淫羊藿总黄酮纳米混悬剂的制备及体外评价

丁志远[1,2,3]，杨 娟[1]，谢 燕[1,2,3]*

（1. 上海中医药大学公共健康学院，上海 201203；2. 江苏康缘药业股份有限公司，江苏连云港 222001；
3. 中药制药过程新技术国家重点实验室，江苏连云港 222001）

摘要：为提高淫羊藿总黄酮（**1**）的溶解度和溶出度，该研究分别采用微型化介质研磨法和沉淀 - 高压均质法，以十二烷基硫酸钠（SDS）和聚乙烯己内酰胺 - 聚乙酸乙烯酯 - 聚乙二醇接枝共聚物（Soluplus）为稳定剂，制备了 3 种淫羊藿总黄酮纳米混悬剂（**1**-NSps）。表征结果显示，3 种 **1**-NSps 粒径均在 200 nm 以下，在 4 ℃下具有良好的物理稳定性。并且，**1** 制成纳米混悬剂后，其中各成分的分子结构未发生改变，少量晶型化合物在稳定剂为 Soluplus 的纳米混悬剂中晶型衍射峰减弱、结晶度降低，但在稳定剂为 SDS 的纳米混悬剂中以无定形状态存在。3 种 **1**-NSps 中淫羊藿苷和淫羊藿次苷Ⅱ的饱和溶解度与稳定剂种类相关。相较于原料药，3 种 **1**-NSps 中总黄酮的溶出速率和溶出程度均明显增加，在水中 180 min 时的溶出率分别为 75.77%、76.26%和 84.36%；与微型化介质研磨法制品相比，沉淀 - 高压均质法制品的溶出更完全。

关键词：淫羊藿总黄酮；纳米混悬剂；微型化介质研磨法；沉淀-高压均质法；饱和溶解度；溶出度

中图分类号：R944.9 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2023)03-0395-09

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.03.013

Preparation and *in vitro* Evaluation of Total Flavones of *Epimedium* Nanosuspensions

DING Zhiyuan[1,2,3], YANG Juan[1], XIE Yan[1,2,3]*

(*1. School of Public Health, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203; 2. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001; 3. State Key Lab. of New-tech for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001*)

ABSTRACT: To improve the solubility and dissolution of the total flavones of *Epimedium*(**1**), three kinds of nanosuspensions(**1**-NSps) were respectively prepared by miniaturized media milling method and precipitation-high pressure homogenization method with sodium dodecyl sulfate(SDS) and polyvinyl caprolactam-polyvinyl acetate-polyethylene glycol graft copolymer(Soluplus). The characterization results showed that the particle sizes of the three **1**-NSps were all below 200 nm and the products were all physically stable at 4 ℃. Moreover, the molecular structure of each compound was not changed after preparation of **1**-NSps. The peak height and crystallinity of some crystalline compounds in **1** was weakened in the nanosuspension stabilized by Soluplus, but they existed in amorphous forms in the nanosuspension stabilized by SDS. The saturated solubilities of icariin and icariside Ⅱ in the three **1**-NSps were related to the stabilizer species. Compared with the raw **1**, the dissolution rate and degree of total flavonoids in the three **1**-NSps were significantly increased, and their dissolution rates in water at 180 min were 75.77%, 76.26% and 84.36%, respectively. The dissolution amount from the product obtained by precipitation-high-pressure homogenization method was more complete than those from the products prepared by miniaturized media milling method.

Key Words: total flavones of *Epimedium*; nanosuspension; miniaturized media milling method; precipitation-high pressure homogenization method; saturated solubility; dissolution

淫羊藿总黄酮（total flavones of *Epimedium*，**1**）是从小檗科植物淫羊藿中提取的多种以异戊烯基黄酮为母核的结构类似物，具有抗骨质疏松、抗性腺衰老、抗肿瘤等药理活性[1]，是淫羊藿的主要功效成分。然而，黄酮类化合物分子结构排列紧密，难

收稿日期：2022-05-27

作者简介：丁志远(1996—)，男，博士研究生，专业方向：中药制剂新技术的研究与应用。

通信作者：谢 燕(1978—)，女，研究员，博士生导师，从事中药制剂新技术的研究与应用。

E-mail：rosexie_2004@163.com

溶或不溶于水，致使该类成分口服生物利用度较低。据报道，**1** 中主要成分淫羊藿苷（icariin，**2**）在水中的平衡溶解度为 15.04 μg/mL [2]，口服绝对生物利用度仅有 0.1% [3]，严重阻碍其药效的充分发挥。因此，迫切需要采取适宜策略改善 **1** 的溶解度以提高其生物利用度。

纳米混悬剂（nanosuspensions，NSps）是将纯固体药物颗粒分散在含有稳定剂（表面活性剂或聚合物）的液体分散介质中形成的一种亚微粒胶体分散体系，能通过减小粒径、增加比表面积来改善药物的溶解度和溶出速率，具有载药量高、制备工艺简单、适于规模化生产等优点。近年来，该技术已被广泛用于改善难溶性成分的溶解度与生物利用度的研究中 [4—5]。与脂质体、微球、纳米粒等微粒体系相比，NSps 仅需添加少量稳定剂，处方组成简单、载药量高，适用于含多成分的中药提取物。因此，本研究拟采用微型化介质研磨法和沉淀 - 高压均质法制备 **1**-NSps，并进行粒径、透射电镜（TEM）、傅里叶变换红外光谱（FT-IR）、粉末 X 射线衍射（PXRD）、差示扫描量热（DSC）等表征，以及饱和溶解度、溶出度等体外评价，以期为提高 **1** 的溶解度和生物利用度提供参考。

1　仪器与试药

1260 Infinity Ⅱ型高效液相色谱仪（美国安捷伦科技有限公司）；CP225D 型分析天平［赛多利斯科学仪器（北京）有限公司］；RC-MD 型溶出仪（天津市天大天发科技有限公司）；FA-25 型高速剪切机（上海弗鲁克流体机械制造有限公司）；AH-NO 型高压均质机（ATS 工业系统有限公司）；Ultima Ⅳ型 PXRD 仪（日本 Rigaku 公司）；NICOLET 380 型 FT-IR 仪（美国 Thermo 公司）；Q2000 型 DSC 仪（美国 TA 仪器有限公司）；ZEN3600 Nano ZS 型激光粒径仪（英国马尔文公司）；JEM-2100F 型 TEM 仪（日本日立公司）；UV-2800 型紫外分光光度计［尤尼柯（上海）有限公司］。

1［陕西慧科植物开发有限公司，以 **2** 计含量≥ 20%（HPLC 法），批号 HK20210318］；**2** 对照品（中国食品药品鉴定研究院，含量≥ 98%，批号 110737-200415）；淫羊藿次苷Ⅱ（icariside Ⅱ，**3**）对照品（成都德思特生物技术有限公司，含量≥ 98%，批号 DST200518-092）；聚乙烯己内酰胺 - 聚乙酸乙烯酯 - 聚乙二醇接枝共聚物［由巴斯夫（中国）有限公司赠送，商品名 Soluplus，批号 59450068E0］；十二烷基硫酸钠（SDS，美国 Genview 公司，批号 8926010250）；氧化锆珠（直径 0.4 ～ 0.6 mm，浙江金琨西立锆珠有限公司）；磷酸、乙腈为色谱纯，甲醇为分析纯，水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　微型化介质研磨法制备 **1**-NSps

称取 **1** 120 mg 于 10 mL 西林瓶中，分别加入 SDS 16 mg 和 Soluplus 28 mg，加入水 4 mL，超声使药物分散均匀后加入搅拌子及 10.5 g 氧化锆珠，以 1 200 r/min 的速度搅拌 8 h 后将药液吸出，氧化锆珠用水冲洗（0.5 mL×2），洗液与上述药液合并，即得 **1**-NSps（a）和 **1**-NSps（b）。

2.2　沉淀 - 高压均质法制备 **1**-NSps

取甲醇 30 mL，加入过量的 **1**（约 2 g），37 ℃ 水浴振摇 24 h。取出，放至室温，离心（3 214×*g*）10 min，取上清液，待用。另配制 1.4% 的 Soluplus 水溶液 100 mL，逐滴加入上述 **1** 甲醇溶液，边加边分散，并以 16 000 r/min 的速度搅拌，持续分散 20 min，旋转蒸除甲醇。使用 60 MPa 循环 5 次、100 MPa 循环 5 次、130 MPa 循环 10 次的条件进行高压均质处理，即得 **1**-NSps（c）。

2.3　粒径、多分散性指数（PDI）和 ζ 电位测定

取上述不同方法制得的 **1**-NSps，以水适当稀释后用激光粒径仪测定其平均粒径、PDI 及 ζ 电位。仪器测定参数设定为：循环次数为 100 次，分散剂折射率为 1.330，材质折射率为 1.590，分散介质为水，温度 25 ℃。结果如图 1 所示。

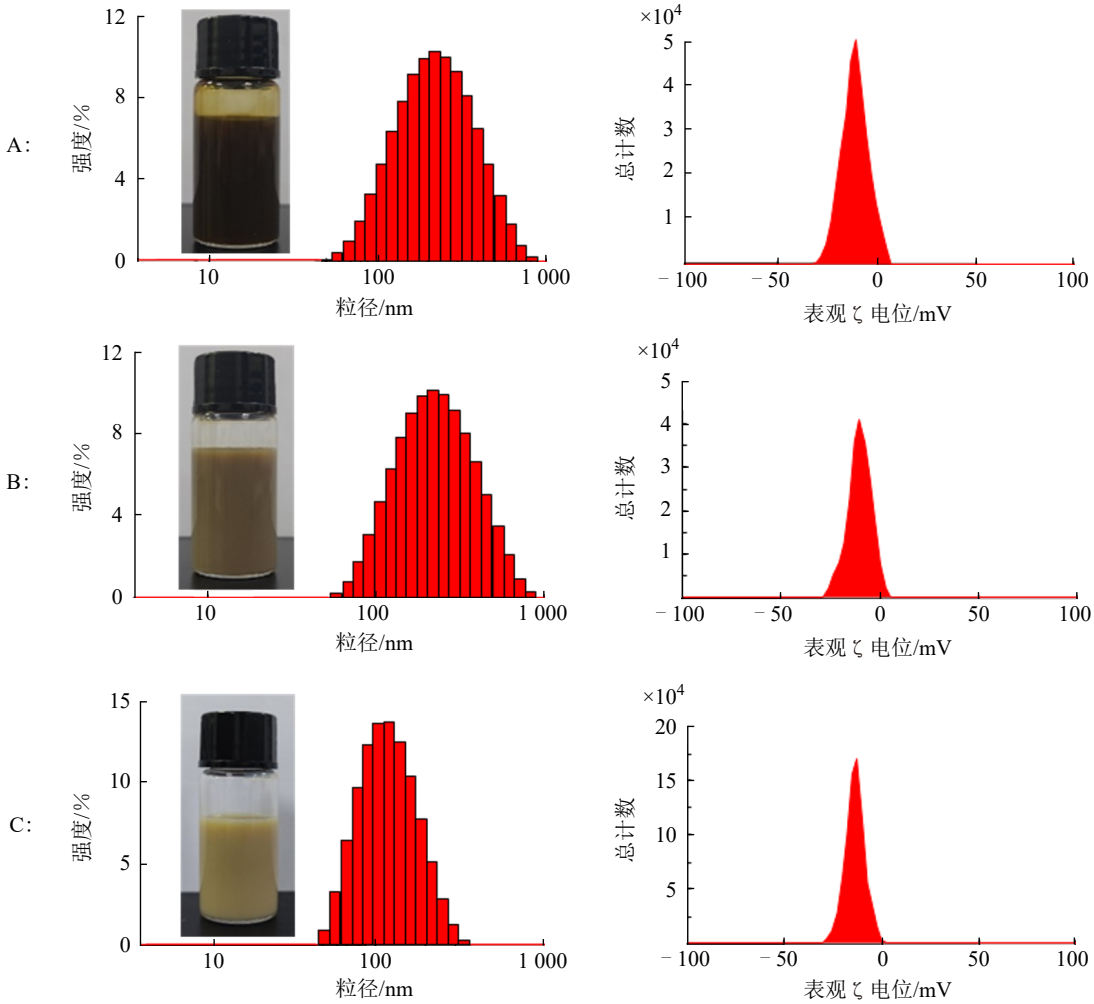
由图 1 可知，3 种 **1**-NSps 的平均粒径分别为 195、193、113 nm，ζ 电位分别为 －17.0、－17.4 和 －18.3 mV，说明微型化介质研磨法和沉淀 - 高压均质法均可将 **1** 制备成 NSps。3 种处方工艺制得 **1**-NSps 的 PDI 分别为 0.234、0.211、0.132，均小于 0.3，表明 NSps 体系稳定且粒度分布均匀。**1**-NSps（a）和 **1**-NSps（b）的粒度分布和 ζ 电位较接近，说明稳定剂种类和浓度对 **1**-NSps 的粒子特征影响较小。与 **1**-NSps（b）相比，**1**-NSps（c）的粒径

更小，原因可能是微型化介质研磨法以磁力搅拌器为动力装置，提供的机械力作用有限；而沉淀 - 高压均质法所提供的空化作用、剪切力、撞击力较大，使药物颗粒的粒径降低更多。此外，**1**-NSps（a）呈深褐色、**1**-NSps（b）呈深黄色，可能是 Soluplus 溶于水形成的淡蓝色乳光对纳米混悬剂颜色产生了影响；**1**-NSps（c）呈淡黄色，较 **1**-NSps（b）颜色稍浅，可能是因为良溶剂甲醇仅能溶解 **1** 中黄酮类成分等醇溶性物质所致。

2.4 微观结构分析

取 **1**、**1**-NSps，以水稀释至适宜浓度后，吸取 20 μL 滴至孔径为 100 μm 的铜网上，自然晾干，置 TEM 下观察各样品的微观形态；其中，**1**-NSps 样品用 2% 磷钨酸进行负染。结果如图 2 所示。

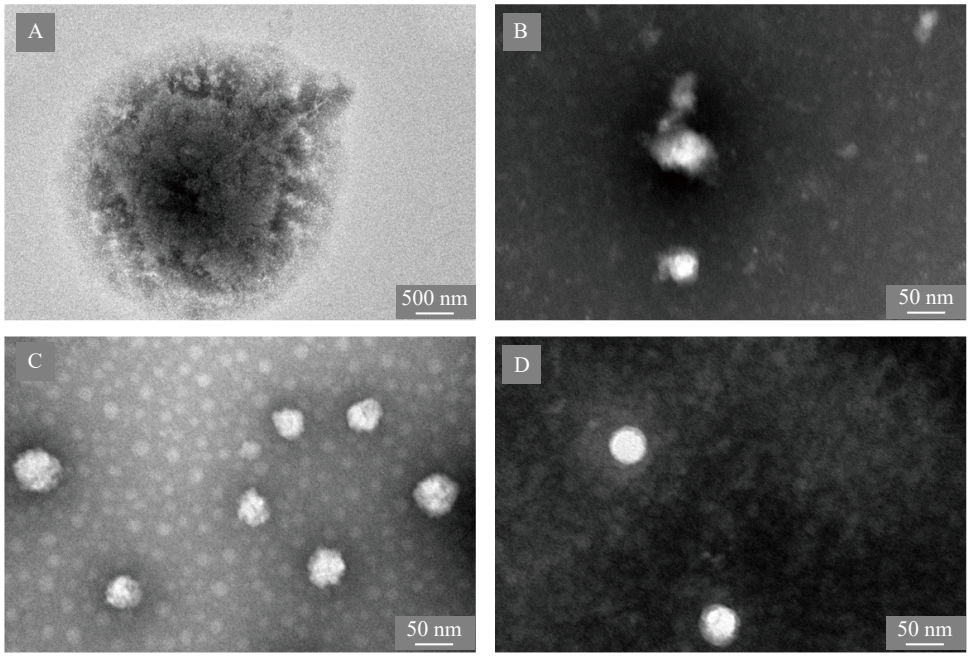
结果显示，**1** 呈圆球形，粒径在 3 μm 左右，表面凹凸不平，可能是由药物粉末团聚而成。**1**-NSps 形态不一，与其稳定剂种类和制备工艺有关。微型化介质研磨法制备的 **1**-NSps 粒径在 100 nm 左右，**1**-NSps（a）内部呈圆球形，外部包裹层呈无规则形状，可能是由于所使用的稳定剂 SDS 浓度高于其临界胶束浓度（1.586 mg/mL），此时的 SDS 在颗粒表面形成电双层后仍进一步聚集，在球状表面形成无规则状胶束 [6]；**1**-NSps（b）呈无规则球状，表面凹凸，可能是机械力作用破坏了 **1** 的原有形态所致。



A—**1**-NSps（a）；B—**1**-NSps（b）；C—**1**-NSps（c）。

图 1 1-NSps 的外观、粒度分布和 ζ 电位分布

Fig.1 Appearance, Particle Size Distribution and ζ Potential Distribution of **1**-NSps



A—**1**（×25 000）；B—**1**-NSps（a）（×250 000）；C—**1**-NSps（b）（×250 000）；D—**1**-NSps（c）（×250 000）。

图 2　1-NSps 的 TEM 照片

Fig.2　TEM Images of **1**-NSps

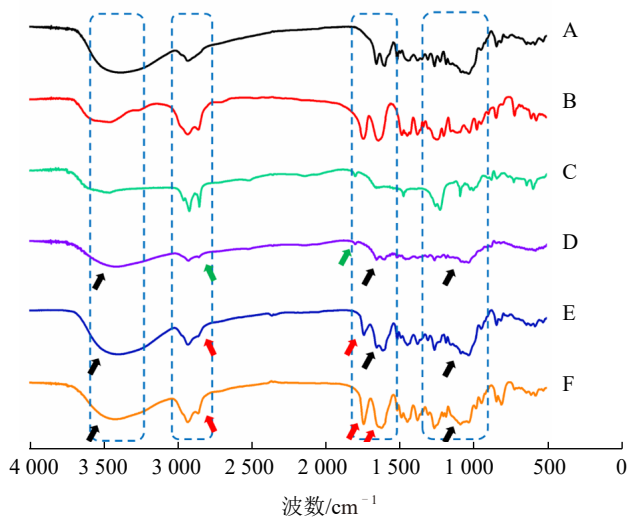
沉淀 - 高压均质法制备的 **1**-NSps（c）呈圆球形，粒径在 50 nm 左右，可能是稳定剂 Soluplus 在晶核形成和成长过程中更加均匀地包裹 **1** 粒子的缘故。

激光粒径仪和 TEM 仪所得结果有较大差异，这可能与 2 种方法的测定原理及样品处理过程不同有关：前者基于动态光散射原理，纳米粒在水溶液中的轻微聚集和溶胀现象均会导致粒径的增加；为避免未干燥的染液在电子束的照射下产生“冒泡”现象而引起的样品微细结构损伤和镜筒污染，TEM 样品通常需减压并充分干燥，这个步骤可能会造成纳米粒失水收缩[7—8]。

2.5　FT-IR 分析

取 **1**、Soluplus、SDS、**1**-NSps 冻干粉末适量，与 KBr 混匀后压片，在 400 ～ 4 000 cm^{-1} 波数范围扫描，进行 FT-IR 分析，结果如图 3 所示。

结果显示，**1** 分别在 3 382.63、1 652.78、1 596.85、1 025.99 cm^{-1} 处有 O-H、C=C、C=O、C-O 伸缩振动峰，与文献[9]报道一致；**1**-NSps（a）和 **1**-NSps（b）的红外图谱中，除上述 4 处的伸缩振动峰外，还分别有 SDS 在 2 917.91 cm^{-1} 处的 C-H 不对称伸缩振动峰和 2 850.42 cm^{-1} 处的 C-H 对称伸缩振动峰[10]（图 3D），以及 Soluplus 在 2 858.13、1 739.56 cm^{-1} 处的 C-H、C=O 伸缩振动峰[11]（图 3E）。而与



A—**1**；B—Soluplus；C—SDS；D—**1**-NSps（a）；E—**1**-NSps（b）；F—**1**-NSps（c）。

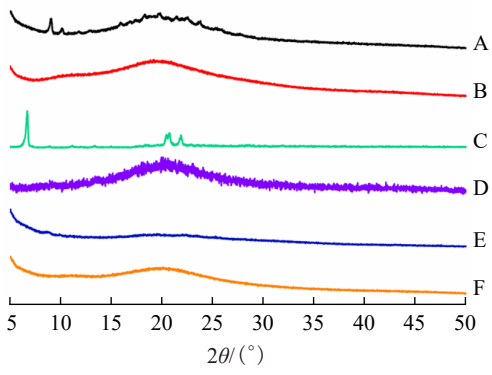
图 3　不同样品的 FT-IR 光谱图

Fig.3　FT-IR Spectra of Different Samples

1-NSps(b) 相比，**1**-NSps(c) 中 Soluplus 含量较高，在 1 637.35 cm^{-1} 处—COOH 中的 C=O 伸缩振动峰对 **1** 造成干扰，导致 **1** 在 1 596.85 cm^{-1} 处的 C=O 伸缩振动峰未被检出。在 **1**-NSps 的红外光谱图中，均能观察到药物与稳定剂各自的特征峰，且没有新的特征峰出现，说明以上 3 种处方的制备过程未引起 **1** 中组分化学结构的改变；但可见个别特征峰的波数发生细微偏移，可能是粒径减小、能级间距变宽而引起的光吸收带移动[12]。

2.6 PXRD 分析

取 **1**、Soluplus、SDS、**1**-NSps 冻干粉末适量，用 PXRD 仪进行分析，测定参数设置为：Cu K_α 靶，2θ 扫描范围 5° ～ 50°，采样宽度为 0.01°，电压为 40 kV，电流为 100 mA，扫描速度为 2(°)/min，结果如图 4 所示。



A—**1**；B—Soluplus；C—SDS；D—**1**-NSps(a)；E—**1**-NSps(b)；F—**1**-NSps(c)。

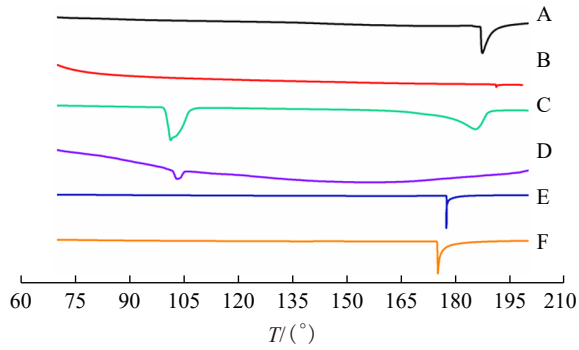
图 4 不同样品的 PXRD 谱图

Fig.4 PXRD Patterns of Different Samples

如图 4 所示，**1** 仅在 9.02°、10.17° 处有晶体衍射峰，但强度较低，且在 15° ～ 25° 范围内出现高背底和较多毛刺，可能是因为 **1** 是多种成分并存的混合物，其中仅有少量化合物以晶型状态存在，结晶度不高。**1**-NSps 的 PXRD 图中均无明显的晶体衍射峰，究其原因，可能是 **1**-NSps 中粒子粒径较小，致使其中化合物的衍射峰半峰宽和衍射强度进一步减弱。

2.7 DSC 分析

取 **1**、Soluplus、SDS、**1**-NSps 冻干粉末适量，用 DSC 仪进行分析。测定参数设置为：氮气流下，升温速度为 10 ℃/min，升温范围为 65 ～ 200 ℃，氧化铝为参比，结果如图 5 所示。



A—**1**；B—Soluplus；C—SDS；D—**1**-NSps(a)；E—**1**-NSps(b)；F—**1**-NSps(c)。

图 5 不同样品的 DSC 曲线

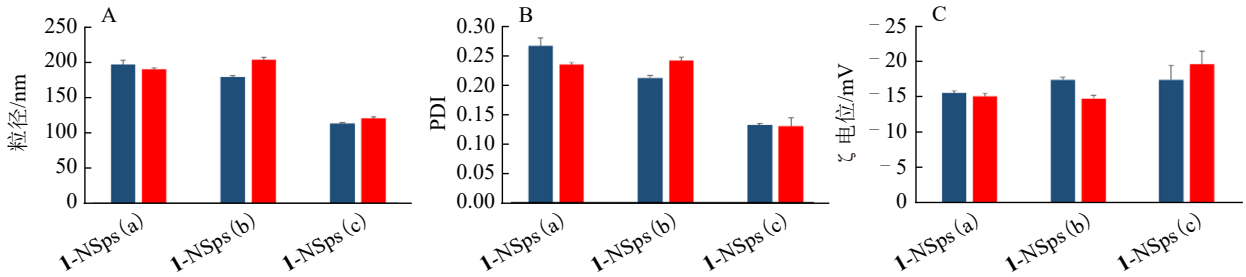
Fig.5 DSC Curves of Different Samples

结果显示，**1** 在 187.30 ℃处有吸热峰，结合 PXRD 结果分析，认为可能是 **1** 中存在的少量晶型药物的吸热熔融峰。**1**-NSps(a) 的 DSC 曲线中，仅 103.17 ℃处存在 SDS 的吸热峰[9]，**1** 的特征性吸热峰完全消失，表明 **1** 中的少量晶型药物在 **1**-NSps(a) 中以无定形状态存在；而其中 SDS 在 185.38 ℃处的吸热峰消失，可能是 SDS 含量较低的缘故。**1**-NSps(b) 和 **1**-NSps(c) 的 DSC 曲线中，少量晶型药物的特征吸热峰分别在 177.36 和 175.04 ℃处出现。根据范托夫方程可知，当物质中有微量杂质存在时，其熔点降低、熔距变宽[13]。**1**-NSps(b) 和 **1**-NSps(c) 中由于稳定剂 Soluplus 的存在，致使其少量晶型药物吸热峰较 **1** 提前。而 **1**-NSps(c) 中 Soluplus 含量更高，粒径更小，故吸热峰较 **1**-NSps(b) 提前，熔距更宽。此外，研磨和高压均质可能造成物质固有晶格的紊乱和分裂，也会影响药物的熔化行为[14]。

2.8 放置稳定性

将 **1**-NSps 密封放置于 4 ℃环境中，分别在 0、7 d 时取样测定粒径、ζ 电位和 PDI，考察其放置稳定性，结果如图 6 所示。

以静电型稳定剂 SDS 制备的 **1**-NSps(a) 在放置过程中粒径从 196.3 nm 减少至 190.1 nm。根据



A—粒径；B—PDI；C—ζ 电位。

■—0 d；■—7 d。

图 6　1-NSps 的稳定性试验结果（*n*=3）

Fig.6　Stability Test Results of **1**-NSps (*n*=3)

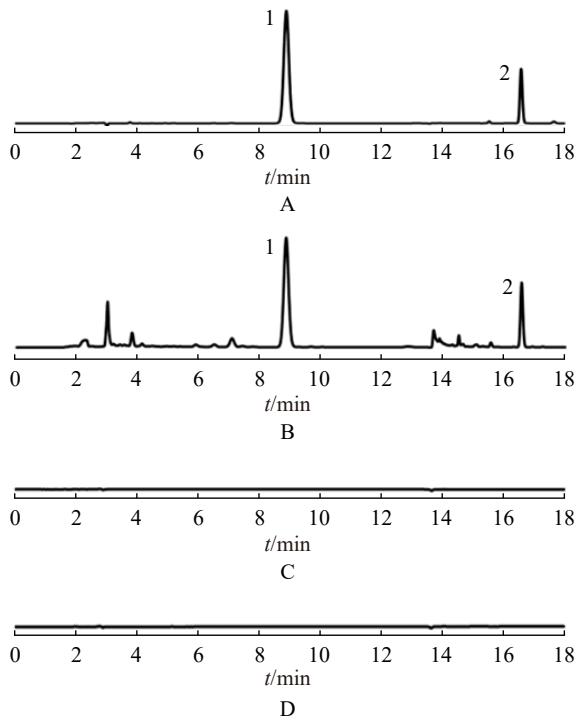
Stokes-Einstein 方程，温度的升高将导致动态黏度的降低和扩散常数的增加，而 **1**-NSps(a) 的贮存温度低于制备温度，削弱了粒子碰撞的速度和动能，静电排斥的能量增加，导致颗粒尺寸略微减小[5]。以空间型稳定剂 Soluplus 制备的 **1**-NSps(b) 和 **1**-NSps(c) 在放置过程中均出现粒径增大的现象，其中，**1**-NSps(b) 的粒径由 178.7 nm 增长至 203.2 nm，**1**-NSps(c) 的粒径增长较少，仅由 113.0 nm 增长至 120.3 nm。3 种处方工艺制备 **1**-NSps 的 ζ 电位在放置 7 d 后均无明显变化，PDI 均小于 0.3，说明 NSps 体系中的粒子粒度分布均匀。上述结果表明，微型化介质研磨法和沉淀 - 高压均质法制备的 **1**-NSps 在 4 ℃条件下放置 7 d 内稳定，其中，沉淀 - 高压均质法制得的 **1**-NSps 更为稳定。

2.9　1-NSps 的含量测定

2.9.1　2 和 3 含量的 HPLC 法

色谱条件：色谱柱 Kromasil C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相　A 为乙腈，B 为 0.2%磷酸水溶液，梯度洗脱（0—10 min，B 70%；10—11 min，B 70%—43%；11—18 min，B 43%）；检测波长 270 nm；流速 1.0 mL/min；柱温 30 ℃；进样量 10 μL。理论塔板数按 **2** 计，不低于 13 000。

专属性考察：称取 **2**、淫羊藿次苷 Ⅱ（**3**）对照品适量，加甲醇制成质量浓度分别为 158.7、27.4 μg/ml 的混合对照品溶液。按“**2.1**”“**2.2**”项下方法制备不含药的空白 NSps。取上述溶液适量，按上述色谱条件进样测定，记录色谱图。结果（图 7）显示，**2** 和 **3** 的保留时间分别为 8.7 和 16.5 min，峰形对称，无拖尾；空白辅料在 8.7 和 16.5 min 处无色谱峰，说明辅料对 **2**、**3** 的检测没有干扰，专属性良好。



A—混合对照品；B—**1**-NSps 供试品；C—空白 NSps(SDS)；D—空白 NSps(Soluplus)。

1—**2**；2—**3**。

图 7　典型 HPLC 色谱图

Fig.7　Typical HPLC Chromatograms

2 和 **3** 的含量测定：精密量取不同处方 **1**-NSps

各 1.0 mL，置 50 mL 量瓶中，平行制备 3 份，以甲醇定容，得供试品溶液。取适量离心（15 871×*g*）10 min，取上清液按上述色谱条件进样检测，计算 **1**-NSps 中 **2**、**3** 的含量，结果如表 1 所示。

2.9.2 总黄酮含量的 UV 测定法

标准曲线绘制：精密称取 **2** 对照品适量，加甲醇制成质量浓度为 21.16 μg/mL 的对照品溶液。精密量取 2.5、3、4、6、8 mL 置 10 mL 量瓶中，以甲醇稀释并定容，即得质量浓度分别为 5.29、6.35、8.46、12.67、16.93 μg/mL 的对照品溶液。以甲醇为空白，于 270 nm 波长下检测吸光度。以质量浓度（*c*）为横坐标、对应的吸光度（*D*）为纵坐标，绘制标准曲线，得线性方程 D=0.040 9c+0.012 4，R^2=0.999 6，表明 **2** 在 5.29 ～ 16.93 μg/mL 范围内线关系良好。

总黄酮含量测定：取“**2.9.1**”项下供试品溶液 1 mL 置 25 mL 量瓶中，平行制备 3 份，以甲醇定容，取适量离心（15 871×*g*）10 min，取上清液，于 270 nm 波长下测定吸光度，代入标曲计算 **1**-NSps 中总黄酮的含量，结果如表 1 所示。

表 1 1-NSps 含量测定结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.1 Content Determination Results of **1**-NSps ($\bar{x}\pm s$, n=3)

处方	总黄酮含量/(mg·mL^{-1})	**2**/(mg·mL^{-1})	**3**/(mg·mL^{-1})
1-NSps(a)	11.51±0.27	5.30±0.06	1.15±0.01
1-NSps(b)	11.36±0.08	5.76±0.08	1.24±0.01
1-NSps(c)	10.52±0.10	5.48±0.59	1.25±0.11

由表 1 可知，3 种处方工艺制备的 **1**-NSps 中主要成分 **2**、**3** 的含量无显著性差异；然而，与 **1**-NSps(b) 相比，**1**-NSps(c) 中总黄酮含量显著降低（P<0.01），原因可能是 **1** 中少量黄酮类成分在甲醇中溶解度较低，表明沉淀 - 高压均质法对药物的结构和理化性质有一定要求，而微型化介质研磨法适用性更广。

2.10 饱和溶解度

在水 30 mL 中加入过量 **1**，按“**2.1**”“**2.2**”项下方法制备 **1**-NSps 及其物理混合物；置 37 ℃水浴中振荡 48 h，取出后离心（15 871×*g*）10 min，过 0.22 μm 滤膜，取续滤液 1.0 mL，置 50 mL 量瓶中，以甲醇稀释并定容，按“**2.9.1**”项下色谱条件进样检测，计算 **2**、**3** 的饱和溶解度，结果如表 2 所示。

表 2 不同样品中的饱和溶解度结果（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.2 Saturated Solubility Results of Different Samples ($\bar{x}\pm s$, n=3)

介质	**2**/(mg·mL^{-1})	**3**/(mg·mL^{-1})
水	1.66±0.06	0.19±0.02
1-NSps(a)	3.94±0.07	0.15±0.03
1-NSps(a)物理混合物	3.27±0.08	0.15±0.06
1-NSps(b)	0.59±0	0.17±0.01
1-NSps(b)物理混合物	0.74±0	0.40±0.01
1-NSps(c)	2.48±0.32	0.43±0.06

由表 2 可知，**2**、**3** 的饱和溶解度分别为（1.66±0.06）和（0.19±0.02）mg/mL，其中 **2** 的饱和溶解度高于文献报道的 15.04 μg/mL [2]，可能与 **1** 中其他成分对 **2** 有一定增溶作用有关 [15]。**1**-NSps(a) 中 **2** 的饱和溶解度最高，为（3.94±0.07）mg/mL，表明在 SDS 增溶作用的基础上，**1**-NSps(a) 仍可通过减小粒径、增大比表面积，进一步提高 **2** 的溶解度。而相同工艺下制备的 **1**-NSps(b) 中 **2** 的饱和溶解度仅为 0.59 mg/mL，这可能是由于空间型稳定剂 Soluplus 将药物分子完全包裹，抑制了溶解；物理混合物中 **2** 的饱和溶解度稍高，可能是药物与 Soluplus 仅简单混合，未经氧化锆珠研磨，导致粒子较大、Soluplus 无法完全均匀地覆盖药物。与 **1**-NSps(b) 有所不同，**1**-NSps(c) 中 **2** 的饱和溶解度为（2.48±0.32）mg/mL，可能是因为 **1**-NSps(c) 的制备中药物经历了晶核形成和成长过程，且机械力使颗粒具有更高的表面能和更小的粒径，从而提高了饱和溶解度。

1-NSps(a) 及其物理混合物中 **3** 的饱和溶解度无明显变化。**1**-NSps(b) 物理混合物中 **3** 的饱和溶解度比在 **1**-NSps(b) 中高，可能也是 Soluplus 对 **3** 完全包裹后抑制了它的溶解有关。**1**-NSps(c) 中 **3** 的饱和溶解度为（0.43±0.06）mg/mL，相对最高，原因与上述 **2** 饱和溶解度的提高相同。

以上结果表明，将 **1** 制成 NSps 后，其主要成分 **2** 和 **3** 的饱和溶解度有一定程度增加。

2.11　体外溶出

取 **1** 120 mg、3 种处方工艺制备的 **1**-NSps 各 4 mL，平行试验 3 份，按《中华人民共和国药典》2020 年版四部 0931 桨法进行溶出度测定。溶出介质为水 500 mL，温度为 (37±0.5)℃，转速为 100 r/min。分别于 5、10、20、40、60、120、180 min 时取样 5 mL（立即补加同温等量溶出介质），经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，续滤液适当稀释后按“**2.9.2**”项下方法，测定各样品中总黄酮浓度，并绘制溶出曲线，结果如图 8 所示。

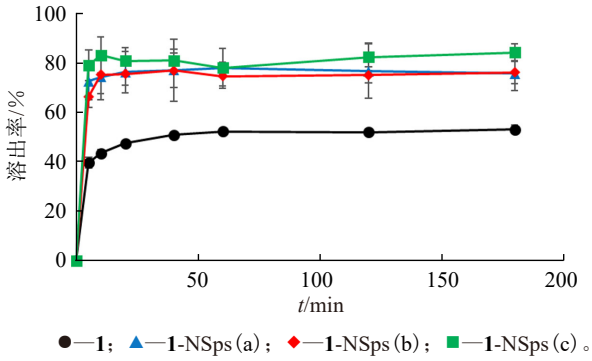


图 8　1-NSps 的体外溶出曲线（*n*=3）

Fig.8　*In vitro* Dissolution Profiles of **1**-NSps (*n*=3)

结果显示，5 min 时，原料中 **1** 溶出率为 39.64%，180 min 时溶出率为 53.16%，表明溶出不完全。微型化介质研磨法制备的 **1**-NSps(a) 和 **1**-NSps(b) 在 5 min 时的溶出率分别为 72.61%、66.33%；180 min 时的溶出率为 75.77%、76.26%，仍不能完全溶出。而沉淀 - 高压均质法制备的 **1**-NSps(c) 在 5 min 时的溶出率为 79.10%，180 min 时达 84.36%，基本溶出完全。可以看出，将 **1** 制成 NSps 后，其体外溶出速率和溶出程度均明显增加，可能与纳米混悬技术使 **1** 各成分粒径减小、比表面积增大有关。此外，与微型化介质研磨法制备的 **1**-NSps 相比，沉淀 - 高压均质法制备的 **1**-NSps 溶出更完全，原因可能与粒径更小有关。

3　讨论

本研究所采用的 **1**-NSps 制备工艺，是在对良溶剂种类、均质工艺、稳定剂种类及浓度等处方工艺参数考察基础上得出的较优工艺。前期研究表明，**1**-NSps(b) 的饱和溶解度低于 **1**，推测可能与 Soluplus 的稳定机制有关。因此，选用静电型稳定剂 SDS 制备 **1**-NSps(a)，以探究不同类型稳定剂对 **1**-NSps 溶解度和溶出速率的影响。结果表明，制成 **1**-NSps(a) 后，**2** 的饱和溶解度确实有所提高，与之前的猜想相符。体外溶出结果表明，**1**-NSps(a) 和 **1**-NSps(b) 的溶出速率和溶出程度均较原料药明显增加，且 180 min 时的溶出率基本相同。但 **1**-NSps(b) 在 5 min 时的溶出率较 **1**-NSps(a) 低 6.28%，可能是 **1**-NSps(b) 中的药物粒子需先解除稳定剂 Soluplus 的包裹，而后才能溶出的缘故。综上，当纳米混悬剂制备工艺相同，且粒径相当时，稳定剂类型可能会影响其饱和溶解度，也提示在纳米混悬剂的制备过程中，需重视稳定剂种类和作用机制研究。

进行饱和溶解度考察时，选用的稳定剂 Soluplus 和 SDS 在 270 nm 处都均有一定的紫外吸光度，空白供试品中稳定剂的浓度无法准确控制，检测干扰较大，故仅采用 HPLC 法测定总黄酮中的 **2** 和 **3**。体外溶出度主要是考察药物在溶出介质中溶出量的变化趋势，用 UV 法测定总黄酮即可反映这种趋势。采用这 2 种分析方法相结合进行含量测定，可以兼顾总黄酮及主要药效成分 **2** 和 **3** 的含量，较全面地反映制剂的载药量。这提示在中药制剂的分析与评价中，需结合分析方法的特点和优势进行。

本研究采用微型化介质研磨法和沉淀 - 高压均质法分别制备 **1**-NSps。后法得到的 NSps 粒径略小、稳定性稍好、体外溶出较完全，表明其可能更适于 **1**-NSps 的制备。但沉淀 - 高压均质法制备 NSps 时稳定剂用量较多，会使制剂服用量增大，给临床实际应用带来不便。微型化介质研磨法制备的 **1**-NSps 所需原料较少，可一定程度提高药物的溶出，适于进行实验室前期的制剂处方及工艺摸索。

致谢：中药制药过程新技术国家重点实验室开放基金（SKL2020Z0204）给予资助。

参考文献：

[1] 罗 露, 袁志鹰, 黄惠勇, 等. 淫羊藿化学成分及药理研究进展[J]. 亚太传统医药, 2019, **15**(6): 190-194.

[2] 王亚乐, 贾晓斌, 陈 彦, 等. 淫羊藿苷平衡溶解度和表观油水分配系数的测定[J]. 中华中医药杂志, 2008, **23**(9): 777-779.

[3] CHENG T, ZHANG Y, ZHANG T, *et al*. Comparative pharmacokinetics study of icariin and icariside Ⅱ in rats [J]. *Molecules*, 2015, **20**(12): 21274-21286.

[4] HONG C, DANG Y, LIN G, *et al*. Effects of stabilizing agents on the development of myricetin nanosuspension and its characterization: an *in vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2014, **477**(1/2): 251-260.

[5] WANG H, XIAO Y, WANG H, *et al*. Development of daidzein nanosuspensions: preparation, characterization, *in vitro* evaluation, and pharmacokinetic analysis [J]. *Int J Pharm*, 2019, **566**: 67-76.

[6] 张增志, 刘浩平. 十二烷基硫酸钠水溶液胶束微观形貌研究[EB/OL]. [2011-07-07]. http://www. paper. edu. cn/releasepaper/content/201107-93.

[7] HONG J, LI Y, XIAO Y, *et al*. Annonaceous acetogenins (ACGs) nanosuspensions based on a self-assembly stabilizer and the significantly improved anti-tumor efficacy [J]. *Colloid Surf B Biointerfaces*, 2016, **145**: 319-327.

[8] 刘湘花, 张彩丽, 张俊霞, 等. 透射电镜负染色技术常见影响因素与对策[J]. 临床与实验病理学杂志, 2016, **32**(10): 1185-1186.

[9] 温春梅. 淫羊藿种质资源黄酮含量快速评价的方法学研究[D]. 南昌: 江西中医药大学硕士学位论文, 2020.

[10] 郭江江. 水相体系中软模板法制备片状聚苯乙烯纳米材料[D]. 北京: 北京化工大学博士学位论文, 2008.

[11] 解仲伯, 李远达, 林华庆, 等. 新型载体 Soluplus® 制备灯盏花素固体分散体及其体外溶出行为研究与表征[J]. 中国新药杂志, 2018, **27**(5): 566-573.

[12] BALL P, GARWIN L. Science at the atomic scale [J]. *Nature*,1992, **355**(6363): 761-764.

[13] 刘柳毅, 温璐平, 许男徽, 等. 灯盏花素纳米晶的制备及质量评价[J]. 中国药房, 2020, **31**(15): 1861-1867.

[14] YANG H, TENG F, WANG P, *et al*. Investigation of a nanosuspension stabilized by Soluplus® to improve bioavailability [J]. *Int J Pharm*, 2014, **477**(1/2): 88-95.

[15] 李 畅. 淫羊藿多糖对其难溶性黄酮苷的增溶作用及机制初探[D]. 南京: 南京中医药大学硕士学位论文, 2021.