

克仑特罗酶联免疫试剂盒的比较评价

王鹤佳,刘智宏,金银珍,汪霞,徐士新

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2012-12-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 06-0050-03 [中图分类号] S859.83

[摘要] 考察了市售 18 个厂家生产的克仑特罗酶联免疫试剂盒,对其用于猪尿中克仑特罗残留检测的可操作性、灵敏度、准确度、精密度等参数进行比较,试验表明目前市售的部分克仑特罗酶联免疫试剂盒可用于猪尿中克仑特罗残留的筛选监测,检测限为 1 $\mu\text{g/L}$ 。

[关键词] 克仑特罗;残留;猪尿;酶联免疫试剂盒

Comparative Evaluation of Commercial ELISA Kits for Clenbuterol

WANG He-jia, LIU Zhi-hong, JIN Yin-zhen, WANG Xia, XU Shi-xin

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: This article presents the comparative results of 18 commercial ELISA kits for clenbuterol in operabilities, sensitivity, recoveries and precisions. The results show that parts of the commercial ELISA test kits can be used for clenbuterol residues detection in swine urine as screening method. The limits of detection are 1 $\mu\text{g/L}$.

Key words: clenbuterol; residue; swine urine; ELISA kit

克仑特罗 (Clenbuterol) 是一种 β -受体激动剂,在临床上用于防治支气管哮喘以及哮喘型慢性支气管炎、肺气肿等疾病^[1]。由于其能显著降低胴体脂肪含量,提高瘦肉率,曾在畜牧业上作为促生长剂而广泛使用。克仑特罗具有较大毒性,人们食用克仑特罗高残留的动物性食品后,可导致心悸、头痛、恶心、呕吐、血管扩张和肌肉震颤等中毒症状。农业部 176 号公告规定,禁止在饲料和动物饮用水中使用克仑特罗^[2]。农业部 193 号公告规定克仑特罗禁用于所有食品动物的所有用途^[3]。农业部 235 号公告规定,禁止使用克仑特罗及其盐、酯,且在动物性食品中不得检出^[4]。

目前检测动物性食品中克仑特罗残留的确诊方法主要为液相色谱-质谱联用法和气相色谱-质谱联用法。但由于需要昂贵的仪器设备,且前处

理步骤复杂,成本较高,不利于基层单位的日常监测和大规模筛查。而酶联免疫 (ELISA) 试剂盒可经济、快速地检测动物性食品中的克仑特罗。实验比较了市售 18 个厂家的试剂盒,用于猪尿中克仑特罗残留检测时,在可操作性、灵敏度、准确度、精密度等参数^[5,6]上的差异,为了解国内市场上克仑特罗酶联免疫试剂盒的现状提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 不同来源猪尿样品 20 份,采自陕西省和宁夏回族自治区屠宰场。市售 18 个厂家的克仑特罗 ELISA 试剂盒,每个厂家选择一个批次的产品 (产品代号为 A-R)。盐酸克仑特罗标准品,纯度 98.5%,Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司。

1.2 仪器 高速冷冻离心机,型号 Ttettich;酶标仪,型号 Sunrise。

1.3 方法

1.3.1 试料的制备 空白试料 20 份不同来源猪尿样品经液相色谱-串联质谱法^[7]确证为不含 β -受体激动剂的空白试料。

阳性添加试料 取经仪器方法确证的空白试料, 添加克仑特罗标准溶液, 制成浓度为 $1 \mu\text{g/L}$ 的阳性添加试料。按上述方法配制 6 个样品。

1.3.2 检测方法 样品前处理方法 将空白试料和阳性添加试料分别于 5000 r/min 离心 5 min , 取上清液备用, 按照试剂盒各自说明书要求对样品进行稀释后测定或直接测定。

试剂盒操作步骤 按照试剂盒各自说明书进行操作。

1.3.3 灵敏度 IC_{50} 测定标准曲线, 得到该标准曲线的 IC_{50} 。 IC_{50} 为 50% 抑制浓度即 $B/B_0 = 50\%$ 时所对应的浓度, 用于衡量抗体灵敏度, IC_{50} 越低说明抗体的灵敏度越高。

检测限 测定 20 份空白试料, 计算测定值的平均值和标准差。猪尿中克仑特罗的检测限为平均值加 3 倍标准差^[8]。

1.3.4 准确度和精密度 取 6 个阳性添加试料进行测定, 计算猪尿中克仑特罗的平均回收率和变异系数^[8]。阳性添加回收率 = 实测浓度 / 添加浓度 $\times 100\%$ 。

2 结果

2.1 试剂盒可操作性 18 个试剂盒中, 15 个产品都采用一步法, 操作时间均在 1 h 左右, 基本不需要样品前处理步骤, 可直接用于测定。结果见表 1。

表 1 操作步骤比较结果

序号	反应原理	样品处理	操作步骤	操作时间	其他要求
A	二步法	无需处理	7	约 90 min	酶结合物、抗体、洗液均需稀释
B	一步法	需稀释	5	约 90 min	酶结合物、洗液均需稀释
C	一步法	无需处理	5	约 70 min	洗液需稀释
D	二步法	无需处理	7	约 90 min	酶结合物、抗体、洗液均需稀释
E	一步法	无需处理	6	约 70 min	洗液需稀释
F	一步法	无需处理	6	约 70 min	洗液需稀释
G	一步法	无需处理	6	约 75 min	洗液需稀释
H	一步法	无需处理	5	约 65 min	酶结合物、洗液需稀释
I	一步法	无需处理	5	约 75 min	酶结合物、洗液需稀释

续表

序号	反应原理	样品处理	操作步骤	操作时间	其他要求
J	一步法	无需处理	5	约 40 min	酶结合物、洗液需稀释
K	一步法	无需处理	5	约 60 min	洗液需稀释
L	一步法	无需处理	5	约 50 min	酶结合物需稀释
M	一步法	无需处理	6	约 60 min	洗液需稀释
N	一步法	无需处理	5	约 60 min	洗液需稀释
O	一步法	无需处理	7	约 60 min	洗液需稀释
P	二步法	无需处理	5	约 90 min	洗液需稀释
Q	一步法	无需处理	5	约 45 min	洗液需稀释
R	一步法	无需处理	6	约 60 min	洗液需稀释

2.2 灵敏度 18 个试剂盒的猪尿中克仑特罗检测限范围为 $0.26 \mu\text{g/L} \sim 2.3 \mu\text{g/L}$, IC_{50} 浓度范围为 $0.25 \mu\text{g/L} \sim 2.1 \mu\text{g/L}$, 标准曲线浓度范围为 $0 \sim 25 \mu\text{g/L}$ 。结果见表 2。

表 2 试剂盒灵敏度及标准曲线范围 ($\mu\text{g/L}$)

试剂盒代号	检测限	IC_{50}	标准曲线浓度范围
A	1.1	2.1	0, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1, 25
B	2.3	0.25	0, 0.1, 0.25, 0.65, 1.6, 4
C	0.26	1.1	0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1
D	0.55	0.30	0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1
E	1.0	0.44	0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1
F	0.98	0.45	0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1
G	1.4	0.62	0, 0.1, 0.4, 1.2, 4
H	0.99	0.56	0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1
I	0.32	0.27	0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1
J	0.67	0.54	0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1
K	0.80	0.91	0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1
L	0.32	0.36	0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1
M	1.4	1.8	0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1
N	0.54	0.39	0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1
O	0.49	0.28	0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1
P	2.0	0.49	0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1
Q	0.53	0.69	0, 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1
R	2.0	0.33	0, 0.05, 0.15, 0.45, 1.35, 4.05

2.3 准确度和精密度 18 个试剂盒的猪尿中克仑特罗 $1 \mu\text{g/L}$ 浓度添加回收率范围为 $61.0\% \sim 378\%$, 平均回收率范围为 $78.8\% \sim 321\%$, 变异系数为 $2.4\% \sim 18.3\%$ 。结果见表 3。

表 3 猪尿中克仑特罗 $1 \mu\text{g/L}$ 浓度添加回收率和变异系数 (%)

试剂盒代号	回收率范围	平均回收率	变异系数
A	140 ~ 168	157	6.4
B	93.6 ~ 100	98.2	2.4
C	165 ~ 212	189	9.7
D	84.4 ~ 94.2	89.1	3.9
E	144 ~ 160	152	4.3

续表

试剂盒代号	回收率范围	平均回收率	变异系数
F	150~171	159	5.5
G	277~378	321	10.9
H	128~198	153	18.3
I	69.7~93.9	78.8	11.7
J	91.6~112	101	8.5
K	82.7~107	101	8.9
L	75.3~104	92.3	11.6
M	208~273	241	10.3
N	83.5~98.3	92.3	6.9
O	81.9~93.1	87.0	4.3
P	278~361	321	9.3
Q	61.0~95.5	78.8	16.3
R	180~231	201	10.2

2.4 试剂盒综合比较 18个试剂盒在检测限、回收率、变异系数和操作时间等参数的综合比较^[8], (评价参数指标未说明)结果见表4。

表4 试剂盒综合比较表

试剂盒代号	检测限	平均回收率	变异系数	操作时间
A	1.1	157	6.4	约90 min
B	2.3	98.2	2.4	约90 min
C	0.26	189	9.7	约70 min
D	0.55	89.1	3.9	约90 min
E	1.0	152	4.3	约70 min
F	0.98	159	5.5	约70 min
G	1.4	321	10.9	约75 min
H	0.99	153	18.3	约65 min
I	0.32	78.8	11.7	约75 min
J	0.67	101	8.5	约40 min
K	0.80	101	8.9	约60 min
L	0.32	92.3	11.6	约50 min
M	1.4	241	10.3	约60 min
N	0.54	92.3	6.9	约60 min
O	0.49	87.0	4.3	约60 min
P	2.0	321	9.3	约90 min
Q	0.53	78.8	16.3	约45 min
R	2.0	201	10.2	约60 min

3 讨论

3.1 灵敏度 市售的18个厂家试剂盒用于猪尿中克仑特罗残留检测的检测限范围为0.26 $\mu\text{g/L}$ ~ 2.3 $\mu\text{g/L}$ 。2012年农业部《全国农产品质量安全例行监测方案》和《动物及动物产品兽药残留监控计划》中规定猪尿中克仑特罗残留的判定限均为1 $\mu\text{g/L}$ 。作为筛选方法,目前市售试剂盒在猪尿中的检测限大部分都能够达到1 $\mu\text{g/L}$,但有5个产品的检测限大于1 $\mu\text{g/L}$ 。

目前市售试剂盒标称的灵敏度多以试剂盒提

供的标准溶液中的最低浓度表示,并非实际样品的检测限。此外,不同组织样品的检测限也有所不同,有些产品说明书中用同一数据覆盖所有组织样品,准确性有待提高。

3.2 准确度和精密度 市售的18个厂家试剂盒在猪尿中克仑特罗1 $\mu\text{g/L}$ 浓度添加试验中,平均回收率范围为78.8%~321%。猪尿基质组成复杂,对酶联免疫检测结果影响较大,回收率可有效反映试剂盒本身的抗干扰能力。实验考察的18个厂家试剂盒中,9个厂家试剂盒的添加回收率在60%~120%之间。

选取不同厂家试剂盒的一个批次的产品进行试验,计算得到的变异系数反映了试剂盒的批内变异情况,变异系数范围为2.4%~18.3%。

3.3 操作便利性 市售18个厂家的试剂盒中,15个产品都采用一步法,其中大部分产品的操作时间都在1 h左右,尿样不需要酶解等前处理步骤,可直接用于测定,便于日常监测和大规模筛查。

3.4 综合评价 近年来,国产克仑特罗酶联免疫试剂盒质量大幅提升,在灵敏度、准确度等方面均可满足目前的日常检测需要。与此同时,试剂盒品种繁多,质量良莠不齐,建议在选择试剂盒前对其重要的性能参数进行考察。

参考文献:

- [1] 张家铨,程鹏.常用药物手册[M].第4版.北京:人民卫生出版社,2011.
- [2] 农业部176号公告.禁止在饲料和动物饮水中使用的药物品种目录[S].
- [3] 农业部193号公告.食品动物禁用的兽药及其它化合物清单[S].
- [4] 农业部235号公告.动物性食品中兽药最高残留限量[S].
- [5] Sabine Hahnau, Bernd Julicher. Evaluation of commercially available ELISA test kits for the detection of clenbuterol and other β_2 -agonists[J]. Food Additives and Contaminants, 1996, 13: 259-274.
- [6] 叶妮,刘智宏,郭文林,等.国内外克仑特罗ELISA检测试剂盒评价[J].中国兽药杂志, 2002, 36(10): 25-28.
- [7] 农业部1025号公告-18-2008.动物源性食品中 β -受体激动剂残留检测液相色谱-串联质谱法[S].
- [8] 农医发[2005]17号.关于发布《兽药残留酶联免疫试剂(盒)备案审查技术资料要求》和《兽药残留酶联免疫试剂(盒)备案参考评判标准》的通知[S].

(责任编辑:陈希)