ICS 67.050
CCS X 04

T/CS

团 体 标 准

T/CS 540—2026

番茄提取物多氢番茄红素含量测定高效液相色谱法

Determination of polydihydro lycopene content in tomato extract by high-performance liquid chromatography

2026－08－05 发布 2026－08－05 实施

中国商品学会 发 布

目　　次

前言 II
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　原理 1
5　试剂与材料 1
6　仪器和设备 2
7　试样的制备 2
8　分析步骤 3
9　结果计算 4
10　精密度 5
11　检出限与定量限 5
附录 A （资料性 ） 标准储备液浓度校正——紫外分光光度法 6

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。

本文件由江南大学提出。

本文件由中国商品学会归口。

本文件起草单位：江南大学、新疆中基天然植物纯化高新技术研究院有限公司、河北晨光检测技术服务有限公司、北京联合利来企业管理有限公司。

本文件主要起草人：张连富、李烨、张勇、张晓芳、焦利卫、范金余、杨正旭。

番茄提取物多氢番茄红素含量测定高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了用高效液相色谱法（HPLC）测定番茄提取物（粉末、油树脂、微囊粉等）中多氢番茄红素（主要包括八氢番茄红素Phytoene和六氢番茄红素Phytofluene）含量的方法，包括原理、试剂与材料、仪器和设备、试样制备、分析步骤、结果计算、精密度、检出限与定量限。

本文件适用于番茄提取物中八氢番茄红素和六氢番茄红素含量的测定。

注：若产品仅含八氢番茄红素，可按八氢番茄红素单项测定；若同时含有六氢番茄红素，可分别测定。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

多氢番茄红素 polyhydrolycopene

指番茄类胡萝卜素生物合成途径中番茄红素前体，包括八氢番茄红素（Phytoene，$C_{40}H_{64}$）和六氢番茄红素（Phytofluene，$C_{40}H_{62}$）。

4 原理

试样中的八氢番茄红素和六氢番茄红素用含抗氧化剂（BHT）的有机溶剂提取，经C_{30}反相色谱柱分离，二极管阵列检测器（DAD/PDA）检测，外标法定量。

5 试剂与材料

5.1 试剂

5.1.1 甲醇（CH_3OH）：色谱纯。

5.1.2 甲基叔丁基醚（MTBE，$C_5H_{12}O$）：色谱纯。

5.1.3 正己烷（C_6H_{14}）：分析纯。

5.1.4 丙酮（CH_3COCH_3）：分析纯。

5.1.5 乙酸乙酯（$C_4H_8O_2$）：分析纯。

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

5.2 试剂溶液

5.2.1 称取 1.0 g BHT，用正己烷溶解并定容至 1000 mL 棕色容量瓶，充氮密封，4℃避光保存，有效期 3 个月。

5.2.2 提取液比例为：

——正己烷：甲醇：丙酮＝2：1：1（V/V/V）；

——临用前加入 BHT 使终浓度约 0.02％，混匀。

5.2.3 定容液比例为：

——MTBE：甲醇＝1：1（V/V）；

——临用前配制。

5.2.4 八氢番茄红素标准物质（$C_{40}H_{64}$，CAS：540-05-6）：纯度大于或等于 95%。

5.2.5 六氢番茄红素（Phytofluene）对照品：CAS[27664-65-9]，纯度不低于 95%。
5.2.6 标准储备液（约 500 μg/mL）：精密称取对照品各适量（精确至 0.01 mg），用含 0.02%BHT 的乙酸乙酯溶解并稀释至 500 μg/mL，充氮避光置于-20℃保存或以下的冰箱保存，有效期 6 个月。标准储备液使用前宜按附录 A 进行紫外吸光度校正。
5.2.7 混合标准工作溶液：用定容液将标准储备液逐级稀释，配制至少 5 个梯度浓度，范围覆盖 2.5 μg/mL～50 μg/mL。

5.3 材料

5.3.1 有机相微孔滤膜：0.22 μm 或 0.45 μm，尼龙或 PTFE。
5.3.2 棕色容量瓶（10 mL、25 mL）、具塞锥形瓶（100 mL）、分液漏斗、无水硫酸钠等。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：配有二极管阵列检测器（DAD/PDA）或紫外检测器。
6.2 分析天平：感量 0.1 mg、0.01 mg。
6.3 旋转蒸发仪或氮吹仪：水浴温度可控不高于 40℃。
6.4 超声波清洗器。
6.5 离心机：不低于 3000 r/min。

7 试样制备

7.1 粉末样品（通则）

7.1.1 从均匀化的番茄提取物粉末样品中，精密称取约 0.2 g～0.5 g（m，精确至 0.0001 g）于 100 mL 具塞锥形瓶中，平行两份。同时做试剂空白（不加试样，同法操作）。
7.1.2 加入 30 mL 提取液（正己烷:甲醇:丙酮=2:1:1，含 0.02% BHT），盖塞，于超声波清洗器中超声提取 15 min（水温≤30 ℃），取出后转移至 250 mL 分液漏斗中，用 10 mL 提取液分两次洗涤锥形瓶，洗液合并入分液漏斗。加塞，剧烈振摇 3 min，静置分层。
7.1.3 弃去下层（水-甲醇-丙酮相），上层（正己烷相）收集至 100 mL 棕色容量瓶中。下层水相再用 20 mL 提取液重复萃取一次，合并上层有机相至同一容量瓶。用提取液定容至刻度（V=100 mL），混匀。
7.1.4 取部分溶液经 0.22 μm 有机相滤膜过滤后进样测定。
7.1.5 若试样浓度过高，可移取适量定容液（如 10 mL）于 40℃以下氮吹至近干，用定容液（MTBE:甲醇=1:1）复溶并定容至 10 mL，此时稀释倍数 f=定容液体积/移取体积（按实际计算）。

7.2 油树脂样品

7.2.1 精密称取约 0.2 g～0.5 g（m，精确至 0.0001 g）油树脂样品于 100 mL 具塞锥形瓶中，平行两份。同时做试剂空白。
7.2.2 溶解：先加入 5 mL 乙酸乙酯，轻轻摇动使油树脂完全溶解（必要时可超声辅助溶解，水温≤40 ℃，时间≤1 min）。
7.2.3 加提取液：加入约 30 mL 提取液（正己烷:甲醇:丙酮=2:1:1，含 0.02% BHT），盖塞，充分振摇 2 min～3 min。
7.2.4 转移与分液：将上述混合液全部转移至 250 mL 分液漏斗中，并用 10 mL 提取液分两次洗涤锥形瓶，洗涤液合并入分液漏斗。加塞，剧烈振摇 3 min～5 min，静置分层。
7.2.5 收集有机相：下层（水-甲醇-丙酮相）弃去，上层（正己烷相）收集至 100 mL 棕色容量瓶或具塞锥形瓶中。如有乳化，可加入少量饱和氯化钠水溶液（约 5 mL）破乳。
7.2.6 重复萃取：下层水相再用 20 mL 提取液萃取一次，合并上层有机相至同一容器。
7.2.7 脱水：合并后的有机相通过无水硫酸钠柱（约 5 g，置于漏斗中）脱水，收集滤液。
7.2.8 定容：用提取液或正己烷洗涤无水硫酸钠柱，洗液并入收集液，最后用提取液定容至 100 mL（V = 100 mL），混匀。
7.2.9 取部分溶液氮吹或旋蒸后复溶（可选，若需浓缩）：精密移取上述定容液 10 mL 至梨形瓶，于

不高于 40℃水浴旋转蒸发或氮吹至近干，立即用定容液（MTBE:甲醇=1:1） 溶解并转移至 10 mL 棕色容量瓶中，定容至刻度（此时稀释倍数 f = 10）。若浓度适中，也可不过滤浓缩直接进样。

7.2.10 过滤：用 0.22 μm 或 0.45 μm 有机相滤膜过滤至进样小瓶，供 HPLC 分析。

7.3 微囊粉样品

7.3.1 称样：精密称取约 0.2 g～0.5 g（m，精确至 0.0001 g）微囊粉样品，置于 100 mL 具塞锥形瓶中，记录样品质量。平行制备两份试样，同时制备一份试剂空白（不加样品，其余操作完全相同）。

7.3.2 破壁处理应符合下列规定：

——向锥形瓶中加入 10 mL pH ≈9.8 的氨-磷酸盐缓冲液（现配），加盖，摇匀使样品初步润湿分散；

——将锥形瓶置于 55℃±2℃水浴中，同时开启超声波清洗器，超声处理 15 min～20 min（水浴与超声可同步进行，或先水浴预热 5 min 后再超声）；

——处理期间每隔 5 min 取出振摇一次（约 10 s），使样品与缓冲液充分接触，促进壁材软化与内容物释放。

7.3.3 冷却：取出锥形瓶，用流动水（或冰水浴）快速冷却至 室温（约 25 ℃）。

7.3.4 提取应符合下列规定：

——向冷却后的锥形瓶中准确加入 30 mL 提取液（正己烷:甲醇:丙酮 = 2:1:1，含 0.02% BHT），盖紧瓶塞；

——置于超声波清洗器中，室温超声提取 15 min（水温控制≤30 ℃），使多氢番茄红素充分转移至有机相。

7.3.5 液-液分配应符合下列规定：

——将提取液全部转移至 250 mL 分液漏斗中，用 10 mL 提取液分两次洗涤原锥形瓶，洗涤液合并入分液漏斗；

——加塞，剧烈振摇 3 min～5 min，注意定时放气（约每 1 min 放气一次），静置 10 min～15 min 至分层清晰。

7.3.6 分层与收集应符合下列规定：

——弃去下层（水-甲醇-丙酮相，呈乳白或淡黄色），上层（正己烷相，呈橙红至无色，视含量而定）收集至 100 mL 棕色容量瓶中；

——若中间有乳化层，可加入 2 mL～3 mL 饱和氯化钠水溶液轻摇破乳，静置后再分离。

7.3.7 二次萃取：将下层水相重新放回分液漏斗中，再加入 20 mL 提取液，振摇 2 min，静置分层后，合并上层有机相至同一 100 mL 棕色容量瓶中。

7.3.8 定容：用提取液（正己烷:甲醇:丙酮 = 2:1:1，含 0.02% BHT）定容至 100 mL 刻度线（V = 100 mL），盖塞，颠倒混匀。

7.3.9 脱水（可选但推荐）：若有机相中含少量水珠，可将定容后的溶液通过装有约 5 g 无水硫酸钠的漏斗（漏斗颈部放少许脱脂棉）过滤至另一洁净锥形瓶中，弃去初滤液 2 mL～3 mL，收集后续滤液。

7.3.10 稀释或浓缩（视浓度而定）：若直接进样浓度适中：取上述滤液经 0.22 μm 有机相滤膜（尼龙或 PTFE）过滤至进样小瓶，待测。

7.3.11 若浓度超出标准曲线范围：精密移取滤液 5 mL 或 10 mL（记为 V_1 ）于 25 mL 梨形瓶中，在≤40℃ 水浴中旋转蒸发或氮吹至近干，立即用 定容液（MTBE:甲醇 = 1:1） 溶解并转移至 10 mL 棕色容量瓶中，定容至刻度（V_2 =10 mL），此时，稀释倍数 $f=V_2/V_1$（如移取 10 mL 浓缩至 10 mL，则 f = 1；若移取 5 mL 浓缩至 10 mL，则 f=2）。过滤后进样。

注：试剂空白同法操作，用于扣除背景。

8 分析步骤

8.1 色谱参考条件

色谱参考条件应符合表1的规定。

表 1　色谱参考条件

项目	参数
色谱柱	C_{30}柱，250 mm×4.6 mm，5 μm（或性能相当者）
柱温	25℃±5℃
流速	1.0 mL/min
检测波长	若使用二极管阵列检测器（DAD/PDA）：八氢番茄红素286 nm，六氢番茄红素348 nm（同时采集双波长）；若使用紫外检测器（UV）：根据目标物设置单波长（八氢番茄红素为286 nm，六氢番茄红素为348 nm）；如需同时测定两种组分，应选用具双波长模式的紫外检测器，或分两次进样测定
进样体积	10 μL～20 μL
流动相A	MTBE：甲醇＝80：20（V/V）
流动相B	甲醇：MTBE：水＝90：5：5（V/V/V）

8.2　梯度洗脱程序

梯度洗脱程序应符合表2的规定。

表 2　梯度洗脱程序

时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0	40	60
15	60	40
25	85	15
30	40	60
35	40	60
注：35 min后停止采集，继续运行至40 min以平衡色谱柱。		

8.3　标准曲线的绘制

将5.2.7混合标准工作溶液按8.1色谱条件进行测试，测定相应的峰面积，以质量浓度ρ（μg/mL）为横坐标、峰面积A为纵坐标，绘制标准曲线。

8.4　试样测定

将试样溶液进样，记录保留时间及峰面积，与标准品保留时间对照定性，用外标法计算浓度。若峰面积超出线性范围，用定容液适当稀释后重新测定。

8.5　空白试验

除不加试样外，按8.1～8.3相同步骤操作，空白值应低于定量限的1/5，否则需在计算时扣除。

9　结果计算

试样中各组分（八氢番茄红素或六氢番茄红素）含量按式(1)计算：

$$X_i = \frac{p_i \times V \times f}{m} \times 100 \cdots\cdots (1)$$

式中：

Xi——试样中组分i的含量，单位为微克每百克（μg/100 g）；

pi——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（μg/mL）；
V——试样定容体积，单位为毫升（mL）；
f——稀释倍数；
m——试样的取样量，单位为g；
100——换算系数。
注：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。

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得超过算术平均值的10%。

11 检出限与定量限

当称样量m＝0.5 g、定容体积V＝10 mL时：
——八氢番茄红素、六氢番茄红素的检出限（LOD，S/N＝3）约为 3 μg/g（即 0.3 mg/100 g）；
——定量限为 50μg/g。
——可根据实际称样量和定容体积按比例推算。

附 录 A
（资料性）
标准储备液浓度校正——紫外分光光度法

A.1 取标准储备液适量，用含 0.02%BHT 的正己烷或乙酸乙酯稀释至适宜浓度，用 1 cm 石英比色皿，以相同溶剂为参比，于最大吸收波长（八氢番茄红素≈286 nm，六氢番茄红素≈348 nm）测定吸光度 A，按公式校正实际浓度：

$$c = \frac{A}{E_{lcm}^{1\%} \times l} \quad \cdots\cdots (A.1)$$

式中：

$E_{lcm}^{1\%}$——百分吸光系数（参照标准品证书或文献）；

l——光程（cm）；

A——实测吸光度；

C——标准储备液的实际浓度，单位为克每百毫升（g/100mL）。

A.2 各组分百分吸光系数（$E_{lcm}^{1\%}$）取值见表 A.1。

表 A.1 各组分百分吸光系数取值

组分	测定波长（nm）	$E_{lcm}^{1\%}$	说明
六氢番茄红素（Phytofluene）	348	1557	该值为正己烷或乙酸乙酯中的参考值，文献值可能存在波动，建议以标准品证书标示值为准；如证书未提供，可参考本值
八氢番茄红素（Phytoene）	286	按所用标准品证书标示值	该值因溶剂、标准品来源及纯度差异较大，应以所购对照品附带的证书（CoA）上给出的 $E_{lcm}^{1\%}$ 为准，不可使用通用经验值替代
注：标准储备液浓度校正操作应在 避光、充氮（如有条件）条件下快速完成，防止光氧化降解。稀释液及参比液均应含0.02% BHT 作为抗氧化剂。			