

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20211107001

方菁, 申哲民, 袁涛, 等. 雌激素的3D-QSAR模型构建及其预测饲料与猪肉中雌激素对人体内分泌影响的应用[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(4): 72-79

Fang J, Shen Z M, Yuan T, et al. Construction of 3D-QSAR model of estrogen and its effect on human endocrine in pork and feed [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(4): 72-79 (in Chinese)

雌激素的3D-QSAR模型构建及其预测饲料与猪肉中雌激素对人体内分泌影响的应用

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

收稿日期: 2021-11-07 录用日期: 2022-01-14

摘要: 雌激素作为环境内分泌干扰物对人体有内分泌干扰效应, 影响人体健康。以雌激素受体相对亲和力(relative binding affinity, RBA)的对数表征生物活性, 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 ($q^2 = 0.721$, $r^2 = 0.925$) 和 CoMSIA ($q^2 = 0.824$, $r^2 = 0.961$) 模型。对全国范围内各地区猪饲料和猪肉进行了雌激素含量检测与雌激素效应评估。植物雌激素在猪饲料和猪肉中检出率为 75% 和 92%, 天然雌激素在猪饲料和猪肉中检出率均为 33%, 合成雌激素在猪饲料中未检出, 在猪肉中检出率为 33%。利用饲料和肉中植物雌激素浓度计算得出, 植物雌激素从猪饲料到猪肉中的生物富集系数为 0.27 ~ 8.2。对全国范围内各地区猪肉进行了雌激素风险评估, 结果显示虽然雌激素风险指数显示相对安全, 但香芹酚、香豆素和 β -谷甾醇等植物雌激素的雌激素效应较高, 应引起重视。

关键词: 雌激素; 植物雌激素; 雌激素受体; 内分泌干扰效应; 3D-QSAR

文章编号: 1673-5897(2022)4-072-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Construction of 3D-QSAR Model of Estrogen and Its Effect on Human Endocrine in Pork and Feed

Fang Jing^{1,*}, Shen Zhemin¹, Yuan Tao¹, Zhang Xuxiang²

1. School of Environmental Science and Technology, State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Health Impact Assessment of Emerging Contaminants, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

2. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Environmental Health Research Center, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China

Received 7 November 2021 accepted 14 January 2022

Abstract: As an environmental endocrine disruptor, estrogen has an endocrine disrupting effect on the human body and affects human health. This paper uses the estrogen receptor relative binding affinity (RBA) to characterize the biological activity of estrogens and calculates the three-dimensional quantitative structure-activity relationship (3D-QSAR) of estrogen to obtain CoMFA ($q^2 = 0.721$, $r^2 = 0.925$) and CoMSIA ($q^2 = 0.824$, $r^2 = 0.961$) models. Estrogen concentration detection and estrogen effect evaluation were carried out on pig feed and pork in various regions of the country. Detection rate of phytoestrogens in pig feed and pork are 75% and 92%. Detection rate of

基金项目: 上海交通大学“医工交叉基金”项目(YG2017ZD15); 国家重大科技专项子课题(2017ZX07202005-005)

第一作者: 方菁(1997—), 女, 硕士, 主要研究方向为环境毒理学, E-mail: rollingdog@sjtu.edu.cn

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: rollingdog@sjtu.edu.cn

natural estrogens in pig feed and pork are 33%. Synthetic estrogens were not detected in pig feed and the detection rate of synthetic estrogens in pork is 33%. The bioconcentration factor (BCF) of phytoestrogens from pig feed to pork is 0.27 ~ 8.2. An estrogen risk assessment has been conducted on pork. The results show that although the risk index indicates estrogens in pork are relatively safe, the phytoestrogens such as carvacrol, coumarin and beta-sitosterol have relatively high estrogenic effects.

Keywords: estrogen; phytoestrogens; estrogen receptor; endocrine disrupting effects; 3D-QSAR

在过去的几十年里,人类内分泌(激素)相关疾病的高发病率和不断增加的趋势引发了人们对环境内分泌干扰物(environmental endocrine disruptors, EDCs)的关注。EDCs能够干扰和改变内分泌系统的功能,引起人体内分泌紊乱^[1]、引发儿童肥胖^[2]等。雌激素就是一种典型的EDC,人体受雌激素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3类:天然雌激素(雌酮、雌二醇和雌三醇等),合成雌激素(双酚A),以及植物雌激素(金雀异黄酮、 β -谷甾醇和豆甾醇等)^[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];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)的数据来评估。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。

本研究对全国范围内的猪饲料以及猪肉中含有的天然雌激素(雌酮、雌二醇和雌三醇等)、合成雌激素(双酚A)、植物雌激素(金雀异黄酮、 β -谷甾醇和豆甾醇等)进行了含量的检测;并对雌激素从饲料到猪肉的生物富集进行了评估。本研究还对雌激素和雌激素类似物的雌激素受体相对结合亲和力进行了QSAR计算,建立了 $q^2=0.721$, $r^2=0.925$ 的CoMFA预测模型和 $q^2=0.824$, $r^2=0.961$ 的CoMSIA预测模型。通过使用本研究预测得到的雌激素受体相对结合亲和力以及农业农村部给出的人群猪肉摄入量,对测得的雌激素水平进行了对人体的影响评估。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 材料

β -谷甾醇标准品($\geq 99\%$)、柚皮素标准品($\geq$

99%)、豆甾醇标准品($\geq 99\%$)和大豆苷标准品($\geq 99\%$)购自ANPEL公司;香豆素标准品购自Dr. Ehrenstorfer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($\geq 99\%$)购自ANPEL公司;硅烷化试剂(V(BSTFA): V(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。

猪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;猪肉样品于各地购买后冷冻空运至实验室,并于-40 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。猪饲料及猪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、东南地区和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

样品经粉碎均匀后制成待测样,于室温下密封保存。称取2.0 g待测样品于50 mL聚乙烯离心管中,加入10 mL超纯水,涡旋振荡1 min后,加入10 mL 1%乙酸+乙酸乙酯,涡旋振荡2 min后,摇床振荡90 min,再加入4.0 g无水硫酸钠和1.0 g氯化钠,涡旋振荡2 min。取上清液约8 mL置于装有100 mg C18、50 mg PSA和200 mg无水硫酸钠的15 mL离心管中,涡旋振荡2 min,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置过夜。取5 mL上清液至10 mL试管中,40 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹至干,用1 mL甲醇复溶,经0.22 μm 滤膜过滤后,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 $^{\circ}\text{C}$,进样器温度程序如下:初始温度50 $^{\circ}\text{C}$,以8 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ 的速率升温至220 $^{\circ}\text{C}$,保持2 min;之后以10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ 的速率升温至280 $^{\circ}\text{C}$,保持16 min。载气流速1 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半数抑制浓度(IC₅₀)来计算的。

$$RBA = \frac{IC_{50}^{E2}}{IC_{50}} \times 100$$

式中:IC₅₀^{E2} 是雌二醇在生物测定中对 ER 结合产生 50% 抑制作用的浓度,IC₅₀ 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负对数(pRBA)来衡量结合亲和力,RBA 活性数据来自美国 EPA CompTox 平台^[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(Tripos)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

本研究在 PubChem 中搜索了 1 000 多种雌激素结构相似化合物,最后筛选出了 65 种具有 RBA 实验值的化合物。从这 65 种化合物中选取 29 个化

合物进行 3D-QSAR 研究,以雌激素受体相对亲和力(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,选用活性最好的分子作为模板分子,将全部分子的共有骨架作为固定结构,进行分子的叠合,使它们的立体场差别最小,29 个化合物的分子叠合图如图 1 所示。

CoMFA 和 CoMSIA 模型的各项统计学参数如表 1 所示。就 CoMFA 模型而言,交叉验证相关系数(q^2)和非交叉验证相关系数(r^2)分别是 0.721 和 0.925, F 检验值相对较低,仅为 64.977,尚在可靠范围内。上述参数均表明,CoMFA 模型具有较好的预测能力。对测试集中分子进行活性预测,相关系数为 0.991。CoMFA 立体场(steric field, S)贡献率为 56.6%,静电场(electrostatic field, E)为 43.4%,可见该类化合物周围的立体场和静电场二者对其发挥活性有重要的影响。CoMSIA 模型的 q^2 和 r^2 分别是 0.824 和 0.961, F 检验值为 113.157,尚在可靠范围内。上述参数均表明,CoMSIA 模型具有较好的预测能力。

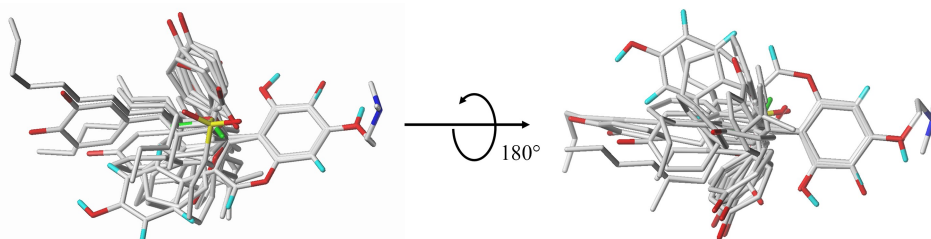


图 1 训练集中化合物的分子叠合

Fig. 1 Molecular superposition of compounds in the training set

表 1 CoMFA 和 CoMSIA 模型的统计参数

Table 1 Statistical parameters of CoMFA and CoMSIA models

模型	PLS 参数 PLS statistics						
Models	ONC ^a	q^2 ^b	E_s ^c	r^2 ^d	F ^e	P ^f	r_p^{2g}
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
模型	场贡献 Contributions						
Model	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		

注:^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,^jH 疏水场,^k氢键供体场,^l氢键受体场。

Note: ^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, and ^l H-bond acceptor field.

基于 CoMFA 和 CoMSIA 模型预测得到的 pRBA 与通过实验测定的活性值进行了相关性分析,二者相关性系数分别为 0.991 和 0.989。优良的线性相关性(r^2 均>0.9)再次证明了这 2 种模型均具有良好的预测能力(图 2)。

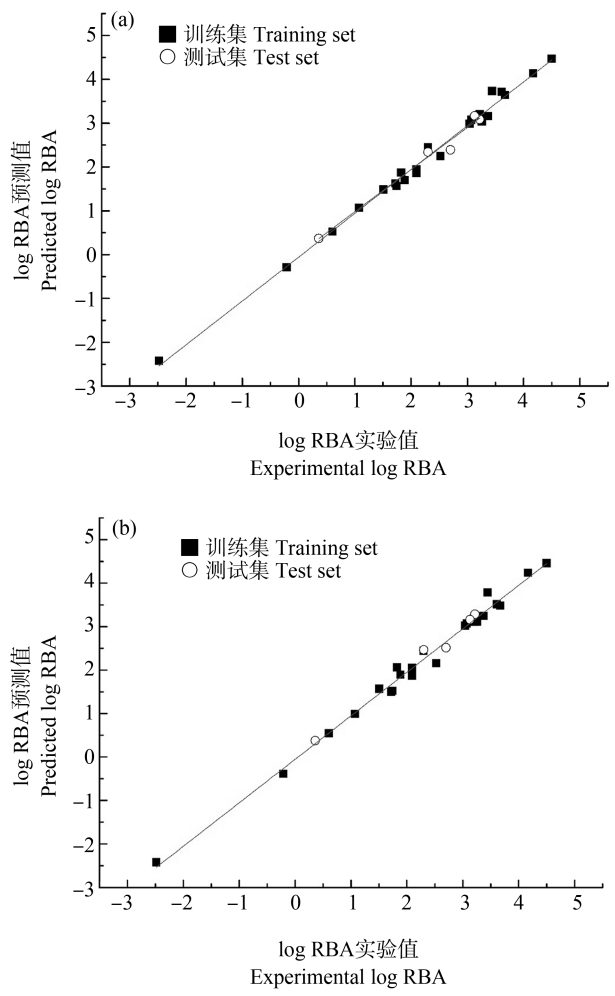


图 2 CoMFA (a) 和 CoMSIA (b) 模型预测 logRBA 值与实验值的相关性

注:RBA 表示相对亲和力。

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

Note: RBA means relative binding affinity.

本研究使用该模型得到所检测的 13 种雌激素的 RBA 预测值如表 2 所示。

由表 2 可知,该模型较适合用于预测 RBA 值较

低的植物雌激素,后续评估具有 RBA 实验值的雌激素使用实验值;无 RBA 实验值的雌激素使用 CoM-SIA 预测值, β -谷甾醇使用 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 estrogens

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

2.2 猪饲料与猪肉中雌激素含量

在代表我国东北地区、华北地区、华中地区、华东地区、东南地区和西南地区的猪饲料以及猪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 3)。

其中植物雌激素在猪饲料和猪肉中检出率较高,为 75% 和 92%;天然雌激素在猪饲料和猪肉中检出率较低,均为 33%;合成雌激素在猪饲料中未检出,在猪肉中检出率为 33%。利用饲料和肉中植物雌激素浓度计算得出,植物雌激素从猪饲料到猪肉中的生物富集系数(bioconcentration factor, BCF)为 0.27~8.2。

2.3 猪肉雌激素效应评估

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猪肉的每日摄入量数据为 89.6 g;参照标准人定义(体质量 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 所示^[22]。

猪肉中雌激素的每日暴露量(E)=猪肉中雌激素浓度(C) $\times$ 猪肉每日摄入量(F)
人均体质量(W)

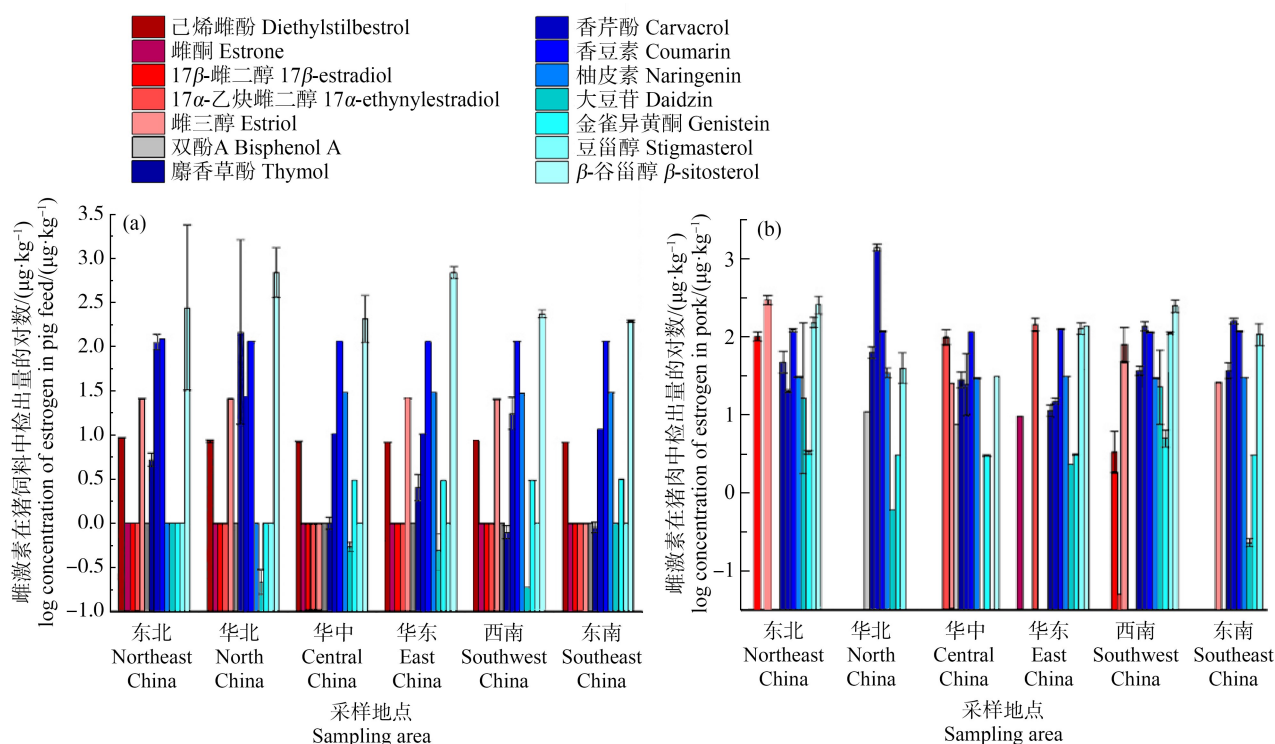


图 3 我国各地区猪饲料(a)与猪肉(b)中雌激素检出量

Fig. 3 Concentration of estrogens in pig feed (a) and pork (b) in China

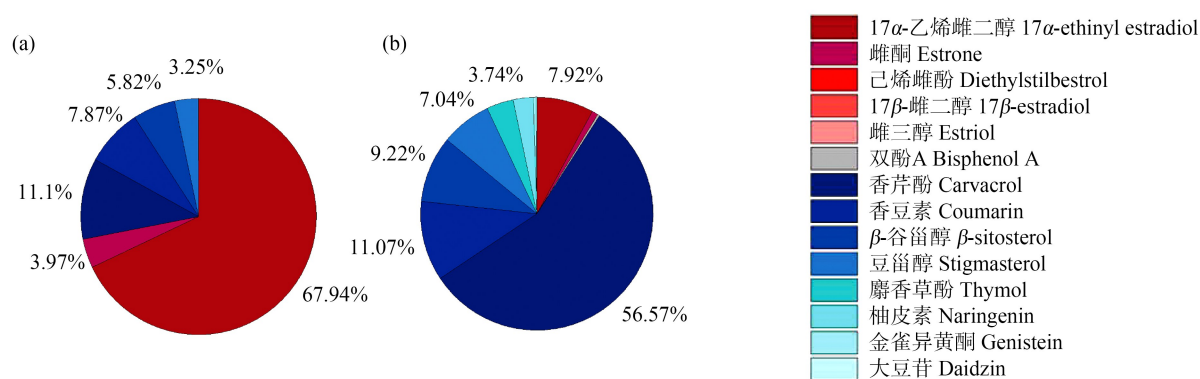


图 4 猪饲料(a)与猪肉(b)中各雌激素对雌激素当量(EEQ)的贡献

Fig. 4 Contribution of estrogen in pig feed and pork to total estrogen equivalence quotient (EEQ)

一般来说,雌激素的雌激素作用是由它的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^[23],计算公式如下:

$$EEQ = RBA_i \times C_i$$

式中:RBA_i表示某个雌激素的相对结合亲和力,C_i是猪肉中该雌激素的浓度。各雌激素对总雌激素效应的贡献 EEQ 如图 4 所示。

由图 4 可知,猪饲料中天然雌激素贡献的总雌

激素当量较高;猪肉中植物雌激素贡献的总雌激素当量较高,因此植物雌激素的雌激素效应不可忽视,尤其是香芹酚、香豆素和β-谷甾醇贡献的 EEQ 较高,应引起重视。

猪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,对毒性效应有阈值的化学物质,选用毒理学上描述危害特征的毒性参数与膳食暴露量的估计值比较来进行风险评估,计算公式如下:

$RI = E/ADI$

式中: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 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 的物质可通过使用预测的 RBA 值进行估算。

通过计算得出各物质雌激素 RI 如表 4 所示。可见各地区猪肉中各物质 RI 均<1,可以安全食用,但有部分物质 RI 值接近于 1,若猪肉摄入量高于平均值则仍有雌激素效应风险。

表 3 各地区猪肉中雌激素每日暴露量

Table 3 Daily exposure to estrogen in pork in various regions

物质名称 Compounds	雌激素每日暴露量/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)					
	Daily exposure to estrogen/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)					
	东北	华北	华中	华东	西南	东南
	Northeast	North	Central	East	Southwest	Southeast
	China	China	China	China	China	China
己烯雌酚 Diethylstilbestrol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
雌酮 Estrone	0.001896	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	2.87E-05
17 β -雌二醇 17 β -estradiol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17 α -乙炔雌二醇 17 α -ethynylestradiol	N.D.	N.D.	0.006303	0.009269	N.D.	0.002076
雌三醇 Estriol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
双酚 A Bisphenol A	N.D.	N.D.	0.00062	N.D.	N.D.	N.D.
麝香草酚 Thymol	0.000778	0.004293	0.001708	0.000898	0.000148	0.000508
香芹酚 Carvacrol	0.000311	0.12122	0.001028	0.001075	0.00023	0.002138
香豆素 Coumarin	0.001796	0.009362	N.D.	0.009698	0.002018	0.00179
柚皮素 Naringenin	0.00047	N.D.	0.00237	0.002417	0.000492	0.000463
大豆苷 Daidzin	1.23E-05	4.75E-05	N.D.	N.D.	N.D.	0.00012
金雀异黄酮 Genistein	5.33E-05	0.000242	0.000241	0.000248	5.05E-05	9.71E-05
豆甾醇 Stigmasterol	0.003007	0.002575	N.D.	0.008334	N.D.	0.001771
β -谷甾醇 β -sitosterol	0.005271	N.D.	N.D.	0.010854	N.D.	0.004421

注:N.D.表示未检出。

Note: N.D. represents not detected.

表 4 各地区猪肉中雌激素风险指数 (RI)

Table 4 Estrogen risk index (RI) in pork from different region

物质名称 Compounds	雌激素风险指数(RI)					
	Estrogen risk index (RI)					
	东北	华北	华中	华东	西南	东南
	Northeast	North	Central	East	Southwest	Southeast
	China	China	China	China	China	China
己烯雌酚 Diethylstilbestrol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
雌酮 Estrone	0.150952	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.002286
17 β -雌二醇 17 β -estradiol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
17 α -乙炔雌二醇 17 α -ethynylestradiol	N.D.	N.D.	0.50183	0.738027	N.D.	0.165315
雌三醇 Estriol	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
双酚 A Bisphenol A	N.D.	N.D.	0.049365	N.D.	N.D.	N.D.
麝香草酚 Thymol	0.061941	0.341829	0.136026	0.07147	0.011774	0.040437
香芹酚 Carvacrol	0.024724	0.9651719	0.081846	0.085574	0.018321	0.170239

续表4

物质名称 Compounds	雌激素风险指数(RI) Estrogen risk index (RI)					
	东北	华北	华中	华东	西南	东南
	Northeast	North	Central	East	Southwest	Southeast
	China	China	China	China	China	China
香豆素 Coumarin	0.14301	0.745383	N.D.	0.772138	0.160666	0.142487
柚皮素 Naringenin	0.037452	N.D.	0.188715	0.192444	0.03918	0.036894
大豆苷 Daidzin	0.000982	0.003779	N.D.	N.D.	N.D.	0.009589
金雀异黄酮 Genistein	0.004245	0.019261	0.019185	0.019741	0.004019	0.00773
甾甾醇 Stigmasterol	0.23945	0.205057	N.D.	0.66355	N.D.	0.141007
β -谷甾醇 β -sitosterol	0.419683	N.D.	N.D.	0.864183	N.D.	0.352039

注:N.D.表示未检出。

Note: N.D. represents not detected.

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, 2010, 878(13-14): 949-956
- [13] 黄斌, 潘学军, 万幸, 等. 固相萃取-衍生化-气相色谱/质谱测定水中类固醇类环境内分泌干扰物[J]. 分析化学, 2011, 39(4): 449-454
- Huang B, Pan X J, Wan X, et al. Simultaneous determination of steroid endocrine disrupting chemicals in water by solid phase extraction-derivatization gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39(4): 449-454 (in Chinese)
- [14] Lee S H, Jung B H, Kim S Y, et al. Determination of phy-

- toestrogens 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] He J Y, Peng T, Yang X H, et al. Development of QSAR models for predicting the binding affinity of endocrine disrupting chemicals to eight fish estrogen receptor [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 148: 211-219
- [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] United States Environmental Protection Agency (US EPA). CompTox, U.S. Environmental Protection Agency [DB]. [2021-10-5]. <https://comptox.epa.gov/dashboard/predictions/index>
- [21] National Center for Biotechnology Information. PubChem, National Center for Biotechnology Information [DB]. [2021-09-21]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [22] 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)
- [23] 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

