

《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)》

编制说明

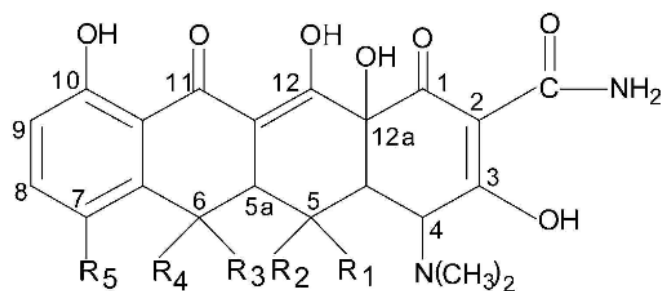
一、任务来源

本标准是根据国标委综合【2013】90号《国家标准委关于下达2013年第二批国家标准制修订计划的通知》，由上海出入境检验检疫局工业品与原材料检测技术中心负责组织起草工作，国家化肥质量监督检验中心(上海)、上海交通大学等单位参加。项目名称为《有机肥料中四环素类抗生素含量的测定 高效液相色谱法》的国家标准，计划编号为20131369-T-606。本标准为第一次制定。

二、标准制定的意义和特点

四环素类抗生素(TCs)是由放线菌产生的一类广谱抗生素，包括天然四环素（如，金霉素（CTC）、土霉素（OTC）、四环素（TC））、半合成四环素（如，强力霉素(DOXY)、二甲胺基四环素），其结构均含并四苯基本骨架。一切四环素都有由四个融合环构成的氢并四苯核心结构，各种同类物的差异就体现在基本结构取代基的不同上。

在畜牧业生产过程中，为预防和治疗畜禽疾病、促进动物的生长与繁殖，提高饲料利用率等，常在饲料中加入一定量的药物作为饲料添加剂，这些药物包括抗菌素、磺胺类、生长促进剂等。此外，为了治疗畜禽疾病，也经常给其服用或注射各种抗菌素药物。目前,我国允许在生产中使用的抗生素有17种,其中四环素类最为普遍,约占抗生素总用量的57%。四环素类抗生素因其广谱的抗菌效果和便宜的价格，成了近年来常用兽用抗生素的主要品种，四环素类抗生素主要有金霉素、土霉素、四环素及强力霉素四种，这一类抗菌素的抗菌谱最广，对大多数革兰氏阳性菌和阴性菌都很敏感，主要用于布鲁氏菌病、炭疽、大肠杆菌、急性呼吸道感染、乳房炎等的防治。但是，抗生素在畜禽体内并不能被完全吸收,大约60%~90%以药物原形或初级代谢产物的形式随动物粪便排出体外。



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
四环素	H	H	OH	CH ₃	H
金霉素	H	H	OH	CH ₃	Cl
土霉素	H	OH	OH	CH ₃	H
强力霉素	H	OH	H	CH ₃	H

图 1 四种常见的四环素类抗生素

以畜禽粪便为主要肥源的有机肥因含有丰富的有机质以及氮、磷等作物生长所需要的营养物质，被广泛用于农业生产上。畜禽粪便一般未经处理或经简单堆沤后作为有机肥施入土壤，TCs 由此进入土壤环境中。TCs 在土壤中比较稳定，并随粪肥的不断施入在土壤中累积，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。

因此，建立有效检测有机肥料中残留抗生素含量的方法，并制定相应的国家标准对规范有机肥料的质量，维护生态环境安全具有重要的理论和实际意义。本项目通过对国内外相关分析方法的查询和研究，以目前畜禽业常用的天然和半合成四环素为对象，研究一种适合定性、定量检测有机肥料中典型抗生素的高效液相色谱法(HPLC)，为保障农产品安全提供技术支撑。本项目适用于有机肥料中典型四环素类抗生素土霉素、四环素、金霉素和强力霉素含量的测定。主要技术内容包括基于高效液相色谱法分析的技术路线，净化方法的研究，仪器分析条件的建立以及方法的验证等。

三、本标准的有机肥测定范围

本标准测定的有机肥中四种土霉素、四环素、金霉素和强力霉素残留量，所提及的有机肥主要包括以下种类：有机粪肥、有机-无机混合肥、脲醛缓释肥、

下角料肥等。

第二章 实验部分

有机肥中抗生素的检测

1. 实验部分

1.1 试剂与溶液

本实验所用的化学试剂均为分析纯。

1.1.1 NaOH 饱和溶液：向蒸馏水中加入 NaOH 固体至饱和。

1.1.2 标准溶液：分别称取 0.0500g 的土霉素 (oxytetracycline, OTC)、四环素 (tetracycline, TC)、氯霉素 (chlortetracycline, CTC) 和强力霉素 (doxycycline, DO) 标准品，用甲醇定容至 25mL，配制成 2mg/mL 的标准储备液。将四种标准储备液等体积混合，配制成 500 μ g/mL 的混标。将四种标准储备液各吸取 625 μ L，用甲醇定容至 50mL，配制成 25 μ g/mL 的混标。上述的标准溶液均保存在 4℃ 冰箱中。

1.1.3 McIlvaine 缓冲液：0.2 mol/L 柠檬酸:0.4 mol/L Na₂HPO₄=4.55:15.45。

1.1.4 0.1 mol/L Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液：McIlvaine 缓冲液:0.1 mol/L Na₂EDTA=1:1(v/v)。

1.1.5 提取液：McIlvaine 缓冲液:0.1 mol/L Na₂EDTA:甲醇=1:1:2(v/v)，必要时用 NaOH (1.1.1) 调 pH=7.2。

1.1.6 固相萃取小柱：Waters Oasis HLB 小柱 (300mg, 3mL)。

1.2 抗生素的提取

称取 1.0g 肥料粉末置于 50mL 离心管中，分别用 20、20、10 mL 的提取液在 25℃ 下机械振荡提取 3 次，每次 20min，15℃ 下 3500 r/min 离心 10min，合并上清液。

1.3 固相萃取步骤

1.3.1 固相小柱的活化与载样

依次用 2 mL 甲醇，2 mL 水活化 HLB 柱，取 5mL 已去除甲醇的样品上清液，

以 1 mL/min 的速度过 HLB 柱。

1.3.2 杂质的清洗与样品的洗脱

依次用 5 mL 水, 5 mL 甲醇-水 (5+95) 淋洗 HLB 柱, 弃去全部流出液。减压抽干 5 min, 用 5 mL 0.01 mol/L 草酸-甲醇溶液洗脱目标物。洗脱液使用饱和 NaOH 溶液调至 pH 值约为 5~6, 随后氮气吹至近干, 用 1 mL 水溶解残渣, 过 0.22 μ m 滤膜, 待测。

1.4 样品的预处理

对于较干燥的有机肥样品, 直接至机械粉碎机上粉碎后过 0.5mm 筛, 置于棕色瓶中避光干燥保存。

如有水分潮湿有机肥样品, 采用液氮低温冷冻破碎机破碎, 过 0.5mm 筛, 试验待用。

2. 结果与讨论

2.1 提取条件的选择

2.1.1 提取液种类的选择

由于 TCs 属高极性的弱酸弱碱性化合物, 具有很强的吸附性, 且易与金属离子螯合, 如 EDTA 和 McIlvaine 缓冲溶液。文献报道利用 EDTA-McIlvaine 缓冲液配比甲醇, 作为有机肥或土壤中抗生素的提取液, 提取效率在 70%-84%之间。本实验使用甲醇、EDTA-McIlvaine 缓冲液、流动相、水作为溶剂溶解抗生素标样, 得到 TCs 分离谱图 (图 1)。图中可见, TCs 物质对溶剂较敏感, 同等浓度下在纯甲醇中溶解会导致灵敏度的大幅度降低以及峰形的变差, 而缓冲液体系、流动相体系及水体系因为水溶液含量较高, 均得到了比纯甲醇体系优异的分

离表现。因此, 在最终处理好样品置于 HPLC 仪器上测定时, 最终被测物溶剂中甲醇比例不能太高。

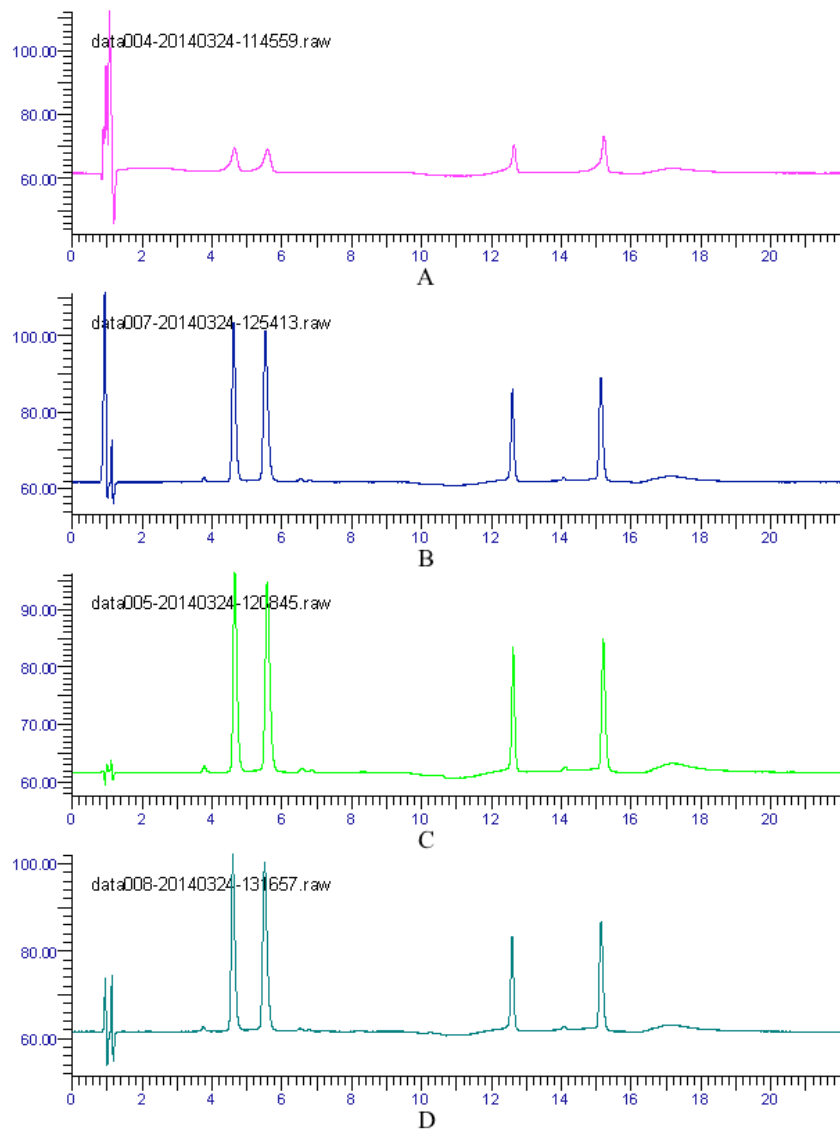


图 1 相同浓度 TCs 在不同溶剂中的谱图比较

(A) 甲醇； (B) 0.1 mol/L Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液 (pH=7)； (C) 流动相 (8%乙腈，84% 0.01mol/L 草酸，8%甲醇)； (D) 蒸馏水

2.2.2 提取液中甲醇比例的优化

虽然本实验选择 EDTA-McIlvaine 缓冲液为竞争性螯合剂，对目标抗生素进行提取，但是抗生素在甲醇中有较高的溶解度，实验发现适当增加甲醇的含量可以帮助提高抗生素的提取效率。

本实验在 1g 的 10 号有机肥样品中加入 500 μ g/mL TCs 的混标 200 μ L，冰箱中静置至少半天，使其充分渗透至样品粉末中。分别用 1.1.5 (McIlvaine 缓冲液:0.1 mol/L Na₂EDTA:甲醇=1:1:2(v/v)， pH 约 7.0) 的溶液和 1.1.4 (0.1 mol/L

Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液 pH 约 7.0) 作为提取液, 根据 1.2 的步骤提取上述加标样, 进样后得到结果如图 2。

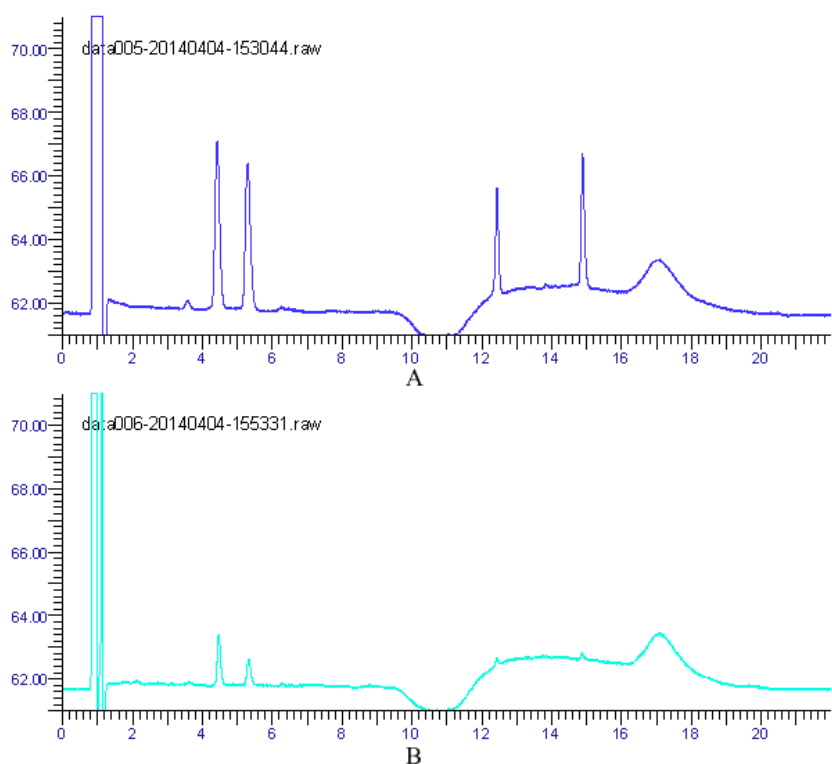


图 2 两种提取液的提取效率

(A)提取液: McIlvaine 缓冲液:0.1 mol/L Na₂EDTA:甲醇=1:1:2(v/v), pH=7.2; (B)提取液: 0.1 mol/L

Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液

从图 2 中可以看出, A (甲醇在缓冲液中比例达到 50%) 的提取效率高于 B (甲醇比例为 0%), 说明在缓冲液中增加甲醇的比例可以使目标物的提取效率得到大幅提高。此外, 本实验还尝试了用缓冲液中加入甲醇比例分别为 20%和 70%的溶液作为提取液, 根据 1.2 的步骤提取上述加标样, 进样后得到分离图谱并积分目标物的峰面积, 根据峰面积的大小来判断提取效率的高低, 结果如图 3。

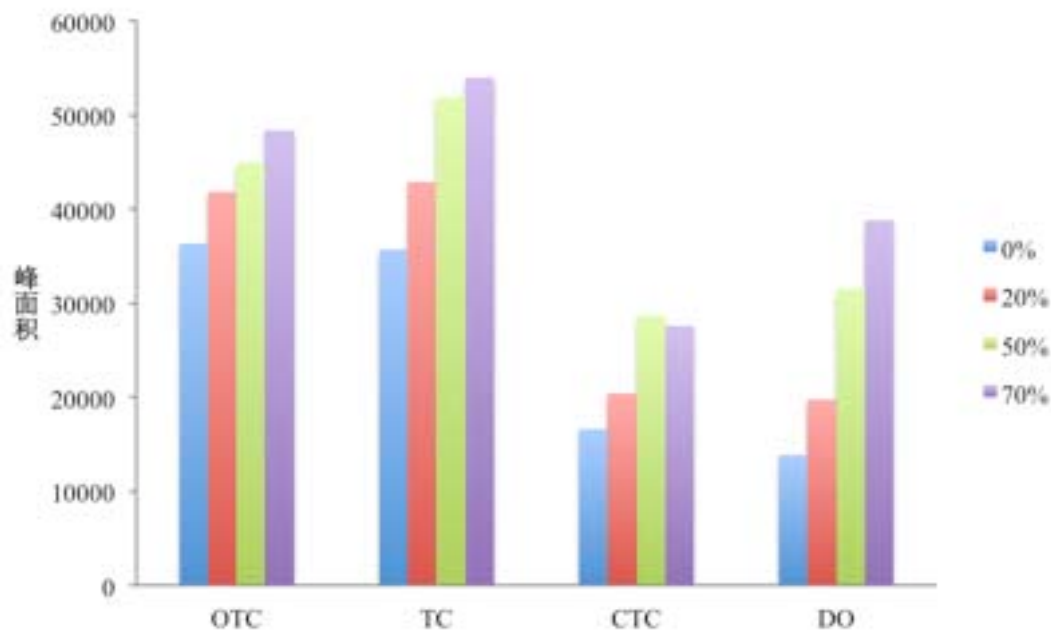


图 3 不同提取液甲醇比例对提取效率的影响

根据图 3 的数据可以分析得出，增加提取液中的甲醇比例，会大幅提高提取效率。但是根据 2.1.1 节中的结论，过量甲醇会导致色谱分离时目标物的峰形变形及灵敏度变差。而且 HLB 上柱要求样品为水相，当样品中溶剂甲醇含量高于 5% 时可导致目标物在上柱载样和淋洗杂质时损失。因此在上柱前必须将提取液中所含甲醇用氮气吹除，提取液中甲醇含量过高会使氮吹过程过长，增加目标物稳定性变差的风险。因此选用 McIlvaine 缓冲液:0.1 mol/L Na₂EDTA:甲醇 = 1:1:2(v/v) 即甲醇含量在缓冲液中达 50% 的混合液作为最终的提取液。

2.1.3 提取液 pH 值对提取效率的影响

另外，由于 pH 值的变化会对抗生素的提取产生影响，本实验测试了不同 pH 值的提取液处理加标样品，进样后对各目标物峰面积进行积分，具体如下。

在 1g 的 10 号有机肥样品中加入浓度为 500 μ g/mL 的 TCs 混标 200 μ L，冰箱中静置至少半天。按照 McIlvaine 缓冲液的配制手册，调整柠檬酸和磷酸氢二钠的比例，与 Na₂EDTA 及甲醇混合后，使提取液之 pH 值为 5~9 之间，根据 1.2 的步骤提取上述加标样，积分峰面积得到结果如图 4。

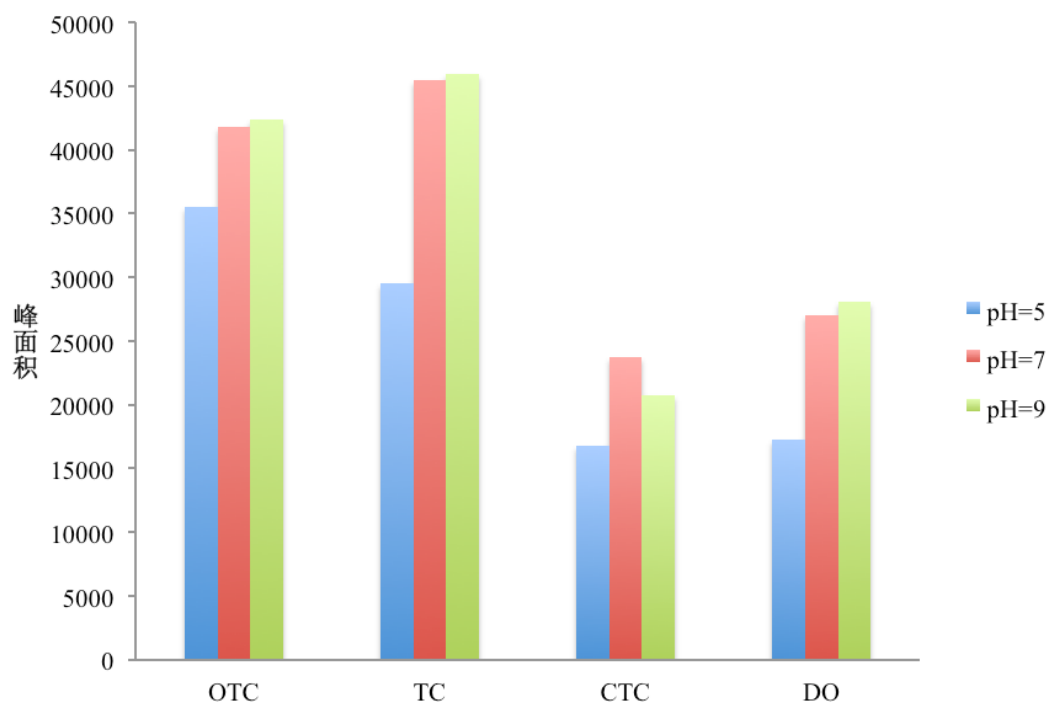


图 4 不同 pH 值对提取效率的影响

根据图 4 可知，在中性至偏碱性条件有利于抗生素的提取。但是考虑到四环素类抗生素在 $\text{pH}>9$ 的条件下易分解^[3]，故采用 $\text{pH}=7$ 左右的提取液作为最终提取条件。

2.1.4 提取温度和提取时间的选择

为探究提取温度对抗生素提取效率的影响，本实验测试了不同温度下机械振荡处理加标样品，具体过程如下。

在 1g 的 10 号有机肥样品中加入浓度为 $500\mu\text{g/mL}$ 的 TCs 混标 $200\mu\text{L}$ ，冰箱中静置至少半天。用 20mL 的 $0.1\text{ mol/L Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$ 缓冲溶液分别在 20°C 、 25°C 、 30°C 、 35°C 下提取 20min，过 $0.22\mu\text{m}$ 滤膜，积分峰面积得到结果如图 5。

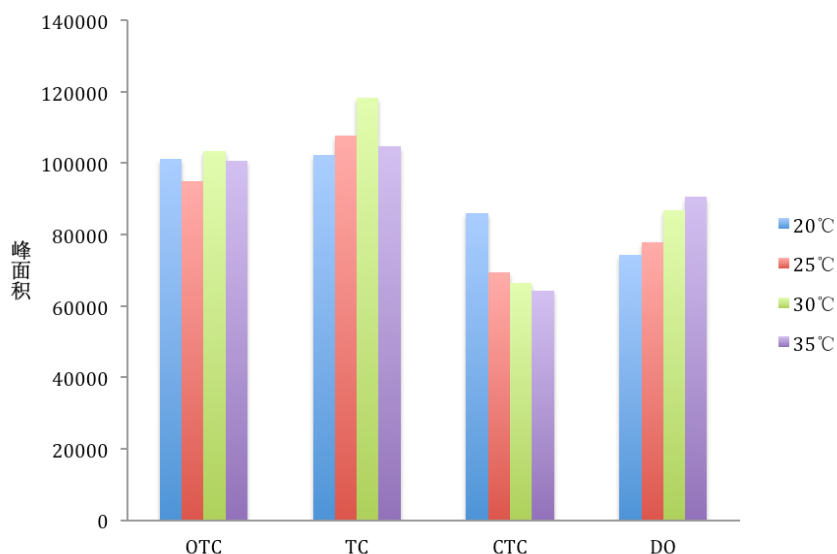


图 5 提取温度对提取效率的影响

由结果可知，提取温度的增加没有明显提高 OTC 的提取效率；温度对 TC 提取效率的影响则是先增加后减少；CTC 的提取效率随温度提高有下降趋势；DO 的提取效率随温度增加而增加。考虑到抗生素在高温下易分解，加之抗生素提取效率的变化趋势不很明显，综合考虑实验人员操作的便利性，最后选用室温约 25°C 作为提取温度。

机械振荡时间过短不利于肥料中抗生素的完全提取，而四环素类在机械振荡时间超过 20 min 时回收率会降低，因此将机械振荡时间定为 20min。

2.1.5 提取效率

为了解提取时的提取效率，本实验通过不过柱子的回收率数据来说明。将 500 μ g/mL 的混标分别稀释至 125 μ g/mL 和 25 μ g/mL。称取 1g 的 10 号有机肥样品及脲醛肥样品，并带空白平行样，分别加入 25、125 和 500 μ g/mL 的 TCs 混标 200 μ L，即加标量分别为 5、25 和 100mg/kg。加标样在冰箱中静置至少半天。同时，以提取液配制系列标准混合溶液，绘制标准曲线。经测定样品后根据标准曲线计算出实测加标量与标识加标量进行比较，得到回收率数据。根据该回收率数据判断提取条件的提取效率。

在系列数据中，我们发现，不同种类的有机肥料其采用同一种提取方法时的回收率有一定的差异。例如对于基质中杂质较少，空白样基线相对平稳的有机-无机复合肥料以及脲醛缓释肥（提取效率见表 1A）而言，其提取效率可以达到

100%。而对于杂质较多，成分比较复杂的有机粪肥（提取效率见表 1B），下角料肥等，相对提取效率要低一些，在 75%~110%之间，具体如表 1。

表 1 四种抗生素的回收率

（A）脲醛缓释肥提取效率

脲醛缓释肥		OTC	TC	CTC	DO
TCs 添加量					
5 mg/kg	1	89.58%	101.95%	125.14%	102.41%
	2	108.92%	97.09%	129.84%	100.69%
	平均	99.25%	99.52%	127.49%	101.55%
25 mg/kg	1	96.85%	103.73%	103.64%	105.40%
	2	99.95%	107.35%	105.84%	98.94%
	平均	98.40%	105.54%	104.74%	102.17%
100 mg/kg	1	106.66%	106.06%	104.91%	108.75%
	2	105.63%	102.72%	101.15%	105.12%
	平均	106.14%	104.39%	103.03%	106.94%

（B）10 号有机肥提取效率

SJF-10（有机肥）		OTC	TC	CTC	DO
TCs 添加量					
5 mg/kg	1	113.45%	108.56%	71.09%	102.52%
	2	100.04%	104.00%	92.81%	83.99%
	平均	106.75%	106.28%	81.95%	93.25%
25 mg/kg	1	83.17%	83.90%	102.41%	80.37%
	2	88.12%	88.31%	99.53%	81.02%
	平均	85.64%	86.10%	100.97%	80.70%
100 mg/kg	1	83.51%	80.42%	84.89%	76.67%
	2	83.72%	80.87%	86.47%	77.58%
	平均	83.61%	80.64%	85.68%	77.12%

2.2 固相萃取条件的优化^③

2.2.1 活化与载样

HLB 固相萃取小柱填料为聚合物，保留机理为反相，类似 C18 柱，是可适用于大范围 pH 值的通用型吸附剂固相萃取小柱，常被用于抗生素的萃取。

HLB 柱一般采用 2 mL 甲醇，2 mL 水活化，活化时应注意使甲醇完全去除。

HLB 柱要求上载的样品中甲醇含量在 2% 之下，当甲醇含量高于 10% 时就可造成上载样品流失，当甲醇含量达到 50% 时，上载样品时可造成目标抗生素 80% 以上流失，无法截留在柱上。本实验为提高提取的效率，提取液中含有 50% 甲醇，因此在样品上载前必须去除溶液中的甲醇含量。采用水稀释法降低甲醇含量至 2% 以下，需要将样品提取原液稀释至少 30 倍，这种操作较简便易行，但是会造成灵敏度的损失，使检出限变高，低浓度目标物检测变得困难。使用氮气吹干法挥发提取液中甲醇，保留水的成分，操作时间长，增加了抗生素变化溅失的风险，特别是当溶液 pH 值对抗生素稳定性不利时，会发生抗生素的降解。在本实验中，我们采取了优先保障灵敏度，利用氮气吹干去除提取液中甲醇，将上柱溶液吹至原体积的一半左右。

上载样品时，流速应控制在 1 mL/min 之内，避免样品上载速度过快流失目标物。样品上载量为 5 mL，可根据灵敏度和样品基质的情况作出调整。当需要提高痕量目标物的检测灵敏度时可将样品上载量调高至 10 mL，但是有机肥样品基质比较多变，在实验中发现颜色较深的有机肥种类，因含有大量杂质，上载量调高后可能会阻塞小柱，使淋洗和洗脱的流程大大加长。因此最终选择 5 mL 作为普遍上载量。

根据 HLB 小柱反相原理，极性越大越容易洗脱，极性越小越容易保留。利用抗生素不同的 pKa 值，调节溶液的 pH 值可以使物质在离子状态和中性分子之间转换，从而改变物质的极性，以便利于保留或洗脱。

表 2 抗生素的 pKa 值

抗生素	pKa 值		
CTC	3.33	7.55	9.33
OTC	3.22	7.46	8.94
TC	3.32	7.78	9.58

DOXY	3.02	7.97	9.15
------	------	------	------

从表 2 中可以看出，每种目标抗生素均有三级 pK_a 值，当 pH 值小于 3 时，抗生素可呈现中性分子的状态，极性较弱，在柱上更易于保留，可使用较弱的流动相进行洗脱。但是考虑到抗生素在较强的酸性条件下不能稳定存在，因此通常应将 pH 值调至 2.5~3.0 最适合抗生素在柱上的保留。在此条件下淋洗杂质，抗生素理论上损失最小。本实验尝试了调整上柱 pH 至 2.5~3.0，以及不调整 pH 值（ pH 值约为 7.2），结果发现，对于抗生素的保留影响不太大， pH 为中性时依然可以较好保留抗生素在柱上，因此，为实验的便利性，在上柱时不需调节 pH 值。

2.2.2 杂质的淋洗

2.2.2.1 基础条件

当样品基质比较简单时，可采用 HLB 较常用的淋洗条件，即依次用 5 mL 水，5 mL 甲醇-水 (5+95) 淋洗，并减压抽干 5 min。在该条件下目标抗生素在柱上可以得到完全保留，不会被洗脱，而极性比抗生素大的干扰杂质可以得到洗脱。

2.2.2.2 优化条件

当样品基质比较复杂时，例如豆饼肥（常用有机肥料的一种），该类有机肥氨基酸、有机质、氮、磷等元素较多，因此对目标抗生素的可能产生较多的干扰。为更加有效地去除杂质，本实验尝试调整上柱前溶液的 pH 值，用饱和 NaOH 或氨水和磷酸调节溶液的 pH 至 11 及 3；改变淋洗条件，如增加甲醇/水的淋洗体积至 15mL，或者在用水、甲醇/水淋洗后，再用 5mL 2%甲酸淋洗；改变洗脱液，尝试用 5mL 氨水:甲醇（5:95，v/v）洗脱，或用 5mL 甲醇洗脱。但以上优化尝试均没有明显的作用。豆饼肥中的杂质无法用这些条件去除，因此对于豆饼肥类有机肥的净化处理，应考虑其他特别的化学处理方法沉淀氨基酸蛋白质，或者利用选择性较强的检测器如质谱检测器进行测定。该类有机肥不在本实验的讨论范围内。

2.2.3 洗脱液的选择

利用 HLB 柱对抗生素进行富集和净化时,本实验比较了 0.01mol/L 草酸甲醇与 0.01mol/L 草酸甲醇:水=1:1 以及纯甲醇的溶液对洗脱效果的影响。结果显示,使用 5mL 0.01mol/L 草酸甲醇完全洗脱目标物,而选用其与水的混合溶液或纯甲醇时,5mL 无法完全洗脱,需要二次洗脱才能完全,这会导致洗脱液对目标物稀释效应放大,对较低浓度下的目标物检测不利。因此,本实验最终选择了 5mL 0.01mol/L 草酸甲醇作为洗脱液。洗脱后溶剂为甲醇,之前本实验讨论过 TCs 在甲醇含量高的溶剂中分离峰形差,灵敏度差的问题,因此最终溶剂必须为水相,因此本实验将最终洗脱液置于氮气吹干仪上吹至近干后加水溶解后,过滤进样。

2.2.2 洗脱液 pH 值对目标物的影响

由于洗脱液中含有草酸使得洗脱液的 pH 值达到 1.8,并且由于 TCs 为弱酸弱碱性物质,在弱酸至弱碱介质中能够稳定存在,而 pH 低于 2.0 时稳定性变差。因此,虽然 TCs 不具有挥发性,但是在氮气吹干过程中出现了不稳定以及 CTC、DO 损失较大的不正常现象。针对这个问题,在本实验中尝试调整洗脱液的 pH 值以及洗脱后调整 pH 值对抗生素稳定性的影响,结果发现,调整洗脱液 pH 值在 5-6 之间时,洗脱液中有晶体析出现象,并且洗脱效果较差,洗脱目标物后再调整溶液 pH 值在 5-6 之间然后氮气吹干,抗生素中 CTC、DO 的稳定性有较大的改善。

⑩: 对于基质比较简单干扰成分很少的有机肥类样品,如脲醛缓释肥、有机-无机混合肥等,固相萃取步骤可以省略,直接采取提取后过滤进样,可减少 TCs 的损失并大大缩短检测流程。

3. 仪器条件选择

3.1 色谱柱的选择

选用三种色谱柱: Spheri-5 RP C18 5 μ m 4.6*250mm, SPP C18 2.7 μ m 4.6*100mm 和 Pinnacle ODS 5 μ m 4.6*250mm,在同一色谱条件下进样。流动相为乙腈: 0.01mol/L 草酸: 甲醇=18:77:5,柱温 30℃,进样量 20 μ L,流速 1ml/min,检测波长 355nm。实验结果见图 6。

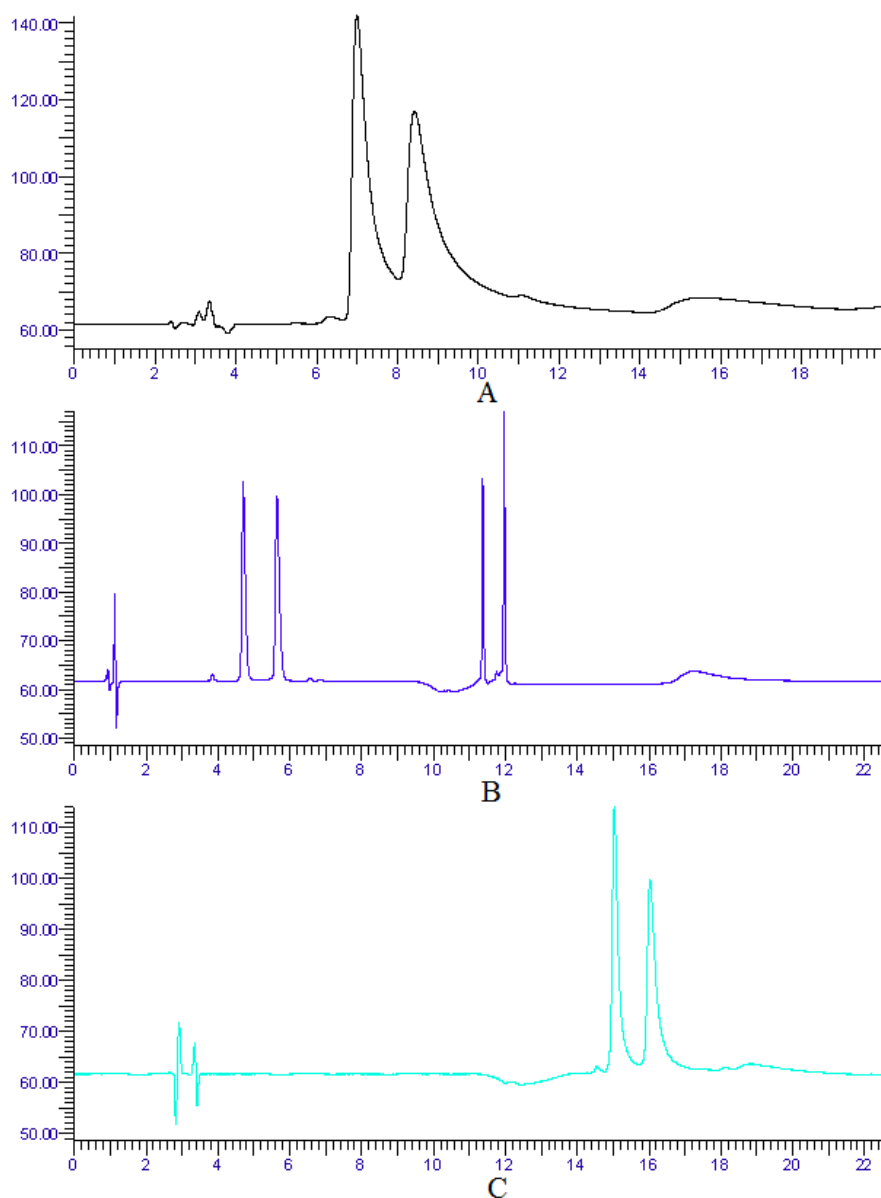


图6 抗生素在三种色谱柱中的分离情况

(A)Spheri-5 RP C18 5 μ m 4.6*250mm; (B)SPP C18 2.7 μ m 4.6*100mm; (C)Pinnacle ODS 5 μ m 4.6*250mm

色谱柱 Spheri-5 RP C18 5 μ m 4.6*250mm 只出现前面两个峰。色谱柱 SPP C18 2.7 μ m 4.6*100mm 对四种抗生素的分离情况较好，在保留时间为 10 和 17min 左右时基线有所抖动，为仪器本身的基线不稳定。色谱柱 Pinnacle ODS 5 μ m 4.6*250mm 同样只出现两个色谱峰。

综合三种色谱柱的检测结果，选用色谱柱 SPP C18 2.7 μ m 4.6*100mm。

3.2 色谱条件的选择

3.2.1 柱温的选择

本研究测定了25~40℃的分离效能，结果见图7。由图可知，柱温对四种TCs的分离并无明显影响。

40℃以上四环素类受热易分解，而柱温低易受环境温度影响，不易稳定，综合考虑，选择30℃为合适的柱温，此时分离度符合要求，柱压合适。

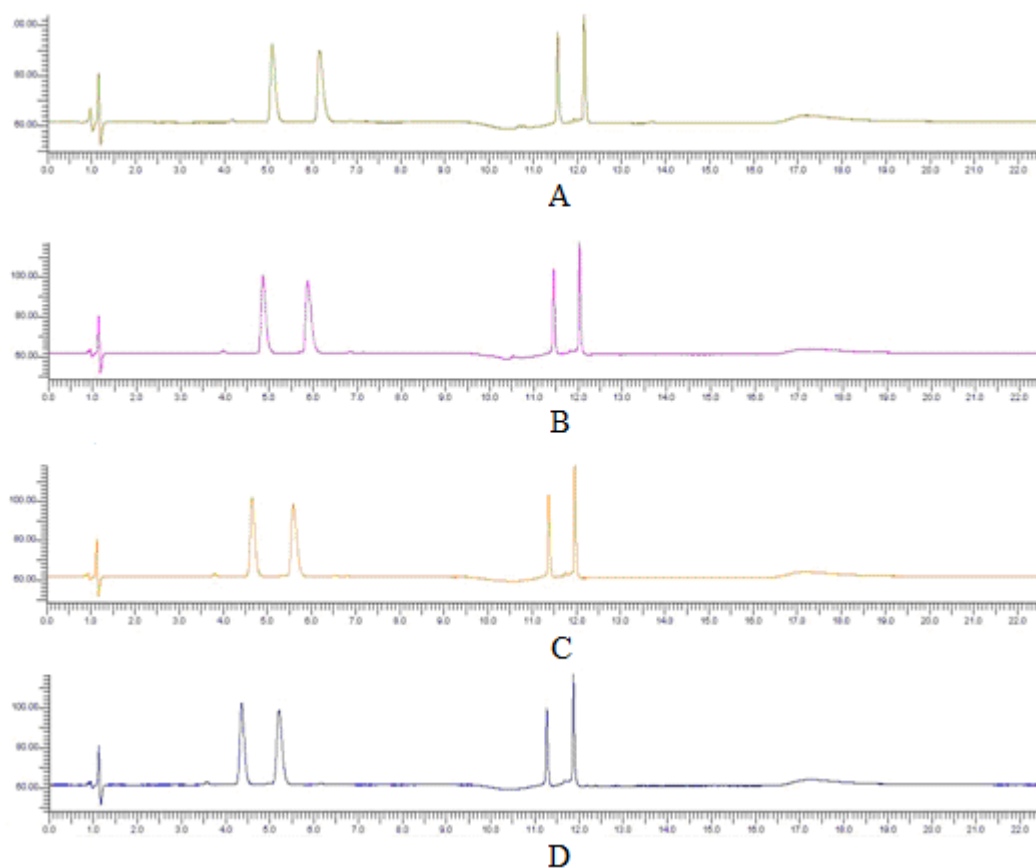


图7 不同柱温对抗生素分离情况的影响

(A) 25℃；(B) 30℃；(C) 35℃；(D) 40℃

3.2.2 检测波长的选择

有研究表明，TCs抗生素在 270 nm 和355 nm 附近均有强烈的紫外吸收。因此选用这两种波长进行实验比较，结果见图8。

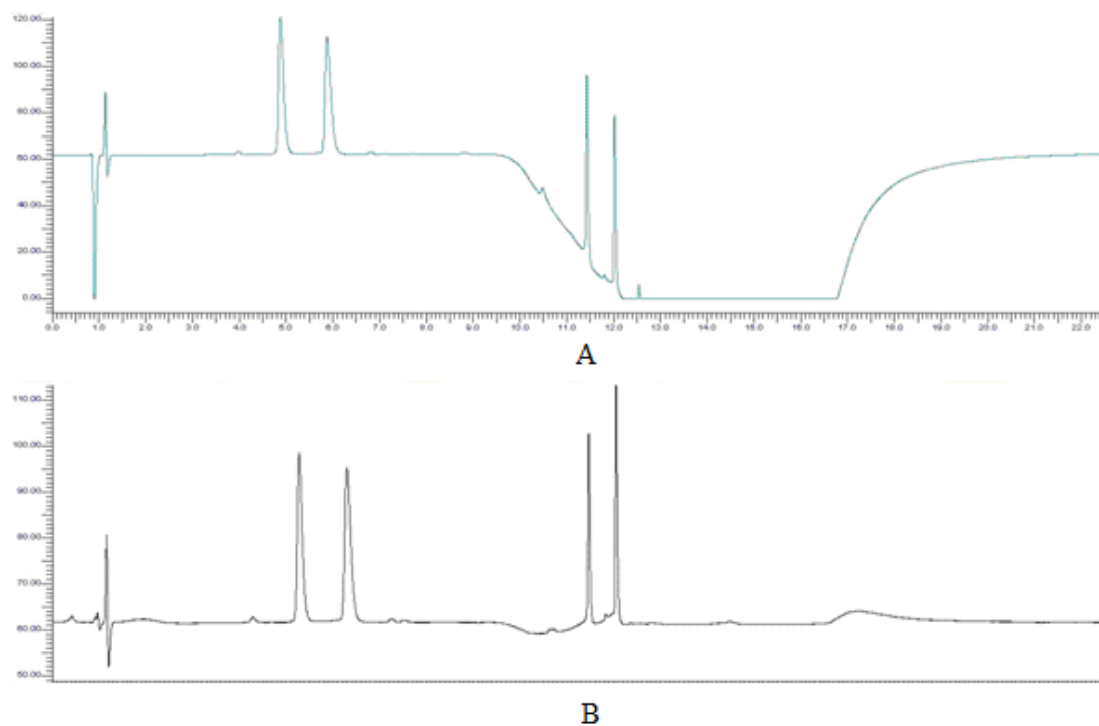


图8 不同波长下抗生素的响应

(A) 270 nm; (B) 355 nm

由图8可以看到，在355nm时的峰形较好，270nm的峰形虽然响应值要稍高于355nm，但是峰形太差。因此，把355nm作为四环素类抗生素的检测波长。

3.2.3 流速的选择

本实验选择了0.5、0.8、1.0、1.2ml/min四种流速进行比较，结果见图9。流速太慢，会导致保留时间太长，甚至实现不了分离；流速较快会将保留时间较短的物质一起洗入，造成干扰。综合考虑，选择流速1ml/min是合适的。

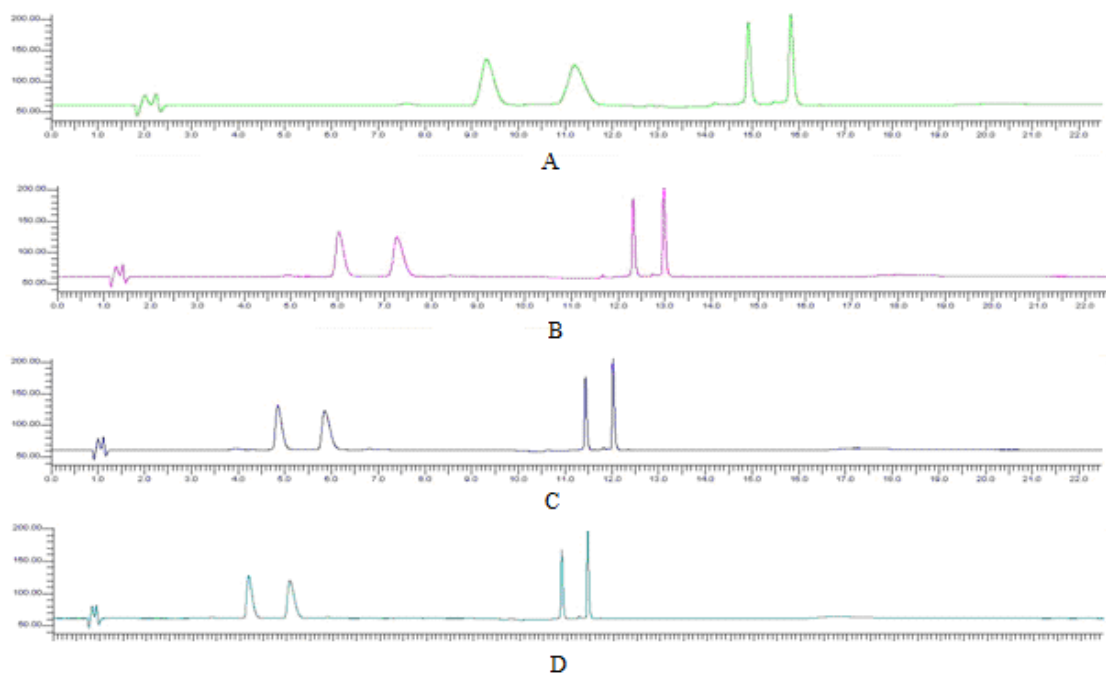


图9 不同流速下抗生素的分离

(A) 0.5ml/min; (B) 0.8ml/min; (C) 1.0ml/min; (D) 1.2ml/min

3.2.4 梯度洗脱程序的确定

在等度淋洗条件下，OTC、TC 有较好的分离效果，且出峰较快，而 CTC、DO 的分离需要梯度淋洗来实现。因此，本实验考虑了梯度淋洗来实现四种物质的基线分离。在 7.5min 后开始改变流动相配比。本实验对比了梯度洗脱时间分别为 1、3、6min 时四种抗生素的分离效果，结果见图 10。

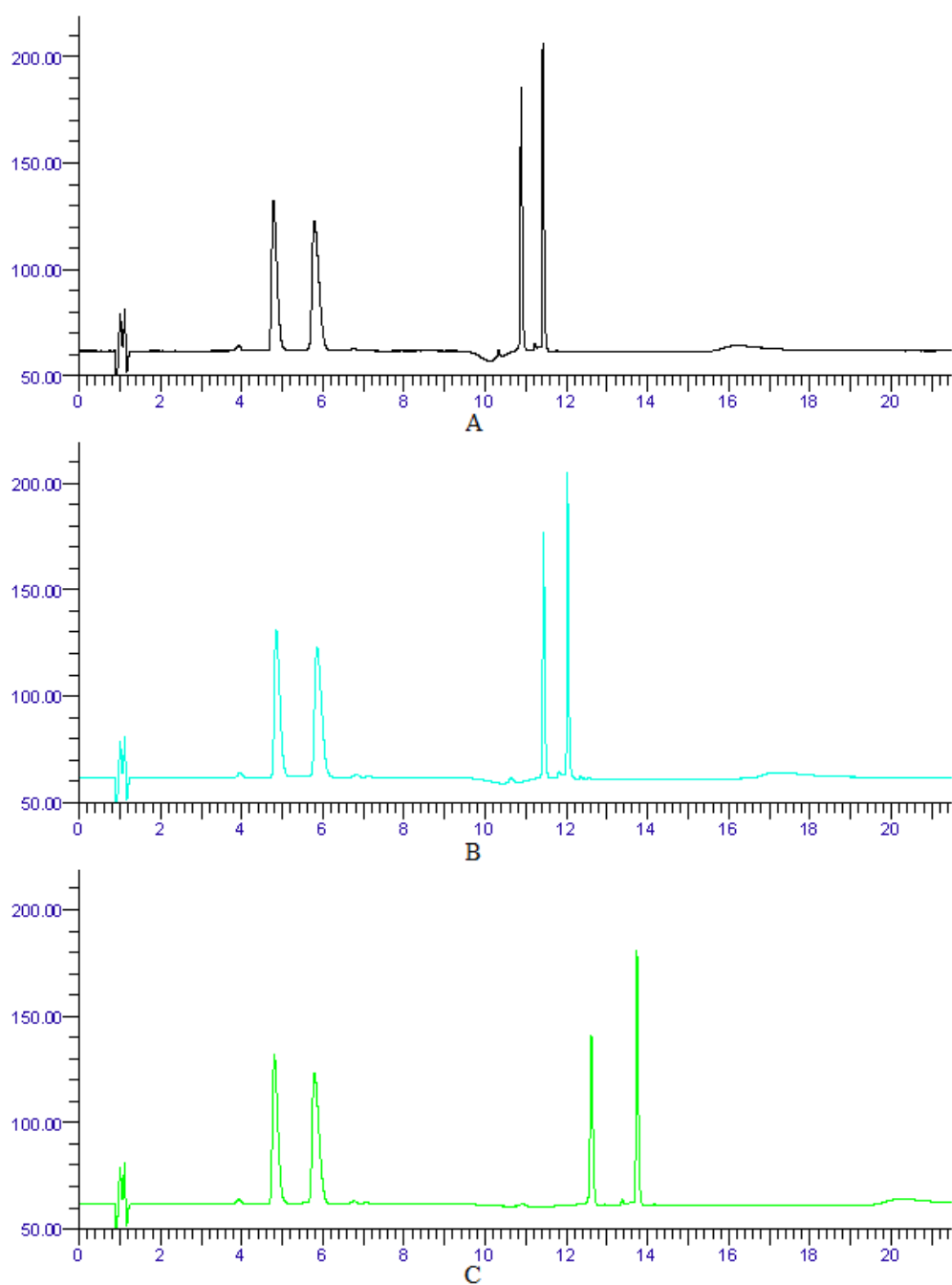


图 10 不同梯度洗脱时间对分离效果的影响

(A) 1min; (B) 3min; (C) 6min

可以看出梯度时间的增加会使得CTC和DO的分离度变大，10min后出现的基线不稳定变小，有利于提高实验的准确性，综合考虑检测时间等因素，选择6min作为最佳的梯度洗脱保持时间。

另外，本实验对比了在梯度淋洗阶段不同流动相比比例对分离效果的影响。

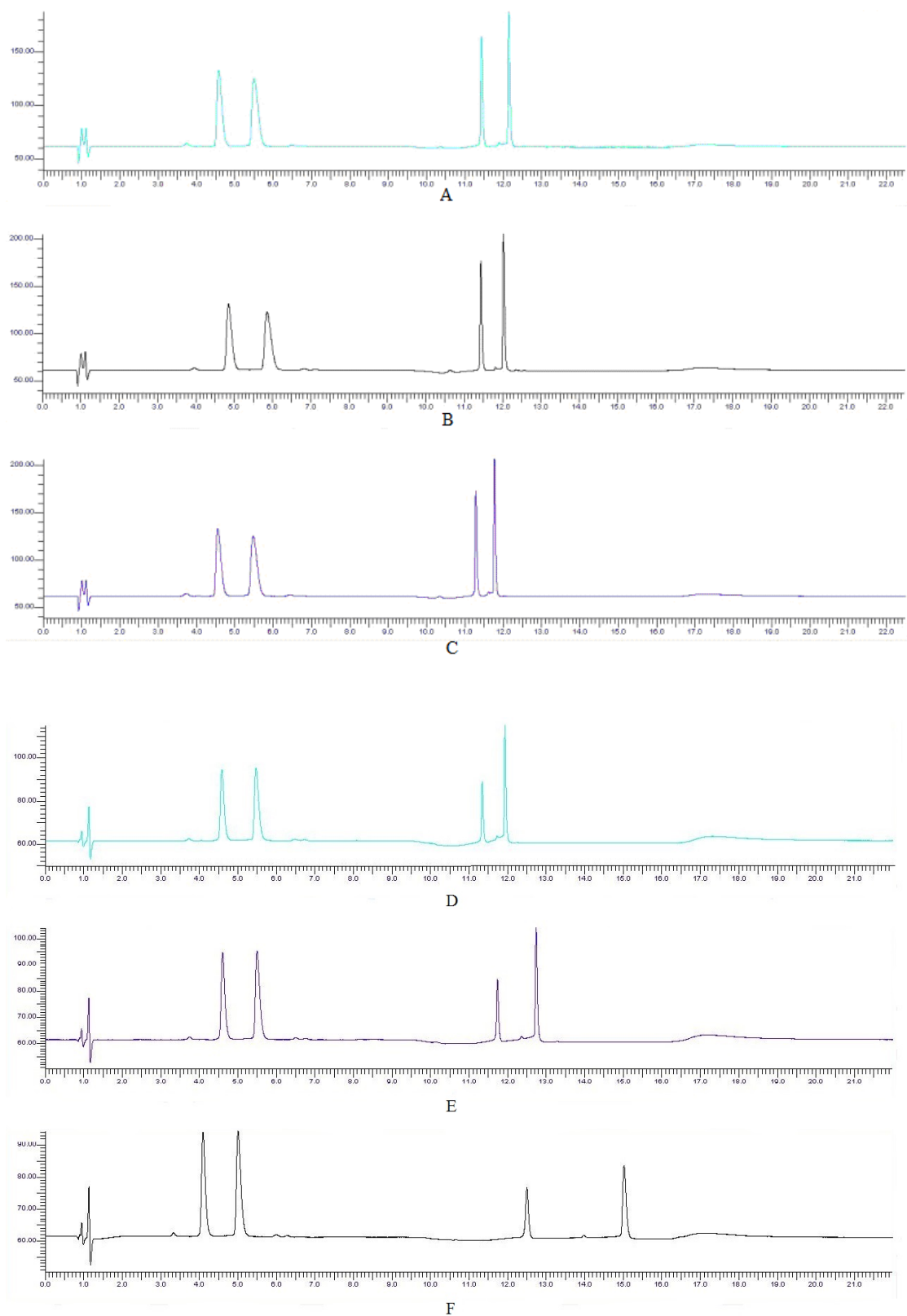


图6 梯度淋洗对分离效果的影响

乙腈: 0.01mol/L 草酸: 甲醇比例 (A) 20: 50: 30; (B) 25: 50: 25; (C) 30: 50: 20; (D) 25: 50:

25; (E) 20: 60: 20; (F) 15: 70: 15

根据图11可以看出，当流动相中水相比比例增加时，CTC、DO的分离度增加，但是出峰时间变长，因此在兼顾分离效率和分析速度两方面因素时，选择乙腈：0.01mol/L草酸：甲醇比例为15：70：15作为梯度淋洗的流动相比比例。最终确定整个分析的梯度淋洗程序如表3所示。

表 3 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

3.2.5 检测限的确定

本实验分别测定了 0.05μg/mL，0.1μg/mL，0.2μg/mL，0.5μg/mL 的混合标准溶液，根据十倍信噪比，最终确定 0.1μg/mL 为四种抗生素的定量限。具体如图 12。

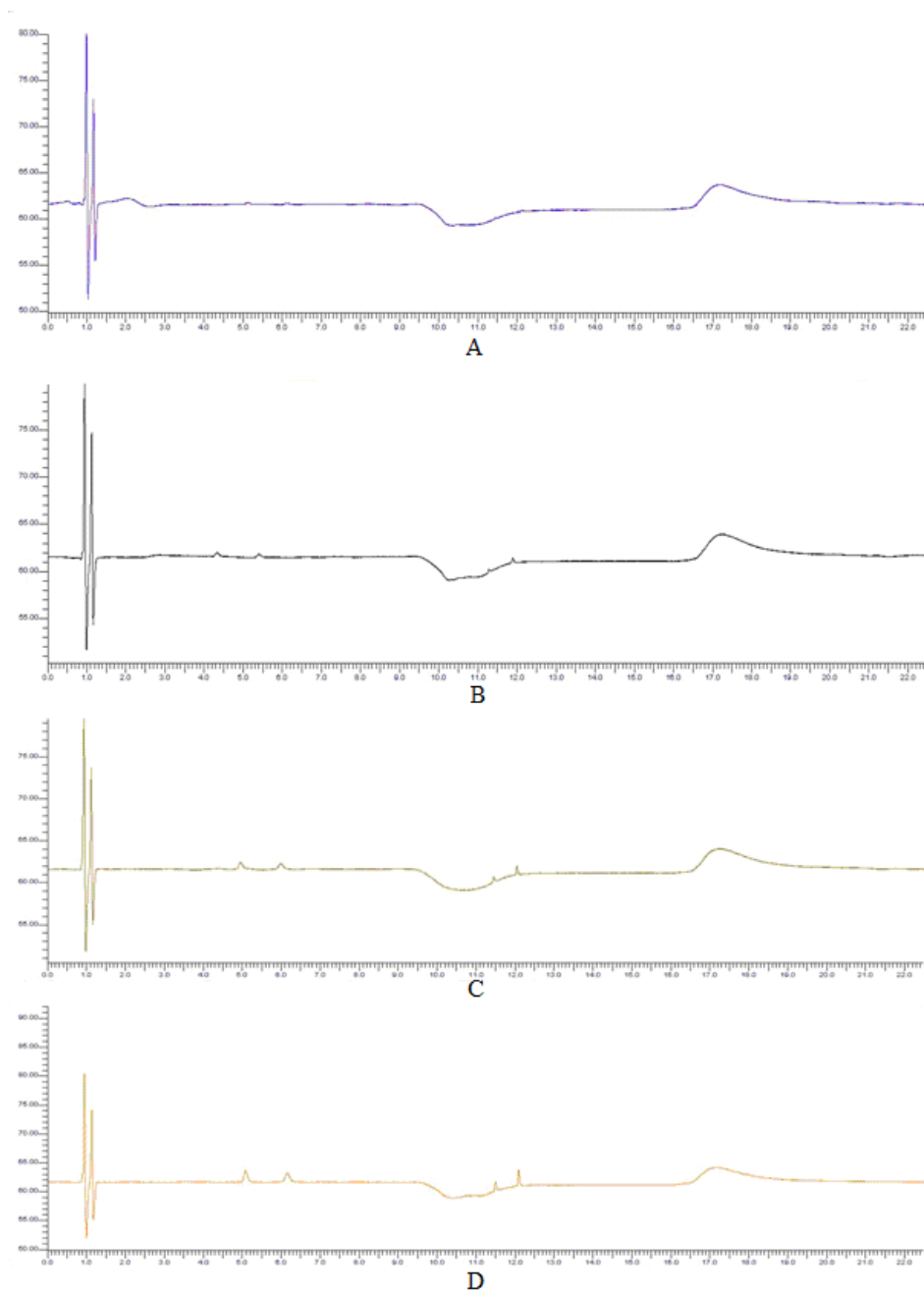


图7 抗生素混标四种浓度的谱图

(A) 0.05 $\mu\text{g/mL}$; (B) 0.1 $\mu\text{g/mL}$; (C) 0.2 $\mu\text{g/mL}$; (D) 0.5 $\mu\text{g/mL}$

另外，本实验还以十倍信噪比测定了方法的检测限，以 10 号有机肥（粪肥）为例，测试了 2.5mg/kg 和 5.0mg/kg，10mg/kg 添加量。5.0mg/kg 和 2.5mg/kg 添加量图谱如图 13、图 14，最终确定 5.0mg/kg 为方法定量限。

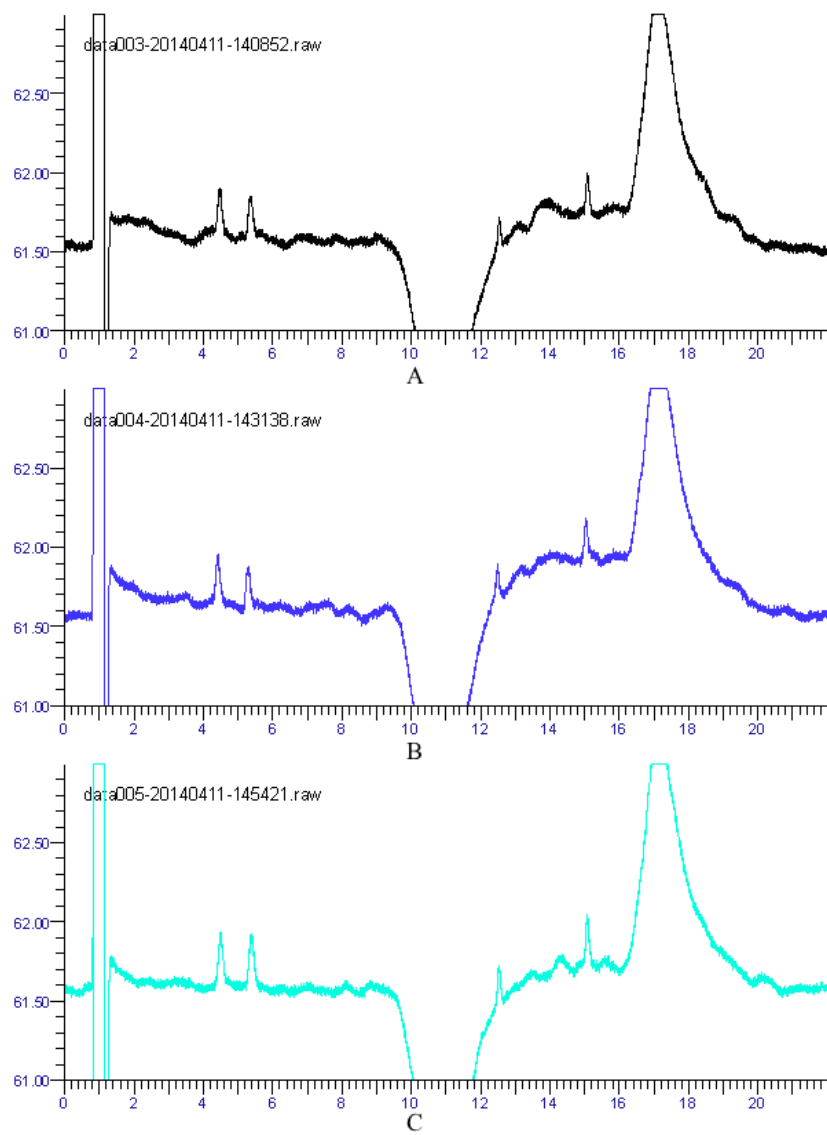


图 13 10 号有机肥加标回收 (5.0 mg/kg)

(A) (B) 10 号有机肥加标平行样; (C) 空白加标样

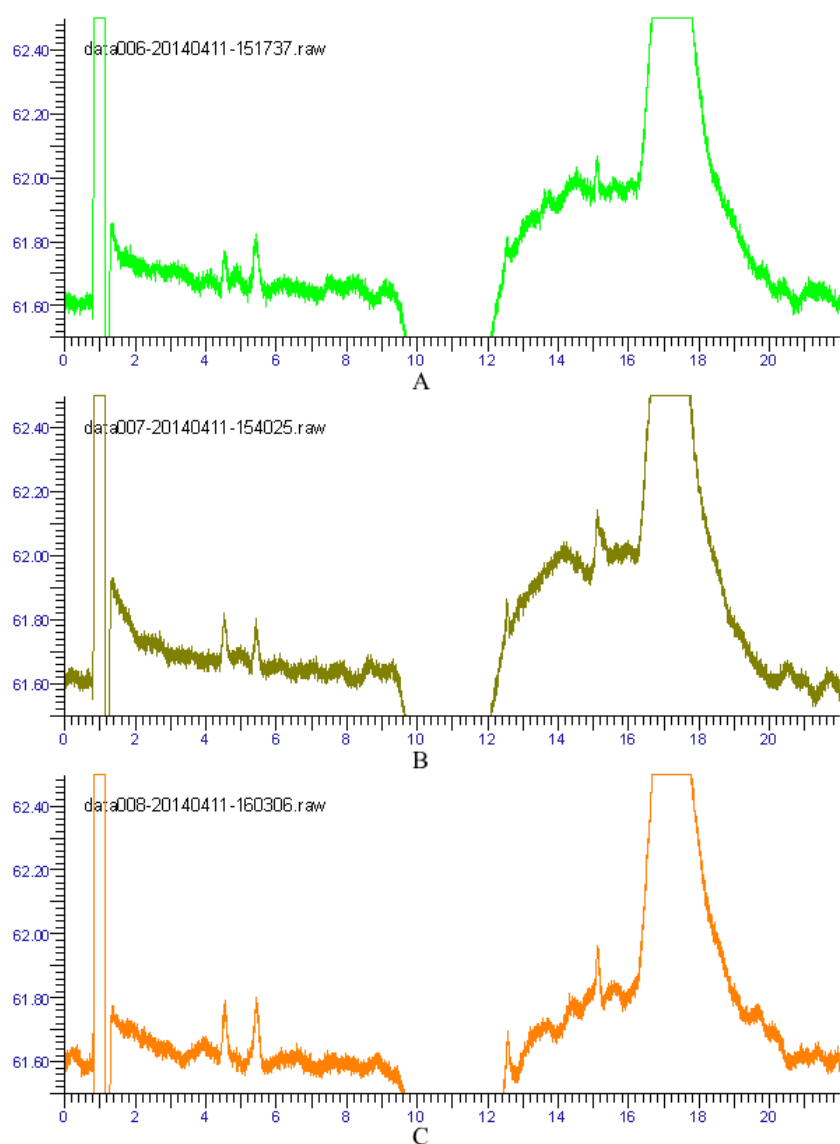


图 14 10 号有机肥加标回收 (2.5 mg/kg)

(A) (B) 10 号有机肥加标平行样; (C) 空白加标样

3.3 工作曲线

由于有机肥样品中各种样品的基质差别大,因此本实验建议,对于基质较少,分离基线十分稳定的样品,即不需要 HLB 柱处理,直接过滤后进样的样品,其定量所依据的工作曲线按照配制方法一进行。而对于基质复杂,分离基线不稳定,有较多干扰峰的样品,需要 HLB 柱进行进化处理的,则按照配制方法二配制工作曲线。

3.3.1 配制方法一:

分别从土霉素、四环素、金霉素、强力霉素混合标准溶液（含每种抗生素 100 $\mu\text{g/mL}$ ）中取 0.1, 1, 2, 5, 10, 20mL 置 100mL 容量瓶中，用提取液（1.1.5）稀释至刻度，该系列标准混合溶液含土霉素、四环素、金霉素、强力霉素分别为 0.1、1、2、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.3.2 配制方法二：

分别从土霉素、四环素、金霉素、强力霉素混合标准溶液（含每种抗生素 100 $\mu\text{g/mL}$ ）中取 0.2, 2, 4, 10, 20, 40mL 置 100mL 容量瓶中，用提取液（1.1.5）稀释至刻度，分别取 5mL 系列溶液置于氮气吹干仪上，常温（22 $^{\circ}\text{C}$ ）下吹至原体积的一半左右，加 7mL 水稀释，以 1 mL/min 的速度通过已活化处理的 Oasis HLB 柱。依次用 5 mL 水，5 mL 甲醇-水（5+95）淋洗 HLB 柱，弃去全部流出液。减压抽干 5 min，用 5 mL 0.01mol/L 草酸-甲醇溶液洗脱目标物。洗脱液使用饱和 NaOH 溶液或氨水调至 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 0.22 μm 滤膜。该系列标准混合溶液含土霉素、四环素、金霉素、强力霉素分别为 0.05、0.5、1、2.5、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 。

图 15 为按照 3.3.1 配制方法得到的抗生素工作曲线，四种抗生素在浓度范围 0.1-20 $\mu\text{g/mL}$ 之间呈良好线性关系，相关系数均在 0.999 以上，最高可达 0.999922（OTC）。

加方程式去图

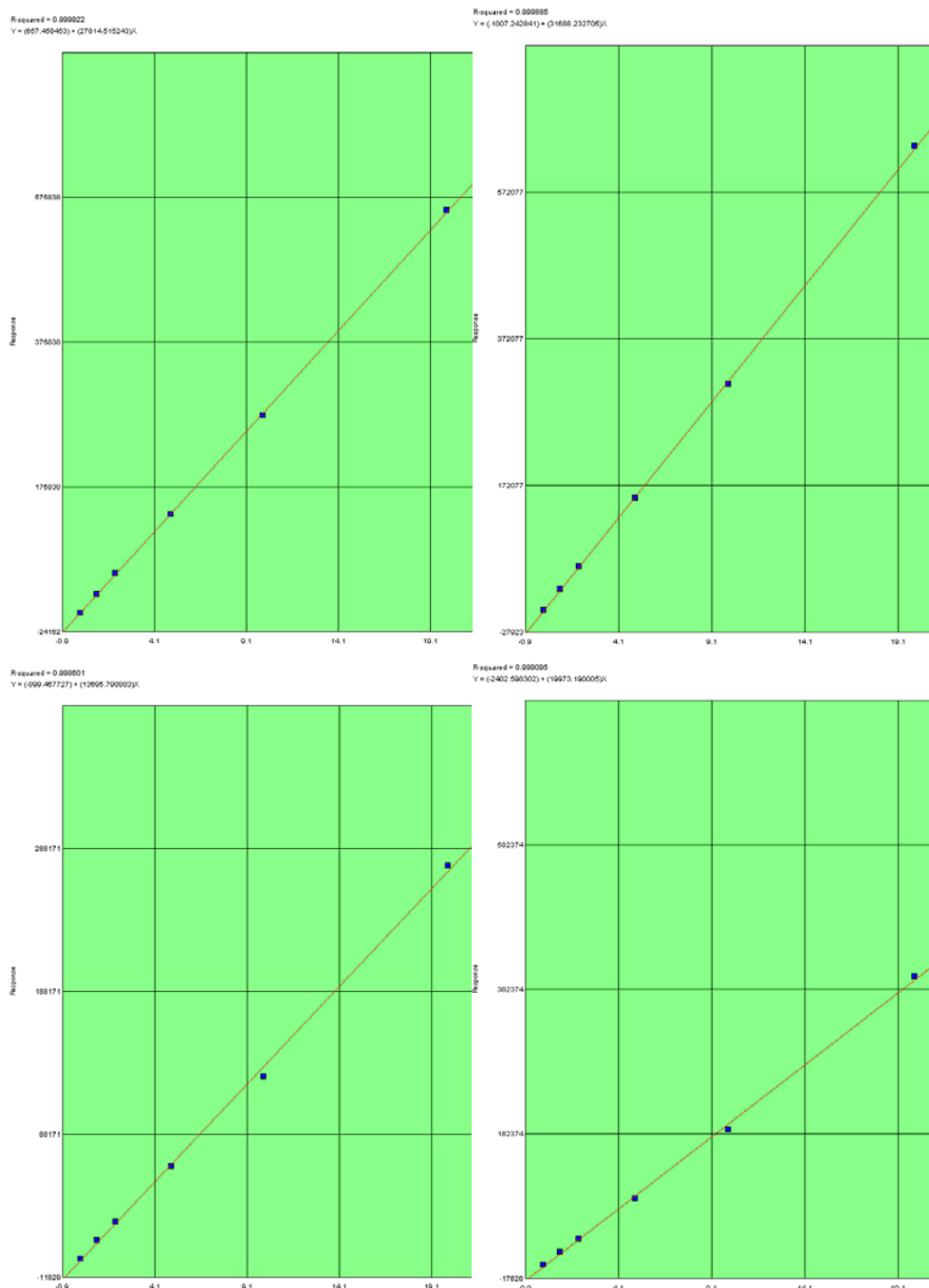


图 8 OTC、TC、CTC、DO 的工作曲线

4 回收率实验

将 500 $\mu\text{g/mL}$ 的混标分别用甲醇稀释至 125 $\mu\text{g/mL}$ 和 25 $\mu\text{g/mL}$ 。本实验以六种有机肥作为回收率实验的样品，分别称取 1g 有机肥，并带空白样，分别加入 25、125 和 500 $\mu\text{g/mL}$ 的 TCs 混标 200 μL ，即加标量分别为 5、25 和 100mg/kg。

加标样在冰箱中静置至少半天。同时，两种方法配制系列标准混合溶液，绘制标准曲线（具体见 3.3 节）。经测定样品后根据标准曲线计算出实测加标量与标识加标量进行比较，得到回收率数据。该回收率数据分为两组，分别为六种有机肥不经过柱进化与经过过柱净化的回收率数据。表 4 系列为部分有机肥样品（不过 HLB 柱净化时）的回收率。

表 4 当样品不过柱时的样品加标回收率

脲醛缓释肥		OTC	TC	CTC	DO
添加量					
5 mg/kg	1	89.58%	101.95%	125.14%	102.41%
	2	108.92%	97.09%	129.84%	100.69%
	平均	99.25%	99.52%	127.49%	101.55%
25 mg/kg	1	96.85%	103.73%	103.64%	105.40%
	2	99.95%	107.35%	105.84%	98.94%
	平均	98.40%	105.54%	104.74%	102.17%
100 mg/kg	1	106.66%	106.06%	104.91%	108.75%
	2	105.63%	102.72%	101.15%	105.12%
	平均	106.14%	104.39%	103.03%	106.94%

SJF-10（有机肥）		OTC	TC	CTC	DO
添加量					
5 mg/kg	1	113.45%	108.56%	71.09%	102.52%
	2	100.04%	104.00%	92.81%	83.99%
	平均	106.75%	106.28%	81.95%	93.25%
25 mg/kg	1	83.17%	83.90%	102.41%	80.37%
	2	88.12%	88.31%	99.53%	81.02%
	平均	85.64%	86.10%	100.97%	80.70%
100 mg/kg	1	83.51%	80.42%	84.89%	76.67%
	2	83.72%	80.87%	86.47%	77.58%
	平均	83.61%	80.64%	85.68%	77.12%

SJF-12（有机无机复混肥）添加量		OTC	TC	CTC	DO
5 mg/kg	1	125.31%	105.44%	91.10%	119.87%
	2	114.55%	90.55%	101.07%	112.88%
	平均	119.93%	97.99%	96.09%	116.37%
25 mg/kg	1	110.32%	107.89%	100.71%	115.64%
	2	106.13%	107.49%	102.16%	110.15%
	平均	108.22%	107.69%	101.44%	112.90%
100 mg/kg	1	101.30%	102.60%	100.00%	100.00%
	2	102.87%	103.94%	104.14%	106.20%
	平均	102.08%	103.27%	102.07%	103.10%

OY1（牛粪肥）添加量		OTC	TC	CTC	DO
5 mg/kg	1	62.85%	120.19%	77.79%	63.21%
	2	83.14%	110.03%	74.81%	49.01%
	平均	73.00%	115.11%	76.30%	56.11%
25 mg/kg	1	95.70%	94.35%	83.93%	86.86%
	2	91.29%	98.66%	84.10%	87.21%
	平均	93.50%	96.51%	84.02%	87.03%
100 mg/kg	1	95.29%	89.97%	82.47%	85.66%
	2	94.89%	90.30%	82.45%	87.64%
	平均	95.09%	90.14%	82.46%	86.65%

SJF-32（有机肥）添加量		OTC	TC	CTC	DO
25 mg/kg	1	98.40%	80.18%	63.44%	72.70%
	2	100.78%	81.48%	66.67%	69.81%
	平均	99.59%	80.83%	65.05%	71.26%
100 mg/kg	1	85.82%	80.73%	65.37%	64.67%
	2	88.02%	81.76%	67.67%	68.28%

平均	86.92%	81.25%	66.52%	66.47%
----	--------	--------	--------	--------

有机肥经过 HLB 柱净化后的回收率部分结果如表 5 所示。

表 5 当样品过 HLB 柱时的样品加标回收率

SJF-10 (有机肥) 过 HLB 柱		OTC	TC	CTC	DO
添加量					
5 mg/kg	1	83.83%	77.93%	73.38%	93.88%
	2	82.91%	74.17%	70.07%	90.19%
	平均	83.37%	76.05%	71.73%	92.03%
25 mg/kg	1	80.89%	74.97%	70.79%	76.58%
	2	82.63%	76.08%	72.20%	78.64%
	平均	81.76%	75.52%	71.49%	77.61%
100 mg/kg	1	85.32%	77.61%	75.26%	79.21%
	2	81.87%	75.61%	72.26%	74.83%
	平均	83.60%	76.61%	73.76%	77.02%

有机肥 2 号过 HLB		OTC	TC	CTC	DO
添加量					
5 mg/kg	1	74.35%	88.05%	74.26%	135.43%
	2	72.76%	80.51%	75.30%	120.75%
	平均	73.55%	84.28%	74.78%	128.09%
25 mg/kg	1	89.07%	79.69%	74.28%	76.40%
	2	81.33%	75.31%	65.20%	69.45%
	平均	85.20%	77.50%	69.74%	72.92%
100 mg/kg	1	89.00%	94.14%	78.08%	85.39%
	2	87.95%	91.82%	78.45%	85.39%
	平均	88.48%	92.98%	78.27%	85.39%

脲醛缓释肥过 HLB 柱		OTC	TC	CTC	DO
添加量					
5 mg/kg	平均	118.14%	108.84%	106.50%	108.35%

SJF-12（有机无机复混肥）过 HLB 柱		OTC	TC	CTC	DO
添加量					
25 mg/kg	平均	108.18%	105.43%	107.28%	111.42%

SJF-32（有机肥）过 HLB 柱		OTC	TC	CTC	DO
添加量					
100 mg/kg	平均	108.18%	105.43%	107.28%	111.42%

经过对六种有机肥的两种净化方式的回收率数据的收集和分析，本实验的回收率分析结果如下表 6。

表 6 样品加标回收率

化合物名称	样品提取过滤（不经 HLB 柱净化）		样品提取并净化（经 HLB 柱净化）	
	添加浓度/ (mg/kg)	回收率范围/%	添加浓度/ (mg/kg)	回收率范围/%
土霉素	5	62.8~125.3	5	72.8~118.1
	25	83.2~110.3	25	80.9~108.2
	100	83.5~106.7	100	81.9~90.2
四环素	5	90.5~120.2	5	74.2~108.8
	25	80.2~107.9	25	75.0~105.4
	100	80.4~106.1	100	75.6~90.4
金霉素	5	71.1~129.8	5	70.1~106.5
	25	63.4~105.8	25	65.2~107.3
	100	65.4~104.9	100	72.3~79.7
强力霉素	5	49.0~119.9	5	90.2~135.4
	25	69.8~115.6	25	69.5~111.4
	100	64.7~108.8	100	74.8~85.4

结果显示，利用该方法检测有机肥中的加标四环素族类抗生素 TCs，大多数 TCs 的回收率良好，过柱与不过柱净化的回收率没有显著性差别。

5，方法的验证及精密度

为了对方法的准确度、精密度进行考察，拟请 8-9 个有资质认证的实验室参加，对 5 个样品进行 2-3 个浓度水平添加回收测试，平行进行 2 次重复测量。当检测结果小于 1%时，保留 3 位有效数字，当检测结果大于 1%时，保留 2 位小数，加标回收率保留 1 位小数。对于所得到的验证数据，根据 GB/T6379.2-2004 进行验证和处理。计算 r, R 。（目前正在进行中，2014.10 月完成）。