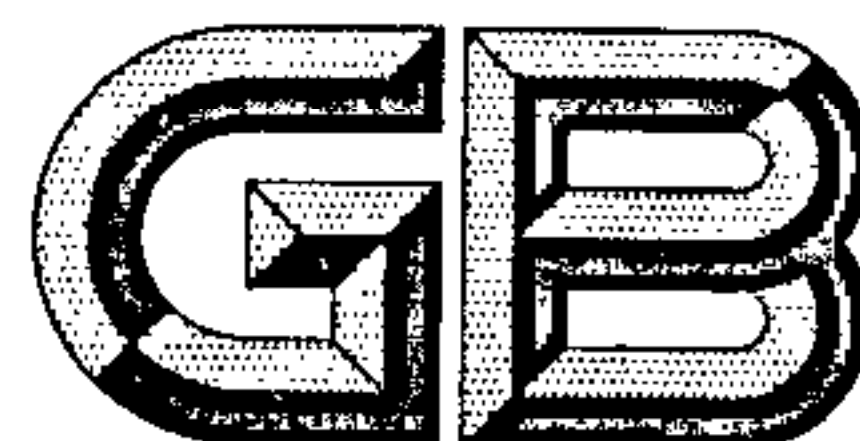




中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.170—2003

保健食品中褪黑素含量的测定

Determination of melatonin in health foods

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准第一法负责起草单位：卫生部食品卫生监督检验所。

本标准第二法负责起草单位：中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所、卫生部食品卫生监督检验所、北京市卫生防疫站。

本标准第一法主要起草人：杨大进、王竹天、方从容、吴国华、李萍。

本标准第二法主要起草人：李萍、吴永宁、王绪卿、杨大进、吴国华。

引 言

褪黑素(Melatonin)是松果体内分泌的一种吲哚类激素,其化学名称为 N-乙酰基-4-甲氧基色胺,该物质具有广泛的生理作用。褪黑素类产品已在国外广泛应用,近年来我国也开始大量生产和销售此类产品。为达到保证褪黑素类产品的质量、保护消费者身体健康的目的,特建立保健食品中褪黑素的测定方法。

保健食品中褪黑素含量的测定

1 范围

本标准规定了以褪黑素为有效成分的胶囊或片剂包装的保健食品中褪黑素的测定方法。

本标准适用于以褪黑素为有效成分的胶囊或片剂包装的保健食品中褪黑素的测定。

本标准第一法高效液相色谱-紫外检测法的检出限为 0.5 ng; 取样量 0.5 g 时, 检出浓度为 0.07 mg/kg。第二法高效液相色谱-荧光法的检出限为 30 pg, 线性范围为 0.05 ng~0.50 ng。

第一法 高效液相色谱-紫外检测法

2 原理

试样中的褪黑素经溶解、稀释、过滤后, 使用具有紫外检测器的高效液相色谱仪检测, 根据色谱峰的保留时间定性, 外标法定量。

3 试剂

除非另有说明, 在分析中仅使用确定为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

3.1 甲醇: 色谱纯。

3.2 无水乙醇: 优级纯。

3.3 三氟乙酸: 优级纯。

3.4 高效液相色谱流动相: 甲醇+水+三氟乙酸=45+55+0.05。

3.5 褪黑素(Melatonin)标准品。

3.6 褪黑素标准溶液的配制

精确称量 30 mg 褪黑素标准品于 100 mL 容量瓶中, 加入 70% 乙醇溶解后定容至刻度。准确吸取 2 mL 上述溶液于 10 mL 容量瓶中, 加入流动相(3.4)定容至刻度, 此溶液浓度为 0.060 mg/mL。

4 仪器设备

4.1 高效液相色谱仪: 附紫外检测器。

4.2 超声波清洗器。

4.3 离心机。

5 分析步骤

5.1 试样处理: 使用研钵将片剂或胶囊研成粉末并使之混合均匀。

5.2 精确称量约一粒片剂或胶囊的质量于 10 mL 容量瓶中, 以 70% 乙醇定容至刻度, 使用超声波清洗器提取 10 min。将提取液离心至澄清。准确量取上清液 2 mL 于 10 mL 容量瓶中, 以流动相定容至刻度, 混匀后经 0.45 μ m 滤膜过滤后进行色谱分析。

5.3 测定

5.3.1 液相色谱参考条件

5.3.1.1 色谱柱: μ -Bondapak C₁₈, 4.6 mm $\times$ 250 mm。

5.3.1.2 紫外检测器: 检测波长 222 nm。

5.3.1.3 流速: 0.8 mL/min。

5.3.1.4 柱温: 室温。

5.3.2 色谱分析

量取 10 μL 标准溶液及试样净化液注入高效液相色谱仪中,以保留时间定性,以试样峰高或峰面积与标准比较定量。

5.3.3 色谱图

见图 1。

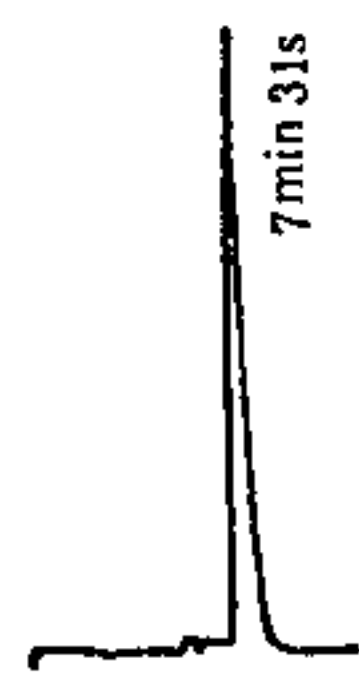


图 1 色谱图

6 结果计算

按式(1)计算:

$$X = \frac{\frac{h}{h_s} \times c \times 10 \times \frac{10}{2} \times 1\,000}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X——试样中褪黑素的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- h——试样的峰高或峰面积;
- h_s——标准的峰高或峰面积;
- c——褪黑素标准溶液的浓度,单位为毫克每毫升(mg/mL);
- m——试样质量,单位为克(g)。

计算结果保留两位有效数字。

7 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 5%。

第二法 高效液相色谱荧光法

8 原理

试样中褪黑素经甲醇反复提取,制成甲醇溶液,按一定比例进行稀释后,注入高效液相色谱仪,经反相色谱分离,以荧光检测器进行检测,根据保留时间定性和与标准品峰面积比较进行定量。

9 试剂

- 9.1 甲醇:重蒸。
- 9.2 褪黑素标准品:纯度为 99.7%。
 - 9.2.1 储备溶液:精密称取褪黑素标准品 0.010 0 g,用甲醇溶解并配成 1 g/L 的储备溶液,于-20℃保存。
 - 9.2.2 使用溶液:使用前精密量取一定量标准品储备溶液,根据褪黑素在仪器上的响应情况,用甲醇稀释成标准使用溶液。

10 仪器

- 10.1 高效液相色谱仪:附荧光检测器和微处理机。

- 10.2 离心机。
- 10.3 超声波清洗机。

11 试样制备

片剂研细备用；胶囊内容物混合均匀备用。

12 分析步骤

12.1 提取

精密称取试样 0.200 0 g 于 5 mL 的刻度试管中，加甲醇约 3 mL，超声振荡 10 min，离心，取上清液于 10 mL 容量瓶中，再加甲醇约 3 mL 于残渣中，按前述方法重复提取 2 次，合并上清液，加甲醇至刻度，摇匀。取此溶液适量，用甲醇稀释并定容，制成试样溶液待测。

12.2 测定

12.2.1 高效液相色谱条件

- 12.2.1.1 色谱柱：Alltima C₁₈ 4.6 mm×250 mm 不锈钢柱。
- 12.2.1.2 流动相：甲醇。
- 12.2.1.3 流速：1 mL/min。
- 12.2.1.4 进样量：10 μL。
- 12.2.1.5 检测器：荧光检测器，激发光波长 286 nm，发射光波长 352 nm。

12.2.2 色谱分析

将仪器调至最佳状态后，分别将 10 μL 标准溶液及净化后试样液注入色谱仪中，以保留时间定性，以试样峰高或峰面积与标准比较定量。本方法线性范围为 0.05 ng~0.50 ng。

12.2.3 色谱图

色谱图见图 2。



13 结果计算

按式(2)计算：

$$X = \frac{m_1 \times V_2 \times 1\,000}{m \times V_1 \times 1\,000} \times n \dots\dots\dots (2)$$

式中：

- X——试样中褪黑素的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)；
- m₁——被测样液中褪黑素的含量，单位为纳克(ng)；
- m——试样质量，单位为克(g)；
- V₁——样液进样体积，单位为微升(μL)；
- V₂——试样稀释液总体积，单位为毫升(mL)；
- n——稀释倍数。

计算结果保留两位有效数字。

14 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%。