

原儿茶酸在鸡组织中的残留消除规律

肖红芝 韩娥 郭永霞 李佳 韩振海 文鹏程 何诚*

(中国农业大学 动物医学院,北京 100193)

摘要 为研究原儿茶酸在鸡组织中残留消除规律,利用高效液相色谱法(HPLC)在260 nm处检测原儿茶酸在鸡组织中残留情况,确定流动相体积比为乙腈:水=9:91,用 H_3PO_4 调pH至2.5。结果表明:试验测得鸡肝、肾、肌肉、皮肤和脂肪中检测限分别为13.5、25.0、12.0和16.0 ng/g,定量限为45、85、40和50 ng/g;平均加标回收率为63.30%~102.65%,变异系数为1.01%~11.43%。以临床推荐剂量20 mg/kg(体重)口服给药,每天2次,连续5 d,肾脏、肝脏中原儿茶酸的残留量最高,皮肤和脂肪、肌肉中残留量较低。停药4 h后,各组织中原儿茶酸残留量均低于最高残留限量(肝脏1.52 mg/g,肾脏3.05 mg/g,肌肉0.51 mg/g,皮肤和脂肪3.05 mg/g)。试验结果表明,原儿茶酸在鸡组织中的残留消除较快,新药休药期的制定应根据具体情况进一步研究确定,目前初步建议休药期为0 h。

关键词 鸡组织;原儿茶酸;残留;消除;高效液相色谱法

中图分类号 S859.84

文章编号 1007-4333(2017)05-0075-07

文献标志码 A

Residue depletion of protocatechuic acid in chicken tissues

XIAO Hongzhi, HAN E, GUO Yongxia, LI Jia, HAN Zhenhai, WEN Pengcheng, HE Cheng*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The research objective was to study the tissue residues of protocatechuic acid (PCA) in chicken. A high-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to detect and determine the PCA residues at 260 nm in chicken tissues. The mobile phase of HPLC was composed of acetonitrile and water with the volume ratio of 9:91 and adjusted to pH 2.5 with H_3PO_4 . The limits of detection (LOD) were 13.5, 25.0, 12.0, 16.0 ng/g, and the limits of quantitation (LOQ) were 45, 85, 40 and 50 ng/g for liver, kidney, muscle, fat and skin, respectively. Average recoveries were ranged from 63.30% to 102.65%, and coefficients of variance were ranged from 1.01% to 11.43%. After the chickens were orally administered successively of 20 mg PCA per kg of body weight twice every day for 5 days, the residue levels were higher in liver and kidney and lower in muscle, fat and skin. Concentrations of PCA in tissues were all lower than the maximum residue level (MRL) at 4 h after final administration. The results indicated that there existed a rapid depletion of PCA in chicken tissues. Although we suggested the withdrawal period of PCA should be 0 hour, the withdrawal period of new medicine should be made based on the national specific situation.

Keywords chicken tissues; protocatechuic acid; residue; depletion; HPLC

近几年动物源性食品中兽药残留问题得到社会的广泛关注,兽药残留不仅直接影响人体健康,还会对生态环境造成不良影响,影响养殖业的发展,及制约动物性食品的出口^[1]。原儿茶酸是从乌梅中分离纯化得到一种单体酚酸类化合物,能有效提高鸡、小

鼠的免疫功能,口服后可以防治鸡法氏囊病毒和 H_9N_2 禽流感病毒的感染^[2],具有体外抑制多种病原微生物,体内防治致病性大肠杆菌感染的功效^[3],国内外文献均显示原儿茶酸在畜禽疾病的防治中具有良好的开发前景^[4-6]。前期报道原儿茶酸在鼠、兔

收稿日期:2016-05-11

基金项目:北京地区高校大学生创业优秀团队资助

第一作者:肖红芝,硕士研究生,E-mail:xiaohongzhi1992@163.com

通讯作者:何诚,教授,主要从事畜禽疾病诊断与防治,E-mail:hecheng@cau.edu.cn

体内的药动学研究^[7-9],但是在鸡组织中残留消除规律的研究尚未报道。本试验以高效液相色谱法(HPLC)技术,检测原儿茶酸在鸡组织中残留,并初步制定安全合理的休药期,旨在为原儿茶酸作为新兽药应用于临床提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物

16日龄AA健康肉鸡60只,雌雄各半,由北京肉鸡生产联营公司提供。

1.1.2 试验药品与试剂

原儿茶酸标准品(含量>98%,批号:lot.P5WOM-1L)购于梯希爱(TCI)(上海)化成工业发展有限公司;乙腈(色谱纯)购自赛默飞世尔科技有限公司;乙酸乙酯(分析纯)、高氯酸(分析纯)、氯化钠(分析纯)、磷酸(分析纯)、聚乙二醇400均购自北京国药集团化学试剂有限公司;无水乙醇(分析纯)购自北京化工厂;超纯水(分析纯)购自北京广达恒益科技有限公司。

1.1.3 主要仪器设备

高效液相色谱仪(LC-20AT),日本岛津公司;高通量组织研磨器(SCIENTZ-48),宁波新芝生物科技股份有限公司;氮吹仪(UGC-12WF),北京优晟联合科技有限公司;高速低温离心机(TGL-16M),湖南湘鹰离心机公司;pH计(PB-10),德国Sartorium公司。

1.1.4 主要溶液的配制

原儿茶酸标准贮备液的配制:准确称取(0.010±0.0005)g原儿茶酸标准品溶于100mL容量瓶中,用流动相溶解并定容,4℃保存。

10%原儿茶酸口服液的配制:准确称取5g原儿茶酸标准品于50mL的容量瓶中,先加入8.3mL聚乙二醇400和5mL无水乙醇,最后加水至刻度线处,超声使其完全溶解。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计

60只肉鸡随机分为空白对照组(12只)和试验组(48只)。试验组按照原儿茶酸20mg/kg(体重)口服给药,2次/d,连续给药5d,空白组饲喂不含原儿茶酸及其类似物的全价饲料。在停药后4、24、48、72、96和144h的每个时间点随机选择8只鸡经颈静脉放血快速致死,取其胸肌、肝脏、肾脏、皮肤和

脂肪单独包装于干净的器皿中,做好标记,置于-20℃冰箱中保存,待测。

1.2.2 样品的前处理

取出组织经解冻后,剪碎并用研磨器初步研磨组织,称取已研磨组织(0.50±0.02)g,加入0.5mL生理盐水15000r/min匀浆1min,加入50μL10%高氯酸,涡旋振荡1min,再加4mL乙酸乙酯,涡旋振荡2min,3500r/min离心15min,取上清液。沉淀中再加3mL乙酸乙酯,涡旋振荡2min,3500r/min离心15min,合并2次上清。40℃氮气流吹干合并的上清,残渣用500μL流动相复溶,12000r/min离心10min取上清过0.22μm有机滤膜,取20μL进HPLC分析。

1.2.3 检测条件

检测波长260nm;流速1.0mL/min;柱温25℃;进样量20μL,手动进样,流动相:V(水):V(乙腈)=91:9(磷酸调pH至2.5);色谱柱:Shim-pack VP-ODS C18(4.6mm×250mm,5μm)。

1.2.4 标准曲线的绘制

用流动相将原儿茶酸标准贮备液稀释成20、50、100、200、500、1000和2000ng/mL的标准工作液,以原儿茶酸的浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制原儿茶酸标准曲线。

1.2.5 定量限和检测限的测定

取空白的肾脏、肝脏、皮肤和脂肪和肌肉样品,添加一定浓度标准品后,按照1.2.2所述的样品前处理方法处理样品,测得基线噪音值,以信噪比S/N=3为检测限(LOD),S/N=10为定量限(LOQ)。

1.2.6 回收率和精密度测定

称取(0.50±0.02)g空白匀浆组织(肝、肾、皮肤和脂肪和肌肉)各3份,添加标准溶液后,肌肉和皮肤和脂肪组织中原儿茶酸质量分数分别为40、100、200μg/kg,肝脏和肾脏中为50、250、500μg/kg。按1.2.2所述的样品前处理方法处理之后,取20μL进HPLC检测,同时以相应浓度的原儿茶酸标准工作液20μL进HPLC检测,计算回收率和变异系数,连续测3d,计算日间精密度和变异系数。

回收率的计算公式:

$$\text{回收率} = S/S_0 \times 100\%$$

式中:S为预处理后样品中原儿茶酸的实测峰面积;S₀为对应质量浓度的原儿茶酸的峰面积。

1.2.7 试样中原儿茶酸含量的计算

样品中原儿茶酸的计算方法：

$$Con(ng/g) = [(S - B) \times V] \times F / (K \times M)$$

式中：S 为原儿茶酸的峰面积；B 为标准曲线的截距；K 为标准曲线的斜率；V 为提取样品最终定容体积；M 为样品的量；F 为稀释因子。

1.2.8 最高残留限量的制定

根据相关文献报道^[10-12]，兽药最高残留限量(MRL)的确定由：1)最大无毒性作用剂量(No observed effect level, NOEL)；2)每日允许摄入量(Acceptable Daily Intake, ADI)；3)组织消费量，按照 WTO 推荐制定。其中 NOEL 是根据兽药的三性(急性、亚慢性、慢性)和三致试验(致突变、致畸胎、致癌)结果所得，ADI=NOEL/安全因子。其中如果 NOEL 是根据急性实验得到的，安全因子为

1 000；如果 NOEL 是根据慢性实验得到的，安全因子则为 100。

$$MRL = (ADI \times 60 / (kg/d)) / (组织消费量/d)$$

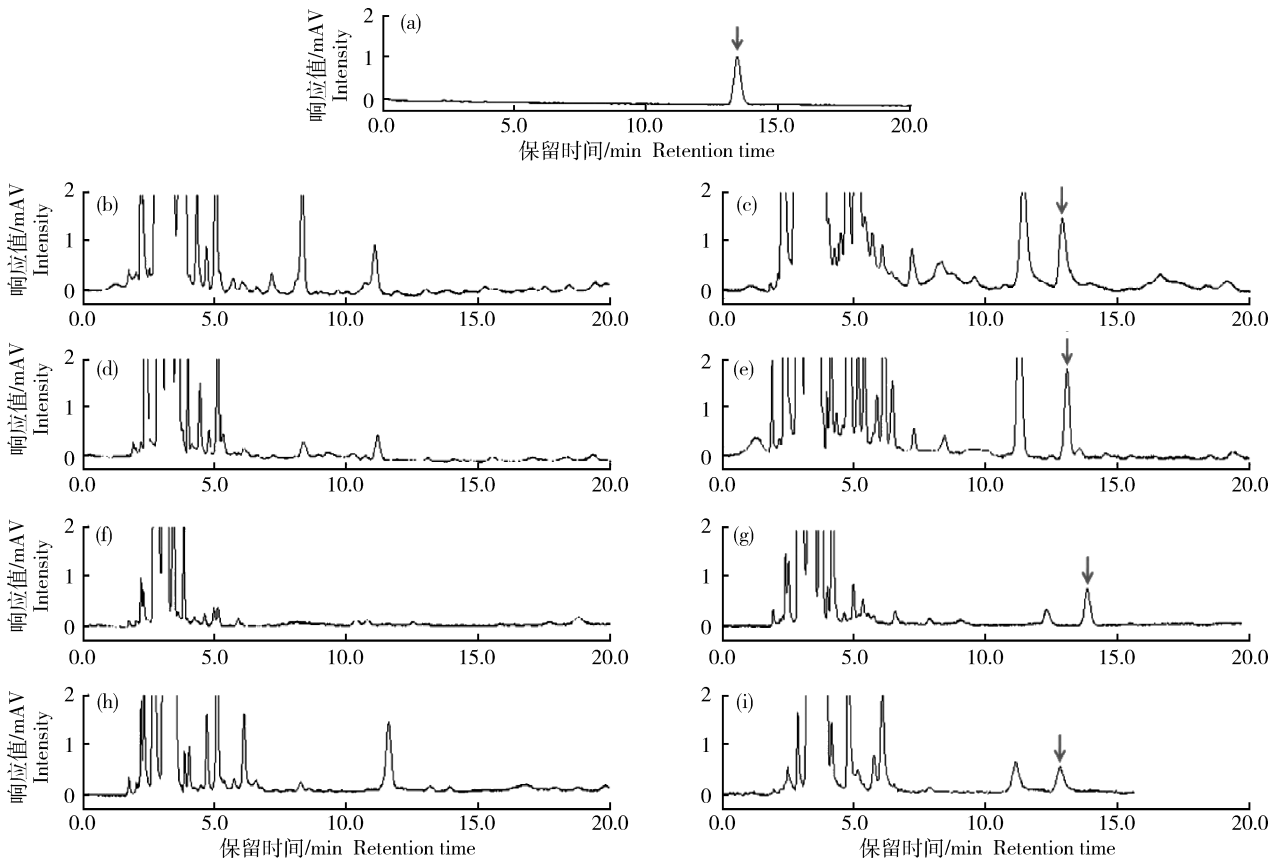
1.2.9 鸡组织中原儿茶酸残留量的测定

按照上述 1.2.1 的采取鸡肝、肾、肌肉、皮肤和脂肪组织，经 1.2.2. 进行样品处理后，由 1.2.3 中的高效液相色谱的检测条件对其组织中的残留量进行分析，并根据标准曲线及相应的 1.2.7 中的计算公式对组织中原儿茶酸的残留量进行定量分析。

2 结果

2.1 色谱分离

原儿茶酸的分离度良好，保留时间均集中在 13.5 min 左右，空白组织经提取之后，原儿茶酸保留时间附近无干扰峰出现，见图 1 所示。



(a)原儿茶酸对照品(0.2 μg/mL)；(b)空白肾脏；(c)添加肾脏样品(0.5 μg/g)；(d)空白肝脏；(e)添加肝脏(0.5 μg/g)；(f)空白肌肉；(g)添加肌肉样品(0.1 μg/g)；(h)空白皮肤和脂肪；(i)添加肌肉样品(0.1 μg/g)。

(a) PCA control sample(0.2 μg/mL)；(b) Negative samples from the kidney；(c) Fortified sample from the kidney(0.5 μg/g)；(d) Negative samples from the liver；(e) Fortified samples from the liver(0.5 μg/g)；(f) Negative samples from the muscle；(g) Fortified samples from the muscle (0.1 μg/g)；(h) Negative samples from the skin；(i) Fortified samples from the skin(0.1 μg/g)。

图 1 鸡组织中原儿茶酸检测的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of PCA in chicken tissues

2.2 标准曲线

分别取 20、50、100、200、500、1 000 和 2 000 ng/mL 的标准工作液 20 μ L,按质量浓度由小到大的顺序进 HPLC 检测,以原儿茶酸浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线(图 2)。标准曲线方程为: $y=90.946x+1\ 531.600$, $R^2=0.999\ 63$ 显示在 20~2 000 ng/mL 的质量浓度范围内,原儿茶酸色谱峰面积与质量浓度呈良好的线性相关。若样品质量浓度超过了此范围,则应将样品作适当稀释后再进行分析。

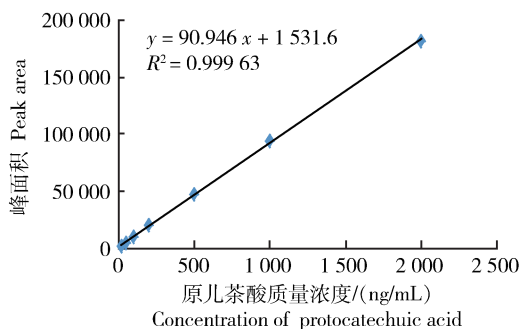


图 2 原儿茶酸标准曲线

Fig. 2 Standard curve of protocatechuic acid

2.3 检测限及定量限

按信噪比 $S/N=3$ 为 LOD, $S/N=10$ 为 LOQ,

测得鸡肝、肾、肌肉、皮肤和脂肪中检测限分别为 13.5、25.0、12.0 和 16.0 ng/g,定量限为 45、85、40 和 50 ng/g。

2.4 回收率及变异系数

由表 1 可知,空白肾脏中添加原儿茶酸 50、250 和 500 ng/g 3 个水平日内平均回收率为 81.03%~97.09%,日内变异系数为 2.09%~9.33%;日间平均回收率为 73.85%~102.65%,日间变异系数为 1.57%~7.88%。空白肝脏中日内平均回收率为 70.21%~96.38%,日内变异系数为 2.87%~5.17%;日间平均回收率为 64.11%~99.54%,日间变异系数为 1.82%~7.23%。空白肌肉添加原儿茶酸 40、100 和 200 ng/g 3 个水平日内平均回收率为 82.70%~98.77%,日内变异系数为 3.53%~5.80%;日间回收率为 81.08%~93.06%,日间变异系数为 3.73%~8.17%。空白皮肤和脂肪组织日内平均回收率为 74.36%~89.07%,日内变异系数为 3.57%~5.31%;日间平均回收率为 82.56%~106.79%,日间变异系数 8.70%~12.17%。根据农业部残留分析方法要求^[12],残留药物 <0.1 mg/kg 时,回收率应 $>60\%$,变异系数 $<20\%$;药物质量分数 >0.1 mg/kg 时,回收率应在 80%~110%之间,变异系数 $<15\%$ ^[9]。

表 1 鸡组织中原儿茶酸的添加回收率和变异系数($n=5$)

Table 1 Recovery and variation coefficients of protocatechuic acid in the chicken tissues ($n=5$)

样品 Sample	添加量/ (ng/g) Added	日内 Intraday		日间 Interday	
		平均回收率/% Average recovery	变异系数/% CV	平均回收率/% Average recovery	变异系数/% CV
肾脏	50	81.03	9.33	73.85	7.88
	250	97.09	5.56	102.65	1.57
	500	87.19	2.09	88.61	2.41
肝脏	50	70.21	2.87	64.11	7.23
	250	92.99	5.17	96.85	1.82
	500	96.38	3.62	99.54	4.17
肌肉	40	82.70	3.53	86.03	5.45
	100	98.77	5.80	93.06	3.73
	200	89.31	3.94	81.08	8.17
皮肤和脂肪	40	74.36	3.57	82.56	9.94
	100	86.46	4.76	92.01	8.70
	200	89.07	5.31	106.79	12.17

2.5 最高残留限量的制定

根据本试验前期进行的毒理学试验：急性、亚慢性实验、致突变、致畸胎，特殊毒性实验，其结果为急性毒性试验的对小鼠的 LD₅₀ 为 5 297 mg/kg，根据国家标准 GB15193. 3—2014^[13] 中的毒物毒性分级原则 LD₅₀ 大于 5 000 mg/kg 属于实际无毒。亚慢性试验显示以 1 024 mg/kg 剂量口服长期使用无显

著毒性，特殊毒性 (Ames 试验、原儿茶酸口服液的微核试验和精子畸形试验、原儿茶酸口服液的致畸试验) 试验结果均为阴性，且无致畸作用。综合上述试验，根据亚慢性实验中的最大耐受剂量为 2 538 mg/kg 确定为 NOEL，安全因子设为 100，根据 1. 2. 8 中的计算公式，计算出各组织中原儿茶酸的最高残留限量。如表 2 所示。

表 2 各组织最高残留限量

Table 2 Maximum residue level in chicken tissues mg/g

指标 Index	肝脏 Liver	肾脏 Kidney	肌肉 Muscle	皮肤和脂肪 Skin and fat
最高残留限量	1. 52	3. 05	0. 51	3. 05

2.6 原儿茶酸在鸡组织中的消除

不同时间点采取肝脏、肾脏、肌肉和皮肤和脂肪进行前处理后，进 HPLC 检测。外标法定量各个组织中原儿茶酸的含量，检测结果见表 3。肾脏中原

儿茶酸残留量最高，但消除速度较肝脏快，而皮肤和脂肪和肌肉组织中的残留量较低，下降趋势相对较为平缓。肝脏中原儿茶酸残留量较高，但是消除速度最慢。

表 3 鸡组织中原儿茶酸的残留量 (n=8)

Table 3 Determination of the PCA residues in the chicken tissues (n=8)

ng/g

时间/h Time	肝脏 Liver	肾脏 Kidny	皮肤和脂肪 Skin and fat	肌肉 Muscle
4	80. 65±3. 25	1 288. 52±3. 78	26. 49±4. 01	<LOQ
24	86. 13±6. 05	110. 73±6. 75	20. 24±4. 63	<LOQ
48	22. 29±3. 43	49. 43±2. 96	<LOQ	<LOQ
72	26. 68±2. 38	<LOQ	<LOQ	<LOQ
96	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
144	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

注：LOQ 为定量限。

Note: LOQ, limits of quantitation.

由图 3 可以看出，停药 4 h，肌肉中原儿茶酸残留量已低于检测限 LOD。停药 4 及 24、48 h，肾脏、肝脏、肌肉残留量为：肾脏 > 肝脏 > 肌肉。休药 96 h 各组织中原儿茶酸残留量均低于检测限。休药 4 h，肾脏中原儿茶酸的残留量最高，并在休药后 24 h 迅速降低。肝脏中残留量较高，且消除缓慢。根据本试验的前期研究得出的各组织最高残留限量 (表 2)，可以看出停药 4 h 原儿茶酸在各组织的残留量均远远低于最高残留限量。由此可以初步推断出原儿茶酸在各组织的休药期为 0 h，在鸡的休药期为 0 h。

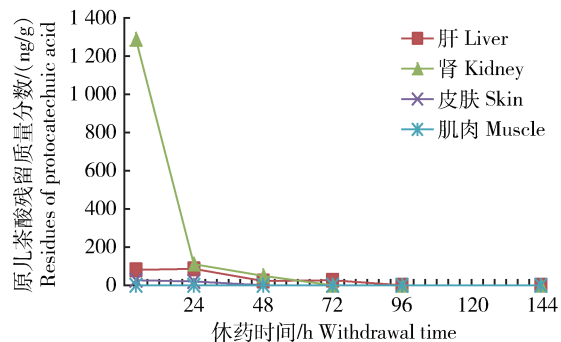


图 3 10%原儿茶酸口服液在鸡各种组织中的消除曲线
Fig. 3 Eliminating curve of 10%PCA in the chicken's tissues

3 讨论

3.1 色谱条件

本试验利用 $V(\text{乙腈}) : V(\text{水}) = 9 : 91$ (H_3PO_4 调 $\text{pH} 2.5$) 为流动相,检测波长 260 nm 。在此条件下峰形较为尖锐,分离度较好且保留时间恰当。结合相关文献记载的方法,比较了甲醇:水(15:85,醋酸调 $\text{pH} 2.8$)^[14],甲醇:0.2%甲酸水^[15]、乙腈:水(15:85,8 mmol/L 的己烷磺酸钠, $\text{pH} = 3$)^[16] 乙腈:水(9:91,磷酸调 $\text{pH} 2.5$)^[17] 等作为流动相。发现用乙腈:水(9:91,磷酸调节 pH 至 2.5 时)作为流动相时目标峰峰形更佳且与杂峰的分离效果好。另外,原儿茶酸在 260 和 295 nm 分别为第 1 和第 2 特征峰,本试验发现 260 nm 处不仅有最大吸收峰且受杂峰干扰较少,一定程度上提高了分析方法的准确度和灵敏度,因此最终选择 260 nm 作为检测波长。

3.2 组织样品前处理方法

本试验以 10% 高氯酸为蛋白沉淀剂,乙酸乙酯为提取剂处理样品,回收率较高,且峰型较为尖锐。结合相关文献^[3,8],尝试以 10% 高氯酸、盐酸、甲醇为蛋白沉淀剂处理组织样品,乙酸乙酯、乙醇、甲醇、甲醇-乙腈为提取剂。结果在选择蛋白沉淀剂时,发现盐酸和甲醇的蛋白变性效果均不理想,杂质较多、色谱峰形较为杂乱。故选择了 10% 高氯酸为蛋白质变性剂。在选择提取试剂时,用甲醇和甲醇-乙腈提取后的溶液浑浊含杂质较多,回收率较低,乙酸乙酯在提取原儿茶酸时,提取液较为干净透亮,且乙酸乙酯易挥发 40°C 氮气流可以短时间内吹干,浓缩效率较大,回收率也较高且安全无毒是理想中的提取试剂。

3.3 残留消除规律及休药期

本试验表明原儿茶酸在鸡肾脏、肝脏、肌肉和皮肤和脂肪中消除迅速,消除时间分别为 72、96、0 和 24 h。肌肉中几乎不存在原儿茶酸的残留,这与以大鼠、小鼠体内原儿茶酸残留的报道相吻合^[18-20]。试验中发现原儿茶酸在肾脏中的残留量最高,提示原儿茶酸主要通过肾脏进行代谢,肝脏中原儿茶酸含量虽较肾脏低,但消除时间比肾脏长,提示肝脏也是原儿茶酸的一个重要的代谢器官。此外,本试验发现个别后一个检测时间点的残留量高于前一个检测时间点残留量的现象,这可能与以下因素有关:1) 组织称量误差,2) 提取样品时没有充分震荡均匀导

致提取不够充分,3) 鸡口服样品的时间点不同,因此,必须保证在同一时间点让所有鸡只饮水机会均等。

目前尚缺少原儿茶酸的食品安全控制标准,根据原儿茶酸在鸡组织中的最高残留限量(MRL)与鸡体内的原儿茶酸的残留消除数据,可知该药安全性相当高,目前初步建议停药期为 0 h,但在实际生产中仍需要结合其他指标来确定其休药期时间。

参考文献 References

- [1] 刘彩,沈向荣,杨迪,张晓辉,宗昕如,王文超,鲍恩东. 磷酸替米考星在猪组织中的残留消除研究[J]. 中国农业大学学报, 2013,18(4):134-140
Liu C, Shen X R, Yang D, Zhang X H, Zong X R, Wang W C, Bao E D. Study on residue depletion of tilmicosin phosphate in swine tissues[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2013,18(4):134-140 (in Chinese)
- [2] 欧长波. 原儿茶酸防治 IBDV、AIV 的疗效及其促进免疫功能研究[D]. 北京:中国农业大学,2013
Ou C B. Efficacy of protocathechuic acid on IBDV and AIV and its immune enhancement functions [D]. Beijing: China Agricultural University, 2013 (in Chinese)
- [3] 陈曦. 原儿茶酸口服液的药学、安全性和药代动力学评价[D]. 北京:中国农业大学,2011
Chen X. Studies on pharmacy, safety and pharmacokinetic of protocathechuic acid oral liquid[D]. Beijing: China Agricultural University, 2011 (in Chinese)
- [4] Semaming Y, Pannengetch P, Chattipakorn S C, Chattipakorn N. Pharmacological properties of protocathechuic acid and its potential roles as complementary medicine[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015,2015:1-11
- [5] Yin X, Zhang X, Lv C, Li C, Yu Y, Wang X, Han F. Protocatechuic acid ameliorates neurocognitive functions impairment induced by chronic intermittent hypoxia [J]. *Scientific Reports*, 2015(5):14507
- [6] Kakkar S, Bais S. A Review on protocathechuic acid and its pharmacological potential [J]. *ISRN Pharmacology*, 2014, 2014:1-9
- [7] 杨丽丽,汪电雷,陶秀华,曹银,汪辰吟,陈金佩. 原儿茶酸在大鼠体内的药理学及组织分布[J]. 中国医院药学杂志, 2014(4): 263-266
Yang L L, Wang D L, Tao X H, Cao Y, Wang C Y, Chen J P. Pharmacokinetics and tissue distribution of protocathechuic acid in rats[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2014(4): 263-266 (in Chinese)
- [8] 蔡文涛,柳力,陈勇,韩凤梅. 原儿茶酸在大鼠血浆中的药代动力学研究[J]. 湖北大学学报:自然科学版, 2010, 32(1): 98-100, 111

- Cai W T, Liu L, Chen Y, Han F M. Study on pharmacokinetics of protocatechuic acid in rats plasma [J]. *Journal of Hubei University: Natural Science*, 2010, 32 (1): 98-100, 111 (in Chinese)
- [9] 杨洁, 王世祥, 兰薇, 刘春芝, 郑晓晖. 冰片对原儿茶酸在家兔体内药动学的影响[J]. 中国中药杂志, 2009(9): 1141-1143
Yang J, Wang S X, Lan W, Liu C Z, Zheng X H. Effects of borneol on protocatechuic of protocatechuic acid in rabbits[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009 (9): 1141-1143 (in Chinese)
- [10] 李俊琐, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002
Li J S, Qiu Y M, Wang C. *Veterinary Drug Residue Analysis* [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2002 (in Chinese)
- [11] 吴永宁, 邵兵, 沈建忠. 兽药残留检测与监控技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007
Wu Y N, Shao B, Shen J Z. *The Technology of Detection and Control on Veterinary Drugs* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007 (in Chinese)
- [12] 中国兽医药品监察所. 兽药管理政策法规选编[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007
China Institute of Veterinary Drug Control. *Selected Management Policies and Regulations of Veterinary Drugs* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007 (in Chinese)
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB15193. 3—2014 食品安全国家标准急性经口毒性试验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014: 32
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB15193. 3—2014 National standards of food safety Acute oral toxicity test [S]. Beijing: Standards Press of China, 2014: 32
- [14] 王治平, 杨柯, 孟祥平, 李久香, 王一飞. RP-HPLC法测定滇桂艾纳香中原儿茶酸与原儿茶醛的含量[J]. 中药材, 2005, 28 (5): 393-394
Wang Z P, Yang K, Meng X P, Li J X, Wang Y F. Simultaneous determination of protocatechuic acid and protocatechuic aldehyde in herba blumeae ripariae by RP-HPLC[J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2005, 28 (5): 393-394 (in Chinese)
- [15] 张前. “丹参-降香”君-使对药药代动力学及作用物质基础研究[D]. 西安: 西北大学, 2010
Zhang Q. Study on substantial basis of effects of *Jun-Shi* couple herb of *Salvia miltiorrhiza-dalbergiaodorifera* [D]. Xi'an: Northwest University, 2010 (in Chinese)
- [16] 柳力. 拉米夫定与原儿茶酸药物组合在大鼠体内的药动学研究[D]. 武汉: 湖北大学, 2010
Liu L. Pharmacokinetic studies on lamivudine and protocatechuic acid[D]. Wuhan: Hubei University, 2010 (in Chinese)
- [17] 韩英, 熊志立, 杨春娟, 刘曼, 李发美. 高效液相色谱法测定大鼠血浆中的原儿茶酸[J]. 色谱, 2007(2): 207-210
Han Y, Xiong Z L, Yang C J, Liu M, Li F M. Determination of protocatechuic acid in rat plasma by high performance liquid chromatography [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2007(2): 207-210 (in Chinese)
- [18] Ma F W, Deng Q F, Zhou X, Gong X J, Zhao Y, Chen H G, Zhao C. The tissue distribution and urinary excretion study of gallic acid and protocatechuic acid after oral administration of polygonum capitatum extract in rats[J]. *Molecules*, 2016, 21 (4): 399-413
- [19] Cao Y, Zhang L, Ma C, Chang B, Chen Y, Tang Y, Liu X, Liu X. Metabolism of protocatechuic acid influences fatty acid oxidation in rat heart: New anti-angina mechanism implication [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2009, 77(6): 1096-1104
- [20] Xu M, Zhang Z, Fu G, Sun S, Sun J, Yang M, Liu A, Han J, Guo D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of protocatechuic aldehyde and its phase I and II metabolites in rat[J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 856(1/2): 100-107

责任编辑: 苏燕