

动物源性食品中克伦特罗、莱克多巴胺及沙丁胺醇的快速检测 胶体金免疫层析法

(KJ201706)

1 范围

本方法规定了动物肌肉组织中克伦特罗、莱克多巴胺及沙丁胺醇的胶体金免疫层析快速检测方法。

本方法适用于猪肉、牛肉等动物肌肉组织中克伦特罗、莱克多巴胺及沙丁胺醇的快速测定。

2 原理

本方法采用竞争抑制免疫层析原理。样品中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇与胶体金标记的特异性抗体结合，抑制抗体和检测卡中检测线（T线）上抗原的结合，从而导致检测线颜色深浅的变化。通过检测线与控制线（C线）颜色深浅比较，对样品中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇进行定性判定。

3 试剂与材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的二级水。

3.1 试剂

3.1.1 甲醇：色谱纯。

3.1.2 氢氧化钠。

3.1.3 磷酸二氢钾。

3.1.4 磷酸氢二钠。

3.1.5 盐酸。

3.1.6 氯化钠。

3.1.7 氯化钾。

3.1.8 三氯化钠。

3.1.9 乙二胺四乙酸二钠。

3.1.10 三羟甲基氨基甲烷，即 Tris。

3.1.11 乙酸乙酯。

3.1.12 磷酸二氢钠。

3.1.13 氢氧化钠溶液（1mol/L）：称取氢氧化钠（3.1.2）4g，用水溶解并稀释至 100mL。

3.1.14 缓冲液：准确称取磷酸二氢钾（3.1.3）0.3g，磷酸氢二钠（3.1.4）1.5g，溶于约 800mL 水中，充分混匀后用盐酸（3.1.5）或氢氧化钠溶液（3.1.13）调节 pH 至 7.4，用水稀释至 1000mL，混匀。4℃ 保存，有效期三个月。

3.1.15 展开液：准确称取磷酸二氢钾（3.1.3）2g，磷酸氢二钠（3.1.4）1.44g，氯化钠（3.1.6）8g，氯化钾（3.1.7）0.2g，三氯化钠（3.1.8）0.5g，乙二胺四乙酸二钠（3.1.9）1.0g 溶于约 500mL 水

中，充分混匀后用水稀释至 1000mL。

3.1.16 Tris 缓冲液 (pH9.0, 1mol/L): 称取 Tris (3.1.10) 121.14g, 溶于约 700mL 水中, 充分混匀后加入盐酸 (3.1.5) 调试 pH 至 9.0 后用水定容至 1000mL。

3.1.17 Tris 缓冲液 (pH9.0, 10mmol/L): 精密量取 1mol/L Tris 缓冲液 (3.1.16) 1mL, 用水稀释定容至 100mL。

3.1.18 磷酸二氢钠溶液 (0.2mol/L): 称取磷酸二氢钠 (3.1.12) 24.0g, 用水溶解并稀释至 1000mL。

3.1.19 磷酸氢二钠溶液 (0.2mol/L): 称取磷酸氢二钠 (3.1.4) 28.4g, 用水溶解并稀释至 1000mL。

3.1.20 磷酸盐缓冲液 (pH7.4, 0.2mol/L): 量取磷酸二氢钠溶液 (3.1.18) 19mL, 加入 81mL 磷酸氢二钠溶液 (3.1.19), 混匀。

3.1.21 磷酸盐缓冲液 (pH7.4, 10mmol/L): 精密量取 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液 (3.1.20) 50mL, 用水稀释至 1000mL。

3.2 参考物质

克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇参考物质的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子量见表 1, 纯度 \geq 97%。

表 1 克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇参考物质的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子量

序号	中文名称	英文名称	CAS 登录号	分子式	相对分子量
1	克伦特罗	Clenbuterol	37148-27-9	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O	277.19
2	莱克多巴胺	Ractopamine	97825-25-7	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃	301.38
3	沙丁胺醇	Salbutamol	18559-94-9	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	239.31

注: 或等同可溯源物质。

3.3 标准溶液配制

3.3.1 标准储备液: 精密称取适量克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇参考物质 (3.2), 分别置于 100mL 容量瓶中, 用甲醇 (3.1.1) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 分别制成浓度为 100 μ g/mL 的克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇标准储备液。-18 $^{\circ}$ C 保存, 有效期一年。

3.3.2 克伦特罗标准中间液 (1 μ g/mL): 精密量取克伦特罗标准储备液 (100 μ g/mL) (3.3.1) 1mL 置于 100mL 容量瓶中, 用甲醇 (3.1.1) 稀释至刻度, 摇匀, 制成浓度为 1 μ g/mL 的克伦特罗标准中间液。临用新制。

3.3.3 克伦特罗标准工作液 (20ng/mL): 精密量取克伦特罗标准中间液 (1 μ g/mL) (3.3.2) 1mL, 置于 50mL 容量瓶中, 用甲醇 (3.1.1) 稀释至刻度, 摇匀, 制成浓度为 20ng/mL 的克伦特罗标准工作液。临用新制。

3.3.4 莱克多巴胺标准中间液 (1 μ g/mL): 精密量取莱克多巴胺标准储备液 (100 μ g/mL) (3.3.1) 1mL 置于 100mL 容量瓶中, 用甲醇 (3.1.1) 稀释至刻度, 摇匀, 制成浓度为 1 μ g/mL 的莱克多巴胺标准中间液。临用新制。

3.3.5 莱克多巴胺标准工作液 (20ng/mL): 精密量取莱克多巴胺标准中间液 (1 μ g/mL) (3.3.4) 1mL, 置于 50mL 容量瓶中, 用甲醇 (3.1.1) 稀释至刻度, 摇匀, 制成浓度为 20ng/mL 的莱克多巴胺标准工作液。临用新制。

3.3.6 沙丁胺醇标准中间液 (1 μ g/mL): 精密量取沙丁胺醇标准储备液 (100 μ g/mL) (3.3.1) 1mL

置于 100mL 容量瓶中，用甲醇（3.1.1）稀释至刻度，摇匀，制成浓度为 1 μ g/mL 的沙丁胺醇标准中间液。临用新制。

3.3.7 沙丁胺醇标准工作液（20ng/mL）：精密量取沙丁胺醇标准中间液（1 μ g/mL）（3.3.6）1mL，置于 50mL 容量瓶中，用甲醇（3.1.1）稀释至刻度，摇匀，制成浓度为 20ng/mL 的沙丁胺醇标准工作液。临用新制。

3.4 材料

3.4.1 克伦特罗试剂盒/检测卡（条）：含胶体金试纸条及配套的试剂。

3.4.2 莱克多巴胺试剂盒/检测卡（条）：含胶体金试纸条及配套的试剂。

3.4.3 沙丁胺醇试剂盒/检测卡（条）：含胶体金试纸条及配套的试剂。

3.4.4 固相萃取柱：丙烯酸系弱酸性阳离子交换柱。

4 仪器和设备

4.1 电子天平：感量为 0.01g 和 0.0001g。

4.2 组织粉碎机。

4.3 水浴箱。

4.4 离心机：转速 \geq 4000r/min。

4.5 移液器：10 μ L，100 μ L，1mL，5mL。

4.6 读数仪：产品配套可使用的检测仪器（可选）。

4.7 固相萃取装置（可选）。

4.8 其他产品说明书操作中需用的仪器。

4.9 环境条件：温度 10—40 $^{\circ}$ C，湿度 \leq 80%。

5 分析步骤

5.1 试样制备

取适量具有代表性样品的可食部分，充分粉碎混匀。

5.2 试样提取和净化

称取适量试样，按照方法一（5.2.1）或方法二（5.2.2）提取步骤分别对空白试样、加标质控样品、待测样进行处理。

5.2.1 方法一（隔水煮法）

称取粉碎混匀的样品 5g（精确至 0.01g）于 50mL 离心管，置 90 $^{\circ}$ C 水浴中加热 20min 至离心管中可清晰看见有组织液渗透，4000r/min 离心 10min，将上清液转至另一离心管，重复离心操作一次。准确量取上清液 900 μ L，加入缓冲液（3.1.14）100 μ L 混匀，即得待测液。本方法推荐水浴加热，也可按照试剂盒说明书进行操作。

5.2.2 方法二（固相萃取法）

称取粉碎混匀的样品 5g（精确至 0.01g）于 50mL 离心管，加入 10mmol/L Tris 缓冲液（3.1.17）

5mL, 剧烈振摇 5min, 放置 20min, 加入乙酸乙酯 (3.1.11) 10mL, 剧烈振摇 1min。以 4000r/min 离心 2min, 上清液待净化。连接好固相萃取装置 (4.7), 并在固相萃取柱 (3.4.4) 上方连接 30mL 注射器针筒, 将上述上清液全部倒入 30mL 针筒中, 用手缓慢推压注射器活塞, 控制液体流速约 1 滴/秒, 使注射器中液体全部流过固相萃取柱, 尽可能将固相萃取柱中溶液去除干净。将固相萃取柱下方的接液管更换为洁净的离心管, 向固相萃取柱中加入 0.5mL 10mmol/L 磷酸盐缓冲液 (3.1.21)。用手缓慢推压注射器活塞, 控制液体流速约 1 滴/秒, 使固相萃取柱中的液体全部流至离心管中, 即得待测液。

注: 试样制备过程可按照试剂盒说明书进行操作, 不做限定。

5.3 测定步骤

5.3.1 检测卡与金标微孔测定步骤

测试前, 将未开封的检测卡恢复至室温。吸取 100 μ L 上述待测液于金标微孔中, 上下抽吸 5—10 次直至微孔试剂混合均匀。室温温育 5min, 将反应液全部加入到检测卡的加样孔中, 1min 后加入 1 滴展开液 (3.1.15)。检测卡加入样本后 10min 进行结果判定。

5.3.2 无金标微孔时, 检测卡测定步骤

测试前, 将未开封的检测卡恢复至室温。吸取 100 μ L 上述待测液直接加入到检测卡加样孔中, 1min 后加入 1 滴展开液 (3.1.15)。检测卡加入样本后 10min 后进行结果判定。

5.3.3 试纸条与金标微孔测定步骤

测试前, 将未开封的试纸条恢复至室温。吸取 100 μ L 上述待测液于金标微孔中, 上下抽吸 5—10 次直至微孔试剂混合均匀。室温温育 1min, 将试纸条样品垫插入到金标微孔中。室温温育 4min, 从微孔中取出试纸条, 去掉试纸条下端样品垫, 进行结果判定。

注: 1. 测定步骤建议按照试剂盒说明书进行操作。

2. 结果判定建议使用读数仪, 读数仪的具体使用参照仪器使用说明书。

5.4 质控试验

每批样品应同时进行空白试验和加标质控试验。

5.4.1 空白试验

称取空白试样, 按照 5.2 和 5.3 步骤与样品同法操作。

5.4.2 加标质控试验

称取空白试样 5g (精确至 0.01g) 置于 50mL 离心管中, 加入适量克伦特罗标准工作液 (20ng/ml) (3.3.3), 使克伦特罗浓度为 0.5 μ g/kg, 按照 5.2 和 5.3 步骤与样品同法操作。

称取空白试样 5g (精确至 0.01g) 置于 50mL 离心管中, 加入适量莱克多巴胺标准工作液 (20ng/ml) (3.3.3), 使莱克多巴胺浓度为 0.5 μ g/kg, 按照 5.2 和 5.3 步骤与样品同法操作。

准确称取空白试样 5g (精确至 0.01g) 置于 50mL 离心管中, 加入适量沙丁胺醇标准工作液 (20ng/ml) (3.3.3), 使沙丁胺醇浓度为 0.5 μ g/kg, 按照 5.2 和 5.3 步骤与样品同法操作。

6 结果判定要求

6.1 读数仪测定结果

通过仪器对结果进行判读。

6.1.1 无效

当质控线 (C 线) 不显色时, 无论检测线 (T 线) 是否显色, 均表示实验结果无效。

6.1.2 阳性结果

若检测结果显示“+”（阳性），表示试样中含有待测组分且其含量大于等于方法检测限。

6.1.3 阴性结果

若检测结果显示“-”（阴性），表示试样中不含待测组分或其含量低于方法检测限。

6.2 目视判定

通过对比质控线（C线）和检测线（T线）的颜色深浅进行结果判定。

6.2.1 无效

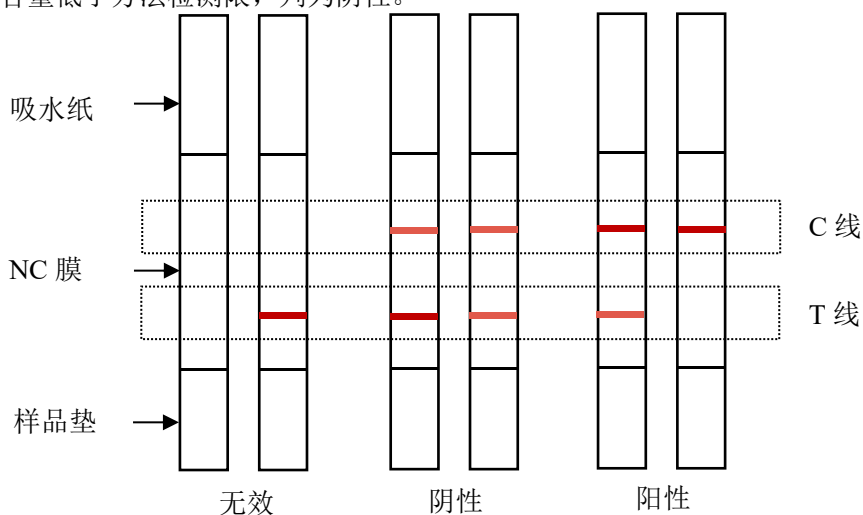
当质控线（C线）不显色时，无论检测线（T线）是否显色，均表示实验结果无效。

6.2.2 阳性结果

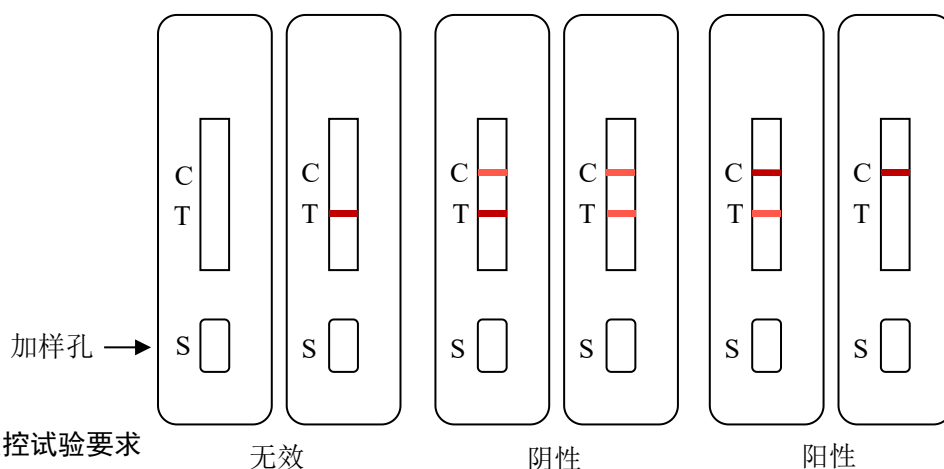
质控线（C线）显色，若检测线（T线）不出现或出现但颜色浅于质控线（C线），表示试样中含有待测组分且其含量高于方法检测限，判为阳性。

6.2.3 阴性结果

质控线（C线）显色，若检测线（T线）颜色深于或等于质控线（C线），表示试样中不含待测组分或其含量低于方法检测限，判为阴性。



A. 试纸条



6.3 质控试验要求

空白试样测定结果应为阴性，加标质控样品测定结果应为阳性。

7 结论

当检测结果为阳性时，应对结果进行确证。

8 性能指标

8.1 检测限：克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇检出限均为 0.5 μ g/kg。

8.2 灵敏度： $\geq 95\%$

8.3 特异性： $\geq 85\%$

8.4 假阴性率： $\leq 5\%$

8.5 假阳性率： $\leq 15\%$

注：性能指标计算方法见附录 A。

9 其他

本方法所述试剂、试剂盒信息、操作步骤及结果判定要求是为给方法使用者提供方便，在使用本方法时不做限定。方法使用者在使用替代试剂、试剂盒或操作步骤前，须对其进行考察，应满足本方法规定的各项性能指标。

本方法参比方法为 GB/T 22286-2008《动物源性食品中多种 β -受体激动剂残留量的测定 液相色谱串联质谱法》（包括所有的修改单）。

本方法使用克伦特罗试剂盒可能与沙丁胺醇、特布他林、西马特罗等有交叉反应，当结果判定为阳性时，应对结果进行确证。

本方法使用沙丁胺醇试剂盒可能与克伦特罗、特布他林、西马特罗等有交叉反应，当结果判定为阳性时，应对结果进行确证。

附录 A

快速检测方法性能指标计算表

表 A.1 性能指标计算方法

样品情况 ^a	检测结果 ^b		总数
	阳性	阴性	
阳性	N11	N12	N1.=N11+N12
阴性	N21	N22	N2.=N21+N22
总数	N.1=N11+N12	N.2=N21+N22	N=N1.+N2.或 N.1+N.2
显著性差异 (χ^2)	$\chi^2 = (N12 - N21 - 1)^2 / (N12 + N21),$ 自由度 (df) = 1		
灵敏度 (p+, %)	p+=N11/N1.		
特异性 (p-, %)	p-=N22/N2.		
假阴性率 (pf-, %)	pf-=N12/N1.=100-灵敏度		
假阳性率 (pf+, %)	pf+=N21/N2.=100-特异性		
相对准确度, % ^c	(N11+N22) / (N1.+N2.)		
注： ^a 由参比方法检验得到的结果或者样品中实际的公认值结果； ^b 由待确认方法检验得到的结果。灵敏度的计算使用确认后的结果。 N: 任何特定单元的结果数，第一个下标指行，第二个下标指列。例如：N11 表示第一行，第一列，N1.表示所有的第一行，N.2 表示所有的第二列；N12 表示第一行，第二列。 ^c 为方法的检测结果相对准确性的结果，与一致性分析和浓度检测趋势情况综合评价。			