|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 67.050 |
| CCS | |  | | --- | | D:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T.pngD:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T后面的反斜杠.png JSQA |   X14 |

江苏省质量协会团体标准

T/JSQA XXXX—2025

高脂肪农产品中丙二醛、4-羟基-壬烯醛和4-羟基-己烯醛含量的测定 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法

Determination of MDA, 4-HNE and 4-HHE in high-fat agricultural products—Ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry

2025 - XX - XX发布

2025 - XX - XX实施

江苏省质量协会  发布

目次

[前言 II](#_Toc176957527)

[1 范围 1](#_Toc176957528)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc176957529)

[3 术语和定义 1](#_Toc176957530)

[4 原理 1](#_Toc176957530)

[5 试剂和材料 1](#_Toc176957530)

[6 仪器设备 2](#_Toc176957530)

[7 分析步骤 2](#_Toc176957530)

[8 计算结果](#_Toc176957530) 4

[9 精密度](#_Toc176957530) 4

[10 检出限和定量限](#_Toc176957530) 5

1. 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。

本文件由江苏大学提出。

本文件由江苏省质量协会归口。

本文件起草单位：江苏大学、南京市产品质量监督检验院（南京市质量发展与先进技术应用研究院）、南京大学。

本文件主要起草人：王飞轩、欧阳臻、徐卫东、万晶琼、陈佳俊、朱南、林东翔。

高脂肪农产品中丙二醛、4-羟基-壬烯醛和4-羟基-己烯醛含量的测定 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法

* 1. 范围

本文件规定了高脂肪农产品中丙二醛、4-羟基-壬烯醛和4-羟基-己烯醛含量的测定的原理、试剂和

材料、仪器设备、分析步骤、结果计算、精密度、检出限和定量限。

本文件适用于动植物油脂、坚果等高脂肪农产品中丙二醛、4-羟基-壬烯醛和4-羟基-己烯醛含量的测定。

* 1. 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

* 1. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

* 1. 原理

试样先用50%乙醇提取，再将提取液与2,4-二硝基苯肼（DNPH）作用生成黄色腙类衍生物，采用超高效液相色谱-QTRAP三重四极杆质谱联用对丙二醛（MDA）、4-羟基-壬烯醛（4-HNE）和4-羟基-己烯醛（4-HHE）同时测定，外标法定量。

* 1. 试剂和材料

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 甲醇（CH3OH）：色谱纯。

5.3 乙醇（CH3CH2OH）：色谱纯。

5.4 乙腈（CH3CN）：色谱纯。

5.5 甲酸（CH3COOH）：质谱纯。

5.6 盐酸（HCl）：12 mol/L。

5.7 石油醚（沸程30-60 ℃）：色谱纯。

5.8 二氯甲烷（CH2Cl2）：色谱纯。

5.9 2,4-二硝基苯肼（DNPH）：色谱纯。

5.10 10%甲醇溶液：量取10 mL甲醇（5.2），加水稀释，稀释至100 mL。

5.11 50%乙醇溶液：量取50 mL乙醇（5.3），加水稀释，稀释至100 mL。

5.12 盐酸/乙醇溶液：量取10 mL盐酸溶液（5.6），加乙醇（5.3）稀释，稀释至100 mL。

5.13 2,4-二硝基苯肼（DNPH）溶液：用分析天平（6.2）准确称取0.9907 g（精确至0.0001 g）2,4-二硝基苯肼（5.9），用盐酸/乙醇溶液溶解（5.12），定容至100 mL。

5.14 丙二醛（MDA，C3H4O2，CAS号：542-78-9）：1000 μg/mL，纯度≥98%。

5.15 4-羟基-壬烯醛（4-HNE，C9H16O2,CAS号：75899-68-2）：纯度≥97%。

5.16 4-羟基-己烯醛（4-HHE，C6H10O2,CAS号：17427-21-3）：纯度≥98%。

5.17 MDA标准标准储备液（1000 μg/mL）：移取1 mL丙二醛（5.14），避光置于冰箱4 ℃储存。有效期3个月。

5.18 MDA标准使用溶液（10 μg/mL）：准确移取0.10 mL MDA（5.17）至100 mL容量瓶中，用50%乙醇（5.11）稀释至10 mL，避光置于冰箱4 ℃储存。有效期2周。

5.19 4-HNE标准储备液（1000 μg/mL）：准确称取0.0010 g（精确至0.0001 g）4-HNE（5.15）至1 mL容量瓶中，用50%乙醇（5.11）溶解后稀释至1 mL，避光置于冰箱4 ℃储存。有效期3个月。

5.20 4-HNE标准使用溶液（10 μg/mL）：准确移取0.10 mL 4-HNE标准储备液（5.19）至10 mL容量瓶中，用50%乙醇（5.11）稀释至10 mL，避光置于冰箱4 ℃储存。有效期2周。

5.21 4-HHE标准储备液（1000 μg/mL）：准确称取0.0010 g（精确至0.0001 g）4-HHE（5.16）至1 mL容量瓶中，用50%乙醇（5.11）溶解后稀释至1 mL，避光置于冰箱4 ℃储存。有效期3个月。

5.22 4-HHE标准使用溶液（10 μg/mL）：准确移取0.10 mL 4-HHE标准储备液（5.21）至10 mL容量瓶中，用50%乙醇（5.11）稀释至10 mL，避光置于冰箱4 ℃储存。有效期2周。

5.23 MDA、4-HNE、4-HHE混合标准系列溶液：分别准确移取MDA、4-HNE、4-HHE标准使用液0.0010 mL、0.0050 mL、0.010 mL、0.050 mL、0.10 mL、0.15 mL、0.25 mL、0.50 mL、1 mL、2 mL于10 mL容量瓶中，加入50%乙醇（5.11）定容至刻度，该混合标准溶液系列浓度为0.001 μg/mL、0.005 μg/mL、0.01 μg/mL、0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、 0.15 μg/mL、0.25 μg/mL、0.50 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL，现配现用。

* 1. 仪器设备

6.1 超高效液相色谱仪-串联三重四级杆质谱仪：配有电喷雾离子源(ESI)。

6.2 分析天平：感量为0.0001 g和0.1 g。

6.3 涡旋振荡仪。

6.4 恒温水浴锅。

6.5 氮吹仪。

6.6 组织匀浆机。

6.7 离心机：转速不低于5000 r/min。

6.8 有机相针式滤器：0.22 μm有机尼龙滤膜。

6.9 C18固相萃取柱。

6.10 固相萃取装置。

* 1. 分析步骤

7.1 样品前处理

7.1.1 试样提取

a） 动植物油脂：准确称取均匀的样品2.00 g（精确至0.01 g），置于15 mL离心管中，准确加入5 mL 50%乙醇溶液，避光涡旋混匀5 min，混合物以4000 g离心5 min，吸取上清液备用。

b） 坚果等固体：准确称取样品50.00 g（精确至0.01 g）研磨粉碎，置于50 mL离心管中，准确加入15 mL石油醚，避光涡旋2 min，混合物放置在25 ℃恒温摇床上振摇提取1 h，静置10 min后在5000 r/min离心5 min，吸取上清液至新的50 mL离心管中，并用5 mL石油醚冲洗试样离心管内壁和残渣，5000 r/min离心5 min取上清液合并至新的50 mL离心管中，氮吹仪吹干后准确加入5 mL 50%乙醇溶液，避光涡旋混匀5 min，混合物以4000 g离心5 min，吸取上清液备用。

7.1.2 试样衍生化

移取样品（7.1.1）上清液和MDA、4-HNE、4-HHE标准系列溶液分别置于15 mL离心管中，加入0.5 mL DNPH溶液，避光涡旋混匀5 min，置于60 ℃水浴内避光反应2 h，取出，冷却至室温。

7.1.3 试样萃取分离

向衍生化的样品（7.1.2）及标准系列溶液中加入5 mL二氯甲烷，涡旋混匀5 min后，混合物以4000 g离心5 min，将二氯甲烷层物质转移至单独的15 mL离心管中，用氮吹仪吹至近干，用100 μL的10%甲醇溶液（5.10）复溶后以13000 r/min离心10 min，吸取上清液进一步萃取。

取C18固相萃取柱（6.9）纯化衍生物，用甲醇分2次活化，每次100 μL。取10%甲醇溶液平衡固相萃取柱，缓慢将10%甲醇溶液（5.10）溶解的样品及标准系列溶液上清液装载至固相萃取柱，10%甲醇溶液（5.10）淋洗去除杂质，80%甲醇进行洗脱，合并滤液备用。

7.1.4 去除溶剂并复溶

氮吹仪吹干滤液后，用1 mL含0.1%甲酸（5.5）的乙腈溶液复溶，涡旋3 min后，混合物以13000 r/m离心10 min，取适量上清液过0.22 μm滤膜，置于冰箱4 ℃储存，待测。

7.2 超高效液相色谱条件

超高效液相色谱仪（6.1）的色谱参考条件如下：

1. 色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3柱，1.8 μm，100 mm×2.1 mm（内径），或性能相当者。
2. 流动相A：甲酸（5.5）+水（5.1）（浓度0.1%）；流动相B：甲酸（5.5）+乙腈（5.4）（浓度

0.1%）；洗脱梯度应符合表1的规定。

1. 柱温：40 ℃。
2. 流速：0.4 mL/min。
3. 进样量：1 μL。
4. 检测波长：254 nm。

注：由于测试设备的多样性,色谱条件可依超高效液相色谱仪的型号作相应调整。

1. 洗脱梯度条件

| 时间 min | 流动相A % | 流动相B % | 流速 mL/min |
| --- | --- | --- | --- |
| 0.0 | 50 | 50 | 0.4 |
| 1.0 | 50 | 50 | 0.4 |
| 5.0 | 10 | 90 | 0.4 |
| 6.0 | 10 | 90 | 0.4 |
| 6.5 | 50 | 50 | 0.4 |
| 10.0 | 50 | 50 | 0.4 |

7.3 三重四级杆质谱条件

三重四级杆质谱仪（6.1）的质谱参考条件如下：

1. 离子源/电离方式：电喷雾离子源（ESI）。
2. 扫描模式：多重反应监测（MRM）。
3. 离子源温度：450 ℃。
4. 辅助加热气压强：55 psi。
5. 气帘气压强：40 psi。
6. 雾化气体：氮气。
7. 雾化气压强：55 psi。
8. 质谱测定参数见表2。

注：对于不同质谱仪器，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

1. 主要参考质谱参数

| 化合物 | 保留时间 min | 定性离子对  （m/z） | 定量离子对  （m/z） | 离子源喷雾电压  V | 碰撞气电压  强度 | 去簇电压  V | 入口电压  V | 碰撞池出口电压  V |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| MDA衍生物 | 1.78 | 235/159.1、235/143.1 | 235/159.1 | 5500 | 中等 | 60 | 10 | 10 |
| HNE衍生物 | 4.03 | 335.1/182  335.1/163 | 335.1/163 | -4500 | 中等 | -24 | -10 | -11 |
| HHE衍生物 | 2.48 | 293.1/182、293.1/163 | 293.1/163 | -4500 | 中等 | -20 | -10 | -11 |

7.4 标准曲线的制作

按照 7.2 色谱条件和 7.3 质谱条件,将混合标准工作液（5.23）注入超高效液相色谱仪-串联三重四级杆质谱仪（6.1）中进行测试，测定相应的峰面积，以混合标准工作液（5.23）的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

7.5 试样的测定

按照 7.2 色谱条件和 7.3 质谱条件，将待测样品（7.1.4）注入超高效液相色谱仪-串联三重四级杆质谱仪（6.1）中进行测试，待测样品溶液中目标物质的响应值应在仪器线性相应范围内，否则应适当稀释。混合标准工作液（5.23）与待测样品等体积进样。根据标准溶液质谱峰的保留时间和峰面积，对试样溶液的质谱峰根据保留时间和离子对进行定性，外标法定量。MDA、4-HNE、4-HHE衍生物混合标准质谱图见图1。

标准质谱图

标引序号说明：

1 ——MDA衍生物；

2 ——HHE衍生物；

3 ——HNE衍生物。

图1 MDA、4-HNE、4-HHE衍生物混合标准质谱图

* 1. 计算结果

试样中MDA、4-HNE、4-HHE的含量按式（1）计算：

...........................................................（1）

式中：

X ——试样中MDA或4-HNE或4-HHE含量，单位为纳克每克（ng/g）；

c ——从标准系列曲线中得到的试样溶液中MDA、4-HNE或4-HHE的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——试样溶液定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——最终试样溶液所代表的试样质量，单位为克（g）；

1000 ——换算系数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留四位有效数字。

* 1. 精密度

在重复性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%。

* 1. 检出限和定量限

当取样量为2 g，定容体积为1 mL，MDA、4-HNE、4-HHE的检出限和定量限见表3。

1. MDA、4-HNE、4-HHE的检出限和定量限

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 项目 | MDA | 4-HNE | 4-HHE |
| 检出限（ng/g） | 0.0589 | 0.2424 | 0.7905 |
| 定量限（ng/g） | 1.5605 | 1.5425 | 1.5745 |

