

# 猪肾脏等组织中盐酸莱克多巴胺的 HPLC 检测方法及其残留消除

申屠芬琴, 强致懿, 张素霞, 丁双阳, 江海洋, 沈建忠\*

(中国农业大学动物医学院药理与毒理实验室/国家兽药残留基准实验室, 北京 100094)

**摘要:** 本研究建立了猪肝脏、肾脏、肌肉和脂肪中盐酸莱克多巴胺的高效液相色谱检测方法。方法的检测限为 1 ng/g, 定量限为 2 ng/g, 肝脏的平均回收率在 73.4%~83.2%, 变异系数在 2.1%~6.6%; 肾脏的平均回收率在 73.1%~95.5%, 变异系数在 3.8%~4.0%; 肌肉的平均回收率在 80.7%~82.5%, 变异系数在 4.9%~9.1%; 脂肪的平均回收率在 73.3%~78.8%, 变异系数在 2.9%~6.7%。对 60 头健康猪以 18 mg/kg 的剂量混饲给药 28 d, 停药饲喂 14 d。在给药 7、14、28 d 和停药 1、2、3、7、9、14 d 分别屠宰 6 头猪, 取各组织进行残留量测定。结果显示: 肾脏中残留量最高, 肝脏其次, 残留量在停药期间较给药期间显著降低。其中肾脏和肝脏中的残留量分别在停药 14 d、停药 9 d 后降至定量限以下; 肌肉和脂肪中的残留量显著低于肾脏和肝脏, 给药 28 d 时, 残留基本低于定量限; 停药 1 d 时均低至检测限以下。

**关键词:** 高效液相色谱; 盐酸莱克多巴胺; 猪组织; 残留; 消除

中图分类号: S859.84

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)06-0589-06

## Determination and Residue Depletion of Ractopamine Hydrochloric in 4 Porcine Tissues by HPLC

SHENTU Fen-qin, QIANG Zhi-yi, ZHANG Su-xia, DING Shuang-yang,  
JIANG Hai-yang, SHEN Jian-zhong\*

(Department of Pharmacology and Toxicology, College of Veterinary Medicine, China  
Agricultural University/National Reference Laboratory for  
Veterinary Drug Residue, Beijing 100094, China)

**Abstract:** A high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed to determine ractopamine hydrochloric in porcine tissues. The limit of detection (LOD) was 1 ng/g and the limit of quantification (LOQ) was 2 ng/g. The average recovery rate in liver was 73.4%-83.2% with coefficients of variation (CV) of 2.1%-6.6%; in kidney was 73.1%-95.5% with CV of 3.8-4.0%; in muscle was 80.7%-82.5% with CV of 4.9%-9.1%; and in fat was 73.3%-78.8% with CV of 2.9%-6.7%. Sixty healthy pigs were administered ractopamine hydrochloric at a dosage of 18 mg/kg in feeds for 28 days, then fed without the drug for 14 days. Six pigs were slaughtered at day 7, 14, 28 since the first feeding and with withdrawal periods of day 1, 2, 3, 7, 9 and 14. Tissues including kidney, liver, muscle and fat of each pig were collected and determined by HPLC. Results showed that the concentration of ractopamine hydrochloric in kidney was the highest, and lower in liver. Residues were significantly lower after the last feeding with the drug. Residues were declined below the LOQ at day 14 withdrawal period in kidney, and at day 9 of withdrawal period in liver. The concentration of ractopamine hydrochloric in muscle and

收稿日期: 2006-08-23

作者简介: 申屠芬琴(1980-), 女, 浙江桐庐人, 硕士生, 主要从事药理与毒理方面研究, E-mail: Fenqin0@126.com

\* 通讯作者: 沈建忠, Tel: 010-62732803, E-mail: sjz@cau.edu.cn

fat were much lower than that in liver and kidney, residues were declined below the LOQ at day 28, and dropped to LOD at day 1 of withdrawal period.

**Key words:** HPLC; ractopamine hydrochloric; porcine tissues; residue; depletion

莱克多巴胺(Ractopamine)属于苯乙醇胺类 $\beta$ -受体激动剂,它可以促进畜禽生长,降低酮体脂肪含量,起到改变酮体瘦肉和脂肪比例的作用,从而提高瘦肉率<sup>[1,2]</sup>。但与许多兽药相同,莱克多巴胺存在组织残留问题,危害人类健康。目前,莱克多巴胺被美国等少数国家批准应用于提高动物瘦肉率,但在世界上大多数国家是被禁用的,我国也将其列入禁用目录<sup>[3]</sup>。然而,在饲料加工或饲养过程中违法使用莱克多巴胺的现象时有发生,并有蔓延之势。因此,研究建立快速、简便、有效的检测手段已成为控制 $\beta$ -兴奋剂非法使用的迫切任务。

国内外有关动物组织中莱克多巴胺的检测方法主要有高效液相色谱法<sup>[4,5]</sup>、液相色谱-质谱法<sup>[6,7]</sup>、气相色谱-质谱法<sup>[8]</sup>及酶联免疫测定法<sup>[9,10]</sup>等。由于莱克多巴胺在动物体内代谢较快,因此建立动物组织中莱克多巴胺的检测方法,研究莱克多巴胺在组织中的残留消除规律,可对畜产品整个生产过程中使用该药的现象进行有效监控。笔者采用高效液相色谱法建立了猪肝脏、肾脏、肌肉和脂肪中莱克多巴胺的残留检测方法,研究了给药期间该药物在组织中的残留消除规律,拟为检测和控制该药物的非法使用提供可行的检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

Waters 高效液相色谱仪(600 泵、717 自动进样器、2475 多波长荧光检测器、Empower 色谱工作站),ACC Nissei AM-6 型组织匀浆机,LD4-2A 离心机,旋涡混合仪,BÜCHI R-200 旋转蒸发仪,METTLER AE-240 型微量分析天平,氮吹仪,隔膜真空泵,微孔滤膜(0.45  $\mu\text{m}$ );SPE 固相萃取柱(Waters Sep-Pak Plus Alumina A,500 mg,6 cc)。

莱克多巴胺标准品(纯度 99.05%)、莱克多巴胺预混剂(含量 1.8%)由中国农业大学动物医学院药理与毒理实验室保存。

$\beta$ -葡萄糖苷酶,购自 Sigma 公司;甲醇和乙腈为色谱纯;乙酸乙酯等其他试剂为分析纯;水为超纯水。

### 1.2 溶液配制

1.2.1 样品稀释液 将 2 mL 冰乙酸加入装有 900 mL 超纯水的容量瓶中,再用超纯水定容至 1 000 mL。

1.2.2 流动相 将 0.70 g 戊烷磺酸钠溶于超纯水中,加入 2 mL 冰乙酸,定容至 1 L(A),0.45  $\mu\text{m}$  水系滤膜过滤脱气后使用。与乙腈(B)组成流动相,比例为 A : B=80 : 20。

1.2.3 莱克多巴胺标准贮备液 准确称取(0.010 0 $\pm$ 0.000 5) g 莱克多巴胺标准品,置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,即为浓度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的贮备液,置 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.2.4 莱克多巴胺标准添加溶液 取出标准贮备液回至室温,移取 500  $\mu\text{L}$  于 50 mL 容量瓶中,用样品稀释液定容,配制成 1 000 ng/mL 的标准添加溶液。移取 5 mL 1 000 ng/mL 的添加溶液至 50 mL 容量瓶中,用样品稀释液定容,配制成 10 ng/mL 的标准添加溶液,置 4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

1.2.5 莱克多巴胺标准工作溶液 分别准确量取一定量的标准贮备液,置于 100 mL 容量瓶中,用样品稀释液稀释、定容,配制成浓度为 5、10、20、50、100、200、500 ng/mL 的标准工作溶液,分别进 HPLC 检测。

### 1.3 色谱条件

色谱柱:Supelcosil LC-18 柱 4.6 mm $\times$ 250 mm (i. d.),粒径 5  $\mu\text{m}$ ;荧光检测器:激发波长为 226 nm,发射波长为 305 nm;流速:1.0 mL/min;进样量:100  $\mu\text{L}$ ;柱温:室温;采集时间:20 min。

### 1.4 标准曲线绘制

将莱克多巴胺标准工作溶液(见 1.2.5)各取 100  $\mu\text{L}$  进行 HPLC 分析,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

### 1.5 动物处理及取样

60 头体重约 50 kg 的健康长白猪,以 18 mg/kg 的剂量拌料饲喂 28 d,之后饲喂不含任何药物的相同饲料 14 d,每天定时给料 2 次,自由采食、饮水。在给药 7、14、28 d(即停药 0 d)和停药 1、2、3、7、9、14 d 分别屠宰 6 头猪,取肝脏、肾脏、肌肉和脂肪,于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.6 样品处理

1.6.1 样品提取 称取 5.00 g 匀浆组织于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 丙酮,涡动 1 min,超声 1 min,静置 10 min 后,3 000 r/min 离心 10 min。将上清液转入离心管中,残渣用 10 mL 丙酮重复提取 2 次。合并 3 次提取液,3 000 r/min 离心 10 min,将上清液转入鸡心瓶中,50 °C 下旋蒸至近干。加入 1 mL 乙酸铵溶液(25 mmol/L,pH 5.00±0.05)和 20 μL β-葡萄糖苷酶,涡动混匀,65 °C 静置 2 h。

加入 2 mL 硼酸钠缓冲液(25 mmol/L,pH 10.3±0.1),涡动 1 min,再加入 7 mL 乙酸乙酯,涡动 1 min,移至 15 mL 离心管,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液,再重复萃取下层液体,合并上清。

1.6.2 样品净化 将酸性氧化铝柱置于固相萃取真空歧管装置上,5 mL 乙酸乙酯平衡,将提取液过柱,5 mL 乙酸乙酯洗涤,真空干燥数分钟,10 mL 甲醇洗脱于刻度试管中,50 °C 下氮气吹干;1 mL 样品稀释液复溶,0.45 μm 水系针孔滤膜过滤,进 HPLC 分析。

### 1.7 检测限和定量限的测定

取空白的肝脏、肾脏、肌肉和脂肪各 6 个平行样品,按上述样品处理的方法处理,测得基线噪音值,按信噪比 S/N=3 为检测限(LOD),S/N=6 为定量限(LOQ)。

### 1.8 添加回收率及变异系数的测定

分别取空白的肝脏、肾脏、肌肉和脂肪各 5.0 g,添加一定体积的标准添加溶液,使肝脏和肾脏中药物浓度为 2、10、20 和 50 ng/g;肌肉和脂肪中为 2、10 和 20 ng/g,按上述样品处理方法分别处理后进行 HPLC 测定,1 d 内每个浓度取 4 个平行样品,分别测定,计算回收率和日内变异系数。

样品中盐酸莱克多巴胺浓度的计算公式为: $X = (A/A_s) \times C_s \times V/M$

式中: $X$  为供试样品中盐酸莱克多巴胺的残留量(ng/g); $C_s$  为对照溶液的浓度(ng/mL); $A$  为供试样品的峰面积; $A_s$  为对照溶液的峰面积; $V$  为浓缩至干后,流动相溶解残余物质所用体积(mL); $M$  为供试样品量(g)。

添加样品的回收率的计算公式为: $R = X_s/X_0 \times 100\%$

式中: $X_s$  为实测浓度(ng/g); $X_0$  为添加浓度(ng/g)。

## 1.9 猪组织中盐酸莱克多巴胺的测定

按上述样品处理方法,检测已采集样品(见 1.5)中盐酸莱克多巴胺的残留量。

## 2 结果

### 2.1 标准曲线的绘制

在浓度为 5~1 000 ng/mL 范围内色谱峰面积与浓度呈线性相关。其线性方程为: $Y = 1\,530X + 702$ , $R^2 = 0.999\,9$ ,见图 1。若分析样品时,浓度超出此范围,稀释样品即可。

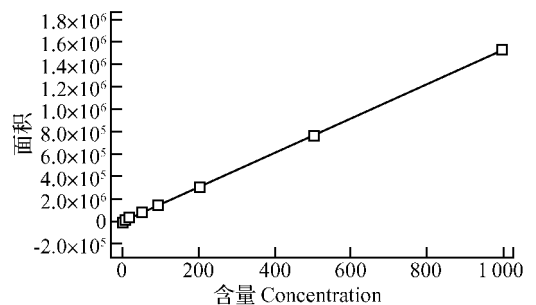


图 1 盐酸莱克多巴胺标准曲线

Fig. 1 The standard curve of ractopamine hydrochloride

### 2.2 定量限和检测限

根据 6 个空白样品的基线噪音值求其平均值,按信噪 S/N=3 为检测限(LOD),S/N=6 为定量限(LOQ),求得猪肝脏中盐酸莱克多巴胺的 LOD 为 1 ng/g、LOQ 为 2 ng/g;肾脏中 LOD 为 1 ng/g、LOQ 为 2 ng/g;肌肉中 LOD 为 1 ng/g、LOQ 为 2 ng/g;脂肪中 LOD 为 1 ng/g、LOQ 为 2 ng/g。

### 2.3 添加回收率与日内变异系数

本方法的添加回收率及变异系数如表 1 所示。由表 1 可见本检测方法准确度和精密度较好,回收率较高。

盐酸莱克多巴胺标准品色谱图和猪各组织空白及添加色谱图见图 2。由色谱图可见,盐酸莱克多巴胺的色谱峰峰形尖锐且对称,分离度良好,无明显干扰峰。

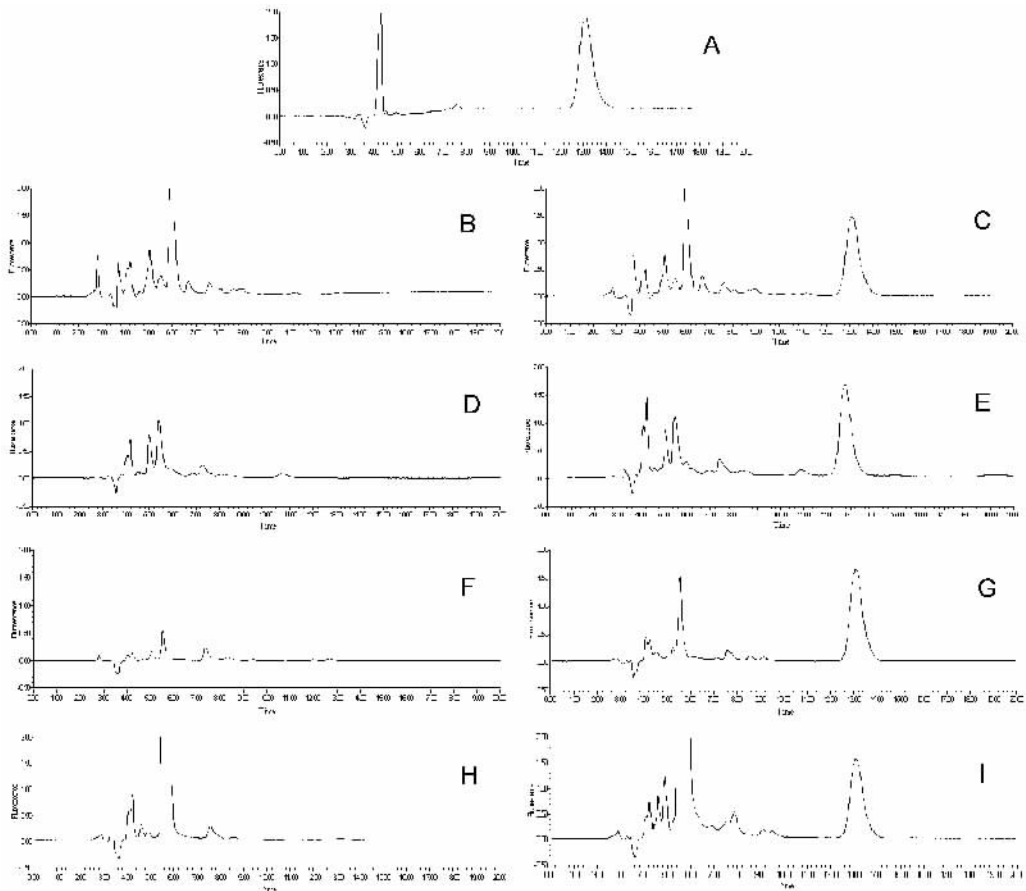
### 2.4 猪组织中盐酸莱克多巴胺的残留消除

用 HPLC 方法测定不同时间点采集的肝脏、肾脏、肌肉和脂肪样品中盐酸莱克多巴胺的残留量,检测结果分别见表 2~5。

表 1 猪组织中盐酸莱克多巴胺添加回收率和变异系数(n=4)

Table 1 The recovery and R. S. D. of ractopamine hydrochloride in porcine tissues (n=4)

组织 Tissues	添加浓度 Fortified concentration/(ng/g)	实测浓度 Determined value/(ng/g)	平均回收率 Average recovery rate/%	变异系数 R. S. D. / %
肝脏 Liver	2	1.5±0.08	74.4	5.1
	10	7.3±0.49	73.4	6.6
	20	16.6±0.47	83.2	2.8
	50	40.3±0.84	81.8	2.1
肾脏 Kidney	2	1.5±0.06	73.1	3.8
	10	8.1±0.31	80.8	3.8
	20	19.1±0.74	95.5	3.9
	50	43.7±1.73	87.4	4.0
肌肉 Muscle	2	1.6±0.15	81.0	9.1
	10	8.2±0.58	82.5	7.1
	20	16.1±0.79	80.7	4.9
脂肪 Fat	2	1.5±0.05	77.2	3.5
	10	7.9±0.53	78.8	6.7
	20	14.7±0.44	73.3	2.9



A. 标准溶液(50 ng/mL); B. 空白肝脏样品; C. 添加肝脏样品(10 ng/g); D. 空白肾脏样品; E. 添加肾脏样品(10 ng/g); F. 空白肌肉样品; G. 添加肌肉样品(10 ng/g); H. 空白脂肪样品; I. 添加脂肪样品(10 ng/g)

A. Standard solution(50 ng/mL); B. Blank liver sample; C. Spike liver sample (10 ng/g); D. Blank kidney sample; E. Spike kidney sample (10 ng/g); F. Blank muscle sample; G. Spike muscle sample (10 ng/g); H. Blank fat sample; I. Spike fat sample (10 ng/g)

图 2 猪组织中盐酸莱克多巴胺色谱分析

Fig. 2 The chromatogram of ractopamine hydrochloride in 4 porcine tissues

表 2 猪肝脏中盐酸莱克多巴胺残留 (n=6)

Table 2 The residues of ractopamine hydrochloric in porcine liver (n=6)

时间 Time	盐酸莱克多巴胺残留的实际检测值/(ng/g) Determined value of ractopamine hydrochloric/(ng/g)					
给药 7 d	43.26	61.82	61.66	30.41	28.64	50.77
给药 14 d	62.12	61.87	61.20	61.65	52.41	60.43
给药 28 d	13.97	28.00	37.50	15.04	65.73	26.52
停药 1 d	13.56	1.95	10.12	10.36	6.29	8.75
停药 2 d	2.58	5.13	3.84	2.65	1.83	3.12
停药 3 d	4.88	5.84	3.38	3.66	9.21	3.85
停药 7 d	ND	ND	<2	2.45	2.21	2.01
停药 9 d	ND	ND	ND	ND	<2	<2
停药 14 d	ND					

ND. 表示不可检出;—,表示停药 2d 后未检测,下表同

ND. Means could not be detected;—, Means did not be analyzed after 2 days withdrawal, the same as below

表 3 猪肾脏中盐酸莱克多巴胺残留 (n=6)

Table 3 The residues of ractopamine hydrochloric in porcine kidney (n=6)

时间 Time	盐酸莱克多巴胺残留的实际检测值/(ng/g) Determined value of ractopamine hydrochloric/(ng/g)					
给药 7 d	157.97	232.10	175.89	172.86	94.43	182.36
给药 14 d	194.79	148.89	181.03	177.38	155.75	173.25
给药 28 d	53.77	74.53	60.96	53.28	117.97	62.15
停药 1 d	16.10	5.62	12.19	37.06	7.07	10.64
停药 2 d	6.37	12.79	5.66	9.40	4.68	5.48
停药 3 d	7.36	14.24	4.88	6.33	19.00	6.98
停药 7 d	<2	2.04	8.68	4.42	5.49	3.52
停药 9 d	ND	ND	4.36	<2	3.34	<2
停药 14 d	ND	<2	<2	ND	<2	ND

表 4 猪肌肉中盐酸莱克多巴胺残留 (n=6)

Table 4 The residues of ractopamine hydrochloric in porcine muscle (n=6)

时间 Time	盐酸莱克多巴胺残留的实际检测值/(ng/g) Determined value of ractopamine hydrochloric/(ng/g)					
给药 7 d	5.73	4.62	5.17	5.40	3.44	5.30
给药 14 d	3.33	3.60	4.24	4.31	3.32	3.58
给药 28 d	<2	3.03	2.20	<2	4.21	2.06
停药 1 d	ND					
停药 2 d	—					

表 5 猪脂肪中盐酸莱克多巴胺残留 (n=6)

Table 5 The residues of ractopamine hydrochloric in porcine fat (n=6)

时间 Time	盐酸莱克多巴胺残留的实际检测值/(ng/g) Determined value of ractopamine hydrochloric/(ng/g)					
给药 7d	<2	2.20	3.75	5.69	2.25	3.87
给药 14d	5.05	5.74	7.35	2.75	2.52	4.87
给药 28d	ND	<2	2.03	ND	ND	<2
停药 1d	ND					
停药 2d	—					

### 3 讨论

猪组织中盐酸莱克多巴胺的高效液相色谱检测方法的建立参考了 Shishani 等<sup>[7]</sup>的研究,并进行了改进。本研究经过比较甲醇、乙腈和丙酮的提取效果,以丙酮提取的回收率最高,最终选用丙酮为提取溶剂。Shishani 等选择的流动相由 320 mL 乙腈、680 mL 纯水、20 mL 冰乙酸和 0.87 g 戊烷磺酸钠组成。本试验经过比较乙酸和戊烷磺酸钠的浓度对药峰响应值、出峰时间及药峰与杂峰分离度的影响,确定乙酸的浓度为 0.2%,戊烷磺酸钠的量为 0.7 g。

本试验采用自由采食的饲养方式,组内个体差异较大,但此试验设计更符合实际生产,具有实际意义。研究表明,盐酸莱克多巴胺在肾脏中残留最高,在停药 1 d 时,盐酸莱克多巴胺的平均残留量为 14.78 ng/g,较给药期间显著降低(给药 28 d 即停药 0 d 时,平均残留量为 70.44 ng/g),停药 9 d 时仍有部分个体可检测出药物,在停药 14 d 后,肾脏中残留均降至定量限以下;肝脏其次,在停药 9 d 时,残留量降至定量限以下;肌肉和脂肪中的残留量显著低于肾脏和肝脏,给药 28 d 时,残留基本低于定量限;停药 1 d 时均降至检测限以下。据报道,用 <sup>14</sup>C-盐酸莱克多巴胺以 30 ppm 的浓度拌料饲喂 4 d,在停药 0、1 和 2 d 分别检测猪肝脏、肾脏、肌肉和脂肪中 <sup>14</sup>C-盐酸莱克多巴胺的残留<sup>[11]</sup>。虽然试验设计不同,但仍可看出其各组织中的残留消除规律与本研究中盐酸莱克多巴胺在各组织中残留消除的趋势是一致的。

本研究建立的猪组织中盐酸莱克多巴胺的高效液相色谱检测方法,准确度和精确度均较好,监测该药在肝脏、肾脏、肌肉和脂肪中的残留消除显示,在

肝脏和肾脏中残留较高,在各组织中均消除较快。本法经进一步完善可为执法部门对禁药的残留检测方法提供参考。

#### 参考文献:

- [1] Carr S N, Ivers D J, Anderson D B, *et al.* The effects of ractopamine hydrochloride on lean carcass yields and pork quality characteristics [J]. *J Anim Sci*, 2005, 83(12): 2 883~2 893.
- [2] Armstrong T A, Vers D J, Wagner J R, *et al.* The effect of dietary ractopamine concentration and duration of feeding on growth performance, carcass characteristics, and meat quality of finishing pigs [J]. *J Anim Sci*, 2004, 82(11): 3 245~3 253.
- [3] 农业部公告 176 号. 禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录 [S].
- [4] Turberg M P, Macy T D, Lewis J J, *et al.* Determination of ractopamine hydrochloride in swine and turkey tissues by liquid chromatography with coulometric detection [J]. *J AOAC Int*, 1995, 78(6): 1 394~1 402.
- [5] Turberg M P, Rodewald J M, Coleman M R. Determination of ractopamine in monkey plasma and swine serum by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1996, 675(2): 279~285.
- [6] Fessler A C, Dickson L C, MacNeil J D, *et al.* Determination of beta-agonists in liver and retina by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J AOAC Int*, 2005, 88(1): 61~69.
- [7] Shishani E, Chai S C, Jamokha S, *et al.* Determination of ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-fluorescence and liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 483(1-2): 137~145.
- [8] Lehner A F, Hughes C G, Harkins J D, *et al.* Detection and confirmation of ractopamine and its metabolites in horse urine after Paylean administration [J]. *J Anal Toxicol*, 2004, 28(4): 226~238.
- [9] Shelver W L, Smith D J. Determination of ractopamine in cattle and sheep urine samples using an optical biosensor analysis: comparative study with HPLC and ELISA [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(13): 3 715~3 721.
- [10] Haasnoot W, Stouten P, Lommen A, *et al.* Determination of fenoterol and ractopamine in urine by enzyme immunoassay [J]. *Analyst*, 1994, 119(12): 2 675~2 680.
- [11] NADA. Freedom of information summary original new animal drug application [S]. 140~863.