

HPLC-ECD法测定大鼠血浆中银杏叶黄酮成分及药代动力学研究*

张颖, 刘建勋**, 林力, 张强强, 王建农

(中国中医科学院 西苑医院实验研究中心, 北京 100091)

摘要 目的: 建立大鼠灌胃银杏叶提取物后血浆中黄酮类成分的灵敏分析方法, 并进行药代动力学研究。方法: 血浆样品经葡萄糖醛酸苷水解酶水解后, 采用高效液相色谱分离及电化学检测, 同时分析大鼠血浆样品中槲皮素、异鼠李素和山柰酚。色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-异丙醇-磷酸盐缓冲液 (磷酸二氢钠-磷酸, pH=2) (15:15:70), 流速 0.8 mL·min⁻¹, 检测电压为 200 mV, 柱温 30 °C。结果: 槲皮素、异鼠李素和山柰酚与其他内源性和药源性成分达到良好分离; 最低检测浓度达到 0.5 ng·mL⁻¹; 平均提取回收率分别为 88.7%, 86.2%, 87.0%; 准确度在 92.7%~105.3% 之间, 日内精密度 RSD 小于 6%, 日间精密度 RSD 小于 14.1%, 样品分析时间为 20 min。大鼠灌胃给予银杏叶提取物 10 mg·kg⁻¹ 后, 酶水解血浆中槲皮素、异鼠李素和山柰酚的半衰期分别为 (3.53 ± 1.88) h, (6.94 ± 4.05) h, (3.97 ± 2.30) h, 3 个黄酮类成分在大鼠血浆中都显示明显的二次达峰现象。结论: 建立的检测方法能灵敏、特异、准确, 可用于银杏叶提取物灌胃给药后黄酮类成分的药代动力学研究。

关键词: 高效液相色谱-电化学; 银杏叶提取物; 黄酮; 血药浓度; 药代动力学

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)01-0010-05

HPLC-ECD determination of flavonols from *Ginkgo biloba* leaf extracts in rat plasma and its pharmacokinetic study*

ZHANG Ying LIU Jian-xun**, LIN Li ZHANG Qiang-qiang WANG Jian-nong

(Research Center, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100091, China)

Abstract Objective To establish a sensitive method for the quantification of flavonols from rat plasma after intragastric administration of *Ginkgo biloba* leaf extracts. **Methods** HPLC with electrochemical detection (ECD) was employed to quantify quercetin, isorhamnetin and kaempferol simultaneously after plasma samples were hydrolyzed by glucuronidase. The sample was separated by Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column and eluted by the mobile phase composed of methanol-isopropanol-phosphate buffer (NaH₂PO₄-H₃PO₄, pH=2) (15:15:70) at column temperature of 30 °C, and the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹. The potential of analysis cell was selected as 200 mV. **Results** The analysis of plasma samples could be performed in 20 min with the quantitative limit of 0.5 ng·mL⁻¹ and average recovery of 88.7%, 86.2% and 87.0% for quercetin, isorhamnetin and kaempferol respectively. The intra- and inter-day precision (RSD) was measured less than 6% and 14.1%, meanwhile the accuracy was calculated as 92.7% - 105.3%. The concentration-time data after oral administration of 10 mg·kg⁻¹ *Ginkgo biloba* leaf extracts showed that flavonols was absorbed rapidly and presenting the first peak appeared at 0.17-0.23 h and the second peak at 6 h. The elimination half-life time (t_{1/2k}) was calculated as (3.53 ± 1.88) h, (6.94 ± 4.05) h and (3.97 ± 2.30) h for quercetin, isorhamnetin and kaempferol respectively. **Conclusion** The method developed in the present study using HPLC-ECD is highly sensitive, accurate, rapid and suitable for pharmacokinetic study of *Ginkgo biloba* leaf extracts in rats.

Key words HPLC-ECD; *Ginkgo biloba* leaf extracts; flavonols; pharmacokinetics

* 科技部重大新药创制专项 (2009ZX09502-014); 国家自然科学基金重点项目 (30830118)

** 通讯作者 Tel: (010) 62874049 E-mail: liujk0324@sina.com

自 20 世纪 60 年代银杏制剂 EGb761 问世以来,国内外市场已有为数众多的银杏叶提取物产品。银杏叶提取物在临床上主要用于高血压、冠心病等心血管系统以及脑梗死、痴呆等神经系统疾病的治疗。黄酮是银杏叶提取物中的主要有效部位,化学研究表明黄酮类成分主要由槲皮素、异鼠李素和山柰酚的多种糖苷组成^[1],具有扩张血管、抗氧化、促进脂肪脂解等多种药理作用^[2-4]。

药代动力学研究作为药物化学和药理作用之间的桥梁,有助于进一步揭示银杏黄酮类成分发挥药效的机制。有研究显示给予银杏叶提取物后在水解和未水解的血、尿中检测不到黄酮苷和苷元^[5],但也有文献报道尿液或血浆经过水解后检测到苷元^[6-7],不同的结论可能是由于分析方法的灵敏度所致,同时也表明银杏叶黄酮类成分的生物利用度较低。对于银杏叶黄酮类成分的体内分析主要有 HPLC-UV、GC-MS、LC-MS 和 LC-MS/MS 等几种方法,其中 HPLC-UV 方法的灵敏度较低,需要较大给药剂量,造成实验剂量和临床剂量偏离较大的弊端^[8]。GC-MS 方法的灵敏度达到最低定量限 (LLOQ) 1.5 ng~10 pg 但是该方法需要衍生化,操作烦琐^[9]。LC-MS 方法的灵敏度也不够理想,LLOQ 仅为 5 ng^[10]。LC-MS/MS 是较灵敏的检测方式,但是实验成本较高,并且不同流动相组成对待测成分的离子化能力和基质效应的影响有很大差别,这可能是造成不同文献报道的检测灵敏度差异很大的主要原因。Zhao Y 等建立的 LC-MS/MS 检测方法,对槲皮素、山柰酚和异鼠李素的检测限达到 0.137, 0.137, 0.4 ng·mL⁻¹^[11],但 Nielsen SE 等报道的 LC-MS/MS 方法 LLOQ 只达到 3.4~17 ng^[12]。由于黄酮类成分具有多个酚羟基而易被氧化,本文尝试采用高效液相色谱-电化学 (HPLC-ECD) 检测方式建立高灵敏度并且操作简单的银杏叶黄酮类成分的体内分析方法,能够适用于低剂量灌胃后银杏黄酮在大鼠体内的药代动力学研究。

1 仪器、试剂与材料

美国 ESA 公司 HPLC-ESA 系统,组成部件有二元高压泵 (ESA model 582)、电化学检测器 (ESA model 5600A Coul array detector)、检测池 (ESA model 5011 Analytical cell)。

银杏叶提取物由中国中医科学院西苑医院实验研究中心化学室提取制备,其中总黄酮含量 (g/g) 为 4.5%;槲皮素、异鼠李素和山柰酚的含量分别为 20.0%、3.5%、15.9%;总内酯含量为 15%;提取物

批号 051116,对照品异鼠李素 (批号 200406) 和山柰酚 (批号 200405) 购自中国药品生物制品检定所,槲皮素 (批号 015k1225,纯度 > 98%) 和葡萄糖醛酸苷水解酶 (批号 015k3785, 98000 U·mL⁻¹) 为 Sigma 公司产品。流动相用甲醇、异丙醇 (美国 Fisher 公司) 以及磷酸和磷酸二氢钠 (美国 J.T. BAKER 公司) 均为 HPLC 级,其他试剂为分析纯。

实验动物:Wistar 大鼠,雄性,体重为 (220 ± 10) g 中国医学科学院动物实验研究中心,许可证号:SCXY (京) 2004-000 L。

2 实验方法

2.1 色谱条件 采用高效液相色谱-电化学方法分析血浆样品。分析柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱,预柱为 Eclipse XDB-C₈ (12.5 mm × 4.6 mm, 5 μm) 柱,流动相为甲醇-异丙醇-磷酸盐缓冲液 (50 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液以磷酸调节至 pH = 2) (15:15:70),流速 0.8 mL·min⁻¹,柱温 30 °C;检测器检测电压 200 mV,进样器温度 4 °C,进样量 20 μL。

2.2 样品采集 5 只健康雄性 Wistar 大鼠,实验前禁食 12 h,自由饮水。按 10 mg·kg⁻¹ 剂量 (银杏叶提取物临床每日剂量折算) 灌胃给予银杏叶提取物,给药前 (0 h) 和给药后 0.167, 0.333, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 h 经大鼠尾静脉采血约 0.5 mL,置肝素化离心管中,3000 r·min⁻¹ 离心 15 min,精密吸取上层血浆 200 μL,加入 0.2 mol·L⁻¹ 醋酸盐缓冲液 (pH = 4.6) (0.2 mol·L⁻¹ 醋酸钠和醋酸以 4:69:5:10 体积比混合) 120 μL,混匀后置 -30 °C 冰箱保存待测。实验期间自由饮水,给药 12 h 后自由进食。

2.3 血浆样品的前处理 37 °C 水浴解冻样品后,加入 980 U·mL⁻¹ 葡萄糖醛酸苷水解酶 [以 0.2 mol·L⁻¹ 醋酸盐缓冲液 (pH = 4.6) 稀释 98000 U·mL⁻¹ 葡萄糖醛酸苷水解酶而得] 80 μL,37 °C 振荡水浴下水解 30 min,加入丙酮 600 μL 终止反应。涡旋 2 min 后,10000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液 850 μL,50 °C 下氮气吹干,加入流动相 85 μL 溶解,15000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液进样分析。

3 方法学评价

3.1 专属性 取空白大鼠血浆,按“2.3”项下方法处理后进样分析,得到空白血浆色谱图见图 1-A; 3 个黄酮类对照品溶于流动相后进样分析,得到对照品的图谱见图 1-B; 抽取给药后生物样品 1 份,按“2.3”项下方法处理后进样分析,得到生物样品图见图 1-C。由

图可见在本文分析方法下, 空白血浆的内源性物质不干扰槲皮素、异鼠李素和山柰酚的测定, 且给药后生物

样品和对照品在相同位置出峰, 说明该分析方法对大鼠血浆中 3 个黄酮类成分有专属性。

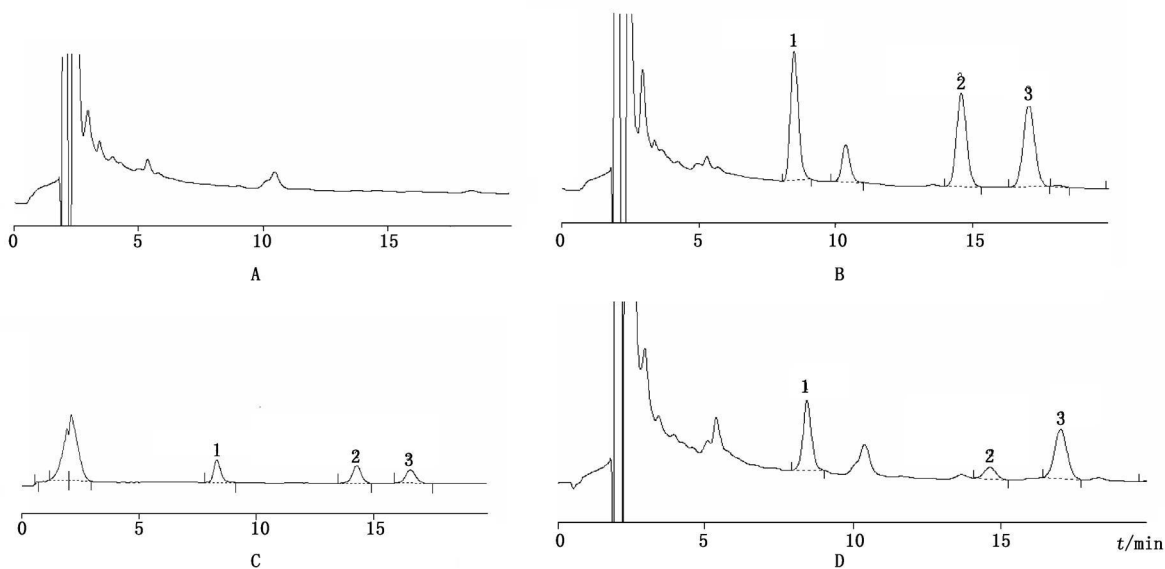


图 1 色谱图

Fig 1 Chromatograms

A. 空白血浆 (blank plasma) B. 空白血浆外加槲皮素、异鼠李素和山柰酚 (blank plasma spiked with quercetin, isohannettin and kaempferol)
C. 槲皮素、异鼠李素和山柰酚对照品溶液 [quercetin, isohannettin and kaempferol dissolved in mobile phase ($20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)] D. 大鼠灌胃 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 银杏叶提取物后 10 min 的血浆样品 (rat plasma sample 10 min after single intragastric administration of $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ *Ginkgo biloba* extracts)

1 槲皮素 (quercetin) 2 异鼠李素 (isohannettin) 3 山柰酚 (kaempferol)

3.2 线性关系考察 分别精密称取槲皮素、异鼠李素和山柰酚各 1.0 mg 以甲醇定容至 10 mL , 作为混合对照品储备液。以流动相稀释储备液 100 倍, 配制 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。在 $450 \mu\text{L}$ 空白大鼠血浆中精密加入对照品溶液 $50 \mu\text{L}$, 再以空白血浆逐级稀释, 配制成 $0.5, 1, 5, 10, 50, 100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列浓度的对照品血浆。精密吸取对照品血浆 $200 \mu\text{L}$, 加入 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 醋酸盐缓冲液 ($\text{pH} = 4.6$) $120 \mu\text{L}$, 按“2.3”项下方法处理后进样分析。以峰面积 Y 为纵坐标, 对照品浓度 X 为横坐标, 采用加权最小二乘法作直线回归, 权重为 $1/X$, 计算得到槲皮素、异鼠李素、山柰酚回归方程分别为:

$$Y = 15.70X - 2.130 \quad r = 0.9995$$

$$Y = 13.81X + 3.354 \quad r = 0.9994$$

$$Y = 13.86X + 0.9663 \quad r = 0.9995$$

3.3 稳定性试验 以空白血浆配制槲皮素、异鼠李素和山柰酚对照品血浆, 配制后立即按照“2.3”项下方法处理, 进样测定峰面积, 作为 0 h 的峰面积 A_0 ; 对照品血浆配制后, 于室温下放置 2 h 再按照“2.3”项下方法处理, 进样测定峰面积 A_1 ; 将对照品

血浆按“2.3”项下方法处理后在室温下放置 24 h, 进样测定峰面积 A_2 ; 对照品血浆放置 $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱 30 d 后按“2.3”项下方法处理, 进样测定峰面积 A_3 。结果 A_1, A_2, A_3 分别与 A_0 比较, 偏差均在 15% 以内。

3.4 提取回收率试验 在标准曲线范围内选择高、中、低 3 个浓度 ($100, 10, 1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 以空白血浆配制相应对照品血浆, 每个浓度 5 份; 同时配制相同浓度的以流动相为基质的对照品溶液。对照品血浆在经考察的样品稳定期内, 按照“2.3”项下方法处理后进样测定, 对照品溶液直接进样分析。对照品血浆测定值和对照品溶液测定值之比为提取回收率。结果见表 1。3 个成分在 3 个浓度下的提取回收率差值均在 11% 以内, 说明高、中、低浓度下回收率基本一致。

3.5 精密度和准确度试验 选择高、中、低 3 个浓度 ($100, 10, 1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$), 在 1 d 内不同时间和连续 3 d 时间, 以空白大鼠血浆配制相应对照品血浆, 每个浓度 5 份, 按照“2.3”项下方法处理后进样分析, 计算浓度, 求得本法的准确度和精密度, 结果见表 1。

表 1 大鼠血浆中槲皮素、异鼠李素和山柰酚提取回收率、精密度和准确度的测定结果

Tab 1 Determination results of extraction recovery accuracy and precision of quercetin, isorhamnetin and kaempferol in rat plasma

成分 (component)	浓度 (concentration) /ng·mL ⁻¹	提取回收率 (extraction recovery) % (n=5)	准确度 (accuracy) % (n=5)	精密度 (precision)	
				日内 (intra-day) RSD % (n=5)	日间 (inter-day) RSD % (n=15)
槲皮素 (quercetin)	1	88.9	105.3 ± 4.80	4.6	3.1
	10	85.4	92.7 ± 4.54	4.9	6.5
	100	88.9	101.2 ± 1.40	1.4	1.4
异鼠李素 (isorhamnetin)	1	81.5	97.9 ± 4.78	5.4	7.6
	10	85.1	100.0 ± 8.03	4.6	14.1
	100	91.9	100.6 ± 1.21	1.9	6.7
山柰酚 (kaempferol)	1	81.3	95.4 ± 5.29	6.6	7.8
	10	91.5	98.9 ± 4.02	5.7	7.8
	100	88.4	100.1 ± 1.16	1.8	3.5

4 银杏叶提取物在大鼠的体内药代动力学

按“2.2”项下方法采集大鼠灌胃给予银杏叶提取物 10 mg·kg⁻¹后不同时间的血浆样品,按“2.3”

项下方法处理后进样分析,测定 0~24 h 各时间点槲皮素、异鼠李素和山柰酚的血药浓度,绘制时间-浓度曲线,见图 2。

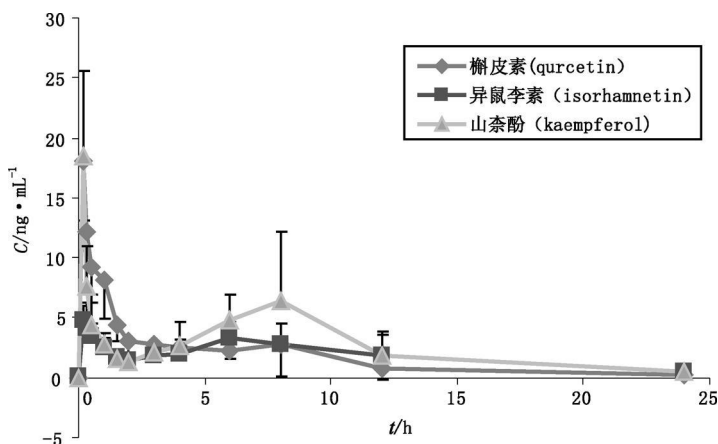


图 2 单次灌胃给予大鼠 10 mg·kg⁻¹银杏叶提取物后血浆中的槲皮素、异鼠李素和山柰酚的平均血药浓度-时间曲线 (n=5)

Fig 2 Mean plasma concentration-time curves of quercetin, isorhamnetin and kaempferol in rat plasma after five male rats received single intragastric administration of 10 mg·kg⁻¹ *Ginkgo biloba* leaf extracts (n=5)

结果显示 3 个黄酮类成分在大鼠血浆中浓度较低,都显示明显的 2 次达峰现象,最高峰浓度均低于 20 ng·mL⁻¹。给药后很快达到第 1 个峰,平均达峰时间均小于 20min,而第 2 个峰在 6h 左右,第 1 个峰浓度均高于第 2 个峰浓度,其中槲皮素和山柰酚的第 1 个峰浓度较高,根据血药浓度-时间数据,采用非房室模型经 DAS 2.0 软件计算得到银杏叶提取物 10 mg·kg⁻¹灌胃给药后 3 个黄酮苷元的药代动力学参数见表 2。3 个黄酮类成分的曲线下面积相差不大,但是槲皮素的平均滞留时间 (MRT_{0-t}) 只有 4.9 h,远小于异鼠李素和山柰酚。异鼠李素的末端消除半衰期 (t_{1/2β}) 较槲皮素和山柰酚更长,达到 6.94 h。

表 2 灌胃给予大鼠银杏叶提取物 10 mg·kg⁻¹后槲皮素、异鼠李素和山柰酚的平均药代参数 (平均值 ±SD, n=5)

Tab 2 Mean pharmacokinetic parameters of quercetin, isorhamnetin and kaempferol in rat plasma after single intragastric administration of 10 mg·kg⁻¹ *Ginkgo biloba* extracts (mean ±SD, n=5)

药代参数 (parameter)	槲皮素 (quercetin)	异鼠李素 (isorhamnetin)	山柰酚 (kaempferol)
AUC _{0-t} /ng·h·mL ⁻¹	43.03 ± 21.93	41.34 ± 27.01	58.28 ± 39.80
MRT _{0-t} /h	4.99 ± 1.41	7.94 ± 1.31	7.13 ± 1.23
t _{1/2β} /h	3.53 ± 1.88	6.94 ± 4.05	3.97 ± 2.30
T _{max1} /h	0.17 ± 0.00	0.23 ± 0.08	0.17 ± 0.00
C _{max1} /ng·mL ⁻¹	18.11 ± 5.02	5.37 ± 2.03	18.52 ± 7.00
T _{max2} /h	5.20 ± 2.32	5.60 ± 0.80	6.80 ± 1.10
C _{max2} /ng·mL ⁻¹	4.03 ± 1.94	3.57 ± 1.55	7.25 ± 5.64

5 讨论

电化学检测方法是根据电化学原理和物质的电化学性质进行检测的。在液相色谱中,它可以检测出所有电活性物质。由于酚羟基容易被氧化,在电化学检测下有良好的相应信号,我们曾应用在丹参中活性成分丹酚酸 B 的药代研究中,取得良好实验结果^[13]。黄酮成分同样也具有酚羟基结构,因此本实验尝试采用电化学检测建立灵敏的体内分析方法。本试验比较了 200 300 400 500 mV 不同检测电压对信号的影响,发现在 200 mV 电压下,异鼠李素和山柰酚的反应较完全,槲皮素随着电压增大,信号增强明显,但是在较低电压下有更强的抗空白基质干扰能力,因此选择检测电压为 200 mV。与紫外检测方式相比,本实验中所测定的黄酮类成分在电化学检测方式下灵敏度提高了约 100 倍,血浆中槲皮素、异鼠李素和山柰酚的定量下限达到 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,使得在较低给药剂量下能够检测到 24 h 内血浆中的 3 种黄酮类成分。

实验中曾使用不同比例流动相甲醇-磷酸盐缓冲液和乙腈-磷酸盐缓冲液进行分离,但是无法去除血浆中内源性物质干扰,因此尝试加入改性剂改善分离。由于常用改性剂四氢呋喃通过电化学检测池时会被氧化使基线噪音升高,因此采用异丙醇作为改性剂,经过优化筛选后确定最终流动相为甲醇-异丙醇-磷酸盐缓冲液($\text{pH} = 2$) (15: 15: 70)。

有研究表明给予银杏叶提取物后,在大鼠体内检测不到黄酮苷和苷元^[5],但是用葡萄糖醛酸苷水解酶水解后在检测到低浓度的黄酮苷元槲皮素、异鼠李素和山柰酚^[6],说明药物成分在体内主要以 II 相代谢产物存在。本试验考察了 pH 、酶浓度和反应时间对水解产物的影响,发现在葡萄糖醛酸苷水解酶终浓度为 $198 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, pH 为 4.6 条件下反应 30 min 得到黄酮苷元的量最大。实验发现 3 个黄酮苷元在大鼠体内都呈现双峰,这与 Zhao Y 等^[11]在比格犬、汪凤梅等^[8]在家兔体内测得数据一致。双吸收峰的产生与黄酮糖苷类成分特殊的吸收机制有关。Hollman 等^[14]研究显示结合不同糖基的槲皮素苷吸收程度和达峰时间不同,槲皮苷的吸收部位主要在小肠,而芦丁主要在回肠去糖基后吸收。银杏叶提取物由槲皮素、异鼠李素和山柰酚等多种糖苷组成,本文研究结果也提示部分黄酮苷类成分在消化道上部迅速被吸收,而部分在消化道下部经肠内菌代谢后再吸收,不同糖苷在不同部位的吸收可能是造成了双吸收峰现象的主要原因。

参考文献

- 1 Beek TA V, Scheeren HA, Meijer WC. Determination of ginkgolides and bilobalide in *Ginkgo biloba* leaves and phytopharmaceuticals. *J Chromatogr A*, 1991, 543: 375
- 2 Kubota Y, Tanaka N, Umegaki K, et al. Ginkgo biloba extract-induced relaxation of rat aorta is associated with increase in endothelial intracellular calcium level. *Life Sci*, 2001, 69(20): 2327
- 3 Horakova L, Licht A, Sandig G, et al. Standardized extracts of flavonoids increase the viability of PC12 cells treated with hydrogen peroxide: effects on oxidative injury. *Arch Toxicol*, 2003, 77(1): 22
- 4 Dell'Agli M, Bosio E. Flavonoids of *Ginkgo biloba* stimulate lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Planta Med*, 2002, 68(1): 76
- 5 Pietta PG, Gardana C, Mauri R, et al. Identification of *Ginkgo biloba* flavonol metabolites after oral administration to humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1997, 693(1): 249
- 6 Watanabe CM, Wollfiam S, Ader P, et al. The in vivo neuroprotective effects of the herbal medicine *Ginkgo biloba*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(12): 6577
- 7 Wang FM, Yao TW, Zeng S. Determination of quercetin and kaempferol in human urine after orally administered tablet of *Ginkgo biloba* extract by HPLC. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 33(2): 317
- 8 WANG Feng-mei (汪凤梅), ZHOU Li (周莉), YAO Tong-wei (姚彤伟), et al. Determination of quercetin and kaempferol in rabbit plasma by HPLC (高效液相色谱法测定口服银杏制剂后兔血中槲皮素和山柰酚浓度). *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2005, 25(01): 10
- 9 Watson DG, Oliveira EJ. Solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of kaempferol and quercetin in human urine after consumption of *Ginkgo biloba* tablets. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999, 723(1-2): 203
- 10 Dubber M J, Sewram V, Mshicileli N, et al. The simultaneous determination of selected flavonol glycosides and aglycones in *Ginkgo biloba* oral dosage forms by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 37(4): 723
- 11 Zhao Y, Li W, Bao Y, et al. A sensitive method for the detection and quantification of Ginkgo flavonols from plasma. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(6): 971
- 12 Nielsen SE, Freese R, Comett C, et al. Identification and quantification of flavonoids in human urine samples by column-switching liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Anal Chem*, 2000, 72(7): 1503
- 13 GAO Rui (高蕊), ZHANG Ying (张颖), WANG Shu-chen (王书臣), et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics research on salvia B in healthy volunteers (丹参酚酸盐在健康志愿者的药代动力学和药效学研究). *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2004, 9(11): 1209
- 14 Hollman PC, Bijman MN, Van Ganeren Y, et al. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res*, 1999, 31(6): 569

(本文于 2010 年 11 月 18 日修改回)