



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

有机肥中土霉素、四环素、金霉素与强力霉素的含量测定 高效液相色谱法

Determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in
organic fertilizer HPLC

(送审稿)

2014.12

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中国石油和化学工业联合会提出。

本标准由全国肥料和土壤调理剂标准化技术委员会（SAC/TC 105）归口。

本标准起草单位：上海出入境检验检疫局工业品与原材料检测技术中心、上海化工研究院、泰州市产品质量监督检验所、上海交通大学。

本标准主要起草人：周辉、周韵、孙明星、叶平、马明、闵红、刘刚、沈国清、商照聪、赵杰。

有机肥中土霉素、四环素、金霉素与强力霉素含量的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了有机肥中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素含量的高效液相色谱检测方法。

本标准适用于有机无机复合肥、有机肥中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素含量的测定。

本方法检出限：土霉素 0.75mg/kg，四环素 0.75 mg/kg，金霉素 1.0 mg/kg，强力霉素 0.75 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6379.1 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第1部分：总则与定义

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）第2部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试样中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素经 Na_2EDTA -Mcllvaine-甲醇提取液提取、固相萃取小柱净化处理后进样，高效液相色谱紫外检测器测定，外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所有试剂均为分析纯，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 磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）。

4.4 柠檬酸（ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）。

4.5 乙二胺四乙酸二钠（ $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）。

4.6 草酸（ $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）。

4.7 磷酸氢二钠溶液：0.4mol/L。称取 143.26g 磷酸氢二钠（4.3），用水溶解，定容至 1000mL。

4.8 柠檬酸溶液：0.2mol/L。称取 42.03g 柠檬酸（4.4），用水溶解，定容至 1000mL。

4.9 乙二胺四乙酸二钠（ Na_2EDTA ）溶液：0.1mol/L。称取 37.22g 乙二胺四乙酸二钠（4.5），用水溶解，定容至 1000mL。

- 4.10 磷酸氢二钠-柠檬酸 (McIlvaine) 缓冲液 ($\text{pH}=6.8\pm0.05$)：将 1000mL 0.4mol/L 磷酸氢二钠溶液 (4.7) 与 294mL 0.2mol/L 柠檬酸溶液 (4.8) 混合。
- 4.11 Na_2EDTA -McIlvaine-甲醇提取液：取 Na_2EDTA (4.9)，磷酸氢二钠-柠檬酸 (McIlvaine) 缓冲液 (4.10) 与甲醇 (4.1) 按 1:1:2 (v:v:v) 比例混匀，必要时用 NaOH 或 HCl 调 $\text{pH}=7.2\pm0.05$ 。
- 4.12 草酸溶液：0.01mol/L。称取 1.26g 草酸 (4.6)，用水溶解，定容至 1000mL。
- 4.13 甲醇-水 (1+19)：量取 5mL 甲醇 (4.1) 与 95mL 水混匀。
- 4.14 草酸-甲醇溶液：0.01mol/L。称取 0.13g 草酸 (4.6)，用甲醇 (4.1) 溶解，定容至 100mL。
- 4.15 土霉素 (oxytetracycline, CAS: 2058-46-0)、四环素 (tetracycline, CAS: 64-75-5)、金霉素 (chlorotetracycline, CAS: 64-72-2)、强力霉素 (doxycycline, CAS: 24390-14-5) 标准物质：纯度 92-98%。
- 4.16 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准储备溶液：2mg/mL。准确称取一定量的土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质 (4.15)，分别用甲醇 (4.1) 配成 2mg/mL 的标准储备液。储备液于 0°C - 8°C 保存。
- 4.17 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素混合标准溶液：分别取 5mL 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准储备液 (4.16) 至 100mL 容量瓶中，用甲醇 (4.1) 稀释至刻度，混匀，每种物质浓度为 $100\mu\text{g/mL}$ ，储存于冰箱中，每周配制。
- 4.18 固相萃取柱 (Waters Oasis HLB 或相当者)：300mg/3mL。使用前依次通过 2mL 甲醇 (4.1) 及 2mL 水预处理，保持柱体湿润。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱仪：配紫外检测器。
- 5.2 分析天平：感量 0.1mg，0.01g。
- 5.3 机械振荡提取仪：50~500 次/min。
- 5.4 冷冻离心机：转速大于 3500rpm。
- 5.5 固相萃取装置。
- 5.6 真空泵。
- 5.7 氮气吹干仪。
- 5.8 pH 计：测量精度 ± 0.02 。
- 5.9 针式过滤头：0.22 μm 。
- 6.0 金属筛：0.5mm。

6 试样制备与保存

6.1 试样的制备

将有机肥料粉碎，过 0.5mm 筛，待用。

6.2 试样保存

过筛的有机肥料在常温 (25°C) 下避光保存，并注意防潮防霉。

7 测定步骤

7.1 试料

称取过筛的肥料粉末 1.0g~2.0g，精确至 0.01g。

7.2 提取

试样置于 50mL 带盖塑料离心管中。向试样中加入 20mL Na₂EDTA-McIlvaine-甲醇提取液（4.11），于机械振荡提取仪中室温（25℃）下提取 20min，于 15℃下置于离心机上，离心速度不小于 3500rpm，离心 10min，取上清液至另一离心管中。残渣中再依次加入 20mL、10mLNa₂EDTA-McIlvaine-甲醇提取液（4.11），重复提取两次，合并上清液并定容至 50mL。

7.3 净化

从定容的 50mL 上清液中取 5mL 置于氮气吹干仪上，常温（25℃）下吹至原体积的一半左右，加适量水稀释至体积约 5mL，以 1mL/min 的速度通过已活化处理的固相萃取柱（4.18）。依次用 5mL 水，5mL 甲醇-水（4.13）淋洗固相萃取柱（4.18），弃去全部流出液。减压抽干 5min，用 5mL 草酸-甲醇溶液（4.14）洗脱目标物。洗脱液使用饱和 NaOH 溶液调至 pH 值约为 5~6，置于氮气吹干仪上吹至近干，用 1 mL 水溶解残渣，过 0.22μm 滤膜，按 7.4.3.1 测定一进行测定。

注：当有机肥样品中基体及杂质对目标物色谱峰没有影响时，可省略该步骤，试样经 7.2 步骤后，过 0.22μm 滤膜按照 7.4.3.2 测定二进行测定。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

推荐的液相色谱条件如下：

- a) 色谱柱：SPP C18，2.7μm，4.6×100mm 或相当者；
- b) 流动相及梯度洗脱条件：见表 1；

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间（min）	流动相（乙腈（4.2））/%	流动相（0.01mol/L 草酸（4.12））/%	流动相（甲醇（4.1））/%
8	8	84	8
10	15	70	15
16	15	70	15
17	8	84	8
25	8	84	8

- c) 流速：1.0mL/min；
- d) 柱温：30℃；
- e) 检测波长：355nm；
- f) 进样量：20μL。

7.4.2 工作曲线

7.4.2.1 曲线一

分别从土霉素、四环素、金霉素、强力霉素混合标准溶液（4.17）中取 0.1mL、0.2mL、0.4mL、1.0mL、2.0mL、4.0mL 置于 6 个 100mL 容量瓶中，用 Na₂EDTA-McIlvaine-甲醇提取液（4.11）稀释至刻度得到

系列溶液，分别取 5mL 置于氮气吹干仪上，常温（25℃）下吹至原体积的一半左右，以下按照 7.3 净化步骤处理，最终得到系列混合标准溶液浓度为：0.5μg/mL、1μg/mL、2μg/mL、5μg/mL、10μg/mL、20μg/mL。

7.4.2.2 曲线二

分别从土霉素、四环素、金霉素、强力霉素混合标准溶液（4.17）中取 0.1mL、1.0mL、2.0mL、5.0mL、10.0mL、20.0mL 置于 6 个 100mL 容量瓶中，用 Na₂EDTA-McIlvaine-甲醇提取液（4.11）稀释至刻度，该系列混合标准溶液浓度为：0.1μg/mL、1μg/mL、2μg/mL、5μg/mL、10μg/mL、20μg/mL。

7.4.3 试样测定

7.4.3.1 测定一

试样经 7.2、7.3 提取并净化后，待上机测定。按照 7.4.2.1 曲线一配制系列混合标准溶液，以浓度和响应峰面积值为 x 轴、y 轴绘制工作曲线，外标法进行定量。测试液中土霉素、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，否则应重新调整浓度后测定。

土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质液相色谱图参见附录 A 中的图 A.1。

注：当测定结果低于本方法规定的检出限，或者样品经净化处理后仍有复杂基体时，可参考附录 B 方法。

7.4.3.2 测定二

试样经 7.2 提取后，过 0.22μm 滤膜，待上机测定。按照 7.4.2.1 曲线二配制系列混合标准溶液，以浓度和响应峰面积值为 x 轴、y 轴绘制工作曲线，外标法进行定量。测试液中土霉素、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，否则应重新调整浓度后测定。

7.5 空白试验

除不称取试样外，按以上步骤同时完成空白试验。

7.6 平行试验

按以上步骤，对同一试样进行平行试验测定。

8 结果计算

被测物的测定按式（1）计算：

$$X_i = c_i \times \frac{V}{m} \times K \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- X_i ——试样中被测组分含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
- c_i ——从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 ——样品溶液定容体积，单位为毫升（mL）；
- m ——样品溶液所代表试样的质量，单位为克（g）；
- K ——稀释因子。

计算结果应扣除空白值，以两次平行试验结果的算术平均值表示，保留两位有效数字。

9 精密度

9.1 一般规定

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的，其重复性和再现性的值是以 95%的可信度来计算。

9.2 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 ，有机肥中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素添加浓度范围及重复性方程参见表 2。

表 2 有机肥中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素的重复性和再现性方程 单位为 mg/kg

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
土霉素	15~500	$r=0.100m-0.941$	$R=0.159m+1.254$
四环素	15~500	$r=0.0941m-0.041$	$R=0.216m-1.785$
金霉素	15~500	$r=0.108m+0.069$	$R=0.237m-1.605$
强力霉素	15~500	$r=0.0993m-0.331$	$R=0.228m-0.112$
注：m 为两次测定结果的算术平均值。			

9.3 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 ，有机肥中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素添加浓度范围及再现性方程参见表 2。

附 录 A
(资料性附录)

土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质液相色谱图，见图 A. 1。

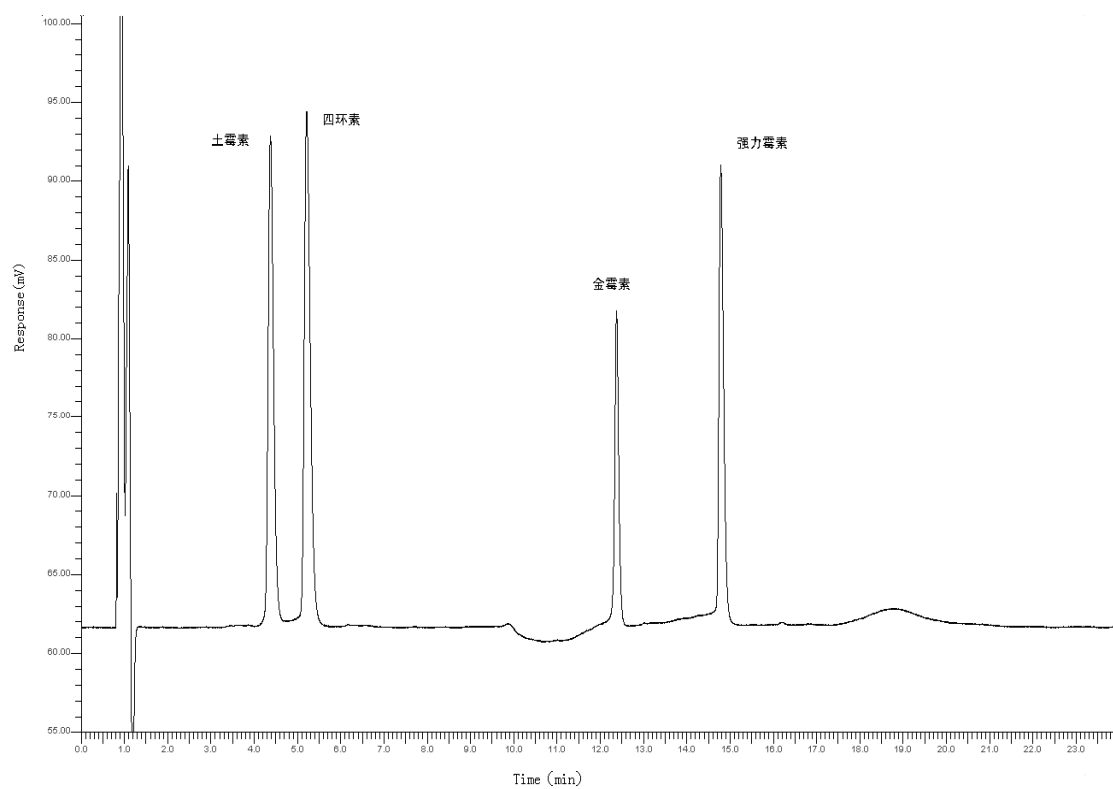


图 A. 1 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质液相色谱图

附录 B

（资料性附录）

有机肥料中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素含量的测定

高效液相色谱串联质谱检测方法

B.1 范围

本附录规定了有机肥中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素含量的高效液相色谱串联质谱检测方法。本标准适用于基体较复杂的有机肥中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素的含量测定。本方法检出限为土霉素 10 μ g/kg，四环素 10 μ g/kg，金霉素 10 μ g/kg，强力霉素 10 μ g/kg。

B.2 原理

试样中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素经提取、净化处理后进样，高效液相色谱质谱检测器测定，标准加入法定量。

B.3 试剂和材料

除另有说明外，所有试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。除另有说明外，所有试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。本方法中所用到其他试剂同标准第4节试剂和材料。

B.3.1 甲醇：色谱纯。

B.3.2 乙腈：色谱纯。

B.3.3 甲酸（CH₂O₂）：色谱纯。

B.3.4 乙酸铵（CH₃COONH₄）：色谱纯。

B.3.5 0.5mol/L 乙酸铵：称取 38.54g 乙酸铵（B.3.4），用水溶解，定容至 1000mL。

B.3.6 0.2%甲酸溶液（含 0.5mmol/L 乙酸铵）：取甲酸（B.3.3）2.0mL 置于 1000mL 容量瓶中，同时移取 0.5mol/L 乙酸铵（B.3.5）1.0mL 置该容量瓶中，加水稀释至刻度。

B.3.7 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素混合标准溶液：分别取 5mL 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准储备液（标准正文 4.16）至 100mL 容量瓶中，用甲醇（B.3.1）稀释至刻度，混匀，每种物质浓度为 100 μ g/mL，储存于冰箱中，每周配制。

B.4 仪器和设备

B.4.1 液相色谱仪：配质谱检测器。

B.4.2 其他本方法中提及的仪器设备同第 5 节中仪器和设备。

B.5 测定步骤

B.5.1 试料的提取

称取过筛的肥料粉末 1.0g~2.0g，精确至 0.01g。提取步骤同第 7.2 节。

B.5.2 净化

准确移取经 B.5.1 步骤得到的试样提取液 1.0mL 置于 25mL 容量瓶中，加水稀释至刻度。准确移取该稀释液 5mL，以 1mL/min 的速度通过已活化处理的固相萃取柱(4.18)。依次用 5mL 水,5mL 甲醇-水(4.13)淋洗固相萃取柱，弃去全部流出液。减压抽干 5min，用 5mL 草酸-甲醇溶液（4.14）洗脱目标物。洗脱液使用饱和 NaOH 溶液调至 pH 值约为 5~6，置于氮气吹干仪上室温下吹至近干，用 1mL 流动相(B.5.3.1 (b))溶解残渣，过 0.22μm 滤膜，待测定。

同时按照上述步骤准备空白样品提取液用以配制标准曲线。

B.5.3 测定

B.5.3.1 液相色谱串联质谱参考条件

推荐的液相色谱串联质谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：Hypersil GOLD aQ, C18, 1.9μm, 2.1mm×100mm 或相当者；
- b) 流动相：A：0.2%甲酸溶液（含 0.5mmol/L 醋酸铵）； B：乙腈；流动相比例：A：B=7：3；
- c) 流速：0.30 mL/min；
- d) 柱温：25℃；
- e) 进样量：10μL；
- f) 离子化模式：电喷雾电离（ESI），正离子模式；
- g) 喷雾电压：4000V；
- h) 鞘气压力：35PSI；
- i) 辅助气流量：5L/min；
- j) 离子传输管温度：350℃；
- k) 雾化温度：275℃；
- l) 碰撞气压力：氩气，1.5mTorr；
- m) 扫描模式：选择反应监测（SRM），选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量见表 B.1。

表 B.1 母离子、子离子和碰撞能量表

目标化合物	母离子（m/z）	子离子（m/z）	碰撞能量（eV）
土霉素	461	426*	20
		443	12
四环素	445	410*	19
		428	16
金霉素	479	444*	22
		154	31
强力霉素	445	428*	19
		154	33
注：对于不同质谱仪器，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。*定量离子。			

B.5.3.2 工作曲线

分别从土霉素、四环素、金霉素、强力霉素混合标准溶液（B.3.7）中取适量溶液，用样品空白提取液稀释定容，该系列混合标准溶液浓度为：2、5、10、20、50、100ng/mL。

B.5.3.3 试样测定

按照 B.5.3.2 配制系列混合标准溶液，以浓度和响应峰面积值为 x 轴、y 轴绘制工作曲线，外标法定量测定经 B.5.1、B.5.2 提取净化后的试样。测试液中土霉素、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，否则应重新调整浓度后测定。随试样测定进行空白试验和平行试验。

B.6 结果计算

被测物的测定按式（1）计算：

$$X_i = c_i \times \frac{V}{m} \times K \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- X_i ——试样中被测组分含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；
- c_i ——从工作曲线得到的被测组分溶液浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；
- V ——样品溶液定容体积，单位为毫升（ mL ）；
- m ——样品溶液所代表试样的质量，单位为克（ g ）；
- K ——稀释因子。

计算结果应扣除空白值，以两次平行试验结果的算术平均值表示，保留 2 位有效数字。