

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3787—2020

## 土壤中四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类、 大环内酯类和氯霉素类抗生素含量 同步检测方法 高效液相色谱法

Simultaneous determination of tetracyclines, fluoroquinolones, sulfonamides,  
macrolides and chloramphenicols in soil by HPLC method

2020-11-12 发布

2021-04-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

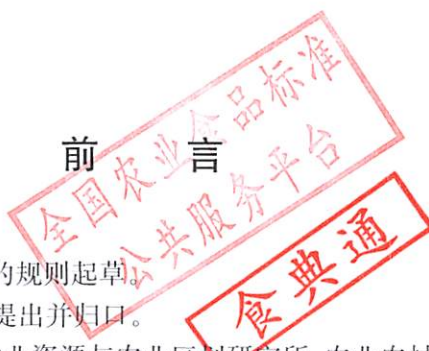
## 前言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：中国农业科学院农业资源与农业区划研究所、农业农村部农业耕地质量监测保护中心、北京农学院、中国农业科学院蜜蜂研究所、中国农业大学、中国标准化研究院。

本标准主要起草人：李兆君、冯瑶、李艳丽、陈守伦、魏朝俊、薛晓峰、徐彦军、赵林萍、杨丽。



# 土壤中四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类、大环内酯类和氯霉素类 抗生素含量同步检测方法 高效液相色谱法

## 1 范围

本标准规定了土壤中四环素类(土霉素、金霉素)、氟喹诺酮类(环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星)、磺胺类(磺胺噻唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺二甲嘧啶)、大环内酯类(泰乐菌素)和氯霉素类(氯霉素)共5类11种抗生素含量的高效液相色谱检测方法。

本标准适用于土壤中四环素类(土霉素、金霉素)、氟喹诺酮类(环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星)、磺胺类(磺胺噻唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺二甲嘧啶)、大环内酯类(泰乐菌素)和氯霉素类(氯霉素)共5类11种抗生素含量的检测。

## 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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 36197 土壤质量 土壤采样技术指南

## 3 原理

试样中11种抗生素经 $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -McIlvaine缓冲液、有机混合提取剂依次提取,固相萃取柱净化处理后进样,高效液相色谱-紫外检测器测定,外标峰面积法定量。

## 4 试剂和材料

除另有说明外,本标准所用试剂均为分析纯,实验用水应符合GB/T 6682中一级水的规格。

- 4.1 甲醇:色谱纯。
- 4.2 乙腈:色谱纯。
- 4.3 丙酮:色谱纯。
- 4.4 甲酸:色谱纯。
- 4.5 乙二胺四乙酸二钠( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )。
- 4.6 柠檬酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )。
- 4.7 无水磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )。
- 4.8 柠檬酸溶液:0.1 mol/L。称取21.01 g柠檬酸(4.6),用水溶解,定容至1 000 mL,摇匀。
- 4.9 磷酸氢二钠溶液:0.2 mol/L。称取28.41 g无水磷酸氢二钠(4.7),用水溶解,定容至1 000 mL,摇匀。
- 4.10 磷酸氢二钠-柠檬酸(McIlvaine)缓冲液:将1 000 mL 0.1 mol/L柠檬酸溶液(4.8)与625 mL 0.2 mol/L磷酸氢二钠溶液(4.9)混合并摇匀。必要时,用1 mol/L氢氧化钠溶液或1 mol/L盐酸溶液调节 $\text{pH}=4.0 \pm 0.1$ 。
- 4.11  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -McIlvaine缓冲液:0.1 mol/L。称取60.5 g乙二胺四乙酸二钠(4.5),使其溶解于1 625 mL McIlvaine缓冲液(4.10)中,摇匀。
- 4.12 有机混合提取剂:量取40 mL甲醇(4.1)、40 mL乙腈(4.2)、20 mL丙酮(4.3)混合并摇匀。必要时,用1 mol/L氢氧化钠溶液或1 mol/L盐酸溶液调节 $\text{pH}=4.0 \pm 0.1$ 。

- 4.13 25%甲醇水溶液:量取 25 mL 甲醇(4.1)与 75 mL 水混合并摇匀。
- 4.14 65%甲醇水溶液:量取 65 mL 甲醇(4.1)与 35 mL 水混合并摇匀。
- 4.15 0.1%甲酸水溶液:准确吸取 1 mL 甲酸(4.4)于 1 000 mL 容量瓶中,用水溶解并定容至刻度,摇匀。
- 4.16 乙腈-甲酸溶液(1:4):量取 200 mL 乙腈(4.2)与 800 mL 甲酸水溶液(4.15)混合并摇匀。
- 4.17 Oasis HLB 固相萃取柱或相当者:500 mg/6 mL。使用前,依次通过 5 mL 甲醇(4.1)及 10 mL 水预处理,保持柱体湿润。
- 4.18 标准物质:土霉素、金霉素、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺噻唑、磺胺间甲氧嘧啶、环丙沙星、诺氟沙星、恩诺沙星、泰乐菌素、氯霉素的药物名称、英文名称、CAS 号、分子式、纯度参见附录 A 中的表 A.1。
- 4.19 标准储备溶液:准确称取按其纯度折算为 100%质量的土霉素、金霉素、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺噻唑、磺胺间甲氧嘧啶、环丙沙星、诺氟沙星、恩诺沙星、泰乐菌素、氯霉素各 10.0 mg,环丙沙星、诺氟沙星、恩诺沙星分别用 0.03 mol/L 氢氧化钠溶液溶解并定容至 10 mL,其余标准品用甲醇溶解并定容至 10 mL,配制成浓度为 1.0 mg/mL 的单标储备液,于 4℃ 储存于棕色瓶中,有效期为 1 个月。
- 4.20 混合标准工作溶液:根据需要,用甲醇(4.1)将标准储备溶液(4.19)配制为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 仪器及设备

- 5.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器。
- 5.2 真空冷冻干燥机。
- 5.3 分析天平:感量 0.01 mg,0.001 g。
- 5.4 pH 计:测量精度 $\pm 0.02$ 。
- 5.5 涡旋混合器。
- 5.6 超声波清洗机。
- 5.7 低温高速离心机:转速不低于 8 000 r/min。
- 5.8 固相萃取装置。
- 5.9 旋转蒸发器。

## 6 分析步骤

### 6.1 样品采集与制备

土壤样品取样方法应符合 GB/T 36197 中的规定,所有土壤样品用洁净棕色瓶密闭保存,用干冰冷藏保存并运输至实验室,储存于 $-20^{\circ}\text{C}$ 。将采集回的样品冷冻干燥,研磨过 2 mm 筛,装入洁净的样品瓶中,密封,并标明标记,常温避光保存,备用。制样操作过程中应防止样品受到污染后残留物含量发生变化。

### 6.2 提取

称取冻干土样( $1.00\pm 0.01$ ) g,置于 50 mL 聚乙烯离心管中,加入 10 mL  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -McIlvaine 缓冲液(4.11),涡旋混匀 30 s(室温)。于 4℃ 下,超声 15 min,8 000 r/min 条件下离心 10 min,吸取上清液至另一洁净的离心管中,残渣再加入 10 mL 的  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ -McIlvaine 缓冲液,重复以上步骤提取一次。提取 2 次后的残渣再用 10 mL 有机混合提取剂(4.12)提取 2 次,每次提取剂用量 5 mL,步骤同上。合并 4 次上清液,过 0.45  $\mu\text{m}$  有机相微孔滤膜,将过滤后液体在旋转蒸发器(70 r/min,40℃)上浓缩至 3 mL~5 mL,用于净化。

### 6.3 净化

将浓缩后的提取液以 1 mL/min 的流速过固相萃取柱(4.17),提取液完全流出后,用 5 mL 25%甲醇水溶液(4.13)淋洗,弃去全部流出液,并真空抽干 5 min,最后用 10 mL 65%甲醇水溶液(4.14)洗脱,收集洗脱液于旋转蒸发器上蒸至干燥,吸取 1 mL 乙腈-甲酸溶液(1:4)(4.16)定容,过 0.22  $\mu\text{m}$  有机相微孔

滤膜过滤,供液相色谱-紫外检测器测定。

#### 6.4 仪器参考条件

- 6.4.1 色谱柱:T3 色谱柱,150 mm × 4.6 mm,3 μm 或相当者。
- 6.4.2 流动相:A:0.1%甲酸水溶液(4.15),B:乙腈(4.2)梯度洗脱条件见附录 B 的表 B.1。
- 6.4.3 流速:1.0 mL/min。
- 6.4.4 检测波长:274 nm。
- 6.4.5 柱温:40℃。
- 6.4.6 进样量:10 μL。

#### 6.5 标准工作曲线绘制

分别移取一系列浓度为 0.1 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L 和 50.0 mg/L 的抗生素标准工作液。按仪器参考条件(6.4)进行测定,记录色谱峰面积,以色谱峰的峰面积为纵坐标,以抗生素溶液浓度为横坐标,分别对 11 种抗生素浓度在线性范围内作图,绘制标准工作曲线。

11 种抗生素的标准物质高效液相色谱图参见附录 C 中的图 C.1。

#### 6.6 试样测定

将试样溶液按照仪器参考条件(6.4)进行测定,记录色谱峰面积,由色谱峰的峰面积从标准曲线上求出相应的浓度。样品溶液中的被测物响应值均应在仪器测定的线性范围之内,否则应重新调整浓度后测定。

注:当测定结果低于仪器测定的线性范围,可调整称样量;当测定结果高于仪器测定的线性范围,则应稀释后再进行测定。

#### 6.7 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

#### 6.8 空白试验

除不加试样外,均按上述步骤同时进行。

### 7 结果计算

按式(1)计算目标抗生素含量。

$$X_i = \frac{(C_i - C_0) \times V}{m} \quad (1)$$

式中:

- $X_i$  ——样品中被测目标抗生素的质量浓度,单位为毫克每千克(mg/kg);
- $C_0$  ——空白试验中被测目标抗生素的质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- $C_i$  ——标准曲线查得目标抗生素的质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- $V$  ——样品溶液定容总体积,单位为毫升(mL);
- $m$  ——样品质量(干基),单位为克(g)。

### 8 方法检出限与定量限

测得各样品的峰高与噪声(基线峰高),以 3 倍信噪比计算检出限(LOD),10 倍信噪比计算定量限(LOQ)。检出限与定量限参见附录 D 中的表 D.1。

### 9 回收率与精密度

在添加浓度 5 mg/kg、10 mg/kg 和 50 mg/kg 时,回收率分别介于 62.7%~90.4%、72.4%~97.1% 和 74.1%~99.2%,相对标准偏差低于 10%。回收率与精密度参见附录 E 中的表 E.1。

### 10 允许差

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 10%。

## 附 录 A

(资料性附录)

## 11 种抗生素的药物名称、英文名称、CAS 号、分子式、纯度

11 种抗生素的药物名称、英文名称、CAS 号、分子式、纯度见表 A. 1。

表 A. 1 11 种抗生素的药物名称、英文名称、CAS 号、分子式、纯度

药物名称	英文名称	CAS 号	分子式	纯度, %
土霉素	Oxytetracycline	2058-46-0	$C_{22}H_{25}ClN_2O_9$	$\geq 96.0$
金霉素	Chlortetracycline	64-73-3	$C_{21}H_{21}ClN_2O_8$	$\geq 93.0$
诺氟沙星	Norfloxacin	70458-96-7	$C_{19}H_{24}FN_3O_6$	$\geq 97.2$
环丙沙星	Ciprofloxacin	93107-08-5 86483-48-9	$C_{17}H_{19}ClFN_3O_3$	$\geq 92.3$
恩诺沙星	Enrofloxacin	93106-60-6	$C_{19}H_{22}FN_3O_3$	$\geq 99.5$
磺胺噻唑	Sulfathiazole	72-14-0	$C_9H_9N_3O_2S_2$	$\geq 99.0$
磺胺二甲嘧啶	Sulfamethazine	57-68-1	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	$\geq 99.0$
磺胺间甲氧嘧啶	Sulfamonomethoxine	1220-83-3	$C_{11}H_{12}N_4O_3S$	$\geq 93.0$
磺胺甲恶唑	Sulfamethoxazole	723-46-6	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	$\geq 99.0$
氯霉素	Chloramphenicol	56-75-7	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$	$\geq 98.6$
泰乐菌素	Tylosin	74610-55-2	$C_{49}H_{81}NO_{23}$	$\geq 96.0$

附 录 B  
(规范性附录)  
梯度洗脱条件

梯度洗脱条件见表 B. 1。

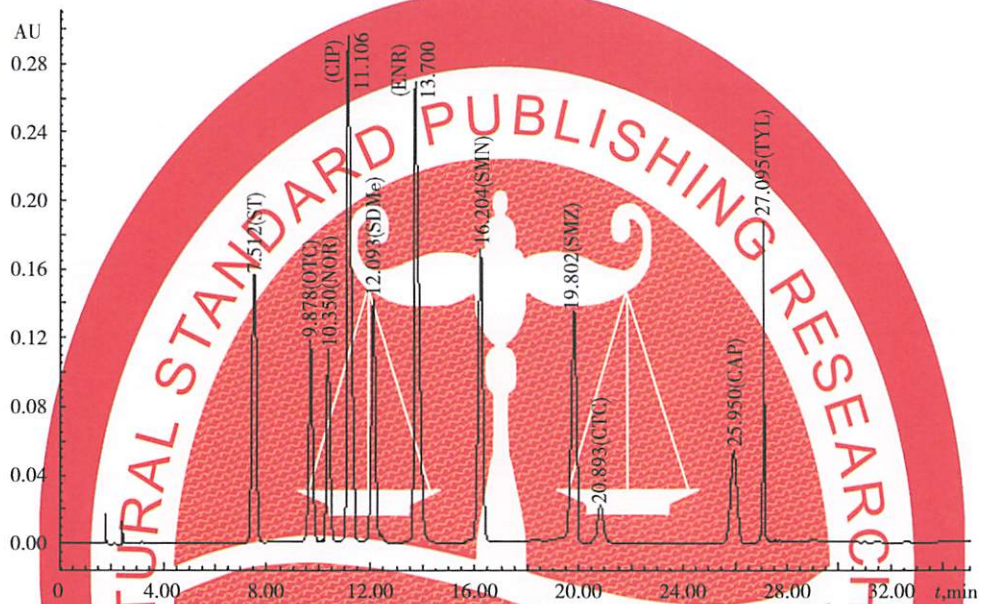
表 B. 1 梯度洗脱条件

时间, min	A, %	B, %
0	90	10
20	80	20
24	80	20
25	40	60
31	40	60
32	90	10
35	90	10

附录 C  
(资料性附录)

11 种抗生素的标准物质高效液相色谱图

11 种抗生素的标准物质高效液相色谱图见图 C.1。



说明:

- |                           |                           |
|---------------------------|---------------------------|
| ST——磺胺嘧啶(7.512 min);      | SMN——磺胺间甲氧嘧啶(16.204 min); |
| OTC——土霉素(9.878 min);      | SMZ——磺胺甲恶唑(19.802 min);   |
| NOR——诺氟沙星(10.350 min);    | CTC——金霉素(20.893 min);     |
| CIP——环丙沙星(11.106 min);    | CAP——氯霉素(25.950 min);     |
| SDMe——磺胺二甲嘧啶(12.093 min); | TYL——泰乐菌素(27.095 min)。    |
| ENR——恩诺沙星(13.700 min);    |                           |

图 C.1 11 种抗生素的标准物质高效液相色谱图

附 录 D  
(资料性附录)  
方法的检出限和定量限

方法的检出限和定量限见表 D.1。

表 D.1 方法的检出限和定量限

化合物	检出限, $\mu\text{g}/\text{kg}$	定量限, $\mu\text{g}/\text{kg}$
土霉素	0.3	1.0
金霉素	0.4	1.3
诺氟沙星	0.4	1.4
环丙沙星	0.3	0.8
恩诺沙星	1.9	5.9
磺胺噻唑	1.0	3.1
磺胺二甲嘧啶	0.6	1.9
磺胺间甲氧嘧啶	0.1	0.3
磺胺甲恶唑	0.9	2.8
氯霉素	0.2	0.5
泰乐菌素	1.7	5.0

附录 E  
(资料性附录)  
方法的回收率和精密度

方法的回收率和精密度见表 E.1。

表 E.1 方法的回收率和精密度

化合物	5 mg/kg		10 mg/kg		50 mg/kg	
	回收率,%	相对标准偏差,%	回收率,%	相对标准偏差,%	回收率,%	相对标准偏差,%
土霉素	76.4	1.7	92.6	2.5	90.6	2.8
金霉素	73.1	3.6	72.4	4.8	77.0	5.4
诺氟沙星	81.4	3.2	83.8	1.6	91.2	3.8
环丙沙星	73.0	5.1	76.8	2.3	74.1	5.7
恩诺沙星	90.2	4.1	80.4	1.7	84.4	5.0
磺胺噻唑	75.4	4.1	76.5	3.0	81.7	3.2
磺胺二甲嘧啶	71.6	0.8	71.4	1.1	71.2	3.7
磺胺间甲氧嘧啶	62.7	3.5	85.8	0.9	71.0	4.8
磺胺甲恶唑	69.3	5.6	77.3	10.0	79.1	6.2
氯霉素	90.4	4.6	97.1	5.7	99.2	6.7
泰乐菌素	83.6	4.4	96.7	5.5	98.2	5.9

中华人民共和国  
农业行业标准

土壤中四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类、大环内酯类和  
氯霉素类抗生素含量同步检测方法 高效液相色谱法

NY/T 3787—2020

\* \* \*

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

\* \* \*

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20 千字

2021 年 3 月第 1 版 2021 年 3 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8427

定价: 32.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



NY/T 3787—2020