

# T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 942—2025

## 六堡茶中花青素的测定 高效液相色谱法/ 三重四极杆液质联用法

Determination of anthocyanidins in Liupao tea—  
High performance liquid chromatography/ Liquid chromatography - triple  
quadrupole mass spectrometry

2025 - 01 - 17 发布

2025 - 01 - 23 实施

广西标准化协会 发布



## 前 言

本文件参照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。

本文件由梧州市食品药品检验所提出并宣贯。

本文件由广西标准化协会归口。

本文件起草单位：梧州市食品药品检验所、广西梧州圣源茶业有限公司、广西梧州茉叶茶叶股份有限公司、梧州市天誉茶业有限公司、广西速溶六堡茶工程技术研究中心、北京旗硕基业科技股份有限公司。

本文件主要起草人：蒋德莉、文俊萍、姚泳成、陈婵、李君、钟水桥、罗达龙、陈启钊、何珊珊、覃蓝、王华、李夷君、黄琳、卓海琳、黄金福、韦燕娟、骆刚、宋好、冯成。



# 六堡茶中花青素的测定 高效液相色谱法/三重四极杆液质联用法

## 1 范围

本文件规定了六堡茶中飞燕草色素、矢车菊色素、天竺葵色素、芍药素、锦葵色素和矮牵牛色素共6种花青素的测定方法。

本文件适用于六堡茶中飞燕草色素、矢车菊色素、天竺葵色素、芍药素、锦葵色素和矮牵牛色素共6种花青素含量的测定。

本文件第一法为高效液相色谱法，第二法为三重四极杆液质联用法。

## 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 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 高效液相色谱法

### 4.1 原理

六堡茶中花青素主要以花色苷的形式存在。试样经无水乙醇-水-盐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，用高效液相色谱法测定，以保留时间定性，外标法定量。

### 4.2 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，实验用水应符合GB/T 6682中一级水的要求。

#### 4.2.1 试剂

4.2.1.1 无水乙醇( $C_2H_5OH$ ): 分析纯。

4.2.1.2 乙腈( $CH_3CN$ ): 色谱纯。

4.2.1.3 甲醇( $CH_3OH$ ): 色谱纯。

4.2.1.4 甲酸( $HCOOH$ ): 色谱纯。

4.2.1.5 盐酸( $HCl$ ): 优级纯。

#### 4.2.2 溶液配制

4.2.2.1 提取液: 无水乙醇+水+盐酸=2+1+1(v/v/v)，量取200 mL无水乙醇(4.2.1.1)，100 mL水和100 mL盐酸(4.2.1.5)，混匀。

4.2.2.2 10%盐酸甲醇溶液: 准确量取10 mL盐酸(4.2.1.5)和90 mL甲醇(4.2.1.3)混匀。

4.2.2.3 流动相A: 1%甲酸水溶液: 准确量取甲酸(4.2.1.4)10 mL至1000 mL容量瓶中，水定容至刻度，摇匀。

4.2.2.4 流动相B: 1%甲酸乙腈: 准确量取甲酸(4.2.1.4)10 mL至1000 mL容量瓶中，乙腈(4.2.1.2)定容至刻度，摇匀。

#### 4.2.3 标准品

- 4.2.3.1 氯化飞燕草色素(Delphinidin Chloride): CAS号 528-53-0, 纯度 $\geq$ 96%。
- 4.2.3.2 氯化矢车菊色素(Cyanidin Chloride): CAS号 528-58-5, 纯度 $\geq$ 98%。
- 4.2.3.3 氯化矮牵牛色素(Petunidin Chloride): CAS号 1429-30-7, 纯度 $\geq$ 96%。
- 4.2.3.4 氯化天竺葵色素(Pelargonidin Chloride): CAS号 134-04-3, 纯度 $\geq$ 96%。
- 4.2.3.5 氯化芍药素(Peonidin Chloride): CAS号 134-01-0, 纯度 $\geq$ 98%。
- 4.2.3.6 氯化锦葵色素(Malvidin Chloride): CAS号 643-84-5, 纯度 $\geq$ 96%。

#### 4.2.4 标准溶液配制

- 4.2.4.1 分别准确称取飞燕草色素、矢车菊色素、矮牵牛色素、天竺葵色素、芍药素和锦葵色素标准品 10 mg (精确至 0.01 mg), 用 10%盐酸甲醇溶液(4.2.2.2)溶解并分别定容至 10 mL 容量瓶中, 即得到 1 mg/mL 的单标储备液, 于密闭的棕色玻璃瓶中冷冻(-18℃)保存, 有效期为 6 个月。
- 4.2.4.2 混合标准使用液: 将单一标准储备液进行等比例混合后, 用 10%盐酸甲醇溶液(4.2.2.2)作为溶剂, 逐级稀释成 0.1  $\mu$ g/mL、0.2  $\mu$ g/mL、0.5  $\mu$ g/mL、2.0  $\mu$ g/mL、10.0  $\mu$ g/mL、20.0  $\mu$ g/mL, 于 4℃ 条件下避光保存, 有效期为 3 个月。

#### 4.2.5 材料

- 4.2.5.1 微孔滤膜(有机相): 0.22  $\mu$ m。

#### 4.3 仪器和设备

- 4.3.1 高效液相色谱仪: 带紫外或二极管阵列检测器。
- 4.3.2 天平: 感量 0.01 mg, 0.01 g。
- 4.3.3 数显恒温水浴锅。
- 4.3.4 研磨机。
- 4.3.5 超声波清洗器: 功率参数: 100 W, 34 千赫兹, 25℃。
- 4.3.6 标准筛: 60 目。

#### 4.4 分析步骤

##### 4.4.1 试样制备

采用四分法分取样品, 取约 200 g 样品于研磨机中粉碎, 过 60 目筛。制得试样在 -18℃ 下保存。

##### 4.4.2 提取

称取 5 g (精确至 0.01 g) 制备好的试样于 50 mL 锥形瓶中, 加入 20 mL 提取液(4.2.2.1)至刻度, 混匀 1 min, 超声提取 15 min。

##### 4.4.3 水解

超声提取后, 于沸水浴中水解 1 h, 冷却至室温后, 将上清液转移至 25 mL 容量瓶中, 提取液(4.2.2.1)定容至刻度, 摇匀, 静置。取其上清液用 0.22  $\mu$ m 滤膜(4.2.5.1)过滤, 待测。制备好的样品可在 4℃ 条件下避光保存不超过 48 h。

##### 4.4.4 空白试验

除不加试样外, 均按上述步骤进行。

#### 4.5 测定

##### 4.5.1 液相色谱参考条件

- 4.5.1.1 色谱柱: SB-C<sub>18</sub>, 2.7  $\mu$ m, 100 mm $\times$ 2.1 mm (内径) 或性能相当的液相色谱柱(耐酸性)。
- 4.5.1.2 流动相 A: 1%甲酸水溶液(4.2.2.3), 流动相 B: 1%甲酸乙腈(4.2.2.4)。
- 4.5.1.3 检测波长: 530 nm。
- 4.5.1.4 柱温: 40℃。

4.5.1.5 进样体积：2.0 μL。

4.5.1.6 梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间/min	流速/(mL/min)	流动相A/%	流动相B/%
0.00	0.3	90	10
1.00	0.3	90	10
13.00	0.3	78	22
13.50	0.3	10	90
15.50	0.3	10	90
15.60	0.3	90	10
18.00	0.3	90	10

#### 4.5.2 色谱分析

4.5.2.1 分别将标准溶液和样品溶液，注入液相色谱仪中，以保留时间定性，以样品溶液峰面积与标准溶液峰面积比较定量。色谱图参见附录A。

4.5.2.2 被测样品溶液中目标花青素色谱峰的保留时间与相应标准溶液的色谱峰的保留时间相比较，相对误差应在±2.5%之内。

#### 4.6 结果计算

高效液相色谱测定采用标准曲线法定量，标准曲线法定量结果按式(1)计算：

$$X_i = \frac{(c_i - c_0) \times v \times 1000}{m \times 1000} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

- $X_i$  ——试样中花青素的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)；  
 $c_i$  ——从标准曲线上得到的被测组分溶液浓度，单位为微克每毫升(μg/mL)；  
 $c_0$  ——空白试样的浓度，单位为微克每毫升(μg/mL)；  
 $v$  ——样品溶液定容体积，单位为毫升(mL)；  
 $m$  ——试样质量，单位为克(g)。

计算结果应扣除空白值，测定结果取两次测定的算术平均值，计算结果保留三位有效数字。

#### 4.7 精密度

在重复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%。

#### 4.8 检出限和定量限

本方法检出限和定量限见表2。

表2 方法的检出限和定量限

序号	化合物名称	英文名称	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
1	飞燕草色素	Delphinidin	0.5	1.5
2	矢车菊色素	Cyanidin	0.5	1.5
3	矮牵牛色素	Petunidin	0.5	1.5
4	天竺葵色素	Pelargonidin	0.5	1.5
5	芍药素	Peonidin	0.5	1.5
6	锦葵色素	Malvidin	0.5	1.5

## 5 三重四极杆液质联用法

### 5.1 原理

六堡茶中花青素主要以花色素苷的形式存在。试样经无水乙醇-水-盐酸溶液超声提取花色素苷后，经沸水浴将花色素苷水解成花青素，用液相色谱-三重四极杆质谱仪测定，以保留时间和特征离子峰定性，外标法定量。

### 5.2 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，实验用水应符合GB/T 6682中一级水的要求。

#### 5.2.1 试剂

同4.2.1。

#### 5.2.2 溶液配制

5.2.2.1 提取液：同4.2.2.1。

5.2.2.2 10%盐酸甲醇溶液：同4.2.2.2。

5.2.2.3 流动相A：0.1%甲酸水溶液：准确吸取甲酸(4.2.1.4)1 mL至1000 mL容量瓶中，水定容至刻度，摇匀。

5.2.2.4 流动相B：0.1%甲酸乙腈：准确吸取甲酸(4.2.1.4)1 mL至1000 mL容量瓶中，乙腈(4.2.1.2)定容至刻度，摇匀。

#### 5.2.3 标准品

同4.2.3。

#### 5.2.4 标准溶液配制

5.2.4.1 单标储备液：同4.2.4.1。

5.2.4.2 混合标准使用液：将单一标准储备液进行等比例混合后，用10%盐酸甲醇溶液(5.2.2.2)作为溶剂，逐级稀释成1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、20 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL。于4℃条件下避光保存，有效期为1个月。

#### 5.2.5 材料

5.2.5.1 同4.2.5.1。

### 5.3 仪器和设备

5.3.1 液相色谱-串联质谱仪：三重四极杆质谱，配有电喷雾离子源(ESI)，具备多反应监测功能。

5.3.2 其他仪器设备同4.3.2~4.3.6。

### 5.4 分析步骤

#### 5.4.1 试样制备

操作步骤同4.4.1。

#### 5.4.2 提取

操作步骤同4.4.2。

#### 5.4.3 水解

操作步骤同4.4.3。

#### 5.4.4 空白试验



操作步骤同 4.4.4。

## 5.5 测定

### 5.5.1 液相色谱参考条件

- 5.5.1.1 色谱柱：同 4.5.1.1。  
 5.5.1.2 流动相 A：0.1%甲酸水溶液 (5.2.2.3)，流动相 B：0.1%甲酸乙腈 (5.2.2.4)。  
 5.5.1.3 检测波长：同 4.5.1.3。(视实验室实际情况，配有紫外检测器或二极管阵列检测器时可选)  
 5.5.1.4 柱温：40℃。  
 5.5.1.5 进样体积：1.0 μL。  
 5.5.1.6 梯度洗脱程序同 4.5.1.6。

### 5.5.2 质谱参考条件

- 5.5.2.1 电喷雾离子源 (ESI)，正离子模式。  
 5.5.2.2 毛细管电压：3500 V。  
 5.5.2.3 鞘气温度：350℃。  
 5.5.2.4 鞘气流速：12 L/min。  
 5.5.2.5 干燥气温度：250℃。  
 5.5.2.6 干燥气流速：18 L/min。  
 5.5.2.7 雾化器压力：25 psi。  
 5.5.2.8 多反应监测方式 (MRM)。  
 5.5.2.9 监测离子对、碎裂电压、碰撞能量见表 3。

表3 目标化合物的离子多反应监测条件

化合物	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	驻留时间/s	碎裂电压/V	碰撞能量/eV
飞燕草色素	303.1	257.0	30	380	28
		229.0*	30	380	30
矢车菊色素	287.1	108.9	30	380	42
		137.0*	30	380	32
矮牵牛色素	317.1	302.0*	30	380	24
		203.0	30	380	38
天竺葵色素	271.0	121.0*	30	380	38
		65.0	30	380	55
芍药素	301.05	286.05*	30	380	25
		201.09	30	380	40
锦葵色素	331.2	315.1*	30	380	28
		242.0	30	380	30

注：带\*的为定量离子。本方法提供的质谱条件为推荐条件，对于不同质谱仪器参数可能存在差异，根据实际情况，选择响应信号强且无干扰的离子对进行检测，质谱参数亦可根据实际可达到最优灵敏度的条件进行设定。

### 5.5.3 质谱分析

#### 5.5.3.1 离子丰度比

在相同实验条件下进行样品测定时，如样品溶液检出的色谱峰的保留时间与标准溶液相一致，并且在扣除背景后的样品溶液质谱图中，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，样品溶液目标化合物的离子丰度比与质量浓度相当的标准溶液相比，其允许偏差不超过表4规定的范围，则判断样品中存在目标化合物。本方法的标准溶液多反应监测 (MRM) 提取离子色谱图参见附录B。

表4 定性时离子丰度比的最大允许偏差

单位为百分比

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

### 5.6 结果计算

液相色谱-串联质谱测定采用标准曲线法定量，标准曲线法定量结果按式(2) 计算：

$$X_i = \frac{(c_i - c_0) \times v \times 1000}{m \times 1000 \times 1000} \dots \dots \dots (2)$$

式中：

$X_i$  —— 试样中花青素的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)；

$c_i$  —— 从标准曲线上得到的被测组分溶液浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

$c_0$  —— 空白试样的浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

$v$  —— 样品溶液定容体积，单位为毫升(mL)；

$m$  —— 试样质量，单位为克(g)。

计算结果应扣除空白值，测定结果取两次测定的算术平均值，计算结果保留三位有效数字。

### 5.7 精密度

在重复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%。

### 5.8 检出限和定量限

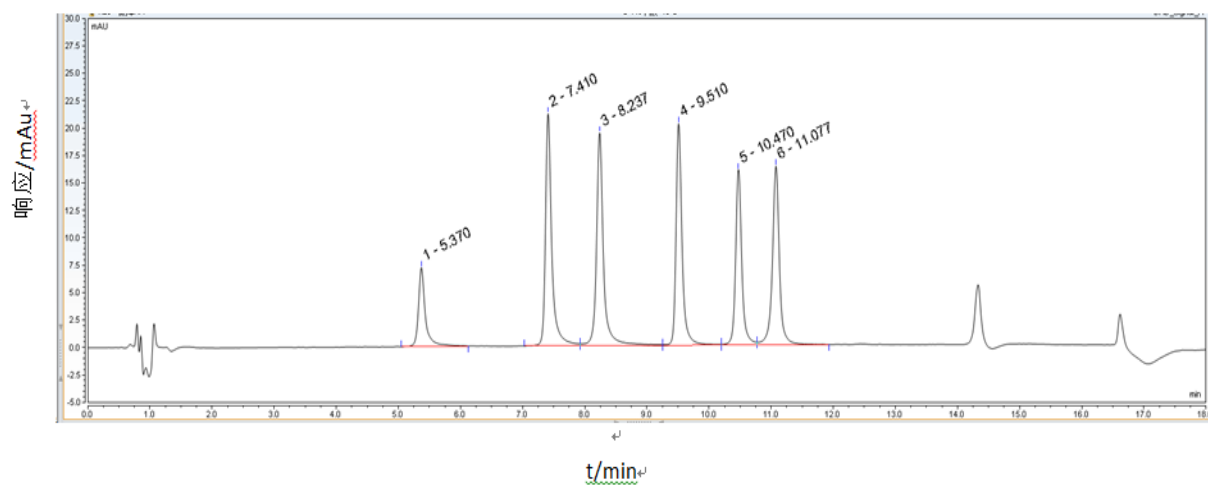
本方法检出限和定量限见表5。

表5 方法的检出限和定量限

序号	化合物名称	英文名称	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
1	飞燕草色素	Delphinidin	0.005	0.015
2	矢车菊色素	Cyanidin	0.005	0.015
3	矮牵牛色素	Petunidin	0.005	0.015
4	天竺葵色素	Pelargonidin	0.005	0.015
5	芍药素	Peonidin	0.005	0.015
6	锦葵色素	Malvidin	0.005	0.015

附录 A  
(资料性)  
6 种花青素标准溶液色谱图 (波长=530 nm)

见图 A. 1。



标引序号说明:

- 1—飞燕草色素-5.370 min
- 2—矢车菊色素-7.410 min
- 3—矮牵牛色素-8.237 min
- 4—天竺葵色素-9.510 min
- 5—芍药素-10.470 min
- 6—锦葵色素-11.077 min

图 A. 1 6 种花青素标准溶液色谱图 (波长=530 nm)

附录 B  
(资料性)

6 种花青素标准溶液 (20 ng/mL) 的多反应监测 (MRM) 提取离子色谱图

见图 B. 1~图 B. 12。

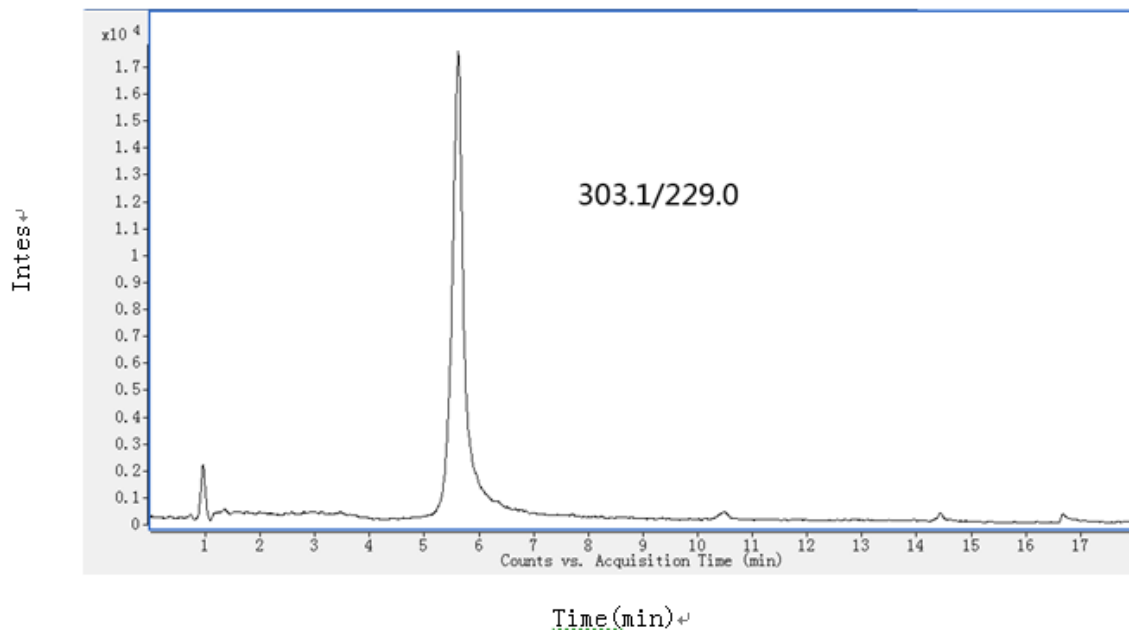


图 B. 1 飞燕草色素标准溶液 (20 ng/mL) 的多反应监测 (MRM) 提取离子色谱图 (303. 1/229. 0)

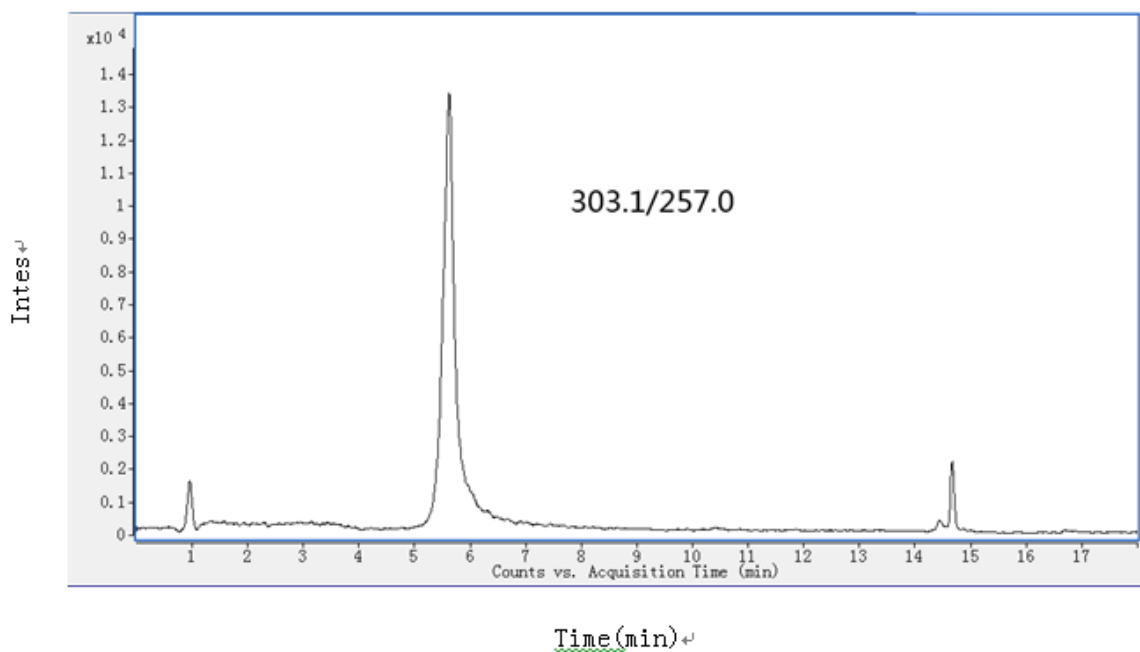
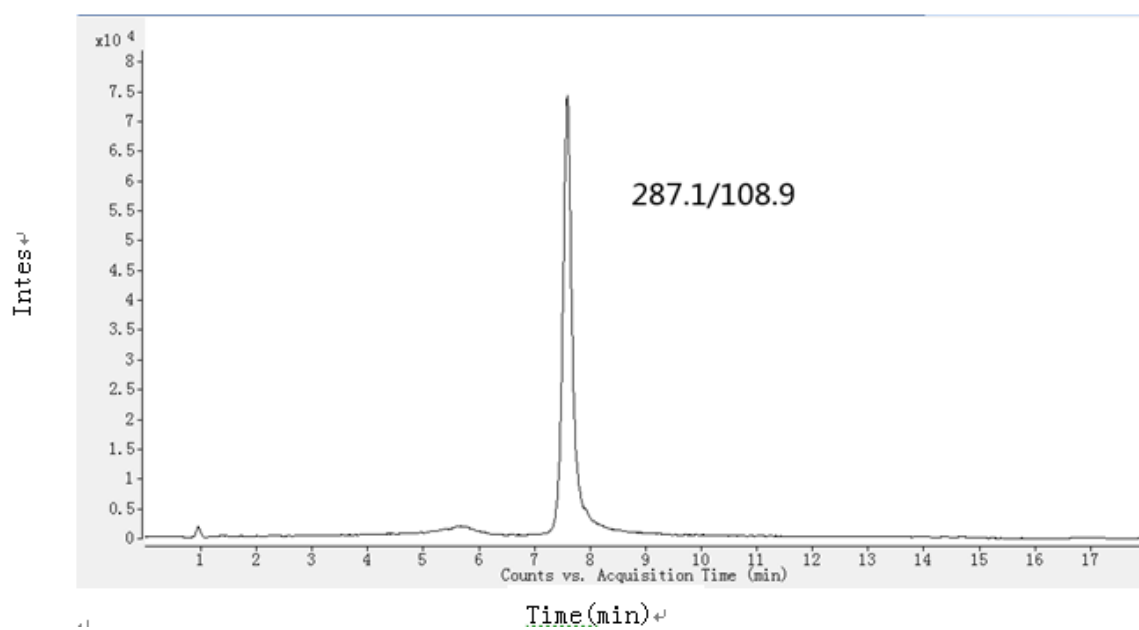
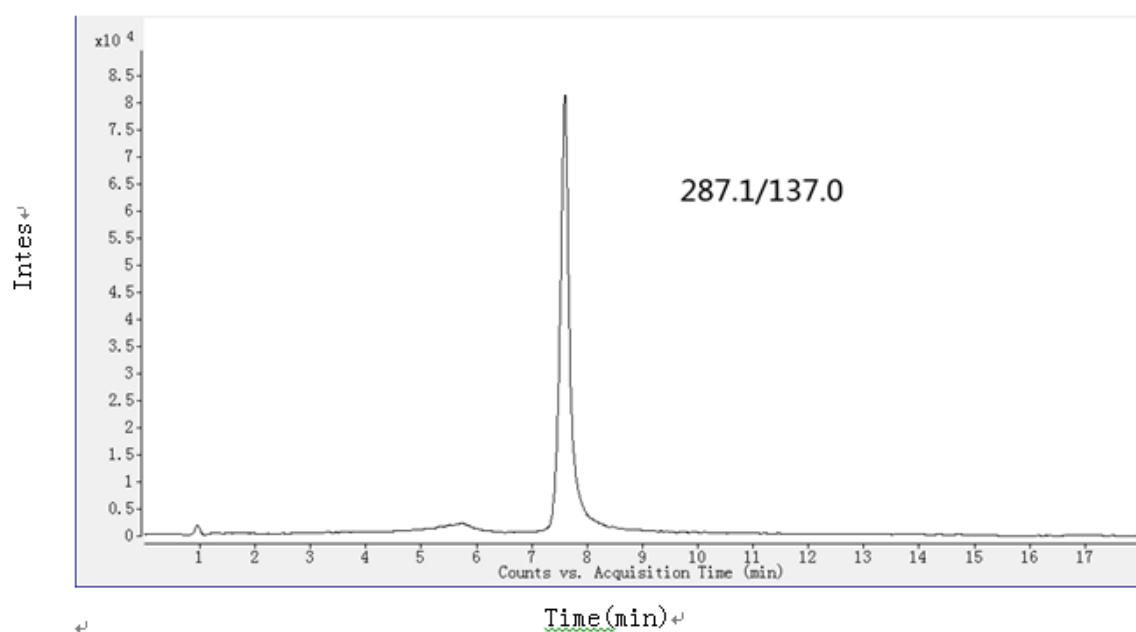


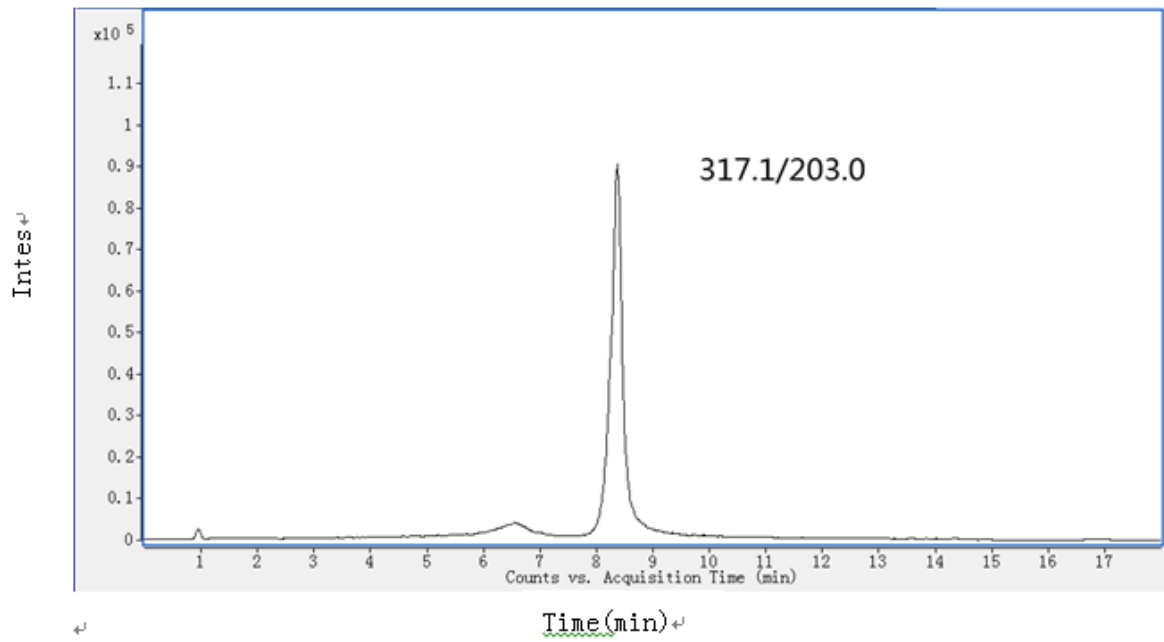
图 B. 2 飞燕草色素标准溶液 (20 ng/mL) 的多反应监测 (MRM) 提取离子色谱图 (303. 1/257. 0)



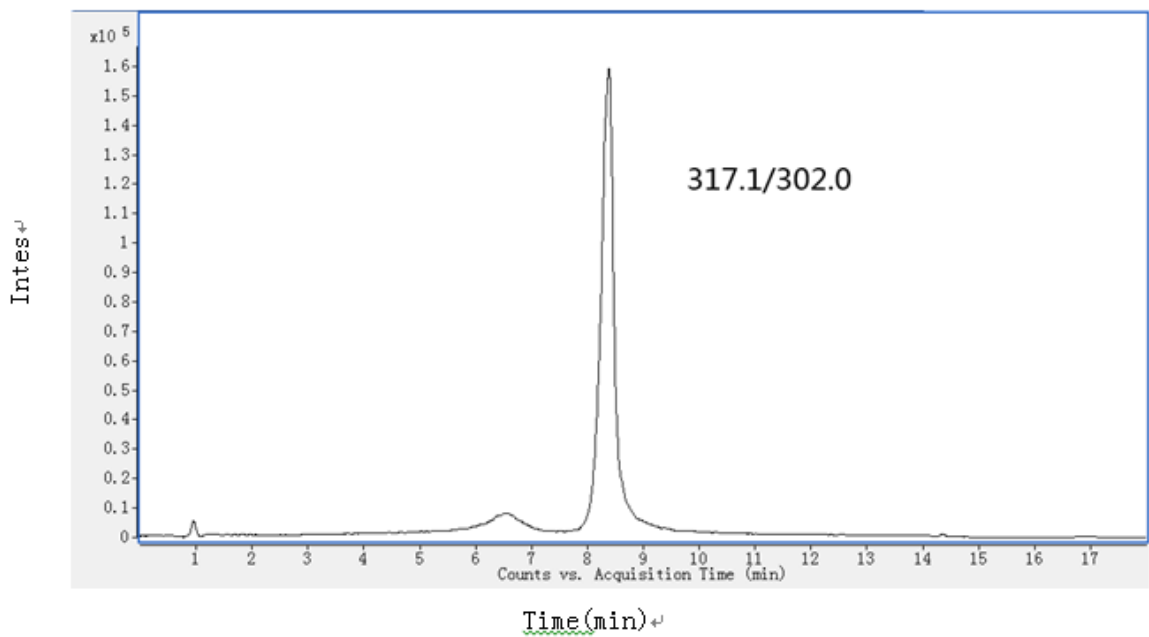
图B.3 矢车菊色素标准溶液（20 ng/mL）的多反应监测（MRM）提取离子色谱图（287.1/108.9）



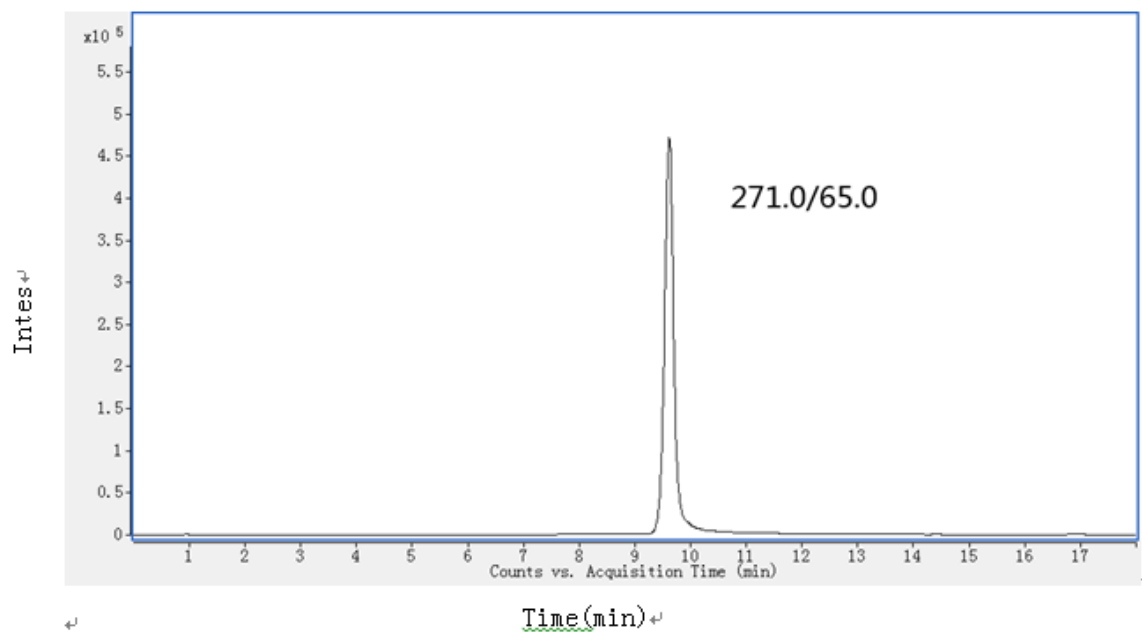
图B.4 矢车菊色素标准溶液（20 ng/mL）的多反应监测（MRM）提取离子色谱图（287.1/137.0）



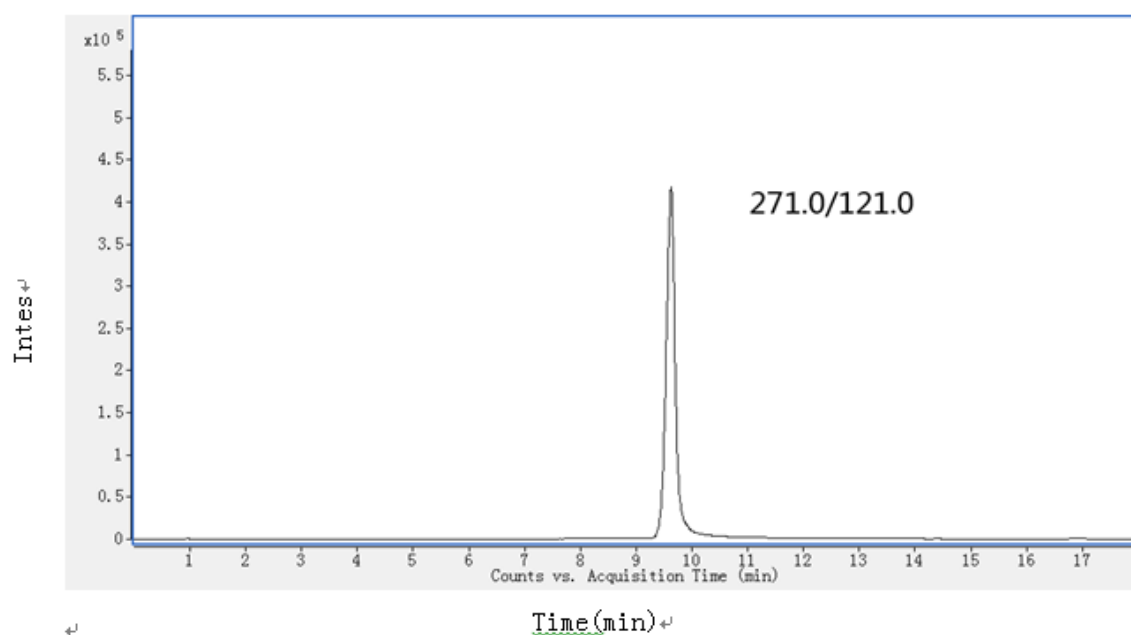
图B.5矮牵牛色素标准溶液（20 ng/mL）的多反应监测（MRM）提取离子色谱图（317.1/203.0）



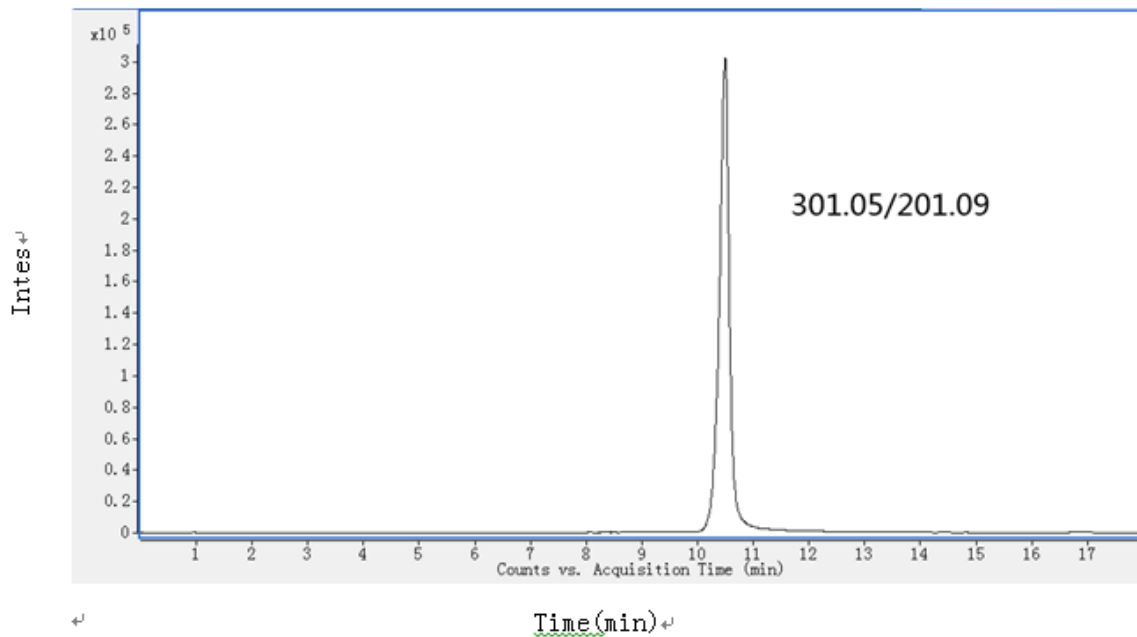
图B.6矮牵牛色素标准溶液（20 ng/mL）的多反应监测（MRM）提取离子色谱图（317.1/302.0）



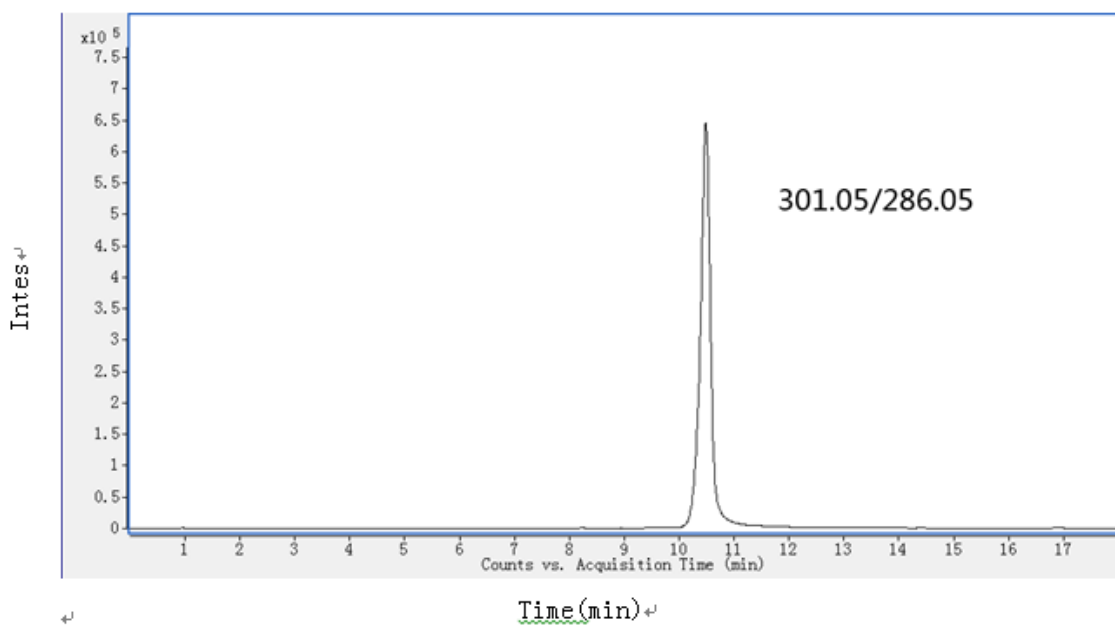
图B.7 天竺葵色素标准溶液（20 ng/mL）的多反应监测（MRM）提取离子色谱图（271.0/65.0）



图B.8 天竺葵色素标准溶液（20 ng/mL）的多反应监测（MRM）提取离子色谱图（271.0/121.0）

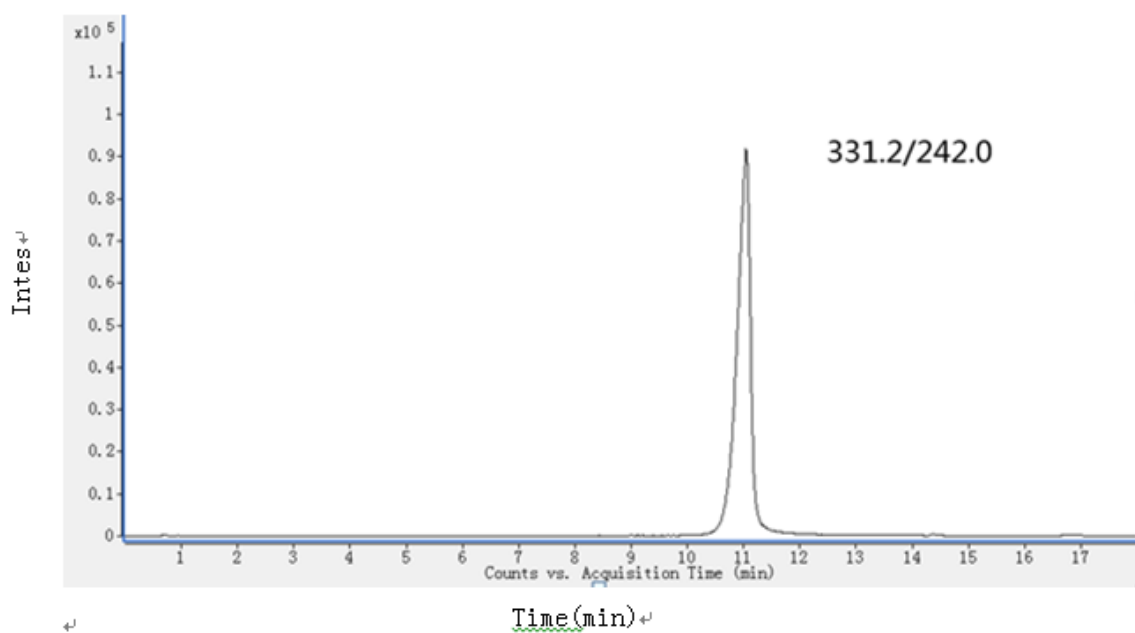


图B. 9 芍药素标准溶液（20 ng/mL）的多反应监测（MRM）提取离子色谱图（301.05/201.09）

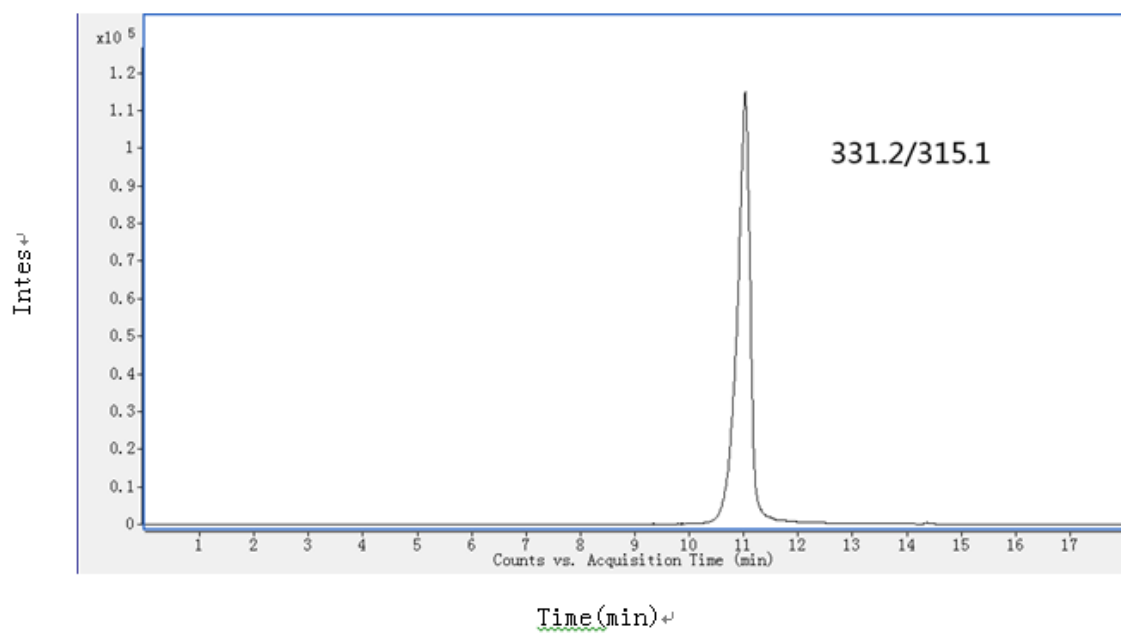


图B. 10 芍药素标准溶液（20 ng/mL）的多反应监测（MRM）提取离子色谱图（301.05/286.05）





图B.11 锦葵色素标准溶液（20 ng/mL）的多反应监测（MRM）提取离子色谱图（331.2/242.0）



图B.12 锦葵色素标准溶液（20 ng/mL）的多反应监测（MRM）提取离子色谱图（331.2/315.1）

中华人民共和国团体标准  
六堡茶中花青素的测定 高效液相色谱法/  
三重四极杆液质联用法  
T/GXAS 942—2025  
广西标准化协会统一印制  
版权专有 侵权必究