

《保健食品中葛根素的测定》国家标准（征求意见稿）编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

根据《国家标准化管理委员会关于下达 2023 年第二批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》（国标委发〔2023〕37 号），《保健食品中葛根素的测定》（计划号 20230870-T-424）列入修订计划，由全国特殊食品标准化技术委员会归口，由中国食品发酵工业研究院等单位共同组织完成起草修订工作。

（二）简要起草过程

目前市场上含葛根素及葛根素提取物的相关保健食品的种类和剂型较多，而原标准 GB/T 22251-2008《保健食品中葛根素的测定》中存在缺少试样制备、大孔树脂操作费时复杂、无法满足检出限和定量限要求等问题。

为了改进原有方法中存在的这些问题，本次开展标准修订工作，能够更好的满足实际检测工作的需要，根据葛根素的结构、性质和相关保健食品基质特性，增加了样品制备过程，对前处理方法和仪器条件进行了完善和优化，修改了方法的检出限、定量限。具体的修订过程如下：

2023 年 8 月~2023 年 10 月，成立标准修订组，确定标准制修订方案和工作计划，并开展了方法学验证。

2023 年 11 月，全国特殊食品标准化技术委员会在北京召开《14 项保健食品分析方法标准启动会》修订工作启动会，会上讨论了《保健食品中葛根素的测定》的修订方案。

2023 年 11 月~2024 年 1 月，起草组各单位根据《保健食品中葛根素的测定》标准修订方案开展实验室内方法验证的工作。

2024 年 1 月，全国特殊食品标准化技术委员会组织各参与单位开展新修订保健食品中葛根素测定方法的实验室间方法验证工作。

2024 年 1 月，起草工作组在前期工作基础上形成标准征求意见稿。

二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据

（一）标准编制原则：

本方法编制遵循“先进性、实用性、统一性、规范性”的原则，注重方法的可操作性，严格按照 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》和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则》的要求进行编写。并且按照 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范、食品理化检测》、GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》对方法学进行了考察。

标准修订符合我国国情，方法满足软胶囊、硬胶囊、片剂、粉剂、颗粒剂、液体、糖果、丸剂等类型保健食品保健食品中添加的葛根素测定，具有普遍适用性。

（二）主要修订内容

本标准主要内容有：标准的范围、原理、试剂和材料、仪器和设

备、试样处理、分析结果的表述、精密度、色谱图、定量限和检出限等 9 项。通过多方面分析和验证，本次标准修订较原版本有如下变化：

- (1) 增加了试样制备的内容；
- (2) 修改了前处理的内容；
- (3) 修改了设备和色谱条件；
- (4) 修改了方法的检出限、定量限。

三、试验验证的分析、综述报告

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

无。

五、以国际标准为基础的起草情况

本标准没有采用国际标准。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

本标准与现行法律、法规和强制性国家标准协调一致。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准制定过程中无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本标准不涉及专利。

九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和 implementation 日期的建议

建议本标准发布 6 个月后实施，由归口单位组织行业相关单位积极开展宣贯工作。

十、其他应当说明的事项

无。

附件：方法学验证报告

附件

《保健食品中葛根素的测定》方法学验证

1、方法研究过程

1.1 提取溶剂的选择

结合文献及 GB/T 22251-2008 标准使用的溶剂，实验针对固体、液体和含油类等各种剂型的样品，考察了水、30%甲醇水溶液、50%甲醇水溶液、70%甲醇水溶液及纯甲醇作为提取溶液的提取效率。结果发现，针对固体试样、液体试样和含油试样等样品，使用甲醇作为提取溶剂时葛根素的提取效率均低于 90%，且上机进样分析发现峰形较差，目标物质包裹了杂峰（见图 1~2）；使用其他四种提取溶液提取时，各剂型样品的提取效率均达到 90%以上。

针对固体类试样，各提取溶剂的提取效率见图 3，实验提取过程发现使用 50%甲醇溶液提取时样品分散较好，不出现结团的现象（见图 4）。故针对固体类试样本方法确定使用 50%甲醇溶液作为提取溶剂。

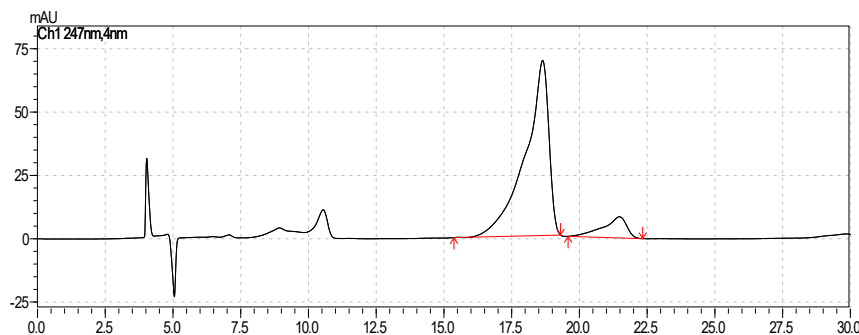


图 1 纯甲醇溶液提取时的色谱图

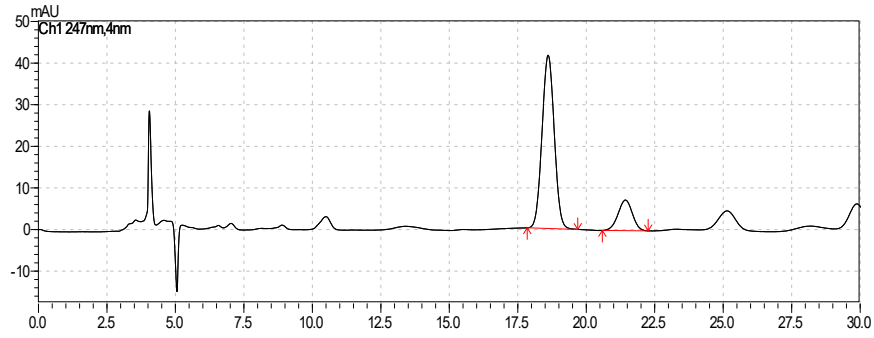


图 2 50%甲醇水溶液提取时的色谱图

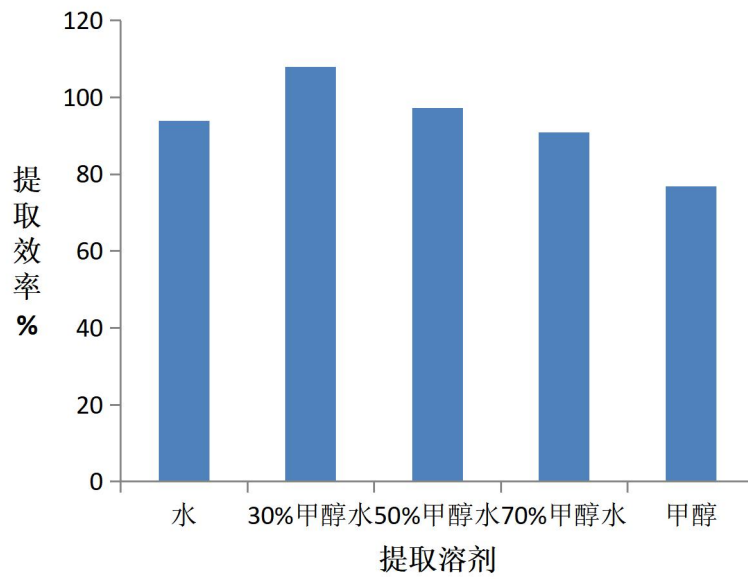


图 3 固体试样不同提取溶剂的比较

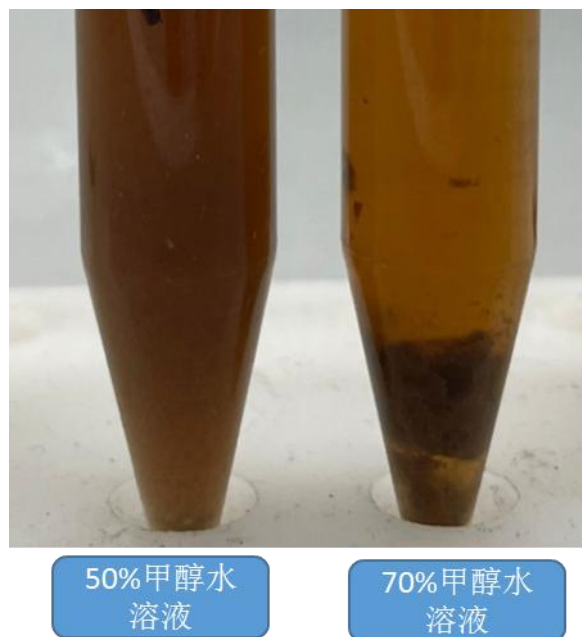


图 4 提取时的状态

针对液体类试样，各提取溶剂的提取效率见图 5，结果发现使用 50% 甲醇溶液提取时提取效率最高，针对液体类试样本方法确定使用 50% 甲醇溶液作为提取溶剂。

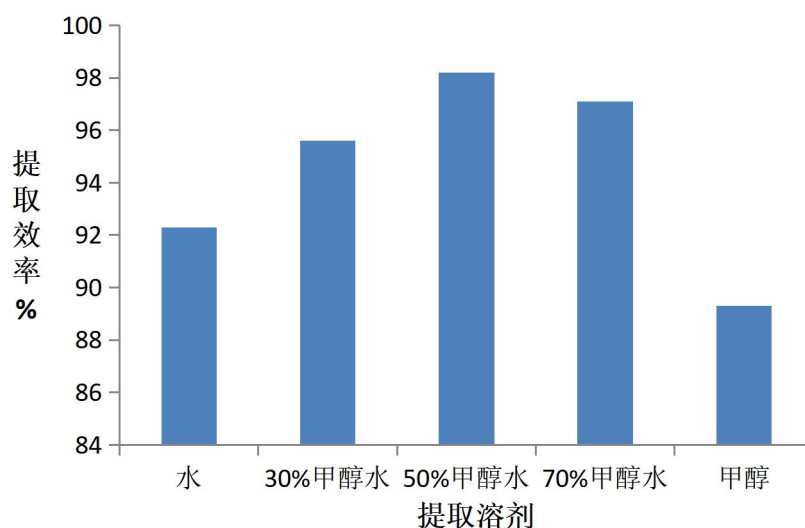


图 5 液体试样不同提取溶剂的比较

针对含油类试样，各提取溶剂的提取效率见图 6，同样发现使用 50% 甲醇溶液作为提取溶剂时提取效率最高。实验提取过程发现部分样品会出现乳化或分层不清晰的现象，结合葛根素物质的性质，考虑用石油醚等试剂除油，实验发现通过加入适量石油醚后可解决此问题（见图 7），且不影响提取效率。

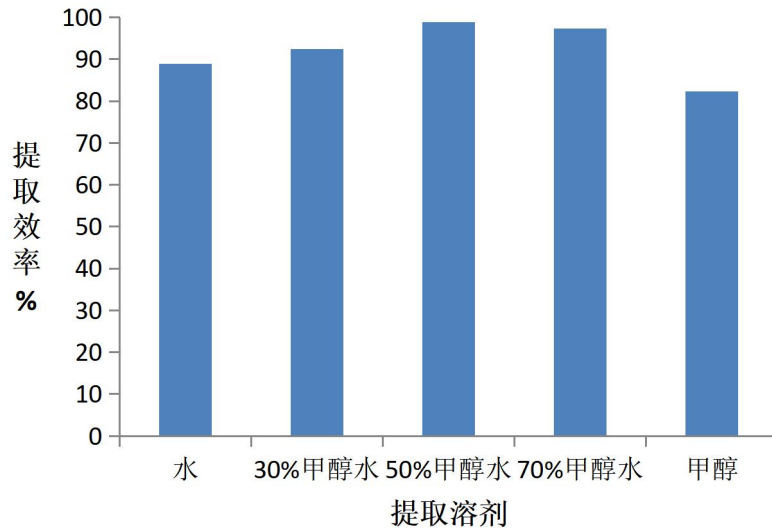


图 6 含油试样不同提取溶剂的比较

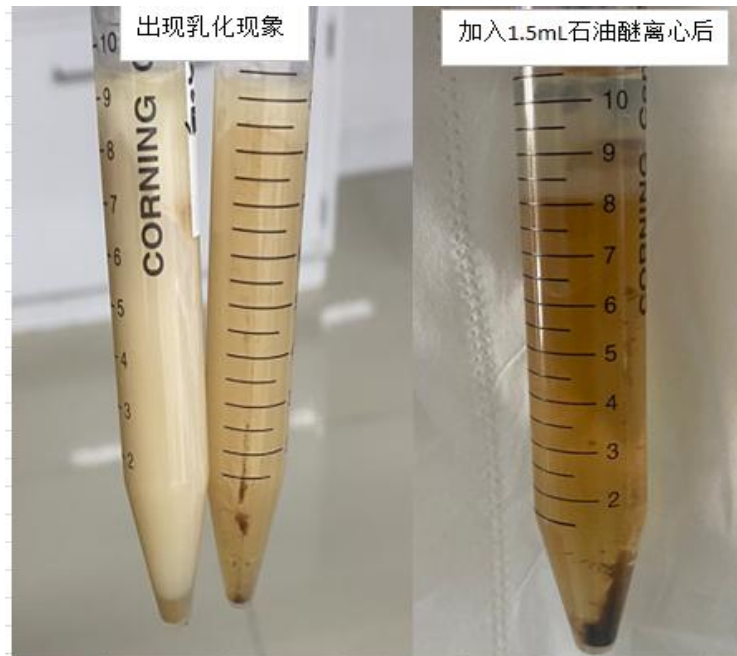


图 7 含有试样使用石油醚除油脂

1.2 流动相的选择

原标准采用 ODS C18 色谱柱、甲醇+36%乙酸+水=15+3+72 比例的流动相等度洗脱，目标物质于 17.5 min 出峰，发现此条件下在运行到 30 min 的时候仍有杂质未完全洗脱（见图 8），故本修订方案考虑采用梯度洗脱的方式，结合参考文献，通过实验验证，确认采用乙腈和 0.1%磷酸水溶液作为流动相，色谱图见图 9。

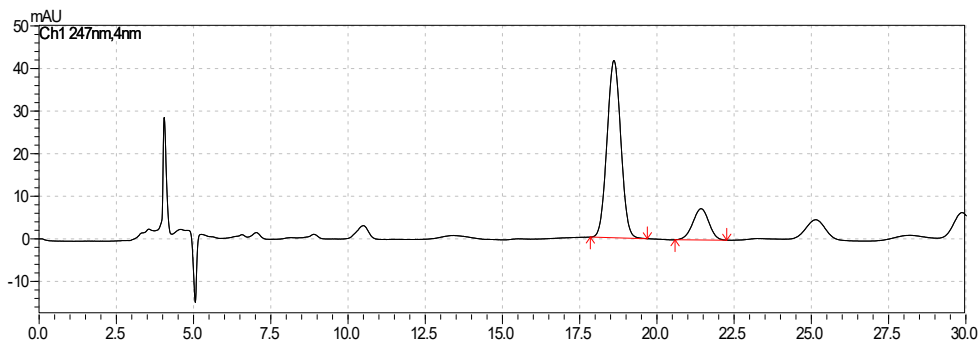


图 8 采用原标准等度洗脱时的色谱图

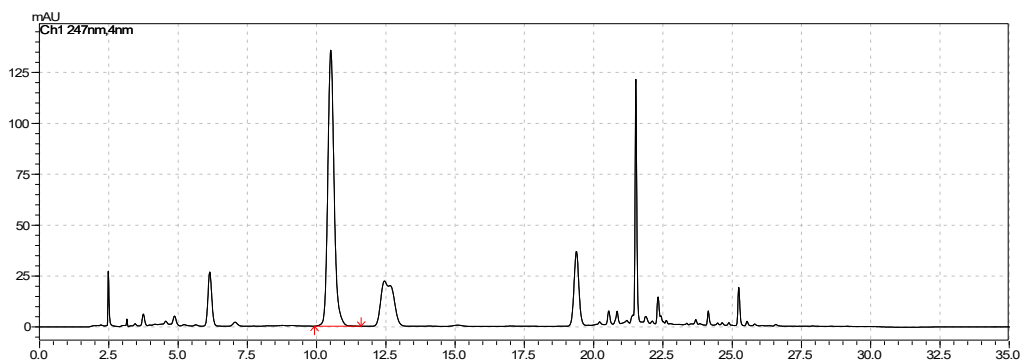


图 9 采用梯度洗脱时的色谱图

1.3 色谱柱柱温的选择

试验比较了柱温 25°C， 30°C， 35°C 三个温度对葛根素峰型和分离度的影响，结果显示：柱温 30°C 时，葛根素峰型和分离度比较好，故选择 30°C 为本方法的检测温度。

1.4 最终确定的分析条件

- (a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱（250×4.6 mm，5 μm），或等效色谱柱；
- (b) 流动相A：乙腈；流动相B：0.1%磷酸水溶液；梯度洗脱见表1。
- (c) 柱温：30°C；
- (d) 进样体积：10 μL；
- (e) 检测波长：247 nm。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间 min	流动相 A %	流动相 B %	流速 mL/min
0.00	12.0	88.0	1.0
12.0	12.0	88.0	1.0
20.0	40.0	60.0	1.0
25.0	40.0	60.0	1.0
25.1	12.0	88.0	1.0
35.0	12.0	88.0	1.0

2、方法特异性

按检测方法称取空白样品并依法操作，按检测方法仪器条件测定空白溶剂、空白样品、空白样品加标及标准物质溶液，典型色谱图见图 10~23。

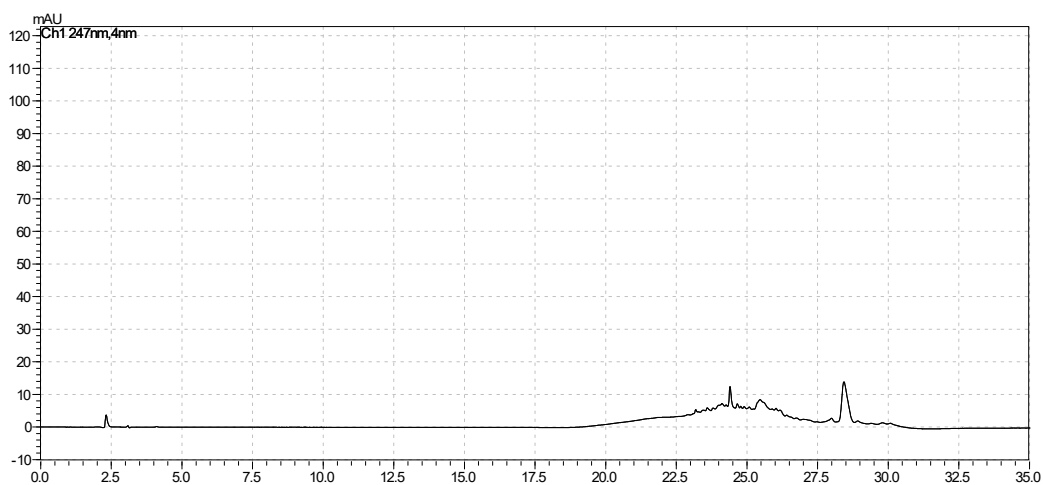


图 10 空白溶剂基质液相色

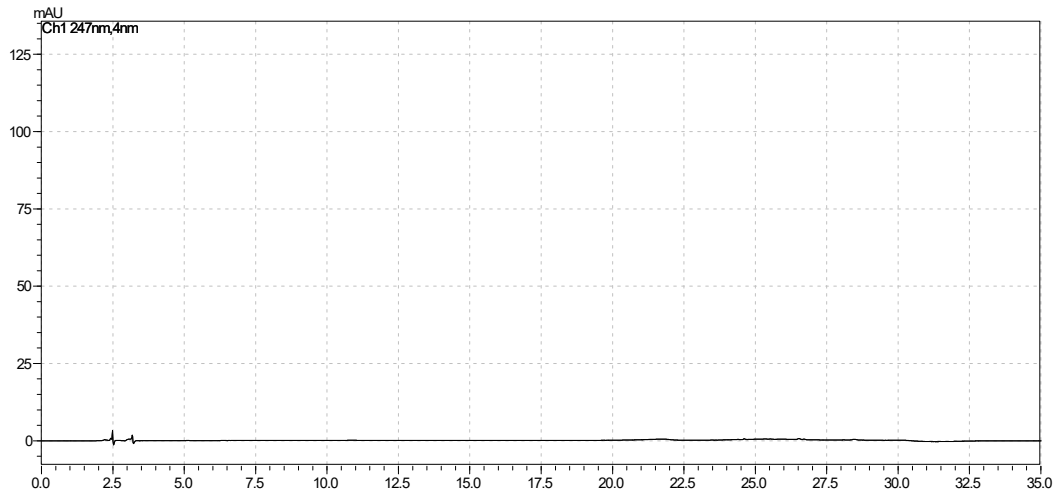


图 11 片剂空白基质液相色谱图

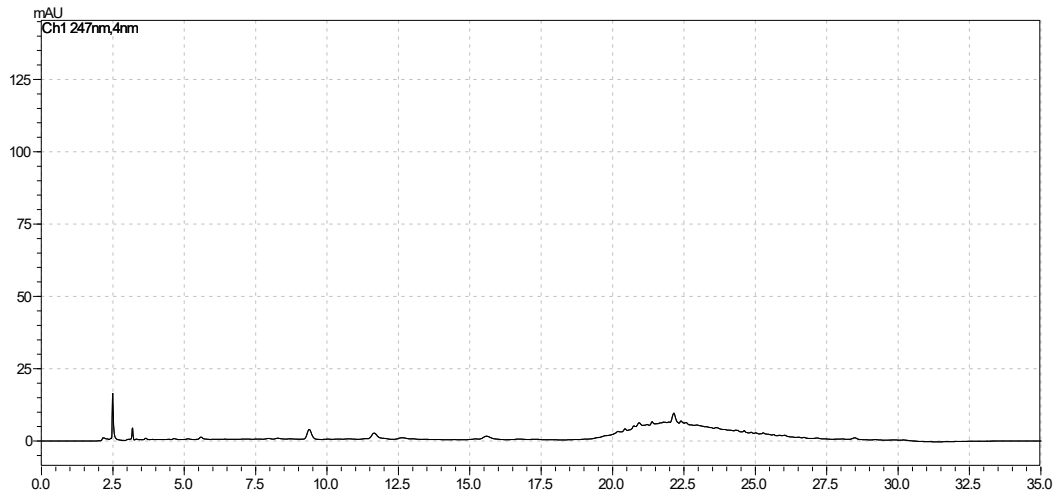


图 12 醋空白基质液相色谱图

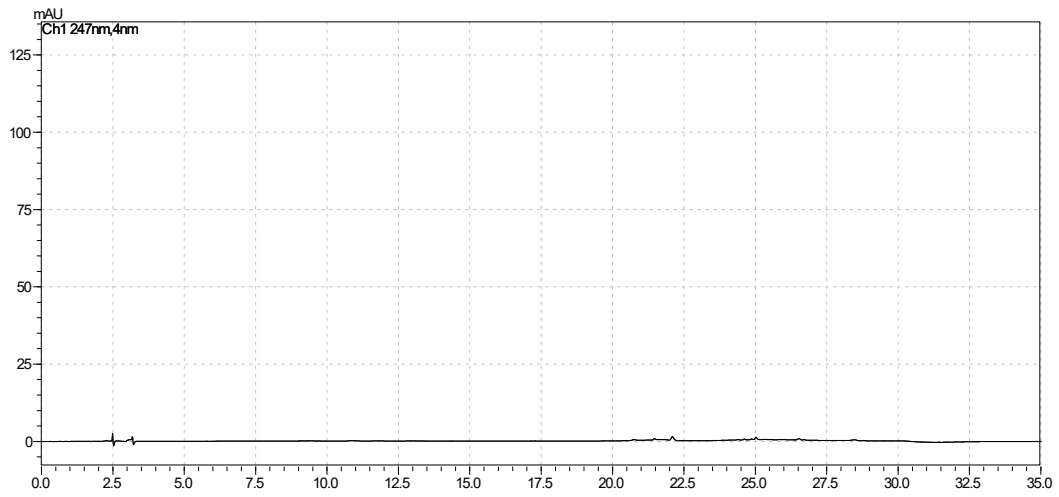


图 13 硬胶囊空白基质液相色谱图

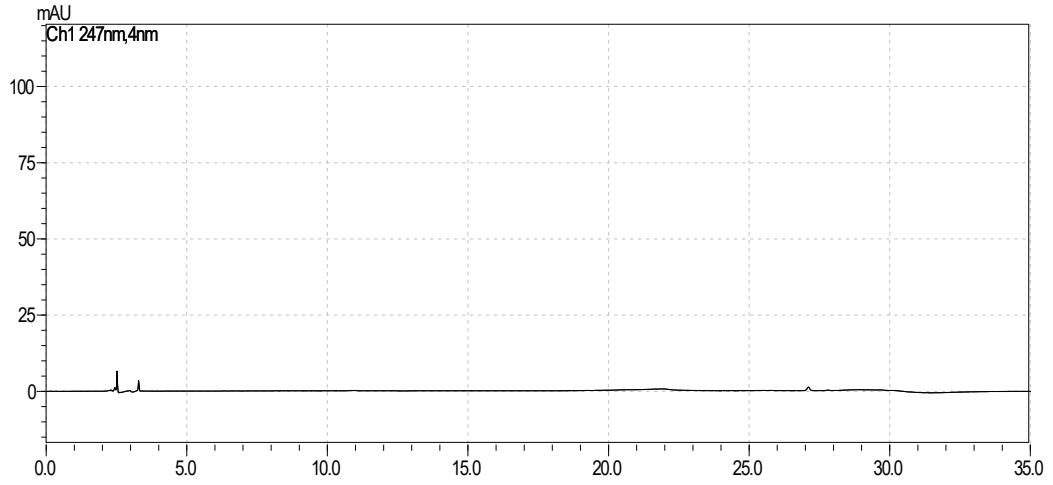


图 14 软胶囊空白基质液相色谱图

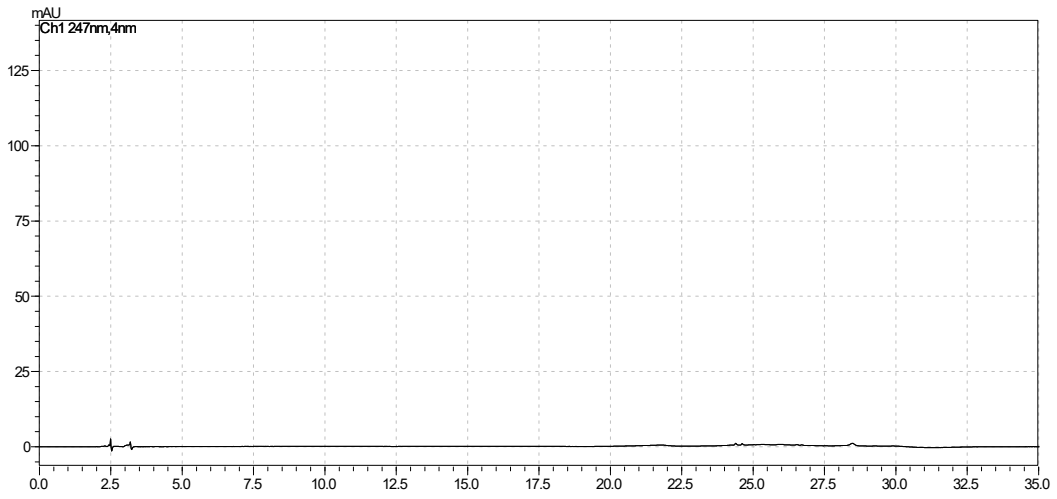


图 15 酒剂空白基质液相色谱图

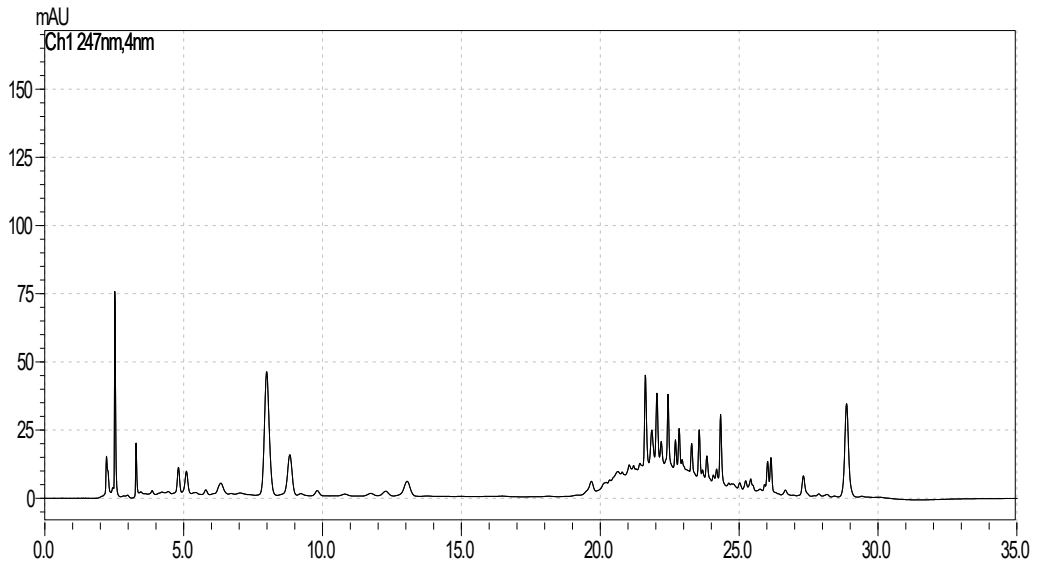


图 16 口服液空白基质液相色谱图

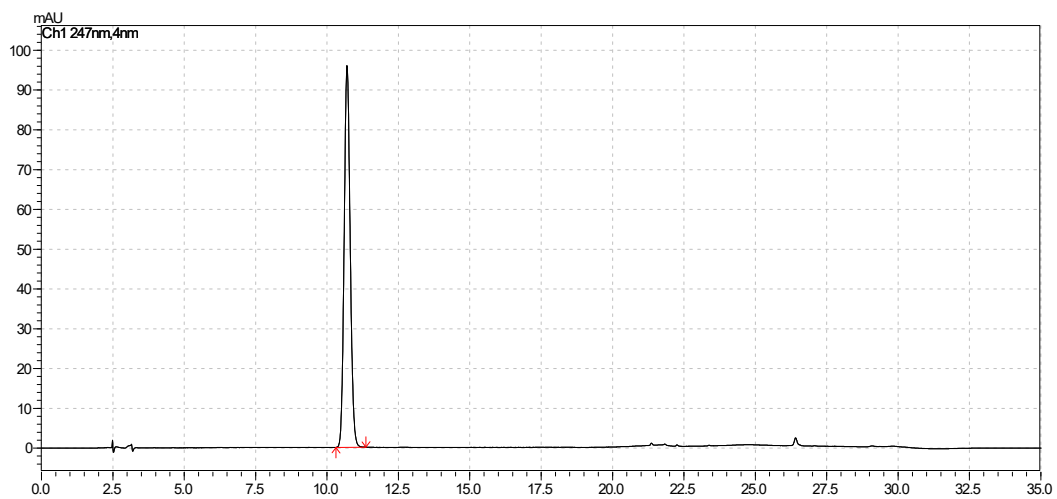


图 17 片剂空白基质加标液相色谱图 (0.40 g/kg)

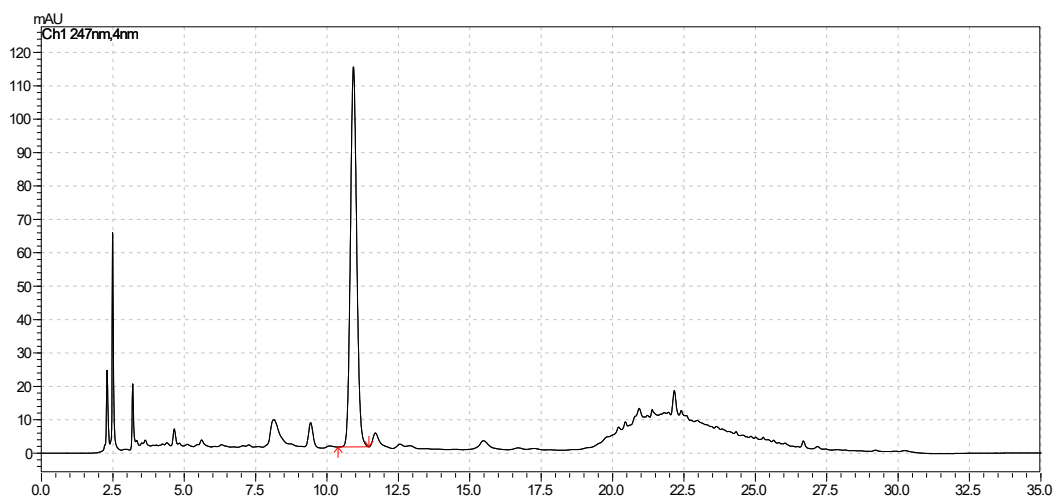


图 18 醋空白基质加标液相色谱图 (0.40 g/kg)

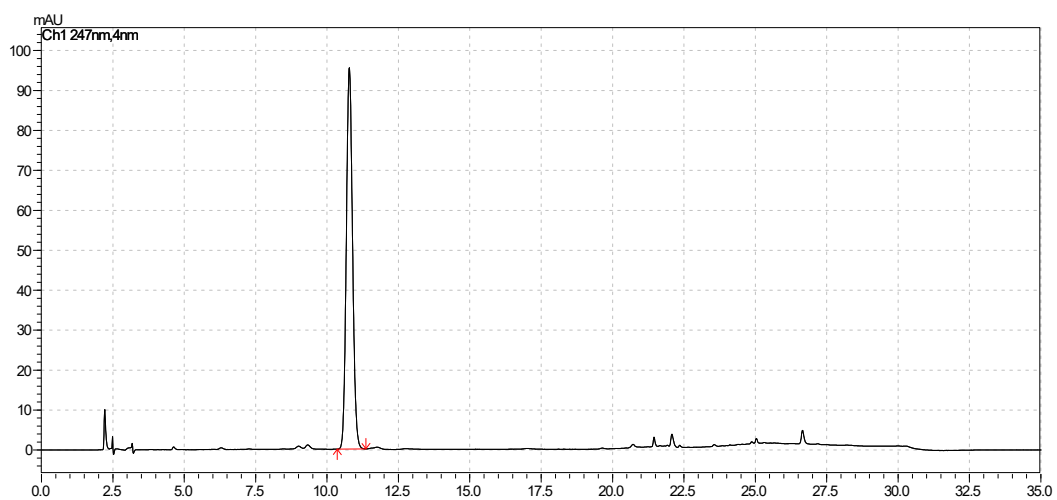


图 19 硬胶囊空白基质加标液相色谱图 (0.40 g/kg)

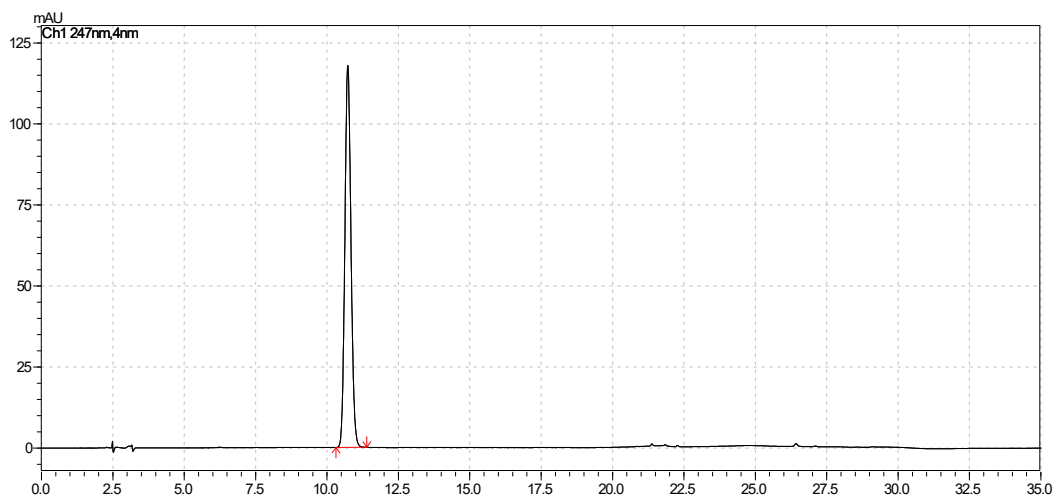


图 20 软胶囊空白基质加标液相色谱图 (0.40 g/kg)

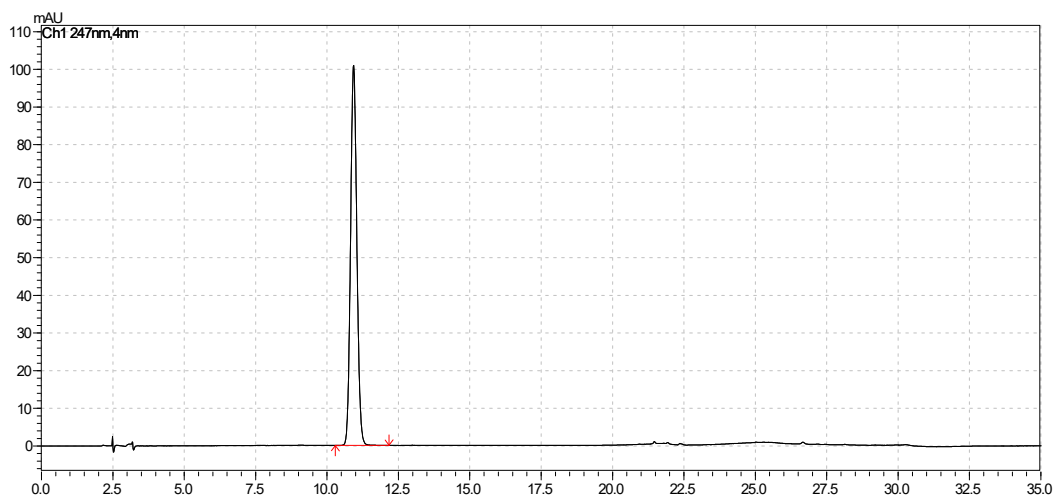


图 21 酒剂空白基质加标液相色谱图 (0.40 g/kg)

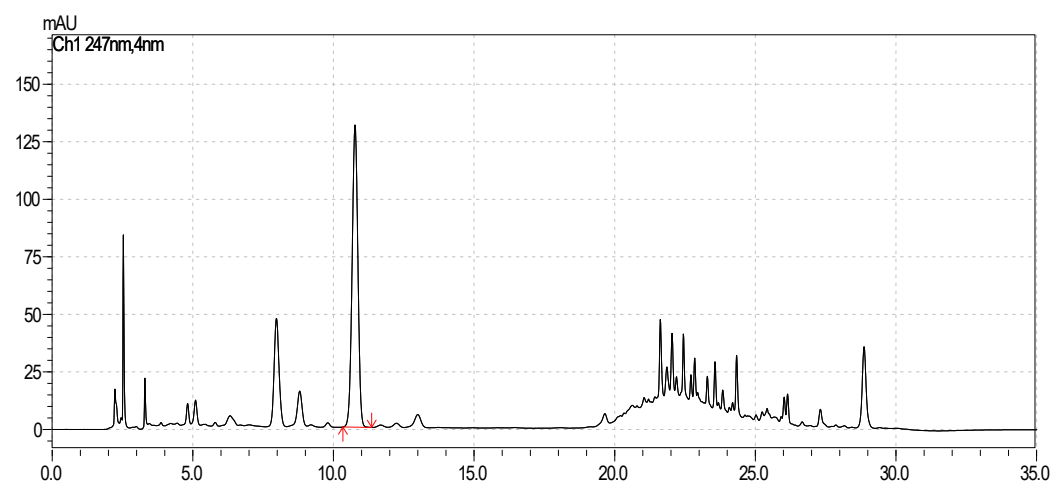


图 22 口服液空白基质加标液相色谱图 (0.40 g/kg)

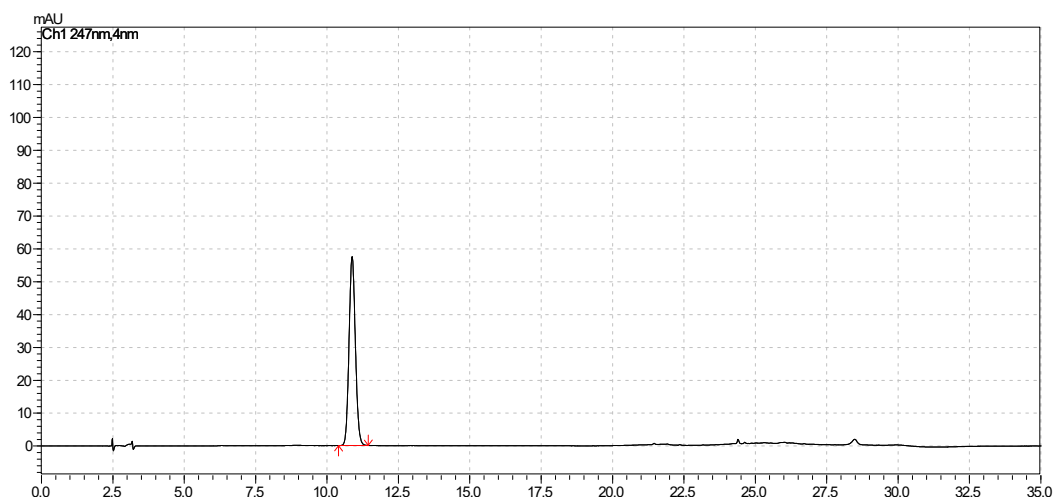


图 23 葛根素标准溶液的液相色谱图 (20 µg/mL)

3、检出限和定量限

称取片剂、液体、硬胶囊、软胶囊 4 种基质样品 1.00 g 置于刻度离心管中，分别加入 10 µg/mL 葛根标准溶液 0.030 mL、0.100 mL，其余步骤同 3.2~3.3 步骤处理，获得葛根素的 S/N 值，以 S/N=10 计算方法的定量限，以 S/N=3 计算方法的检出限。

检出限实验每种基质平行测定 20 次，目标分析物的检出概率不低于 95%时，定为检出限；定量限实验每种基质平行测定 6 次，各基质的检出限和定量限如表 2-3 所示，色谱图见图 24~25。

表 2 葛根素检出限结果 (n=20)

基质类型	检出率 (%)	检出限 (g/kg)
片剂	100	3×10^{-4}
液体	100	3×10^{-4}
硬胶囊	100	3×10^{-4}
软胶囊	100	3×10^{-4}

表 3 葛根素定量限结果 (n=6)

基质类型	S/N1	S/N2	S/N3	S/N4	S/N5	S/N6	定量限(g/kg)
片剂	13.1	10.62	10.47	13.77	10.96	11.47	1×10^{-3}

液体	12.38	11.46	11.74	13.76	17.08	10.45	1×10^{-3}
硬胶囊	11.79	10.86	15.17	13.72	13.62	12.51	1×10^{-3}
软胶囊	10.63	12.40	10.86	10.49	15.21	10.73	1×10^{-3}

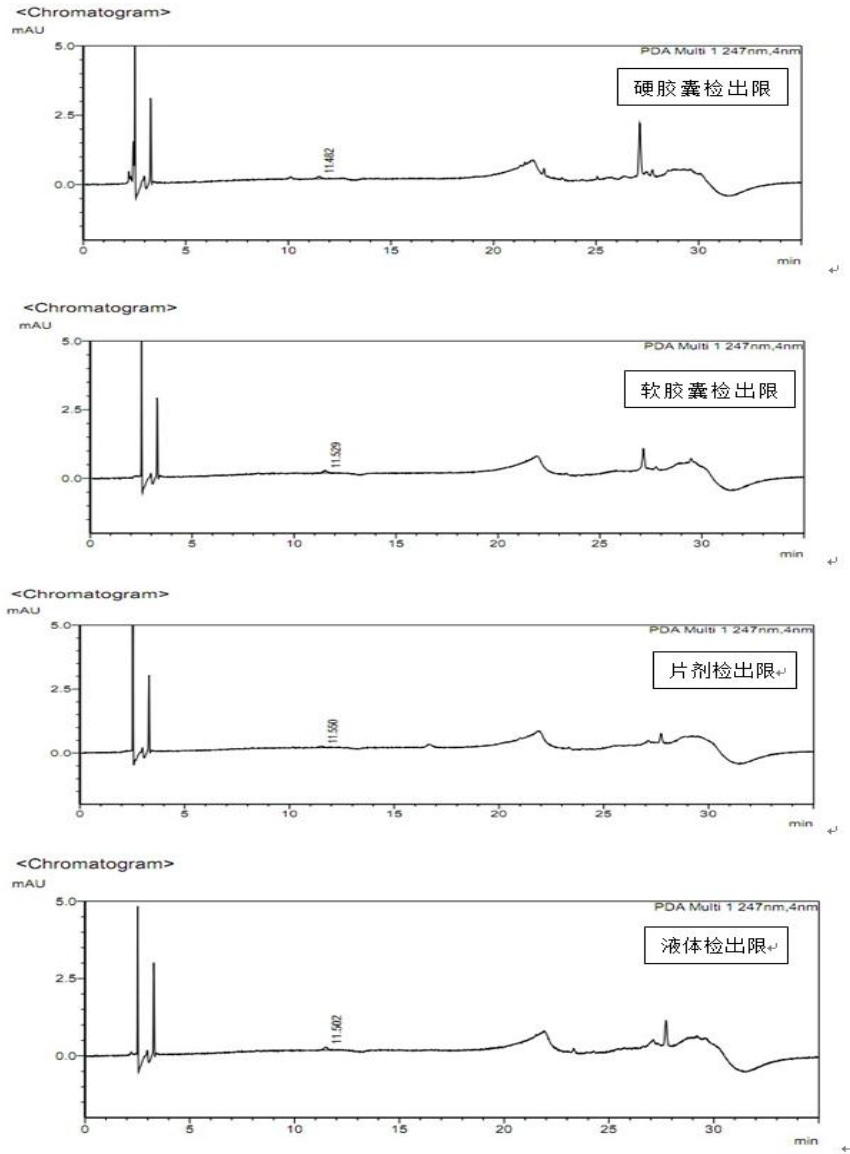


图 24 检出限色谱图

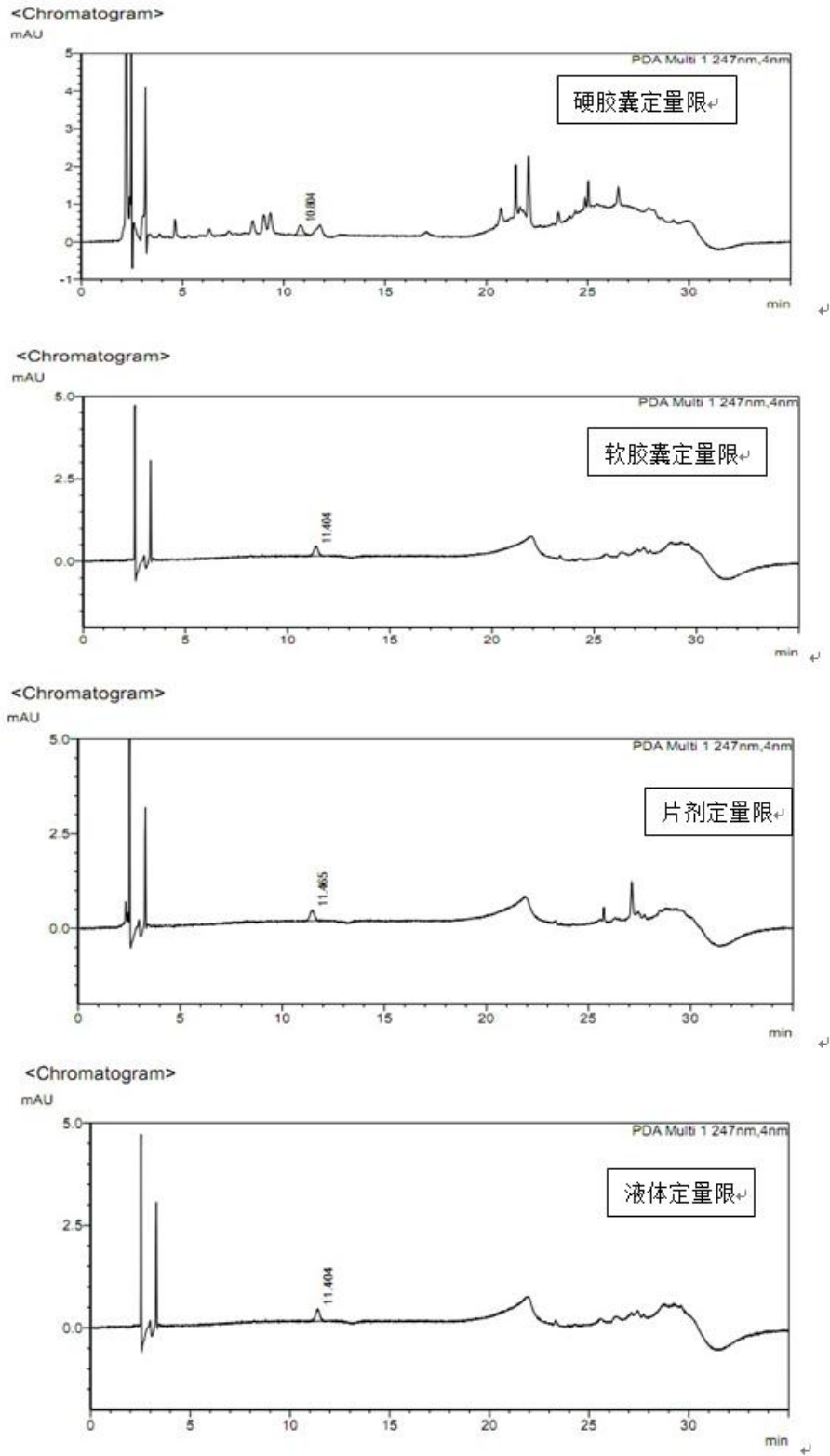


图 25 定量限色谱图

4、测定范围

按照提供的标准方法，分别吸取标准使用液，用 70% 甲醇溶液稀释并定容的浓度分别为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准系列。临用时配制，供 HPLC 分析后绘制标准曲线。以目标化合物峰面积 Y 与其浓度 X 绘制标准曲线，结果见表 4 和图 26。

表 4 目标物标准曲线

名称	浓度范围 $\mu\text{g}/\text{mL}$	线性方程	相关系数
葛根素	1~200	$Y=45301.8x+0$	0.9999993

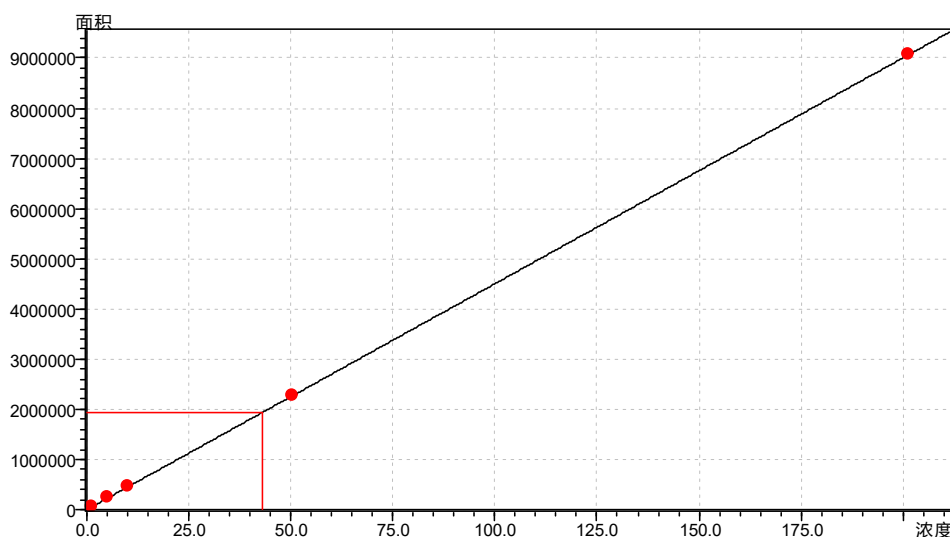


图 26 葛根素的标准曲线

5、正确度、重复性和精密度

称取硬胶囊、软胶囊、片剂、液体 4 种空白基质 1.00 g 置于 15 mL 离心管中，加入葛根素标准溶液，按标准方法进行前处理，每个水平平行制备 6 份。测定并计算回收率和精密度，葛根素标准储备液加入体积见表 5，测定结果见表 6-8。其中，标准储备液的稳定性实验将持续进行。

表 5 加标实验加标量

样品基质	添加水平	标准溶液浓度	加标体积
	g/kg	µg/mL	mL
硬胶囊、软胶囊、片剂、 液体	0.02	200	0.1
	0.40	2000	0.2
	1.80	2000	0.9

表 6 低浓度加标回收结果 (0.02 g/kg)

基质类型	回收率结果 (%)						平均回收率 (%)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6		
硬胶囊	96.4	99.8	96.9	95.2	96.0	97.1	96.9	1.6
软胶囊	108.8	109.1	108.1	106.7	106.9	108.2	108.0	0.9
片剂	102.9	106.2	105.5	97.5	100.0	100.0	102.0	3.4
液体	102.5	103.3	101.5	104.0	103.6	103.1	103.0	0.9

表 7 中浓度加标回收结果 (0.40 g/kg)

基质类型	回收率结果 (%)						平均回收率 (%)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6		
硬胶囊	95.1	95.8	96.5	97.9	92.9	95.6	95.5	1.8
软胶囊	97.7	99.5	103.5	104.0	102.9	104.9	102.1	2.8
片剂	91.2	92.1	99.7	98.3	95.3	95.8	95.4	3.5
液体	95.0	96.0	100.9	99.0	100.8	101.8	98.9	2.8

表 8 高浓度加标回收结果 (1.80 g/kg)

基质类型	回收率结果 (%)						平均回收率 (%)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6		
硬胶囊	99.5	97.2	96.7	97.6	97.8	98.4	97.9	1.0
软胶囊	101.2	102.7	99.4	98.4	105.6	107.2	102.4	3.4
片剂	96.3	95.5	92.5	92.8	97.3	96.3	95.1	2.1
液体	102.0	102.5	100.0	100.4	102.0	102.0	101.5	1.0

6、再现性 (实验室间方法验证)

本方法经过南京食品药品监督检验院、浙江食品药品检验研究院、安徽省食品药品检验研究院、中国海关科学技术研究中心、河北省食

品检验研究院等单位，根据修订方法进行实验室间验证，测定结果符合要求，具体比对实验结果见表 9。

表 9 实验室间方法比对结果

编号	葛根素含量 (g/100g)					RSD %
	Lab1	Lab2	Lab3	Lab4	Lab5	
样品 1 (软胶囊) GGs-01S	8.2	8.13	7.95	8.3	8.77	3.72
样品 2 (片剂) GGs-03S	1.02	1.04	1.01	0.93	0.98	4.30
样品 3 (液体) GGs-12S	0.0026	0.0029	0.0024	0.0029	0.00271	7.85