

ICS 67.050
X 04



中华人民共和国国家标准

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

Determination of soybean isoflavone in health-care food—
High-performance liquid chromatography

2009-05-18 发布

2009-12-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由全国特殊膳食标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：北京市朝阳区产品质量监督检验所、红牛维他命饮料有限公司、中国食品发酵工业研究院。

本标准主要起草人：崔岩、邢晓慧、张立刚、钟其顶、张淑玲、郎涛、苏文英、吴镇君、仇凯。

保健食品中大豆异黄酮的测定方法

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了保健食品中大豆异黄酮的测定方法。

本标准适用于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),也可用于保健食品原料中大豆异黄酮含量的测定。

本标准的检出限:固体、半固体样品大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素和染料木素组分的检出限均为5 mg/kg;液体样品的大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素和染料木素组分的检出限均为0.2 mg/L。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准;然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008, ISO 3696:1987, MOD)

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、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素和染料木素的总称,黄酮类物质。分子式如下:大豆苷: $C_{21}H_{30}O_7$,大豆黄苷: $C_{22}H_{22}O_7$,染料木苷: $C_{21}H_{30}O_{10}$,大豆素: $C_{15}H_{16}O_4$,大豆黄素: $C_{16}H_{12}O_6$,染料木素: $C_{15}H_{10}O_5$ 。

4 方法提要

样品制备、提取、过滤后,经高效液相色谱仪分析(C_{18} 柱分离),依据保留时间定性,用外标法定量。

5 试剂和材料

本标准使用符合GB/T 6682规定的一级水。除另有规定仅使用分析纯试剂。

5.1 乙腈:色谱纯。

5.2 甲醇:优级纯。

5.3 80%甲醇:用甲醇80 mL,加水20 mL,混匀。

5.4 磷酸。

5.5 磷酸水溶液:用磷酸调节pH至3.0,经0.45 μm 滤膜过滤。

5.6 二甲基亚砜:色谱纯。

5.7 50%二甲基亚砜溶液:取二甲基亚砜50 mL,加水50 mL,混匀。

5.8 大豆异黄酮标准贮备溶液:称取大豆苷(daidzin)、大豆黄苷(glycitin)和染料木苷(genistin)、大豆

素(daidzein)、大豆黄素(glycitein)和染料木素(genistein)(纯度均为98.0%以上)各4 mg,分别置于10 mL容量瓶中,加入二甲基亚砷(5.6)至接近刻度,超声处理30 min,再用二甲基亚砷(5.6)定容。各标准贮备溶液浓度均为400 mg/L(大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素和染料木素)。

5.9 大豆异黄酮混合标准使用溶液:

8.0 mg/L混合标准溶液配制:吸取大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素、染料木素六种标准贮备溶液(5.8)各0.2 mL于10 mL容量瓶中,加入等体积水,用50%二甲基亚砷溶液(5.7)定容。

16.0 mg/L混合标准溶液配制:吸取大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素、染料木素六种标准贮备溶液(5.8)各0.4 mL于10 mL容量瓶中,加入等体积水,用50%二甲基亚砷溶液(5.7)定容。

24.0 mg/L混合标准溶液配制:吸取大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素、染料木素六种标准贮备溶液(5.8)各0.6 mL于10 mL容量瓶中,加入等体积水,用50%二甲基亚砷溶液(5.7)定容。

32.0 mg/L混合标准溶液配制:吸取大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素、染料木素六种标准贮备溶液(5.8)各0.8 mL于10 mL容量瓶中,加入等体积水,用50%二甲基亚砷溶液(5.7)定容。

40.0 mg/L混合标准溶液配制:吸取大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素、染料木素六种标准贮备溶液(5.8)各1.0 mL于10 mL容量瓶中,加入等体积水,用50%二甲基亚砷溶液(5.7)定容。

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 超声波振荡器。

6.3 分析天平:感量0.01 mg。

6.4 酸度计:精度0.02 pH。

6.5 离心机:转速不低于8 000 r/min。

6.6 滤膜:孔径为0.45 μm。

6.7 容量瓶:10 mL。

7 分析步骤

7.1 样品处理

7.1.1 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 g~0.5 g(精确至0.1 mg),用80%甲醇溶液(5.3)溶解并转移至50 mL容量瓶中,加入80%甲醇溶液至接近刻度。

7.1.2 液体样品:吸取混匀的液体样品0.5 mL~5.0 mL于50 mL容量瓶中,加入80%甲醇溶液至接近刻度。

7.1.3 将上述样品溶液(7.1.1或7.1.2)用超声波振荡器振荡20 min,用80%甲醇定容,摇匀。取样品溶液置于离心管中,离心机离心15 min(转速大于8 000 r/min)。取上清液用滤膜(6.6)过滤,收集滤液备用。

7.2 色谱条件

7.2.1 色谱柱

C₁₈, 4.6 mm×250 mm, 粒度5 μm 不锈钢色谱柱;也可使用分离效果相当的其他不锈钢柱。

7.2.2 流动相

流动相A:乙腈(5.1)。

流动相B:磷酸水溶液(pH=3.0)(5.5)。

7.2.3 梯度洗脱条件

见表1。

表 1

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

7.2.4 流速:1.0 mL/min。

7.2.5 波长:260 nm。

7.2.6 进样量:10 μ L。

7.2.7 柱温:30 $^{\circ}$ C。

7.3 测定

7.3.1 定性

分别将大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素、染料木素的标准贮备溶液(5.8)稀释10倍后,按色谱条件(7.2)进行测定,依据单一标准样品的保留时间,对样品溶液中的组分进行定性,定性色谱图参见附录A。

7.3.2 定量

将大豆异黄酮混合标准使用溶液(5.9)在色谱条件(7.2)下进行测定,绘制以峰面积为纵坐标、混合标准使用溶液浓度为横坐标的标准曲线。将7.1.3制备的样品溶液注入高效液相色谱仪中,保证样品溶液中大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素和染料木素的响应值均在工作曲线的线性范围内,由标准曲线查得样品溶液中大豆苷、大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素和染料木素的浓度。

8 结果计算

8.1 样品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)、大豆素(X_4)、大豆黄素(X_5)和染料木素(X_6)]的含量分别按式(1)计算:

$$X_i = c_i \times \frac{V}{m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X_i ——样品中大豆异黄酮单一组分的含量,单位为毫克每千克(mg/kg)或毫克每升(mg/L);

c_i ——根据标准曲线得出的大豆苷(或大豆黄苷、染料木苷、大豆素、大豆黄素、染料木素)的浓度,单位为毫克每升(mg/L);

V ——样品稀释液总体积的数值,单位为毫升(mL);

m ——固体、半固体样品质量的数值,单位为克(g);

液体样品体积的数值,单位为毫升(mL)。

8.2 样品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 ——样品中大豆异黄酮总含量,单位为毫克每千克(mg/kg)或毫克每升(mg/L);

X_1 ——样品中大豆苷的含量,单位为毫克每千克(mg/kg)或毫克每升(mg/L);

X_2 ——样品中大豆黄苷的含量,单位为毫克每千克(mg/kg)或毫克每升(mg/L);

X_3 ——样品中染料木苷的含量,单位为毫克每千克(mg/kg)或毫克每升(mg/L);

X_4 ——样品中大豆素的含量,单位为毫克每千克(mg/kg)或毫克每升(mg/L);

X_5 ——样品中大豆黄素的含量,单位为毫克每千克(mg/kg)或毫克每升(mg/L);

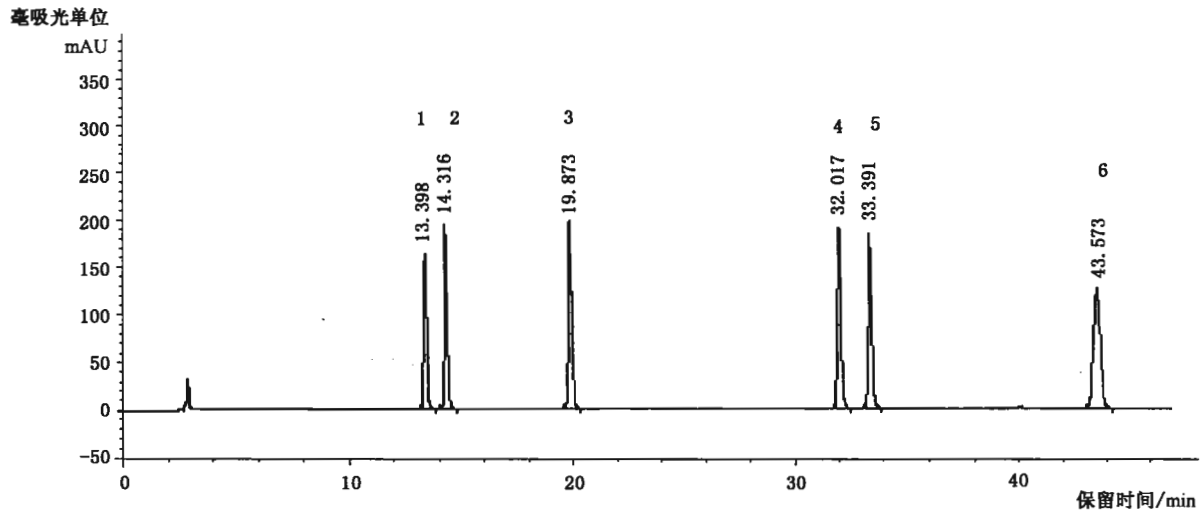
X_6 ——样品中染料木素的含量,单位为毫克每千克(mg/kg)或毫克每升(mg/L)。

计算结果应表示到小数点后一位。

9 精密度

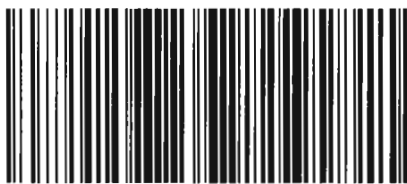
在重复性条件下,两次独立测定结果之差不得超过算术平均值的10%。

附录 A
(资料性附录)
标准样品色谱图



- 1——大豆苷(daidzin);
- 2——大豆黄苷(glycitin);
- 3——染料木苷(genistin);
- 4——大豆素(daidzein);
- 5——大豆黄素(glycitein);
- 6——染料木素(genistein)。

图 A.1 大豆异黄酮标准品的 HPLC 色谱图



GB/T 23788-2009

版权专有 侵权必究

*

书号:155066·1-37906

定价: 14.00 元