



饲料中莱克多巴胺的HPLC法测定

作者:应永飞 吴平谷 陆春波 林仙军 周文海 吕伟 军 期号:2005年第7期

摘要 用碱性甲醇提取试样中的莱克多巴胺,经SLA固相萃取柱净化,浓缩后用2%乙酸溶液定容,过膜后用高效液相色谱-荧光检测法分离测定;色谱柱类型Waters Symmetry C18柱,250mm×4.6mm(i.d.),粒径5μm;流动相为戊烷磺酸钠溶液:乙腈(体积比80:20);激发波长为226nm,发射波长为306nm;流速1ml/min;进样量50μl;饲料中莱克多巴胺的检测限为0.5mg/kg;莱克多巴胺的测定在0.02~0.50μg/ml范围内具有良好的线性关系,平均回收率在85.1%以上,RSD小于7.5%;方法简单,灵敏度高,可用于饲料中莱克多巴胺的含量测定。

关键词 莱克多巴胺; 残留; 饲料; 高效液相色谱法
中图分类号 S816.7

莱克多巴胺是苯乙醇胺类β2-肾上腺素兴奋剂,能促进动物体蛋白质沉积,抑制脂肪沉积,具有营养“再分配效应”[1,2]。因此,有人用来作为饲料添加剂,提高猪胴体的瘦肉率。但是,动物在饲用含莱克多巴胺的饲料后,会造成肌肉及组织中不同程度的残留,使用不当将导致消费者出现不同程度的中毒现象。为保障人民的身体健康和生命安全,保障畜牧业的健康持续发展,我国已经明确将其列入禁用药品目录。然而,在饲料或饲养过程中违法使用莱克多巴胺的现象已经出现,并有蔓延之势。

由于莱克多巴胺是一种新型的β2-肾上腺素兴奋剂,目前的检测方法和检测标准很少[3,4],特别是国内尚未见文献报道。因此探索饲料中莱克多巴胺的检测方法具有很重要的意义。我们比较了提取剂、提取方法、固相萃取柱、萃取试剂、流动相对提取效果的影响,在此基础上对HPLC测定方法进行了系统考察,即线性范围、重复性试验、稳定性试验、加标回收率等,最终确定了一套比较理想的检测条件。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 2695高效液相色谱仪; Waters W-474荧光检测器; PE LS-45型荧光分光光度计; KQ-500超声波振荡器; Sigma 2k15冷冻离心机; BüCHI B-490旋转蒸发器; MS2 minishaker漩涡混匀器; METTLER AG-285电子天平; 氮吹仪; SLA固相萃取柱(500mg/5ml),杭州富裕科技服务有限公司提供。

1.2 色谱条件

色谱柱类型Waters Symmetry C18柱,4.6mm×250mm(i.d.),粒径5μm;流动相为戊烷磺酸钠溶液(取800ml水,加20ml冰醋酸和0.87g戊烷磺酸钠):乙腈(体积比80:20);激发波长为226nm,发射波长为306nm;流速1ml/min;进样量50μl。

1.3 标准曲线的绘制

精密称取25mg莱克多巴胺对照品置于100ml棕色量瓶中,用甲醇溶解后定容,摇匀,为莱克多巴胺储备液。精密量取莱克多巴胺储备液1ml,置50ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度,得莱克多巴胺工作液。分别准确吸取一定量的标准工作液,用2%乙酸溶液稀释、定容,配制浓度为0.02μg/ml、0.04μg/ml、0.1μg/ml、0.2μg/ml、0.5μg/ml的标准溶液,分别进行HPLC检测。

1.4 样品提取与纯化

称取饲料3.0g,准确加入2%氨/甲醇溶液25ml,涡旋振荡1min,超声振荡10min,5000r/min离心5min,取上清液10ml至鸡心瓶中,50℃旋转蒸干。用2ml甲醇和2ml正己烷溶解鸡心瓶,重复一次,弃去上层;再加入2ml正己烷,重复一次,分出甲醇至10ml离心管中,45℃氮气吹干。用5ml乙酸乙酯溶解,加少量无水硫酸钠,5000r/min离心3min。洗涤液过SLA固相萃取柱(先经5ml乙酸乙酯润洗)用50%乙腈/乙酸乙酯溶液3ml洗涤柱子,然后用50%甲醇/乙酸乙酯溶液5ml洗脱收集,氮吹至干。用2%乙酸溶液定容到1ml,过膜,上机。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

由于莱克多巴胺的紫外最大吸收波长在224nm左右,如果用此波长作为检测波长,则杂质干扰很大。由于莱克多巴胺具有荧光吸收,故我们采用荧光检测器进行检测。结果表明激发波长为226nm,发射波长为306nm时,吸收最强。流动相为戊烷磺酸钠溶液与乙腈经一定的配比而成,通过调整配比,流动相为戊烷磺酸钠溶液:乙腈体积比为80:20时,莱克多巴胺的保留时间比较适合,避免了杂质峰的干扰。

2.2 线性关系与线性范围

将绘制标准曲线用莱克多巴胺工作液按浓度从低到高,依次进行高效液相色谱分析。按其所得峰面积与对应的工作液浓度作标准曲线图,并计算回归方程和相关系数。莱克多巴胺浓度与峰面积的回归方程为: $y=10\ 080\ 548x+6\ 438$, 相关系数 $r=0.999\ 9$, 在浓度0.02~1.0μg/ml的范围内线性关系良好,图1为莱克多巴胺的标准曲线图。

会员登录

用户名:

密码:

验证码: 6148

相关文章

- 高效液相色谱法测定饲料中安...
- 饲料中微量元素硒的测定方法...
- 植酸酶活性测定应注意的几个...
- 不同原料中菜籽油、豆油氧化...
- 饲料中氢氰酸含量测定方法的...
- 氯化胆碱产品质量鉴定及掺假...
- 近红外光谱分析技术在饲料工...
- 饲料中磺胺二甲嘧啶、磺胺六...
- 几种蛋白质原料体外消化率测...
- 动物性饲料体外蛋白质消化率...

合作伙伴



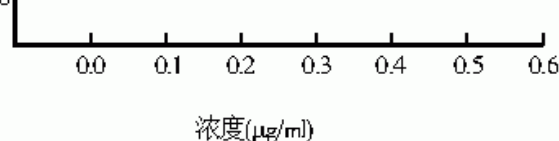


图1 莱克多巴胺的标准曲线

2.3 净化条件的确定

2.3.1 不同固相萃取柱的比较

用于β-兴奋剂净化的固相萃取柱有硅藻土、C8、C18、硅胶、强阳离子交换柱和弱阳离子交换柱等，本文对SLA、SLH、C18、硅胶、胺基5种SPE净化柱进行除杂及过柱回收率比较，结果见表1（添加量为5.0mg/kg）。

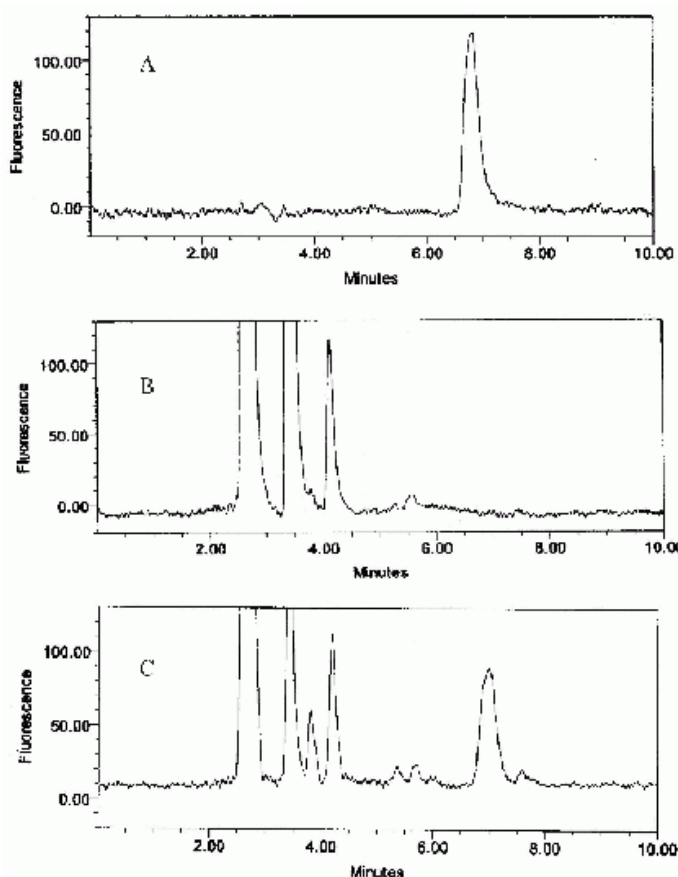
经过以上效果比较，选择SLA型SPE净化柱作为饲料中莱克多巴胺测定净化柱，样品甲醇提取物经过SLA柱净化后，可以较好的达到净化目的，且过柱回收率在90%以上。

表1 不同净化柱净化效果比较

项目	SLA	SLH	C ₁₈	silica gel	amidocyanogen
recovery(%)	90.4	88.9	86.7	85.7	88.3
除脂肪效果	好	好	好	一般	一般
除色素效果	好	一般	一般	一般	一般

2.3.2 固相萃取条件的确定

选用2ml甲醇和2ml正己烷溶解鸡心瓶，弃去上层，利用正己烷的脂溶性除去部分杂质，收到了较好的效果。氮吹至干后用5ml乙酸乙酯溶解，加少量无水硫酸钠，除去微量水，洗涤液过SLA固相萃取柱。用50%乙腈/乙酸乙酯溶液洗涤柱子，当洗涤液为3ml时回收率较高，而且杂质干扰较少。然后用50%甲醇/乙酸乙酯溶液洗脱收集，先用洗脱液为5ml洗脱；另取5ml洗脱液重复一次，同法检测未发现莱克多巴胺，说明5ml可以将吸附在柱子上的莱克多巴胺完全洗脱下来。故理想的洗涤液用量为50%乙腈/乙酸乙酯溶液3ml，洗脱液用量为50%甲醇/乙酸乙酯溶液5ml。



A:对照溶液;B:空白样品;C:阳性添加样品

图2 高效液相色谱图

图2是莱克多巴胺对照品、空白样品的、空白添加样品的高效液相色谱图。

2.4 重复性试验

对添加了0.5mg/kg、1.0mg/kg和5.0mg/kg莱克多巴胺的饲料进行重复试验。每个浓度取5份平行样，根据测定结果计算回收率和批内相对标准偏差，重复测定3次，计算批间相对标准偏差。

表2是莱克多巴胺添加量分别为0.5mg/kg、1.0mg/kg和5.0mg/kg的回收率结果列表。

序号	Spiked(mg/kg)	recoveries(%)	average(%)	RSD(%)
1	0.5	82.3,85.6,78.6,85.9,90.2	85.1	5.6
2	0.5	85.6,90.3,86.7,80.1,95.6	87.7	7.4
3	0.5	100.1,85.6,90.1,93.2,87.6	89.1	3.7
4	1.0	93.2,78.2,85.9,94.2,88.6	86.3	7.5
5	1.0	85.6,82.7,90.4,98.1,94.5	90.3	7.0
6	1.0	95.6,93.1,92.3,85.6,101.7	93.7	6.2
7	5.0	90.2,88.6,86.9,85.6,80.2	86.3	4.4
8	5.0	95.1,103.2,92.3,96.5,98.0	97.0	4.2
9	5.0	94.6,94.3,98.3,102.5,99.3	97.8	3.5

以上数据表明，莱克多巴胺添加量分别为0.05mg/kg、1.0mg/kg和5.0mg/kg时的回收率比较稳定。在5.0mg/kg的添加量时，批内相对变异系数5.0，批间相对变异系数≤10.0。而在添加量0.5mg/kg、1.0mg/kg时的回收率的批内相对变异系数≤10.0，批间相对变异系数≤10.0。为了保证本方法的有效性，确定本方法的实验室内平行测定间的变异系数不大于10%。

3 结论

本方法准确地测定了饲料中违禁药物莱克多巴胺的含量。在本实验的色谱条件下，可以使被测样品中的各组分很好的分离开，出峰时间合适。通过本方法的建立，为打击不法分子使用莱克多巴胺提供了技术保证。

参考文献

- 1 郑春田. β-兴奋剂改善畜禽胴体组成的研究进展. 中国饲料, 1997 (10), 10~12
- 2 丁焕中, 陈杖榴, 杨志凌. 营养重分配剂莱克多巴胺的药理作用和应用. 兽药与饲料添加剂, 2002 (7) 18~20
- 3 Determination of ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-fluorescence and liquid chromatography/ tandem mass spectrometry. E. Shishani, S. C. Chai. S. Jamokha et al. Analytica Chimica Acta 483, 2003, 137~145
- 4 Identification of ractopamine residues in tissue and urine samples at ultra-trace level using liquid chromatography-positive electrospray tandem mass spectrometry. J. P. Antignac, P. Marchand, B. L. Bizet et al. J. Chromatogr. B774, 2002, 59~66

...评论...

发表
评论

*40字以内

提交

重置

[关于我们](#) | [网站导航](#) | [友情连接](#) | [联系我们](#) | [会员须知](#) | [广告服务](#) | [服务条款](#)

版权所有:饲料工业杂志社 Copyright © [Http://www.feedindustry.com.cn](http://www.feedindustry.com.cn) 2004-2005 All Rights 辽 ICP备 05006846号

饲料工业杂志社地址: 沈阳市皇姑区金沙江街16号6门 邮编: 110036 投稿: E-mail: tg@feedindustry.com.cn 广告: E-mail: ggb@feedindustry.com.cn

编辑一部: (024) 86391926 (传真) 编辑二部: (024) 86391925 (传真) 网络部、发行部: (024) 86391237 总编室: (024) 86391923 (传真)