

《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》编制说明

一、工作简况

1.1 标准来源和起草单位

团体标准《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》，来源于北京预防医学会，于2023年2月由北京市通州区疾病预防控制中心向北京预防医学会提出申请，经专家评审后获得立项。起草单位包括：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。

1.2 主要工作过程

1.2.1 标准立项

2023年1月，北京市预防医学会发布了《关于开展2023年团体标准编制工作的通知》。2023年2月，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和海淀区疾病预防控制中心三家单位对蜂蜜中甲硝唑和氯霉素残留量检测的相关技术成果进行整理，进行标准立项申报。2023年3月，该项目经北京预防医学会专家评审立项。

1.2.2 成立标准编制小组

2023年2月，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三家起草单位成立了标准编制小组。确定了标准制定计划，标准编制组成员及其主要工作为：

北京市通州区疾病预防控制中心：魏玉霞、王建国、王芳、左郡、杨文英、王艳春、李晓辉、李亚、张子彤、籍术良：主要负责前期调研、成立编制组、检测方法的开发、建立、验证和应用、标准申报、标准起草、征求意见和汇总、以及后续的标准修改、标准解读等相关事项等工作。

北京市顺义区疾病预防控制中心：刘盛田、王静、李秦：作为标准申报起草单位，负责方法技术方案确认、方法验证、验证方案、验证报告等相关事项。

北京市海淀区疾病预防控制中心：崔悦、曹冬、马爱英：作为标准申报起草单位，负责方法技术方案确认、进行标准申报、标准起草、征求意见和汇总、以及后续的标准修改、标准解读等相关事项。

1.2.3 制定方案：

查阅相关文献和资料，总结和分析目前相关检测方法的优缺点，提出《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》团体标准的起草方案，

并拟定起草标准的具体方法和步骤。

1.2.4 开展实验工作进行方法建立和确认，组织方法验证

2023 年 3 月至 8 月标准编制组按照实验方案，结合本单位实验室条件，参照相关标准，在前期技术基础上，进一步进行优化和确认相应的样品前处理方法和分析检测方法。并进行了方法学参数的验证。

2023 年 8 月组织北京市顺义区疾病预防控制中心和北京市疾病预防控制中心进行了方法验证。

1.2.5 编写标准征求意见稿和编制说明

2023 年 8-9 月，标准编制组编制征求意见稿和编制说明。

二、标准编制的必要性和预期效果

2.1 必要性

蜂蜜富含糖类、黄酮类、维生素等多种营养物质，是一款老少皆宜的营养滋补品。蜂蜜养殖中的某些蜜蜂疾病，可以采用抗生素治疗。同时，抗生素的使用会导致蜂蜜中抗生素的残留和聚积。食用有抗生素残留的蜂蜜会对人体健康产生不同程度的影响和危害。

甲硝唑属于硝基咪唑类抗生素，被普遍用于预防和控制蜜蜂孢子虫病，对厌氧细菌十分有效。近年来，一些研究和文献报道，硝基咪唑类抗生素具有遗传毒性、致突变性和致癌性。氯霉素是一种酰基醇类广谱抗生素，对多种需氧和厌氧微生物具有活性，它的蛋白质抑制特性使其可有效治疗蜂蜜养殖中的多种传染病。

《GB 14963-2011 食品安全国家标准 蜂蜜》中 3.5 兽药残留限量和农药残留限量中规定兽药残留限量兽药残留限量应符合相关标准的规定。《GB 31650-2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》规定甲硝唑允许做治疗用，但不得在动物性食品中检出。中华人民共和国农业农村部公告第 250 号公告中规定在动物源性食品中氯霉素及其残留物不得检出。但有文献报道蜂蜜中甲硝唑和氯霉素仍有检出，因此有必要进行蜂蜜中甲硝唑和氯霉素同时检测的方法研究，并建立蜂蜜中氯霉素和甲硝唑残留量同时测定的标准方法，为蜂蜜中氯霉素和甲硝唑的测定提供一种补充方法和技术支持，为食品监管部门提供监管和执法依据，保障食品安全。

现行国家标准和公告中已有蜂蜜中氯霉素残留测定的液相色谱-串联质谱法和气相色谱质谱法（GB/T 20744-2006，农业部 781 号公告-10-2006，GB/T 18932.19-2003，GB/T 18932.20-2003，GB/T 18932.21-2003）以及甲硝唑类化合物检测的液相色谱-串联质谱法（GB/T 20744-2006），但关于同时检测蜂蜜中甲硝唑和氯霉素的标准方法尚未颁布和实施。鉴于此，本项目拟申报适用于蜂蜜中

的甲硝唑和氯霉素残留量同时测定的液相色谱-串联质谱法。为蜂蜜中甲硝唑和氯霉素残留量的同时测定提供一种方法补充和技术支持。

2.2 预期效果

本项目申报的是适用于蜂蜜中甲硝唑和氯霉素残留量同时测定的液相色谱质谱方法。该项目的实施将提供快速同时测定蜂蜜中甲硝唑和氯霉素残留量的方法，为蜂蜜中甲硝唑和氯霉素残留量的快速、准确、同时测定提供标准方法和技术支持，是现行蜂蜜中甲硝唑和氯霉素检测方法的补充。

三、标准编制的原则和依据

遵循统一性、协调性、适用性、一致性、规范性的原则，尽可能与通行标准接轨，注重标准的可操作性。本标准依据《GB/T1.1-2020 标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》。文本中的计量、单位、公示、符号以及数据分析均按照《GB/T 20001.4-2015 标准编写规则：化学分析方法》中的要求进行。保证标准的适用性；保持标准的先进性；注意标准的统一性和协调性；注意标准的经济性和社会效益。

本次标准制订的基本原则如下：方法灵敏度满足实际样品测定的要求；方法准确可靠，满足各项方法特性指标的要求；方法适用性强，易于推广使用。

四、主要技术内容的论据

本方法适用于蜂蜜中甲硝唑和氯霉素残留量的测定。

本标准是新制订标准，标准编制组收集了大量相关资料，查询了相关法律法规和标准方法，确定了通过式固相萃取进行样品前处理，液相色谱-串联质谱进行分析检测的技术路线。本项目适用于蜂蜜中的氯霉素和甲硝唑的同时测定。

本标准的主要技术路线包括样品前处理条件的优化和液相色谱分离条件和质检测条件的优化，以及方法学参数考察，包括检出限、定量限、线性范围、准确度和精密度等。优化后的技术路线为：蜂蜜样品加水溶解，加乙腈涡旋混匀后，超声提取 30min。上清液过 C18 和 NH₂ 复合小柱进行净化，滤过液浓缩定容，在优化的液相色谱-串联质谱条件下上机测定。保留时间和离子对定性，内标法定量。

五、主要试验（或验证）的分析、综述报告

5.1 方法研究目标

建立液相色谱-串联质谱法检测蜂蜜中甲硝唑和氯霉素残留量的样品前处理条件方法和分析检测方法。

5.2 方法原理

试样经乙腈提取、通过式固相萃取净化，液相色谱-串联质谱检测，保留时

间和离子对定性，内标法定量。

5.3 样品制备条件的优化

5.3.1 提取溶剂的优化

在现行有关氯霉素的色谱-质谱检测标准中，提取溶剂多采用乙酸乙酯进行提取。农业部 781 号公告-10-2006、GB/T 18932.20-2003 和 GB/T 18932.19-2003 在试样制备中都采取了用水溶解蜂蜜试样，蜂蜜中的氯霉素残留用乙酸乙酯提取，提取液浓缩后再用水溶解的样品提取方法。在 GB/T 20744-2006 中试样制备用乙酸乙酯提取蜂蜜中甲硝唑、洛硝唑、二甲硝唑残留量的测定。

乙腈有优良的溶剂性能，能溶解多种物质，据文献报道在液相色谱-串联质谱分析检测的样品前处理和分析检测中得到了广泛的应用。团体标准 T/SDAA018-2021《鸡肉中 37 种兽药残留量的测定液相色谱-串联质谱法》和地方标准 DB12/T 987—2020《鲜、冻畜禽肉中磺胺类、喹诺酮类和四环素类兽药残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》中采用酸化乙腈进行多种兽药残留的提取。考虑到本实验中氯霉素最后是在负离子模式下进行检测，考察了用乙腈做提取溶剂时的提取效果，同时考察了乙酸乙酯做提取溶剂时的提取效果，并进行了比较。

结果表明，用乙腈做提取液时甲硝唑的提取效率为 87%，氯霉素的提取效率为 127%；用乙酸乙酯做提取溶液后吹干复溶，甲硝唑的提取效率为 83%，氯霉素的提取效率为 112%。由此可见，乙腈做提取液和乙酸乙酯做提取液，效果相当。且使用乙腈进行样品提取，提取液可直接上样固相萃取小柱，避免了在固相萃取上样前进行浓缩和复溶的操作，简化了提取流程，避免了浓缩和复溶过程中可能的损失。因此，本方法选择用乙腈进行蜂蜜中甲硝唑和氯霉素残留量的提取。

5.3.2 提取条件的优化

在蜂蜜中甲硝唑和氯霉素的相关检测标准中，GB/T 20744-2006，农业部 781 号公告-10-2006，GB/T 18932.20-2003，GB/T 18932.19-2003 等现行标准中，提取方式包括振荡器震荡、高速涡旋混合等提取方式，时间为 5-20min。T/SDAA 018-2021 和 DB12/T 987—2020 中进行兽药残留的提取时采用了涡旋、涡旋超声和振荡相结合的提取方式。

本方法结合现行标准提取方式，采用加入提取溶剂涡旋混匀后超声提取的提取方式，并考察了 10min 和 30min 的超声时间对样品提取的影响。结果表明，超声 10min 和 30min 时，甲硝唑和氯霉素的响应基本一致。为保证充分提取，本方法选择涡旋混匀后超声提取 30min。

5.3.3 净化条件的优化

在本方法中选择 C18 和 NH₂ 复合小柱，采用通过式固相萃取的方式进行样

品净化。通过式固相萃取的净化方式，是直接将样品上样固相萃取小柱，滤过液直接进行测定或者经过浓缩后上机测定。与传统的固相萃取中需要进行活化、上样、洗脱、浓缩等操作相比，操作简单，尤其适用于大批量样品的测定。

本方法在取样量 5.00g，0.10µg/kg 加标水平，比较了不同品牌固相萃取小柱中的净化效果。结果表明，在 0.10µg/kg 的加标浓度，采用不同品牌的固相萃取柱进行净化，甲硝唑和氯霉素响应的信噪比均可实现准确检出。

5.4 仪器分析条件的选择

5.4.1 液相色谱条件

- (1) 色谱柱：BEH C18 柱，100mm×2.1mm，粒径 1.7µm
- (2) 流速: 0.3 mL/min
- (3) 柱温：40℃
- (4) 进样量：5µL
- (5) 流动相：A=5mmol/L 乙酸铵水溶液，B=乙腈溶液，梯度洗脱条件见表 1。

表 1 液相梯度洗脱程序

时 间 (min)	5mmol/L 乙酸铵水溶液%	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

5.4.2 甲硝唑质谱条件

- (1) 电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI⁺）。
- (2) 毛细管电压：3 KV。
- (3) 离子源温度：500 ℃。
- (4) 脱溶剂气流量：1000 L/Hr。
- (5) 锥孔反吹气流量：150 L/Hr。
- (6) 雾化器压力：7 bar。
- (7) 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。

5.4.3 氯霉素质谱参考条件

- (1) 电离方式：电喷雾电离，负离子模式（ESI⁻）。
- (2) 毛细管电压：2.8 KV。
- (3) 离子源温度：500 ℃。
- (4) 脱溶剂气流量：1000 L/Hr。
- (5) 锥孔反吹气流量：150 L/Hr。
- (6) 雾化器压力：7 bar。
- (7) 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。在优化的液相色谱-质谱条件下甲硝唑、氯霉素及其内标的色谱图见图 1。

表 2 甲硝唑和氯霉素及其内标的 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

5.5 方法学参数

5.5.1 标准曲线及灵敏度

用乙腈/水溶液（体积比 1:9）配制以下浓度的标准曲线系列：0.10 μg/L、0.25 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。以待测物峰面积与内标峰面积比值为纵坐标、待测物浓度为横坐标绘制标准曲线。甲硝唑和氯霉素在 0.1~50μg/L 范围内，线性方程分别为： $y = 0.5674x - 0.4324$ 和 $y = 0.7594x + 0.2465$ ，线性相关系数分别为 0.994 和 0.999，线性良好。取样量按 5.00g 计算，以定性离子通道中大于 3 倍信噪比（S/N）对应的浓度为方法检出限，甲硝唑和氯霉素的检出限均为 0.10 μg/kg，大于 10 倍信噪比（S/N）对应的浓度为方法定量限，甲硝唑和氯霉素的检出限均为 0.30 μg/kg。

5.5.2 准确度和精密度

用空白蜂蜜样品，在低（0.3μg/kg）、中（0.6μg/kg）、高（5.0μg/kg）三个浓度水平进行加标实验，计算加标回收率和相对标准偏差（RSD），结果见表 3。由表可见，回收率在 71.0~118.8%之间，相对标准偏差在 4.3~8.0%之间，方法学验证参数，满足《GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测》中检测方法确认的技术要求中的规定。

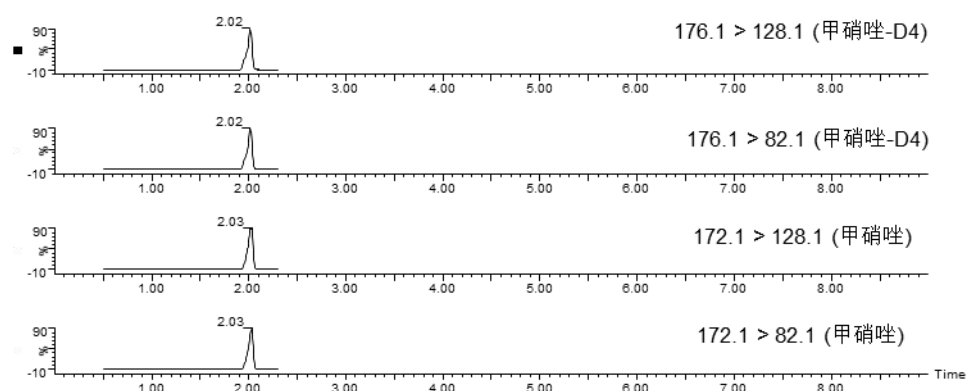


图 1a 标准溶液中甲硝唑和甲硝唑-D4 的提取离子流色谱图（EIC）

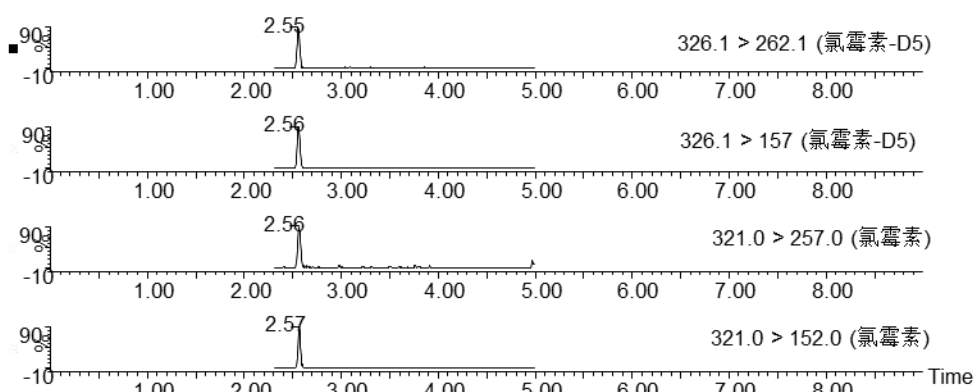


图 1 b

标准

溶液中氯霉素和氯霉素-D5 的提取离子流色谱图（EIC）

图 1 标准溶液中甲硝唑和氯霉素及其内标的提取离子流色谱图（EIC）

表 3 空白蜂蜜加标样品中的准确度和精密度（n=6）

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	83.5~100.9	92.5	6.2
		0.6	71.0~98.5	86.5	6.9
		5.0	73.7~94.9	80.3	4.7
氯霉素	<0.1	0.3	93.3~118.0	105.9	7.5
		0.6	78.9~112.9	100.9	8.0
		5.0	93.7~118.8	108.1	5.7

5.6 样品测定

5.6.1 定性：液相色谱-串联质谱法对样品定性确证须满足以下要求：

- （1）待测样品的保留时间在标准样品的保留时间的±2.5%之内；

- (2) 定性离子的信噪比大于 3 ($S/N>3$);
- (3) 与标准品相比, 样品的两个特征离子相对丰度在表 4 规定的许可范围内。

表 4 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

5.6.2 定量： 内标法定量

5.6.3 结果计算

结果按式 (1) 计算:

$$X = \frac{C \times V1 \times V3 \times 1000}{m \times V2 \times 1000}$$

式中:

- X ——样品中目标物含量, 单位为 $\mu\text{g/kg}$;
- C ——进样溶液中目标物按照内标法在标准曲线中对应的浓度, 单位为 $\mu\text{g/L}$;
- 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 。

5.7 参考样测定

5.7.1 样品信息

标准物质名称: 蜂蜜中甲硝唑残留分析标准物质; 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 ($\mu\text{g/kg}$)

5.7.2 参考样测定

样品按照本方法确定的样品制备条件和分析条件进行参考样测定, 甲硝唑的测定结果见表 5, 参考样中甲硝唑 EIC 色谱图见图 2。由表可见, 测定值在参考样标准值范围内, 结果满意。

表 5 参考样测定结果

称样量 (g)	测定值 ($\mu\text{g/kg}$)	平均值 ($\mu\text{g/kg}$)	Rc (%)	标准值 ($\mu\text{g/kg}$)	判定
2.52	12.8	12.6	3.2	13.7 ± 1.7	在控
2.21	12.4				

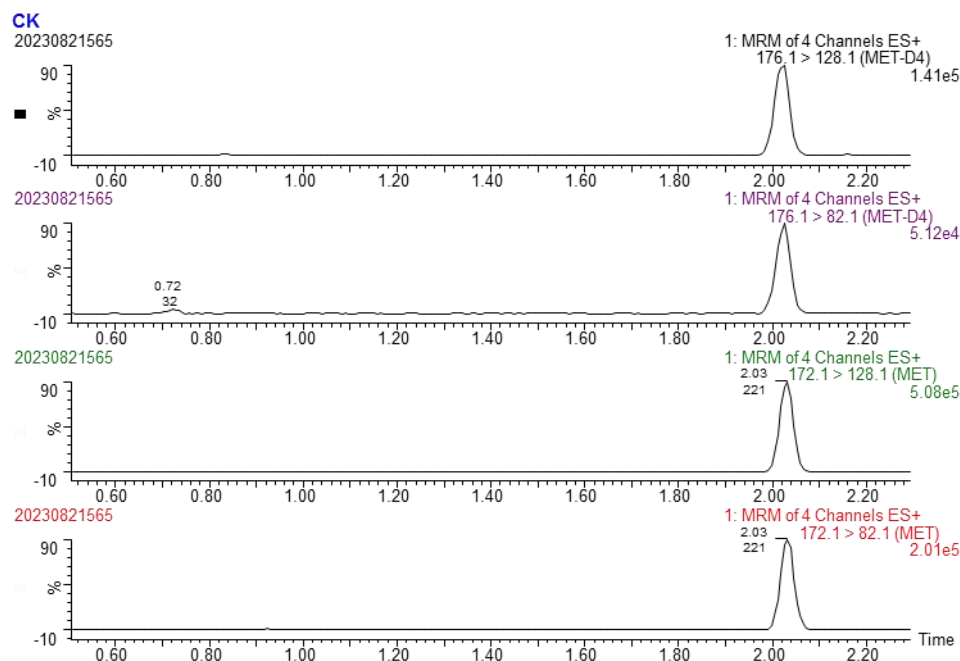


图 2 参考样中甲硝唑及内标的 EIC 色谱图

5.8 参考样加标回收实验

5.8.1 参考样加标样品的制备：准确称取 2.50g 参考样，按 13.7 μ g/kg 的加标量进行甲硝唑和氯霉素加标实验，加标后涡旋混匀，超声 30min，放置过夜。

5.8.2 参考样加标实验：按照本方法确定的样品制备条件和分析条件进行参考样加标回收实验，结果见表 6。由表可见，甲硝唑和氯霉素的回收率在 85.4~116.7% 之间，准确度好。

表 6 质控样加标回收实验结果

化合物	称样量（g）	本底值(μ g/kg)	加标量(μ g/kg)	测定值(μ g/kg)	回收率（%）
甲硝唑	2.50	13.7	13.7	23.4	85.4
				23.8	86.9
氯霉素	2.50	<0.1	13.7	16.0	116.7
				15.6	113.8

5.9 方法验证

北京市疾病预防控制中心、北京市顺义区疾病预防控制中心对本方法进行了协同验证。验证内容包括：标准曲线、准确度、精密度等。主要验证结果如下：

5.9.1 标准曲线

表 7 给出了两家单位验证的标准曲线线性结果。在本检验方法所确定的实验条件下，取一系列标准溶液以内标法做工作曲线，R 都大于 0.99，表明甲硝

唑和氯霉素在一定浓度范围内呈现良好的线性关系。

表 7 标准曲线验证结果

化合物	验证单位 1			验证单位 2		
	线性方程	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 r	线性方程	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 r
甲硝唑	$y=0.5465x-0.0070$	0.1~50	0.9998	$y=0.5481x+0.0019$	0.1~50	0.9998
氯霉素	$y=0.3624x-0.0078$	0.1~50	0.9995	$y=1.1138x+0.0158$	0.1~50	0.9999

5.9.2 方法检出限

方法检出限受到仪器性能状态、溶液的基质等影响，按照取样量 5.00g 计算，两家验证单位的检出限均可达到 0.10 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限均可达到 0.30 $\mu\text{g/kg}$ 。

5.9.3 准确度

分别采用加标回收、参考样测定和参考样加标回收实验进行准确度验证。加标回收实验中采用空白蜂蜜样品，在 0.30 $\mu\text{g/kg}$ 、0.60 $\mu\text{g/kg}$ 和 5.0 $\mu\text{g/kg}$ 低、中、高三不同浓度加标水平进行了验证，具体结果见表 8；相对标准偏差（RSD）均小于 20%。

表 8 样品的回收率及相对标准偏差

化合物	加标水平 ($\mu\text{g/kg}$)	验证单位 1		验证单位 2	
		平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率(%)	RSD(%)
甲硝唑	0.30	100.5	2.0	102.7	3.6
	0.60	96.9	3.9	99.3	3.6
	5.0	95.5	1.3	100.9	0.7
氯霉素	0.30	92.2	8.5	96.1	4.1
	0.60	85.9	2.4	93.5	1.6
	5.0	87.2	3.8	99.8	1.5

除采用加标回收进行准确度考察外，还分别进行了参考样（蜂蜜中甲硝唑残留分析标准物质）的测定和参考样加标回收实验。该参考样标准值为 13.7 $\pm$ 1.7 $\mu\text{g/kg}$ ，两家验证单位的测定值分别为 12.9 $\mu\text{g/kg}$ 和 13.8 $\mu\text{g/kg}$ ，结果满意。参考样测定三个实验室间的 R_c 值为 6.1%。参考样加标回收实验中，在 13.7 $\mu\text{g/kg}$ 的加标水平，两家验证单位甲硝唑和氯霉素的回收率在 82.4~111.0%之间，满足《GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测》中检测方法确认的技术要求中的规定。

5.9.4 验证结果小结

由此可见，应用该方法检测蜂蜜中甲硝唑和氯霉素残留量，具有较低的检出

限，且方法操作简单、准确度高、精密度好，是一种可以推广使用的检测方法。

六、采用国际标准的程度与水平的简要说明

蜂蜜中氯霉素和甲硝唑残留量的液相色谱-串联质谱检测方法中，氯霉素和甲硝唑的现行标准检测方法大多为氯霉素和甲硝唑分别检测，样品前处理多为固相萃取方法，需进行固相萃取小柱的活化，上样，富集、洗脱、浓缩。本方法中采用通过式固相萃取进行样品前处理，样品直接上样，滤过液经浓缩即可上机检测。如果仪器灵敏度比较高，也可以在固相萃取后直接上机检测。

本标准作为方法类标准，采用通过式固相萃取法同时分析检测蜂蜜中的甲硝唑和氯霉素残留量，属于首次制定。

本标准与现行法律、法规不存在任何冲突。本标准首次制定，与现行的强制性国家标准也不存在任何相左的规定。

七、标准涉及的专利及相关知识产权说明

无

八、重大意见分歧的处理经过和依据

无

九、其他应予说明的事项

无