

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2018.05.0568

• 短篇论著 •

酮康唑促进环维黄杨星 D 羟丙基- β -环糊精包合物大鼠在体肠吸收

鲁文娟, 陈 静, 张景劼, 蒋心惠*

重庆医科大学重庆高校药物工程研究中心, 重庆 400016

[摘要] **目的** 研究环维黄杨星 D (CB) 羟丙基- β -环糊精包合物 (CBHD) 的大鼠在体肠吸收特征, 探讨细胞色素 P450 抑制剂酮康唑 (KET) 对 CB 和 CBHD 肠吸收的影响。**方法** 雄性 SD 大鼠 24 只, 随机平均分为 4 组: CB 组、CBHD 组、KET+CB 组、KET+CBHD 组, 每组 6 只, 建立大鼠在体肠吸收模型。采用单向灌注法考察 CB 和 CBHD 在大鼠各肠段的吸收情况, 及 KET 对 CB 和 CBHD 肠吸收行为的影响。以高效液相色谱/荧光检测器 (HPLC/FLD) 法测定 CB 浓度, 色谱柱为依利特 C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μ m); 流动相为甲醇-水 (85:15, 体积比); 激发波长为 231 nm, 发射波长为 385 nm; 柱温为 25 $^{\circ}$ C, 流速为 1.0 mL/min; 进样量为 20 μ L。**结果** 所建 HPLC/FLD 法专属性好, 以 CB 峰面积 (A) 对 CB 浓度 (C) 进行线性回归, 建立的标准曲线方程为 $A=106.7 C+41.861$ ($R^2=0.999 08$), 表明 CB 在 0.5~20.0 μ g/mL 范围内线性良好。低、中、高 3 个浓度 (1.0、5.0、10.0 μ g/mL) 样品溶液的日内精密度分别为 2.25%、2.44%、3.04%, 日间精密度分别为 4.22%、2.00%、2.50%, 符合方法学要求。低、中、高浓度样品溶液的回收率分别为 99.08%、98.24%、97.25%, 符合方法学要求。加入 KET 后, CBHD 在十二指肠、空肠、回肠、结肠的吸收速率常数 (K_a) 分别为 CB 的 4.18、5.05、1.91、2.85 倍 ($P<0.05$), 有效渗透率 (P_{eff}) 分别为 CB 的 4.92、5.98、2.19、3.24 倍 ($P<0.05$)。**结论** KET 可促进 CB 与 CBHD 在肠道的吸收。

[关键词] 环维黄杨星 D; 包合物; 酮康唑; 肠吸收**[中图分类号]** R 972**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2018)05-0568-05

Ketoconazole promotes *in situ* intestinal absorption of cyclovirobuxine D hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex in rats

LU Wen-juan, CHEN Jing, ZHANG Jing-qing, JIANG Xin-hui*

Chongqing Research Center for Pharmaceutical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To study the *in situ* intestinal absorption characteristics of cyclovirobuxine D (CB) hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex (CBHD) in rats, and to explore the effect of cytochrome P450 inhibitor ketoconazole (KET) on CB and CBHD *in situ* intestinal absorption. **Methods** Twenty-four male rats were randomized into CB, CBHD, KET+CB and KET+CBHD groups, with 6 rats in each group. *In situ* intestinal absorption was adopted in a rat model. One-way intestinal perfusion model was employed to investigate the absorption of CB and CBHD in the intestinal segments of rats and the effects of KET on CB and CBHD absorption. The concentration of CB was determined by high-performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC/FLD; Lichrospher C₁₈ column [250 mm×4.6 mm, 5 μ m]). The mobile phase was methanol-water with volume ratio being 85:15. The excitation wavelength was set at 231 nm, and emission wavelength was set at 385 nm. The column temperature was 25 $^{\circ}$ C, and flow rate was 1.0 mL/min. The injection volume was 20 μ L. **Results** The specificity of HPLC/FLD method was good and the standard curve equation was $A=106.7 C+41.861$ ($R^2=0.999 08$) based on the linear regression of CB concentration (C) with CB peak area (A), indicating that the CB mass concentration was linear in the range of 0.5 to 20.0 μ g/mL. The intra-day precision of the 1.0, 5.0 and 10.0 μ g/mL samples was 2.25%, 2.44% and 3.04%, and the inter-day precision was 4.22%, 2.00% and 2.50%, respectively. The precision was good and the method was in accordance with the requirements of methodology. The recovery rates of the 1.0, 5.0 and 10.0 μ g/mL samples were 99.08%, 98.24% and 97.25%, respectively, which were also in accordance with the requirements of methodology. The intestinal absorption rate constant (K_a) values of CBHD with KET were 4.18, 5.05, 1.91 and 2.85 times those of CB, and the effective permeability (P_{eff}) values were 4.92, 5.98, 2.19 and 3.24 times those

[收稿日期] 2017-04-05

[接受日期] 2017-08-26

[作者简介] 鲁文娟, 硕士生. E-mail: lu1092@foxmail.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-68485161, E-mail: jiangxinhui3@hotmail.com

of CB in the duodenum, jejunum, ileum and colon, respectively (all $P < 0.05$). **Conclusion** KET can improve the intestinal absorption of CB and CBHD in rats.

[Key words] cycloviobuxine D; inclusion complex; ketoconazole; intestinal absorption

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2018, 39(5): 568-572]

环维黄杨星 D (cycloviobuxine D, CB) 是小叶黄杨的主要活性成分^[1], 其具有行气活血、通络止痛的药理作用^[2], 临床上主要用于治疗气滞血瘀所致的胸痹心痛、脉结代、冠心病、心律失常等^[3]。细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 存在于人体肝脏、肠道和肾脏^[4], 参与药物等外源性物质的代谢^[5]。酮康唑 (ketoconazole, KET) 为药物代谢实验中 CYP450 酶系的首选抑制剂^[6]。近年来少见对 CB 及其制剂在体肠吸收特征的研究报道。本研究将 CB 与羟丙基- β -环糊精 (hydroxypropyl- β -cyclodextrin, HP- β -CD) 以研磨法制成 CB 羟丙基- β -环糊精包合物 (CBHD), 并采用单向肠灌注法考察了 KET 对 CBHD 在体肠吸收的影响, 探讨了 CB 及 CBHD 在肠道的吸收代谢机制, 为临床研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 仪器 Agilent 1260 型高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 仪 (美国 Agilent 公司); AB204S 型电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 仪器公司); HWCL-3 型集热式恒温磁力搅拌浴 (郑州长城科技工贸有限公司); HL-1 型恒流泵 (上海青浦沪西仪器厂); HHS-4S 型电子恒温不锈钢水浴锅 (上海康路仪器设备有限公司); SHZ-D 型循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限责任公司); VOS-30A 型真空干燥箱 [施都凯仪器设备 (上海) 有限公司]; VM-02U 型旋涡混合器 (美国精骐有限公司); G16 型医用离心机 (北京白洋医疗器械有限公司)。

1.2 药品与试剂 CB 纯度 > 99%, 购于武汉富驰生物科技有限公司; HP- β -CD 购于淄博千汇生物科技有限公司; 1-萘基异氰酸酯购于美国 Sigma 公司; KET 购于湖北兴银河化工有限公司; 无水氯化钙 (CaCl_2)、羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 均购于成都市科龙化工试剂厂; 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 购于广东省化学试

剂工程技术研究开发中心; 氯化钠 (NaCl)、碳酸氢钠 (NaHCO_3)、葡萄糖、七水硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 均购于上海泰坦科技股份有限公司; 氯化钾 (KCl)、二氯甲烷 (CH_2Cl_2)、无水乙醇购于重庆川东化工集团有限公司化学试剂厂; 甲醇购于美国天地科技有限公司。

1.3 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠 24 只, 体质量为 (200 ± 20) g, 由重庆医科大学实验动物中心提供, 许可证号: CQLA-2016-164。

1.4 CBHD 的制备 采用研磨法。精密称取处方量 CB、HP- β -CD, 混合均匀, CB 与 HP- β -CD 物质的量比为 1:1, 常温下加少量水研磨 1 h, 真空干燥 2 h (真空度为 0.09 MPa, 干燥温度 40 °C), 干燥物依次用少量乙醇和水洗涤, 然后真空干燥 12 h (真空度为 0.09 MPa, 干燥温度 40 °C), 即得 CBHD^[7]。CBHD 的平均包载率为 95.31%^[7]。

1.5 CB 含量测定方法

1.5.1 色谱条件 色谱仪: Agilent 1260 型 HPLC 仪, 荧光检测器 (fluorescence detector, FLD); 色谱柱: 依利特 C_{18} 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (85:15, 体积比); 荧光检测: 激发波长为 231 nm, 发射波长为 385 nm; 柱温为 25 °C, 流速为 1.0 mL/min; 进样量为 20 μL 。

1.5.2 对照品溶液的制备 精密称取 CB 10 mg, 以少量甲醇溶解后转移至 100 mL 容量瓶中, 再用甲醇定容至刻度, 配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CB 对照品溶液, 于 4 °C 冰箱中保存, 备用。

1.5.3 1-萘基异氰酸酯溶液的配制 取 1-萘基异氰酸酯 5 mL 置于 500 mL 容量瓶中, 加 CH_2Cl_2 稀释、定容至刻度, 摇匀即得 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的 1-萘基异氰酸酯溶液, 于 4 °C 冰箱中保存, 备用。

1.5.4 样品处理 取空白灌流液 100 μL , 加入 CH_2Cl_2 1 mL, 旋涡振荡 3 min, 9 100 $\times g$ 离心 10 min, 收集下层溶液, 加入浓度为 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的 1-萘基异氰酸酯溶液 50 μL , 40 °C 反应 60 min, 氮气吹干, 加 1 mL 甲醇复溶, 进样分析。

1.6 方法学考察

1.6.1 专属性 分别取空白灌流液、含 CB 的灌流液、经单向灌流后的样品液,按 1.5.4 项下方法处理,进样分析,考察专属性。

1.6.2 标准曲线 取空白灌流液 100 μL ,分别加入系列 CB 对照品溶液 100 μL ,得到含 CB 浓度分别为 0.5、1、3、5、8、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 的标准样品溶液,按 1.5.4 项下方法处理后在 1.5.1 项色谱条件下分别进样分析,记录色谱图。以 CB 峰面积 (A) 对 CB 浓度 (C) 进行线性回归。

1.6.3 精密度 取空白灌流液 100 μL ,分别加入系列 CB 对照品溶液 100 μL ,配制成低、中、高 3 个浓度 (1.0、5.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$) 的标准样品溶液各 5 份,按 1.5.4 项下方法处理后进样分析。分别在同一天内测定并连续测定 5 d,考察日内和日间精密度。

1.6.4 回收率 取空白灌流液 100 μL ,分别加入系列 CB 对照品溶液 100 μL ,配制成低、中、高 3 个浓度 (1.0、5.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$) 的标准样品溶液各 5 份,按 1.5.4 项下方法处理后进样分析,计算回收率。

1.7 肠灌流液的配制 Krebs-Ringer 小肠营养液配制:分别称取 NaCl 6.92 g、KCl 0.35 g、 KH_2PO_4 0.16 g、 NaHCO_3 2.1 g、葡萄糖 2.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.29 g 于干燥洁净的烧杯中,加入适量蒸馏水溶解,转入 1 000 mL 容量瓶中;称取 CaCl_2 0.35 g 于干燥洁净的烧杯中,加入适量蒸馏水溶解后转入上述同一 1 000 mL 容量瓶中混匀,定容,即得 Krebs-Ringer 液,放入 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中备用。

生理盐水配制:精密量取 NaCl 9 g,加入少量蒸馏水溶解后,转入 1 000 mL 容量瓶中,加入蒸馏水并定容至刻度。

3.5% 水合氯醛溶液配制:精密称取水合氯醛 0.35 g 于 100 mL 容量瓶中,加入蒸馏水溶解并定容至刻度。

0.5% CMC-Na 溶液配制:称取 0.5 g CMC-Na,先加入 50 mL 蒸馏水加热溶解,待其冷却后转移至 100 mL 容量瓶中定容至刻度。

CB 循环储备液配制:精密称取 CB 25.25 mg,先用 20 mL 0.5% CMC-Na 溶液充分混匀后转移至 250 mL 容量瓶中,用 Krebs-Ringer 液稀释定容至刻度,即得质量浓度为 101 $\mu\text{g/mL}$ 的 CB

储备液。

CBHD 循环储备液配制:取约 10.1 mL CBHD 制剂 (浓度为 2.5 mg/mL),加入 Krebs-Ringer 液稀释并定容至 250 mL,即得质量浓度为 101 $\mu\text{g/mL}$ 的储备液。

KET 储备液配制:精密称取 KET 40 mg,加入 Krebs-Ringer 液溶解并定容至 25 mL,配制成质量浓度为 1.6 mg/mL 的 KET 储备液。

CB 循环液配制:精密称取 CB 25 mg,先加入 20 mL 0.5% CMC-Na 溶液充分溶解、混匀后转移至 250 mL 容量瓶中,用 Krebs-Ringer 液稀释定容至刻度,即得质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 CB 循环液。

CBHD 循环液配制:取约 6.25 mL 的 CBHD 制剂 (浓度为 4 mg/mL),用 Krebs-Ringer 液稀释并定容至 250 mL,即得质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 CBHD 循环液。

KET+CB 循环液和 KET+CBHD 循环液配制:分别精密量取 KET 储备液 2.5 mL 加入 250 mL CB、CBHD 储备液中,充分混合即得 KET+CB、KET+CBHD 循环液 (CB 和 CBHD 质量浓度均为 100 $\mu\text{g/mL}$,KET 质量浓度为 16 $\mu\text{g/mL}$)。

1.8 大鼠肠灌流实验^[8-9] 实验前动物禁食 18 h,不禁水,用 3.5% 水合氯醛腹腔注射麻醉并固定。沿腹中线切开腹腔约 3 cm,在待测肠段的上端和下端分别剪一个小口,插管结扎,用 37 $^\circ\text{C}$ 生理盐水将肠内容物冲洗干净,再用空气排出生理盐水,并用水浴恒温至 37 $^\circ\text{C}$ 的空白 Krebs-Ringer 液以 0.25 mL/min 流速循环 15 min,取样 2 mL 作为空白。再用空气排出 Krebs-Ringer 液,换用含药循环液 (每肠段 15 mL),在灌流液进入肠段时计为 0 min,并调节流速至 0.25 mL/min,灌流 60 min,收集灌流液并测量记录各肠段的流出液体积,待测。测量并记录大鼠各肠段的长度 (L) 和内径 (r),计算药物吸收速率常数 (K_a)、有效渗透率 (P_{eff}): $K_a = Q + (1 - C_{\text{out}}V_{\text{out}}/C_{\text{in}}V_{\text{in}}) / \pi r^2 L$; $P_{\text{eff}} = Q + \ln(C_{\text{in}}V_{\text{in}}/C_{\text{out}}V_{\text{out}}) / 2\pi r L$ 。其中 V_{in} 和 V_{out} 分别为每 60 min 肠道灌入液和流出液的体积 (假设灌流液密度为 1 g/mL), C_{in} 和 C_{out} 分别为肠道灌入液和流出液的浓度, Q 为灌流速度。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本比较的 t 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 方法学实验结果 在 1.5.1 项色谱条件下进样分析。CB 的 HPLC 谱图如图 1 所示, CB 峰形对称, 保留时间为 8.5 min, 大鼠肠液中杂质均不干扰测定, 所建立的分析方法专属性强。建立的标准曲线回归方程为 $A=106.7 C+41.861$ ($R^2=0.999 08$), 表明 CB 在 0.5~20.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内具有良好的线性。低、中、高 3 个浓度样品溶液的日内精密度分别为 2.25%、2.44%、3.04%, 日间精密度分别为 4.22%、2.00%、2.50%, 精密度符合方法学要求。低、中、高 3 个浓度样品溶液的回收率分别为 99.08%、98.24%、97.25%, 符合方法学要求。

2.2 在体肠吸收评价 CB、CBHD 以及加入 KET 后的 CB 和 CBHD 在各个肠段的吸收情况如图 2 所示。CBHD 在十二指肠、空肠、回肠、结肠的 K_a 分别为 CB 的 2.77、1.98、1.02、1.21 倍, P_{eff} 分别为 CB 的 3.01、2.06、1.02、1.22 倍。加入 CYP450 抑制剂 KET 后, CBHD 在十二指肠、空肠、回肠、结肠的 K_a 分别为 CB 的 4.18、5.05、1.91、2.85 倍

($P<0.05$), P_{eff} 分别为 CB 的 4.92、5.98、2.19、3.24 倍 ($P<0.05$)。表明 CBHD 可改善 CB 在各肠段的吸收情况; 加入 KET 后, CB 在各肠段的吸收均提高, 说明 KET 可促进 CB 在肠道的吸收。

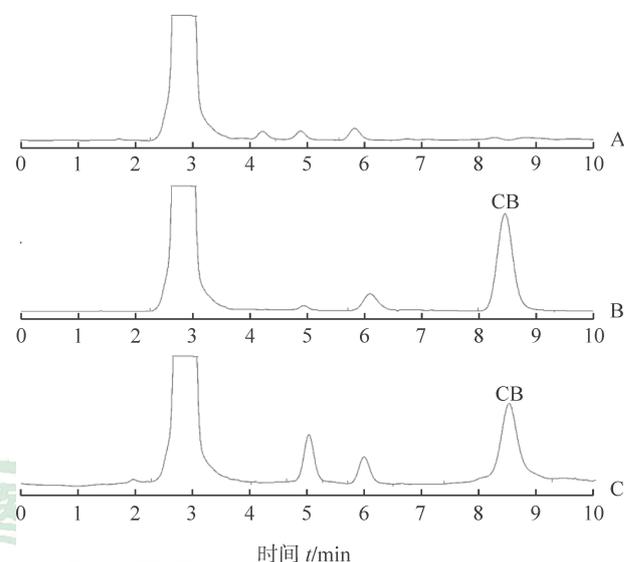


图 1 CB 的 HPLC 谱图

A: 空白灌流液; B: 空白灌流液加 CB 标准品; C: 灌流后样品液; CB: 环维黄杨星 D; HPLC: 高效液相色谱

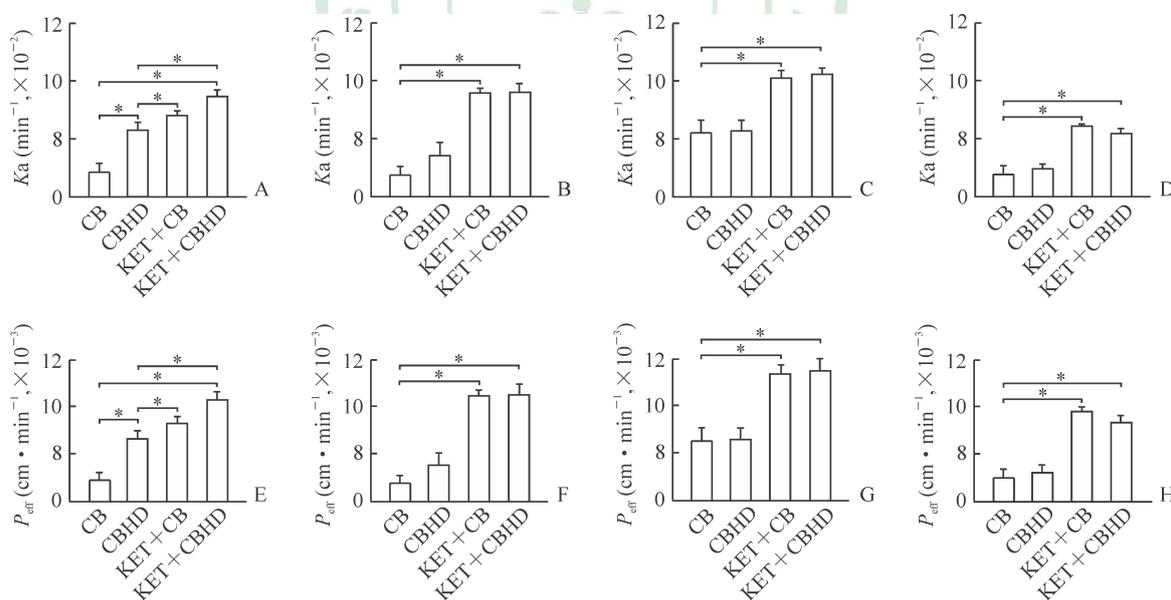


图 2 大鼠各肠段的吸收速率常数 (K_a , A~D) 和有效渗透率 (P_{eff} , E~H)

A, E: 十二指肠; B, F: 空肠; C, G: 回肠; D, H: 结肠。CB: 环维黄杨星 D; CBHD: 环维黄杨星 D 羟丙基- β -环糊精包合物; KET: 酮康唑。* $P<0.05$. $n=6$, $\bar{x}\pm s$

3 讨论

本研究采用单向肠灌流法考察 CB 在大鼠各肠段的吸收情况。单向灌流是在体肠灌流法中的一种, 是通过测定药物经肠段后灌流液损失的量而计

算药物渗透系数的方法, 其不仅操作简便, 还能保证肠道神经的完整性及体液的供应, 所得指标更加真实, 对肠黏膜损伤较小^[10]。

从实验结果看, CBHD 与 CB 在十二指肠、空肠、回肠和结肠 4 个肠段均有吸收。且将 CB 制备

成 CBHD 后能提高 CB 的吸收,在十二指肠差异有统计学意义 ($P < 0.05$),在其他肠段的差异无统计学意义, CBHD 与 CB 的 K_a 之比与 P_{eff} 之比都是十二指肠 > 空肠 > 结肠 > 回肠。加入 CYP450 抑制剂 KET 后, CBHD 在各肠段的吸收较 CB 提高 ($P < 0.05$), KET+CBHD 促进空肠吸收的作用大于十二指肠、回肠和结肠,且在空肠部分的 K_a 与 P_{eff} 分别为游离 CB 的 5.05 和 5.98 倍。

加入 KET 可提高 CB 和 CBHD 在大鼠各肠段的吸收。CYP3A4 占肠道 P450 酶系总量的 70%,是肠道分布最多的 P450 亚酶体系,通过抑制 CYP3A4 可能减慢 CB 的代谢速率。由于 CYP3A4 阳性抑制剂 KET 的存在抑制了 CYP450 酶的活性^[11],从而使 CB 在肠内需要 CYP450 酶参与的 I 相代谢反应(氧化、还原、水解反应)过程减慢,促进了 CB 在各肠段的吸收。

本研究应用大鼠小肠在体单向肠灌注模型考察 KET 对 CB 在体肠吸收的影响,提示 CYP3A4 作用可能是导致 CB 口服生物利用度降低的原因。本研究通过对 CB 的肠道吸收特征的研究,为以提高 CB 口服生物利用度为目的的剂型改造提供了一定的实验依据。

[参考文献]

- [1] WU J, TAN Z, CHEN J, DONG C. Cyclovirobuxine D inhibits cell proliferation and induces mitochondria-mediated apoptosis in human gastric cancer cells[J]. *Molecules*, 2015, 20: 20659-20668.
- [2] 胡江波,杨林,王红,赵德璋,张景勃. 高效液相色谱法测定环维黄杨星 D 脂质体的含量[J]. *激光杂志*, 2014, 35:112-113.
- [3] 陈静,张景勃,何丹,王红,雷婷婷,蒋心惠. 环维黄杨星 D 磷脂复合物药代动力学评价[J]. *第二军医大学学报*, 2016, 37:17-21.
- CHEN J, ZHANG J Q, HE D, WANG H, LEI T T, JIANG X H. Pharmacokinetics evaluation of cyclovirobuxine D phospholipid complex[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2016, 37: 17-21.
- [4] 卜明华,郑咏秋,张颖,李利群,刘建勋,刘东春. 参麦注射液和注射用血栓通对大鼠肝脏及肠道药物代谢酶 CYP450 的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2012, 28:49-52.
- [5] 侯健,孙娥,宋捷,杨蕾,张振海,宁青,等. 肝脏药物代谢酶 CYP450 与中药肝毒性的关系[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41:2774-2780.
- [6] 于敏,张双庆,闻镍,李佐刚. 细胞色素 P450 酶系体外药物代谢研究方法进展[J]. *中国药事*, 2013, 27:81-87.
- [7] 陈静,张景勃,赵华,王红,孙全,袁誉铭,等. 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[J]. *重庆医科大学学报*, 2017, 42:200-204.
- [8] 钟萌,杨林,杨梅,胡雪原,张景勃. 单向灌注法研究阿奇霉素泡囊的大鼠在体肠吸收[J]. *第二军医大学学报*, 2014, 35:419-422.
- ZHONG M, YANG L, YANG M, HU X Y, ZHANG J Q. Single-pass intestinal perfusion for studying intestinal absorption of azithromycin niosomes in rats[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2014, 35: 419-422.
- [9] WAN K, SUN L, HU X, YAN Z, ZHANG Y, ZHANG X, et al. Novel nanoemulsion based lipid nanosystems for favorable *in vitro* and *in vivo* characteristics of curcumin[J]. *Int J Pharm*, 2016, 504: 80-88.
- [10] 沈芸,徐蓓蕾,杨新宇,季宇彬. 三种研究药物肠道吸收机制的方法[J]. *哈尔滨商业大学学报(自然科学版)*, 2016, 32:11-13.
- [11] 朱倩,李俊,汤文建. 中药对细胞色素 P450 酶活性影响及研究方法进展[J]. *安徽医药*, 2013, 17:1457-1461.

[本文编辑] 尹 茶