《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》

编制说明

1. 工作简况

（一）任务来源

2024年10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《人体尿液中8种农药及代谢物的测定 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的相关管理要求，对《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》进行方法研制工作。

（二）协作单位

《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》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。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参加了项目的验证工作。

（三）主要工作进程

收到批复通知后，开始着手查阅相关文献、国内外标准，确定了标准方法中包含的8种农药残留（2种原型、6种代谢物）。文献调研完成后，于2024年10月20日召开第一次标准制定讨论会。10月30日前完成了验证单位筛选工作。根据会议安排，2024日12月30日前，完成研制方法过程所需试剂、耗材的购买及实际尿液样品的采集工作。2025年1月15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5月，各验证单位开始进行方法验证。6月初，完成方法验证并返回验证报告，6月底完成标准文本、研制报告、编制说明和验证报告撰写工作。

（四）主要起草人及工作分工

参与本标准起草的人员包括10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 |
| 张续（环境所） | 负责项目的总体设计，检验方法标准文本，编制说明，研制报告的撰写工作，回复专家意见。 |
| 胡小键（环境所） | 组织相关工作实施与推进。协助审定标准文本、编制说明及研制报告，协助回复专家意见。 |
| 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。 |
| 王亚韡、黎娟（中国科学院生态环境研究中心） | 负责方法的验证工作，编制方法验证报告。 |
| 谭磊、邓芬芳、黄家玲（广州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。 |
| 万延建、孙言凤（武汉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。 |

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农药及其相关代谢物测定的标准方法。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

本方法充分调研了我国人群尿中农药原型及代谢物的检出情况，检出浓度，以及调研了我国农药使用情况。确定了8种农药原型及代谢物，包括：2种苯氧乙酸类除草剂原型（2,4-二氯苯氧乙酸、2,4,5-三氯苯氧乙酸），２种有机磷类农药代谢物（对硝基苯酚、3,5,6-三氯-2-吡啶酚）和4种拟除虫菊酯类农药代谢物（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和反式二氯乙烯基二甲基环丙烷羧酸）。

2.先进性

尿中农药及代谢物痕量存在于人体尿液中（多在ng/mL或更低），同时，不同人因生活习惯、饮食习惯等不同，导致上述物质的人体赋存水平变化差异较大。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8种目标分析物。

3.适用性

当前，可供参考的标准方法主要是美国疾控中心建立的液质联用法，该法采用固相萃取技术。但上述方法在实验过程中使用了丙酮，丙酮在我国属于管制溶液，购买、存储及使用等存在一定缺陷，因此，推广该方法存在一定局限。本方法对样品进行了优化，样品前处理过程中主要使用甲醇、乙腈等常用试剂，同时兼具有操作方便、省时、节约试剂及耗材的方式。该方法涉及的前处理设备要求低，相较国外的方法更具适用性。

4.可操作性

尿液样本基体复杂，可能会产生较强基质干扰效应。因此，在前处理过程中，对提取液进行稀释后上机测定。具备低基质效应，省时，省力的效果，可满足大批量样品的分析测定。

（二）标准的主要内容

1.方法适用范围

本标准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。

本标准适用于人尿中8种农药及代谢物的测定。

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 38735 人类尿液样本采集与处理

3.原理

尿液样本中的特异性农药原形及农药代谢物经β-葡萄糖醛酸酶水解后，采用HLB固相萃取进行目标物富集及净化，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，稳定同位素内标法定量。

4.试剂或材料

4.1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

4.2甲醇（CH3OH）。

4.3乙腈（CH3CN）。

4.4乙酸（CH3COOH）。

4.5甲酸（HCOOH）。

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

4.7乙酸钠溶液（*c* = 0.2 mol/L）：称取乙酸钠0.82 g，加入160 μL乙酸，用水溶解后定容至50 mL。

4.8乙酸甲醇溶液（1+25+74）：移取1mL乙酸和25 mL甲醇，加入74mL水。

4.9标准品和稳定同位素内标：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。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%。

4.10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0.00001 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浓度均为100 mg/L。可直接使用符合要求的有证标准溶液。

4.11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 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。

4.12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稀释至1.00 mg/L，配制成混合稳定同位素内标使用溶液。

5.仪器设备

5.1液相色谱串联质谱仪（LC-MS/MS）：配电喷雾离子源（ESI）。

5.2电子天平：感量为0.00001 g和0.01 g。

5.3恒温水浴锅：可控制37℃ ± 2℃。

5.4离心机：相对离心力≥1700 ×*g*。

5.5固相萃取装置：配强阴离子交换固相萃取柱（3 mL，60 mg）。

5.6针头过滤器：配0.22 μm微孔滤膜，亲水性聚丙烯材质。

5.7涡旋混匀器。

6.样本采集、运输和保存

**6.1样本采集**

按GB/T 38735规定方法采集尿液样本，同时制备样本空白。尿液样本最少采集量2.5 mL，宜采集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。

**6.2样本保存与运输**

现场采集时，应将尿液样本暂存在装有冰袋或冰盒的保温箱中。采集完成后，12 h内−20℃冷链运输转移至实验室，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。

7.分析步骤

**7.1样本前处理**

**7.1.1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。反复冻融3次内不影响检测结果，未发现浓度有明显变化。

**7.1.2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。

**7.1.3固相萃取**

依次用3 mL甲醇和3 mL水活化固相萃取柱；将离心好的上清液倒入固相萃取柱。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 1%乙酸的25%甲醇水淋洗，空气抽干5 min；1 mL甲醇溶液缓慢洗脱固相萃取柱，重复洗脱一次；收集洗脱液，氮吹至500 μL，加100 μL水作为保护剂，再继续氮吹至有机组分挥发至干，加入400 μL 10%乙腈水；离心10 min（≥1700 *×g*）后测定。处理完的样品溶液，-20℃密封避光保存，可稳定2周。

**7.2推荐分析条件**

**7.2.1 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）为流动相A，乙酸乙腈溶液（1+999）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。

表2-1 梯度洗脱程序

| 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 |

**7.2.2质谱参考条件**

1. 离子源：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）c）
3. 其他质谱参数见表2-2。

表2-2 8种目标分析物及其内标的质谱参数

| 序号 | 化合物 | 离子对m/z | 碰撞电压 | 去簇电压 |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 1 | PNP | 138.0/108.0\* | -24 | -40 |
| 138.0/92.1 | -30 | -40 |
| 2 | TCPY | 196.0/35.1\* | -44 | -30 |
| 198.0/35.1 | -40 | -30 |
| 3 | 3-PBA | 213.1/93.0\* | -26 | -30 |
| 213.1/65.1 | -70 | -30 |
| 4 | 4F-3PBA | 231.1/93.1\* | -28 | -30 |
| 231.1/65.1 | -75 | -30 |
| 5 | *cis*-DCCA | 206.9/35.1\* | -35 | -20 |
| 208.9/35.1 | -35 | -20 |
| 6 | *trans*-DCCA | 207.1/35.2\* | -40 | -20 |
| 209.1/35.2 | -40 | -30 |
| 7 | 2,4-D | 219.0/161.1\* | -18 | -30 |
| 219.0/125.0 | -36 | -30 |
| 8 | 2,4,5-T | 253.1/195.0\* | -19 | -20 |
| 253.1/159.0 | -39 | -20 |
| 9 | 13C6-PNP | 144.1/114.1 | -10 | -20 |
| 10 | 13C3-TCPY | 201.1/35.1 | -40 | -50 |
| 11 | 13C6-3-PBA | 219.1/99.1 | -27 | -25 |
| 12 | 13C6-4F-3PBA | 236.9/99.1 | -30 | -30 |
| 13 | 13C2-D1-*cis*-DCCA | 210.2/35.1 | -30 | -30 |
| 14 | 13C2-D1-*trans*-DCCA | 210.1/35.1 | -38 | -40 |
| 15 | 13C6-2,4-D | 224.8/167.0 | -17 | -30 |
| 16 | 13C6-2,4,5-T | 260.6/203.0 | -15 | -40 |

1. \*定量离子。

**7.3校准**

**7.3.1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10%乙腈水稀释，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,稳定同位素内标浓度为10.0 μg/L。

**7.3.2标准曲线绘制**

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图见图2-1。



**图2-1 8种目标分析物的提取离子图**

**7.4样本测定**

**7.4.1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，可判定为样本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 |

**7.4.2定量分析**

尿液样本中目标分析物的浓度按如下公式计算：

$$ ρ=\frac{\left(\frac{A\_{x}}{A\_{is}}−b\right)}{an} ×C\_{is}\cdots \cdots \cdots \cdots \cdots \cdots \cdots \cdots (1)$$

式中：

*ρ*—尿液样本中目标分析物的质量浓度，ng/mL；

*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。

**7.5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。

8.方法特性

**8.1方法检出限与定量限**

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2-4。

表2-4 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 | 0.10 | 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 |

**8.2精密度与回收率**

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%。

9.质量保证和控制

9.1实验室应经常考察校正结果、精密度和回收率，以确定分析系统处于正常状态。

9.2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）。

9.3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。

9.4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。

9.5平行样测定结果的相对偏差应小于20%。

9.6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，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，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。

10.注意事项

10.1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。

10.2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。

10.3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。

10.4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。

10.5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。

10.6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

农药是农业生产中的重要生产要素，在提高农作物产量和保障粮食安全中发挥重要作用。近几十年，农药在全球范围内的生产和使用呈现增长趋势。1995~2020年，我国各类农药的年总产量从41.65万吨增长到214.8万吨，成为全球最大的农药生产国和消费国。而为防治中草药病虫害、提高产量品质，在中草药种植中施撒农药对防治中草药病虫害、提高产量品质起到积极作用。部分农药因高毒性、代谢缓慢、持久残留及不科学使用等原因造成了对中草药的污染，而引起中草药质量下降。目前，中草药中检出率较高的农药品种主要包括有机氯和有机磷类农药。当农药残留于中草药后，会随着中药熬制进入药汤，被人体摄入后可能会导致药效的削弱和安全性的降低，增加健康风险。

农药在人体内无明显蓄积，数小时或数日内可通过肾脏随尿液排出体外。因此，测定尿中农药原型或代谢物的浓度水平，可在一定程度上反应其暴露数据。常用的测定尿中农药代谢物或原型的分析方法主要包括高效液相色谱-串联质谱法（HPLC-MS/MS）、在线固相萃取-液相色谱-串联质谱法（Online-SPE-LC-MS/MS）和气相色谱-质谱联用（GC-MS）等。虽然，人尿液中有机磷检测作为一种有效的监测手段，能够准确反映人体摄入有机磷农药的剂量，有助于评估中草药的安全性。但目前针对尿液中有机磷农药原型或代谢物检测方面尚无统一标准。开展人尿液中相关农药检测方法的标准化，可以提高检测的准确性和一致性，为中草药的安全性和有效性提供科学依据，也能够为及时发现和控制中草药中的有机磷残留，保护消费者的健康，增强公众对中草药的信任。

基于此，本标准拟建立人尿液中2种苯氧乙酸类除草剂（2,4-二氯苯氧乙酸、2,4,5-三氯苯氧乙酸），２种有机磷类农药代谢物（对硝基苯酚、3,5,6-三氯-2-吡啶酚）和4种拟除虫菊酯类农药代谢物（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和反式二氯乙烯基二甲基环丙烷羧酸），共8种农药及其代谢物的检测方法，并分别从试剂与材料、仪器与设备、样品采集运输与保存、样品前处理、仪器测定条件、方法学特性、质量控制和质量保证等内容方面进行方法研制。

（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，结合目前针对我国人群开展的农药原型及代谢物测定的科研文献确定。其中，美国国家健康统计中心自1999年起开展健康和营养检测调查项目（National Health and Nutrition Examination Survey，NHANES）。该项目每两年针对约2500名来自于不同种族，不同性别和不同年龄段的人群进行10种有机磷原型及代谢物分析。从目前公布的研究结果显示，相关农药及代谢物在美国人群体内的浓度水平的中位值在ppb水平。在测定指标方面，NHANES项目包括的指标除本方法设置外，还包括IMPY（二嗪农代谢物），MDA（马拉硫磷代谢物）。加拿大健康测量调查（Canadian Health Measures Survey, CHMS）项目对2700名不同年龄段人群开展农药及代谢物调查研究，涉及的检测指标包括磷酸二烷基酯（Dialkyl phosphates），TCPY，马拉硫磷二羧酸，乙酰甲胺磷、甲胺磷、3-PBA、4F-3PBA、cis-DCCA和trans-DCCA。在上述指标中，磷酸二烷基酯属非特异性标志物，且上述多数农药在我国使用量并不高，在我国人群体内研究结果表明其检出率及检出浓度均处于较低水平。因此，本方法选择的检测指标即参考了国外相关研究，也兼顾了我国实际农药应用情况及检出水平。

根据上述调查结果，本文件适用范围包括了尿液样本中2,4-二氯苯氧乙酸、2,4,5-三氯苯氧乙酸、对硝基苯酚、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和反式二氯乙烯基二甲基环丙烷羧酸8种农药原型或其代谢物的液相色谱串联质谱（LC-MS/MS）测定方法。

2.方法优化

**2.1水解酶的选择及酶解时间的确定**

尿液中的目标分析物主要以葡萄糖醛酸酯和/或硫酸酯等结合物形式存在，因此，应先对样品进行酶解。Mark等和Paramjit等采用固体酶酶解过夜的方式处理尿液样本，酶活力分别为>500 U/mL和>1000 U/mL。本课题组前期研究表明，来源相同（如全部来自罗曼蜗牛）的固体酶和液体酶，其酶解效率可能存在差异。因此，方法比较了不同液体酶添加量（10、15和20 μL）的酶解效果。结果表明，添加10 μL液体酶时（>850 U/mL），尿中各目标分析物的测定值最低；添加量15 μL液体酶时（>1275 U/mL），尿中各物质的测定值进入平台期，与添加20 μL液体酶的（>1700 U/mL）测定结果一致。因此，本方法确定液体酶添加量为15 μL。在相同酶活力条件下，比较两个不同来源（来源于罗曼蜗牛和大肠杆菌）液体酶的酶解效果。结果表明，罗曼蜗牛液体酶对PNP和2,4-D两类物质的酶解效果更高，两类物质的测定值比大肠杆菌液体酶酶解后的测定值高1倍。因此，方法选择罗曼蜗牛β-葡萄糖醛酸酶进行酶解，添加量为15 μL（酶活力>1275 U/mL）。

**2.2固相萃取优化**

2.2.1 固相萃取柱选择

研究显示，HLB柱对尿中农药及代谢物的富集，以及相关生物样本复杂基质去除具有良好效果，因此，本方法选择了HLB柱对样品进行富集与净化。鉴于冷冻后的尿液常伴随沉淀量增多的现象。我们实验室之前选用30 μm粒径填料的固相萃取柱在酶解后上样时，常发生样品堵塞固相萃取柱，导致尿液样品无法顺利过柱得问题。因此，本方法选择使用60 μm粒径的填料，进行固相萃取柱。经实验后发现，使用该粒径的固相萃取柱进行样品前处理时，样品过柱顺畅，未见堵塞固相萃取柱的情况发生。

2.2.2 上样条件

对样品进行适度酸化能增加目标分析物在HLB柱上的富集和保留。向酶解完成的尿液中加入不同体积的乙酸（0、10、20、30 µL），比较目标分析物在不同乙酸添加条件下的质谱响应。峰面积越高，表明在该条件下有更多的目标物被富集在固相萃取柱上。结果显示，随着乙酸添加量增加，8种目标分析物的定量离子峰面积均呈现不同程度的增加，其中以2,4-D的增加最为显著。当乙酸添加量为20 µL时，目标分析物峰面积达到最高值。因此，本方法向酶解完成的样品中添加20 μL乙酸以提高目标分析物的灵敏度。

2.2.3 淋洗条件

用不同体积分数（5%、10%、15%、20%、25%、30%）的甲醇水溶液淋洗固相萃取柱，以不同淋洗条件下各目标分析物的色谱峰面积大小来评估淋洗效果。结果显示，随着甲醇比例的增加，8种目标分析物的色谱峰面积均呈现增加趋势（增加幅度在10%~15%之间）。当甲醇体积分数为25%时，峰面积增加幅度最大。其原因是由于淋洗液中的甲醇比例升高导致淋洗液的极性降低，低极性溶液在反相固相萃取柱上具有更强的淋洗效果。因此有更多的干扰物被淋洗，进而降低了基质对样品测定的干扰。而当淋洗液中甲醇比例升高至30%时，此时由于淋洗强度变强，部分目标化合物可能随干扰物一同被淋洗，从而导致目标物丢失。此外，实验向25%甲醇水溶液（体积分数）中分别添加0.5%、1%和2%（体积分数）的乙酸，以考察酸性条件对淋洗效果的影响。结果表明，8种目标分析物的峰面积在不同酸性环境淋洗条件下无明显差异。因此，实验选择25%甲醇水（体积分数）溶液作为淋洗溶剂。

2.2.4 洗脱条件

向尿液中加入5 ng/mL目标分析物，以甲醇、乙腈、甲醇-乙腈（1:1，v/v）、甲醇-乙酸乙酯（1:1，v/v）、乙腈-乙酸乙酯（1:1，v/v）和丙酮作为洗脱溶剂，比较6种洗脱溶剂的回收率结果。如图2所示，以甲醇和甲醇-乙腈（1:1，v/v）作为洗脱溶剂时，8种目标分析物的回收率差异不明显，但优于其他4种洗脱溶剂。为获得最优洗脱溶剂，实验又分别对6种不同洗脱条件下各目标分析物的基质效应（Matrix effects）进行了初步评估。分别向不同洗脱溶剂处理后的样品基质和纯溶剂基质中加入5 ng/mL的目标分析物，以目标分析物在样品基质中的峰面积与相应目标分析物在纯溶剂中的峰面积比值的百分比评估基质效应。当基质效应在80%~120%之间时为低基质效应；基质效应在50%~80%或120%~150%时为中基质效应；基质效应<50%或>150%时为高基质效应。如图3所示，以甲醇为洗脱溶剂时，所有目标分析物均表现为低基质效应或中基质效应；而以甲醇-乙腈（1:1，v/v）作为洗脱剂时，PNP表现为高基质效应。因此，实验最终选择甲醇作为洗脱溶剂。

2.2.5 洗脱次数

使用2 mL甲醇分4次洗脱固相萃取柱（每次0.5 mL）。收集4次洗脱液并上机测定，以每次洗脱后各目标分析物的峰面积与各目标分析物经4次洗脱后总面积的比值百分比计算洗脱效率。结果显示，一次洗脱完成后，此时8种目标分析物的洗脱效率为90.3%~98.4%；当完成第2次洗脱后，仍有1.13%~8.88%的化合物可被洗脱，各目标分析物在完成2次洗脱后，其洗脱效率可达到99%以上。因此，实验最终选择2次洗脱（每次0.5 mL）的方式洗脱目标化合物。

**2.3 仪器方法优化**

2.3.1 质谱条件优化

将50 μg/L单标溶液注入质谱仪进行目标分析物的质谱参数优化。由于8种目标化合物的结构中均含有羟基，在ESI源下易失去H而形成[M-H]-的母离子。因此，本实验在负电离模式下确定化合物及其同位素内标的母离子信息。确定母离子后，再依次进行子离子扫描，选择丰度较高的2个特征碎片离子作为子离子，同时优化各特征离子对的碰撞电压（CE）和去簇电压（DP）。最后在MRM模式下对CAD、CUR、GS1、TEM等质谱参数进行优化，使各目标化合物的离子化效果均处于最佳状态。

**2.3.2色谱条件优化**

采用Waters Acquity UPLC BEH C18（100 mm×2.1 mm, 1.7 µm）、Waters Xbridge BEH C18（100 mm×2.1 mm, 2.5 µm）、Waters CSH C18（100 mm×2.1 mm, 1.7 µm）、Waters HSS T3（100 mm×2.1 mm, 1.7 µm）和Waters BEH Phenyl柱（100 mm×2.1 mm, 1.7 µm）对8种目标分析物进行色谱分离。结果显示，以乙腈-水为流动相时，8种目标分析物在CSH C18、HSS T3和BEH Phenyl柱上的保留效果不理想。目标分析物经3种色谱柱分离后的质谱响应显著低于BEH C18和Xbridge C18柱。除此之外，使用HSS T3和BEH Phenyl柱进行分析时，其色谱图的基线明显偏高。对比BEH C18和Xbridge C18色谱柱的分离效果，发现BEH C18柱在兼顾灵敏度的条件下实现了cis-DCCA和trans-DCCA两种同分异构体的完全分离。因此，实验选择BEH C18柱作为分析柱。

以BEH C18作为分析柱，在甲醇-水和乙腈-水两种流动相体系下优化梯度洗脱。结果显示，无论如何调节洗脱梯度，甲醇-水进行洗脱时均无法实现cis-DCCA和trans-DCCA的有效分离，两种目标物表现为重叠峰或驼峰。当以乙腈-水作为流动相时，可通过调整洗脱梯度实现两种物质的完全分离。在流动相中加入有机酸能改善带负电荷的目标分析物在色谱柱上的保留效果。因此，向流动相中加入不同体积分数的乙酸（0.05%、0.1%和0.2%）以确定最优流动相。结果显示，随着乙酸浓度增加，目标分析物的色谱峰半峰宽变窄，色谱分离度提高。然而，在改善分离效率的同时，乙酸对多种目标分析物的电离产生抑制，导致灵敏度降低。因此，综合考虑同分异构体的分离效果和方法的灵敏度，实验最终选择0.1%（体积分数）乙酸乙腈和0.1%（体积分数）乙酸水作为流动相。

3.检出限和定量限确定

检出限和定量限根据美国环保署（United States Environmental Protection Agency，USEPA）检出限测定程序第2版（EPA 821-R-16-006规范文件）计算。对于3-PBA、4F-3PBA等物质，由于其在尿液中浓度水平较低，选择测定值较低的尿液样本，用纯水稀释5倍制成空白尿液，采用实际稀释尿液基质加标形式（n=7），以测定值的3 SD和10 SD计算检出限和定量限。对于2,4-D、TCPY、PNP三种物质，由于其存在过程空白干扰，以7次过程空白的均值加3倍标准偏差为检出限，7次过程空白均值加10倍标准偏差为定量限。其余5种目标分析物，因此，还需得到上述目标分析物的空白均值（X）及空白值标准差（SD1）（n=7），并计算得到X+3 SD1和X+10 SD1。比较该值与通过3 SD和10 SD得到检出限和定量限值，分别以各自的较大者作为对应目标分析物的检出限和定量限。表3-2和表3-3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8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，8种目标分析物的方法检出限范围是0.02μg//L~0.08 μg/L，定量限为0.08μg/L~0.2 μg/L，具体数据见本编制说明验证数据分析部分。

表3-2 方法检出限及定量限（ng/mL）

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组分 | 测定值 | 平均值（ng/mL） | 标准偏差 | 检出限 | 定量限 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| PNP | 0.083 | 0.108 | 0.102 | 0.104 | 0.116 | 0.116 | 0.105 | 0.105 | 0.011 | 0.03 | 0.11 |
| 3PBA | 0.097 | 0.111 | 0.099 | 0.076 | 0.084 | 0.092 | 0.102 | 0.094 | 0.012 | 0.03 | 0.12 |
| 4F-3PBA | 0.105 | 0.112 | 0.106 | 0.084 | 0.095 | 0.095 | 0.108 | 0.101 | 0.01 | 0.03 | 0.10 |
| 24-D | 0.083 | 0.113 | 0.102 | 0.087 | 0.089 | 0.095 | 0.102 | 0.096 | 0.01 | 0.03 | 0.10 |
| 2,4,5-T | 0.096 | 0.103 | 0.108 | 0.094 | 0.091 | 0.096 | 0.112 | 0.100 | 0.008 | 0.02 | 0.08 |
| TCPY | 0.098 | 0.112 | 0.116 | 0.111 | 0.119 | 0.117 | 0.115 | 0.113 | 0.007 | 0.02 | 0.07 |
| cis-DCCA | 0.120 | 0.102 | 0.080 | 0.088 | 0.099 | 0.093 | 0.115 | 0.100 | 0.014 | 0.04 | 0.14 |
| trans-DCCA | 0.115 | 0.098 | 0.107 | 0.116 | 0.083 | 0.084 | 0.111 | 0.102 | 0.014 | 0.04 | 0.14 |

表3-3 含空白物质检出限及定量限（ng/mL）

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 组分 | 空白值 | 平均值 | 标准偏差 | 检出限 | 定量限 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| PNP | 0.0579 | 0.0433 | 0.0577 | 0.0569 | 0.0654 | 0.0622 | 0.0451 | 0.054 | 0.008 | 0.08 | 0.13 |
| 24-D | 0.022 | 0.018 | 0.012 | 0.011 | 0.016 | 0.014 | 0.017 | 0.016 | 0.007 | 0.03 | 0.09 |
| TCPY | 0.024 | 0.012 | 0.055 | 0.042 | 0.040 | 0.038 | 0.008 | 0.038 | 0.015 | 0.08 | 0.19 |

4.回收率与精密度

本方法对样品进行低浓度（2 ng/mL），中浓度（20 ng/mL）和高浓度（40 ng/mL）3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12个不同个体的实际尿液样品，每6个样品混合成一个混合尿液样品，并对上述尿液进行定值。

在同一批次中处理24个样品（尿液、低浓度，中浓度和高浓度样品各6个），获得8种目标分析物的批内精密度，相应结果见表3-4。

表3-4 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 |
| PNP | 2.94 | 低（2） | 4.76 | 4.82 | 4.81 | 5.11 | 5.13 | 4.68 | 3.9 |
| 中（20） | 21.1 | 20.4 | 20.9 | 21.2 | 24.1 | 23.6 | 7.1 |
| 高（80） | 72.9 | 69.5 | 78.4 | 76.5 | 78.1 | 80.5 | 5.3 |
| 1.59 | 低（2） | 3.60 | 3.35 | 3.50 | 3.54 | 3.82 | 3.47 | 4.4 |
| 中（20） | 20.0 | 21.9 | 19.8 | 20.5 | 22.3 | 21.6 | 5.0 |
| 高（80） | 75.5 | 76.9 | 76.2 | 83.1 | 76.2 | 78.4 | 3.6 |
| 3-PBA | 0.69 | 低（2） | 2.50 | 2.41 | 2.49 | 2.52 | 2.66 | 2.75 | 4.9 |
| 中（20） | 19.6 | 19.7 | 20.8 | 19.6 | 21.2 | 18.7 | 4.6 |
| 高（80） | 78.5 | 79.2 | 81.4 | 80.5 | 84.1 | 83.5 | 2.8 |
| 0.11 | 低（2） | 2.21 | 2.15 | 1.96 | 1.98 | 2.01 | 2.08 | 4.8 |
| 中（20） | 20.5 | 18.7 | 19.2 | 21.2 | 20.4 | 18.5 | 5.6 |
| 高（80） | 81.8 | 85.4 | 78.2 | 81.6 | 85.0 | 77.6 | 4.0 |
| 4F-3PBA | 0.08 | 低（2） | 1.77 | 1.91 | 1.96 | 2.02 | 1.82 | 1.93 | 4.8 |
| 中（20） | 19.1 | 19.2 | 19.4 | 18.5 | 17.6 | 21.2 | 6.2 |
| 高（80） | 76.0 | 79.5 | 79.5 | 87.4 | 84.8 | 89.6 | 6.4 |
| / | 低（2） | 2.17 | 1.87 | 1.95 | 1.94 | 1.87 | 2.12 | 6.5 |
| 中（20） | 20.2 | 20.1 | 19.4 | 19.0 | 21.1 | 18.7 | 4.5 |
| 高（80） | 76.0 | 79.5 | 79.8 | 77.3 | 75.0 | 79.2 | 2.6 |
| 2,4-D | 0.15 | 低（2） | 2.18 | 2.10 | 2.16 | 2.08 | 2.21 | 2.18 | 2.4 |
| 中（20） | 21.4 | 21.5 | 21.7 | 20.8 | 19.5 | 18.7 | 6.0 |
| 高（80） | 81.5 | 79.6 | 82.0 | 78.4 | 77.6 | 79.5 | 2.1 |
| 0.04 | 低（2） | 2.24 | 2.17 | 2.30 | 2.25 | 2.15 | 2.18 | 2.6 |
| 中（20） | 21.5 | 22.3 | 21.7 | 22.3 | 20.5 | 18.7 | 6.5 |
| 高（80） | 81.1 | 83.3 | 85.2 | 84.5 | 78.2 | 77.4 | 4.0 |
| 2,4,5-T | 2.83 | 低（2） | 4.59 | 4.61 | 4.69 | 4.82 | 4.72 | 4.57 | 2.0 |
| 中（20） | 22.7 | 21.4 | 21.5 | 20.8 | 22.4 | 21.7 | 3.2 |
| 高（80） | 78.5 | 71.5 | 78.3 | 77.6 | 80.5 | 81.3 | 4.4 |
| 0.23 | 低（2） | 2.17 | 2.14 | 1.98 | 1.99 | 1.92 | 2.08 | 4.8 |
| 中（20） | 19.2 | 18.3 | 18.1 | 18.2 | 19.5 | 20.1 | 4.4 |
| 高（80） | 86.8 | 90 | 87.7 | 89.1 | 85.4 | 81.5 | 3.5 |
| TCPY | 1.82 | 低（2） | 4.12 | 3.93 | 3.84 | 3.62 | 3.91 | 3.73 | 4.5 |
| 中（20） | 22.8 | 22.0 | 22.7 | 21.6 | 22.5 | 22.1 | 2.1 |
| 高（80） | 75.0 | 76.1 | 78.2 | 76.0 | 79.3 | 77.5 | 2.1 |
| 0.19 | 低（2） | 2.21 | 2.15 | 2.11 | 2.20 | 2.18 | 2.10 | 2.1 |
| 中（20） | 19.6 | 20.1 | 19.5 | 19.7 | 18.7 | 18.8 | 2.8 |
| 高（80） | 82.3 | 83.2 | 78.2 | 82.3 | 81.6 | 88.2 | 3.9 |
| cis-DCCA | 0.24 | 低（2） | 2.34 | 2.24 | 2.18 | 2.21 | 1.99 | 2.05 | 5.9 |
| 中（20） | 19.9 | 21.3 | 20.6 | 20.3 | 21.2 | 18.7 | 4.7 |
| 高（80） | 74.5 | 79.0 | 81.0 | 82.5 | 81.3 | 78.6 | 3.6 |
| 0.1 | 低（2） | 2.06 | 2.03 | 0.17 | 2.04 | 2.21 | 1.82 | 6.6 |
| 中（20） | 19.6 | 20.1 | 19.5 | 19.7 | 18.6 | 19.2 | 2.6 |
| 高（80） | 82.3 | 83.2 | 78.1 | 82.3 | 77.6 | 79.5 | 3.0 |
| trans-DCCA | 0.44 | 低（2） | 2.41 | 2.36 | 2.22 | 2.38 | 2.61 | 2.55 | 5.8 |
| 中（20） | 19.5 | 19.3 | 19.8 | 20.1 | 18.7 | 19.2 | 2.5 |
| 高（80） | 77.5 | 74.0 | 76.5 | 81.2 | 79.3 | 78.1 | 3.2 |
| 0.05 | 低（2） | 2.06 | 2.03 | 19.8 | 2.05 | 1.87 | 1.92 | 3.9 |
| 中（20） | 18.7 | 18.2 | 18.4 | 18.3 | 19.6 | 18.9 | 2.8 |
| 高（80） | 74.6 | 72.6 | 73.4 | 73.8 | 80.5 | 77.7 | 4.0 |

在一周内，分6批次处理2个样品，获得8种目标分析物的批间精密度，相应结果见表3-5。

表3-5 批间精密度试验结果

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 组分名称 | 加标浓度(ng/mL) | 测定值(ng/mL) | RSD（%） |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| PNP | 样品1 | 5.164 | 5.063 | 4.625 | 5.142 | 4.867 | 4.28 | 7.2 |
| 样品2 | 10.675 | 10.931 | 9.645 | 10.493 | 11.498 | 8.766 | 9.5 |
| 3-PBA | 样品1 | 2.456 | 2.457 | 2.384 | 2.438 | 2.28 | 2.249 | 3.9 |
| 样品2 | 9.542 | 9.794 | 9.305 | 9.214 | 9.314 | 8.888 | 3.3 |
| 4F-3PBA | 样品1 | 2.097 | 2.198 | 2.196 | 2.348 | 2.245 | 2.15 | 3.9 |
| 样品2 | 9.703 | 9.585 | 9.424 | 9.137 | 9.324 | 9.552 | 2.2 |
| 2,4-D | 样品1 | 2.637 | 2.57 | 2.84 | 2.755 | 2.708 | 2.767 | 3.6 |
| 样品2 | 11.325 | 11.329 | 11.133 | 11.292 | 10.935 | 11.952 | 3.0 |
| 2,4,5-T | 样品1 | 2.626 | 2.532 | 2.508 | 2.561 | 2.479 | 2.496 | 2.1 |
| 样品2 | 10.425 | 10.942 | 10.863 | 11.472 | 10.814 | 10.731 | 3.2 |
| TCPY | 样品1 | 2.707 | 2.843 | 2.83 | 2.801 | 2.809 | 2.594 | 3.5 |
| 样品2 | 9.737 | 10.067 | 9.709 | 9.739 | 9.73 | 9.75 | 1.4 |
| cis-DCCA | 样品1 | 2.091 | 2.216 | 2.303 | 2.095 | 2.16 | 1.821 | 7.8 |
| 样品2 | 8.858 | 8.505 | 8.293 | 8.773 | 8.987 | 7.867 | 4.8 |
| trans-DCCA | 样品1 | 2.276 | 2.329 | 2.275 | 2.314 | 2.218 | 2.231 | 1.9 |
| 样品2 | 9.161 | 9.23 | 8.757 | 9.005 | 8.886 | 8.649 | 2.5 |

取18个尿液样本，分别进行低、中、高3个浓度水平的加标回收试验。加标回收率按公式（2）计算，8种目标分析物加标回收率结果如表3-6所示。

$$加标回收率\left（\%\right）=\frac{加标后测定浓度−本底浓度}{加标浓度}×100\% （2）$$

表3-6 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 |
| PNP | 2.94 | 低（2） | 96.0 | 101.5 | 107.0 | 96.5 | 94.0 | 104.0 | 94.0~107.0 | 83.2~107.0 |
| 中（20） | 90.8 | 87.3 | 89.8 | 91.3 | 105.8 | 103.3 | 87.3~105.8 |
| 高（80） | 87.5 | 83.2 | 94.3 | 92.0 | 94.0 | 97.0 | 83.2~97.0 |
| 1.59 | 低（2） | 100.5 | 88.0 | 95.5 | 97.5 | 111.5 | 94.0 | 88.0~111.5 | 88.0~111.5 |
| 中（20） | 92.1 | 101.6 | 91.1 | 94.6 | 103.6 | 100.1 | 91.1~103.6 |
| 高（80） | 92.4 | 94.1 | 93.3 | 101.9 | 93.3 | 96.0 | 92.4~101.9 |
| 3-PBA | 0.69 | 低（2） | 90.5 | 86.0 | 90.0 | 91.5 | 98.5 | 103.0 | 86.0~103.0 | 86.0~104.3 |
| 中（20） | 94.6 | 95.1 | 100.6 | 94.6 | 102.6 | 90.1 | 90.1~102.6 |
| 高（80） | 97.3 | 98.1 | 100.9 | 99.8 | 104.3 | 103.5 | 97.3~104.3 |
| 0.11 | 低（2） | 105.0 | 102.0 | 92.5 | 93.5 | 95.0 | 98.5 | 92.5~105.0 | 92.0~106.6 |
| 中（20） | 102.0 | 93.0 | 95.5 | 105.5 | 101.5 | 92.0 | 92.0~105.5 |
| 高（80） | 102.1 | 106.6 | 97.6 | 101.9 | 106.1 | 96.9 | 96.9~106.6 |
| 4F-3PBA | 0.08 | 低（2） | 84.5 | 91.5 | 94.0 | 97.0 | 87.0 | 92.5 | 84.5~97.0 | 84.5~111.9 |
| 中（20） | 95.1 | 95.6 | 96.6 | 92.1 | 87.6 | 105.6 | 87.6~105.6 |
| 高（80） | 94.9 | 99.3 | 99.3 | 109.2 | 105.9 | 111.9 | 94.9~111.9 |
| / | 低（2） | 108.5 | 93.5 | 97.5 | 97.0 | 93.5 | 106.0 | 93.5~108.5 | 90.0~113 |
| 中（20） | 101.0 | 100.5 | 97.0 | 95.0 | 105.5 | 93.5 | 93.5~105.5 |
| 高（80） | 95.0 | 99.4 | 99.8 | 96.6 | 93.8 | 99.0 | 93.8~99.8 |
| 2,4-D | 0.15 | 低（2） | 101.5 | 97.5 | 100.5 | 96.5 | 103.0 | 101.5 | 96.5~103.0 | 92.8~107.8 |
| 中（20） | 106.3 | 106.8 | 107.8 | 103.3 | 96.8 | 92.8 | 92.8~107.8 |
| 高（80） | 101.7 | 99.3 | 102.3 | 97.8 | 96.8 | 99.2 | 96.8~102.3 |
| 0.04 | 低（2） | 110.0 | 106.5 | 113.0 | 110.5 | 105.5 | 107.0 | 105.5~113.0 | 93.3~113.0 |
| 中（20） | 107.3 | 111.3 | 108.3 | 111.3 | 102.3 | 93.3 | 93.3~111.3 |
| 高（80） | 101.3 | 104.1 | 106.5 | 105.6 | 97.7 | 96.7 | 96.7~106.5 |
| 2,4,5-T | 2.83 | 低（2） | 88.0 | 89.0 | 93.0 | 99.5 | 94.5 | 87.0 | 87.0~99.5 | 85.8~99.5 |
| 中（20） | 99.4 | 92.9 | 93.4 | 89.9 | 97.9 | 94.4 | 89.9~99.4 |
| 高（80） | 94.6 | 85.8 | 94.3 | 93.5 | 97.1 | 98.1 | 85.8~98.1 |
| 0.23 | 低（2） | 97.0 | 95.5 | 87.5 | 88.0 | 84.5 | 92.5 | 84.5~97.0 | 84.5~111.2 |
| 中（20） | 94.9 | 90.4 | 89.4 | 89.9 | 96.4 | 99.4 | 89.4~99.4 |
| 高（80） | 108.2 | 112.2 | 109.3 | 111.1 | 106.5 | 101.6 | 101.6~111.2 |
| TCPY | 1.82 | 低（2） | 115.0 | 105.5 | 101.0 | 90.0 | 104.5 | 95.5 | 90.0~115.0 | 90.0~115.0 |
| 中（20） | 104.9 | 100.9 | 104.4 | 98.9 | 103.4 | 101.4 | 98.9~104.9 |
| 高（80） | 91.5 | 92.9 | 95.5 | 92.7 | 96.9 | 94.6 | 91.5~96.9 |
| 0.19 | 低（2） | 101.0 | 98.0 | 96.0 | 100.5 | 99.5 | 95.5 | 95.5~101.0 | 92.6~110.0 |
| 中（20） | 97.1 | 99.6 | 96.6 | 97.6 | 92.6 | 93.1 | 92.6~99.6 |
| 高（80） | 102.6 | 103.8 | 97.5 | 102.6 | 101.8 | 110.0 | 97.5~110.0 |
| cis-DCCA | 0.24 | 低（2） | 105.0 | 100.0 | 97.0 | 98.5 | 87.5 | 90.5 | 87.5~105.0 | 87.5~105.3 |
| 中（20） | 98.3 | 105.3 | 101.8 | 100.3 | 104.8 | 92.3 | 92.3~105.3 |
| 高（80） | 92.8 | 98.5 | 101.0 | 102.8 | 101.3 | 98.0 | 92.8~102.8 |
| 0.1 | 低（2） | 98.0 | 96.5 | 3.5 | 97.0 | 105.5 | 86.0 | 86.0~105.5 | 86.0~105.5 |
| 中（20） | 97.5 | 100.0 | 97.0 | 98.0 | 92.5 | 95.5 | 92.5~100.0 |
| 高（80） | 102.8 | 103.9 | 97.5 | 102.8 | 96.9 | 99.3 | 96.9~103.9 |
| trans-DCCA | 0.44 | 低（2） | 98.5 | 96.0 | 89.0 | 97.0 | 108.5 | 105.5 | 89.0~108.5 | 89.0~108.5 |
| 中（20） | 95.3 | 94.3 | 96.8 | 98.3 | 91.3 | 93.8 | 91.3~98.3 |
| 高（80） | 96.3 | 92.0 | 95.1 | 101.0 | 98.6 | 97.1 | 92.0~101.0 |
| 0.05 | 低（2） | 100.5 | 99.0 | 987.5 | 100.0 | 91.0 | 93.5 | 91.0~100.5 | 90.7~100.6 |
| 中（20） | 93.3 | 90.8 | 91.8 | 91.3 | 97.8 | 94.3 | 90.8~97.8 |
| 高（80） | 93.2 | 90.7 | 91.7 | 92.2 | 100.6 | 97.1 | 90.7~100.6 |

5.样品稳定性

**5.1 溶液稳定性**

本方法不涉及所配溶液的稳定性问题。但乙酸铵溶液长时间存放可能会出现空白干扰，因此，在配制溶液时不可一次性配制过多，以100-200 mL为宜。

**5.2 样品稳定性**

本试验将2个浓度的尿液样本放置于-70℃环境下保存1年，前四个月每个月测定1次，后6个月，每2个月测定一次，评估样品稳定性。结果如表3-7所示，相应结果表明尿液样本可在-70℃下稳定保存至少1年天。

表3-7 样品稳定性结果（ng/mL）

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | 0月 | 1月 | 2月 | 3月 | 4月 | 6月 | 8月 | 10月 | 12月 |
| PNP | 样品1 | 5.11 | 4.88 | 4.57 | 4.89 | 6.17 | 5.39 | 4.88 | 4.93 | 4.94 |
| 样品2 | 10.8 | 10.1 | 10.1 | 9.4 | 10.9 | 11.2 | 10.2 | 11.3 | 9.9 |
| 3-PBA | 样品1 | 2.46 | 2.41 | 2.26 | 2.38 | 2.29 | 2.38 | 2.39 | 2.33 | 2.45 |
| 样品2 | 9.67 | 9.26 | 9.10 | 9.42 | 9.58 | 8.85 | 9.63 | 9.22 | 9.58 |
| 4F-3PBA | 样品1 | 2.15 | 2.27 | 2.20 | 2.29 | 2.07 | 2.09 | 2.08 | 2.19 | 2.15 |
| 样品2 | 9.64 | 9.28 | 9.44 | 9.67 | 9.14 | 8.85 | 9.58 | 10.2 | 9.92 |
| 2,4-D | 样品1 | 2.60 | 2.80 | 2.74 | 2.83 | 2.20 | 2.75 | 2.76 | 2.60 | 2.50 |
| 样品2 | 11.3 | 11.2 | 11.4 | 11.6 | 9.4 | 10.3 | 10.7 | 11.8 | 11.2 |
| 2,4,5-T | 样品1 | 2.58 | 2.53 | 2.49 | 2.64 | 2.39 | 2.46 | 2.53 | 2.64 | 2.55 |
| 样品2 | 10.7 | 11.2 | 10.8 | 11.0 | 9.7 | 9.6 | 10.5 | 11.3 | 11.0 |
| TCPY | 样品1 | 2.78 | 2.82 | 2.70 | 2.67 | 2.67 | 2.79 | 2.74 | 2.91 | 2.83 |
| 样品2 | 9.90 | 9.72 | 9.74 | 9.39 | 10.0 | 10.3 | 10.4 | 9.8 | 10.2 |
| cis-DCCA | 样品1 | 2.15 | 2.20 | 1.99 | 2.06 | 1.94 | 2.25 | 2.30 | 2.23 | 2.21 |
| 样品2 | 8.68 | 8.56 | 8.43 | 8.85 | 8.73 | 9.23 | 9.34 | 8.99 | 8.49 |
| trans-DCCA | 样品1 | 2.30 | 2.29 | 2.22 | 2.33 | 2.04 | 2.22 | 2.21 | 2.30 | 2.37 |
| 样品2 | 9.20 | 8.88 | 8.77 | 9.06 | 9.18 | 9.26 | 8.90 | 9.01 | 9.25 |

**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，我们将样品处理完毕后，立刻进样分析。分析完成后，继续将该样品放在进样室中保存48h 8℃后再重复进样一次，记录两次测定的峰面积，考察其是否会在进样过程中降解。结果见表3-8，表明样品进样稳定，不会出现样品降解情况。

表3-8 48h上样周期下各目标分析物的稳定性

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 0 h | 48 h |
| PNP | 1.40E+07 | 1.32E+07 |
| 3-PBA | 9.53E+06 | 8.91E+06 |
| 4F-3PBA | 1.13E+07 | 1.02 E+07 |
| 2,4-D | 4.38 E+06 | 4.28 E+06 |
| 2,4,5-T | 4.81 E+06 | 4.86 E+06 |
| TCPY | 9.71 E+05 | 9.83 E+05 |
| Cis-DCCA | 2.64 E+05 | 2.45 E+05 |
| Trans-DCCA | 7.80 E+05 | 7.49 E+05 |

**5.5 样品反复冻融时的稳定性**

将样品保存在-20摄氏度下，反复冻融3次，测定结果如表3-10所示。结果显示，样品经反复冻融3次后，8种目标分析物的浓度变化不明显。

表3-10 -20℃下进行三次冻融实验的稳定性结果（ng/mL）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 第一次 | 第二次 | 第三次 |
| PNP | 5.50 | 5.34 | 5.60 |
| 3-PBA | 2.34 | 2.23 | 2.45 |
| 4F-3PBA | 2.12 | 2.11 | 2.26 |
| 2,4-D | 11.7 | 11.7 | 12.4 |
| 2,4,5-T | 9.35 | 9.80 | 9.71 |
| TCPY | 10.7 | 10.6 | 10.4 |
| Cis-DCCA | 2.02 | 2.41 | 2.15 |
| Trans-DCCA | 2.50 | 2.56 | 2.79 |

6.基质效应评价

**6.1提取液加标评估基质效应**

取6个不用来源的尿液样品，按前处理步骤处理样品，收集洗脱液。将洗脱液分为两份。其中一份取1 mL进样，记录各目标化合物峰面积A1。从另一份中取1mL洗脱液，加入20 ng混合标准，进样后记录各目标化合物峰面积A2。取1 mL甲醇，加入20 ng 混合标准，进样后记录各化合物峰面积A3。按公式（2）计算各目标化合物基质效应ME，结果见表3-11。相关结果表明，PNP，3-PBA、4F-3PBA、2,4-D表现出较强基质效应，剩余4类物质基质效应处于中等或弱基质效应。

$ ME=\frac{A\_{2}−A\_{1}}{A\_{3}}×100\%$ （3）

表3-11 基质提取液加标结果

|  |  |
| --- | --- |
| 化合物 | 基质提取液加标（ME%） |
| 样1 | 样2 | 样3 | 样4 | 样5 | 样6 |
| PNP | 60.7 | 53.9 | 71.8 | 52.7 | 58.6 | 51.5 |
| 3-PBA | 73.1 | 70.4 | 83.4 | 61.7 | 72.5 | 69.8 |
| 4F-3PBA | 78.5 | 70.6 | 86.5 | 65.6 | 75.3 | 68.2 |
| 2,4-D | 66.0 | 68.0 | 87.4 | 65.1 | 72.5 | 71.6 |
| 2,4,5-T | 86.1 | 91.4 | 99.6 | 61.4 | 78.4 | 81.5 |
| TCPY | 113.9 | 83.4 | 119 | 95.0 | 103 | 79.2 |
| Cis-DCCA | 86.8 | 90.1 | 87.9 | 76.9 | 78.2 | 81.3 |
| Trans-DCCA | 78.7 | 75.5 | 82.7 | 70.6 | 79.2 | 77.6 |

**6.2加入内标后的基质效应的抵消效应**

取6个不用来源的尿液样品，按前处理步骤处理样品后收集洗脱液。将洗脱液分为两份。其中一份进样，记录各目标化合物峰面积A1。从另一份中取1 mL洗脱液，加入20 ng标准，加入10 ng内标，进样分析后记录峰面积A2和内标峰面积AIS1。取1 mL甲醇，加入20 ng 标准和10 ng内标，进样分析后记录峰面积A3和AIS2。按公式（4）计算基质效应ME。

$ ME=\frac{\left(A\_{2}−A\_{1}\right)×AIS2}{A\_{3}×AIS1}×100\%$ （4）

表3-13 基质提取液加标结果（内标校正）

|  |  |
| --- | --- |
|  | 基质提取液加标（ME%） |
|  | 样1 | 样2 | 样3 | 样4 | 样5 | 样6 |
| PNP | 97.8 | 96.2 | 95.7 | 101.8 | 98.5 | 102 |
| 3-PBA | 94.1 | 92.7 | 98.1 | 91.4 | 92.6 | 92.8 |
| 4F-3PBA | 97.4 | 95.5 | 91.8 | 101.4 | 101.2 | 98.7 |
| 2,4-D | 95.1 | 96.2 | 92.9 | 101.3 | 94.2 | 94.9 |
| 2,4,5-T | 97.5 | 101 | 102 | 97.2 | 101 | 95.2 |
| TCPY | 98.6 | 101.4 | 100 | 98.2 | 97.6 | 94.8 |
| Cis-DCCA | 95.5 | 101 | 96.8 | 97.6 | 99.2 | 96.7 |
| Trans-DCCA | 96.7 | 98.8 | 102 | 96.7 | 98.5 | 93.9 |

（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，Agilent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），由江苏省疾病预防控制中心（实验室编号2），湖北省疾病预防控制中心（实验室编号3）和深圳市疾控中心（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3-15。

表3-15 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 |
| 中国科学院生态环境研究中心 | 王亚韡 | 48 | 研究员 | 环境化学 | 19 |
| 中国科学院生态环境研究中心 | 黎娟 | 40 | 副研究员 | 环境化学 | 11 |
| 广州市疾病预防控制中心 | 谭磊 | 38 | 副部长/副主任技师 | 卫生检验 | 12 |
| 广州市疾病预防控制中心 | 邓芬芳 | 35 | 科员/副主任技师 | 卫生检验 | 10 |
| 广州市疾病预防控制中心 | 黄家玲 | 27 | 科员/无 | 卫生检验 | 1 |
| 武汉市疾病预防控制中心 | 万延建 | 42 | 副主任医师 | 卫生检验 | 15 |
| 武汉市疾病预防控制中心 | 孙言凤 | 39 | 副主任技师 | 卫生检验 | 17 |

**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3-16。

表3-16 参与验证所用仪器设备表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 单位 | 仪器名称 | 品牌规格型号 |
| 中国科学院生态环境研究中心 | 超高效液相色谱串联质谱仪 | LC-AD30液相色谱岛津 8060质谱 |
| 广州市疾病预防控制中心 | 超高效液相色谱串联质谱仪 | Water I class液相色谱AB SCIEX 6500 质谱 |
| 武汉市疾病预防控制中心 | 超高效液相色谱串联质谱仪 | ExionLC 液相色谱AB SCIEX 6500 质谱 |

**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4-17~表3-28。

表3-17 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－PNP

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 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 | 0.1-100 | 0.9996 | 0.08 | 0.2 |
| 2 | 0.065-100 | 0.9997 | 0.065 | 0.106 |
| 3 | 0.10-100 | 0.9991 | 0.03 | 0.1 |
| 4 | 0.2-100 | 0.9991 | 0.1 | 0.2 |

表3-18 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－3-PBA

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 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 | 0.1-100 | 0.9993 | 0.03 | 0.1 |
| 2 | 0.018-100 | 0.9998 | 0.018 | 0.059 |
| 3 | 0.10-100 | 0.9998 | 0.015 | 0.05 |
| 4 | 0.05-100 | 0.9990 | 0.02 | 0.05 |

表3-19 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－4F-3PBA

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 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 | 0.1-100 | 0.9998 | 0.03 | 0.1 |
| 2 | 0.007-100 | 0.9995 | 0.007 | 0.024 |
| 3 | 0.10-100 | 0.9998 | 0.01 | 0.03 |
| 4 | 0.05-100 | 0.9993 | 0.02 | 0.05 |

表3-20 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－2,4-D

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 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 | 0.1-100 | 0.9994 | 0.03 | 0.1 |
| 2 | 0.015-100 | 0.9998 | 0.015 | 0.051 |
| 3 | 0.10-100 | 0.9998 | 0.015 | 0.05 |
| 4 | 0.05-100 | 0.9991 | 0.02 | 0.05 |

表3-21 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－2,4,5-T

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 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 | 0.1-100 | 0.9998 | 0.03 | 0.1 |
| 2 | 0.011-100 | 0.9993 | 0.011 | 0.037 |
| 3 | 0.10-100 | 0.9998 | 0.01 | 0.03 |
| 4 | 0.05-100 | 0.9993 | 0.02 | 0.05 |

表3-22 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－TCPY

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 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 | 0.1-100 | 0.9993 | 0.05 | 0.2 |
| 2 | 0.052-100 | 0.9996 | 0.052 | 0.173 |
| 3 | 0.10-100 | 0.9999 | 0.025 | 0.09 |
| 4 | 0.05-100 | 0.9988 | 0.02 | 0.05 |

表3-23 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－cis-DCCA

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 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 | 0.10-100 | 0.9995 | 0.06 | 0.2 |
| 2 | 0.042-100 | 0.9992 | 0.042 | 0.140 |
| 3 | 0.10-100 | 0.9991 | 0.03 | 0.10 |
| 4 | 0.10-100 | 0.9989 | 0.05 | 0.10 |

表3-24 线性范围、相关系数、方法检出限和定量限－trans-DCCA

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 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 | 0.1-100 | 0.9994 | 0.03 | 0.1 |
| 2 | 0.033-100 | 0.9998 | 0.033 | 0.109 |
| 3 | 0.10-100 | 0.9991 | 0.015 | 0.05 |
| 4 | 0.05-100 | 0.9990 | 0.02 | 0.05 |

**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3-40。

表3-29 精密度测定结果（n=6）－PNP

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | 中浓度 | 高浓度 |
| 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） |
| 1 | 3.547 | 0.158 | 4.4 | 21.017 | 1.053 | 5.0 | 77.717 | 2.815 | 3.6 |
| 2 | 0.098 | 0.008 | 7.7 | 8.805 | 0.538 | 6.1 | 17.483 | 1.065 | 6.1 |
| 3 | 0.265 | 0.01 | 4.0 | 2.592 | 0.152 | 5.9 | 25.367 | 0.739 | 2.9 |
| 4 | 2.200 | 0.063 | 2.9 | 3.617 | 0.075 | 2.1 | 16.667 | 0.516 | 3.1 |

表3-30 精密度测定结果（n=6）－3-PBA

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | 中浓度 | 高浓度 |
| 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） |
| 1 | 2.065 | 0.100 | 4.8 | 19.750 | 1.100 | 5.6 | 81.600 | 3.274 | 4.0 |
| 2 | 0.053 | 0.005 | 9.7 | 9.013 | 0.332 | 3.7 | 18.35 | 0.485 | 2.6 |
| 3 | 0.222 | 0.008 | 3.4 | 2.557 | 0.100 | 3.9 | 25.700 | 0.632 | 2.5 |
| 4 | 0.833 | 0.021 | 2.5 | 2.567 | 0.082 | 3.2 | 14.667 | 0.516 | 3.5 |

表3-31 精密度测定结果（n=6）－4F-3PBA

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | 中浓度 | 高浓度 |
| 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） |
| 1 | 1.987 | 0.128 | 6.5 | 19.750 | 0.887 | 4.5 | 77.800 | 2.009 | 2.6 |
| 2 | 0.053 | 0.005 | 9.7 | 9.95 | 0.404 | 4.1 | 20.50 | 0.469 | 2.3 |
| 3 | 0.100 | 0.006 | 6.3 | 2.430 | 0.170 | 7.0 | 24.767 | 1.069 | 4.3 |
| 4 | 0.202 | 0.008 | 3.7 | 1.967 | 0.052 | 2.6 | 15.500 | 0.548 | 3.5 |

表3-32 精密度测定结果（n=6）－2,4-D

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | 中浓度 | 高浓度 |
| 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） |
| 1 | 2.215 | 0.058 | 2.6 | 21.167 | 1.378 | 6.5 | 81.617 | 3.277 | 4.0 |
| 2 | 0.053 | 0.005 | 9.7 | 9.577 | 0.302 | 3.2 | 19.417 | 0.402 | 2.1 |
| 3 | 0.217 | 0.010 | 4.8 | 2.525 | 0.081 | 3.2 | 25.000 | 0.636 | 2.5 |
| 4 | 0.453 | 0.008 | 1.8 | 2.267 | 0.082 | 3.6 | 15.667 | 0.516 | 3.3 |

表3-33 精密度测定结果（n=6）－2,4,5-T

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | 中浓度 | 高浓度 |
| 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） |
| 1 | 2.047 | 0.099 | 4.8 | 18.900 | 0.822 | 4.4 | 86.750 | 3.045 | 3.5 |
| 2 | 0.055 | 0.005 | 10 | 9.183 | 0.131 | 1.4 | 18.467 | 0.280 | 1.5 |
| 3 | 0.098 | 0.004 | 4.2 | 2.487 | 0.122 | 4.9 | 26.100 | 0.576 | 2.2 |
| 4 | 0.198 | 0.008 | 3.8 | 2.033 | 0.052 | 2.5 | 15.833 | 0.408 | 2.6 |

表3-34 精密度测定结果（n=6）－TCPY

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | 中浓度 | 高浓度 |
| 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） |
| 1 | 2.158 | 0.046 | 2.1 | 19.400 | 0.544 | 2.8 | 82.633 | 3.233 | 3.9 |
| 2 | 0.290 | 0.018 | 6.2 | 8.898 | 0.070 | 0.8 | 18.467 | 0.512 | 2.8 |
| 3 | 0.212 | 0.008 | 3.6 | 2.517 | 0.147 | 5.8 | 25.500 | 0.573 | 2.2 |
| 4 | 0.708 | 0.018 | 2.6 | 2.417 | 0.075 | 3.1 | 15.667 | 0.516 | 3.3 |

表3-35 精密度测定结果（n=6）－cis-DCCA

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | 中浓度 | 高浓度 |
| 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） |
| 1 | 2.055 | 0.137 | 6.6 | 19.450 | 0.509 | 2.6 | 80.500 | 2.406 | 3.0 |
| 2 | 0.100 | 0.014 | 14.1 | 9.892 | 0.247 | 2.5 | 20.217 | 0.697 | 3.4 |
| 3 | 0.098 | 0.008 | 7.7 | 2.468 | 0.111 | 4.5 | 24.917 | 0.902 | 3.6 |
| 4 | 0.480 | 0.024 | 4.9 | 2.183 | 0.098 | 4.5 | 15.500 | 0.548 | 3.5 |

表3-36 精密度测定结果（n=6）－trans-DCCA

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号 | 低浓度 | 中浓度 | 高浓度 |
| 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） | 平均值（μg/L） | 标准差 | RSD（%） |
| 1 | 1.985 | 0.077 | 3.9 | 18.683 | 0.519 | 2.8 | 75.433 | 3.044 | 4.0 |
| 2 | 0.105 | 0.01 | 10 | 8.872 | 0.297 | 3.3 | 17.950 | 1.498 | 8.3 |
| 3 | 0.232 | 0.010 | 4.2 | 2.448 | 0.054 | 2.2 | 25.250 | 0.706 | 2.8 |
| 4 | 0.715 | 0.021 | 2.9 | 2.417 | 0.075 | 3.1 | 15.833 | 0.408 | 2.6 |

**2.5 方法的准确度试验**

验证实验室的准确度结果见表3-53~表4-64。

表3-53 加标回收测定结果－PNP

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围 | 中浓度回收率范围 | 高浓度回收率范围 |
| 1 | 88.0~111.5 | 87.3~105.8 | 83.2~101.9 |
| 2 | 92.0~107.8 | 80.8~94.6 | 81.0~96.0 |
| 3 | 84.5~109 | 89.8~104 | 98.2~106 |
| 4 | 80~120 | 95~102 | 99~106 |

表3-54 加标回收测定结果－3PBA

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围 | 中浓度回收率范围 | 高浓度回收率范围 |
| 1 | 86~105 | 90.1~105.5 | 96.9~106.6 |
| 2 | 95.6~112 | 86.7~94.4 | 88.3~94.5 |
| 3 | 83.0~101 | 92.0~104 | 99.2~106 |
| 4 | 90~110 | 89~96 | 97~104 |

表3-55 加标回收测定结果－4F-3PBA

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围 | 中浓度回收率范围 | 高浓度回收率范围 |
| 1 | 84.5~108.5 | 87.6~105.6 | 93.5~111.9 |
| 2 | 101.6~115.6 | 93.4~103.3 | 98.8~105.6 |
| 3 | 91.0~107 | 90.2~109 | 90.2~109 |
| 4 | 95~105 | 100~107 | 91~100 |

表3-56 加标回收测定结果－2,4-D

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围 | 中浓度回收率范围 | 高浓度回收率范围 |
| 1 | 96.5~113.0 | 92.8~111.3 | 96.7~106.5 |
| 2 | 101.2~119.6 | 91.7~100.8 | 94.9~98.9 |
| 3 | 92.5~111 | 92.1~100 | 95.2~103 |
| 4 | 100~110 | 98~105 | 98~102 |

表3-57 加标回收测定结果－2,4,5-T

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围 | 中浓度回收率范围 | 高浓度回收率范围 |
| 1 | 84.5~99.5 | 89.4~99.4 | 85.8~111.2 |
| 2 | 105.2~114.0 | 90.6~93.8 | 90.0~94.0 |
| 3 | 93.5~105 | 92.7~107 | 101~108 |
| 4 | 95~105 | 100~107 | 95~105 |

表3-58 加标回收测定结果－TCPY

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围 | 中浓度回收率范围 | 高浓度回收率范围 |
| 1 | 90.0~115 | 92.6~104.9 | 91.5~110.0 |
| 2 | 88.1~104 | 88.2~90.1 | 88.9~96.2 |
| 3 | 89.8~110 | 89.3~103 | 98.6~104 |
| 4 | 85~110 | 97~103 | 88~101 |

表3-59 加标回收测定结果－cis-DCCA

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围 | 中浓度回收率范围 | 高浓度回收率范围 |
| 1 | 86.0~105.5 | 92.3~105.3 | 92.8~103.9 |
| 2 | 82.0~120.0 | 96.6~102.8 | 96.4~106.0 |
| 3 | 91.3~107 | 91.3~104 | 95.3~104 |
| 4 | 85~115 | 98~105 | 92~98 |

表3-60 加标回收测定结果－trans-DCCA

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 实验室编号\* | 低浓度回收率范围 | 中浓度回收率范围 | 高浓度回收率范围 |
| 1 | 89.0~108.5 | 90.8~98.3 | 90.7~101 |
| 2 | 88.6~118.8 | 84.8~92.2 | 82.3~104.2 |
| 3 | 91.7~110 | 88.9~94.7 | 97.0~104 |
| 4 | 90~115 | 97~103 | 101~112 |

**2.6 小结**

建立了人尿中8种农药及代谢物的液相色谱串联质谱分析方法。

PNP在 0.1~100 ng/mL范围内线性关系良好，相关系数大于0.9993。在0.5~80 ng/mL加标范围内的回收率为80.0~120%，精密度2.9%~7.7%。

3-PBA在0.1~100 ng/mL范围内线性关系良好，相关系数大于0.9993。在0.5~80 ng/mL加标范围内的回收率为83.0~112%，精密度2.5%~9.7%。

4F-3PBA在0.1~100 ng/mL范围内线性关系良好，相关系数大于0.9993。在0.5~80 ng/mL加标范围内的回收率为84.5~116%，精密度2.3%~9.7%。

2,4-D在0.1~100 ng/mL范围内线性关系良好，相关系数大于0.9993。在0.5~80 ng/mL加标范围内的回收率为91.7%~120%，精密度1.8%~9.7%。

2,4,5-T在0.1~100 ng/mL范围内线性关系良好，相关系数大于0.9993。在0.5~80 ng/mL加标范围内的回收率为84.5~114%，精密度1.5%~10%。

TCPY在0.1~100 ng/mL范围内线性关系良好，相关系数大于0.9993。在0.5~80 ng/mL加标范围内的回收率为85.0%~115%，精密度0.8%~6.2%。

cis-DCCA在0.1~100 ng/mL范围内线性关系良好，相关系数大于0.9991。在0.5~80 ng/mL加标范围内的回收率为82.0%~120%，精密度2.5%~13%。

trans-DCCA在0.1~100 ng/mL范围内线性关系良好，相关系数大于0.9991。在0.5~80 ng/mL加标范围内的回收率为82.3%~119%，精密度2.2%~10%。

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，国内尚未制定尿中农药原型及代谢物分析测定的标准方法，可供比对的方法为美国疾病预防控制中心建立的尿中农药原型及代谢物的自动固相萃取高效液相色谱串联质谱法。

美国在2013年公布的分析方法SOP中，采用了自动固相萃取法方法建立了人尿中10种农药及代谢物分析方法，方法检出限在0.1~0.6 ng/mL，线性0.6-1000 ng/mL，精密度为3.7%-15%。

虽然，美国CDC已经形成了较为完善的分析测试方法体系。但上述方法体系在实际应用时仍存在一定的问题。首先，该方法体系主要是基于全自动固相萃取进行的前处理。但由于全自动固相萃取仪器价格较贵，在我国的普及率并不高，因此适用性不好。其次，美国CDC建立的方法中使用了丙酮，而丙酮在我国属于管制品，购买、储存和使用均受限。

基于以上，本标准与美国CDC标准相比，具有统一水平的灵敏度和精密度。具有操作简单，节省时间的特点，可以进行推广使用。

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。