

《保健食品中大豆异黄酮的测定》国家标准 (征求意见稿) 编制说明

一、工作简况

(一) 任务来源

根据《国家标准化管理委员会关于下达 2023 年第二批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》(国标委发〔2023〕37 号),《保健食品中大豆异黄酮的测定方法高效液相色谱法》(计划号 20230869-T-424)列入修订计划,由全国特殊食品标准化技术委员会归口,由中国食品发酵工业研究院有限公司等单位共同完成起草修订工作。

(二) 修订背景

1.大豆异黄酮性质及相关保健食品情况

大豆异黄酮主要存在于豆科植物中,其化学结构与雌激素类似,可以被人体识别并作用于下丘脑、垂体等组织的雌激素受体(ER),影响动物内源性激素分泌水平,进而影响动物的免疫功能、生长发育、提高动物繁殖性能等。大豆异黄酮(soybeanisoflavones,SI)又被称为“植物雌激素”,是大豆等豆科植物生长过程中产生的黄酮类次生代谢产物,也是大豆的主要生物活性成分之一,在自然界中多以 2 种形式存在,即结合型糖苷和游离型糖苷配基(亦称苷元)。大豆异黄酮对人体有多种积极作用,如缓解骨质疏松症、预防心血管疾病、调节血脂和抗氧化、抗炎、抗肿瘤、提高免疫等活性、降低胆固醇、清除氧自由基、保护肾功能等,并可影响子宫内膜细胞和颗粒细胞的增殖与凋亡。

目前从大豆中分离出的大豆异黄酮有 12 种,主要可以分为两大类,如图 1 所示。一类是结合的糖苷型大豆异黄酮,占总大豆异黄酮的 97%~98%,以葡萄糖苷(Glucoside)、乙酰基葡萄糖苷(Acetylglucoside)、丙二酰基葡萄糖苷(Malonylglucoside)的形式存在,具体有大豆苷、染料木苷、黄豆苷、乙酰大豆苷、乙酰染料木苷、乙酰黄豆苷、丙二酰大豆苷、丙二酰染料木苷、丙二酰黄豆苷;二是游离的苷元型大豆异黄酮(Aglycone),只占总大豆异黄酮的 2%~3%,具体有大豆苷元、染料木素、黄豆黄素。研究发现,具有生理活性的主要是苷元型组分。去掉糖基侧链的苷元型大豆异黄酮可以在人体肠道内被有效吸收利用,其吸收速度和吸收数量远大于结合的糖苷型大豆异黄酮。不同异黄酮

形式可根据分子量进行换算，具体分子量形式如表 1 所示。

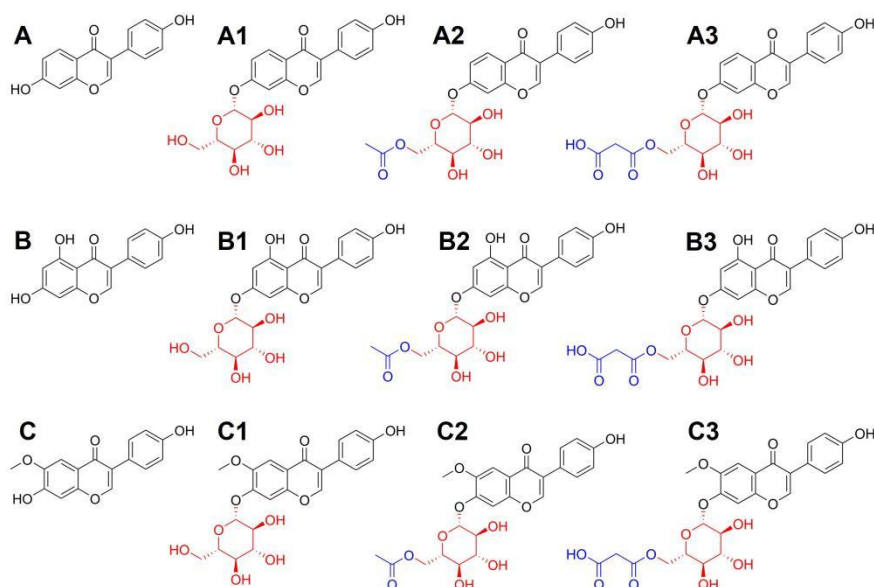


图 1 各类大豆异黄酮苷元及苷的结构式：（A）大豆苷元（A1）大豆苷（A2）乙酰大豆苷（A3）丙二酰大豆苷（B）染料木素（B1）染料木苷（B2）乙酰染料木苷（B3）丙二酰染料木苷（C）黄豆黄素（C1）黄豆黄苷（C2）乙酰黄豆黄苷（C3）丙二酰黄豆黄苷。

表 1 不同类型大豆异黄酮分子量

名称	苷元形式	苷形式	乙酰糖苷形式	丙二酰糖苷形式
大豆苷元	254.24	416.38	458.41	502.42
黄豆黄素	284.26	446.40	488.44	532.45
染料木素	270.24	432.38	474.41	518.42

原国家食品药品监督管理局于 2009 年 9 月 2 日发布的“关于含大豆异黄酮保健食品产品注册申报与审评有关规定的通知（国食药监许[2009]567 号）”明确，大豆异黄酮应当来源于大豆，大豆异黄酮测定的成分包括大豆苷、大豆苷元、染料木素和染料木苷四种，应当标明每一种成分的具体含量和大豆异黄酮的总量。

根据国家市场监督管理总局官网有关大豆异黄酮保健食品注册信息，截至 2024 年 12 月，国内大豆异黄酮相关保健食品共 130 款，包括胶囊 93 款（包含软胶囊和硬胶囊），片剂 33 款，颗粒 4 款。胶囊剂型在市面产品中占据大多数。在含量方面， $\geq 3\text{g}/100\text{g}$ 的产品占比约 50%。大部分产品以 $\text{g}/100\text{g}$ 为单位。

在检测方法方面，大部分企业采用 GB/T23788 规定的测量方法，大豆异黄酮含量以大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素、黄豆苷、黄豆黄素计；小部分企业采用《保健食品检验与评价技术规范》（2003 年版）中“金雀异黄素的测定”和附录方法，大豆异黄酮含量以染料木素、大豆苷元、染料木苷、大豆苷计。大豆异黄酮的国标检测方法使用较为广泛。

2. 相关标准情况

目前测定大豆异黄酮的方法主要为高效液相色谱（HPLC）以及液质联用法，也有报道采用酶联免疫法及毛细管电泳法测定。GB/T23788-2009《保健食品中大豆异黄酮的测定方法-高效液相色谱法》为目前用于保健食品中测定大豆异黄酮的唯一国标方法。其他有关大豆异黄酮标准如表 2 所示。

大豆异黄酮相关检测标准共 5 种，包括 2 种国家标准、2 种农业标准、1 种行业标准；其中 4 种采用高效液相色谱法，1 种采用液相色谱-串联质谱法；测定范围包括豆腐、豆奶粉、豆豉等大豆食品、大豆异黄酮保健食品及原料、植物油、食用大豆粕为基准的大豆异黄酮粉末状产品等。在大豆异黄酮的计量方式上，均以大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆素、黄豆黄素、染料木素直接加和计算。

表 2 国内不同大豆异黄酮的检测方法

标准号	GB/T23788-2009 保健食品中大豆异黄酮的测定方法高效液相色谱法	GB/T26625-2011 粮油检验大豆异黄酮含量测定高效液相色谱法	QB/T5397-2019 大豆食品中异黄酮含量的测定	NY/T3112-2017 植物油中异黄酮的测定液相色谱-串联质谱法	NY/T1252-2006 大豆异黄酮
方法	高效液相色谱法	高效液相色谱法	高效液相色谱法	液相色谱-串联质谱法	高效液相色谱法
测定范围	以大豆异黄酮为主要功能性成分的保健食品（片剂，胶囊，口服液，饮料）或保健食品原料	大豆，豆奶粉，豆豉	原料大豆及豆浆、豆腐、腐乳等大豆食品中的异黄酮含量	植物油	以食用大豆粕为主要原料生产的、主要成分为大豆异黄酮的粉末状产品
前处理	固体样品、半固体样品：固体样品粉碎、磨细(过 80 目筛)、混匀，半固体样品混匀，称取样品 0.05-0.5g(精确至 0.1mg)、用 80%甲醇溶液溶解并转移至 50mL 容量瓶中，加入 80%甲醇溶液至接近刻度。 液体样品：吸取混匀的液体样品 0.5-5.0mL 于 50mL 容量瓶中，加入 80%甲醇溶液至接	称取 5g 试样于 250mL 具塞三角瓶中，加 90mL90%甲醇溶液，置于超声波清洗器中 60℃提取 30min，在离心机中 10000r/min 离心 10min，上清液转移至 250mL 浓缩瓶中，残渣再加入 60mL90%甲醇溶液进行提取，上清液也转入 250mL 浓缩瓶，在旋转蒸发器 60℃浓缩至约 40mL，浓缩液转入 50mL 容量瓶，用	准确称取试样 0.1-1g 于离心管中，向其中加入 0.5-5mL 乙腈、0.5-5mL 水，密封后充分混匀，在室温条件下，使用恒温摇床以 300r/min 的速度振荡提取 2h，然后以 10000r/min 的速度，在 25℃下离心 5min，取上清液过滤。35℃旋转蒸发器浓缩至干，向其加入 5-10mL 甲醇溶液（体积分数	称取约 0.5g 试样至 10mL 离心管中，然后加入 8mL 正己烷，涡旋 1min 混匀，储存在 4℃条件下，备用。 将二醇基固相萃取柱放在固相萃取仪上，依次用 5mL 甲醇和 5mL 正己烷活化，控制流速 1mL/min。将待净化液加入固相萃取柱中，用 5mL10%乙酸乙	大豆提取物样品混匀后取 5g 放入干燥器内真空干燥 24h 备用。 称取上述绝干大豆提取物样品 25mg±0.1mg，置于 25mL 容量瓶中，加 80%乙醇约 20mL 完全溶解后定容。然后取 3-5mL，再用 80%甲醇定容于 25mL 容量瓶中。吸取 1mL 溶液于离心管中，以 10000rpm 离心

	近刻度。 将上述样品溶液用超声波振荡器振荡20min。用80%甲醇定容，摇匀。取样品溶液置于离心管中，离心机离心15min(转速大于8000r/min)。取上清液用0.45μm滤膜过滤，收集滤液备用。	10%甲醇溶液冲洗浓缩瓶并定容至刻度。取1mL提取液通过0.45μm滤膜，供高效液相色谱仪测定。	80%)以溶解干物质，通过针头式过滤器过0.22μm有机相滤膜过滤。	酯+正己烷淋洗，弃去；再用6mL甲醇加入到固相萃取柱中，用10mL离心管收集洗脱液。将离心管置于氮吹仪上，水浴温度50℃，氮吹至近干，1.00mL50%甲醇+水复溶，涡旋30s后过0.22μm滤膜过滤，待液相色谱串联质谱测定。	10min，取上层清液作为试样溶液备用。
色谱柱	C ₁₈ 柱 (4.6mm×250mm 粒度5μm 不锈钢色谱柱)	RPC ₁₈ 柱 (250mm×4.6mm, 5μm)	C ₁₈ 柱(5μm、 4.6mm×250mm)	C ₁₈ ，柱长 100mm，内径 2.1mm，粒径 3.0μm	C ₁₈ ,φ4.6mm×250 mm,5μm
流动相	流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 磷酸水 溶液 (pH=3.0)	流动相 A: 0.1%乙 酸溶液; 流动相 B: 0.1%乙 酸乙腈溶液	流动相 A: 含有 0.1%乙酸溶液; 流动相 B: 含有 0.1%乙酸乙腈溶液	流动相 A: 0.01% 乙酸水; 流动相 B: 0.01% 乙酸甲醇	乙腈: 水: 乙酸, 11:89:0.1 (体积 比)
检测波长	260nm	260nm	260nm	/	254nm
测定时间	60min	26min	40min	16min	/
计量方式	大豆食品中异黄酮 (大豆苷, 染料木 苷, 大豆苷元, 染 料木素, 黄豆黄素, 黄豆黄苷) 含量	大豆甙, 黄豆黄素, 染料木甙, 大豆黄 素, 黄豆黄素甙元, 染料木素	大豆食品中异黄酮 (大豆苷, 染料木 苷, 大豆苷元, 染 料木素, 黄豆黄素, 黄豆黄苷) 含量	异黄酮化合物以 质量分数记 (大 豆黄酮苷, 染料 木苷, 大豆黄酮, 染料木素)	大豆异黄酮苷 (大豆苷、大豆 黄苷、染料木 苷)、大豆异黄 酮苷元(大豆素、 大豆黄素、染料 木素)

3. 大豆异黄酮检测方法相关文献情况

查阅相关文献如表 3 所示。文献中大豆异黄酮测定时，提取溶液多为甲醇或甲醇水溶液，以 80%甲醇为主；检测波长多为 260nm，与实际紫外吸收光谱图一致，少数方法采用 254nm；流动相组成上，基本为酸溶液和甲醇或乙腈，从方

法提供的色谱图上，几种色谱峰都能分离，出峰时间随流动相和色谱柱不同有所差异；大多数关于大豆异黄酮的高效液相色谱法所需时间长，至少为 45-60min，如果缩短大豆异黄酮的检测时间，通常使用超高效液相色谱法，检测时间为 10-25min。

表 3 不同文献中关于大豆异黄酮的测定方法

文献名称	超高效液相色谱法同时测定保健品中 4 种大豆异黄酮	饲料中大豆异黄酮检测方法的建立	一测多评法同时测定淡豆豉配方颗粒中 6 种异黄酮含量	豆芽发芽过程中黄酮类成分的检测及变化研究	超高效液相色谱法检测保健品中的大豆异黄酮各组分含量	高效液相色谱法测定保健食品中大豆异黄酮含量的方法改进	豆浆中水溶性大豆异黄酮检测方法的建立
基质	保健品	饲料	淡豆豉配方颗粒	豆芽	保健品	保健品	大豆
方法	超高效液相色谱法	高效液相色谱方法	超高效液相一测多评法	高效液相色谱法	超高效液相色谱法	高效液相色谱法	高效液相色谱法
检测物质	大豆苷、染料木苷、染料木素和大豆素	大豆苷、大豆苷元、大豆黄苷、染料木苷、大豆黄素和染料木素	大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、大豆黄素、染料木素	大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素、染料木素	大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素、染料木素	大豆苷、大豆黄素、染料木苷、大豆素、大豆黄苷、染料木素	大豆甙,染料木甙,大豆苷元,染料木素
提取溶液	80% 甲醇超声提取 20min	甲醇超声 5min	70%甲醇超声 30min	80% 甲醇超声提取 20min	80%甲醇超声提取 20min	70%乙醇	水
波长	260nm	260nm	260nm	260nm	260nm	254nm	260nm
色谱柱	XbridgeBE HC18 色谱柱 (100mm×2.1mm,1.7μm)	色谱柱 C18,4.6mm×250mm,5μm	CORTECS T3(2.1mm×100mm,1.6μm)	DIKMADi amonsilPlusC18(4.6mm×250mm,5μm)	WatersXSE LECTHSST 3(2.1mm×100mm,2.5μm)	AgilentZORBAXSB-C18,250mm×4.6mm,5μm	C18 色谱柱 (150mm×4.6mm,5.0μm)
流动相	甲醇(A) -0.1%磷酸(V/V)(B)	乙腈(A) -0.1%醋酸水(B)	乙腈(A) -0.1%甲酸溶液(B)	流动相 A 为乙腈, B 为磷酸水溶液 (pH=3)	流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 1%磷酸溶液	1%磷酸水溶液和甲醇	流动相 A 为含 0.1%(V/V) 乙腈水溶液, 流动相 B 为含 0.1%(V/V) 乙酸甲醇溶液
色谱条件	0~2min,10%A;2~15min,10%~80%	0min,12%A;0~10min,12%~18%	0~6min,10%~17%A;6~12min,17%	0~20min,12%~30%A;20~32min,	流动相 A 的初始比例为 6%, 保持	0 ~ 4min,70% 磷酸水溶液	0~6min,B50%~45%;6~10min,B45%~25%;

	%A;15~20min,80%A;20~21min,80%~10%A;21~25min,10%A.	A;10~23min,18~24%A;23~30min,24%~30%A;30~50min,30%A;50~55min,30~80%A;55~56min,80%~12%A;56~60min,12%A	%~25%A;12~15min,25%~35%A;15~16min,35%~45%A;16~17min,45%~60%A;17~19min,60%A	30%A;32~36min,30%~80%A;36~37min,80%~12%A;37~45min,12%A.	0.5min,4min后A的比例升至30%,保持至7min,7~7.5min内A的比例降至6%,A的比例保持6%到10min	+30%甲醇;14~24min,45%磷酸水溶液+55%甲醇;25~30min,70%磷酸水溶液+30%甲醇	10~12min,B25%;12~15min,B25%~50%
检测时间	25min	60min	19min	45min	10min	30min	15min

4. 被修订标准情况

GB/T23788-2009《保健食品中大豆异黄酮的测定方法高效液相色谱法》于2009年5月18日发布，12月1日正式实施，已有16年标龄，随着产业发展和政策完善，原标准已不能满足产品发展的需求，所以亟须进一步修订，主要存在以下问题：（1）缺少大豆异黄酮样品制备步骤；（2）大豆异黄酮现有色谱条件需优化；（3）现有色谱条件易与其他类黄酮类物质（芍药苷）保留时间重合；（4）线性范围不合理，同一样品不同物质含量有差异，应设置梯度线性范围。

（三）主要工作过程

2023年8月~2023年10月，成立标准修订组，确定标准制修订方案和工作计划，并开展了方法学验证。

2023年11月，全国特殊食品标准化技术委员会（SAC/TC466）在北京召开“14项保健食品分析方法标准启动会”修订工作启动会，会上讨论了《保健食品中大豆异黄酮的测定》的修订方案。

2024年1月~2025年8月，起草组各单位根据《保健食品中大豆异黄酮的测定》标准修订方案开展实验室内方法验证的工作。

2024年12月~2025年1月，全国特殊食品标准化技术委员会（SAC/TC466）组织各参与单位开展新修订保健食品中大豆异黄酮测定方法的实验室间方法验证工作。

2025年1月，起草工作组在前期工作基础上形成标准征求意见稿。

二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据

（一）标准编制原则

本标准依据 GB/T1.1-2020《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/T20001.4-2015《标准编写规则》的要求进行编写，按照 GB/T27404-2008《实验室质量控制规范食品理化检测》和 GB5009.295-2023《食品安全国家标准化学分析方法验证通则》对方法学进行了考察。

1.高效性与实用性

GB/T23788-2009《保健食品中大豆异黄酮的测定方法高效液相色谱法》描述了大豆苷等六种组分测定方法，但针对实际产品，苷和苷元的含量差异较大，线性范围设置不合理，对于含量较高的样品，需要稀释1-2次，操作繁琐，检测成本高。

2.通用性与适用性

保健食品中大豆异黄酮的测定基本采用高效液相色谱法，以 GB/T23788-2009 为基础修订后的标准，适用于片剂、胶囊、口服液和酒剂等剂型保健食品中大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素和染料木素的测定，满足实际样品的检测要求。

（二）标准主要内容及其确定依据

1.标准主要修订内容

随着目前市面上大豆异黄酮保健食品剂型的不断丰富，原标准的适用性和实用性不足。通过多方面分析和验证，本次标准修订较原版本有如下变化：

- （1）增加了试样制备的内容；
- （2）修改了前处理的内容；
- （3）修改了色谱条件；
- （4）修改了方法的检出限、定量限。

主要修订要点详见表4。

表4 标准主要修订要点

内容	原标准	修订后标准	修改理由
定义	大豆异黄酮是大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素和染料木素的总称。	大豆异黄酮为大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素这6种异黄酮物质的总称。	原标准对于标准品名称有通俗表示，故进行修改。
原理	方法制备、提取、过滤后，经高效液相色谱仪	试样经80%甲醇溶液提取，过滤后，经高效液相色谱仪分析（C ₁₈ 柱分离），依据	与修订后的标准吻合。

	分析 (C ₁₈ 柱分离), 依据保留时间定性, 用外标法定量。	保留时间定性, 用外标法定量大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素。	
标准溶液配制	原标准称取 4mg 标准品, 二甲基亚砷溶解, 50%二甲基亚砷稀释为 6 种标准品等度浓度	标准品称取 25mg 标准品, 先用二甲基亚砷溶解, 再用甲醇定容到刻度, 使用 50% 甲醇稀释为梯度标准曲线。	二甲基亚砷流动性较差, 对色谱柱和泵均有不利因素。综合大豆异黄酮标准品特性, 先添加少量二甲基亚砷促进溶解, 溶解后即可使用甲醇定容至刻度。参考真实样品测试数据, 在大豆异黄酮保健食品中, 大豆异黄酮苷(大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷)的含量高于大豆异黄酮苷元(大豆苷元、黄豆黄素、染料木素)。
试样制备	无。	增加了固体试样、半固体试样、液体试样的详细制备步骤。	根据每个剂型或样品的特点, 增加相应的试样制备, 保证试样取样的代表性和均匀性。
前处理	80%甲醇超声 20min, 离心后过膜上机。	80%甲醇振荡 10min 后, 再超声 20min, 过膜上机。	与原理保持一致。
色谱柱	C18, 4.6mm×250mm, 粒度 5μm 不锈钢色谱柱; 也可使用分离效果相当的其他不锈钢柱。	烷基键合的表面多孔型反相色谱柱, 4.6×250mm×5μm (或性能相当者)。	分离其他黄酮类物质。
流动相	流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 磷酸水溶液 (pH=3.0)。	流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 0.01%磷酸水溶液。	优化流动相配制流程。
公式单位	mg/kg 或 mg/L	g/100g 或 g/100mL	根据市售大豆异黄酮样品进行单位修改。
检出限量	固体、半固体检出限为 5mg/kg, 液体检出限 0.2mg/L。	固体、半固体: 当称样量为 0.10g, 定容体积为 50mL 时, 检出限为 0.001g/100g; 定量限为: 0.003g/100g。 液体试样: 当取样量为 1.0mL 时, 定容体积为 50mL 时, 检出限为: 0.0001g/100mL; 定量限为: 0.0003g/100mL。	满足实际样品检测要求。

2. 修改大豆异黄酮的名称

将大豆异黄酮的名称进行统一，由“大豆素”改为“大豆苷元”“大豆黄苷”改为“黄豆黄苷”“大豆黄素”改为“黄豆黄素”。文献所示，大豆异黄酮分为结合型糖苷类和游离型苷元两类，包括3种苷元（大豆苷元、黄豆黄素、染料木素）和9种糖苷（大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、乙酰大豆苷、乙酰黄豆黄苷、乙酰染料木苷、丙二酰大豆苷、丙二酰黄豆黄苷、丙二酰染料木苷），修改后，大豆异黄酮表述与现有文献保持一致。

3. 标准溶液的配制

3.1 标准溶液单标的配制

原标准中称取各标准物质 4mg，在实际取样中，4mg 偏小，容易造成取样误差，因此修改为取样 25mg。

参考文献和其他标准，大豆异黄酮标准品在一般的有机溶剂中溶解性较差，易溶于二甲基亚砜，在乙腈、甲醇、乙醇中具有一定溶解性。原标准中使用二甲基亚砜溶解标准品，50%二甲基亚砜稀释。但由于二甲基亚砜流动性较差，对色谱柱和泵均有不利因素。综合大豆异黄酮标准品特性，先添加少量二甲基亚砜促进溶解，溶解后即可使用甲醇定容至刻度。

在标准品稀释中，使用 50%甲醇进行稀释。标准品的稀释过程中，使用 50%甲醇和 80%甲醇均可，但对于实际样品，80%甲醇和甲醇稀释容易出现溶剂效应（图 2），因此选择 50%甲醇稀释。

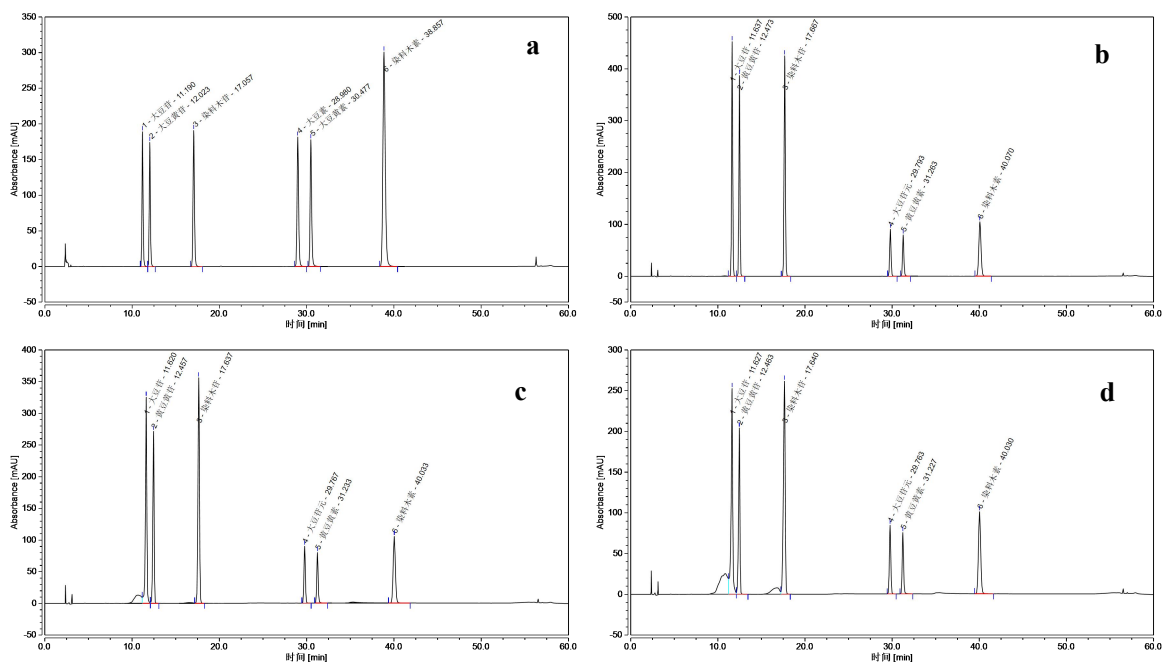


图 2 不同溶剂稀释大豆异黄酮标准品色谱图 (a50%二甲基亚砜, b50%甲醇稀释, c80%
甲醇, d 甲醇)

3.2 大豆异黄酮标准储备液

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 25mg, 分别置于 25mL 棕色容量瓶中, 加入 5~15mL 二甲基亚砜溶解, 用甲醇定容至刻度, 混匀, 浓度约为 1000 μ g/mL。在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中贮存, 保存期 3 个月。黄豆黄素与其他 5 种标准品的相比, 溶解度较差, 在配制过程中, 需要多加入二甲基亚砜促进溶解。

3.3 大豆异黄酮混合标准溶液

参考真实样品测试数据, 在大豆异黄酮保健食品中, 大豆异黄酮苷(大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷)的含量高于大豆异黄酮苷元(大豆苷元、黄豆黄素、染料木素), 保证测定准确性, 将线性范围修订为大豆异黄酮苷(大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷) 1.0~100 μ g/mL、大豆异黄酮苷元(大豆苷元、黄豆黄素、染料木素) 0.2~20 μ g/mL。同时为了防止部分大豆异黄酮含量较高试样的测定浓度超出曲线范围, 在试样处理步骤增加“必要时, 可适当增加或减少稀释倍数 f , 使试样中待测物质量浓度在标准曲线范围内”。

4. 试样前处理条件的选择和优化

4.1 试样制备

保健食品种类繁多, 保健食品中添加大豆异黄酮的剂型有软胶囊、硬胶囊、片剂、颗粒剂、液体口服液等。本方法将不同剂型分别规定了前处理方法。片剂: 取片剂、颗粒剂(不低于 20 粒或 10g)试样, 经高速粉碎机或研钵磨成粉状, 封存备用; 软胶囊和硬胶囊: 取样品不低于 20 粒, 剪开, 挤出内容物, 研细(必要时)混匀; 液体口服液: 取 5 支独立包装样品(如有), 混合均匀, 试样测定前振摇混匀。

4.2 样品称样量的选择

原标准规定称样量为 0.05~0.5g, 在本次修订过程中修改了样品的取样量: 固体或半固体取样量 0.1~0.5g, 液体试样 1.0~5.0mL, 同时注明操作者可根据试样中组分的含量, 适当增加或减少稀释倍数, 使各组分浓度处于标准曲线测定范围内。

4.3 试样前处理条件的选择和优化

根据保健食品各个剂型的特点，参考相关方法以及专家建议，确定试样前处理条件。

4.3.1 提取溶剂选择

参考国内外检测大豆异黄酮的方法，多数采用甲醇提取，少数采用乙腈和乙醇提取，为验证提取溶剂有效性，考察了 40%乙腈、80%乙腈、80%甲醇、80%乙醇、70%甲醇、90%甲醇作为提取溶液的提取效率。从测定结果看（表 5），80%甲醇和 40%乙腈提取效果最佳，硬胶囊、软胶囊、液体使用 80%甲醇要稍好于 40%乙腈，片剂使用 40%乙腈提取效果最好，综合考虑，沿用原标准的提取溶剂（80%甲醇）进行提取。

表 5 不同提取溶剂对大豆异黄酮测定结果

提取溶剂	硬胶囊	片剂	软胶囊	液体
70%甲醇	17.10±0.71	12.20±0.69	16.00±1.43	0.82±0.14
90%甲醇	15.30±1.12	12.10±1.07	15.20±1.70	0.75±0.29
80%乙腈	6.89±0.58	10.39±0.64	4.91±0.36	0.23±0.42
40%乙腈	17.60±0.78	13.00±1.02	14.80±1.30	0.78±0.06
80%乙醇	13.50±0.15	11.90±0.05	11.40±0.64	0.56±0.11
80%甲醇	17.80±0.11	12.80±0.48	16.10±1.16	0.83±0.24
标示值 (g/100g)	14.4	11.72	8.4	/

4.3.2 提取时间优化

各剂型辅料工艺差别大，软胶囊在超声时，呈现微乳状或混悬状，硬胶囊、片剂在超声时，呈现细微颗粒沉底，液体在超声时，呈现几乎澄清状，提取液测定结果显示，其含量均符合产品标示量要求。

原标准中使用 50mL 棕色容量瓶超声震荡提取，在实际操作中不方便操作，修改为在 50mL 具塞离心管中准确加入 80%甲醇溶液 40mL。

硬胶囊和片剂研磨后提取，先震荡 10min，确保小颗粒完全散开后，再超声提取 20min，可充分提取试样中的目标物。因此，对不同剂型的工艺特点进行综合考虑，提取方式确定为先振荡 10min，超声 20min。

5. 色谱条件的确定

5.1 检测波长确定

通过采用二极管阵列检测器，考察了 6 种目标物的紫外吸收光谱图（图 3）。结果显示，大豆苷和大豆苷元在 250nm 处有最大吸收，黄豆黄苷和黄豆黄素在 258nm 处有最大吸收，染料木苷和染料木素在 260nm 处有最大吸收，综合操作方便性，与原标准保持一致，吸收波长为 260nm。

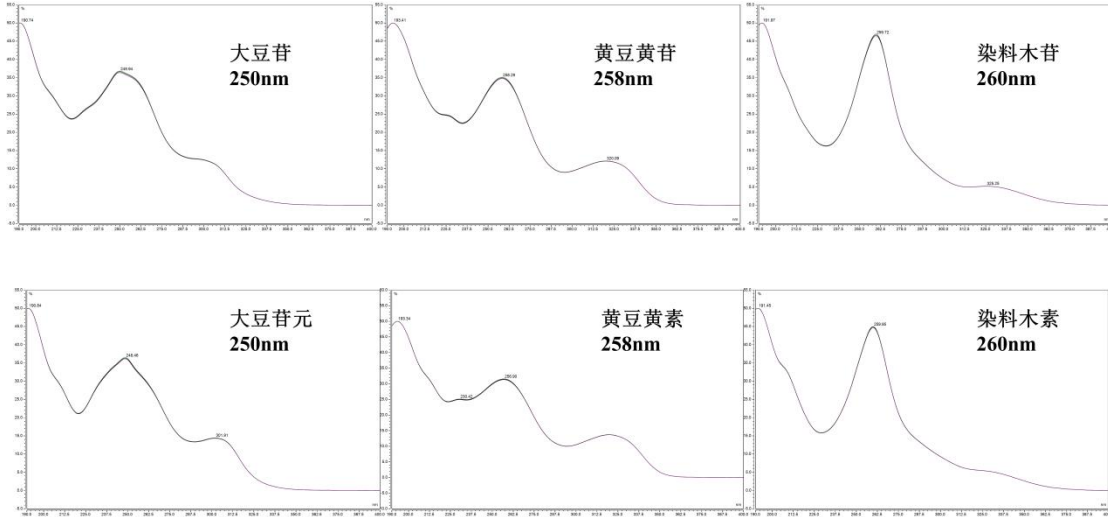


图 3 大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的紫外光谱图

5.2 色谱柱的选择

本方法采用了烷基键合的表面多孔型反向色谱柱，这款色谱柱用于大豆异黄酮类物质测定具有良好的重现性和分离度，得到较好的峰形。有些大豆异黄酮产品中含有其他功效成分，如维生素 C、维生素 E、钙、原花青素、芍药苷等，其中有些成分可能会对大豆异黄酮定量有影响。在前期的实验中，某些 C18 柱(如 ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱)对多种黄酮类物质分离效果有限，芍药苷在大豆异黄酮检测条件下可出峰，出峰时间与黄豆黄苷相近，会对黄豆黄苷的检测含量产生影响。使用烷基键合的表面多孔反相色谱柱可有效避免此问题。比较了不同品牌的色谱柱（安捷伦 ZORAX Stable Bond Aq 色谱柱 4.6×250mm×5μm、赛默飞 Hypersil GOLDAQ 250×4.6mm×5μm、月旭 Ultimate AQ-C18 4.6×250 mm×5μm），如图 4 所示，除在保留时间上略有差异外，均能得到较好的实验结果。

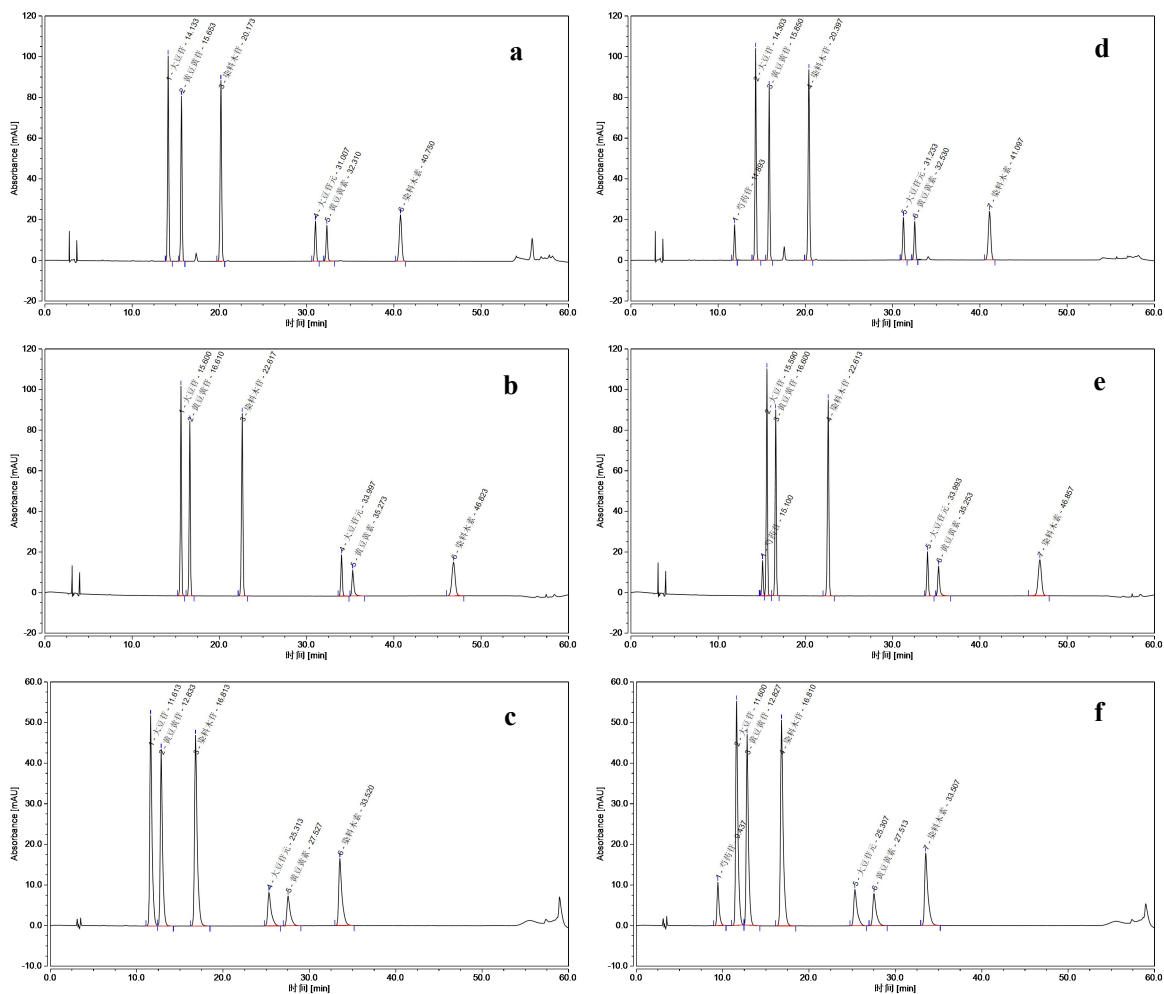


图 4 安捷伦、月旭、赛默飞色谱柱在磷酸水溶液 (pH=3.0) 的色谱图 (a 安捷伦测定大豆异黄酮 6 种标准品, b 安捷伦测定大豆异黄酮 6 种标准品和芍药苷, c 月旭测定大豆异黄酮 6 种标准品, d 月旭测定大豆异黄酮 6 种标准品和芍药苷, e 赛默飞测定大豆异黄酮 6 种标准品, f 赛默飞测定大豆异黄酮 6 种标准品和芍药苷)

5.3 流动相的选择

原标准的流动相是磷酸水溶液 (pH=3.0) 和乙腈, 通过查阅已有标准和文献, 磷酸水溶液除需调 pH 外, 配制相对简单, 分离效果较好, 因此优化流动相的配制流程。参考文献, 选择 0.01% 磷酸水溶液和 0.1% 乙酸水溶液。如图 5 所示, 综合比较后, 选择 0.01% 磷酸水溶液作为流动相。

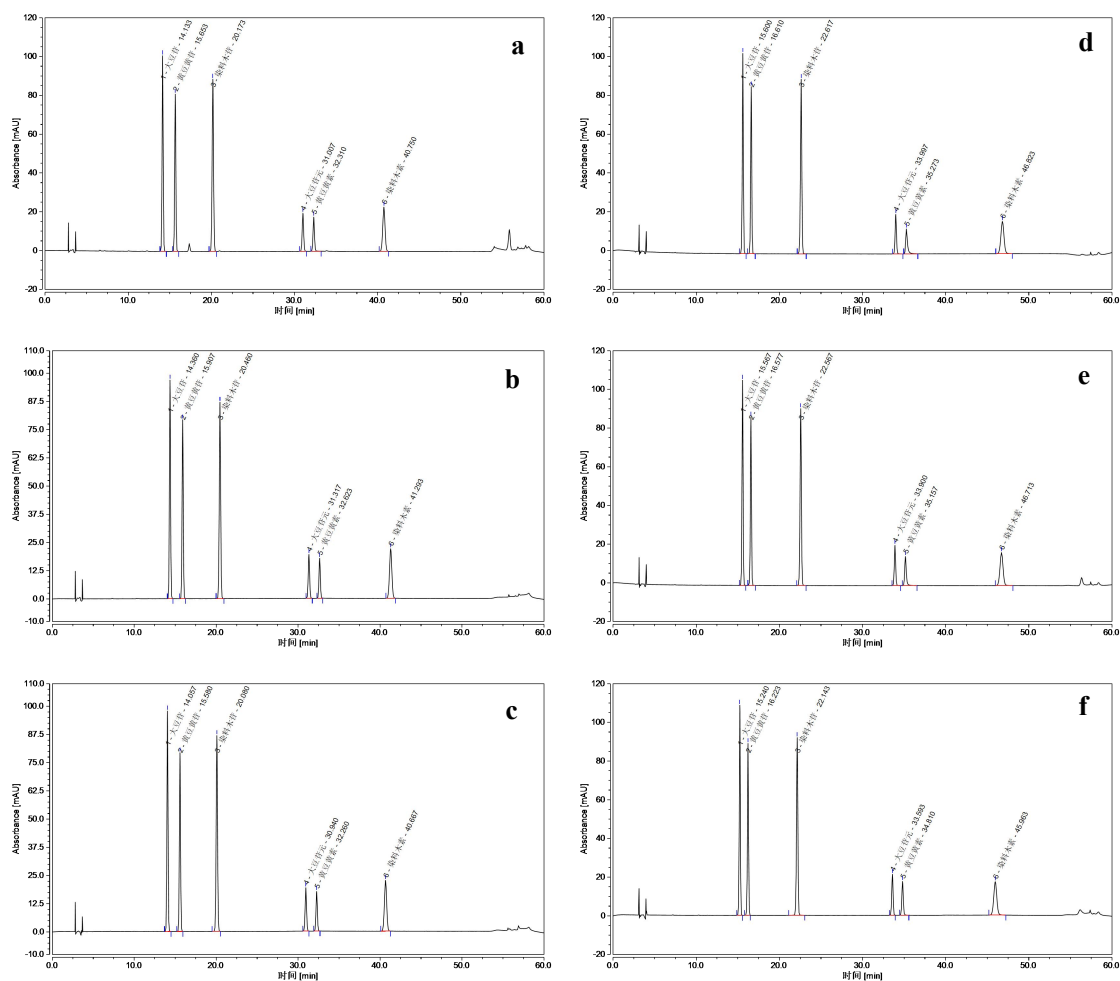


图 5 安捷伦和月旭色谱柱在不同流动相条件的色谱图（a 安捷伦 pH=3 磷酸水溶液，b 安捷伦 0.01%磷酸水溶液，c 安捷伦 0.1%乙酸水溶液，d 月旭 pH=3 磷酸水溶液，e 月旭 0.01%磷酸水溶液，f 月旭 0.1%乙酸水溶液）

6. 滤膜对大豆异黄酮物质的影响

使用尼龙材质 0.45 μm 有机滤膜，发现滤膜对大豆异黄酮均有不同程度的吸附。比较离心、弃初滤液 1 mL、弃少量 ($< 1 \text{ mL}$) 初滤液 3 种方式对不同基质大豆异黄酮浓度影响 (表 6)。离心和弃初滤液 1 mL 结果差异很小，弃少量 ($< 1 \text{ mL}$) 初滤液会降低各组份浓度，造成结果偏差。从结果准确性上，建议弃初滤液 1 mL 以上，再进行上机。

表 6 不同过膜方式对大豆异黄酮浓度的影响

	过膜方式	片剂 $\mu\text{g/mL}$	液体 $\mu\text{g/mL}$	软胶囊 $\mu\text{g/mL}$	硬胶囊 $\mu\text{g/mL}$
大豆苷	离心	67.52	102.64	64.61	34.81
	弃初滤液 1mL	67.50	102.70	64.21	34.53

	弃少量初滤液	66.25	100.33	62.20	33.49
黄豆黄苷	离心	29.49	33.37	7.18	11.80
	弃初滤液 1mL	29.94	33.62	7.38	12.07
	弃少量初滤液	29.44	33.00	7.15	11.72
染料木苷	离心	81.96	43.25	84.25	43.72
	弃初滤液 1mL	81.67	43.67	84.74	43.59
	弃少量初滤液	78.45	42.79	82.48	42.36
大豆苷元	离心	7.76	8.23	8.81	3.47
	弃初滤液 1mL	7.86	8.32	8.97	3.44
	弃少量初滤液	7.60	8.09	8.68	3.33
黄豆黄素	离心	0.95	2.44	2.03	0.50
	弃初滤液 1mL	0.95	2.48	2.08	0.50
	弃少量初滤液	0.93	2.42	2.01	0.49
染料木素	离心	7.82	3.42	8.13	1.66
	弃初滤液 1mL	7.84	3.49	8.19	1.66
	弃少量初滤液	7.58	3.39	7.96	1.63

7. 公式单位

国家市场监督管理总局官网有关大豆异黄酮保健食品注册信息所示，目前国内大豆异黄酮注册产品主要以 g/100g 和 g/100mL 为单位，因此将标准单位统一为 g/100g 和 g/100mL，公式也相应调整。

三、试验验证的分析、综述报告

(一) 实验室内验证

方法线性关系：以大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素为定量外标，在 1.0~100 μ g/mL 和 0.2~20 μ g/mL 浓度范围内，相关系数大于 0.999，线性关系良好。

经过实验确定了方法的检出限和定量限。固体试样，为当称样量为 0.10g，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：0.001g/100g；大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的定量限为：0.003g/100g。液体试样，当取样量为 1.0mL 时，

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：0.0001g/100mL；大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的定量限为：0.0003g/100mL。

方法准确度和精密度方面，低水平方法加标试验中，四种基质中大豆苷的加标回收率在 92.20%~98.91%，相对标准偏差 RSD 在 0.79%~2.31%；黄豆黄苷的加标回收率在 92.72%~97.79%，相对标准偏差 RSD 在 0.73%~1.97%；染料木苷的加标回收率在 92.70%~98.93%，相对标准偏差 RSD 在 1.06%~2.26%；大豆苷元的加标回收率在 91.13%~103.27%，相对标准偏差 RSD 在 1.51%~2.91%；黄豆黄素的加标回收率在 90.91%~100.19%，相对标准偏差 RSD 在 1.82%~3.05%；染料木素的加标回收率在 90.17%~98.93%，相对标准偏差 RSD 在 0.85%~2.75%。

中水平方法加标试验中，四种基质中大豆苷的加标回收率在 91.76%~99.94%，相对标准偏差 RSD 在 1.36%~2.31%；黄豆黄苷的加标回收率在 91.93%~96.96%，相对标准偏差 RSD 在 1.34%~1.71%；染料木苷的加标回收率在 91.08%~98.94%，相对标准偏差 RSD 在 1.48%~3.17%；大豆苷元的加标回收率在 92.14%~99.12%，相对标准偏差 RSD 在 0.83%~1.71%；黄豆黄素的加标回收率在 91.84%~100.92%，相对标准偏差 RSD 在 1.21%~2.36%；染料木素的加标回收率在 91.83%~98.93%，相对标准偏差 RSD 在 1.60%~2.10%。

高水平方法加标试验中，四种基质中大豆苷的加标回收率在 92.92%~100.25%，相对标准偏差 RSD 在 0.80%~2.22%；黄豆黄苷的加标回收率在 91.81%~99.72%，相对标准偏差 RSD 在 1.50%~2.43%；染料木苷的加标回收率在 91.20%~99.40%，相对标准偏差 RSD 在 0.63%~2.13%；大豆苷元的加标回收率在 94.75%~98.56%，相对标准偏差 RSD 在 0.27%~0.76%；黄豆黄素的加标回收率在 95.54%~98.20%，相对标准偏差 RSD 在 0.59%~0.85%；染料木素的加标回收率在 94.49%~98.21%，相对标准偏差 RSD 在 0.39%~0.96%。该方法精确度较好，能够满足保健食品中大豆异黄酮的准确测定。

稳定性方面，标准储备溶液在 3 个月内较稳定。实际样品的测试方面，修订前后的标准不会对市场上的该类保健食品监管产生影响，确保了标准的连贯性和市场监督的有效性。综上所述，修订后的标准实验室内方法学验证满足 GB5009.295-2023 的要求，具体结果见附件一。

（二）实验室间验证

组织无锡市食品安全检验检测中心、劲牌有限公司、仙乐健康科技股份有限公司、南京市食品药品监督检验院、华测检测认证集团股份有限公司等 5 家实验室，验证修订后标准的测定范围、正确度、再现性、定量限和检出限等。结果显示，以上各实验室验证的检出限、定量限、测定范围、正确度、再现性均验证结果均符合修订后标准和 GB5009.295-2023 要求。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

查阅国外大豆异黄酮测试方法，如表 7 所示。美国分析化学家协会（AOAC）AOAC2008.03 和美国药典（USP）记载的大豆异黄酮测定方法均采用了标准图谱比对法，实现了通过 6 种异黄酮（大豆苷、大豆苷元、黄豆黄苷、黄素黄素、染料木苷、染料木素）对 12 种异黄酮成分的色谱定性，并通过引入“转换因子”的方式以大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷为标准品对乙酰类及丙二酰类大豆异黄酮苷定量。但是采用以上方法需要确保色谱条件的充分一致性，包括色谱柱的规格、品牌的选择，以保证获得相对一致的保留时间，当样品基质复杂时往往引起较大的结果偏差（图 6）；AOAC2008.03 规定了两种异黄酮总量计算的两种方式：一种为 12 种异黄酮加和计；另一种为相当于苷元计。其他方法如 AOAC2001.10（图 7），先将乙酰类及丙二酰类大豆异黄酮苷进行皂化水解，当全部转化为 3 类异黄酮苷后，分别对样品中的大豆苷、大豆苷元、黄豆黄苷、黄豆黄素、染料木苷、染料木素进行定量，大豆异黄酮总量以 3 种苷元的总和计。

表 7 AOAC 关于大豆异黄酮测定的方法

标准号	AOAC Official Method 2001.10 Isoflavones in Soy and Selected Foods Containin g Soy Extraction, Saponification, and Liquid Chromatography First Action 2001	AOAC Official Method 2008.03 Total Soy Isoflavones in Dietary Supplements, Supplement Ingredients, and Soy Foods High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection First Action 2008
基质	大豆提取物、大豆饮料、大豆粉等	商业膳食补充剂中总大豆异黄酮、用于制造膳食补充剂的大豆异黄酮浓缩物以及含有至少 0.5mg/g 总异黄酮的大豆食品

标准品	大豆苷、大豆苷元、黄豆黄苷、黄素黄素、染料木苷、染料木素	大豆苷、大豆苷元、黄豆黄苷、黄豆黄素、染料木苷、染料木素
方法	高效液相色谱法	高效液相色谱法
提取方式	将样品使用 80% 甲醇在 65°C 水浴中振摇提取 2h，冷却至室温，加入 3mL 2mol/L 氢氧化钠。置摇床旋摇 10min 后加入 1mL 冰醋酸，定容后稀释上机	将样品使用 40% 乙腈振荡 60min，振荡结束后，稀释含有 80% 乙腈溶液，稀释上机
流动相	流动相 A：水：甲醇：乙酸=88+10+2，流动相 B：甲醇：乙酸=98+2	流动相 A：0.05% 磷酸，流动相 B：乙腈
测定时间	45min	73min
标准品	大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷 大豆苷元、黄豆黄素、染料木素	大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷 大豆苷元、黄豆黄素、染料木素 注：图谱比对法，需要用标准大豆粉定性 乙酰和丙二酰异黄酮苷
计量方式	异黄酮总量：以异黄酮苷元及异黄酮苷相当于苷元的总和计	(1) 异黄酮总量：以 12 种异黄酮形式的总和计 (2) 异黄酮总量：以异黄酮苷元及异黄酮苷相当于苷元的总和计

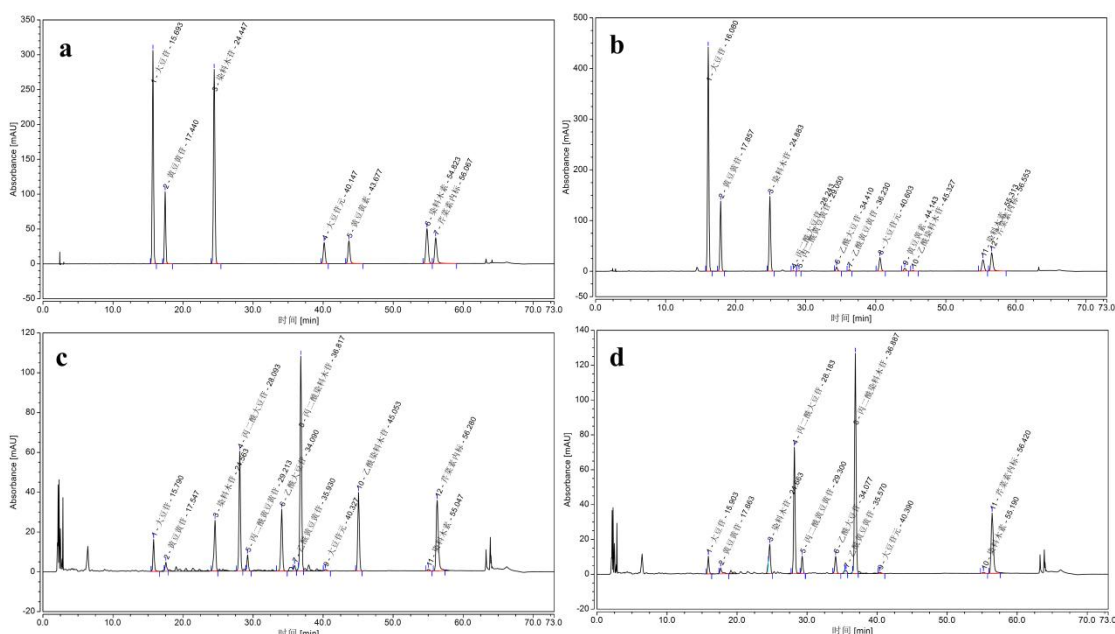


图 6 AOAC2008.03 色谱图 (a.大豆异黄酮标准品图谱, b.某软胶囊大豆异黄酮图谱, c. 加热后的大豆粉, d.未加热的大豆粉)

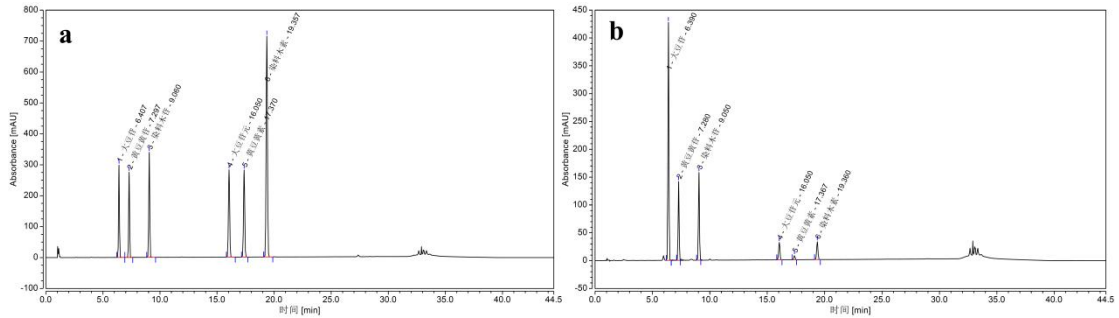


图 7 AOAC2001.10 色谱图 (a.大豆异黄酮标准品图谱, b.某软胶囊大豆异黄酮图谱)

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

本标准没有采用国际标准。

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

本标准与现行法律法规和强制性国家标准协调一致。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准制定过程中无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本标准不涉及专利。

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

建议本标准发布 6 个月后实施, 由归口单位组织行业相关单位积极开展宣贯工作。

十、其他应当说明的事项

本标准发布实施后, GB/T 23788-2009 废止。

附件一: 方法学验证报告

附件一

保健食品中大豆异黄酮的测定方法学验证

1. 特异性

在空白溶剂和空白辅料干扰性试验中,项目组选择国内市售的大豆异黄酮保健食品所有剂型,包括硬胶囊内容物、软胶囊内容物、片剂和液体。结果如表 8 所示,空白辅料中无色谱峰对大豆异黄酮检测造成干扰。

表 8 空白基质杂质峰和色谱峰保留时间

样品代码	产品空白辅料色谱峰保留时间(min)	功能成分色谱峰保留时间(min)					
	杂质 1	大豆苷	黄豆苷	染料木苷	大豆苷元	黄豆黄素	染料木素
软胶囊	/	14.427	15.987	20.543	31.323	32.600	41.183
硬胶囊	/	14.443	16.037	20.577	31.337	32.607	41.260
片剂	/	14.433	15.987	20.560	31.397	32.663	41.313
液体	17.790	14.437	15.990	20.577	31.433	32.710	41.417
接受标准	产品空白辅料与各功能成分色谱峰分离度>1.5						
结论	空白辅料不干扰主成分测定						

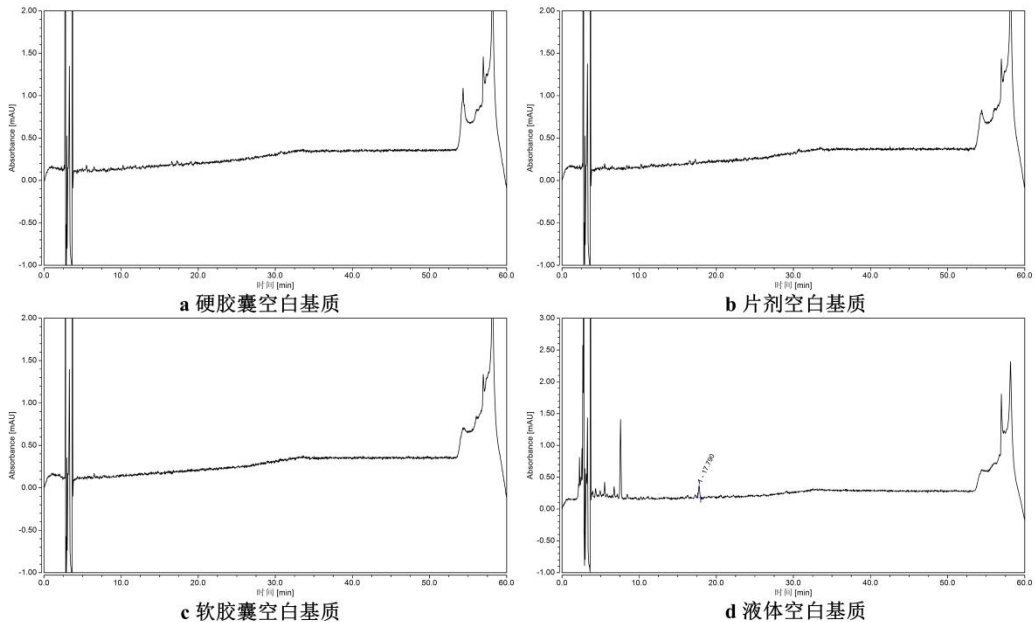


图 8 空白基质色谱图

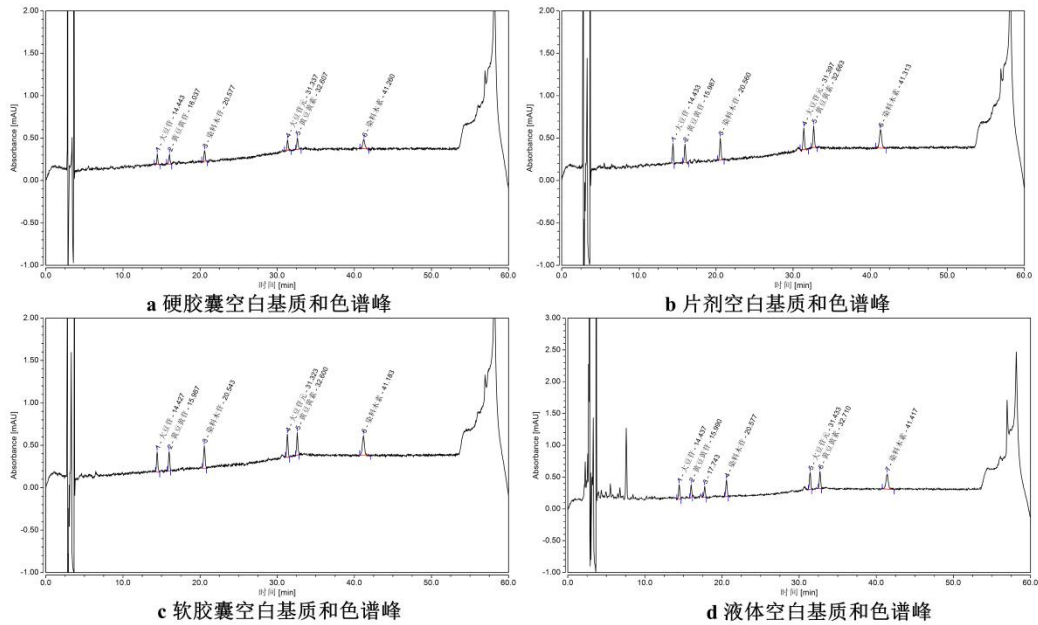


图9 空白基质和目标峰色谱图

2. 检出限

采用信噪比估算方法的检出限：向空白样品基质添加目标分析物，信噪比为3时的添加浓度作为估算检出限。综合考虑不同仪器的灵敏度及方便可操作性，将大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素的最低估算检出浓度定为 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 。

测定：选取空白样品基质 20 个平行样，分别添加估算检出限浓度的目标分析物，如目标分析物的检出概率不低于 95%，则定为检出限。结果如表 9 所示。

表 9 方法检出限验证结果

基质	目标分析物检出数量	目标分析物检出率
硬胶囊	20	100%
软胶囊	20	100%
片剂	20	100%
液体口服液	20	100%
接受标准	目标分析物检出率 \geq 95%	
结论	空白辅料不干扰主成分测定	

3. 定量限

以 3 倍检出限作为估算定量限。表 10 是定量限估算结果。

表 10 保健食品分析方法定量限验证估算结果

样品基质（剂型）	取样量	最低定量浓度
硬胶囊	0.10g	0.003g/100g

软胶囊	0.10g	0.003g/100g
片剂	0.10g	0.003g/100g
液体口服液	1.0mL	0.0003g/100mL

测定：采用估算定量限浓度水平的有证标准物质/标准样品进行独立检测，检测 6 个平行样品。结果如表 11 所示，回收率和相对标准偏差均在范围区间内。

表 11 方法定量限验证结果

基质类型	组分名称	空白样品含量	实际添加水平	回收率 (%)						平均回收率 (%)	RSD(%)
				1	2	3	4	5	6		
软胶囊	大豆苷	ND	0.003g/100g	96.77	94.89	96.71	95.89	94.62	95.85	95.79	0.93%
	黄豆黄苷	ND	0.003g/100g	97.08	95.98	97.71	96.22	96.77	97.62	96.90	0.73%
	染料木苷	ND	0.003g/100g	95.44	95.07	97.32	96.29	98.12	96.56	96.47	1.18%
	大豆苷元	ND	0.003g/100g	96.35	97.25	97.11	94.27	99.31	96.17	96.74	1.70%
	黄豆黄素	ND	0.003g/100g	97.78	97.64	92.95	96.36	91.32	99.11	95.86	3.19%
	染料木素	ND	0.003g/100g	99.97	95.31	93.79	92.61	92.34	90.45	94.08	3.51%
硬胶囊	大豆苷	ND	0.003g/100g	96.67	92.49	95.08	96.67	95.04	99.22	95.86	2.34%
	黄豆黄苷	ND	0.003g/100g	100.11	96.24	94.96	95.47	93.81	97.88	96.41	2.35%
	染料木苷	ND	0.003g/100g	99.14	95.05	94.96	97.04	93.23	96.97	96.07	2.16%
	大豆苷元	ND	0.003g/100g	102.32	100.32	99.89	100.11	99.31	103.60	100.92	1.64%
	黄豆黄素	ND	0.003g/100g	93.91	94.88	92.95	92.91	96.48	99.46	95.10	2.65%

			0g									
	染料木素	ND	0.003g/100g	94.25	91.72	93.49	91.42	91.94	92.86	92.61	1.20%	
片剂	大豆苷	ND	0.003g/100g	96.14	93.12	94.27	96.70	93.02	97.35	95.10	1.97%	
	黄豆黄苷	ND	0.003g/100g	96.08	95.07	94.72	97.66	93.51	95.87	95.49	1.47%	
	染料木苷	ND	0.003g/100g	94.65	95.17	94.23	95.70	93.53	97.25	95.09	1.36%	
	大豆苷元	ND	0.003g/100g	100.70	99.08	100.20	92.43	95.01	96.17	97.27	3.36%	
	黄豆黄素	ND	0.003g/100g	95.67	99.36	97.79	95.67	93.38	100.50	97.06	2.73%	
	染料木素	ND	0.003g/100g	93.43	90.13	94.59	90.62	93.53	92.06	92.39	1.91%	
液体	大豆苷	ND	0.0003g/100mL	99.00	95.05	95.85	94.49	97.04	99.01	96.74	2.02%	
	黄豆黄苷	ND	0.0003g/100mL	97.60	95.30	94.59	93.06	93.01	98.10	95.28	2.29%	
	染料木苷	ND	0.0003g/100mL	97.47	95.58	94.29	96.94	92.99	99.24	96.09	2.36%	
	大豆苷元	ND	0.0003g/100mL	95.41	91.41	93.73	95.19	98.39	96.79	95.15	2.54%	
	黄豆黄素	ND	0.0003g/100mL	91.83	92.82	95.36	91.20	91.66	94.95	92.97	1.91%	
	染料木素	ND	0.0003g/100mL	93.92	93.05	92.26	93.14	96.18	99.24	94.63	2.78%	

ND: 未检出

4.测定范围

采用标准曲线法定量，定量方法标准曲线的线性相关系数应大于等于 0.99，并具有 6 个数据点（不包括 0 点）。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 µg/mL、10.0 µg/mL、20.0 µg/mL、50.0 µg/mL、100.0 µg/mL，大豆苷元、黄豆黄素、染料木素浓度分别为 0.2 µg/mL、2.0 µg/mL、4.0 µg/mL、10.0 µg/mL、20.0 µg/mL。标准曲线具体结果见表 12。

表 12 方法的标准曲线

标曲点	1	2	3	4	5
大豆苷峰面积	0.648	6.544	13.232	32.537	66.07
黄豆黄苷峰面积	0.492	4.972	10.073	24.747	50.37
染料木苷峰面积	0.693	7.065	14.293	35.134	71.591
大豆苷元峰面积	0.212	2.123	4.31	10.583	21.583
黄豆黄素峰面积	0.12	1.21	2.452	6.096	12.471
染料木素峰面积	0.316	3.198	6.507	16.016	32.692
线性方程	大豆苷标准曲线: $y=0.6186x-0.0826$, 相关系数 $R=0.9999$ 黄豆黄苷标准曲线: $y=0.6158x-0.0809$, 相关系数 $R=0.9999$ 染料木苷标准曲线: $y=0.8368x-0.1297$, 相关系数 $R=0.9999$ 大豆苷元标准曲线: $y=0.9127x-0.0417$, 相关系数 $R=0.9999$ 黄豆黄素标准曲线: $y=0.8616x-0.0444$, 相关系数 $R=0.9999$ 染料木素标准曲线: $y=1.3134x-0.0788$, 相关系数 $R=0.9999$				

5. 正确度和重复性

对不同基质进行加标回收率实验，软胶囊、硬胶囊、片剂和液体基质进行三水平加标回收率实验，计算每个样品中目标分析物的浓度，计算每个浓度的平均回收率，计算 6 次重复性实验的标准偏差，结果汇总于表 13-15。

由表 13 可知，低水平方法加标试验中，四种基质中大豆苷的加标回收率在 92.20%~98.91%，相对标准偏差 RSD 在 0.79%~2.31%；黄豆黄苷的加标回收率在 92.72%~97.79%，相对标准偏差 RSD 在 0.73%~1.97%；染料木苷的加标回收率在 92.70%~98.93%，相对标准偏差 RSD 在 1.06%~2.26%；大豆苷元的加标回收率在 91.13%~103.27%，相对标准偏差 RSD 在 1.51%~2.91%；黄豆黄素的加标回收率在 90.91%~100.19%，相对标准偏差 RSD 在 1.82%~3.05%；染料木素的加标回收率在 90.17%~98.93%，相对标准偏差 RSD 在 0.85%~2.75%。

由表 14 可知，中水平方法加标试验中，四种基质中大豆苷的加标回收率在 91.76%~99.94%，相对标准偏差 RSD 在 1.36%~2.31%；黄豆黄苷的加标回收率在

91.93%~96.96%，相对标准偏差 RSD 在 1.34%~1.71%；染料木苷的加标回收率在 91.08%~98.94%，相对标准偏差 RSD 在 1.48%~3.17%；大豆苷元的加标回收率在 92.14%~99.12%，相对标准偏差 RSD 在 0.83%~1.71%；黄豆黄素的加标回收率在 91.84%~100.92%，相对标准偏差 RSD 在 1.21%~2.36%；染料木素的加标回收率在 91.83%~98.93%，相对标准偏差 RSD 在 1.60%~2.10%。

由表 15 可知，高水平方法加标试验中，四种基质中大豆苷的加标回收率在 92.92%~100.25%，相对标准偏差 RSD 在 0.80%~2.22%；黄豆黄苷的加标回收率在 91.81%~99.72%，相对标准偏差 RSD 在 1.50%~2.43%；染料木苷的加标回收率在 91.20%~99.40%，相对标准偏差 RSD 在 0.63%~2.13%；大豆苷元的加标回收率在 94.75%~98.56%，相对标准偏差 RSD 在 0.27%~0.76%；黄豆黄素的加标回收率在 95.54%~98.20%，相对标准偏差 RSD 在 0.59%~0.85%；染料木素的加标回收率在 94.49%~98.21%，相对标准偏差 RSD 在 0.39%~0.96%。

综上，本方法对不同样品中六种目标组分的测定准确度和重复性良好，满足 GB5009.295-2023 《食品安全国家标准化学分析方法验证通则》相关要求。

表 13 低水平方法正确度和重复性验证结果

基质类型	组分名称	空白样品含量	实际添加水平	回收率 (%)						平均回收率 (%)	RSD (%)
				1	2	3	4	5	6		
软胶囊	大豆苷	ND	0.05g/100g	94.60	96.41	95.59	94.33	95.55	95.49	95.33	0.79
	黄豆黄苷	ND	0.05g/100g	95.68	97.40	95.92	96.47	97.31	96.59	96.56	0.73
	染料木苷	ND	0.05g/100g	94.78	97.02	95.99	97.82	96.26	96.17	96.34	1.06
	大豆苷元	ND	0.01g/100g	96.94	96.81	93.98	99.00	95.87	96.44	96.51	1.69
	黄豆黄素	ND	0.01g/100g	97.33	92.66	96.06	91.03	98.80	95.56	95.24	3.05
	染料木素	ND	0.01g/100g	95.02	93.49	92.33	92.05	90.17	93.78	92.81	1.81

硬胶 囊	大豆 苷	ND	0.05g/100 g	92.20	94.78	96.36	94.75	98.91	95.56	95.43	2.31
	黄豆 黄苷	ND	0.05g/100 g	95.94	94.66	95.17	93.52	97.57	96.11	95.50	1.45
	染料 木苷	ND	0.05g/100 g	94.76	94.66	96.73	92.94	96.67	95.77	95.26	1.51
	大豆 苷元	ND	0.01g/100 g	100.01	99.58	99.80	99.00	103.27	100.6 1	100.38	1.51
	黄豆 黄素	ND	0.01g/100 g	94.59	92.66	92.62	96.18	99.15	94.80	95.00	2.58
	染料 木素	ND	0.01g/100 g	91.44	93.19	91.13	91.65	92.57	92.32	92.05	0.85
片剂	大豆 苷	ND	0.05g/100 g	92.83	93.97	96.39	92.73	97.05	94.80	94.63	1.91
	黄豆 黄苷	ND	0.05g/100 g	94.78	94.42	97.36	93.22	95.57	95.19	95.09	1.44
	染料 木苷	ND	0.05g/100 g	94.88	93.93	95.40	93.24	96.95	94.79	94.87	1.34
	大豆 苷元	ND	0.01g/100 g	98.77	99.89	92.15	94.72	95.87	96.96	96.39	2.91
	黄豆 黄素	ND	0.01g/100 g	99.05	97.48	95.37	93.09	100.19	96.76	96.99	2.63
	染料 木素	ND	0.01g/100 g	92.85	94.29	91.34	93.24	91.77	92.11	92.60	1.17%
液体	大豆 苷	ND	0.005g/10 0mL	94.76	95.55	94.20	96.74	98.70	96.44	96.06	1.68
	黄豆 黄苷	ND	0.005g/10 0mL	95.01	94.29	92.77	92.72	97.79	94.98	94.60	1.97
	染料 木苷	ND	0.005g/10	95.28	93.99	96.63	92.70	98.93	95.79	95.56	2.26

			0mL								
	大豆 苷元	ND	0.001g/10 0mL	91.13	93.43	94.89	98.08	96.49	94.86	94.81	2.54
	黄豆 黄素	ND	0.001g/10 0mL	92.53	95.06	90.91	91.37	94.66	92.68	92.87	1.82
	染料 木素	ND	0.001g/10 0mL	92.76	91.98	92.85	95.88	98.93	94.34	94.46	2.75

ND: 未检出

表 14 中水平方法正确度和重复性验证结果

基质 类型	组分 名称	空白 样品 含量	实际添 加水平	回收率 (%)						平均回 收率 (%)	RSD(%)
				1	2	3	4	5	6		
软 胶 囊	大豆 苷	ND	0.25g/10 0g	96.16	97.48	97.25	94.12	98.49	97.58	96.85	1.58
	黄 豆 黄苷	ND	0.25g/10 0g	96.14	95.31	92.66	93.90	92.00	93.95	93.99	1.66
	染 料 木苷	ND	0.25g/10 0g	95.37	93.73	91.90	95.08	92.20	93.33	93.60	1.53
	大 豆 苷元	ND	0.05g/10 0g	98.50	96.50	94.59	93.81	96.24	96.28	95.98	1.71
	黄 豆 黄素	ND	0.05g/10 0g	94.91	98.93	93.77	92.19	94.41	94.70	94.82	2.36
	染 料 木素	ND	0.05g/10 0g	97.93	95.57	95.97	92.50	95.93	96.22	95.69	1.85
硬 胶 囊	大豆 苷	ND	0.25g/10 0g	95.95	94.46	91.76	96.47	92.80	94.06	94.25	1.91
	黄 豆 黄苷	ND	0.25g/10 0g	93.93	93.50	91.93	95.33	92.19	93.85	93.46	1.34
	染 料 木苷	ND	0.25g/10	93.26	93.43	91.08	98.94	97.91	95.71	95.06	3.17

			0g								
	大豆 苷元	ND	0.05g/10 0g	95.12	93.30	95.95	92.14	93.31	94.21	94.00	1.47
	黄豆 黄素	ND	0.05g/10 0g	95.77	93.65	91.91	91.84	92.00	93.40	93.09	1.64
	染料 木素	ND	0.05g/10 0g	96.33	94.38	91.83	95.27	94.33	95.09	94.54	1.60
片 剂	大豆 苷	ND	0.25g/10 0g	97.03	99.94	94.99	96.06	93.33	96.94	96.38	2.31
	黄豆 黄苷	ND	0.25g/10 0g	95.87	94.74	92.10	95.20	92.15	93.85	93.99	1.69
	染料 木苷	ND	0.25g/10 0g	92.84	92.23	98.47	96.08	98.52	96.36	95.75	2.82
	大豆 苷元	ND	0.05g/10 0g	98.96	97.56	96.25	94.42	96.39	96.58	96.69	1.56
	黄豆 黄素	ND	0.05g/10 0g	97.49	94.50	97.00	94.91	96.31	96.25	96.07	1.21
	染料 木素	ND	0.05g/10 0g	98.53	93.59	98.93	95.07	96.73	96.31	96.52	2.10
液 体	大豆 苷	ND	0.025g/1 00mL	95.23	94.65	93.01	96.42	93.25	95.08	94.61	1.36
	黄豆 黄苷	ND	0.025g/1 00mL	95.40	94.51	91.97	96.96	94.74	94.94	94.75	1.71
	染料 木苷	ND	0.025g/1 00mL	95.67	94.27	92.62	96.16	93.09	94.78	94.43	1.48
	大豆 苷元	ND	0.005g/1 00mL	97.43	96.65	97.58	97.53	99.12	97.82	97.69	0.83
	黄豆 黄素	ND	0.005g/1 00mL	98.04	97.45	100.92	97.71	99.54	98.67	98.72	1.33

	染料木素	ND	0.005g/100mL	96.19	94.40	98.12	98.22	98.46	96.94	97.05	1.61
--	------	----	--------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	------

ND: 未检出

表 15 高水平方法正确度和重复性验证结果

基质类型	组分名称	空白样品含量	实际添加水平	回收率 (%)						平均回收率(%)	RSD(%)
				1	2	3	4	5	6		
软胶囊	大豆苷	ND	0.50g/100g	97.45	95.61	94.24	94.42	94.14	96.31	95.36	1.41%
	黄豆黄苷	ND	0.50g/100g	91.81	92.80	93.14	93.76	95.79	94.63	93.65	1.50%
	染料木苷	ND	0.50g/100g	98.82	97.55	96.16	97.51	98.61	98.23	97.81	0.99%
	大豆苷元	ND	0.10g/100g	96.68	96.19	95.33	94.75	96.38	96.19	95.92	0.76%
	黄豆黄素	ND	0.10g/100g	98.05	97.72	97.14	96.39	97.49	97.59	97.40	0.59%
	染料木素	ND	0.10g/100g	98.21	97.71	96.32	95.98	97.91	97.64	97.29	0.94%
硬胶囊	大豆苷	ND	0.50g/100g	100.25	97.64	94.37	99.33	95.85	97.83	97.55	2.22%
	黄豆黄苷	ND	0.50g/100g	98.52	92.95	97.47	94.92	99.22	96.95	96.67	2.43%
	染料木苷	ND	0.50g/100g	92.00	92.20	91.20	92.95	92.49	92.30	92.19	0.63%
	大豆苷元	ND	0.10g/100g	95.61	95.55	95.51	96.19	95.93	95.77	95.76	0.27%
	黄豆黄素	ND	0.10g/100g	96.08	96.48	98.20	97.27	96.84	97.10	96.99	0.75%
	染料木素	ND	0.10g/100g	96.94	97.11	96.71	97.69	96.64	97.13	97.04	0.39%
片剂	大豆苷	ND	0.50g/100g	94.70	93.97	93.11	94.54	92.92	94.78	94.00	0.87%
	黄豆黄苷	ND	0.50g/100g	95.17	97.26	96.93	93.17	99.72	96.80	96.51	2.28%
	染料木苷	ND	0.50g/100g	97.34	99.30	96.31	96.26	94.96	96.33	96.75	1.51%
	大豆苷元	ND	0.10g/100g	96.55	96.31	95.17	95.39	95.44	95.91	95.80	0.58%

液 体	黄 豆 黄 素	ND	0.10g/100g	96.90	97.30	96.16	95.94	96.23	96.70	96.54	0.53%
	染 料 木 素	ND	0.10g/100g	97.74	96.55	95.53	95.22	96.96	96.61	96.43	0.96%
	大 豆 苷	ND	0.050g/100 mL	98.65	98.29	96.58	97.57	98.54	98.22	97.98	0.80%
	黄 豆 黄 苷	ND	0.050g/100 mL	92.40	97.27	95.30	97.04	98.02	96.20	96.04	2.10%
	染 料 木 苷	ND	0.050g/100 mL	93.55	99.40	97.55	97.98	98.91	97.52	97.48	2.13%
	大 豆 苷 元	ND	0.010g/100 mL	98.00	98.01	97.04	98.56	97.36	97.86	97.81	0.55%
	黄 豆 黄 素	ND	0.010g/100 mL	96.30	97.81	95.54	97.53	96.74	96.80	96.79	0.85%
	染 料 木 素	ND	0.010g/100 mL	96.16	95.23	94.49	95.67	94.52	95.29	95.23	0.68%

ND: 未检出

6. 标准储备液稳定性

为了考察标准溶液的稳定性，将储藏在 4℃冰箱中的大豆苷、黄豆黄苷、染料木苷、大豆苷元、黄豆黄素、染料木素标准品单标储备溶液分别于第 1 天、第 7 天、第 15 天、第 30 天、第 45 天、第 60 天、第 90 天配制成约 100 μg/mL 混合对照溶液分别进样，记录目标组分的色谱峰面积，进行分析，说明 3 个月内单标储备溶液浓度变化无显著性差异，表明 3 种组分在 4℃冰箱中可稳定储存三个月。标准储备液稳定性测试结果见表 16。

表 16 标准储备液稳定性结果

天数	大豆苷 μg/mL	黄豆黄苷 μg/mL	染料木苷 μg/mL	大豆苷元 μg/mL	黄豆黄素 μg/mL	染料木素 μg/mL
1	99.572	104.500	94.732	100.188	87.648	112.772
7	94.688	101.904	90.816	98.780	83.424	107.228
15	98.076	105.512	93.500	97.636	84.260	110.396
30	96.668	100.760	93.676	96.096	86.108	109.604
45	96.184	101.156	93.192	99.396	85.712	111.628
60	96.888	101.244	91.696	98.956	86.592	112.464

90	99.616	100.496	90.376	99.616	86.988	111.144
平均值	97.385	102.225	92.570	98.667	85.819	110.748
RSD/%	1.86%	1.93%	1.75%	1.40%	1.75%	1.72%

7. 修订前后标准一致性评价

采用新旧方法对各剂型样品进行测定，计算样品中目标组分的含量，并比对结果，试验结果见表 17。标准方法修订后不会对市场上的该类保健食品监管产生影响，从而保证标准的连贯性和市场监管的有效性。

表 17 不同大豆异黄酮实际测量值

编号	名称	剂型	方法	大豆苷 g/100g	黄豆 黄苷 g/100g	染料木 苷 g/100g	大豆苷 元 g/100g	黄豆黄 素 g/100g	染料木 素 g/100g	大豆异黄 酮总含量 g/100g	新标准/ 原标准
1	样品 1	软胶囊	新标准	2.73	0.88	1.20	0.23	0.07	0.10	5.22	101.35%
			原标准	2.68	0.86	1.21	0.23	0.07	0.11	5.15	
			标签值	2.00	/	0.88	0.10	/	0.07	3.00	
2	样品 2	硬胶囊	新标准	8.91	4.45	2.18	0.22	0.11	0.07	15.94	100.67%
			原标准	8.81	4.41	2.20	0.22	0.11	0.07	15.83	
			标签值	/	/	/	/	/	/	11.50	
3	样品 3	软胶囊	新标准	2.87	0.71	4.87	0.19	0.04	0.19	8.86	101.21%
			原标准	2.78	0.68	4.87	0.19	0.04	0.19	8.76	
			标签值	1.87	/	2.55	0.04	/	0.01	4.47	
4	样品 4	软胶囊	新标准	1.92	0.24	2.60	0.28	0.07	0.26	5.37	100.17%
			原标准	1.89	0.23	2.64	0.28	0.07	0.26	5.36	
			标签值	3.4mg		3.5mg	0.08mg		0.02mg	7mg	
5	样品 5	片剂	新标准	1.72	0.72	0.47	9.36	0.04	0.04	12.36	99.32%
			原标准	1.73	0.70	0.48	9.45	0.04	0.04	12.45	
			标签值	/	/	/	/	/	/	11.72	
6	样品 6	硬胶囊	新标准	6.88	2.71	6.93	0.54	0.12	0.21	17.39	99.83%
			原标准	6.80	2.71	7.04	0.54	0.12	0.21	17.42	
			标签值	5.50		5.50	0.30		0.10	11.40	
7	样品 7	片剂	新标准	2.53	1.07	2.90	0.25	0.03	0.25	7.03	100.80%
			原标准	2.47	1.05	2.91	0.25	0.04	0.26	6.98	
			标签值	1.87	/	1.93	0.09	/	0.10	3.99	
8	样品 8	软胶囊	新标准	8.65	2.81	2.08	1.13	0.12	0.11	14.89	101.90%
			原标准	8.41	2.76	2.08	1.13	0.12	0.11	14.62	
			标签值	6.80	/	0.76	0.80	/	0.04	8.40	
9	样品 9	硬胶囊	新标准	1.65	0.70	1.79	0.14	0.04	0.13	4.46	103.36%
			原标准	1.56	0.66	1.77	0.14	0.05	0.14	4.31	
			标签值	/	/	/	/	/	/	2.80	
10	样品 10	软胶囊	新标准	4.00	1.32	1.21	0.26	0.07	0.19	7.03	100.77%

			原标准	3.94	1.31	1.22	0.26	0.07	0.19	6.98	
			标签值	6.80	/	0.76	0.80	/	0.04	8.40	
11	样品 11	软胶囊	新标准	8.98	2.93	2.16	1.19	0.13	0.12	15.51	101.59%
			原标准	8.77	2.89	2.17	1.19	0.13	0.12	15.26	
			标签值	6.80	/	0.76	0.80	/	0.04	8.40	
12	样品 12	硬胶囊	新标准	1.07	0.33	1.53	0.09	0.02	0.07	3.11	100.27
			原标准	1.06	0.34	1.50	0.09	0.02	0.07	3.10	
			标签值	/	/	/	/	/	/	2.15	
13	样品 13	液体	新标准	0.629	0.140	0.106	0.013	0.006	0.002	0.90	104.17%
			老标准	0.600	0.134	0.102	0.013	0.010	0.002	0.86	
			标签值	/	/	/	/	/	/	/	

8. 再现性

依据《保健食品中大豆异黄酮的测定方法 高效液相色谱法》标准草案，组织无锡市食品安全检验检测中心（Lab1）、劲牌有限公司（Lab2）、仙乐健康科技股份有限公司（Lab3）、南京市食品药品监督管理局（Lab4）、华测检测认证集团股份有限公司（Lab5）等 5 家实验室，验证方法测定范围、正确度、再现性、定量限和检出限。结果符合要求，实际样品再现性验证结果如表 18~表 19 所示。

表 18 固体、半固体试样实验室间比对结果

编号	指标	含量 (g/100g)					RSD
		Lab1	Lab2	Lab3	Lab4	Lab5	
DD-01S (软胶囊)	大豆苷	2.51	2.72	2.74	2.34	2.17	9.82
	黄豆黄苷	1.16	1.20	1.23	1.18	1.09	4.49%
	染料木苷	1.23	1.32	1.33	1.28	1.35	3.67%
	大豆苷元	0.239	0.242	0.249	0.231	0.243	2.72%
	黄豆黄素	0.0282	0.0297	0.0300	0.0269	0.0300	4.74%
	染料木素	0.150	0.154	0.160	0.150	0.160	3.31%
	大豆异黄酮总量	5.32	5.66	5.74	5.21	5.04	5.53%
DD-02S (硬胶囊)	大豆苷	10.24	9.96	9.89	9.37	8.44	7.42%
	黄豆黄苷	4.09	3.95	3.90	3.86	3.82	2.65%
	染料木苷	2.46	2.30	2.27	2.33	2.47	3.94%
	大豆苷元	0.322	0.304	0.311	0.327	0.326	3.19%
	黄豆黄素	0.166	0.137	0.143	0.171	0.153	9.38%
	染料木素	0.0627	0.0580	0.0726	0.0602	0.0674	9.13%
	大豆异黄酮总量	17.3	16.7	16.6	16.1	15.3	4.69%

表 19 液体试样实验室间比对结果

编号	指标	含量 (mg/100mL)					RSD
		Lab1	Lab2	Lab3	Lab4	Lab5	
DD-12S (液体)	大豆苷	18.73	19.10	19.0	18.00	15.30	8.78%
	黄豆黄苷	2.24	2.70	2.71	2.50	2.45	7.75%

染料木苷	7.11	7.40	7.30	7.00	7.35	2.35%
大豆苷元	2.17	2.30	2.33	2.20	2.34	3.37%
黄豆黄素	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	<0.3	/
染料木素	2.68	2.60	2.76	2.50	2.74	4.04%
大豆异黄酮总含量	32.9	34.1	34.1	32.2	30.2	4.97%