

ICS 67.180.10
X 31



中华人民共和国国家标准

GB/T 18932.26—2005

蜂蜜中甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑 残留量的测定方法 液相色谱法

Method for the determination of metronidazole, ronidazole and
dimetridazole residues in honey—
Liquid chromatographic method

2005-02-04 发布

2005-08-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

GB/T 18932 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秦皇岛出入境检验检疫局提出。

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、刘永明、曹彦忠、贾光群、范春林、张进杰、李学民、石玉秋。

本部分系首次发布的国家标准。

蜂蜜中甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑 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甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑残留量的液相色谱测定方法。

本部分适用于蜂蜜中甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑残留量的测定。

本部分的方法检出限：甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑均为 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 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 5725:1987)

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

试样中硝基咪唑类药物残留用乙酸乙酯提取，提取液蒸干后，用水溶解，经过 Oasis HLB 固相萃取柱和 BAKERBOND Carboxylic Acid 固相萃取柱净化，液相色谱仪紫外检测器测定，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 规定的一级水。

- 4.1 甲醇：色谱纯。
- 4.2 乙腈：色谱纯。
- 4.3 乙酸乙酯：色谱纯。
- 4.4 无水乙酸钠：分析纯。
- 4.5 冰乙酸：优级纯。
- 4.6 甲醇+水(5+95)：量取 5 mL 甲醇与 95 mL 水混合。
- 4.7 乙酸盐缓冲溶液：0.82 g/L。称取 0.82 g 无水乙酸钠，用 800 mL 水溶解，用冰乙酸调节 pH 至 4.3，用水稀释至 1 L。
- 4.8 洗脱剂：甲醇+乙腈+乙酸盐缓冲溶液(40+6+54)。
- 4.9 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。
- 4.10 BAKERBOND Carboxylic Acid 固相萃取柱或相当者：500 mg, 3 mL。使用前用 5 mL 乙酸乙酯预处理，保持柱体湿润。

- 4.11 甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑标准物质:纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.12 甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑标准储备溶液:1.0 mg/mL。准确称取适量的甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑标准物质,分别用甲醇配成 1.0 mg/mL 的标准储备液。储备液可在温度低于 4℃ 冰箱中保存二个月。
- 4.13 甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑混合标准工作溶液:根据需要吸取适量甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑标准储备溶液,用流动相稀释成适当浓度的混合标准工作溶液,混合标准工作溶液应现用现配。

5 仪器

- 5.1 液相色谱仪:配有紫外检测器。
- 5.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g 各一台。
- 5.3 液体混匀器。
- 5.4 固相萃取真空装置。
- 5.5 振荡器。
- 5.6 具塞玻璃离心管:50 mL。
- 5.7 真空泵:真空度应达到 80 kPa。
- 5.8 离心机。
- 5.9 旋转蒸发器。
- 5.10 样品管:5 mL。
- 5.11 pH 计:测量精度 ± 0.02 。
- 5.12 梨形瓶:200 mL。

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 6 g 试样(精确到 0.01 g)置于 50 mL 具塞玻璃离心管中,加入 6 mL 水,在液体混匀器上混匀,加 20 mL 乙酸乙酯,于振荡器上振荡 20 min,离心,取上清液至梨形瓶中。再用 20 mL 乙酸乙酯提取一次,合并上清液,用旋转蒸发器于 45℃ 水浴上减压蒸发至干,用 5 mL 水溶解,待净化。

7.2 净化

将上述 5 mL 水溶液移至 Oasis HLB 柱中,以小于等于 3 mL/min 的流速通过 Oasis 固相萃取柱后,用 5 mL 水洗脱梨形瓶,移至 Oasis HLB 柱中洗柱,再用 5 mL 甲醇+水(4.6)洗柱,弃去全部流出液。在 65 kPa 的负压下,减压抽干 20 min,将 Oasis HLB 柱下接 Carboxylic Acid 固相萃取柱,用 5 mL 乙酸乙酯以小于等于 3 mL/min 的流速洗脱 Oasis HLB 柱并通过 Carboxylic Acid 固相萃取柱,弃去 Oasis HLB 柱,分别用 5 mL 乙酸乙酯和 5 mL 乙腈洗涤 Carboxylic Acid 固相萃取柱,弃去全部流出液。在 65 kPa 的负压下,减压抽干 5 min,用 2 mL 洗脱剂(4.8)洗脱,收集洗脱液于 5 mL 样品管中,用

洗脱剂定容至 2 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: Diamonsil C₁₈, 5 μm, 250 mm×4.6 mm(内径)或相当者;
- b) 流动相: 乙腈+乙酸盐缓冲溶液(10+90);
- c) 流速: 1.0 mL/min;
- d) 柱温: 25℃;
- e) 进样量: 50 μL;
- f) 检测波长: 315 nm。

7.3.2 液相色谱测定

用甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑混合标准溶液分别进样,以峰面积为纵坐标,工作溶液浓度为横坐标绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑的响应值均应在仪器测定的线性范围内。甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑标准物质色谱图参见图 A.1。在上述色谱条件下,甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑的参考保留时间见表 1。

表 1 甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑的参考保留时间

硝基咪唑类药物名称	保留时间/min
甲硝哒唑	12.7
洛硝哒唑	15.0
二甲硝咪唑	21.2

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,均按上述步骤同时完成空白试验。

8 结果计算

结果按式(1)计算:

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

式中:

X——试样中被测组分残留量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c——从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度,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——样品溶液所代表最终试样的质量,单位为克(g)。

注:计算结果应扣除空白值。

9 精密度

本部分的精密度数据是按照 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),蜂蜜中甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑含量范围及重复性方程见表 2。

表 2 含量范围及重复性和再现性方程

名 称	含量范围/(mg/kg)	重复性限 r	再现性 R
甲硝哒唑	0.010~0.100	$r=0.030\ 3\ m+2.167\ 3$	$R=0.080\ 7\ m+1.040\ 8$
洛硝哒唑	0.010~0.100	$r=0.060\ 8\ m+1.872\ 7$	$R=0.062\ 0\ m+1.719\ 0$
二甲硝咪唑	0.010~0.100	$r=0.062\ 7\ m+1.441\ 1$	$\lg R=0.709\ 9\ \lg m-0.437\ 7$
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),蜂蜜中甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑的含量范围及再现性方程见表 2。

附录 A
(资料性附录)
标准物质色谱图

甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑标准物质色谱图见图 A.1。

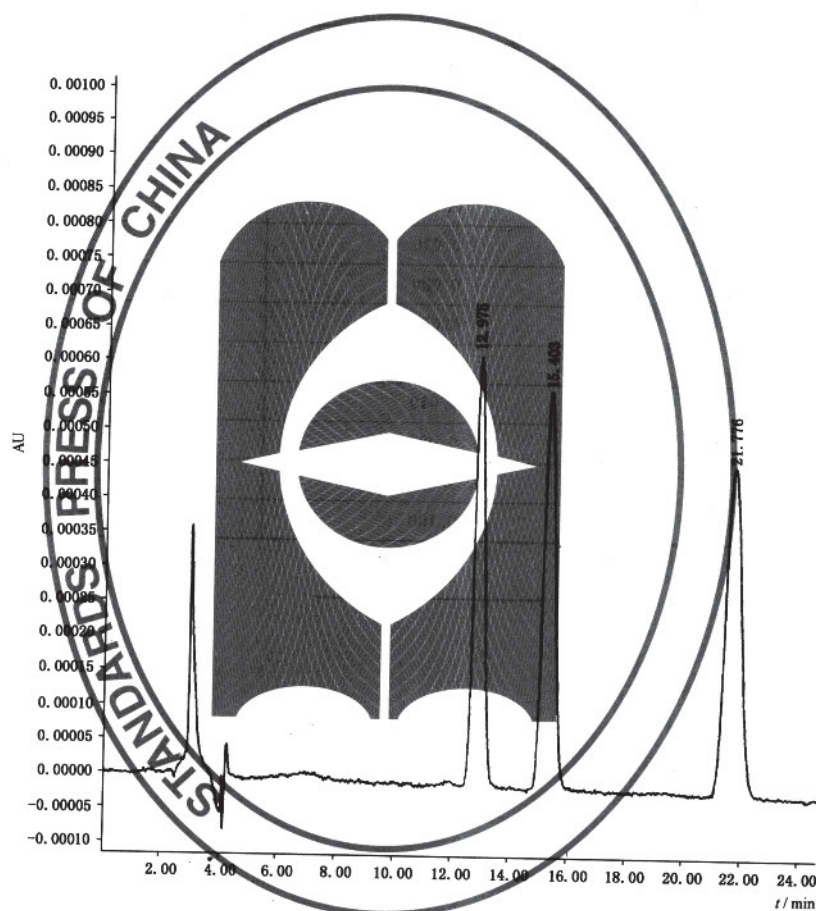


图 A.1 甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑标准物质色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法中甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑添加浓度及其平均回收率的试验数据见表 B. 1。

表 B. 1 甲硝哒唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑添加浓度及其平均回收率的试验数据

药物名称	添加浓度/(mg/kg)	平均回收率/(%)
甲硝哒唑	0.010	86.27
	0.020	87.13
	0.050	87.35
	0.100	86.33
洛硝哒唑	0.010	84.64
	0.020	89.38
	0.050	82.87
	0.100	87.99
二甲硝咪唑	0.010	85.96
	0.020	84.86
	0.050	90.70
	0.100	88.61