



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104360052 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201410635259.3

(22)申请日 2014.11.05

(73)专利权人 中国农业科学院农业质量标准与
检测技术研究所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街
12号

(72)发明人 苏晓鸥 王瑞国 程劼 王培龙
樊霞 李阳 张维

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245

代理人 关畅 赵静

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

(56)对比文件

CN 102798560 A,2012.11.28,

CN 103091501 A,2013.05.08,

CN 102226805 A,2011.10.26,

CN 1329250 A,2002.01.02,

CN 1329250 A,2002.01.02,

US 4172049 A,1979.10.23,

审查员 肖吉

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种克伦特罗检测质控用动物尿液干粉及其
制备方法与应用

(57)摘要

本发明提供一种克伦特罗检测质控用动物
尿液干粉及其制备方法与应用。所述动物尿液干
粉包括独立包装的阴性和阳性尿液干粉。所述制
备包括:采集新鲜尿液,离心处理,收集上清液;
真空室温干燥得到阴性尿液干粉;采集新鲜尿
液,离心处理,收集上清液;加入克伦特罗标准
品,混匀;真空室温干燥,得到阳性尿液干粉。所
述动物尿液干粉可用作克伦特罗酶联免疫试纸
卡和试剂盒使用中的质控样品。本发明提供的动
物尿液干粉能够在常温下密封长期保存,在向干
粉中加入适量纯水后,干粉溶解形成的溶液与利
用新鲜动物尿液配制的克伦特罗酶联免疫试纸
卡和试剂盒质控样品在应用上无差异,可以替代
新鲜动物尿液配制而成的克伦特罗检测质控样
品。

1. 一种制备克伦特罗检测质控用动物尿液干粉的方法,包括下述a)和b):

所述a)为阴性样品的制备,具体步骤如下:采集新鲜尿液,离心处理,收集上清液,得到离心净化后的尿液;接着将所述离心净化后的尿液干燥,得到阴性尿液干粉;所述干燥为在真空浓缩仪中进行的室温干燥;所述干燥的时间为4-6小时;

所述b)为阳性样品的制备,具体步骤如下:采集新鲜尿液,离心处理,收集上清液,得到离心净化后的尿液;接着向所述离心净化后的尿液中加入克伦特罗标准品,混匀,得到含克伦特罗标准品的尿液;最后将所述含克伦特罗标准品的尿液干燥,得到阳性尿液干粉;所述干燥为在真空浓缩仪中进行的室温干燥;所述干燥的时间为4-6小时。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤a)中,所述新鲜尿液来源于已知来源并确定从未食用过克伦特罗的动物;

所述动物为猪、牛或羊;

所述尿液的采集时间与动物的排尿时间间隔不超过10分钟;

所述离心处理的条件为:1500×g离心5~15分钟。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:步骤b)中,所述新鲜尿液来源于已知来源并确定从未食用过克伦特罗的动物;

所述动物为猪、牛或羊;

所述尿液的采集时间与动物的排尿时间间隔不超过10分钟;

所述离心处理的条件为:1500×g离心5~15分钟。

4. 由权利要求1-3中任一项所述的方法制备得到的克伦特罗检测质控用动物尿液干粉。

5. 根据权利要求4所述的克伦特罗检测质控用动物尿液干粉,其特征在于:所述克伦特罗检测质控用动物尿液干粉包括独立包装的阴性尿液干粉和阳性尿液干粉。

6. 权利要求4或5所述的克伦特罗检测质控用动物尿液干粉用作质控样品在克伦特罗胶体金试纸卡和酶联免疫试剂盒使用中的应用。

一种克伦特罗检测质控用动物尿液干粉及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于食品安全检测领域,具体涉及一种克伦特罗检测质控用动物尿液干粉及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 克伦特罗是最主要的一种“瘦肉精”类物质,在国内外已经发生多起食用动物源性食品导致克伦特罗中毒的事件,我国政府明令禁止在动物生产中使用克伦特罗。但是,由于克伦特罗具有提高动物生长速度和瘦肉率的作用,仍有少数不法分子铤而走险,非法制造、销售和使用克伦特罗,导致克伦特罗在动物生产中禁而不绝,造成的食品安全事件屡有发生。由于克伦特罗主要在动物养殖阶段使用,并且大部分以原型药物的形式从尿液中排出。因此,动物养殖环节是各级管理部门和食品企业克伦特罗监测的重点,其方法主要是采用酶联免疫试纸卡或试剂盒对养殖动物的尿液进行克伦特罗筛查检测。但是,酶联免疫试纸卡或试剂盒本身具有假阳性和假阴性的误判风险,易受环境等因素影响导致失效,对操作环境和人员水平有一定要求,加之市售产品质量参差不齐,一般用户缺乏专业的实验室条件进行质量评价,从而难以对此类产品的质量做出合理的判断,导致了检测结果可靠性差。使用阴性和阳性质控样品对检测产品进行验证是提高检测准确度和可靠性的重要手段。然而,由于动物尿液不便于保存、运输和现场操作,质控样品只能现用现配,所以在酶联免疫试纸卡和试剂盒中的应用很少。因此,开发出易于保存、运输和便于现场操作的质控用动物尿液样品对于提高克伦特罗检测产品结果可靠性十分必要。

发明内容

[0003] 本发明的目的之一是提供一种制备克伦特罗检测质控用动物尿液干粉的方法。

[0004] 本发明所提供的制备克伦特罗检测质控用动物尿液干粉的方法,包括下述a)和b):

[0005] 所述a)为阴性样品的制备,具体步骤如下:采集新鲜尿液,立即进行离心处理,收集上清液,得到离心净化后的尿液;接着将所述离心净化后的尿液干燥,得到阴性尿液干粉;

[0006] 所述b)为阳性样品的制备,具体步骤如下:采集新鲜尿液,立即进行离心处理,收集上清液,得到离心净化后的尿液;接着向所述离心净化后的尿液中加入克伦特罗标准品,混匀,得到含克伦特罗标准品的尿液;最后将所述含克伦特罗标准品的尿液干燥,得到阳性尿液干粉。

[0007] 上述方法步骤a)中,所述新鲜尿液来源于已知来源并确定从未食用过克伦特罗的动物;其中,所述动物具体可为猪、牛、羊等。

[0008] 所述尿液的采集时间与动物的排尿时间间隔不超过10分钟,以保证尿液的新鲜程度。

[0009] 所述离心处理的条件为:1500×g离心5~15分钟。

[0010] 所述干燥为在真空浓缩仪中进行的室温干燥;所述干燥的时间为4-6小时。

[0011] 所述干燥的具体操作如下:将所述离心净化后的尿液置于样品瓶中,将所述含有尿液的样品瓶置于真空浓缩仪内进行室温干燥,得到尿液干粉,立即对盛有尿液干粉的样品瓶加盖密封,得到所述阴性尿液干粉。

[0012] 所得阴性尿液干粉用1mL纯水溶解后形成的克伦特罗阴性动物尿液复原液中,克伦特罗的含量小于0.1ng/mL。

[0013] 当需要制备大量的阴性尿液干粉时,上述方法步骤1)的具体操作如下:将每次排尿后的新鲜尿液收集,立即进行离心处理,收集上清液,随后将所述上清液于2~6℃下暂存不超过24小时;将多次排出的经离心净化后暂存的尿液混合,于-18℃以下的温度下冻存;在所冻存的尿液的总量达到要求后,将所述冻存后的尿液回温至室温,震荡混匀,得到均匀一致的尿液;最后将所述均匀一致的尿液干燥,得到所述阴性尿液干粉。

[0014] 上述方法步骤b)中,所述新鲜尿液的来源与步骤1)中新鲜尿液的来源相同,同样来源于已知来源并确定从未食用过克伦特罗的动物;所述动物具体可为猪、牛、羊等。

[0015] 所述尿液的采集时间与动物的排尿时间间隔不超过10分钟,以保证尿液的新鲜程度。

[0016] 所述离心处理的条件为:1500×g离心5~15分钟。

[0017] 所述干燥为在真空浓缩仪中进行的室温干燥;所述干燥的时间为4-6小时。

[0018] 所述干燥的具体操作如下:将所述含克伦特罗标准品的尿液置于样品瓶中,将所述含有尿液的样品瓶置于真空浓缩仪内进行室温干燥,得到尿液干粉,立即对盛有尿液干粉的样品瓶加盖密封,得到所述阳性尿液干粉。

[0019] 所得阳性尿液干粉用与浓缩前尿液体积相同的纯水溶解后得到的克伦特罗阳性动物尿液复原液中,克伦特罗的含量与配置浓度比值介于80-120%。

[0020] 当需要制备大量的阳性尿液干粉时,上述方法步骤1)的具体操作如下:将每次排尿后的新鲜尿液收集,立即进行离心处理,收集上清液,随后将所述上清液于2~6℃下暂存不超过24小时;将多次排出的经离心净化后暂存的尿液混合,于-18℃以下的温度下冻存;在所冻存的尿液的总量达到要求后,将所述冻存后的尿液回温至室温,震荡混匀,得到均匀一致的尿液;接着向所述均匀一致的尿液中加入克伦特罗标准品,混匀后得到含克伦特罗标准品的尿液;最后将所述含克伦特罗标准品的尿液干燥,得到所述阳性尿液干粉。

[0021] 由上述方法制备得到的克伦特罗检测质控用动物尿液干粉也属于本发明的保护范围。

[0022] 所述克伦特罗检测质控用动物尿液干粉包括独立包装的阴性尿液干粉和阳性尿液干粉。

[0023] 本发明的另一个目的是提供所述克伦特罗检测质控用动物尿液干粉的用途。

[0024] 本发明所提供的克伦特罗检测质控用动物尿液干粉的用途是将所述动物尿液干粉用作克伦特罗酶联免疫试纸卡和试剂盒使用中的质控样品。

[0025] 具体使用方法为:分别向所述阴性尿液干粉和阳性尿液干粉中加入与浓缩前尿液体积相同的纯水;充分震荡,使尿液干粉全部溶解;按照克伦特罗酶联免疫试纸卡或试剂盒的操作步骤分别对所述阴性和阳性样品进行验证检测,根据验证结果的符合性对试纸卡或试剂盒产品进行现场使用过程中的质量控制。

[0026] 实验证明,本发明提供的克伦特罗检测质控用动物尿液干粉,能够在常温下密封长期保存,克伦特罗能够长期稳定存在,不会发生降解。并且,在向干粉中加入适量纯水后,干粉溶解形成的溶液与利用新鲜动物尿液配制的克伦特罗酶联免疫试纸卡和试剂盒质控样品在应用上无差异,可以替代新鲜动物尿液配制而成的克伦特罗检测质控样品。本发明可以方便地用于克伦特罗酶联免疫试纸卡和试剂盒现场质控,而且生产过程简单,易于保存、运输和使用,克服了一般质控样品配制中动物尿液不好保存、运输,需要专业实验室条件等不足。

具体实施方式

[0027] 下面通过具体实施例对本发明进行说明,但本发明并不局限于此。

[0028] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法;下述实施例中所用的试剂、生物材料等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0029] 下述实施例中所采用的克伦特罗标准品为德国Dr.Ehrensorfer公司产品,其CAS号:21898-19-1,纯度>98.5%。

[0030] 下述实施例中所采用的克伦特罗胶体金快速检测试纸卡(猪尿)为北京勤邦生物技术有限公司产品,产品编号:B001,检测限:3ng/ml(ppb)。

[0031] 下述实施例中所采用的克伦特罗ELISA检测试剂盒为北京勤邦生物技术有限公司产品,产品编号:A041,检测限:0.1ng/ml(ppb)。

[0032] 实施例1、克伦特罗检测质控用阴性猪尿液干粉的制备

[0033] 一、猪尿液的采集

[0034] 1、在试验猪场选择健康状态良好、未食用过克伦特罗的生长猪(杜长大三元杂交猪),置于代谢笼中预饲7天使其适应环境;

[0035] 2、预饲期过后,收集猪在自然状态下排出的新鲜尿液,收集猪尿的时间和猪排尿时间间隔不超过10分钟,以保证尿液新鲜。将收集的新鲜尿液,立即置于离心机中1500×g离心15分钟,收集上清液置于2~6℃冰箱中暂存;

[0036] 3、每天将收集并经离心净化的尿液混合在一起,用1000mL塑料瓶分装,置于冰柜中,-18℃以下冻存。

[0037] 二、阴性猪尿干粉的制备

[0038] 1、将猪尿液从冰柜中取出,回温至室温,并置于震荡器上进行旋转震荡,使尿液均匀一致;

[0039] 2、用连续分液器从混合均匀的猪尿中依次取出1mL分别置于1.5mL压盖样品瓶中;

[0040] 3、将盛好猪尿的样品瓶置于真空浓缩仪内旋转架上,室温下真空离心干燥6小时,待液体完全挥发后,取出样品瓶,并立即压盖密封,制成阴性猪尿干粉。

[0041] 三、产品检验

[0042] 对阴性猪尿液干粉进行克伦特罗阴性确认的抽样检测,每批次生产的产品中随机抽取2个样品。将1mL纯水用注射器注入尿液干粉瓶中,充分震荡,使干粉全部溶解,形成克伦特罗阴性猪尿复原液。根据农业行业标准《动物尿液中11种β-受体激动剂的检测液相色谱-串联质谱法》(农业部1063号公告-3-2008)的方法步骤,采用液相色谱-串联质谱仪对尿液干粉复溶液进行克伦特罗确证检测,检测结果均为未检出(低于方法检出限0.1ppb)。

[0043] 实施例2、克伦特罗检测质控用阳性猪尿液干粉的制备

[0044] 一、猪尿液的采集

[0045] 1、在试验猪场选择健康状态良好、未食用过克伦特罗的生长猪(杜长大三元杂交猪),置于代谢笼中预饲7天使其适应环境;

[0046] 2、预饲期过后,收集猪在自然状态下排出的新鲜尿液,收集猪尿的时间和猪排尿时间间隔不超过10分钟。每次猪排尿后收集的尿液,立即置于离心机中 $1500 \times g$ 离心15分钟,收集上清液置于 $2 \sim 6^{\circ}\text{C}$ 冰箱中暂存;

[0047] 3、每天将收集并经离心净化的尿液混合在一起,用1000mL塑料瓶分装,置于冰柜中, -18°C 以下冻存。

[0048] 二、阳性猪尿干粉的制备

[0049] 1、将猪尿液从冰柜中取出,回温至室温,并置于震荡器上进行旋转震荡,使尿液均匀一致。

[0050] 2、精确称量克伦特罗标准品 10.0mg ,置于100ml玻璃容量瓶中,向其中加入猪尿至刻度,充分震荡使克伦特罗标准品完全溶解,并混合均匀,即得浓度为 $100\mu\text{g/mL}$ 的克伦特罗阳性尿液储备液;

[0051] 3、用移液管准确移取1mL上述克伦特罗阳性尿液储备液于100ml玻璃容量瓶中,向其中加入空白猪尿至刻度,充分震荡,混合均匀,即得浓度为 $1\mu\text{g/mL}$ 的克伦特罗阳性尿液稀释液;

[0052] 4、用移液管准确移取5mL上述克伦特罗阳性尿液稀释液于1000ml玻璃容量瓶中,向其中加入空白猪尿至刻度,充分震荡,混合均匀,即得浓度为 5ng/mL 的克伦特罗阳性尿液应用液;

[0053] 2、将上述克伦特罗阳性尿液应用液倒入广口瓶中,用液用连续分液器从中依次取出1mL分别置于1.5mL压盖样品瓶中;

[0054] 3、将盛好猪尿的样品瓶置于真空浓缩仪内的旋转架上,室温下真空离心干燥6小时,待液体完全挥发后,取出样品瓶,并立即压盖密封,制成阳性猪尿干粉,理论上,每瓶阳性猪尿干粉用1mL纯水溶解后形成的阳性猪尿复原液中克伦特罗的浓度为 5ng/mL (5ppb)。

[0055] 三、产品检验

[0056] 对所述阳性猪尿液干粉进行克伦特罗阴性确认的抽样检测,每批次生产的产品中随机抽取2个样品。将1mL纯水用注射器注入尿液干粉瓶中,充分震荡,使干粉全部溶解,形成克伦特罗阳性猪尿复原液。根据农业行业标准《动物尿液中11种 β -受体激动剂的检测液相色谱-串联质谱法》(农业部1063号公告-3-2008)的方法步骤,采用液相色谱-串联质谱仪对尿液干粉复溶液进行克伦特罗确证检测,检测结果分别为 5.0ng/mL 和 5.1ng/mL 。

[0057] 实施例3、克伦特罗检测质控用猪尿液干粉在胶体金试纸条上的应用

[0058] 一、猪尿干粉复原液的配制

[0059] 取阴性猪尿干粉和阳性猪尿干粉各1支,将1mL纯水用注射器分别注入2个尿液干粉瓶中,充分震荡,使干粉全部溶解,形成克伦特罗阴性和阳性猪尿复原液。

[0060] 二、试纸条的抽样检验

[0061] 在克伦特罗胶体金快速检测试纸卡(猪尿)开封使用前,从一盒(50个/盒)中随机取出2个试纸卡。按照试纸卡操作说明书要求的条件及操作步骤,用移液管吸取阴性和阳性

猪尿复原液分别滴入2个试纸卡进样槽内,静置5分钟后读取结果。结果显示,滴入阴性猪尿复原液的试纸卡显示为阴性,滴入阳性猪尿复原液的试纸卡显示为阳性。检验结果满意,说明该批(盒)试纸卡通过现场质控样品检验,可用于动物尿液样品筛查。

[0062] 实施例4、克伦特罗检测质控用猪尿液干粉在酶联免疫试剂盒上的应用

[0063] 一、猪尿干粉复原液的配制

[0064] 取阴性猪尿干粉和阳性猪尿干粉各1支,将1mL纯水用注射器分别注入2个尿液干粉瓶中,充分震荡,使干粉全部溶解,形成克伦特罗阴性和阳性猪尿复原液。

[0065] 二、试剂盒检测过程的质控

[0066] 在克伦特罗酶联免疫试剂盒检测样品时,按照试剂盒操作说明书要求的条件及操作步骤,将阴性和阳性猪尿复原液作为质控样品与其他检测样品同时检测。结果显示:阴性质控样品检测值为 $<0.1\text{ppb}$;阳性质控样品检测值为 5.5ppb ,结果位于标准值 5.0ppb 的 $80\%\sim 120\%$ ($4.0\sim 6.0\text{ppb}$)之间。检验结果满意,说明本次试剂盒检测通过现场质控样品检验,可用于动物尿液样品筛查。

[0067] 实施例5、克伦特罗质控用动物尿液干粉样品的稳定性考察

[0068] 作为一种能够长期储存、即配即用的质控样品,最主要的性能指标就是稳定性。由于动物尿液中干物质成分以尿素、尿酸和无机盐为主,占干物质含量的 99% 以上。因此,动物尿液真空浓缩干燥形成的尿液干粉,主要是尿素、尿酸和无机盐,这类物质在干燥状态下非常稳定。而且,克伦特罗具有很高的稳定性。因此,本发明涉及的克伦特罗质控用动物尿液干粉样品性质稳定,具有较强理论基础。

[0069] 按照所述克伦特罗检测质控用阴性猪尿液干粉和阳性猪尿液干粉的制备方法,分别制备600瓶阴性和阳性猪尿(5ppb)干粉。从制备当天开始(第0天),每隔60天,随机分别取出6瓶阴性和阳性尿液干粉,连续8次抽样,持续时间420天。按照所述猪尿干粉复原液的配制方法,制成阴性和阳性尿液干粉复原液。采用农业行业标准《动物尿液中11种 β -受体激动剂的检测液相色谱-串联质谱法》(农业部1063号公告-3-2008)的方法步骤,采用液相色谱-串联质谱仪对阴性和阳性尿液干粉复溶液进行克伦特罗确证检测,检测结果见表1。由表可见,420天内,阴性样品始终是克伦特罗未检出;阳性样品检测平均值为 4.99 ,连续8次测定结果无显著差异,且结果位于标准值 5.0ppb 的 $80\%\sim 120\%$ ($4.0\sim 6.0\text{ppb}$)之间。结果表明,本发明涉及的克伦特罗质控用动物尿液干粉在设定保质期1年(365天)内,克伦特罗含量稳定。

[0070] 表1阴性和阳性尿液干粉复溶液克伦特罗确证检测结果

[0071]

序号	时间（天）	测定结果	
		阴性质控样品	阳性质控样品
1	0	ND	4.93 ± 0.05^a
2	60	ND	5.02 ± 0.11^a
3	120	ND	5.04 ± 0.07^a
4	180	ND	5.07 ± 0.12^a
5	240	ND	4.97 ± 0.03^a
6	300	ND	5.00 ± 0.06^a
7	360	ND	4.94 ± 0.09^a
8	420	ND	4.96 ± 0.08^a
平均值		ND	4.99 ± 0.02

[0072] 注：ND为未检出(<0.1ppb)；肩标字母相同表示无显著差异。

专利名称(译)	一种克伦特罗检测质控用动物尿液干粉及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN104360052B	公开(公告)日	2016-08-17
申请号	CN201410635259.3	申请日	2014-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所		
[标]发明人	苏晓鸥 王瑞国 程劼 王培龙 樊霞 李阳 张维		
发明人	苏晓鸥 王瑞国 程劼 王培龙 樊霞 李阳 张维		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/558		
代理人(译)	关畅 赵静		
审查员(译)	肖吉		
其他公开文献	CN104360052A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种克伦特罗检测质控用动物尿液干粉及其制备方法与应用。所述动物尿液干粉包括独立包装的阴性和阳性尿液干粉。所述制备包括：采集新鲜尿液，离心处理，收集上清液；真空室温干燥得到阴性尿液干粉；采集新鲜尿液，离心处理，收集上清液；加入克伦特罗标准品，混匀；真空室温干燥，得到阳性尿液干粉。所述动物尿液干粉可用作克伦特罗酶联免疫试纸卡和试剂盒使用中的质控样品。本发明提供的动物尿液干粉能够在常温下密封长期保存，在向干粉中加入适量纯水后，干粉溶解形成的溶液与利用新鲜动物尿液配制的克伦特罗酶联免疫试纸卡和试剂盒质控样品在应用上无差异，可以替代新鲜动物尿液配制而成的克伦特罗检测质控样品。

序号	时间(天)	测定结果	
		阴性质控样品	阳性质控样品
1	0	ND	4.93±0.05 ^a
2	60	ND	5.02±0.11 ^a
3	120	ND	5.04±0.07 ^a
4	180	ND	5.07±0.12 ^a
5	240	ND	4.97±0.03 ^a
6	300	ND	5.00±0.06 ^a
7	360	ND	4.94±0.09 ^a
8	420	ND	4.96±0.08 ^a
平均值		ND	4.99±0.02