·药物动力学研究·

莱菔子水提液中芥子碱硫氰酸盐在大鼠小肠的吸收特性研究

朱立俏，盛华刚，周洪雷(山东中医药大学，山东 济南 250355)

摘要：目的 研究莱菔子水提液中芥子碱硫氰酸盐在大鼠小肠的吸收特性。**方法** 采用大鼠在体单向肠灌流模型，用 HPLC 法对芥子碱硫氰酸盐质量浓度进行分析，计算其吸收速率常数和表观吸收系数，分别研究药物质量浓度和 P-糖蛋白(P-gp)抑制剂对芥子碱硫氰酸盐吸收的影响。**结果** 芥子碱硫氰酸盐在大鼠小肠的吸收速率常数(K_a)和表观吸收系数(P_{app})随浓度增加先增加后减小，且芥子碱硫氰酸盐的表观吸收速率小于 1.8×10^{-4} cm·min^{-1}，P-gp 抑制剂对芥子碱硫氰酸盐的吸收具有显著影响 ($P < 0.01$)。**结论** 芥子碱硫氰酸盐在大鼠小肠中的吸收机制可能为主动转运或易化扩散，且其在小肠中的吸收较差，芥子碱硫氰酸盐为 P-gp 底物。

关键词： 莱菔子；芥子碱硫氰酸盐；在体单向肠灌流模型；肠吸收

中图分类号： R285.5 **文献标志码：** A **文章编号：** 1003-9783(2014)04-0459-04

doi： 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.017

Studies on Intestinal Absorption of Sinapine Cyanide Sulfonate of Semen Raphani Water Extract in Rats

ZHU Liqiao, SHENG Huagang, ZHOU Honglei (Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong 250355 Jinan, China)

Abstract: Objective To investigate the intestinal absorption of sinapine cyanide sulfonate of Semen Raphani water extract in rats. **Methods** The concentration of sinapine cyanide sulfonate was analyzed by HPLC and by using rat in-vivo single-pass intestinal perfusion model. The effects of drug concentration and P-glycoprotein (P-gp) inhibitors on the intestinal absorption of sinapine cyanide sulfonate were evaluated by calculating absorption rate constant(Ka) and apparent absorption coefficient($Papp$). **Results** The absorption rate constant(K_a)and the apparent absorption coefficient (P_{app}) of sinapine cyanide sulfonate were increased firstly and then decreased with the increase of concentration. The apparent absorption coefficient (Pap_p) was lower than 1.8×10^{-4} cm·min^{-1}. P-gp inhibitors had significant effect on the absorption of sinapine cyanide sulfonate($P < 0.01$). **Conclusion** The absorption mechanism of sinapine cyanide sulfonate in rat small intestine may be in active transport or facilitated diffusion. Sinapine cyanide sulfonate has poor intestinal absorption, and sinapine cyanide sulfonate is proved to be a substrate of P-gp.

Keywords: Semen Raphani; Sinapine Cyanide Sulfonate; In-vivo single-pass intestinal perfusion model; Intestinal absorption

莱菔子为十字花科植物萝卜 *Raphanus sativus* L. 的干燥成熟种子，具有消食除胀、降气化痰之功效，临床上主要用于饮食停滞、脘腹胀痛、大便秘结、积滞泻痢、痰壅咳喘的治疗[1]。现代医学研究发现其具有降血压作用。莱菔子中主含莱菔素、芥子碱、芥子酸、亚油酸、植物甾醇等，其中芥子碱是降压作用的活性成分之一，芥子碱多以芥子碱硫氰酸盐的形式存在[2-3]。目前关于莱菔子中芥子碱硫氰酸盐的肠吸收特性研究尚未见报道。本研究采用在体单向肠灌流模型考察了不同浓度莱菔子提取液中芥子

收稿日期： 2014-03-07

作者简介： 朱立俏，女，硕士，讲师，研究方向：中药及天然药物有效成分及质量控制研究。Email：zliqiao@163.com。通讯作者：周洪雷，博士，教授，研究方向：中药及天然药物有效成分及质量控制研究。Email：zhouhongleitcm@163.com。

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)。

碱硫氰酸盐的肠吸收特性，为进一步研究莱菔子的胃肠道吸收机制以及对莱菔子的剂型研发、临床用药提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器　Agilent 1100 高效液相色谱仪、二极管阵列检测器，美国安捷伦科技有限公司；QC225 型超声波清洗器，上海超声波仪器厂；DT-100 分析天平，北京医用仪器厂；旋转蒸发器，上海亚荣生化仪器厂；恒温水浴锅，上海树立仪器仪表有限公司；BT100M 恒流泵，保定创锐泵业有限公司。

1.2 药品及试剂　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 satious* L.的干燥成熟种子，凭证标本保存于本实验室。芥子碱硫氰酸盐对照品，经 HPLC 法测定纯度＞98%，自制；甲醇、乙腈(色谱纯)，天津科密欧试剂有限公司；娃哈哈纯净水；其他试剂为分析纯。

1.3 动物　清洁级 SD 大鼠，雄性，体质量 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 溶液制备

2.1.1 莱菔子水提液的制备[4]　莱菔子粉碎成粗粉，加 10 倍量水提取 3 次，每次 1.5 h，合并提取液，浓缩，加水定容至质量浓度为 0.5 g·mL^{-1}。

2.1.2 K-R 试液的配制[5]　精密称取 $CaCl_2$ 0.37 g，葡萄糖 1.4 g，分别加少量蒸馏水溶解，再称取 NaCl 7.8 g，KCl 0.35 g，$NaHCO_3$1.37 g，NaH_2PO_4 0.32 g 和 $MgCl_2$ 0.02 g，加蒸馏水溶解后与 $CaCl_2$ 溶液及葡萄糖混匀，定容至 1 L，即得 K-R 试液，备用。

2.1.3 空白大鼠肠灌流液　取 K-R 试液适量，按 2.4 项下“大鼠在体单向肠灌流实验”方法灌流，收集流出液，即得。

2.1.4 药物灌流液的配制　精密量取莱菔子提取液 4，10，15，20 mL，置于 100 mL 量瓶中，加 pH5.12 的 K-R 试液分别配成 0.02，0.05，0.075，0.1 g·mL^{-1} 的药物灌流液。

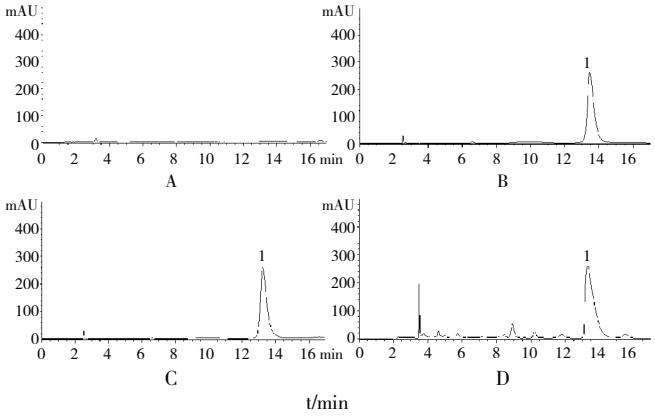
2.2 芥子碱硫氰酸盐含量测定的方法学考察

2.2.1 色谱条件　色谱柱为 Thermo Scientific C_{18}(4.6 mm × 250 mm，5 μm)，流动相为 0.1 %H_3PO_4 溶液 - 乙腈溶液(87∶13)，流速为 1 mL·min^{-1}，检测波长326 nm，柱温 25 ℃，进样量 20 μL。

2.2.2 对照品溶液的配制　精密称量芥子碱硫氰酸盐对照品 8.91 mg(置五氧化二磷减压干燥器中干燥 12 h)，置 10 mL 量瓶中，加甲醇充分溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

2.2.3 标准曲线的绘制　精密吸取芥子碱硫氰酸盐对照品溶液 0.1，0.2，0.4，0.8，1.6 ，2.0 mL，置于 2 mL 量瓶中，加入甲醇稀释至刻度，摇匀，按 2.2.1 项下色谱条件，注入高效液相色谱仪，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，结果表明芥子碱硫氰酸盐在 0.04455 ~ 0.891 mg·mL^{-1} 呈较好的线性关系，线性回归方程为 $Y = 21810X - 592.75$，$r = 0.9998$。

2.2.4 专属性考察　见图 1。取空白肠灌流液，芥子碱硫氰酸盐对照品，空白肠灌流液 + 芥子碱硫氰酸盐对照品，莱菔子水提液肠灌流液适量，经 0.45 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液进样测定，考察空白肠灌流液是否对芥子碱硫氰酸盐的测定有干扰。结果显示，空白肠灌流液对芥子碱硫氰酸盐的测定无干扰。



A. 空白肠灌流液　B. 芥子碱硫氰酸盐对照品　C. 对照品 + 空白肠灌流液　D. 肠灌流液

图 1　芥子碱硫氰酸盐各成分的 HPLC 色谱图

Figure 1　HPLC chromatograms of blank intestinal perfusate(A), sinapine cyanide sulfonate reference(B), reference+blank intestinal perfusion(C) and intestinal perfusion (D)

2.2.5 精密度考察　取 2.2.2 项下的芥子碱硫氰酸盐质量浓度为 0.0446，0.1782，0.7128 mg·mL^{-1} 的低、中、高 3 个浓度的对照品溶液，按照 2.1.1 项下色谱条件测定，重复进样 5 次，结果低、中、高质量浓度的芥子碱硫氰酸盐的日内精密度 RSD 分别为 1.0 %、1.2 %、0.9 %，日间精密度 RSD 分别为 1.3 %、2.75 %、1.93 %。表明精密度良好。

2.2.6 方法回收率试验　取 2.2.2 项下对照品溶液

0.1，0.4，1.6 mL 置于 2 mL 量瓶中，加空白肠灌流液定容至刻度，分别配制成 0.04456，0.1782，0.7128 mg·mL^{-1} 低、中、高 3 个质量浓度的芥子碱硫氰酸盐溶液，按 2.2.1 项下色谱条件测定，重复进样 5 次，记录芥子碱硫氰酸盐的峰面积，将峰面积代入回归方程计算芥子碱硫氰酸盐浓度，以测得值 / 加入值计算回收率，测得芥子碱硫氰酸盐低、中、高浓度的回收率为（102.32 ± 1.32）%，（98.53 ± 1.09）%，（99.54 ± 1.39）%，结果表明芥子碱硫氰酸盐的回收率均符合要求。

2.3 莱菔子水提液中芥子碱硫氰酸盐在不同 pH 的 K–R 液中的稳定性考察 见图 2。采用 1.0 mol·L^{-1}HCl 和 NaOH 溶液调节 K–R 液得到 pH 分别为 5.12，6.31，7.02 和 8.24，加入一定量的莱菔子水提液配制成药液，37 ℃水浴条件下放置，分别于 0，1，2 和 4 h 取样。测定芥子碱硫氰酸盐含量，并计算其残存百分率。结果表明，芥子碱硫氰酸盐在 4 个 pH 的 K–R 试液中稳定性均良好，其中在 pH 为 5.12 的 K–R 试液中稳定性最好。

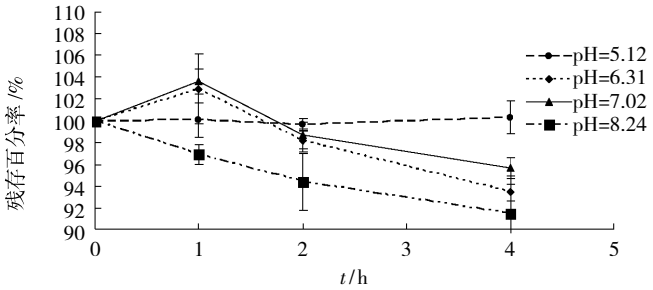


图 2 不同 pH 值下芥子碱硫氰酸盐的残存百分率曲线

Figure 2 The remaining percentage curves of sinapine cyanide sulfonate at different pH values

2.4 大鼠在体单向肠灌流实验[6-7] 取禁食过夜（自由饮水）的大鼠，10 %水合氯醛麻醉（4 mL·kg^{-1}）腹腔注射，背位固定，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 ℃的生理盐水将肠内容物冲洗干净，再用空气将生理盐水排净。实验时取不同浓度的药物灌流液（预热至 37 ℃）100 mL，先以 1.0 mL·min^{-1} 的流速灌流 10 min，再将流速调为 0.2 mL·min^{-1}，预平衡 30 min 后，开始计时，用 6 个已知质量的小瓶分别于 0~15，15 ~ 30，30 ~ 45，45 ~ 60，60 ~ 75，75~90 min 时间段收集各灌流液样品，称质量。取样品经 0.45 μm 的微孔滤膜滤过，续滤液用 HPLC 测定峰面积，计算各个时间段灌流液样品中芥子碱硫氰酸盐的含量。最后剪取各个被灌流的肠段，测量肠内径以及长度。

2.5 不同浓度莱菔子提取液的芥子碱硫氰酸盐肠吸收特征 见表 1。分别用 2.2.3 项下 0.02，0.05，0.075 和 0.1 g·mL^{-1} 的药物灌流液按 2.4 项下方法进行单向灌流肠吸收实验，收集的灌流液用微孔滤膜（0.45 μm）滤过，精密取 20 μL 注入高效液相色谱仪，按 2.2.1 项下的色谱条件测定芥子碱硫氰酸盐的含量，色谱图见图 1（D）。采用重量法按照下式[8]计算芥子碱硫氰酸盐吸收速率常数（K_a）和药物表观吸收系数（P_{app}）。

$$K_a=\left(1-\frac{C_{out}Q_{out}}{C_{in}Q_{in}}\right)\frac{Q}{V} \qquad P_{app}=\frac{-Q\ln\left(\frac{C_{out}Q_{out}}{C_{in}Q_{in}}\right)}{2\pi rl}$$

其中：C_{out} 为稳态肠管药物浓度，即肠道出口药物浓度；C_{in} 为药物进入肠管开始灌流前浓度；Q 为灌流速度（0.2 mL·min^{-1}）；l 和 r 分别为被灌流肠段的长度（cm）和被灌流肠断的横截面半径（cm）；Q_{in} 和 Q_{out} 分别为肠道进出口灌流液的体积（mL）（假定进出口灌流液密度为 1 g·mL^{-1}）。采用 SPSS 13.0 对数据进行分析，各组间数据比较采用单因素方差分析（one-way analysis of variance，ANOVA），$P < 0.05$ 认为具有统计学意义。结果见表 1。结果表明，0.02 g·mL^{-1} 莱菔子提取液中芥子碱硫氰酸盐的吸收速率常数（K_a）和表观吸收系数（P_{app}）与 0.05 g·mL^{-1}、0.075 g·mL^{-1} 与 0.1 g·mL^{-1} 间差异有统计学意义（$P < 0.05$），0.05，0.075 及 0.1 g·mL^{-1} 间的 K_a 和 P_{app} 差异无统计学意义。随着莱菔子药物浓度的增大，芥子碱硫氰酸盐的吸收出现了高浓度饱和现象，提示其吸收特性可能存在易化扩散或主动转运，需进一步探讨。另有文献报道[9]，药物在大鼠体内的 $P_{app} < 1.8 \times 10^{-4}$ cm·min^{-1} 和 $P_{app} > 1.2 \times 10^{-3}$ cm·min^{-1} 分别表明难以吸收和易于吸收，由结果可知，P_{app} 值均小于 1.8×10^{-4} cm·min^{-1}，说明芥子碱硫氰酸盐的吸收较差。

2.6 P–gp 抑制剂对芥子碱硫氰酸盐吸收的影响 见表 2。据前期研究结果，确定选用 K–R 试液配制 0.02 g·mL^{-1} 莱菔子提取液作为供试品溶液，加入盐酸维拉帕米（Ver）为 P–gp 抑制剂，使其浓度为 1 mmol·L^{-1}，按 2.4 项下方法进行小肠单向灌流试验。按照 2.2.1 项下的色谱条件测定芥子碱硫氰酸盐的浓度，由公式计算 K_a、P_{app}。加入盐酸维拉帕米组与不加盐酸维拉帕米实验组相比较，芥子碱硫氰酸盐的 K_a 和 P_{app} 增加，差异有统计学意义（$P < 0.01$），说明芥子碱硫氰酸盐是 P–gp 的底物。

3 讨论

目前研究药物小肠吸收状况的方法主要为离体外翻肠囊法、在体肠循环法和在体单向肠灌流法[10-12]，

表 1　不同浓度莱菔子提取液的芥子碱硫氰酸盐肠吸收特征（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 1　Intestinal absorption characteristics of sinapine cyanide sulfonate of semen raphani water extract at different concentrations

莱菔子提取液浓度	肠吸收特征参数	
/g·mL^{-1}	K_a /10^{-3} min^{-1}	P_{app} /10^{-4} cm·min^{-1}
0.020	0.103 ± 0.017	0.489 ± 0.084
0.050	0.821 ± 0.177*	0.796 ± 0.093
0.075	1.141 ± 0.632**	1.021 ± 0.532
0.100	0.914 ± 0.338**	0.884 ± 0.673*

注：与 0.02 g·mL^{-1} 莱菔子提取液比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

表 2　P-gp 抑制剂对芥子碱硫氰酸盐在大鼠小肠吸收的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 2　Effect of P-gp inhibitors on the intestinal absorption parameters of sinapine cyanide sulfonate

组别	K_a /10^{-3} min^{-1}	P_{app} /10^{-4} cm·min^{-1}
0.02 g·mL^{-1} 莱菔子提取液	0.103 ± 0.017	0.489 ± 0.084
0.02 g·mL^{-1} 莱菔子提取液 +Ver	7.852 ± 2.159**	9.215 ± 3.07**

注：与 0.02 g·mL^{-1} 莱菔子提取液比较，$^{**}P < 0.01$ 。

其中在体大鼠肠灌流模型为美国食品药品管理局（FDA）认可的研究药物与候选药物的吸收特性的模型。此模型的特点是在整个实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，可较好地模拟人体的体内环境，且结果与人体试验结果相关性良好，近年来已成为药物肠吸收的主要研究模型。

大鼠肠灌流模型常采用“在体肠循环灌流法”和“单向肠灌流法”两种方法，考虑到前者灌流时流速较高，回流供试液易对肠黏膜造成损伤，可能会导致药物的吸收增大，影响实验结果的准确性。本研究采用大鼠在体单向灌流模型，其实验条件与口服给药后药物接触的肠道正常生理环境较接近。同时，为了确保灌流液中芥子碱硫氰酸盐浓度的降低是因为肠道吸收而不是其他原因，本实验将灌流管路的乳胶管剪短至 15 cm，在实验前以实验时的灌流速度用供试液预平衡灌流管路，以避免灌流管路的物理吸附对实验结果的影响。

P-gp 载体蛋白在肠吸收中的主要功能是将已经吸收入细胞的药物转运回肠腔中，以降低口服药物的生物利用度。通过实验发现芥子碱硫氰酸盐属于难吸收药物，且其 K_a 在不同浓度下有显著性差异，可能与 P-gp 参与肠道吸收有关，研究[13-14]表明，P-gp 参与底物肠道吸收的过程中表现出明显的剂量依赖性。低剂量给药时，P-gp 分泌对药物经小肠上皮的渗透性影响很大，导致药物吸收不完全；相反在高剂量下，P-gp 介导的分泌转运达到饱和，使药物吸收受 P-gp 介导的分泌影响较小。本研究提示，在低浓度药液中加入 P-gp 抑制剂后，芥子碱硫氰酸盐的 K_a 显著增大，可能与上述原因有关。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中国药典（一部）[M]. 北京：中国医药科技出版社，2010：256.

[2] 谭鹏，姜虹玉，吕文海. 莱菔子研究概况[J]. 实用中医药杂志，2005，21(4)：254-255.

[3] 沈亚芬，孙元龙，沈金银. 中药莱菔子药理作用研究进展[J]. 中国中医药科技，2011，18(3)：271.

[4] 丁臻，蔡梅超，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(01)：19-21.

[5] 安叡，张华，张艺竹，等. 采用在体单向肠灌流模型研究葛根芩连汤不同配伍组主要指标成分的肠吸收特性[J]. 药学学报，2012，47(12)：1696-1703.

[6] 张艳，王平，王进荣，等. 在体单向肠灌流模型研究大黄素的大鼠肠吸收特性[J]. 中药新药与临床药理，2012，23(3)：286-289.

[7] 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]. 药学学报，2009，44(08)：922-926.

[8] 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- 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)：1016-1021.

[9] Fagerholm U，Johansson M，Lennernah. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum [J]. Pharm Res，1996，13(9)：1336 -1342.

[10] 梁新丽，祝婧云，廖正根，等. 白芷提取物对葛根中葛根素肠吸收的影响研究[J]. 中国中药杂志，2012，37(10)：1477-1482.

[11] 张英丰，李玉洁，杨庆，等. 采用离体外翻肠囊模型进行穿心莲内酯的肠吸收特性研究[J]. 中国实验方剂学杂志，2010，16(9)：107-110.

[12] 耿婷，朱慧，丁安伟，等. 荆芥内酯大鼠在体肠吸收动力学研究[J]. 中国药学杂志，2011，46(24)：1911-1915.

[13] 贺云霞，孙进，程刚. 多药耐药性 P- 糖蛋白在药物肠道吸收中的作用[J]. 沈阳药科大学学报，2004，21(5)：389-391.

[14] Wagner D，Spahn-Langguth H，Hanafy A， et al. Intestinal drug efflux：formulation and food effects[J]. Adv Drug Deliv Rev，2001，50 (Suppl 1)：S13-31.

（编辑：邓响潮）