

《保健食品中甘草酸的测定》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），《保健食品中甘草酸的测定》（计划号 20230861-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有限公司等单位共同组织完成起草修订工作。

（二）简要起草过程

GB/T 22248-2008《保健食品中甘草酸的测定》为高效液相色谱法。在实际使用过程中，不同实验室对该方法提出了许多意见，一是该方法的范围为“适用于以甘草为主要原料的保健食品中甘草酸的测定”，未明确剂型。近年来随着保健食品市场的发展，不同剂型的产品不断增加，方法的适用性需要明确。二是该标准仅规定了 HPLC 法，随着色谱技术的发展，超高效液相色谱（UPLC）逐渐普及，因此色谱分析的条件需要拓展，以更好地满足不同实验室的使用需求。三是该方法的检出限和定量限需进一步明确。

为了改进原有方法中存在的这些问题，本次修订明确了方法的适用范围，包括了片剂、胶囊，液体、膏剂四种基质；修改了色谱条件；修改了方法的检出限和定量限的表达。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《保健食品中甘草酸的测定》的修订方案。

2023年11月~2024年1月，起草组单位根据《保健食品中甘草酸的测定》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甘草酸测定方法的实验室间方法验证工作。

2024年2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：

本方法的主要参数、公式、性能要求等主要依据 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则》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，方法满足片剂、胶囊、液体、膏剂剂型的保健食品中甘草酸的测定，具有普遍适用性。

（二）主要修订内容

1. 标准名称：

将标准名称修订为“保健食品中甘草酸的测定”，英文名称为

“Determination of glycyrrhizic acid in health foods”。

2. 适用范围：

在适用范围中增加了甘草酸测定适用的具体的剂型。将标准适用范围修改为：

本文件描述了保健食品中甘草酸的测定方法。

本文件适用于片剂、胶囊、液体、膏剂剂型保健品中甘草酸的测定。

3. 标准溶液的制备

甘草酸标准使用液（10.0 mg/mL）：准确称量甘草酸标准品 100 mg（精确至 0.01 mg），用甲醇溶解并定容至 10 mL，在 2℃~8℃冰箱中贮存，保存期 6 个月。

甘草酸标准系列工作液：分别吸取甘草酸标准使用液适量，用 50%甲醇水配制浓度为：1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、20.0 μg/mL、50.0 μg/mL、100.0 μg/mL、200.0 μg/mL 的甘草酸标准溶液。

4. 试样前处理的优化

1) 试样制备：近年保健食品的剂型不断增加，根据市场调查，目前含甘草酸的保健食品剂型包括片剂、胶囊、醋、酒等。同时根据近几年保健品剂型流行趋势，增加了膏剂。本方法根据不同的剂型分别规定了前处理方法。

2) 试样的净化

经过调研发现：目前保健食品中的甘草酸主要来自于甘草相关的提取物或加工物，成分非常复杂，此外，不同剂型的产品在加工过程

中还可能加入麦芽糊精、乳糖、微晶纤维素，羟甲基淀粉钠、羟丙基甲基纤维素、二氧化硅、明胶、麦芽糖醇、赤藓糖醇、琼脂、柠檬酸、香精等辅料成分。甘草酸的分子式为 $C_{42}H_{62}O_{16}$ ，辛醇水分配系数为3.2，具有较强的亲脂性，本文件采用50%甲醇水溶液对试样进行超声提取，在保证较好的浸润性的同时兼具高的提取效率。但由于样品的基质非常复杂，因此加入了HLB固相萃取小柱净化步骤。

5. 色谱参考条件

参考 GB/T22248-2008 色谱条件，并进行了优化，增加了 UPLC 测定参数。

6. 线性范围的选择

考虑到目前产品中甘草酸含量差异较大，从几mg/kg到数十g/kg不等，实验将线性范围修订为：1 $\mu\text{g/mL}$ ~ 200 $\mu\text{g/mL}$ 。

同时为了防止样品中甘草酸含量较高试样的测定浓度超出曲线范围，增加了“若超出线性范围，则用流动相对样品进行稀释后再测定”。

7. 计算公式的修订

本方法计算公式为计算保健食品中甘草酸的含量公式。与原标准相比进行了以下修订：

1) 由于试样前处理过程可能需求进行额外的稀释，故在公式中增加了稀释倍数“ f ”。

2) 修改了单位换算系数。

8. 检出限和定量限的修订

经过实验确定了方法的检出限和定量限为当胶囊、片剂和膏剂试样称样量为1.0 g 时，检出限为3 mg/kg，定量限为10 mg/kg。

当液体剂型试样称样量为1 mL时，检出限为3 mg/L，定量限为10 mg/L。

三、试验验证分析

方法线性关系：甘草酸 1~200 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内，相关系数 R^2 大于0.999，线性关系良好。方法准确度和精密度：该方法的回收率在92.3%~104%范围区间，6次平行实验结果的RSD%在2.33%~5.83%范围内，说明该方法精确度较好，能够满足保健食品中甘草酸的准确测定需求。方法重现性：方法验证基础上，起草工作组组织6家实验室进行验证，结果符合验证比对要求。

具体方法验证和实验室比对情况见附件。

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、过渡期和实施日期的建议

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：

保健食品中甘草酸的测定

方法学验证

1、检测方法的特异性

选择片剂、口服液、胶囊空白、膏剂与甘草酸的标准谱图进行比对，结果显示目标物保留时间为 3.24 min (UPLC)，7.59 min (HPLC) 空白辅料中无色谱峰对甘草酸检测造成干扰。

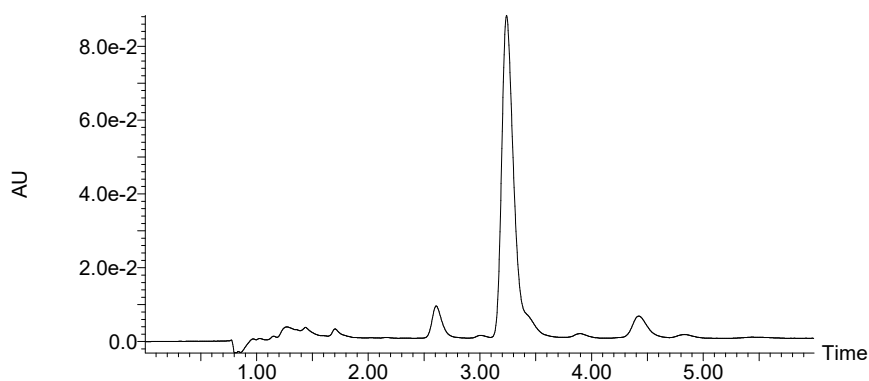


图 1 甘草酸标准品色谱图 (UPLC)

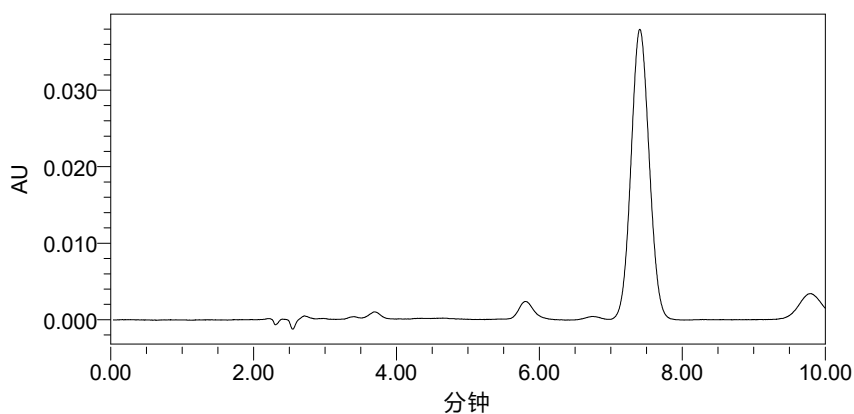


图 2 甘草酸标准品色谱图 (HPLC)

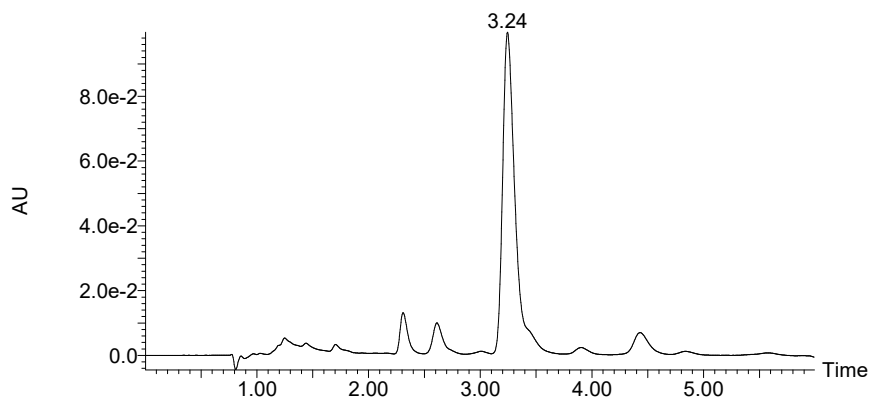


图 3 某口服液样品色谱图 (UPLC)

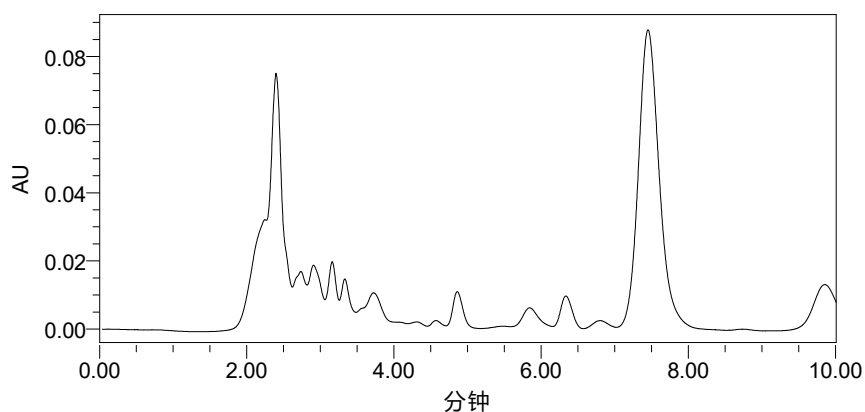


图 4 某片剂样品色谱图 (HPLC)

2、色谱条件的比较

2.1 色谱柱的选择

由于甘草酸具有较好的亲脂性,在普通的反相色谱柱上可达到良好的保留效果,本文件参考 GB/T 22248-2008 和文献,选择 C₁₈ 柱作为分离甘草酸的色谱柱。

2.2 流动相的选择

GB/T 22248-2008 使用的流动相条件为 67%甲醇+33%含有 0.2 mol/L 醋酸铵溶液,再加入 1%乙酸混合成的溶液等度洗脱,本文件经优化,将 HPLC 分析时乙酸铵浓度降至 0.1mol/L,同时,为了保护色谱柱和色谱仪,在等度洗脱之后增加了高有机相比例的流动相冲柱

子的步骤，具体为流动相 A：甲醇，流动相 B：0.1 mol/L 乙酸铵-0.5% 乙酸溶液，67%A 保持 10min，0.2 min 内上升至 95%，保持 4 min，然后降至 67%，平衡 5 min 等待下一针进样。

UPLC 选用 C₁₈ 柱，规格为 2.1 mm×100 mm, 1.7 μm 或性能相当者。流动相 A：甲醇，流动相 B：0.1%甲酸水，67%A 保持 5min，0.1 min 内上升至 98%，保持 2 min，然后将至 67%，平衡 2.5 min 等待下一针进样。

2.3 柱温和流速的选择

色谱柱温度和流速的改变可以影响目标化合物的出峰时间和响应强度，经实验，UPLC 条件下选择 0.3 mL/min 的流速和 35℃ 的柱温。

3、前处理方法比较

为了更好的比较不同前处理方法对甘草酸检测的影响，选择了片剂、胶囊、口服液和膏剂对试样的前处理方法进行了比对。

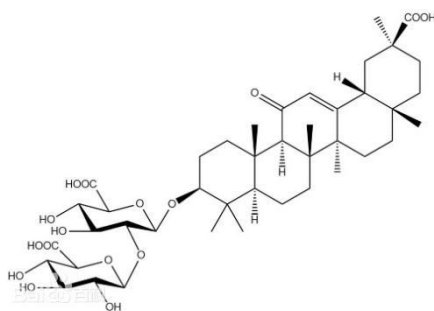


图 5 甘草酸结构式

甘草酸是一种三萜皂苷类化合物，其分子结构基础是由五个六元环和一个五元环组成的三萜骨架（图 5）。这种特殊的骨架结构决定了甘草酸具有一系列的生物活性。甘草酸易溶于热的水和稀乙醇，几

乎不溶于无水乙醇或乙醚，其水溶液有微弱的起泡性。考虑色谱分析流动相的组成，本文件使用 50%甲醇水溶液对样品进行提取，不同剂型中甘草酸的回收率在 92%-105%之间。

由于甘草酸相关保健品的成分非常复杂，除多种天然成分外，可能还有人工添加的辅料和添加剂，这些物质通常会被同时提取出来，对于高效液相色谱分析而言，过多的干扰物可能会对检测结果造成不良影响，且会降低色谱柱和检测器寿命，为了减少干扰物的影响，本文件采用 HLB 固相萃取柱对提取液进行净化，弃去流出液，甲醇洗脱。总体回收率在 92%-104%之间。

4、检出限

检出限估值：采用信噪比法估计方法检出限：向空白样品基质添加目标分析物，信噪比为 3 时的添加浓度作为估算检出限。结果显示当胶囊、片剂和膏剂试样称样量为 1.0 g 时，检出限为 3 mg/kg。当液体剂型试样取样量为 1 mL 时，检出限为 3 mg/L。

5、定量限

估算：向空白样品基质添加目标分析物，信噪比为大于 10: 1 时的添加浓度作为定量限。结果显示当胶囊、片剂和膏剂试样称样量为 1.0 g 时，定量限为 10 mg/kg。当液体剂型试样取样量为 1 mL 时，定量限为 10 mg/L。

测定：采用估算定量限浓度水平的有证标准物质/标准样品、质控样品或标准添加样品进行独立检测，至少检测 6 个平行样品。

表 1 方法定量限验证结果

样品名称	本底值	添加定量限 浓度 mg/kg	实测值 mg/kg	回收率 (%)	平均回收 率 (%)	相对标 准偏差 RSD%
硬胶囊	未检出	10	9.38	93.8	97.9	3.62
			9.42	94.2		
			9.74	97.4		
			9.85	98.5		
			10.1	101.4		
			10.2	102.3		
片剂	未检出	10	9.89	98.9	99.9	4.55
			9.82	98.2		
			10.2	102.3		
			9.23	92.3		
			10.2	102.3		
			10.5	105.4		
口服液	未检出	10	10.2	102.4	101.1	2.31
			9.85	98.5		
			10.4	104.1		
			10.4	103.9		
			9.98	99.8		
			10.4	103.6		
膏剂	未检出	10	9.39	93.9	98.3	5.59
			10.5	104.5		
			9.47	94.7		
			10.5	105.1		
			9.25	92.5		
			9.88	98.8		

6、测定范围

采用标准曲线法定量，定量方法标准曲线的线性相关系数应大于等于 0.99，并具有 7 个数据点（不包括 0 点）。

表 2 方法的标准曲线

浓 度 μg/mL	1	2	5	10	50	100	200
峰面积	23136	45669	110148	220300	1119624	2201577	4423089

标准曲线 $y=22100x$ 相关系数 $R^2 = 0.9999$
--

7、正确度和重复性

片剂、胶囊、膏剂以 20 mg/kg, 200mg/kg 和 2000 mg/kg 进行加标回收实验, 液体以 20 mg/L、200 mg/L、2000 mg/L 进行 6 次平行独立试验。计算每个样品中目标分析物的浓度, 计算每个浓度的平均回收率, 计算 6 次重复性实验的标准偏差。结果显示回收率在 92.3%~103.6%之间, 如表 3 所示。

表 3 三个加标水平下方法正确度和重复性验证结果 (%)

剂型	20 mg/kg		200 mg/kg		2000 mg/kg	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
胶囊	95.9	4.55	99.7	2.33	96.4	3.86
片剂	92.3	5.48	99.4	4.74	94.5	3.21
口服液*	101.3	5.75	98.3	5.83	103.5	2.64
膏剂	94.9	4.06	103.6	2.87	102.9	4.48

*加标水平的单位为 mg/L

8、重现性

本方法经过中国海关科学技术研究中心、北京化工大学、北京市科学技术研究院分析测试研究所、北京市朝阳区疾病预防控制中心、北京市延庆区疾病预防控制中心、北京市疾病预防控制中心等 6 家单位, 根据标准草案进行实验室间方法验证 (包括检出限、定量限、测定范围、正确性和再现性), 结果符合要求, 实际样品再现性验证结果见表 4。

表 4 实际样品实验室间比对结果

编号	甘草酸含量 (mg/kg)						RSD (%)
	Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5	Lab 6	
GCS-02S (胶囊)	2728	2551	2889	2640	2598	2742	4.52
GCS-03S (片剂)	41790	39736	40750	45231	42238	41852	4.43
GCS-06S (口服液)	396	375	412	410	399	386	3.57
GCS-12S (醋)	30.9	29.7	29.2	28.4	27.7	30.0	3.92