



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106526163 A

(43)申请公布日 2017.03.22

(21)申请号 201610982167.1

(22)申请日 2016.11.09

(71)申请人 无锡艾科瑞思产品设计与研究有限公司

地址 214070 江苏省无锡市蠡园开发区建筑西路599号1幢305室

(72)发明人 蒋韦艳 刘金杰 吴敏芳 徐静
赵春城 胡勇

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种盐酸克伦特罗检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种盐酸克伦特罗检测方法,包括如下步骤:a.样品制备,称取 $4.0 \pm 0.05\text{g}$ 均质化后的组织样本至50-60ml离心管中;加入3-5ml13%的三氯乙酸,用振荡器振荡摇至均匀,颠倒混匀15-20min;3000r以上离心10-15分钟;将上述离心后的上清液取5-10ml转入20ml试管,加3-5ml异丙醇-乙酸乙酯混合液,体积比2:3,震荡10min,静置5min;然后,3000r以上离心10分钟;取1.5ml上述离心后的上层有机相于小烧杯或玻璃试管中,60℃氮气吹干;用2ml稀释液充分溶解;取50 μl 上清液用于检测,检测稀释倍数。本发明能够对盐酸克伦特罗进行快速检测,且结果准确,误差小,检测灵敏度高,对检测设备要求低。

1. 一种盐酸克伦特罗检测方法, 其特征在于, 包括如下步骤: a. 样品制备, 称取 $4.0 \pm 0.05\text{g}$ 均质化后的组织样本至 $50\text{--}60\text{ml}$ 离心管中; 加入 $3\text{--}5\text{ml}$ 3% 的三氯乙酸, 用振荡器振荡摇至均匀, 颠倒混匀 $15\text{--}20\text{min}$; 3000r 以上离心 $10\text{--}15$ 分钟; 将上述离心后的上清液取 $5\text{--}10\text{ml}$ 转入 20ml 试管, 加 $3\text{--}5\text{ml}$ 异丙醇-乙酸乙酯混合液, 体积比 $2:3$, 震荡 10min , 静置 5min ; 然后, 3000r 以上离心 10 分钟; 取 1.5ml 上述离心后的上层有机相于小烧杯或玻璃试管中, 60°C 氮气吹干; 用 2ml 稀释液充分溶解; 取 $50\mu\text{l}$ 上清液用于检测, 检测稀释倍数; b. 加样检测, 将在冷藏环境中贮藏的试剂室温 25°C 平衡; 将浓度分别为: 0ng/ml 、 0.1ng/ml 、 0.3ng/ml 、 0.9ng/ml 、 2.7ng/ml 、 8.1ng/ml 的盐酸克伦特罗标准溶液和待测样品按浓度由低到高加入酶标板的板孔中, 每孔 $50\mu\text{l}$; 然后将 $100\mu\text{l}$ 稀释的酶结合物即辣根过氧化物酶标记的 CL 抗原, $1:2000$ 稀释倍数, 加入到板孔底部, 用震荡机震荡 30 秒, 盖上封板膜, 25°C 温育 30 分钟; 用洗涤液洗涤, 方法是向板孔中每孔注满洗涤液, 停留 10 秒后吸尽拍干, 重复 5 次; 第一底物和第二底物以体积比 $1:1$ 混合均匀, 加入到板孔中, 每孔加入 $50\mu\text{l}$, 震荡 20 秒; 震荡后 10 分钟测定结果, 使用微孔板化学发光免疫分析仪及化学发光检测软件进行分析; c. 根据各标准溶液发光值, 借助化学发光检测软件进行四参数 Logistic 拟合, 坐标选择 X-Y, 得标准曲线, 根据标准曲线即可推算出盐酸克伦特罗的浓度, 然后乘上相应的稀释倍数, 即获得样品稀释前实际的克伦特罗含量。

2. 根据权利要求 1 所述的盐酸克伦特罗检测方法, 其特征在于, 所述均质化后的组织样本为肌肉样本。

3. 根据权利要求 1 所述的盐酸克伦特罗检测方法, 其特征在于, 所述均质化后的组织样本为心肝样本。

一种盐酸克伦特罗检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测方法,具体是一种盐酸克伦特罗检测方法。

背景技术

[0002] 盐酸克伦特罗 (clenbuterol hydrochloride, 简称 CL) 是一种 β_2 -肾上腺素受体激动剂,商品名为氨哮素、克喘素,是儿茶酚胺的一种衍生物,俗称“瘦肉精”。将一定量的CL添加到饲料中,能明显促进动物生长率和饲料转化率,促进动物脂肪分解,瘦肉率提高10%左右。随着CL在畜牧生产中的应用,人们发现CL能在动物体内蓄积残留,导致食用中毒。CL中毒会对人的身体健康造成严重的危害,其症状包括:血压升高、血管扩张、心跳加快、呼吸加剧、体温升高、肌肉颤抖、头痛、胸闷、神经过敏、肌肉疼痛、心悸、恶心、呕吐等。由于CL作为饲料添加剂的危害严重,上世纪90年代,欧洲等国家纷纷颁布法规,严禁将CL用作促生长剂。我国农业部在1997年3月(农牧发[1997]3号文)严令禁止肾上腺素在动物生产中的应用,但目前国内非法滥用的情况依然严重。目前检测CL的方法主要有HPLC-MS(高效液相色谱-质谱)、GC-MS(气相色谱-质谱)和ELISA(酶联免疫吸附法)法。HPLC-MS和GC-MS两种方法所需的设备昂贵、操作复杂,通常作为定量和确证方法;ELISA方法操作简单、快速,但其灵敏度低,适用于定性和半定量,通常用作大规模样品筛选。化学发光免疫分析法(chemiluminescence immunoassay, CLIA)是将免疫反应和化学发光反应相结合以检测抗原或抗体的免疫技术,它以化学发光物质或酶为标记物,直接标记在抗原或抗体上,免疫反应结束后,加入发光底物。利用发光信号检测仪测量发光强度,根据化学发光标记物与发光强度的关系计算出被测物的含量(Shelver等,2002)。它同时具有化学发光法的高灵敏度和免疫分析法的成本低、速度快、特异性强、样品与处理简单和选择性强等优点,非常适合快速检测。目前化学发光酶免疫分析技术在环境监测、食品安全、制药和临床医学等领域有较大发展。前人采用间接竞争化学发光酶免疫分析法对猪尿样中的CL进行检测,检测灵敏度分别为 $0.08\mu\text{g/L}$ 和 $0.01\mu\text{g/L}$,但方法只限于猪尿样中CL的测定;有些采用间接竞争化学发光酶免疫法测定沙丁胺醇和CL,但操作繁琐耗时。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种盐酸克伦特罗检测方法,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0004] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

一种盐酸克伦特罗检测方法,包括如下步骤:a. 样品制备,称取 $4.0\pm 0.05\text{g}$ 均质化后的组织样本至50-60ml离心管中;加入3-5ml13%的三氯乙酸,用振荡器振荡摇至均匀,颠倒混匀15-20min;3000r以上离心10-15分钟;将上述离心后的上清液取5-10ml转入20ml试管,加3-5ml异丙醇-乙酸乙酯混合液,体积比2:3,震荡10min,静置5min;然后,3000r以上离心10分钟;取1.5ml上述离心后的上层有机相于小烧杯或玻璃试管中,60℃氮气吹干;用2ml稀释液充分溶解;取50 μl 上清液用于检测,检测稀释倍数;b. 加样检测,将在冷藏环境中贮藏的试

剂室温25℃平衡；将浓度分别为：0ng/ml、0.1ng/ml、0.3ng/ml、0.9ng/ml、2.7ng/ml、8.1ng/ml的盐酸克伦特罗标准溶液和待测样品按浓度由低到高加入酶标板的板孔中，每孔50μl；然后将100μl稀释的酶结合物即辣根过氧化物酶标记的CL抗原，1:2000稀释倍数，加入到板孔底部，用振荡机振荡30秒，盖上封板膜，25℃温育30分钟；用洗涤液洗涤，方法是向板孔中每孔注满洗涤液，停留10秒后吸尽拍干，重复5次；第一底物和第二底物以体积比1:1混合均匀，加入到板孔中，每孔加入50μl，震荡20秒；震荡后10分钟测定结果，使用微孔板化学发光免疫分析仪及化学发光检测软件进行分析；c. 根据各标准溶液发光值，借助化学发光检测软件进行四参数Logistic拟合，坐标选择X-Y，得标准曲线，根据标准曲线即可推算出盐酸克伦特罗的浓度，然后乘上相应的稀释倍数，即获得样品稀释前实际的克伦特罗含量。

[0005] 作为本发明进一步的方案：所述均质化后的组织样本为肌肉样本。

[0006] 作为本发明再进一步的方案：所述均质化后的组织样本为心肝样本。

[0007] 与现有技术相比，本发明的有益效果是：本发明能够对盐酸克伦特罗进行快速检测，且结果准确，误差小，检测灵敏度高，对检测设备要求低。

具体实施方式

[0008] 下面对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。

[0009] 本发明实施例中，一种盐酸克伦特罗检测方法，包括如下步骤：a. 样品制备，称取 4.0 ± 0.05 g均质化后的组织样本至50-60ml离心管中；加入3-5ml13%的三氯乙酸，用振荡器振荡摇至均匀，颠倒混匀15-20min；3000r以上离心10-15分钟；将上述离心后的上清液取5-10ml转入20ml试管，加3-5ml异丙醇-乙酸乙酯混合液，体积比2:3，震荡10min，静置5min；然后，3000r以上离心10分钟；取1.5ml上述离心后的上层有机相于小烧杯或玻璃试管中，60℃氮气吹干；用2ml稀释液充分溶解；取50μl上清液用于检测，检测稀释倍数；b. 加样检测，将在冷藏环境中贮藏的试剂室温25℃平衡；将浓度分别为：0ng/ml、0.1ng/ml、0.3ng/ml、0.9ng/ml、2.7ng/ml、8.1ng/ml的盐酸克伦特罗标准溶液和待测样品按浓度由低到高加入酶标板的板孔中，每孔50μl；然后将100μl稀释的酶结合物即辣根过氧化物酶标记的CL抗原，1:2000稀释倍数，加入到板孔底部，用振荡机振荡30秒，盖上封板膜，25℃温育30分钟；用洗涤液洗涤，方法是向板孔中每孔注满洗涤液，停留10秒后吸尽拍干，重复5次；第一底物和第二底物以体积比1:1混合均匀，加入到板孔中，每孔加入50μl，震荡20秒；震荡后10分钟测定结果，使用微孔板化学发光免疫分析仪及化学发光检测软件进行分析；c. 根据各标准溶液发光值，借助化学发光检测软件进行四参数Logistic拟合，坐标选择X-Y，得标准曲线，根据标准曲线即可推算出盐酸克伦特罗的浓度，然后乘上相应的稀释倍数，即获得样品稀释前实际的克伦特罗含量。所述均质化后的组织样本为肌肉样本。所述均质化后的组织样本为心肝样本。

[0010] 实施例1

本发明盐酸克伦特罗检测方法，包括如下步骤：a. 样品制备，称取4.0g均质化后的组织样本至50ml离心管中；加入3ml13%的三氯乙酸，用振荡器振荡摇至均匀，颠倒混匀15min；3000r以上离心10分钟；将上述离心后的上清液取5ml转入20ml试管，加3ml异丙醇-乙酸乙酯混合液，体积比2:3，震荡10min，静置5min；然后，3000r以上离心10分钟；取1.5ml上述离心后的上层有机相于小烧杯或玻璃试管中，60℃氮气吹干；用2ml稀释液充分溶解；取50μl

上清液用于检测,检测稀释倍数;b.加样检测,将在冷藏环境中贮藏的试剂室温25℃平衡;将浓度分别为:0ng/ml、0.1ng/ml、0.3ng/ml、0.9ng/ml、2.7ng/ml、8.1ng/ml的盐酸克伦特罗标准溶液和待测样品按浓度由低到高加入酶标板的板孔中,每孔50μl;然后将100μl稀释的酶结合物即辣根过氧化物酶标记的CL抗原,1:2000稀释倍数,加入到板孔底部,用震荡机震荡30秒,盖上封板膜,25℃温育30分钟;用洗涤液洗涤,方法是向板孔中每孔注满洗涤液,停留10秒后吸尽拍干,重复5次;第一底物和第二底物以体积比1:1混合均匀,加入到板孔中,每孔加入50μl,震荡20秒;震荡后10分钟测定结果,使用微孔板化学发光免疫分析仪及化学发光检测软件进行分析;c.根据各标准溶液发光值,借助化学发光检测软件进行四参数Logistic拟合,坐标选择X-Y,得标准曲线,根据标准曲线即可推算出盐酸克伦特罗的浓度,然后乘上相应的稀释倍数,即获得样品稀释前实际的克伦特罗含量。所述均质化后的组织样本为肌肉样本。所述均质化后的组织样本为心肝样本。

[0011] 实施例2

本发明盐酸克伦特罗检测方法,包括如下步骤:a.样品制备,称取4.05g均质化后的组织样本至55ml离心管中;加入4ml13%的三氯乙酸,用振荡器振荡摇至均匀,颠倒混匀18min;3000r以上离心12分钟;将上述离心后的上清液取8ml转入20ml试管,加4ml异丙醇-乙酸乙酯混合液,体积比2:3,震荡10min,静置5min;然后,3000r以上离心10分钟;取1.5ml上述离心后的上层有机相于小烧杯或玻璃试管中,60℃氮气吹干;用2ml稀释液充分溶解;取50μl上清液用于检测,检测稀释倍数;b.加样检测,将在冷藏环境中贮藏的试剂室温25℃平衡;将浓度分别为:0ng/ml、0.1ng/ml、0.3ng/ml、0.9ng/ml、2.7ng/ml、8.1ng/ml的盐酸克伦特罗标准溶液和待测样品按浓度由低到高加入酶标板的板孔中,每孔50μl;然后将100μl稀释的酶结合物即辣根过氧化物酶标记的CL抗原,1:2000稀释倍数,加入到板孔底部,用震荡机震荡30秒,盖上封板膜,25℃温育30分钟;用洗涤液洗涤,方法是向板孔中每孔注满洗涤液,停留10秒后吸尽拍干,重复5次;第一底物和第二底物以体积比1:1混合均匀,加入到板孔中,每孔加入50μl,震荡20秒;震荡后10分钟测定结果,使用微孔板化学发光免疫分析仪及化学发光检测软件进行分析;c.根据各标准溶液发光值,借助化学发光检测软件进行四参数Logistic拟合,坐标选择X-Y,得标准曲线,根据标准曲线即可推算出盐酸克伦特罗的浓度,然后乘上相应的稀释倍数,即获得样品稀释前实际的克伦特罗含量。所述均质化后的组织样本为肌肉样本。所述均质化后的组织样本为心肝样本。

[0012] 实施例3

本发明盐酸克伦特罗检测方法,包括如下步骤:a.样品制备,称取3.95g均质化后的组织样本至50ml离心管中;加入4ml13%的三氯乙酸,用振荡器振荡摇至均匀,颠倒混匀20min;3000r以上离心15分钟;将上述离心后的上清液取10ml转入20ml试管,加5ml异丙醇-乙酸乙酯混合液,体积比2:3,震荡10min,静置5min;然后,3000r以上离心10分钟;取1.5ml上述离心后的上层有机相于小烧杯或玻璃试管中,60℃氮气吹干;用2ml稀释液充分溶解;取50μl上清液用于检测,检测稀释倍数;b.加样检测,将在冷藏环境中贮藏的试剂室温25℃平衡;将浓度分别为:0ng/ml、0.1ng/ml、0.3ng/ml、0.9ng/ml、2.7ng/ml、8.1ng/ml的盐酸克伦特罗标准溶液和待测样品按浓度由低到高加入酶标板的板孔中,每孔50μl;然后将100μl稀释的酶结合物即辣根过氧化物酶标记的CL抗原,1:2000稀释倍数,加入到板孔底部,用震荡机震荡30秒,盖上封板膜,25℃温育30分钟;用洗涤液洗涤,方法是向板孔中每孔注满洗涤液,

停留10秒后吸尽拍干,重复5次;第一底物和第二底物以体积比1:1混合均匀,加入到板孔中,每孔加入50 μ l,震荡20秒;震荡后10分钟测定结果,使用微孔板化学发光免疫分析仪及化学发光检测软件进行分析;c.根据各标准溶液发光值,借助化学发光检测软件进行四参数Logistic拟合,坐标选择X-Y,得标准曲线,根据标准曲线即可推算出盐酸克伦特罗的浓度,然后乘上相应的稀释倍数,即获得样品稀释前实际的克伦特罗含量。所述均质化后的组织样本为肌肉样本。所述均质化后的组织样本为心肝样本。

[0013] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。

[0014] 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

专利名称(译)	一种盐酸克伦特罗检测方法		
公开(公告)号	CN106526163A	公开(公告)日	2017-03-22
申请号	CN201610982167.1	申请日	2016-11-09
[标]申请(专利权)人(译)	无锡艾科瑞思产品设计与研究有限公司		
申请(专利权)人(译)	无锡艾科瑞思产品设计与研究有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	无锡艾科瑞思产品设计与研究有限公司		
[标]发明人	蒋韦艳 刘金杰 吴敏芳 徐静 赵春城 胡勇		
发明人	蒋韦艳 刘金杰 吴敏芳 徐静 赵春城 胡勇		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种盐酸克伦特罗检测方法，包括如下步骤：a.样品制备，称取 $4.0\pm 0.05\text{g}$ 均质化后的组织样本至50-60ml离心管中；加入3-5ml3%的三氯乙酸，用振荡器振荡摇至均匀，颠倒混匀15-20min；3000r以上离心10-15分钟；将上述离心后的上清液取5-10ml转入20ml试管，加3-5ml异丙醇-乙酸乙酯混合液，体积比2：3，震荡10min，静置5min；然后，3000r以上离心10分钟；取1.5ml上述离心后的上层有机相于小烧杯或玻璃试管中，60℃氮气吹干；用2ml稀释液充分溶解；取50 μl 上清液用于检测，检测稀释倍数。本发明能够对盐酸克伦特罗进行快速检测，且结果准确，误差小，检测灵敏度高，对检测设备要求低。