

女贞子中橄榄苦苷与羟基酪醇在大鼠血浆中的药动学差异

徐保鑫¹, 李转梅¹, 张学兰^{1*}, 李慧芬¹, 吴 鹏¹, 郭常川², 王均秀¹, 宋梦晗¹
(1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355; 2. 山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250000)

摘要: **目的** 比较女贞子中橄榄苦苷与羟基酪醇在大鼠血浆中的药动学差异。**方法** 大鼠灌胃 0.4 mmol/kg 橄榄苦苷与羟基酪醇, 于给药前后不同时间点 (0.083、0.167、0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10 h) 眼眶采血, 液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法测定两者血药浓度, 绘制血药浓度-时间曲线, 计算药动学参数。**结果** 橄榄苦苷与羟基酪醇分别在 10~1 000 ng/mL ($R^2=0.999\ 0$) 和 200~30 000 ng/mL ($R^2=0.999\ 6$) 范围内线性关系良好, 平均加样回收率均大于 95%, RSD 均小于 8%。两者 $T_{\max}$ 分别为 (1.7±0.3) h 和 (0.2±0.0) h, $t_{1/2\alpha}$ 分别为 (1.7±0.2) h 和 (3.0±0.1) h, $C_{\max}$ 分别为 (356.4±45.0) ng/mL 和 (24 170.0±3 458.4) ng/mL, $AUC_{0\sim 10\ h}$ 分别为 (1 223.1±107.4) ng/(mL·h) 和 (30 535.4±5 636.5) ng/(mL·h), 药动学行为均符合二室模型特征。**结论** 等剂量下橄榄苦苷与羟基酪醇的药动学行为有显著差异, 后者较前者更有利于机体吸收。女贞子酒蒸后药效加强, 可能与蒸制过程中橄榄苦苷水解生成羟基酪醇有关。

关键词: 女贞子; 橄榄苦苷; 羟基酪醇; 药动学; 大鼠; 血浆; LC-MS/MS

中图分类号: R969.1 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)07-1387-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.07.012

Pharmacokinetic differences between oleuropein and hydroxytyrosol in *Ligustri lucidi Fructus* in rat plasma

XU Bao-xin¹, LI Zhuan-mei¹, ZHANG Xue-lan^{1*}, LI Hui-fen¹, WU Peng¹, GUO Chang-chuan², WANG Jun-xiu¹, SONG Meng-han¹

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China; 2. Shandong Provincial Institute for Food and Drug Control, Jinan 250000, China)

KEY WORDS: *Ligustri lucidi Fructus*; oleuropein; hydroxytyrosol; pharmacokinetics; rats; plasma; LC-MS/MS;

女贞子为木犀科植物女贞 *Ligustrum lucidum* Ait. 的干燥成熟果实, 具有滋补肝肾, 明目乌发的功效^[1], 主要含有环烯醚萜苷类、三萜类、苯乙醇类成分^[2]。酒蒸女贞子可缓和其寒滑之性, 增强补肝肾作用, 故历代入药均以炮制品为主, 但其炮制机理尚未阐明。本课题组前期研究表明, 酒蒸女贞子可增强其对肾阴虚模型大鼠睾丸组织氧化应激损伤的保护作用^[3]; 女贞子酒蒸后, 特女贞苷、橄榄苦苷含有量显著降低, 而红景天苷、羟基酪醇显著升高; 特女贞苷和橄榄苦苷经模拟炮制后分别可水解生成红景天苷和羟基酪醇^[4,6]。据此推测,

女贞子酒蒸增效与环烯醚萜苷类成分水解生成其次级苷或苷元、更利于机体吸收有关。

研究表明, 橄榄苦苷与其苷元羟基酪醇均为女贞子的有效成分, 均具有抗癌、抗骨质疏松、降血糖和抗氧化活性^[7-11]。但橄榄苦苷口服吸收差^[12], 其在大鼠体内可代谢为其苷元羟基酪醇^[13-14], 然而两者口服吸收的差异性尚未见报道。本实验采用 LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中橄榄苦苷与羟基酪醇的含有量, 对两者等摩尔剂量灌胃给药后的药动学行为进行比较, 以期揭示女贞子酒蒸增效的炮制机理提供科学依据, 也为橄榄苦苷和羟基酪醇的临

收稿日期: 2017-02-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81373968); 国家公共卫生专项中药炮制技术传承基地建设项目 (2015)

作者简介: 徐保鑫 (1993—), 男, 硕士生, 从事中药饮片制备技术与质量控制研究。E-mail: xubaoxin666@126.com

* 通信作者: 张学兰 (1963—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药饮片制备技术与质量控制研究。E-mail: zhang8832440@sina.com

床应用提供借鉴。

1 仪器与材料

1.1 仪器 Waters Quattro Premier Xe 高效液相质谱联用仪、ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司); N-EVAP116 氮吹仪 (美国 Organomation 公司); FA1604N 电子天平 (十万分之一, 上海精密科学仪器有限公司); Thermo Pico21 微量台式离心机 (美国 Thermo 公司); KQ-250E 医用超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); XK96-B 快速混匀器 (姜堰市新康医疗器械有限公司)。

1.2 试药 橄榄苦苷对照品 (天津士兰科技有限公司, 批号 20140327, 含量 > 98%); 羟基酪醇对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号 110818-20040, 含量 > 98%); 毛蕊花糖苷对照品 (上海源叶生物科技有限公司, 批号 20120528, 含量 > 98%); 水杨苷对照品 (北京世纪奥科生物技术有限公司, 批号 MUST-14031901, 含量 > 98%)。乙腈、甲醇、乙酸乙酯为色谱纯 (天津市四友精细化学品有限公司); 其他试剂均为分析纯; 水为超纯水。

1.3 动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠, 体质量 250 ~ 270 g (山东鲁抗医药股份有限公司, 许可证号 SCXK 鲁 20130001)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液制备 精密称取橄榄苦苷、羟基酪醇、毛蕊花糖苷、水杨苷对照品各 5 mg, 置于 5 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 得到 1 mg/mL 母液, 用时甲醇稀释。

2.2 血浆样品处理

2.2.1 橄榄苦苷 取 -80 ℃ 保存的血浆样品, 室温下解冻, 取 200 μL 置于 1.5 mL EP 管中, 加 100 μg/mL 毛蕊花糖苷 (内标) 对照品溶液 10 μL, 涡旋混匀 3 min, 加乙酸乙酯 1 mL, 涡旋混匀 3 min, 14 800 r/min 离心 12 min, 取上清液 1 mL, 37 ℃ 氮气吹干, 残渣加 50% 甲醇 120 μL 复溶, 14 800 r/min 离心 15 min, 取上清液, 进样测定。

2.2.2 羟基酪醇 取 -80 ℃ 保存的血浆样品, 室温下解冻, 取 200 μL 置于 1.5 mL EP 管中, 加 100 μg/mL 水杨苷 (内标) 对照品溶液 10 μL, 涡旋混匀 3 min, 加乙腈 1 mL, 涡旋混匀 3 min, 14 800 r/min 离心 12 min, 取上清液 1 mL, 37 ℃ 氮气吹干, 残渣加初始流动相 120 μL 复溶, 14 800 r/min 离心 15 min, 取上清液, 进样测定。

2.3 色谱条件 流动相乙腈 (A) - 0.1% 甲酸 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 1 min, 95% B; 1 ~ 2.5 min, 95% → 5% B; 2.5 ~ 5 min, 5% B; 5 ~ 5.1 min, 5% → 95% B; 5.1 ~ 7 min, 95% B); 柱温 30 ℃; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 7 μL。

2.4 质谱条件 MRM 多反应监测, 电喷雾负离子源; 毛细管电压 2.5 kV; 提取电压 3 V; 离子源温度 120 ℃; 脱溶剂气温度 400 ℃; 碰撞电压 23 V (橄榄苦苷) 和 15 V (羟基酪醇); 锥孔电压 35 V (橄榄苦苷) 和 30 V (羟基酪醇); 脱溶剂气体积流量 800 L/h; 橄榄苦苷、毛蕊花糖苷、羟基酪醇、水杨苷的选择检测离子质核比 m/z 分别为 539.38 → 275.42、623.52 → 161.03、153.01 → 123.01、285.28 → 123.04。

2.5 方法学考察

2.5.1 专属性考察 制备空白血浆加橄榄苦苷对照品、大鼠灌胃橄榄苦苷 1.5 h 后血浆样品、空白血浆加羟基酪醇对照品、大鼠灌胃羟基酪醇 0.25 h 后血浆样品, 按“2.2”项下方法处理, 进样测定。结果, 橄榄苦苷与羟基酪醇色谱峰峰形良好, 血浆中无明显杂质和内源性物质的干扰, 表明该方法专属性强, 色谱图见图 1 ~ 2。

2.5.2 线性关系考察 取空白血浆, 加入橄榄苦苷、羟基酪醇对照品溶液, 配制成含橄榄苦苷 10、50、100、250、500、1 000 ng/mL, 羟基酪醇 200、2 000、5 000、10 000、20 000、30 000 ng/mL 的血浆样品, 按“2.2”项下方法处理。以各成分的质量浓度为横坐标 (X), 与内标峰面积之比为纵坐标 (Y) 进行回归, 得橄榄苦苷、羟基酪醇的回归方程分别为 $Y = 0.0002X + 0.0030$ ($R^2 = 0.9990$)、 $Y = 0.0021X + 0.1581$ ($R^2 = 0.9996$), 分别在 10 ~ 1 000、200 ~ 30 000 ng/mL 范围内线性关系良好。按照信噪比 (S/N) 为 3, 确定橄榄苦苷和羟基酪醇的最低检测限分别为 3.5 ng/mL 和 2 ng/mL。

2.5.3 精密度试验 取空白血浆, 分别加入橄榄苦苷、羟基酪醇对照品溶液, 配制成低、中、高质量浓度的血浆样品 (橄榄苦苷 10、100、1 000 ng/mL, 羟基酪醇 200、5 000、30 000 ng/mL), 平行 5 份, 按“2.2”项下方法处理, 连续测定 3 d, 测得橄榄苦苷与羟基酪醇日内精密度 RSD 分别为 6.1% ~ 7.3% 和 3.5% ~ 7.8%, 日间精密度 RSD 分别为 4.8% ~ 6.9% 和 5.4% ~ 7.0%, 表明该方法精密度良好。

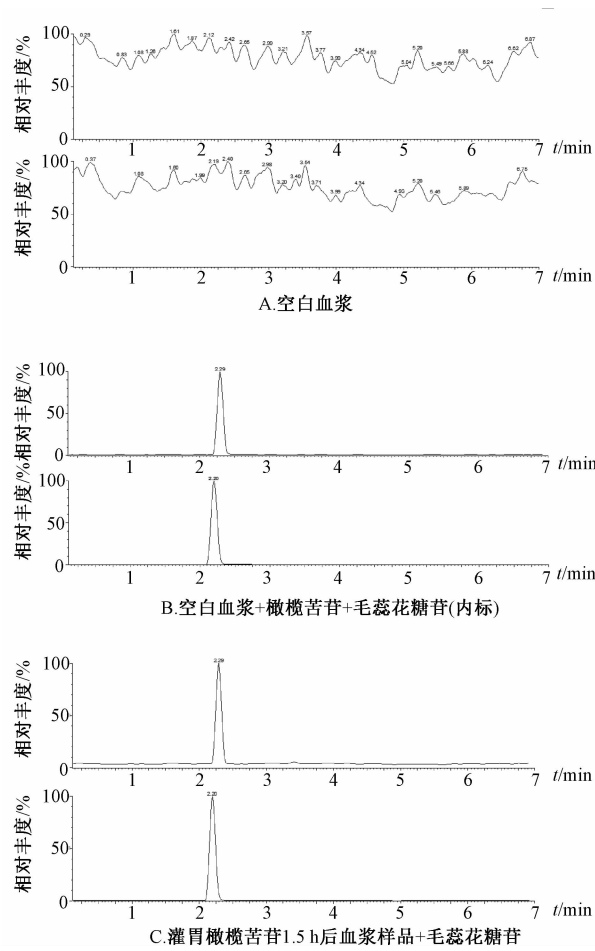


图 1 橄榄苦苷 MRM 色谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of oleuropein

2.5.4 稳定性考察 按“2.5.3”项下方法制备血浆样品，于-20℃冰箱中冷冻放置6 d（测定时间为放置0、1、2、4、6 d）、室温下避光放置12 h（测定时间为0、3、6、9、12 h），按“2.2”项下方法处理，测得血浆样品在2种条件下的含有量RSD分别为3.0%~6.5%和5.0%~5.3%，表明该方法稳定性良好。

2.5.5 加样回收率试验 按“2.5.3”项下方法制备血浆样品，按“2.2”项下方法处理，进样测定，结果见表1。

2.6 药动学考察 取大鼠12只，随机分成2组，每组6只，实验前禁食12 h，自由饮水，分别灌胃0.4 mmol/kg 橄榄苦苷(216 mg/kg)和0.4 mmol/kg 羟基酪醇(61.6 mg/kg)，于给药前后0.083、0.167、0.25、0.5、1、1.5、2、3、4、6、8、10 h眼球后静脉丛采血500 μL，置于1.5 mL 肝素化试管中，3 000 r/min 离心10 min，分离血浆，-80℃下冷冻贮存备用。测定时，按“2.2”项下

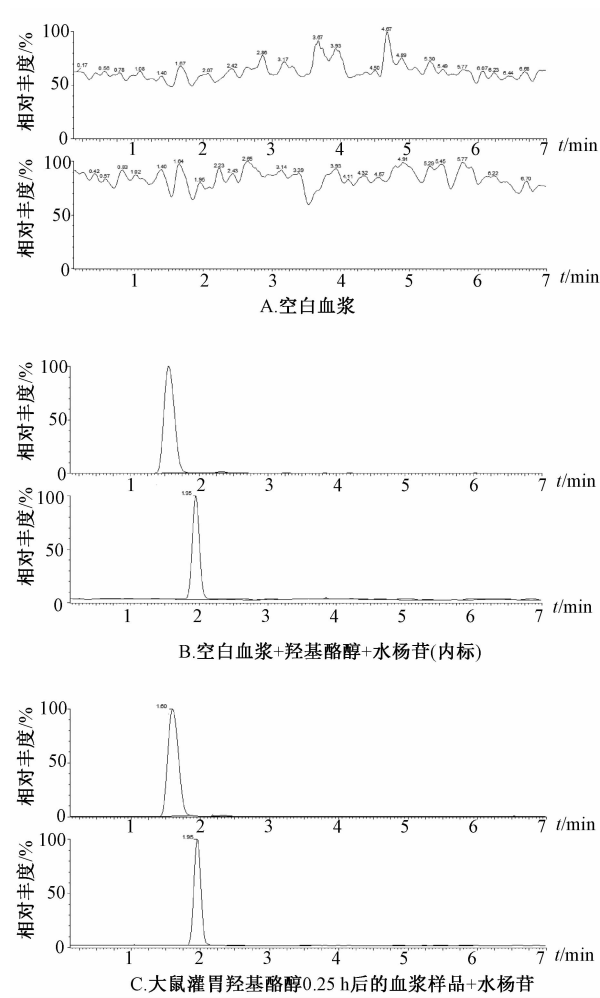


图 2 羟基酪醇 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatograms of hydroxytyrosol

表 1 各成分加样回收率试验结果 (n=5)

Tab. 1 Results of recovery tests for various constituents (n=5)

成分	质量浓度/(ng·mL ⁻¹)	平均回收率/%	RSD/%
橄榄苦苷	10	97.4	5.3
	100	96.4	7.8
	1 000	97.9	5.1
羟基酪醇	200	95.8	4.7
	5 000	97.4	5.9
	30 000	99.1	5.1

方法处理样品血浆，进样测定血药浓度，并用 DAS2.0 药动学数据处理软件进行统计拟合，结果见图3和表2。由此可知，橄榄苦苷和羟基酪醇在大鼠体内的药动学行为均符合二室模型特征；在等摩尔剂量下与橄榄苦苷比较，羟基酪醇吸收时间短、速度快、体内消除速度慢。

3 讨论

女贞子蒸制后，其补肝肾、明目乌发效果有所

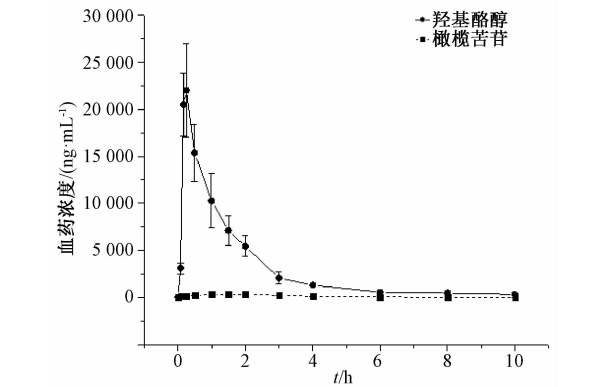


图3 各成分血药浓度-时间曲线

Fig.3 Plasma concentration-time curves of various constituents

表2 各成分药动学参数 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Tab.2 Pharmacokinetic parameters of various constituents ($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	单位	橄榄苦苷	羟基酪醇
AUC _{0-10 h}	ng·(mL·h) ⁻¹	1 223.1 ± 107.4	30 535.4 ± 5 636.5
AUC _{0-∞}	ng·(mL·h) ⁻¹	1 250.4 ± 107.5	31 879.3 ± 5 777.5
MRT _{0-10 h}	h	2.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1
MRT _{0-∞}	h	3.1 ± 0.1	2.3 ± 0.1
t _{1/2z}	h	1.7 ± 0.2	3.0 ± 0.1
T _{max}	h	1.7 ± 0.3	0.2 ± 0.0
CL _{z/F}	L·(h·kg) ⁻¹	173.9 ± 15.7	2.0 ± 0.4
V _{z/F}	L·kg ⁻¹	436.8 ± 64.6	8.5 ± 1.7
C _{max}	ng·mL ⁻¹	356.4 ± 45.0	24 170.0 ± 3 458.4

提升，可能是橄榄苦苷蒸制后的水解产物羟基酪醇更容易被人体吸收，而且更快地达到最高血药浓度，同时消除时间更长。药动力学实验表明，可将橄榄苦苷水解生成羟基酪醇后给药，以提高其生物利用度，有望解决该成分吸收效率低的问题。

在橄榄苦苷血浆样品处理时，曾采用甲醇、乙腈沉淀蛋白，但色谱图中内源性干扰峰较多，回收率低。再改用液液萃取，考察了异丙醇、乙酸乙酯、乙酸乙酯-异丙醇（2：1），发现乙酸乙酯回收率较高，加样回收率大于80%，故选择其作为橄榄苦苷的提取溶剂。在羟基酪醇血浆样品处理时，曾选择高氯酸、甲醇、乙腈作为蛋白沉淀剂，发现乙腈沉淀蛋白后的样品中羟基酪醇含有量最高，加样回收率大于85%，而且无基质干扰，故选用其作为羟基酪醇的提取溶剂。然后，比较了初始流动相、50% 甲醇、甲醇，发现橄榄苦苷以50% 甲醇复溶时回收率最高，而羟基酪醇以初始流动相复溶

为佳。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2015年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2015：45-46.

[2] 刘亭亭，王 萌. 女贞子化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2014，20(14)：228-234.

[3] 李慧芬，张学兰，赵资堂. 酒蒸女贞子对肾阴虚模型大鼠睾丸组织氧化应激损伤的保护作用[J]. 中成药，2014，36(10)：2144-2147.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 宋梦晗，张学兰，李慧芬，等. LC-TOF/MS快速鉴定女贞子4种环烯醚萜苷类化合物模拟清蒸品的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志，2016，22(16)：14-17.

[7] Caroline P, Jacinthe M, Apostolis A, et al. Dose-response study of effect of oleuropein, an olive oil polyphenol, in an ovariectomy/inflammation experimental model of bone loss in the rat[J]. Clin Nutr, 2006, 25(5)：859-868.

[8] Chen Q, Yang L, Zhang G, et al. Bioactivity-guided isolation of antiosteoporotic compounds from Ligustrum lucidum[J]. Phytother Res, 2013, 27(7)：973-979.

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

[10] 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.

[11] Antonella D L, Alessandra A, Gabriele A, et al. Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (Olea europaea L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity[J]. Eur Food Res Technol, 2008, 226(4)：653-659.

[12] Del B P, Di D A, De C A, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of oleuropein and its metabolite hydroxytyrosol in rat plasma and urine after oral administration[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 785(1)：47-56.

[13] Lin P Y, Qian W D, Wang X Y, et al. The biotransformation of oleuropein in rats[J]. Biomed Chromatogr, 2013, 27(9)：1162-1167.

[14] Zhou T, Qian T X, Wang X Y, et al. Application of LC-MS/MS method for the in vivo metabolite determination of oleuropein after intravenous administration to rat[J]. Biomed Chromatogr, 2011, 25(12)：1360-1363.