

微型化介质研磨法制备大黄素纳米混悬剂及其体外评价

王梦琳, 胡宇峰, 马思媛, 朱海婷, 张俊丽, 张新宁, 王慧楠, 姜明瑞, 吴 玥, 王英姿*
北京中医药大学中药学院, 北京 102488

摘要: 目的 制备大黄素纳米混悬剂 (emodin nanosuspension, Emo-NS) 及其冻干粉, 并对其进行体外评价。方法 采用微型化介质研磨法制备 Emo-NS, 在单因素实验基础上, 以粒径大小及多分散指数 (poly dispersity index, PDI) 为考察指标, 考察氧化锆珠子体积、研磨速率及研磨时间的影响。采用冷冻干燥法固化, 考察冻干保护剂对固化的影响。采用透射电子显微镜法 (transmission electron microscopy, TEM)、差示扫描量热法 (differential scanning calorimetry, DSC)、X 射线衍射法 (X-ray diffraction, XRD)、傅里叶变换红外光谱法 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 对 Emo-NS 进行表征, 透析袋法评价其体外释放度。结果 Emo-NS 最佳处方为大黄素用量 50 mg, 泊洛沙姆 407 用量 20 mg, 氧化锆珠子体积 5.9 mL, 研磨速率 1 390 r/min, 研磨时间 3.9 h; Emo-NS 的平均粒径为 (236.23 ± 1.13) nm, PDI 为 0.205 ± 0.011 , 均与 Box-Behnken 设计-响应面法预测值接近; ζ 电位为 (-31.22 ± 1.34) mV。Emo-NS 固化时的冻干保护剂确定为 50 mg/mL 的蔗糖。体外释放结果显示, Emo-NS 冻干粉 144 h 累积释放率为 $(93.47 \pm 2.74)\%$, 符合 Ritger-Peppas 释放模型。Emo-NS 外貌为球形, DSC、XRD、FT-IR 结果显示, Emo-NS 冻干粉中大黄素以无定型状态分散于纳米混悬剂中或被稳定剂完全包裹, 有利于其溶出。结论 将大黄素制备成 Emo-NS, 处方设计合理、制备工艺可行, 显著提高了其体外溶出率。

关键词: 大黄素; 纳米混悬剂; 微型化介质研磨法; 冻干粉; 体外释放; 冷冻干燥法; Box-Behnken 设计-响应面法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)20-6918-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.20.009

Preparation of emodin nanosuspension by miniaturized media milling method and its *in vitro* evaluation

WANG Menglin, HU Yufeng, MA Siyuan, ZHU Haiting, ZHANG Junli, ZHANG Xinning, WANG Huinan, JIANG Mingrui, WU Yue, WANG Yingzi

School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To prepare emodin nanosuspension (Emo-NS) and its lyophilized powder and perform *in vitro* evaluation. **Methods** Emo-NS was prepared by miniaturized media milling method, and the effects of zirconia bead volume, milling speed and milling time were investigated on a one-factor basis, with particle size and poly dispersity index (PDI) as the investigating indexes. Adopting freeze-drying method for curing, investigate the effect of freeze-drying protectant on curing. Transmission electron microscopy (TEM), differential scanning calorimetry (DSC), X-ray diffraction (XRD), and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) were used to characterize the Emo-NS, and the dialysis bag method was used to evaluate its *in vitro* release. **Results** The optimal prescription of Emo-NS was 50 mg of emodin, 20 mg of poloxamer 407, zirconia beads volume of 5.9 mL, milling speed of 1 390 r/min, and milling time of 3.9 h. The average particle size was (236.23 ± 1.13) nm, and the PDI was 0.205 ± 0.011 , which was close to that predicted by the Box-Behnken design-response surface method. The lyophilized protectant for curing was determined to be 50 mg/mL sucrose. The ζ potential was (-31.22 ± 1.34) mV. The *in vitro* release results showed that the 144 h cumulative release of Emo-NS was $(93.47 \pm 2.74)\%$, which was consistent with the Ritger-Peppas release model. The external appearance of Emo-NS was spherical, and the DSC, XRD, and FT-IR results showed that emodin in the Emo-NS was dispersed in nanosuspension in an amorphous state or was completely encapsulated by stabilizers, which was conducive to its dissolution. **Conclusion** The preparation of emodin into nanosuspension drug prescription was well-designed and feasible, which significantly improved its *in vitro* dissolution rate.

收稿日期: 2024-04-19

基金项目: 国家中医药管理局高水平建设学科 (zyyzdxk-2023272)

作者简介: 王梦琳 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药制剂新技术与新剂型研究。E-mail: mlllwang@163.com

*通信作者: 王英姿 (1975—), 女, 教授, 博士生导师, 博士, 研究方向为中药制剂新技术与新剂型研究。E-mail: wangyzi@sina.com

Key words: emodin; nanosuspensions; miniaturized media milling method; lyophilized powder; *in vitro* release; freeze-drying method; Box-Behnken design-response surface method

大黄素是存在于大黄、虎杖、何首乌等中药中的天然蒽醌类成分，几乎不溶于水。研究表明，大黄素具有多种药理作用，包括抗炎和免疫调节^[1]、抗菌和抗病毒^[2-3]、抗肿瘤^[4]、保护器官^[5]等。但是大黄素的水溶性极差，口服溶出速度慢，在肠道和肝脏中通过葡萄糖醛酸化快速代谢排出体外，从而其生物利用度较低，限制了临床应用，因此需要合适的材料进行负载，制备出稳定性高且重复性好、适宜大规模生产的新剂型，以期更好地发挥其药效并用于临床^[6]。

纳米混悬剂(nanosuspension, NS)是通过制剂手段，将难溶性药物在稳定剂作用下制备成的一种“纯”药物纳米制剂^[7]，制备工艺简单可靠，容易实现工业化生产^[8]，载药量高，可有效提高难溶性药物的溶解度，促进其溶出以及体内吸收^[9-11]。微型化介质研磨(miniaturized media milling, MMM)法是一种以机械研磨方式得到纳米级粒子的最有效且最经济的方法，可以明显提高药物的活性；操作简单，工艺稳定，且无需使用有机溶剂，避免了因有机溶剂残留而造成的环境污染和机体毒性^[12-13]。

本实验通过 MMM 法制备大黄素纳米混悬剂(emodin nanosuspension, Emo-NS)，采用 Box-Behnken 设计-响应面法(Box-Behnken design-response surface method, BBD-RSM)优化 Emo-NS 的处方工艺，并对其进行体外评价，以期为大黄素纳米制剂的后续研发提供借鉴。

1 仪器与材料

1.1 仪器

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪，Chromleon 工作站，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；BSI10S 型电子天平，赛多利斯科学仪器(北京)有限公司；MMS4pro 型多联磁力搅拌器，群安实验仪器(浙江)有限公司(JOANLAB)；Zetasizer nano ZS90 型激光粒度分析仪，英国马尔文仪器有限公司；KQ-400DB 型超声清洗机，昆山市超声仪器有限公司；LGJ-12 型冷冻干燥机，北京松源华兴科技发展有限公司；FS-50B 型恒温培养摇床，河北菲斯福仪器有限公司；H-7650 型透射电子显微镜(TEM)，日本日立公司；Mettler DSC3 型差式扫描量热仪，瑞士梅特勒-托利多集团；Bruker D8 Advance 型 X 射线衍射仪、VERTEX70 型傅里叶变换红外/拉曼光谱仪，德

国 Bruker 公司。

1.2 试药

大黄素原料药，质量分数>98%，西安万滋生物科技有限公司；大黄素对照品(HPLC 测定质量分数>98%，批号 M29IB216001)、泊洛沙姆 188(P188，批号 M11GS148056)、壳聚糖(批号 A22J12X138337)、泊洛沙姆 407(P407，批号 J24GS155964)、葡萄糖(批号 S26F11H108778)、甘露醇(批号 M24GS149532)、蔗糖(批号 M21IS210367)，上海源叶生物科技有限公司；聚乙烯醇(PVA，批号 C12851514)、聚乙烯吡咯烷酮 K30(PVP-K30，批号 C12673616)、聚山梨酯 80(Tween-80, T80，批号 C15122420)，上海麦克林生化科技有限公司；羟丙基甲基纤维素(HPMC)，批号 D1908084，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；十二烷基硫酸钠(SDS)，批号 20171020，天津市福晨化学试剂厂；羧甲基纤维素钠(CMC-Na)，批号 1502010，安徽山河药用股份有限公司；透明质酸钠(SH)，批号 2021102704，山东焦点生物科技股份有限公司；乳糖，批号 0020211026，山东长霄生物工程有限公司；溴化钾，批号 MGD10014MK，河北科研生物科技有限公司；氧化锆珠子，直径为 0.4~0.6 mm，批号 20230705，萍乡市金祥新材料有限公司；甲醇，色谱纯，美国 Fisher Scientific 公司；磷酸，色谱纯，批号 20230201，天津市大茂化学试剂厂；水为去离子水以及娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 MMM 法制备 Emo-NS

称取适量大黄素原料药及稳定剂，置于 10 mL 西林瓶中，加入 5 mL 蒸馏水，加入搅拌子及适量直径为 0.4~0.6 mm 的氧化锆珠子，将西林瓶置于磁力搅拌器上，在一定的转速下搅拌研磨数小时，取出，滤过去除氧化锆珠子，即得 Emo-NS。

2.2 平均粒径及多分散指数(polydispersity index, PDI)的测定

取适量 Emo-NS 样品，用去离子水稀释至合适浓度，用马尔文纳米激光粒度仪测定粒径大小及反映粒度分布的 PDI 值，重复测定 3 次，取平均值。

2.3 单因素考察 Emo-NS 处方及制备工艺

2.3.1 稳定剂种类筛选 固定大黄素用量 50 mg、稳定剂用量 20 mg、氧化锆珠子体积 5 mL、研磨速

率 1 300 r/min、研磨时间 3 h，对稳定剂种类进行考察，结果见表 1。结果发现 P407 作为稳定剂所制备的 Emo-NS 平均粒径及 PDI 较小，因此选择 P407 为稳定剂制备 Emo-NS。

表 1 稳定剂种类对 Emo-NS 平均粒径及 PDI 的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effects of stabilizer types on average particle size and PDI of Emo-NS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

稳定剂种类	平均粒径/nm	PDI
PVA	921.06 ± 42.79**	0.41 ± 0.06**
PVP	336.74 ± 5.76**	0.36 ± 0.04**
HPMC	1 179.11 ± 46.97**	0.45 ± 0.10**
SDS	380.27 ± 7.87**	0.34 ± 0.03*
P188	336.04 ± 13.52**	0.32 ± 0.02
P407	293.74 ± 3.81	0.27 ± 0.02
CMC-Na	925.49 ± 20.69**	0.34 ± 0.05**
SH	464.69 ± 43.21**	0.37 ± 0.04**
CS	700.46 ± 44.08**	0.51 ± 0.09**
TW-80	321.66 ± 5.67*	0.30 ± 0.02

与 P407 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs P407 group.

2.3.2 稳定剂用量的考察 固定大黄素用量 50 mg、氧化锆珠子体积 5 mL、研磨速率 1 300 r/min、研磨时间 3 h，对稳定剂用量进行考察，结果见表 2。由结果可知，随着 P407 用量的增大，Emo-NS 平均粒径及 PDI 总体表现出先降低后升高的趋势，在 P407 用量为 20 mg 时，所制备 Emo-NS 的平均粒径及 PDI 较小，因此选择稳定剂 P407 用量为 20 mg。

2.3.3 大黄素用量的考察 固定 P407 用量 20 mg、氧化锆珠子体积 5 mL、研磨速率 1 300 r/min、研磨时间 3 h，对大黄素用量进行考察，结果见表 3。由结果可知，随着大黄素用量的增大，Emo-NS 平均粒径及 PDI 总体表现出先降低后升高的趋势，在大

表 2 稳定剂用量对 Emo-NS 平均粒径及 PDI 的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of stabilizer dosages on average particle size and PDI of Emo-NS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

稳定剂用量/mg	平均粒径/nm	PDI
5	389.31 ± 76.00**	0.37 ± 0.06**
10	343.22 ± 30.90**	0.33 ± 0.05**
15	292.31 ± 34.08	0.35 ± 0.06**
20	263.74 ± 3.69	0.24 ± 0.02
25	323.29 ± 23.34**	0.34 ± 0.04**

与 20 mg 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs 20 mg group.

表 3 大黄素用量对 Emo-NS 平均粒径及 PDI 的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of emodin dosages on average particle size and PDI of Emo-NS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

大黄素用量/mg	平均粒径/nm	PDI
30	384.32 ± 64.39**	0.37 ± 0.07**
40	299.46 ± 4.71*	0.30 ± 0.02**
50	263.74 ± 3.69	0.24 ± 0.02
60	305.34 ± 5.61**	0.29 ± 0.03*
70	364.74 ± 24.59**	0.38 ± 0.03**

与 50 mg 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs 50 mg group.

黄素用量为 50 mg 时，所制备 Emo-NS 的平均粒径及 PDI 较小，因此选择大黄素用量为 50 mg。

2.3.4 氧化锆珠子体积的考察 固定大黄素用量 50 mg、P407 用量 20 mg、研磨速率 1 300 r/min、研磨时间 3 h，对氧化锆珠子体积进行考察，结果见表 4。由结果可知，随着氧化锆珠子体积的增加，Emo-NS 的平均粒径及 PDI 总体表现出先降低后升高的趋势，在氧化锆珠子体积为 5 mL 时，Emo-NS 的平均粒径与 PDI 最小，因此选择氧化锆珠子体积为 5 mL。

表 4 氧化锆珠子体积对 Emo-NS 平均粒径及 PDI 的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effects of zirconia bead volumes on average particle size and PDI of Emo-NS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

氧化锆珠子体积/mL	平均粒径/nm	PDI
3	366.98 ± 9.89**	0.34 ± 0.03**
4	328.17 ± 24.21**	0.33 ± 0.03**
5	263.74 ± 3.69	0.24 ± 0.02
6	283.00 ± 4.86**	0.27 ± 0.03*
7	291.81 ± 4.80**	0.26 ± 0.01

与 5 mL 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs 5 mL group.

2.3.5 研磨速率的考察 固定大黄素用量 50 mg、P407 用量 20 mg、氧化锆珠子体积 5 mL、研磨时间 3 h，对研磨速率进行考察，结果见表 5。由结果可知，随着研磨速率的增加，Emo-NS 的平均粒径及 PDI 总体表现出先降低后升高的趋势，在研磨速率为 1 300 r/min 时，Emo-NS 的平均粒径与 PDI 最小，因此选择研磨速率为 1 300 r/min。

2.3.6 研磨时间的考察 固定大黄素用量 50 mg、P407 用量 20 mg、氧化锆珠子体积 5 mL、研磨速率 1 300 r/min，对研磨时间进行考察，结果见表 6。由结果可知，随着研磨时间的增加，Emo-NS 平均粒

表5 研磨速率对 Emo-NS 平均粒径及 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 5 Effects of grinding speeds on average particle size and PDI of Emo-NS ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

研磨速率/(r·min ⁻¹)	平均粒径/nm	PDI
1 100	308.03 ± 21.52**	0.32 ± 0.06**
1 200	300.72 ± 2.41**	0.30 ± 0.02*
1 300	263.74 ± 3.69	0.24 ± 0.02
1 400	300.19 ± 3.70**	0.27 ± 0.02
1 500	306.47 ± 21.61*	0.31 ± 0.06**

与 1 300 r·min⁻¹ 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs 1 300 r·min⁻¹ group.

表6 研磨时间对 Emo-NS 平均粒径及 PDI 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 6 Effects of grinding time on average particle size and PDI of Emo-NS ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

研磨时间/h	平均粒径/nm	PDI
1	446.83 ± 17.13**	0.45 ± 0.06**
2	338.58 ± 6.76**	0.31 ± 0.02**
3	263.74 ± 3.69	0.24 ± 0.02
4	279.03 ± 5.35**	0.25 ± 0.02
5	325.03 ± 6.83**	0.33 ± 0.07**

与 3 h 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs 3 h group.

径及 PDI 总体表现出先降低后升高的趋势, 在研磨时间为 3 h 时, Emo-NS 的平均粒径与 PDI 最小, 因此选择研磨时间为 3 h。

2.4 BBD-RSM 优化 Emo-NS 制备工艺

2.4.1 BBD-RSM 试验因素选择与试验设计 在 Emo-NS 制备过程中发现, 制备工艺参数之间的相互影响较大, 因此在单因素实验研究的基础上, 结合制备过程中的实际情况, 选择对 Emo-NS 制备工艺影响较显著的 3 个因素[即氧化锆珠子体积(X_1)、

研磨速率(X_2)和研磨时间(X_3)]进行进一步的交互效应考察, 以平均粒径(Y_1)和 PDI(Y_2)为响应值, 通过 BBD-RSM 对 Emo-NS 制备工艺进行优化, 各因素水平及试验设计与结果见表 7。

2.4.2 二次多元回归模型的建立及显著性分析 采用 Design-Expert 10.0.4 软件对数据进行处理和响应面设计中的制备工艺参数进行优化, 以 X_1 、 X_2 、 X_3 为自变量, 以 Y_1 和 Y_2 为因变量, 进行二次多项式方程拟合, 结果分别为 $Y_1 = 271.88 - 35.79 X_1 - 2.73 X_2 - 43.82 X_3 - 1.94 X_1 X_2 - 0.35 X_1 X_3 - 85.87 X_2 X_3 + 16.45 X_1^2 + 49.69 X_2^2 + 62.10 X_3^2$, $R^2 = 0.954 5$; $Y_2 = 0.250 - 0.038 X_1 - 0.021 X_2 - 0.043 X_3 - 2.500 \times 10^{-4} X_1 X_2 + 3.500 \times 10^{-3} X_1 X_3 - 0.081 X_2 X_3 + 0.043 X_1^2 + 0.053 X_2^2 + 0.064 X_3^2$, $R^2 = 0.887 2$ 。

方差分析结果见表 8。对于 Y_1 模型方程, $P = 0.000 7 < 0.01$, 极显著, 而失拟项 $P = 0.712 9 > 0.05$, 失拟不显著; 对于 Y_2 模型方程, $P = 0.013 1 < 0.05$, 显著, 失拟项 $P = 0.524 0 > 0.05$, 失拟不显著。说明该模型拟合度均良好, 可用于 Emo-NS 制备工艺的优化。

2.4.3 效应面分析与优化结果 以 X_1 、 X_2 、 X_3 为自变量, Y_1 和 Y_2 为因变量, 固定其中 1 个自变量, 通过 Design-Expert 10.0.4 软件绘制得到响应面图, 结果见图 1、2。Emo-NS 的最佳制备工艺为氧化锆珠子体积 5.922 mL, 研磨速率 1 385.034 r/min, 研磨时间 3.874 h; 结合实际制备情况, 最终确定工艺为氧化锆珠子体积 5.9 mL, 研磨速率 1 390 r/min, 研磨时间 3.9 h。

2.5 最佳处方工艺确定及验证

根据优化后的处方工艺: 大黄素用量 50 mg, 泊洛沙姆 407 用量为 20 mg, 氧化锆珠体积为 5.9 mL,

表7 BBD-RSM 试验设计与结果 ($n = 3$)

Table 7 BBD-RSM test design and test results ($n = 3$)

序号	X_1 /mL	X_2 /(r·min ⁻¹)	X_3 /h	平均粒径/nm	PDI	序号	X_1 /mL	X_2 /(r·min ⁻¹)	X_3 /h	平均粒径/nm	PDI
1	5 (0)	1 300 (0)	3 (0)	259.26	0.227	10	3	1 300	4	354.78	0.365
2	5	1 200 (-1)	2 (-1)	358.70	0.376	11	5	1 400	4	236.90	0.205
3	3 (-1)	1 400 (+1)	3	375.32	0.377	12	7 (+1)	1 300	4	271.34	0.271
4	3	1 200	3	361.14	0.375	13	3	1 300	2	428.82	0.458
5	5	1 300	3	259.28	0.247	14	5	1 300	3	263.22	0.256
6	5	1 400	2	509.20	0.454	15	7	1 300	2	346.77	0.350
7	5	1 300	3	256.98	0.215	16	7	1 200	3	304.59	0.324
8	5	1 200	4 (+1)	429.88	0.452	17	7	1 400	3	311.02	0.325
9	5	1 300	3	320.64	0.326						

表 8 二次多元回归方程方差分析结果

Table 8 Results of analysis of variance for quadratic multiple regression equations

方差来源	Y ₁				Y ₂			
	平方和	自由度	F值	P值	平方和	自由度	F值	P值
模型	85 438.800	9	16.320	0.000 7	0.098	9	6.120	0.013 1
X ₁	10 248.820	1	17.620	0.004 1	0.012	1	6.560	0.037 5
X ₂	59.787	1	0.100	0.757 9	3.445×10 ⁻³	1	1.940	0.206 0
X ₃	15 364.170	1	26.410	0.001 3	0.015	1	8.390	0.023 1
X ₁ X ₂	15.016	1	0.026	0.876 9	2.500×10 ⁻⁷	1	1.410×10 ⁻⁴	0.990 9
X ₁ X ₃	0.483	1	8.302×10 ⁻⁴	0.977 8	4.900×10 ⁻⁵	1	0.028	0.872 7
X ₂ X ₃	29 494.630	1	50.690	0.000 2	0.026	1	14.890	0.006 2
X ₁ ²	1 139.310	1	1.960	0.204 4	7.659×10 ⁻³	1	4.320	0.076 3
X ₂ ²	10 397.030	1	17.870	0.003 9	0.012	1	6.770	0.035 3
X ₃ ²	16 238.560	1	27.910	0.001 1	0.017	1	9.770	0.016 7
残差	4 072.668	7			0.012	7		
失拟项	1 080.100	3	0.480	0.712 9	4.923×10 ⁻³	3	0.880	0.524 0
纯误差	2 992.568	4			7.487×10 ⁻³	4		

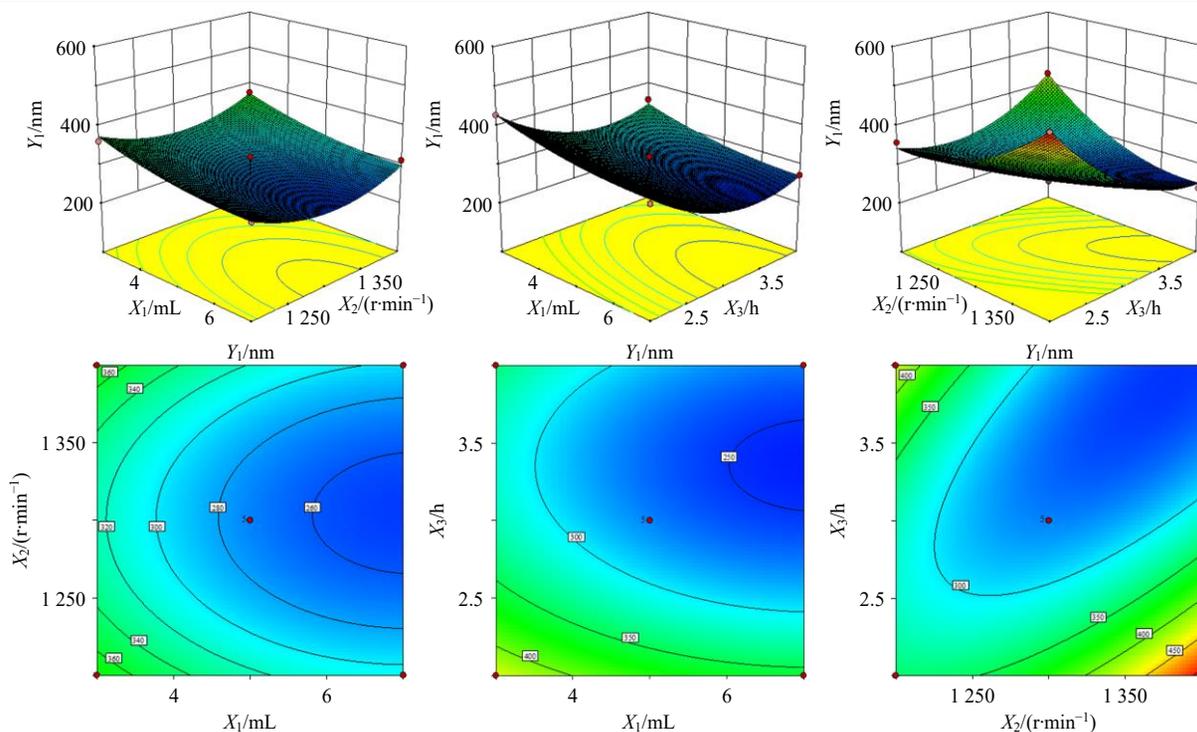


图 1 各因素对 Emo-NS Y₁ 影响的响应面和等高线图

Fig. 1 Response surface and contour plots of effect of each factor on Y₁ of Emo-NS

研磨速度为 1 390 r/min，研磨时间为 3.9 h，制备 3 批 Emo-NS，分别测定其平均粒径与 PDI，验证结果见表 9。平均粒径与 PDI 均值分别为(236.23±1.13) nm 与 0.205±0.011，与 BBD-RSM 预测值接近，重现性较好，表明该模型可用于 Emo-NS 处方工艺的优化。

2.6 Emo-NS 固化制备冻干粉研究

2.6.1 Emo-NS 冻干粉的制备工艺

NS 属于热力学

不稳定体系，若长期储存会造成药物粒子的聚集，因此在实际应用过程中将其制备成冻干粉来长期储存。取 5 mL Emo-NS，加入适量的冻干保护剂，于 -20 °C 冰箱中预冻 24 h，置于冻干机中，冷冻干燥 48 h，即得其冻干粉，密封保存，备用。

2.6.2 Emo-NS 冻干粉再分散性评价方法建立

取按“2.6.1”项下方法制备的 Emo-NS 冻干粉，加纯水复溶，测定复溶后的平均粒径与 PDI。

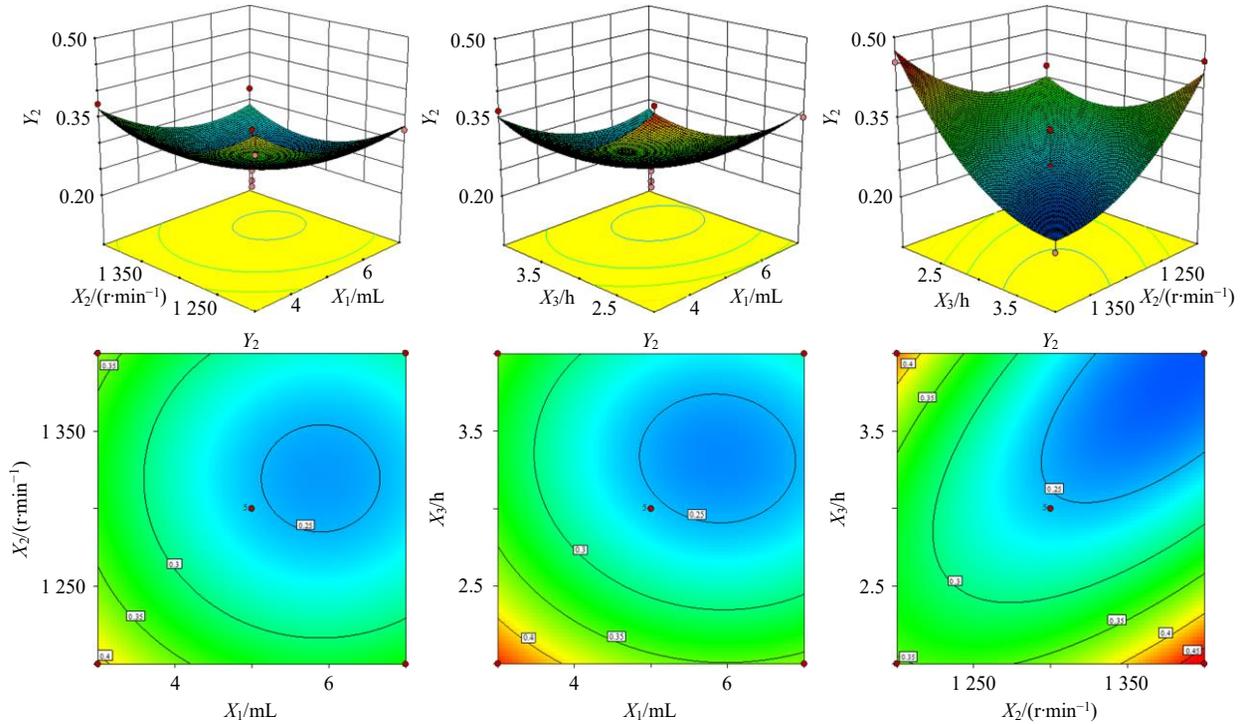


图 2 各因素对 Emo-NS Y_2 影响的响应面和等高线图

Fig. 2 Response surface and contour plots of effect of each factor on Y_2 of Emo-NS

表 9 处方工艺验证结果 ($n = 3$)

Table 9 Verification results of prescription process ($n = 3$)

序号	平均粒径/nm	PDI	粒径均值/nm	PDI 均值	粒径预测值/nm	PDI 预测值
1	236.20 ± 1.78	0.201 ± 0.013	236.23 ± 1.13	0.205 ± 0.011	236.90	0.219
2	236.60 ± 1.21	0.214 ± 0.011				
3	235.90 ± 0.36	0.199 ± 0.002				

2.6.3 冻干保护剂种类筛选 按“2.6.1”项下方法制备 Emo-NS 冻干粉，以复溶后的平均粒径及 PDI 为评价指标，对甘露醇、乳糖、蔗糖、葡萄糖 4 种冻干保护剂进行筛选，结果见表 10。当蔗糖作为冻干保护剂时，制备的 Emo-NS 冻干粉平均粒径变化最小，复溶后的平均粒径为 (272.04 ± 3.86) nm，PDI 值为 0.221 ± 0.014。

2.6.4 冻干保护剂用量考察 按“2.6.1”项下方法

表 10 Emo-NS 的冻干保护剂筛选 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Screening of freeze-dried protective agents of Emo-NS ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

保护剂种类	复溶后平均粒径/nm	复溶后 PDI
空白	371.01 ± 4.02**	0.356 ± 0.013**
甘露醇	331.22 ± 2.12**	0.350 ± 0.025**
乳糖	353.70 ± 2.16**	0.339 ± 0.010**
蔗糖	272.04 ± 3.86	0.221 ± 0.014
葡萄糖	295.01 ± 8.65**	0.311 ± 0.007**

与蔗糖组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs sucrose group.

分别制备含冻干保护剂蔗糖 3、5、7、10、30、50、70、90、100 mg/mL 的 Emo-NS 冻干粉，以复溶后的平均粒径及 PDI 为评价指标，对冻干保护剂的用量进行考察，结果见表 11。添加 50 mg/mL 蔗糖作为冻干保护剂的 Emo-NS 冻干粉，复溶后的平均粒径及 PDI 最小，因此选择冻干保护剂蔗糖质量浓度为 50 mg/mL。

2.7 Emo-NS 冻干粉短期储存稳定性考察

取制备好的 Emo-NS 冻干粉适量，于室温（温度 25 °C、湿度 55%）下放置，在不同时间点分别测定其平均粒径和 PDI 值，以研究 Emo-NS 冻干粉的短期储存稳定性，结果见表 12。从表中结果可以看出，在室温下储存 14 d，Emo-NS 冻干粉的粒径及 PDI 均未发生明显变化，表明其短期储存稳定性良好。

2.8 Emo-NS 的表征

2.8.1 粒径、PDI 及 ζ 电位考察 取适量 Emo-NS 样品，用去离子水稀释至合适浓度，采用马尔文激

表 11 蔗糖质量浓度对 Emo-NS 冻干粉再分散性的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 11 Effect of sucrose concentration on redispersibility of Emo-NS lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

蔗糖质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	复溶后平均粒径/nm	复溶后 PDI
3	396.02±8.34**	0.389±0.015**
5	328.90±24.53**	0.334±0.024**
7	302.22±8.52**	0.311±0.019**
10	296.59±3.41**	0.297±0.021**
30	286.81±4.30**	0.282±0.032**
50	265.21±6.96	0.200±0.006
70	313.32±5.91**	0.391±0.014**
90	374.87±14.83**	0.424±0.023**
100	394.54±28.74**	0.460±0.043**

与蔗糖质量浓度 50 mg·mL⁻¹ 组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01。

P*<0.05 *P*<0.01 vs sucrose concentration 50 mg·mL⁻¹ group.

表 12 Emo-NS 冻干粉短期储存稳定性考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 12 Investigation results of short-term storage stability table of Emo-NS freeze-dried test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

t/d	平均粒径/nm	PDI
0	265.21±6.96	0.200±0.006
3	266.30±0.55	0.198±0.010
7	268.80±2.75	0.200±0.007
14	269.73±1.50	0.210±0.008

光粒度仪测定其粒径分布及 PDI 值,重复测定 3 次。结果见图 3、4, 结果测得 Emo-NS 的平均粒径为 (236.23±1.13) nm, PDI 为 0.205±0.011, ζ 电位为 (-31.22±1.34) mV。

2.8.2 形态观察 Emo-NS 外观呈黄色, 结果如图

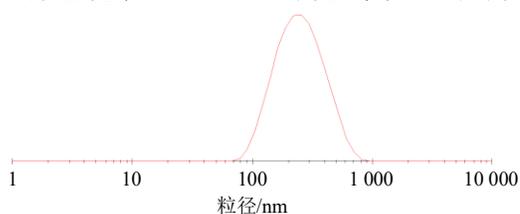


图 3 Emo-NS 粒径分布 (*n* = 3)

Fig. 3 Particle size distribution of Emo-NS (*n* = 3)

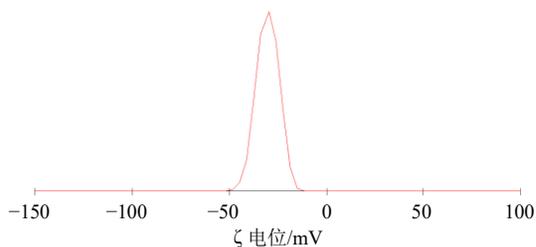


图 4 Emo-NS ζ 电位 (*n* = 3)

Fig. 4 ζ potential of Emo-NS (*n* = 3)

5-A 所示。取 Emo-NS 适量, 适当稀释后, 滴在 300 目的铜网上, 自然挥干后用 1% 磷钨酸染色, 吸干染色液后进行 TEM 观察, 结果如图 5-B 所示, Emo-NS 外貌呈球形, 分布比较均匀。

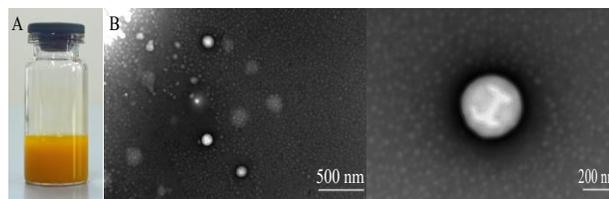


图 5 Emo-NS 外观 (A) 与 TEM 图 (×120 000, B)

Fig. 5 Appearance (A) and TEM diagram (×120 000, B) of Emo-NS

2.8.3 差示扫描量热 (differential scanning calorimetry, DSC) 分析 取大黄素原料药、P407、蔗糖、物理混合物 (大黄素原料药、P407、蔗糖的三者粉末混合) 以及 Emo-NS 冻干粉共 5 组样品, 分别置于铝钳锅中, 以空白钳锅为参比物, 采用差式扫描量热仪在氮气氛围下以 10 °C/min 的速率升温, 升温范围 20~300 °C, 进行 DSC 分析, 结果见图 6。大黄素原料药在 259.2 °C 处有 1 个明显的特征峰; P407 在 55.3 °C 处存在尖锐的熔点峰; 蔗糖在 191.3 °C 和 227.5 °C 处存在尖锐的熔点峰; 物理混合物仅是大黄素、P407 和蔗糖特征峰简单的叠加; 图中 Emo-NS 冻干粉仅存在辅料特征峰, 大黄素在 259.2 °C 处的特征吸收峰消失, 提示将大黄素制备成 Emo-NS 后晶型状态发生了变化, 可能是以无定型状态分散于 NS 中, 或被稳定剂完全包裹, 有利于药物的溶出。

2.8.4 X 射线衍射 (X-ray diffraction, XRD) 分析

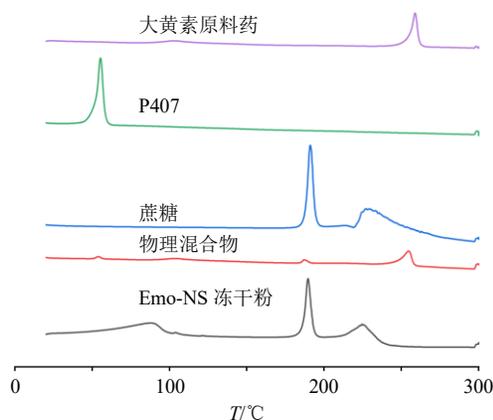


图 6 大黄素原料药、P407、蔗糖、物理混合物、Emo-NS 冻干粉的 DSC 分析图

Fig. 6 DSC analysis diagrams of emodin, P407, sucrose, physical mixture, and Emo-NS lyophilized powder

取大黄素原料药、P407、蔗糖、物理混合物以及 Emo-NS 冻干粉共 5 组样品, 采用 X 射线衍射仪在工作电压为 40 kV、电流为 40 mA、扫描角度为 5°~90°、扫描步长为 0.02°、入射线波长为 0.154 06 nm、扫描速率为 4°/min 的条件下进行 XRD 分析, 结果见图 7。大黄素原料药在 7.94°、9.97°、11.76°、13.14°、22.53°、26.25°、26.99°、28.41° 处有明显的衍射峰, 说明大黄素具有完整的晶型状态; 物理混合物中大黄素的晶体衍射峰强度有所减弱, 可能是大黄素在与辅料简单的物理搅拌混合过程中产生了较弱的相互作用, 但仍然能清晰地分辨出大黄素的特征衍射峰, 说明大黄素在介质中的晶体状态并未发生改变; Emo-NS 冻干粉中大黄素的特征衍射峰消失, 其结构由晶体转变为无定型状态, 或被稳定剂完全包裹。XRD 结果进一步验证了 DSC 的结果。

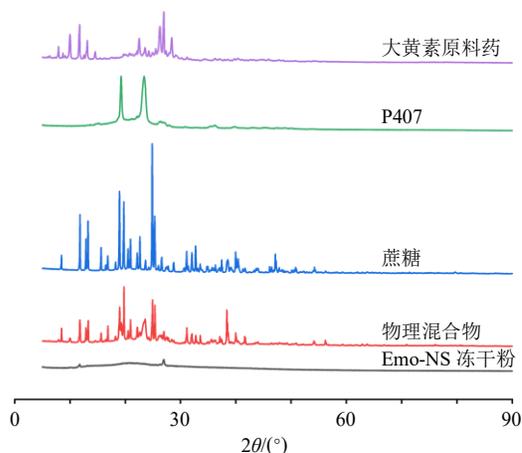


图 7 大黄素原料药、P407、蔗糖、物理混合物、Emo-NS 冻干粉的 XRD 图

Fig. 7 XRD diagrams of emodin, P407, sucrose, physical mixture, and Emo-NS lyophilized powder

2.8.5 傅里叶变换红外光谱 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR) 分析 取大黄素原料药、P407、蔗糖、物理混合物以及 Emo-NS 冻干粉共 5 组样品, 采用傅里叶变换红外/拉曼光谱仪在波数为 4 000~400 cm^{-1} 、分辨率为 4 cm^{-1} 的条件下进行扫描, 进行 FT-IR 分析, 结果见图 8。大黄素原料药在 1 750~500 cm^{-1} 处存在集中的吸收峰, 且在 3 417.30 cm^{-1} 处存在 O-H 吸收峰; 物理混合物出现与大黄素同样的吸收峰, 提示大黄素原料药与空白辅料进行物理混合后, 其化学结构未发生改变; Emo-NS 冻干粉与物理混合物曲线相比, 吸收峰峰形、强度和化学位移均发生改变, 表明大黄素在 Emo-NS 冻干粉中的化学结构可能发生了改变。FT-

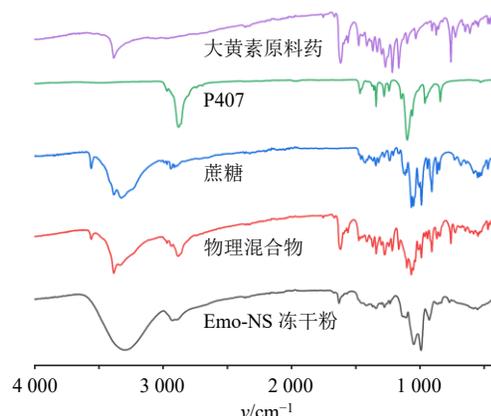


图 8 大黄素原料药、P407、蔗糖、物理混合物、Emo-NS 冻干粉的 FT-IR 图

Fig. 8 FT-IR diagrams of emodin, P407, sucrose, physical mixture, and Emo-NS lyophilized powder

IR 结果与 XRD 和 DSC 的实验结果相符。

2.9 Emo-NS 冻干粉体外释放研究

2.9.1 色谱条件 采用 HPLC 法测定 Emo-NS 冻干粉中大黄素的含量。色谱柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱; 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (85 : 15); 检测波长 254 nm; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 1 mL/min; 进样量 10 μL ; 理论塔板数以大黄素计不低于 3 000。

2.9.2 对照品溶液的制备 精密称取大黄素对照品 5.04 mg, 甲醇超声溶解并定容至 5 mL, 配制成质量浓度为 1.008 mg/mL 的对照品溶液。

2.9.3 供试品溶液的制备 精密称取 Emo-NS 冻干粉 10 mg, 加甲醇定容至 50 mL, 制得供试品溶液。

2.9.4 专属性考察 按照“2.9.1”项下色谱条件分别取大黄素对照品溶液、Emo-NS 冻干粉供试品溶液、溶剂甲醇各 10 μL , 进行 HPLC 测定, 由色谱图 (图 9) 提示, 在对照品色谱相应的位置上, 供试品溶液具有相同保留时间的色谱峰, 流动相在此峰位置处无吸收, 对 Emo-NS 冻干粉中大黄素的含量测定没有干扰峰, 方法专属性良好。

2.9.5 线性关系考察 精密吸取大黄素对照品溶液 0.1、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。按照“2.9.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 色谱峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程为 $Y=564.93 X-2.088 7$, $R^2=0.999 9$, 结果表明大黄素在 20.16~1 008.00 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.9.6 精密度考察 精密吸取 1.008 mg/mL 大黄素

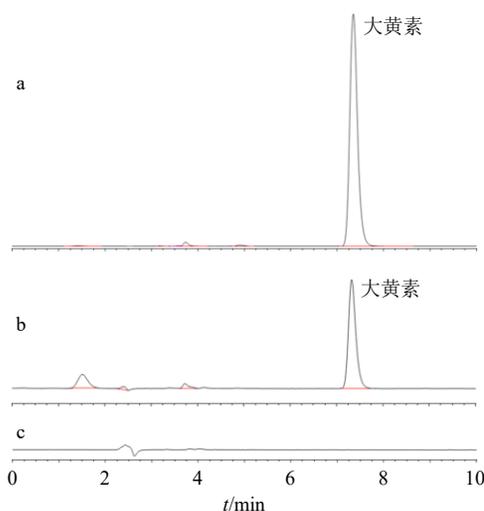


图9 大黄素对照品 (a)、Emo-NS 样品溶液 (b)、甲醇 (c) 的 HPLC 图

Fig. 9 HPLC of emodin reference substance (a), Emo-NS sample solution (b), and methyl alcohol (c)

对照品溶液 10 μL , 按照“2.9.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次。测定结果显示, 大黄素峰面积的 RSD 为 1.43%, 表明仪器的精密度良好。

2.9.7 稳定性考察 精密吸取 Emo-NS 冻干粉溶液 10 μL , 按照“2.9.1”项下色谱条件分别于制备后 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 记录峰面积。测定结果显示, 大黄素峰面积的 RSD 为 0.89%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.9.8 重复性考察 取同一批 Emo-NS 冻干粉样品 6 份, 分别按“2.9.3”项下方法制备 Emo-NS 冻干粉供试品溶液, 按照“2.9.1”项下色谱条件进行测定。结果显示, 大黄素质量分数的 RSD 为 2.04%, 表明该方法重复性良好。

2.9.9 加样回收率考察 精密称取已测定大黄素含量的 Emo-NS 冻干粉 6 份, 加甲醇定容, 每份 1 mL, 分别加入含量相当的大黄素对照品溶液, 按照“2.9.1”项下方法测定大黄素的含量, 计算加样回收率。结果显示, 大黄素的平均加样回收率为 101.62%, RSD 为 2.99%。

2.9.10 体外释放率测定及模型拟合 采用透析袋法^[4]测定大黄素原料药及 Emo-NS 冻干粉的体外释放率。取大黄素原料药以及 Emo-NS 冻干粉各 1 mg, 分散于 1 mL 释放介质 (含 0.5% CMC-Na 的去离子水) 中后将其加入截留相对分子质量 8 000~10 000 的即用型透析袋中, 两端扎口防止药物泄露, 将装载药物的透析袋置于含 100 mL 接收液 (含 3% SDS 的 pH 值 7.4 磷酸盐缓冲液) 的锥形瓶中, 加入磁力

搅拌转子, 释放介质温度控制在 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, 置于恒温磁力搅拌器中, 按 100 r/min 转速进行磁力搅拌, 分别于释放开始后 0.5、1、2、4、6、8、12、24、36、48、60、72、84、96、108、120、132、144 h 的时间点取 0.2 mL 接收液, 同时补加相同体积的同温新鲜释放介质。

将取出的接收液用 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取滤过液 10 μL 进样, 按 HPLC 法测定接收液中大黄素质量浓度, 并按下列公式计算大黄素的累积释放率 (cumulative release, Q), 重复进行 3 次, 结果见图 10。

$$Q = [C_i V_1 + (C_1 + C_2 + \dots + C_{i-1}) V_2] / M$$

C_1 、 C_2 、 \dots 、 C_i 为不同时间点释放介质中大黄素的质量浓度, V_1 为释放介质总体积, V_2 为每次所取的样品体积, M 为药物的初始量

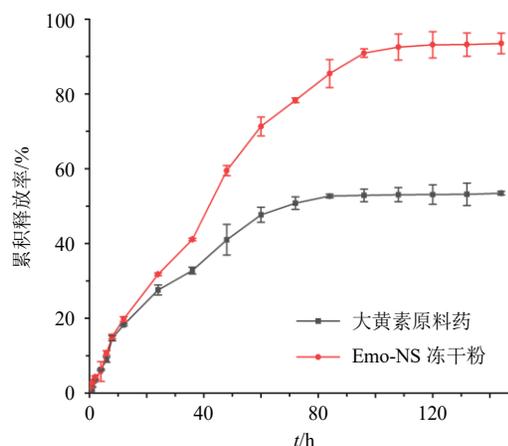


图10 大黄素原料药和 Emo-NS 冻干粉的体外释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 *In vitro* release curve of emodin and Emo-NS lyophilized powder ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

144 h 时, Emo-NS 冻干粉的体外累积释放率明显高于大黄素原料药, 其 144 h 累积释放率分别为 $(93.47 \pm 2.74)\%$ 和 $(53.46 \pm 0.50)\%$, 说明将大黄素制备成 Emo-NS 后, 体外释放情况得到显著提高, 其主要原因可能是因为 Emo-NS 粒径减小, 从而导致其比表面积增大, 溶出速率增加^[15]。

对两者的累积释放率分别进行零级、一级、Higuchi 以及 Ritger-Peppas 动力学方程模型拟合, 结果见表 13。由相关系数 (R^2) 可以看出, 大黄素原料药各模型的拟合优度为一级 > Higuchi > Ritger-Peppas > 零级, 符合一级释放模型; Emo-NS 冻干粉各模型的拟合优度为 Ritger-Peppas > 一级 > Higuchi > 零级, 符合 Ritger-Peppas 释放模型。

表 13 体外释放模型拟合
Table 13 *In vitro* release model fitting

模型	大黄素原料药		Emo-NS 冻干粉	
	拟合方程	R^2	拟合方程	R^2
Zero-order	$Q=0.438\ 58\ t+3.168\ 09$	0.846 58	$Q=1.032\ 64\ t+1.263\ 57$	0.966 79
First-order	$Q=54.813\ 10\ (1-e^{-0.032\ 32\ t})$	0.997 34	$Q=129.923\ 05\ (1-e^{-0.0117\ 40\ t})$	0.989 72
Higuchi	$Q=5.415\ 46\ t^{1/2}-3.512\ 39$	0.971 71	$Q=8.324\ 58\ t^{1/2}-4.714\ 76$	0.973 60
Ritger-Peppas	$Q=3.229\ 21\ t^{0.593\ 29}$	0.950 68	$Q=2.781\ 75\ t^{0.762\ 44}$	0.991 91

综上, 采用 MMM 法将大黄素制备成 Emo-NS 是提高其溶出速率的有效手段。

2.10 载药量的测定

取 5 mL Emo-NS 至 5 mL 量瓶中, 加入甲醇超声处理 5 min, 甲醇定容至刻度, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 在“2.9.1”项下色谱条件进样测定, 计算大黄素质量 (M_1), 平行 3 次; 另取 5 mL Emo-NS, 不添加保护剂进行直接冻干, 称定质量 (M_2), 平行 3 次, 计算载药量。测定结果显示, Emo-NS 冻干粉中大黄素的平均载药量为 (57.32 \pm 0.72) %。

$$\text{载药量} = M_1/M_2$$

3 讨论

本研究采用 MMM 法成功制备了平均粒径在 200 nm 左右、PDI<0.3 的 Emo-NS。

NS 的制备方法有“由上到下”(top-down)和“由下到上”(bottom-up)以及组合法 3 种类型, MMM 法是对传统介质研磨法的改良, 属于“top-down”制备法的一种。介质研磨法已经实现了多个产品的上市, 如 Rapamune、Emend、Tricor 和 Megace ES^[16], 具有操作简便、生产成本低、效率高、可控性强、重现性好等特点, 且因制备过程可控制温度而适用于热不稳定性药物, 适合于工业化大规模生产, 并且被广泛应用于各个领域^[17]。但它需要专门的介质研磨机, 设备费用昂贵, 且一次制备所需原料药较多, 制剂成型前系统的处方和工艺优化过程造成大量原料药的浪费^[18-19]。MMM 法是将介质研磨法的制备规模按比例缩小至实验室规模, 装置仅需磁力搅拌器、西林瓶等, 简单易得, 研磨效率较高, 装置体积小, 一次制备量仅需几十毫克样品, 能够有效节约原料^[18,20], 更适合前期在实验室的制剂处方及工艺研究^[13]。在本方法中, 磁力搅拌器是系统的动力装置, 也是破碎药物粒子的能量来源, 磁力搅拌器通过搅拌子旋转带动研磨介质和药物粗混悬液, 使它们在玻璃研磨室内可以共同涡旋流动, 在该过程中药物粒子会与研磨介质之间不断发生碰

撞与摩擦, 被逐渐破碎成细小的颗粒^[18], 最终形成均匀的 NS。

在 NS 的制备过程中, 稳定剂种类和用量对保持药物纳米粒的稳定至关重要, 会直接影响 NS 的物理稳定性, 其机制包括空间立体稳定、静电稳定等^[21]。本研究对多种稳定剂进行了筛选, 发现当使用 P407 时制备所得 Emo-NS 的平均粒径较小, 其原因可能为 P407 为非离子型表面活性剂, 可提供较大的空间阻力, 起到空间位阻作用, 从而防止 NS 聚集^[22-23]。

冷冻干燥法是 NS 固化的常用方法, 在冷冻干燥过程中, 一般加入一定量的冻干保护剂来发挥骨架支撑作用, 用以减小冷冻损伤和固化损伤^[24-25]。本研究考察加入不同种类及用量的冻干保护剂, 结果发现添加质量浓度为 50 mg/mL 蔗糖的冻干粉, 复溶后的平均粒径和 PDI 最小, 得到的 Emo-NS 冻干粉成型好、外观疏松饱满, 更易于进一步的转移和保存, 理论认为冻干保护剂在干燥过程中, 可替代水与药物纳米粒形成氢键, 从而保持冻干粉的稳定^[26]。本研究通过对 Emo-NS 冻干粉的稳定性进行考察, 经室温放置 14 d 后平均粒径及 PDI 变化较小, 表明其短期储存稳定性良好, 后期将对 Emo-NS 冻干粉的长期稳定性进行更加深入的研究。

在 NS 的制备过程中, 药物的晶型可能会发生改变, 进而影响药物的溶解度和溶出度。本研究采用 DSC 分析法、XRD 法和 FT-IR 法对大黄素原料药和 Emo-NS 冻干粉进行晶型分析, 以考察 MMM 法和冻干处理对大黄素晶型的影响。结果表明, 将大黄素制备成 Emo-NS 后, 晶型发生变化, 以无定型状态分散于 NS 中或被稳定剂完全包裹, 有利于其溶出。

体外释放结果显示, Emo-NS 体外累积释放率明显优于大黄素原料药, 分析其原因可能是: 根据 Ostwald-Freundlich 方程, 药物粒径与药物的溶解度及溶出速率成正相关, 当将大黄素制备成 Emo-NS

后,可以提供比较大的分散面积与较小的药物粒径,渗透性增强,从而使药物的溶出度得到了提高^[22,27]。

综上所述,本研究制备的 Emo-NS,制备工艺精简可控、易于产业化、效率高,制剂短期储存稳定性好,以期有助扩大大黄素的剂型应用范围,同时可为后续该制剂相关剂型的开发、药效学评价等方面奠定坚实基础,从而有利于其临床推广。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 韩思琪, 哈伟, 师彦平. 大黄及其有效成分抗炎作用的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(1): 303-316.
- [2] 唐铭坚, 谭礼萍, 刘争红, 等. 大黄的药理活性研究进展 [J]. 中国热带医学, 2012, 12(7): 886-889.
- [3] 王帅兵, 熊良伟, 季振南. 大黄素对嗜水气单胞菌的抑菌作用及其机制 [J]. 中国兽医杂志, 2023, 59(3): 140-146.
- [4] 陈伟凡, 皮佩仙, 李继蕾, 等. 大黄蒽醌类有效成分抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中成药, 2022, 44(11): 3587-3595.
- [5] 胡莉芸, 谭佳颖, 沈隽, 等. 大黄素对盲肠结扎穿孔脓毒症大鼠模型各器官氧化应激与炎症反应的保护作用 [J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(7): 1388-1395.
- [6] 马明星, 黄嫒, 李明娟, 等. 大黄素新型制剂抗肿瘤作用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2016, 44(27): 144-146.
- [7] 李晓蒙, 郑妮媚, 张智强. 柚皮素磷脂复合物纳米混悬剂制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2024, 46(1): 41-48.
- [8] 王柯静, 决利利, 常宝珠, 等. 柠檬苦素纳米混悬剂和冻干粉的制备及体外评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(13): 1471-1478.
- [9] 罗开沛, 严春梅, 杨露, 等. 以甘草酸为稳定剂的姜黄素-水飞蓟宾共载纳米混悬剂的制备及体外评价 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 4823-4831.
- [10] 李晓婷, 决利利, 郝海军, 等. 隐丹参酮纳米混悬剂的制备及其抗肿瘤活性 [J]. 中成药, 2021, 43(1): 6-10.
- [11] 毛艳婷, 陶兴茹, 张胜男, 等. 漆黄素纳米混悬剂和冻干粉末的制备及体外评价 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(4): 393-398.
- [12] 郑爱萍, 石靖. 纳米晶体药物研究进展 [J]. 国际药学研究杂志, 2012, 39(3): 177-183.
- [13] 黄甜甜, 沈一平, 路丽康, 等. 高载药量雷公藤红素纳米混悬剂的制备及体外评价 [J]. 中草药, 2020, 51(8): 2125-2133.
- [14] 梁新丽, 鲁永锋, 汪新婵, 等. 姜黄素纳米晶混悬液制备、表征及体内外药剂学性质评价 [J]. 中国新药杂志, 2023, 32(21): 2198-2209.
- [15] 程佳慧, 刘喜纲, 常金花, 等. 不同稳定剂种类对齐墩果酸纳米混悬剂溶出度的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(22): 2327-2331.
- [16] 岳鹏飞, 刘阳, 谢锦, 等. 药物纳米晶体制备技术30年发展回顾与展望 [J]. 药科学报, 2018, 53(4): 529-537.
- [17] Liu P, Rong X Y, Laru J, et al. Nanosuspensions of poorly soluble drugs: Preparation and development by wet milling [J]. *Int J Pharm*, 2011, 411(1/2): 215-222.
- [18] 申宝德, 连王权, 沈成英, 等. 微型化介质研磨法制备难溶性黄酮类化合物纳米混悬剂 [J]. 中草药, 2017, 48(21): 4413-4418.
- [19] 连王权, 沈成英, 申宝德, 等. 微型化介质研磨法制备延胡索乙素纳米混悬剂 [J]. 沈阳药科大学学报, 2020, 37(3): 202-209.
- [20] 胡春晓, 左洁杰, 申宝德, 等. 落新妇苷纳米混悬剂冻干粉的制备及体外溶出考察 [J]. 解放军药学学报, 2018, 34(2): 120-123.
- [21] 寇应琳, 徐向宇, 孙宁. 染料木素纳米混悬剂制备及其体内药动学研究 [J]. 中成药, 2023, 45(4): 1045-1051.
- [22] 胡宇峰, 马思媛, 王梦琳, 等. 延胡索乙素纳米混悬剂制备及体外评价 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(8): 18-24.
- [23] 申献玲, 张洪, 彭锐. 泊那替尼纳米混悬剂的表面活性剂筛选及其稳定性考察 [J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(12): 1147-1150.
- [24] 杜俊锋, 涂亮星, 胡凯莉, 等. 葛根素纳米晶的制备工艺及其表征 [J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(4): 369-372.
- [25] 宗时宇, 刘洋, 王春柳, 等. 丹皮酚纳米混悬剂的制备及固化 [J]. 中国新药杂志, 2023, 32(20): 2099-2105.
- [26] 吕舰, 张洪, 王丽, 等. 氯雷他定纳米混悬剂冻干粉制备及其溶出度考察 [J]. 中国药师, 2018, 21(5): 809-813.
- [27] 靳世英, 袁海龙, 靳士晓, 等. 黄芩苷纳米晶体微丸的制备及其药代动力学初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1156-1159.

[责任编辑 郑礼胜]