

# 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 <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	277.19
2	莱克多巴胺	Ractopamine	97825-25-7	C <sub>18</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>3</sub>	301.38
3	沙丁胺醇	Salbutamol	18559-94-9	C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	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 $\mu$ 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 $\mu$ g/mL): 精密量取克伦特罗标准储备液 (100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ g/mL): 精密量取莱克多巴胺标准储备液 (100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ g/mL): 精密量取沙丁胺醇标准储备液 (100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ L，100 $\mu$ 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 $\mu$ L，加入缓冲液（3.1.14）100 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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

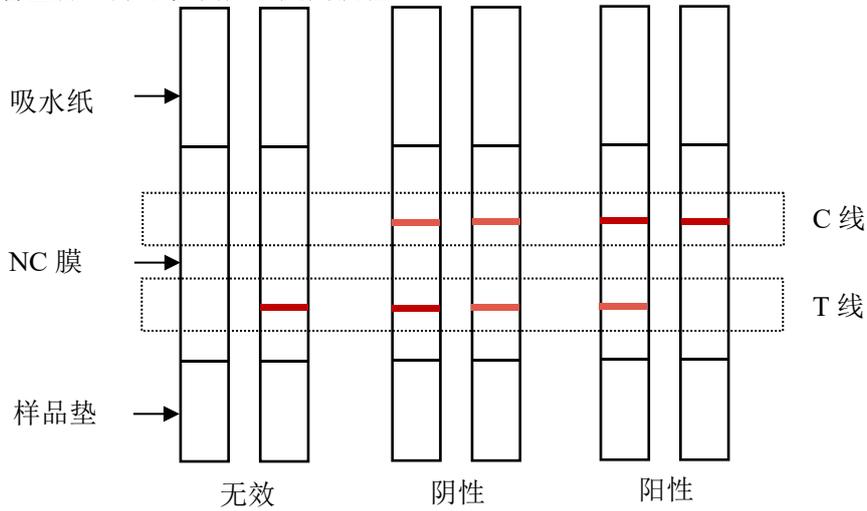
当质控线（C线）不显色时，无论检测线（T线）是否显色，均表示实验结果无效。

### 6.2.2 阳性结果

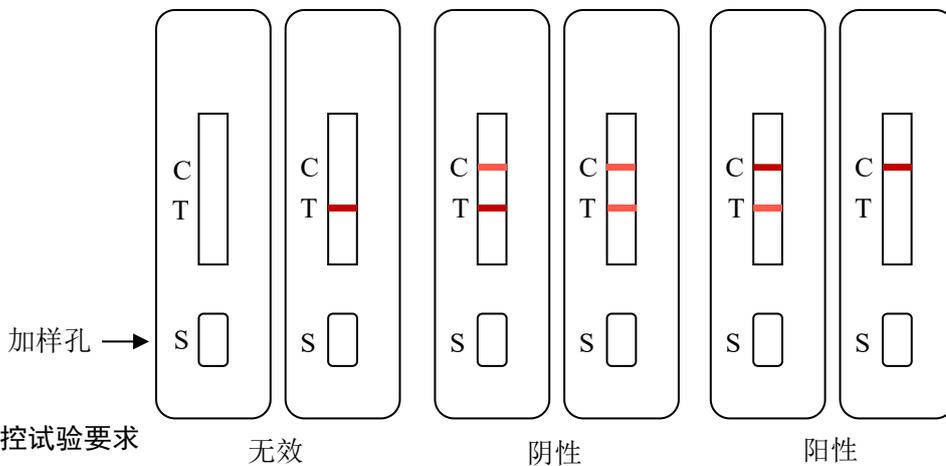
质控线（C线）显色，若检测线（T线）不出现或出现但颜色浅于质控线（C线），表示试样中含有待测组分且其含量高于方法检测限，判为阳性。

### 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 $\mu$ 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 $\beta$ -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 <sup>a</sup>	检测结果 <sup>b</sup>		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 ( $\chi^2$ )	$\chi^2 = ( N12 - N21  - 1)^2 / (N12 + N21),$ 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, % <sup>c</sup>	(N11+N22) / (N1.+N2.)		
注： <sup>a</sup> 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； <sup>b</sup> 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。 <sup>c</sup> 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。			