

· 药物代谢 ·

HPLC 测定绿茶浸出液灌胃动脉粥样硬化大鼠 血浆中4个有效成分的含量

潘美秀¹, 刘声菊¹, 刘国旗¹, 左雅敏¹, 伍庆^{2*}, 李兴^{1*}

(1. 贵州医科大学医学检验学院, 贵阳 550004; 2. 贵州师范大学分析测试中心, 贵阳 550001)

[摘要] 目的: 建立 HPLC 测定绿茶浸出液中没食子酸、咖啡因、表儿茶素没食子酸酯、山柰酚在动脉粥样硬化大鼠体内的血药浓度, 为动脉粥样硬化的治疗提供参考。方法: 动脉粥样硬化大鼠灌胃绿茶浸出液后, 分别在不同时间点取血, 采用依利特 Hypersil ODS2 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相甲醇(A)-0.03% 磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~30 min, 10%~43% A; 30~43 min, 43%~45% A; 43~44 min, 45%~51% A; 44~60 min, 51%~53% A; 60~70 min, 53%~90% A), 流速 0.7 mL·min⁻¹, 检测波长 278 nm 的色谱条件进样分析。结果: 没食子酸、咖啡因、表儿茶素没食子酸酯、山柰酚分别在 0.255~20.40, 0.430~86.00, 0.245~19.60, 0.270~21.60 mg·L⁻¹ 内呈良好线性关系, 日内和日间精密度的 RSD 均 < 9.0%, 提取回收率和方法回收率都 > 87%; 酸化后主要药代动力学参数药时曲线下面积(AUC_{0-t})分别为(8.902 ± 1.235), (198.5 ± 12.5), (7.367 ± 0.412), (4.426 ± 0.251) mg·h·L⁻¹, 表观分布容积(V_d)分别为(0.990 ± 0.134), (1.409 ± 0.201), (0.501 ± 0.243), (0.029 ± 0.009) L·kg⁻¹, 达峰时间(T_{max})均为 1.5 h。结论: 该方法对所测成分的分度好, 适用于测定绿茶浸出液中4个有效成分的血药浓度, 为临床预防此类疾病提供一定理论依据。

[关键词] 没食子酸; 咖啡因; 表儿茶素没食子酸酯; 山柰酚; 动脉粥样硬化; 绿茶; 没食子酸丙酯; 药代动力学

[中图分类号] R969.1; R284.1; R284.2; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)08-0092-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017080092

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170208.1006.002.html>

[网络出版时间] 2017-02-08 10:06

Determination of Four Effective Components in Plasma of Rats with Atherosclerosis After Intragastric Administration of Green Tea Extract by HPLC

PAN Mei-xiu¹, LIU Sheng-ju¹, LIU Guo-qi¹, ZUO Ya-min¹, WU Qing^{2*}, LI Xing^{1*}

(1. School of Clinical Laboratory Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;

2. Instrumental Analysis Center, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for determination of gallic acid, caffeine, epicatechin gallate and kaempferol in plasma of rats with atherosclerosis after intragastric administration of green tea extract. **Method:** After being administrated green tea extract, the rats' blood were taken at different time points, separation was carried out on a Hypersil ODS2 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.03% phosphoric acid aqueous solution, the flow rate was 0.7 mL·min⁻¹ and the detection wavelength was set at 278 nm, the column temperature was maintained at 30 °C. **Result:** The calibration curves of gallic acid, caffeine, epicatechin gallate and kaempferol were in good linearity over the range of 0.255-20.40, 0.430-

[收稿日期] 20160823(011)

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金项目(81560720); 喀斯特地区生物与信息技术协同创新中心项目(黔教合协同创新字[2014]04)

[第一作者] 潘美秀, 在读硕士, 从事临床检验诊断学生物化学研究, Tel: 15185078934, E-mail: 1329643913@qq.com

[通讯作者] * 李兴, 博士, 教授, 从事临床生物化学与分子生物学研究, Tel: 13765146895, E-mail: 542535283@qq.com;

* 伍庆, 教授, 从事分析化学研究, Tel: 13984029735, E-mail: wq0851@126.com

86.00, 0.245-19.60, 0.270-21.60 mg·L⁻¹. RSDs of inter-day and intra-day assay were less than 9.0%. The average method separating degree for four ingredients and their extraction recoveries were more than 87%. After acidification, main pharmacokinetic parameters of the area under the curve (AUC_{0-t}) were (8.902 ± 1.235), (198.5 ± 12.5), (7.367 ± 0.412), (4.426 ± 0.251) mg·h·L⁻¹ and the apparent volume of distribution (V_d) were (0.990 ± 0.134), (1.409 ± 0.201), (0.501 ± 0.243), (0.029 ± 0.009) L·kg⁻¹, respectively; the peak time (T_{max}) of these four ingredients were 1.5 h. **Conclusion:** This method has good separation which can be used to detect blood drug concentration of four effective ingredients from green tea extract.

[Key words] gallic acid; caffeine; epicatechin gallate; kaempferol; atherosclerosis; green tea; propyl gallate; pharmacokinetics

茶叶在中国就一直作为药用植物被人们广泛应用^[1],现代医学研究发现其具有保肝、减肥、降脂、抗癌、降血糖等功效^[2-5]。目前,关于茶叶的降血脂作用及其机制研究发展迅速,是近年来茶叶与健康领域的研究热点之一。动脉粥样硬化是一种严重危害人类健康的常见病,其发生与血浆中脂质关系密切^[6]。茶叶中含有丰富的多酚类物质,可通过调节血脂代谢、抗凝促纤溶及抑制血小板聚集等多种机制起到抗动脉粥样硬化作用^[7]。Ikeda等^[8]研究证明茶叶中的儿茶素可以在体外抑制胰脂肪酶活性,同时还发现其可以在体内剂量依赖性地抑制餐后血清甘油三酯升高。临床研究还表明茶色素有显著的抗凝、防止血小板黏附和聚集、控制动脉粥样硬化的形成等作用^[7]。文献报道家兔灌胃茶多糖后,可降低血小板黏附率,抑制血栓形成。

没食子酸、咖啡因、表儿茶素没食子酸酯和山柰酚作为茶叶中的有效成分,研究报道显示这4个成分具有降血脂、抗氧化、抑制脂质过氧化、保护血管内皮、抗炎、改善血小板功能和抑制动脉粥样斑块形成等功效^[9-13],但目前许多报道主要集中在茶叶中单一成分或者单一成分的生物制剂的功效及含量检测^[14-16],而对没食子酸、咖啡因、表儿茶素没食子酸酯和山柰酚这4个成分在生物体内的协同作用尚未见报道。故本实验采用HPLC测定绿茶浸出液灌胃动脉粥样硬化大鼠后血浆中没食子酸、咖啡因、表儿茶素没食子酸酯和山柰酚的质量浓度,为后续研究茶叶中这4个有效成分在动脉粥样硬化大鼠体内发挥协同作用奠定了方法学基础,为临床预防此类疾病提供了一定理论依据。

1 材料

H39212E型移液枪, H39424E型移液枪和I28407E型移液枪(德国Eppendorf公司,量程100~1000 μL);1100系列高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司),VORTEX-5型涡旋振荡器(海口市其

林贝尔有限公司),AL-204型电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),TD5M型台式低速离心机(长沙迈佳森仪器设备有限公司),ALZ15H006型低温冷冻高速离心机(美国Beckman公司)。

没食子酸、表儿茶素没食子酸酯、咖啡因、山柰酚对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110831-201204, 111987-201501, 171215-201211, 110861-200304),没食子酸丙酯(国药集团化学试剂有限公司,批号F20090707),绿茶供试品(贵州省流通环节食品安全检验中心,编号FT201520139),甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF级SD大鼠8只,雄性,体重(200 ± 10)g,由贵州医科大学动物中心提供,合格证号SCXK(黔)2012-0001,经贵州医科大学实验动物伦理委员会批准,动物伦理委员会批准编号1602003。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Hypersil ODS2色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇(A)-0.03%磷酸水溶液(B)梯度洗脱(0~30 min, 10%~43% A; 30~43 min, 43%~45% A; 43~44 min, 45%~51% A; 44~60 min, 51%~53% A; 60~70 min, 53%~90% A),流速0.7 mL·min⁻¹,检测波长278 nm,柱温30℃,进样量10 μL。

2.2 对照品溶液配制 分别称取没食子酸、咖啡因、表儿茶素没食子酸酯、山柰酚适量,加甲醇稀释成质量浓度分别为51.0, 86.0, 49.0, 54.0 mg·L⁻¹的对照品储备液。取各对照品储备液适量,分别用甲醇稀释成没食子酸质量浓度分别为40.80, 20.40, 10.20, 5.10, 4.08, 2.04, 1.02, 0.51 mg·L⁻¹;咖啡因质量浓度分别为172.00, 86.00, 43.00, 17.20, 8.60, 4.30, 1.72, 0.86 mg·L⁻¹;表儿茶素没食子酸酯质量浓度分别为39.20, 19.60, 9.80, 4.90, 3.92, 2.45, 1.96, 0.49 mg·L⁻¹;山柰酚质量浓度分别为43.20, 21.60, 10.80, 5.40, 4.32, 2.70,

2.16, 0.54 mg·L⁻¹ 的单个系列对照品溶液。

2.3 内标溶液配制 称取没食子酸丙酯 10.5 mg 置于 5 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,混匀,得 2.1 g·L⁻¹ 内标母液;精密吸取该内标母液 200 μL,置于 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,混匀,得 0.042 g·L⁻¹ 内标溶液。

2.4 动脉粥样硬化大鼠模型的建立 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,参照邢玉桂等^[17] 的方法建立动脉粥样硬化大鼠模型。

2.5 样品制备 精密称取绿茶粉末 20.0 g,加 10 倍量水,摇匀,70 °C 条件下水浴 1 h,过滤,取一定体积续滤液,浓缩,用水定容至原来体积的 1/2,摇匀,供大鼠灌胃使用,取浓缩液 1 mL 过 0.45 μm 微孔滤膜,采用 HPLC 测定没食子酸、咖啡因、表儿茶素没食子酸酯、山柰酚的含量。

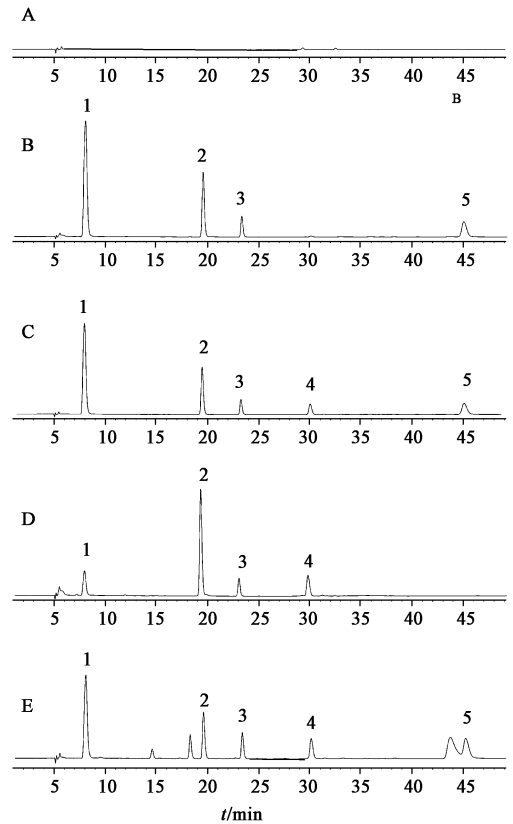
2.6 血浆样品的前处理

2.6.1 方法 1 精密量取血浆 100 μL 于离心管中,加入内标液 10 μL,加入 4 倍量甲醇沉淀蛋白,经 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,挥干,加入甲醇 100 μL 复溶,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液 10 μL 直接进样分析。

2.6.2 方法 2 另取血浆 100 μL 于离心管中,加入内标液 10 μL 及 4 mol·L⁻¹ 盐酸 50 μL,70 °C 条件下水浴 2 h,加入乙酸乙酯 1.5 mL,涡旋 5 min,经 4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,70 °C 水浴条件下将有机溶剂挥干,加入甲醇 100 μL 复溶,涡旋 2 min,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液 10 μL 直接进样分析。

2.7 专属性试验 取空白血浆 100 μL,按 2.6.1 项下方法操作,取 10 μL 进样分析;分别取 2.2 项下对照品储备液适量,用甲醇稀释成一定质量浓度的混合对照品溶液,取 10 μL 进样分析;取空白血浆 100 μL,加入适量的混合对照品及内标物质,按 2.6.1 项下方法操作,取 10 μL 进样分析;分别取同一只动脉粥样硬化大鼠血浆样品(1.5 h) 2 份,1 份按 2.6.1 项下方法操作,取 10 μL 进样分析;另 1 份按 2.6.2 项下方法操作,取 10 μL 进样分析,见图 1。结果表明在本实验条件下,内标物质和血浆中内源性物质或者代谢物均不会干扰没食子酸、咖啡因、表儿茶素没食子酸酯和山柰酚的检测。

2.8 线性关系、最低定量限及检测限 取空白血浆 100 μL,共 8 份,分别加入 2.2 项下的系列对照品溶液 50 μL,按 2.6.1 项下方法操作,得 8 个不同质量浓度的没食子酸、咖啡因、表儿茶素没食子酸酯、山



A. 空白血浆; B. 混合对照品; C. 空白血浆 + 混合对照品 + 内标物; D. 1.5 h 未经酸化的血浆样品 + 内标物; E. 1.5 h 酸化的血浆样品 + 内标物; 1. 没食子酸; 2. 咖啡因; 3. 表儿茶素没食子酸酯; 4. 没食子酸丙酯(内标物); 5. 山柰酚

图 1 绿茶浸出液灌胃后血浆的 HPLC

Fig. 1 HPLC chromatograms of plasma after intragastric administration of green tea extract

柰酚血浆质控样品,分别吸取上述血浆质控样品按 2.1 项下色谱条件测定,记录峰面积,以待测物与内标物峰面积比为纵坐标,质量浓度为横坐标,利用 SPSS 17.0 软件中加权最小二乘法计算,得线性方程分别为 $Y = 0.303X + 0.033$ ($r = 0.995$), $Y = 0.333X - 0.012$ ($r = 0.999$), $Y = 0.173X + 0.025$ ($r = 0.998$), $Y = 0.239X + 0.075$ ($r = 0.998$), 没食子酸、咖啡因、表儿茶素没食子酸酯及山柰酚线性范围分别为 0.255 ~ 20.40, 0.430 ~ 86.00, 0.245 ~ 19.60, 0.270 ~ 21.60 mg·L⁻¹, 四者的最低定量限分别为 0.255, 0.430, 0.245, 0.270 mg·L⁻¹, 检测限 ($S/N = 3$) 分别为 0.004, 0.004, 0.005, 0.006 mg·L⁻¹。

2.9 精密度及准确度试验 取空白血浆 100 μL,共 15 份,分别加入 2.2 项下 3 个质量浓度的系列对照品溶液适量,按 2.6.1 项下处理方法处理血浆质控样品,制成没食子酸质量浓度分别为 0.255,

5.100, 16.32 mg·L⁻¹; 咖啡因质量浓度分别为 0.430, 21.500, 68.80 mg·L⁻¹; 表儿茶素没食子酸酯质量浓度分别为 0.490, 4.900, 15.68 mg·L⁻¹; 山柰酚质量浓度分别为 0.540, 5.400, 17.28 mg·L⁻¹ 的低、中、高不同质量浓度血浆质控样品, 每个质量浓度平行制备 6 份, 连续测定 3 d, 将所得的峰面积比代入标准曲线, 得没食子酸、咖啡因、表儿茶素没食子酸酯和山柰酚的准确度分别为 98.8% ~ 106.9%, 98.6% ~ 103.3%, 92.6% ~ 97.3%, 96.6% ~ 101.5%; 日内精密度的 RSD 分别为 0.7% ~ 8.9%, 1.0% ~ 5.8%, 2.0% ~ 4.4%, 1.3% ~ 8.6%; 日间精密度的 RSD 分别为 1.0% ~ 8.1%, 0.8% ~ 5.3%, 2.0% ~ 6.8%, 1.1% ~ 7.4%, 表明仪器的精密度及准确度好。

2.10 稳定性试验 精密吸取甲醇 100 μL, 共 15 份, 除不加空白血浆 100 μL 外, 按 2.9 项下步骤操作, 所得低、中、高质量浓度贮备液在室温放置 24 h 后放入 -4 °C 冰箱 2 d, 再转入 -80 °C 冰箱冷冻 3 d, 取出在常温下冷却至室温, 取 10 μL 进样分析, 记录色谱峰面积, 计算待测物质与内标物的峰面积比, 通过与新配制贮备液峰面积比比较, 计算没食子酸、咖啡因、表儿茶素没食子酸酯和山柰酚稳定性的 RSD 分别为 1.7% ~ 3.5%, 1.5% ~ 3.9%, 2.5% ~ 3.2%, 1.7% ~ 3.3%, 表明血浆样品稳定性良好。

2.11 回收率试验 按 2.9 项下步骤制备低、中、高质量浓度血浆质控样品, 按 2.6.1 项下方法操作, 取 10 μL 进样分析; 另取相应质量浓度的混合对照品

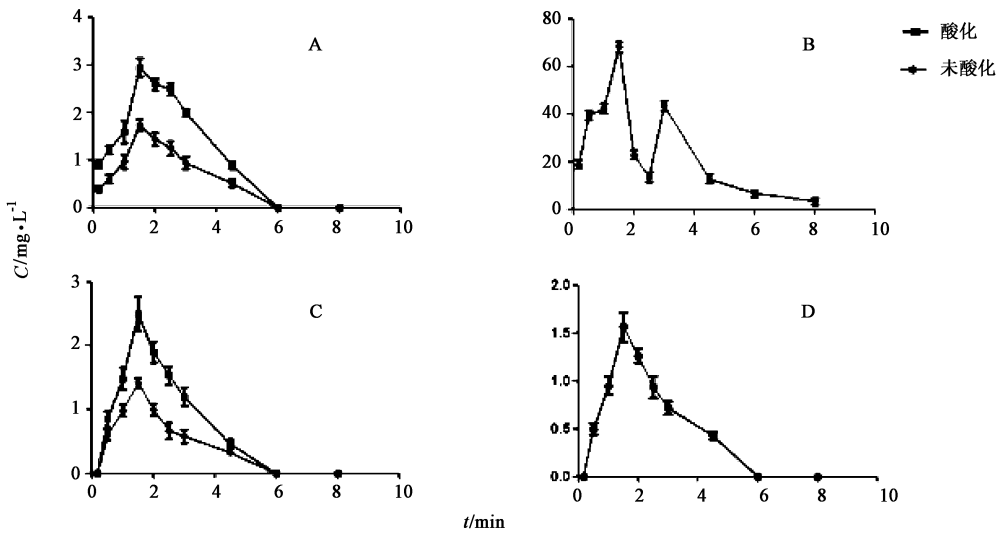
溶液, 得被测物质与内标物峰面积, 通过峰面积比计算提取回收率, 将峰面积比代入标准曲线得实际测定质量浓度, 通过质量浓度比计算方法回收率。同理, 分别加入 2.2 项下的对照品储备液适量, 除不加入咖啡因储备液外, 其他按 2.9 项下步骤制备相应低、中、高质量浓度血浆质控样品, 按 2.6.2 项下操作, 进样分析, 另取相应质量浓度的混合对照品溶液, 得被测物质与内标物峰面积, 通过面积比计算提取回收率, 将所得的峰面积比代入标准曲线计算实际测定质量浓度, 计算方法回收率, 结果见表 1。

2.12 方法学的应用 动脉粥样硬化 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 实验前 12 h 禁食, 自由饮水, 灌胃前给 8 只动脉粥样硬化大鼠进行编号, 取 2.5 项下制备的浸出液按 25 mL·kg⁻¹ (按咖啡因计 75 mg·kg⁻¹) 的剂量灌胃, 分别在给药前和给药后 0.167, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4.5, 6, 8 h 经眼眶后静脉丛取血 0.4 mL, 置于肝素化抗凝管中, 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上层血浆, 分别按照 2.6.1 和 2.6.2 项下方法处理, 通过 HPLC 测定血药浓度, 经 GraphPad Prism 7 软件作图, 见图 2, 采用 DAS 2.0 软件计算 4 个有效成分的药代动力学参数, 见表 2。结果表明给动脉粥样硬化大鼠灌胃绿茶浸出液后, 没食子酸、表儿茶素没食子酸酯和山柰酚的吸收、消除趋势相似, 并且平均血药浓度-时间曲线关系符合二室开放动力学模型; 而咖啡因的药-时曲线呈现双峰现象。4 个有效成分在 0.5 h 均可在血浆中发现, 约 1.5 h 血药浓度达最大值, 之后开始逐渐消除。

表 1 绿茶浸出液灌胃动脉粥样硬化大鼠后血浆中 4 个有效成分的回收率试验 (n=6)

Table 1 Recovery tests of four effective components in plasma of rats with atherosclerosis after intragastric administration of green tea extract (n=6)

成分	质量浓度 /mg·L ⁻¹	未酸化			酸化		
		测得质量浓度 ($\bar{x} \pm s$)/mg·L ⁻¹	方法回收率 /%	提取回收率 /%	测得浓度 ($\bar{x} \pm s$)/mg·L ⁻¹	方法回收率 /%	提取回收率 /%
没食子酸	0.255	0.247 ± 0.004	96.9	92.6	0.228 ± 0.009	89.4	92.6
	5.100	4.805 ± 0.054	94.2	95.3	5.005 ± 0.060	98.1	91.2
	16.320	16.13 ± 0.005	98.8	94.7	16.00 ± 0.138	98.0	94.7
咖啡因	0.430	0.419 ± 0.053	97.4	96.9	-	-	-
	21.500	21.43 ± 0.093	99.7	97.9	-	-	-
	68.800	67.83 ± 0.646	98.6	92.1	-	-	-
表儿茶素	0.490	0.472 ± 0.021	96.3	92.2	0.444 ± 0.010	90.6	91.3
没食子酸酯	4.900	4.756 ± 0.116	97.1	97.8	4.406 ± 0.154	90.1	92.3
	15.680	15.19 ± 0.155	96.9	98.7	14.12 ± 0.133	90.0	87.3
山柰酚	0.540	0.529 ± 0.035	98.0	94.5	0.512 ± 0.021	94.8	90.5
	5.400	5.278 ± 0.102	97.7	94.0	5.188 ± 0.100	96.1	93.3
	17.280	16.73 ± 0.012	96.8	96.4	16.67 ± 0.149	96.5	94.7



A. 酸化和未酸化的没食子酸; B. 未酸化的咖啡因; C. 酸化和未酸化的表儿茶素没食子酸酯; D. 酸化的山柰酚

图 2 绿茶浸出液灌胃动脉粥样硬化大鼠后血浆中 4 个成分的平均血药浓度-时间曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Mean plasma concentration-time curves of four components in plasma of rats with atherosclerosis after intragastric administration of green tea extract ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

表 2 绿茶浸出液灌胃动脉粥样硬化大鼠后血浆中 4 个成分的药代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of four components in plasma of rats with atherosclerosis after intragastric administration of green tea extract ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

参数/单位	咖啡因	山柰酚	未酸化		酸化	
			没食子酸	表儿茶素没食子酸酯	没食子酸	表儿茶素没食子酸酯
$AUC_{0-4}/mg \cdot h \cdot L^{-1}$	198.5 ± 12.50	4.426 ± 0.251	4.902 ± 0.357	3.892 ± 0.402	$8.902 \pm 1.235^{1)}$	$7.367 \pm 0.412^{1)}$
$t_{1/2}/h$	1.820 ± 1.012	2.920 ± 0.121	3.052 ± 0.109	2.299 ± 0.225	3.290 ± 0.230	2.499 ± 0.173
$C_{max}/mg \cdot L^{-1}$	68.56 ± 3.014	1.521 ± 0.251	1.792 ± 0.179	1.399 ± 0.120	2.902 ± 0.222	2.521 ± 0.420
$V_d/L \cdot kg^{-1}$	1.409 ± 0.201	0.029 ± 0.009	0.517 ± 0.102	0.101 ± 0.022	$0.990 \pm 0.134^{1)}$	$0.501 \pm 0.243^{1)}$
$CL/L \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$	0.592 ± 0.016	0.009 ± 0.002	0.112 ± 0.082	0.040 ± 0.019	$0.152 \pm 0.065^{1)}$	$0.077 \pm 0.024^{1)}$

注: T_{max} 均为 1.5 h。与未酸化比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3 讨论

3.1 试验条件的优化 在实验样品的选择上,绿茶是未经发酵制成的茶,与其他种类的茶叶相比,含有的茶多酚(主要为儿茶素类和黄酮类化合物),生物碱,氨基酸,维生素等营养成分较多;在提取工艺的选择上,本实验主要是为了给后期研究绿茶对人体的保健作用提供一定的理论依据,因此选择绿茶水浸出液更贴切实际。在 HPLC 条件优化上,本实验考察了不同波长(220, 254, 278, 360 nm)与不同流动相(甲醇-水和甲醇-0.03% 磷酸)检测体系,发现 278 nm 波长和甲醇-0.03% 磷酸梯度洗脱体系下同时测定血浆样品中 4 个成分杂峰较少、响应值及分离效果好,但是在此波长下山柰酚呈现倒峰,而关闭 Reference 可避免这种情况发生。

在内标物的选择上,本研究考察了没食子酸丙酯、盐酸小檗碱、大黄素,结果在本实验色谱条件下,

没食子酸丙酯与所测物质保留时间接近,并且与所测成分达到了很好分离,同时采用内标法构建标准曲线,较外标法定量准确可靠。在酸水解条件优化上,由于本实验所测的成分中有 3 个成分都属于黄酮类化合物,参照文献[18]采用 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸在 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 下水浴 1 h,但在此条件下所测物质的峰面积较低,此后本实验考察了将水解时间延长至 2 h,而在此条件下所测物质的峰面积相对较高,故最终确定酸水解的条件为 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸在 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 条件下水浴 2 h。

3.2 血浆样品处理方法的探讨 血浆样品经甲醇沉淀蛋白后,能检测出没食子酸、咖啡因和表儿茶素没食子酸酯,不能检测出山柰酚;但经 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸水解后,能检测出没食子酸、咖啡因、表儿茶素没食子酸酯和山柰酚。但在同一时间点同一份血浆样品中,咖啡因经酸水解后含量呈现不同程度的减少,

表明咖啡因在血液中主要以原形出现,而山柰酚在血液中主要以结合态出现,没食子酸和表儿茶素没食子酸酯在血液中则以游离态和结合态2种形式出现。与未酸化比较,没食子酸与表儿茶素没食子酸酯在酸化后药时曲线下面积(AUC_{0-t}),表观分布容积(V_d)和清除率(CL)差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。本实验有效地测定了动脉粥样硬化大鼠血浆中没食子酸、咖啡因、表儿茶素没食子酸酯和山柰酚的血药浓度及其药代动力学参数,为进一步研究茶叶的保健作用奠定了理论基础,有助于揭示其药效机制。

[参考文献]

[1] 林智. 茶叶的保健作用及其机理[J]. 中国食物与营养, 2003(4):49-52.

[2] Wolfram S. Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health [J]. J Am Coll Nutr, 2007, 26(4):373S-388S.

[3] KAO Y H, CHANG H H, Lee M J, et al. Tea, obesity, and diabetes [J]. Mol Nutr Food Res, 2006, 50(2):188-210.

[4] Shimotoyodome A, Haramizu S, Inaba M, et al. Exercise and green tea extract stimulate fat oxidation and prevent obesity in mice [J]. Med Sci Sports Exerc, 2005, 37(11):1884-1892.

[5] Park H J, DiNatale D A, Chung M Y, et al. Green tea extract attenuates hepatic steatosis by decreasing adipose lipogenesis and enhancing hepatic antioxidant defenses in ob/ob mice [J]. J Nutr Biochem, 2011, 22(4):393-400.

[6] 朱振宝, 王艳斐, 易建华. 紫甘蓝花色苷对动脉粥样硬化兔血脂的调节作用[J]. 现代食品科技, 2016, 32(2):7-11.

[7] 张建海, 冯彬彬. 茶叶主要药效成分的药理作用及应

用[J]. 宁夏农林科技, 2012, 53(1):84-85, 90.

[8] Ikeda I, Tsuda K, Suzuki Y, et al. Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats [J]. J Nutr, 2005, 135(2):155-159.

[9] Hodgson A B, Randell R K, Mahabir-Jagessar T K, et al. Acute effects of green tea extract intake on exogenous and endogenous metabolites in human plasma [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(5):1198-1208.

[10] Wong F C, YONG A L, TING E P, et al. Antioxidant, metal chelating, anti-glucosidase activities and phytochemical analysis of selected tropical medicinal plants [J]. Iran J Pharm Res, 2014, 13(4):1409-1415.

[11] Zinellu A, Sotgia S, Scanu B, et al. Human serum albumin increases the stability of green tea catechins in aqueous physiological conditions [J]. PLoS One, 2015, 10(7):e0134690.

[12] 赵保路. 茶多酚的抗氧化作用[J]. 科学通报, 2002, 47(16):1206-1210.

[13] 宋剑南. 中医药防治动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 11(9):871-875.

[14] 金石, 高梓. 大鼠血浆中儿茶素主要代谢产物没食子酸含量测定[J]. 海峡药学, 2011, 23(6):41-43.

[15] 王怡薇, 梁日欣, 杨滨, 等. 茶叶、槐米、金荞麦、红花醇提物的抗氧化活性的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(2):58-60.

[16] 何煜舟, 汪云开, 祝晨, 等. 山柰酚抗氧化作用研究进展[J]. 浙江中西医结合杂志, 2012, 22(6):499-501.

[17] 邢玉桂, 马飞, 孙洪胜. 大鼠动脉粥样硬化模型的建立[J]. 药学研究, 2015, 34(4):192-194, 205.

[18] 刘小雨, 冯芳. 血中柚皮素、橙皮素缀合物酸水解条件优化[J]. 广州化工, 2014, 42(8):4-6.

[责任编辑 刘德文]