

动物性食品中莱克多巴胺检测方法研究进展

石 晶, 王毅谦, 吴福平, 郭 旸
(张家港出入境检验检疫局, 江苏 张家港 215600)

摘 要: 莱克多巴胺作为激素类添加剂, 对动物机体产生副作用, 同时影响消费者的健康。近年我国进出境口岸屡次在进口动物性食品中检出莱克多巴胺。本文对近几年来动物性食品中莱克多巴胺的检测方法新进展和新兴技术做了大量调查和整理, 旨在为出入境口岸动物性食品中莱克多巴胺的检测提供一定的参考, 为进出口动物性食品的安全控制提供理论依据。

关键词: 动物性食品; 莱克多巴胺; 检测方法

Recent Progress on Analytical Methods for Ractopamine in Foods of Animal Origin

SHI Jing, WANG Yi-qian, WU Fu-ping, GUO Yang
(Zhangjiagang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhangjiagang 215600, China)

Abstract: As a hormone additive, ractopamine can not only produce side effects in animals, but also affect consumer health. In recent years, there have been many reports on detectable levels of ractopamine in import and export animal-derived food products. This review presents the recent progress on analytical techniques (including newly emerging ones) for ractopamine in animal-derived food, aimed at providing references for the determination and safety quality of ractopamine in animal-derived food.

Key words: animal-derived products; ractopamine; detection methods

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-8123(2013)04-0044-04

莱克多巴胺(ractopamine, RAC)是人工合成的 β -肾上腺受体激动剂, 属于“瘦肉精”的一种, 可以同时提高动物的日增质量, 提高饲料利用率, 提高动物的蛋白质含量。目前只有美国、加拿大、巴西等24个美洲和亚太地区允许将莱克多巴胺用于食用性动物(主要用于猪和牛)的促生长和提高瘦肉率。莱克多巴胺属于激素类添加剂, 而激素类饲料添加剂用于动物后, 具有激素残留的问题, 对动物机体产生副作用, 同时也会影响消费者的健康^[1-2]。欧盟早已明确禁止在食用性动物中使用包括莱克多巴胺在内的所有 β -肾上腺素兴奋剂类药物(欧盟96/22/EC法令), 我国也已于2002年明确将其列入《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》。中华人民共和国工业和信息化部、农业部、商务部、卫生部、国家工商行政管理总局、国家质量监督检验检疫总局联合发布公告, 自2011年12月5日起在我国境内禁止生产和销售莱克多巴胺^[3]。

近年来, 我国出入境口岸也屡次在进口动物性食品中检出莱克多巴胺。根据国家质检总局公布的信息, 截至2007年8月底, 广东检验检疫局辖区各口岸已从10批美

国猪产品和一批加拿大猪产品中检出莱克多巴胺残留; 2008年辽宁大窑湾口岸进出境动物产品中有4批次97.473吨来自美国的冻猪产品被检出莱克多巴胺; 2011年12月由美国进口的近23.5吨冻猪鼻在广东入境时被检出了莱克多巴胺; 这些产品均依法全部退运出境。因此, 出入境口岸对进出口动物性食品中莱克多巴胺的检测具有十分重要的意义。

目前, 国内外对于动物性食品中莱克多巴胺的检测方法主要有免疫分析法、色谱分析技术、传感器技术等, 本文对这几种常用检测方法的应用现状进行了综述, 同时介绍了近年来兴起的一些如分子印迹技术、光谱技术、化学发光法等新技术在莱克多巴胺检测中的应用, 旨在为出入境口岸动物性食品中莱克多巴胺的检测提供一定的参考, 为进出口动物性食品的安全控制提供理论依据。

1 免疫分析方法

免疫分析方法是利用抗原与抗体特异性反应为基

收稿日期: 2013-03-20

作者简介: 石晶(1984—), 女, 硕士, 研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: shijing01984@sina.com



础的分析技术, 主要包括酶联免疫法、胶体金免疫层析法、荧光微球免疫层析技术和时间分辨荧光免疫分析技术等。

1.1 酶联免疫法

酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是基于竞争性酶联反应原理, 把抗原-抗体免疫反应的特异性和酶的高效催化作用有机结合起来的一种检测技术, 目前广泛应用于莱克多巴胺残留的检测^[4-7]。ELISA法检测动物性食品中的莱克多巴胺, 最低检测限可达0.1ng/mL^[7], 平均回收率在70%~90%之间^[6]。

ELISA法具有快速、灵敏和高通量等特点, 且无需昂贵的仪器, 是目前基层检测部门应用的主要方法, 一般用来进行大批量样品的初步筛选, 但该方法稳定性差, 出现的假阳性较多, 需用气相质谱或液相质谱进行确证。

1.2 胶体金免疫层析技术

胶体金免疫层析技术(gold immunochromatography assay, GICA)是近年来兴起的一种快速检测技术, 该技术是一种将胶体金颗粒与包括抗原、抗体在内的许多蛋白质标记形成免疫金复合物的技术^[8-10]。基于胶体金免疫层析法研制出的试纸条, 可在8~10min内完成莱克多巴胺测试, 检测限为5ng/mL, 肉眼即可判断^[10]。

胶体金免疫层析技术具有简单、快速、特异、灵敏的特点, 不需要借助相关仪器, 检测效率能得到很大提高, 适合大规模样品的现场检测。

1.3 荧光微球免疫层析技术

荧光微球免疫层析方法比胶体金免疫层析方法具有更高的灵敏度。刘道峰等^[11]以荧光微球为新型标记物, 采用EDC法进行偶联, 制备了莱克多巴胺抗体荧光微球复合物, 并以之为探针针对莱克多巴胺进行检测, 检测限为2.5ng/mL, 且特异性强、检测范围宽。崔浩等^[12]建立了莱克多巴胺的荧光胶乳颗粒免疫层析快速检测技术, 对猪肉组织中莱克多巴胺的最低检出限为0.5μg/L, 方法操作便捷、稳定可靠、灵敏度高, 可用于猪肉组织中莱克多巴胺残留的现场检测和监控。

1.4 时间分辨荧光免疫分析技术

时间分辨荧光免疫测定(time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA)是一种非同位素免疫分析技术, 它用镧系元素标记抗原或抗体, 根据镧系元素螯合物的发光特点, 用时间分辨技术测量荧光, 同时检测波长和时间两个参数进行信号分辨, 可有效地排除非特异荧光的干扰, 极大地提高了分析灵敏度。TRFIA作为一项新兴的超微量标记免疫技术, 其灵敏度比ELISA法更高、稳定性更好, 目前已有其应用于莱克多巴胺检测的报道^[13-14]。

2 色谱分析技术

色谱分析技术是莱克多巴胺检测中常用的定量和确证方法, 主要包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)和液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)等。

2.1 高效液相色谱法

莱克多巴胺的HPLC法检测主要是采用SPE固相萃取小柱净化, 二极管阵列检测器(diode array detector, DAD)^[15-16]或荧光检测器(fluorescence detector, FLD)^[17-19]检测。由于莱克多巴胺的紫外最大吸收波长在224nm左右, 采用HPLC-DAD对莱克多巴胺进行检测时, 在此波长附近干扰较大, 通常不采用DAD检测器检测。莱克多巴胺含酚羟基, 具有荧光性, 可采用FLD检测器测定, 激发波长约为226nm, 发射波长约为305nm, 该方法灵敏, 检出限可达0.3μg/L^[17], 同时可排除杂质干扰。

臧李纳等^[19]将DAD和FLD两种检测器串联, 对莱克多巴胺、沙丁胺醇和克伦特罗进行检测, 结果发现可以很好的分离3种物质, 方法相关系数达0.999, 相对标准偏差为0.75%~2.01%, 回收率在90%~110%之间。

2.2 气相色谱-质谱法

莱克多巴胺化学结构中具有不易气化的羟基和氨基, 属于高沸点、难挥发的化合物, 衍生后才能测定。常用的衍生剂有BSTFA(双三甲基硅烷基三氟乙酰胺)和BSTFA+1%TMCS(三甲基氯硅烷), 衍生温度为80℃左右, 衍生时间为1h^[20-25]。采用GC-MS对猪肝组织中莱克多巴胺检测的检出限和定量限分别为0.5ng/g和2.0ng/g^[26], 对猪尿的检出限和定量限分别为0.3μg/L和1.0μg/L^[27]。

GC-MS是莱克多巴胺检测最常用的定量和确证方法, 但是它需要衍生, 衍生效率对测定结果影响很大, 因此加标回收率不高, 同时衍生剂和甲苯有极强的毒性。

2.3 液相色谱-质谱法

液相色谱-质谱法不需要衍生, 采用内标法定量, 在提高效率的同时提高检测的准确度^[28-30], 采用UPLC-ESI-MS-MS对牛肉中的莱克多巴胺的检出限和定量限分别为0.07μg/kg和0.22μg/kg^[30]。液相质谱法灵敏度高, 重现性强, 适用于莱克多巴胺的确证检测, 但是其分析成本昂贵, 难以普及。

3 传感器技术

3.1 生物传感器技术

近年来, 表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)生物传感器受到人们的关注, 原理为将



能够与待测物结合的物质固定在传感器芯片上,当待测物流过芯片表面时与芯片表面的物质结合,引起芯片表面光学参数变化,并以电信号的形式表现出来。该技术可在15min内完成单个样品的莱克多巴胺检测^[31],检出限达0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[32]。

该技术无需对分子进行标记,方法的建立和样品预处理简单,所需样品量少,可利用动力学特性绘制标准曲线,检测时间短,可分析弱相互作用或瞬间相互作用,可实时检测^[31]。

3.2 电化学传感器技术

张洪才等^[33]采用Nafion-Au-Nafion修饰玻碳电极,建立了莱克多巴胺的循环伏安电化学传感方法,在pH2.0、B-R为支持液、富集时间120s、扫描速度50mV/s、电位1.1V条件下,检测限可达2 $\mu\text{g}/\text{L}$,检测时间不超过5min。陈昌云等^[34]建立了一种基于碳纳米管和离子液体复合物修饰电极的免疫传感器技术检测莱克多巴胺,检测限可低至0.3ng/mL。该方法具有设备简单、操作方便、检测迅速、应用范围广等优点,适合大批量样品的检测。

4 分子印迹技术

分子印迹技术的原理是:当模板分子(印迹分子)与聚合物单体接触时会形成多重作用点,通过聚合过程这种作用就会被记忆下来,当模板分子除去后,聚合物中就形成了与模板分子空间构型相匹配的具有多重作用点的空穴,这样的空穴将对模板分子及其类似物具有选择识别特性。分子印迹技术具有预定性、识别性和实用性等特点,目前广泛应用于色谱技术(固相萃取前处理)^[35-37]、酶联免疫技术^[38]、电化学传感器技术^[39-40]中,对动物性食品中的莱克多巴胺进行检测。

5 光谱技术

近年来,光谱技术用于盐酸莱克多巴胺的检测也有了新的进展,主要是表面增强拉曼光谱技术和太赫兹时域光谱。

Zhai Fuli等^[41]将表面增强拉曼散射光谱(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)用于猪尿中莱克多巴胺的检测,样品中的莱克多巴胺采用液液萃取(liquid-liquid extraction, LLE)和液液萃取-固相萃取(liquid-liquid extraction-solid phase extraction, LLE-SPE)两种方式提取后分别进行SERS检测,检测限分别为0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。SERS技术测量样品的制备方法简单,具有很大的潜力,可用于快速分析的猪尿中莱克多巴胺。

陈锡爱等^[42]通过研究证明了将太赫兹时域光谱技术(terahertz time domain spectroscopy, THz-TDS)用于盐酸

莱克多巴胺检测和识别的可行性,为其残留检测的应用提供了新的实验方法。THz-TDS测量样品的制作过程简单,采用粉末压片的方法即可获得;样品的THz时域光谱在几十秒内就可获得,因而有望成为一种有效的物质快速检测技术。

6 化学发光法

冯婷等^[43]根据碱性介质中莱克多巴胺对鲁米诺-铁氰化钾体系化学发光的增敏作用,建立了新的流动注射-化学发光快速测定莱克多巴胺的方法,相对发光强度与莱克多巴胺质量浓度在0.004~0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内呈良好的线性关系,检出限为2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,对于猪肉和尿样中莱克多巴胺的加标回收率为69.3%~101.3%。

7 展望

综上所述,免疫分析方法具有设备相对简单、快速、特异性等优点,可以作为大量样品的初筛方法;色谱分析技术灵敏度和准确性都较高,可作为莱克多巴胺的定量和确证方法;传感器技术设备简单、检测迅速、灵敏、样品前处理简单,有望成为大批量样品和现场检测莱克多巴胺的快速筛选方法;分子印迹技术具有很强的识别性和实用性,和其他技术结合后将广泛应用于莱克多巴胺的检测;时间分辨荧光免疫分析技术和表面增强拉曼光谱技术在莱克多巴胺的检测中的应用也将有广阔的前景。

参考文献:

- [1] ROSS K A, BEAULIEU A D, MERRILL J, et al. The impact of ractopamine hydrochloride on growth and metabolism, with special consideration of its role on nitrogen balance and water utilization in pork production[J]. Journal of Animal Science, 2011, 89(7): 2243-2256.
- [2] HALSEY C H C, WEBER P S, REITER S S, et al. The effect of ractopamine hydrochloride on gene expression in adipose tissues of finishing pigs[J]. Journal of Animal Science, 2011, 89(4): 1011-1019.
- [3] 工信部、农业部等6部门联合公告禁产禁销莱克多巴胺[J]. 农产品质量与安全, 2012(1): 76-76.
- [4] 肖静, 赵健亚, 许世勇, 等. ELISA 检测饲料中莱克多巴胺的不确定度分析[J]. 中国饲料, 2012(7): 37-39.
- [5] PLEADIN J, PERSI N, VULIC A, et al. Determination of residual ractopamine concentrations by enzyme immunoassay in treated pig's tissues on days after withdrawal[J]. Meat Science, 2012, 90(3): 755-758.
- [6] 郑海松, 陈雪娇, 杨小娇, 等. 肉及肉制品中莱克多巴胺的ELISA检测方法的建立[J]. 肉类研究, 2011, 25(10): 26-28.
- [7] 裴道国, 王雄, 许美玲, 等. 莱克多巴胺酶联免疫分析方法的建立[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(2): 319-331.
- [8] ZHANG Mingzhou, WANG Minzi, CHEN Zonglun, et al. Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for



- the rapid simultaneous detection of clenbuterol and ractopamine in swine urine[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(10): 2591-2599.
- [9] 赵彦岭, 张宁, 胡自然, 等. 动物组织中莱克多巴胺残留胶体金免疫层析和LC-MS/MS检测方法的比较[J]. *山东畜牧兽医*, 2012, 33(1): 1-4.
 - [10] 蒋蔚, 刘迎春, 陈永军, 等. 莱克多巴胺胶体金免疫层析法快速检测试纸条的研制[J]. *中国动物传染病学报*, 2011, 19(6): 59-64.
 - [11] 刘道峰, 邓省亮, 赖卫华, 等. 莱克多巴胺荧光微球免疫层析检测方法的建立[J]. *食品与机械*, 2012, 28(1): 73-77.
 - [12] 崔浩, 陈耀强, 唐勇, 等. 莱克多巴胺荧光胶乳颗粒免疫层析检测法的建立[J]. *分析测试学报*, 2011, 30(7): 764-768.
 - [13] 王超, 李志雄, 林冠峰, 等. 时间分辨荧光免疫分析法测定莱克多巴胺[J]. *中国食品卫生杂志*, 2011, 23(5): 438-441.
 - [14] ZHANG Zhen, LIU Jingfu, YAO Yan, et al. A competitive dual-label time-resolved fluoroimmunoassay for the simultaneous determination of chloramphenicol and ractopamine in swine tissue[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2011, 56(15): 1543-1547.
 - [15] 董璐, 王金凯, 刘林娜, 等. 盐酸多巴胺、硫酸沙丁胺醇、盐酸莱克多巴胺、盐酸克伦特罗残留量的HPLC检测[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2012(3): 79-81.
 - [16] 程盛华, 杨春亮, 郑龙, 等. 高效液相色谱法测定动物组织中的莱克多巴胺残留量[J]. *分析仪器*, 2009(4): 69-72.
 - [17] 孙建文, 彭志妮, 王乾, 等. 固相萃取-液相色谱荧光测定动物组织中盐酸莱克多巴胺[J]. *分析实验室*, 2008, 27(9): 90-93.
 - [18] QU Chunhua, LI Xianliang, ZHANG Lei, et al. Simultaneous determination of cimaterol, salbutamol, terbutaline and ractopamine in feed by SPE coupled to UPLC[J]. *Chromatographia*, 2011, 73(10): 243-249.
 - [19] 臧李纳, 湛社霞, 孙世宏, 等. DAD-FLD串联SPE-HPLC测定肉制品中沙丁胺醇、莱克多巴胺和克伦特罗[J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22(5): 1006-1008.
 - [20] 吴平谷, 沈向红, 管健, 等. 动物组织中莱克多巴胺残留的气相色谱-质谱法测定[J]. *中华预防医学杂志*, 2006, 40(6): 444-446.
 - [21] 吴银良, 李晓薇, 刘素英, 等. 气相色谱-质谱法测定肝脏组织中盐酸克伦特罗和盐酸莱克多巴胺[J]. *分析化学*, 2006, 34(8): 1083-1086.
 - [22] 刘勇军, 吴银良, 刘素英, 等. 固相萃取气相色谱-质谱联用法测定动物组织中的莱克多巴胺[J]. *食品科学*, 2006, 27(8): 231-234.
 - [23] LIU Xiaoyun, HE Xiaowei, WANG Guohong, et al. Effects of SPE and derivatization conditions on the sensitivities of GC/MS and LC/MS/MS in the detection of multi-functional ractopamine[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2010, 26(11): 1283-1288.
 - [24] 谢劲心, 林星. 气质联用法同时检测尿及组织中的克伦特罗和莱克多巴胺残留[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(8): 1864-1866.
 - [25] HE Limin, SU Yijuan, ZENG Zhenling, et al. Determination of ractopamine and clenbuterol in feeds by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 132: 316-323.
 - [26] WANG J P, LI X W, ZHANG W, et al. Development of immunoaffinity sample-purification for GC-MS analysis of ractopamine in swine tissue[J]. *Chromatographia*, 2006, 64(9/10): 613-617.
 - [27] 应永飞, 皮雄娥, 吴平谷, 等. 气相色谱-质谱法同时测定动物尿样中莱克多巴胺和克伦特罗[J]. *质谱学报*, 2006, 27(2): 74-78.
 - [28] MORAGUES F, IGUALADA C. How to decrease ion suppression in a multiresidue determination of β -agonists in animal liver and urine by liquid chromatography-mass spectrometry with ion-trap detector[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 637(10): 193-195.
 - [29] 郑百芹, 李爱军, 张建民, 等. 液相色谱-串联质谱法测定猪肉中3种 β -受体激动剂类药物残留[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(3): 224-227.
 - [30] ZHENG Hong, DENG Ligang, LU Xiao, et al. UPLC-ESI-MS-MS determination of three β_2 -agonists in pork[J]. *Chromatographia*, 2010, 72(7): 79-84.
 - [31] 李辉, 蔡浩原, 陈兴, 等. 表面等离子体共振生物传感器连续检测莱克多巴胺[J]. *分析化学*, 2010, 38(3): 381-384.
 - [32] LU Xiao, ZHENG Hong, LI Xiuqing, et al. Detection of ractopamine residues in pork by surface plasmon resonance-based biosensor inhibition immunoassay[J]. *Food Chemistry*, 2012, 130(4): 1061-1065.
 - [33] 张洪才, 刘晓芳, 翁芝莹, 等. Nafion-Au-Nafion修饰玻碳电极循环伏安法测定莱克多巴胺[J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2010, 28(6): 534-537.
 - [34] 陈昌云, 张红琳, 柳闽生, 等. 基于碳纳米管和离子液体复合物修饰电极的免疫传感器检测莱克多巴胺[J]. *化学学报*, 2011, 69(23): 2865-2869.
 - [35] ZHANG Hongcai, LIU Guoyan, CHAI Chunyan. A novel amperometric sensor based on screen-printed electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and molecularly imprinted membrane for rapid determination of ractopamine in pig urine[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012, 168(20): 103-110.
 - [36] 黄怡, 张青杰, 刘敏, 等. 分子印迹固相萃取-高效液相色谱法测定饲料中莱克多巴胺[J]. *色谱*, 2012, 30(1): 56-61.
 - [37] ZHANG Qingjie, SU Yijuan, HE Qianqian, et al. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective HPLC determination of ractopamine in pig urine[J]. *Journal of Separation Science*, 2011, 34(23): 3399-3409.
 - [38] FANG Guozhen, LU Jinping, PAN Mingfei, et al. Substitution of antibody with molecularly imprinted film in enzyme-linked immunosorbent assay for determination of trace ractopamine in urine and pork samples[J]. *Food Anal Methods*, 2011, 4(4): 590-597.
 - [39] CHAI Chunyan, LIU Guoyan, LI Feng, et al. Towards the development of a portable sensor based on a molecularly imprinted membrane for the rapid determination of salbutamol in pig urine[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 675(7): 185-190.
 - [40] 张洪才, 刘国艳, 商璟, 等. 多壁碳纳米管和分子印迹膜修饰电极检测猪尿液中莱克多巴胺[J]. *分析化学*, 2012, 40(1): 95-100.
 - [41] ZHAI Fuli, HUANG Yiqun, LI Chunying, et al. Rapid determination of ractopamine in swine urine using surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(18): 10023-10027.
 - [42] 陈锡爱, 黄平捷, 侯迪波, 等. 盐酸莱克多巴胺的太赫兹光谱研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2011, 31(3): 600-603.
 - [43] 冯婷, 胡玉斐, 李攻科. 鲁米诺-铁氰化钾化学发光体系快速分析生物样品中莱克多巴胺[J]. *光谱与光谱分析*, 2012, 32(1): 74-77.