

# 牛奶中激素检测方法的研究进展

常嵘<sup>1,2</sup>, 叶巧燕<sup>1</sup>, 刘慧敏<sup>1</sup>, 郝欣雨<sup>1</sup>, 郭洪侠<sup>1</sup>, 郑楠<sup>1\*</sup>

- [1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业农村部奶产品质量安全风险评估实验室(北京), 农业农村部奶及奶制品质量监督检验测试中心(北京), 动物营养学国家重点实验室, 北京 100193;  
2. 甘州区动物卫生监督所, 张掖 734000]

**摘要:** 牛奶是人类的重要食品之一, 为人类提供蛋白、维生素、碳水化合物等营养, 其安全性一直都是社会各界关注的重点。牛奶中的激素主要分为内源性激素和外源性激素, 微量的内源性激素是牛奶中激素含量的主要来源。奶牛养殖方式及环境等因素的变化, 会对牛奶中激素含量造成影响。本文对比了国内外对牛奶中激素的限量要求, 介绍了牛奶中激素检测方法的研究进展, 包括免疫分析法、高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法等, 并总结了各类方法的检出限及优缺点, 提出未来应在完善牛奶激素检测技术标准, 研发高通量检测技术等方面开展深入研究, 争取实现检测过程自动化、智能化, 以提高检测效率、降低成本, 为研发精准快速的检测方法, 科学制定牛奶中激素相关限量提供参考。

**关键词:** 牛奶; 激素; 免疫分析法; 高效液相色谱法; 液相色谱-串联质谱法

## Research progress on detection methods of hormones in milk

CHANG Rong<sup>1,2</sup>, YE Qiao-Yan<sup>1</sup>, LIU Hui-Min<sup>1</sup>, HAO Xin-Yu<sup>1</sup>, GUO Hong-Xia<sup>1</sup>, ZHENG Nan<sup>1\*</sup>

- (1. *Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Dairy Products of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Milk and Milk Products Inspection Center of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;*  
2. *Ganzhou District Animal Health Supervision Institute, Zhangye 734000, China*)

**ABSTRACT:** Milk is one of the most important foods for human, providing protein, vitamins, carbohydrates and other nutrients, and its safety has always been a major concern for the community. Hormones in milk are mainly divided into endogenous and exogenous hormones, with trace amounts of endogenous hormones being the main source of hormone in milk. Changes in dairy farming practices, environmental and other factors can affect the hormone content in milk. This paper compared the domestic and foreign requirements for the limit of hormones in milk, and introduced the research progress of hormone detection methods in milk, including immunoassay, high performance liquid chromatography, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *etc.*, summarized the detection limits, advantages and disadvantages of each method, proposed that in the future, in-depth research should be carried out in improving the technical standards for milk hormone detection and developing high-throughput detection technology, which could achieve automation and intelligence in the detection process, improve detection

**基金项目:** 中国农业科学院科技创新工程项目(ASTIP-IAS12)、财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系项目(CAAS-XTCX20190025-9)

**Fund:** Supported by the Agricultural Science and Technology Innovation Program (ASTIP-IAS12), and the China Agriculture Research System of Ministry of Finance and Ministry of Agriculture and Rural Affairs (CAAS-XTCX20190025-9)

\*通信作者: 郑楠, 博士, 研究员, 主要研究方向为奶产品风险评估与营养功能评价。E-mail: jiaqiawang@vip.163.com

\*Corresponding author: ZHENG Nan, Ph.D., Professor, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China. E-mail: jiaqiawang@vip.163.com

efficiency and reduce costs, so as to provide a reference for the development of accurate, rapid detection methods and the scientific development of hormone-related limits in milk.

**KEY WORDS:** milk; hormone; immunoassay; high performance liquid chromatography; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

## 0 引言

牛奶作为人类摄取蛋白、维生素等营养的主要食物来源之一,具有很高的营养价值,其安全性一直都是社会各界关注的重点。牛奶含有天然的微量激素,其中最主要的是类固醇激素,如雌激素、孕酮等<sup>[1-2]</sup>。奶牛养殖方式、环境等因素的变化,会对牛奶中激素含量造成影响<sup>[3-4]</sup>。激素类兽药可用于治疗奶牛的生殖疾病,很多国家禁止将其用于促进动物生长、提高饲料转化率,也不允许己烯雌酚等激素类药物在牛奶等动物源性食品中检出,并对允许使用的激素类药物设定了最高残留限量,以避免激素通过食物链进入人体后扰乱体内分泌系统。因此,牛奶中激素的主要来源是奶牛自身分泌的微量激素。近年来,随着检测技术的不断发展,国内外研究人员通过改进现有检测技术或开发新的检测方法,达到操作步骤更简便快捷、检测结果更及时准确、检测灵敏度更高、检出限和定量限更低的目的,以满足牛奶中微量激素的检测需求。本文介绍了牛奶中激素的来源,对比了国内外牛奶中激素的限量要求,重点总结了近年来牛奶中激素检测方法的最新研究进展,分析了各类方法的优缺点,提出了检测技术的研究方向,为检测技术的不断改进和开发提供思路。

## 1 牛奶中激素的来源

牛奶中的激素主要分为内源性激素和外源性激素。内源性激素是指奶牛自身分泌的微量激素,主要有促性腺激素释放激素、催乳素、促卵泡素、促黄体素、生长

激素、雌激素、雄激素、孕激素等<sup>[5]</sup>,分别由奶牛的下丘脑、垂体、性腺和胎盘分泌,在奶牛发情、分娩、泌乳等生殖过程中必不可少,发挥调控和维持奶牛正常生殖机能的作用<sup>[6]</sup>,是牛奶中激素含量的主要来源。

外源性激素是指兽医临床用于治疗疾病的激素类兽药<sup>[7-9]</sup>。奶牛生长过程中可能患繁殖障碍性疾病,可以通过使用激素类兽药,治疗奶牛卵巢静止、持久黄体、卵巢囊肿、排卵延迟等生殖疾病<sup>[10-11]</sup>。上世纪九十年代,美国允许使用重组牛生长激素(recombinant bovine somatotropin, rBST)以提高牛奶产量,而欧盟、加拿大、日本、我国等国家因对 rBST 安全性有质疑而禁止其使用<sup>[12-13]</sup>。《中国兽药典》<sup>[14]</sup>中收录了地塞米松、醋酸可的松、促黄体素释放激素等允许使用的激素类兽药,对用途、用法、休药期等进行了严格的规定(表 1<sup>[14]</sup>)。奶牛治疗过程中只要严格按照适应症、用法用量、休药期等规定使用激素类兽药,就不会出现外源性激素残留的安全问题。

## 2 国内外对牛奶中激素的限量要求

我国一直高度重视激素类兽药的监管,对所有上市的激素类兽药均进行严格的注册审查,并从 1999 年起实施国家畜禽产品兽药残留监控计划,先后在农业部 176 号公告<sup>[15]</sup>、193 号公告<sup>[16]</sup>、235 号公告中<sup>[17]</sup>,明令禁止己烯雌酚等激素类药物用于食品动物。在 235 号公告中,分别对倍他米松、地塞米松和醋酸氟孕酮设定 0.3、0.3、1 μg/kg(羊奶)的最高残留限量,规定己烯雌酚、苯甲酸雌二醇、苯丙酸诺龙、丙酸睾酮、醋酸甲孕酮、甲基睾丸酮、

表 1 部分允许奶牛使用的激素类兽药  
Table1 Parts of hormone veterinary drugs allowed for cows

名称	用途	用量及用法	其他规定
地塞米松	治疗炎症性、过敏性疾病	5~20 mL, 注射	妊娠早期及后期母畜禁用, 牛休药期 21 d, 弃奶期 3 d
醋酸可的松	治疗炎症性、过敏性疾病	10~30 mL, 注射	妊娠早期及后期母畜禁用
氢化可的松	治疗结膜炎、虹膜炎、角膜炎等疾病	滴眼	/
促黄体素释放激素(A2、A3)	治疗奶牛卵巢静止、持久黄体、卵巢囊肿等疾病	12.5~25 μg, 总剂量不超过 75~100 μg, 注射	使用后不能再用其他激素
苯甲酸雌二醇	用于催情及胎衣滞留、死胎的排出	2.5~10 mL, 注射	休药期 28 d, 弃奶期 7 d
垂体促卵泡素	治疗卵巢静止、持久性黄体等疾病	100~150 单位, 注射	根据卵巢变化修正剂量和次数

注: /表示无此项。

去甲雄三烯醇酮(群勃龙)、玉米赤霉醇 8 种激素类药物不得在动物性食品中检出, 促卵泡素 (follicle-stimulating hormone, FSH)、绒促性素、促黄体生成激素 (luteinizing hormone, LH) 等激素药物允许用于食品动物且不需要制定最大残留限量。2019 年, 我国发布了 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》, 明确马、牛、猪、羊可以使用可的松, 氢化可的松可外用于所有食品动物、泌乳期动物禁用黄体酮。

用激素类兽药治疗奶牛生殖疾病, 是国际上常用方法。世界很多国家或国际组织都对牛奶中激素类药物制定了最大残留限量(表 2<sup>[18-19]</sup>)。由表 2 可知, 中国、欧盟、日本肯定列表及国际食品法典委员会(Codex Alimentarius Commission, CAC)设定了最高残留限量的激素类药物分别有 11 种、4 种、12 种和 2 种。其中, 对用于抗炎、抗过敏的糖皮质激素类药物倍他米松和地塞米松都制定了最高残留限量。

### 3 牛奶中激素检测方法

牛奶中激素检测方法主要有免疫分析法和色谱分析

法。免疫分析法具有快速、高效、低成本、操作简单以及高灵敏等优点<sup>[20]</sup>, 适用于对大批量样品的初筛及现场高通量快速检测。色谱分析法适用于多组分分析, 具有灵敏度高、准确性好等优点, 备受各国研究人员的青睐和认可<sup>[21-22]</sup>。我国围绕奶及奶制品中激素的检测方法先后制定了 GB/T 22967—2008《牛奶和奶粉中  $\beta$ -雌二醇残留量的测定》、NY/T 2069—2011《牛乳中孕酮含量的测定》等 14 项国家或行业标准, 其中主要涉及到能同时检测多种激素的液相色谱-串联质谱法, 其余标准采用高效液相色谱-串联质谱法、气相色谱-负化学电离质谱法或气相色谱-质谱法。

#### 3.1 免疫分析法

免疫分析法是利用抗原抗体特异性结合反应进行检测的分析方法, 常用的有酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、胶体金免疫层析法 (colloidal gold immunochromatography assay, GICA)、化学发光免疫分析法 (chemiluminescent immunoassay, CLIA) 等。近年来, 化学发光免疫分析法因其高灵敏度发展迅速, 在牛奶中激素检测得到应用。

表 2 中国、欧盟、CAC 和日本对奶中激素的最大残留限量比较( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )  
Table 2 Maximum residue limit for hormones in milk in China, EU, CAC and Japan ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

激素类别	药物名称	中国	欧盟	CAC	日本
糖皮质激素	倍他米松	0.3	0.3	0.05	0.3
	地塞米松	0.3	0.3	0.3	20
	氢化可的松	-	-	-	10
	泼尼松龙	-	6	-	0.7
	甲基泼尼松龙	-	-	-	10
	烯丙孕素	-	-	-	3
孕激素	氯地孕酮	-	2.5	-	3
	诺孕美特	-	-	-	0.1
	醋酸甲孕酮	不得检出	-	-	-
	醋酸氟孕酮	1(羊奶)	-	-	-
	氯睾酮	-	-	-	0.5
雄激素	甲基睾丸酮	不得检出	-	-	-
	丙酸睾酮	不得检出	-	-	-
	去甲雄三烯醇酮(群勃龙)	不得检出	-	-	不得检出
	苯丙酸诺龙	不得检出	-	-	-
雌激素	己烯雌酚及其盐、酯	不得检出	-	-	不得检出
	苯甲酸雌二醇	不得检出	-	-	-
雌激素类似物	玉米赤霉醇	不得检出	-	-	2

注: -表示无此项。

化学发光免疫分析方法是化学发光与免疫学相结合的方法,利用化学发光的酶、纳米颗粒等物质对抗体或抗原进行标记,与待测抗原或者抗体反应后,再利用分离游离态化学发光物质的方法,使得加入到化学发光系统中的其他相关物产生化学发光,然后进行抗原或者是抗体的定量或者是定性的检测<sup>[23]</sup>,解决了经典免疫分析法中灵敏度低的问题。云瀚漩等<sup>[24]</sup>以 ELISA 原理为依托,用量子点标记羊抗小鼠二抗,建立了一种快速荧光免疫检测方法,牛奶中己烯雌酚和雌二醇的检出限(limits of detection, LODs)分别为 0.236、0.109 ng/mL,该方法检测时间短,无需显色,可用于实际样品现场快速检测。

此外,还有一种在化学发光免疫分析方法的基础上结合磁性分离技术的新兴分析方法,已成功应用于管式化学发光免疫及电化学发光免疫等检测项目,即磁微粒化学发光免疫分析方法,方法充分利用了磁性分离技术的快速易自动化性。傅慧君<sup>[25]</sup>建立了管式化学发光免疫分析方法,使用氢化可的松抗原、羊抗兔二抗偶联羧基磁珠,采用竞争模式,通过检测发光强度得到目标物的含量,氢化可的松 LODs 为 0.12 ng/mL,此方法无需酶催化、受环境因素干扰较小、发光强度大、灵敏度高,可用于牛奶中氢化可的松的检测。

同时,为满足快速准确、低成本、即时的检测需求,国

内外研究人员在提高免疫层析试纸条检测性能方面做了大量的努力<sup>[26]</sup>。LI 等<sup>[27]</sup>基于乳胶微球的测流免疫层析技术,结合条形读数器,开发了用于定量检测牛奶中地塞米松含量的方法,LODs 低至 0.3 ng/mL,适用于现场大批量快速检测。WANG 等<sup>[28]</sup>开发了一种可同时检测睾酮、雌二醇、氢化可的松等 17 种激素类药物的新型多重定量免疫层析试纸条方法,试纸条含 3 条检测线,可用于去甲基睾酮、地塞米松、己烷雌酚三类结构类似的激素类药物检测,此方法的 LODs 为 0.005~4.85 ng/mL,提高了免疫层析试纸条检测牛奶中激素含量的检测通量。

目前,市场上出现了基于免疫分析法的快速检测试剂盒(表 3),此类试剂盒操作简单、灵敏度高、检测速度快、适合大批量检测,可定量检测牛奶中多种激素的含量,应用于部分企业和规模养殖场的乳制品检测中。

### 3.2 高效液相色谱法

高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)是色谱分析法的一种<sup>[29]</sup>,其高效、高速和高分辨力等优点备受食品分析、环境检测等领域的青睐,但前处理步骤烦琐、耗时长等缺点也不容忽视。国内外学者通过不断简化前处理方法、优化色谱条件等方式对高效液相色谱法进行改进,以满足灵敏度更高、目标物损失更少的检测需求<sup>[30-32]</sup>。

表 3 检测乳制品中激素含量的市售试剂盒

Table 3 Commercially available kits for the detection of hormone levels in dairy products

试剂盒名称	方法	适用范围
19-去甲睾酮/群勃龙 ELISA 试剂盒	竞争酶标免疫分析法	定量检测牛奶、尿液、血清及组织中 19-去甲睾酮/群勃龙含量。
脱氢异雄酮 ELISA 试剂盒	竞争酶标免疫分析法	定量检测牛奶、尿液、血清等样本中脱氢异雄酮含量。
睾酮 ELISA 试剂盒	竞争酶标免疫分析法	定量检测血清和牛奶等样本中睾酮的含量,可广泛应用于各大小实验室。
孕酮 ELISA 试剂盒	竞争酶标免疫分析法	定量检测牛奶和奶牛血清、血浆中的孕酮含量,检测时间 2 h,检出限 45 pg/mL,回收率 80%。
17 $\alpha$ -羟基孕酮 ELISA 试剂盒	竞争酶标免疫分析法	定量检测牛奶和奶牛血清、血浆中的 17 $\alpha$ -羟基孕酮含量。
雌酮 ELISA 试剂盒	竞争酶标免疫分析法	定量检测牛奶中雌酮含量。
人胎盘泌乳素 ELISA 试剂盒	竞争酶标免疫分析法	定量检测牛奶和奶牛血清、血浆中的人胎盘泌乳素含量。
促绒毛膜激素 ELISA 试剂盒	竞争酶标免疫分析法	定量检测牛奶中促绒毛膜激素含量。
雌三醇 ELISA 试剂盒	竞争酶标免疫分析法	定量检测血清和牛奶等样本中游离雌三醇的含量,采用高特异性的 E3 抗体和酶标记结合物,最后用酶标仪检测显色产物,可广泛应用于各大小实验室。
雌二醇 ELISA 试剂盒	双抗体夹心法	定量检测牛奶和奶牛血清、血浆中的雌二醇含量。
促卵泡生成素 ELISA 试剂盒	双抗体夹心法	定量检测牛奶和奶牛血清、血浆中的促卵泡生成素含量。
促黄体素 ELISA 试剂盒	双抗体夹心法	定量检测牛奶和奶牛血清、血浆中的促黄体素含量。
催乳素 ELISA 试剂盒	双抗体夹心法	定量检测牛奶和奶牛血清、血浆中的催乳素含量。

近年来,随着液相色谱技术的迅速发展,HPLC 自动化程度越来越高,当大量样品需要进行复杂的前处理时,自动化就极大地缩短了检测时间。在线固相萃取技术就是一种可以实现自动化完成上样、清洗、洗脱等步骤的前处理方法,可以加快样品前处理过程、缩短检测时间,避免人为误差<sup>[33]</sup>。刘坤<sup>[34]</sup>结合在线固相萃取和 HPLC,建立了牛奶中波尼松龙、地塞米松、睾酮、甲基睾酮和醋酸甲地孕酮 5 种激素的检测方法,通过对在线富集条件的优化,5 种待测物的 LODs 分别为 0.008、0.009、0.009、0.013、0.012  $\mu\text{g/mL}$ ,定量限(limits of quantitation, LOQs)分别为 0.026、0.031、0.029、0.043、0.040  $\mu\text{g/mL}$ ,此方法前处理过程简单快速、检测时间短,可以满足牛奶中激素的检测需求。

国内外研究人员通过合成多种选择性高、吸附容量大的新型吸附材料并和 HPLC 前处理步骤结合,实现对样品中痕量极性化合物的萃取。近年来,利用碳基磁性材料作为吸附剂的磁性固相萃取(magnetic-solid phase extraction, MSPE)技术因具有操作简单、无需离心过滤等优点被当作一种高效的前处理技术<sup>[35]</sup>。新型的碳基类别包括碳纳米管基、石墨烯基、金属有机骨架衍生碳基等。KASRA 等<sup>[36]</sup>合成了一种新型磁性碳纳米管基锆钛( $\text{Fe/CNT-SrTiO}_3$ )吸附剂,结合磁固相萃取-高效液相色谱法对牛奶中的 17 $\beta$ -雌二醇、孕酮、乙炔基雌二醇进行检测,方法的 LODs 和 LOQs 分别为 0.033~0.34  $\text{ng/mL}$  和 0.11~1.14  $\text{ng/mL}$ 。WANG 等<sup>[37]</sup>合成了包含氧化石墨烯海绵(graphene oxide sponge, GOS)的纳米复合材料 ZIF-8-GOS,并结合 HPLC 对牛奶中诺龙等 5 种性激素进行检测,方法的 LODs 和 LOQs 分别为 0.52~2.11  $\mu\text{g/L}$  和 1.75~6.97  $\mu\text{g/L}$ 。可见,新型碳基磁性材料与 HPLC 结合使用可以实现检出限更低的目的。

### 3.3 液相色谱-串联质谱法

液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)是以液相色谱作为分离系统、质谱作为检测系统的检测技术,兼具色谱的高分离能力和质谱的高灵敏度等优点,因分离度和灵敏度相较于 HPLC 更高而被广泛应用<sup>[38-39]</sup>。与 HPLC 相同的是,使用液相色谱-串联质谱法检测牛奶中激素的含量也可以通过结合在线固相萃取技术<sup>[40]</sup>、使用新型吸附材料<sup>[41-43]</sup>等优化前处理方法的方式提高检测效率,并实现对多种激素同时进行检测。

另外,有研究人员为提高检测结果的准确度和精密性、消除基质干扰效应,使用同位素内标进行检测<sup>[44]</sup>。韩超男等<sup>[45]</sup>使用超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)对牛奶中睾酮、孕酮及氢化可的松 3 种类固醇激素进行检测,引入同位素内标,优化样品提取和净化条件,睾酮、孕酮和氢化可的松的 LODs 分别为 0.043、

0.027、0.085  $\mu\text{g/kg}$ , LOQs 分别为 0.122、0.083 和 0.227  $\mu\text{g/kg}$ ,加标回收率为 97.29%~102.71%,日内相对标准偏差为 0.30%~2.96%,日间相对标准偏差为 0.84%~4.08%,引入同位素内标后方法的准确性、稳定性高,并能在 8 min 内完成快速分析。刘东等<sup>[46]</sup>使用同位素内标法对牛乳和乳粉样品中氢化可的松、雌二醇等 4 种类固醇激素进行定量检测,方法 LODs 和 LOQs 分别为 0.4~2.0  $\mu\text{g/kg}$  和 0.8~4.0  $\mu\text{g/kg}$ ,牛乳基质和乳粉基质的加标回收率分别为 87.7%~110.8%、89.2%~107.4%,适用于不同基质中激素的检测。

随着技术手段的改进、以及快速高效、多残留的检测趋势,近年来,样品前处理技术 QuEChERS 发展迅速、应用广泛<sup>[47-48]</sup>。奶及奶制品中含有多种激素,研究人员采用高通量的 QuEChERS 技术可以提高牛奶中激素含量的检测效率。TAN 等<sup>[49]</sup>采用 QuEChERS 结合超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法,同时对牛奶中的雌激素、雌三醇、己烯雌酚等 13 种甾体激素进行了检测,方法 LODs 和 LOQs 分别为 0.07~0.51  $\mu\text{g/kg}$  和 0.23~1.7  $\mu\text{g/kg}$ 。陈娟等<sup>[50]</sup>同时对牛奶中群勃龙、甲基睾酮等 11 种激素进行检测,方法的 LOQs 为 1.0  $\mu\text{g/kg}$ 。陈晓鹏等<sup>[51]</sup>同时对牛奶和奶粉中波尼松龙、氢化可的松等 42 种类固醇激素进行检测,方法的 LODs 为 0.06~1.5  $\mu\text{g/kg}$ 。QuEChERS 技术的实施实现了对多种目标激素进行同时检测目标,未来,QuEChERS 技术在奶及奶制品中激素含量的检测等方面的应用必将更为广泛。

### 3.4 气相色谱-串联质谱法

气相色谱-串联质谱法(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)凭借其高分辨能力、高灵敏度、可准确测定微量药物的优点在食品安全、环境监测等多个领域起着重要的作用。目前,气相色谱-串联质谱法对牛奶及奶粉等奶制品中激素的研究多集中于对雌激素的检测,对孕激素等其他激素含量的检测几乎没有应用。刘勇军等<sup>[52]</sup>通过液液萃取和固相萃取提取、净化牛奶中雌二醇、雌三醇<sup>[53]</sup>,并使用双(三甲基硅基)三氟乙酰胺[bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide, BSTFA]进行衍生化,选择监测特征离子  $m/z$  129、 $m/z$  232、 $m/z$  285 和  $m/z$  416 检测雌二醇含量, $m/z$  311、 $m/z$  345、 $m/z$  414 和  $m/z$  504 检测雌三醇含量,雌二醇、雌三醇的检出限分别为 0.1、0.5  $\mu\text{g/L}$ 。

随着我国食品检测工作的不断深入,2013 年我国发布了 GB 29698—2013《食品安全国家标准 奶及奶制品中 17 $\beta$ -雌二醇、雌三醇、炔雌醇多残留的测定》,使用气相色谱-质谱法对奶及奶制品中 17 $\beta$ -雌二醇、雌三醇、炔雌醇进行检测,检出限为 0.5  $\mu\text{g/kg}$ 。尽管气相色谱-串联质谱法可以满足牛奶中激素含量的检测需求,但此方法在检测过程中需要衍生,耗时较长,而且有的激素在衍生

后挥发性和热稳定性较弱,限制了其在高通量检测中的应用。

### 3.5 生物传感器

生物传感器由分子识别元件和信号转换器组成。分子识别元件是能与待测物质发生特异性反应的生物活性物质,近年来的研究热点是将适配体作为分子识别元件,常见的种类有荧光适配体传感器、核酸适配体传感器等。信号转换器的主要功能是将生物识别作用转换为可以检测的信号,其中,最理想的检测方法就是电化学方法。

研究人员基于荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 的原理构建新型荧光适配体传感器,刘晓等<sup>[54]</sup>以黑磷晶体为原料,利用超声辅助液相剥离技术制备了黑磷纳米片 (black phosphorus nanosheet, BPNs) 作为荧光受体,基于 6-羧基荧光素 (carboxyfluorescein, FAM) 标记的适配体与 BPNs 间的荧光共振能量转移机制,建立了荧光适配体传感器,可对雌激素进行快速定量检测, LODs 为 1.0 ng/mL。史学丽等<sup>[55]</sup>基于 FRET 原理,采用水热合成法制备了掺杂的镓酸锌长余辉纳米粒子,建立了一种基于荧光适配体传感器的雌激素定量分析方法, LODs 为 0.4 ng/mL, 该适配体传感器在检测目标激素时灵敏度高、特异性强,并有效避免了牛奶基质等因素产生的荧光干扰。

核酸适配体是一段体外筛选出的 DNA 或 RNA 序列,对待测物具有高度特异性识别能力,其优点是成本低、稳定且易于修饰标记<sup>[56]</sup>。王欣等<sup>[57]</sup>建立了基于核酸适配体的雌二醇纳米金比色传感检测方法,以纳米金比色分析为基础,将雌二醇特异性适配体作为传感探针,当纳米金粒子与核酸适配体浓度比为 1:11000 时,牛奶中雌二醇的 LODs 为 0.183 nmol/L。

电化学生物传感器可将物理、化学等信号转化为电信号对目标物进行定性、定量分析,其灵敏度高、响应时间短,受到了多个领域研究学者的青睐。傅慧君<sup>[25]</sup>利用雌二醇的酚羟基在通电条件下发生氧化反应形成醌的原理,将合成的钴镍氧化物纳米材料修饰玻碳电极,建立了电化学传感器方法用于检测雌二醇, LODs 为 0.42 nmol/L。

生物传感器因高灵敏度、低成本、可便携、在线检测等优势被广泛应用于环境和食品中的激素检测<sup>[58]</sup>,但高度特异性的特点使其不能同时检测牛奶中的多种激素,未来可以在解决稳定性、特异性以及适用性等方面进行改进。

## 4 结束语

本文主要对免疫分析法、色谱分析法和生物传感器等牛奶中激素残留的检测方法进行了综述,并从检测通量、检出限、优缺点等方面进行了分析。免疫分析法中应用最

广泛的酶联免疫吸附法,具有成本低、操作简单快速的优点,但抗原抗体特异性强、仅能检测一种目标激素。此外,多重定量免疫层析试纸条方法检测范围广,但目前处于实验室研发阶段,尚未投入大规模应用。色谱分析法中液相色谱-串联质谱法具有灵敏度高、准确性好的优点,能对多种目标激素同时进行检测,而气相色谱-串联质谱法多应用于对牛奶及奶粉等奶制品中雌激素的检测,对其他激素的检测较少,且所使用的衍生试剂很难对多种性激素进行衍生,无法进行高通量检测。近年来,生物传感器因具有操作简单、灵敏度高、响应时间短、检测时间短等优点在食品检测领域快速发展,尽管在牛奶中检测的目标激素单一,但随着技术的成熟与完善,其特异性及适用性将不断改善。

当前,高通量检测已成为动物源性食品中激素检测方法的开发趋势。液相色谱-串联质谱法由于其分析速率快,选择性高等优点在牛奶中激素检测的应用愈来愈广泛。未来应继续完善检测技术标准,研发高通量检测技术,争取实现分析过程自动化、智能化,以提高检测效率、降低成本。因此,寻找快速、精准、高效的激素检测手段,加强牛奶中激素检测方法的开发,对牛奶中激素含量本底值进行深入研究,完善牛奶中激素限量要求,将成为下一步研究的重点。

## 参考文献

- [1] MALEKINEJAD H, REZABAKHSH A. Hormones in dairy foods and their impact on public health—a narrative review article [J]. *Iran J Public Health*, 2015, 44(6): 742–758.
- [2] PALACIOS OM, CORTES HN, JENKS BH, *et al.* Naturally occurring hormones in foods and potential health effects [J]. *Toxicol Res Appl*, 2020, 4: 1–12.
- [3] GANMAA D, SATO A. The possible role of female sex hormones in milk from pregnant cows in the development of breast, ovarian and corpus uteri cancers [J]. *Med Hypotheses*, 2005, 65(6): 1028–1037.
- [4] WHITFIELD L. Milk production, fertility and the modern dairy cow [J]. *Livestock*, 2020, 25(2): 72–75.
- [5] 吴昊, 姚松阳, 宋玉坤, 等. 褪黑素对荷斯坦奶牛妊娠率及生殖激素的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(7): 2523–2529.  
WU H, YAO SY, SONG YK, *et al.* Effects of melatonin on pregnancy rate and reproductive hormone in holstein dairy cows [J]. *China Anim Husb Vet Med*, 2021, 48(7): 2523–2529.
- [6] 姚志兰, 崔平福, 宗佳丽, 等. 奶牛泌乳启动调控激素的研究进展[J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(8): 129–132.  
YAO ZL, CUI PF, ZONG JL, *et al.* A review of research on hormones regulating initiation of lactating in dairy cow [J]. *Anim Husb Vet Med*, 2018, 50(8): 129–132.
- [7] 常虹, 叶盛恒, 张爱荣, 等. 肉类食品中激素残留检测技术探讨[J]. *中国食品*, 2021, (17): 126–127.

- CHANG H, YE SH, ZHANG AIR, *et al.* Exploration of hormone residue detection technology in meat products [J]. *China Food*, 2021, (17): 126–127.
- [8] 张彩云, 赵兴鑫, 东贤, 等. 浅谈兽药残留对人体的危害[J]. *今日畜牧兽医*, 2021, 37(11): 1, 9.
- ZHANG CY, ZHAO XX, DONG X, *et al.* The harm of veterinary drug residues on the human body [J]. *Today Anim Husb Vet*, 2021, 37(11): 1, 9.
- [9] KOLOKA S, ALI JM, ROGAN EG, *et al.* The fate of synthetic and endogenous hormones used in the US beef and dairy industries and the potential for human exposure [J]. *Curr Env Hlth Rep*, 2018, (5): 225–232.
- [10] 张丽. 常用生殖激素的功能及其在奶牛生产中的应用[J]. *山东畜牧兽医*, 2011, 32(6): 24–25.
- ZHANG L. Functions of common reproductive hormones and applications in dairy production [J]. *Shandong J Anim Sci Vet Med*, 2011, 32(6): 24–25.
- [11] KURNIWAN S, HANDARINI R. Giving response gnRH hormone, estrogen, progesterone and prostaglandin in estrus synchronizatin implementation estrous cow recipient friesland holstein [J]. *Jurnal Peternakan Nusantara*, 2018, 4(2): 93–98.
- [12] COLLIER R. Regulation of rBST in the US [J]. *AgBioForum*, 2000, 3: 156–163.
- [13] DERVILLY-PINEL G, PREVOST S, MONTEAU F, *et al.* Analytical strategies to detect use of recombinant bovine somatotropin in food-producing animals [J]. *Trac Trend Anal Chem*, 2014, 53: 1–10.
- [14] 中国兽药典委员会. 中国兽药典[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Chinese veterinary pharmacopoeia [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2020.
- [15] 农业部, 卫生部. 国家药品监督管理局公告(第 176 号)[J]. *饲料研究*, 2002, (9): 19–20.
- Ministry of Agriculture, Ministry of Health. State drug administration announcement (No.176) [J]. *Feed Res*, 2002, (9): 19–20.
- [16] 中华人民共和国农业部公告第 193 号[J]. *养猪*, 2005, (5): 3.
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Announcement No.193 [J]. *Swine Prod*, 2005, (5): 3.
- [17] 中华人民共和国农业部公告第 235 号. 动物性食品中兽药最高残留限量[EB/OL]. [2002-12-24]. [http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg\\_1/gg/201006/t20100606\\_1535491.htm](http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/gg/201006/t20100606_1535491.htm) [2002-12-24].
- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China Announcement No.235. Maximum residue limits for veterinary drugs in animal foods [EB/OL]. [2002-12-24]. [http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg\\_1/gg/201006/t20100606\\_1535491.htm](http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/gg/201006/t20100606_1535491.htm) [2002-12-24].
- [18] 屈雪寅, 王加启, 郑楠, 等. 牛奶质量安全主要风险因子分析V.激素类药物残留[J]. *中国畜牧兽医*, 2012, 39(5): 7–13.
- QU XY, WANG JQ, ZHENG N, *et al.* Main risk factor analysis for milk quality and safety V.hormones [J]. *China Anim Husb Vet Med*, 2012, 39(5): 7–13.
- [19] QU X, SU C, ZHENG N, *et al.* A survey of naturally-occurring steroid hormones in raw milk and the associated health risks in Tangshan city, Hebei Province, China [J]. *Multidiscipl Digit Pub Instit*, DOI: 10.3390/IJERPH15010038
- [20] 王忠兴, 郭玲玲, 匡华. 食品安全免疫层析检测技术研发及应用进展[J]. *生物产业技术*, 2019, (4): 75–81.
- WANG ZX, GUO LL, KUANG H. Development and application of immunochromatographic biotechnology in food safety detection [J]. *Biotechnol Business*, 2019, (4): 75–81.
- [21] 陆斌. 色谱技术在检测牛奶中激素类药物残留的应用分析[J]. *现代食品*, 2018, (12): 144–147.
- LU B. Application of chromatographic technology in the detection of hormone residues in milk [J]. *Mod Food*, 2018, (12): 144–147.
- [22] NIE Q, NIE S. High-performance liquid chromatography for food quality evaluation [M]. UK: Evaluation Technologies for Food Quality, 2019.
- [23] 代润泽, 邓建成. 化学发光免疫分析方法与应用进展[J]. *化工设计通讯*, 2016, 42(1): 106, 121.
- DAI RZ, DENG JC. Luminescent immunoassay chemistry and application progress [J]. *Chem Eng Des Commun*, 2016, 42(1): 106, 121.
- [24] 云瀚漩, 盖雪皎, 韩振宇, 等. 量子点荧光免疫检测牛奶中己烯雌酚、雌二醇[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(3): 130–136.
- YUN HX, GE XJ, HAN ZY, *et al.* Quantum dots fluorescence immunoassay technology to detect diethylstilbestrol and 17 $\beta$ -estradiol residues in milk [J]. *Food Res Dev*, 2021, 42(3): 130–136.
- [25] 傅慧君. 牛奶中类固醇激素快速检测方法研究与应用[D]. 广州: 华南农业大学, 2017.
- FU HJ. The research and application of steroid hormones residue detection in milk [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017.
- [26] 黄小林, 李倩影, 吴雨豪, 等. 多重免疫层析试纸辅助食品安全快速检测的研究进展[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(11): 10.
- HUANG XL, LI QY, WU YH, *et al.* Research progress of multiplex immunochromatographic test strips for rapid food safety detection [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2021, 40(11): 10.
- [27] LI X, CHEN X, LIU Z, *et al.* Latex microsphere immunochromatography for quantitative detection of dexamethasone in milk and pork [J]. *Food Chem*, 2020, 345(2): 128607.
- [28] WANG Z, GUO L, LIU L, *et al.* Colloidal gold-based immunochromatographic strip assay for the rapid detection of three natural estrogens in milk [J]. *Food Chem*, 2018, 259: 122–129.
- [29] GRITTI F. Perspective on the future approaches to predict retention in liquid chromatography [J]. *Anal Chem*, 2021, 93(14): 5653–5664.
- [30] 薛敏, 王安, 王瑜, 等. 分子印记固相萃取技术检测江水、尿液及牛奶中雌激素残留[J]. *分析化学*, 2011, 39(6): 793–798.
- XUE M, WANG AN, WANG Y, *et al.* Application of molecularly imprinted solid phase extraction for determination of estrogens in river water, milk and urine samples [J]. *Chin J Anal Chem*, 2011, 39(6): 793–798.
- [31] 丁郭影. 牛奶中三种雌激素的微波辅助提取及其高效液相色谱串联检测[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2014.
- DING GY. High performance liquid chromatography series detection and microwave assisted extraction of three estrogens in milk [D]. Hefei: Anhui

- Agricultural University, 2014.
- [32] 王录. 分子印迹有机功能化介孔硅的制备及牛奶中雌激素检测新方法[D]. 保定: 河北大学, 2016.
- WANG L. Preparation of molecularly imprinted organic functionalized mesoporous silica for detection of estrogen in milk [D]. Baoding: Hebei University, 2016.
- [33] 樊成. 3 种固相萃取新技术在食品检测前处理中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(14): 4678–4684.
- FAN C. Applications of 3 new solid phase extraction technologies in pretreatments of food analysis [J]. *J Food Saf Food Qual*, 2020, 11(14): 4678–4684.
- [34] 刘坤. 牛奶中激素和环境水中抗生素的在线固相萃取-高效液相色谱卫生检测方法研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2018.
- LIU K. Application of on-line solid phase extraction coupled to high performance liquid chromatography in the analysis of food and environmental samples [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2018.
- [35] 廖颖敏, 黄晓佳, 王卓卓, 等. 基于碳基磁性材料的磁固相萃取技术在食品分析应用中的研究进展[J]. 色谱, 2021, 39(4): 8.
- LIAO YM, HUANG XJ, WANG ZZ, *et al.* Research progress in the application of magnetic solid phase extraction based on carbon based magnetic materials in food analysis [J]. *Chin J Chromatogr*, 2021, 39(4): 8.
- [36] KASRA R, HASSAN S, SARA S, *et al.* Extraction and determination of three steroid molecules in milk using functionalized magnetic carbon nanotube-based solid phase extraction coupled with HPLC [Z]. 2018.
- [37] WANG XM, WANG J, DU T, *et al.* Application of zif-8-graphene oxide sponge to a solid phase extraction method for the analysis of sex hormones in milk and milk products by high-performance liquid chromatography [J]. *New J Chem*, 2019, 43(6): 2783–2789.
- [38] 牛文君. SPE-HPLC-MS/MS 法检测乳源性运动营养品中 5 种激素残留[J]. 中国乳品工业, 2021, (5): 54–57.
- NIU WJ. Determination of five kinds of hormones in milk derived sports nutrition by SPE-HPLC-MS/MS [J]. *China Dairy Ind*, 2021, (5): 54–57.
- [39] HE S, WANG R, WEI W, *et al.* Simultaneous determination of 22 residual steroid hormones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Int J Dairy Technol*, 2020, 73(2): 357–365.
- [40] 闫永欢, 陈敏娜, 檀笑昕, 等. 整体柱在线净化-液相色谱-高分辨质谱法快速测定牛奶中 15 种糖皮质激素[J]. 分析实验室, 2021, (12): 1393–1398.
- YAN YH, CHEN MN, TAN XX, *et al.* Fast determination of 15 glucocorticoids in milk by monolith column with on-line purification-liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2021, (12): 1393–1398.
- [41] 李娜, 钟年孝, 杨琳燕, 等. 免疫亲和-填充吸附微萃取和液相色谱-串联质谱法测定牛奶中己烯雌酚[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2021, 54(2): 99–105.
- LI N, ZHONG NX, YANG LY, *et al.* Determination of diethylstilbestrol in milk by immunoaffinity microextraction by packed sorbent and liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Acta Sci Nat Univ Nankaiensis*, 2021, 54(2): 99–105.
- [42] 刘柱, 华颖, 陈万勤, 等. 氧化修饰多壁碳纳米管固相萃取-超高效液相色谱/串联质谱法同时测定牛奶中 7 种雌性激素残留[J]. 分析科学学报, 2018, 34(1): 73–79.
- LIU Z, HUA Y, CHEN WQ, *et al.* Simultaneous determination of seven estrogens in milk by oxidation modified multi-walled carbon nanotubes cleaning with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Anal Sci*, 2018, 34(1): 73–79.
- [43] 余鹏飞, 倪娟娟, 赵月钧, 等. GO/HF-SPME-HPLC-MS/MS 测定牛奶中 7 种糖皮质激素[J]. 食品工业, 2020, (1): 306–309.
- YU PF, NI JZ, ZHAO YJ, *et al.* Determination of 7 glucocorticoids residues in milk by GO/HF-SPME-HPLC-MS/MS [J]. *Food Ind*, 2020, (1): 306–309.
- [44] 何妹, 曹晶. 基于稳定同位素内标的液相色谱串联质谱法测定乳制品中唾液酸的含量[J]. 食品与发酵工业, 2022. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.030317
- HE S, CAO J. Determination of sialic aci in dairy products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with stable isotope internal standard [J]. *Food Ferment Ind*, 2022. DOI: 10.13995/j.cnki.11-1802/ts.030317
- [45] 韩超男, 李秀琴, 逯海, 等. 同位素稀释超高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中类固醇激素[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(7): 1669–1675.
- HAN CN, LI XQ, LU H, *et al.* Determination of steroid hormones in milk by isotope dilution-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(7): 1669–1675.
- [46] 刘东, 李强, 范素芳, 等. 通过式固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定牛乳和乳粉中 4 种类固醇激素[J]. 乳业科学与技术, 2020, (2): 26–30.
- LIU D, LI Q, FAN SF, *et al.* Determination of 4 steroid hormones in milk and milk power by filtration solid phase extraction coupled to high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Dairy Sci Technol*, 2020, (2): 26–30.
- [47] PERESTRELO R, SILVA P, PORTO-FIGUERIA P, *et al.* QuEChERS-fundamentals, relevant improvements, applications and future trends [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1070: 1–28.
- [48] SANTANA-MAYOR Á, SOCAS-RODRÍGUEZ B, HERRERA-HERRERA AV, *et al.* Current trends in QuEChERS method. a versatile procedure for food, environmental and biological analysis [J]. *Trac Trend Anal Chem*, 2019, 116: 214–235.
- [49] TAN XT, ZENG ML, DENG LG, *et al.* Analysis of 13 kinds of steroid hormones in raw milk using modified QuEChERS method combined with UPLC-QTOF-MS [J]. *J Integr Agric*, 2016, 15(9): 2163–2174.
- [50] 陈娟, 李永琴, 卜宁霞, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中 11 种激素类药物残留[J]. 中国兽药杂志, 2021, (8): 27–33.
- CHEN J, LI YQ, BU NX, *et al.* Determination of 11 hormones residues in milk using QuEChERS by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Vet Drugs*, 2021, (8): 27–33.
- [51] 陈晓鹏, 顾采琴, 綦艳, 等. QuEChERS-UPLC-MS/MS 同时测定牛奶



- 和奶粉中 42 种类固醇激素[J]. 食品科学, 2018, (8): 314-321.
- CHEN XP, GU CQ, QI Y, *et al.* Simultaneous determination of 42 steroid hormones in milk and milk powder by QuEChERS combined with UPLC-MS/MS [J]. Food Sci, 2018, (8): 314-321.
- [52] 刘勇军, 吴银良, 单吉浩, 等. 固相萃取气相色谱-质谱联用法测定牛奶中的雌二醇[J]. 畜牧与兽医, 2006, (7): 37-39.
- LIU YJ, WU YL, SHAN JH, *et al.* Determination of estradiol in marketed milk by solid phase extraction with gas chromatography-mass spectrometry [J]. Anim Husband Vet Med, 2006, (7): 37-39.
- [53] 刘勇军, 吴银良, 姜艳彬, 等. 固相萃取气相色谱-质谱联用法测定牛奶中的雌三醇[J]. 中国乳品工业, 2006, (11): 47-49.
- LIU YJ, WU YL, JIANG YB, *et al.* Determination of estrin in milk by solid phase extraction with gas chromatography-mass spectrometry [J]. China Dairy Ind, 2006, (11): 47-49.
- [54] 刘晓, 朱成龙, 庞月红, 等. 基于黑磷纳米片的荧光适配体传感器检测雌激素 17 $\beta$ -雌二醇[J]. 食品工业科技, 2021, 42(11): 248-254.
- LIU X, ZHU CL, PANG YH, *et al.* Fluorescence aptasensor for 17 $\beta$ -estradiol determination based on black phosphorus nanosheets [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(11): 248-254.
- [55] 史学丽, 高辉, 周永红, 等. 一种基于适配体传感器的 17 $\beta$ -雌二醇定量分析方法[J]. 河北工业科技, 2021, 38(5): 7.
- SHI XL, GAO H, ZHOU YH, *et al.* A quantitative analysis method for 17 $\beta$ -estradiol based on aptasensor [J]. Hebei J Ind Sci Technol, 2021, 38(5): 7.
- [56] 张亚丽, 牛立沙, 赵丽敏, 等. 核酸适体在乳及乳制品检测中的应用[J]. 乳业科学与技术, 2020, 43(5): 43-48.
- ZHANG YL, NIU LS, ZHAO LM, *et al.* A review on recent advances in application of aptamers in the detection of milk and dairy products [J]. J Dairy Sci Technol, 2020, 43(5): 43-48.
- [57] 王欣, 孙涵颖. 基于核酸适配体的牛奶和鸡蛋中雌二醇纳米金比色检测[J]. 农业机械学报, 2020, 51(9): 10.
- WANG X, SUN HY. Gold nanoparticles colorimetric detection based on aptamer for 17 $\beta$ -estradiol in milk and eggs [J]. Trans Chin Soc Agric Mach, 2020, 51(9): 10.
- [58] LU X, SUN J, SUN X. Recent advances in biosensors for the detection of estrogens in the environment and food [J]. Trac Trend Anal Chem, 2020, 127: 115882.

(责任编辑: 韩晓红 张晓寒)

### 作者简介



常 嵘, 硕士, 兽医师, 主要研究方向为畜产品质量安全与风险评估。  
E-mail: u-know-cr@163.com

郑 楠, 博士, 研究员, 主要研究方向为奶产品风险评估与营养功能评价。  
E-mail: jiaqiawang@vip.163.com