

ICS 67.050

B20

团体标准

T/ NAIA XXX—2024

葡萄酒中褪黑素及其代谢物 2-羟基褪黑素、6-羟基褪黑素的测定 高效液相色谱-串联质谱法

Simultaneous Determination of Melatonin and 2-hydroxy-melatonin、
6-hydroxy-melatonin in Wine by HPLC-MS/MS

2024-XX-XX 发布

2024-XX-XX 实施

宁夏化学分析测试协会 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》规定编写。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区食品检测研究院（国家葡萄酒质量检验检测中心、国家市场监督管理总局重点实验室（枸杞及葡萄酒质量安全））、宁夏贺兰山东麓葡萄酒产业园区管理委员会、宁夏长和翡翠酒庄有限公司、宁夏化学分析测试协会。

本文件主要起草人：马雪梅、朱燕燕、汤丽华、王鹏、周叶丽、章苒、刘竞择、王琛、刘继辉、郭阳、吕毅、张小飞。

本文件于 2024 年 XX 月 XX 日首次发布。

葡萄酒中褪黑素及其代谢物 2-羟基褪黑素、6-羟基褪黑素的测定

高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了葡萄酒中褪黑素及其代谢物 2-羟基褪黑素、6-羟基褪黑素的高效液相色谱-串联质谱检测方法。

本文件适用于葡萄酒中褪黑素及其代谢物 2-羟基褪黑素、6-羟基褪黑素的测定和确证。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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实验方法

T/BDAS 001-2023 牛奶中褪黑素含量的测定 液相色谱-串联质谱法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样经 N-丙基乙二胺（PSA）净化后，经反相色谱柱分离，以保留时间定性，供高效液相色谱-串联质谱仪测定和确证，外标法定量。

5 试剂和材料

本方法所用的试剂，除另有规定外，均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈：色谱纯。

5.1.2 甲酸：优级纯。

5.1.3 N-丙基乙二胺（PSA）粉末：粒径。

5.1.4 0.1%甲酸的乙腈溶液：取 0.1mL 甲酸用乙腈定容到 100mL

5.1.5 50%乙腈溶液：取 50mL 乙腈和 50mL 水混合均匀。

5.2 标准品

5.2.1 标准品：褪黑素（Melatonin, MT, CAS 号 73-31-4）、2-羟基褪黑素（2-Hydroxy Melatonin, CAS 号 229018-17-1）、6-羟基褪黑素（6-Hydroxy Melatonin, CAS 号 2208-41-5）。

5.2.2 标准储备液（100.0μg/mL）：分别准确称取褪黑素、2-羟基褪黑素、6-羟基褪黑素标准物质适

量，用甲醇溶解并定容，配制成 100.0μg/mL 的标准储备溶液，于-20℃避光贮存。

5.2.3 混合标准溶液：分别准确吸取褪黑素、2-羟基褪黑素、6-羟基褪黑素标准储备液各 1.0 mL 于 10mL 容量瓶中，甲醇定容至刻度，配制成 10.0μg/mL 的混合标准储备液于-20℃避光贮存。

5.2.4 标准工作溶液：分别准确吸取不同体积混合标准溶液，用 50%乙腈溶液定容至 1.0 mL，配制成褪黑素、2-羟基褪黑素、6-羟基褪黑素的浓度分别为 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 ng/mL 的系列标准工作溶液，临用现配。

6 仪器和设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪：配备电喷雾离子源。
- 6.2 天平：感量 0.1mg 和 0.001g。
- 6.3 涡旋混合器。
- 6.4 高速冷冻离心机：最大转速 13000r/min。

7 分析步骤

7.1 试液的提取

吸取 2mL（精确至 0.01mL）混匀的葡萄酒样品于含有 50mg N-丙基乙二胺(PSA) 的净化管中，充分涡旋后经 10000 rpm/min 离心 5min。移取上清液经 0.22μm 滤膜过滤后，经高效液相色谱-串联质谱（HPLC-MS/MS）进行分析。

7.2 仪器参考条件

7.2.1 液相色谱参考条件

- 7.2.1.1 色谱柱： C18，2.1×100mm，粒径 3.5μm 或性能相当。
- 7.2.1.2 柱温： 30℃。
- 7.2.1.3 流动相： A： 水（含 0.1%甲酸）， B： 乙腈；梯度洗脱见表 1。
- 7.2.1.4 流速： 0.25mL/min。
- 7.2.1.5 进样量： 5μL。

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间/min	流速/（mL/min）	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	0.25	90	10
1.00	0.25	90	10
3.00	0.25	50	50
5.00	0.25	50	50
7.00	0.25	10	90
8.00	0.25	10	90
8.10	0.25	90	10
10.00	0.25	90	10

7.2.2 质谱参考条件

- 7.2.2.1 离子源：电喷雾离子源（ESI）。

- 7.2.2.2 扫描方式：正离子扫描。
- 7.2.2.3 检测方式：多反应监测（MRM）。
- 7.2.2.4 离子源温度：300℃。
- 7.2.2.5 干燥气流速：7L/min。
- 7.2.2.6 喷嘴电压：45psi
- 7.2.2.7 定性离子对、定量离子对、碰撞能量等参数参见附录 A。

7.3 定量测定

根据试液中被测物含量情况，选定浓度相近的混合标准使用液，混合标准使用液和待测试液中被测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。混合标准使用液与试液等体积进样测定,标准溶液及试液均按 7.2.1 和 7.2.2 规定的条件进行测定，如果试液中与标准溶液相同的保留时间有峰出现，则对其进行确证。褪黑素、2-羟基褪黑素、6-羟基褪黑素的参考保留时间见表 2。褪黑素、2-羟基褪黑素、6-羟基褪黑素标准品的多反应监测（MRM）色谱图参见附录 B，采用试剂溶液校准曲线外标法定量。

表 2 参考保留时间

被测物名称	保留时间/（min）
褪黑素	5.62
2-羟基褪黑素	4.61
6-羟基褪黑素	4.49

7.4 定性测定

经确证分析被测物质色谱峰保留时间与标准物质相一致，并且在扣除背景后的样品谱图中，所选择的离子均出现。同时所选择离子的丰度比与标准溶液中相关离子的相对丰度一致，相似度在允许偏差之内（见表 3），则可判定样品中存在对应的被测物。

表 3 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%至 50%	>10%至 20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.5 空白试验

除不加试样外，均按上述步骤进行。

8 分析结果的表述

试样中褪黑素、2-羟基褪黑素、6-羟基褪黑素的含量按式（1）进行计算：

$$X = \frac{c \times 1000}{1000}$$

(1)

式中：

- X ——试样中各种化合物含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/L}$ ）；
 - c ——由标准曲线计算出的试样溶液浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；
- 注：测定结果用平行测定的算数平均值表示，保留两位有效数字。

9 精密度

在重复性测定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%。

10 其他

褪黑素、2-羟基褪黑素、6-羟基褪黑素的定量限均为 1.0 $\mu\text{g/L}$ ，检出限为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 。

附录 A
(资料性附录)

表 A.1 褪黑素、2-羟基褪黑素、6-羟基褪黑素的质谱参数

被测物名称	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碎裂电压/V	碰撞电压/V
褪黑素	233.2	174.2	135	14
		159.2*	135	20
2-羟基褪黑素	249.1	190	80	16
		161.9	80	28
		146.9*	80	40
6-羟基褪黑素	249.1	189.9	80	16
		162.0	80	28
		158.0*	80	30
注：带“*”为定量离子对。				

附录 B
(资料性附录)

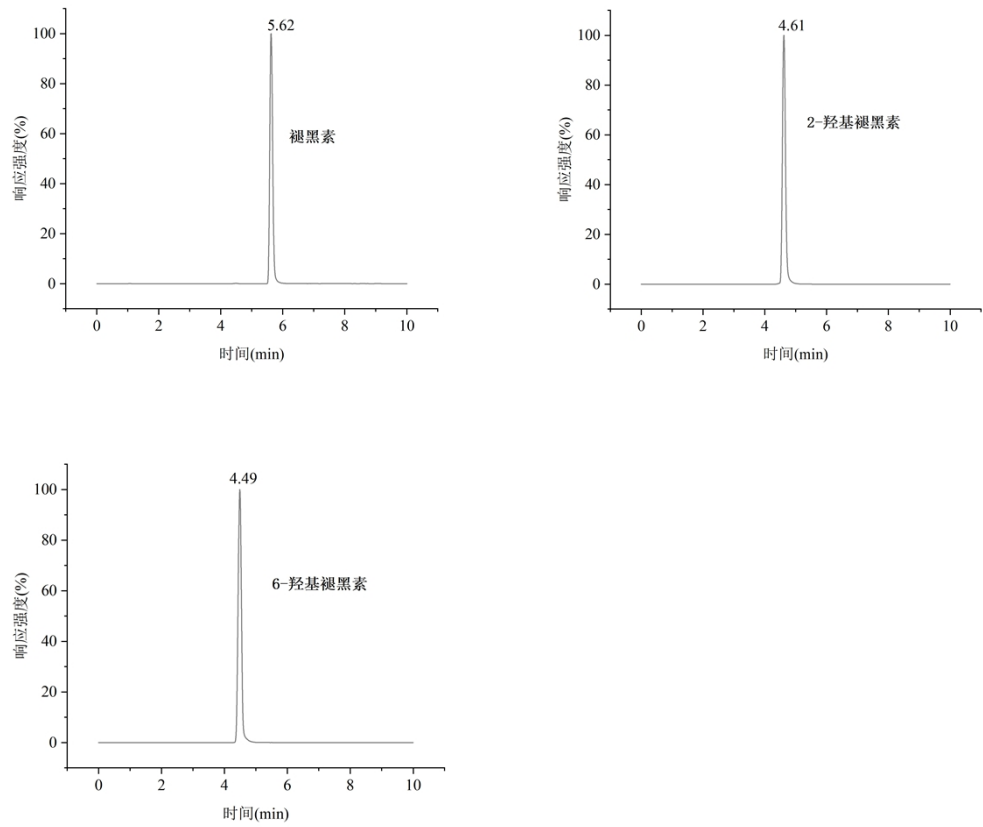


图 B 褪黑素、2-羟基褪黑素、6-羟基褪黑素多反应监测（MRM）典型色谱图