

doi: 10. 11751/ISSN. 1002 - 1280. 2021. 1. 7

# 穿心莲内酯纳米混悬剂的制备与评价

刘锦妮<sup>1,2</sup>, 郝素旗<sup>1</sup>, 陈啸钦<sup>1</sup>, 叶兆伟<sup>1,2</sup>, 吴海港<sup>1,2\*</sup>

(1. 信阳农林学院牧医工程学院, 河南信阳 464000; 2. 信阳市兽药新制剂研发与创制工程技术研究中心, 河南信阳 464000)

[收稿日期] 2020 - 08 - 21 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280 (2021) 01 - 0041 - 06 [中图分类号] S859. 79

**[摘要]** 为优选穿心莲内酯纳米混悬剂的制备工艺并进行初步评价, 试验以二甲基亚砜为溶剂、水为反溶剂, 采用反溶剂法制备穿心莲内酯纳米混悬剂 (ANDRO - NS), 以得率为指标, 通过单因素试验和正交试验优化了 ANDRO - NS 的制备工艺, 并进行验证试验, 采用透射电镜、激光粒径仪对所制备的纳米混悬剂进行表征。结果显示: 1% 吐温 - 80 混和 0.05% 泊洛沙姆为稳定剂, 药物浓度为 40 mg/mL, 反溶剂和溶剂的体积比为 20, 搅拌速率为 1400 r/min, 搅拌时间为 80 min, 制得的 ANDRO - NS 平均粒径为  $568.51 \pm 13.74$  nm, 粒径合适, 稳定性良好。试验表明, 采用反溶剂沉淀法制备的 ANDRO - NS 工艺简单, 值得进一步研究。

**[关键词]** 穿心莲内酯; 纳米混悬剂; 反溶剂沉淀法; 正交试验; 反溶剂法

## Preparation and Evaluation of Andrographolide Nanosuspensions

LIU Jin - ni<sup>1,2</sup>, HAO Su - qi<sup>1</sup>, CHEN Xiao - qin<sup>1</sup>, YE Zhao - wei<sup>1,2</sup>, WU Hai - gang<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Animal Husbandry and Medical Engineering, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang, Henan 464000, China;

2. Engineering Center for Research and Innovation of New Veterinary Medicine Preparation of Xinyang City, Xinyang, Henan 464000, China)

Corresponding author: WU Hai - gang, E - mail: haigang413@126.com

**Abstract:** In order to optimize the preparing process of Andrographolide nanosuspension (ANDRO - NS) and evaluate it preliminarily, anti - solvent recrystallization method was used to prepare ANDRO - NS with dimethyl sulfoxide as solvent and water as anti - solvent. Using yield rate as indicator, single factor test and orthogonal test were adopted and verification test was conducted. The ANDRO - NS were characterized by transmission electron microscopy and laser particle size analyzer. The results showed that Tween - 80 and F68 were used as stabilizer and co - stabilizer respectively. The ratio of Tween - 80 to F68 was 20:1, solvent - anti - solvent volume ratio was 1:20, the concentration of the drug was 40 mg/mL, the stirring speed was 1400 r/min, and the stirring time was 80 minutes. The average size of prepared ANDRO - NS was  $568.51 \pm 13.74$  nm, which was suitable and

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (17A230006)

作者简介: 刘锦妮, 讲师, 硕士, 从事药理学研究及教学。

通讯作者: 吴海港。E - mail: haigang413@126.com

stability. In a conclusion, using the anti-solvent precipitation method to prepared ANDRO-NS was simple and safe, and this method was valuable to study further.

**Key words:** Andrographolide; nanosuspensions; anti-solvent precipitation method; orthogonal test; anti-solvent method

穿心莲内酯是来源于天然植物穿心莲的二萜类内酯化合物,具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、解热及保护心脑血管等多种药理活性<sup>[1-3]</sup>。然而由于穿心莲内酯在水中溶解度低、溶出速率慢,口服时体内生物利用度差、在体内不稳定等问题,成为限制其应用的主要瓶颈<sup>[4-6]</sup>。因此,解决穿心莲内酯在水中难溶的问题,增加药物吸收,改善其口服生物利用度成为众多学者的研究热点<sup>[7-9]</sup>。纳米混悬剂是一种以表面活性剂作为助悬剂,将药物颗粒分散在水中,通过粉碎或控制析晶技术形成的稳定的纳米胶态分散体系<sup>[10]</sup>。纳米混悬剂作为一种新型,具有高载药量、制备工艺简单、可实现工业化大生产等优点,被广泛应用于难溶性药物制剂的制备,改善药物溶出度和生物利用度。本试验采用反溶剂法为制备技术,以药物稳定性为指标,通过对处方及制备工艺参数的筛选和优化,探究穿心莲内酯纳米混悬剂的最优制备工艺,为穿心莲内酯新型制剂研发提供新的思路。

## 1 材料与方法

1.1 试剂与药品 泊洛沙姆 188 (F68)、吐温-80、十二烷基硫酸钠、二甲基亚砷均购于上海国药集团化学试剂有限公司;穿心莲内酯原料药(含量 $\geq 93\%$ ,批号:170421)购于河南自然康生物技术有限公司。

1.2 主要仪器 SCIOLOGEX 磁力搅拌器,上海珂淮仪器有限公司;BT-9300ST 激光粒度分布仪,厦门利特晶检测科技有限公司;JEM2100 透射电镜,合肥吉纳新材料科技有限公司。

1.3 穿心莲内酯纳米混悬剂制备工艺的单因素试验

1.3.1 稳定剂浓度 穿心莲内酯浓度为 40 mg/mL、搅拌时间为 1 h、搅拌速率为 1000 r/min、反溶剂和溶剂的体积比为 10, F68 的浓度为 0.05%, 考察吐温-80 浓度为 0.6%、0.8%、1.0%、1.2% 对

ANDRO-NS 稳定性的影响。

1.3.2 穿心莲内酯原料药的浓度 F68 浓度为 0.05%、吐温-80 浓度为 1%、搅拌时间为 1 h、搅拌速率为 1000 r/min、反溶剂和溶剂体积比为 10, 考察药物浓度分别为 20、30、40、50 mg/mL 对 ANDRO-NS 稳定性的影响。

1.3.3 反溶剂和溶剂体积比 F68 浓度为 0.05%、吐温-80 浓度为 1%、搅拌时间为 1 h、搅拌速率为 1000 r/min、穿心莲内酯浓度为 40 mg/mL, 考察反溶剂和溶剂体积比分别为 10、15、18、20 时对 ANDRO-NS 稳定性的影响。

1.3.4 搅拌时间 F68 浓度为 0.05%、吐温-80 浓度为 1%、搅拌速率为 1000 r/min、反溶剂和溶剂体积比为 10、穿心莲内酯浓度为 40 mg/mL, 考察搅拌时间分别为 60、80、100、120 min 对 ANDRO-NS 稳定性的影响。

1.3.5 搅拌速率的筛选 F68 浓度为 0.05%、吐温-80 浓度为 1%、搅拌时间为 1 h、反溶剂和溶剂体积比为 10、穿心莲内酯浓度为 40 mg/mL, 考察搅拌速率分别为 900、1100、1200、1400 r/min 对 ANDRO-NS 稳定性的影响。

1.4 正交试验优化 根据单因素试验的考察,以 ANDRO-NS 得率为评价指标,选取药物浓度(A)、搅拌速率(B)、搅拌时间(C)、反溶剂和溶剂体积比(D)为考察指标,采用四因素三水平  $L_9(3^4)$  正交试验设计(表 1)。

表 1 ANDRO-NS 正交试验因素水平

Tab 1 The factors and the levels of of orthogonal test				
水平	药物浓度/ (mg · mL <sup>-1</sup> ) (A)	搅拌速率/ (r · min <sup>-1</sup> ) (B)	搅拌时间/ min (C)	反溶剂和溶剂 的体积比 (D)
1	20	900	60	20
2	40	1200	80	15
3	50	1400	120	10

1.5 穿心莲内酯纳米混悬剂制备验证试验 称取 F68 0.0125 g,吐温 - 80 0.5 mL 于 50 mL 蒸馏水中,搅拌充分溶解,为反溶剂;称取穿心莲内酯原料药 0.24 g,溶于 2.5 mL 二甲基亚砜中,搅拌均匀溶解,为溶剂相;在搅拌速率为 1400 r/min 条件下将溶剂相逐渐滴加到反溶剂相中,搅拌 80 min,用 0.8  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤,即得 ANDRO - NS,采用 BT - 9300ST 激光粒度分布仪和 JEM2100 透射电镜对所制备的混悬剂的粒径和结构进行评价。

1.6 穿心莲内酯纳米混悬剂得率计算 取试验所制备的穿心莲内酯混悬剂,震荡 2 min,0.8  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后,取下滤膜,干燥,称量,计算穿心莲内酯纳米混悬剂的得率,其计算公式为:得率 = (穿心莲内酯纳米药物量/穿心莲内酯药物总量)  $\times$  100%。

1.7 数据处理与统计分析 试验数据采用 Excel 2007 整理并进行分析。

## 2 结果与分析

2.1 稳定剂种类的选择 试验分别考察了吐温 - 80、F68、十二烷基硫酸钠对穿心莲内酯纳米混悬剂稳定性的影响。结果表明穿心莲内酯原料颗粒较大,呈团块状(图 1);单独一种稳定剂时,药物结晶变为长条状或者更小的棱形状,但形状大小分布极其不规则(图 2),而使用 F68 和吐温 - 80 作为混合稳定剂时,光镜下观察药物形状大小均一,分布均匀(图 3),因此本试验确定 F68 混和吐温 - 80 为稳定剂。



图 1 穿心莲内酯原料药结构(  $\times$  100)

Fig 1 Optical photomicrograph of Andrographalide

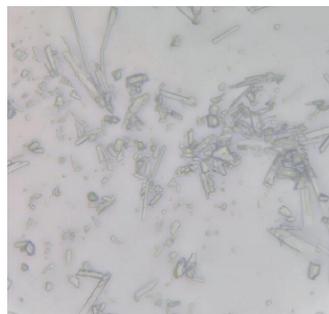


图 2 F68 对 ANDRO - NS 影响(  $\times$  100)

Fig 2 Optical photomicrograph of the influence of poloxamers



图 3 混合稳定剂对 ANDRO - NS 影响(  $\times$  100)

Fig 3 Optical photomicrograph of the influence of mixed stabilizers

2.2 稳定剂浓度试验结果 由表 2 分析可知,当吐温 - 80 浓度从 0.6% 升高到 1.0% 时,纳米药物得率增加到 71.97%,当其浓度为 1.2% 时,得率下降。因此选用吐温 - 80 的浓度为 1%。

表 2 稳定剂浓度对穿心莲内酯纳米混悬剂的影响

Tab 2 The influence of the concentration of stabilizer of ANDRO - NS

浓度/%	0.6	0.8	1.0	1.2
得率/%	41.86	44.49	71.97	48.52

2.3 药物浓度试验结果 由表 3 可知药物浓度为 40 mg/mL 时得率最高,随着药物浓度增加,药物颗粒碰撞的机会增加,易发生团聚。因此本试验选用的药物浓度为 40 mg/mL。

表 3 药物浓度对穿心莲内酯纳米混悬剂的影响

Tab 3 The influence of the concentration of drug of ANDRO - NS

药物浓度/(mg · mL <sup>-1</sup> )	20	30	40	50
得率/%	60.36	83.47	89.86	60.36

2.4 反溶剂和溶剂体积比的筛选结果 根据表 4 可知,随着反溶剂比例增加,纳米药物得率总体呈上升趋势,反溶剂和溶剂的体积比为 20 时,观察到的结晶外观均为较小的球形颗粒且分布均匀,因此选择反溶剂和溶剂的体积比为 20 有利于穿心莲内酯纳米混悬剂的制备。

表 4 反溶剂和溶剂体积比对穿心莲内酯纳米混悬剂的影响

Tab 4 The influence of ratio of solvent and anti - solvent of ANDRO - NS

反溶剂和溶剂的体积比	10	15	18	20
得率/%	48.60	49.53	51.77	81.46

2.5 搅拌时间的筛选结果 由表 5 分析可知,搅拌时间为 60 min 时,药物得率达到最高为 76.62%,随着时间的增加,得率呈现先下降后升高的趋势,可能原因是混悬液中的微小颗粒不太稳定,出现了聚集,但搅拌时间继续延长,又会将体系中团聚的颗粒分开。

表 5 搅拌时间对穿心莲内酯纳米混悬剂的影响

Tab 5 The influence of stirring time of ANDRO - NS

搅拌时间/min	60	80	100	120
得率/%	76.62	66.09	63.07	86.08

2.6 搅拌速率的筛选结果 由表 6 分析可知,转速为 1200 r/min 以下时得率平稳,增加转速时得率也呈现增高趋势。

表 6 搅拌速率对穿心莲内酯纳米混悬剂的影响

Tab 6 The influence of stirring rate of ANDRO - NS

搅拌速率/(r · min <sup>-1</sup> )	900	1100	1200	1400
得率/%	46.74	42.33	67.32	85.95

2.7 正交试验结果 由表 7 正交试验结果分析可知,以穿心莲内酯纳米粒得率为指标时,根据极差

大小,其对影响因素为 C > A > B > D,依据 K 值大小,其较优条件为 C<sub>2</sub>A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>D<sub>1</sub>。结合单因素试验,最终确定反溶剂法制备穿心莲内酯纳米混悬剂的最佳工艺为:搅拌速率为 1400 r/min、搅拌时间为 80 min、药物浓度为 40 mg/mL、反溶剂和溶剂的体积比为 20。

表 7 正交试验结果

Tab 7 The results of orthogonal test

序号	A	B	C	D	得率/%
1	1	1	1	1	74.60
2	1	2	2	2	65.55
3	1	3	3	3	32.12
4	2	1	2	3	91.32
5	2	2	3	1	54.71
6	2	3	1	2	69.18
7	3	1	3	2	47.86
8	3	2	1	3	68.47
9	3	3	2	1	75.78
K1	172.27	213.78	212.25	205.09	
K2	215.21	188.73	232.65	182.59	
K3	192.11	177.08	134.69	191.91	
R1	42.94	36.70	97.96	22.50	

2.8 验证试验结果 按照上述正交试验所确定的较优试验条件制备穿心莲内酯纳米混悬剂的粒径大小见图 4,其平均粒径为 568.51 ± 13.74 nm,得率为 93.71% ± 1.84%。取适量穿心莲内酯纳米混悬剂滴于铜网上,2% 磷钨酸负染 3 min,透射电镜观察见图 5。

### 3 讨论与结论

纳米混悬剂是热力学不稳定体系,药物的粒径越小,其稳定性相对也越差,容易出现沉降、聚集等现象,因此在制备过程中常需加入稳定剂以解决其物理稳定的问题。表面活性剂的种类和浓度对纳米混悬剂稳定性有显著的影响,能够与纳米药物快速形成稳定粒子,降低粒子聚集和聚结的机率<sup>[11]</sup>。本试验前期预实验中单用泊洛沙姆时,所制得的混悬液极其不稳定,放置 24 h 结晶就开始聚集变大,分析其中原因,可能是在形成 ANDRO - NS 时,上

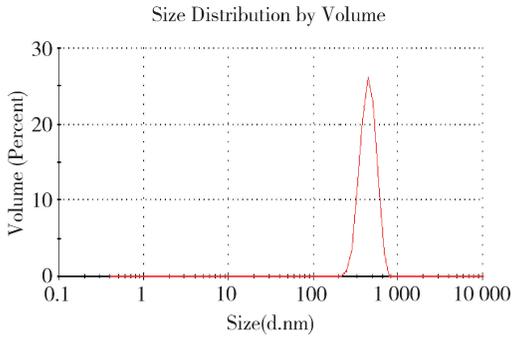


图 4 ANDRO-NS 粒径图

Fig 4 Particle size distribution of ANDRO-NS

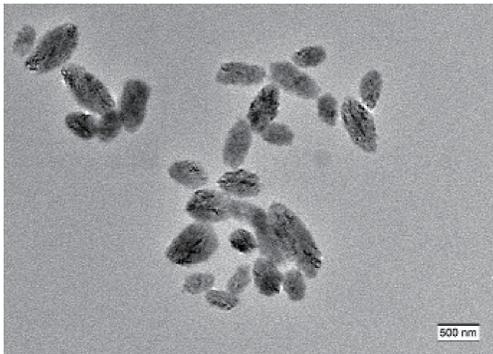


图 5 ANDRO-NS 透射电镜图(×6000)

Fig 5 Transmission electron microscopy micrographs of ANDRO-NS

述单一稳定剂不足以提供足够的立体位阻和静电排斥作用,致使析出的纳米聚集增大,引起沉淀。据文献报道,F68 和吐温-80 属于低粘度表面活性剂<sup>[12]</sup>,可以增加混悬液稳定性,因此本试验选择混合稳定剂制备纳米混悬剂。本试验考察了不同的吐温-80 浓度对结晶的影响,当其为 1% 时,结晶外观比较均一,当继续增加稳定剂浓度,则纳米粒稳定性降低,其原因可能是由于稳定剂浓度增大,多余的稳定剂会自组装形成胶束,引起胶束与纳米粒表面竞争来吸附稳定剂所致。因此选用吐温-80 及 F68 混合稳定剂进行后续研究。

反沉淀法制备的纳米结晶的外观及粒径受到制备工艺多种因素的影响,例如药物浓度、溶剂和反溶剂的体积比及搅拌速度等,因此需要优化制备工艺。药物浓度是影响纳米混悬剂稳定性的重要条件之一,药物浓度过高,在反溶剂制备过程中过

饱和程度更高,粒子成核迅速,生长快,但容易导致纳米粒出现聚集现象,而药物浓度过低往往达不到用药需求,所以在制备过程中要选择适宜的药物浓度,从而得到理想的纳米粒子并且满足用量<sup>[13]</sup>。本试验选择药物浓度 40 mg/mL 时得率最高,且粒径稳定。

搅拌速率、时间也是影响纳米混悬液稳定性重要条件之一。搅拌速率低,搅拌时间短,反应不均匀,因而获得的结晶较大、分布不均匀。搅拌速率升高,表面活性剂可以与药物均匀混合,有利于获得更小的结晶。李旺<sup>[14]</sup>采用反溶剂法联合高压均质法制得牡荆干纳米混悬剂,结果表明搅拌速率越高微粒趋向于更小,在 1500 r/min 时微粒最小,再增加速率,得率变化不明显,这与本试验结果相似。此外,本试验对搅拌时间也进行了考察,结果显示搅拌时间短,微粒的大小和形状分布极其不均匀,可能是在搅拌短时间内微粒的成核速率迅速增加,微粒的生长速率低,体系中的小颗粒增加,但随着时间的延长,得率有高有低,因此搅拌时间可以根据其他因素的高低来合适的时间。本试验结果表明在搅拌时间为 80 min 时,所制备的纳米混悬剂的得率和外观都较好,所以本试验最佳搅拌时间选为 80 min。

本研究通过单因素试验和正交试验对穿心莲内酯纳米混悬剂的处方工艺进行了优化。结果显示,最优处方工艺条件为:以 1% 吐温-80 和 0.05% 泊洛沙姆为稳定剂,药物浓度为 40 mg/mL,反溶剂和溶剂的体积比为 20,搅拌速率为 1400 r/min,搅拌时间为 80 min,所制得的穿心莲内酯纳米混悬液粒径为  $568.51 \pm 13.74$  nm。

#### 参考文献:

- [1] 杨雪松,高慧媛,张又夕,等.穿心莲内酯药理作用的研究进展[J].热带医学杂志,2019,19(4):518-522.  
Yang X S, Gao H Y, Zhang Y X, et al. Research progress in pharmacological action of Andrographolide [J]. Journal of Tropical Medicine, 2019, 19(4): 518-522.
- [2] Rahul R, Sanith C, Joseph M, et al. Exploring the mechanisms of cytotoxic and anti-inflammatory property of Andrographolide

- and its derivative[J]. *Pharmacognosy Reviews*, 2018, 12(23): 2451–2458.
- [3] Xu Y Z, Tang D, Wang J P, *et al.* Neuroprotection of Andrographolide against microglia – mediated inflammatory injury and oxidative damage in PC12 [J]. *Neurons Neurochemical Research*, 2019, 44(11): 2619–2630.
- [4] Giridhar S, Kandanura S, Tamanga N, *et al.* Andrographolide: A natural product template for the generation of structurally and biologically diverse diterpenes[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 176(15): 513–533.
- [5] 周 燃, 成佳路, 龙凯花. 穿心莲内酯新型给药系统的研究进展[J]. *辽宁化工*, 2020, 49(5): 549–552.  
Zhou R, Cheng J L, Long K H. Research progress in new drug delivery systems for Andrographolide [J]. *Liaoning Chemical Industry*, 2020, 49(5): 549–552.
- [6] 张守德, 赵国巍, 袁友泉, 等. 穿心莲内酯聚丙烯酸树脂 II 固体分散体的制备及表征[J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(23): 2370–2374.  
Zhang S D, Zhao G W, Zhong Y Q, *et al.* Preparation and characterization of Andrographolide solid dispersion prepared by Eudragit II [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2019, 39(23): 2370–2374.
- [7] 李园园, 华 素. 穿心莲内酯自乳化制剂工艺研究[J]. *价值工程*, 2016, 35(36): 122–123.  
Li Y Y, Hua S. Study on self – emulsifying preparation process of Andrographolide[J]. *Value Engineering*, 2016, 35(36): 122–123.
- [8] 郭珏铄, 董佳乐, 杨秀芳, 等. 喷雾冷凝技术制备穿心莲内酯固体分散体的研究 [J]. *中成药*, 2019, 30(9): 2113–2117.  
Guo Y S, Dong J L, Yang X F, *et al.* Rreparation of Andrographolide solid dispersions by spray condensation technique [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2019, 30(9): 2113–2117.
- [9] 张丹妮, 黄 瑶, 乔 颖, 等. 羟丙基 –  $\beta$  – 环糊精包合穿心莲内酯及其衍生物的抑菌活性研究[J]. *南京农业大学学报*, 2016, 39(2): 318–324.  
Zhang D N, Huang Y, Qiao Y, *et al.* Antibacterial activity of inclusion complexes of Andrographolide and 14 – acetylandrographolide by hydroxypropyl –  $\beta$  – cyclodextrin [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2016, 39(2): 318–324.
- [10] 尹晓兰. 依托泊苷脂质纳米混悬剂及其冻干制剂的制备及体内外评价[D]. 山东大学, 2018.  
Yin X L. Preparation and evaluation of Etoposide loaded lipid – based nanosuspensions and lyophilized formulation *in vitro* and *in vivo* [D]. Shandong University, 2018.
- [11] 冯子奇, 刘佳莹, 桑 梅, 等. 反溶剂法制备叶黄素酯纳米粒 [J]. *中草药*, 2017, 48(14): 2870–2876.  
Feng Z Q, Liu J Y, Sang M, *et al.* Optimization of preparation, characterization, and dissolution characteristics of Lutein Ester nanoparticles by anti – solvent method [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2017, 48(14): 2870–2876.
- [12] 黄 平, 毛坤军, 王雪婷, 等. 纳米混悬剂中稳定剂的研究进展[J]. *广州化工*, 2016, 44(20): 7–9.  
Huang P, Mao K J, Wang X T, *et al.* Research progress on stabilizers nan – suspensions [J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2016, 44(20): 7–9.
- [13] 侯成栋. 大环内酯类药物纳米混悬剂制备工艺及其颗粒构建机理模型化研究[D]. 北京化工大学, 2011.  
Hou C D. Preparation of macrolide nan – suspensions and the modeling research for the formation mechanism of nan/micro particles [D]. Beijing University of Chemical Technology, 2011.
- [14] 李 旺. 牡荆苷纳米混悬剂及其冻干粉的制备工艺研究[D]. 东北林业大学, 2013.  
Li W. Studies on preparation process of Vitexin nanosuspension and its lyophilized powders [D]. Northeast Forestry University, 2013.

(编辑:李文平)