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） 北京市疾病预防控制中心

通讯地址 北京市东城区和平里中街 16 号

验证人员 张楠 王子怡

报告日期 2023.8

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 - TQS）

（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，50mm×2.1mm，粒径 1.7μm

（2）流速: 0.3 mL/min

（3）柱温：40℃

（4）进样量：3μL

（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)	2.8
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	40	20
		321.0	257.0	40	15
氯霉素-D5		326.1	157.0	40	20
		326.1	262.1	40	15
甲硝唑	ES+	172.1	82.1	20	20
		172.1	128.1	20	15
甲硝唑-D4		176.1	82.1	20	20
		176.1	128.1	20	15

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 的 D5-氯霉素、D4-甲硝唑中间液，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 NH_2 双层复合固相萃取柱，接收全部流出液，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 样品提取：加入 40μL 100ng/mL D5-氯霉素和 D4-甲硝唑混合使用液，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，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. 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、标准曲线等。

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	3.19	y=0.5465x-0.0070	0.1~50	0.9998	0.10	0.30
氯霉素	3.90	y=0.3624x-0.0078	0.1~50	0.9995	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	0.30	97.1~102.5	100.5	2.0
		0.60	92.1~101.2	96.9	3.9
		5.0	83.7~96.9	95.5	1.3
氯霉素	<0.1	0.30	84.6~100.9	92.2	8.5
		0.60	83.9~89.7	85.9	2.4
		5.0	84.5~91.4	87.2	3.8

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
2.39	12.9	12.9	0	13.7±1.7	在控
2.43	12.9				

附表　　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	2.50	13.7	13.6	26.1	91.2	4.7
	2.50			24.9	82.4	
氯霉素	2.50	<0.1	13.6	12.0	88.2	1.7
	2.50			12.2	89.0	

附谱图：

1. 溶液中氯霉素、甲硝唑及内标的色谱图
2. 空白基质中氯霉素、甲硝唑及内标的色谱图
3. 标准曲线
4. 参考样色谱图
5. 参考样加标样品色谱图

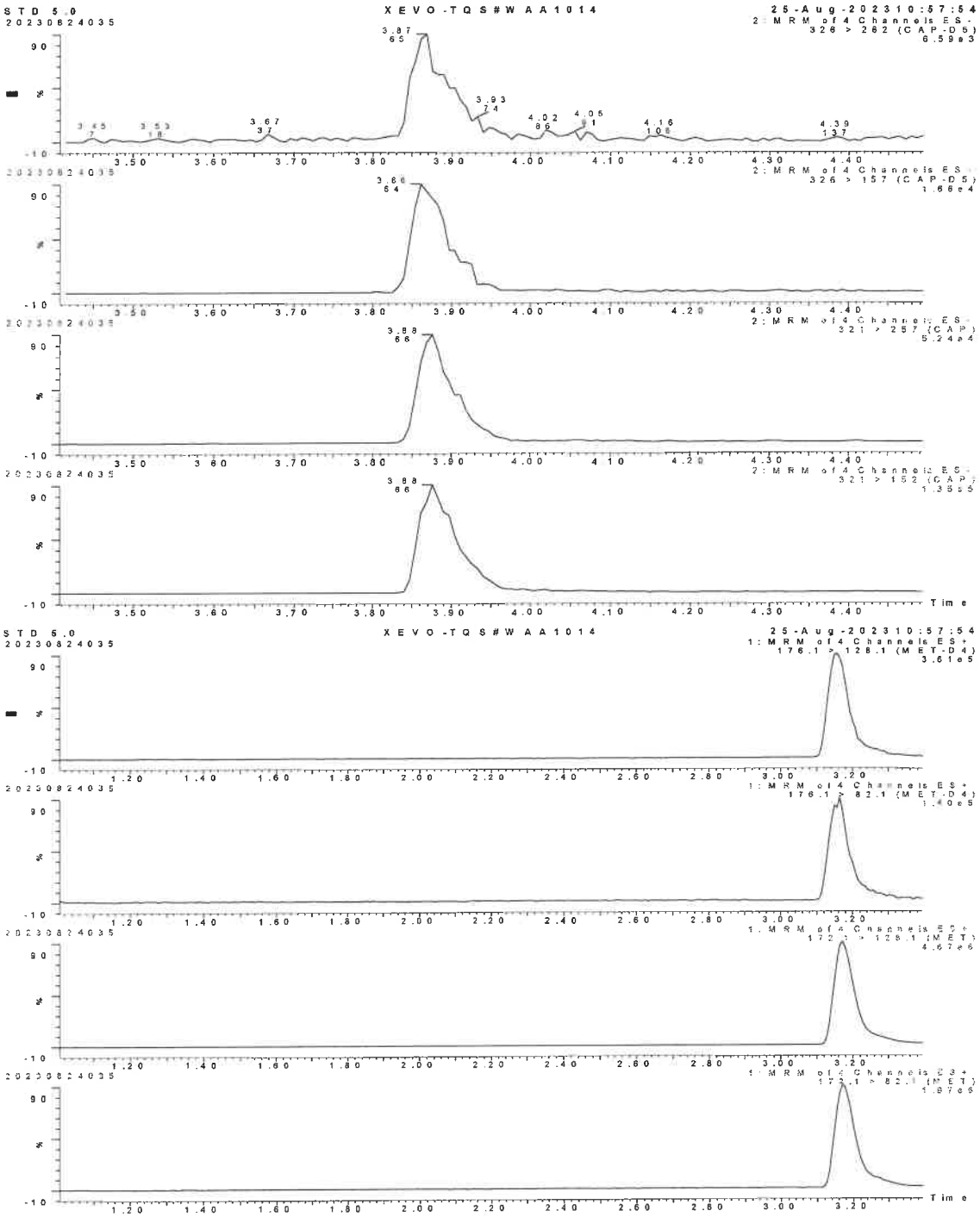


图 1. 溶液中氯霉素、甲硝唑及内标的 EIC 色谱图

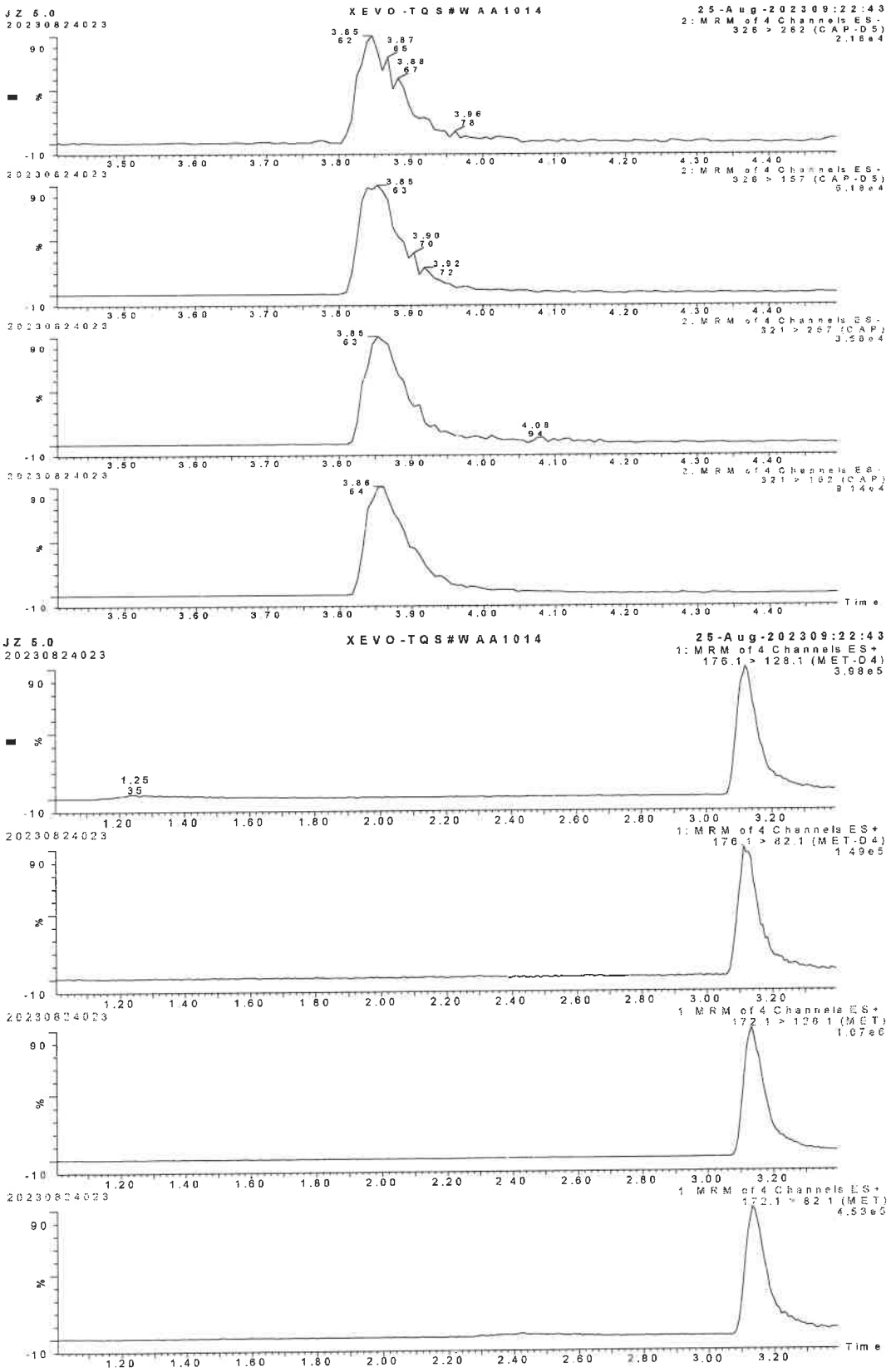


图 2. 空白基质中氯霉素、甲硝唑及内标的 EIC 色谱图

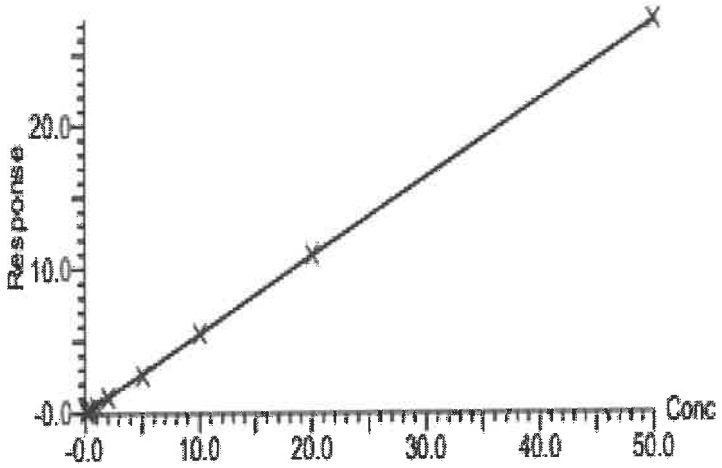


图 3a. 乙腈/水混合溶液中甲硝唑标准曲线

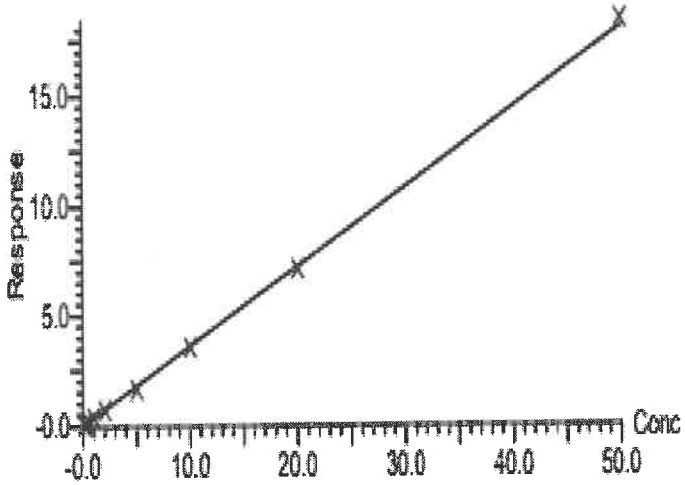


图 3b. 乙腈/水混合溶液中氯霉素标准曲线

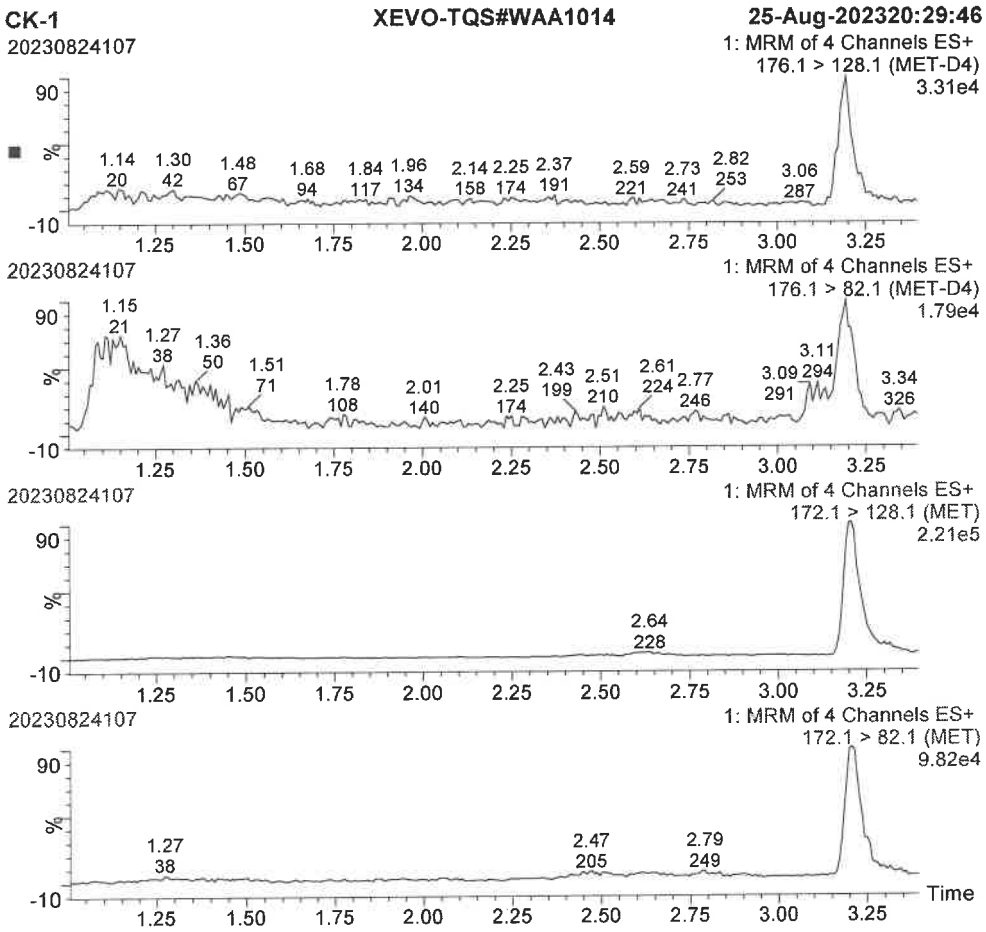
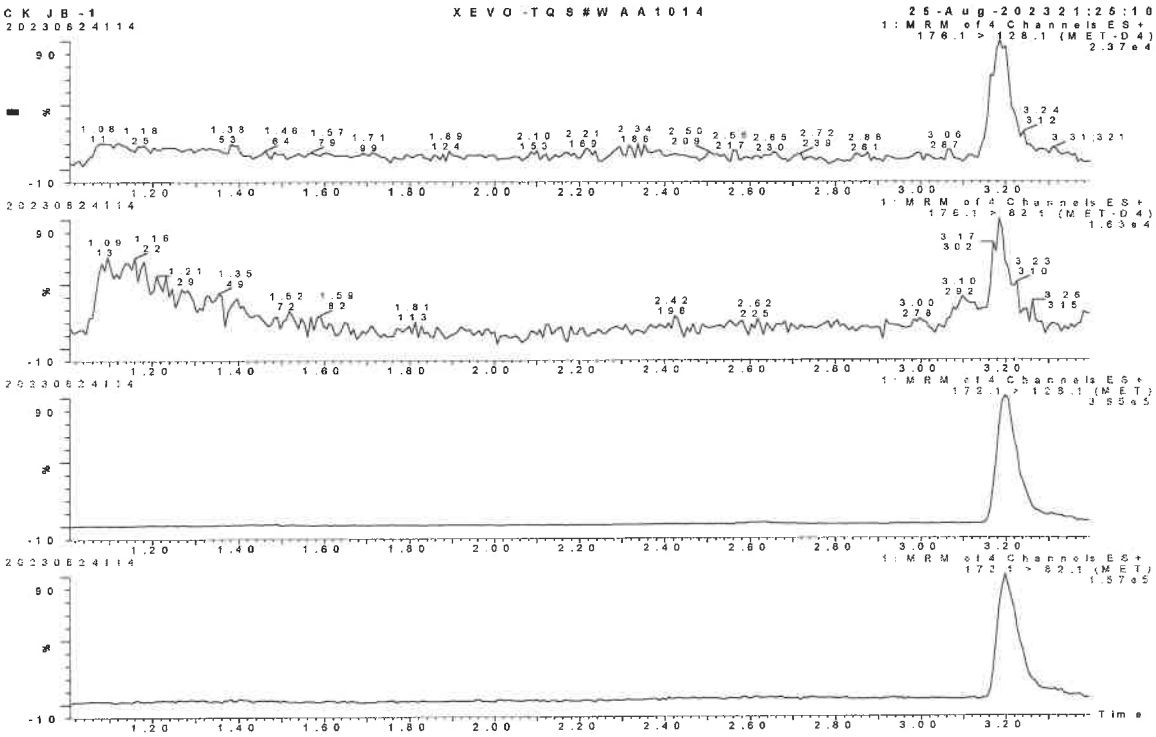
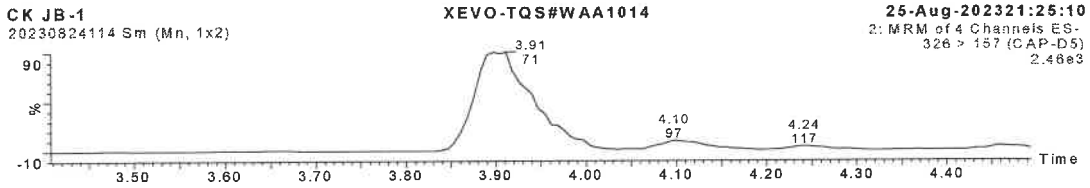
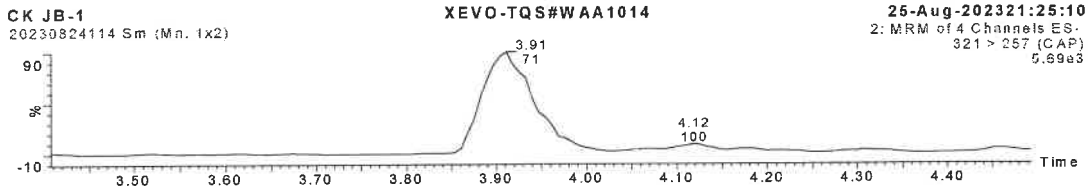
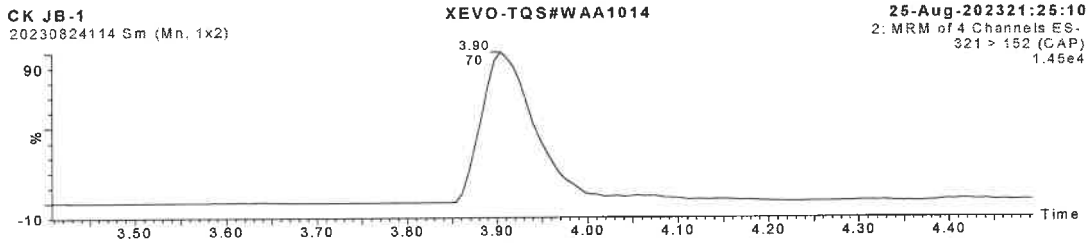


图 4. 参考样中甲硝唑及内标的 EIC 色谱图









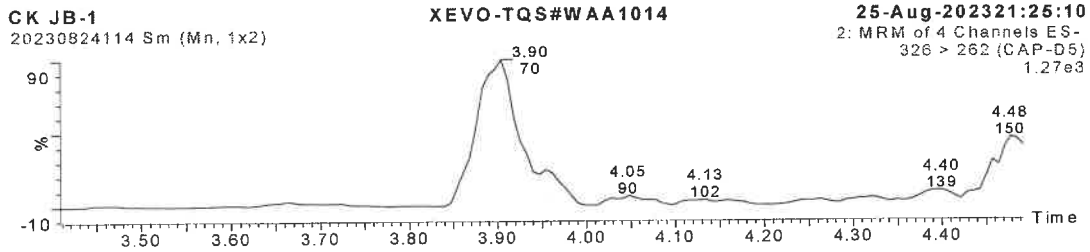


图 5. 参考样加标样品中甲硝唑、氯霉素及内标的 EIC 色谱图