

团 体 标 准

T/GDFCA 104—2025

代替T/GDFCA 104—2023

光果甘草根提取物中主要有效成分含量的 测定 高效液相色谱法

Determination of main active ingredient in *Glycyrrhiza glabra* L root extract-HPLC

（征求意见稿）

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。

2025 –XX– XX 发布

2025 –XX– XX 实施

广东省食品流通协会 发 布

目 次

前 言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 原理 1

5 试剂和材料 1

6 仪器和设备 2

7 测定步骤 2

8 结果计算和表述 3

9 检出限、定量限 3

10 精密度 4

11 回收率 4

附 录 A （资料性） 高效液相色谱法测定光果甘草根提取物主要有效成分的典型色谱图 5

附 表 B （资料性） 光果甘草根提取物 Glabridin-40 的的 标志物指标判定限 8

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T/GDFCA 104—2023《光果甘草根提取物中主要有效成分含量的测定 高效液相色谱法》，与T/GDFCA 104—2023相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

a) “范围”中，增加了“，包括方法的原理、试剂和材料、仪器和设备、试样的制备、分析步骤、结果计算、精密度等要求”。

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、广州数维科技有限公司、广东省科学院生物与医学工程研究所、必维科技服务（西安）有限公司、东南大学、沈阳药科大学、南京中科药业有限公司、广州华生检测技术服务有限公司。

本文件主要起草人：罗琳、武俊超、刘凤松、陆智、高智、林文俊、林伟、林晓锋、高玲、夏小乐、高裕锋、王桂华、文钰、李家威、刘铭宇、李颖茵、刘泽槟、黄冬婷、徐日益、庞无瑕、阮家成、杨殿卿、潘达、吴桐、冯鹏、周亚杰。

光果甘草根提取物中主要有效成分含量的测定 高效液相色谱法

警示——使用本文件的人员应有正规实验室工作的实践经验。本文件并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本文件描述了高效液相色谱法测定光果甘草根提取物中主要有效成分含量的方法，包括方法的原理、试剂和材料、仪器和设备、试样的制备、分析步骤、结果计算、精密度等要求。

本文件适用于光果甘草根提取物中黄酮类标志物（光甘草定和芒柄花黄素）和三萜类标志物（光甘草醇和甘草内酯）含量的测定，其他固体、半固体植物提取物可参照执行。

本文件不适用于光甘草定 $\geq 50\%$ 的光果甘草根提取物。

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 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

5.1 甲醇（ CH_3OH ，CAS 号：67-56-1）：色谱纯。

5.2 乙腈（ $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ，CAS 号：75-05-8）：色谱纯。

5.3 磷酸（ H_3PO_4 ，CAS 号：7664-38-2）：分析纯。

5.4 0.05% 磷酸水溶液：取 500 μL 磷酸（见 5.3），加一级水定容至 1 L。

5.5 标准物质具体包括：

——光甘草定标准物质（Glabridin， $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_4$ ，CAS 号：59870-68-7），纯度 $\geq 98\%$ ；

——芒柄花黄素标准物质（Formononetin， $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$ ，CAS 号：485-72-3），纯度 $\geq 98\%$ ；

——光甘草醇标准物质（Glabrol， $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_4$ ，CAS 号：59870-65-4），纯度 $\geq 98\%$ ；

——甘草内酯标准物质（Glabrolide， $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_4$ ，CAS 号：10401-33-9），纯度 $\geq 98\%$ 。

5.6 标准储备液的类别及制备步骤具体包括：

——甘草内酯标准储备液（2000 mg/L）：准确称取 20 mg（精确至 0.1 mg）甘草内酯标准物质（见 5.5），用甲醇（见 5.1）溶解并定容到 10 mL，混合均匀。标准储备液避光于 0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 下储存，有效期 2 个月；

——芒柄花黄素标准储备液（1000 mg/L）：准确称取 10 mg（精确至 0.1 mg）芒柄花黄素标准物质（5.5），用甲醇（见 5.1）溶解并定容到 10 mL，混合均匀。标准储备液避光于 0℃~4℃下储存，有效期 2 个月；

——光甘草定标准储备液（1000 mg/L）：准确称取 10 mg（精确至 0.1 mg）光甘草定标准物质（见 5.5），用甲醇（见 5.1）溶解并定容到 10 mL，混合均匀。标准储备液避光于 0℃~4℃下储存，有效期 2 个月；

——光甘草醇标准储备液（1000 mg/L）：准确称取 10 mg（精确至 0.1 mg）光甘草醇标准物质（见 5.5），用甲醇（见 5.1）溶解并定容到 10 mL，混合均匀。标准储备液避光于 0℃~4℃下储存，有效期 2 个月。

5.7 标准工作溶液的类别及制备步骤包括：

——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（见 5.6）至 5 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配成 10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L、60 mg/L、80 mg/L、100 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。

——光甘草定标准工作液：分别吸取适量的光甘草定标准储备液（见 5.6）至 5 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配成 100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L、600 mg/L、800 mg/L、1000 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；

——光甘草醇标准工作液：分别吸取适量的光甘草醇标准储备液（见 5.6）至 5 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配成 100 mg/L、200 mg/L、400 mg/L、600 mg/L、800 mg/L、1000 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；

——甘草内酯标准工作溶液：分别吸取适量的甘草内酯标准储备液（见 5.6）至 5 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）。

注：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。

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：功率不低于 480W、频率支持 40kHz。
- 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 0.0001 g）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℃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，取续滤液用稀释一定倍数为供试品溶液(建议检测甘草内酯不稀释，检测光甘草醇、芒柄花黄素稀释 10 倍、检测光甘草定稀释 20 倍)。

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℃。
- 7.2.3 流动相：乙腈、0.05%磷酸水溶液，梯度洗脱。梯度洗脱条件见表 1 和表 2。

表 1 光甘草定、芒柄花黄素检测的洗脱条件

时间 min	乙腈/%	0.05%磷酸水溶液/%
0	20	80
5	20	80

时间 min	乙腈/%	0.05%磷酸水溶液/%
45	70	30
55	95	5
65	20	80

表 1 光甘草定、芒柄花黄素检测的洗脱条件（续）

时间 min	乙腈/%	0.05%磷酸水溶液/%
70	20	80

表 2 甘草内酯、光甘草醇检测的洗脱条件

时间 min	乙腈/%	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

7.2.4 检测波长：280nm。

7.2.5 进样量：20 μL。

7.2.6 流速：1.0 mL/min。

7.3 液相色谱测定

按照7.2色谱条件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、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

8.1 试样中物质含量按式(1)计算：

$$X = \frac{(C-C_0) \times V \times f}{m} \dots\dots\dots (1)$$

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）；
- C₀——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）。

8.2 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

本方法对芒柄花黄素、光甘草定、光甘草醇和甘草内酯的检测限和定量限见表3。

表 3 芒柄花黄素、光甘草定、光甘草醇和甘草内酯的检测限和定量限

名称	检出限 mg/g	定量限 mg/g
芒柄花黄素	0.15	0.4
光甘草定	0.15	0.6
光甘草醇	0.05	0.075

表 3 芒柄花黄素、光甘草定、光甘草醇和甘草内酯的检测限和定量限（续）

名称	检出限 mg/g	定量限 mg/g
甘草内酯	2	5

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应超过算数平均值的10%。

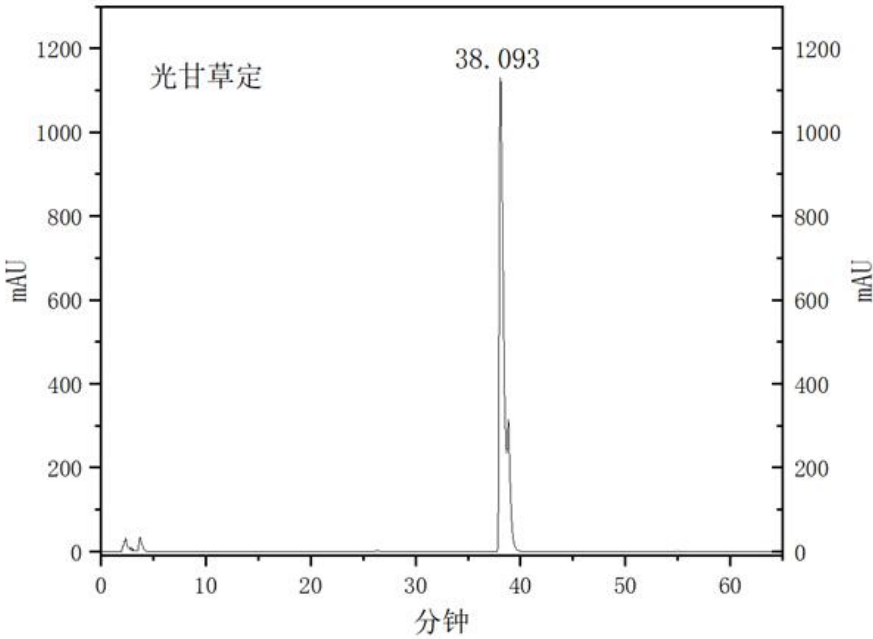
11 回收率

本方法检测芒柄花黄素的线性范围为10 mg/L~100 mg/L，检测光甘草定、芒柄花黄素、光甘草醇的线性范围为100 mg/L~1000 mg/L，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 ，标准品添加量在待测样品浓度0.5~1.5倍浓度范围内，回收率范围为80%~120%。

附录 A
(资料性)

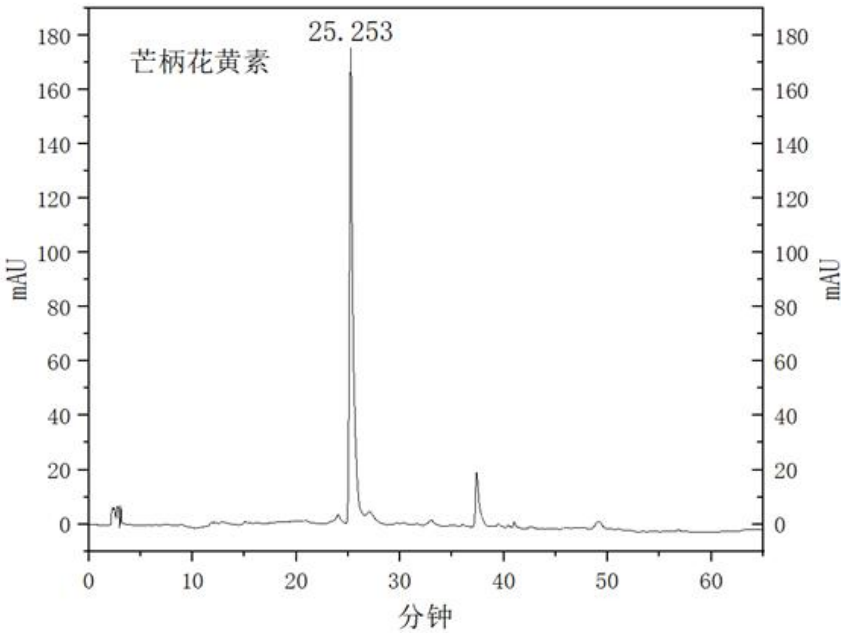
高效液相色谱法测定光果甘草根提取物主要有效成分的典型色谱图

A.1 光甘草定物质色谱图，见图A.1。



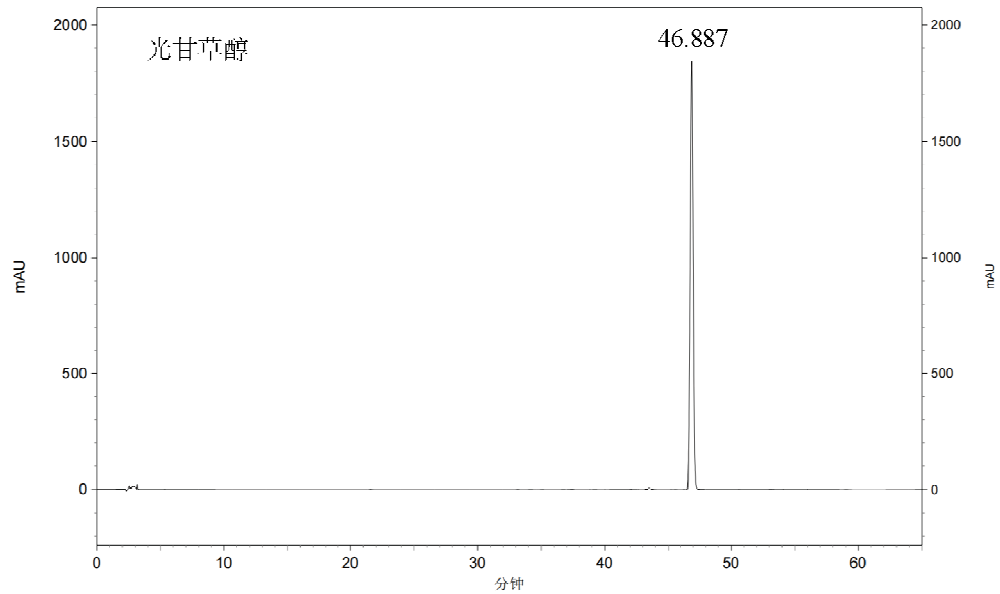
图A.1 光甘草定标准物质色谱图（1000 mg/L）

A.2 芒柄花黄素物质色谱图，见图A.2。



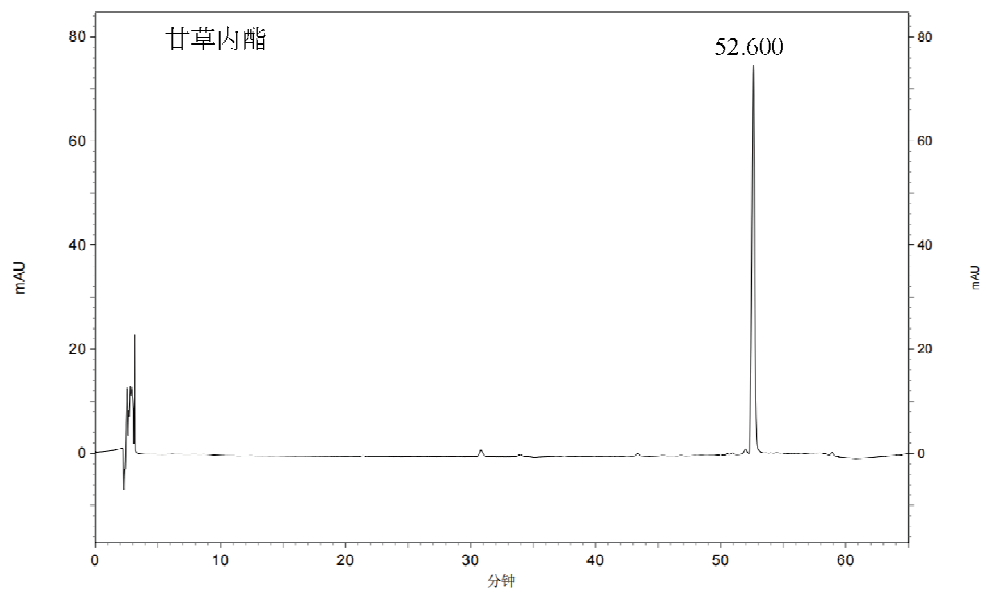
图A.2 芒柄花黄素标准物质色谱图（100 mg/L）

A. 3 光甘草醇物质色谱图，见图A. 4。



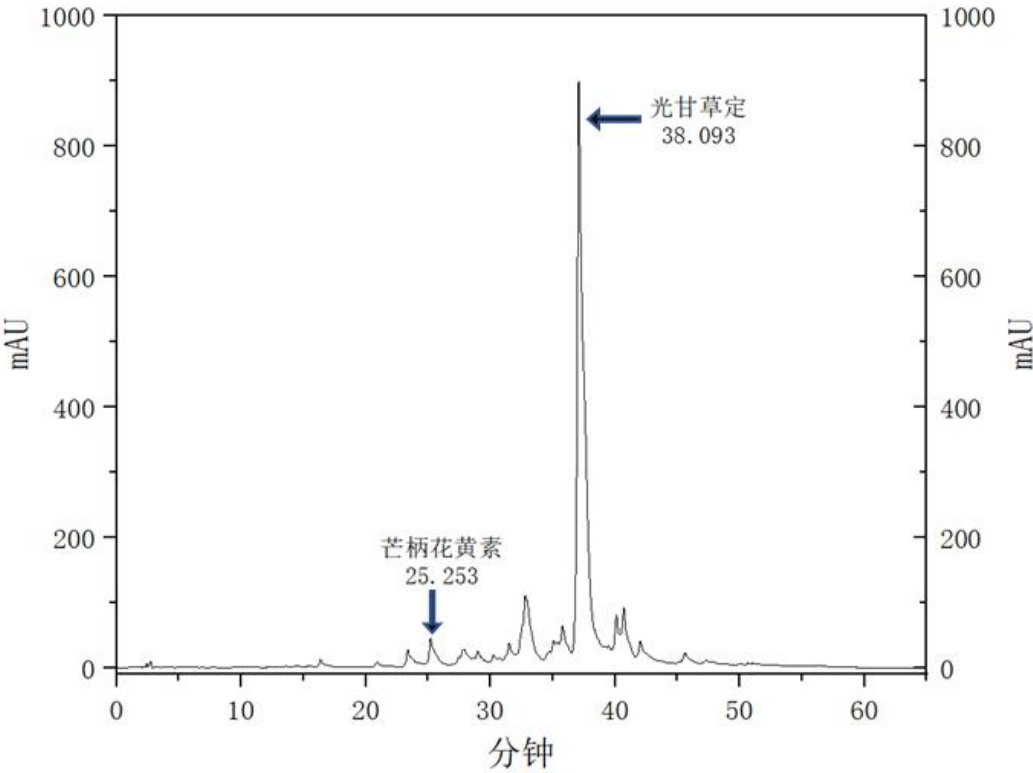
图A. 3 光甘草醇标准物质色谱图（800 mg/L）

A. 4 甘草内酯物质色谱图，见图A. 4。

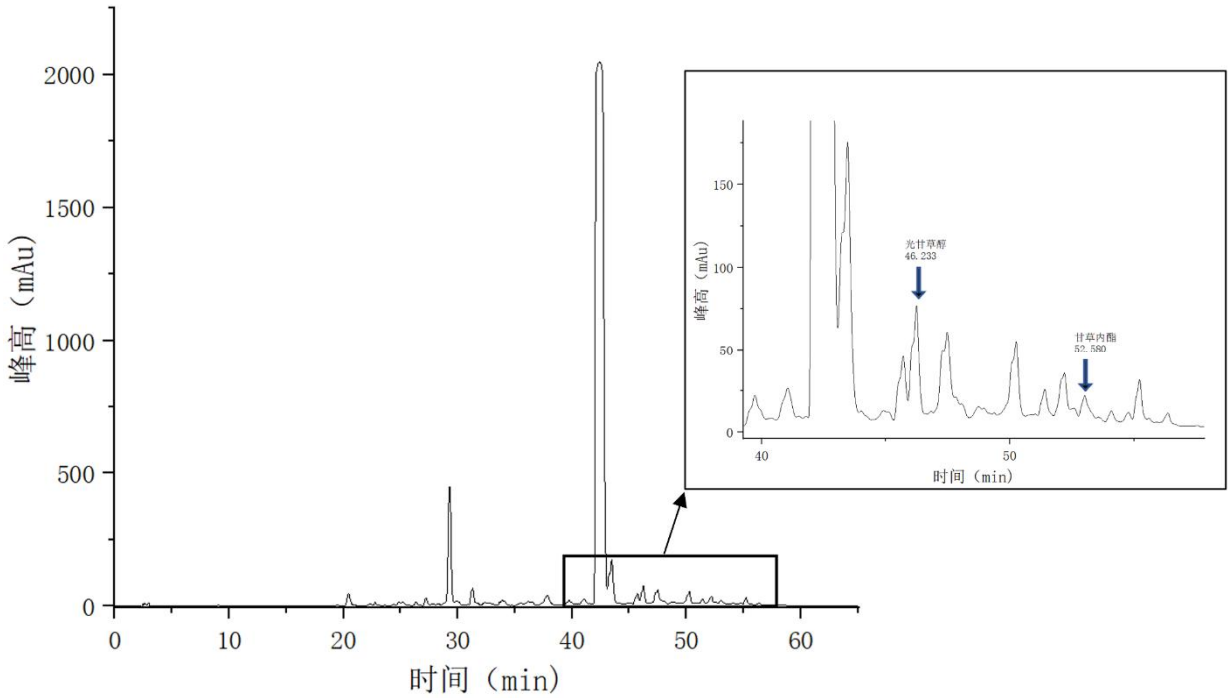


图A. 4 甘草内酯标准物质色谱图（800 mg/L）

A.5 光甘草定-40 光果甘草根提取物样品色谱图，见图 5.1，5.2。



图A.5.1黄酮类方法检测光甘草定-40光果甘草根提取物样品色谱图



图A.5.2三萜类方法检测光甘草定-40光果甘草根提取物样品色谱

附表 B
(资料性)
光果甘草根提取物 Glabridin-40 的的标志物指标判定限

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	光甘草醇 (mg/g)	≥ 1
	甘草内酯 (mg/g)	≥ 10