



中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××—202×

代替 GB/T 23788—2009

保健食品中大豆异黄酮的测定

Determination of soybean isoflavones 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 23788—2009《保健食品中大豆异黄酮的测定方法 高效液相色谱法》，与 GB/T 23788—2009 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了文件的适用范围(见第 1 章,2009 年版的第 1 章)；
- b) 删除了术语“大豆异黄酮”(见 2009 年版的 3.1)；
- c) 更改了原理(见第 4 章,2009 年版的第 4 章)；
- d) 更改了标准曲线的制作方法(见 5.4,2009 年版的 5.8 和 5.9)；
- e) 更改了材料、仪器和设备(见 5.5 和第 6 章,2009 年版的第 6 章)；
- f) 更改了试样处理方法(见 7.1 和 7.2,2009 年版的 7.1)；
- g) 更改了色谱参考条件(见 7.3,2009 年版的 7.2)；
- h) 更改了标准曲线的制作和试样溶液的测定(见 7.4 和 7.5,2009 年版的 7.3)；
- i) 更改了大豆异黄酮的计算公式(见第 8 章,2009 年版的第 8 章)；
- j) 更改了检出限、定量限(见第 10 章,2009 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：无锡市食品安全检验检测中心、江中药业股份有限公司、斯坦德科创医药科技(青岛)有限公司、中轻技术创新中心有限公司、劲牌有限公司、河北晨光检测技术服务有限公司、黑龙江省质量监督检测研究院、北京同仁堂健康药业股份有限公司、天津科技大学、哈尔滨商业大学、中轻检验认证有限公司、江南大学、南京市食品药品监督检验院、河南大学、渤海大学、浙江省食品药品检验研究院。

本文件主要起草人：冯永巍、陈芳、王闻、钟其顶、武竹英、康春生、李强、李国辉、周宇、黎晨曼、张晓芳、沈晓芳、张宏、张翠英、张娜、王希平、佟晓芳、杨清山、吉鑫、徐浩然、熊晓通、查圣华、吴一凡、魏思宇、周士琦、孙小杰、康文艺、刘贺、顾文、梁晶晶、神雪、王玉梅、黄丽俊、焦利卫、韩璐、王磊。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2009 年首次发布为 GB/T 23788—2009；

——本次为第一次修订。

保健食品中大豆异黄酮的测定

1 范围

本文件描述了保健食品中大豆异黄酮的测定方法。

本文件适用于片剂、硬胶囊、软胶囊、口服液、酒剂、饮料剂型形态保健食品中大豆异黄酮的测定。

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

试样中大豆异黄酮经 80% 甲醇溶液提取后，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 乙腈(CH_3CN)：色谱纯。

5.1.3 甲醇(CH_3OH)：色谱纯。

5.1.4 二甲基亚砜($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)：色谱纯。

5.2 试剂配制

5.2.1 80% 甲醇溶液：量取 800 mL 甲醇(5.1.3)，加水稀释至 1 000 mL，混匀。

5.2.2 0.01% 磷酸水溶液：吸取 0.1 mL 磷酸，加水稀释至 1 000 mL，混匀。

5.2.3 50% 甲醇溶液：量取 50 mL 甲醇(5.1.3)，加水稀释至 100 mL，混匀。

5.3 标准样品/标准物质

5.3.1 大豆苷(Daidzin, $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$ ，CAS 号：552-66-9)：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予证书的标准

样品/标准物质。

5.3.2 大豆黄苷(Glycitin, $C_{22}H_{22}O_{10}$, CAS 号: 40246-10-4):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予证书的标准样品/标准物质。

5.3.3 染料木苷(Genistin, $C_{21}H_{20}O_{10}$, CAS 号: 529-59-9):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予证书的标准样品/标准物质。

5.3.4 大豆苷元(Daidzein, $C_{15}H_{10}O_4$, CAS 号: 486-66-8):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予证书的标准样品/标准物质。

5.3.5 大豆黄素(Glycitein, $C_{16}H_{12}O_5$, CAS 号: 40957-83-3):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予证书的标准样品/标准物质。

5.3.6 染料木素(Genistein, $C_{15}H_{10}O_5$, CAS 号: 446-72-0):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予证书的标准样品/标准物质。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 大豆异黄酮标准储备液(1 000 $\mu\text{g/mL}$)

称取大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、大豆黄素和染料木素标准样品(5.3)各 25 mg(精确至 0.1 mg,按标准样品纯度折算),分别加入 10 mL 二甲基亚砜(5.1.4),超声至充分溶解,转移至 25 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(5.1.3)定容至刻度,混匀。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中贮存,有效期 3 个月。

5.4.2 大豆异黄酮混合标准中间溶液

分别移取大豆苷、大豆黄苷、染料木苷三种标准储备液(5.4.1)各 2.5 mL,移取大豆苷元、大豆黄素、染料木素三种标准储备液(5.4.1)各 0.5 mL,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(5.1.3)定容至刻度,混匀。该大豆异黄酮混合标准溶液中大豆苷、大豆黄苷、染料木苷浓度分别为 250 $\mu\text{g/mL}$,大豆苷元、大豆黄素、染料木素浓度分别为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中贮存,有效期 3 个月。

5.4.3 大豆异黄酮系列标准工作液

分别移取混合标准中间溶液(5.4.2)0.02 mL、0.2 mL、0.4 mL、1.0 mL、2.0 mL,用 50% 甲醇溶液(5.2.3)定容至 5 mL,混匀。该系列标准浓度下,大豆苷、大豆黄苷、染料木苷浓度分别为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 、100.0 $\mu\text{g/mL}$,大豆苷元、大豆黄素、染料木素浓度分别为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、4.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 。临用现配。

5.5 材料

5.5.1 滤膜:0.45 μm ,有机系。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪:带紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 超声波清洗器。

6.3 分析天平:精确度 0.1 mg 和 0.001 g。

6.4 离心机:转速不低于 8 000 r/min。

6.5 高速粉碎机。

7 分析步骤

7.1 试样制备

不同剂型形态试样制备步骤如下。

- a) 固体试样(硬胶囊、片剂):片剂取不少于 20 片或不少于 10 g 样品,经高速粉碎机或研钵磨成粉状,混匀备用;硬胶囊取不少于 20 粒或不少于 10 g 样品,取其内容物,必要时研细,混匀备用。
- b) 半固体试样(软胶囊):取不少于 20 粒或不少于 10 g 样品,剪开,挤出内容物,必要时研细,混匀备用。
- c) 液体试样(口服液、酒剂、饮料):取不少于 5 个最小规格包装或不少于 50 mL(若试样因黏度或密度过大不宜量取体积,则以 g 为单位称取),混匀备用。

7.2 试样处理

7.2.1 固体试样(硬胶囊、片剂)、半固体试样(软胶囊)

准确称取样品 0.10 g~0.50 g(精确至 0.001 g),置于 50 mL 具塞离心管中,加入 40 mL 80%甲醇溶液(5.2.1),混合均匀后震荡 10 min,超声提取 20 min,冷却至室温,将试样溶液转移至 50 mL 容量瓶中。用 80%甲醇溶液(5.2.1)冲洗离心管,全部洗涤液转移至 50 mL 容量瓶中,并用 80%甲醇溶液(5.2.1)定容,摇匀。取适量溶液置于离心管中,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液,经 0.45 μm 滤膜(5.5.1)过滤,弃初滤液 1 mL,备用。

7.2.2 液体试样(口服液、酒剂、饮料)

准确移取混匀的液体样品 1.0 mL~5.0 mL 或 1.0 g~5.0 g,置于 50 mL 具塞离心管中,加入 40 mL 80%甲醇溶液(5.2.1),混合均匀后震荡 10 min,超声提取 20 min,冷却至室温,转移至 50 mL 容量瓶中。用 80%甲醇溶液(5.2.1)冲洗离心管,全部洗涤液转移至 50 mL 容量瓶中,并用 80%甲醇溶液(5.2.1)定容,摇匀。取适量溶液置于离心管中,8000 r/min 离心 5 min,取上清液,经 0.45 μm 滤膜(5.5.1)过滤,弃初滤液 1 mL,备用。

注 1: 酒剂等能与 80%甲醇溶液(5.2.1)完全混溶的样品,不经过震荡、超声提取和离心操作。

注 2: 根据试样中组分的含量,适当增加或减少稀释倍数 f ,使组分的质量浓度处于标准曲线测定范围内。

7.3 色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:AQ C₁₈柱(粒径 5.0 μm ,4.6 mm×250 mm),或等效亲水型色谱柱。
- b) 流动相:A 相为乙腈(5.1.2),B 相为 0.01%磷酸水溶液(5.2.2),梯度洗脱条件见表 1。
- c) 流速:1.0 mL/min。
- d) 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。
- e) 进样量:10 μL 。
- f) 波长:260 nm。

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0	12	88
10	18	82
23	24	76
30	30	70
50	30	70
55	80	20
56	12	88
60	12	88

7.4 标准曲线的制作

将大豆异黄酮系列标准工作液(5.4.3)由低浓度到高浓度依次注入高效液相色谱仪中,测定各组分相应的峰面积,以标准工作液中大豆异黄酮各组分质量浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。大豆异黄酮标准工作液(大豆苷、大豆黄苷、染料木苷的浓度为 100 μg/mL,大豆苷元、大豆黄素、染料木素的浓度为 20 μg/mL)高效液相色谱图见附录 A 的图 A.1。

7.5 试样溶液的测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中,得到各目标化合物相应的峰面积,根据标准曲线得到待测试样溶液中大豆异黄酮各组分的浓度。试样中大豆异黄酮高效液相色谱图见图 A.2。
平行做两份试验。

8 结果计算

8.1 试样中大豆异黄酮各组分[大豆苷(X_1)、大豆黄苷(X_2)、染料木苷(X_3)、大豆苷元(X_4)、大豆黄素(X_5)和染料木素(X_6)]的含量分别按公式(1)计算:

$$X_i = \frac{\rho_i \times V \times f}{m \times 1\,000 \times 1\,000} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:
 X_i ——样品中大豆异黄酮单一组分的含量,单位为克每百克(g/100 g)或克每百毫升(g/100 mL);
 ρ_i ——根据标准曲线得出的大豆异黄酮单一组分的浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
 V ——试样溶液体积,单位为毫升(mL);
 f ——试样溶液的稀释倍数;
 m ——试样取样量,单位为克或毫升(g 或 mL);
1 000、1 000、100 ——单位换算系数。

8.2 试样中大豆异黄酮总含量,按公式(2)计算:

$$X = X_1 + X_2 + X_3 + X_4 + X_5 + X_6 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X ——试样中大豆异黄酮总含量,单位为克每百克(g/100 g)或克每百毫升(g/100 mL);

X_1 ——试样大豆苷的含量,单位为克每百克(g/100 g)或克每百毫升(g/100 mL);

X_2 ——试样大豆黄苷的含量,单位为克每百克(g/100 g)或克每百毫升(g/100 mL);

X_3 ——试样染料木苷的含量,单位为克每百克(g/100 g)或克每百毫升(g/100 mL);

X_4 ——试样大豆苷元的含量,单位为克每百克(g/100 g)或克每百毫升(g/100 mL);

X_5 ——试样大豆黄素的含量,单位为克每百克(g/100 g)或克每百毫升(g/100 mL);

X_6 ——试样染料木素的含量,单位为克每百克(g/100 g)或克每百毫升(g/100 mL)。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,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

固体试样(硬胶囊、片剂)、半固体试样(软胶囊):当称样量为 0.10 g,定容体积为 50 mL 时,大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、大豆黄素、染料木素的检出限为 0.001 g/100 g,定量限为 0.003 g/100 g。

液体试样(口服液、酒剂、饮料):当取样量为 1.0 mL 或 1.0 g,定容体积为 50 mL 时,大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、大豆黄素、染料木素的检出限为 0.000 1 g/100 mL 或 0.0001 g/100 g,定量限为 0.000 3 g/100 mL 或 0.000 3 g/100 g。

附录 A

(资料性)

大豆异黄酮标准工作液和试样溶液高效液相色谱图

A.1 大豆异黄酮标准工作液(大豆苷、大豆黄苷、染料木苷的浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$,大豆苷元、大豆黄素、染料木素的浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$)高效液相色谱图见图 A.1。

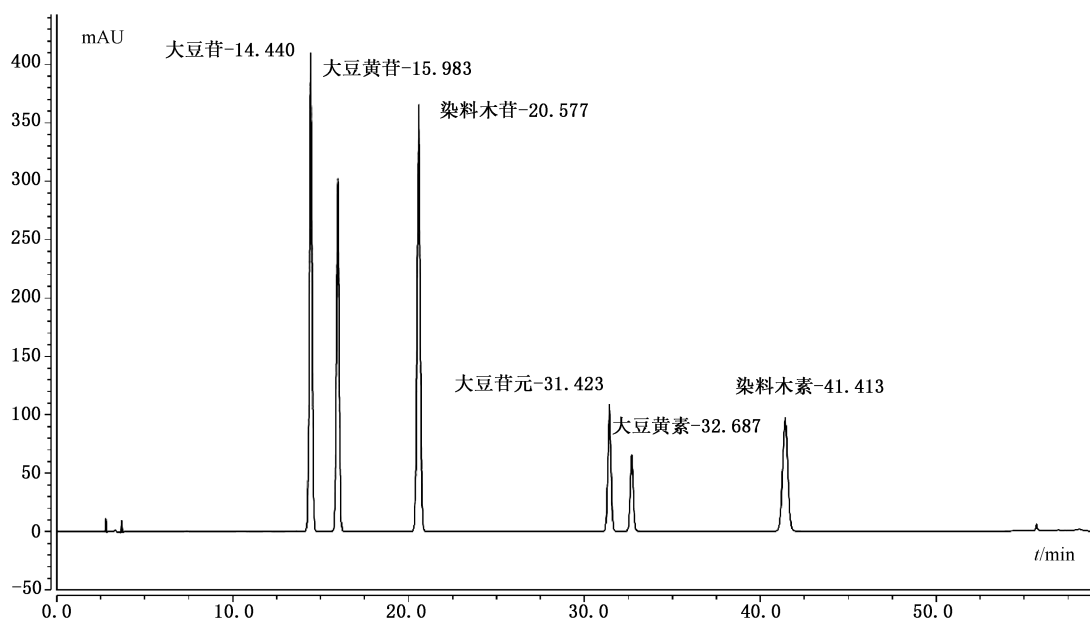


图 A.1 大豆异黄酮标准工作液(大豆苷、大豆黄苷、染料木苷的浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$,大豆苷元、大豆黄素、染料木素的浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$)高效液相色谱图

A.2 试样溶液中大豆异黄酮高效液相色谱图见图 A.2。

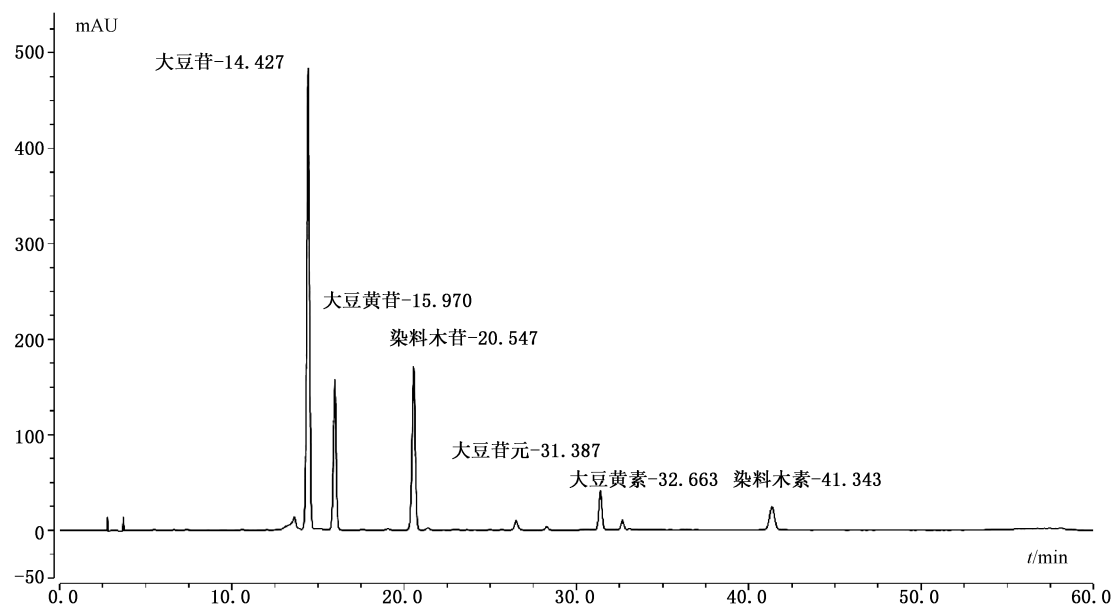


图 A.2 试样溶液中大豆异黄酮高效液相色谱图