

# 莱克多巴胺 ELISA 快检技术样品前处理方法研究

肖小华, 周 思, 李攻科\*

(中山大学化学与化学工程学院, 广州 510275)

**摘 要:** **目的** 建立适合莱克多巴胺 ELISA 快速检测技术基体干扰消除的样品前处理方法。**方法** 样品经乙腈-0.1 mol/L 盐酸(84 : 16, v/v)处理, 上清液采用正己烷萃取除杂, 水相用 NaOH 调成碱性后, 用乙酸乙酯萃取, 有机相层吹干后待测。**结果** 样品采用正己烷萃取 1 次后, 基体干扰可消除约 25%; 萃取 3 次后, 样品中的基体干扰可被基本消除。**结论** 该前处理方法能有效消除莱克多巴胺快速检测的基体干扰, 对猪肝、猪肉等肉类食品的适用性良好。

**关键词:** 莱克多巴胺; ELISA; 样品前处理; 基体干扰

## Study on the sample pretreatment for rapid detection of ractopamine residues in foods by ELISA

XIAO Xiao-Hua, ZHOU Si, LI Gong-Ke\*

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish an efficient sample pretreatment method for the rapid detection of ractopamine using enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) technique. **Methods** The samples were extracted with acetonitrile and 0.1 mol/L HCl (84 : 16, v/v), washed with *n*-hexane and then adjusted to basicity. The extract was further extracted with ethyl acetate and the ethyl acetate extractant was dried for further analysis. The influences of *n*-hexane, petroleum ether, *n*-heptane and cyclo-hexane were tested. **Results** Twenty five percentage of the matrix interferences were eliminated by extracting the sample one time with *n*-hexane, and the matrix interferences were eliminated after the sample was extracted 3 times. **Conclusion** This proposed sample pretreatment method is efficient and it has a good potential on the rapid detection of ractopamine in other meat samples.

**KEY WORDS:** ractopamine; enzyme-linked immunosorbent assay; sample pretreatment; matrix interferences

### 1 引 言

莱克多巴胺俗称“瘦肉精”, 是一种  $\beta$ -肾上腺素抗体激动剂, 用于畜牧业和养殖业, 它能增加瘦肉含量, 提高饲料的转化率。在饲料中滥用莱克多巴胺作为添加剂可使其通过日常饮食摄入转移到人体中,

导致恶心、心悸、头晕等中毒症状, 对心脑血管患者的危害更为严重<sup>[1]</sup>。我国明令禁止在国内生产和销售莱克多巴胺, 但在利益驱使下仍有不少商家和养殖户明知故犯, 在食用动物养殖中使用莱克多巴胺, 从而对人们的健康造成威胁。

常用的莱克多巴胺检测方法包括 HPLC、

基金项目: 广东省省部产学研项目(2010B090400142)

\*通讯作者: 李攻科, 教授, 食品安全分析。E-mail: cesgkl@mail.sysu.edu.cn

HPLC-MS 等<sup>[2,3]</sup>, 这些方法的前处理步骤繁琐, 费用昂贵, 专业性强, 不能满足我国广大的肉类消费市场安全监测的要求。近年来出现的酶联免疫法(ELISA)具有经济、快速、简便的特点, 在农残、兽残等食品安全检测领域应用广泛<sup>[4,5]</sup>。莱克多巴胺 ELISA 法具有较高的灵敏度和较好的选择性, 一般检测限范围在 0-50  $\mu\text{g/L}$  内, 与同类  $\beta$ -肾上腺素抗体激动剂的交叉反应率在 5%左右<sup>[6,7]</sup>。但 ELISA 法在测试中使用的抗原、抗体容易与各类样品基体物质如酯类、蛋白质等发生结合, 产生基体效应, 导致检测结果呈现假阳性或假阴性<sup>[8]</sup>。使用磷酸缓冲溶液对样品进行稀释, 添加干扰屏蔽剂等方法能有效减少 ELISA 实验中的基体干扰, 但这些方法受灵敏度、使用范围等因素的限制并未得到广泛应用<sup>[9,10]</sup>。本文拟将液液萃取与 ELISA 方法的样品前处理过程相结合, 尝试通过简单的操作步骤达到分离干扰物和目标物的目的, 从而降低样品基体干扰作用, 提高 ELISA 方法的准确性。

## 2 材料和方法

### 2.1 仪器、试剂和材料

**仪器:** DY-5000 型综合分析仪(广州达元食品安全技术有限公司); BP 252 AG 多功能食物搅拌机(广州美的集团); RE-52A 旋转蒸发器和 SHZ-III 型循环水真空泵(上海亚荣生化仪器厂); TDL-80-2B 低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 二氧化碳培养箱(上海一恒科技有限公司)。

**试剂:** 莱克多巴胺 ELISA 试剂盒(广州达元食品安全技术有限公司); 乙酸乙酯、正己烷、正庚烷、环己烷、石油醚等常用有机溶剂(分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司); 乙腈(色谱纯, LAB-SCAN, 英国); 怡宝纯净水(深圳怡宝公司); 莱克多巴胺标准品(SIGMA-ALDRICH, 美国)。

**材料:** 实验用瘦肉、肥肉、牛肉、猪肝样品于附近超市、农贸市场随机采购。

### 2.2 测试方法

#### 2.2.1 样品前处理

取适量组织样品充分绞碎, 准确称取 2.0 g, 加入 6 mL 乙腈-0.1 mol/L 盐酸(84:16, v/v), 振荡 10 min, 离心 3 min。取上清液 3 mL, 加入 2 mL 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液, 再加入 6 mL 乙酸乙酯, 振荡 10 min, 离心 3 min, 取上清液, 在 50  $^{\circ}\text{C}$  水浴中旋蒸

至近干, 加入 1 mL 纯净水复溶, 待测。

#### 2.2.2 样品测试

每份样品取 4 个微孔板平行测定。先向微孔板中加入 50  $\mu\text{L}$  待测物, 再加入 50  $\mu\text{L}$  抗体工作液, 混匀, 用盖板膜盖板, 室温下反应 30 min。弃去微孔板中液体, 用洗涤液反复清洗 6 次, 吸水纸拍干。向微孔板中加入 100  $\mu\text{L}$  酶标记物溶液, 用盖板膜盖好, 室温下反应 20 min。弃去微孔板中液体, 用洗涤液反复清洗 6 次, 吸水纸拍干。向微孔板中先后加入 50  $\mu\text{L}$  底物 A 和底物 B, 混匀, 暗处孵化 10 min。加入 50  $\mu\text{L}$  终止液, 混匀后在 450 nm 处测量吸光度。

#### 2.2.3 结果处理

测定时, 以同等情况下纯水的吸光度( $A_0$ )值为对照, 用样品的吸光度值( $A$ )与纯水的吸光度值比值  $A/A_0$  作为判断依据, 以 1 作为判断标准, 样品的  $A/A_0$  值越接近 1 说明基体干扰越弱。

## 2.3 液液萃取样品前处理方法

### 2.3.1 选择萃取溶剂

称取猪肝样品 5 份, 按 2.2.1 中样品前处理方法进行处理。样品经乙腈提取后, 以其中 1 份提取液作为对照, 其他 4 份提取液中分别加入 3 mL 的石油醚、正庚烷、环己烷、正庚烷, 充分振荡萃取, 离心, 弃去上层溶液。此后其它步骤不变, 对比这五份样品的测试结果。

### 2.3.2 萃取溶剂对目标物的影响

称取猪肝、牛肉、瘦肉、肥肉样品各 3 份, 按 2.3.1 中“选择萃取溶剂”步骤处理。每份样品分为 3 组, 第 1 组直接测试, 第 2 组使用 3 mL 正己烷萃取后测试, 第 3 组加入浓度为 100  $\mu\text{g/L}$  的莱克多巴胺标准溶液 20  $\mu\text{L}$ , 避光放置 2 h, 按方法处理进行测试。

### 2.3.3 优化萃取溶剂用量

称取猪肝样品 6 份, 按 2.3.1 中“选择萃取溶剂”方法处理, 在加入正己烷溶液萃取时, 分别加入体积为 0、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 的正己烷, 其他过程不变。对比这 6 份样品与纯水的吸光度值。

### 2.3.4 优化萃取次数

称取猪肝样品 5 份, 按 2.3.1 中“溶剂选择”所提及的方法进行处理, 在加入正己烷进行萃取时, 分别萃取 0、1、2、3 次, 其他过程不变。对比这 5 份样品与纯水的吸光度值。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 萃取溶剂的选择

采用色谱方法检测肉类样品中兽药残留时,常使用正己烷等有机溶剂对样品提取液进行萃取,以除去基体中的极性干扰杂质。本文选择正己烷、石油醚、正庚烷、环己烷等四种极性较弱的溶剂,以萃取前后样品的  $A/A_0$  为参数,考察它们对 ELISA 法测定肉类食品中莱克多巴胺的影响。结果如图 1 所示。

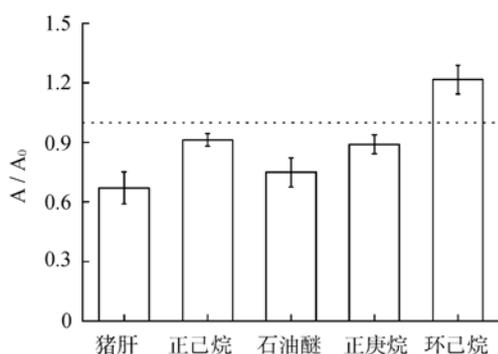


图 1 萃取溶剂的选择

Fig. 1 The choice of extraction solvents

由图 1 可知,猪肝样品的  $A/A_0$  值在 0.7 左右,与 1 相差大,表明样品的基体干扰较严重。使用有机溶剂进行萃取除杂后,样品的吸光度值均有所增加,其中使用正己烷、石油醚、正庚烷萃取过后的样品,  $A/A_0$  值都接近于 1,其中正己烷的值最为接近。这说明采用有机溶剂萃取能有效减少样品基体的干扰。使用环己烷萃取后,  $A/A_0$  值远大于 1,这可能是因为环己烷的加入有利于酶标记物的吸附,使得结果的吸光度值偏高,导致结果出现假阴性。因此,后续实验选用正己烷为提取液的除杂溶剂。

#### 3.2 萃取溶剂对目标物的影响

采用弱极性有机溶剂萃取可以有效降低基体干扰,但方法是否可行还需考察萃取试剂对目标物莱克多巴胺的影响。如果试剂在萃取除杂过程同时萃取了莱克多巴胺,将会造成目标物的损失,方法同样不可行。本文采用正己烷为萃取除杂剂对猪肝样品的提取液进行除杂处理,比较了萃取除杂前后猪肝及猪肝加标(100  $\mu\text{g/L}$ )样品的  $A/A_0$  值和对应浓度莱克多巴胺标准品的  $A/A_0$  值结果。

结果表明,使用正己烷对乙腈样品提取液萃取除杂后,莱克多巴胺标准品的  $A/A_0$  值基本不变,但猪肝及猪肝加标(100  $\mu\text{g/L}$ )样品的  $A/A_0$  值均有明显提高。说明正己烷萃取除杂处理能有效减少样品基体的干扰,同时不会对待测物的测定造成显著影响。

#### 3.3 萃取溶剂用量和萃取次数

在样品前处理过程中萃取试剂用量和萃取次数会影响到基体干扰的去除效果,萃取溶剂的量越大,萃取的次数越多,除杂效果越明显。但实际应用中需要综合考虑除杂效果、试剂用量和操作复杂程度等多种因素。因此,本文考察了萃取溶剂用量及其萃取次数对莱克多巴胺 ELISA 检测效果的影响。结果见图 2。

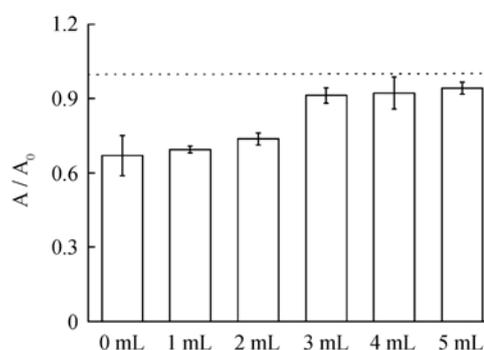


图 2 萃取溶剂的体积

Fig. 2 The volume of extraction solvent

由图 2 可知,猪肝样品的  $A/A_0$  值为 0.7 左右,与 1 相差大,基体干扰严重。随着正己烷用量的增加,猪肝基体的  $A/A_0$  值逐步增加,当正己烷的体积达到 3 mL 时,  $A/A_0$  值随试剂体积增加的趋势变缓,并逐步接近 1。综合考虑溶剂用量和萃取效果,最终选定萃取溶剂的体积为 4 mL,可提高  $A/A_0$  值约 25%。在此基础上,考察了其萃取次数的影响,结果如图 3 所示。

使用正己烷萃取 1 次后  $A/A_0$  值由原来的 0.6 增加至 0.7 左右,萃取 3 次后吸光度值已十分接近纯水的测定值。考虑到增加萃取次数会增加操作的复杂度,延长操作时间,在实际应用中萃取 1 次即可。当样品的基体干扰严重或者测试要求较高时,可视需要增加萃取次数。

#### 3.4 实际样品测试

本试验以猪肝为样品,选择了萃取除杂试剂,

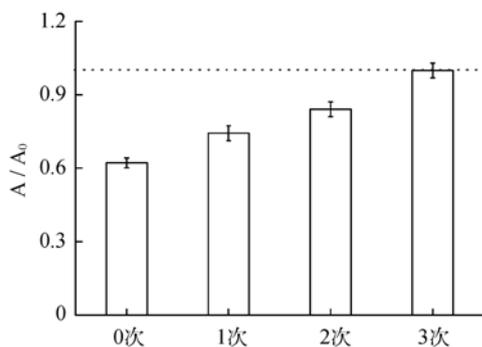


图3 萃取次数的选择

Fig. 3 The choice of extraction times

并对其萃取条件进行了优化,建立了适用于肉类样品莱克多巴胺快速测定中的萃取除杂方法。结合建立

的样品前处理方法和 ELISA 快速检测技术对周边市场的猪肉(包括肥肉、瘦肉和猪肝等)及牛肉等共 20 个样品进行了检测,结果如表 1 所示。

可以看出,猪肝、牛肉、瘦肉、肥肉四种样品的直接测试  $A/A_0$  值偏低,大部分位于 0.4~0.6 之间,最低值仅为 0.390,基体干扰严重。使用 4 mL 的正己烷萃对样品进行萃取后,样品的  $A/A_0$  值都有所上升,大部分位于 0.7~0.9 之间,平均增幅为 0.2 左右,萃取后样品的  $A/A_0$  值最高可达 0.912,基体干扰作用可忽略,还可根据实际需要增加萃取次数。因此,使用正己烷萃取进行除杂,可有效降低样品基体对测定结果的干扰而不会影响目标物的测定。

表 1 实际样品测试结果( $n=4$ )  
Table 1 The results of real samples ( $n=4$ )

种类		比值		种类		比值	
编号	名称	萃取前	萃取后	编号	名称	萃取前	萃取后
BS-1	牛肉	0.390±0.008	0.809±0.032	BS-2	肥肉	0.654±0.026	0.715±0.007
XM-1	牛肉	0.745±0.015	0.857±0.035	XM-9	肥肉	0.419±0.017	0.631±0.06
XM-2	牛肉	0.684±0.014	0.780±0.031	XM-10	肥肉	0.452±0.018	0.904±0.009
XM-3	牛肉	0.643±0.012	0.798±0.032	XM-11	肥肉	0.556±0.022	0.705±0.007
XM-4	牛肉	0.709±0.014	0.804±0.032	XM-12	肥肉	0.671±0.027	0.912±0.009
BS-3	瘦肉	0.459±0.030	0.879±0.026	BS-4	猪肝	0.420±0.013	0.538±0.011
XM-5	瘦肉	0.696±0.049	0.764±0.023	XM-13	猪肝	0.533±0.016	0.677±0.014
XM-6	瘦肉	0.549±0.038	0.756±0.024	XM-14	猪肝	0.503±0.015	0.720±0.014
XM-7	瘦肉	0.567±0.040	0.710±0.021	XM-15	猪肝	0.479±0.014	0.764±0.015
XM-8	瘦肉	0.531±0.036	0.694±0.021	XM-16	猪肝	0.668±0.021	0.829±0.016

## 4 结论

本文建立的萃取除杂法可用于消除莱克多巴胺 ELISA 方法中的基体干扰现象。试验表明:使用弱极性的溶剂正己烷、正庚烷和石油醚对乙腈提取液进行萃取都可以有效地降低肉类样品基体的干扰作用,其中正己烷作用效果最好。使用 4 mL 的正己烷对猪肝样品提取液萃取 1 次,可使样品的  $A/A_0$  值提高 25%;萃取 3 次后,样品中的基体干扰可基本消除,方法在牛肉、瘦肉和肥肉样品的检测中适用性良好。

## 参考文献

[1] 陈冬梅,陶燕飞,余欢,等.兽药残留分析中样品前处理技术研究进展[J].化学通报,2009,8:713-719.

- [2] GB/T 22147-2008. 饲料中沙丁醇胺、莱克多巴胺和盐酸克伦特罗的测定 液相色谱质谱联用法 [S].
- [3] 农业部 958 号公告-3-2007. 动物源性食品中莱克多巴胺残留量的测定 高效液相色谱法-质谱法 [S].
- [4] Sun JW, Liu B, Zhang Y, *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for metolcarb residue analysis and investigation of matrix effects from different agricultural products[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 394: 2223-2230.
- [5] Shelver WL, Smith DJ. Application of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of ractopamine in incurred samples from food animals[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50 (10): 2742-2747.
- [6] Shelver WL, Smith DJ, Berry ES. Production and characterization of a monoclonal antibody against the beta-adrenergic agonist

- ractopamine[J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48 (9): 4020-4026.
- [7] 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, 10: 26-28.
- [8] Font H, Adrian J, Galve R, *et al.* Immunochemical assays for direct sulfonamide antibiotic detection in milk and hair samples using antibody derivatized magnetic nanoparticles[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 736-743.
- [9] Song Y, Ge Y, Zhang Y, *et al.* Hapten synthesis and enzyme-linked immunosorbent assay for phosmet residues: assay optimization and investigation of matrix effects from different food samples[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393: 2001-2008.
- [10] Dagnac T, Garcia-Chao M, Pulleiro P, *et al.* Dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem

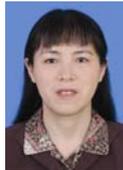
mass spectrometry for the multi-residue analysis of pesticides in raw bovine milk[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216: 3702-3709.

(责任编辑: 赵静)

### 作者简介



肖小华, 男, 博士, 副教授。主要研究方向: 食品及药物中危害因子快速检测方法研究。  
E-mail: xiaoxhua@mail.sysu.edu.cn



李攻科, 女, 博士, 教授, 食品与药物安全分析; 色谱及光谱分析; 复杂体系分离分析。  
E-mail: cesgk1@mail.sysu.edu.cn