附件6

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。

3.1.8三氮化钠。

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，三氮化钠（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。

3.1.16Tris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。

3.1.17Tris缓冲液（pH9.0，10mmol/L）：精密量取1mol/LTris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≥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、相对分子质量

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 中文名称 | 英文名称 | CAS登录号 | 分子式 | 相对分子质量 |
| 1 | 克伦特罗 | Clenbuterol | 37148-27-9 | C12H18Cl2N2O | 277.19 |
| 2 | 莱克多巴胺 | Ractopamine | 97825-25-7 | C18H23NO3 | 301.38 |
| 3 | 沙丁胺醇 | Salbutamol | 18559-94-9 | C13H21NO3 | 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100μg/mL的克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇标准储备液。-18℃保存，有效期一年。

3.3.2克伦特罗标准中间液（1μg/mL）：精密量取克伦特罗标准储备液（100μg/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1μg/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（1μg/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（1μg/mL）：精密量取莱克多巴胺标准储备液（100μg/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1μg/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（1μg/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沙丁胺醇胺标准中间液（1μg/mL）：精密量取沙丁胺醇标准储备液（100μg/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1μg/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（1μg/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≥4000r/min。

4.5移液器：10µL，100µL，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℃，湿度≤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℃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900μL，加入缓冲液（3.1.14）100μL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/LTris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0.5mL10mmol/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100μL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100μL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100μL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0.5μg/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0.5μg/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0.5μg/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。

吸水纸

NC膜

样品垫

无效

阴性

阳性

C线

T线

A．试纸条

C

T

S

C

S

T

C

T

S

C

T

S

C

T

S

C

T

S

加样孔

无效

阴性

阳性

B．检测卡

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0.5μg/kg。

8.2灵敏度：≥95%

8.3特异性：≥85%

8.4假阴性率：≤5%

8.5假阳性率：≤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（χ2） | χ2=（⏐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议值结果；  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。 | | | |

本方法负责起草单位：四川省食品药品检验检测院。

验证单位：陕西省食品药品监督检验研究院、山西省食品药品检验所。

主要起草人：余晓琴，黄璐瑶，黄瑛，张媛媛，王颖。