



中华人民共和国国家标准

GB/T 22251—202×

代替 GB/T 22251—2008

保健食品中葛根素的测定

Determination of puerarin in health foods

×××××-××-×××发布

×××××-××-×××实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件规定了食品质量相关技术要求，食品安全相关要求见有关法律法规、政策和食品安全标准等文件。

本文件代替 GB/T 22251—2008《保健食品中葛根素的测定》，与 GB/T 22251—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了范围的适用界限(见第 1 章,2008 年版的第 1 章)；
- b) 更改了原理的内容(见第 4 章,2008 年版的第 2 章)；
- c) 更改了试剂和材料的要求(见第 5 章,2008 年版的第 3 章)；
- d) 更改了设备的要求(见第 6 章,2008 年版的第 4 章)；
- e) 增加了试样制备的内容(见 7.1),更改了试样的处理方法(见 7.2,2008 年版的 5.1),更改了色谱参考条件(见 7.3.1,2008 年版的 5.3)；
- f) 更改了方法的检出限、定量限(见第 10 章,2008 年版的第 1 章)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国特殊食品标准化技术委员会(SAC/TC 466)提出并归口。

本文件起草单位：南京市食品药品监督检验院、中轻技术创新中心有限公司、中检科(北京)测试技术有限公司、劲牌有限公司、斯坦德科创医药科技(青岛)有限公司、无限极(中国)有限公司、中国食品发酵工业研究院有限公司、河北省食品检验研究院、天津科技大学。

本文件主要起草人：孙小杰、钟其顶、武竹英、王楠、刘明、李强、王闻、张翠英、黄美山、史国华、杨军、王亚楠、陈楠楠、郭新光、王玉梅、刘洋、张岩、周靖宇、高桂琴、杨峰、田世民。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2008 年首次发布为 GB/T 22251—2008；

——本次为第一次修订。

保健食品中葛根素的测定

1 范围

本文件描述了保健食品中葛根素的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于软胶囊、硬胶囊、片剂、粉剂、颗粒剂、口服液、酒剂等剂型形态的保健食品中葛根素的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的葛根素经 50% 甲醇溶液提取后，必要时经固相萃取柱净化，高效液相色谱分离，紫外检测器检测，以保留时间定性，外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 试剂

5.1.1 水，按 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1.2 甲醇(CH_3OH)：色谱纯。

5.1.3 甲醇(CH_3OH)。

5.1.4 乙腈(CH_3CN)：色谱纯。

5.1.5 磷酸(H_3PO_4)：优级纯。

5.1.6 石油醚：沸程 30℃～60℃。

5.2 试剂配制

5.2.1 0.1% (体积分数) 磷酸溶液：量取 1.0 mL 磷酸(5.1.5)，加水稀释至 1 000 mL，混匀。

5.2.2 50% (体积分数) 甲醇溶液：量取 50 mL 甲醇(5.1.3)，加水稀释至 100 mL，混匀。

5.2.3 15%(体积分数)甲醇溶液:量取 15 mL 甲醇(5.1.3),加水稀释至 100 mL,混匀。

5.2.4 70%(体积分数)甲醇溶液:量取 70 mL 甲醇(5.1.2),加水稀释至 100 mL,混匀。

5.3 标准物质或标准样品

葛根素($C_{21}H_{20}O_9$, CAS 号:3681-99-0);纯度不低于 95%,或经国家认证并授予证书的标准物质或标准样品。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 葛根素标准储备溶液(2 mg/mL):称取 20 mg 葛根素标准物质或标准样品(精确至 0.1 mg),用 70%(体积分数)甲醇溶液(5.2.4)溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,混匀,2℃~8℃条件下保存,有效期 1 个月。

5.4.2 葛根素标准工作溶液(200 μg/mL):移取 1 mL 葛根素标准储备溶液(5.4.1),用 70%(体积分数)甲醇溶液(5.2.4)定容至 10 mL 容量瓶中,混匀,2℃~8℃条件下保存,有效期 7 天。

5.5 系列标准工作溶液配制

分别移取葛根素标准工作溶液(5.4.2)0.05 mL(必要时)、0.25 mL、0.5 mL 于 10 mL 容量瓶中,用 70%(体积分数)甲醇溶液(5.2.4)稀释并定容;再分别移取葛根素标准储备溶液(5.4.1)0.25 mL、0.5 mL、1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用 70%(体积分数)甲醇溶液(5.2.4)稀释并定容。制成葛根素质量浓度分别为 1 μg/mL(必要时)、5 μg/mL、10 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL 的系列标准工作溶液。临用现配。

5.6 材料

5.6.1 固相萃取柱:二乙烯苯/*N*-基吡咯烷酮亲水亲脂平衡型(500 mg/6 mL);或性能相当者。固相萃取小柱使用前依次使用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化。

5.6.2 微孔滤膜:0.45 μm,有机系。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器或相当者。

6.2 电子天平:感量 0.1 mg 和 0.001 g。

6.3 超声波清洗器。

6.4 涡旋混合器。

6.5 氮吹仪。

6.6 粉碎机。

6.7 高速离心机:转速不低于 8 000 r/min。

6.8 固相萃取装置。

7 分析步骤

7.1 试样制备

7.1.1 固体试样(硬胶囊、片剂、粉剂、颗粒剂等):片剂、粉剂、颗粒剂取不少于 20 粒或不少于 5 g 样

品,经高速粉碎机或研钵磨成粉状,混匀;硬胶囊取不少于 20 粒或不少于 5 g 样品,取其内容物,混匀,必要时研细。封存备用。

7.1.2 液体试样(口服液、酒剂等):取不少于 5 个最小规格包装或不少于 50 mL 样品,混合均匀,封存备用。

7.1.3 半固体试样(软胶囊等):取不少于 20 粒或不少于 5 g 样品,剪开,挤出内容物,混匀,封存备用。

7.2 试样处理

7.2.1 试样预处理

7.2.1.1 固体试样(硬胶囊、片剂、粉剂、颗粒剂等):称取 0.5 g~1 g 混合均匀的试样(精确至 0.001 g)置于刻度管中,加入 10 mL 50%(体积分数)甲醇溶液(5.2.2),充分混匀,称重,超声提取 20 min,冷却至室温,用 50%(体积分数)甲醇溶液(5.2.2)补足失重,混匀,8 000 r/min 离心 5 min 取上清液,经微孔滤膜(5.6.2)过滤,待测。

7.2.1.2 液体试样(口服液等):称取 0.5 g~1 g(精确至 0.001 g)或移取 0.5 mL~1 mL 混合均匀的试样置于刻度管中,加入 50%(体积分数)甲醇溶液(5.2.2) 8 mL,充分混匀,超声提取 20 min,冷却至室温,转移至 10 mL 容量瓶中,再用 50%(体积分数)甲醇溶液(5.2.2)定容,混匀,经滤膜(5.6.2)过滤,待测。

7.2.1.3 半固体试样(软胶囊等):称取 0.5 g~1 g 混合均匀的试样(精确至 0.001 g)置于刻度管中,加入 50%(体积分数)甲醇溶液(5.2.2) 8 mL,充分混匀,超声提取 20 min,冷却至室温,加入 1.5 mL 石油醚(5.1.6),涡旋混匀,8 000 r/min 离心 5 min,弃去上层石油醚层,转移下层样液至 10 mL 容量瓶中,用 50%(体积分数)甲醇溶液(5.2.2)定容,混匀,经微孔滤膜(5.6.2)过滤,待测。

注:必要时采取振摇提取的方式。

7.2.2 试样净化

预处理后溶液浑浊或测定时存在干扰峰时,需要经过固相萃取柱净化。移取 1.0 mL 上述试样(7.2)通过已活化的固相萃取柱(5.6.1),待样液完全流出后用 15%(体积分数)甲醇溶液(5.2.3) 5 mL 淋洗,弃去流出液,用 10 mL 甲醇(5.1.3)洗脱,收集所有洗脱液,60 °C 氮吹或旋转蒸发至干,加入 1.0 mL 70%(体积分数)甲醇溶液(5.2.4),涡旋混匀,经微孔滤膜(5.6.2)过滤,待测。

7.3 测定步骤

7.3.1 色谱参考条件

色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 或等效色谱柱;
- b) 流动相 A: 乙腈(5.1.4); 流动相 B: 0.1%(体积分数)磷酸溶液(5.2.1); 液相色谱梯度洗脱程序见表 1;
- c) 柱温: 30 °C;
- d) 进样体积: 10 μL;
- e) 检测波长: 247 nm。

表 1 液相色谱梯度洗脱程序

时间 min	流速 mL/min	流动相 A %	流动相 B %
0	1	12	88
12	1	12	88
20	1	40	60
25	1	40	60
25.1	1	12	88
35	1	12	88

7.3.2 标准曲线制作

将系列标准工作溶液(5.5)分别注入高效液相色谱仪中,测定各组分的峰面积,以相应标准工作溶液的质量浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。葛根素标准溶液(10 μg/mL)高效液相色谱图见附录 A 中的图 A.1。

7.3.3 试样溶液测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中,得到相应峰面积,根据标准曲线,以外标法计算待测试样溶液中葛根素的含量。必要时可根据试样中组分的含量,适当增加稀释倍数 f ,以不超出标准曲线测定范围。试样(片剂)中葛根素高效液相色谱图见图 A.2。

平行做两份试验。

8 计算结果与表述

试样中葛根素的含量按公式(1)计算:

$$X = \frac{\rho \times V \times f \times 100}{m \times 1\,000 \times 1\,000} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X —— 试样中葛根素的含量,单位为克每百克(g/100 g)或克每百毫升(g/100 mL);
 ρ —— 由标准曲线计算得到的待测液中葛根素的质量浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
 V —— 试样定容体积,单位为毫升(mL);
 m —— 试样质量或体积,单位为克(g)或毫升(mL);
 f —— 稀释倍数;
100、1 000 —— 单位换算系数。

结果保留三位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 10%。

10 检出限与定量限

固体或半固体试样:当称样量为 1 g,提取液体积或定容体积为 10 mL 时,方法检出限为 2×10^{-4} g/100 g,定量限为 6×10^{-4} g/100 g。

液体试样:当称样量为 1 g(或取样量为 1 mL),定容体积为 10 mL 时,方法检出限为 2×10^{-4} g/100 g(或 g/100 mL),定量限为 6×10^{-4} g/100 g(或 g/100 mL)。

附 录 A

(资料性)

葛根素标准溶液和试样高效液相色谱图

A.1 葛根素标准溶液(10 $\mu\text{g/mL}$)高效液相色谱图见图 A.1。

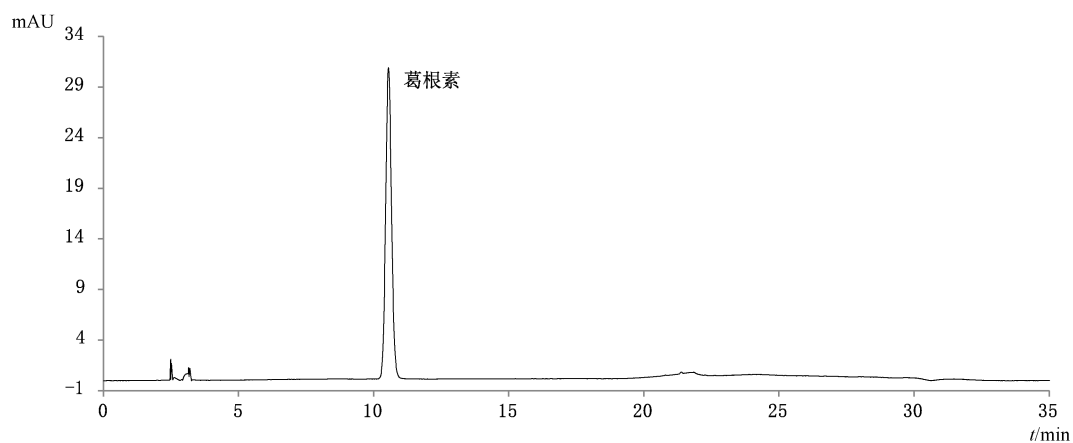


图 A.1 葛根素标准溶液(10 $\mu\text{g/mL}$)高效液相色谱图

A.2 试样(片剂)中葛根素高效液相色谱图见图 A.2。

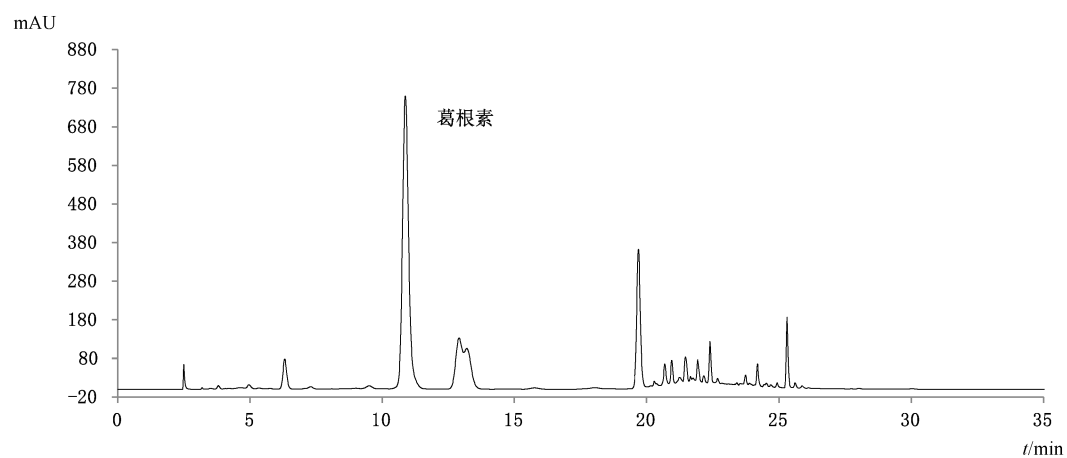


图 A.2 试样(片剂)中葛根素高效液相色谱图