



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 18932 4—2002

---

## 蜂蜜中土霉素、四环素、金霉素、 强力霉素残留量的测定方法 液相色谱法

Method for the determination of oxytetracycline, tetracycline,  
chlortetracycline, and doxycycline residues in honey—  
Liquid chromatographic 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 4—2002

## 前 言

GB/T 18932—2002 分为 12 个部分,本部分为第 4 部分。

GB/T 18932 的本部分是修改采用加拿大国家标准 ACC-042-V1 0《蜂蜜中四环素残留量测定——高效液相色谱法》,其修改的主要内容是:

- 淋洗液由甲醇改为乙酸乙酯;
- 增加了羧酸型阴离子交换柱净化;
- 质谱检测器或二极管阵列检测器改为紫外检测器。

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、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、曹彦忠、范春林、张进杰、李学民、林忠。

本部分系首次发布的国家标准。

# 蜂蜜中土霉素、四环素、金霉素、 强力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土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量液相色谱测定方法。本部分适用于蜂蜜中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量的测定。本部分的方法检出限：土霉素、四环素、金霉素、强力霉素均为 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

试样中四环素族抗生素残留用 0.1 mol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$  ( $\text{pH}=4.0\pm 0.05$ ) 缓冲溶液提取，经离心后，上清液用 Oasis HLB 或相当的固相萃取柱和阴离子交换柱净化，紫外检测器高效液相色谱仪测定，外标法定量。

## 4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682—1992 规定的一级水。

- 4.1 甲醇：一级色谱纯。
- 4.2 乙腈：一级色谱纯。
- 4.3 乙酸乙酯：重蒸馏。
- 4.4 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )：优级纯。
- 4.5 柠檬酸 ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )。
- 4.6 乙二胺四乙酸二钠 ( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )。
- 4.7 草酸。
- 4.8 磷酸氢二钠溶液：0.2 mol/L。称取 28.41 g 磷酸氢二钠 (4.4)，用水溶解，定容至 1 000 mL。
- 4.9 柠檬酸溶液：0.1 mol/L。称取 21.01 g 柠檬酸 (4.5)，用水溶解，定容至 1 000 mL。
- 4.10 McIlvaine 缓冲溶液：将 1 000 mL 0.1 mol/L 柠檬酸溶液 (4.9) 与 625 mL 0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液 (4.8) 混合，必要时用氢氧化钠或盐酸溶液调节  $\text{pH}=4.0\pm 0.05$ 。
- 4.11  $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$  缓冲溶液：0.1 mol/L。称取 60.5 g 乙二胺四乙酸二钠 (4.6) 放入

## GB/T 18932 4—2002

1 625 mL McIlvaine 缓冲溶液(4.10)中,使其溶解,摇匀。

4 12 甲醇+水(1+19);量取 5 mL 甲醇(4.1)与 95 mL 水混合。

4 13 Oasis HLB 固相萃取柱或相当者;500 mg,6 mL。使用前分别用 5 mL 甲醇和 10 mL 水预处理,保持柱体湿润。

4 14 阴离子交换柱:羧酸型,500 mg,3 mL。使用前用 5 mL 乙酸乙酯预处理,保持柱体湿润。

4 15 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质;纯度 $\geq 95\%$ 。

4 16 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准溶液:0.1 mg/mL。准确称取适量的土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质(4.15),分别用甲醇配成 0.1 mg/mL 的标准储备液。储备液贮存在 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。根据需要用流动相逐级稀释成适当浓度的混合标准工作溶液,混合标准工作溶液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,可使用 3 天。

## 5 仪器

5 1 高效液相色谱仪:配有紫外检测器。

5 2 分析天平:感量 0.1 mg,0.01g。

5 3 液体混匀器。

5 4 固相萃取真空装置。

5 5 贮液器;50 mL。

5 6 微量注射器;25  $\mu\text{L}$ ,100  $\mu\text{L}$ 。

5 7 刻度样品管;5 mL,精度为 0.1 mL。

5 8 真空泵:真空度应达到 80 kPa。

5 9 离心管;50 mL。

5 10 平底烧瓶;100 mL。

5 11 pH 计,测量精度 $\pm 0.02$ 。

## 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 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 试样保存

将试样于常温下保存。

## 7 测定步骤

### 7 1 提取

称取 6 g 试样,精确到 0.01 g。置于 150 mL 三角瓶中,加入 30 mL  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -McIlvaine 缓冲溶液(4.11),于液体混匀器上快速混合 1 min,使试样完全溶解。样液倒入 50 mL 离心管中,以 3 000 r/min 离心 5 min,待净化。

### 7 2 净化

将上清液(7.1)倒入下接 Oasis HLB 柱或相当者(4.13)的贮液器中,上清液以 $\leq 3\text{ mL/min}$ 的流速通过 Oasis 或相当的固相萃取柱,待上清液完全流出后,用 5 mL 甲醇+水(4.12)洗柱,弃去全部流出液。在 65 kPa 的负压下,减压抽干 20 min,最后用 15 mL 乙酸乙酯(4.3)洗脱;收集洗脱液于 100 mL 圆底烧瓶中。

按上述方法使洗脱液(7.2)在减压情况下以 $\leq 3\text{ mL/min}$ 的流速通过阴离子交换柱(4.14),待洗脱

液全部流出后,用 5 mL 甲醇(4.1)洗柱,弃去全部流出液。在 65 kPa 负压下,减压抽干 5 min,再用 4 mL 流动相洗脱,收集洗脱液于 5 mL 样品管中,定容至 4 mL,供液相色谱仪测定。

### 7.3 测定

#### 7.3.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱:  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub>, 10  $\mu$ , 300 mm  $\times$  3.9 mm 或相当者;
- b) 流动相: 乙腈+甲醇+0.01 mol/L 草酸溶液(20+10+70,);
- c) 流速: 1.5 mL/min;
- d) 柱温: 25℃;
- e) 检测波长: 350 nm;
- f) 进样量: 100  $\mu$ L。

#### 7.3.2 液相色谱测定

根据样品溶液中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素含量的情况,选定峰高相近的标准工作溶液,标准工作溶液和样品溶液中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素的响应值均应在仪器测定的线性范围内。对标准工作溶液和样品溶液等体积参插进行测定。在上述色谱条件下,土霉素、四环素、金霉素、强力霉素色谱峰的分离度应大于 1.2,其参考保留时间如下。

药物名称	保留时间/min
土霉素	4.0
四环素	4.8
金霉素	9.6
强力霉素	14.0

土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质色谱图见附录 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

按以上步骤对同一试样进行平行试验测定。

### 7.5 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行。

## 8 结果计算

结果按式(1)计算:

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

式中:

X——试样中被测组分残留量,单位为毫克每千克(mg/kg);

h——样品溶液中被测组分的峰高,单位为毫米(mm);

c<sub>s</sub>——标准工作溶液中被测组分的浓度,单位为微克每毫升( $\mu$ g/mL);

V——样品溶液定容体积,单位为毫升(mL);

h<sub>s</sub>——标准工作溶液中被测组分的峰高,单位为毫米(mm);

m——所称样品的质量,单位为克(g)。

注 计算结果应扣除空白值。

## 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 13 个实验室对四个添加

## GB/T 18932 4—2002

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( $r$ ),蜂蜜中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素的含量范围及重复性方程见表 1。

表 1 含量范围及重复性和再现性方程

单位为毫克每千克

名称	含量范围/(mg/kg)	重复性限 $r$	再现性限 $R$
土霉素	0.010~0.20	$\lg r = 0.8520 - 1.5307$	$\lg R = 0.9393 - 1.9810$
四环素	0.010~0.20	$\lg r = 0.5242 - 1.9931$	$\lg R = 0.8693 - 1.8950$
金霉素	0.010~0.20	$r = 0.0267m - 0.0012$	$\lg R = 0.7271 - 1.1455$
强力霉素	0.010~0.20	$r = 0.0236m - 0.0035$	$\lg R = 0.6227 - 1.2716$

注  $m$  为两次测定结果的算术平均值。

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( $R$ ),蜂蜜中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素的含量范围及再现性方程见表 1。

附录 A  
(资料性附录)  
标准物质色谱图

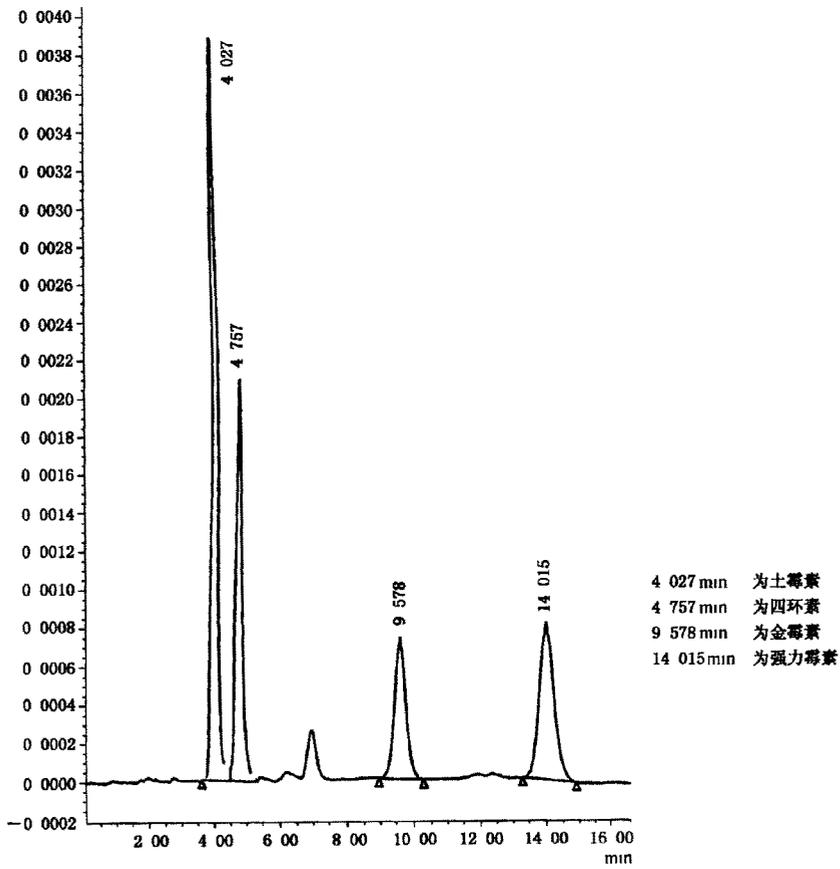


图 A 1 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质色谱图

GB/T 18932 4—2002

**附 录 B**  
**(资料性附录)**  
**回 收 率**

本方法中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素添加浓度及其回收率的试验数据,见表 B.1。

**表 B 1**

药物名称	添加浓度/(mg/kg)	回收率/(%)
土霉素	0.010	87.8
	0.050	93.0
	0.50	99.5
四环素	0.010	89.0
	0.050	87.2
	0.50	93.3
金霉素	0.010	84.6
	0.050	80.9
	0.50	87.5
强力霉素	0.010	97.1
	0.050	85.6
	0.50	85.3