

# 《保健食品中褪黑素的测定》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），《保健食品中褪黑素的测定》（计划号 20230857-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组织完成起草修订工作。

### （二）主要工作过程

#### 背景资料查询

褪黑素（melatonin），又称为美拉酮宁、抑黑素、松果腺素，分子式为 N-乙酰基-5-甲氧基色胺，是存在于从藻类到人类等众多生物中的一种荷尔蒙，它在生物中的含量水平随每天的时间变化而变化。国内外对褪黑激素的生物学功能，尤其是作为膳食补充剂的保健功能进行了广泛的研究，表明其具有促进睡眠、调节时差、抗衰老、调节免疫、抗肿瘤等多项生理功能。因此，褪黑素广泛应用于保健食品中，通过市场监管总局查询，注册的褪黑素相关保健食品有 114 种，备案的褪黑素相关产品达 269 种。

GB/T 5009.170-2003 《保健食品中褪黑素含量的测定》国家标准与发布近 20 年，标准发布至今，褪黑素相关产品的剂型在不断丰富，

基质多样化明显，现有的前处理方法对部分基质（如含油基质）的产品提取效果不好；不同产品中褪黑素的添加量差异也较大，现有方法未必适合全部产品。项目将针对不同基质、不同含量的褪黑素保健食品，细化前处理方法以提高方法适用性，对现有方法进行验证和优化。

### 起草阶段

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《保健食品中褪黑素的测定》的修订方案。

2023年11月~2024年1月，开展实验室内方法验证的工作。

2024年1月，开展新修订保健食品中褪黑素测定方法的实验室间方法验证工作。

2024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

本标准是根据 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构与编写规则》进行编写。

### （二）标准主要内容及其确定依据（包括修订前后技术内容的对比）

#### 1. 标准名称：

将标准名称修订为“保健食品中褪黑素的测定”。

## 2.适用范围：

在适用范围中明确褪黑素作为主要功能成分。将标准适用范围修改为：

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。

## 3.标准品

明确标准品CAS号为73-31-4。

## 4.仪器条件的优化

原有国标温度为室温，分别测试褪黑素标准品（5 ppm、50ppm）在 25 °C、30 °C、35 °C 的响应，结果详见表 1，结果表明不同温度下褪黑素的峰面积差异不大，考虑到季节变化以及实验室环境，将柱温确定为 30 °C。

表 1 温度对褪黑素峰面积的影响

| 柱温     | 标准溶液浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ） |         |
|--------|----------------------------|---------|
|        | 5.0                        | 50.0    |
| 25. °C | 356167                     | 3924320 |
| 30 °C  | 357046                     | 3914495 |
| 35 °C  | 354851                     | 3906341 |

同时，验证了高效液相色谱-荧光检测法的测定方法，对比结果显示方法等效。详见图 1 和图 2。

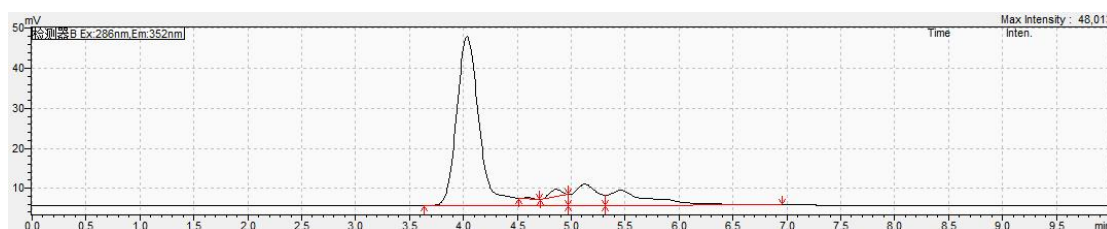


图 1 原国标仪器条件褪黑素标准品 50 ppb 谱图

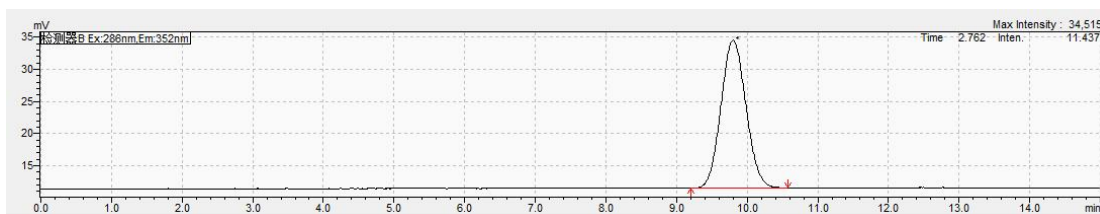


图 2 同紫外检测法仪器条件褪黑素标准品 50 ppb 谱图

经过方法优化，仪器条件为：

色谱柱：C<sub>18</sub> 柱（粒径 5.0 μm，4.6 mm×250 mm），或相当者；

流动相（5.2.2）：甲醇+三氟乙酸水（45+55，体积比）；

流速：0.8 mL/min；

柱温：30 °C；

进样体积：10 μL；

检测波长：222 nm。

## 5. 试样前处理条件的优化

### (1) 试样制备

增加了试样的剂型种类，包括片剂、粉剂、颗粒、软胶囊和硬胶囊、口服液、凝胶糖果剂型，明确制备步骤。

### (2) 试样处理方式优化

#### ① 含淀粉试样

对比70%乙醇对不同含量、不同剂型的褪黑素产品的提取效果，根据提取率确定提取次数。首先在空白片剂（0.2 g）基质中添加不同水平的褪黑素标准品。综合四种添加水平不同提取次数对应的提取效果，确定提取次数为2次。

#### ② 含油试样

分别对比石油醚和 HRM 除脂柱的去脂效果，考虑到含油试样取样量比较少，加入石油醚后与样品分层不明显，后期采用去脂柱除脂，样品中加入提取剂涡旋混合均匀后，上清液通过去脂柱除脂，取适量滤液氮吹，当取样量为 0.1g 和 0.2g 时，去脂较为彻底。

### ③ 含蛋白试样

分别对比不同比例的乙醇水对蛋白质的沉淀效果，当乙醇水比例为 60% 时，蛋白质不能完全沉淀，乙醇水比例为 70%、80%、95% 和 100% 时，蛋白沉淀效果较好。分别在含蛋白质空白基质中加入 10 ppm 的褪黑素标准品，对比不同比例乙醇水提取率以及提取次数，最终确定含蛋白基质用 70% 的乙醇水提取两次。

### ④ 液体试样

针对口服液剂型，经过提取溶液的优化，优化后的前处理方法为：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，以流动相定容，混匀后经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后待进样。

### ⑤ 凝胶固体试样

针对常见的凝胶糖果剂型，对提取溶剂和样品制备进行方法优化，优化后的方法：为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，80℃ 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，以流动相定容，

混匀后经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后待进样。

### 三、试验验证的分析、综述报告

方法线性关系：以褪黑素为定量外标，紫外检测法在1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内，相关系数 $R^2$ 大于0.999，线性关系良好。荧光检测法在0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内，相关系数 $R^2$ 大于0.999，线性关系良好。

方法准确度和精密度：该方法的空白样品回收率：片剂为92.1%~105.8%、凝胶糖果为95.0%~109.1%、软胶囊为91.2%~106.7%、含蛋白基质为91.7%~106.8%，实际样品6次平行实验结果的回收率RSD在1.0%~10%范围区间，说明该方法精确度较好，能够满足保健食品中褪黑素的准确测定。方法重现性：方法验证基础上，起草工作组组织7家实验室进行验证，结果符合验证比对要求。

具体方法验证情况见附件一。

### 四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

无。

### 五、以国际标准为基础的起草情况

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

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

无。

附件：方法学验证报告

## 附件

### 保健食品中褪黑素的测定方法学验证

#### 1. 特异性

国家市场监督管理总局制定的《辅酶 Q<sub>10</sub> 等五种保健食品原料备案产品剂型及技术要求》中以褪黑素为保健食品原料时，可以以单一褪黑素原料备案，也可同时加入维生素 B<sub>6</sub> 作为原料进行产品备案。现有部分产品同时加入褪黑素和维生素 B<sub>6</sub>，采用 PDA 检测器分别测试褪黑素标准品（5 ppm）和含有褪黑素和维生素 B<sub>6</sub> 的实际样品，结果见图 3~图 4。采用荧光检测器分别测试褪黑素标准品、褪黑素和吡哆醇标准品混合溶液、褪黑素和吡哆醛标准品混合溶液、褪黑素和吡哆胺标准品混合溶液，结果见图 5~图 8，结果表明维生素 B<sub>6</sub> 对褪黑素的检测无干扰。

##### 1.1 紫外检测法

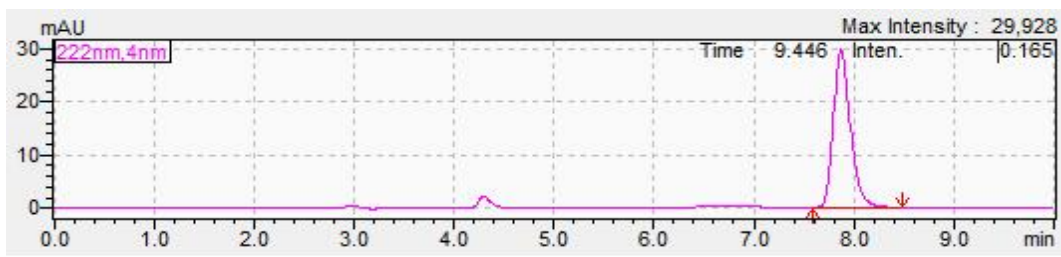


图 3 褪黑素标准品（5 ppm）谱图

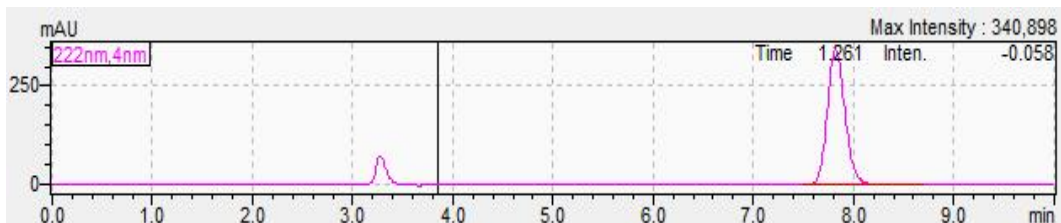


图 4 含维生素 B<sub>6</sub> 和褪黑素实际样品谱图

##### 1.2 荧光检测法



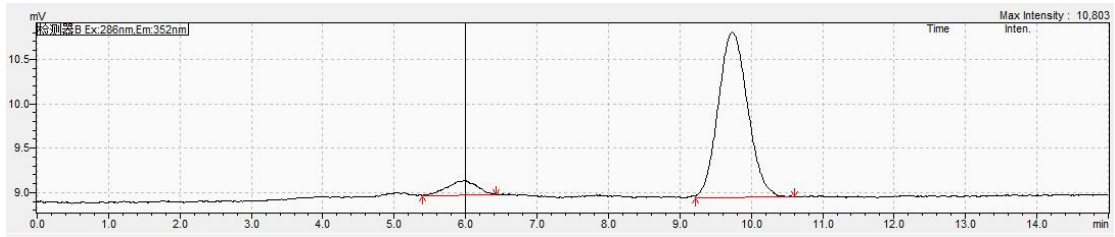


图 5 褪黑素标准品（5 ppb）谱图

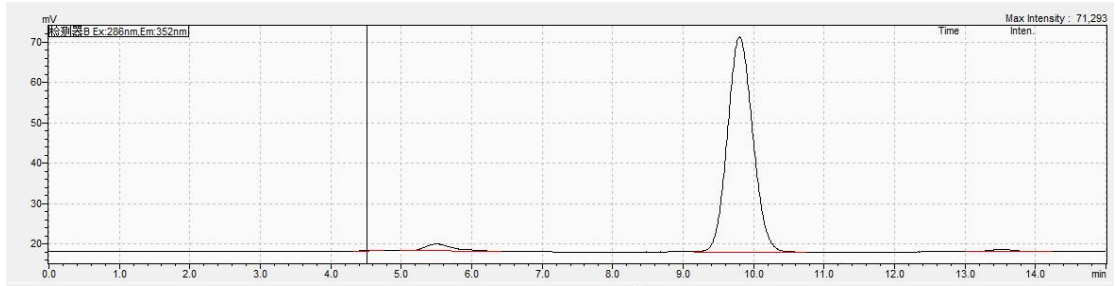


图 6 含吡哆醇(100 ng/mL)和褪黑素（100 ng/mL）标准品谱图

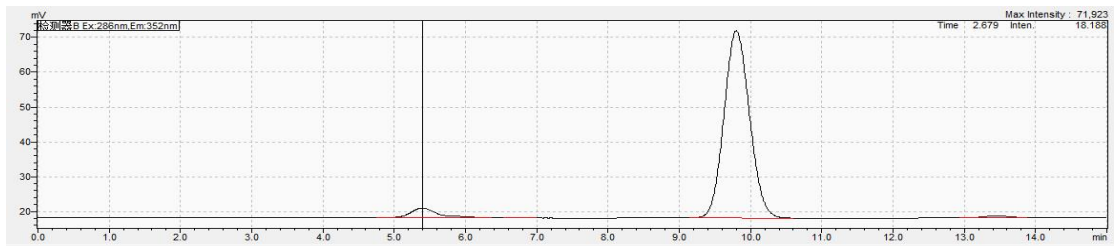


图 7 含吡哆醛（100 ng/mL）和褪黑素标准品（100 ng/mL）谱图

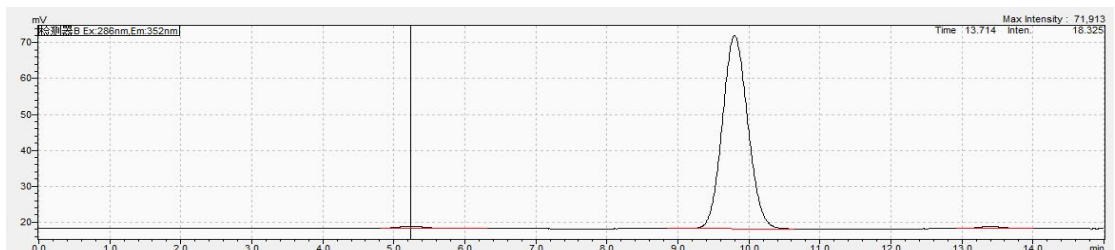


图 8 含吡哆胺（100 ng/mL）和褪黑素标准品（100 ng/mL）谱图

## 2. 检出限和定量限

将标准品稀释成不同浓度进行测试，用紫外检测器检测时,当浓度为  $0.05 \mu\text{g/mL}$  时,  $S/N \geq 3$ , 当浓度为  $0.1 \mu\text{g/mL}$  时,  $S/N \geq 10$ 。用荧光检测器检测时当浓度为  $0.2 \text{ ng/mL}$  时,  $S/N \geq 3$ , 当浓度为  $0.5 \text{ ng/mL}$  时,  $S/N \geq 10$ , 表 2 为测试结果。

表 2 紫外检测法和荧光检测法的信噪比

|       |     |                       |       |       |       |       |       |      |
|-------|-----|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 紫外检测法 | 浓度  | 0.05 $\mu\text{g/mL}$ |       |       |       |       |       | 均值   |
|       | S/N | 4.77                  | 5.16  | 5.71  | 5.60  | 4.71  | 4.34  | 5.04 |
|       | 浓度  | 0.1 $\mu\text{g/mL}$  |       |       |       |       |       | /    |
|       | S/N | 12.06                 | 12.85 | 10.13 | 10.14 | 10.27 | 11.4  | 11.1 |
| 荧光检测法 | 浓度  | 0.2 $\text{ng/mL}$    |       |       |       |       |       | /    |
|       | S/N | 4.99                  | 4.25  | 4.79  | 4.72  | 5.62  | 4.34  | 4.78 |
|       | 浓度  | 0.5 $\text{ng/mL}$    |       |       |       |       |       | /    |
|       | S/N | 11.75                 | 10.87 | 11.22 | 12.30 | 12.98 | 11.27 | 11.7 |

由上述结果可知，褪黑素的紫外检测法检出限为 $0.05 \mu\text{g/mL}$ ，定量限为 $0.1 \mu\text{g/mL}$ ；荧光检测法检出限为 $0.2\text{ng/mL}$ ，定量限为 $0.5 \text{ng/mL}$ 。

### 3. 测定范围

分别取空白溶剂、系列标准工作溶液进行测定，以褪黑素标准工作液的浓度为横坐标(x)，褪黑素特征峰峰面积为纵坐标(y)，进行线性回归分析，计算线性相关系数，结果详见表3和表4。

表 3 线性范围（紫外检测法）

| 峰面积   | 标准工作溶液 ( $\mu\text{g/mL}$ )    |          |        |           |           |         |
|-------|--------------------------------|----------|--------|-----------|-----------|---------|
|       | 1                              | 5        | 10     | 25        | 50        | 100     |
| 平行样 1 | 75978                          | 386227   | 762564 | 1889849   | 3920203   | 7685604 |
| 平行样 2 | 78883                          | 392808   | 768453 | 1957698   | 3979296   | 7691550 |
| 平行样 3 | 77745                          | 392397   | 770800 | 1814530   | 3935820   | 7700166 |
| 平行样 4 | 77748                          | 393715   | 767391 | 1963886   | 4008361   | 7690595 |
| 平行样 5 | 79354                          | 386352   | 760902 | 1926415   | 3991394   | 7856308 |
| 平行样 6 | 78825                          | 384944   | 758180 | 1944561   | 3996079   | 7762557 |
| 平均值   | 78088.8                        | 389407.2 | 764715 | 1916156.5 | 3971858.8 | 7731130 |
| 线性方程  | $Y=77608X+4705.1$ $R^2=0.9998$ |          |        |           |           |         |

表 4 线性范围（荧光检测法）

| 峰面积   | 标准工作溶液 ( $\text{ng/mL}$ )     |           |            |            |         |          |
|-------|-------------------------------|-----------|------------|------------|---------|----------|
|       | 10                            | 50        | 100        | 250        | 500     | 1000     |
| 平行样 1 | 123952                        | 599001    | 1259078    | 3188678    | 6229430 | 12752557 |
| 平行样 2 | 120602                        | 576930    | 1229121    | 3111596    | 6071495 | 12454773 |
| 平行样 3 | 115250                        | 557851    | 1203864    | 3055183    | 5952953 | 12227949 |
| 平行样 4 | 116610                        | 565161    | 1196604    | 3062788    | 6038614 | 12450237 |
| 平均值   | 119103.5                      | 574735.75 | 1222166.75 | 3104561.25 | 6073123 | 12471379 |
| 线性方程  | $Y=12460X-38842$ $R^2=0.9998$ |           |            |            |         |          |



表 6 空白基质的加标回收和精密度结果（凝胶糖果和软胶囊）

| 凝胶糖果         |                   |                   |              |                |          | 软胶囊          |                   |                   |              |             |          |
|--------------|-------------------|-------------------|--------------|----------------|----------|--------------|-------------------|-------------------|--------------|-------------|----------|
| 本底<br>g/100g | 添加<br>量<br>g/100g | 实测<br>值<br>g/100g | 回收<br>率<br>% | 回收率范<br>围<br>% | RSD<br>% | 本底<br>g/100g | 添加<br>量<br>g/100g | 实测<br>值<br>g/100g | 回收<br>率<br>% | 回收率范围<br>%  | RSD<br>% |
|              | 0.025             | 0.0255            | 102.0        | 97.2~109.1     | 4.4      |              | 0.025             | 0.0250            | 100.1        | 100.1~106.7 | 2.5      |
|              |                   | 0.0258            | 103.1        |                |          |              |                   | 0.0267            | 106.7        |             |          |
|              |                   | 0.0243            | 97.2         |                |          |              |                   | 0.0265            | 105.9        |             |          |
|              |                   | 0.0273            | 109.1        |                |          |              |                   | 0.0253            | 101.3        |             |          |
|              |                   | 0.0255            | 102.1        |                |          |              |                   | 0.0261            | 104.2        |             |          |
|              |                   | 0.0273            | 109.0        |                |          |              |                   | 0.0261            | 104.2        |             |          |
| /            | 0.125             | 0.122             | 97.9         | 97.5~104.6     | 3.3      | /            | 0.125             | 0.119             | 95.2         | 92.8~104.0  | 5.0      |
|              |                   | 0.123             | 98.2         |                |          |              |                   | 0.130             | 104.0        |             |          |
|              |                   | 0.131             | 104.6        |                |          |              |                   | 0.129             | 103.4        |             |          |
|              |                   | 0.122             | 97.5         |                |          |              |                   | 0.116             | 92.8         |             |          |
|              |                   | 0.129             | 103.2        |                |          |              |                   | 0.117             | 93.7         |             |          |
|              |                   | 0.130             | 103.9        |                |          |              |                   | 0.120             | 95.8         |             |          |
|              | 0.250             | 0.247             | 98.8         | 95.0~105.2     | 3.7      |              | 0.250             | 0.259             | 103.8        | 91.2~103.8  | 4.2      |
|              |                   | 0.237             | 95.0         |                |          |              |                   | 0.228             | 91.2         |             |          |
|              |                   | 0.242             | 96.6         |                |          |              |                   | 0.242             | 96.9         |             |          |
|              |                   | 0.263             | 105.2        |                |          |              |                   | 0.238             | 95.2         |             |          |
|              |                   | 0.238             | 95.4         |                |          |              |                   | 0.244             | 97.5         |             |          |
|              |                   | 0.248             | 99.4         |                |          |              |                   | 0.245             | 97.9         |             |          |

表 7 空白基质的加标回收和精密度结果（含蛋白产品）

| 空白样品含量<br>g/100g | 添加量<br>g/100g | 加标样品含量<br>g/100g | 回收率 R<br>% | 回收率范围<br>% | RSD<br>% |
|------------------|---------------|------------------|------------|------------|----------|
| /                | 0.025         | 0.026            | 104.8      | 96.4~106.8 | 3.6      |
|                  |               | 0.027            | 106.8      |            |          |
|                  |               | 0.026            | 104.5      |            |          |
|                  |               | 0.026            | 104.1      |            |          |
|                  |               | 0.025            | 101.4      |            |          |
|                  |               | 0.024            | 96.4       |            |          |
|                  | 0.125         | 0.127            | 101.3      | 91.7~102.7 | 4.0      |
|                  |               | 0.128            | 102.7      |            |          |
|                  |               | 0.115            | 91.7       |            |          |
|                  |               | 0.124            | 98.8       |            |          |
|                  |               | 0.126            | 101.1      |            |          |
|                  |               | 0.126            | 100.4      |            |          |
| 0.250            | 0.253         | 101.1            | 94.9~103.4 | 3.0        |          |
|                  | 0.258         | 103.4            |            |            |          |
|                  | 0.237         | 94.9             |            |            |          |
|                  | 0.245         | 98.1             |            |            |          |
|                  | 0.248         | 99.3             |            |            |          |
|                  | 0.253         | 101.1            |            |            |          |

表 8 实际样品的加标回收和精密度结果（片剂和硬胶囊）

| 片剂           |                   |                   |              |                |          | 硬胶囊          |                   |                   |                |                |          |
|--------------|-------------------|-------------------|--------------|----------------|----------|--------------|-------------------|-------------------|----------------|----------------|----------|
| 本底<br>g/100g | 添加<br>量<br>g/100g | 实测<br>值<br>g/100g | 回收<br>率<br>% | 回收率范<br>围<br>% | RSD<br>% | 本底<br>g/100g | 添加<br>量<br>g/100g | 实测<br>值<br>g/100g | 回收<br>率<br>%   | 回收率范<br>围<br>% | RSD<br>% |
| 0.650        | 0.350             | 1.01              | 102.2        | 97.4~<br>104.9 | 3.0      | 1.38         | 0.550             | 1.93              | 99.7           | 96.7~<br>104.2 | 2.7      |
|              |                   | 0.990             | 97.9         |                |          |              |                   | 1.91              | 96.7           |                |          |
|              |                   | 1.01              | 102.8        |                |          |              |                   | 1.94              | 101.0          |                |          |
|              |                   | 0.988             | 97.4         |                |          |              |                   | 1.95              | 104.2          |                |          |
|              |                   | 1.01              | 103.1        |                |          |              |                   | 1.97              | 99.9           |                |          |
|              | 1.03              | 104.9             | 1.92         | 97.3           |          |              |                   |                   |                |                |          |
|              | 0.700             | 1.31              | 94.4         | 90.1~<br>101.1 | 4.2      |              | 2.54              | 104.1             | 99.0~<br>104.1 | 2.0            |          |
|              |                   | 1.31              | 94.9         |                |          |              | 2.47              | 99.0              |                |                |          |
|              |                   | 1.35              | 100.0        |                |          |              | 2.49              | 100.5             |                |                |          |
|              |                   | 1.35              | 101.1        |                |          |              | 2.51              | 102.6             |                |                |          |
|              |                   | 1.28              | 90.1         |                |          |              | 2.49              | 101.2             |                |                |          |
|              | 1.31              | 95.2              | 2.56         | 103.8          |          |              |                   |                   |                |                |          |
|              | 1.05              | 1.67              | 97.5         | 96.4~100.0     | 1.4      |              | 2.97              | 96.5              | 96.5~103.7     | 2.4            |          |
|              |                   | 1.69              | 99.0         |                |          |              | 3.02              | 99.7              |                |                |          |
|              |                   | 1.66              | 96.4         |                |          |              | 3.05              | 101.5             |                |                |          |
| 1.70         |                   | 100.0             | 3.05         |                |          | 101.3        |                   |                   |                |                |          |
| 1.67         |                   | 97.1              | 3.09         |                |          | 103.7        |                   |                   |                |                |          |
| 1.67         | 97.2              | 3.04              | 100.3        |                |          |              |                   |                   |                |                |          |

表 9 实际样品的加标回收和精密度结果（粉剂和口服液）

| 粉剂           |                   |                   |              |                |          | 口服液          |                   |                   |                 |                |          |
|--------------|-------------------|-------------------|--------------|----------------|----------|--------------|-------------------|-------------------|-----------------|----------------|----------|
| 本底<br>g/100g | 添加<br>量<br>g/100g | 实测<br>值<br>g/100g | 回收<br>率<br>% | 回收率范<br>围<br>% | RSD<br>% | 本底<br>g/100g | 添加<br>量<br>g/100g | 实测<br>值<br>g/100g | 回收<br>率<br>%    | 回收率范<br>围<br>% | RSD<br>% |
| 0.0552       | 0.03              | 0.0824            | 90.7         | 88.4~<br>109.7 | 10.0     | 0.0232       | 0.012             | 0.0345            | 94.5            | 94.5~<br>110.1 | 5.0      |
|              |                   | 0.0827            | 91.7         |                |          |              |                   | 0.0358            | 104.9           |                |          |
|              |                   | 0.0812            | 88.4         |                |          |              |                   | 0.0353            | 100.9           |                |          |
|              |                   | 0.0881            | 109.7        |                |          |              |                   | 0.0358            | 104.8           |                |          |
|              |                   | 0.0871            | 106.3        |                |          |              |                   | 0.0367            | 110.1           |                |          |
|              | 0.0877            | 108.3             | 0.0357       | 104.4          |          |              |                   |                   |                 |                |          |
|              | 0.06              | 0.112             | 94.3         | 91.9~<br>105.6 | 5.4      |              | 0.0486            | 105.9             | 105.9~<br>108.9 | 1.1            |          |
|              |                   | 0.110             | 91.9         |                |          |              | 0.0490            | 107.4             |                 |                |          |
|              |                   | 0.117             | 103.0        |                |          |              | 0.0493            | 108.9             |                 |                |          |
|              |                   | 0.119             | 105.6        |                |          |              | 0.0492            | 108.3             |                 |                |          |
|              |                   | 0.116             | 101.7        |                |          |              | 0.0493            | 108.9             |                 |                |          |
|              | 0.116             | 101.8             | 0.0490       | 107.4          |          |              |                   |                   |                 |                |          |
|              | 0.09              | 0.141             | 94.8         | 90.5~97.4      | 3.3      |              | 0.0605            | 103.5             | 98.1~107.9      | 3.7            |          |
|              |                   | 0.138             | 92.4         |                |          |              | 0.0620            | 107.9             |                 |                |          |
|              |                   | 0.137             | 90.5         |                |          |              | 0.0618            | 107.2             |                 |                |          |
| 0.142        |                   | 97.0              | 0.0620       |                |          | 107.7        |                   |                   |                 |                |          |
| 0.137        |                   | 90.5              | 0.0617       |                |          | 107.0        |                   |                   |                 |                |          |
| 0.143        | 97.4              | 0.0585            | 98.1         |                |          |              |                   |                   |                 |                |          |

表 10 实际样品的加标回收和精密度结果（软胶囊和凝胶糖果）

| 软胶囊          |                   |                   |              |                |          | 凝胶糖果         |                   |                   |              |                |          |
|--------------|-------------------|-------------------|--------------|----------------|----------|--------------|-------------------|-------------------|--------------|----------------|----------|
| 本底<br>g/100g | 添加<br>量<br>g/100g | 实测<br>值<br>g/100g | 回收<br>率<br>% | 回收率范<br>围<br>% | RSD<br>% | 本底<br>g/100g | 添加<br>量<br>g/100g | 实测<br>值<br>g/100g | 回收<br>率<br>% | 回收率范<br>围<br>% | RSD<br>% |
|              |                   | 0.818             | 104.4        |                |          |              |                   | 0.141             | 90.2         |                |          |
|              |                   | 0.826             | 105.4        |                |          |              |                   | 0.150             | 102.8        |                |          |
|              | 0.275             | 0.782             | 95.3         | 95.3~          | 4.4      |              | 0.0625            | 0.146             | 97.5         | 90.2~          | 5.8      |
|              |                   | 0.814             | 105.0        | 105.4          |          |              |                   | 0.153             | 104.9        | 105.8          |          |
|              |                   | 0.794             | 99.5         |                |          |              |                   | 0.149             | 101.5        |                |          |
|              |                   | 0.786             | 96.8         |                |          |              |                   | 0.154             | 105.8        |                |          |
|              |                   | 1.06              | 98.2         |                |          |              |                   | 0.168             | 93.9         |                |          |
|              |                   | 1.08              | 101.2        |                |          |              |                   | 0.177             | 105.0        |                |          |
| 0.520        | 0.550             | 1.03              | 91.9         | 91.9~          | 4.2      | 0.0855       | 0.0875            | 0.180             | 105.9        | 92.5~          | 6.0      |
|              |                   | 1.10              | 104.6        | 104.6          |          |              |                   | 0.166             | 92.5         | 105.9          |          |
|              |                   | 1.06              | 98.7         |                |          |              |                   | 0.178             | 105.3        |                |          |
|              |                   | 1.06              | 98.6         |                |          |              |                   | 0.174             | 101.5        |                |          |
|              |                   | 1.35              | 100.2        |                |          |              |                   | 0.214             | 102.7        |                |          |
|              |                   | 1.31              | 95.4         |                |          |              |                   | 0.212             | 100.9        |                |          |
|              | 0.825             | 1.32              | 97.0         | 95.4~100.2     | 2.0      |              | 0.125             | 0.208             | 97.7         | 96.5~106.6     | 4.0      |
|              |                   | 1.32              | 97.4         |                |          |              |                   | 0.218             | 105.4        |                |          |
|              |                   | 1.31              | 95.4         |                |          |              |                   | 0.222             | 106.6        |                |          |
|              |                   | 1.34              | 98.9         |                |          |              |                   | 0.206             | 96.5         |                |          |

以上结果表明，添加量在 100 μg/kg~1000mg/kg 时，回收率均在 80%~110%之间，添加量>1g/kg 时，回收率均在 90.0%~105.0%之间，回收率良好，符合 GB 5009.295-2023 中不同浓度对方法正确度的要求。

#### 4.2 荧光检测法

分别在片剂、凝胶糖果的空白基质，以及口服液、硬胶囊、软胶囊和粉剂的实际样品中采用添加 3 水平褪黑素，并进行 6 平行的试验，对结果进行检测，计算回收率和精密度，以评估方法的正确度和重复性，结果详见表 11-表 13。

表 11 空白基质的加标回收和精密度结果（片剂和凝胶糖果）

| 片剂           |                   |                   |              |                |          | 凝胶糖果         |                   |                   |              |                |          |
|--------------|-------------------|-------------------|--------------|----------------|----------|--------------|-------------------|-------------------|--------------|----------------|----------|
| 本底<br>g/100g | 添加<br>量<br>g/100g | 实测<br>值<br>g/100g | 回收<br>率<br>% | 回收率范<br>围<br>% | RSD<br>% | 本底<br>g/100g | 添加<br>量<br>g/100g | 实测<br>值<br>g/100g | 回收<br>率<br>% | 回收率范<br>围<br>% | RSD<br>% |
|              | 0.025             | 0.0220            | 87.8         | 87.8~<br>98.7  | 4.1      |              | 0.025             | 0.0257            | 102.9        | 97.1~<br>109.2 | 4.1      |
|              |                   | 0.0242            | 96.8         |                |          |              |                   | 0.0263            | 105.3        |                |          |
|              |                   | 0.0235            | 93.8         |                |          |              |                   | 0.0243            | 97.1         |                |          |
|              |                   | 0.0235            | 94.0         |                |          |              |                   | 0.0268            | 107.1        |                |          |
|              |                   | 0.0247            | 98.7         |                |          |              |                   | 0.0256            | 102.6        |                |          |
|              |                   | 0.0242            | 96.9         |                |          |              |                   | 0.0273            | 109.2        |                |          |
| /            | 0.125             | 0.121             | 97.1         | 97.1~<br>103.8 | 2.8      | /            | 0.125             | 0.120             | 96.1         | 95.9~<br>101.9 | 2.7      |
|              |                   | 0.120             | 96.2         |                |          |              |                   | 0.120             | 95.9         |                |          |
|              |                   | 0.125             | 100.4        |                |          |              |                   | 0.126             | 101.0        |                |          |
|              |                   | 0.125             | 99.9         |                |          |              |                   | 0.120             | 96.0         |                |          |
|              |                   | 0.130             | 103.8        |                |          |              |                   | 0.124             | 99.1         |                |          |
|              |                   | 0.127             | 101.6        |                |          |              |                   | 0.127             | 101.9        |                |          |
|              | 0.250             | 0.225             | 90.1         | 86.2~95.0      | 3.5      |              | 0.250             | 0.232             | 92.6         | 92.6~103.7     | 4.7      |
|              |                   | 0.223             | 89.1         |                |          |              |                   | 0.232             | 92.8         |                |          |
|              |                   | 0.215             | 86.2         |                |          |              |                   | 0.238             | 95.0         |                |          |
|              |                   | 0.237             | 95.0         |                |          |              |                   | 0.259             | 103.7        |                |          |
|              |                   | 0.228             | 91.2         |                |          |              |                   | 0.250             | 100.0        |                |          |
|              |                   | 0.225             | 90.1         |                |          |              |                   | 0.251             | 100.5        |                |          |

表 12 实际样品的加标回收和精密度结果（口服液和硬胶囊）

| 口服液          |                   |                   |              |                 |          | 硬胶囊          |                   |                   |              |                |          |       |                 |
|--------------|-------------------|-------------------|--------------|-----------------|----------|--------------|-------------------|-------------------|--------------|----------------|----------|-------|-----------------|
| 本底<br>g/100g | 添加<br>量<br>g/100g | 实测<br>值<br>g/100g | 回收<br>率<br>% | 回收率范<br>围<br>%  | RSD<br>% | 本底<br>g/100g | 添加<br>量<br>g/100g | 实测<br>值<br>g/100g | 回收<br>率<br>% | 回收率范<br>围<br>% | RSD<br>% |       |                 |
| 0.0220       | 0.012             | 0.0322            | 85.0         | 85.0~<br>104.5  | 7.3      | 1.47         | 1.10              | 2.01              | 98.7         | 98.4~112.7     | 5.3      |       |                 |
|              |                   | 0.0338            | 98.2         |                 |          |              |                   | 2.06              | 107.2        |                |          |       |                 |
|              |                   | 0.0340            | 100.0        |                 |          |              |                   | 2.06              | 107.6        |                |          |       |                 |
|              |                   | 0.0342            | 101.4        |                 |          |              |                   | 2.32              | 105.4        |                |          |       |                 |
|              |                   | 0.0345            | 104.3        |                 |          |              |                   | 2.11              | 112.7        |                |          |       |                 |
|              | 0.0345            | 104.5             | 2.01         | 98.4            |          |              |                   |                   |              |                |          |       |                 |
|              | 0.024             | 0.0467            | 102.9        | 102.3~<br>105.6 | 1.3      |              |                   | 2.3               | 1.10         |                | 2.67     | 108.9 | 108.9~<br>115.4 |
|              |                   | 0.0466            | 102.3        |                 |          |              |                   |                   |              |                | 2.68     | 110.1 |                 |
|              |                   | 0.0472            | 104.9        |                 |          |              |                   |                   |              |                | 2.68     | 109.9 |                 |
|              |                   | 0.0466            | 102.6        |                 |          |              |                   |                   |              |                | 2.75     | 114.1 |                 |
| 0.0473       |                   | 105.6             | 2.71         |                 |          | 112.9        |                   |                   |              |                |          |       |                 |
| 0.036        | 0.0470            | 0.0470            | 104.0        | 94.2~103.6      | 3.3      | 1.65         | 1.65              | 2.80              | 115.4        | 100.9~114.3    | 4.4      |       |                 |
|              |                   | 0.0578            | 99.4         |                 |          |              |                   | 3.14              | 100.9        |                |          |       |                 |
|              |                   | 0.0593            | 103.6        |                 |          |              |                   | 3.31              | 111.8        |                |          |       |                 |
|              |                   | 0.0589            | 102.6        |                 |          |              |                   | 3.31              | 111.7        |                |          |       |                 |
|              |                   | 0.0584            | 101.1        |                 |          |              |                   | 3.32              | 111.9        |                |          |       |                 |
|              |                   | 0.0583            | 100.9        |                 |          |              |                   | 3.38              | 114.3        |                |          |       |                 |
| 0.0559       | 94.2              | 3.37              | 113.6        |                 |          |              |                   |                   |              |                |          |       |                 |

表 13 实际样品的加标回收和精密度结果（软胶囊和粉剂）

| 软胶囊          |                   |                   |              |                |          | 粉剂           |                   |                   |              |                |          |            |     |
|--------------|-------------------|-------------------|--------------|----------------|----------|--------------|-------------------|-------------------|--------------|----------------|----------|------------|-----|
| 本底<br>g/100g | 添加<br>量<br>g/100g | 实测<br>值<br>g/100g | 回收<br>率<br>% | 回收率范<br>围<br>% | RSD<br>% | 本底<br>g/100g | 添加<br>量<br>g/100g | 实测<br>值<br>g/100g | 回收<br>率<br>% | 回收率范<br>围<br>% | RSD<br>% |            |     |
| 0.486        | 0.275             | 0.755             | 97.8         | 97.8~<br>110.8 | 4.6      | 0.0529       | 0.03              | 0.0830            | 100.3        | 97.8~115.2     | 6.8      |            |     |
|              |                   | 0.791             | 110.8        |                |          |              |                   | 0.0824            | 98.3         |                |          |            |     |
|              |                   | 0.762             | 100.4        |                |          |              |                   | 0.0822            | 97.8         |                |          |            |     |
|              |                   | 0.762             | 100.5        |                |          |              |                   | 0.0855            | 108.7        |                |          |            |     |
|              |                   | 0.758             | 98.8         |                |          |              |                   | 0.0875            | 115.2        |                |          |            |     |
|              |                   | 0.764             | 101.2        |                |          |              |                   | 0.0830            | 100.3        |                |          |            |     |
|              | 0.550             | 0.970             | 87.3         | 86.3~<br>100.2 | 5.9      |              | 7.4               | 0.06              | 0.107        |                | 90.6     | 89.3~107.4 | 7.4 |
|              |                   | 1.01              | 95.3         |                |          |              |                   |                   | 0.107        |                | 89.3     |            |     |
|              |                   | 0.96              | 86.3         |                |          |              |                   |                   | 0.111        |                | 96.3     |            |     |
|              |                   | 1.04              | 100.2        |                |          |              |                   |                   | 0.116        |                | 104.7    |            |     |
|              |                   | 1.01              | 95.6         |                |          |              |                   |                   | 0.117        |                | 107.4    |            |     |
|              |                   | 1.02              | 96.4         |                |          |              |                   |                   | 0.112        |                | 97.9     |            |     |
| 0.825        | 1.21              | 88.0              | 87.7~92.8    | 2.5            | 6.1      | 0.09         | 0.124             | 79.2              | 75.2~89.4    | 6.1            |          |            |     |
|              | 1.23              | 90.0              |              |                |          |              | 0.130             | 85.4              |              |                |          |            |     |
|              | 1.24              | 91.8              |              |                |          |              | 0.128             | 83.3              |              |                |          |            |     |
|              | 1.25              | 92.8              |              |                |          |              | 0.133             | 89.4              |              |                |          |            |     |
|              | 1.21              | 87.7              |              |                |          |              | 0.121             | 75.2              |              |                |          |            |     |
|              | 1.25              | 92.4              |              |                |          |              | 0.130             | 85.1              |              |                |          |            |     |

以上结果表明，添加量在 100  $\mu$ g/kg~1000mg/kg 时，回收率均在 80%~110%之间，添加量>1g/kg 时，回收率均在 90.0%~105.0%之间，回收率良好，符合 GB 5009.295-2023 中不同浓度对方法正确度的要求。

## 5. 不同品牌褪黑素标准物质的比较

选择了五个不同品牌（安谱，Anpel；西格玛，Sigma-Aldrich；佳途，CATO；曼哈格，BePure；中国计量研究院，GBW（E））的褪黑素标准物质，对其 DAD 检测器在 222 nm 响应情况进行比较，采用外标法以验证不同品牌脂肪酸乙酯标准物质的差异。

主要从以下两方面进行比较：



—保留时间稳定情况：对5个品牌的褪黑素溶液图谱进行叠加比较；

—不同品牌间标准物质的峰面积相对标准偏差：对每种品牌的峰面积进行统计分析。

5个品牌样品的叠加谱图详见图9，样品峰面积结果详见表14。图9结果显示，目标物峰形尖锐，样品保留时间稳定，重复性良好；从表中峰面积结果可以看出，不同品牌5种标准物质的峰面积相对标准偏差（RSD，relative standard deviation）均小于1.5%。

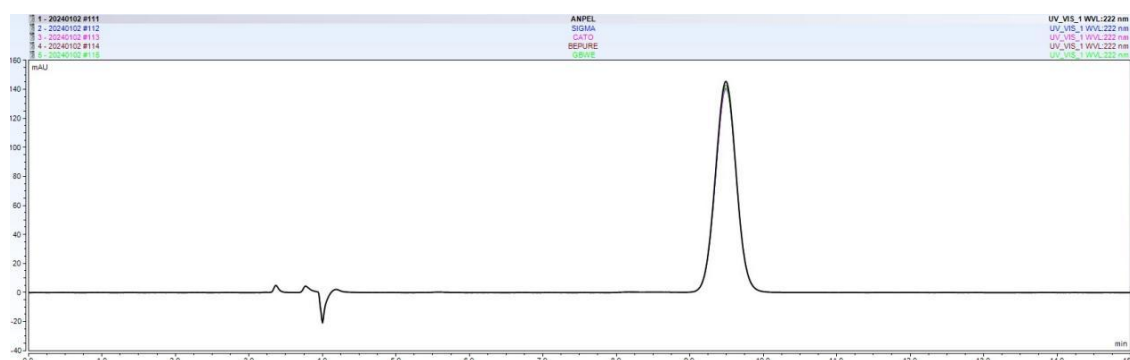


图 9 五种品牌的 50  $\mu\text{g/mL}$  褪黑素单标溶液叠加图

表 14 五个品牌的褪黑素的峰面积（counts\*min）比较表

| 序号      | Anpel   | Sigma-Aldrich | CATO    | BePure  | GBW (E) |
|---------|---------|---------------|---------|---------|---------|
| 1       | 48.0325 | 46.6115       | 46.801  | 47.7255 | 47.6881 |
| 2       | 47.9052 | 46.5665       | 46.8864 | 47.508  | 47.5982 |
| 3       | 47.9057 | 46.3506       | 46.8758 | 47.539  | 47.8148 |
| 均值      | 47.9478 | 46.5095       | 46.8544 | 47.5908 | 47.7003 |
| RSD (%) | 0.15    | 0.30          | 0.10    | 0.25    | 0.23    |

表 15 五个品牌的褪黑素单位浓度的峰面积（counts\*min）对比数据

| Anpel  | Sigma-Aldrich | CATO   | BePure | GBW (E) | 平均值    | RSD% |
|--------|---------------|--------|--------|---------|--------|------|
| 0.9570 | 0.9266        | 0.9362 | 0.9452 | 0.9456  | 0.9421 | 1.2  |

将五个品牌的褪黑素峰面积均按照实际浓度折算到单位浓度（1  $\mu\text{g/mL}$ ）时的峰面积进行对比，数据见表 15。从表中可以看出，折算

到单位浓度后不同品牌褪黑素溶液峰面积的 RSD 为 1.2%，说明五个品牌的褪黑素浓度和响应无明显差异，选用安谱品牌的标准物质开展后续实验。

## 6. 褪黑素标准溶液的稳定性

开展褪黑素标准溶液的稳定性研究，测定计划和保存时间详见表 16 和表 17。

表 16 标准溶液稳定性测定计划

| 条件 | -20℃ | +4℃ | +20℃ |
|----|------|-----|------|
| 避光 | √    | √   | √    |
| 光照 | ×    | ×   | √    |

表 17 标准溶液稳定性测定保存时间

| 标液       | 1 周 | 2 周 | 4 周 | 3 月 | 6 月 |
|----------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 标准储备溶液   | √   | √   | √   | √   | √   |
| 标准中间溶液   | √   | √   | √   | √   | √   |
| 标准系列工作溶液 | √   | √   | √   | ×   | ×   |

注：√表示需要开展相关条件的稳定性测试，×表示未开展相关条件的稳定性测试。

标准储备溶液、标准中间溶液和标准工作溶液的剩余分析物结果详见表 18。

表 18 标准储备溶液、标准中间溶液和标准工作溶液剩余分析物结果（单位：%）

| 浓度 (μg/mL) | 保存条件   | 1 周   | 2 周   | 4 周 | 3 月 | 6 月 |
|------------|--------|-------|-------|-----|-----|-----|
| 1          | +4℃避光  | 100.2 | 100.1 | /   | /   | /   |
|            | -20℃避光 | 99.7  | 100.4 | /   | /   | /   |
|            | +20℃避光 | 99.7  | 100.0 | /   | /   | /   |
|            | +20℃光照 | 99.8  | 100.0 | /   | /   | /   |
| 5          | +4℃避光  | 100.2 | 98.8  | /   | /   | /   |
|            | -20℃避光 | 99.7  | 99.5  | /   | /   | /   |
|            | +20℃避光 | 99.7  | 98.3  | /   | /   | /   |
|            | +20℃光照 | 99.8  | 98.8  | /   | /   | /   |

|      |        |       |       |   |   |   |
|------|--------|-------|-------|---|---|---|
| 10   | +4℃避光  | 100.5 | 101.3 | / | / | / |
|      | -20℃避光 | 100.6 | 100.4 | / | / | / |
|      | +20℃避光 | 99.4  | 100.8 | / | / | / |
|      | +20℃光照 | 100.2 | 101.1 | / | / | / |
| 25   | +4℃避光  | 100.1 | 99.7  | / | / | / |
|      | -20℃避光 | 100.0 | 100.3 | / | / | / |
|      | +20℃避光 | 99.6  | 99.8  | / | / | / |
|      | +20℃光照 | 99.8  | 99.7  | / | / | / |
| 50   | +4℃避光  | 100.0 | 99.4  | / | / | / |
|      | -20℃避光 | 100.6 | 100.0 | / | / | / |
|      | +20℃避光 | 99.9  | 100.0 | / | / | / |
|      | +20℃光照 | 99.9  | 100.0 | / | / | / |
| 100  | +4℃避光  | 100.0 | 100.0 | / | / | / |
|      | -20℃避光 | 100.0 | 100.2 | / | / | / |
|      | +20℃避光 | 100.0 | 99.8  | / | / | / |
|      | +20℃光照 | 99.8  | 100.0 | / | / | / |
| 1000 | +4℃避光  | 99.4  | 99.0  | / | / | / |
|      | -20℃避光 | 98.8  | 99.2  | / | / | / |
|      | +20℃避光 | 98.6  | 98.6  | / | / | / |
|      | +20℃光照 | 98.8  | 98.4  | / | / | / |

表18结果表明：对以上不同储存条件（+4℃避光、-20℃避光、+20℃避光和+20℃光照）下的褪黑素样品进行了为期6个月的剩余分析物监测，并采用t检验对监测数据进行评估，目前已开展2周，结果表明2周内不同储存条件下的褪黑素样品，其剩余分析物含量不存在显著性变化趋势。

## 7. 再现性（实验室间方法验证）

本方法经过中原食品实验室、南京海关、广东省科学院测试分析

研究所（中国广州分析测试中心）、广东产品质量监督检验研究院、无锡市食品安全检验检测中心、广东长兴生物科技股份有限公司、汤臣倍健股份有限公司等单位，根据标准草案进行实验室间方法验证（包括检出限、定量限、测定范围、正确度和再现性），结果符合要求，实际样品再现性验证结果见表 19。

表 19 实际样品结果比对

| 编号                      | 褪黑素含量 (mg/g) |              |              |                                 |       |              |              |              |              |                                 |       | RSD% |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------------------------|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------------------------|-------|------|
|                         | Lab1<br>(紫外) | Lab1<br>(荧光) | Lab2<br>(紫外) | Lab2<br>(荧光)                    | Lab3  | Lab4<br>(紫外) | Lab4<br>(荧光) | Lab5<br>(紫外) | Lab5<br>(荧光) | Lab6                            | Lab7  |      |
| 样品 1<br>片剂<br>THS-01S   | 13.7         | 13.9         | 13.9         | 12.9                            | 13.67 | 12.47        | 12.64        | 13.68        | 13.52        | 11.4<br>(未用<br>除脂<br>柱, 舍<br>去) | 13.93 | 4.09 |
| 样品 2<br>硬胶囊<br>THS-02S  | 7.46         | 7.60         | 7.68         | 7.30                            | 7.6   | 7.35         | 7.45         | 8.08         | 8.24         | 7.38                            | 7.36  | 4.05 |
| 样品 3<br>凝胶糖果<br>THS-05S | 0.856        | 0.888        | 0.799        | 0.636<br>(格拉<br>布斯<br>检验离<br>群) | 0.851 | 0.89         | 0.92         | 0.831        | 0.925        | 0.81                            | 0.86  | 4.97 |