

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2018.06.014

国内牛奶中常见卫生指标分析方法研究进展^{*}

孙建楠 综述 张 凯 审校
(济宁医学院公共卫生学院, 济宁 272067)

摘 要 牛奶是我国人民日常膳食的重要组成部分。随着各类食品安全问题的出现,牛奶的安全问题受到越来越多的关注。本文综述了牛奶中 5 种常见的卫生指标,包括抗生素、三聚氰胺、农残、雌激素和重金属检测的新思路和新方法,旨在为牛奶的安全监管提供更简便、更高效的分析思路与手段。

关键词 牛奶;常见卫生指标;检测

中图分类号:X836 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2018)12-431-04

Recent developments in the analytical methods of common health indicators in domestic milk

SUN Jiannan, ZHANG Kai
(School of Public Health, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Milk is an important component of our daily diet. With the emerging kinds of food safety problems, more and more attention has been paid into the safety of milk. In this paper, the new detection ideas and methods for five kinds of the most common health indicators in domestic milk including antibiotics, melamine, pesticides residues, estrogen and heavy metals have been summarized. This paper aims to provide more convenient and efficient ideas and means for safety supervision of milk.

Keywords: Milk; Common health indicators; Detection

牛奶,被誉为“白色血液”,含有多种微量元素和矿物质,是人体钙的最佳来源。在 1964 – 1994 年,我国居民每日牛奶消耗量仅占总摄入能量的 0.3%^[1],远远低于西方国家水平。近年来,随着我国经济发展和人民饮食习惯的改变,牛奶才开始成为人民日常膳食不可或缺的组成部分。因此,牛奶的安全问题,也成为我国食品安全的重要监督对象,得到越来越多的公众关注。

我国国标关于牛奶的质量安全指标可分为两大类:一类涉及牛奶营养价值的理化指标,包括蛋白质、脂肪含量及酸度等;另一类是监控牛奶中有毒有害物质的种类和含量卫生指标,主要指抗生素、重金属、农残、防腐剂等禁止检出或是限量的物质。而第二类指标,即牛奶中有毒有害物质的含量会对人体健康造成更大的影响,成为食品监管中最受关注的目标。考虑到牛奶成分复杂,基质对测定

结果干扰大,且各成分之间物理化学性质和含量差别较大,有害物质在较低含量就会对人体造成伤害等因素,建立针对性强、灵敏、准确、可靠、快速、经济的分析检测方法,成为保证企业对原料奶的监控、食品安全部门对市售牛奶安全监督的重要手段。基于上述考虑,本文分析了目前市售牛奶中最常见的几类有毒有害物质,并归纳了近 5 年内报道的针对每类物质建立的理化检测方法。

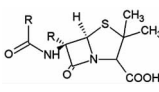
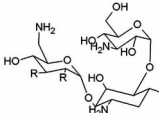
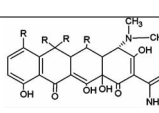
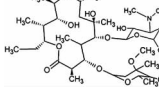
1 抗生素类物质检测

抗生素作为一类高效的杀菌药物,常被用于治疗奶牛的乳腺炎等疾病(表 1)。而对泌乳期奶牛的违规用药,是造成牛奶中抗生素超标的主要原因。人类长期饮用含超标抗生素的牛奶,会使人体产生耐药性菌株,造成菌群失调,降低免疫力,严重时危及生命。同时未分解的抗生素进入环境中,会对环境造成持久性危害^[2]。因此,早在 2002 年,我国农业部发布的《无公害食品生鲜牛乳》(NY/T

^{*} [基金项目] 济宁市科技局科技发展项目(2015-57-104)

5045-2001)规定“抗生素不得检出”,并在 2008 年将抗生素残留作为强制检测项目。

表 1 牛奶中常见抗生素的分类

名称	基本结构	用途	常见药物
β -内酰胺类		抑制细胞壁中肽聚糖的合成,导致细菌细胞破裂死亡,消炎抗感染的首选兽药	青霉素 G、头孢唑酮等
氨基糖苷类		治疗奶牛的各种感染,如乳腺炎、子宫内膜炎等,并以亚剂量给药方式预防疾病和提高饲料利用率	链霉素、阿米卡星等
四环素类		抑制细菌蛋白质的生物合成,加入饲料以促进生长和预防奶牛的疾病	四环素、土霉素等
大环内酯类		抗革兰氏阳性菌活性,通过抑制 DNA 和 RNA 的合成,抑制细菌生长	红霉素、螺旋霉素等

现阶段,检测牛奶中抗生素残留的方法根据测定原理的不同可分为 4 类,即微生物检测法、酶联免疫法、理化检测法和免疫传感器法。根据目标物浓度的差异和实验室条件的限制,每种检测方法都有其相应的适用范围。近 5 年内,报道的抗生素检测的新方法也主要围绕这 4 类发展。见表 2。

表 2 牛奶中抗生素类物质分析方法

分析物类型	分析方法	检出限 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	文献
β -内酰胺类抗生素	固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱	0.03~10	[3]
氨基糖苷类抗生素	高效液相色谱-串联质谱	10	[4]
四环素类抗生素	液相色谱-串联质谱	10	[5]
大环内酯类抗生素	液相色谱-荧光分析法	1.07	[6]

液相色谱-串联质谱仪(liquid chromatography coupled with mass spectrometry, LC-MS)已成为近年来牛奶中抗生素类物质检测的主流方法。该方法兼具液相色谱的高分离效果和质谱的高灵敏度,能在较为复杂的基质中检测出低浓度的目标物,是痕量物质快速检测的首选方法。对牛奶中低浓度的抗生素残留检测,具有显著的优势。LC-MS 技术突出优点是可实现多种药物的同时快速分析。这对于牛奶中多种类型抗生素的残留测定,具有非常重要的现实意义。

2 三聚氰胺检测

2008 年,我国爆发了三聚氰胺(Melamine)毒

奶粉事件,牛奶和乳制品三聚氰胺污染问题受到了世界范围的关注,成为当时食品公共安全的焦点。三聚氰胺是一种三嗪类含氮杂环有机化合物,形态酷似蛋白粉,成本低廉,被称为蛋白精,本身具有毒性。三聚氰胺事件中,不法分子利用检测方法的局限性,将其作为蛋白质的替代品加入牛奶和奶制品中,以提高牛奶的蛋白质含量,最终导致 6 名儿童死亡。奶牛饲料被三聚氰胺污染时,也会导致牛奶中的三聚氰胺超标。随着研究的深入,发现三聚氰胺对于泌尿系统、神经系统、生殖系统等具有毒性,甚至可能诱导肿瘤细胞产生,与同系物结合作用时具有遗传毒性。因此,虽然毒奶粉事件的爆发距今已有 10 年,但其产生的恶劣的影响却一直延续至今。

目前,牛奶中三聚氰胺的国标检测方法主要包括 3 种,分别是高效液相色谱法(high liquid chromatography, HPLC)、LC-MS 和气相色谱-质谱联用法(gas chromatography coupled with MS, GC-MS)。检测时,根据检测对象及灵敏度的规定,选用与其相适应的检测方法。色谱方法分离效率高,分析速度快,灵敏度相对较高,为牛奶中三聚氰胺的检测提供了可靠的技术手段。而近年来,研究人员试图在其他领域为三聚氰胺的检测提供更快速和简便的方法。

谭棕等^[7]将咖啡环效应与显微拉曼技术相结合,充分利用咖啡环现象的高效分离富集作用和显微拉曼光谱的微区分析能力和成像功能,发展了一种牛奶中三聚氰胺的简便、高效检测方法。

魏玉娟等^[8]采集纯牛奶以及 9 种不同质量浓度掺假三聚氰胺牛奶的近红外光谱图,运用主成分分析方法、线性判别分析方法以及基于虚拟矢量编码的偏最小二乘判别分析方法对纯牛奶和不同质量浓度掺假三聚氰胺的牛奶近红外光谱数据进行判别分析。

3 农药残留检测

牛奶农药残留主要来源于奶牛食用了被污染的水源及饲料。研究表明,牛奶农药残留污染对人体健康存在微剂量、慢性细微毒性危害。农业常用农药,如菊酯类农药会导致神经细胞病变,有机氯类农药可使神经元受损,导致神经中枢死亡,也是肝硬化肿大原因之一。

根据农药易挥发,热稳定性好的性质,目前检

测农残的分析方法仍以 GC-MS 技术为主。但考虑到牛奶本身含有大量蛋白质、脂肪类物质,近年来针对牛奶中农残的测定多先进行适当的样品前处理步骤,以提高分析的灵敏度。见表 3。

表 3 牛奶中农药残留分析方法

分析物	前处理方法	分析方法	文献
敌百虫	液液萃取	超高速液相色谱-串联质谱法	[9]
有机氯农药	固相分散萃取	超高效液相色谱-串联质谱法	[10]
拟除虫菊酯类农药	磁性固相萃取	气相色谱-质谱联用法	[11]
拟除虫菊酯类农药	基于碳纳米管的固相分散萃取	气相色谱-质谱联用法	[12]

4 雌激素检测

雌激素是分子中含有 18 个碳原子、化学结构相似的一类类固醇激素的总称。医学上,常用雌激素治疗妇科疾病和进行生育控制。但长期过量的摄入雌性激素,会造成机体代谢调控紊乱,最终对人体产生极大伤害。因此,我国早在 2002 年就将己烯雌酚等合成类雌激素列为食品中的不得检出类物质。而牛奶作为一种特殊的食品,恰恰是人体雌激素来源的主要途径之一。因此,牛奶中雌激素类物质的检测是保障牛奶安全的重要内容之一。

根据来源不同,牛奶中所含有的雌激素可分为两类:内源性雌激素和外源性雌激素。内源性雌激素,又称为天然雌激素,是指奶牛由自身合成分泌的,如雌酮、雌二醇、雌三醇等;外源性雌激素,又称环境雌激素,是指可代替雌激素体内作用的一类化合物,外源性雌激素既包括合成类激素,也包括其他物种产生的天然雌激素,如己烯雌酚等。

牛奶中雌性激素的检测方法由早期普通的化学提取方法和光度法等,发展到后来的色谱方法,近年来,色谱质谱联用技术的广泛应用,使牛奶和各种奶制品中雌性激素的种类和含量得以进一步确认。

范志影等^[13]建立了 LC-MS 法测定牛奶中 4 种内源雌激素的方法,可用于牛奶中 17- α -雌二醇、17- β -雌二醇、雌三醇和雌酮等内源雌激素的同时测定,检出限 0.28~0.64 ng·kg⁻¹。

尤亮亮等^[14]采用固相萃取-高效液相色谱质谱联用法(SPE-HPLC/MS),建立牛奶中 9 种性激素(雌酮、雌三醇、17 α -雌二醇、诺龙、甲睾酮、丙酸睾酮、醋酸氯地孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸甲羟孕酮)残留的检测方法。样品经甲醇提取,过固相萃

取柱净化,氮气吹干,残留物甲醇溶解后测定。其中雌激素(雌酮、雌三醇、17 α -雌二醇)采用负模式;其余性激素为正模式,进行多反应监测(MRM)模式定性定量分析。

5 重金属检测

近年来,我国环境受重金属污染的情况不容乐观,而产生于此环境中的饮用水和饲料必然会受到的污染,并在奶牛体中沉积下来,最终通过牛奶对人体产生负面影响。牛奶中重金属含量的检测,一直是牛奶质量控制的重要组成部分。牛奶中的重金属含量较低,所以针对其的检测,多依据食品安全国家标准,采用石墨炉原子吸收光谱法测定,该方法通常需要一定步骤的前处理过程,虽然方法灵敏度完全可达到检测要求,但是受仪器所限,每次测定只能检测一种重金属元素,增加了检验工作量。目前,有研究人员^[15-16]采用电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定鲜奶中重金属含量,并获得更高的灵敏度和更低的检出限。与传统原子吸收光谱法相比,ICP-MS 的检出限更低,一次进样,可同时测定多种元素,极大提供了检验效率。目前,尚无独立的乳制品中多种重金属检测的标准颁布,这也需要检验工作者继续努力制定。

6 小结

牛奶作为一种营养丰富的食品,其安全直接关系到国民的身体健康。近年来,随着食品安全监管力度的增大,人们对于国产食品的信心开始重新建立。本文通过对近 5 年来牛奶中常见的有毒有害物质检测方法的进行总结,发现检测方法日益向简便、快速和普适性的方向发展,为食品安全部门的监管提供了更广阔的思路 and 选择余地。

参考文献:

[1] Zhang JJ, Kesteloot H. Milk consumption in relation to incidence of prostate, breast, colon, and rectal cancers: Is there an independent effect[J]. Nutr Cancer, 2005, 53:65-72.

[2] Hernandez F, Sancho JV, Ibanezetal. Antibiotic residue determination in environmental waters by LC-MS[J]. Trend Anal Chem, 2007, 26:466-485.

[3] Han RW, Zheng N, Yu ZN, et al. Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in rawmilk by UPLC-MS/MS[J]. Food Chem, 2015, 181: 119-126.

- DOI:10.1016/j.foodchem.2015.02.041.
- [4] Salutia G, Diamantial I, Giusepponi D, et al. Simultaneous determination of aminoglycosides and colistins in food [J]. Food Chem, 2018, 266: 9-16. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.05.113.
- [5] Husniye I, Elmas OO. Analysis of veterinary drug and pesticide residues using the ethyl acetate multiclass/multiresidue method in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Anal Meth Chem, 2016; 1-17.
- [6] Chen M, Ding SY, Wen k, et al. Development of a fluorescence-linked immunosorbent assay for detection of avermectins using a fluorescent single-domain antibody [J]. Anal Method, 2015, 7(9): 3728-3734.
- [7] 谭棕, 陈达. 牛奶中三聚氰胺的显微拉曼光谱检测新方法研究 [J]. 分析仪器, 2016(S1): 51-53.
- [8] 魏玉娟, 李琳, 杨笑亚, 等. 近红外光谱模式识别三聚氰胺掺假牛奶 [J]. 中国乳品工业, 2016, 44(10): 48-51.
- [9] Jadhav MR, Pudale A, Raut P, et al. A unified approach for high-throughput quantitative analysis of the residues of multi-class veterinary drugs and pesticides in bovine milk using LC-MS/MS and GC-MS/MS [J]. Food Chem, 2019, 272: 292-305. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.08.033.
- [10] Rong LL, Wu XH, Xu J, et al. Determination of pydiflumetofen residues in some foods of plant and animal origin by QuEChERS extraction combined with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass [J]. Food Anal Method, 2018, 11(10): 2682-2692.
- [11] Zhou PP, Chen K, Gao M, et al. Magnetic effervescent tablets containing ionic liquids as a non-conventional extraction and dispersive agent for determination of pyrethroids in milk [J]. Food Chem, 2018, 268: 468-475. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.06.099.
- [12] Gao Y, Sun P. Determination of five pyrethroid pesticides residue in liquid milk by gas chromatography using multi-walled carbon nanotubes as dispersion solid phase extraction sorbent [J]. Acta Chromatogr, 2018, 30(2): 141-146.
- [13] 范志影, 刘庆生, 常碧影. 液相色谱串联质谱法测定牛奶中的内源性雌激素 [J]. 分析实验室, 2016, 7(34): 751-755.
- [14] 尤亮亮, 魏巍, 刘海燕, 等. 固相萃取-高效液相色谱串联质谱测定牛奶中 9 种性激素残留 [J]. 中国测试, 2016, 5(42): 46-49, 55.
- [15] Zhou XW, Qu XY, Zheng N, et al. Large scale study of the within and between spatial variability of lead, arsenic, and cadmium contamination of cow milk in China [J]. Sci Total Environ, 2019, 65(2): 3054-3061. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.094.
- [16] Qu XY, Zheng N, Zhou XW et al. Analysis and risk assessment of seven toxic element residues in raw bovine milk in China [J]. Bio Trace Element Res, 2018, 183(1): 92-101. DOI: 10.1007/s12011-017-1116-x.

(收稿日期 2018-09-10)

(本文编辑:石俊强)

(上接第 430 页)

- [22] Chockalingam S, Ghosh SS. Amelioration of cancer stem cells in macrophage colony stimulating factor-expressing U87MG-Human glioblastoma upon 5-fluorouracil therapy [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e83877. DOI: 10.1371/journal.pone.0083877.
- [23] Teng J, Hejazi S, Hiddin L, et al. Recycling drug screen repurposes hydroxyurea as a sensitizer of glioblastomas to temozolomide targeting de novo DNA synthesis, irrespective of molecular subtype [J]. Neuro-Oncology, 2018, 20(5): 642-654. DOI: 10.1093/neuonc/nox198.
- [24] Hegi ME, Diserens A, Gorlia T, et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma [J]. N Engl J Med, 2005, 352(10): 997-1003. DOI: 10.1056/NEJMoa043331.
- [25] Stritzelberger J, Distel L, Buslei R, et al. Acquired temozolomide resistance in human glioblastoma cell line U251 is caused by mismatch repair deficiency and can be overcome by lomustine [J]. Clin Transl Oncol, 2018, 20(4): 508-516. DOI: 10.1007/s12094-017-1743-x.
- [26] Nagel ZD, Kitange GJ, Gupta SK, et al. DNA repair capacity in multiple pathways predicts chemoresistance in glioblastoma multiforme [J]. Cancer Res, 2017, 77(1): 198-206. DOI: 10.1158/0008-5472.can-16-1151.
- [27] 韩庆芳, 徐丁, 吴江. 胶质母细胞瘤和胶质瘤干细胞 [J]. 四川解剖学杂志, 2012, 20(3): 21-25. DOI: 10.3969/j.issn.1005-1457.2012.068.

(收稿日期 2018-08-26)

(本文编辑:石俊强)