

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS XXXX—XXXX

# 八角及其制品中莽草毒素含量的测定 液 相色谱-串联质谱法

Determination of mangrove toxin in Star Anise (*Illicium verum*) and its  
products by LC-MS/MS

(征求意见稿)

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

广西标准化协会 发 布



目 次

前言 ..... II

1 范围 ..... 1

2 规范性引用文件 ..... 1

3 术语和定义 ..... 1

4 原理 ..... 1

5 试剂和材料 ..... 1

    5.1 试剂 ..... 1

    5.2 标准品 ..... 1

    5.3 标准溶液配制 ..... 1

    5.4 溶液配制 ..... 2

6 仪器和设备 ..... 2

7 样品 ..... 2

8 分析步骤 ..... 2

    8.1 试样提取 ..... 2

    8.2 净化 ..... 2

    8.3 仪器调试 ..... 2

    8.4 标准曲线的制作 ..... 3

    8.5 定性测定 ..... 3

    8.6 定量测定 ..... 4

    8.7 空白试验 ..... 4

9 结果计算 ..... 4

10 检出限、定量限、精密度 ..... 4

    10.1 检出限及定量限 ..... 4

    10.2 精密度 ..... 4

11 试验报告 ..... 5

附录 A（资料性） 莽草毒素标准溶液及提取离子色谱图 ..... 6

## 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）〕提出和宣贯。

本文件由广西标准化协会归口。

本文件起草单位：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。

本文件主要起草人：杨黎、韦环、兰斌、黄高武、冯广福、吕晨艳、胡王艳、何善廉、王海波、农毅清、王先锋、王警、蒋湘、廖夏云、赵就彬、苏俞友、陈明媚、韦尚升、卢恩、黄玲、张言、黄钰婷、李华冰、韦福广、陈清、陈佳丽、李枝文、赵莉莉、黄春媛、刘双斌、蒙韦玲。

# 八角及其制品中莽草毒素含量的测定 液相色谱-串联质谱法

## 1 范围

本文件描述了液相色谱-串联质谱法测定八角及其制品莽草毒素含量的方法。

本文件适用于液相色谱-串联质谱法测定八角、八角茴油、含八角植物饮料、含八角复合调味料中莽草毒素含量。

## 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

GB/T 12729.2 香辛料和调味品 取样方法

GB/T 21708 八角中挥发油含量的测定

GB/T 27404 实验室质量控制规范 食品理化检测

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 原理

试样中的莽草毒素用甲醇超声提取，根据不同样品基质，提取液经离心、过滤后，采用液相色谱-串联质谱仪分析，根据保留时间、母离子/子离子对进行定性，基质标准曲线外标法定量。

## 5 试剂和材料

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（CH<sub>3</sub>OH）：色谱纯。

5.1.2 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

5.1.3 乙腈（CH<sub>3</sub>CN）：色谱纯。

### 5.2 标准品

（C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>，CAS号为23056-26-0）：纯度≥98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

### 5.3 标准溶液配制

#### 5.3.1 标准储备液（1.0 mg/mL）

精密称取莽草毒素标准品10.0mg（5.2），置于10mL棕色容量瓶中，用甲醇（5.1.1）溶解并定容，摇匀，于4℃避光保存，有效期3个月。

#### 5.3.2 中间标准工作液（10.0 μg/mL）

准确移取标准储备液1.0 mL（5.3.1），用甲醇（5.1.1）稀释至100 mL，现配现用或4℃保存不超过14 d。

### 5.3.3 标准工作曲线溶液

取适量中间标准工作液于10 mL容量瓶中用甲醇(5.1.1)定容至刻度,配制成浓度为1 μg/L、2 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、20 μg/L、50 μg/L、100 μg/L的系列溶液,临用现配。

### 5.4 溶液配制

0.1%甲酸水溶液:准确量取1.0 mL甲酸溶液(5.1.2),将量取的甲酸溶液移至1000 mL容量瓶中,加入纯化水定容至刻度,盖好瓶塞,反复颠倒摇匀,备用。

## 6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源(ESI)。

6.2 天平:感量分别为0.01 g和0.0001 g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 离心机,转速>4000 r/min。

6.5 超声波清洗器。

6.6 粉碎机。

6.7 微孔滤膜:有机系,0.22 μm。

6.8 固相萃取小柱(Oasis® HLB 3cc 60 mg)。

## 7 样品

液态试样摇匀待提取;基质均匀的半固态试样和粉状试样待提取,其他样品需匀浆或粉碎均匀待提取,制备好的试样0℃~5℃保存待检测。

## 8 分析步骤

### 8.1 试样提取

#### 8.1.1 八角

称取试样0.5 g(精确至0.0001 g)于50 mL具塞离心管中,加入50 mL甲醇(5.1.1),涡旋混匀30 s,超声提取30 min(功率≥250 W,温度≤40℃),于10000 r/min、4℃离心10 min,取上清液至250 mL容量瓶中;重复提取1次,合并2次提取液至250 mL容量瓶中用甲醇(5.1.1)定容至刻度;混匀,待净化。

#### 8.1.2 固体、半固体样品(含八角复合调味料、火锅料等)

称取试样0.5 g(精确至0.0001 g)于50 mL具塞离心管中,加入25.0 mL甲醇(5.1.1),涡旋混匀30 s,超声提取30 min(功率≥250 W,温度≤40℃),于10000 r/min、4℃离心10 min,取上清液至50 mL容量瓶中;重复提取1次,合并两次提取液至50 mL容量瓶中用甲醇(5.1.1)定容至刻度,混匀,待净化。

#### 8.1.3 液体样品(含八角植物饮料、八角茴油等)

称取试样1.0 g(精确至0.0001 g)于10 mL具塞离心管中,加入5 mL甲醇(5.1.1),涡旋混匀30 s,超声提取10 min(功率≥250 W,温度≤40℃),用甲醇(5.1.1)定容至刻度,混匀,待净化。

### 8.2 净化

精密吸取提取液3 mL,以低于1 mL/min的流速通过固相萃取小柱(6.8),过微孔滤膜(6.7),供液相色谱-串联质谱仪分析。

### 8.3 仪器调试

#### 8.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C18 柱（2.1 mm×150 mm，2.7 μm）或性能相当者。
- b) 柱温：40 ℃。
- c) 流动相：A 相为 0.1% 甲酸水溶液，B 相为甲醇，梯度洗脱程序见表 2。
- d) 流速：0.5 mL/min。
- e) 进样量：2 μL。

表1 流动相洗脱参考梯度

时间(min)	流速(mL/min)	A 相(%)	B 相(%)
0	0.5	90	10
1	0.5	90	10
10	0.5	70	30
11	0.5	2	98
15	0.5	2	98
15.1	0.5	90	10
18	0.5	90	10

8.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 离子化模式：ESI-；
- b) 雾化气流速：3.0 L/min；
- c) 接口电压：4 kV；
- d) 干燥气流速：10.0 L/min；
- e) 加热气流速：10.0 L/min；
- f) 碰撞气：氦气；
- g) 接口温度：300 ℃；
- h) DL 温度：250 ℃；
- i) 加热模块温度：400 ℃；
- j) 扫描模式：多反应监测；
- k) 参考保留时间、母离子、子离子、去簇电压和碰撞能量，见表 2。

表2 参考母离子、子离子和碰撞能量

化合物	模式	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能 (V)
莽草毒素	负离子	327.0	165	-14
莽草毒素	负离子	327.0	150	-36
注：实际参数应根据仪器型号进行优化，确保灵敏度与稳定性				

8.4 标准曲线的制作

将系列标准工作液分别注入液相色谱-串联质谱仪，测定相应的峰面积。以系列标准工作液中莽草毒素浓度为横坐标，以定量离子峰面积响应值为纵坐标，绘制标准曲线。莽草毒素标准溶液及提取离子色谱图见附录A。

8.5 定性测定

在相同试验条件下，试样中被测组分的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内；且试样中被测组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较，偏差不超过表3规定的范围，则可判定为试样中存在莽草毒素。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

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

8.6 定量测定

8.6.1 将试样溶液注入液相色谱-串联质谱仪中，得到相应的峰面积，根据标准曲线得到试样溶液中被测组分的浓度。

8.6.2 用标准工作曲线对试样进行定量，应使试样溶液被测组分的响应值在仪器测定的线性范围内，若被测组分含量超出标准曲线的测定范围，应根据测定浓度进行适当倍数稀释，同时用同等稀释倍数的空白基质配制标准曲线溶液后测定。

注：在可以获得基质匹配的空白试样情况下，应优先采用基质匹配标准曲线法，如无法获得空白试样，应采用溶剂标准曲线法。

8.7 空白试验

除不加试样外，采用完全相同的提取与检测步骤进行空白试验，确保无目标物干扰。空白样品不允许检出莽草毒素。

9 结果计算

结果按式（1）计算：

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

式中：

- $X$  ——试样中莽草毒素的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
- $c$  ——由标准曲线得出的试样溶液中目标化合物的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；
- $V$  ——提取液总体积，单位为毫升（mL）；
- $m$  ——试样的质量，单位为克（g）；
- 1000——单位换算系数。

注：计算结果保留3位有效数字；

10 检出限、定量限、精密度

10.1 检出限及定量限

10.1.1 八角

当称样量为0.5 g，定容体积为250 mL时，本方法中莽草毒素的检出限为0.2 mg/kg，定量限为0.5 mg/kg。

10.1.2 八角茴油

当称样量为1.0 g，定容体积为10 mL时，本方法中莽草毒素的检出限为0.01 mg/kg，定量限为0.05 mg/kg。

10.1.3 含八角植物饮料

当称样量为1.0 g，定容体积为10 mL时，本方法中莽草毒素的检出限为0.01 mg/kg，定量限为0.05 mg/kg。

10.1.4 含八角复合调味料

当称样量为0.5 g，定容体积为50 mL时，本方法中莽草毒素的检出限为0.05 mg/kg，定量限为0.2 mg/kg。

10.2 精密度

在重复性条件下获得的2次独立测定结果的绝对差值不允许超过算术平均值的15%。



## 11 试验报告

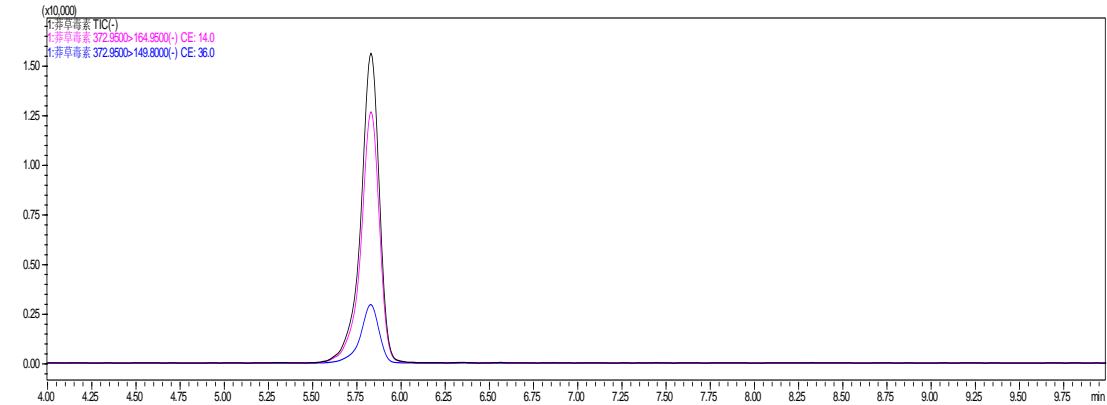
试验报告的内容包括但不限于：

- 试验对象；
- 所使用的标准(包括发布或出版年号)；
- 所使用的方法(如果标准中包括几个方法)；
- 结果；
- 观察到的异常现象；
- 试验日期。

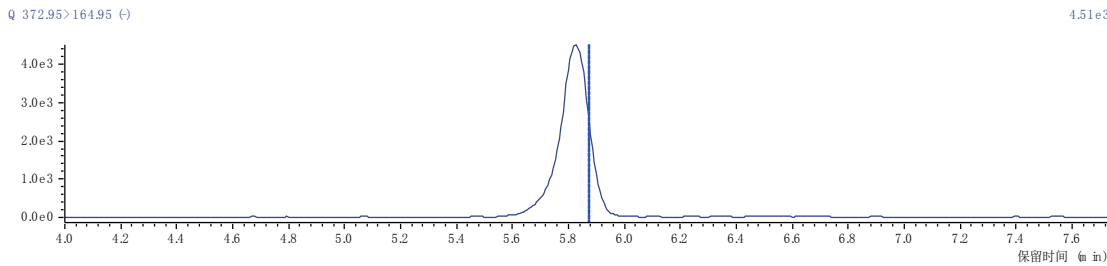
附 录 A  
(资料性)

莽草毒素标准溶液及提取离子色谱图

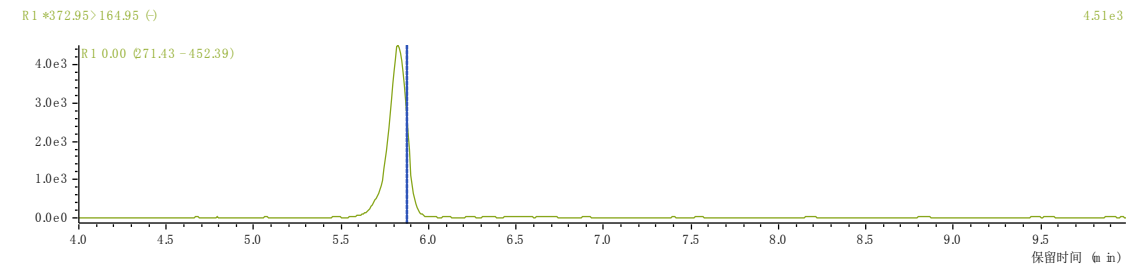
莽草毒素标准溶液色谱图见图A. 1，莽草毒素提取离子（372.95>164.95）色谱图(10 ng/mL) 见图A. 2，莽草毒素提取离子（372.95>164.95）色谱图(10 ng/mL) 见图A. 3。



图A. 1 莽草毒素标准溶液色谱图（10 ng/mL）



图A. 2 莽草毒素提取离子（372.95>164.95）色谱图(10 ng/mL)



图A. 3 莽草毒素提取离子（372.95>164.95）色谱图(10 ng/mL)