



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 32951—2016

---

## 有机肥料中土霉素、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  
content for organic fertilizers—HPLC method

2016-08-29 发布

2017-03-01 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

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:上海化工研究院、上海出入境检验检疫局工业品与原材料检测技术中心、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、商照聪、叶平、马明、闵红、沈国清、赵杰、洪丽玲。

# 有机肥料中土霉素、四环素、金霉素与强力霉素的含量测定 高效液相色谱法

**警告:**使用本标准可能会涉及到危险的材料、操作和设备,但本标准无意对与其使用相关的所有安全问题都提出建议。使用者在应用本标准之前,有责任建立使用的安全和防护措施,并确定相关规章限制的使用性。

## 1 范围

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

本标准适用于有机肥料、有机-无机复混肥料中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素含量的测定。

本标准不适用于豆饼肥中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素含量的测定。

本方法检出限分别为:土霉素 0.75 mg/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  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -McIlvaine-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 水合草酸( $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )。

4.7 磷酸氢二钠溶液:0.4 mol/L。称取 143.26 g 磷酸氢二钠,用水溶解,定容至 1 000 mL。

4.8 柠檬酸溶液:0.2 mol/L。称取 42.03 g 柠檬酸,用水溶解,定容至 1 000 mL。

4.9 乙二胺四乙酸二钠( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )溶液:0.1 mol/L。称取 37.22 g 乙二胺四乙酸二钠,用水溶解,定容至 1 000 mL。

4.10 磷酸氢二钠-柠檬酸(McIlvaine)缓冲液( $\text{pH}=6.8\pm0.05$ ):将 1 000 mL 0.4 mol/L 磷酸氢二钠溶液(见 4.7)与 294 mL 0.2 mol/L 柠檬酸溶液(见 4.8)混合。

4.11  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -McIlvaine-甲醇提取液:取  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ (见 4.9),磷酸氢二钠-柠檬酸(McIlvaine)缓冲液(见 4.10)与甲醇按 1+1+2 (体积)比例混匀,必要时用 NaOH 溶液或 HCl 溶液调节  $\text{pH}=7.20\pm0.05$ 。

4.12 草酸溶液:0.01 mol/L。称取 1.26 g 草酸,用水溶解,定容至 1 000 mL。

4.13 甲醇-水(1+19):量取 5 mL 甲醇与 95 mL 水混匀。

4.14 草酸-甲醇溶液:0.01 mol/L。称取 0.13 g 草酸,用甲醇溶解,定容至 100 mL。

4.15 土霉素(oxytetracycline, CAS:2058-46-0)、四环素(tetracycline, CAS:64-75-5)、金霉素(chlortetracycline, 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:2 mg/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(见 4.15),分别用甲醇配成 2 mg/mL 的标准储备液。储备液于 0 ℃~8 ℃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 5 mL 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准储备液(见 4.16)至 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,混匀,每种物质浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,储存于冰箱中,每周配制。

4.18 固相萃取柱(二乙烯基苯和 N-乙烯基吡咯烷酮的大孔共聚物-HLB 或相当者):300 mg/3 mL。使用前依次通过 2 mL 甲醇及 2 mL 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 0.1 mg。

5.3 机械振荡提取仪:50 次/min~500 次/min。

5.4 冷冻离心机:转速大于 3 500 r/min。

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 $\pm0.02$ 。

5.9 针式过滤头:0.22  $\mu\text{m}$ 。

5.10 金属试验筛:0.5 mm。

## 6 试样制备与保存

### 6.1 试样的制备

将样品粉碎,全部通过 0.5 mm 试验筛,待用。

### 6.2 试样保存

过筛的实验室样品在室温(约 25 ℃)下避光保存,并注意防潮防霉。

## 7 分析步骤

### 7.1 称样

称取过筛的试样 1.0 g~2.0 g,精确至 0.1 mg。

### 7.2 提取

试料置于 50 mL 带盖塑料离心管中。向试料中加入 20 mL  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -Mcllvaine-甲醇提取液,于机械振荡提取仪中室温(约 25 ℃)下提取 20 min,于 15 ℃下置于离心机上,离心速度不小于 3 500 r/min,离心 10 min,取上清液至另一离心管中。残渣中再依次加入 20 mL、10 mL  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -Mcllvaine-甲醇提取液,重复提取两次,合并上清液并定容至 50 mL。

### 7.3 净化

从定容的 50 mL 上清液中取 5 mL 置于氮气吹干仪上,室温(约 25 ℃)下吹至原体积的一半左右,加适量水稀释至体积约 5 mL,以 1 mL/min 的速度通过已活化处理的固相萃取柱。依次用 5 mL 水,5 mL 甲醇-水淋洗固相萃取柱,弃去全部流出液。减压抽干 5 min,用 5 mL 草酸-甲醇溶液洗脱目标物。洗脱液使用饱和 NaOH 溶液调至 pH 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 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,按 7.4.3.1 测定一进行测定。

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 7.3 净化步骤,试样经 7.2 提取步骤后,过 0.22  $\mu\text{m}$  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:C18 柱,2.7  $\mu\text{m}$ ,4.6 mm $\times$ 100 mm 或相当者;
- b) 流动相及梯度洗脱条件:见表 1;
- c) 流速:1.0 mL/min;
- d) 柱温:30 ℃;
- e) 检测波长:355 nm;
- f) 进样量:20  $\mu\text{L}$ 。

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[0.01 mol/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

## 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(见 4.17)中取 0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、1.0 mL、2.0 mL、4.0 mL 置于 6 个 100 mL 容量瓶中,用 Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine-甲醇提取液稀释至刻度得到系列溶液,分别取 5 mL 置于氮气吹干仪上,室温(约 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:0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/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(见 4.17)中取 0.1 mL、1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL、10.0 mL、20.0 mL 置于 6 个 100 mL 容量瓶中,用 Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine-甲醇提取液稀释至刻度,该系列混合标准溶液浓度为:0.1 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL。

## 7.4.3 测定

### 7.4.3.1 测定一

试料经 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 给出的方法。

### 7.4.3.2 测定二

试料经 7.2 提取后,过 0.22 μm 滤膜,待上机测定。按照 7.4.2.2 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

除不加试样外,按以上步骤同时进行空白试验。

## 7.6 平行试验

做两份试料的平行测定。

## 8 分析结果的计算和表述

试料中被测组分的含量  $X_i$ ,数值用毫克每千克(mg/kg)表示,按式(1)计算:

$$X_i = (c_i - c_0) \times \frac{V}{m} \times K \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$c_i$  ——从工作曲线得到的被测组分溶液浓度的数值,单位为微克每毫升(μg/mL);

$c_0$  ——空白试验值,单位为微克每毫升(μg/mL);

$V$  ——试液定容体积的数值,单位为毫升(mL);

$m$  —— 试料质量的数值,单位为克(g);

$K$  —— 稀释因子。

计算结果保留两位有效数字,取平行测定结果的算术平均值作为测定结果。

## 9 精密度

### 9.1 一般规定

本标准中精密度数据是按照 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、强力霉素浓度范围及重复性方程见表 2。

表 2 有机肥料中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素的重复性和再现性方程

单位为毫克每千克

名称	浓度范围	重复性限 $r$	再现性限 $R$
土霉素	15~500	$r=0.100\ m-0.941$	$R=0.159\ m+1.254$
四环素	15~500	$r=0.094\ 1\ m-0.041$	$R=0.216\ m-1.785$
金霉素	15~500	$r=0.108\ m+0.069$	$R=0.237\ m-1.605$
强力霉素	15~500	$r=0.099\ 3\ m-0.331$	$R=0.228\ m-0.112$
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

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。

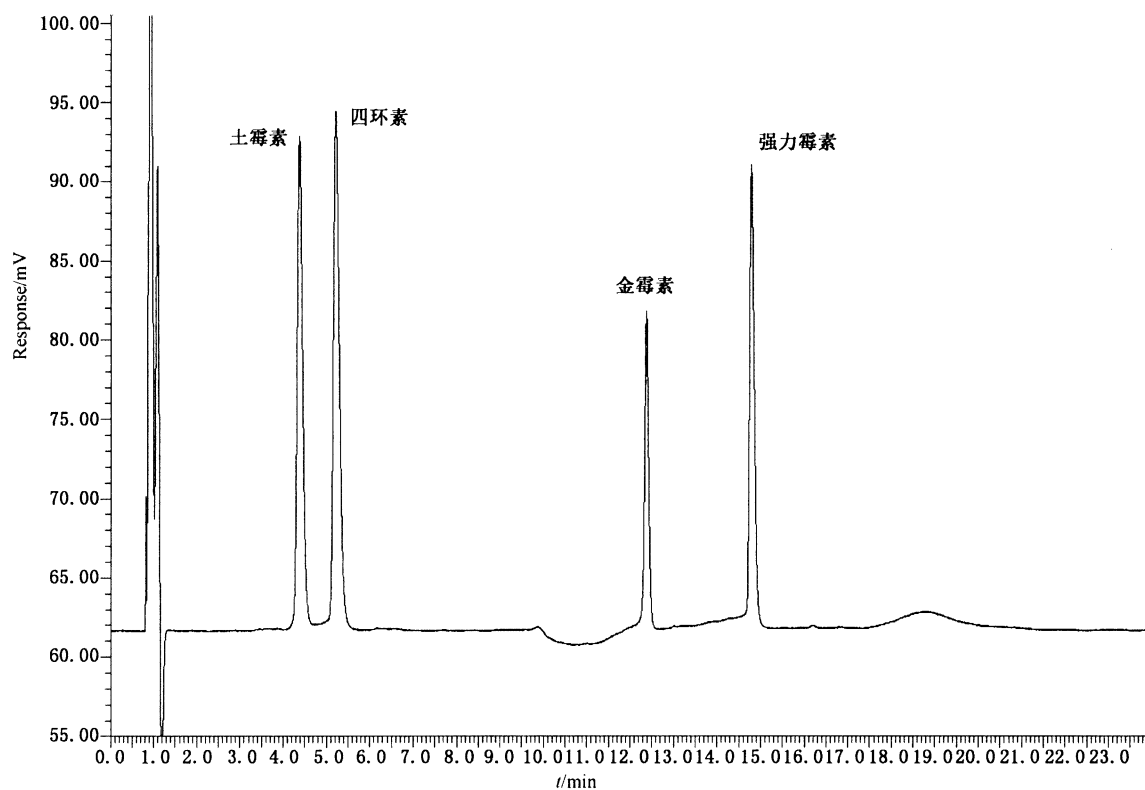


图 A.1 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准物质液相色谱图



## 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法

#### B.1 说明

本附录给出了基体较复杂的有机肥料(如豆饼肥)中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素的含量测定方法供参考,方法检出限为土霉素 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,四环素 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,金霉素 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,强力霉素 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

#### B.2 原理

试料中土霉素、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。本方法中所用到其他试剂同第 4 章试剂和材料。

**B.3.1** 甲醇:色谱纯。

**B.3.2** 乙腈:色谱纯。

**B.3.3** 甲酸( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ):色谱纯。

**B.3.4** 乙酸铵( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ):色谱纯。

**B.3.5** 0.5 mol/L 乙酸铵:称取 38.54 g 乙酸铵,用水溶解,定容至 1 000 mL。

**B.3.6** 0.2% 甲酸溶液(含 0.5 mmol/L 乙酸铵):取甲酸 2.0 mL 置于 1 000 mL 容量瓶中,同时移取 0.5 mol/L 乙酸铵(见 B.3.5)1.0 mL 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 5 mL 土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准储备液(见 4.16)至 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,混匀,每种物质浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,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** 同第 5 章。

#### B.5 分析步骤

##### B.5.1 提取

称取过筛的肥料粉末 1.0 g~2.0 g,精确至 0.1 mg。提取步骤同 7.2。

B.5.2 净化

准确移取经 B.5.1 步骤得到的试料提取液 1.0 mL 置于 25 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度。准确移取该稀释液 5 mL,以 1 mL/min 的速度通过已活化处理的固相萃取柱。依次用 5 mL 水,5 mL 甲醇-水淋洗固相萃取柱,弃去全部流出液。减压抽干 5 min,用 5 mL 草酸-甲醇溶液洗脱目标物。洗脱液使用饱和 NaOH 溶液调至 pH 约为 5~6,置于氮气吹干仪上室温下吹至近干,用 1 mL 流动相[见 B.5.3.1b)]溶解残渣,过 0.22  $\mu\text{m}$  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:极性包埋 C18 键合硅胶柱,C18,1.9  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm $\times$ 100 mm 或相当者;
- b) 流动相:A:0.2% 甲酸溶液(含 0.5 mmol/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  $^{\circ}\text{C}$ ;
- e) 进样量:10  $\mu\text{L}$ ;
- f) 离子化模式:电喷雾电离(ESI),正离子模式;
- g) 喷雾电压:4 000 V;
- h) 鞘气压力:241 kPa;
- i) 辅助气流量: 5 L/min;
- j) 离子传输管温度:350  $^{\circ}\text{C}$ ;
- k) 雾化温度:275  $^{\circ}\text{C}$ ;
- l) 碰撞气压力:氩气,0.2 Pa;
- 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(见 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 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL。

### B.5.3.3 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 分析结果的计算和表述

试料中被测组分的含量  $X_i$ ,数值用微克每千克( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )表示,按式(B.1)计算:

$$X_i = (c_i - c_0) \times \frac{V}{m} \times K \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots (\text{B.1})$$

式中:

$c_i$  ——从工作曲线得到的被测组分溶液浓度的数值,单位为纳克每毫升( $\text{ng/mL}$ );

$c_0$  ——空白试验值,单位为纳克每毫升( $\text{ng/mL}$ );

$V$  ——试液定容体积的数值,单位为毫升( $\text{mL}$ );

$m$  ——试料质量的数值,单位为克( $\text{g}$ );

$K$  ——稀释因子。

计算结果保留两位有效数字,取平行测定结果的算术平均值作为测定结果。