

# 莱菔子提取液中萝卜苷的大鼠肠吸收特性考察

朱立俏, 盛华刚, 周洪雷\*  
(山东中医药大学, 济南 250355)

**[摘要]** **目的:**考察莱菔子水提液中萝卜苷在大鼠小肠的吸收特性。**方法:**采用大鼠在体单向肠灌注法考察不同药物质量浓度(0.02, 0.05, 0.1 g·mL<sup>-1</sup>)对萝卜苷肠吸收特性的影响, 计算吸收速率常数( $K_a$ )和表观吸收系数( $P_{app}$ )。采用HPLC测定萝卜苷含量, 流动相0.1%磷酸溶液-乙腈(87:13), 检测波长225 nm。**结果:**萝卜苷在pH 5.12的K-R试液中稳定性最好。不同质量浓度的莱菔子水提液中萝卜苷在大鼠小肠的 $K_a$ 分别为 $(7.750 \pm 1.744) \times 10^{-3}$ ,  $(7.204 \pm 1.045) \times 10^{-3}$ ,  $(7.148 \pm 0.837) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ,  $P_{app}$ 分别为 $(1.519 \pm 0.507) \times 10^{-3}$ ,  $(1.504 \pm 0.617) \times 10^{-3}$ ,  $(1.592 \pm 0.345) \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ , 均无显著性变化。**结论:**萝卜苷为易吸收成分, 在大鼠小肠中的吸收机制为被动扩散。

**[关键词]** 莱菔子; 萝卜苷; 在体单向肠灌注模型; 肠吸收特性; 硫苷类成分

**[中图分类号]** R283.1; R283.6; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)16-0124-03

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014160124

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140627.0947.109.html>

**[网络出版时间]** 2014-06-26 10:33

## Investigation of Intestinal Absorption Characteristics in Rats of Glucoraphenin in Raphani Semen Extract

ZHU Li-qiao, SHENG Hua-gang, ZHOU Hong-lei\*  
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate small intestine absorption characteristics in rats of glucoraphenin in Raphani Semen extract. **Method:** Taking *in situ* rat single-pass intestinal perfusion model, effects of different drug mass concentrations (0.02, 0.05, 0.1 g·mL<sup>-1</sup>) on intestinal absorption characteristics of glucoraphenin was investigated, and calculated their absorption rate constant ( $K_a$ ) and apparent absorption coefficient ( $P_{app}$ ). HPLC was employed to determine the content of glucoraphenin with mobile phase of 0.1% phosphoric acid solution-acetonitrile (87:13) and detectopm wavelength at 225 nm. **Result:** Glucoraphenin had the best stability in K-R test solution with pH of 5.12. In Raphani Semen extract with different concentrations,  $K_a$  of glucoraphenin in small intestine of rats were  $(7.750 \pm 1.744) \times 10^{-3}$ ,  $(7.204 \pm 1.045) \times 10^{-3}$ ,  $(7.148 \pm 0.837) \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ,  $P_{app}$  were  $(1.519 \pm 0.507) \times 10^{-3}$ ,  $(1.504 \pm 0.617) \times 10^{-3}$ ,  $(1.592 \pm 0.345) \times 10^{-3} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ , these data had no significant changes. **Conclusion:** Glucoraphenin was easy-to-absorped component, its absorption mechanism in small intestine of rats was passive diffusion.

**[Key words]** Raphani Semen; glucoraphenin; *in situ* single-pass intestinal perfusion model; intestinal absorption characteristics; sulfur glycosides

莱菔子具有消食除胀、降气化痰之功效, 主要用于治疗饮食停滞、脘腹胀痛、大便秘结、积滞泻痢、痰

壅咳喘<sup>[1]</sup>。其主要成分包括硫苷类、水溶性生物碱类、脂肪酸及植物甾醇等, 其中萝卜苷是硫苷类成分

**[收稿日期]** 20131213(015)

**[基金项目]** 山东省自然科学基金项目(ZR2010HM017); 山东省高等学校科技计划项目(J105LL05); 山东中医药大学校级课题(ZYDXY1332)

**[第一作者]** 朱立俏, 硕士, 讲师, 从事中药及天然药物有效成分的质量控制研究, Tel:0531-89628081, E-mail: zliqiao@163.com

**[通讯作者]** \*周洪雷, 教授, 博士生导师, 从事中药复方活性成分及质量控制研究, Tel:0531-89628081, E-mail: zhouhongleitcm@163.com

中含量较高的。目前关于莱菔子的研究主要集中于水溶性生物碱类成分,而对该药材中硫苷类成分研究较少,有关萝卜苷的肠吸收特性研究尚未见报道。故本实验采用在体单向肠灌流模型考察不同质量浓度莱菔子提取液中萝卜苷的肠吸收特性,为该药材的开发利用提供参考。

## 1 材料

1100 系列高效液相色谱仪(美国安捷伦公司),CP225D 型电子天平(德国赛多利斯公司),DT-100 型电子分析天平(北京医用仪器厂),BT100M 型恒流泵(保定创锐泵业有限公司)。

莱菔子购于山东济南建联中药店,经山东中医药大学李峰教授鉴定为十字花科植物萝卜 *Raphanus sativus* L. 的干燥成熟种子,凭证标本保存于本实验室;萝卜苷对照品(经 HPLC 测定纯度 > 90%,自制),甲醇、乙腈为色谱纯,水为娃哈哈纯净水,其他试剂为分析纯。

清洁级 SD 大鼠,雄性,体重 180 ~ 200 g,合格证号 SCXK(鲁)20080002,由山东鲁抗医药股份有限公司动物室提供。

## 2 方法与结果

**2.1 莱菔子水提液的制备**<sup>[2]</sup> 称取适量莱菔子,粉碎成粗粉,加 10 倍量水回流提取 3 次,每次 1.5 h,合并提取液,浓缩,加水定容至  $0.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 K-R 试液的配制**<sup>[3]</sup> 精密称取氯化钙 0.37 g 和葡萄糖 1.4 g,分别加少量水溶解;依次称取氯化钠、氯化钾、碳酸氢钠、磷酸二氢钠、氯化镁 7.8,0.35,1.37,0.32,0.02 g,加水溶解后与氯化钙溶液及葡萄糖溶液混匀,加水定容至 1 L,即得。

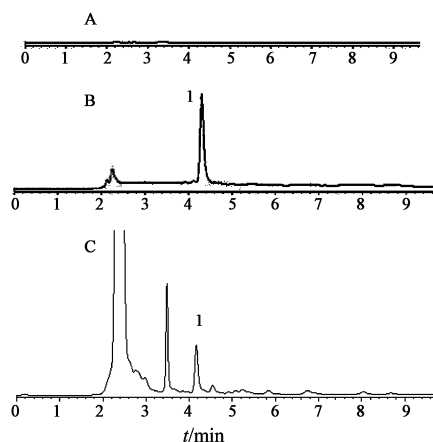
**2.2.2 空白大鼠肠灌流液** 取 K-R 试液适量,按一定方法灌流,收集流出液,即得。

**2.2.3 药物灌流液的配制** 精密量取莱菔子提取液 4,10,20 mL,分别置于 100 mL 量瓶中,加 pH 5.12 的 K-R 试液依次配成  $0.02, 0.05, 0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的药物灌流液。

### 2.3 萝卜苷的含量测定

**2.3.1 色谱条件** Thermo Scientific  $\text{C}_{18}$  色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ),流动相 0.1% 磷酸溶液-乙腈(87:13),流速  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,检测波长 225 nm,柱温  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,进样量 20  $\mu\text{L}$ ,见图 1,结果显示空白肠灌流液对萝卜苷的含量测定无干扰。

**2.3.2 对照品溶液的配制** 精密称量萝卜苷对照品 9.53 mg(置五氧化二磷减压干燥器中干燥



A. 空白样品; B. 对照品; C. 供试品; 1. 萝卜苷

图 1 莱菔子水提液肠灌流液 HPLC

12 h),置 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.3.3 标准曲线的绘制** 精密吸取萝卜苷对照品溶液 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5,0.6 mL,分别置于 2 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,按 2.3.1 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,得回归方程  $Y = 16353X + 135.7$  ( $r = 0.9998$ ),线性范围  $0.04765 \sim 0.2859 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**2.3.4 精密度考察** 取  $0.04765, 0.14295, 0.23825 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的萝卜苷对照品溶液,分别按 2.3.1 项下色谱条件测定,重复进样 5 次,结果日内精密度 RSD 分别为 1.35%,1.09%,0.96%,日间精密度 RSD 分别为 1.53%,2.07%,1.84%,表明仪器精密度良好。

**2.3.5 方法回收率试验** 精密吸取 2.3.2 项下对照品溶液 0.1,0.3,0.5 mL,分别加空白肠灌流液稀释至 2 mL,得低、中、高( $0.04765, 0.14295, 0.23825 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )质量浓度的萝卜苷对照品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件测定,重复进样 3 次,计算平均回收率分别为 99.36%,100.81%,98.49%,RSD 分别为 2.60%,1.93%,2.81%,表明该方法准确可靠。

**2.4 在不同 pH 的 K-R 试液中稳定性考察** 利用  $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 HCl 和 NaOH 溶液调节 K-R 试液的 pH 分别为 5.12,6.31,7.02,8.24,各加入一定量莱菔子水提液配成药物灌流液,于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴放置,分别于 0,1,2,4 h 取样,按 2.3.1 项下色谱条件测定,计算萝卜苷残存率,结果见表 1,表明萝卜苷在 pH 5.12 的 K-R 试液中稳定性最好,故将配制药物灌流液的 K-R 试液的 pH 调至 5.12。

**2.5 大鼠在体单向肠灌流试验**<sup>[4]</sup> 取禁食过夜(自由饮水)的大鼠,按  $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射 10% 水合氯醛使麻醉,背位固定,用红外灯保持  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  体温,

表 1 K-R 试液不同 pH 对莱菔子水提液中萝卜苷稳定性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ ) %

pH	萝卜苷残存率		
	1 h	2 h	4 h
5.12	99.67 ± 2.76	101.51 ± 3.04	99.50 ± 1.38
6.31	101.22 ± 1.33	101.09 ± 1.23	98.40 ± 2.63
7.02	99.38 ± 1.87	98.74 ± 0.96	93.03 ± 2.19
8.24	100.86 ± 2.45	95.18 ± 1.67	88.57 ± 1.44

沿腹中线打开腹腔,小心分离出待考察肠段,于两端切口插管,结扎,用预热至 37 °C 的生理盐水以 5 mL·min<sup>-1</sup> 流速将肠内容物冲洗干净,用空气将生理盐水排净。取不同质量浓度的药物灌流液(预热至 37 °C)100 mL,以 1.0 mL·min<sup>-1</sup> 的流速灌流 10 min,将流速调至 0.2 mL·min<sup>-1</sup> 灌流 30 min,平衡管路及肠段,开始计时,出液口处用一已知质量的小瓶收集流出液,每隔 15 min 迅速更换收集液小瓶,称定质量。取流出液适量,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液按 2.3.1 项下色谱条件测定,计算各时间段灌流液样品中萝卜苷质量浓度。试验持续 60 min,剪取各个被灌流的肠段,测量肠内径及长度。采用质量法<sup>[5]</sup> 计算萝卜苷吸收速率常数( $K_a$ )和药物表观吸收系数( $P_{app}$ )。

$$K_a = (1 - C_{out}Q_{out}/C_{in}Q_{in})V/\pi r^2 l$$

$$P_{app} = -V \ln(C_{out}Q_{out}/C_{in}Q_{in})/2\pi r l$$

式中  $C_{out}$  为稳态肠管药物质量浓度(肠道出口药物质量浓度), $C_{in}$  为药物进入肠管开始灌流前质量浓度, $V$  为灌流速度(0.2 mL·min<sup>-1</sup>), $l$  和  $r$  分别为被灌流肠段的长度和被灌流肠段的横截面半径, $Q_{in}$  和  $Q_{out}$  分别为肠道进、出口灌流液的体积(假定进出口灌流液密度 1 g·mL<sup>-1</sup>)。根据 Grubbs 检验法对获得的若干个  $K_a$  和  $P_{app}$  分别进行偶然误差值的取舍,取舍后必须保证 ≥3 个的  $K_a$  和  $P_{app}$  无显著误差,计算平均值。采用 SPSS 13.0 软件对数据进行分析,各组间数据比较采用单因素方差分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

**2.6 萝卜苷肠吸收特征分析** 取 SD 大鼠 15 只,随机等分成 5 组,分别以 0.02,0.05,0.1 g·mL<sup>-1</sup> 莱菔子水提液将 2.5 项下方法对大鼠小肠进行灌流,收集出口灌流液,将收集的灌流液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按 2.3.1 项下色谱条件测定萝卜苷含量,计算  $K_a$  和  $P_{app}$ ,结果见表 2。表明当莱菔子水提液中萝卜苷质量浓度在 0.02 ~ 0.1 g·mL<sup>-1</sup> 时,萝卜苷的  $K_a$  和  $P_{app}$  随质量浓度的增加无显著变化,提示其吸收特性为被动扩散。文献报道药物在大鼠体内的  $P_{app} < 1.8 \times 10^{-4}$  cm·min<sup>-1</sup> 和  $P_{app} > 1.2 \times 10^{-3}$  cm·

min<sup>-1</sup> 分别表示难以吸收和易于吸收<sup>[6]</sup>,说明萝卜苷为易吸收成分。

表 2 不同质量浓度莱菔子水提液的萝卜苷肠吸收特征 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

质量浓度 /g·mL <sup>-1</sup>	$K_a$ /min <sup>-1</sup>	$P_{app}$ /cm·min <sup>-1</sup>
0.02	(7.750 ± 1.744) × 10 <sup>-3</sup>	(1.519 ± 0.507) × 10 <sup>-3</sup>
0.05	(7.204 ± 1.045) × 10 <sup>-3</sup>	(1.504 ± 0.617) × 10 <sup>-3</sup>
0.10	(7.148 ± 0.837) × 10 <sup>-3</sup>	(1.592 ± 0.345) × 10 <sup>-3</sup>

### 3 讨论

研究药物小肠吸收的方法主要有离体外翻肠囊法、在体肠循环法和在体单向肠灌流法,其中在体大鼠肠灌流模型是美国食品药品监督管理局(FDA)认可的研究药物与候选药物吸收特性的模型。该模型在整个试验过程中灌流的肠段都有血供,不损伤研究部位的淋巴和血液循环系统,能较好地模拟人体的体内环境,结果与人体试验相关性良好,已成为药物肠吸收的主要研究模型。

常用的大鼠肠灌流模型有在体肠循环灌流法和单向肠灌流法,考虑到前者灌流流速较高,回流灌流液易对肠黏膜造成损伤,可能会导致药物的吸收增大,影响试验结果的准确性,故本文采用大鼠在体单向灌流模型,试验条件与口服给药后药物接触的肠道正常生理环境相接近。同时,为确保灌流液中萝卜苷质量浓度的降低是因为肠道吸收而不是其他原因,本问将灌流管路的乳胶管剪短至 15 cm,在试验前以相同灌流速度用灌流液预平衡灌流管路,以避免灌流管路的物理吸附对试验结果的影响。

### [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,2010:256.
- [2] 丁臻,蔡海超,周洪雷,等. 正交试验法优选莱菔子水溶性生物碱提取工艺[J]. 食品与药品,2011,13(1):19.
- [3] 安靛,张华,张艺竹,等. 采用在体单向肠灌流模型研究葛根苓连汤不同配伍组主要指标成分的肠吸收特性[J]. 药学报,2012,47(12):1696.
- [4] 杜秋,狄留庆,单进军,等. 在体单向肠灌流模型研究瑞香素的大鼠肠吸收特性[J]. 药学报,2009,44(8):922.
- [5] 高秀蓉,蒋学华,王凌,等. 基于大鼠在体单向肠灌流模型研究 P-糖蛋白抑制剂对蝙蝠葛碱肠吸收的影响[J]. 中国医院药学杂志,2012,32(13):1016.
- [6] Fagerholm U, Johansson M, Lennernah H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum[J]. Pharm Res,1996,13(9):1336.

[责任编辑 刘德文]