

基于介质研磨法的蛇床子素纳米结晶的制备、表征及体外水溶性评价

王梦颜¹, 杨曼², 巨倩茹¹, 聂嘉璇¹, 高丹¹, 刘喜纲¹, 常金花^{1*} (1. 承德医学院, 河北省中药研究与开发实验室, 河北 承德 067000; 2. 沧州市人民医院中药房, 河北 沧州 061000)

摘要:目的 以蛇床子素(osthole, OST)为模型药物,研究纳米结晶技术提高 OST 水溶性的适用性。方法 采用介质研磨法制备蛇床子素纳米混悬液(OST-NSs),以平均粒径和分散系数(PDI)为指标,优化处方和工艺参数;对蛇床子素纳米结晶(OST-NCs)的晶体形态、晶型及其与稳定剂相互作用进行表征;并考察其表面润湿性、平衡溶解度及其在多种介质中的体外溶出度, f_2 值评价溶出曲线相似性。结果 OST-NCs 处方和工艺参数为:OST($30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$):聚乙烯吡咯烷酮-乙酸乙烯酯聚合物(PVP-VA64)-脱氧胆酸钠=25:5:1;研磨珠(0.4~0.6 mm)与 OST 混悬液的体积比 2:1,450 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 研磨 70 min;90 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 甘露醇为冻干保护剂,制备 OST-NCs。OST-NSs 的稳定性随着温度增加而降低;OST-NCs 复溶后,粒径为(354.2 ± 9.857) nm, PDI 为(0.259 ± 0.023), Zeta 电位为(-22.2 ± 0.896) mV;OST-NCs 基本保持晶体结构,呈棒状,OST 和稳定剂之间无相互作用,表面润湿性优于 OST 及其物理混合物;OST-NCs 在纯水中平衡溶解度是 OST 的 2.31 倍;在 6 种溶出介质中,OST-NCs 的溶出速度和累积溶出度均显著优于 OST 及其物理混合物,而且与 OST 的溶出曲线相比,物理混合物的 f_2 值均大于 50,而 OST-NCs 的 f_2 值均小于 50。结论 介质研磨法制备 OST-NCs,重现性好;在制备 OST-NSs 时,应降低研磨温度,减少研磨时间;OST-NCs 的溶出行为与 OST 显著不同,粒径减小是 OST-NCs 提高 OST 水溶性的主要原因;提示基于介质研磨法的纳米结晶策略能够有效改善 OST 的水溶性和疏水性,在 OST 新药开发方面具有较好的应用前景。

关键词: 蛇床子素;纳米混悬液;纳米结晶;介质研磨法;质量评价

doi:10.11669/cpj.2024.22.009 中图分类号:R944 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)22-2169-10

Preparation, Characterization and *in Vitro* Solubility Evaluation of Osthole Nanocrystallization Based on Wet Medium Grinding

WANG Mengyan¹, YANG Man², JU Qianru¹, NIE Jiakuan¹, GAO Dan¹, LIU Xigang¹, CHANG Jinhua^{1*} (1. Hebei Province Key Laboratory of Research and Development for Chinese Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, China; 2. Pharmacy of Traditional Chinese Medicine, Cangzhou People's Hospital, Cangzhou 061000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare osthole(OST) nanocrystallization and evaluate its characterization. **METHODS** OST-NSs were prepared by a media grinding method, and the average particle size and polydispersity index (PDI) were used as indicators to optimize the formulation and process parameters. The crystal morphology, crystal form, and interaction between OST-NCs and stabilizers were characterized. Their surface wettability, equilibrium solubility, and *in vitro* dissolution in various media were investigated, and the f_2 value was used to evaluate the similarity of the dissolution curves. **RESULTS** The formulation and process parameters for preparing OST-NCs were as follows: OST (3%): PVP-VA64, sodium deoxycholate 25:5:1, the volume ratio of grinding beads (0.4–0.6 mm) to OST suspension was 2:1, and it was ground at 450 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ for 70 min, and 9% mannitol was used as a lyophilized protective agent to prepare OST-NCs. The stability of OST-NCs decreases with increasing temperature. After reconstitution, the particle size of OST-NCs was (354.2 ± 9.857) nm, the PDI was (0.259 ± 0.023), and the Zeta potential was (-22.2 ± 0.896) mV. OST-NCs basically maintain the rod-shaped crystal structure. There is no interaction between OST and the stabilizer. The surface wettability of OST-NCs is better than that of OST and its physical mixture. The equilibrium solubility of OST-NCs in pure water is 231% that of OST. Among the six dissolution media, the dissolution rate and cumulative dissolution of OST-NCs were significantly better than those of OST and its physical mixture. Additionally, the f_2 values for the physical mixtures were greater than 50, whereas those for OST-NCs were less than 50, as compared with the dissolution curves of OST. **CONCLUSION** The results show that the reproducibility of OST-NCs is good during their preparation. The grinding temperature should be reduced, and the grinding time should be optimized. The dissolution behavior of OST-NCs is significantly different from that of OST. The reduction of particle size is the main

基金项目: 河北省自然科学基金项目资助(H2022406073);河北省中央引导地方科技发展资金项目资助(246Z2504G);河北省高等学校科学技术研究项目资助(ZD2022121);承德医学院中药学学科建设项目资助

作者简介: 王梦颜,女,硕士研究生 研究方向:中药新剂型 * 通讯作者:常金花,女,硕士,副教授,硕士生导师 研究方向:药物新剂型与新技术 Tel:(0314)2290629

reason for the improved water solubility of OST-NCs. These results suggest that the nanocrystallization strategy based on media grinding can effectively improve the water solubility and hydrophobicity of OST and has a good application prospect in the development of new OST drugs.

KEY WORDS: osthole; nanosuspension; nanocrystallization; media grinding; quality evaluation

中医学理论认为骨质疏松症属于“骨痿”“骨痹”的范畴,补肾中药能够广泛用于防治骨质疏松症。蛇床子素(osthole, OST)是一种小分子香豆素类化合物,是中药蛇床子的主要有效成分,具有温肾壮阳的功效^[1]。现代药理学研究发现,OST可以通过激活 AKT/eNOS/GC/PKG 信号通路而促进骨形成^[2],同时增强骨代谢活动,促进骨修复和骨重建^[3]。因此,OST 是一种非常有前景的防治骨质疏松症的候选药物。

按照生物药剂学分类系统(BSC),OST 属于 BSC II 类,具有低溶解性、高渗透性的特征,课题组前期研究表明 OST 绝对生物利用度仅为 2.22%。近些年,已经有研究将 OST 制成新型递药系统^[4-8],提高其生物利用度,但这些递药系统仍存在载药量低、有机溶剂残留、稳定性差等缺点。

纳米混悬液是由少量稳定剂稳定的纳米范围的药物分散体系,可以改善药物的疏水性、增加药物的体外溶出度、提高药物的载药量和稳定性^[9-11],因此它是提高难溶性药物口服生物利用度的有效策略。纳米混悬液的制备方法有自上而下和自下而上两大类,研究证实不同制备方法对纳米混悬液的物理化学性质具有一定的影响,其中介质研磨法具有操作简单、容易放大制备的优点,而且在保持药物的物理稳定性和晶型稳定方面较好^[12-15]。

因此,本研究拟采用介质研磨法制备蛇床子素纳米混悬液(OST-NSs),采用单因素考察筛选其处方和研磨工艺,冷冻干燥法进行固化,得到蛇床子素纳米结晶(OST-NCs),并对其形貌、晶型、润湿性等物理化学性质进行表征,同时考察其平衡溶解度和在多种溶出介质中的溶出度。本研究旨在为改善 OST 水溶性和丰富 OST-NCs 研究,提供实验数据和新思路。

1 材料

1.1 仪器

Agilent1260-II 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);RC807DP 型溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司);马尔文 ZEN3690 型激光粒径仪(英国马尔文公司);QM3SP2 型行星式球磨机(南京驰顺

科技发展有限公司);LGJ-22D 型冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂);GTCS-2013B 型恒温振荡器(金坛市天竟实验仪器厂);磁力搅拌器(江苏科析仪器有限公司);KQ-300 型超声波清洗器(昆山洁力美超声仪器有限公司);Theta Lite 接触角仪[大昌洋行(上海)有限公司]。

1.2 药品与试剂

OST 原料药(西安天本生物工程有限公司,纯度:98%,批号:201910);OST 对照品(成都普菲德生物技术有限公司,批号:18032005,纯度:HPLC 为 97.85%);聚乙烯吡咯烷酮-乙酸乙烯酯共聚物(PVP-VA64)(德国 BASF 公司);脱氧胆酸钠(西格玛奥德里奇上海贸易有限公司);甘露醇(北京凤礼精求医药股份有限公司);麦芽糖(上海蓝季科技发展有限公司);海藻糖(北京凤礼精求医药股份有限公司);盐酸(振兴化工试剂厂);氢氧化钠(天津欧博凯化工有限公司);磷酸二氢钾(天津市光复科技发展有限公司);聚山梨酯 80(天津市试剂批发公司);甲醇、甲酸为色谱纯;娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 OST-NSs 的制备

精密称取适量 PVP-VA64 和脱氧胆酸钠,置于 100 mL 烧杯中,加适量去离子水,搅拌溶解;再将适量 OST 原料药加入到稳定剂溶液中,搅拌分散,形成 OST 混悬液。量取直径为 0.4~0.6 mm 的氧化铝研磨珠,置于研磨罐中,按照一定的体积比,加入 OST 混悬液,搅匀,将研磨罐放置到行星式球磨机中,设置研磨工艺参数,研磨一定时间后,即得 OST-NSs。

2.2 OST-NSs 处方和工艺的筛选

2.2.1 平均粒径和多分散系数(PDI)的测定 精密吸取 OST-NSs 10 μL ,去离子水稀释 400 倍后,使用马尔文激光粒径仪 ZEN3690 测定稀释后的 OST-NSs 平均粒径和 PDI。OST-NSs 粒径和 Zeta 电位结果见图 1~2。

2.2.2 稳定剂种类 选择 OST 的质量浓度为 30 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,OST 与稳定剂的质量浓度比为 5:1,OST 混悬液与研磨珠的体积比为 1:2,研磨速度为 450 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,研磨时间为 70 min,按照“2.1”

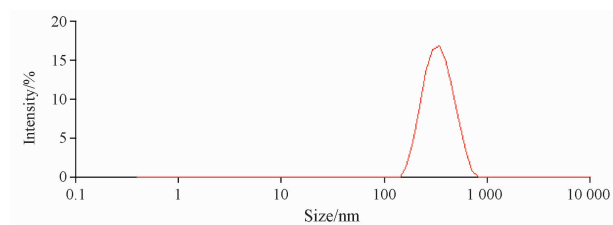


图1 蛇床子素(OST)纳米混悬液粒径分布

Fig. 1 Particle size distribution of OST-NSs

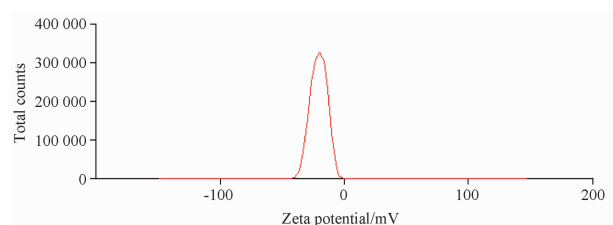


图2 OST 纳米混悬液 Zeta 电位分布

Fig. 2 Zeta potential distribution of OST-NSs

项下方法制备 OST-NSs。以平均粒径和 PDI 为指标,筛选稳定剂种类,结果见图 3。

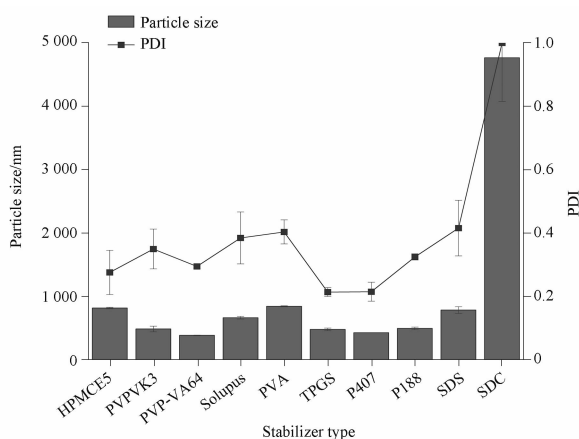


图3 稳定剂种类对蛇床子素纳米混悬液(OST-NSs)粒径和多分散系数(PDI)的影响。 $n=3, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Effect of stabilizer type on OST-NSs particle size and PDI. $n=3, \bar{x} \pm s$

由图 3 可知,采用不同种类的稳定剂制得的 OST-NSs,其平均粒径的范围为(381 ~ 4 766) nm, PDI 的变化范围为 0.213 ~ 1.000。其中以 PVP-VA64 作为稳定剂,制得的 OST-NSs 的平均粒径最小,为(381 ± 5.285) nm,且 PDI 在 0.2 ~ 0.3 之间。因此,本研究选择 PVP-VA64 为空间稳定剂。

2.2.3 OST 与 PVP-VA64 的质量浓度比 固定药物质量浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,选择 OST 与 PVP-VA64 的质量浓度比分别为 5:1,10:1,25:1,50:1,OST 混悬液与研磨珠的体积比为 1:2,研磨速度为

$450 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,研磨时间为 70 min,按“2.1”项下方法制备 OST-NSs,以平均粒径和 PDI 为指标,确定药物与稳定剂的质量浓度比,结果见图 4。由图 4 可知,OST 与 PVP-VA64 的质量浓度比为 5:1 时粒径最小,为 375.1 nm。

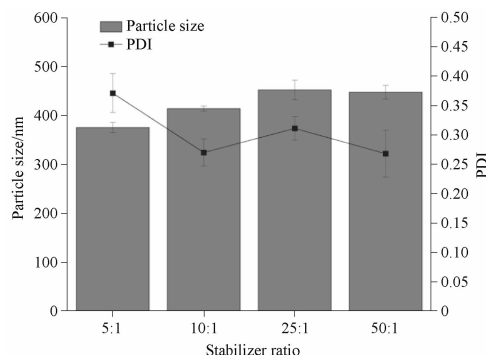


图4 稳定剂比例对 OST-NSs 粒径及 PDI 的影响。 $n=3, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 Effect of stabilizer ratio on OST-NS particle size and PDI. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.2.4 联合稳定剂 文献[16]报道选择高分子聚合物和表面活性剂的组合作为联合稳定剂,可形成静电空间稳定,有利于减小粒径和提高稳定性。固定药物质量浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,OST 与 PVP-VA64 的质量浓度比为 5:1,OST 混悬液与研磨珠的体积比为 1:2,研磨速度为 $450 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,研磨时间为 70 min,选择表面活性剂(脱氧胆酸钠和 SDS)为稳定剂 2,按“2.1”项下方法制备 OST-NSs,以平均粒径和 PDI 为指标,筛选联合稳定剂的比例,结果见表 1。由表 1 可知,选择 PVP-VA64 和脱氧胆酸钠作为联合稳定剂,且质量浓度比为 5:1 时,平均粒径和 PDI 均较好。

表1 联合稳定剂比例对 OST-NSs 粒径和 PDI 的影响。 $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab. 1 Effect of combined stabilizer ratio on OST-NSs particle size and PDI. $n=3, \bar{x} \pm s$

Proportion	PVP-VA64 + SDS		PVP-VA64 + sodium deoxycholate	
	Particle size/nm	PDI	Particle size/nm	PDI
1:1	711.4 ± 25.13	0.241 ± 0.028	631.1 ± 11.28	0.377 ± 0.078
2:1	540.7 ± 0.078	0.250 ± 0.078	528.1 ± 0.078	0.358 ± 0.078
5:1	504.7 ± 0.078	0.215 ± 0.078	323.4 ± 0.078	0.197 ± 0.078
10:1	417.0 ± 0.078	0.180 ± 0.017	402.4 ± 0.017	0.294 ± 0.017
20:1	585.2 ± 0.017	0.336 ± 0.017	394.5 ± 0.017	0.190 ± 0.017

2.2.5 OST 质量浓度 选择 OST:PVP-VA64:脱氧胆酸钠的质量浓度比为 25:5:1,OST 混悬液与研磨珠

的体积比为 1:2, 研磨速度为 $450 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 研磨时间为 70 min, 按照“2.1”项下方法制备 OST-NSs。以平均粒径和 PDI 为指标, 筛选 OST 质量浓度 ($10, 30, 100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 结果见图 5。由图 5 可知, 当 OST 质量浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, OST-NSs 的平均粒径和 PDI 均较小。

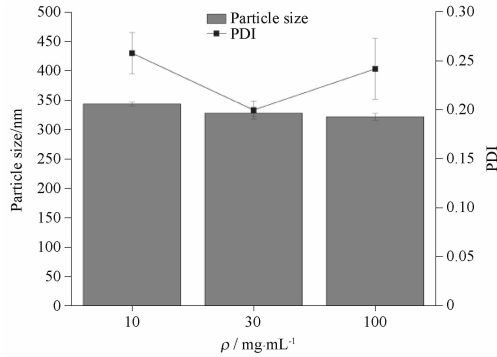


图 5 药物浓度对 OST-NSs 粒径及 PDI 的影响。 $n=3, \bar{x} \pm s$
Fig. 5 Effect of drug concentration on OST-NSs particle size and PDI. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.2.6 研磨介质用量 固定 OST 质量浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, OST: PVP-VA64: 脱氧胆酸钠的质量浓度比为 25:5:1, OST 混悬液体积为 30 mL, 研磨速度为 $450 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 研磨时间为 70 min, 以平均粒径和 PDI 为指标, 筛选研磨珠与 OST 混悬液的体积比 (1:1, 1.5:1, 2:1), 结果见表 2。由表 2 可知, 随着研磨珠体积的增加, OST-NSs 的平均粒径减小, 而 PDI 基本不变, 推测其原因可能是研磨珠的填充率越大, 研磨腔内药物与研磨珠发生碰撞频率越高, 研磨效率越高^[17], 越有利于粒径的减小。因此, 选择研磨珠与 OST 混悬液的体积比为 2:1。

表 2 研磨珠与 OST 混悬液的体积比对 OST-NSs 粒径和 PDI 的影响。 $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab. 2 Effect of grinding medium dosage on OST-NS particle size and PDI. $n=3, \bar{x} \pm s$

Proportion	Particle size/nm	PDI
1:1	480.7 ± 7.582	0.230 ± 0.061
1.5:1	460.7 ± 12.17	0.262 ± 0.11
2:1	334.1 ± 2.577	0.211 ± 0.048

2.2.7 研磨速度考察 固定 OST 质量浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, OST: PVP-VA64: 脱氧胆酸钠的质量浓度比为 25:5:1, OST 混悬液体积为 30 mL, 研磨珠与 OST 混悬液的体积为 2:1, 研磨时间为 70 min, 以平均粒径和 PDI 为指标, 筛选研磨速度 ($250, 350,$

$450 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 结果见表 3。由表 3 可知, 随着研磨速度的增加, 粒径也随之减小, 这是因为碰撞频率和剪切力强度增强, 导致颗粒破碎率增大。因此, 选择研磨速度 $450 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 制备 OST-NSs。

表 3 转速对 OST-NSs 粒径和 PDI 的影响。 $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab. 3 Effect of rotational speed on OST-NSs particle size and PDI. $n=3, \bar{x} \pm s$

Rotational speed/ $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$	Particle size/nm	PDI
450	334.1 ± 2.577	0.211 ± 0.048
350	355.9 ± 0.1532	0.210 ± 0.039
250	487.4 ± 3.510	0.291 ± 0.030

2.2.8 研磨时间考察 固定 OST 质量浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, OST: PVP-VA64: 脱氧胆酸钠的质量浓度比为 25:5:1, OST 混悬液体积为 30 mL, 研磨珠与 OST 混悬液的体积为 2:1, 研磨速度为 $450 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 以平均粒径和 PDI 为指标, 筛选研磨时间 (10、20、30、40、50、60、70、80 min), 结果见图 6。由图 6 可知, 随着研磨时间的增加, 粒径减小, 但当研磨时间超过 70 min 时, OST-NSs 的粒径稍稍增加。推测是因为随着研磨时间的延长, 研磨过程中产生的热量增多, 促使粒子团聚, 致使 NSs 粒径变大。因此, 选择研磨时间为 70 min。

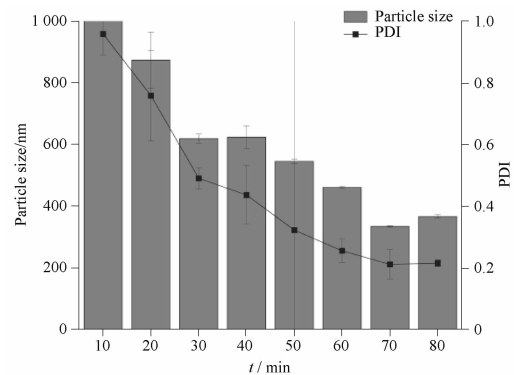


图 6 研磨时间对 OST-NSs 粒径和 PDI 的影响。 $n=3, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 Effect of grinding time on OST-NSs particle size and PDI. $n=3, \bar{x} \pm s$

2.2.9 验证试验 精密称取 PVP-VA64 180.0 mg, 脱氧胆酸钠 36.0 mg, 置于 100 mL 烧杯中, 加 30 mL 去离子水, 搅拌溶解; 再将精密称定的 OST 900.0 mg 加入到稳定剂溶液中, 搅拌分散, 形成 OST 混悬液。量取 60 mL 直径为 0.4 ~ 0.6 mm 的氧化锆研磨珠, 置于研磨罐中, 加入 OST 混悬液, 搅匀, 将研磨罐放置到行星式球磨机中, 设置研磨速度为

450 r · min⁻¹, 研磨 70 min, 即得 OST-NSs, 平行制备 3 批样品。测定样品的平均粒径, PDI 和 Zeta 电位, 结果见表 4。

由表 4 可知, 3 批样品的粒径、PDI 和 Zeta 电位基本一致, 表明优选处方和研磨工艺重复性较好, 可用于 OST-NSs 的制备。

表 4 OST-NSs 最优处方和研磨工艺的验证试验。n = 3, $\bar{x} \pm s$
Tab. 4 Verification test of optimal formulation and grinding process for OST-NSs. n = 3, $\bar{x} \pm s$

Batch No.	Particle size/nm	PDI	Zeta potential/mV
1	347.8 ± 4.2	0.271 ± 0.01	-21.3 ± 0.553
2	332.3 ± 6.317	0.251 ± 0.022	-20.4 ± 0.404
3	334.5 ± 1.637	0.205 ± 0.018	-21.8 ± 0.839

2.2.10 稳定性考察 取 OST-NS 分别置于 4 °C、室温和 40 °C 下, 于放置后 1、2、7、14、21、30 d 取样, 按照“2.2.1”项下方法测定粒径和 PDI, 见图 7。OST-NSs 在 0 d 时的粒径和 PDI 分别为 418.1 nm 和 0.273, 放置 30 d 后, 在 4 °C 下, 粒径和 PDI 分别增加到 418.1 nm 和 0.330; 在室温下, 粒径和 PDI 分别增长到 468.7 nm 和 0.372; 在 40 °C 下, 粒径和 PDI 分别增长到 935.9 nm 和 0.643, 表明 OST-NSs 在高温下粒径和 PDI 稳定性较差。

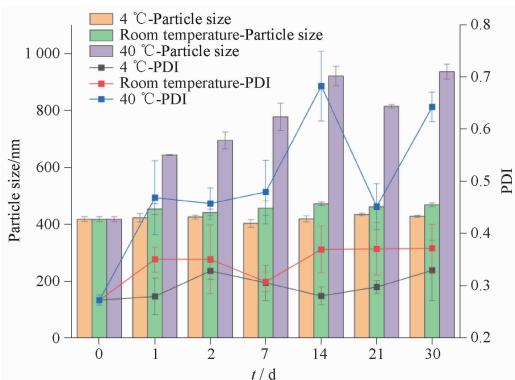


图 7 贮存温度对 OST-NSs 粒径和 PDI 稳定性的影响。n = 3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 7 Effect of storage temperature on the stability of OST-NSs particle size and PDI. n = 3, $\bar{x} \pm s$

2.3 OST-NSs 固化

为了改善 NSs 的物理稳定性, 采用冷冻干燥法将其固化。首先按照“2.2.9”项下方法制备 OST-NSs, 测定粒径和 PDI, 然后将冻干保护剂加入到 OST-NSs 中, 待冻干保护剂溶解后, 将其放置在 -80 °C 下预冻, 再放入冷冻干燥机中干燥 48 h。

分别以外观、再分散性、OST-NSs 冻干粉复溶后的粒径和 PDI 为评价指标, 筛选冻干保护剂种类(麦芽糖、海藻糖、甘露醇)和质量浓度(30、60、90 mg · mL⁻¹)。OST-NCs 粒径和 PDI 结果见图 8。

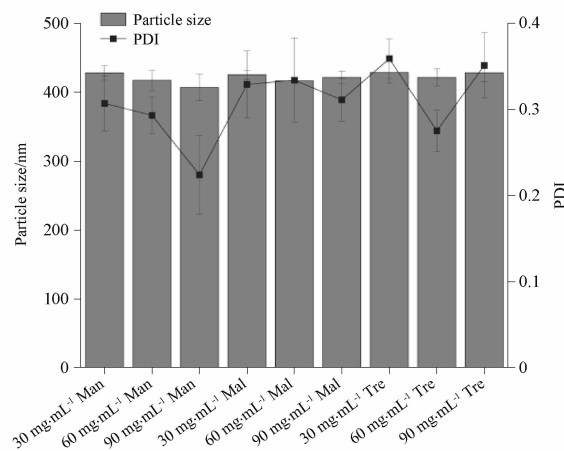


图 8 冻干保护剂种类和质量浓度对 OST-NSs 粒径和 PDI 的影响。n = 3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 8 Effect of lyophilized protective agents type and ratio on OST-NSs particle size and PDI. n = 3, $\bar{x} \pm s$

选择不同浓度的麦芽糖为冻干保护剂, 冻干后产品外观塌陷, 且有蜂窝, 不利于保存; 海藻糖为冻干保护剂, 冻干后产品不易分散, 复溶后无法成均一稳定的纳米混悬液, 甘露醇外观呈粉末状, 且无蜂窝, 分散性较好, 尤其是 90 mg · mL⁻¹甘露醇为冻干保护剂的 OST-NCs 复溶后的粒径和 PDI 均较小。因此, 选择以甘露醇为冻干保护剂, 质量浓度为 90 mg · mL⁻¹, 制备 OST-NSs 冻干粉(OST-NCs), 见图 9。



A - 甘露醇; B - 海藻糖; C - 麦芽糖。

A - mannitol; B - trehalose; C - maltose.

图 9 使用不同冻干保护剂的蛇床子素纳米混悬液冻干粉(OST-NCs)外观

Fig. 9 Appearance of OST-NCs using different lyophilized protective agents

2.4 OST-NCs 的表征

2.4.1 扫描电镜 (SEM) 取 OST-NCs 适量, 加去离子水稀释, 滴于锡箔纸上、晾干, 进行真空喷金处理, 再采用 SEM 观察样品表面形态, 结果见图 10。由图 10 可知, OST 原料药晶体形态不规则, 且粒度分布较宽; OST-NCs 中的 OST 基本呈棒状或片状, 粒径明显小于原料药, 且大小较均一。

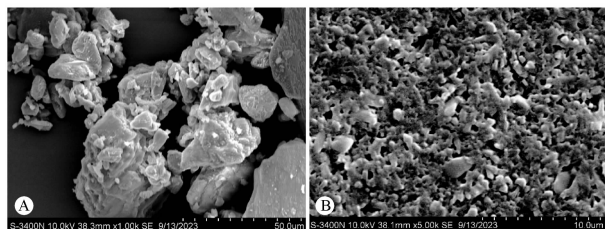
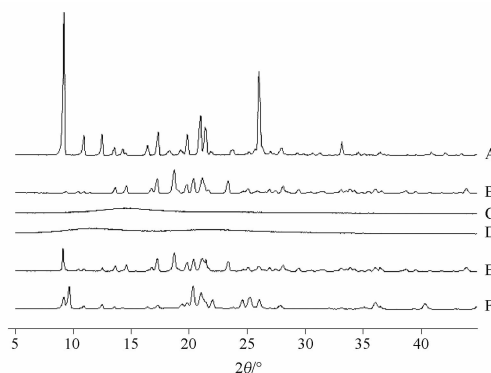


图 10 OST(A) 和 OST-NCs(B) 的扫描电镜图

Fig. 10 SEM photograph of OST(A) and OST-NCs(B)

2.4.2 X-射线衍射 (XRD) 分别取适量 OST 原料药、OST-NCs、物理混合物 (OST 与处方量的稳定剂和冻干保护剂的混合物)、PVP-VA64、脱氧胆酸钠、甘露醇进行 XRD, 测定参数设置为: Cu 靶, 2θ 扫描范围 $5^\circ \sim 45^\circ$, 扫描速度为 $5^\circ \cdot \text{min}^{-1}$, 结果见图 11。蛇床子素在 9.19° 、 12.47° 、 19.25° 、 20.98° 、 21.37° 、 26.02° 有较强的衍射峰, 表明 OST 原料药为晶体结构。甘露醇的衍射特征峰分别为 13.63° 、 14.60° 、 17.25° 、 18.72° 、 19.82° 、 20.40° 、 23.34° , 而 PVP-VA64 和脱氧胆酸钠图谱无明显的衍射特征峰。在物理混合物和 OST-NCs 衍射图谱中, 能够观察到 OST 和甘露醇的特征衍射峰, 表明 OST 仍保持晶体结构, 但是与物理混合物相比, OST-NCs 的衍射峰强度降低。应用 Origin2023 软件, 根据结晶度 = 结晶区面积/总面积, 计算样品结晶度。结果 OST、物理混合物和 OST-NCs 的结晶度分别为 73.7%、66.97%、6.7%, 与衍射图谱结果一致。推测其原因可能与 OST-NCs 粒径减小有关, 也可能是在研磨过程中, 部分 OST 晶体转变为无定形。

2.4.3 差示扫描量热法 (DSC) 分析 取 OST 原料药、甘露醇、脱氧胆酸钠、PVP-VA64、物理混合物和 OST-NCs 适量, 进行 DSC 分析。测定参数设置为: 氮气流下, 升温速度为 $10^\circ \text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, 升温范围为 $40 \sim 200^\circ \text{C}$, 氧化铝为参比, 结果见图 12, OST 原料药在 84°C 存在吸热熔融峰, 甘露醇在 167°C 处有吸热熔融峰, 脱氧胆酸钠和 PVP-VA64 图谱中无明显的吸热熔融峰。在 OST-NCs 和物理混合物的



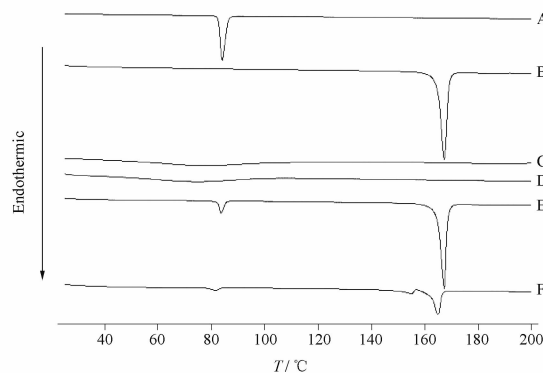
A - OST 原料药; B - 甘露醇; C - 脱氧胆酸钠; D - PVP-VA64; E - 物理混合物; F - OST-NCs。

A - OST; B - mannitol; C - sodium deoxycholate; D - PVP-VA64; E - physical mixture; F - OST-NCs.

图 11 样品的 X 射线衍射 (XRD) 图谱

Fig. 11 XRD spectrograms of samples

图谱中, 均能观察到 OST 和甘露醇的吸热熔融峰, 表明 OST 在 OST-NCs 中保持晶体结构, 与 XRD 结果一致。但是, OST-NCs 中 OST 的吸热熔融峰出现在, 而且熔距变宽, 峰面积降低, 其原因可能是 OST-NCs 的粒径较小。



A - OST 原料药; B - 甘露醇; C - 脱氧胆酸钠; D - PVP-VA64; E - 物理混合物; F - OST-NCs。

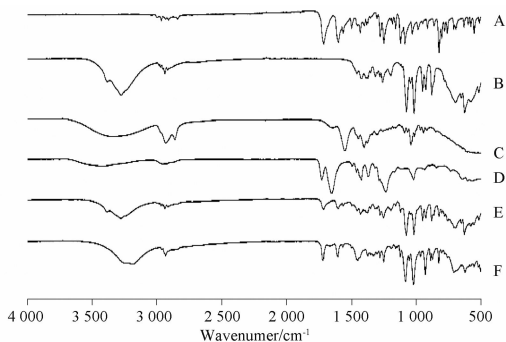
A - OST; B - mannitol; C - sodium deoxycholate; D - PVP-VA64; E - physical mixture; F - OST-NCs.

图 12 样品的差示扫描量热 (DSC) 图谱

Fig. 12 DSC spectrograms of samples

2.4.4 傅里叶变换红外光谱法 (FTIR) 分别将 OST 原料药、OST-NCs 冻干粉末、物理混合物、PVPVA64 和脱氧胆酸钠、甘露醇与 KBr 混匀后压片, 扫描范围 $4000 \sim 500 \text{ cm}^{-1}$ 。由图 13 可知, OST 在 1714 和 1121 cm^{-1} 处存在 C=O 和 C-O 的伸缩振动峰, 甘露醇在 3277 cm^{-1} 处有羟基 (-OH) 的伸缩振动。OST-NCs 在 1720 和 1123 cm^{-1} 处存在

有 OST 原料药特征峰,在 $3\ 186\ \text{cm}^{-1}$ 处存在甘露醇的特征峰,表明在制备 OST-NCs 过程中,OST 与辅料之间无相互作用。



A - OST 原料药;B - 甘露醇;C - 脱氧胆酸钠;D - PVP-VA64;E - 物理混合物;F - OST-NCs。

A - OST; B - nannitol; C - sodium deoxycholate; D - PVP-VA64; E - physical mixture; F - OST-NCs.

图 13 样品的傅里叶变换红外光谱 (FTIR) 图谱

Fig. 13 FTIR spectrograms of samples

2.4.5 水接触角 将 OST 原料药、OST-NCs、物理混合物在 $1.6\ \text{kPa}$ 压力下压片,用 Theta Lite 接触角仪以去离子水为媒介,采用悬滴法对样品的润湿性进行分析,平行测定 3 次。测试条件为 $4\ \mu\text{L}$ 去离子水,结果 OST 原料药、物理混合物和 OST-NCs 的水接触角分别为 $(68.03 \pm 0.49)^\circ$, $(33.17 \pm 0.42)^\circ$ 和 $(21.82 \pm 0.93)^\circ$ 。与 OST 相比,物理混合物和 OST-NCs 的水接触角均降低,而且 OST-NCs 的最小。表明 OST-NCs 的润湿性最好。

2.5 HPLC 分析方法

2.5.1 溶液的制备 对照品溶液的制备 精密称定 OST 对照品约 $10.00\ \text{mg}$,置于 $10\ \text{mL}$ 量瓶中,加入体积分数 75% 甲醇溶液超声溶解后定容,得质量浓度为 $130.6\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ OST 对照品储备液。

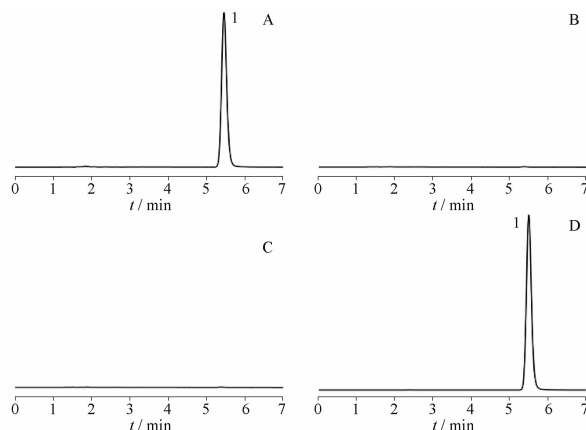
供试品溶液的制备:精密称定 OST-NCs $10.00\ \text{mg}$,置于 $25\ \text{mL}$ 量瓶中,加入体积分数 75% 甲醇超声溶解后,定容,即得。

阴性溶液的制备:按照 OST-NCs 处方比例,精密称定 PVP-VA64、脱氧胆酸钠和甘露醇,置于 $25\ \text{mL}$ 量瓶中,加入体积分数 75% 甲醇超声溶解后,定容,得到阴性溶液。

2.5.2 色谱条件 色谱柱 Thermo C_{18} ($4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}, 5\ \mu\text{m}$);流动相:体积分数 0.1% 甲酸水-甲醇 (25:75);检测波长 $322\ \text{nm}$;流速 $1\ \text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温 $30\ ^\circ\text{C}$;进样 $10\ \mu\text{L}$ 。

2.5.3 专属性 取 OST 对照品溶液、空白溶剂、阴

性溶液、供试品溶液,经 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后,取续滤液,按照“2.5.2”项下色谱条件下进样测定,结果见图 14。空白溶剂和空白辅料对于 OST-NCs 中 OST 的测定无干扰,该方法专属性良好。



A - 对照品;B - 空白溶剂;C - 空白辅料;D - 供试品;1 - 蛇床子素。

A - reference substance; B - blank solvent; C - blank excipient; D - test sample;

1 - osthole

图 14 样品专属性考察 HPLC 色谱图

Fig. 14 HPLC chromatograms of samples for specificity

2.5.4 标准曲线制备 精密量取 OST 对照品储备液,用流动相分别配置成系列质量浓度 (0.653 、 1.306 、 2.612 、 6.53 、 13.06 、 26.12 、 65.3 、 $130.6\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的溶液,进样测定。以质量浓度 (ρ) 为横坐标,峰面积 (A) 为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为: $A = 39.202\rho - 1.6649$ ($r^2 = 0.9999$),表明 OST 在 $0.653 \sim 130.6\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.5.5 精密度试验 取质量浓度为 $65.3\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对照品溶液,在同一天内按照“2.5.2”项下色谱条件,连续进样测定 6 次,记录峰面积,计算相对标准偏差 (RSD)。结果日内精密度 RSD 分别为 0.05%,表明仪器精密度良好。

2.5.6 重复性 按照“2.5.1”项下方法,制备供试品溶液 6 份,记录峰面积,外标一点法,测定供试品溶液中 OST 质量浓度,计算 RSD。结果 RSD 为 0.86%,表明重复性良好。

2.5.7 准确度 取处方量空白辅料,加入适量 OST,按照“2.5.1”项下方法制备供试品溶液,平行制备 6 份,按“2.5.2”项下色谱条件测定,计算回收率。结果 OST 平均回收率分别为 95.31%,RSD 为 0.35%。

2.5.8 稳定性 按照“2.5.1”项下方法,制备供试品溶液,分别于进样器放置后 0、2、4、8、12 h,按照“2.5.2”项下的色谱条件进样分析,记录峰面积,外

标一点法测定样品中 OST 的质量浓度,计算 RSD。结果 RSD 为 0.09%,表明供试品溶液在进样器中放置 12 h 稳定。

2.5.9 含量测定 精密称取 3 批 OST-NCs 适量(相当于 OST10.00 mg),置于 25 mL 量瓶中,加体积分数 75% 甲醇溶液超声溶解,放置室温后定容。经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,按照“2.5.2”项下方法测定样品中 OST 的浓度,计算百分含量。结果平均含量为 22.59%,RSD 为 0.86%。

2.6 平衡溶解度

测定 OST、OST-NCs 和物理混合物在纯水中的平衡溶解度,以及 OST 在含有不同浓度聚山梨酯 80

水溶液中的平衡溶解度。取过量的 OST 原料药、物理混合物和 OST-NCs 各 3 份,加入到纯水中,同时将过量的 OST 原料药各 3 份加入到含有聚山梨酯 80 的水溶液中,将样品放置在恒温振荡器中,在 25 $^{\circ}\text{C}$,150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下,振荡 48 h 后,离心取上清液。将上清液用无水乙醇稀释后,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,按照“2.5.2”项下方法测定样品中 OST 的浓度,结果见表 5。OST-NCs 中 OST 的平衡溶解度高于原料药和物理混合物,表明稳定剂和减小粒径均有利于提高 OST 的溶解性。而且聚山梨酯 80 对于 OST 具有较好的增溶作用,可用于体外溶出度试验,来满足漏槽条件。

表 5 25 $^{\circ}\text{C}$ 下各样品在不同介质中的溶解度。 $n=3, \bar{x} \pm s$

Tab. 5 The solubility of the samples in different medium in 25 $^{\circ}\text{C}$. $n=3, \bar{x} \pm s$

Medium	$\rho(\text{Solubility})/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		
	OST	Physical mixture	OST-NCs
Pure water	5.98 \pm 3.54	10.54 \pm 3.55	13.86 \pm 0.92
Aqueous solution containing 0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ tween-80	11.95 \pm 3.23	-	-
Aqueous solution containing 0.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ tween-80	25.64 \pm 1.36	-	-
Aqueous solution containing 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ tween-80	37.27 \pm 0.67	-	-
Aqueous solution containing 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ tween-80	74.44 \pm 4.81	-	-
Aqueous solution containing 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ tween-80	170.55 \pm 8.30	-	-

注: - - 未检测。

Note: - - data was not measured.

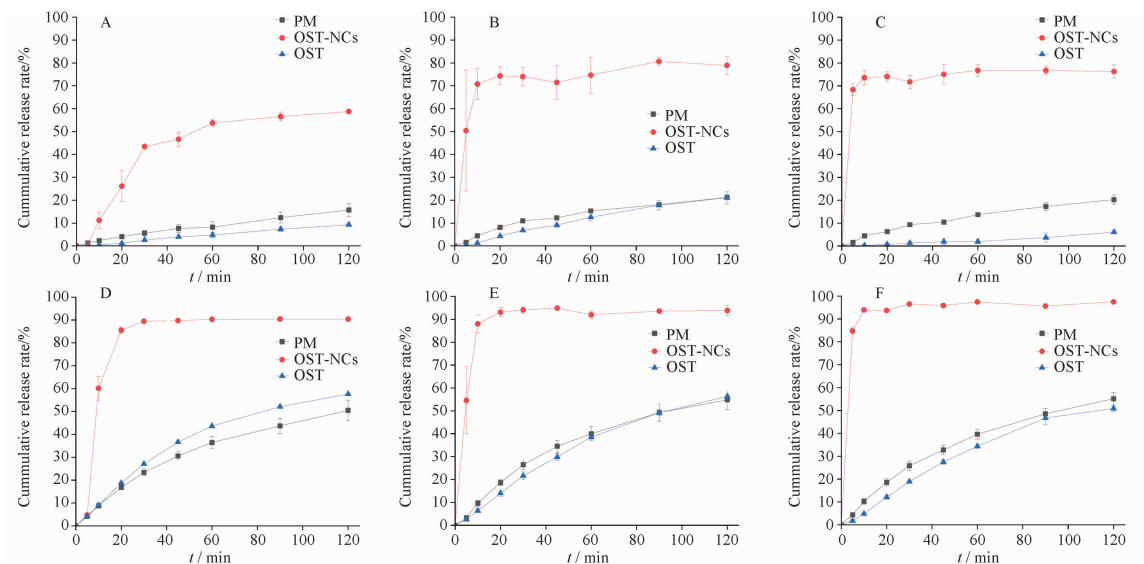
2.7 体外溶出度试验

2.7.1 物理混合物的制备 取处方量的空白辅料和 OST,混合均匀,即得物理混合物。精密称取相当于 OST10.00 mg 的物理混合物适量,按照“2.5.1”项下方法制备供试品溶液,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,按照“2.5.2”项下方法测定样品中 OST 的浓度,计算百分含量,结果为 22.58%。

2.7.2 溶出度试验 参照《中国药典》2020 年版溶出度测定二法^[18],每个样品进行 3 次平行试验。精密称定相当于 10.00 mg OST 的 OST-NCs、物理混合物及 OST 原料药粉末,装入 0#胶囊壳,然后放置到沉降篮中,进行溶出度的测定。溶出介质分别为纯水、0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液和 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液以及含有 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 聚山梨酯 80 的纯水 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸水溶液和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液(900 mL),转速为 75 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,温度为(37 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 。分别于 5、10、20、30、45、60、90、120 min 取样 5 mL(同时补充等温等量的溶出介质),经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,按照“2.5.2”项下方法测定样品中 OST 的浓度,每个样品进行 3 次平行试验,计算累积溶出度,绘制溶出

曲线,见图 15。

溶出介质为纯水、0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸水溶液和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液时,为非漏槽条件;OST 在含有 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 聚山梨酯 80 的水溶液中达到漏槽浓度,为漏槽条件。由测定结果可知,在非漏槽条件时,与原料药相比,OST-NCs 中 OST 的溶出速率和累积溶出度明显提高,而物理混合物溶出度与原料药基本一致,推测 OST-NCs 提高 OST 的溶出度的主要原因是粒径减小,而稳定剂和润湿性作用不明显。此外,OST-NCs 在纯水、0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸水溶液和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中,5 min 的累积溶出度分别为 68.30%、0.67%、50.40%,120 min 累积溶出度分别为 76.26%、58.71%、78.91%,推测其原因是 OST-NCs 在 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸水溶液中,更容易产生聚集;同时 OST 在 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸中不稳定,易发生降解。在漏槽条件下,OST-NCs 的溶出速率和累积溶出度均优于 OST 原料药和物理混合物,表明减小粒径能够提高 OST 的水溶性,与非漏槽条件的溶出试验结果一致。此外,在含有 0.1% 聚山梨酯 80 的纯水、0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸水溶液和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液中,OST-NCs 在 120 min 时的累积



A - 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸; B - pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液; C - 纯水; D - 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸-0.1% 聚山梨酯 80; E - pH 6.8 磷酸盐缓冲溶液-0.1% 聚山梨酯 80; F - 纯水-0.1% 聚山梨酯 80。

A - 0.1 mol · L⁻¹ HCl; B - pH 6.8 PBS; C - pure water; D - 0.1 mol · L⁻¹ HCl-0.1% Tween 80; E - pH 6.8-0.1% Tween 80; F - pure water-0.1% Tween 80.

图 15 OST, OST-NCs 和物理混合物在不同溶出介质中的溶出曲线。n = 3, $\bar{x} \pm s$

Fig. 15 Dissolution profiles of OST, OST-NCs and PM in different media. n = 3, $\bar{x} \pm s$

溶出度均高于 90%，其中在 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸水溶液中其溶出速率和溶出度最小。

2.7.3 溶出曲线相似性评价 采用相似因子法比较 OST 原料药与物理混合物和 OST-NCs 在 6 种溶出介质中溶出曲线的相似性(公式 1):当 f_2 值介于 0 ~ 50 之间时,即可认为两条曲线有显著性差异;介于 50 ~ 100 之间时,即说明两条曲线为无显著性差异; f_2 值越接近 100,相似程度也就越高,结果见表 6。

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left[\left[1 + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right] \right]^{\frac{1}{2}} \times 100 \right\} \quad \text{公式(1)}$$

公式 1 中, R_i 为参比样品 t 时刻的累积溶出率, T_i 为待测样品 t 时刻的累积溶出率, n 为取样时间点的个数。

表 6 OST-NCs、物理混合物相对于原料药体外溶出的相似因子
Tab. 6 The f_2 of dissolution *in vitro* for OST-NCs and Physical mixtures compared with crude material

Dissolution medium	f_2	
	OST-NCs	Physical mixtures
Pure water	7.1	51.11
Aqueous solution containing 1 mg · mL ⁻¹ tween-80	7.32	64.49
0.1 mol · L ⁻¹ HCl aqueous solution	21.05	70.33
0.1 mol · L ⁻¹ HCl aqueous solution containing 1 mg · mL ⁻¹ tween-80	15.89	63.27
pH 6.8 phosphate buffer solution	9.63	71.11
pH 6.8 phosphate buffer solution containing 1 mg · mL ⁻¹ tween-80	10.647	73.92

由计算结果可知,在 6 种溶出介质中,与原料药的溶出曲线相比,物理混合物的 f_2 值均大于 50,而 OST-NCs 的 f_2 远远小于 50,表明物理混合物中 OST 的溶出行为与原料药相似,而 OST-NCs 中 OST 的溶出行为与原料药有显著差异,提示加入稳定剂虽然可以提高 OST 的润湿性,但是对于溶出度的改善作用不明显;减小粒径可能是 OST 溶出度提高的主要原因。

3 讨论

采用介质研磨法制备粒径小且具有较好物理稳定性的纳米混悬液,受到多个因素影响。本研究对稳定剂种类及浓度、药物浓度,研磨速度、研磨时间及研磨介质的用量进行筛选,逐步优化处方,最终获得了 OST-NSs,其中稳定剂种类的筛选是十分重要的一项。为防止在制备纳米混悬液过程中由于表面自由能增大使粒子聚集或者粒径增加,在制备过程中常常加入稳定剂,但值得注意的是,空间稳定剂对温度具有一定的敏感性,离子型稳定剂受体系 pH 值的影响较大,单独使用一种稳定剂时可能无法获得稳定的纳米混悬液^[16],联合使用时通过空间位阻和电荷相斥两种机制,可获得粒径更小,更稳定的 OST-NSs,本研究最终选择 PVP-VA64(空间稳定剂)和脱氧胆酸钠(离子型稳定剂)联合使用。稳定剂的用量过少,无法起到抑制粒子生长的作用,过大时

又会产生增溶的效果^[17],稳定剂的用量是影响粒径非常重要的因素,通过单因素考察得出当 PVP-VA64 和脱氧胆酸钠的比例为 5:1 时,获得的 OST-NSs 的粒径和 PDI 较好。此外,药物浓度也是影响研磨结果的关键因素之一,药物浓度应该保持在足够的水平,随着药物浓度的增加,可增加混悬液的黏稠性,使药物与研磨珠之间可以得到充分接触,防止纳米混悬液的沉降;但药物浓度过大,与研磨珠间的距离过近时,会影响药物粒子间以及与研磨珠的撞击效果,进而影响粒径和 PDI^[19-20],本研究最终确定 OST 的质量浓度为 30 mg · mL⁻¹。

药物在纳米混悬液等液体处方中的降解风险较高,其中研磨介质的高能量输入会增加活性成分降解的速度^[19],因此研磨介质的用量也是在制备过程中需要重视的一个因素,本实验考察了研磨介质对制备纳米混悬液的影响,通过粒径和 PDI 作为评价指标,发现当研磨介质质量和药液量为 2:1 时制得的纳米混悬液粒径为 334.1 nm, PDI 为 0.211,且 OST-NCs 中 OST 的含量为 22.59% (是标示量的 95.8%)。在整个研磨过程中,开始时药物与研磨珠的碰撞可能性较大,粒径随着时间的延长而减小,随着时间继续增加,微小的晶体有着更大的机械阻力,研磨过程中也会产热,使晶体聚集在一起,反而会使粒径增大。转速较小时,剪切力和碰撞频率小,颗粒获得能量少,破碎率下降,导致制备效率低,高转速能够提高获得粒径较小且均一稳定的纳米混悬液的效率^[21],因此本研究最终选择的研磨时间为 70 min,研磨速度为 450 r · min⁻¹。此外,由初步稳定性试验结果可知 OST-NSs 在 40 °C 下,粒径和 PDI 均增长较快,提示在制备 OST-NSs 时,应降低研磨温度,减少研磨时间。

由本研究结果可知,采用介质研磨方法,将 OST 原料药的粒径减小至纳米级,不仅能够增加其表面润湿性,稍稍增加平衡溶解度,而且能够明显提高 OST 在 6 种溶出介质中的溶出速率和累积溶出度;通过溶出曲线相似性评价结果推测,粒径减小是 OST 水溶性改善的主要原因。因此,本研究能够为进一步的 OST 纳米结晶的开发提供理论依据。

REFERENCES

[1] Ch. P(2020) Vol I (中国药典 2020 年版. 一部)[S]. 2020: 328-329.
 [2] WEI J J, HE W F, GAO Y H, et al. Effect of osthole on AKT/eNOS/sGC/PKG signaling path way and osteoblast differentiation and maturation of rat [J]. *Chin J Osteopor Bone Mineral Res*(中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志), 2023, 16(3): 266-274.

[3] WANG Z F, ZHANG Z Q, GE Z H. TCM cognition and prophylaxis and treatment of osteoporosis [J]. *Chin J Osteopor*(中国骨质疏松杂志), 2022, 28(2): 296-299.
 [4] CHEN H H. The study on the effect of the osthole extracts microcapsules against the trichomonas gallinae[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
 [5] WANG Z F, ZHANG Z Q, GE Z H. Comparative study of preparation, characterization and pharmacokinetics of three preparations of osthole [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2019, 50(15): 3615-3621.
 [6] XIN J, YI H, LI M, et al. Preparation and *in vivo* pharmacokinetics of osthole albumin nanoparticles [J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2022, 44(10): 3104-3110.
 [7] CHEN Y X, YUAN J L. Optimization of the formulation of the preparation process of osthole microspheres [J]. *Ind Sci Trib*, 2019, 18(22): 72-74.
 [8] GAO X C, TONG Y. Effect of wintergreen oil on *in vitro* transdermal permeation of osthole and geniposide [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2017, 42(7): 1338-1343.
 [9] BI J W, LIU J X, ZHAO Y M, et al. Preparation and quality evaluation of meloxicam nanosuspension [J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2023, 54(4): 569-576.
 [10] GE F C, LUO D D, ZHANG X B, et al. Preparation of tadalafil nanosuspension by wet media milling [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2022, 42(11): 1121-1125, 1137.
 [11] WANG Y Q, HAO G Z, LI Q, et al. Preparation of phillygenin nanosuspension and optimization of solidifying technology for pellets [J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2022, 53(4): 522-529.
 [12] WANG L L, LV Y N, LI Z J, et al. Effects of different preparation methods on properties of meloxicam nanosuspension [J]. *J Yantai Univ Nat Sci Eng Ed*(烟台大学学报 自然科学与工程版), 2023, 36(3): 354-358.
 [13] KAKRAN M, SHEGOKAR R, SAHOO N G, et al. Long-term stability of quercetin nanocrystals prepared by different methods [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64: 1394-402.
 [14] ZHOU Y, FANG Q, NIU B, et al. Comparative studies on amphotericin B nanosuspensions prepared by a high pressure homogenization method and an antisolvent precipitation method [J]. *Coll Surfaces B Biointerfaces*, 2018, 172: 372-379.
 [15] LIU X X, GONG J B, WEI Z P. Advances in nanocrystal technology and its application to improve the pharmacological efficacy for poorly-water soluble drugs [J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 2021, 56(12): 3431-3440.
 [16] ZENG S M, CAI W J, ZENG S Q, et al. Research progress on preparation and evaluation of injectable nanosuspensions by wet media milling technology [J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2022, 53(9): 1251-1261.
 [17] Ch. P(2020) Vol IV(中国药典 2020 年版. 四部)[S]. 2020: 132-137.
 [18] YAGMUR P T, BURCU M, SEVGI G, et al. Systematic screening study for the selection of proper stabilizers to produce physically stable canagliflozin nanosuspension by wet milling method [J]. *Bioengineering*, 2023, 10(8): 927.
 [19] ZHAO P F, LI H X, GAN D, et al. Preparation and pharmaceutical properties of hydroxycamptothecin nanocrystals [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2021, 41(23): 2401-2405, 2446.
 [20] LUO K P, YAN C M, YANG L, et al. Preparation and *in vitro* evaluation of curcumin and silibinin co-loaded nanosuspension with glycyrrhizic acid as stabilizer [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2023, 54(15): 4823-4831. (收稿日期:2024-02-06)