**附件2：**

《人体尿液中多种抗生素的测定液相色谱串联质谱法》

编制说明

1. 工作简况

（一）任务来源

2025年1月，由中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所申报的《人尿液中多种抗生素的测定液相色谱串联质谱法》团体标准获得中国民族卫生协会立项批复。按照中国民族卫生协会相关管理要求，对《人尿液中多种抗生素的测定液相色谱串联质谱法》进行方法研制工作。

（二）协作单位

《人尿液中多种抗生素的测定液相色谱串联质谱法》的制订工作由中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所（以下简称“环境所”）承担。主要负责项目的总体协调、方法研制等工作。

深圳市罗湖区疾病预防控制中心、山东省疾病预防控制中心和无锡市疾病预防控制中心、茂名市中医院等单位参加了方法的验证工作。

（三）主要工作进程

（1）批复下达：2025年1月，《人尿液中多种抗生素的测定液相色谱串联质谱法》团体标准被中国民族卫生协会正式批准立项。

（2）前期文献及资料调研：收到批复通知后，用时30天进行相关文献及国内外标准查阅，确定了标准方法中测定物质及基本方法。

（3）项目讨论：文献调研完成后，编写组于2025年2月24日开会讨论研制方案。并于2月28日前完成了验证单位筛选工作。

（4）项目研制工作进程： 2025年3月7日，开始进行方法的研制工作，同时制定了研制报告、验证报告和编制说明模板。2025年4月中旬，各验证单位开始进行方法验证。2025年6月15日前，撰写标准文本、研制报告、编制说明和验证报告工作。

（四）主要起草人及工作分工

参与本标准起草的人员包括11人，主要任务分工见表1-1。

表1-1 标准的研制单位，协助单位等信息

|  |  |
| --- | --- |
| 主要起草人（单位） | 承担的工作 |
| 胡小键（环境所） | 标准方法研制、撰写、组织验证 |
| 张续（环境所） | 方法的研制 |
| 朱英（环境所） | 审定标准文本、编制说明及研制报告，专家回复意见的确定及审核。 |
| 李振环 | 方法的研制 |
| 倪一平、朱波（深圳罗湖区疾控中心） | 负责方法的验证工作，编制方法验证报告。 |
| 付慧（环境所） | 方法的研制 |
| 郑凤家、王晓琳（山东省疾病预防控制中心） | 负责方法的验证工作，编制方法验证报告。 |
| 吴林林、吴宇伉（无锡市疾病预防控制中心） | 负责方法的验证工作，编制方法验证报告。 |
| 徐建华（茂名市中医院） | 标准评估 |

1. 标准编制原则和确定标准的主要内容

（一）编制原则

目前，国内尚未制定人体尿液样本中多种抗生素检测的标准方法。本标准主要以科学性、先进性、适用性和可操作性等方面作为标准原则，在进行充分的文献调研工作的前提下，采用准确度、精密度、稳定性等方法学指标进行了分析方法的可靠性评估。其检出限、精密度、稳定性等指标均符合痕量分析要求。

1.科学性

抗生素通过各种途径进入人体产生作用后，约30%~90%的抗生素以原型或代谢物的形式排出到外环境中。本研究通过测定尿中抗生素浓度水平来评估人体抗生素暴露情况。

2.先进性

尿中抗生素浓度水平较低（多在ng/mL）且变化差异较大。应采用分辨率高、灵敏度好，定量准确的仪器进行测定。通过调研文献，目前常用的方法为高效液相色谱串联质谱法（LC-MS/MS）法，能兼顾分辨率及灵敏度。因此，本标准采用LC-MS/MS法测定尿中19种抗生素。

3.适用性

当前，尚无尿中抗生素标准检验方法 。有一些文献方法报导采用固相萃取LC-MS/MS法测定尿中抗生素。但是，这些方法检测条件各异，方法学指标差异较大，因此无法在国内推广使用。本方法采用高通量固相萃取技术LC-MS/MS法测定尿中的抗生素水平，该方法具有检测效率高、样品用量少、自动化程度高、操作方便、省时、节约试剂等优点，具有广泛的适用性，适合人群大规模监测研究。

（二）标准的主要内容

1.方法适用范围

本文件规定了人尿液样本中阿奇霉素（azithromycin）、克拉霉素（clarithromycin）、罗红霉素（roxithromycin）、四环素（tetracycline）、强力霉素（doxycycline）、土霉素（oxytetracycline）、恩诺沙星（enrofloxacin）、培氟沙星（pefloxacin）、二氟沙星（difloxacin）、洛美沙星（lomefloxacin）、磺胺二甲嘧啶（sulfamethazine）、磺胺甲噁唑（sulfamethoxazole）、磺胺嘧啶（sulfadiazine）、甲氧苄啶（trimethoprim）、磺胺喹噁啉（sulfaquinoxaline）、磺胺氯哒嗪（Sulfachloropyridazine）、磺胺林（sulfalene）、头孢克洛（cefaclor）、林可霉素（lincomycin）的液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）测定方法。

本文件适用于人尿液样本中19种抗生素的测定。

* 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 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

尿液样品中的抗生素经β-葡萄糖醛酸酶水解，用固相萃取板进行富集和净化，液相色谱串联质谱正离子多反应监测模式测定，同位素内标法定量。

* 1. 试剂或材料

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；

乙酸；

乙腈；

甲酸；

乙酸铵；

甲醇；

96孔固相萃取板：聚苯乙烯二乙烯基苯吡咯烷酮亲水亲酯平衡填料，30 mg，2 mL；

β-葡萄糖醛酸酶：活性不低于85000 U/mL；

1.0 mol/L乙酸铵缓冲溶液（pH=5.0）：称取1.93 g乙酸铵于50 mL烧杯中，加入约20 mL水，混匀，加入乙酸，调节缓冲液pH为5.2，调节好pH溶液倒入25 mL容量瓶，定容；

标准物质和同位素内标：纯度不低于98%。标准物质和内标的CAS号、相对分子量和结构式见附录A；

标准溶液配制：分别取10 mg标准物质和内标固体于10mL容量瓶，用甲醇溶解并定容至刻度，配成1 mg/mL的单标标准溶液，-20℃保存6个月；也可直接使用符合要求的有证标准溶液；

标准混合溶液中间液：取适量标准物质单标溶液用置于容量瓶中，甲醇配制成10 μg/mL的混合标准溶液，置于冰箱-20℃保存3个月；

标准混合使用液：取标准混合溶液中间液0.10 mL置于10 mL容量瓶中，用20%（v/v） 甲醇水溶液定容，配成100 μg/L的标准混合溶液使用液；临用现配

同位素内标混合中间液：取适量内标标准品单标溶液置于25 mL容量瓶中，用甲醇配制成4 μg/mL的混合内标溶液，置于冰箱-20℃保存3个月。

同位素内标混合使用液：取内标混合溶液中间液1.00 mL置于10 mL容量瓶中，用20%（v/v） 甲醇水溶液配制成400 μg/L的混合内标使用液。临用现配。

标准系列工作液：分别准确吸取标准混合使用液0 mL、0.05 mL、0.25 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.50 mL、5.00 mL于10 mL容量瓶中，加入0.50 mL的内标混合使用液。用20%（v/v） 甲醇水溶液定容至刻度，混匀。各物质浓度分别为0 μg/L、0.50 μg/L、2.50 μg/L、5.00 μg/L、10.0 μg/L、25.0 μg/L、50.0 μg/L，同位素内标浓度为20.0 μg/L。临用现配。

* 1. 仪器设备

液相色谱-三重四极杆质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）；

电子天平：感量为0.0001 g和0.01 g；

恒温水浴锅：可控制37℃±2℃水浴；

离心机：最大离心力2860 g，最大转速4500 rpm；

96孔固相萃取板装置；

涡旋混匀器；

氮吹仪。

* 1. 样品采集、运输和保存
     1. 样品采集

按GB/T 38735中规定的方法采集。样品最少采集2.5 mL。采集的样品应装在硼硅酸盐玻璃或聚丙烯材质的采样管中，使用聚丙烯或特氟龙材质的盖子，不得使用橡胶塞。

* + 1. 样品运输与保存

尿液样品应在-20 ℃以下避光保存。现场采集时，如无冷冻保存条件，可先将尿液样品在放置有冰袋或冰盒的保温箱中暂存，并在12 h内转移至-20 ℃以下保存。分装和保存过程中应防止样品受到污染或发生所测待测组分含量变化。

尿液样品应在-20 ℃以下冷链运输。

* 1. 分析步骤
     1. 样品前处理
        1. 样品准备

将冻存的尿液样品取出，4℃下解冻不小于8 h后自然放置至室温。

* + - 1. 样品制备

用涡旋混匀器混匀尿液样品，准确移取1 mL尿液于96孔收集板中，依次加入10 μL 400 μg/L的混合内标（5.15），20 μL β-葡萄糖醛酸酶（5.8），200 μL 乙酸铵缓冲溶液（5.9），在涡旋混匀器上充分振荡。将样品置于37℃水浴酶解过夜（大于12小时）。

* + - 1. 固相萃取

依次用1mL甲醇和1mL 纯水活化96孔固相萃取板（5.7）。将8.1.2中上清液转移至96孔固相萃取板中，在不加压力的条件下依靠自然重力过板。样品过板后，用1mL超纯水快速淋洗，负压抽干5 min。后用1 mL甲醇溶液缓慢洗脱固相萃取板，重复一次，采用96孔收集板收集洗脱液。洗脱完毕后，于洗脱液中加入200μL纯水，45℃条件下氮吹至约200μL，96孔板离心机离心以4000rpm/min速度离心10min，待进样。

* + 1. 推荐分析条件
       1. 液相色谱参考条件

1. 色谱柱：高强度硅胶基质反相C18柱，100 mm（柱长）× 3.0 mm（内径），1.8 μm（粒径），或等效色谱柱。
2. 流动相：A为0.1%甲酸水溶液，B为0.1%甲酸乙腈溶液。梯度洗脱程序见表1。
3. 流速：0.30 mL/min。
4. 柱温：40 ℃。
5. 样品室温度10℃。
6. 进样量：5μL。
7. 梯度洗脱条件

| 时间（min） | A（V，%） | B（V，%） |
| --- | --- | --- |
| 初始条件 | 97.0 | 3.0 |
| 0.3 | 97.0 | 3.0 |
| 0.5 | 85.0 | 15.0 |
| 1.0 | 85.0 | 15.0 |
| 7.0 | 70.0 | 30.0 |
| 9.5 | 60.0 | 40.0 |
| 11.0 | 5.0 | 95.0 |
| 13.0 | 5.0 | 95.0 |
| 13.5 | 97.0 | 3.0 |
| 16.0 | 97.0 | 3.0 |

**8.2.2质谱参考条件**

1. 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
2. 电离方式：正电离；
3. 检测方式：多离子反应监测（MRM）；
4. 离子源温度：400℃；
5. 喷雾电压：5500V；
6. 碰撞气：High；
7. 气帘气：30psi；
8. 雾化气：30psi；
9. 辅助气：50psi。
10. 各目标分析物及内标的质谱参数见表2－2。

表2-2 19种目标物及其内标的质谱参数

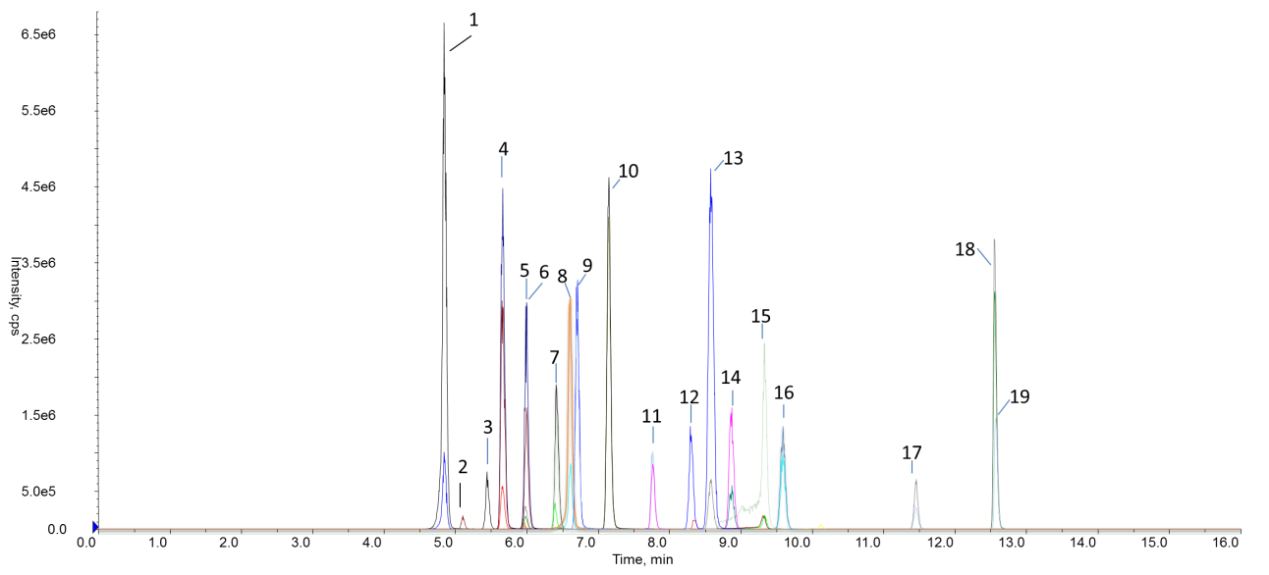
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | | 目标物 | 保留时间（min） | 母离子/（*m/z*） | 子离子/（*m/z*） | CE/eV | DP/V | 内标 |
| 1 | | 阿奇霉素 | 8.5 | 749.7 | 591.3\*  573.5 | 44  48 | 60 | 阿奇霉素-D3 |
| 2 | | 克拉霉素 | 12.5 | 748.6 | 158.2\*  590.3 | 34  25 | 10 | 克拉霉素-13C，D3 |
| 3 | | 罗红霉素 | 12.6 | 837.6 | 679.3\*  158.1 | 30  43 | 30 | 罗红霉素-D7 |
| 4 | | 四环素 | 6.7 | 445.2 | 154.0\*  410.0 | 34  27 | 20 | 四环素-D6 |
| 5 | | 强力霉素 | 9.4 | 445.2 | 428.1\*  410.1 | 25  35 | 45 | 强力霉素-D3 |
| 6 | | 土霉素 | 6.1 | 461.1 | 426.0\*  443.1 | 26  18 | 35 | 四环素-D6 |
| 7 | | 恩诺沙星 | 6.8 | 360.2 | 316.3\*  342.0 | 28  31 | 35 | 恩诺沙星-D5 |
| 8 | | 培氟沙星 | 6.0 | 334.1 | 233.0\*  290.1 | 32  26 | 130 | 培氟沙星-D3 |
| 9 | | 二氟沙星 | 7.9 | 400.2 | 356.1\*  299.0 | 25  35 | 125 | 二氟沙星-D3 |
| 10 | | 洛美沙星 | 6.5 | 352.2 | 265.1\*  308.1 | 29  23 | 128 | 洛美沙星-D5 |
| 11 | | 磺胺二甲嘧啶 | 7.1 | 278.9 | 186.2\*  156.2 | 31  31 | 25 | 磺胺二甲嘧啶-D4 |
| 12 | | 磺胺甲噁唑 | 9.5 | 254.1 | 91.8\*  108.1 | 24  31 | 45 | 磺胺甲噁唑-13C6 |
| 13 | | 磺胺嘧啶 | 5.4 | 251.1 | 156.1\*  92.0 | 20  28 | 63 | 磺胺嘧啶-D4 |
| 14 | | 甲氧苄啶 | 5.7 | 291.3 | 230.1\*  261.2 | 36  30 | 50 | 13C3-甲氧苄啶 |
| 15 | | 磺胺喹噁啉 | 11.3 | 300.9 | 156.1\*  108.0 | 22  32 | 67 | 磺胺喹噁啉-D4 |
| 16 | | 磺胺氯哒嗪 | 8.7 | 284.9 | 156.0\*  92.0 | 19  30 | 30 | 磺胺氯哒嗪-D4 |
| 17 | | 磺胺林 | 8.4 | 281.1 | 156.1\*  108.0 | 22  27 | 40 | 磺胺林-13C6 |
| 18 | 头孢克洛 | | 4.9 | 368.0 | 105.9\*  174.1 | 24  18 | 40 | 头孢噻呋-D3 |
| 19 | 林可霉素 | | 4.8 | 407.3 | 126.1\*  359.5 | 34  26 | 120 | 林可霉素-D3 |
| 20 | 阿奇霉素-D3 | | 8.5 | 752.6 | 594.4 | 46 | 30 | - |
| 21 | 克拉霉素-13C，D3 | | 12.5 | 752.4 | 162.3 | 32 | 53 | - |
| 22 | 罗红霉素-D7 | | 12.6 | 844.7 | 686.5 | 33 | 26 | - |
| 23 | 四环素-D6 | | 6.7 | 451.1 | 416.1 | 29 | 40 | - |
| 24 | 强力霉素-D3 | | 9.4 | 448.3 | 431.0 | 26 | 30 | - |
| 25 | 恩诺沙星-D5 | | 6.7 | 365.3 | 245.2 | 36 | 40 | - |
| 26 | 培氟沙星-D3 | | 6.0 | 337.2 | 293.1 | 27 | 125 | - |
| 27 | 二氟沙星-D3 | | 7.9 | 403.1 | 359.2 | 29 | 70 | - |
| 28 | 洛美沙星-D5 | | 6.4 | 357.2 | 270.1 | 34 | 134 | - |
| 29 | 磺胺二甲嘧啶-D4 | | 7.0 | 283.0 | 186.1 | 26 | 150 | - |
| 30 | 磺胺甲噁唑-13C6 | | 9.4 | 260.1 | 162.0 | 25 | 30 | - |
| 31 | 磺胺嘧啶-D4 | | 5.4 | 255.0 | 160.0 | 23 | 30 | - |
| 32 | 13C3-甲氧苄啶 | | 5.7 | 294.1 | 231.0 | 28 | 130 | - |
| 33 | 磺胺喹噁啉-D4 | | 11.2 | 305.1 | 160.1 | 21 | 80 | - |
| 34 | 磺胺氯哒嗪-D4 | | 8.7 | 288.9 | 160.1 | 20 | 60 | - |
| 35 | 磺胺林-13C6 | | 8.4 | 287.0 | 162.1 | 23 | 50 | - |
| 36 | 头孢噻呋-D3 | | 10.4 | 527.1 | 244.0 | 24 | 110 | - |
| 37 | 林可霉素-D3 | | 4.8 | 410.2 | 129.1 | 35 | 127 | - |

1. \*定量离子。

**8.3校准**

**8.3.1标准曲线绘制**

按推荐分析条件，依次测定标准系列溶液。以定量离子峰面积和内标峰面积比为纵坐标，以待测组分的质量浓度为横坐标，绘制校准曲线。各化合物的LC-MS/MS多反应监测离子提取图见附录3。



**图2-1 19种目标物提取离子流图**

1. 1：林可霉素；2：头孢克洛；3：磺胺嘧啶；4：甲氧苄啶；5：培氟沙星；6：土霉素；7：洛美沙星；8：四环素；9：恩诺沙星；10：磺胺二甲嘧啶；11：二氟沙星；12：阿奇霉素；13：磺胺林；14：磺胺氯哒嗪；15：强力霉素；16：磺胺甲噁唑；17：磺胺喹噁啉；18：克拉霉素；19：罗红霉素。

**8.4样本测定**

**8.4.1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，可判定为样品中存在相应的目标分析物。

表2-3 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 |

**8.4.2定量分析**

尿液样本中目标分析物的浓度按式（1）计算：

式中：

ρ—尿液样品中目标分析物的质量浓度，单位为微克/升（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—进样液中内标的理论浓度，单位为纳克/毫升（ng/mL）；

a—校准曲线的斜率；

b—校准曲线的截距；

n—尿液前处理浓缩倍数。

。

测量结果的表述应同时考虑计量器具的精密度、准确度和读数误差。对检定合格的计量器具，有效数字位数可以记录到最小分度值，最多保留一位不确定数字。测量结果一般保留三位有效数字，但当测量结果接近方法检出限时，测量结果表述与检出限小数点后位数保持一致。

**8.5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。

**9.方法特性**

**9.1方法检出限与定量限**

19种目标物的方法检出限范围是0.03 μg/L ~0.20 μg/L，方法定量限为0.10 μg/L ~ 0.80 μg/L。各化合物的检出限和定量限具体数据见表2-4。

表2-4 19种目标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） |
| --- | --- | --- |
| 阿奇霉素 | 0.03 | 0.10 |
| 克拉霉素 | 0.03 | 0.10 |
| 罗红霉素 | 0.03 | 0.10 |
| 四环素 | 0.03 | 0.10 |
| 强力霉素 | 0.08 | 0.30 |
| 土霉素 | 0.04 | 0.10 |
| 恩诺沙星 | 0.07 | 0.30 |
| 培氟沙星 | 0.06 | 0.20 |
| 二氟沙星 | 0.04 | 0.10 |
| 洛美沙星 | 0.10 | 0.40 |
| 磺胺二甲嘧啶 | 0.10 | 0.40 |
| 磺胺甲噁唑 | 0.10 | 0.40 |
| 磺胺嘧啶 | 0.06 | 0.20 |
| 甲氧苄啶 | 0.10 | 0.30 |
| 磺胺喹噁啉 | 0.05 | 0.20 |
| 磺胺氯哒嗪 | 0.10 | 0.40 |
| 磺胺林 | 0.10 | 0.40 |
| 头孢克洛 | 0.20 | 0.80 |
| 林可霉素 | 0.05 | 0.20 |

**9.2精密度与回收率**

19种目标物的加标回收率在80.0%~120%之间，日内精密度小于15.4%，日间精密度小于16.2%。

**10.质量保证和控制**

10.1　实验室应经常考察标准曲线校正结果、精密度和回收率，以确定分析系统处于正常状态。

10.2　每批试验应至少包含1个质控样品，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）。

10.3　可使用标准参考物质、质控样品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；质控样品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。

10.4　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，可根据空白样品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。

10.5　平行样测定结果的相对偏差应小于20%。

10.6　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，目标物相关系数＞0.995。用校准曲线反推各标准点浓度，定量限测量值应在校准点浓度的±30%以内，其余各浓度点应在±20%以内。

**11.注意事项**

11.1　乙酸铵溶液不宜一次性配制过多，建议根据实验需要现用现配。

11.2　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5日内完成测定。

11.3　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。

11.4　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。

11.5　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. 主要试验（或验证）的分析，综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

（一）简要综述情况

抗生素因在治疗与预防感染性疾病和促进生长发育方面效果显著，被广泛应用于临床治疗、农业生产和养殖业等领域中。抗生素通过临床用药、食物摄入或环境暴露等途径进入人体后，主要经尿液排出体外。近年来，其造成的人体健康问题受到普遍关注。已有人群流行病学研究显示，抗生素暴露与多种健康风险密切相关，如耐药性、肠道菌群失调、肥胖/超重。因此，建立生物样本中多种类抗生素的分析方法，了解其人群负荷水平，科学管理抗生素的使用，在降低生态环境和人群健康风险等方面具有重要价值。

目前，在食品、地表水、土壤、底泥等非生物样本中抗生素的分析方法研究较多，在人体生物样本中的研究相对较少。生物样本基质复杂，且抗生素负荷水平多为痕量水平，因此高效的前处理方法和高灵敏度的检测技术成为同时检测多种目标物的关键。已有报道的尿液中抗生素的前处理方法主要包括固相萃取（SPE）、液液萃取（liquid liquid extraction，LLE）、蛋白沉淀（protein precipitation，PPT）、固相分散萃取（solid phase disperse extraction，DPSE）和固相微萃取（solid phase micro extraction，SPME）等，其中SPE是目前最常用的前处理方法。检测技术主要包括微生物分析、免疫分析、高效液相色谱法（HPLC）和液相色谱-串联质谱法（LC-MS/MS）等，其中LC-MS/MS因具有灵敏度高、特异性强、分析速度快等优点，在当前检测中应用广泛。但是，已有研究多关注一种或一类目标物，同时检测尿液中多种抗生素的分析方法鲜有报道。鉴于此，本研究建立了基于高通量全自动固相萃取的尿液中19种常见抗生素（大环内酯类、四环素类、喹诺酮类、磺胺类）的高效液相色谱-串联质谱（UPLC-MS/MS）检测方法。该方法操作简便、分析效率高、灵敏度高、重现性好，适合大批量人群样品的快速定量检测，具有较高的实际应用价值。

（二）主要试验的分析

1.方法适用范围的确定

方法适用范围根据目前已经在国外开展的相关项目，结合文献调研确定。抗生素主要经环境暴露和食物/药品摄入进入体内， 并可在人体中持续蓄积。经口摄入是抗生素最主要的暴露途径， 且以动物源性食品的摄入为主。 目前， 在人体和动物中常用的抗生素超过 100 种， 已有 80种抗生素及其代谢物在食品和饮用水中检出， 其很有可能已经经过食物链进入人体。此外，人体也会经皮肤接触以及呼吸接触等方式暴露于抗生素。 对于病人而言， 摄入途径一般通过服用抗生素。据报道， 30%~90%的抗生素不能被人体和动物体吸收， 其会随着尿液和粪便排出体外。 有研究发现，人体尿液中抗生素浓度是血液中的数十至数百倍。 因此，在人体内暴露研究中， 除少部分研究采用血浆、 血清、 脑脊液、器官组织等生物样本外， 大多数研究均采用尿液基质。此外，尿液作为非损伤性生物样本采集方式， 具有采样成本低、 采样对象依从性高等特点， 尤其适用于一些以婴儿或未成年人为目标人群的研究，有助于增加样本量和提高应答率，因此本研究采用尿液为研究基体。

2.方法优化

**2.1 流动相选择**

采用 HSS T3 色谱柱， 比较了水-甲醇、水-乙腈、0.1%（ v/v） 甲酸水溶液-0.1%（ v/v） 甲酸甲醇溶液和 0.1%（ v/v） 甲酸水溶液-0.1%（ v/v） 甲酸乙腈溶液不同流动相条件下， 各目标物出峰情况。 结果显示，水-甲醇和水-乙腈作为流动相时，大部分目标物响应低， 且多呈拖尾峰， 以喹诺酮类物质为主。 可能是因为在中性条件下，目标物多呈离子状态， 与色谱柱固定相间存在强吸附作用，使得目标物难以洗脱。 为使流动相 pH 处于稳定状态， 在水相和有机相中同时加入 0.1%甲酸溶液。发现在 0.1%（v/v） 甲酸水溶液-0.1%（v/v） 甲酸甲醇溶液和 0.1%（v/v） 甲酸水溶液-0.1%（v/v） 甲酸乙腈溶液两种流动相体系下， 各目标物峰形较好， 响应提高。主要是因为加酸后，能够抑制目标物水解，提高目标物响应， 改善拖尾现象；同时在正离子模式下， 由于常检测的母离子为[M+H]+离子， 加酸可向目标物提供 H+，从而提高其离子化效率。 考虑到甲醇粘性大于乙腈， 采用液相色谱进行分离时， 柱压偏高， 在大样本检测时容易出现超压现象， 最终选择乙腈作为有机相。

**2.1水解酶的选择及酶解时间的确定**

轭合反应是在酶的催化下将动物体内源性的极小分子（ 如葡萄糖醛酸、 硫酸、 氨基酸、 谷胱甘肽等） 结合到药物分子或药物代谢产物中的反应， 抗生素在尿液中主要以结合态的形式存在。利用 β-葡萄糖醛酸酶 可将尿液中结合态目标物进行酶解， 使目标物转变成游离态进行测定。 因此，酶解是尿液中抗生素常见的前处理方法。 本研究取 1 mL 高浓度真实尿样分别加入内标、 缓冲液及20μL 酶充分混匀后，置于 37℃ 水浴摇床酶解。 每时间点设置 4 个平行样本， 分别于酶解 0、 4、 8、 12、 16 和 20 h 进行前处理及仪器分析， 比较不同酶解时间对目标物检测浓度的影响。 结果显示， 此尿液中共检出 6 种抗生素， 分别为阿奇霉素（120.0~137.0 ng/mL）、 克拉霉素（0.6~1.0 ng/mL）、 罗红霉素（3453.9~3710.6 ng/mL）、 四环素（222.7~282.6 ng/mL） 和土霉素（697.3~942.6 ng/mL）。5种物质在酶解 12 h 时， 检出浓度最高；随酶解时间的增加， 浓度出现下降趋势。 因此， 为使目标物充分释放且减少酶解过程中的降解， 本研究选择12 h为最佳酶解时间。

**2.2固相萃取优化**

根据目标物的极性、 pKa、 相对分子质量， 研究比较了 Prime MCX、 Sep-Pak C18、Prime HLB 3 种 96 孔固相萃取板对尿液中目标物的萃取效果（ n=3）。 MCX 萃取板采用混合型阳离子交换反相吸附剂， 对碱性化合物具有高选择性， 因此需在使用前将样品进行酸化以促进离子交换； C18 固相萃取板以十八烷基硅胶为填料， 通过强疏水作用保留非极性或中等极性化合物； HLB 萃取板采用新型亲水亲脂共平衡的聚合物反相填料，对多种化合物均具有较好萃取效果。 采用真实尿液加标， 经甲醇和水分别平衡和活化，SPE富集， 再用甲醇洗脱， 比较各 SPE 固相萃取板对目标物的富集效。 MCX 萃取板对磺胺类抗生素的萃取效果较为理想， 这可能是由于磺胺类抗生素结构中含有多个胺基基团， 在酸性条件下容易形成正离子， 利用阳离子交换柱进行净化和富集是较为理想的方法。 C18 固相萃取板除四环素类和喹诺酮类外， 对其他物质均有保留。 Prime HLB 板应用范围广， 适用于极性、 非极性和弱极性多种化合物， 对于本研究 19种目标物均有较好的净化富集效果。 另外， 对采用 PrimeHLB 板时目标物的绝对回收率进行评估，所有目标物绝对回收率范围为45.5%~90.9%， 满足分析的要求（n=3）。 因此， 最终选择 Prime HLB 96 孔萃取板提取样品。

**2.3固相萃取洗脱条件的优化**

本研究比较了甲醇、 乙腈、 丙酮、 乙酸乙酯、 二氯甲烷等不同有机溶剂对目标物洗脱效果的影响。 由于丙酮、 乙酸乙酯和二氯甲烷不能直接进样， 需采用甲醇溶液进行置换。 将洗脱液氮吹至 500 μL 后， 加入 2 mL 甲醇溶液， 氮吹至 200 μL， 再加入200 μL 水氮吹至200 μL。 结果显示， 采用二氯甲烷洗脱时， 对多数磺胺类洗脱效果较好， 但其他物质未被洗脱。 采用乙酸乙酯洗脱时， 可对大环内酯类、 四环素类、 磺胺类进行洗脱， 但在相同洗脱体积条件下（ 2 mL）， 乙酸乙酯洗脱效果较甲醇、 乙腈和丙酮差。 喹诺酮类极性较强， 乙酸乙酯未能洗脱。 采用甲醇、 乙腈或丙酮时， 可洗脱所有目标物， 且对于多数目标物， 甲醇洗脱的回收率明显高于乙腈和丙酮， 如阿奇霉素经甲醇、 乙腈和丙酮洗脱的回收率分别为 98.2%、 95.6%和 90.6%， 强力霉素经甲醇、 乙腈和丙酮洗脱的回收率分别为 102.1%、 93.35%和 89.9%。 因此， 选择甲醇溶液作为洗脱液。在此基础上， 进一步考察了洗脱液的使用量（ 0.5~3.0 mL） 对洗脱效果的影响。结果表明， 当洗脱液的使用量达到 2.0 mL 后， 各目标物的绝对回收率无明显提高，说明 2.0 mL 甲醇能够满足目标物的洗脱需求，为节约溶剂，减少氮吹时间，本研究确定 2.0 mL 甲醇作为洗脱液。

3.检出限和定量限确定

采用美国EPA公布的检出限定量限计算方法。由于其在尿液中浓度水平较低，因此采用实际尿液基质加标形式（n=7），以3 SD和10 SD计算检出限和定量限。表3-1列出了项目研制单位（环境所）通过上述方法得到的检出限和定量限。

方法研制单位和3家验证单位采用相同方法获得了19种目标分析物的检出限和定量限，以最高检出限和定量限值作为本方法的检出限和定量限。因此，19物质的方法检出限范围是0.02 ng/mL~0.13 ng/mL，定量限为0.07 ng/mL~0.45 ng/mL，具体数据见本编制说明验证数据分析部分。

表3-1 方法检出限及定量限（ng/mL）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组分 | 测定值 | | | | | | | 平均值 | 标准  偏差 | 检出限 | 定量限 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 阿奇霉素 | 0.086 | 0.073 | 0.069 | 0.092 | 0.078 | 0.082 | 0.095 | 0.082 | 0.010 | 0.03 | 0.10 |
| 克拉霉素 | 0.071 | 0.062 | 0.069 | 0.07 | 0.075 | 0.072 | 0.088 | 0.072 | 0.008 | 0.02 | 0.08 |
| 罗红霉素 | 0.078 | 0.069 | 0.086 | 0.083 | 0.077 | 0.081 | 0.1 | 0.082 | 0.010 | 0.03 | 0.10 |
| 四环素 | 0.069 | 0.068 | 0.072 | 0.081 | 0.066 | 0.084 | 0.084 | 0.075 | 0.008 | 0.02 | 0.08 |
| 强力霉素 | 0.252 | 0.294 | 0.31 | 0.292 | 0.25 | 0.294 | 0.316 | 0.287 | 0.026 | 0.08 | 0.26 |
| 土霉素 | 0.053 | 0.037 | 0.052 | 0.051 | 0.059 | 0.052 | 0.055 | 0.051 | 0.007 | 0.02 | 0.07 |
| 恩诺沙星 | 0.179 | 0.147 | 0.176 | 0.151 | 0.184 | 0.186 | 0.222 | 0.178 | 0.025 | 0.07 | 0.25 |
| 培氟沙星 | 0.098 | 0.081 | 0.081 | 0.103 | 0.087 | 0.09 | 0.105 | 0.092 | 0.010 | 0.03 | 0.10 |
| 二氟沙星 | 0.099 | 0.089 | 0.097 | 0.095 | 0.09 | 0.088 | 0.124 | 0.097 | 0.012 | 0.04 | 0.12 |
| 洛美沙星 | 0.248 | 0.268 | 0.242 | 0.256 | 0.236 | 0.22 | 0.294 | 0.252 | 0.024 | 0.07 | 0.24 |
| 磺胺二甲嘧啶 | 0.092 | 0.091 | 0.088 | 0.091 | 0.093 | 0.095 | 0.106 | 0.094 | 0.006 | 0.02 | 0.06 |
| 磺胺甲噁唑 | 0.244 | 0.228 | 0.284 | 0.26 | 0.242 | 0.252 | 0.36 | 0.267 | 0.045 | 0.13 | 0.45 |
| 磺胺嘧啶 | 0.089 | 0.076 | 0.087 | 0.082 | 0.073 | 0.101 | 0.09 | 0.085 | 0.009 | 0.03 | 0.09 |
| 甲氧苄啶 | 0.103 | 0.108 | 0.093 | 0.104 | 0.114 | 0.116 | 0.124 | 0.109 | 0.010 | 0.03 | 0.10 |
| 磺胺喹噁啉 | 0.18 | 0.19 | 0.19 | 0.18 | 0.19 | 0.2 | 0.2 | 0.190 | 0.007 | 0.02 | 0.07 |
| 磺胺氯哒嗪 | 0.388 | 0.408 | 0.366 | 0.358 | 0.436 | 0.39 | 0.33 | 0.382 | 0.035 | 0.10 | 0.35 |
| 磺胺林 | 0.206 | 0.191 | 0.193 | 0.212 | 0.206 | 0.192 | 0.197 | 0.200 | 0.008 | 0.03 | 0.08 |
| 头孢克洛 | 0.161 | 0.181 | 0.158 | 0.159 | 0.178 | 0.151 | 0.166 | 0.165 | 0.011 | 0.03 | 0.11 |
| 林可霉素 | 0.117 | 0.14 | 0.134 | 0.138 | 0.121 | 0.17 | 0.153 | 0.139 | 0.018 | 0.05 | 0.18 |

4.回收率与精密度

本方法对样品进行低浓度（尿中0.5ng/mL）和高浓度（尿中2 ng/mL）2个浓度水平的加标回收试验。加标回收率计算方法如下：选择来源于6个不同个体的实际尿液样品，混合上述尿液样品，并对上述尿液进行定值。

在同一批次中处理12个样品（低浓度、高浓度样品各6个），获得19种目标分析物的批内精密度，相应结果见表3-2。

表3-2 批内精密度试验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组分名称 | 本底浓度(ng/mL) | 加标浓度(ng/mL) | 测定值(ng/mL) | | | | | | RSD（%） |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 阿奇霉素 | <LOD | 0.5 | 0.54 | 0.48 | 0.56 | 0.56 | 0.60 | 0.49 | 8.0 |
| 2 | 1.96 | 1.89 | 2.12 | 2.15 | 2.11 | 2.20 | 5.7 |
| 克拉霉素 | <LOD | 0.5 | 0.45 | 0.43 | 0.45 | 0.42 | 0.49 | 0.49 | 6.3 |
| 2 | 1.82 | 1.92 | 1.75 | 1.71 | 1.79 | 1.77 | 4.1 |
| 罗红霉素 | <LOD | 0.5 | 0.54 | 0.59 | 0.55 | 0.45 | 0.51 | 0.49 | 9.4 |
| 2 | 2.24 | 2.37 | 2.09 | 2.18 | 2.33 | 2.20 | 4.5 |
| 四环素 | <LOD | 0.5 | 0.45 | 0.48 | 0.42 | 0.43 | 0.48 | 0.53 | 8.8 |
| 2 | 1.75 | 1.95 | 1.87 | 1.76 | 1.90 | 1.88 | 4.2 |
| 强力霉素 | <LOD | 0.5 | 0.55 | 0.60 | 0.53 | 0.57 | 0.54 | 0.55 | 6.8 |
| 2 | 2.21 | 2.15 | 2.25 | 2.36 | 2.31 | 2.13 | 4.0 |
| 土霉素 | <LOD | 0.5 | 0.47 | 0.45 | 0.41 | 0.43 | 0.47 | 0.46 | 5.2 |
| 2 | 1.98 | 1.89 | 1.96 | 2.13 | 1.84 | 2.17 | 6.5 |
| 恩诺沙星 | <LOD | 0.5 | 0.52 | 0.57 | 0.56 | 0.52 | 0.57 | 0.59 | 5.5 |
| 2 | 2.29 | 2.38 | 2.15 | 2.27 | 2.35 | 2.39 | 3.9 |
| 培氟沙星 | <LOD | 0.5 | 0.57 | 0.53 | 0.48 | 0.58 | 0.46 | 0.49 | 9.7 |
| 2 | 2.16 | 2.25 | 2.06 | 2.13 | 1.95 | 2.14 | 4.7 |
| 二氟沙星 | <LOD | 0.5 | 0.53 | 0.59 | 0.56 | 0.54 | 0.57 | 0.52 | 4.7 |
| 2 | 2.21 | 2.07 | 2.15 | 1.93 | 1.86 | 1.79 | 8.5 |
| 洛美沙星 | <LOD | 0.5 | 0.55 | 0.56 | 0.51 | 0.45 | 0.59 | 0.42 | 12.5 |
| 2 | 1.89 | 1.95 | 2.12 | 1.84 | 2.26 | 1.94 | 7.9 |
| 磺胺二甲嘧啶 | <LOD | 0.5 | 0.42 | 0.48 | 0.49 | 0.43 | 0.45 | 0.49 | 6.6 |
| 2 | 1.86 | 1.98 | 2.15 | 1.85 | 1.94 | 1.92 | 5.7 |
| 磺胺甲噁唑 | <LOD | 0.5 | 0.54 | 0.59 | 0.41 | 0.48 | 0.56 | 0.54 | 12.4 |
| 2 | 1.87 | 1.76 | 1.92 | 1.85 | 1.73 | 1.79 | 4.0 |
| 磺胺嘧啶 | <LOD | 0.5 | 0.41 | 0.45 | 0.48 | 0.57 | 0.60 | 0.43 | 15.4 |
| 2 | 1.88 | 1.96 | 1.86 | 2.16 | 1.82 | 1.95 | 6.2 |
| 甲氧苄啶 | <LOD | 0.5 | 0.54 | 0.58 | 0.56 | 0.51 | 0.57 | 0.60 | 5.5 |
| 2 | 2.15 | 2.06 | 2.18 | 2.03 | 2.09 | 2.22 | 3.5 |
| 磺胺喹噁啉 | <LOD | 0.5 | 0.54 | 0.52 | 0.55 | 0.47 | 0.55 | 0.43 | 9.8 |
| 2 | 1.94 | 2.13 | 1.92 | 2.08 | 1.86 | 1.82 | 6.3 |
| 磺胺氯哒嗪 | <LOD | 0.5 | 0.41 | 0.48 | 0.47 | 0.44 | 0.56 | 0.53 | 11.8 |
| 2 | 1.65 | 1.88 | 2.08 | 2.15 | 1.94 | 2.07 | 9.2 |
| 磺胺林 | <LOD | 0.5 | 0.48 | 0.42 | 0.52 | 0.42 | 0.47 | 0.46 | 8.6 |
| 2 | 2.10 | 2.21 | 2.24 | 2.34 | 2.07 | 1.93 | 6.7 |
| 头孢克洛 | <LOD | 0.5 | 0.46 | 0.59 | 0.52 | 0.57 | 0.55 | 0.46 | 10.4 |
| 2 | 1.95 | 2.19 | 1.85 | 1.94 | 2.12 | 1.91 | 6.6 |
| 林可霉素 | <LOD | 0.5 | 0.47 | 0.50 | 0.53 | 0.45 | 0.55 | 0.53 | 7.4 |
| 2 | 2.12 | 1.86 | 1.97 | 1.95 | 1.87 | 1.79 | 5.9 |

在一周内，分6批次处理12个样品（低浓度，高浓度样品各6个），获得19种目标分析物的批间精密度，相应结果见表3-3。

表3-3 批间精密度试验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组分名称 | 本底浓度(ng/mL) | 加标浓度(ng/mL) | 测定值(ng/mL) | | | | | | RSD（%） |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 阿奇霉素 | <LOD | 0.5 | 0.599 | 0.63 | 0.559 | 0.525 | 0.536 | 0.54 | 7.3 |
| 2 | 2.142 | 2.262 | 2.216 | 1.701 | 1.748 | 2.009 | 11.9 |
| 克拉霉素 | <LOD | 0.5 | 0.541 | 0.537 | 0.622 | 0.518 | 0.531 | 0.509 | 7.5 |
| 2 | 2.019 | 1.931 | 1.921 | 1.805 | 1.873 | 2.057 | 4.8 |
| 罗红霉素 | <LOD | 0.5 | 0.507 | 0.47 | 0.483 | 0.508 | 0.474 | 0.474 | 3.5 |
| 2 | 2.308 | 2.396 | 2.31 | 1.652 | 1.753 | 1.834 | 16.2 |
| 四环素 | <LOD | 0.5 | 0.42 | 0.46 | 0.45 | 0.46 | 0.56 | 0.58 | 13.4 |
| 2 | 1.75 | 1.87 | 1.72 | 2.14 | 2.08 | 2.25 | 11.1 |
| 强力霉素 | <LOD | 0.5 | 0.5 | 0.503 | 0.534 | 0.551 | 0.571 | 0.486 | 6.3 |
| 2 | 2.18 | 2.21 | 2.26 | 1.85 | 1.96 | 2.1 | 7.6 |
| 土霉素 | <LOD | 0.5 | 0.431 | 0.424 | 0.404 | 0.439 | 0.493 | 0.47 | 7.3 |
| 2 | 2.12 | 1.95 | 1.84 | 2.24 | 1.76 | 2.22 | 10.0 |
| 恩诺沙星 | <LOD | 0.5 | 0.55 | 0.58 | 0.46 | 0.42 | 0.44 | 0.47 | 13.1 |
| 2 | 2.17 | 2.31 | 1.94 | 1.87 | 1.79 | 1.89 | 10.1 |
| 培氟沙星 | <LOD | 0.5 | 0.47 | 0.55 | 0.45 | 0.58 | 0.42 | 0.47 | 12.6 |
| 2 | 2.17 | 2.28 | 1.94 | 1.86 | 2.04 | 2.17 | 7.6 |
| 二氟沙星 | <LOD | 0.5 | 0.55 | 0.57 | 0.45 | 0.56 | 0.51 | 0.59 | 9.4 |
| 2 | 2.14 | 2.16 | 1.95 | 2.04 | 2.23 | 2.06 | 4.8 |
| 洛美沙星 | <LOD | 0.5 | 0.45 | 0.47 | 0.454 | 0.488 | 0.492 | 0.454 | 3.9 |
| 2 | 1.75 | 1.86 | 2.14 | 1.95 | 2.16 | 1.88 | 8.3 |
| 磺胺二甲嘧啶 | <LOD | 0.5 | 0.597 | 0.557 | 0.576 | 0.533 | 0.554 | 0.565 | 3.8 |
| 2 | 1.76 | 1.73 | 1.86 | 1.8 | 1.77 | 1.95 | 4.5 |
| 磺胺甲噁唑 | <LOD | 0.5 | 0.523 | 0.502 | 0.564 | 0.576 | 0.53 | 0.594 | 6.4 |
| 2 | 1.75 | 2.15 | 1.94 | 2.07 | 2.16 | 1.85 | 8.4 |
| 磺胺嘧啶 | <LOD | 0.5 | 0.48 | 0.54 | 0.58 | 0.47 | 0.42 | 0.56 | 12.1 |
| 2 | 2.24 | 1.96 | 1.82 | 2.23 | 2.14 | 2.21 | 8.2 |
| 甲氧苄啶 | <LOD | 0.5 | 0.54 | 0.47 | 0.57 | 0.55 | 0.59 | 0.56 | 7.6 |
| 2 | 1.86 | 1.75 | 1.94 | 2.14 | 2.27 | 2.08 | 9.6 |
| 磺胺喹噁啉 | <LOD | 0.5 | 0.517 | 0.474 | 0.475 | 0.489 | 0.474 | 0.472 | 3.6 |
| 2 | 1.85 | 1.93 | 2.08 | 2.17 | 2.24 | 2.21 | 7.6 |
| 磺胺氯哒嗪 | <LOD | 0.5 | 0.496 | 0.467 | 0.543 | 0.501 | 0.54 | 0.587 | 8.2 |
| 2 | 1.72 | 1.84 | 2.15 | 2.24 | 1.87 | 2.24 | 11.3 |
| 磺胺林 | <LOD | 0.5 | 0.42 | 0.47 | 0.55 | 0.53 | 0.45 | 0.4 | 12.7 |
| 2 | 2.17 | 2.27 | 2.04 | 2.13 | 1.86 | 1.94 | 7.3 |
| 头孢克洛 | <LOD | 0.5 | 0.438 | 0.404 | 0.445 | 0.457 | 0.437 | 0.469 | 5.0 |
| 2 | 1.86 | 2.08 | 2.36 | 1.84 | 1.9 | 2.24 | 10.6 |
| 林可霉素 | <LOD | 0.5 | 0.489 | 0.511 | 0.475 | 0.478 | 0.501 | 0.506 | 3.0 |
| 2 | 2.24 | 1.85 | 1.88 | 2.14 | 1.87 | 1.74 | 9.9 |

取12个尿液样本，分别进行低、高2个浓度水平的加标回收试验。加标回收率按公式（2）计算，19种物质加标回收率结果如表3-4所示。

表3-4 加标回收试验结果

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组分名称 | 本底浓度(ng/mL) | 加标浓度(ng/mL) | 回收率% | | | | | | 不同加标浓度回收率范围（%） | 不同组分回收率范围（%） |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 阿奇霉素 | <LOD | 0.5 | 108.4 | 96.6 | 111.2 | 112.4 | 119.0 | 98.6 | 96.6-119.0 | 94.7-119.0 |
| 2 | 98.2 | 94.7 | 106.1 | 107.7 | 105.4 | 110.1 | 94.7-110.1 |
| 克拉霉素 | <LOD | 0.5 | 90.6 | 85.2 | 89.8 | 84.6 | 97.2 | 98.2 | 84.6-98.2 | 84.6-98.2 |
| 2 | 91.1 | 96.2 | 87.6 | 85.3 | 89.7 | 88.7 | 85.3-96.2 |
| 罗红霉素 | <LOD | 0.5 | 107.2 | 118.6 | 110.4 | 90.0 | 102.6 | 98.8 | 90-118.6 | 90-118.6 |
| 2 | 112.2 | 118.4 | 104.6 | 109.2 | 116.3 | 109.8 | 104.6-118.3 |
| 四环素 | <LOD | 0.5 | 90.4 | 95.6 | 83.0 | 85.4 | 96.6 | 105.2 | 83-105.2 | 83-105.2 |
| 2 | 87.6 | 97.5 | 93.5 | 88.2 | 94.9 | 94.2 | 87.6-97.5 |
| 强力霉素 | <LOD | 0.5 | 110.2 | 120 | 105.0 | 114.6 | 107.2 | 110.8 | 105-120 | 105-120 |
| 2 | 110.6 | 107.5 | 112.7 | 117.9 | 115.7 | 106.7 | 106.7-117.9 |
| 土霉素 | <LOD | 0.5 | 94.4 | 90.6 | 82.4 | 86.8 | 94.4 | 92.0 | 82.4-94.4 | 82.4-108.7 |
| 2 | 98.9 | 94.7 | 98.1 | 106.3 | 92.2 | 108.7 | 92.2-108.7 |
| 恩诺沙星 | <LOD | 0.5 | 104.4 | 114.0 | 112.8 | 103.0 | 113.2 | 118.8 | 103-118.8 | 103-119.5 |
| 2 | 114.6 | 119.2 | 107.7 | 113.3 | 117.5 | 119.5 | 107.6-119.5 |
| 培氟沙星 | <LOD | 0.5 | 113.0 | 105.2 | 96.4 | 116.8 | 91.0 | 98.6 | 91.0-116.8 | 91.0-116.8 |
| 2 | 108.2 | 112.3 | 103.0 | 106.3 | 97.7 | 107.2 | 97.7-112.2 |
| 二氟沙星 | <LOD | 0.5 | 105.4 | 117.0 | 111.4 | 108.6 | 113.0 | 103.0 | 103-117 | 89.6-117 |
| 2 | 110.7 | 103.3 | 107.7 | 96.3 | 92.8 | 89.6 | 89.6-110.7 |
| 洛美沙星 | <LOD | 0.5 | 110.6 | 112.4 | 102.8 | 90.6 | 117.0 | 84.6 | 84.6-117 | 84.6-117 |
| 2 | 94.6 | 97.7 | 106.2 | 92.1 | 113.0 | 97.1 | 92.1-113 |
| 磺胺二甲嘧啶 | <LOD | 0.5 | 84.8 | 95.0 | 98.8 | 85.2 | 90.6 | 97.2 | 84.8-98.8 | 84.8-107.7 |
| 2 | 93.2 | 99.1 | 107.7 | 92.3 | 97.2 | 96.2 | 92.3-107.7 |
| 磺胺甲噁唑 | <LOD | 0.5 | 108.4 | 118.8 | 82.0 | 96.8 | 111.2 | 107.2 | 82-118.8 | 82-118.8 |
| 2 | 93.6 | 88.0 | 95.9 | 92.3 | 86.3 | 89.7 | 86.3-95.9 |
| 磺胺嘧啶 | <LOD | 0.5 | 82.0 | 90.2 | 95.4 | 113.2 | 119.0 | 86.4 | 82-119 | 82-119 |
| 2 | 94.0 | 97.9 | 93.2 | 108.1 | 91.1 | 97.3 | 91.7-108.1 |
| 甲氧苄啶 | <LOD | 0.5 | 107.4 | 116.8 | 112.2 | 102.6 | 114.6 | 119.2 | 102.6-119.2 | 101.3-119.2 |
| 2 | 107.3 | 103.0 | 109.2 | 101.3 | 104.4 | 111.0 | 101.3-111 |
| 磺胺喹噁啉 | <LOD | 0.5 | 107.0 | 103.0 | 110.8 | 94.4 | 109.0 | 85.2 | 85.2-110.8 | 85.2-110.8 |
| 2 | 97.1 | 106.7 | 96.1 | 104.2 | 93.1 | 91.2 | 91.2-106.7 |
| 磺胺氯哒嗪 | <LOD | 0.5 | 82.4 | 96.2 | 94.6 | 87.0 | 112.4 | 106.4 | 82.4-112.4 | 82.4-112.4 |
| 2 | 82.6 | 94.1 | 104.2 | 107.3 | 97.1 | 103.3 | 82.6-107.3 |
| 磺胺林 | <LOD | 0.5 | 96.2 | 84.2 | 104.6 | 83.2 | 94.4 | 92.8 | 83.2-104.6 | 83.2-117 |
| 2 | 105.0 | 110.5 | 112.2 | 117.0 | 103.7 | 96.7 | 96.7-117 |
| 头孢克洛 | <LOD | 0.5 | 92.8 | 117.8 | 104.4 | 114.8 | 110.8 | 92.2 | 92.2-117.8 | 92.2-117.8 |
| 2 | 97.7 | 109.5 | 92.5 | 97.2 | 106.1 | 95.6 | 92.5-109.5 |
| 林可霉素 | <LOD | 0.5 | 94.8 | 99.2 | 106.4 | 90.8 | 110.0 | 106.0 | 90.8-110 | 89.7-110 |
| 2 | 106.1 | 93.2 | 98.7 | 97.7 | 93.6 | 89.7 | 89.7-106.1 |

5.样品稳定性

**5.1 样品稳定性**

采用内部质控样品对样品稳定性进行评估， 将质控样混合均匀后进行分装， 放置于-40℃ 冷冻保存。 分别于分装后 0、 2、 4、 6、 8、 10 周各测定一次， 以回收率和 RSD进行评价。四环素、头孢克洛稳定性差， 约 2 周后开始降解， 第10 周时回收率为初始回收率的 47.0%~71.1%， 磺胺林约 4 周后开始降解， 第 10 周时回收率为初始回收率的 60.6%； 其他物质10 周内状态稳定， 回收率 RSD 为 3.2%~10.5%， 可至少保持 10 周。 结果见表3－5。为提高检测准确度， 减少目标物的降解， 应避免长时间放置样品。

表3-5 样品稳定性结果

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 化合物 | 测定值（ng/mL） | | | | | |
| 初始浓度 | 2周 | 4周 | 6周 | 8周 | 10周 |
| 阿奇霉素 | 2.43 | 2.33 | 2.44 | 2.21 | 1.93 | 2.10 |
| 克拉霉素 | 2.20 | 2.34 | 2.43 | 2.16 | 2.10 | 2.08 |
| 罗红霉素 | 2.41 | 2.46 | 2.52 | 2.34 | 1.96 | 2.09 |
| 四环素 | 2.29 | 2.25 | 1.93 | 1.63 | 1.46 | 1.63 |
| 强力霉素 | 1.98 | 2.08 | 2.02 | 1.91 | 1.66 | 1.75 |
| 土霉素 | 1.98 | 1.91 | 1.80 | 1.82 | 1.73 | 1.98 |
| 恩诺沙星 | 1.95 | 1.89 | 1.86 | 1.94 | 1.66 | 1.67 |
| 培氟沙星 | 1.78 | 1.81 | 1.88 | 1.70 | 1.66 | 1.79 |
| 二氟沙星 | 1.86 | 2.64 | 3.00 | 2.32 | 3.24 | 3.49 |
| 洛美沙星 | 2.02 | 2.00 | 2.04 | 2.13 | 1.83 | 1.96 |
| 磺胺二甲嘧啶 | 2.10 | 2.43 | 2.23 | 2.10 | 2.23 | 2.50 |
| 磺胺甲噁唑 | 2.22 | 2.61 | 2.68 | 2.39 | 2.52 | 2.69 |
| 磺胺嘧啶 | 2.69 | 2.86 | 2.70 | 2.50 | 2.60 | 2.88 |
| 甲氧苄啶 | 2.31 | 2.56 | 2.51 | 2.38 | 2.22 | 2.33 |
| 磺胺喹噁啉 | 2.15 | 2.14 | 2.21 | 2.25 | 1.88 | 1.98 |
| 磺胺氯哒嗪 | 2.20 | 2.42 | 2.36 | 2.02 | 1.96 | 2.10 |
| 磺胺林 | 2.05 | 2.08 | 2.04 | 2.13 | 1.32 | 1.24 |
| 头孢克洛 | 3.59 | 4.44 | 1.91 | 1.72 | 1.48 | 1.65 |
| 林可霉素 | 2.04 | 2.39 | 2.34 | 2.25 | 2.02 | 2.09 |

**5.3上样周期内的稳定性**

样品处理完毕后进行测定时，整个进样序列包含标准曲线，待测样品，空白，洗针等多种样品，可能会导致进样时间较长。因此，我们考查上样周期的稳定性。采用加标的实际尿液进行前处理， 将氮吹并离心后样品置于 10℃ 进样室中， 分别在上样周期的 0、 6、 12、 18、 24 和 30 h 重复进样， 考察目标物是否会在进样过程中降解， 以回收率 RSD 进行评价。 结果显示， 其回收率 RSD 为 1.1%~7.4%。 可见，在进样室温度为 10℃ 时， 30 h 的进样周期内目标物稳定，不易分解。结果见表3－6。

表3-6 24h上样周期下各物质的稳定性

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 化合物 | 测定值（ng/mL） | | | | | |
| 初始浓度 | 6小时 | 12小时 | 18小时 | 24小时 | 30小时 |
| 阿奇霉素 | 5.24 | 4.60 | 5.12 | 4.20 | 4.66 | 5.61 |
| 克拉霉素 | 6.26 | 5.86 | 5.90 | 6.06 | 5.72 | 6.01 |
| 罗红霉素 | 4.90 | 4.85 | 4.93 | 5.04 | 4.86 | 5.03 |
| 四环素 | 4.00 | 4.09 | 4.02 | 4.32 | 4.31 | 3.90 |
| 强力霉素 | 3.67 | 3.24 | 3.59 | 3.67 | 3.14 | 3.27 |
| 土霉素 | 2.54 | 2.70 | 2.70 | 2.94 | 2.83 | 2.78 |
| 恩诺沙星 | 3.50 | 3.63 | 3.61 | 3.42 | 3.49 | 3.49 |
| 培氟沙星 | 2.97 | 3.31 | 3.35 | 3.27 | 3.27 | 3.38 |
| 二氟沙星 | 9.56 | 9.56 | 9.75 | 9.51 | 9.68 | 9.75 |
| 洛美沙星 | 3.99 | 3.90 | 4.02 | 3.95 | 3.94 | 3.94 |
| 磺胺二甲嘧啶 | 6.07 | 5.92 | 6.16 | 6.08 | 5.75 | 5.89 |
| 磺胺甲噁唑 | 5.43 | 5.33 | 5.28 | 5.58 | 5.48 | 5.44 |
| 磺胺嘧啶 | 7.38 | 7.51 | 7.08 | 7.22 | 7.61 | 7.09 |
| 甲氧苄啶 | 4.75 | 5.09 | 5.16 | 5.07 | 4.66 | 5.39 |
| 磺胺喹噁啉 | 4.68 | 4.96 | 4.66 | 4.86 | 4.86 | 4.81 |
| 磺胺氯哒嗪 | 5.50 | 5.54 | 5.90 | 5.88 | 5.43 | 5.71 |
| 磺胺林 | 2.64 | 2.57 | 2.58 | 2.63 | 2.67 | 2.66 |
| 头孢克洛 | 1.19 | 1.54 | 1.40 | 1.44 | 1.37 | 1.38 |
| 林可霉素 | 5.01 | 5.16 | 5.22 | 5.04 | 4.98 | 5.08 |

**5.4 提取液稳定性**

样品处理完毕后，可能会遇到某些不可控因素导致无法立刻进行样品分析时，需要将提取液进行保存，待不可控因素解决后进行样品分析。因此，需要评估提取液的温度性。对同一个加标后实际尿液样品进行前处理， 收集氮吹后复溶液， 混合均匀并分装，分别置于 4℃ 和-20℃ 保存， 于第 0、 1、 3、 5 天进行测定，以回收率 RSD 进行评价。结果显示， 于 4℃ 放置的提取液回收率 RSD 为 0.7%~8.9%， -20℃ 放置的提取液回收率 RSD 为 1.0%~7.7%。 可见， 提取液于 4℃ 或-20℃ 放置 5 天各目标物稳定，不易分解，但更长时间的提取液稳定性还应进一步实验证明。结果见表3－7。

表3-7 提取液的稳定性

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 4℃条件 | | | | －20℃条件 | | | |
| 0天 | 1天 | 3天 | 5天 | 0天 | 1天 | 3天 | 5天 |
| 阿奇霉素 | 3.84 | 3.50 | 3.81 | 3.74 | 3.84 | 3.91 | 3.87 | 4.36 |
| 克拉霉素 | 3.78 | 3.54 | 3.69 | 3.27 | 3.78 | 3.29 | 3.32 | 3.33 |
| 罗红霉素 | 4.98 | 5.07 | 4.75 | 4.94 | 4.98 | 4.79 | 4.87 | 4.79 |
| 四环素 | 3.86 | 4.01 | 3.88 | 3.92 | 3.86 | 4.18 | 3.91 | 3.94 |
| 强力霉素 | 3.97 | 4.05 | 3.79 | 3.64 | 3.97 | 3.81 | 3.86 | 3.71 |
| 土霉素 | 2.88 | 3.15 | 3.25 | 3.42 | 2.88 | 3.22 | 3.18 | 3.43 |
| 恩诺沙星 | 3.14 | 3.33 | 3.49 | 3.55 | 3.14 | 3.50 | 3.52 | 3.34 |
| 培氟沙星 | 3.11 | 3.49 | 3.27 | 3.41 | 3.11 | 3.47 | 3.17 | 3.15 |
| 二氟沙星 | 9.81 | 9.21 | 9.69 | 10.03 | 9.81 | 10.30 | 9.00 | 9.54 |
| 洛美沙星 | 3.79 | 3.60 | 3.61 | 3.81 | 3.79 | 3.64 | 3.73 | 3.78 |
| 磺胺二甲嘧啶 | 6.99 | 6.50 | 7.04 | 6.43 | 6.99 | 6.51 | 6.50 | 6.33 |
| 磺胺甲噁唑 | 8.21 | 8.83 | 8.39 | 8.67 | 8.21 | 8.77 | 8.84 | 9.02 |
| 磺胺嘧啶 | 7.72 | 7.20 | 7.50 | 7.11 | 7.72 | 7.56 | 7.15 | 7.22 |
| 甲氧苄啶 | 5.43 | 5.16 | 5.54 | 5.52 | 5.43 | 5.42 | 5.56 | 5.21 |
| 磺胺喹噁啉 | 4.78 | 5.11 | 4.84 | 4.82 | 4.78 | 4.94 | 4.86 | 5.15 |
| 磺胺氯哒嗪 | 5.76 | 5.92 | 5.91 | 5.72 | 5.76 | 5.57 | 5.89 | 5.90 |
| 磺胺林 | 2.69 | 2.66 | 2.73 | 2.71 | 2.69 | 2.69 | 2.65 | 2.60 |
| 头孢克洛 | 2.89 | 2.57 | 2.44 | 2.70 | 2.89 | 3.22 | 3.09 | 2.60 |
| 林可霉素 | 5.13 | 5.15 | 5.07 | 5.20 | 5.13 | 5.18 | 4.95 | 5.24 |

**5.5 样品反复冻融时的稳定性**

将加标后实际尿液样品置于-40℃ 冷冻保存， 实验前取出放于室温解冻， 解冻后充分混匀进行前处理分析， 剩余尿液样品再次置于-40℃ 环境下冷冻， 反复冻融三次且每次样品冻存时间至少 12 h 以上。 结果显示，目标物回收率RSD 为 2.2%~7.5%， 结果稳定。结果见表3－8。

表3-8冻融实验的稳定性结果（ng/mL）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 第一次 | 第二次 | 第三次 |
| 阿奇霉素 | 1.28 | 0.98 | 0.96 |
| 克拉霉素 | 1.17 | 1.03 | 0.99 |
| 罗红霉素 | 1.24 | 1.07 | 1.15 |
| 四环素 | 0.67 | 0.65 | 0.61 |
| 强力霉素 | 0.99 | 1.12 | 0.94 |
| 土霉素 | 0.87 | 0.91 | 0.83 |
| 恩诺沙星 | 0.93 | 1.01 | 0.97 |
| 培氟沙星 | 0.79 | 0.84 | 0.83 |
| 二氟沙星 | 0.99 | 0.96 | 0.93 |
| 洛美沙星 | 0.73 | 0.78 | 0.72 |
| 磺胺二甲嘧啶 | 1.32 | 1.40 | 1.25 |
| 磺胺甲噁唑 | 1.13 | 1.13 | 1.08 |
| 磺胺嘧啶 | 1.66 | 1.65 | 1.51 |
| 甲氧苄啶 | 1.27 | 1.23 | 1.26 |
| 磺胺喹噁啉 | 1.21 | 1.15 | 1.14 |
| 磺胺氯哒嗪 | 1.13 | 1.14 | 1.07 |
| 磺胺林 | 1.14 | 1.20 | 1.10 |
| 头孢克洛 | 2.02 | 1.99 | 2.13 |
| 林可霉素 | 1.20 | 1.21 | 1.15 |

6.基质效应评价

采用人工尿液作为基质， 选取 6 个不同来源的尿液， 按前处理方法收集洗脱液，配制质量浓度分别为 0.1、 0.5、 1.0、 2.5、 5.0、 10.0、 15.0、 20.0、 30.0、 50.0 ng/mL 的基质标准系列工作溶液， 与标准系列工作溶液一同上机测定。 根据公式 3-1， 评估基质效应（matrix effect，ME）。 当|ME|<20%时为弱基质效应； 当 20%≤|ME|<50%为中等基质效应， 当|ME|≥50%为强基质效应。

结果显示，磺胺甲噁唑、 磺胺嘧啶、头孢克洛的|ME|范围为 4.3%~49.4%， 为中等基质效应， 甲氧苄啶|ME|范围为 26.9%~72.8%， 需采取补偿措施，其余目标物的|ME|范围为 0.13%~20.0%，为弱基质效应。 采用同位素内标抵消基质效应，结果表明磺胺甲噁唑、磺胺嘧啶、甲氧苄啶经过抵消后的|ME|范围为 0.2%~19.8%，为弱基质效应。头孢克洛因无一一对应内标， 经过抵消后|ME|范围为 14.2%~48.6%，为中等基质效应。为提高工作效率， 定量分析时可用溶剂标准曲线代替基质工作曲线。

（三）验证报告分析

1.验证方法及相关数据的取舍

由于不同品牌、不同型号液相色谱串联质谱仪灵敏度可能会有差异，本标准在进行方法验证，尽可能选择了覆盖市场的不同品牌液相色谱串联质谱仪，包括AB Sciex和Waters等品牌，确保了方法广泛的适用性。

按照方法验证方案准备实验用品，与验证单位确定验证时间。在方法验证前，参与验证的操作人员应熟悉和掌握方法原理、操作步骤及流程。方法验证过程中所用的试剂和材料、仪器和设备及分析步骤应符合方法相关要求。

验证内容主要包括标准曲线的线性范围及相关系数；方法的检出限和定量限；方法的准确度与精密度等。考虑到实验室间的差异，验证过程中的方法学评估指标，如检出限，定量限，均选取4家实验室试验结果中的最大值。

2.方法验证结果汇总

**2.1 参与验证单位及验证人员情况**

本方法由中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所负责研制（实验室编号1），由山东省疾病预防控制中心（实验室编号2），无锡市疾病预防控制中心（实验室编号3）和深圳市罗湖区疾控中心（实验室编号4）参与验证实施方法验证。具体实验单位及验证人员情况见表3-9。

表3-9 参与验证的单位及验证人员

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 单位 | 姓名 | 年龄 | 职务/职称 | 业务专业 | 参加分析工作年限 |
| 山东省疾病预防控制中心 | 郑家凤 | 40 | 副主任技师 | 卫生检验学 | 13 |
| 山东省疾病预防控制中心 | 王晓琳 | 36 | 主管技师 | 卫生检验学 | 11 |
| 无锡市疾病预防控制中心 | 吴宇伉 | 34 | 主管医师 | 理化分析 | 9 |
| 无锡市疾病预防控制中心 | 吴林林 | 33 | 主管技师 | 理化分析 | 8 |
| 深圳市罗湖区疾病预防控制中心 | 倪一平 | 33 | 主管技师 | 理化分析 | 7 |
| 深圳市罗湖区疾病预防控制中心 | 朱波 | 38 | 副主任技师 | 理化分析 | 15 |
| 深圳市罗湖区疾病预防控制中心 | 纪翔 | 39 | 检验技师 | 理化分析 | 7 |

**2.2 使用的仪器设备情况**

验证实验所用仪器和设备情况见表3-10。

表3-10 参与验证所用仪器设备表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 单位 | 仪器名称 | 品牌规格型号 |
| 山东省疾病预防控制中心 | 超高效液相色谱串联质谱仪 | Waters UPLC 液相色谱  Waters TQS 三重四极杆质谱仪 |
| 无锡市疾病预防控制中心 | 超高效液相色谱串联质谱仪 | 岛津Nexera UHPLC LC-30AD  AB SCIEX 5500 QTRAP 三重四极杆质谱仪 |
| 罗湖区疾病预防控制中心 | 超高效液相色谱串联质谱仪 | Exion LC  AB SCIEX 5500 QTRAP 三重四极杆质谱仪 |

**2.3 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限**

4家实验室开展试验过程的线性范围、相关系数、方法检出限和定量限见表3-11~表3-28。

表3-11 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－阿奇霉素

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.03 | 0.10 |
| 2 | 0.05-50 | 0.999 | 0.02 | 0.06 |
| 3 | 0.05-50 | 0.997 | 0.02 | 0.05 |
| 4 | 0.05-50 | 0.996 | 0.01 | 0.03 |

表3-12 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－克拉霉素

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.02 | 0.08 |
| 2 | 0.05-50 | 0.998 | 0.01 | 0.03 |
| 3 | 0.05-50 | 0.999 | 0.02 | 0.05 |
| 4 | 0.05-50 | 0.999 | 0.03 | 0.08 |

表3-13 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－罗红霉素

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | | 0.03 | 0.10 |
| 2 | 0.05-50 | 0.998 | | 0.01 | 0.03 |
| 3 | 0.05-50 | 0.997 | | 0.01 | 0.04 |
| 4 | 0.05-50 | 0.999 | | 0.02 | 0.07 |

表3-20 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－四环素

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.02 | 0.08 |
|  | 0.05-50 | 0.998 | 0.01 | 0.03 |
| 3 | 0.1-50 | 0.995 | 0.03 | 0.08 |
| 4 | 0.05-50 | 0.999 | 0.02 | 0.06 |

表3-14 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－强力霉素

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.08 | 0.26 |
| 2 | 0.05-50 | 0.999 | 0.01 | 0.04 |
| 3 | 0.1-10 | 0.990 | 0.03 | 0.09 |
| 4 | 0.05-50 | 0.995 | 0.02 | 0.06 |

表3-15 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－土霉素

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.02 | 0.07 |
| 2 | 0.05-50 | 0.999 | 0.04 | 0.12 |
| 3 | 0.1-10 | 0.999 | 0.03 | 0.09 |
| 4 | 0.05-50 | 0.998 | 0.02 | 0.07 |

表3-16 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－恩诺沙星

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.07 | 0.25 |
| 2 | 0.05-50 | 0.998 | 0.02 | 0.05 |
| 3 | 0.05-50 | 0.999 | 0.02 | 0.04 |
| 4 | 0.05-50 | 0.999 | 0.03 | 0.08 |

表3-17 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－培氟沙星

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.03 | 0.10 |
| 2 | 0.05-50 | 0.999 | 0.02 | 0.05 |
| 3 | 0.05-50 | 0.993 | 0.02 | 0.05 |
| 4 | 0.05-50 | 0.998 | 0.06 | 0.20 |

表3-18 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－二氟沙星

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.04 | 0.12 |
| 2 | 0.05-50 | 0.999 | 0.04 | 0.12 |
| 3 | 0.05-50 | 0.998 | 0.01 | 0.04 |
| 4 | 0.05-50 | 0.999 | 0.03 | 0.09 |

表3-19 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－洛美沙星

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.07 | 0.24 |
| 2 | 0.05-50 | 0.999 | 0.12 | 0.40 |
| 3 | 0.05-50 | 0.998 | 0.02 | 0.05 |
| 4 | 0.05-50 | 0.998 | 0.03 | 0.11 |

表3-20 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－磺胺二甲嘧啶

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.02 | 0.06 |
| 2 | 0.05-50 | 0.999 | 0.13 | 0.40 |
| 3 | 0.05-50 | 0.997 | 0.01 | 0.04 |
| 4 | 0.05-50 | 0.998 | 0.03 | 0.09 |

表3-21 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－磺胺甲噁唑

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.13 | 0.45 |
| 2 | 0.05-50 | 0.999 | 0.03 | 0.09 |
| 3 | 0.05-50 | 0.999 | 0.02 | 0.06 |
| 4 | 0.05-50 | 0.999 | 0.03 | 0.11 |

表3-22 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－磺胺嘧啶

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.03 | 0.09 |
| 2 | 0.05-50 | 0.999 | 0.02 | 0.05 |
| 3 | 0.05-50 | 0.998 | 0.06 | 0.18 |
| 4 | 0.05-50 | 0.999 | 0.03 | 0.09 |

表3-23 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－甲氧苄啶

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.03 | 0.10 |
| 2 | 0.05-50 | 0.999 | 0.10 | 0.30 |
| 3 | 0.05-50 | 0.998 | 0.02 | 0.06 |
| 4 | 0.05-50 | 0.999 | 0.01 | 0.04 |

表3-24 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－磺胺喹噁啉

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.02 | 0.07 |
| 2 | 0.05-50 | 0.999 | 0.01 | 0.03 |
| 3 | 0.05-50 | 0.998 | 0.05 | 0.15 |
| 4 | 0.05-50 | 0.999 | 0.03 | 0.12 |

表3-25 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－磺胺氯哒嗪

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.10 | 0.35 |
| 2 | 0.05-50 | 0.999 | 0.03 | 0.10 |
| 3 | 0.05-50 | 0.996 | 0.02 | 0.06 |
| 4 | 0.05-50 | 0.998 | 0.02 | 0.07 |

表3-26 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－磺胺林

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.03 | 0.08 |
| 2 | 0.05-50 | 0.999 | 0.11 | 0.40 |
| 3 | 0.05-50 | 0.997 | 0.02 | 0.06 |
| 4 | 0.05-50 | 0.999 | 0.03 | 0.09 |

表3-27 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－头孢克洛

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.03 | 0.11 |
| 2 | 0.05-50 | 0.998 | 0.12 | 0.40 |
| 3 | 0.5-50 | 0.998 | 0.15 | 0.49 |
| 4 | 0.05-50 | 0.999 | 0.23 | 0.76 |

表3-28 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－林可霉素

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 浓度范围(ng/mL) | 相关系数(r) | 检出限(ng/mL) | 定量限(ng/mL) |
| 1 | 0.10-50 | 0.999 | 0.05 | 0.18 |
| 2 | 0.05-50 | 0.999 | 0.03 | 0.10 |
| 3 | 0.05-50 | 0.997 | 0.02 | 0.06 |
| 4 | 0.05-50 | 0.999 | 0.02 | 0.06 |

**2.4 方法精密度试验**

整理4家实验室批内精密度，结果见表3-29~表3-47。

表3-29 精密度测定结果（n=6）－阿奇霉素

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.54 | 0.04 | 8.0 | 2.07 | 0.12 | 5.7 |
| 2 | 0.47 | 0.06 | 11.8 | 1.89 | 0.20 | 10.7 |
| 3 | 0.46 | 0.05 | 10.8 | 1.87 | 0.20 | 10.7 |
| 4 | 0.55 | 0.022 | 4.0 | 2.08 | 0.047 | 2.3 |

表3-30 精密度测定结果（n=6）－克拉霉素

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.45 | 0.03 | 6.3 | 1.80 | 0.07 | 4.1 |
| 2 | 0.42 | 0.01 | 1.3 | 1.79 | 0.06 | 3.1 |
| 3 | 0.48 | 0.04 | 9.4 | 1.75 | 0.13 | 7.7 |
| 4 | 0.47 | 0.013 | 2.8 | 1.90 | 0.035 | 1.8 |

表3-31 精密度测定结果（n=6）－罗红霉素

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.52 | 0.05 | 9.4 | 2.23 | 0.10 | 4.5 |
| 2 | 0.56 | 0.03 | 5.5 | 2.29 | 0.10 | 4.5 |
| 3 | 0.43 | 0.04 | 9.0 | 1.77 | 0.23 | 13.2 |
| 4 | 0.48 | 0.022 | 4.7 | 1.97 | 0.042 | 2.1 |

表3-32 精密度测定结果（n=6）－四环素

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.46 | 0.04 | 8.8 | 1.85 | 0.08 | 4.2 |
| 2 | 0.43 | 0.02 | 4.3 | 1.73 | 0.06 | 3.6 |
| 3 | 0.49 | 0.05 | 10.5 | 1.81 | 0.14 | 7.7 |
| 4 | 0.45 | 0.027 | 5.9 | 1.75 | 0.034 | 2.0 |

表3-33 精密度测定结果（n=6）－强力霉素

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.56 | 0.03 | 4.8 | 2.24 | 0.09 | 4.0 |
| 2 | 0.44 | 0.02 | 5.3 | 1.81 | 0.16 | 8.6 |
| 3 | 0.50 | 0.03 | 5.7 | 2.05 | 0.17 | 8.4 |
| 4 | 0.66 | 0.013 | 1.9 | 2.15 | 0.032 | 1.5 |

表3-34 精密度测定结果（n=6）－土霉素

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.45 | 0.02 | 5.2 | 2.00 | 0.13 | 6.5 |
| 2 | 0.51 | 0.06 | 12.3 | 2.30 | 0.08 | 3.3 |
| 3 | 0.44 | 0.05 | 10.7 | 1.89 | 0.24 | 12.6 |
| 4 | 0.48 | 0.018 | 3.8 | 1.97 | 0.074 | 3.8 |

表3-35 精密度测定结果（n=6）－恩诺沙星

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.56 | 0.03 | 5.5 | 2.31 | 0.09 | 3.9 |
| 2 | 0.42 | 0.01 | 2.6 | 1.73 | 0.05 | 3.1 |
| 3 | 0.51 | 0.04 | 8.7 | 2.02 | 0.18 | 8.8 |
| 4 | 0.56 | 0.025 | 4.5 | 2.38 | 0.102 | 4.3 |

表3-36 精密度测定结果（n=6）－培氟沙星

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.52 | 0.05 | 9.7 | 2.12 | 0.10 | 4.7 |
| 2 | 0.53 | 0.06 | 10.6 | 2.05 | 0.20 | 9.6 |
| 3 | 0.53 | 0.05 | 9.4 | 1.92 | 0.24 | 12.6 |
| 4 | 0.56 | 0.036 | 6.4 | 2.02 | 0.075 | 3.7 |

表3-37 精密度测定结果（n=6）－二氟沙星

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.55 | 0.03 | 4.7 | 2.00 | 0.17 | 8.5 |
| 2 | 0.42 | 0.01 | 2.4 | 1.70 | 0.07 | 4.3 |
| 3 | 0.44 | 0.04 | 9.8 | 1.98 | 0.23 | 11.4 |
| 4 | 0.55 | 0.027 | 4.9 | 1.97 | 0.049 | 2.5 |

表3-38 精密度测定结果（n=6）－洛美沙星

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.52 | 0.06 | 12.5 | 2.00 | 0.16 | 7.9 |
| 2 | 0.42 | 0.01 | 3.4 | 2.25 | 0.09 | 3.9 |
| 3 | 0.48 | 0.05 | 10.2 | 2.14 | 0.16 | 7.7 |
| 4 | 0.47 | 0.031 | 6.5 | 1.92 | 0.041 | 2.1 |

表3-39 精密度测定结果（n=6）－磺胺二甲嘧啶

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.46 | 0.03 | 6.6 | 1.95 | 0.11 | 5.7 |
| 2 | 0.42 | 0.01 | 3.4 | 1.70 | 0.06 | 3.4 |
| 3 | 0.54 | 0.04 | 7.4 | 1.88 | 0.18 | 9.5 |
| 4 | 0.46 | 0.045 | 9.9 | 1.84 | 0.022 | 1.2 |

表3-40 精密度测定结果（n=6）－磺胺甲噁唑

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.52 | 0.06 | 12.4 | 1.82 | 0.07 | 4.0 |
| 2 | 0.50 | 0.05 | 10.6 | 2.12 | 0.16 | 7.7 |
| 3 | 0.48 | 0.06 | 12.4 | 2.11 | 0.23 | 10.7 |
| 4 | 0.41 | 0.041 | 10.1 | 1.66 | 0.101 | 6.1 |

表3-41 精密度测定结果（n=6）－磺胺嘧啶

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.49 | 0.08 | 15.4 | 1.94 | 0.12 | 6.2 |
| 2 | 0.42 | 0.02 | 3.9 | 1.93 | 0.20 | 10.4 |
| 3 | 0.48 | 0.06 | 12.4 | 1.84 | 0.18 | 9.7 |
| 4 | 0.46 | 0.035 | 7.6 | 1.94 | 0.080 | 4.1 |

表3-42 精密度测定结果（n=6）－甲氧苄啶

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.56 | 0.03 | 5.5 | 2.12 | 0.08 | 3.5 |
| 2 | 0.44 | 0.02 | 4.9 | 1.85 | 0.14 | 7.7 |
| 3 | 0.55 | 0.02 | 3.5 | 2.04 | 0.34 | 16.7 |
| 4 | 0.50 | 0.032 | 6.4 | 2.02 | 0.118 | 5.8 |

表3-43 精密度测定结果（n=6）－磺胺喹噁啉

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.51 | 0.05 | 9.8 | 1.96 | 0.12 | 6.3 |
| 2 | 0.53 | 0.03 | 4.8 | 2.21 | 0.15 | 6.7 |
| 3 | 0.48 | 0.05 | 10.1 | 1.93 | 0.19 | 9.7 |
| 4 | 0.44 | 0.030 | 6.8 | 1.76 | 0.031 | 1.8 |

表3-44 精密度测定结果（n=6）－磺胺氯哒嗪

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.48 | 0.06 | 11.8 | 1.96 | 0.18 | 9.2 |
| 2 | 0.52 | 0.02 | 3.5 | 2.17 | 0.17 | 7.9 |
| 3 | 0.52 | 0.06 | 12.1 | 1.90 | 0.23 | 12.2 |
| 4 | 0.48 | 0.025 | 5.2 | 1.92 | 0.067 | 3.5 |

表3-45 精密度测定结果（n=6）－磺胺林

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.46 | 0.04 | 8.6 | 2.15 | 0.14 | 6.7 |
| 2 | 0.57 | 0.01 | 2.3 | 2.22 | 0.10 | 4.6 |
| 3 | 0.49 | 0.06 | 12.3 | 1.84 | 0.21 | 11.5 |
| 4 | 0.47 | 0.03 | 5.4 | 0.49 | 0.02 | 4.0 |

表3-46 精密度测定结果（n=6）－头孢克洛

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.53 | 0.06 | 10.4 | 1.99 | 0.13 | 6.6 |
| 2 | 0.43 | 0.01 | 3.1 | 1.68 | 0.06 | 3.7 |
| 3 | 0.50 | 0.05 | 9.9 | 1.80 | 0.18 | 10.0 |
| 4 | 0.48 | 0.026 | 5.4 | 1.96 | 0.079 | 4.0 |

表3-47 精密度测定结果（n=6）－林可霉素

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | | | 高浓度 | | |
| 平均值（ng/mL） | 标准差（μg/L） | RSD  （%） | 平均值（ng/mL） | 标准差（ng/mL） | RSD  （%） |
| 1 | 0.51 | 0.04 | 7.4 | 1.93 | 0.11 | 5.9 |
| 2 | 0.43 | 0.01 | 2.5 | 1.70 | 0.04 | 2.4 |
| 3 | 0.51 | 0.06 | 11.4 | 1.89 | 0.23 | 12.2 |
| 4 | 0.50 | 0.016 | 3.3 | 1.95 | 0.048 | 2.5 |

**2.5 方法的准确度试验**

验证实验室的准确度结果见表3-48~表3-66。

表3-48 加标回收测定结果－阿奇霉素

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 96.6-119.0 | 94.7-110.1 |
| 2 | 82.9~115.1 | 83.1~108.49 |
| 3 | 80.47~104.87 | 87.57~113.57 |
| 4 | 102.00~114.00 | 101.20~107.50 |

表3-49 加标回收测定结果－克拉霉素

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 84.6-98.2 | 85.3-96.2 |
| 2 | 84.4~86.1 | 86.9~94.1 |
| 3 | 85.33~108.53 | 81.30~100.88 |
| 4 | 91.40~98.00 | 92.80~97.80 |

表3-50 加标回收测定结果－罗红霉素

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 90-118.6 | 104.6-118.3 |
| 2 | 102.2~116.0 | 106.4~120.0 |
| 3 | 80.80~102.40 | 80.30~112.10 |
| 4 | 89.20~100.20 | 95.00~100.50 |

表3-51 加标回收测定结果－四环素

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 83-105.2 | 87.6-97.5 |
| 2 | 80.8~89.4 | 83.2~89.6 |
| 3 | 84.40~114.20 | 84.30~101.70 |
| 4 | 86.60~98.40 | 85.95~89.85 |

表3-52 加标回收测定结果－强力霉素

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 105-120 | 106.7-117.9 |
| 2 | 82.2~94.8 | 81.1~102.3 |
| 3 | 93.20~108.80 | 86.35~110.85 |
| 4 | 110.40~115.00 | 106.20~109.90 |

表3-53 加标回收测定结果－土霉素

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 82.4-94.4 | 92.2-108.7 |
| 2 | 81.9~113.6 | 110.4~118.9 |
| 3 | 80.35~105.50 | 81.80~113.60 |
| 4 | 91.60~101.60 | 94.90~104.20 |

表3-54 加标回收测定结果－恩诺沙星

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 103-118.8 | 107.6-119.5 |
| 2 | 82.1~87.6 | 82.0~89.0 |
| 3 | 92.40~115.20 | 87.80~113.20 |
| 4 | 94.62~107.08 | 100.14~107.57 |

表3-55 加标回收测定结果－培氟沙星

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 91.0-116.8 | 97.7-112.2 |
| 2 | 89.4~115.4 | 89.5~114.1 |
| 3 | 90.40~113.60 | 81.30~115.15 |
| 4 | 103.80~119.40 | 94.75~105.40 |

表3-56 加标回收测定结果－二氟沙星

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 103-117 | 89.6-110.7 |
| 2 | 82.8~88.1 | 80.5~89.9 |
| 3 | 80.40~102.60 | 84.80~114.25 |
| 4 | 104.40~119.20 | 96.30~101.55 |

表3-57 加标回收测定结果－洛美沙星

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 84.6-117 | 92.1-113 |
| 2 | 81.2~88.4 | 104.1~116.3 |
| 3 | 85.00~108.60 | 94.95~118.95 |
| 4 | 95.20~115.20 | 91.35~107.35 |

表3-58 加标回收测定结果－磺胺二甲嘧啶

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 84.8-98.8 | 92.3-107.7 |
| 2 | 80.8~88.5 | 85.4~88.7 |
| 3 | 95.40~117.60 | 84.05~105.80 |
| 4 | 91.60~102.00 | 91.05~93.80 |

表3-59 加标回收测定结果－磺胺甲噁唑

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 82-118.8 | 86.3-95.9 |
| 2 | 92.6~120.2 | 94.4~118.2 |
| 3 | 84.05~115.60 | 88.94~117.60 |
| 4 | 89.00~108.40 | 89.70~99.15 |

表3-60 加标回收测定结果－磺胺嘧啶

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 82-119 | 91.7-108.1 |
| 2 | 80.0~89.4 | 89.1~114.2 |
| 3 | 80.80~110.40 | 80.00~100.90 |
| 4 | 86.20~101.20 | 89.95~102.45 |

表3-61 加标回收测定结果－甲氧苄啶

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 102.6-119.2 | 101.3-111 |
| 2 | 84.2~94.84 | 80.9~99.1 |
| 3 | 104.80~114.40 | 84.65~118.1 |
| 4 | 88.60~106.40 | 94.25~109.50 |

表3-62 加标回收测定结果－磺胺喹噁啉

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 85.2-110.8 | 91.2-106.7 |
| 2 | 100.5~111.2 | 103.3~120.0 |
| 3 | 81.60~109.00 | 81.45~106.90 |
| 4 | 99.00~108.40 | 95.75~99.95 |

表3-63 加标回收测定结果－磺胺氯哒嗪

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 82.4-112.4 | 82.6-107.3 |
| 2 | 99.2~108.2 | 98.7~120 |
| 3 | 85.80~117.20 | 82.25~113.05 |
| 4 | 98.22~114.44 | 93.10~102.20 |

表3-64 加标回收测定结果－磺胺林

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 83.2-104.6 | 96.7-117 |
| 2 | 110.5~117.8 | 102.8~118.5 |
| 3 | 82.40~114.00 | 81.75~108.90 |
| 4 | 88.40~101.60 | 91.05~102.10 |

表3-65 加标回收测定结果－头孢克洛

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 92.2-117.8 | 92.5-109.5 |
| 2 | 84.4~89.8 | 81.1~89.8 |
| 3 | 87.60~117.60 | 81.85~106.25 |
| 4 | 88.80~116.60 | 94.30~114.25 |

表3-66 加标回收测定结果－林可霉素

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围（%） | 高浓度回收率范围（%） |
| 1 | 90.8-110 | 89.7-106.1 |
| 2 | 83.5~89.8 | 83.8~87.1 |
| 3 | 85.60~115.60 | 81.70~108.45 |
| 4 | 95.80~104.60 | 95.35~102.10 |

**2.6 小结**

建立了人尿中19种抗生素的液相色谱串联质谱分析方法。

19种目标物的加标回收率为80.0%~120%，日内精密度小于15.4%，日间精密度小于16.2%。

本方法适合实验室开展大批量生物样本的检测工作。

1. 国内外相关规定和标准情况的比对说明

目前，国内尚未制定尿中抗生素测定的标准方法，国外也无相关的标准检测方法。

1. 与有关的现行法律、法规和其它标准的关系

本标准与目前有关的现行法律、法规和其它标准无任何关系。

1. 重大意见分歧的处理结果和依据

无相关内容。

1. 作为强制性或推荐性标准的建议

本标准建议作为推荐性标准。

1. 贯彻标准的要求和措施建议

本标准建议自发布之日起实施。

1. 废止现行有关标准的建议

无相关内容。

1. 其他应予说明的事项

无相关内容。