

T B

团体标准

T/ NAIA×××-××××

葡萄酒中 5 种花色苷的测定
液相色谱-串联质谱法

2022-××-××发布

2022-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前 言

本标准按照 GB/T1.1-2020 给出的规则起草。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区食品检测研究院（国家市场监管重点实验室（枸杞和葡萄酒质量安全））、宁夏回族自治区标准化研究院、银川海关技术中心、宁夏化学分析测试协会、宁夏农产品质量标准与检测技术研究所。

本文件主要起草人：马桂娟、李瑞雪、龚慧、张茹、王芳焕、汤丽华、高琳、吴明、吕毅、王泽岚、谢芳、葛谦、张小飞。本文件为首次发布。

葡萄酒中 5 种花色苷的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了葡萄酒中 5 种花色苷含量的液相色谱-串联质谱法。

本文件适用于葡萄酒中牵牛花色素-3-D-葡萄糖苷、氯化芍药素-3-O-葡萄糖苷、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、氯化飞燕草素-3-O-葡萄糖苷和氯化锦葵素-3-O-葡萄糖苷含量的测定和确证。

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

样品经混匀、离心，液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

5 试剂和材料

除另有说明，所用试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲酸(HCOOH)：色谱纯。

5.1.2 甲醇(CH₃OH)：色谱纯。

5.1.3 乙醇(CH₃COOH)：色谱纯。

5.1.4 酒石酸(C₄H₆O₆)。

5.2 溶液配制

5.2.1 0.5%甲酸水溶液：准确移取 5mL 甲酸（5.1.1）至 1000mL 容量瓶中，用水定容。

5.2.2 0.5%甲酸甲醇：准确移取 5mL 甲酸（5.1.1）至 1000mL 容量瓶中，用甲醇（5.2）定容。

5.2.3 0.3%酒石酸乙醇溶液：称取 0.3g 酒石酸，加入 1.5mL 乙醇，用水溶解并定容至 100mL。

5.3 标准品

花色苷标准物质：纯度均不低于 80%，基本内容见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液（1mg/mL）：准确称取适量的标准物质（5.3），分别用甲醇（5.1.2）制备浓度为 1mg/mL 的标准储备液，该储备液在-18℃避光保存，有效期 6 个月。

5.4.2 混合标准工作液：移取适量的标准储备液（5.4.1），用 0.3%酒石酸乙醇溶液（5.2.3）稀释成浓度为 10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、500ng/mL 的混合标准工作溶液。

6 仪器和设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾电离源。
- 6.2 分析天平：感量为 0.00001g 和 0.01g。
- 6.3 高速离心机：15000 r/min。
- 6.4 涡旋混合器。
- 6.5 具塞塑料离心管：2.0mL。
- 6.6 往复式摇床。
- 6.7 超声波振荡器。

7 分析步骤

7.1 试样制备

将所取原始样品 1kg 在瓷混样桶内充分混匀，将混匀样品置于洁净容器内密封，作为试样。起泡葡萄酒需预先脱气。将 1kg 试样倒入带排气塞的瓶中，在室温下使用往复式摇床（6.6）或超声波振荡器（6.7）脱气，直至无起泡逸出。

7.2 试样的提取

将葡萄酒试样摇匀，取一定量试样于塑料离心管中，于 15000 r/min 离心 5 min，取上清液约 1mL 于进样瓶中，供液相色谱-串联质谱分析。

7.3 仪器参考条件

7.3.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：C18 色谱柱（100mm×2.1mm，3.5 μ m），或相当者；
- b) 柱温：35 $^{\circ}$ C；
- c) 进样量：2 μ L；
- d) 流速：0.25 mL/min；
- e) 流动相 A：0.5%甲酸水溶液（5.2.1），流动相 B：0.5%甲酸甲醇（5.2.2）。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/%
0.00	95	5
2.00	95	5
10.00	35	65
10.50	0	100
12.50	0	100
13.00	95	5
17.00	95	5

7.3.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源；

- b) 扫描方式:正离子扫描;
- c) 检测方式:多反应离子监测(MRM);
- d) 脱溶剂气、锥孔气、碰撞气均为高纯氮气或其它合适气体;
- e) 喷雾电压、碰撞能等参数应优化至最优灵敏度;
- f) 监测离子参数情况见表2。

表2 花色苷特征离子参考质谱条件

化合物	母离子 m/z	子离子 m/z	去簇电压 V	碰撞能 eV
牵牛花色素-3-D-葡萄糖苷	478.9	478.9>317 ^a	91	23
		478.9>302	91	55
氯化芍药素-3-O-葡萄糖苷	462.9	462.9>300.9 ^a	100	30
		462.9>285.9	100	50
矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	448.9	448.9>286.9 ^a	100	30
氯化飞燕草素-3-O-葡萄糖苷	464.9	464.9>302.9 ^a	101	20
氯化锦葵素-3-O-葡萄糖苷	492.9	492.9>330.9 ^a	95	20
		492.9>315	95	50

^a为定量碎片离子。

7.4 定性与定量测定

7.4.1 定性测定

在同样测试条件下,试样中花色苷类组分的保留时间与标准溶液中花色苷的保留时间之比,偏差在±2.5%以内,且检测到的相对离子丰度,应当与浓度相当的校正标准溶液相对丰度一致。其允许偏差应符合表3的要求。

表3 定性测定时相对离子丰度最大允许偏差

相对丰度(基峰)	>50%	20%~50%(含)	10%~20%(含)	<10%
允许的相对偏差	±10%	±15%	±20%	±50%

7.4.2 定量测定

取试样溶液和相应的标准溶液,作单点或多点校准,以色谱峰面积定量,按外标法计算,标准溶液及试样溶液中花色苷响应值均应在仪器检测的线性范围内,在上述液相色谱-质谱条件下,花色苷标准溶液的特征离子质量色谱图见附录B。

7.5 空白试验

除不加试样外,采用相同的测定步骤进行操作。

8 结果计算和表述

试样中花色苷各组分含量按标准曲线法或按公式(1)计算获得,计算结果应扣除空白值,并保留两位有效数字。

$$X = C \times f \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X—试样中花色苷的含量,单位为微克每升(μg/L);

C —从标准曲线得到的试样中溶液花色苷的浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g/L}$);
 f —样品稀释倍数。

9 定量限

本方法的检出限：牵牛花色素-3-D-葡萄糖苷、氯化芍药素-3-O-葡萄糖苷、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、氯化飞燕草素-3-O-葡萄糖苷、氯化锦葵素-3-O-葡萄糖苷均为 $0.05\mu\text{g/L}$ 。定量限：牵牛花色素-3-D-葡萄糖苷、氯化芍药素-3-O-葡萄糖苷、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、氯化飞燕草素-3-O-葡萄糖苷、氯化锦葵素-3-O-葡萄糖苷均为 $0.1\mu\text{g/L}$ 。

10 精密度

在重复性测定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%。

附录 A
(资料性)

标准物质中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

标准物质中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号见表 A.1。

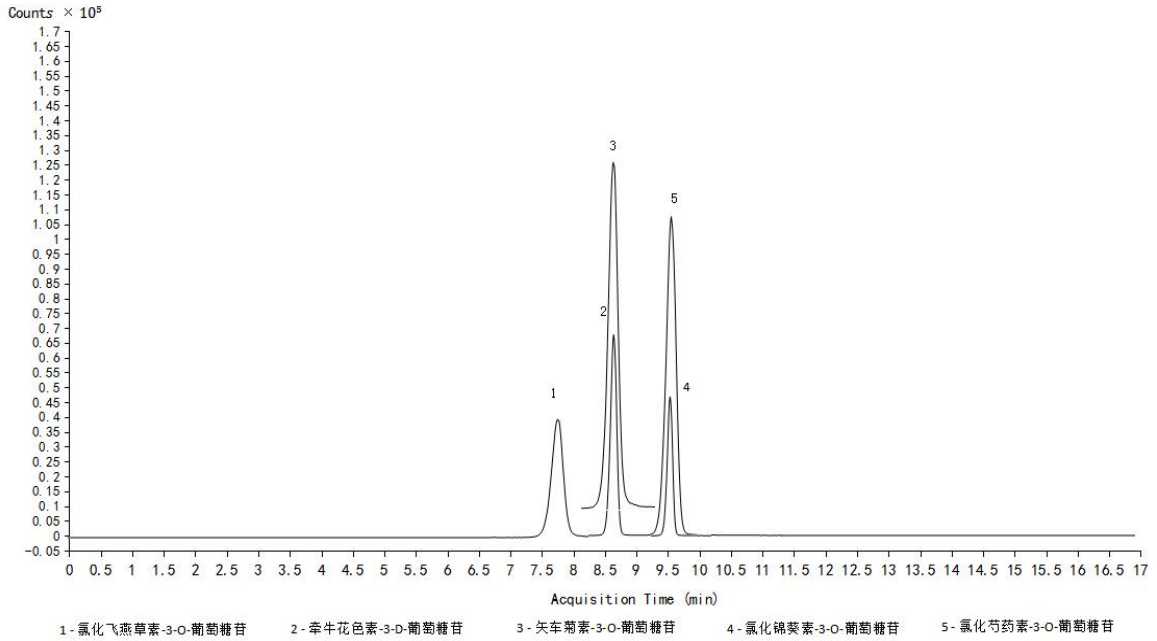
表 A.1 标准物质中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

中文名称	英文名称	化学分子式	CAS 号
牵牛花色素-3-D-葡萄糖苷	Petunidin 3-Glucoside	$C_{22}H_{23}O_{12}Cl$	6988-81-4
氯化芍药素-3-O-葡萄糖苷	Peonidin 3-Glucoside Chloride	$C_{22}H_{23}ClO_{11}$	6906-39-4
矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	Cyanidin 3-Glucoside	$C_{21}H_{21}O_{11}Cl$	7084-24-4
氯化飞燕草素-3-O-葡萄糖苷	Delphinidin-3-O-Glucoside Chloride	$C_{21}H_{21}ClO_{12}$	6906-38-3
氯化锦葵素-3-O-葡萄糖苷	Malvidin 3-Glucoside Chloride	$C_{23}H_{23}ClO_{12}$	7228-78-6

附录 B
(资料性)

5 种花色苷标准溶液特征离子质量色谱图

5 种花色苷标准溶液特征离子质量色谱图见图 B. 1。



标引序号说明:

- 1 ---- 氯化飞燕草素-3-O-葡萄糖苷;
- 2 ---- 牵牛花色素-3-D-葡萄糖苷;
- 3 ---- 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷;
- 4 ---- 氯化锦葵素-3-O-葡萄糖苷;
- 5 ---- 氯化芍药素-3-O-葡萄糖苷;

图 B. 1 5 种花色苷标准溶液特征离子质量色谱图