

《保健食品中肌醇的测定》国家标准修订编制说明（征求意见稿）

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），《保健食品中肌醇的测定》（计划号 20230866-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等单位共同完成起草修订工作。

（二）主要工作过程

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《保健食品中肌醇的测定》的修订方案。

2023 年 11 月~2024 年 1 月，起草组各单位根据《保健食品中肌醇的测定》标准修订方案开展实验室内方法验证的工作。

2024 年 1 月，全国特殊食品标准化技术委员会组织各参与单位开展新修订保健食品中肌醇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

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/T1.1-2009《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

1、气相色谱法

1.1 试样制备

根据市场调查，目前保健食品中添加肌醇的剂型包括：功能性饮料、片剂、口服液、胶囊等剂型，本方法根据不同的剂型分别规定了试样制备方法。

1.2 试样的提取

为选择合适的提取溶剂，选取多元维生素片、红牛维生素功能饮料、东鹏特饮维生素功能饮料为研究对象，考察不同溶剂（水、乙醇、40%乙醇溶液、50%乙醇溶液、60%乙醇溶液、70%乙醇溶液、80%乙醇溶液、95%乙醇）对目标物的提取效果。结果表明，70%乙醇水溶液对含目标物样品的提取效果最佳。

为选择合适的提取方式，实验选取多元维生素片、东鹏特饮维生素功能饮料为研究对象，考察振荡提取（提取时间 10min、20min、30min、1h）和超声提取（超声时间 10min、20min、30min、1h）的提取效果。结果表明，超声提取 20min 的提取效果最佳。

含蛋白样品，我们参照 GB 5009.270-2023《食品安全国家标准 食

品中肌醇的测定》采用乙醇沉淀的方法去除蛋白干扰。含蛋白固体试样：称取混合均匀的固体试样 1 g（精确至 1 mg）于 50mL 刻度管中，加入 6 mL 40℃~45℃的温水溶解，超声提取 10 min，用 95%乙醇定容至 25mL，混匀，静置沉淀 20min，9500r/min 离心 5min，取 5.0mL 上清液待干燥。含蛋白液体试样：称取混合均匀的液体试样 10mL 于 50mL 刻度管中，加入 95%乙醇至 50mL，混匀，超声提取 20min，9500r/min 离心 5min，取 5.0mL 上清液待干燥。

软胶囊等含油试样由于含油大量脂肪酸影响目标物的提取，实验选取添加肌醇（添加浓度 50mg/100g）的软胶囊样品为研究对象，考察石油醚除脂和正己烷除脂两种方式下提取效果。结果表明，正己烷除脂的效果更好。后续实验，含油样品采用正己烷除脂。

1.3 干燥条件的选择

配制 1mg/mL 的肌醇溶液，分别于 60℃、70℃、80℃旋蒸和 60℃、70℃、80℃氮吹，后进行衍生、测定，每个处理三个平行。结果表明，80℃旋蒸时，标液响应最高，因此选择干燥选择 80℃旋蒸。

1.4 衍生条件的优化

配制 1mg/mL 的肌醇溶液，旋蒸干燥后，加入 5mL 硅烷化试剂，分别置于 60℃、70℃、80℃、90℃水浴加热 10min，每个处理三个平行，结果见图 5-1。称取混合均匀的东鹏试样 10mL 于 50mL 刻度管中，加入 70%乙醇至 50mL，混匀，超声提取 10min，9500r/min 离心 5min，取 5.0mL 上清液待干燥；加衍生试剂后分别于 60℃、70℃、80℃、90℃水浴加热 10min，每个处理 3 个平行。结果表明，水浴温

度为 80°C 时, 衍生效果最好。后续实验, 衍生时水浴温度设定为 80°C。

配制 1mg/mL 的肌醇溶液, 旋蒸干燥后, 加入 5mL 硅烷化试剂, 在 80°C 水浴下, 分别加热 10min, 20min, 30min, 60min, 90min, 每个处理三个平行。结果表明, 水浴温度为 80°C 时, 衍生时间为 20min 时肌醇响应最高。称取混合均匀的东鹏试样 10mL 于 50mL 刻度管中, 加入 70%乙醇至 50mL, 混匀, 超声提取 10min, 9500r/min 离心 5min, 取 5.0mL 上清液待干燥; 加衍生试剂后在 80°C 水浴下, 分别加热 10min, 20min, 30min, 60min, 90min, 每个处理三个平行。结果表明, 水浴温度为 80°C 时, 衍生时间为 20min 时即可衍生完全。后续实验, 衍生时间设定为 20min。

配制 1mg/mL 的肌醇溶液, 旋蒸干燥后, 分别加入 5mL、8mL、10mL 硅烷化试剂, 于 80°C 水浴加热 20min, 每个处理三个平行。结果表明, 5mL 衍生液即可达到良好的衍生效果。后续硅烷化试剂用量设定为 5mL。

配制 1mg/mL 的肌醇溶液, 选择干燥后, 加入 5mL 硅烷化试剂, 于 80°C 水浴加热 20min, 冷却后不加水、加 5mL、10mL 水, 每个处理三个平行。结果表明, 不加水时肌醇标液响应最高, 后续实验冷却至室温后不加水。

1.5 仪器条件

仪器条件参照 GB 5009.270-2023 《食品安全国家标准 食品中肌醇的测定》第一法 气相色谱法, 优化仪器条件。

1.6 线性范围的选择

考虑到部分产品肌醇添加量较低，将线性范围修订为：
0.05mg~10.0mg。

同时为了防止部分肌醇含量较高或较低试样的测定浓度超出曲线范围，增加“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”。

1.7 计算公式的修订

修订后计算公式如下：

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

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/100mL）；

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）；

V₂—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）；

V₁—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。

（5）检出限和定量限的修订

经过实验确定了方法的检出限和定量限为：液体试样，当试样量为 10mL 时，试样中肌醇的检出限为 2 mg/100mL、定量限为 5

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

2、确证法 液相色谱-串联质谱法

此方法主要用于定性测定，也可以用于浓度较低的肌醇含量测定。

2.1 提取溶剂的选择

由于肌醇是一种水溶性维生素，可以用水直接提取。参考 ISO-20637-2015、SNT5147-2019 以及其他文献，选择室温水 and 40 °C 左右温水为提取剂，分别在 1 g 咀嚼片空白样品中加入 50 µg/mL 肌醇标准品，分别加入 50 mL 室温水 and 40 °C 左右温水，涡旋震荡、超声提取后测定。室温水 and 40 °C 左右温水提取肌醇测定结果差异不大，考虑到操作简便性将提取剂确定为室温水。

2.2 仪器测定条件的选择和优化

质谱条件的优化：

肌醇含有 6 个羟基，易形成 [M-H]⁻母离子，使用 ESI 负离子模式。将 1.0 µg/mL 的肌醇标准溶液直接注入三重四极杆质谱仪，通过质谱自动优化 MS/MS 采集参数和特征碎片离子。

色谱柱的选择：

考察了肌醇在 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(1.7 µm, 2.1 mm × 100 mm) 和 Polans 3 Amide-C₁₈ 色谱柱 (3 µm, 150 × 3.0 mm) 的保留效果，结果见图 1，肌醇在 BEH C₁₈ 色谱柱上基本无保留，在 Amide-C₁₈ 色谱柱中却能很好地保留，且峰型良好，因此，后续试验选用 Polans 3 Amide-C₁₈ 色谱柱。

流动相条件的选择：

本方法比较了甲醇-0.2%乙酸水、甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%氨水四种流动相体系，其中甲醇-0.2%乙酸水作为流动相时肌醇峰型较好且响应明显优于其他三种流动相体系，故本方法采用甲醇-0.2%乙酸水作为流动相。进一步对比了不同体积比甲醇-0.2%乙酸水对应的肌醇响应强度，随着乙酸水比例的增加，响应逐渐增强，最终确定甲醇-0.2%乙酸水体积比为 2+98。

柱温的选择：

分别比较了柱温为 30 °C、35 °C、40 °C时肌醇的响应强度，随着温度的增加，肌醇的响应略有降低，但整体差异不大，最终选择柱温为 30 °C。

三、试验验证的分析

（一）试验验证的分析

1、气相色谱法

方法线性关系：以肌醇为定量外标，在0.05~10.0 mg浓度范围内，相关系数 R^2 大于0.999，线性关系良好。选择功能性饮料（红牛、东鹏特饮）、口服液、果汁、营养快线（含蛋白饮料）等液体试样空白样品，分别加入5mg/100mL（LOQ）、25mg/100mL（5LOQ）、50mg/100mL（10LOQ）肌醇标准品，选择片剂、软胶囊空白样品，分别加入10mg/100g（LOQ）、50mg/100g（5LOQ）、100mg/100g（10LOQ）肌醇标准品，每个添加六个平行。结果显示：实验室内样品的平均加标回收率在85.0 %~109.6 %之间，相对偏差在0.624%~4.92%之间。

2、确证法 液相色谱-串联质谱法

在最优实验条件下，选取片剂、硬胶囊、咀嚼片、含片、泡腾片 5 种空白样品，分别添加 0.4 g/100g、 0.8 g/100g、 1.2 g/100g 肌醇标准品。在不同加标水平下肌醇的回收率范围为 89.2%~110.6%，RSD 为 0.5%~4.2%。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。

方法验证基础上，起草工作组组织4家实验室进行验证，结果符合验证比对要求。

具体方法验证和实验室比对情况见附件。

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等措施建议

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

本标准发布实施后，GB/T 5009.196-2003 废止。

附件：方法学验证报告

附件

保健食品中肌醇的测定方法学验证

一、实验室内方法验证

(一) 气相色谱法

1. 特异性

选择功能性饮料、片剂、口服液等空白样品与肌醇标准进行比对，结果显示肌醇保留时间为 10.868min，空白辅料中无色谱峰对肌醇检测造成干扰，具体见图 1。

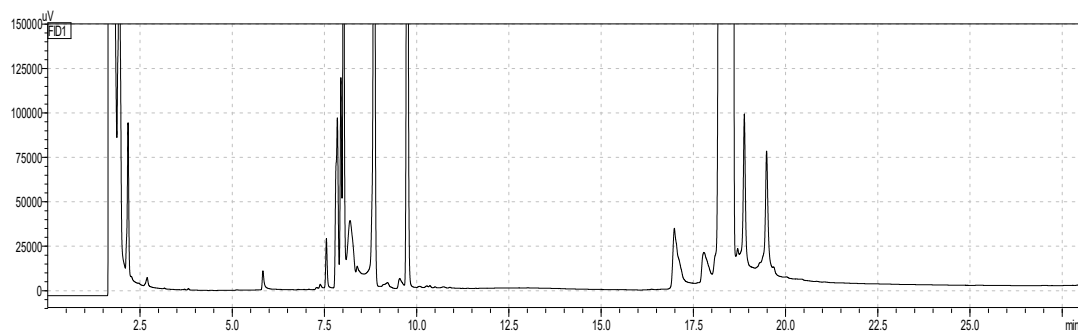


图 1-1 功能性饮料（红牛）空白样品

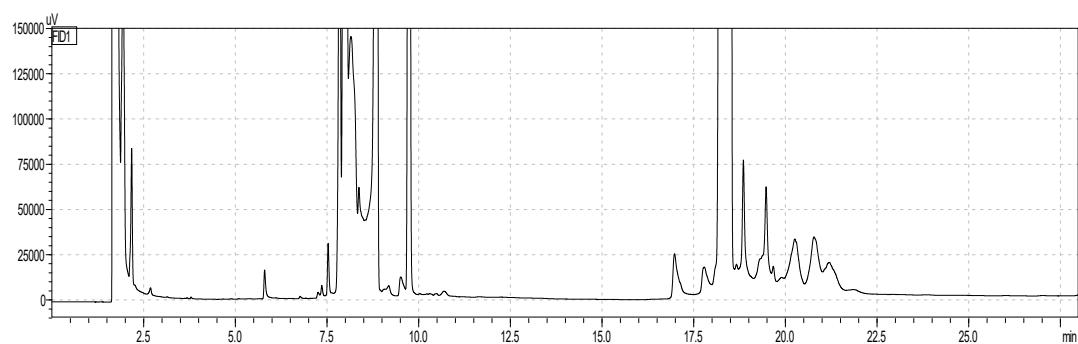


图 1-2 功能性饮料（东鹏特饮）空白样品

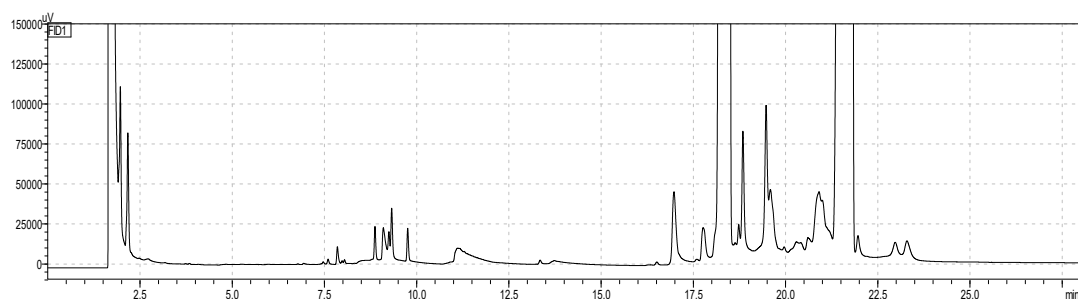


图 1-3 片剂空白样品

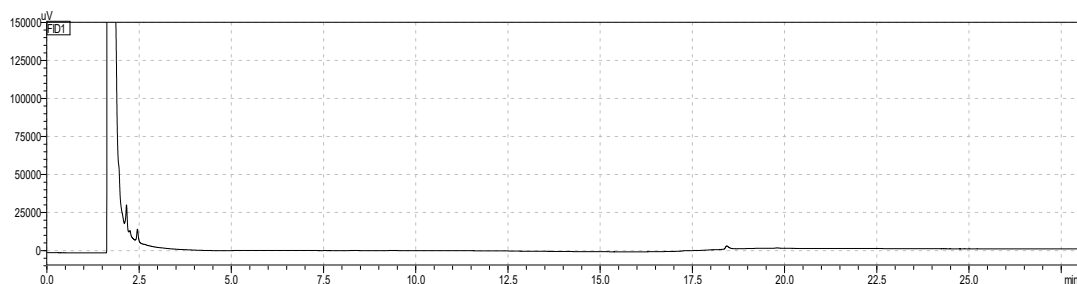


图 1-4 软胶囊空白样品

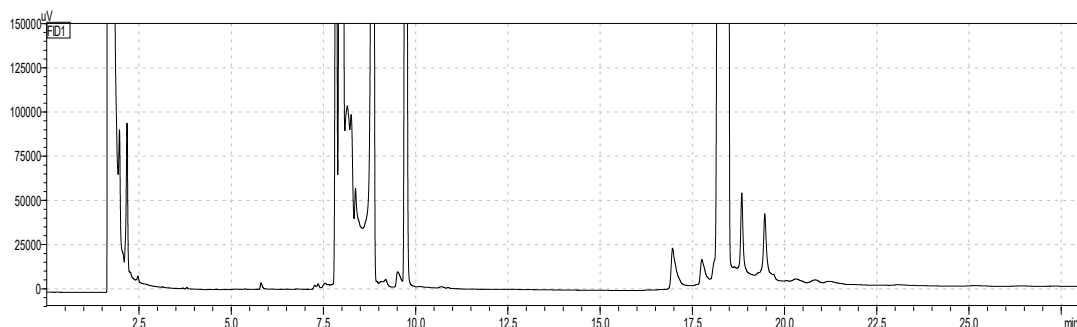


图 1-5 口服液空白样品

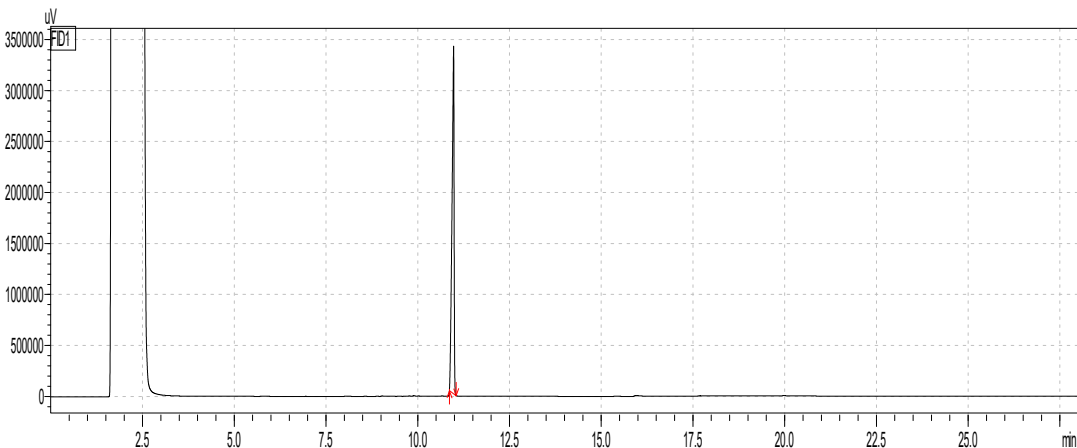


图 1-6 肌醇标准溶液

2、前处理条件的选择和优化

2.1 提取溶剂的选择

为选择合适的提取溶剂，选取多元维生素片、红牛维生素功能饮料、东鹏特饮维生素功能饮料为研究对象，考察不同溶剂（水、乙醇、40%乙醇溶液、50%乙醇溶液、60%乙醇溶液、70%乙醇溶液、80%乙醇溶液、95%乙醇）对目标物的提取效果。结果见图 2，由实验结果可知，70%乙醇水溶液对含目标物样品的提取效果最佳。

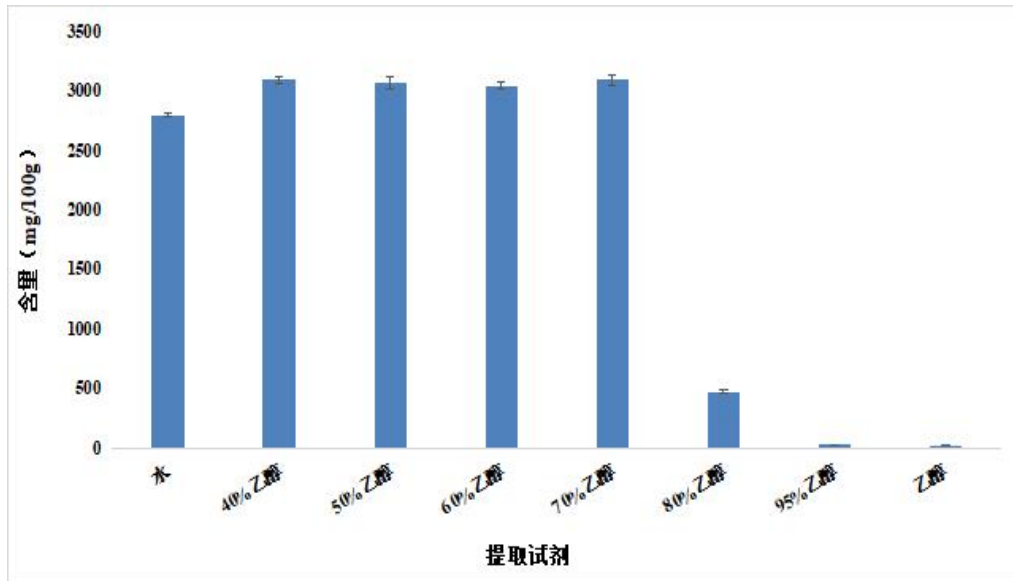


图 2-1 不同溶剂对多元维生素片中肌醇的提取效果

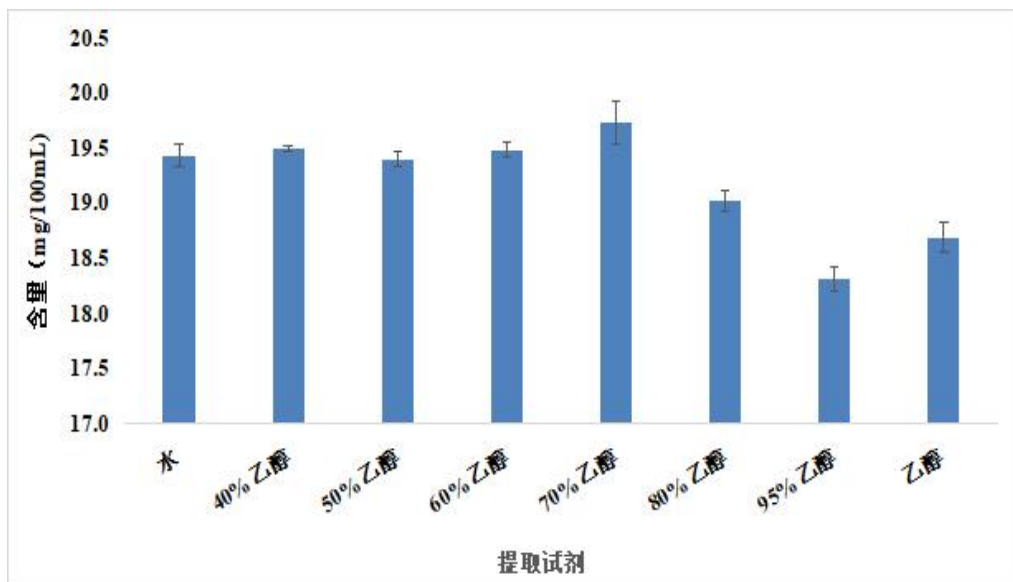


图 2-2 不同溶剂对红牛维生素饮料中肌醇的提取效果

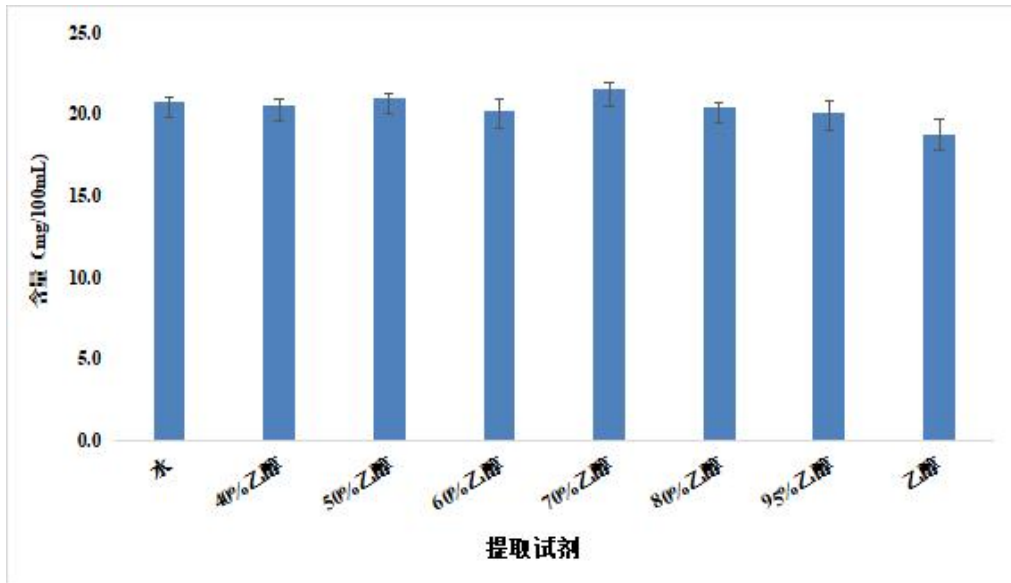


图 2-3 不同溶剂对东鹏特饮维生素饮料中肌醇的提取效果

2.2 提取方式的选择

为选择合适的提取方式，实验选取多元维生素片、东鹏特饮维生素功能饮料为研究对象，考察振荡提取（提取时间 10min、20min、30min、1h）和超声提取（超声时间 10min、20min、30min、1h）的提取效果。结果见图 3，由实验结果可知，超声提取 20min 的提取效果最佳。

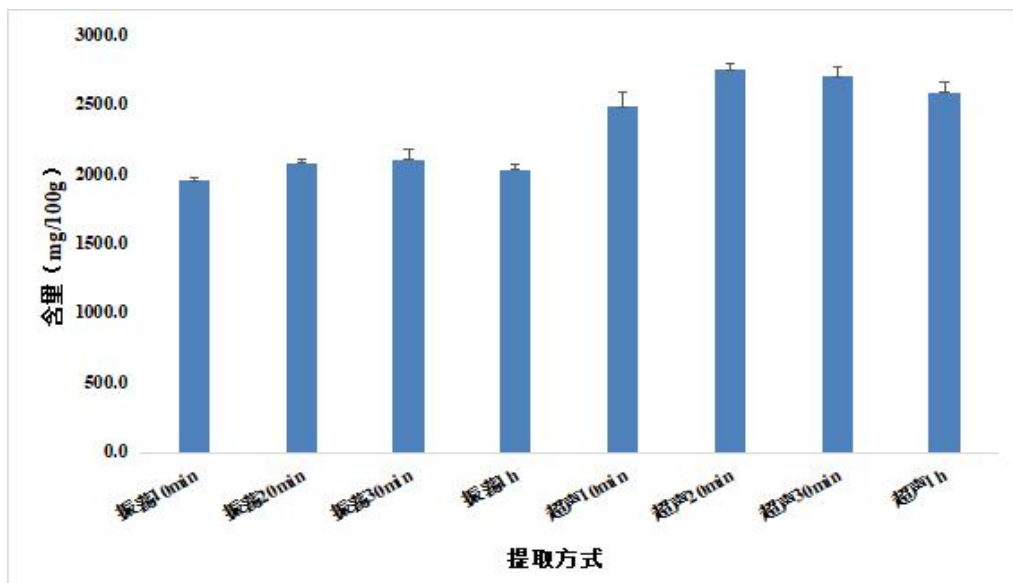


图 3-1 不同提取方式对多元维生素片中肌醇的提取效果

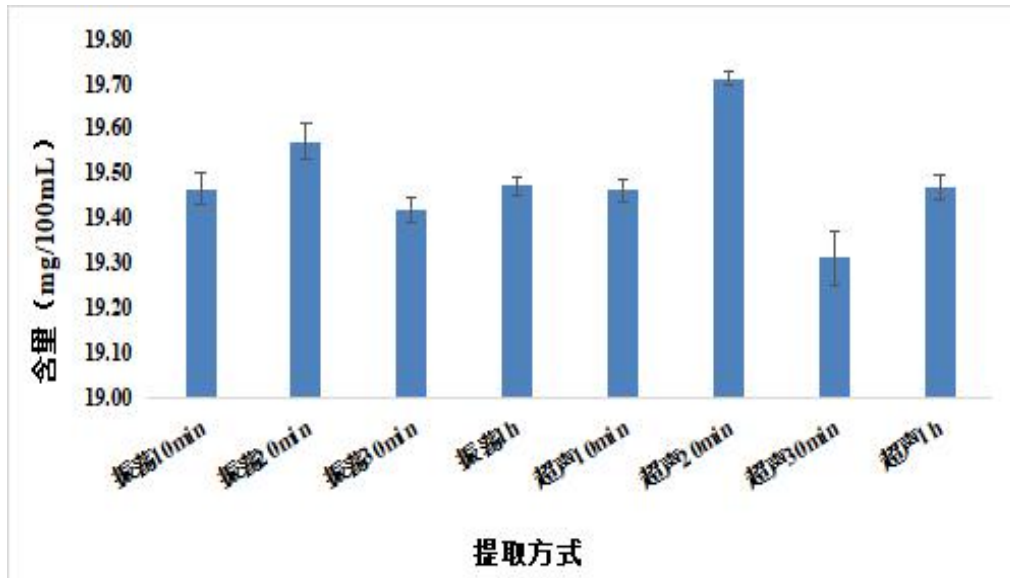


图 3-2 不同提取方式对东鹏特饮维生素饮料中肌醇的提取效果

2.3 固体试样前处理方式的确定

在做阳性样品测定时，我们发现片剂样品按照“称取混合均匀的固体试样 1 g 于 50mL 刻度管中，加入 10 mL 70%乙醇，超声提取 20 min，9500r/min 离心 5min，取 2.0mL 上清液待干燥”处理时回收率只有 80%左右。我们参照 GB 5009.270-2023 《食品安全国家标准 食品中肌醇的测定》固体样品前处理方法“称取混合均匀的固体试样 1 g（精确至 1 mg）于 50mL 刻度管中，加入 6 mL 40℃~45℃的温水溶解，超声提取 10 min，用 95%乙醇定容至 25mL，混匀，静置沉淀 20min，9500 r/min 离心 5min，取 5.0mL 上清液待干燥”处理样品时，片剂样品回收率达 90%以上，因此固体样品前处理方式参照 GB 5009.270-2023。

2.4 含油试样除脂方式的选择

软胶囊等含油试样由于含油大量脂肪酸影响目标物的提取，实验选取添加肌醇（添加浓度 50mg/100g）的软胶囊样品为研究对象，考

察石油醚除脂和正己烷除脂两种方式下提取效果。结果见图 4，由实验结果可知，正己烷除脂的效果更好。后续实验，含油样品采用正己烷除脂。

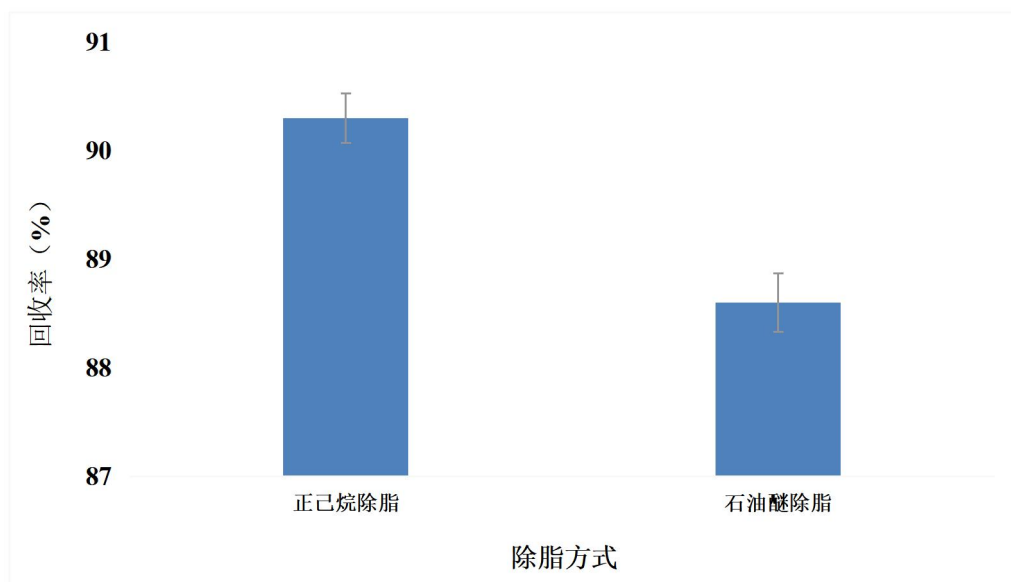


图 4 除脂方式对肌醇影响

2.5 干燥条件的选择

配制 1mg/mL 的肌醇溶液，分别于 60°C、70°C、80°C 旋蒸和 60°C、70°C、80°C 氮吹，后进行衍生、测定，每个处理三个平行。结果见图 5，80°C 旋蒸时，标液响应最高，因此选择干燥选择 80°C 旋蒸。

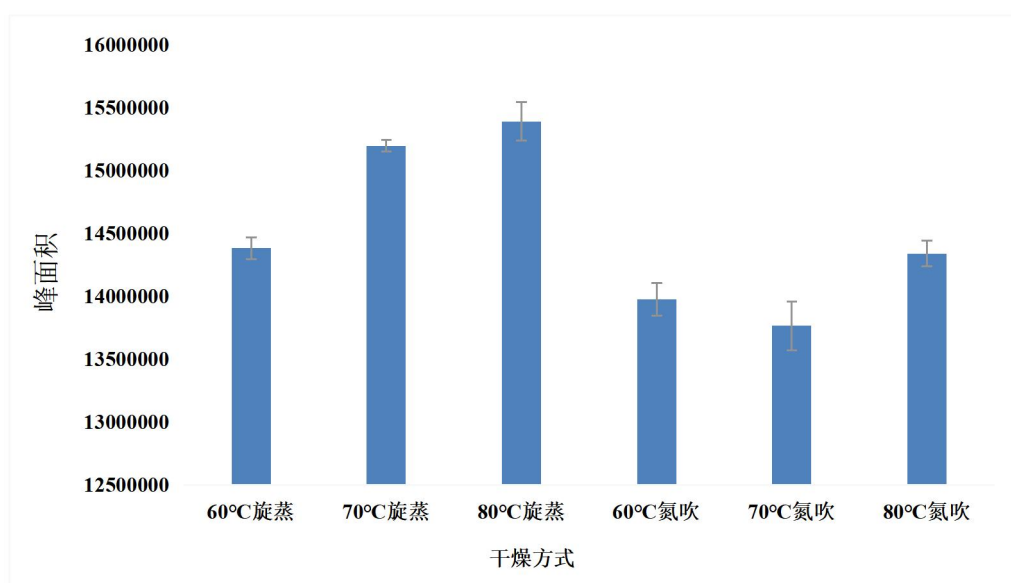


图 5 不同干燥温度对肌醇影响

2.6 衍生条件的选择

2.6.1 衍生温度的优化

配制 1mg/mL 的肌醇溶液，旋蒸干燥后，加入 5mL 硅烷化试剂，分别置于 60°C、70°C、80°C、90°C 水浴加热 10min，每个处理三个平行，结果见图 6-1。称取混合均匀的东鹏试样 10mL 于 50mL 刻度管中，加入 70%乙醇至 50mL，混匀，超声提取 10min，9500r/min 离心 5min，取 5.0mL 上清液待干燥；加衍生试剂后分别于 60°C、70°C、80°C、90°C 水浴加热 10min，每个处理 3 个平行，结果见图 6-2。结果表明，水浴温度为 80°C 时，衍生效果最好。后续实验，衍生时水浴温度设定为 80°C。

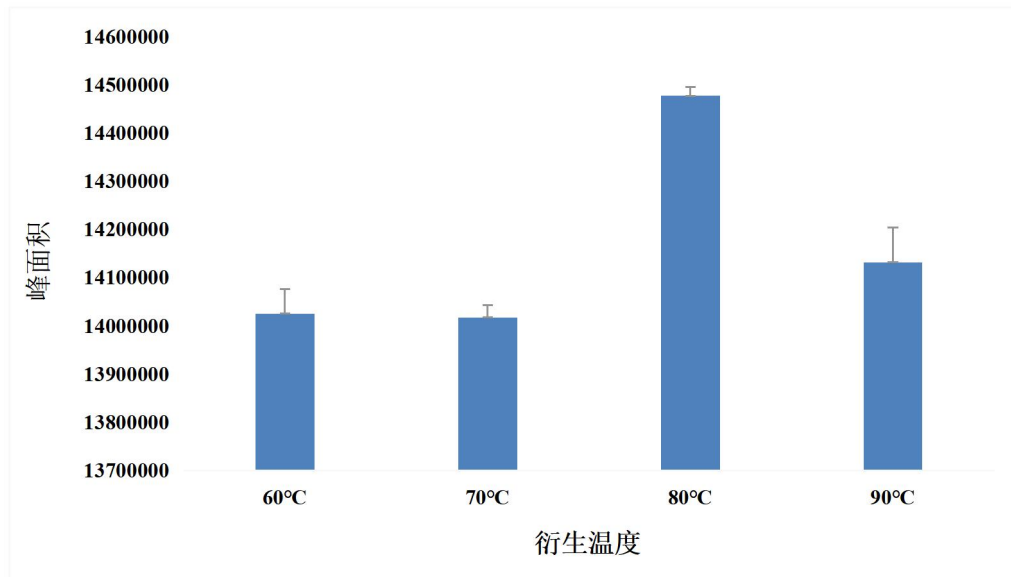


图 6-1 衍生温度对肌醇影响（肌醇标液）

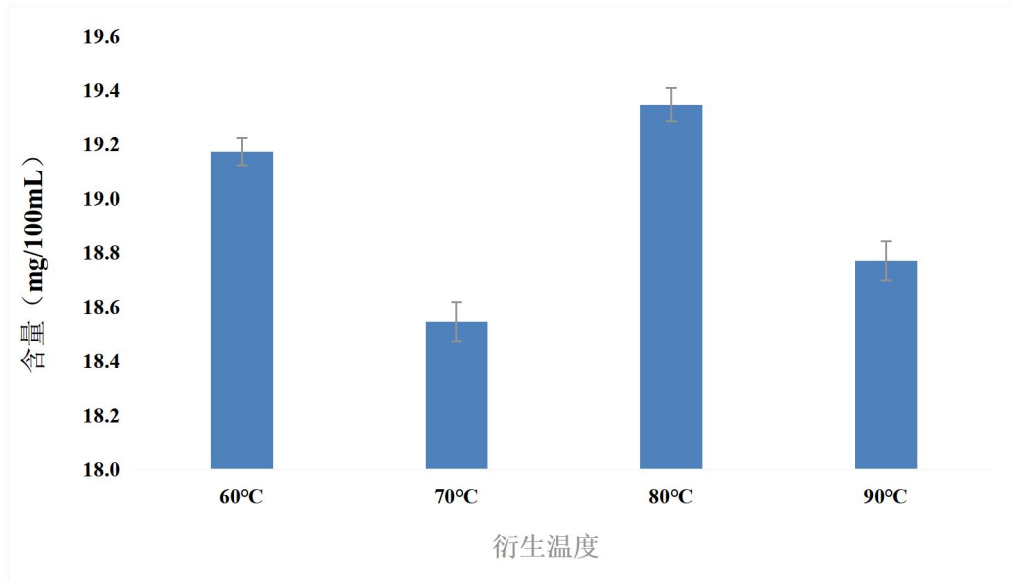


图 6-2 衍生温度对肌醇影响（东鹏特饮）

2.6.2 衍生时间的优化

配制 1mg/mL 的肌醇溶液，旋蒸干燥后，加入 5mL 硅烷化试剂，在 80°C 水浴下，分别加热 10min，20min，30min，60min，90min，每个处理三个平行，结果见图 7-1。

称取混合均匀的东鹏试样 10mL 于 50mL 刻度管中，加入 70%乙醇至 50mL，混匀，超声提取 10min，9500r/min 离心 5min，取 5.0mL 上清液待干燥；加衍生试剂后在 80°C 水浴下，分别加热 10min，20min，30min，60min，90min，每个处理三个平行，结果见图 7-2。结果表明，水浴温度为 80°C 时，衍生时间为 20min 时即可衍生完全。后续实验，衍生时间设定为 20min。

固体样品衍生时间为 20min 时，结果偏低，因此固体样品衍生时间参照 GB 5009.270-2023 设定为 75min。

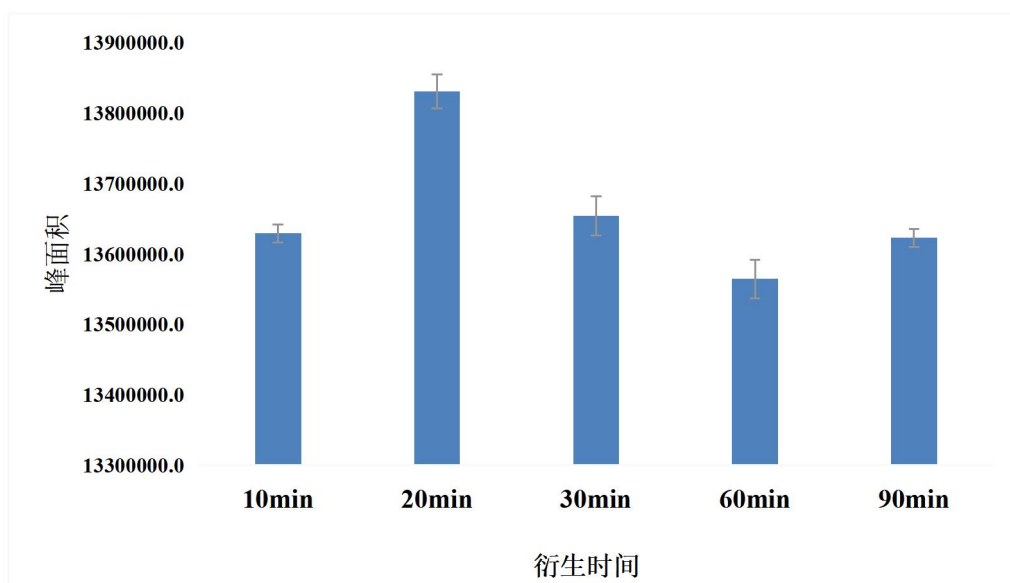


图 7-1 衍生时间对肌醇影响（肌醇标液）

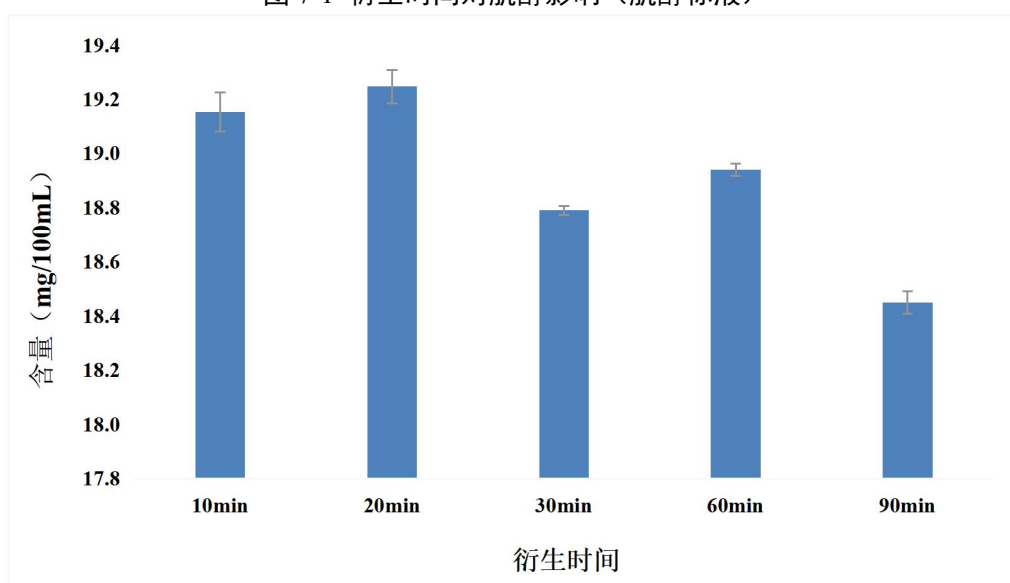


图 7-2 衍生时间对肌醇影响（东鹏特饮）

2.6.3 硅烷化试剂用量的优化

配制 1mg/mL 的肌醇溶液，旋蒸干燥后，分别加入 5mL、8mL、10mL 硅烷化试剂，于 80°C 水浴加热 20min，每个处理三个平行。结果如图 8 所示，5mL 衍生液即可达到良好的衍生效果。后续硅烷化试剂用量设定为 5mL。

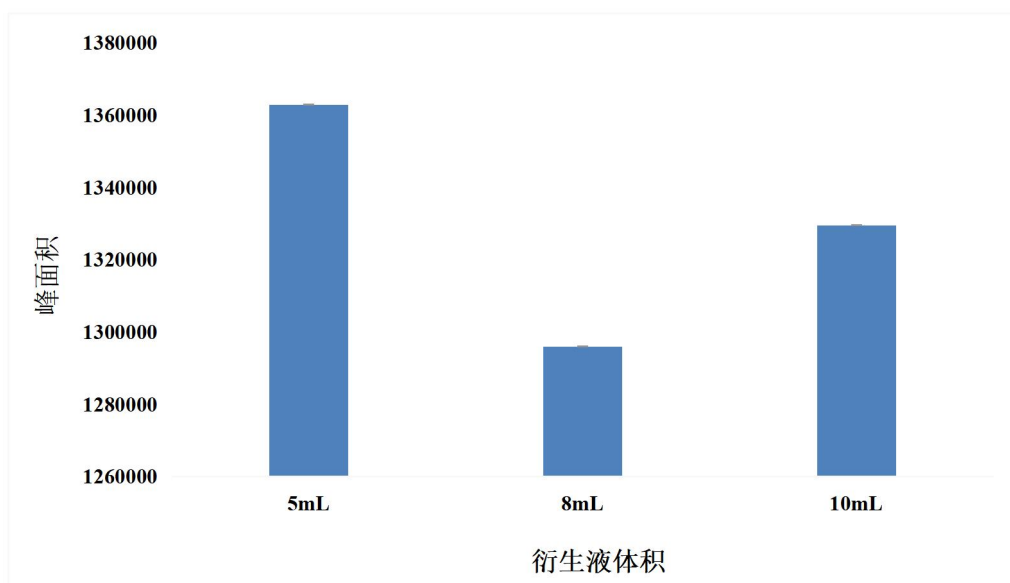


图 8 衍生液用量对肌醇影响

2.6.4 冷却后加水量的选择

配制 1mg/mL 的肌醇溶液，选择干燥后，加入 5mL 硅烷化试剂，于 80°C 水浴加热 20min，冷却后不加水、加 5mL、10mL 水，每个处理三个平行。结果见图 9，不加水时肌醇标液响应最高，后续实验冷却至室温后不加水。

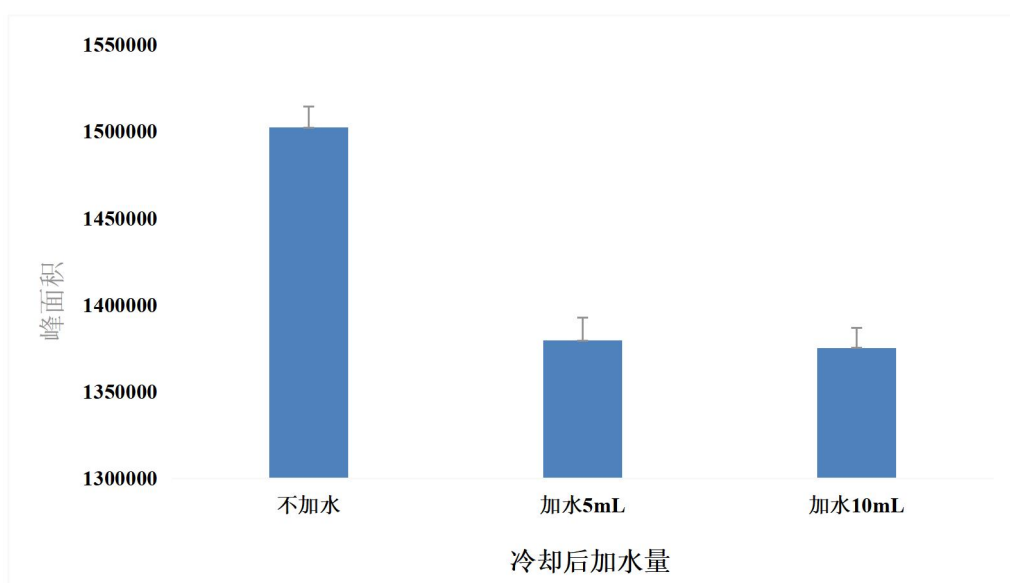


图 9 冷却后加水量对肌醇影响

3. 仪器条件的选择和优化

3.1 色谱柱的选择

考察分析了 DB-23、DB-1701、DB-5、HP-5 四种不同色谱柱对检测肌醇的适用性，分析四种色谱柱的色谱图，如图 10 所示，其中涂层为氰丙基-苯基-甲基聚硅氧烷的 DB-23 色谱柱的目标峰峰形不对称，呈现前沿峰（图 10-1、10-2）；DB-1701 色谱柱的基线出现一定漂移（图 10-3）。涂层为苯基-甲基聚硅氧烷的 DB-5 和 HP-5 色谱柱目标峰前后基线平稳（图 10-4、10-5），峰型对称。综合以上因素，考虑肌醇衍生后形成的硅烷化产物极性较弱且衍生后由正己烷提取检测，更适合采用弱极性柱进行分离，因此，推荐苯基-甲基聚硅氧烷更适合肌醇的测定。色谱柱信息见表 1。

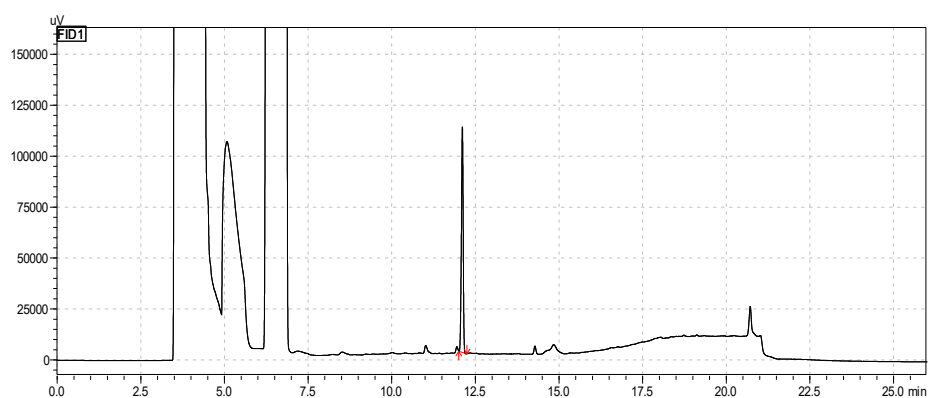


图 10-1 肌醇标准衍生物色谱图 (DB-23)

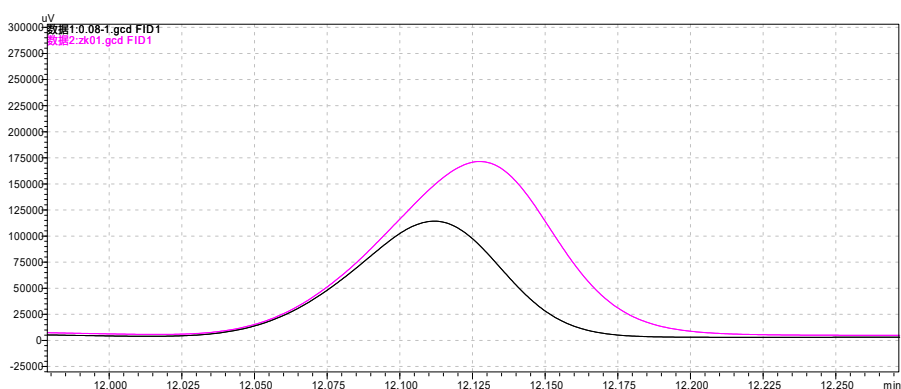


图 10-2 肌醇标准衍生物放大色谱图 (DB-23,目标峰峰形不对称, 呈现前沿峰)

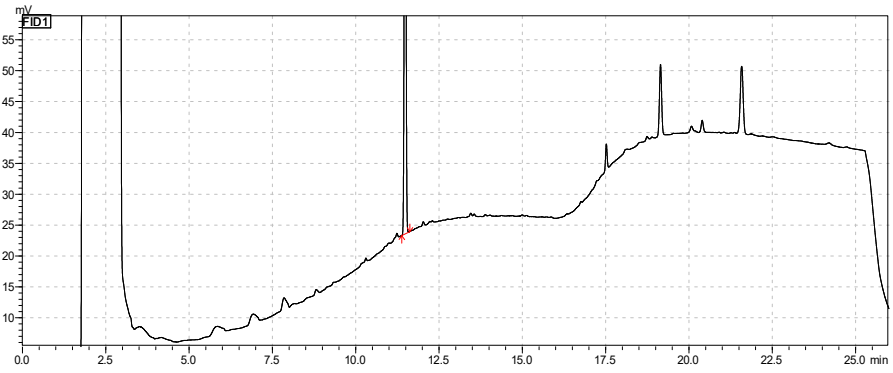


图 10-3 肌醇标准衍生物色谱图 (DB-1701, 基线漂移)

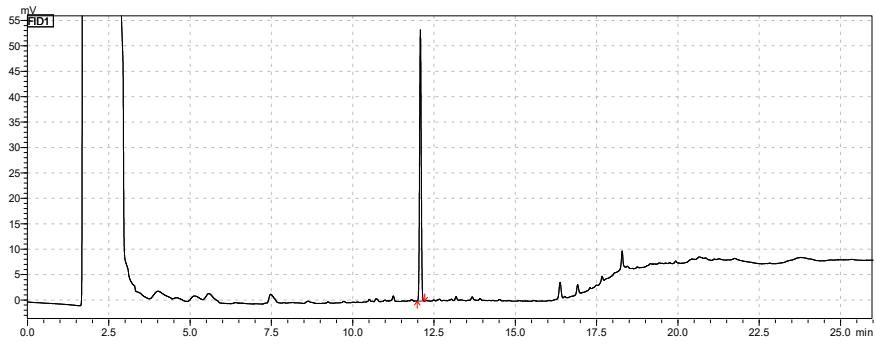


图 10-4 肌醇标准衍生物色谱图(HP-5, 目标峰前后基线平稳, 峰型对称)

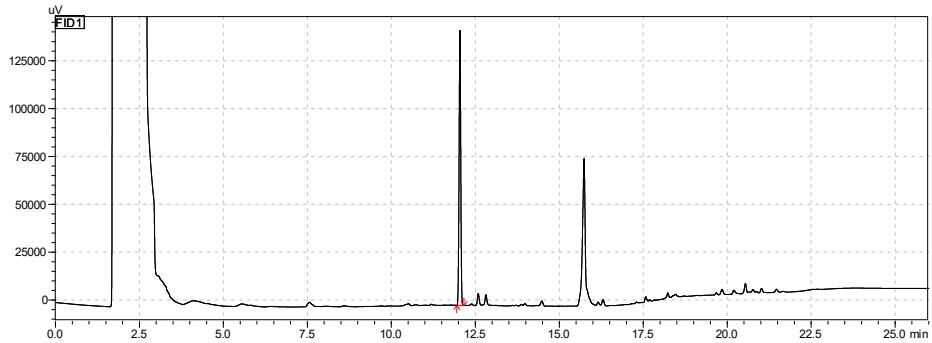


图 10-5 肌醇标准衍生物色谱图 (DB-5 色谱柱, 目标峰前后基线平稳, 峰型对称)

表 1 色谱柱信息

色谱柱填料	型号	性质
50%氰丙基-甲基聚硅氧烷	DB-23, 60m×250μm×0.25μm	强极性
14%氰丙基-苯基-甲基聚硅氧烷	DB-1701, 30m×250μm×0.25μm	低/中等极性

5%苯基-甲基聚硅氧烷	DB-5, 60m×250μm×0.25μm	弱极性
5%苯基-甲基聚硅氧烷	HP-5, 30m×230μm×0.25μm	弱极性

3.2 最终确定的仪器条件

检测器：FID；

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 μm）；或同等性能的色谱柱；

进样口温度：260 °C；

检测器温度：300 °C；

分流比：建议分流比 10：1，可根据实际情况调整；

进样量：1.0 μL；

载气：高纯氮气；

载气流速：1 mL/min；

氢气流量：40 mL/min；

空气流量：400 mL/min。

程序升温见表2。

表2 程序升温

升温速率, °C/ min	温度, °C	保持时间, min
---	160	3
10	240	5
20	280	8

4、检出限

检出限估值：采用信噪比法估计方法检出限：向空白样品基质添

加目标分析物，信噪比为 3 时的添加浓度作为估算检出限。结果见表 3。

表 3 肌醇分析方法检出限验证估算结果

信噪比 (S: N=3: 1)		
样品基质 (剂型)	取样量	最低检出浓度
功能性饮料 (红牛)	10.0mL	2mg/100mL
功能性饮料 (东鹏特饮)	10.0mL	2mg/100mL
片剂	1.0g	5mg/100g
软胶囊	1.0g	5mg/100g
口服液	10.0mL	2mg/100mL

测定：选取空白样品基质至少 20 个平行样，分别添加估算检出限浓度的目标分析物，如目标分析物的检出概率不低于 95%，则定为检出限。结果见表 4。

表 4 方法检出限验证结果

样品基质 (剂型)	目标分析物检出数量	目标分析物检出率
功能性饮料 (红牛)	20	100%
功能性饮料 (东鹏特饮)	20	100%
片剂	20	100%
软胶囊	20	100%
口服液	20	100%

5、定量限

估算：取对照品溶液，逐步稀释成一定的浓度，以信噪比 S:N=10:1 时的浓度作为定量限。

表 5 肌醇分析方法定量限验证估算结果

信噪比 (S: N=10: 1)		
样品基质 (剂型)	取样量	最低定量浓度
功能性饮料 (红牛)	10.0mL	5mg/100mL
功能性饮料 (东鹏特饮)	10.0mL	5mg/100mL
片剂	1.0g	10mg/100g

软胶囊	1.0g	10mg/100g
口服液	10.0mL	5mg/100mL

测定：采用估算定量限浓度水平的有证标准物质/标准样品、质控样品或标准添加样品进行独立检测，至少检测 6 个平行样品。

表 6 肌醇分析方法定量限验证结果

样品名称	本底值	添加定量限浓度	实测值	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
功能性饮料(红牛)	未检出	5mg/100mL	4.79	95.8	90.6	3.27
			4.40	88.0		
			4.42	88.4		
			4.45	89.0		
			4.52	90.4		
			4.61	92.2		
功能性饮料(东鹏特饮)	未检出	5mg/100mL	4.89	97.8	92.6	4.59
			4.25	85.0		
			4.67	93.4		
			4.71	94.2		
			4.58	91.6		
			4.69	93.8		
片剂	未检出	10mg/100g	9.65	96.5	97.8	0.901
			9.85	98.5		
			9.85	98.5		
			9.7	97.0		
			9.75	97.5		
			9.85	98.5		
软胶囊	未检出	10mg/100g	9.40	94.0	93.5	0.940
			9.45	94.5		
			9.25	92.5		
			9.31	93.1		
			9.26	92.6		
			9.43	94.3		
口服液	未检出	5mg/100mL	4.82	96.4	96.5	0.624
			4.86	97.2		
			4.8	96.0		

			4.78	95.6		
			4.83	96.6		
			4.85	97.0		

6、测定范围

采用标准曲线法定量，定量方法标准曲线的线性相关系数应大于等于 0.99，并具有 6 个数据点（不包括 0 点）。

表 7 肌醇标准曲线

标准点	1	2	3	4	5	6
质量浓度 mg	0.05	0.1	0.5	2.5	5.0	10.0
峰面积	122148	312792	1621331	3308853	15409806	29488573
曲线方程	$Y=2.95546 \times 10^6 X + 175849$					
相关系数 (R ²)	0.9997					

备注：至少 6 个点，不强制过 0 点；2.5mg、5.0mg 和 10.0mg 三个点峰前延，但不影响线性。

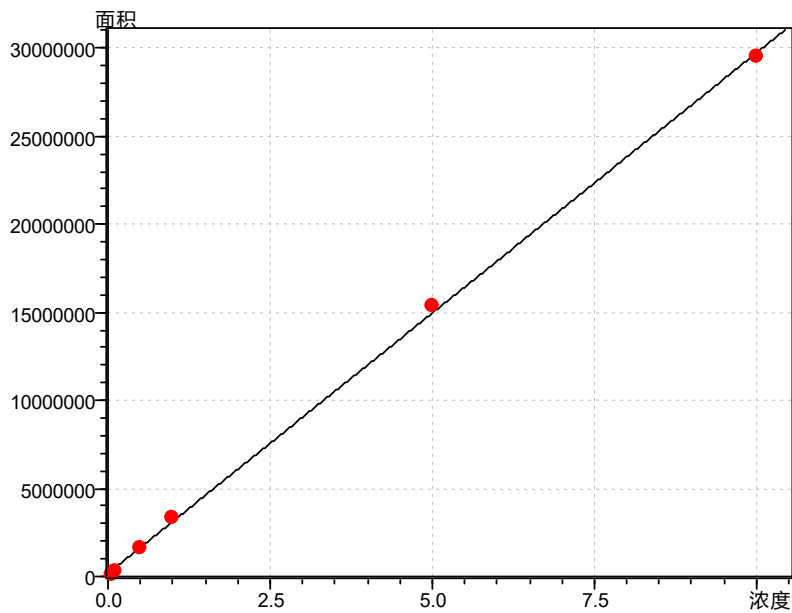


图 11 肌醇标准曲线

7、正确度

选择功能性饮料（红牛、东鹏特饮）、口服液、果汁、营养快线（含蛋白饮料）等液体试样空白样品，分别加入 5mg/100mL（LOQ）、25mg/100mL（5LOQ）、50mg/100mL（10LOQ）肌醇标准品，选择

片剂、软胶囊空白样品，分别加入 10mg/100g（LOQ）、50mg/100g（5LOQ）、100mg/100g（10LOQ）肌醇标准品，每个添加六个平行。结果显示：实验室内样品的平均加标回收率在 85.0 %~109.6 %之间，相对偏差在 0.624%~4.92%之间，符合 GB 5009.295-2023《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》对方法正确度和精密度的要求。具体结果见表 8。

表 8-1 功能性饮料（红牛）空白样品加标回收率

添加水平 (mg/100mL)	测定值 (mg/100mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
5	4.79	95.8	90.6	3.27
	4.40	88.0		
	4.42	88.4		
	4.45	89.0		
	4.52	90.4		
	4.61	92.2		
25	23.8	95.0	96.4	1.12
	24.1	96.3		
	24.1	96.3		
	24.5	98.0		
	24.3	97.2		
	23.9	95.6		
50	48.4	96.8	95.2	1.29
	47.1	94.2		
	46.9	93.7		
	47.6	95.2		
	48.2	96.4		
	47.3	94.6		

表 8-2 功能性饮料（东鹏特饮）空白样品加标回收率

添加水平 (mg/100mL)	测定值 (mg/100mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
5	4.89	97.8	92.6	4.59
	4.25	85.0		
	4.67	93.4		
	4.71	94.2		
	4.58	91.6		
	4.69	93.8		
25	23.17	92.7	93.0	2.39
	22.5	90.2		
	23.6	94.2		
	23.4	93.6		
	24.1	96.4		

	22.8	91.2		
50	47.1	94.2	96.2	1.37
	49.0	97.9		
	47.8	95.6		
	48.6	97.2		
	47.8	95.6		
	48.2	96.4		

表 8-3 片剂样品加标回收率

添加水平 (mg/100g)	测定值 (mg/100g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
10	9.65	96.5	97.8	0.901
	9.85	98.5		
	9.85	98.5		
	9.7	97.0		
	9.75	97.5		
	9.85	98.5		
50	49.8	99.5	98.6	4.92
	48.5	96.9		
	47.9	95.7		
	46.8	93.5		
	49.2	98.3		
	53.8	107.5		
100	96.1	96.1	98.1	1.61
	97.8	97.8		
	98.4	98.4		
	96.5	96.5		
	100.2	100.2		
	99.4	99.4		

表 8-4 软胶囊样品加标回收率

添加水平 (mg/100g)	测定值 (mg/100g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
10	9.40	94.0	93.5	0.940
	9.45	94.5		
	9.25	92.5		
	9.31	93.1		
	9.26	92.6		
	9.43	94.3		
50	46.6	93.1	93.0	2.44
	45.2	90.3		
	48.2	96.3		
	47.1	94.2		
	46.8	93.6		
	45.3	90.6		
100	91.6	91.6	92.5	1.62
	94.5	94.5		
	90.2	90.2		
	93.0	93.0		
	92.6	92.6		
	93.4	93.4		

表 8-5 口服液样品加标回收率

添加水平 (mg/100mL)	测定值 (mg/100mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
5	4.82	96.4	96.5	0.624
	4.86	97.2		
	4.8	96.0		
	4.78	95.6		
	4.83	96.6		
	4.85	97.0		
25	24.5	97.8	97.0	0.898
	24.3	97.2		
	24.4	97.8		
	23.9	95.5		
	24.2	96.6		
	24.3	97.0		
50	50.6	101.3	99.1	1.447
	49.6	99.3		
	49.8	99.6		
	49.0	98.0		
	49.7	99.3		
	48.6	97.1		

表 8-6 果汁样品加标回收率

添加水平 (mg/100mL)	测定值 (mg/100mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
5	5.24	104.8	105.2	2.58
	5.48	109.6		
	5.19	103.8		
	5.08	101.6		
	5.23	104.6		
	5.33	106.6		
25	24.8	99.3	97.5	1.97
	24.6	98.2		
	24.9	99.4		
	23.6	94.4		
	24.1	96.4		
	24.3	97.2		
50	50.0	100.1	97.7	1.77
	48.3	96.6		
	49.5	99.0		
	47.8	95.6		
	48.2	96.4		
	49.1	98.2		

表 8-7 营养快线样品加标回收率

添加水平 (mg/100mL)	测定值 (mg/100mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
5	5.31	106.2	104.8	1.55
	5.22	104.4		
	5.36	107.2		
	5.14	102.8		
	5.21	104.2		
	5.19	103.8		
25	24.5	98.0	97.6	0.816
	24.7	99.0		
	24.3	97.3		
	24.3	97.0		
	24.2	96.7		
	24.4	97.5		
50	48.7	97.4	96.8	1.02
	48.2	96.4		
	49.0	98.0		
	48.5	97.0		
	48.4	96.7		
	47.6	95.1		

8、稳定性

肌醇标准储备液（1.00 mg/mL）放置 2 °C-8 °C 冰箱中贮存 1 个月
后，与新配制同浓度肌醇标准储备液峰面积无差异。

将前处理好后的待测试样溶液分别放置 0、2、4、6、8 小时后进行
测定，含肌醇的功能性饮料、片剂样品的峰面积相对标准偏差低于
2%，含量相对偏差低于 2%，表明试样溶液的稳定性良好。

表 9 样品稳定性测试

样品 类别	时间 (h)	0	2	4	6	8	平均值	RSD (%)
含肌 醇的 功能 性饮 料	峰面积	1183496	1157478	1159410	1153635	1142950	1159394	1.28
	含量 (mg/100 mL)	21.7	21.3	21.3	21.2	21.0	21.3	1.29
含肌	峰面积	2616554	2643752	2666430	2652181	2657058	2647195	0.717

醇的功能性饮料	含量 (mg/100 mL)	19.2	19.4	19.6	19.5	19.5	19.4	0.704
含肌醇的片剂	峰面积	81290659	81703383	84440845	82484630	80964076	82176719	1.69
	含量 (mg/100g)	2984.9	3000.0	3100.6	3028.8	2973.0	3017.4	1.69

(二) 液相色谱-串联质谱法

1. 特异性

选择含片、咀嚼片、泡腾片以及饮料等空白样品与肌醇标准品溶液进行比对，结果显示肌醇标准溶液保留时间为 1.818 min，空白样品中无色谱峰对肌醇检测造成干扰，各样品谱图见图 12~图 16。

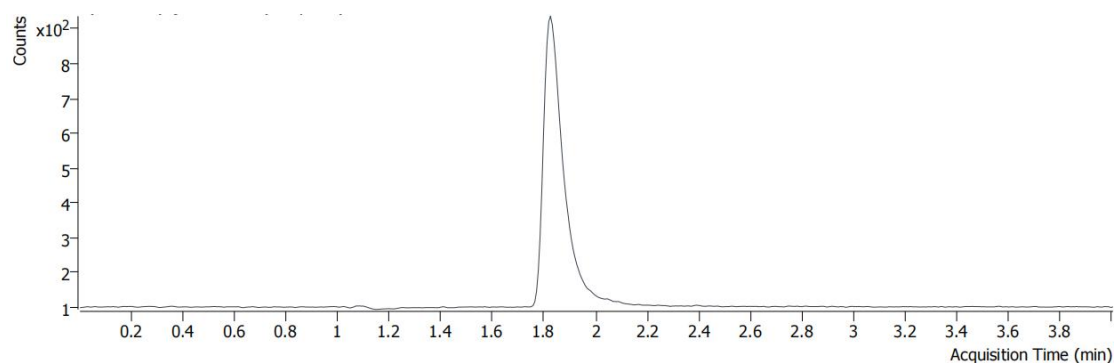


图 12 肌醇标准品 (1 µg/mL) 色谱图

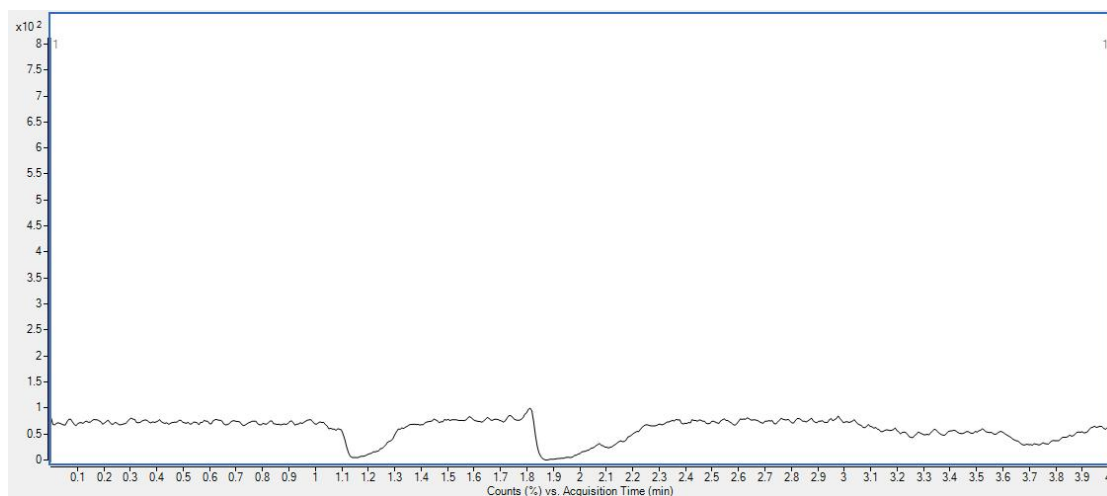


图 13 含片空白样品

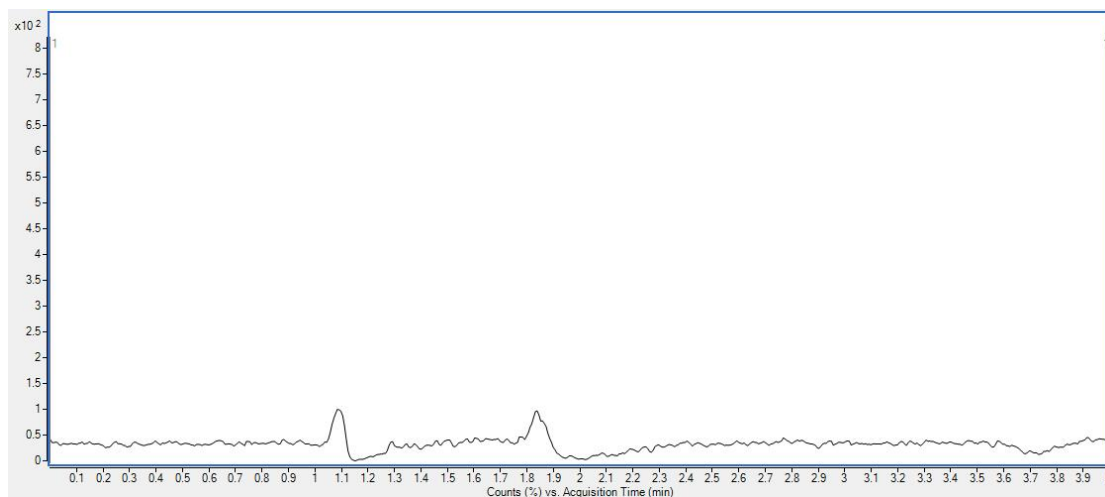


图 14 咀嚼片空白样品

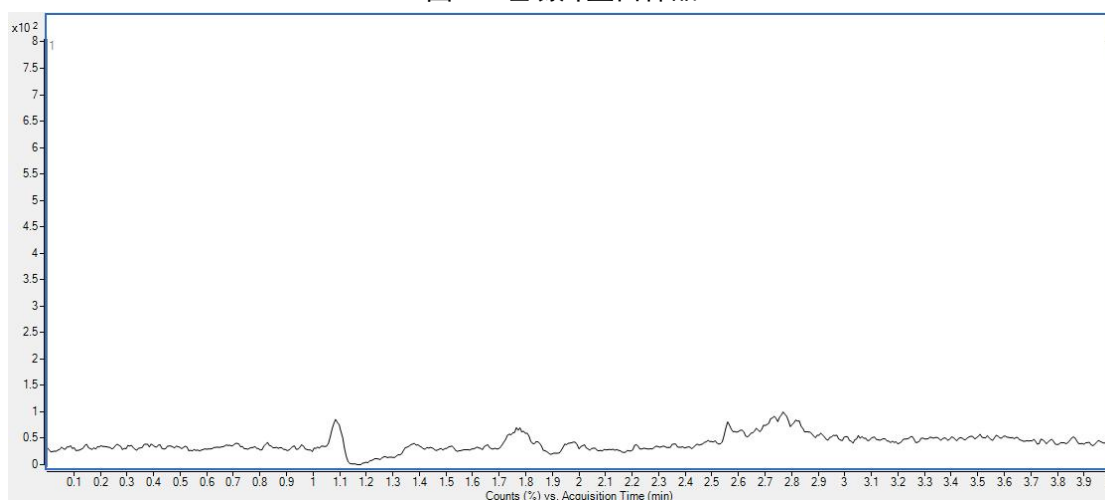


图 15 泡腾片空白样品

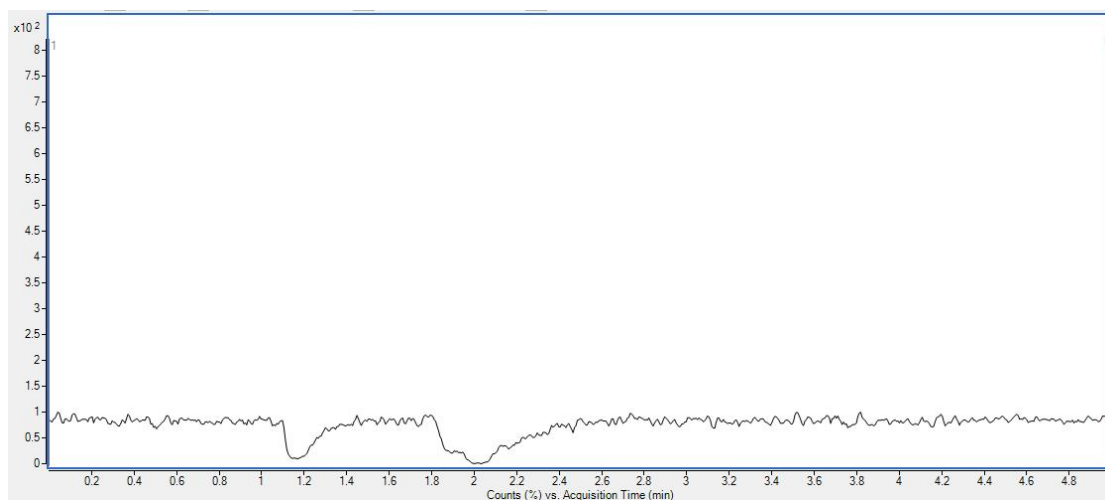


图 16 饮料空白样品

此外，实际样品中的肌醇能够得到很好的分离，获得较好的峰型，色谱图见图 17~图 18。

起草阶段征求意见用

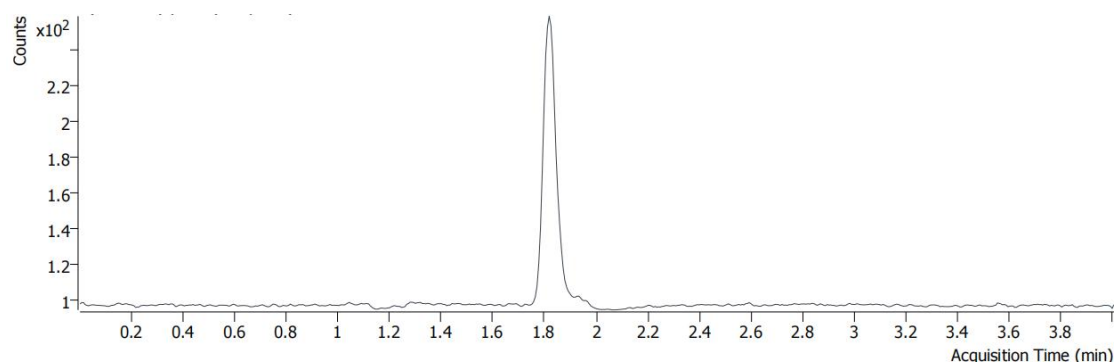


图 17 012S 样品谱图

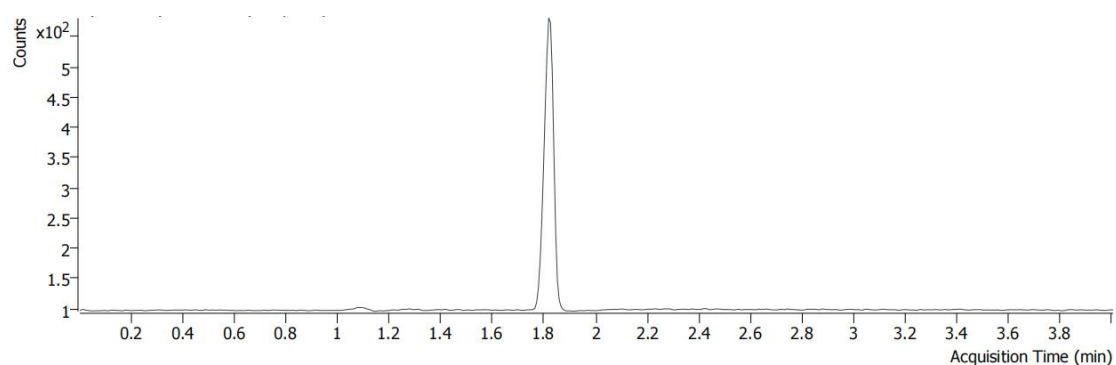


图 18 03S-2 样品谱图

2、方法的线性范围

采用标准曲线定量，定量方法标准曲线的线性相关系数应大于等于 0.99，并具有 6 个数据点（不包括 0 点）。

表 10 肌醇标准曲线（LS-MS）

标准点	1	2	3	4	5	6
浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）	0.05	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0
峰面积	271.2	500.9	890.8	2150.1	4140.8	7478.2
曲线方程	$Y=3711.7X+190.31$					
相关系数（ R^2 ）	0.997					

3、方法的检出限和定量限

检出限估值：采用信噪比法估计方法检出限，向空白样品基质添加肌醇，信噪比为 3 时的添加浓度作为估算检出限，结果见表 11。

表 11 肌醇分析方法检出限估算结果

信噪比 (S:N=3: 1)		
样品基质 (剂型)	取样量	最低检出浓度
含片	1.0 g	0.1 mg/100g
咀嚼片	1.0 g	0.1 mg/100g
泡腾片	1.0 g	0.1 mg/100g
片剂	1.0 g	0.1 mg/100g
硬胶囊	1.0 g	0.1 mg/100g
饮料	1.0 mL	0.2 mg/100 mL

测定：选取空白样品基质至少 20 个平行样，分别添加估算检出限浓度的目标分析物，如目标分析物的检出概率不低于 95%，则定为检出限。结果见表 12。

表 12 方法检出限验证结果

样品基质 (剂型)	目标分析物检出数量	目标分析物检出率
含片	20	100%
咀嚼片	20	100%
泡腾片	20	100%
片剂	20	100%
硬胶囊	20	100%

饮料	20	100%
----	----	------

定量限估值：取对照品溶液，逐步稀释成一定的浓度，以信噪比 S: N=10:1 时的浓度作为定量限，结果见表 13。

表 13 肌醇分析方法定量限验证估算结果

信噪比 (S:N=10: 1)		
样品基质 (剂型)	取样量	最低检出浓度
含片	1.0 g	0.25 mg/100g
咀嚼片	1.0 g	0.25 mg/100g
泡腾片	1.0 g	0.25 mg/100g
片剂	1.0 g	0.25 mg/100g
硬胶囊	1.0 g	0.25 mg/100g
饮料	1.0 mL	0.5 mg/100 mL

测定：采用估算定量限浓度水平的有证标准物质/标准样品、质控样品或标准添加品进行独立检测，至少检测 6 个平行样品，结果见表 14。

表 14 肌醇分析方法定量限验证结果

样品名称	本底值	添加定量限浓度	实测值	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
含片	未检出	0.25	0.231	92.4	95.8	3.7

		mg/100g	0.249	99.7		
			0.229	91.7		
			0.248	99.3		
			0.235	94.2		
			0.244	97.7		
咀嚼片	未检出	0.25 mg/100g	0.250	100.1	99.1	1.5
			0.244	97.5		
			0.242	97.0		
			0.249	99.5		
			0.250	100.2		
			0.251	100.4		
含片	未检出	0.25 mg/100g	0.241	96.5	100.1	2.6
			0.258	103.3		
			0.250	100.0		
			0.255	102.1		
			0.244	97.6		
			0.253	101.2		
片剂	未检出	0.25 mg/100g	0.242	97.0	95.1	3.7
			0.233	93.0		
			0.237	94.9		
			0.238	95.3		
			0.225	90.1		

			0.251	100.4		
硬胶囊	未检出	0.25 mg/100g	0.219	87.6	93.4	4.1
			0.239	95.5		
			0.240	95.8		
			0.233	93.4		
			0.226	90.4		
			0.244	97.7		
饮料	未检出	0.5 mg/100 mL	0.516	103.2	98.7	3.7
			0.475	95.0		
			0.479	95.7		
			0.492	98.4		
			0.499	99.8		
			0.498	99.7		

4、方法的准确度和精密度（重复性和再现性）

在最优实验条件下，选取片剂、硬胶囊、咀嚼片、含片、泡腾片 5 种空白样品，分别添加 0.4 g/100g、 0.8 g/100g、 1.2 g/100g 肌醇标准品。选择饮料空白样品，分别添加 0.02 g/100 mL、 0.05 g/100 mL、 0.1 g/100 mL 肌醇标准品，每个添加 6 个平行，计算回收率和相对标准偏差，结果见表 15~表 17。在不同加标水平下肌醇的回收率范围为 89.2%~110.6%，RSD 为 0.5%~4.2%。

表 15 片剂和硬胶囊样品加标回收率

片剂						硬胶囊					
本底	添加	实测	回收	回收率范	RSD	本底	添加	实测	回收	回收率范围	RSD

起草阶段征求意见用

g/100g	量	值	率	围	%	g/100g	量	值	率	%	%
	g/100g	g/100g	%	%			g/100g	g/100g	%		
		0.386	96.4					0.417	104.2		
		0.400	99.9					0.414	103.5		
	0.400	0.411	102.7	96.4~104.3	2.9		0.400	0.414	103.6	102.1~104.9	0.9
		0.417	104.3					0.408	102.1		
		0.413	103.3					0.415	103.8		
		0.411	102.7					0.419	104.9		
		0.779	97.3					0.825	103.1		
		0.780	97.5					0.817	102.2		
/	0.800	0.793	99.1	97.3~99.6	1.0	/	0.800	0.832	104.0	101.5~104.0	0.9
		0.796	99.5					0.812	101.5		
		0.797	99.6					0.828	103.5		
		0.789	98.6					0.826	103.3		
		1.12	93.3					1.18	98.2		
		1.11	92.7					1.19	99.3		
	1.20	1.15	95.4	92.7~95.4	1.1		1.20	1.18	98.4	96.2~99.3	1.1
		1.11	92.8					1.18	98.6		
		1.11	92.8					1.18	98.7		
		1.11	92.9					1.15	96.2		

表 16 咀嚼片和含片样品加标回收率

咀嚼片						含片					
本底	添加	实测	回收	回收率范围	RSD	本底	添加	实测	回收	回收率范围	RSD
g/100g	量	值	率	%	%	g/100g	量	值	率	%	%
	g/100g	g/100g	%				g/100g	g/100g	%		
		0.421	103.2					0.415	103.7		
		0.422	103.9					0.416	103.9		
	0.400	0.411	102.7	102.7~104.1	0.5		0.400	0.411	102.6	102.6~105.4	1.0
		0.415	103.5					0.422	105.4		
		0.416	104.1					0.418	104.4		
/		0.419	103.7			/		0.422	105.4		
		0.828	103.5					0.723	90.4		
	0.800	0.808	101.0	101.0~104.5	1.4		0.800	0.727	90.8	90.4~95.7	2.2
		0.812	101.5					0.727	90.9		
		0.833	104.1					0.739	92.4		

起草阶段征求意见用

	0.823	102.9				0.744	93.0		
	0.836	104.5				0.766	95.7		
	1.23	102.7				1.14	94.7		
	1.24	103.1				1.11	92.1		
1.200	1.21	100.7	100.3~103.1	1.1		1.21	100.7	89.2~100.7	4.2
	1.22	101.9				1.10	91.8		
	1.23	102.2				1.12	93.1		
	1.20	100.3				1.07	89.2		

表 17 泡腾片和口服液样品加标回收率

泡腾片						口服液					
本底 g/100g	添加 量 g/100g	实测 值 g/100g	回 收 率 %	回收率范 围 %	RSD %	本底 g/100g	添加 量 g/100g	实测 值 g/100g	回 收 率 %	回收率范围 %	RSD %
		0.396	99.0					0.0220	110.2		
		0.373	93.4					0.0219	109.6		
	0.400	0.383	95.8	93.0~99.0	2.9		0.02	0.0217	108.7	108.7~110.2	0.5
		0.394	98.6					0.0220	109.9		
		0.395	98.9					0.0218	109.1		
		0.372	93.0					0.0220	109.9		
		0.746	93.2					0.0540	108.1		
		0.760	95.0					0.0545	109.0		
/	0.800	0.758	94.8	93.2~99.0	2.4	/	0.05	0.0544	108.9	108.1~110.1	0.6
		0.756	94.5					0.0550	110.1		
		0.740	92.6					0.0549	109.7		
		0.792	99.0					0.0545	109.1		
		1.10	91.4					0.108	108.5		
	1.200	1.09	90.7	90.7~95.7	1.9		0.10	0.107	107.0	106.6~110.6	1.5
		1.15	95.7					0.107	106.6		
		1.11	92.5					0.109	109.0		

1.10 92.0

0.110 110.0

1.10 91.4

0.111 110.6

三、再现性（实验室间方法学验证）

本方法经过河北省食品检验研究院、中原食品实验室、江中药业股份有限公司、广东产品质量监督检验研究院等单位，根据修订方法进行实验室间方法学验证（包括检出限、定量限、测定范围、正确性和再现性），测定结果符合要求，实际样品再现性比对结果见表 18。

表 18 再现性验证结果

样品编号	肌醇含量 (mg/kg)						RSD(%)
	Lab 1(气相)	Lab 1(液质)	Lab 2 (气相)	Lab 2 (液质)	Lab 3 (气相)	Lab 4 (气相)	
1	3100	—	2906	—	3186	3177	4.20
2	702.0	685.0	607.5	697.3	704.0	711.7	5.66
3	19.9	18.6	18.3	20.8	20.9	18.9	5.77