

ICS 67.160.10

X 62

TB

团体标准

T/NAIA ×××—2022

葡萄酒中花青素的测定 液相色谱质谱/质谱法

2022-XX-XX 发布

2022-XX-XX 实施

宁夏化学分析测试协会发布

前言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写》规定编写。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的起草和发布机构不承担相关责任。

本文件由银川智慧食品安全检验检测中心（有限公司）提出。

本文件由宁夏化学分析测试协会归口。

本文件起草单位：银川智慧食品安全检验检测中心（有限公司）、宁夏化学分析测试协会。

本文件主要起草人：田婧、陈红丽、张宝明、田碧桃、许云霄、何健辉、孔坚、冒莉萍、钱克俊、朱清苗、张小飞。

本文件于 2022 年 X 月 XX 日首次发布。

葡萄酒中花青素的测定 液相色谱质谱/质谱法

1 范围

本文件规定了葡萄酒中 6 种花青素含量的液相色谱质谱/质谱法。

本文件适用葡萄酒中飞燕草色素、矢车菊色素、矮牵牛色素、天竺葵色素、芍药素、锦葵素含量的测定和确证。

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

试样经乙醇-水的强酸溶液超声提取花色苷后，经沸水浴将花色苷水解成花青素，用液相色谱质谱/质谱法测定，外标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯。

5.1.2 盐酸 (HCl)：分析纯。

5.1.3 无水乙醇 (C₂H₅OH)：分析纯。

5.1.4 甲酸 (CH₂O₂)：分析纯。

5.2 试剂配制

5.2.1 10%盐酸甲醇溶液：取 10mL 盐酸、90mL 甲醇混匀。

5.2.2 提取液：无水乙醇+水+盐酸=2+1+1 (V+V+V)，量取 200mL 无水乙醇、100mL 水、100mL 盐酸混匀。

5.3 标准品

飞燕草素标准品 (CAS: 528-53-0)：纯度 \geq 96%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

矢车菊素标准品 (CAS: 528-58-5)：纯度 \geq 98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

矮牵牛素标准品 (CAS: 1429-30-7)：纯度 \geq 96%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

天竺葵素标准品 (CAS: 134-04-3)：纯度 \geq 96%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

芍药素标准品 (CAS: 134-04-0)：纯度 \geq 98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

锦葵素标准品 (CAS: 643-84-5)：纯度 \geq 96%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备溶液(100 ug/mL)：分别准确称取各标准物 1 mg 到 10 mL 容量瓶中，用 10% 盐酸甲醇溶液溶解并定容，混合均匀得到 100 ug/mL 的单标标准储备液，贮存于棕色密闭玻璃瓶中，于-18℃下保存，有效期 3 个月。

5.4.2 标准工作液：将单一标准储备液进行混合后，用 10%盐酸甲醇溶液作为溶剂，并逐级稀释成 0.5ng/mL、1.0 ng/mL、10.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100.0 ng/mL、200.0 ng/mL。混合标准工作液现用现配。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱-串联质谱仪：配备电喷雾离子源 (ESI)。

6.2 分析天平：感量分别为 0.01 mg 和 0.01 g。

6.3 恒温水浴锅。

6.4 超声波清洗器。

7 分析步骤

7.1 试样制备

将所取原始样品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。

7.2 试样前处理

称取上述样品 1.00 g 于 50 mL 具塞刻度试管中，用提取液定容至刻线，混匀 1 min 后，超声提取 30 min。超声提取后，于沸水浴中水解 1 h，取出冷却后，用提取液再次定容，静止，取上清液，用 0.22 μ m 水相滤膜过滤，待测。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：选用 C₁₈ (1.7 μ m 2.1 mm \times 50 mm)液相色谱柱。
- b) 柱温：35 $^{\circ}$ C。
- c) 流动相：A 为 0.1%甲酸水，B 为乙腈；梯度洗脱见表 1。
- d) 流速：0.30mL/min。
- e) 进样量：5 μ L。

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间/min	A 0.1%甲酸水 (%)	B 乙腈 (%)
0	95	5
0.5	95	5
3.0	10	90
4	10	90
4.1	95	5

6.0	95	5
-----	----	---

7.3.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）。
- b) 扫描方式：正离子扫描。
- c) 检测方式：多反应监测（MRM）。
- d) 离子源温度：150°C。
- e) 溶剂洗脱温度：450°C。
- f) 锥孔压力：18V。
- g) 毛细管电压：4.5KV。
- h) 定性离子对、定量离子对、碰撞能量等参数参见表 2。

表 2 六种花青素的定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能

中文名称	定性离子对/(m/z) (母离子/子离子)	定量离子对/(m/z) (母离子/子离子)	锥孔电压/V	碰撞能/V
飞燕草素	303.100/229.000	303.100/229.000	30	30
	303.100/257.000		30	28
矢车菊素	287.100/108.900	287.100/108.900	30	32
	287.100/137.000		30	42
矮牵牛素	317.100/203.000	317.100/203.000	20	24
	317.100/302.000		20	38
天竺葵素	306.87/121.008	306.87/121.008	14	42
	306.87/93.05		14	46
芍药素	301.047/286.049	301.047/286.049	40	40
	301.047/201.085		40	25
锦葵素	331.200/242.000	331.200/242.000	6	28
	331.200/315.100		6	30

7.3.3 定量测定

根据样液中被测物含量情况，选定浓度相近的混合标准工作溶液，混合标准工作溶液和待测样液中 6 种花青素的响应值均应在仪器检测的线性范围内。混合标准工作溶液与样液等体积进样测定。标准溶液及样液均按 7.3.1 和 7.3.2 规定的条件进行测定，如果样液中与标准溶液相同的保留时间有色谱峰出现，则对其进行确证，飞燕草色素、矢车菊色素、矮牵牛色素、天竺葵色素、芍药素、锦葵素的参考保留时间见表 3。飞燕草色素、矢车菊色素、矮牵牛色素、天竺葵色素、芍药素、锦葵素标准品的多反应监测（MRM）色谱图参见附录 A，采用标准曲线外标法定量。

表 3 参考保留时间

被测物名称	保留时间/（min）
飞燕草素	2.426
矢车菊素	2.530
矮牵牛素	2.538
天竺葵素	2.635
芍药素	2.648
锦葵素	2.645

8 结果计算

按以下公式计算测定结果。

计算公式：

$$X = \frac{c \times V \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X— 试样中各花青素的含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

C — 进样溶液中花青素的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V — 定容体积，单位为毫升（mL）；

M — 试样的称样量，单位为克（g）；

1000—换算系数。

测定结果取两次测定的算数平均值，计算结果保留三位有效数字。

9 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%。

10 检出限及定量限

飞燕草色素、锦葵色素、矮牵牛色素检出限均为 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、矢车菊色素、天竺葵色素、芍药素检出限均为 25.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

附录 A

(资料性附录)

6种色素多反应监测 (MRM) 色谱图

