|  |  |
| --- | --- |
| ICS  | 13.020 |
| 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       |

C51 |

团体标准

T/XXX XXXX—XXXX

人体尿液中8种农药及代谢物的测定

液相色谱串联质谱法

Determination of eight pesticide and its metabolites in human urine——Liquid chromatography tandem mass spectrometry

（征求意见稿）

2024

     - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

  发布

目次

[前言 II](#_Toc201916951)

[引言 III](#_Toc201916952)

[1 范围 1](#_Toc201916953)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc201916954)

[3 原理 1](#_Toc201916955)

[4 试剂和材料 1](#_Toc201916956)

[5 仪器设备 2](#_Toc201916957)

[6 样本采集、运输和保存 2](#_Toc201916958)

[7 分析步骤 2](#_Toc201916959)

[8 方法特性 4](#_Toc201916960)

[9 质量保证和控制 4](#_Toc201916961)

[10 注意事项 5](#_Toc201916962)

[附录A （资料性） 8种农药及代谢物的基本信息 6](#_Toc201916963)

[附录B （资料性） 8种农药及代谢物及其稳定同位素内标的质谱参数 7](#_Toc201916964)

[附录C （资料性） 8种农药及代谢物的提取离子流图 8](#_Toc201916965)

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。

本文件的附录A、附录B、附录C为资料性附录。

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xxx提出并归口。

本文件起草单位：中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所，中国科学院生态环境研究中心，广州市疾病预防控制中心，武汉市疾病预防控制中心

本文件主要起草人：张续，胡小键，朱英，王亚韡，黎娟，谭磊，万延建

本文件为首次发布。

1. 引言

人体生物样本是重要的生物资源，人体生物样本中环境化学污染物及其代谢物反映了经呼吸道、消化道、皮肤等多种途径进入人体的化学物质总量。对它们的识别和量化有助于建立人体化学品和毒物接触标准，对于揭示环境污染物的暴露途径、评估人体化学污染物不良效应剂量、认识环境暴露与健康（疾病）风险之间的关系意义重大。农药是一类重要的环境化学污染物，对人体具有暴露隐蔽性大、暴露周期性长、暴露健康风险高等特点。尿中农药及代谢物浓度水平是评估人体受到该类污染物暴露的重要手段。

本文件规定了人尿中对硝基苯酚（PNP），3,5,6-三氯-2-吡啶酚(TCPY)，[2,4-二氯苯氧乙酸](https://baike.so.com/doc/5437870-7117710.html%22%20%5Ct%20%22_blank) (2,4-D)，[2,4,5-三氯苯氧乙酸](https://www.so.com/link?m=bLNKs%2F3EiZR0vs%2B9bxX6okVtQ8W5rkQcEysXrkcKSB9mNm68VKy%2FBm8JBoHytn8q21ATkjXC1wsfyrb7PqdPx82NlPj5t%2FaChHR0DrqqyM5VhVqI8%2BS2HFXNY9WAdJjz6on0Eyotrrk5m1qI7oWlM%2FDxwamFhcyUzPr%2FNbhMwwAbjLzvopjv4gWQQ1DfBnJCO" \t "_blank) (2,4,5-T)，3-苯氧基苯甲酸(3-PBA), 4-氟-3-苯氧基苯甲酸(4F-3PBA),顺式二氯乙烯基二甲基环丙烷羧酸(cis-DCCA)，反式二氯乙烯基二甲基环丙烷羧酸(trans-DCCA)的液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）检测方法。

人体尿中8种农药及代谢物的测定

液相色谱串联质谱法

* 1. 范围

本标准规定了人体尿液中对硝基苯酚（PNP），3,5,6-三氯-2-吡啶酚(TCPY)，[2,4-二氯苯氧乙酸](https://baike.so.com/doc/5437870-7117710.html%22%20%5Ct%20%22_blank) (2,4-D)，[2,4,5-三氯苯氧乙酸](https://www.so.com/link?m=bLNKs%2F3EiZR0vs%2B9bxX6okVtQ8W5rkQcEysXrkcKSB9mNm68VKy%2FBm8JBoHytn8q21ATkjXC1wsfyrb7PqdPx82NlPj5t%2FaChHR0DrqqyM5VhVqI8%2BS2HFXNY9WAdJjz6on0Eyotrrk5m1qI7oWlM%2FDxwamFhcyUzPr%2FNbhMwwAbjLzvopjv4gWQQ1DfBnJCO" \t "_blank) (2,4,5-T)，3-苯氧基苯甲酸(3-PBA), 4-氟-3-苯氧基苯甲酸(4F-3PBA),顺式二氯乙烯基二甲基环丙烷羧酸(cis-DCCA)，反式二氯乙烯基二甲基环丙烷羧酸(trans-DCCA)的液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）检测方法。

本标准适用于人体尿液中2种农药原型（[2,4-二氯苯氧乙酸](https://baike.so.com/doc/5437870-7117710.html%22%20%5Ct%20%22_blank)，[2,4,5-三氯苯氧乙酸](https://www.so.com/link?m=bLNKs%2F3EiZR0vs%2B9bxX6okVtQ8W5rkQcEysXrkcKSB9mNm68VKy%2FBm8JBoHytn8q21ATkjXC1wsfyrb7PqdPx82NlPj5t%2FaChHR0DrqqyM5VhVqI8%2BS2HFXNY9WAdJjz6on0Eyotrrk5m1qI7oWlM%2FDxwamFhcyUzPr%2FNbhMwwAbjLzvopjv4gWQQ1DfBnJCO" \t "_blank)）和6种农药代谢物（硝基苯酚，3,5,6-三氯-2-吡啶酚，3-苯氧基苯甲酸，4-氟-3-苯氧基苯甲酸，顺式二氯乙烯基二甲基环丙烷羧酸，反式二氯乙烯基二甲基环丙烷羧酸）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

GB/T 15603 常用化学危险品贮存通则

GB/T 38735 人类尿液样本采集与处理

* 1. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

* 1. 原理

尿液样本中的特异性农药原型及农药代谢物经β-葡萄糖醛酸酶水解后，采用亲水亲脂共平衡聚合物基体固相萃取柱富集和净化，液相色谱串联质谱负离子模式测定，以目标分析物的保留时间和离子丰度比定性，稳定内标法定量。

* 1. 试剂和材料

除非有特殊说明，所有试剂均为色谱纯；水为GB/T 6682规定的一级水

甲醇（CH3OH）。

乙腈（CH3CN）。

乙酸（CH3COOH）。

甲酸（HCOOH）。

*β*-葡萄糖醛酸酶：来源于大肠杆菌（*E.coli*）或罗曼蜗牛(*Helix pomatia*)，活性≥85 000 U/mL。

乙酸钠（CH3COONa）。

固相萃取柱：亲水亲脂共平衡聚合物基体(HLB)固相萃取柱（30 mg，3 mL，30 μm）。

滤膜：0.22 μm，亲水性聚丙烯材质。

乙酸钠溶液（*c* = 0.2 mol/L）：称取乙酸钠1.64 g，加入320 μL乙酸，用水溶解后定容至100 mL。

乙酸甲醇溶液（1+25+74，V/V/V）：移取1mL乙酸和25 mL甲醇于100 mL容量瓶中，用水定容至刻度。

乙酸溶液：（1+999，V/V）:移取1 mL乙酸，用水定容至1000 mL。

乙酸乙腈溶液：（1+999，V/V）: 移取1 mL乙酸，用乙腈定容至1000 mL。

乙腈溶液：（1+9，V/V）:移取10 mL乙腈，用水定容至100 mL。

标准品：PNP、TCPY、2,4-D、2,4,5-T、3-PBA、4F-3PBA、cis-DCCA、trans-DCCA，纯度≥95%，基本信息见附录A。

稳定同位素内标：13C6-PNP、13C3-TCPY、13C6-2,4-D、13C6-2,4,5-T、13C6-3-PBA、13C6-4F-3PBA、13C2-D1-*cis*-DCCA、13C2-D1-*trans*-DCCA，纯度≥95%。

标准及稳定同位素内标储备溶液：准确称取标准品及稳定同位素内标各0.001 g（精确到0.0001 g），分别用甲醇定容至10 mL。8种农药及代谢物标准及稳定同位素内标储备溶液质量浓度均为100 mg/L，4℃可保存2年。也可直接使用符合要求的有证标准溶液。

混合标准及稳定同位素内标中间溶液：准确移取PNP、TCPY、2,4-D、2,4,5-T、3-PBA、4F-3PBA、cis-DCCA、trans-DCCA标准储备溶液各1.00 mL，甲醇定容至25 mL，配制成混合标准中间溶液，质量浓度为4.00 mg/L，4℃可保存1年。准确移取8种稳定同位素内标标准储备溶液1.00 mL，甲醇定容至25 mL，配制成混合稳定同位素内标中间溶液，质量浓度为4.00 mg/L，4℃可保存1年。上述混合标准中间溶液可直接使用符合要求的有证混合标准溶液配制。

混合标准及稳定同位素内标使用溶液：准确移取混合标准中间溶液，用甲醇稀释成质量浓度为1.00 mg/L的混合标准使用溶液。将混合稳定同位素内标中间溶液用甲醇稀释至1.00 mg/L，配制成混合稳定同位素内标使用溶液。混合标准使用溶液和混合稳定同位素内标使用溶液应现用现配。

* 1. 仪器设备

液相色谱串联质谱仪（LC-MS/MS）：配电喷雾离子源（ESI）。

电子天平：感量为0.0001g和0.01 g。

恒温水浴锅：可控制37℃ ± 2℃。

离心机：相对离心力≥1700 ×*g*。

固相萃取装置：24孔，可连接亲水亲酯平衡性固相萃取柱。

涡旋混匀器。

* 1. 样本采集、运输和保存
		1. 样本采集

按GB/T 38735规定方法采集尿液样本。尿液样本最少采集量4.5 mL，以满足重复测定需求。采集的样本应储存于硼硅酸盐玻璃或聚丙烯材质的采样管中，使用聚丙烯或聚四氟乙烯材质的盖子，不得使用橡胶塞。

* + 1. 样本运输和保存

现场采集时，先检查采样管是否清洁、是否未开启、是否损坏。样品采集完成后，应将尿液样本暂存在装有冰袋或冰盒的保温箱中，并于12 h内−20℃冷链运输至实验室，避光保存。尿液样本在-20℃下可保存2个月，在-70℃下可至少保存1年。

* 1. 分析步骤
		1. 样本前处理

样本准备

将冻存的尿液样本取出，4℃下完全解冻后，取出自然放置至室温。

样本制备

用涡旋混匀器混匀尿液样本，准确移取1.00 mL于5 mL聚丙烯离心管中，依次加入100 μL混合稳定同位素内标使用溶液（相当于10.0 ng）（5.12），0.5 mL乙酸钠溶液（5.7）和15 μL *β*-葡萄糖醛酸酶（5.6），在涡旋混匀器上充分振荡，置于37℃水浴酶解12 h，取出冷却至室温。置于涡旋混匀器上充分振荡。离心10 min（≥1700 *×g*），取上清液进行固相萃取。

固相萃取

依次用3 mL甲醇和3 mL水活化固相萃取柱；将离心好的上清液转移至固相萃取柱。在不加压力的条件下依靠自然重力过柱（上清液的过柱速度约为1 mL/min）。用3 mL乙酸甲醇溶液（5.9）淋洗，真空抽干5 min去除固相萃取柱中残留水分；1 mL甲醇溶液缓慢洗脱（0.5 mL/min）固相萃取柱，重复1mL甲醇洗脱一次；收集洗脱液，35℃氮吹至500 μL，加100 μL水作为保护剂，再继续在35℃条件下氮吹至有机组分挥发至干，加入400 μL 10%乙腈水；过滤膜后测定。处理完的样品溶液，-20℃密封避光保存，可稳定保持3天。

* + 1. 方法空白试验

除不加样本外，按分析步骤进行方法空白试验。

* + 1. 推荐分析条件

液相色谱参考条件

1. 色谱柱：C18柱，100 mm× 2.1 mm，粒径1.7 μm；或等效色谱柱。
2. 流动相：乙酸溶液（1+999，V/V）为流动相A，乙酸乙腈溶液（1+999,V/V）为流动相B进行洗脱，梯度程序见表1。
3. 流速：0.3 mL/min。
4. 柱温：40℃。
5. 进样量：10 μL。
6. 液相色谱梯度程序

| 时间 / min | A（V%） | B（V%） |
| --- | --- | --- |
| 0.0 | 95 | 5 |
| 1.0 | 95 | 5 |
| 2.0 | 80 | 20 |
| 4.0 | 80 | 20 |
| 5.0 | 60 | 40 |
| 7.0 | 60 | 40 |
| 8.0 | 50 | 50 |
| 10.0 | 50 | 50 |
| 10.5 | 0 | 100 |
| 12.5 | 0 | 100 |
| 13.0 | 95 | 5 |
| 16.0 | 95 | 5 |

质谱参考条件

1. 电离模式：电喷雾离子源（ESI），负离子模式。
2. 扫描方式：多反应监测模式（MRM）。
3. 其他质谱参数见附录B。
	* 1. 校准

标准系列工作溶液配制

分别准确移取混合标准使用溶液（5.12）适量，用乙腈溶液（5.13）稀释，配制成不同浓度的标准系列工作溶液。标准系列工作溶液中农药及代谢物质量浓度分别为0.10 μg/L、0.50 μg/L、1.00 μg/L、5.00 μg/L、10.0 μg/L、25.0 μg/L、50.0 μg/L和100 μg/L,稳定同位素内标添加量10.0 μL，质量浓度为10.0 μg/L。

校准曲线绘制

按推荐分析条件，依次测定稀释后的标准系列工作溶液。以目标分析物定量离子峰面积和对应稳定同位素内标峰面积比值为纵坐标，以其质量浓度比值为横坐标绘制校准曲线（权重取1/x）。8种农药及代谢物的提取离子流图见附录C。

* + 1. 样本测定
			1. 定性分析

尿液样本中目标分析物的保留时间与校准曲线中相应分析物的保留时间相对偏差应在±2.5%之内。当尿液样本中目标分析物定性离子的相对丰度与校准曲线中相近浓度点相应目标分析物定性离子的相对丰度进行比较，其允许偏差不超过表2规定的范围时，可判定为样本中存在相应的目标分析物。

1. 定性离子相对丰度的最大允许偏差

| 相对离子丰度 / % | ＞50 | 20~50 | 10~20 | ≤10 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 最大允许偏差 / % | ±20 | ±25 | ±30 | ±50 |

* + - 1. 定量分析

尿液样本中目标分析物的浓度按如下公式计算：

ρ——尿液样本中目标分析物的质量浓度，（μg/L）；

*Ax*——目标分析物的峰面积；

*Ais*——目标分析物对应内标的峰面积；

*Cis*——尿液样本进样时的内标浓度，ng；

*a*——校准曲线的斜率；

b——校准曲线的截距；

*n*——尿液样本前处理过程的浓缩倍数mL；

测量结果保留三位有效数字，但当结果接近方法检出限时，测量结果与检出限小数点后位数保持一致。

* 1. 方法特性
		1. 方法检出限和定量限

8种农药及代谢物的方法检出限为0.03 μg/L ~ 0.10 μg/L，方法定量限为0.10 μg/L~ 0.20 μg/L，具体见表3。

1. 8种农药及代谢物的方法检出限和定量限

| 目标分析物 | 方法检出限/（μg/L） | 方法定量限/（μg/L） |
| --- | --- | --- |
| PNP | 0.1 | 0.20 |
| TCPY | 0.05 | 0.20 |
| 3-PBA | 0.03 | 0.10 |
| 4F-3PBA | 0.03 | 0.10 |
| cis-DCCA | 0.06 | 0.20 |
| trans-DCCA | 0.03 | 0.10 |
| 2,4-D | 0.03 | 0.10 |
| 2,4,5-T | 0.03 | 0.10 |

* + 1. 精密度和回收率

8种目标分析物在加标浓度在1.0 μg/L~80 μg/L之间，回收率为80%~120%，精密度为1.5% ~ 13%。

* 1. 质量保证和控制

实验室应经常考察质控结果、精密度和回收率，以确定分析系统处于正常状态。

每批试验应至少包含1个质控样，1个方法空白，并按5%的比例设置平行样（不足20个样本时至少设置1个平行样）。

可使用标准参考物质、质控样本和加标回收等方式评估方法准确性。标准参考物质的检测结果应符合给定的参考值范围；质控样本测定结果应满足每次测定值落在相应目标分析物均值的±2倍标准偏差内，且连续测定10次的测定结果不能落在均值同侧；加标回收率应满足检验方法要求。

方法空白应低于方法检出限。若不能满足要求，需确定方法空白来源，评估方法空白的稳定性。稳定性评估中，需进行不低于6批次的方法空白试验，根据方法空白中目标分析物的质谱响应值，计算相对标准偏差，若低于20%，表示方法空白稳定，可根据空白样本和实际尿液样本中目标分析物的含量水平评估扣除空白的可能性。

平行样测定结果的相对偏差应小于20%。

每批试验应重新配制校准曲线，不得采用单点校正等方法代替校准曲线。校准曲线应包括不少于5个平均分布的标准浓度点（不包含零点）。采用1/x权重拟合校准曲线，8种农药及代谢物的相关系数＞0.995。用校准曲线反推各标准点浓度，标准曲线下限测定值应在其理论浓度值的±30%以内，其余各浓度点应在±20%以内。

* 1. 注意事项

反复冻融尿液样本会影响测定结果，尿液样本反复冻融超过3次后会影响测定结果。

乙酸钠溶液不宜一次性配制过多，建议根据实验需要现用现配。

流动相配制过程中易出现PNP，TCPY的污染。如出现污染，可在进样器前端连接捕集柱，以降低干扰。

尿液样本经前处理过程所得到的样品溶液可能存在降解。如在完成样本前处理后不能立即测定，应将样品溶液保存于-20℃条件下，并在3日内完成测定。

每批进样列表周期不宜超过72h，且样品盘温度应设置在10℃以下。

样品中目标分析物浓度超过线性范围时，需进行复测。复测时，应采用减少取样体积或稀释待测尿液样本的方式，不得直接稀释经过前处理的样品溶液。

连续对两个样品进行测定时，当第一个样品浓度超过第二个样品50倍且第二个样品测定值高于定量限时，需对第二个样品进行复测。

样品中内标未检出时，需对该样品进行重复进样。当重复进样测定仍未检出内标时，可判断该样品基质效应影响较大，需进行复测。复测时，宜稀释待测尿液样本以降低基质效应。

1.
2. （资料性）
8种农药及代谢物的基本信息
	1. 中文名称、英文名称、CAS号、相对分子质量和结构式

| 序号 | 中文名称 | 英文名称 | 缩写 | CAS号 | 相对分子质量 | 结构式 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | 对硝基苯酚 | Para-Nitrophenol | PNP | 100-02-7 | 139.11 |  |
| 2 | 3,5,6-三氯-2-吡啶酚 | 3,5,6-Trichloro-2-pyridinol | TCPY | 6515-38-4 | 198.43 |  |
| 3 | 3-苯氧基苯甲酸 | 3-Phenoxybenzoic acid | 3-PBA | 3739-38-6 | 214.22 |  |
| 4 | 4-氟-3-苯氧基苯甲酸 | 4-Fluoro-3-phenoxy benzoic acid | 4F-3PBA | 77279-89-1 | 232.21 |  |
| 5 | 顺式二氯乙烯基二甲基环丙烷羧酸 | Cis-dichlorovinyl-dimethylcyclopropane carboxylic acid | cis-DCCA | 59042-49-8 | 209.07 |  |
| 6 | 反式二氯乙烯基二甲基环丙烷羧酸 | Trans-dichlorovinyl-dimethylcyclopropane carboxylic acid | trans-DCCA | 59042-50-1 | 209.07 |  |
| 7 | 2,4-二氯苯氧乙酸 | 2,4-Dicholorphenoxyacetic acid | 2,4-D | 94-75-7 | 221.04 |  |
| 8 | 2,4,5-三氯苯氧乙酸 | 2,4,5-Tricholorphenoxyacetic acid | 2,4,5-T | 93-76-5 | 225.48 |  |

1. （资料性）
8种农药及代谢物及其稳定同位素内标的质谱参数

8种农药及代谢物的质谱参数参考条件1如下：

1. 碰撞气：氮气。
2. 气帘气：207 kPa。
3. 雾化气：345 kPa。
4. 加热气：414 kPa。
5. 喷雾电压：-4500 V。
6. 离子源温度：350 ℃。

8种农药及代谢物的质谱参数参考条件1如下：

1. 雾化气流量：3.0 L/min。
2. 干燥器流量：10.0 L/min。
3. 加热气流量：10.0 L/min。
4. 接口温度：350℃。
5. 脱溶剂管温度：250℃。
6. 加热块温度：400℃

各目标分析物及内标的离子对、碰撞能量参数见表B.1。

* 1. 8种农药及代谢物及其稳定同位素内标的质谱参数

| 序号 | 化合物 | 离子对m/z | 碰撞能量(eV) |
| --- | --- | --- | --- |
| 1 | PNP | 138.0/108.0\* | -24 |
| 138.0/92.1 | -30 |
| 2 | TCPY | 196.0/35.1\* | -44 |
| 198.0/35.1 | -40 |
| 3 | 3-PBA | 213.1/93.0\* | -26 |
| 213.1/65.1 | -70 |
| 4 | 4F-3PBA | 231.1/93.1\* | -28 |
| 231.1/65.1 | -75 |
| 5 | *cis*-DCCA | 206.9/35.1\* | -35 |
| 208.9/35.1 | -35 |
| 6 | *trans*-DCCA | 207.1/35.2\* | -40 |
| 209.1/35.2 | -40 |
| 7 | 2,4-D | 219.0/161.1\* | -18 |
| 219.0/125.0 | -36 |
| 8 | 2,4,5-T | 253.1/195.0\* | -19 |
| 253.1/159.0 | -39 |
| 9 | 13C6-PNP | 144.1/114.1 | -10 |
| 10 | 13C3-TCPY | 201.1/35.1 | -40 |
| 11 | 13C6-3-PBA | 219.1/99.1 | -27 |
| 12 | 13C6-4F-3PBA | 236.9/99.1 | -30 |
| 13 | 13C2-D1-*cis*-DCCA | 210.2/35.1 | -30 |
| 14 | 13C2-D1-*trans*-DCCA | 210.1/35.1 | -38 |
| 15 | 13C6-2,4-D | 224.8/167.0 | -17 |
| 16 | 13C6-2,4,5-T | 260.6/203.0 | -15 |

1. \*定量离子。
2. （资料性）
8种农药及代谢物的提取离子流图



* 1. 8种农药及代谢物提取离子流图（10.0 ng/mL人工尿液基质加标溶液）