doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2022.05.09

动物产品中莱克多巴胺的残留检测研究进展

李 苗[1,2],马月姣[1,2],李建成[1,2*]

(1.中国农业大学动物源性食品安全检测技术北京市重点实验室,北京 100193;2. 中国农业大学动物医学院,北京 100193)

[收稿日期] 2021 - 11 - 16　[文献标识码]A　[文章编号]1002 - 1280 (2022) 05 - 0069 - 11　[中图分类号]S859.796

[摘　要]　莱克多巴胺(Ractopamine, RAC)是一种人工合成的 β - 肾上腺素能受体激动剂类化合物,属于第二代"瘦肉精"。分别从传统仪器检测法和快速检测法及生物传感器技术三个方面综述了当前 RAC 在动物性产品中残留检测技术的研究进展,并对 RAC 检测技术的发展趋势进行了展望,旨在为 RAC 的残留监控提供方法学上的参考,为检测新方法的建立提供思路。

[关键词]　莱克多巴胺;残留;仪器;快速;检测

A Review of the Development of Residue Detection for Ractopamine in Animal Products

LI Miao[1,2], MA Yue - jiao[1,2], LI Jian - cheng[1,2*]

(1. *Beijing Key Laboratory of Detection Technology for Animal - Derived Food Safety, China Agricultural University, Beijing* 100193, *China*; 2. *College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing* 100193, *China*)

Corresponding author: LI Jian - cheng, *E - mail*: *horse20@ cau. edu. cn*

Abstract: Ractopamine (RAC) is a synthetic beta - adrenergic agonist compound that is a second generation "leptin". The current research progress on the detection of the RAC residues in animal products is reviewed from three aspects: traditional instrumental detection, rapid detection, and biosensor technology, and the development trend of the RAC detection technology is also reviewed, aiming to provide methodological reference for the monitoring of the RAC residues and to provide ideas for the establishment of new detection methods.

Key words: ractopamine; residue; instrument; rapid; detection

2019 年 6 月,中国海关部门在查验一批来自加拿大的输华猪肉产品时检出莱克多巴胺(Ractopamine, RAC),动物性产品尤其是猪、牛可食用部分含有"瘦肉精"引发人们的热议。2021 年 3 · 15 晚会中河北沧州青县被曝出当地存在大范围的违规使用瘦肉精现象,再次使得关于 RAC 残留检测方法的研究备受关注。20 世纪 60 年代,一种 β - 肾上腺素能受体激动剂药物盐酸克伦特罗,由美国

基金项目:国家自然科学基金(31972738);国家重点研发项目(2018YFC1602301 - 4)

作者简介:李 苗,硕士,从事动物源性食品安全的研究。

通讯作者:李建成。E - mail: horse20@ cau. edu. cn

Cyanamid公司首次研制,用于治疗呼吸道疾病,因为能促进禽畜增加瘦肉率,1978 年开始用于饲料研制。90 年代初,添加于我国猪饲料中,1997 年,在香港发生猪内脏中“克伦特罗”中毒事件,我国严禁在养殖中使用盐酸克伦特罗[1]。RAC 是第二代“瘦肉精”,一类毒性低于盐酸克伦特罗的新型“瘦肉精”,代谢较快,检测相对困难,曾在畜牧生产上被用来代替盐酸克伦特罗使用[2]。RAC 能促进动物机体营养再分配,加速蛋白质沉积及肌肉生长,抑制脂肪的合成,促进胴体生长与改善品质[3-4]。因为 RAC 还有增加肌肉量和肺活量的作用,某些运动员为使自己夺冠而刻意食用,被国际奥委会列为禁用药物。同时,RAC 的化学性质稳定,在烹任动物性食品时,并不能破坏 RAC 结构,食用含有 RAC 动物性食品时可能会引起急性中毒及四肢肌肉颤动,心律失常,血压升高,长期食用可能诱发恶性肿瘤。

RAC 在动物肝脏、肾脏残留量高,肌肉中残留量低,因此,以肉类为主的美国、澳大利亚、加拿大等国允许使用 RAC。2011 年我国工信部、农业部、商务部、原卫生部、国家工商行政管理总局、国家质量监督检验检疫总局六部委发布联合公告(2011 年第 41 号),要求即日起在我国境内禁止 RAC 的生产和销售。然而我国畜禽肝脏、肾脏的消费量大,2020 年我国农业农村部为进一步规范养殖用药行为,根据《兽药管理条例》有关规定,修订并发布《食品动物中禁止使用的药品及其他化合物清单》(农业部公告第 250 号),禁止动物养殖中使用 RAC。虽明令禁止,但“瘦肉精”事件仍频繁发生。

1　RAC 简介

1.1　理化性质　RAC 又名雷托巴安、舒喘灵、权莱克、金莱多巴、Paylean。化学名称为 4 -[3 -[2 -羟基 -2 -(4 -羟基苯基) - 乙基]氨基丁基]苯酚(4 -[3 -[2 - hydroxy - 2 -(4 - hydroxyphenyl) - ethyl] aminobutyl] phenol),主要以盐酸盐(RAC · HCl)的形式存在,分子式 $C_{18}H_{23}NO_3 \cdot HCl$,分子量为 337.83,密度 1.189 g/cm^3,化学结构如图 1 所示,含有 3 个活性基团(碱性酚、对羟甲基酚和仲胺,pH 分别为 11.01、9.21、8.85),属于苯基乙醇胺类化合物。在 RAC 的结构中,主要的活性部位是伯氨基和酚羟基,乙醇胺基与细胞上 β_2受体结合后激活腺苷酸环化酶,使三磷酸腺苷(Adenosine triphosphate, ATP)转化成环磷酸腺苷(Cyclic adenosine monophosphate, cAMP),活化蛋白、激酶,诱发动物体内一系列酶的磷酸化过程,从而实现机体营养再分配,有研究表明,细胞膜上的上 β_2受体可与 RAC 结合,提高动物皮下脂肪中 cAMP 浓度,抑制脂肪合成,促进脂肪分解[5]。常温状态下 RAC 呈白色或近白色结晶性粉末状,化学性质稳定,分解温度为 165 ℃,因此一般加热方式不能破坏其结构,可溶于水,其水溶液 pH 为 9.4,易溶于甲醇、乙醇等有机溶剂,微溶于丙酮,皮肤接触可发生过敏反应,在 pH > 7 时以非离子化形式存在,易被乙酸乙酯有机溶剂作为萃取剂从水等溶液中萃取出来,该方法可用于待测样品的前处理[6]。

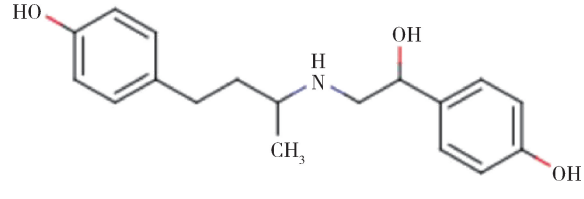

图 1　RAC 结构示意图

Fig 1　The schematic diagram of RAC structure

1.2　RAC 残留限量标准　世界各国在养殖业中对 RAC 的使用有不同的规定(表 1),国际食品法典委员会规定猪、牛的肾脏、肝脏、肌肉及脂肪中残留限量分别为 0.09、0.04、0.01 mg/kg;美国规定猪肉、猪肝脏、牛肉、牛肝脏残留限量分别为 0.05、0.15、0.03、0.09 mg/kg,火鸡肌肉、肝脏中残留限量分别为 0.1、0.45 mg/kg;加拿大规定猪肉中残留限量为 0.04 mg/kg;中国、欧盟、日本、新西兰禁止使用 RAC 为饲料添加剂或在动物饮用水中加入 RAC,日本与新西兰允许进口猪肉中含有 RAC,最大残留量均为 0.01 mg/kg[7]。

表 1　RAC 残留限量标准

Tab 1　RAC residue limit standard

	RAC 残留限量标准										
	猪肉 Porcine muscle	猪肝 Porcine liver	猪脂肪 Porcine fat	猪肾脏 Porcine kidney	牛肾脏 Bovine kidney	牛肝脏 Bovine livers	牛肌肉 Bovine muscle	牛脂肪 Bovine fat	火鸡肌肉 Turkey muscle	火鸡肝脏 Turkey liver	进口猪肉 Imports of porcine muscle
国际食品法典委员会 Codex Alimentarius Commission	0.01 mg/kg	0.04 mg/kg	0.01 mg/kg	0.09 mg/kg	0.09 mg/kg	0.04 mg/kg	0.01 mg/kg	0.01 mg/kg	–	–	–
美国 America	0.05 mg/kg	0.15 mg/kg	–	–	–	0.09 mg/kg	0.03 mg/kg	–	0.1 mg/kg	0.45 mg/kg	–
加拿大 Canada	0.04 mg/kg	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
中国 China	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
欧盟 European union	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
日本 Japan	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01 mg/kg
新西兰 New Zealand	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01 mg/kg

2　RAC 检测方法研究进展

我国是畜牧生产和消费大国,生猪产量占全球一半,即使如此,每年仍需要从国外大量进口,而进口猪及产品并不能保证其可食组织中没有 RAC。目前常用 RAC 检测方法有高效液相色谱法[8]、超高效液相色谱 – 串联质谱法[9]、酶联免疫吸附法[10]、免疫层析法[11]、化学发光法[12]、电化学免疫传感器检测法[13]等。

2.1　RAC 传统仪器检测方法　传统仪器检测方法多为高效液相色谱法、高效液相色谱 – 串联质谱联用法、超高效液相色谱 – 串联质谱法、气相色谱 – 质谱联用法。

2.1.1　高效液相色谱法　高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)即采用合适的有机试剂将 RAC 提取出来,经过液 – 液萃取净化和选择适当的色谱条件(色谱柱种类、流动相、柱温、室温、激发波长、发射波长及进样量),使用色谱峰面积定量测定 RAC。2016 年 Tang[8] 建立以 Fe_3O_4 磁微粒结合分子印迹聚合物(Fe_3O_4@ MIPs)为吸附剂的 HPLC – 荧光(Fluorescence detection, FD)检测方法,用于检测猪肉样品中 RAC,LOD 为 0.05 μg/kg, LOQ 为 0.17 μg/kg, 回收率为 73.60% ~ 94.50% (*RSD* < 11.17%), 在 0.5 ~ 100.0 μg/kg 范围内线性良好,该方法具有良好的重现性以及高灵敏度。2015 年 Ding[14] 提出了一种快速的 HPLC – 紫外检测(Ultraviolet, UV)方法,检测猪肉样品中 LOD 为 0.045 μg/g, LOQ 为 0.149 μg/g,在 0.15 ~ 100.0 μg/g 浓度范围内建立了线性关系,回收率为 80.3% ~ 96.1%, *RSD* 为 4.1%,该方法灵敏度远不如 Tang 所建立的方法。2021 年 Peng[15] 开发了一种简便的管内固相微萃取程序,用于在 HPLC – UV 分析前富集猪肉中的 RAC,LOD 为 0.64 ng/g,LOQ 为 1.95 ng/g,回收率在 85.2% ~ 108.1% 之间,线性范围为 2.0 ~ 800 ng/g,与常规样品预处理方法相比,这种管内固相微萃取方法具有操作简单,有机溶剂消耗低等优点,但灵敏度没有 Tang 所建立的方法高,总的来说

该方法相比于上述方法具有良好的回收率以及较广的检测范围。

2.1.2 高效液相色谱 - 串联质谱联用检测法 高效液相色谱 - 串联质谱(High performance Liquid chromatography linked to tandem mass spectrometry, HPLC - MS/MS)检测方法,以高效液相色谱为分离系统,质谱为检测系统。2020 年李丽珍[16]等应用 HPLC - MS/MS 建立猪肉中莱克多巴胺的残留检测方法,采用正己烷净化实现基质净化效果,节省检测成本,检测 RAC 的 LOD 为 0.15 μg/kg,LOQ 为 0.25 μg/kg,线性范围 0.5 ~ 5 μg/kg,在猪肉中检测 RAC 回收率为 88% ~ 99%(*RSD* < 16.18%),该方法灵敏度良好但方法的精密度还需改良。2018 年 Kyunghun Jeong[17]开发了一种 LC - MS/MS 检测牛组织中的 RAC,测得 LOD、LOQ 分别为 1.7 ng/g和 5.0 ng/g,回收率为 74%,该方法灵敏度、精确度及回收率在实际应用中不足够。2018 年 Kaylee R[18]使用 LC - MS/MS 开发并验证了猪肉中 10 种 β 肾上腺素能激动剂的检测,该方法提取残留物时间小于 20 min,LC - MS/MS 总运行时间为 9.6 min,测得猪肉中 RAC 的 LOD 为 0.2 ng/g,LOQ 为 0.7 ng/g,10 种 β 肾上腺素能激动剂回收率均大于 85%,相比于同年 Kyunghun Jeong 开发的方法具有良好的灵敏度。2017 年 Sun[19]提出了建立了一种采用免疫亲和柱(IAC)净化结合 LC - MS/MS 方法测定了猪肉及猪肝及鱼肉中的 RAC,LOD 为 0.009 μg/kg,LOQ 为 0.03 μg/kg,线性范围 0.05 ~ 25 μg/L,回收率分别为 89.8% ~ 99%、87.6% ~ 91.5%、87.6% ~ 96.1%,该方法相比于以上两种方法具有良好的灵敏度和精密度以及良好的回收率。

2.1.3 超高效液相色谱 - 串联质谱法 超高效液相色谱 - 串联质谱(Ultra - performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry, UPLC - MS/MS)检测方法具有分析时间短、灵敏度和选择性更高的优点,使用非常广泛。2019 年 Suo[20]开发了一种用 UPLC - MS/MS,测得动物产品血粉中 RAC 的检测限(Limit of detection,LOD)为 0.32 μg/kg,定量限(limit of quantification,LOQ)为 1 μg/kg,线性范围为 2 ~ 200 ng/g,在各类血粉中回收率为 76.6% ~ 98.6%,相对标准偏差(Relative standard deviation,*RSD*) < 14.8%。2020 年 Cao[21]等开发了制备了 4 - 苯乙烯磺酸钠官能化聚丙烯腈纳米纤维垫(SS/PAN - NFM)作为 96 孔板固相萃取吸附剂,结合 UPLC - MS/MS 检测猪肉中 RAC,LOD 为 0.24 μg/kg,LOQ 为 0.8 μg/kg,线性范围为 1 ~ 100 μg/kg,回收率为 91.4% ~ 111%(*RSD* < 11.9%),该方法相比于 Suo 所建立的具有更好的回收率以及更高的灵敏度及精确度。2021 年 Wu[22]用超高性能液相色谱和高分辨率串联质谱法(Ultra - performance liquid chromatography - high resolution mass spectrometry, UPLC - HRMS)通过直接编织法合成了一种具有高表面积的有机聚合物(PPOP)作为牛奶中 RAC 固相萃取新型吸附剂,洗脱液通过 UPLC - HRMS 分析。RAC 的回收率为 97.4% ~ 106.8%,*RSD* 为 1.3% ~ 5.1%,LOD 为 0.02 ng/g,LOQ 为 0.05 ng/g,线性范围为 0.05 ~ 250 ng/g,相比于上述两种方法该方法表现出高灵敏度、高精确度以及很好的重现性。

2.1.4 气相色谱 - 质谱联用检测法 气相色谱 - 质谱联用(Gas chromatography - mass spectrometry, GC - MS)可分离尚未分离的色谱峰,定性能力高,可以明显提高定量分析精度,但它的不足在于分析对象仅限于在 300 ℃左右可以汽化与离子化的样品,在加热过程中易于分解、极性太强的化合物不能直接检测,需要进行酯化衍生处理才可进行检测,若不能汽化或衍生化则不能采用此法。根据报道,用于检测猪组织中 RAC 残留量的 GC - MS 方法较少。2019 年赵敏儿[23]通过优化提取条件,建立了气相色谱 - 质谱法测定猪肝中 RAC 残留量的分析方法,LOD 为 2.0 μg/L,回收率为 94.2% ~ 108.2%,*RSD* 为 3.3% ~ 4.9%,线性范围 2 ~ 40 μg/kg。该方法回收率高,其准确度和精密度能满足兽药残留分析检测的要求。2017 年 Liu[24]建立了新型搅拌棒阵列吸附萃取(Stir bar sorptive extraction,SBSE)和 GC - MS 同时测定猪肉样品中

RAC，LOD 为 0.091 ng/g，LOQ 为 0.253 ng/g，回收率为 85.7% ~93.9%（*RSD* < 10%），线性范围为 0.5 ~100 ng/g，与赵敏儿建立的方法相比该方法灵敏度较高。RAC 仪器检测方法比较结果见表 2。

表 2　RAC 仪器检测方法比较

Tab 2　Comparison of traditional instrument detection methods

方法 Method	基质 Matrix	提取液 Extract	净化 Clean – up	检测方式 Detection modality	LOD	LOQ	出处 Reference
HPLC	猪肉 Porcine muscle	乙腈，碳酸钾	Fe_3O_4@ MIPs	荧光	0.05 μg/kg	0.17 μg/kg	[12]
	猪肉 Porcine muscle	异丙醇、乙酸乙酯	MCX 固相萃取柱	紫外	0.045 μg/g	0.149 μg/g	[14]
	猪肉 Porcine muscle	乙腈	SPME	紫外	0.64 ng/g	1.95 ng/g	[15]
HPLC – MS/MS	猪肉 Porcine muscle	乙酸乙酯、高氯酸、乙腈	正己烷	ESI^+	0.15 μg/kg	0.25 μg/kg	[16]
	牛组织 bovine tissues	乙酸乙酯	–	ESI^+	1.7 ng/g	5.0 ng/g	[17]
LC – MS/MS	猪肉 Porcine muscle 猪尿 Porcine urine	乙腈、甲醇、甲酸	分散移液管萃取（DPX）	ESI^+	0.2 ng/g	0.7 ng/g	[18]
	猪肝 Porcine liver	氢氧化铵、乙酸乙酯、乙醚	IAC 固相萃取柱	ESI^+	0.009 μg/kg	0.03 μg/kg	[19]
UPLC – MS/MS	鱼肉 Fish 血粉 Blood meal	乙酸钠，β – 葡萄糖醛酸酶/硫酸酶	Bond Elut PCX 固相萃取柱	ESI^+	0.32 μg/kg	1 μg/kg	[20]
	猪肉 Porcine muscle	乙酸钠、高氯酸	SS/PAN – NFM 固相萃取 96 孔板	ESI^+	0.24 μg/kg	0.8 μg/kg	[21]
UPLC – HRMS	牛奶 Milk	乙腈、三氯乙酸	PPOP 固相萃取柱	ESI^+	0.02 ng/g	0.05 μg/kg	[22]
GC – MS	猪肝 Porcine liver	乙酸铵，高氯酸	MCX 固相萃取柱	–	2.0 μg/L	–	[23]
	猪肉 Porcine muscle	乙酸乙酯	SBSE	EI	0.091 ng/g	0.253	[24]

2.2　RAC 的快速检测方法　相比传统仪器检测而言，快速检测在短时间内就可进行大量初步筛查，快速检测方法多为酶联免疫吸附法、化学发光快速检测法、胶体金免疫层析法、时间分辨荧光免疫分析方法。

2.2.1　酶联免疫吸附法　因传统检测方法受净化程序复杂，耗时耗力，仪器昂贵，需要熟练检测人员等条件制约，如何快速简便低成本的检测 RAC 已成为近年来研究热点。相比于仪器方法，酶联免疫吸附剂法（Enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）更加快速、简便、灵敏。利用抗原抗体的特异性结合和酶的催化反应原理，根据酶标仪测定 OD_{450} 和四参数方程计算，判断 RAC 的含量及检测方法的灵敏度。2014 年 Zhang 等[25]为了测定动物性食品（鸡肌肉、猪脚、猪肌肉和猪肝）中 RAC 残留量，利用 RAC – BSA 产生多克隆抗体和抗体在磷酸盐缓冲液中具有较高的敏感性和特异性，建立一种快速 dcELISA 方法，测得 IC_{50} 为 0.6 ng/mL，LOD 为 0.04 ng/mL，灵敏度相对较高。近年来基因工程技术快速发展，单链抗体因具有制备周期短，成本低，易于大量制备而备受研究者青睐，2012 年 Dong 等[26]根据杂交瘤细胞株构建了 RAC 单链抗体 – 碱

性磷酸酶融合蛋白,并建立了化学发光酶免疫分析法检测猪肉样品,IC_{50} 为 0.25 ± 0.03 ng/mL,LOD 为 0.02 ± 0.004 ng/mL,线性范围在 0.05 ~ 1.45 ng/mL,虽然检测范围较小,但其灵敏度远高于上述单克隆抗体与多克隆抗体建立的方法,且融合蛋白不与 RAC 类似物发生交叉反应。Han[27] 于 2018 年建立了一种基于金纳米颗粒的 RAC 等离子体 icELISA,尿中 LOD 为 0.35 ng/mL。2019 年 Peng[28] 制备了针对 RAC 的特异性单克隆抗体(McAb)以此构建了一种新的 ic - ELISA 以检测猪尿中的 RAC 残留,IC_{50} 为 1.15 ± 0.037 ug/L,LOD 为 0.35 μg/L,同时回收率为 96.7% ~ 108.6%,变异系数低于 6.8%,线性范围在 0.1 ~ 8.1 μg/L,灵敏度不如以上 Zhang 以及 Dong 建立的方法,但在实际样品中进行了检测应用并且回收率良好。

2.2.2 化学发光快速检测法 化学发光法(Chemiluminescence,CL)是利用待测物浓度与化学检测体系中的化学发光强度在一定条件下呈线性定量关系的原理,通过仪器检测体系的化学发光强度,确定待测物含量。2012 年 Feng 等[29] 建立了测定 RAC 的流动注射化学发光分析方法,LOD 为 2.5 ng/mL,在最佳实验条件下,RAC 在 4 ~ 800 ng/mL 线性良好。2015 年刁雅洁[30] 利用镍 - 鲁米诺流动注射化学发光体系,建立检测 β - 兴奋剂的方法,RAC 的 LOD 为 1.0×10^{-10} mol/L, 检测范围为 1.0×10^{-8} ~ 1.0×10^{-6} mol/L,与冯婷的方法相比,稳定性较好。张召香等[31] 利用不同胺分子对 CdSe 量子点电化学发光的增强作用不同,构建了 CdSe 量子点电化学发光传感器并结合胶束扫集预富集技术,使量子点电化学发光信号增强 6000 倍,从而建立了一种基于胶束反向扫集的毛细管电泳量子点电化学发光新方法,用于猪肉中 RAC 和克伦特罗的同时分离检测,该方法对 RAC 的线性范围为 0.8 ~ 29.6 ng/mL,LOD 达到 0.0968 ng/mL,与 2012 年 Feng 建立的方法相比,灵敏度提高了数倍。

2.2.3 胶体金免疫层析法 近年来胶体金免疫层析法(Immune colloidal gold technique,GICT)发展迅速,使检测更加简单、快速、特异、灵敏,不需要借助相关仪器,检测效率能得到很大提高。其原理是胶体金标记的抗体与试纸条上的包被原或二抗在层析作用下发生特异性结合,从而使胶体金聚集形成肉眼可见的颜色。2009 年 Zhang 等[32] 建立了一种能同时快速检测猪尿中克伦特罗和 RAC 的胶体金侧流免疫分析法,仅需 5 min 即可通过颜色是否出现进行评价,在进行猪尿检测时,RAC 的 LOD 及 IC_{50} 分别为 0.10 ± 0.01 ng/mL 和 0.71 ± 0.06 ng/mL。2011 年蒋蔚等[33] 通过柠檬酸钠还原法制备胶体金颗粒,基于胶体金免疫层析法制备快速检测 RAC 的试纸条,用于检测猪尿时,该试纸条在 8 ~ 10 min 内完成测试,LOD 为 5 ng/mL,与 Zhang 建立方法相比,耗费时间久,灵敏度相对来说较差。2013 年 Jiang 等[34] 建立了同时检测 RAC 与克伦特罗的胶体金免疫层析法,对 RAC 的 LOD 为 2 ng/mL,需要时间为 5 ~ 8 min,此方法优于 2011 年蒋蔚建立的方法,但与 Zhang 建立的免疫层析法的灵敏度相比较低,稳定性较好。

2.2.4 时间分辨荧光免疫分析方法 时间分辨荧光免疫分析方法(Time - resolved fluoroimmunoassay,TRFIA)是一种非放射性标记免疫分析技术,以钐、铕、铕等三价稀土离子镧系元素为标记物,代替荧光物质、同位素、酶、化学发光物质标记抗体,用时间分辨荧光仪测定在抗原抗体发生特异性反应时产生特定的荧光,从而推断出抗原的浓度。2011 年王超等[35] 通过时间分辨荧光免疫分析方法,利用 Eu^{3+} 标记 RAC 多克隆抗体,测定尿样中的 RAC,LOD 为 0.05 ng/mL,相比于 ELISA 检测方法,灵敏度更好,也有更高的稳定性。2017 年李贞[36] 建立了基于 RAC - mAb 的钐标记时间分辨荧光免疫分析方法,IC_{50} 与 LOD 分别为 1.6 ng/mL 和 0.136 ng/mL,检测范围为 0.39 ~ 12.77 ng/mL,此方法灵敏度优于化学发光法,也优于张祯等[37] 建立的基于竞争双标记时间分辨荧光免疫分析法(LOD 为 0.25 ng/g),但与王超的分析方法相比,灵敏度相对较低。2018 年向露等[38] 建立同时测定猪肉与牛肉组织中克伦特罗和 RAC 的纳米均相时间分辨荧

光免疫分析方法，LOD 为 0.02 ng/mL，相比王超所用的时间分辨荧光免疫分析方法，不仅能同时检测克伦特罗和 RAC，灵敏度也更优。RAC 快速检测方法比较结果见表 3。

表 3　RAC 快速检测方法比较

Tab 3　Comparison of rapid RAC detection methods

方法 Method	基质 Matrix	抗体 Antibody	检测方式 Detection modality	LOD	出处 Reference
ELISA	猪肉 Porcine muscle	PcAb	dcELISA	0.04 ng/mL	[25]
	猪肉 Porcine muscle	ScFv	scFv – AP 化学发光 ELISA	0.02 ng/mL	[26]
	猪肉 Porcine muscle	PcAb	等离子体 icELSA	0.35 ng/mL	[27]
	猪尿 Porcine urine	McAb	icELISA	0.35 μg/L	[28]
CL	猪尿 Porcine urine	–	RAC 对鲁米诺与铁氰化钾化学发光信号的增敏作用	2.5 ng/mL	[29]
	猪肉 Porcine muscle	–	胺分子对 CdSe 量子点电化学发光的增强作用	0.0968 ng/mL	[30]
GICT	猪尿 Porcine urine	PcAb	胶体金免疫分析法	0.10 ng/mL	[32]
TRFIA	猪尿 Porcine urine	PcAb	(Eu^{3+} 标记的抗体) dcELISA	0.05 ng/mL	[35]
	猪肉 Porcine muscle	McAb	纳米均相时间分辨荧光免疫分析法	0.02 ng/mL	[38]

PcAb. 多克隆抗体；ScFv. 单链抗体；McAb. 单克隆抗体
PcAb. Polyclonal antibody; ScFv. Single chain antibody; McAb. Monoclonal antibody

2.3　*生物传感器技术*　免疫传感器是将高灵敏度的传感技术与特异性免疫反应结合起来，用以监测抗原抗体反应的生物传感器。表面等离子共振（Surface plasmon resonance, SPR）免疫传感器作为生物传感器的一种，以抗体为识别元件，将光敏管作为换能器的光学传感器，无需对样品进行标记、灵敏度高、能实时动态检测，已经广泛应用于制药、生命科学和生物化学的各个领域。2017 年 Wang[39] 以 RAC 为检测对象，使用一抗开发了一种无标记的间接竞争性表面等离子体共振（SPR）免疫传感器，LOD 为 0.09 ng/mL，线性范围为 0.3 ~ 32 ng/mL，此方法灵敏度、准确度都较高，并且在猪尿中回收率为 101.8% ~ 106.6%。2016 年张媛媛等[40] 以改性壳聚糖包埋固定羧基化多壁碳纳米管和莱克多巴肽抗体，构建新的免疫传感器用于 RAC 的检测，线性范围为 0.05 ~ 4.05 ng/mL，LOD 为 0.08 ng/mL，并且对猪肉、羊肉、牛肉、鸡肉样品进行检测，回收率为 96.0% ~ 102.0%，不仅灵敏度高而且准确度和精密度好。

2014 年周妮等[41] 成功的构建了 RAC 适配体电化学生物传感器，电化学适配体生物传感器是由固定了适配体的电极和电化学活性识别元素构成，该方法线性范围为 0.5 ~ 100 ng/mL，LOD 为 0.1 ng/mL，反应时间为 15 min，并且周妮对同一浓度的 RAC 利用该方法重复检测了 7 次，其峰电流值 *RSD* 值为 3.8%，该方法有良好的重现性，但没有应用到实际样本中进行检测。

2017 年 He 等[42] 以壳聚糖为稳定剂，在等离子体辐照下合成了一种基于壳聚糖金纳米颗粒的电化学免疫传感器，电化学免疫传感器作为免疫传感器的一种是将免疫分析与电化学传感技术相结合而构建的一类新型生物传感器，应用于痕量免疫原性物质的分析研究。其建立的方法检测 RAC 的 LOD 为 2.27 pg/mL，检测范围为 0.01 ~ 5 ng/mL，并且对猪尿进行了样品检测，回收率为 93.0% ~ 103.2%，稳定性好，灵敏度比其他检测方法高出近

百倍,可用于痕量 RAC 的超灵敏检测。2020 年 Gu 等[43]制备了 GCE/GNP/RAC 电化学免疫传感器,并在猪肉、猪脂肪及猪肝中进行 RAC 残留检测,检测范围为 1 ~ 7000 ng/mL,回收率为 87.6% ~ 103.3%(*RSD* < 14.6%),LOD 为 0.1 ng/mL,该方法相比于上述方法检测范围广,并且可应用于多种基质。RAC 生物传感器检测方法比较见表 4。

表 4 RAC 生物传感器检测方法比较

Tab 4 Comparison of RAC biosensor detection methods

样品基质 Matrix	检测方法 Method	提取 Extract	线性范围 Linear range	检测限 LOD	IC_{50}	回收率 Recovery	出处 Reference
猪尿 Porcine urine	SPR 生物传感器 SPR biosensor	–	0.3 ~ 32 ng/mL	0.09 ng/mL	1.96 ng/mL	101.8% ~ 106.6%	[39]
猪肉 Porcine muscle	免疫生物传感器 Immune biosensor	乙腈 Acetonitrile	0.05 ~ 4.05 ng/mL	0.08 ng/mL	–	96.8%	[40]
牛肉 Bovine muscle						98.0%	
羊肉 Sheep muscle						102.0%	
鸡肉 Chicken muscle						96.0%	
–	适配体电化学生物传感器 Aptamer electrochemical biosensor	–	0.5 ~ 100 ng/mL	0.1 ng/mL	–	–	[41]
猪尿 Porcine urine	电化学免疫传感器 Electrochemical immunosensor	–	0.01 ~ 5 ng/mL	2.27 pg/mL	–	93.0 ~ 103.2%	[42]
猪肉 Porcine muscle	电化学免疫传感器 Electrochemical immunosensor	乙腈、丙酮 Acetonitril、acetone	1 ~ 7000 ng/mL	0.1 ng/mL	–	95.3 ~ 100.4%	[43]
猪脂肪 Porcine fat						87.6 ~ 103.3%	
猪肝 Porcine liver						95.6 ~ 101.4%	

3 小 结

如今,创新并完善 RAC 的检测方法来有效地监控其非法滥用,保障人民的食品安全是一项非常紧迫的任务。以上所述检测方法,在实际检测过程中可根据不同方法的优缺点以及预备应用地点,结合其长处来使用,不可完全互相取代,如使用免疫检测方法进行大量样品的现场初步筛查,再用超高效液相色谱 – 质谱法等仪器方法对初筛结果进一步确证。目前 RAC 较先进的检测方法,大多数与生物学结合,具有精确、灵敏、智能、新颖等优点,但此类方法多数操作难度大,专业性较强,成本较高,在实际操作中较难施展,可根据其现有方法优缺点对其加以修饰改进,突出方法的简便性、高效率、低成本与环保度,在实际应用中保证其检测结果,保障人们的饮食安全。

参考文献:

[1] Johnson B J, Smith S B, Chung K Y. Historical Overview of the Effect of β – Adrenergic Agonists on Beef Cattle Production[J]. Asian – Australasian journal of animal sciences, 2014, 27(5):757.

[2] Smith D J, Shelver W L, Marx A. Detection of residues in urine and tissues of sheep treated with trace levels of dietary ractopamine HCl[J]. Journal of Animal Science, 2016, 94(12):5423 – 5433.

[3] Hoque M R. Effect of dietary ractopamine supplementation on growth performance, meat quality and fecal score in finishing pig [J]. Korean Journal of Agricultural Science, 2020, 47 (4): 707 – 715.

[4] Swanson, R. M., ractopamine HCl improved cardiac hypertrophy but not poor growth, metabolic inefficiency, or greater white blood cells associated with heat stress in concentrate – fed lambs[J]. Translational animal science, 2019. 3(1):1786 – 1791.

[5] Antonelo D S, Mazon M R, Nubiato K, *et al*. Effects of immunocastration and β – adrenergic agonists on the performance and carcass traits of feedlot finished Nellore cattle[J]. Animal, 2017. 11 (11):2103 – 2110.

[6] Kunping, Yan, Huiqun, *et al*. Rapid screening of toxic salbutamol, ractopamine, and clenbuterol in pork sample by high – performance liquid chromatography—UV method [J]. Journal of Food & Drug Analysis, 2016, 24 (2):277 – 283.

[7] Feddern V, Aroeira C N, Molognoni L, *et al*. Ractopamine analysis in pig kidney, liver, and lungs: A validation of the method scope extension using QuEChERS as a sample preparation step [J]. Journal of Chromatography B, 2018: 1091:79 – 86.

[8] Tang Y, Gao J, Liu X, *et al*. Determination of ractopamine in pork using a magnetic molecularly imprinted polymer as adsorbent followed by HPLC[J]. Food Chemistry, 2016, 201:72 – 79.

[9] Vulic A, Pleadin J, Persi N, *et al*. UPLC – MS/MS determination of ractopamine residues in retinal tissue of treated food – producing swines[J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences, 2012, 895 – 896 (5):102 – 107.

[10] Zhang Y, Wang F, Fang L, *et al*. Rapid determination of ractopamine rsidues in edible animal products by enzyme – linked immunosorbent assay: development and investigation of matrix effects[J]. Biomed Research International, 2014, 2009 (3): 269 – 281.

[11] Zvereva E A, Shpakova N A, Zherdev A V, *et al*. Highly sensitive immunochromatographic assay for qualitative and quantitative control of beta – agonist ractopamine in foods[J]. Applied Biochemistry & Microbiology, 2018, 54(4):436 – 441.

[12] Feng T, Hu Y F, Li G K. A novel flow injection chemiluminescence method with ferricyanide and luminol for the determination of ractopamine in biological samples[J]. Spectroscopy & Spectral Analysis, 2012, 32(1):74.

[13] Qi S, Bo Z, Bo Z, *et al*. An electrochemical immunosensor based on pristine graphene for rapid determination of ractopamine[J]. Chemical Physics Letters, 2017, 685:146 – 150.

[14] Ding G, D Li, Jiao Q, *et al*. Development and validation of a high – performance liquid chromatography method for determination of ractopamine residue in pork samples by solid phase extraction and pre – column derivatization[J]. Meat Science, 2015, 106:55 – 60.

[15] Cp A, Sz A, Cw A, *et al*. In – tube solid phase microextraction and determination of ractopamine in pork muscle samples using amide group modified polysaccharide – silica hybrid monolith as sorbent prior to HPLC analysis – ScienceDirect[J]. Food Chemistry, 2021, 355(1):129662.

[16] 李丽珍,吴学贵,李小梅,等. 高效液相色谱 – 串联质谱法测定猪肉中 8 种 β – 受体激动剂残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(5):1642 – 1650.
Li L Z, Wu X G, Li X M, *et al*. Determination of eight kinds of β – agonist residues in pork by high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2020, 11(5):1642 – 1650.

[17] Jeong K, Akil H M, Park H C, *et al*. Simultaneous determination of β – agonists and monitoring in bovine tissues by liquid chromatography – tandem mass spectrometry[J]. Acta Veterinaria Brno, 2018, 87(1):47 – 54.

[18] Mastrianni, Kaylee, R, *et al*. Analysis of 10 beta – agonists in pork meat using automated dispersive pipette extraction and LC – MS/MS[J]. Journal of chromatography, B. Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 2018, 1084:64 – 68.

[19] Sun X, Tang Q, Du X, *et al*. Simultaneous Determination of Ractopamine, Chloramphenicol, and Zeranols in Animal – Originated Foods by LC – MS/MS Analysis with Immunoaffinity Clean – up Column[J]. Food Analytical Methods, 2017, 10:3239 – 3246.

[20] Decheng S, Peilong W, Yang L, *et al*. Evaluation of β – agonists in blood meal: Validation of determination method and potential pathway for reentry into the environment[J]. Journal of Chromatography A, 2019, 1612:460624.

[21] A J C, A S L, B H Z, *et al*. Sodium 4 – styrenesulfonate functionalized nanofibers mat as 96 – well plate solid – phase extraction adsorbent for quantitative determination of multiple β – agonists residues in pork samples – ScienceDirect[J]. Food Chemistry, 2021, 335:127631 – 127631.

[22] Wu C, Ning X, Chen X, *et al*. Multi – functional porous organic polymers for highly efficient solid – phase extraction of β – agonists and β – blockers in milk[J]. RSC Advances, 2021, 11, 28925 – 28933

[23] 赵敏儿,彭志超. 3 种提取方法在猪肝 β – 受体激动剂残留检测中的比较与应用[J]. 现代食品,2019(3):182 – 184.
Zhao M E, Peng Z C. Comparison and Application of Three Extraction Methods in Detection of Receptor Agonist Residues in Pig Liver [J]. Analysis and Testing, 2019(3):182 – 184.

[24] Haibo Liu, Diebate Ousmane, Ning Gan, *et al*. Novel Stir Bar Array Sorptive Extraction Coupled With Gas Chromatography – Mass Spectrometry for Simultaneous Determination of Three β2 – Agonist Residues in Pork [J]. Chromatographia, 2017, 80: 473 – 482.

[25] Zhang Y, Wang F X, Fang L, *et al*. Rapid determination of ractopamine residues in edible animal products by enzyme – linked immunosorbent assay: development and investigation of matrix Effects[J]. Biomed Research International, 2014, 2009(3): 269 – 281.

[26] Dong J X, Li Z F, Lei H T, *et al*. Development of a single – chain variable fragment – alkaline phosphatase fusion protein and a sensitive direct competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of ractopamine in pork[J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 736(5):85 – 91.

[27] Han S, Zhou T, Yin B, *et al*. Gold nanoparticle – based colorimetric ELISA for quantification of ractopamine[J]. Microchimica Acta, 2018, 185(4):210.

[28] Peng D, Zhao L, Zhang L, *et al*. A Novel Indirect Competitive Enzyme – Linked Immunosorbent Assay Format for the Simultaneous Determination of Ractopamine and Phenylethanolamine A Residues in Swine Urine[J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(5): 1077 – 1085.

[29] Feng T, Hu Y F, Li G K. A novel flow injection chemiluminescence method with ferricyanide and luminol for the determination of ractopamine in biological samples[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2012, 32(1):74.

[30] 刁雅洁. 基于镍(Ⅳ) – 鲁米诺化学发光体系建立 β – 兴奋剂类药物检测新方法[D]. Shijiazhuang: 河北医科大学, 2015.
Diao Y J. A novel Ni (Ⅳ) Complex – Luminol Chemiluminescence System Coupled with Flowinjection for Determination of Two $_2$ · agonists. [D]. shijiazhuang: Hebei Medical University, 2015.

[31] 张召香, 刘玉洁, 王 琪, 等. 基于胶束反向扫集的毛细管电泳量子点电化学发光研究[J]. 化学学报, 2019, 77(2): 179 – 183.
Zhang Z X, Liu Y J, Wang Q, *et al*. Capillary Electrophoresis and Quantum Dot Electrochemiluminescence by Micellar Reversed Sweeping [J]. Acta Chimica Sinica, 2019, 77(2):179 – 183.

[32] Zhang M Z, Wang M Z, Chen Z L, *et al*. Development of a colloidal gold – based lateral – flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of clenbuterol and ractopamine in swine urine [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2009, 395(8): 2591 – 2599.

[33] 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.
Jiang W, Liu Y C, Chen Y J, *et al*. Development of colloidal gold immunochromatography test strip for rapid detection of ractopamine [J]. Chinese Journal of animal infectious diseases, 2011, 19(6):59 – 64.

[34] Jiang J Q, Yang X F, Wang Z L, *et al*. Development of a monoclonal antibody based colloidal gold immunochromatography strip for multianalysis of clenbuterol and ractopamine[J]. Chinese Journal of Animal & Veterinary Sciences, 2013, 44(1):87 – 94.

[35] 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.
Wang C, Li Z X, Lin G F, *et al*. Test ractopamine with the method of time – resolved fluoroimmunoassay [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2011, 23(5):438 – 441.

[36] 李 贞. 莱克多巴胺钐标记时间分辨荧光免疫分析方法的建立[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(3):36 – 40.
Li Z. Establishment of time – resolved fluorescence immunoassay for ractopamine samarium labeling [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(3):36 – 40.

[37] 张 祯, 刘景富, 姚 焱, 等. 竞争双标记时间分辨荧光免疫分析法同时测定猪肉组织中氯霉素和莱克多巴胺研究[J]. 科学通报, 2011, 56(4):304 – 308.
Zhang Z, Liu J F, Yao Y, *et al*. Simultaneous determination of chloramphenicol and ractopamine in pork tissues by competitive double label time – resolved fluoroimmunoassay [J]. Chinese Science Bulletin, 2011, 56(4):304 – 308.

[38] 向 露, 龚 倩, 王 智, 等. Alphalisa 法同时测定动物组织中克伦特罗和莱克多巴胺[J]. 重庆医科大学学报, 2018, 43(11):67 - 72.
Xiang L, Gong Q, Wang Z, *et al*. Simultaneous determination of clenbuterol and ractopamine in animal tissues by AlphaLISA[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2018, 43(11): 67 - 72.

[39] Wang S, Shuai Z, Xiao W, *et al*. An Improved Label - Free Indirect Competitive SPR Immunosensor and Its Comparison with Conventional ELISA for Ractopamine Detection in Swine Urine [J]. Sensors, 2017, 17(3):604.

[40] 张媛媛, 王瑞鑫,李秋薇, 等. 基于多壁碳纳米管免疫传感器法快速测定食品中的莱克多巴胺[J]. 食品科学, 2016, 37(08):170 - 175.
Zhang Y Y, Wang R X, Li Q W, *et al*. An Immunosensor for Rapid Determination of Ractopamine in Foods Based on Multi - Walled Carbon Nanotubes [J]. Food Science, 2016, 37(08): 170 - 175.

[41] 周 妮,陈 丹,姚冬生, 等. 莱克多巴胺核酸适配体电化学生物传感器的研制[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(1): 42 - 29.
Zhou N, Chen D, Yao D S, *et al*. Development of An Electrochemical Aptasensor Basic on the ssDNA Aptamer of Ractopamine [J]. China Biotechnology, 2014, 34(1):42 - 29.

[42] He L, Guo C, Song Y, *et al*. Chitosan stabilized gold nanoparticle based electrochemical ractopamine immunoassay[J]. Microchimica Acta, 2017, 184(8):2919 - 2924.

[43] Gu C,Ren P,Zhang F, *et al*. Detection of Six β - Agonists by Three Multiresidue Immunosensors Based on an Anti - bovine Serum Albumin - Ractopamine - Clenbuterol - Salbutamol Antibody [J]. ACS Omega, 2020, 5(10)5548 - 5555.

(编 辑:侯向辉)