

中华人民共和国轻工行业标准

QB/T 5397—2019

大豆食品中异黄酮含量的测定

Determination of soybean isoflavones in soyfoods

2019-08-02 发布

2020-01-01 实施



中华人民共和国工业和信息化部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国食品工业协会提出并归口。

本标准起草单位：苏州金记食品有限公司、中国食品工业协会豆制品专业委员会、国家大豆产业技术研发中心加工研究室、吉林农业大学食品科学与工程学院、四川省食品药品检验检测院、祖名豆制品股份有限公司、上海清美绿色食品(集团)有限公司、深圳市福荫食品集团有限公司、山东禹王生态食业有限公司、长春维石检测技术服务有限公司、上海市豆制品行业协会、合肥市豆制品行业协会。

本标准主要起草人：吴月芳、金兴仓、于寒松、曾祥博、岳清洪、韩晓华、张凡芝、杨金平、刘军、王猛、张建秋、张之斌、孙玉坤。

大豆食品中异黄酮含量的测定

1 范围

本标准规定了大豆食品中异黄酮(大豆苷、染料木苷、大豆苷元、染料木素、黄豆黄素、黄豆黄苷)含量测定的高效液相色谱法。

本标准适用于原料大豆及豆浆、豆腐、腐乳等大豆食品中异黄酮含量的测定。

本标准测试方法的线性范围:0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

本标准测试方法的检出限:2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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—2008 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文件。

3.1

大豆异黄酮 *soybean isoflavones*

大豆生长过程中形成的一类次生代谢产物,以异黄酮葡萄糖苷和相应苷元形式存在的物质,包括大豆苷(Daidzin)、染料木苷(Genistin)、大豆苷元(Daidzein)、染料木素(Genistein)、黄豆黄素(Glycitein)、黄豆黄苷(Glycitin)。其分子式如下:大豆苷($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_9$)、染料木苷($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$)、大豆苷元($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$)、染料木素($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$)、黄豆黄素($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$)、黄豆黄苷($\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$)。

4 原理

样品经过乙腈-水溶液振荡提取,提取液经离心、浓缩后用甲醇溶液(体积分数 80%)定容、过滤,经高效液相色谱分析(C_{18} 柱分离),在 260 nm 条件下测定,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—2008 规定的一级水。除另有规定仅使用分析纯试剂。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇(Methanol, CH_3OH):色谱纯。

5.1.2 乙腈(Acetonitrile, $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$):色谱纯。

5.1.3 二甲基亚砜(DMSO, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)。

5.1.4 冰醋酸(Acetic Acid, CH_3COOH)。

5.2 试剂配制

- 5.2.1 甲醇溶液(体积分数 80%):取 800 mL 甲醇(5.1.1)用水定容至 1 000 mL,混匀。
- 5.2.2 二甲基亚砜-乙腈-甲醇溶液(1:2:2 体积比):取 10 mL 二甲基亚砜(5.1.3)和 20 mL 乙腈(5.1.2)用 80%甲醇(5.2.1)定容至 50 mL,混匀。
- 5.2.3 乙酸溶液(体积分数 0.1%):取 1 mL 冰醋酸(5.1.4)用水定容至 1 000 mL,混匀。
- 5.2.4 乙酸乙腈溶液(体积分数 0.1%):取 1 mL 冰醋酸(5.1.4),用乙腈(5.1.2)定容至 1 000 mL,混匀。

5.3 标准品

- 5.3.1 大豆苷元(Daidzein, $C_{15}H_{10}O_4$, CAS 号:486-66-8,纯度:≥98%)。
- 5.3.2 染料木素(Genistein, $C_{15}H_{10}O_5$, CAS 号:446-72-0,纯度:≥98%)。
- 5.3.3 黄豆黄素(Glycitein, $C_{16}H_{12}O_5$, CAS 号:40957-83-3,纯度:≥98%)。
- 5.3.4 大豆苷(Daidzin, $C_{21}H_{20}O_9$, CAS 号:552-66-9,纯度:≥98%)。
- 5.3.5 染料木苷(Genistin, $C_{21}H_{20}O_{10}$, CAS 号:529-59-9,纯度:≥98%)。
- 5.3.6 黄豆黄苷(Glycitin, $C_{22}H_{22}O_{10}$, CAS 号:40246-10-4,纯度:≥98%)。

5.4 标准品配制

- 5.4.1 大豆异黄酮标准储备溶液:使用分析天平(6.2)分别准确称取 6 种大豆异黄酮标准品 5 mg 分别置于容量瓶中,加入 5 mL 二甲基亚砜-乙腈-甲醇溶液(5.2.2),充分溶解,配制成 1 mg/mL 的单标标准储备液。-18℃避光保存,有效期 6 个月。
- 5.4.2 大豆异黄酮单标标准中间溶液:分别移取 0.5 mL 大豆异黄酮标准储备溶液(5.4.1),加入体积分数为 80%的甲醇溶液(5.2.1)于 5 mL 容量瓶中定容,混匀,配制成 0.1 mg/mL 单标标准中间溶液。0℃~4℃冷藏避光保存,有效期 3 个月。
- 5.4.3 大豆异黄酮混合标准工作溶液:分别吸取大豆异黄酮标准储备溶液(5.4.1)0.002 5 mL、0.005 mL、0.025 mL、0.05 mL、0.1 mL、0.15 mL、0.2 mL、0.25 mL、0.5 mL,置于 5 mL 容量瓶中,用体积分数为 80%的甲醇溶液(5.2.1)定容,分别配制成各组分浓度为 0.5 μg/mL、1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、30 μg/mL、40 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 系列大豆异黄酮混合标准工作液用以制作标准曲线。0℃~4℃冷藏避光保存,有效期 1 周。

6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱仪:配有四元梯度泵系统、柱温箱、紫外检测器、色谱工作站。
- 6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.000 1 g。
- 6.3 旋转蒸发仪。
- 6.4 恒温摇床。
- 6.5 冷冻离心机:转速不低于 8 000 r/min。
- 6.6 样品筛:60 目。
- 6.7 超声波振荡器。
- 6.8 破壁料理机。
- 6.9 组织粉碎机。
- 6.10 滤膜:孔径为 0.22 μm 的有机滤膜。
- 6.11 真空冷冻干燥机。
- 6.12 液相进样瓶:带有预开口聚四氟乙烯盖的棕色瓶,1.5 mL。

7 试样制备与保存

7.1 试样制备

7.1.1 大豆

取样品 200 g~500 g,用组织粉碎机(6.9)粉碎,使其全部通过样品筛(6.6),混匀,装入洁净而干燥的容器密封备用。

7.1.2 豆浆

取 100 mL 豆浆通过真空冷冻干燥机(6.11)制成粉末并记录冻干粉质量,装入洁净而干燥的容器,密封备用。

7.1.3 豆腐(干)、腐乳等大豆食品

取一定质量的豆腐或其他豆制品经真空冷冻干燥机(6.11)制成粉末并记录冻干粉质量,装入洁净而干燥的容器,密封备用。

7.2 试样保存

试样于 4℃ 以下避光保存。试样制备过程中,应防止污染或组分变化。

8 操作步骤

8.1 提取

准确称取试样 0.1 g~1 g(精确至 0.001 g)于离心管中,向其中加入 0.5 mL~5 mL 乙腈(5.1.2)、0.5 mL~5 mL 水,密封后充分混匀,在室温条件下,使用恒温摇床(6.4)以 300 r/min 的速度振荡提取 2 h。然后以 10 000 r/min 的速度,在 25℃ 下离心 5 min,取上清液过滤。35℃ 旋转蒸发仪(6.3)浓缩至干,向其中加入 5 mL~10 mL 甲醇溶液(体积分数 80%)以溶解干物质,通过针头式过滤器过 0.22 μm 有机相滤膜(6.10)过滤上机待测。

同时,做试剂空白。

8.2 色谱参考条件

色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C₁₈ 柱(5 μm, 4.6 mm×250 mm), 或相当型号色谱柱。
- b) 流动相 A: 含有 0.1% 乙酸溶液(5.2.3)。流动相 B: 含有 0.1% 乙酸乙腈溶液(5.2.4)。
- c) 流速: 1.2 mL/min。
- d) 柱温: 35℃。
- e) 检测波长: 260 nm。
- f) 进样量: 10 μL。
- g) 梯度洗脱条件: 见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	0.1%乙酸溶液/mL	0.1%乙酸乙腈溶液/mL
0	85	15
3	84	16
10	82	18
12	80	20
20	76	24
25	73	27
33	69	31
36	65	35
38	85	15
40	85	15

8.3 测定

8.3.1 定性

分别将大豆异黄酮单标标准中间溶液(5.4.2)按色谱参考条件(8.2)进行高效液相色谱测定,依据单一标准品的保留时间,对大豆异黄酮各组分进行定性分析,定性色谱图参照附录 A。

8.3.2 定量

8.3.2.1 标准曲线制作

将不同浓度梯度大豆异黄酮混合标准工作溶液(5.4.3)按色谱参考条件(8.2)进行高效液相色谱测定,绘制以峰面积为纵坐标、各大豆异黄酮单体浓度为横坐标的标准曲线。

8.3.2.2 样品分析

将已进行前处理的试样(7.1)按色谱参考条件(8.2)高效液相色谱测定,保证样品溶液各异黄酮单体浓度总和在标准曲线检出范围内,若超出线性范围则需要对样品进行适当稀释,得到检测结果后,对应标准曲线得到原样品溶液中各异黄酮单体的浓度。

9 结果与计算

9.1 试样中大豆异黄酮各组分含量

按式(1)计算试样中大豆异黄酮各组分含量:

$$X_i = \frac{(A_s - b) \times V \times \lambda}{a \times m} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X_i —— 试样中各异黄酮单体含量,单位为微克每克($\mu\text{g/g}$);
- A_s —— 试样样品中各异黄酮单体的峰面积值;
- b —— 标准线性回归方程中的截距;

- V —— 蒸干后重新溶解的体积,单位为毫升(mL);
- λ —— 稀释倍数;
- a —— 标准品线性回归方程中的斜率,单位为毫升每微克(mL/μg);
- m —— 样品取样质量,单位为克(g)。

结果保留 3 位有效数字。

9.2 试样中大豆异黄酮总含量

试样中大豆异黄酮总含量按式(2)计算:

$$X_{\text{总}} = \sum X_i \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- $X_{\text{总}}$ —— 试样中总大豆异黄酮含量,单位为微克每克(μg/g);
- X_i —— 试样中各异黄酮单体含量,单位为微克每克(μg/g)。

结果保留 3 位有效数字。

9.3 样品中大豆异黄酮含量

液体样品中大豆异黄酮含量按式(3)计算:

$$X_{\text{样}} = \frac{X_{\text{总}} \times m_i}{V} \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- $X_{\text{样}}$ —— 液体样品中总大豆异黄酮含量,单位为微克每毫升(μg/mL);
- $X_{\text{总}}$ —— 试样中总大豆异黄酮含量,单位为微克每克(μg/g);
- m_i —— 液体样品冻干后质量,单位为克(g);
- V —— 液体样品冻干时体积,单位为毫升(mL)。

结果保留 3 位有效数字。

固体或半固体样品中大豆异黄酮含量按式(4)计算:

$$X_{\text{样}} = \frac{X_{\text{总}} \times m'_i}{m} \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

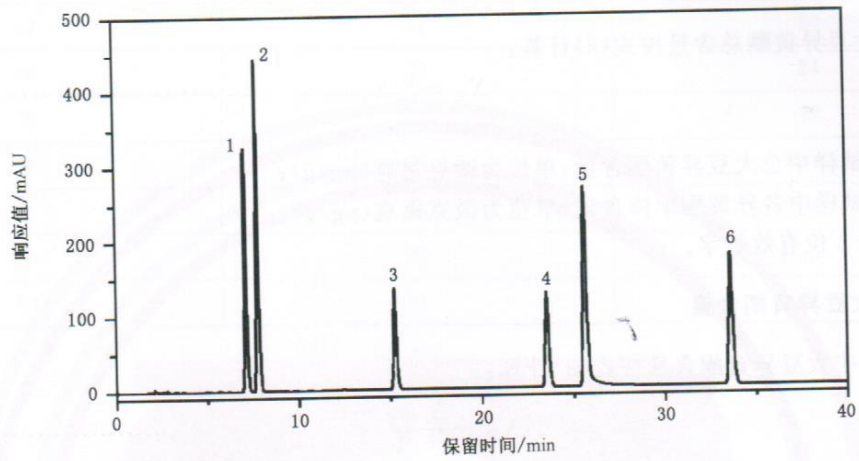
- $X_{\text{样}}$ —— 固体或半固体样品中总大豆异黄酮含量,单位为微克每克(μg/g);
- $X_{\text{总}}$ —— 试样中总大豆异黄酮含量,单位为微克每克(μg/g);
- m'_i —— 固体或半固体样品冻干后质量,单位为克(g);
- m —— 固体或半固体样品冻干时质量,单位为克(g)。

10 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的差值不应超过算数平均值的 10%。

附录 A
(资料性附录)
标准样品色谱图

大豆异黄酮标准样品的 HPLC 色谱图见图 A.1。



说明:

- 1——大豆苷(Daidzin);
- 2——黄豆黄苷(Glycitin);
- 3——染料木苷(Genistin);
- 4——大豆苷元(Daidzein);
- 5——黄豆黄素(Glycitein);
- 6——染料木素(Genistein)。

图 A.1 大豆异黄酮标准样品的 HPLC 色谱图

中华人民共和国轻工业
行 业 标 准
大豆食品中异黄酮含量的测定

QB/T 5397—2019

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字
2020年3月第一版 2020年3月第一次印刷

*

书号: 155066·2-34898 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



QB/T 5397-2019