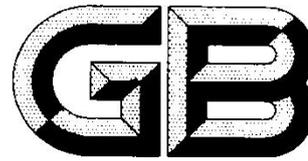


ICS 67.050
CCS X83



中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX
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

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 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》。

本文件与GB/T 23788-2009相比，除结构调整和编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 增加了试样制备；
- 优化了前处理条件和色谱条件；
- 修改了检出限和定量限；

本文件由全国特殊食品标准化技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：略。

本文件主要起草人：略。

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、酒剂等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

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 大豆异黄酮 soybean isoflavone

大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素6种黄酮类物质的总称。

4 原理

试样经 80%甲醇溶液提取、过滤后，经高效液相色谱(烷基键合的表面多孔型反向色谱柱)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，仅使用色谱纯试剂。

5.1 试剂

5.1.1 水，按 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1.2 乙腈（CH₃CN）。

5.1.3 甲醇（CH₃OH）。

5.1.4 二甲基亚砷（C₂H₆OS）。

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 1000 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 1000 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 标准物质或标准样品

5.3.1 大豆苷标准品（ $C_{21}H_{20}O_9$, CAS: 552-66-9）标准品：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予证书的标准物质或标准样品。

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

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

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

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

5.3.6 染料木素标准品（ $C_{15}H_{10}O_5$, CAS: 446-72-0）标准品：纯度 $\geq 98\%$ ，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 大豆异黄酮标准储备液（1000 $\mu\text{g/mL}$ ）

精密称取大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素各约 25 mg，分别置于 25 mL 棕色容量瓶中，加入 5 mL~15 mL 二甲基亚砜（5.1.4）超声至充分溶解，用甲醇定容至刻度，混匀，使浓度约为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 。在 4°C 冰箱中贮存，有效期 3 个月。

5.4.2 大豆异黄酮混合标准溶液

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

5.4.3 大豆异黄酮标准系列工作液

分别精密移取混合标准溶液（5.4.2）0.2 mL、2.0 mL、4.0 mL、10.0 mL、20.0 mL，用 50% 甲醇溶液（5.2.3）定容至 50 mL，混匀。该标准系列浓度下，大豆苷、黄豆黄苷、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、黄豆黄素、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 $\mu\text{g/mL}$ 。

5.5 材料

5.5.1 微孔滤膜：0.45 μm ，有机相。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：带紫外检测器或相当者。

6.2 超声波清洗器。

6.3 分析天平：感量 0.1 mg。

6.4 离心机：转速不低于 8000 r/min。

6.5 高速粉碎机。

7 分析步骤

7.1 试样制备

- a) 固体（硬胶囊、片剂等）：取不少于20粒或不少于10 g样品，硬胶囊取内容物，必要时经高速粉碎机或研钵磨成粉状，封存备用；
- b) 半固体（软胶囊）：取不少于20粒或不少于10 g样品，剪开，挤出内容物，研细（必要时）混匀；
- c) 液体（口服液、酒剂）：取5支独立包装样品（如有），混合均匀，试样测定前振摇混匀。

7.2 试样处理

7.2.1 固体样品、半固体样品

精密称取样品0.1 g~0.5 g (精确至0.1 mg)，置于50 mL具塞离心管中，加入80%甲醇溶液（5.2.1）40 mL，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，将全部洗涤液转移至50 mL容量瓶中，并用80%甲醇溶液（5.2.1）定容。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滤膜过滤（建议弃初滤液1 mL以上），备用。

7.2.2 液体样品

精密移取混匀的液体样品1.0 mL~5.0 mL于50 mL具塞离心管中，加入80%甲醇溶液（5.2.1）40 mL，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。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滤膜过滤（建议弃初滤液1 mL以上），备用。

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

7.3 色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：烷基键合的表面多孔型反向色谱柱（4.6×250 mm×5 μm），或等效色谱柱；
- b) 流动相：A相为乙腈，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) 波长：260 nm；
- e) 进样量：10 μL；
- f) 柱温：30°C。

表1 梯度洗脱条件

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

7.4 标准曲线的制作

将标准系列溶液由低浓度到高浓度依次注入液相色谱仪中，测定各组分相应的峰面积（标品色谱图见附录A图A.1），以标准工作液中各异黄酮浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。必要时，可适当增加或减少稀释倍数 f ，使试样中待测物质质量浓度在标准曲线范围内。

7.5 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱仪中，以保留时间定性，得到各目标化合物相应的峰面积（样品色谱图见图A.2），根据标准曲线得到待测液中各物质浓度。

8 结果计算

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

$$X_i = \frac{C_i \times V \times f}{m \times 1000 \times 1000} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

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/100g) 或克每百毫升(g/100mL)；

C_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($\mu\text{g/mL}$)；

V ——试样溶液体积，单位为毫升(mL)；

f ——样品稀释倍数；

m ——试样取样量，单位为克或毫升(g 或 mL)；

1000、1000、100——单位换算系数。

8.2 试样中大豆异黄酮总含量，按式(2)计算：

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

式中：

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

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

X_2 ——试样黄豆黄素的含量，单位为克每百克(g/100g)或克每百毫升(g/100mL)；

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

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

X_5 ——试样黄豆黄苷的含量，单位为克每百克(g/100g)或克每百毫升(g/100mL)；

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

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得超过算术平均值的10%。

10 其他

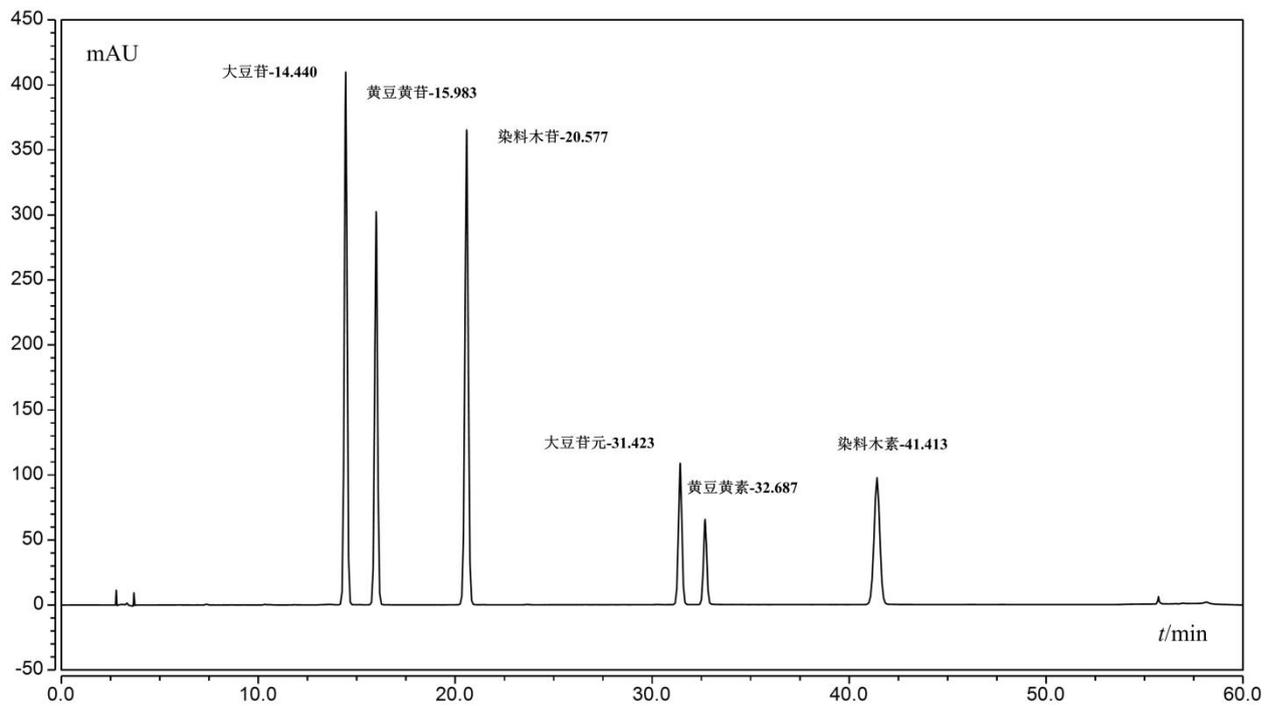
固体和半固体试样：当称样量为 0.10 g，定容体积为 50mL 时，大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的检出限为 0.001 g/100g，定量限为 0.003 g/100g。

液体试样：当取样量为 1.0 mL，定容体积为 50 mL 时，大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的检出限为 0.0001 g/100mL，定量限为 0.0003 g/100mL。

附录 A
(资料性附录)

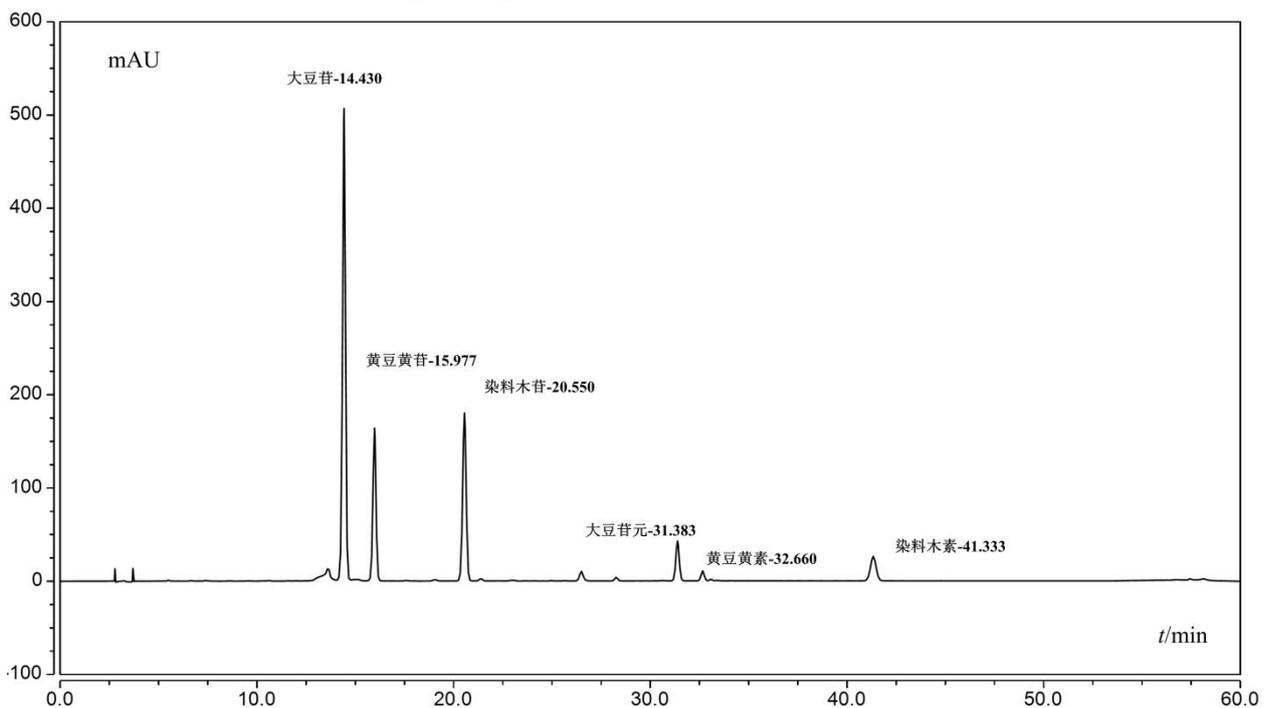
大豆异黄酮标准溶液和试样溶液液相色谱图

大豆异黄酮标准溶液高效液相色谱图见图A.1。



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

试样中大豆异黄酮高效液相色谱图见图A.2。



图A.2 试样 (软胶囊) 中大豆异黄酮高效液相色谱图