

# 橄榄苦苷与羟基酪醇的大鼠在体胃肠吸收比较

赵鑫, 张学兰\*, 姜秋, 李慧芬, 王集会, 吴鹏, 王均秀, 宋梦晗  
(山东中医药大学, 国家中医药管理局中药炮制技术传承基地, 济南 250355)

**[摘要]** **目的:**比较橄榄苦苷与其苷元羟基酪醇的大鼠在体胃肠吸收差异,分析橄榄苦苷在大鼠体内的代谢产物,为女贞子酒蒸增效机制研究提供科学依据。**方法:**采用大鼠在体胃肠灌注模型,以 HPLC 测定给药后不同时间点大鼠胃与小肠灌注流出液中橄榄苦苷和羟基酪醇的含量,流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min,10%~20% A;10~25 min,20%~35% A),检测波长 240 nm。计算二者的吸收速率常数和累计吸收率;通过已知橄榄苦苷、羟基酪醇对照品定位,分析橄榄苦苷在大鼠胃和小肠中的代谢产物。**结果:**羟基酪醇在大鼠胃和小肠中的吸收速率常数和累计吸收率均显著高于橄榄苦苷;在橄榄苦苷的大鼠胃和小肠代谢物中均检出羟基酪醇。**结论:**羟基酪醇较橄榄苦苷更利于机体吸收,橄榄苦苷在大鼠胃和小肠中均可代谢为羟基酪醇。

**[关键词]** 橄榄苦苷;羟基酪醇;在体胃肠吸收;酚红;女贞子

**[中图分类号]** R283.6;R284.1;R945;R969.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0006-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160006

## Comparison of Gastrointestinal Absorption of Oleuropein and Hydroxytyrosol in Rats

ZHAO Xin, ZHANG Xue-lan\*, JIANG Qiu, LI Hui-fen, WANG Ji-hui, WU Peng,  
WANG Jun-xiu, SONG Meng-han

(Heritage Base of Traditional Chinese Medicine (TCM) Processing Technology,  
State Administration of TCM, Shandong University of TCM, Ji'nan 250355, China)

**[Abstract]** **Objective:** To compare difference between gastrointestinal absorption of oleuropein and its aglycone (hydroxytyrosol) in rats, analyze metabolites of oleuropein in rats, and provide a scientific basis for research on synergistic mechanism of Ligustri Lucidi Fructus steamed with wine. **Method:** Gastrointestinal perfusion model of rats was used, contents of oleuropein and hydroxytyrosol in the gastrointestinal perfusion effluent of rats were detected by HPLC after administrating at different time points, absorption rate constant ( $K_a$ ) and cumulative absorption rate were calculated. The mobile phase was acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous solution for gradient elution, detection wavelength was set at 240 nm. By positioning of oleuropein and hydroxytyrosol reference, metabolites of oleuropein in rat's stomach and small intestine were determined. **Result:** Cumulative absorption rate in 4 h and  $K_a$  of hydroxytyrosol in rat stomach and small intestine were significantly higher than oleuropein. Hydroxytyrosol can be detected in rat stomach and intestine metabolites after pouring into oleuropein. **Conclusion:** Compared with oleuropein, hydroxytyrosol is more conducive to be absorbed by the body. Oleuropein can be metabolized into hydroxytyrosol both in rat stomach and small intestine.

**[Key words]** oleuropein; hydroxytyrosol; gastrointestinal absorption; phenol red; Ligustri Lucidi Fructus

女贞子味甘、苦,性凉,归肝、肾经,具有滋补肝肾、明目乌发的功效<sup>[1]</sup>。酒蒸可增强女贞子的滋补

**[收稿日期]** 20151121(006)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81373968)

**[第一作者]** 赵鑫,在读硕士,从事中药新药研发及中药炮制原理研究,Tel:18253170100,E-mail:137462537@qq.com

**[通讯作者]** \*张学兰,硕士生导师,教授,从事中药新药研发与中药炮制研究,Tel:0531-89628081,E-mail:zhang8832440@sina.com

肝肾作用,但其炮制增效的机制尚不明确。现代研究表明环烯醚萜苷类和苯乙醇类是女贞子的主要活性成分,环烯醚萜苷类成分主要有特女贞苷,oleoneuzhenide,女贞苷 G13,橄榄苦苷等<sup>[2]</sup>,苯乙醇类成分主要有红景天苷、松果菊苷、酪醇、羟基酪醇等。其中橄榄苦苷具有抗氧化、抗炎、抗癌、降血糖、抗菌的作用<sup>[3-5]</sup>。羟基酪醇具有抗炎、抗癌、降血糖、防治视网膜黄斑变性、抗骨质疏松的作用<sup>[6-11]</sup>。本课题组前期研究表明女贞子经酒蒸或清蒸后,橄榄苦苷含量显著降低,而羟基酪醇含量升高<sup>[12-13]</sup>;橄榄苦苷经模拟炮制后可水解生成羟基酪醇。目前,国内外学者对女贞子中部分成分的体内吸收代谢进行了研究<sup>[14]</sup>,但关于橄榄苦苷和羟基酪醇的体内吸收差异尚未见报道。本实验采用大鼠在体胃肠吸收模型,以 HPLC 测定橄榄苦苷和羟基酪醇在大鼠胃和小肠的吸收情况,比较二者的吸收差异,通过已知对照品定位,分析橄榄苦苷在大鼠胃和小肠中的代谢产物,为阐述女贞子酒蒸增效的炮制机制提供实验依据,为女贞子的相关新药研制提供参考。

## 1 材料

L-2000 型高效液相色谱仪(日本日立公司),HL-2 型恒流泵(苏州江东精密仪器有限公司),FA1604N 型 1/10 万电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。橄榄苦苷、羟基酪醇对照品(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为 20121020,20121112,纯度均 >98%),水合氯醛、酚红(芜湖纽科伦医药有限公司),Kreb-Ringer's 营养液(K-R 氏液,自制,每 1 L 含 NaCl 7.80 g, KCl 0.35 g, NaHCO<sub>3</sub> 1.37 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.32 g, MgCl<sub>2</sub> 0.02 g 和葡萄糖 1.40 g),水为娃哈哈纯净水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级雄性健康 SD 大鼠,体重 250 ~ 300 g,由山东鲁抗医药股份有限公司提供,合格证号 SCXK(鲁)2013-0001。

## 2 方法与结果

**2.1 混合对照品溶液的配制** 分别精密称取酚红、橄榄苦苷、羟基酪醇 4.72, 4.00, 2.02 mg, 置于 10 mL 量瓶中,加乙醇定容至刻度,得混合对照品溶液。

**2.2 胃肠灌注液的配制** 精密称取酚红、橄榄苦苷、羟基酪醇适量,分别置于 5 mL 量瓶中,加乙醇定容,制成质量浓度分别为 2.36, 1.00, 0.998 g·L<sup>-1</sup> 的对照品溶液,精密吸取上述对照品溶液各 1 mL,分别置于 100 mL 量瓶中,分别加 K-R 氏液定容,即得。

## 2.3 方法学考察

**2.3.1 色谱条件** Kromasil C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,流动相乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 10 min, 10% ~ 20% A; 10 ~ 25 min, 20% ~ 35% A),检测波长 240 nm,进样量 20 μL,柱温 25 ℃。

**2.3.2 回收率考察**<sup>[15]</sup> 精密称定橄榄苦苷适量,用 K-R 氏液稀释配制成 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 的灌注液,按一定方法操作,收集橄榄苦苷的胃肠灌注流出液,分别加入 3 种不同量的橄榄苦苷,每种平行 3 份,按 **2.3.1** 项下色谱条件进样 60 μL,计算回收率 98.65%,RSD 1.0%。

**2.3.3 精密度考察**<sup>[15]</sup> 精密称定橄榄苦苷适量,配制质量浓度分别为 5, 10, 20 mg·L<sup>-1</sup> 的胃肠灌注液,按一定方法操作,收集橄榄苦苷的胃肠灌注流出液,每个质量浓度平行 3 份,重复测定 5 次,计算精密度 RSD 均为 0.5%。

**2.3.4 稳定性考察**<sup>[15]</sup> 精密称定橄榄苦苷适量,配成 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 的胃肠灌注液,平行 3 份,按一定方法操作,收集胃肠灌注流出液,于 0, 1, 2, 3, 4 h 时取样,按 **2.3.1** 项下色谱条件分析,结果橄榄苦苷峰面积的 RSD 0.9%,说明橄榄苦苷在大鼠胃肠灌注液中 4 h 稳定。

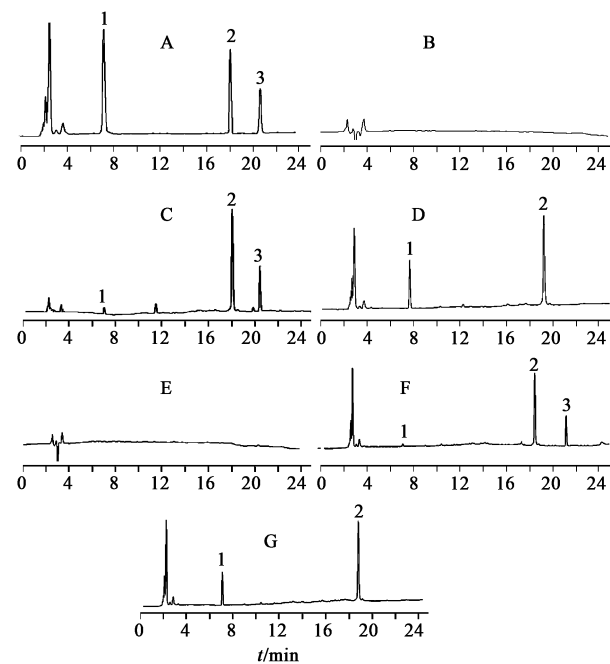
**2.4 线性关系考察** 精密吸取混合对照品溶液 5 mL,置 10 mL 量瓶中,用 K-R 氏液稀释至刻度,摇匀,按 **2.3.1** 项下色谱条件分别进样 2, 5, 10, 20, 60 μL,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得橄榄苦苷、羟基酪醇、酚红标准曲线分别为  $Y = 352\ 948X - 4\ 517.2$  ( $r = 0.999\ 7$ ),  $Y = 640\ 691X - 3\ 552.4$  ( $r = 0.999\ 7$ ),  $Y = 344\ 037X + 971.8$  ( $r = 0.999\ 5$ ),线性范围依次为 0.40 ~ 12.00, 0.202 ~ 6.06, 0.472 ~ 14.16 μg。

**2.5 大鼠在体胃吸收试验**<sup>[16]</sup> 取大鼠,随机分为 3 组,分别为空白组、橄榄苦苷组、羟基酪醇组,每组 5 只,禁食 20 h,自由饮水,按剂量 3 mL·kg<sup>-1</sup> 腹腔注射 10% 水合氯醛溶液使其麻醉,固定,剖腹,暴露胃,用线结扎贲门,用 37 ℃ 的生理盐水冲净胃腔,用注射器吸取 K-R 氏液 4 mL 平衡胃腔,重复 4 次,排净内部液体后结扎幽门,注射器内吸取药液 10 mL,将含药供试液 4 mL 注入胃内,再抽回到注射器,重复几次,将上述混合均匀的药液 4 mL 注入胃内。注射器内留下的药物浓度为药物初始浓度,4 h 后从胃中抽出药液的浓度为药物终浓度。

**2.6 大鼠在体小肠吸收试验**<sup>[17]</sup> 取大鼠,随机分

为 3 组,分别为空白组、橄榄苦苷组、羟基酪醇组,每组 5 只,禁食 20 h,自由饮水,按剂量  $3 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射 10% 水合氯醛溶液使其麻醉,固定,用红外灯保持体温在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,剪开腹部,量取小肠肠段 10 cm,在两端各切一小口,分别在两切口处插入橡胶管,用线扎紧。用  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  的生理盐水以  $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速洗净肠管内容物,直至流出的液体变澄清。将小肠放在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  的 K-R 氏液中平衡 5 min,以空气排尽 K-R 氏液。取预热至  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  的橄榄苦苷胃肠灌注液和羟基酪醇胃肠灌注液各 90 mL,以  $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速快速循环 10 min,取样 2 mL 作为 0 h 时样品液,补充含等量 K-R 氏液配制的酚红供试液 ( $20.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2 mL,开始计时。以  $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  的流速循环,取样时间点分别为 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4 h,取样量均为 2 mL,分别用于酚红、橄榄苦苷及羟基酪醇的质量浓度测定。

**2.7 灌注液的测定** 取不同时间点的 2 种大鼠样品胃肠灌注液,经  $0.45 \text{ } \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过,量取续滤液  $20 \text{ } \mu\text{L}$  按 2.3.1 项下色谱条件测定,计算酚红、橄榄苦苷及羟基酪醇的质量浓度,见图 1。



A. 混合对照品; B. 空白胃灌注样品; C. 橄榄苦苷胃灌注样品; D. 羟基酪醇胃灌注样品; E. 空白肠循环液样品; F. 橄榄苦苷肠循环样品; G. 羟基酪醇肠循环样品; 1. 酚红; 2. 羟基酪醇; 3. 橄榄苦苷

**图 1 橄榄苦苷和羟基酪醇的大鼠在体胃、小肠灌注流出液 HPLC**  
**Fig. 1 HPLC chromatograms of oleuropein and hydroxytyrosol in stomach and small intestine perfusion effluent of rats**

**2.8 橄榄苦苷和羟基酪醇的胃肠吸收差异比较<sup>[18]</sup>**

根据实验中肠壁不能吸收供试液中的酚红,而在

吸收药物的同时也吸收水分的原理,由酚红的浓度变化来校正供试液的体积,准确求出药物总量的变化和药物的吸收率( $X$ )。

$$X = \frac{C_0 \times V_0 - C_{1,n} \times V_{2,n} + V_4 \times \sum_{n=1}^{i=1} C_i}{C_0 \times V_0} \times 100\%$$

$$V_{2,n} = \frac{(V_{2,n-1} - V_4) \times C_{3,n-1} + C_{3,0} \times V_4}{C_{3,n}}$$

式中  $C_0$  和  $V_0$  分别为原供试液中药物的浓度和体积,  $C_{1,n}$  为不同取样时间点时回流液中药物的浓度,  $V_2$  为供试液的体积,  $C_3$  为酚红的浓度,  $V_4$  为每次取样后补加的酚红液体积。以剩余药量的对数对取样时间作图,由直线的斜率求出吸收速率常数 ( $K_a$ )。见表 1。

**表 1 橄榄苦苷与羟基酪醇的大鼠在体胃肠吸收比较 ( $n=5$ )**

**Table 1 Comparison of rat gastrointestinal absorption of oleuropein and hydroxytyrosol ( $n=5$ )**

吸收部位	化合物	$K_a$ / $\text{h}^{-1}$	累计吸收量 / $\mu\text{g}$	累计吸收率 / $\%$
胃	橄榄苦苷	0.010 1	11.91	33.16
	羟基酪醇	0.024 5	19.27	62.49
小肠	橄榄苦苷	0.011 4	307.70	36.74
	羟基酪醇	0.023 8	481.60	60.50

注:小肠的吸收数值时间均为 4 h。

**3 讨论**

大鼠在体胃肠灌注法是根据酚红的浓度变化校正供试液的体积,求出药物总量的变化的方法,准确测定不同时间点酚红的含量是保障实验结果准确的重要条件。本实验采用 HPLC 对酚红进行含量测定,研究橄榄苦苷与羟基酪醇在大鼠体胃肠的吸收差异及转化规律,结果表明此方法下酚红分离效果好,且较紫外分光光度法更准确、稳定、可靠,能够准确求出药物总量的变化情况。此方法为丰富中药蒸制的科学内涵提供保障,也为其他中药炮制机制研究提供了新方法与新思路。

口服药物在动物体内的吸收与其相对分子质量、分子的空间结构及极性大小密切相关。女贞子中橄榄苦苷与羟基酪醇的大鼠在体胃和小肠  $K_a$  和累计吸收率结果表明,羟基酪醇  $K_a$  和累计吸收率明显高于橄榄苦苷,表明相对分子质量较小、极性较大的羟基酪醇在胃肠道中的吸收更好,橄榄苦苷可能由于相对分子质量大和空间结构复杂等原因不易被吸收。提示女贞子炮制后补肝肾药效增强的机制与橄榄苦苷转化为更利于机体吸收的羟基酪醇关系

密切。

本实验是在对女贞子中橄榄苦苷和羟基酪醇化学结构式研究的基础上,对两者进行在体胃肠灌流试验研究,结果表明橄榄苦苷在大鼠胃肠道内均可转化成羟基酪醇。此研究结果与课题组前期研究的环烯醚萜苷类成分模拟炮制转化规律一致,从而在分子水平上阐明了环烯醚萜苷类成分的体内外转化规律。橄榄苦苷与羟基酪醇在大鼠胃肠道中的吸收比较,对探索女贞子及其有效成分的合理给药途径、给药方案及其相关新药研制具有重要指导意义。

[参考文献]

[ 1 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015:45-46.

[ 2 ] 赵丽丽,冯毅凡. 女贞子中三萜类和环烯醚萜类成分研究进展[J]. 广东药学院学报,2012,28(1):107-111.

[ 3 ] Han J, Talorete T P, Yamada P, et al. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells[J]. Cytotechnology, 2009,59(1):45-53.

[ 4 ] Al-Azzawie H F, Alhamdani M S. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits[J]. Life Sci,2006,78(12):1371-1377.

[ 5 ] Lee-Huang S, Huang P L, Zhang D W, et al. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol:Part I. Integrase inhibition[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007,354(4):872-878.

[ 6 ] Ju H Y, Chen S C, Wu K J, et al. Antioxidant phenolic profile from ethyl acetate fraction of Fructus Ligustri Lucidi with protection against hydrogen peroxide-induced oxidative damage in SH-SY5Y cells[J]. Food Chem Toxicol,2011,50(3/4):492-502.

[ 7 ] 王芳,邬树伟. 羟基酪醇的作用机制及研究进展[J]. 食品工业科技,2010,31(8):358-359.

[ 8 ] Hashim Z H, Rowland I R, Mcglynn H, et al. Inhibitory effects of olive oil phenolics on invasion in human colon adenocarcinoma cells *in vitro* [J]. Int J Cancer, 2008, 122(3):495-500.

[ 9 ] Hamden K, Allouche N, Damak M, et al. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste *in vitro* and in rats [J]. Chem Biol Interact, 2009, 180(3):421-432.

[ 10 ] Zhu L, Liu Z B, Feng Z H, et al. Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase II detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells[J]. J Nutr Biochem, 2010, 21(11):1089-1098.

[ 11 ] Hagiwara K, Goto T, Araki M, et al. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 662(1/3):78-84.

[ 12 ] 张学兰,姜秋,李慧芬,等. 女贞子酒蒸过程中 5 种苯乙醇类成分的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(16):60-63.

[ 13 ] 张学兰,姜秋,李慧芬,等. 女贞子酒蒸过程中 4 种裂环环烯醚萜苷类成分的动态变化[J]. 中成药, 2014, 36(12):2561-2564.

[ 14 ] 李慧芬,张学兰. 特女贞苷与红景天苷的大鼠在体胃肠吸收比较[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(5):27-30.

[ 15 ] 赵艳红,贾晓斌,陈彦,等. 淫羊藿黄酮类化合物的大鼠在体肠吸收研究[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(3):188-191.

[ 16 ] 刘喜刚,崔英慧,陈大为,等. 大黄总蒽醌大鼠在体胃肠吸收[J]. 中国医院药学杂志, 2011, 31(3):188-191.

[ 17 ] 汤继辉,胡容峰,常宫. 丹皮酚大鼠在体小肠吸收动力学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(7):35-37.

[ 18 ] 刘宏飞,苏显英,彭博,等. 阿昔洛韦在大鼠胃肠道吸收的研究[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(8):1561-1564.

[责任编辑 刘德文]