

广东省分析测试协会团体标准  
《血清中米酵菌酸的测定 超高效液相色谱  
串联质谱法（征求意见稿）》  
编制说明

《血清中米酵菌酸的测定 超高效液相色谱串联质谱法》编制组

2024年10月

## 目录

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 目录.....                   | 2  |
| 1 项目背景.....               | 4  |
| 1.1 本标准制定的目的与意义.....      | 4  |
| 1.2 检测方法研究.....           | 4  |
| 1.3 现行的米酵菌酸检测标准方法.....    | 5  |
| 2 标准起草工作简况.....           | 5  |
| 2.1 任务来源.....             | 5  |
| 2.2 主要工作过程.....           | 5  |
| 2.3 主要参加单位和工作组成员.....     | 6  |
| 3 标准编制原则和确定标准主要内容的论据..... | 7  |
| 3.1 标准的编制原则.....          | 7  |
| 3.2 确定标准主要内容的论据.....      | 7  |
| 4 方法研究报告.....             | 8  |
| 4.1 方法研究目标.....           | 8  |
| 4.2 方法原理.....             | 8  |
| 4.3 试剂与材料.....            | 8  |
| 4.4 试样的采集、保存和运输.....      | 10 |
| 4.5 分析步骤.....             | 10 |
| 4.6 结果计算和表述.....          | 12 |
| 4.7 方法的灵敏度、精密度和准确度.....   | 13 |
| 5 方法验证.....               | 14 |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 5.1 方法验证方案 .....                | 14 |
| 5.1.1 方法验证单位 .....              | 14 |
| 5.1.2 测试要求 .....                | 14 |
| 5.1.3 试样的制备及分析 .....            | 15 |
| 5.2 方法验证过程 .....                | 15 |
| 5.3 方法验证结果 .....                | 15 |
| 5.3.1 线性范围和相关系数 .....           | 15 |
| 5.3.2 检出限和定量限 .....             | 16 |
| 5.3.3 准确度和精密度 .....             | 16 |
| 5.3.4 实际样品测定结果 .....            | 17 |
| 6 与现行法律、法规、政策及相关标准协调性 .....     | 18 |
| 7 重大意见分歧的处理依据和结果 .....          | 18 |
| 8 预期的社会效益及贯彻实施标准的要求、措施等建议 ..... | 18 |
| 8.1 预期的社会效益 .....               | 18 |
| 8.2 贯彻实施标准的要求和措施建议 .....        | 18 |
| 9 附件材料（方法验证报告） .....            | 18 |
| 10 其他应当说明的事项 .....              | 19 |
| 附录 A .....                      | 20 |

# 1 项目背景

## 1.1 本标准制定的目的与意义

米酵菌酸（Bongkrekic Acid, BA）是一种对人和动物均有强烈毒性作用的细菌毒素，是带有特殊分支结构的高度不饱和三羧基脂肪酸，CAS 号：11076-19-0，分子式： $C_{28}H_{38}O_7$ ，分子量：486.61，易溶于氯仿、甲醇、乙醚、石油醚等有机溶剂及碱性水溶液中。其中毒症状不典型、误诊率高，无特效疗法、中毒死亡率高，由此引发的食物中毒事件在我国仍时有发生，给人民群众的生命财产造成巨大损失，在社会上产生很大不良影响。编制使用超高效液相色谱串联质谱法测定血清中米酵菌酸的团体标准对中毒事件的鉴定、中毒病人的及时诊断与救治都具有重要意义。

## 1.2 检测方法研究

目前，米酵菌酸的检测研究主要聚焦在食品中，较为主流的提取净化和浓缩前处理方法有液液萃取法、固相萃取法、QuEChERS 法等，检测方法主要有薄层色谱法、紫外分光光度法、液相色谱法、液相色谱串联质谱法、超高效液相色谱—四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法等。血液和尿液等生物材料中米酵菌酸的检测，在前处理过程中，尿液经离心后取上清液或正己烷萃取后可直接进样检测，而血液需先进行蛋白变性沉降去除，后续检测与食品基质中检测无异，方法灵敏度均较高，适用于中毒事件患者的相应检测。然而，我们在实际

工作中，病例的尿液中少有检出米酵菌酸。也有研究发现，米酵菌酸中毒病人尿中米酵菌酸浓度仅为血中米酵菌酸浓度的 1.56%，提示米酵菌酸极少通过尿液以原型排泄，应急检测中尿液不是理想的样本。

### 1.3 现行的米酵菌酸检测标准方法

1) 国家标准《GB5009.189-2016 食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定》，适用于银耳及其制品、酵米面及其制品等食品中米酵菌酸的测定。

2) 团体标准《T/SATA 042-2023 鲜湿米粉中米酵菌酸的测定液相色谱-串联质谱法》，适用于鲜湿米粉中米酵菌酸的测定。

经查询 ISO、IEC、DIN、AFNOR、AENOR、GOSTR、ANSI 等多个国内外标准组织、机构，暂未发现血液、尿液等生物样本中，检测米酵菌酸的相关标准。

## 2 标准起草工作简况

### 2.1 任务来源

本项目由广东省分析测试协会立项，项目名称：《血清中米酵菌酸的测定 超高效液相色谱串联质谱法》（立项编号：GAIA/JH20230202）。

### 2.2 主要工作过程

标准编制项目于 2023 年 12 月获得立项，2023 年 12 月开始征集遴选参编单位，2024 年 2 月成立标准起草工作组。3 月工作组对当前米酵

菌酸的研究现状进行全面调研，同时广泛搜集和检索了国内外相关资料，并进行了大量的研究分析、资料查证工作。5月由广州市疾病预防控制中心对标准的测试方法进行方法学研究，优化实验条件，最终确定了测试方法。6月所有参编单位对标准方法进行方法验证，经验证，标准方法快速，简便，稳定性、重复性、回收率均表现良好。7月经编制小组相关单位专家研讨后，对标准草案初稿进行了认真的修改，于2024年8月形成标准征求意见稿，报广东省分析测试协会秘书处。

### 2.3 主要参加单位和工作组成员

主要起草单位：广州市疾病预防控制中心

协作单位：深圳市疾病预防控制中心、珠海市疾病预防控制中心、广州市越秀区疾病预防控制中心、广州市番禺区疾病预防控制中心。

主要起草人：朱惠扬、卢祝靛子、袁俊、凌莉、马浩嘉、李琼霞、韩洁君、张宏峰、黎晓欣、林泽安、白志军、姜杰。

工作分工：朱惠扬任工作组组长主持全面协调工作；袁俊、白志军负责标准的工作指导，标准规范化把关等；朱惠扬、卢祝靛子负责本标准的起草及编写；朱惠扬、卢祝靛子、张宏峰负责对国内外相关检测方法及技术标准的现状与发展情况进行全面调研，开展实验方法学研究；凌莉、马浩嘉、李琼霞、韩洁君、黎晓欣、林泽安、姜杰负责资料查证和方法验证工作。

### 3 标准编制原则和确定标准主要内容的论据

#### 3.1 标准的编制原则

本标准主要按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分:标准的结构和编写规则》、GB/T8170《数值修约规则与极限数值的表示和判定》进行编写。本标准的制定主要遵循以下原则:

(1)方法的检出限和测定范围满足食物中毒等突发公共卫生事件应急检测要求;

(2)建立标准分析方法准确度高、精密度好,满足各项方法特性指标要求;

(3)建立的标准分析方法具有科学性、先进性和可操作性,易于推广使用;

(4)标准内容符合国家法律、法规的有关要求,未与已有标准冲突。

#### 3.2 确定标准主要内容的论据

按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第1部分:标准的结构和编写规则》、GB/T 8170《数值修约规则与极限数值的表示和判定》的有关要求,确定了本标准的主要内容包括以下十个部分:范围、规范性引用文件、原理、试剂与材料、仪器和设备、试样的制备与保存、分析步骤、结果计算和表示、方法灵敏度、准确度和精密度。

## 4 方法研究报告

### 4.1 方法研究目标

建立超高效液相色谱串联质谱检测血清中米酵菌酸浓度的方法，确定方法的检出限、定量限、准确度、精密度等参数，并开展方法验证，确定方法的可行性和适用性。

### 4.2 方法原理

样品用 0.1%氨水甲醇-乙腈溶液（80:20，v/v）提取，采用液相色谱-质谱法定性定量，以保留时间、质谱特征碎片离子峰和相对丰度比作为定性判断依据，以峰面积为定量依据，采用外标法进行定量分析。

### 4.3 试剂与材料

#### （1）试剂与材料

- 1) 乙腈（CH<sub>3</sub>CN）：色谱纯。
- 2) 甲醇（CH<sub>4</sub>O）：色谱纯。
- 3) 甲酸（CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）：色谱纯。
- 4) 氨水（NH<sub>4</sub>OH）：色谱纯。

#### （2）试剂配制

- 1) 0.1% 氨水甲醇-乙腈溶液（80:20，v/v）：取 20 mL 乙腈，加入 0.1 mL 氨水，加甲醇定容至 100 mL，摇匀。
- 2) 0.05% 甲酸水溶液：取 5 mL 甲酸，用水定容至 1000 mL，摇匀。

### (3) 标准溶液

1) 米酵菌酸标准储备溶液 (10.0 mg/L)：根据米酵菌酸标准物质的纯度，称取适量标准物质固体，用甲醇配制成 10 mg/L 米酵菌酸标准物质溶液，-20°C 避光保存，有效期 6 个月。或采用市售有证标准溶液配置。

2) 米酵菌酸标准中间溶液 (200 µg/L)：准确吸取米酵菌酸中间溶液 200 µL 于 10 mL 容量瓶，用甲醇定容至刻度，摇匀，得到浓度为 200 µg/L 的标准中间溶液，-20°C 避光保存。

3) 米酵菌酸标准使用溶液：准确吸取米酵菌酸标准中间溶液，用流动相逐步稀释成浓度为 0.0 µg/L、0.50 µg/L、1.00 µg/L、2.00 µg/L、5.00 µg/L、10.0 µg/L、20.0 µg/L、50.0 µg/L 的系列标准工作溶液，临用现配。

### (4) 材料

- 1) 具塞塑料离心管：2 mL。
- 2) 吸管：5 mL。
- 3) 微孔滤膜（有机相）：0.22 µm。

### (5) 仪器和设备

- 1) 超高效液相色谱质谱联用仪：带电喷雾离子源 (ESI) 和三重四极杆质量分析器。
- 2) 离心机：转速不低于 10000 r/min。
- 3) 涡旋震荡器。
- 4) 精密移液器。

5) 生物安全柜。

#### 4.4 试样的采集、保存和运输

试样的采集、保存和运输应符合 WS/T 679-2020 中的第 8 章要求。

#### 4.5 分析步骤

##### (1) 个人防护

应于生物安全柜中对样本进行实验操作，并做好相应个人防护。

##### (2) 提取

准确移取血清样品 0.2 mL 于 2 mL 塑料离心管中，加入 1 mL 0.1% 氨水甲醇-乙腈溶液（4.2.1），涡旋 2 min，10000 r/min 离心 5 min，取上清液于 2 mL 塑料离心管加入 0.5 mL 正己烷涡旋混合，静置 2 min 后，取甲醇-乙腈层过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后上机。

##### (3) 仪器检测

###### 1) 液相色谱参考条件

色谱柱：Acquity BEH C18 色谱柱（2.1×50 mm，1.7  $\mu\text{m}$ ），或相当者。流动相：A 为 0.05%（v/v）甲酸水溶液，B 为甲醇，梯度洗脱条件见表 1。流速：0.3 mL/min。柱温：35  $^{\circ}\text{C}$ 。进样量：1  $\mu\text{L}$ 。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

| 时间 (min) | 流动相 A (%) | 流动相 B (%) |
|----------|-----------|-----------|
| 0.0      | 70        | 30        |
| 1.0      | 70        | 30        |

|     |    |    |
|-----|----|----|
| 3.0 | 15 | 85 |
| 6.0 | 10 | 90 |
| 7.0 | 5  | 95 |
| 7.1 | 70 | 30 |
| 9.0 | 70 | 30 |

## 2) 质谱仪参考条件

离子源：电喷雾离子源（ESI）。毛细管电压：-2.5kV；去溶剂温度：500°C；离子源温度：150°C。扫描方式：负离子扫描。检测方式：多反应检测（MRM）。雾化气、气帘气、辅助加热气由氮气发生器产生或使用高纯氮气、碰撞气均为高纯氦气；使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。锥孔电压、碰撞能量等电压值优化至最优灵敏度。定性离子对、定量离子对，锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2 米酵菌酸的质谱参数

| 化合物  | 离子对(m/z)        | 锥孔电压<br>(V) | 碰撞能量<br>(eV) |
|------|-----------------|-------------|--------------|
| 米酵菌酸 | 定量: 485.2>441.2 | -22         | -12          |
|      | 定性: 485.4>397.3 | -22         | -18          |

## 3) 标准曲线的制作

精确吸取 1.0 μL 的米酵菌酸系列标准工作溶液，由低浓度到高浓度依次注入超高效液相色谱-质谱联用仪中进行测定。以米酵菌酸定量离子离子的质量色谱图峰面积为纵坐标，相对应的标准工作溶液浓度为横坐标，绘制标准工作曲线，标准溶液的液相色谱图参见附录 A。米酵菌酸在 0.5-50.0 μg/L 范围内呈线性，线性回归方程为  $y = 480.203 * x - 59.2574$ ，相关系数为 0.9999。

#### 4) 定性测定

在相同实验条件下进行样品测定时，被测试样中目标化合物色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较，相对误差应在±2.5%之内，并且在扣除背景后的样品质谱图中，所选择的离子均出现，而且所选择的离子丰度比与标准样品的离子丰度比相一致（相对丰度>50%，允许±20%偏差；相对丰度 20%~50%，允许±25%偏差；相对丰度 10%~20%，允许±30%偏差；相对丰度≤10%，允许±50%偏差），则可判断样品中存在米酵菌酸。

#### 5) 定量测定

本标准采用外标-标准曲线法定量测定，定量用标准溶液采用同种基质配置，且所测样品中米酵菌酸的相应值应在仪器的线性范围内，如果试样待测液中被测物质的响应值超出仪器检测的线性范围，可适当稀释后测定。空白、血清样本及血清样本加标的液相色谱图参见附录 A。

#### 6) 空白试验

除不加试样外，均按照上述测定步骤进行。

### 4.6 结果计算和表述

试样中米酵菌酸的含量 C 按式（1）计算。

$$C = \frac{C_0 \times V}{V_0} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

C——待测组分含量（μg/L）；

C<sub>0</sub>——由标准曲线求得样液中被测组分浓度（μg/L）；

V—样品定容体积 (mL) ;

V<sub>0</sub>—样品取样体积 (mL) ;

注：计算结果需扣除空白值。测定结果用两次平行测定的算术平均值表示，计算结果保留 2~3 位有效数字。

#### 4.7 方法的灵敏度、精密度和准确度

##### (1) 灵敏度

在空白基质加标样品中，以 3 倍信噪比浓度计算检出限，以 10 倍信噪比浓度计算定量限。本方法的检出限和定量限分别为 0.74 μg/L 和 2.5 μg/L。

##### (2) 准确度和精密度

向血清中添加 5、25 和 75 μg/L 三个浓度的米酵菌酸进行加标回收实验，使最终上机浓度为 1、5 和 15 μg/L。如表 3 所示，3 个不同浓度加标水平下，米酵菌酸的回收率为 88.4%-90.7%，相对标准偏差 (RSD) 均小于 5%。说明方法的准确度和精密度良好。

表 3 血清样品中米酵菌酸的加标回收率及相对标准偏差 (n=6)

| 化合物      | 添加浓度<br>(μg/L) | 实测浓度 (μg/L) (n=6) |      |      |      |      |      | 回收率<br>(%) | RSD<br>(%) |
|----------|----------------|-------------------|------|------|------|------|------|------------|------------|
|          |                | 1                 | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |            |            |
| 米酵<br>菌酸 | 1.00           | 0.89              | 0.86 | 0.91 | 0.92 | 0.87 | 0.88 | 89.0       | 2.6        |
|          | 5.00           | 4.35              | 4.42 | 4.51 | 4.49 | 4.28 | 4.46 | 88.4       | 2.0        |
|          | 15.00          | 13.7              | 13.1 | 13.4 | 14.1 | 13.3 | 13.8 | 90.7       | 2.7        |

## 5 方法验证

### 5.1 方法验证方案

#### 5.1.1 方法验证单位

标准起草工作小组组织 5 个单位，包括广州市疾病预防控制中心、深圳市疾病预防控制中心、珠海市疾病预防控制中心、广州市越秀区疾病预防控制中心、广州市番禺区疾病预防控制中心对本标准方法进行了验证。各验证单位都具有开展验证实验的实验室条件，所有成员都对本标准进行了方法验证及实际样品测试。

#### 5.1.2 测试要求

(1) 标准曲线：由各单位根据实际实验条件及器皿规格自行配置标准曲线，要求相关系数  $r$  大于 0.99，且所有样品浓度落在线性范围内。

(2) 检出限和定量限：以 3 倍信噪比计算检出限，以 10 倍信噪比计算定量限，结合样品前处理过程，计算得到方法检出限与定量限。

(3) 方法准确度和精密度：向血清样品中分别加入 5、25 和 75  $\mu\text{g/L}$  三个浓度的米酵菌酸进行加标回收实验，使最终上机浓度为 1、5 和 15  $\mu\text{g/L}$ 。按照上述方法处理样品，并测定含量，每个水平重复测定 6 次，计算加标回收率，加标回收率范围应在 80.0%-120%之间，相对标准偏差 $\leq 10\%$ 。

(4) 实际样品测试：每个样品平行测试两次，得到两次测试结果平均值。

### 5.1.3 试样的制备及分析

若采集的样本为全血（不含抗凝剂），需在 4°C 下 2500 rpm 离心 10 min，上清液即为血清。准确移取血清样品 0.2 mL 于 2 mL 塑料离心管中，加入 1 mL 0.1% 氨水甲醇-乙腈溶液（4.2.1），涡旋 2 min，10000 r/min 离心 5 min，取上清液于 2 mL 塑料离心管加入 0.5 mL 正己烷涡旋混合，静置 2 min 后，取甲醇-乙腈层过 0.22 μm 滤膜后上机。

## 5.2 方法验证过程

筛选了有资历的验证单位，并提供方法草案、验证方案和验证报告格式。验证单位按照验证方案准备实验用品，在规定时间内完成验证实验并反馈验证结果报告。在方法验证前，参加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。

## 5.3 方法验证结果

### 5.3.1 线性范围和相关系数

将系列标准工作液分别注入超高效液相色谱串联质谱仪中，测得相应的峰面积，以标准工作液的质量浓度为横坐标，以被测组分的峰面积和内标物的峰面积之比为纵坐标，绘制标准曲线。结果见表 4。

表 4 方法的线性范围和相关系数汇总

| 验证单位           | 线性范围 (μg/L) | 相关系数 (r) |
|----------------|-------------|----------|
| 广州市疾病预防控制中心    | 0.5-50.0    | 0.9999   |
| 深圳市疾病预防控制中心    | 0.5-50.0    | 0.9999   |
| 珠海市疾病预防控制中心    | 0.5-50.0    | 0.9999   |
| 广州市越秀区疾病预防控制中心 | 0.5-50.0    | 0.9998   |
| 广州市番禺区疾病预防控制中心 | 0.5-50.0    | 0.9996   |

### 5.3.2 检出限和定量限

以 3 倍信噪比计算检出限，以 10 倍信噪比计算定量限，结合样品前处理过程，计算得到方法检出限与定量限，结果见表 5。

表 5 方法的检出限和定量限汇总

| 验证单位           | 检出限 (μg/L) | 定量限 (μg/L) |
|----------------|------------|------------|
| 广州市疾病预防控制中心    | 0.74       | 2.5        |
| 深圳市疾病预防控制中心    | 0.70       | 2.4        |
| 珠海市疾病预防控制中心    | 0.24       | 0.81       |
| 广州市越秀区疾病预防控制中心 | 1.0        | 3.0        |
| 广州市番禺区疾病预防控制中心 | 1.0        | 3.0        |

### 5.3.3 准确度和精密度

向血清样本中分别加入 5.00、25.0 和 75.0 μg/L 三个浓度的米酵菌酸进行加标回收实验，使最终上机浓度为 1.00、5.00 和 15.0 μg/L。按照上述方法处理样品，并测定含量，每个水平重复测定 6 次，计算加标回收率，结果列于表 6。

表 6 方法的平均加标回收率及相对标准偏差 (n=6)

| 验证单位           | 添加浓度<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 回收率<br>(%) | RSD<br>(%) |
|----------------|-----------------------------|------------|------------|
| 广州市疾病预防控制中心    | 1.00                        | 89.0       | 2.6        |
|                | 5.00                        | 88.4       | 2.0        |
|                | 15.0                        | 90.7       | 2.7        |
| 深圳市疾病预防控制中心    | 1.00                        | 115        | 4.0        |
|                | 5.00                        | 106        | 2.2        |
|                | 15.0                        | 105        | 0.9        |
| 珠海市疾病预防控制中心    | 1.00                        | 104        | 2.2        |
|                | 5.00                        | 96.3       | 1.4        |
|                | 15.0                        | 107        | 2.5        |
| 广州市越秀区疾病预防控制中心 | 1.00                        | 94.2       | 4.6        |
|                | 5.00                        | 90.3       | 2.5        |
|                | 15.0                        | 93.6       | 4.0        |
| 广州市番禺区疾病预防控制中心 | 1.00                        | 117        | 3.0        |
|                | 5.00                        | 112        | 2.7        |
|                | 15.0                        | 103        | 2.2        |

#### 5.3.4 实际样品测定结果

表 7 血清样品测定结果

| 验证单位           | 平均值 ( $\mu\text{g/L}$ ) | 相对偏差 (%) |
|----------------|-------------------------|----------|
| 广州市疾病预防控制中心    | ND                      | 0.0      |
| 深圳市疾病预防控制中心    | ND                      | 0.0      |
| 珠海市疾病预防控制中心    | ND                      | 0.0      |
| 广州市越秀区疾病预防控制中心 | ND                      | 0.0      |
| 广州市番禺区疾病预防控制中心 | ND                      | 0.0      |

注：ND 为小于方法检出限。

## **6 与现行法律、法规、政策及相关标准协调性**

本标准与现行相关法律、法规、政策及相关标准协调一致。符合现行相关法律、法规和政策及相关标准的规定。

## **7 重大意见分歧的处理依据和结果**

本标准的编写过程中无重大分歧意见。

## **8 预期的社会效益及贯彻实施标准的要求、措施等建议**

### **8.1 预期的社会效益**

本标准适用性广、可操作性强，可以为不同层次的实验室测定血清中米酵菌酸提供适宜的方法。本标准的实施可为为相关中毒事件的鉴定、中毒病人的救治提供技术支持，具有重要的社会意义。

### **8.2 贯彻实施标准的要求和措施建议**

本标准发布后，建议起草单位和广东省分析测试协会联合向相关检测机构开展标准的培训和宣贯。

## **9 附件材料（方法验证报告）**

附件 1：方法验证报告-广州市疾病预防控制中心

附件 2：方法验证报告-深圳市疾病预防控制中心

附件 3：方法验证报告-珠海市疾病预防控制中心

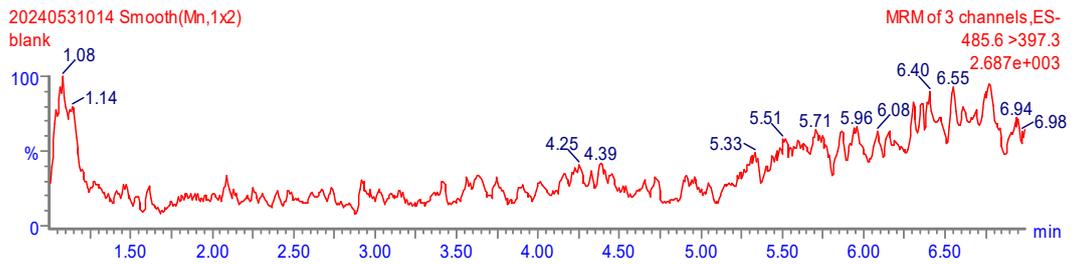
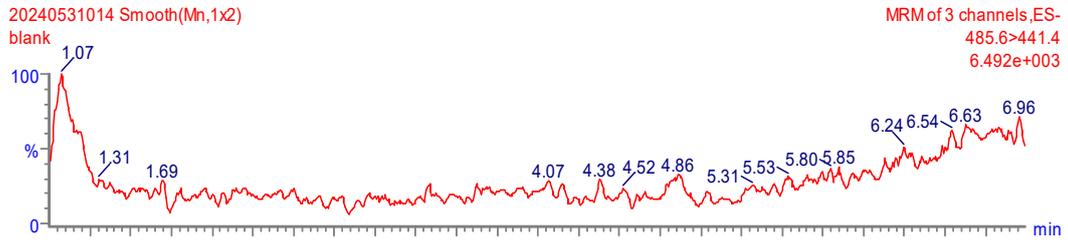
附件 4：方法验证报告-广州市越秀区疾病预防控制中心

附件 5：方法验证报告-广州市番禺区疾病预防控制中心

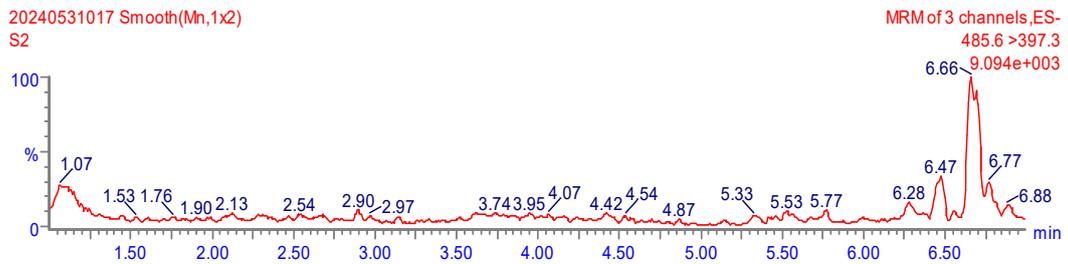
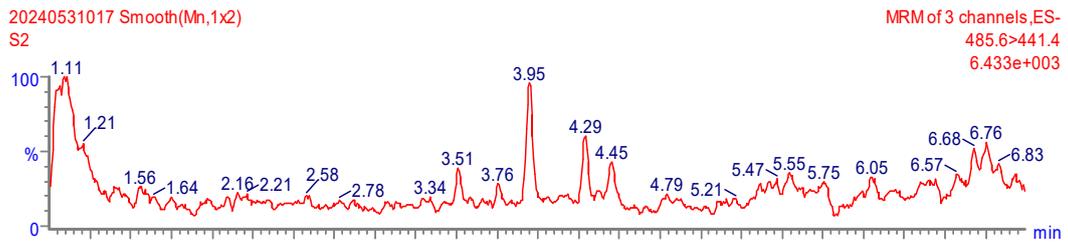
## **10 其他应当说明的事项**

无

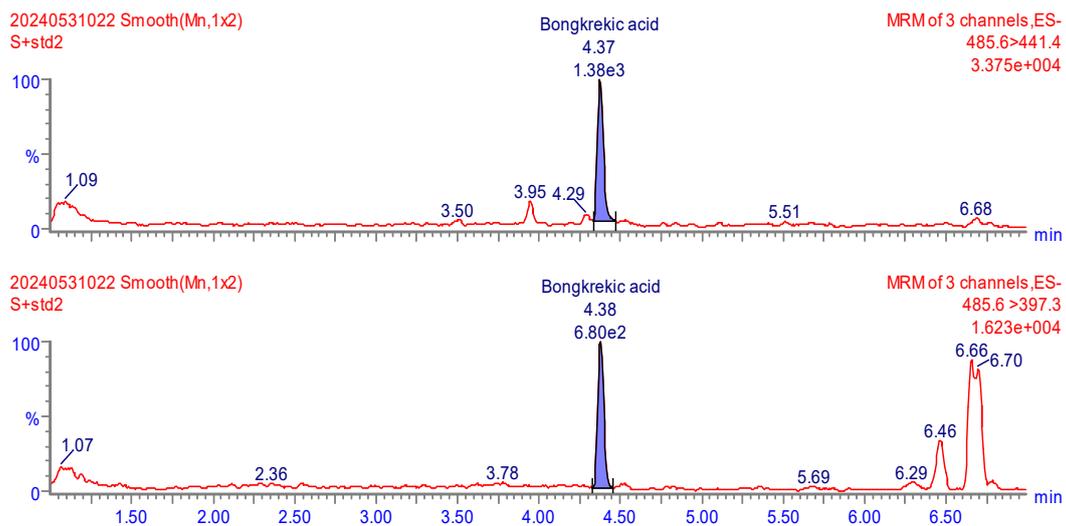
## 附录 A



图A.1 空白试验LC-MS/MS图



图A.2 血清样本LC-MS/MS图



图A.3 血清样品加标 (5.00  $\mu\text{g/L}$ ) LC-MS/MS图

附件

# 血清中米酵菌酸的测定 高效液相色谱串联质谱法 方法验证报告



项目名称 血清中米酵菌酸的测定高效液相色谱串联质谱法  
委托单位 广州市疾病预防控制中心  
委托时间 2024年5月27日  
验证单位 广州市疾病预防控制中心  
验证时间 2024年5月30日 - 2024年6月3日

## 一. 验证内容

对广州市疾病预防控制中心提供的《血清中米醇菌酸的测定 高效液相色谱串联质谱法》进行方法学验证。

## 二. 样品前处理

准确移取血清样品 0.2 mL 于 2 mL 塑料离心管中，加入 1 mL 0.1% 氨水甲醇-乙腈溶液 (4.2.1)，涡旋 2 min，10000 r/min 离心 5 min，取上清液于 2 mL 塑料离心管加入 0.5 mL 正己烷涡旋混合，静置 2 min 后，取甲醇-乙腈层过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后上机。

## 三. 仪器条件

1. 仪器及型号：液相色谱-质谱联用仪 AcQuity/Xevo TQ-S (美国 Waters 公司)
2. 色谱柱：ACQUITY UPLC BEH C18 柱，2.1 mm $\times$ 50 mm  $\times$ 1.7  $\mu\text{m}$  (美国 Waters 公司)
3. 色谱条件：
  - a) 流动相：A 为 0.05% (v/v) 甲酸水溶液，B 为甲醇
  - b) 洗脱方式：梯度洗脱，梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

| 时间 (min) | A (%) | B (%) |
|----------|-------|-------|
| 0.0      | 70    | 30    |
| 1.0      | 70    | 30    |
| 3.0      | 15    | 85    |
| 6.0      | 10    | 90    |
| 7.0      | 5     | 95    |
| 7.1      | 70    | 30    |
| 9.0      | 70    | 30    |

- c) 流速：0.3 mL/min;
  - d) 柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ ;
  - e) 进样量：1  $\mu\text{L}$ 。
- 4 质谱条件：
    - a) 离子源：电喷雾离子源 (ESI)。
    - b) 毛细管电压：-2.5 kv; 去溶剂温度：500 $^{\circ}\text{C}$ ; 离子源温度：150 $^{\circ}\text{C}$ 。
    - c) 扫描方式：负离子扫描。
    - d) 检测方式：多反应检测 (MRM)。
    - e) 雾化气、气帘气、辅助加热气由氮气发生器产生或使用高纯氮气、碰撞气均为高纯氩气;

使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。

f) 锥孔电压、碰撞能量等电压值优化至最优灵敏度。

g) 定性离子对、定量离子对，锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2 米醇菌酸的质谱参数

| 化合物  | 离子对 (m/z)       | 锥孔电压 (V) | 碰撞能量 (eV) |
|------|-----------------|----------|-----------|
| 米醇菌酸 | 定量: 485.2>441.2 | -22      | -12       |
|      | 定性: 485.4>397.3 | -22      | -18       |

## 四. 方法学评价结果

### 1. 标准曲线

如表 3 所示，米醇菌酸在 0.5-50.0  $\mu\text{g/L}$  范围内呈线性，相关系数为 0.9999。在空白基质加标样品中，以 3 倍信噪比浓度计算检出限，以 10 倍信噪比浓度计算定量限。最终，该方法的检出限和定量限分别为 0.74  $\mu\text{g/L}$  和 2.5  $\mu\text{g/L}$ 。

表 3 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

| 化合物  | 线性回归方程                      | 线性范围 ( $\mu\text{g/L}$ ) | 相关系数 ( $r$ ) | 检出限 ( $\mu\text{g/L}$ ) | 定量限 ( $\mu\text{g/L}$ ) |
|------|-----------------------------|--------------------------|--------------|-------------------------|-------------------------|
| 米醇菌酸 | $y = 480.203 * x - 59.2574$ | 0.5-50.0                 | 0.9999       | 0.74                    | 2.5                     |

### 2. 准确度和精密度

向血清中添加 5、25 和 75  $\mu\text{g/L}$  三个浓度的米醇菌酸进行加标回收实验，使最终上机浓度为 1、5 和 15  $\mu\text{g/L}$ 。如表 4 所示，3 个不同浓度加标水平下，米醇菌酸的回收率为 88.4%-90.7%，相对标准偏差 (RSD) 均小于 5%。

表 4 血清样品中米醇菌酸的加标回收率及相对标准偏差 (n=6)

| 化合物  | 添加浓度 ( $\mu\text{g/L}$ ) | 实测浓度 ( $\mu\text{g/L}$ ) (n=6) |      |      |      |      |      | 回收率 (%) | RSD (%) |
|------|--------------------------|--------------------------------|------|------|------|------|------|---------|---------|
|      |                          | 1                              | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |         |         |
| 米醇菌酸 | 1.00                     | 0.89                           | 0.86 | 0.91 | 0.92 | 0.87 | 0.88 | 89.0    | 2.6     |
|      | 5.00                     | 4.35                           | 4.42 | 4.51 | 4.49 | 4.28 | 4.46 | 88.4    | 2.0     |
|      | 15.00                    | 13.7                           | 13.1 | 13.4 | 14.1 | 13.3 | 13.8 | 90.7    | 2.7     |

## 五. 结论

我单位对《血清中米醇菌酸的测定 超高效液相色谱串联质谱法》的线性范围、方法检出限、方法定量限、精密度、回收率等指标进行方法学验证。结果表明：该方法中米醇菌酸的精密度在 2.0%-2.7%之间，回收率在 88.4%-90.7%之间，方法能满足血清中米醇菌酸的定性、定量分析要求。



附件

# 血清中米酵菌酸的测定 高效液相色谱串联质谱法 方法验证报告



项目名称 血清中米酵菌酸的测定高效液相色谱串联质谱法

委托单位 广州市疾病预防控制中心

委托时间 2024年7月17日

验证单位 深圳市疾病预防控制中心

验证时间 2024年7月22日 - 2024年8月2日

## 一. 验证内容

对广州市疾病预防控制中心提供的《血清中米酵菌酸的测定 高效液相色谱串联质谱法》进行方法学验证。

## 二. 样品前处理

准确移取血清样品 0.2 mL 于 2 mL 塑料离心管中，加入 1 mL 0.1% 氨水甲醇-乙腈溶液（4.2.1），涡旋 2 min，10000 r/min 离心 5 min，取上清液于 2 mL 塑料离心管加入 0.5 mL 正己烷涡旋混合，静置 2 min 后，取甲醇-乙腈层过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后上机。

## 三 仪器条件

1. 仪器及型号：API QTRAP 6500 液质联用仪（美国 AB SCIEX）
2. 色谱柱：ACQUITY UPLC BEH C18 柱，2.1 mm $\times$ 50 mm $\times$ 1.7  $\mu\text{m}$ （美国 Waters 公司）
3. 色谱条件：
  - a) 流动相：A 为 0.05% (v/v) 甲酸水溶液，B 为甲醇
  - b) 洗脱方式：梯度洗脱，梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

| 时间 (min) | A (%) | B (%) |
|----------|-------|-------|
| 0.0      | 70    | 30    |
| 1.0      | 70    | 30    |
| 3.0      | 15    | 85    |
| 6.0      | 10    | 90    |
| 7.0      | 5     | 95    |
| 7.1      | 70    | 30    |
| 9.0      | 70    | 30    |

- c) 流速：0.3 mL/min;
  - d) 柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ ;
  - e) 进样量：1  $\mu\text{L}$ 。
4. 质谱条件：
    - a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）。
    - b) 毛细管电压：-4.5 kv；去溶剂温度：300 $^{\circ}\text{C}$ 。
    - c) 扫描方式：负离子扫描。
    - d) 检测方式：多反应检测（MRM）。

- e) 雾化气、气帘气、辅助加热气由氮气发生器产生或使用高纯氮气、碰撞气均为高纯氩气；使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。
- f) 锥孔电压、碰撞能量等电压值优化至最优灵敏度。
- g) 定性离子对、定量离子对，锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2 米酵菌酸的质谱参数

| 化合物  | 离子对 (m/z)       | 锥孔电压 (V) | 碰撞能量 (eV) |
|------|-----------------|----------|-----------|
| 米酵菌酸 | 定量: 485.1>441.2 | -40      | -15       |
|      | 定性: 485.1>397.1 | -40      | -25       |

## 四、方法学评价结果

### 1. 标准曲线线性

如表 3 所示，米酵菌酸在 0.5-50  $\mu\text{g/L}$  范围内呈线性，相关系数为 0.9999。

表 3 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

| 化合物  | 线性回归方程                       | 线性范围 ( $\mu\text{g/L}$ ) | 相关系数 ( $r$ ) |
|------|------------------------------|--------------------------|--------------|
| 米酵菌酸 | $y = 3.5272e4 x - 3980.0137$ | 0.5-50.0                 | 0.9999       |

### 2. 检出限和定量限:

在空白基质加标样品中，以 3 倍信噪比浓度计算检出限，以 10 倍信噪比浓度计算定量限。最终，该方法的检出限和定量限分别为 0.7  $\mu\text{g/L}$  和 2.4  $\mu\text{g/L}$ 。

### 2. 准确度和精密度

向血清中添加 5、25 和 75  $\mu\text{g/L}$  三个浓度的米酵菌酸进行加标回收实验，使最终上机浓度为 1、5 和 15  $\mu\text{g/L}$ 。如表 4 所示，3 个不同浓度加标水平下，米酵菌酸的回收率为 104.5-114.6%，相对标准偏差 (RSD) 均小于 5%。

表 4 血清样品中米酵菌酸的加标回收率及相对标准偏差(n=6)

| 化合物  | 浓度 ( $\mu\text{g/L}$ ) | 实测浓度(n=6) |       |       |       |       |       | 回收率 (%) | RSD (%) |
|------|------------------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|---------|
|      |                        | 1         | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |         |         |
| 米酵菌酸 | 1.00                   | 1.23      | 1.16  | 1.14  | 1.13  | 1.12  | 1.10  | 114.6   | 3.95    |
|      | 5.00                   | 5.33      | 5.43  | 5.41  | 5.35  | 5.18  | 5.14  | 106.1   | 2.25    |
|      | 15.00                  | 15.60     | 15.82 | 15.75 | 15.81 | 15.51 | 15.52 | 104.5   | 0.91    |

## 三. 结论

我单位对《血清中米酵菌酸的测定 超高效液相色谱串联质谱法》进行了方法学验证，验证内容包括线性范围、方法检出限、定量限、精密度、回收率等。实验结果表明：使用该方法检测血清中米酵菌酸浓度，回收率在 104.5-114.6%之间，精密度在 0.91-3.95%之间，该方法能满足血清中米酵菌酸的定性、定量分析要求。

附件

# 血清中米酵菌酸的测定 高效液相色谱串联质谱法 方法验证报告

项目名称 血清中米酵菌酸的测定 高效液相色谱串联质谱法  
委托单位 广州市疾病预防控制中心  
委托时间 2024年7月17日  
验证单位 珠海市疾病预防控制中心  
验证时间 2024年8月13日 - 2024年8月16日

## 一. 验证内容

对广州市疾病预防控制中心提供的《血清中米酵菌酸的测定 高效液相色谱串联质谱法》进行方法学验证。

## 二. 样品前处理

准确移取血清样品 0.2 mL 于 2 mL 塑料离心管中，加入 1 mL 0.1% 氨水甲醇-乙腈溶液（4.2.1），涡旋 2 min，10000 r/min 离心 5 min，取上清液于 2 mL 塑料离心管加入 0.5 mL 正己烷涡旋混合，静置 2 min 后，取甲醇-乙腈层过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后上机。

## 三. 超高效液相色谱串联质谱法验证结果

### 1. 仪器条件

1.1 仪器及型号：超高效液相色谱质谱联用仪 Waters TQ-S

1.2 色谱柱：Acquity BEH C18 色谱柱（2.1 $\times$ 50 mm，1.7  $\mu\text{m}$ ）

1.3 色谱条件：

a) 流动相：A 为 0.05%（v/v）甲酸水溶液，B 为甲醇

b) 洗脱方式：梯度洗脱，梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

| 时间 (min) | A (%) | B (%) |
|----------|-------|-------|
| 0.0      | 70    | 30    |
| 1.0      | 70    | 30    |
| 3.0      | 15    | 85    |
| 6.0      | 10    | 90    |
| 7.0      | 5     | 95    |
| 7.1      | 70    | 30    |
| 9.0      | 70    | 30    |

c) 流速：0.3 mL/min；

d) 柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ ；

e) 进样量：5  $\mu\text{L}$ 。

1.4 质谱条件：

a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）。

b) 毛细管电压：2.5 kv；去溶剂温度：450 $^{\circ}\text{C}$ ；离子源温度150 $^{\circ}\text{C}$ 。

c) 扫描方式：负离子扫描。

d) 检测方式：多反应检测（MRM）。

g) 定性离子对、定量离子对，锥孔电压及碰撞能量电压值优化至最优灵敏度见表2。

表 2 米酵菌酸的质谱参数

| 化合物  | 离子对 (m/z)      | 锥孔电压 (V) | 碰撞能量 (eV) |
|------|----------------|----------|-----------|
| 米酵菌酸 | 定量：485.3>441.2 | 22       | 12        |
|      | 定性：485.3>397.3 | 22       | 18        |

## 2. 方法学评价

2.1 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限如表 3 所示，以低浓度加标点最低信噪比进行计算， $3 \times 1.00 \times 5 / 62 = 0.242 \mu\text{g/L}$ ，定量限  $10 \times 1.00 \times 5 / 62 = 0.806 \mu\text{g/L}$

表 3 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

| 化合物  | 线性回归方程                      | 线性范围<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 相关系数<br>( $r$ ) | 检出限<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 定量限<br>( $\mu\text{g/L}$ ) |
|------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|
| 米酵菌酸 | $Y = 3374.87 * x - 1410.99$ | 0.50~50.00                  | 0.9999          | 0.242                      | 0.806                      |

2.2 方法准确度和精密度如表 4 所示，血清样品加标浓度为 5.00，25.0，75.0  $\mu\text{g/L}$ ，上机浓度为 1.00、5.00、15.0  $\mu\text{g/L}$ 。

表 4 血清样品中米酵菌酸的加标回收率及相对标准偏差(n=6)

| 化合物  | 添加后上机浓度<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 回收率 (%) (n=6) |      |      |      |      |      | 回收率<br>(%) | RSD<br>(%) |
|------|--------------------------------|---------------|------|------|------|------|------|------------|------------|
|      |                                | 1             | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |            |            |
| 米酵菌酸 | 1.00                           | 105           | 103  | 106  | 102  | 103  | 108  | 104        | 2.2        |
|      | 5.00                           | 98.1          | 94.0 | 95.4 | 96.5 | 96.7 | 96.9 | 96.3       | 1.4        |
|      | 15.00                          | 110           | 102  | 107  | 108  | 106  | 107  | 107        | 2.5        |

## 四. 结论

实验对《血清中米酵菌酸的测定 超高效液相色谱串联质谱法》的线性范围、方法检出限、方法定量限、精密度、回收率等指标进行方法学验证。结果表明：该方法中米酵菌酸的精密度在 1.4%~2.5%之间，回收率在 96.3%~107 %之间，方法能满足血清中米酵菌酸的定性、定量分析要求。

检测者：为莉

复核者：姚妍

签发者：洪素丹

附件

# 血清中米醇菌酸的测定 高效液相色谱串联质谱法 方法验证报告

项目名称 血清中米醇菌酸的测定高效液相色谱串联质谱法  
委托单位 广州市疾病预防控制中心  
委托时间 2024年7月17日  
验证单位 广州市越秀区疾病预防控制中心  
验证时间 2024年08月01日 - 2024年08月09日



## 一. 验证内容

对广州市疾病预防控制中心提供的《血清中米酵菌酸的测定 高效液相色谱串联质谱法》进行方法学验证。

## 二. 样品前处理

准确移取血清样品 0.2 mL 于 2 mL 塑料离心管中，加入 1 mL 0.1% 氨水甲醇-乙腈溶液（4.2.1），涡旋 2 min，10000 r/min 离心 5 min，取上清液于 2 mL 塑料离心管加入 0.5 mL 正己烷涡旋混合，静置 2 min 后，取甲醇-乙腈层过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后上机。

## 三. 超高效液相色谱串联质谱法验证结果

### 1. 仪器条件

1.1 仪器及型号：液质联用 WATERS AcQuiy TQ-Smicro

1.2 色谱柱：Acquity BEH C18 色谱柱（2.1 $\times$ 50 mm，1.7  $\mu\text{m}$ ）

1.3 色谱条件：

a) 流动相：A 为 0.05%（v/v）甲酸水溶液，B 为甲醇

b) 洗脱方式：梯度洗脱，梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

| 时间 (min) | A (%) | B (%) |
|----------|-------|-------|
| 0.0      | 70    | 30    |
| 1.0      | 70    | 30    |
| 3.0      | 15    | 85    |
| 6.0      | 10    | 90    |
| 7.0      | 5     | 95    |
| 7.1      | 70    | 30    |
| 9.0      | 70    | 30    |

c) 流速：0.3 mL/min；

d) 柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ ；

e) 进样量：5  $\mu\text{L}$ 。

1.4 质谱条件：

a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）。

b) 毛细管电压：2.5 kv；去溶剂温度：500 $^{\circ}\text{C}$ 。

- c) 扫描方式：负离子扫描。
- d) 检测方式：多反应检测（MRM）。
- e) 雾化气、气帘气、辅助加热气由氮气发生器产生或使用高纯氮气、碰撞气均为高纯氩气；使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。
- f) 锥孔电压、碰撞能量等电压值优化至最优灵敏度。
- g) 定性离子对、定量离子对，锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2 米酵菌酸的质谱参数

| 化合物  | 离子对 (m/z)       | 锥孔电压 (V) | 碰撞能量 (eV) |
|------|-----------------|----------|-----------|
| 米酵菌酸 | 定量: 485.2>441.2 | 22       | 12        |
|      | 定性: 485.2>397.3 | 22       | 18        |

## 2. 方法学评价

### 2.1 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限如表 3 所示。

表 3 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

| 化合物  | 线性回归方程               | 线性范围<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 相关系数<br>( $r$ ) | 检出限<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 定量限<br>( $\mu\text{g/L}$ ) |
|------|----------------------|-----------------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|
| 米酵菌酸 | $Y=204.734X-7.22441$ | 0.50~50.0                   | 0.9998          | 1.00                       | 3.00                       |

### 2.2 方法准确度和精密度如表 4 所示。

表 4 血清样品中米酵菌酸的加标回收率及相对标准偏差(n=6)

| 化合物  | 添加浓度<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 回收率(n=6) |      |      |      |      |      | 回收率<br>(%) | RSD<br>(%) |
|------|-----------------------------|----------|------|------|------|------|------|------------|------------|
|      |                             | 1        | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |            |            |
| 米酵菌酸 | 1.00                        | 102      | 94.4 | 91.4 | 93.1 | 94.8 | 89.5 | 94.2       | 4.6        |
|      | 5.00                        | 93.4     | 88.4 | 92.6 | 90.8 | 88.2 | 88.5 | 90.3       | 2.5        |
|      | 15.00                       | 92.7     | 92.6 | 90.7 | 90.9 | 93.4 | 101  | 93.6       | 4.0        |

## 四. 结论

实验对《血清中米酵菌酸的测定 超高效液相色谱串联质谱法》的线性范围、方法检出限、方法定量限、精密度、回收率等指标进行方法学验证。结果表明：该方法中米酵菌酸的精密度在 2.5%~4.6% 之间，回收率在 88.2%~102% 之间，方法能满足血清中米酵菌酸的定性、定量分析要求。

附件

血清中米酵菌酸的测定  
超高效液相色谱串联质谱法  
方法验证报告

项目名称 血清中米酵菌酸的测定  
超高效液相色谱串联质谱法  
委托单位 广州市疾病预防控制中心  
委托时间 2024年8月08日  
验证单位 番禺区疾病预防控制中心  
验证时间 2024年8月15日 - 2024年08月23日

## 一. 验证内容

对广州市疾病预防控制中心提供的《血清中米酵菌酸的测定 超高效液相色谱串联质谱法操作程序》进行方法学验证。样品基质：血清。

## 二. 样品前处理

准确移取 0.2mL 血清样本于 2 mL 塑料离心管中，加入 1.0 mL 0.1% 氨水甲醇-乙腈溶液，涡旋混匀 2min，10000 r/min 离心 5 min，取上清液于 2 mL 塑料离心管加入 0.5 mL 正己烷涡旋混合，静置 2 min 后，取甲醇-乙腈层过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后上机。

## 三. 超高效液相色谱串联质谱法验证结果

### 1. 仪器条件

1.1 仪器及型号：AB SCIEX 4500 超高效液相色谱串联质谱。

1.2 色谱柱：Acquity BEH C18 色谱柱（2.1  $\times$  50 mm，1.7  $\mu\text{m}$ ）

1.3 色谱条件：

a) 流动相：A 为 0.05% (v/v) 甲酸水溶液，B 为甲醇；

b) 洗脱方式：梯度洗脱，梯度洗脱程序如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱程序

| 时间(min) | A (%) | B (%) |
|---------|-------|-------|
| 0       | 70.0  | 30.0  |
| 2.00    | 30.0  | 70.0  |
| 6.00    | 5.00  | 95.0  |
| 8.00    | 5.00  | 95.0  |
| 8.10    | 70.0  | 30.0  |
| 10.0    | 70.0  | 30.0  |

c) 流速：0.3 mL/min；

d) 柱温：40°C；

e) 进样量：1  $\mu\text{L}$ 。

1.4 质谱条件：

a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）。

b) 离子源电压：4500 kv；去溶剂化温度：500°C。

c) 扫描方式：负离子扫描。

d) 检测方式：多反应检测（MRM）。

e) 雾化气、气帘气、辅助加热气由氮气发生器产生或使用高纯氮气、碰撞气均为高纯氩气；使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。

f) 锥孔电压、碰撞能量等电压值应优化至最优灵敏度。

g) 定性离子对、定量离子对，锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表 2 米酵菌酸质谱参数

| 化合物  | 保留时间<br>(min) | 离子对          | 去簇电压<br>(V) | 碰撞能<br>(eV) |
|------|---------------|--------------|-------------|-------------|
| 米酵菌酸 | 4.46          | 485.3>441.3* | 3           | 17          |
|      |               | 485.3>397.3  | 20          | 27          |

## 2. 方法学评价

2.1 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限如表 3 所示。

表 3 线性回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

| 化合物  | 线性回归方程                                      | 线性范围<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 相关系数<br>( $r$ ) | 检出限<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 定量限<br>( $\mu\text{g/L}$ ) |
|------|---|-----------------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|
| 米酵菌酸 | $y = 1.81 \times 10^3 x - 1.50 \times 10^3$ | 0.500-50.0                  | 0.9996          | 1.00                       | 3.00                       |

2.2 方法准确度和精密度如表 4 所示。

表 4 血清样品中米酵菌酸的加标回收率及相对标准偏差(n=6)

| 化合物  | 添加浓度<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 回收率(n=6) |     |     |     |     |     | 回收率<br>(%) | RSD<br>(%) |
|------|-----------------------------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|------------|------------|
|      |                             | 1        | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   |            |            |
| 米酵菌酸 | 1.00                        | 117      | 111 | 118 | 119 | 119 | 117 | 117        | 3.0        |
|      | 5.00                        | 113      | 113 | 108 | 116 | 110 | 112 | 112        | 2.7        |
|      | 15.0                        | 105      | 105 | 101 | 104 | 101 | 105 | 103        | 2.2        |

## 3. 样品测定结果

表 5 血清样品测定结果

| 化合物  | 测定1<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 测定2<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 平均值<br>( $\mu\text{g/L}$ ) | 相对偏差% |
|------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-------|
| 米酵菌酸 | <1.0                       | <1.0                       | <1.0                       | 0     |

## 四. 结论

实验对《血清中米酵菌酸的测定 超高效液相色谱串联质谱法操作程序》的线性范围、方法检出限、方法定量限、精密度、回收率等指标进行方法学验证。结果表明：该方法中米酵菌酸的精密度在 0.5%~4.5%之间，回收率在 103%~117%之间，方法能满足血清中米酵菌酸的测定要求。