

《保健食品中番茄红素的测定》国家标准 (征求意见稿) 编制说明

一、工作简况

(一) 任务来源

根据《国家标准化管理委员会关于下达 2023 年第二批推荐性国家标准计划及相关标准外文版计划的通知》(国标委发〔2023〕37 号),《保健食品中番茄红素的测定》(计划号 20230862-T-424)列入修订计划,由全国特殊食品标准化技术委员会归口,由中国食品发酵工业研究院有限公司等单位共同组织完成起草修订工作。

(二) 修订背景

1、研究背景与意义

番茄红素(Lycopene, LYC)是一种类胡萝卜素,主要存在于成熟番茄等果实及其制品中。番茄红素具有长链多不饱和烯烃分子结构,使其不仅具有很强的抗氧化和消除自由基能力,还具有降低心血管疾病风险、增强免疫力、抑制肿瘤增殖等作用。随着“大健康”理念的不断深入,番茄红素等具有合理营养和保健功能的食品成了新的消费潮流。联合国粮农组织(FAO)、食品添加剂委员会(JECFA)和世界卫生组织(WHO)也已批准番茄红素为 A 类营养素。

番茄红素独特的分子结构造成其对光照反应十分敏感,容易发生顺反异构反应和氧化降解,故其稳定性很差。随着技术的进步与发展,为了减少食品中番茄红素成分的损失,多种形式的微胶囊化技术已成

功应用于保健食品原料番茄红素中，而现有的标准检测方法已经不能够满足于部分样品的检测，主要表现在：（1）前处理检测方法不适用导致检测含量较理论值偏低。核心技术原因是直接使用溶剂萃取微胶囊化的产品时，无法实现产品破壁，造成番茄红素成分无法释放出来。（2）番茄红素标准品不稳定。番茄红素标准品易氧化降解，从生产、储存、运输到用户使用过程，极难保证其含量不损失，标准品损失的不确定性造成检测误差不可控。（3）色谱条件适用性差。流动相条件仅在某类品牌色谱柱上能进行方法重现，普适性较差。

由于现行标准存在的以上问题，导致了企业使用无技术依据，政府监管缺乏技术手段。因此，亟需对 GB/T 22249-2008《保健食品中番茄红素的检测》标准进行修订，建立切实可行的技术操作方法，满足各类样品的检测，保障行业的健康发展。并通过对产品中番茄红素的精准测量来确认产品货架期，以及产品保质期内番茄红素含量对产品质量的控制和消费者权益保护具有重要意义，为保健食品科学监管提供技术支撑。

（2）国内外相关标准法规

目前，关于番茄红素含量检测的标准主要有 GB 28316-2012《食品安全国家标准 食品添加剂番茄红》（与 JECFA 标准：Lycopene Extract From Tomato（Lycopene (Tomato); INS 160d(ii)）标准相似）、GB/T 22249-2008《保健食品中番茄红素的测定》、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》，以及 SN/T 3865-2014《出口保健食品中番茄红素的测定 液

相色谱-质谱/质谱法》、T/CCCMHPIE 1.28-2018《植物提取物 番茄红素》，其中保健食品中番茄红素的检测主要采用 GB/T 22249-2008 标准。不同标准之间的前处理方法和色谱条件差异较大。前处理方面 GB 28316-2012、GB/T 22249-2008、T/CCCMHPIE 1.28-2018 中均采用含有抗氧化剂的二氯甲烷溶液提取后直接进行仪器测定；GB/T 41133-2022、SN/T 3865-2014 则是完成提取后，采用中性氧化铝进行净化，而在 SN/T 3865-2014 标准的提取过程样品需进行皂化。不同标准中提供的可用于分离的色谱柱包括 C₁₈ 和 C₃₀，其中 C₁₈ 柱在五个标准中均有提及。四个标准方法中除 SN/T 3865-2014 标准采用液相色谱质谱法外，其余方法均采用高效液相色谱法进行含量测定。以上标准具体差异见表 1。

表 1 现行番茄红素检测标准比较

标准号	GB 28316-2012	GB/T 22249-2008	GB/T 41133-2022	SN/T 3865-2014	Lycopene Extract From Tomato((Lycopene (Tomato); INS 160d(ii))	T/CCCMHPIE 1.28-2018
检测方法	液相色谱 (472nm)	液相色谱 (472nm)	液相色谱 (450nm)	液相色谱-质 谱/质谱法 (APCI 源)	HPLC (472nm)	液相色谱 (472nm)
检测使用范围	食品添加剂 番茄红素	保健品	番茄制品	保健品	Additive (添加剂)	植物提取物-- 番茄红素
色谱柱	C ₁₈	ODS C ₁₈ 或者 ODS C ₃₀	多环芳烃分析 用 C ₁₈	C ₁₈	(RP-C8) (250 x 4.6 mm, 5 μm)	十八烷基键合 硅胶柱
流动相	乙腈-水-乙酸 乙酯	甲醇-乙腈	甲醇-二氯甲烷- 水	乙腈-叔丁基 甲醚	acetonitrile:methanol:dic hloromethane:nhexane: N-ethyl-diisopropylamin e 850:100:25:25:0.5 (v/v/v/v/v).	甲醇-二氯甲烷
检出限	/	检出限: 3*10 ⁻⁴ g/kg; 定量 限: 1*10 ⁻³ g/kg	检出限: 0.6 ug/100g; 定量 限: 2.0 ug/100g	测定低限: 0.1mg/kg	/	/
标样校	紫外分光光度	液相色谱面积	紫外分光光度	无校准方法	紫外分光光度法校准	紫外分光光度

准方式	法校准	归一化校准	法校准			法和液相色谱面积归一化法结合校准
是否有微囊化番茄红素检测方法	无	有，但存在部分样品不适用	无	无	无	无

（三）主要工作过程

2023年8月~2023年10月，成立标准修订组，确定标准制修订方案和工作计划，并开展了方法学验证。

2023年11月，全国特殊食品标准化技术委员会在北京召开《14项保健食品分析方法标准启动会》修订工作启动会，会上讨论了《保健食品中番茄红素的测定》的修订方案。

2023年11月~2024年1月，开展实验室内方法验证的工作。

2024年1月，开展新修订保健食品中番茄红素测定方法的实验室间方法验证工作。

2024年1月，起草工作组在前期工作基础上形成标准征求意见稿。

二、国家标准编制原则、主要内容及其确定依据

（一）标准编制原则

本标准按照 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》的规定起草和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准的原则》进行起草编写。

以科学技术和实验数据为依据，经过科学研究而制定。本标准的制定充分考虑行业发展需求，促进保健食品行业番茄红素产品的质量

提升，保护消费者权益，确保标准的科学性、先进性、可操作性。

（二）标准主要内容及其确定依据（包括修订前后技术内容的对比）

1、增加对照品标定

与 GB/T 22249-2008 相比，新标准增加了对照品标定步骤（见标准稿附录 A）。针对番茄红素标准品不稳定和使用过程不易控制的难题，借鉴 JECFA 番茄红素（天然）标准、国标 GB 28316-2012 和 GB/T 22249-2008 的技术原理，参照 T/CCCMHPIE 1.28-2018 中的解决办法，在朗博比尔定律和质量吸收系数等基础化学理论的支撑下，采用了分光光度法结合液相色谱面积归一化法的操作方式，解决了标准品的准确性不可控难题，使得方法简单易行。关于本标准中标定方法的说明：

1) 关于 P 值的说明

标样定量检测使用的是番茄红素的峰，因此需要校准出这个峰对应的成分浓度。针对校准公式中的 P 值，其目的是为了修正校准的准确性，考察市场上的番茄红素标准品，其色谱峰前段会有其他非番茄红素成分干扰，按照校准方法的原理需要消除掉这些非番茄红素峰才能保证结果准确性，只有引进 P 值消除杂峰才能确保校准的结果是番茄红素成分，否则校准出来的结果是所有可见峰对应的浓度，校准结果就会偏高。因此，引进 P 值的修正，针对标样校准是非常有必要性的，能够消除由于标准品不确定性引进的误差，也能得到真正的校准值。

2) 关于质量吸收系数 345 的说明

质量吸收系数的定义是指特定物质在一定波长下，特定溶液浓度

为 1 g/L、厚度为 1 cm 的所产生的吸光度，其单位为 $L/(g \cdot cm)$ 。本标准编制时，充分考虑的数据单位的可推导性，将质量吸收系数的单位和比色皿的宽度等进行了说明，能够有利于使用者理解公式，相比现有参照标准均具有明显严谨性。

此外，原标准配制和使用为临用现配，相当于标准品为一次性使用。本方法增加了标定步骤，且通过稳定性试验验证对照品溶液可以储存更长的周期，依据 JECFA 标准：Lycopene Extract From Tomato (Lycopene (Tomato); INS 160d(ii))，增加标定步骤后，标准溶液至少可稳定保存三周。

2、前处理方法的选择

(1) 取样量的修改

与 GB/T 22249-2008 相比，原标准中线性的最高检测含量为 20mg/100g，而市场上的产品含量通常为 500mg/100g~5000mg/100g 水平，因此使用原标准需要稀释操作较多倍数。现方法修改了不同剂型样品的称样量及定容体积：油溶性液体和一般性固体样品的取样量为 0.1 g~0.5 g，微囊化固体样品的取样量为 0.1 g，定容体积均为 100 mL，修改后的方法更便于实际样品中的操作使用，在无需稀释操作的情况下就能够直接检测市场上常规规格的产品。

(2) 提取方法的选择

与 GB/T 22249-2008 相比，原标准中微囊化固体的前处理方法对于搜集到的很多样品不适用，但能够基本满足非微囊化的固体样品检

测，因此本标准修改并完善了油溶性样品和一般固体样品的提取方法，增加了微囊化固体样品处理方法。新标准油溶性试样采用 BHT-二氯甲烷溶液直接提取，一般性固体试样经 N,N-二甲基甲酰胺提取后采用 BHT-二氯甲烷溶液稀释，微囊化固体试样经氨缓冲溶液破壁分散后采用 BHT 四氢呋喃溶液稀释，能够有效提取相应剂型样品中的番茄红素。

(3) 仪器分析条件的选择

原标准中流动相使用甲醇和乙腈混合体系检测的方式，要重现标准中的方法需要反复筛选较多款色谱柱才能实现分离，因此使用起来也有不便利性。根据番茄红素的溶解性，借鉴了相关标准和文献方法，经试验选定甲醇：二氯甲烷（95:5，v/v）流动相体系，可以较快的实现番茄红素成分的分离，且该流动相条件不再需要筛选色谱柱，任何常规 C₁₈ 色谱柱均能实现分离应用，较大地提高了方法的耐用性。

(5) 检出限和定量限的修订

按照新修订检测标准验证确定不同剂型的检出限和定量限，适用性更强，相比原标准可以在不稀释操作的情况下满足市场上大部分样品的定量，操作更简便。

(6) 异构体检测

原标准仅在色谱条件处提到了使用 C₃₀ 色谱柱分离异构体的方式，但在标准文本中的其他位置未在做出说明，包括：色谱条件、色谱图、定量方式等。考虑到市场和行业的实际需求情况，以及标准使用的便

利性，因此修订后标准直接删除该部分内容，仅保留 C₁₈ 色谱柱检测番茄红素总量的方法，且使用 C₁₈ 色谱柱检测在相关标准和文献中也均是用于检测番茄红素总量，因此不再考虑顺反异构体的分离和检测。

三、试验验证的分析、综述报告

方法线性关系：以番茄红素为定量外标，在 0.25~50 μg/mL 浓度范围内，相关系数 R² 大于 0.999，线性关系良好。

方法稳定性：该方法含量测定精密度、中间精密度高，稳定性符合要求。

方法加标回收率：该方法的回收率在 91%~103% 范围区间，回收率的 RSD 在 0.7%~3.0% 范围区间，说明该方法精确度较好，能够满足保健食品中番茄红素的准确测定。

方法准确性：方法验证基础上，起草工作组组织 5 家实验室进行验证，结果符合验证比对要求。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

(一) JECFA 标准: Lycopene Extract From Tomato (Lycopene (Tomato); INS 160d(ii)) 采用乙腈-水-乙酸乙酯溶剂体系提取，紫外分光光度法校准，液相色谱测定。

(二) USP 美国药典 Lycopene (official, 2020-05-01): 番茄红素含量测定采用 BHT 和二氯甲烷溶解，液相色谱测定。

五、以国际标准为基础的起草情况

无

六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

本标准属于 GB/T 22249-2008 的修订。本标准本标准与现行法律、法规和强制性国家标准协调一致。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准制定过程中无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本标准不涉及专利。

九、实施国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议

建议本标准发布 6 个月后实施，由归口单位组织行业相关单位积极开展宣贯工作。

十、其他应当说明的事项

无。

附件：方法学验证报告

附件一

保健食品中番茄红素的测定方法学验证

（一）方法原理

试样中的番茄红素经提取后，提取液过滤后进高效液相色谱仪，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、峰面积定量。

（二）操作步骤

1、样品的处理

（1）样品的预处理

胶囊：取不少于 20 粒样品，剪开，取出内容物，研细（必要时），混匀。

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。

（2）样品的提取

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 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 二氯甲烷溶液定容至刻度，摇匀，过 0.45 μm 有机滤膜，待用。

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-二甲基甲酰胺后超声提取 20 min，再加入 50 mL 0.5% BHT 二氯甲烷溶液，

继续超声 10 min 后,转移至 100 mL 棕色容量瓶中,最后用 0.5% BHT 二氯甲烷溶液定容至刻度,摇匀,过 0.45 μm 有机滤膜,待用。

微囊化固体样品:称取 0.1 g (精确至 0.1 mg) 样品,加 20 mL 氨-磷酸缓冲溶液,于 55℃ 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,待用。

注:也可根据微囊的特性,采用其他适宜的破包埋方法。

(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。

(4) 计算

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 (μg/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。

2、提取操作步骤说明

（1）标准品要求

番茄红素标准品（CAS 号：502-65-8）：市面上番茄红素标准品虽多标称纯度 $\geq 90\%$ 甚至更高，试验验证发现，部分标准品并不能达到标称的浓度，这可能是由于部分商家未真空或充氮保存导致。由于番茄红素容易氧化降解，番茄红素标准品在每次使用前均需校正，经起草工作组验证，校正后的标准品与未校准的标准品浓度相差较大，因此，起草工作组参考 GB/T 41133-2022 和 GB 28316-2012 标准中提及的标定方法，发现不同定容溶剂对紫外标定结果差异不大，最终在 GB 28316-2012 的标定基础上，结合 T/CCCMHPIE 1.28—2018 中的面积归一化法，最终确定本标准中对照品标定的最终方案。

根据标准溶液的性质，选择了 -18°C 以下储存条件和时间间隔，采用同样的分析方法和分析条件对经放置后的标准溶液进行含量标定，考察对照品溶液的储藏稳定性，稳定性可保存 7 天以上。

（2）称样量规定

确保待测样的均一性和代表性，胶囊样品：取样品 20 粒，取内容物，研细（必要时），混匀。内容物总量不低于 5 g，若 20 粒样品

内容物低于 5 g，则增大取样单元数；片剂、粉剂等能够形成粉末状的样品：取样品 20 个单元，研细，混匀。内容物总量不低于 10 g，若 20 个单元内容物低于 10 g，则增大取样单元数。

考虑到市场上不同产品中番茄红素的含量，确定油溶性液体样品、一般性固体样品取样量在 0.1~0.5 g，基本在检测范围内，可提高实际应用过程中的可操作性，文本中也规定，超过线性范围则应稀释。

微囊化固体样品由于包埋的特殊性，样品中的番茄红素需要破壁后才能释放出来，为了确保样品能够实现破壁完全性，经验证称样量需要控制在 0.1g 左右。

（3）提取方法选择

① 油溶性样品

软胶囊中番茄红素存在于油溶性液体中，针对番茄红素的特性，直接选取二氯甲烷溶剂溶解即可，即能溶解样品中的油脂成分，又能对番茄红素产生最佳的溶解性。

② 一般性固体样品

N, N-二甲基甲酰胺极性较强，可与水、醚、醇、酯、酮、不饱和烃和芳烃等混溶，有“万能溶剂”之称，可增加固体样品的提取效率。起草组通过在实际样品（珍奥番茄红素）的测定中发现：不添加 N, N-二甲基甲酰胺，只加入 BHT 溶液时，无法提取出试样中的番茄红素。同时，考察了 N, N-二甲基甲酰胺添加量对番茄红素提取率的影响，发现分别加入 10、20、40、50 mL N, N-二甲基甲酰胺进行提取，结果无显著差异，但 N, N-二甲基甲酰胺具有毒性高、稳定性高、难

降解等特点，因此加入体积定为 10 mL。同时，考虑粉末状固体样品，加入 10 mL N, N-二甲基甲酰胺提取溶剂后，少量样品易附着在容量瓶内壁，造成平行样品间精密度差，因此加入 N, N-二甲基甲酰胺后超声提取 20 min，再加入 50 mL BHT 二氯甲烷溶液，继续超声 10min，可减小不同样品间的实验误差。

③ 微囊化样品

收集了不同厂家和工艺的 7 种微囊化样品，采用了包括原标准及收集到的 5 家企业提供的前处理方法，经试验验证最终确定了收集到的“企业方法 5”前处理方法具有更好的适用性，能够满足不同类型的微囊化产品检测，检测结果与商家提供理论值基本一致。

在此方法基础上，进行了检测步骤优化，最终确定的微囊化前处理方法为：称取 0.1 g（精确至 0.001 g）样品，加 20 mL 4%氨缓冲溶液，于 55℃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 滤膜。滤液备用。

不同方法对于不同来源微囊化样品的试验效果见表 2：

表 2 不同方法对于不同来源微囊化样品的试验效果

样品信息情况	收集样品	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	样品 5	样品 6	样品 7	
	样品描述	番茄红素微囊粉 CGWNF	番茄红素微囊 CGWN	番茄红素微囊 FYWN	番茄红素微囊 ZZYYWNF	番茄红素微囊 GRWN	中科番茄红素胶囊	无限极悦扬胶囊	
	标注含量	5%	10%	5%	10%	10%	7%	0.40%	
方法来源	方法内容及验证效果情况								
原标准方法	微囊化试样：根据试样中番茄红素的含量，准确称取混合均匀的试样 0.1 g~0.5 g（精确至 0.001 g）于 100 mL 棕色容量瓶中，加入 0.1 g BHT 和 10 mL N, N-二甲基甲酰胺后超声提取 30min 后，再用 BHT 溶液定容至刻度，摇匀，过 0.45 μm 滤膜。滤液备用。	处理状态描述	样品溶解	样品未溶解	样品未溶解	样品溶解	样品溶解	样品未溶解	样品未完全溶解
		检测结果	5.14%	方法不适用	方法不适用	10.8%	9.80%	方法不适用	0.185%
		结论说明	方法不适用于所有基质						
收集企业方法 1	称取 30mg（精确至 0.01mg）左右番茄红素微囊粉样品于 100mL 容量瓶中，加入 25 mg BHT 和 2.5mL 氢氧化铵（2 g/100mL）水溶液，混合，50℃超声 5min，期间摇晃容量瓶，避免物料粘到玻璃表面上，直到物料完全分散，没有团块儿。冷却到室温。加入 5	处理状态描述	加入 2.5mL 氢氧化铵水溶液超声后物料不能完全分散，有团块，甲基叔丁基醚不能萃取完全，存在带颜色沉淀	方法不能适用于样品 1，不再验证其他样品					

	mL 四氢呋喃和 40 mL 无水乙醇，50℃混合超声 1 min，冷却到室温。加入 20 mL 甲基叔丁基醚，50℃超声萃取 5min，再冷却至室温用甲基叔丁基醚定容至刻度，摇匀得到测试液。		物						
		检测结果	2.96%						
		结论说明	检测结果不到理论值且相差较大，甲基叔丁基醚沸点低、易挥发，该方法不适用。						
收集企业方法 2	称取 0.01 g 左右样品于 50ml 塑料离心管内，加入 10 ml 温度为 50℃ 的温水，盖好盖子超声 20 min，每 5 min 摇匀一次，冷却至室温，加入 20 mL BHT-二氯甲烷溶液。涡旋 1 min，然后 4℃、2000 rpm 离心 5 min。去掉水层，取二氯甲烷层定容，待测。	处理状态描述	需去掉的水层中仍要有颜色，萃取不完全，需使用 BHT 二氯甲烷萃取 3-4 次	需去掉的水层中仍要有颜色，萃取不完全，需用 BHT 二氯甲烷萃取 5-6 次	需去掉的水层中仍要有颜色，萃取不完全，需用 BHT 二氯甲烷萃取 5-6 次	需去掉的水层中仍要有颜色，萃取不完全，需用 BHT 二氯甲烷萃取 3-4 次	需去掉的水层中仍要有颜色，萃取不完全，需反复萃取 6-7 次	-	-
		检测结果	2.95% (萃取 1 次)/5.11% (多	11.84%	4.76%	9.44%	8.29%	-	-

			次萃取后)						
		结论说明	该方法需反复多次使用 BHT 二氯甲烷萃取，直至水层无色，不同微囊产品萃取效果不同，萃取次数过多；二氯甲烷沸点低，极易挥发；不建议使用。						
收集企业方法 3	根据试样中番茄红素的含量，准确称取混合均匀的试样 0.2 g~1.0 g (精确至 0.001g) 于 100 mL 棕色容量瓶中，加入 10 mL 水，超声处理 15 min。在容量瓶中加入 50 mL 的无水乙醇和 30 mL BHT-二氯甲烷溶液 30 mL，混匀后再超声处理 5 min，用 BHT-二氯甲烷溶液定容至刻度，摇匀，过 0.45μm 滤膜。滤液备用。	处理状态描述	加水超声后物料不能完全溶解，加无水乙醇及二氯甲烷混匀超声后放置仍存在大量有色沉淀	方法不能适用于样品 1，不再验证其他样品					
		检测结果	2.61%						
		结论说明	提取不完全、结果偏低，且二氯甲烷极易挥发，该方法不适用						
收集企业方法 4	取 10 粒胶囊内容物，混合均匀，取约 0.38g，精密称定，置具塞锥形瓶中，先加入焦性没食子酸磷酸盐溶液 70mL，涡旋混匀 1min（剧烈混合），再加入 0.1%BHT	处理状态描述	三次萃取后水层仍有颜色，萃取不完全	方法不能适用于样品 1，不再验证其他样品					
		检测结果	4.23%						

	<p>二氯甲烷溶液 100mL，涡旋混匀 2min（剧烈混合），超声处理（功率 250W，频率 50kHz）30min，涡旋混匀 1min（剧烈混合），静置 5min，目测瓶底无明显红色番茄红素细微颗粒（若有则可加入 8mL 甲苯再超声 30min），涡旋混匀 3-5min（剧烈混合），离心（5500r/min）5min，分取二氯甲烷液，水液依次再加入 0.1%BHT 二氯甲烷溶液 80、60ml 进行两次萃取，每次均涡旋混匀 3min（剧烈混合）、离心（5500r/min）5min、分取用二氯甲烷液，合并三次二氯甲烷液，加入 1%BHT 二氯甲烷溶液定容至 250ml，摇匀，吸取此溶液 2.00ml 用 0.1%BHT 丙酮定容至 10ml，摇匀，过 0.45 μm 滤膜，即得。（为保证重复性建议剧烈混合步骤用机器振摇并计时）。</p>	<p>结论说明</p>	<p>前处理步骤较为复杂、易损失，结果偏低，且二氯甲烷极易挥发，稳定性差，该方法不适用</p>	
<p>收集企业方法 5</p>	<p>称取样品约 2 g，充分研磨，混合均匀后精密称取 100 mg 样品置于 100ml 棕色容量瓶中，加 20ml 4% 氨缓冲溶液（取 143mL</p>	<p>处理状态描述</p>	<p>加入 20mL 氨水缓冲溶液后能较好溶解，定容后溶液较为澄清，能够完全溶解</p>	

	<p>的氨水，加入纯净水定容至 1L，混合均匀。用 85%的磷酸，在室温 25 度下调节 pH 至 9.8），于 55℃水浴中超声 20min，每 5min 手摇一次。待溶液冷却至室温后，用稳定的四氢呋喃溶液（称取 0.25gBHT（2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚）于 1L 四氢呋喃溶液中。）定容，置于磁力搅拌器上搅拌 20min。静置 5min 待溶液澄清，吸取上清液 1.0ml 置 10ml 棕色容量瓶中，随后再用二氯甲烷甲醇(90:10)定容至刻度。</p>	<p>检测结果</p>	<p>5.47%、5.44%、 5.42%、5.35%</p>	<p>8.80%、 9.73%</p>	<p>6.13%、 5.88%</p>	<p>11.4%、 10.7%</p>	<p>10.8%、9.98%</p>	<p>5.90%</p>	<p>0.937%</p>
		<p>结论说明</p>	<p>该方法基质适用性好，操作相对简便，且四氢呋喃相比二氯甲烷和甲基叔丁基醚沸点较高，不易挥发，方法适用</p>						

④ 色谱条件选择

考察现行四个标准中的流动相条件，选择 Waters Sunfire C₁₈(4.6 × 250mm, 5 μm) 柱时，分别比较了 GB/T 22249-2008、GB/T 41133-2022 以及 GB 28316-2012 三个标准中的流动相条件。结果在甲醇-二氯甲烷（485：15）-水（GB/T 41133-2022）梯度洗脱时，目标化合物未出峰；甲醇-乙腈（50：50）（GB/T 22249-2008）等度洗脱时，番茄红素响应低；乙腈溶液（9+1）-乙酸乙酯梯度洗脱（GB 28316-2012），但溶剂效应会导致色谱峰分叉。相比于其余三种流动相条件，采用甲醇-二氯甲烷（95:5,v/v）等度洗脱（T/CCMHPIE 1.28-2018）时，相同浓度的番茄红素紫外响应较高，且峰形对称。

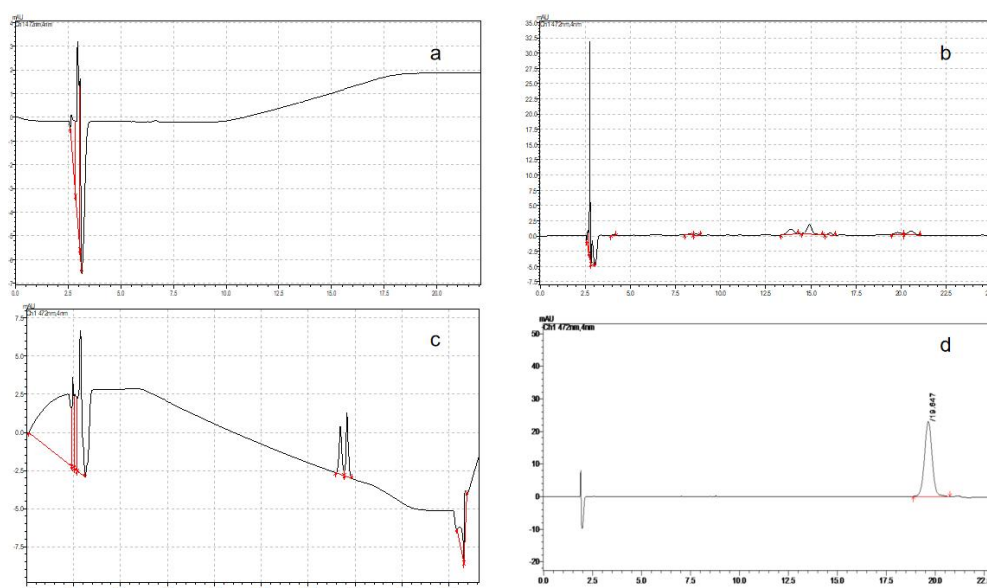


图 1 不同色谱条件下番茄红素的色谱图

（a、甲醇-二氯甲烷（485：15）-水梯度洗脱条件下；b、甲醇-乙腈（50：50）等度洗脱条件下；c、乙腈溶液（9+1）-乙酸乙酯 梯度度洗脱；d、甲醇-二氯甲烷（95:5,v/v）等度洗脱）

因此在确定以甲醇-二氯甲烷（95:5,v/v）为流动相的前提下，考察了该色谱条件对不同色谱柱的适用性。分别采用了 Aglient Zorbax

SB-C₁₈ (4.6×150mm, 5 μm), 月旭 Ultimate XB-C₁₈ (4.6×150mm, 5 μm), 迪马 Silversil C₁₈ (4.6×250mm, 5 μm), 均得到了较好的分离效果, 以及色谱峰形状。考虑试剂消耗情况, 最终推荐 150mm 色谱柱进行色谱分离。

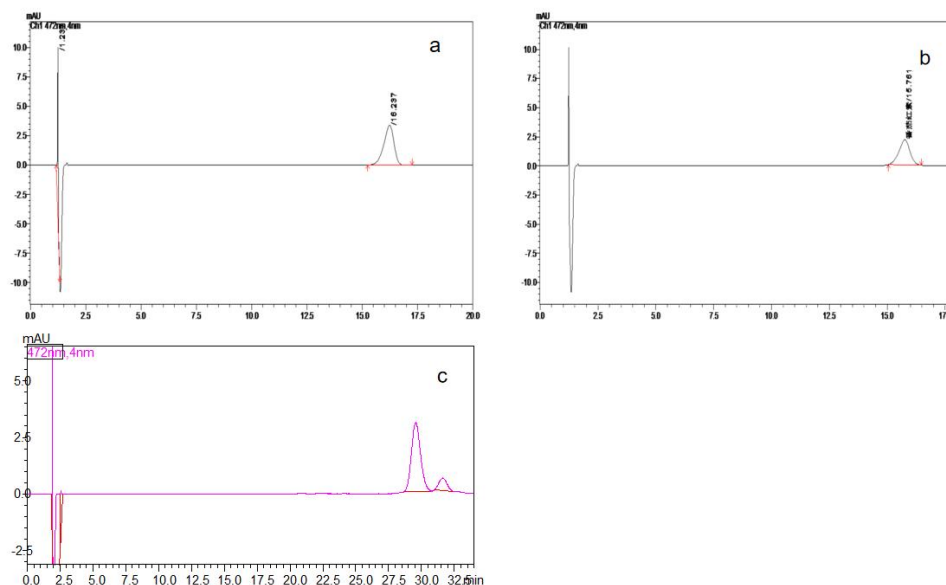


图 2 相同色谱条件下, 不同色谱柱得到的番茄红素色谱图
(a、Agilent Zorbax SB-C₁₈; b、月旭 Ultimate XB-C₁₈; c、迪马 Silversil C₁₈)

(三) 方法验证

起草工作组按照《GB 5009.295-2023 食品安全国家标准 化学分析方法验证通则》的程序和要求, 开展了方法验证工作。针对常用的三种不同基质, 准备了三组含番茄红素的油溶性液体样品、一般性固体样品、微囊化固体样品和对应的空白辅料。

1、特异性

按本含量测定方法配制对照品溶液、空白辅料溶液、样品溶液, 在含量测定色谱条件下, 注入液相色谱仪进行测定。实验数据和结果见表 3。

表 3 不同基质中番茄红素的测定专属性验证结果

样品类别	番茄红素保留时间 (min)	产品空白辅料色谱峰保留时间 (min)	样品溶液番茄红素峰与相邻峰的分度度
油溶性液体样品	15.373	无	14.443
一般性固体样品	15.373	无	18.277
微囊化固体样品	15.373	无	33.664
接受标准	1、产品空白辅料图谱中无番茄红素色谱峰或附近无显著干扰峰 2、产品空白辅料与番茄红素色谱峰分度度 > 1.5 或无色谱峰		
结论	空白辅料不干扰主成分测定		

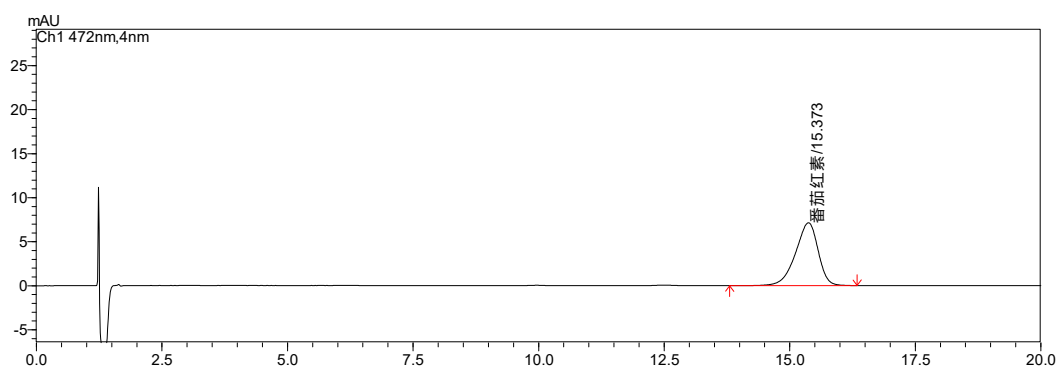


图 3 番茄红素典型色谱图

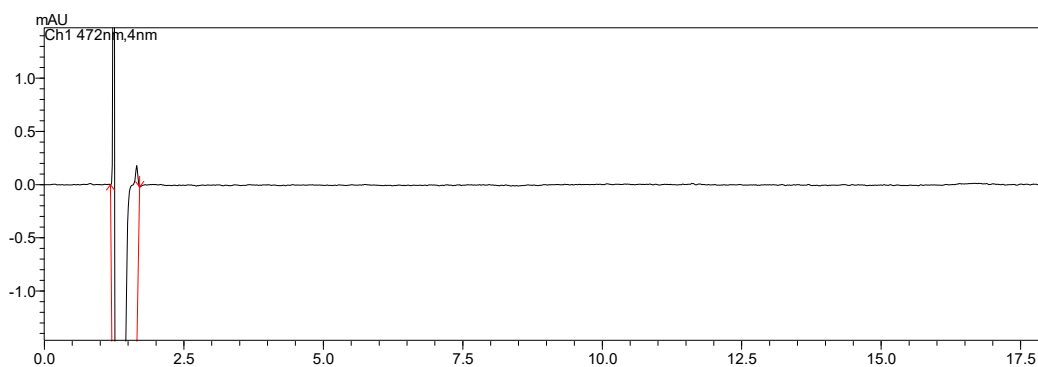


图 4 油溶性液体样品空白基质典型色谱图

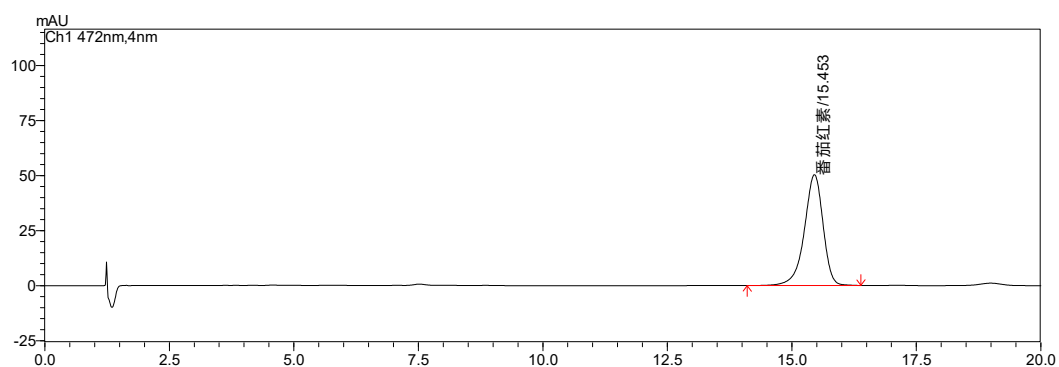


图 5 油溶性液体样品典型色谱图

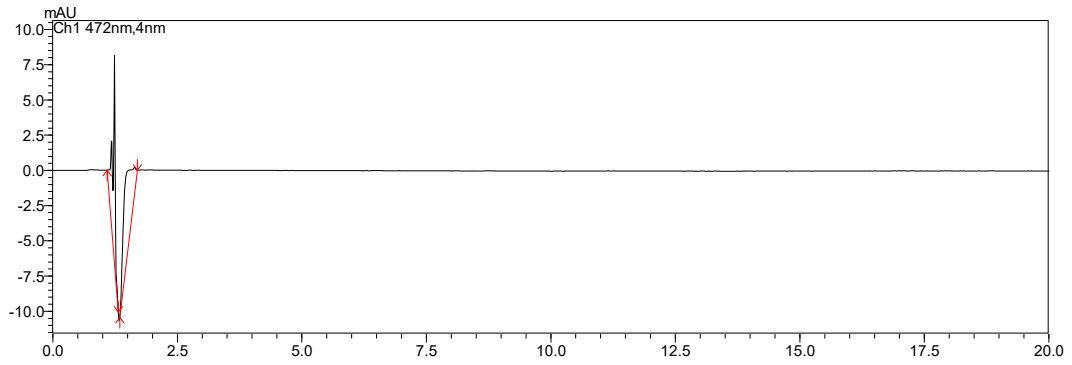


图 6 一般性固体样品空白基质典型色谱图

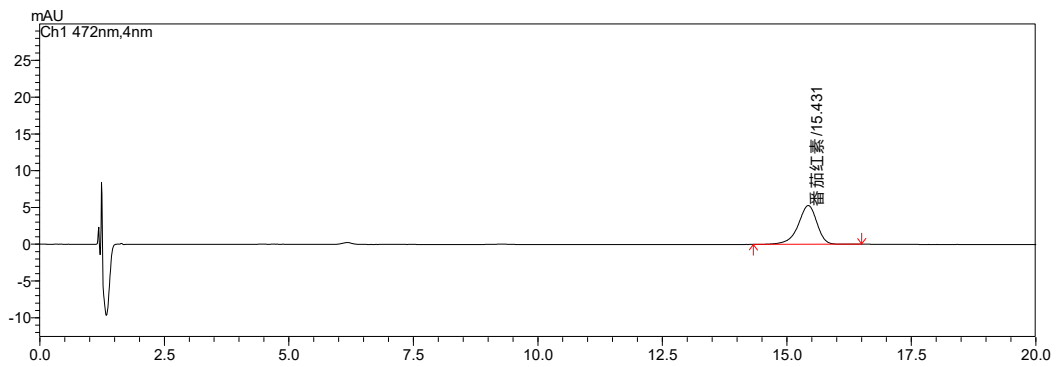


图 7 一般性固体样品典型色谱图

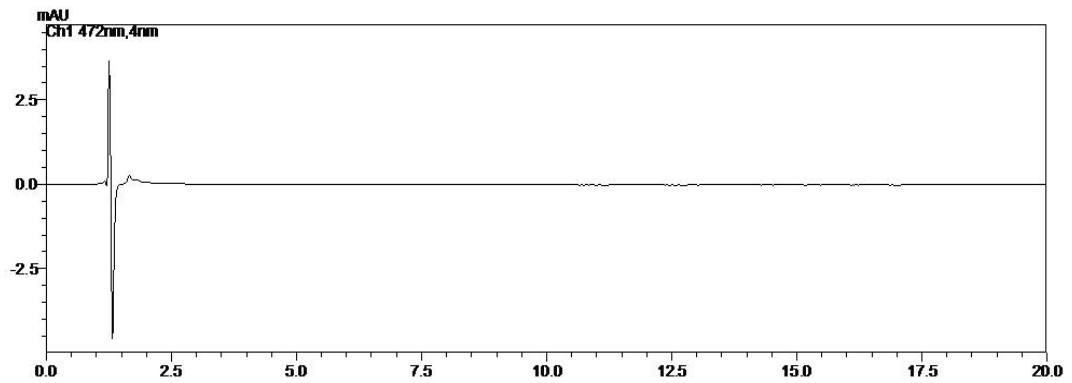


图 8 微囊化固体样品典型色谱图

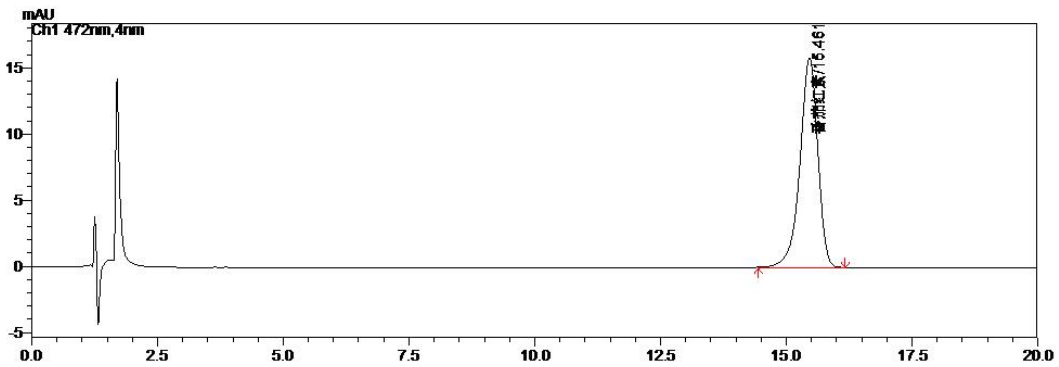


图 9 微囊化固体样品空白基质典型色谱图

2、检出限

选取空白样品基质 20 个平行样，分别添加估算检出限浓度的目标分析物，当目标分析物的检出概率不低于 95%时，定为检出限。

分别称取 0.25g 油溶性液体和一般性固体样品空白样品基质，各 20 份，添加 10 mg/100g 浓度水平的番茄红素，按标准规定进行处理后，测定番茄红素的检出率为 100%，因此本方法的检测限定为：当取样量 0.25g，定容体积至 100mL，进样量 5 μ L 时，方法检出限为 10mg/100g。

称取 0.1g 微囊化固体样品空白样品基质，各 20 份，添加 10 mg/100g 浓度水平的番茄红素，按标准规定进行处理后，测定番茄红素的检出率为 100%，因此本方法的检测限定为：当取样量 0.1g，定容体积至 100mL，进样量 5 μ L 时，方法检出限为 25 mg/100g。

表 4 检出限验证结果

基质	目标分析物检出数量	目标分析物检出率
油溶性液体样品	20	100%
一般性固体样品	20	100%
微囊化固体样品	20	100%
接受标准	目标分析物检出率 \geq 95%	
结论	本方法能够满足规定的检出限要求。	

3、定量限

分别称取 6 份 0.25g 油溶性液体样品和一般性固体样品的空白样品基质，按照 30 mg/100g 的浓度水平添加番茄红素标准物并进行独立检测。

称取 6 份 0.1g 微囊化固体样品的空白样品基质，按照 75 mg/100g 的浓度水平添加番茄红素标准物并进行独立检测；

该添加浓度水平测定结果的正确度和精密度见表 5。

表 5 定量限验证结果

测定次数	油溶性液体样品		一般性固体样品		微囊化固体样品	
	测定结果 (mg/100g)	信噪比	测定结果 (mg/100g)	信噪比	测定结果 (mg/100g)	信噪比
1	24.63	107.81	31.12	93.39	74.6	25
2	24.33	85.67	32.22	98.78	73.1	25
3	22.52	100.89	31.45	79.71	73.7	25
4	24.36	110.19	32.69	135.24	74.9	27
5	23.83	118.88	31.07	109.72	76.4	26
6	24.31	112.63	31.19	137.45	76.6	27
平均值	24.00	/	31.62	/	74.9	/
RSD(%)	3.2	/	2.1	/	1.72%	/
接受标准	目标分析物					
结论	本方法能够满足规定的定量限要求。					

4、测定范围

采用标准曲线法定量，分别吸取适量经标定合格后的番茄红素对照品溶液，用 BHT 二氯甲烷溶液稀释，并用棕色容量瓶定容，配制浓度范围为 0.25-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的番茄红素标准工作溶液。试验数据和结果见表 6。

表 6 标准曲线测定结果

物质名称	浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	峰面积	线性方程	相关系数
------	--------------------------------	-----	------	------

				r
番茄红素	0.25	18896	$y = 69017x + 3870.8$ $R^2 = 0.9997$	0.9997
	1	77950		
	5	358099		
	10	708918		
	25	1683541		
	50	3473609		

5、正确度

通过测定标准添加样品中已知量目标分析物的回收率获得方法的正确度。

称取 0.25g 油溶性液体基质样品和 0.25g 一般性固体基质样品各 6 份，添加 30 mg/100g、500 mg/100g 和 1000 mg/100g 3 个浓度水平。

称取 0.1g 微囊化固体基质样品各 6 份，添加 75 mg/100g、1000 mg/100g 和 3000 mg/100g 3 个浓度水平。

测定并计算回收率和精密度，验证结果如下：

表 7 标准曲线测定结果

基质	浓度水平 (mg/100g)	测定次数						平均回收率 (%)	RSD (%)
		1	2	3	4	5	6		
油溶性液体样品	30	92	94	87	91	89	94	91	3.0
	500	94	94	93	94	95	96	94	0.9
	1000	96	95	94	96	95	95	95	0.7
一般性固体样品	30	90	94	92	96	90	91	92	2.6
	500	95	96	97	97	95	96	96	1.0
	1000	98	97	97	97	98	99	98	0.8
微囊化固体样品	75	100	98	98	100	102	102	100	1.8
	1000	98	99	99	97	98	98	98	0.8
	3000	102	102	103	103	103	103	103	0.5
接受标准	1、 $100 \mu\text{g}/\text{kg} < \text{浓度水平} \leq 1000\text{mg}/\text{kg}$ 时，回收率应在 80%~110%之间，重复性相对标准偏差应 $\leq 5.0\%$ 。 2、浓度水平 $> 1\text{g}/\text{kg}$ 时，回收率应在 90%~105%之间，重复性相对标准偏差应 $\leq 2.0\%$ 。								

结论	回收率和重复性标准偏差均符合要求，方法准确度和重复性良好。
----	-------------------------------

6、标样放置稳定性

(1) 验证要求

标准溶液在-20℃不同时间储存条件下，其经放置后标定的番茄红素含量应与新配制标准溶液经标定的番茄红素含量无显著差异。

(2) 验证方法

根据标准溶液的性质，选择-20℃储存条件和时间间隔，采用同样的分析方法和分析条件对经放置后的和新配制的标准溶液进行含量标定，并以新配制的标准溶液定量经放置后的标准溶液浓度。

(3) 结果评价

对比经放置后的标准溶液采用标定方法标定的浓度与新配制的标液定量出的浓度无差异，说明标样放置 8 天的稳定性能够满足要求。

表 8 稳定性验证结果

成分名称	时间（天）	0	2	4	6	8
番茄红素	标定含量(mg/mL)	0.06751	0.06786	0.06734	0.06531	0.06565
	定量含量(mg/mL)	0.06751	0.06785	0.06732	0.06518	0.06564
	定量含量/标定含量	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	平均值	0.00		RSD	0.00%	

7、稳健性

(1) 验证要求

选取 3 种不同品牌的番茄红素对照品，配制后进行浓度标定，不同品牌的对照品标定结果应无明显差异。

(2) 验证方法

将标定后的对照品溶液进行液相上机检测，使用其中 1 种品牌的作为标准溶液定量其他 2 种品牌的标准溶液。

(3) 结果评价

以 1 种品牌的标准溶液定量其他两种品牌标准溶液的浓度与其标定浓度结果基本一致，说明该种标样的标定方式稳健性能够满足要求。

表 9 稳健性验证结果

品牌	配制浓度 mg/mL	标定浓度 mg/mL	标定/配 制	以品牌 1 定量浓度 mg/mL	相对偏 差%
品牌 1	0.09913	0.06526	65.83%	——	——
品牌 2	0.09933	0.09738	98.04%	0.09634	1.08%
品牌 3	0.10694	0.10387	97.13%	0.10192	1.92%

8、溶液稳定性

(1) 验证要求

三种不同基质试样溶液保存在不同时间条件下，其目标分析物含量应无显著差异。

(2) 验证方法

根据试样溶液的性质，选择不同的储存时间间隔，采用同样的分析方法和分析条件对标准溶液或样品溶液中的目标分析物进行测定。

(3) 结果评价

取样品溶液进行稳定性试验，分别测定放置 0、2、4、6、8 小时后的含量，样品含量无变化，说明样品溶液稳定性满足要求。

表 10 稳定性验证结果记录表格样例

基质	时间 (h)	0	2	4	6	8
油溶性 液体样 品	峰面积	1890505	1730013	1699880	1694882	1694758
	含量(g/100g)	1.10	1.00	0.983	0.980	0.980
	平均值(g/100g)	1.01		RSD	5.15%	

一般性 固体样 品	峰面积	1890505	1789568	1761585	1772777	1776638
	含量(g/100g)	1.10	1.04	1.02	1.03	1.03
	平均值(g/100g)	1.04		RSD	2.92%	
微囊化 固体样 品	峰面积	743490	749702	745880	751398	752140
	含量(g/100g)	1.103	1.112	1.106	1.114	1.116
	平均值(g/100g)	1.11		RSD	0.50%	

(四) 实验室间方法验证

本方法经过河北晨光检测技术服务有限公司、浙江省食品药品检验研究院、广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）、华测检测认证集团股份有限公司、仙乐健康科技股份有限公司等，根据标准草案进行实验室间验证（包括检出限、定量限、测定范围、正确性和再现性），测定结果符合要求，实际样品再现性比对结果见下表。

编号	番茄红素含量 (g/100g)					RSD%
	Lab1	Lab2	Lab3	Lab4	Lab5	
样品 1 FQ-01S 软胶囊	2.35	2.33	2.53	2.68	2.591	5.5
样品 2 FQ-01S-2 软胶囊	3.7	3.79	3.8	3.95	4.040	3.5
样品 3 FQ-02S 硬胶囊（一般固 体内容物）	0.097	0.11	0.0929	0.125（格 拉布斯检 验法排除）	0.096	8.2
样品 4 FQ-02S-2 硬胶囊（微囊化 固体内容物）	0.83	0.702	1.18（格拉 布斯检验 法排除）	0.916	0.816	9.4