



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

代替 GB/T 5009.196-2003

保健食品中肌醇的测定

Determination of inositol 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2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

保健食品中肌醇的测定

1 范围

本文件描述了保健食品中肌醇的测定方法。

本文件适用于以功效成分添加于保健食品中肌醇的测定。

2 原理

试样中的肌醇用乙醇—水提取、干燥后，与硅烷化试剂衍生，衍生物经正己烷提取，采用气相色谱分离，氢火焰离子化检测器检测，外标法定量。

3 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。

3.1 试剂

3.1.1 无水乙醇（ C_2H_6O ）。

3.1.2 95%乙醇（ C_2H_6O ）。

3.1.3 正己烷（ C_6H_{14} ）。

3.1.4 三甲基氯硅烷（ C_3H_9ClSi ）。

3.1.5 六甲基二硅胺烷（ $C_6H_{19}NSi_2$ ）。

3.1.6 *N,N*-二甲基甲酰胺（ C_3H_7NO ）。

3.1.7 无水硫酸钠（ Na_2SO_4 ）。

3.2 试剂配制

3.2.1 70%乙醇：量取 700 mL 无水乙醇（3.1.1），用水定容至 1000 mL，混匀。

3.2.2 硅烷化试剂：分别吸取三甲基氯硅烷（3.1.4）、六甲基二硅胺烷（3.1.5）、*N,N*-二甲基甲酰胺（3.1.6），按体积比为 1：2：8 混合，超声混匀，临用现配。

注：硅烷化试剂若出现白色浑浊现象，需重新配制。

3.3 标准品

肌醇标准品（ $C_6H_{12}O_6$ ，CAS 号：87-89-8）：纯度 $\geq 99\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 肌醇标准储备液（10.00 mg/mL）：称取已于 $105^\circ C \pm 2^\circ C$ 干燥至恒重的肌醇标准品 100 mg（精确至 0.1 mg），用水溶解并定容至 10 mL，混匀， $2^\circ C \sim 8^\circ C$ 贮存，有效期 1 个月。

3.4.2 肌醇标准工作液（1.00 mg/mL）：准确移取 1.00 mL 肌醇标准储备液，用 70%乙醇（3.2.1）定容至 10 mL，混匀，临用现配。

4 仪器和设备

4.1 气相色谱仪：配氢火焰离子化检测器。

- 4.2 分析天平：感量为 0.1 mg 和 1 mg。
- 4.3 离心机：转速 $\geq 4\,000$ r/min。
- 4.4 恒温水浴锅：温度精度为 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。
- 4.5 旋转蒸发仪。
- 4.6 涡旋振荡器。
- 4.7 超声波仪。

5 试样制备

- 5.1 硬胶囊：取样品 20 粒，剪开，取出内容物，研细（必要时），混匀；内容物总量不低于 5g，若 20 粒样品内容物低于 5 g，增大取样量。
- 5.2 软胶囊：取样品 20 粒，剪开，挤出内容物，混匀；内容物总量不低于 5 g，若 20 粒样品内容物低于 5g，增大取样量。
- 5.3 片剂：取样品 20 片，研细，混匀；若 20 片总量低于 10 g，增大取样量。
- 5.4 粉剂、颗粒剂等其他固体试样：取样品 20 g，混匀。
- 5.5 口服液：取 5 支独立包装样品，混合均匀；若内容物低于 10 g，增大取样量。
- 5.6 饮料类、酒类及其他普通食品剂型：取样品 20 g（或 mL）样品，混合均匀。

6 分析步骤

6.1 提取

- 6.1.1 固体试样：称取混合均匀的固体试样 1 g（精确至 1 mg）于 50 mL 刻度管中，加入 6 mL 40°C ~ 45°C 的温水溶解，超声提取 20 min，用 95%乙醇（3.1.2）定容至 25 mL，混匀，静置沉淀 20 min，9 500 r/min 离心 5 min，取 5.0 mL 上清液，待干燥。
- 6.1.2 液体试样
 - 6.1.2.1 不含蛋白液体试样：称取混合均匀的液体试样 10 mL 于 50 mL 刻度管中，加入 70%乙醇（3.2.1）至 50 mL，混匀，超声提取 20 min，9 500 r/min 离心 5 min，取 5.0 mL 上清液，待干燥。
 - 6.1.2.2 含蛋白液体试样：称取混合均匀的液体试样 10 mL 于 50 mL 刻度管中，加入 95%乙醇（3.1.2）至 50 mL，混匀，超声提取 20 min，9 500 r/min 离心 5 min，取 5.0 mL 上清液，待干燥。
- 6.1.3 含油试样：称取 1 g 试样（精确至 0.001 g）于 50 mL 离心管中，加入 4 mL 正己烷（3.1.3），涡旋振荡 1 min，加入 10.0 mL 70%乙醇（3.2.1），涡旋振荡 1 min，超声提取 20 min，9 000 r/min 离心 5 min，弃去上层正己烷，加入 5 mL 正己烷（3.1.3），涡旋振荡 1 min，9 000 r/min 离心 5 min，弃去上层正己烷，吸取 2.0 mL 下层清液，待干燥。

注：可根据试样中组分的含量，适当增加或减少稀释倍数 f ，使组分浓度处于标准曲线测定范围内。

6.2 干燥

向待干燥试样中加 5 mL 无水乙醇（3.1.1），于 80°C 下旋转蒸发浓缩至剩少量液体，再加入 5 mL 无水乙醇（3.1.1）至浓缩瓶中液体完全除去。

6.3 衍生

向干燥后的试样中加入 5 mL 硅烷化试剂（3.2.2），超声 5 min，于 25 mL 螺口玻璃瓶中密封混匀，于 80°C 水浴中反应 20 min（固体样品 80°C 水浴中反应 75 min，每隔 20 min 取出振荡 10 s），冷却至室

温，加入 3 mL 正己烷（3.1.3），涡旋 2 min，待静置分层后，取正己烷萃取液于预先加入少许无水硫酸钠（3.1.7）的离心管中，涡旋后，以不低于 4 000 r/min 转速离心 5 min，将溶液转移至进样瓶中，即得试样测定液，待气相色谱仪测定。

6.4 肌醇标准测定液

分别吸取 0.05 mL、0.1 mL、0.5 mL 的肌醇标准工作溶液（3.4.2）和 0.25 mL、0.5 mL、1 mL 的肌醇标准储备液（3.4.1）于旋蒸瓶，其他分析步骤同 6.2 和 6.3，得到的标准测定液中肌醇含量分别为 0.05 mg、0.1 mg、0.5 mg、2.5 mg、5.0 mg、10.0 mg。

6.5 仪器参考条件

- (a) 检测器：氢火焰离子化检测器。
- (b) 色谱柱：石英毛细管柱（5%苯基—甲基聚硅氧烷，柱长 30 m，内径 0.25 mm，膜厚 0.25 μ m），或具同等性能的色谱柱。
- (c) 进样口温度：260 $^{\circ}$ C。
- (d) 检测器温度：300 $^{\circ}$ C。
- (e) 分流比：10：1，可根据实际情况调整。
- (f) 进样量：1.0 μ L
- (g) 载气：高纯氮气。
- (h) 载气流速：1 mL/min。
- (i) 氢气流量：40 mL/min。
- (j) 空气流量：400 mL/min。
- (k) 参考程序升温：见表 1。

表 1 程序升温表

升温速率 $^{\circ}$ C/min	温度 $^{\circ}$ C	保持时间 min
—	160	3
10	240	5
20	280	8

6.6 标准曲线的制作

将肌醇标准测定液（6.4）分别注入气相色谱仪中，以肌醇标准测定液中肌醇的质量为横坐标，测得的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

6.7 试样溶液的测定

将试样测定液注入气相色谱仪中，测得保留时间和峰面积。试样测定液中肌醇衍生物的保留时间与肌醇标准品衍生物的保留时间相比，相对偏差应在 $\pm 0.5\%$ 以内。试样测定液中肌醇的质量根据标准曲线得到。

7 结果计算

试样中肌醇的含量按式（1）进行计算：

$$X = \frac{C_x \times V_2}{m \times V_1} \times f \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中肌醇的含量，固体试样单位为毫克每百克（mg/100 g），液体试样单位为毫克每百毫升（mg/100 mL）；

C_x ——由标准曲线得到的试样测定液中肌醇的含量，单位为毫克（mg）；

V_2 ——提取液体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样量，单位为克或毫升（g或mL）；

V_1 ——干燥试液体积（mL）；

f ——试样制备过程中的稀释倍数；

100——换算系数。

计算结果保留3位有效数字。

8 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超过算术平均值的10%。

9 其他

液体试样，当试样量为 10 mL 时，试样中肌醇的检出限为 2 mg/100 mL、定量限为 5 mg/100 mL；

固体试样、含油试样，当试样量为 1.0 g 时，试样中肌醇的检出限为 5 mg/100 g、定量限为 10 mg/100 g。

10 气相色谱图

肌醇标准溶液衍生后的气相色谱图参见图1。

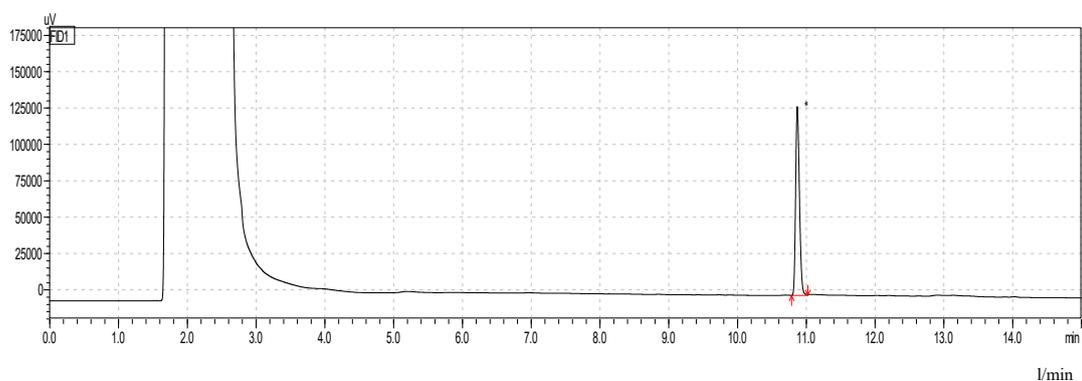


图1 肌醇标准溶液衍生后的气相色谱图

附 录 A
(资料性)
肌醇液相色谱-质谱确证试验

A.1 原理

试样中的肌醇经水提取、稀释、过滤后，采用高效液相色谱-串联质谱仪检测，外标法定量。

A.2 试剂和材料

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

A.2.1 试剂

A.2.1.1 甲醇（CH₃OH）。

A.2.1.2 乙酸（CH₃COOH）。

A.2.2 试剂配制

A.2.2.1 0.2%乙酸溶液：量取 2 mL 乙酸（A.2.1.2），用水定容至 1 000 mL，混匀。

A.2.3 标准品

同 3.3。

A.2.4 标准溶液配制

A.2.4.1 肌醇标准储备液（10.00 mg/mL）：称取已于 105 °C ± 2 °C 干燥至恒重的肌醇标准品 100 mg（精确至 0.01 mg），用水溶解并定容至 10 mL，混匀，2 °C~8 °C 贮存，有效期 1 个月。

A.2.4.2 肌醇标准中间液（1.00 mg/mL）：准确移取 1.00 mL 肌醇标准储备液（A.2.4.1），用水定容至 10 mL，混匀。

A.2.4.3 肌醇标准中间液（0.10 mg/mL）：准确移取 1.00 mL 肌醇标准中间液（A.2.4.2），用水定容至 10 mL，混匀。

A.2.4.4 肌醇标准中间液（0.01 mg/mL）：准确移取 1.00 mL 肌醇标准中间液（A.2.4.3），用水定容至 10 mL，混匀。

A.3 仪器和设备

A.3.1 高效液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源（ESI）。

A.3.2 天平：感量 1 mg 和 0.01 mg。

A.3.3 超声波清洗器。

A.3.4 涡旋振荡器。

A.3.5 高速离心机：转速 ≥ 10 000 r/min。

A.3.6 滤膜：0.22 μm，水相。

A.4 试样制备

A.4.1 固体试样：片剂、含片、咀嚼片、泡腾片取不少于 20 粒或不低于 5 g 样品，研细，混匀；硬胶囊：取出内容物，研细（必要时），混匀，封存备用。

A.4.2 液体试样（饮料类和口服液）：取不少于 20 mL 样品充分混匀，封存备用。

A.5 分析步骤

A.5.1 提取

A.5.1.1 固体试样

称取混合均匀的固体试样 1 g（精确至 1 mg）于 50 mL 刻度管中，加入 50 mL 水溶解，涡旋震荡 10 min，超声提取 10 min，10 000 r/min 离心 10 min，根据样品含量取适量上清液稀释至适宜浓度，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，供检测。

A.5.1.2 液体试样

称取混合均匀的液体试样 1 mL 于 100 mL 容量瓶中，加水定容至刻度，超声提取 20 min，根据样品含量取适量上清液稀释至适宜浓度，经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，供检测。

注：可根据试样中组分的含量，选择适当的稀释倍数 f ，使组分浓度处于标准曲线测定范围内。

A.5.2 肌醇标准工作溶液制备

分别准确吸取适量肌醇标准中间液（A.2.4.4），用水配制成浓度分别为 0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.0 μg/mL 的标准系列工作溶液。

A.5.3 液相色谱参考条件

- (a) 色谱柱：Polans 3 Amide-C₁₈，3 μm，150×3.0 mm，或相当者；
- (b) 流动相：甲醇-0.2%乙酸（2+98，体积比）；
- (c) 流速：0.4 mL/min；
- (d) 柱温：30°C；
- (e) 进样量：5 μL；

A.5.4 质谱参考条件

- (a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- (b) 扫描方式：负离子扫描；
- (c) 检测方式：多反应监测（MRM）；
- (d) 气体温度：250 °C；
- (e) 气体流速：7 L/min；
- (f) 雾化器压力：30 psi；
- (g) 毛细管电压：2 500 V (-)；
- (h) 定性离子对、定量离子对和碰撞能量的参考值见表A.1；

表 A.1 定性、定量离子对及碰撞能量

化合物	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	碎裂电压 (V)	碰撞能量CE (V)
肌醇	179.1>161.0	179.1>161.0	133	12
	179.1>116.8		133	12

A.5.5 定性测定

在同样测定条件下，试样溶液中肌醇的保留时间与基质匹配标准溶液中相应肌醇的保留时间的偏差在±2.5%以内，且检测到的相对离子丰度应当与浓度相当的基质匹配标准溶液相对离子丰度一致。其允许偏差应符合表 A.2 的要求。

表 A.2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差 (%)

相对离子丰度	>50	20~50	10~20	≤10
允许的最大偏差	±20	±25	±30	±50

A.5.6 定量测定

在仪器最佳工作条件下，将基质标准工作溶液进样，以峰面积为纵坐标，基质标准工作溶液浓度为横坐标绘制标准工作曲线，用标准工作曲线对样品进行定量，样品溶液中的待测物的响应值应在仪器测定的线性范围内。

A.5.7 空白实验

除不加试样外，均按上述步骤进行。

A.6 分析结果的表述

试样中肌醇的含量按式（A.1）计算：

$$X = \frac{(C - C_0) \times V}{m} \times f \times \frac{100}{1000} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

X ——试样中肌醇的含量，固体试样单位为毫克每百克（mg/100 g），液体试样单位为毫克每百毫升（mg/100 mL）；

C ——试样测定液中肌醇的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

C_0 ——空白测定液中肌醇的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

m ——试样量，单位为克或毫升（g或mL）；

V ——提取液体积，单位为毫升（mL）；

f ——稀释倍数；

100, 1000——单位换算系数。

计算结果保留3位有效数字。

A.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应超过算术平均值的10%。

A.8 其他

液体试样：当试样量为1 mL时，定容体积为100 mL时，试样中肌醇的检出限为0.2 mg/100 mL，定量限为0.5 mg/100 mL；

固体试样：当试样量为1.0 g时，定容体积为50 mL时，试样中肌醇的检出限为0.1 mg/100 g，定量限为0.25 mg/100 g。

A.9 色谱图

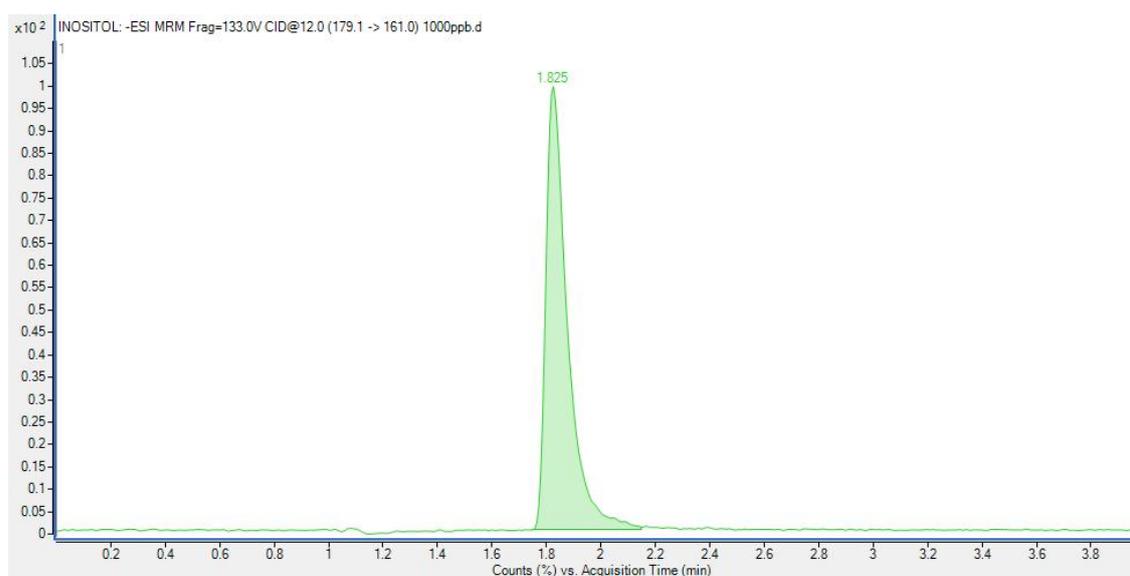


图 A.1 肌醇的多反应监测 (MRM) 色谱图 (179.1>161.0)

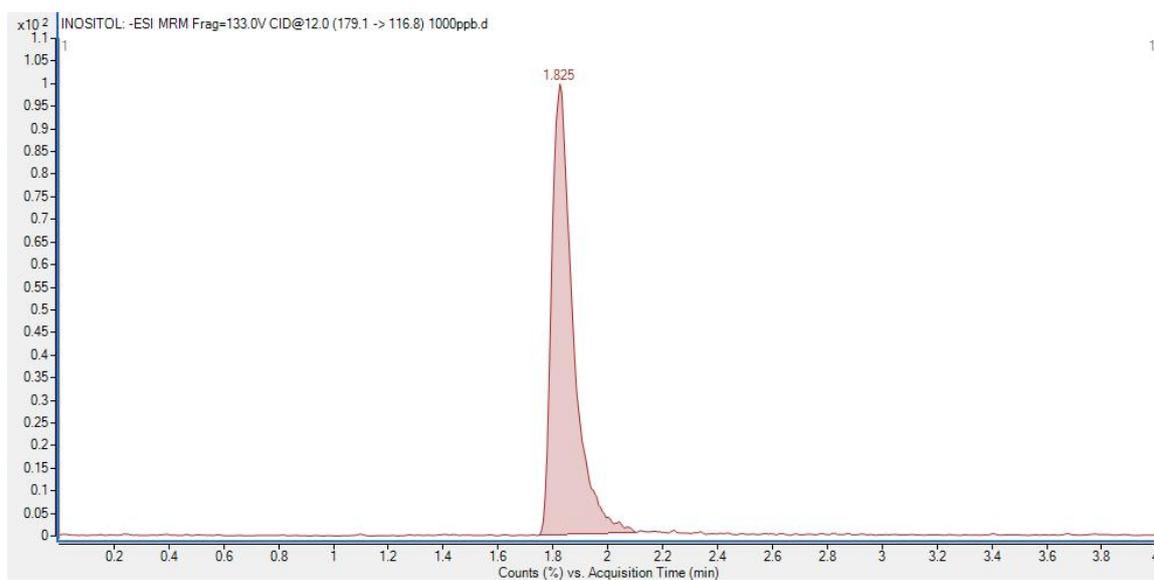


图 A.2 肌醇的多反应监测 (MRM) 色谱图 (179.1>116.8)