

贵州民族大学学术文库
贵州民族大学学术著作出版基金资助
国家自然科学基金（NO. 30972211）资助

油菜花粉超微粉有效成分溶出、 代谢特征及指纹图谱研究

姚秋萍 著

西南交通大学出版社

• 成 都 •

《贵州民族大学学术文库》编委会

主任委员：高万能 王凤友

副主任委员：唐建荣 刘黔生 刘 雷 杨昌儒

吴晓萍（常务） 范允龙

委 员：肖远平 周相卿 王 林 吴有富

杨正万 张艾清 石开忠 夏五四

汪文学 肖唐金 颜春龙 王建山

童 红 贺华中 任达森 王建平

龚 锐 岑燕坤 田 铁 索红敏

白明政 龙耀宏 张鹏程 张 平

何兴发 吕映红 王道铭 杜国景

管 兵 莫子刚

办公室主任：吴有富（兼）

办公室成员：柳远超 张琪亚

前 言

油菜花粉是一种丰富的花粉资源，具有提高免疫活性、降血脂、抗肿瘤等生物学功能。目前对油菜花粉的研究侧重于基础和应用研究，而对于其结构与功能深入系统的研究较少。本研究以油菜花粉为实验材料，采用超微粉碎技术使花粉破壁，以普通粉碎方式作为对照，对比了两种粉碎方式对所得的超微粉和细粉中主要营养成分、有效成分的影响及组织形态学上的差异；比较油菜花粉超微粉、细粉中槲皮素和山奈酚在实验动物体内的药代动力学参数；对油菜花粉超微粉多糖进行分级，筛选抗氧化和免疫活性部位，对活性部位多糖进行结构表征；建立油菜花粉超微粉黄酮类成分的 HPLC 指纹图谱，使这一丰富资源的开发和应用提高到新的水平。主要结果如下：

(1) 分析比较了超微粉碎和普通粉碎方式对油菜花粉主要营养成分含量的影响，并比较了扫描电镜下超微粉和细粉形态学上的差异。结果表明：除粗纤维含量降低外，粗蛋白、粗脂肪、灰分、还原糖和总黄酮含量都有不同程度的提高。

在电镜下观察，油菜花粉细粉基本可以看到完整的细胞形态，而超微粉的颗粒变小、大小均匀，绝大多数细胞壁破裂，基本无完整的细胞存在，破壁率为 98.86%

(2) 分别采用高效液相色谱法、比色法分析比较了油菜花粉超微粉和细粉中黄酮类成分（槲皮素、山奈酚）、不同浸提时间下多糖的溶出差异。结果表明：在相同的提取条件下，油菜花粉超微粉中槲皮素和山奈酚的溶出率比细粉分别提高了 45.16% 和 27.86%；油菜花粉超微粉多糖的溶出量和溶出速度都大于细粉，浸提时间为 10 min 时多糖的溶出率较细粉提高了 252.54%。红外光谱结果显示，油菜花粉超微粉和细粉多糖的主要基团无明显差异。可见，超微粉碎可显著提高油菜花粉有效成分的溶出率。

(3) 采用高效液相色谱法测定家兔灌胃给予油菜花粉超微粉和细粉后血浆中槲皮素和山奈酚的浓度, 血药浓度-时间数据经药代动力学分析软件 (PKS 软件) 处理, 比较油菜花粉超微粉和细粉中槲皮素和山奈酚在家兔体内的药代动力学参数。结果表明: 油菜花粉超微粉和细粉中槲皮素和山奈酚的药代动力学最佳模型均为二室开放模型。油菜花粉超微粉槲皮素的主要药动力学参数: $K_a=0.5793\text{ h}^{-1}$, $t_{1/2\alpha}=2.43\text{ h}$, $t_{1/2\beta}=18.33\text{ h}$, $AUC_{0\rightarrow\infty}=0.3613\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$, $V_d=804.8\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$, $T_{\text{peak}}=2.5714\text{ h}$, $C_{\text{max}}=0.01908\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 油菜花粉细粉槲皮素的主要药动力学参数: $K_a=1.2790\text{ h}^{-1}$, $t_{1/2\alpha}=2.63\text{ h}$, $t_{1/2\beta}=28.00\text{ h}$, $AUC_{0\rightarrow\infty}=0.3411\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$, $V_d=997.3\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$, $T_{\text{peak}}=3.048\text{ h}$, $C_{\text{max}}=0.018769\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。油菜花粉超微粉山奈酚的主要药动力学参数: $K_a=0.4136\text{ h}^{-1}$, $t_{1/2\alpha}=2.29\text{ h}$, $t_{1/2\beta}=2.97\text{ h}$, $AUC_{0\rightarrow\infty}=1.8897\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$, $V_d=33.056\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$, $T_{\text{peak}}=3.6429\text{ h}$, $C_{\text{max}}=0.28079\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 油菜花粉细粉山奈酚的主要药动力学参数: $K_a=0.44362\text{ h}^{-1}$, $t_{1/2\alpha}=1.74\text{ h}$, $t_{1/2\beta}=1.99\text{ h}$, $AUC_{0\rightarrow\infty}=1.4599\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$, $V_d=31.418\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$, $T_{\text{peak}}=3.7143\text{ h}$, $C_{\text{max}}=0.24553\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。与细粉组比较, 油菜花粉超微粉组血浆槲皮素和山奈酚的达峰时间缩短、达峰浓度提高, 相对生物利用度较细粉分别提高了 46.00%、29.44%。可见, 超微粉碎技术可提高油菜花粉有效成分槲皮素和山奈酚的生物利用度。

(4) 采用不同截留相对分子质量 (100 kD、50 kD 和 10 kD) 的超滤膜对油菜花粉超微粉粗多糖进行分级纯化, 分析了压力和时间对超滤过程的影响, 确定最适操作条件, 3 种截留相对分子质量的超滤膜运行时间分别控制在 28 min、36 min 和 48 min 以内, 操作压力分别为 1.1 MPa、1.3 MPa 和 1.6 MPa。油菜花粉超微粉粗多糖 M 按相对分子质量分成 $M_1>100\text{ kD}$ 、 $50\text{ kD}<M_2<100\text{ kD}$ 、 $10\text{ kD}<M_3<50\text{ kD}$ 及 $M_4<10\text{ kD}$ 4 个级别, 所得多糖质量分布比例约为 2.3 : 1 : 1.1 : 1.6, 获得各段相对分子质量的多糖制品纯度均高于 68%。通过体外抗氧化、体内抗氧化和免疫活性试验相结合对分级的产物跟踪筛选活性组分。体外清除 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 的试验结果表明, 油菜花粉多糖的

抗氧化活性与其相对分子质量分布密切相关, M_3 、 M_4 两个级分的抗氧化作用较低, 在后续试验中合并作为一个组分 M_3 进行研究。由体内抗氧化、免疫活性试验筛选得到高活性组分 M_2 和低活性组分 M_3 , M_2 级分多糖比其他组分有较好的抗氧化和免疫活性, 各组分的抗氧化和免疫活性大小顺序为 $M_2 > M > M_1 > M_3$ 。

(5) M_2 级分多糖先后经 DEAE-SephadexA-25 离子交换柱层析和 Sephadex G-100 凝胶柱层析纯化得到 RPP1-2。经高效液相凝胶色谱鉴定其纯度及计算相对分子质量, RPP1-2 为单一对称峰, 重均相对分子质量为 65 358 Da。离子色谱测定 RPP1-2 中 SO_4^{2-} 含量为 2.81%。紫外光谱、红外光谱和核磁共振分析结果表明, RPP1-2 为糖蛋白缀合物, 为 α -糖苷键构型, 分子结构中存在 α -1,3、 α -1,6 糖苷键, RPP1-2 为由 3 种不同单糖残基组成的杂多糖, 糖链中重复单位包含葡萄糖、甘露糖和半乳糖。

(6) 采用高效液相色谱法对不同产地的油菜花粉超微粉的指纹图谱进行比较, 应用中药色谱指纹图谱相似度评价系统软件对油菜花粉超微粉黄酮类成分 HPLC 指纹图谱进行分析评价。以芦丁为内标物, 采用 Diamonsil C_{18} 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 为分析色谱柱, 乙腈-0.4%磷酸水溶液为流动相梯度洗脱, 流速 0.8 mL \cdot min $^{-1}$, 检测波长 254 nm, 柱温 25 $^\circ\text{C}$ 。结果表明: 10 批不同产地的油菜花粉超微粉黄酮类成分 HPLC 指纹图谱较相似, 各成分得到较好的分离, 并根据检测结果确定了 10 个共有指纹峰。该方法具有重现性好、特征性强、方法简便、快速等特点, 能够客观反映油菜花粉超微粉的指纹特征, 可以成为油菜花粉超微粉质量评价及控制的表征指标。

由于作者水平有限, 书中难免存在不足之处, 敬请读者及同行专家批评指正。

作 者

2014 年 3 月

目 录

- 1 绪 论…………… **错误！未定义书签。**
 - 1.1 油菜花粉的研究概况…………… **错误！未定义书签。**
 - 1.2 超微粉碎技术在食品工业中的应用研究进展 **错误！未定义书签。**
 - 1.3 黄酮类化合物药代动力学研究概况………… **错误！未定义书签。**
 - 1.4 指纹图谱研究概况…………… **错误！未定义书签。**
 - 1.5 本研究的立题依据、研究内容及研究意义 **错误！未定义书签。**

- 2 油菜花粉超微粉主要成分分析及组织形态学研究… **错误！**

未定义书签。

- 2.1 材料与仪器…………… **错误！未定义书签。**
 - 2.2 实验方法…………… **错误！未定义书签。**
 - 2.3 结果与分析…………… **错误！未定义书签。**
 - 2.4 讨论与结论…………… **错误！未定义书签。**
- 3 油菜花粉超微粉和细粉中功能性成分——多糖和

黄酮类物质的溶出研究 **错误！未定义书签。**

- 3.1 材料与仪器……………错误！未定义书签。
- 3.2 实验方法……………错误！未定义书签。
- 3.3 结果与分析……………错误！未定义书签。
- 3.4 讨论与结论……………错误！未定义书签。

4 油菜花粉有效成分槲皮素和山奈酚在家兔体内的

药代动力学研究……………	53
4.1 材料与仪器……………	54
4.2 实验方法……………	55
4.3 结果与分析……………	57
4.4 讨论与结论……………	65

5 油菜花粉超微粉多糖分级分离及抗氧化、免疫活性研究 **错**

误！未定义书签。

- 5.1 材料与仪器……………错误！未定义书签。
- 5.2 实验方法……………错误！未定义书签。
- 5.3 结果与分析……………错误！未定义书签。
- 5.4 讨论与结论……………错误！未定义书签。

6 油菜花粉超微粉多糖活性级分的结构表征 **错误！未定**

义书签。

- 6.1 材料与仪器……………错误！未定义书签。
- 6.2 实验方法……………错误！未定义书签。
- 6.3 结果与分析……………错误！未定义书签。
- 6.4 讨论与结论……………错误！未定义书签。

7 油菜花粉超微粉黄酮类成分 HPLC 指纹图谱的研究 **错误！**

未定义书签。

- 7.1 材料与仪器……………错误！未定义书签。
- 7.2 实验方法……………错误！未定义书签。
- 7.3 结果与分析……………错误！未定义书签。
- 7.4 讨论与结论……………错误！未定义书签。

8 总结与展望…………… **错误！未定义书签。**

- 8.1 本研究结论……………错误！未定义书签。
- 8.2 本研究创新点……………错误！未定义书签。
- 8.3 本研究还需进一步解决的问题……………错误！未定义书签。

参考文献……………**错误！未定义书签。**

附录 已发表的论文**错误！未定义书签。**

附录 A 超微粉碎对油菜花粉多糖溶出率的影响**错误！未定义书签。**

附录 B 超微粉碎技术对油菜花粉中
槲皮素和山奈素溶出率的影响……………**错误！未定义书签。**

附录 C 固相萃取-高效液相色谱法
测定兔血浆中山奈素的含量……………**错误！未定义书签。**

附录 D 油菜花粉有效成分山奈酚
在家兔体内的药代动力学研究……………**错误！未定义书签。**

附录 E 油菜花粉超微粉有效成分
山奈酚在家兔体内的药代动力学研究**错误！未定义书签。**

附录 F 基于高效液相色谱指纹图谱的
油菜花粉质量评价研究……………**错误！未定义书签。**

4 油菜花粉有效成分 槲皮素和山奈酚在家兔 体内的药代动力学研究

槲皮素和山奈酚都属于黄酮醇类化合物，也是油菜花粉中主要的黄酮类化合物^[28,30,195]，具有抗氧化、抗炎、抗辐射、抗癌和预防心血管疾病等药理活性^[196]。由于黄酮类成分广泛的药理作用及其在药物、蔬菜、水果中存在的普遍性，其在生物体内的吸收、代谢受到研究者的关注。随着黄酮类成分开发和应用的不断扩大，有关其生物利用度、药动学以及代谢诸方面的研究越来越被人们所重视。有关槲皮素、山奈酚血浆药物浓度的测定方法一般采用液-液萃取的方法，常用的有 HPLC-ECD 法^[197]、RP-HPLC 法^[198]等。第 2 章的溶出度试验表明，超微粉碎可提高油菜花粉槲皮素和山奈酚的溶出度。药物的生物利用度与药物成分的溶出量和溶出速率在一定程度上具有相关性。但近年来对花粉的主要有效成分槲皮素和山奈酚在生物体内的存在形式及其在体内随时间的变化尚未见文献报道。因此，本研究建立了固相萃取-HPLC 分析方法测定家兔灌胃给予油菜花粉超微粉和细粉后槲皮素和山奈酚的血药浓度，比较油菜花粉超微粉、细粉中槲皮素和山奈酚在家兔体内的药代动力学参数，以期揭示油菜花粉经超微粉碎后主要功效成分在体内的变化规律及其生物利用度，为在功能食品加工中的添加量起到参考作用，为新产品的开发提供依据。

4.1 材料与仪器

4.1.1 材料

同第 2 章 2.1.1。

4.1.2 药品与试剂

槲皮素（中国药品生物制品检定所，批号为 100081-200406）；山奈酚（中国药品生物制品检定所，批号 110861-200606）； β -葡萄糖醛酸酶（Type IX-A, from *Escherichia coli*, 1 660 000 U \cdot G⁻¹ solid, Lot093K8600）、硫酸酯酶（Type H-1, from *Helix pomatia*, 14 000 U \cdot G⁻¹ solid, Lot075K3801）和抗坏血酸购自 Sigma 公司；肝素钠（上海惠兴生化试剂有限公司）；甲醇（色谱纯）；其余试剂均为分析纯。

4.1.3 主要仪器

PE203-E 型电子天平（梅特勒-托利多上海有限公司）；
BF-S2500 型固相萃取仪（北京八方世纪科技有限公司）；
HSC-24A 型氮气吹干仪（北京八方世纪科技有限公司）；
SQW-6BL 三清植物超微粉碎机（山东三清不锈钢设备有限公司）；
XSB-70B 型 ϕ 200 标准筛振荡筛机（柳州探矿机械厂）；
Agilent-1100 高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；
TGL-16B 高速台式离心机（上海安亭科学仪器厂）；
DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱（上海一恒科技仪器有限公司）；
SSW 型电热恒温水槽（上海博迅实业有限公司）；

Agilent ODS (C₁₈) 固相萃取小柱 (200 mg/3 mL)。

4.1.4 试验动物

健康家兔 14 只, 体重 2.0~2.5 kg, 雌雄兼用, 由福建医科大学实验动物中心提供。单笼饲养, 自由饮水。

4.2 实验方法

4.2.1 给药方案

14 只家兔试验前根据性别、体重随机分为 2 组, 即油菜花粉超微粉组和油菜花粉细粉组。家兔试验前禁食 (不禁水) 12 h 以上, 按 15 g·kg⁻¹ 的剂量灌胃给予油菜花粉, 分别于灌胃后 5 min、10 min、30 min、50 min、80 min、100 min、2 h、2.5 h、3 h、4 h、5 h、8 h、9 h、10 h、12 h、16 h、24 h 由颈静脉采血 2~3 mL, 收集于肝素化的离心管内, 离心 (10 min, 4 000 r·min⁻¹), 分离出血浆并于 -20 °C 冷冻保存, 待测。

4.2.2 兔血浆中槲皮素和山奈酚含量测定方法的建立

4.2.2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZorbaxSB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.4%磷酸 (55:45, V/V); 检测波长: λ=360 nm; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 室温; 进样量: 50 μL。

4.2.2.2 血浆样品预处理

在固相萃取仪上对 C₁₈ 萃取小柱进行活化。先以甲醇 3 mL 润湿活化, 再先后以水 1 mL 和 0.1% 的磷酸 1 mL 冲洗平衡小柱。精密量取血浆样品 800 μL , 加入 0.1 mol \cdot L⁻¹ 抗坏血酸 80 μL , 再加入 0.58 mol \cdot L⁻¹ 醋酸 80 μL , 旋涡混匀使酸化, 再加入 β -葡萄糖醛酸酶和硫酸酯酶各 40 μL (终浓度分别为 400 U \cdot mL⁻¹ 和 20 U \cdot mL⁻¹), 混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴振荡孵育 2 h, 取出置冰浴中放置 8 min, 离心 (10 min, 15 000 r \cdot min⁻¹), 上清液加入已活化的固相萃取柱, 以甲醇-0.1%磷酸水溶液 (1 : 9, V/V) 1 mL 淋洗, 最后再用甲醇 2 mL 洗脱, 收集洗脱液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮气流挥干, 最后以 0.2 mL 流动相充分溶解, 旋涡 (1 min), 超声 (10 min), 离心 (10 min, 4 000 r \cdot min⁻¹), 吸取上清液 50 μL 进行 HPLC 分析。

4.2.2.3 标准曲线和线性范围

精密称取经五氧化二磷干燥过夜的槲皮素对照品 3.80 mg、山奈酚对照品 6.50 mg, 置于 25 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成槲皮素和山奈酚浓度分别为 152 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、260 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液, -4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。取 7 支离心管依次加入兔空白血浆 700 μL , 再分别加入适量的槲皮素、山奈酚混合对照品溶液, 即得血浆中槲皮素、山奈酚的终浓度为 ① 0.005 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.019 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; ② 0.01 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.038 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; ③ 0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.076 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; ④ 0.04 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.152 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; ⑤ 0.08 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.304 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; ⑥ 0.24 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.456 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; ⑦ 0.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.608 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列混合对照品血浆样品。按 4.2.2.2 项下方法操作后进行 HPLC 分析, 分别以槲皮素浓度、山奈酚浓度 C ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标、以其相应的峰面积 A 为纵坐标绘制标准曲线。

4.2.2.4 精密度和回收率试验

精密量取槲皮素、山奈酚混合对照品溶液 100 μL , 加入空白血浆 700 μL , 配制成 ① 0.005 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.019 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; ② 0.04 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.152 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; ③ 0.4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.608 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

低、中、高 3 种浓度的混合对照品血浆样品，按 4.2.2.2 方法操作，分别记录槲皮素、山奈酚的峰面积，测定日内精密度、5 d 的日间精密度（每天 1 次）和回收率，每个浓度平行测定 5 份。

4.2.2.5 稳定性试验

同 4.2.2.4 项下方法制备低、中、高浓度的混合对照品血浆样品，在冷冻-解冻、长期冷冻、室温条件下存放不同时间后，按 4.2.2.2 方法操作，考察样品放置稳定性，并考察处理完的溶液在室温下的稳定性。

4.2.2.6 数据处理

所得的药时数据以 PKS (Pharmaceutical Kinetics Software) 药代动力学软件处理，进行优度选择和房室模型拟合，计算药代动力学参数。

4.3 结果与分析

4.3.1 血浆中槲皮素、山奈酚测定方法的建立

取空白血浆、混合对照品血浆样品以及血浆样品，按 4.2.2.2 项下方法处理，在 4.2.2.1 项色谱条件下进样分析（图 4.1 至图 4.3）。结果表明，血浆中槲皮素和山奈酚的保留时间分别约为 6.2 min 和 10.4 min。血浆样品经过处理后，其中的内源性物质不会影响槲皮素和山奈酚的测定。

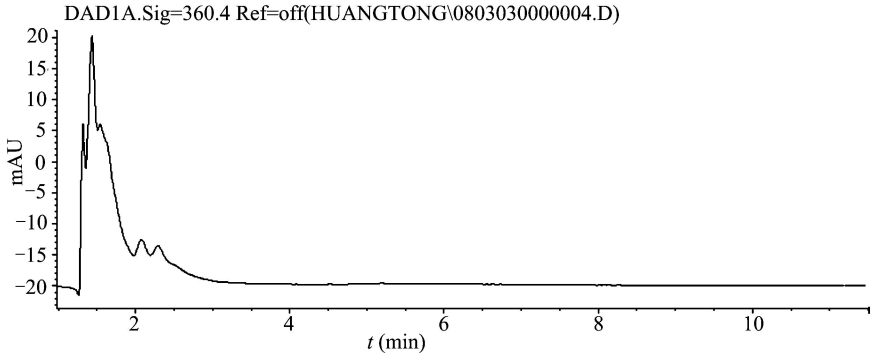


图 4.1 空白血浆色谱图

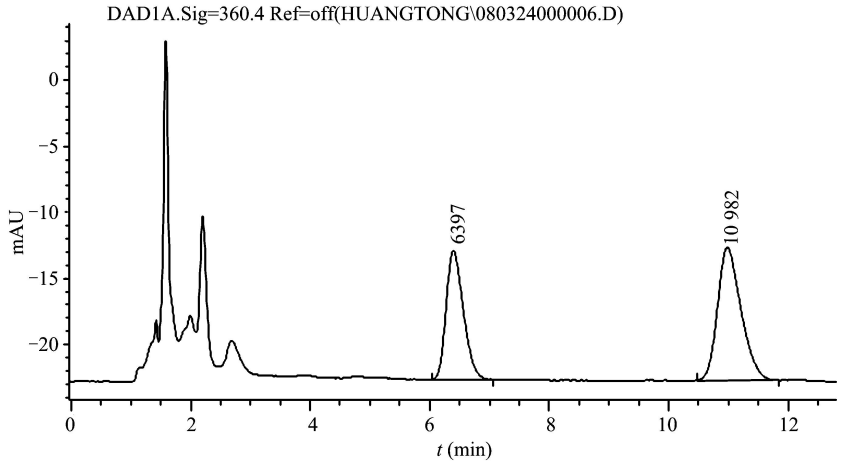


图 4.2 血浆中槲皮素和山奈酚标准品的色谱图

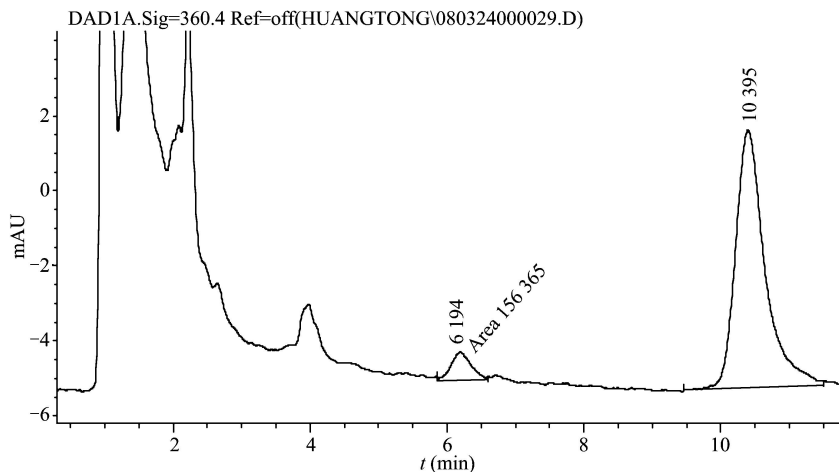


图 4.3 家兔灌胃油菜花粉超微粉后血浆中槲皮素和山奈酚的 HPLC 色谱图

4.3.2 标准曲线和线性范围

将制备的系列混合对照品血浆样品，按 4.2.2.2 项下方法操作进行 HPLC 分析。分别以槲皮素浓度、山奈酚浓度 C ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标、以其相应的峰面积 A 为纵坐标进行线性回归，得回归方程分别为：

槲皮素： $A = 742.98C - 0.1099$ ， $R^2 = 0.9934$ ($n = 7$)。结果表明，槲皮素血浆浓度测定方法的线性范围为 $0.005 \sim 0.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，槲皮素定量限为 $0.005 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

山奈酚： $A = 997.57C - 0.3559$ ， $R^2 = 0.9936$ ($n = 7$)。结果表明，山奈酚血浆浓度测定方法的线性范围为 $0.019 \sim 0.608 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，山奈酚定量限为 $0.019 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

4.3.3 精密度和回收率试验结果

将制备的低、中、高 3 种浓度的混合对照品血浆样品，按 4.2.2.2

方法操作，每个浓度平行测定 5 份。结果表明，槲皮素、山奈酚日内和日间精密度的 RSD 均小于 11%，表明血浆样品分析的精密度良好。槲皮素的绝对回收率为 78.6%~83.0%、方法回收率为 79.34%~82.72%；山奈酚的绝对回收率为 79.8%~85.0%、方法回收率为 80.04%~84.27%（表 4.1、表 4.2）。

表 4.1 槲皮素的精密度和回收率试验结果 (n=5)

浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	精密度 RSD (%)		绝对回收率		方法回收率	
	日内	日间	平均值 (%)	RSD (%)	平均值 (%)	RSD (%)
0.005	10.48	9.85	78.6	4.94	79.34	4.87
0.04	6.78	10.29	81.1	4.26	82.72	4.03
0.4	8.43	10.53	83.0	4.77	81.09	3.78

表 4.2 山奈酚的精密度和回收率试验结果 (n=5)

浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	精密度 RSD (%)		绝对回收率		方法回收率	
	日内	日间	平均值 (%)	RSD (%)	平均值 (%)	RSD (%)
0.019	7.32	8.49	79.8	3.34	80.04	4.03
0.152	5.23	10.17	83.1	3.07	84.27	3.87
0.608	4.42	9.48	85.0	2.86	83.42	2.96

4.3.4 稳定性试验结果

将制备的低、中、高浓度对照品血浆样品在冷冻-解冻、长期冷冻、室温条件下存放不同时间。结果表明，对照品血浆样品中槲皮素和山奈酚在冷冻-解冻 2 次、冷冻保存 2 周稳定，血浆样品室温放置 6 h 内稳定，处理完的溶液在室温条件下 6 h 内稳定，其 RSD 均小于 4.85%。

4.3.5 家兔灌胃给予油菜花粉后两组试验动物的

平均药物浓度

家兔灌服油菜花粉 ($15 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 超微粉和细粉后, 血浆中槲皮素浓度分别在给药后 2~2.5 h 和 2.5~3 h 维持在一个较高浓度; 血浆中山奈酚的浓度分别在给药后 2.5~3 h 和 3~5 h 达到高峰。各组动物血药浓度实测值见表 4.3 和表 4.4, 药时曲线见图 4.3 和图 4.4。

表 4.3 家兔灌胃给予油菜花粉后槲皮素的血药浓度 ($n=7, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

采血时间 (h)	油菜花粉细粉	油菜花粉超微粉
0.083	0.007 535±0.001 302	0.007 639±0.004 029
0.167	0.010 535±0.001 113	0.009 958±0.003 258
0.5	0.011 037±0.001 845	0.011 551±0.005 094
0.833	0.013 685±0.003 269	0.014 133±0.003 127
1.333	0.014 642±0.002 944	0.015 950±0.002 567
1.667	0.016 175±0.004 469	0.018 100±0.003 970
2	0.016 769±0.002 699	0.018 880±0.004 357
2.5	0.017 383±0.002 850	0.018 127±0.003 442
3	0.016 869±0.003 706	0.018 120±0.003 428
4	0.014 922±0.003 683	0.017 068±0.002 840
5	0.013 694±0.004 237	0.016 249±0.003 053
6	0.011 791±0.001 194	0.014 085±0.001 459
8	0.009 384±0.002 942	0.010 996±0.002 702
9	0.007 247±0.001 692	0.008 62±0.000 875
10	0.006 09±0.000 739	0.006 254±0.001 038
12	0.005 28±0.000 351	0.005 36±0.000 436

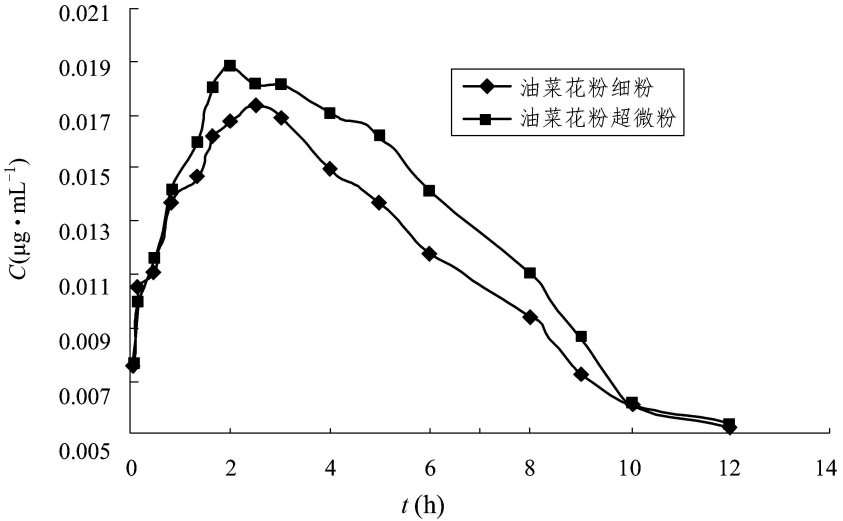


图 4.4 家兔灌服油菜花粉后血浆中槲皮素的 C-T 曲线

表 4.4 家兔灌胃给予油菜花粉后山奈酚的血药浓度 ($n=7$, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)

采血时间 (h)	油菜花粉细粉	油菜花粉超微粉
0.083	0.035 830±0.006 815	0.038 402±0.007 987
0.167	0.061 18±0.030 51	0.057 30±0.015 37
0.5	0.086 93±0.026 39	0.079 67±0.036 41
0.833	0.120 6±0.047 04	0.125 28±0.026 20
1.333	0.153 23±0.049 72	0.151 93±0.029 47
1.667	0.192 33±0.057 20	0.197 03±0.066 42
2	0.203 09±0.044 99	0.220 30±0.074 79
2.5	0.202 08±0.052 59	0.243 17±0.087 25
3	0.219 49±0.065 09	0.254 24±0.093 24
4	0.226 98±0.050 90	0.231 01±0.031 61
5	0.186 49±0.061 65	0.223 76±0.066 14
6	0.109 51±0.051 74	0.169 21±0.018 63
8	0.041 24±0.020 88	0.092 40±0.092 01
9	0.036 43±0.020 01	0.061 72±0.064 86
10	0.030 55±0.016 13	0.048 27±0.049 24
12	0.022 79±0.007 78	0.031 50±0.022 85
16	0.020 12±0.002 37	0.021 647±0.006 794
24	1.92E-2±3.46E-2	1.91E-2±2.70E-4

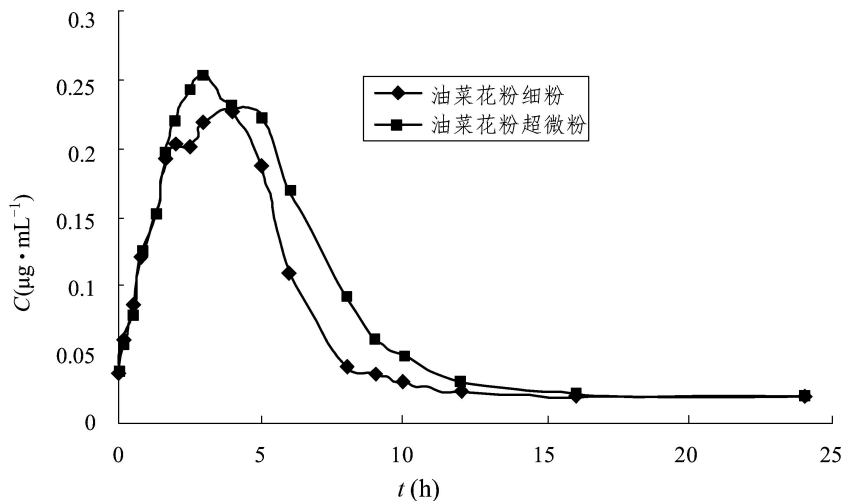


图 4.5 家兔灌服油菜花粉后血浆中山奈酚的 C - T 曲线

4.3.6 家兔灌胃给予油菜花粉后槲皮素和山奈酚的药代动力学参数

将两组给药后不同时间点采血测得的血药浓度时间数据的均值输入药代动力学软件 (Pharmaceutical Kinetics Software, PKS), 进行优度选择和房室模型拟合。结果表明, 家兔灌胃给予油菜花粉后, 槲皮素和山奈酚在体内的代谢过程均符合一级吸收二室模型。与细粉比较, 油菜花粉超微粉槲皮素的吸收相半衰期 $T_{1/2Ka}$ 延长, 分布相半衰期 $t_{1/2\alpha}$ 缩短, 消除相半衰期 $t_{1/2\beta}$ 缩短, 达峰时间 T_{peak} 提前, 达峰浓度 C_{max} 增加, 药时曲线下面积 AUC 增加; 油菜花粉超微粉山奈酚的吸收相半衰期 $T_{1/2Ka}$ 延长, 分布相半衰期 $t_{1/2\alpha}$ 延长, 消除相半衰期 $t_{1/2\beta}$ 延长, 达峰时间 T_{peak} 提前, 达峰浓度 C_{max} 增加, 药时曲线下面积 AUC 增加。主要药动学参数分别见表 4.5、表 4.6。

表 4.5 家兔灌胃给予油菜花粉后槲皮素的主要药动学参数 ($n=7$)

参数	油菜花粉细粉 $\bar{X} \pm SD$	油菜花粉超微粉 $\bar{X} \pm SD$
A ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
α (h^{-1})	0.419 6 \pm 0.926 4	0.047 35 \pm 0.036 06
B ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.364 3 \pm 0.246 3	0.324 0 \pm 0.145 3
β (h^{-1})	0.030 82 \pm 0.044 13	0.048 16 \pm 0.037 42
K_a (h^{-1})	0.132 0 \pm 0.105 8	0.137 65 \pm 0.098 13
$T_{1/2K_a}$ (h)	1.279 0 \pm 0.974 5	0.579 3 \pm 0.411 9
$t_{1/2\alpha}$ (h)	0.96 \pm 0.76	1.60 \pm 0.76
$t_{1/2\beta}$ (h)	2.63 \pm 1.41	2.43 \pm 0.78
V_d ($\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$)	28.00 \pm 56.91	18.33 \pm 24.49
AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$)	997.3 \pm 840.7	804.8 \pm 677.7
K_{10} (h^{-1})	0.341 1 \pm 0.397 6	0.361 3 \pm 0.318 9
K_{21} (h^{-1})	0.146 28 \pm 0.099 38	0.160 93 \pm 0.087 03
K_{12} (h^{-1})	0.268 7 \pm 0.205 9	0.231 5 \pm 0.107 2
T_{peak} (h)	0.080 8 \pm 0.142 1	0.069 21 \pm 0.090 97
C_{max} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	3.048 \pm 1.458	2.571 4 \pm 0.786 8
	0.018 769 \pm 0.002 731	0.019 082 \pm 0.003 614

表 4.6 家兔灌胃给予油菜花粉后山奈酚的主要药动学参数 ($n=7$)

参数	油菜花粉细粉 ($\bar{X} \pm SD$)	油菜花粉超微粉 $\bar{X} \pm SD$
A ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.590 1 \pm 0.772 2	1.742 \pm 1.241
α (h^{-1})	0.406 42 \pm 0.057 95	0.316 03 \pm 0.059 47
B ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	2.104 5 \pm 0.738 1	1.429 \pm 1.585
β (h^{-1})	0.350 37 \pm 0.030 71	0.280 13 \pm 0.095 67
K_a (h^{-1})	0.443 62 \pm 0.034 76	0.413 61 \pm 0.077 40
$T_{1/2K_a}$ (h)	1.57 \pm 0.14	1.72 \pm 0.30
$t_{1/2\alpha}$ (h)	1.74 \pm 0.27	2.29 \pm 0.47
$t_{1/2\beta}$ (h)	1.99 \pm 0.19	2.97 \pm 1.82

V_d (L·kg ⁻¹)	31.418±8.010	33.056±9.753
AUC (μg·L ⁻¹ ·h)	1.459 9±0.438 9	1.889 7±0.639 0

续表 4.6

参数	油菜花粉细粉 ($\bar{X} \pm SD$)	油菜花粉超微粉 $\bar{X} \pm SD$
K_{10} (h ⁻¹)	0.351 51±0.030 66	0.301 04±0.066 24
K_{21} (h ⁻¹)	0.405 23±0.058 89	0.294 14±0.094 36
K_{12} (h ⁻¹)	4.95E-5±8.22E-5	0.000 978±0.002 18
T_{peak} (h)	3.714 3±0.951 2	3.642 9±0.852 2
C_{max} (μg·mL ⁻¹)	0.245 53±0.061 46	0.280 79±0.077 44

注： A —分布相的零时截距； α —分布相消除速率常数； B —消除相的零时截距； β —消除相消除速率常数； K_a —吸收速率常数； $T_{1/2K_a}$ —药物的吸收相半衰期； $t_{1/2\alpha}$ —药物的分布相半衰期； $t_{1/2\beta}$ —药物的消除相半衰期； V_d —表观分布容积；AUC—药时曲线下面积； K_{10} —药物从中央室消除速率常数； K_{21} —从外周室向中央室运转速率常数； K_{12} —从中央室向外周室运转速率常数； T_{peak} —达峰时间； C_{max} —达峰浓度

4.4 讨论与结论

(1) 在对生物体内药物进行分析时，体液成分十分复杂，干扰物质多，而待测药物浓度一般都很低。固相萃取可将少量的药物从大量复杂的生物基质中分离出来，避免使用大量有机溶剂，同时可以除去被测物中的杂质干扰，避免了提取过程中的乳化现象^[199]。本试验同时也考察了 SPE 小柱的使用次数，发现该种小柱至少可以重复使用 3 次以上，且样品回收率稳定。

(2) 酶解方法的确定：在研究中比较了酸解和酶解两种处理方法。酸解的主要方法是：血浆中加相同体积的 10 mol·L⁻¹ HCl，在 80 °C 水浴中水解 2 h，再加 1/2 体积的 10% 三氯乙酸除蛋白，最后用 5 倍体积的乙酸乙酯萃取。结果发现酶解法比酸解法条件更温和，水解也比较完全。另外也比较了未酶解和酶解处理后血浆中槲皮素和

山奈酚的含量区别, 血浆未经酶解处理时, 几乎检测不到游离的槲皮素和山奈酚, 而经 β -葡萄糖醛酸酶和硫酸酯酶酶解后, 血浆中槲皮素和山奈酚的浓度明显增加。上述结果表明, 槲皮素和山奈酚在血浆中主要以葡萄糖醛酸结合物和硫酸酯结合物的形式存在。本研究选用 β -葡萄糖醛酸酶和硫酸酯酶进行孵育酶解的方法, 测定血浆中槲皮素和山奈酚浓度。

(3) 酶用量、水解时间和抗坏血酸对回收率的影响: 实验考察了酶用量 ($400 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $600 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $30 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和酶解时间 (1 h、2 h、3 h) 对回收率的影响, 结果发现酶用量和水解时间为 2 h 或 3 h 时无显著差别; 而水解时间为 1 h 时, 血浆中槲皮素和山奈酚的回收率均小于 50%, 这是由于水解时间较短导致酶解不完全。因此, 选取酶解条件为: β -葡萄糖醛酸酶和硫酸酯酶的终浓度分别为 $400 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $20 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 酶解时间为 2 h。

在研究中比较了加抗坏血酸和未加抗坏血酸对回收率的影响。结果表明, 加抗坏血酸的回收率明显高于未加抗坏血酸的。这是由于血浆处理过程较长, 并且长时间暴露于空气中, 黄酮类化合物是具有酚羟基的一类还原性化合物, 易发生氧化和降解, 因此, 在血浆处理过程中加微量抗坏血酸作为抗氧化剂。

(4) 方法的有效性评价: 方法的有效性评价结果表明, 槲皮素和山奈酚浓度分别在 $0.005 \sim 0.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.019 \sim 0.608 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内呈良好线性关系; 槲皮素的绝对回收率为 78.6%~83.0%, 方法回收率为 79.34%~82.72%; 山奈酚的绝对回收率为 79.8%~85.0%, 方法回收率为 80.04%~84.27%; 日内和日间精密度 RSD 均小于 11%。该方法能满足生物样品分析的要求, 可作为本试验血药浓度监测的手段。

(5) 本试验所得的血药浓度-时间数据经药代动力学软件 PKS 分析处理, 分别按一室、二室模型进行模拟, 根据 F 检验和 AIC 值选择房室数, 家兔灌胃给予油菜花粉后, 其有效成分槲皮素和山奈酚在体内的代谢过程符合一级吸收二室开放模型。家兔灌胃给予油菜花粉后药物从胃肠道吸收快, 5 min 即可测到。达峰时间较长

($T_{\text{peak}} > 3 \text{ h}$)，说明槲皮素和山奈酚在体内的吸收较缓慢。这是由于固体剂型药物的吸收主要包括药物释放和溶解两个步骤，即油菜花粉在水溶液中先崩解成颗粒的粗分散体，进而释放药物，药物只有溶解于体液后才能被吸收。达峰浓度都较低，可能是口服给药受到胃肠道内的代谢和分解以及肝脏首过效应的影响，导致进入体内血液循环的药量较低。文献报道^[200,201]，山奈酚吸收进入体内后，在肝脏进行二相代谢。山奈酚的消除相半衰期较槲皮素的小，说明山奈酚比槲皮素在家兔体内的消除更迅速。槲皮素和山奈酚在兔体内都有较大的表观分布容积，说明药物可能在组织体内分布广泛，也有可能某一深部组织大量储存。

(6) 达峰时间 (T_{peak})、达峰浓度 (C_{max})、药时曲线下面积 (AUC) 是衡量药物吸收速度与程度的重要参数。与细粉组比较，油菜花粉超微粉中槲皮素的达峰时间 T_{peak} 缩短了 0.48 h，说明超微粉吸收得更快； C_{max} 提高了 61.59%，说明超微粉比细粉吸收得更多、更完全；两者的 AUC 分别是 $0.895 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$ 和 $0.613 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$ ，油菜花粉超微粉的相对生物利用度提高了 46.00%。与细粉组比较，油菜花粉超微粉中山奈酚的达峰时间 T_{peak} 缩短了 0.07 h； C_{max} 提高了 14.36%；两者的 AUC 分别是 $1.8897 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$ 和 $1.4599 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$ ，超微粉中山奈酚的相对生物利用度提高了 29.44%，表明超微粉比细粉生物利用度大。对固体药物来说，溶出是吸收的前提，药物粉体粒径越小，比表面积越大，溶出越快，吸收越好^[202]。油菜花粉经过超微粉碎处理后，其粒度更加细微均匀，表面积增加，孔隙率增大，且与胃肠黏膜的接触面积增大，有效成分能较好地分散、溶解在胃肠道，更易被胃肠道吸收。超微粉颗粒小，有效成分充分暴露，可溶性成分迅速溶解，又由于超微颗粒具有表面效应、体积效应、量子效应和宏观隧道效应，其对物质的吸附性较大，因而细胞级微粉油菜花粉对肠壁的黏附作用增强，使颗粒紧紧黏附于胃肠道黏膜上，增加了在肠内的停留时间，有利于有效成分的吸收^[203]。

(7) 超微粉碎技术可以提高油菜花粉有效成分槲皮素和山奈酚的生物利用度。本研究结果为油菜花粉的临床合理用药、提高疗效

油菜花粉超微粉有效成分溶出、代谢特征及指纹图谱研究

提供了实验数据，为确定在功能食品加工中的添加量起到参考作用，为新产品的开发提供依据。

