

中华人民共和国国家标准

转基因植物及其产品食用安全检测

苜蓿皂苷含量的测定

分光光度法

编 制 说 明

(征求意见稿)

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所

农业农村部科技发展中心

中国疾病预防控制中心营养与健康所

2026 年 10 月 20 日

目 录

一、工作简况	1
(一) 任务来源.....	1
(二) 制定背景.....	1
(三) 起草单位情况.....	2
(四) 起草过程.....	5
1. 前期准备.....	5
2. 方法建立.....	5
3. 文本起草及组织方法验证.....	6
4. 定向征求意见.....	6
5. 标准预审.....	6
二、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
1. 科学性.....	7
2. 先进性.....	7
3. 适用性.....	7
4. 一致性.....	7
5. 协调性.....	7
6. 易用性.....	8
(二) 标准编制依据.....	8
(三) 标准的主要技术内容.....	8
1 分光光度测定条件的确定.....	8
2 样品制备和提取条件的优化.....	10
3 方法学评价.....	14
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.....	17
(一) 实验室间方法学验证及数据.....	17
(二) 主要试验结论.....	19
(三) 预期经济效益、社会效益、生态效益.....	19
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况	19

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	19
六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系	19
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	20
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	20
十、其他应当说明的事项	20

一、工作简况

（一）任务来源

本文件来源于农业农村部关于下达 2025 年第二批农业国家和行业标准制修订项目计划的通知（农质标函[2025]96 号），项目编号 NYB-25135。由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、农业农村部科技发展中心、中国疾病预防控制中心营养与健康所、浙江大学联合起草。

本文件主要起草人为：张宏福、张连华、陈亮、孟庆石、朱淑馨、宋贵文、焦悦、卓勤、王迪铭。

（二）制定背景

转基因植物及其产品的食用安全评价以比较分析为重要基础，通过对转基因材料与非转基因受体或适宜常规对照的关键营养成分、抗营养因子及天然毒素等进行比较，识别可能发生的非预期变化，并结合天然变异范围和膳食暴露情况评价其安全意义。苜蓿除主要用于饲用外，其芽苗及部分加工产品也具有食用用途，因此，有必要根据具体产品用途和食用部位开展相关成分检测。皂苷是苜蓿中具有代表性的次生代谢物，对其含量进行测定，可为转基因苜蓿及其产品的成分比较和食用安全评价提供基础数据。

苜蓿皂苷主要为三萜类皂苷，是由不同皂苷元与糖基结合形成的一类化合物，具有较为复杂的组成和生物学活性。部分皂苷具有溶血活性及抗营养作用，其影响与化合物结构、含量和暴露条件等因素有关。经济合作与发展组织（OECD）关于苜蓿及其他温带豆科牧草成分的共识文件对皂苷进行了专门论述，表明其是苜蓿成分评价中需要关注的组分。因此，将总皂苷作为转基因苜蓿及其产品成分比较的检测指标，有助于识别相关次生代谢物总量的变化，为进一步评价其营养和安全意义提供依据。

皂苷的分析方法主要包括分光光度法和色谱法等。其中，分光光度法具有仪器设备较为普及、操作相对简便、检测成本较低等特点，适用于总皂苷的常规测定和批量样品比较分析。但总皂苷测定结果受样品提取与净化、显色反应条件及校准物质等因素影响，不同方法所得结果的直接比较存在一定局限。因此，有必

要针对苜蓿及其产品的基质特点，建立统一的样品前处理、显色测定、标准曲线制备和结果计算要求，明确测定结果的含义，提高检测数据的可比性。

本标准采用 70%乙醇溶液提取样品中的皂苷，经固相萃取净化后，加入香草醛—冰醋酸溶液和高氯酸反应显色，在 545 nm 波长下测定吸光度，以齐墩果酸为校准物质，通过标准曲线进行定量。该方法测定的是规定提取、净化和显色条件下，以齐墩果酸当量表示的总皂苷含量，可用于转基因苜蓿与相应对照材料的总皂苷含量比较。制定《转基因植物及其产品食用安全检测 苜蓿皂苷含量的测定 分光光度法》标准，旨在统一检测程序、关键技术条件和质量控制要求，规范检测结果的计算与表达，提高方法的重复性和实验室间可比性，为转基因苜蓿及其产品的食用安全评价提供方法学支撑。

（三）起草单位情况

项目牵头申报单位中国农业科学院北京畜牧兽医研究所隶属于农业农村部，是国家设立的中央级畜牧科研机构，在畜禽营养与饲养、饲料资源开发利用、饲料成分分析及营养价值评价等领域具有长期的研究积累。研究所是畜禽营养与饲养全国重点实验室和农业农村部动物营养与饲料学（综合性）重点实验室等科研平台的依托单位，牵头组织参评的畜牧学在全国第四轮学科评估中获评 A+。现拥有畜禽营养与饲养全国重点实验室、畜禽生物育种全国重点实验室等多个国家级及省部级研究平台，形成了较为完善的科研平台体系，可为苜蓿及其产品中总皂苷检测方法的研究与标准制定提供科研条件和技术保障。

研究所建有科研设施共享平台，覆盖细胞生物学、基因组学、蛋白质组学、微生物组学、代谢组学及营养元素分析等研究方向，仪器设备先进、配套齐全。配备有 QTRAP 6500 质谱仪、LC-QQQ 串联三重四极杆质谱仪、GC-MS 气相色谱质谱联用仪、NanoLC-TripleTOF 6600 高分辨质谱仪、ICP-MS 电感耦合等离子体质谱仪等分析设备，具备开展植物及其产品化学成分分析、代谢物研究和相关检测技术研究的条件。上述平台能够为苜蓿样品的基质组成分析、皂苷提取与净化条件研究及共存组分干扰分析提供辅助技术支持，为分光光度测定方法的建立和优化提供研究基础。

研究所长期开展饲料成分分析、营养价值评定及饲料资源开发利用研究，在植物性样品的采集、制备、保存、前处理和分析检测等方面具有丰富经验。领衔

国家农业大数据“饲料营养价值评定和畜禽营养需要”长期监测项目，组织全国多个省份的试验站和监测点开展测定工作，建设畜牧高质量数据集汇交共享服务HERD平台，并长期发布《中国饲料成分及营养价值表》，在检测数据积累、质量控制、结果统计及数据共享等方面形成了系统的工作基础。苜蓿是重要的植物性饲料资源，相关研究积累可为本标准涉及的苜蓿粉末及其产品样品制备、总皂苷提取、样品净化和含量测定提供技术支撑。

本标准采用70%乙醇溶液提取皂苷，经固相萃取净化后，以香草醛—冰醋酸溶液和高氯酸反应显色，在545 nm波长下测定吸光度，并采用齐墩果酸标准曲线进行定量。研究所依托现有科研平台、植物成分分析基础及检测方法研究经验，具备开展样品提取与净化条件优化、显色反应条件研究、基质干扰评价和方法学验证的技术能力，能够为标准中关键技术参数的确定、检测操作程序的规范和结果计算方法的完善提供支持。建所以来，研究所承担了多项国家及省部级科研任务，形成了较为完善的科研组织与项目管理体系，具备组织实施本标准研制工作的条件。

农业农村部科技发展中心为农业农村部直属事业单位，加挂农业农村部转基因生物安全监管中心牌子，是国家农业转基因生物安全评价与检定中心的依托单位，是我国专门从事农业转基因生物检测鉴定、监测监控和安全评价的全国性技术机构。主要承担农业转基因生物安全管理相关法律法规制定和组织实施的技术支持，农业转基因生物安全评价和标识申请的受理与审查，安全评价、检定与监控技术标准的制修订，以及农业转基因生物安全技术检测体系建设与管理等工作。同时，承担全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会秘书处工作，组织开展农业转基因生物产品成分、食用安全和环境安全检测鉴定与监测监控，以及相关国际合作、技术培训和公众宣传等工作，在农业转基因生物安全评价与检测标准化方面具有系统的工作基础。

中心长期主持和参与转基因检测标准研制，积累了标准立项、技术方案论证、方法验证、意见征集及标准审查等方面的工作经验，能够从农业转基因生物安全评价的实际需求出发，统筹检测方法的科学性、适用性和可操作性。对于苜蓿及其产品中总皂苷含量的测定，中心可为检测指标与食用安全评价需求的衔接、适用样品范围的确定、实验室间验证方案设计以及标准文本的规范化提供技术支持，促进本标准与农业转基因生物食用安全检测标准体系相协调。

依托农业农村部科技发展中心建立的农业农村部农业生物技术产品质量安全检验检测中心，拥有实验大楼、试验基地和动物房等设施，配备液相色谱—质谱联用仪、气相色谱仪、荧光定量 PCR 仪、数字 PCR 仪等分析检测设备，建设有农业转基因生物成分、环境和食用安全检测及生物材料保存设施，具备开展相关检测方法研究和验证的条件。中心与农业转基因生物研发机构及安全检测技术机构具有广泛的业务联系，具备统筹试验材料、组织实验室间方法验证和协调项目实施的能力，可为本标准研制过程中的样品组织、验证工作实施、检测结果汇总和技术问题协调提供保障。

中国疾病预防控制中心营养与健康所是中国疾病预防控制中心领导下的国家级营养、食品与健康专业研究、技术指导与咨询机构，是全国营养与健康业务技术指导中心。承担全国营养与健康监测、食物成分数据库建设、人群营养参考摄入量及膳食营养指导、人群营养改善及干预、营养标准研制、营养与健康代谢研究等工作，在食物成分分析、营养评价和食品检验方法研究方面具有长期的技术积累。相关研究基础可为苜蓿及其产品中总皂苷检测结果的分析与解释，以及其在转基因植物食用安全成分比较中的应用提供专业支持。

营养与健康所在食品理化检测、分析方法研究及实验室质量控制等方面具有较好的技术条件，并承担特殊膳食食品、婴幼儿配方食品、保健食品和特殊医学用途配方食品等相关标准及检验方法的制修订工作，具有检测方法建立、技术指标评价和标准文本编写经验。针对本标准采用分光光度法测定总皂苷的技术特点，可为校准物质选择、标准曲线评价、空白对照设置、方法准确度与精密度评价以及结果表达方式的规范提供技术支持，促进检测程序和质量控制要求的完善。

营养与健康所曾主持和参与多项转基因产品食用安全评价研究课题，包括“973”计划中的转基因产品食用安全性评价模型研究，以及转基因生物新品种培育科技重大专项中的转基因生物食用和饲用安全性评价研究，并主持和参与多项转基因生物及其产品食用安全检测方法标准研制。通过相关研究，积累了转基因产品成分比较、营养与安全评价以及分析检测方法验证等方面的经验，具备参与本标准研制的技术条件和能力，可为苜蓿及其产品中总皂苷测定方法的评价、检测数据分析及标准内容完善提供支持。

本标准各起草单位在植物及其产品成分分析、农业转基因生物安全评价与检测标准化、营养与食用安全评价等方面具有互补优势。中国农业科学院北京畜牧

兽医研究所的科研平台和植物性饲料分析基础,农业农村部科技发展中心的标准化组织协调与检测体系建设经验,以及中国疾病预防控制中心营养与健康所的食品成分分析和食用安全评价能力,共同为本标准的技术研究、方法学验证、实验室间验证和文本编制提供保障,具备完成《转基因植物及其产品食用安全检测 苜蓿皂苷含量的测定 分光光度法》标准研制工作的条件。

（四）起草过程

1. 前期准备

2025年9月-10月,在编写标准之前,首先收集、整理和分析国内外有关苜蓿皂苷提取、净化及含量测定的研究文献和试验方法,重点比较分光光度法的样品前处理、显色反应、校准物质选择和结果表达方式。根据转基因植物及其产品食用安全评价的需要,结合苜蓿及其产品的基质特点,明确以总皂苷含量为测定指标,确定试验设计原则、方法研究内容和技术路线。

在前期研究的基础上,确定以乙醇溶液提取、固相萃取净化、香草醛-冰醋酸溶液与高氯酸反应显色、分光光度测定为主要技术路线,以齐墩果酸作为校准物质。围绕提取效率、基质干扰、显色稳定性及定量分析要求,制定试验方案,明确标准曲线、定量限、准确度、精密度及实验室间验证等方法学评价内容,为检测方法的建立和标准文本起草提供基础。

2. 方法建立

2025年11月-2026年7月,按照确定的技术路线开展试验,对苜蓿样品制备、皂苷提取、固相萃取净化及显色测定等关键步骤进行研究。重点考察提取溶剂、提取方式和提取时间对测定结果的影响,以及净化条件对基质干扰的控制效果;研究显色试剂用量、反应温度、反应时间、显色后放置时间和检测波长等因素,确定适用于苜蓿样品中总皂苷测定的操作条件。

建立以70%乙醇溶液提取皂苷、经固相萃取净化后,加入香草醛-冰醋酸溶液和高氯酸反应显色,在545 nm波长下测定吸光度,并采用齐墩果酸标准曲线进行定量的方法。对标准曲线、定量限、准确度和精密度等指标进行评价,考察方法的适用性、科学性和可靠性。针对试验中发现的问题,对操作步骤和技术参数进行修正与验证,明确样品测定、空白对照、结果计算及质量控制要求,形成苜蓿及其产品中总皂苷含量分光光度测定的方法技术体系。

3. 文本起草及组织方法验证

2026 年 8 月-9 月，标准文本及编制说明由标准起草组负责编写，标准主要起草人为张宏福、张连华、陈亮、孟庆石、朱淑馨、宋贵文、焦悦、卓勤、王迪铭。标准的编写规则及表述按照 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》、GB 5009.295-2023《化学分析方法验证通则》、GB/T 27417-2017《合格评定化学分析方法确认和验证指南》、GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》、GB/T 5009.1-2003《食品卫生检验方法理化部分 总则》的要求，整理汇总试验数据，编写《转基因植物及其产品食用安全检测 苜蓿皂苷含量的测定 分光光度法》标准征求意见稿。同时，邀请经 3 家检测单位对标准中制定的技术指标等内容进行验证。

4. 定向征求意见

2026 年 10 月，以信函或邮件形式将标准文本征求意见稿和编制说明征求意见稿发往该领域相关专家征求意见，专家对标准的技术内容、文本和编制说明提出修改建议和意见。发送征求意见稿单位 19 家，共 21 位专家，收到回函 21 份，收到建议或意见 89 条，其中采纳 84 条，部分采纳 0 条，不采纳 5 条。根据反馈意见，采纳合理建议对标准文本进行修改。

5. 标准预审

2026 年 10 月 21 日，全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会组织专家对《转基因植物及其产品食用安全检测 苜蓿皂苷含量的测定 分光光度法》标准进行了认真审查。专家组由万靓军、谢家建、崔金杰、吴刚、王渭霞、路兴波、李飞武、温洪涛、王永、陈笑芸、刘文娟、贺晓云和姜大刚组成。在听取制定专家汇报的基础上，专家组审查了标准文本及编制说明。专家组一致同意审查通过，建议标准起草单位按照修改意见进一步修改后形成公开征求意见稿。

二、标准编制原则、主要内容及其确定依据

（一）标准编制原则

本文件的制定过程严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，遵循以下几项原则：

1. 科学性

以苜蓿皂苷的理化性质、样品基质特点及显色反应特性为基础，科学选择样品提取、净化和分光光度测定方法。通过试验研究和方法学验证，确定提取条件、净化步骤、显色试剂用量、反应温度、反应时间及检测波长等关键技术参数，评价标准曲线、定量限、准确度和精密度等方法性能。明确以齐墩果酸作为校准物质的定量方式及测定结果的含义，确保技术内容依据充分、表述准确，满足标准适用范围内总皂苷含量测定的要求。

2. 先进性

在收集和分析国内外皂苷检测方法及相关研究成果的基础上，结合苜蓿及其产品的检测需求，采用合理的提取、净化和显色测定技术。通过固相萃取净化控制样品基质干扰，规范显色反应条件和吸光度测定程序，并以方法学验证结果作为技术参数确定的依据。在兼顾仪器设备普及程度和检测成本的同时，提高方法的可靠性和检测结果的可比性，体现相关分析技术在常规检测中的有效应用。

3. 适用性

围绕苜蓿及其产品中总皂苷含量测定的实际需求，合理确定方法的适用范围、操作程序、试剂材料及仪器设备要求。兼顾提取与净化效果、检测性能、试验成本和实验室实施条件，使方法具有可操作性，便于相关科研和检测机构开展常规检测及批量样品分析。对适用范围内的样品，按照统一的前处理和测定程序获得可用于成分比较的检测数据，为转基因苜蓿及其产品的食用安全评价提供支持。

4. 一致性

保持标准各章节之间的技术要求、术语、符号、计量单位及表述方式一致。确保测定原理、试剂配制、标准曲线制备、样品处理、吸光度测定和结果计算相互衔接，避免操作条件不一致或定量关系不明确。统一总皂苷含量的表达方式，明确测定结果以齐墩果酸当量计，保证标准文本逻辑清晰、技术内容完整，避免歧义。

5. 协调性

注重本文件与农业转基因生物食用安全评价、分析实验室用水、化学分析方法验证及实验室质量控制等相关要求的衔接，合理引用有关标准，避免重复规定和不必要的技术差异。结合农业转基因生物食用安全检测标准体系，明确本文件作为总皂苷含量测定方法标准的定位，使其适用范围、技术内容和结果表达与相

关检测及评价工作相协调。

6. 易用性

按照检测操作顺序，清晰规定样品制备、提取与净化、标准曲线制备、显色反应、吸光度测定及结果计算等步骤。对影响测定结果的试剂用量、温度、时间、波长及空白对照等条件作出明确规定，规范计算公式、参数含义、计量单位和结果报告要求。标准文本采用准确、简明的语言，便于使用人员理解、执行和引用，提高方法实施的规范性。

（二）标准编制依据

本标准按照 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》和 GB/T 20001.4—2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的规定起草。参考相关国家及行业标准，查阅国内外有关苜蓿皂苷提取、净化及分光光度测定的研究文献，结合苜蓿及其产品的基质特点和转基因植物食用安全评价需求，通过试验研究和比较分析，确定样品前处理方法、显色反应条件、检测波长、标准曲线制备及结果计算方法，并开展方法学验证。

本标准采用 70%乙醇溶液提取样品中的皂苷，经固相萃取净化后，加入香草醛—冰醋酸溶液和高氯酸反应显色，在 545 nm 波长下测定吸光度，以齐墩果酸为校准物质，通过标准曲线进行定量。试验过程中的质量控制及数据统计分析参照 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》的相关要求进行，对标准曲线、定量限、准确度和精密度等指标进行评价，为标准技术要求的确定提供依据。

本编制说明中所述总皂苷含量，均指在本标准规定的提取、净化和显色测定条件下，以齐墩果酸当量表示的含量，单位为毫克每克（mg/g）。

（三）标准的主要技术内容

1 分光光度测定条件的确定

本标准采用显色反应结合分光光度法测定苜蓿及其产品中的总皂苷含量。样品中的皂苷经乙醇溶液提取、固相萃取净化后，加入香草醛—冰醋酸溶液和高氯酸反应显色，在规定波长下测定吸光度，并与齐墩果酸标准曲线比较定量。标准

溶液与样品溶液采用相同的显色条件和检测波长,以保证定量分析条件的一致性。

采用紫外-可见分光光度计对标准溶液经显色后的反应液在 400~700 nm 范围内进行光谱扫描,结果见图 1。扫描结果表明,显色反应液在 545 nm 附近具有明显的吸收峰,仪器显示 545 nm 处的吸光度为 0.770。根据显色反应液的吸收光谱特征,本标准选择 545 nm 作为检测波长,用于标准溶液和样品溶液的吸光度测定。

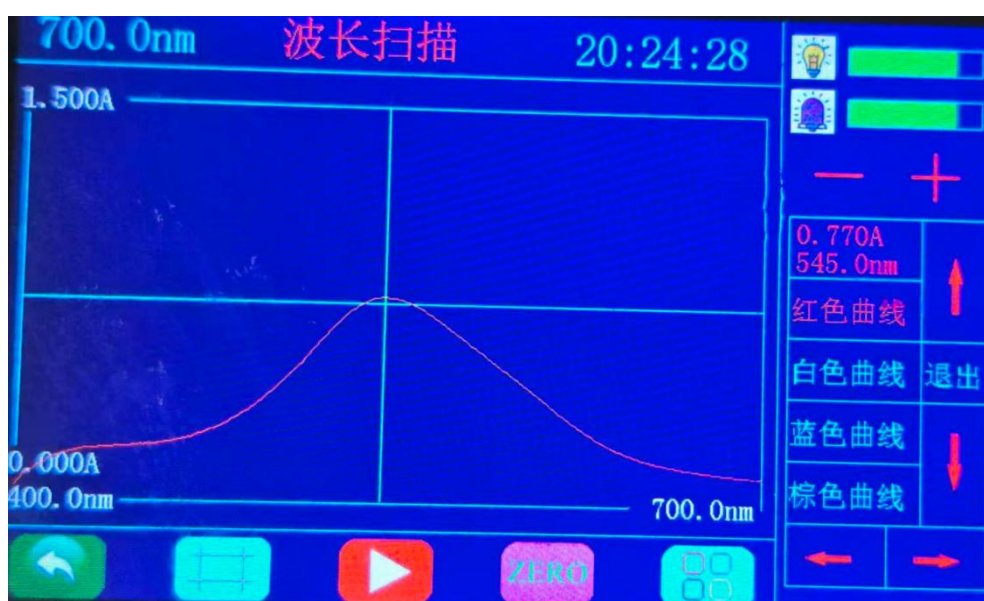


图 1 皂苷标准溶液显色后吸收光谱图

通过对全草苜蓿样品在显色后吸光度的测定分析表明,显色后 20 min 内不同样品间组内吸光度相对变化较大,而显色后的 20-60 min 内样品的吸光度基本保持稳定。故实验样品显色反应后,室温静置 20 min 后再进行吸光度的测定为宜(图 2)。

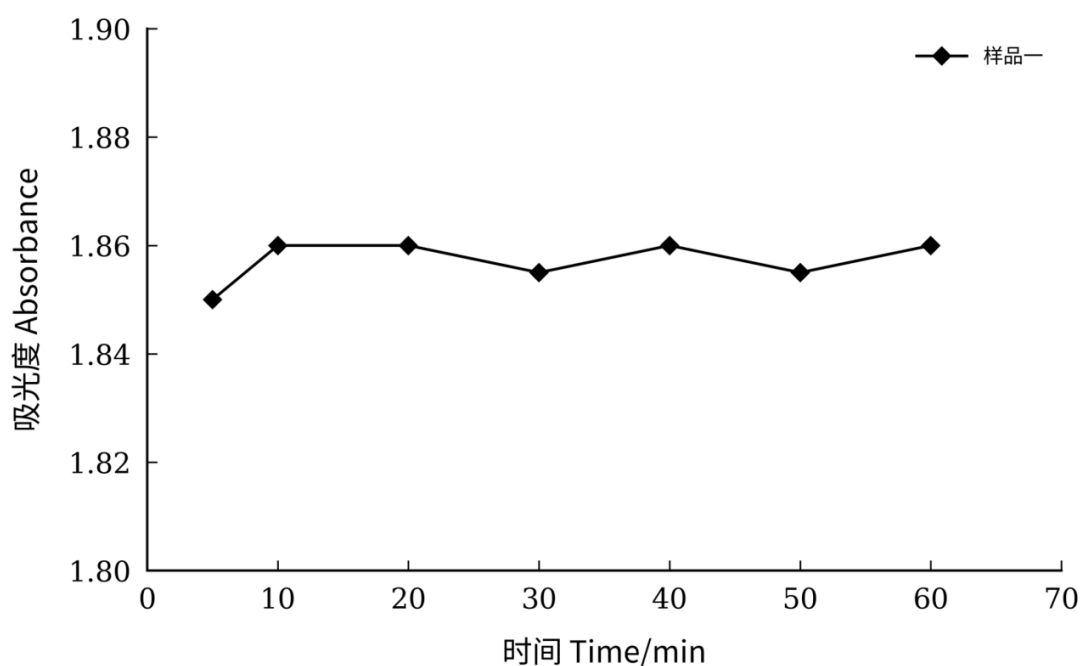


图 2 显色稳定性实验结果

2 样品制备和提取条件的优化

2.1 样品来源与制备

将苜蓿样品粉碎、混匀，制成具有代表性的试样。准确称取苜蓿粉末 30 mg，加入 1 mL 70%乙醇溶液，涡旋振荡 3 min，室温下超声提取 30 min，于 4℃放置过夜后，再次超声提取 30 min，以 10000 g 离心 30 min，取上清液用于后续净化和测定。

取 100 μ L 上清液，氮气吹干后用纯水重悬，注入经预处理的固相萃取微柱，分别用 5 mL 超纯水和 5 mL 30%甲醇溶液冲洗，再用纯甲醇洗脱 4 次，合并洗脱液。将洗脱液水浴蒸干，冷却后加入 5%香草醛-冰醋酸溶液 200 μ L 和高氯酸 800 μ L，于 70℃水浴中反应 15 min，立即冰浴冷却，加入冰醋酸 5 mL，静置 20 min，在 545 nm 波长下测定吸光度，通过齐墩果酸标准曲线计算总皂苷含量。

以下提取条件比较试验均以苜蓿样品中总皂苷测定含量为考察指标，结果以齐墩果酸当量计。在保持其他操作条件一致的情况下，比较 50%、70%和 90%乙醇溶液的提取效果，确定适宜的乙醇提取浓度。

2.2 提取试剂的选择

苜蓿皂苷是一类由皂苷元与糖基结合形成的化合物，其结构同时具有亲水性和疏水性特征。乙醇与水组成的混合溶剂可通过改变乙醇比例调整溶剂性质，从

而影响皂苷的溶出及样品共存组分的提取。苜蓿样品基质较为复杂，提取过程中还可能带入色素及其他可溶性成分，因此，提取溶剂的选择应兼顾皂苷的提取效果和后续净化、显色测定的要求。

为确定适宜的乙醇浓度，本试验分别采用 50%、70%和 90%乙醇溶液对苜蓿样品进行提取。在试样质量、提取液体积、涡旋振荡时间、超声提取条件、低温放置条件及离心条件相同的情况下，将提取液按相同程序进行固相萃取净化和显色测定，通过齐墩果酸标准曲线计算总皂苷含量，比较不同乙醇浓度下的测定结果，结果见图 2。

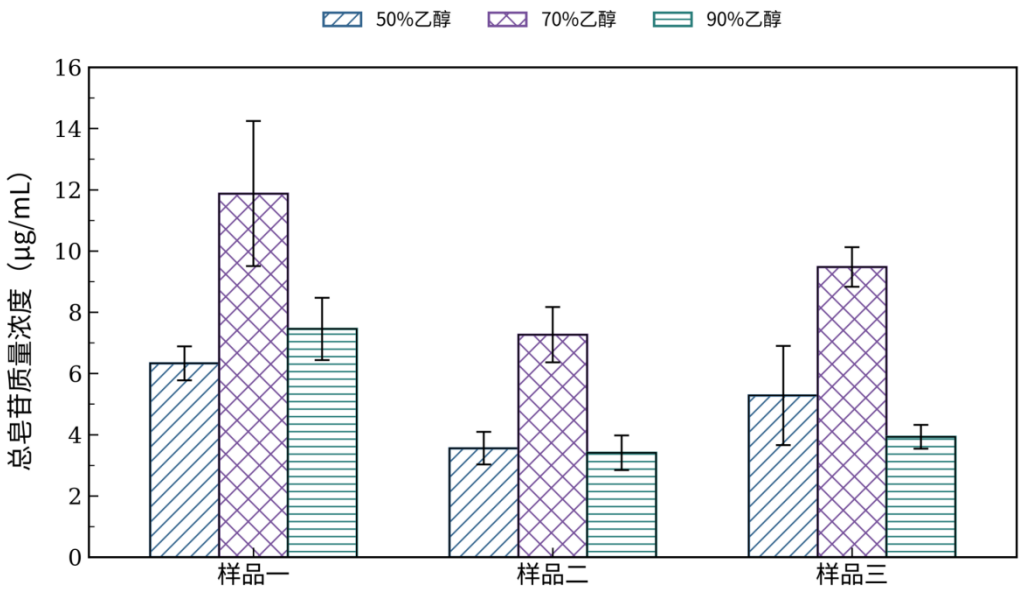


图 3 乙醇溶液浓度对苜蓿总皂苷提取效果的影响

试验结果表明，在所比较的三种乙醇浓度条件下，70%乙醇溶液提取所得的总皂苷测定含量最高，提取效果优于 50%和 90%乙醇溶液。因此，在本试验条件下，确定 70%乙醇溶液为适宜的提取溶剂，并将其作为本标准规定的提取试剂。

2.3 提取时间的选择

为确定适宜的提取程序，选取 3 个苜蓿样品，比较两种提取方案对总皂苷测定结果的影响：一是室温下连续超声提取 60 min；二是室温下超声提取 30 min，于 4℃放置过夜后，再次在室温下超声提取 30 min。两种方案的超声提取总时间均为 60 min，在试样质量、70%乙醇溶液用量及后续净化、显色和测定条件一致的情况下，以总皂苷质量浓度为考察指标，比较增加低温过夜步骤后的提取效果，结果见图 3。

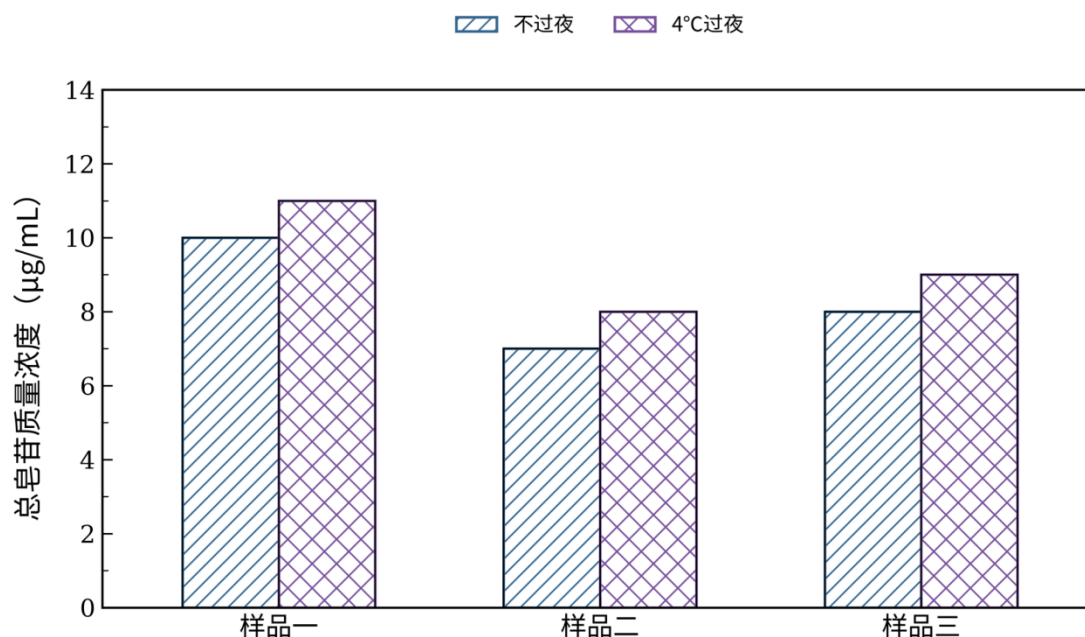


图 4 提取时间对苜蓿总皂苷提取效果的影响

试验结果表明, 采用 4℃过夜后再次超声提取的方案, 样品一、样品二和样品三的总皂苷质量浓度分别为 11、8 和 9 μg/mL; 采用不过夜、连续超声提取 60 min 的方案, 对应质量浓度分别为 10、7 和 8 μg/mL。三个样品采用过夜方案所得的总皂苷质量浓度均较高, 表明在本试验条件下, 增加 4℃过夜步骤有利于提高总皂苷的提取效果。

因此, 本标准选择室温下超声提取 30 min、于 4℃放置过夜后再次在室温下超声提取 30 min 的提取程序。上述总皂苷质量浓度均以齐墩果酸当量计。

2.4 SPE 柱子洗脱条件的优化

由表 1 所示, 经过 4 mL 和 5 mL 甲醇洗脱后, 洗脱液中齐墩果酸的含量与上柱前的齐墩果酸含量是一致的, 说明经过 4mL 甲醇洗脱后齐墩果酸样品基本可以被洗脱。故实验确定 SPE 柱洗脱条件为: 超纯水和 30%甲醇分别淋洗 5 次, 每次 1mL, 再用 1mL (1mL·min⁻¹) 甲醇洗脱 4 次, 收集甲醇洗脱液, 进行比色测定。

表 1 不同洗脱体积的比较

洗脱体积(mL)	吸光度	上样量 (μg)	测得量 (μg)	洗脱率 (%)
0	0.5969	-	79.2	-
1	0.4216	79.2	56.2	70.9
2	0.5409	79.2	71.82	90.7
3	0.5789	79.2	76.82	97.0
4	0.5975	79.2	79.3	100.1
5	0.5965	79.2	79.1	99.9

2.5 样品前处理方法比较优化

根据乙醇溶液浓度及提取程序的比较结果,确定采用 70%乙醇溶液提取,并在两次超声提取之间增加 4℃过夜步骤。准确称取粉碎、混匀后的苜蓿粉末 30 mg,加入 1 mL 70%乙醇溶液,涡旋振荡 3 min,室温下超声提取 30 min,于 4℃放置过夜后,再次在室温下超声提取 30 min,以 $10000 \times g$ 离心 30 min,取上清液进行后续固相萃取净化及显色测定。

2.6 样品基质效应

苜蓿样品经乙醇溶液提取后,提取液中除皂苷外,还可能含有色素及其他共存组分。这些组分可能产生背景吸收或影响显色反应,从而干扰总皂苷的分光光度测定。因此,样品前处理不仅需要提取皂苷,还需控制共存组分对后续测定的影响。

本标准采用固相萃取对样品提取液进行净化。取提取上清液,氮气吹干后用纯水重悬,注入经预处理的固相萃取微柱,分别用超纯水和 30%甲醇溶液冲洗,再用纯甲醇洗脱,收集并合并洗脱液,用于后续显色测定。该步骤用于减少共存组分进入显色体系,控制样品基质干扰。

测定过程中,设置按相同操作程序制备的空白对照,并保持标准溶液与样品溶液的显色试剂用量、反应温度、反应时间及测定前放置时间一致,减少试剂背景和条件差异对检测结果的影响。上述措施用于控制潜在干扰,其控制效果需结合加标回收等方法学验证结果进行评价。

3 方法学评价

3.1 标准曲线

准确移取适量齐墩果酸标准储备溶液（1 mg/mL），用甲醇稀释，配制成质量浓度为 5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL 和 100 μg/mL 的系列标准工作溶液，现用现配。

分别取各浓度标准工作溶液 1 mL 置于比色管中，另取 1 mL 甲醇作为空白对照。将各管于 80℃水浴蒸干，加入 5%香草醛—冰醋酸溶液 200 μL 和高氯酸 800 μL，于 70℃水浴中反应 15 min，立即冰浴冷却，加入冰醋酸 5 mL，混匀并静置 20 min。以空白对照管中的溶液为参比，在 545 nm 波长下测定吸光度。

以齐墩果酸标准工作溶液的质量浓度为横坐标（x，μg/mL），对应吸光度为纵坐标（y），进行线性回归分析，获得标准曲线回归方程及决定系数（R²）。在 5~100 μg/mL 范围内，回归方程为 $y=0.0089x-0.016$ ，R²为 0.9988。结合各浓度点的拟合情况，评价该浓度范围内的线性关系，确定其是否满足本方法的定量要求。

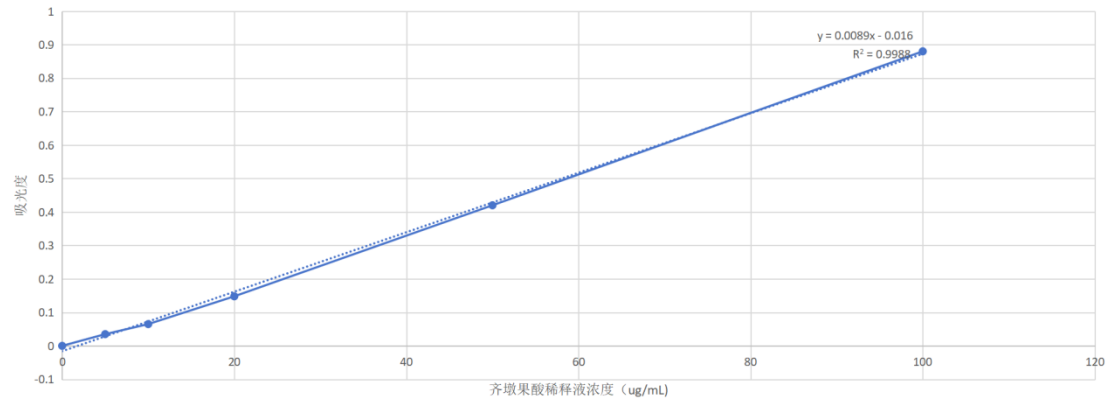


图 5 齐墩果酸标准曲线回归方程

表 2 齐墩果酸线性回归方程及相关系数

化合物	线性范围（μg/mL）	线性方程	相关系数
齐墩果酸	5~100	$y=0.0089x-0.016$	0.9988

标准曲线及回归结果分别见图 5 和表 1。样品测定时，由吸光度和标准曲线回归方程计算相应质量浓度，再结合取样量、提取体积及分取比例等参数，计算以齐墩果酸当量表示的总皂苷含量。

3.2 方法的灵敏度

本方法采用齐墩果酸标准曲线对苜蓿及其产品中的总皂苷进行定量。方法灵敏度的评价应结合标准曲线、样品前处理过程及低含量样品的测定情况开展。由标准曲线获得的溶液质量浓度，应按本方法规定的试样质量、提取体积、分取比例及稀释倍数等参数换算为样品中的总皂苷含量，结果以齐墩果酸当量计，单位为毫克每克（mg/g）。采用 GB/T 27417-2017《合格评定化学分析方法确认和验证指南》中校准方程的适用范围评估方法检出限（LOD）和定量限（LOQ）。即测定一组标准曲线溶液，并重复测定同一皂苷样品 20 次，代入下列公式（1）和公式（2）计算，得到苜蓿中皂苷测定的 LOD 为 0.28 mg/g，LOQ 为 0.95 mg/g。因此，确定本试验的 X_{LOD} 为 0.3 mg/g， X_{LOQ} 为 1.0 mg/g。

$$X_{LOD} = 3S/b \quad (1)$$

$$X_{LOQ} = 10S/b \quad (2)$$

式中：S—样品重复测定 20 次的校准标准误差；b—标准曲线线性回归方程的斜率。

3.3 方法的精密度

按试验前处理方法提取苜蓿中总皂苷并用分光光度计法测定其浓度，计算总皂苷含量和批内相对标准偏差（RSD），结果见表 3。按同样的方式进行 6 个批次试验，计算批间相对标准偏差（RSD），结果见表 4。由表 3 和表 4 可知，相对标准偏差符合 GB/T27404 的要求，说明试验具有很好的重复性，精密度高。

表 3 批内精密度（n=6）

基质	实测值（mg/g）						平均值 （mg/g）	RSD （%）
	1	2	3	4	5	6		
苜蓿样品 1	6.91	6.73	6.70	6.63	6.92	6.71	6.77	1.77
苜蓿样品 2	6.88	7.49	7.35	7.03	7.22	7.21	7.20	3.03
苜蓿样品 3	3.96	4.07	4.34	4.14	4.23	4.30	4.17	3.46

表 4 批间精密度 (n=6)

基质	实测值 (mg/g)						平均值 (mg/g)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6		
苜蓿样品 4	2.85	2.77	2.84	3.22	3.25	3.22	3.03	7.52
苜蓿样品 5	1.76	1.76	1.64	1.87	1.91	1.72	1.78	5.45
苜蓿样品 6	2.09	1.98	1.87	1.98	2.05	2.13	2.02	4.68

3.4 方法的准确度

采用加标回收试验评价本方法在苜蓿样品中的准确度。选取 3 个具有代表性的苜蓿样品,按照本标准规定的方法进行独立平行测定,以未加标样品的总皂苷平均测定含量作为本底测定值,结果以齐墩果酸当量计。

结合样品本底测定值和标准曲线的适用范围,分别设置本底值的 50%、100% 和 150%三个加标水平。准确称取苜蓿试样,在提取前分别加入相应量的齐墩果酸标准溶液。各加标水平进行 6 次独立平行测定,加标样品与未加标对照均按照相同的提取、净化、显色及分光光度测定程序进行处理。加标后待测溶液的响应应处于标准曲线适用范围内;超出范围时,按规定进行适当稀释并计入计算。根据下列公式(3)计算回收率。由表 5 可知,3 种样品的平均回收率均在 91%~106% 范围内,符合 GB/T 27404 要求,说明试验准确度高。

$$\text{回收率} = (\text{A}-\text{B}) / \text{C} \times 100\% \quad (3)$$

式中: A—加标后样品中总皂苷含量的数值 (mg/g);

B—样品中总皂苷含量的数值 (mg/g);

C—齐墩果酸标准品添加量的数值 (mg/g)。

分别计算各样品、各加标水平的回收率及回收率的相对标准偏差,结果见表 5。三个样品的平均回收率为〔填写实际范围〕,回收率的相对标准偏差为〔填写实际范围〕。本试验结果反映齐墩果酸在规定样品基质及操作条件下的加标回收情况,作为本方法准确度评价的依据之一。

表 5 苜蓿样品中齐墩果酸加标回收试验结果 (n=6)

样品名称	本底值 (mg/g)	添加量 (mg/g)	回收率 (%)						RSD (%)
苜蓿样品 4	3.03	1.515	87.01	87.75	84.53	91.95	99.38	91.95	5.82
		3.030	105.36	99.17	90.51	86.68	94.22	95.46	6.87
		4.545	106.52	99.93	89.92	94.98	102.40	99.10	5.85
苜蓿样品 5	1.78	0.890	103.15	115.57	111.57	98.94	90.52	94.73	9.46
		1.799	106.31	108.42	102.10	112.63	102.10	104.21	3.85
		2.669	104.56	110.75	98.94	86.31	96.14	93.33	8.72
苜蓿样品 6	2.02	1.011	92.59	85.18	103.70	107.81	92.59	107.40	9.55
		2.022	114.81	96.29	111.11	103.70	98.14	105.55	6.85
		3.034	106.17	88.88	102.46	101.23	98.76	96.06	6.05

3.5 实际样品测定

按所建立的方法,对转基因苜蓿和对应的原型苜蓿样本中总皂苷的含量进行测定。结果显示,耐草甘膦苜蓿样品中总皂苷含量为 4.17 mg/g,原型苜蓿样品中总皂苷含量为 4.32 mg/g。

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

(一) 实验室间方法学验证及数据

将统一制备的苜蓿样品,同时送至吉林省农业科学院(中国农业科技东北创新中心)畜牧业质量安全技术中心(实验室1)、天津市农业科学院畜牧兽医研究所(实验室2)、山东省农业科学院家禽研究所(实验室3)进行方法学验证,分别对标准曲线的线性相关系数、精密度、准确度进行验证。

表 6 线性回归方程及相关系数

验证单位	线性范围 (μg/mL)	线性方程	相关系数
实验室 1	5~100	$y = 0.0064x + 0.0024$	0.9985
实验室 2	5~100	$y = 0.0064x + 0.001$	0.9991
实验室 3	5~100	$y = 0.0063x + 0.0002$	1

表 7 精密度 (n=6)

样品编号	批内 RSD (%)			样品编号	批间 RSD (%)		
	实验室 1	实验室 2	实验室 3		实验室 1	实验室 2	实验室 3
苜蓿样品 I	1.77	2.59	2.43	苜蓿 4	1.33	1.34	2.05
苜蓿样品 II	2.80	3.01	2.48	苜蓿 5	2.35	5.17	2.42
苜蓿样品 III	2.29	2.96	2.72	苜蓿 6	4.83	7.76	2.42

表 8 准确度 (n=6)

样品编号	实验室 1		实验室 2		实验室 3	
	添加量 (mg/g)	平均回收率 (%)	添加量 (mg/g)	平均回收率 (%)	添加量 (mg/g)	平均回收率 (%)
苜蓿样品 I	1.75	87.06±5.14	1.73	89.34±2.88	1.76	91.00±4.93
	3.49	96.27±5.32	3.46	112.20±4.65	3.52	102.80±2.72
	5.24	106.47±4.54	5.19	108.61±3.11	5.28	108.93±2.28
苜蓿样品 II	0.99	92.11±5.52	0.90	104.05±12.49	0.99	98.49±7.85
	1.97	91.67±8.55	1.80	106.21±7.60	1.98	94.58±10.18
	2.96	98.25±1.57	2.70	109.34±2.42	2.97	101.57±1.75
苜蓿样品 III	0.96	97.30±7.64	0.91	92.49±10.55	0.97	101.37±4.58
	1.92	104.86±5.20	1.81	95.38±11.80	1.93	103.84±5.68
	2.88	92.97±2.05	2.72	92.00±4.27	2.90	93.70±2.89

（二）主要试验结论

本试验是针对分光光度计检测全草苜蓿样品中皂苷含量进行的方法学验证。对以下七个方面进行了试验分析：包括样品前处理条件、仪器分析条件、标准曲线相关系数、方法检出限和定量限、方法精密度、方法准确度以及实验室间方法学验证。通过验证以证明所采用的试验方法及试验条件适合苜蓿样品中皂苷的检测。

（三）预期经济效益、社会效益、生态效益

本文件的内容主要针对生物育种产品中转基因生物的食用安全评价，标准的制定和实施是保障我国转基因生物技术产业健康发展的重要技术支撑，是一项社会公益性事业。农业农村部科技发展中心组织制定并发布实施的一批转基因植物及其产品食用安全检测标准，为我国的转基因生物技术安全健康发展起到了积极的促进作用，为我国转基因作物安全评价提供了科学手段和标准技术方法。标准的实施将会产生良好的社会效益，由此促进生物技术产业的发展，保障食品安全，将间接产生巨大的经济效益。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

目前，尚未检索到国际、国内同类标准。

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

本标准未检索到相关国际标准。

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，遵循政策性和协调同一性的原则，与现行相关法律、法规和强制性标准没有冲突。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准制定过程中，标准编制小组查阅了国内外相关文献资料，向高校、检测机构、企业等单位有关专家广泛征求意见，并将按照征求的意见、预审和终审专家意见进行修改、完善。本标准制定实验过程、征求意见、审定会上均未出现重大意见分歧。

八、涉及专利的有关说明

本文件不涉及特定的专利。

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

本标准作为成分检验方法标准，并不涉及人身健康和生命财产安全、国家安全、生态环境安全以及满足经济社会管理基本需要等有关强制性地方标准或强制性条文等的要求，建议将其作为推荐性标准颁布实施。其实施旨在将转基因植物及其产品食用安全的检测工作推向更加科学、规范的方向发展，为政府管理部门在食品安全监管、营养评估及产业政策制定等方面提供更具公信力与一致性的科学依据。为确保标准得以快速有效实施，现提出如下宣传贯彻的建议。

（一）加强宣传推广

在行业媒体、专业自媒体及相关公众号平台发布标准内容，并借助有关行政管理与技术推广机构开展权威解读与系统宣贯。同时，积极利用各类行业会议、专题研讨会等场合，面向行业内外开展多渠道、多层次的宣传推广工作。

（二）组织培训与贯彻

面向高校、科研院所、检测机构和企业等相关单位人员组织开展标准专题培训。通过标准解读、实操培训以及新媒体平台信息推送等多种形式，提升各方对标准的理解深度与执行能力。

（三）实施安排

建议本标准自正式批准发布至实施日期之间的过渡期定为 6 个月。

十、其他应当说明的事项

无。