

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.8.05

猪尿液中 7 种 β -受体激动剂残留的一步法酶联免疫检测试剂盒的评价

蔡文金, 应永飞, 陆春波, 陈慧华, 周 炜, 林仙军, 屈 健, 陈 勇

(浙江省兽药饲料监察所, 杭州 311101)

[收稿日期] 2017-01-10 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 08-0026-04 [中图分类号] S859.83

[摘 要] 对新研发的可同时快速检测猪尿液中克伦特罗、沙丁胺醇、特布他林、马布特罗、溴布特罗、妥布特罗和西布特罗 7 种 β -受体激动剂残留的一步法酶联免疫检测试剂盒进行评价, 评价项目为检测限、灵敏度、多交叉反应率、准确度和精密度。结果表明, 研制的试剂盒各项技术指标均能满足相关要求。

[关键词] β -受体激动剂; 多交叉; 酶联免疫

Evaluation of 7 Kinds of β -agonist Residues in Swine Urine by One-step ELISA Test Kit

CAI Wen-jin, YING Yong-fei, LU Chun-bo, CHEN Hui-hua, ZHOU Wei, LIN Xian-jun, QU Jian, CHEN Yong

(Zhejiang Province Supervisory Institute of Veterinary Drug and Feed, Hangzhou 311101, China)

Abstract: The detection limit, sensitivity, multiple cross reactivity, accuracy and precision of one-step ELISA test kit were estimated, which could be used for the detections of clenbuterol, salbutamol, terbutaline, mabuterol, brombuterol, tulobuterol and cimbuterol simultaneously in swine urine. The results showed that this ELISA kit were suitable for the determinations of 7 kinds of β -agonists residues in swine urine.

Key words: β -agonist; multi crossover; enzyme-linked immunosorbent assay

β -受体激动剂是一类具有肾上腺素功能的苯乙醇胺类人工合成化合物, 在结构上均具有苯乙醇胺的母核^[1]。 β -受体激动剂作为药物添加剂促进动物生长和改善动物肉品质, 但高剂量的 β -受体激动剂类药物在体内代谢缓慢, 易在可食性动物组织中残留, 当人类大量或长期食用后会对健康造成极大的危害。临床表现为头晕、恶心、手脚震颤、心

率加快和肌肉衰弱等症状, 严重的会出现心脏骤停、昏迷甚至是死亡^[2]。最早被用于提高动物瘦肉品质的 β -受体激动剂是克伦特罗, 但是, 随着国际范围内对其的禁用和检测方法的不断进步, 莱克多巴胺和沙丁胺醇开始成为其替代品。近年来, 溴布特罗、西布特罗等开始用于促进动物的生长^[3]。浙江省地处东部沿海地区, 中小化工企业众多, 从业

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2015C32015)

作者简介: 蔡文金, 助理兽医师, 从事畜产品中药物残留和兽药检测工作。E-mail: 526667495@qq.com

人员知识更新快,新型“瘦肉精”等非法添加物生产、使用异常活跃,给农业执法和监管带来很大难度。目前检测畜产品中 β -受体激动剂的主要方法为 GC-MS 和 LC-MS/MS,但是,这两种方法前处理较繁琐,需要对样品进行酶解或衍生化、提取、净化等^[4]。酶联免疫试剂盒采用直接竞争酶联免疫法建立了同步快速检测猪尿液中克伦特罗和沙丁胺醇等 7 种 β -受体激动剂残留方法量,有效解决了检测技术难题,本实验从方法学角度对本试剂盒进行评价,以期为行业监管提供有力技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 β 兴奋剂一步法 ELISA 试剂盒,由浙江迪恩生物科技股份有限公司提供,批号分别为 33215,81206,60106;试剂盒内含包被有抗体的 96 微孔板一块,酶标物冻干粉 1 瓶,酶标物溶解液 1 瓶(13 mL),样品稀释液 10×1 瓶(20 mL),清洗液 20×1 瓶(25 mL),显色剂一瓶(13 mL),终止液一瓶(13 mL),浓度分别为 0、0.1、0.3、0.9、2.7、8.1 ng/mL 的克伦特罗对照品;沙丁胺醇对照品,德国 Dr.Ehrenstorfer 公司,含量 99%,批号 20618;妥布特罗对照品,德国 WITEGA,含量 99.7%,批号 272038;溴布特罗对照品,德国 WITEGA,含量 99.64%,批号 231717;克伦特罗对照品,德国 Dr.Ehrenstorfer 公司,含量 99.1%,批号 50224;西布特罗对照品,德国 WITEGA,含量 99.42%,批号 212332;马布特罗对照品,德国 WITEGA,含量 99.88%,批号 120805;特布他林对照品,德国 Dr.Ehrenstorfer 公司,含量 98.5%,批号 10331。Mide1680 酶标仪, Bio-Rad 公司;XS205DU 电子天平,瑞士 mettler 公司。

1.2 方法

1.2.1 试料的制备 空白试料 20 份不同来源猪尿液,经液相色谱-串联质谱法确证为不含 β -受体激动剂。用于准确度和精密度评价的阳性添加试料为取经仪器确证的空白试料,添加克伦特罗标准溶液,制成浓度为 0.7、1.4、2.8 $\mu\text{g/L}$ 的阳性添加试料,每个浓度同法配制 6 份。添加沙丁胺醇、妥布特罗、溴布特罗、克伦特罗、西布特罗、马布特罗、特布他林标准溶液,各制成浓度为 1.0 $\mu\text{g/L}$ 和

2.0 $\mu\text{g/L}$ 的阳性添加试料作为评价交叉反应率时使用。

1.2.2 试剂盒检测步骤^[5] 所有试剂与微孔板放置于控制在室温 22~25 $^{\circ}\text{C}$ 的房间内或 22~25 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱内进行充分回温,微孔板预先进行编号,标记标准品和试料的位置,进行双孔平行实验,在对应微孔板中加入 50 μL 的标准品和试料溶液,立即在所有孔中加入 100 μL 的酶标物工作液,轻轻晃动混匀,在 22~25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min,然后倒掉微孔中液体,按 250 μL /孔的清洗液洗板四次,拍干,彻底清除微孔中的残留液和气泡,立即向每个微孔中加入 100 μL 显色剂,在 22~25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下显色 10 min,再向每个微孔中加入 100 μL 终止液,混匀,在 450 nm 下 10 min 内检测吸光度值,并进行分析。

1.2.3 试剂盒相关指标检测方法

1.2.3.1 灵敏度 IC₅₀ 测定标准曲线,得到该标准曲线的 IC₅₀,IC₅₀ 用于衡量抗体灵敏度,IC₅₀ 越低说明抗体的灵敏度越高。

1.2.3.2 检测限 用 3 个批次的试剂盒测定 20 份空白试料,根据结果计算测定值的平均值和标准差,检测限为平均值加三倍标准差。

1.2.3.3 准确度和精密度 将配制好的克伦特罗阳性添加试料进行测定(0.7、1.4、2.8 $\mu\text{g/L}$),重复测定 6 次,计算猪尿中克伦特罗的平均回收率和变异系数。

1.2.3.4 交叉反应率 将配制好的 7 种 β -受体激动剂阳性添加试料进行测定,每个浓度测定 10 个平行,计算平均回收率得出交叉反应率。

2 结果与分析

2.1 测定 5 条标准曲线 灵敏度 IC₅₀ 的范围为 0.6~0.9 ng/mL。

2.2 检测限 测定 20 份空白试料,根据测得 OD 值的结果计算测定值的平均值和标准差,检测限为 0.7 $\mu\text{g/L}$ (表 1)。

2.3 准确度和精密度 在克伦特罗 0.7、1.4、2.8 $\mu\text{g/L}$ 浓度的回收率范围为 72%~110%;批间变异系数为 6.2%~12.1%;批内变异系数为 2.2%~11.9%。结果见表 2。

表 1 20 份空白试料的测定值

Tab 1 The measured value of 20 copies of blank sample

	批号		
	32215	81206	60106
测定值/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.416	0.272	0.335
	0.260	0.235	0.245
	0.402	0.410	0.403
	0.311	0.320	0.318
	0.017	0.248	0.022
	0.290	0.265	0.204
	0.311	0.344	0.424
	0.368	0.306	0.277
	0.302	0.255	0.206
	0.342	0.261	0.230
	0.396	0.380	0.338
	0.300	0.474	0.316
	0.373	0.235	0.292
	0.482	0.377	0.337
	0.411	0.430	0.397
	0.412	0.482	0.425
	0.405	0.458	0.412
	0.000	0.000	0.000
	0.000	0.000	0.000
	0.393	0.363	0.441
平均值/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.31	0.31	0.28
相对标准偏差/%	0.14	0.13	0.14
检出限/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)(平均值+3 标准差)	0.7	0.7	0.7

表 2 准确度和精密度

Tab 2 Accuracy and precision

添加浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	批号	平均回收率/%	批内变异系数/%	批间变异系数/%
0.7	32215	86.6	11.9	
	81206	96.5	8.5	9.5
	60106	96.5	10.1	
1.4	32215	94.9	4.4	
	81206	95.4	8.8	12.1
	60106	79.9	6.7	
2.8	32215	98.8	4.3	
	81206	91.8	4.0	6.2
	60106	91.5	2.2	

2.4 交叉反应率 沙丁胺醇、溴布特罗、妥布特罗、克伦特罗、西布特罗、马布特罗、特布他林在 1.0 和 2.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度时,交叉反应率结果见表 3。

表 3 7 种 β -受体激动剂的交叉反应率

Tab 3 Cross reactivity of 7 kinds of β -agonist

添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	测定物质	交叉反应率/%
1.0	沙丁胺醇	215.20
	溴布特罗	93.50
	妥布特罗	115.39
	克伦特罗	67.64
	西布特罗	58.33
	马布特罗	91.97
	特布他林	71.01
2.0	沙丁胺醇	58.19
	溴布特罗	87.55
	妥布特罗	120.80
	克伦特罗	77.45
	西布特罗	45.90
	马布特罗	86.90
	特布他林	394.85

4 讨论小结

本研究的结果表明新研发的试剂盒的灵敏度较好,尿液的检测限为 0.7 $\mu\text{g/L}$,阳性添加回收率范围为 70%~110%。试剂盒吸光度批内误差小于 12%,批间误差小于 15%,沙丁胺醇、溴布特罗、妥布特罗、克伦特罗、西布特罗、马布特罗、特布他林在 1.0和 2.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度时,交叉反应率结果在 45%~395%之间。结果均符合《农业部文件》农医发[2005]17 号附件 2 中试剂盒备案参考标准中的

规定^[6]。
研发的一步法同时测定 7 种 β -受体激动剂残留 ELISA 试剂盒,推广应用后将大大降低生产、销售企业的自检成本,提高畜产品安全检测水平,从而保障消费者的自身健康。

参考文献:

[1] 王培龙. β -受体激动剂及其检测技术研究[J]. 农产品质量与安全, 2014, (1): 44-52.
Wang P L. The research of β -agonists and dection techniques [J]. Quality and safety of agricultural products, 2014, (1): 44-52.

[2] 李丹. 瘦肉精屡禁不止的原因和对策[J]. 养殖与饲料, 2009, (9): 62-63.
Li D. The reasons and Countermeasures of repeated prohibition of Clenbuterol[J]. Breeding and feed, 2009, (9): 62-63.

[3] 彭涛, 赖卫华, 张富生, 等. 20 种 β_2 -受体激动剂的性质及检测方法研究进展[J]. 食品与机械, 2013, (3): 254-260.
Peng T, Lai W H, Zhang F S, *et al.* Research progress of properties and detection methods of 20 kinds of β_2 -agonist[J]. Food and machinery, 2013, (3): 254-260.

[4] 张浩, 艾君涛, 赵燕飞. HPLC-MS/MS 同时测定猪肉中 7 种 β -受体激动剂残留[J]. 肉类工业, 2015, (11): 42-47.
Zhang H, Ai J T, Zhao Y F. Determination of seven β -agonists residues in pork by high performance liquid chromatography-tandem mass spectromrtry[J]. Meat industry, 2015, (11): 42-47.

[5] β -兴奋剂一步法 ELISA 试剂盒使用说明书 1504 版. 浙江迪恩生物科技股份有限公司[Z].
The instructions of β -agonist residues by one-step ELISA kit, 2015, DNA[Z].

[6] 农业部农医发[2005]17 号. 试剂盒备案参考评判标准[S].
Ministry of Agriculture. No. 17 bulletin of Veterinary Bureau of Ministry of Agriculture, 2005[S].

(编辑:侯向辉)