

2种粒径的薯蓣皂苷元纳米混悬液的体外评价

常金花, 薛禾菲, 刘沛, 刘喜纲, 王汝兴, 李忠思, 刘翠哲*

承德医学院 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北承德 067000

摘要:目的 比较2种粒径的薯蓣皂苷元纳米混悬液(DSG-NS)的物理化学性质、水溶解性和初步稳定性。方法 采用介质研磨的方法,以普朗尼克F127和十二烷基硫酸钠为稳定剂,分别应用直径为1.0、0.5 mm的研磨珠制备DSG-NS(分别称为DSG-NS1.0、DSG-NS0.5),冷冻干燥将其固化。分别应用马尔文粒度测定仪、扫描电子显微镜(SEM)、X射线衍射和傅里叶红外光谱对2种粒径的DSG-NS的物理化学性质进行表征;以平衡溶解度和溶出度为指标,评价二者的水溶解性。

结果 DSG-NS1.0、DSG-NS0.5的粒径分别为 (762.5 ± 18.4) 、 (342.8 ± 7.3) nm,多分散指数(PDI)分别为 0.435 ± 0.087 、 0.170 ± 0.018 ;冻干粉复溶后的粒径分别为 (919.0 ± 27.2) 、 (458.0 ± 10.3) nm, PDI分别为 0.521 ± 0.094 、 0.298 ± 0.021 ;SEM照片显示DSG-NS1.0、DSG-NS0.5均呈近似棒状或片状,且晶体间无明显的聚集;DSG-NS1.0、DSG-NS0.5在冻干后仍维持晶体状态,平衡溶解度分别为 (5.094 ± 2.083) 、 (26.121 ± 10.286) $\mu\text{g/mL}$,60 min内的累积溶出率分别为36.1%和64.9%;DSG-NS1.0的粒径在10 d后有明显的增加,而DSG-NS0.5的粒径在30 d内基本无变化,二者冻干产品的粒径在3个月内保持稳定。**结论** 减小粒径没有改变DSG-NS的形态和晶型,而且有助于提高平衡溶解度、溶出度和物理稳定性。

关键词:薯蓣皂苷元;纳米混悬液;粒径;平衡溶解度;溶出度;稳定性

中图分类号:R283.6 文献标志码:A 文章编号:0253-2670(2017)17-3529-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.17.013

In vitro evaluation of diosgenin nanosuspensions with different particle sizes

CHANG Jin-hua, XUE He-fei, LIU Pei, LIU Xi-gang, WANG Ru-xing, LI Zhong-si, LIU Cui-zhe

Hebei Province Key Laboratory of Research and Development for Chinese Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, China

Abstract: Objective To investigate the effect of particle size on the physicochemical properties, aqueous solubility and physical stability of diosgenin nanosuspensions (DSG-NS). **Methods** DSG-NS with different particle sizes were prepared using the milling bead with the diameter of 0.5 (DSG-NS0.5) and 1.0 mm (DSG-NS1.0) by media milling method using the combination of Pluronic F127 and sodium dodecyl sulfate as stabilizer, respectively. The DSG-NS were solidified by freeze drying method. The physicochemical properties of DSG-NS were characterized in term of particle distribution, scanning electron microscope, X-Ray diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy. The aqueous solubility of DSG-NS with two particle size was compared by equilibrium solubility and dissolution rate. **Results** The particle sizes of the DSG-NS1.0 and DSG-NS0.5 prepared in this paper were (762.5 ± 18.4) and (342.8 ± 7.3) nm with the polydispersion index (PDI) of 0.435 ± 0.087 and 0.170 ± 0.018 , respectively. The re-dispersed freeze drying products had particle sizes of (919.0 ± 27.2) and (458.0 ± 10.3) nm with the polydispersion index of 0.521 ± 0.094 and 0.298 ± 0.021 , respectively. Both DSG-NS1.0 and DSG-NS0.5 had an irregular rod-shape or flake without any aggregates. The DSG retained its original crystalline state during the manufacturing process of DSG-NS1.0 and DSG-NS0.5. The solubilities of freeze drying DSG-NS1.0 and DSG-NS0.5 were (5.094 ± 2.083) and (26.121 ± 10.286) $\mu\text{g/mL}$. The accumulated dissolution rate of freeze drying DSG-NS1.0 and DSG-NS0.5 was 36.1% and 64.9% in 60 min, respectively. The particle size presented significant increase in 10 d for the DSG-NS1.0, whereas it had no change in 30 d for DSG-NS0.5. However, the particle size and distribution of the freeze drying DSG-NS1.0 and DSG-NS0.5 were stable during the storage of 3 month. **Conclusion** The reduction of particle size had

收稿日期: 2017-03-14

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(H2014406036); 河北省高等学校科学技术研究项目(QN2015127); 河北省高校重点学科建设项目(冀教高[2013]4号)

作者简介: 常金花(1981—),女,硕士,讲师,研究方向为药物新剂型及药动学研究。Tel: (0314)2290629 E-mail: xiaoniqu@126.com

*通信作者 刘翠哲(1964—),女,博士,博士生导师,研究员,研究方向为中药制剂现代化及中药药动学研究。

Tel: (0314)2290359 E-mail: liucuihexy@163.com

no effect on the changing of morphology and original crystalline state and contributed to the improvement of solubility, dissolution rate and physical stability of DSG-NS.

Key words: diosgenin; nanosuspension; particle size; solubility; dissolution; stability

目前, 通过高通量筛选或从天然提取物发现的新活性成分中, 大约 40% 是难溶性的药物, 溶解度低使得这些药物很难在体内溶解进而被吸收发挥药效^[1-2]。因此, 药物的增溶是在研制新药过程中亟待解决的问题。纳米混悬液技术^[3-4] (nanosuspensions, NS) 是指将微米级的药物颗粒通过研磨分散或沉淀结晶, 使粒径减小到亚微米级甚至毫微米级, 并在稳定剂的作用下稳定存在。当药物粒径达到纳米级别时, 因其粒径小、比表面积大, 使其溶解度和溶出速率增大, 进而增加了药物的生物利用度^[5-6]。

薯蓣皂苷元 (diosgenin, DSG) 是一种甾体皂苷元, 是薯蓣科植物穿龙薯蓣 *Dioscorea Nipponica* Makino 的有效成分之一^[7-8], 也是薯蓣皂苷在体内发挥作用的最终物质, 其具有多种生物活性, 特别是其抗肿瘤、心血管保护、抗炎等作用已经引起了国内外研究学者的极大重视^[9-11]。然而, DSG 在水中几乎不溶, 疏水性强, 口服生物利用度低^[12]。有研究表明增加 DSG 的水溶性, 能够提高其生物利用度^[13]。因此, 为了提高 DSG 的水溶性, 在本实验的前期研究中, 采用介质研磨的方法, 以普朗尼克 F127 (Pluronic F127, F127) 和十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS) 为稳定剂, 经过处方和工艺参数的优选, 将 DSG 制成了薯蓣皂苷元纳米混悬液 (DSG-NS)。制得的 DSG-NS 的平均粒径为 400 nm 左右, 溶出度明显优于 DSG 原料药和物理混合物, 而且初步的药动学研究结果表明 DSG-NS 能够提高 DSG 的生物利用度。已有文献报道, 纳米晶的粒径可以影响药物的溶出度和生物利用度, 而且不同粒径纳米晶的形态也可能不同^[14-15]。因此, 本实验将应用前期研究优选的处方和工艺, 制备 2 种粒径的纳米晶: DSG-NS1.0 (大粒径, 接近微米级) 和 DSG-NS0.5 (400 nm 左右); 分别考察粒径对于其粒度分布、形态、晶型转变、平衡溶解度、体外溶出度和初步稳定性的影响。

1 仪器与材料

79HW-1 型恒温磁力搅拌器, 浙江乐清乐成电器厂; PM 行星式球磨机, 南京顺驰科技发展有限公司; AR1140 型电子分析天平, 奥豪斯国际贸易有限公司; TG328A 型分析天平, 上海仪器制造厂;

DRC-1000REC 冻干机, 日本东京 Rikakikai 公司; ZS90 纳米粒度和 Zeta 电位仪, 英国马尔文公司; YS2-H 显微镜, 尼康映像仪器销售 (中国) 有限公司; D\Max-2400 型 X 射线衍射 (XRD) 仪, 日本 Rigaku 公司; EQUINOX55 傅里叶变换红外光谱 (FT-IR) 仪, 德国布鲁克光谱仪器公司; SHA-C 型水浴振荡器, 常州国华电器有限公司; RC806D 型溶出试验仪, 天津天大天发科技有限公司; YS2-H 扫描电子显微镜 (SEM), 尼康仪器销售有限公司。

DSG 对照品, 批号 111539-200001, 质量分数 98%, 中国食品药品检定研究院; DSG 原料药, 批号 201503102, 质量分数 95%, 南京春秋生物工程有限公司; SDS, 天津博迪化工股份有限公司; F127, 德国巴斯夫化工 (中国) 有限公司; 甘露醇、聚乙二醇 6000 (polyethylene glycol 6000, PEG6000), 北京凤礼精求商贸有限责任公司。乙腈, 色谱纯, 天津市康科德科技有限公司; 水为双蒸水; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 DSG-NS 的制备

采用介质研磨法, 制备 DSG-NS。在前期的研究中, 分别对处方和工艺参数进行了优选: 选择 F127、普朗尼克 F68、聚维酮 K30 (PVP K30)、羟丙甲基纤维素 E5、聚山梨酯-80 和 SDS 为稳定剂, 固定质量分数为 1.25%, 结果以 F127 为稳定剂时, DSG-NS 的粒径最佳。以 F127 为稳定剂, 选择不同的质量分数 (2.5%、1.25%、1.0%、0.83%、0.625%、0.312 5%) 进行考察, 结果 F127 的质量分数为 0.83% 时, DSG-NS 的粒径最佳。为了提高 DSG-NS 的稳定性, 在 DSG-NS 处方中加入离子型稳定剂 SDS, 经过优选, 确定 F127 与 SDS 的比例为 8:1。分别选择不同的研磨时间 (30、60、90、120、150 min) 和研磨珠的用量 (研磨珠-粗混悬液 2:1 或 4:1) 制备 DSG-NS, 结果研磨时间为 120 min 和研磨珠用量为 4:1 时, 得到的 DSG-NS 的粒径最小。按照优选的处方和工艺参数, 首先分别精密称取 F127 (250.00 mg) 和 SDS (31.25 mg), 于 30 mL 双蒸水中溶解; 然后加入 1.5 g 的 DSG 原料药, 搅拌使其分散, 得到质量浓度为 50 g/L 的 DSG 粗混悬液。

按照研磨珠与粗混悬液的比例为 4 : 1, 依次向研磨罐中加入 120 g 直径约为 1.0 mm 的氧化锆研磨珠和 30 mL DSG 粗混悬液; 然后将研磨罐放入球磨机中, 调节转速为 37 Hz, 研磨 20 min 后, 得到 DSG-NS1.0。另取 120 g 直径约为 0.5 mm 的研磨珠和 30 mL DSG 粗混悬液依次加入到研磨罐中, 将研磨罐放入球磨机中, 调节转速为 37 Hz, 研磨 120 min 后, 得到 DSG-NS0.5。

2.2 固化

为了得到更加稳定的 DSG-NS, 应用冷冻干燥的方法将其固化。在本实验的前期研究中, 分别以外观、冻干粉复溶后的粒径和显微镜下的形态为指标, 优选冻干保护剂的种类和用量。选择常用的冻干保护剂, 如葡萄糖、麦芽糖、海藻糖、蔗糖、乳糖、山梨醇、甘露醇、甘氨酸、PEG6000 和 PVP K30, 固定质量分数为 5%。结果表明 PEG6000 为冻干保护剂时, DSG-NS 冻干粉复溶后的粒径较小, 显微镜下纳米晶间轻微聚集, 外观尚可。为了进一步改善冻干粉的粒径, 优选 PEG6000 的质量分数 (4%、6%、8%、10%), 结果表明加入 8% PEG6000 时, 所得到的 DSG-NS 冻干粉的粒径最小。固定 PEG 6000 的质量分数为 8%, 加入不同比例的甘露醇, 在不增加冻干粉粒径的前提下, 改善冻干粉的外观。结果表明, 联合 PEG6000 (8%) -甘露醇 (2%) 为冻干保护剂时, 冻干粉的粒径几乎没有变化, 外观呈白色, 而且有光泽。因此, 本实验最终选择以 PEG 6000 (8%) -甘露醇 (2%) 为冻干保护剂。分别取 1 mL DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5, 置于西林瓶中, 加入质量分数分别为 8% 的 PEG6000 和 2% 的甘露醇作为冻干保护剂, 搅拌使冻干保护剂溶解。将其在 -75 °C 下预冻 12 h, 然后置于冷冻干燥机中, 在 -25 °C 下干燥 12 h, 随后在 20 °C 下干燥 4 h, 得到冻干的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5。

2.3 DSG 物理混合物制备

精密称取处方量的 F127 和 SDS, 加入适量的双蒸水, 溶解。加入适量的 DSG, 搅拌下使其分散, 得到药物质量浓度为 50 g/L 的 DSG 初混悬液。将初混悬液离心后, 取沉淀, 干燥。向干燥物中加入 8% 的 PEG6000 和 2% 的甘露醇, 即得 DSG 物理混合物。

2.4 DSG-NS 的表征

2.4.1 粒径与粒度分布 分别将 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 用双蒸水稀释至质量浓度为 50 mg/L 的

稀释液。应用动态光散射原理, 将该稀释液在角度为 90°、温度为 25 °C 和平衡时间为 30 s 的条件下, 循环测定 3 次, 每次循环运行 10 次, 每次运行 10 s, 得到粒径和多分散指数 (polydispersity index, PDI), 结果见表 1。同时, 以双蒸水为复溶溶剂, 将冻干的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 中加入 1 mL 双蒸水, 稍稍振摇, 使其再分散, 同前述方法测定粒径和 PDI (表 1)。由表 1 可知, DSG-NS1.0 的 PDI 值为 0.435 ± 0.087 , 而 DSG-NS0.5 的 PDI 值为 0.170 ± 0.018 , 说明 DSG-NS0.5 的粒度分布较窄, 减小粒径有利于粒子的均匀分布; 冻干后的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5, 粒径和 PDI 都有小幅增加。

表 1 DSG-NS1.0、DSG-NS0.5 和冻干的 DSG-NS1.0、DSG-NS0.5 的粒径和 PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Average particle size and PDI of DSG-NS1.0, DSG-NS0.5 and lyophilized DSG-NS1.0 and DSG-NS0.5 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	粒径/nm	PDI
DSG-NS1.0	762.5 ± 18.4	0.435 ± 0.087
冻干 DSG-NS1.0	919.0 ± 27.2	0.521 ± 0.094
DSG-NS0.5	342.8 ± 7.3	0.170 ± 0.018
冻干 DSG-NS0.5	458.0 ± 10.3	0.298 ± 0.021

2.4.2 SEM 观察 将 DSG 原料药、DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 分别分散在金属样品台的导电胶上, 真空镀金后, SEM 观察, 并拍摄照片, 结果见图 1。DSG 原料药呈棒状, 大小不均一, 而且晶体间有明显的聚集。DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 均呈近似棒状或片状, 粒子间没有明显的聚集; 而且比较 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 的 SEM 可知, DSG-NS0.5 的粒子大小较均一, 与粒径测定结果一致。

2.4.3 XRD 分析 在功率 3 kW (管压 40 kV) 铜靶, 以 $0.03^\circ/\text{min}$ 的速度, 扫描角度 $3^\circ \sim 25^\circ$, 对 DSG 原料药、空白辅料、物理混合物、冻干的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 进行测定, 得到其 X 射线衍射图谱, 结果见图 2。DSG 的特征衍射峰分别出现在 7.134° 、 14.190° 、 14.883° 、 16.050° 、 16.980° ; 冻干的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 的衍射图谱与物理混合物的一致, 而且 DSG 的特征衍射峰均出现在物理混合物、冻干的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 的衍射图谱。这些结果表明 DSG 在冻干的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 中均保持着原来的晶体状态, 在 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 的制备和固化过程中 DSG 没有发生晶

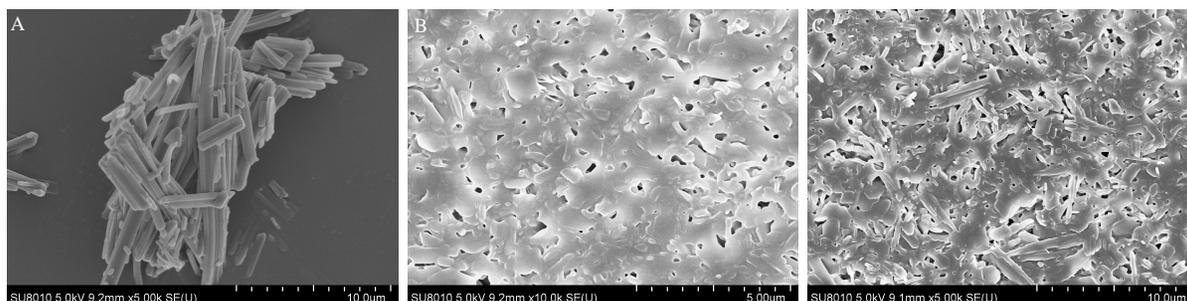


图 1 DSG 原料药 (A)、DSG-NS1.0 (B) 和 DSG-NS0.5 (C) 的 SEM 照片
Fig. 1 SEM images of DSG coarse powder (A), DSG-NS1.0 (B), and DSG-NS0.5 (C)

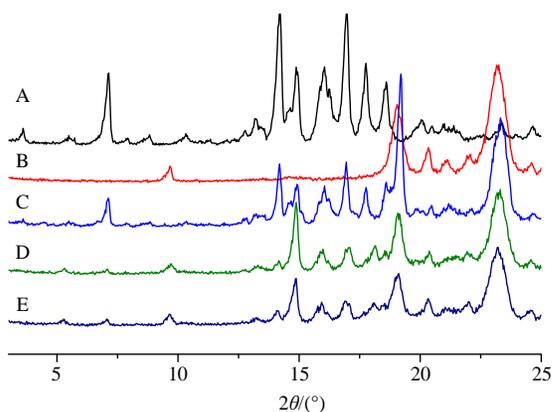


图 2 DSG 原料药 (A)、空白辅料 (B)、物理混合物 (C)、冻干 DSG-NS1.0 (D) 和冻干 DSG-NS0.5 (E) 的 XRD 图谱
Fig. 2 X-Ray diffraction patterns of DSG coarse powder (A), blank excipients (B), physical mixtures (C), freeze drying DSG-NS1.0 (D), and freeze drying DSG-NS0.5 (E)

型的转变。然而，与 DSG 原料药的衍射图谱相比，在冻干的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 的衍射图谱中 DSG 的特征衍射峰的峰强度下降，其原因可能是粒径减小^[16]。

2.4.4 FT-IR 分析 采用溴化钾将 DSG、空白辅料、物理混合物、冻干的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 压片，分别进行 FT-IR 测试，得到 FT-IR 图，结果见图 3。DSG 的特征吸收峰在物理混合物、冻干的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 的 FT-IR 中没有消失，说明药物和辅料之间均没有发生相互作用，DSG 的化学结构没有发生变化。

2.5 DSG-NS 的初步稳定性

将 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 分别于室温下避光放置在干燥器内，分别于 0、1、10、20、30 d 取样，按照“2.4.1”项下方法测定粒径和 PDI，结果见表 2。冻干的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 放置在上述条件下，然后分别于 0、30、60、90 d 后取样；首先取相当于 1 mL DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 的冻

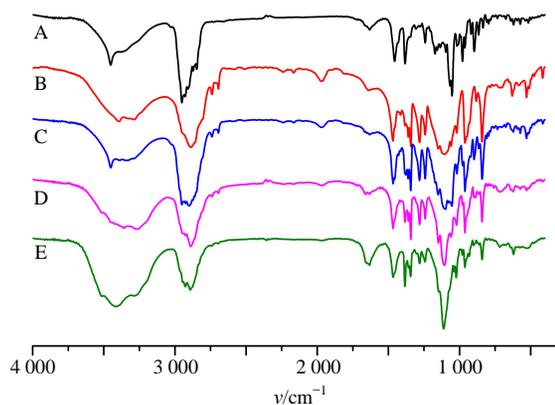


图 3 DSG 原料药 (A)、空白辅料 (B)、物理混合物 (C)、冻干 DSG-NS1.0 (D) 和冻干 DSG-NS0.5 (E) 的 FT-IR 图谱
Fig. 3 FT-IR patterns of DSG coarse powder (A), blank excipients (B), physical mixtures (C), freeze drying DSG-NS1.0 (D), and freeze drying DSG-NS0.5 (E)

干样品，用 1 mL 双蒸水分散后，按照“2.4.1”项下方法测定粒径和 PDI (表 2)。

由表 2 可知，DSG-NS1.0 在室温下放置 10 d 后，粒径由 (762.5±18.4) nm 增加到 (1 067.4±25.6) nm，而且其晶体较容易发生聚集，表明其稳定性较差；而 DSG-NS0.5 在放置 30 d 后，粒径和 PDI 没有发生明显的变化，表明稳定性较好。冻干的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 在同等条件下放置 90 d 后，粒径没有发生明显变化，表明冻干样品的稳定性优于 NS。

2.6 HPLC 测定 DSG 方法的建立

2.6.1 色谱条件 高效液相色谱仪：Agilent 1260 (包括四元泵、DAD 检测器)；色谱柱为 Diamonsil Plus C₁₈ 柱 (150 mm×4.6 mm, 5.0 μm)，流动相为乙腈-水 (0.05% 磷酸) (90 : 10)，体积流量 1 mL/min，检测波长 206 nm，柱温 30 °C，进样量 10 μL，理论塔板数以 DSG 峰面积计为 9 334。

2.6.2 对照品溶液制备 精密称定 DSG 对照品

表 2 样品在放置不同时间后的粒径和 PDI ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Table 2 Particle size and PDI of DSG-NS1.0, DSG-NS0.5, and freeze drying product at different time after storage ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品	放置时间/d	粒径/nm	PDI
DSG-NS1.0	0	762.5 ± 18.4	0.435 ± 0.087
	1	876.8 ± 20.1	0.476 ± 0.012
	10	1 067.4 ± 25.6	0.586 ± 0.091
	20	—	—
	30	—	—
冻干 DSG-NS1.0	0	919.0 ± 27.2	0.521 ± 0.094
	30	890.3 ± 24.7	0.478 ± 0.069
	60	905.3 ± 13.8	0.488 ± 0.055
	90	920.2 ± 11.8	0.511 ± 0.041
DSG-NS0.5	0	342.8 ± 7.3	0.170 ± 0.018
	1	340.2 ± 4.5	0.189 ± 0.009
	10	354.6 ± 3.4	0.201 ± 0.012
	20	365.2 ± 6.8	0.199 ± 0.020
	30	387.3 ± 3.8	0.211 ± 0.067
冻干 DSG-NS0.5	0	458.0 ± 10.3	0.298 ± 0.021
	30	448.5 ± 14.6	0.301 ± 0.011
	60	451.7 ± 15.3	0.304 ± 0.012
	90	460.9 ± 12.5	0.288 ± 0.033

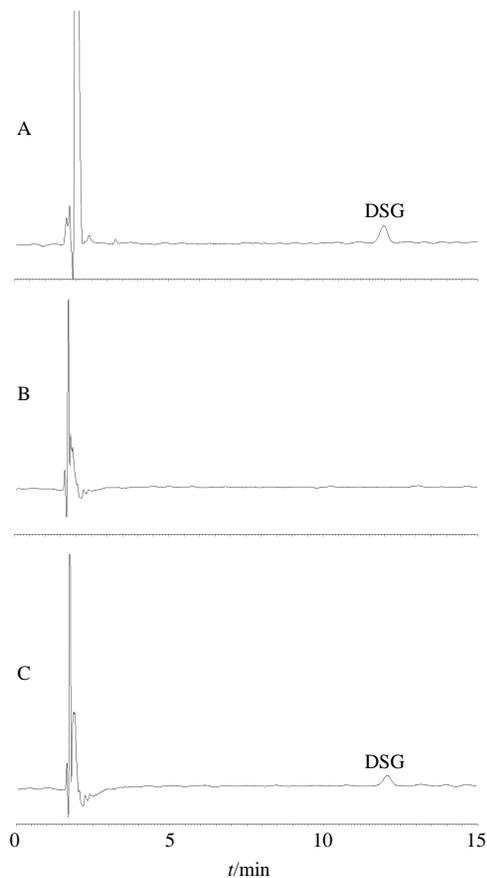
5.00 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 加入 10 mL 无水乙醇溶解, 并用 0.2% SDS 水溶液稀释至刻度, 得到质量浓度为 50 μg/mL DSG 对照品溶液。

2.6.3 供试品溶液制备 分别精密称取冻干 DSG-NS1.0 40.0 mg (相当于含有 10.0 mg DSG), 装入 #0 胶囊中, 按照《中国药典》2015 年版四部附录第二法浆法^[17], 加沉降篮, 以 900 mL 的 0.2% SDS 水溶液为溶出介质, 转速 100 r/min, 温度 (37.0 ± 0.5) °C, 于 45 min 取样 10 mL, 用 0.10 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液作为冻干粉的供试品溶液。

2.6.4 空白辅料溶液 依照 40.0 mg DNS-NS 冻干粉的处方比例称取空白辅料, 溶于 900 mL 的溶出介质中, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液。

2.6.5 专属性考察 取对照品溶液、空白辅料溶液、供试品溶液, 按照“2.6.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图 (图 4)。由色谱图可知, 空白辅料对于 DSG 的测定无干扰。

2.6.6 线性关系和最低定量限考察 分别精密量取 DSG 对照品溶液适量, 置于 10 mL 量瓶中, 用溶出介质稀释至刻度, 得到质量浓度分别为 0.2、0.5、



A-DSG 对照品 B-空白辅料 C 冻干 DSG-NS1.0
 A-DSG reference substance B-blank excipients
 C-freeze drying DSG-NS1.0

图 4 专属性色谱图

Fig. 4 Chromatogram of specificity test

1.0、5.0、10.0、50.0 μg/mL 的 DSG 对照品溶液。按照“2.6.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y), DSG 质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归, 结果 DSG 回归方程为 $Y = 19\,450.87 X + 1\,511.7$, $r = 0.999\,8$, 结果表明 DSG 在 0.2~50.0 μg/mL 线性关系良好。以信噪比 (S/N) 为 10 时的对照品质量浓度作为最低定量限, 结果最低定量限为 0.2 μg/mL。

2.6.7 精密度试验 取 5.0 μg/mL DSG 对照品溶液, 按照“2.6.1”项下色谱条件, 同 1 天连续进样 6 次, 连续测定 3 d, 记录峰面积。结果日内和日间精密度 RSD 分别为 1.1% 和 1.6%。

2.6.8 稳定性试验 在室温条件下, 分别于 0、2、4、8、12 h 取供试品溶液, 按照“2.6.1”项下方法分析, 记录色谱峰峰面积, 结果峰面积的 RSD 为 2.1%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.6.9 重复性试验 取冻干的 DSG-NS 6 份, 按照

“2.6.3”项下方法制备供试品溶液,采用“2.6.1”项下色谱条件分析,记录峰面积,计算其量,结果 DSG 量的 RSD 为 1.3%,表明重复性良好。

2.6.10 回收率试验 依照 DSG-NS1.0 冻干粉的处理比例称取空白辅料适量 ($n=9$),分别置于 10 mL 量瓶中,以 45 min 溶出液中 DSG 质量浓度为 100% 质量浓度水平,分别按照 0.8:1、1:1、1.2:1 的比例精密加入 DSG 对照品储备液适量,加入溶出介质稀释至刻度,得到相当于含有 DSG 的质量浓度分别为 3.6、4.5、5.4 $\mu\text{g/mL}$ 的供试品溶液^[17]。按照“2.6.1”项下色谱条件,进样分析,记录峰面积,计算测得量,回收率用(测得量/加入量)表示。结果表明,低、中、高质量浓度供试品溶液的回收率为 99.6%~101.2%,平均回收率为 100.8%,RSD 为 1.2%。

2.7 平衡溶解度考察

分别精密称取 10.0 mg DSG 原料药和 40.0 mg 冻干 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 样品(相当于 10.0 mg DSG)各 3 份,将其置于 10 mL 离心管中,加入 8 mL 双蒸水,稍加涡漩,使样品分散。将离心管于 37 °C 水浴中振荡 72 h 后,取样,样品经 0.10 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,HPLC 法测定 DSG 在不同样品中的平衡溶解度。结果冻干 DSG-NS1.0、DSG-NS0.5 中的平衡溶解度分别为(5.094 \pm 2.083)、(26.121 \pm 10.286) $\mu\text{g/mL}$;而 DSG 原料药在纯水中的溶解度低于本实验建立的分析方法的最低定量限。这些结果表明,制备成 DSG-NS 可以增加 DSG 的溶解度,而且 DSG-NS0.5 的平衡溶解度高于 DSG-NS1.0。

2.8 溶出度考察

参照《中国药典》2015 年版四部中溶出度测定二法^[17]。分别精密称取 DSG 约 10.0 mg 和 40.0 mg 的物理混合物、冻干 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 样品(相当于含有 DSG 约 10.0 mg)各 3 份,装入#0 胶囊壳中,将胶囊放入沉降篮中。以 900 mL 含 0.2% SDS 的水溶液作为溶出介质,采用浆法,在转速为 100 r/min 和温度为(37.0 \pm 0.5) °C 条件下,分别于 5、10、20、30、45、60 min 时取样 10 mL,取样后立即补充同温的空白溶出介质。不同时间点的样品经 0.10 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,HPLC 法测定不同样品中 DSG 的质量浓度,计算累积溶出率,以累积溶出率为纵坐标,时间为横坐标,分别绘制 DSG 原料药、物理混合物、冻干 DSG-NS1.0 和

DSG-NS0.5 的累积溶出率-时间曲线,结果见图 5。由图 5 可知,DSG 原料药、物理混合物、冻干 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 在 5 min 时的累积溶出率分别为 2.5%、11.5%、19.7%、39.5%;在 60 min 时的累积溶出率分别为 27.7%、34.0%、36.1%、64.9%。这些结果表明 DSG-NS 可以提高 DSG 的溶出率,而且 DSG-NS0.5 的溶出率高于 DSG-NS1.0。

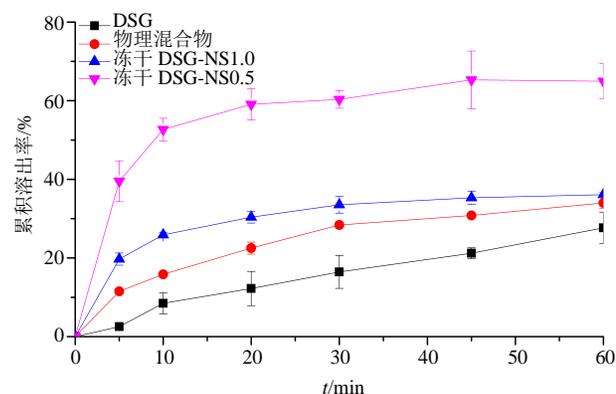


图 5 DSG 原料药、物理混合物、冻干 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 在含 0.2% SDS 纯水中的溶出曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Dissolution profiles of DSG, physical mixtures, freeze-drying DSG-NS1.0 and DSG-NS0.5 in 0.2% SDS ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

稳定剂的种类和浓度、研磨时间和研磨珠的直径均可以对粒径和粒度分布产生影响。为了得到不同粒径的纳米混悬液,文献报道选择应用不同的稳定剂来实现^[18-19],但有文献报道认为稳定剂可能会影响纳米混悬液的溶出度和生物利用度^[14,20]。因此,本实验应用相同的稳定剂制备 DSG-NS。为了制备不同粒径的 DSG-NS,分别考察了不同直径的研磨珠和不同研磨时间对于 DSG-NS 粒径的影响。结果发现应用直径为 0.5 mm 的研磨珠制备大粒径的 DSG-NS,减少研磨时间,则粒度不均匀;增加研磨时间,则无法得到合适的粒径;应用直径为 1.0 mm 的研磨珠,能够得到较为满意的大粒径的 DSG-NS1.0,但是增加研磨时间,粒径将会减小,通过优化,确定研磨时间为 20 min。

在实验中,分别应用直径为 1.0、0.5 mm 的研磨珠,成功制备 2 种粒径的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5。粒径测定结果表明 DSG-NS1.0 的粒径大于 DSG-NS0.5;然而扫描电镜结果显示 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 的形态与 DSG 原料药基本一致,均呈近似棒状。其原因可能是由于本实验应用介质研磨

法制备 DSG-NS, 该方法是通过机械力的作用, 将 DSG 粉碎至纳米级; 在粒径减小的过程中, 没有发生物相的转变。因此, 药物颗粒在研磨过程中粒径逐渐减小, 形态基本保持不变。

由于制备 DSG-NS0.5 的研磨时间明显多于 DSG-NS1.0, 文献报道药物在研磨过程中可能会发生晶型的转变^[21-22]。因此, 本实验采用 X 射线衍射法考察了 DSG 在冻干的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 中的晶型是否一致。结果表明二者的衍射图谱一致, 在粒径减小过程中, DSG 的晶型没有发生转变, 均维持原来的晶体状态。

实验过程中, 分别以含有 0.05%、0.1%、0.2% SDS 的水溶液为溶出介质, 研究结果发现在 0.05%、0.1% SDS 水溶液中, 应用 HPLC 法不能全部测定 DSG 在不同时间点样品中的浓度, 而且 DSG 原料药、物理混合物、冻干的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 溶出曲线的区分性不强, 其原因可能是 DSG 在水中的溶解度极低 (大约为 10 ng/mL)^[12], 而且疏水性较强, 在 0.05% 和 1.0% 的 SDS 水溶液中, DSG 不能有效地溶出。在 0.2% SDS 的水溶液中, DSG 原料药、物理混合物、冻干的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 的溶出曲线不仅可以满足漏槽条件, 而且具有区分性。因此, 本实验选择 0.2% SDS 的水溶液为溶出介质。

在本实验中, 冻干 DSG-NS0.5 的溶解度和溶出度均高于冻干的 DSG-NS1.0, 其原因可以用 Ostwald-Freundlich、Noyes-Whiney、Prandtl 方程来解释^[14]。根据 Ostwald-Freundlich 方程, 当药物处于微粉状态时, 粒径减小, 溶解度增大; 而且 Noyes-Whiney 方程表明药物的溶出速率与溶出速率常数 (K), 药物粒子的表面积 (S)、药物的溶解度 (C_s) 成正比。减小药物的粒径, 不仅可以增加药物颗粒的表面积和溶解度, 而且根据 Prandtl 方程, 减小粒径还可以减小药物扩散边界层厚度。因此, 减小粒径有利于增加药物的溶解度和溶出度。但是, 减小粒径是否有利于增加 DSG 的口服生物利用度, 本课题组将继续研究。

DSG-NS 属于热力学不稳定体系, 容易产生聚集, 来降低表面自由能。DSG-NS1.0 的粒径较大, 布朗运动减弱, 使得其晶体粒径更容易长大, 稳定性下降。但是, 冻干的 DSG-NS1.0 和 DSG-NS0.5 的粒径和 PDI 均可以在 90 d 内保持稳定, 表明减小粒径对于二者冻干产品的稳定性影响较小。

参考文献

- [1] 高会乐, 蒋新国. 新型药物递释系统的研究进展 [J]. 药学学报, 2017, 52(2): 181-188.
- [2] 周新波, 吴素香, 孙梦莹, 等. 中药难溶性有效成分共晶的研究进展 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 336-343.
- [3] 张明珠, 李怡静, 苏文晶, 等. 雷公藤红素纳米混悬剂的制备及其抗肿瘤作用研究 [J]. 现代药物与临床, 2016, 31(10): 1528-1534.
- [4] 沈成英, 申宝德, 徐平华, 等. 灵芝三萜纳米混悬凝胶剂的制备及其体外透皮研究 [J]. 中草药, 2014, 45(19): 2770-2775.
- [5] 王健, 段京莉, 李邱雪. 纳米晶提高难溶性药物溶出及生物利用度的研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(3): 253-258.
- [6] 罗开沛, 李小芳, 罗佳, 等. 纳米混悬技术在中药制剂中的应用及发展趋势 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 865-871.
- [7] 曾涌, 罗建军, 何文生, 等. 薯蓣属植物化学成分及药理活性的研究进展 [J]. 中国药房, 2016, 21(31): 4454-4459.
- [8] 赵敏, 谭大维, 余河水, 等. 薯蓣皂苷元的制备方法研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(13): 1860-1866.
- [9] Jiang S S, Fan J J, Wang Q, *et al.* Diosgenin induces ROS-dependent autophagy and cytotoxicity via mTOR signaling pathway in chronic myeloid leukemia cells [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(3): 243-252.
- [10] 何焱, 王继双, 张鹏, 等. 薯蓣皂苷元药理作用及其机制研究进展 [J]. 中草药, 2013, 44(19): 2759-2765.
- [11] 刘军, 何晓乐, 甄平, 等. SIRT1 信号通路介导薯蓣皂苷元在骨性关节炎软骨细胞代谢中的作用机制 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2017, 42(2): 121-127.
- [12] Okawara M, Hashimoto F, Todo H, *et al.* Effect of liquid crystals with cyclodextrin on the bioavailability of a poorly water-soluble compound, diosgenin, after its oral administration to rats [J]. *Int J Pharm*, 2014, 472(1/2): 257-261.
- [13] Okawara M, Tokudome Y, Todo H, *et al.* Enhancement of diosgenin distribution in the sky by cyclodextrin complexation following oral administration [J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(1): 36-40.
- [14] Liu D D, Pan H, He F W, *et al.* Effect of particle size on oral absorption of carvedilol nanosuspensions: *In vitro* and *in vivo* evaluation [J]. *Int J Nanomed*, 2015, 10(1): 6425-6434.
- [15] 武娜, 张利红, 程玲, 等. 金丝桃苷固体纳米晶体

- 的制备及其体外释放研究 [J]. 中草药, 2015, 46(12): 1759-1763.
- [16] Yang H, Teng F, Wang P X, *et al.* Investigation of a nanosuspension stabilized by Soluplus to improve bioavailability [J]. *Int J Pharm*, 2014, 477(1/2): 88-95.
- [17] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [18] Sun W, Mao S, Shi Y, *et al.* Nanonization of itraconazole by high pressure homogenization: Stabilizer optimization and effect of particle size on oral absorption [J]. *J Pharm Sci*, 2011, 100(8): 3365-3373.
- [19] 郭静静, 李仙义, 袁海龙, 等. 波棱甲素纳米混悬剂胶囊的制备及体外溶出度测定 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 467-470.
- [20] 苏文晶, 肖 瑶, 张明珠, 等. 番荔枝素纳米混悬剂的制备及其抗肿瘤作用研究 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(6): 966-972.
- [21] Sharma P, Denny W A, Garg S. Effect of wet milling process on the solid state of indomethacin and simvastatin [J]. *Int J Pharm*, 2009, 380(1/2): 40-48.
- [22] 邸 静, 洪靖怡, 刘营营, 等. 槲皮素纳米混悬剂的制备及其性能研究 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(6): 647-652.