技术方法 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000948

环维黄杨星 D 羟丙基 -β- 环糊精包合物理化性质与大鼠口服生物利用度

陈 静[1],张景勋[1],赵 华[1],王 红[1],孙 全[2],袁誉铭[1],蒋心惠[1]
(1. 重庆医科大学药学院高校药物工程研究中心,重庆 400016;2. 重庆市中医院药剂科,重庆 400021)

【摘 要】**目的**:本研究对制备的环维黄杨星 D 羟丙基-β-环糊精包合物(D hydroxypropyl-β-cyclodextrin complex,CBHD)理化性质进行表征,并考察其在大鼠体内的药动学特征。**方法**:采用红外光谱法、差示扫描量热法对 CBHD 物进行表征。大鼠灌胃给予 CBHD 和环维黄杨星 D(CB)混悬液后,于不同时间点大鼠眼底静脉丛取血。采用 HPLC/FLD 测定血浆中 CB 的浓度。**结果**:CBHD 的理化性质与 CB 和物理混合物明显不同,差示扫描量热法测定结果显示形成包合物后一种新物相峰出现;CBHD 和 CB 的主要药动学参数如下:C_{max} 为(76.83 ± 6.73) μg/L 和(69.27 ± 8.66) μg/L;T_{max} 为(6.00 ± 0.00) h 和(4.33 ± 0.00) h;AUC_{0-t} 为(1 541.04 ± 178.61) μg/(L·h)和(619.93 ± 75.67) μg/(L·h)。**结论**:CBHD 的相对生物利用度为 248.58%,CBHD 明显提高了 CB 在大鼠体内的生物利用度。

【关键词】环维黄杨星 D;羟丙基-β-环糊精;包合物;表征;生物利用度
【中图法分类号】R944.9 【文献标志码】A 【收稿日期】2015-09-20

Physicochemical characterization of cyclovirobuxine D hydroxypropyl-β-cyclodextrin and its oral bioavailability in rats

Chen Jing[1], Zhang Jingqing[1], Zhao Hua[1], Wang Hong[1], Sun Quan[2], Yuan Yuming[1], Jiang Xinhui[1]
(1. Chongqing Research Center for Pharmaceutical Engineering in University, College of Pharmacy, Chongqing Medical University; 2. Department of Pharmacy, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital)

【Abstract】***Objective***: To characterize the physicochemical properties of cyclovirobuxine D hydroxypropyl-β-cyclodextrin complex (CBHD) and to explore its pharmacokinetic features in rats. ***Methods***: CBHD were characterized by infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. Blood was collected from retinal venous plexus of SD rats after oral administration of CBHD and CB, and the blood concentration was determined by HPLC/FLD. ***Results***: CBHD showed different physicochemical propertie; a new substance peak was shown in the DSC analysis of CBHD. The pharmacokinetic parameters of CBHD and CB were calculated as follows: C_{max} (76.83 ± 6.73) μg/L and (69.27 ± 8.66) μg/L, Tmax (6.00 ± 0.00) h and (4.33 ± 0.00) h, AUC_{0-t} (1 541.04 ± 178.61) μg/(L·h) and (619.93 ± 75.67) μg/(L·h). ***Conclusion***: The relative bioavailability of CBHD is 248.58%. CBHD significantly increases the bioavailability of CB in rats.

【Key words】cyclovirobuxine D; hydroxypropyl-β-cyclodextrin; complex; characterization; bioavailability

环维黄杨星 D(cyclovirobuxine D,CB)系从黄杨科植物小叶黄杨(*Buxus microphylla Sieb. et Zucc. var. sinica Rehd. et Wils.*)及其同属植物中提取的一种生物碱,具有行气活血、通络止痛的功效,主要用于治疗气滞血瘀所致的胸痹心痛、冠心病、心律失常等心血管疾病[1-5]。CB 是一个从我国中药宝库中发掘出来的具有划时代意义的单体化合物,在临床上具有良好的应用前景。然而 CB 却因其脂溶性强、水溶性差、生物利用度低等缺点[6],一定程度上制约了 CB 的推广使用。

羟丙基-β-环糊精(hydroxypropyl-β-cyclodextrin,HPCD)为 β-环糊精的水溶性衍生物,是一种安全性高、无毒副作用的药物辅料,能够增加难溶性药物的水溶性、提高药物的生物利用度、降低药物

作者介绍:陈 静,Email:1170958306@qq.com,
研究方向:体内药物分析。
通信作者:蒋心惠,Email:jiangxinhui3@hotmail.com。
基金项目:重庆市教育委员会科学技术研究资助项目(编号:KJ120321)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160513.1017.042.html
(2016-05-13)

的毒副作用[7-9]。本课题组将 CB 制备成环维黄杨星 D 羟丙基-β-环糊精包合物（cyclovirobuxine D hydroxypropyl-β-cyclodextrin complex，CBHD），以增加药物的溶解度，同时研究了 CBHD 在大鼠体内的药代动力学过程，为制剂开发提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 1260 型高效液相色谱仪（美国安捷伦公司）；Hypersil ODS 色谱柱（大连依利特分析仪器有限公司）；TGL-16G 高速台式离心机（上海安亭科学仪器厂）；分析电子天平（AB204-E，瑞士 Mettler Toledo 公司）；DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器（巩义市予华仪器有限公司）；旋涡混合器（QL-901，海门其林贝尔仪器公司）；RE-52AA 型旋转蒸发仪（上海亚荣生化仪器厂）；Edi-S10 UV 型实验室纯水系统（上海和泰仪器有限公司）。

1.1.2 试药 环维黄杨星（纯度>99%，武汉富驰生物科技有限公司）；Lipoid S75（PC）（德国 Lucas Meyer 公司）；1-萘基异氰酸酯（美国 Sigma 公司）；甲醇（色谱纯，美国天地有限公司）；超纯水。

1.1.3 实验动物 清洁级 SD 大鼠 12 只，雄性，体质量（200 ± 20）g，由重庆医科大学实验动物中心提供。实验前并未使用过其他药物。

1.2 方法

1.2.1 CBHD 的制备 采用研磨法制备包合物。称取适量 CB 和 HPCD（摩尔比为 1:1）混合均匀，常温下加少量水研磨 1 h，真空干燥 2 h，干燥物依次用少量乙醇和水洗涤，然后真空干燥 12 h 即得 CBHD。

1.2.2 CBHD 理化性质的研究

1.2.2.1 包封率 分别精密称取按照“1.2.1”项下制备的 CBHD 3 份，无水乙醇适量溶解，按“1.2.4.2”项下方法处理，在“1.2.3.1”项色谱条件下测定样品的中的 CB 含量。

1.2.2.2 红外扫描 采用 KBr 压片法，分别对 CB、HPCD、处方比例物理混合物、CBHD 在 400~4 000/cm 频数范围内进行扫描，即得红外光谱图。

1.2.2.3 差示扫描量热法 分别取 CB、HPCD、物理混合物、CBHD 适量，置于铝质样品坩埚中，采用该法进行热分析。测定条件：温度-20~350 ℃，升温速度 10 ℃/min，气氛为氮气。

1.2.3 血药浓度分析方法的建立

1.2.3.1 色谱条件 色谱柱：C18 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇-水（85:15）（v/v）；荧光检测：激发波长 231 nm，发射波长 385 nm；流速：1.0 mL/min；柱温：25 ℃；进样量：20 μL。

1.2.3.2 CB 对照品溶液的制备 取 CB 对照品 10 mg，用二氯甲烷溶解后转移至 25 mL 容量瓶中，二氯甲烷定容，得 CB 储备液，取适量储备液配制成质量浓度为 15、30、60、90、150、300、600 ng/mL 的 CB 系列对照品溶液，于 4 ℃冰箱中保存，备用。

1.2.3.3 异氰酸萘酯溶液的制备 取异氰酸萘酯 20 μL 置 100 mL 量瓶中，加二氯甲烷至刻度，摇匀即可（0.2 μL/mL），于 4 ℃冰箱中保存，备用。

1.2.3.4 专属性考察 空白血浆、空白血浆加对照品的混合物、大鼠灌胃 CBHD 的血浆样品分别按“1.2.4.2”项下方法处理，在“1.2.3.1”项色谱条件下进行测定，记录色谱图。

1.2.3.5 标准曲线的制备 取空白血浆 100 μL，加入系列 CB 对照品溶液 50 μL，得到含 CB 平均浓度分别为 5、10、20、30、50、100、200 ng/mL 的标准血浆样品。按“1.2.4.2”项下方法处理，在“1.2.3.1”项色谱条件下测定各样品的中的 CB。以 CB 峰面积（A）对 CB 的浓度（C）进行线性回归，得标准曲线。

1.2.3.6 精密度考察 取空白血浆 100 μL，加入系列 CB 对照品溶液 50 μL，配制成低、中、高 3 种不同浓度（5、30、200 ng/mL）的标准血浆样品各 5 份按“1.2.4.2”项下方法处理，在“1.2.3.1”项色谱条件下进样分析。连续测定 3 d，计算日内、日间精密度。

1.2.3.7 提取回收率和方法回收率 取空白血浆 100 μL，加入 CB 对照品溶液，分别配制成低、中、高浓度（5、30、200 ng/mL）的标准血浆样品各 5 份，按“1.2.4.2”项下方法处理，在“1.2.3.1”项色谱条件下进样分析，记录峰面积，计算各浓度的平均峰面积 Ar。另以配制相同浓度的对照品溶液直接衍生化后进样，同法操作，计算平均峰面积 As。以前后 2 种处理得到的峰面积之比（Ar/As）计算提取回收率。

取空白血浆 100 μL，加入 CB 对照品溶液，分别配制成低、中、高浓度（5、30、200 ng/mL）的标准血浆样品各 5 份，按“1.2.4.2”项下方法处理，在“1.2.3.1”项色谱条件下进样分析，考察方法回收率。

1.2.4 药代动力学研究

1.2.4.1 分组、给药及血样采集 采用单剂量给药方案，雄性 SD 大鼠 12 只，随机分为 2 组并编号，每组大鼠分别灌胃给与 CBHD、CB（均相当于给药量 CB60 mg/kg），给药前禁食 12 h，不禁水。在灌胃给药后 15、30 min，1、2、3、4、5、6、8、12、24、48、72、96 h 眼底静脉丛取血 0.3 mL 于肝素浸润过的试管中，3 000 r/min 离心 10 min，吸取上层血浆于洁净的 EP 管中，放入-20 ℃保存，备用。

1.2.4.2 血浆样品的处理 取血浆 150 μL，加入二氯甲烷 1 mL，旋涡振荡 5 min，6 000 r/min 离心 10 min，收集下层溶液，加入异氰酸萘酯溶液 50 μL，40 ℃反应 60 min，氮气吹干，加 150 μL 甲醇溶解，12 000 r/min 离心 10 min，取上清液进样分析。

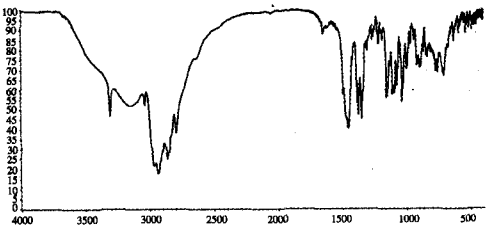
1.2.4.3 数据分析 CBHD 血药浓度-时间曲线采用 DAS 2.1.1 药动学软件进行拟合分析，计算药代动力学参数。

2 结 果

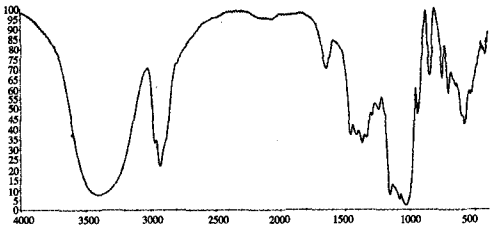
2.1 CBHD 理化性质的研究

2.1.1 包封率 分别将所测峰面积 A 代入 CB 的标准曲线中，得出 CB 浓度，从而计算得到 CBHD 的平均包合率为 95.31%（n=3）。

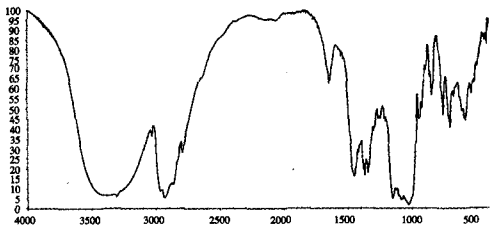
2.1.2　红外扫描　由图 1 可知，CB 与 HPCD 物理混合物的红外光谱基本为 CB 与 HPCD 主要锋的简单叠加，说明混合物中二者之间并没有发生相互作用。包合物与物理混合物的红外光谱相比，混合物在 3307.38（νNH_2^+）cm^{-1}、3 405.11（νOH）cm^{-1}、2 970.25（$\nu^{as}CH_3$）、2 932.01（$\nu^{as}CH_2$）有特征吸收峰，而包合物中仅有 HPCD 在 3 405.11（νOH）cm^{-1}、2 970.25（$\nu^{as}CH_3$）、2 932.01（$\nu^{as}CH_2$）处的吸收峰，CB 在 3 307.38（νNH_2^+）cm^{-1} 处的特征峰几乎不见或消失，表明 CBHD 已经形成。



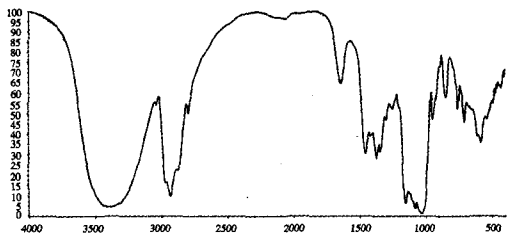
A. CB



B. HPCD



C. 物理混合物

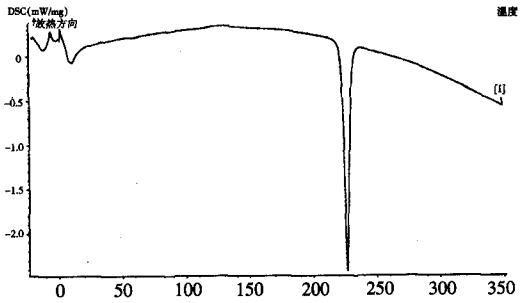


D. CBHD

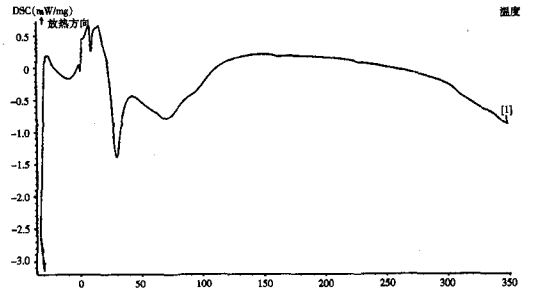
图 1　CB、HPCD、物理混合物、CBHD 的红外光谱图

Fig.1　FT-IR spectra of CB, HPCD, physical mixture and CBHD

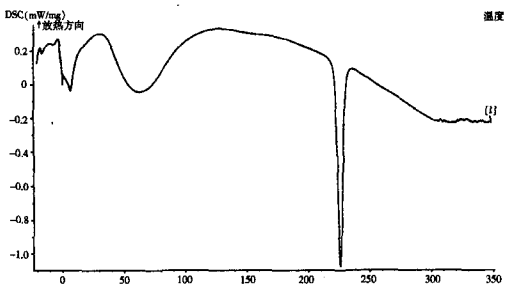
2.1.3　差示扫描量热法　由图 2 可知，HPCD 在 68.2 ℃处有特征吸热峰，CB 在 226.4 ℃有特征吸热峰，物理混合物为 CB 与 HPCD 特征吸热峰的简单叠加；包合物与物理混合物相比，包合物图谱中 226.4 ℃处的 CB 吸热峰消失，在 68.2 ℃的吸热峰移至 73.7 ℃处，同时此处的吸热峰强度显著增强，表明 CB-HPCD 包合物已构成了新的物相，形成了包合物。



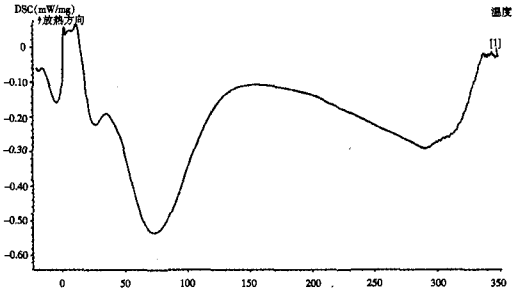
A. CB



B. HPHD



C. CB 和 HPHD 物理混合物



D. CBHD

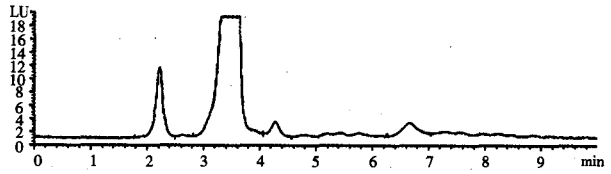
图 2　CB、HPHD、CB 和 HPHD 物理混合物、CBHD 的 DSC 图谱

Fig.2　DSC of CB, HPHD, physical mixture of CB and HPHD and CBHD

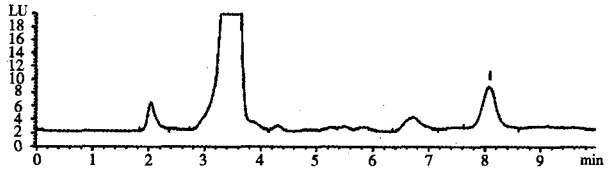
2.2　*血药浓度分析方法*

2.2.1　专属性　在选定的色谱条件下，血浆中杂质或内源性物质均不干扰测定，所建立的分析方法专属性强，HPLC 色谱图见图 3。

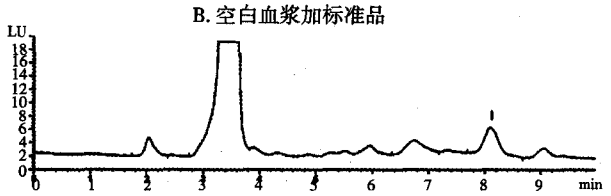
2.2.2　标准曲线及检测限　以 CB 峰面积（A）为横坐标，CB 的浓度（C）为纵坐标进行线性回归，得标准曲线方程为 Y=1.334 1X+7.225 6（r^2=0.999 8），表明 CB 血浆质量浓度在 5~200 ng/mL 范围内具有良好的线性（表 1，图 4）。在信噪比（S/N）为 3 的条件下，CB 的检测限为 1 ng/mL；在信噪比（S/N）为 10 的条件下，CB 的定量限为 5 ng/mL。



A. 空白血浆



B. 空白血浆加标准品



C. 血浆样品

1. CB

图 3 CB 色谱图

Fig.3 Chromatogram of CB

表 1 线性测定结果

Tab.1 Results of linearity test

CB浓度(ng/mL)	平均峰面积
5.00	10.91
10.00	21.77
20.00	35.13
30.00	47.62
50.00	74.50
100.00	140.46
200.00	273.82

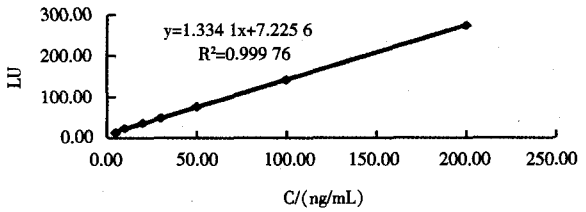


图 4 CB 的标准曲线

Fig.4 Linearity curve of CB

2.2.3 精密度试验 低、中、高 3 种浓度(5、30、200 ng/mL)的标准血浆样品的日内精密度 RSD 分别为 5.48%、3.11%、2.59%；日间精密度 RSD 分别为 6.25%、2.98%、2.01%。实验结果(表 2)表明精密度好，符合方法学要求。

2.2.4 提取回收率、方法回收率 低、中、高 3 种浓度(5、30、200 ng/mL)的标准血浆样品的提取回收率分别为94.63%、95.83%、94.10%；方法回收率分别为 95.64%、98.39%、97.77%，结果(表 2)表明以上均符合方法学要求。

2.3 *血药浓度和药动学参数*

大鼠灌胃给予 CBHD、CB 后的血药浓度-时间曲线见图 4 和表 3，由图可知，CBHD 和 CB 在口服灌胃给药后最大血药浓度分别出现在 6.00 h 和 4.33 h。采用 DAS 2.1.1 软件对血药浓度-时间数据进行非房室模型拟合，并用 t 检验对实验结果进行统计学分析，T_{max} 和 C_{max} 采用实测值，AUC 根据梯形法进行计算，CBHD、CB 的主要药动学参数见表 4。由表 4 可知，相对于 CB，CBHD 的 AUC_{0-t} 增加到(1 541.04 ± 178.61) μg/(L·h)提高了 2.48 倍；CBHD 的 $t_{1/2}$ 增加到(24.22 ± 5.10) h，提高了 2.17 倍，说明其在体内消除较慢；CBHD 的增 Cmax加到(76.83 ± 6.73) μg/L；CBHD 的相对生物利用度为248.58%。

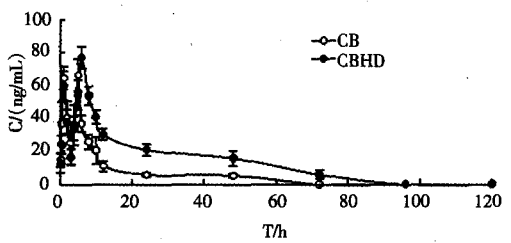


图 4 CBHD、CB 的血药浓度 - 时间曲线

Fig.4 Mean plasma concentration–time profiles of CBHD and CB suspension after oral

3 讨 论

本文以研磨法制备了 CBHD，以差示扫描量热和红外吸收光谱对其进行了表征。综合表征结果表明，CB 被 HPCD 包合后呈现出新的物相特征，其理化性质与单纯的物理混合物有明显区别。

根据文献报道[10-11]，CB 结构中不含双键，紫外扫描具有末端吸收，而末端吸收不能满足体内血药浓度测定的要求，因此建立合适的体内血药浓度测

表 2 精密度和回收率考察试验结果（n=5）

Tab.2 Precision and recovery of CBHD（n=5）

加入浓度 (ng/mL)	日内精密度		日间精密度		提取回收率			方法回收率 (%)
	测得浓度 (ng/mL)	RSD (%)	测得浓度 (ng/mL)	RSD (%)	提取后测得峰面积(LU)	未提取测得峰面积(LU)	提取回收率 (%)	
5	4.78 ± 0.26	5.48	4.85 ± 0.30	6.25	13.61 ± 0.35	14.38 ± 0.28	94.63	95.64
30	29.52 ± 0.92	3.11	29.41 ± 0.88	2.98	46.27 ± 1.13	49.93 ± 1.65	95.83	98.39
200	195.55 ± 5.07	2.59	196.43 ± 3.96	2.01	268.10 ± 6.77	286.14 ± 8.28	94.10	97.77

表 3 c-t 的测定结果

Tab.3 Results of c-t

t/h	CB的血药浓度(ng/mL)	CBHP的血药浓度(ng/mL)
0.25	14.94 ± 4.29	12.57 ± 5.71
0.5	36.98 ± 13.19	23.85 ± 5.62
1	64.47 ± 7.19	59.78 ± 8.92
2	40.56 ± 9.82	37.58 ± 7.69
3	24.81 ± 12.71	16.52 ± 4.91
4	36.00 ± 12.41	33.88 ± 7.38
5	66.11 ± 10.06	54.14 ± 9.09
6	36.94 ± 4.92	76.83 ± 6.72
8	25.73 ± 4.10	53.68 ± 5.52
10	20.36 ± 8.09	40.64 ± 4.19
12	10.90 ± 3.20	30.15 ± 3.35
24	5.62 ± 1.18	21.03 ± 3.43
48	5.12 ± 1.29	15.72 ± 4.78
72	0.00 ± 0.00	5.94 ± 2.49
96	0	0
120	0	0

表 4 SD 大鼠口服 CBHD 和 CB 混悬液的主要药动学参数

Tab.4 Main pharmacokinetic parameters of SD rats after oral administration of CBHD and CB suspensions as non-compartment model

参数	CB	CBHD
AUC_{0-t}(μg/L·h)	619.93 ± 75.67	1 541.04 ± 178.61[b]
$AUC_{0-\infty}$(μg/L·h)	657.95 ± 82.93	1 743.55 ± 216.63[b]
C_{max}(μg/L)	69.27 ± 8.66	76.83 ± 6.73
T_{max}(h)	4.33 ± 1.63	6.00 ± 0.00[a]
Cl(L/h/kg)	92.46 ± 12.09	34.88 ± 4.54[b]
$t_{1/2}$(h)	11.12 ± 1.63	24.22 ± 5.10[b]
F(%)	-	248.58

注：a，$P<0.05$；b，$P<0.01$ vs. CB

定方法极为重要。中国药典(2015 版)中 CB 原料药及其制剂的含量测定分别采用非水滴定法[12]和酸性染料比色法[13]测定的均为总生物碱，专属性差，已有文献报道的测定 CB 的方法有 HPLC-APCI-MS 法[14]、LC/MS/MS 法[15]，但均对仪器有不同程度的特殊要求，限制了其应用。本文建立了测定大鼠血浆中 CB 的柱前衍生化 HPLC/FLD 法，该分析方法条件可靠，杂质干扰小，分离性能高，符合生物样品测定的要求。

由血药浓度-时间曲线图可知，CBHD 和 CB 在大鼠体内存在双峰现象，已有文献报道[16-18]，可能是由于胃肠道多吸收位点、肝肠循环、P-gp 在肠道的不均匀分布所造成的，但 CBHD 和 CB 的药-时曲线出现双峰的原因还有待进一步研究。

由 CB 和 CBHD 在小鼠体内的药动学参数可以看出，大鼠口服 CBHD 后的最大血药浓度高于 CB，说明包合物具有促进药物吸收的作用。相对于 CB，CBHD 的 AUC、$t_{1/2}$ 明显增加，CL 显著减小，说明CB 制备成包合物后，能够提高药物在体内的吸收程度、降低体内消除速率、延长体内作用时间、增加生物利用度，为临床新药剂型的研究奠定理论基础。

参 考 文 献

[1] 喻 斌，阮 鸣，沈祥春，等. 环维黄杨星 D 对麻醉犬血流动力学的影响[J]. 中药材，2011，34(11)：1741-1745.

[2] Hu D，Liu X，Wang Y，Chen S. Cyclovirobuxine D ameliorates acute myocardial ischemia by K(ATP) channel opening，nitric oxide release and anti-thrombosis[J]. Eur J Pharmacol，2007，569(1-2)：103-109.

[3] 黄丹丹，邵靓婧，许 立. 环维黄杨星 D 对大鼠心力衰竭的治疗作用[J]. 医药导报，2014，33(12)：1562-1565.

[4] 周玖瑶. 环维黄杨星 D 药理研究概况[J]. 广州中医药大学学报，2005，22(1)：70-74.

[5] 梁 涛，方泰惠，姚秀娟，等. 环维黄杨星 D 的药理研究进展[J]. 解放军药学学报，2001，17(1)：35-38.

[6] 郭彩红，窦后松，郜 宁，等. 环维黄杨星 D 磺酰化衍生物的合成及耐缺氧活性的研究[J]. 华西药学杂志，2006，21(6)：511-514.

[7] 孙家艳，庞芳苹，刘墨祥. 羟丙基-β-环糊精在天然药物中的应用研究进展[J]. 中成药，2015，37(2)：388-391.

[8] 杨建文，任晓亮，戚爱棣. 环糊精及其衍生物在中药提取中的应用研究进展[J]. 药物评价研究，2015，38(2)：208-213.

[9] 周 伟，李 颖，杨大坚. β-环糊精及其衍生物在药剂学中的研究与应用进展[J]. 中南药学，2011，9(9)：692-695.

[10] 黄勤安，黄海燕，鲁 静，等. 高效液相色谱法测定黄杨宁片中环维黄杨星 D 的含量和含量均匀度[J]. 药物分析杂志，2007，27(2)：264-266.

[11] 郭 青，吕 霞，伍乃英，等. 黄杨宁片及原料中环维黄杨星 D 含量测定的 3 种 HPLC 方法评价[J]. 中国现代应用药学，2009，26(11)：929-933.

[12] 中国药典[S]. 2015 年版，一部，2015：406.

[13] 中国药典[S]. 2015 年版，一部，2015：1472.

[14] Ding L，Hu J，Jiang M，et al. Sensitive HPLC-APCI-MS method for the determination of cyclovirobuxine D in human plasma[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2006，843(1)：78-83.

[15] Yu P，Zou L，Liu W，et al. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of cyclovirobuxine D in human plasma[J]. J Pharm Biomed Anal，2006，42(4)：488-493.

[16] Schaiquevich P，Niselman A，Rubio M. Comparison of two compartmental models for describing ranitidine's plasmatic profiles[J]. Pharmacol Res，2002，45(5)：399-405.

[17] Qu J，Gao J，Sun J，et al. Pharmacokinetics of conjugated metabolites in rat plasma after oral adminis tration of tectoridin[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci，2012(902)：61-69.

[18] Wada S，Kano T，Mita S，et al. The role of inter-segmental differences in P-glycoprotein expression and activity along the rat small intestine in causing the double-peak phenomenon of substrate plasma concentration[J]. Drug Metab Pharmacokinet，2013，28(2)：98-103.

（责任编辑：张辉洁）