



中华人民共和国国家标准

GB/T —XXXX

有机肥中土霉素、四环素、金霉素与强力霉素残留量的测定(高效液相色谱法)

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

(征求意见稿)

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《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》的规定起草。

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、国家化肥质量监督检验中心(上海)、上海交通大学。

本标准主要起草人：

本标准为首次发布。

有机肥中土霉素、四环素、金霉素与强力霉素残留量的测定（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、金霉素和强力霉素残留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、金霉素和强力霉素残留量的测定。
本标准检出限为土霉素 0.15 mg/L，四环素 0.15 mg/L，金霉素 0.20 mg/L，强力霉素 0.15 mg/L。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。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标准，然而，鼓励根据本标准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标准。

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 6379.1-2004，ISO 5725-1：1994，IDT）

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 6379.2-2004，ISO 5725-2：1994，IDT）

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法（GB/T 6682-2008，ISO 3696：1987，MOD）

3 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/T6682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：0.2 mol/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: 0.1 mol/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 ($\text{pH}=6.8\pm 0.05$): 将 1000mL 0.4 mol/L 磷酸氢二钠溶液 (4.7) 与 294mL 0.2 mol/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 $v:v:v=1:1:2$ 比例混匀, 必要时用 NaOH 或 HCl 调 $\text{pH}=7.2\pm 0.05$ 。
- 4.12 草酸溶液: 0.01 mol/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: 0.01 mol/L。称取 0.13g 草酸 (4.6), 用甲醇溶解, 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), 分别用甲醇配成 2mg/mL 的标准储备液。储备液于 -20°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 Oasis HLB 固相萃取柱 (或相当者): 300mg, 3mL。使用前依次通过 2mL 甲醇及 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 3000rpm。
- 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 。

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 1.0~2.0g，精确至 0.01g。

7.2 提取

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、10mL 提取液(4.11)，重复提取两次，合并上清液。

7.3 净化^③

取 5mL 上清液（7.1）置于氮气吹干仪上，常温（25℃）下吹至原体积的一半左右，加适量水洗涤，稀释至体积约 5mL，以 1 mL/min 的速度通过已活化处理的 Oasis HLB 柱（4.18）。依次用 5 mL 水，5 mL 甲醇-水（4.13）淋洗 HLB 柱，弃去全部流出液。减压抽干 5 min，用 5 mL 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 7.4.3.2 方法^②进行测定。

③：当有机肥样品中基体及杂质干扰较少时，可省略该步骤，试样经 7.2 步骤后，过 0.22μm 滤膜按照 7.4.3.1 方法^①进行测定。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

- 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 A（乙腈）/%	流动相 B（0.01mol/L 草酸）/%	流动相 C（甲醇）/%
0.5	8	84	8
7.0	8	84	8
2.0	15	70	15
6.0	15	70	15
1.0	8	84	8
8.0	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^①：

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 0.1，1，2，5，10，20mL 置 100mL 容量瓶中，用提取液（4.11）稀释至刻度，该系列混合标准溶液浓度为：0.1、1、2、5、10、20μg/mL。

7.4.2.2 曲线②:

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 0.02, 0.2, 0.4, 1, 2, 4mL 置 100mL 容量瓶中, 用提取液(4.11)稀释至刻度, 分别取 5mL 系列溶液置于氮气吹干仪上, 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: 0.1、1、2、5、10、20μg/mL。

7.4.3 试样测定④

④当有机肥样品中基体及杂质干扰较少时, 无须过 HLB 柱, 则按照 7.4.3.1 方法①测定土霉素、四环素、金霉素、强力霉素含量。当有机肥样品中基体及杂质干扰较多时, 需过 HLB 柱净化时, 则按照 7.4.3.2 方法②测定土霉素、四环素、金霉素、强力霉素含量。

7.4.3.1 方法①:

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①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。

7.4.3.2 方法②:

试样经 7.2、7.3 提取并净化后, 待上机测定。按照 7.4.2.2 曲线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。

7.5 空白试验

称取试样, 以土霉素、四环素、金霉素、强力霉素零浓度溶液作为试料空白。

7.6 平行试验

对同一试样进行平行试验测定。

8 结果计算

试样中被测组分（土霉素、四环素、金霉素、强力霉素）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 2 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见表 2。

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 见表 2。

表 2 有机肥中四环素族抗生素添加浓度范围及重复性和再现性 单位为毫克每千克

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
土霉素	5~100		
四环素	5~100		
金霉素	5~100		
强力霉素	5~100		
注：m 为两次测定结果的算术平均值。			

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。

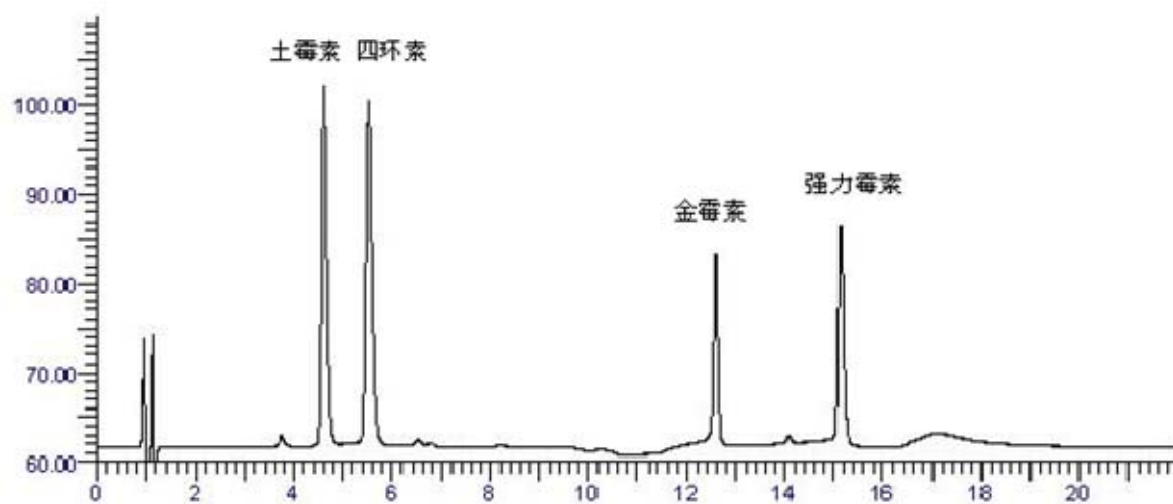


图 A.1 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质液相色谱图