

中华人民共和国国家标准

GB/T 21036—2007

饲料中盐酸多巴胺的测定 高效液相色谱法

Determination of dopamine hydrochloride in feeds—
High performance liquid chromatography

2007-06-21 发布

2007-09-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

饲料中盐酸多巴胺的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了测定饲料中盐酸多巴胺含量的高效液相色谱法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中盐酸多巴胺含量的测定。本方法的最低检测限为 0.5 mg/kg,最低定量限为 1.7 mg/kg。

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

3 方法原理

用盐酸溶液/甲醇提取饲料中的盐酸多巴胺,经离心除去固体物及部分杂质后,用酸性氧化铝固相萃取柱净化,洗脱液经滤膜过滤后用高效液相色谱荧光检测器检测。

4 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为去离子水,符合 GB/T 6682 二级用水规定。

- 4.1 甲醇:色谱纯。
- 4.2 乙酸乙酯:色谱纯。
- 4.3 硫化钠溶液:浓度为 325 mg/L,称取 0.1 g 硫化钠($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)用水溶解,并定容至 100 mL。
- 4.4 盐酸溶液:浓度为 0.1 mol/L,取 8.6 mL 浓盐酸于 1 L 容量瓶中,用水定容至刻度,混匀。
- 4.5 提取液:取 50 mL 盐酸溶液(4.4)与 450 mL 甲醇混匀。
- 4.6 固相萃取柱活化液:称取 4.5 g 氯化钠溶于 90 mL 水中,再加入 10 mL 甲醇混匀。
- 4.7 洗脱液:取 450 mL 盐酸溶液(4.4)与 50 mL 甲醇混匀。
- 4.8 酸性甲醇溶液:取 250 μL 甲酸溶于 500 mL 甲醇中,混匀。
- 4.9 0.02%甲酸溶液:取 200 μL 甲酸溶于 1 000 mL 水中,混匀。
- 4.10 盐酸多巴胺标准贮备液:准确称取盐酸多巴胺标准品(含量大于 98%)0.100 0 g 于 100 mL 容量瓶中,用酸性甲醇溶液(4.8)溶解定容,配制成浓度为 1 mg/mL 的盐酸多巴胺贮备液。4℃条件下贮藏,有效期三个月。
- 4.11 盐酸多巴胺标准中间液:移取 10 mL 标准贮备液(4.10)置于 100 mL 容量瓶中,用酸性甲醇稀释并定容,配制成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的盐酸多巴胺标准中间液。4℃条件下贮藏,有效期一个月。
- 4.12 盐酸多巴胺标准工作液:分别移取盐酸多巴胺标准中间液(4.11)0.025 mL、0.050 mL、0.125 mL、0.250 mL、1.25 mL 和 2.50 mL 于 25 mL 容量瓶中,用水稀释定容配制成 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准工作液。

5 仪器和设备

- 5.1 实验室常用仪器、设备。
 5.2 高效液相色谱仪(配有荧光检测器)。
 5.3 分析天平。
 5.4 旋涡混合器。
 5.5 离心机。
 5.6 酸性氧化铝固相萃取柱 500 mg/根。

6 试样制备

按 GB/T 14699.1 规定,取有代表性的样品 1 kg,四分法缩减取约 200 g,经粉碎,全部过 0.45 mm 孔筛,混匀装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 提取

称取一定量的试样(配合饲料 2 g,浓缩饲料 1 g,预混合饲料 1 g,准确至 0.001 g)置于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 试样提取液(4.5),涡动 1 min,3 500 r/min 离心 5 min。将上清液转入另一个 50 mL 离心管中,再分别用 5 mL 试样提取液重复提取两次,合并三次试样提取液。

7.2 配合饲料和浓缩饲料的净化

提取后立即将试样提取液置 4℃ 冰箱中冷却。将酸性氧化铝固相萃取柱用 5 mL 固相萃取柱活化液(4.6)活化。从 4℃ 冰箱中取出试样提取液,全部加于固相萃取柱上,自然流过小柱。用 10 mL 乙酸乙酯洗涤小柱,吹干。最后用 20 mL 洗脱液(4.7)洗脱,保持流速不超过 1 mL/min,收集洗脱液,并尽可能吹干小柱。洗脱液经 0.45 μm 滤膜过滤后用高效液相色谱分析。

7.3 预混合饲料的净化

立即向试样提取液中加入硫化钠溶液(4.3)2 mL,涡动 10 s,3 500 r/min 离心 5 min。上清液转移至另一离心管中。固相萃取柱净化方法同 7.2。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱条件

色谱柱: C₁₈ 柱,长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm,或相当者。

柱温:室温。

流动相:0.02%甲酸溶液(4.9)与甲醇(4.1)进行梯度洗脱,梯度洗脱条件详见表 1。

激发波长:290 nm。

发射波长:330 nm。

进样体积:10 μL。

表 1 梯度洗脱条件

时间/ min	流速/ (mL/min)	0.02%甲酸/ %	甲醇/ %
0	0.6	95	5
9	0.6	95	5
11	1	10	90
22	1	10	90
25	0.6	95	5
30	0.6	95	5

7.4.2 液相色谱测定

分别取适量的标准工作液和试样溶液,按 7.4.1 列出的条件进行液相色谱分析测定。以标准工作液作单点或多点校准,并用色谱峰面积积分值定量。测定中应注意调整试样溶液的浓度,使盐酸多巴胺的积分值落在标准曲线的相应范围内,并在试样溶液分析间适当穿插标准工作液,以确保定量的准确性。所得盐酸多巴胺的色谱图见图 1。

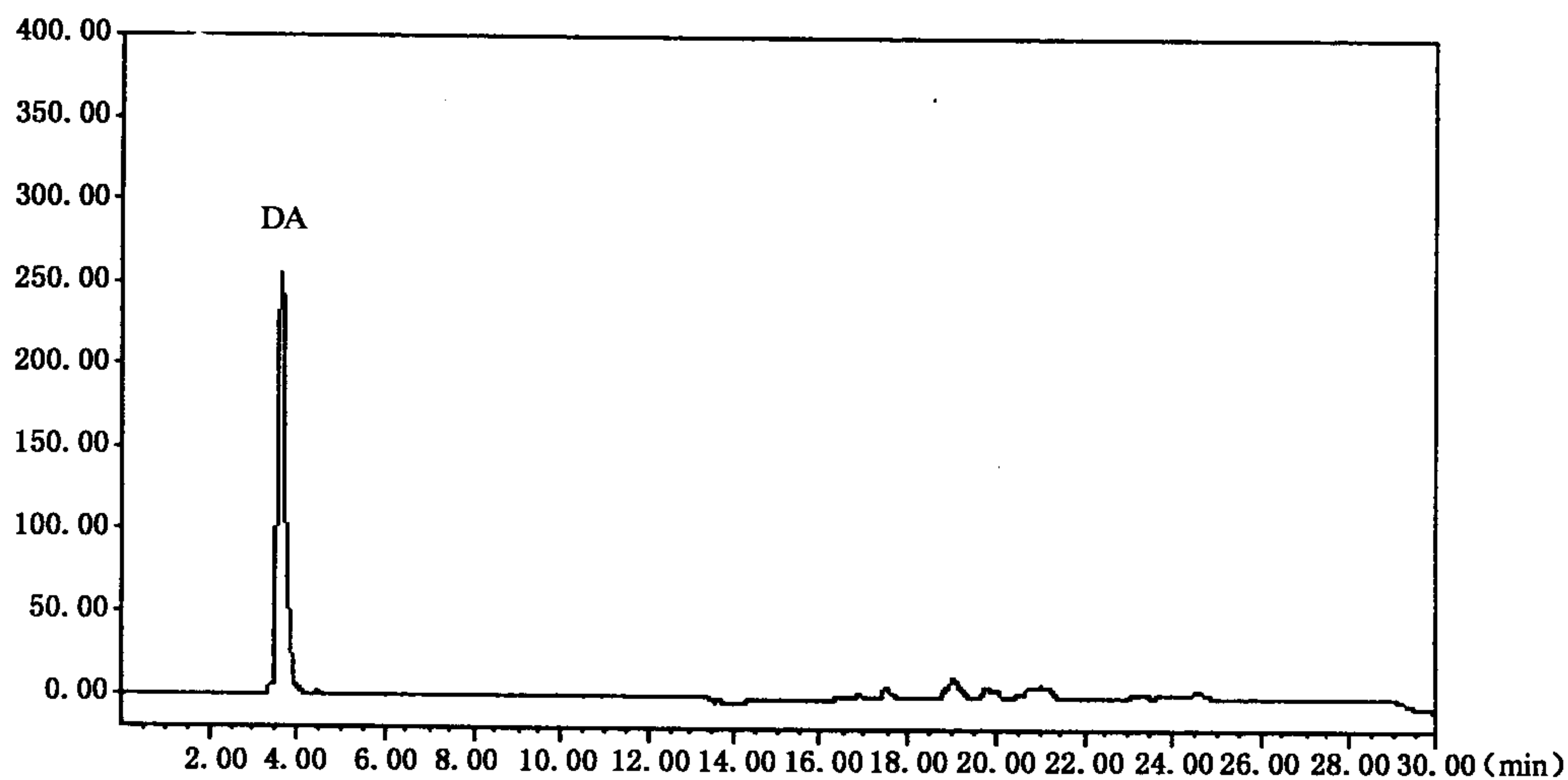


图 1 5 µg/mL 标准溶液色谱图(保留时间 3.5 min)

8 结果计算与表述

饲料中盐酸多巴胺的含量 X ,以质量分数(mg/kg)表示,按式(1)计算:

$$X = \frac{c \cdot V \cdot n}{m} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

c ——试样液中对应的盐酸多巴胺的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——试样液总体积,单位为毫升(mL);

n ——稀释倍数;

m ——饲料样品质量,单位为克(g)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

9 精密度

同一实验室由同一操作人员使用同一台仪器完成的两个平行测定结果的相对偏差不大于 15%。