

网络出版时间:2014-02-28 13:13

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.03.026

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.03.026.html

DEHP 对中国林蛙肝细胞中雌激素受体和卵黄蛋白原合成的影响

王娟娟,李忻怡,张育辉

(陕西师范大学 生命科学院,陕西 西安 710062)

【摘 要】 【目的】探讨邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(di-2-ethylhexyl phthalate, DEHP)对诱导雄性两栖动物肝细胞合成卵黄蛋白原(Vitellogenin, VTG)的影响。【方法】将中国林蛙(*Rana chensinensis*) 雄性成体分别暴露在含 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} mol/L DEHP 的水体中,以自来水为对照,并分别于暴露 20, 30 和 40 d 时取肝脏制作石蜡切片,用免疫组织化学方法检测肝细胞中雌激素受体(Estrogen receptor, ER)和 VTG 的表达情况。【结果】用不同浓度 DEHP 处理后,林蛙肝细胞中 ER 和 VTG 的相对表达量均显著或极显著高于对照组,且其相对表达量呈现随 DEHP 浓度的增高而增大的趋势,但二者的相对表达量随暴露时间延长而产生变化的规律性不明显。【结论】ER 和 VTG 表达水平的一致性,揭示 DEHP 可通过诱导雄性两栖动物肝细胞中 ER 表达的增高而促使 VTG 合成。

【关键词】 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯;肝细胞;雌激素受体;卵黄蛋白原;中国林蛙

【中图分类号】 Q418

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)03-0062-06

Effects of di-2-ethylhexyl phthalate exposure on estrogen receptor and vitellogenin synthesis in hepatocytes of male frogs *Rana chensinensis*

WANG Juan-juan, LI Xin-yi, ZHANG Yu-hui

(College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to investigate the effects of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on the vitellogenin (VTG) synthesis in hepatocytes of male amphibians. 【Method】 Adult male frogs *Rana chensinensis* were exposed to 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} and 10^{-4} mol/L DEHP consecutively and their livers were taken at 20, 30 and 40 d, respectively. The expressions of estrogen receptor (ER) and VTG protein in hepatocytes were detected by immunohistochemistry. 【Result】 The expression levels of ER and VTG protein increased significantly in the hepatocytes of *R. chensinensis* exposed to DEHP compared to the control (Water). The relative expression levels of ER and VTG increased as the increase of DEHP dose at the same exposure time. When the concentration of DEHP was identical, VTG synthesis and expression of ER did not significantly fluctuate with extension of exposure. 【Conclusion】 The expression levels of ER with VTG protein were consistent, suggesting that DEHP could promote VTG synthesis by inducing the overexpression of ER in hepatocytes of male *R. chensinensis*.

Key words: di-2-ethylhexyl phthalate; hepatocytes; estrogen receptor; vitellogenin; *Rana chensinensis*

内分泌干扰物(Endocrine disrupting chemicals, EDCs)可干扰生物机体正常的内分泌活动,对

【收稿日期】 2013-03-22

【基金项目】 国家自然科学基金项目(30770243);中央高校基本科研业务费项目(GK200902039)

【作者简介】 王娟娟(1985—),女,陕西富县人,在读硕士,主要从事生殖生态毒理学研究。E-mail:349875308@qq.com

【通信作者】 张育辉(1956—),男,陕西兴平人,教授,博士生导师,主要从事动物生殖与发育研究。E-mail:yu-huizhang@163.com

机体的繁殖、生长和发育均产生一定的影响。邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(di-2-ethylhexyl phthalate, DEHP)属于邻苯二甲酸酯类化合物(Phthalic acid esters, PAEs),被作为增塑剂广泛应用于乙烯聚合物的生产中,其产品如玩具、电缆、建筑材料以及食品包装袋等对环境的污染日趋严重。DEHP为脂溶性化合物,化学性质稳定,属于难降解类有机物。已有研究证实,DEHP为环境内分泌干扰物,可通过污染水等媒介进入水生动物体内,干扰水生动物正常的内分泌和生殖活动,并产生雌激素效应。肝脏是DEHP及代谢产物作用的主要靶器官之一^[1]。

具有雌激素效应的EDCs被称为环境雌激素(Environmental estrogens),其可模拟内源性雌激素与雌激素受体(Estrogen receptor, ER)结合,从而发挥雌激素效应。肝细胞中的ER散在于胞质和胞核中,可与雌激素结合形成激素-受体复合物,与靶DNA以高亲和力结合诱导或抑制靶基因的转录。已有研究表明,DEHP达到一定浓度时可模拟雌激素与ER结合,具有雌激素效应,而浓度过低则不能产生该效应^[2]。

卵黄蛋白原(Vitellogenin, VTG)是卵生动物的卵细胞为胚胎发育提供营养的物质,为“雌性特异性”蛋白。在卵生动物的卵黄合成期,VTG由肝脏合成并经血液运送到卵巢的卵母细胞^[3]。然而已有研究表明,在雄性和幼体体内的雌激素达到一定水平时,也将会诱导其肝细胞的ER基因表达,ER与雌激素的结合,同样可促使肝细胞合成VTG,但由于雄性和幼体对VTG无特异性需求,故血液中VTG浓度将可累积升高^[4]。有关DEHP诱导雄性动物肝细胞产生VTG的研究,在虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)中已经得到证实^[5]。两栖动物的生殖活动和幼体发育过程在水域中进行,而且其皮肤的渗透性较高,可作为研究水域污染的模式动物。虽然有关其他EDCs诱导雄性两栖动物肝细胞产生VTG的研究已有报道^[6],然而与DEHP相关的试验仅见通过对离体细胞培养进行的研究,通过对雄性两栖动物成体以水体暴露方式来证实DEHP可诱导肝细胞合成VTG的试验还未见报道。本试验将中国林蛙(*Rana chensinensis*)雄性成体在含不同浓度DEHP的水体中暴露一定时间后,用免疫组织化学技术检测其肝细胞中ER和VTG的表达情况,通过分析二者的相对表达量,探讨DEHP对雄性两栖动物的雌激素效应,为环境治理和保护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(di-2-ethylhexyl phthalate, DEHP),分子式为 $C_{24}H_{38}O_4$,相对分子质量390.56,纯度>99%(上海化学试剂公司),用无水乙醇配制成 10^{-2} mol/L母液备用;兔抗人ER α 和兔抗鱼VTG一抗(博奥森产品)、0.01 mol/L PBS(pH7.4)在应用时的稀释度均为1:100;试验还用即用型生物素化羊抗兔IgG抗体(Boste产品)和浓缩型DAB显色剂(中杉金桥产品)。

中国林蛙(*Rana chensinensis*)雄性成体有效标本共90只,体质量6.34~6.98 g,于2011-11采自陕西秦岭北坡的大峪水库附近。

1.2 林蛙不同浓度DEHP水体暴露处理与肝脏切片制备

将林蛙随机分为5组进行不同浓度DEHP水体暴露处理,DEHP浓度分别设为 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 和 10^{-4} mol/L,空白对照组用自来水。将林蛙在30 cm×30 cm×60 cm的水族箱中暴露,每个DEHP处理组以及对照组均使用18只林蛙,分3个水族箱处理,每箱6只。每箱中装2 L暴露液,48 h换水并投食1次,连续暴露40 d。

分别在暴露20、30和40 d时取材,每次每处理取6只,毁髓处死,取其肝脏。将部分肝脏用40 g/L多聚甲醛固定24 h后浸泡在体积分数70%乙醇中,于4℃冰箱中保存。制作常规石蜡切片,片厚6 μ m,裱于铬矾明胶处理的载玻片上,先室温干燥24 h,再于37℃烘箱中干燥,最后保存于4℃冰箱中备用。

1.3 林蛙肝脏切片的免疫组织化学染色

肝脏切片的免疫组织化学染色采用常规SABC法:切片常规脱蜡、复水;用体积分数3% H_2O_2 浸片10 min;再用0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)于92~95℃下修复10 min;自然冷却后PBS洗涤1~2次;滴加50 g/L BSA封闭液室温封闭20 min,甩去多余液体;分别加ER或VTG一抗(稀释度为1:100),湿盒中4℃孵育过夜;PBS漂洗3次,5 min/次;滴加生物素化羊抗兔IgG抗体,37℃孵育20 min;PBS漂洗3次,2 min/次;滴加SABC复合物,37℃孵育20 min;PBS漂洗4次,5 min/次;DAB显色5 min。常规脱水、透明、封片、镜检并拍照。阴性对照用0.01 mol/L PBS(pH 7.4)代替一抗,其余步骤不变。镜检标准:胞质和胞核内

棕黄色颗粒为阳性反应产物,阴性对照不着色。

1.4 数据采集与统计分析

每组取 5 张切片用于检测,用 Leica CAMER 图像采集系统(Lecia Qwin V3)采集图像,用软件 Image-Pro Plus 6.0 系统测定视野中 30 个免疫阳性细胞反应产物的光密度,以光密度值作为该蛋白的相对表达量,着色越深,光密度值越大。数据处理用 SPASS 16.0 软件,用 Kolmogorov-Smirnov 检验所得数据符合正态分布后,进行单因素方差分析(one way-ANOVA analysis), $P<0.05$ 为差异显著;组间多重比较采用 Duncan's 检验。结果以“平均值±标准差”表示,用 Excel 2003 软件制图。

准差”表示,用 Excel 2003 软件制图。

2 结果与分析

2.1 在 DEHP 水体中暴露对林蛙肝细胞 ER 表达的影响

免疫组织化学检测结果显示,在不同浓度 DEHP 水体中暴露后,林蛙肝细胞中可见 ER 阳性反应产物,呈棕黄色颗粒状,在胞质和核膜中均有分布;空白对照组林蛙的肝组织未见 ER 阳性反应产物(图 1)。

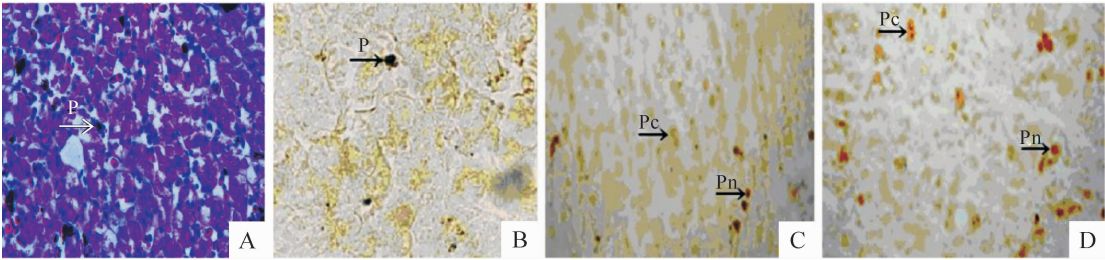


图 1 在不同浓度 DEHP 水体中暴露后中国林蛙肝细胞内 ER 免疫反应的部分结果(×120)

A. 正常肝组织,HE 染色;B. 免疫组织化学对照;C. 10^{-7} mol/L DEHP 处理 40 d;D. 10^{-5} mol/L DEHP 处理 20 d

P. 色素颗粒;Pn. 胞核的阳性反应;Pc. 胞质中的阳性反应

Fig. 1 Part results of ER immunoreactions in hepatocytes of *Rana chensinensis* exposed to DEHP (×120)

A. Hepatic tissue, HE stain;B. Control;C. 10^{-7} mol/L DEHP for 40 d;D. 10^{-5} mol/L DEHP for 20 d

P. Pigment;Pn. Positive reaction on nucleus;Pc. Positive reaction in cytoplasm

ER 相对表达量的统计结果(图 2)显示,与空白对照组相比,各 DEHP 处理组林蛙肝细胞的 ER 相对表达量均极显著增高($P<0.01$)。

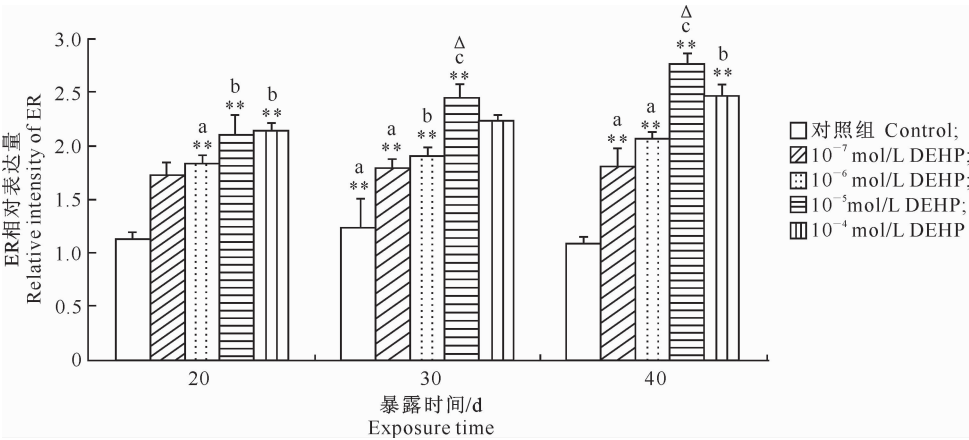


图 2 在不同浓度 DEHP 水体中暴露后中国林蛙肝细胞内 ER 的相对表达量

同一暴露时间与对照组相比,*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$)(one way-ANOVA);DEHP 处理间相比,标不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);同一 DEHP 处理浓度不同暴露时间相比,标△表示差异显著($P<0.05$)。图 4 同

Fig. 2 Relative ER expression levels in hepatocytes of *Rana chensinensis* exposed to DEHP

* means significant difference($P<0.05$) and ** means extremely significant difference ($P<0.01$) for comparisons with control on same exposure time (one way-ANOVA);Lowercase letters mean significant difference ($P<0.05$) among different concentrations;Triangle(Δ)means significant difference ($P<0.05$) among different exposure times with same DEHP concentration. The same for Fig. 4

比较同一暴露时间不同 DEHP 浓度组林蛙 ER 的相对表达量,在暴露 20 d 时, 10^{-6} 与 10^{-7} mol/L DEHP 组、 10^{-4} 与 10^{-5} mol/L DEHP 组相比,ER 相对表达量差异均不显著($P>0.05$);但后 2 组与前 2 组相比,ER 相对表达量显著增高($P<0.05$)。在暴露 30 和 40 d 时, 10^{-6} 与 10^{-7} mol/L DEHP 组相比,ER 相对表达量差异均不显著($P>0.05$),但 10^{-4} 与 10^{-5} mol/L DEHP 组相比,ER 相对表达量显著降低($P<0.05$);与暴露 20 d 相似,后 2 组比前 2 组 ER 表达量显著增高($P<0.05$)。总体显示,ER 相对表达量随着 DEHP 浓度的升高呈增大趋势。

比较同一 DEHP 浓度在不同暴露时间下林蛙

ER 的相对表达量可知,在暴露 20,30 和 40 d 时,空白对照组的 ER 差异不显著($P>0.05$);在 10^{-5} mol/L DEHP 组,暴露 30 和 40 d 与 20 d 相比,ER 相对表达量显著增高($P<0.05$);但其他浓度 DEHP 处理组在暴露不同时间后 ER 相对表达量差异均不显著($P>0.05$)。总体显示,ER 相对表达量没有随暴露时间的延长而明显增大。

2.2 在 DEHP 水体中暴露对林蛙肝细胞 VTG 表达的影响

免疫组织化学检测结果显示,各 DEHP 处理组林蛙的肝细胞中有 VTG 阳性产物,呈棕黄色颗粒状或絮状,分布于胞质中,而空白对照反应较弱(图 3)。

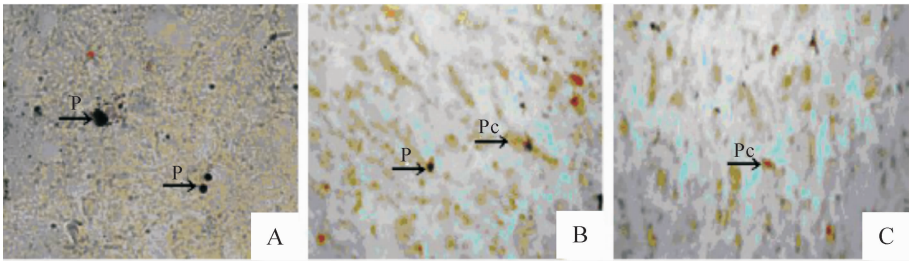


图 3 在不同浓度 DEHP 水体中暴露后中国林蛙肝细胞内 VTG 免疫反应的部分结果 (×120)
A. 对照;B. 10^{-6} mol/L DEHP 处理 40 d;C. 10^{-7} mol/L DEHP 处理 30 d
P. 色素颗粒;Pc. 胞质的阳性反应

Fig. 3 Part results of VTG immunoreactions in hepatocytes of *Rana chensinensis* exposed to DEHP(×120)
A. Control;B. 10^{-6} mol/L DEHP for 40 d;C. 10^{-7} mol/L DEHP for 30 d
P. Pigment;Pc. Positive reaction in cytoplasm

VTG 相对表达量统计结果(图 4)显示,与空白对照组相比,不同暴露时间各 DEHP 处理组林蛙肝细胞中的 VTG 相对表达量均显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)增高。

比较同一暴露时间不同 DEHP 浓度组林蛙的 VTG 相对表达量可知,各暴露时间下, 10^{-6} 与 10^{-7}

mol/L DEHP 组相比差异极显著($P<0.01$), 10^{-4} 与 10^{-5} mol/L 组相比差异不显著($P>0.05$),但后 2 组比前 2 组的 VTG 相对表达量显著增加($P<0.05$)。总体显示,VTG 相对表达量随 DEHP 浓度的升高呈增高趋势。

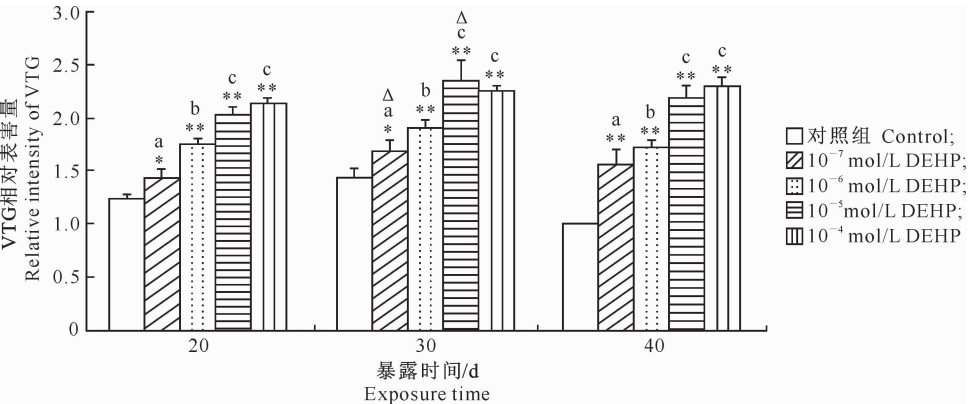


图 4 在不同浓度 DEHP 水体中暴露后中国林蛙肝细胞内 VTG 的相对表达量
Fig. 4 Relative VTG expression levels in hepatocytes of *Rana chensinensis* exposed to DEHP

比较同一 DEHP 浓度在不同暴露时间下林蛙的 VTG 相对表达量可知,在 10^{-5} 和 10^{-7} mol/L DEHP 组,暴露 30 与 20 d 相比差异显著($P < 0.05$);其他各组在不同暴露时间 VTG 相对表达量的差异均不显著($P > 0.05$)。总体显示,VTG 相对表达量不随 DEHP 暴露时间的延长而产生规律性变化。

3 讨 论

3.1 DEHP 对动物肝细胞 ER 表达的影响

ER 是核内受体家族,能与雌激素以二聚体方式结合,使雌激素的应答元件转录启动产生雌激素效应^[7]。有关 DEHP 的内分泌干扰活性及其机制存在不同观点:一种观点认为 DEHP 的内分泌干扰作用是通过与 ER 结合实现的;另一种观点则认为 DEHP 可模拟雌激素而干扰正常的内分泌活动^[8-9]。有研究证实,DEHP 能模拟雌激素产生雌激素效应,其机制与内源雌激素作用相同,可通过 ERs 介导途径产生雌激素效应^[10-11]。也有研究表明,DEHP 能提高人乳腺癌 MCF-7 细胞 ER 基因和蛋白质的表达,因此推测 DEHP 也可能提高动物组织中 ER 的表达水平,实现内源性雌激素对于靶细胞的有效作用;该研究结果同时显示,DEHP 对 MCF-7 细胞增殖效应的浓度与天然雌二醇相似,并且浓度为 10^{-3} mol/L 时增殖效应达到最大,呈现出显著的时间-浓度依赖关系^[12]。本试验检测结果显示,在含 DEHP 的水体中暴露可诱导林蛙肝组织中 ER 的表达,ER 表达对 DEHP 具有明显的剂量效应,但没有随暴露时间的延长产生明显的累积效应。推测这种差异可能是由于 DEHP 的处理方式以及动物种类和组织的差异所致。由于本试验对雄性林蛙的处理方式是水体暴露,虽然 DEHP 随暴露时间的延长可能在机体中蓄积,但同时机体也可以通过代谢途径减少 DEHP 蓄积,或者通过应激调节去减轻其效应,所以并不形成无限制的累积^[13]。

3.2 DEHP 对动物肝细胞 VTG 合成的影响

VTG 是特异组织所合成的大分子多肽,其作为“雌性特异性蛋白”通过血液循环被运到卵巢,在卵母细胞中参与卵黄合成。在雄性或幼体中 VTG 含量很低或者没有,但在外源雌激素或类雌激素诱导下可在肝细胞内生成 VTG。也正是由于 VTG 具有这一特性,所以被作为检测外源化学物质雌激素效应的标志物。

已有试验证实,DEHP 为环境内分泌干扰物,且毒性较强。Flouriot 等^[14]通过对雄性虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)离体肝细胞的培养,显示外源雌

激素能上调 ER 表达,同时可使 VTG mRNA 表达增加,表明 VTG mRNA 表达依赖于 ER 水平的提高。这与对欧洲林蛙(*R. temporaria*)原代肝细胞培养试验所得出的结论相似^[15]。对两栖动物的 DEHP 暴露试验,仅见于美洲豹蛙(*R. pipiens*),证实浓度大于 10^{-4} mol/L 的 DEHP 可对美洲豹蛙产生急性毒性^[16],但是否会导致肝细胞产生雌激素效应,并未做相关检测。

本试验所采用的 DEHP 浓度为 10^{-7} 至 10^{-4} mol/L 共 4 个数量级,在这个浓度范围内,ER 表达和 VTG 合成均呈现随 DEHP 浓度的增加而上升的趋势,呈现一定的剂量依赖关系。但相同的 DEHP 浓度组,随着暴露时间的延长,ER 和 VTG 表达量的变化规律性并不强,显示在 DEHP 的雌激素效应中,剂量效应比累积效应明显。有假设认为,当外源雌激素的受体在有限时间内达到饱和后,其累积效应就不明显^[12]。本试验的结果支持这一假设。

在本试验中,VTG 和 ER 的相对表达量在不同 DEHP 处理组之间的变化规律基本一致,表明 VTG 的合成依赖 ER 的表达水平。然而, 10^{-7} mol/L DEHP 组在暴露 20 d 时,肝细胞的 ER 表达较对照极显著增高,而 VTG 的表达仅为显著增高,类似现象表明 VTG 合成稍晚于 ER 表达,符合 VTG 的合成依赖于 ER 表达水平增高的观点。

4 结 论

通过雄性中国林蛙的 DEHP 水体暴露试验可知,肝细胞内的 ER 和 VTG 相对表达量均较对照明显增高,二者的表达值均随 DEHP 浓度的上升而增高,其变化趋势相似,具有一定的剂量依赖性,但 ER 和 VTG 表达随暴露时间延长而产生变化的规律性不强。本试验结果中 ER 和 VTG 表达水平的一致性,揭示 DEHP 可通过诱导雄性肝细胞中 ER 的表达促使 VTG 合成。

[参考文献]

- [1] Bhattacharya N, Dufour J M, Vo M N, et al. Differential effects of phthalates on the testis and the liver [J]. Biol Reprod, 2005, 72(3): 745-754.
- [2] Rishikesh M, Steve W, Hong M, et al. Biological impact of phthalates [J]. Toxicology Letters, 2013, 217(1): 50-58.
- [3] Pan M L, Bell J. Vitellogenin blood protein synthesis by insect-fat body [J]. Science, 1969, 165(3891): 393-394.
- [4] Barbara H T, Tommey H M, Richard T D G. Octylphenol in-

- duces vitellogenin production and cell death in fish hepatocytes [J]. Environ Toxicol Chem, 1999, 18(4): 734-739.
- [5] Christiansen L B, Pedersen K L, Pedersen S N, et al. *In vivo* comparison of xenoestrogens using rainbowtrout vitellogenin induction as a screening system [J]. Environ Toxicol Chem, 2000, 19(7): 1867-1874.
- [6] Bogi C, Schwaiger J, Ferling H, et al. Endocrine effects of environmental pollution on *Xenopus laevis* and *Rana temporaria* [J]. Environ Res, 2003, 93: 195-201.
- [7] Weigel N L, Zhang Y X. Ligand-independent activation of steroid hormone receptors [J]. Molecular Medicine, 1998, 76(7): 469-479.
- [8] Kuiper G M, Enmakr E, Pelto H M, et al. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary [J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93(12): 5925-5930.
- [9] Paech K, Webb P, Kuiper G, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites [J]. Science, 1997, 277(5331): 1508-1510.
- [10] McLachlan J A. Functional toxicology: A new approach to detect biologically active xenobiotics [J]. Environ Health Perspect, 1993, 101(5): 386-387.
- [11] Colborn T, Saal F S, Soto A M. Developmental effects of endocrine-disruption chemicals in wildlife and humans [J]. Environ Health Perspect, 1993, 101: 378-384.
- [12] Tomoko O, Suzuki T, Yokoyama Y, et al. Estimation of estrogenic and anti-estrogenic activities of some phthalate diesters and monoesters by MCF-7 cell proliferation assay *in vitro* [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2003, 26(8): 1219-1224.
- [13] Sohoni P, Tyler C R, Hurd K, et al. Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) [J]. Environmental Science and Technology, 2001, 35(14): 2917-2925.
- [14] Flouriot G, Pakdel F, Ducouret B, et al. Differential regulation of two genes implicated in fish reproduction: Vitellogenin and estrogen receptor genes [J]. Molecular Reproduction and Development, 1997, 48(3): 317-323.
- [15] Rankouhi T R, Sanderson J T, van Holsteijn I, et al. Effects of environmental and natural estrogens on vitellogenin production in hepatocytes of the brown frog (*Rana temporaria*) [J]. Aquatic Toxicology, 2005, 71(1): 97-101.
- [16] van Wezel A P, van Vlaardingen P, Posthumus R, et al. Environmental risk limits for two phthalates, with special emphasis on endocrine disruptive properties [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2000, 46: 305-321.

(上接第 61 页)

- [12] 刘忠艳, 赵宝玉, 孙莉莎, 等. 苦马豆素来源及其检测方法的研究进展 [J]. 中国兽医科学, 2008, 38(2): 175-180.
- Liu Z Y, Zhao B Y, Sun L S, et al. Research advances in swainsonine resources and its detection methods [J]. Chinese Veterinary Science, 2008, 38(2): 175-180. (in Chinese)
- [13] 赵兴华, 崔忠华, 耿果霞, 等. 气相色谱-甲基化- α -D-甘露糖苷内标法测定变异黄芪中的苦马豆素 [J]. 色谱, 2007, 25(5): 781-782.
- Zhao X H, Cui Z H, Geng G X, et al. Determination of swainsonine content in *Astragalus variabilis* Bunge by gas chromatography using methylation- α -D-mannoside as internal standard substances [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2007, 25(5): 781-782. (in Chinese)
- [14] 王玉红, 刘芳, 赵卉, 等. 微流蒸发光散射检测器的研制及评价 [J]. 分析化学, 2012, 40(10): 1622-1626.
- Wang Y H, Liu F, Zhao H, et al. Development and evaluation of micro evaporative light scattering detector [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(10): 1622-1626. (in Chinese)
- [15] 何海红. 高效液相色谱用蒸发光散射检测器检定方法研究 [J]. 化学分析计量, 2010, 19(2): 78-80.
- He H H. Test method of evaporative light scattering detector for high performance liquid chromatography [J]. Chemical Analysis and Meterage, 2010, 19(2): 78-80. (in Chinese)
- [16] 张悦晗, 甄汉深, 成莉. 蒸发光散射检测器 (ELSD) 应用概况 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(4): 831-833.
- Zhang Y H, Zhen H S, Cheng L, et al. The application of introduced evaporative light-scattering detector (ELSD) [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2007, 25(4): 831-833. (in Chinese)
- [17] 陈醒, 杨光明, 蔡宝昌. 棘豆属植物生物碱类成分结构特征和生理活性研究进展 [J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(1): 95-97.
- Chen X, Yang G M, Cai B C. Research advances in structures and biological activities of alkaloids in *Oxytropis* [J]. Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2011, 27(1): 95-97. (in Chinese)