

T/SSFS

团体标准

T/SSFS XXXX—2023

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

(征求意见稿)

2023 - XX - XX 发布

2023 - XX - XX 实施

上海市食品学会 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。

本文件的某些内容可能涉及专利。

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、新疆冠农果茸股份有限公司、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、杨青山。

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。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件首批承诺执行单位：新疆冠农检测科技有限公司、新疆冠农果茸股份有限公司、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。

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

警示——使用本标准的人员应有正规实验室工作的实践经验。本标准并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关规定的条件。

1 范围

本文件规定了番茄及其制品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正己烷：甲醇：丙酮（2：1：1，v/v/v）提取，用少量乙酸乙酯溶解，甲醇：甲基叔丁基醚（1：1，v/v，色谱纯）定容，采用反相色谱法分离，由紫外检测器检测，参照标准品的保留时间和峰面积进行定性和定量。

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 乙腈(CH₃CN)：色谱纯。
- 5.2 甲醇(CH₃OH)：色谱纯。
- 5.3 甲基叔丁基醚[CH₃OC(CH₃)₃，MTBE]：色谱纯。
- 5.4 正己烷(C₆H₁₄)。
- 5.5 丙酮(CH₃COCH₃)。
- 5.6 乙酸乙酯(C₄H₈O₂，EA)。
- 5.7 提取液：正己烷：甲醇：丙酮（2：1：1，v/v/v）按体积比混匀备用。
- 5.8 六氢/八氢番茄红素储备液稀释液：甲醇：甲基叔丁基醚（1：1，v/v）按比混匀备用。
- 5.9 六氢番茄红素(C₄₀H₆₀，CAS号：540-05-6)：纯度大于或等于97%。
- 5.10 八氢番茄红素(C₄₀H₆₂，CAS号：540-05-5)：纯度大于或等于97%。
- 5.11 六氢番茄红素/八氢番茄红素标准储备液(1 mg/mL)：1 mg 六氢番茄红素/八氢番茄红素标准品，分别加1 mL 乙酸乙酯溶解，转移至棕色小瓶封口。于-20℃下避光贮存，使用期限不超过1个月，标准储备液用前需参考初次试验所得标准曲线及附录A提供的六氢和八氢番茄红素标准品的色谱和光谱图，若浓度有所降低或峰型和光谱图与参考有异，则判定标准储备液失效，改用标准曲线来定量。
- 5.12 六氢番茄红素/八氢番茄红素标准系列工作溶液：准确移取适量标准储备液(5.11)于1 mL 容量瓶中，用稀释液(5.8)稀释定容配成系列标准溶液，浓度分别为2.5 μg/mL、5 μg/mL、7.5 μg/mL、10 μg/mL、12.5 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL的混合标准工作液。临用现配。

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 0.01 g 和 0.0001 g。
- 6.3 打浆机（果汁机、料理机皆可）。
- 6.4 筛网（14 目）。
- 6.5 磁力搅拌器。
- 6.6 真空泵。
- 6.7 旋转蒸发仪。
- 6.8 超声波清洗器。
- 6.9 微孔滤膜：0.22 μm ，聚四氟乙烯（PTFE）材质。

7 样品制备

7.1 含水样品

新鲜番茄：随机取样2个~4个，去蒂、清洗、切块（约1 cm^3 ~2 cm^3 ），用打浆机（6.3）破碎30 s 成匀浆，匀浆过14目筛网（6.4）去除绝大多数皮和籽。取番茄浆5 g，精确到1 mg，取样抽滤去除绝大多数水分，将滤渣转移至锥形瓶中，待下一步提取。

番茄饮料：依据产品中番茄的添加量，取相当于含鲜番茄15 g~20 g的样品，精确到1 mg，取样抽滤去除绝大多数水分，将滤渣转移至锥形瓶中，待下一步提取。

番茄酱：称取0.5 g番茄酱至锥形瓶中，待下一步提取。

7.2 粉剂

番茄粉：称取0.5 g番茄粉至锥形瓶中，待下一步提取。

7.3 油剂

番茄籽油：称取0.5 g番茄籽油至锥形瓶中，待下一步溶解稀释。

8 试验步骤

8.1 试样溶液的制备

平行做三份试验。对于含水样品和粉剂，取新鲜番茄浆/番茄饮料5 g或0.5 g番茄酱/番茄（干）粉，加入20 mL提取液（5.7）：正己烷：甲醇：丙酮混合提取液（2：1：1，v/v/v）于50 mL~100 mL锥形瓶中，磁力搅拌20 min；之后，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，若样品水分多则会发生分层，加入5 mL去离子水，加速分液，取上层有机层进行下一步旋蒸；若样品水分少则不分层，则可直接旋蒸去除有机溶剂。40 $^{\circ}\text{C}$ 、250 mbar旋转蒸干后乙酸乙酯溶解，并用稀释液（5.8）定容至10 mL容量瓶中，在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待测。对于油剂样品，先用少量乙酸乙酯溶解，后用稀释液（5.8）定容至10 mL容量瓶中，在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待测。样品经 0.22 μm 微孔滤膜（6.9）过滤后存于棕色液相小瓶中，进行高效液相色谱分析。

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 \times 4.6 mm，粒径5 μm ），或性能相当者。

流速：1.0 mL/min。

柱温：20 $^{\circ}\text{C}$ 。

检测波长：八氢番茄红素：286 nm，六氢番茄红素：348 nm。

检测设备：所选检测设备（二极管阵列检测器，DAD/PDA）需一次可以检测2种波长；若一次无法检测2种波长，同一样品需在不同波长下各测1次。

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 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

在仪器最佳条件下，将标准系列工作溶液（5.12）注入高效液相色谱仪中测定。记录出峰时间和峰面积。以标准系列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，标准曲线的相关系数不应低于0.998。标准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参见附录A。

8.2.3 样品测定

在仪器最佳条件下，将试样溶液（8.1）注入高效液相色谱仪中测定。记录出峰时间和峰面积。监测光谱图并与标准溶液的光谱图（附录A）对照。试样溶液（8.1）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。如超出线性范围，应将试样溶液用稀释液（5.8）稀释（稀释倍数n）至线性范围内，上机测定。单点校准定量时，试样溶液中的六氢番茄红素或八氢番茄红素浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

8.3 空白试验

不称取试样，其余均按照8.2进行。

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

$$X = \frac{c \times V}{m} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X ——试样中六氢番茄红素或八氢番茄红素的含量，单位为微克每克（ $\mu\text{g/g}$ ）；

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（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

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）。

注：计算结果需扣除空白值，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/番茄饮料时，检出限为0.3 $\mu\text{g/g}$ ，定量限为1.0 $\mu\text{g/g}$ 。

当取样量为0.5 g番茄酱/番茄粉/番茄籽油时，检出限为3 $\mu\text{g/g}$ ，定量限为10 $\mu\text{g/g}$ 。

附录 A

(资料性)

八氢番茄红素和六氢番茄红素的色谱图与光谱图

A.1 八氢番茄红素色谱图与光谱图

八氢番茄红素色谱图与光谱图，见图A.1与图A.2。

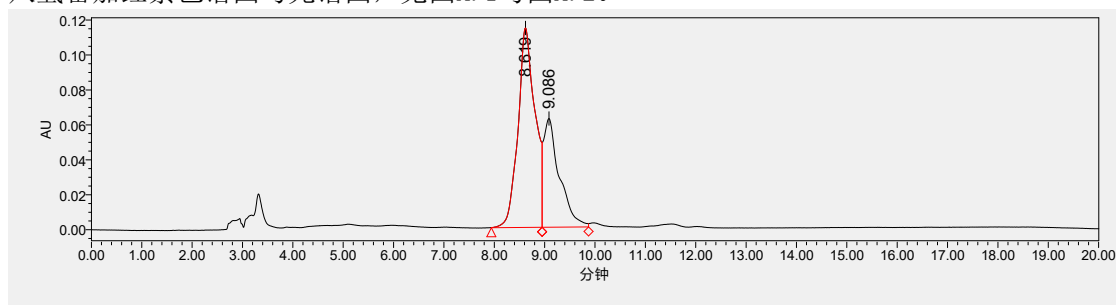


图 A.1 八氢番茄红素标准品色谱图

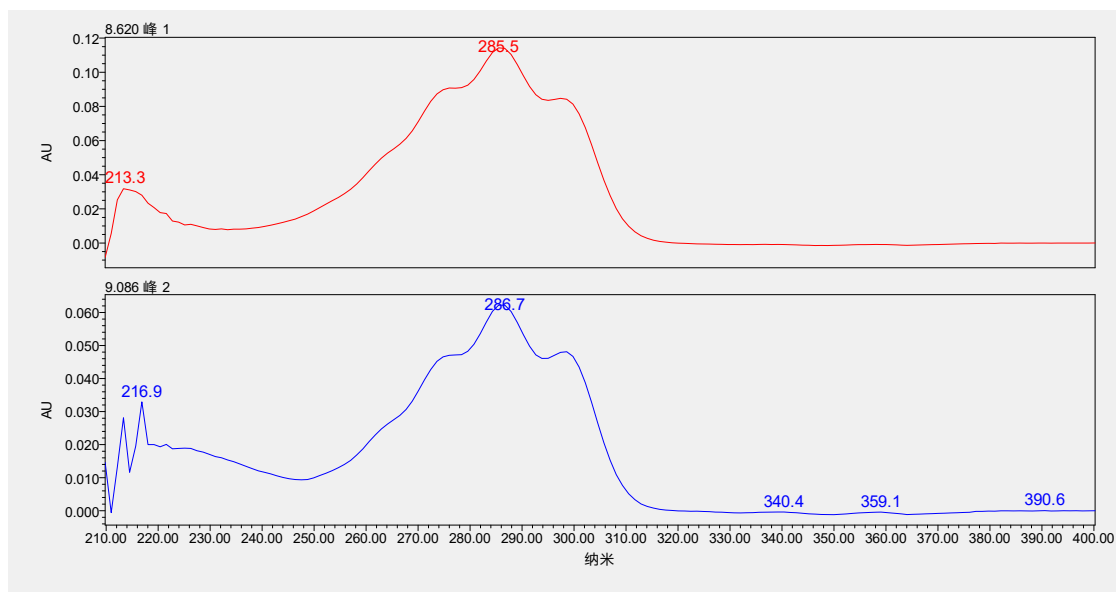


图 A.2 八氢番茄红素标准品光谱图

A.2 六氢番茄红素色谱图与光谱图

六氢番茄红素色谱图与光谱图，见图A.3与图A.4。

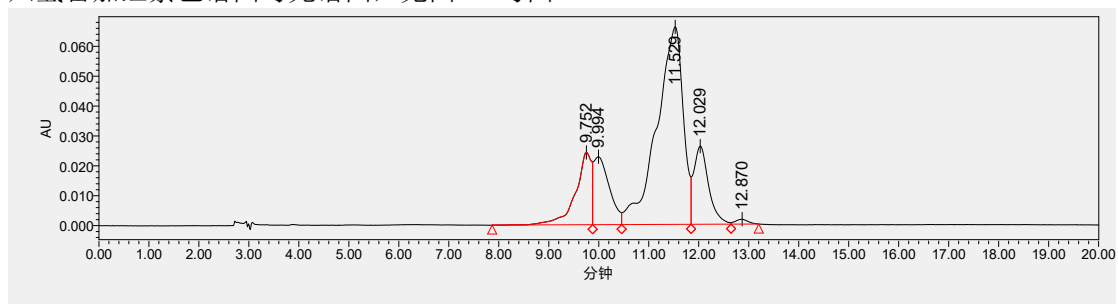


图 A.3 六氢番茄红素标准品色谱图

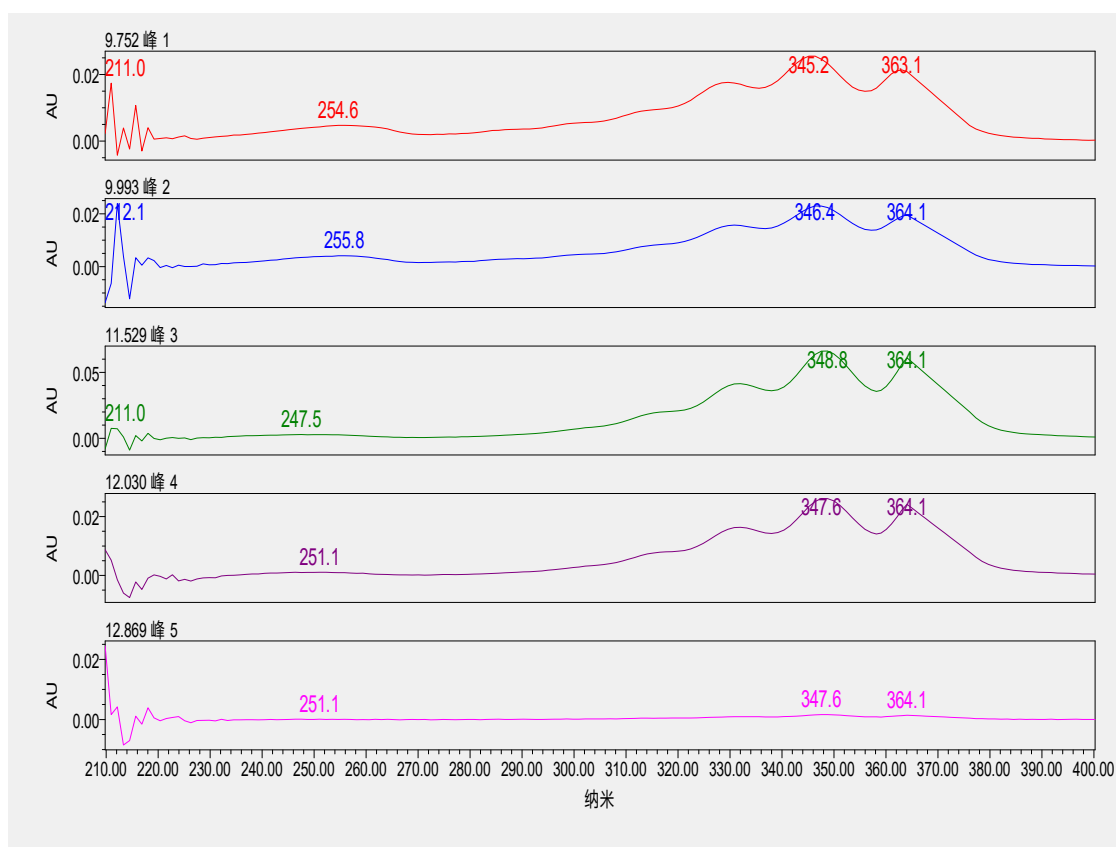


图 A.4 六氢番茄红素标准品光谱图