ICS 点击此处添加 ICS 号
CCS 点击此处添加 CCS 号

T/JAASS

团 体 标 准

T/JAASS XX—2022

甘薯中花青素含量的测定
液相色谱-串联质谱法

Determination of Anthocyanidins in Sweetpotato-
Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX－XX－XX 发布 XXXX－XX－XX 实施

江苏省农学会 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：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的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。

本文件由江苏徐淮地区徐州农业科学研究所提出

本文件由江苏省农学会归口。

本文件起草单位：江苏徐淮地区徐州农业科学研究所

本文件主要起草人：徐振、王维、苏涵、张巧凤、侯会、耿晓月、董韦、赵凌霄、曹清河。

甘薯中花青素含量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了甘薯中矢车菊色素、芍药素、天竺葵色素、锦葵色素、矮牵牛色素、飞燕草色素共6种花青素含量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于甘薯薯块、叶片中花青素含量的测定。

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于本文件；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 6379.1测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第1部分：总则与定义

GB/T 6379.2测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第2部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法

GB/T 6682分析实验室用水规格和实验方法

3 原理

甘薯中花青素主要以花色苷的形式存在。试样经甲醇-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-串联质谱法测定，以特征离子对和保留时间定性，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲酸（CH_2O_2，CAS 号：64-18-6）：色谱纯。

4.2 甲醇（CH_3OH，CAS 号：67-56-1）：色谱纯。

4.3 乙腈（C_2H_3N，CAS 号：75-05-8）：色谱纯

4.4 盐酸（HCl，CAS 号：7647-01-0）：优级纯。

4.5 提取液：取 50 mL 甲醇、39.2 mL 水和 10.8 mL 盐酸混匀。

4.6 10 %甲酸甲醇溶液（体积比）：取 2 mL 甲酸、18 mL 甲醇混匀。

4.7 0.5 %甲酸-水溶液（体积比）：取 200 mL 水，加入 1 mL 甲酸（4.1）。

4.8 0.1 %甲酸-乙腈溶液（体积比）：取 200 mL 乙腈（4.3），加入 0.2 mL 甲酸（4.1）.

4.9 氯化天竺葵色素（Pelargonidin Chloride）：CAS 号 134-04-3，纯度≥96。

4.10 氯化矢车菊色素（Cyanidin Chloride）：CAS 号 528-58-5，纯度≥96。

4.11 氯化芍药素（Peonidin Chloride）：CAS 号 134-01-0，纯度≥96。

4.12 氯化锦葵色素（Malvidin Chloride）：CAS 号 643-84-5，纯度≥96。

4.13 氯化矮牵牛色素（Petunidin Chloride）：CAS 号 1429-30-7，纯度≥96。

4.14 氯化飞燕草色素（Delphinidin Chloride）：CAS 号 528-53-0，纯度≥96。

4.15 单标储备溶液

使用分析天平分别准确称取氯化天竺葵色素（Pelargonidin Chloride）、氯化矢车菊素（Cyanidin Chloride）、氯化芍药素（Peonidin Chloride）、氯化锦葵色素（Malvidin Chloride）、氯化矮牵牛色素（Petunidin Chloride）、氯化飞燕草色素（Delphinidin Chloride）标准品1 mg（精确至0.1 mg），用1 mL 10 %甲酸甲醇溶液（4.6）作为溶剂溶解，即为1 mg/mL的单标储备液，-20 ℃环境条件下，贮存于密闭的棕色玻璃瓶中，保存有效期为3个月。

4.16 混合标准使用液

用10 %甲酸甲醇溶液（4.6）作为溶剂分别将单标储备液（4.15）稀释成0.1 mg/mL，放入1.5mL棕色进样瓶中，作为使用液。

将6种使用液混合配制，氯化矢车菊色素、氯化芍药素使用液逐步稀释成0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL，氯化天竺葵色素、氯化锦葵色素、氯化矮牵牛色素、氯化飞燕草色素标品稀释成0.01 μg/mL、0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.5 μg/mL，作为混合标准溶液。现配现用。

4.17 滤膜：0.22 μm，有机相滤膜。

5 仪器与设备

5.1 液相色谱-三重四极杆质谱联用仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

5.2 分析天平：感量 0.1 mg。

5.3 离心机：转速不低于 8000 r/min。

5.3 水浴锅：精度±2 ℃。

5.4 超声波清洗机。

5.5 冻干机。

5.6 粉碎机。

6 分析步骤

6.1 试样制备

甘薯薯块或叶片样品用冻干机冻干后用粉碎机进行粉碎，过 250 μm 筛后在-20 ℃环境条件下保存。

6.2 提取

准确称取 0.10 g 甘薯冻干粉末放入 2 ml 离心管，加入提取液（4.5）1.5 mL，振荡均匀，常温超声提取 10 min，8000 r/min 常温离心 3 min，保留沉淀，吸取上清液液转移至 10 mL 离心管，反复提取 4 次，总收集液定容至 6 mL。

6.3 水解

有将收集的上清液于沸水浴中水解 1 h，取出后自来水冲淋冷却，用 0.22 μm 有机相滤膜过滤待测。样品制备后，在 4 ℃避光环境条件下，保存时间不超过 3 d。

6.4 测定

6.4.1 液相色谱参考条件

a) 色谱柱：C_{18} 柱，50 mm×2.1 mm×1.8 μm，或性能相当者；

b) 流动相：A 相为 0.5 %甲酸-水溶液（4.7），B 相为 0.1 %甲酸-乙腈溶液（4.8）。流动相梯度条件见表 1；

表 1 流动相及其梯度条件（V_A+V_B）

时间 min	V_A%	V_B%
0	98	2
1	98	2
7	75	25
8	75	25
9	98	2
10	100	0

c) 流速：0.2 mL/min；

d) 柱温：40 ℃；

e) 进样量：0.5 μL。

6.4.2 质谱参考条件

a) 离子源类型：电喷雾离子源（ESI）；

b) 扫描方式：正离子扫描；

c) 电喷雾电压：正离子 5500 V；

d) 离子源温度：550 ℃；

e) 雾化气：50 psi；

f) 辅助加热气：60 psi；

g) 气帘气：30 psi；

h) 喷撞气：Medium；

i) 多反应监测：每种花青素分别选择两个子离子。所有需要检测的子离子按照出峰顺序，分时段分别检测。每种花青素的保留时间、母离子、子离子及离子对质谱参数，相关示例见附录 A。

6.4.3 定性及定量

6.4.3.1 保留时间

被测试样中目标花青素色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较，相对误差应在±2.5 %之内。

6.4.3.2 离子丰度比

在相同实验条件下进行样品测定时，如果检出的色谱峰的保留时间与标准样品相一致，并且在扣除背景后的样品质谱图中，目标化合物选择的子离子均出现，而且同一检测批次，对同一化合物，样品中目标化合物的离子丰度比与质量浓度相当的基质标准溶液相比，其允许偏差不超过表 2 规定的范围，则可判断样品中存在目标花青素。

表 2 定性时离子丰度比的最大允许偏差

离子丰度比	＞50 %	＞20 %至 50 %	＞10 %至 20 %	≤10 %
允许相对偏差	±20 %	±25 %	±30 %	±50 %

本方法的标准物质 LC-MS 多反应监测质量色谱图相关示例见附录 B。

6.4.3.3 定量

外标法定量。

6.5 试样溶液的测定

将标准工作溶液和试样溶液依次放入液相色谱-质谱联用仪进样盘中，保留时间和离子丰度比定性，测得定量用子离子的质量色谱图峰面积，待测样液中花青素的响应值应在仪器检测的定量测定线性范围之内，超过线性范围时应根据测定浓度进行适当倍数稀释后再进行分析。

6.6 平行试验

按以上步骤对同一试样进行平行试验测定。

6.7 空白试验

除不加试样外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

7 结果计算

试样中各花青素以质量分数 ω 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示，按公式（1）计算。

$$\omega = \frac{\rho \times v}{m} \quad \text{.....（1）}$$

式中：

ρ——待测液中各花青素的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

v——定容体积，单位为毫升（mL）；

m——试样质量，单位为克（g）。

计算结果取两次独立测定的算术平均值，保留两位有效数字。

8 精密度

在重复性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过重复性限（r），相关示例见附录 D。

在再现性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过再现性限（R），相关示例见附录 D。

9 其他

本标准方法对各种花青素的定量限为 0.44 mg/kg～2.14 mg/kg （相关示例见附录 C）。

附 录 A

（资料性附录）

6 种花青素保留时间、母离子、子离子及离子对质谱参数

6 种花青素的保留时间、母离子、子离子及离子对质谱参数见表 A.1。

表 A.1 6 种花青素保留时间、母离子、子离子及离子对质谱参数

序号	花青素名称	电离方式	保留时间 RT（min）	去簇电压 DP（V）	离子对 I	碰撞能 CE（V）	离子对 II	碰撞能 CE（V）
1	氯化矢车菊色素（Cyanidin Chloride）	正	5.95	160	287.0/212.9	42.81	287.0/137.2	42.00
2	氯化芍药素（Peonidin Chloride）	正	6.79	95	301.0/286.1	30.33	301.0/258.1	44.90
3	氯化天竺葵色素（Pelargonidin Chloride）	正	6.50	123	271.0/121.0	41.77	271.0/141.0	46.87
4	氯化锦葵色素（Malvidin Chloride）	正	7.22	124	331.0/314.8	39.00	331.0/287.0	39.00
5	氯化矮牵牛色素（Petunidin Chloride）	正	6.46	73	317.0/274.1	37.7	317.0/302.0	33.78
6	氯化飞燕草色素（Delphinidin Chloride）	正	5.69	128	302.9/229.1	41.94	302.9/173.2	47.09

附　录　B

（资料性附录）

6 种花青素多反应监测（MRM）质量色谱图

2.0 μg/mL 氯化矢车菊色素、氯化芍药色素标准溶液色谱图见图 A.1、图 A.2。

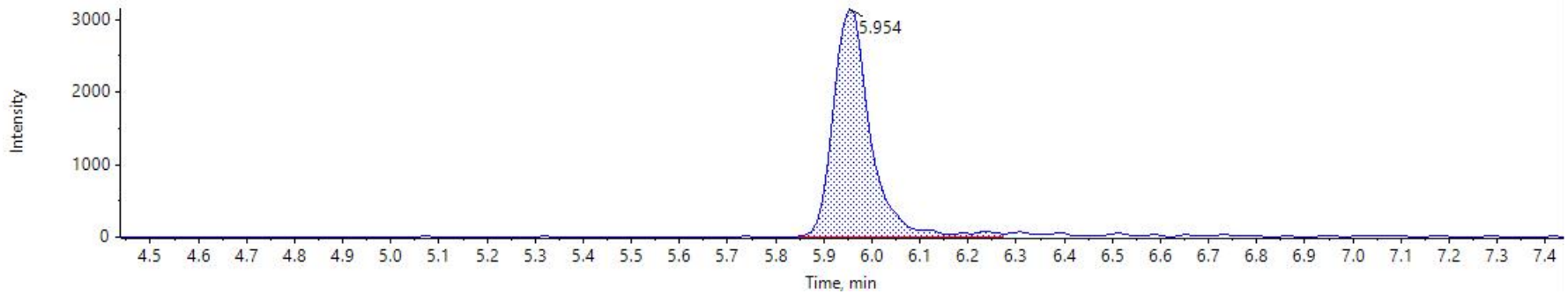

图 A.1 2.0 μg/mL 氯化矢车菊色素标准溶液色谱图

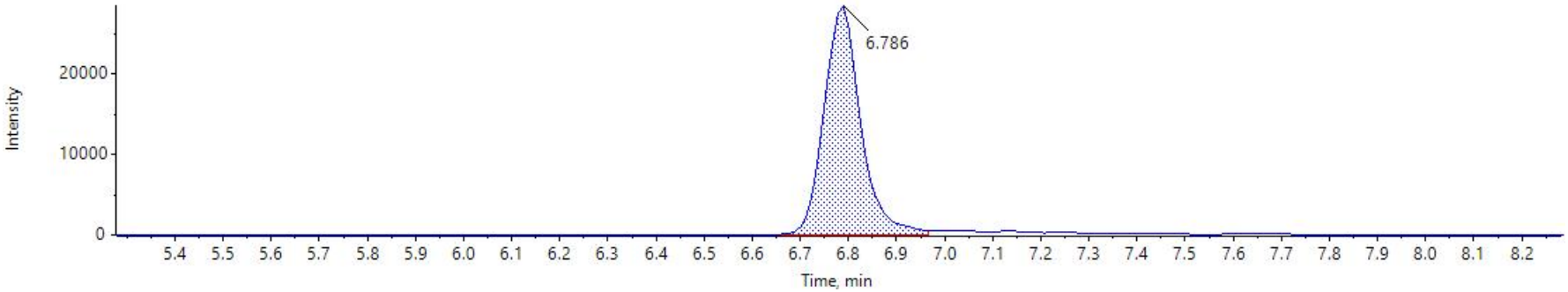

图 A.2 2.0 μg/mL 氯化芍药色素标准溶液色谱图

0.2 μg/mL 氯化天竺葵色素、氯化锦葵色素、氯化矮牵牛色素、氯化飞燕草标准溶液色谱图见图 A.3、图 A4、图 A.5、图 A.6。

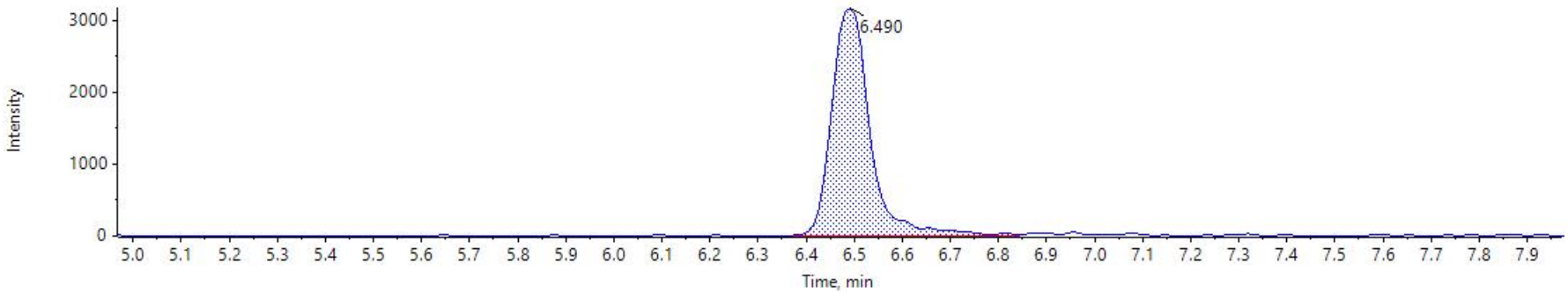

图 A.3 0.2 μg/mL 氯化天竺葵色素标准溶液色谱图

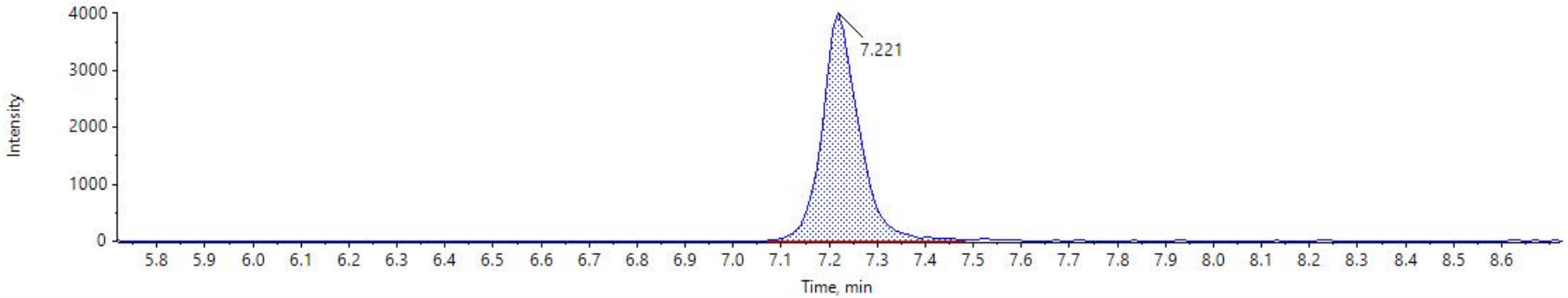

图 A.4 0.2 μg/mL 氯化锦葵色素标准溶液色谱图

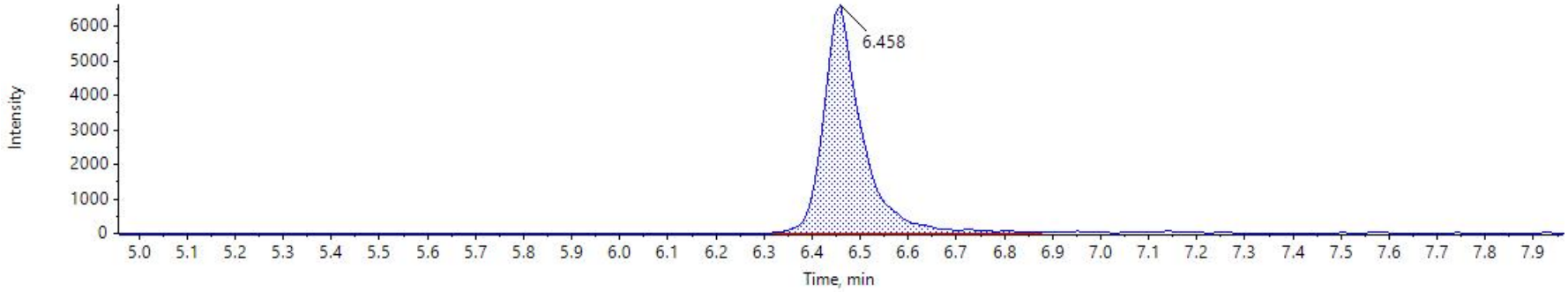

图 A.5 0.2 μg/mL 氯化矮牵牛色素标准溶液色谱图

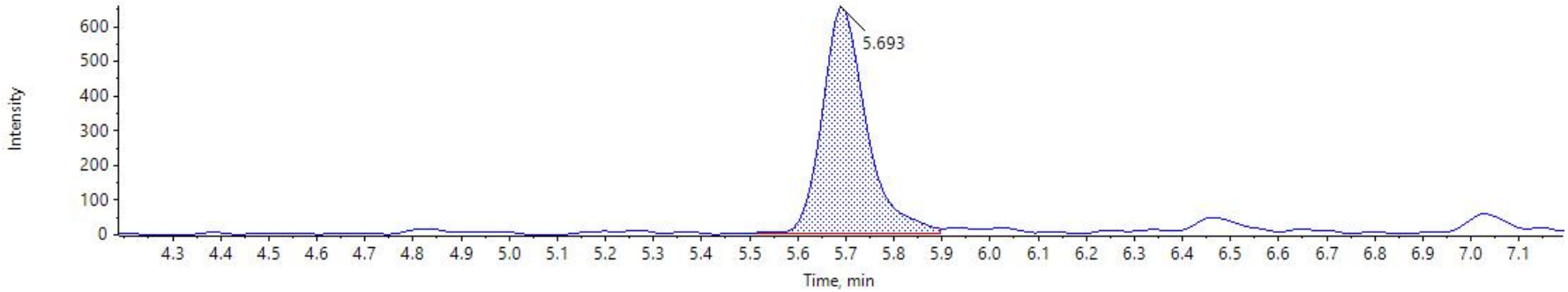

图 A.6 0.2 μg/mL 氯化飞燕草色素标准溶液色谱图

附 录 C

（资料性附录）

甘薯中 6 种花青素中英文名称和方法检出限、定量限

甘薯中 6 种花青素中文与英文名称和方法检出限、定量限，见表 A.1。

表 C.1 甘薯中 6 种花青素中英文名称和方法检出限、定量限

序号	花青素中文名	花青素英文名	方法检出限（mg/kg）	方法定量限（mg/kg）
1	氯化矢车菊色素	Cyanidin Chloride	0.64	2.14
2	氯化芍药素	Peonidin Chloride	0.49	1.63
3	氯化天竺葵色素	Pelargonidin Chloride	0.13	0.44
4	氯化锦葵色素	Malvidin Chloride	0.13	0.44
5	氯化矮牵牛色素	Petunidin Chloride	0.13	0.44
6	氯化飞燕草色素	Delphinidin Chloride	0.14	0.46

附 录 D
（资料性附录）
方法精密度

方法精密度见表 D.1。

表 D.1 方法精密度

参数	含量 mg/kg	*r*	*R*	参数	含量 mg/kg	*r*	*R*	参数	含量 mg/kg	*r*	*R*
矢车菊	a	0.63	0.73	矢车菊	30	1.75	2.22	矢车菊	300	7.14	7.81
芍药	b	0.52	0.54	芍药	30	1.91	2.42	芍药	300	7.53	8.32
天竺葵	c	0.13	0.15	天竺葵	6	0.55	0.72	天竺葵	30	1.73	1.97
锦葵	d	0.13	0.15	锦葵	6	0.68	0.80	锦葵	30	0.97	1.14
矮牵牛	e	0.13	0.15	矮牵牛	6	0.62	0.70	矮牵牛	30	0.69	0.84
飞燕草	f	0.13	0.16	飞燕草	6	0.46	0.77	飞燕草	30	0.51	0.80
注：含量 a、b、c、d、e、f 分别为 6 种花青素的定量限，参见附录 C。r 为重复性限，R 为再现性限。											