

HPLC 法测定有机肥中土霉素、四环素、金霉素和强力霉素含量

LC-158

摘要: 本文参照《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》，建立了一种使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A 测定有机肥中四环素类含量的方法。样品中目标组分经 Na₂EDTA-McIlvaine- 甲醇提取液提取、SPE 小柱净化后进样分析，外标法定量，校准曲线线性良好，线性相关系数均不低于 0.9995，对低、中、高不同浓度的样品平行测试 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03%~0.12% 和 0.07%~3.51% 之间，仪器定量限在 0.011~0.033 mg/L 之间，可满足有机肥中四环素类含量检测的要求。

关键词: HPLC 有机肥四环素类 GB/T 32951-2016

土霉素 (Oxytetracycline, OTC)、四环素 (Tetracycline, TC)、金霉素 (Chlortetracycline, CTC) 与强力霉素 (Doxycycline, DC) 属于四环素类抗生素 (TCs)，由于其广谱的抗菌效果和低廉的价格，在畜牧业中应用广泛。抗生素在动物体内不能被完全吸收，约 60-90% 会随动物粪便排出。有机肥以畜禽粪便为主要肥源，一般未经处理或简单堆沤后即施加到土壤中。TCs 在土壤中较为稳定，过量的抗生素进入环境中，对农田土壤、地表和地下水及生态系统中各类生物产生危害，并诱发和传播各

类抗生素耐药细菌，对人类公共健康产生威胁。鉴于此，国家已颁布《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》来监控其在有机肥中的含量。

本文参照该标准，建立了一种使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A 测定有机肥中四环素类含量的方法：样品中目标组分经 Na₂EDTA-McIlvaine- 甲醇提取液提取、SPE 小柱净化后进样分析，外标法定量，可满足有机肥中四环素类含量检测的要求。

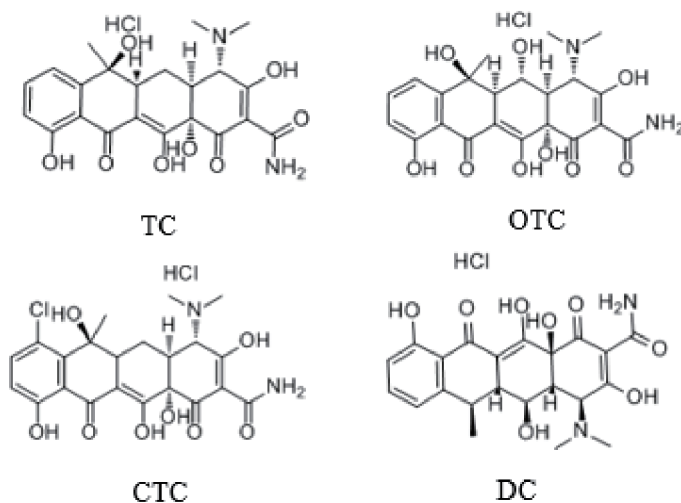


图1 4种目标组分分子结构式

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A 系统。具体配置为 LC-20AT×2 输液泵，DGU-20A₃ 在线脱气机，SIL-20AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，SPD-20A 紫外检测器，LabSolutions Ver. 5.87 色谱工作站。

1.2 分析条件

色谱柱: InertSustain™ C18(4.6 mm I.D.
×150 mm L., 5 μm)

流动相: A相 -0.01 mol/L 草酸溶液,
B相 - 甲醇 / 乙腈 =1:1(v/v)

流速: 1.0 mL/min

柱温: 30℃

检测波长: 355 nm

进样量: 20 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B相初始浓度为 10%, 洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pumps	Pump B Conc.	10
14.00	Pumps	Pump B Conc.	45
16.00	Pumps	Pump B Conc.	90
17.00	Pumps	Pump B Conc.	90
17.10	Pumps	Pump B Conc.	10
25.00	Controller	Stop	

1.3 标准溶液的配制

标准溶液配制: 将 1000 mg/L 混合标样储备液以 20% 甲醇水溶液逐级稀释得到浓度分别为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mg/L 的标准溶液。

1.4 样品前处理方法

参照 GB/T 32951-2016 中“7 分析步骤”所述前处理方法, 样品经过 Na₂EDTA-McIlvaine- 甲醇提取液提取、SPE 小柱净化后, 以 0.22 μm 滤膜过滤待测。

■ 结果讨论

2.1 标准样品色谱图

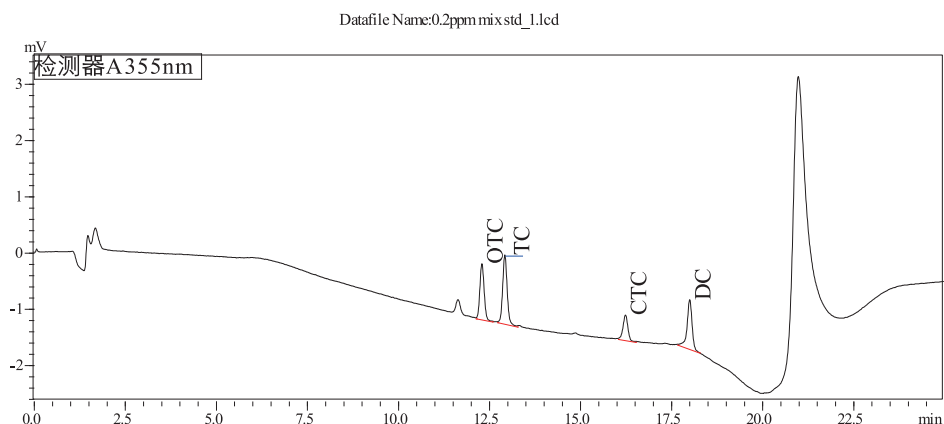


图2 0.2 mg/L标准样品色谱图

2.2 线性范围

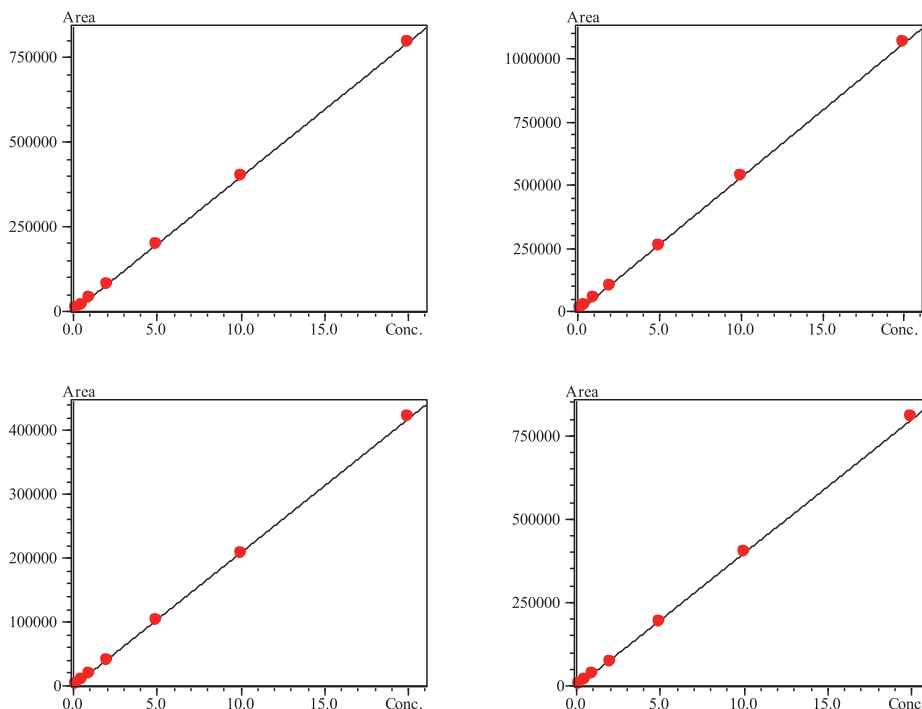


图3 校准曲线

将浓度为 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 和 20.0 mg/L 的 4 种目标物标准工作液, 按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 外标法制作校准曲线, 如图 2 所示, 线性方程、线性范围和相关系数见表 2。

表2 校准曲线参数

名称	校准曲线	线性范围 (mg/L)	相关系数 R	准确度 (%)
OTC	$Y = (39899.0)X - 990.496$	0.2-20	0.9999	98.4-103.4%
TC	$Y = (8932.6)X - 2.7160$	0.2-20	0.9999	97.0-106.8%
CTC	$Y = (30778.2)X - 18.0396$	0.2-20	0.9998	96.7-109.5%
DC	$Y = (36057.1)X - 196.210$	0.2-20	0.9995	93.8-114.9%

2.3 精密度实验

配制目标物浓度分别为 0.2、2.0、20 mg/L 的混合标样, 平行测定各 6 次, 考察仪器的重复性, 保留时间和峰面积重复性结果如表 3 所示, 仪器重复性良好。

表3 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

名称	RSD (% ,0.2 mg/L)		RSD (% ,2.0 mg/L)		RSD (% ,20mg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
OTC	0.10	0.77	0.11	0.19	0.04	0.10
TC	0.11	0.75	0.10	0.16	0.03	0.07
CTC	0.12	2.85	0.06	0.17	0.03	0.18
DC	0.09	3.51	0.05	0.26	0.03	0.15

2.4 灵敏度实验

对目标物浓度为 0.20 mg/L 标准溶液进样分析，由信噪比计算各目标组分仪器定量限 (ILOQ, S/N=10)，结果如表 4 所示。

表4 仪器定量限

名称	ILOQ (mg/L)
OTC	0.014
TC	0.011
CTC	0.033
DC	0.017

2.5 回收率实验

将购买的有机肥样品和加标样品分别按照 1.4 对样品处理后进样分析，色谱图如图 4 和图 5 所示。样品中未检出 4 种目标组分，计算加标回收率，结果如表 5 所示。

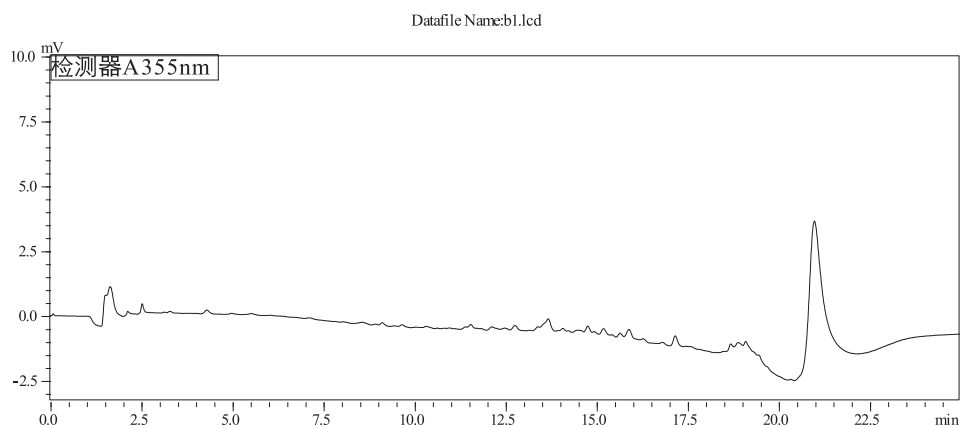


图4 空白样品色谱图

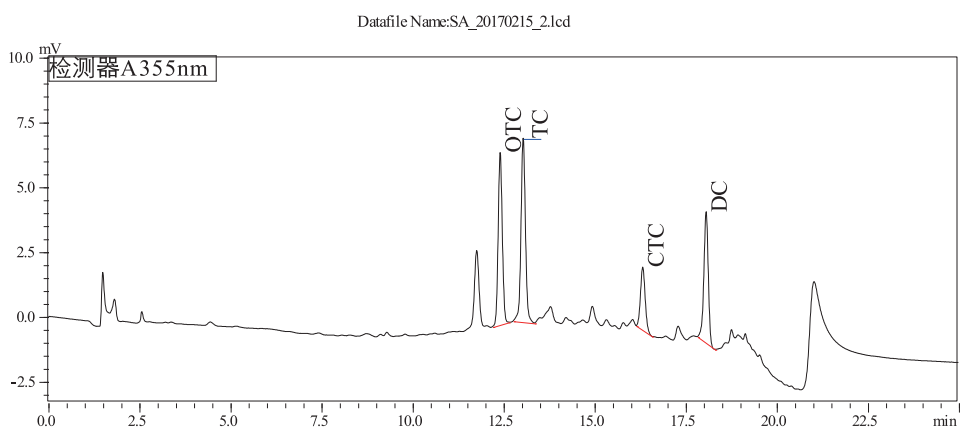


图5 样品加标2 mg/L色谱图

表5 加标回收实验

名称	加标浓度 (mg/L)	加标回收率 (%)
OTC	2.0	83.7
TC	2.0	80.0
CTC	2.0	83.4
DC	2.0	76.5

■ 结论

本文参照《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》，建立了一种使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A 测定有机肥中四环素类含量的方法。样品中目标组分经 Na₂EDTA-McIlvaine-甲醇提取液提取、SPE 小柱净化后进样分析，外标法定量，校准曲线线性良好，线性相关系数均不低于 0.9995，对低、中、高不同浓度的样品平行测试 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03%~0.12% 和 0.07%~3.51% 之间，仪器定量限在 0.011~0.033 mg/L 之间，可满足有机肥中四环素类含量检测的要求。