

《保健食品中绿原酸的测定》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），《保健食品中绿原酸的测定》（计划号 20230863-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）研究背景

绿原酸（CGA）是在奎宁酸和某些反式肉桂酸之间形成的一类不同酯（单酯、二酯、三酯和混合酯），主要是咖啡酸、阿魏酸或对香豆酸。5-O-咖啡酰奎宁酸（5-CQA）是在奎宁酸和咖啡酸之间形成的单酯，直到现在，仍然会被错误地称为 CGA 或 3-CQA（IUPAC 早期的命名编号）。需要强调的是，当前文献出现的术语 CGA 仅用于指代相关奎宁酸偶联物家族。类似的其他膳食酚类化合物 CGAs 在咖啡豆和不同形式的咖啡以及人类饮食中的许多果蔬中含量丰富，如苹果、梨、桃、李子、杏、樱桃、蓝莓、草莓、茄子、番茄和马铃薯。一些生物学、药理学和生理学研究报告指出，食用富含 CGA 的饮食对人体健康起着有益的作用。它们包括强大的抗氧化活性，延缓衰老，以及与氧化应激相关的各种疾病，例如某些类型的癌症和神经

退行性疾病。同时发现有明显的降血压、降糖和降脂的作用。

由于从大量基质中逐渐发现和分离出单个异构体，并且由于发现后术语系统的变化，各个时期的文章之间的差异很常见。造成这种混淆的原因是，该家族的主要化合物 5-咖啡酰奎宁酸（也称为绿原酸）在 1976 年之前被真正称为 3-咖啡酰奎宁酸，同年，发布了新的命名规则。然而，许多研究人员和化学品供应商继续使用“pre-IUPAC”命名法，并错误地将 3-咖啡酰奎宁酸称为绿原酸，这是该化合物家族的主要取代基。于是，在提到绿原酸时，会出现 3-CQA 和 5-CQA 的不同叫法。尽管名称中有“氯”，但绿原酸不含氯。这个名字来自希腊语，意思是浅绿色。这很可能是因为化合物被氧化时产生的绿色。

1932 年，Fischer 和 Dangschat 通过从生咖啡豆中分离出来，建立了 3-O-咖啡酰奎宁酸的结构，即目前 IUPAC 命名法的 5-O-咖啡酰奎宁酸（5-CQA）。首先，必须说明绿原酸这个名称不应仅用于一种化合物，而应描述在某些顺式或反式肉桂酸之间形成的一个或多个酯家族，主要是咖啡酸、阿魏酸或对香豆酸，以及奎宁酸。

最大的差异是属于咖啡酰奎宁酸的两种化合物的名称，即 5-CQA 和 3-咖啡酰奎宁酸（3-CQA），它们通常分别称它们为绿原酸和新绿原酸。这些是光学异构体，如果研究人员的命名法没有得到很好地认可，就很难区分。如果不使用说明绿原酸的空间结构，则不可能识别上述两种对映异构体。

如上所述，最大的问题是 5-CQA 和 3-CQA 的换向。如今，这两种化合物都以纯晶体形式提供，可从供应商处购买。不幸的是，大

多数供应商保留了 IUPAC 之前的命名法，并以 3-咖啡酰奎宁酸的形式出售绿原酸。这可能是因为在 1976 年，当 IUPAC 的环醇编号系统发布时，绿原酸的名称实际上是 3-咖啡酰奎宁酸。最佳的购买识别，是以 CAS 号来进行辨认。

（三）主要工作过程

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《保健食品中绿原酸的测定》的修订方案。

2023 年 11 月~2024 年 1 月，开展实验室内方法验证的工作。

2024 年 1 月，开展新修订保健食品中绿原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

本标准是根据 GB/T1.1-2020《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构与编写规则》进行编写。

（二）标准主要内容及其确定依据

1. 标准名称：

为《保健食品中绿原酸的测定》，与原标准一致。

2. 适用范围:

适用于添加了植物提取物的保健食品中绿原酸含量的测定。修订后的标准包括目前市售的所有含绿原酸的剂型（片剂、硬胶囊、软胶囊、口服液、硬糖）。

3. 高效液相色谱检测条件变化:

(1) 流动相调整：A 为乙腈，B 为 0.1%磷酸溶液，梯度洗脱条件见表 1。修订后采用梯度洗脱，流动相由原标准 0.5%乙酸溶液—乙腈体系改为 0.1%磷酸溶液—乙腈体系，并采用梯度洗脱，不仅可以有效实现对绿原酸异构体的良好分离，无叠加干扰，峰型较好，而且通过梯度洗脱方式可去除部分基质干扰。

4. 检出限和定量限

经过实验确定了方法的检出限和定量限，以信噪比 $S/N=3$ 为方法检出限（LOD）：当样品称样量为 1 g，提取液体积为 25 mL 时，检出限为 3 mg/kg；以信噪比 $S/N=10$ 为方法定量限（LOQ）：当样品称样量为 1 g，提取液体积为 25 mL 时，定量限为 10 mg/kg。

三、试验验证的分析

本次标准修订方法，以绿原酸（ $C_{16}H_{18}O_9$ ，3-咖啡酰奎宁酸）为定量外标，在 0.5~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内，相关系数大于 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 90.8%~105%范围区间，不同剂型 6 次平行试验结果的 RSD%在 1.01%~3.50%范围区间，说明该方法精确度较好，能够满足保健食品中绿原

酸的准确测定。方法重现性：方法验证基础上，组织实验室比对，结果符合验证比对要求。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

国际上有关绿原酸的标准方法有 AOAC Official Method 957.04 和 AOAC Official Method 957.05，AOAC Official Method 957.05 是 AOAC Official Method 957.04 方法的修改补充，增加了烤咖啡和速溶咖啡的测定方法。该方法采用紫外分光光度法测定咖啡中的绿原酸总量，仅适用于各类咖啡。

本研究与 AOAC Official Method 957.04 和 AOAC Official Method 957.05 的样品检测方法不同，采用高效液相色谱法，可对单一绿原酸准确定量，可以有效实现对绿原酸异构体的良好分离，无叠加干扰，峰型较好。

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

本标准发布实施后，GB/T 22250-2008 废止。

附件：方法学验证内容

附件

保健食品中绿原酸的测定方法学验证内容

1、条件优化过程

(1) HPLC 流动相梯度的优化

表1 流动相梯度洗脱程序1（方法最终选取梯度）

时间/	流动相 A/ %	流动相 B（乙腈）/ %
0	90	10
5	90	10
18	60	40
18.5	20	80
20.0	20	80
21.0	90	10
25.0	90	10

表2 流动相梯度洗脱程序2（文献）

时间/	流动相 A/ %	流动相 B（乙腈）/ %
0	90	10
15	60	40
20	60	40
21	10	90
24	10	90
24.1	90	10
28	90	10

柱温：30℃，流速 1 mL/min 条件下，分别验证了色谱柱 1（Luna C18 250*4.6, 5 μm）和色谱柱 2（SymmetryShield RP18 250*4.6, 5 μm）实验结果：使用流动相梯度洗脱程序 1 条件时，色谱柱 1 可以将 6 种

绿原酸分离，色谱柱 2 无法分离绿原酸和隐绿原酸。使用流动相梯度洗脱程序 2 条件时，色谱柱 1 和色谱柱 2 均可以分离。

经查询，色谱柱 2 填料硅胶颗粒表面经极性基团修饰，可以使用全水流动相，和普通 C₁₈ 极性不完全相同。

(2) 流动相 A 为甲酸 (FA) 和磷酸 (H₃PO₄) 体系的比较

表 3 不同 A 相和梯度条件下多组分绿原酸异构体保留时间 (min)

绿原酸异构体	A 相为 0.1%FA 洗脱程序 1 RT	A 相为 0.1%H ₃ PO ₄ 洗脱程序 2 RT	A 相为 0.1%H ₃ PO ₄ 洗脱程序 1 RT
新绿原酸	8.5	7.4	8.6
绿原酸	12.1	9.5	12.2
隐绿原酸	12.5	9.2	12.6
异绿原酸 B	17.1	14.6	17.1
异绿原酸 A	17.6	15.4	17.7
异绿原酸 C	18.0	15.9	18.0

目前，从文献调研的流动相可以看出，中国药典以及其他世界各地的药典，为磷酸体系，部分多酚或绿原酸（异构体）的地方标准、团体标准或行业标准为甲酸/乙酸体系，原保健食品绿原酸的测定为乙酸体系。以下为绿原酸异构体甲酸和磷酸体系分离效果的比较：

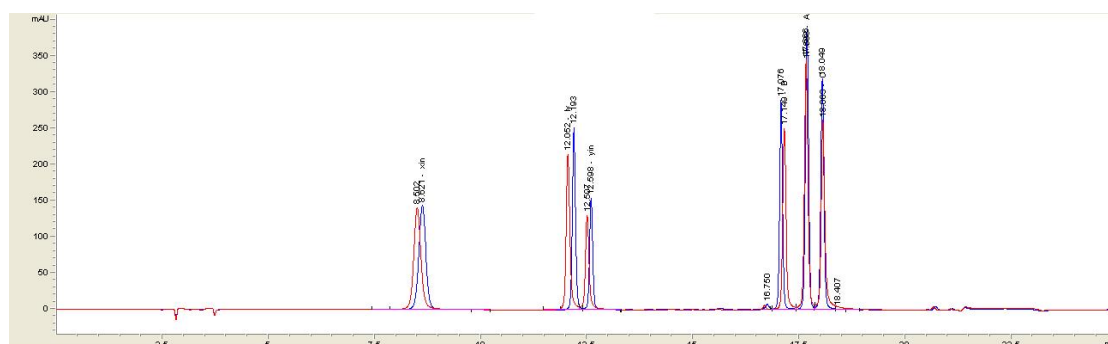


图 1 流动相 A 为 0.1%FA 和 0.1% H₃PO₄ 标准品色谱图对比

图 1 中，红色为 0.1%FA 色谱图，蓝色为 0.1% H₃PO₄ 色谱图。

可以看出，H₃PO₄体系的峰形得到改善，灵敏度更高。

(3) 绿原酸和隐绿原酸分离度

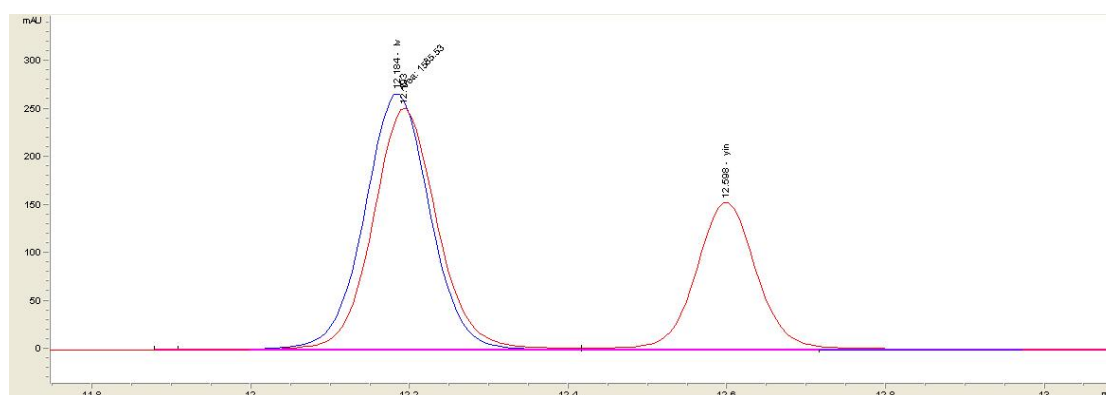


图2 绿原酸和隐绿原酸的分离效果

图2中，蓝色图线为绿原酸单一标准，红色图线为混合标准物质绿原酸与隐绿原酸的有效分别。

(4) 滤膜对绿原酸类化合物的影响

使用尼龙材质 0.45 μm 有机滤膜，发现滤膜对异绿原酸 A、B、C 均有不同程度的吸附，对绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸无明显吸附。

表4 50 μg/mL的标准溶液过膜后浓度 (μg/mL)

化合物	新绿原酸	绿原酸	隐绿原酸	异绿原酸 A	异绿原酸 B	异绿原酸 C
过膜后浓度	50.0	49.1	48.5	41.1	39.0	39.5

流动相梯度洗脱程序 1 绿原酸和隐绿原酸分离度更高，A 相为 0.1% H₃PO₄ 下绿原酸峰型更佳，灵敏度更高，故最终选取流动相梯度洗脱程序 1，使用 0.1% H₃PO₄ 和乙腈作为流动相。

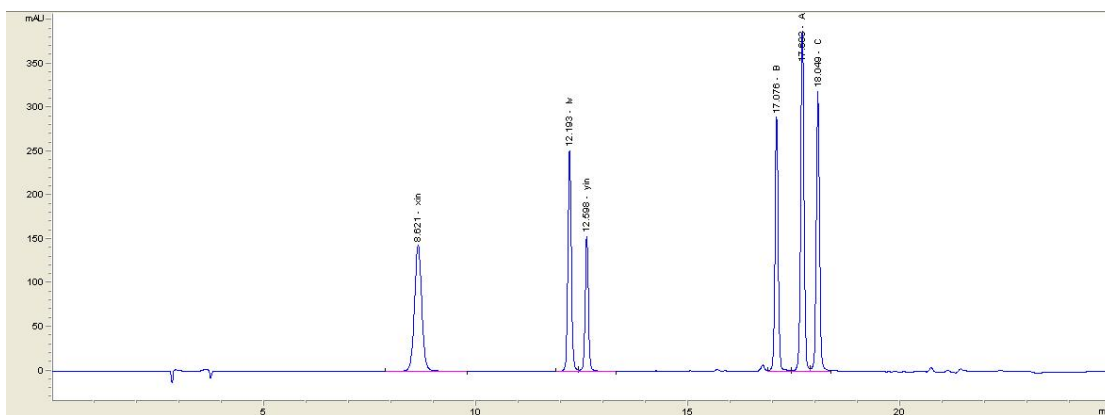


图3六种绿原酸类化合物标准品色谱图（浓度均为49 μg/mL）

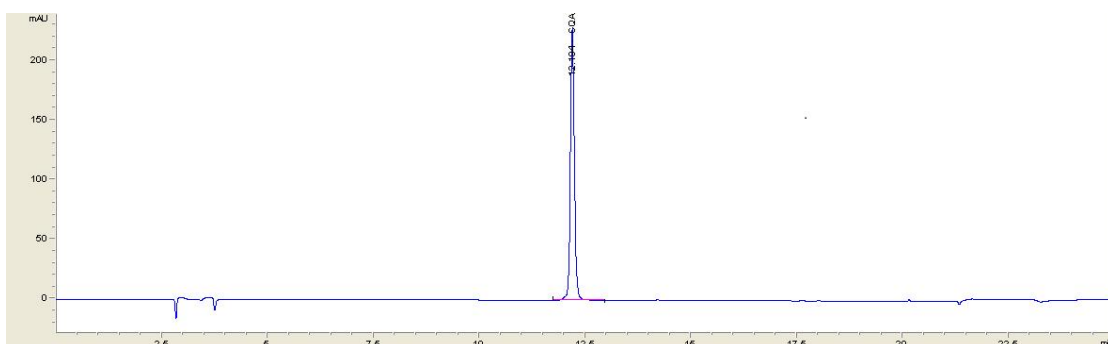


图4 绿原酸单一标准品色谱图（浓度为50 μg/mL）

表5校准曲线线性范围，线性方程和相关系数

化合物	线性范围	线性方程	相关系数
绿原酸	0.5-50 μg/mL	$Y=31.0X+3.15$	$R=0.9999$

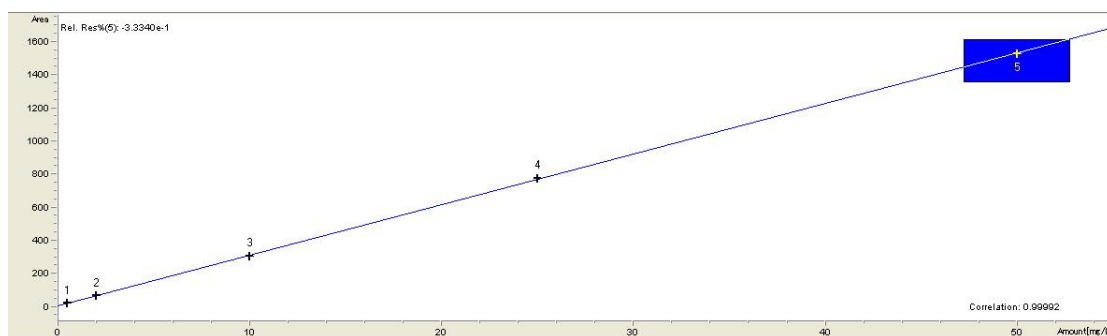


图 5 绿原酸 校准曲线线性范围，线性方程和相关系数

(5) 植物提取物原料等样品测定及提取剂的优化选择

采用 30%、50%和 70%甲醇水对咖啡提取物进行提取，结果显示 70%甲醇水提取效率更高。

表6 提取液优化实验

提取液	绿原酸峰面积 (m · Au)
30%甲醇	11664
50%甲醇	10610
70%甲醇	12433

表7植物提取物原料等测定浓度 (μg/mL)

目标化合物	绿咖啡提取物 测定值	金银花提取物 测定值	金银花茶 测定值
新绿原酸	68.3	4.0	8.8
绿原酸	406.5	8.9	561.3
隐绿原酸	188.5	12.5	19.6
异绿原酸 B	59.5	3.0	6.7
异绿原酸 A	32.8	1.5	131.6
异绿原酸 C	66.0	2.1	34.5

说明：绿咖啡提取物：陕西产；金银花提取物：陕西产；金银花茶：安徽产。

通过对植物提取物和天然产物的测定，发现多数情况下作为功效成分选择绿原酸作为标志物，结果基本相符。虽然目前对绿原酸异构体等酚类化合物的研究比较活跃，药典仍然选择绿原酸为功能标志物。采用梯度洗脱的优化方式，其目的是还需要考虑将异构体得到有效分离，避免植物提取物异构体的干扰绿原酸的定量。

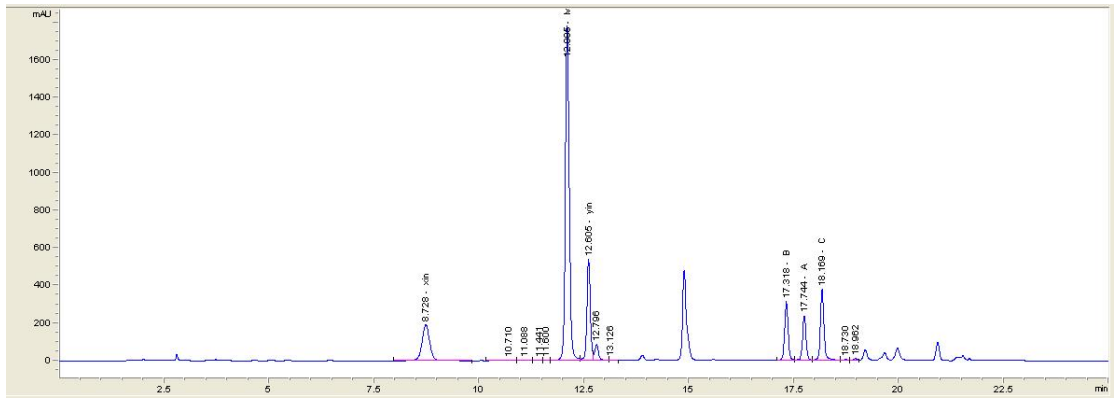


图 6 绿咖啡提取物色谱图

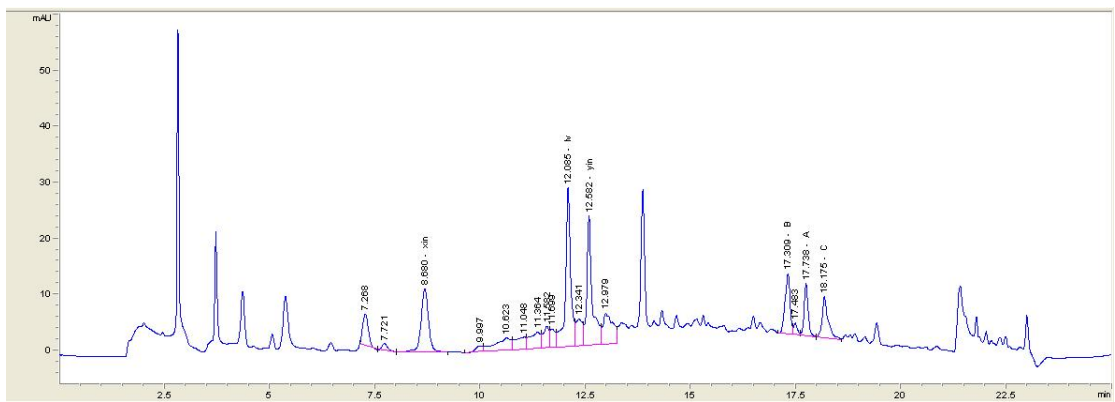


图7 金银花提取物色谱图

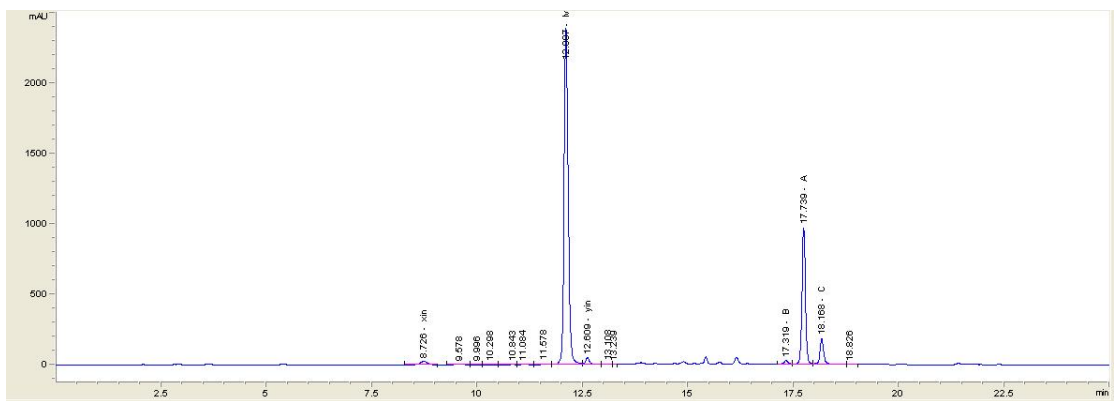


图8 金银花茶色谱图

(7) 绿原酸标准溶液的稳定性

对绿原酸标准溶液的稳定性的研究多数在分析方法的开发和方法学验证的文献中有涉及。作者 Irina N. Urakova (Irina N. Urakova,

Olga N. Pozharitskaya, Alexander N. Shikov, Vera M. Kosman, Valery G. Makarov , Comparison of high performance TLC and HPLC for separation and quantification of chlorogenic acid in green coffee bean extracts , J. Sep. Sci. , Volume31, Issue2 , 237-241 , 2008 , <https://doi.org/10.1002/jssc.200700472>) 提到, 在采用 HPLC 法定量分析绿咖啡豆提取物中绿原酸的含量时, 绿原酸储备液和工作液在 4℃ 条件下保存时, 一周内稳定, 无分解。本工作组将浓度为 50 μg/mL 工作液在 4℃ 存放 20 天后测定, 浓度降低小于 10%。

2、特异性

在空白溶剂和空白辅料干扰性试验中, 选择空白溶剂, 软胶囊、口服液、硬糖、硬胶囊、片剂的空白辅料与绿原酸标准溶液进行比对, 结果显示绿原酸保留时间为 9.353, 空白溶剂及各剂型的空白辅料均不干扰绿原酸峰的测定。见图 9-15。

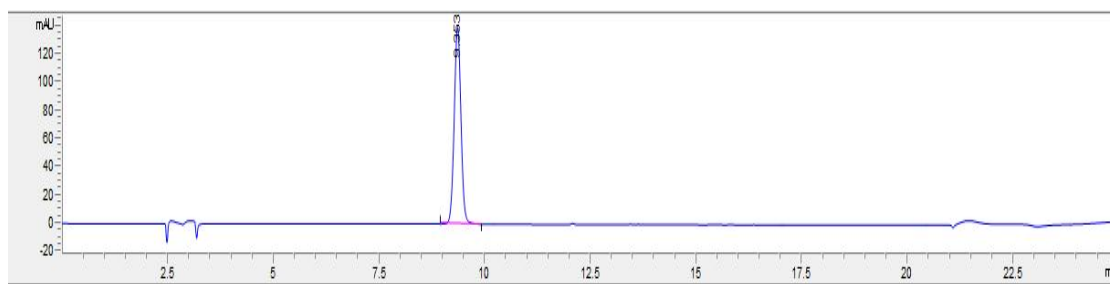


图9 绿原酸标准溶液

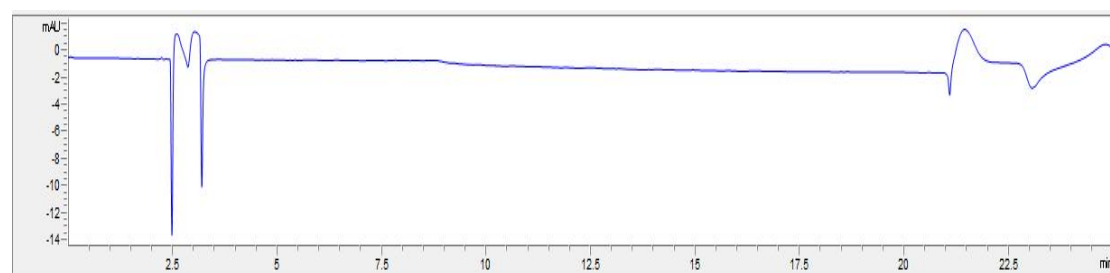


图10 空白溶剂

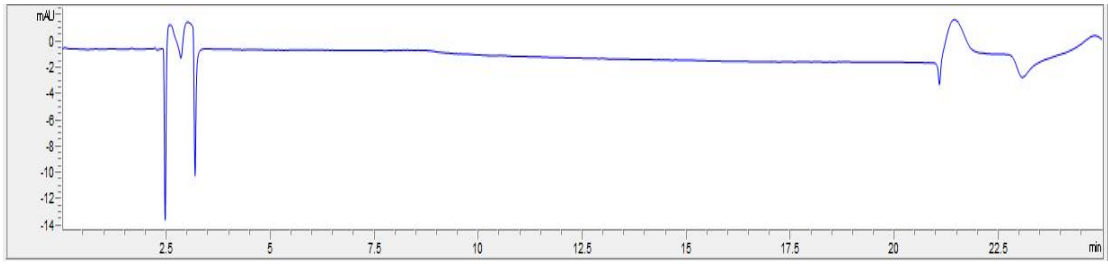


图11 空白辅料（软胶囊）

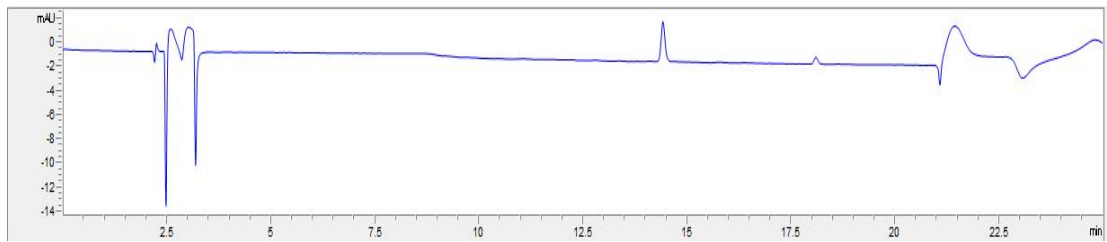


图12 空白辅料（口服液）

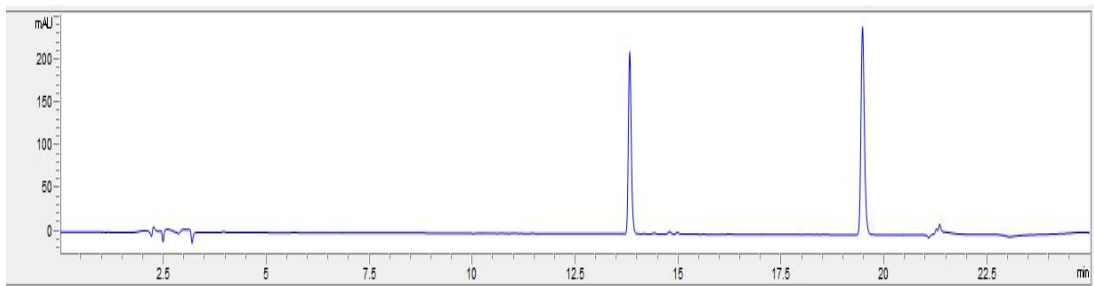


图13 空白辅料（硬糖）

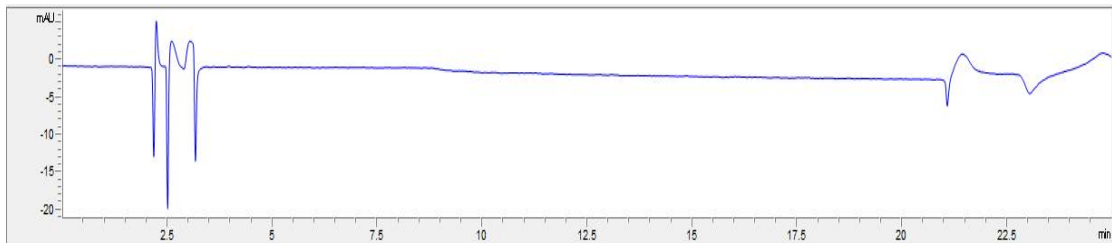


图14 空白辅料（硬胶囊）

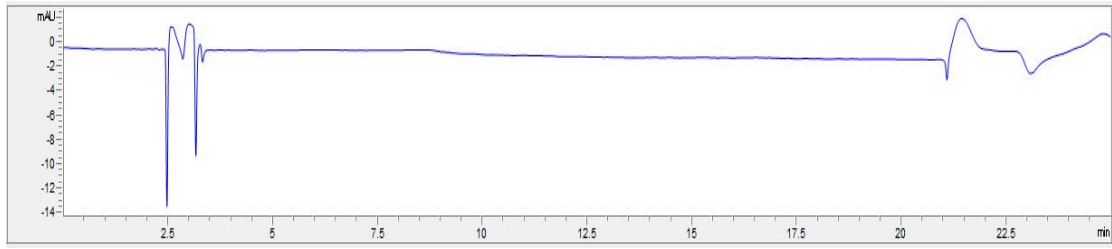


图15 空白辅料（片剂）

3、定量限

分别称取不同剂型的空白辅料 1g（精确至 0.01 g），分别置 50 ml 离心管中，分别加入绿原酸标准储备液（200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）50 μL ，相当于试样中的绿原酸含量仅为 10 mg/kg ，以标准草案中相应前处理方式进行操作后，上机测定。结果见表 8。

表8 定量限结果一览表

剂型	试样称量（g）	加入绿原酸（200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）体积（ μL ）	定量限（ mg/kg ）
片剂	1.0018	50	10
硬胶囊	1.0026	50	10
软胶囊	1.0033	50	10
口服液	1.0021	50	10
硬质糖果	1.0009	50	10

当取样量为 1.0 g，提取液体积为 25 mL 时，本方法的定量限为 10 mg/kg 。

4、检出限

分别精密量取定量限溶液 3 mL，置 10 mL 量瓶中，加70%甲醇定容至刻度，上机测定，结果见表9。

表9 检出限结果一览表

剂型	片剂	硬胶囊	软胶囊	口服液	硬质糖果
检出限(mg/kg)	3	3	3	3	3

当取样量为 1.0 g，提取液体积为 25 mL 时，本方法的检出限为 3 mg/kg。

5、测定范围

标准曲线：绿原酸在 0.5~50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围，线性良好 ($R^2 > 0.999$)。

表10 方法的标准曲线

序号	1	2	3	4	5
浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	0.500	2.00	10.0	25.0	50.0
峰面积	19.10181	66.13026	332.72525	803.46625	1610.87817
线性方程及 R^2	$Y=32.11681X+4.41612$ $R^2=1.0000$				

6、正确度和重复性

以 10 mg/kg，50 mg/kg 和 500 mg/kg 三个水平进行加标回收率实验，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、每个浓度的平均回收率以及 6 次重复性实验的相对标准偏差。结果显示回收率在 90.8%~105%之间，相对标准偏差在 1.01%~3.50%范围区间。详见表 11。

表11 正确度和重复性试验结果

样品名称	本底值	添加水平 mg/kg	标曲查得 浓度 $\mu\text{g/mL}$	回 收 率 (%)	平均回收 率 (%)	相对标 准 偏 差 RSD%
软胶囊	未检出	10	0.495	99.0	95.9	2.20
			0.468	93.6		
			0.484	96.8		
			0.469	93.8		
			0.486	97.2		
			0.476	95.2		

		50	2.32	92.8	93.1	1.58
			2.28	91.2		
			2.38	95.2		
			2.36	94.4		
			2.31	92.4		
			2.31	92.4		
		500	24.6	98.4	98.7	1.55
			24.6	98.4		
			25.3	101		
			25.1	100		
			24.3	97.2		
			24.3	97.2		
饮料/口服液	未检出	10	0.493	98.6	95.8	2.37
			0.483	96.6		
			0.465	93.0		
			0.480	96.0		
			0.466	93.2		
			0.487	97.4		
		50	2.28	91.2	92.1	1.94
			2.27	90.8		
			2.37	94.8		
			2.28	91.2		
			2.35	94.0		
			2.27	90.8		
		500	24.9	99.6	101	1.24
			25.1	100		
			25.2	101		
			25.3	101		
			25.7	103		
			25.6	102		
硬糖	未检出	10	0.469	93.8	94.9	3.17
			0.501	100		
			0.485	97.0		
			0.459	91.8		
			0.467	93.4		

			0.468	93.6		
		50	2.46	98.4	99.1	1.76
			2.47	98.8		
			2.55	102		
			2.42	96.8		
			2.47	98.8		
			2.50	100		
		500	25.8	103	102	1.61
			25.8	103		
			26.1	104		
			25.5	102		
			25.5	102		
			24.8	99.2		
酒剂	未检出	10	0.470	94.0	98.7	3.50
			0.484	96.8		
			0.484	96.8		
			0.498	99.6		
			0.508	102		
			0.513	103		
		50	2.62	105	100	3.37
			2.49	99.6		
			2.51	100		
			2.37	94.8		
			2.54	102		
			2.48	99.2		
		500	24.9	99.6	101	1.51
			25.5	102		
			25.6	102		
			24.6	98.4		
			25.3	101		
			25.4	102		
醋	未检出	10	0.495	99.0	96.9	1.64
			0.487	97.4		
			0.475	95.0		
			0.485	97.0		

			0.489	97.8			
			0.475	95.0			
		50		2.52	101	102	1.01
				2.57	103		
				2.52	101		
				2.58	103		
				2.57	103		
				2.58	103		
		500		2.52	101	102	1.19
				2.57	103		
				2.52	101		
				2.58	103		
				2.57	103		
				2.58	103		

7、再现性（实验室间方法验证）

本方法经过中国海关科学技术研究中心、深圳市计量质量检测研究院、河北晨光检测技术服务有限公司、成都市食品检验研究院、北京疾病预防控制中心、劲牌有限公司、中轻技术创新中心有限公司等单位，根据修订方法进行实验室间验证，测定结果符合要求，实际样品再现性比对结果见表 12。

表 12 再现性验证结果

样品编号	绿原酸含量 (mg/kg)						RSD(%)
	Lab1	Lab2	Lab3	Lab4	Lab5	Lab6	
LYS-08S (糖)	736	704	676	723.08	760	741	4.12
LYS-12S (酒)	14.8	15	14.7	21.5 (G 值检验离群)	15.2	16.3	4.24
LYS-06S (口服液)	255	256	250	281.71	265	未收到该样品	4.78