

# 落新妇苷-β-环糊精包结物的溶解性及生物利用度研究

张清峰, 聂海纯, 付莹娟, 上官新晨, 郑国栋, 尹忠平

(江西农业大学食品科学与工程学院, 江西省高等学校天然产物开发与利用重点实验室, 江西南昌 330045)

**摘要:** 本文通过紫外吸收光谱法研究了落新妇苷与β-环糊精(β-CD)的包结反应。β-CD可与落新妇苷形成1:1包结物, 并使其在291 nm处吸光度有规律下降, 二者包结平衡常数为 $1788.54 \pm 273.41 \text{ M}^{-1}$ 。采用研磨法制备落新妇苷与β-CD的包结物, 考察了水分含量和摩尔比对落新妇苷包结率的影响。适当提高研磨过程中水份含量和β-CD摩尔比可增加落新妇苷包结率。最后, 比较了β-CD包结物和落新妇苷单体的溶解度、体外溶出度和大鼠体内生物利用度。形成β-CD包结物可显著提高落新妇苷溶解度。25℃条件下, 包结物中落新妇苷的溶解度为52.01 mM, 为落新妇苷单独存在时的106.14倍。体外溶出度曲线表明包结物中落新妇苷的溶解速度更快。包结物中落新妇苷在大鼠体内达到峰值时间更短, 且峰值浓度更高, 但二者生物利用度相当, 绝对生物利用度都约为3.7%。

**关键词:** 落新妇苷; β-环糊精; 包结物; 溶解度; 生物利用度

文章编号: 1673-9078(2014)5-82-86

## Solubility and *in vivo* Bioavailability of Astilbin-β-cyclodextrin Complexes

ZHANG Qing-feng, NIE Hai-chun, FU Ying-juan, SHANG GUAN Xin-cheng, ZHENG Guo-dong,  
YIN Zhong-ping

(Key Laboratory of Jiangxi Provincial Department of Education in Natural Product Research and Development, Jiangxi Agriculture University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** The inclusion reaction of astilbin with β-cyclodextrin (β-CD) was investigated by UV spectrometry in this study. β-CD could form complex with astilbin in ratio of 1:1 with formation constant of  $1788.54 \pm 273.41 \text{ M}^{-1}$ , and gradually decrease the absorbance of astilbin at 291 nm. The complex was prepared by co-grinding method. The effects of water content and molar ratio on inclusion rate during grind were investigated. The results showed that properly increasing of water content and β-CD molar ratio enhanced the formation of astilbin complexes. Finally, the solubility and *in vivo* bioavailability of astilbin and its β-CD complexes prepared with molar ratio of 1:2 were investigated. The solubility of astilbin in β-CD complexes was increased 106.14 times and its dissolution profiles were improved. The *in vivo* bioavailability study showed that β-CD enhanced the absorb rate of astilbin, shortened  $T_{\max}$  and increased  $C_{\max}$ . However, the absolute bioavailability between astilbin and its β-CD complexes had no difference, and were both around 3.7%.

**Key words:** astilbin; β-cyclodextrin; complexes; solubility; bioavailability

落新妇苷是一种天然的二氢黄酮醇, 广泛存在于多种中药、水果和食品中, 如土茯苓、菝葜、葡萄、龟苓膏、葡萄酒等<sup>[1]</sup>。中国药典要求土茯苓中落新妇苷含量不低于0.45%<sup>[2]</sup>; 法国葡萄酒中落新妇苷含量介于0.77~15.12 mg/L, 平均含量为5.21 mg/L<sup>[3]</sup>。南京大学徐强教授等发现落新妇苷具有独特的免疫抑制活性、可显著抑制迟发型超敏反应<sup>[4-5]</sup>、胶原性关节炎<sup>[6]</sup>以及免疫性肝损伤<sup>[7]</sup>。与现阶段常用免疫抑制剂环孢

素A相比, 落新妇苷的免疫抑制作用更具选择性, 可抑制过剩的细胞免疫而不影响体液免疫<sup>[8]</sup>。另外, 落新妇苷还有调节脂肪及胆固醇代谢、抗氧化、抑菌及杀虫等生物活性<sup>[1]</sup>。

黄酮化合物通常有水溶性差和不稳定等特点。落新妇苷在25℃时溶解度仅约为250 μg/mL<sup>[9]</sup>, 根据中国药典属极微溶解样品; 其在水溶液中也非常不稳定, 在碱性条件下易发生降解<sup>[9]</sup>。因此, 要扩大落新妇苷的应用范围, 需要提高其水溶性和稳定性。环糊精是一类由环糊精葡萄糖基转移酶水解淀粉生成的环状低聚糖, 整个分子成截顶圆锥状, 具有疏水的空腔和亲水的外壳, 因此可以与客体分子形成包结物, 从而提高客体分子的水溶性、稳定性及生物利用率<sup>[10]</sup>。最常

收稿日期: 2013-10-30

基金项目: 江西省自然科学基金资助项目(20122BAB214005); 江西农业大学青年基金资助项目(QN201108)

通讯作者: 张清峰(1983-), 男, 博士, 讲师, 研究方向为功能性食品成分、天然产物开发与利用

见的 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -CD)由7个吡喃葡萄糖单元组成,空腔内径为0.62 nm,与含苯环的芳香族客体分子空间匹配程度较好<sup>[10]</sup>。

本文以 $\beta$ -CD为主体,通过紫外吸收光谱法研究落新妇苷与 $\beta$ -CD的包结反应并计算其包结平衡常数;通过研磨法制备二者包结物,并分析水分含量及摩尔比对包结物形成的影响;最后,比较了落新妇苷单体及其包结物的体外溶出度和在大鼠体内生物利用度。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂、原料及实验动物

落新妇苷(>91%)由本实验室从土茯苓中纯化,经UV、IR、MS和NMR结构鉴定; $\beta$ -CD购买于江苏丰园生物技术有限公司;沃凯,色谱纯,乙腈购自国药集团化学试剂有限公司;水为超纯水。其余所用试剂均为分析纯。雄性SD大鼠(200±20 g)和普通饲料购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物质量合格证编号:43004700002217,公司许可证号:SCXK(湘)2011-0003。动物饲养5周后,体重增至400 g左右,用于药代实验。

### 1.2 主要仪器设备

HPLC系统为Waters 1525二元高压梯度泵,配备双波长检测器及在线脱气系统;色谱柱为Agilent Zorbax SB C18柱(250 mm×4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m)。SPECORD 200紫外分光光度计,德国耶拿分析仪器股份有限公司;SKY-2112B摇床,上海苏坤实业有限公司。

### 1.3 落新妇苷标准曲线

精密称取落新妇苷5 mg于50 mL容量瓶中,用少量50%的甲醇将落新妇苷溶解后,加水至刻度线,配成0.1 mg/mL溶液。精密移取0、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、2.4 mL落新妇苷溶液于10 mL容量瓶中,定容后摇匀。以蒸馏水为空白,在291 nm处测定吸光度,得标准曲线的方程为 $Y=34.179X+0.0283$ , $R^2=0.9997$ ,式中X为落新妇苷浓度(0~24  $\mu$ g/mL),Y为吸光度。

### 1.4 紫外吸收光谱法研究落新妇苷与CD的包结反应

精密称取13.5 mg落新妇苷于50 mL容量瓶中,用少量50%的甲醇溶解后,加水定容得0.6 mM的落新妇苷溶液。用蒸馏水配置2 mM  $\beta$ -CD溶液。往10

个10 mL容量瓶中分别加入0.6 mM的落新妇苷溶液1 mL, $\beta$ -CD溶液0~7 mL,加水定容并摇匀。室温(25  $^{\circ}$ C)下放置15 min后,以蒸馏水为参比,在波长200~400 nm范围内扫描,得紫外吸收光谱图。

### 1.5 研磨法制备包结物<sup>[11~12]</sup>

水分含量的影响:称取0.2 g落新妇苷,按摩尔比1:1加入0.5 g  $\beta$ -CD,用移液枪滴加适量蒸馏水控制研磨过程中水分含量,混匀后在研钵内研磨20 min,50  $^{\circ}$ C真空干燥后收集包结物。

摩尔比的影响:称取0.2 g落新妇苷,分别按 $\beta$ -CD和落新妇苷的摩尔比为1:1、1.5:1和2:1加入适量 $\beta$ -CD。混匀后在研钵内研磨20 min,收集包结物。

用于溶解度、体外溶出度和大鼠体内生物利用度研究的包结物中 $\beta$ -CD和落新妇苷的摩尔比为2:1,包结物中落新妇苷的含量为16.56%。

### 1.6 包结率的测定

包结物中客体分子的包结率测定参考文献<sup>[11]</sup>及<sup>[12]</sup>。称取干燥后含30 mg落新妇苷的包结物于6 mL蒸馏水中,超声溶解5 min。经0.45  $\mu$ m水系膜过滤,滤液经适当稀释后于291 nm下测定吸光度。根据标准曲线计算滤液中落新妇苷含量,包结率的计算公式如下:

$$\text{包结率} = \frac{\text{滤液中落新妇苷}}{30\text{mg}} \times 100\% \quad (1)$$

### 1.7 溶解度测定<sup>[13]</sup>

称取约10 mg落新妇苷和1 g包结物于10 mL离心管中,分别加入5 mL蒸馏水。然后置于转速为115 r/min、温度为25  $^{\circ}$ C的摇床内震荡7 d,后取出样液,经0.45  $\mu$ m水系膜过滤,滤液适当稀释后,以蒸馏水为空白对照,在291 nm波长下测量吸光度,计算落新妇苷溶解度。

### 1.8 体外溶出度实验

分别称取25 mg落新妇苷和适量包结物(含25 mg落新妇苷),加入100 mL蒸馏水,在37  $^{\circ}$ C恒温水浴中搅拌,搅拌速度为100 r/min。每隔适当时间,用移液枪吸取0.5 mL溶液,经0.45  $\mu$ m水系膜过滤,滤液适当稀释后,在291 nm下测量其吸光度。每次取样后用蒸馏水补足至100 mL。

### 1.9 大鼠体内生物利用度

取健康雄性SD大鼠12只(400±20 g),给药前

禁食 12 h, 随机分为 3 组, 每组 4 只。其中两组灌胃给药, 分别给予落新妇苷和落新妇苷-β-CD 包结物(用生理盐水配成浓度为 20 mg/mL), 给药剂量为 100 mg/kg, 给药后 15、30、60、90、150 和 240 min 后眼眶取血; 另一组为尾静脉给药组, 通过尾静脉注射落新妇苷(适量乙醇溶解后用生理盐水稀释, 配成含 5% 乙醇、落新妇苷浓度为 1 mg/mL 的溶液), 给药剂量为 2.0 mg/kg, 于给药后 5、15、30、60、90、150、240 后进行眼眶取血。大鼠给药后 2 h 内禁食, 2 h 后给予标准鼠粮, 整个实验过程中自由饮水。适当灌胃补充生理盐水。

每个时间点约取血 600 μL, 置于 1.5 mL 肝素抗凝离心管中, 放置约 10 min, 4000 r/min 离心 10 min, 移取 200 μL 血浆于 1.5 mL 离心管中, 加入 10 μg/mL 的白黎芦醇内标溶液 10 μL, 涡旋混合; 加入 400 μL 乙酸乙酯进行萃取, 涡旋混合 1 min 后 10000 r/min 离心 10 min。将上层有机相转移至新离心管中, 用吹风机将乙酸乙酯全部挥干, 残渣用 50 μL 60%乙醇溶解后 10000 r/min 离心 20 min, 取上清液进样 HPLC 分析。

HPLC 流动相为纯乙腈(A)和水(B), 线性梯度洗脱程序为: 0~8 min, 25.0% A; 8~15 min, 25.0~30.0% A。流速为 1 mL/min, 进样量为 20 μL, 检测波长为 291 nm, 柱温为 40 °C。

### 1.10 统计分析

数据统计和作图软件为 origin 7.0。实验平行重复三次, 结果表示为平均值±标准偏差。

## 2 结果与讨论

### 2.1 紫外吸收光谱研究包结反应

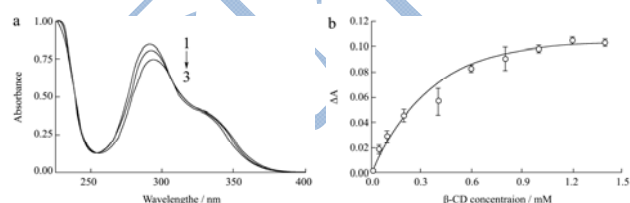


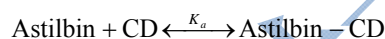
图 1 β-CD 对落新妇苷紫外吸收光谱的影响(a); β-CD 浓度对应落新妇苷在 291 nm 处吸光度降低值(b)

Fig.1 Effect of β-CD on the UV spectral of astilbin (a); β-CD concentration vs absorbance decrease values of astilbin at 291 nm (b)

CD 与客体分子包结后, 由于其空腔内高度电子云密度, 通常会导致客体分子的紫外-可见吸收光谱发生变化<sup>[10]</sup>。如图 1a 所示, 落新妇苷在 291 nm 波长下

具有最大吸收峰, 在 325 nm 波长下具有肩峰, 这与二氢黄酮醇紫外吸收特征一致。加入 β-CD 后, 落新妇苷的最大吸收波长从 291 nm 红移至 296 nm, 吸光度逐渐降低; 同时在 305 nm 波长下出现了一个等吸收点。这些现象表明落新妇苷与 β-CD 形成了包结物。

固定落新妇苷浓度, 由图 1b 所示随着 β-CD 浓度升高, 落新妇苷在 291 nm 处吸光度逐渐降低。依据吸光度的变化可计算落新妇苷与 β-CD 的包结平衡常数。假设落新妇苷与环糊精形成 1:1 的包结物, 包结反应可表达如下:



包结平衡常数  $K_a$  值可由公式 2 通过非线性拟合计算得出<sup>[14]</sup>。

$$A = A_0 + \frac{\Delta A_{\max} K_a [\text{CD}]}{1 + K_a [\text{CD}]} \quad (2)$$

注: A 为存在 β-CD 时溶液的吸光度;  $A_0$  为不存在 β-CD 时溶液的吸光度; [CD] 为 β-CD 的浓度。

图 1b 中各点是落新妇苷随 β-CD 浓度变化在 291 nm 处吸光度变化值, 曲线是根据公式 2 的非线性拟合曲线。由图可知, 实验数据和拟合曲线有良好吻合性 ( $R=0.989$ ), 表明落新妇苷与 β-CD 形成化学计量比为 1:1 的包结物, 并且计算得出  $K_a$  值为  $1788.54 \pm 273.41 \text{ M}^{-1}$ 。

### 2.2 研磨法制备落新妇苷与 β-CD 包结物

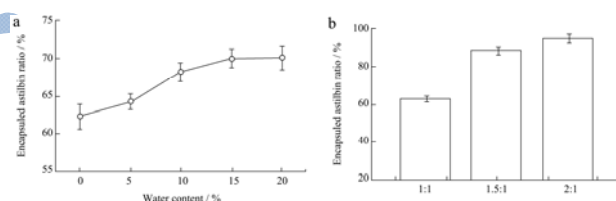


图 2 水分含量(a)和摩尔比(b)对研磨过程中落新妇苷包结率的影响

Fig.2 The effects of water content (a) and molar ratio (b) on the encapsulated astilbin ratio during co-grinding

常用的环糊精包结物制备方法有共沉淀法、研磨法、冷冻干燥法等。本研究采用研磨法制备落新妇苷与 β-CD 包结物。考察了研磨过程水分含量为 0、5%、10%、12%、15% 和 20% 对包结率的影响, 结果如图 2a 所示: 在各水分含量下, β-CD 与落新妇苷的包结率都在 60% 以上; 随着水分含量的提高, 包结率也有所提高, 但当水分含量大于 15% 时, 包结率基本不再提高, 因此制备包结物时可将水分含量控制在 15%。

考察不同摩尔比 (β-CD:落新妇苷) 对包结率的影响, 结果如图 2b 所示: 随着 β-CD 摩尔比的增加, 反应平衡向正反应方向移动, 落新妇苷的包结率也增加。



当 $\beta$ -CD与落新妇苷摩尔比为2:1时, 落新妇苷包结率高达94.13%。

### 2.3 落新妇苷- $\beta$ -CD 包结物的溶解性

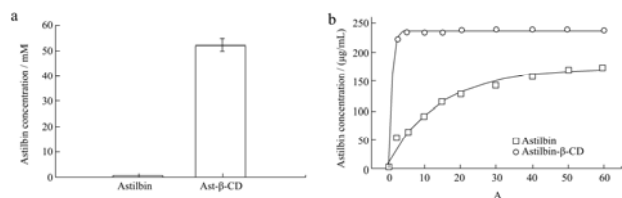


图3 a: 落新妇苷及其  $\beta$ -CD 包结物的溶解度 (25 °C); b: 落新妇苷及其  $\beta$ -CD 包结物的体外溶出度曲线 (37 °C)

Fig.3 a: Solubility of astilbin and its  $\beta$ -CD complexes at 25 °C; b: Dissolution profiles of astilbin and its CD complexes at 37 °C

如图3a所示, 与 $\beta$ -CD形成包结物后, 落新妇苷的溶解度显著提高。25 °C时, 落新妇苷单体的溶解度为0.49 mM (0.22 g/L), 根据中国药典, 属极微溶解样品。与 $\beta$ -CD形成包结物后, 其溶解度提高至52.01 mM, 为落新妇苷单独时的106.14倍。图3b为包结物及落新妇苷单体在37 °C时的体外溶出度曲线, 由图可知包结物中落新妇苷溶解速度更快, 且溶解量也更大。

### 2.4 大鼠体内生物利用度

图4a为不同大鼠血浆乙酸乙酯萃取样品的HPLC色谱图。可以看到, 落新妇苷和内标(白藜芦醇)可以很好的分离。经大鼠经口服后, 可以在其血浆中检测到落新妇苷。往空白血浆中加入不同浓度的落新妇苷和恒定浓度的内标, 以其峰面积比值为纵坐标, 以落新妇苷浓度为横坐标, 获得标准曲线为 $Y=0.384X-0.0063$ , 线性相关系数为0.997, 落新妇苷浓度范围为0~3  $\mu\text{g/mL}$ 。

图4b为大鼠口服和尾静脉注射落新妇苷后不同时间点的血药浓度曲线。与口服落新妇苷单体相比, 经 $\beta$ -CD包结后可以加快落新妇苷吸收, 缩短达峰时间( $T_{\text{max}}$ ), 并提高峰值浓度( $C_{\text{max}}$ )。这可能与 $\beta$ -CD能提高落新妇苷溶解度并加快其溶解速率有关。通过积分法计算血药浓度-时间曲线下面积( $AUC_{0-t}$ ), 尾静脉注射组(2 mg/kg)  $AUC_{0-t}$ 为51.95, 口服落新妇苷单体组(100 mg/kg)  $AUC_{0-t}$ 为97.06, 口服落新妇苷- $\beta$ -CD包结物组(100 mg/kg)  $AUC_{0-t}$ 为96.46。因此, 口服落新妇苷单体的绝对生物利用度为3.73%, 口服落新妇苷- $\beta$ -CD包结物的绝对生物利用度为3.71%。 $\beta$ -CD包结对落新妇苷的绝对生物利用度没有提升作用, 这可能是因为落新妇苷通过透过小肠上皮细胞进入血液循环, 而 $\beta$ -CD难以透过<sup>[10]</sup>, 因此包结

物在小肠中解离。

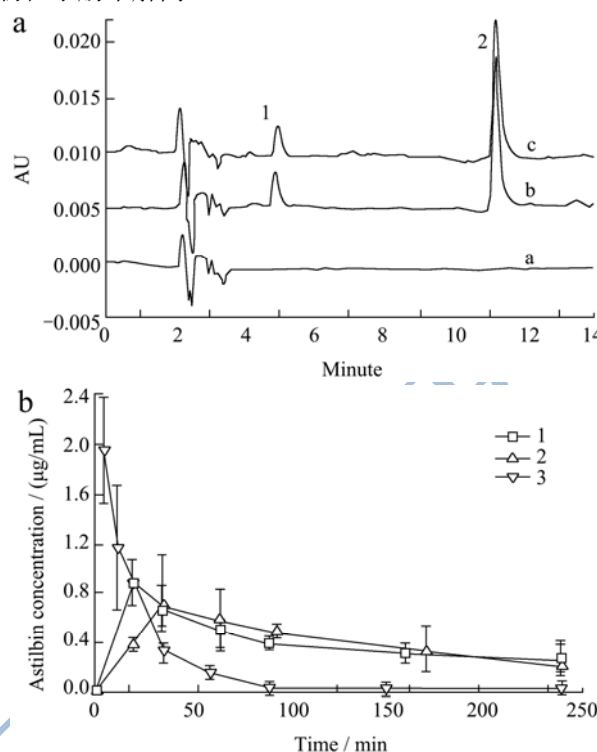


图4 a: 大鼠血浆萃取物 HPLC 色谱图; b: 大鼠口服和尾静脉注射落新妇苷后的血药浓度曲线

Fig.4 a: Typical HPLC chromatograms of the extracts from rat plasma, b: Kinetics of astilbin in plasma of rats after oral administration (100 mg/kg) or i.v. (2 mg/kg) injection

注: 峰1: 落新妇苷; 峰2: 白藜芦醇(内标); a:空白血浆; b: 空白血浆加标; c: 口服落新妇苷后血浆; B: 落新妇苷血药浓度-时间曲线, 1: 口服落新妇苷- $\beta$ -CD包结物(100 mg/kg); 2: 口服落新妇苷单体(100 mg/kg); 3: 尾静脉注射落新妇苷(2 mg/kg)。

### 3 结论

落新妇苷能与 $\beta$ -CD形成摩尔比为1:1的包结物, 二者包结平衡常数为 $1788.54 \pm 273.41 \text{ M}^{-1}$ 。研磨法制备包结物过程中, 落新妇苷包结率随着 $\beta$ -CD摩尔比的升高而升高;适当提高水分含量可增加落新妇苷包结率。形成包结物可显著提高落新妇苷溶解度和体外溶解速率。大鼠体内生物利用度研究表明 $\beta$ -CD可加快落新妇苷吸收速率, 缩短达到峰值浓度时间, 且峰值浓度更大。但落新妇苷单体与其 $\beta$ -CD包结物在大鼠体内绝对生物利用度相当, 都约为3.7%。

### 参考文献

[1] 张清峰, 聂海纯, 郑国栋, 等. 落新妇苷的理化性质和生物活性的研究[J]. 现代食品科技, 2012, 28(12): 1834-1838  
ZHANG Qing-feng, NIE Hai-chun, ZHENG Guo-dong, et al.

- Physicochemical properties, bioactivities and metabolism of astilbin [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2012, 28(12): 1834-1838
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010 版第一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010
- National commission of chinese pharmacopoeia. pharmacopoeia of peoples republic of China: 2010, Vol 1 [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010
- [3] Landrault N, Larronde F, Delaunay J C, et al. Levels of stilbene oligomers and astilbin in french varietal wines and in grapes during noble rot development [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50: 2046-2052
- [4] Fei M J, Wu X F, Xu Q. Astilbin inhibits contact hypersensitivity through negativecytokine regulation distinct from cyclosporin [J]. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2005, 116: 1350-1356
- [5] Guo J M, Qian F, Li J X, et al. Identification of a new metabolite of astilbin, 3'-O-methylastilbin, and its immunosuppressive activity against contact dermatitis [J]. *Clinical chemistry*, 2007, 53: 465-471
- [6] Cai Y, Chen T, Xu Q. Astilbin suppresses collagen-induced arthritis via the dysfunction of lymphocytes [J]. *Inflammation Research*, 2003, 52: 334-340
- [7] Xu Q, Wu F G, Cao J S, et al. Astilbin selectively induces dysfunction of liver-infiltrating cells-novel protection from liver damage [J]. *European Journal of Pharmacology*, 1999, 377: 93-100
- [8] 徐强,孙洋.源于中药选择性效应的新型免疫抑制疗法[J]. *化学进展*,2009,21(1):55-62
- XU Qiang, SUN Yang. Novel immunosuppression stemming from the selective activity of Chinese herbal drugs [J]. *Progress in Chemistry*, 2009, 21(1):55-62
- [9] Zhang Q F. The Quantitative study, fingerprint analysis and biological effect of rhizoma smilacis glabrae [D]. Doctoral thesis, City University of Hong Kong, 2010
- [10] Martin Del Valle E M. Cyclodextrins and their uses: a review [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39: 1033-1046
- [11] Yuichi T, Arpansiree W, Keiko S, et al. Co-grinding with cyclodextrin as a nanoparticle preparation method of a poorly water soluble drug [J]. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2004, 50: 67-71
- [12] Arpansiree W, Satoko Y, Yuichi T, et al. Investigation of drug nanoparticle formation by cogrinding with cyclodextrins:studies for indomethacin. furosemide and naproxen [J]. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2006, 56: 29-32
- [13] Shehatta I. Cyclodextrins as enhancers of the aqueous solubility of the anthelmintic drug mebendazole: thermodynamic considerations [J]. *Monatshefte Fur Chemie*, 2002, 133: 1239-1247
- [14] Pacioni N L, Veglia A V. Determination of poorly fluorescent carbamate pesticides in water, bendiocarb and promecarb, using cyclodextrin nanocavities and related media [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 583: 63-71