团体标准《肉桂及其制品中香豆素含量的测定 液相色谱—串联质谱法》（征求意见稿）

编制说明

一、任务来源、起草单位、主要起草人

根据《广西标准化协会关于下达2025年第十五批团体标准制修订项目计划的通知》（桂标协〔2025〕115号）文件精神，由广西—东盟食品检验检测中心〔国家市场监督管理总局技术创新中心（天然香料香精）〕、中国农业大学食品科学与营养工程学院、岛津企业管理（中国）有限公司、广西药食同源资源开发重点实验室、广西壮族自治区产品质量检验研究院、贺州市检验检测中心、广西壮瑶药技术创新中心、崇左市食品药品检验所等单位共同起草的团体标准《肉桂及其制品中香豆素含量的测定 液相色谱—串联质谱法》（项目编号：2025-1508），已获立项。

为高质量编制团体标准《肉桂及其制品中香豆素含量的测定 液相色谱—串联质谱法》，由起草单位成立标准编制工作组并进行如下分工：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **姓 名** | **职称/职位** | **工作单位** | **主要负责工作** |
| 杨黎 | 副主任药师/副部长 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 统筹主持标准编制工作 |
| 覃文霞 | 副主任技师 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 参与标准编制工作，组织人员进行标准发布后的宣贯培训。 |
| 韦升坚 | 副主任技师/办公室主任 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 参与标准编制工作，组织人员进行标准发布后的宣贯培训。 |
| 陈麒宇 | 助理工程师 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 陆石英 | 副主任药师 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 张言 | 副主任药师/科长 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 黄高武 | 仪器工程师 | 岛津企业管理（中国）有限公司 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 吕晨艳 | 教授/教师 | 中国农业大学食品科学与营养工程学院 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 刘珈伶 | 正高级实验师/副部长 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 黄玲 | 工程师/科长 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 何善廉 | 高级工程师/副所长 | 广西壮族自治区产品质量检验研究院 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 农毅清 | 主任药师/部长 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 冯广福 | 检验员 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 兰斌 | 实验师 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 杨方方 | 高级工程师 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 刘星 | 高级工程师 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 李华冰 | 中级工程师 | 崇左市食品药品检验所 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 王先锋 | 工程师/质量管理员 | 深圳市格物正源质量标准系统有限公司 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 陈宁周 | 副主任药师 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 冯婷 | 主管药师 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 廖夏云 | 副教授/教研室主任 | 广西药食同源资源开发重点实验室 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 陈清 | 教授/教研室主任 | 广西壮瑶药技术创新中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 胡王艳 | 高级工程师/食品检验所所长 | 贺州市检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 韦福广 | 高级工程师/中心副主任 | 贺州市检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 苏俞友 | 助理工程师 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 黄钰婷 | 主管中药师 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 万涛 | 工程师 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 覃思 | 工程师 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 陈佳丽 | 主管药师 | 广西壮族自治区产品质量检验研究院 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 李枝文 | 工程师 | 广西壮族自治区产品质量检验研究院 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 赵莉莉 | 初级工程师 | 崇左市食品药品检验所 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |
| 黄春媛 | 技师 | 崇左市食品药品检验所 | 对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。 |

二、制定标准的必要性和意义

肉桂是樟科樟属植物，在热带及亚热带地区广为栽培，广西肉桂产量巨大。肉桂作为一种全球广泛使用的药食同源物质，不仅是传统烹饪中不可或缺的增香辛香料，也因其蕴含的多种生物活性成分而在食品、药品、化妆品、香烟等领域占据重要地位。肉桂主要活性成分包括桂皮醛、肉桂酸、丁香酚、香豆素等，然而，其中所含的香豆素成分，近年来因其潜在的安全风险而受到国际食品安全监管机构和科研界的密切关注。

香豆素是一类苯并α-吡喃酮化合物，天然存在于肉桂等多种植物中。虽然低剂量香豆素在研究中显示出抗炎等潜在生物活性，但流行病学与毒理学研究均表明，长期或过量摄入会导致饮食失调、头晕恶心，甚至会对肝肾等器官造成损伤。毒理实验发现，香豆素对小鼠胚胎有毒性，能引起痛觉消失，使中性胆碱醋酶发生变化，对大鼠为可疑致肿瘤物。这种风险认知已直接转化为日益严格的国际法规。2017年世界卫生组织国际癌症研究机构也将香豆素列为3类致癌物。GB 2760—2024《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》中没有列出香豆素，欧盟、美国等则禁止香豆素作为食品添加剂使用。欧洲食品安全局明确设定了香豆素的每日可耐受摄入量（TDI）。更具贸易导向性的实践来自印度食品安全标准局，其于2021年发布公告，要求对所有进口肉桂进行香豆素含量检验，并规定其含量不得超过0.3% 。这对以中国为代表的肉桂主要出口国构成了明确的技术性贸易壁垒。然而，我国现行有效的GB 5009.284-2021《食品安全国家标准食品中香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素的测定》主要针对婴幼儿配方食品、糕点、饮料、乳制品以及小麦粉等终产品，针对肉桂及其制品的香豆素检测标准尚属空白。标准方法的缺失，使得生产源头质量控制、进出口合规判定以及精准的膳食暴露评估均缺乏统一、权威的技术依据，凸显了建立专属检测方法的紧迫性。

在香豆素检测领域，诸多分析方法已被探索和应用，但它们各自在应对肉桂及其制品复杂基质时均显露出局限性。高效液相色谱法（HPLC-UV）是实验室的常规装备，成本相对较低，但仪器检出限较高。有研究采用高效液相色谱法同时测定肉桂中的肉桂酸、香豆素、桂皮醛等多种成分，但其根本缺陷在于选择性不强，需要复杂的前处理步骤。气相色谱-质谱联用法（GC-MS）具有良好的分离能力和确证功能，但其应用前提是目标物需具备足够的挥发性或经衍生化后挥发。香豆素虽然具有一定挥发性，但在面对沸点范围宽、成分极其复杂的肉桂精油基质时，基质干扰效应依然明显，存在假阳性风险。

这些方法学上的挑战，呼唤一种能够在特异性、灵敏度、抗干扰性和分析通量之间取得更佳平衡的技术方案。液相色谱-串联质谱法，特别是超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术，凭借其独特的工作原理，成为应对上述挑战的理想选择。该技术将UPLC的高效分离能力与三重四极杆质谱的多反应监测模式相结合，实现了分析性能的飞跃。卓越的选择性与抗干扰能力：这是LC-MS/MS最核心的优势。MRM模式通过选择性监测目标化合物母离子预定的特征子离子对，相当于为待测物设置了“分子指纹”级别的双重身份验证（母离子质量数→子离子质量数）。即使色谱分离未能将香豆素与所有干扰物完全分开，质谱的高选择性检测也能有效排除绝大多数共流出基质的干扰，从根本上解决了假阳性问题，确保了定性的唯一性和定量的准确性。极高的灵敏度与低检测限：MRM模式将质谱的检测能量高度聚焦于特定离子对，极大地降低了化学噪声，使信噪比显著提升。这使得LC-MS/MS能够轻松达到μg/kg甚至更低的检测限和定量限，完全满足对肉桂及其制品中可能存在的痕量香豆素进行监控的要求，为早期风险预警提供了技术可能。

本标准通过优化提取及净化条件，建立高效液相色谱-串联质谱法测定肉桂及其制品中香豆素含量的方法，并进行方法学考察，以期为填补当前标准空白，为今后探索香豆素含量与肉桂品种、地理来源、加工工艺之间的相关性，为低风险品种选育和安全生产提供科学指导。推动该方法的建立、验证与标准化应用，将直接服务于消费者健康保护、食品产业合规生产以及应对国际贸易挑战，具有重要的现实意义和广阔的应用前景。

三、主要起草过程

**（一）成立标准编制工作组**

团体标准《肉桂及其制品中香豆素含量的测定 液相色谱—串联质谱法》项目任务下达后，广西—东盟食品检验检测中心〔国家市场监督管理总局技术创新中心（天然香料香精）〕成立了标准编制工作组，起草单位制定了起草编写方案与进度安排，明确任务职责，确定工作技术路线，开展标准研制工作。具体标准编制工作由广西—东盟食品检验检测中心〔国家市场监督管理总局技术创新中心（天然香料香精）〕、中国农业大学食品科学与营养工程学院、广西药食同源资源开发重点实验室、广西壮族自治区产品质量检验研究院、广西壮瑶药技术创新中心、贺州市检验检测中心、崇左市食品药品检验所等单位负责人组成的标准编制工作组完成。

编制工作组下设三个组，分别是资料收集组、草案编写组、标准实施组。

资料收集组负责国内外有关肉桂及其制品中香豆素含量的测定的文献资料的查询、收集和整理工作，查阅前人对肉桂及其制品中香豆素含量的测定的研究情况。

草案编写组负责起草标准草案、征求意见稿和标准编制说明、送审稿及编制说明的编写工作，包括后期召开征求意见会、网上征求意见，以及标准的不断修改和完善。

标准实施组负责团体标准《肉桂及其制品中香豆素含量的测定 液相色谱—串联质谱法》发布后，组织相关企事业单位开展标准宣贯培训会，对标准进行详细解读，让相关人员了解标准，并根据标准对液相色谱—串联质谱法测定肉桂及其制品中香豆素含量进行规范化操作，并对标准实施情况进行总结分析，不断对团体标准提出修正意见。

**（二）收集整理文献资料**

标准编制工作组收集了国内有关“肉桂及其制品中香豆素含量的测定”“ 液相色谱—串联质谱法”相关文献资料。主要有：

[1] 中华人民共和国卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局.食品安全国家标准 食品中香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素的测定:GB 5009.284-2021[S].北京:中国标准出版社, 2021.

[2] Mert A，Qi A M，Bygrave A，Stotz H U. Food Control，2022，133（Part A）：108616.

[3] Kulsoom D，Sarah-Marie A E D，Sun Y C，Ana M R，Joseph B. Toxicol. Appl. Pharmacol.，2021，410：115354.

[4] HSIEH CYJ, SUN M, OSBORNE G, et al. Cancer hazard identification integrating human variability: The case of coumarin [J]. Int J Toxicol, 2019, 38(6): 50‒552.

[5] 高心雨,叶玲,曾广丰,等.UPLC-Q-TOF/MS法测定桂皮中香豆素含量[J].中国酿造,2022,41(11):217-222.

[6] 张永,丁越, 杨骏, 等.一测多评法同时测定肉桂药材中4种成分的含量[J].中华中医药学刊,2021,39(02):51-55.

**（三）研讨确定标准特色、创新点和主体内容**

1、标准特色和创新点

采用高效液相色谱-串联质谱法，多反应监测模式扫描，利用高效液相色谱-串联质谱法,对肉桂及其制品中香豆素进行快速定性定量检测,避免了传统高效液相色谱法的假阳性干扰，通过优化离子源参数，提高检测灵敏度，可满足痕量香豆素的检测需求。方法验证覆盖肉桂、肉桂粉等多种形态样品,建立适用于全品类肉桂制品的统一检测方法，填补了桂油等脂溶性产品中香豆素检测的技术空白。该方法的建立为肉桂产品质量安全监管提供了关键技术支撑,其创新性主要体现在高特异性、高灵敏度等方面。

2、主体内容

标准编制工作组在对收集的资料进行整理研究之后，准编制工作组召开了标准编制会议，对标准的整体框架结构进行了研究，并对标准的关键性内容进行了初步探讨。经过研究，标准的主体内容确定为原理、试剂和材料、仪器和设备、样品、分析步骤、结果计算、检出限、定量限、精密度和准确度、试验报告。

**（四）调研及形成草案、征求意见稿**

2025年5月1日-5月30日，标准制定任务下达后，首先确定了工作组的主要组成人员及人员分工，主要由从事标准制修订、检测分析的专业研究人员组成；召开了标准起草会议，项目负责人对标准的立项情况做了详细介绍，制定了标准研制的总体思路和框架。

2025年5月30日-6月30日，工作组收集相关材料，查阅研读我国真菌毒素分布特点、产品认证情况、标准以及科技文献资料，决定制定肉桂及其制品中香豆素含量的测定 液相色谱-串联质谱法标准，并制定了初步的标准编制工作计划。

2025年6月30日-2025年7月30日，工作组按照计划任务书的要求，结合制定标准的要求，调研实验方案，工作组赴广西香精香料协会、广西供应链服务集团南宁物资储运有限公司、广西庚源实业集团有限公司、广西天雨农业科技有限公司、广西中医药大学、中国农业大学、贺州市检验检测中心等行业协会、企业、检测机构、高校等地进行广泛调研。

2025年8月1日-12月30日，工作组查阅、收集和整理了国内外有关研究进展和专利、标准、法规等文献资料。方法起草工作组通过查阅相关资料和文献，确定了本技术规范的基本框架。包括：范围、规范性引用文件、原理、试剂和材料、仪器和设备、样品制备和提取、测定条件、结果计算与表达、定量限、精密度等内容。参考GB/T 27404 《实验室质量控制规范 食品理化检测》和GB 5009.284-2021《食品安全国家标准食品中香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素的测定》，结合本实验室的条件和本方法的技术特点，摸索并优化了标准曲线配制方案、制样和前处理方法、仪器方法，并开展了定量限、精密度、准确度等技术指标的技术论证，建立了一种肉桂及其制品中香豆素含量的测定 液相色谱-串联质谱法的测定方法。根据论证结果，工作组共同讨论起草形成了《肉桂及其制品中香豆素含量的测定 液相色谱-串联质谱法》团体标准的技术框架和主要内容，初步形成了标准草案。经过多次讨论、研究、征求意见，对存在的问题进行了修订，初步确定了标准初稿并对初稿进行多次反复修改，形成征求意见稿及编制说明。

四、制定标准的原则和依据，与现行法律、法规的关系，与有关国家标准、行业标准的协调情况

**（一）编制原则**

**1、实用性原则**

本文件是在充分收集相关资料和文献，分析肉桂及其制品中香豆素含量的测定当前现状，在现有相关液相色谱—串联质谱法测定肉桂及其制品中香豆素含量要求的基础上，结合编制单位多年相关经验而总结起草的，符合当前肉桂及其制品中香豆素含量的测定发展的方向，具有较强的实用性和可操作性。

**2、协调性原则**

本文件编写过程中注意了与肉桂及其制品中香豆素含量的测定相关法律法规的协调问题，在内容上与现行法律法规、标准协调一致。

**3、规范性原则**

本文件严格参照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》编写本标准的内容，保证标准的编写质量。

**4、前瞻性原则**

本文件在兼顾当前区内肉桂及其制品中香豆素含量的测定现实情况的同时，还考虑到了液相色谱—串联质谱法测定肉桂及其制品中香豆素含量技术快速发展的趋势和需要，在标准中体现了个别特色性、前瞻性和先进性条款，作为对液相色谱—串联质谱法测定肉桂及其制品中香豆素含量工作发展的指导。

**（二）编制依据**

本标准严格按照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》的规则起草，标准主要内容参考相关标准文件并结合起草单位多年的相关经验和实践验证情况总结进行起草。

**（三）与现行法律、法规的关系，与有关国家标准、行业标准的协调情况**

本编制工作组承诺本标准内容与各项指标不违反相关法律法规要求，且不低于国家强制性标准、推荐性国家标准和行业标准要求。

经查阅，截至目前，暂无《肉桂及其制品中香豆素含量的测定 液相色谱—串联质谱法》标准。与“肉桂”有关的标准主要有《GB/T42780-2023肉桂质量等级》、《GB 28346-2012 食品安全国家标准 食品添加剂 肉桂醛》、《GB 1886.207-2016 食品安全国家标准 食品添加剂 中国肉桂油》《DB4453/T 11-2022地理标志产品罗定肉桂》 《DB45/T 227-2022地理标志产品广西肉桂》等，上述标准均未涉及肉桂中的香豆素含量的测定液相色谱-串联质谱法的内容。

五、主要条款的说明

团体标准《肉桂及其制品中香豆素含量的测定 液相色谱—串联质谱法》的主要内容包括：原理、试剂和材料、仪器和设备、样品、分析步骤、结果计算、检出限、定量限、精密度和准确度、试验报告。本文件参考了GB 5009.284-2021《食品安全国家标准食品中香兰素、甲基香兰素、乙基香兰素和香豆素的测定》的液相色谱-质谱/质谱法，制定肉桂及肉桂制品中香豆素的检测方法。本方法标准草案附录A中提供香豆素标准物质的提取离子色谱图。本文件主要内容及依据来源说明如下：

**(一）原理**

试样经乙腈超声提取，经分散固相萃取净化，过滤后，滤液供高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪测定，外标法定量。

**(二）试剂和材料**

所用试剂和材料按检测所需分别列出。试剂主要包括甲酸、乙腈、盐酸、无水氯化钠、香豆素标准品、标准储备液（1 mg/mL）、标准中间液（1 μg/mL）、标准系列工作溶液

材料主要包括：微孔滤膜、QuEChERS净化粉末。

**(三）仪器和设备**

试验所需的仪器和设备如下：

1、高效液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI源）。

2、电子天平：感量分别为1 mg和0.01 mg。

3、超声波清洗仪。

4、涡旋振荡器。

5、离心机：转速≥8 000 r/min。

**(四）样品**

一般液态试样应匀浆或粉碎均匀，粉碎均匀后于0 ℃～4 ℃下保存。基质均匀的半固态试样和粉状试样按以下方法处理：准确称取样品1.0 g（精确至0.001 g）于50 mL具塞离心管中，加2.5 mL水，震荡摇匀后加入10 mL乙腈和0.25 mL的盐酸溶液，涡旋震荡5 min，超声提取15 min，8 000 r/min离心5 min，将上清液转移至另一干净离心管，重复提取一次，离心后合并上清液，加入5g无水氯化钠，振摇1 min，8 000 r/min离心5 min，取上层有机层净化。

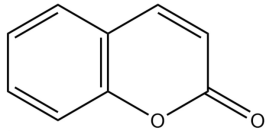
取上述有机层1.5 mL，加入QuEChERS净化粉末，涡旋震荡1 min，8 000 r/min离心5 min，上清液用微孔滤膜过滤，取续滤液，根据实际浓度适当用乙腈稀释至标准曲线线性范围内，供液相色谱-串联质谱仪测定。起草单位还进行了化合物样品先处理的条件优化，结果如下：

**1、化合物性质及标准物质稳定性**

香豆素化合物信息如表1所示，结构如图1所示。参考GB 5009.284-2021配制香豆素的标准储备液（1000 mg/L）、标准中间液（10 mg/L），-18℃下避光保存，保存期分别为8个月和3个月，因此确定了标准草案的储备液和中间液的配制、存储方案和保质期。

**表1 香豆素的中文名称、英文名称、CAS号、分子式、相对分子质量**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **中文名称** | **英文名称** | **CAS号** | **分子式** | **相对分子**  **质量** |
| 香豆素 | Coumarin | 91-64-5 | C9H6O2 | 146.15 |



**图1香豆素结构式**

**2、样品提取溶剂的选择**

香豆素在甲醇、乙腈中的溶解性良好，分别考察甲醇、乙腈两种溶剂对肉桂、香油、肉桂奶茶、酱料四种基质中香豆素的提取效果，结果（见图2）显示，甲醇在提取香豆素含量较大的奶茶和肉桂样品时，所得提取率较低。相比甲醇，乙腈的提取能力更强，四种基质中都能得到较满意的提取率，且在后续的QuEChERS净化中有较强的盐析效应，加入NaCl后，乙腈在水中的溶解度急剧下降，能迅速形成清晰、稳定的上层有机相（乙腈相），所以选择乙腈作为提取溶剂。

**图2甲醇和乙腈对四种基质中香豆素的提取率**

**3、净化方法的考察**

在不净化的情况下，用乙腈提取肉桂、香油、肉桂奶茶、调味料四种基质中的香豆素，并做加标回收实验。结果（见表2）显示，酱料和香油的回收率基本满足要求，但肉桂和奶茶回收率不理想，基质干扰严重，所以需要一种净化方法，去除样品中的蛋白质、糖、有机酸、色素等杂质，降低基质干扰。

|  |  |
| --- | --- |
| 名称 | 回收率% |
| 酱料 | 105 |
| 香油 | 111 |
| 奶茶 | 139 |
| 肉桂 | 144 |

**表2 提取后不净化的回收实验**

采用固相萃取柱能净化样品，降低基质效应。亲水亲脂平衡HLB固相萃取柱具有广谱保留作用， QuEChERS净化管能有效去除糖、有机酸、色素、蛋白质等杂质， WAX混合型弱阴离子交换固相萃取柱对酸性物质具有保留作用。实验考察这3种净化方式对香豆素测定的影响，结果（见图3）显示，由于香豆素酸性太弱，WAX柱的阴离子交换能力基本无效，仅靠较弱的反相作用保留，导致香豆素穿透，保留很弱。HLB柱及QuEChERS法的回收率较好，由于HLB净化需要淋洗、洗脱等复杂步骤，而QuEChERS净化法操作更为简单，因此本文选择QuEChERS净化法。

**图3 三种净化方式的考察**

香豆素在碱性条件下易水解开环，但在酸性环境下通常稳定。QuEChERS净化常用的PSA吸附剂呈碱性，为了保证香豆素的稳定性，需加入酸维持体系的酸性环境。分别考察QuEChERS净化时使用盐酸和甲酸，结果显示，使用甲酸时回收在66.7~89.6%，使用盐酸时回收在86.3%~118.1，盐酸能获得更满意的回收率。这可能是因为盐酸作为不挥发的强酸，能更好的控制环境酸度；另外盐酸与氯化钠属于同一阴离子体系，协同作用好，能最大化盐析效率，从而获得稳定的两相分离。由此确定QuEChERS净化时加入盐酸。

**(五）分析步骤**

**1、液相色谱条件的优化**

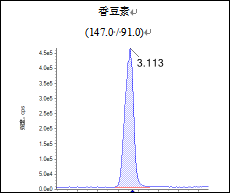
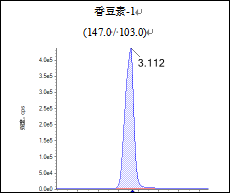
本方法参考了GB 5009.284-2021的液相色谱-质谱条件，采用高选择性高灵敏度的MRM作为扫描模式。根据化合物在正负不同电离模式下的响应值、峰形和稳定性确定了正离子电离方式。实验考察了液质联用常用的有机流动相甲醇和乙腈。结果显示，相同条件下香豆素乙腈作为有机相为的出锋时间为2.82min，甲醇作为有机相的出锋时间为4.51 min，二者均能有效检出，但乙腈作为有机相的峰形更好，本方法选择乙腈作为有机相。并采用挥发性的甲酸来调节水相流动相酸度以提高离子化效率和改善峰形，甲酸浓度选择为0.5%。由此确定了流动相组成为0.5%甲酸水溶液-甲醇。

为了提高待测物的分离效果和检测灵敏度，分别考察7种色谱柱Shim-pack GIST C18（2.1×100 mm，2.0 μm）、TYPE MG3-H（2.0×100 mm，3.0 μm）、Kinetex -XB-C18 （2.1×100 mm，2.6 μm）、CAPCELL PAK HR （2.1×100 mm，2.0 μm）、Poroshell 120 （2.1×100 mm，2.7 μm）、Bridge Phenyl Column（2.1×150mm，3.5 μm）和ACQUITY BEH（2.1×100mm，1.7μm）的检测效果。结果表明，香豆素成分均能在7种色谱柱的梯度洗脱条件下检出，但ACQUITY BEH色谱柱柱效更高，色谱柱柱压更低且峰形和化合物响应更优。故最终选用ACQUITY BEH色谱柱作为分析柱。由于检测的样本类型种类差异较大且存在其它提取物干扰，为更好的维护色谱柱和提高分析准确性，方法采用梯度洗脱模式，液相色谱条件如下：a) 色谱柱：C18柱（1.7 μm，2.1×100 mm），或性能相当者；b) 流动相：A为0.5％甲酸水溶液（5.2.1），B为乙腈（5.1.3），梯度洗脱程序见表1；c) 流速：0.3 mL/min；d) 柱温：40 ℃；e) 进样量：5 μL。

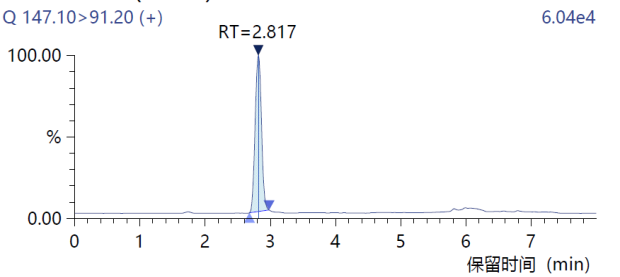
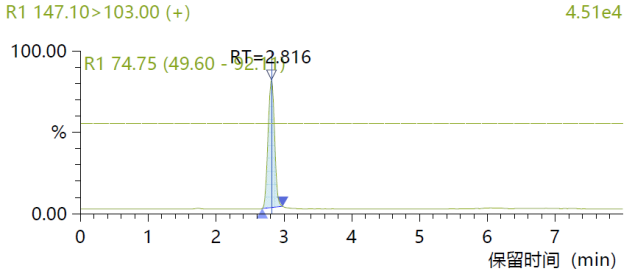
**2、质谱条件的优化**

实验配制1 μg/mL的香豆素成分标准溶液标准溶液注入岛津三重四极杆液质联用仪LCMS-8050中，基于目标化合物的相对分子质量，确定质荷比（m/z）的扫描范围，设定母离子质谱扫描范围为m/z 100～250，在正负离子模式下进行质谱全扫描获取母离子质谱图，结果表明香豆素为[M＋H]＋呈现显著响应信号，比负离子模式高出了多倍。因此，本方法选择响应相对高稳定性强的正离子模式。

参考GB 5009.284-2021，分别在岛津LCMS-8050和AB 5500上查找信号最佳的离子对作为监测离子对，以香豆素标准溶液（50ng/mL）为实验对象分别在岛津LCMS-8050和AB 5500上考察其监测离子对的响应，如图4-5所示，所选监测离子对均有较好的信号响应，且峰形好、无分叉，干扰少。两台仪器上的监测离子对偏差不大，本文选择147.1<91.2和147.1<103.0作为定性和定量监测离子对。

**图4 AB5500的监测离子色谱图**

**图5 岛津LCMS-8050的监测离子色谱图**

实验配制0.2 μg/mL的香豆素成分标准溶液，在岛津三重四极杆液质联用仪LCMS-8050上用双通串联直接进样。在ESI+模式下，对香豆素成分裂解产生的m/z 91.2和m/z 103.0 的CE碰撞能、Q1和Q3电压进行优化，其结果显示，香豆素产物离子m/z 91.2在碰撞能为-27 V、Q1电压为-6 V和Q3电压为-36 V时有最优响应；产物离子m/z 103.0在碰撞能为-18 V、Q1电压为-6 V和Q3电压为-10 V时有最优响应。碰撞能优化和电压优化叠加色谱图如图6~图8所示：



**图6 CE碰撞能优化色谱图**



**图7 Q1 Pre偏差电压优化色谱图**



**图8 Q3 Pre偏差电压优化色谱图**

分别以200 ng/mL的香豆素标准溶液，在岛津LC-MS 8050上用针泵连续直接进样。在MRM多反应监测模式下，分别对脱溶剂管温度、离子源温度、加热气流量、雾化气流量、接口温度、接口电压等质谱参数进行了优化。质谱参考条件详见标准草案5.3.2。考虑到不同型号仪器之间的差异，标准文本中明确方法提供的监测离子对等测定条件为推荐条件，各实验室应根据所配置仪器的具体情况作适当调整；在样品基质有测定干扰的情况下，可以选用其他监测离子对。

**3、分析方法评价**

**（1）线性回归方程和检出限实验**

配制2~200ng/mL的香豆素标准系列工作液，以各组分峰面积与浓度作线性回归。所得线性回归方程为y=7774.306x + 7539.816，相关系数*r*=0.9999120，香豆素在2~200 ng/mL质量浓度范围内线性关系良好。

由于无法获得阴性肉桂，所以直接使用阳性肉桂样品按本实验测定，阴性奶茶、阴性香油、阴性酱料按0.02 mg/kg水平加标后按本实验测定，计算信噪比（S/N）为3时的浓度作为检出限，信噪比（S/N）为10时的浓度作为定量限。结果显示（见表3），四种基质的检出限及定量均小于GB 5009.284-2021中的检出限（0.02 mg/kg）和定量限（0.05mg/kg），0.02 mg/kg加标水平的奶茶、香油、酱料信噪比（S/N）均大于10。考虑到不同仪器和实验条件的影响，将本文件的检出限和定量限确定为：当称样量为1 g，定容体积为20 mL时，本方法的检出限为0.02 mg/kg，定量限为0.05 mg/kg。

**表3 香豆素检出限和定量限**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **样品类型** | **检出限/**  **(****μg/kg)** | **定量限/**  **(μg/kg)** |
| 肉桂 | 0.6 | 1.5 |
| 油脂 | 0.6 | 1.8 |
| 半固体酱料 | 0.5 | 1.0 |
| 固体饮料 | 0.6 | 1.3 |

**（2）回收率实验**

实验考察了肉桂、肉桂奶茶、香油、酱料四种基质中香豆素的回收实验，肉桂及肉桂奶茶的加标水平为低于含量、约等于含量和大于含量，香油（含量低于定量限）及阴性酱料的加标水平为定量限、两倍定量限和十倍定量限，各水平平行测定6次，结果如表4-5所示。

**表4 阳性样品回收率实验 (*n*=6)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 添加水平  基质类型 | | 低于含量 | 约等于含量 | 大于含量 |
| 肉桂 | 1 | 117.31 | 119.66 | 120.27 |
| 2 | 110.72 | 119.81 | 116.79 |
| 3 | 116.80 | 113.32 | 118.99 |
| 4 | 118.37 | 116.59 | 118.71 |
| 5 | 115.29 | 117.25 | 116.59 |
| 6 | 115.74 | 117.54 | 117.54 |
| 平均值 | 115.7 | 117.4 | 118.1 |
| RSD (%) | 2.3 | 2.0 | 1.2 |
| 奶茶 | 1 | 86.23 | 105.53 | 112.73 |
| 2 | 89.90 | 104.68 | 113.27 |
| 3 | 84.23 | 105.96 | 111.03 |
| 4 | 97.71 | 109.72 | 108.01 |
| 5 | 94.99 | 109.43 | 112.35 |
| 6 | 98.53 | 106.98 | 111.08 |
| 平均值 | 91.9 | 107.1 | 111.4 |
| RSD (%) | 6.6 | 2.0 | 1.7 |

**表5 阴性样品回收率实验 (*n*=6)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 添加水平  基质类型 | | 定量限 | 两倍定量限 | 十倍定量限 |
| 酱料 | 1 | 87.40 | 95.50 | 88.72 |
| 2 | 93.20 | 84.00 | 88.34 |
| 3 | 96.20 | 81.90 | 87.94 |
| 4 | 83.40 | 90.60 | 87.06 |
| 5 | 97.80 | 81.00 | 87.66 |
| 6 | 88.00 | 84.70 | 87.76 |
| 平均值 | 91.0 | 86.3 | 87.9 |
| RSD (%) | 6.2 | 6.5 | 0.7 |
| 香油 | 1 | 92.19 | 96.85 | 89.38 |
| 2 | 92.40 | 87.07 | 90.82 |
| 3 | 96.59 | 88.17 | 93.13 |
| 4 | 90.87 | 94.23 | 87.11 |
| 5 | 100.66 | 97.48 | 89.31 |
| 6 | 98.03 | 89.62 | 89.33 |
| 平均值 | 95.1 | 92.2 | 89.8 |
| RSD (%) | 4.1 | 4.9 | 2.2 |

香豆素回收率范围在86.3%~118.1%内，相对标准偏差RSD为0.7%~6.6 %，结果符合GB/T 27404-2008的技术要求。考虑到不同基质及实验条件的影响，参考GB 5009.284-2021确定了准确度。

**（3）精密度实验**

将香豆素的3水平标准溶液（2 ng/mL、50ng/mL、200ng/mL）在相同条件下连续重复进样6次。香豆素3水平平均测得浓度分别为（单位：ng/mL）：1.988,50.383,197.993，相对标准偏差RSD分别为2.2%、1.0%、1.1%， RSD均小于5%，进样精密度较好。将香豆素阳性样品，按方法提取，在相同条件下，重复进样3次，连续三天测定香豆素日间精密度，经检测，测定的平均值为394.96 mg/kg，RSD 0.9 %，说明使用该方法所得检测结果准确可靠，精密度高。

**4、方法验证**

**（1）仪器比对**

为考察不同仪器间本方法的可行性，实验采用岛津LCMS-8050和SCIEX Triple Quad™ AB 5500两种不同品牌的三重四极杆串联质谱系统，按本文件方法对相同标准曲线溶液、阳性样品、阴性样品溶液进行检测，标准曲线及样品溶液测定结果如表6所示。

**表6 仪器比对结果汇总表**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **项目** | | **岛津LCMS-8050** | AB 5500 |
| **色谱柱** | | ACQUITY BEH（2.1×100mm，1.7μm） | ACQUITY BEH（2.1×100mm，1.7μm） |
| **保留时间** | | 2.82 | 3.11 |
| **标准**  **曲线** | **方程** | y=7774.306 \* x + 7539.816 | y = 74259.7\*x + 55270.8 |
| ***r*** | 0.9999120 | 0.99909 |
| **阴性样品** | | 未检出 | 未检出 |
| **阳性样品** | | 39.278 mg/kg | 39.229 mg/kg |

结果显示，两种品牌仪器对被测组分的检出均不存在干扰。两种仪器对同一阳性样品的香豆素检测平均值为 39.253 mg/kg，精密度为0.1%，精密度＜10 %，说明本方法在两种仪器间适用性良好，重现性高。

**（2）实验室间比对**

将仪器比对同一奶茶阳性样品，在广西产品质量检验研究院（A）、贺州市检验检测中心（B）进行结果比对。综合两个机构及本中心（C）的验证结果进行分析，结果如表7所示。

**表7 实验室间验结果汇总表**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **机构**  **编号** | **仪器** | **阴性空白含量/mg/kg** | **检出限**  **S/N** | **阳性样品检出结果/g/kg** | | | |
|  | **1** | **2** | **平均结果** | **精密度%** |
| **A** | AB 5500 | 未检出 | 180.1 | 39.781 | 39.603 | 39.7 | 0.4 |
| **B** | 岛津LCMS-8040 | 未检出 | 139.2 | 40.000 | 38.994 | 39.5 | 2.5 |
| **C** | 岛津LCMS-8050 | 未检出 | 115.7 | 39.074 | 39.044 | 39.1 | 0.1 |
| AB 5500 | 未检出 | 171.4 | 38.845 | 39.612 | 39.2 | 2.0 |
| **平均值** | | | | | | 39.4 | / |
| **RSD%** | | | | | | 0.7 | / |

**5、实际样品测定**

在产地为广西、云南和越南的肉桂样品中均检出香豆素，含量高达391.53 mg/kg，本次检测结果显示，肉桂样品均含有香豆素，且含量较高。为保障香料香精产业的高质量发展，急需建立针对肉桂及肉桂制品的相关检测标准。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准研制过程中无重大分歧意见。

七、实施标准的措施

**（一）标准报批发布后，成立标准宣贯工作组**

本标准发布后，成立以主要起草人为成员的标准宣贯工作组，主要负责标准的宣贯实施培训计划制定、标准实施交流会策划、标准实施信息反馈收集和标准实施效果评估等工作，并根据标准实施信息反馈和标准实施效果评估情况，及时组织标准复审修订。

**（二）组织开展标准宣贯培训**

标准发布实施后，标准宣贯工作小组制作标准解读宣贯培训PPT课件和标准核心技术明白书，并按标准宣贯培训计划深入各市县相关机构、单位开展标准宣贯培训，对标准进行逐条解读，让技术人员掌握标准核心内容，助力标准实施落地。

**（三）开展标准实施交流会，收集标准实施反馈信息**

标准起草小组深入各市县相关机构、单位组织技术人员召开标准实施交流会，听取标准实施过程中存在的问题并做好记录和解答，对存在的问题组织专家团队进行研讨，为标准的复审修订做准备。

**（四）开展标准实施效果评估**

标准实施满2年，每年标准宣贯工作组采取网络调查、问卷调查、实地调研、召开座谈会或论证会、专家咨询等方式开展标准实施效果评估，并形成标准实施效果评估报告，为标准的复审修订做准备。

八、其他应当说明的事项

无。

团体标准《肉桂及其制品中香豆素含量的测定 液相色谱—串联质谱法》标准编制工作组

2026年2月3日