

前 言

GB/T 18932 的本部分修改采用加拿大标准 ACC-060-V1.2《高效液相色谱荧光检测法测定蜂蜜中苯甲醛含量》，修改的主要内容是：流动相由甲醇+水改为乙腈+水。

本部分的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本部分由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、李学民、范春林、郭彤彤。

本部分系首次发布的国家标准。

蜂蜜中苯甲醛残留量的测定方法

液相色谱-荧光检测法

1 范围

GB/T 18932 的本部分规定了蜂蜜中苯甲醛残留量的高效液相色谱-荧光检测方法。

本部分适用于蜂蜜中苯甲醛残留量的测定。

本部分苯甲醛的方法检出限为 0.012 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 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 (GB/T 6379—1986, neq ISO 5725:1981)

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

3 原理

试样中苯甲醛残留在过量铵离子存在的条件下与 1,3-环己二酮反应生成荧光衍生物。样液过滤后用 C₁₈ 色谱柱分离,高效液相色谱荧光检测器测定。

4 试剂和材料

除另有说明外,所用试剂为分析纯,试验用水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇:色谱纯。

4.2 20%甲醇溶液:用甲醇(4.1)和水按体积比(1+4)配制。

4.3 乙腈:色谱纯。

4.4 浓盐酸:优级纯。

4.5 乙酸铵:优级纯。

4.6 1,3-环己二酮:含量大于 97%。

4.7 C₁₈ 固相萃取柱:2000 mg, 12 mL。

4.8 苯甲醛标准物质:纯度大于 99%。

4.9 苯甲醛标准储备液:称取适量苯甲醛标准物质(4.8)到 100 mL 容量瓶,用甲醇溶解,并稀释至刻度。储备液浓度为 1 000 μg/mL,放入 4℃ 冰箱中保存。

4.10 苯甲醛标准工作溶液:吸取适量苯甲醛标准储备液(4.9)用 20%甲醇水溶液(4.2)稀释为 10 μg/mL 标准工作溶液。

4.11 苯甲醛标准校准溶液:吸取适量的苯甲醛标准工作溶液(4.10),用 20%甲醇水溶液分别配制成 0.012 μg/mL, 0.024 μg/mL, 0.12 μg/mL, 0.25 μg/mL, 0.50 μg/mL 的标准校准溶液。

4.12 冰水浴:将冰块捣碎放入 500 mL 烧杯中与水混合。

4.13 具塞比色管:10 mL, 25 mL。

4.14 针管式过滤器滤头:0.45 μm。

4.15 玻璃固相萃取装置。

4.16 衍生剂

4.16.1 衍生剂的制备:称取 25 g 乙酸铵(4.5)和 2 g 1,3-环己二酮(4.6)于 150 mL 三角瓶中,加入 50 mL 水,在磁力搅拌器上搅拌使其完全溶解。然后边搅拌边缓慢加入 8 mL 浓盐酸(4.4),再搅拌 5 min,使浓盐酸溶解时产生的白烟散尽。转入 100 mL 容量瓶中并用水稀释到刻度。

4.16.2 衍生剂的提纯:将初制备的衍生剂(4.16.1)转入 4 支 25 mL 具塞比色管(4.13)中,盖好塞子放入 60℃热水浴中 60 min。取出比色管并放入冰水浴(4.12)中 30 min。把一个 C₁₈ 固相萃取柱(4.7)连接到玻璃固相萃取装置(4.15)上,用 10 mL 甲醇和 20 mL 水预处理萃取柱,再用 5 mL 初制备的衍生剂洗涤萃取柱,弃去全部淋出液。用真空泵控制淋洗流速为每秒钟 2 滴,使初制备的衍生剂通过萃取柱,用干净的 200 mL 平底烧瓶接收提纯的衍生剂。

衍生剂需当天制备,从制备到使用一般不应超过 24 h。如果衍生剂放置时间太长,会明显降低衍生效率。

5 仪器

5.1 高效液相色谱仪配有荧光检测器。

5.2 真空泵。

5.3 pH 计:测量精度±0.02。

5.4 液体混匀器。

5.5 磁力搅拌器。

5.6 微量进样器:25 μL,100 μL。

5.7 天平:精确到 0.1 g。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

实验室样品,将其搅拌均匀。不得加热。制备好的试样置于样品瓶中密封,并做上标记。

6.2 试样的保存

将试样于常温下保存。

7 分析步骤

7.1 样品的提取

称取 10 g 蜂蜜样品(精确到 0.1 g)置于 100 mL 三角瓶中,加入 10 mL 甲醇,在液体混匀器上高速混合并放置 30 min 以上。转入 50 mL 容量瓶中,用水洗涤三角瓶,并入容量瓶中,再用水稀释至刻度。混合均匀后为样品提取溶液。

7.2 样品提取液的衍生

准确吸取 0.5 mL 样品提取溶液(7.1)置于 10 mL 具塞比色管中,加入 1 mL 提纯的衍生剂(4.16.2)盖好塞子,混合均匀,放入 60℃热水浴中反应 2.5 h。取出比色管放入冰水浴中 30 min,然后放置到室温。衍生溶液用 0.45 μm 滤膜过滤到 5 mL 刻度离心管中,待测。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

a) 色谱柱:Diamonsil C₁₈ 5 μm, 250 mm×4.6 mm(内径)或相当者;

b) 流动相:乙腈+水(30+70);

c) 流动相流速:1.0 mL/min;

- d) 检测器波长:激发波长 380 nm,发射波长 450 nm;
 e) 色谱柱温度:30℃;
 f) 进样量:80 μL。

7.3.2 色谱测定

根据样品溶液中苯甲醛残留量,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苯甲醛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,苯甲醛的参考保留时间约为 16 min。苯甲醛标准物质的色谱图参见附录 A 中的图 A.1。

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

不称取蜂蜜样品,以 20%甲醇水溶液作为空白样品按上述步骤操作。

7.6 标准溶液测定

苯甲醛标准校准溶液(4.11),按上述步骤操作。

8 结果计算

结果按式(1)计算:

$$X = \frac{h \cdot c \cdot V}{h_s \cdot m} \cdot \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X ——试样中苯甲醛的残留含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

h ——样品溶液中苯甲醛的峰高,单位为毫米(mm);

h_s ——标准溶液中苯甲醛的峰高,单位为毫米(mm);

c ——标准溶液中苯甲醛的浓度,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质量,单位为克(g)。

注:计算结果需将空白值扣除。

9 精密度

本部分精密度数据是按照 GB/T 6379 的规定确定的,重复性和再现性的值以 95%的可信度计算。

9.1 重复性

在重复性条件下,蜂蜜中苯甲醛的含量在 0.060 mg/kg~0.50 mg/kg 时,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:

$$\lg r = 1.055 \lg m - 0.967 6 \dots\dots\dots(2)$$

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,蜂蜜中苯甲醛的含量在 0.060 mg/kg~0.50 mg/kg 时,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:

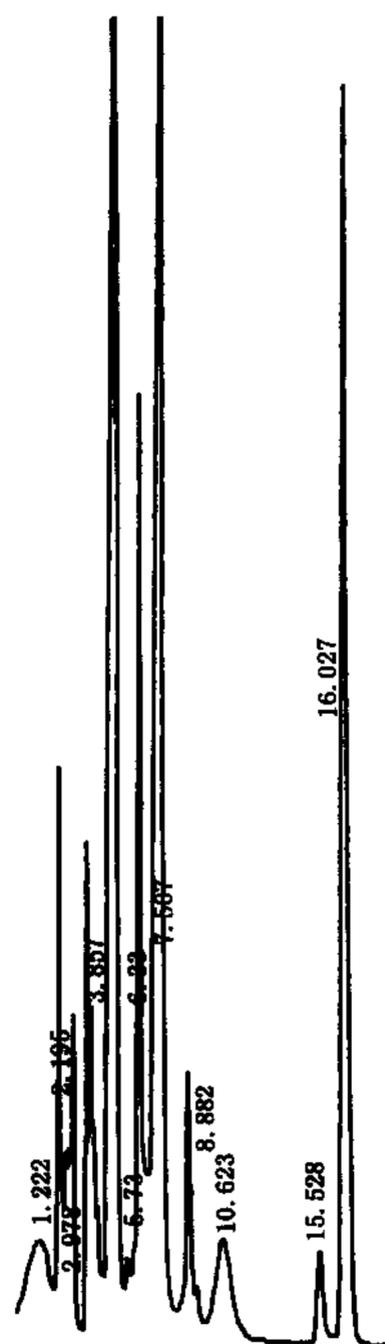
$$\lg R = 0.958 0 \lg m - 0.921 4 \dots\dots\dots(3)$$

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

苯甲醛标准物质液相色谱图, 见图 A. 1。



注: 苯甲醛的保留时间为 16.027 min。

图 A. 1

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法中苯甲醛添加浓度和平均回收率的数据如下：
在添加量为 0.060 mg/kg 时，平均回收率为 90.3%；
在添加量为 0.12 mg/kg 时，平均回收率为 88.4%；
在添加量为 0.60 mg/kg 时，平均回收率为 96.7%；
在添加量为 1.20 mg/kg 时，平均回收率为 97.6%。
