

Determination of the Content of Some Estrogens in Raw Cow's Milk Using Reverse Phase High-performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Dr. Juhaina Dib*
Issa Rajab Kurdi**

(Received 22 / 8 / 2022. Accepted 26 / 3 / 2023)

□ ABSTRACT □

This study aimed to determine the natural estrogen 17β -estradiol (17β -E2) and its synthetic derivative 17α -ethinyl estradiol (17α -EE2) in samples of raw cow's milk during three gestational periods (first trimester, second trimester and third trimester) for comparison with Raw cow's milk (without lamb). RP-HPLC method was used on a C18 column and isocratic elution system with a mobile phase (acetonitrile: water 55:45 v/v). The extraction was accomplished by using acetonitrile and ultrasonic device. The measurements were made after the ideal conditions for chromatographic separation were achieved and with it the two compounds E2 and EE2 of the samples were separated with good selectivity ($\alpha=1.157$) and sufficient resolution ($R_s=1.543$) within 7 min. The analytical results obtained LOD and LOQ limit values for compound E2 and compound EE2 and were (0.0321, 0.1070) ng/ml, (0.0032, 0.0106) ng/ml, respectively, with average recovery (98.88%) for E2 compound and (107.16%) for EE2 compound.

The results showed that milk content of natural estrogen E2 in the second and third trimesters samples was (40.458 ± 0.748) ng/L, and that is higher than the contents of the first trimester samples of pregnancy and non-pregnant, which is $(19,519 \pm 2.300)$ ng/L, while its contents of synthetic estrogen EE2 in the samples of the second and third trimester of pregnancy was (3.8345 ± 0.4775) ng/L, and that is lower than the contents of the first trimester samples of pregnancy and non-pregnant, which reached (9.9805 ± 0.5585) ng/L.

Keywords: estrogen, estradiol, ethinyl estradiol, cow's milk, reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC).

Copyright



:Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* Associate Professor, Chemistry Department - Faculty of Science - Tishreen University - Lattakia - Syria. juhaina.deeb@tishreen.edu.sy

** Master Student, Department of Chemistry - Faculty of Science - Tishreen University - Lattakia - Syria. issa.kurdi@tishreen.edu.sy

تحديد محتوى الحليب البقري الخام من بعض الإستروجينات باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي بالطور العكوس (RP-HPLC)

د. جهينة ديب*

عيسى رجب كردي**

تاريخ الإيداع 22 / 8 / 2022. قُبِلَ للنشر في 26 / 3 / 2023

□ ملخص □

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد الإستروجين الطبيعي 17β -إستراديول (17β -E2) ومشتقه الاصطناعي 17α -إيثينيل إستراديول (17α -EE2) في عينات من الحليب البقري الخام خلال ثلاث فترات من الحمل (ثالث أول، ثلث ثاني وثلث ثالث حمل) للمقارنة مع الحليب البقري الخام من غير حمل. استخدمت تقنية RP-HPLC على عمود C18 ونظام فصل (Isocratic elution) مع طور متحرك (أسيتونتريل : ماء 55 : 45 v/v). انجز الاستخلاص بمذيب الأسيتونتريل وجهاز الأمواج فوق الصوتية. أجريت القياسات بعد أن تم تحقيق الشروط المثالية لعمليات التحليل الكروماتوغرافي وتحقق فصل المركبين (E2) و (EE2) في العينات بانتقائية جيدة ($\alpha=1.157$) وفصل كافٍ ($R_s=1.543$) في غضون 7 min. أظهرت النتائج التحليلية حد كشف LOD وحد تحديد كمي LOQ للمركب (E2) وللمركب (EE2) وكانت على التوالي ($0.0321, 0.1070$) ng/ml، ($0.0032, 0.0106$) ng/ml وبمتوسط استرجاعية (98.88%) للمركب (E2) و (107.16%) للمركب (EE2). بينت النتائج محتوى الحليب من الإستروجين الطبيعي (E2) في عينات الثلث الثاني والثلث الثالث من فترة الحمل وبلغت (40.458 ± 0.748) ng/L وهي أعلى بالمقارنة مع عينات الثلث الأول من فترة الحمل وغير الحامل والتي بلغت (19.519 ± 2.300) ng/L، أما محتواه من الإستروجين الاصطناعي (EE2) في عينات الثلث الثاني والثلث الثالث من فترة الحمل فبلغت (3.8345 ± 0.4775) ng/L وهي أقل مقارنة بمحتوى عينات الثلث الأول من فترة الحمل وغير الحامل والتي سجلت (9.9805 ± 0.5585) ng/L.

الكلمات المفتاحية: إستروجين، إستراديول، إيثينيل إستراديول، حليب الأبقار، الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي بالطور العكوس (RP-HPLC).

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص



CC BY-NC-SA 04

* أستاذ مساعد - قسم الكيمياء-كلية العلوم-جامعة تشرين-اللاذقية-سورية. juhaina.deeb@tishreen.edu.sy

** طالب ماجستير - قسم الكيمياء-كلية العلوم-جامعة تشرين-اللاذقية-سورية. issa.kurdi@tishreen.edu.sy

مقدمة:

يحتل ضبط الجودة في المنتجات الغذائية الطبيعية والمصنعة أهمية كبيرة في مجال سلامة الأغذية والرصد البيئي خاصة بعد أن طغت متطلبات الحضارة الصناعية على كل مقومات الحياة والتي كان من أحد أولوياتها ومآزال الزيادة في الانتاج بهدف تحقيق تغطية كاملة للحاجات او ما يزيد، وأدى ذلك بالطبع مع الوقت الى حدوث تغييرات في محتوى المكونات الطبيعية لكل المنتجات الطبيعية ولم يكن الحليب الخام بعيدا عن ذلك.

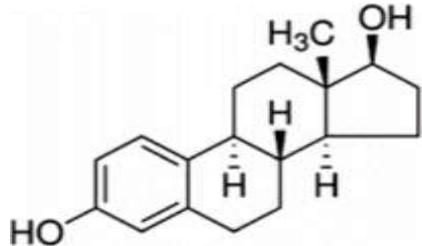
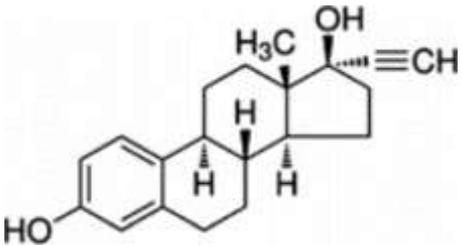
يجد الحليب الخام مع مشتقاته حضوراً دائماً على موائد أغلب البشر كونه أحد المواد الغذائية الأساسية، لكن في الفترة الأخيرة بدأ القلق يتسرب الى المستهلكين نتيجة لظهور بعض الأبحاث التي تشكك في سلامة استهلاكه لاحتوائه على الهرمونات الستيروئيدية ولا سيما الإستروجينات، وأشارت إلى أن بعض هذه الاستروجينات أو نواتج استقلالها تلعب دوراً في الإصابة بالسرطان وخاصة سرطان الثدي والبروستات والمبيض، كونها مواد نشطة تتداخل مع نظام الغدد الصماء في الجسم وتتسبب في اضطراب عملها [1,2,3].

تحتوي في الواقع جميع المواد الغذائية ذات الأصل الحيواني (لحوم، بيض، حليب ومشتقاته) تقريباً على β 17-إسترايول ونواتج استقلاله، وتختلف مستوياته ونواتج استقلاله باختلاف نوع الطعام، الجنس، الأنواع الحيوانية، العمر والحالة الفيزيولوجية للحيوانات [4,5]، ومن الناحية الواقعية لا يمكن تجنب الهرمونات الطبيعية سواء في الأغذية ذات الأصل الحيواني [6] أو في المنتجات النباتية حيث تحتوي أيضاً على مركبات تشبه من الناحية الهيكلية مركب β 17-إسترايول وقد تم تصنيفها على أنها إستروجينات نباتية وسميت باسم فيتو إستروجينات (Phytoestrogens) [7].

هناك ثلاثة مصادر رئيسة لتلوث الحليب بمركبات الاستروجين ويمكن تصنيفها وفق الآتي:

- المصدر الأول طبيعي يأتي من الحيوانات نفسها لهذا يمكن للحليب ان يحتوي على الإسترون (E1) والإسترايول (E2) والإستريول (E3).
- المصدر الثاني صناعي يأتي من خلال عمليات التصنيع كالتعبئة والتعليق والتخزين حيث تحاكي المواد المستخدمة فيها نشاط الإستروجين وبالتالي تتداخل مع النظام الهرموني في الجسم وتسبب الإشكالات الصحية.
- المصدر الثالث يأتي عن طريق الأعلاف الحيوانية وعلى وجه الخصوص هرمونات الميكو إستروجين [8]. يُعد الإسترايول E2 الهرمون الستيروئيدي الطبيعي الأنثوي الأساس والأكثر فعالية في البشر، فهو مسؤول عن الخصائص الجنسية كنمو الثدي وبدء سن البلوغ والتحكم في الدورة الشهرية والتناسلية عند الإناث [9]، بينما يُعد الابيثينيل إسترايول EE2 هرمون اصطناعي مشتق من الإسترايول E2 ويستخدم بصورة أساسية كمكون في حبوب منع الحمل ومن تطبيقاته الطبية المعالجة ببدائل الإستروجين وتعليق الرضاعة الطبيعية [10]. يظهر الجدول (1) البنية الكيميائية والتسمية النظامية والشائعة لهذين المركبين.

جدول (1): البنية الكيميائية والتسمية النظامية والشائعة لهرمون الإستروجين 17β -إستراديول ومشتقه $\alpha 17$ -ايثينيل إستراديول

الإستروجينات	17β -إستراديول	$\alpha 17$ -ايثينيل إستراديول
الاسم الشائع والاختصار	17β -Estradiol (17β -E2) or (E2)	17α -Ethinylestradiol (17α -EE2) or (EE2)
الاسم النظامي	1,3,5-estratriene-3,17beta-diol	17alpha-ethynyl-1,3,5(10)-estratriene-3,17beta-diol
الصيغة الجزيئية	$C_{18}H_{24}O_2$	$C_{20}H_{24}O_2$
الصيغة الهيكلية [11]		

استخدم في تحديد هذه المركبات في عينات الحليب تقانة المقايضة المناعية بنوعها المقايضة المناعية الشعاعية ومقايضة الممتز المناعي المرتبط بالأنزيم لكن بقيت محدودة التطبيق بسبب التداخلات الناتجة عن تشابه مركبات الإستروجينات هيكلياً، لذا يعد استخدام تقانات التحليل الكروماتوغرافي التي تمكن من فصل وتحديد مركبات الإستروجين دون أية تداخلات معيقة [12,13] خاصة الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي (HPLC) الخيار الأفضل لتحليل هذه الأنواع من المركبات في العينات البيئية والبيولوجية [14].

ستركز هذه الدراسة على تحديد 17β -إستراديول و $\alpha 17$ -ايثينيل إستراديول في الحليب البقري الخام، باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي بالطور العكوس، للتأكد من محتواه من هذين المركبين لمقارنته مع الحدود المقبولة عالمياً وبالتالي تقدير مستوى التعرض تبعاً لكمية الحليب المتناولة.

أهمية البحث وأهدافه:

يعد هذا البحث إضافة علمية وعملية سهلة التطبيق ومنخفضة التكاليف في مجال مراقبة سلامة الأغذية والرصد البيئي وضبط الجودة في إنتاج الحليب الخام وإدراك مخاطر التعرض لمركبات الإستروجينات وكذلك في التحقق من مدى توافق نسبة الإستروجينات (17β -إستراديول و $\alpha 17$ -ايثينيل إستراديول) الموجودة في الحليب الخام مع الحدود الآمنة للاستهلاك البشري، حيث سيتم تحديد تراكيز هذه الإستروجينات في الحليب الخام للأبقار خلال فترة الحمل (الثالث الأول، الثالث الثاني والثالث الثالث من الحمل) ومقارنتها مع الحليب الخام للأبقار غير الحوامل بغية تقدير مستوى التعرض لكل نوع من هذه المركبات تبعاً لنوعية وكمية الحليب المتناولة.

طرائق البحث ومواده:

1- المواد والأدوات المستخدمة:

- محلول عياري مرجعي لـ 17β -إسترايول بنقاوة 96.6% انتاج شركة Ehrenstorfer الالمانية ومحلول عياري مرجعي لـ $\alpha 17$ -ايتينيل إسترايول بنقاوة 98.0% انتاج شركة Ehrenstorfer الالمانية.
- أسيتونتريل ماركة Honeywell (for HPLC, gradient grade, $\geq 99.9\%$).
- ماء ثنائي التقطير.
- أوراق ترشيح حجم مسام الورقة $4\ \mu\text{m}$ ، دائرية ذات قطر 15 cm ماركة MACHEREY-NAGEL الألمانية، ورق الألمنيوم.
- زجاجيات المانية الصنع ماركة SCHOTT (ببشير، دوارق حجمية، ماصات وأقماع فصل) ذات ساعات مختلفة.
- سيرنغ حقن سعة 5,10 ml ومرشح حقنة ذو مسام $0.45\ \mu\text{m}$.
- عبوات زجاجية معقمة سعة 5 ml.
- مايكروبايبيت $10-100\ \mu\text{l}$.

2- الأجهزة المستخدمة:

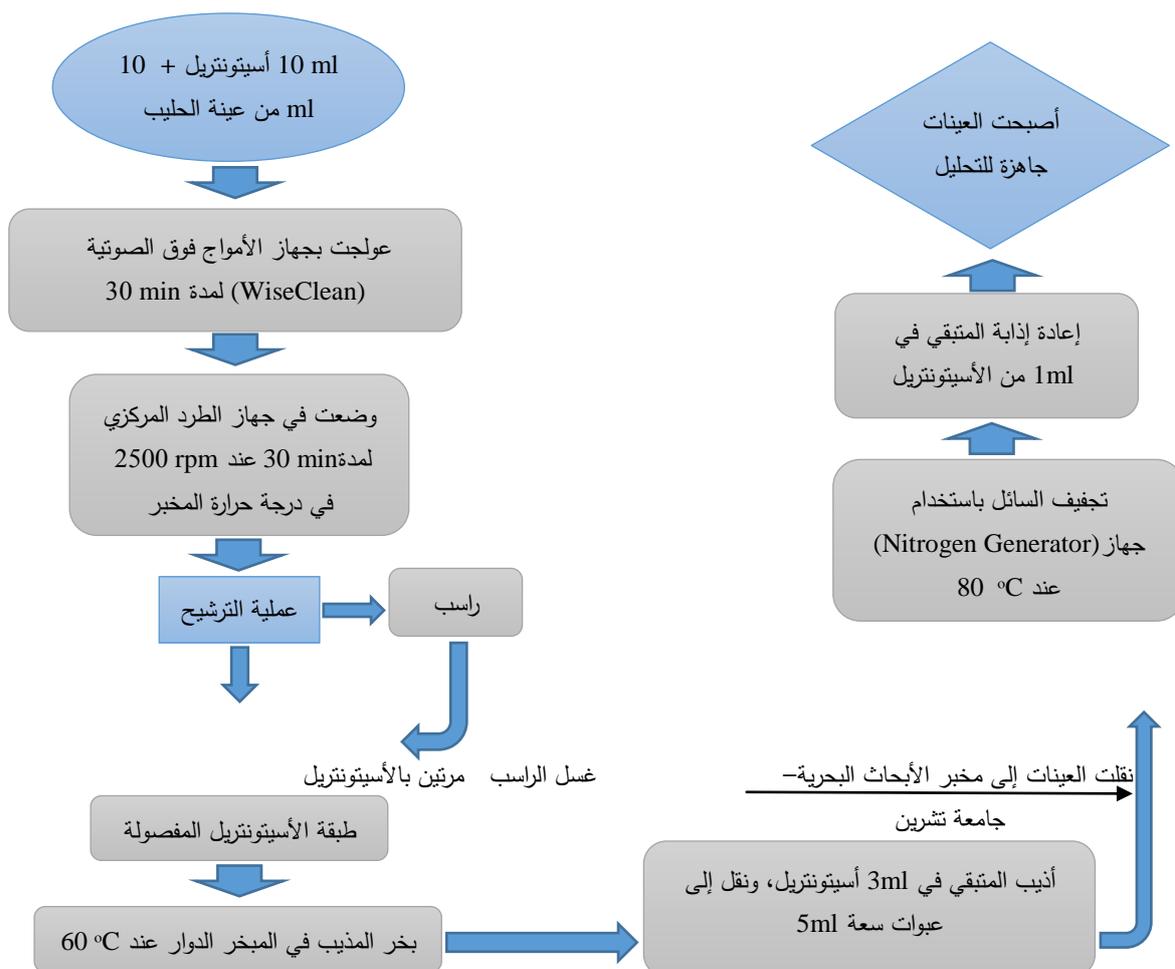
- استخدمت الأجهزة الموجودة في مديرية المخابر (المخبر المركزي)، شعبة تحليل بقايا الأدوية البيطرية والهرمونات. وزارة التجارة الداخلية وحماية المستهلك - محافظة دمشق.
 - جهاز الأمواج فوق الصوتية إنتاج شركة Daihan نموذج WiseClean WUC D-10H.
 - جهاز الطرد المركزي ماركة Heraeus Christ Labofuge (0-6000 rpm).
 - مُبخّر الدوار صناعة Buchi موديل R-215 and B-491، سرعة الدوران (20-280 rpm)، مجال درجة الحرارة ($20-180\ ^\circ\text{C}$).
 - جهاز توليد النتروجين Nitrogen Generator صناعة Nitrox LTD البريطانية موديل DCN 400-1 [الموجود في مخبر الأبحاث البحرية - جامعة تشرين].
 - جهاز كروماتوغرافيا سائلة إنتاج شركة HITACHI اليابانية مزود بكاشف الأشعة فوق البنفسجية (DAD L-2455) وبمضخة موديل L-2130، وفرن العمود نموذج L-2350.
 - عمود كروماتوغرافي إنتاج شركة MACHEREY-NAGEL الألمانية، C18 (250x4.6 mm I.D; $5\ \mu\text{m}$).
- ### 3 - عينات الحليب البقري الخام:

تم الاعتيان من ميقرة فديو - الهنادي - محافظة اللاذقية، جمعت عينات الحليب البقري الخام من الحليب لأبقار حوامل في الثلث الأول، الثلث الثاني والثلث الثالث حمل، وعينات من غير الحوامل. جمعت العينات مباشرة من ضرع الأبقار في عبوات زجاجية معقمة ثم وضعت في المجمدة حتى إنجاز التحليل.

العمل المخبري:

1- تحضير العينات للتحليل:

عُدلت درجة حرارة العينات إلى درجة حرارة المخبر، ثم تم تحضيرها للتحليل باتباع الخطوات الآتية [15]:



2- تحضير المحاليل العيارية:

تم تحضير محلولين أم من 17β -E2 و 17α -EE2 بتركيز 50 ng/ml لكل منهما باستخدام الأسيتونتريل كمذيب ومنها تم تحضير سلسلة المحاليل العيارية للمركبين بالتركيز المبينة في الجدول (2)

جدول (2): تراكيز سلسلة المحاليل العيارية للمركبين 17α -EE2 و 17β -E2

رقم المحلول العياري	1	2	3	4	5	6
CE2 (ng/ml)	0.050	0.125	0.250	0.500	1.000	2.700
CEE2 (ng/ml)	0.005	0.010	0.050	0.100	0.150	2.700

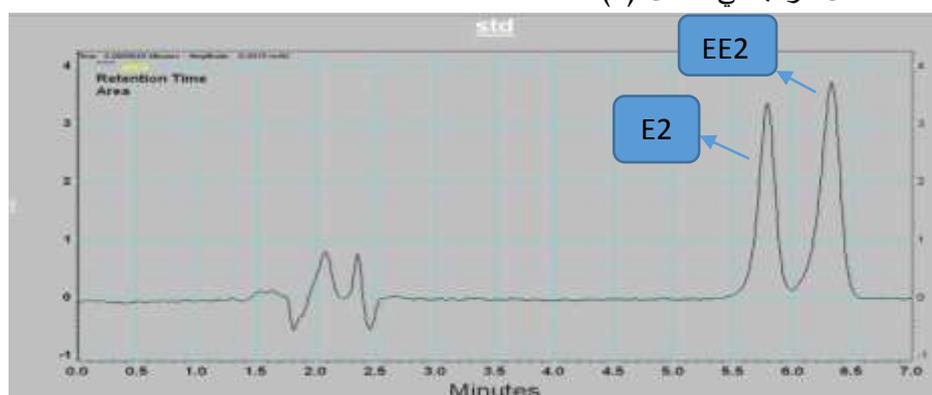
3- اختبار كفاءة طريقة التحليل:

تمّ التوصل إلى الشروط الكروماتوغرافية المثلى من خلال اجراء اختبارات تجريبية متعددة التي اعتمدت في العمليات التحليلية وهي موضحة في الجدول (3).

جدول (3): الشروط الكروماتوغرافية المطبقة لتحديد 17α -EE2 و 17β -E2

C18 (250 x4.6 mm I.D; 5 μ m)	العمود المستخدم
Diode Array Detector	الكاشف المستخدم
271 nm	طول موجة القياس
ACN/H ₂ O (55 : 45 V/V)	الطور المتحرك
Isocratic elution	نظام الغسل
1 ml/min	تدفق الطور المتحرك
20 μ l	الحجم المحقون
40 °C	درجة حرارة فرن العمود

يظهر الشكل (1) الكروماتوغرام الناتج عن حقن عينة من المحلول العياري المكون من 17α -EE2 و 17β -E2 بتركيز 2.7 ng/ml لكل مركب في الشكل (1).



شكل (1) كروماتوغرام محلول عياري مكون من 17α -EE2 و 17β -E2 بتركيز 2.7 ng/ml لكل مركب.

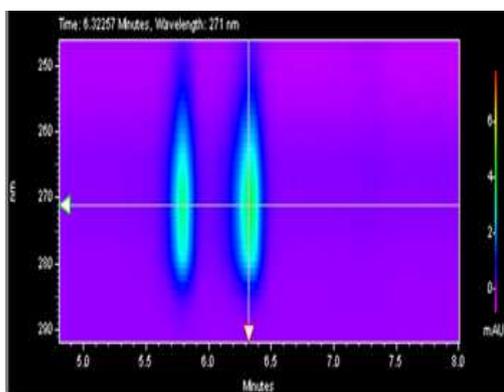
تحققت عملية الفصل في زمن أقل من 7 min للمركبين بانتقائية جيدة $\alpha = 1.157$ وفصل جيد $R_s = 1.543$ وبالطبع هذا يعود إلى الكفاءة العالية في تحديد شروط عملية الفصل الكروماتوغرافي والتحليل. تم من خلال الشكل (1) حساب المعاملات الكروماتوغرافية لفصل المركبين 17α -EE2 و 17β -E2 للتأكد من كفاءة نظام الفصل كما هو موضح في الجدول (4).

جدول (4): المعاملات الكروماتوغرافية الموافقة لقمم فصل المركبين (17α -EE2 و 17β -E2)

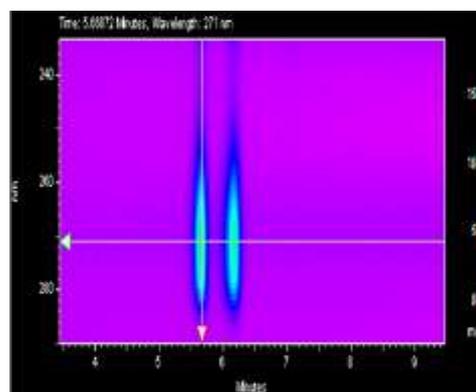
المعامل الكروماتوغرافي	العلاقة المعبرة عنه	قيمه بالنسبة لـ E2	قيمه بالنسبة لـ EE2
t_R - زمن الفصل (min)	-	5.787	6.327
K' - عامل الفصل	$K' = (t_R - t_M) / t_M$	1.462	1.692
α - عامل الفصل النسبي	$\alpha = K'_{(EE2)} / K'_{(E2)}$	1.157	

1.543		$R_s = \frac{2(t_{R(EE2)} - t_{R(E2)})}{(W(E2) + W(EE2))}$	R _s - درجة الفصل
4003	5953	$N = 16 (t_R/W)^2$	N - عدد مراكز الفصل
0.0062	0.0042	$H = L / N$	H - ارتفاع مراكز الفصل (cm)
t_M - زمن عبور الطور المتحرك (min)، W - عرض القمة (cm)، L - طول العمود الكروماتوغرافي (cm).			

يتميز الكاشف المستخدم (DAD L-2455) بإجراء فحص تلقائي لتحديد طول الموجة المناسب ضمن مجال لطول الموجة يتراوح ما بين (900-190nm)، ويظهر الشكل (2) والشكل (3) طول الموجة الأعظمي للمركبين E2 و EE2 على التوالي، حيث تم اختيار طول الموجة ($\lambda_{max}=271 \text{ nm}$) الذي يقابل امتصاص أعظمي في مجال الأشعة فوق البنفسجية لكل من المركبين المدروسين.



شكل (3): اختيار طول الموجة الأعظمي للمركب 17α-EE2



شكل (2): اختيار طول الموجة الأعظمي للمركب 17β-E2

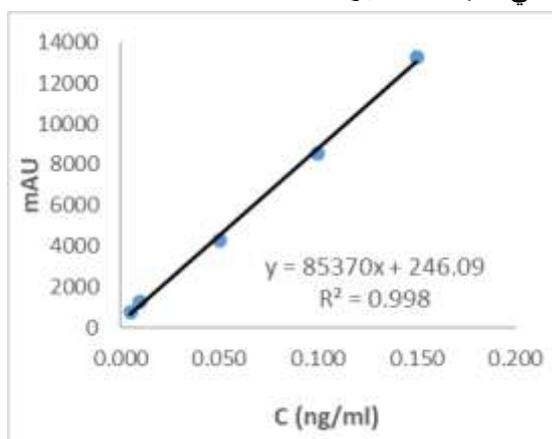
تم القيام بالعملية التحليلية لسلسلة المحاليل العيارية بثلاثة مكررات عند طول الموجة 271 nm للمركبين المدروسين وانجزت الحسابات الإحصائية للمعطيات التحليلية كما هو موضح في الجدول (5).

جدول (5): المعطيات التحليلية للمحاليل العيارية والحسابات الإحصائية لها (n=3)

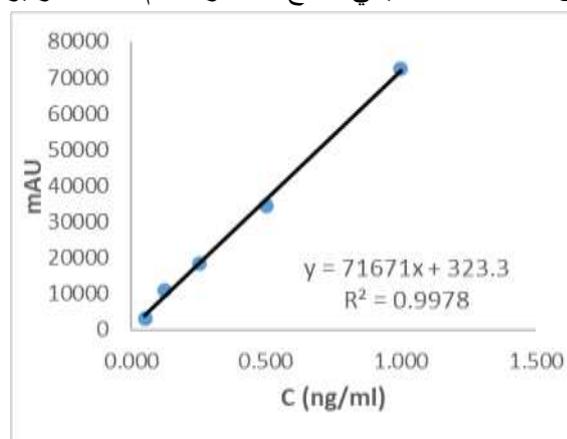
	NO. Std	C (ng/ml)	A	C _{exp} (ng/ml)	\bar{C}_{exp} (ng/ml)	SD	RSD%	Rec%	$\bar{Rec}\%$
E2	1	0.050	3329	0.04194	0.03976	0.002424	6.10	79.5	98.88
			3204	0.04019					
			2986	0.03715					
	2	0.125	10951	0.14828	0.14654	0.004865	3.32	117.2	
			10432	0.14104					
			11095	0.15029					
	3	0.250	18112	0.24820	0.25444	0.005815	2.29	101.8	
			18937	0.25971					
			18628	0.25540					
	4	0.500	34619	0.47852	0.47511	0.007385	1.55	95.0	

			34738	0.48018					
			33768	0.46664					
	5	1.000	73084	1.01520	1.00916	0.005290	0.52	100.9	
			72378	1.00535					
			72491	1.00693					
EE2	1	0.005	768	0.00611	0.00616	0.001184	19.22	123.2	107.16
			856	0.00714					
			692	0.00522					
	2	0.010	1315	0.01252	0.01197	0.001655	13.83	119.7	
			1109	0.01011					
			1380	0.01328					
	3	0.050	4535	0.05024	0.04701	0.003567	7.59	94.0	
			3932	0.04318					
			4310	0.04760					
	4	0.100	8458	0.09619	0.09710	0.001884	1.94	97.1	
			8721	0.09927					
			8429	0.09585					
	5	0.150	13416	0.15427	0.15276	0.002022	1.32	101.8	
			13354	0.15354					
			13091	0.15046					
<p>NO.Std - رقم المحلول العياري، C - التركيز النظري، A(Area) - مساحة القمة، Cexp -(experimental) - التركيز المقاس (التجريبي)، \bar{C} exp - متوسط التركيز المقاس، SD - الانحراف المعياري، %RSD - الانحراف المعياري النسبي المئوي، Rec% - الاسترجاعية، \bar{R} - متوسط الاسترجاعية.</p>									

تم الحصول كما هو موضح في الجدول (5) على متوسط استرجاعية بلغت قيمته 98.88% للمركب (E2)، و 107.16% للمركب (EE2) وهذا يدل على الدقة العالية لنتائج التحليل. وبلغت قيم متوسط الانحراف المعياري النسبي المئوي 2.75% للمركب (E2) و 8.78% للمركب (EE2) مما يشير إلى تكرارية جيدة لنتائج القياس. يُظهر الشكل (4) والشكل (5) المنحني العياري لكل من E2 و EE2 على التوالي وذلك عند طول الموجة 271 nm، ومن معادلة الخط البياني الناتج لكل مركب تم حساب تركيزهما في العينات المجهولة.



شكل (5): المنحني العياري لمركب 17α-EE2



شكل (4): المنحني العياري لمركب 17β-E2

4- تقدير حدود الكشف:

تم حساب الانحراف المعياري SD كما هو مبين في الجدول (6)، و m: ميل المنحني العياري الناتج عن تحليل السلسلة العيارية للتركيز المنخفضة لكل من المركبين 17α -EE2 و 17β -E2 على حده في الشكلين (6) و (7) على التوالي، ثم تم تحديد حد الكشف النوعي وحد التحديد الكمي لكل مركب من المركبين المدروسين وفق العلاقتين (1) و (2) الآتيتين:

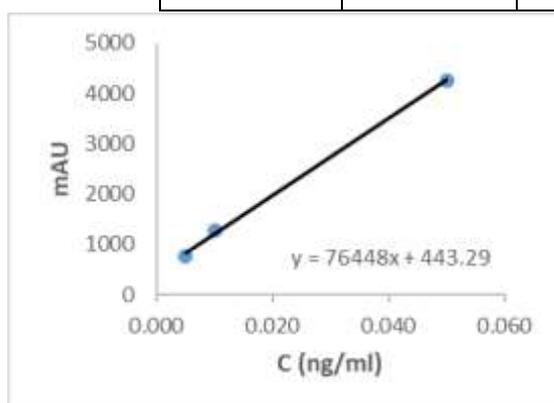
$$LOD = \frac{3 \times SD}{m} \dots\dots(1)$$

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{m} \dots\dots(2)$$

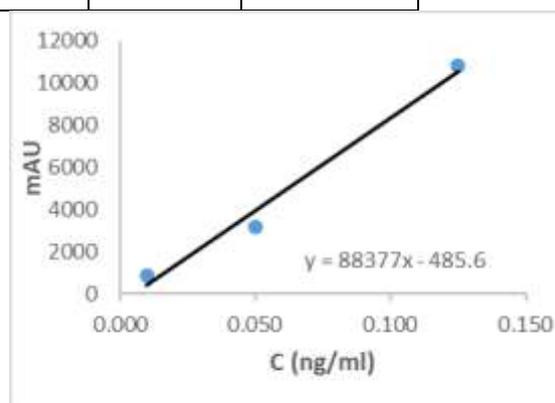
يوضح الجدول (6) قيم كل من حد الكشف النوعي (LOD (Limit Of Detection)، وحد التحديد الكمي (LOQ (Limit Of Quantification).

جدول (6): قيم حدود الكشف للإستروجينات المدروسة

الإستروجينات	SD	m	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
E2	945.4	88377	0.0321	0.107
EE2	80.9	76448	0.0032	0.0106



شكل (7): المنحني العياري لـ EE2 عند تراكيز منخفضة



شكل (6): المنحني العياري لـ E2 عند تراكيز منخفضة

تم رسم المنحنيين العياريين في الشكلين (6) و (7) الذي يمثل العلاقة بين التراكيز المنخفضة للمركبين المدروسين ومتوسط مساحات القمم الناتجة الموضحة في الجدول (7).

جدول (7): متوسط المساحات الناتجة للتركيز المنخفضة (n=3)

الإستروجينات	C(ng/ml)	\bar{A}	RSD%
E2	0.010	894	15.14
	0.050	3173	6.10
	0.125	10826	3.32
EE2	0.005	772	19.22
	0.010	1268	13.83
	0.050	4259	7.59
- متوسط مساحات القمم \bar{A}			

النتائج والمناقشة:

أجريت العمليات التحليلية لكل عينة من العينات المدروسة بثلاثة مكررات والحسابات الإحصائية للمركب (17β-E2) وللمركب (17α-EE2) كما هو مبين في الجدولين (8) و(9) على التوالي.

جدول (8): نتائج تحديد تركيز المركب 17β-E2 في العينات المدروسة (n=3)

العينة	A	C _{exp} (ng/ml)	\bar{C}_{exp} (ng/ml)	SD	RSD%	CL(P=0.95)
حليب خام (غير حامل)	12316	0.16733	0.17219	0.00496	2.88	0.17219±0.01232
	13027	0.17725				
	12649	0.17198				
حليب خام (ثلاث أول حمل)	15472	0.21136	0.21819	0.00593	2.72	0.21819±0.01473
	16237	0.22204				
	16174	0.22116				
حليب خام (ثلاث ثاني حمل)	30359	0.41908	0.41206	0.01050	2.55	0.41206±0.02609
	28991	0.39999				
	30218	0.41711				
حليب خام (ثلاث ثالث حمل)	28851	0.39804	0.39710	0.00547	1.38	0.39710±0.01359
	29138	0.40204				
	28363	0.39123				

CL(Confidence Limit) - حدود الثقة؛ تعطى بالعلاقة $CL = \frac{t \cdot S}{\sqrt{n}}$ حيث t - معامل احصائي في شروط عملنا يساوي (4.303).
(P=0.95) - مستوى ثقة 95% بأن القيمة الحقيقية تقع ضمن مجال حدود الثقة.

جدول (9): نتائج تحديد تركيز المركب 17α-EE2 في العينات المدروسة (n=3)

العينة	A	C _{exp} (ng/ml)	\bar{C}_{exp} (ng/ml)	SD	RSD%	CL(P=0.95)
حليب خام (غير حامل)	9406	0.10730	0.10539	0.00265	2.51	0.10539±0.00658
	8985	0.10237				
	9338	0.10650				
حليب خام (ثلاث أول حمل)	8427	0.09583	0.09422	0.00390	4.14	0.09422±0.00969
	8532	0.09706				
	7911	0.08978				
حليب خام (ثلاث ثاني حمل)	2844	0.03043	0.03357	0.00275	8.19	0.03357±0.00683
	3210	0.03472				
	3282	0.03556				
حليب خام (ثلاث ثالث حمل)	4258	0.04699	0.04312	0.00341	7.91	0.04312±0.00847
	3710	0.04058				
	3813	0.04178				

تبين نتائج تحديد مركب 17β-E2 الموجودة في الجدول (8) لعينات الحليب أن تركيز 17β-E2 ارتفع بمعدل تقريبي يتراوح ما بين 2.4 - 1.82 مرة في عينات الثلث الثاني والثلث الثالث من الحمل بالمقارنة مع تركيزه في عينات الثلث الأول من الحمل وغير الحامل، ويعود ذلك بصورة أساسية إلى زيادة الإنتاج في المشيمة، حيث يزداد تركيز هرمون

الاستروجين خلال فترة الحمل [16]، كما يتبين أن أعلى قيمة له وجدت في عينة الثلث الثاني حمل رغم تقاربها مع عينة الثلث الثالث حمل إلا أن هذا الاختلاف البسيط يعود إلى دور العوامل الفيزيولوجية في التصنيع الحيوي للهرمونات الستيروئيدية في جسم الحيوان [3]، كما هو موضح في الشكل (8).



شكل (8): مخطط بياني لتراكيز 17β -E2 في عينات الحليب المدروسة

لُحظ بمقارنة تراكيز 17α -EE2 بين العينات في الجدول (9) انخفاض التركيز في عينات الثلث الثاني والثلث الثالث من الحمل مقارنة مع مستوى تركيزه في عينات الثلث الأول من الحمل وغير الحامل كما هو موضح في الشكل (9).



شكل (9): مخطط بياني لتراكيز 17α -EE2 في العينات المدروسة

تجدر الإشارة إلى أن تراكيز المركبين المدروسين الموضحة في الجدول (8) والجدول (9) والمقدرة بوحدة (ng/ml) ناتجة عن تحليل 10ml من عينات الحليب وبالتالي يُمكن حساب التركيز في 1 لتر من الحليب لكل عينة كما هو موضح في الشكل (10).

جدول (10): تراكيز 17α -EE2 و 17β -E2 في لتر واحد مقدرة بوحدة (ng/L) في عينات الحليب المدروسة

المركب	حليب خام (غير حامل)	حليب خام (ثلث أول حمل)	حليب خام (ثلث ثاني حمل)	حليب خام (ثلث ثالث حمل)
17β -E2	17.219	21.819	41.206	39.710
17α -EE2	10.539	9.422	3.357	4.312

يُلاحظ بمقارنة نتائج هذه الدراسة الموضحة في الجدول (10) مع الدراسات المرجعية أن:

- سُجّلت مستويات المركب 17β-E2 حسب Malekinejad وآخرون [17] في الحليب الخام للأبقار غير الحامل 5.6 ± 1.2 ng/L، ثلث أول حمل 10 ± 2 ng/L، ثلث ثاني حمل 20.4 ± 1.4 ng/L وثلث ثالث حمل 21 ± 3 ng/L، وهي أقل بالمقارنة مع نتائج هذه الدراسة.
- سُجّلت مستويات 17β-E2 في عينات الحليب التي جمعت مباشرة من السوق حسب Courant وآخرون [18] كانت 20 ng/L، وهذه النتائج تتقارب مع المستويات التي ظهرت في عينات الثلث الأول حمل وغير الحامل لهذه الدراسة.
- بلغ تركيز 17β-E2 في حليب البقر الحامل حسب ما جاء به Grgurevic وآخرون [19] وصل إلى 65 ng/L، وهذه القيمة أعلى مقارنة مع نتائج هذا البحث.
- تركيز 17α-EE2 في الحليب الخام حسب Rodríguez وآخرون كان $5.7-142$ (μg/L) [20]. وهذا التركيز أعلى بكثير بالمقارنة مع نتائج هذه الدراسة وتفسير ذلك بأنه عائد إلى التلوث البيئي من مياه الصرف الصحي وثبات المركب في البيئة [21,22]، إلى جانب استخدامه كمحفزات نمو بهدف التسمين [23].
- يقع المدخول اليومي المسموح به من مركب 17β-E2 حسب لجنة الخبراء المشتركة بين منظمة الأغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية المعنية بالإضافات الغذائية *JECFA ضمن المجال (0–50 ng) لكل كيلوغرام من وزن الجسم [6]. في حين حدد المدخول اليومي المسموح به من مركب 17α-EE2 وفق ما جاء من قبل اللجنة العلمية للصحة والبيئة والمخاطر الناشئة **SCHEER وهو (0.007 μg) لكل كيلوغرام من وزن الجسم [24].
- بالنتيجة، تجدر الإشارة إلى أهمية الأخذ بالحسبان جميع الأغذية المتناولة خلال اليوم الواحد والتي يمكن أن تكون مصدراً آخر للتعرض لهذه الهرمونات وليس فقط من الحليب الخام ومشتقاته.

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

- تميزت شروط عملية الفصل الكروماتوغرافي المعتمدة بكفاءة عالية حيث تحققت عملية فصل المركبين E2 وEE2 في زمن أقل من 7 min بانتقائية جيدة $\alpha = 1.157$ وفصل جيد $R_s = 1.543$.
- بينت النتائج أن أعلى قيم لتركيز المركب (E2) في العينات المدروسة كان في عينة الثلث الثاني من الحمل 41.206 ng/L وعينة الثلث الثالث من الحمل 39.710 ng/L، بينما سُجّلت أعلى قيم لتركيز مركب (EE2) في عينة الحليب من غير الحامل 10.539 ng/L وعينة الثلث الأول من الحمل 9.422 ng/L.
- تُشير نتائج تراكيز الإستروجينات في عينات الحليب الخام التي جمعت من مبقرة فديو إلى عدم وجود مخاطر صحية في حال تناول 1 L/day من الحليب الخام المنتج خلال فترات الحمل الثلاث كونها أقل من المدخول اليومي المسموح به حسب معايير JECFA وما ورد حسب SCHEER.

التوصيات:

- توفر هذه الدراسة طريقة لفحص وتقييم سلامة الحليب الخام ومشتقاته التي قد تحتوي على المواد الكيميائية المخلة بعمل الغدد الصماء من الاستروجينات.
- تعد هذه الطريقة التحليلية ذات أهمية خاصة لما لها من آفاق تطبيقية واسعة في رقابة سلامة الأغذية ورصد التلوث البيئي.

JECFA*: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

SCHEER**: Scientific Committee on Health, Environmental and Emerging Risks.

References:

- [1]- Pape-Zambito D, Magliaro A, Kensinger R. Concentrations of 17 β -Estradiol in Holstein Whole Milk. *Journal of Dairy Science*. 2007;90(7):3308-3313.
- [2]- Yan W, Li Y, Zhao L, Lin J. Determination of estrogens and bisphenol A in bovine milk by automated on-line C30 solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2009;1216(44):7539-7545.
- [3]- Goyon A, Cai J, Kraehenbuehl K, Hartmann C, Shao B, Mottier P. Determination of steroid hormones in bovine milk by LC-MS/MS and their levels in Swiss Holstein cow milk. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 2016;33(5):804-816.
- [4]- MALEKINEJAD H, REZABAKHSH A. Hormones in Dairy Foods and Their Impact on Public Health- A Narrative Review Article. *Iran J Public Health*. 2015;44(6):742-758.
- [5]- Lykholat O, Grigoryuk I, Lykholat T. Metabolic effects of alimentary estrogen in different age animals. *Annals of Agrarian Science*. 2016;14(4):335-339.
- [6]- Barreiro R, Regal P, Díaz-Bao M, Fente C, Cepeda A. Analysis of Naturally Occurring Steroid Hormones in Infant Formulas by HPLC-MS/MS and Contribution to Dietary Intake. *Foods*. 2015;4(4):605-621.
- [7]- Desmawati D, Sulastri D. A Phytoestrogens and Their Health Effect. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2019;7(3):495-499.
- [8]- Capriotti A, Cavaliere C, Piovesana S, Stampachiachiere S, Samperi R, Ventura S et al. Simultaneous Determination of Naturally Occurring Estrogens and Mycoestrogens in Milk by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015;63(40):8940-8946.
- [9]- Perriman L. Xenoestrogen levels in milk – bioavailability and relevance as breast cancer risk factors [Master of Science in Biochemistry]. University of Canterbury; 2018.
- [10]- Aris A, Shamsuddin A, Praveena S. Occurrence of 17 α -ethynylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review. *Environment International*. 2014;69:104-119.
- [11]- Socas-Rodríguez B, Asensio-Ramos M, Hernández-Borges J, Herrera-Herrera A, Rodríguez-Delgado M. Chromatographic analysis of natural and synthetic estrogens in milk and dairy products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2013;44:58-77.
- [12]- Wang S, Huang W, Fang G, Zhang Y, Qiao H. Analysis of steroidal estrogen residues in food and environmental samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2008;88(1):1-25.
- [13]- Hu Y, Fan Y, Li G. Preparation and evaluation of a porous monolithic capillary column for microextraction of estrogens from urine and milk samples online coupled to high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2012;1228:205-212.
- [14]- Sosa-Ferrera Z, Mahugo-Santana C, Santana-Rodríguez J. Analytical Methodologies for the Determination of Endocrine Disrupting Compounds in Biological and Environmental Samples. *BioMed Research International*. 2013;2013:1-23.
- [15]- Yan Q, Yang L, Li S. Solid-phase extraction combined with high performance liquid chromatography-diode array detector for rapid determination of estrogens in milk. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2015;14(11):2077.
- [16]- Cunningham J, Klein B. *Textbook of veterinary physiology*. 5th ed. St. Louis, Mo.: Elsevier Saunders; 2013.

- [17]- Malekinejad H, Scherpenisse P, Bergwerff A. Naturally Occurring Estrogens in Processed Milk and in Raw Milk (from Gestated Cows). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(26):9785-9791.
- [18]- Courant F, Antignac J, Maume D, Monteau F, Andre F, Le Bizec B. Determination of naturally occurring oestrogens and androgens in retail samples of milk and eggs. *Food Additives and Contaminants*. 2007;24(12):1358-1366.
- [19]- Grgurevic N, Koracin J, Majdic G, Snoj T. Effect of dietary estrogens from bovine milk on blood hormone levels and reproductive organs in mice. *Journal of Dairy Science*. 2016;99(8):6005-6013.
- [20]- Socas-Rodríguez B, Asensio-Ramos M, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado M. Hollow-fiber liquid-phase microextraction for the determination of natural and synthetic estrogens in milk samples. *Journal of Chromatography A*. 2013;1313:175-184.
- [21]- Barreiros L, Queiroz J, Magalhães L, Silva A, Segundo M. Analysis of 17- β -estradiol and 17- α -ethinylestradiol in biological and environmental matrices — A review. *Microchemical Journal*. 2016;126:243-262.
- [22]- Ribeiro A, Nunes O, Pereira M, Silva A. An overview on the advanced oxidation processes applied for the treatment of water pollutants defined in the recently launched Directive 2013/39/EU. *Environment International*. 2015;75:33-51.
- [23]- Shao B, Zhao R, Meng J, Xue Y, Wu G, Hu J et al. Simultaneous determination of residual hormonal chemicals in meat, kidney, liver tissues and milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2005;548(1-2):41-50.
- [24]- [Internet]. 2022 [cited 19 August 2022]. Available from: https://ec.europa.eu/health/latest-updates/scheer-final-opinion-draft-eqs-priority-substances-under-water-framework-directive-v17-alpha-2022-03-02_en.