

ICS xxx
中国标准文献分类号

T/GAIA

广东省分析测试协会团体标准

T/GAIAxxx—xxxx

血清中米酵菌酸的测定 超高效液相色谱串联质谱法

Determination of bongkrekic acid in serum by ultra-high performance liquid
chromatography-tandem mass spectrometry

xxxx-xx-xx 发布

xxxx-xx-xx 实施

广东省分析测试协会

发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由广东省分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：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。

本文件主要起草人：朱惠扬、卢祝靓子、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。

本标准系首次发布。

血清中米酵菌酸的测定 超高效液相色谱串联质谱法

1 范围

本标准规定了血清中米酵菌酸的超高效液相色谱串联质谱定性定量检测方法。

标准适用于血清中米酵菌酸的定性、定量分析。其他可疑样品中米酵菌酸的定性、定量分析可参照使用。

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 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

WS/T 679 突发中毒事件卫生应急处置技术规范总则

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

样品用0.1%氨水甲醇—乙腈溶液（80：20，v/v）提取，采用超高效液相色谱串联质谱法检测，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。

5 试剂与材料

5.1 试剂

5.1.1 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

5.1.2 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

5.1.3 甲酸（CH₂O₂）：色谱纯。

5.1.4 氨水（NH₄OH）：色谱纯。

5.2 试剂配制

5.2.1 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。

5.2.2 0.05%甲酸水溶液：取 5 mL甲酸，用水定容至1000 mL，摇匀。

5.3 标准溶液配置

5.3.1 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10.0 mg/L米酵菌酸标准物质溶液，-20℃避光保存，有效期6个月。或采用市售有证标准溶液配置。

5.3.2 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（5.3.1）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℃避光保存。

5.3.3 米酵菌酸标准使用溶液：准确吸取米酵菌酸标准中间溶液（5.3.2），用初始流动相逐步稀释成浓度为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。

5.4 材料

5.4.1 具塞塑料离心管：2 mL。

5.4.2 吸管：5 mL。

5.4.3 微孔滤膜（有机相）：0.22 μm

6 仪器和设备

6.1 超高效液相色谱质谱联用仪：配电喷雾离子源（ESI）和三重四极杆质量分析器。

6.2 离心机：转速不低于10000 r/min。

6.3 涡旋震荡器。

6.4 精密移液器。

6.5 生物安全柜。

7 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。

8 分析步骤

8.1 个人防护

在处理样本时，应严格遵从对潜在生物传染性样本处理的相关规定，使用时遵循生物安全规则，于生物安全柜中对样本进行实验操作，并根据规定对废物进行处理，做好相应个人防护。

8.2 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（5.2.1），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。

8.3 仪器检测

8.3.1 液相色谱参考条件

a) 色谱柱：Acquity BEH C18 色谱柱（2.1×50 mm，1.7 μm），或相当者。

b) 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。

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: 40 °C。

e) 进样量: 5 μ L。

8.3.2 质谱仪参考条件

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°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	保留时间 (min)	离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
米酵菌酸	4.37	定量: 485.2>441.2	-22	-12
		定性: 485.4>397.3	-22	-18

8.3.3 标准曲线的制作

精确吸取5 μ L的米酵菌酸系列标准工作溶液 (5.3.3), 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。以米酵菌酸定量用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 图A。

8.3.4 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 $\pm 2.5\%$ 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 $\pm 20\%$ 偏差; 相对丰度 $20\% \sim 50\%$, 允许 $\pm 25\%$ 偏差; 相对丰度 $10\% \sim 20\%$, 允许 $\pm 30\%$ 偏差; 相对丰度 $\leq 10\%$, 允许 $\pm 50\%$ 偏差), 则可判断样品中存在米酵菌酸。

8.3.5 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。

8.4 空白试验

除不加试样外，均按照上述测定步骤进行。

9 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（ $\mu\text{g/L}$ ）；

C_0 —由标准曲线求得样液中被测组分浓度（ $\mu\text{g/L}$ ）；

V—样品定容体积（mL）；

V_0 —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，计算结果保留三位有效数字。

10 方法的灵敏度、精密度和准确度

10.1 灵敏度

本方法检出限为1.0 $\mu\text{g/L}$ ，定量限为3.0 $\mu\text{g/L}$ 。

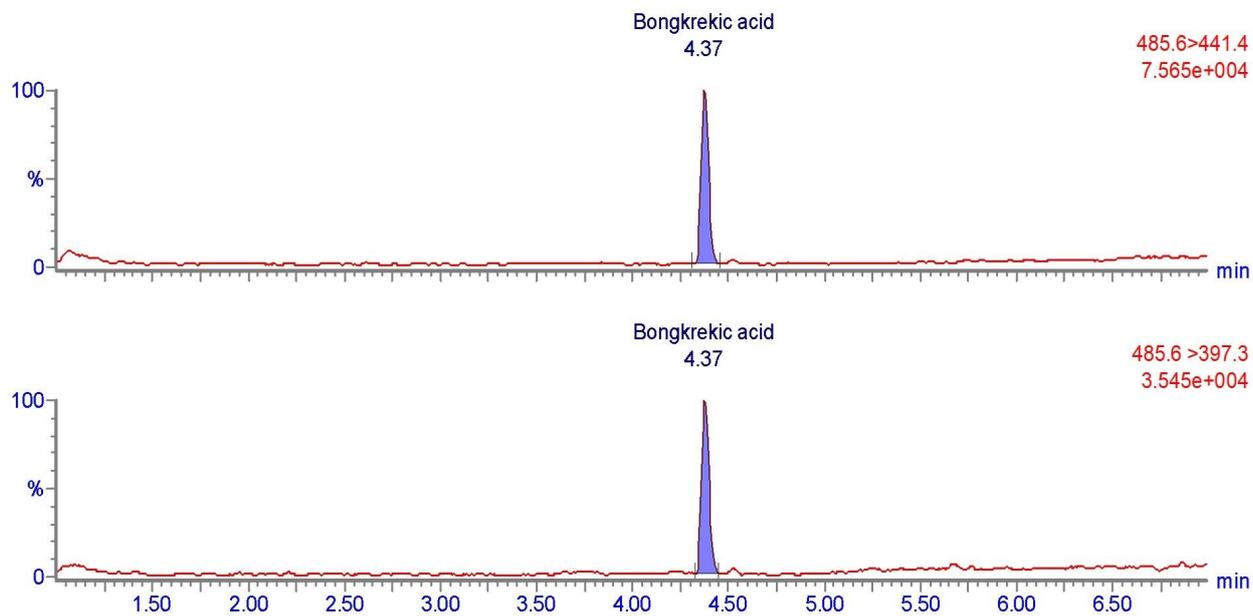
10.2 准确度

本方法中米酵菌酸在0.50 $\mu\text{g/L}$ ~50.0 $\mu\text{g/L}$ 的添加浓度水平时，回收率为80.0%-120%。

10.3 精密度

本方法相对标准偏差 $\leq 10\%$ 。

附录 A



图A 米酵菌酸标准溶液 (10.0 $\mu\text{g/L}$) 液相色谱图