

鲜牛乳及乳制品中 4 种雌激素含量的 HPLC 测定

谭欣同¹, 邓立刚^{2,3}, 赵善仓^{2,3}, 董燕婕^{2,3}, 王燕¹, 李增梅^{2,3*}

1. 山东农业大学食品科学与工程学院, 山东 泰安 271018
2. 山东农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 山东 济南 250100
3. 山东省食品质量与安全检测技术重点实验室, 山东 济南 250100

摘要: 本文建立了鲜牛乳及奶粉中 4 种雌激素 (17 β -雌二醇、雌三醇、雌酮、己烯雌酚) 的 HPLC 分析方法。奶粉样品溶解于水, QuEChERS 方法萃取, 用乙腈沉淀蛋白质并提取雌激素, 正己烷除脂, 经氨基柱净化, C₁₈ 色谱柱分离, 采用紫外检测器, 检测波长为 230 nm。该方法对鲜牛乳及奶粉中 17 β -雌二醇、雌三醇、雌酮、己烯雌酚的检出限 (S/N=3 计) 分别为 0.03 mg/kg、0.026 mg/kg、0.03 mg/kg、0.012 mg/kg 和 0.024 mg/kg、0.021 mg/kg、0.025 mg/kg、0.01 mg/kg。定量限 (以 S/N=10 计) 分别为 0.1 mg/kg、0.09 mg/kg、0.1 mg/kg、0.04 mg/kg 和 0.07 mg/kg、0.07 mg/kg、0.08 mg/kg、0.03 mg/kg 在 0.1、1.0、2.0 mg/kg 三个浓度水平添加的平均回收率在 81%~97% 的范围内, RSD 值在 3.2%~8.7% 之间。

关键词: 鲜牛乳; 奶粉; 雌激素; QuEChERS; HPLC

中图分类号: TS252.51;O657.7+2

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2015)04-0519-05

Determination on 4 Estrogens Content in Fresh Milk and Dairy Products by HPLC

TAN Xin-tong¹, DENG Li-gang^{2,3}, ZHAO Shan-cang^{2,3}, DONG Yan-jie^{2,3}, WANG Yan¹, LI Zeng-mei^{2,3*}

1. College of Food Science and Engineering/Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China
2. Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology Research, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China
3. Key Laboratory of Test Technology on Food Quality and Safety of Shandong Province, Jinan 250100, China

Abstract: A novel method for the determination of 4 estrogens (17 β -estradiol, Estriol, Estrone and Diethylstilbestrol) in raw milk and milk powder has been developed by HPLC. The milk powder was dissolved in water and then it was extracted with acetonitrile by QuEChERS method and purified by NH₂ solid phase extraction cartridge after fats were removed by hexane. The analyte was separated on a C₁₈ column (Waters Atlantis dC₁₈, 4.6 \times 250 mm, i.d 5 μ m) at UV 230 nm. The detection limits(S/N=3) of 17 β -estradiol, estriol, estrone and diethylstilbestrol in milk powder and fresh milk were 0.03 mg/kg, 0.026 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.012 mg/kg and 0.024 mg/kg, 0.021 mg/kg, 0.025 mg/kg, 0.01 mg/kg, respectively. The quantitation limit(S/N=10) in milk powder and raw milk were 0.1 mg/kg, 0.09 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.04 mg/kg and 0.07 mg/kg, 0.07 mg/kg, 0.08 mg/kg, 0.03 mg/kg, respectively. The recoveries were 81%~97% with the range of RSD from 3.2% to 8.7%.

Keywords: Fresh milk; milk powder; estrogen; QuEChERS; HPLC

牛奶及其乳制品是人们生活中重要的食品之一, 因其富含蛋白质、维生素、钙质及其它人体所需的营养素, 倍受人们青睐^[1]。奶粉作为重要的奶制品之一更是婴幼儿和老年人的重要营养来源, 其质量安全问题极为重要。然而, 近几年来不断发生的乳制品安全事件, 使得人们“谈奶色变”。2013 年圣元奶粉导致婴幼儿性早熟事件的发生, 使人们普遍意识到奶粉中的激素水平是关系到奶粉安全的一个重要因素。有研究表明, 儿童性早熟, 妇女乳腺癌和男性前列腺癌的发病率的上升和食品中的雌激素的残留有关^[2,3]。在中华人民共和国农业部发布的第 235 号公告中, 修订了《动物性食品中兽药最高残留限量》, 其中规定雌二醇、己烯雌酚等雌激素在任何动物性食品中不允许添加和检出^[4,5]。在欧盟 CAC(国际食品法典委员会)发布的《Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Food》中, 规定在牛的肌肉、肝脏、脂肪中不得检出 17 β -雌二醇。生鲜牛乳作为原料乳, 其质量安全直接影响了奶粉质量。但在经济利益的驱动下, 养殖户们为提高奶牛的产奶量, 滥用这类违规药物, 易导致奶牛体内雌激素分泌异常, 从而使生鲜牛乳中的雌激素含量升高, 存在风险隐患。

收稿日期: 2015-04-11

修回日期: 2015-06-22

基金项目: 公益性行业(农业)项目(201403071); 山东省科技发展计划(20070917214 和 20100814601)

作者简介: 谭欣同(1990-),男,硕士研究生,主要从事食品质量与安全工作. E-mail:tanxintong142536@163.com

***通讯作者:** Author for correspondence. E-mail:lizengmei78@163.com

目前国家新近制定的《食品安全国家标准乳粉》中,并没有关于检测雌激素项目的规定,这就意味着目前我国对雌激素的检测和控制存在盲区,可能导致雌激素的泛滥^[6]。

目前,国内外检测牛奶或者奶粉中的雌激素方法较多,其中放射免疫法^[7]和酶联免疫法^[8]等生物技术虽然具有操作简单,适合大批量的测定,灵敏度较高等优点,但是容易出现相互影响,造成污染,样品导致假阳性率偏高。此外还有气相色谱串联质谱法^[9]、液相色谱串联质谱法^[10]和高效液相色谱法^[11]等方法。

QuEChERS方法是由美国农业部农业研究服务中心开发的一种快速、简便、价格低廉、环境友好的预处理方法,是实验室大规模样品处理较理想的方法,有较高的实际应用价值^[12]。QuEChERS方法常用于农产品中农药残留的检测,研究证明有超过200种农药可以用此法分析^[13]。本研究采用QuEChERS方法萃取,结合SPE净化处理样品,HPLC分析。实验方法简便、快速、可操作性强且液相色谱法的普及率较高,此方法可适用于生鲜牛乳和奶粉中雌激素水平含量的分析。

1 材料与方 法

1.1 样品的采集

奶粉样品为进口的某品牌婴幼儿奶粉,购于超市;生鲜牛乳样品采集于济南市12个不同的生鲜牛乳收购站或奶牛养殖场。

1.2 仪器与试剂

2.2.1 仪 器 Waters2695 高效液相色谱仪配2489紫外检测器(美国waters公司); Heidolph L4000 型旋转蒸发仪(德国Heidolph公司); 3K30 型高速旋转离心机(美国sigma公司); IKA-MS3 涡旋振荡器(德国IKA工业设备公司); KQ-500E 超声波提取器(昆山市超生仪器有限公司); 0.22 μm 有机滤膜(美国Pall公司); 彩色单道移液枪(100~1000 μL)(德国Eppendorf有限公司); 彩色单道移液枪(10~100 μL)(德国Eppendorf有限公司); 氨基固相萃取小柱; 旋蒸瓶; 离心管、胶头滴管。

2.2.2 试 剂 17β-雌二醇、雌三醇、雌酮、己烯雌酚固体标准品(纯度>99%,德国DR公司); 乙腈(分析纯、色谱纯)、蒸馏水、乙酸铵(优级纯)、正己烷、二氯甲烷、氯化钠、乙酸乙酯、无水硫酸镁。

以上试剂除标明外,其他均为分析纯。

2.2.3 标准溶液的配制 准确称取10.0 mg标准品于100 mL容量瓶中,用甲醇溶解后定容,此时标准液浓度为100 mg/kg;使用前用甲醇稀释成10 mg/kg的标准使用液。

另外,用甲醇分别稀释为0.1、0.5、1.0、2.0、2.5、10.0 mg/kg标准系列溶液,以绘制标准曲线。

2.3 色谱条件

色谱柱: Waters Atlantis dC₁₈ 不锈钢柱(4.6×250 mm, i.d 5 μm); 检测波长: 230 nm; 柱温: 40 °C; 流动相: 水(A): 乙腈(B); 梯度洗脱程序: 0~7 min, 70%~50% A; 7~20 min, 保持50% A; 20~21 min, 50%~70% A; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 10 μL。

2.4 样品处理

2.4.1 奶粉样品处理 称取奶粉样品10 g(精确到0.01 g)于100 mL具塞塑料离心管中,加入15 mL去离子水,充分振摇2 min使奶粉充分溶解,加入40 mL乙腈,振摇2 min,超声提取10 min,然后加入5 g QuEChERS盐析剂(4 g无水硫酸镁,1 g氯化钠),高速振摇,以8000 r/min离心12 min,取上清液20 mL至50 mL离心管中,加入20 mL用乙腈饱和过的正己烷。振荡后静置分层,除去上层正己烷,再重复操作一次。将离心管内的乙腈层转入旋转蒸发瓶内,以40 °C旋蒸近干,用2 mL二氯甲烷: 甲醇(95:5, V/V)溶解,待净化。

2.4.2 生鲜牛乳样品处理 准确称取生鲜牛乳样品10 g(精确到0.01 g)于50 mL具塞塑料离心管中,加入20 mL乙腈,震摇2 min,超声提取10 min,加入3 g QuEChERS盐析剂(2.5 g无水硫酸镁,0.5 g氯化钠),高速振摇,以8000 r/min离心12 min,取上清液10 mL至50 mL离心管中,加入10 mL

用乙腈饱和过的正己烷。充分震荡后静置分层,除去上层正己烷,再重复操作一次。将离心管内的乙腈层转入旋蒸瓶内,以40℃旋蒸近干,用2 mL二氯甲烷:甲醇(95:5, V/V)溶解,待净化。

2.4.3 净化 预先用10 mL二氯甲烷:甲醇(95:5, V/V)活化平衡氨基柱后,将上述待净化液上柱,再用15 mL二氯甲烷:甲醇(95:5, V/V)洗脱,流速控制在约2 mL/min。将待净化液与洗脱液一起收集于旋转蒸发瓶内,以40℃旋蒸近干,用1 mL的色谱甲醇定容,过0.22 μm有机滤膜,待上机分析。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的优化

本研究分别考察了Waters Atlantis dC₁₈柱(4.6×250 mm, i.d 5 μm)、Waters SunFire™C₁₈柱(4.6×150 mm, i.d 5 μm)和Waters Atlantis dC₁₈柱(4.6×150 mm, i.d 5 μm)三根色谱柱对4种雌激素的分离效果,由于雌三醇的极性较强,在两根不同型号的150 mm的C₁₈色谱柱上,雌三醇在色谱柱上难以保留;实验表明,在流动相中添加10 mmol/L乙酸铵时,四种雌激素的灵敏度下降约20%~30%之间;当乙腈:水(50:50, V/V)作流动相时,无法实现与样品杂质的完全分离,通过优化洗脱梯度,可解决这一问题。优化后的梯度洗脱程序见2.2小节。17β-雌二醇、雌酮、雌三醇均在在230 nm和280 nm处有较强的紫外吸收,己烯雌酚在220 nm~260 nm有较强的紫外吸收。本实验选择了220 nm、230 nm、280 nm三个检测波长进行分别测试,结果表明四种雌激素在230 nm处有良好的峰型并能排除杂质干扰。优化后的色谱图分离度好,且具有峰窄,无拖尾,重现性好的特点。4种雌激素的标准品色谱图(图1)。

3.2 样品前处理的优化

QuEChERS^[12]的提取方法常用QuEChERS盐吸剂(4 g无水硫酸镁,1 g氯化钠)促使水与乙腈快速分层,实现有机物的快速溶剂萃取,本实验采用这种液液萃取的方法提取四种雌激素,四种雌激素的添加回收率均在81%~97%之间,平均回收率为88%。较于直接用乙腈或者甲醇单独提取四种雌激素,添加回收率有了明显的提高(图2)。

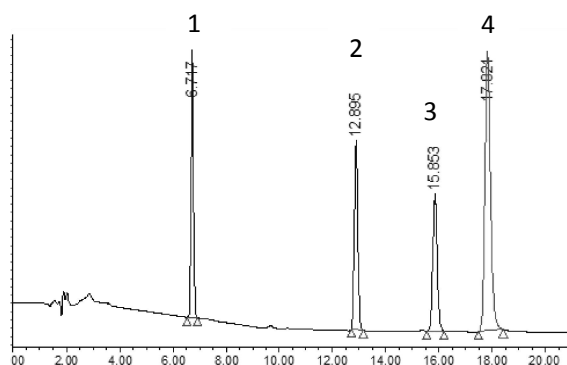


图1 4种雌激素标准品液相色谱图(5 mg/kg)

Fig.1 HPLC of 4 estrogen standards (5 mg/kg)

1:雌三醇; 2:17β-雌二醇; 3:雌酮; 4:己烯雌酚
1:Estriol; 2:17β-estradiol; 3:Estrone; 4:Diethylstilbestrol

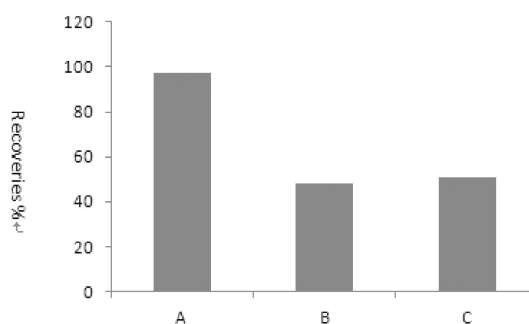


图2 三种不同提取方法的回收率比较

Fig.2 Comparison among recovery rates of 3 different methods

A:QuEChERS 提取方法; B:甲醇提取; C:乙腈提取
A:QuEChERS extracts; B:Methanol extracts; C:Acetonitrile extracts

对于净化洗脱液的选择:本试验选用乙酸乙酯-甲醇(90:10, V/V)的混合液和二氯甲烷-甲醇(95:5, V/V)的混合液进行氨基柱活化与洗脱。实验中探究了两种不同的洗脱液对净化的影响,发现用乙酸乙酯-甲醇(90:10, V/V)活化洗脱奶粉样品后,在雌三醇峰图附近存在一个干扰极强的杂质峰,严重影响雌三醇的定量分析。而使用二氯甲烷-甲醇(95:5, V/V)的混合液净化处理,无论是奶粉样品还是生鲜牛乳样品,均有很好的净化效果。故本实验使用二氯甲烷-甲醇(95:5, V/V)净化样品。用10 mL~20 mL洗脱液进行洗脱实验,当洗脱液为15 mL时,回收率达到最大值97%,且后5 mL的洗脱液中4种雌激素均未检出,由此最终确定洗脱液的体积为15 mL。

3.3 线性范围和检出限

用 0.5~10.0 mg/kg 的四种雌激素标准溶液制作标准曲线, 见图 3, 峰面积 $Y(\mu V \cdot sec)$ 与其质量 $X(ng)$ 具有良好的线性关系, R 均大于 0.999。以 3 倍信噪比 ($S/N=3$) 对应的奶粉和生鲜牛乳样品中雌激素浓度作为检出限(LOD), 10 倍信噪比 ($S/N=10$) 对应的样品中雌激素作为定量限(LOQ), 算得四种雌激素的检出限和定量限。所得结果见表 1。

表 1 线性方程、线性相关系数及 4 种雌激素在奶粉中和生鲜牛乳中的检出限和定量限

Table 1 The liner equation, correlation coefficient, LOD and LOQ of 4 estrogens in milk powder and fresh milk

雌激素 Estrogen	线性方程 Liner equation	线性相关系数 Correlation coefficient	鲜牛乳/奶粉检出限 LOD (mg/kg)	鲜牛乳/奶粉定量限 LOQ (mg/kg)
己烯雌酚	$y=28391x+4106.9$	0.9992	0.01/0.012	0.04/0.03
17 β -雌二醇	$y=9787.2x+132.65$	0.9999	0.024/0.03	0.07/0.1
雌三醇	$y=10697x+120.33$	0.9999	0.021/0.026	0.07/0.09
雌酮	$y=9643.2x-473.4$	0.9999	0.025/0.03	0.08/0.1

3.4 奶粉与生鲜牛乳样品的添加回收实验

在奶粉和生鲜牛乳中添加三种浓度水平 (0.1 mg/kg, 1.0 mg/kg 和 2.0 mg/kg) 的 4 种雌激素, 每个平行重复 5 次, 进样分析并计算回收率和精密度, 结果见表 2, 平均回收率为 81.3%~97.4%, 相对标准偏差在 3.2%~8.7%。添加回收图谱(图 3-6)。

表 2 生鲜牛乳和奶粉中雌激素的添加回收实验

Table 2 The average recovery and RSD in fresh milk and powder

雌激素 Estrogen	添加量 (mg/kg) Spiked	平均回收率 (%) Average recovery	相对标准偏差 RSD
己烯雌酚	0.1	91.2/88.2	6.3/6.4
	1.0	97.4/96.7	4.5/6.2
	2.0	94.5/91.8	3.2/4.3
17 β -雌二醇	0.1	89.2/81.3	7.2/8.7
	1.0	94.3/87.6	5.4/4.3
	2.0	93.4/89.9	4.6/4.0
雌三醇	0.1	89.5/82.6	4.4/5.3
	1.0	93.4/82.5	4.9/5.9
	2.0	89.5/88.8	3.2/6.2
雌酮	0.1	88.9/84.7	7.1/6.3
	1.0	89.4/92.7	4.3/4.5
	2.0	87.2/90.6	5.5/3.6

通过上述数据可以得出: 随着添加量的增加, 奶粉和生鲜牛乳中的平均回收率升高, 相对标准偏差值减小; 生鲜牛乳的平均回收率高于奶粉, 且检出限更低, 原因可能是相对于生鲜牛乳, 奶粉的成分较为复杂, 且脂肪含量较高, 通过净化以后仍然存在较多的杂质干扰, 所以出现上述实验结果。

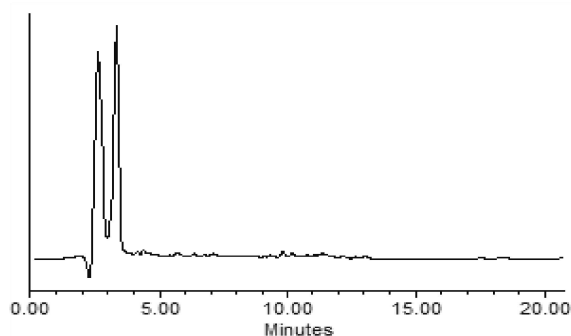


图 3 空白样品色谱图

Fig.3 The chromatography of blank samples

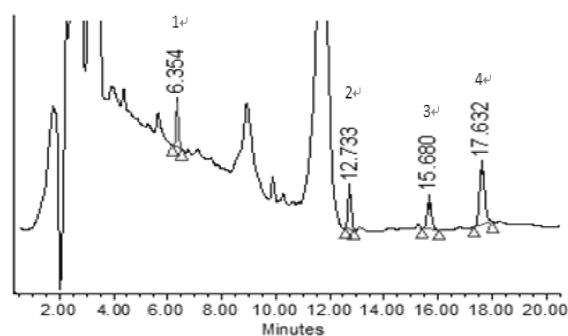


图 4 空白样品添加激素后色谱图 (0.1 mg/kg)

Fig.4 The chromatography of blank milk powder samples after adding 4 estrogens (0.1 mg/kg)

1:雌三醇; 2:17 β -雌二醇; 3:雌酮; 4:己烯雌酚

1:Estriol; 2:17 β -estradiol; 3:Estrone; 4:Diethylstilbestrol

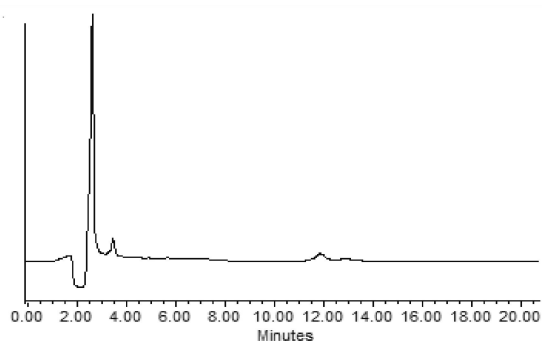


图5 鲜牛乳空白样品色谱图

Fig.5 The chromatography of blank fresh milk sample

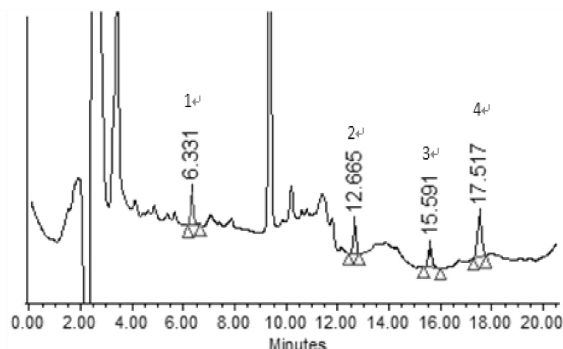


图6 鲜牛乳添加激素样品色谱图(0.1 mg/kg)

Fig.6 The chromatography of blank fresh milk samples after adding 4 estrogens (0.1 mg/kg)

1:雌三醇; 2:17 β -雌二醇; 3:雌酮; 4:己烯雌酚1:Estriol; 2:17 β -estradiol; 3:Estrone; 4:Diethylstilbestrol

3.5 实际样品的测定

对购买的贝因美品牌的奶粉用上述方法进行分析,未检出上述4种雌激素的残留。对从济南不同奶站采集回来的12个生鲜牛乳样品进行分析,其中一个生鲜牛乳样品检测出含有雌酮,含量是0.045 mg/kg,其他样品均为检出。

4 结论

本研究采用了QuEChERS法提取、结合传统的SPE净化,HPLC分析的方法,分析了奶粉和生鲜牛乳中不同性质的4种雌激素,该方法实现了4种雌激素的快速分离,增强了4种雌激素的定性能力,方法的回收率高,重现性好。同时发现了生鲜牛乳中存在着雌激素超标的现象。发现了奶粉乃至其他乳制品当中雌激素可能的来源,这对奶粉及其他乳品企业有一定的预警和指导作用。

参考文献

- [1] 袁丽君.牛奶中的雌激素及其安全性[J].国际内科学杂志,2007,4(271):1004-2369
- [2] 王和兴,周颖,姜庆五.超高效液相色谱—四级杆飞行时间串联质谱法同时分析奶粉中9种雌激素[J].分析化学,2011,39(9):1323-1328
- [3] Aksglaede L, Juul A, Leffers H, *et al.* The sensitivity of the child to sex steroids: possible impact of exogenous estrogens[J]. Hum. Reprod. Update, 2006, 12(4):341-349
- [4] 中华人民共和国农业部.动物性食品中兽药最高残留限量[J].中国兽药杂志,2003,37(2):7-9
- [5] 中华人民共和国农业部.动物性食品中兽药最高残留限量续[J].中国兽药杂志,2003,37(4):15-20
- [6] 中华人民共和国卫生部.食品安全国家标准乳粉 GB 19644-2010[S].北京:中国标准出版社,2010
- [7] 慕慧,李林,周玲.放射免疫法测定羊胎盘粉中的雌二醇的含量[J].中国公共卫生,2002,18(3):364-365
- [8] 闫小峰,郭志红,左文霞,等.酶联免疫法测定饲料中盐酸克仑特罗含量[J].中国兽药杂志,2004,37(12):16-18
- [9] 张红英,张宏,王淑惠,等.气相色谱-质谱法测定牛奶中的8种环境雌激素和内源性雌激素[J].中国卫生检验杂志,2009(8):1713-1715
- [10] 罗辉泰,黄晓兰.液相色谱-串联质谱法同时测定乳制品中14种雌激素及孕激素残留[J].分析实验室,2012,31(11):76-80
- [11] 赵金莲,杜兰祥,李月娟,等.牛乳中三种雌激素残留的HPLC检测法[J].甘肃农业大学学报,2009,44(2):153-156
- [12] Anastassiades M, Lehota SJ, Stajnbaher D, *et al.* Fast and easy multi-residue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residue in produce[J]. J AOAC Int, 2003,86(2):412-431
- [13] 刘亚伟,董一威,孙宝利,等. QuEChERS 在食品中农药多残留检测的应用研究进展[J].食品科学,2009(9):285-289