doi:10.11751/ISSN.1002 – 1280.2020.09.05

高效液相色谱法检测猪肉、羊肉中阿托品残留量的研究

薄永恒[1],李淑焕[2],杨修镇[1],陈　玲[1],魏茂莲[1],李有志[1*],章安源[1],侯云峰[3],张　勇[3]

（1.山东省兽药质量检验所,山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室,济南 250022;
2.山东省农业工程学院食品科学与工程学院,济南 250100;3.山东金铸基药业有限公司,济南 271100）

[收稿日期] 2020 – 04 – 09　[文献标识码] A　[文章编号] 1002 – 1280 (2020) 09 – 0028 – 05　[中图分类号] S859.79

[摘　要]　为了检测阿托品在猪肉、羊肉中残留量,本研究通过实验条件的建立与优化,建立了其高效液相色谱分析方法。猪肉、羊肉中的阿托品经乙腈提取两次,用正己烷除脂两次,再经 HLB 柱净化后,用高效液相色谱仪分离,紫外检测器检测,外标法定量。结果表明:阿托品在 0.5 ~ 20.0 μg/mL 的系列浓度范围内均呈良好线性关系,相关系数 r 均大于 0.999。样品中阿托品的检测限为 0.25 mg/kg,定量限为 0.5 mg/kg。在 0.5 ~ 5 mg/kg 添加浓度范围内,阿托品的回收率均为 80 ~ 110 %,相对标准偏差(*RSD*)均小于 10 %。该方法具有简便快捷、灵敏度高、定性准确等特点。

[关键词]　猪肉;羊肉;阿托品;残留;高效液相色法

Study on the Determination of Atropine Residues in Pork and Lamb by HPLC

BO Yong – heng[1], LI Shu – huan[2], YANG Xiu – zhen[1], CHEN Ling[1], WEI Mao – lian[1], LI You – zhi[1*], ZHANG An – yuan[1], HOU Yun – feng[3], ZHANG Yong[3]

(1. *Shandong Provincial Veterinary Medicine Supervision Institute, Shandong Provincial Key Laboratory of Quality Safety Risk Assessment for Livestock and Poultry Products, Jinan* 250022, *China*; 2. *College of Food Science and Engineering, Shandong Agriculture and Engineering University*, *Jinan* 250022, *China*; 3. *Shandong Jinzhuji Pharmaceutical Co.*, *Ltd*, *Jinan* 271100, *China*)

Corresponding authors: *LI You – zhi*, *E – mail*: *liyouzhi*2009@126.*com*

Abstract: High performance liquid chromatography (HPLC) method by the established and optimized conditions for the determination of atropine residues in pork and lamb. Pork and lamb samples were extracted twice with acetonitrile, degreased twice with n – hexane, and were cleared up by HLB column. Quantification of the analyte was achieved by HPLC using external standard. The results indicated that the correlations were greater than 0.999 at the range of 0.5 to 20.0 μg/mL. The limit of detection of atropine was 0.25 mg/kg, and the limit of quantification was 0.5 mg/kg. The average recoveries of atropine ranged from 80% to 110% at spiled levels of 0.5 to 5 mg/kg with *RSD* less then 10%. The experiment show that the method is simple, rapid, high sensitivity, good reproducibility and suitable for detection of atropine residues in pork and lamb.

Key words: pork; lamb; atropine; residue; HPLC

作者简介: 薄永恒,博士,高级兽医师,从事兽药质量检验与兽药残留技术研究。

通讯作者: 李有志。E – mail: liyou zhi 2009@126.com

阿托品(atropine)是一种 M 胆碱受体阻断药,具有解除平滑肌的痉挛、抑制腺体分泌、解除迷走神经对心脏的抑制、兴奋呼吸中枢等药理活性, 在临床医学上,阿托品主要用来解除平滑肌痉挛、缓解内脏绞痛、改善循环和抑制腺体分泌,并扩大瞳孔,升高眼压,兴奋呼吸中枢。而在兽医临床上主要作为解毒药,缓解有机磷中毒的症状[1]。

但近年来,不法商贩利用阿托品的以上药理特点,在长途运输前或宰前注射阿托品,利用其抑制腺体分泌的作用特点在短时间内引起动物口渴自主大量饮水,有效减少长途运输的损失、提高屠宰率和保持短时间内猪肉、羊肉的持水性能, 从而获得非法高额利润,已经成为业内公开的秘密[2-3]。若食用含有阿托品残留的动物性食品后,人会出现瞳孔扩大、神志模糊、狂躁不安、抽搐、昏迷等症状,因食用含有阿托品的猪肉、羊肉而产生的人群集体中毒事件在近 30 年来也在报纸和杂志上有报道。我国目前暂未制定阿托品在动物源性食品中相关残留限量,欧盟也仅仅对婴幼儿食品中阿托品残留设有 1 ng/g 的最高残留限量标准[4-5]。

为了保障食品安全和公共卫生安全,必须加强对运输活猪、活羊屠宰后肉品中阿托品残留的监控,本文对猪肉、羊肉中阿托品残留量的检测方法进行研究,选择普及广且操作简单高效液相色谱仪进行检测,分别对试样前处理、色谱方法等条件摸索优化,保证了检测方法快速、准确,可以满足大批量样品高灵敏测定,为猪肉、羊肉的安全检测提供可靠的确证检测方法。

1　材料与方法

1.1　仪器　高效液相色谱仪(配紫外检测器) waters公司; MP200B 天平; 台式高速冷冻离心机(贝克曼公司);氮吹仪(美国 Organomation 公司);固相萃取装置;XW-80A 涡旋混合器(上海精科实业有限公司);HY-4 调速多用振荡器。

1.2　试剂　阿托品对照品(纯度为 99.9%, Dr. Ehrenstorfer公司);甲醇、乙腈、正己烷为色谱纯(Fisher 公司);磷酸、三乙胺、氯化钠均为分析纯;实验用水均为超纯水。

1.3　标准溶液配制　标准储备液:精密称取阿托品对照品 10 mg,用甲醇定容至 100 mL,制成 100 μg/mL 的溶液,作为标准储备液, -20 ℃标箱保存,在 3 个月内使用。

1.4　实验方法[6]

1.4.1　色谱条件　色谱柱:C18 柱,250 mm×4.6 mm (i. d.),粒径 5 μm;流动相为 0.025 mol/L 磷酸溶液(用三乙胺调 PH=3)-乙腈(87+13,v/v);流速 1.0 mL/min;进样量 20 μL;柱温 30 ℃。

1.4.2　样品前处理

1.4.2.1　提取[7]　称取均质的猪肉或羊肉组织 2.00 g(精确至 0.01 g)置于 50 mL 具塞离心管中,加乙腈 10 mL,涡旋震荡 1 min,震荡提取 15 min, 8000 r/min 离心 5 min,吸取上清液。向残渣中加入乙腈 10 mL,重复提取 1 次,合并 2 次提取液,氮吹至近干,用4%氯化钠溶液5 mL,加正己烷5 mL,涡旋 1 min,静置分层,弃去正己烷溶液,重复除脂一次,取4%氯化钠溶液层,置于 10 mL 具塞离心管中,备用。

1.4.2.2　净化[1]　取 HLB 固相萃取柱,依次使用 3 mL 甲醇、3 mL 水依次活化,将备用液全部过柱,分别用水 3 mL 和 5% 甲醇溶液 3 mL 淋洗,抽干。用乙腈 3 mL 洗脱,洗脱液于 50 ℃下氮气吹干。准确加入流动相 1.00 mL,溶解定容,涡旋混匀,过 0.22 μm 微孔滤膜,进高效液相色谱仪测定。

1.4.3　标准曲线的绘制　分别精密量取标准储备液适量,用流动相稀释成浓度分别为:0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、20.0 μg/mL 标准溶液,经 0.45 μm 滤膜过滤后,用高效液相色谱检测,外标法定量。以阿托品峰面积为纵坐标,相应浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.4.4　灵敏度　在空白猪肉、羊肉中添加阿托品标准溶液,分别制成 0.25、0.5、1.0、5 mg/kg 等 4 个浓度的空白添加样品,按确定的提取净化方法处理后,经高效液相色谱检测,观察阿托品色谱峰信噪比和对应的药物浓度,确定其检测限和定量限。

1.4.5　准确度与精密度　采用标准添加法,在猪

肉、羊肉的匀浆组织中添加 3 个不同浓度的阿托品进行回收率试验。各浓度进行 5 个样品平行试验,重复 3 次,求批内、批间相对标准偏差。

2　结果与分析

2.1　标准曲线　阿托品浓度在 0.5 ~ 20.0 μg /mL 范围内,色谱峰面积有良好的线性关系,标准曲线见图 1。

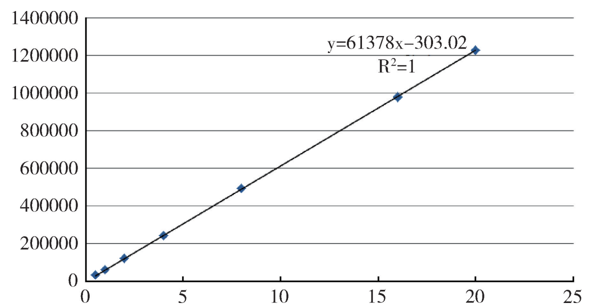

图 1　阿托品溶液的标准曲线

Fig 1　Atropine linear graph

2.2　方法灵敏度　按上述方法进行处理,猪肉、羊肉空白组织中添加浓度为 0.25 mg /kg 时,阿托品峰信噪比(S/N)均 >3,确定为方法的检测限,添加浓度为 0.5 mg /kg 时,信噪比(S/N)均 >10,确定为方法的最低定量限。猪肉、羊肉空白组织中添加 0.5 mg/kg 阿托品及相应的空白组织的高效液相色谱图,见图 2 ~ 图 5。阿托品标准品色谱见图 6。

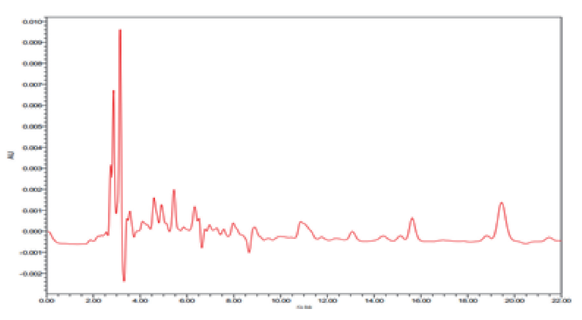

图 2　空白猪肉液相色谱图

Fig 2　Chromatogram of blank pork sample

2.3　方法准确度与精密度　空白组织中阿托品在 0.5、1.0、5 mg/kg 三个添加水平,平均回收率为 80% ~110% ,批内相对标准偏差≤10 % , 批间相对标准偏差≤20 % 。结果见表 1。

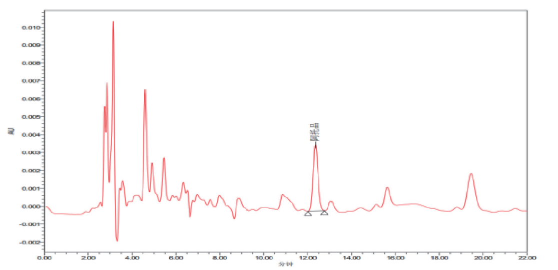

图 3　空白猪肉中添加阿托品液相色谱图(0.5 mg/kg)

Fig 3　Chromatogram of pork sample of 0.5 mg/kg atropine

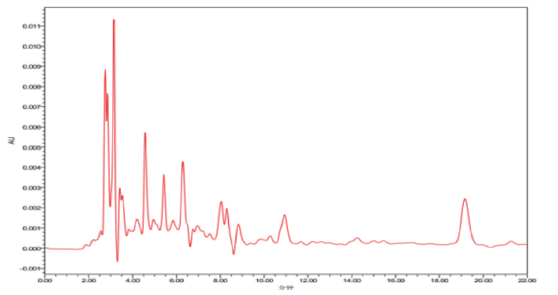

图 4　空白羊肉液相色谱图

Fig 4　Chromatogram of blank lamb sample

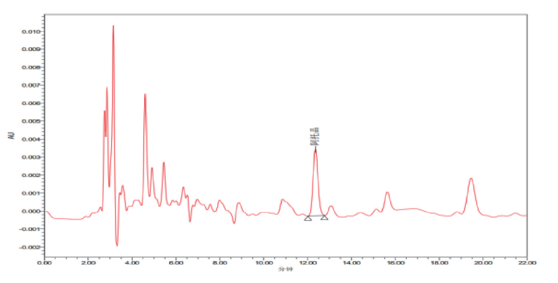

图 5　空白羊肉中添加阿托品液相色谱图(0.5 mg/kg)

Fig 5　Chromatogram of lamb sample of 0.5 mg/kg atropine

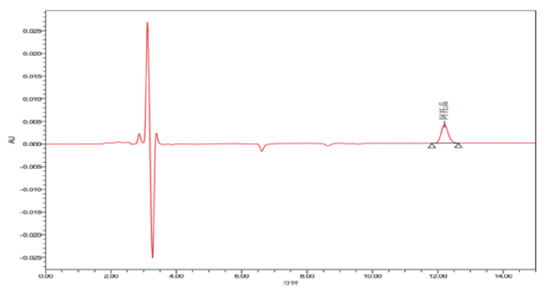

图 6　阿托品标准品(1.0 μg /mL)色谱图

Fig 6　Typical chromatogram of a atropine standard of 1.0 μg /mL

表 1　猪肉、羊肉中阿托品的相对回收率和精密度

Tab 1　The recovery of atropine and the precision determination in pork and lamb

动物组织	添加浓度/($mg \cdot kg^{-1}$)	批内平均回收率/%			批内 *RSD*/%			批间 *RSD*(%)
		1	2	3	1	2	3	
猪肉	0.5	84.25	84.81	84.47	6.2	6.3	6.1	5.7
	1.0	87.86	87.85	88.02	3.7	4.2	4.3	3.9
	5.0	82.15	82.29	82.49	2.6	2.5	2.6	2.4
猪肉	0.5	90.06	89.68	90.99	2.0	2.1	2.2	2.1
	1.0	85.54	85.81	85.52	5.6	6.1	5.8	5.4
	5.0	82.94	82.13	82.97	2.3	2.2	1.7	2.1

3　讨论与结论

3.1　色谱条件的优化　在前期摸索条件的基础上优化了流动相条件。首先,甲醇 +0.2 mol/L 磷酸二氢钠(pH =3.5) =(45 +55)[1],由于流动相盐较多,容易堵塞仪器通道及色谱柱,且柱压太高,弃用。其次,改为甲醇∶0.1% 三乙胺(pH =5.8) =35∶65[8-9],发现出峰时间为 4 min 左右,与文献不一致,且由于测定样品是肌肉组织,出峰时间早,容易出现分离度太小,目标物与杂质不易分离现象,弃用。最后改为,0.025 mol/L 磷酸溶液(pH =3.0)∶乙腈 =85∶15[6],出峰时间在 9 min 左右,但是在做添加回收时,猪肉和羊肉中在 8 min 时有一高含量杂质与目标峰分离度小于 1.5,最后调整流动相为 0.025 mol/L 磷酸溶液(pH =3.0)∶乙腈 =87∶13,出峰时间在 12 min 左右,所有杂质与目标物均有效分离。其中用三乙胺调节 pH 值,三乙胺可有效提高峰形。

通过对阿托品标准溶液进行的紫外光谱扫描,发现在波长为 210 ~202 nm 区间有强吸收,而在多个参考文献中都是以 210 nm 作为测定波长,选择 210 和 202 两个波长进行了对比实验 实验结果表明,在本法所采用的流动相下,210 nm 处的测定结果较好,故确定 210 nm 为检测波长。

色谱柱采用了 C18 柱,250 mm ×4.6 mm (i.d.),粒径 5 μm,柱子较长,对多杂质的分离效果较好。柱温在 25 ~30 ℃时,对分离影响不大,条件定为室温,有利于节能。进样量 20 μL,有利于降低检出限。

3.2　样品处理方法的优化

3.2.1　提取条件　本研究在李伟妮等研究基础上[1],提取条件共优化了 2 次。第一次增加了冰箱 -20 ℃冷冻时间为 5 min,用于除脂肪;用水提取体积为 10 mL 提取 2 次,精简了实验步骤。但在净化时,出现过柱困难的情况,净化效率严重降低,原因在于超声后,细胞碎片过多,细小杂质更容易堵住 HLB 小柱,其次离心转速及时间不够,细胞碎片没有沉淀,也容易堵住 HLB 小柱。第二次提取优化,更换了提取条件,改为乙腈提取 2 次,正己烷除脂,减少了超声后细胞碎片的产生,同时脂肪有效去除[7]。用 4 % 氯化钠溶解氮吹后的残渣,能减少正己烷与水的乳化作用,使之更容易分层。经改进后的提取条件,提取彻底,杂质更少,脂肪颗粒减少,为后续净化步骤奠定了基础。

3.2.2　净化条件　净化条件改善了淋洗步骤,将丙酮淋洗,改为水和 5 % 的甲醇水淋洗。水和 5 % 甲醇的极性比较大,能将保留在小柱中的杂质大多数冲洗出来,为液相的分离效果以及保护液相色谱柱提供了保障。

3.3　结论　通过对样品的提取条件、净化条件、色谱条件的优化,最后设定阿托品在猪肉、羊肉中的检测限为 0.25 mg/kg,定量限为 0.5 mg/kg。本方法在 0.5 ~5 mg/kg 添加浓度范围内,阿托品回收率为 80% ~110%,符合兽药残留实验室质量控制规范[10]。该方法简单快速,灵敏度高,重现性好,适合猪肉、羊肉中阿托品残留的测定。

参考文献:

[1] 李伟妮. 阿托品对羊肉品质及安全性的影响[D]. 浙江工商大学. 2010.

Li weini. Effecr of atropine sulfate on fresh goat meat quality and safety. [D]. Zhcjiang Gongshang Universit. 2010.

[2] 苏 岭,温海玲. "潜规则"鬼魅下的注水肉[J]. 健康必读, 2009(5):32.

Su L,Wen H L. Water - filled meat under the ghost of "Unspoken Rules"[J]. Healthy Reading,2009(5):32.

[3] 王梓乐. 动物源性食品中阿托品残留检测研究进展[J]. 中国动物防疫,2019,36(11):50 - 52.

Wang X L. Research Progress on Detection of Atropine Residues in Animal - derived Foods[J]. China Animal Health Inspection, 2019,36(11):50 - 52.

[4] 中华人民共和国农业部第 235 号公告: 动物性食品中兽药最高残留限量[S].

Announcement No. 235 of the Ministry of agriculture of the People's Republic of China. Maximum residues limit of Veterinary drugs in animal derived food[S].

[5] 中华人民共和国农业农村部,GB31650 - 2019,食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量[S].

Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People′s Republic of China,GB31650 - 2019, National food safety standard - Maximum residue limits for veterinary drugs in foods[S].

[6] 刘益庆. 高效液相法测定颠茄磺苄啶片中硫酸阿托品含量[J]. 北方药学,2016,13(2):13.

Liu Y Q. Determination of Atropine in Belladonna Sulfamethoxazole and Trimerhoprim Tablets by HPLC[J]. Journal of North Pharmacy, 2016,13(2):13.

[7] 胡兴娟. 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定猪肉猪肝及猪尿中的阿托品残留[J]. 中国兽药杂志,2014,48(7):46 - 49.

Hu X J. Determination of Atropine in Porcine Muscle, Liver and Urine by Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014,48(7):46 - 49.

[8] 李长缨. 高效液相色谱法测定肉制品中硫酸阿托品含量[J]. 中国卫生检验杂志,2011,21(5):1090 - 1091.

Li C Y. Determination of atropine sulfate in meat by HPLC[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology,2011,21(5):1090 - 1091.

[9] 王海娇. 高效液相色谱法测定猪肉中安定残留量[J]. 实验技术与方法,2006,18(2):117 - 118.

Wang H J. Determinination of Diazepam Residue in Pork by HPLC [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2006,18(2):117 - 118.

[10] 中华人民共和国农业部,NY/T1896 - 2010,兽药残留实验室质量控制规范[S].

Agriculture of the People's Republic of China, NY/T1896 - 2010, Criterion on quality control of laboratories for residue analysis of veterinary druys[S].

(编 辑:陈 希)