**《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》编制说明**

**一、目的意义**

随着社会经济发展和生活水平的提高，我国人口超重和肥胖患病率已达到50.7％（其中34%属于超重，16%属于肥胖），其主要原因之一为每日脂肪摄入量和机体内脂肪量的提高。人们在重点关注并防范脂肪中丙烯酰胺和多环芳烃等有害物质外，忽视了脂质过氧化对食品质量的威胁、以及脂质过氧化产物对人体的危害。

脂质过氧化产物指多不饱和脂肪酸等脂质通过自氧化和/或羟基自由基等氧化降解后所产生的各种醛类物质。高脂肪农产品如动植物油脂、和坚果等因富含不饱和脂肪酸，所以极易发生脂质过氧化反应，并在加工、烹饪和储藏等过程中进一步分解成多种可对机体造成氧化应激损伤的次级产物，主要产物且具有遗传毒有的丙二醛（MDA）和4-羟基壬烯醛（4-HNE）和4-羟基己醛（4-HHE）[1、2]。

由于同时定量检测MDA、4-HNE和4-HHE的国家标准仍为空白，且尚未设置安全限量。关于检测MDA、4-HNE和4-HHE的标准主要为：GB 5009.181-2016 《食品安全国家标准 食品中丙二醛的测定》和T/CI 088-2022《干制鱼中4-羟基-己烯醛和4-羟基-壬烯醛的测定 液相色谱-串联质谱法》。前者有近十年未进行修订，且国家标准中缺少4-HNE和4-HHE的检测；后者虽然可以检测4-HNE和4-HHE，但缺少检测MDA的方法。

为此，本项目组在超高效液相色谱-QTRAP三重四极杆质谱仪的平台上开发和建立检测MDA、4-HNE和4-HHE含量的标准。本检测方法标准可以实时并同时了解高脂肪农产品中MDA、4-HNE和4-HHE含量变化，为调整高脂肪农产品的加工、烹饪、储存等工艺过程中提供准确定量的数据支撑以进行工艺优化；后续为国家设定安全限量、做好大宗农食品的风险监测和制定相关法规政策，提供检测标准和技术支撑；对于保障农食品质量和安全、保护人体健康具有重要意义。

[1]Dragoev S G. Lipid peroxidation in muscle foods: Impact on quality, safety and human health[J]. Foods, 2024, 13(5): 797.

[2]Nikmaram N, Keener K M. The effects of cold plasma technology on physical, nutritional, and sensory properties of milk and milk products[J]. Lwt, 2022, 154: 112729.

**二、任务来源**

本标准受到南京市市场监督管理局科技项目“高脂肪食品中LOPs检测方法的研发”（项目编号：Kj2022003）的资助。项目组向江苏省质量协会提交《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》（名称暂定）团体标准立项申请。

1. **起草单位和起草人员信息及分工**

起草单位：

3.1 江苏大学是江苏省属的全国重点大学，是全国首批具有博士、硕士、工程硕士、学士学位授予权的高校之一。本项目依托江苏大学药学院省重点学科重点实验室完善的科研设施，包括先进的生物技术实验室、植物化学实验室、仪器分析实验室等；实验室设备齐全，包括超高效液相色谱仪、气质联用仪、液相色谱质谱联用仪以及大批生化分析仪器，具有保证实验顺利进行、实施及按时完成的良好条件和保障。

3.2 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，以下简称“南京质检院”“NQI”）是南京市市场监管局直属的综合性技术机构，主要从事加工食品及食品添加剂、建材产品、金银制品、软件及网络产品、智能电网等相关领域的检验检测、标准研制、认证技术服务及检测科技成果转化；连续多年被评为江苏省科技服务业百强机构；2020年正式成为南京市市属科研院所。

3.3 南京大学

起草人员：王飞轩（项目负责人）、欧阳臻（科研指导）、徐卫东（检测方法开发）、万晶琼（检测方法开发）、陈佳俊（检测方法开发）、朱南（标准研发）、林东翔（标准研发）等。

**四、编制过程（需根据标准制定程序各阶段的进展不断补充，直到报批为止）**

标准草案编制阶段：本标草案的初步编制、立项申请和预研工作

2025年1月-2025年4月，项目组对现有MDA、4-HNE和4-HHE的背景、检测标准、科研进展进行了梳理、分析，对前期预研工作情况和标准立项申请的可行性、必要性与意义进行了总结。最终确定以超高效液相色谱-QTRAP三重四极杆质谱仪的平台上开发和建立检测MDA、4-HNE和4-HHE含量的标准。

2025年5月，项目组向江苏省质量协会提交立项申请、标准草稿和编制说明。

2025年6月，组织行业专家、有关单位等对团体标准的草案进行研讨，在多次研讨后形成征求意见稿。

**五、主要内容及技术指标确立依据**

**（一）理论依据**

目前针对食品中的MDA、4-HNE和4-HHE的检测，大多停留在科研实验阶段、且并非高脂肪含量的食品。但液相色谱串联质谱法仍然是检测MDA、4-HNE和4-HHE最佳技术方法。为此，基于科研文献报道的检测过程，项目组分析当前主要在的问题有：

1、传统检测方法缺乏特异性和灵敏度，如硫代巴比妥酸反应法用总醛含量代替MDA含量，并且在衍生化过程中需要高温（90℃），这会导致醛含量增加。

2、配备荧光检测器的高效液相色谱法虽已被用于检测食品中的MDA，但其对荧光干扰敏感，限制了其应用范围。

3、气相色谱或液相色谱串联质谱法检测限均较高，不利于检测低含量样本，同时操作复杂且耗时。

4、高效液相色谱结合光电二极管阵列检测器虽然能同时检测MDA、4-HNE和4-HHE，但仍旧耗时。

5、DNPH衍生化虽然能增强MDA、4-HNE和4-HHE检测信号，但残留的DNPH会干扰低浓度衍生物的检测，目前仍然缺乏纯化衍生物的方法。

**（二）技术关键问题的解决**

为此，本项目组在超高效液相色谱-QTRAP三重四极杆质谱仪的平台上开发和建立检测MDA、4-HNE和4-HHE含量的标准，其技术关键问题的解决主要为：

1、优化色谱方法促进MDA、4-HNE和4-HHE特异性分离并提高分析灵敏度。

1.1、标准溶液和样品中MDA、4-HHE和4-HNE的DNPH衍生物在50%-100%有机流动相中保留时间最佳，本方法有机相为0.1%甲酸乙腈，在10 min的洗脱程序中浓度均≥50%，缩短了检测时间，且各目标分析物的色谱峰清晰，无干扰峰，表明该方法具有较高的专属性。

1.2、本检测方法配备超高效液相色谱可变波长紫外（TUV）检测器，利用自身较低的延迟体积和噪音，提高了低含量检测的分析灵敏度。

2、QTRAP 6500+质谱大幅提高MDA、4-HNE和4-HHE检测精度

2.1、在过去食品MDA、4-HHE和4-HNE检测中，由于样本稀释倍数大及仪器精度不足导致部分样品无法准确定量，多数情况只能检测到纳克级信号，AB SCIEX QTRAP 6500+质谱具有超高的灵敏度和稳定性，定量限低于1 pg/mL，降低了基质对化合物检测的影响，为食品中MDA、4-HHE和4-HNE的痕量分析提供了技术支持。

2.2、多重反应监测（MRM）分析能够快速、灵敏、特异地定量检测目标分析物，在此基础上，QTRAP 6500+质谱的极性切换性能使得MRM扫描速度大幅提升，一级/二级/三级质谱信息切换时间小于2 ms，正/负离子模式切换时间为5 ms。同时，内置的QTRAP能快速对多个离子对进行监测，一次进样在一个时间窗口可以高通量分析4000对MRM离子，提高样品分析效率，操作简便。

3、DNPH衍生化增加MDA、4-HNE和4-HHE紫外吸收并改善质谱响应

3.1、醛类化合物在紫外光区的吸收较弱，检测灵敏度低，而DNPH与醛反应生成的腙类衍生物具有较强的紫外吸收，在240-280 nm波长下有明显的吸收峰。

3.2、在质谱分析中，醛类化合物没有可电离基团，很难带上电荷，离子化效率低。DNPH衍生化后，生成的腙类衍生物引入了新的化学基团，改善了目标分析物的离子化效率，从而提高了MDA、4-HHE和4-HNE在质谱检测中的灵敏度。

3.3、为了进一步提高目标分析物的灵敏度和选择性，对质谱参数进行了优化，通过将DNPH衍生化后的的MDA、4-HHE和4-HNE标准品注入质谱系统来监测MS/MS参数，选取信号强且稳定的离子进行定量分析。

4、固相萃取纯化MDA、4-HNE和4-HHE衍生物

虽然DNPH自带极性基团（硝基），极性大于MDA、4-HNE和4-HHE衍生物，在水相中更稳定，但二氯甲烷有中等极性，可能会导致少量DNPH溶于二氯甲烷，最终干扰低浓度MDA、4-HNE和4-HHE衍生物的特异性检测，形成较高的基线。此外，二氯甲烷密度比水相大，在二氯甲烷萃取MDA、4-HNE和4-HHE衍生物后，需要去除水相才能收集二氯甲烷层衍生物，同样容易引入少量水相DNPH。为此，在收集到二氯甲烷层衍生物后，进一步将衍生物加入C18固相萃取柱，经过淋洗、氮气吹干、洗脱等步骤纯化衍生物，去除包含DNPH在内的非目标物质。

（三）技术创新点

1、超高效液相色谱串联QTRAP 6500+质谱实现食品中MDA、4-HNE和4-HHE的高效精准定量

本项目将配备可变波长紫外（TUV）检测器的超高效液相色谱与定量检测限低于1 pg/mL的QTRAP 6500+先进质谱串联，在高通量分析离子对的基础上，还能同时准确检测出食品中浓度低于1 ng/g的MDA、4-HNE和4-HHE，解决了目前检测技术通量小、特异性欠佳、灵敏度低、稳定性弱、定量浓度受限的问题。

2、MRM定量模式下混合标准品制作标准曲线提升MDA、4-HNE和4-HHE衍生物检测效率

经典试剂盒检测方法，单次仅能制作一种化合物的标准曲线并检测其含量，操作繁琐、成本高且耗时，测样量有限的同时易受操作影响。本项目基于结构相似性建立了能同时检测MDA、4-HNE和4-HHE的方法，MRM模式下混合标准品单次进样即可制备以上3种物质衍生物的标准曲线，每种样本单次进样即可对MDA、4-HNE和4-HHE准确定量，24 h内能检测上百种样品，自动化程度高，操作简便，解决了目前MDA、4-HNE和4-HHE检测效率低的问题。

3、优化衍生物萃取方法降低残留DNPH对低浓度MDA、4-HNE和4-HHE衍生物检测的影响

为了降低DNPH及待测样本中其他非目标物质对检测的影响，本项目利用C18固相萃取方法对衍生物进行纯化，明显增强了MDA、4-HNE和4-HHE衍生物的检测信号，无干扰峰，降低了基质干扰，能准确定量皮克级浓度，解决了MDA、4-HNE和4-HHE衍生物纯度不足、定量限高的问题。

**（四）技术原理**

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。

**（五）主要技术流程**

1、仪器设备

（1）超高效液相色谱仪-串联三重四级杆质谱仪：配有可变波长紫外（TUV）检测器和电喷雾离子源(ESI)。

（2）分析天平：感量为0.0001 g和0.1 g。

（3）涡旋振荡仪。

（4）恒温水浴锅。

（5）氮吹仪。

（6）组织匀浆机。

（7）离心机：转速不低于 5000 r/min。

（8）有机相针式滤器：0.22 μm有机尼龙滤膜。

（9）C18固相萃取柱。

（10）固相萃取装置。

2、分析步骤

2.1样品前处理

（1）试样提取

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。

（2）试样衍生化

移取样品上清液和MDA、4-HNE、4-HHE标准系列溶液各2 mL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。

（3）试样萃取分离

向衍生化的样品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。

取C18固相萃取柱纯化衍生物，用乙腈分2次活化，每次5mL。取备用液过柱，用10mL乙腈淋洗。收集全部淋洗液，50 ℃旋转蒸发至干。

（4）去除二氯甲烷并复溶

用氮吹仪将每种样品和标准系列溶液的衍生物体积减少至1 mL左右，向每种混合物中加入5 mL甲醇复溶，涡旋3 min后，混合物以4000 g离心5 min，取适量上清液过0.22 μm滤膜，置于冰箱4 ℃储存，待测。  
（5）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：

a）色谱柱：C18柱，3 μm，100 mm×2.1 mm（内径），或性能相当者。

b）流动相A：甲酸+水（浓度0.1%）；流动相B：甲酸+乙腈（浓度0.1%）；洗脱梯度应符合表1的规定。

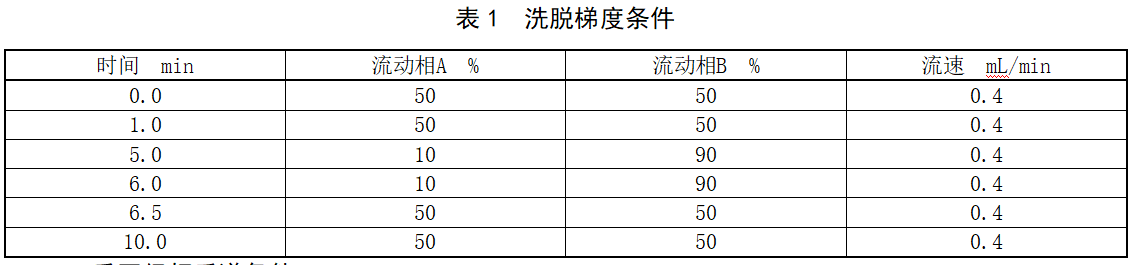
c）柱温：40 ℃。

d）流速：0.4 mL/min。

e）进样量：1 μL。

f）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。



（6）三重四级杆质谱条件

三重四级杆质谱仪的质谱参考条件如下：

a）离子源/电离方式：电喷雾离子源（ESI）。

b）扫描模式：多重反应监测（MRM）。

c）离子源温度：450 ℃。

d）辅助加热气压强：55 psi。

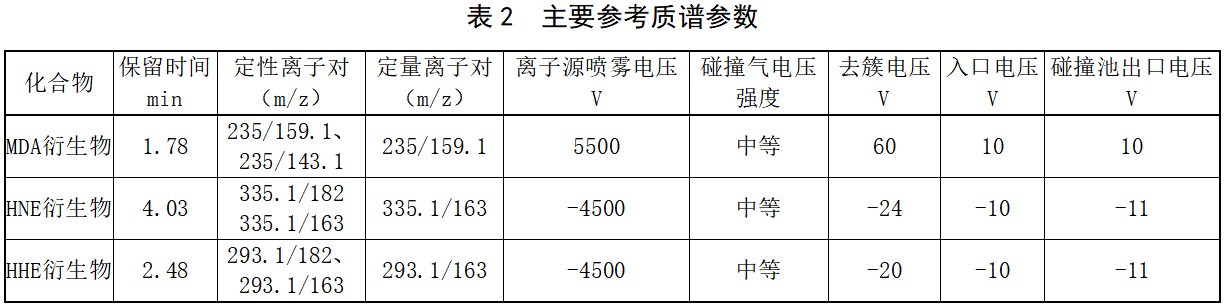
e）气帘气压强：40 psi。

f）雾化气体：氮气。

g）雾化气压强：55 psi。

h）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。



（7）标准曲线的制作

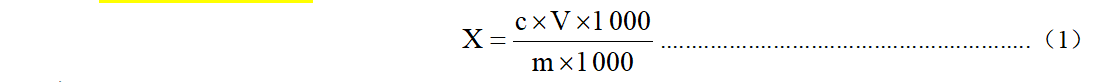
在该色谱条件下，将混合标准工作液注入超高效液相色谱仪-串联三重四级杆质谱仪中进行测试，测定相应的峰面积，以混合标准工作液的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

（8）试样的测定

在该色谱条件下，将待测样品注入超高效液相色谱仪-串联三重四级杆质谱仪中进行测试，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。混合标准工作液与待测样品等体积进样。根据标准溶液色谱峰的保留时间和峰面积，对试样溶液的色谱峰根据保留时间进行定性，外标法定量。

（9）结果计算

试样中MDA、4-HNE、4-HHE的含量按式（1）计算：



式中：

X ——试样中MDA或4-HNE或4-HHE含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

c ——从标准系列曲线中得到的试样溶液中丙二醛的浓度，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）；

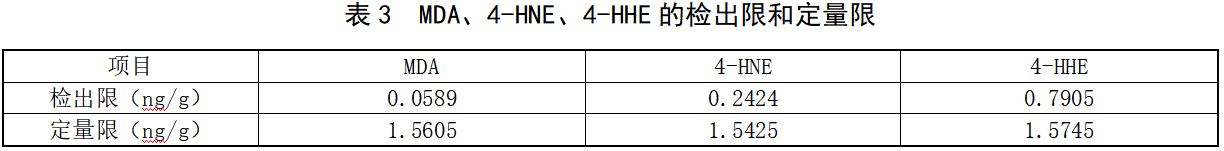
1000 ——换算系数。

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，结果保留两位有效数字。

（10）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%。

（11）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。

（12）质谱图

a）丙二醛—2,4-二硝基苯肼衍生物标准溶液质谱图见图1：

图1

0.05 μg/mL MDA衍生物标准质谱图

b）4-羟基-壬烯醛—2,4-二硝基苯肼衍生物标准溶液质谱图见图2：



图2 0.05 μg/mL 4-HNE衍生物标准质谱图

c）4-羟基己烯醛—2,4-二硝基苯肼衍生物标准溶液质谱图见图3：



图3 0.05 μg/mL 4-HHE衍生物标准质谱图

d）MDA、4-HNE、4-HHE衍生物混合标准质谱图见图4：

标准质谱图

图4 MDA、4-HNE、4-HHE衍生物混合标准质谱图

**六、与现行相关法律法规和标准的关系**

本标准符合国家现行法律、法规、规章和强制性国家标准的要求，与其他推荐性标准具有协调性。国内、国外没有同时测定MDA、4-HNE和4-HHE的超高效液相色谱-三重四极杆质谱检测方法标准。本标准将填补空白。本标准将有助于《中华人民共和国产品质量法》等相关法律、法规、规章和强制性国家标准的实施。

1. **实施推广建议**

本标准适用于动植物油脂、坚果等高脂肪农产品中MDA、4-HNE和4-HHE含量的测定。本标准为首次制定，建议作为推荐性标准发布实施，可作为高脂肪农产品企业为调整高脂肪农产品的加工、烹饪、储存等工艺过程中提供准确定量的数据支撑以进行工艺优化；后续为国家设定安全限量、做好大宗农食品的风险监测和制定相关法规政策，提供检测标准和技术支撑。

1. **团体标准涉及专利的说明**

无。

**九、重大分歧意见的处理过程和依据**

无。

团体标准《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》编制组

2025年5月21日