

ICS 号: 67.080

中国标准文献分类号: X04

团 体 标 准

T/SSFS0010-2024

番茄及其制品中六氢番茄红素和八氢番茄红素的测定 高效液相色谱法

Determination of phytofluene and phytoene in tomato and its products— High performance liquid chromatography

2024-03-13 发布

2024-05-01 实施

上海市食品学会

发布



24031315525104

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。

本文件由上海市食品学会提出、归口并组织实施。

本文件起草单位：新疆冠农检测科技有限公司、新疆冠农股份有限公司、上海植营生物科技有限公司、晨光生物科技集团股份有限公司、河北晨光检测技术服务有限公司、江南大学。

本文件主要起草人：张连富、杨成、丁岚、王雪铭、王陈强、焦利卫、张晓芳。

声明：本文件的知识产权归属于上海市食品学会，未经上海市食品学会同意，不得印刷、销售。任何组织、个人使用本标准开展认证、检测等活动应经上海市食品学会批准授权。

本文件首批承诺执行单位：新疆冠农检测科技有限公司、新疆冠农股份有限公司、上海植营生物科技有限公司、晨光生物科技集团股份有限公司、河北晨光检测技术服务有限公司、江南大学、上海根莱食品有限公司、上海倍赛科营养品有限公司、天津恒健盛达生物科技有限公司、南德商品检测（上海）有限公司。



番茄及其制品中六氢番茄红素和 八氢番茄红素的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了番茄及其制品（番茄汁、番茄酱、番茄干粉和番茄籽油）中六氢番茄红素和八氢番茄红素的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于番茄及其制品（番茄汁、番茄酱、番茄干粉和番茄籽油）中六氢番茄红素和八氢番茄红素的测定。

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

试样中的六氢番茄红素和八氢番茄红素经提取剂提取、浓缩，用高效液相反相色谱法分离，紫外检测器或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，水为符合GB/T 6682规定的一级水。

5.1 甲醇(CH₃OH)：色谱纯。

5.2 甲基叔丁基醚[CH₃OC(CH₃)₃, MTBE]：色谱纯。

5.3 正己烷(C₆H₁₄)。

5.4 丙酮(CH₃COCH₃)。

5.5 乙酸乙酯(C₄H₈O₂, EA)。

5.6 提取液：正己烷：甲醇：丙酮(2:1:1, v/v/v)按体积比混匀备用。

5.7 稀释液：甲醇：甲基叔丁基醚(1:1, v/v)按体积比混匀备用。

5.8 六氢番茄红素(C₄₀H₆₂)：纯度≥97%。

5.9 八氢番茄红素(C₄₀H₆₄)：纯度≥97%。

5.10 六氢番茄红素标准储备液(1 mg/mL)：准确称取1 mg六氢番茄红素(5.8)于1 mL棕色容量瓶，用少量乙酸乙酯溶解并定容至刻度，-20℃避光密封保存。有效期不超过7天。储备液临用前应回温至室温，并按附录B的规定校正。

5.11 八氢番茄红素标准储备液(1 mg/mL)：准确称取1 mg八氢番茄红素(5.9)于1 mL棕色容量瓶，用少量乙酸乙酯溶解并定容至刻度，-20℃避光密封保存。有效期不超过7天。储备液临用前应回温至室温，并按附录B的规定校正。

5.12 六氢番茄红素标准中间液(0.5 mg/mL)：准确移取0.5 mL六氢番茄红素标准储备液(5.10)于1 mL容量瓶中，用稀释液(5.7)定容至刻度，得到质量浓度为0.5 mg/mL的标准中间液。现用现配。

- 5.13 八氢番茄红素标准中间液 (0.5 mg/mL): 准确移取 0.5 mL 八氢番茄红素标准储备液 (5.11) 于 1 mL 容量瓶中, 用稀释液 (5.7) 定容至刻度, 得到质量浓度为 0.5 mg/mL 的标准中间液。现用现配。
- 5.14 六氢番茄红素标准工作溶液: 准确移取一定体积的六氢番茄红素标准中间液 (5.12) 于 5 mL 容量瓶中, 用稀释液 (5.7) 定容至刻度, 得到质量浓度为 2.5 μg/mL、5 μg/mL、7.5 μg/mL、10 μg/mL、12.5 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL 的系列标准工作液。现用现配。
- 5.15 八氢番茄红素标准工作溶液: 准确移取一定体积的八氢番茄红素标准中间液 (5.13) 于 5 mL 容量瓶中, 用稀释液 (5.7) 定容至刻度, 得到质量浓度为 2.5 μg/mL、5 μg/mL、7.5 μg/mL、10 μg/mL、12.5 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL 的系列标准工作液。现用现配。

6 仪器设备

- 6.1 高效液相色谱仪: 配有紫外检测器或二极管阵列检测器。
- 6.2 天平: 感量为 0.1 mg 和 0.01 g。
- 6.3 匀浆机。
- 6.4 筛网 (14 目)。
- 6.5 磁力搅拌器。
- 6.6 真空泵。
- 6.7 旋转蒸发器。
- 6.8 聚四氟乙烯微孔滤膜: 0.22 μm。

7 样品制备

- 新鲜番茄: 取一定数量的有代表性的样品, 去蒂切块, 用匀浆机 (6.3) 破碎 30 s, 过 14 目筛网 (6.4) 去除绝大多数皮和籽, 得到番茄浆, 转移至锥形瓶, 备用。
- 番茄汁: 依据产品中番茄的添加量, 取相当于含新鲜番茄 15 g~20 g 的样品至锥形瓶, 备用。
- 番茄酱: 充分搅匀样品, 取 0.5 g 番茄酱至锥形瓶, 备用。
- 番茄干粉: 充分混匀样品, 取 0.5 g 番茄干粉至锥形瓶, 备用。
- 番茄籽油: 转动并翻转装满样品的容器, 搅匀, 取 0.5 g 番茄籽油至锥形瓶, 备用。

8 试验步骤

8.1 试样溶液的制备

平行做两份试验。

取 5 g 番茄浆、适量番茄汁或 0.5 g 番茄酱于 50 mL~100 mL 锥形瓶中, 加入 20 mL 提取液 (5.6) 磁力搅拌 20 min, 抽滤收集滤液, 重复萃取滤渣 2 次直至滤渣颜色褪尽, 合并滤液。将滤液倒入分液漏斗中, 静置, 加入 5 mL 去离子水, 加速分液, 取上层有机层, 用旋转蒸发器 (6.7) 在 40 °C、250 mbar 旋转蒸干, 用乙酸乙酯溶解, 并用稀释液 (5.7) 定容至 10 mL。测定前应经 0.22 μm 微孔滤膜 (6.8) 过滤, 存于棕色液相小瓶中, 于当天完成检测。

取 0.5 g 番茄干粉于 50 mL~100 mL 锥形瓶中, 加入 20 mL 提取液 (5.6) 磁力搅拌 20 min, 抽滤收集滤液, 重复萃取滤渣 2 次直至滤渣颜色褪尽, 合并滤液。用旋转蒸发器 (6.7) 在 40 °C、250 mbar 旋转去除有机溶剂, 用乙酸乙酯溶解, 并用稀释液 (5.7) 定容至 10 mL。测定前应经 0.22 μm 微孔滤膜 (6.8) 过滤, 存于棕色液相小瓶中, 于当天完成检测。

取 0.5 g 番茄籽油, 用少量乙酸乙酯溶解, 用稀释液 (5.7) 定容至 100 mL。测定前应经 0.22 μm 微孔滤膜 (6.8) 过滤, 存于棕色液相小瓶中, 于当天完成检测。

8.2 测定

8.2.1 高效液相色谱参考条件

色谱柱: YMC Carotenoids C30 (250 mm×4.6 mm, 粒径 5 μm), 或性能相当者。
流速: 1.0 mL/min。

柱温：20 ℃。

检测波长：八氢番茄红素：286 nm，六氢番茄红素：348 nm。

进样体积：20 μL。

流动相：A：甲基叔丁基醚：甲醇=80：20； B：甲醇：甲基叔丁基醚：水=90：5：5，梯度洗脱条件见表1。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相A (%)	流动相B (%)
0	45	55
20	50	50
28	95	5
32	95	5
34	100	0
37	100	0
40	45	55
50	45	55

8.2.2 标准曲线的制备

将六氢番茄红素标准工作溶液（5.14）和八氢番茄红素标准工作溶液（5.15）注入高效液相色谱仪中测定。记录保留时间和峰面积，以标准工作溶液的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。求回归方程和相关系数，相关系数不应低于0.998。标准工作溶液中六氢番茄红素或八氢番茄红素的响应值应在仪器检测的线性范围内。六氢番茄红素和八氢番茄红素标准溶液的液相色谱图见附录A。

8.2.3 试样溶液的测定

将试样溶液（8.1）注入高效液相色谱仪中测定。记录保留时间和峰面积。以保留时间定性。试样溶液中六氢番茄红素或八氢番茄红素的响应值应在仪器检测的线性范围内。超出线性范围的应用稀释液（5.7）稀释至线性范围内再测定。外标法定量。

8.3 空白试验

除不加试样外，其余均按8.2操作。

9 结果计算与表述

试样中六氢番茄红素或八氢番茄红素的含量按式（1）计算

$$X = \frac{(c - c_0) \times V}{m} \times 10 \quad (1.)$$

式中：

X ——试样中六氢番茄红素或八氢番茄红素的含量，单位为毫克每一百克（mg/100g）；

c ——由标准曲线计算得到的样品溶液中六氢番茄红素或八氢番茄红素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

c_0 ——由标准曲线计算得到的空白试验中六氢番茄红素或八氢番茄红素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——试样溶液定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

10——换算系数。

测定结果用平行测定后的算术平均值表示，保留三位有效数字。

10 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超过其算术平均值的10%。

11 检出限和定量限

当取样量为5 g番茄浆、番茄汁时，六氢番茄红素和八氢番茄红素的检出限为0.10 mg/100g，定量限为0.30 mg/100g。

当取样量为0.5 g番茄酱、番茄干粉、番茄籽油时，六氢番茄红素和八氢番茄红素的检出限为1.00 mg/100g，定量限为3.00 mg/100g。



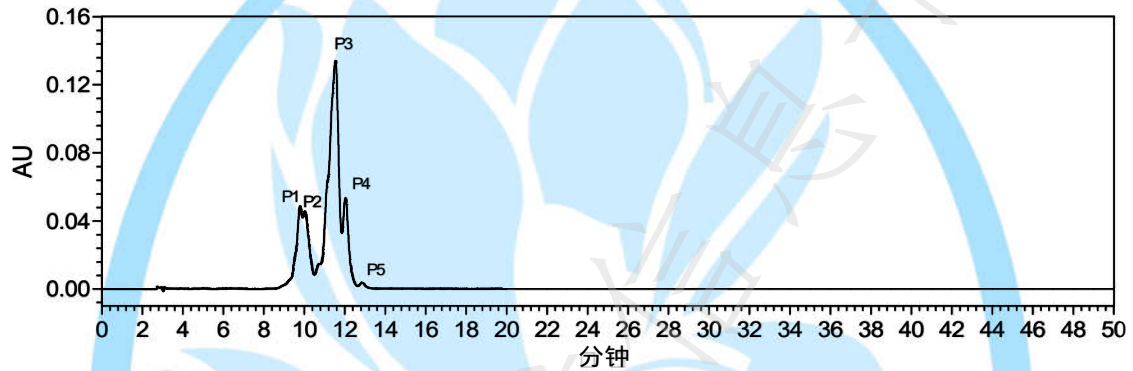
附录 A

(资料性)

六氢番茄红素和八氢番茄红素的色谱图

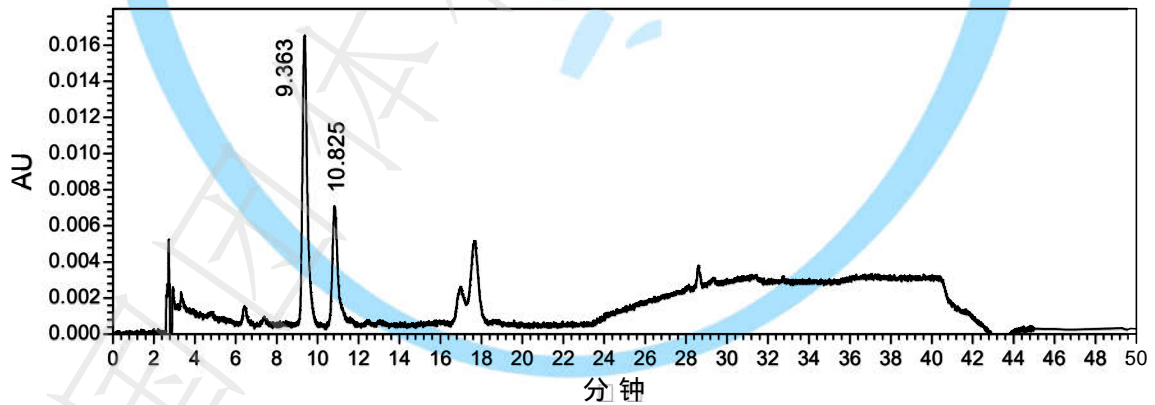
A.1 六氢番茄红素色谱图

六氢番茄红素色谱图，见图A.1与图A.2。



注：此图显示标准品中六氢番茄红素主要含5种同分异构体，分别为顺式六氢番茄红素1 (P1, 保留时间: 9.752 min)、顺式六氢番茄红素2 (P2, 保留时间: 9.993 min)、全反式六氢番茄红素 (P3, 保留时间: 11.529 min)、顺式六氢番茄红素3 (P4, 保留时间: 12.030 min) 和顺式六氢番茄红素4 (峰P5, 保留时间: 12.869 min)。以5个峰的峰面积之和作为六氢番茄红素的峰面积

图A.1 六氢番茄红素标准品色谱图 (40 µg/mL)

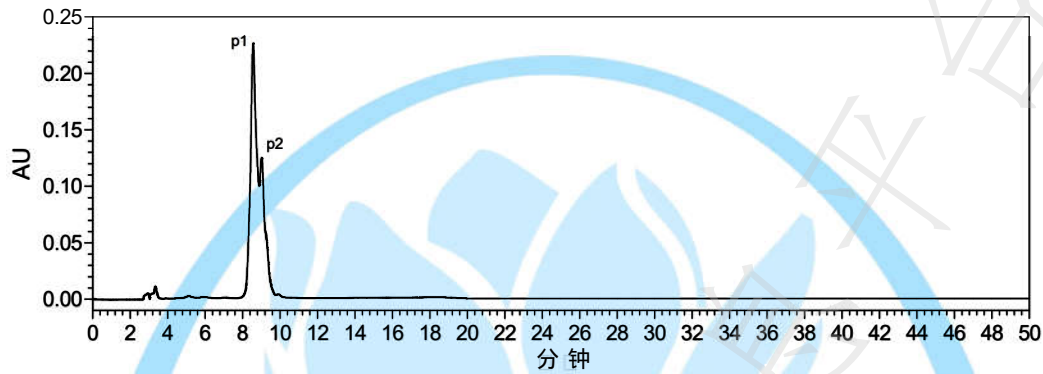


注：此图显示样品含六氢番茄红素2种，分别为六氢番茄红素1 (峰1, 保留时间, 9.363 min)、六氢番茄红素2 (峰2, 保留时间, 10.825 min)。

图A.2 六氢番茄红素样品色谱图 (新鲜番茄)

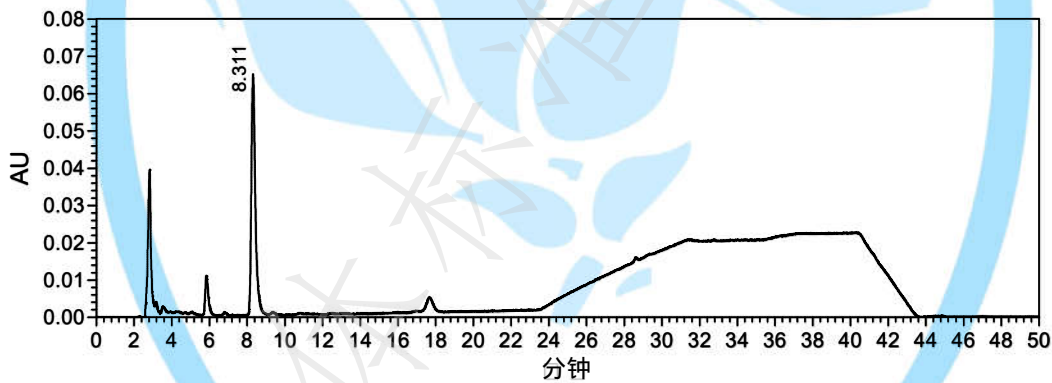
A.2 八氢番茄红素色谱图

八氢番茄红素色谱图，见图A.3与图A.4。



注：此图显示标准品中八氢番茄红素主要含2种同分异构体，分别为15顺八氢番茄红素（p1，保留时间：8.620 min）和全反式八氢番茄红素（p2，保留时间：9.086 min）。以2个峰的峰面积之和作为八氢番茄红素的峰面积。

图A.3 八氢番茄红素标准品色谱图（40 µg/mL）



注：此图显示样品中含八氢番茄红素1种（保留时间：8.311min）。

图A.4 八氢番茄红素样品色谱图（新鲜番茄）

附 录 B
(规范性)

六氢番茄红素和八氢番茄红素标准储备液浓度的校正

B.1 校正

分别移取六氢番茄红素和八氢番茄红素标准储备液100 μL 于10 mL棕色容量瓶中，用正己烷定容至刻度，混匀，将溶液置于1 cm石英比色皿，以正己烷为空白参比，用紫外分光光度计测定，测定波长见表B.1。

表B.1 六氢番茄红素和八氢番茄红素的测定波长及百分吸光系数

目标物	测定波长/nm	E (1%比色吸光系数)
六氢番茄红素	348	1800
八氢番茄红素	287	780

B.2 计算结果

标准储备液的质量浓度按式 (B.1) 计算：

$$\rho = \frac{A}{E} \times 10000 \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

ρ ——标准稀释液质量浓度，单位为微克每毫升 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)；

A——标准稀释液的平均吸光值；

E——1%比色吸光系数；

10000——换算系数。