方法验证报告

蜂蜜中氯霉素和甲硝唑残留量测定液相色谱串联质谱法

验证单位（盖章） 北京市顺义区疾病预防控制中心

通讯地址 北京市顺义区顺康路66号

验证人员 刘戟川、王静 李泰

报告日期 2023.08.

蜂蜜中氯霉素和甲硝唑残留量的测定 液相色谱串联质谱法验证报告

1. 目的：完成《蜂蜜中氯霉素和甲硝唑残留量测定 液相色谱串联质谱法》方法验证。

2. 材料准备

2.1 验证基质信息：本方法涉及 1 种基质： 蜂蜜

2.2 验证目标物：氯霉素、甲硝唑

2.3 材料与方法

2.3.1 仪器设备

（1）液相色谱-质谱联用仪（Waters Acquity UPLC - TQ）

（2）分析天平

（3）涡旋混合器

（4）冷冻离心机：转速不低于 10000r/min

（5）超声仪

2.3.2 试剂与材料

（1） 乙腈：色谱纯

（2） 乙酸铵：色谱纯

（3） PTFE 微孔过滤膜：0.22μm

（4） C18和 NH2 双层复合固相萃取柱

（5） 标准溶液：氯霉素标准溶液、甲硝唑标准溶液、D5-氯霉素标准溶液、D4-甲硝唑标准溶液

（6） 标准物质名称：蜂蜜中甲硝唑残留分析标准物质；参考样来源：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所；标准物质编号 GBW(E)100568；有效期 24 个月（定值日期：2022 年 9 月）； 批号 568202209 标准值 13.7±1.7（μg/kg）

（7） 试验用水为符合 GB/T 6682 的一级水

3. 实验方法

3.1 仪器条件

3.1.1 液相色谱条件

（1）色谱柱：Waters BEH C18 柱，100mm×2.1mm，粒径 1.7μm 或性能相当者

（2）流速: 0.25 mL/min

（3）柱温：40℃

（4）进样量：5μL

（5）流动相：A=5mM 乙酸铵水溶液，B=乙腈溶液

（6）梯度洗脱条件见表 1.

表 1 液相梯度洗脱程序

时 间（min)	流动相 *A*	流动相 *B*
初始	*95*	*5*
0.5	*95*	*5*
3	*0*	*100*
4	*0*	*100*
5	*95*	*5*

3.1.2 质谱条件

离子源参数

甲硝唑

模式：	ES+
喷雾电压(KV)	3
锥孔电压(V)	38
离子源温度(°C)	500
脱溶剂气流量(L/Hr）	1000
锥孔反吹气流量（L/Hr)	150

雾化气压力（bar）	7

氯霉素

模式：	ES-
喷雾电压(KV)	1.5
锥孔电压(V)	40
离子源温度(°C)	500
脱溶剂气流量(L/Hr）	1000
锥孔反吹气流量（L/Hr)	150
雾化气压力（bar）	7

检测方式：MRM (多反应监测），参数见表 2。

表 2 MRM 参数

化合物	模式	母离子（m/z）	子离子（m/z）	锥孔电压（v）	碰撞电压（v）
氯霉素	ES-	321.0	152.0*	26	16
		321.0	194.0	26	10
氯霉素-D5		326.1	157.0*	26	16
甲硝唑	ES+	172.0	82.0	22	23
		172.0	128.0*	22	14
甲硝唑-D4		176.0	128.0*	22	16

备注：*为定量离子

3.2 前处理方法

3.2.1 样品的制备及保存

对无结晶的实验室样品，将其搅拌均匀。对有结晶的样品，在密闭情况下，

置于不超过 60℃ 的水浴中温热，振荡，将样品全部融化后搅匀，冷却至室温。分出 0.5kg 作为试样，制备好的试样置于样品瓶中，密封，并做上标记。

3.2.2 试样保存

将试样于常温下保存。

3.2.3 试样的前处理

称取蜂蜜 5.00g（精确至 0.01g）于 50mL 离心管中，分别加入 40μL 100ng/mL D5-氯霉素、D4-甲硝唑应用液，加水 5mL，混匀溶解，再加入 10mL 乙腈，涡旋混匀，超声 30min，10000rpm 离心 10min，吸取上层乙腈 5mL 入 10mL 试管。将 5mL 待净化液直接上样 C18 和 NH_2双层复合固相萃取柱，接收全部流出液，将接出的流出液 40℃ 水浴条件下氮吹至近干，用水定容至 1mL，过膜，上机测定。

4. 验证内容

4.1 标准曲线、检出限、定量限

按照实验需要用乙腈/水（体积比 1：:1）配制 1.0-50.0μg/L 的混合标准系列，内标浓度为 2.0μg/L。临用现配。

取样量按 *5.00g* 计算，以定性离子通道中 *3* 倍信噪比（*S/N*）对应的浓度为方法定性限，*10* 倍信噪比（*S/N*）对应的浓度为方法定量限。

标准曲线、检出限和定量限结果列于附表。

4.2 回收加标实验

向样品中加入已知量的标准溶液和内标溶液，制备低、中、高三个加标浓度的样品（n=6），室温放置过夜后按照 3.2 样品前处理方法进行样品前处理，后上机测定，计算回收率和精密度（n=6）。结果列于附表。

4.3 参考样测定

准确称取蜂蜜参考样 2.50g（精确至 0.01g）于 50mL 离心管中，加入 40μL 100ng/mL 氯霉素-D5、甲硝唑-D4 的混合使用液，加水 2.5mL，混匀溶解，再加入 10mL 乙腈，涡旋混匀，超声 30min，10000rpm 离心 10min，吸取上层乙腈 5mL 入 10mL 试管。将 5mL 待净化液直接上样 C18 和 NH2 双层复合固相萃取柱，接收全部 流出液，将滤过液 40℃ 水浴条件下氮吹至近干，用水定容至 1mL，过膜，

上机测定。结果见附表。

4.4 参考样加标实验

4.4.1 加标样品的制备：准确称取蜂蜜参考样 2.50g（精确至 0.01g）于 50mL 离心管中，加入 340μL 100ng/mL 的甲硝唑和氯霉素混合标准溶液，涡旋，超声 30min，室温放置过夜。

4.4.2 样品测定：按照 4.3 参考样测定的样品前处理方法进行样品制备。结果见附表。

4. 谱图

谱图包括溶剂标准品色谱图和质谱图、加标样品色谱图和质谱图等。

5. 结论：对该方法完成了方法学验证，结果表明该方法样品前处理简单、快速，实验检测结果准确可靠，可用于蜂蜜中氯霉素和甲硝唑残留量的测定。

6.问题与建议

附表

附表 1　溶液中甲硝唑、氯霉素的校准曲线及灵敏度

化合物	保留时间（min）	线性方程	线性范围（μg/L）	相关系数 r	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
甲硝唑	1.87	y=0.548149x+0.00196136	0.1~50	0.9998	0.10	0.30
氯霉素	2.57	y=1.11389x+0.0158289	0.1~50	0.9999	0.10	0.30

附表 2　蜂蜜样品中准确度和精密度

化合物名称	本底值 (μg/kg)	加标量 (μg/kg)	回收率范围 (%)	平均回收率 (%)	RSD(%)
甲硝唑	<0.1	0.3	99.1-105.9	102.7	3.6
		0.6	95.7-102.5	99.3	3.6
		5.0	100.0-101.5	100.9	0.7
氯霉素	<0.1	0.3	92.6-99.8	96.1	4.1
		0.6	92.4-95.6	93.5	1.6
		5.0	97.9-101.6	99.8	1.5

附表 3. 参考样测定结果

称样量（g）	测定值（μg/kg）	平均值（μg/kg）	Rc（%）	标准值（μg/kg）	判定
2.569	13.8	13.8	0	13.7±1.7	在控
2.543	13.8				

附表 4　参考样加标样品中甲硝唑和氯霉素的测定

化合物名称	称样量（g）	本底值 (μg/kg)	加标量 (μg/kg)	测得值（μg/kg）	回收率（%）	Rc (%)
甲硝唑	2.412	13.7	13.6	28.8	111.0	2.1
	2.494			28.2	106.6	
氯霉素	2.412	<0.1	13.6	14.1	103.7	8.8
	2.494			12.9	94.9	

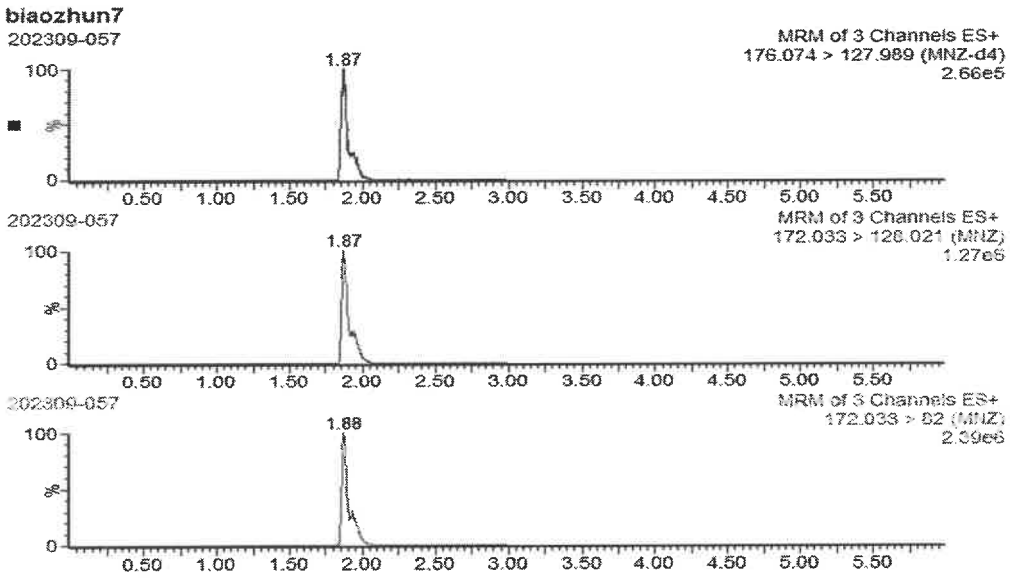

图 1（a）溶液中甲硝唑和甲硝唑-D4 的提取离子流色谱

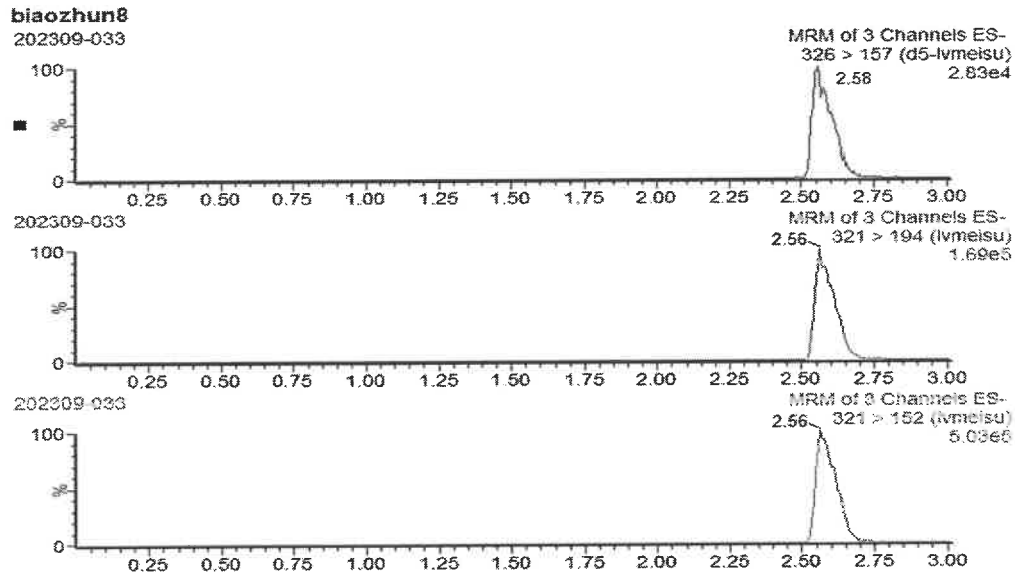

图 1（b）溶液中氯霉素和氯霉素-D5 的提取离子流色谱图（EIC）

图 1. 溶液中甲硝唑和氯霉素及其内标的提取离子流色谱图（EIC）

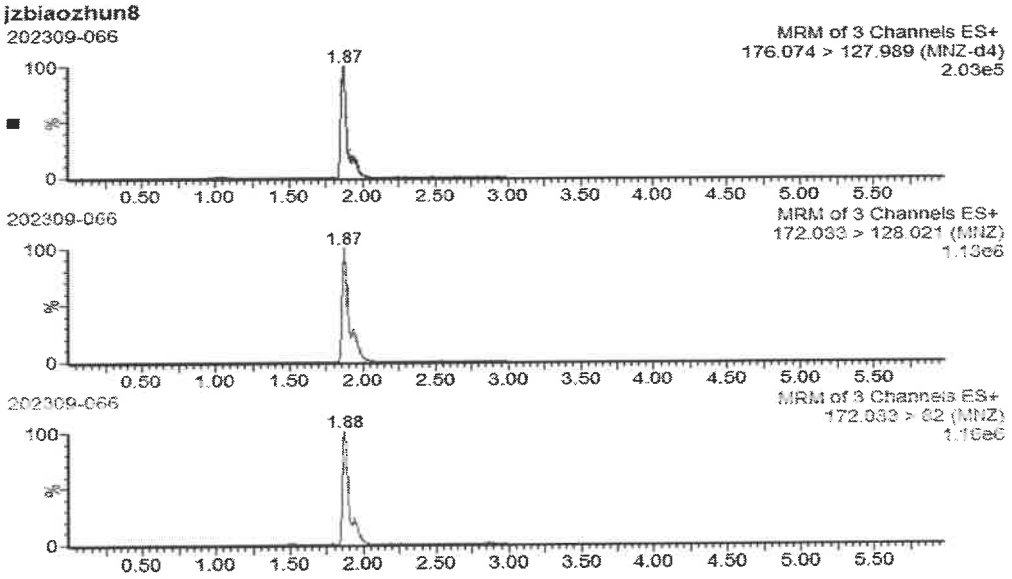

图 2（a）空白基质加标样品中的甲硝唑和甲硝唑-D4 的提取离子流色谱图（EIC）

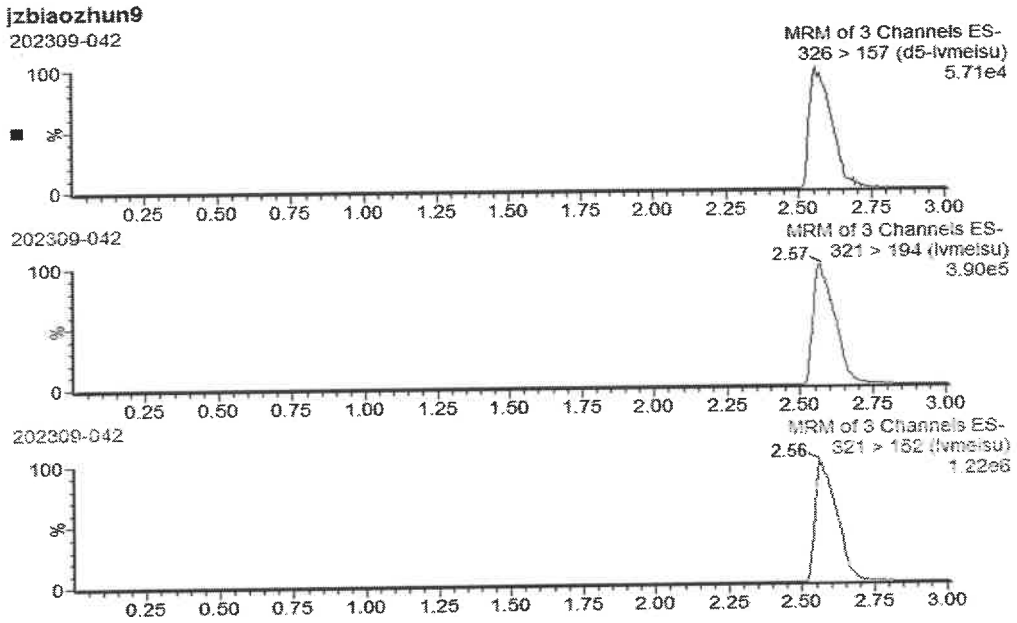

图 2（b）空白基质加标样品中氯霉素和氯霉素-D5 的提取离子流色谱图（EIC）

图 2. 空白基质加标样品中甲硝唑和氯霉素及其内标的提取离子流色谱图（EIC）

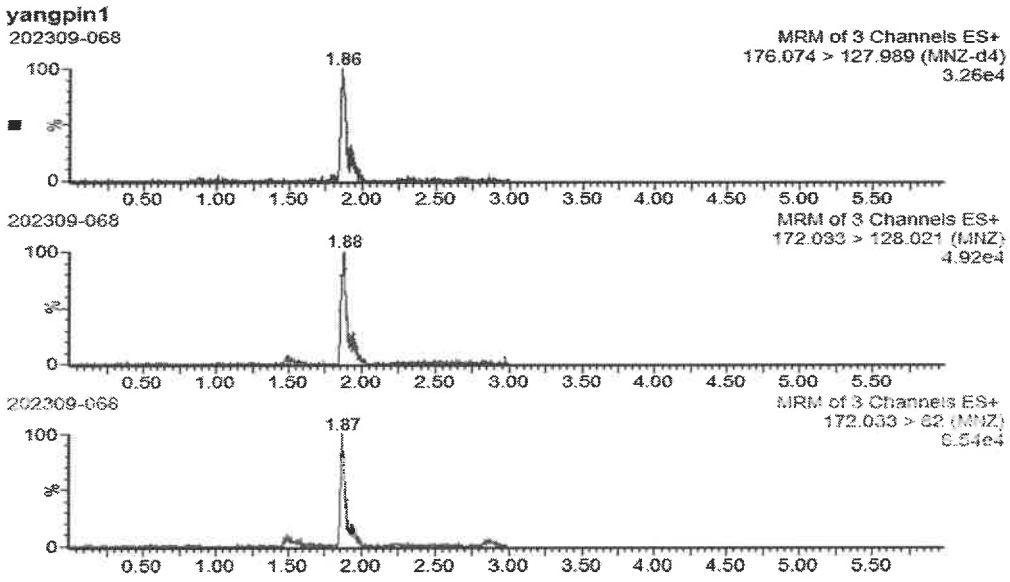

图 3. 参考样中甲硝唑和甲硝唑-D4 的提取离子流色谱图（EIC）

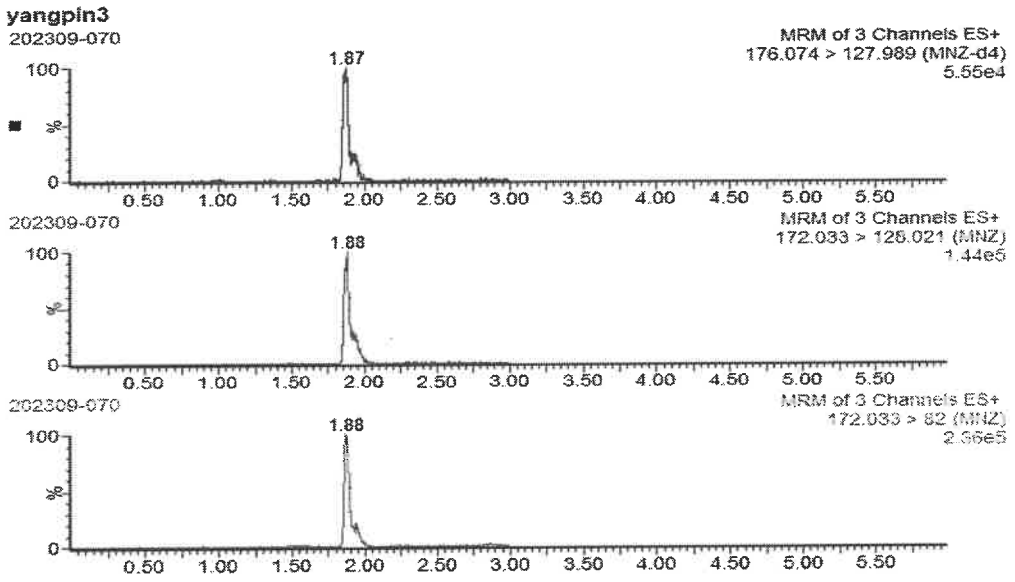

图 4（a）参考样加标样品中甲硝唑和甲硝唑-D4 的提取离子流色谱图（EIC）

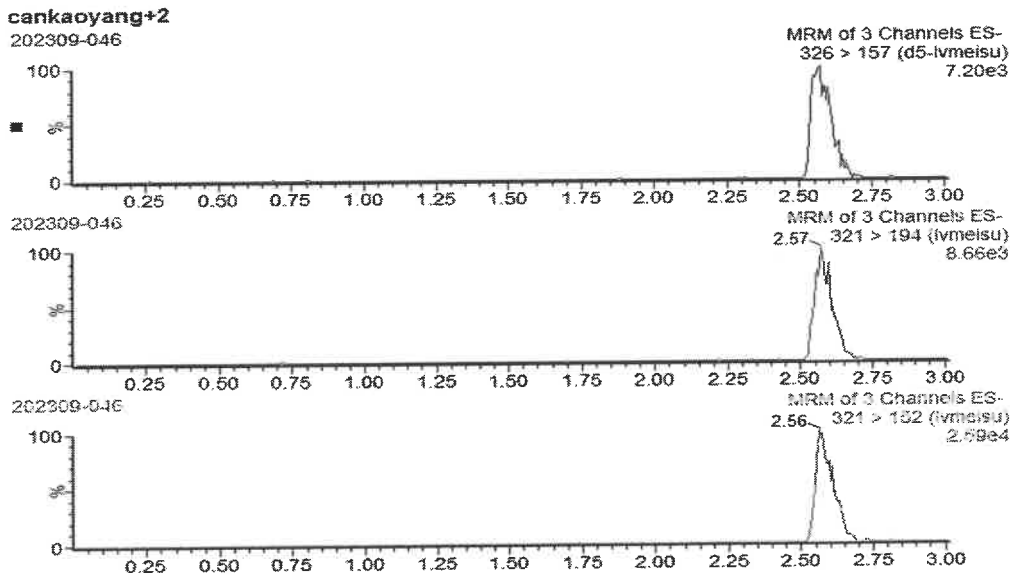

图 4（b）参考样加标样品中氯霉素和氯霉素-D5 的提取离子流色谱图（EIC）

图 4. 参考样加标样品中甲硝唑和氯霉素及其内标的提取离子流色谱图（EIC）