

中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

代替 GB/T 5009.170-2003

保健食品中褪黑素的测定

Determination of melatonin in health foods

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

(本草案完成时间：2024年1月)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

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 5009.170-2003《保健食品中褪黑素含量的测定》。

本文件与GB 5009.170-2003相比，除结构调整和编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 更改了文件名称；
- 增加了含油试样、液体试样以及高蛋白试样的测定；
- 优化了前处理的条件。

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。

保健食品中褪黑素的测定

1 范围

本文件描述了保健食品中褪黑素的液相色谱测定方法。

本文件适用于以褪黑素作为主要功效成分添加于保健食品中的褪黑素的测定。

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

试样中的褪黑素经提取、净化，液相色谱分离，保留时间定性，外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

5.1.2 无水乙醇（ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ）。

5.1.3 三氟乙酸（ $\text{C}_2\text{HF}_3\text{O}_2$ ）：优级纯。

5.1.4 三氟乙酸水溶液：取 908 μL 三氟乙酸（5.1.3），用水定容至 1 L。

5.1.5 70%乙醇溶液（体积比）：量取 700 mL 无水乙醇（5.1.2），用水定容至 1000 mL，混匀。

5.1.6 流动相：甲醇（5.1.1）+三氟乙酸水溶液（5.2.1）=45+55（体积比）。

5.2 标准品

褪黑素标准品（ CHN_2O_2 ，CAS号：73-31-4）：纯度 $\geq 99\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3 标准溶液配制

5.3.1 褪黑素标准储备液（1 mg/mL）：准确称取 50 mg（精确至 0.01 mg）褪黑素标准品，用 70%

乙醇溶液（5.1.5）溶解并转移至 50 mL 棕色容量瓶中，定容，-20℃避光保存，有效期 6 个月。

5.3.2 褪黑素标准使用液 A (0.01 mg/mL)：吸取 1 mL 褪黑素标准储备液（5.3.1），用流动相（5.1.6）定容至 100 mL 棕色容量瓶，2℃~8℃避光保存，有效期 3 个月。

5.3.3 褪黑素标准使用液 B (1 μg/mL)：吸取 1 mL 褪黑素标准使用液 A（5.3.2），用流动相（5.1.6）定容至 10 mL 棕色容量瓶，2℃~8℃避光保存，有效期 3 个月。

5.3.4 褪黑素标准系列工作液 1：分别吸取褪黑素标准储备液（5.3.1）和使用液 A（5.3.2）适量，用流动相（5.1.6）配制成浓度分别为 1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 的系列工作溶液，供 PDA 检测器或紫外检测器使用。

5.3.5 褪黑素标准系列工作液 2：分别吸取褪黑素标准使用液 B（5.3.3）适量，用流动相（5.1.6）配制成浓度分别为 0.05 μg/mL、0.10 μg/mL、0.25 μg/mL、0.50 μg/mL、1.0 μg/mL 的系列工作液，供荧光检测器使用。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：配 PDA 检测器，紫外检测器或荧光检测器。

6.2 天平：感量为 0.01 mg 和 1 mg。

6.3 超声波清洗器。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 高速离心机，不低于 8 000 r/min。

6.6 固相萃取装置。

6.7 高效除脂专用柱：无机硅铝填料，600 mg，6 mL 或等效除脂柱。

6.8 0.45 μm 有机滤膜。

7 分析步骤

7.1 试样制备

片剂、粉剂、颗粒：取片剂（不低于20粒或10 g）、粉剂（不低于20 g）、颗粒（不低于20 g）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；口服液：取5支独立包装样品，混合均匀。凝胶糖果：取样品不低于10粒（对于不同色泽或风味混装的试样，则按色泽或种类均匀取样），深度冷冻粉碎或剪碎，备用。

7.2 试样处理

7.2.1 含淀粉试样（片剂、硬胶囊、颗粒、粉剂）

准确称取适量混合均匀的固体试样，精确至 1 mg，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 10 mL 70%乙醇溶液（5.1.5），超声提取 10 min。8000 r/min 离心 5 min，上清液转移至 50 mL 棕色容量瓶中，再加 10 mL 70%乙醇溶液（5.1.5）于残渣中，按前述方法重复提取一次，合并上清液。以流动相（5.1.6）定容，混匀后经 0.45 μm 滤膜（6.8）过滤后待进样。

7.2.2 含油试样（软胶囊）

准确称取适量混合均匀的软胶囊试样，精确至 1 mg，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 8 mL 70%乙醇溶液（5.1.5），涡旋混合 10 min，将混合液转移至高效除脂专用柱（5.1.5）中，再用 2 mL 70%乙醇（5.1.5）冲洗刻度管，洗液一并转入高效除脂专用柱，取合并混匀后的滤液 2 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中，以流动相（5.1.6）定容，混匀后经 0.45 μm 滤膜（6.8）过滤后待进样。

7.2.3 液体试样（口服液）

准确称取适量（精确至1 mg）或移取特定体积的混合均匀的液体试样，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（5.1.5）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（5.1.6）定容，混匀后经0.45 μm滤膜（6.8）过滤后待进样。

7.2.4 凝胶固体（凝胶糖果）

准确称取适量制备好的试样，精确至1 mg，使所取试样中褪黑素含量约为1.5 mg，于50 mL刻度管中，加入10 mL 70%乙醇溶液（5.1.5），80 °C加热至样品完全溶解，超声提取10 min，8000 r/min离心5 min，取2 mL混合液于10 mL棕色容量瓶中，以流动相（5.1.6）定容，混匀后经0.45 μm滤膜（6.8）过滤后待进样。

7.2.5 含蛋白试样

准确称取适量混合均匀的固体试样，精确至1 mg，使所取试样中褪黑素含量约为1.5 mg，于50 mL刻度管中，加入10 mL 70%乙醇溶液（5.1.5），超声提取10 min，4 °C静置30 min，8 000 r/min离心5 min，上清液转移至50 mL棕色容量瓶中，再加10 mL 70%乙醇溶液（5.1.5）于残渣中，按前述方法重复提取一次，合并上清液。以流动相（5.1.6）定容，混匀后经0.45 μm滤膜（6.8）过滤后待进样。

7.3 色谱参考条件

- a) 色谱柱：C₁₈柱（粒径 5.0 μm，4.6 mm×250 mm），或相当者；
- b) 流动相：甲醇+三氟乙酸水（45+55，体积比）；
- c) 流速：0.8 mL/min；
- d) 柱温：30 °C；
- e) 进样体积：10 μL；
- f) PDA 检测器或紫外检测器，波长：222 nm；
- g) 荧光检测器，激发光波长：286 nm，发射光波长：352 nm。

7.4 标准曲线的制作

根据检测器类型，选择对应的标准系列工作液，分别注入高效液相色谱仪中，测定其峰面积（标准品色谱图见附录A的图A.1和图A.2），以相应标准工作液的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

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（样品色谱图见附录A的图A.3和图A.4），根据标准曲线，以外标法计算待测试样溶液中褪黑素的浓度。

注：可根据试样中组分的含量，适当增加稀释倍数f，使其不超出标准曲线测定范围。

8 结果计算与表述

试样中褪黑素的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{C \times V \times 100}{m \times 10^6} \times f \dots \dots \dots (1)$$

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）；

C——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（μg/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）；

100, 10^6 ——单位换算系数；

f ——稀释倍数。

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得超过算术平均值的10%。

附录 A

(资料性)

褪黑素标准品和样品液相色谱图

图A.1给出了紫外检测法的褪黑素标准品液相色谱图。

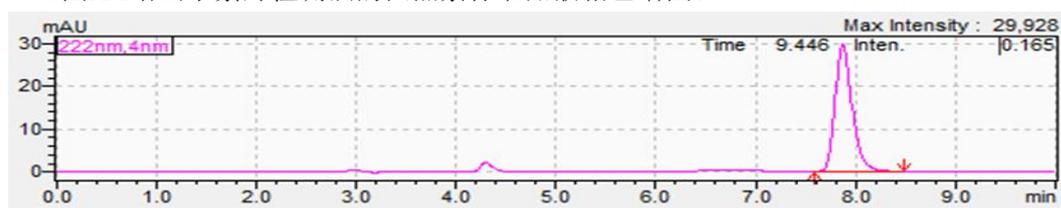


图 A.1 褪黑素标准品液相色谱图（紫外检测器）

图A.2给出了荧光检测法的褪黑素标准品液相色谱图。

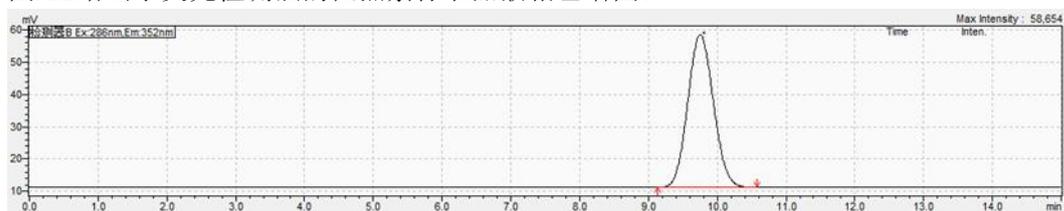


图 A.2 褪黑素标准品液相色谱图（荧光检测器）

图A.3给出了紫外检测法的褪黑素样品液相色谱图。

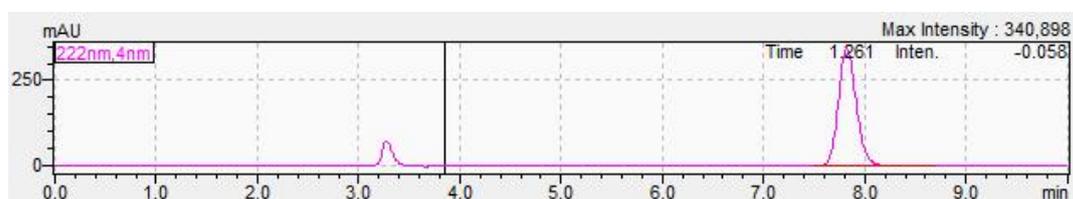


图 A.3 褪黑素样品液相色谱图（紫外检测器）

图A.4给出了荧光检测法的褪黑素样品液相色谱图。

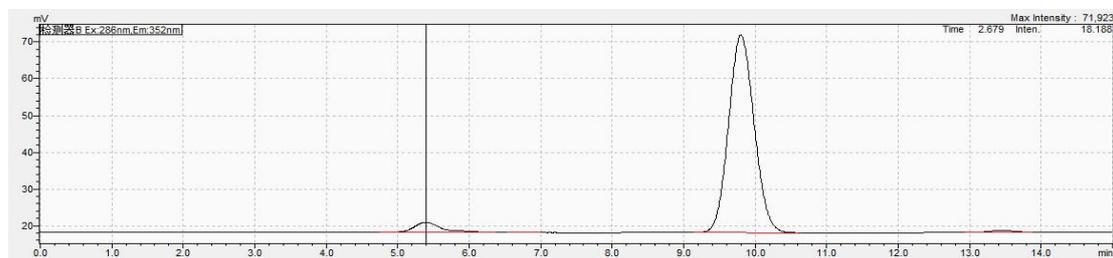


图 A.4 褪黑素样品液相色谱图（荧光检测器）