

食品中己烯雌酚的检测方法

王瑶¹, 周建华¹, 张鸿雁¹, 邢欣^{2,*}

(1. 山东师范大学生命科学学院, 山东济南 250014;

2. 山东省产品质量监督检验研究院, 山东济南 250103)

摘要: 己烯雌酚是人工合成的雌激素, 主要添加在饲料中, 能引起人体内激素失调等疾病。综述了己烯雌酚的理化性质、存在的危害、测定方法等, 重点介绍了己烯雌酚的定性和定量测定方法, 为我国食品检测方法的研究提供借鉴的依据。

关键词: 己烯雌酚, 雌激素, 食品, 测定方法

Review on detection methods of diethylstilbestrol in food

WANG Yao¹, ZHOU Jian-hua¹, ZHANG Hong-yan¹, BING Xin^{2,*}

(1. College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China;

2. Shandong Supervision and Inspection Institute for Product Quality, Jinan 250103, China)

Abstract: Diethylstilbestrol is an artificial synthetic estrogen, mainly added in fodder, and can cause an imbalance of human body hormone. The physicochemical property, presence, the harm to human health and detection methods of diethylstilbestrol were reviewed. Qualitative and quantitative detection methods of diethylstilbestrol were introduced in detail, which could offer a helpful reference for further study of detection methods of diethylstilbestrol in food.

Key words: diethylstilbestrol; estrogen; food; detection methods

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)03-0373-03

己烯雌酚(Diethylstilbestrol)是一种人工合成的雌性激素类药物, 常当做性激素调节动物的生理功能, 还被用作动物饲料添加剂, 以促进动物的生长。国内外研究表明, 己烯雌酚可以破坏机体的遗传物质, 导致基因突变, 引发肿瘤。由于己烯雌酚的滥用, 对动物性食品中己烯雌酚的残留检测引起了国内外的高度重视。目前己烯雌酚的检测方法主要有高效液相色谱法、气相色谱法、酶联免疫分析法、电化学法和荧光测定法等。

1 己烯雌酚的理化性质

己烯雌酚别名丙酸己烯雌酚、女性素、人造求偶素等, 分子式 $C_{18}H_{20}O_2$, 相对分子质量268.35, 化学名称(E)-4,4'-(1,2-二乙基-1,2-亚乙烯基)双苯酚。己烯雌酚是一种无色结晶或白色结晶性粉末, 几乎无臭、无味。有两种几何异构体, 其中反式作用较强, 用于医药。熔点169~172℃, 紫外最大吸收波长为

242nm。几乎不溶于水, 溶于乙醇、氯仿、乙醚、脂肪油、稀氢氧化钠溶液。Coats^[1]通过模型生态系统的研究发现, 己烯雌酚在环境中降解很慢, 能够在生物体中积累, 造成对环境的污染和对生物体的危害。己烯雌酚的化学结构式见图1。

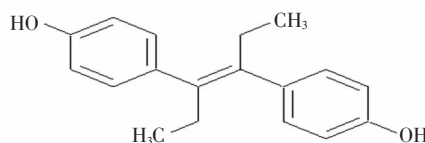


图1 己烯雌酚的化学结构式

Fig.1 Chemical structure of diethylstilbestrol

2 己烯雌酚的存在及危害

己烯雌酚是人工合成的非甾体雌激素, 属于雌激素及孕激素类药物。它在促进动物蛋白质的合成代谢、提高动物日增重和减少脂肪等方面效果明显^[2], 另外具有增加瘦肉率、治疗胎衣不下、排出死胎以及提高饲料转化率等功能而广泛应用于畜牧业^[3]。将其添加到饲料里可以提高产崽率或催情作用, 同时通过饲喂会使己烯雌酚残留在动物的内脏以及肌肉组织中^[4]。它存在于动物源性食品中, 如果在肝脏、鸡

收稿日期: 2011-02-28 * 通讯联系人

作者简介: 王瑶(1986-), 女, 硕士, 研究方向: 食品安全检测。

基金项目: 山东省质量技术监督局科研项目(2009KYZ05); 第四十七批博士后基金(20100471569)。

肉、蛋、奶中残留,被人食用后能够损伤肝脏,引起少儿的发育早熟、男性女性化、破坏机体遗传物质、导致基因突变^[5]以及人体内激素失调,女性乳腺癌、卵巢癌等疾病^[6]。

目前世界上许多国家已经规定己烯雌酚在家禽和水产养殖业中禁用。我国于1999、2002年先后两次制定法规禁止DES及其盐、酯制剂用于所有食品动物的所有用途^[7-9]。然而,由于巨大经济利益的驱使,滥用己烯雌酚的现象依然存在。因此加强对饲料产品中己烯雌酚的监测可以保障食品安全工作的顺利开展,从而保护人的健康与安全。

3 己烯雌酚的测定方法

3.1 高效液相色谱法

近几年,高效液相色谱法大量用于食品和饲料中己烯雌酚的测定,该法已经成功地应用于肉制品、奶粉、海产品和饲料中己烯雌酚含量的测定,使用较广泛的是甲醇和磷酸二氢钠溶液为流动相,采用荧光或紫外检测器检测,该法有较好的精密度和准确度。

万美梅等^[10]建立了动物组织中己烯雌酚的高效液相色谱检测方法,流动相为乙腈和磷酸二氢铵,己烯雌酚浓度在0.2~100ng/g范围内具有良好线性关系,相关系数为0.9995。各组织不同添加浓度的平均回收率均为80%,批内变异系数小于3.60%,批间变异系数小于3.72%,检测限为0.2ng/g。张彩虹^[11]用甲醇二次提取畜禽肉及内脏中己烯雌酚,按常规取样5g时最小检出浓度0.24mg/kg,加标回收率分别为98.7%~104.3%和99.6%~101.7%,精密度小于5%,相关系数为0.9996。刘虹等^[12]建立测定奶粉中己烯雌酚的高效液相色谱法,测定己烯雌酚的线性范围0.5~200ng/mL,相关系数为0.9995,平均回收率92.2%,检出限为0.06 μ g。林红英等^[13]建立了鳗鱼肉中己烯雌酚的高效液相色谱检测方法,平均回收率可达84%以上,相对偏差小于15%,最低检测限为10 μ g/kg。

Xu等^[14]通过高灵敏的高效液相色谱荧光检测器检测水产品中己烯雌酚的含量。通过在浓硫酸中的磺化反应和水解作用,把己烯雌酚转变成能够发射出荧光的物质,并用高效液相色谱的方法进行测定,检测下限是0.1 μ g/kg,回收率超过86%,相对标准偏差小于6.2%。

液相色谱-质谱联用常被用于己烯雌酚含量的确证,分析过程包括提取、样品预处理和带有四级离子捕获质谱分析器的电喷雾质谱定性的反相高效液相分离过程。色谱条件:流动相为乙腈-水,流速0.2mL/min,进样体积10 μ L,柱温35 $^{\circ}$ C。在0.1~500 μ g/L浓度范围内呈良好的线性,相关系数为0.999。在1、5、20mg/kg 3个添加水平,平均回收率75.2%~97.6%,日内变异系数为2.1%~6.3%,日间变异系数为3.2%~9.7%,检测限为10 μ g/kg^[16]。常碧影等^[17]建立了液相色谱-质谱法测定饲料中己烯雌酚的分析方法,最低检出限0.5ng,回收率平均92.86%,平均变异系数5.64%,适合多种动物各种饲料品种中己烯雌酚的测定。

3.2 气相色谱

只要己烯雌酚在分离柱温度范围内可挥发或可

转化为可挥发物质,气相色谱就可用于测定己烯雌酚。宫向红等^[15]建立了水产品中己烯雌酚的气相色谱-质谱检测方法,当添加水平在0.5~1.0 μ g/kg时,回收率大于75%,相对标准偏差为0.9%~2.7%,相关系数为0.999。

3.3 酶联免疫分析法

以上介绍的检测己烯雌酚的各种方法往往需要复杂昂贵的仪器,而且需要经过繁琐的前处理,很难达到快速、简便的现场检测要求。酶联免疫分析方法具有特异性强、灵敏度高、简便和快速等优点。这些丰富的分析研究成果对于监测和安全使用己烯雌酚起到了十分重要的作用。

Wang等^[18]用试剂盒进行酶联免疫吸附实验测定己烯雌酚的残留。Wang等^[19]运用多克隆抗体进行间接竞争酶联免疫方法测定己烯雌酚,己烯雌酚的检测下限是0.01ng/mL,IC₅₀值为1.02ng/mL,回收率为86%~120.2%。Wang等^[20]又用单克隆抗体通过间接竞争酶联免疫实验测定己烯雌酚,IC₅₀值为9.8ng/mL,检测下限是2.3ng/mL,检测的线性范围是2~42ng/mL。Xu等^[21]运用竞争的酶联免疫吸附实验对己烯雌酚进行了定量测定,对鸡肉和肝脏组织进行了检测,IC₅₀值为2.4ng/mL,检测下限是0.07ng/mL。Goldstein P等^[22]为了定量检测组织、细胞和亚细胞中的己烯雌酚的浓度,将KLH和半抗原偶联制备抗己烯雌酚抗体,应用改良的酶联免疫方法对己烯雌酚进行研究。

胡鲲等^[23]用国外进口试剂盒测定中华鳖肌肉中己烯雌酚残留量,检测下限是0.0125 μ g/kg,平均回收率为74.8%,变异系数为1.763%~3.084%。王文^[24]等建立了间接竞争酶联免疫吸附分析方法,该方法的最低检测限为0.04ng/mL。廖敏等^[9]通过对罗非鱼和对虾样品加标回收实验,试剂盒在加标浓度为1.00 μ g/kg和2.00 μ g/kg时,对虾和罗非鱼样品的加标回收率为78.80%~93.30%。邴爱英^[25]等用酶联免疫法进行实验,该方法的检测灵敏度为0.125ng/mL,可定量检测范围是0.25~15.60ng/mL。Degand^[26]用酶联免疫法测定牛尿液中己烯雌酚含量,最低检测限是0.09ng/mL,完全满足欧盟对己烯雌酚允许的最大残留量为2 μ g/kg的要求。

3.4 电化学法

己烯雌酚分子中的酚羟基具有电化学活性,在多壁碳纳米管修饰玻碳电极上出现灵敏的氧化峰。而在同样的条件下,己烯雌酚在裸玻碳电极上的电化学活性却低得多,因此可用电化学方法测定己烯雌酚。

王木皓等^[27]建立了一种测定己烯雌酚的电化学酶免疫分析新方法,此方法测定的己烯雌酚线性范围是1.0~500ng/mL,检出限为0.4ng/mL。孙延一等^[28]制作了碳纳米管修饰电极,并研究己烯雌酚在该电极上的电化学行为。峰电流与己烯雌酚浓度在 1×10^{-8} ~ 2×10^{-6} mol/L有良好的线性关系,检测限为 2.5×10^{-9} mol/L。 1×10^{-6} mol/L己烯雌酚溶液的相对标准偏差为2.9%。吴翠敏^[29]在玻碳电极上,在pH=9.0的磷酸盐缓冲溶液中,己烯雌酚对Luminol(发光试剂)的电化学发光

有一定的抑制作用,己烯雌酚浓度在 $1.5 \times 10^{-6} \sim 2.5 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 范围内与发光减少值分段呈良好的线性关系,检出限为 $5.0 \times 10^{-7} \text{mol/L}$ 。对 $5.0 \times 10^{-5} \text{mol/L}$ 己烯雌酚平行测定10次,其相对标准偏差为3.28%。

3.5 荧光测定法

基于己烯雌酚与浓硫酸反应后的水解产物的荧光性质,可建立一种测量己烯雌酚的荧光光度分析方法。潘祖婷等^[30]研究了不同环境介质对产物荧光性质的影响,在 $0 \sim 4.5 \times 10^{-6} \text{mol/L}$ 浓度范围内,荧光强度与浓度之间呈良好的线性关系,相关系数为0.9996,检测限为 $2.0 \times 10^{-8} \text{mol/L}$ 。

4 结论

由于己烯雌酚的滥用,国内外开始高度重视食品中己烯雌酚的检测。己烯雌酚在动物体内代谢快,在组织中浓度低,因此其检测方法应准确、灵敏、特异和精确^[10]。己烯雌酚的定性以及定量测定方法的研究涉及样品处理方法、检测器灵敏度、杂质干扰等诸多因素的影响。根据实际需要,可选用适宜的测定方法。目前我国应尽快制定己烯雌酚的含量测定的国标方法,为我国食品安全等行业的发展提供借鉴的依据。

参考文献

[1] Coats JR, Metcalf RL, Lu PY, et al. Model ecosystem valuation of the environmental impacts of the veterinary drug phenothiazine, sulfamethazine, clopidol and diethylstilbestrol[J]. Environ Health Perspect, 1976(18): 167-179.

[2] Lone KP. Natural sex steroids and their xenobiotic analogs in animal production: growth, carcass quality, pharmacokinetics, metabolism, mode of action, residues, methods and epidemiology[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1997, 37(2): 193-209.

[3] 伦丽丽,董英,王云,等. 己烯雌酚完全抗原及其单抗的制备与分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009(10): 67-69.

[4] 贾涛. 酶联免疫法检测饲料中己烯雌酚的探讨[J]. 饲料广角, 2010(5): 38-40, 43.

[5] 李凯年,姜荃. 国外对食品药物残留控制的发展趋势[J]. 世界农业, 2003(5): 44-46.

[6] 廖敏,钱莉. 酶联免疫法: 水产品中己烯雌酚检测新招[J]. 农业技术与装备, 2009(10): 28-29.

[7] 动物性食品中兽药最高残留限量[S]. 中华人民共和国农业部, 1999.

[8] 动物性食品中兽药最高残留限量[S]. 中华人民共和国农业部, 2002.

[9] Becker J. Artificial hormones European register[J]. Nature, 1981, 289: 215.

[10] 万美梅,陈杖榴,刘雅红,等. 动物组织中己烯雌酚残留的高效液相色谱/电化学检测方法研究[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(7): 4-6.

[11] 张彩虹. 高效液相色谱法测定己烯雌酚的实验研究[J]. 中国热带医学, 2006, 6(2): 328-329.

[12] 刘虹,谢承恩. 高效液相色谱法测定奶粉中己烯雌酚[J]. 检

测技术, 2006, 12(6): 374-375.

[13] 林红英,蒋天梅,沈子龙. 鳃鱼肉中己烯雌酚残留量的高效液相色谱法测定[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(4): 456-459.

[14] Xu YJ, Geng JP, Zhang XZ, et al. Determination of diethylstilbestrol in aquatic products by high performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Chinese Journal of Chemistry, 2010, 28(1): 86-90.

[15] 官向红,徐英江,张秀珍,等. 气相色谱-质谱法测定水产品中的己烯雌酚[J]. 食品科学, 2009, 30(2): 168-169.

[16] 闫小峰,孙志文. 超高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中的己烯雌酚[J]. 检测分析, 2010(11): 38-40.

[17] 常碧影,张萍,袁汉成,等. LC-MC测定饲料中己烯雌酚方法的研究[J]. 现代科学仪器, 2003(1): 38-41.

[18] Wang W, Li J, Xu T. Detection kit for enzyme linked immunosorbent assay applied for diethylstilbestrol residue analysis[P]. China. CN1967247-A, 2007-05-23.

[19] Wang WJ, Ling Y, Xu T, et al. Development of an indirect competitive ELISA based on polyclonal antibody for the detection of diethylstilbestrol in water samples[J]. Chinese Journal of Chemistry, 2007, 25(8): 1145-1150.

[20] Wang WJ, Li J, Zhao JX, et al. Development of monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay to the estrogen diethylstilbestrol[J]. Chinese Journal of Chemistry, 2006, 24(12): 1758-1765.

[21] Xu CL, Chu XG, Peng CF, et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of diethylstilbestrol residues in chicken and liver tissues [J]. Biomedical Chromatography, 2006, 20(10): 1056.

[22] Goldstein P. Biological response and quantitation of diethylstilbestrol via enzyme-linked-immunosorbent-assay [J]. Acs Symposium Series, 1991, 451: 280-292.

[23] 胡鲲,杨先乐,张菊. 酶联免疫法检测中华鳖肌肉中己烯雌酚[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(3): 199-202.

[24] 王文,李季,张国中,等. 己烯雌酚多克隆抗体的制备研究[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(增刊): 245-250.

[25] 邴爱英,成连贵,褚新星,等. 己烯雌酚酶联免疫检测方法的建立[J]. 西南农业学报, 2006, 19(6): 1159-1161.

[26] Degand G, Schmitz P, Maghuin-Rogister G. Enzyme immunoassay screening procedure for the synthetic anabolic estrogens and androgens diethylstilbestrol nortestosterone, methyltestosterone and trenbolone in bovine urine[J]. J Chromatogr, 1989(489): 235-243.

[27] 王术皓,庄惠生,王传涛,等. 电化学免疫分析方法测定饲料中的己烯雌酚[J]. 持久性有机污染物论坛, 2006: 347-350.

[28] 孙延一,吴康兵,胡胜水. 己烯雌酚在多壁碳纳米管修饰电极上的电化学行为及其电化学测定[J]. 药学学报, 2003, 38(5): 364-367.

[29] 吴翠敏. 己烯雌酚在玻碳电极上的电化学发光法研究[J]. 海峡药学, 2005, 17(2): 46-48.

[30] 潘祖亭,姚礼峰,马红燕. 己烯雌酚荧光性质的研究及其分析应用[J]. 武汉大学学报, 1997, 43(6): 701-705.