

# 新型瘦肉精多残留胶体金检测卡的研制

罗奕铭

(广州瑞森生物科技股份有限公司, 广东广州 511400)

**摘要:** 本研究建立一种检测新型瘦肉精多残留胶体金检测卡的方法, 能对大量样品进行定量检测。应用胶体金免疫层析技术, 采用柠檬酸钠还原法, 标记新型瘦肉精多克隆抗体并喷于玻璃纤维上, 新型瘦肉精偶联 OVA 抗原和羊抗鼠 IgG 分别结合于硝酸纤维素膜上, 依次将样品垫、胶体金垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组装切割成新型瘦肉精多残留胶体金检测卡。通过灵敏度、假阳性、假阴性试验测试, 梯度浓度显色结果表明, 该检测卡的灵敏度分别为克伦特罗 3 ng/mL、莱克多巴胺 5 ng/mL、沙丁胺醇 3 ng/mL、西马特罗 5 ng/mL、班布特罗 5 ng/mL、妥布特罗 5 ng/mL、特布他林 8 ng/mL、氯丙那林 5 ng/mL、马布特罗 5 ng/mL、溴布特罗 8 ng/mL, 检测时间为 3 min, 检测滴加的最优尿液量为 70~90  $\mu$ L, 批内和批间重复性为 100%, 假阳性率和假阴性率均为 0。联检技术能实现现场快速检测, 提高检测速度和准确性、降低检测成本, 可作为生产过程监管和大批量样品的筛选。

**关键词:** 新型瘦肉精; 胶体金免疫层析; 多残留胶体金检测卡

文章编号: 1673-9078(2018)01-233-238

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.1.036

## Development of a Multi-Residue Colloidal Gold Detection Card for New Type Lean Meat Powder

LUO Yi-ming

(Guangzhou Ruisen Biotechnology Co., Ltd., Guangzhou 511400, China)

**Abstract:** A new method of multi-residue colloidal gold detection card for detecting lean meat powder was established and could be used for quantitative detection of a large number of samples. Applied, Be used Colloidal gold immunochromatography assay and sodium citrate reduction method were used to mark the new type lean meat powder antibody, which was then sprayed onto a glass fiber. The new type lean meat powder was coupled with OVA and goat anti-mouse IgG on nitrocellulose membrane, and the sample pad, colloidal gold pad, nitrocellulose membrane and absorbent paper were assembled and cut into multi-residue colloidal gold detection cards for new type lean meat powder. The gradient color results obtained by investigating sensitivity, false positive and false negative, showed that the sensitivities of the detection card were as follows: clenbuterol, 3 ng/mL, ractopamine, 5 ng/mL, salbutamol, 3 ng/mL, sima Tero, 5 ng/mL, bambuterol, 5 ng/mL, tulobuterol, 5 ng/mL, terbutaline, 8 ng/mL, clorprenaline, 5 ng/mL, mabuterol 5 ng/mL, brombuterol 8 ng/mL. The detection time was 3 min, and the optimal urine volume was 70~90 mL. In addition, the intra-and inter-reproducibility was 100%, and the false positive rate and false negative rates were both 0. The joint inspection technology, which could be used to supervise the production process and screen large quantities of samples, could realize rapid detection, improve the detection speed and accuracy and reduce the cost.

**Key words:** new type lean meat powder; colloidal gold immunochromatography; multi-residue colloidal gold detection card

进入 21 世纪以来, 食品安全问题受到越来越多人的重视, 我国多起瘦肉精中毒事件的频繁发生, 引起社会对食品安全监管的强烈不满。瘦肉精<sup>[1,2]</sup>是一类药物, 而不是一种特定的物质, 是指能够促进瘦肉生长的药物添加剂, 例如盐酸克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺、苯乙醇胺 A、溴布特罗、马布特罗、马贲特罗、塞曼特罗、齐帕特罗、妥布特罗和特布他林<sup>[3,4]</sup>

收稿日期: 2017-07-06

基金项目: 科技型中小企业技术创新资金专项项目 (2014J4200054)

作者简介: 罗奕铭 (1985-), 男, 研究生, 硕士, 研究方向: 食品质量与安全

等。瘦肉精能使猪提高生长速度, 增加瘦肉率, 猪毛色红润光亮, 收腹, 卖相好; 屠宰后, 肉色鲜红, 脂肪层极薄, 往往是皮贴着瘦肉, 瘦肉丰满。但对人体产生副作用<sup>[5]</sup>, 轻则导致心律不整, 严重一点就会导致心脏病<sup>[6]</sup>。

目前检测瘦肉精主要有方法有色谱技术和免疫分析技术等方法。色谱法包括高效液相色谱法和气质联用色谱法。高效液相色谱 (HPLC) 法的优点是检测精密度高, 假阳性率低, 但存在样品处理时间长检测过程繁琐、仪器昂贵、难于操作等缺点, 在实际应用中受到一定的限制。而气质联用法 (GC-MS) 检测前

需要对分子上的羟基、氨基等极性基团衍生化,难以作为常规方法应用,不能进行现场检测。

免疫分析检测包括放射性免疫分析技术、酶免疫分析技术和金标免疫分析技术等。放射性免疫分析技术具有特异性强、灵敏度高、准确、快速、操作简便、易于标准化等优点<sup>[7-9]</sup>。但其所用仪器昂贵,且使用的放射性同位素存在辐射和污染,其废弃物不易处理,限制了此种方法的广泛应用。酶联免疫法和金标免疫法是目前检测瘦肉精较高效的免疫分析技术,但常规的酶联免疫检测一次只能检测一种瘦肉精,所以如果要对多种瘦肉精进行检测则需要多次实验,操作繁琐费时,常规的金标免疫检测也有此缺陷,且传统的检测方法只能进行粗略的阴性与阳性判定,且判定时间相对较短,因此,我们需要一种能够同时检测多种瘦肉精的新型检测方法<sup>[10,11]</sup>。

本研究建立一种快速、有效、高灵敏度的新型瘦肉精多残留胶体金检测卡<sup>[12]</sup>,试验根据胶体金免疫层析原理,实现特异性免疫检测。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与设备

主要试剂和仪器:牛血清白蛋白(BSA)(天津正将高科公司);聚乙二醇(PEG)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)(北京鼎国生物);柠檬酸三钠、碳酸氢钠、碳酸钾、碳酸钠、叠氮钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、吐温-20、盐酸(广州化学试剂厂);氯金酸(上海国药);羊抗鼠抗体(武汉博士德);新型瘦肉精多克隆抗体、瘦肉精-BSA(瑞森生物);硝酸纤维素膜(Sartorius);聚酯膜、玻璃纤维(Pall);吸水纸、磁白板(上海金标);塑料卡、铝箔袋(广州)。

三维划膜喷金仪 HM3030、金标试纸分切机 WM-100(上海金标);连续点膜机 R5DD-2(韩感);磁力搅拌器(国产)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 胶体金溶液的制备

量取 40 mL 纯水于洁净的圆底烧杯,用磁力搅拌器加入至沸腾,加入 0.04 mL 10%氯金酸溶液沸腾 5 min 后加入 0.096 mL 10%柠檬酸三钠溶液,保持沸腾 10 min。待溶液温度降至室温后装入棕色密封容量瓶中,避光保存。

#### 1.2.2 金标记新型瘦肉精多克隆抗体的制备

量取 20 mL 胶体金溶液,倒入洁净离心管内,用

0.1 M 碳酸钾溶液和 0.1 M 盐酸溶液调胶体金溶液 pH 值至 8.2。再称取 0.186 mg 的新型瘦肉精多克隆抗体加入到胶体金溶液内,振荡混匀,室温放置 20 min 后加入 0.02 mL 10% BSA 溶液,振荡混匀,室温放置 20 min 后,把金标记的抗体溶液分装到离心管内,11000 r/min 离心 15 min。吸取上清液。再加入 10 mL 0.1 M 磷酸盐缓冲液将沉淀混匀,于 11000 r/min 离心 15 min,吸取上清液后加入 4 mL 金标缓冲液将沉淀混匀,得到金标记新型瘦肉精多克隆抗体溶液。

#### 1.2.3 金标抗体结合垫的制备

量取 0.42 mL 金标新型瘦肉精多克隆抗体溶液倒入洁净小离心管内。设定喷金仪主机程序:喷金浓度为 20  $\mu\text{L}/\text{cm}$ ,平台移动速度为 132 mm/s,再将玻璃纤维膜放置于喷金仪平台,按设定程序将金标抗体均匀喷洒于玻璃纤维膜上。将喷好的金标抗体结合垫放置于真空干燥箱内室温抽干 6 h 后,再放于有干燥剂的自封袋中保存备用。

#### 1.2.4 划膜

称取 0.332 mg 瘦肉精-BSA 原液于洁净离心管内,加入划膜缓冲液稀释至终浓度为 1 mg/mL,称取 1.79 mg 羊抗鼠二抗溶液于另一离心管内,加入划膜缓冲液稀释终浓度为 2 mg/mL。将硝酸纤维素膜放置于划膜仪平台,两端用压条固定,设定划膜仪主机程序:划膜浓度为 2  $\mu\text{L}/\text{cm}$ ,平台移动速度为 128 mm/s。按设定程序将瘦肉精-BSA 按一定比例混合后和二抗划于硝酸纤维素膜上后置于真空干燥箱内室温抽干 6 h,干燥后封袋保存备用。使瘦肉精-BSA 所划线标记为检测线 T,羊抗鼠二抗所划线标记为质控线 C。

#### 1.2.5 胶体金免疫层析新型瘦肉精多残留胶体金检测卡组

将样品垫、胶体金垫、已包被好抗原抗体的 NC 膜、吸水纸依次粘贴到 PVC 底板上,切割成条,装卡封口密封,置于干燥器中常温保存备用。

#### 1.2.6 样品制备

##### 1.2.6.1 阴性样品的制备

经 GC-MS 法(农业部 1031 号公告-3-2008 中的“猪肝和猪尿中  $\beta$ -受体激动剂残留检测-气相色谱-质谱法”)检测克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、西马特罗、班布特罗、妥布特罗、特布他林、氯丙那林、马布特罗、溴布特罗阴性的 80 份尿液。

##### 1.2.6.2 克伦特罗

(莱克多巴胺、沙丁胺醇、西马特罗、班布特罗、妥布特罗、特布他林、氯丙那林、马布特罗、溴布特罗)添加阳性样品的制备。见表 1。

表1 标准品配制

Table 1 Preparation of Standards

序号	样品名称	配置浓度/( $\mu\text{g/L}$ )	配置方法
1	克伦特罗	1、3、5	克伦特罗工作液 10、30、50 $\mu\text{L}$ 于 990、970、950 $\mu\text{L}$ 阴性猪尿中混匀
2	莱克多巴胺	3、5、8	莱克多巴胺工作液 30、50、80 $\mu\text{L}$ 于 970、950、920 $\mu\text{L}$ 阴性猪尿中混匀
3	沙丁胺醇	1、3、5	沙丁胺醇工作液 10、30、50 $\mu\text{L}$ 于 990、970、950 $\mu\text{L}$ 阴性猪尿中混匀
4	西马特罗	3、5、8	西马特罗工作液 30、50、80 $\mu\text{L}$ 于 970、950、920 $\mu\text{L}$ 阴性猪尿中混匀
5	班布特罗	3、5、8	班布特罗工作液 30、50、80 $\mu\text{L}$ 于 970、950、920 $\mu\text{L}$ 阴性猪尿中混匀
6	妥布特罗	3、5、8	妥布特罗工作液 30、50、80 $\mu\text{L}$ 于 970、950、920 $\mu\text{L}$ 阴性猪尿中混匀
7	特布他林	5、8、10	特布他林工作液 50、80、100 $\mu\text{L}$ 于 950、920、900 $\mu\text{L}$ 阴性猪尿中混匀
8	氯丙那林	3、5、8	氯丙那林工作液 30、50、80 $\mu\text{L}$ 于 970、950、920 $\mu\text{L}$ 阴性猪尿中混匀
9	马布特罗	3、5、8	马布特罗工作液 30、50、80 $\mu\text{L}$ 于 970、950、920 $\mu\text{L}$ 阴性猪尿中混匀
10	溴布特罗	5、8、10	溴布特罗工作液 50、80、100 $\mu\text{L}$ 于 950、920、900 $\mu\text{L}$ 阴性猪尿中混匀

1.2.6.3 实测阳性样品的准备

10 份经 GC-MS 检测克伦特罗为阳性的实际猪尿样品 (浓度均大于 3  $\mu\text{g/L}$ )。10 份经 GC-MS 检测莱克多巴胺为阳性的实际猪尿样品 (浓度均大于 5  $\mu\text{g/L}$ )。10 份经 GC-MS 检测沙丁胺醇为阳性的实际猪尿样品 (浓度均大于 3  $\mu\text{g/L}$ )。10 份经 GC-MS 检测西马特罗为阳性的实际猪尿样品 (浓度均大于 5  $\mu\text{g/L}$ )。10 份经 GC-MS 检测班布特罗为阳性的实际猪尿样品 (浓

度均大于 5  $\mu\text{g/L}$ )。10 份经 GC-MS 检测妥布特罗为阳性的实际猪尿样品 (浓度均大于 5  $\mu\text{g/L}$ )。10 份经 GC-MS 检测特布他林为阳性的实际猪尿样品 (浓度均大于 8  $\mu\text{g/L}$ )。10 份经 GC-MS 检测氯丙那林为阳性的实际猪尿样品 (浓度均大于 5  $\mu\text{g/L}$ )。10 份经 GC-MS 检测马布特罗为阳性的实际猪尿样品 (浓度均大于 3  $\mu\text{g/L}$ )。10 份经 GC-MS 检测溴布特罗为阳性的实际猪尿样品 (浓度均大于 8  $\mu\text{g/L}$ )。见表 2。

表2 实际猪尿样品

Table 2 Practical urine sample of pig

项目	GC-MS 测定/( $\mu\text{g/L}$ )									
克伦特罗 (Clenbuterol, CLEN)	4.9	5.2	4.3	4.2	5	4.9	4.1	4.2	4.9	5.1
莱克多巴胺 (Ractopamine, RAC)	7.9	9.2	8.3	8.2	9	8.9	8.1	8.2	8.9	9.1
沙丁胺醇 (Salbutamol, SAL)	4.1	4.2	4.6	4.7	4.3	4.7	5.1	5.2	4.6	4.1
西马特罗 (Sima Tero, SIT)	6.9	8.2	7.6	8.2	8.9	6.9	8.1	7.6	8.5	9.0
班布特罗 (Bambuterol, BUT)	6.8	8.3	7.8	9.2	7.9	7.9	9.1	8.3	8.2	8.8
妥布特罗 (Tulobuterol, BBT)	7.2	7.2	8.6	8.4	7.9	8.9	9.1	8.2	7.5	9.1
特布他林 (Terbutaline, TER)	10.9	11.2	9.3	10.2	9.8	10.9	11.1	9.2	9.9	11.1
氯丙那林 (Clorprenaline, CLOR)	8.5	8.4	8.7	7.7	8.3	8.5	7.4	8.9	8.9	7.9
马布特罗 (Mabuterol, MAT)	8.0	9.2	8.7	7.9	6.7	8.3	9.5	8.3	8.5	8.8
溴布特罗 (Brombuterol, BUB)	9.8	10.4	10.8	10.7	9.9	9.9	11.3	11.2	10.7	10.4

1.2.7 灵敏度

取 3 批次新型瘦肉精多残留胶体金检测卡分别检测添加克伦特罗/沙丁胺醇浓度为 0  $\mu\text{g/L}$ 、1  $\mu\text{g/L}$ 、3  $\mu\text{g/L}$  和 5  $\mu\text{g/L}$  的猪尿样; 添加莱克多巴胺/西马特罗/班布特罗/妥布特罗/氯丙那林/马布特罗浓度为 0  $\mu\text{g/L}$ 、3  $\mu\text{g/L}$ 、5  $\mu\text{g/L}$  和 8  $\mu\text{g/L}$  的猪尿样; 添加特布他林/溴布特罗为 0  $\mu\text{g/L}$ 、5  $\mu\text{g/L}$ 、8  $\mu\text{g/L}$  和 10  $\mu\text{g/L}$  的猪尿样各 10 份。室温条件下操作, 肉眼观测进行判定。

1.2.8 假阳性率试验

新型瘦肉精多残留胶体金检测卡对 80 份经 GC-MS 检测为阴性的猪尿进行检测, 并分别以含克伦

特罗/沙丁胺醇为 0 和 3  $\mu\text{g/L}$  的猪尿; 特布他林/溴布特罗为 0 和 8  $\mu\text{g/L}$  的猪尿; 莱克多巴胺/西马特罗/班布特罗/妥布特罗/氯丙那林/马布特罗为 0 和 5  $\mu\text{g/L}$  的猪尿为阴性对照和阳性对照, 计算假阳性率。

1.2.9 假阴性率试验

新型瘦肉精多残留胶体金检测卡对 40 份阳性猪尿 (10 份为 3  $\mu\text{g/L}$  克伦特罗/沙丁胺醇阳性添加样品, 10 份为 8  $\mu\text{g/L}$  特布他林/溴布特罗阳性添加样品, 10 份为 5  $\mu\text{g/L}$  莱克多巴胺/西马特罗/班布特罗/妥布特罗/氯丙那林/马布特罗阳性添加样品, 10 份为浓度均大于 3  $\mu\text{g/L}$  实测克伦特罗/沙丁胺醇阳性样品, 10 份为

浓度均大于 8 μg/L 实测特布他林/溴布特罗阳性样品, 10 份为浓度均大于 5 μg/L 实测莱克多巴胺/西马特罗/班布特罗/妥布特罗/氯丙那林/马布特罗阳性样品) 进行检测, 并分别以含克伦特罗/沙丁胺醇 0 和 3 μg/L 尿样; 特布他林/溴布特罗 0 和 8 μg/L 尿样; 莱克多巴胺/西马特罗/班布特罗/妥布特罗/氯丙那林/马布特罗 0 和 5 μg/L 尿样为阴性对照和阳性对照, 计算假阴性率。  
1.2.10 新型瘦肉精多残留胶体金检测卡的批内和批间重复

将同批和不同批次的新型瘦肉精多残留胶体金检测卡分别检测上述阴性样品、阳性样品、实测阳性样品, 每个浓度重复 10 次, 观察其重复性。

## 2 结果与讨论

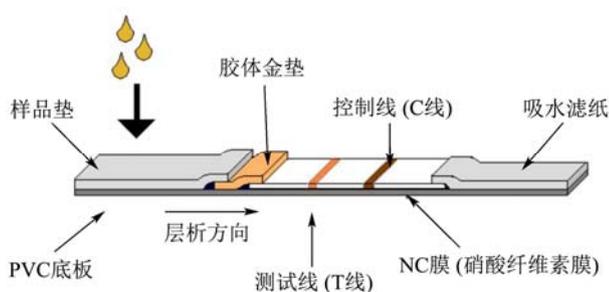


图 1 试纸条结构示意图

Fig.1 Structure diagram of colloidal gold strip

胶体金免疫试纸条的作用原理主要有双抗夹心和竞争结合两种。本试验研制的新型瘦肉精多残留胶体金检测卡采用了竞争原理, 如图 1 所示拆开卡壳的试纸条, 底板为 PVC 底板 (双面胶白色塑料板), 从加样处开始分别为样品吸收垫、胶体金垫(玻璃纤维)、硝酸纤维素膜 (NC 膜)和吸水垫。胶体金垫上喷涂胶体金标记的新型瘦肉精多克隆抗体, NC 膜上分别喷涂偶联新型瘦肉精-BSA (检测线 T) 和羊抗鼠 IgG (质控线 C)。该法检测线 T 出现红色条带, 结果显示为新型瘦肉精阴性; 检测线无条带, 结果显示为新型瘦肉精阳性。这是因为当被检物质溶液中不含新型瘦肉精时, 玻璃纤维上释放的胶体金标记新型瘦肉精多克隆抗体便会被检测线处的偶联抗原新型瘦肉精-BSA 物质识别并结合, 因而被截留在该处, 当累积到一定程度便出现红色线, 但弱阳性时会出现反应强度减弱的检测线; 当被检物质溶液中新型瘦肉精的浓度达到一定时, 新型瘦肉精与胶体金标记的全部多抗体的反应位点结合, 这样当免疫胶体金到达检测线时不能再与偶联抗原发生反应, 因而不出现红色线。无论被检测物质中有无新型瘦肉精, 胶体金标记的新型瘦肉精多克隆抗体都会与喷涂在 NC 膜上的羊抗鼠 IgG 发生

免疫反应, 即在质控区出现红色线。

### 2.1 灵敏度与滴尿量



图 2 梯度浓度显色结果

Fig.2 the results of color gradient concentration

试验结果如图 2 所示, 三个批号各梯度浓度的检测卡在 3 min 内结果呈梯度变化, CLEN 3 μg/L、RAC 5 μg/L、SAL 3 μg/L、SiT 5 μg/L、BUT 5 μg/L、BBT 5 μg/L、TER 8 μg/L、CLOR 5 μg/L、MAT 5 μg/L、BUB

8 μg/L 的添加样品质控带显色, 检测带无明显显色; CLEN 5 μg/L、RAC 8 μg/L、SAL 5 μg/L、SiT 8 μg/L、BUT 8 μg/L、BBT 8 μg/L、TER 10 μg/L、CLOR 8 μg/L、MAT 8 μg/L、BUB 10 μg/L 的添加样品质控带显色, 检测带无显色; 0 μg/L, 样品质控带和检测带均显色。表明胶体金免疫层析试验具有良好的敏感性和特异性, 故该胶体金检测试纸卡的检测限可定为 CLEN 3 μg/L、RAC 5 μg/L、SAL 3 μg/L、SiT 5 μg/L、BUT 5 μg/L、BBT 5 μg/L、TER 8 μg/L、CLOR 5 μg/L、MAT 5 μg/L、BUB 8 μg/L。滴尿量约为 70~90 μg/L, 对判读效果无大影响, 但发现滴尿量超过 200 μg/L 以上, 胶体金检测卡会出现死金现象、或者层析垫因浸泡太多液体而出现假阳性, 通过图示可知, 三个批次的稳定性及色度辨析达到判读要求, 可以实现现场快速检

测, 对监管检测工作提供便捷的检测利器。

### 2.2 假阳性率试验

一般检测猪尿出现假阳性现象主要由以下因素导致: 喂养的兽药会产生干扰性物质, 饲料中金属离子浓度过高, 过夜未保存好的猪尿影响检测结果, 尿液含有特殊的、或者其他新型瘦肉精导致交叉反应等。现对 80 份经 GC-MS 法检测为阴性的猪尿进行检测, 以该方法检测限 CLEN 3 μg/L、RAC 5 μg/L、SAL 3 μg/L、SiT 5 μg/L、BUT 5 μg/L、BBT 5 μg/L、TER 8 μg/L、CLOR 5 μg/L、MAT 5 μg/L、BUB 8 μg/L 为判定限进行判断, 80 份尿样均为阴性, 该 80 份样品的假阳性率为 0。见表 3。

表 3 猪尿阴性样本检测结果

Table 3 Results of negative samples of pig urine

样品	测定结果 (80 份样品)										
阴性空白猪尿	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性

### 2.3 假阴性率试验

新型瘦肉精多残留胶体金检测卡对 160 份阳性猪尿进行检测, 以该方法检测限 CLEN 3 μg/L、RAC 5

μg/L、SAL 3 μg/L、SiT 5 μg/L、BUT 5 μg/L、BBT 5 μg/L、TER 8 μg/L、CLOR 5 μg/L、MAT 5 μg/L、BUB 8 μg/L 为判定限进行判断, 160 份尿样均为阳性, 该 160 份样品的假阴性率为 0。见表 4。

表 4 猪尿阳性样本检测结果

Table 4 Results of positive samples of pig urine

样品	方法	测定结果									
CLEN 阳性添加样品	检测卡 (10 份)	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
	添加浓度/(μg/L)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
实测 CLEN 阳性样品	GC-MS 测定/(μg/L)	4.9	5.2	4.3	4.2	5	4.9	4.1	4.2	4.9	5.1
	检测卡 (10 份)	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
RAC 阳性添加样品	添加浓度/(μg/L)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	GC-MS 测定/(μg/L)	7.9	9.2	8.3	8.2	9	8.9	8.1	8.2	8.9	9.1
SAL 阳性样品	检测卡 (10 份)	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
	添加浓度/(μg/L)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
实测 SAL 阳性样品	GC-MS 测定/(μg/L)	4.1	4.2	4.6	4.7	4.3	4.7	5.1	5.2	4.6	4.1
	检测卡 (10 份)	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
SIT 阳性样品	添加浓度/(μg/L)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	GC-MS 测定/(μg/L)	6.9	8.2	7.6	8.2	8.9	6.9	8.1	7.6	8.5	9.0

转下页

接上页

BUT 阳性样品	检测卡 (10 份)	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
	添加浓度/( $\mu\text{g/L}$ )	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
实测 BUT 阳性样品	GC-MS 测定/( $\mu\text{g/L}$ )	6.8	8.3	7.8	9.2	7.9	7.9	9.1	8.3	8.2	8.8
BBT 阳性样品	检测卡 (10 份)	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
	添加浓度/( $\mu\text{g/L}$ )	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
实测 BBT 阳性样品	GC-MS 测定/( $\mu\text{g/L}$ )	7.2	7.2	8.6	8.4	7.9	8.9	9.1	8.2	7.5	9.1
TER 阳性样品	检测卡 (10 份)	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
	添加浓度/( $\mu\text{g/L}$ )	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
实测 TER 阳性样品	GC-MS 测定/( $\mu\text{g/L}$ )	10.9	11.2	9.3	10.2	9.8	10.9	11.1	9.2	9.9	11.1
CLOR 阳性样品	检测卡 (10 份)	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
	添加浓度/( $\mu\text{g/L}$ )	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
实测 CLOR 阳性样品	GC-MS 测定/( $\mu\text{g/L}$ )	8.5	8.4	8.7	7.7	8.3	8.5	7.4	8.9	8.9	7.9
MAT 阳性样品	检测卡 (10 份)	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
	添加浓度/( $\mu\text{g/L}$ )	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
实测 MAT 阳性样品	GC-MS 测定/( $\mu\text{g/L}$ )	8.0	9.2	8.7	7.9	6.7	8.3	9.5	8.3	8.5	8.8
BUB 阳性样品	检测卡 (10 份)	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
	添加浓度/( $\mu\text{g/L}$ )	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
实测 BUB 阳性样品	GC-MS 测定/( $\mu\text{g/L}$ )	9.8	10.4	10.8	10.7	9.9	9.9	11.3	11.2	10.7	10.4

### 3 总结

本文研究成功建立检测新型瘦肉精多残留胶体金检测卡的方法,通过大量样本的测试,梯度浓度显色结果表明:新型瘦肉精多残留胶体金检测卡的灵敏度分别为 CLEN  $3\ \mu\text{g/L}$ 、RAC  $5\ \mu\text{g/L}$ 、SAL  $3\ \mu\text{g/L}$ 、SIT  $5\ \mu\text{g/L}$ 、BUT  $5\ \mu\text{g/L}$ 、BBT  $5\ \mu\text{g/L}$ 、TER  $8\ \mu\text{g/L}$ 、CLOR  $5\ \mu\text{g/L}$ 、MAT  $5\ \mu\text{g/L}$ 、BUB  $8\ \mu\text{g/L}$ ,浓度梯度性可以有效确认样本的半定量结果,其检测最快观察时间为 3 min,若想显色更加稳定,可以在 5 min 后进行判读,本研究没有体系化的测试检测卡的保质期,没法确保产品在长期保存时间下的稳定性,后续应进行保质期稳定性测试,通过大批实际样品及加标样品的测试,批内和批间重复性为 100%,假阳性率和假阴性率均为 0,达到预期的测试效果,同时,测通过测试,检测滴加的最优尿液量为  $70\sim 90\ \mu\text{L}$ 。该方法应用胶体金免疫层析技术,实现一个样本可同时检测 8 种类似的激素,大大降低了检测时间和检测成本,比单检技术更有优势,这方法既简捷又可靠,是一种值得推广的定性筛选方法,可作为液相色谱等仪器法的补充,通过与孙晓亮<sup>[12]</sup>针对猪尿中 30 种不同瘦肉精的药物残留进行比对,虽没达到全面覆盖所有的新型瘦肉精,但适合现场检测,本方法属于快速检测法,是猪尿初筛的便捷途径,能有广泛应用于全国基础检测,减少资源的浪费,同时,也作为新型瘦肉精快速检测的利器,在我国家禽生产场、动物性食品加工厂、国家和

地方的检验/监督部门、食品卫生与安全检验/监察部门等行业领域推广应用,将为我国农药/兽药残留检测和监控计划提供技术支撑,促进我国农业全面发展,提升食品安全和质量等级、提高市场竞争力和增加进出口贸易。

### 参考文献

- [1] Zhang G, Guo J, Wang X. Immunochromatographic lateral flow strip tests [J]. *Methods Mol. Biol.*, 2009, 504: 169-183
- [2] Harkins J D, Woods W E, Lehner A F, et al. Clenbuterol in the horse: urinary concentrations determined by ELISA and GC/MS after clinical doses [J]. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 2001, 24(1): 7-14
- [3] 农业部.猪尿液中克伦特罗检测方法-酶联免疫吸附测定法 [J].*中国兽药杂志*,2002,36(12):12-13  
Ministry of agriculture. Methods for the detection of clenbuterol in swine urine -an enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2002, 36(12): 12-13
- [4] Du W, Zhao G, Fu Q, et al. Combined microextraction by packed sorbent and high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection for rapid analysis of ractopamine in porcine muscle and urine samples [J]. *Food Chem.*, 2014, 145: 789-795 (下转第 133 页)
- [5] Shiu T C, Chong Y H. A cluster of clenbuterol poisoning associated with the pork and pig ofal in Hong Kong [J].

- Public Health Epidemiol Bull (Hong Kong), 2001, 10: 14-17
- [6] 黄克群,马艳玲,李冬雪,等.关于“瘦肉精”介绍及监管措施[J].中国动物检疫,2011,28(9):21-22  
HUANG Ke-qun, MA Yan-ling, LI Dong-xue, et al. About the introduction and regulatory measures of lean meat [J]. China Animal Quarantine, 2011, 28(9): 21-22
- [7] 黄小洁,朱永仁.盐酸克伦特罗检测方法的比较和应用[J].现代农业科技 2011,15:37  
HUANG Xiao-jie, ZHU Yong-ren. Comparison and application of detection methods for clenbuterol hydrochloride [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2011, 15: 37
- [8] Chai J, Xu Q, Dai J, et al. Investigation on potential enzymotoxicity of clenbuterol to trypsin [J]. Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc., 2013, 105: 200-206
- [9] Grimmer N M, Gimbar R P, Bursua A, et al. Rhabdomyolysis secondary to clenbuterol use and exercise [J]. J Emerg. Med., 2016, 50(2): 71-74
- [10] National Committee for Clinical Laboratory Standards Performance standards for antimicrobial susceptibility testing Ninth informational supplement 100-S9 [S] Wayne: NCCLS, 1999: 32-75
- [11] 张改平,王选年,肖肖.瘦肉精的毒害作用及其试纸快速检测技术[J].中国动物检疫,2011,28(5):1-6  
ZHANG Gai-ping, WANG Xuan-nian, XIAO Xiao. Rapid detection technology [J]. Chinese Animal Quarantine and Toxicity Test Clenbuterol, 2011, 28(5): 1-6
- [12] 孙晓亮,李雪莲,曹旭敏.超高效液相色谱-串联质谱法快速测定猪尿液中30种不同种类“瘦肉精”药物残留[J].分析化学,2017,45:124-132  
SUN Xiao-liang, LI Xue-lian, CAO Xu-min. Rapid determination of 30 different kinds of clenbuterol residues in pig urine by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2017, 45: 124-132