



中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××—××××

代替 GB/T 5009.170—2003

保健食品中褪黑素的测定

Determination of melatonin 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 5009.170—2003《保健食品中褪黑素含量的测定》，与 GB/T 5009.170—2003 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了文件的适用范围(见第 1 章,2003 年版的第 1 章)；
- b) 更改了试样处理方法(见 7.2,2003 年版的 5.1 和 5.2)；
- c) 更改了标准曲线的制作方法(见 7.4,2003 年版的 5.3.2)；
- d) 更改了褪黑素计算公式(见第 8 章,2003 年版的第 6 章)；
- e) 更改了精密度内容(见第 9 章,2003 版的第 7 章)；
- f) 更改了检出限、定量限(见第 10 章,2003 年版的第 1 章)；
- g) 删除了荧光法(见 2003 年版的第二法 高效液相色谱荧光法)。

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、中原食品实验室、南京海关动植物与食品检测中心、汤臣倍健股份有限公司、河北晨光检测技术服务有限公司、广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心)、广东长兴生物科技股份有限公司、方圆标志检验检测(山东)有限公司、中国食品发酵工业研究院有限公司、浙江省食品药品检验研究院。

本文件主要起草人：安红梅、白若缤、丁涛、钟其顶、李珍、武竹英、杨清山、梁滨、夏冰、盛建伟、梁晶晶、王艳杰、朱静怡、刘洋、王道兵、刘光兰、范非非、王利平、岳红卫、程林林、刘军、陈碧莲、房家祥、林庆秀。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2003 年首次发布为 GB/T 5009.170—2003；
- 本次为第一次修订。

保健食品中褪黑素的测定

1 范围

本文件描述了保健食品中褪黑素的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于片剂、硬胶囊、软胶囊、颗粒剂、粉剂、口服液、凝胶糖果剂型形态的保健食品中褪黑素的测定。

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

试样中的褪黑素经 70%乙醇溶液提取后，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 甲醇(CH₄O)：色谱纯。

5.1.3 无水乙醇(C₂H₆O)。

5.1.4 三氟乙酸(C₂HF₃O₂)：优级纯。

5.1.5 三氟乙酸水溶液：取 908 μL 三氟乙酸(5.1.4)，用水定容至 1 000 mL，混匀。

5.1.6 70%乙醇溶液：量取 700 mL 无水乙醇(5.1.3)，用水稀释至 1 000 mL，混匀。

5.1.7 流动相：甲醇-三氟乙酸水溶液(45 : 55, 体积比)。量取 450 mL 甲醇(5.1.2)加入, 550 mL 三氟乙酸水溶液(5.1.5)，混匀。

5.2 标准物质或标准样品

褪黑素(C₁₃H₁₆N₂O₂，CAS 号：73-31-4)标准品：纯度不低于 99%，或经国家认证并授予证书的标准

物质或标准样品。

5.3 标准溶液配制

5.3.1 褪黑素标准储备溶液(1 mg/mL):称取 50 mg(精确至 0.1 mg)标准品,用 70%乙醇溶液(5.1.6)溶解并转移至 50 mL 棕色容量瓶中,70%乙醇溶液(5.1.6)定容。-20 °C 避光保存,有效期 6 个月。

5.3.2 褪黑素标准中间溶液(10.0 μg/mL):移取 1 mL 褪黑素标准储备溶液(5.3.1),用流动相(5.1.7)定容至 100 mL 棕色容量瓶,2 °C~8 °C 避光保存,有效期 3 个月。

5.3.3 褪黑素系列标准工作溶液:分别移取适量褪黑素标准储备溶液(5.3.1)和褪黑素标准中间溶液(5.3.2),用流动相(5.1.7)配制成质量浓度分别为 1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 的系列标准工作溶液。

5.4 材料

5.4.1 滤膜:0.45 μm,有机系。

5.4.2 高效除脂专用柱:无机硅铝填料(规格 600 mg/6 mL),或等效除脂柱。

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:感量 0.1 mg 和 0.001 g。

6.3 超声波清洗器。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 高速离心机:转速不低于 8 000 r/min。

7 分析步骤

7.1 试样制备

不同剂型形态试样制备步骤如下:

- 片剂:取不少于 20 粒或不少于 5 g 样品,经高速粉碎机或研钵磨成粉状,混匀;
- 颗粒剂:取不少于 5 g 样品,经高速粉碎机或研钵磨成粉状,混匀;
- 粉剂:取不少于 5 g 样品,经高速粉碎机或研钵磨成粉状,混匀;
- 硬胶囊:取不少于 20 粒或不少于 5 g 样品,取其内容物,混匀,必要时研细;
- 凝胶糖果:取不少于 20 粒或不少于 10 g 样品(对于不同色泽或风味混装的试样,按色泽或风味均匀取样),-80 °C 冰箱冷冻或液氮冷冻后粉碎或剪碎,混匀备用;
- 半固体试样(软胶囊):取不少于 20 粒或不少于 5 g 样品,剪开,挤出其内容物,混匀备用;
- 液体试样(口服液):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 固体试样(片剂、硬胶囊、颗粒剂、粉剂)

称取适量混合均匀的试样(精确至 0.001 g),根据标示含量使所取试样中褪黑素含量约为 1.5 mg,置于 50 mL 刻度管中,加入 70%乙醇溶液(5.1.6)10 mL,超声提取 10 min,8 000 r/min 离心 5 min,将上清液全部转移至 50 mL 棕色容量瓶中,再加 70%乙醇溶液(5.1.6)10 mL 于残渣中,按前述方法重复提取一次,合并上清液至 50 mL 棕色容量瓶,以流动相(5.1.7)定容,混匀,经滤膜(5.4.1)过滤,待测。

7.2.2 固体试样(凝胶糖果)

称取适量混合均匀的试样(精确至 0.001 g),根据标示含量使所取试样中褪黑素含量约为 1.5 mg,置于 50 mL 具塞刻度管中,加入 70%乙醇溶液(5.1.6)10 mL,80 °C 加热至样品完全溶解,超声提取 10 min,冷却至室温,8 000 r/min 离心 5 min,取 2 mL 上清液于 10 mL 棕色容量瓶中,以流动相(5.1.7)定容,混匀,经滤膜(5.4.1)过滤,待测。

7.2.3 半固体试样(软胶囊)

称取适量混合均匀的试样(精确至 0.001 g),根据标示含量使所取试样中褪黑素含量约为 1.5 mg,置于 50 mL 刻度管中,加入 70%乙醇溶液(5.1.6)8 mL,涡旋混合 10 min,将混合液转移至高效除脂专用柱(5.4.2)中,再加入 70%乙醇溶液(5.1.6)2 mL,冲洗刻度管,将洗液一并转入高效除脂专用柱(5.4.2),取合并混匀后的滤液 2 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中,以流动相(5.1.7)定容,混匀,经滤膜(5.4.1)过滤,待测。

7.2.4 液体试样(口服液)

称量(精确至 0.001 g)适量或移取特定体积的混合均匀的液体试样,根据标示含量使所取试样中褪黑素含量约为 1.5 mg,置于 10 mL 棕色容量瓶中,70%乙醇溶液(5.1.6)定容,混合均匀后,取 2 mL 混合液于 10 mL 棕色容量瓶中,以流动相(5.1.7)定容,混匀,经滤膜(5.4.1)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 5.0 μm,4.6 mm×250 mm),或等效色谱柱;
- b) 流动相:甲醇-三氟乙酸水溶液(5.1.7);
- c) 流速:0.8 mL/min;
- d) 柱温:30 °C;
- e) 进样体积:10 μL;
- f) 检测波长:222 nm。

7.4 标准曲线的制作

将褪黑素系列标准工作溶液(5.3.3)分别注入高效液相色谱仪中,测定其峰面积,以相应标准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。褪黑素标准溶液(50 μg/mL)高效液相色谱图见附录 A 中图 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,得到相应峰面积,根据标准曲线得到待测试样溶液中褪黑素的质量浓度。试样中褪黑素高效液相色谱图见图 A.2。

平行做两份试验。

8 结果计算与表述

试样中褪黑素按公式(1)计算:

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

式中：

- X —— 试样中褪黑素的含量,单位为克每百克或克每百毫升(g/100 g 或 g/100 mL);
- ρ —— 通过标准曲线得到的试样溶液中褪黑素的质量浓度,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);
- m —— 取样量,单位为克或毫升(g 或 mL);
- f —— 稀释倍数;
- 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

固体试样(片剂、硬胶囊、颗粒剂、粉剂)和半固体试样(软胶囊):当取样量为 0.2 g 时,检出限为 0.001 25 g/100 g,定量限为 0.003 75 g/100 g。

固体试样(凝胶糖果):当取样量为 1 g 时,检出限为 0.000 250 g/100 g,定量限为 0.000 750 g/100 g。

液体试样(口服液):当取样量为 1 mL 或 1 g 时,检出限为 0.000 250 g/100 mL 或 0.000 250 g/100 g,定量限为 0.000 750 g/100 mL 或 0.000 750 g/100 g。

附录 A

(资料性)

褪黑素标准溶液和试样中褪黑素高效液相色谱图

褪黑素标准溶液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)高效液相色谱图见图 A.1。

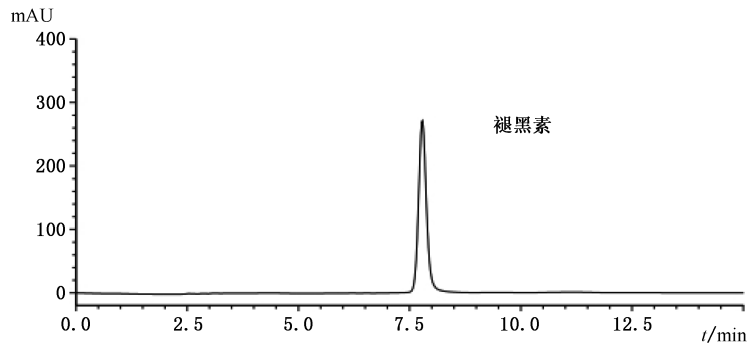


图 A.1 褪黑素标准溶液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)高效液相色谱图

试样中褪黑素高效液相色谱图见图 A.2。

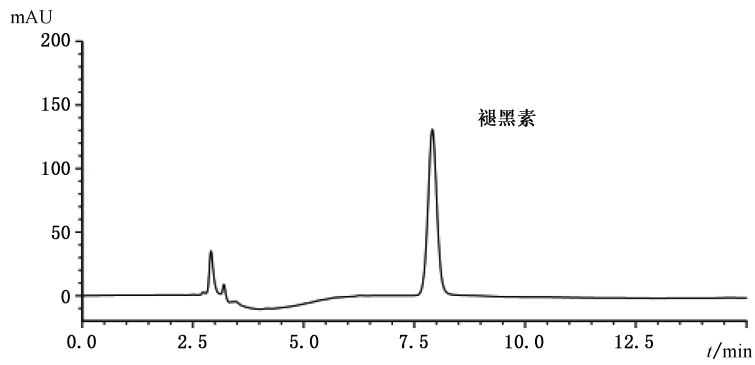


图 A.2 试样中褪黑素高效液相色谱图