团体标准《八角中56种真菌毒素的测定 超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨

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，由广西一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)]提出，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。等单位共同起草的团体标准《八角中56种真菌毒素的测定 超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法》（项目编号：2025-1509），已获立项。

为高质量编制团体标准《八角中56种真菌毒素的测定 超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法》，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 |
| 袁光蔚 | 副主任药师 | 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。 |
| 刘珈伶 | 正高级实验师/副部长 | 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。 |
| 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。 |
| 李海霞 | 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。 |
| 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。 |
| 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。 |
| 王海波 | 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。 |
| 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。 |
| 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。 |
| 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。 |
| 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。 |
| 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。 |
| 曾令阳 | 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。 |
| 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。 |
| 刘常凯 | 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。 |
| 蓝嫄嫄 | 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。 |
| 李璐 | 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。 |
| 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。 |
| 辛丽娜 | 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。 |
| 蒙初曦 | 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。 |
| 林静 | 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。 |
| 黄明杰 | 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。 |
| 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。 |
| 刘双斌 | 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。 |
| 蒙韦玲 | 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。 |

二、制定标准的必要性和意义

2021年6月，广西壮族自治区人民政府印发《关于规范生产经营推动八角产业高质量发展的通知》（桂政办发〔2021〕58号），提出在全区实施八角产业发展战略，使资源优势转化为经济动能优势，推动八角产业高质量发展，研究制定并推广使用硫磺熏制八角的加工方法和标准，重点支持标准化、规范化的加工工艺，支持产品精深加工和综合利用。组织开展八角产业标准比对研究，推进相关地方标准、团体标准的研制，健全八角全产业链标准体系。2023年，自治区政府办公厅印发《广西万亿林业产业三年行动方案（2023—2025年）》，指出要增强特色林产品供给。到2025年，全区特色经济林种植规模保持在5000万亩以上，年稳定供应油茶籽100万吨以上、八角15万吨以上、肉桂150万吨以上。

2024年，《关于落实中共中央国务院关于学习运用“千村示范、万村整治”工程经验有力有效推进乡村全面振兴工作部署的实施意见》（农发〔2024〕1号）指出，要深入实施农业生产和农产品“三品一标”行动，推进品种培优、品质提升、品牌打造和标准化生产，加快绿色、有机、地理标志和名特优新等优质农产品生产基地建设。

作为“世界八角之乡”，广西八角种植面积占全国80%以上，年产量占全球90%以上，是乡村振兴的重要支柱产业。八角兼具药食同源特性，既是重要调味品，又是医药原料，其莽草酸等活性成分具有显著药用价值。广西现有八角种植面积约600多万亩，种植范围遍布全区9市40多个县（市、区）和主要区直国有林场，八角干果年产量18万吨左右，种植面积和产量均占全国90%、全球85%左右，成为名副其实的世界八角生产中心。

从八角出口贸易来看，八角的国际贸易出口产品主要为八角干果与八角茴油。八角干果主要出口英国、美国、法国、德国、西班牙、东南亚以及其他西欧国家，八角油主要出口东南亚国家（印度尼西亚、马来西亚、新加坡、越南、泰国、菲律宾）以及法国、美国、日本、加拿大等国家。与此同时，广西凭借“中国—东盟博览会”坐落于南宁的优势条件，为广西八角产业的发展提供了无限商机。

查阅文献，在中国常见的天然香辛料中真菌毒素污染情况的研究主要集中在辣椒、花椒等类别，且研究的真菌毒素种类主要是目前公认的一些毒性较大的真菌毒素如黄曲霉毒素(aflatoxins, AFs)、赭曲霉毒素(ochratoxin,OT)、伏马菌毒素(fumonisin, FB)等。随着气候、环境的改变以及检测技术的发展，一些新的真菌毒素逐渐引起关注，比如交链孢毒素、新兴镰刀菌毒素、桔青霉素等，这些毒素因研究有限，尚未得到限量监管，也没有标准检验方法。

在真菌毒素的限量标准方面，中国强制标准为GB 2761-2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》，但该标准并不涉及较宽范围的食品种类，监管食品种类非常有限。以八角为例，八角在我国食品类别中被划分为香辛料，在GB2761食品类别说明中香辛料属于调味品，但是标准中仅黄曲霉毒素B1项下规定了调味品的限量为5.0μg/kg，而该限量仅适用于酱油、醋和酿造酱类三种调味品，不适用于八角，其他毒素对调味料基质均无具体规定，气候原因导致广西的作物具有比中国其他地区更有可能感染真菌毒素的风险，因此有必要建立八角中多毒素的快速检测方法并持续追踪污染情况，以保证八角产业良性发展。

依托广西区市场局2023年八角相关科技项目，广西—东盟食品检验检测中心课题组对收集到的生产、流通领域多批次样品进行多种农药残留的高通量检测，结果发现了八角可能受到桔青霉素、杂色曲霉素、交链孢酚3种新兴真菌毒素的污染。因此制定八角中多种真菌毒素的快速准确检测标准迫在眉睫：一是可填补标准空白，完善监管依据；二是提升产品质量安全水平，突破国际贸易技术壁垒；三是促进产业规范化发展，增强我国在国际标准制定中的话语权。尽快启动八角专用农残限量标准制定工作，建立与国际接轨又符合国情的技术规范，为广西八角产业高质量发展提供标准支撑。

三、主要起草过程

**（一）成立标准编制工作组**

团体标准《八角中56种真菌毒素的测定 超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法》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八角中56种真菌毒素的测定的文献资料的查询、收集和整理工作，查阅前人对八角中56种真菌毒素的测定的研究情况。

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《八角中56种真菌毒素的测定 超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法》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，并根据标准对超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法测定八角中56种真菌毒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“八角中56种真菌毒素的测定”“超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法”相关文献资料。主要有：

[1] El Darra, N.; Gambacorta, L.; Solfrizzo, M. Multimycotoxins occurrence in spices and herbs commercialized in Lebanon. Food Control 2019, 95, 63–70.

[2] Gambacorta, L.; El Darra, N.; Fakhoury, R.; Logrieco, A.F.; Solfrizzo, M. Incidence and levels of Alternaria mycotoxins in spices and herbs produced worldwide and commercialized in Lebanon. Food Control. 2019, 106, 106724.

[3] 蒋日红.香飘八桂——广西香料产业小记[J].生命世界，2021（9）: 4-5.

[4] 盛万里，韩祎陟，刘丹，等. 免疫磁珠净化-高效液相色谱法测定香辛料中的黄曲霉毒素[J].农产品加工，2024（10）: 64-66，73.

[5] 黄思瑜，董宪兵，周纯洁，等.超高效液相色谱串联-质谱法同时测定香辛料中7 种真菌毒素，［J］.食品工业科, 2019，40( 14) : 270－274，279.

[6] Jingyang Zhang; Banglei Zhu; Xiaoyu Zhang; et al.CLICK-FLISA Based on Metal–Organic Frameworks for Simultaneous Detection of Fumonisin B1 (FB1) and Zearalenone (ZEN) in Maize [J] Biosensors. Volume 14 , Issue 7 . 2024. PP 355-355

[7] Dan Wei; Jianliang Li; Shuangshuang Zheng;et al.Effective extraction and detection of aflatoxins in cereals using nitrogen-rich benzodiimidazole linkage magnetic covalent organic framework based solid phase extraction and HPLC-MS/MS analysis [J] Food Chemistry: X. Volume 24 , Issue . 2024. PP 101797-101797.

[8] 莫紫梅，王海波，袁光蔚,等.广西地区八角中多种真菌毒素测定前处理方法的优化[J]食品科技，2023,48（01）:298-304

[9] 申慧婧, 张 弛, 周 爽,等. 食品中新兴真菌毒素检测技术及其污染现状研究进展[J]食品安全质量检测学报，2023,14（12）: 203-213

[10] Xiaofeng Ji; Yeyu He; Yingping Xiao;et al. The fate of Alternaria toxin tenuazonic acid (TeA) during the processing chain of wheat flour products and risk control strategies for mycotoxins[J] Food Research International. Volume 194 , Issue . 2024. PP 114941-114941.

[11] Fabian Dick; Alena Dietz; Stefan Asam et al .Development of a high-throughput UHPLC-MS/MS method for the analysis of Fusarium and Alternaria toxins in cereals and cereal-based food. [J] Analytical and bioanalytical chemistry. Volume , Issue prepublish . 2024. PP 1-19.

[12] Veronica Zingales; Maria Rosaria Esposito; Martina Quagliata;et al . Cytotoxic effects induced by combined exposure to the mycotoxins sterigmatocystin, ochratoxin A and patulin on human tumour and healthy 3D spheroids. Journal | [J] Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. Volume 192 , Issue . 2024. PP 114951.

[13] 袁光蔚，莫紫梅，周嵩煜，等.液相色谱-四级杆/静电场轨道阱质谱同时测定粮油中77种真菌毒素[J]中国粮油学报，2022,37（5）: 157-165.

[14] 尹青春，陈小妹，周凌聿，陈春泉，高云慨，李备，梁成美，邓英林，邓浩．龙眼及其制品中44 种真菌毒素高通量检测方法的建立及其膳食暴露风险评估[J/OL]．现代食品科技.https://doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.7.0695

[15] TONG Lanyan,XU Bozhou,NIE Xuemei,et al.Determination of 22 mycotoxins in milk by liquid chromatography-quadrupole/orbitrap mass spectrometry.Chinese Journal of Chromatography,2023,41(11):986-994.

[16]中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会，国家食品药品监督管理总局.GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S]. 北京：中国标准出版社.2017.

[17] 邵亮亮，应美蓉，杜京霖，等. 复合免疫亲和柱净化高效液相色谱法同时测定小麦中的4种真菌毒素[J].食品科技, 2021 ,46 (02): 328-334.

[18] 张烁,周爽,裴晓燕,，等. 免疫亲和柱结合超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中的16种真菌毒素比较研究[J].食品安全质量检测学报 . 2023 ,14 (03): 234-242.

[19] 杨祥龙，毛劲，程玲,等. 分子印迹聚合物在真菌毒素检测中的研究进展[J].化学试剂 . 2024 ,46 (07): 1-10.

[20] 吴天琪,苏丹,张亦琴, 等. 纳米材料标记分子印迹技术分析检测真菌毒素[J].食品研究与开发 . 2021 ,42 (21): 192-200.

[21] 谢思敏，古锶巧，顾利红，等. mPFC-QuEChERS净化联合UPLC-MS/MS法快速测定3种根茎类中药材中16种真菌毒素[J]. 分析测试学报 . 2024 ,43 (07) :1003-1010.

[22] 柳婷婷,张巍巍,史晓梅,等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱法同时测定玉米秸秆饲料中20种真菌毒素[J]. 饲料研究 . 2023 ,46 (22): 119-126.

[23] 张丹，刘柏林，赵紫微，等. PRiME HLB柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定果蔬制品中5种新型真菌毒素[J] 分析化学 . 2023 ,51 (08): 1343-1357.

[24] 易珊珊，杜鑫. PRIME-HLB固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法同时快速检测粮食中4种真菌毒素的含量[J] 云南师范大学学报(自然科学版) . 2020 ,40 (05) :47-52.

[25] 钟世欢，叶佳明，叶磊海，等. 超高压液相色谱-串联质谱法测定粮食中多种真菌毒素残留[J]. 农产品加工 . 2018 (24) : 59-62.

[26] 刘华文，邓美晴，陈北燕. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中47 种农药残留[J]. 食品工业科技，2024，45（9）:255−264.

[27] 黄晓德，钱骅，陈斌，等.常用食用香辛料霉菌污染状况研究，[J]中国野生植物资源，2015,34（6）：13-17.

[28] 黄思瑜, 董宪兵, 邓宇杰,等.重庆地区辣椒、花椒、八角中真菌毒素污染状况分析[J].食品安全质量检测学报，2020,11（21）: 8119-8124.

[29] Pickova Darina; Ostry Vladimir; Malir Jan; et al. A Review on Mycotoxins and Microfungi in Spices in the Light of the Last Five Years. [J]ToxinsVolume 12, Issue 12. 2020.

[30] Veršilovskis, A.; De Saeger, S. Sterigmatocystin: Occurrence in Foodstuffs and Analytical Methods—An Overview. Mol. Nutr. Food Res. 2010, 54, 136–147.

[31] Yoshinari, T.; Takeuchi, H.; Kosugi, M.; Taniguchi, M.; Waki, M.; Hashiguchi, S.; Fujiyoshi, T.; Shichinohe, Y.; Nakajima, M.; Ohnishi, T.; et al. Determination of Sterigmatocystin in Foods in Japan: Method Validation and Occurrence Data. Food Addit. Contam. Part A 2019, 36, 1404–1410.

[32] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the Risk for Public and Animal Health Related to the Presence of Sterigmatocystin in Food and Feed. EFSA J. 2013, 11, 3254–3335.

[33] Díaz Nieto, C.H.; Granero, A.M.; Zon, M.A.; Fernández, H. Sterigmatocystin: A Mycotoxin to Be Seriously Considered. Food Chem. Toxicol. 2018, 118, 460–470.

[34] 王柯新，谭剑斌，李庆，等.基于系统文献检索的桔青霉素遗传毒性分析与识别[J].中国食品卫生杂志，2023,35（8）:1235-1241.

[35] LJG S, PEREIRA A, PENA A, et al. Citrinin in foods and supplements: A review of occurrence and analytical methodologies [J]. Foods, 2020.

[36] FRANK H K. Citrinin［J］. Zeitschrift Für Ernährungswissenschaft，1992，31（3）：164-177.

[37] ARAI M，HIBINO T. Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats[J].Cancer Letters,1983,17(3):281-287.

[38] IARC. IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans Citrinin［B/OL］. 2022.

[39] ALI N，DEGEN G H. Citrinin biomarkers：A review of recent data and application to human exposure assessment ［J］. Archives of Toxicology，2019， 93（11）：3057-3066.

[40] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局，中国国家标准化管理委员会.GB/T 7652-2016 八角[S]. 北京：中国标准出版社.2016.

**（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

建立改良的QuEChERS方法提取，prim HLB固相萃取柱净化，利用超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱，对八角中56种包括受监管的和新兴的真菌毒素进行高通量快速定性定量筛查的方法。与目前检索到的其他方法相比，本方法测定八角中毒素种类更全面，灵敏度更高，成本更低，简便省时，适用于八角中多种真菌毒素的高通量筛查，具有较高的实际应用价值。

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试剂和材料、仪器和设备、样品、分析步骤、结果计算、精密度、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，决定制定超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法快速、高通量、精准定量测定八角中56种真菌毒素标准，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。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，建立了一种高选择性、高灵敏度，既定性又定量的八角中56种真菌毒素的测定方法。根据论证结果，工作组共同讨论起草形成了《八角中56种真菌毒素的测定 超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法》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《八角中56种真菌毒素的测定 超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法》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，分析八角中56种真菌毒素的测定当前现状，在现有相关超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法测定八角中56种真菌毒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，符合当前八角中56种真菌毒素的测定发展的方向，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八角中56种真菌毒素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八角中56种真菌毒素的测定现实情况的同时，还考虑到了超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法测定八角中56种真菌毒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，作为对超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法测定八角中56种真菌毒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《八角中56种真菌毒素的测定 超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法》标准。与“八角”相关的标准主要有《GB/7652-2016八角》、《DB45/T 226-2017地理标志产品广西八角》、《DB45/T 1350-2022地理标志产品 上林八角》、《T/CFNA 6102-2020 八角》、《T/ZSGTS 091-2022 香山之品 八角》、《T/CAI 211-2023 地理标志证明商标 防城八角》、《T/CAI 197-2023地理标志证明商标 玉林八角》等，但上述标准均未见八角本文所述的56种真菌毒素高通量筛查方法的内容。

五、主要条款的说明

团体标准《八角中56种真菌毒素的测定 超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法》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、精密度。本文件主要内容及依据来源说明如下：

**(一）原理**

试样用甲醇、乙腈混合溶液提取，提取液经固相萃取小柱净化，液相色谱-高分辨质谱联用仪检测，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。试剂主要包括甲醇、乙腈、甲酸、乙酸铵、柠檬酸钠、柠檬酸氢二钠、氯化钠、无水硫酸镁、prime HLB固相萃取小柱（规格：6cc，200 mg）及单标标准储备液（1 mg/mL）、混合标准中间液（1 μg/mL）、标准系列工作液。

材料主要包括：微孔滤膜、微孔滤膜。

**(三）仪器和设备**

试验所需的仪器和设备如下：

1、超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI源）。

2、电子天平：感量分别为0.01 mg和1 mg。

3、超纯水机。

4、涡旋振荡器。

5、低温冷冻高速离心机：转速≥8 000 r/min。

6、固相萃取缸。

7、样品粉碎机。

8、筛网：0.425 mm孔径试验筛。

**(四）样品**

八角干果样品经粉碎机粉碎均匀后，过40目筛（6.8），放入聚乙烯袋中备用，试样制备方法具体如下：试样称取2 g试样（精确至0.01 g）于50 mL塑料离心管中，加入10 mL含10％柠檬酸钠和5％柠檬酸氢二钠的水溶液，置于涡旋振荡器上涡旋提取10 min；加入9 mL乙腈和1 mL甲醇，涡旋提取10 min；加入1 g氯化钠和4 g无水硫酸镁，涡旋振荡1 min，以8 000 r/min离心5 min后，取上清液进行净化；将prime HLB小柱安装在预先清洁过的固相萃取缸上方，不给予真空度，无需执行小柱活化步骤，取0.5 mL上清液，使其通过小柱并弃去滤液，再吸取2mL上清液，再次通过小柱并收集滤液；所得滤液经过0.22 μm有机滤膜，待高分辨质谱测定，可根据实际浓度将样品适当稀释至线性范围内。

**(五）分析步骤**

**1、色谱、质谱条件的优化**

**（1）色谱柱的选择**

在本文检测的毒素中，细胞松弛素C和细胞松弛素D是同分异构体，麦角辛宁和Ergosine是同分异构体，[Waters CORTECS UPLC C18柱](https://www.baidu.com/s?rsv_dl=re_dqa_generate&sa=re_dqa_generate&wd=Waters%20CORTECS%20UPLC%20C18%E6%9F%B1&rsv_pq=d9c17af2004f21b1&oq=Waters%20CORTECSTM%20%C2%AE%20UPLC%20%C2%AE%20C18%E6%9F%B1%E7%9A%84%E4%BB%8B%E7%BB%8D&rsv_t=80d0pcfjMopuKjbCilGDnPhfBK29yqIVHhsF+NXpikqNTWdU1krwNu+Tb/VtdoiCrNpa&tn=baiduhome_pg&ie=utf-8" \t "_blank)是一种实心核颗粒柱，优良的分离能力能对细胞松弛素C和细胞松弛素D达到很好的分离，见图1，而对麦角辛宁和Ergosine能基本进行分离并不影响定量，见图2，因此采用该色谱柱进行分析。



**图1 细胞松弛素C和细胞松弛素D的提取离子流图**



**图2 麦角辛宁和Ergosine的提取离子流图**

**（2）流动相的选择**

因为分析的目标化合物较多，考虑仪器采集速率有限，为保证定量采集点数，因此所有化合物均采用正离子模式采集，酸性环境有利于带正电荷的分子离子加合物的离子化效率，因此在流动相中加入小体积甲酸，乙酸铵的加入则可以提供NH4+离子的来源，改善加NH4+化合物的峰型及响应。

## 优化后的色谱条件如下：

色谱柱：Waters CORTECSTM ® UPLC ® C18柱（1.6 μm ，100 mm × 2.1 mm）；流动相A为含0.1%（体积分数）的甲酸和1 mmol/L乙酸铵的水溶液，B为甲醇；流速：0.3 mL/min，柱温40 °C；进样量2 μL；梯度洗脱条件见下表所示：

**表1 液相色谱梯度洗脱程序**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 时间/min | 流速/（mL/min） | 流动相A/% | 流动相B/% |
| 0 | 0.3 | 90 | 10 |
| 2 | 0.3 | 90 | 10 |
| 3 | 0.3 | 80 | 20 |
| 4 | 0.3 | 79 | 21 |
| 5 | 0.3 | 74 | 26 |
| 7 | 0.3 | 74 | 26 |
| 10.5 | 0.3 | 40 | 60 |
| 13.5 | 0.3 | 40 | 60 |
| 14.5 | 0.3 | 5 | 95 |
| 17 | 0.3 | 5 | 95 |
| 18 | 0.3 | 90 | 10 |
| 21 | 0.3 | 90 | 10 |

**（3）质谱条件的确定、数据库及定性方法的建立**

将混合标准溶液进行全扫描模式采集，确定各化合物的最佳电离模式以及加合形式。在优化过程中发现，各目标物在正离子模式下均有较好的响应，为确保定量所需采集点数，最终所有化合物皆采用正离子采集模式进行检测。同时，进行常规的+H、+NH4、+Na三种加合形式对母离子进行提取，取响应强度最强的为其加合形式。采用Full MS /dd MS2采集模式对混合标准溶液进行数据采集，获得化合物的保留时间、母离子质荷比及二级碎片离子信息，将各目标化合物的名称、CAS号、分子式、加合行式、保留时间、二级碎片离子等基本信息输入软件，完成质谱数据库的建立。

利用上述采集方法对八角样品溶液进行上机分析，参考相关高分辨质谱检测方法中确证参数要求，通过数据库对真菌毒素进行筛查确证。在定量方面，选取特征母离子作为定量离子，以系列标准溶液中化合物母离子响应对浓度进行线性方程拟合，根据样品中检出毒素的母离子响应进行含量计算。

优化后的质谱条件及56种真菌毒素的化合物信息和质谱参数如下：

1）离子源：

可加热的电喷雾离子源（HESI-Ⅱ）；喷雾电压：3.20 kV（+）；鞘气：氮气，流速：35 L/min；辅助气：氮气，流速：10 L/min，温度：300 ℃；吹扫气：氮气，流速：0 L/min；离子传输管温度：320 ℃；

2）扫描参数：

质谱数据采集模式：一级母离子全扫描加数据依赖的二级子离子扫描模式（Full MS/dd-MS2）；扫描模式：正离子扫描；Inclusion：on；一级母离子全扫描分辨率：70000；最大注入时间：100 ms；质量扫描范围：70～900 m/z；二级质谱分辨率：17500；触发阈值：2.0e4；最大注入时间：50 ms；归一化碰撞能：20、40、60；动态排除：8.0 s。

其他质谱参数详见表2所示：

**表2 56种真菌毒素的化合物信息和质谱参数**

| **序号** | **化合物** | **CAS** | **加合形式** | **保留时间(min)** | **理论精确质荷比（m/z）** | **测量精确质荷比（m/z）** | **相对质量偏差（×10-6）** | **碎片离子（m/z）** | | | |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | Aflatoxicol | 29611-03-8 | [M+H]+ | 12.41 | 297.07575 | 297.07624 | 1.65 | 269.08084 | 226.06245 | 241.08592 | 254.05736 |
| 2 | Aflatoxin B1 | 1162-65-8 | [M+H]+ | 11.68 | 313.07066 | 313.07152 | 2.75 | 285.07575 | 269.04445 | 201.09101 | 214.06245 |
| 3 | Aflatoxin B2 | 7220-81-7 | [M+H]+ | 11.38 | 315.08631 | 315.08715 | 2.67 | 287.0914 | 259.0601 | 243.06519 | 203.07027 |
| 4 | Aflatoxin G1 | 1165-39-5 | [M+H]+ | 11.05 | 329.06558 | 329.06638 | 2.43 | 243.06519 | 215.07027 | 311.05501 | 283.0601 |
| 5 | Aflatoxin G2 | 7241-98-7 | [M+H]+ | 10.66 | 331.08123 | 331.08043 | -2.42 | 313.07066 | 245.08084 | 217.08592 | 285.07575 |
| 6 | Aflatoxin M1 | 6795-23-9 | [M+H]+ | 10.79 | 329.06558 | 329.06621 | 1.91 | 273.07575 | 259.0601 | 301.07066 | 229.04954 |
| 7 | Aflatoxin M2 | 6885-57-0 | [M+H]+ | 10.24 | 331.08123 | 331.08221 | 2.96 | 273.07575 | 259.05988 | 313.07016 | 149.02328 |
| 8 | Sterigmatocystin | 10048-13-2 | [M+H]+ | 15.91 | 325.07066 | 325.07152 | 2.65 | 310.04719 | 281.04445 | 297.07575 | 254.05736 |
| 9 | α-Zeranol | 26538-44-3 | [M+H]+ | 14.12 | 323.1853 | 323.18545 | 0.46 | 123.04406 | 189.09101 | 149.05971 |  |
| 10 | Zearalenone | 17924-92-4 | [M+H]+ | 15.19 | 319.154 | 319.15417 | 0.53 | 187.07536 | 283.13287 | 203.07027 | 301.14344 |
| 11 | α-Zearalenol | 36455-72-8 | [M+H]+ | 14.83 | 321.16965 | 321.17024 | 1.84 | 303.15909 | 285.14852 | 177.05462 | 257.15361 |
| 12 | β-Zearalenol | 71030-11-0 | [M+H]+ | 13.33 | 321.16965 | 321.17033 | 2.12 | 303.15909 | 285.14852 | 177.05462 | 257.15361 |
| 13 | Zearalanone | 5975-78-0 | [M+H]+ | 14.83 | 321.16965 | 321.17044 | 2.46 | 303.16012 | 207.10255 | 69.07091 |  |
| 14 | Zearalenone-4-O-beta-D-glucopyranoside | 105088-14-0 | [M+NH4]+ | 12.35 | 498.23337 | 498.23485 | 2.97 | 319.15445 | 301.14382 | 283.13335 | 187.07555 |
| 15 | Alternariol | 641-38-3 | [M+H]+ | 12.88 | 259.0601 | 259.06082 | 2.78 | 185.05971 | 213.05462 | 241.04954 |  |
| 16 | Ochratoxin A | 303-47-9 | [M+H]+ | 15.58 | 404.08954 | 404.08859 | -2.35 | 257.02113 | 239.01056 | 358.08406 | 193.00508 |
| 17 | Ochratoxin B | 4825-86-9 | [M+H]+ | 13.48 | 370.12851 | 370.12945 | 2.54 | 205.04954 | 223.0601 | 324.12303 | 177.05462 |
| 18 | Tentoxin | 28540-82-1 | [M+H]+ | 13.15 | 415.23398 | 415.23514 | 2.79 | 312.17065 | 256.18082 | 132.08078 | 330.18122 |
| 19 | Ochratoxin C | 4865-85-4 | [M+H]+ | 16.25 | 432.12084 | 432.12212 | 2.96 | 358.08414 | 257.02105 | 239.01054 |  |
| 20 | 14-decarboxy-OTA | / | [M+H]+ | 16.14 | 360.09971 | 360.10015 | 1.22 | 257.02107 | 239.01059 | 193.00592 |  |
| 21 | Alternariol monomethyl Ether | 26894-49-5 | [M+H]+ | 15.78 | 273.07575 | 273.07564 | -0.4 | 258.05328 | 241.05014 | 230.05808 |  |
| 22 | Altenuene | 889101-41-1 | [M+H]+ | 11.51 | 293.10196 | 293.10272 | 2.59 | 275.09222 | 257.08158 | 229.08681 |  |
| 23 | Fumonisin B1 | 116355-83-0 | [M+H]+ | 13.08 | 722.39575 | 722.39759 | 2.55 | 334.31004 | 352.32101 | 546.36366 | 159.0288 |
| 24 | Fumonisin B2 | 116355-84-1 | [M+H]+ | 15.72 | 706.40083 | 706.40267 | 2.6 | 336.32609 | 318.31553 | 159.0288 | 354.3385 |
| 25 | Fumonisin B3 | 1422359-85-0 | [M+H]+ | 14.71 | 706.40083 | 706.40287 | 2.89 | 336.32559 | 159.0288 | 318.31553 | 238.21654 |
| 26 | Hydrolyzed Fumonisin B2 | 147985-10-2 | [M+H]+ | 14.74 | 390.35779 | 390.35887 | 2.77 | 372.34817 | 336.32712 | 149.02393 |  |
| 27 | Fumonisin A1 | 117415-48-2 | [M+H]+ | 15.32 | 764.40631 | 764.40846 | 2.81 | 746.39788 | 728.38715 | 376.32231 |  |
| 28 | Beauvericin | 26048-05-5 | [M+NH4]+ | 16.73 | 801.44331 | 801.44514 | 2.28 | 134.09643 | 244.13321 | 262.14377 |  |
| 29 | Cytochalasin C | 22144-76-9 | [M+H]+ | 14.74 | 508.26936 | 508.27077 | 2.77 | 430.23767 | 120.08078 | 265.15869 | 402.24276 |
| 30 | Cytochalasin D | 22144-77-0 | [M+H]+ | 13.34 | 508.26936 | 508.27081 | 2.85 | 430.23767 | 402.24276 | 120.08078 | 265.15869 |
| 31 | Cytochalasin E | 36011-19-5 | [M+NH4]+ | 15.31 | 513.25953 | 513.26103 | 2.92 | 240.13829 | 416.22202 | 434.23258 | 159.08244 |
| 32 | Enniatin B | 917-13-5 | [M+NH4]+ | 16.66 | 657.44331 | 657.44523 | 2.92 | 640.41676 | 196.13321 | 214.14377 | 314.19486 |
| 33 | Enniatin B1 | 19914-20-6 | [M+NH4]+ | 16.77 | 671.45896 | 671.46095 | 2.96 | 196.13321 | 654.43241 | 214.14377 | 314.19888 |
| 34 | T-2 Toxin | 21259-20-1 | [M+NH4]+ | 13.95 | 484.25411 | 484.25518 | 2.21 | 185.09609 | 215.10666 | 305.13835 | 245.11722 |
| 35 | Destruxin A | 6686-70-0 | [M+H]+ | 14.01 | 578.35483 | 578.35644 | 2.78 | 465.27213 | 437.27714 | 178.08685 |  |
| 36 | Destruxin B | 2503-26-6 | [M+H]+ | 15.87 | 594.38613 | 594.38788 | 2.94 | 481.30348 | 453.30845 | 194.11829 |  |
| 37 | Enniatin A | 2503-13-1 | [M+NH4]+ | 17.03 | 699.49026 | 699.49192 | 2.37 | 228.16041 | 210.14975 | 100.11296 |  |
| 38 | Enniatin A1 | 4530-21-6 | [M+NH4]+ | 16.89 | 685.47461 | 685.47647 | 2.71 | 228.16022 | 210.14967 | 100.11282 |  |
| 39 | Citrinin | 518-75-2 | [M+H]+ | 12.49 | 251.0914 | 251.09213 | 2.91 | 233.08084 | 205.08592 | 147.08044 | 191.07027 |
| 40 | Cyclopiazonic acid | 18172-33-3 | [M+H]+ | 16.05 | 337.15467 | 337.15569 | 3.03 | 196.11208 | 182.08117 | 140.0706 |  |
| 41 | Citreoviridin | 25425-12-1 | [M+H]+ | 15.63 | 403.21152 | 403.21252 | 2.48 | 139.03897 | 297.14852 | 315.15909 | 285.14852 |
| 42 | 15-Acetoxyscirpenol | 2623-22-5 | [M+H]+ | 10.77 | 325.16456 | 325.16421 | -1.08 | 107.08553 | 265.14344 | 229.12231 | 307.154 |
| 43 | Chaetoglobosin A | 50335-03-0 | [M+H]+ | 15.91 | 529.2697 | 529.27126 | 2.95 | 130.06518 | 511.25913 | 349.19105 | 185.07094 |
| 44 | Diacetoxyscirpenol | 2270-40-8 | [M+NH4]+ | 11.81 | 384.20168 | 384.20281 | 2.94 | 307.154 | 247.13287 | 229.12231 | 199.11174 |
| 45 | Fumagillin | 23110-15-8 | [M+H]+ | 16.15 | 459.23773 | 459.23825 | 1.13 | 177.05462 | 215.14304 | 233.15361 | 265.17982 |
| 46 | Mycophenolic Acid | 24280-93-1 | [M+H]+ | 13.48 | 321.13326 | 321.13412 | 2.68 | 207.06519 | 177.05462 | 159.04406 | 91.05423 |
| 47 | Neosolaniol | 36519-25-2 | [M+NH4]+ | 7.22 | 400.19659 | 400.19727 | 1.7 | 185.09609 | 215.10666 | 305.13835 | 245.11722 |
| 48 | Penicillic Acid | 90-65-3 | [M+H]+ | 6.11 | 171.06519 | 171.06527 | 0.47 | 125.05971 | 153.05462 | 97.06479 |  |
| 49 | Penitrem A | 12627-35-9 | [M+H]+ | 16.34 | 634.29299 | 634.29346 | 0.74 | 558.24056 | 616.28243 | 540.23 |  |
| 50 | Verruculogen | 12771-72-1 | [M+H]+ | 16.06 | 494.22856 | 494.22993 | 2.77 | 352.12918 | 199.08659 | 227.0815 | 255.07642 |
| 51 | Griseofulvin | 126-07-8 | [M+H]+ | 12.71 | 353.07864 | 353.07951 | 2.46 | 285.05235 | 215.01056 | 165.05474 |  |
| 52 | Helvolic acid | 29400-42-8 | [M+NH4]+ | 16.21 | 586.33744 | 586.33916 | 2.93 | 509.29188 | 463.28552 | 309.18545 |  |
| 53 | Ergocornine | 564-36-3 | [M+H]+ | 11.61 | 562.3024 | 562.30382 | 2.53 | 223.12298 | 544.29183 | 208.07569 | 305.12845 |
| 54 | Ergocristine | 511-08-0 | [M+H]+ | 12.09 | 610.3024 | 610.30421 | 2.97 | 223.12297 | 208.07569 | 268.1444 | 305.12845 |
| 55 | Ergosinine | 596-88-3 | [M+H]+ | 11.33 | 548.28675 | 548.28817 | 2.59 | 223.12297 | 530.27518 | 208.07569 | 263.1392 |
| 56 | Ergosine | 561-94-4 | [M+H]+ | 11.41 | 548.28675 | 548.28829 | 2.81 | 223.12297 | 208.07569 | 530.27618 | 263.10531 |

**2、前处理方法的优化**

**（1）提取溶剂的选择**

56种真菌毒素分子结构式各异，溶解性能各不相同，乙腈的极性比甲醇大，溶解性更好，因此选择乙腈为主要的提取溶剂。考察了纯乙腈、不同浓度有机酸（甲酸、乙酸）乙腈、乙腈-甲醇（9:1）的提取能力，在加标50μg/kg水平下，称取2g八角阴性样品，加入10mL水涡旋水化样品，分别加入10mL前述4种溶剂进行提取，然后加入1g氯化钠和4g无水硫酸镁进行盐析分层，直接取上清液过滤后上机，结果，提取溶剂中加入低浓度乙酸或甲酸缓冲并不能显著增加56种毒素的加标回收率，且随着酸浓度增加，伏马毒素B1、环匹阿尼酸、交链孢酚、黄曲霉毒素M1等组分回收率下降，可能系加酸后不利于这些毒素在溶液中的稳定，而提取液中加入10%的甲醇，能够得到更高的平均回收率，综合考量，最后选取乙腈-甲醇（9:1）为提取溶剂。

**（2）净化方式的优化**

经典的QuEChERS方法中，净化剂主要含有无水硫酸镁、N-丙基乙二胺硅烷化硅胶（PSA）、十八烷基键合硅胶（C18）和石墨化碳黑（GCB），其中无水硫酸镁能去除水分带走部分溶于水的干扰物，硅胶C18能去除脂类和固醇等非极性杂质，PSA能去除极性的有机酸、糖类等，GCB能去除色素酚类。研究发现，GCB对黄曲霉毒素类化合物具有较严重的吸附，黄曲霉毒素及其衍生物分子结构中含有双呋喃环结构，而GCB对含苯环结构化合物具有较强吸附，因此GCB不能用于此次多种真菌毒素的净化。PSA结构中乙二胺-N-丙基是属于仲胺基，使其具有较强的弱阴离子交换能力，PSA可与样品溶液中的有机酸结合，本研究目标化合物中存在部分酸性化合物，研究结果显示，PSA对环匹阿尼酸、伏马毒素、霉酚酸、青霉酸、赭曲霉毒素等酸性化合物具有较强吸附，PSA亦不能用于此次多种真菌毒素净化。因此着重考察C18、prime HLB小柱的净化能力，在预实验基础上进行阴性样品加标回收率试验，比较方法优劣性。取阴性样品，进行50μg/kg水平加标，以无水MgSO4和乙酸钠盐析分层，然后吸取上清液考察方法①直接过滤，方法②C18、无水MgSO4分散固相萃取，方法③通过prime HLB小柱三种净化方式的净化效果，结果见图3、图4所示。

结果可见，C18和无水MgSO4净化后与直接过滤不净化的样品平均回收率几乎没有改变，C18分散固相萃取净化效果不理想，而通过prime HLB固相萃取小柱后，平均加标回收率与前述2种方式相比分别提高了4.0%和2.9%，且约有20个组分回收率得到较大提高，因此以prime HLB固相萃取小柱作净化材料继续进行下一步考察。

**（3）萃取盐包的考察**

在5.2.2净化方式优化的基础上进行了萃取盐包的考察，萃取盐包主要有两种配比，4 g无水硫酸镁+1 g氯化钠+1 g柠檬酸钠+0.5 g柠檬酸氢二钠组成的萃取盐编号为A，1.5 g乙酸钠+6 g无水硫酸镁组成的萃取盐编号为B，考察两种盐包对回收率的影响，结果可见，以柠檬酸缓冲体系的萃取盐包，平均回收率达到76.9%，比乙酸钠体系增加了10.1%，且伏马毒素B1、B2、B3、A1四个成分加标回收率不再为0，说明柠檬酸体系缓冲盐对多种真菌毒素保护能力更强，选择A为萃取盐包继续进行考察。

**（4）缓冲盐加入顺序的优化**

萃取盐包考察结果表明，柠檬酸体系缓冲盐能对目标化合物进行更好的保护，进一步考察缓冲盐体系加入顺序的改变是否能进一步提高加标回收率。称取样品加标后，即刻加入10 mL含10%柠檬酸钠和5%柠檬酸氢二钠的水溶液，然后提取并净化，结果显示，称样加标后即刻加入柠檬酸体系缓冲溶液，平均加样回收率提高到99.2%，与前述方法相比增加了22.3%，加标回收率得到大幅提升，原因可能是，56种真菌毒素中部分目标化合物因对环境或pH值敏感而容易出现降解现象，在样品提取前先添加具有缓冲能力的柠檬酸钠和柠檬酸氢二钠，最大限度保护目标化合物不被降解或防止因环境导致结构改变，从而最大限度降低目标化合物在提取过程的损失。

**图3 不同提取净化方法的加标回收率对比（n=6）**

**（注：1-56号真菌毒素与表2中化合物相对应；方法1：盐包B分层+直接过滤；方法2：盐包B分层+ C18、无水MgSO4分散固相萃取净化；方法3：盐包B分层+ primeHLB小柱净化；方法4：盐包A分层+ primeHLB小柱净化；方法5：调整缓冲盐加入顺序后优化的方法）**

**图4 5种不同提取净化方法的平均加标回收率对比**

**3、基质效应评价**

基质效应已是质谱分析检测时需要重点关注的问题之一，特别是在复杂样品中，基质效应更加明显，通过选择合适的净化手段或其他方法来降低基质效应，可有效提高检测准确度和可靠性。对56种真菌毒素的基质效应进行了评价，以阴性样品提取空白基质溶液，分别配制空白基质溶液标准曲线和溶剂标准曲线上机测试，得到两条拟合曲线，以“基质匹配曲线斜率/溶剂曲线斜率”（斜率比ME）的结果进行评价，ME＞1.2时判定为基质增强效应，ME＜0.8时判定为基质抑制效应，ME=0.8～1.2时判定为基质影响不大。结果可见，56种真菌毒素基质效应在0.50-1.44之间，其中，29种ME值在0.8～1.2之间，基质效应不明显，19种ME＜0.8，表现为基质抑制离子化，8种ME＞1.2，表现为基质增强离子化，结果表明，占比51.8%的化合物几乎不受基质的影响，约占比33.9%的化合物呈基质抑制效应，少量化合物如伏马毒素类、麦角碱类呈基质增强效应，因此采用基质匹配标准溶液校正，补偿基质效应对测定结果的影响。

**4、方法学验证**

**（1）校准曲线、检出限及定量限**

采用空白基质匹配标准曲线溶液，配制浓度级别为1、5、10、20、50、100μg/L的系列标准溶液以满足不同响应的化合物的需求，经高分辨质谱检测，以质量浓度( x，μg /L) 为横坐标，对应的峰面积(y) 为纵坐标绘制标准曲线。结果56种真菌毒素在各自线性范围内呈良好线性关系，相关系数均大于0.995；采用逐级稀释加标样品获得仪器检出限（LOD），以3倍检出限计算得到定量限（LOQ），在本试验条件下，方法检出限为0.012～0.86 μg/kg，定量限为0.039～2.9 μg/kg，优化后的方法灵敏度满足检测要求，结果见表3。

**（2）回收率和精密度**

取八角空白样品，进行低、中、高三水平加样回收率试验，每个水平6份，计算平均回收率以及相对标准偏差（RSD），验证方法准确度与精密度，结果见表3，56种真菌毒素的平均加标回收率在67.46%～122.19% 之间，RSD为1.4%～10.8%，在本文中的56种真菌毒素中，在没有稳定同位素内标校正的情况下，有55种的绝对回收率在70%以上，本方法具有较高准确度和精密度。

**表3 56种真菌毒素的线性方程、线性范围、相关系数、回收率、检出限、定量限（*n*=6）**

| No | Compound | Linear ranges/(μg/L) | Regression equation | correlation coefficients（r） | Spiked/（μg/kg） | Recoveries/%（n=6） | RSD/% | LOQs(μg/kg) | LODs(μg/kg) | matrix effect |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | Aflatoxicol | 1～200 | y=7.34×105x+5.38×104 | 0.9996 | 50，100，250 | 98.24，88.72，88.86 | 5.2，3.1，7.6 | 2.8 | 0.8 | 0.79 |
| 2 | Aflatoxin B1 | 1～200 | y=1.14×106x+1.01×106 | 0.9977 | 50，100，250 | 82.41，85.7，72.55 | 5.5，4.7，6.2 | 1.5 | 0.4 | 0.53 |
| 3 | Aflatoxin B2 | 1～200 | y=1.22×106x+8.78×105 | 0.996 | 50，100，250 | 94.64，83.42，70.86 | 4.8，3.5，6.2 | 1.7 | 0.5 | 0.67 |
| 4 | Aflatoxin G1 | 1～200 | y=9.71×105x+9.91×105 | 0.9986 | 50，100，250 | 96.71，86.13，74.28 | 5.6，3.4，7.9 | 2.1 | 0.6 | 0.72 |
| 5 | Aflatoxin G2 | 5～1000 | y=4.30×106x+1.02×107 | 0.9979 | 250，500，1250 | 91.12，83.84，78.77 | 4.2，2.9，5.7 | 2.2 | 0.7 | 0.70 |
| 6 | Aflatoxin M1 | 1～200 | y=5.92×105x+4.56×105 | 0.9998 | 50，100，250 | 88.89，88.32，91.78 | 3.7，5.0，6.9 | 2.7 | 0.8 | 0.86 |
| 7 | Aflatoxin M2 | 1～200 | y=5.00×105x+1.73×106 | 0.9999 | 50，100，250 | 88.65，84.16，91.92 | 3.5，2.6，6.1 | 4.1 | 1.2 | 0.93 |
| 8 | Sterigmatocystin | 1～200 | y=8.66×105x-1.18×106 | 0.9996 | 50，100，250 | 94.45，90.7，101.55 | 6.8，1.7，7.1 | 1.9 | 0.6 | 0.80 |
| 9 | α-Zeranol | 10～200 | y=4.25×104x+9.14×105 | 0.9968 | 50，100，250 | 97.51，109.55，122.19 | 3.9，6.7，7.5 | 14.8 | 4.4 | 0.60 |
| 10 | Zearalenone | 2～200 | y=2.38×105x-1.49×105 | 0.9999 | 50，100，250 | 91.64，107.9，94.99 | 6.8，4，8.8 | 10.7 | 3.2 | 0.87 |
| 11 | α-Zearalenol | 2～200 | y=2.23×105x+2.07×105 | 0.9999 | 50，100，250 | 108.7，103.11，96.61 | 4.2，3.0，7.1 | 9.8 | 2.9 | 0.68 |
| 12 | β-Zearalenol | 2～200 | y=4.49×104x+7.49×105 | 0.9990 | 50，100，250 | 98.44，100.48，95.21 | 7.1，7.4，6.9 | 24.5 | 7.4 | 0.59 |
| 13 | Zearalanone | 5～200 | y=2.25×105x+2.27×105 | 0.9999 | 50，100，250 | 109.61，102.32，97.78 | 4.7，1.7，7.0 | 8.5 | 2.5 | 1.30 |
| 14 | Zearalenone-4-O-beta-D-glucopyranoside | 10～400 | y=1.09×105x+1.20×105 | 0.9990 | 100，200，500 | 115.92，95.23，103.32 | 7.5，8.7，7.2 | 23.8 | 7.1 | 0.63 |
| 15 | Alternariol | 5～1000 | y=3.00×105x+5.73×105 | 0.9985 | 250，500，1250 | 78.51，69.44，67.46 | 6.9，6.0，7.1 | 43.8 | 13.1 | 0.80 |
| 16 | Ochratoxin A | 1～200 | y=2.43×105x-1.02×105 | 0.9999 | 50，100，250 | 109.76，100.78，100.8 | 2.6，3.9，5.1 | 6.5 | 1.9 | 0.91 |
| 17 | Ochratoxin B | 2～200 | y=2.54×105x-6.83×105 | 0.9991 | 50，100，250 | 107.35，106.1，109.07 | 9.4，6.3，7.8 | 9.3 | 2.8 | 0.92 |
| 18 | Tentoxin | 2～400 | y=1.18×106x-6.41×105 | 0.9999 | 100，200，500 | 104.05，106.3，104.89 | 5.1，6.9，5.0 | 3.2 | 1.0 | 0.96 |
| 19 | Ochratoxin C | 1～200 | y=1.44×106x+2.65×105 | 0.9990 | 50，100，250 | 113.62，103.51，92.32 | 6.8，9.8，5.3 | 0.7 | 0.2 | 0.82 |
| 20 | 14-decarboxy-OTA | 1～200 | y=1.20×106x+3.44×106 | 0.9970 | 50，100，250 | 104，86.18，78.39 | 8.9，4.9，7.1 | 0.8 | 0.2 | 0.66 |
| 21 | Alternariol monomethyl Ether | 5～200 | y=3.36×105x+5.87×104 | 0.9995 | 50，100，250 | 79.36，91.3，78.44 | 5.7，6.0，9.3 | 9.4 | 2.8 | 0.78 |
| 22 | Altenuene | 10～400 | y=3.99×105x+1.28×105 | 0.9982 | 100，200，500 | 105.98，110.57，86.14 | 2.3，10.0，9.5 | 14.1 | 4.2 | 0.65 |
| 23 | Fumonisin B1 | 5～200 | y=1.00×105x-2.63×105 | 0.9995 | 50，100，250 | 92.26，99.6，108.08 | 8.8，6.2，8.9 | 3.7 | 1.1 | 1.17 |
| 24 | Fumonisin B2 | 1～200 | y=1.07×105x-1.01×105 | 0.9997 | 50，100，250 | 90.86，94.4，98.02 | 9.5，2.6，5.5 | 6.3 | 1.9 | 1.38 |
| 25 | Fumonisin B3 | 5～200 | y=9.53×104x-1.32×105 | 0.9996 | 50，100，250 | 94.57，98.17，100.06 | 8.9，5.7，6.9 | 20.4 | 6.1 | 1.29 |
| 26 | Hydrolyzed Fumonisin B2 | 1～200 | y=1.67×105x-2.00×105 | 0.9992 | 50，100，250 | 96.22，94.67，101.58 | 5.4，6.4，4.9 | 14.6 | 4.4 | 1.21 |
| 27 | Fumonisin A1 | 10～200 | y=5.36×104x-2.47×105 | 0.9979 | 50，100，250 | 86.96，83.01，95.74 | 8.6，4.5，9.3 | 34.0 | 10.2 | 1.26 |
| 28 | Beauvericin | 1～200 | y=1.07×106x-4.72×104 | 1.0000 | 50，100，250 | 103.8，105.45，101.08 | 9.1，4.6，10.2 | 17.6 | 5.3 | 0.95 |
| 29 | Cytochalasin C | 5～200 | y=6.32×104x-2.68×105 | 0.9999 | 50，100，250 | 101.41，105.73，100.71 | 9.8，7.9，3.3 | 31.4 | 9.4 | 1.39 |
| 30 | Cytochalasin D | 5～200 | y=7.68×104x-3.18×105 | 0.9999 | 50，100，250 | 115.06，116.52，113.25 | 6.0，5.5，9.4 | 1.2 | 0.3 | 1.20 |
| 31 | Cytochalasin E | 5～200 | y=1.57×105x-4.26×105 | 0.9998 | 50，100，250 | 110.56，111.13，114.37 | 2.3，5.1，7.1 | 50.8 | 15.2 | 1.01 |
| 32 | Enniatin B | 1～200 | y=1.57×106x+2.21×106 | 0.9994 | 50，100，250 | 96.07，100.77，96.61 | 5.0，7.0，2.1 | 36.7 | 11.0 | 0.93 |
| 33 | Enniatin B1 | 1～200 | y=1.71×106x-1.24×106 | 1.0000 | 50，100，250 | 110.87，96.06，101.92 | 3.6，6.0，6.9 | 26.3 | 7.9 | 0.92 |
| 34 | T-2 Toxin | 0.5～100 | y=2.19×105x-1.54×105 | 0.9998 | 25，50，125 | 115.57，100.58，114.24 | 6.5，3.8，3.9 | 17.0 | 5.1 | 0.97 |
| 35 | Destruxin A | 1～200 | y=1.09×106x-2.24×105 | 0.9992 | 50，100，250 | 100.83，94.91，97.03 | 5.5，3.8，5.6 | 1.0 | 0.3 | 0.86 |
| 36 | Destruxin B | 1～200 | y=1.27×106x-1.56×106 | 0.9971 | 50，100，250 | 98.46，97.91，87.58 | 8.7，5.0，3.5 | 0.8 | 0.3 | 0.88 |
| 37 | Enniatin A | 1～200 | y=1.60×106x-5.22×104 | 0.9999 | 50，100，250 | 100.05，101.06，101 | 7.0，3.2，8.3 | 4.4 | 1.3 | 0.95 |
| 38 | Enniatin A1 | 1～200 | y=1.69×106x+2.59×106 | 0.9967 | 50，100，250 | 108.16，116.42，101.8 | 3.8，1.4，7.9 | 2.5 | 0.8 | 0.91 |
| 39 | Citrinin | 1～200 | y=3.52×105x+1.54×105 | 0.9996 | 50，100，250 | 94.34，81.61，70.63 | 6.0，3.7，7.7 | 1.3 | 0.4 | 0.92 |
| 40 | Cyclopiazonic acid | 1～200 | y=3.22×105x-4.78×105 | 0.9998 | 50，100，250 | 88.58，83.57，84.25 | 5.7，8.7，4.7 | 0.8 | 0.2 | 0.83 |
| 41 | Citreoviridin | 1～200 | y=2.43×105x+4.30×104 | 0.9997 | 50，100，250 | 109.04，94.28，111.96 | 4.9，4.3，7.8 | 0.6 | 0.2 | 0.87 |
| 42 | 15-Acetoxyscirpenol | 5～200 | y=5.62×104x-3.31×104 | 0.9994 | 50，100，250 | 90.84，85.95，94.23 | 6.7，8.3，8.1 | 7.6 | 2.3 | 0.59 |
| 43 | Chaetoglobosin A | 1～200 | y=7.95×104x-7.35×104 | 0.9994 | 50，100，250 | 84.63，79.67，91.82 | 9.7，7.7，9.6 | 5.7 | 1.7 | 0.87 |
| 44 | Diacetoxyscirpenol | 1～200 | y=7.92×105x-6.81×105 | 0.9994 | 50，100，250 | 102.56，102.66，102.45 | 3.8，6.6，5.9 | 7.2 | 2.2 | 0.79 |
| 45 | Fumagillin | 5～200 | y=1.69×105x+9.10×104 | 0.9962 | 50，100，250 | 92.55，96.3，85.09 | 6.9，4.8，3.5 | 30.6 | 9.2 | 0.74 |
| 46 | Mycophenolic Acid | 1～200 | y=3.72×105x-9.28×104 | 0.9991 | 50，100，250 | 115.47，116.59，115.46 | 3.4，7.1，5.5 | 17.7 | 5.3 | 1.01 |
| 47 | Neosolaniol | 1～200 | y=3.50×105x+4.33×105 | 0.9999 | 50，100，250 | 106.12，104.62，110.98 | 3.3，2.5，4.2 | 1.8 | 0.5 | 0.93 |
| 48 | Penicillic Acid | 5～200 | y=3.99×105x+7.72×105 | 0.9991 | 50，100，250 | 108.9，100，88.98 | 2.2，3.5，3.9 | 12.3 | 3.7 | 0.64 |
| 49 | Penitrem A | 5～200 | y=1.16×105x-1.62×105 | 0.9997 | 50，100，250 | 111.19，92.62，93.75 | 8.0，6.9，6.6 | 5.2 | 1.6 | 0.82 |
| 50 | Verruculogen | 1～200 | y=4.24×105x-4.49×105 | 0.9995 | 50，100，250 | 84.78，88.52，104.5 | 4.6，5.6，4.9 | 10.5 | 3.2 | 0.98 |
| 51 | Griseofulvin | 1～200 | y=1.32×106x+1.11×105 | 0.9998 | 50，100，250 | 107.72，96.83，95.44 | 4.3，4.0，7.4 | 10.1 | 3.0 | 0.76 |
| 52 | Helvolic acid | 10～400 | y=1.98×105x-6.30×105 | 0.9991 | 100，200，500 | 112.78，116.37，94.45 | 7.1，5.3，9.7 | 10.2 | 3.1 | 0.68 |
| 53 | Ergocornine | 1～100 | y=1.30×105x-2.06×105 | 0.9986 | 25，50，125 | 83.8，82.23，85.35 | 9.4，6.5，9.6 | 0.6 | 0.2 | 1.44 |
| 54 | Ergocristine | 1～100 | y=1.44×105x+2.91×104 | 0.9981 | 25，50，125 | 98.59，96.44，83.5 | 6.5，5.4，9.4 | 3.2 | 1.0 | 1.41 |
| 55 | Ergosinine | 0.5～100 | y=1.55×105x-1.80×105 | 0.9995 | 25，50，125 | 88.91，90.54，87.08 | 4.7，8.2，9.0 | 1.0 | 0.3 | 0.50 |
| 56 | Ergosine | 2.5～100 | y=1.47×105x-3.97×105 | 0.9983 | 25，50，125 | 82.34，84.89，82.13 | 8.4，8.2，10.8 | 8.2 | 2.5 | 1.03 |

**5、实际样品测定**

采用本法对收集的51批八角干果样品进行检测，结果，共5批占比9.8%的样品检出3种真菌毒素，分别为杂色曲霉素、桔青霉素、交链孢酚，单个样品检出真菌毒素最少1种, 最多2种, 检出范围为113.62~743.15μg/kg,杂色曲霉素和交链孢酚检出2批，桔青霉素检出4批，且检出最高值为743.15μg/kg，说明本次采集的样品更容易受到桔青霉素的侵染，阳性检出提示应逐步关注八角等天然香料中新兴毒素污染的风险，阳性样品中3种真菌毒素的提取离子流图和二级碎片离子图见图5～8，检出结果见表4。

表**4** 八角样品中真菌毒素的检出结果

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 编号 | 真菌毒素名称 | 检出范围/μg/kg | 检出均值/μg/kg | 检出批次 | 阳性检出率/% |
| 1 | 8 | 杂色曲霉素 | 307.47~413.56 | 360.52 | 2 | 3.9 |
| 2 | 15 | 交链孢酚 | 140.19~235.85 | 188.02 | 2 | 3.9 |
| 3 | 39 | 桔青霉素 | 113.62~743.15 | 426.99 | 4 | 7.8 |







图5 阳性样品中3种检出的真菌毒素提取离子流图

（A：杂色曲霉素；B：交链孢酚；C：桔青霉素）



a 标准溶液



b 阳性样品

图7 桔青霉素在标准溶液和阳性样品中的二级质谱图（a标准溶液，b阳性样品）



a 标准溶液



b 阳性样品

图8 交链孢酚在标准溶液和阳性样品中的二级质谱图（a标准溶液，b阳性样品）

**6、方法对比**

八角中真菌毒素的研究较少，检索到目前八角中多种真菌毒素的检测方法对比，见表5所示，本研究采用改良的QuEChERS方法提取-prime HLB固相萃取柱通过式净化，四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱测定，与表所列方法对比，检测目标物种类覆盖更全面，采样主要在生产环节，且检出了交链孢酚等3种真菌毒素，方法具有一定先进性和适用性。

表5 八角中多种真菌毒素检测方法对比

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 基质 | 毒素种类 | 净化方法 | 检测方法 | 回收率 | 定量限范围 | 采样环节 | 检出种类 | 参考文献 |
| 八角 | 黄曲霉毒素4种，赭曲霉毒素1种，伏马毒素2种 | Myco6in1TM真菌毒 素免疫亲和净化柱， | 高效液相色谱-串联质谱 | 77.00%-113.47% | 0.5-20μg/kg | / | 未进行样品检测 | 5 |
| 八角 | 黄曲霉毒素B1 | / | 快检试剂盒 | / | / | 市场流通 | 黄曲霉毒素B1 | 27 |
| 八角 | 黄曲霉毒素4种，赭曲霉毒素1种，伏马毒素2种 | 国标方法 | 国标方法 | / | / | 市场流通 | 均有检出 | 28 |
| 八角 | 50种真菌毒素 | Anybond SinCHERS-Myco17净化小柱 | 超高效液相-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 | 64.9%～118.2% | 2-60μg/kg | 市场流通 | 均未检出 | 8 |
| 八角 | 56种真菌毒素 | prime HLB固相萃取柱净化 | 超高效液相-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱 | 67.46%～122.19% | 0.6～50.8 μg/kg | 生产+流通 | 桔青霉素、杂色曲霉素、交链孢酚 | 本研究 |

**7、实验室间比对**

将阳性样品，在广西产品质量检验研究院（A）、中国农业大学（B）进行结果比对。综合两个单位及本中心（C）的验证结果进行分析，结果如表6所示。

表6 实验室间比对

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 检出化合物名称 | C | | A | | B | | 平均值(μg/kg) | RSD（%） |
| 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
|
| 杂色曲霉素 | 308.64 | 306.29 | 309.79 | 308.12 | 304.45 | 311.37 | 308.11 | 0.8 |
| 交链孢酚 | 143.38 | 137 | 145.38 | 138.40 | 147.38 | 138.41 | 141.66 | 3.0 |
| 桔青霉素 | 111.08 | 116.15 | 108.43 | 113.22 | 114.24 | 108.85 | 112.00 | 2.7 |

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《八角中56种真菌毒素的测定 超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法》标准编制工作组

2026年2月3日