



中华人民共和国国家标准

GB/T 18932.3—2002

蜂蜜中链霉素残留量的测定方法 液相色谱法

Method for the determination of streptomycin residues in honey—
Liquid chromatography method

2002-12-30 发布

2003-06-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

GB/T 18932.3—2002

前 言

GB/T 18932—2002 分为 12 个部分,本部分为第 3 部分。

GB/T 18932 的本部分等同采用德国 DIN 0010761《柱后衍生—高效液相色谱法测定蜂蜜中链霉素含量》。本部分在技术内容上与方法一致,但是考虑到我国国家标准自身的特点及汉语表达习惯,对《柱后衍生—高效液相色谱法测定蜂蜜中链霉素含量》的个别内容作了编辑性修改。

本部分遵循 GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第 1 部分,标准的结构和编写规则》和 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第 4 部分,化学分析方法》的编写规则。

本部分的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本部分由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出。

本部分由中华全国供销合作总社归口。

本部分起草单位:中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局。

本部分主要起草人:庞国芳、张进杰、曹彦忠、范春林、李学民、林忠。

本部分系首次发布的国家标准。

蜂蜜中链霉素残留量的测定方法

液相色谱法

1 范围

GB/T 18932 的本部分规定了蜂蜜中链霉素残留量的高效液相色谱测定方法。

本部分适用于蜂蜜中链霉素残留量的测定。

本部分链霉素的方法检出限为 0.010 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 18932 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本部分,然而,鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

GB/T 6379—1986 测试方法的精密度 通过实验室间试验确定标准测试方法的重复性和再现性 (neq ISO 5725:1981)

GB/T 6682—1992 分析实验室用水规格和试验方法(neq ISO 3696:1987)

3 原理

试样中链霉素残留用磷酸溶液提取。提取液过滤后,用阳离子交换柱和 C_{18} 固相萃取柱净化。用甲醇洗脱吸附在萃取柱上的链霉素残留。用旋转蒸发器减压蒸干洗脱液。用 0.01 mol/L 庚烷磺酸钠溶液溶解残渣。溶液供带柱后衍生装置的高效液相色谱荧光检测器测定。

4 试剂和材料

4.1 甲醇:色谱纯。

4.2 乙腈:色谱纯。

4.3 正己烷:分析纯。

4.4 乙酸:分析纯。

4.5 磷酸:优级纯。

4.6 磷酸氢二钾:优级纯。

4.7 磷酸二氢钾:优级纯。

4.8 氢氧化钠:优级纯。

4.9 庚烷磺酸钠: $C_7H_{15}NaO_3S \cdot H_2O$, 色谱纯。

4.10 1,2-萘醌-4-磺酸钠:分析纯。

4.11 叔丁基甲醚:分析纯。

4.12 阳离子交换柱:苯磺酸型固相萃取柱,500 mg,3 mL。使用前用 5 mL 甲醇(4.1)和 10 mL 水预洗并保持柱体湿润。

4.13 C_{18} 固相萃取柱:500 mg,3 mL。使用前用 5 mL 甲醇和 10 mL 水预洗并保持柱体湿润。

4.14 玻璃棉:磷酸浸泡。

GB/T 18932.3—2002

- 4 15 磷酸溶液:pH=2。1 000 mL 水中加入 1 mL 磷酸(4.5),在 pH 测试仪上滴加磷酸调节溶液 pH=2。
- 4 16 磷酸盐缓冲溶液:0.2 mol/L,pH=8。称取 33.46 g 磷酸氢二钾(4.6)和 1.05 g 磷酸二氢钾(4.7)于 2 000 mL 烧杯中,加入 900 mL 水并置于磁力搅拌器上搅拌,待其完全溶解后,用水定容至 1 000 mL。在 pH 测试仪上滴加数滴磷酸调节溶液 pH=8。
- 4 17 氢氧化钠溶液:0.2 mol/L。称取 8 g 氢氧化钠(4.8)溶于 1 000 mL 水中。
- 4 18 庚烷磺酸钠溶液:0.5 mol/L。称取 11 g 庚烷磺酸钠(4.9)溶于 100 mL 水中。
- 4 19 庚烷磺酸钠溶液:0.01 mol/L,pH=3.3。称取 2.2 g 庚烷磺酸钠于 2 000 mL 烧杯中,加入 900 mL 水使其完全溶解,再转入 1 000 mL 容量瓶中,用水定容至刻度。在 pH 测试仪上滴加乙酸(4.4)调节溶液 pH=3.3。
- 4 20 叔丁基甲醚-正己烷混合溶液·4+1。分别量取 80 mL 叔丁基甲醚(4.11)和 20 mL 正己烷(4.3)于 100 mL 容量瓶中,混匀。
- 4 21 链霉素标准物质·含量大于 95%。
- 4 22 链霉素标准储备溶液:准确称取适量链霉素标准物质(4.2.1),用水配成 0.10 mg/mL 的标准储备溶液,贮存于 4℃ 冰箱中。
- 4 23 链霉素标准工作溶液:根据试验需要,用庚烷磺酸钠溶液(4.19)稀释标准储备液(4.22)配成适当浓度的标准工作溶液。
- 4 24 试验用水为符合 GB/T 6682—1992 规定的一级水。

5 仪器

- 5 1 高效液相色谱仪配有柱后衍生装置和荧光检测器。
- 5 2 旋转蒸发器。
- 5 3 真空泵·真空度应达到 80 kPa。
- 5 4 pH 计:测量精度±0.02。
- 5 5 液体混匀器。
- 5 6 真空固相萃取装置。
- 5 7 储液器:50 mL。
- 5 8 鸡心瓶:150 mL。
- 5 9 平底烧瓶:200 mL。
- 5 10 微量进样器:100 μ L。

6 试样的制备与保存

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,待样品全部融化后搅匀,迅速冷却至室温。分出 0.5 kg 作为试样。制备好的试样置于样品瓶中,密封,并标明标记。

6 2 试样的保存

将试样于常温下保存。

7 分析步骤

7 1 提取

称取 10 g 试样,精确到 0.01 g,置于 150 mL 三角瓶中。加入 25 mL 磷酸溶液(4.15),在液体混匀器上高速混合 5 min,使试样完全溶解。

7.2 净化

7.2.1 阳离子交换柱净化

在储液器底部塞入少许玻璃棉(4.14)并用适量水冲洗后,装在预洗好的苯磺酸固相萃取柱(4.12)上。把样液(7.1)移入储液器。在真空萃取装置上,使样液以1.5 mL/min的流速通过苯磺酸固相萃取柱。分别用5 mL磷酸溶液和10 mL水淋洗固相萃取柱,弃去全部淋出液。用30 mL磷酸盐缓冲溶液(4.16),以1.5 mL/min的流速洗脱链霉素于200 mL平底烧瓶中。在洗脱液中加入3 mL庚烷磺酸钠溶液(4.18),摇匀。再用磷酸调节洗脱液pH=2。

7.2.2 C₁₈固相萃取柱净化

将储液器装在预洗好的C₁₈固相萃取柱(4.13)上。将上述洗脱液(7.2.1)移入储液器中。在真空萃取装置上,使洗脱液以1.5 mL/min的流速通过C₁₈固相萃取柱。用5 mL磷酸溶液淋洗C₁₈固相萃取柱,在真空泵65 kPa负压下,减压抽干5 min。再用4 mL叔丁基甲醚-正己烷混合溶液(4.20)淋洗C₁₈固相萃取柱,同样减压抽干5 min,弃去全部淋出液。用10 mL甲醇以1.5 mL/min的流速洗脱链霉素到150 mL鸡心瓶中,用旋转蒸发器于45℃水浴上将其减压蒸发至干。加入1.0 mL庚烷磺酸钠溶液(4.19)溶解残渣,溶液供液相色谱测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱:Hypersil 5 μ m,C₁₈柱,150 mm×4.6 mm(内径)或相当者;
- b) 流动相:称取1.10 g庚烷磺酸钠和0.052 g 1,2-萘醌-4-磺酸钠(4.10)溶于500 mL乙腈+水混合液(27+73)中,摇匀。用乙酸(4.4)调节溶液pH=3.3。通过调整乙腈比例,使链霉素出峰时间在9 min左右。当天配制;
- c) 流动相流速:1.0 mL/min;
- d) 检测器波长:激发波长263 nm,发射波长435 nm;
- e) 色谱柱温度:50℃;
- f) 衍生管10 m×0.25 mm(内径),不锈钢管;
- g) 衍生剂:氢氧化钠溶液(4.17);
- h) 衍生管温度:50℃;
- i) 衍生剂流速:0.4 mL/min;
- j) 进样量:80 μ L。

7.3.2 色谱测定

根据样品溶液中链霉素残留量,选择峰高相近的标准工作溶液。标准工作溶液和样品溶液中链霉素响应值均应在仪器检测线性范围内。对标准工作溶液和样品溶液等体积参插进样进行测定。在上述色谱条件下,链霉素保留时间约为9 min。

链霉素标准物质的色谱图见附录A中的图A.1。

本方法的添加回收率数据参见附录B。

7.4 平行试验

按上述步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7.5 空白试验

除不称取样品外,均按上述步骤进行。

GB/T 18932.3—2002

8 结果计算

结果按式(1)计算:

$$X = \frac{h \cdot c \cdot V}{h_s \cdot m} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X——试样中链霉素的残留含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- h——样品溶液中链霉素的峰高,单位为毫米(mm);
- h_s——标准工作溶液中链霉素的峰高,单位为毫米(mm);
- c——标准工作溶液中链霉素的浓度,单位为微克每毫升(μg/mL),
- V——样品溶液最终定容体积,单位为毫升(mL);
- m——最终样品溶液所代表的试样量,单位为克(g)。

注 计算结果需将空白值扣除。

9 精密度

GB/T 18932 的本部分精密度数据是按照 GB/T 6379—1986 的规定,通过 15 个实验室对四个添加水平的试样所做的试验中确定的。获得重复性和再现性的值是以 95% 的可信度来计算。

9.1 重复性

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限(*r*),本部分的重复性限按方程式(2)计算:

蜂蜜中链霉素的含量在 0.010 mg/kg~0.10 mg/kg 范围:

$$\lg r = 0.8504 \lg m - 0.9735 \dots\dots\dots(2)$$

式中:

m——两次测定值的平均值,单位为毫克每千克(mg/kg)。

如果差值超过重复性限,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.2 再现性

在再现性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限(*R*),本部分再现性限按方程式(3)计算:

蜂蜜中链霉素的含量在 0.010 mg/kg~0.10 mg/kg 范围:

$$\lg R = 0.8416 \lg m - 0.8795 \dots\dots\dots(3)$$

式中:

m——两次测定值的平均值,单位为毫克每千克(mg/kg)。

附录 A
(资料性附录)
标准物质色谱图

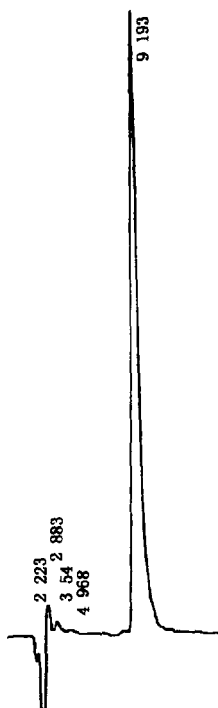


图 A 1 链霉素标准物质液相色谱图

GB/T 18932.3—2002

附录 B
(资料性附录)
回收率

本方法中链霉素添加浓度和回收率的试验数据:

在添加量为 0.010 mg/kg 时,平均回收率为 86.5%;

在添加量为 0.020 mg/kg 时,平均回收率为 82.4%;

在添加量为 0.050 mg/kg 时,平均回收率为 82.7%;

在添加量为 0.10 mg/kg 时,平均回收率为 82.1%。
