

《凝胶糖果中叶黄素酯的测定》团体标准（征求意见稿）

编制说明

一、工作简况

（一）项目来源

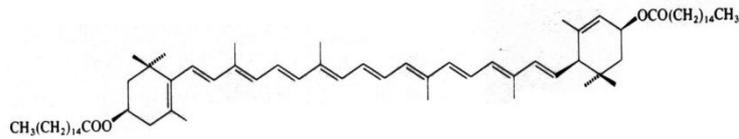
项目由北京理化分析测试技术学会，由杭州丁香健康管理有限公司、江苏艾兰得营养品有限公司、艾兰得营养品泰州有限公司、大连医诺生物股份有限公司、河北晨光检测技术服务有限公司、青岛藻蓝生物有限公司、晨光生物科技集团股份有限公司、中轻技术创新中心有限公司、天津科技大学、青岛市华测检测技术有限公司、通标标准技术服务（上海）有限公司、北京市产品质量监督检验研究院和北京市营养源研究所等单位负责该标准的起草工作。

（二）目的意义

叶黄素（Lutein）是目前已知的仅有的存在于人视网膜和晶状体中的类胡萝卜素。叶黄素稳定性较差，常以叶黄素酯（lutein esters）的形式存在。叶黄素酯广泛存在于万寿菊花、南瓜、甘蓝、苜蓿等植物体内。叶黄素酯在万寿菊花中含量最为丰富，因此，万寿菊花是叶黄素酯的重要工业来源。

叶黄素酯有多种生物学功能，可通过清除自由基、猝灭单线态氧和降低光化学敏感剂等作用发挥其抗氧化作用；可在人眼视网膜内部形成一种有效的蓝光过滤器，在蓝光到达感受器之前削弱或吸收掉蓝光，起到保护视觉感受器免受蓝光损害的作用，并对预防老年性黄斑变性（AMD）和白内障，以及白内障术后视力恢复具有独特功效；可通过抗氧化、抗炎及蓝光过滤作用及其本身独特的分子结构，起到保护大脑健康，预防认知功能减退的作用；可通过抑制低密度脂蛋白氧化过程，减缓动脉粥样硬化进程；作为天然色素，通过饲料或加工过程调节食品色泽。

叶黄素酯于2008年被批准为新资源食品（中华人民共和国卫生部公告，2008年第12号）。公告中给出叶黄素酯化学名称：叶黄素二棕榈酸酯（CAS注册号：547-17-1）；分子式为 $C_{72}H_{116}O_4$ 分子量为1045.71；其结构式如下。根据公告，叶黄素酯可用于焙烤食品、乳制品、饮料、即食谷物、冷冻饮品、调味品和糖果，但不包括婴幼儿食品。市场上，常用于糖果（尤其是凝胶糖果）的生产中。



叶黄素不稳定，因此，在相关产品中，多添加叶黄素酯，而非叶黄素，因此，以叶黄素酯来计量更加符合产品实际情况。凝胶糖果基质复杂，待测组分分离提纯复杂，导致凝胶糖果中叶黄素酯测定困难，且无相关标准可依。因此，相关产品中叶黄素酯含量常用添加量而非用标示量来计量，也没有科学的方法来对其添加量进行验证和监管。产品中的叶黄素酯会因氧化等因素而出现逐渐降解的情况，而作为叶黄素酯产品中的主要功能成分，叶黄素酯的含量高低直接影响消费者的利益，因此，通过对产品中叶黄素酯的精准测量来确认产品货架期，以及产品保质期内叶黄素酯含量对产品质量的控制和消费者权益保护具有重要意义。

（三）简要编制过程

2021年11月-2022年3月，由杭州丁香健康管理有限公司、江苏艾兰得营养品有限公司、艾兰得营养品泰州有限公司、中轻技术创新中心有限公司等公司组成标准立项准备工作组，对凝胶糖果中叶黄素酯的测定方法进行可行性评估和初步验证，开展立项准备工作。

2022年3月，标准立项准备工作组北京理化分析测试技术学会提出《凝胶糖果中叶黄素酯的测定》立项建议。

2022年4月，北京理化分析测试技术学会正式批复立项。标准立项准备工作组协调组建起草工作组。

2022年5月-7月，对前期初步确认的方法进行方法验证，验证结果符合要求。

2022年7月-8月，开展实验室比对工作，结果符合要求。起草工作组在方法验证和实验室比对基础上，提出标准文本的征求意见稿。

二、 标准编制原则和主要内容

1、 标准编制原则

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，促进叶黄素酯凝胶糖果行业提高产品质量，保护消费者权益，确保标准的科学性、先进性、可操作性。

2、 主要内容

本文件规定了以明胶、果胶或其混合胶为基质的凝胶糖果中叶黄素酯的液相色谱测定方法。
本标准适用于以明胶、果胶或其混合胶为基质的凝胶糖果中叶黄素酯的液相色谱测定。

三、 主要试验（或验证）情况分析

（1）**方法线性关系**：以叶黄素为定量外标，在0.1~6 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内，相关系数 R^2 大于0.999，线性关系良好。（2）**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。（3）**方法加标回收率**：该方法的回收率在97.17%~98.89%范围区间，回收率的RSD在0.08%~1.49%范围区间，说明该方法精确度较好，能够满足凝胶糖果中叶黄素酯的准确测定。（4）**方法准确性**：方法验证基础上，起草工作组组织6家实验室进行验证，结果符合验证比对要求。

具体方法验证和实验室比对情况见附件一。

四、 标准中涉及的专利

无。

五、 产业化情况、推广应用论证和预期达到的经济效果等情况

该标准的实施，将解决目前凝胶糖果中叶黄素酯含量测定方法标准不足的问题，对维护消费者利益，促进行业持续良性发展具有非常重要的意义。

六、 与我国有关法律和其他标准的关系

1、国内标准情况简要说明

目前，国内没有关于食品中叶黄素酯的测定方法的国家、行业或团体标准。国内已发布的可以参考的标准中，GB 26405-2011《食品安全国家标准 食品添加剂 叶黄素》，该方法适用于基质单一或叶黄素纯度较高的物质。B 5009.248-2016《食品安全国家标准 食品中叶黄素的测定》适用于婴幼儿配方奶粉、乳品、冷冻饮品、米面制品、焙烤食品、果酱、果冻和饮料中叶黄素的测定，**但对凝胶糖果类的产品并不适用**。DB64/T 1514-2017《枸杞及枸杞籽油中玉米黄质、 β -胡萝卜素和叶黄素的测定》仅适用于**枸杞及枸杞籽油**的测定，范围较窄。目前国内外针对凝胶糖果中叶黄素酯的检测标准属于技术空白。因此，有必要制定凝胶糖果中叶黄素酯的测定方法标准，实现对相关产品的准确测定，方便企业质量控制和政府机构监管。

2、该项目未采用国际标准或国外先进标准。

3、该标准从叶黄素酯行业的实际情况出发，参考了国内外相关资料，体现了科学性、先进性和可操作性原则，在制定过程中充分考虑成品成分复杂的情况；与相关标准法规标准协调一致。该项目与国

内标准配套成体系。

七、 国外有关法律、法规和标准情况的说明

国外有联合国粮农组织世界卫生组织（FAO/WHO）的食品法典委员会下的食品添加剂联合专家委员会制订的《LUTEIN ESTERS FROM TAGETES ERECTA (JECFA-2016)》，另外各生产企业制定了适用于企业内部的产品标准和检测方法。

八、 重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

九、 其它应予说明的事项

无。

凝胶糖果中叶黄素酯的测定方法学验证

（一）方法原理

凝胶糖果经粉碎、酶解后，通过有机溶剂提取样品中叶黄素酯，经皂化反应后转化为叶黄素，经C₃₀色谱柱分离，液相色谱-紫外检测器测定，通过保留时间定性、外标法定量。

（二）操作步骤

1、具体操作步骤

取不少于20粒样品（对于不同色泽或风味混装的样品，则按色泽或种类均匀取样），在含有液氮的低温容器中浸泡约10 min，取出后立即用匀浆仪粉碎，使之形成均匀的粉末或颗粒。称取适量（0.5~3 g）粉碎后的样品置于50 mL离心管中，加入0.35 g果胶（(5.1.10)、0.35 g胰（(5.1.1)）和10 mL水，混匀，置于50 °C恒温水浴振荡直至样品完全溶解。在溶解液中加入3 g氯化钠（5.1.7），混匀，加入15 mL无水乙醇（5.1.3），振荡3 min，加入15 mL正己烷（5.1.6），剧烈振荡1 min，离心（3500 r/min，1 min）或静置分层，转移上部正己烷层清液，重复提取3~5（第二次起加入正己烷的量可适当减），合并上层提取液，用氮吹仪吹干或40 °C条件下旋蒸蒸至近干。加入20 mL乙醇，涡旋或超声溶解残渣，混匀，加入0.4 g/mL氢氧化钾-甲醇溶液2 mL，置于55 °C水浴锅中水浴皂化30 min，取出冷却至室温，转移至50 mL棕色容量瓶中，用0.1%BHT乙醇溶液（5.2.2）定容至刻度。

注：50°C恒温水浴振荡期间，可将样品取出涡旋1-2次以加快样品水解。

2、操作步骤说明

（1）试剂和耗材要求。叶黄素标准品（CAS号：127-40-2）：市面上叶黄素标准品虽多标称纯度≥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。由于叶黄素容易降解，叶黄素标准品在每次使用前均需校正，经起草工作组验证，校正后的标准品对测定结果影响不大。综上所述，标准文本中并未规定叶黄素标准品的纯度。由于叶黄素标准品比较敏感，因此，起草工作组参考GB 5009.248-2016《食品安全国家标准 食品中叶黄素的测定》标准，规定该标准溶液充氮避光置于-20°C或以下的冰箱保存可保存6个月。

（2）称样。确保待测样的均一性和代表性，应取不少于20粒凝胶糖果；凝胶糖果产品中可能存在不同颜色或风味的产品，取样的时候应注意不同颜色或风味的产品均匀取样，以保证待测样的均一性和代表性。在含有液氮的低温容器中浸泡约10 min，取出后立即用匀浆仪粉碎。如多个样品同时开展试验，应确保样品粉碎前一直保持在液氮环境下，以避免因样品温度回升和吸潮而导致的样品粉碎困难的

情况出现，粉碎前始终在液氮环境下浸泡的样品，一般为细小颗粒状态，方便后续称量和水解；而粉碎前提早从液氮中取出的样品，粉碎度较大、微孔较少，导致称量困难且水解时间延长。考虑到市场上不同产品中叶黄素酯的含量、样品处理过程中试剂和酶制剂的使用量，以及酶解皂化时间，确定取样量在 0.5~3 g，一般能达到测定要求，文本中也规定，超过线性范围则应稀释或浓缩后再进行分析。粉碎后的样品置于 50 mL 离心管中，为后续样品水解做准备。

(3) 样品酶解。经调查，市场上的凝胶糖果基质多为果胶、明胶或其混合胶，因此，选择果胶酶和胰酶进行基质水解。称取适量 (0.5~3 g) 粉碎后的样品置于 50 mL 离心管中，加入 0.35 g 果胶酶、0.35 g 胰酶，加入 10 mL 水，混匀，置于 50 °C 恒温水浴振摇直至样品溶解。50 °C 恒温水浴振摇期间，可将样品取出涡旋 1-2 次以加快样品水解。

(4) 待测物质提取。在溶解液中加入 3 g 氯化钠，混匀 (用以增加离子强度，防止乳化，提高萃取效果，提高萃取率)。加入 15 mL 乙醇，振摇 3 min (用于叶黄素酯的溶解)，加入 15 mL 正己烷，剧烈振摇 1 min，静置或离心 (经验证，静置或离心不会对结果产生显著影响)，待溶液分层后转移上部正己烷层清液，重复提取至提取完全，一般情况下至少 3 次，第二次起加入正己烷的量可适当减少，合并上层正己烷层，用氮吹仪吹干或 40 °C 旋蒸至近干 (经验证，氮吹或旋蒸不会对结果产生显著影响)。

(5) 皂化反应。加入 20 mL 乙醇，混匀，加入 0.4 g/mL 氢氧化钾-甲醇溶液 2 mL，置 55 °C 水浴锅中水浴皂化 30 min，取出冷却至室温，用 0.1%BHT 乙醇定容至刻度。由于上一步操作 (待测物提取) 中有氮吹、旋蒸或旋蒸后氮吹多种操作可选择，所用容器不确定，因此，本操作中未规定使用何种容器进行皂化。

(6) 样品测定。参考色谱条件如下：①色谱柱：C₃₀ 柱 250 mm×4.6 mm，5.0 μm；②流动相：甲醇：乙酸乙酯=80：20 (体积比)；③流速：1.5 mL/min；④检测波长：445 nm；⑤进样体积：20 μL；⑥柱温：30 °C；⑦等度洗脱。

3、其他注意事项

(1) 操作和保存环境说明

叶黄素酯与空气接触时易氧化，且对光较敏感，叶黄素稳定性则进一步降低。因此，在操作和保存过程中应尽量避免光，并降低与氧气的接触时间。因此，在操作和储存过程中应注意避光和避免接触空气 (标准储备液应充氮冷冻保存 6 个月内，且每次使用前均需校准；标准中间液建议现配现用，尽量减少与空气的接触时间)。

(2) 顺式和反式叶黄素的定性

由于在样品提取过程中，温度、光照等原因可使部分反式结构的叶黄素发生异构化，可按以下步骤获得顺式叶黄素，用于确定异构化的叶黄素定性：以乙醇为溶剂，配制 800 $\mu\text{g/L}$ 的叶黄素标准溶液 50 mL，加入 2 mL 碘的乙醇溶液（5.2.3），摇匀，混合液在太阳光或日光灯下放置 30 min，可获得顺式结构的叶黄素。经光碘异构化的反式叶黄素标准溶液色谱图参见图 1。

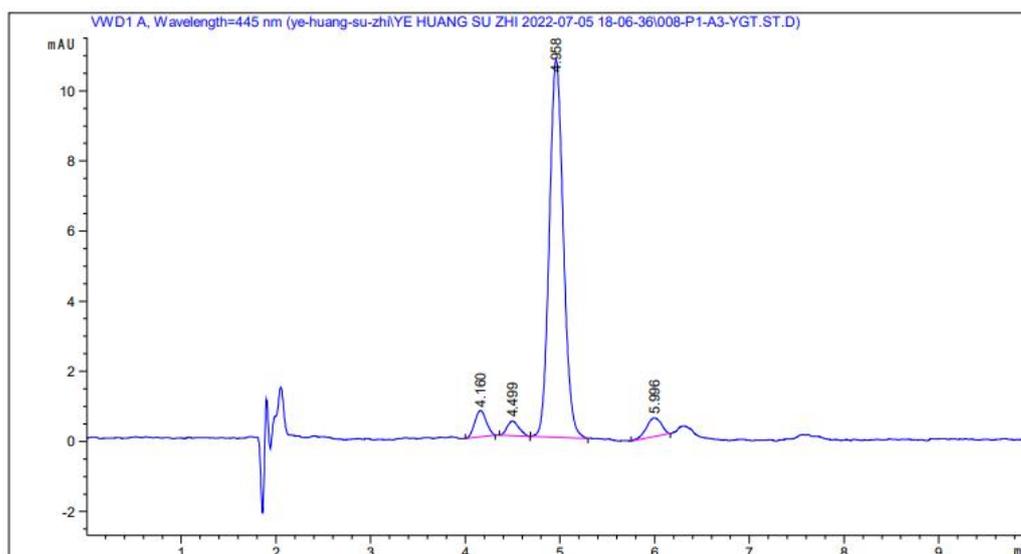


图1 经光碘异构化的反式叶黄素标准溶液色谱图

(3) 叶黄素标准溶液浓度校正方法

叶黄素极易氧化，因此，叶黄素标准溶液应尽量避免接触氧气，且叶黄素标准储备液在配置后、使用前需校正，为方便系列标准溶液的配制，需配制标准中间溶液，因此，在配制标准中间液前进行叶黄素标准储备液的校正，操作方法是：在445 nm波长下准确吸取1.0 mL标准储备液于100 mL棕色容量瓶中，用无水乙醇定容至刻度，摇匀。移取该溶液至1 cm 的石英比色皿中，以乙醇为空白，以分光光度计在445 nm波长下测定吸光值A。按下式计算标准溶液浓度。

$$C_{\text{标}} = \frac{A \times 100}{255 \times 1} \times 1000 \times F$$

式中：

$C_{\text{标}}$ ——标准溶液浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

A——叶黄素标准溶液在445 nm处吸光度值；

255——无水乙醇中叶黄素标准品在445 nm波长下的吸光系数，单位为 $\text{L/g} \cdot \text{cm}$ ；

100——稀释倍数；

1——比色皿厚度，单位厘米（cm）；

1000——单位换算系数（g/L转化为 $\mu\text{g/mL}$ ）

F ——校正系数，通过以下方式获得：用液相色谱分析校正后的标准溶液，将色谱图上溶剂峰以外的所有可见色谱峰面积加和作为总峰面积，其中反式叶黄素峰面积除以总峰面积所得值为校正系数。

需要说明的是：经起草工作组验证，市场上的部分叶黄素标准品中除玉米黄质外，还有少量其他杂质，而这些成分在445 nm下往往有吸光值，因此，在标准溶液校正过程中，计算校正系数 F 时，应以除溶剂峰外的所有可见峰面积之和作为总峰面积。叶黄素对照品色谱图见图2。

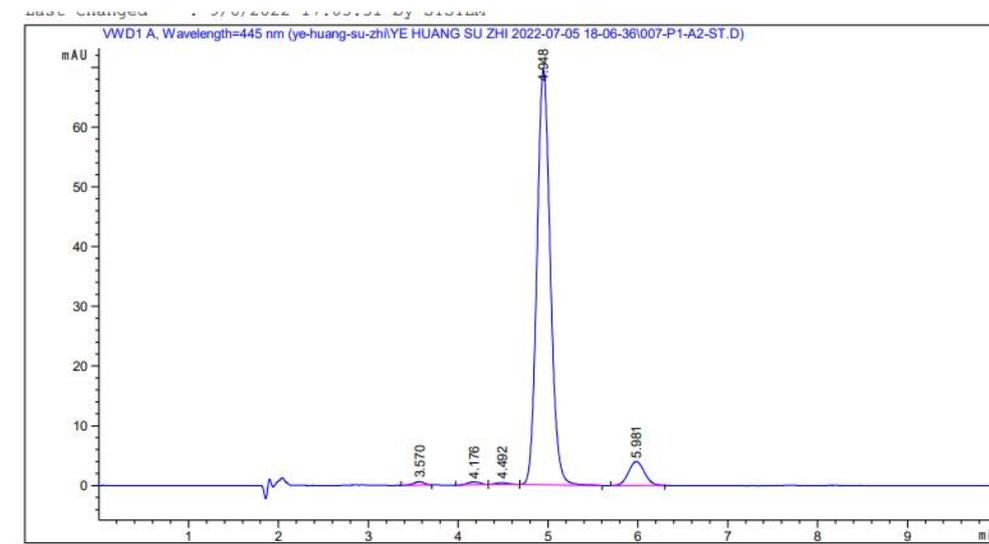


图2 叶黄素标准品谱图

(三) 方法验证

起草工作组按照GB/T 32465-2015 《化学分析方法验证确认和内部质量控制要求》和《食品安全国家标准 化学分析方法验证通则（征求意见稿）》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，由起草单位负责制备了三组含叶黄素酯的凝胶糖果样品和对应的空白凝胶糖果样品。

1. 专属性

配制产品空白辅料，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 1。

表 1 凝胶糖果中叶黄素酯的测定专属性验证结果

样品代码	叶黄素色谱峰保留时间 (min)	产品空白辅料色谱峰保留时间 (min)	样品溶液叶黄素峰与相邻峰的分度
OG0J	4.9	无	1.8
PG0D	4.9	无	1.7
OG10	4.9	无	1.8
接受标准	1、产品空白辅料图谱中无叶黄素色谱峰或附近无显著干扰峰		

	2、产品空白辅料与叶黄素色谱峰分离度 >1.5 或无色谱峰
结论	空白辅料不干扰主成分测定

三个样品的测定谱图见图 3-5。

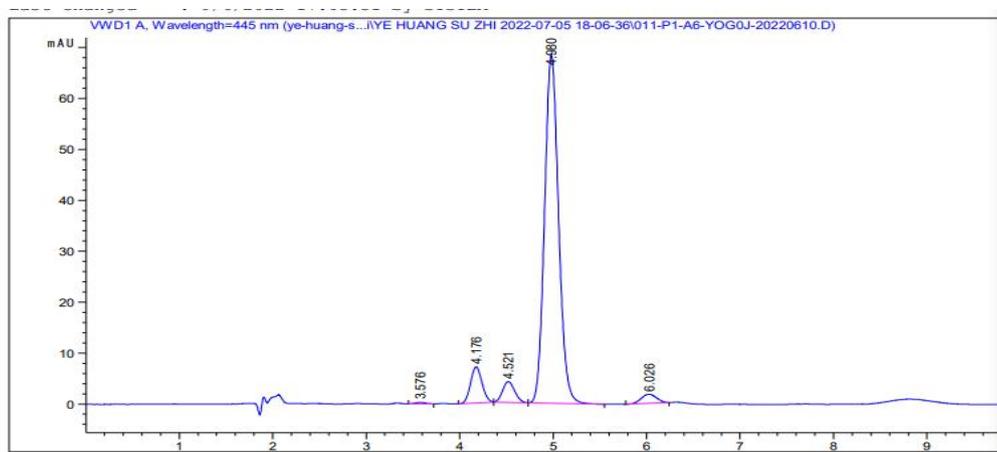


图 3 样品（代码 OG0J）谱图

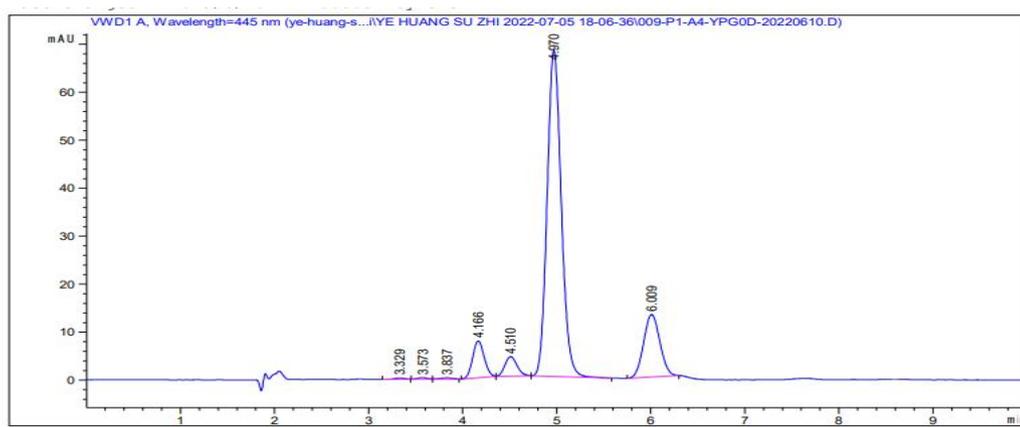


图 4 样品（代码 PG0D）谱图

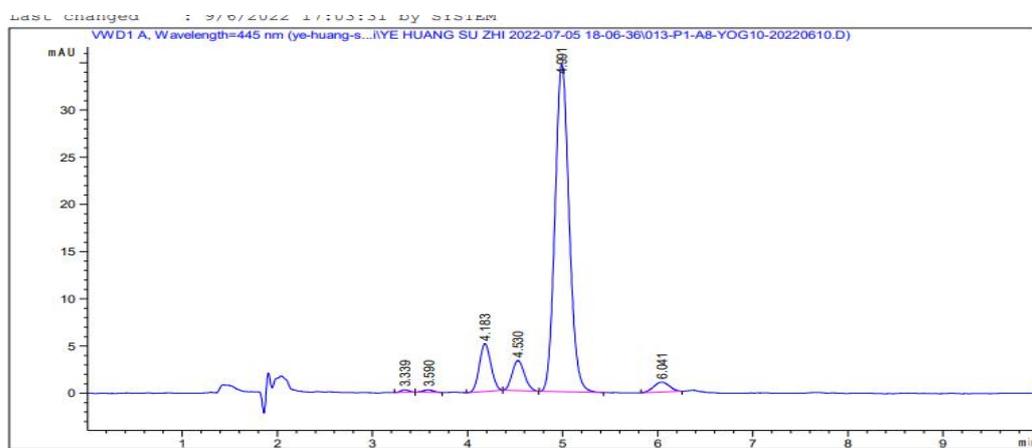


图 5 样品（代码 OG10）谱图

2.精密度

(1) 含量测定精密度

称取样品 6 份，进行测定，计算样品中叶黄素酯的含量。试验数据和结果见表 2。

表 2 含量测定精密度验证结果

样品代码	样品	第 1 份	第 2 份	第 4 份	第 5 份	第 6 份
OG0J	含量 (mg/g)	2.790	2.809	2.744	2.717	2.687
	平均值 (mg/g)	2.74	RSD	接受标准: RSD 应 \leq 10%		
PG0D	含量 (mg/g)	2.441	2.411	2.470	2.423	2.507
	平均值 (mg/g)	2.45	RSD	接受标准: RSD 应 \leq 10%		
OG10	含量 (mg/g)	0.0701	0.0709	0.0717	0.0694	0.0715
	平均值 (mg/g)	0.0709	RSD	接受标准: RSD 应 \leq 10%		
结论	本品含量测定的 RSD \leq 10%(n=6), 表明该测定含量的方法精密度很好。					

(2) 中间精密度

取同一批样品，同一人员在不同仪器上及不同人员在同样仪器上检测样品的含量，考察仪器及人员差异。试验数据和结果见表 3。

表 3 中间精密度验证结果

仪器 含量 (mg/g)	HPLC1	HPLC2	HPLC1	平均含量 (mg/g)	相对偏差
分析人员	分析员 A	分析员 A	分析员 B		
OG0J	2.74	2.73	2.79	2.75	1.2%
PG0D	2.45	2.31	2.32	2.36	3.3%
OG10	0.0709	0.0688	0.0699	0.0699	1.5%
接受标准	相对偏差应 \leq 15%				
结论	本方法通用性很好，不同人员、不同仪器之间的差异很小。				

3.回收率

按实验样品工艺配方比例称取叶黄素酯原料及空白辅料，叶黄素酯原料加入量为配方量的 50%、100%、150%和 300%，按含量测定的方法操作，注入高效液相色谱仪，记录色谱图，计算回收率。试验数据和结果见表 4。

表 4 回收率验证结果

样品代码	编号	主成分加入量	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD
OG0J	1	50%	98.06	97.77	0.28%

	2	100%	97.74	98.47	0.09%	
	3		97.51			
	4		98.39			
	5	150%	98.47	97.17	0.22%	
	6		98.56			
	7		96.93			
	8	接受标准	回收率应在 90~105%之间			
	9		97.33	97.25		
	PG0D	1	50%	97.30	97.55	0.22%
2		97.66				
3		97.68				
4		100%	98.62	98.32	0.28%	
5			98.26			
6			98.09			
7		150%	96.62	96.58	0.08%	
8			96.49			
9			96.62			
接受标准	回收率应在 90~105%之间					
OG10	1	50%	98.42	98.89	0.43%	
	2		99.25			
	3		99.01			
	4	100%	99.06	98.22	1.49%	
	5		99.07			
	6		96.53			
	7	150%	96.82	97.64	0.75%	
	8		97.88			
	9		98.22			
接受标准	回收率应在 80~110%之间					
结论		回收率符合要求，方法准确度良好				

4.线性和范围

用一贮备液经精密稀释，制备一系列（0、25%、50%、100%、150%、200%、300%）供试样品溶液。以测得的响应信号作为被测物浓度的函数作图再进行线性回归。试验数据和结果见表 5。

表 5 线性和范围验证结果

浓度（ $\mu\text{g/mL}$ ）	0	1.0667	2.1334	4.2668	6.4002	8.5336	12.8004
平均峰面积	0	203.24	407.21	804.50	1229.61	1637.35	2440.39
线性方程	$Y=191.0943X-0.6330$						
R	0.9999						
范围	0 - 12.8 $\mu\text{g/mL}$						

5 定量限

以空白样品为基质配制定量溶液，以信噪比 S:N=10:1 时的浓度作为定量限。试验数据和结果见表 6。起草工作组验证最低定量量为 1.85 $\mu\text{g/g}$ ，考虑标准执行过程中的一些人员、设备、环境等因此的变化，文本中规定：以称取样品质量 3 g，定容体积 50 mL 计，本方法的定量限为 3 $\mu\text{g/g}$ 。

表 6 定量限验证结果

样品代码	信噪比 (S: N=10:1)
	最低定量
OG0J	当样品称量为 3g，定容至 50 mL 时，定量量为 1.85 $\mu\text{g/g}$ 。
PG0D	当样品称量为 3g，定容至 50 mL 时，定量量为 1.85 $\mu\text{g/g}$ 。
OG10	当样品称量为 3g，定容至 50 mL 时，定量量为 1.85 $\mu\text{g/g}$ 。

6 检测限

以空白样品为基质配制定量溶液，以信噪比 S:N=3:1 时的浓度作为检测限。试验数据和结果见表 7。起草工作组验证最低检测限为 0.68 $\mu\text{g/g}$ ，考虑标准执行过程中的一些人员、设备、环境等因此的变化，文本中规定：以称取样品质量 3 g，定容体积 50 mL 计，本方法的检测限为 1 $\mu\text{g/g}$ 。

表 7 检测限验证结果

样品代码	信噪比 (S: N=3:1)
OG0J	当样品称量为 3g，定容至 50 mL 时，检测限为 0.68 $\mu\text{g/g}$ 。
PG0D	当样品称量为 3g，定容至 50 mL 时，检测限为 0.68 $\mu\text{g/g}$ 。
OG10	当样品称量为 3g，定容至 50 mL 时，检测限为 0.68 $\mu\text{g/g}$ 。

7 耐用性

(1) 样品溶液稳定性

取样品溶液进行稳定性试验，分别测定放置 0、2、4、6、8、10 小时后的含量。试验数据和结果见表 8。

表 8 样品溶液稳定性验证

样品代码	时间	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h
OG0J	峰面积	712.91	708.66	705.65	698.84	694.10	688.00
	含量 (mg/g)	2.679	2.661	2.651	2.629	2.615	2.597
	平均值 (mg/g)	2.64		RSD	1.2%		
PG0D	峰面积	721.31	719.42	713.75	710.01	701.99	695.48

	含量 (mg/g)	2.311	2.303	2.286	2.277	2.254	2.237
	平均值 (mg/g)	2.28		RSD	1.3%		
OG10	峰面积	358.93	357.22	357.43	357.05	356.84	356.48
	含量 (mg/g)	0.0684	0.0681	0.0681	0.0681	0.0681	0.0682
	平均值 (mg/g)	0.0682		RSD	0.18%		
接受标准		RSD 应 \leq 5.0%					
结论		样品溶液放置 10 小时后稳定					

(2) 皂化温度影响

取同一批样品，更改皂化温度，将温度分别设置 50℃、55℃、60℃进行检测的含量，考察更改皂化温度的差异。试验数据和结果见表 9。

表 9 更改皂化温度表格

皂化温度 含量(mg/g)	50℃	55℃	60℃	平均含量 (mg/g)	RSD
分析人员	分析员 A	分析员 A	分析员 A		
OG0J	2.53	2.59	2.56	2.56	1.2%
PG0D	2.25	2.27	2.25	2.26	0.52%
OG10	0.0645	0.0690	0.0682	0.0672	3.6%
接受标准	RSD 应 \leq 15%				
结论	本方法通用性好，皂化温度在 50-60℃之间无影响。				

(四) 实验室间方法验证

选择 4 个样品（其中样品 3 与样品 4 为不同批次的同一产品，生产周期间隔约 3 个月），对本方法进行实验室间验证，经中轻技术创新中心有限公司、河北晨光检测技术服务有限公司、通标标准技术服务（上海）有限公司、青岛市华测检测技术有限公司、北京市产品质量监督检验研究院和中国食品发酵工业研究院有限公司 6 家实验室进行验证，结果符合要求，具体验证结果见附表 10。实验室间比对数据经格拉布斯法（Grubbs）检验法验证是否有离群值后，通过经典统计方法进行数据处理。样品 1、样品 3、样品 4 测定结果稳定，不同实验室间 RSD 理想。样品 2 由于样品中叶黄素酯含量较低，与其余样品相比，不同实验室间 RSD 较大，经格拉布斯法（Grubbs）检验法验证，所有参与实验室测定结果无离群值，且 RSD 为 12.8%，满足文本中规定的“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 15%”的要求。

表 10 实验室间方法验证结果

实验室编号	叶黄素酯含量 (mg/g)			
	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4
Lab1	3.66	0.0958	2.54	2.65
Lab2	3.70	0.0817	2.60	2.75
Lab3	3.48	0.0890	2.46	2.72
Lab4	3.64	0.0715	2.41	2.76
Lab6	3.24	0.0812	2.49	2.48
RSD	5.18%	12.8%	2.7%	4.5%