

中华人民共和国国家标准

《植物提取物类饲料添加剂特征图谱制定 技术要求》

编制说明

(公开征求意见稿)

标准起草工作组

二〇二三年六月

项目名称：植物提取物类饲料添加剂特征图谱制定技术要求

国家标准项目计划编号：20214593-T-469

承担单位：湖南农业大学、 中国农业科学院畜牧兽医研究所

编制组主要成员：

目 录

一、工作简况，包括任务来源、制定背景、起草过程等	3
(一) 任务来源.....	3
(二) 制订背景.....	3
(三) 起草过程.....	4
1. 成立编制小组.....	4
2. 标准申报与立项.....	5
3. 确定标准制订技术路线、制订原则.....	5
4. 编写标准征求意见稿.....	5
5. 编写标准预审稿.....	5
二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据	6
(一) 标准编制原则.....	6
(二) 主要内容及其确定依据.....	6
(三) 相关技术内容说明.....	7
1.对“适用范围”的编制说明.....	7
2.对“术语与定义”的编制说明.....	7
3.对“特征图谱内容”的编制说明.....	8
4.对“特征图谱制定起草说明”的编制说明.....	9
4.1 关于“标题”的编制说明.....	9
4.2 关于“提取物来源”的编制说明.....	9
4.3 关于“测定方法选择”的编制说明.....	10
4.4 关于“色谱条件与系统适用性试验确定依据”的编制说明.....	10
4.5 关于“分析方法建立依据”的编制说明.....	12
4.5.1 试样溶液制备.....	12
4.5.2 参照物溶液制备.....	12
4.6 关于“方法学验证要求”的编制说明.....	12
4.7 关于“特征图谱及技术参数的确定方法”的编制说明.....	14

4.7.1 对照特征图谱建立的依据	14
4.7.1.1 特征峰的选择和标定	14
4.7.1.2 特征峰的验证	15
4.7.1.3 特征峰的指认	15
4.7.1.4 参照物和 S 峰的选择	15
4.7.1.5 特征峰相对保留时间和相对峰面积的规定	16
4.7.1.6 对照特征图谱的生成	17
4.7.2 测定结果评判标准的依据	17
4.8 关于“对照提取物制备”的说明	18
三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益	19
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况	20
五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因	20
六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系	20
七、重大分歧意见的处理经过和依据	20
八、涉及专利的有关说明	26
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等措施建议	26
十、其他应当说明的事项	27

《植物提取物类饲料添加剂特征图谱制定技术要求》

一、工作简况，包括任务来源、制定背景、起草过程等

（一）任务来源

《植物提取物类饲料添加剂特征图谱制定技术要求》由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出，湖南农业大学在承担天然植物饲料原料风险监测预警（项目编号：16190005）和天然植物提取物产品评价技术规程制定（项目编号：16200025）的基础上，起草形成标准草案。

本国家标准制定工作为《国家标准化管理委员会关于下达 2021 年第四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〔2021〕41 号）的任务之一，项目编号为 20214593-T-469，本项任务由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。由湖南农业大学牵头组织标准起草工作，按计划于 2023 年完成。

（二）制订背景

自 2020 年促生长类药物饲料添加剂退出后，养殖业对饲用抗生素替代品的需求十分旺盛，在动物养殖中对具有促进采食、抗氧化、增强免疫力、改善肠道健康和动物源食品品质等作用的绿色养殖投入品关注度高，特别是植物提取物类饲料添加剂受到普遍关注，农业农村部印发《农业绿色发展技术导则（2018—2030 年）》明确提出重点研发高效植物提取物新型绿色饲料添加剂等养殖投入品的要求，以支撑养殖业绿色高质量发展。

将植物提取物作为动物健康产业的原料应用已成共识，但植物提取物原料来源存在品种、产地、采收季节等差异，且受产地初加工和制备工艺影响，而且提取物的来

源植物广泛（如某些植物原料有多个基原），不同基原植物的化学组成具有相似性，给人为混用提供了可能，众多因素造成植物提取物的质量标准难以规范和控制。虽然对天然植物中的活性成分研究一直在进行，但大部分天然植物中的有效成分未被阐明或仅部分阐明，因此仅对植物提取物中的某个有效成分或指标性成分进行定性、定量分析,不能全面有效地反映植物提取物的质量情况。

特征图谱作为在指纹图谱基础上发展起来的能方便有效地辨识植物提取物产品特征及其来源的技术手段，相比指纹图谱简单易行，便于实施推广。特征图谱可通过整体性、相似性和相关性对比发现质量变异和缺陷，从而全面、准确地控制植物提取物的质量，鉴别原料和产品的真伪，确保产品质量的稳定性和可控性，已作为一种成熟的质量控制技术，广泛应用于兽用中药、中药和提取物产品等领域。为加强饲料添加剂质量安全和保障监管，体现植物提取物类饲料添加剂的质量标准符合其内在特点，农业农村部《新饲料添加剂申报资料要求》（农业农村部公告第 226 号）和《植物提取物类饲料添加剂申报指南》（农办牧〔2023〕2 号）要求在产品鉴别报告和质量标准中提供特征图谱。为规范植物提取物类饲料添加剂特征图谱的制定工作，特制定本标准。

（三）起草过程

1. 成立编制小组

2019 年-2020 年，湖南农业大学受农业农村部畜牧兽医局委托，承担“天然植物饲料原料风险监测预警”和“天然植物提取物产品评价技术规程制定”项目，研究了 10 种饲用植物原料及其粗提物的特征图谱，确认了特征图谱技术在饲用植物原料及其粗提

物质量控制应用中的可行性，成立标准编制小组，初步确定标准框架和结构。

2. 标准申报与立项

2020年10月~2021年12月，本标准编制组成员查询和收集了国内外相关标准和文献资料，确立了建立标准的指导思想，制订了标准的技术路线，形成了申请报告和标准草案初稿，并制定了初步的实施方案，完成标准的申报和立项。

3. 确定标准制订技术路线、制订原则及形成标准讨论稿

2021年12月~2022年12月，湖南农业大学多次召开了标准开题论证会，会上标准编制组介绍了对国内外相关分析方法的研究，标准制订的技术路线和技术难点，以及拟开展的主要工作等内容，形成了《植物提取物类饲料添加剂特征图谱制定技术要求》标准文本及编制说明的讨论稿。

4. 形成标准定向征求意见稿

2023年1月~2023年3月，在前期工作的基础上，标准编制组内部多次召开讨论会研讨修改，形成《植物提取物类饲料添加剂特征图谱制定技术要求》标准文本及编制说明的定向征求意见稿。

5. 形成标准预审稿

2023年3月~2023年4月，向畜牧兽医、植物提取物、分析化学和中药质量控制等领域行业、协会专家定向征求修改意见，根据专家反馈的修改意见进行讨论和修改，形成《植物提取物类饲料添加剂特征图谱制定技术要求》标准文本及编制说明的预审稿说明：①发送《定向征求意见稿》的单位数：30个；收到《定向征求意见稿》后，回函的单位数：20个，回函并有建议或意见的单位数：19个，无意见的单位数：1个，没有回函的单位数：10个；总计征集意见178条，其中同意采纳119条，占

66.8 %；部分采纳和不采纳 59 条，占 33.1 %。

6. 召开标准预审会及形成标准公开征求意见稿

2023年5月24日，湖南农业大学以现场会议方式组织召开了《植物提取物类饲料添加剂特征图谱制定技术要求》的标准预审会。根据与会专家的意见进行讨论和修改，形成《植物提取物类饲料添加剂特征图谱制定技术要求》公开征求意见稿。

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

1、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》的规定起草。

2、制订的技术要求能够满足相关饲料标准和饲料质量安全监管工作的需要。

3、制订的技术要求更具科学性、可靠性及普遍适用性，易于推广使用。

（二）主要内容确定依据

本标准的制定主要参考了国家相关法律法规，农业农村部、国家药典委员会、国家兽药典委员会等相关部委政策文件。依据《饲料和饲料添加剂管理条例》、《新饲料和新饲料添加剂管理办法》和《饲料添加剂安全使用规范》，遵循农业农村部第226号公告《新饲料添加剂申报资料要求》、《植物提取物类饲料添加剂申报指南》（农办牧〔2023〕2号）、《天然植物饲料原料通用要求》（GB/T19424-2018）和《标准编写规则 第1部分：术语》（GB/T 20001.1），参照《中华人民共和国兽药典》（以下简称《中国兽药典》）和《中华人民共和国药典》（以下简称《中国药典》）的中药质量标准研究制定技术要求、《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》（暂行）和

《国家药品标准工作手册》等技术规范。

(三) 主要技术内容说明

1.对“适用范围”的编制说明

为准确界定和理解本标准内容，规定了植物提取物类饲料添加剂特征图谱制定涉及的术语与定义，结合当前技术水平和特征图谱在《中国药典》和《中国兽药典》等的实际应用情况，均采用液相色谱法或气相色谱法作为特征图谱制定方法。

2.对“术语与定义”的编制说明

为规范本标准的理解和使用，规定了 17 个术语和定义，为保持与已有标准、法规的一致性，引用了《植物提取物类饲料添加剂申报指南》、《植物提取物 术语》（报批稿）、《国家药品标准物质通则》、《中国药典》和《中国兽药典》等文件，具体如下：

表 1 术语及来源

编号	章条	术语	来源	类型
1	3.1	植物提取物类饲料添加剂	植物提取物类饲料添加剂申报指南	引用
2	3.2	纯化提取物	植物提取物类饲料添加剂申报指南	引用
3	3.3	组分提取物	植物提取物类饲料添加剂申报指南	引用
4	3.4	简单提取物	植物提取物类饲料添加剂申报指南	引用
5	3.5	特征图谱	植物提取物 术语（报批稿）	引用
6	3.6	特征成分	植物提取物 术语（报批稿）	引用
7	3.7	类组分	植物提取物类饲料添加剂申报指南	引用
8	3.8	有效成分	植物提取物类饲料添加剂申报指南	引用
9	3.9	有效组分	植物提取物类饲料添加剂申报指南	引用
10	3.10	标示成分	植物提取物 术语（报批稿）	引用
11	3.11	特有成分	/	编制

编号	章条	术语	来源	类型
12	3.12	对照提取物	国家药品标准物质通则	改写
13	3.13	相对保留时间	中华人民共和国药典（2020年版）	改写
14	3.14	相对峰面积	中华人民共和国药典（2020年版）	改写
15	3.15	参照物	国家药品标准物质通则	编制
16	3.16	对照品	/	编制
17	3.17	标准峰	/	编制

根据定向征求的反馈意见，为便于理解特征峰的选择、标定及参照物的选择，建议设立“特有成分、有效成分、标示成分、参照物、对照品和标准峰”的术语与定义，其中“有效成分”、“标示成分”分别引用自《植物提取物类饲料添加剂申报指南》和《植物提取物 术语》（报批稿）；“特有成分”、“参照物”、“对照品”和“标准峰”的定义则根据其内涵进行编制。

3.对“4.1 特征图谱内容”的编制说明

该部分是为规范特征图谱内容和书写格式。参照特征图谱在《中国药典》和《中国兽药典》中的应用案例，特征图谱内容应包括但不限于标题、来源、测定方法、色谱条件及系统适用性试验、参照物溶液的制备、试样溶液的制备、测定和对照特征图谱“图”的信息要求。为便于理解和图谱的统一，增设了对照特征图谱“图”的信息要求，对图的横纵坐标等信息进行了明确。

本标准中“特征图谱内容”将“对照提取物溶液的制备”设置为非必选项。按照目前的相关要求，对照提取物属于标准物质的一种，应当按照标准物质的要求进行管理。然而，根据植物提取物类饲料添加剂的应用现状，已登记或拟申报的植物提取物类饲料添加剂，并未强制要求其申报者按照规定的原料来源、制备工艺提供对照提取物，也尚无符合“标准物质”要求的对照提取物。若在特征图谱内容中设置“对照提取物”相

关内容为必须条款，将增加特征图谱制定的技术难度，而且目前《中国药典》和《中国兽药典》也并未强制要求提供对照提取物。但是，若申报者在制定其产品的特征图谱时，觉得有必要设定“对照提取物”的相关要求时，应当按照“标准物质”的相关要求制备和提供“对照提取物”，可在特征图谱内容中增加【其他】项，并说明“对照提取物”的来源及其溶液的制备方法。

4.对“4.2 特征图谱制定起草说明”的编制说明

4.1 关于“4.2.2 标题中产品名称的命名依据”的编制说明

为提高植物提取物特征图谱的专属性和辨识度，应对不同原料和生产工艺得到不同规格的植物提取物设立唯一性的标题标识。基于“植物提取物类饲料添加剂”在产品登记或拟申报时按照通用名称的命名原则设定的通用名称，具有专属性特征，标题使用产品登记时的通用名。

4.2 关于“4.2.3 提取物来源的依据”的编制说明

植物提取物类饲料添加剂的质量与来源植物和生产工艺有极大的相关性，故应予以说明。

植物的基原和部位是影响植物中有效成分的两个关键因素。部分同一名称或同一合法来源的植物有多个基原，不同基原植物中有效成分差异较大，因此，在制定特征图谱时应固定基原不能混用，否则会导致特征图谱的专属性降低。此外，同一基原植物的不同部位中有效成分通常也存在显著的差异，如三七叶和根中的主要有效成分皂苷的种类和含量存在明显的差别。因此，特征图谱制定应对其来源植物的基原和使用部位进行规定。

因《植物提取物类饲料添加剂申报指南》对来源植物进行了分类规定，为与指南保持一致，故本标准直接引用了指南中的规定。

4.3 关于“4.2.4 测定方法的选择依据”的编制说明

制定特征图谱可用高效液相色谱、气相色谱、薄层色谱等色谱或近红外光谱等多种技术手段。为了特征图谱能准确评价产品的质量和便于推广，特征图谱的检测方法讲究简单易行、操作性强、专属性和稳定性好，避免使用复杂的数据分析方法，而近红外光谱等技术由于数据分析较复杂，难掌握和推广，一般用于指纹图谱制定；薄层色谱由于专属性和准确性不如液相、气相色谱，使用较少；参照《中国药典》和《中国兽药典》中的案例，高效液相色谱法和气相色谱法因具有很好的通用性、准确性和专属性，已被广泛用于特征图谱的制定。

因此，本标准选用高效液相色谱法或气相色谱法，但需根据待测组分的理化性质，通过考察选择适宜的检测器，如紫外检测器、蒸发光检测器、荧光检测器、电雾式检测器等；

为统一标准和便于推广，应对高效液相色谱法或气相色谱法的使用方法进行规范，具体操作规程按照已发布具有法规性的技术要求进行。《中国兽药典》通则中对高效液相色谱法和气相色谱法的规范使用进行了详细的规定，是农业领域中相关质量标准制定的指导性文件，因此本标准要求参照其执行。

4.4 关于“4.2.5 色谱条件与系统适用性试验确定依据”的编制说明

特征图谱制定时要求测定方法具有选择性和稳定性等特点，而使用的仪器类型、

试剂类型和色谱条件等的不同均会直接影响特征图谱的适用性，因此，应对制定特征图谱测定方法的色谱条件进行充分考察。对于液相色谱和气相色谱应考察的参数参照《中国兽药典》通则中高效液相色谱法、气相色谱法中相关要求设立。

为便于特征图谱的生成，在优化色谱条件时，应综合考虑样品测定时间与组分分离情况。对于样品测定时间，参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求（暂行）》一般设为 1 小时，但应考虑产品组分的复杂程度，在保证色谱分离的情况下，遵循分析时间越短越好原则，在合适的测定时间范围内获得尽可能多的色谱峰，确保特征峰获得较好的分离。

本标准对于植物提取物类饲料添加剂一般要求每个产品提供一张特征图谱即可。但针对成分复杂且成分类别相差较大的产品，单一色谱条件难以测定其特征成分，需要制定一张以上特征图谱，如需要提供不同波长、不同检测器类型测得的图谱，则应说明建立多张特征图谱的理由。

系统适用性试验作为分析方法不可分割的一部分，当一个分析方法建立后，它可能会被不同分析人员在不同时间和不同实验室等不同情况下使用，可能会发生许多异常或偏差。因此，为了确保分析方法的准确性和重现性，需要建立一系列的系统适用性参数来保证分析方法在任何情况下都有效和可靠。色谱条件及系统适用性参数的考察应按照已发布具有法规性的技术要求进行，《中国兽药典》通则中对高效液相色谱法和气相色谱法色谱条件和系统适应性参数进行了详细的规定，在农业领域中是相关质量标准制定的指导性文件。鉴于特征图谱作为一个定性鉴别手段，参照《中国药典》和《中国兽药典》的应用案例，系统适用性试验要求考察 S 峰的理论板数即可。

4.5 关于“4.2.6 分析方法建立的依据”的编制说明

4.5.1 试样溶液的制备

试样溶液制备的基本原则是确保溶液的稳定性、代表性、完整性以及与测定方法的兼容性，是整个分析步骤中关键的起始部分，试样溶液制备的好坏直接影响了分析结果的优劣及可信程度。因此，试样溶液的制备必须保证能够充分地反映出试样的基本特性，同时也必须保证试样所含特征成分的完整性。

由于不同提取物中成分的理化性质存在较大的差异，因此针对不同的提取物需要制定不同的制备方法。对于试样中某些特殊组分，无法通过简单前处理和测定方法建立其特征图谱，可以采用特殊的前处理方法得到其降解或衍生物来建立特征图谱。

4.5.2 参照物溶液的制备

参照物溶液的制备需要考虑参照物在溶液中的稳定性、溶解性，以及与测定方法的兼容性，比如是否出现溶剂效应和析晶等情况进行考察，且有些参照物的对照品可能出现同分异构体的情况，故需说明对照品的化学结构、化学名称、来源和纯度等信息。

由于不同参照物的理化性质存在较大的差异，因此针对不同的参照物需要制定不同的参照物溶液制备方法。

4.6 关于“4.2.7 方法学验证的要求”的编制说明

植物提取物样品一般存在较多未知成分，而特征图谱的测定条件复杂，导致分析方法可靠与否的影响因素较多。为保障所制定特征图谱测定方法的可靠性和可重复性，应对其进行方法学验证考察。为了简化特征图谱的制定过程和保障其方法可行性，参

照《中国兽药典》和《中国药典》中对指纹图谱、特征图谱分析方法学考察的要求（一般需进行稳定性、精密度、重复性、耐用性和专属性等试验的考察）。

耐用性考察系指在测定条件有小的变动时，测定结果不受影响的承受程度，为所建立的方法用于常规检验提供依据，开始研究分析方法时，就应考虑其耐用性。特征图谱测定方法在色谱条件优化过程应对不同进样量、色谱柱、柱温、仪器等因素进行考察和测定方法进行方法学稳定性考察。另外，本标准要求再现性试验，对3家不同实验室进行再现性试验，考察了不同实验环境、实验人员、仪器的影响。

分析方法的方法学考察一般设置专属性试验，以考察建立的方法在其他成分存在的情况下能否正确测定被测成分。特征图谱测定方法只需从试样中主要有效成分、特有成分、次要有效成分或主要标示成分等入手，使其尽可能的在特征图谱色谱中得到分离，目测就能观察其是否能区分其他成分的干扰，能够辨别建立的方法是否具有专属性。若色谱分离不理想，一般通过优化色谱条件得以解决。若再要求开展专属性试验，从峰纯度、总峰响应值、容量因子分布、最难分离物质对的分离情况、总分离效能指标等进行，技术难度大，不利于特征图谱的推广。因此，本文件中特征图谱测定方法暂不要求开展系统的专属性试验。

另外，《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求（暂行）》的指纹图谱的方法学考察只要求对稳定性、精密度和重复性试验进行考察。结合植物提取物的特点和已有实际应用案例，比如沉香药材特征图谱的制定只对稳定性、精密度和重复性试验进行考察，因此，植物提取物特征图谱测定方法的方法学考察可重点关注稳定性、精密度、重复性和再现性试验。

参照《中药注射液指纹图谱研究的技术要求（暂行）》等技术要求，只要求开展稳定性、精密度和重复性试验，考察各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的一致性，以各特征峰的相对保留时间和相对峰面积的相对标准偏差为评价指标。参照《中国兽药典》中兽用中药质量标准分析方法验证指导原则中对含量测定方法中重现性的要求，综合考虑方法可靠性和可推行性，规定特征图谱方法学对相对保留时间和相对峰面积进行，相对保留时间的 RSD 不得大于 3%，相对峰面积的 RSD 不得大于 5%。

4.7 关于“4.2.8 特征图谱及技术参数的确定方法”的编制说明

该部分核心依据是根据《国家药品标准工作手册》、《中国药典》中药质量标准研究制定技术和《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》等技术规范，参照中药色谱指纹图谱相似度评价系统中数据处理方法，借鉴中药及中兽药领域使用特征图谱技术的相关案例进行编制，特征图谱及技术参数应包括对照特征图谱的建立和测定结果的评判标准。

4.7.1 对照特征图谱建立的依据

4.7.1.1 特征峰的选择和标定

本标准中规定特征图谱建立需 15 批次以上的样品，设定的依据为参照《国家药品标准工作手册》。关于代表性样品的选择，若该产品是基于特定来源植物原料开发得到的，其原料来源应覆盖来源植物特定品种、产地、采收时间及初加工方式的代表性样品。该条款是为保护原研者选择特定的原料创制植物提取物类饲料添加剂产品。

为了便于起草单位制定特征图谱，可使用国家药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”生成叠加图谱来寻找不同批次样品中的共有色谱峰，将其标定为特

征峰。

根据《中国药典》、《中国兽药典》和中药配方颗粒中已有的植物提取物特征图谱案例，一般只标定 4-8 个特征峰便能反应其内在质量特征。对于特征峰数量低于 4 个的提取物，如组分少的植物提取物，无法找出 4 个及以上的特征峰，可以考虑选择 2-3 个共有色谱峰作为特征峰；对于纯化提取物，视情况可选择除有效成分外的微量组分，可从微量组分中选择 3-4 个成分作为特征峰，若其微量组分也只有 2-3 个特征峰，不受 4-8 个特征峰的约束，可根据实际情况确定。

对于组分复杂的提取物，如粗提物的共有色谱峰数量可能会远多于 8 个，若都标定为特征峰，则在测定结果评定时不能体现特征图谱的便捷性，则应根据其所含组分在色谱图中的分布，建议选择不超过 9 个的特有成分、主要有效成分、次要有效成分或主要标示成分作为特征峰，可优先考虑分布在色谱图中不同位置的共有色谱峰。

4.7.1.2 特征峰的验证

为了避免标定特征峰的假阳性，确保每批次样品中均有标定的特征峰，本标准设置了特征峰的验证要求。

4.7.1.3 特征峰的指认

特征峰的指认实质为对特征峰进行定性判断，在可以获得对照品的条件下，优先选择对照品进行指认。若无法获得对照品，使用 LC-MS 或 GC-MS 进行推测也是可行的。

4.7.1.4 参照物和 S 峰的选择

参照物的选择是特征图谱建立的重要内容，通过对照品指认的特征峰，可以选定

为参照物。而 S 峰一般从参照物中选取。

对于需要利用其他特征峰与 S 峰相对峰面积比值进行判定时，这要求参照物 S 峰的峰面积在各批次样品中应当相对稳定，否则存在因 S 峰面积在各批次中的差异导致其他特征峰与 S 峰的峰面积比值不在规定范围内的情况，不能准确评判。因此，从各批次样品的主要有效成分、特有成分、次要有效成分、大量存在或各批次中含量较稳定的成分中选择峰面积相对稳定的特征峰作为 S 峰。

若无法获得参照物对照品，则选择与参照物峰色谱保留行为相似，且与参照物峰分离良好的内标物作为参照物也是可行的。

4.7.1.5 特征峰相对保留时间和相对峰面积的规定

相对保留时间是特征图谱判别的重要依据，参照《中国药典》和《中国兽药典》等要求，相对保留时间为特征峰与 S 峰保留时间的比值，相对保留时间规定值为 15 批次样品的平均值。

一般情况下对提取物特征图谱中特征峰与 S 峰的峰面积比值（相对峰面积比值）范围不做强制要求，但申报者认为有必要制定比值范围时则应进行明确规定。

植物提取物原料质量受品种、产地、采收季节等因素影响，即使不同产地、不同采收期的原料来源合规但质量差异较大，难以保障不同批次产品质量的稳定性。申请者通过科技创新培育新品种以及固定产地、采收期等方式，确保提取物原料质量在一定范围内稳定可控；申请者也可以对不同产地等来源原料的配比进行研究，从技术上解决了将质量差异较大的原料配比为质量相对稳定原料组合。为保护原研者的技术诀窍，可考虑规定相对峰面积的比值范围。因此，此时需要对特征峰与 S 峰的相对峰面

积比值固定在一个相对稳定范围内，以保障产品质量的相对稳定，同时鼓励对不同产地原料进行技术性搭配投料、鼓励来源植物基于品质性状的新品种选育和推广应用。

若申报者在制定特征图谱时发现，该产品的特征峰中存在另一组特征峰（无 S 峰）的相对峰面积也稳定在一定范围时，也可以将该范围作为判定标准。

参照《国家药品标准工作手册》，采用 15 批次以上提取物试样的色谱图进行计算相对峰面积比值。鉴于给出相对峰面积范围要求时，申报者就考虑到原料质量的相对稳定性（如新品种或固定产地足量供应等），或采取不同产地原料配放投料等技术措施，所以特征峰与 S 峰的相对峰面积比值，最少取 15 批可满足数据统计的需要。

4.7.1.6 对照特征图谱的生成

对照特征图谱作为特征图谱测定结果评价的重要依据，应具有代表性，参照《国家药品标准工作手册》中对照图谱的生成方法得到，并附在特征图谱中。

对于有些产品的成分复杂，含有多个种类成分，且成分类别相差较大，此时一张特征图谱难以反映产品的质量时，则可以制定多张特征图谱。纯化提取物则由于其组成的特殊性，主要成分是单一化合物，无法制定特征图谱；然而天然植物提取物与化学合成的产品的最大差别在于其他组分，此时可通过制定纯化提取物其他微量组分的特征图谱来实现对其来源进行评价。

4.7.2 测定结果评判标准的依据

必须对试样的测定结果进行评判才能评价试样的质量是否满足标准要求。将试样图谱与对照特征图谱或随行对照提取物图谱进行目测比较得到初步判定结果，体现了特征图谱技术鉴别的便捷和高效。试样图谱目测评价，首先从特征峰的数目及色谱图

的轮廓方面与对照特征图谱进行目测比较，如果有对照提取物，与随行对照提取物图谱进行色谱图重叠处理比较进行相似性判定可以提高结果判定的准确性。

随行对照评价是特征图谱评价的主要模式，随行对照评价是一般采用对照提取物与对照品作为随行对照，采用随行对照，不受色谱柱、仪器等因素影响，不同实验室均有较好的重现性。对照提取物更能体现提取物质量的真实信息，试样的图谱与随行对照提取物的图谱比较，更能真实地反映相对保留时间一致的特征峰，然而对照提取物在本标准中为非强制项，若申报者提供了对照提取物，则可进行随行对照评价。

参照《中国兽药典》和《中国药典》特征图谱在植物油脂和提取物质量控制的案例中，特征峰的相对保留时间均规定在 $\pm 5\%$ ，而药材和配方颗粒的特征峰的相对保留时间大部分规定在 $\pm 10\%$ ，因此，本标准设定相对保留时间误差在 $\pm 10\%$ 以内则判定为合格。

当特征图谱有峰面积比值要求时，考虑到合规来源植物存在产地、年限的差异，某些成分含量波动较大，甚至远超过 100%，但考虑到既然作了这个要求，要么申请者已有足量质量稳定的原料来源（如植物特定品种的推广应用）或通过不同产地原料进行配料投料提取这种技术手段达到相对稳定，为支持并保护原研者的技术创新积极性，确保产品质量相对稳定，设定一定的变动范围是适宜的。

4.8 关于“对照提取物制备”的说明

对照提取物必须以产品登记时规定的原料按照其规定的提取工艺制备而得，并且应符合“标准物质”的相关要求，一般由首次申请产品登记单位向审评监管部门足量提供，也可由农业农村部委托相关监管部门制备和供应。

设置“对照提取物”的必要性：虽然参照物对照品及对照特征图谱能有助于对试样特征图谱的辨认，但对于复杂样品不能很好的动态体现提取物的真实信息，而对照提取物可以弥补这一缺点。对照提取物在特征图谱鉴别中可作为随行对照，不仅可保证特征峰指认的准确性，还可客观地体现样品的整体信息，在中国、欧洲等药典中得到了广泛的应用，如银杏叶对照提取物。因此，可根据实际情况需要设置“对照提取物”。

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

随着人们对食品安全和健康的关注度不断提高，对于动物饲料的质量和安全性也越来越重视。《植物提取物类饲料添加剂特征图谱制定技术要求》国家标准的制定，将进一步规范植物提取物饲料添加剂的生产和使用，保障动物饲料的质量和安全性，提高畜牧业的生产效率和产品品质，提高养殖业的经济效益，促进植物提取物饲料添加剂产业的发展，推动我国养殖业的转型升级，为农业经济的可持续发展做出贡献。此外，该标准的实施还将有助于推动我国畜牧业向绿色、环保、可持续发展的方向发展，为保障国家粮食安全和生态环境做出积极贡献。

植物提取物饲料添加剂特征图谱制定技术要求的国家标准的发布，将对我国畜牧业的发展产生积极的生态效益。首先，该标准的实施将促进畜牧业的绿色发展，推动畜牧业向生态友好型转型。其次，该标准的实施将提高畜禽产品的质量和安全性，保障消费者的健康权益。同时，该标准的实施还将促进植物提取物饲料添加剂的研发和生产，推动我国畜牧业的技术创新和产业升级。最后，该标准的实施将有助于减少畜禽养殖对环境的污染和破坏，提高畜禽养殖的环保性，促进生态文明建设。总之，该

标准的发布将为我国畜牧业的可持续发展和生态文明建设做出积极的贡献。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

国外尚无同类标准。

五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

标准编制工作组根据我国目前饲料工业生产及检验水平的实际情况，未采用相关的国际标准。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章。与相关的各种基础标准相衔接，遵循政策性和协调统一性的原则。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

《定向征求意见稿》发送单位数：30 个；收到《定向征求意见稿》后，回函的单位数：20 个，回函并有建议或意见的单位数：19 个，无意见的单位数：1 个，没有回函的单位数：10 个；总计征集意见 178 条，其中同意采纳 119 条，占 66.8%；部分采纳和不采纳 59 条，占 33.1%，部分采纳和不采纳意见处理详见表 2。

表 2 定向征求意见不采纳或部分采纳处理汇总表

序号	标准章 条编号	意见内容	处理意见及理由（凡不采纳。或部分采纳的意见需说明理由）
1	1	“范围”第 2 句“色谱法”后面加“和质谱法”	不采纳。已删掉原 3.3 定义中“质谱法”，本标准暂只适用于色谱法。
2	1	范围：“本文件适用于采用色谱法制定植物提取物饲料添加剂特征图谱”改为“本文件适用于采用色谱法或质谱法制定植物提取物饲料添加剂特征图谱”。	不采纳。理由同 1。
3	2	规范性引用文件,增加“GB/T 19424-2018 天然植物饲料原料通用要求”	不采纳。未直接引用。
4	3	建议补充“对照品”的术语和定义。	不采纳。对照品为法定术语，术语常识，本标准不再描述。
5	3.1	植物提取物的定义中，一种或多种成份，是否可以修改为一种或多种“有效成份”？我的理解是提取的目的是获得功能性的有效成份，而且提取过后，植物原有结构成份应该是发生了很大的改变，至少纤维类物质都去除了，而且采用不同的提取方法，提取获得的化合物会区别很大。因此建议“一般不改变植物原有成分结构特征”修改为“一般不改变植物原有功能成分的组成特征”。	不采纳。遵循《植物提取物类饲料添加剂申报指南》中植物提取物饲料添加剂的定义。
6	3.1	植物提取物：“以植物全部或者某一部分为原料”修改为“以植物特定部位为原料”	不采纳。遵循《植物提取物类饲料添加剂申报指南》中植物提取物饲料添加剂的定义。
7	3.1	将“3.1 注中简单提取物”改为“粗提取物”	不采纳。遵循《植物提取物类饲料添加剂申报指南》中植物提取物饲料添加剂的定义。
8	3.1	根据植物提取物常规生产工艺过程，分离应在干燥之前。	不采纳。已经删掉“植物提取物”定义。
9	3.1	植物提取物“分离”修改为“分离纯化”，对应注 1：“纯化提取物”。同时也是更准确的表述。	不采纳。已经删掉“植物提取物”定义。
10	3.1	3.1 段尾删除“一般不改变植物原有成分结构特征的产品”	不采纳。已经删掉“植物提取物”定义。
11	3.1	植物提取物。建议删除“一般”，提取过程不应该改变	不采纳。已经删掉“植物提

		成分结构特征，如果改变就属于合成或半合成范围了。	取物”定义。
12	3.1	注 3：与兽药如何区分？建议删除，避免与兽药无法区分。	不采纳。已经删掉“植物提取物”定义。
13	3.1 和 3.2	建议两个定义合并，按照农牧办【2023】2号文件定义“植物提取物类饲料添加剂”	不采纳。已修订植物提取物类饲料添加剂的定义
14	3.2	植物提取物饲料添加剂 plant extracts as feed additive：饲料添加剂必须是原料目录中的物质，本条与法规冲突，应添加剂注：包括拟申请为饲料添加剂的植物提取物或者列入目录的植物来源的饲料添加剂。	不采纳。遵循《植物提取物类饲料添加剂申报指南》中植物提取物饲料添加剂的定义。
15	3.1	将“在饲料加工、制作、使用过程中添加的少量或者微量的植物提取物（3.1）”修改为“用于饲料生产、使用过程中添加的，并列于“饲料添加剂品种目录”或“新饲料添加剂品种目录”的植物提取物（3.1）”	不采纳。遵循《植物提取物类饲料添加剂申报指南》中植物提取物饲料添加剂的定义。
16	3.3	有效成分中所指单一成分具体是什么？与组分的区别是？比如杜仲黄酮归类是组分还是单一成分。	不采纳。本标准增加了类组分，有效组分的定义，黄酮属于类组分。
17	3.3	characteristic spectra 修改为：characteristic spectrum	不采纳。同《植物提取物术语》（报批稿）保持一致。
18	3.5	标准物质。“与用于校准设备、评价测量方法、给供试植物提取物（3.1）产品鉴别或赋值”有些重复，标准物质的定义可以看看 JJF1001-2011 8.14	不采纳。该术语已删掉。
19	3.5	标准物质 standard substance 供国家法定植物提取物（3.1）产品标准中产品的产品物理、化学及生物学等测试用，	不采纳。该术语已删掉。
20	3.6	“单一成分”建议修改为“成分”。因为有效成分可以是多个也可以是 1 个。	不采纳。遵循《植物提取物类饲料添加剂申报指南》中“有效成分”的定义。
21	3.6	修改“单一成分”为“单体化合物成分”	不采纳。遵循《植物提取物类饲料添加剂申报指南》中“有效成分”的定义。
22	3.6	植物提取物（3.1）中具有特定的生物活性、能代表其应用效果的单一或者一组成分	不采纳。遵循《植物提取物类饲料添加剂申报指南》中“有效成分”的定义。
23	3.8	特征成分：建议对“基源”进行定义。规定基原、部位、采收期和工艺等来源的不同批次的植物提取物（3.1）中含有的共有物质。（全部或部分？）	不采纳。“基原”属于药典的基本术语。

24	3.9	在 3.9 前增加色谱峰、保留时间、参照物 S 峰、理论板数等术语。	不采纳。常见术语，不再特别说明。
25	3.9	定义了相对保留时间，但标准中是不是可以给出一个确定的相对保留时间的域值范围，我们都知道是 5%以内，那么是否可以征对相对保留时间这个比值给出一个具体的范围值，按这个比值，应该是越接近 1 越准确，那么范围是不是规定为 0.95~1.05?	不采纳。按照其定义，相对保留时间须根据具体情况进行计算，不需要设定阈值范围。
26	3.1-3.10	全部去掉后面的空格，标题部分上移	不采纳。现有排版为国标术语的排版方式
27	4.2	基原是中药领域的专业词汇，饲料行业很少使用此类表达，建议调整	不采纳。植提取物是饲料添加剂的原料，来源于植物，“基原”是区分不同植物的通用术语。
28	4.1	删除“特征图谱的内容应包括标题、来源、测定方法依据、色谱条件及系统适用性试验、参照物溶液的制备、供试品溶液的制备、对照提取物溶液的制备、测定法及其他。具体技术要求如下：”的内容	不采纳。作为总体要求条款设置。
29	4.1	建议增加特征有效成分的含量这一参数，作为 4.8，单独列出。	不采纳。特征图谱作为定性鉴别手段，不对含量测定做要求。
30	4.1.1	测定方法依据：建议将参照《中国兽药典》通则中高效液相色谱法[0512]、气相色谱法[0521]中相关要求，作为附录。不建议引用兽药典的标准	不采纳。参照《中国兽药典》特征图谱案例的描述。
31	4.1.2	建议同农牧办【2023】2号文件不规定植物的基原和使用部位	不采纳。植物不同基原、部分成分差异大，需规定基原和部位，才能更好进行质量控制。
32	4.1.2	应为植物提取物饲料添加剂产品名称加“特征图谱”。删除产品	不采纳。通过双引号将“产品名称”区分
33	4.1.3	测定方法依据本标准只介绍了色谱法，根据标准题目，建议涵盖其他方法。	不采纳。目前药典中已有植物提取物产品特征图谱均为色谱法，本标准优先规范色谱法的技术要求，后续可根据需要升级标准，加入其它方法。
34	4.1.4	采用梯度洗脱或程序升温时，流动相比例或柱温的变化及所对应的时间程序以表格的形式列出。建议删除以表格形式，只保留列出。	不采纳。参考药典案例，方便查看。
35	4.1.4	建议删除“系统适应性要求应写明参照物 S 峰的理论	不采纳。参照《中国兽药

		板数”	典》特征图谱案例的要求。
36	4.1.5	删除色谱条件及系统适应性要求	不采纳。参照药典特征图谱案例设置
37	4.1.5	建议修改为：、配制溶剂、保存条件及有效期。	不采纳。参照药典特征图谱案例设置，只需注明溶液制备方法即可，保存条件可自行根据需要确定。
38	4.1.6	建议修改为：、配制溶剂、保存条件及有效期。	不采纳。该过程已明确要求提供溶液配制过程、溶液浓度及配制溶剂。
39	4.1.6 和 4.1.7	合并	不采纳。按照药典案例一般是分开设置，对照提取物不是必须强制设立项。
40	4.1.7	应注明供试品溶液配制过程、溶液浓度及配制溶剂	不采纳。该项已删除。
41	4.1.8	将 4.1.8 单独列为 4.2。因为 4.1 是规范指纹图谱的内容的，4.1.8 则规范了测定方法。	不采纳。测定法是特征图谱内容的一部分，测定方法是指使用的仪器方法。
42	4.1.8.2	转移至 4.1	不采纳。这是按照特征图谱的通用写法排序。
43	4.1.8.2	删除 4.1.8.2	不采纳。特征图谱应说明对照图谱的技术参数。
44	4.1.8.2	S 峰简称, 前述部分无说明, 请在合适位置予以说明。	不采纳。S 峰仅作为一个标记, 不需要解释。
45	4.1.8.3	建议增加中药色谱指纹图谱相似度评价系统中相似度计算的方式作为一种更直观的测定结果评判标准	不采纳。相似度是指纹图谱关注的内容。
46	4.1.8.3	测定结果评判标准	不采纳。相似度是指纹图谱关注的内容。
47	4.1.8.3	现“4.1.8.3 测定结果评判标准”建议修改为 4.1.8.5, 增加“4.1.8.3 有效成分的定量检测”, 对植物提取物中已知的典型有效成分进行含量测定; 增加“4.1.8.4 主成分的定量检测”, 对提供了对照提取物的植物提取物检测, 可以对照提取物各特征峰总面积为参照, 对供测试提取物的质量进行定量分析。仅供参考。	不采纳。特征图谱作为定性鉴别手段, 不对含量测定做要求。
48	4.2.1.1	标题中产品名称的命名依据: 建议删除依据, 并建议改为标题命名, 此标准不应涉及产品命名	不采纳。该条款为起草说明, 应当保留“依据”。
49	4.2.2.1	测定方法的选择依据: 建议将参照《中国兽药典》通则中高效液相色谱法[0512]、气相色谱法[0521]中相关要求, 作为附录。不建议引用兽药典的标准	不采纳。参照《中国兽药典》中植物提取物特征图谱案例的描述。
50	4.2.3.3	参照物溶液制备的依据: 参照物溶液制备方法应和	不采纳。参照物为对照品,

		供试溶液制备方法一致	其溶液配制应根据其理化性质，选择合适的溶剂配制即可，不同于供试品组分复杂。
51	4.2.4	“精密度”指仪器的精密度，不放入本文件，将“重复性”改为“精密度（重复性和再现性）”，对方法重复性和再现性进行规定。	部分采纳。保留精密度，增加再现性试验要求。
52	4.2.4	重复性试验主要考察试验方法的重现性。取同一批号的供试品 6 份以上应为不同批次	不采纳。重复性考察是采用同一批样品重复 6 次试验。
53	4.2.5.1	“品种”是不是改为“物种”更准确？	不采纳。品种是通用的说法
54	4.2.5.1	“指认”改为“鉴定”是不是更专业？	不采纳。参照中药指纹图谱或特征图谱的表述。
55	4.2.5.1	建议删除“一般选择 4-8 个共有色谱峰作为特征峰”	不采纳。
56	4.2.5.1 (1)	根据 15 批以上来源准确，“应包括该植物主要产地(增加)”且具有代表性样品的测定结果	不采纳。原描述要求具有代表性的 15 批次以上样本，包含了主产地。
57	4.2.5.4	测定结果评判的依据建议纳入相似度指标	不采纳。相似度是指纹图谱的判别依据，不属于特征图谱的范畴。
58	题目	建议修改为“植物提取物饲料添加剂特征图谱制定指南”	不采纳。根据反馈共性建议，修改为“植物提取物类饲料添加剂特征图谱制定技术要求”。
59	无	建议拓展为植物提取物，不限定饲料添加剂	不采纳。该标准为《植物提取物类饲料添加剂申报指南》配套规范文件，后续可以根据应用再拓展。

八、涉及专利的有关说明

未涉及相关专利。

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等措施建议

1.实施国家标准的要求

农业农村部《新饲料添加剂申报资料要求》（农业农村部公告第 226 号）和《植物提取物类饲料添加剂申报指南》（农办牧〔2023〕2 号）要求在产品鉴别报告和质量标准中提供特征图谱。本标准是为规范植物提取物类饲料添加剂特征图谱的制定工作，所有相关企业和组织必须遵守国家标准，建立完善的质量管理体系，确保产品的质量稳定可靠。

2.组织措施

政府部门、相关行业协会和组织应当加强对国家标准的宣传和推广，提高企业和公众对国家标准的认识和重视程度。

政府部门应当建立健全的标准化管理机制，加强对标准制定、修订和实施的监督和管理。

3.技术措施

建立标准化的检测和测试方法，确保产品和服务的质量符合国家标准的要求。

4.过渡期

建议制定一个过渡期，让企业有足够的时间进行技术改造和设备更新，以满足新标准的要求。对于已经生产的产品和提供的服务，应当在一定时间内逐步符合国家标准的要求。对于新产品和服务，应当从实施日期起即符合国家标准的要求。

求。

5.实施日期建议

建议标准实施日期为报批通过后 6 个月实施。

此外，还建议加强对植物提取物饲料添加剂的监管力度，加强对企业的检查和抽检，确保植物提取物饲料添加剂的质量和安​​全，保障动物的健康和消费者的安全。

十、其他应当说明的事项

甘草提取物特征图谱示例及起草说明见附件 1。

附件 1

甘草提取物特征图谱及起草说明 示例

一、甘草提取物特征图谱

【来源】为豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、胀果甘草(*Glycyrrhiza inflata* Bat.)或光果甘草(*Glycyrrhiza glabra* L.)的干燥根和根茎经醇提加工制成的干粉。

【特征图谱】照《中华人民共和国兽药典》高效液相色谱法(通则 0512)测定。

1. 色谱条件与系统适用性试验

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(柱长为 25 cm, 内径为 4.6 mm, 粒径为 5 μm); 以乙腈为流动相 A, 以 0.05%磷酸溶液为流动相 B, 按下表中的规定进行梯度洗脱; 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 30 ℃; 检测波长为 276 nm。理论板数按甘草苷峰计算应不低于 50000。

表 1 甘草提取物特征图谱高效液相色谱梯度洗脱程序表

时间(分钟)	流动相A(%)	流动相B(%)
0~15	10→25	90→75
15~35	25→50	75→50
35~60	50→90	50→10
60~65	90→90	10→10

2. 参照物溶液的制备

分别准确称取芹糖甘草苷、甘草苷、甘草酸对照品 5 mg, 置于 25 mL 棕色容量瓶中, 加甲醇超声溶解并定容至刻度, 制成每 1 mL 含 0.2 mg 对照品的参照物储备液。

3. 试样溶液的制备

取甘草提取物约 0.2 g，准确称取，置具塞锥形瓶中，准确加入 70%乙醇溶液 25 mL，超声处理（功率 250 W，频率 40 kHz）10 min，放冷，再称定重量，用 70%乙醇补足减失的重量，摇匀，静置，取上清液滤过，取滤液作为试样溶液。

4. 测定

分别精密吸取试样溶液、参照物溶液各 10 μ L，注入液相色谱仪，测定，即得。

试样图谱中应呈现 8 个特征峰，并与对照特征图谱中的 8 个特征峰相对应，其中峰 2、峰 3、峰 5 应分别与对应的对照品参照物峰的保留时间相一致，与甘草苷色谱峰相应的峰标定为 S 峰（峰 3），计算峰 1、2、4、5、6、7、8 与 S 峰的相对保留时间，相对保留时间应在规定值的 $\pm 10\%$ 以内。规定值为 0.596（峰 1）、0.976（峰 2）、1.533（峰 4）、2.109（峰 5）、2.622（峰 6）、2.882（峰 7）和 3.179（峰 8）。

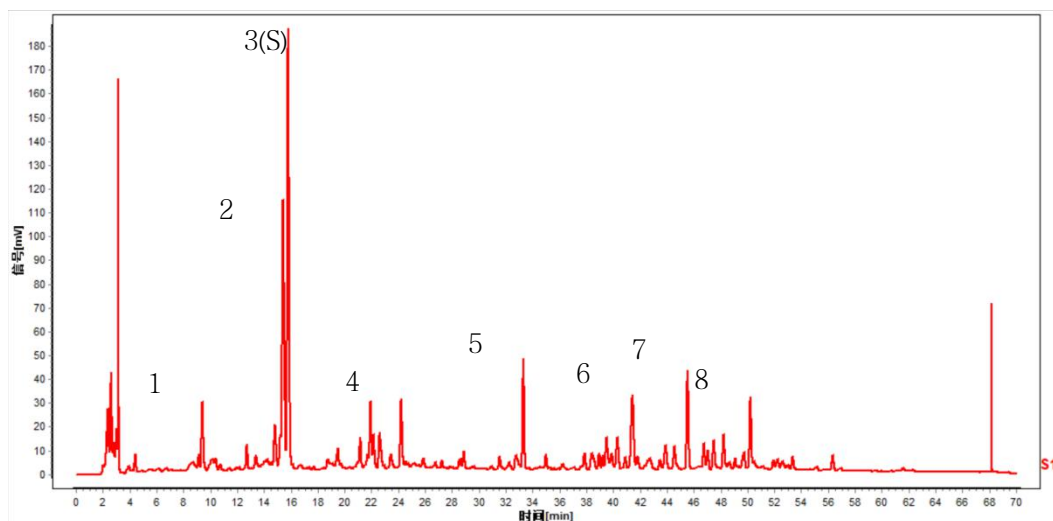


图 1 对照特征图谱

峰 2: 芹糖甘草苷; 峰 3 (S 峰): 甘草苷; 峰 5: 甘草酸; 色谱柱: Unitary C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)

二、甘草提取物特征图谱的起草说明

(一) 提取物基本信息

【来源】以农业部 1773 号公告《饲料原料目录》规定的豆科植物甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、胀果甘草 (*Glycyrrhiza inflata* Bat.) 或光果甘草 (*Glycyrrhiza glabra* L.) 的干燥根和根茎经醇提加工制成的干粉。

(二) 测定方法的选择与建立

1. 测定方法的选择依据与说明

甘草中所含化学成分主要以三萜皂苷类和黄酮类为主, 还有香豆素、生物碱的理化性质, 根据已有文献报道, 甘草中所含化学成分适宜使用高效液相色谱法测定, 并按照《中华人民共和国兽药典》通则中高效液相色谱法[0512]的要求建立分析方法。

2. 色谱条件与系统适用性试验的说明

(1) 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪 (二极管阵列检测器、二元高压梯度泵、真空脱气机、柱温箱、自动进样器、色谱工作站); 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 十万分之一电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); 色谱柱: Unitary C18 (4.6×250 mm, 5 μm)。

无水乙醇 (General-Reagent)、色谱级乙腈 (Merck); 磷酸, Milli-Q 超纯水。芹糖甘草苷、甘草苷、甘草酸对照品均购自中国食品药品检定研究院。

甘草购自亳州、安国、禹州和廉桥几大药材市场干燥根和根茎, 详细样品来源、产地及编号见表 2。

表 2 甘草原料来源信息

序号	编号	产地	采购地点	序号	编号	产地	采购地点
1	GC-BZ-GS-07	甘肃	亳州	18	GC-AG-GS-11	甘肃	安国
2	GC-BZ-GS-03	甘肃	亳州	19	GC-AG-XJ-10	新疆	安国
3	GC-BZ-GS-09	甘肃	亳州	20	GC-AG-GS-02	甘肃	安国
4	GC-BZ-GS-06	甘肃	亳州	21	GC-AG-GS-08	甘肃	安国
5	GC-BZ-GS-08	甘肃	亳州	22	GC-BZ-GS-11	甘肃	亳州
6	GC-BZ-GS-04	甘肃	亳州	23	GC-AG-XJ-02	新疆	安国
7	GC-BZ-GS-05	甘肃	亳州	24	GC-AG-NM-01	内蒙	安国
8	GC-BZ-XJ-01	新疆	亳州	25	GC-BZ-GS-10	甘肃	亳州
9	GC-BZ-GS-02	甘肃	亳州	26	GC-AG-GS-14	甘肃	安国
10	GC-AG-GS-17	甘肃	安国	27	GC-BZ-GS-01	甘肃	亳州
11	GC-AG-GS-16	甘肃	安国	28	GC-AG-NM-15	内蒙	安国
12	GC-AG-GS-04	甘肃	安国	29	GC-BZ-NM-01	内蒙	亳州
13	GC-AG-XJ-07	新疆	安国	30	GC-AG-NM-06	内蒙	安国
14	GC-AG-GS-05	甘肃	安国	31	GC-LQ-GS-01	甘肃	廉桥
15	GC-AG-NM-09	内蒙	安国	32	GC-LQ-NM-02	内蒙	廉桥
16	GC-AG-XJ-13	新疆	安国	33	GC-LQ-GS-03	甘肃	廉桥
17	GC-AG-GS-03	甘肃	安国	34	GC-LQ-XJ-04	新疆	廉桥

(2) 甘草提取物试样的制备

由于本研究使用的甘草提取物试样均为湖南农业大学自制,根据前期优化的制备工艺,分别将 34 批次合规来源的甘草粉碎物过 1 号筛,取过筛后粉碎物 100 g,分别用 800 mL 和 500 mL 的 70%乙醇回流提取 2 次,每次 1 小时,合并提取液,过滤,滤液减压回收乙醇至稠膏状,60 °C 烘干,研磨粉碎,即得。

3. 色谱条件的考察

3.1 检测波长的选择

参考药典中甘草有效成分的含量测定波长为 276 nm,本实验采用二极管阵列检测器(DAD)对样品进行全波长扫描,检测结果显示甘草有效成分的最大吸收波长为 276 nm,且最大吸收波长下,样品测定结果中色谱峰数量及响应程度均优于其他波长,因此选择 276 nm 作为数据采集波长。

3.2 色谱柱考察

取试样溶液，分别考察了 Unitary、Sunfire、Diamonsil 三种不同品牌的 C18 色谱柱对甘草中主要色谱峰分离的影响，实验结果见图 2，结果表明不同色谱柱对分离效果影响不大，故综合考虑选择 Unitary 色谱柱。

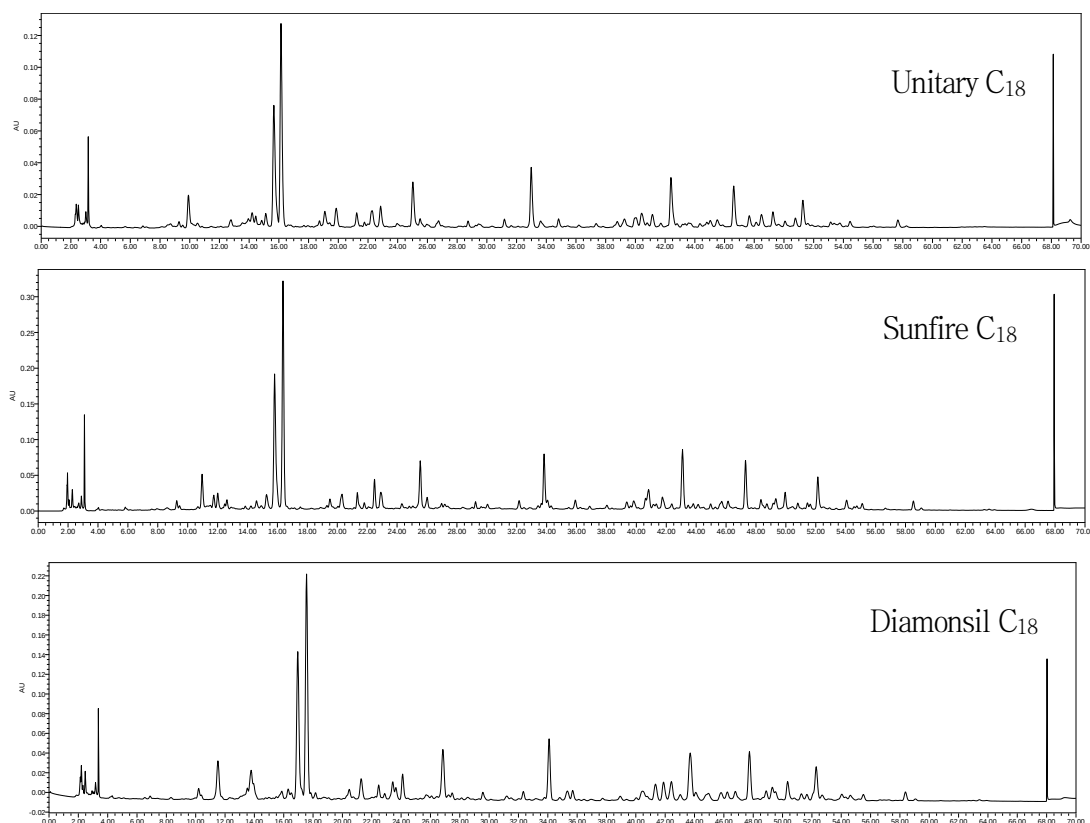


图 2 不同色谱柱的 HPLC 图

3.3 梯度洗脱条件的考察

参照药典和文献等相关资料记录的测定方法，并对其进行优化，最终确定的梯度洗脱条件见表 3。

表 3 色谱梯度洗脱条件

时间 (分钟)	乙腈 (%)	0.05%磷酸水 (%)
0 ~ 15	10→25	90→75
15 ~ 35	25→50	75→50
35 ~ 60	50→90	50→10

3.4 流速的考察

取质控样品溶液，分别考察 0.8 mL/min，1.0 mL/min 和 1.2 mL/min 不同流速对甘草提取物中主要有效成分分离的影响，实验结果见图 3，结果表明流速为 1.2 mL/min 时有部分成分未能完全分离，0.8 mL/min 时分离效果与 1.0 mL/min 相近，但分离时间过长，故选择流速为 1.0 mL/min。

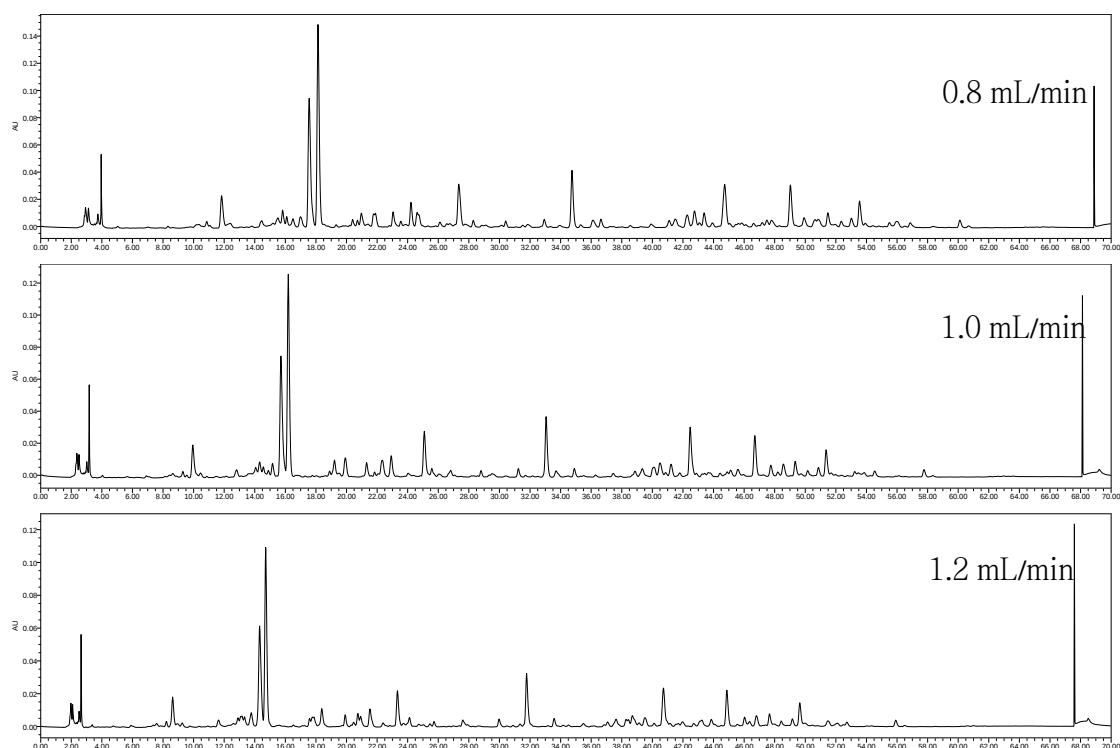


图 3 不同流速对应的 HPLC 图

3.5 柱温的考察

取质控样品溶液，分别考察柱温 25 °C、30 °C、35 °C 对甘草提取物中主要有效成分分离的影响，实验结果见图 4，结果表明柱温 30 °C 时色谱峰的分离情况最好，故选择柱温 30 °C。

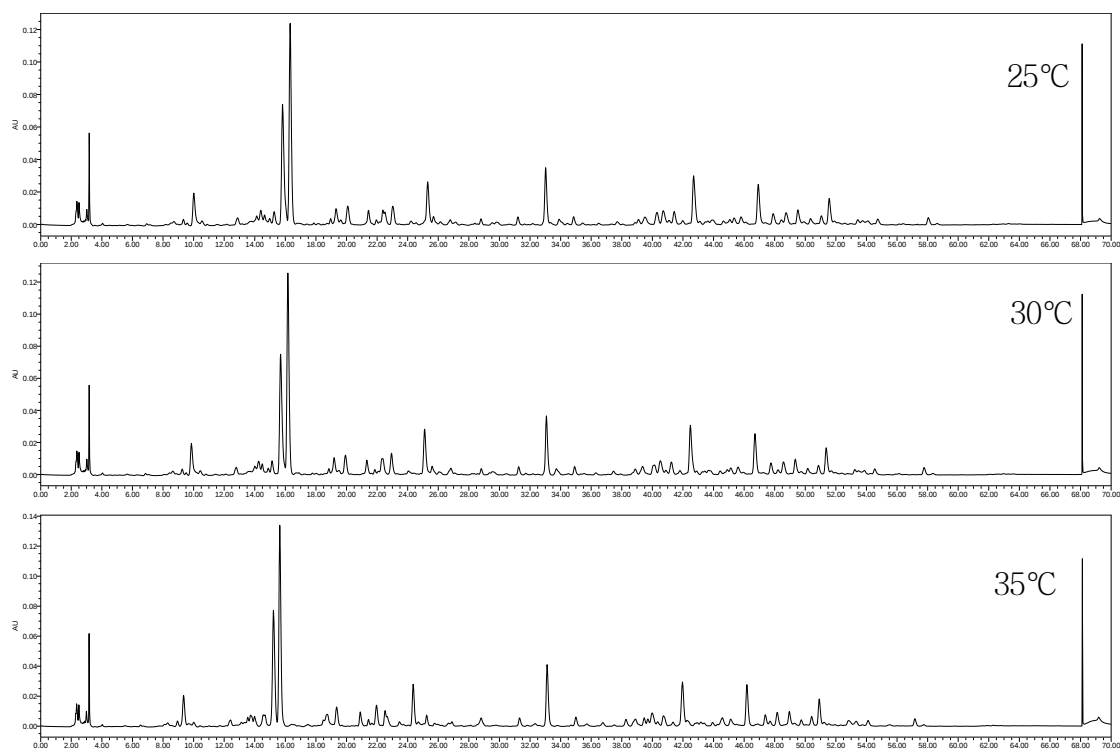
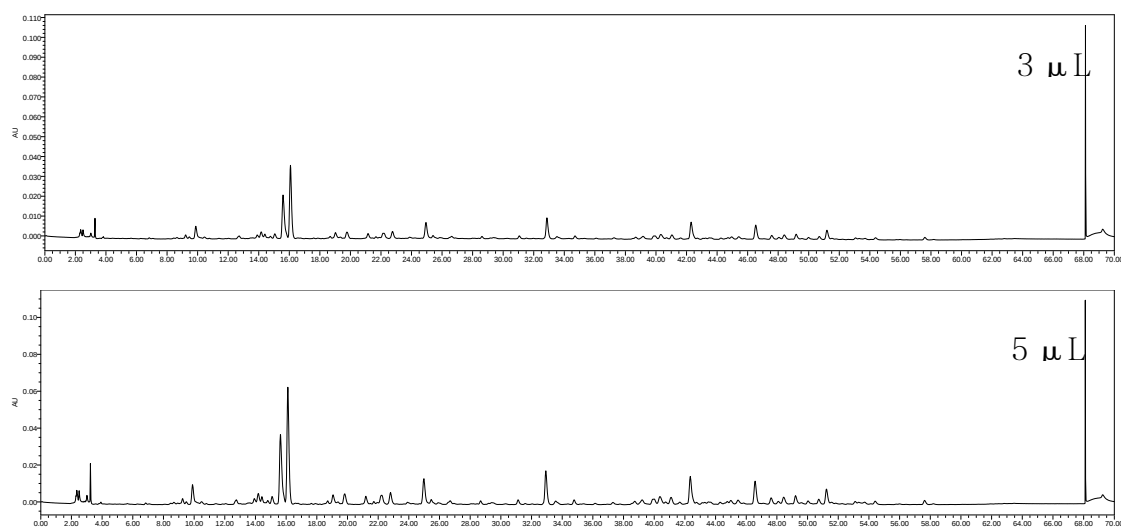


图 4 不同柱温的 HPLC 色谱图

3.6 进样量的考察

取质控样品溶液，分别考察进样量为 3 μL 、5 μL 、10 μL 对甘草有效成分分离的情况，结果见图 5。结果表明进样量为 3 μL 和 5 μL 时甘草提取物有效成分色谱峰响应偏低，故选择 10 μL 作为本实验的进样量。



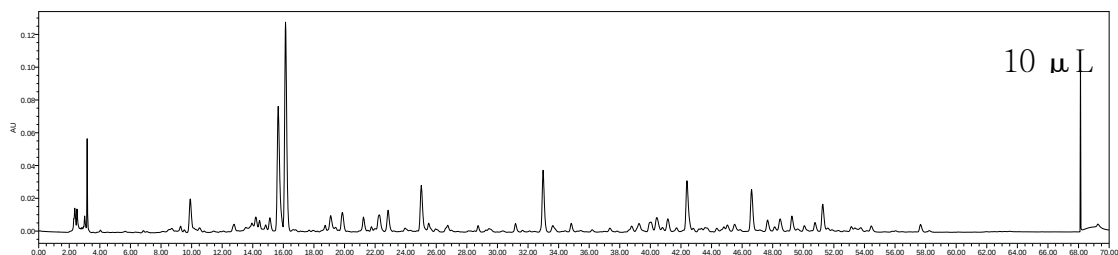


图 5 不同进样量下的 HPLC 图

3.7 数据采集时间考察

取质控样品溶液，根据已确定好的色谱条件进行数据采集时间考察，将数据采集时间设为测定方法中采集时间的 2 倍，记录得到一张采集时间为 120 分钟的色谱图，结果如图 6。由图可知，在测定方法采集时间后没有色谱峰出现，样品中的化合物已在方法规定的时间内全部显示，说明方法设定的数据采集时间合理。

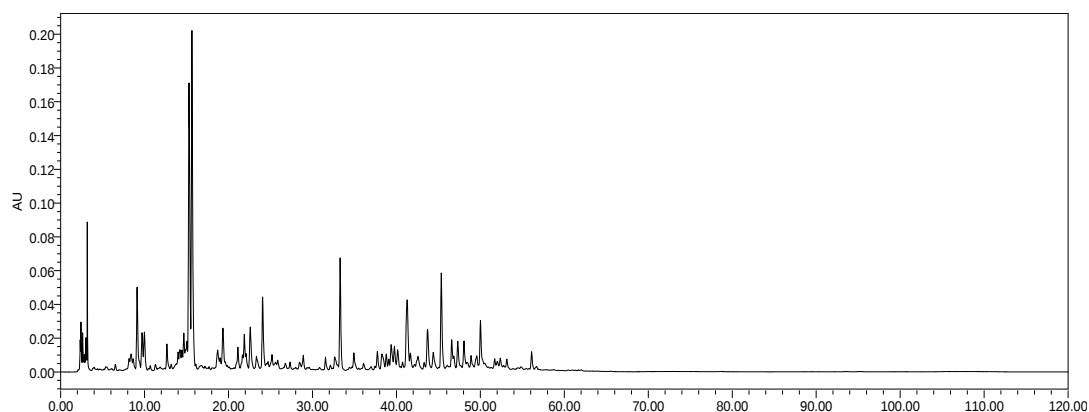


图 6 120 分钟 (2T) 下的 HPLC 图

综上所述，优化后得到的液相色谱条件为：流动相 A 为乙腈，流动相 B 为 0.05%磷酸水；梯度洗脱条件（见表 2）；流速为 1.0 mL/min；Unitary 色谱柱，柱温为 30 °C；检测波长为 276 nm；进样量为 10 μL。

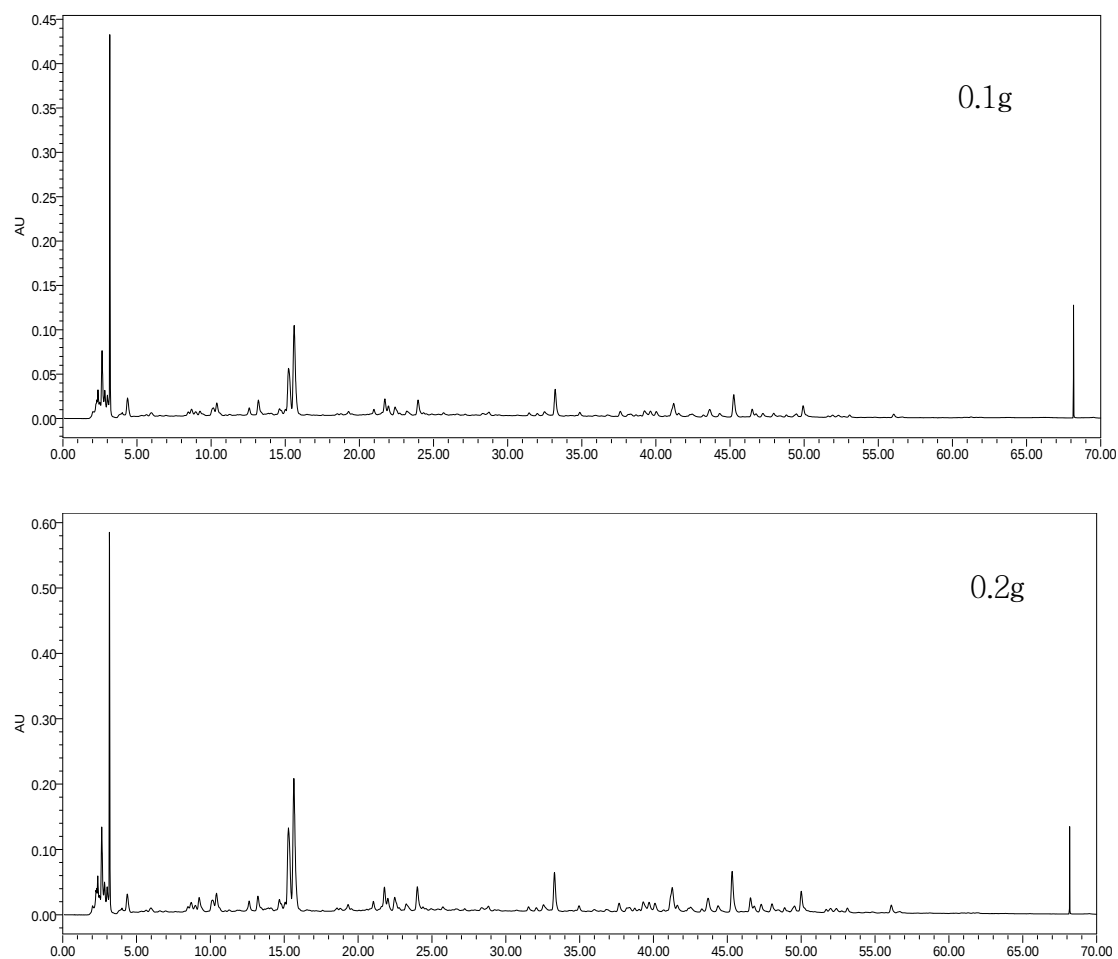
(三) 分析方法的建立

1. 试样溶液的制备

为确保甘草提取物主要成分最大限度地转移到溶液中，便于样品测定。由于

甘草提取物是经 70%乙醇回流提取、浓缩、干燥而得，其主要成分均易溶于 70%乙醇中，因此选用 70%的乙醇作为溶剂。

通过考察 5、10、30min 不同超声时间，0.2 g 试样在 25 mL70%乙醇中的溶解情况，实验结果表明超声 10 min 即能全部溶解。通过考察 0.1、0.2、0.5g 不同称样量，加入 25 mL70%乙醇超声 10min 后 HPLC 分析，结果如图 7。实验表明称样量在 0.2 g 时试样溶液具有较好的色谱峰响应，而 0.5 g 时色谱图响应过高，有过载情况。因此确定试样溶液的制备方法为精密称取 0.2g 试样,加入 25mL 70%乙醇超声 10min，即得试样溶液。



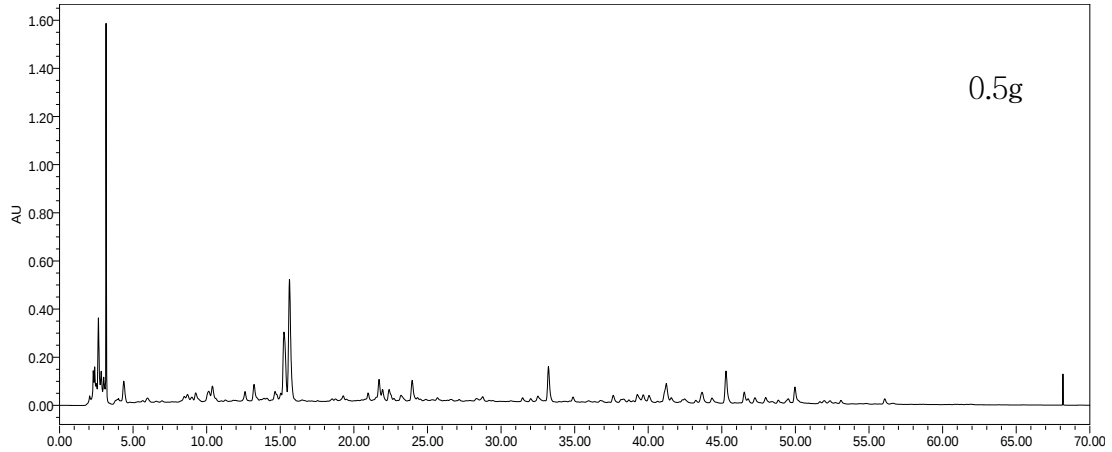


图 7 不同溶剂用量的色谱图

2. 参照物溶液的制备

参照药典的制备方法，分别精密称定芹糖甘草苷、甘草苷、甘草酸对照品 5 mg，置于 25 mL 棕色容量瓶中，加甲醇超声溶解定容至刻度，制成浓度为 0.2 mg/mL 的参照物储备液备用。

(四) 方法学验证

1. 精密度考察

按照已建立的色谱条件，取同一试样约 0.2 g，按试样制备方法制备试样溶液，连续进样 6 次，进样 10 μ L。使用仪器自带软件的积分功能对 8 个特征峰进行积分获得保留时间和峰面积，以色谱峰 3（甘草苷）为参照峰，计算各特征峰的相对峰面积和相对保留时间的相对标准偏差，结果见表 4 和表 5。

表 4 精密度试验各特征峰的相对保留时间

	1 号峰	2 号峰	3 号峰	4号峰	5 号峰	6 号峰	7 号峰	8 号峰
精密度1	0.617	0.970	1.000	1.548	2.042	2.622	2.882	3.170
精密度2	0.616	0.970	1.000	1.549	2.044	2.624	2.884	3.172
精密度3	0.617	0.970	1.000	1.547	2.041	2.620	2.880	3.167
精密度4	0.617	0.970	1.000	1.548	2.041	2.621	2.882	3.169
精密度5	0.617	0.970	1.000	1.549	2.042	2.623	2.884	3.173
精密度6	0.617	0.970	1.000	1.550	2.046	2.626	2.888	3.176
RSD(%)	0.06	0.03	0.000	0.06	0.09	0.09	0.09	0.10

表 5 精密度试验各特征峰的相对峰面积

	1 号峰	2 号峰	3 号峰	4号峰	5 号峰	6 号峰	7 号峰	8 号峰
精密度1	0.167	0.722	1.000	0.270	0.318	0.340	0.247	0.166
精密度2	0.167	0.720	1.000	0.270	0.316	0.340	0.246	0.166
精密度3	0.168	0.723	1.000	0.268	0.318	0.341	0.257	0.167
精密度4	0.166	0.724	1.000	0.263	0.318	0.342	0.248	0.167
精密度5	0.167	0.724	1.000	0.263	0.318	0.341	0.257	0.166
精密度6	0.167	0.723	1.000	0.271	0.320	0.344	0.267	0.172
RSD(%)	0.393	0.206	0.000	1.342	0.407	0.450	3.255	1.504

由上表可以看出,各特征峰与 S 峰相对保留时间 RSD < 3%和相对峰面积的 RSD < 5%,说明该方法的精密度符合分析方法的要求。

2. 稳定性考察

按照已建立的色谱条件,取同一试样约 0.2 g,按试样溶液制备方法制备试样溶液,分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样 10 μ L。使用仪器自带软件的积分功能对 8 个特征峰进行积分获得保留时间和峰面积,以色谱峰(甘草苷)为参照峰,计算各特征峰的相对峰面积和相对保留时间的相对标准偏差,结果见表 6 和表 7。

表 6 稳定性试验各特征峰的相对保留时间

	1 号峰	2 号峰	3 号峰	4号峰	5 号峰	6 号峰	7 号峰	8 号峰
0h	0.616	0.970	1.000	1.550	2.045	2.627	2.889	3.177
2h	0.624	0.971	1.000	1.542	2.033	2.608	2.867	3.154
4h	0.619	0.970	1.000	1.548	2.041	2.620	2.880	3.168
6h	0.619	0.970	1.000	1.547	2.041	2.620	2.881	3.169
8h	0.619	0.970	1.000	1.547	2.040	2.619	2.879	3.167
12h	0.619	0.970	1.000	1.547	2.039	2.618	2.878	3.165
24h	0.617	0.970	1.000	1.549	2.043	2.622	2.883	3.170
RSD(%)	0.41	0.01	0.000	0.17	0.18	0.22	0.22	0.22

表 7 稳定性试验各特征峰的相对峰面积

	1 号峰	2 号峰	3 号峰	4号峰	5 号峰	6 号峰	7 号峰	8 号峰
0h	0.1978	0.7096	1.0000	0.2651	0.3187	0.3438	0.2499	0.1676

2h	0.1723	0.7162	1.0000	0.2689	0.3372	0.3517	0.2544	0.1710
4h	0.1689	0.7198	1.0000	0.2754	0.3218	0.3448	0.2512	0.1694
6h	0.1688	0.7219	1.0000	0.2661	0.3202	0.3464	0.2508	0.1703
8h	0.1690	0.7204	1.0000	0.2744	0.3209	0.3470	0.2513	0.1680
12h	0.1694	0.7225	1.0000	0.2740	0.3178	0.3443	0.2621	0.1676
24h	0.1686	0.7235	1.0000	0.2675	0.3175	0.3396	0.2458	0.1654
RSD(%)	0.127	0.216	0.000	1.640	2.146	1.197	1.226	1.467

由上表可以看出,各特征峰与 S 峰相对保留时间 RSD < 3%和相对峰面积的 RSD < 5%,说明该方法稳定。

3. 重复性考察

按照已建立的色谱条件,取同一试样约 0.2 g,按试样溶液制备方法平行制备 6 份试样溶液,进样 10 μ L。使用仪器自带软件的积分功能对 8 个特征峰进行积分获得保留时间和峰面积,以色谱峰 3 (甘草苷)为参照峰,计算各特征峰的相对峰面积和相对保留时间的相对标准偏差,结果见表 8 和表 9。

表 8 重复性试验各特征峰的相对保留时间

	1 号峰	2 号峰	3 号峰	4号峰	5 号峰	6 号峰	7 号峰	8 号峰
重复性1	0.613	0.969	1.000	1.553	2.044	2.635	2.898	3.187
重复性2	0.613	0.969	1.000	1.553	2.044	2.634	2.897	3.185
重复性3	0.613	0.969	1.000	1.553	2.044	2.634	2.897	3.186
重复性4	0.614	0.970	1.000	1.553	2.045	2.634	2.897	3.187
重复性5	0.613	0.970	1.000	1.553	2.045	2.634	2.897	3.187
重复性6	0.613	0.970	1.000	1.554	2.046	2.635	2.898	3.188
RSD(%)	0.05	0.04	0.000	0.02	0.04	0.02	0.02	0.03

表 9 重复性试验各特征峰的相对峰面积

	1 号峰	2 号峰	3 号峰	4号峰	5 号峰	6 号峰	7 号峰	8 号峰
重复性1	0.198	0.728	1.000	0.270	0.321	0.315	0.239	0.154
重复性2	0.198	0.725	1.000	0.267	0.319	0.311	0.237	0.153
重复性3	0.197	0.723	1.000	0.265	0.319	0.320	0.239	0.157
重复性4	0.199	0.706	1.000	0.266	0.323	0.333	0.244	0.170
重复性5	0.196	0.711	1.000	0.264	0.314	0.318	0.234	0.156
重复性6	0.198	0.700	1.000	0.266	0.320	0.325	0.239	0.162

	1 号峰	2 号峰	3 号峰	4号峰	5 号峰	6 号峰	7 号峰	8 号峰
RSD(%)	0.514	1.571	0.000	0.829	0.916	2.449	1.430	4.013

由上表可以看出,各特征峰与 S 峰相对保留时间 RSD < 3%和相对峰面积的 RSD < 5%,说明该方法的重复性满足要求。

由上述结果可以看出,在该特征图谱测定方法下,甘草提取物的 8 个特征峰具有较好的保留重现性和稳定性,检测方法符合要求。

(五) 特征图谱及技术参数的确定依据

1. 对照特征图谱的建立

1.1 特征峰的选择和标定

按照已确定的试样制备方法和色谱分析方法,对 34 批次甘草提取物试样进行测定,得到各批次样品的色谱图(各批次样品色谱图见附件 1)。利用仪器厂家数据分析软件(Empower 3)对上述 34 批次样品色谱图进行手动叠加,选择色谱图上不同保留时间段且响应较好的 8 个共有色谱峰标定为特征峰(图 8)。

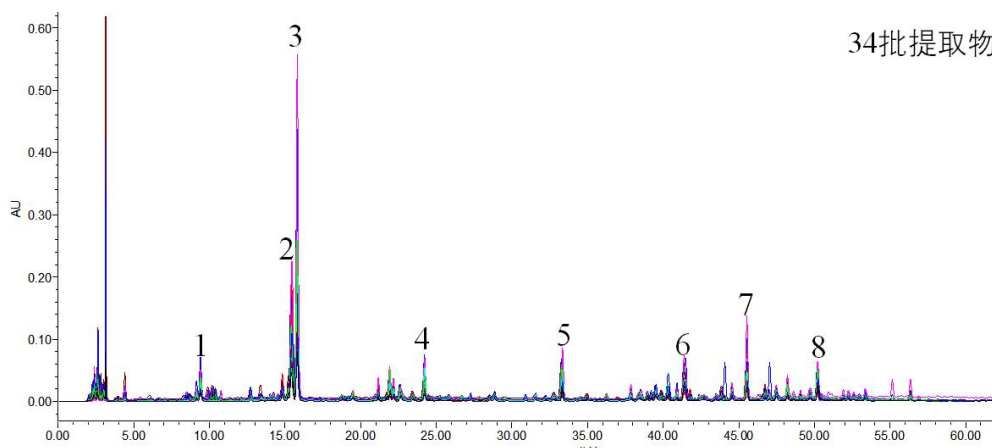


图 8 Empower 3 软件对 34 批提取物的手动叠加图谱

1.2 特征峰的验证

运用 Empower 3 软件将已标定的特征峰进行自动识别与积分,积分参数设定以确保各特征峰在各批次样品图谱中均能被自动识别和积分为准(积分参数设定为:阈值:30、最小峰面积:5000、最小峰宽:30),结果显示标定的 8 个特

征峰在所有批次样本中均能被识别与积分,则确认标定的 8 个共有色谱峰为特征峰。

1.3 特征峰的指认及参照物和S峰的选择

根据查阅药典和文献等相关资料,从中检所购置了甘草中主要有效成分芹糖甘草苷、甘草苷和甘草酸对照品。经与芹糖甘草苷、甘草苷和甘草酸对照品色谱峰比对,确定了色谱峰 2、色谱峰 3 和色谱峰 5 分别为芹糖甘草苷、甘草苷和甘草酸,鉴于甘草苷为甘草中的主要有效成分,因此设定其为参照物(S 峰)。

1.4 特征峰相对保留时间的确定

通过建立的甘草提取物对照特征图谱可知,其特征图谱应有 8 个特征峰,以特征峰 3(甘草苷)为参照峰(S 峰),计算上述 34 批次样品中其它 7 个特征峰与 S 峰的相对保留时间,结果见表 10,并得到各特征峰相对保留时间的平均值,将其设定为各特征峰相对保留时间的规定值,分别为 0.596、0.976、1.533、2.109、2.622、2.882、3.179。

表 10 34 批次甘草提取物特征图谱中 8 个特征峰的相对保留时间

样品编号	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8
BZ-GS-07	0.594	0.976	1.00	1.534	2.109	2.626	2.887	3.183
BZ-GS-03	0.594	0.976	1.00	1.533	2.108	2.625	2.884	3.180
BZ-GS-09	0.595	0.976	1.00	1.532	2.105	2.619	2.881	3.177
BZ-GS-06	0.595	0.975	1.00	1.533	2.106	2.619	2.881	3.177
BZ-GS-08	0.595	0.976	1.00	1.534	2.108	2.621	2.884	3.180
BZ-GS-04	0.595	0.975	1.00	1.533	2.109	2.625	2.885	3.181
BZ-GS-05	0.595	0.976	1.00	1.532	2.106	2.617	2.880	3.176
BZ-XJ-01	0.596	0.975	1.00	1.533	2.107	2.624	2.882	3.178
BZ-GS-02	0.596	0.976	1.00	1.533	2.107	2.623	2.882	3.178
AG-GS-17	0.596	0.975	1.00	1.533	2.108	2.619	2.882	3.178
AG-GS-16	0.597	0.976	1.00	1.534	2.108	2.623	2.883	3.179
AG-GS-04	0.597	0.976	1.00	1.533	2.107	2.623	2.880	3.176

样品编号	峰1	峰2	峰3	峰4	峰5	峰6	峰7	峰8
AG-XJ-07	0.595	0.976	1.00	1.533	2.107	2.624	2.882	3.181
AG-GS-05	0.597	0.975	1.00	1.535	2.110	2.627	2.885	3.181
AG-NM-09	0.596	0.975	1.00	1.532	2.107	2.622	2.879	3.175
AG-XJ-13	0.595	0.976	1.00	1.532	2.106	2.622	2.879	3.175
AG-GS-03	0.596	0.975	1.00	1.532	2.108	2.624	2.882	3.178
AG-GS-11	0.595	0.975	1.00	1.533	2.107	2.622	2.880	3.176
AG-XJ-10	0.595	0.976	1.00	1.531	2.106	2.615	2.877	3.173
AG-GS-02	0.596	0.976	1.00	1.533	2.109	2.625	2.882	3.178
AG-GS-08	0.596	0.976	1.00	1.533	2.109	2.624	2.880	3.176
BZ-GS-11	0.596	0.976	1.00	1.533	2.108	2.622	2.881	3.177
AG-XJ-02	0.596	0.976	1.00	1.534	2.110	2.621	2.883	3.180
AG-NM-01	0.596	0.976	1.00	1.534	2.112	2.628	2.885	3.180
BZ-GS-10	0.595	0.975	1.00	1.533	2.109	2.619	2.881	3.177
AG-GS-14	0.596	0.976	1.00	1.535	2.109	2.623	2.882	3.178
BZ-GS-01	0.595	0.975	1.00	1.533	2.111	2.626	2.884	3.180
AG-NM-15	0.595	0.976	1.00	1.534	2.111	2.626	2.884	3.180
BZ-NM-01	0.595	0.976	1.00	1.533	2.111	2.621	2.884	3.180
AG-NM-06	0.595	0.976	1.00	1.534	2.111	2.622	2.884	3.180
LQ-GS-01	0.596	0.976	1.00	1.533	2.109	2.620	2.882	3.178
LQ-NM-02	0.596	0.975	1.00	1.533	2.111	2.621	2.883	3.180
LQ-GS-03	0.596	0.976	1.00	1.535	2.113	2.624	2.887	3.183
LQ-XJ-04	0.596	0.977	1.00	1.533	2.109	2.625	2.882	3.177
RSD(%)	0.12	0.04	0.00	0.06	0.09	0.11	0.07	0.07

1.5 对照特征图谱的生成

将上述 34 批样品的测定结果导入到中国药典委员会推荐的“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”软件中，对已标定的 8 个特征峰进行选择，结果见图 9，使用“生成对照”功能得到对照特征图谱，结果见图 10。

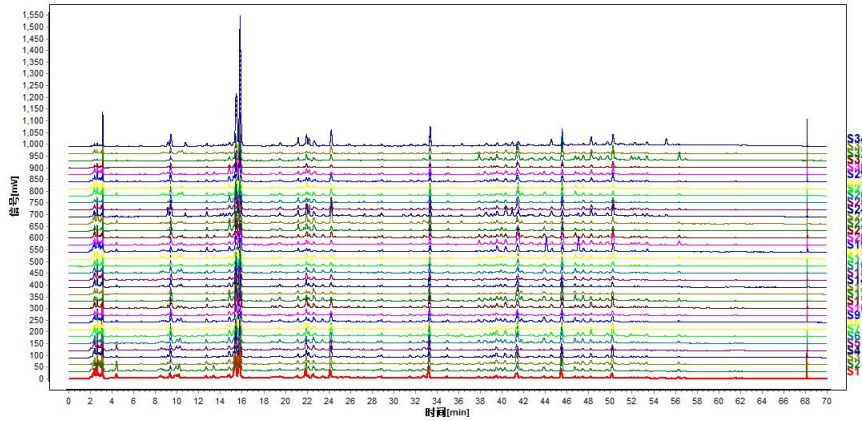


图 9 相似度评价系统对 34 批提取物的叠加图谱

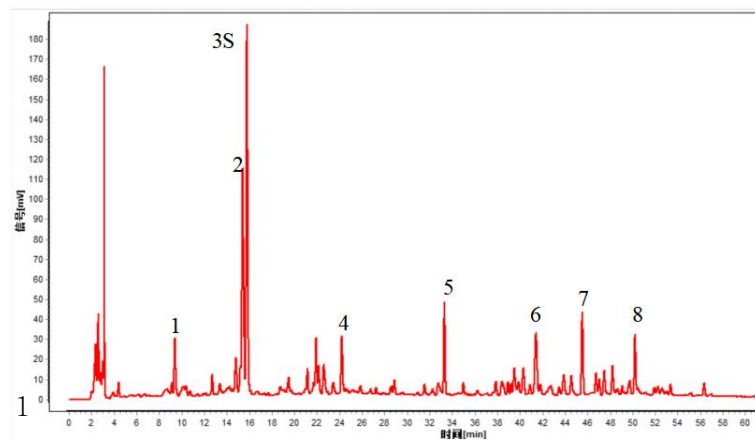


图 10 甘草提取物对照特征图谱

2. 测定结果评判依据的确定

(1) 试样图谱应与对照特征图谱进行比对，从特征峰的数量、色谱图轮廓上进行目测比较，相吻合则初步判定为合格。

(2) 计算各批次试样中各特征峰的相对保留时间均在规定值的 $\pm 10\%$ 以内则判定为合格，峰 1、2、4、5、6、7、8 与 S 峰的相对保留时间的规定值分别为 0.596 (峰 1)、0.976 (峰 2)、1.533 (峰 4)、2.109 (峰 5)、2.622 (峰 6)、2.882 (峰 7) 和 3.179 (峰 8)。

另外，由于本研究制定的甘草提取物特征图谱，对原料的来源只要符合法定规定即可，不做特别的要求，因此只需对甘草提取物中的特征峰进行标定和对相

对保留时间进行规定，不需要对特征峰的相对峰面积比值进行规定，以免出现合
规原料因质量标准严格而排除在外。

3. 实际样品的测定结果评判

将随机试样图谱首先与对照特征图谱进行目测对比，观察其与对照特征图谱
的 8 个特征峰是否相吻合，结果见图 11。从对比结果可知，实际样品图谱与对
照特征图谱的 8 个特征峰均能一一对应，初步判断试样为甘草提取物。

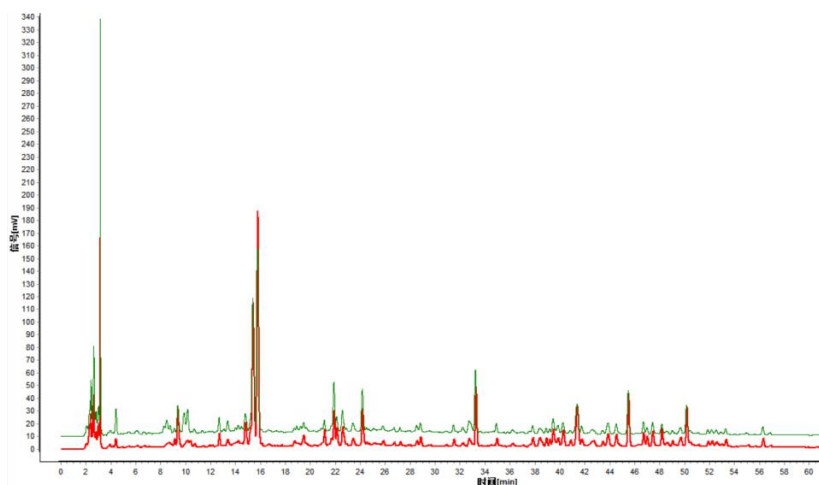


图11 试样图谱与对照特征图谱比对

S1（下图）：对照特征图谱；S2（上图）：试样图谱

以参照物峰 3 为参照，计算其他各特征峰的相对保留时间，与规定值比较，
结果见表 11。从结果可以看出各特征峰的相对保留时间均在规定值的 $\pm 10\%$ 以内，
符合要求，确认试样为甘草提取物。

表 11 试样各特征峰相对保留时间与规定值比较

色谱峰	试样	规定值	相对偏差
峰1	0.595	0.596	-0.17%
峰2	0.975	0.976	-0.10%
峰3	1.000	1.000	0.00%
峰4	1.533	1.533	0.00%
峰5	2.107	2.109	-0.09%

峰6	2.622	2.622	0.00%
峰7	2.880	2.882	-0.07%
峰8	3.176	3.179	-0.09%

附件 1 附录

不同批次甘草提取物的色谱图

