

陈 泱,王俊跃,闫佳艺,等.基于 UE-SPE-HPLC/FLD 的蔬菜中天然甾体雌激素检测方法 [J]. 中国环境科学, 2025,45(6):3420-3427.

Chen Y, Wang J Y, Yan J Y, et al. The detection methods of natural steroidal estrogens in vegetables based on UE-SPE-HPLC/FLD [J]. China Environmental Science, 2025,45(6):3420-3427.

基于 UE-SPE-HPLC/FLD 的蔬菜中天然甾体雌激素检测方法

陈 泱,王俊跃,闫佳艺,张紫康,凌婉婷* (南京农业大学,土壤有机污染控制与修复研究所,江苏 南京 210095)

摘要: 本研究通过超声提取(UE)-固相萃取(SPE)相结合,采用高效液相色谱仪/荧光检测(HPLC/FLD)技术,构建了一种蔬菜中天然甾体雌激素提取与检测方法. HPLC/FLD 仪器分析结果表明,3 种天然甾体雌激素在 1.00~1000 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内具有良好的线性关系,其相关系数均高于 0.9995.蔬菜中雌三醇、17 β -雌二醇和雌酮的方法检出限分别为 0.36~3.23,0.76~3.67 和 13.97~20.12 $\mu\text{g/kg}$,地上部样品中 3 种雌激素的平均回收率为 104.9%~130.5%,相对标准偏差为 4.9%~18.7%;根部样品中 3 种雌激素的平均回收率为 80.5%~129.9%,相对标准偏差为 4.2%~38.8%.采用该方法对市场随机采集的蔬菜样品进行检测,结果表明,所有蔬菜样品中均检测到天然甾体雌激素,其中雌三醇地上部及根部检出率为 100%,17 β -雌二醇地上部检出率为 75%、根部为 100%,雌酮地上部检出率 43.8%、根部为 18.8%.本方法的准确性与精密度良好,能够满足蔬菜中雌激素分析测定要求,为蔬菜中天然甾体雌激素环境风险评估与管控提供了科学依据.

关键词: 蔬菜; 天然甾体雌激素; 超声提取; 固相萃取; 高效液相色谱

中图分类号: X132 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2025)06-3420-08

The detection methods of natural steroidal estrogens in vegetables based on UE-SPE-HPLC/FLD. CHEN Yang, WANG Jun-yue, YAN Jia-yi, ZHANG Zi-kang, LING Wan-ting* (Institute of Organic Contaminant Control and Soil Remediation, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China). *China Environmental Science*, 2025,45(6): 3420-3427

Abstract: To systematically assess the environmental risks of natural steroidal estrogens in vegetables, there is an urgent need to establish an efficient, reliable, universal, and convenient extraction and detection system for these estrogens. This study demonstrated that the three natural steroidal estrogens showed a strong linear relationship, with a correlation coefficient greater than 0.9995. The detection limits for estradiol, 17 β -estradiol, and estrone were found to be 0.36~3.23 $\mu\text{g/kg}$, 0.76~3.67 $\mu\text{g/kg}$, and 13.97~20.12 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The average recoveries for these substances ranged from 104.9% to 130.5%, while the relative standard deviations were between 4.9% and 18.7%. In root samples, the average recoveries were between 80.5% and 129.9%, with relative standard deviations ranging from 4.2% to 38.8%. This method detected natural estrogens in vegetable samples randomly collected in Nanjing city. The results indicated that natural estriol was detected in all vegetable samples, with a 100% detection rate in both the ground and root parts. The detection rate for 17 β -estradiol was 75% in the ground part and 100% in the root. In contrast, the detection rate for estrone was 43.8% in the ground part and 18.8% in the root. Further studies are needed to assess the potential risks associated with estrone. Overall, The method exhibits high accuracy and precision, fulfilling the requirements for analysis and determination. Consequently, it provides scientific evidences for effectively assessing and control the environmental risks associated with natural steroidal estrogens in vegetables.

Key words: vegetables; natural steroidal estrogen; ultrasonic extraction; solid phase extraction; high-performance liquid chromatography

雌激素作为一种生物活性激素常应用于医疗、饲养及加工等生产过程,具有在极低浓度(<1ng/L)下就可扰乱生物内分泌系统正常功能的风险^[1],过量雌激素通过生物排泄及工业生产等行为进入环境.环境雌激素为具有环境内分泌干扰作用的新污染物,包括天然甾体雌激素和人工合成雌激素,其中天然甾体雌激素包括雌酮、雌二醇和雌三醇,由人类和动物的肾上腺皮质、睾丸、卵巢和胎盘释放,在结构上有甾体母核且具有较强的内分泌干扰效应,通过

模拟、干扰或对抗机体内生荷尔蒙原有的正常合成、运输和释放,使生物无法维持自身平衡和调节,导致生物雌性化、繁殖力下降、免疫力降低、女性多种妇科疾病发生^[2-5].在世界范围内,天然甾体雌激素在水土环境中的浓度迅速增加^[6],其污染范围

收稿日期: 2024-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(42177016,42261144738);江苏省重点研发计划项目(BE2022849)

* 责任作者, 教授, lingwanting@njau.edu.cn

广、对人体健康和生态系统的危害极大^[7-8],近年来引起了人们的极大关注.用处理过的废水或受污染的地表水进行农业灌溉以及有机肥的施用会导致环境中的天然甾体雌激素迁移到新鲜农产品的可食用部分,成为进入人体的潜在风险.目前蔬菜中已有天然甾体雌激素检出^[9-10],人们对雌激素进入人类食物链表现关注,进一步推进了关于植物如何吸收和代谢天然甾体雌激素的研究,其中如何高效且方便检出蔬菜中雌激素的方法成为了首要解决的问题.

目前,植物中天然甾体雌激素定量检测的主要方法有高效气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、高效气相色谱-质谱联用法(GC-MS)及高效液相色谱-质谱联用(LC-MS)法等^[11-13].近年来,质谱检测技术因其与 GC 或 HPLC 的结合使用而受到越来越多的关注,这种联用技术不仅显著提高了检测的灵敏度,还极大地增强了定性分析的能力^[14],适用于植物中雌激素含量的检测,但质谱检测成本高、操作复杂且其数据分析对操作人员专业要求较高.使用高效气相色谱法需要在上样前对样品进行衍生化处理^[11].在仅用高效液相法检测过程中常会采用荧光检测器来提高检测的灵敏度^[15],同时会遇到雌激素化合物荧光效应不够强的情况,因此出现了结合荧光衍生剂以加强雌激素化合物的荧光效应的方法^[12].

植物组织成分复杂,含有大量有机酸等有机物,这对有效分离雌激素和定性、定量方面提出更高的要求;同时由于植物样品中雌激素含量通常极低,常处于 ng/kg 和 μg/kg 级别^[11],对有效的富集及高灵敏的检测有较高需求,开发一种快速而有效的预处理方法对于成功检测雌激素至关重要.固相萃取(SPE)是目前富集天然甾体雌激素使用最为广泛的净化富集方法^[14],但尚未有系统性的高效提取-检测方法应用于蔬菜检测.

相关研究发现生菜中 17β-雌二醇含量高于严重影响公众健康的毒性水平^[11].目前粮农组织/世界卫生组织食品添加剂联合专家委员会仅对 17 β-雌二醇每日摄入量提出建议^[16],但已有研究表明人体和植物中雌酮、雌三醇和雌二醇三者会发生相互转化^[17-19].因此,本研究不仅关注雌二醇含量,还同时关注雌酮和雌三醇的潜在风险.本研究旨在优化 UE-

SPE-HPLC/FLD 技术,通过比较不同的提取剂、提取剂体积、提取次数、固相萃取柱的种类和高效液相色谱方法,建立了一套高效、精确、泛用性好且兼具便捷性的蔬菜中天然甾体雌激素的提取与检测系统方法.本研究方法可用于分析市售有机肥种植蔬菜中雌激素的含量,能够为雌激素风险评估体系提供更准确的科学依据,并为保障食品安全和公众健康提供技术支持.

1 材料与方法

1.1 材料

雌三醇标准品(E3,98%)、17β-雌二醇(17β-E2,98%)、雌酮(E1,98%)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司.甲醇、乙腈为色谱纯级别.C₁₈固相萃取柱购自北京迈瑞达科技有限公司.GCB 固相萃取柱购自北京迈瑞达科技有限公司.HLB 固相萃取柱购自北京化玻站生物分析技术有限公司.PSA 固相萃取柱购自北京迈瑞达科技有限公司.

1.2 样品采集

2024 年选取南京市进行采样,分别在菜市场 and 超市随机购买蔬菜样品,并收集实验室温室盆栽种植的施用有机肥的油麦菜样品,样品采集后尽快运回实验室,洗净后分离地上部和根部冷冻干燥处理.冻干后的植物样品进一步切碎后避光、4℃密封保存待用.

1.3 标准溶液配制

准确称取 3 种天然甾体雌激素(E3、17β-E2 和 E1)标准品(100.00±0.01) mg 置于 100mL 棕色容量瓶中,以甲醇为溶剂配置浓度 1.00g/L 的母液,-20℃保存.分别取 E3、17β-E2 和 E1 母液 100μL 置于 100mL 棕色容量瓶中,甲醇定容,得到 E3、17β-E2 和 E1 浓度均为 1.0mg/L 的混合标准储备液,-20℃保存.

1.4 色谱条件

色谱柱: Inertsil ODS-SP-C₁₈ (150mm × 4.6mm, 5μm);流动相为乙腈:水(体积比为 40:60),流速 0.8mL/min,进样量 20μL,柱温 40℃;采用荧光检测器:激发/发射波长为 280/310nm,每个样品 20min.

1.5 样品前处理

1.5.1 超声提取 本研究的超声提取方法参考了付银杰等^[15]对畜禽粪便中雌激素超声提取条件的

优化研究成果,以及 Adeel 等^[11]对生菜中雌激素的提取方法.综合考虑提取效率与实验条件的可行性,本研究选择以 30min 作为超声提取时间,以此为基础进一步优化提取剂等条件以实现目标雌激素的最佳提取效果.

冷冻干燥的蔬菜样品分为地上部分和根部,称取地上部分(0.50 ± 0.01) g,根部(0.05 ± 0.001) g,置于 40mL 顶空瓶中.加入 10μL 的 3 种天然甾体雌激素混合标准溶液,涡旋混合均匀后避光放置 12h.提取时加入 10mL 提取剂,涡旋 30s 后超声提取 30min,振荡 30min,并以 10000r/min 离心 10min^[11],上清液过 0.22μm 有机相滤膜后转入另一顶空瓶,重复提取 1 次,合并 2 次提取液,40℃恒温水浴并氮吹至 1mL,后加入 1mL 乙腈溶解、超纯水稀释至 40mL 容量瓶中待用.空白组:称取地上部分(0.50 ± 0.01) g,根部(0.05 ± 0.001) g,置于 40mL 玻璃顶空瓶中.加入 10 μL 的甲醇溶液,涡旋混合均匀后避光放置 24h,其他操作同上.实验中每个处理组均设置了 3 个平行样本,以确保数据的重复性和可靠性.

1.5.2 固相萃取 C₁₈ 固相萃取^[15]:需分别采用 5mL 甲醇和 5mL 超纯水活化固相萃取柱,然后将提取后的样品溶液以 5~8mL/min 流速过固相萃取柱,用 5mL 超纯水淋洗柱体清除杂质并继续抽吸至无液体滴下,最后用 15mL 体积比为 1:1 的乙酸乙酯和甲醇混合液洗脱,洗脱液收集至小试管中.小试管置于 40℃恒温水浴并氮吹至干,加入 2mL 甲醇重新溶解并涡旋,过 0.22μm 有机相滤膜后,收集于棕色液相小瓶,-20℃保存,用于高效液相色谱分析.

HLB+GCB 固相萃取^[11]:Oasis HLB 固相萃取柱先采用 5mL 乙酸乙酯活化,再加入 5mL 甲醇浸泡柱体 5min,然后以 1~3mL/min 的速率通过 10mL 超纯水.将提取后的样品溶液以 5~8mL/min 流速过固相萃取柱,用 10mL 10%甲醇水溶液淋洗柱体清除杂质并继续抽吸至无液体滴下,最后用 15mL 体积比为 1:1 的乙酸乙酯和甲醇混合液洗脱,洗脱液收集至小试管中.小试管置于 40℃恒温水浴并氮吹至干.为了去除色素的干扰,将上一步的样品再通过 GCB 固相萃取柱净化.GCB 固相萃取柱先采用 10mL 正己烷:丙酮(1:1,体积分数,下同)活化,然后以 1~3mL/min 的速率通过 5mL 超纯水.上一步的样品加入 2mL 甲醇重新溶解并用超纯水定容至 10mL,以 5~8mL/min 流速过固相

萃取柱,用 5mL 超纯水淋洗柱体清除杂质并继续抽吸至无液体滴下,最后用 15mL 体积比为 1:1 的乙酸乙酯和甲醇混合液洗脱,洗脱液收集至小试管中.小试管置于 40℃恒温水浴并氮吹至干,加入 2mL 甲醇重新溶解并涡旋,过 0.22μm 有机相滤膜后,收集于棕色液相小瓶,-20℃保存,用于高效液相色谱分析.

PSA^[20]+GCB 固相萃取:PSA 固相萃取柱先采用 5mL 乙酸乙酯活化,再加入 10mL 正己烷:丙酮体积比(1:1)浸泡柱体 5min,然后以 1~3mL/min 的速率通过 10mL 超纯水.将提取后的样品溶液以 5~8mL/min 流速过固相萃取柱,用 10mL 水溶液淋洗柱体清除杂质并继续抽吸至无液体滴下,最后用 15mL 体积比为 1:1 的乙酸乙酯和甲醇混合液洗脱,洗脱液收集至小试管中.小试管置于 40℃恒温水浴并氮吹至干.为了去除色素的干扰,将上一步的样品再通过 GCB 固相萃取柱净化.GCB 固相萃取柱的操作同上.

1.6 回收率计算

鉴于采用有机肥种植的蔬菜含有雌激素,因此在计算回收率时需要扣除雌激素的本底浓度,因此得到以下回收率公式:

$$R = \frac{(C_x - C_0) \cdot V}{C_s \cdot V_s} \cdot 100\% \quad (1)$$

式中: C_x 为加标检测浓度,mg/L; C_0 为样品检测浓度,mg/L; C_s 为标准溶液浓度,mg/L; V_s 为加入标准溶液体积,mL; V 为样品定容体积,mL.

1.7 数据处理与统计分析

相关图形使用 Origin 2024 绘制,使用 Excel 365 处理回收率、相对标准偏差等实验数据,使用 IBM SPSS Statistics 22 对所有数据进行统计分析.

符合正态分布的连续变量用均数 ± 标准差(SD)表示.单因素方差分析(连续变量)被用于对于多组数据比较.在所有比较中,显著性水平为 0.05 被认为具有统计学意义.本次统计分析采用字母标记法来展示不同组别之间的显著性差异.

2 结果与分析

2.1 植物样品前处理方法

2.1.1 提取剂类型 雌激素在弱极性或中等极性有机溶剂中有较高的溶解性.已知的有机溶剂极性比较为:乙腈>甲醇>乙酸乙酯>二氯甲烷>正己烷^[15].提取剂的选择参考了目前植物总雌激素提取检测方法中

涉及到的提取剂如表 1。在提取过程中,绿叶蔬菜中的酚类色素和有机酸等杂质同时被提取出来,对后续检测产生了显著干扰。当采用甲醇作为提取剂时,提取液颜色较深,其中所含杂质会影响目标物的定量分析;采用甲醇:二氯甲烷(7:3,体积分数,下同)提取时,后续检测中雌二醇与雌酮无法实现有效分离;采用乙腈提取时,检测结果整体偏低。此外,还普遍存在同一种提取剂对 3 种天然甾体雌激素提取效果差异显著的现

象。如采用正己烷:丙酮(1:1)提取时,雌二醇回收率极低,而雌酮则出现超量检出。同时,同一种提取剂在植物地上部和根部的提取效果也存在差异。从统计学角度分析,在所选共 6 种提取剂中,乙腈:水(1:1)对蔬菜地上部中的雌三醇及蔬菜中雌二醇提取效果有显著优势,在其他方面则保持较好提取水平且地上部和根部回收效果差异较小,具有良好的通用性。因此,本实验选择乙腈:水(1:1)作为提取剂。

表 1 提取剂类型对提取效率的影响(% , mean±SD)

Table 1 Effect of extractants on extraction efficiency(% , mean±SD)

雌激素种类	植物组分	提取剂类型					
		甲醇 ^[18]	乙腈 ^[11]	乙酸乙酯 ^[15]	乙腈:水(1:1) ^[11]	正己烷:丙酮(1:1) ^[21]	甲醇:二氯甲烷(7:3)
雌三醇	地上部	5.9±1.0d	19.3±11.8c	0d	106.6±12.9a	57.5±10.1b	4.7±2.7d
	根部	77.9±66.4ab	123.3±55.9a	35.1±17.7b	129.1±16.7ab	44.1±40.3ab	92.7±49.0ab
雌二醇	地上部	2.1±0.4b	30.8±5.2b	0.5±0.8b	111.9±18.7a	2.7±1.6b	76.8±44.3a
	根部	1.7±1.5b	13.1±6.4b	4.6±3.9b	105.8±14.1a	0b	0b
雌酮	地上部	152.1±67.4b	31.4±18.1bc	94.3±60.3bc	104.9±14.8bc	323.3±143.0a	0c
	根部	109.2±30.2ab	21.5±15.1b	87.9±24.2ab	80.5±31.8ab	266.8±214.8a	0b

注:同行不同小写字母表示显著差异。

乙腈:水(1:1)作为提取剂时回收率大都超过 100%,考虑到植物体中含有大量木质素、纤维素、果酸、叶绿素、生物碱和植物激素等有机物质^[22],其中部分有机物与目标提取物同时被提出。由于目标提取物含量相对较低,杂质对液相色谱检测结果产生了显著的干扰,影响了检测的准确性和灵敏度。因此后续仍需优化提取条件,以实现样品深度净化,从而降低杂质对检测结果的干扰,提高检测的可靠性与准确性。

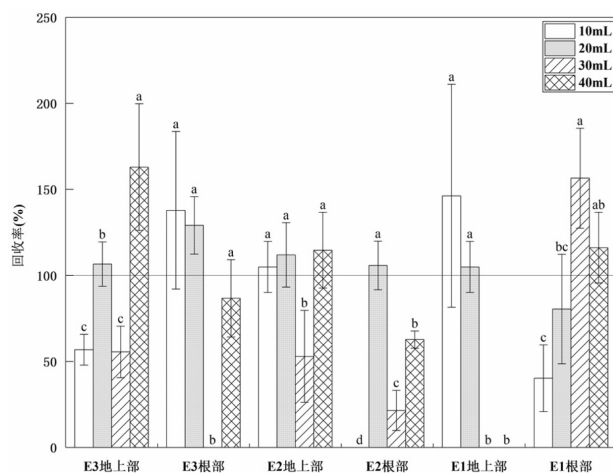


图 1 提取剂体积对回收率的影响

Fig.1 Effects of extractant volume on recovery rate

同色柱形不同小写字母表示显著差异,下同

2.1.2 提取剂体积 提取剂体积偏少则无法将蔬菜中的 3 种天然甾体雌激素完全提出,由于蔬菜中含有大量有机酸及酚类色素物质,用量过多则易产生较多杂质干扰液相检测结果。为了追求较好的提取效率且同时能尽可能减少杂质的干扰,试验考察了乙腈:水(1:1)体积分别为 10、20、30 和 40mL 时对 3 种物质的提取回收率。由图 1 可知,提取体积在 10mL 和 20mL 时,整体回收效率均表现出相对稳定性。然而 10mL 提取体积下,根部的雌酮和雌二醇提取效果欠佳,20mL 提取体积在天上部和根部的提取效果都表现良好,3 种天然甾体雌激素的提取回收率在 80.50%~129.10%。当提取剂体积分别增加至 30mL 和 40mL 时,观察到地上部雌酮回收率显著降低,而雌三醇回收率异常升高;或根部雌酮回收率异常升高,雌三醇回收率显著降低的现象。推测其原因可能是提取剂体积的增加导致地上部和根部的杂质大量析出,进而对液相色谱检测中的出峰产生干扰。因此,综合考虑回收率和杂质干扰的影响,本研究最终确定 20mL 为提取剂的最佳体积。

2.1.3 提取次数 试验选择体积 20mL 作为提取剂体积,考察了提取 1 次 20mL、2 次各 10mL 和 4 次各 5mL 分别提取蔬菜地上部和根部样品中 3 种天然甾体雌激素。地上部的提取结果显示(图 2),雌

二醇的提取效果最为稳定,雌三醇和雌酮在单次提取时效果较差,且随着提取次数的增加,误差呈增大趋势.从实验操作复杂程度和误差控制的角度分析,提取四次的操作最为复杂,并且引入的误差最大.相比之下,提取两次的效果较为稳定,且误差处于可接受范围内.因此,本研究确定提取两次作为最佳提取次数.

2.1.4 固相萃取柱填料类型 C₁₈ 固相萃取柱可以为疏水化合物提供反相键合作用^[23].HLB 固相萃取柱对各类极性,非极性化合物具有较均衡的吸附作用,PSA 固相萃取柱可以有效去除食品中影响农残检测的脂肪酸(包括油酸、棕榈酸、亚麻酸等)有机酸、一些极性色素以及糖类干扰物,GCB 则对平面分子有很强的吸附能力,例如可以去除蔬菜水果中的叶绿素、叶黄素、胡萝卜素等.由于目标提取物三种天然甾体雌激素均具有中度疏水性($\lg K_{ow}$:

2.6~3.94)^[24,6],同时考虑到蔬菜中糖类有机酸等干扰物较多,选用 GCB 分别结合 C₁₈、HLB 和 PSA 实验其优化效果.

结果表明(图3),样品经过 GCB 柱处理后能够有效去除杂质,实现对目标提取物的纯化.然而,采用 HLB + GCB 和 C₁₈ + GCB 固相萃取方法时,由于均为两次过柱操作,目标提取物在两次过柱过程中发生了显著损耗,导致回收率较低.相比之下,PSA + GCB 固相萃取方法表现出较好的回收率和稳定性,无论是在植物地上部还是根部,均展现出显著优势.然而,本研究中使用的 PSA 与 GCB 填料结合柱在抽滤样品时,相较于单一填料的固相萃取柱,需要更大的压力且更容易发生堵塞.此外,PSA + GCB 键合柱的成本较高,限制了其广泛应用.综合考虑经济性和实验操作的可行性,本研究最终选择 C₁₈ 柱作为固相萃取柱,以实现目标提取物的有效纯化.

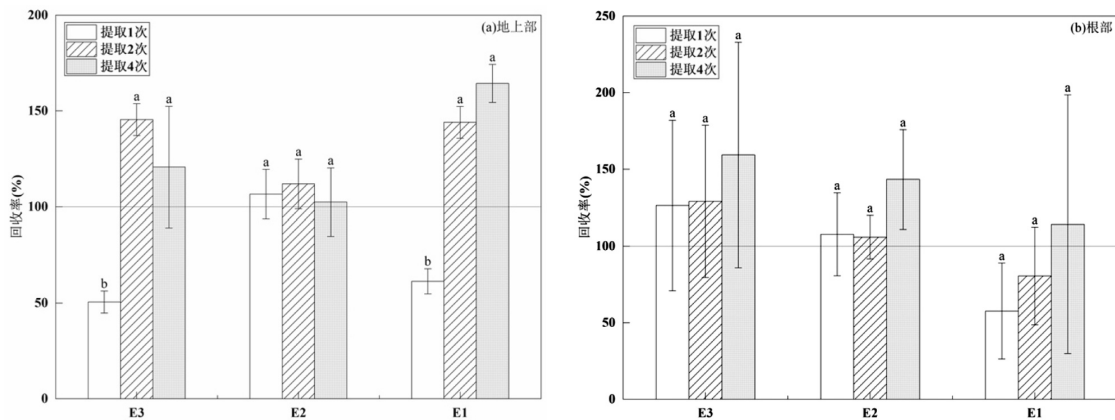


图2 提取次数对地上部和根部内3种天然甾体雌激素提取效率的影响

Fig.2 Effects of extraction times on the recovery rate of three natural SEs in the shoot and the root

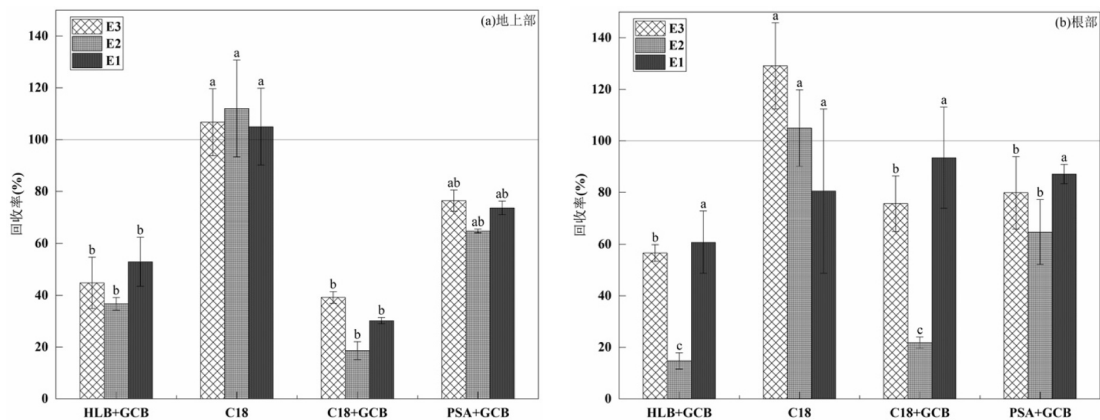


图3 固相萃取柱对地上部和根部内3种天然甾体雌激素提取效率的影响

Fig.3 Effects of SPE columns on the recovery rate of three natural SEs in the shoot and the root

2.2 标准曲线及检出限

由表 2 可知,3 种天然甾体雌激素在浓度范围内具有良好的线性关系,相关系数均大于 0.9995.分别用 3 倍噪音值法和液相色谱仪检定规程来计算 3 种天然甾体雌激素所对应的方法的检出限.如表 3 所示,可以得到雌三醇、雌二醇和雌酮的检出限分别为 0.36~3.23、0.76~3.67 和 13.97~20.12 $\mu\text{g}/\text{kg}$,保留时间的相对标准偏差均小 0.1%.

表 2 三种天然甾体雌激素的工作曲线

Table 2 Working curves of three types of natural steroidal estrogen

雌激素种类	线性方程	相关系数	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	保留时间相对标准偏差(%)
雌三醇	$H=407.99C+6433.4$	0.9997	5.00~1000.00	0.07
雌二醇	$H=202.75C+3590.9$	0.9996	5.00~1000.00	0.08
雌酮	$H=5.5333C+198.70$	0.9998	30.00~1000.00	0.10

注:H为峰高,C为浓度.

表 3 三种天然甾体雌激素的液相检出限

Table 3 Detection limits of three types of natural steroidal estrogen

雌激素种类	3 倍噪音值法		液相色谱仪检定规程		
	3 倍标准偏差值	回归方程 ($5/30\sim500\mu\text{g}/\text{L}$)	检出限 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	信号值 (30 $\mu\text{g}/\text{L}$)	噪音值 检出限 ($\mu\text{g}/\text{L}$)
雌三醇	1364.82	$H=422.79C+2509.8$	3.23	15448	93.88 0.36
雌二醇	786.90	$H=214.16C+1019.9$	3.67	7422	93.88 0.76
雌酮	80.61	$H=5.7745C+138.19$	13.97	280	93.88 20.12

2.3 加标回收率及相对标准偏差

在蔬菜样品中加入不同浓度的 3 种天然甾体雌激素混合标准溶液,制备加标浓度为 50,500 和 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标样品,并将两者混合均匀后放置 12h,使目标物与蔬菜样品充分接触.加标样品经超声提取、固相萃取柱净化和 HPLC/FLD 分析,每个混合加标样平行测定 4 次,计算 3 种天然甾体雌激素的回收率和相对标准偏差值(RSD).每次样品提取物分析后,纯甲醇样品分析均未显示仪器残留,整个过程证明是稳定的.通过对其他浓度的回收率测试进一步验证了稳健性,由表 4 可知,上海青地上部样品中 3 种物质的平均回收率为 104.9%~130.5%,相对标准偏差为 4.9%~18.7%;根部样品中 3 种物质的平均回收率为 80.5%~129.9%,相对标准偏差为 4.2%~38.8%.表明所建立方法的准确性与精密度均良好,

满足分析测定的要求.

表 4 方法的加标回收及相对标准偏差($n=6$)

Table 4 Recoveries and RSD of the method ($n=6$)

雌激素种类	加标后浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)		相对标准偏差(%)	
		地上部	根部	地上部	根部
雌三醇	50	121.5	129.9	4.9	27.6
	500	130.5	119.6	8.4	25.0
	1000	106.6	129.1	12.9	16.7
雌二醇	50	111.6	92.5	11.5	8.2
	500	119.8	88.9	8.7	4.2
	1000	111.9	105.8	18.7	14.1
雌酮	50	110.7	112.7	15.2	38.8
	500	121.2	90.8	18.4	25.5
	1000	104.9	80.5	14.8	31.8

注:n,样品数.

2.4 方法比较

表 5 本文方法与其他方法的比较

Table 5 Comparison of the proposed method with other methods

实际样品	目标雌激素数量	检测方法	仪器分析时间 (min)	检出限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)	来源
蔬菜	3	HPLC/FLD	20	1.1~27.0	80.5~130.5	本研究
蔬菜	3	HPLC-ESI-MS/MS	20	0.04~0.8	69.0~127.0	[25]
蔬菜	5	LC-MS/MS	12~21.5	0.04~0.6	70.0~130.0	[26]
蔬菜	5	GC-MS/MS	14.7	0.1~0.8	55.0~137.0	[27]
蔬菜	3	LC-MS/MS	27	0.025~12.5	81.0~125.0	[28]

将本研究建立的方法与目前已发表的蔬菜中雌激素的检测方法进行对比,目前检测蔬菜中雌激素的方法主要采用气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)或液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术,具体结果见表 5.液质联用对样品的纯度要求较高,需要进行更为复杂的前处理,在处理蔬菜类等复杂基质的样品时重复性可能不如高效液相色谱,且结果的准确性可能受到样品基质效应的影响.由于天然甾体雌激素的分子量大、饱和蒸汽压低,且分子中存在一些极性基团,可相互之间形成氢键,使得分子间结合更紧密,降低其挥发性.因此,使用气相色谱检测天然甾体雌激素时,需要在上样前进行衍生化处理,样品处理时间更长,并可能产生有毒残留物.气质联用和液质联用技术在仪器购置及运行成本方面均表现出较高的费用需求.本方法针对三种天然甾体雌激素

的检测方法进行了优化,该方法在回收率方面表现出色,虽然检出限略高于基于质谱的检测方法,但在分离效率、分析速度和重复性方面均表现良好,且操作相对简便、成本较低,具有较高的实用性,能够满足日常检测的需求。

2.5 实际样品检测

按照粮农/世卫组织食品添加剂联合专家委员会对 17 β -雌二醇每日摄入量的评价^[16],60kg 的成人每日允许摄入 17 β -雌二醇的量为 3 μ g,参考《中国居民膳食指南(2016)》建议成人每天应摄入 300~500g 蔬菜,即蔬菜中雌二醇含量小于 60 μ g/kg dw 为安全浓度。本次测量的样本中仅有机上海青可食用部分超过安全阈值,如表 6 所示,蔬菜样品均有天然甾体雌激素的检出,雌三醇地上部及根部检出率为 100%;17 β -雌二醇地上部检出率为 75%,根部为 100%;雌酮地上部检出率 43.8%,根部为 18.8%,其潜在风险仍需进一步研究。对实际样品的检测结果表明,本方法的检测效果良好,可用于开展蔬菜中 3 种天然甾体雌激素的检测。

表 6 蔬菜样品中三种天然甾体雌激素的检出结果(μ g/kg dw, mean \pm SD)

Table 6 Contents of three types of natural steroidal estrogen in vegetable samples(μ g/kg dw, mean \pm SD)

样品	雌三醇	雌二醇	雌酮
上海青地上部($n=9$)	1353.4 \pm 90.0	160.2 \pm 13.2	n.d.
油麦菜地上部($n=4$)	16.2 \pm 6.1	n.d.	28.6 \pm 1.6
生菜地上部($n=3$)	248.8 \pm 2.7	8.8 \pm 1.2	267.7 \pm 13.0
地上部检出率($n=16$)	100%	75%	43.8%
上海青根部($n=9$)	3499.0 \pm 93.7	314.0 \pm 68.5	n.d.
油麦菜根部($n=4$)	140.3 \pm 9.4	131.3 \pm 5.9	n.d.
白萝卜根部($n=3$)	701.6 \pm 56.1	13.0 \pm 3.9	454.5 \pm 93.1
根部检出率($n=16$)	100%	100%	18.8%

注:dw,干重; n ,样品数;n.d.,没有或低于检出限。

3 结论

3.1 采用超声提取-固相萃取-高效液相色谱联用的分析方法提取并检测蔬菜中天然甾体雌激素含量。对提取剂、提取剂体积、提取次数、固相萃取柱的种类进行优化,该方法对蔬菜地上部样品中 3 种物质的平均回收率为 104.9%~130.5%,相对标准偏差为 4.9%~18.7%;根部样品中 3 种物质的平均回收率为 80.5%~129.9%,相对标准偏差为 4.2%~38.8%。

蔬菜中雌三醇、17 β -雌二醇和雌酮的方法检出限分别为 0.36~3.23,0.76~3.67 和 13.97~20.12 μ g/kg。

3.2 利用该方法对南京市内随机采样的蔬菜检测时发现,雌三醇地上部及根部检出率为 100%;17 β -雌二醇地上部检出率为 75%,根部为 100%;雌酮地上部检出率 43.8%,根部为 18.8%,其潜在风险仍需进一步研究。同时,检测结果表明,不同蔬菜对雌激素积累特征存在差异,本文方法可用于进一步明确不同种类蔬菜吸收和积累天然甾体雌激素的机制及风险。

参考文献:

- [1] Hamid H, Eskicioglu C. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix [J]. Water Research, 2012,46(18):5813-5833.
- [2] Jobling S, Williams R, Johnson A, et al. Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations [J]. Environmental Health Perspectives, 2006, 114Suppl 1(Suppl 1):32-39.
- [3] Andersen L, Holbech H, Gessbo Å, et al. Effects of exposure to 17 α -ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*danio rerio*) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2003,134(3):365-374.
- [4] Hotchkiss A K, Rider C V, Blystone C R, et al. Fifteen years after "wingspread"—environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go [J]. Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology, 2008,105(2):235-259.
- [5] Marlatt V L, Bayen S, Castaneda-Cortès D, et al. Impacts of endocrine disrupting chemicals on reproduction in wildlife and humans [J]. Environmental Research, 2022,208:112584.
- [6] Adeel M, Song X, Wang Y, et al. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review [J]. Environment International, 2017,99:107-119.
- [7] Willi R A, Castiglioni S, Salgueiro-González N, et al. Physiological and transcriptional effects of mixtures of environmental estrogens, androgens, progestins, and glucocorticoids in zebrafish [J]. Environmental Science & Technology, 2020,54(2):1092-1101.
- [8] Leal C S, Mesquita D P, Amaral A L, et al. Environmental impact and biological removal processes of pharmaceutically active compounds: The particular case of sulfonamides, anticonvulsants and steroid estrogens [J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 2019,50(7):698-742.
- [9] Yin G G, Kookana R S, Ru Y J. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment [J]. Environment International, 2002, 28(6):545-551.
- [10] Casey F X M, Hakk H, DeSutter T M. Free and conjugated estrogens detections in drainage tiles and wells beneath fields receiving swine

- manure slurry [J]. *Environmental Pollution*, 2020,256:113384.
- [11] Adeel M, Zain M, Fahad S, et al. Natural and synthetic estrogens in leafy vegetable and their risk associated to human health [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2018, 25(36):36712-36723.
- [12] 闫冬良. 基于 SPE-HPLC 的芹菜中环境雌激素检测 [J]. *安徽农业科学*, 2011,39(22):13279-13281,13284.
- Yan D L. Determination of environmental estrogens from celery stem and leaf by solid phase extraction and high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011,39(22):13279-13281,13284.
- [13] 朱艳琼, 韩宝三. 天然雌激素雌酮、雌二醇和雌三醇的分析检测进展 [J]. *化学世界*, 2020,61(4):237-244.
- Zhu Y Q, Han B S. Progress in the analysis and detection of natural estrogen estrone, estradiol and estriol [J]. *Chemistry World*, 2020,61(4):237-244.
- [14] 姚 军, 李 敏, 王 磊, 等. 天然雌激素色谱-质谱检测方法研究进展 [J]. *应用化工*, 2015,44(6):1122-1126.
- Yao J, Li M, Wang L, et al. Research progress on chromatography-mass spectrometry detection methods of natural estrogen [J]. *Applied Chemical Industry*, 2015,44(6):1122-1126.
- [15] 付银杰, 凌婉婷, 董长勋, 等. 应用 UE-SPE-HPLC/FLD 法检测养殖业畜禽粪便中雌激素 [J]. *应用生态学报*, 2013,24(11):3280-3288.
- Fu Y J, Ling W T, Dong C X, et al. Detection of estrogen in livestock and poultry manure using UE-SPE-HPLC/FLD method [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013,24(11):3280-3288.
- [16] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Summary and conclusions of the fifty-second meeting [Z]. Rome, Feb 2-11, 1999; <https://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/Home/Chemical/1835>.
- [17] Sui Y, Wu J, Chen J. The role of gut microbial β -glucuronidase in estrogen reactivation and breast cancer [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021,9:631552.
- [18] Li S, Wang Y, Sun K, et al. Fe(III)-aided novosphingobium sp. ES2-1 regulates molecular mechanisms of 17 β -estradiol biodegradation [J]. *Environmental Science & Technology*, 2024,58(50):22245-22256.
- [19] Chen X, Li Y, Jiang L, et al. Uptake, accumulation, and translocation mechanisms of steroid estrogens in plants [J]. *Science of The Total Environment*, 2021,753:141979.
- [20] Hu J, Zhang H, Chang H. Improved method for analyzing estrogens in water by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005,1070(1):221-224.
- [21] Sun K, Dai L Z, Chen M H, et al. Laccase-induced decontamination and humification mechanisms of estrogen in water-crop matrices [J]. *PNAS Nexus*, 2024,4(3):118.
- [22] 杨玉珍, 曾佑炜. 植物生理学 [M]. 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2019: 93.
- Yang Y Z, Zeng Y W. *Plant physiology* [M]. 2nd ed. Beijing: Chemical Industry Press, 2019:93.
- [23] 李利荣, 左 明, 王 迎, 等. 固相萃取填料对水中脂肪族二元酸酯类增塑剂萃取效率的影响 [J]. *中国环境监测*, 2024,40(2):177-184.
- Li L R, Zuo M, Wang Y, et al. Effect of solid phase extraction fillers on extraction efficiency of aliphatic dibasic ester plasticizers in water [J]. *China Environmental Monitoring*, 2024,40(2):177-184.
- [24] Hanselman T A, Graetz D A, Wilkie A C. Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants: A review [J]. *Environmental Science & Technology*, 2003,37(24):5471-5478.
- [25] Merlo F, Suppini S, Maraschi F, et al. A simple and fast multiclass method for determination of steroid hormones in berry fruits, root and leafy vegetables [J]. *Talanta Open*, 2022,5:100081.
- [26] Mijangos L, Bizkarguenaga E, Prieto A, et al. Simultaneous determination of a variety of endocrine disrupting compounds in carrot, lettuce and amended soil by means of focused ultrasonic solid-liquid extraction and dispersive solid-phase extraction as simplified clean-up strategy [J]. *Journal of Chromatography A*, 2015,1389:8-18.
- [27] Albero B, Sánchez-Brunete C, Miguel E, et al. Application of matrix solid-phase dispersion followed by GC-MS/MS to the analysis of emerging contaminants in vegetables [J]. *Food Chemistry*, 2017,217:660-667.
- [28] Aparicio I, Martín J, Abril C, et al. Determination of household and industrial chemicals, personal care products and hormones in leafy and root vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2018,1533:49-56.

作者简介: 陈 泱(2001-),女,江苏常州人,南京农业大学硕士研究生,主要从事土壤有机污染控制与修复研究.2023103029@stu.njau.edu.cn.