—Test methods

(ISO 5565-2; 1999, Vanilla [*Vanilla fragrans*(Salisbury)
Ames]-Part 2: Test methods, NEQ)

(征求意见稿)

(本草案完成时间: 2025 年 07 月 10 日)

在提交反馈意见时, 请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替GB/T 32732—2016《香草 试验方法》。与GB/T 32732—2016相比，除编辑性修改外主要技术变化如下：

- 为与我国行业内现有产品名称一致，将标准名称由《香草 试验方法》改为《香荚兰 试验方法》，将本文件中所有产品名称中的“香草”一词修改为“香荚兰”；
- 删除了香荚兰豆和香荚兰粉水分含量的测定方法；
- 更改了第1章“范围”的表述（见第1章，2016年版的第1章）；
- 增加了术语和定义引用的标准化文件（见第3章）；
- 增加了4-羟基苯甲酸的标准储备液的浓度要求（见4.2.1）；
- 更改了“仪器”引用的规范性引用文件，更改了仪器设备，（见4.3与5.3, 2016年版的4.3.3与4.2.3）；
- 更改了公式，以峰面积代替峰高，删除式中的注（见式1与式2, 2016年版的式2与式3）；

本文件对应于ISO 5565-2:1999《香荚兰 第2部分 试验方法》，一致性程度为非等效。主要差异是：

- 删除了ISO 5565-2:1999的香荚兰豆和香荚兰粉水分含量的测定方法；
- 增加了4-羟基苯甲酸的标准储备液的浓度要求。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华全国供销合作总社提出。

本文件由全国辛香料标准化技术委员会(SAC/TC 408)归口。

本文件起草单位：中华全国供销合作总社南京野生植物综合利用研究所、中国热带农业科学院香料饮料研究所、

本文件主要起草人：

香荚兰 试验方法

1 范围

本文件规定了香荚兰 [*Vanilla fragrans*(Salisbury) Ames] 的两种试验方法：

- a) 香草醛、香草酸、4-羟基苯甲醛、4-羟基苯甲酸的高效液相色谱测定法；
- b) 香草醛的紫外光谱测定法。

本文件适用于香荚兰(香荚兰豆、切碎香荚兰和香荚兰粉)的质量评定及其贸易。

本文件不适用于香荚兰提取物。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 12806 实验室玻璃仪器 单标线容量瓶(GB/T 12806-2011, ISO 1042: 1998, NEQ)

GB/T 22268 香荚兰 词汇 (ISO 3493:2014)

3 术语和定义

GB/T 22268界定的术语和定义适用于本文件。

4 香草醛、香草酸、4-羟基苯甲醛、4-羟基苯甲酸的高效液相色谱测定法

4.1 原理

将试样萃取后稀释（若需要），用高效液相色谱法（HPLC）分离，内标法、紫外光谱检测器测定。

4.2 试剂、工作溶液、内标溶液

4.2.1 试剂

除非特别标注，所需试剂纯度均为分析纯。使用蒸馏水、去离子水或纯度相当的水。所需试剂如下：

- a) 乙醇：98%（V/V）；
- b) 甲醇：色谱纯；
- c) 稀磷酸： $c(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0.01 \text{ mol/L}$ ；
- d) 流动相（作为参导）：将 75 份稀磷酸与 25 份甲醇混合，膜过滤后，脱气；
- e) 参比物质（纯度 $\geq 99\%$ ）：
 - 香草醛（4-羟基-3-甲氧基苯甲醛）；
 - 香草酸（4-羟基-3-甲氧基苯甲酸）；
 - 4-羟基苯甲醛；
 - 4-羟基苯甲酸。

- f) 内标物：水杨酸，纯度 $\geq 99\%$ ；
- g) 标准储备液：溶于流动相。
 - 香草醛储备液：浓度1 g/L, 称量精确至0.001 g；
 - 香草酸储备液：浓度0.1 g/L, 称量精确至0.001 g；
 - 4-羟基苯甲醛储备液：浓度0.1 g/L, 称量精确至0.001 g。
 - 4-羟基苯甲酸储备液：浓度0.1 g/L, 称量精确至0.001 g。

4.2.2 工作溶液

将标准储备液稀释得到工作溶液，工作溶液可在温度4℃、避光下储存数天，具体浓度如下：

- a) 香草醛工作液：浓度0.1 g/L。
- b) 香草酸工作液：浓度0.008 g/L。
- c) 4-羟基苯甲醛工作液：浓度0.008 g/L。
- d) 4-羟基苯甲酸工作液：浓度0.002 g/L。

4.2.3 内标溶液

将水杨酸溶于流动相中，使其浓度达到0.6 g/L，称量精确至0.001 g。

注：浓度应接近样品中的浓度。

4.3 仪器

常用实验室仪器，其它仪器如下：

- a) 气密研磨；
- b) 单刻度容量瓶：100 mL、200 mL、250 mL（符合GB/T 12806的要求）；
- c) 多孔滤膜：0.45 μm ；
- d) 连续提取装置：索氏提取器（由如下部分组成）。
 - 索氏提取器：125 mL；
 - 冷凝器；
 - 烧瓶：250 mL（带磨口）；
 - 滤纸筒；
 - 热源：电加热套或油浴（带可变电阻或其它热调节装置及线路延时开关）。
- e) 高效液相色谱仪（配置如下）：
 - 光谱检测器：可测波长254 nm；
 - 进样装置：10 μL 至100 μL ；
 - 色谱柱： C_{18} 键合硅胶，粒度5 μm ~10 μm 。
- a) 注射器：适合高效液相色谱使用。
- b) 分析天平：精度0.001 g。

4.4 试样准备

4.4.1 香荚兰豆、切碎香荚兰和混合香荚兰

将样品磨碎、混合均匀。

4.4.2 香荚兰粉

将样品充分混匀。

4.5 称样

称取20 g制备好的样品放入滤纸筒密封好，精确至0.001 g。

4.6 提取

用200 mL乙醇，在提取装置中连续提取试样16 h，即溶剂回流25次至30次。

香草豆荚或香草粉的试样量应使每升提取溶剂，在100 g香荚兰豆荚中能得到最大的提取物浓度。

将提取物移入250 mL容量瓶中，用少量乙醇将烧瓶洗涤数次，并将洗涤液合并到容量瓶中。用乙醇稀至刻度，这样得到已知稀释度的溶液。用流动相将该溶液稀释10倍。

4.7 方法

4.7.1 色谱操作条件

室温下按4.3中高效液相色谱仪配置进行，用流速约1 mL/min的流动相进行分析。

4.7.2 校正

4.7.2.1 将参比物质和内标物分别进样，混合后进样；用合适的操作条件使所有化合物的馏出因子大于等于1。

4.7.2.2 将4.6制备好的样品经膜过滤后进样，内标物不得干扰样品中的其它组分。

4.7.2.3 将10mL标准储备液与10mL内标溶液混合，膜过滤后进样。

响应系数 (K_i) 由式 (1) 得到：

$$K_i = \frac{m_i \times h_s}{m_s \times h_i} \quad (1)$$

式中：

K_i —被测组分 i 的响应系数；

m_i —进样溶液中组分 i 的质量；

m_s —进样溶液中内标的质量；

h_i —被测组分 i 的色谱峰面积；

h_s —内标的色谱峰面积。

4.7.3 测定

将10 mL按4.6制备的溶液与10mL内标溶液混合，经膜过滤后进样。

用式 (2) 计算被测物浓度：

$$m_i = \frac{K_i \times h_i \times m_s}{h_s} \quad (1)$$

式中：

K_i —被测组分 i 的响应系数；

m_i —进样溶液中组分 i 的质量；

m_s —进样溶液中内标的质量；

h_i —被测组分 i 的色谱峰面积；

h_s —内标的色谱峰面积。

5 香草醛含量的紫外光谱测定法

5.1 原理

用乙醇萃取试样得到香草醛，然后用紫外光谱法测定。

5.2 试剂

仅使用分析纯试剂、蒸馏水去离子水或纯度相当的水。所需试剂如下：

a) 乙醇：96%（V/V），适用于紫外光谱测定。

b) 氢氧化钠溶液： $c(\text{NaOH}) \approx 1\text{mol/L}$ 。

c) 香草醛（4-羟基-3-甲氧基苯甲醛）。

5.3 仪器

除常用实验室仪器，其它仪器如下：

a) 气密研磨机；

b) 单刻线容量瓶：100mL、200mL、250mL，符合 GB/T 12806 要求；

c) 移液管：10mL、20mL 和 25mL；

d) 干燥器：内有干燥剂；

e) 提取装置：同 4.3 索氏提取器；

f) 光谱仪；

g) 石英比色池：1cm 光程（可选）；

h) 称量瓶：25mL，带气密盖子；

i) 注射器：适用于高效液相色谱测定；

j) 分析天平：精度 0.001g。

5.4 方法

5.4.1 香草醛特征吸收的测定

5.4.1.1 标准溶液的制备

用称量瓶称取约30mg预先在干燥器中干燥的香草醛（精确至0.001g），然后用约200mL乙醇将其溶解，定量移入250 mL容量瓶中，用乙醇洗称量瓶数次，将洗涤液并入容量瓶中，最后用乙醇稀至刻度，混合均匀（溶液 A_1 ）。

吸取25mL溶液 A_1 至100mL容量瓶中，用乙醇稀至刻度，混合均匀（溶液 B_1 ）。

吸取10mL溶液 B_1 至100mL容量瓶中，加约60mL乙醇和2mL氢氧化钠溶液，用乙醇稀至刻度，混合均匀（溶液 C_1 ）。

5.4.1.2 参比溶液的制备

吸取2 mL氢氧化钠溶液，放入100mL容量瓶中，用乙醇稀至刻度，混合均匀。

5.4.1.3 测定

用光谱仪和比色池，在波长为250纳米至420纳米范围内，记录溶液C₁相对于参比溶液的紫外吸收光谱。

5.4.1.4 计算

最大吸收位于350 μm±3 μm处，其吸收值在0.2~0.8之间。

基线从270 μm划至380 μm。

观察最大吸收（ $A_{\max}$ ）以及在最大吸收波长处的基线吸收（ A_{base} ）。

用式(3)计算特征波长吸收（ $E_{1\%}$ ）

$$E_{1\%} = \frac{100(A_{\max} - A_{\text{base}})}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

m ——用于制备标准溶液的香草醛质量，单位为毫克（mg）。

5.4.2 试样的制备

5.4.2.1 香荚兰豆荚、切碎香荚兰和混合香荚兰

将样品研磨后混合均匀。

5.4.2.2 香荚兰粉

将样品混合均匀。

5.4.3 称样

称取20g制备好的样品放入滤纸筒密封好，精确至0.001 g。

5.4.4 提取

用提取设备、约200mL乙醇提取试样16h，即溶剂回流25至30次。

将提取物转移至250mL容量瓶中，用少量乙醇洗烧瓶数次，将洗涤液并入容量瓶中。用乙醇稀至刻度，并混合均匀（溶液A₂）。

5.4.5 参比溶液的制备

吸取2mL氢氧化钠溶液放入100mL容量瓶中，用乙醇稀至刻度，混合均匀。

5.4.6 标准溶液测定

吸取25mL溶液A₂至100mL容量瓶中，用乙醇稀至刻度并混合均匀（溶液B₂）。

吸取20mL溶液B₂至100mL容量瓶中，用乙醇稀至刻度并混合均匀（溶液C₂）。

吸取10mL溶液C₂至100mL容量瓶中，加60mL乙醇和2mL氢氧化钠溶液，用乙醇稀至刻度并混合均匀（溶液D₂）。

用分光光度计和比色池，在250 nm~420 nm范围，记录溶液D₂相对于参比溶液的吸收光谱。

4.3.4.7 结果表示

香草醛含量（ W_v ），以样品质量分数表示如式(4)：

$$W_v = 50000 \times \frac{(A_{\max} - A_{\text{base}})}{E_{1\%} \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$A_{\max}$ ——最大吸收；

A_{base} ——最大吸收波长处的基线吸收；

$E_{1\%}$ ——香草醛的特征吸收；

m ——用于提取的样品质量, 单位为克（g）。

若需要表示为绝干样品含量，应扣除样品的水分含量。

5 检验报告

上述两种试验方法的检验报告应说明：

——鉴别样品所需的全部信息；

——采用的取样方法（若知道）；

——所用试验方法及ISO5565的本部分参考信息；

——ISO5565未规定的、可选的或可能影响结果的全部细节；

——得到的检验结果，是否考虑了样品绝干；

——如果检验了重复性，是否在最后测定结果中采用了。