

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2021110701

方菁, 申哲民, 袁涛, 等. 雌激素的3D-QSAR模型构建及其在饲料与鸡肉中含量的测定以及对人体的影响[J]. 环境化学, 2023, 42(4): 1077-1084.

FANG Jing, SHEN Zhemin, YUAN Tao, et al. 3D-QSAR predicts the endocrine disrupting effect of estrogen and measures and evaluates the effect of estrogen in chicken feed and chicken on the human body[J]. Environmental Chemistry, 2023, 42 (4): 1077-1084.

雌激素的3D-QSAR模型构建及其在饲料与鸡肉中含量的测定以及对人体的影响*

方菁^{1**} 申哲民¹ 袁涛¹ 张徐祥²

(1. 上海交通大学环境科学与工程学院, 国家环境保护新型污染物环境健康影响评价重点实验室, 上海, 200240; 2. 南京大学环境学院环境卫生研究中心, 污染控制与资源再利用国家重点实验室, 南京, 210023)

摘要 雌激素对人体有显著的内分泌干扰效应. 本文以雌激素受体相对亲和力 (relative binding affinity, RBA) 作为生物活性, 对雌激素进行了三维定量构效关系 (3D-QSAR) 计算, 得到具有较好预测能力的 CoMFA (交叉验证相关系数 $q^2=0.721$, 非交叉验证相关系数 $r^2=0.925$) 和 CoMSIA ($q^2=0.824$, $r^2=0.961$) 模型. 并对国内各地区鸡肉进行了雌激素含量检测与雌激素效应评估. 植物雌激素在鸡饲料和鸡肉中检出率为 69% 和 84%; 天然雌激素在鸡饲料和鸡肉中检出率为 53% 和 50%. 检测及评估结果显示绝大部分鸡肉可以安全食用, 但鸡肉中含有的己烯雌酚、17 α -乙炔雌二醇以及香芹酚所具有的雌激素效应值得引起重视.
关键词 雌激素, 植物雌激素, 3D-QSAR, 激素效应, 评估.

3D-QSAR predicts the endocrine disrupting effect of estrogen and measures and evaluates the effect of estrogen in chicken feed and chicken on the human body

FANG Jing^{1**} SHEN Zhemin¹ YUAN Tao¹ ZHANG Xuxiang²

(1. Shanghai Jiaotong University, School of Environmental Science and Technology, State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Health Impact Assessment of Emerging Contaminants, Shanghai, 200240, China; 2. Nanjing University, School of the Environment, State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Environmental Health Research Center, Nanjing, 210023, China)

Abstract Estrogen has a significant endocrine disrupting effect on the human body. In this paper, the relative binding affinity (RBA) was used as the biological activity, and the three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) calculation of estrogen was carried out. CoMFA ($q^2=0.721$, $r^2=0.925$) and CoMSIA ($q^2=0.824$, $r^2=0.961$) models with good predictive ability are obtained. The detection rates of phytoestrogens in chicken feed and chicken were 69% and 84%; the detection rates of natural estrogens in chicken feed and chicken were 53% and 50%. The results show that most chickens are safe to eat, but the estrogenic effects of diethylstilbestrol, 17 α -ethinyl estradiol and carvacrol in chicken are worthy of attention.

Keywords Estrogen, phytoestrogens, 3D-QSAR, hormonal effects, evaluation.

2021年11月7日收稿(Received: November 7, 2021).

* 上海交通大学“医工交叉研究基金”(YG2017ZD15)资助.

Supported by the Medicine & Engineering Collaborative Research Fund of Shanghai Jiao Tong University (YG2017ZD15).

** 通信联系人 Corresponding author, Tel: 13551822376, E-mail: 443936694@qq.com

近年来,人类内分泌相关疾病的发病率不断增加引发了人们对环境内分泌干扰物(environmental endocrine disruptors, EDCs)的关注,如人体内分泌紊乱^[1]、儿童肥胖^[2]等. EDCs 的影响可以通过该物质对雌激素受体(estrogen receptor, ER)的激动作用来评估^[3].

对人类雌激素受体有激动作用的雌激素可以分为三类:天然雌激素(雌酮、雌二醇、雌三醇等);合成雌激素(双酚 A);以及植物雌激素(金雀异黄酮、 β -谷甾醇、豆甾醇等)^[4]. 目前大量研究已从人体血液、尿液中检测出了天然雌激素^[5-7]、合成雌激素^[8-9]以及植物雌激素^[10-12]. 还有研究检测了人从水体环境接触雌激素的风险^[13]以及从中草药^[14]、豆浆^[15]等通过食用摄入雌激素的风险.

雌激素对 ER 的激动作用可以通过相对结合亲和力(relative binding affinity, RBA)的数据进行评估,有研究通过实验确定了部分雌激素的雌激素受体相对结合亲和力^[16]. 对于部分没有实验数据的物质,一些研究通过分子对接^[17]或者使用 QSAR 建模^[18]预测了雌激素受体相对结合亲和力.

本研究对雌激素进行了 3D-QSAR 计算,得到具有较好预测能力的 CoMFA($q^2=0.721$, $r^2=0.925$)和 CoMSIA($q^2=0.824$, $r^2=0.961$)模型. 并通过使用 CoMFA 和 CoMSIA 模型预测了部分雌激素的 RBA. 对我国各地区的鸡饲料和鸡肉样品中的天然雌激素(雌酮、雌二醇、雌三醇等)、合成雌激素(双酚 A)、植物雌激素(金雀异黄酮、 β -谷甾醇、豆甾醇等)的水平进行了检测,在饲料以及肉样品中均有不同程度检出雌激素. 最后利用 QSAR 模型预测的 RBA 对全国范围的鸡肉样品进行了雌激素风险评估.

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验材料

β -谷甾醇标准品、柚皮素标准品、豆甾醇标准品、大豆苷标准品,购自 ANPEL 公司;香豆素标准品,购自 Dr 公司;香芹酚($\geq 95\%$)、麝香草酚($\geq 99\%$),购自 CNW 公司;金雀异黄酮(96.0%),购自 TCI 公司;8 种激素类混标(GB31660.2-2019),购自 ANPEL 公司;硅烷化试剂 BSTFA:TMCS=99:1,购自 REGIS 公司;SPE 填料 LC-C18(40—63 μm)、PSA(40—63 μm),购自 CNW 公司.

鸡饲料样品于各地购买后空运至实验室,并于室温下密封保存;鸡肉样品于各地购买后冷冻空运至实验室,并于 $-40\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存. 鸡饲料及鸡肉样品的采样点设置在我国东北地区、华北地区、华中地区、华东地区、东南地区、西南地区具有代表性的城市,分别是哈尔滨、北京、西安、上海、广州和成都.

1.2 试验方法

1.2.1 样品前处理

采用 QuEChERS 法进行样品处理,在进行衍生化后进样. 饲料及鸡肉用粉碎机粉碎后,作为样品待测,在室温下密封保存. 处理时称取 2.0 g 左右样品,加入 50 mL 聚乙烯离心管中,向离心管中加入 10 mL 超纯水,于涡旋混合器上混合 1 min. 向离心管中加入 10 mL 1% 乙酸+乙酸乙酯,再于涡旋混合器上混合 1 min,在摇床振荡混合 90 min. 向振荡后的样品中加入 4.0 g 无水硫酸钠和 1.0 g 氯化钠萃取盐,于涡旋混合器上混合 1 min. 将离心管置于离心机中,以 $4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速离心 10 min 后,取约 8 mL 上清液于 15 mL 离心管中. 向离心管中加入 100 mg C_{18} 、50 mg PSA 和 200 mg 无水硫酸钠,于涡旋混合器上混合 1 min. 在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱静置过夜后,取 5 mL 上清液至 10 mL 样品瓶中, $40\text{ }^\circ\text{C}$ 氮吹至干,用 100 μL BSTFA-TMCS 衍生化试剂衍生处理后,转移至 2 mL 样品瓶中上机测定^[19].

1.2.2 色谱条件

使用日本岛津 GCMS-QP2010 气相色谱质谱联用仪进行分析,进样器为岛津 AOC-6000 多功能自动进样器,使用的色谱柱是 Rtx-5ms 气相色谱柱(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μm). 进样量为 1 μL ,电子能量 70 eV,离子源温度 $230\text{ }^\circ\text{C}$,进样器温度程序如下:初始温度 $50\text{ }^\circ\text{C}$,以 $8\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ 的速率升温至 $220\text{ }^\circ\text{C}$,保持 2 min;之后以 $10\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ 的速率升温至 $280\text{ }^\circ\text{C}$,保持 16 min. 载气流速 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,扫描模式为选择离子(SIM)模式.

1.3 QSAR 计算

相对结合亲和力(relative binding affinity, RBA)是通过比较测试化学品与雌二醇的 IC_{50} (抑制浓度的一半)来计算的.

$$\text{RBA} = \frac{\text{IC}_{50}^{\text{E}_2}}{\text{IC}_{50}} \times 100$$

其中, $\text{IC}_{50}^{\text{E}_2}$ 指的是雌二醇在生物测定中对 ER 结合产生 50% 抑制作用的浓度, IC_{50} 指的是测试化学品在生物测定中对 ER 结合产生 50% 抑制作用的浓度。

在本研究中, 使用相对结合亲和力的对数 ($\log \text{RBA}$) 来衡量结合亲和力, 活性数据来自美国 EPA^[20], 物质结构数据来自 PubChem^[21], 经 MarvinSketch 软件处理后导入 Sybyl-X 2.1.1 进行 QSAR 计算。

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 雌激素及其类似物的 QSAR 计算

本研究首先在 PubChem 中搜索了 1000 多种雌激素结构相似化合物, 其中 65 种化合物具有 RBA 实验值. 从这 65 种化合物中选取 29 个能够较好分子叠合的化合物进行 3D-QSAR 研究, 以 RBA 的对数表征生物活性, 建立了 CoMFA 与 CoMSIA 模型. 构建三维定量构效关系模型时, 选用 p-Cresol 作为模板分子, 将所有分子的苯环作为公共结构, 进行分子的叠合. 训练集中化合物与模板分子叠合后的构象如下图 1 所示。

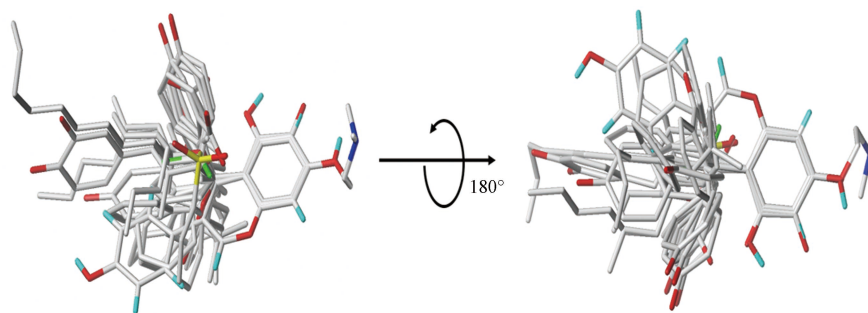


图 1 训练集中化合物的分子叠合

Fig.1 Molecular superposition of compounds in the training set

对分子叠合后构象进行 CoMFA 和 CoMSIA 建模分析得出的各项数据如表 1 所示. CoMFA 模型的交叉验证相关系数 (q^2) 为 0.721, 非交叉验证相关系数 (r^2) 为 0.925, F 检验值为 64.977, 说明 CoMFA 模型较为可靠. CoMFA 立体场(S)贡献率为 56.6%, 静电场(E)为 43.4%, 因此立体场和静电场对 RBA 活性都有着重要的影响. CoMSIA 模型的 q^2 和 r^2 分别是 0.824 和 0.961, F 检验值为 113.157, 说明 CoMSIA 模型较为可靠. CoMSIA 模型中贡献率最高的是氢键供体场, 为 29.4%, 空间场、静电场、疏水场、氢键受体场贡献值接近, 均在 16%—20% 之间, 因此应该综合考虑各分子场的影响。

表 1 CoMFA 和 CoMSIA 模型的统计参数

Table 1 Statistical parameters of CoMFA and CoMSIA models

模型 Models	PLS statistics						
	ONC ^a	q^2 ^b	E_s ^c	r^2 ^d	F ^e	P ^f	r_p^2 ^g
CoMFA	6	0.721	0.450	0.925	64.977	0.000	0.991
CoMSIA	6	0.824	0.323	0.961	113.157	0.000	0.989
Contributions							
	S ^h	E ⁱ	H ^j	D ^k	A ^l		
CoMFA	0.566	0.434	—	-	—		
CoMSIA	0.180	0.191	0.164	0.294	0.171		

^a 最佳主成分数. ^b 留一法 (LOO) 交叉验证相关系数. ^c 估计标准误差. ^d 非交叉验证相关系数. ^e F 检验值. ^f r^2 的概率. ^g 测试集的预测相关系数. ^h 空间场. ⁱ 静电场. ^j H疏水场. ^k 氢键供体场. ^l 氢键受体场.

^a Optimum number of components. ^b Leave-one-out (LOO) cross-validated correlation coefficient. ^c Standard error of estimate. ^d Noncross-validated correlation coefficient. ^e F -test value. ^f Probability of r^2 . ^g Predicted correlation coefficient for the test set. ^h Steric field. ⁱ Electrostatic field. ^j Hydrophobic field. ^k H-bond donor field. ^l H-bond acceptor field.

对 CoMFA 和 CoMSIA 模型预测得到的 lgRBA 值与 RBA 的实验值进行了相关性分析, 得到 r^2 分别为 0.991 和 0.989, 说明 CoMFA 和 CoMSIA 模型均具有较为良好的预测能力(图 2)。

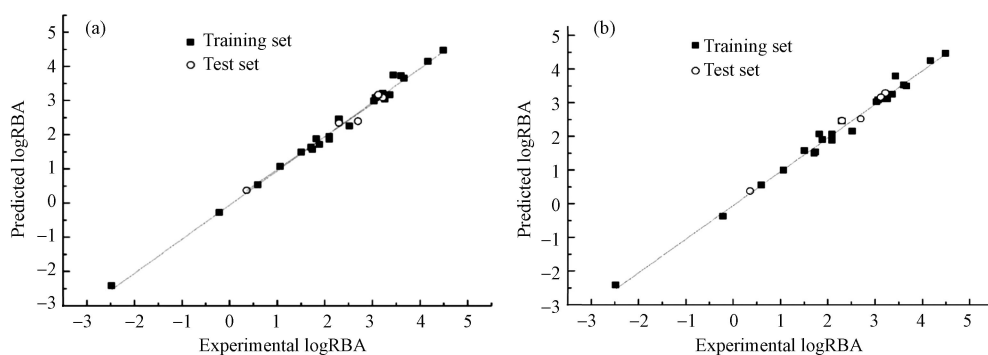


图 2 CoMFA(a)和 CoMSIA(b)模型预测 lgRBA 值与实验值的相关性

Fig.2 CoMFA(a) and CoMSIA(b) models predict the correlation between the lgRBA value and the experimental value

以模板分子对甲酚绘制了 CoMFA 和 CoMSIA 等值线图(图 3). CoMFA 模型仅计算立体场和电子场, 如图 3a 和 b 所示, a 代表立体场, b 代表静电场, 等势线截断比为 80% : 20%. 立体场中, 黄色代表体积增大, 分子的 RBA 值降低; 绿色代表体积增大, 分子的 RBA 值增大. 电子场中, 在红色处添加带负电的基团, 分子的 RBA 值增大; 在蓝色处添加带负电的基团, 分子的 RBA 值降低. CoMSIA 模型除立体场与电子场外, 还计算了疏水场、氢键供体场和氢键受体场, 如图 3c、d、e、f 和 g 所示, c 代表立体场, d 代表静电场, e 代表疏水场, f 代表氢键供体场, g 代表氢键受体场, 等势线截断比为 80% : 20%. 疏水场中, 黄色表示引入疏水性基团, 分子的 RBA 值增大; 灰色代表引入疏水性基团, 分子的 RBA 值降低. 氢键供体场中, 蓝色代表增加氢键供体, 分子的 RBA 值增大. 氢键受体场中, 紫色代表增加氢键受体, 分子的 RBA 值增大; 红色代表减少氢键受体, 分子的 RBA 值增大.

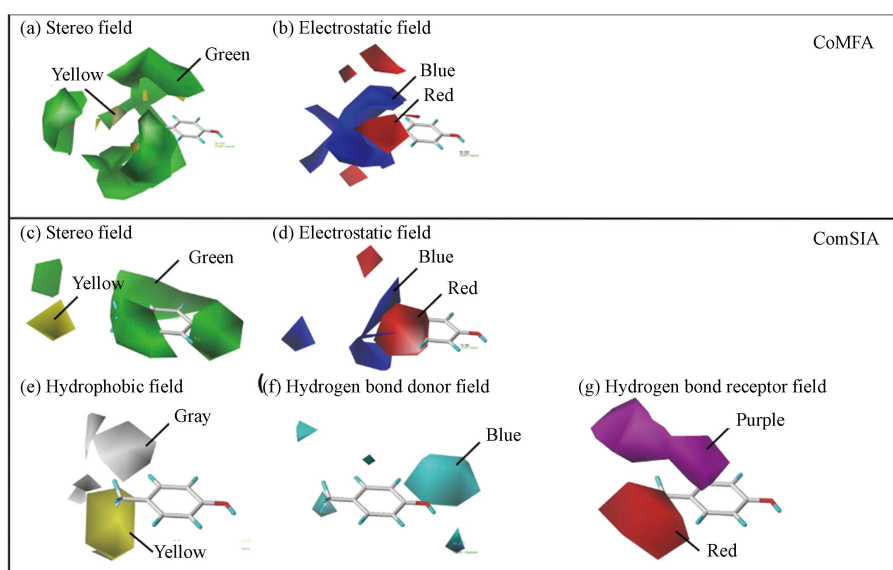


图 3 模板分子的 CoMFA 和 CoMSIA 等值线图

Fig.3 CoMFA and CoMSIA contour plots of template molecules

使用该模型得到所检测的 13 种雌激素的 RBA 预测值如表 2. 从表 2 数据可知, 在预测己烯雌酚、17 β -雌二醇、17 α -乙炔雌二醇等 RBA 值较高的天然雌激素时, 模型预测结果较不理想, 因此该模型不适用于预测 RBA 值较高的天然雌激素, 对 RBA 值较低的部分植物雌激素有一定预测能力. 为了使评估所用数据更为可靠, 具有 RBA 实验值的雌激素使用实验值; 无 RBA 实验值的雌激素使用 CoMSIA 预测值, 因为 CoMFA 模型的总体预测能力略低于 CoMSIA 模型, β -谷甾醇的 CoMSIA 预测值出现了不符合常理的正值, 因此使用 CoMFA 预测值.

表 2 13 种雌激素的 RBA 实验值与预测值

Table 2 RBA experimental and predicted values of 13 estrogen

物质名称 Compounds	RBA		
	实验值 Experimental value	CoMFA	CoMSIA
己烯雌酚	398.107	3.969	4.305
雌酮	7.244	2.034	2.433
17 β -雌二醇	100	2.511	2.789
17 α -乙炔雌二醇	100	1.98	2.435
雌三醇	9.772	1.878	2.663
双酚A	0.008	1.861	1.871
麝香草酚	—	9.747	3.645
香芹酚	—	4.022	4.133
香豆素	—	8.886	4.569
柚皮素	0.007	9.283	1.179
大豆苷	—	8.886	4.569
金雀异黄酮	0.437	0.368	0.374
豆甾醇	—	0.862	1.057
β -谷甾醇	—	0.484	-0.087

2.2 鸡饲料与鸡肉中雌激素含量

在代表我国东北地区、华北地区、华中地区、华东地区、东南地区、西南地区的鸡饲料以及鸡肉样品中均有不同程度检出天然雌激素以及植物雌激素(图 4)。其中植物雌激素在鸡饲料和鸡肉中检出率较高,为 69% 和 84%;天然雌激素在鸡饲料和鸡肉中检出率较低,为 53% 和 50%,合成雌激素在鸡饲料和鸡肉中均未检出。利用饲料和肉中植物雌激素浓度计算得出,植物雌激素从鸡饲料到鸡肉中的生物富集系数(Bioconcentration Factor, BCF)为 0.98—19.7。

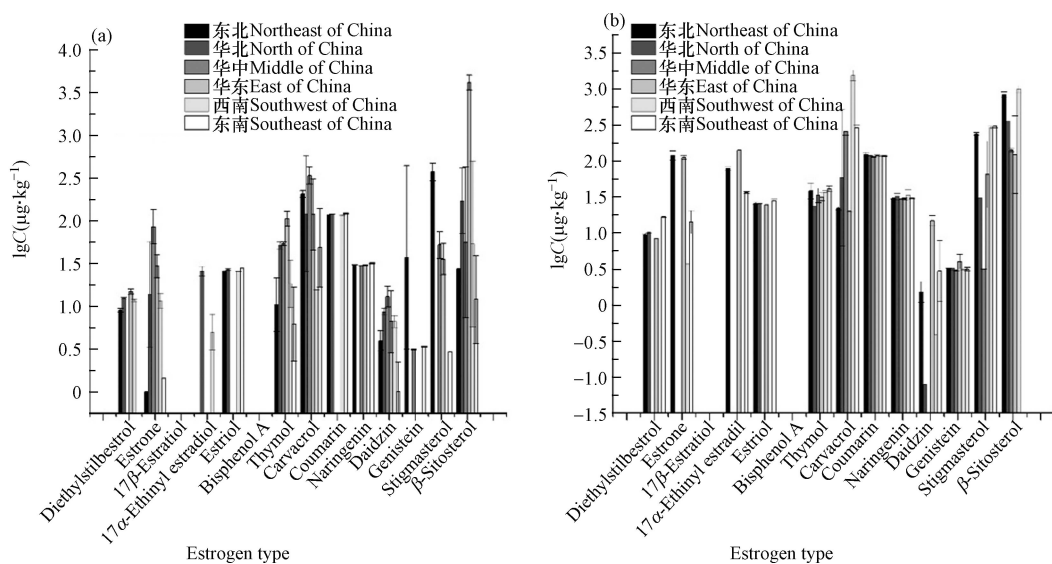


图 4 我国各地区鸡饲料(a)与鸡肉(b)中雌激素检出量

Fig.4 Concentration of estrogens in chicken feed(a) and chicken(b) in China

2.3 鸡肉雌激素效应评估

从《2020 中国卫生健康统计年鉴》中的城乡居民膳食结构以及城乡居民每人每日食物摄入量得到鸡肉的每日摄入量数据为 89.7 g;参照标准人定义(体重 63 kg, 年龄 18—45 岁, 从事轻体力劳动的成年男性), 算出各雌激素每日暴露量如表 3^[21]。

表 3 各地区鸡肉中雌激素每日暴露量($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)

Table 3 Daily exposure to estrogen in chicken meat in various regions

物质名称 Compounds	东北	华北	华中	华东	西南	东南
己烯雌酚	0.013382	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
雌酮	0.17143	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.021743
17 β -雌二醇	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17 α -乙炔雌二醇	0.112584	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.052181
雌三醇	0.037081	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
双酚A	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
麝香草酚	0.056508	0.033633	0.048733	0.045679	0.052643	0.058782
香芹酚	0.031307	0.633206	0.372618	0.028756	2.245922	0.417594
香豆素	0.175107	0.17087	0.162316	0.167872	0.167255	0.167619
柚皮素	0.04352	0.046175	0.042312	0.042596	0.049038	0.04333
大豆苷	0.002276	N.D.	N.D.	0.01428	N.D.	0.006006
金雀异黄酮	0.004643	N.D.	0.004314	0.005906	N.D.	0.004468
豆甾醇	0.340804	N.D.	0.000487	0.138105	0.416443	0.43459
β -谷甾醇	1.193188	N.D.	0.201398	0.355421	1.434338	N.D.

N.D., 未检出 N.D., not detected.

$$\text{鸡肉中雌激素的每日暴露量 } E = \frac{\text{鸡肉中雌激素浓度 } C \times \text{鸡肉每日摄入量 } F}{\text{人均体重 } W}$$

一般来说, 雌激素作用效应是由其浓度和雌激素效力决定的, 这可以用雌激素当量 (Estrogen equivalence quotient, EEQ) 反映^[22], 计算公式如下:

$$\text{EEQ} = \text{RBA}_i \times C_i$$

其中, RBA_i 表示某个雌激素的相对结合亲和力, C_i 是鸡肉中该雌激素的浓度。

各雌激素对总雌激素效应的贡献如图 5。由图 5 可以看到, 鸡饲料和鸡肉中植物雌激素所贡献的雌激素效应总量都与天然雌激素相当, 因此植物雌激素的雌激素效应不可忽视。

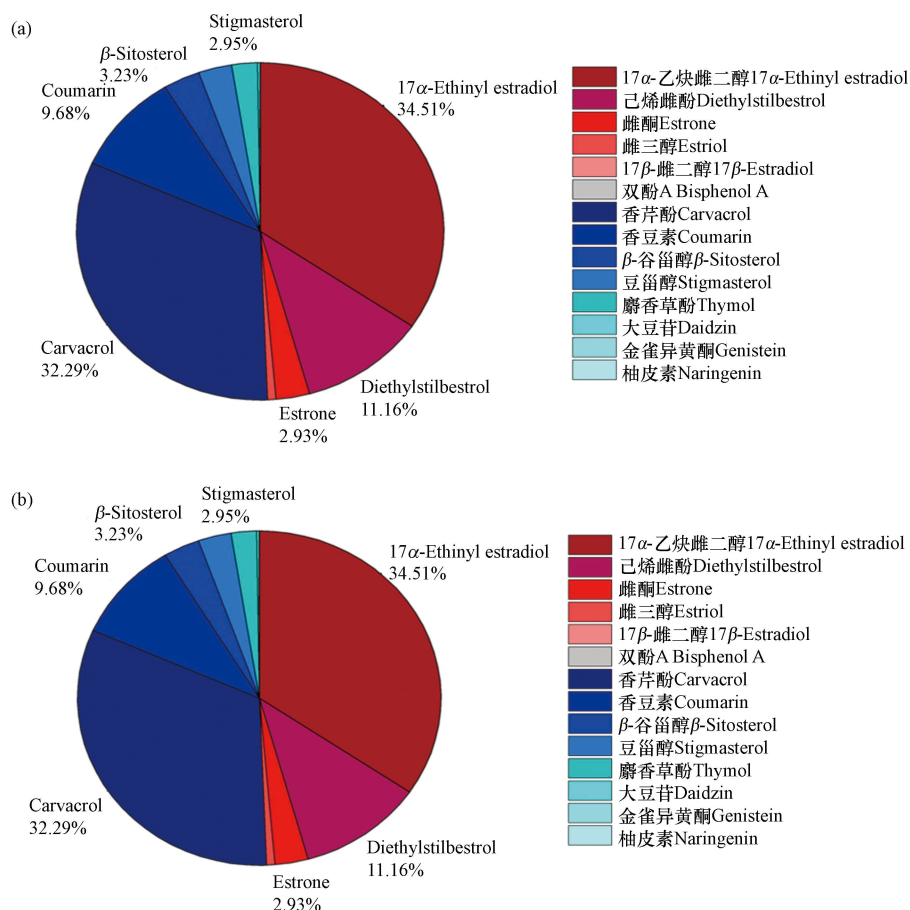


图 5 鸡饲料(a)与鸡肉(b)中各雌激素对总雌激素当量的贡献

Fig.5 Contribution of estrogen in chicken feed and chicken to total EEQ

鸡肉中雌激素风险指数的计算, 参照食品中化学物质风险评估的原则和方法, 计算公式如下:

$$RI = E/ADI$$

其中, RI 为环境雌激素的风险指数, E 为环境雌激素的每日暴露量, ADI 为环境雌激素的每日容许摄入量. 若 $RI \leq 1$, 则说明该雌激素的暴露风险在可接受范围内; 若 $RI > 1$, 则说明该雌激素有健康风险.

欧洲食品安全局(EPSA)以及世界卫生组织(WHO)给出了部分雌激素的日容许摄入量(Acceptable daily intake, ADI), 17 β -雌二醇为 $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 双酚 A 为 $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. 其他未给出 ADI 的物质可通过使用 EEQ 转化为雌二醇当量进行估算.

通过计算得出各物质雌激素风险指数(Risk index, RI)如表 4 所示. 由表 4 数据可见, 东北地区的己烯雌酚和西南地区的香芹酚 $RI > 1$, 值得引起重视; 其余大部分地区的鸡肉可以安全食用.

表 4 各地区鸡肉中雌激素风险指数(RI)
Table 4 Estrogen risk index (RI) in chicken meat by region

物质名称 Compounds	东北	华北	华中	华东	西南	东南
己烯雌酚	1.065483	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
雌酮	0.248368	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.031501
17 β -雌二醇	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17 α -乙炔雌二醇	0.011258	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.005218
雌三醇	0.072472	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
双酚A	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
麝香草酚	0.041194	0.024518	0.035526	0.0333	0.038377	0.042852
香芹酚	0.025879	0.523408	0.308006	0.02377	1.856479	0.345183
香豆素	0.160013	0.156141	0.148325	0.153401	0.152838	0.15317
柚皮素	6.09×10^{-5}	6.46×10^{-5}	5.92×10^{-5}	5.96×10^{-5}	6.87×10^{-5}	6.07×10^{-5}
大豆苷	0.00208	N.D.	N.D.	0.013049	N.D.	0.005488
金雀异黄酮	0.000406	N.D.	0.000377	0.000516	N.D.	0.00039
豆甾醇	0.072046	N.D.	0.000103	0.029195	0.088036	0.091872
β -谷甾醇	0.115501	N.D.	0.019495	0.034405	0.138844	N.D.

N.D., 未检出 N.D., not detected.

3 结论(Conclusion)

本文以 logRBA 表征生物活性, 对雌激素进行了 3D-QSAR 计算, 得到具有较好预测能力的 CoMFA ($q^2=0.721$, $r^2=0.925$) 和 CoMSIA ($q^2=0.824$, $r^2=0.961$) 模型, 并以此模型预测出了部分雌激素的 RBA.

对代表我国东北地区、华北地区、华中地区、华东地区、东南地区、西南地区的鸡饲料以及鸡肉样品中的雌激素含量进行了检测. 结果显示, 植物雌激素在鸡饲料和鸡肉中检出率较高, 为 69% 和 84%; 天然雌激素在鸡饲料和肌肉中检出率较低, 为 53% 和 50%, 合成雌激素在鸡饲料和鸡肉中均未检出. 同时通过计算得出植物雌激素从鸡饲料到鸡肉中的平均残留率为 71.4%.

通过计算鸡肉中雌激素的每日暴露量以及使用雌激素的日容许摄入量, 对全国范围内各地区鸡肉进行了雌激素风险评估. 结果显示鸡饲料和鸡肉中植物雌激素所贡献的雌激素效应都与天然雌激素相当, 因此植物雌激素的雌激素效应不可忽视. 其中香芹酚、己烯雌酚、17 α -乙炔雌二醇的 EEQ 最高, 值得引起重视. 各地区鸡肉的雌激素风险指数显示, 东北地区的己烯雌酚和西南地区的香芹酚 $RI > 1$, 值得引起重视; 其余大部分地区的鸡肉可以安全食用.

参考文献 (References)

- [1] BOBERG J, MANDRUP K R, JACOBSEN P R, et al. Endocrine disrupting effects in rats perinatally exposed to a dietary relevant

- mixture of phytoestrogens [J]. *Reproductive Toxicology*, 2013, 40: 41-51.
- [2] HERAS-GONZÁLEZ L, LATORRE J A, MARTINEZ-BEBIA M, et al. The relationship of obesity with lifestyle and dietary exposure to endocrine-disrupting chemicals [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 136: 110983.
- [3] EMARA Y, FANTKE P, JUDSON R, et al. Integrating endocrine-related health effects into comparative human toxicity characterization [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 762: 143874.
- [4] FLECK S C, CHURCHWELL M I, DOERGE D R, et al. Urine and serum biomonitoring of exposure to environmental estrogens II: Soy isoflavones and Zearalenone in pregnant women [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2016, 95: 19-27.
- [5] ROBLES J, MARCOS J, RENAU N, et al. Quantifying endogenous androgens, estrogens, pregnenolone and progesterone metabolites in human urine by gas chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2017, 169: 20-29.
- [6] HUANG J, SUN J H, CHEN Y H, et al. Analysis of multiplex endogenous estrogen metabolites in human urine using ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A case study for breast cancer [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 711: 60-68.
- [7] ADLERCREUTZ H, KIURU P, RASKU S, et al. An isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the simultaneous assay of estrogens and phytoestrogens in urine [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 92(5): 399-411.
- [8] FOSTER W G, KUBWABO C, KOSARAC I, et al. Free bisphenol A (BPA), BPA-Glucuronide (BPA-G), and total BPA concentrations in maternal serum and urine during pregnancy and umbilical cord blood at delivery [J]. *Emerging Contaminants*, 2019, 5: 279-287.
- [9] LACROIX M Z, PUEL S, COLLET S H, et al. Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: Applicability to toxicokinetic investigations [J]. *Talanta*, 2011, 85(4): 2053-2059.
- [10] MUSTAFA A M, MALINTAN N T, SEELAN S, et al. Phytoestrogens levels determination in the cord blood from Malaysia rural and urban populations [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007, 222(1): 25-32.
- [11] PRASAIN J K, ARABSHAHI A, MOORE D R II, et al. Simultaneous determination of 11 phytoestrogens in human serum using a 2 Min liquid chromatography/tandem mass spectrometry method [J]. *Journal of Chromatography B*, 2010, 878(13/14): 994-1002.
- [12] WYNS C, BOLCA S, DE KEUKELEIRE D, et al. Development of a high-throughput LC/APCI-MS method for the determination of thirteen phytoestrogens including gut microbial metabolites in human urine and serum [J]. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2010, 878(13/14): 949-956.
- [13] 王亮, 毛茜慧, 袁守军, 等. 气相色谱-质谱联用法同时测定污水中对羟基苯甲酸酯和甾体雌激素 [J]. *环境化学*, 2016, 35(1): 49-56.
- WANG L, MAO Q H, YUAN S J, et al. Simultaneous determination of parabens and steroid estrogens in sewage water using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Environmental Chemistry*, 2016, 35(1): 49-56(in Chinese).
- [14] LEE S H, JUNG B H, KIM S Y, et al. Determination of phytoestrogens in traditional medicinal herbs using gas chromatography-mass spectrometry [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2004, 15(8): 452-460.
- [15] BENEDETTI B, di CARRO M, MIRASOLE C, et al. Fast derivatization procedure for the analysis of phytoestrogens in soy milk by gas chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Microchemical Journal*, 2018, 137: 62-70.
- [16] GRAY S L, LACKEY B R. Optimizing a recombinant estrogen receptor binding assay for analysis of herbal extracts [J]. *Journal of Herbal Medicine*, 2019, 15: 100252.
- [17] COTTERILL J V, PALAZZOLO L, RIDGWAY C, et al. Predicting estrogen receptor binding of chemicals using a suite of in silico methods - Complementary approaches of (Q)SAR, molecular docking and molecular dynamics [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2019, 378: 114630.
- [18] 蒙延娟, 易忠胜, 艾芳婷, 等. 基于对接的植物激素3D-QSAR和分子动力学模拟 [J]. *环境化学*, 2014, 33(6): 880-890.
- MENG Y J, YI Z S, AI F T, et al. 3D QSAR study of phytoestrogens: A combined molecular docking and molecular dynamics simulation [J]. *Environmental Chemistry*, 2014, 33(6): 880-890(in Chinese).
- [19] 胡海山, 赵淑娥, 芦慧, 等. QuEChERS-超高效液相色谱法快速测定果蔬中4种植物激素残留 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(10): 2995-2999.
- HU H S, ZHAO S E, LU H, et al. Rapid determination of 4 kinds of phytohormone residues in fruits and vegetables by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2019, 10(10): 2995-2999(in Chinese).
- [20] CompTox, U. S. Environmental Protection Agency [DB]. [2021-10-5]
- [21] 赵娜娜, 应力, 孙方云, 等. 温州市食品环境雌激素污染状况及风险评估 [J]. *温州医科大学学报*, 2014, 44(3): 173-176.
- ZHAO N N, YING L, SUN F Y, et al. Contamination levels of environmental estrogens in foods and risk assessment in Wenzhou [J]. *Journal of Wenzhou Medical University*, 2014, 44(3): 173-176(in Chinese).
- [22] TANG Z, WAN Y P, LIU Z H, et al. Twelve natural estrogens in urines of swine and cattle: Concentration profiles and importance of eight less-studied [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 803: 150042.