ICS 67.050
CCS X 04

T/BPMA

北 京 预 防 医 学 会 团 体 标 准

T/BPMA XXXX—XXXX

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

Method of determination of chloramphenicol and metronidazole residues in honey by LC-MS-MS method

征求意见稿

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

北京预防医学会　　发 布

目　　次

前言 II
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　原理 1
5　试剂和材料 1
6　仪器 1
7　试样的制备和保存 2
8　测定步骤 2
9　结果计算 3
10　方法检测的灵敏度、准确度、精密度 4
附录 A（资料性）　标准溶液中甲硝唑和氯霉素的色谱图 5

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。

本文件由北京市通州区疾病预防控制中心提出。

本文件由北京预防医学会归口。

本文件起草单位：北京市通州区疾病预防控制中心、北京市顺义区疾病预防控制中心、北京市海淀区疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：魏玉霞、王建国、刘盛田、王芳、崔悦、王静、左郡、杨文英、王艳春、李晓辉、曹冬、籍术良、李秦、马爱英、李亚、张子彤。

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

1 范围

本文件给出了蜂蜜中氯霉素和甲硝唑残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。
本文件适用于蜂蜜中氯霉素和甲硝唑残留量的测定。

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

3.术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

3 原理

试样用乙腈提取，提取后经固相萃取柱净化，氮吹浓缩，液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明，本方法所用试剂均为优级纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

4.1 乙腈：色谱纯。
4.2 乙酸铵：色谱纯。
4.3 PTFE 微孔过滤膜：0.22 μm。
4.4 C 18 和 NH_2 复合小柱。
4.5 乙腈-水溶液：10 mL 乙腈和 90 mL 水，混合均匀。
4.6 5 mmol/L 乙酸铵溶液：准确称取 0.385 g 乙酸铵，用水溶解，定容至 1 L。
4.7 氯霉素标准溶液：100 μg/mL。
4.8 甲硝唑标准溶液：100 μg/mL。
4.9 氯霉素-D5 标准溶液：100 μg/mL。
4.10 甲硝唑-D4 标准溶液：100 μg/mL。
4.11 混合标准中间液：分别准确吸取甲硝唑标准溶液和氯霉素标准溶液 0.50 mL 于 50 mL 容量瓶中，用乙腈配制为 1.00 μg/mL 的混合标准中间液。
4.12 混合标准使用液：准确吸取 1.00 μg/mL 的混合标准中间液 5.00 mL 于 50 mL 容量瓶中，用乙腈配制为 100 μg/L 的混合标准使用液。
4.13 混合内标中间液：分别准确吸取甲硝唑-D4 标准溶液和氯霉素-D5 标准溶液 0.50 mL 于 50 mL 容量瓶中，用乙腈配制为 1.00 μg/mL 的混合内标中间液。
4.14 混合内标使用液：准确吸取 1.00 μg/mL 的混合内标中间液 5.00 mL 于 50 mL 容量瓶中，用乙腈配制为 100 μg/L 的混合内标使用液。
4.15 混合标准系列溶液：分别准确吸取一定量的混合标准使用液和混合内标使用液，用乙腈-水溶液配制氯霉素和甲硝唑浓度为：0.1 μg/L、0.2 μg/L、0.5 μg/L、1.0 μg/L、2.0 μg/L、5.0 μg/L、10.0 μg/L、20.0 μg/L、50.0 μg/L 的混合标准系列，内标浓度为 2.0 μg/L。

5 仪器

5.1 液相色谱-串联四极杆质谱仪：配有电喷雾离子源。
5.2 分析天平：感量 0.1 mg 和 0.01 g。
5.3 色谱柱（BEH C18，100 mm×2.1 mm，1.7 μm）或相当者。
5.4 涡旋混合器。
5.5 冷冻离心机：转速 10000 r/min。
5.6 超声仪。
5.7 氮吹仪或相当者。

6 试样的制备和保存

6.1 试样的制备

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0.5 kg作为试样，制备好的试样置于样品瓶中，密封，并做上标记。

6.2 试样保存

将试样于常温下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

称取蜂蜜5.00 g（精确至0.01 g）于50 mL离心管中，分别加入40 μL 100 μg/L混合内标使用液，加水5 mL，混匀溶解，再加入10 mL乙腈，涡旋提取2 min，超声提取30 min，10000 rpm离心8 min，吸取上清液于另一洁净试管。

7.2 净化

准确移取5 mL上清液直接上样C18和NH_2复合小柱，接收全部流出液，将接出的流出液在40 ℃水浴条件下氮吹至近干，用水定容至1 mL，过膜，上机测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱参考条件

a) 色谱柱： BEH C18 色谱柱，100 mm×2.1 mm，粒径 1.7 μm，或性能相当者。
b) 流动相 A= 5 mmol/L 乙酸铵溶液， B=乙腈，梯度洗脱程序见表 1。
c) 柱温：40 ℃。
d) 流速: 0.3 mL/min。
e) 进样量：5 μL。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间（min)	5 mmol/L乙酸铵溶液 %	乙腈 %
初始	95	5.0
0.5	95	5.0
3.0	0	100
4.0	0	100
5.0	95	5.0

7.3.2 甲硝唑质谱参考条件

a) 电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI^+）。
b) 毛细管电压：3 KV。
c) 离子源温度：500 ℃。

d) 脱溶剂气流量：1000 L/Hr。
e) 锥孔反吹气流量：150 L/Hr。
f) 雾化器压力：7 bar。
g) 检测方式：多反应监测模式（MRM），离子对、锥孔电压、碰撞电压见表 2。

7.3.3 氯霉素质谱参考条件

a) 电离方式：电喷雾电离，负离子模式（ESI⁻）。
b) 毛细管电压：2.8 KV。
c) 离子源温度：500 ℃。
d) 脱溶剂气流量：1000 L/Hr。
e) 锥孔反吹气流量：150 L/Hr。
f) 雾化器压力：7 bar。
g) 检测方式：多反应监测模式（MRM），离子对、锥孔电压、碰撞电压见表 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	ES-	326.1	157.0*	40	20
		326.1	262.1	40	15
甲硝唑	ES+	172.1	128.1*	20	20
		172.1	82.1	20	15
甲硝唑-D4	ES+	176.1	82.1	20	20
		176.1	128.1*	20	15
注：*为定量离子					

7.3.4 定性测定

在相同实验条件下，样品中待测化合物的保留时间与相应标准品色谱峰的保留时间一致，变化范围应在±2.5% 之内；在相同的保留时间下提取到与已知标准相同的特征离子；与已知标准的特征离子相对丰度的允许偏差不超出表 3 规定的范围；满足以上条件即可进行确证。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度（%）	≤ 10	＞ 10～20	＞ 20～50	＞ 50
允许相对偏差（%）	±50	±30	±25	±20

7.3.5 定量测定

在液相色谱-串联质谱设定条件下分别进样混合标准系列溶液，绘制标准工作曲线，用标准工作曲线对样品进行定量，样品溶液中氯霉素、甲硝唑的响应值均应在仪器测定的线性范围内，在上述色谱条件下，氯霉素和甲硝唑的参考保留时间、提取离子流色谱图参见附录A。

7.4 平行试样

按7.1~7.2进行平行样品制备，在7.3条件下对同一试样进行平行试样测定。

7.5 空白试验

除不称取试样外，按7.1~7.2进行样品制备，在7.3条件下进行空白试验测定。

8 结果计算

结果按式（1）计算：

$$X = \frac{C \times V1 \times V3 \times 1000}{m \times V2 \times 1000} \quad \cdots\cdots(1)$$

式中：

X ——样品中目标物含量，单位为 μg/kg；

C ——进样溶液中目标物在标准曲线中对应的浓度，单位为 μg/L；

V1 ——提取液体积，单位为 mL；

V2 ——用于净化的样品体积，单位为 mL；

V3 ——定容体积，单位为 mL；

1000 ——换算系数；

m ——试样的称样量，单位为 g。

9 方法检测的灵敏度、准确度、精密度

9.1 灵敏度

取样量按 5.00 g 计算，方法检测的检出限为：氯霉素 0.10 μg/kg，甲硝唑 0.10 μg/kg。定量限：氯霉素 0.30 μg/kg，甲硝唑 0.30 μg/kg。

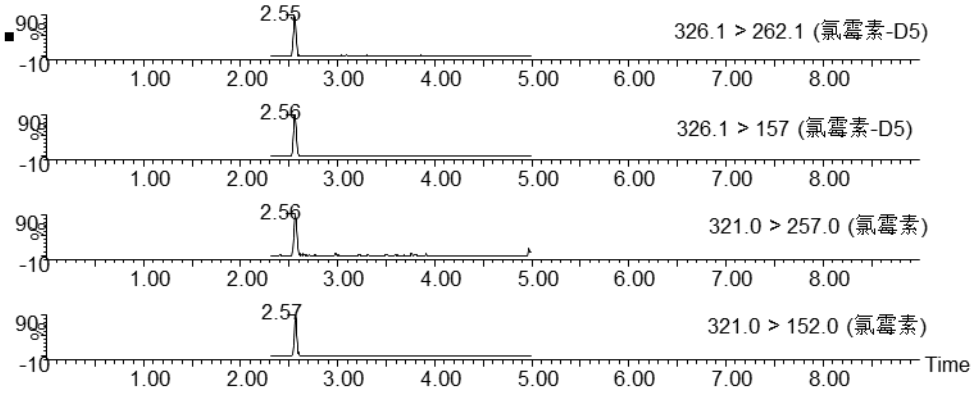
9.2 准确度

本方法在 0.30 μg/kg ~5.0 μg/kg 范围内，进行低、中、高三个不同浓度水平的加标回收测定，回收率范围为：71.0%~118.8%。

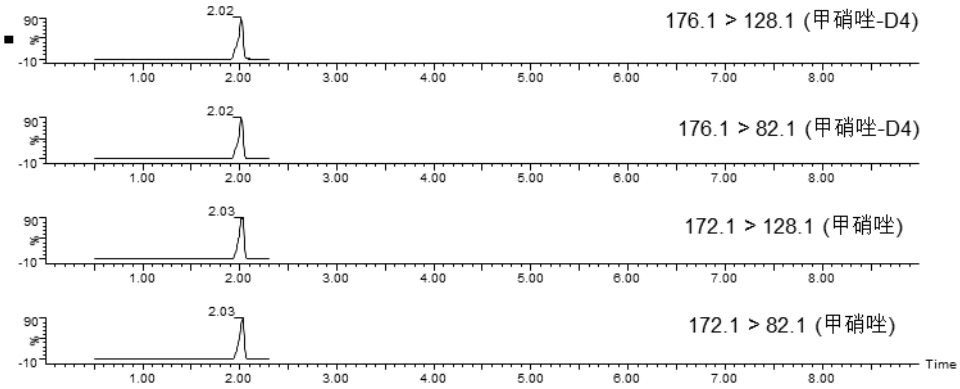
9.3 精密度

本方法的批内变异系数≤20%，批间变异系数≤20% 。

附 录 A
（资料性）
标准溶液中甲硝唑和氯霉素的色谱图



图A.1 标准溶液中氯霉素和氯霉素-D5 的提取离子流色谱图(EIC)



图A.2 标准溶液中甲硝唑和甲硝唑-D4 的提取离子流色谱图(EIC)