

团 体 标 准

T/GDFCA xxx—2023

光果甘草根提取物的真伪鉴别 高效液相色谱法

Indentification of Glycyrrhiza glabra L Root Extract by HPLC method

2023 – XX – XX 发布

2023 - XX – XX 实施

广东省食品流通协会 发 布

目 次

前 言..... 1

1 范围..... 2

2 规范性引用文件..... 2

3 术语和定义..... 2

4 原理..... 2

5 试剂和材料..... 2

6 仪器和设备..... 3

7 测定步骤..... 3

8 结果计算和表述..... 4

9 检出限、定量限..... 4

10 精密度..... 5

11 回收率..... 5

附 录 A （资料性） 高效液相色谱法测定光果甘草根提取物真伪的典型色谱图..... 6

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。

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。

本文件由广东省食品流通协会提出并归口。

本文件起草单位：无限极（中国）有限公司，江南大学，广东省食品流通协会。

本文件主要起草人：XXX

本文件为首次发布。

光果甘草根提取物的真伪鉴别 高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了光果甘草根提取物（主要为光甘草定40%，不适用于高浓度光甘草定，其他药材的适用度未考察过，若药材中含有本方法中所检测的物质，可以参考使用。）中黄酮类标志物光甘草定、芒柄花黄素，三萜类标志物甘草酸、光甘草醇、甘草内酯含量的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于甘草提取粉末中光甘草定、芒柄花黄素、甘草酸、光甘草醇、甘草内酯含量的测定，其他固体、半固体植物提取物可参照执行。本方法通过对潜在的廉价甘草提取物和光果甘草根提取物Glabridin-40中的主要功效成分和含量测定，实现光果甘草根提取物Glabridin-40真伪鉴定，保障消费者权益。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样经甲醇超声提取，过滤，续滤液中各物质经液相色谱柱分离后，用紫外检测器进行检测，用保留时间进行定性，外标法定量。

5 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 甲醇（CH₃OH，CAS 号：67-56-1）：色谱纯。

5.2 乙腈（C₂H₃N，CAS 号：75-05-8）：色谱纯。

5.3 磷酸（H₃PO₄，CAS 号：7664-38-2），分析纯。

5.4 0.05% 磷酸水溶液：取 500μL 磷酸（5.1），加一级水定容至 1L。

5.5 标准物质：

光甘草定标准物质（Glabridin，C₂₀H₂₀O₄，CAS 号：59870-68-7），纯度≥98%。

芒柄花黄素标准物质（Formononetin，C₁₆H₁₂O₄，CAS 号：485-72-3），纯度≥98%。

甘草酸标准物质（Glycyrrhizic acid，C₄₂H₆₂O₁₆，CAS 号：1405-86-3），纯度≥98%。

光甘草醇标准物质（Glabrol，C₂₅H₂₈O₄，CAS 号：59870-65-4），纯度≥98%。

甘草内酯标准物质（Glabrolide，C₃₀H₄₄O₄，CAS 号：10401-33-9），纯度≥98%。

5.6 标准储备液（1000 mg/L）：准确称取 10 mg（精确至 0.1 mg）标准物质（5.3），用甲醇（5.1）溶解并定容到 10 mL，混合均匀。标准储备液避光于≤4℃下储存，有效期 2 个月。

5.7 标准工作溶液：

芒柄花黄素标准工作溶液：分别吸取适量的芒柄花黄素标准储备液（5.4）至 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配成 5 µg/mL、10 µg/mL、15 µg/mL、20 µg/mL、25 µg/mL、30 µg/mL 的标准工作溶液（可根据样品含量适当调节溶液的浓度），临用现配。

光甘草定、甘草酸、光甘草醇、甘草内酯标准工作液：分别吸取适量的光甘草定、甘草酸、甘草内酯、光甘草醇标准储备液（5.4）至 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配成 200 mg/L、400 mg/L、600 mg/L、800 mg/L、1000 mg/L、1200 mg/L 的标准工作溶液（可根据样品含量适当调节溶液的浓度），临用现配。

5.8：实验材料：离心管、烧杯、量筒、移液枪、注射器、微孔滤膜（孔径 0.22 µm，有机系）。

6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器（或二极管阵列检测器）。
- 6.2 分析天平：感量 0.01 g 和 0.0001 g。
- 6.3 超声波清洗器。
- 6.4 高速离心机：转速不低于 8000 r/min。

7 测定步骤

7.1 样品预处理

精密称取 0.5 g（精确至 0.01）甘草提取物粉末于 50 mL 离心管中，加入 25 mL 甲醇充分溶解，称量。在超声水浴温度 25 °C 条件下超声提取 30 min，冷却至室温后称量，用甲醇补足余量，避光储存，以 4000 r/min 离心 5 min，取上清液过 0.22 µm 微孔滤膜，取续滤液为供试品溶液。

7.2 液相色谱参考条件

- 7.2.1 色谱柱：C₁₈ 色谱柱（250 mm×4.6 mm，5 µm），或性能相当者。
- 7.2.2 柱温：35 °C。
- 7.2.3 流动相：乙腈、0.05%磷酸水溶液，梯度洗脱。
- 7.2.4 洗脱程序：
 - （1）检测光甘草定、芒柄花黄素

时间（min）	A%（乙腈）	B%（0.05%磷酸水溶液）
0	20	80
5	20	80
45	70	30
55	95	5
65	20	80
70	20	80

（2）检测甘草酸、光甘草醇、甘草内酯

时间（min）	A%（乙腈）	B%（0.05%磷酸水溶液）
0	20	80
5	20	80

40	60	40
55	95	5
65	20	80
70	20	80

- 7.2.5 检测波长：280 nm。
- 7.2.6 进样量：20 μL。
- 7.2.7 流速：1.0 mL/min。

7.3 液相色谱测定

按照上述色谱条件下分别对标准工作溶液和样品试液进行检测，得到相应的标准工作液和样品试液中光甘草定、芒柄花黄素、甘草酸、光甘草醇、甘草内酯的色谱峰面积，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线；以保留时间对样品进行定性，保留时间允许误差范围为1%，标准曲线外标法对样品定量。当检测样品基质复杂，杂质干扰后续检测时，可适当调整色谱条件。典型色谱图参见附录A。

7.4 空白试验

除不加试样外，采用与试样完全相同的分析步骤进行。

8 结果计算和表述

试样中物质含量按式(1)计算：

$$X = (C - C_0) \times V \times f / m \cdots \cdots (1)$$

式中：

- X ——试样中标志物含量，单位为毫克每克（mg/g）；
- C ——根据标准曲线测得样品溶液各标志物质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；
- C_0 ——根据标准曲线测得空白溶液各标志物质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；
- V ——样品定容体积，单位为升（L）；
- f ——样品溶液稀释倍数；
- m ——称取样品粉末的质量，单位为克（g）。

计算结果应扣除空白值，计算结果用平行测定的算数平均值表示，保留三位有效数字。

9 检出限、定量限

当试样质量为0.5 g，定容体积为25 mL时，本方法检测样品中光甘草定的检出限为10 mg/g，芒柄花黄素的检出限为0.005 mg/g，甘草酸的检出限为10 mg/g，光甘草醇的检出限为0.01 mg/g，甘草内酯的检出限为5 mg/g，空白试验应无干扰。

光果甘草根提取物Glabridin-40的的标志物指标定量限可参照符合表1要求。（A：表1是资料性）

项目		指标
黄酮类标志物指标	光甘草定（Glabridin）（mg/g）	≥280
	芒柄花黄素（mg/g）	≥1
三萜类标志物指标	甘草酸（mg/g）	≥200

	光甘草醇（mg/g）	≥1
	甘草内酯（mg/g）	≥10

10 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算数平均值的10 %。

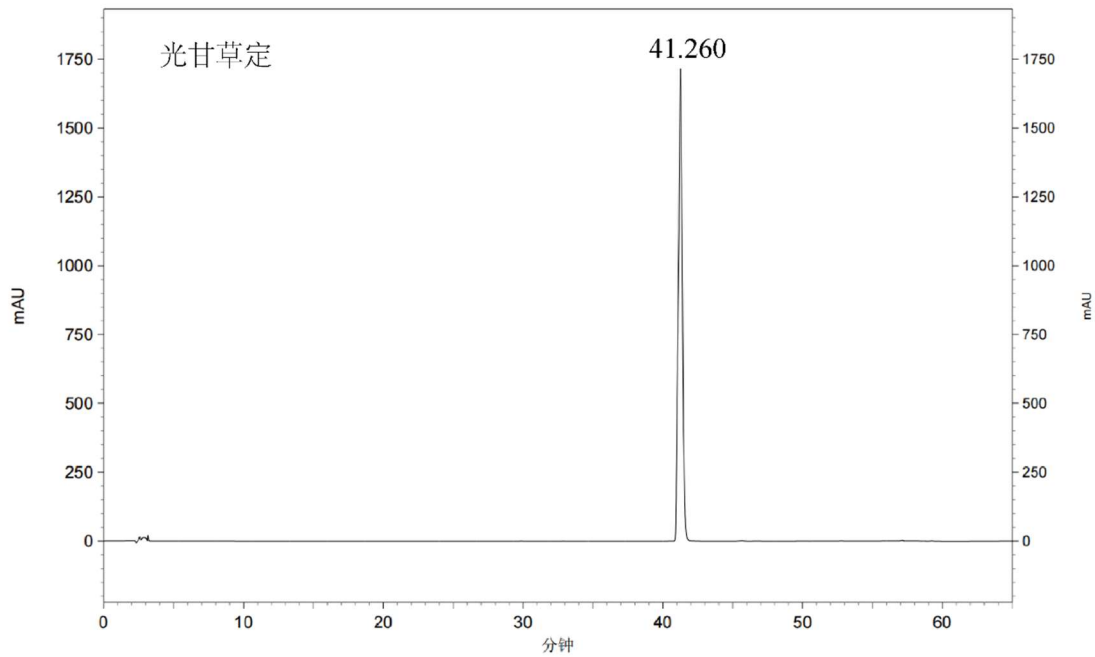
11 回收率

本方法检测芒柄花黄素的线性范围为5 μg/L~30 μg/L，检测光甘草定芒柄花黄素、甘草酸、光甘草醇、甘草内酯的线性范围为200 mg/L~1200 mg/L，标准曲线相关系数≥0.99，回收率范围为80 %~120 %。

附录 A
(资料性)

高效液相色谱法测定光果甘草根提取物真伪的典型色谱图

A.1 光甘草定物质色谱图，见图 A.1。



图A.1 光甘草定标准物质色谱图（800 mg/L）

A.2 芒柄花黄素物质色谱图，见图 A.2。

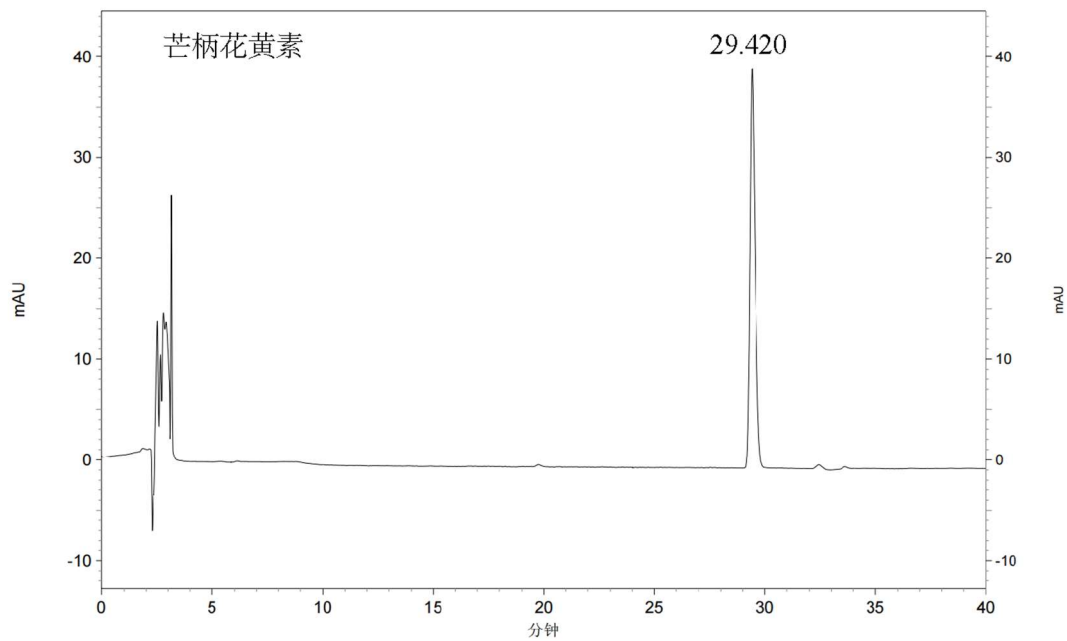


图 A.2 芒柄花黄素标准物质色谱图（20 mg/L）

A. 3 甘草酸物质色谱图，见图 A.3。

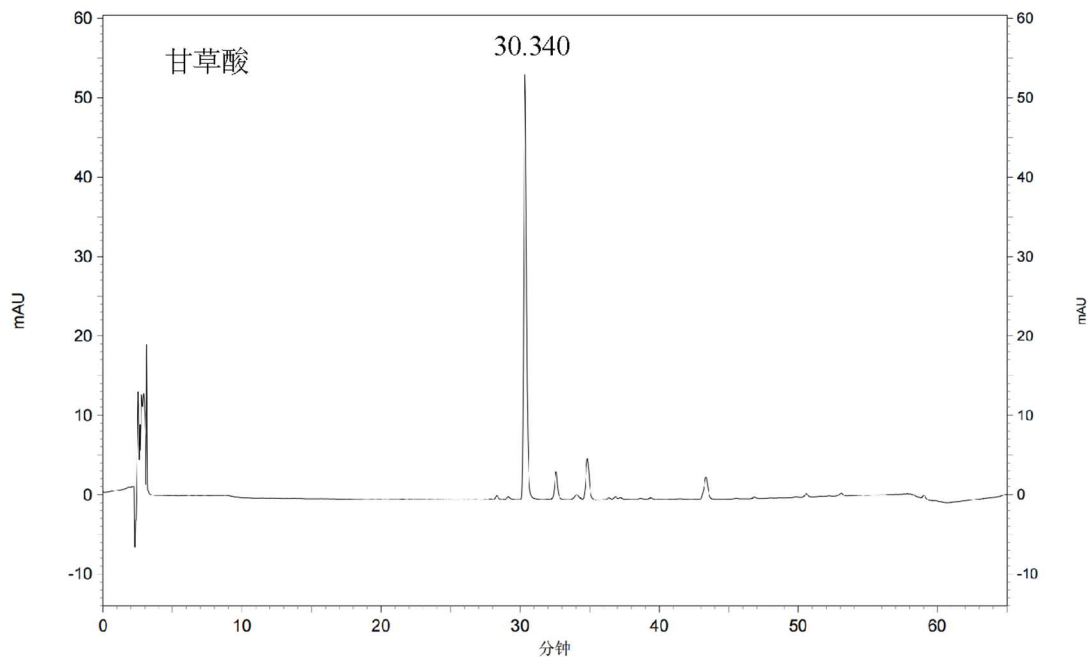


图 A.3 甘草酸标准物质色谱图（800 mg/L）

A. 4 光甘草醇物质色谱图，见图 A.4。

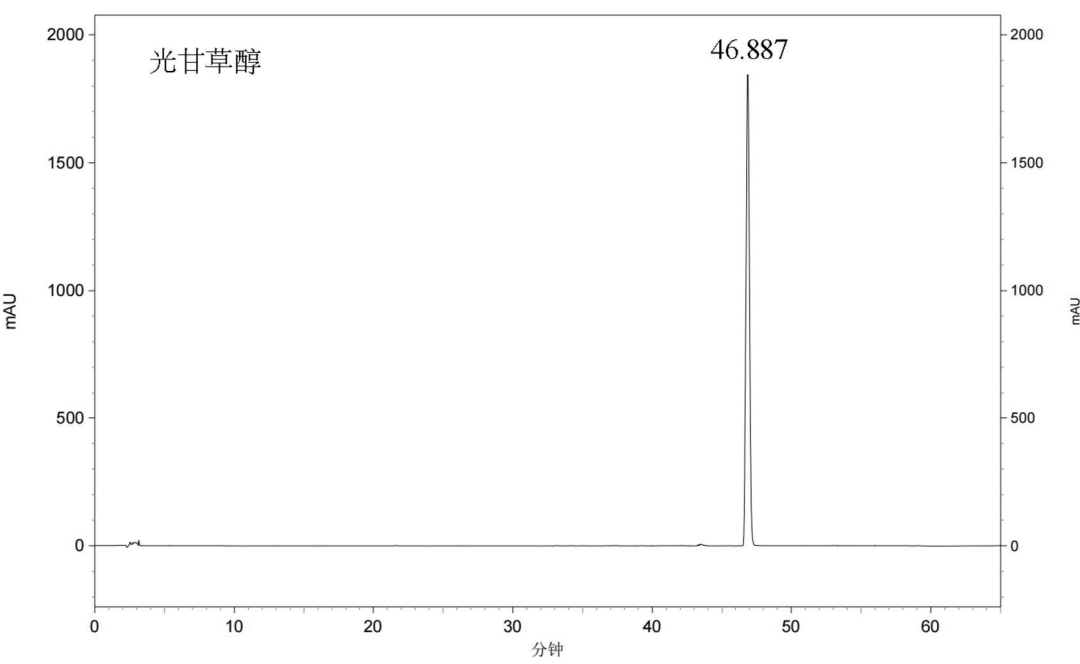


图 A.4 光甘草醇标准物质色谱图（800 mg/L）

A. 5 甘草内酯物质色谱图，见图 A.5。

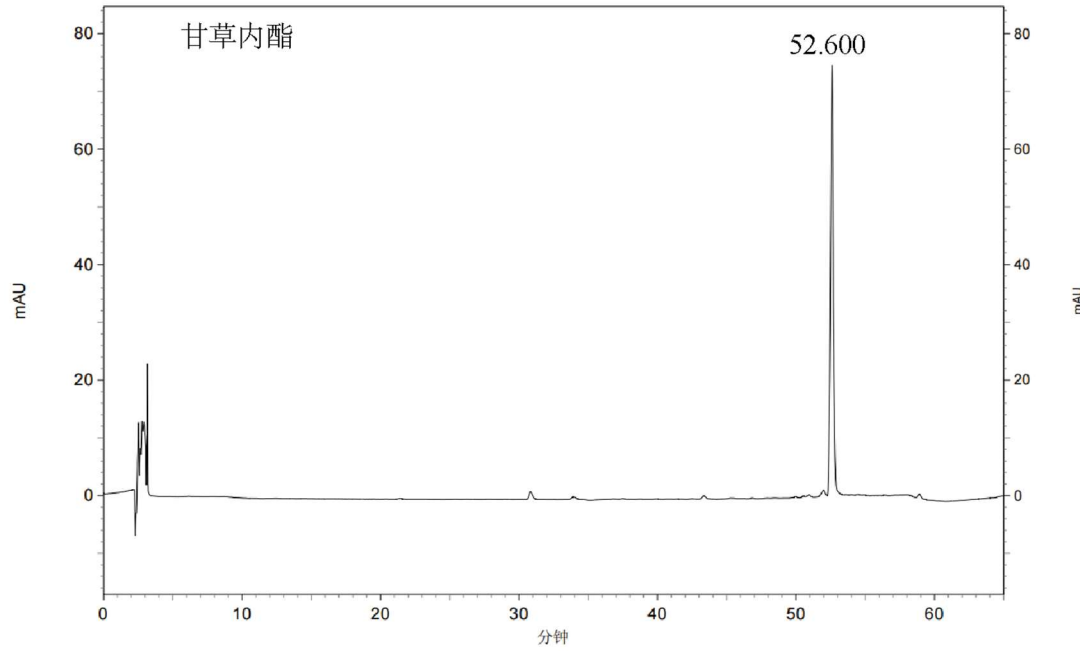
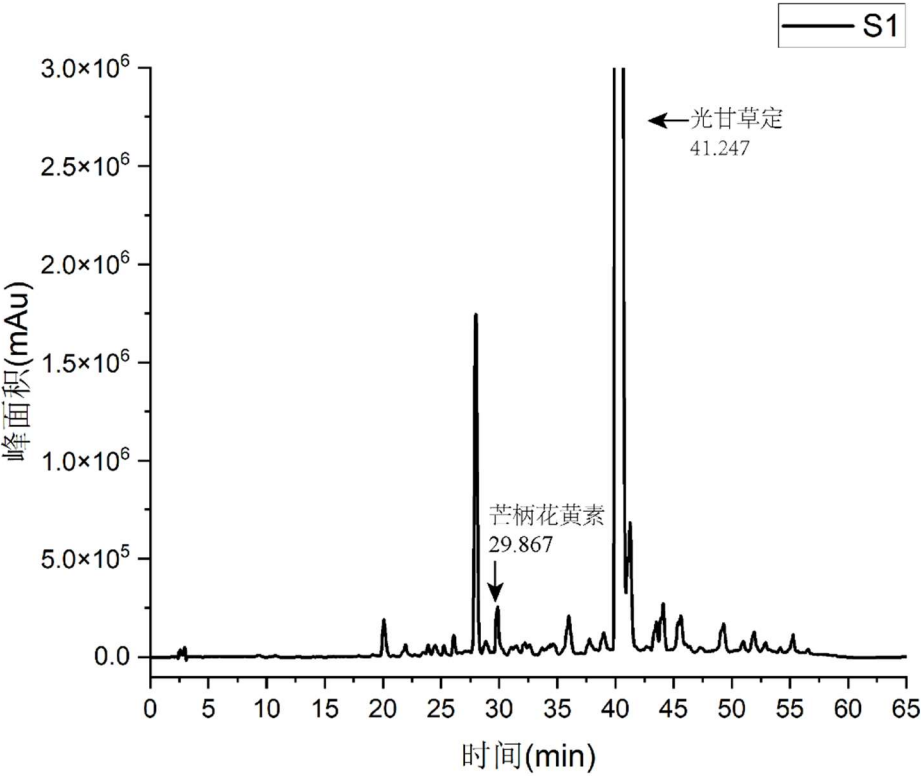
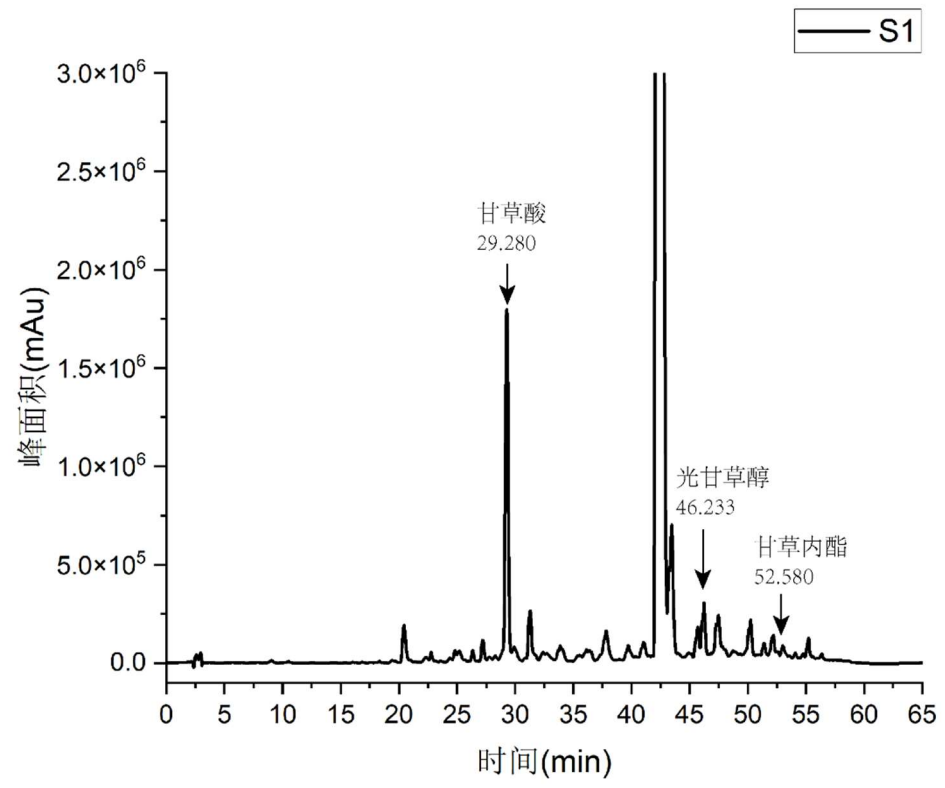


图 A.4 甘草内酯标准物质色谱图（800 mg/L）

A. 6 光甘草定-40 光果甘草根提取物样品色谱图，见图 A.6.1、A.6.2。



A.6.1 样品在检测光甘草定、芒柄花黄素液相条件下的色谱图



A.6.1 样品在检测甘草酸、光甘草醇、甘草内酯液相条件下的色谱图