

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110301. 1645. 004

· 工艺与制剂 ·

卷柏中雌激素类成分的提取

郑晓珂, 李冬梅, 蒋贇, 苏成福, 王小兰, 张莉, 冯卫生*
(河南中医学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:对不同提取方法所得的卷柏提取物进行雌激素活性筛选,探索卷柏发挥雌激素作用的活性部位。方法:采用小鼠子宫增重试验,将卷柏分别以 70% 乙醇回流所得总部位经聚酰胺柱分离;95% 乙醇回流药渣经水提取;药渣水提物去除多糖等所得的卷柏各组分进行雌激素活性筛选。运用 HPLC 指纹图谱技术对卷柏 95% 醇提物、药渣水提物进行分析。结果:70% 乙醇回流所得的卷柏总部位、药渣水提物高剂量、药渣水提物去多糖组与空白组比较,均能显著性增加小鼠子宫系数($P < 0.01$),卷柏其余各组与空白组相比无明显作用;HPLC 指纹图谱显示卷柏 95% 醇提物中穗花杉双黄酮为其主要成分,而药渣水提物中基本不含穗花杉双黄酮。结论:95% 乙醇回流药渣水提法与聚酰胺柱分离法相比,前者更适用于卷柏雌激素活性物质的提取分离;水溶性除多糖物质为卷柏中发挥雌激素样作用的有效部位;HPLC 指纹图谱结果提示,穗花杉双黄酮不是卷柏发挥雌激素作用的成分。

[关键词] 卷柏;雌激素类活性成分;子宫系数;提取方法;HPLC 指纹图谱

[中图分类号] R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0001-05

Extraction of Estrogenic Active Substance from *Selaginella tamariscina*

ZHENG Xiao-ke, LI Dong-mei, JIANG Yun, SU Cheng-fu, WANG Xiao-lan, ZHANG Li, FENG Wei-sheng*
(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the suitable extraction method and polarity for estrogenic active substance in *Selaginella tamariscina*, through the estrogenic active screening of different extracts of *S. tamariscina* from different extraction methods. **Method:** *Selaginella tamariscina* was extracted by 70% ethanol to obtain the total fraction. The total fraction was separated by polyamide column to obtain the water fraction, 50% ethanol and 80% ethanol fractions; *S. tamariscina* was refluxed by 95% ethanol to obtain the 95% ethanol extract, and the residue was decocted by water to obtain the residue water extract; the residue water extract was removed polysaccharides to obtain non-polysaccharides part of water-soluble components. Then the uterine weight method in mice was adopted to detect the estrogenic activity of all these different extracts. The 95% ethanol extract and the residue of water extract were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) fingerprint. **Result:** Compared with the control group, the total fraction, high dose of the water extract residue and non-polysaccharides part of water-soluble components group significantly increased uterus coefficient ($P < 0.01$), while the other groups of *S. tamariscina*

[收稿日期] 20101122(001)

[基金项目] 国家自然科学基金(81073034);国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103440);河南省重大公益性科研招标项目(08110091800)

[通讯作者] *冯卫生,教授,研究方向:中草药活性成分研究及新药开发, Tel: 0371-65575963, E-mail:fwsh@hactcm.edu.cn

[网络出版时间] 2011-03-01 16:45

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110301.1645.004.html>

showed no significantly effects ($P > 0.05$); HPLC fingerprint demonstrated that amentoflavone was the main component of the 95% ethanol extract, but no amentoflavone was observed in the residue water extract.

Conclusion: The extraction method of 95% ethanol refluxing and the residue water decocting was more suitable for extracting the estrogenic active substance of *S. tamariscina*; the non-polysaccharides part of water-soluble components played an important role in estrogen activity in *S. tamariscina*; HPLC fingerprint suggested that amentoflavone was not the estrogenic active component of *S. tamariscina*.

[**Key words**] *Selaginella tamariscina*; estrogenic active substance; uterus coefficient; extraction; HPLC fingerprint

由于健康状况和生活条件的普遍提高,英国、日本妇女的平均预期寿命已分别达 80, 82.5 岁,即很多妇女 1/3 以上的时间将在绝经后度过^[1]。伴随而来的更年期综合征,如潮热、情绪变化、心血管系统疾病、骨质疏松、免疫功能衰退等严重影响了更年期妇女的生活质量。雌激素替代疗法(estrogen replacement treatment, ERT)在改善这些症状的同时,也增加子宫内膜癌、乳腺癌等的发病率。目前,植物雌激素作为一种天然的选择性雌激素受体调节剂,具有防治心脑血管系统疾病,预防骨质疏松,调节自主神经,降低乳腺癌、子宫内膜癌的发病率等作用^[2-5]。因此,从天然植物中寻找和研究开发具有雌激素作用的药物,包括发现和筛选其活性成分,确定给药剂量,探讨作用途径,对临床安全用药具有重要意义,从而为人类的健康需求提供更多的选择。

卷柏为蕨类卷柏科植物卷柏 *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring 的全草,本实验对卷柏化学成分进行了全面系统地分析,发现卷柏中含有大量的黄酮类、木脂素类、核苷类和多酚类化合物^[6-11]。前期的研究发现,卷柏具有雌激素样作用,用 pCXN2-hER α 或 pCXN2-hER β , pERE-TAL-luc, p β gal-Control 共转染 HEK293 细胞株,ERE 调控的报告基因瞬时表达检测,卷柏发挥雌激素活性主要是通过 ER β 受体的介导^[12-14]。为了明确卷柏中发挥雌激素作用为何种化合物,本实验室首先采用聚酰胺柱分离卷柏各部位^[15],运用小鼠子宫增重试验进行雌激素活性筛选。此法中 70% 乙醇回流所得的卷柏总部位经聚酰胺柱分离后,得到的各部位无明显子宫增重作用,无法确定卷柏发挥雌激素作用的活性部位。在此基础之上,本研究采用 95% 乙醇回流后药渣再水提^[16]的方法,对 95% 醇提取物及其药渣水提取物进行筛选。并结合 HPLC 指纹图谱技术,以期初步明确卷柏中发挥雌激素作用的物质的极

性,确立药物雌激素类活性物质提取分离的方法。

1 材料

1.1 动物 昆明种小鼠,雌性,出生 21 d(刚断乳),体重 9~12 g,购于河南省实验动物中心,动物合格证号 SCXK(豫)2010-0002。在二级动物房给予基础饲料喂养,环境温度为 25 \pm 1 $^{\circ}$ C。

1.2 药物与试剂 尼尔雌醇片(上海华联制药有限公司),己烯雌酚片(合肥久联制药有限公司),基础饲料(郑州大学实验动物中心提供)。甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 仪器 AB204-N 1/万电子分析天平(METTLER TOLEDO 公司),MCO-5AC 二氧化碳培养箱(日本 SANYO 公司),CKX-31 倒置显微镜(日本 Olympus),KDC-160HR 型高速低温冷冻离心机(科大创新股份有限公司),BIO-RAD 680 酶标仪(美国 BIO-RAD 伯乐),Shimadzu LC-10AT 型高效液相色谱仪。

1.4 药物的制备 卷柏购于河南省中药材市场,经河南中医学院药学院董诚明教授鉴定为卷柏 *S. tamariscina*。

聚酰胺柱分离法:卷柏全草加 10 倍量 70% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,合并滤液,提取物减压浓缩干燥得到卷柏总部位,上聚酰胺柱,依次用水、50% 乙醇、80% 乙醇洗脱,洗脱液减压浓缩干燥,得到水、50% 乙醇、80% 乙醇各部位。

95% 乙醇回流药渣水提法:卷柏全草加 10 倍量 95% 乙醇回流提取 2 次,每次 2 h,提取物减压浓缩干燥得到 95% 醇提取物。乙醇提取后的药渣用 10 倍量的水煎煮 2 次,每次 2 h,水煎液减压浓缩干燥得到药渣水提取物。

药渣水提取物去多糖的制备^[17]:卷柏药渣水提取物加入适量水,80 $^{\circ}$ C 水浴使其完全溶解,加入适量乙醇,使乙醇体积分数为 30%,搅拌,4 $^{\circ}$ C 静置过夜,6 000

$r \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,分别收集上清液、沉淀。上清液加入乙醇使其体积分数分别为 50%,80%,重复上述操作。上清液减压浓缩干燥得到卷柏药渣水提去多糖成分;多次离心后的沉淀物,依次用无水乙醇、丙酮、乙醚相继洗涤,室温干燥,得到卷柏多糖成分。

2 方法

2.1 小鼠子宫增重法 性未成熟雌性小鼠按体重均衡和随机的原则分组,每组 10 只。空白对照组每日灌胃 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 蒸馏水;阳性对照组每日灌胃阳性药 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ (尼尔雌醇片按 $1.7 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给药;己烯雌酚片按 $0.35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 给药)。各给药组按临床用药的 20 倍量 \times 提取率计算,配成相应浓度的混悬液,每日按 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ 灌胃。所有小鼠给药期间均自由进食饮水。持续给药 7 d,最后 1 次给药 24 h,摘除眼球取血,脱颈处死小鼠,迅速剥离子宫称重。

$$\text{子宫系数} = \text{子宫湿重} / \text{体重} \times 100\%$$

2.2 卷柏提取物的 HPLC 指纹图谱分析^[18]

表 2 聚酰胺柱分离法中卷柏各部位对性未成熟小鼠子宫系数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	体重/g	子宫湿重/mg	子宫系数/%
空白	-	16.58 \pm 1.02	14.10 \pm 3.09	0.090 \pm 0.015
尼尔雌醇	0.001 7	14.11 \pm 1.05	69.95 \pm 8.84	0.551 \pm 0.101 ²⁾
卷柏总部位	0.293	16.53 \pm 1.06	32.66 \pm 10.84	0.245 \pm 0.071 ^{1,2)}
卷柏水部位	0.097	17.25 \pm 1.23	19.59 \pm 3.35	0.119 \pm 0.015 ²⁾
卷柏 50% 部位	0.085	16.71 \pm 0.95	16.89 \pm 3.62	0.116 \pm 0.014 ²⁾
卷柏 80% 部位	0.037	17.76 \pm 1.95	19.13 \pm 4.18	0.123 \pm 0.020 ²⁾

注:与空白对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与尼尔雌醇组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 3~4 同)。

上述结果显示,卷柏总部位经聚酰胺柱分离后,各部位对小鼠子宫无明显作用,无法明确卷柏发挥雌激素样作用的活性部位,说明此种分离方法不适合于卷柏雌激素活性部位的提取和分离。

因此,我们改用 95% 乙醇回流药渣水提的方法,对得到的不同部位进行雌激素活性成分的筛选。

表 3 卷柏各提取物对性未成熟小鼠子宫系数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	体重/g	子宫湿重/mg	子宫系数/%
空白	-	14.49 \pm 1.54	17.14 \pm 5.39	0.104 \pm 0.017
己烯雌酚	0.000 35	13.25 \pm 2.85	70.53 \pm 10.16	0.596 \pm 0.070 ¹⁾
药渣水提物	0.235	14.29 \pm 2.04	16.70 \pm 2.58	0.125 \pm 0.018 ²⁾
	0.470	14.24 \pm 1.54	21.83 \pm 5.98	0.193 \pm 0.051 ^{1,2)}
95% 醇提物	0.235	15.03 \pm 1.74	16.28 \pm 3.01	0.138 \pm 0.040 ²⁾
	0.470	14.67 \pm 1.44	16.08 \pm 3.71	0.131 \pm 0.012 ²⁾

上述结果显示,95% 乙醇回流药渣水提法中,卷柏药渣水提物对小鼠子宫有明显的增重作用,而 95% 醇提物无明显作用。综上可知,卷柏中水溶性成分可能为其发挥雌激素作用的有效部位。

卷柏药渣水提物为 95% 醇提后药渣水煎所得,

Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.2% 磷酸梯度洗脱,洗脱条件见表 1,流速 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 337 nm,柱温 30°C ,进样量 10 μL 。

表 1 卷柏提取物的 HPLC 指纹图谱的梯度洗脱条件

t/min	A(甲醇)/%	B(0.2% 磷酸)/%
0	30	70
30	100	0
38	30	70

2.3 统计方法 试验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)统计处理, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 聚酰胺柱分离法中卷柏各部位对性未成熟小鼠子宫系数的影响 卷柏总部位组小鼠子宫系数增加,与空白组比具有显著性差异($P < 0.01$);卷柏水、50% 乙醇、80% 乙醇部位与空白组比无统计学差异,见表 2。

3.2 95% 乙醇回流药渣水提法中卷柏各提取物对性未成熟小鼠子宫系数的影响 卷柏药渣水提高剂量组小鼠子宫系数增加,与空白组比具有显著性差异($P < 0.01$);卷柏药渣水提低剂量,95% 醇提高、低剂量组均与空白组比无统计学差异,见表 3。

含有大量的多糖类成分,多糖类化合物具有调节免疫、抗炎、抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、降糖降脂、抗凝血、类似肾上腺皮质激素和促肾上腺皮质激素的作用^[19]。为进一步明确卷柏中发挥雌激素作用的物质,我们对卷柏药渣水提物去除多糖进行雌激素活

性筛选。

3.3 卷柏药渣水提物去多糖前后各组分对性未成熟小鼠子宫系数的影响

卷柏药渣水提物,药渣水

提物去多糖组小鼠子宫系数均增加,与空白组比具有显著性差异($P < 0.01$);卷柏多糖组与空白组比无统计学差异,见表 4。

表 4 卷柏药渣水提物去多糖前后各组分对小鼠子宫系数的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	体重/g	子宫湿重/mg	子宫系数/%
空白	-	14.41 ± 0.09	13.86 ± 1.37	0.081 ± 0.010
己烯雌酚	0.000 35	13.33 ± 1.19	66.54 ± 15.60	0.433 ± 0.046 ¹⁾
药渣水提物	0.470	15.60 ± 1.73	16.40 ± 2.13	0.119 ± 0.016 ^{1,2)}
药渣水提物去多糖	0.071	15.29 ± 0.88	18.50 ± 2.30	0.134 ± 0.007 ^{1,2)}
卷柏多糖	0.375	15.35 ± 1.21	14.50 ± 2.39	0.089 ± 0.014

结果提示,卷柏药渣水提物对小鼠子宫有明显的增重作用,且去多糖后对小鼠子宫的增重作用较去多糖前更为明显,而卷柏多糖无明显作用,说明卷柏中发挥雌激素作用的为水溶性除多糖物质。卷柏药渣水提物去多糖后用药量大大减少,仅为去糖前用量的 15.1%,达到了临床用药量减效增的目的。

前期研究中发现,卷柏富含黄酮类化合物^[7-9],且穗花杉双黄酮为卷柏总黄酮的主要成分^[15,18]。现代研究结果表明,植物雌激素主要包含 4 类:黄酮类,木脂素类,二苯乙烯类和香豆素类化合物^[20]。为明确卷柏中黄酮类化合物是否也是其发挥雌激素作用的成分,本实验以穗花杉双黄酮为对照品,对药渣水提物、95% 醇提物进行 HPLC 指纹图谱分析,以期初步判断可能的有效成分。

3.4 以穗花杉双黄酮为标准对照品,对卷柏 95% 醇提物、药渣水提物进行 HPLC 指纹图谱分析

结果显示,穗花杉双黄酮为卷柏 95% 醇提物的主要成分,而药渣水提物中基本不含穗花杉双黄酮(图 1)。

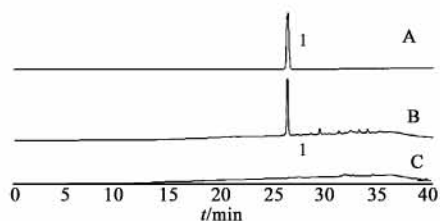


图 1 卷柏 95% 醇提物、药渣水提物的 HPLC

A. 对照品; B. 95% 醇提物; C. 药渣水提物; 1. 穗花杉双黄酮

4 讨论

子宫含有大量的雌激素受体(ERs),雌激素或具有雌激素活性的化合物通过与该受体结合,可诱导子宫靶蛋白(IPs)含量增加,表现为子宫组织增生^[21],因此通过测定外来激素对性未成熟小鼠促子宫增长作用强弱评价药物的雌激素活性大小^[22]。本实验采用性未成熟雌性小鼠子宫湿重与体重之比(子宫系数)作为评价雌激素活性的指标。

本实验室前期采用传统的 4 部位分离法,即卷柏水煎煮提取液浓缩后依次用乙醚、醋酸乙酯、正丁醇萃取,分别得到乙醚、醋酸乙酯、正丁醇和水部位^[12],此种分离方法因使用大量有机溶剂,不适合工业化大生产。在此基础上,改用适合于工业化大生产的方法,即聚酰胺柱分离法。小鼠子宫增重试验结果显示,卷柏总部位经聚酰胺柱分离后的各部位对小鼠子宫的增重作用与空白组比无明显差异,该方法不适合于卷柏雌激素活性部位的提取分离。

在此基础上,本研究采用 95% 乙醇回流药渣水提法,对得到的 95% 醇提物、药渣水提物进行筛选。该法中卷柏药渣水提物高剂量组具有明显的雌激素活性,而 95% 醇提物与空白组比无明显差异。卷柏药渣水提物含有大量的多糖类成分,多糖类物质具有多种生物学活性,为了进一步明确卷柏中发挥雌激素作用的成分,本实验对卷柏药渣水提物去除多糖进行筛选。结果显示,卷柏药渣水提物去除多糖后,用药量仅为去糖前的 15.1%,仍能显著性增加小鼠子宫系数,达到了临床用药量减效增的目的,同时也说明水溶性除多糖物质为卷柏中发挥雌激素作用的有效部位。

上述结果表明,与聚酰胺柱分离法相比,95% 乙醇回流药渣水提法更适用于卷柏雌激素活性部位的提取分离。此法中,95% 乙醇和水的极性相差较大,且卷柏经 95% 乙醇回流后,药渣再对其水煎,从而避免了极性相近化合物在不同部位的大量交叉和流失,适合于对无法明确极性范围或极性范围较大的中药活性成分的筛选研究。

进一步通过 HPLC 指纹图谱分析结果显示,卷柏 95% 醇提物中穗花杉双黄酮为其主要成分,而药渣水提物中基本不含穗花杉双黄酮。提示穗花杉双黄酮不是卷柏中发挥雌激素作用的主要成分。

中药发挥雌激素样作用,对子宫的增重作用受

到多种因素的影响,如:种属、年龄、靶器官功能状态、剂量、方式、时间及代谢产物等^[23]。有研究报告^[24]小于20 mg的子宫放在自然环境中,由于自然干燥作用,在1 min内可使子宫质量下降3.9%,2 min内下降7.8%,3 min下降11.5%。我们在处死动物解剖取子宫时,需要迅速修剪去除附在子宫上的组织、脂肪,然后称重。

本实验通过小鼠子宫增重试验,确定了95%乙醇回流药渣水提法更适合于卷柏雌激素活性物质的提取分离,同时筛选出水溶性除多糖物质为卷柏中发挥雌激素作用的有效部位;HPLC指纹图谱结果提示以穗花杉双黄酮不是卷柏发挥雌激素作用的主要成分。卷柏中发挥雌激素作用的为何种单体化合物,同时,卷柏是通过何种途径发挥雌激素样作用的,还需要进一步的实验研究。

[参考文献]

- [1] 张绍芬. 绝经——内分泌与临床[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:4.
- [2] Okamura S, Sawada Y, Satoh T, et al. Pueraria mirifica phytoestrogens improve dyslipidemia in postmenopausal women probably by activating estrogen receptor subtypes [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2008,216(4):341.
- [3] 李洁,潘喜华,仲伟鉴,等. 大豆异黄酮防治骨质疏松的研究进展[J]. *上海预防医学*,2000,12(4):191.
- [4] 陆曙民,于传鑫. 激素补充治疗[M]. 上海:上海科学技术出版社,2001:83.
- [5] Goodman M T, Wilkens L R, Hankin J H, et al. Association of soy and fiber consumption with the risk of endometrial cancer [J]. *Am J Epidemiol*, 1997, 146(4):294.
- [6] 郑晓珂,史社坡,毕跃峰,等. 卷柏中一个新木脂素苷的分离与鉴定[J]. *药学报*,2004,39(9):719.
- [7] 郑晓珂,毕跃峰,冯卫生,等. 卷柏化学成分研究[J]. *药学报*,2004,39(4):266.
- [8] 郑晓珂,史社坡,毕跃峰,等. 卷柏中黄酮类成分研究[J]. *中草药*,2004,35(7):742.
- [9] 毕跃峰,郑晓珂,冯卫生,等. 卷柏中化学成分的分离与结构鉴定[J]. *药学报*,2004,39(1):41.
- [10] Zheng Xiao-ke, Li Ke-ke, Wang Yan-zhi, et al. A new dihydrobenzofuran lignanoside from *Selaginella moellendorffii* Hieron [J]. *Chin Chem Lett*, 2008, 19(1):79.
- [11] Wang Zhi-yan, Chen Hui, Zheng Xiao-ke, et al. A new sesquiterpene from *Selaginella sinensis* (Desv.) Spring [J]. *Chin Chem Lett*,2007,18(10):1224.
- [12] 郑晓珂. 卷柏化学成分及雌激素样作用机理研究[D]. 北京:北京中医药大学,2006.
- [13] 郑晓珂,吕鹏飞,王玲巧,等. 卷柏等5种中药植物雌激素活性筛选的实验研究[J]. *中国中药杂志*,2006,31(15):1254.
- [14] 郑晓珂,冯卫生,王继峰,等. 中药卷柏的新用途:中国,200610017494[P]. 2006-03-03.
- [15] 郑晓珂,赵献敏,王彦志,等. 卷柏总黄酮纯化工艺研究[J]. *中成药*,2009,31(4):62.
- [16] Kuniyoshi Shimizu, Ichiko Miyamoto, Liu Jie, et al. Estrogen-like activity of ethanol extract of *Ganoderma lucidum* [J]. *The Japan Wood Research Society*, 2009, 55(1):53.
- [17] 陈群,杨桂文,安利国. 银杏白果多糖的提取、纯化和分析[J]. *中国药学杂志*,2002,37(5):331.
- [18] 郑晓珂,赵献敏,王彦志,等. 反相高相液相色谱法测定不同产地卷柏中阿曼托双黄酮的含量[J]. *时珍国医国药*,2009,20(6):1408.
- [19] 黄芳,蒙义文. 活性多糖的研究进展[J]. *天然产物研究与开发*,1998,11(5):90.
- [20] 赵洁,侯连兵. 植物雌激素的活性成分及其生物活性研究进展[J]. *中药材*,2005,28(6):524.
- [21] 赵丕文,王大伟,王玲巧,等. 用小鼠子宫增重法筛选淫羊藿等10种中药雌激素样作用的实验研究[J]. *北京中医药大学学报*,2006,29(10):686.
- [22] Shelby M D, Newbold R R, Tully D B, et al. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of *in vitro* and *in vivo* assays [J]. *Environ Health Perspect*, 1996, 104(12): 1296.
- [23] Mayr U, Butsch A, Schneider S. Validation of two *in vitro* test systems for estrogenic activities with zearalenone phytoestrogens and cereal extracts [J]. *Toxicology*,1992,74(2/3):135.
- [24] Thigpen J E, Li L A, Richter C B, et al. The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets;I. A standardized method for conducting the mouse bioassay [J]. *Lab Anim Sci*, 1987,37(5):596.

[责任编辑 仝燕]