

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1460—2007

饲料中盐酸克仑特罗的测定 酶联免疫吸附法

Determination of clenbuterol hydrochloride in feed
—Enzyme-linked immunosorbent assay

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：国家饲料质量监督检验中心(北京)。

本标准起草人：杨曙明、高生、范理、宋荣、马东霞、苏晓鸥。

饲料中盐酸克仑特罗的测定 酶联免疫吸附法

1 范围

本标准规定了饲料中盐酸克仑特罗的酶联免疫吸附测定(ELISA)方法。
本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中盐酸克仑特罗的测定。

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

NY 438—2001 饲料中盐酸克仑特罗的测定

3 原理

利用抗原抗体特异性结合的特性和酶的高效催化作用,通过化学方法将辣根过氧化物酶(HRP)与克仑特罗(CL)偶联,形成辣根过氧化物酶标记克仑特罗。将固相载体上已包被的抗抗体(羊抗兔 IgG 抗体)与特异性的抗克仑特罗抗体结合,使抗克仑特罗抗体固相化,然后加入待测克仑特罗和辣根过氧化物酶标记克仑特罗,它们竞争性地与克仑特罗抗体结合,洗涤后加显色剂,根据显色剂的颜色变化计量待测克仑特罗量。若待测克仑特罗多,则被结合的酶标记克仑特罗少,显色剂颜色浅,反之则深。用目测法或比色法测定样品中的克仑特罗含量,比色的最佳波长为 450 nm。

4 试剂与材料

以下所用的试剂和水,除特别注明者外均为分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 中规定的三级水。

4.1 克仑特罗酶联免疫法测试盒组成。

4.1.1 包被羊抗兔 IgG 抗体的聚苯乙烯微量反应板,24 孔、48 孔或 96 孔。

4.1.2 克仑特罗抗体:多抗或单抗。多抗可以由兔或羊血清获得,效价应 $>5\,000$ (间接 ELISA 法),或有效抗体含量应 $>5\text{ mg/mL}$; $IC_{50} < 1.0$ (间接竞争 ELISA 法)。单抗由鼠腹水获得,效价应 $>5\,000$ (间接 ELISA 法),或有效抗体含量应 $>5\text{ mg/mL}$; $IC_{50} < 1.0$ (间接竞争 ELISA 法)。

4.1.3 盐酸克仑特罗的标准溶液,6 个浓度:0 ng/mL、0.1 ng/mL、0.3 ng/mL、0.9 ng/mL、2.7 ng/mL、8.1 ng/mL。

4.1.4 辣根过氧化物酶标记克仑特罗:交联比为 6~12:1,以偶联物浓溶液保存,使用前需用 4.1.5 液稀释。

4.1.5 辣根过氧化物酶标记克仑特罗稀释液:含 0.01 mol/L~0.05 mol/L pH7.5 磷酸钠缓冲液(PBS),加入 0.05%吐温-20,0.1%牛血清白蛋白。

4.1.6 洗涤缓冲液:含 0.01 mol/L~0.05 mol/L pH7.5 磷酸钠缓冲液(PBS),加入 0.05%吐温-20。

4.1.7 底物液:过氧化氢,浓度为 0.3%。

4.1.8 显色剂液:用 pH 5.0 乙酸钠—柠檬酸缓冲液配制 0.2 g/L 的四甲基联苯胺溶液。

4.1.9 终止液:2 mol/L 硫酸溶液。

4.2 甲醇。

4.3 盐酸溶液: $c(\text{HCl})=0.1 \text{ mol/L}$ 。

4.4 氢氧化钠溶液: $c(\text{NaOH})=1 \text{ mol/L}$ 。

5 仪器、设备

5.1 实验室常用仪器、设备。

5.2 分析天平,感量 0.000 1 g。

5.3 酶标仪,带有 450 nm 滤光片。

5.4 离心机,10 000 r/min。

5.5 震荡器。

5.6 超声波发生器。

5.7 微量移液器:20 μL ,50 μL ,100 μL ,200 μL 。

6 样品的制备

取具代表性的饲料样品,用四分法缩减分取 200 g 左右,粉碎过 0.45 mm(40 目)孔径的筛,充分混匀,装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 样品处理

7.1.1 称取约 1 g 样品,精确到 0.000 1 g,放入 15 mL 离心管中。

7.1.2 加入 1 mL 盐酸溶液(4.3),混匀。

7.1.3 加入 9 mL 水,混匀。

7.1.4 在超声波发生器(5.6)中超声 20 min,得到试样提取溶液,在离心机(5.4)上 2 000 r/min 离心 20 min。

7.1.5 取 0.5 mL 上清液置于 15 mL 离心管中用氢氧化钠溶液(4.4)调 pH 至 7~9;对于矿物质预混料等偏酸性样品,可用更浓的氢氧化钠溶液调 pH 至 7~9,避免中和用碱溶液体积过大。

7.1.6 加水定容至 10 mL,混匀。

7.1.7 在离心机(5.4)上 2 000 r/min 离心 20 min。

7.1.8 取 2 mL 上清液置于 10 mL 试管中,加入 3 mL 水,混匀,此溶液为待测溶液。

7.2 限量测定

7.2.1 酶联免疫反应

7.2.1.1 准备包被抗体的聚苯乙烯微量反应板。根据待测样品数量和标准样品(每个样品 2 个平行),决定微孔的使用量。将微孔(4.1.1)从冰箱中取出,放在室温($25^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$)下回温 90 min~120 min。

7.2.1.2 每个微孔中加入 100 μL 克仑特罗的抗体(4.1.2),室温下放置 15 min。

7.2.1.3 将微孔内液体垂直倒掉,加入 250 μL 洗涤缓冲液(4.1.6),轻轻晃动半分钟,垂直倒掉,再重复洗涤微孔 3 次~4 次,在滤纸上用力垂直磕掉残留在壁上的液体。

7.2.1.4 每个微孔加入 20 μL 克仑特罗标准溶液(4.1.3)或待测样品溶液(7.1.8)。

7.2.1.5 每个微孔加入 100 μL 辣根酶标记克仑特罗(4.1.4),在室温下放置 30 min。

7.2.1.6 将微孔内液体垂直倒掉,加入 250 μL 洗涤缓冲液(4.1.6),轻轻晃动半分钟,垂直倒掉,再重

复洗涤微孔 3 次~4 次,在滤纸上用力垂直磕掉残留在壁上的液体。

7.2.1.7 每个微孔加入 50 μL 底物液(4.1.7)和 50 μL 显色剂液(4.1.8),混合后室温下黑暗放置 15 min。然后,每个微孔加入 100 μL 终止液(4.1.9)。

7.2.2 结果判定

7.2.2.1 定性方法:必须在白色背景下进行。先比较阴性对照和阳性对照孔的颜色,两者颜色应有明显差异,前者深后者浅。如果待测样品的颜色与阴性对照孔接近或更深,则判定该样品不含 CL;如果待测样品比阴性对照孔浅,比限量孔深,则判定该样品疑似含有 CL,但浓度低于限量;如果待测样品比阳性对照浅,则判定该样品疑似含有 CL 且浓度高于限量;如果待测样品比阳性对照相同或接近,则判定该样品疑似含有 CL 且浓度等于限量。所有与阳性对照孔相比疑似含有克仑特罗的,均应以 NY 438—2001 中的 GC/MS 方法进行确认。

7.2.2.2 半定量方法:用酶标仪(5.3)在波长 $\lambda 450\text{ nm}$ 处用空气做参比调零点后测定标准孔及试样孔吸光度 A 值。 $A_{\text{阴性对照}}$ 与 $A_{\text{阳性对照}}$ 间差值至少大于 0.2;若 $A_{\text{待测样品}} \geq A_{\text{阴性对照}}$,则判定该样品不含 CL;若 $A_{\text{阴性对照}} > A_{\text{待测样品}} > A_{\text{阳性对照}}$,则判定该样品疑似含有 CL,但浓度低于限量;若 $A_{\text{待测样品}} < A_{\text{阳性对照}}$,则判定该样品疑似含有 CL 且浓度高于限量;若 $A_{\text{待测样品}} = A_{\text{阳性对照}}$,则判定该样品疑似含有 CL 且浓度等于限量。

7.3 定量测定

将 6 个浓度的盐酸克仑特罗的标准溶液(0 ng/mL、0.1 ng/mL、0.3 ng/mL、0.9 ng/mL、2.7 ng/mL、8.1 ng/mL)和待测溶液按限量法测定步骤测定得相应的吸光度值。以 0 浓度的吸光度 A_0 值为分母,其他标准浓度的吸光度 A 值为分子的比值,再乘以 100,获得吸光度的百分比。以此吸光度百分比为纵坐标,对应的 5 个盐酸克仑特罗标准浓度为横坐标,在半对数坐标上绘制标准曲线。该定标模型在 0.1 ng/mL~10 ng/mL 范围内是线性的。在标准曲线中获得待测溶液中盐酸克仑特罗含量。

样品中盐酸克仑特罗的含量 X ,以质量分数($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示,按式(1)计算:

$$X = rVN/m \dots\dots\dots (1)$$

式中:

r ——从标准曲线上查得的待测溶液中盐酸克仑特罗含量,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——试样提取溶液体积,单位为毫升(mL);

N ——试样稀释倍数;

m ——试样的质量,单位为克(g)。

8 重复性

对于定量分析,每个试样最少应取两份平行样进行分析,结果允许的相对偏差见表 1:

表 1

样品中盐酸克仑特罗含量	允许相对偏差
$>1\ 000\ \mu\text{g}/\text{kg}$	$<10\%$
$>10\ \mu\text{g}/\text{kg}, \leq 1\ 000\ \mu\text{g}/\text{kg}$	$<15\%$
$\leq 10\ \mu\text{g}/\text{kg}$	$<20\%$