

青蒿挥发油羟丙基- β -环糊精包合物的制备及其 抗病毒活性分析

陆兆光, 万琴, 孟瑾, 吴云, 王振中, 萧伟*

(江苏康缘药业股份有限公司, 中药制药过程新技术国家重点实验室,
中药提取精制新技术重点实验室, 江苏连云港 222001)

[摘要] **目的:**制备及表征青蒿挥发油羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)包合物,对包合物的体外抗病毒活性进行研究。**方法:**采用饱和水溶液法、研磨法、单相溶液法制备青蒿挥发油 HP- β -CD 包合物,通过显微鉴别、薄层色谱法、红外光谱法和紫外分光光度法对包合物进行表征,采用体外细胞培养法研究青蒿挥发油及其包合物抗呼吸道合胞病毒(RSV),柯萨奇病毒 A16型(CA16)的活性。**结果:**单相溶液法为最佳包合方法,在 HP- β -CD 与青蒿挥发油的投料比 8:1,乙醇体积分数 100%,包合温度 25℃,包合时间 2 h 时包合效果最佳,包合率 80.62%,表征手段表明包合物已生成。体外抗病毒结果表明青蒿挥发油与包合物对 RSV 的半数有效浓度(EC_{50})分别为 3.12, 0.28 $mg \cdot L^{-1}$,对 CA16 的 EC_{50} 分别为 9.14, 0.59 $mg \cdot L^{-1}$ 。**结论:**单相溶液法制备青蒿挥发油 HP- β -CD 包合物的工艺稳定可行,该工艺可显著提高青蒿挥发油的包合率,且包合物的抗 RSV 和 CA16 活性较包合前更强。

[关键词] 青蒿;挥发油;羟丙基- β -环糊精;包合物;呼吸道合胞病毒;柯萨奇病毒;单相溶液法

[中图分类号] R22;R289;R283.6;R284;R978.7;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)18-0011-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181406

Preparation of Hydroxypropyl- β -cyclodextrin Inclusion Complex of Volatile Oil in Artemisiae Annuae Herba and Analysis of Its Antiviral Activity

LU Zhao-guang, WAN Qin, MENG Jin, WU Yun, WANG Zhen-zhong, XIAO Wei*

(Key Laboratory for New Technique Research of Traditional Chinese Medicine Extraction and Purification,
State Key Laboratory of Pharmaceutical Process New-teach for Chinese Medicine, Jiangsu Kanion
Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To prepare and characterize the inclusion complex of volatile oil in Artemisiae Annuae Herba and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), and investigate *in vitro* antiviral activity of this inclusion complex. **Method:** HP- β -CD inclusion complex of volatile oil in Artemisiae Annuae Herba were prepared by saturated aqueous solution method, hand grinding method and single phase solution method. Some analytical methods were applied for characterization of the inclusion complex. The inhibitory effects of volatile oil in Artemisiae Annuae Herba and its HP- β -CD inclusion complex on respiratory syncytial virus (RSV) and cossac virus type A16 (CA16) were investigated by *in vitro* cell culture method. **Result:** Single phase solution method was the best inclusion method, and its best inclusion ratio was 80.62% when ratio of HP- β -CD and volatile oil was 8:1, concentration of ethanol was 100%, inclusion temperature was 25℃ and inclusion time was 2 h. A series of evident characteristics suggested the formation of this inclusion complex. The median effective concentration

[收稿日期] 20171106(007)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09402203)

[第一作者] 陆兆光, 硕士, 研究员, 从事中药新药及中药制剂新技术研究, Tel:0518-81152326, E-mail:luzg83@126.com

[通信作者] * 萧伟, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中药新药的研究与开发, Tel:0518-81152337, E-mail:kanionlunwen@163.com

(EC_{50}) of volatile oil in *Artemisiae Annuae Herba* and its HP- β -CD inclusion complex to RSV were 3.12, 0.28 $mg \cdot L^{-1}$, respectively; and EC_{50} were 9.14, 0.59 $mg \cdot L^{-1}$ against CA16, respectively. **Conclusion:** The preparation process of HP- β -CD inclusion complex of volatile oil in *Artemisiae Annuae Herba* by single phase solution method is stable and feasible, and it can significantly increase inclusion rate of volatile oil in *Artemisiae Annuae Herba*. Antiviral activity on RSV and CA16 of the inclusion complex is stronger than before inclusion.

[Key words] *Artemisiae Annuae Herba*; volatile oil; hydroxypropyl- β -cyclodextrin; inclusion complex; respiratory syncytial virus; cossac virus type A16; single phase solution method

青蒿为菊科植物黄花蒿 *Artemisia annua* 的干燥地上部分^[1],挥发油为其主要活性成分之一,具有解热、止咳平喘、抗氧化和抗菌、抗病毒等作用,临床上用来治疗上呼吸道感染、慢性支气管炎和皮肤病等系列疾病^[2-4]。但青蒿挥发油有刺激性气味,且水溶性差,在制剂中易挥发,性质不稳定^[5],针对其现代生物药剂学应用上的不足,寻求一种适用于青蒿挥发油的新剂型具有重要的临床意义。

β -环糊精(β -CD)是目前唯一在制药工业中大量应用的环糊精,但由于 β -CD中C-2和C-3羟基之间容易形成分子内氢键而导致其水溶性较差,故其应用有一定的局限性^[6]。羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD)是由 β -CD化学修饰后得到的亲水性衍生物,水溶性极大,在口服液制剂、注射制剂、眼科制剂、鼻腔给药制剂、缓释及靶向制剂等方面具有无可替代的优势^[6-7]。目前, β -CD包合青蒿挥发油的研究已有报道^[5],但迄今尚无HP- β -CD包合青蒿挥发油的研究报道,本实验采用HP- β -CD对青蒿挥发油进行包合研究,采用多种手段表征包合物的形成,并采用体外细胞培养法初步研究了青蒿挥发油及其包合物抗呼吸道合胞病毒(RSV)和柯萨奇病毒A16型(CA16)的活性。

1 材料

DF-101S型恒温加热磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂),UV-2700型紫外分光光度仪(日本岛津公司),Nicolet IS5型红外光谱仪和3111型CO₂细胞培养箱(美国Thermo公司),BX53型数码光学显微镜(日本Olympus公司),TC10™型自动细胞计数仪(美国Bio-Rad公司),Wallac 1420型多功能酶标仪(美国PerkinElmer公司)。硅胶板(青岛裕民源硅胶试剂厂),青蒿挥发油(江苏康缘药业股份有限公司数字化车间制备),羟丙基- β -环糊精(HP- β -CD,上海源叶生物科技有限公司),DMEM和RPMI-1640培养基(美国Gibco公司,批号分别为1791920和1662222),胎牛血清(FBS,Biological Industries公司,批号1534372),CellTiter-Glo发光法细胞活力检

测试剂盒(美国Promega公司,批号0000182849),利巴韦林药液(辰欣药业股份有限公司,批号11092910411),人喉表皮样癌细胞(Hep-2细胞)和非洲绿猴肾细胞(Vero细胞)(中国科学院细胞库,由本实验室保存培养),盐酸胍(ICN Bio-medicals公司,批号2345B),水为纯化水,试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 青蒿挥发油 HP- β -CD 包合物的制备

2.1.1 饱和水溶液法^[8] 设定HP- β -CD与青蒿挥发油的用量比例8:1,先将HP- β -CD加入水中制成饱和溶液,磁力搅拌,缓慢加入青蒿挥发油,继续搅拌3h,减压浓缩干燥,加适量石油醚洗涤2次,挥干,得白色粉末状包合物。

2.1.2 研磨法^[8] 设定HP- β -CD与青蒿挥发油的用量比例8:1,称取HP- β -CD于研钵中,加入少量水研磨至面团状,缓慢滴加青蒿挥发油,继续研磨45min,置干燥皿中干燥,产物用适量石油醚洗涤2次,挥干,得白色粉末状包合物。

2.1.3 单相溶液法 设定HP- β -CD与青蒿挥发油的用量比例8:1,先将HP- β -CD溶于适量无水乙醇中,磁力搅拌,缓慢加入青蒿挥发油,继续搅拌2h,减压浓缩干燥,产物用适量石油醚洗涤2次,挥干,得白色粉末状包合物。

2.2 包合率的测定 称取青蒿挥发油HP- β -CD包合物适量,置500mL圆底烧瓶中,加20倍量水提取4h,至刻度管中挥发油量不再增加,停止加热,冷却,读数,计算包合物中实际含油量。计算公式为挥发油包合率=包合物含油量/投药量 \times 100%,结果饱和水溶液法、研磨法和单相溶液法的挥发油包合率分别为21.6%、69.7%和79.9%。故选择单相溶液法作为HP- β -CD包合青蒿挥发油的方法。

2.3 单相溶液法的正交试验优化 选择HP- β -CD与挥发油的投料比、乙醇体积分数、包合温度、包合时间为考察因素,每个因素选取3个水平,以挥发油的包合率为评价指标,采用L₉(3⁴)正交表安排试验,试验安排及结果见表1,方差分析见表2。由

直观分析可知,各因素影响包合效果的排序为 $A > B > C > D$ 。以极差最小的 D 因素为误差项进行方差分析,结果发现因素 A, B, C 均对包合效果具有显著性影响,确定最佳包合工艺条件为 HP- β -CD 与青蒿挥发油的投料比 8:1,乙醇体积分数 100%,包合温度 25 $^{\circ}\text{C}$,包合时间 2 h。按该优选的工艺进行验证试验,重复 6 次,结果平均包合率 80.62%,RSD 1.0%,表明优选的包合工艺稳定性和重复性良好。

表 1 青蒿挥发油包合工艺的正交试验分析

Table 1 Orthogonal test analysis of inclusion process of volatile oil in Artemisiae Annuae Herba

No.	A HP- β -CD 与挥发 油的投料比	B 乙醇体积分 数/%	C 包合温度 / $^{\circ}\text{C}$	D 包合时间 /h	包合率 /%
1	6:1	90	25	1	61.2
2	6:1	95	35	2	62.7
3	6:1	100	45	4	64.5
4	8:1	90	35	4	69.4
5	8:1	95	45	1	67.6
6	8:1	100	25	2	80.0
7	10:1	90	45	2	65.1
8	10:1	95	25	4	72.1
9	10:1	100	35	1	78.5

表 2 包合率的方差分析

Table 2 Variance analysis of inclusion ratio

方差来源	SS	MS	F	P
A	173.88	86.94	302.11	<0.01
B	134.95	67.47	234.47	<0.01
C	49.56	24.78	86.11	<0.05
D(误差)	0.58	0.29	1.00	

注: $F_{0.05}(2,2) = 19, F_{0.01}(2,2) = 99$ 。

2.4 青蒿挥发油 HP- β -CD 包合物的表征

2.4.1 紫外分光光度法 (UV) 取青蒿挥发油, HP- β -CD, 青蒿挥发油与 HP- β -CD 的物理混合物以及青蒿挥发油 HP- β -CD 包合物适量, 分别加无水乙醇溶解并定容至 10 mL, 于 200 ~ 400 nm 测定各样品的吸收图谱, 见图 1。结果发现 HP- β -CD 不存在强的紫外吸收。青蒿挥发油与物理混合物的紫外吸收图谱相似, 而包合物与这二者的紫外吸收光谱明显不同, 在 304 nm 处的紫外吸收被掩盖, 在 328 nm 处的紫外吸收减弱, 说明青蒿挥发油已经被包合进入了 HP- β -CD 分子内部, 并形成了稳定的包合物。

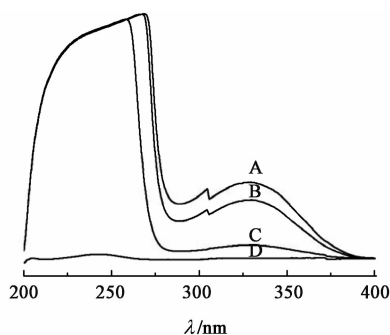


图 1 青蒿挥发油 (A), 物理混合物 (B), 包合物 (C) 和 HP- β -CD (D) 的紫外吸收谱

Fig.1 UV spectrum of volatile oil in Artemisiae Annuae Herba (A), physical mixture (B), inclusion complex (C) and HP- β -CD (D)

2.4.2 红外光谱法 (IR)

吸取青蒿挥发油 20 μL 涂抹于压好片的 KBr 上作为样品 1; 青蒿挥发油和 HP- β -CD 的物理混合物, HP- β -CD 和包合物粉末采用 KBr 压片后分别作为样品 2 ~ 4。在 4 000 ~ 400 cm^{-1} 测定各样品的红外吸收光谱, 见图 2。结果发现包合物与 HP- β -CD 的红外吸收特征相似, 如在 1 616, 1 953, 2 068 cm^{-1} 都有吸收峰, 但两者的吸收并不完全相同, 说明包合物与 HP- β -CD 是不同的物象。包合物与青蒿挥发油的吸收图谱相比, 包合物中挥发油的一些特征吸收峰发生了显著改变, 如 669, 784, 845, 915, 1 381, 1 684, 1 745, 2 872, 2 937, 2 976 cm^{-1} 处的吸收峰消失, 说明青蒿挥发油已包合进入了 HP- β -CD 分子内部。而物理混合物的整体红外吸收轮廓与 HP- β -CD 的红外吸收特征相似, 但红外吸收轮廓中存在诸多较弱的吸收峰, 说明物理混合物的红外图谱是由吸收较强的 HP- β -CD 红外图谱与吸收较弱的挥发油红外图谱加和而成的。

2.4.3 显微鉴别 分别取适量 HP- β -CD 和包合物粉末于载玻片上, 加适量水使溶解, 玻璃盖玻片封片, 于光学显微镜 ($\times 400$) 下观察形态, 见图 3。结果显示 HP- β -CD 为圆筒状或以圆筒状聚集的晶体, 包合物为颗粒状的晶体, 包合前后物相形态发生了较大的改变, 表明包合物形成。

2.4.4 薄层色谱法 (TLC) 取挥发油乙醇溶液作为样品 1; 取 HP- β -CD, 未用石油醚洗涤的包合物, 石油醚洗涤后的包合物, 加适量石油醚浸泡 20 min, 滤过, 蒸干滤液, 加无水乙醇使溶解, 分别作为样品 2 ~ 4; 取适量包合物提取挥发油, 取其挥发油制成乙醇溶液作为样品 5。分别取上述 5 种溶液各 1 μL , 点于同一硅胶 G 板上, 展开, 喷以 5% 香草醛硫酸液, 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热至斑点清晰可见, 见图 4。样品 3 有

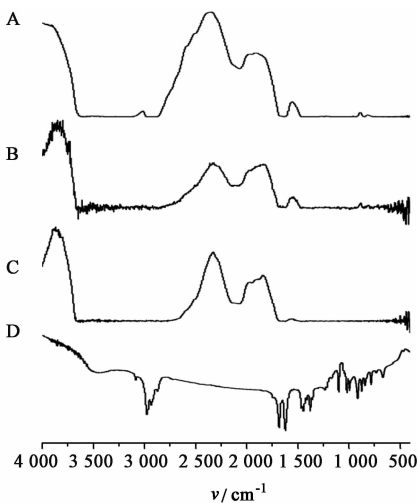


图 2 包合物 (A), 物理混合物 (B), HP- β -CD (C) 和青蒿挥发油 (D) 的红外吸收谱

Fig. 2 IR spectrum of inclusion complex (A), physical mixture (B), HP- β -CD (C) and volatile oil in *Artemisiae Annuae Herba* (D)

胞接种于 96 孔细胞培养板中, 过夜培养后备用。分别加入不同浓度的包合物、挥发油及利巴韦林药液 (均事先用 RPMI-1640 培养液按 2 倍比例稀释得到), 不加药液的细胞作为对照。培养 4 d 后, 采用 CellTiter-Glo 试剂盒检测各组细胞的活性, 计算挥发油、包合物及利巴韦林药液的半数细胞毒性浓度 (CC_{50}) 分别为 12.42, 15.27, $>50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.5.2 包合物对 RSV 的抑制实验 Hep-2 细胞接种于 96 孔细胞培养板中, 待细胞长成单层后, 同时加入不同浓度药液及 RSV 病毒液。设定利巴韦林药液为阳性药物对照, 不加病毒与药液的细胞孔为细胞对照, 只加病毒的孔为病毒对照。病毒感染培养 4 d 后采用 CellTiter-Glo 试剂盒检测各组细胞的活性, 计算挥发油、包合物及利巴韦林药液的半数有效浓度 (EC_{50}) 分别为 3.12, 0.28, 2.19 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 选择指数 (SI) 分别为 3.98, 54.54, >22.83 。

2.6 包合物抗柯萨奇病毒 A16 型 (CA16) 实验

2.6.1 包合物对 Vero 细胞毒性实验 方法同 2.5.1 项, 所用细胞为 Vero 细胞, 稀释液为 DMEM 培养基, 盐酸胍为阳性药物, 加药培养 36 h 后计算挥发油、包合物及盐酸胍的 CC_{50} 分别为 25.96, 22.23, 0.191 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.6.2 包合物对 CA16 的抑制实验 方法同 2.5.2 项, 所用细胞为 Vero 细胞, 所用病毒为 CA16 病毒液, 稀释液为 DMEM 培养基, 盐酸胍为阳性药物, 加药培养 36 h 后计算挥发油、包合物及盐酸胍的 EC_{50} 分别为 9.14, 0.59, 0.008 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, SI 分别为 2.84, 37.68, 25.140。

3 讨论

青蒿挥发油是青蒿的主要有效成分之一, 具有解热、止咳平喘、抗菌、抗病毒等药理作用, 具有重要的临床应用价值^[2], 但具有难溶于水、生物利用度低、有强烈不良口感等缺陷^[5]。包合技术具有提高挥发油溶解性、掩盖其不良气味等作用, 目前在挥发油包合物制备过程中多选择 β -CD 为包合材料^[5], 但 β -CD 水溶性较差, 应用具有一定的局限性^[6]。HP- β -CD 是 β -CD 经化学修饰后的亲水性衍生物, 水溶性极大, 在提高难溶药物的水溶性、增加药物的生物利用度等方面具有广泛的应用^[7,9]。本研究采用 HP- β -CD 对青蒿挥发油进行包合研究, 通过不同包合工艺的摸索, 发现乙醇可以同时溶解 HP- β -CD 和青蒿挥发油, 形成单相溶液, 故称此包合方法为单相溶液法, 与传统的饱和水溶液法、研磨法相比, 此方法显著提高了青蒿挥发油的包合率, 推测可能是

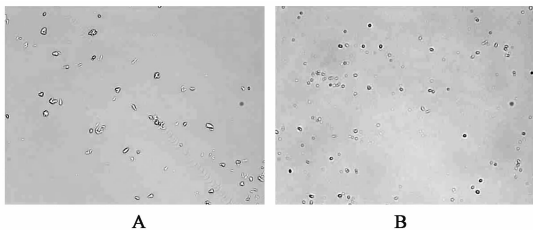


图 3 HP- β -CD (A) 和青蒿挥发油包合物 (B) ($\times 400$)
Fig. 3 Micrographs of HP- β -CD (A) and inclusion complex of volatile oil in *Artemisiae Annuae Herba* (B) ($\times 400$)

斑点, 表明尚有挥发油未被包合; 样品 2 和样品 4 无斑点, 表明挥发油已被包合; 样品 1 和样品 5 具有颜色一致、比移值 (R_f) 相同的斑点, 表明挥发油经 HP- β -CD 包合后其主要成分未发生明显变化。

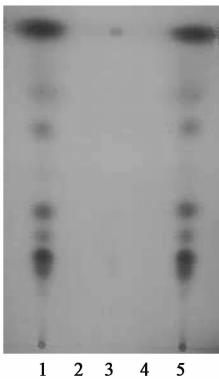


图 4 各样品的薄层色谱
Fig. 4 Thin-layer chromatogram of each sample

2.5 包合物抗呼吸道合胞病毒 (RSV) 实验

2.5.1 包合物对 Hep-2 细胞毒性实验

 Hep-2 细

因为其增加了青蒿挥发油与 HP- β -CD 分子的接触机率。采用正交试验对投料比、乙醇体积分数、包合温度、包合时间等进行优化,得到单相溶液法包合青蒿挥发油的最佳工艺参数;采用 UV, IR, TLC 和显微鉴别等表征手段证明包合物已形成;通过体外抗病毒活性试验发现青蒿挥发油经 HP- β -CD 包合后,可显著增强其抗 RSV 和 CA16 的活性,且治疗安全性更高,可为青蒿挥发油的新制剂开发及应用提供实验依据。

本研究采用单相溶液法制备得到 HP- β -CD 包合物,显著提高了青蒿挥发油的包合率和溶解度,适合用于口服液制剂、注射制剂、眼科制剂、鼻腔给药制剂、缓释及靶向制剂的制备,且工艺简单,适合工业化生产,具有很大的应用前景。但本研究仅初步考察了青蒿挥发油 HP- β -CD 包合物抗 RSV 和 CA16 的活性,对其抗病毒的作用有待于进一步深入研究,期望能将青蒿挥发油 HP- β -CD 包合物用于抗病毒口服液制剂的开发。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:198.
[2] Hwang D I, Won K J, Kim D Y, et al. Anti-adipocyte differentiation activity and chemical composition of essential oil from *Artemisia annua* [J]. Nat Prod Commun,2016,11(4):539-542.

[3] Kim W S, Choi W J, Lee S, et al. Anti-inflammatory, antioxidant and antimicrobial effects of artemisinin extracts from *Artemisia annua* L. [J]. Korean J Physiol Pharmacol,2015,19(1):21-27.
[4] 张丽勇,林秀梅,战月,等. 不同方法提取青蒿挥发油成分分析及抗菌活性比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(22):60-63.
[5] 田吉,何兵,冯文宇,等. 青蒿油 β -环糊精包合物的制备工艺研究[J]. 中成药,2006,28(12):1814-1815.
[6] 宋玉英,于玲,李彦艳,等. 羟丙基- β -环糊精在药剂学中的应用进展[J]. 医药导报,2010,29(10):1314-1317.
[7] LIAO Y, ZHANG X, LI C, et al. Inclusion complexes of HP- β -cyclodextrin with agomelatine: preparation, characterization, mechanism study and *in vivo* evaluation [J]. Carbohydr Polym,2016,147:415-425.
[8] Marreto R N, Almeida E E C V, Alves P B, et al. Thermal analysis and gas chromatography coupled mass spectrometry analyses of hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex containing *Lippia gracilis* essential oil [J]. Thermochim Acta,2008,475(1/2):53-58.
[9] YAO Y, XIE Y, HONG C, et al. Development of a myricetin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: preparation, characterization, and evaluation [J]. Carbohydr Polym,2014,110:329-337.

[责任编辑 刘德文]