

T/GDFDTAEC 标准编制说明

《保健食品中总三萜的测定-分光光度法》

一、 标准制定的目的和意义

灵芝是一种良好药食同源食用菌类，由于具有良好的抗肿瘤、保肝解毒等功效作用，近年来被广泛开发成保健制品。灵芝保健制品包括灵芝子实体，灵芝菌丝体，灵芝孢子粉和灵芝孢子油等，其中所含三萜类化合物具有特别显著的生理活性，因此总三萜的含量是衡量灵芝及制品品质的一个重要指标。目前我国没有统一的总三萜检测方法，消费者对于市场的灵芝保健食品难以肉眼分别优劣，也经常出现以次充好的现象，而市场上经常有灵芝保健品利用总三萜含量来宣传其保健品品质，但往往因为其三萜检测方法不一而导致其结果真实性、公正性都难以信服，因此制定保健食品中总三萜含量的检测标准，为灵芝保健品品质的鉴定提供重要的指标，同时也进一步为灵芝相关产品标准的制定、维护消费者权益和食品市场监管提供技术依据。

在我国，保健品灵芝及其制品中在日常生活中十分常见，三萜类化合物是灵芝中一种重要的功效成分，目前所知三萜类的种类在灵芝种中，已发现将近二百多种。灵芝中含有三萜类的主要功能为：抑制癌细胞生长、抑制组织胺释放，防止过敏、促进肝功能、促进血小板凝集、以及降血脂，防中老年人发生心血管发面的疾病。总三萜的含量高低是保健品灵芝及其制品品质的重要指标，但总三萜的含量检测一直没有统一的检测标准。农业部在 2001 年颁布过备案标准（NY/SJ 339-2001），地方标准也曾经出过关于灵芝中三萜类化合物的检测（如 DB44/T 496-2008），这些标准有些只是备案，有些已经废止，至今没有一份统一的行业检测联合标准，高效液相色谱法是准确测定灵芝三萜的一种方法，但检测仪器昂贵，检测时间长，需要的标准品多且昂贵，这使其应用受限，相对于 HPLC 法，目前市场上应用最广的方法大多是以齐墩果酸或熊果酸为对照品，以香草醛-冰醋酸和高氯酸为显色剂，用紫外-可见分光光度法测定。很多生产企业在自己生产的产品上标示的总三萜的含量都是根据分光光度法制定的企业标准测得，一般该种检测方法简单、快速，能短时间内大量检测试验样品，但是由于目前市场各个灵芝制品企业众多，检测方法手段一致，但是反应条件和检测条件不一，其导致检测结果差异性较大，同一灵芝样品用不同企业标准能得出不一样的数值，从而也就无法体现灵芝的真实品质。因此通过分析各个反应条件对实验结果的影响，得出一个最佳的反应条件，在此基础上建立保健食品中总三萜测定的团体标准，能达到一定衡量标准，促使我国保健食品灵芝市场良性发展。

本项目制定的保健食品中总三萜的测定方法通则适用标准覆盖面广，对于我省灵芝产业大省提供标准保障，更适合我省检测领域的实际情况。

拟特别推广应用至行业各食品、保健品等企业以及相关检测机构，使行业相关产品生产企业和监管部门能较容易地实施全面监控，对保健品灵芝及其制品行业的健康发展将产生积极的作用，为保障人民的身体健康贡献力量。

二、 标准的任务来源及参与单位

2020 年 5 月，广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）、广州汇标检测技术中心向广东省食品药品审评认证技术协会提出了制定广东省食品药品审评认证技术协会团体标准《保健食品中总三萜的测定-分光光度法》的项目申请，协会组织审评专家小组，于 2020 年 6 月 5 日召开团体标准立项审评会议，审评小组成员对该项目进行论证并获得通过，并同时开始该标准的研究制定工作，在组织上拟定了相关的措施，确定了本部标准

的修订思路。

2020年7月，广东省食品药品审评认证技术协会下达了该项目的制定计划任务，详见《关于《植物提取物中二乙烯苯等9种有机残留物含量的测定》等五个团体标准准许立项的通知》（粤食药审评秘[2020]38号）。

标准起草单位为广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）、广州汇标检测技术中心、汤臣倍健股份有限公司、广东粤微食用菌技术有限公司、华测检测认证集团股份有限公司、广州金至检测技术有限公司、纽斯葆广赛（广东）生物科技股份有限公司、无限极（中国）有限公司、广东林中宝生物科技股份有限公司，由广东省食品药品审评认证技术协会归口。标准主要起草人：XXX、XXX、XXX

三、标准的编制过程

我单位2020年6月组织成立了标准起草小组，确定了工作进度时间表，并进行了分工。

（1）2020年6月-2020年7月，起草小组进行了技术论证和技术规范内容探讨，确定了制定计划、制定原则、标准框架，标准基本内容。

（2）2020年7月-2020年8月，起草小组对全省保健食品中总三萜含量测定的方法进行调研，收集相关技术资料，对生产企业总三萜产品类型进行调研汇总。起草小组根据现实需求完成了标准初稿，并对相关企业及技术单位征求意见，对标准初稿意见进行必要的修改。

（3）2020年8月-2020年9月，起草小组完成本方法的研究工作，根据相关参与单位修改意见，完成验证报告。收集相关验证样品，将验证样品分别寄往验证单位，验证单位根据试验报告对标准方法进行验证。

（4）2020年9月-2021年3月，起草小组完成对验证单位对标准验证报告的收集汇总，对验证数据进行分析。见验证报告数据汇总附件。

四、标准编制原则

制定《保健食品中总三萜的测定-分光光度法》遵循以下原则：

（1）规范性

按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》的要求进行制定。

（2）一致性

与现行有效的相关总三萜含量测定的国家法律、法规、标准规范保持一致，对采用分光光度法测定总三萜含量的方法提要、分析步骤、结果计算和试验报告等要求作出相应的规定。

（3）适用性

充分考虑全省保健食品中总三萜的测定方法现状和现实情况，确定测定方法步骤，并把标准制定过程中标准物质因素、样品种类因素、含量高低因素等融入其中，适应性比较广泛。

（4）可操作性

充分考虑当前保健食品行业中灵芝及制品的现状，采用已有的方法、指导原则等对标准进行规范，具有可操作性和普遍性。

（5）先进性

在制定本标准时，参考了现有三萜分析方法等技术标准、指导原则、团体标准、企业标准等，吸收了国内外几年来先进的分析手段、处理过程、反应条件等，对方法中的处理条件、参数调整、数据准确性等进行优化，体现了标准的技术性、科学性和先进性。

五、标准的整体结构

本标准内容主要 9 个部分：范围、规范性引用文件、术语和定义、方法原理、试剂、仪器设备、分析步骤、分析结果表述、精密度。

六、标准的主要内容及解析

1、范围

对标准的目的和适用范围作了描述,明确本标准适用于灵芝子实体、灵芝孢子粉(破壁)、灵芝孢子油中灵芝总三萜含量的测定。

灵芝孢子粉(非破壁),由于三萜难以通过常规方法提取出来,因为本标准不包含非破壁灵芝孢子粉中总三萜含量的测定。

2、规范性引用文件

列出了标准条文制定过程中引用的标准。

3、方法原理

对方法测定引用的原理依据进行了说明。

4、试剂

明确了方法所使用试剂名称及级别。对于对照品的选择上:

a、选择齐墩果酸作为本标准对照品。

分析了常用标准及方法中熊果酸和齐墩果酸的区别,按照标准方法分别配制成齐墩果酸对照品溶液浓度 98.2mg/L,熊果酸对照品溶液浓度为 129.5mg/L。对两种对照品溶液进行线性对比与波长扫描,见表 1、图 1 和图 2。

表 1 熊果酸、齐墩果酸标准溶液的线性回归方程和线性相关系数

编号	对照品相应质量 c (mg)	熊果酸吸光度 值 A	对照品相应质量 c (mg)	齐墩果酸吸光度值 A
1	0	0.042	0	0.042
2	0.026	0.252	0.020	0.195
3	0.052	0.521	0.039	0.371
4	0.078	0.778	0.059	0.567
5	0.104	1.030	0.079	0.741
6	0.130	1.291	0.098	0.946
7	0.156	1.600	0.118	1.146
8	0.194	1.895	0.147	1.445
熊果酸线性方程和相关系数(x 为吸光度, y 为对照品含量)		y=0.1018x-0.0019		R ² =0.9983
齐墩果酸线性方程和相关系数(x 为吸光度, y 为对照品含量)		y=0.104x-0.0009		R ² =0.9985

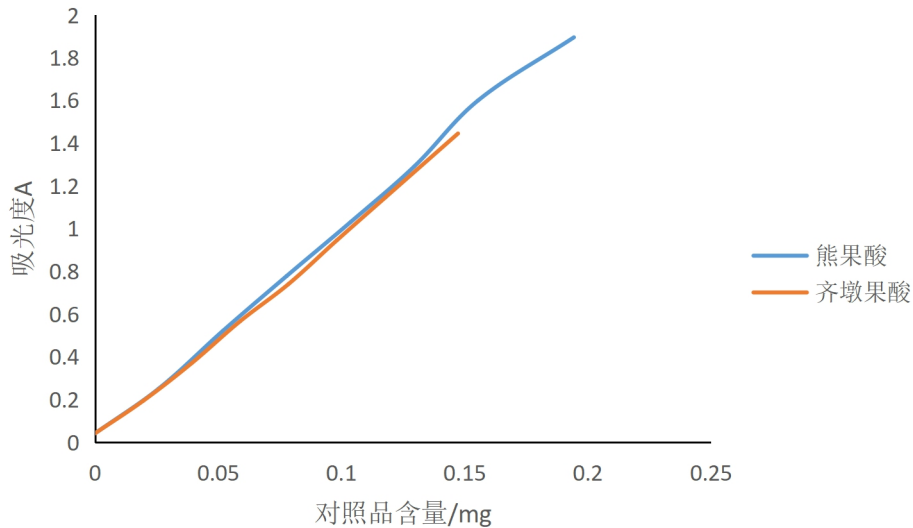


图 1 齐墩果酸与熊果酸标准溶液线性图

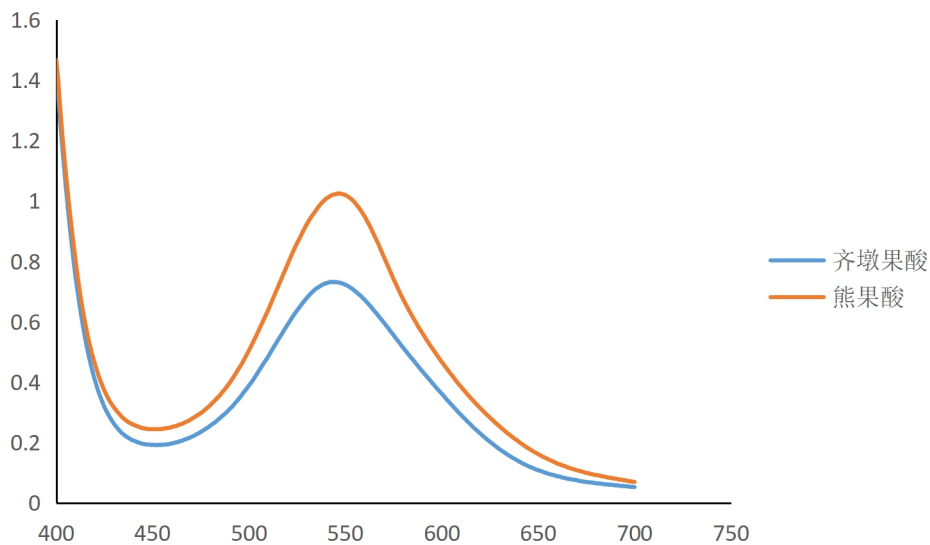


图 2 齐墩果酸与熊果酸对照品溶液的光吸收曲线

由表 1 和图 1 可知，齐墩果酸和熊果酸对照品标准曲线线性良好，且齐墩果酸与熊果酸两者对照品在线性范围内基本重合，各自浓度的吸光度相近。

由图 2 及现场波长扫描数据可知，齐墩果酸和熊果酸均在 546nm 处有最大吸收波长，且峰值相似，因市场齐墩果酸对照品价钱比熊果酸普遍低很多，因此在两者性质相似，实验效果一样的情况下选择齐墩果酸作为实验对照品。

b、不同厂家对照品不对实验结果产生影响。

分别购买市场常用的几种齐墩果酸对照品，按标准 5.1.1 进行配置（国药集团溶度 98.2mg/L，成都普菲德溶度 98.7mg/L，上海源叶浓度 80.0mg/L）后，分别取 0.8mL 各齐墩果酸对照品标准溶液，按 4.1 处理后在可见光区进行波长扫描，扫描结果如图 3

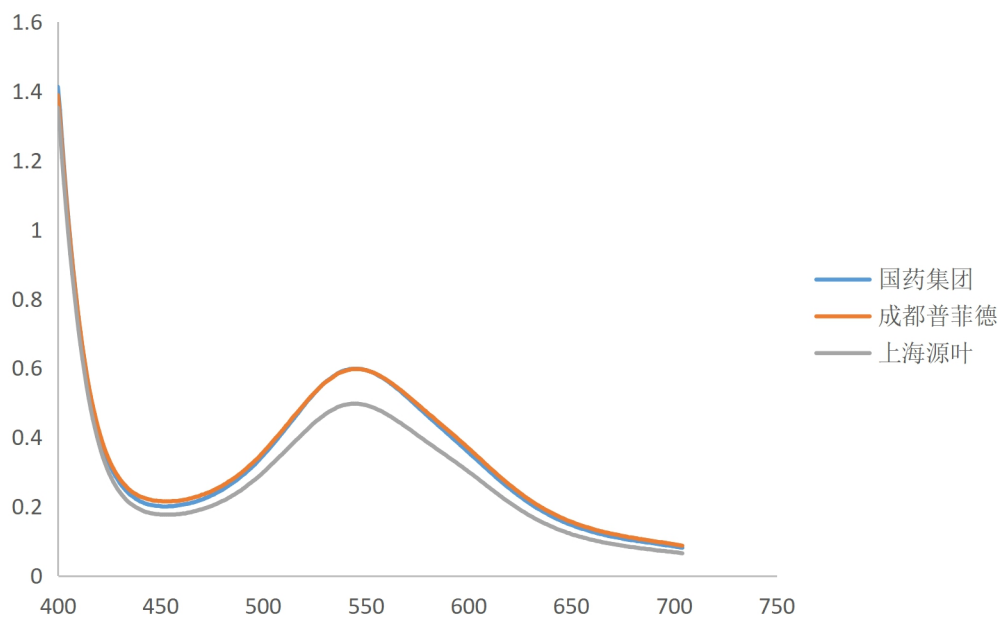


图3 各品牌齐墩果酸对照品溶液的光吸收曲线

由图3可知及现场扫描数据可知，三种对照品溶液均在546nm处有最大吸收波长，且峰值相近，因此对照品品牌的选择不会对实验产生影响。

5、仪器设备

标准中涉及仪器设备均为分析实验中仪器，其中，分析天平精密度要求达到0.0001g，超声提取器超声功率要求为 $\geq 200W$ 。

6、分析步骤

6.1 对于试样提取过程，标准对三种形态试样提取过程进行了分别描述。

6.1.1 提取试剂的选择

分别对粉末和油状胶囊试样提取试剂进行分析，以无水乙醇、氯仿、乙酸乙酯作为提取溶剂，按照上述方法比较提取效果。

表2 提取试剂的选择性

编号	提取试剂	粉末试样测定		提取试剂	油状试样测定	
		含量(g/100g)	定含量平均值(g/100g)		含量(g/100g)	含量平均值(g/100g)
1	75%无水乙醇	0.177	0.177	无水乙醇	24.2	24.2
2	75%无水乙醇	0.177		无水乙醇	24.2	
3	无水乙醇	0.240	0.242	氯仿	23.5	23.5
4	无水乙醇	0.244		氯仿	23.5	
5	氯仿	0.177	0.174	甲醇	23.6	23.6
6	氯仿	0.172		甲醇	23.6	
7	甲醇	0.226	0.226	乙酸乙酯	24.8	24.8
8	甲醇	0.226		乙酸乙酯	24.8	

由表2可知，试样为粉末采用无水乙醇作为提取试剂效果最佳，试样为油状采用乙酸乙酯为提取试剂效果最佳。

6.1.2 提取方式的选择

分析不同提取方式，不同提取条件的变化，选择提取最佳的提取条件。

表 3 提取方式的选择性

编号	提取方式	粉末试样吸光度值	粉末试样吸光度值平均值	油状试样吸光度值	油状试样吸光度值平均值
1	回流提取 2h	0.621	0.628		
2	回流提取 2h	0.635			
3	超声提取 30min	0.640	0.640		
4	超声提取 30min	0.639			
5	超声功率 200w	0.640	0.640	24.2	24.2
6	超声功率 200w	0.639		24.2	
7	超声功率 300w	0.638	0.638	24.4	24.3
8	超声功率 300w	0.638		24.2	
11	超声时间 5min	0.402	0.402	22.0	22.0
12	超声时间 5min	0.402		22.0	
13	超声时间 10min	0.580	0.583	22.2	22.4
14	超声时间 10min	0.585		22.5	
15	超声时间 20min	0.615	0.613	24.2	24.2
16	超声时间 20min	0.610		24.1	
17	超声时间 30min	0.642	0.642	24.0	24.1
18	超声时间 30min	0.642		24.2	
19	超声时间 40min	0.635	0.637	24.4	24.3
20	超声时间 40min	0.638		24.1	

由表 3 可知，粉末样品超声提取与回流提取结果相差不大，但超声操作简单，时间较短，因此粉末样品选择超声提取。超声提取功率选择 200w 和 300w 超声提取效果相当，粉末超声时间 30min 后提取稳定，油状超声 20min 后提取稳定，因此粉末试样选择超声提取，功率 $\geq 200w$ ，超声提取 30min。油状试样超声提取，功率 $\geq 200w$ ，超声提取 20min。

6.2 对于试样溶液测定中几种试剂的加入量及试验条件进行了选择分析。

6.2.1 显色水浴温度的比较

分别取 0.8mL 标准储备溶液加入到 6 个比色管中，按方法操作，改变显色温度为 60, 70, 80℃后，测定其吸光度值。每个温度点做一个空白。分析比较显色温度的最佳点。

表 4 方法耐用性试验（显色水浴温度）

编号	显色水浴温度	吸光度值 A	平均值	空白吸光度值
1	60℃	0.602	0.602	0.038
2	60℃	0.602		
3	70℃	0.741	0.741	0.040
4	70℃	0.741		
5	80℃	0.932	0.924	0.063
6	80℃	0.915		

由表 4 比较得知，显色温度在 70℃时有一个很好的吸光度，在 80℃时虽然吸光度高，但空白吸光度值大，因此水浴温度在 70℃时最佳。

6.2.2 显色的稳定时间的比较

分别取 0.8mL 标准储备溶液加入到 6 个比色管中，按方法操作，改变显色的稳定时间为 15, 30, 45min 后，测定其吸光度值。每个时间点做一个空白，分析最佳显色稳定时间。

表 5 方法耐用性试验（显色稳定时间）

编号	显色稳定时间	吸光度值 A	平均值	空白吸光度值
1	15min	0.741	0.741	0.040
2	15min	0.741		
3	30min	0.790	0.791	0.067
4	30min	0.792		
5	45min	0.810	0.812	0.082
6	45min	0.814		

由表 5 比较得知，稳定时间在 15min 时有很好的吸光度，且平行性好，随着时间的增长，空白吸光度过大。因此选择 15min 为稳定时间。

6.2.3 显色剂用量的比较

分别取 0.8mL 标准储备溶液加入到 6 个比色管中，按方法操作，改变显色的显色剂用量为 0.1, 0.2, 0.3mL 后，测定其吸光度值。每个显色剂用量做一个空白。分析最佳显色剂用量。

表 6 方法耐用性试验（显色剂用量）

编号	显色剂用量	吸光度值 A	平均值	空白吸光度值
1	0.1mL	0.611	0.613	0.025
2	0.1mL	0.615		
3	0.2mL	0.741	0.740	0.040
4	0.2mL	0.740		
5	0.3mL	0.730	0.732	0.096
6	0.3mL	0.734		

由表 6 比较得知，显色剂用量在 0.2mL 时，吸光度较大且平行性好，显色剂用量在 0.3mL 时，空白吸光度太大，选择 0.2mL 为显色剂用量。

6.2.4 高氯酸用量的比较

分别取 0.8mL 标准储备溶液加入到 6 个比色管中，按方法操作，改变高氯酸用量为 0.6, 0.8, 1.0mL 后，测定其吸光度值。每个高氯酸用量做一个空白，分析最佳高氯酸用量。

表 7 方法耐用性试验（高氯酸用量）

编号	高氯酸用量	吸光度值 A	平均值	空白吸光度值
1	0.6mL	0.732	0.732	0.042
2	0.6mL	0.732		
3	0.8mL	0.741	0.742	0.042
4	0.8mL	0.743		
5	1.0mL	0.648	0.642	0.056
6	1.0mL	0.636		

由表 7 比较得知，稳定剂在 0.8mL 时，吸光度较大且平行性好，选择高氯酸用量为 0.8mL 最佳。

6.3 标准方法专属性分析

按上述检测方法分析空白试剂（无水乙醇）、阴性样品（乙二醇）和阳性样品（灵芝）、阴性样品加标、阳性样品加标进行测试。分析方法的专属性。

表 8 方法专属性试验

编号	专属性试验条件	吸光度值 A	平均值
1	空白试剂	0.042	0.042
2	空白试剂	0.042	
3	阴性样	0.042	0.042
4	阴性样	0.042	
5	阳性样	0.439	0.444
6	阳性样	0.449	
7	阴性样加标	0.742	0.742
8	阴性样加标	0.741	
9	阳性样加标	0.861	0.862
10	阳性样加标	0.863	

6.4 标准方法精密度分析

用建立的方法对灵芝子实体、粉末剂和油状剂进行六次测定。计算六个测定结果的相对标准偏差(RSD)，结果见表 9, 10, 11。

表 9 灵芝子实体试样测定方法的重复性

测试序号	测得含量(g/100g)	平均含量(g/100g)	相对标准偏差(RSD/%)
1	0.721	0.721	1.8
2	0.740		
3	0.712		
4	0.711		
5	0.732		
6	0.708		

表 10 粉末试样测定方法的重复性

测试序号	测得含量(g/100g)	平均含量(g/100g)	相对标准偏差(RSD/%)
1	0.229	0.225	1.7
2	0.219		
3	0.223		
4	0.226		

5	0.226
6	0.229

表 11 油状试样测定方法的重复性

测试序号	测得含量 (g/100g)	平均含量 (g/100g)	相对标准偏差 (RSD/%)
1	24.6	24.5	0.40
2	24.6		
3	24.5		
4	24.4		
5	24.6		
6	24.4		

用建立的方法对同一批次的灵芝子实体、粉末剂和油状剂进行六次测定，分别在不同日期，不同人员，不同仪器的情况下分别测试两次，分别计算六个测定结果的相对标准偏差 (RSD)，结果见表 12, 13, 14。

表 12 灵芝子实体测定方法的中间精密度

测试序号	测得含量 (g/100g)	平均含量 (g/100g)	相对标准偏差 (RSD/%)
日期 1	0.718	0.724	1.6
日期 2	0.722		
人员 1	0.738		
人员 2	0.730		
仪器 1	0.705		
仪器 2	0.728		

表 13 粉末剂测定方法的中间精密度

测试序号	测得含量 (g/100g)	平均含量 (g/100g)	相对标准偏差 (RSD/%)
日期 1	0.229	0.224	1.7
日期 2	0.226		
人员 1	0.220		

人员 2	0.225
仪器 1	0.219
仪器 2	0.226

表 14 油状剂试样测定方法的中间精密度

测试序号	测得含量(g/100g)	平均含量(g/100g)	相对标准偏差(RSD/%)
日期 1	24.5		
日期 2	24.2		
人员 1	24.2		
人员 2	24.8	24.4	1.0
仪器 1	24.2		
仪器 2	24.4		

6.5 标准方法准确度分析

称取灵芝子实体试样 1g(精确到 0.0001g), 粉末试样 1g, 油状试样 0.10g, 分别共称取 9 个, 每三个为一组一共三组进行加标回收实验。样品称取后, 按试验方法操作(油状加标试样定容至 100mL), 分别加入样品对应含量的 50%、100%、150%对照品量(粉末试样以标准溶液加入), 按试验方法处理进行比色测定, 即进行三组不同浓度的加标回收实验, 具体实验数据见表 15, 16, 17。

表 15 灵芝子实体状试样回收率实验结果

测试序号	称样量(g)	加标量(mg)	测得量(mg)	加标回收率(%)	平均回收率(%)
1	1.1251	4.92	12.92	98.6	
2	1.1511	5.05	13.11	97.1	97.9
3	1.0952	5.11	12.85	98.0	
4	1.1052	9.98	17.1	89.4	
5	1.1132	9.65	17.1	92.8	90.9
6	1.1514	9.98	17.5	90.6	
7	1.1032	14.2	21.5	91.8	
8	1.1615	14.8	22.5	91.9	90.7
9	1.1915	14.2	21.8	88.5	

表 16 粉末状试样回收率实验结果

测试序号	称样量 (g)	加标量 (mg)	测得量 (mg)	加标回收率 (%)	平均回收率 (%)
1	0.9985	0.982	3.101	87.0	
2	1.0025	0.982	3.102	86.2	86.5
3	1.0014	0.982	3.101	86.3	
4	0.9988	1.964	4.052	91.9	
5	1.0032	1.964	4.102	93.9	92.5
6	0.9985	1.964	4.048	91.7	
7	0.9665	2.946	5.032	97.0	
8	0.9985	2.946	5.132	97.9	97.8
9	1.0025	2.946	5.154	98.4	

表 17 油状试样回收率实验结果

测试序号	称样量 (g)	加标量 (mg)	测得量 (mg)	加标回收率 (%)	平均回收率 (%)
1	0.1021	10.15	34.5	93.5	
2	0.1015	10.05	34.8	98.8	95.2
3	0.1032	10.30	34.9	93.4	
4	0.1032	20.14	44.8	96.9	
5	0.1011	20.13	44.2	96.5	97.0
6	0.1015	20.12	44.5	97.6	
7	0.1032	30.05	54.3	96.6	
8	0.1006	30.15	53.5	95.7	95.2
9	0.1018	30.20	53.1	93.2	

7 结论

通过对标准中试验条件、试验内容、试验材料进行分析,讨论对照品的选择性、线性范围、提取方式的确定、耐用性、精密度、准确度等性能,确定能满足保健食品灵芝及制品中总三萜的测定。

表 15 参与验证单位

编号	验证单位
1	汤臣倍健股份有限公司
2	广东粤微食用菌技术有限公司
3	华测检测认证集团股份有限公司
4	广州金至检测技术有限公司
5	纽斯葆广赛（广东）生物科技股份有限公司
6	无限极(中国)有限公司
7	广州汇标检测技术中心
8	广东林中宝生物科技股份有限公司

七、验证单位试验结果

7.1 方法线性范围

验证单位对方法做线性关系结果如表 16，各验证单位线性相关系数均>0.99。满足线性要求。

表 16 验证单位标准曲线及线性关系结果

单位名称	线性方程	相关系数
汤臣倍健股份有限公司	$y = 0.0088x - 0.0221$	0.9987
广东粤微食用菌技术有限公司	$y=0.0089x-0.0095$	0.9993
华测检测认证集团股份有限公司	$y=0.0091x-0.0462$	0.9968
广州金至检测技术有限公司	$y=0.0098x+0.0049$	0.9996
纽斯葆广赛（广东）生物科技股份有限公司	$y=0.0088x-0.026$	0.9979
无限极(中国)有限公司	$y = 0.0091x - 0.0161$	0.9993
广东林中宝生物科技股份有限公司	$y=0.1132X+0.0025$	0.9993
广州汇标检测技术中心	$y=0.0092x-0.0087$	0.9991

7.2 方法专属性

验证单位对方法专属性结果如表 17，专属性良好。

表 17 专属性验证结果

单位名称	空白试剂	阴性样	阳性样	阴性样加标	阳性样加标
汤臣倍健股份有限公司	0.0028	0.003	0.2943	0.3181	0.6593
广东粤微食用菌技术有限公司	0	0	0.61	0.351	1.051
华测检测认证集团股份有限公司	0.037	0.04	0.459	0.419	0.588
广州金至检测技术有限公司	0.001	0.001	0.308	0.231	0.946
纽斯葆广赛（广东）生物科技股份 有限公司	0.020248	0.019836	0.936959	0.223156	0.993859
无限极(中国)有限公司	0.03282	0.03301	0.39864	0.27240	0.55093
广东林中宝生物科技股份有限公司	-0.0254	0.0015	0.8006	0.8008	0.842
广州汇标检测技术中心	0.001	0.004	0.445	0.516	0.612

7.3 方法精密性

验证单位对方法三种处理试样进行 6 平行测试，测试结果见表 18，RSD 均 < 5%，精密性良好。

表 18 精密度验证结果

单位名称	灵芝子实体相对	灵芝孢子粉相对	灵芝孢子油相对
	标准偏差 (RSD/%)	标准偏差 (RSD/%)	标准偏差 (RSD/%)
汤臣倍健股份有限公司	0.8	1.7	1.8
广东粤微食用菌技术有限公司	4.1	1.2	1.6
华测检测认证集团股份有限公司	1.7	1.2	2.1
广州金至检测技术有限公司	2.7	0.7	2.8
纽斯葆广赛（广东）生物科技股份有 限公司	1.8	2.5	——
无限极(中国)有限公司	2.8	1.3	1.7
广东林中宝生物科技股份有限公司	——	4.0	1.5
广州汇标检测技术中心	0.03	0.4	0.7

7.4 方法准确度

验证单位对方法进行加标回收，三种试样分别添加高、中、低浓度对照品，加入量为所取供试品中待测定分量 50%，100%，150%。测试回收率结果见表 19，加标回收率均为 85% 以上。

表 19 准确度验证结果

单位名称	灵芝子实体回收率 (%)			灵芝孢子粉回收率 (%)			灵芝孢子油回收率 (%)		
	加标 5mg	加标 10mg	加标 15mg	加标 5mg	加标 10mg	加标 15mg	加标 15mg	加标 30mg	加标 45mg
汤臣倍健股份有限公司	90.6	94.5	98.7	92.8	97.7	100.4	101.3	95.6	95.5
广东粤微食用菌技术有限公司	91.5	96.3	99.3	98.5	100.9	100.2	99.2	100.7	99.9
华测检测认证集团股份有限公司	86.5	86.5	91.4	95.2	92.7	102.0	92.4	92.8	91.1
广州金至检测技术有限公司	99.4	93.6	101.0	85.5	86.1	87.4	——	——	——
纽斯葆广赛（广东）生物科技股份有限公司	103.1	105.0	101.9	90.1	93.9	97.8	——	——	——
无限极(中国)有限公司	87.4	89.7	88.5	92.7	95.1	94.1	89.0	90.2	88.8
广州汇标检测技术中心	96.0	97.8	100.0	88.7	85.1	93.4	97.8	94.6	97.4

7.5 方法可靠性

验证单位对派发盲样按标准方法进行测试，结果见表 20,3 个品种 6 个试样测试结果 RSD 均<10%。

表 20 盲样验证结果

单位名称	盲样测试结果 (%)					
	灵芝 1	灵芝 2	灵芝孢子粉 3	灵芝孢子粉 4	灵芝孢子油 5	灵芝孢子油 6
汤臣倍健股份有限公司	0.846	1.29	12.8	12.1	34.3	29.7
广东粤微食用菌技术有限公司	0.844	1.16	11.6	11.8	33.4	32.3

华测检测认证集团股份有 限公司	0.898	1.26	11.5	11.4	31.9	31.0
广州金至检测技术有限公 司	0.728	1.14	11.4	11.4	31.7	29.1
纽斯葆广赛（广东）生物 科技股份有限公司	0.740	1.19	10.0	10.3	33.1	33.2
无限极(中国)有限公司	0.860	1.10	10.6	10.9	33.3	29.1
广东林中宝生物科技股份 有限公司	0.710	1.05	10.4	10.9	32.5	31.6
广州汇标检测技术中心	0.727	1.14	11.5	11.3	36.1	35.9
平均值(%)	0.794	1.17	11.2	11.3	33.3	31.5
RSD(%)	9.4	6.8	7.8	5.1	4.3	7.4

8 结论

通过方法验证与验证单位数据分析,结果表明:广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心)负责修订的《保健食品中总三萜的测定-分光光度法》,适用于保健食品中总三萜含量的测定,本方法操作简单、快速,精密性、重复性、准确度好,适合推荐作为行业团体标准分析方法。

八、 标准水平分析

国外方面,2014年,美国第38版药典已对灵芝质量制定标准,以灵芝酸A等10种三萜酸为标准品,用薄层色谱法检测三萜总含量,或用HPLC法测量这10种灵芝三萜酸含量,国际标准ISO 21315:2018中医药—灵芝中也有对灵芝酸A的HPLC法测定,但实验过程复杂,且三萜酸的种类随着研究的深入,已经达到200多种,单一对照品的HPLC法已经无法准确测定灵芝中总三萜的含量。

在我国,农业部在2001年颁布过备案标准(NY/SJ 339-2001)。2004年11月安徽省发布地方标准DB34/T 485-2004,但于2016年废止。2006年7月河南省发布地方标准DB41/T 472-2006灵芝的标准,标准内容有灵芝中总三萜的指标,但无检测方法,且该方法于2014年8月废止。2008年3月广东省发布地方标准DB44/T 496-2008,但2016年10月废止。相对于最新发布的保健食品理化及卫生指标检验与评价技术指导原则(2020年版)中总三萜的测定,该标准针对性较强,提取方式更优化,对灵芝子实体和灵芝孢子粉提取方式进行区分,更有针对性提取相应产品总三萜,同时在测试方面,对于试样条件和试剂加入量等都有不同,本标准能更有利于保健食品中总三萜含量的测定,完善保健食品中总三萜含量测定的标准应用,填补行业标准空缺,提高保健品行业市场的正规性和公正性。

九、 与现行相关法律、法规、规章及相关标准,特别是强制性标准的协调性

本标准不涉及与任何国家法律、法规、规章及强制性标准冲突问题,标准的

制定符合国家相关法律、法规、规章的要求。

十、 专利及涉及的知识产权

本标准不涉及任何专利或知识产权

十一、 重大分歧意见的处理经过和依据

无

十二、 标准作为强制性或推荐性国家（或行业）标准的建议

建议该标准作为行业团体标准发布实施。

十三、 产业化情况、推广应用论证和预期达到的经济效果

本标准与目前我省保健品行业科技、生产、工艺及管理水平的适应性强，标准化程度高，便于被该类保健品企业所引用。同时，该方法的确定可以有效的监控我省保健品市场中以总三萜作为标志性成分的产品，也可作为中小企业生产中质量监控，为我省保健品市场总三萜含量测定公正性带来可靠性数据，保证我省保健品市场平稳顺利发展。

《保健食品中总三萜的测定-分光光度法》标准编制组

2021年8月