

## 提高环糊精包合物中药物渗透性的竞争剂体外筛选方法的建立

饶义琴, 李姝璇, 李彭宇, 章 溢, 胡海燕\*

(中山大学药学院, 广东 广州 510006)

**摘要:** 环糊精增加难溶性药物溶解度的同时可降低药物渗透性, 从而部分甚至完全抵消溶解度增加对药物口服吸收的贡献。环糊精包合物体系中若加入能与药物争夺环糊精结合位点的竞争剂, 则可通过增加体系中游离药物浓度而提高药物渗透性。本文基于药物渗透性强则细胞摄取增强的原理, 拟建立环糊精包合物竞争剂的体外快速筛选方法。采用相平衡溶解度法测定药物与羟丙倍他环糊精 (hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, HPCD) 的包合常数。选择包合常数大的桂利嗪 (cinnarizine, CN) 为竞争剂, 包合常数小的香豆素 6 (coumarin 6, C6) 和 9-十八烷基小檗碱 (9-octadecane berberine, BD) 为模型药物。考察向 C6 和 BD 的 HPCD 溶液中加入不同浓度 CN 后, HPCD 溶液中 C6 和 BD 溶解度的变化, 以及 Caco-2 和 A549 细胞对 HPCD 包合物体系中 C6 和 BD 的摄取情况。结果显示, CN 浓度依赖性地增加了细胞对 C6 和 BD 的摄取, 延长平衡时间后, 还降低了 HPCD 溶液中 C6 和 BD 的溶解度。这是因为 CN 竞争性地争夺药物与 HPCD 的结合位点, 将药物置换出来增加了体系中游离药物的浓度。本文采用体外细胞摄取验证了竞争剂 CN 增加包合物药物渗透性 (细胞摄取) 的能力, 该方法可用于药物-环糊精包合物竞争剂的初步筛选。

**关键词:** 环糊精; 竞争剂; 胃肠道; 渗透性; 难溶性药物

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)01-0061-05

## An *in vitro* method for preliminarily screening competing agents to enhance drug permeation in cyclodextrin inclusion complexes

RAO Yi-qin, LI Shu-xuan, LI Peng-yu, ZHANG Yi, HU Hai-yan\*

(School of Pharmacy, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** Cyclodextrin can increase the solubility of poorly soluble drugs, but also decrease the permeability of poorly soluble drugs in inclusion complexes simultaneously, which partially or completely counteracts the contribution of improvement in solubility to the oral absorption of poorly soluble drugs. If a competing agent is added to the system to compete binding sites of cyclodextrins with drugs, drug permeability can be improved by increasing the concentration of free drugs in the inclusion complex system. In this paper, a rapid *in vitro* screening method for competing agents of cyclodextrin inclusion complex is proposed based on the principle that good drug permeability is in accord with good cell uptake. The equilibrium constants between drugs and hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPCD) were determined by phase equilibrium solubility method. Cinnarizine (CN) with a high equilibrium constant was selected as a competing agent, coumarin 6 (C6) and 9-octadecyl berberine (BD) with smaller equilibrium constants were selected as model drugs. Both changes of solubility and uptake by Caco-2 and A549 cells of C6 and BD were investigated different concentrations of CN to the HPCD solution of C6 and BD. The results showed that the uptake of C6 and BD increased in a CN concentration-dependent manner, and the solubility of C6 and BD in

收稿日期: 2018-11-06; 修回日期: 2018-11-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473154, 81773659); 中山大学高校基本业务费青年教师重点培育项目 (18ykd08); 靶向药物与释药系统教育部重点实验室开放课题基金; 中山大学实验室开放基金项目 (20180270).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-20-39336119, E-mail: lsshhy@mail.sysu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-1005

HPCD solution decreased with the prolongation of equilibrium time. It might be due to increased free drug concentrations that resulted from the competition of CN for drug binding sites with HPCD. In our study, *in vitro* cell uptake method was firstly used to validate the ability of CN as a competing agent to increase drug permeability (cell uptake). This method can be used for preliminarily screening of competing agents for drug-cyclodextrin inclusion complexes.

**Key words:** cyclodextrin; competitive agent; gastrointestinal tract; permeability; poorly soluble drug

环糊精 (cyclodextrin, CD) 是由葡萄糖苷键连接成的一类具有疏水性空腔和亲水性外壳的环状化合物<sup>[1]</sup>。它可以将难溶性药物分子包裹在其空腔内形成包合物从而显著增加药物的溶解度<sup>[2]</sup>。药物与 CD 分子的包合过程存在一个动态平衡, 包合常数 ( $K$ ) 能反映包合过程中药物与 CD 分子间结合力的强弱<sup>[3]</sup>。相溶解度法是  $K$  值的常用测定方法<sup>[4]</sup>,  $K$  值越大, 则药物与 CD 之间越容易形成包合物, 且形成的包合物越稳定<sup>[5]</sup>。

近年来研究发现, CD 在提高难溶性药物溶解度的同时, 常伴随着药物渗透性的下降, 从而部分甚至完全抵消了药物溶解度增加对药物口服吸收的贡献<sup>[6]</sup>。这是因为 CD 分子外壳呈亲水性, 难以透过胃肠道, 包合在 CD 空腔中的药物受 CD 渗透性低的影响渗透性也会降低<sup>[7,8]</sup>。有研究表明, 在药物-CD 包合物体系中加入一种物质作为竞争剂, 与药物竞争 CD 的疏水性空腔, 可使药物从空腔中置换出来, 增加游离药物的浓度, 提高药物渗透性<sup>[5]</sup>。尤其对于自身具有高渗透性的 BCS II 类药物而言, 竞争剂的加入可显著改善 CD 渗透性低对药物口服吸收的不利影响。

Tokumura 等<sup>[9]</sup>采用比格犬体内实验筛选出 *DL*-苯丙氨酸作为竞争剂将氟桂利嗪从 CD 空腔中竞争出来, 增加其口服生物利用度。Tokumura 等<sup>[10]</sup>证实桂利嗪作为竞争剂将氟比洛芬从 CD 空腔中竞争出来, 增加了小鼠的口服吸收。以上研究均采用整体动物实验, 存在操作繁琐、耗时等缺点, 不适合大量竞争剂的初步快速筛选。

本研究基于药物渗透性强则细胞摄取增强的原理, 采用相平衡溶解度法首先测定了药物与羟丙基倍他环糊精 (hydroxypropyl-beta-cyclodextrin, HPCD) 的  $K$  值<sup>[11]</sup>。选择  $K$  值大的桂利嗪 (cinnarizine, CN) 为竞争剂,  $K$  值小的香豆素 6 (coumarin 6, C6) 和 9-十八烷基小檗碱 (9-octadecane berberine, BD) 分别作为模型药物, 与 HPCD 形成包合物。随后考察 CN 的加入是否影响 Caco-2<sup>[12]</sup> 和 A549 细胞对 C6 和 BD 的摄取, 以此验证体外细胞摄取作为竞争剂快速筛选方法的可行性。

## 材料与方法

**仪器** 气浴恒温振荡器 (THZ-82BA, 金坛市白塔金昌实验仪器厂); 磁力搅拌器 (Big squid, 德国 IKA 公司); 荧光光谱仪 (美国 HORIBA Instruments squid 公司); 双束可见紫外分光光度计 (TU-1901, 北京普析通用仪器有限责任公司); 激光共聚焦显微镜 (LSM 710, 德国 Zeiss 公司)。

**试剂** HPCD (西安德立化工有限公司); 9-十八烷基小檗碱 (实验室自制); 桂利嗪 (上海源叶生物科技有限公司); 甲醇 (天津市大茂化学试剂厂); DMEM 培养基 (赛默飞世尔仪器有限公司); 胎牛血清 (Thermo Scientific 公司); 4% 多聚甲醛固定液 (广州永津生物科技有限公司); 二甲基亚砜 (DMSO, 分析纯, 天津市致远化学试剂有限公司)。

**细胞** Caco-2 细胞 (国家细胞库); A549 细胞 (中山大学实验动物中心)。

**相溶解度法测定 C6-HPCD、BD-HPC 和 CN-HPCD 的包合常数** 精密称取 HPCD 10.001 3 g 溶于蒸馏水中, 得到一系列不同浓度 (4%、8%、12%、16% 和 20%) 的 HPCD 溶液。取 HPCD 溶液各 10 mL, 分别加入过量 C6、BD 和 CN 并置于 25 °C 振荡器中振荡 48 h, 静置 24 h 后取上清液用 0.45 μm 水系微孔滤膜过滤。C6-HPCD 包合物的续滤液经乙醇稀释后用紫外分光光度法测定 457 nm 处的吸光度值, BD-HPCD 包合物的续滤液用甲醇稀释后测定 350 nm 处的吸光度值, 而 CN-HPCD 包合物的续滤液则用 DMSO 稀释后于 258 nm 下测定吸光度。然后分别根据 C6、BD 和 CN 的标准曲线计算药物在相应浓度 HPCD 溶液中的溶解度。最后以 HPCD 浓度为横坐标, 药物溶解度为纵坐标绘制平衡相溶解度图, 计算 C6、BD 和 CN 与 HPCD 的  $K$  值<sup>[4]</sup>。计算公式为:  $K = \frac{k}{k(1 - S_0)}$  ( $k$  为线性方程的斜率,  $S_0$  为线性方程的截距)。

**竞争剂对药物-HPCD 包合物溶解度的影响** 根据相溶解度实验中各药物  $K$  值大小, 选择  $K$  值较大的 CN 作为竞争剂。取 C6-HPCD 包合物溶液用蒸馏水稀释至质量浓度 0.1 和 0.3 μg·mL<sup>-1</sup> 溶液, 取 BD-HPCD 包合物溶液稀释至 1 和 3 μg·mL<sup>-1</sup> 溶液。随后各精密量

取 1 mL, 分别加入 10  $\mu\text{L}$  不同浓度 (10、30、50 和 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 CN DMSO 溶液, 混匀, 以不加 CN 的空白组作为对照, 避光搅拌 4 h。静置 24 h 后在 15 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、4  $^{\circ}\text{C}$  条件下离心 15 min, 取上清液用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 所得滤液经乙醇稀释 10 倍后测定 C6 (激发波长 467 nm, 发射波长 500 nm) 和 BD (激发波长 351 nm; 发射波长 532 nm) 的荧光强度, 根据标准曲线计算 C6 和 BD-HPCD 包合物溶液的溶解度。

### 细胞摄取

**样品配制** 将包合物母液用 DMEM 培养基稀释至质量浓度为 0.1 和 0.3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 C6-HPCD 包合物溶液和质量浓度为 1 和 3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 BD-HPCD 包合物溶液。然后将上述溶液分别与不同浓度 (10、30、50 和 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) CN 溶液按体积比 100:1 混合均匀, 平衡 30 min<sup>[13]</sup>, 以不加 CN 溶液的空白组作为对照。

**激光共聚焦显微镜观察** 分别将 1 mL Caco-2 细胞按每孔  $1 \times 10^5$  个和 1 mL A549 细胞按每孔  $5 \times 10^4$  个接种至激光共聚焦皿中, 孵育 24 h 使其贴壁生长后, 加入 1 mL 含药培养基继续孵育 2 h。随后吸出培养基用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 遍, 加 4% 多聚甲醛固定 20 min, 再用冷 PBS 洗涤 2 遍后, 置于激光共聚焦显微镜下拍摄, 并采用 Image J 对每张图的荧光强度进行定量分析。

**统计学方法** 实验数据表示为  $\bar{x} \pm s$ 。统计分析采用 IBM SPSS 25.0。统计学的显著、非常显著和极非常显著差异分别表示为  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$  和  $P < 0.001$ 。

## 结果

### 1 包含常数的测定

由表 1 可知, CN 与 HPCD 的  $K$  值为 826.7, 远大于 89.7 (C6 与 HPCD) 和 42.6 (BD 与 HPCD)。 $K$  值大的药物更容易与环糊精形成包合物, 并且能竞争环糊精上的结合位点, 将  $K$  值小的药物置换出来。本文选择 CN 作为竞争剂 (CN 在其他研究中也常被用作竞争剂)<sup>[14]</sup>, 考察其在 HPCD 体系中对 C6 和 BD 的竞争作用。

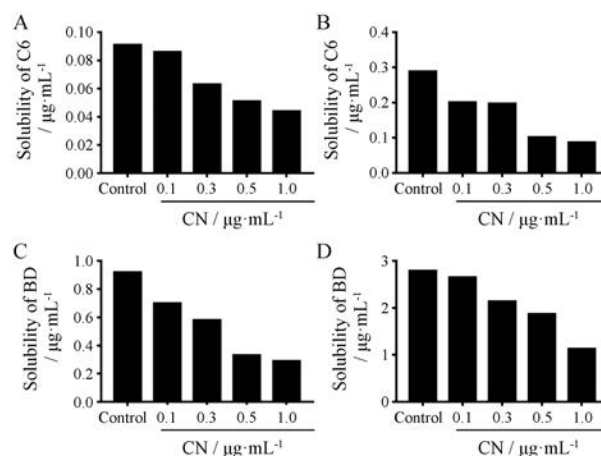
### 2 CN 对环糊精包合物中药物溶解度的影响

不同浓度 CN 对药物-HPCD 包合物溶液中药物溶解度的影响如图 1 所示。随着竞争剂 CN 浓度的增加,

**Table 1** Inclusion constants ( $K$ ) of coumarin 6 (C6), 9-octadecane berberine (BD) and cinnarizine (CN) with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HPCD)

Drug	Linear equation	$R^2$	$K$
C6	$y = 7.35 \times 10^{-4}x + 8.2 \times 10^{-6}$	0.999 4	89.7
BD	$y = 0.016 74 x + 0.000 4$	0.978 3	42.6
CN	$y = 0.001 46 x - 8 \times 10^{-5}$	0.999 3	826.7

药物-HPCD 包合物体系中 C6 和 BD 两种药物的溶解度都呈浓度依赖性地下降。

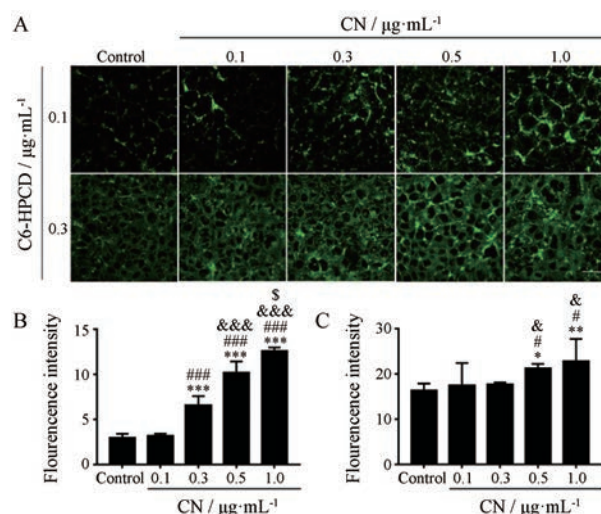


**Figure 1** The solubility of drugs in HPCD solution after adding different concentrations of CN. C6-HPCD solution containing 0.1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  C6 (A) and 0.3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  C6 (B); BD-HPCD solution containing 1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BD (C) and 3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BD (D)

### 3 细胞摄取

采用激光共聚焦显微镜观察 CN 的加入对两种细胞分别摄取包合物溶液中两种药物的影响。

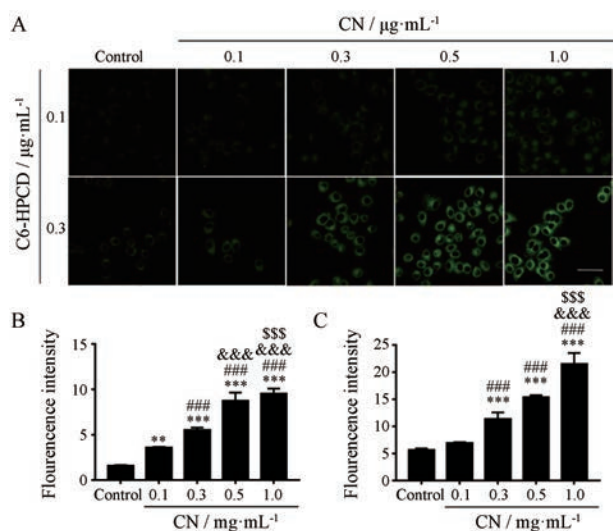
**3.1 在 Caco-2 和 A549 细胞上 CN 对 C6-HPCD 中 C6 摄取的影响** Caco-2 细胞对不同浓度 C6-HPCD 溶液加入 CN 溶液后的摄取呈明显差异 (图 2)。对照组中,



**Figure 2** The effect of CN concentrations on uptake of C6 by Caco-2 cells in C6-HPCD solution. Imaging of C6 uptake by Caco-2 cells in C6-HPCD solution by laser confocal microscope (A); quantization analysis was performed on C6-HPCD solution containing 0.1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  C6 (B) and 0.3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  C6 (C).  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control; # $P < 0.05$ , ### $P < 0.001$  vs 0.1  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CN; & $P < 0.05$ , &&& $P < 0.001$  vs 0.3  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CN; \$ $P < 0.05$  vs 0.5  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CN. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$

对高浓度 ( $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) C6-HPCD 溶液摄取明显增高, 在高、低浓度的 C6-HPCD 中加入不同浓度的 CN 后, Caco-2 细胞对 C6 的摄取随 CN 浓度升高而增强 (图 2A)。从荧光定量结果可知, 相较于低浓度 ( $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) C6-HPCD 溶液 (图 2B), 随 CN 浓度的增加, Caco-2 细胞对高浓度 ( $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) C6-HPCD 溶液中 C6 的摄取增强的现象不是很显著 (图 2C)。

在 A549 细胞上, CN 对 C6-HPCD 包合物摄取的影响 (图 3A) 与在 Caco-2 细胞上类似。稍有不同的是, 从定量结果可以看出 (图 3B, C), 随 CN 浓度的升高, A549 细胞对低浓度 ( $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 或高浓度 ( $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) C6-HPCD 中 C6 的摄取均明显增强, 且呈现浓度依赖性。

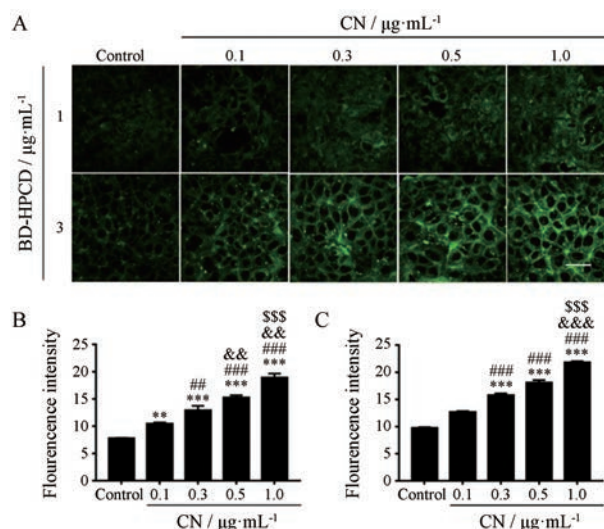


**Figure 3** The effect of CN concentrations on uptake of C6 by A549 cells in C6-HPCD solution. Imaging of C6 uptake by A549 cells in C6-HPCD solution by laser confocal microscope (A); quantization analysis was performed on C6-HPCD solution containing  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  C6 (B) and  $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  C6 (C).  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control; ### $P < 0.001$  vs  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CN; &&& $P < 0.001$  vs  $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CN; SSS $P < 0.001$  vs  $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CN. Scale bar =  $50 \mu\text{m}$

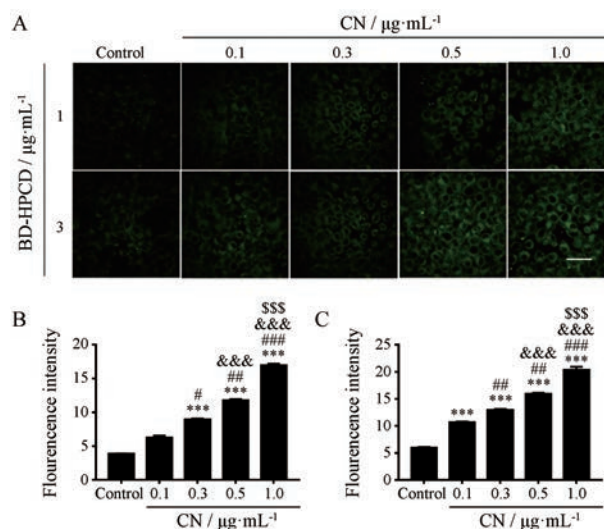
**3.2 在 Caco-2 和 A549 细胞上 CN 对 BD-HPCD 中 BD 摄取的影响** 在 Caco-2 和 A549 细胞上 CN 的加入对 BD-HPCD 中 BD 摄取的结果见图 4、5。无论是低浓度 ( $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 还是高浓度 ( $3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) BD-HPCD, 随 CN 浓度的增加, 两种细胞对 BD-HPCD 中 BD 的摄取都呈现出浓度依赖性增强。

**讨论**

相溶解度的结果 (图 1) 显示, 由于包合物体系中加入的竞争剂 CN 竞争性地争夺药物-HPCD 的结合位



**Figure 4** Effect of CN with increasing concentrations on uptake of BD by Caco-2 cells in BD-HPCD solution. Imaging of BD uptake by Caco-2 cells in BD-HPCD solution by laser confocal microscope (A); quantization analysis was performed on BD-HPCD solution containing  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  C6 (B) and  $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  C6 (C).  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control; ### $P < 0.001$  vs  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CN; &&& $P < 0.001$  vs  $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CN; SSS $P < 0.001$  vs  $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CN. Scale bar =  $50 \mu\text{m}$



**Figure 5** Effect of CN with increasing concentrations on uptake of BD by A549 cells in BD-HPCD solution. Imaging of BD uptake by A549 cells in BD-HPCD solution by laser confocal microscope (A); quantization analysis was performed on BD-HPCD solution containing  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  C6 (B) and  $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  C6 (C).  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs control; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CN; &&& $P < 0.001$  vs  $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CN; SSS $P < 0.001$  vs  $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  CN. Scale bar =  $50 \mu\text{m}$

点, 随着平衡时间延长, 难溶性药物 C6 和 BD 从包合物溶液中析出, 导致溶解度降低。

细胞摄取实验结果 (图 2) 表明, 随着 CN 浓度的升

高, C6-HPCD 中更多的 C6 被置换出来并被摄取。结果(图 2A)显示, Caco-2 细胞对高浓度 ( $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) C6-HPCD 溶液摄取明显增高, 可能是因为药物与 HPCD 的包合作用存在动态平衡, 高浓度中含游离药物多, 所以细胞摄取较多。荧光定量结果(图 2C)可能是因为  $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  C6-HPCD 中游离 C6 浓度较高, 已经接近 Caco-2 细胞的饱和摄取水平, 所以随 CN 浓度的增加摄取增强的现象不是很明显。

结合相溶解度实验和细胞摄取实验结果, 随着竞争剂 CN 的加入, 药物-HPCD 包合物中的 C6 和 BD 被包合常数更大的 CN 成功地从 HPCD 空腔中置换出来。相溶解度结果显示, CN 加入后, 包合物溶液中 C6 和 BD 的溶解度均下降, 然而细胞摄取实验结果显示加入 CN 后增加了 C6 和 BD 的摄取, 这是因为溶解度实验只存在药物从包合物中游离的过程, 随着平衡时间延长, 难溶性的游离药物析出越多。而在细胞摄取实验中不仅存在药物的游离, 还存在细胞对药物的摄取过程, 即被竞争出的游离药物尚未析出就已经被细胞摄取了, 所以最终显示出 CN 提高包合物中药物渗透性的作用。由此可见, 细胞摄取是一个联动的测定药物渗透性的方法: CN 将药物-HPCD 包合物中的药物竞争游离出来, 随即被细胞摄取。与相溶解度实验相比, 本方法不仅能够体现竞争剂置换游离药物的能力, 还能评价细胞对游离药物的摄取, 即药物渗透性的大小, 增加了竞争剂筛选的准确性。本方法与离体灌肠或动物实验相比, 操作相对简单、实验周期短, 适合于研究初期对竞争性的快速筛选。

本文首次通过细胞摄取建立了环糊精包合物竞争剂筛选的方法。但本方法仅在两个细胞株及两个模型药物上显示了 CN 可以通过对药物-HPCD 结合位点的竞争作用提高游离药物浓度从而增强细胞对药物的摄取(提高渗透性)。方法的可行性还需要在更多细胞株及更多药物和竞争剂中得到验证, 以及与体内方法进行比较, 从而对方法的可行性进行评估。值得注意的是, 实验所用的药物-HPCD 包合物中药物的浓度及竞争剂的浓度均较低。在细胞摄取实验时发现包合物中药物浓度会影响竞争剂的竞争效果, 如在高浓度 ( $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) C6-HPCD 下, CN 对 C6 在 Caco-2 细胞中的摄取影响较小。因此, 高浓度竞争剂针对高浓度包合物、低浓度竞争剂针对高浓度包合物以及高浓度竞争剂针对低浓度包合物的影响均值得进一步研究。此外, 本文所用的竞争剂 CN 是一种药物, 如果要扩大竞争剂的应用范围, 应该从辅料或添加剂中筛选有效的竞争剂, 并同时考虑竞争剂的药理作用、胃肠道稳定性及其可能与主药之间产生的相互作用等多种因素。

## References

- [1] Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3: 1023-1035.
- [2] Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review [J]. *Process Biochem*, 2004, 39: 1033-1046.
- [3] Xu XY, Yun F, Di LQ, et al. Research progress in gastrointestinal transportation of cyclodextrin inclusion complex and its mechanism [J]. *Chin Tradit Herb Drug (中草药)*, 2012, 43: 2062-2065.
- [4] Wu XF, Zheng XK, Yao HJ, et al. Inclusion constant of  $\beta$ -CD and paeonol measured by phase solubility method [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2005, 30: 501-503.
- [5] Thompson D, Larsson A. Modeling competitive guest binding to  $\beta$ -cyclodextrin molecular printboards [J]. *J Phys Chem B*, 2006, 110: 16640-16645.
- [6] Dahan A, Miller JM, Hoffman A, et al. The solubility-permeability interplay in using cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers: mechanistic modeling and application to progesterone [J]. *J Pharm Sci*, 2010, 99: 2739-2749.
- [7] Porat D, Dahan A. Active intestinal drug absorption and the solubility-permeability interplay [J]. *Int J Pharm*, 2017, 537: 84-93.
- [8] Dahan A, Miller JM. The solubility-permeability interplay and its implications in formulation design and development for poorly soluble drugs [J]. *AAPS J*, 2012, 14: 244-251.
- [9] Tokumura T, Nanba M, Tsushima Y, et al. Enhancement of bioavailability of cinnarizine from its  $\beta$ -cyclodextrin complex on oral administration with *DL*-phenylalanine as a competing agent [J]. *J Pharm Sci*, 2010, 75: 391-394.
- [10] Tokumura T, Muraoka A, Machida Y. Improvement of oral bioavailability of flurbiprofen from flurbiprofen/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex by action of cinnarizine [J]. *J Pharm Biopharm*, 2009, 73: 202-204.
- [11] Chen AJ, Liu M, Dong LN, et al. Study on the inclusion interaction of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin with three kinds of coumarins by phase solubility method (中国化学会成立 80 周年第十六届全国化学热力学和热分析学术会议论文集) [C]. Wuhan: Chinese Chemical Society, 2012: 1-2.
- [12] Yang HT, Wang GJ. Caco-2 cell monolayers model and its application in pharmacy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2000, 35: 797-800.
- [13] Tang C, Qian Z, Huang Y, et al. A fluorometric assay for alkaline phosphatase activity based on  $\beta$ -cyclodextrin-modified carbon quantum dots through host-guest recognition [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 83: 274-280.
- [14] Muraoka A, Tokumura T, Machida Y. In-vitro evaluation of cinnarizine as a competing agent to  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes: effect of cinnarizine on the membrane permeation rate of progesterone from its  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2008, 128: 89-95.