**农业行业标准制修订项目**

**《天然植物饲料原料中甘草酸的测定 高效液相色谱法》标准制定编制说明**

**项目名称：**天然植物饲料原料中甘草酸的测定 高效液相色谱法

**项目序号：**14202184

**提出单位：**中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局

**归口单位：**全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）

**起草单位：**中国农业大学、全国畜牧总站、山东省饲料兽药质量检验中心、青岛农业大学

**主要起草人：**郝智慧、高雪嫣、李燕松、战余铭、单丽燕、刘畅、唐启和

**实施时间：**

目 次

[1 工作简况 1](#_Toc136981037)

[1.1 任务来源 1](#_Toc136981038)

[1.2 制定背景 1](#_Toc136981039)

[1.3 起草过程及内容 5](#_Toc136981040)

[1.3.1起草过程 5](#_Toc136981041)

[1.3.2起草内容 7](#_Toc136981042)

[1.4 起草单位 8](#_Toc136981043)

[1.5 主要起草人 8](#_Toc136981044)

[2 行业标准编制原则、行业标准主要内容及其确定依据 8](#_Toc136981045)

[2.1 标准编制原则 8](#_Toc136981046)

[2.2 新旧标准对比问题 9](#_Toc136981047)

[2.3 制定本文件的主要内容及其确定依据 9](#_Toc136981048)

[3 主要试验或验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果 14](#_Toc136981049)

[3.1主要试验或验证的分析、综述报告 14](#_Toc136981050)

[3.1.1主要试剂与仪器 14](#_Toc136981051)

[3.1.2试验设计 15](#_Toc136981052)

[3.1.3方法验证结果 30](#_Toc136981053)

[3.1.4实际样品的测定 30](#_Toc136981054)

[3.1.5综述报告 34](#_Toc136981055)

[3.2 技术经济论证 35](#_Toc136981056)

[3.3预期效益分析 36](#_Toc136981057)

[4 与国际标准和国外同类标准技术内容的对比情况 36](#_Toc136981058)

[5 以国际标准为基础的起草情况 37](#_Toc136981059)

[6 与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系 37](#_Toc136981060)

[7 重大分歧意见的处理经过和依据 37](#_Toc136981061)

[8 涉及专利的有关说明 37](#_Toc136981062)

[9 实施行业标准的要求 37](#_Toc136981063)

[10 其他予说明的事项 37](#_Toc136981064)

天然植物饲料原料中甘草酸的测定 高效液相色谱法

1 工作简况

1.1 任务来源

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出，计划编号为“14202184”，中国农业大学、全国畜牧总站、山东省饲料兽药质量检验中心、青岛农业大学承担并组织相关技术人员对《天然植物饲料原料中甘草酸的测定 高效液相色谱法》进行了编制。

1.2 制定背景

在畜禽饲料“禁抗令”全面实行的背景下，天然植物饲料原料成为了提高生长性能、替抗的重要选择。天然植物作为饲料使用在我国有着悠久的历史，我国古代劳动人民在长期饲养畜禽的过程中，积累总结了大量经验。可饲用天然植物来源于大自然，具有天然性、多功能性和毒副作用小等特点，近年来被大量开发作为饲用抗生素替代品，应用对象从鸡、猪、牛、羊、犬、猫、兔等畜禽逐渐拓宽到水产动物和特种经济动物；应用目的包括补充营养成分、提高饲料利用率、增加动物产品产量、改善动物产品质量和饲料品质等方面。但天然植物饲料原料没有统一标准，质量参差不齐，规范天然植物饲料原料的质量要求亟待解决。

我国在农业部发布的第1773号公告《饲料原料目录》中规定了117种可饲用天然植物原料，这117种天然植物可以以单一、复配或混合的形式进行直接添加使用。甘草（Glyeyrrhiza）为“豆科甘草属植物甘草（*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.）、胀果甘草（*Glycyrrhiza inflata* Batal.）或洋甘草（*Glycyrrhiza glabra* L.）的干燥根和根茎”，是重要的可饲用天然植物原料品种。目前，以甘草为单一或复配的天然植物饲用原料产品较为普遍。有研究表明，甘草饲料原料能够有效提高羊的生产性能[1]、提高断奶仔猪的抗病力[2]、促进大黄鱼生长[3]、遏制肉鸡体内有害菌群的繁殖[4]、减少反刍动物胃黏膜的损伤[5-6]等。同时甘草具有调和诸药之功效，使得天然植物饲料原料甘草在天然植物原料中广泛应用。

甘草主产于内蒙古西部、宁夏、甘肃、新疆等地，东北、陕西、青海、河北、山西等地亦产。甘草中含有甘草酸、甘草次酸等三萜及其皂苷类成分，同时含有甘草素、异甘草素、新异甘草苷等黄酮类成分。由于其明显的种属、地域、生长环境等差别，造成甘草中的有效成分及含量具有显著的差异。目前，市场上，以甘草及其提取物作为饲料原料的产品种类繁多，甘草列入《饲料原料目录》而未列入其第四部分《单一饲料品种》，因此，甘草的生产、经营无需办理《饲料生产许可证》，应符合《饲料卫生标准》、《饲料标签》等强制性标准的要求。前期调研发现400余家生产饲料原料的企业，不同企业之间的生产工艺和质量控制标准千差万别，尚缺乏统一的标准，造成市场上甘草可饲用植物原料的质量参差不齐，非常不利于饲料添加剂质量安全监管、养殖业安全使用。

目前我国没有检测可饲用天然植物原料甘草的相关标准发布。国内已发表的有关于甘草的标准为“GB/T 19618—2004 甘草”，该标准规范了甘草为“豆科甘草属植物甘草（*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.）、胀果甘草（*Glycyrrhiza inflata* Batal.）及光果甘草（*Glycyrrhiza glabra* L.）干燥根及根茎的加工产品”，“内在质量检查”项规定了甘草主要指标成分“甘草酸”的测定方法。甘草酸（Glycyrrhizic Acid）是衡量甘草质量的关键指标。同时，甘草酸也是甘草中最主要的活性成分[7]。如表2所示，在甘草、甘草提取物或含甘草药物的研究中，均是以甘草酸作为指标成分进行质量控制。

| **文献名** | **指标成分** |
| --- | --- |
| HPLC测定甘草提取物中甘草酸的含量 | 甘草酸 |
| HPLC 测定川芎茶调散中甘草酸的含量 | 甘草酸 |
| HPLC法测定不同产地甘草中甘草酸的含量 | 甘草酸 |
| HPLC 法测定内蒙古不同产地甘草中甘草酸的含量 | 甘草酸 |
| 甘草酸铋散的质量标准研究 | 甘草酸 |
| 高效液相色谱法测定清肺颗粒中甘草酸的含量 | 甘草酸 |
| 经典名方温经汤标准汤剂HPLC指纹图谱建立及9种成分含量测定 | 甘草酸 |
| 利尿合剂的质量标准分析 | 甘草酸 |
| UPLC-MS/MS法同时检测参芪健胃颗粒中芍药苷、橙皮苷、甘草酸铵的含量 | 甘草酸 |

考虑到饲料行业的整体情况和作为饲料原料的产品属性，我们选择了甘草酸作为指标成分对可饲用天然植物原料中的甘草质量进行质量控制。

目前国内已发表的国家及行业标准涉及甘草酸的标准主要有GB/T 22248—2008保健食品中甘草酸的测定[8]、SN/T 3854—2014出口食品中天然甜味剂甜菊糖苷、甜菊双糖苷、甘草酸、甘草次酸的测定高效液相色谱法[9]。在《中国药典》2000年版和《中国兽药典》2000年版中甘草酸作为甘草含量测定的单一指标成分，此后的《中国药典》和《中国兽药典》增加了甘草苷和甘草酸共同作为甘草含量测定项，均为高效液相色谱法。

随着天然植物饲料原料在饲料中的普遍应用，甘草酸作为主要的活性指标成分之一，尚未制定天然植物饲料原料中甘草酸通用的标准测定方法，高效液相色谱法是目前更适合产业实际并且具有简单、快速，且灵敏度高特点。建立一种高效、灵敏、便捷的检测方法作为指导一线检测重要活性成分指标甘草酸，是指导使用天然植物饲料原料和安全使用提供有力手段。

本团队前期通过收集和监测分析大批量的甘草可饲用植物原料和相关含甘草的饲料原料样品，通过对这些样品进行含量测定，也确定了以甘草酸为指标成分建立天然植物饲料原料中甘草酸高效液相色谱法，能够更加科学合理的建立含甘草的天然植物饲料原料产品标准和质量控制。

表 1国内外甘草相关的标准汇总

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **序号** | **标准编号** | **标准名称** | **检测对象** | **检测方法** |
| 1 | GB/T 19618—2004 | 甘草 | 甘草酸 | 高效液相色谱法 |
| 2 | GB/T 22248—2008 | 保健食品中甘草酸的测定 | 甘草酸 | 高效液相色谱法 |
| 3 | SN/T 3854—2014 | 出口食品中天然甜味剂甜菊糖苷、甜菊双糖苷、甘草酸、甘草次酸的测定高效液相色谱法 | 甘草酸 | 高效液相色谱法 |

因此，针对上述产业实际需求，针对天然植物饲料原料的不同产品形式，如干燥物、粉碎物和粗提取物产品形式，及单一型和复配型产品中甘草酸的高效液相检测方法进行建立，明确色谱工作条件和参数，并对检测方法的灵敏度、准确度和精密度进行确定。拟制定《天然植物饲料原料中甘草酸的测定 高效液相色谱法》方法标准，规定作为可饲用天然植物原料使用的甘草的主要指标成分甘草酸的质量控制指标和检测方法，利用该法完成天然植物饲料原料中甘草酸的检测，实现天然植物饲料原料质量的规范化。这对规范天然植物原料生产企业的生产，保护畜禽养殖企业的利益和促进我国可饲用天然植物原料产业的健康可持续发展具有重大的现实意义。

1.3 起草过程及内容

1.3.1起草过程

2020年8月，中国农业大学、全国畜牧总站、山东省饲料兽药质量检验中心、青岛农业大学接到了农业行业标准制定的任务后，成立了标准编制小组，主要由从事标准制修订、仪器分析、具有丰富技术经验的专业研究人员组成。

2020年9月，中国农业大学组织了有关的专家、主要标准起草人员召开了行业标准《天然植物饲料原料中甘草酸的测定 高效液相色谱法》编制项目的启动会，就《天然植物饲料原料中甘草酸的测定 高效液相色谱法》的国内外标准、检测方法研究进展、项目的主要工作内容、技术路线等进行了探讨，认真分析了技术方案的可行性，并结合国内外发展趋势、当前行业存在的技术问题展开讨论，确定了该标准制定的技术路线、技术内容、分工以及时限要求等。确定了标准制定的技术路线和方案制定。

2020年10月至2021年09月，标准编制小组在有关质量检测的基础上，广泛查阅国内外研究的文献资料、标准和其他权威部门出版物，主要参考《中国兽药典》二〇〇五版二部[10]中的样品前处理及高效液相检测方法开展研究。标准编制小组购买标准品、试剂以及采集代表性的含甘草的单一型、混合型和复配型饲料原料样品，开展了样品前处理、色谱分离条件优化、仪器条件优化等工作，对建立的方法进行了实验室内部的方法学验证，包括准确性、精密度、稳定性以及样品适用性等，随后测定实际样品，对试验数据进行了汇总分析。结合我国天然植物饲料原料质量标准的实际情况，对相关研究成果进行全面评价，制定《天然植物饲料原料中甘草酸的测定 高效液相色谱法》标准草案，形成征求意见稿。

2021年10月至2022年6月，标准编制小组选择了三家质检机构，对标准文本进行了验证，并征求了验证单位意见，根据专家意见进行了标准文本和编制说明的修改完善。完成了标准草案及编制说明的编写和实验室间验证。同时以函审的方式广泛征求相关科研院所的专家和有关企业技术人员的意见，通过意见反馈，进行修改和完善，形成预审稿。

2022年11月至2022年12月，组织专家评审，进行会议审核，再次讨论和征求专家意见，并进行相应的修改完善，最后形成送审稿，报全国饲料标准化技术委员会。

2023年3月1日，全国饲料工业标准化技术委员会微生物及酶制剂标准化工作组组织专家对中国农业大学等单位起草的农业行业标准《天然植物饲料原料中甘草酸的测定 高效液相色谱法》（预审稿）进行审查。

2023年3月至2023年5月，根据全国饲料工业标准化技术委员会微生物及酶制剂标准化工作组专家建议对标准和编制说明进行修改完善，形成公开征求意见稿。

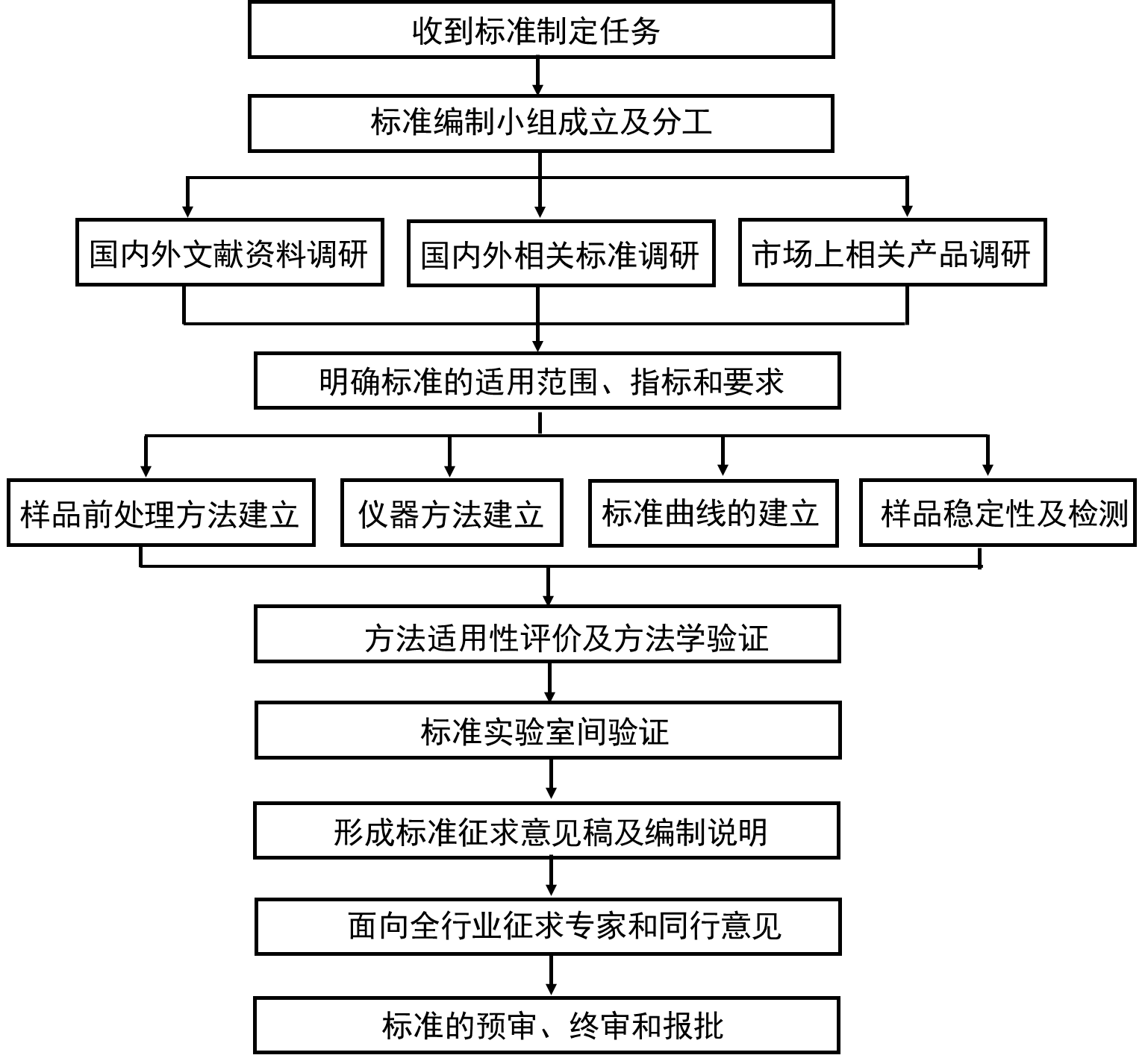


图 1标准编制的技术路线

1.3.2起草内容

建立天然植物饲料原料中甘草酸的测定 高效液相色谱法。

饲料原料在进行分析检测前，根据“GB/T 19424—2018天然植物饲料原料通用要求”[11]中天然植物饲料原料具体种类及市场调研结果，目前市场上用于天然植物饲料原料的样品主要分为三类，即单一型（粉碎物或粗提物）天然植物饲料原料、复配型（粉碎物或粗提物）天然植物饲料原料、混合型天然植物饲料原料。标准编制小组陆续从全国各地收集各类天然植物饲料原料，共计93种样品，用于本标准的方法开发、方法验证和实际样品的测定。

对初步建立的天然植物饲料原料中甘草酸前处理方法，以检测含量为指标，分别考察不同提取溶剂、提取体积、提取时间对提取效率的影响。对天然植物饲料原料中甘草酸的测定 高效液相色谱方法，分别从专属性、线性、检出限、定量限、精密度、准确度、耐用性、标准品稳定性等方面进行方法学验证。本标准的主体内容包括，范围、规范性引用文件、术语和定义、原理、试剂或材料、仪器设备、样品、试验步骤、试验数据处理、精密度等。本标准适用于天然植物原料中甘草酸含量的测定。

1.4 起草单位

本文件起草单位：中国农业大学、全国畜牧总站、山东省饲料兽药质量检验中心、青岛农业大学。

1.5 主要起草人

本文件主要起草人：郝智慧、高雪嫣、李燕松、战余铭、单丽燕、刘畅、唐启和。

2 行业标准编制原则、行业标准主要内容及其确定依据

2.1 标准编制原则

在编制过程中，标准编制小组查阅了国内外相关文献、标准等资料，并对全国天然植物饲料原料及甘草作为饲料原料添加使用的市场规模进行了调研，参考各部门制定的同类标准方法及饲料生产企业相关的产品质控方法，遵循“先进性、实用性、统一性和规范性”的原则，坚持标准的可操作性，完成了天然植物饲料原料中甘草酸的测定工作，形成了标准草案和编制说明。

本标准编写主要依据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》[12]、GB/T 20001.4—2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》[13]、GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》[14]以及GB/T 19424—2018《天然植物饲料原料通用要求》[11]的要求进行起草制定，并且按照GB/T 27417—2017 《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》[15]对方法学进行了考察，确保方法的科学性、可行性和可靠性。依据高效液相色谱法检测天然植物饲料原料中甘草酸的优化试验、方法验证试验的数据及研究结果编制。

利用高效液相色谱法，能够快速、准确的检测天然植物饲料原料中甘草酸的含量，通过检测方法优化和方法验证，本方法灵敏度高，能够满足检测天然植物饲料原料中甘草酸含量检测的要求。标准制定符合我国国情，满足相关检测要求，且普适性强，操作简单，易于推广。

2.2 新旧标准对比问题

迄今，我国尚无“天然植物饲料原料中甘草酸的测定 高效液相色谱法”国家标准、行业标准或地方标准。本文件系首次制定，不存在新旧标准水平对比的问题。

2.3 制定本文件的主要内容及其确定依据

对甘草酸含量检测相关标准进行了查阅，目前已发表的国家及行业标准涉及的检测范围有限，如：GB/T 22248—2008保健食品中甘草酸的测定[8]、SN/T 3854—2014出口食品中天然甜味剂甜菊糖苷、甜菊双糖苷、甘草酸、甘草次酸的测定高效液相色谱法[9]，尚未制定天然植物饲料原料中甘草酸的标准测定方法。

通过查找甘草酸含量检测相关文献，不论是检测含甘草酸的药品、药材还是提取物，针对甘草酸的分离和检测绝大部分采用了高效液相色谱法（见表2）。并且高效液相色谱法是一种具有简单、快速、灵敏度高等特点的检测方法，能够对天然植物饲料原料中的有效成分进行测定。因此，通过选择利用高效液相色谱法，建立一种高效、灵敏、便捷的甘草酸检测方法，作为指导一线检测重要活性成分指标甘草酸的方法，可为天然植物饲料原料的质量检测和监测提供指导。

表 2　以“甘草酸”为含量检测指标的含量检测方法部分相关文献

| **文献名** | **检测手段** | **参考文献** |
| --- | --- | --- |
| HPLC测定甘草提取物中甘草酸的含量 | HPLC | [16] |
| HPLC 测定川芎茶调散中甘草酸的含量 | HPLC | [17] |
| HPLC法测定不同产地甘草中甘草酸的含量 | HPLC | [18] |
| HPLC 法测定内蒙古不同产地甘草中甘草酸的含量 | HPLC | [19] |
| 甘草酸铋散的质量标准研究 | HPLC | [20] |
| 高效液相色谱法测定清肺颗粒中甘草酸的含量 | HPLC | [21] |
| 经典名方温经汤标准汤剂HPLC指纹图谱建立及9种成分含量测定 | HPLC | [22] |
| 利尿合剂的质量标准分析 | HPLC | [23] |
| UPLC-MS/MS法同时检测参芪健胃颗粒中芍药苷、橙皮苷、甘草酸铵的含量 | UPLC-MS/MS | [24] |

根据GB/T 19424—2018 天然植物饲料原料通用要求，天然植物饲料原料（单一型和复配型）包含了不同的干燥物、粉碎物、粗提物、复配型和混合型产品形式。随后，通过市场调研确定目前市场中存在的天然植物饲料原料的产品形式，最常见的天然植物饲料原料为粉碎物、粗提物、复配型粉碎物和粗提物、混合型产品（表3）。因此，在收集不同类型的样品（单一型粉碎物、单一型粗提物、复配型粉碎物、复配型粗提物和混合型产品等），共计93种进行实验（表4）。

表 3　含甘草的可饲用天然植物原料产品的调研情况（单位：个）

| **调查产品** | **粉剂** | **液态** | **粗提物** | **复配型** | **注明规格** | **未注明规格** | **明确有效成分** | **未明确有效成分** |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 30 | 22 | 0 | 8 | 15 | 3 | 12 | 5 | 10 |

表 4　全部实验样品明细

| **样品类型** | **样品成分** | **来源地** |
| --- | --- | --- |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物 | 烟台 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物 | 保定冀中 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物（GT7） | 潍坊 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物 | 滨州 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物 | 无锡 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物 | 保定安国 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物 | 保定冀中 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物（GT8） | 北京 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物（GT9） | 新疆 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物（GT10） | 烟台 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物 | 烟台 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物 | 保定冀中 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物 | 潍坊 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物 | 滨州 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物 | 无锡 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物（GF8） | 保定安国 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物 | 保定冀中 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物 | 菏泽 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物（GF9） | 甘肃 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物（GF10） | 内蒙古 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+杜仲叶粗提物 | 保定冀中 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+杜仲叶粗提物 | 保定冀中 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+诃子粗提物 | 无锡 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+黄芪粗提物 | 保定冀中 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+黄芪粗提物 | 无锡 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+黄芪粗提物 | 滨州 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+黄芪粗提物 | 保定冀中 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+女贞子粗提物 | 潍坊 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+蒲公英粗提物 | 保定冀中 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+蒲公英粗提物 | 保定冀中 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+山茶籽粕粗提物 | 滨州 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+山楂粗提物（4：6） | 保定安国 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+藤茶黄酮-c黄晶 | 无锡 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+甜叶菊粗提物 | 无锡 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+淫羊藿粗提物 | 保定冀中 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+淫羊藿粗提物 | 保定冀中 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+当归粉碎物（1：1）（FP1） | 保定安国 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+党参粉碎物 | 烟台 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+杜仲叶粉碎物 | 保定冀中 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+杜仲叶粉碎物 | 无锡 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+茯苓粉碎物 | 烟台 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+诃子粉碎物 | 无锡 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+黄柏粉碎物（6：4） | 菏泽 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+黄柏粉碎物（9：1） | 菏泽 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+黄芪粉碎物 | 烟台 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+黄芪粉碎物 | 保定冀中 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+黄芪粉碎物 | 无锡 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+金银花粉碎物 | 无锡 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+女贞子粉碎物 | 潍坊 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+蒲公英粉碎物 | 保定冀中 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+蒲公英粉碎物 | 烟台 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+生白术粉碎物 | 保定冀中 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+生白术粉碎物 | 保定冀中 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+甜叶菊粉碎物 | 无锡 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+杨树花粉碎物 | 无锡 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+杨树花粉碎物 | 烟台 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+淫羊藿粉碎物 | 保定冀中 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+枣粉（50%枣+50%蒙脱石粉） | 烟台 |
| 混合型 | 甘草粗提物+川芎粉碎物（4：1） | 保定安国 |
| 混合型 | 甘草粗提物+党参粉碎物 | 烟台 |
| 混合型 | 甘草粗提物+杜仲叶粉碎物 | 保定冀中 |
| 混合型 | 甘草粗提物+杜仲叶粉碎物 | 无锡 |
| 混合型 | 甘草粗提物+茯苓粉碎物 | 烟台 |
| 混合型 | 甘草粗提物+诃子粉碎物 | 无锡 |
| 混合型 | 甘草粗提物+黄芪粉碎物 | 烟台 |
| 混合型 | 甘草粗提物+黄芪粉碎物 | 保定冀中 |
| 混合型 | 甘草粗提物+黄芪粉碎物 | 无锡 |
| 混合型 | 甘草粗提物+金银花粉碎物 | 无锡 |
| 混合型 | 甘草粗提物+金银花粉碎物 | 滨州 |
| 混合型 | 甘草粗提物+女贞子粉碎物 | 潍坊 |
| 混合型 | 甘草粗提物+蒲公英粉碎物 | 保定冀中 |
| 混合型 | 甘草粗提物+蒲公英粉碎物 | 烟台 |
| 混合型 | 甘草粗提物+生白术粉碎物 | 保定冀中 |
| 混合型 | 甘草粗提物+生白术粉碎物 | 保定冀中 |
| 混合型 | 甘草粗提物+甜叶菊粉碎物 | 无锡 |
| 混合型 | 甘草粗提物+杨树花粉碎物 | 无锡 |
| 混合型 | 甘草粗提物+杨树花粉碎物 | 烟台 |
| 混合型 | 甘草粗提物+淫羊藿粉碎物 | 保定冀中 |
| 混合型 | 甘草粗提物+枣粉（50%枣+50%蒙脱石粉） | 烟台 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+杜仲叶粗提物 | 保定冀中 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+甘草粗提物 | 潍坊 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+甘草粗提物 | 滨州 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+甘草粗提物 | 保定安国 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+甘草粗提物 | 保定冀中 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+诃子粗提物 | 无锡 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+黄芪粗提物 | 保定冀中 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+黄芪粗提物 | 滨州 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+黄芪粗提物 | 无锡 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+蒲公英粗提物 | 保定冀中 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+山楂粗提物（1：4） | 保定安国 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+藤茶黄酮-c黄晶 | 无锡 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+甜叶菊粗提物 | 无锡 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+淫羊藿粗提物 | 保定冀中 |

3 主要试验或验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

3.1主要试验或验证的分析、综述报告

3.1.1主要试剂与仪器

a）主要试剂：

水：GB/T 6682，一级水。

甲醇：色谱纯。

0.2 mol/L乙酸铵溶液：称取乙酸铵15.73 g，用水溶解并稀释至1 000 mL，混匀。

乙酸铵缓冲溶液：准确量取冰醋酸5 mL，0.2 mol/L乙酸铵溶液165 mL，混匀。

流动相：准确量取甲醇335 mL，乙酸铵缓冲溶液170 mL，混匀。

甘草酸铵标准储备液（1.0 mg/mL）：准确称取10 mg甘草酸铵标准品（CAS：53956-04-0，纯度≥96.2%）（精确至0.01 mg）于10 mL容量瓶中，用流动相溶解、定容，摇匀。2 ℃～8 ℃保存，有效期90 d。

甘草酸铵标准系列溶液：准确移取适量甘草酸铵标准储备溶液，用流动相稀释定容，配制成浓度为0.01 mg/mL、0.03 mg/mL、0.06 mg/mL、0.12 mg/mL、0.16 mg/mL、0.20 mg/mL的标准系列溶液。临用现配。

微孔滤膜：0.45 μm，有机系。

b）主要仪器：

高效液相色谱仪：配紫外检测器或二极管阵列检测器。

分析天平：精度0.01 mg和0.1 mg。

超声波清洗仪：240 W。

3.1.2试验设计

a）色谱检测条件选择依据：

通过甘草酸峰形、分离度、理论塔板数等指标考察了不同C18色谱柱条件下样品中甘草酸的检测情况，确定相对较优液相检测条件。

通过查阅甘草酸含量检测相关的文献、药典、标准及其他资料显示（表5），甘草酸的分离一般使用C18色谱柱。

表 5　甘草酸含量检测文献中使用的色谱柱

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 文献名 | 色谱柱 | 参考文献 |
| HPLC测定甘草提取物中甘草酸的含量 | C18 | [16] |
| HPLC 测定川芎茶调散中甘草酸的含量 | Kromasil C18 | [17] |
| HPLC法测定不同产地甘草中甘草酸的含量 | C18 | [18] |
| HPLC 法测定内蒙古不同产地甘草中甘草酸的含量 | ZORBAX Exund C18 | [19] |
| 甘草酸铋散的质量标准研究 | C18 | [20] |
| 高效液相色谱法测定清肺颗粒中甘草酸的含量 | C18 | [21] |
| 经典名方温经汤标准汤剂HPLC指纹图谱建立及9种成分含量测定 | Kromasil C18 | [22] |
| 利尿合剂的质量标准分析 | Agilent ZORBAX XDB C18 | [23] |
| UPLC-MS/MS法同时检测参芪健胃颗粒中芍药苷、橙皮苷、甘草酸铵的含量 | Agilent Eclipse Plus C18 | [24] |

因此，比较了Agilent ZORBAX SB C18、Agilent Eclipse XDB C18、Welch Xtimate C18、Agilent Eclipse Plus C18、Shimadzu InertSustain C18等六种不同的C18色谱柱对样品中甘草酸的分离效果。结果显示（表6），C18色谱柱对甘草酸色谱峰的分离度良好。最终选择分离度较好的Shimadzu InertSustain C18色谱柱进行了后续的试验。

表 6　不同色谱柱检测分离度比较

| 色谱柱 | 分离度 |
| --- | --- |
| Agilent ZORBAX SB C18 | 2.61 |
| Agilent Eclipse XDB C18 | 3.03 |
| Welch Xtimate C18 | 1.66 |
| Agilent Eclipse Plus C18 | 2.17 |
| Shimadzu InertSustain C18 | 2.26 |
| Waters Symmetry Shield RP18 | 2.01 |

通过高效液相色谱仪全扫光谱确定甘草酸最大吸收波长为250 nm（图2），因此，确定250 nm为本方法的检测波长。随后，通过甘草酸峰形、分离度等指标考察了不同流动相、不同柱温条件下甘草酸的检测情况。结果显示，以甲醇-0.1%磷酸水（70：30，v/v）为流动相对样品进行甘草酸含量检测时，分离度约为1.72，但未能完全将甘草酸色谱峰（保留时间12.715 min）与杂质峰完全分离（见图3A），而以甲醇-0.2 mol/L乙酸铵溶液-冰醋酸（67：33：1，v/v/v）（见图3B）为流动相对样品进行甘草酸含量检测时，分离度约为1.78，因此，选择甲醇-0.2 mol/L乙酸铵溶液-冰醋酸（67：33：1，v/v/v）作为流动相，即甲醇335 mL，乙酸铵缓冲溶液170 mL，混匀。

随后考察了不同柱温对甘草酸检测效果的影响，比较了20℃、25℃、30℃、35℃等四种柱温，随着柱温的增加，甘草酸保留时间随之减少，峰高随着柱温的增加而增加（图4）。尽管峰高越高检测峰形越好，但随着柱温的增加，甘草酸保留时间的降低也将导致甘草酸色谱峰与杂质峰更加接近，因此选取30℃为测定甘草酸含量的柱温。

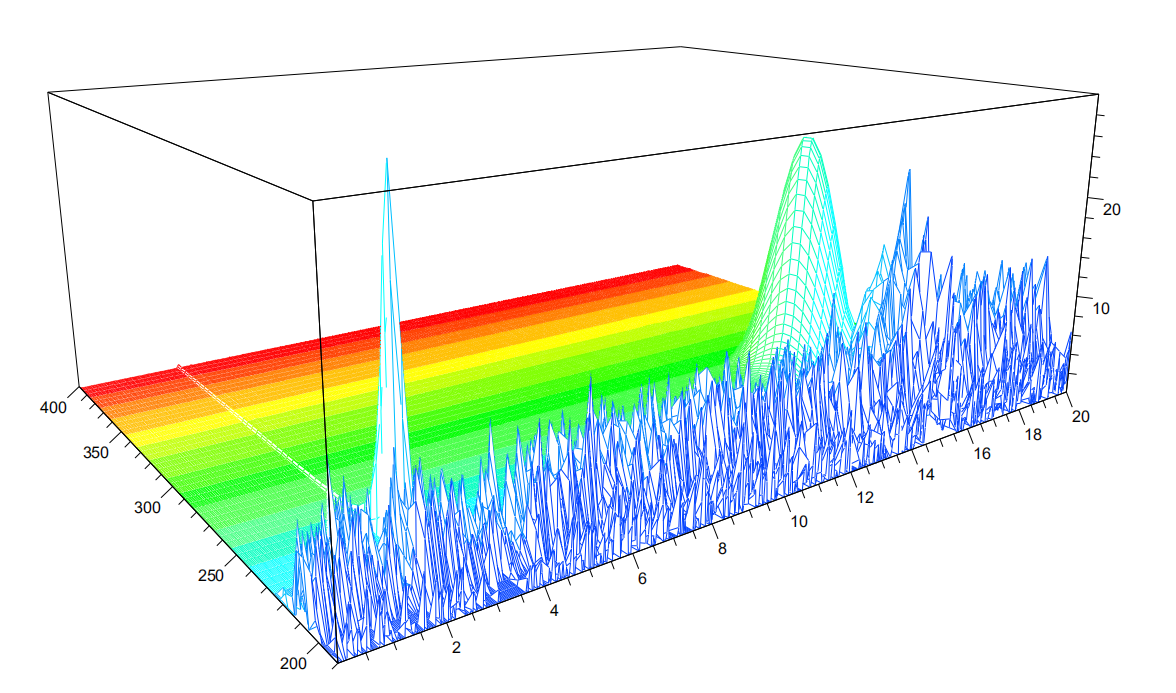


图 2　甘草酸铵标准溶液（0.1 mg/mL）光谱图



图 3　甲醇-0.1%磷酸水（70：30，v/v）(A)和甲醇-0.2 mol/L乙酸铵溶液-冰醋酸（67：33：1, v/v/v）(B)对甘草酸的分离效果

图 4　不同柱温与甘草酸保留时间、吸光度的关系

综上所述，最终确定最佳液相检测条件：色谱柱为C18，柱长250 mm，内径4.6 mm，粒径5 μm，或性能相当者；流动相为甲醇335 mL，乙酸铵缓冲溶液170 mL，混匀；等度洗脱；流速为1 mL/min；柱温为30℃；检测波长为250 nm；进样量为10 μL。

b）样品前处理方法选择依据

根据检测甘草酸相关文献及相关标准中的含量检测方法，甘草酸的提取方法主要为超声提取（表7），并且超声提取方法可达到有效提高提取分离率，缩短提取时间、节约成本、甚至提高产品的质量，同时达到增加产量的效果，故将提取方式确定为超声提取。

表 7　甘草酸含量检测文献中甘草酸的提取方法

| 文献名 | 提取方法 | 参考文献 |
| --- | --- | --- |
| HPLC测定甘草提取物中甘草酸的含量 | 超声提取 | [16] |
| HPLC 测定川芎茶调散中甘草酸的含量 | 超声提取 | [17] |
| HPLC法测定不同产地甘草中甘草酸的含量 | 超声提取 | [18] |
| HPLC 法测定内蒙古不同产地甘草中甘草酸的含量 | 超声提取 | [19] |
| 甘草酸铋散的质量标准研究 | 超声提取 | [20] |
| 高效液相色谱法测定清肺颗粒中甘草酸的含量 | 超声提取 | [21] |
| 利尿合剂的质量标准分析 | 超声提取 | [22] |
| UPLC-MS/MS法同时检测参芪健胃颗粒中芍药苷、橙皮苷、甘草酸铵的含量 | 超声提取 | [23] |

通过甘草酸峰形、峰面积、分离度等指标考察了不同提取体积、不同提取液、不同提取时间条件下甘草酸的检测情况。分别比较了25 mL、50 mL、100 mL的提取体积对GF10和GT8中的甘草酸进行提取，结果显示（表8），3种提取体积下，甘草粉碎物中甘草酸含量无显著性差异（*P*＞0.05），甘草提取物中甘草酸含量相差不大，但50 mL提取液得到的甘草酸含量相对较高。为保证方法能够将甘草酸完全提取，延用药典中的检测体积50 mL。

表 8　不同提取体积得到的含量比较

| 提取体积/mL | 甘草粉碎物GF10检测含量/% | 甘草提取物GT8检测含量/% |
| --- | --- | --- |
| 25 | 2.03 | 7.13 |
| 50 | 2.04 | 7.30 |
| 100 | 2.04 | 7.22 |

在检索文献的过程中发现，大部分方法采用流动相对甘草酸进行提取（见表9），部分方法使用了纯甲醇提取、碱性溶液提取法，因此，本方法分别比较了甲醇、流动相、1 mol/L氨水的提取效果。如图5所示，不同提取溶剂不会影响甘草酸色谱峰的分离效果。但不同提取溶剂提取得到的甘草酸的量不同，甲醇作为提取溶剂时，GF10样品中甘草酸含量为1.27%，明显低于流动相、氨水提取液（分别为2.04%和2.02%）。对于GT8样品来说也显示出了相似的含量差异（甲醇6.6%、流动相和氨水提取液约7.4%）。因此，选择流动相作为提取液。

表 9　甘草酸含量检测文献中甘草酸的提取溶剂

| 文献名 | 提取溶剂 | 参考文献 |
| --- | --- | --- |
| HPLC测定甘草提取物中甘草酸的含量 | 流动相 | [16] |
| HPLC 测定川芎茶调散中甘草酸的含量 | 流动相 | [17] |
| HPLC法测定不同产地甘草中甘草酸的含量 | 甲醇 | [18] |
| HPLC 法测定内蒙古不同产地甘草中甘草酸的含量 | 流动相 | [19] |
| 高效液相色谱法测定清肺颗粒中甘草酸的含量 | 流动相 | [20] |
| HPLC法测定甘草中甘草酸的含量 | 1 mol/L氨水 | [21] |
| 利尿合剂的质量标准分析 | 流动相 | [22] |
| UPLC-MS/MS法同时检测参芪健胃颗粒中芍药苷、橙皮苷、甘草酸铵的含量 | 70%甲醇 | [23] |



图 5　不同提取液对GF10中甘草酸的检测图谱。甲醇（A）、流动相（B）、1 mol/L氨水（C）

随后，考察了不同的提取时间对甘草酸含量的影响，分别以25 min、30 min、35 min为提取时间对GF10样品和GT8样品中甘草酸进行提取，结果显示（表10），25 min、30 min、35 min时测得的样品含量相似。与25 min相比，提取时间为30 min时GF10样品含量略有升高，随着提取时间延长（35 min），GF10样品中甘草酸含量没有继续升高，说明30 min即可将样品中的甘草酸提取完全。因此，延用药典方法，选择超声30 min为提取时间，故选择超声时间为30 min。

表 10　不同提取时间GF10、GT8样品中甘草酸含量比较

| 提取时间/min | 甘草粉碎物GF10检测含量/% | 甘草提取物GT8检测含量/% |
| --- | --- | --- |
| 25 | 1.98 | 7.28 |
| 30 | 2.06 | 7.29 |
| 35 | 2.04 | 7.29 |

进一步，确定本方法最适称样量，依据《中国药典》2000年版和《中国兽药典》2000年版中甘草酸含量测定方法的取样量0.3 g，比较了三种不同的称样量（0.1 g、0.3 g和0.5 g）的重复性。结果显示（表11），不同类型样品在使用不同称样量时，均能满足重复性RSD不超过2%的要求，其中，0.3 g和0.5 g的称样量得到的重复性RSD更低，结果更可靠。为避免浪费试剂、产生过高的成本，选择0.3 g为本方法的取样量。

表 11　不同称样量对不同类型样品检测结果的重复性比较

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 称样量 | 甘草粉碎物（GF8） | | 甘草粗提物（GT7） | | 复配型粉碎物（FP1） | |
| 平均值  （g/kg） | RSD/% | 平均值  （g/kg） | RSD/% | 平均值  （g/kg） | RSD/% |
| 0.1 g | 31.71 | 1.48 | 57.18 | 0.57 | 14.54 | 1.24 |
| 0.3 g | 31.70 | 0.58 | 57.74 | 0.21 | 13.95 | 0.45 |
| 0.5 g | 30.72 | 0.74 | 57.35 | 0.50 | 13.92 | 0.52 |

综上所述，最终确定了如下的样品前处理方法：

称取试样0.3 g，分别置于50 mL容量瓶中，加入约45 mL流动相，超声30 min，取出，放至室温，用流动相定容至刻度，摇匀，用0.45 μm滤膜将样液滤入样品瓶中，供高效液相色谱仪测定。

3.1.3方法学

a）系统适应性

按照“3.1”项下的色谱检测条件及样品前处理方法，经测定天然植物饲料原料中甘草酸的出峰位置均无杂峰干扰（图6）。



图 6　0.12 mg/mL标准溶液(A)、单一型样品(B)、复配型粉碎物样品(C)、复配型粗提物样品(D)、混合型样品(E)检测谱图

b）线性范围

甘草酸在0.01～0.20 mg/mL浓度范围内线性良好（图7），R2＞0.9999。

图 7　甘草酸标准曲线

c）检出限和定量限

将甘草酸铵标准品、单一型样品、复配型样品、混合型样品进样浓度为0.001 mg/mL时，信噪比约为10，计算得到该方法的定量限为0.16 g/kg（图8）。将甘草酸铵标准品、单一型样品、复配型样品、混合型样品进样浓度为0.0004 mg/mL时，信噪比约为3，计算得到该方法的检出限为0.06 g/kg。



图 8　0.001 mg/mL标准溶液(A)、单一型样品(B)、复配型粉碎物样品(C)、复配型粗提物样品(D)、混合型样品(E)中定量限检测谱图

d）精密度和加标回收率

连续三天对GF9、GF10、GT8、GT9、GT10进行提取和检测，每批平行3个样品，计算批内和批间精密度。

采用三种加标水平，每种水平平行3个样品的方法（3×3）进行加标回收率实验。三个加标水平分别为80%、100%、120%，方法检测量为6 mg，故甘草酸的加标量分别为1.8 mg、3.0 mg、4.2 mg，储备液浓度为1 mg/mL，故分别量取标准品储备液1.8 mL、3.0 mL和4.2 mL，并分别置于3个50 mL容量瓶中，加入50%称样质量的饲料原料，加入流动相至容量瓶内体积约为45 mL，超声30 min，放冷，用流动相定容至刻度，每种添加浓度水平平行制备3份，即得加标回收率考察溶液。

本方法批内精密度在0.15%～1.35%之间，批间精密度0.12%～1.23%（见表10）；甘草酸在1.8 mg、3.0 mg、4.2 mg添加水平的加标回收率在92%～105%之间。天然植物饲料原料中甘草酸含量检测的精密度和加标回收率见表12～表17。

表 12　甘草酸批内及批间精密度

| 样品 | 批内精密度/% | | | 批间精密度/% |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1批 | 2批 | 3批 |
| GF9 | 0.31 | 0.79 | 0.29 | 0.75 |
| GF10 | 0.85 | 0.52 | 1.35 | 1.23 |
| GT8 | 1.34 | 1.25 | 0.37 | 0.37 |
| GT9 | 0.15 | 0.59 | 0.87 | 0.12 |
| GT10 | 0.96 | 1.07 | 0.88 | 0.31 |

表 13　GF9中甘草酸的加标回收率

| 添加质量/mg | 称量粉碎物质量/g | 实际检测总质量/mg | 实际检测加标准品总质量/mg | 回收率/% | 平均值/% | RSD  /% |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 4.2 | 0.11423 | 6.596 | 3.955 | 94.13 | 94.46 | 1.38 |
| 0.11126 | 6.601 | 4.029 | 95.89 |
| 0.11537 | 6.589 | 3.925 | 93.34 |
| 3.0 | 0.11135 | 5.335 | 2.764 | 91.99 | 95.58 | 3.28 |
| 0.11341 | 5.557 | 2.939 | 97.79 |
| 0.11326 | 5.528 | 2.911 | 96.96 |
| 1.8 | 0.12734 | 4.632 | 1.690 | 93.69 | 94.05 | 1.25 |
| 0.11425 | 4.359 | 1.718 | 95.36 |
| 0.11828 | 4.411 | 1.678 | 93.10 |

表 14　GF10中甘草酸的加标回收率

| 添加质量/mg | 称量粉碎物质量/g | 实际检测总质量/mg | 实际检测加标准品总质量/mg | 回收率/% | 平均值/% | RSD  /% |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 4.2 | 0.16432 | 7.251 | 3.916 | 93.22 | 93.63 | 1.24 |
| 0.15529 | 7.140 | 3.988 | 94.94 |
| 0.16533 | 7.251 | 3.896 | 92.74 |
| 3.0 | 0.13821 | 5.670 | 2.864 | 95.47 | 94.33 | 1.05 |
| 0.16326 | 6.131 | 2.817 | 93.89 |
| 0.16424 | 6.143 | 2.808 | 93.63 |
| 1.8 | 0.14526 | 4.633 | 1.660 | 91.95 | 93.92 | 2.06 |
| 0.15231 | 4.815 | 1.699 | 94.01 |
| 0.14428 | 4.682 | 1.730 | 95.82 |

表 15　GT8中甘草酸的加标回收率

| 添加质量/mg | 称量粗提物质量/g | 实际检测总质量/mg | 实际检测加标准品总质量/mg | 回收率/% | 平均值/% | RSD  /% |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 4.2 | 0.03932 | 6.991 | 4.001 | 94.98 | 97.04 | 5.01 |
| 0.04022 | 7.000 | 3.933 | 93.55 |
| 0.05144 | 8.237 | 4.403 | 102.60 |
| 3.0 | 0.04526 | 6.271 | 2.821 | 93.84 | 94.18 | 1.18 |
| 0.03225 | 5.261 | 2.807 | 93.28 |
| 0.03143 | 5.263 | 2.886 | 95.42 |
| 1.8 | 0.04601 | 5.244 | 1.716 | 95.29 | 96.67 | 1.85 |
| 0.03628 | 4.559 | 1.798 | 98.69 |
| 0.04616 | 5.269 | 1.741 | 96.02 |

表 16　GT9中甘草酸的加标回收率

| 添加质量/mg | 称量粗提物质量/g | 实际检测总质量/mg | 实际检测加标准品总质量/mg | 回收率/% | 平均值/% | RSD  /% |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 4.2 | 0.04621 | 7.189 | 3.912 | 92.91 | 92.72 | 0.74 |
| 0.04626 | 7.208 | 3.931 | 93.28 |
| 0.04731 | 7.227 | 3.879 | 91.96 |
| 3.0 | 0.03424 | 5.246 | 2.824 | 93.70 | 93.93 | 1.91 |
| 0.03340 | 5.250 | 2.900 | 95.83 |
| 0.03707 | 5.404 | 2.769 | 92.26 |
| 1.8 | 0.03816 | 4.417 | 1.710 | 94.62 | 97.10 | 4.31 |
| 0.03506 | 4.199 | 1.706 | 94.76 |
| 0.03643 | 4.426 | 1.861 | 101.93 |

表 17　GT10中甘草酸的加标回收率

| 添加质量/mg | 称量粗提物质量/g | 实际检测总质量/mg | 实际检测加标准品总质量/mg | 回收率/% | 平均值/% | RSD  /% |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 4.2 | 0.04922 | 7.322 | 3.867 | 91.87 | 92.65 | 0.83 |
| 0.04333 | 6.942 | 3.910 | 92.69 |
| 0.04826 | 7.319 | 3.935 | 93.41 |
| 3.0 | 0.04924 | 6.271 | 2.817 | 93.55 | 93.09 | 0.43 |
| 0.04119 | 5.683 | 2.792 | 92.82 |
| 0.05030 | 6.326 | 2.801 | 92.90 |
| 1.8 | 0.03833 | 4.376 | 1.697 | 93.26 | 93.24 | 1.34 |
| 0.02811 | 3.634 | 1.660 | 91.98 |
| 0.03723 | 4.320 | 1.712 | 94.48 |

e）方法耐用性

考察柱温和流动相比例改变对甘草酸在不同检测出样品中分离度的影响，进而考察方法的耐用性，其分离度大于1.5，耐用性良好（表18）。

表 18　方法耐用性（分离度）

| 样品种类 | 柱温 | | | 流动相（甲醇-0.2 mol/L乙酸铵-冰醋酸）比例 | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 35℃ | 30℃ | 25℃ | （70：30：1） | （67：33：1） | （65：35：1） |
| GF9 | 2.59 | 2.64 | 2.61 | 2.29 | 2.64 | 2.78 |
| GF10 | 1.84 | 1.78 | 2.15 | 1.68 | 1.78 | 2.07 |
| GT8 | 2.56 | 2.62 | 2.57 | 2.33 | 2.62 | 2.76 |
| GT9 | 2.54 | 2.55 | 2.53 | 2.32 | 2.55 | 2.76 |
| GT10 | 2.56 | 2.57 | 2.56 | 2.33 | 2.57 | 2.77 |

f）标准工作溶液的稳定性

结果表明，24 h内甘草酸铵标准工作液的稳定性良好（见表19）。

表 19　24 h甘草酸铵标准工作液稳定性

| 样品编号 | 进样时间/h | 保留时间/min | 峰面积 | 平均值/% | RSD/% |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 0 | 8.960 | 1727.1 | 1730.72 | 0.77 |
| 2 | 2 | 8.968 | 1743.2 |
| 3 | 4 | 8.983 | 1746.2 |
| 4 | 8 | 8.961 | 1710.7 |
| 5 | 12 | 8.992 | 1722.9 |
| 6 | 24 | 9.003 | 1734.2 |

g）甘草酸铵标准储备液的稳定性

为检测储备液稳定性，连续三个月，每月同一时间进行一次含量检测，每次均重新称量甘草酸铵标准品，与储备液稳定性样品进行比较，无显著差异，表明储备液三个月内稳定性良好（见表20）。

表 20　甘草酸铵标准储备液的稳定性

| 存放条件 | | 储备液峰面积（n=3） | | | | | | RSD/% |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 4℃存放 | | | 临用现配 | | |
| 检测时间 | 第0个月 | — | — | — | 8863.38 | 8855.85 | 8853.62 | 0.06 |
| 第1个月 | 8769.25 | 8783.41 | 8795.30 | 8775.57 | 8759.01 | 8769.70 | 0.14 |
| 第2个月 | 9019.76 | 8989.09 | 8979.78 | 9014.75 | 8974.11 | 8992.23 | 0.21 |
| 第3个月 | 8836.30 | 8848.69 | 8860.75 | 8857.10 | 8862.04 | 8846.88 | 0.11 |

h）甘草苷和甘草次酸的干扰检测

配置含甘草酸铵、甘草苷、甘草次酸均为0.2 mg/mL的混标溶液。检测图谱显示（图8），甘草酸的保留时间为4.697 min、甘草苷的保留时间为1.974 min、甘草次酸的保留时间为44.052 min。结果表明，甘草酸、甘草苷和甘草次酸保留时间相差较大，且峰分离度良好，甘草苷和甘草次酸对于甘草酸的检测不存在干扰。

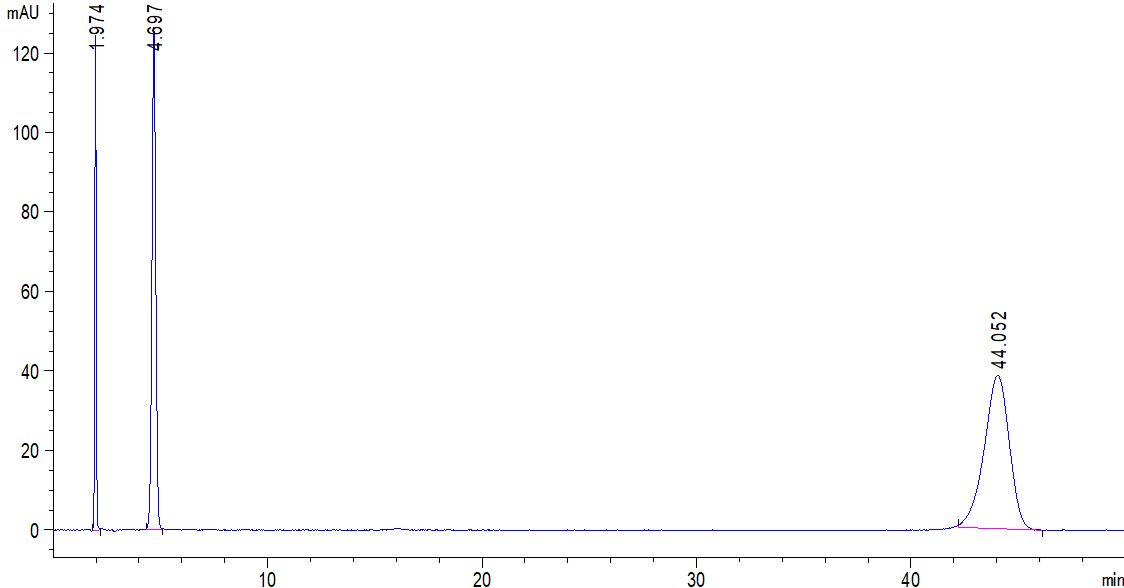


图8　混标溶液（甘草酸、甘草苷、甘草次酸浓度均为0.2 mg/mL）

3.1.3方法验证结果

本标准方法经国家饲料质量检验检测中心（北京）、山东省饲料兽药质量检验中心、北京英太格瑞检测技术有限公司等3家实验室参加了该农业行业标准的验证，标准编制单位向验证单位提供方法草案、验证方案和标准品。验证单位按照方法草案准备实验用品，在规定时间内完成了对标准方法的线性范围、回收率和精密度等技术指标的验证试验并返回试验结果。3家实验室的验证结果标明，方法的线性范围、回收率和精密度等技术指标均符合GB/T 27417—2017和GB/T 27404—2008的要求，说明该方法可行。

3.1.4实际样品的测定

使用本方法对从全国各地采集不同来源不同批次的单一型、复配型和混合型天然植物饲料原料，共93种。按照“3.1”项下的色谱检测条件及样品前处理方法，对这些样品中的甘草酸进行了测定，结果如表21所示，不同类型样品间含量差异较大，在93种样品中甘草酸含量在0.77～88.08 g/kg之间，同一类型样品间甘草酸的含量也存在较大差异，其中，单一型粗提物中甘草酸的含量在44.65～88.08 g/kg之间、单一型粉碎物中甘草酸的含量在12.01～30.70 g/kg之间、复配型粗提物中甘草酸的含量在2.57～44.07 g/kg之间、复配型粉碎物中甘草酸的含量在4.85～15.71 g/kg之间、混合型天然植物饲料原料中甘草酸的含量在0.77～57.49 g/kg之间。同时，实际样品的测定结果显示，不同类型的天然植物饲料原料（单一型粗提物、单一型粉碎物、复配型粗提物、复配型粉碎物、混合型）的称样量为0.3g时，均能够满足试验要求。

表 21　实际样品中甘草酸含量测定结果

| 样品类型 | 样品名称 | 来源地 | 甘草酸含量（g/kg） |
| --- | --- | --- | --- |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物1 | 烟台 | 78.81 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物2 | 保定冀中 | 85.63 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物3 | 潍坊 | 57.74 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物4 | 滨州 | 86.31 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物5 | 无锡 | 88.08 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物6 | 保定安国 | 44.65 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物7 | 保定冀中 | 79.55 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物8 | 北京 | 76.95 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物9 | 新疆 | 71.29 |
| 单一型粗提物 | 甘草粗提物10 | 烟台 | 70.52 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物1 | 烟台 | 23.49 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物2 | 保定冀中 | 20.76 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物3 | 潍坊 | 25.17 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物4 | 滨州 | 19.53 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物5 | 无锡 | 18.81 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物6 | 保定安国 | 31.70 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物7 | 保定冀中 | 21.16 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物8 | 菏泽 | 12.01 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物9 | 甘肃 | 23.02 |
| 单一型粉碎物 | 甘草粉碎物10 | 内蒙古 | 20.44 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+杜仲叶粗提物1 | 保定冀中 | 37.39 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+杜仲叶粗提物2 | 保定冀中 | 40.03 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+诃子粗提物 | 无锡 | 40.80 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+黄芪粗提物1 | 保定冀中 | 36.32 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+黄芪粗提物2 | 无锡 | 40.03 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+黄芪粗提物3 | 滨州 | 10.27 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+黄芪粗提物4 | 保定冀中 | 39.56 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+女贞子粗提物 | 潍坊 | 39.17 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+蒲公英粗提物1 | 保定冀中 | 19.66 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+蒲公英粗提物2 | 保定冀中 | 39.67 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+山茶籽粕粗提物 | 滨州 | 44.07 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+山楂粗提物（4：6） | 保定安国 | 2.57 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+藤茶黄酮-c黄晶 | 无锡 | 35.93 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+甜叶菊粗提物 | 无锡 | 40.04 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+淫羊藿粗提物1 | 保定冀中 | 30.32 |
| 复配型粗提物 | 甘草粗提物+淫羊藿粗提物2 | 保定冀中 | 39.52 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+当归粉碎物（1：1） | 保定安国 | 13.95 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+党参粉碎物 | 烟台 | 9.99 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+杜仲叶粉碎物1 | 保定冀中 | 9.94 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+杜仲叶粉碎物2 | 无锡 | 9.96 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+茯苓粉碎物 | 烟台 | 9.92 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+诃子粉碎物 | 无锡 | 10.34 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+黄柏粉碎物（6：4） | 菏泽 | 4.85 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+黄柏粉碎物（9：1） | 菏泽 | 9.10 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+黄芪粉碎物1 | 烟台 | 9.98 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+黄芪粉碎物2 | 保定冀中 | 9.89 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+黄芪粉碎物3 | 无锡 | 9.88 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+金银花粉碎物 | 无锡 | 10.12 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+女贞子粉碎物 | 潍坊 | 12.82 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+蒲公英粉碎物1 | 保定冀中 | 9.90 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+蒲公英粉碎物2 | 烟台 | 9.95 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+生白术粉碎物1 | 保定冀中 | 9.74 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+生白术粉碎物2 | 保定冀中 | 15.71 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+甜叶菊粉碎物 | 无锡 | 9.78 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+杨树花粉碎物1 | 无锡 | 10.07 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+杨树花粉碎物2 | 烟台 | 9.63 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+淫羊藿粉碎物 | 保定冀中 | 9.92 |
| 复配型粉碎物 | 甘草粉碎物+枣粉（50%枣+50%蒙脱石粉） | 烟台 | 9.67 |
| 混合型 | 甘草粗提物+川芎粉碎物（4：1） | 保定安国 | 28.23 |
| 混合型 | 甘草粗提物+党参粉碎物 | 烟台 | 39.36 |
| 混合型 | 甘草粗提物+杜仲叶粉碎物1 | 保定冀中 | 38.83 |
| 混合型 | 甘草粗提物+杜仲叶粉碎物2 | 无锡 | 39.71 |
| 混合型 | 甘草粗提物+茯苓粉碎物 | 烟台 | 33.82 |
| 混合型 | 甘草粗提物+诃子粉碎物 | 无锡 | 41.68 |
| 混合型 | 甘草粗提物+黄芪粉碎物1 | 烟台 | 39.27 |
| 混合型 | 甘草粗提物+黄芪粉碎物2 | 保定冀中 | 38.32 |
| 混合型 | 甘草粗提物+黄芪粉碎物3 | 无锡 | 38.22 |
| 混合型 | 甘草粗提物+金银花粉碎物1 | 无锡 | 30.49 |
| 混合型 | 甘草粗提物+金银花粉碎物2 | 滨州 | 46.09 |
| 混合型 | 甘草粗提物+女贞子粉碎物 | 潍坊 | 40.99 |
| 混合型 | 甘草粗提物+蒲公英粉碎物1 | 保定冀中 | 38.69 |
| 混合型 | 甘草粗提物+蒲公英粉碎物2 | 烟台 | 39.04 |
| 混合型 | 甘草粗提物+生白术粉碎物1 | 保定冀中 | 38.41 |
| 混合型 | 甘草粗提物+生白术粉碎物2 | 保定冀中 | 39.63 |
| 混合型 | 甘草粗提物+甜叶菊粉碎物 | 无锡 | 37.67 |
| 混合型 | 甘草粗提物+杨树花粉碎物1 | 无锡 | 32.36 |
| 混合型 | 甘草粗提物+杨树花粉碎物2 | 烟台 | 39.76 |
| 混合型 | 甘草粗提物+淫羊藿粉碎物 | 保定冀中 | 39.80 |
| 混合型 | 甘草粗提物+枣粉（50%枣+50%蒙脱石粉） | 烟台 | 39.33 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+杜仲叶粗提物 | 保定冀中 | 9.87 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+甘草粗提物1 | 潍坊 | 52.70 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+甘草粗提物2 | 滨州 | 57.49 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+甘草粗提物3 | 保定安国 | 32.63 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+甘草粗提物4 | 保定冀中 | 36.84 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+诃子粗提物 | 无锡 | 10.13 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+黄芪粗提物1 | 保定冀中 | 9.82 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+黄芪粗提物2 | 滨州 | 9.31 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+黄芪粗提物2 | 无锡 | 10.18 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+蒲公英粗提物 | 保定冀中 | 9.65 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+山楂粗提物（1：4） | 保定安国 | 0.77 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+藤茶黄酮-c黄晶 | 无锡 | 11.75 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+甜叶菊粗提物 | 无锡 | 9.91 |
| 混合型 | 甘草粉碎物+淫羊藿粗提物 | 保定冀中 | 10.03 |

此外，对其他天然植物饲料原料进行测定，并与甘草饲料原料进行复配或混合得到天然植物饲料原料的空白样品色谱图、复配及混合样品色谱图，结果显示（图9），不同种类样品杂质峰对甘草酸色谱峰均无干扰，表明该方法可适用于不同种类的天然植物饲料原料，具有较好的普适性。



图9　0.12 mg/mL标准溶液(A)、金银花粉碎物(B)及其对应复配型粉碎物样品(C)、甜叶菊粗提物(D)及其对应复配型粗提物样品(E)、淫羊藿粗提物(F)及其对应混合型样品(G)检测谱图

3.1.5综述报告

本文件对天然植物饲料原料中甘草酸的色谱条件及样品前处理进行了优化，包括流动相、柱温、提取液、提取时间等对检测方法的影响等，并对建立的检测方法进行方法学验证。上述技术参数的确定主要依据是课题组进行现场实验室技术测定试验获取的数据资料。

分别考察色谱条件（不同流动相、柱温、检测波长）、前处理条件（不同提取方式、提取溶剂、提取体积、提取时间）对检测方法的影响。最终选择检测方法为：

流动相：甲醇335 mL，乙酸铵缓冲溶液170 mL，混匀；等度洗脱；柱温：30℃；检测波长：250 nm；进样量：10 μL；流速：1.0 mL/min。

平行做两份试验。称取试样约0.3 g（精确至0.1 mg），置于50 mL容量瓶中，加入约45 mL流动相，超声30 min，期间振摇2～3次，取出后冷却至室温，用流动相定容，摇匀，静置。上清液用微孔滤膜过滤，备用。

标准曲线范围设置：以设计样品浓度（约0.12 mg/mL）为标准曲线范围的中间浓度，设置线性范围为 0.01～0.20 mg/mL。

定量限、检出限设置：样品的定量限为0.16 g/kg，检出限为0.06 g/kg。

3.2 技术经济论证

拟定各种可能的技术经济方案，建立多种技术方案。按规划目标的要求建立若干个技术方案，包括多种建设方案和多种改造方案（新技术方案代替旧技术方案）。

对各种方案进行初步加工，确定对比方案评价标准。设计包括数量、质量、成本、投资、资金回收等各种指标。

对技术方案进行分析、计算、比较。对各类指标进行“可比”处理，使各种技术方案在使用价值上等同化，然后进行比较。

综合分析、评价、择优。在分析、计算、比较的基础上，对各种指标与指标体系进行定量与定性的分析评价，最后选出最优的方案。

3.3预期效益分析

天然植物饲料原料中甘草酸的测定 高效液相色谱法标准的制定预期产生如下作用和效益：

1. 通过本文件的制定，能够为甘草酸在天然植物饲料原料中含量检测提供科学依据。主管部门或有关企业可依据标准建立全面的检测方法质量管理体系，健全产品质量管理法规，迅速提高和发展企业的科学防治水平，增加经济效益。
2. 通过本文件的制定，可以加快传播技术信息，加速新技术、新成果的应用和推广，促进企业技术、生产水平和产品质量升级。
3. 通过规范企业生产行为，对天然植物饲料原料甘草酸含量严格控制，提高企业经济效益。

4 与国际标准和国外同类标准技术内容的对比情况

目前天然植物饲料原料中甘草酸的测定方法无国际标准和国外先进标准可参照。本标准在制订过程中对以甘草为原料的单一型天然植物饲料原料、含甘草提取物/甘草粉碎物的复配型和混合型天然植物饲料原料的质量、检测和市场进行了充分的调查研究，并广泛征求和采纳了国内相关领域专家的意见和建议，所制定的标准适合我国国情，具有先进性、科学性、实用性和可操作性。

5 以国际标准为基础的起草情况

未采用国际标准，国际尚未制定《天然植物饲料原料甘草酸的测定 高效液相色谱法》。

6 与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系

标准所确定的各项技术指标和内容符合我国现行的有关方针、政策，并与相关法律、法规、标准吻合。

本标准颁布实施后，填补我国饲料添加剂行业，淫羊藿提取物主要成分测定方法的空白，更有利于行业应用和相关产品质量标准的制定；与现行的法律、法规及其他国家标准没有矛盾。

7 重大分歧意见的处理经过和依据

本标准无重大分歧意见。

8 涉及专利的有关说明

本标准未明确涉及某一具体专利，但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。

9 实施行业标准的要求

建议将《天然植物饲料原料甘草酸的测定 高效液相色谱法》批为推荐性标准。同时为了贯彻好本标准，使其有效发挥作用，建议在标准发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，并在相关企业和检测机构进行宣传和贯彻，组织有关部门和人员进行学习和培训。

10 其他予说明的事项

无。

参 考 文 献

张巧娥, 杨库, 周玉香. 日粮中补充甘草对舍饲滩羊羊肉风味的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008(9):000036-37

张巧娥, 周玉香, 朱继红,等. 甘草提取物对舍饲滩羊增重效果的影响[J]. 饲料工业, 2009, 30 (14):12-14.

Yulong Yin, Zhisang He, Xiangfeng Kong, et al． Dietary supplementation with glycyrrhetinic acid (GA) increases endogenous arginine provision and growth performance in milk-fed piglets[J]．Journal of Dairy Science，2007，90: 645.

董永军, 王丽荣, 王宪文,等. 甘草多糖的提取及其对肉仔鸡免疫功能的影响[J]. 江苏农业学报, 2008, 24 (5):692-696.

刘俊峰, 郭雪峰, 刘永宏. 甘草提取物对卡拉库尔羊体外瘤胃发酵参数的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39 (12):73-77.

郑君. 甘草总黄酮对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜保护作用及药理机制研究[D]. 南方医科大学, 2014.

刘秀丽,马世荣,李博萍,牛淼玲,单振东.不同产地甘草抑菌性及甘草酸和甘草苷含量分析[J].黑龙江农业科学,2021(03):103-105+114.

GB/T 22248—2008 《保健食品中甘草酸的测定》.

SN/T 3854—2014《出口食品中天然甜味剂甜菊糖苷、甜菊双糖苷、甘草酸、甘草次酸的测定高效液相色谱法》.

国家药典委员会. 中华人民共和国兽药典：2005版二部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2005, 102-103.

GB/T 19424—2018《天然植物饲料原料通用要求》.

GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》.

GB/T 20001.4—2015《标准编写规则第4部分：试验方法标准》.

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》

徐树芸,王海宁.HPLC测定甘草提取物中甘草酸的含量[J].安徽农业科学,2008(24):10297+10300.

丁慧,闫韶华.HPLC测定川芎茶调散中甘草酸的含量[J].海峡药学,2016,28(03):85-87.

栾海云,李淑翠,许勇.HPLC法测定不同产地甘草中甘草酸的含量[J].滨州医学院学报,2008(04):270-271.

刘彩云.HPLC法测定内蒙古不同产地甘草中甘草酸的含量[J].内蒙古医学杂志,2014,46(03):337-338.

张玉娟,张晓明,杨平荣,陈海龙.甘草酸铋散的质量标准研究[J].中国医院用药评价与分析,2018,18(11):1521-1523.

许世富.高效液相色谱法测定清肺颗粒中甘草酸的含量[J].现代农业科技,2020(07):222-223+225.

张越,陈健,李洋,王洪兰,李俊松,狄留庆.经典名方温经汤标准汤剂HPLC指纹图谱建立及9种成分含量测定[J].中草药,2020,51(18):4664-4672.

陈向英,杨志华,洪美华.利尿合剂的质量标准分析[J].中国医药科学,2020,10(16):245-248.

吴丹,王静,刘龙,王艳.UPLC-MS/MS法同时检测参芪健胃颗粒中芍药苷、橙皮苷、甘草酸铵的含量[J].中国医药导刊,2020,22(10):698-702.

索建兰,沈峰.HPLC法测定甘草中甘草酸的含量[J].陕西中医,2010,31(02):226.