



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

番茄制品中番茄红素、叶黄素、胡萝卜素 含量的测定 超高效液相色谱法

Determination of Lycopene, Lutein and Carotene in Tomato Products—
UPLC method

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

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

前 言

本标准按照 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》的规则起草。

本标准由全国质量监管重点产品检验方法标准化技术委员会（SAC/TC374）提出并归口。

本标准起草单位：上海市质量监督检验技术研究院……

本标准主要起草人：

番茄制品中番茄红素、叶黄素、胡萝卜素含量的测定 超高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了番茄制品中番茄红素、叶黄素、胡萝卜素的测定方法

本标准适用于番茄粉、番茄酱和番茄饮料等番茄制品中番茄红素、叶黄素、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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试验方法。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样加入水和乙醇后，用乙醚-正己烷-环己烷（40+40+20，体积比）提取其中的番茄红素、叶黄素、胡萝卜素，超高效液相色谱法分离，紫外检测器或者二极管阵列检测器检测，外标法定量。

5 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。

5.1 试剂

5.1.1 环己烷（ C_6H_{12} ）：色谱纯。

5.1.2 乙醚 [$(C_2H_5)_2O$]：色谱纯。

5.1.3 正己烷（ C_6H_{14} ）：色谱纯。

5.1.4 无水乙醇（ C_2H_5OH ）：色谱纯。

5.1.5 二丁基羟基甲苯（ $C_{15}H_{24}O$ ，BHT）。

5.1.6 二氯甲烷（ CH_2Cl_2 ）。

5.2 试剂配制

- 5.2.1 萃取溶剂：称取1.0 g BHT (3.1.6)，以400 mL正己烷 (5.1.3) 溶解，加入200 mL环己烷 (5.1.1) 和400 mL乙醚 (5.1.2)，混匀。
- 5.2.2 0.1% BHT 二氯甲烷溶液：称取1.0 g BHT (5.1.5)，加入1000 mL二氯甲烷 (5.1.6) 混匀。
- 5.2.3 0.1% BHT 乙醇+二氯甲烷溶液：称取1.0 g BHT (5.1.5)，以900 mL乙醇 (3.1.4) 溶解，加100 mL二氯甲烷 (5.1.6)，混匀。

5.3 标准品

- 5.3.1 番茄红素 ($C_{40}H_{56}$, CAS 号: 502-65-8)：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。
- 5.3.2 叶黄素 ($C_{40}H_{56}O_2$, CAS 号: 127-40-2)：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。
- 5.3.3 α -胡萝卜素 ($C_{40}H_{56}$, CAS 号: 7488-99-5)：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。
- 5.3.4 β -胡萝卜素 ($C_{40}H_{56}$, CAS 号: 7235-40-7)：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

5.4 标准溶液配制

- 5.4.1 番茄红素储备液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：准确称取 5 mg (精确至 0.01 mg) 番茄红素 (5.3.1)，以 0.1% BHT 二氯甲烷溶液 (5.2.2) 溶解并定容至 100 mL。该标准储备液充氮避光置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 或以下的冰箱中可保存 3 个月。
- 5.4.2 叶黄素储备液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：准确称取 5 mg (精确至 0.01 mg) 叶黄素 (5.3.2)，以 0.1% BHT 二氯甲烷溶液 (5.2.2) 溶解并定容至 100 mL。该标准储备液充氮避光置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 或以下的冰箱中可保存 6 个月。
- 5.4.3 α -胡萝卜素储备液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：准确称取 5 mg (精确至 0.01 mg) α -胡萝卜素 (5.3.3)，以 0.1% BHT 二氯甲烷溶液 (5.2.2) 溶解并定容至 100 mL。该标准储备液充氮避光置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 或以下的冰箱中可保存 6 个月。
- 5.4.4 β -胡萝卜素储备液 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：准确称取 5 mg (精确至 0.01 mg) β -胡萝卜素 (5.3.4)，以 0.1% BHT 二氯甲烷溶液 (5.2.2) 溶解并定容至 100 mL。该标准储备液充氮避光置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 或以下的冰箱中可保存 6 个月。

注：番茄红素、叶黄素、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素标准储备液使用前需校正，具体操作见附录 A。

- 5.4.5 混合标准工作液：分别从番茄红素储备液 (5.4.1)、叶黄素储备液 (5.4.2)、 α -胡萝卜素储备液 (5.4.3) 和 β -胡萝卜素储备液 (5.4.4) 中各准确移取 0.050 mL、0.100 mL、0.200 mL、0.400 mL、1.00 mL 溶液于 5 个 25 mL 棕色容量瓶中，用 0.1% BHT 乙醇+二氯甲烷溶液 (5.2.3) 定容至刻度，得到浓度为 0.100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列混合标准工作液。临用前配置。

5.5 中性氧化铝固相萃取小柱，500 mg/3 mL，或相当者，使用前用 5 mL 萃取溶剂 (5.2.1) 淋洗，保持柱体湿润。

5.6 0.45 μm 滤膜，有机系。

6 仪器设备

- 6.1 超高效液相色谱仪：配有二元及以上梯度泵，带二极管阵列检测器或紫外检测器。
- 6.2 紫外可见分光光度计。

- 6.3 分析天平：感量为 0.01 mg 和 0.01 g。
- 6.4 组织捣碎机。
- 6.5 涡旋振荡器。
- 6.6 减压浓缩装置。
- 6.7 固相萃取装置。
- 6.8 离心机：转速不低于 5000 r/min。

7 分析步骤

注：由于类胡萝卜素类对光敏感，除非另行说明，所有试验操作应在无500 nm以下紫外光的黄色光源或红色光源环境中进行；提取过程应在通风柜中操作。

7.1 样品前处理

7.1.1 试样制备

取一定数量的有代表性的样品，块状或颗粒状样品用粉碎机粉碎，粉末状、糊状或液体样品充分混匀后，储存于样品瓶中。制备好的试样应充氮密封后置于-20 °C或以下的冰箱中保存。

7.1.2 试样提取

称取 5 g（精确到 0.01 g）试样于 50 mL 聚丙烯离心管中，加入 10 mL 水，混匀，加入 10 mL 无水乙醇（5.1.4），以 15 mL 萃取溶剂（5.2.1）避光涡旋振荡提取 3 min，5000 r/min 离心 3min，吸取上清液于另一 50 mL 聚丙烯离心管中，于原离心管中加入 15 mL 萃取溶剂（5.2.1）再次萃取，重复提取 2 次，合并提取液，于室温减压浓缩至近干，以 5 mL 萃取溶剂（5.2.1）涡旋振荡溶解残渣，待净化。

7.1.3 试样净化

将上述溶液以约 1 mL /min 的流速过已活化的中性氧化铝固相萃取小柱（5.5），用 5 mL 萃取溶剂（5.2.1）洗脱，合并流出液与洗脱液，于室温减压浓缩至近干，以 2 mL 0.1% BHT 乙醇+二氯甲烷溶液（5.2.3）涡旋振荡溶解残渣，过 0.45 μm 滤膜（5.6），供超高效液相色谱测定。

7.2 超高效液相色谱参考条件

- 7.2.1 色谱柱：PAH 色谱柱，1.8 μm，100 mm×2.1 mm(内径)，或相当者。
- 7.2.2 流动相：A：甲醇+二氯甲烷（97：3）；B：水，洗脱梯度见表 1。
- 7.2.3 柱温：30 °C。
- 7.2.4 流速：0.4 mL/min。
- 7.2.5 进样量：2 μL。
- 7.2.6 检测波长：450 nm

表 1 PAH 色谱柱-超高效液相色谱法洗脱梯度参考条件

时间 min	流速 mL/min	流动相 A%	流动相 B%

0.0	0.4	92	8
3.0	0.4	92	8
4.5	0.4	100	0
22	0.4	100	0
22.5	0.4	92	8
25	0.4	92	8

7.3 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入超高效液相色谱中，测定相应的峰面积，以标准工作液的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

7.4 试样溶液的测定

待测样品溶液中目标物质的响应值应在仪器线性相应范围内，否则应适当稀释或浓缩。标准工作液与待测样液等体积进样。根据标准溶液色谱峰的保留时间和峰面积，对试样溶液的色谱峰根据保留时间进行定性，外标法定量。番茄红素、叶黄素、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素的混合标准溶液液相色谱图参见图B.1

8 结果计算

试样中组分的含量 X_i （番茄红素、叶黄素、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素）的计算按公式（1）进行：

$$X_i = \frac{C_i \times V \times f}{m} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X_i ——试样中各组分的含量，单位为微克每百克（ $\mu\text{g}/100\text{g}$ ）；

C_i ——从标准工作曲线得到的试样溶液中各组分的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）；

V ——样品定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m ——试样的取样量，单位为克（ g ）；

f ——稀释倍数；

100——换算系数；

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，计算结果保留 3 位有效数字。

9 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 %

10 检出限和定量限

本方法的检出限：当取样量为5 g、定容体积为2 mL时，叶黄素的检出限为1 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ，番茄红素、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素的检出限均为0.5 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。

本方法的定量限：当取样量为5 g、定容体积为2 mL时，叶黄素的定量限为3 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ，番茄红素、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素的定量限均为2 $\mu\text{g}/100\text{g}$ 。

附 录 A
(规范性)
标准溶液浓度标定方法

番茄红素、叶黄素、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素标准溶液配置后，在使用前需要对其浓度进行校正，具体操作如下：

分别取番茄红素、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素标准储备液100 μ L于10 mL棕色容量瓶中，用正己烷定容至刻度，混匀，用1 cm石英比色杯，以正己烷为空白参比，按表A.1的测定波长测定其吸光度。

取叶黄素标准储备液100 μ L于10 mL棕色容量瓶中，用乙醇定容至刻度，混匀，用1 cm石英比色杯，以乙醇为空白参比，按表A的测定波长测定其吸光度。

按式（A.1）计算标准溶液浓度：

$$X = \frac{A}{E} \times 10000 \times 100 \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

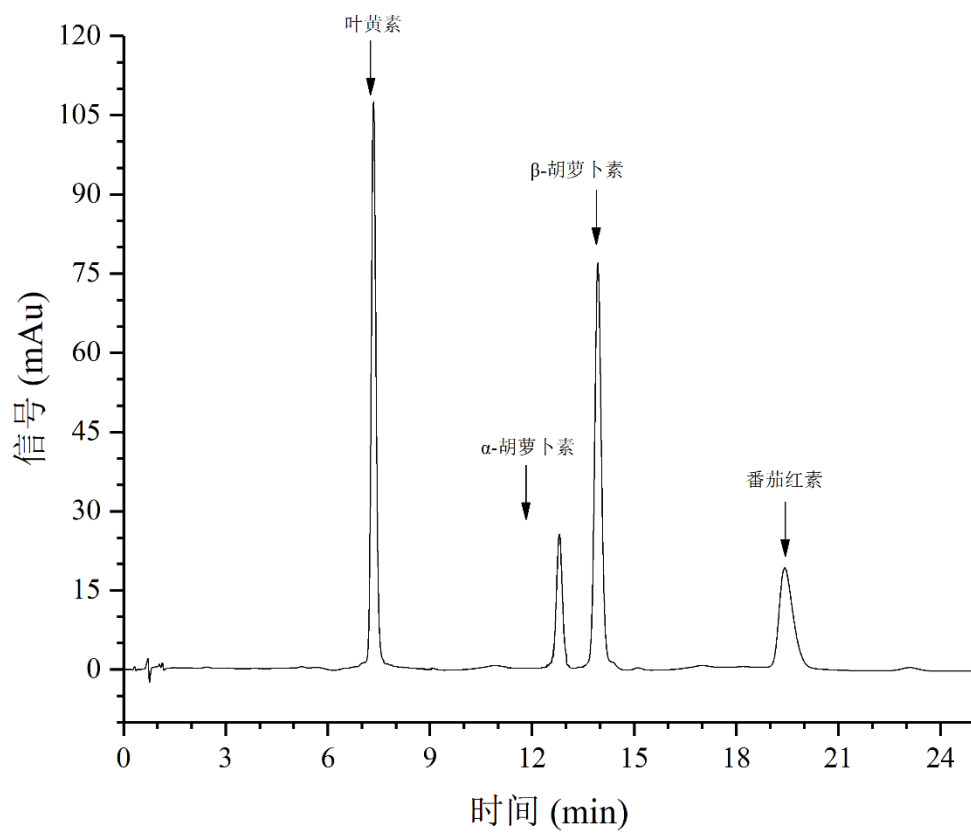
- X —— 标准溶液浓度（ μ g/mL）；
 A —— 标准溶液吸光值；
 E —— 1%比色光系数（各类胡萝卜素相应的比色吸光系数见表 A.1）；
10000 —— 换算系数；
100 —— 稀释倍数；

表 A.1 测定波长及百分吸光系数

目标物	波长/nm	E(1%比色吸光系数)
番茄红素	470	3450
叶黄素	445	2550
α -胡萝卜素	446	2725
β -胡萝卜素	450	2620

附录 B
(资料性)
标准溶液超高效液相色谱图

番茄红素、叶黄素、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素混合标准溶液超高效液相色谱图见图B.1



图B.1 番茄红素、叶黄素、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素混合标准色谱图