

中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX
代替 GB/T 22249—2008

保健食品中番茄红素的测定

Determination of lycopene in health foods

(征求意见稿)

(本稿完成日期：2024年1月)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - 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》的规定起草。

本文件代替GB/T 22249—2008《保健食品中番茄红素的测定》。

本文件与GB/T 22249—2008相比，除结构调整和编辑性修改外，主要技术变化如下：

——增加了番茄红素标准对照品溶液的校正方法（见附录A）；

——修改了试样处理的条件（见7.2）；

——修改了色谱条件（见7.3）；

——修改了方法的检出限、定量限（见10）；

——增加了番茄红素氢稳定同位素比值测定方法（见附录C）。

本文件由全国特殊食品标准化技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：略。

本文件主要起草人：略。

保健食品中番茄红素的测定

1 范围

本文件描述了保健食品中番茄红素的液相色谱测定方法。

本文件适用于以番茄红素作为主要功效成分添加于保健食品中番茄红素的测定。

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

试样中的番茄红素经提取、过滤后采用高效液相色谱仪法，经反相C₁₈色谱柱分离后，由紫外或二极管阵列检测器检测，根据保留时间定性，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 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

5.1.2 乙醇（C₂H₅OH）。

5.1.3 石油醚：沸程 60°C~90°C。

5.1.4 二氯甲烷（CH₂Cl₂）：色谱纯。

5.1.5 N,N-二甲基甲酰胺（C₃H₇NO）：色谱纯。

5.1.6 2,6-二叔丁基对甲酚（BHT）（C₁₅H₂₄O）。

5.1.7 四氢呋喃（C₄H₈O）。

5.1.8 磷酸。

5.1.9 氨水。

5.2 试剂配制

5.2.1 氨-磷酸缓冲溶液的配制：量取 143 mL 的氨水（5.1.9）至烧杯中，加入 857 mL 水，混合均匀，用磷酸（5.1.8）调节 pH 至 9.8。

5.2.2 0.025% BHT 四氢呋喃溶液的配制：准确称取 0.25 g（精确至 0.01 g）BHT（5.1.6），用四氢呋喃（5.1.7）定容至 1 L，混合均匀。

5.2.3 0.5% BHT 二氯甲烷溶液的配制：准确称取 2.5 g（精确至 0.01 g）BHT（5.1.6）置于 500 mL 棕色容量瓶中，加入约 100 mL 二氯甲烷（5.1.4）超声溶解后，冷却至室温，用二氯甲烷（5.1.4）定容至 500 mL，转移至棕色试剂瓶中，常温密闭避光放置，保质期 3 个月。

5.2.4 流动相的配制：准确量取 950 mL 甲醇（5.1.1）和 50 mL 二氯甲烷（5.1.4）混合均匀，超声脱气后待用。

5.3 标准品

番茄红素标准品（ $C_{40}H_{56}$ ，CAS 号：502-65-8）：纯度 $\geq 90\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 番茄红素标准储备液（0.1 mg/mL）：称取 10 mg（精确至 0.1 mg）番茄红素标准品，取少量 0.5% BHT 二氯甲烷溶液(5.2.3)溶解后，转移至 100 mL 棕色容量瓶中，用 0.5%BHT 二氯甲烷溶液(5.2.3)定容，混合均匀，在 -18°C 及以下温度条件下储存，有效期 1 个月。该标准储备液在使用前应按附录 A 的规定进行校正。

注：标准溶液配制应在避光条件下完成。

5.4.2 番茄红素标准系列工作液：使用移液管分别吸取适量经校正后的番茄红素标准储备液（5.4.1），用 0.5%BHT 二氯甲烷溶液(5.2.3)稀释，并用棕色容量瓶定容，配制成浓度分别为 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （必要时）、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的番茄红素标准系列工作液。临用现配。

6 仪器和设备

6.1.1 高效液相色谱仪：配紫外或二极管阵列检测器。

6.1.2 天平：感量 0.01 g 和 0.1 mg。

6.1.3 超声波清洗器。

6.1.4 可见分光光度计。

6.1.5 涡旋混合器。

6.1.6 恒温水浴锅。

6.1.7 0.45 μm 有机滤膜。

7 分析步骤

7.1 试样制备

7.1.1 胶囊：取不少于 20 粒样品，剪开，取出内容物，研细（必要时），混匀。

7.1.2 片剂、粉剂等剂型：取不少于 20 个单元或不低于 10 g 样品，研细（必要时），混匀。

7.2 试样处理

7.2.1 油溶性液体样品

根据样品中番茄红素的标示含量，准确称取混合均匀的试样0.1 g~0.5 g（精确至0.1 mg），加入0.5% BHT二氯甲烷溶液（5.2.3）20 mL，涡旋混匀，超声提取30 min后，转移至100 mL棕色容量瓶中，用0.5% BHT二氯甲烷溶液（5.2.3）定容至刻度，摇匀，过0.45 μm有机滤膜（6.1.7），待用。

7.2.2 一般性固体样品

根据样品中番茄红素的标示含量，准确称取混合均匀的试样0.1 g~0.5 g（精确至0.1 mg），加入10 mL N, N-二甲基甲酰胺（5.1.5）后超声提取20 min，再加入50 mL 0.5% BHT二氯甲烷溶液（5.2.3），继续超声10 min后，转移至100 mL棕色容量瓶中，最后用0.5% BHT二氯甲烷溶液（5.2.3）定容至刻度，摇匀，过0.45 μm有机滤膜（6.1.7），待用。

7.2.3 微囊化固体样品

称取约0.1 g（精确至0.1 mg）样品，加20 mL 氨-磷酸缓冲溶液（5.2.1），于55°C水浴中超声20 min，每5 min手摇一次，至样品全部分散。待溶液冷却至室温后，转移至100 mL棕色容量瓶中，用0.025% BHT四氢呋喃溶液（5.2.2）定容至刻度，超声10 min，摇匀，静置5 min待溶液澄清，取上清液过0.45 μm有机滤膜（6.1.7），待用。

注：若无法确定是否为微囊化样品时，按微囊化固体前处理步骤操作。

7.3 色谱参考条件

- a) 色谱柱：C₁₈柱（粒径5.0 μm，4.6 mm×150 mm），或相当者；
- b) 流动相：甲醇：二氯甲烷（95:5，v/v）；
- c) 流速：1.5 mL/min；
- d) 柱温：40°C；
- e) 进样体积：5 μL；
- f) 检测波长：472 nm。

7.4 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入高效液相色谱仪中，以相应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。

7.5 试样溶液的测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中，得到相应峰面积，根据标准曲线，以外标法计算待测试样溶液中番茄红素的浓度。

注1：操作者可根据试样中组分的含量，在不超出标准曲线测定范围要求的条件下，适当增加稀释倍数。

注2：由于二氯甲烷挥发性较强，使用自动进样器的液相进样样品瓶的瓶盖需采取防挥发措施。

8 结果计算和表述

试样中番茄红素的含量按式（1）计算：

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

式中：

X ——试样中番茄红素的含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

C ——根据标准曲线查得的番茄红素的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ——试样提取液的定容体积，单位为毫升（mL）；

f ——提取溶液稀释倍数；

m ——试样质量，单位为克（g）；

100, 1000——单位换算系数。

结果保留三位有效数字。

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 其他

油溶性液体或一般性固体样品：当取样量 0.25 g，定容体积至 100 mL，进样量 5 μL 时，方法检出限为 10 mg/100 g、定量限为 30 mg/100 g。

微囊化固体样品：当取样量 0.1 g，定容体积至 100 mL，进样量 5 μL 时，方法检出限为 25 mg/100 g、定量限为 75 mg/100 g。

附录 A

(规范性)

番茄红素标准储备液校正方法

A.1 试验步骤

准确移取 1 mL 番茄红素标准储备液(5.4.1),置于 50 mL 棕色容量瓶中,加入 5 mL 乙醇(5.1.2)和 5 mL 0.5%BHT 二氯甲烷溶液(5.2.3),用石油醚(5.1.3)定容,混匀。将此溶液置于 1 cm 比色皿中,以石油醚(5.1.3)作空白对照,用可见分光光度计在 472 nm 处测定吸光度。吸光度应控制在 0.3~0.7 之间,否则应调整溶液浓度,再重新测定吸光度。

A.2 结果计算

番茄红素标准储备液浓度按式(A.1)计算:

$$C_{st} = \frac{A \times D \times P \times 1000}{K \times b} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

C_{st} ——番茄红素对照品溶液的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

A ——番茄红素对照品溶液在 472 nm 波长处测得的吸光度值;

D ——稀释倍数;

P ——取番茄红素标准储备液(5.4.1),按照 7.3 色谱条件进行检测,按照面积归一化法得到的液相图谱中番茄红素峰面积的百分比;

1000 ——单位换算系数;

K ——番茄红素在 1 cm 比色皿石油醚溶液中,在波长 472 nm 处的吸光系数, $K=345 \text{ L}/(\text{g}\cdot\text{cm})$;

b ——比色皿的宽度, $b = 1 \text{ cm}$ 。

A.3 其他

P 值应 $\geq 95\%$,否则应重新配制标样。

附录 B
(资料性)

番茄红素标准品液相色谱图

番茄红素标准品液相色谱图见图 B.1。

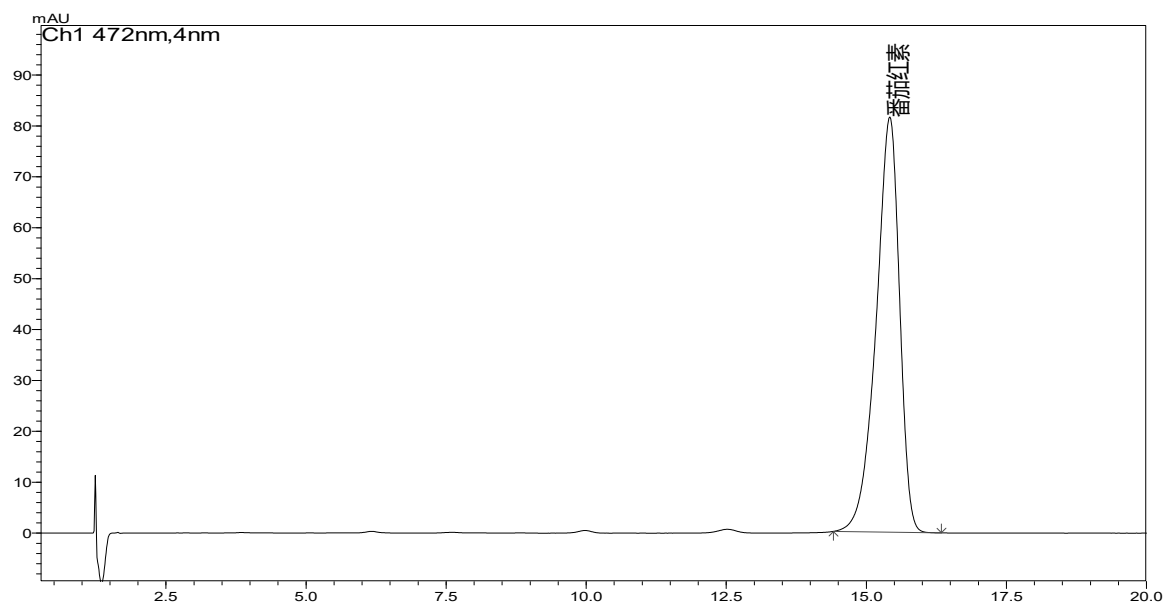


图 B.1 番茄红素标准品液相色谱图

番茄红素样品液相色谱图见图B.2。

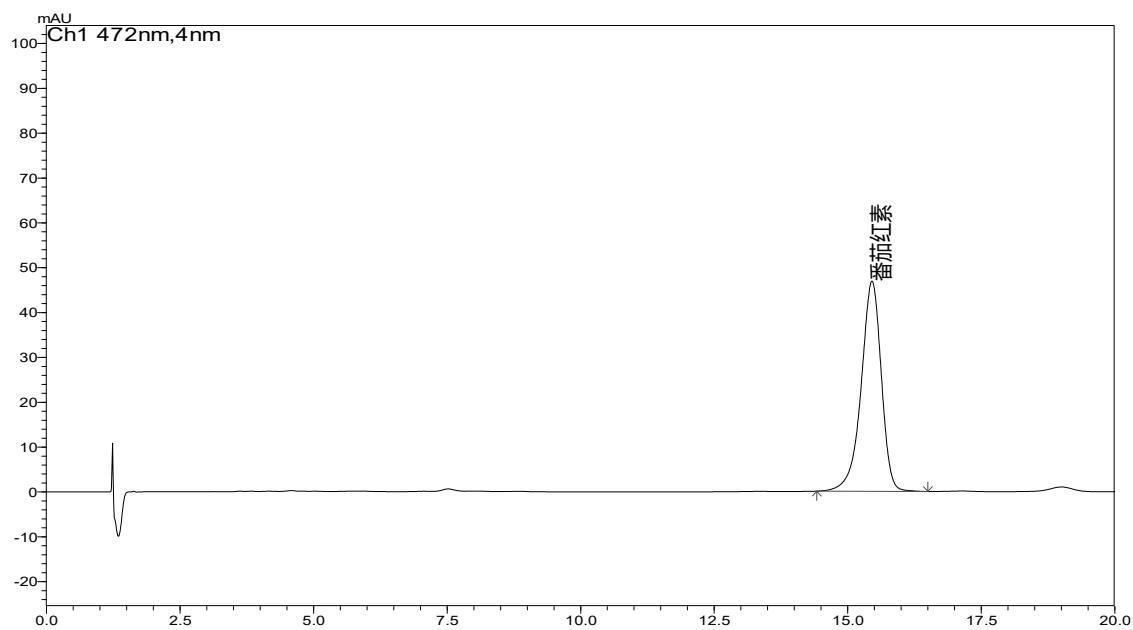


图 B.2 番茄红素样品液相色谱图

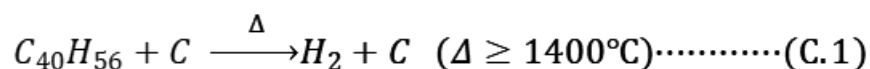
附录 C

(资料性)

番茄红素氢稳定同位素比值 (D/H) 测定方法

C.1 原理

高温条件下番茄红素 ($C_{40}H_{56}$) 定量生成 H_2 , 反应式见式 (C.1)。 H_2 在 He 载气携带下经恒温色谱柱分离纯化, 导入同位素比值质谱仪的离子源内, 在质谱仪上测定 H_2 中 D/H 比值, 通过标准物质校正得到番茄红素样品中 δD_{VSMOW} 值。



C.2 试剂与材料

- C.2.1 高纯氦气 (He): 纯度不小于99.999%。
- C.2.2 高纯氢气 (H_2): 纯度不小于99.999%。
- C.2.3 标准物质: 固体有机物氢稳定同位素有证标准物质。
- C.2.4 玻璃碳粒。
- C.2.5 银杯。

C.3 仪器与设备

- C.3.1 气体同位素比值质谱仪: 带有HD法拉第接收杯, 以连续流模式进行测定, 分析内精度优于0.4%, H_3^+ 因子 < 10 ppm/nA。
- C.3.2 具有高温裂解装置的元素分析仪, 通过接口与质谱仪相连。
- C.3.3 天平: 感量0.01 mg。

C.4 分析样品的称取

准确称取样品0.3 mg~0.4 mg (精确至0.01 mg), 将样品放入银杯 (C.2.5) 中并紧密包裹成小球状或环状, 依次编号待测。

C.5 测定

C.5.1 仪器准备

C.5.1.1 仪器稳定性检查

调节真空度至仪器适宜值, 连续测定10次相同进样量的参比气体 (C.2.2), 同位素比值测定结果 (δ) 的标准偏差应不大于1.0%。

C.5.1.2 仪器线性检查

连续测定不同进样量梯度的参比气体 (C.2.2), 质谱仪自动计算得出的 H_3^+ 因子 < 10 ppm/nA。

C.5.1.3 元素分析仪参数

元素分析仪参数按照仪器说明书设定或者参考以下设定：

- a) 流速“Flow”设定：元素分析仪He气（C.2.1）实际流速应为90 mL/min~100 mL/min；
 - b) 裂解管温度：1400℃；
 - c) 柱温箱温度：80℃；
- 升温后温度稳定6 h后可测试样品。

C.5.2 分析序列

在仪器的工作软件上编辑分析序列。新建的分析序列应包括样品编号、相应的样品类型和测试方法。序列中样品编辑顺序依次为：仪器空白、银杯空白、标准物质和待测样品。通常每10个待测样应插入一个标准物质或质控样，以便对仪器工作状态进行监控。

C.5.3 样品分析

将待测样（C.4）放入自动进样盘中，按照编辑的分析序列开始样品分析。仪器工作软件会根据离子流信号，自动计算并给出氢同位素比值的测量结果。

C.6 试验数据处理

C.6.1 分析结果的表述

番茄红素氢同位素比值（ δD ）测定可通过可溯源至国际基准对应的工作标准物质的比较测量，将被测定氢同位素比值换算成相对于国际基准物质的氢同位素比值的千分差，见公式（C.2）。

$$\delta D = \frac{(D/H)_{SA} - (D/H)_{ST}}{(D/H)_{ST}} \times 1000\% \dots\dots\dots (C.2)$$

式中：

δD —— 番茄红素转化的 H₂ 的 D/H 测定结果相对于氢气参比气体 D/H 测定结果的千分差；

$(D/H)_{SA}$ —— 番茄红素转化的 H₂ 的 D/H 测定结果；

$(D/H)_{ST}$ —— 氢气参比气体的 D/H 测定结果。

结果保留至小数点后一位。

C.6.2 结果校正

所测的样品水稳定氢同位素组成结果应校准至国际标准 VSMOW 值，按公式（C.3）计算：

$$\delta D_{VSMOW} = \delta D_{RM} + \delta D_{RM-VSMOW} + \delta D_{RM} \times \delta D_{RM-VSMOW} \times 1000 \dots\dots\dots (C.3)$$

式中：

δD_{VSMOW} —— 样品的 D/H 相对于 VSMOW 的 D/H 的千分差；

δD_{RM} —— 样品的 D/H 测定值相对于标准物质的 D/H 测定值的千分差；

$\delta D_{RM-VSMOW}$ —— 标准物质的 D/H 相对于 VSMOW 的 D/H 的千分差。

结果保留至小数点后一位。