

加标回收试验在检测克伦特罗残留中的应用

丁 丹¹ 方友平² 杨勇敏² 王有祥² 黎俊君¹

1.湖北省十堰市动物产品质量监督检验测试中心,湖北十堰 442000;

2.湖北省十堰市动物卫生监督所,湖北十堰 442000

摘要 为判定用酶联免疫吸附法测定克伦特罗及其残留的结果准确性,笔者对猪尿、猪肝及猪血清中克伦特罗进行了检测及回收试验分析。结果发现:用酶联免疫吸附法测定克伦特罗及其残留的实验室过程处于可控范围内,检测结果准确、可靠;但猪肝样品的处理会对检测结果产生一定影响,应加以避免。

关键词 加标回收试验;检测;克伦特罗;残留;应用

加标回收试验是实验室常用的质量监督和内部质量控制方法之一,可查找系统误差的某些来源,其对质量控制和检测数据的准确性、可靠性有着十分重要的实践意义。特别是在克伦特罗及其残留检测过程中,由于待检物资的含量处于痕量或微量水平,加之样品中不同组分对待检物质的交叉影响等,因此,实施严格质量控制对保证检测数据准确可靠相当重要。

克伦特罗属于 β 类兴奋剂,我国规定禁止在动物生产中添加使用,但受经济利益的驱使,非法添加屡禁不止,中毒事件时有发生。当前全国市、县级以下实验室主要采用酶联免疫吸附法来检测猪尿、组织中克伦特罗的残留。笔者通过试验对猪尿、猪肝及猪血清中克伦特罗检测的回收试验分析,判定实验室过程是否处于可控范围,对判定检测结果准确性有一定的实际意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1) 试验仪器。Sunrise 酶标仪(滤光片波长为 450 nm/630 nm),离心机(3 000~4 000 r/min),微量移液器(10~300 μ L,单道、多道),氮吹仪。

2) 试验材料。试验用 6 头育肥猪所采食饲料中

添加 5 mg/kg 盐酸克伦特罗,连续饲喂 20 d 后停止,休药期满 20 d 时,同时采集猪血清、猪尿及猪肝样品,对应编号。

3) 试验试剂。酶联免疫检测试剂盒(购自北京维德维康生物技术有限公司)、乙酸乙酯(分析纯)、异丙醇(分析纯)等。

1.2 方 法

1) 试样的制备。猪尿、猪血清:3 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为供试样品。猪肝:准确称取(2.00 \pm 0.01)g 样品,加入 6 mL 0.2 mol/L 高氯酸溶液;室温(25 $^{\circ}$ C)下,剧烈涡动 2 min,4 000 r/min 离心 10 min,将上清液转入新的离心管中,用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 值至 11.6 左右;加入 8 mL 乙酸乙酯-异丙醇(8:2)溶液,室温下剧烈涡动 2 min,4 000 r/min 离心 10 min,取 4 mL 上层有机相于新的离心管中,于 60 $^{\circ}$ C 水浴中,氮气吹干;加入 500 μ L 样品稀释液,充分涡动 1 min,取上清液作为供试试料。

2) 加标回收方法。回收试验分为空白加标回收和样品加标回收。回收率是判定分析结果准确度的量化指标,相对标准偏差是衡量结果精密度的量化指标。本试验主要研究 ELISA 方法测定盐酸克伦特罗时,平行样测定结果的相对标准偏差、空白加标

收稿日期:2014-03-04

通讯作者:杨勇敏

丁 丹,女,1977 年生,硕士,兽医师。

回收率、实际样品加标回收率、空白加标回收率相对标准偏差及样品加标回收率相对标准偏差 5 个质控指标的定量评价标准。

3)加标量。加标量为检出限的 2~6 倍。根据农业部盐酸克伦特罗的最低检测标准 1 μL/L 标准,猪尿、猪血清试剂空白加标和实际样品加标的加标量为分别 2、4 和 6 μL/L 3 个浓度,每个加标量浓度作 6 个平行,同时做 6 个平行的样品检测;猪肝试样分别在样品处理前和处理完成后进行加标试验。检测过程始终在相同的试验条件下进行,减少人员、仪器、环境等条件变化对结果产生的影响。

4)检测步骤。按 ELISA 试剂盒说明书操作。超出标准曲线的样品按一定的比例用蒸馏水稀释后进行检测。

5)回收率、相对标准偏差的计算。

$$\text{回收率}(P_i) = \frac{\text{加标测定值} - \text{试样测定值}}{\text{标准加入量}} \times 100\%$$

$$\text{回收率标准偏差}(S_i) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n P_i^2 - (\sum P_i)^2 / n}{n-1}}$$

相对标准偏差(RSD)是样本标准偏差和回收率平均值间的百分比值,相对标准偏差值越小,检测结果精密度越高。其计算公式为:

$$RSD = (S_i \sqrt{P_i}) \times 100\%$$

2 结果与分析

猪尿、猪血清加标回收率见表 1,样品中克伦特罗含量见表 2,猪肝加标回收试验结果见表 3,空白加标回收试验结果见表 4。

1)由表 1 和表 2 可知,不同样品中添加不同浓度标准品,加标回收率为 60.2%~100.5%,在试剂盒规定的回收率范围(60%~120%)内;精密度均在相同的范围内,表明检测结果在实验室内得到了有效控制。

2)由表 3 可知,样品处理前加标回收率为 60.2%~79.6%,样品处理后加标回收率为 85.6%~95.6%,样

表 1 猪尿、猪血清加标回收试验结果

样品类别	加标量/(μL/L)	加标回收率/%	RSD/%
猪尿	2	94.5;92.0;94.5;89.5;89.5;92.5	2.25
	4	96.8;92.2;94.8;97.6;98.2;94.8	2.23
	6	94.3;88.9;91.2;84.6;92.1;89.6	2.36
猪血清	2	95.3;94.6;99.5;94.8;95.5;97.9	1.98
	4	97.6;92.8;95.0;93.2;100.5;95.6	2.89
	6	96.3;94.5;90.6;95.4;90.2;89.5	2.98

表 2 猪尿、猪血清的检测结果

样品类别	检测结果平均值/(μg/L)	RSD/%
猪尿	4.30;5.28;3.87;7.33;3.27;4.87	0.36;0.20;0.19;0.13;0.09;0.06
猪血清	1.08;0.89;0.95;0.99;1.01;0.99	0.28;0.07;0.09;0.18;0.29;0.13

表 3 猪肝加标回收试验结果

样品类别	加标量/(μL/L)	加标回收率/%	RSD/%
猪尿	2	94.5;92.0;94.5;89.5;89.5;92.5	2.25
	4	96.8;92.2;94.8;97.6;98.2;94.8	2.23
	6	94.3;88.9;91.2;84.6;92.1;89.6	2.36
猪血清	2	95.3;94.6;99.5;94.8;95.5;97.9	1.98
	4	97.6;92.8;95.0;93.2;100.5;95.6	2.89
	6	96.3;94.5;90.6;95.4;90.2;89.5	2.98

表 4 空白加标回收试验结果

加标量/(μL/L)	测定值	平均值	回收率/%	RSD/%
2	1.98;1.95;1.86;1.93;1.85;1.94	1.92	96.0	0.05
4	3.75;3.81;3.47;3.82;3.78;3.81	3.79	94.8	0.13
6	5.37;5.39;5.41;5.32;5.55;5.78	5.65	94.2	0.17

品处理后加标回收率明显高于样品处理前的加标回收率。表明样品处理过程对试验结果准确性产生很大的影响,试验时应考虑样品处理过程中对试验结果产生影响的因素。

3)由表 2 和表 4 可知,试样及空白加标重复测定结果相对标准偏差均小于 0.5%,说明检测操作过程对测定结果的影响相对较小,在试验误差允许范围内。

3 讨 论

1)加标回收率反映了检测结果的准确度,相对标准偏差反映了检测结果的精密度,可有效的运用到克伦特罗药物残留的检测中,对试验分析的准确度有着较好的监控作用,能够及时发现试验过程中存在的问题是由于系统误差产生还是偶然误差产生的,并提出改进的方法,有效提高检测人员的技术水平。

2)由试验结果可知,向含有克伦特罗的猪尿、

猪血清添加不同浓度标准品,回收率和空白添加回收率基本相同,因此,设计回收试验时,可直接用空白加标回收作为质量控制的手段之一。猪肝样品需进行复杂的样品前处理程序,设计回收试验时,最好在样品处理前添加克伦特罗,以便能及时发现问题影响结果准确性的因素,采取有效措施加以改正。

3)在检测过程中应控制好试验条件,避免影响试验结果的各种因素(如人员、仪器、环境、检测方法等)发生变化。应合理设计回收试验,评价试验结果的可信度,对发现结果存在较大偏移的,应立即采取有效措施,取得满意的结果。

4)加标回收试验是实验室质控手段的一种,具有简单、易操作等特点,特别适合于样本数量大的检测,但在实际检测工作中需要结合其他质控方法,对实验室检测结果实施全面质量控制。

蛋鸡养殖如何巧省料

- 1)保证充足的饮水。鸡每产一枚鸡蛋需要消耗 340 mL 水,若在产蛋时缺水,可使产蛋量下降 30%。
- 2)淘汰低产母鸡。鸡群中常有 10%~30%的低产鸡,把低产鸡淘汰掉,鸡群的产蛋量不会明显减少,但可以大大节省饲料。
- 3)把好饲料关。不喂发霉变质的饲料,保证饲料的全价营养饲料;粉碎不能过细,否则易造成采食困难且“料尘”飞扬而浪费。
- 4)使用替代料。蛋白质饲料尤其是鱼粉的价格较高,用一些廉价的昆虫、蚯蚓、当地的小鱼虾、肉类加工的副产品、鱼的下脚料、粉渣、糖渣、豆腐渣、酒糟等,经适当加工调制后替代部分蛋白质饲料喂鸡,可大大降低饲料成本。
- 5)添喂杆菌肽锌。夏季在鸡日粮中添加 100~150 mg/kg 杆菌肽锌,可使产蛋量提高 20%,饲料转化率提高 10%,蛋壳厚度也明显增加。
- 6)添喂蛋氨酸。在一般饲料中添加 0.1%的蛋氨酸,可使饲料蛋白质的利用率提高 2%~3%。
- 7)添喂维生素 C。在每吨鸡饲料中添加 50 g 维生素 C,可使产蛋率提高 10%以上,节省饲料 15%以上。
- 8)添喂沙砾。每周适量补喂 1 次沙砾,有助于肌胃中饲料的研磨,帮助消化和吸收,使饲料消化率提高 3%~8%。
- 9)添喂麦饭石。在蛋鸡日粮中加入 2%的麦饭石粉,可提高产蛋率 8.43%,降低死亡率 1.11%,每产 1 kg 蛋节料 46 g。
- 10)添喂苍耳饼。苍耳饼是苍耳果实榨油脂后的副产品,含粗蛋白质 39%及微量镇静物质,在蛋鸡基础日粮中加入 10%的苍耳饼粉,可使产蛋率提高 8.35%,蛋重提高 2.8%,饲料报酬提高 4.7%。
- 11)改进料槽结构。喂鸡的料槽应该是底尖、肚大、口小,因为这样的料槽容料多,鸡也不容易把饲料啄出来,使鸡能吃净剩料。至于料槽高度,应以鸡能自由采食为主要准则。料槽添料量不宜过满,一般掌握在 1/3 槽高,否则易抛撒、浪费。据报道,饲料添加到料槽的 2/3 时饲料浪费 12%,加到 1/2 时浪费 5%,加到 1/3 时浪费 2%。

来源:中国禽病网