



中华人民共和国国家标准

GB/T ××××—××××

代替 GB/T 22250—2008

保健食品中绿原酸的测定

Determination of chlorogenic acid 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 22250—2008《保健食品中绿原酸的测定》。与 GB/T 22250—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了适用范围(见第 1 章,2008 年版的第 1 章)；
- b) 更改了试样制备和试样处理(见 7.1、7.2,2008 年版的 5.1)；
- c) 更改了色谱参考条件(见 7.3,2008 年版的 5.3)；
- d) 更改了检出限、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：中轻技术创新中心有限公司、中国食品发酵工业研究院有限公司、深圳市计量质量检测研究院、中国海关科学技术研究中心、完美(广东)日用品有限公司、广州市东鹏食品饮料有限公司、天津科技大学、中轻检验认证有限公司、思茅海关综合技术服务中心。

本文件主要起草人：武竹英、钟其顶、张朝晖、张协光、刘明、李军波、胡海娥、蓝雄、张翠英、刘洋、吴一凡、陈楠楠、郭新光、别玮、韦建明、李学莉、祁正有、吉鑫、柴晓、曾倡斌、张鑫。

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 22250—2008；
- 本次为第一次修订。

保健食品中绿原酸的测定

1 范围

本文件描述了保健食品中绿原酸的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于片剂、硬质糖果、硬胶囊、软胶囊、口服液、饮料等剂型形态的保健食品中的绿原酸的测定。

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

试样中的绿原酸用 70% 甲醇溶液提取，经高效液相色谱分离，紫外检测器检测，以保留时间定性，外标法定量。

5 试剂或材料

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(C₂H₃N)：色谱纯。

5.1.3 石油醚(沸程 30℃~60℃)。

5.2 试剂配制

5.2.1 70%(体积分数)甲醇溶液：量取 700 mL 甲醇(色谱纯)，用水定容至 1 000 mL，混匀。

5.2.2 0.1%(体积分数)磷酸溶液：移取磷酸 1 mL，用水定容至 1 000 mL，混匀。

5.3 标准物质或标准样品

绿原酸(C₁₆H₁₈O₉，CAS 号：327-97-9)：纯度不低于 98%，或经国家认证并授予证书的标准物质或标准样品。

5.4 溶液配制

5.4.1 绿原酸标准储备溶液(2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$):称取 20 mg(精确至 0.1 mg)绿原酸标准物质或标准样品(5.3),用甲醇(色谱纯)溶解并定容至 10 mL 容量瓶中,混匀,于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 1 个月。

5.4.2 绿原酸标准中间溶液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$):移取 1 mL 标准储备溶液(5.4.1),用 70%甲醇溶液(5.2.1)定容至 10 mL 容量瓶中,混匀,于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 1 周。

5.4.3 绿原酸系列标准工作溶液:分别移取 0.02 mL、0.1 mL、0.5 mL、1.25 mL、2.5 mL 绿原酸标准中间溶液(5.4.2),用 70%甲醇溶液(5.2.1)定容至 10 mL 容量瓶中,混匀,使绿原酸系列标准工作溶液的质量浓度分别为 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。临用现配。

5.5 材料

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 天平:精确度 0.1 mg 和 0.001 g。

6.3 超声波清洗器。

6.4 高速离心机:转速不低于 8 000 r/min。

6.5 涡旋振荡器。

6.6 氮吹仪。

7 分析步骤

7.1 试样制备

7.1.1 固体试样(片剂、硬质糖果、硬胶囊等):片剂、硬质糖果取不少于 20 片或不少于 5 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 5 g 样品,取其内容物,研细(必要时),混匀备用;

7.1.2 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,混匀备用。

7.1.3 液体试样(口服液、饮料等):取不少于 5 个最小规格包装或不少于 50 mL,混匀备用。

7.2 试样处理

7.2.1 片剂、硬胶囊等固体试样

称取 1 g(精确至 0.001 g)混合均匀的试样置于刻度管中,加入 20 mL 70%甲醇溶液(5.2.1),摇匀,超声波振荡提取 30 min,冷却至室温,将提取液全部转移至 25 mL 容量瓶中,用 70%甲醇溶液(5.2.1)定容,摇匀。如定容后溶液混浊,转移至 50 mL 离心管,8 000 r/min 离心 5 min。取上清液经滤膜(5.5)过滤,待测。

7.2.2 硬质糖果等固体试样

称取 1 g(精确至 0.001 g)混合均匀的试样置于刻度管中,加入 6 mL 水振荡溶解后,加入 14 mL 甲醇(色谱纯),摇匀,超声波振荡提取 30 min,冷却至室温,将提取液全部转移至 25 mL 容量瓶中,用 70%甲醇溶液(5.2.1)定容,摇匀。如定容后溶液混浊,转移至 50 mL 离心管,8 000 r/min 离心 5 min。

取上清液经滤膜(5.5)过滤,待测。

7.2.3 软胶囊等半固体试样

称取 1 g(精确至 0.001 g)混合均匀的试样置于刻度管中,加入 15 mL 石油醚(5.1.3),涡旋振荡 1 min,以 3 000 r/min 离心 10 min,弃去上层溶剂后再重复一次,氮吹将剩余溶剂挥干,加入 20 mL 70%甲醇溶液(5.2.1),摇匀,超声波振荡提取 30 min,冷却至室温,将提取液全部转移至 25 mL 容量瓶中,用 70%甲醇溶液(5.2.1)定容,摇匀。如定容后溶液混浊,转移至 50 mL 离心管,8 000 r/min 离心 5 min。取上清液经滤膜(5.5)过滤,待测。

7.2.4 口服液、饮料等液体试样

称取 1 g(精确至 0.001 g)混合均匀的试样置于刻度管中,加入 20 mL 70%甲醇溶液(5.2.1),摇匀,超声波振荡提取 30 min,冷却至室温,将提取液全部转移至 25 mL 容量瓶中,用 70%甲醇溶液(5.2.1)定容,摇匀。如定容后溶液混浊,转移至 50 mL 离心管,8 000 r/min 离心 5 min。取上清液经滤膜(5.5)过滤,待测。

7.3 色谱参考条件

色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:C₁₈柱(粒径 5 μm,4.6 mm×250 mm),或等效色谱柱;
- b) 流动相:A相为乙腈(5.1.2),B相为 0.1%磷酸溶液(5.2.2),梯度洗脱条件见表 1;
- c) 流速:1.0 mL/min;
- d) 检测波长:327 nm;
- e) 柱温:35 ℃;
- f) 进样量:10 μL。

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0	10	90
5	10	90
18	40	60
18.5	80	20
20	80	20
21	10	90
25	10	90

7.4 标准曲线的制作

将绿原酸系列标准工作溶液分别注入高效液相色谱仪中,测定其峰面积,以标准系列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。绿原酸标准溶液(50 μg/mL)高效液相色谱图见附录 A 中的图 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,通过保留时间定性,得到待测物的峰面积,根据标准曲线得到待测试样溶液中绿原酸的质量浓度。若待测物含量超出标准曲线的测定范围,应使用 70% 甲醇溶液(5.2.1)进行稀释,使其上机质量浓度在线性范围内再进行定量。试样(硬质糖果)中绿原酸高效液相色谱图见图 A.2。

平行做两份试验。

8 结果计算和表述

试样中绿原酸的含量按公式(1)进行计算:

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

式中:

- X —— 试样中绿原酸的含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);
- ρ —— 由标准曲线得到的试样溶液中绿原酸的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- V —— 试样定容体积,单位为毫升(mL);
- f —— 稀释倍数;
- m —— 试样的取样量,单位为克(g);
- 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

当取样量为 1 g 时,检出限为 0.3 mg/100 g,定量限为 1 mg/100 g。

附录 A

(资料性)

绿原酸标准溶液和试样液相色谱图

A.1 绿原酸标准溶液(50 μg/mL)高效液相色谱图见图 A.1。

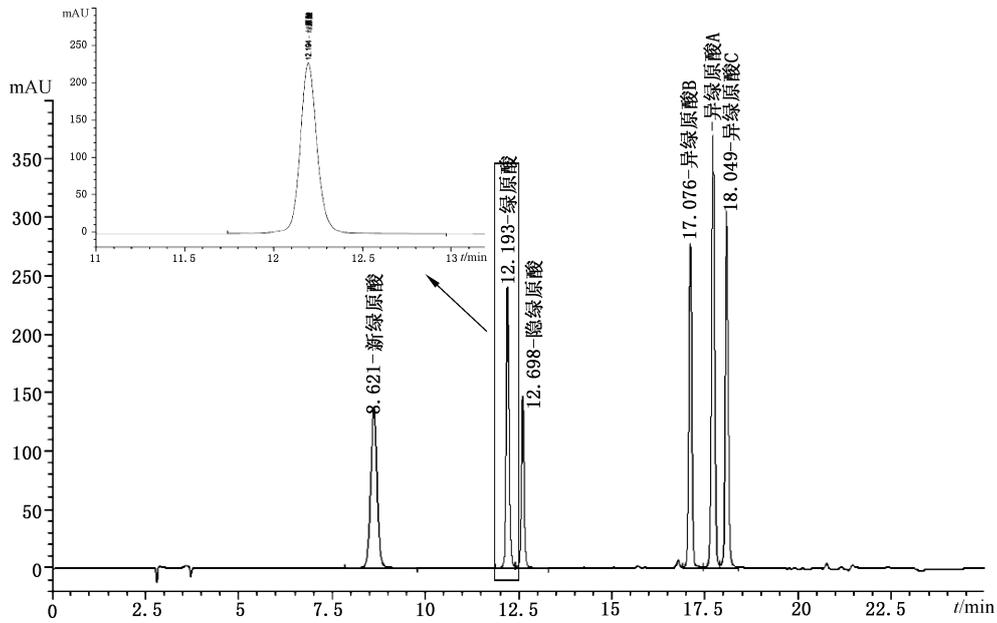


图 A.1 绿原酸标准溶液(50 μg/mL)高效液相色谱图

A.2 试样(硬质糖果)中绿原酸高效液相色谱图见图 A.2。

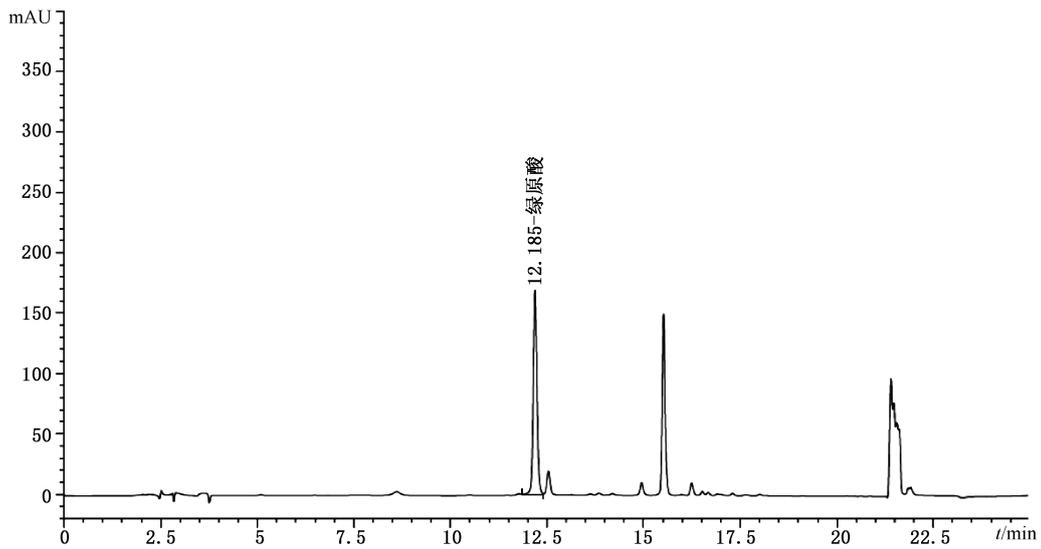


图 A.2 试样(硬质糖果)中绿原酸高效液相色谱图