

ICS 65.120

B 46

备案号:

DB33

浙 江 省 地 方 标 准

DB33/T 539—2005

饲料中莱克多巴胺的测定

Determination of ractopamine in feedstuffs

2005-02-17 发布

2005-03-17 实施

浙江省质量技术监督局发布

前 言

本标准是在参阅了国内外文献的基础上，根据我国技术发展水平研究制定的，采用了酶联免疫法、高效液相色谱—荧光检测法和气相色谱-质谱法。

本标准由浙江省农业厅提出并归口。

本标准由浙江省畜产品质量安全检测中心、浙江省疾病预防控制中心负责起草，浙江一星集团饲料有限责任公司参与起草。

本标准主要起草人：陈慧华、吴平谷、应永飞、任玉琴、屈健、周文海、陈勇、浦琴华。

饲料中莱克多巴胺的测定

1 范围

本标准规定了以酶联免疫（ELISA）法、高效液相色谱（HPLC）法和气相色谱—质谱（GC—MS）法检测饲料中莱克多巴胺的方法，规定GC—MS法为仲裁法。

本标准适用于饲料和饲料添加剂中莱克多巴胺的测定。

酶联免疫（ELISA）法为筛选方法，检测限为0.01mg/kg，高效液相色谱（HPLC）法和气相色谱—质谱（GC—MS）法为定量方法，定量限HPLC法为0.1mg/kg、GC—MS法为0.05mg/kg。线性范围：酶联免疫（ELISA）法为0.005ng-0.05ng，高效液相色谱（HPLC）法为2.5ng-10ng，气相色谱—质谱（GC—MS）法为0.05ng-1.0ng。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料采样方法

3 试样制备

按 GB/T 14699.1 抽取有代表性的饲料样品，用四分法缩减取约 200g，粉碎至过 0.45mm 孔径的分析筛，混匀，装入磨口瓶中备用。

第一法 酶联免疫法

4 原理与方法

4.1 原理

本测定方法是酶联免疫法中的竞争性测定法，其主要原理是：吸附在孔内的莱克多巴胺与标准或样品中的莱克多巴胺竞争性地与莱克多巴胺抗体相结合，与标准品或样品相结合的莱克多巴胺抗体被洗涤去除后，只剩下与微孔内药物相结合的抗体，其再与加入的酶标记的第二抗体相结合，酶底物在酶作用下产生蓝色产物，吸光度的高低与样品中莱克多巴胺的含量成反比。

4.2 方法

采用莱克多巴胺酶联免疫试剂盒或类似产品，按试剂盒的使用说明操作。

5 试剂和溶液

5.1 除非另有说明，本法所用试剂均为分析纯，水为去离子水，符合 GB/T 6682 二级水的规定。

5.2 PBS 缓冲液：用水 10 倍稀释厂商提供的浓缩 PBS 缓冲液。

5.3 工作洗液：用水 20 倍稀释厂商提供的浓缩洗液。

5.4 乙酸乙酯。

5.5 碳酸盐缓冲液：称取 4.3g 碳酸钠（ $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ），2.9g 碳酸氢钠（ NaHCO_3 ），加水至 1000mL，摇匀，调节 pH 值至 9.5。

- 5.6 提取液：取 10mL 甲醇，加 90mL PBS 缓冲液，摇匀。
- 5.7 甲醇。
- 5.8 第二抗体工作液：用第二抗体稀释液 2500 倍稀释第二抗体。

6 仪器与设备

- 6.1 微孔板酶标仪(带 450nm 滤光片)。
- 6.2 振荡器。
- 6.3 冷冻离心机。
- 6.4 微量加样器及配套吸头：20 μ L，50 μ L，100 μ L，200 μ L。
- 6.5 冰箱。
- 6.6 洗板机。
- 6.7 生化培养箱。
- 6.8 氮吹仪。
- 6.9 分析天平：感量 0.01g。

7 测定步骤

7.1 注意事项

不同品牌的试剂盒其操作步骤可能略有差别，具体操作步骤可根据试剂盒使用说明书略作调整。

7.2 试样处理

取 3g 试样于 50mL 离心管中，加入 6mL 提取液(5.5)，上下手摇数次，加入 6mL 碳酸盐缓冲液(5.4)，再加入 8mL 乙酸乙酯(5.3)，振荡 30min；以 4000rpm 的转速离心 5min，移取 2.0mL 上层有机相至另一新试管中，氮吹至干。加入 50 μ L 甲醇(5.6)溶解残余物后，再加入 450 μ L PBS 缓冲液(5.1)，即为供试溶液，取 50 μ L 进行 ELISA 测定。

7.3 测试程序

- 7.3.1 根据所测定样品及标准数，计算出所需微孔条数，将微孔条插入微孔架，标准和样品做两个孔的平行重复，记录标准和样品的位置。
- 7.3.2 加入 50 μ L 的标准品和处理好的样品到各自的微孔中，标准和样品做两个平行重复。
- 7.3.3 加入 100 μ L 第一抗体溶液到每一个微孔中，在 37℃ 孵育 30 分钟后倒出孔中的液体，将微孔架倒置在吸水纸上拍打（每轮拍打 3 次）以保证完全除去孔中的液体，再加入工作液(5.2) 250 μ L，重复操作两遍。最后用吸水纸吸干。
- 7.3.4 加入 150 μ L 稀释的酶标记的第二抗体(5.7) 37℃ 孵育 30 分钟后倒出孔中的液体，将微孔架倒置在吸水纸上拍打（每轮拍打 3 次）以保证完全除去孔中的液体，再加入工作液(5.2) 250 μ L，重复操作两遍。最后用吸水纸吸干。
- 7.3.5 加入 100 μ L 酶底物液到微孔中，充分混合并在室温孵育 5-10min。
- 7.3.6 加入 50 μ L 反应终止液到微孔中，混合后在 450nm 处测量吸光度值。

8 结果计算

以空白（浓度为 0 的标准溶液）吸光度值为 100% 计算，折算出各标准和样品的相对吸光度值。

$$\text{相对吸光度值}(\%) = \frac{\text{标准的吸光度值(或样品)}}{\text{空白的吸光度值}} \times 100$$

计算出的标准相对吸光度值绘成为一个对应浓度 (ng/L) 的半对数坐标系统曲线图，校正曲线在 200-2000ng/L 范围内应当成为线性。相对应每一个样品的浓度 (ng/L) 可以从校正曲线上读出。

第二法 高效液相色谱法

9 方法原理

用2%氨/甲醇溶液提取试样中的莱克多巴胺，经固相萃取柱净化，浓缩后用2%乙酸溶液定容，用高效液相色谱—荧光检测法分离测定。

10 试剂和溶液

10.1 除非另有说明，本法所用试剂均为分析纯，水为去离子水，符合 GB/T 6682 二级水的规定。

10.2 乙腈：色谱纯。

10.3 甲醇。

10.4 乙腈。

10.5 乙酸乙酯。

10.6 冰醋酸。

10.7 无水硫酸钠。

10.8 戊烷磺酸钠：色谱级。

10.9 正己烷。

10.10 氨水。

10.11 50%乙腈/乙酸乙酯溶液：取 250mL 乙腈加乙酸乙酯至 500mL，混匀。

10.12 50%甲醇/乙酸乙酯溶液：取 250mL 甲醇加乙酸乙酯至 500mL，混匀。

10.13 2%乙酸溶液：取 5mL 冰醋酸加水至 250mL，混匀。

10.14 固相萃取柱¹⁾：每根柱填料量为 500mg，柱体积 5mL。

10.15 2%氨/甲醇溶液：取 20mL 氨水加甲醇至 1000mL，混匀。

10.16 戊烷磺酸钠溶液：取 800mL 水，加 20mL 冰醋酸和 0.87g 戊烷磺酸钠 ($C_5H_{11}O_3SNa \cdot H_2O$)，混匀。

10.17 莱克多巴胺标准溶液

10.17.1 莱克多巴胺贮备液 (250 μ g/mL)

精密称取莱克多巴胺对照品25mg，置100mL容量瓶中，用甲醇（10.2）溶解并定容至刻度，置-20℃冰箱中，可保存3个月。

10.17.2 莱克多巴胺稀释液 (5 μ g/mL)

精密量取1mL莱克多巴胺贮备液（10.16.1），置50mL棕色容量瓶中，用甲醇（10.2）稀释并定容至刻度，为莱克多巴胺工作液。

10.17.3 莱克多巴胺工作溶液

分别准确吸取一定量的标准稀释液（10.16.2），用2%乙酸溶液（10.12）稀释、定容，配制成浓度为0.10 μ g/mL、0.20 μ g/mL、0.50 μ g/mL、1.0 μ g/mL、2.0 μ g/mL、5.0 μ g/mL的标准溶液。

11 仪器设备

11.1 高效液相色谱仪（配荧光检测器）。

11.2 冷冻离心机 能达到 5000rpm。

11.3 振荡器。

11.4 离心管 50mL，10mL。

11.5 微孔滤膜 0.45 μ m。

¹⁾固相萃取柱的填充料为聚苯乙烯。

11.6 涡旋混合器。

11.7 分析天平 精度 0.0001g。

11.8 旋转蒸发仪。

11.9 鸡心瓶 50mL。

11.10 氮吹仪。

12 测定步骤

12.1 试样提取

称取试样3.0g, 准确加入2%氨/甲醇溶液(10.14) 25mL, 涡旋振荡1min, 超声振荡10min, 5000rpm离心5min, 取上清液10 mL 至鸡心瓶中, 50℃旋转蒸干。

12.2 试样净化

用2mL甲醇(10.2)和2mL正己烷(10.8)溶解鸡心瓶中的残余物, 重复一次, 弃去上层; 再加入2mL正己烷(10.8), 重复一次, 分出甲醇至10mL离心管中, 45℃下氮气吹干。用5mL乙酸乙酯(10.4)溶解, 加少量无水硫酸钠(10.6), 5000rpm离心3min。洗涤液过固相萃取柱(10.13), 先经5mL乙酸乙酯润洗)用3mL50%乙腈/乙酸乙酯溶液(10.10)洗涤柱子, 然后用5mL50%甲醇/乙酸乙酯溶液(10.11)洗脱收集, 氮吹至干。

12.3 定容

用2%乙酸溶液(10.12)定容到1mL, 过膜, 上机。

12.4 测定

12.4.1 高效液相色谱条件

色谱柱: C₁₈柱, 长250mm, 内径4.6mm, 粒度5 μ m, 或相当者。

保护柱: C₁₈柱, 长20mm, 内径3.9mm, 粒径5 μ m, 或相当者。

流动相: 戊烷磺酸钠溶液(10.15): 乙腈(10.1)=80: 20, 使用前脱气。

流速: 1.0mL/min。

激发波长: 226nm。

发射波长: 306nm。

进样量: 50 μ L。

12.4.2 上机测定

莱克多巴胺对照溶液和试液分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积进行计算。

13 结果计算

试样中莱克多巴胺的含量按下式计算:

$$X = \frac{n \times A_i \times C_s \times V_s}{A_s \times M}$$

式中:

n——样品稀释倍数;

A_i——样品峰面积;

A_s——对照溶液峰面积;

V_s——定容体积 (mL);

C_s——对照溶液浓度 (μ g/mL);

M——样品重量 (g);

X——试样中莱克多巴胺的含量 (mg/kg);

测定结果用平行测定的算术平均值表示, 保留 3 位有效数字。

14 精密度

14.1 重复性

实验室内平行测定间的相对偏差不大于10%。

14.2 再现性

实验室间测定的相对偏差不大于15%。

第三法 气相色谱-质谱法

15 方法原理

试样中莱克多巴胺先用2%氨/甲醇溶液提取，甲醇和正己烷分配脱脂，然后用柱净化，BSTFA（双三甲基硅基三氟乙酰胺）+TMCS（三甲基氯硅烷）衍生，最后用GC-MS法进行定性定量分析。

16 仪器与试剂

16.1 气-质联用仪。

16.2 烘箱。

16.3 BSTFA（双三甲基硅基三氟乙酰胺）+1%TMCS（三甲基氯硅烷）。

16.4 莱克多巴胺标准贮备溶液（5mg/mL）：准确称取 50mg 莱克多巴胺于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，存放在冰箱中备用。

16.5 莱克多巴胺标准工作溶液：取莱克多巴胺标准贮备溶液，用甲醇稀释至所需浓度。

16.6 甲苯。

16.7 其它仪器，同 11。

16.8 其它试剂，同 10。

17 测定步骤

17.1 试样提取

同HPLC法12.1。

17.2 试样净化

同HPLC法12.2。

17.3 试样衍生

蒸发剩余物加0.1 mL BSTFA+1%TMCS（16.3），加盖后于漩涡混合器上震荡，在80℃的烘箱中加热1.0 h，氮气吹干，加0.2mL甲苯（16.5）溶解。

取适量的莱克多巴胺标准工作溶液（16.4），氮气吹干，与试样同法进行衍生化。

17.4 色谱条件

色谱柱：5%苯基甲基聚硅氧烷弹性石英毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm)，或相当者。

进样口温度：300℃。

柱温程序：初温150℃，保持3 min，然后以10℃ / min升至230℃，保持10min，再以20℃ / min升至280℃保持10min。

载气：高纯氮气（99.999%）。

流速：1.0mL/min，不分流进样。

进样量：1.0μL。

17.5 质谱条件

EI源：源温230℃。

电子能量：70eV。

接口温度：280℃。

电子倍增器电压：1506V。

质量扫描范围：30~550U。

选择离子监测方式（SIM）。

监测离子（m/z）：267、250、502，定量离子250。

溶剂延迟：5 min。

17.6 上机测定

莱克多巴胺对照溶液和试液分别注入气相色谱—质谱联用仪，记录谱图，按外标法以峰面积进行计算。

18 结果计算

结果按下式计算：

$$X = m_1 \times n / (m \times 1000)$$

式中：

X——样品中莱克多巴胺含量（mg/kg）；

m_1 ——质谱测定对应的莱克多巴胺量（ng）；

m——取样量（g）；

n——稀释倍数；

测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留3位有效数字。

19 精密度

19.1 重复性

实验室内平行测定间的相对偏差不大于10%。

19.2 再现性

实验室间测定的相对偏差不大于15%。