



中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××—202×

代替 GB/T 22249—2008

保健食品中番茄红素的测定

Determination of lycopene in health foods

××××-××-××发布

××××-××-××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。

本文件规定了食品质量相关技术要求，食品安全相关要求见有关法律法规、政策和食品安全标准等文件。

本文件代替 GB/T 22249—2008《保健食品中番茄红素的测定》，与 GB/T 22249—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了试样制备和处理方法(见 7.1、7.2, 2008 年版的 5.1)；
- b) 更改了色谱参考条件(见 7.3, 2008 年版的 5.3)；
- c) 更改了检出限、定量限(见第 10 章, 2008 年版的第 1 章)；
- d) 增加了番茄红素标准储备溶液校正方法(见附录 A)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国特殊食品标准化技术委员会(SAC/TC 466)提出并归口。

本文件起草单位：中轻技术创新中心有限公司、浙江省食品药品检验研究院、中国食品发酵工业研究院有限公司、晨光生物科技集团股份有限公司、南京中科药业有限公司、仙乐健康科技(广东)有限公司、无限极(中国)有限公司、广东长兴生物科技股份有限公司、帝斯曼(中国)有限公司、昌吉回族自治州检验检测中心、河北晨光检测技术服务有限公司、新疆新茄食品有限责任公司、完美(广东)日用品有限公司、广东保健品商会。

本文件主要起草人：钟其顶、梁晶晶、王道兵、连运河、陈楠楠、周亚杰、黄照荣、许伟沂、梁楠、王晓燕、马小春、杨清山、俞春山、李晓敏、焦昌娅、武竹英、徐潇颖、刘明、郭新光、陈碧莲、袁瑞、钱一帆、谢荣雄、李青、陈静珊、毛雪丹、焦利卫、熊素玉、殷光玲、严建刚、黄敏鑫、马鹏飞、洪梅玲。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2008 年首次发布为 GB/T 22249—2008；

——本次为第一次修订。

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高效液相色谱测定方法。

本文件适用于软胶囊、硬胶囊、片剂、粉剂等剂型形态的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

非微囊化试样中的番茄红素经有机溶剂提取或溶解后制得样品液；微囊化试样经氨-磷酸缓冲溶液破壁后，试样中番茄红素被分散至溶液中，加入四氢呋喃溶解制得样品液。样品液经过滤后采用高效液相色谱分离，紫外检测器检测，以保留时间定性，外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 试剂

5.1.1 水，按 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1.2 乙醇(C₂H₅OH)。

5.1.3 石油醚：沸程 60℃~90℃。

5.1.4 *N,N*-二甲基甲酰胺(C₃H₇NO)：色谱纯。

5.1.5 氨-磷酸缓冲溶液的配制：量取 143 mL 的氨水，加入到 857 mL 水中，混合均匀，用磷酸调 pH 至 9.8±0.1。

5.1.6 0.025% 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)四氢呋喃溶液的配制：称取 0.25 g(精确至 0.1 mg)BHT，用四氢呋喃定容至 1 L，混合均匀。

5.1.7 0.5% BHT 二氯甲烷溶液的配制：称取 2.5 g(精确至 0.1 mg)BHT 至棕色玻璃容器中，用约 100 mL 二氯甲烷(色谱纯)超声溶解后，冷却至室温，转移至 500 mL 棕色容量瓶中，用二氯甲烷(色谱纯)定容，转移至棕色试剂瓶中，常温密闭避光放置，保质期 3 个月。

5.1.8 流动相的配制:量取 950 mL 甲醇(色谱纯)和 50 mL 二氯甲烷(色谱纯)混合均匀,超声脱气后待用。

5.2 标准物质或标准样品

番茄红素($C_{40}H_{56}$, CAS 号:502-65-8):纯度不低于 90%,或经国家认证并授予证书的标准物质或标准样品。

5.3 溶液配制

5.3.1 番茄红素标准储备溶液(0.1 mg/mL):称取 10 mg(精确至 0.1 mg)番茄红素标准物质或标准样品,用少量 0.5% BHT 二氯甲烷溶液(5.1.7)溶解后,转移至 100 mL 棕色容量瓶中,用 0.5% BHT 二氯甲烷溶液(5.1.7)定容,混合均匀,在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及以下温度条件下储存,有效期 3 个月。该标准储备溶液在使用前应按附录 A 的规定进行校正。

5.3.2 番茄红素系列标准工作溶液:使用移液管分别移取适量经校正后的番茄红素标准储备溶液(5.3.1),用 0.5% BHT 二氯甲烷溶液(5.1.7)稀释,并用棕色容量瓶定容,配制成质量浓度分别为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ (必要时)、1 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准工作溶液。临用现配。

注:标准工作溶液配制在避光条件下完成。

5.4 材料

滤膜:0.45 μm ,有机系。

6 仪器设备

6.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器或相当者。

6.2 天平:精确度 0.01 mg 和 0.1 mg。

6.3 超声波清洗器。

6.4 可见分光光度计。

6.5 涡旋混合器。

6.6 恒温水浴锅。

7 分析步骤

7.1 试样制备

7.1.1 软胶囊、硬胶囊等:取不少于 20 粒或不少于 5 g 样品,剪开,取出内容物,研细(必要时),混匀。

7.1.2 片剂、粉剂等:取不少于 20 粒或不少于 5 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(软胶囊)

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(5.1.7) 20 mL,涡旋混匀,超声提取 30 min 后,冷却至室温,转移至 100 mL 棕色容量瓶中,用 0.5% BHT 二氯甲烷溶液(5.1.7)定容,混匀,经滤膜(5.4)过滤,待测。避光操作。

7.2.2 一般性固体样品(硬胶囊、片剂、粉剂等)

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(5.1.4)后超声提取 20 min,再加入 50 mL 0.5% BHT 二氯甲烷溶液(5.1.7),继续超声 10 min 后,冷却至室温,转移至 100 mL 棕色容量瓶中,最后用 0.5% BHT 二氯甲烷溶液(5.1.7)定容,混匀,经滤膜(5.4)过滤,待测。避光操作。

7.2.3 微囊化固体样品(硬胶囊、片剂、粉剂等)

称取混合均匀的试样约 0.1 g(精确至 0.1 mg),加入 20 mL 氨-磷酸缓冲溶液(5.1.5),于 55 °C 水浴中超声 20 min。待溶液冷却至室温后,转移至 100 mL 棕色容量瓶中,用 0.025% 2,6-二叔丁基对甲酚(BHT)四氢呋喃溶液(5.1.6)定容,超声 10 min,摇匀,静置 5 min,取上清液,经滤膜(5.4)过滤,待测。避光操作。

注 1: 若无法确定是否为微囊化固体样品时,按微囊化固体样品前处理步骤操作。

注 2: 根据囊材特性,适当调整氨-磷酸缓冲溶液浓度或用量、增加或减少超声时长、调整水浴温度,以达到样品全部分散的目的。

7.3 色谱参考条件

色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C_{18} 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m), 或等效色谱柱;
- b) 流动相: 甲醇-二氯甲烷;
- c) 流速: 1.5 mL/min;
- d) 柱温: 40 °C;
- e) 进样体积: 5 μ L;
- f) 检测波长: 472 nm。

7.4 标准曲线的制作

将番茄红素标准工作溶液分别注入高效液相色谱仪中,测定其峰面积,以相应标准工作溶液的浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。番茄红素标准溶液(40 μ g/mL)高效液相色谱图见附录 B 中图 B.1。

7.5 试样溶液的测定

7.5.1 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。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,适当增加试样稀释倍数 f 。试样(软胶囊)中番茄红素高效液相色谱图见图 B.2。

注: 由于二氯甲烷具有较强的挥发性,检测过程做好防挥发措施,比如使用的进样样品瓶的瓶盖需采取防挥发措施。

平行做两份试验。

7.5.2 番茄红素氢稳定同位素比值(D/H)测定方法见附录 C。

8 结果计算与表述

试样中番茄红素的含量按公式(1)进行计算:

$$X = \frac{\rho \times V \times 100}{m \times 1\,000 \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X ——试样中番茄红素的含量,单位为克每百克(g/100 g);
 ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中番茄红素的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
 V ——试样定容体积,单位为毫升(mL);
 m ——取样量,单位为克(g);
 f ——稀释倍数;
100、1 000 ——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 检出限与定量限

油溶性液体或一般性固体样品:当取样量为 0.25 g,定容体积为 100 mL,进样量为 5 μL 时,方法的检出限为 0.01 g/100 g,定量限为 0.03 g/100 g。

微囊化固体样品:当取样量为 0.1 g,定容体积为 100 mL,进样量为 5 μL 时,方法的检出限为 0.025 g/100 g,定量限为 0.075 g/100 g。

附录 A

(规范性)

番茄红素标准储备溶液校正方法

A.1 试验步骤

移取 1 mL 番茄红素标准储备溶液(5.3.1)于 50 mL 棕色容量瓶中,加入 5 mL 乙醇(5.1.2),用石油醚(5.1.3)定容并混匀,取适量置于 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,否则应调整溶液稀释倍数,重新测定吸光度。

A.2 结果计算

番茄红素标准储备溶液质量浓度按公式(A.1)进行计算:

$$\rho_{st} = \frac{A \times D \times P \times 1\,000}{K \times b} \dots\dots\dots(A.1)$$

式中:

- ρ_{st} ——番茄红素标准储备溶液的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);
- A ——番茄红素标准物质或标准样品溶液在 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溶液(5.3.1),按色谱参考条件(7.3)进行检测,按照面积归一化法得到的高效液相色谱图中番茄红素峰面积的百分比;
- 1 000 ——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 $\geq 95\%$,否则应重新配制标准溶液或更换标准物质或标准样品。

附录 B

(资料性)

番茄红素标准溶液和试样高效液相色谱图

B.1 番茄红素标准溶液(40 μg/mL)高效液相色谱图见图 B.1。

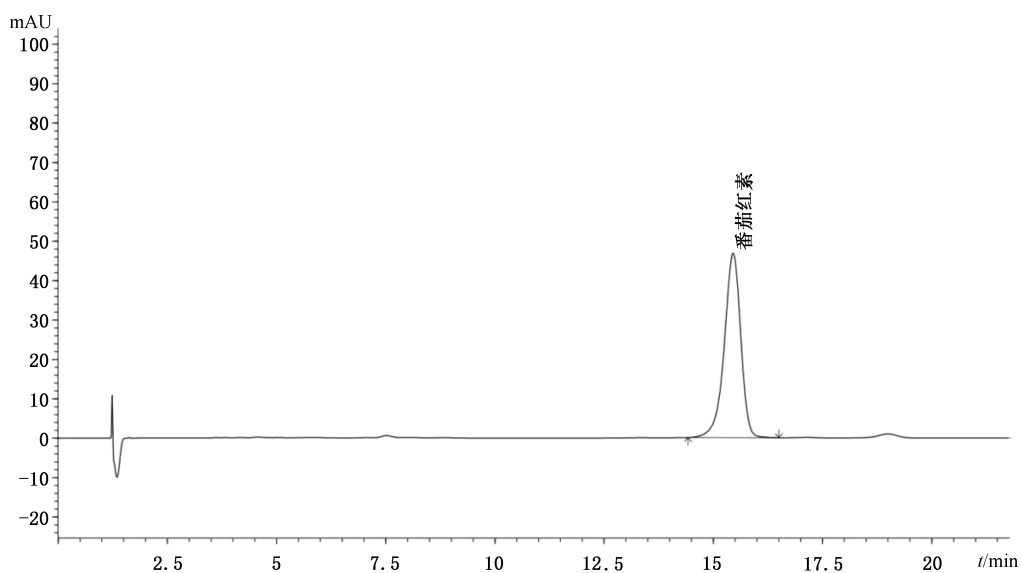


图 B.1 番茄红素标准溶液(40 μg/mL)高效液相色谱图

B.2 试样(软胶囊)中番茄红素高效液相色谱图见图 B.2。

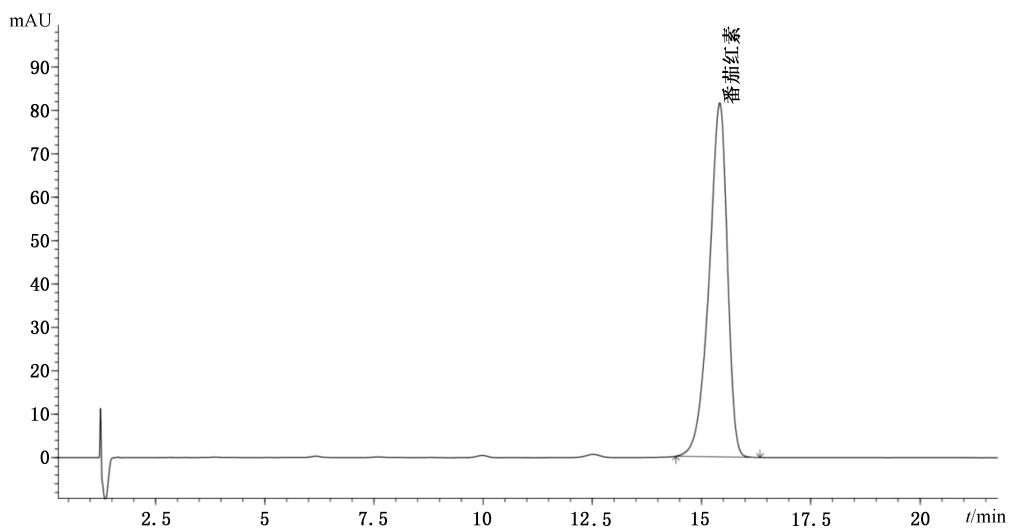


图 B.2 试样(软胶囊)中番茄红素高效液相色谱图

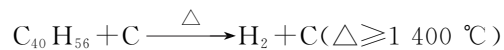
附录 C

(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 , 反应式如下。 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 “固态有机物”氢稳定同位素比值标准物质或标准样品: 国家或国际原子能机构认证并授予证书的标准物质或标准样品(如 IAEA-CH-7, NBS-22 等)。

C.2.4 玻璃碳粒。

C.2.5 银杯: $3.5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$ 。

C.3 仪器与设备

C.3.1 气体同位素比值质谱仪: 可通过连续流接口与高温裂解元素分析仪联机, 并能满足本文件对样品分析结果的质量要求。

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

纯度高于 93% 的番茄红素样品经混匀后, 称取 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, 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^+ 因子测定值应小于 1×10^{-5} 且稳定。

C.5.1.3 元素分析仪参考条件

元素分析仪参考条件如下:

- a) 载气流速:氦气(C.2.1)实际流速应为 90 mL/min~100 mL/min;
 - b) 裂解管温度:1 400 °C;
 - c) 柱温箱温度:80 °C。
- 升温后温度稳定 6 h 后可测试样品。

C.5.1.4 同位素质谱仪参考条件

同位素质谱仪参考条件如下:

- a) 离子源:电子轰击离子源(EI 源);
- b) 真空度: 2.0×10^{-4} Pa。

C.5.2 分析序列

在仪器的工作软件上编辑分析序列,各类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,自动计算并给出氢稳定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

番茄红素氢稳定同位素比值(δD)通过和国际基准对应的工作标准物质的比较获得,将测定的氢稳定同位素比值换算成相对于国际基准物质的氢稳定同位素比值的千分差,按公式(C.1)进行计算:

$$\delta D = \frac{(D/H)_{SA} - (D/H)_{ST}}{(D/H)_{ST}} \times 1\,000\% \quad \dots\dots\dots(C.1)$$

式中:

δD ——番茄红素转化的 H_2 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 H_2 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

所测的样品氢稳定同位素组成结果应校准至国际基准维也纳-国际标准海洋水(VSMOW)值,按公式(C.2)计算:

$$\delta D_{VSMOW} = \delta D_{RM} + \delta D_{RM-VSMOW} + \delta D_{RM} \times \delta D_{RM-VSMOW} \times 1\,000 \quad \dots\dots\dots(C.2)$$

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。