

中华人民共和国国家标准

GB/T 41133—2022

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—
Ultra performance liquid chromatography(UPLC) method

2022-03-09 发布

2022-10-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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。

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。

本文件由全国质量监管重点产品检验方法标准化技术委员会(SAC/TC 374)提出并归口。

本文件起草单位：上海市质量监督检验技术研究院、中检华纳(北京)质量技术中心有限公司、华纳通标(北京)认证有限公司。

本文件主要起草人：翁史昱、林琳、林毅侃、黄雨晴、张雯、郑翌、葛宇、陈羽菲、孟杰、郑存哲。



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

本文件规定了超高效液相色谱法测定番茄制品中番茄红素、叶黄素、胡萝卜素含量的原理、试剂和材料、仪器设备、分析步骤、结果计算、精密度、检出限和定量限。

本文件适用于番茄粉、番茄酱、番茄饮料、番茄干制品中番茄红素、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-环己烷混合溶液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

除非另有规定，仅使用色谱纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 环己烷(C_6H_{12})。

5.3 乙醚 [$(C_2H_5)_2O$]。

5.4 正己烷(C_6H_{14})。

5.5 无水乙醇(C_2H_5OH)：分析纯。

5.6 二丁基羟基甲苯($C_{15}H_{24}O$, BHT)：分析纯。

5.7 甲醇(CH_3OH)。

5.8 二氯甲烷(CH_2Cl_2)。

5.9 萃取溶剂：用分析天平(6.3)称取 1.0 g BHT(5.6)，以 400 mL 正己烷(5.4)溶解，加入 200 mL 环己

烷(5.2)和 400 mL 乙醚(5.3),混匀。

5.10 0.1 % BHT 和二氯甲烷溶液:用分析天平(6.3)称取 1.0 g BHT(5.6),加入 1 000 mL 二氯甲烷(5.8)混匀。

5.11 0.1 % BHT、乙醇和二氯甲烷溶液:用分析天平(6.3)称取 1.0 g BHT(5.6),以 900 mL 乙醇(5.5)溶解,加 100 mL 二氯甲烷(5.8),混匀。

5.12 番茄红素标准物质($C_{40}H_{56}$,CAS 号:502-65-8):纯度大于或等于 98%。

5.13 叶黄素标准物质($C_{40}H_{56}O_2$,CAS 号:127-40-2):纯度大于或等于 98%。

5.14 α -胡萝卜素标准物质($C_{40}H_{56}$,CAS 号:7488-99-5):纯度大于或等于 98%。

5.15 β -胡萝卜素标准物质($C_{40}H_{56}$,CAS 号:7235-40-7):纯度大于或等于 98%。

5.16 番茄红素储备液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$):用分析天平(6.3)准确称取 5 mg(精确至 0.01 mg)番茄红素(5.12),以 0.1% BHT 和二氯甲烷溶液(5.10)溶解并定容至 100 mL。该标准储备液应充氮避光置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 或以下的冰箱中保存,有效期 3 个月。番茄红素标准储备液使用前应按附录 A 的规定校正。

5.17 叶黄素储备液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$):用分析天平(6.3)准确称取 5 mg(精确至 0.01 mg)叶黄素(5.13),以 0.1% BHT 和二氯甲烷溶液(5.10)溶解并定容至 100 mL。该标准储备液应充氮避光置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 或以下的冰箱中保存,有效期 6 个月。叶黄素标准储备液使用前应按附录 A 的规定校正。

5.18 α -胡萝卜素储备液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$):用分析天平(6.3)准确称取 5 mg(精确至 0.01 mg) α -胡萝卜素(5.14),以 0.1% BHT 和二氯甲烷溶液(5.10)溶解并定容至 100 mL。该标准储备液应充氮避光置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 或以下的冰箱中保存,有效期 6 个月。 α -胡萝卜素标准储备液使用前应按附录 A 的规定校正。

5.19 β -胡萝卜素储备液(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$):用分析天平(6.3)准确称取 5 mg(精确至 0.01 mg) β -胡萝卜素(5.15),以 0.1% BHT 和二氯甲烷溶液(5.10)溶解并定容至 100 mL。该标准储备液应充氮避光置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 或以下的冰箱中保存,有效期 6 个月。 β -胡萝卜素标准储备液使用前应按附录 A 的规定校正。

5.20 混合标准工作液:分别从番茄红素储备液(5.16)、叶黄素储备液(5.17)、 α -胡萝卜素储备液(5.18)和 β -胡萝卜素储备液(5.19)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、乙醇和二氯甲烷溶液(5.11)定容至刻度,得到质量浓度为 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。临用前配制。

5.21 中性氧化铝固相萃取小柱:500 mg/3 mL,使用前用 5 mL 萃取溶剂(5.9)淋洗,保持柱体湿润。

5.22 0.22 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 5 000 r/min。

7 试验步骤

7.1 通则

除非另行说明,所有试验操作应在 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。

7.2 样品前处理

7.2.1 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组织捣碎机(6.4)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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或以下的冰箱中保存。

7.2.2 试样提取

用分析天平(6.3)称取 5 g(精确到 0.01 g)试样(7.2.1)于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 10 mL 水(5.1),混匀,加入 10 mL 无水乙醇(5.5),15 mL 萃取溶剂(5.9)于避光条件下用涡旋振荡器(6.5)提取 3 min后,用离心机(6.8)5 000 r/min 离心 3min,吸取上清液于另一 50 mL 聚丙烯离心管中,在原离心管中加入 15 mL 萃取溶剂(5.9)再次萃取,重复提取 2 次,合并提取液,用减压浓缩装置(6.6)在室温下浓缩至近干,在涡旋振荡器(6.5)上用 5 mL 萃取溶剂(5.9)溶解残渣,待净化。

7.2.3 试样净化

于固相萃取装置(6.7)中将提取液(7.2.2)以约 1 mL/min 的流速过已活化的中性氧化铝固相萃取小柱(5.21),用 5 mL 萃取溶剂(5.9)洗脱,合并流出液与洗脱液,用减压浓缩装置(6.6)在室温下浓缩至近干,在涡旋振荡器(6.5)上用 2 mL 0.1% BHT、乙醇和二氯甲烷溶液(5.11)溶解残渣,过 0.22 μm 滤膜(5.22),待用。

7.3 超高效液相色谱条件

超高效液相色谱仪(6.1)的色谱条件如下:

- 色谱柱:多环芳烃分析用 C_{18} 色谱柱,1.8 μm ,100 mm \times 2.1 mm(内径);
- 流动相 A:甲醇(5.7)+二氯甲烷(5.8)(97:3);流动相 B:水(5.1),洗脱梯度应符合表 1 的规定;
- 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;
- 流速:0.4 mL/min;
- 进样量:2 μL ;
- 检测波长:450 nm。

注:由于测试设备的多样性,色谱条件可依超高效液相色谱仪的型号作相应调整。

表 1 多环芳烃分析用 C_{18} 色谱柱-超高效液相色谱法洗脱梯度条件

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

表 1 多环芳烃分析用 C₁₈ 色谱柱-超高效液相色谱法洗脱梯度条件 (续)

时间 min	流速 mL/min	流动相 A %	流动相 B %
4.5	0.4	100	0
22	0.4	100	0
22.5	0.4	92	8
25	0.4	92	8

7.4 标准曲线的制作

按照 7.3 测试条件,将混合标准工作液(5.20)注入超高效液相色谱仪(6.1)中进行测试,测定相应的峰面积,以混合标准工作液(5.20)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

按照 7.3 测试条件,将待测样品溶液(7.2.3)注入超高效液相色谱仪(6.1)中进行测试。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。混合标准工作液(5.20)与待测样品液等体积进样。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 -胡萝卜素混合标准色谱图见附录 B。

8 结果计算

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

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

式中:

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

ρ_i —— 从标准工作曲线得到的试样溶液中各组分的质量浓度,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);

f —— 稀释倍数;

m —— 试样的取样量,单位为克(g);

100—— 换算系数。

计算结果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,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

本文件的检出限: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 $0.6 \mu\text{g}/100 \text{g}$ 。

本文件的定量限:当取样量为 5g 、定容体积为 2mL 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 $2.0 \mu\text{g}/100 \text{g}$ 。

附 录 A
(规范性)
标准溶液浓度的校正

A.1 试验步骤

使用前,应对番茄红素、叶黄素、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素标准溶液的浓度进行校正。

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(5.4)定容至刻度,混匀,用 1 cm 石英比色杯,以正己烷(5.4)为空白参比,用紫外分光光度计(6.2)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(5.5)定容至刻度,混匀,用 1 cm 石英比色杯,以乙醇(5.5)为空白参比,用紫外分光光度计(6.2)按表 A.1 的测定波长测定其吸光度。

表 A.1 各类胡萝卜素测定波长及百分吸光系数

目标物	测定波长 nm	1%比色吸光系数 <i>E</i>
番茄红素	470	3 450
叶黄素	445	2 550
α -胡萝卜素	446	2 725
β -胡萝卜素	450	2 620

A.2 结果计算

按式(A.1)计算标准溶液质量浓度:

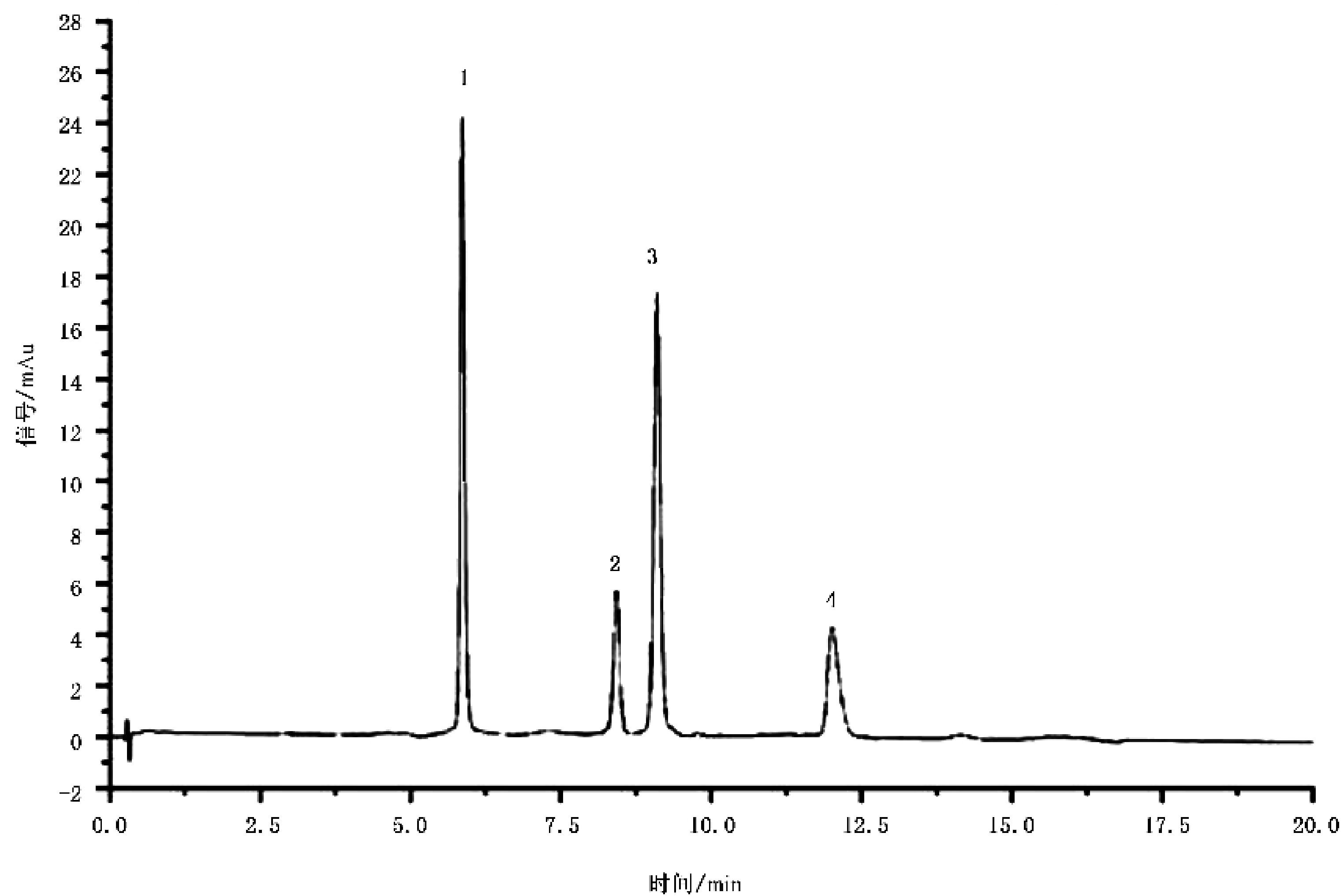
$$\rho = \frac{A}{E} \times 10\,000 \times 100 \dots\dots\dots(A.1)$$

式中:

- ρ ——标准溶液质量浓度,单位为微克每毫升(μ g/mL);
- A* ——标准溶液吸光值;
- E* ——1%比色吸光系数(各类胡萝卜素相应的比色吸光系数见表 A.1);
- 10 000 ——换算系数;
- 100 ——稀释倍数。

附录 B

(资料性)

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。

标引序号说明：

1——叶黄素；

2—— α -胡萝卜素；3—— β -胡萝卜素；

4——番茄红素。

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