

ICS

备案号:

**DB34**

**安 徽 省 地 方 标 准**

DB34/T 819—2008

---

**饲料中莱克多巴胺的测定  
——酶联免疫吸附法**

2008-08-01 发布

2008-08-01 实施

**安徽省质量技术监督局 发布**

## 前 言

本标准由安徽省畜牧兽医局提出。

本标准由安徽省质量技术监督局批准。

本标准由安徽省农业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：安徽省兽药饲料监察所、安徽省畜产品质量安全检测中心。

本标准起草人：许世富、汤春莲、熊惠燕、钱志平。

本标准于2008年8月1日首次发布。

# 饲料中莱克多巴胺的测定 ——酶联免疫吸附法

## 1 范围

本标准规定了饲料和饲料添加剂中莱克多巴胺检验的制样和酶联免疫吸附测定方法。

本标准适用于饲料和饲料添加剂中莱克多巴胺的快速测定。

本标准检测限为 $15\mu\text{g}/\text{kg}$ ，线性范围： $0.0075\text{ng}\sim 0.25\text{ng}$ 。

## 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。

## 4 原理

本方法是酶联免疫法中的竞争性测定法，其主要原理是：反应在已包被有莱克多巴胺多抗的塑料微孔中进行，将莱克多巴胺标准品或样品、酶标物加入微孔，温浴时，游离的和酶标记的莱克多巴胺竞争结合莱克多巴胺抗体的结合位点。所有未反应的酶标物在洗涤步骤中被清除，结合了的酶可以由显色剂显示出来，因为酶可以使无色的显色剂转变成蓝色，反应终止液的加入则可以使蓝色变成黄色，吸收值可以在450nm处进行测定。颜色变化的程度反映样品中莱克多巴胺的含量，在一定浓度范围内吸光度的高低与样品中莱克多巴胺的含量成反比。

## 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 竞争酶标免疫法莱克多巴胺试剂盒， $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

5.2.1 莱克多巴胺标准溶液： $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

5.2.2 酶标物冻干粉。

5.2.3 酶标物溶解液。

5.2.4 样品稀释液。

5.2.5 浓缩洗涤液。

5.2.6 显色剂。

5.2.7 终止液。

5.3 莱克多巴胺工作液：取莱克多巴胺标准溶液，用稀释液稀释为浓度范围 $0.15\mu\text{g}/\text{L}\sim 5.0\mu\text{g}/\text{L}$ 。

5.4 洗涤液：用水10倍稀释厂商提供的浓缩洗涤液。

5.5 酶标物溶液：在冻干粉中精确加入 12mL 酶标物溶解液（配制后静置至少 4h 或者 2℃～6℃放置 8h 后使用），用前摇匀，酶标物溶液有效期为 90d。

5.6 甲醇。

5.7 乙酸乙酯。

5.8 氨水。

5.9 氨化甲醇溶液：取 pH 9～10 的氨水溶液 10mL，加甲醇 90mL，混匀。

## 6 仪器设备

6.1 酶标仪（带 450nm 滤光片）。

6.2 振荡器。

6.3 离心机。

6.4 冰箱。

6.5 氮吹仪。

6.6 分析天平：感量 0.01g。

6.7 微量加样器及配套吸头：（单道 20 μL，50 μL，100 μL，多道 50 μL～300 μL）。

## 7 测定步骤

### 7.1 试样处理

取粉碎后的样品  $2 \pm 0.1$ g，加 12mL 氨化甲醇溶液（5.9），充分混匀，振荡 1～2min，加 9mL 乙酸乙酯，振荡 20min。以 4000g 离心 10min，取上层有机相 500μL 至另一试管中，氮吹至干，加样品稀释液 500μL（5.2.4）溶解残余物后，用于检测。

### 7.2 测试程序

7.2.1 测定在室温 20℃～25℃条件下操作，测定之前将试剂盒以及所有试剂在室温（20℃～25℃）下放置 1h～2h。

7.2.2 将足够标准和样品所用数量的孔条插入微孔架，标准和样品做两个平行实验，记录下标准和样品的位置。

7.2.3 分别在各孔中加 50μL 的标准品溶液或样品溶液。

7.2.4 每孔加 100μL 酶标物溶液（推荐使用多通道加样器）。

7.2.5 轻轻晃动反应板，20℃～25℃反应 10min。

7.2.6 倾出微孔中的液体，加 300μL 洗涤液，轻轻振荡混匀，倾出微孔中的洗涤液，在吸水纸上拍打，彻底清除微孔中的残留液和气泡，重复洗板 3 遍。

7.2.7 立即加 100μL 显色剂（推荐使用多通道加样器），晃动反应板使之彻底混匀，20℃～25℃避光反应 10min。

7.2.8 每孔加 100μL 终止液（推荐使用多通道加样器），轻轻振荡混匀，30min 内在 450nm 下检测吸光度。

## 8 结果判定和表述

按下式计算百分吸光度值：

$$\text{百分吸光度值} = \frac{B}{B_0} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

B—为标准溶液或供试样品的平均吸光度值；

B<sub>0</sub>—为零标准的标准溶液平均吸光度值；

用专业计算机软件求出供试样品中莱克多巴胺的浓度，乘以稀释系数即得检测结果。或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 150ng/L~5000ng/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。

## 9 检测方法灵敏度、准确度、精密度

### 9.1 灵敏度

本方法在饲料中的检测限为 15.0 μg/kg。

### 9.2 准确度

本方法在 30.0 μg/kg 添加浓度水平上的回收率为 80%~120%。

### 9.3 精密度

本方法的批内变异系数 CV% ≤ 10%，批间变异系数 CV% ≤ 15%。

## 10 其他

10.1 本方法饲料稀释系数为 10。

10.2 本方法为快速测定法，检测结果小于 15.0 μg/kg 时可判为未检出，大于 15.0 μg/kg 时需用气相色谱—质谱法 (GC/MS) 确认。

10.3 B<sub>0</sub> 吸光值应该不低于 0.8。

10.4 试剂盒可能存在交叉反应，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。

---