

川芎嗪微乳的制备及不同粒径微乳体外释放对比研究

钟琳瑛, 田湾湾, 刘彩凤, 张琦, 梁军, 刘蕾蕾, 李鹏跃*, 杜守颖*
北京中医药大学, 北京 102488

摘要:目的 研究川芎嗪微乳递药系统的制备工艺, 对其物理药剂学性质进行评价; 以不同油相制备不同粒径大小的微乳, 考察粒径因素对制剂释药行为的影响。方法 以川芎嗪溶解度为指标, 筛选油相、乳化剂、助乳化剂; 采用伪三元相图法对微乳处方进行优化; 采用超滤离心法对载药量、包封率进行研究; 采用马尔文粒径仪对粒径、电位进行检测; 采用透析袋法对不同粒径微乳的释药行为进行对比研究。结果 成功制备了川芎嗪微乳, 外观澄清透明, pH 均值约为 5.46; 成功建立了微乳包封率的检测方法; 川芎嗪载药量为 1.2 mg/mL 时, 包封率为 $(87.43 \pm 0.20)\%$ 。通过改变油相(油酸乙酯、油酸、IPM)制备不同粒径的微乳, 当载药量为 1.2 mg/mL 时 3 者的粒径分别为 (16.80 ± 0.91) 、 (129.50 ± 1.21) 、 (18.51 ± 0.24) nm。释放实验显示, 在 4 h 内 3 者释放率均能达到 90% 以上, 无显著性差异。结论 成功制备了均一、稳定的川芎嗪微乳; 不同粒径川芎嗪微乳的释药行为不受粒径因素的影响。

关键词: 川芎嗪; 微乳; 递药系统; 粒径; 伪三元相图; 体外释放; 物理药剂学; 超滤离心法; 载药量

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)21-5231-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.21.015

Preparation of ligustrazine microemulsion and comparative study on *in vitro* release of different size microemulsions

ZHONG Lin-ying, TIAN Wan-wan, LIU Cai-feng, ZHANG Qi, LIANG Jun, LIU Lei-lei, LI Peng-yue,
DU Shou-ying

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To study the preparation process of ligustrazine microemulsion delivery system and evaluate its physical pharmacy properties; Microemulsions of different particle sizes were prepared in different oil phases, and the effect of particle size factors on the release behavior of the preparation was investigated. **Methods** Taking the solubility of ligustrazine as index, the oil phase, emulsifier, and co-emulsifier were screened. The microemulsion formulation was optimized by pseudo-ternary phase diagram method. The encapsulation efficiency and drug loading was studied by ultrafiltration centrifugation. The particle size and potential were detected by the particle size analyzer. The release behavior of microemulsions with different particle sizes was compared by dialysis bag method. **Results** The tetramethylpyrazine microemulsion was successfully prepared, and the appearance was clear and transparent. The average pH value was about 5.46. The detection method of microemulsion encapsulation rate was successfully established. When the drug loading of ligustrazine was 1.2 mg/mL, the encapsulation efficiency was $(87.43 \pm 0.20)\%$. The microemulsions of different particle sizes were prepared by changing the oil phase (ethyl oleate, oleic acid, and IPM). When the drug loading was 1.2 mg/mL, the three particle sizes were (16.80 ± 0.91) , (129.50 ± 1.21) , and (18.51 ± 0.24) nm, respectively. The release test showed that the release rate of all three could reach more than 90% within 4 h, and there was no significant difference. **Conclusion** The uniform and stable tetramethylpyrazine microemulsion is successfully prepared; The release behavior of different tetramethylpyrazine microemulsions is not affected by the particle size factor.

Key words: ligustrazine; microemulsion; particle size; pseudo-ternary phase diagram; *in vitro* release; physical pharmacy; centrifugation ultrafiltration; drug loading

收稿日期: 2019-06-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(81803738); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2018-JYBZZ-JS019); 北京中医药大学自主课题项目(2019-JYB-XS-068)

作者简介: 钟琳瑛, 在读硕士, 从事中药新剂型与新技术研究。E-mail: zhonglinying01@163.com

*通信作者 杜守颖, 博士, 博士生导师, 从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (010)84738615 E-mail: Dushouying@263.net

李鹏跃, 博士, 副教授, 从事中药新剂型与新技术研究。Tel: (010)53912123 E-mail: pengyuelee@126.com

川芎嗪是从伞形科藁本属植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 中提取的一种活性生物碱单体,是新型的钙离子通道拮抗剂,在缺血性脑血管疾病和冠状动脉粥样硬化性疾病治疗方面备受青睐^[1],具有改善脑缺血、扩张脑血管、保护血管内皮、抗缺血再灌注损伤、抗炎、抗氧化应激等多种心脑血管药理作用^[2-6]。药动学研究表明,川芎嗪在体内具有代谢迅速、排泄快、生物利用度低的特点^[7-8]。基于川芎嗪的显著疗效,提高其生物利用度成为亟待解决的问题。

微乳是油相、亲水相、乳化剂、助乳化剂按照适当的比例混合均匀,自发形成的各向同性、外观透明、热力学相对稳定的分散体系。微乳可有效提高难溶性药物的溶解度,粒径小且分布均匀,促进大分子药物的吸收,提高生物利用度,同时具有脑靶向性好、稳定性高、刺激性低的优势^[9-12]。基于川芎嗪有特殊臭味、易升华、吸湿性强,在水和油中溶解性差的特点,制备成微乳液可防止药物挥发、消除药物特殊臭味,提高药物的稳定性,发挥更好的治疗作用。

纳米载药系统粒径分布在 10~1 000 nm,因其独特的结构特点和理化性质在疾病治疗方面受到广泛研究和应用。研究表明,纳米制剂的颗粒大小对纳米粒子在体内的吞噬、转运、吸附等药动学行为产生一定的影响^[13-14]。基于此,本研究采用伪三元相图法制备不同油相的川芎嗪微乳,不同的粒径大小,其比表面积的差异性可能影响纳米制剂的释药行为,进而可能影响纳米制剂的体内药动学。通过透析法对不同油相的川芎嗪微乳体外释放率进行对比研究,并对其物理药剂学性质进行评价。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AD 高效液相色谱仪,日本岛津公司,SPD-M20A 230V 光电二极管阵列检测器,LC Solution 色谱工作站;TK-20B 型透皮扩散试验仪,上海皆凯科技贸易有限公司;G20 型医用离心机,北京白洋医疗器械有限公司;赛多利斯 BSA224S 电子分析天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;HJ-4H 多头恒温磁力搅拌器,常州市凯航仪器有限公司;Zetasizer Nano ZS 激光粒度仪,英国马尔文仪器有限公司。

1.2 试剂与试药

磷酸川芎嗪对照品,中国食品药品检定研究院,

批号 100845-201603,质量分数 92.7%;2,3,5,6-四甲基吡嗪,北京华威锐科化工有限公司;聚氧乙烯 35 蓖麻油(EL-35),上海源叶生物科技有限公司;乙醇(分析纯)、油酸乙酯、油酸,北京化工厂;聚山梨酯 80(Tween 80, T80),天津市光复精细化工研究所;肉豆蔻酸异丙酯(IPM),上海麦克林生化科技有限公司;辛酸癸酸聚乙二醇甘油酯(Labrasol),嘉法狮(上海)贸易有限公司;聚乙二醇 400(PEG 400),西陇化工股份有限公司;甲醇, Fisher 公司,色谱级;娃哈哈纯净水,杭州娃哈哈集团有限公司。

2 方法与结果

2.1 川芎嗪在各油相、乳化剂、助乳化剂中的溶解度考察

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Inert Sustain AQ-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(60:40);体积流量为 1 mL/min;检测波长为 290 nm;柱温 30 °C;进样量 10 μL。色谱图见图 1。

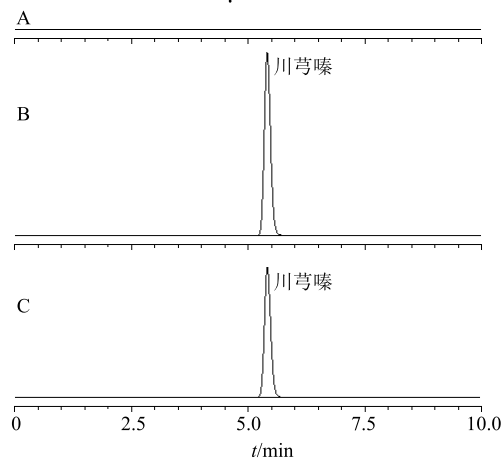


图 1 空白对照 (A)、川芎嗪对照品溶液 (B) 和载川芎嗪的油酸乙酯溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of blank sample (A), ligustrazine reference solution (B), and sample solution (C)

2.1.2 线性关系考察 精密称取磷酸川芎嗪对照品适量,加甲醇配制成系列质量浓度为 5.84、29.20、58.40、116.80、233.60、584.00 μg/mL 的磷酸川芎嗪对照品溶液。按照“2.1.1”项色谱条件进样 10 μL,记录峰面积。以样品色谱峰面积(A)对质量浓度(C)进行线性回归,得回归方程为 $Y=17\ 926 X+41\ 429$, $r=0.999\ 9$,结果表明川芎嗪在 5.84~584.00 μg/mL 线性关系良好。

2.1.3 精密度试验 取低、中、高质量浓度(5.84、233.60、584.00 μg/mL)的川芎嗪对照品溶液,连续进样 3 次,记录峰面积,其 RSD 值分别为 0.73%、

0.07%、0.02%，表明仪器日内精密度良好。

2.1.4 稳定性试验 取“2.1.5”项下，川芎嗪在油酸乙酯中溶解 48 h 时的样品，分别在 0、2、4、6、8、10、12、24 h 按照“2.1.1”项色谱条件进样测定，计算川芎嗪峰面积 RSD 值为 0.44%，表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.1.5 溶解度试验 参考文献报道方法^[7]，测定川芎嗪在不同油相（油酸、油酸乙酯、IPM、大豆油）、不同乳化剂（T80、EL-35、Labrasol）、不同助乳化剂（1,2-丙二醇、丙三醇、无水乙醇、PEG 400）中的溶解度。室温下，取过量的川芎嗪，分别加入 5 mL 上述各溶媒，350 r/min 水浴搅拌 48 h，使药物充分溶解，平行操作 2 份。分别在 3、9、12、24、48 h 取样，每次取 1 mL，于 10 000 r/min 下离心 10 min，取 20 μ L 上清液加入到 10 mL 量瓶中，精密称定质量，甲醇定容至刻度线，HPLC 法测定川芎嗪含量，结果见表 1。结果显示，对于油相，川芎嗪在油酸、油酸乙酯、IPM 中的溶解度大小接近，约为 120 mg/g，均明显高于在大豆油中的溶解度，因此选择油酸、油酸乙酯、IPM 这 3 种油相做进一步考察。对于乳化剂，川芎嗪在 T80、EL-35 中的溶解度大小接近，约为 100 mg/g，明显高于在 Labrasol 的溶解度，因此选择 T80、EL-35 这 2 种乳化剂做进一步考察。对于助乳化剂，川芎嗪在无水乙醇中的溶解度为 156.5 mg/g，显著高于在 1,2-丙二醇、丙三醇、PEG 400 中的溶解度，因此选择无水乙醇作为助乳化剂。

2.2 川芎嗪微乳制备工艺

采用油酸乙酯、油酸、IPM 为油相，EL-35、T80 为乳化剂，无水乙醇为助乳化剂，通过滴加水相的方法制备微乳，记录体系的临界变化点，绘制伪三元相图，考察各组分及比例对微乳形成的影响，优化处方。

表 1 川芎嗪在不同油相、乳化剂、助乳化剂中的溶解度 (n = 2)

Table 1 Solubility of ligustrazine in different oil phase, emulsifier, and surfactant (n = 2)

溶媒	平衡溶解度/%	溶媒	平衡溶解度/%
油酸	12.21	Labrasol	8.69
油酸乙酯	12.56	1,2-丙二醇	1.73
IPM	12.35	丙三醇	1.86
大豆油	9.65	无水乙醇	15.65
T80	10.44	PEG 400	9.46
EL-35	10.89		

2.3 微乳油相的筛选

精密称取 EL-35 作为乳化剂，无水乙醇作为助乳化剂，乳化剂与助乳化剂质量比 (K_m) 为 2 : 1 混合均匀，制成混合乳化剂。将混合乳化剂分别与油酸、油酸乙酯、IPM，按照质量比 9 : 1、8 : 2、3 : 7、4 : 6、5 : 5、6 : 4、7 : 3、8 : 2、9 : 1 精确称量，置于 20 mL 西林瓶中，350 r/min 磁力搅拌混合均匀，以纯净水滴定，每滴 1 次待其充分混合均匀，观察液体的形态变化，同时以入射光照射，观察是否有丁达尔效应现象，记录体系的临界变化点。计算临界点时油相、乳化剂、助乳化剂在微乳体系中的质量分数，借助 Origin Pro 9.1 软件绘制微乳的伪三元相图，确定 O/W 型微乳区（阴影区）。结果见图 2。结果显示，以油酸乙酯为油相的体系相图中，微乳区域面积最大，故选择油酸乙酯为油相。

2.4 微乳乳化剂的筛选

精密称取油酸乙酯作为油相，无水乙醇作为助乳化剂，EL-35、T80 作为乳化剂， K_m 为 2 : 1 混合均匀，制成混合乳化剂。将混合乳化剂分别与油酸乙酯，按照质量比 9 : 1、8 : 2、3 : 7、4 : 6、5 : 5、6 : 4、7 : 3、8 : 2、9 : 1 精确称量，置于 20 mL 西林瓶中，后续操作同“2.3”项。结果见图 3。结果

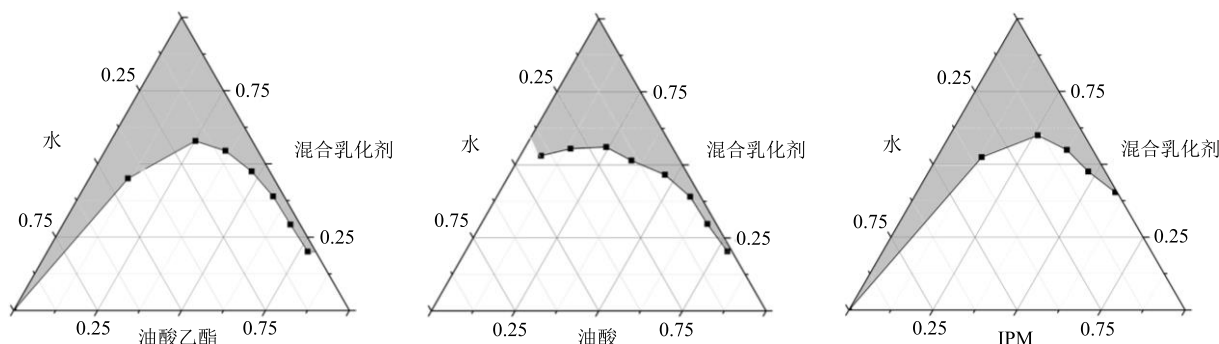


图 2 不同油相形成川芎嗪微乳的伪三元相图

Fig. 2 Pseudo-ternary phase diagram of ligustrazine microemulsion formed by different oil phases

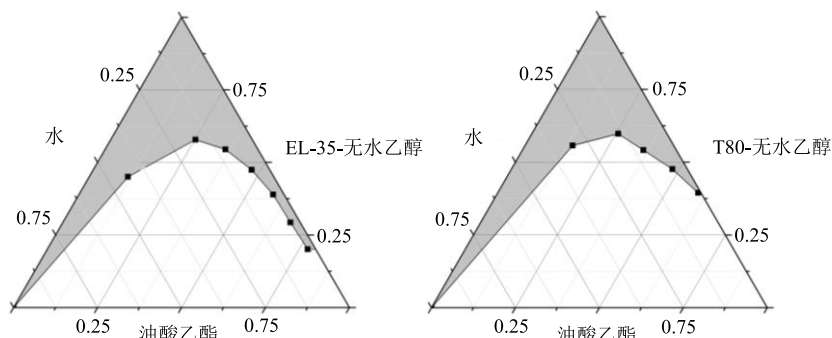


图 3 不同乳化剂形成川芎嗪微乳的伪三元相图

Fig. 3 Pseudo-ternary phase diagram of ligustrazine microemulsion formed by different emulsifiers

显示以 EL-35 为乳化剂的体系相图中，微乳区域面积比 T80 为乳化剂的微乳面积大，因此，选择乳化剂为 EL-35。

2.5 K_m 值的筛选

精密称取 EL-35 作为乳化剂，无水乙醇作为助乳化剂， K_m 为 3 : 1、2 : 1、1 : 1、1 : 2、1 : 3 分别混合均匀，制成混合乳化剂。将混合乳化剂与油酸乙酯按照质量比 9 : 1、8 : 2、3 : 7、4 : 6、5 : 5、6 : 4、7 : 3、8 : 2、9 : 1 精确称量，置于 20 mL 西林瓶中，后续操作同“2.3”项。结果见图 4。结果显示， K_m 值由 1 : 3 增大到 2 : 1 时，微乳区域逐渐增大，当 K_m 值由 2 : 1 增大到 3 : 1 时微乳区域减小，微乳区域的澄清点呈现上移趋势，当 $K_m=2 : 1$ 时，形成的微乳区域面积最大，故选择 $K_m=2 : 1$ 。

2.6 川芎嗪微乳制备工艺验证

取适量川芎嗪加入到油酸乙酯中，搅拌混合均匀，控制川芎嗪浓度为 120 mg/g，取该载药油相 0.1 g，EL-35-无水乙醇 ($K_m=2 : 1$) 的混合乳化剂 0.9 g 于 10 mL 西林瓶中，室温下以 350 r/min 磁力搅拌，使其充分混匀。逐滴加入纯净水不断搅拌至混合均匀，固定总质量 10 g，即得川芎嗪微乳。平行重复 3 批，均制得澄清、均一、泛淡紫色乳光的微乳，与筛选的最优微乳处方一致，重复性良好。

2.7 微乳中川芎嗪的含量测定

2.7.1 色谱条件 色谱柱为 Inert Sustain AQ-C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)；流动相为甲醇-0.15% 磷酸水溶液 (60 : 40)；体积流量为 1 mL/min；检测波长为 290 nm；柱温 30 °C；进样量 10 μL。理论

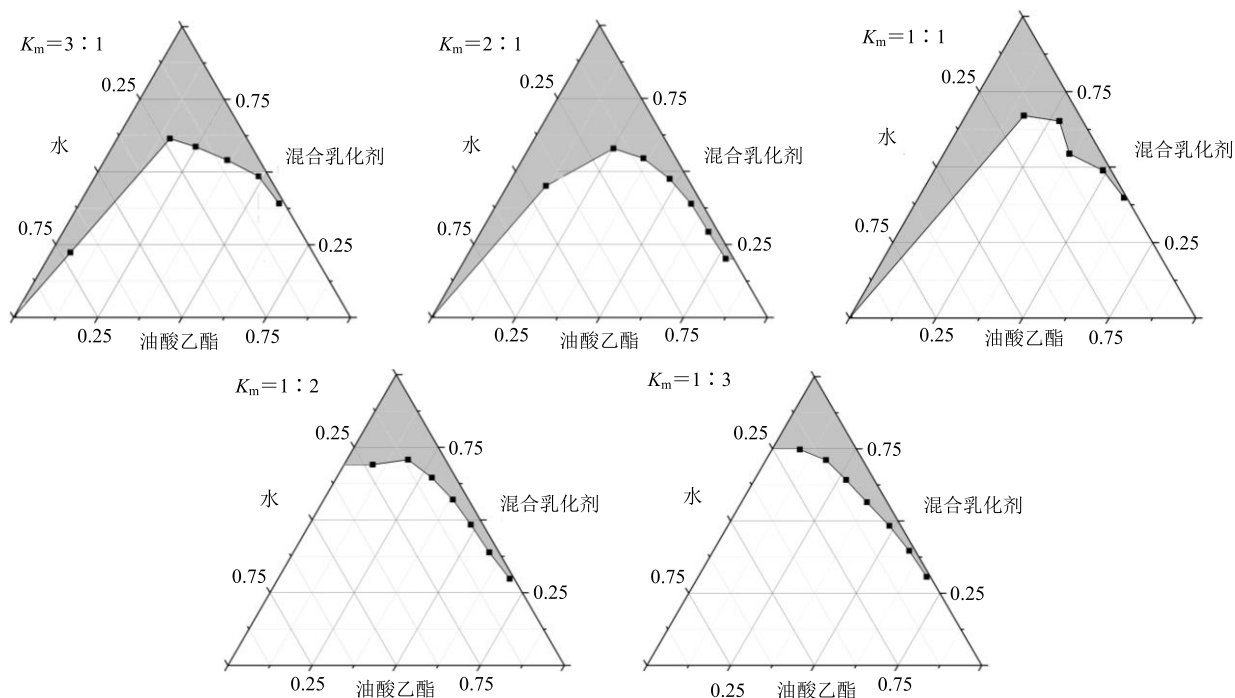


图 4 不同 K_m 值形成川芎嗪微乳的伪三元相图

Fig. 4 Pseudo-ternary phase diagram of ligustrazine microemulsion formed at different K_m values

塔板数按照川芎嗪色谱峰计算不低于 8 000。色谱图见图 5。

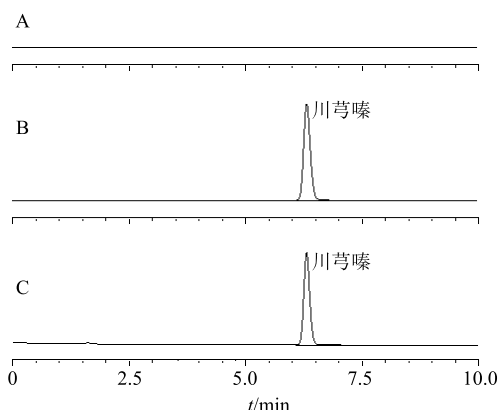


图 5 空白对照 (A)、川芎嗪对照品 (B) 和川芎嗪微乳 (C) 的 HPLC 图

Fig. 5 HPLC of blank sample (A), ligustrazine reference solution (B), and ligustrazine microemulsion sample solution (C)

2.7.2 线性关系考察 精密称取磷酸川芎嗪对照品适量, 加甲醇配制成系列质量浓度分别为 11.68、29.20、58.40、93.44、116.80、233.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的磷酸川芎嗪对照品溶液。按照“2.6.1”项色谱条件进样 10 μL , 记录峰面积。以样品色谱峰面积 (A) 对质量浓度 (C) 进行线性回归, 得回归方程为 $Y=18\,393\,X+6\,865.8$, $r=1.000\,0$, 结果表明川芎嗪在 11.68~233.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好。

2.7.3 专属性实验

(1) 空白体系微乳的配制: 取空白微乳 1 g, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。

(2) 供试品溶液的配制: 取载药微乳 1 g, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 即得。

按照“2.7.1”项色谱条件依次进样, 空白微乳中成分对川芎嗪的测定无干扰, 方法专属性良好。

2.7.4 精密度试验 取浓度为 116.80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的磷酸川芎嗪对照品溶液, 重复进样 6 次, 记录峰面积, 其 RSD 值为 0.18%, 表明仪器日内精密度良好。

2.7.5 重复性试验 按照“2.6”项下的方法平行制备 6 份载药微乳, 按照“2.7.3 (2)”项下供试品溶液的配制方法制备供试品溶液, 按照“2.7.1”项色谱条件进样, 川芎嗪质量分数的 RSD 为 1.11%, 表明本实验方法重复性良好。

2.7.6 稳定性试验 取载药微乳溶液, 按照“2.7.3

(2)”项下供试品溶液的配制方法制备供试品溶液, 于 0、2、4、6、8、10、12、24 h 按照“2.7.1”项色谱条件进样测定, 计算川芎嗪峰面积 RSD 为 2.14%, 表明供试品溶液在处理 24 h 内稳定性良好。

2.7.7 加样回收率试验 取已知川芎嗪质量分数为 820.9 $\mu\text{g}/\text{g}$ 的样品 0.5 g, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 精密加入质量浓度为 1.27 mg/mL 的磷酸川芎嗪对照品溶液 0.5 mL, 甲醇稀释定容至刻度线, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 取续滤液按照色谱条件进行测定, 平均加样回收率为 97.56%, RSD 为 0.01%。

2.7.8 载药微乳的含量测定 按照“2.6”项下的方法平行制备 3 份载药微乳。各取载药微乳 1 g, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加甲醇破乳, 定容至刻度线, 摇匀, 过 0.45 μm 滤膜, 取续滤液按照色谱条件进行测定, 结果 3 份载药微乳中川芎嗪分别为 0.820 5、0.822 0、0.820 3 mg/g , 均值为 0.820 9 mg/g , RSD 为 0.12%。

2.8 川芎嗪微乳 pH 值测定

2.8.1 稀释倍数考察 由于微乳具备一定的黏性, 拟采用稀释后的微乳溶液进行 pH 值考察, 分别将微乳稀释不同倍数, 考察不同稀释倍数对微乳 pH 值的影响, 结果稀释倍数分别为 10、20、50 时的 pH 值分别为 5.75、6.24、6.78。结果表明, 稀释对微乳 pH 值的测定有较大影响, 随着加水量的增大 pH 值逐渐增大, 影响对微乳正确的测定, 因此选择不稀释直接测定。

2.8.2 川芎嗪微乳 pH 值测定 按照“2.6”项下的方法, 平行制备 6 份载药微乳, 测定样品的 pH 值。结果分别为 5.55、5.57、5.35、5.44、5.42、5.42, 平均 pH 值为 5.46。结果表明, 川芎嗪微乳的平均 pH 值为 5.46, 而正常生理状态下, 鼻腔内 pH 值为 4.5~6.5, 在此 pH 值下, 生物适应性良好。

2.9 川芎嗪微乳形态与粒径

取稀释 10 倍的川芎嗪微乳溶液, 用激光散射法测定自微乳粒径和 Zeta 电位, 记录粒径及电位。川芎嗪微乳的平均粒径 (直径) 为 (16.80 ± 0.91) nm, 多分散系数 (PDI) 为 0.13 ± 0.07 , Zeta 电位为 (-5.24 ± 0.25) mV。结果见图 6、7。

按照“2.6”项下川芎嗪微乳的制备方法, 分别制备以油酸乙酯、油酸、IPM 为油相的川芎嗪微乳溶液, 并测定其平均粒径、Zeta 电位, 见表 2。

2.10 川芎嗪微乳包封率的测定

采用超滤离心法测定川芎嗪不同油相处方微乳

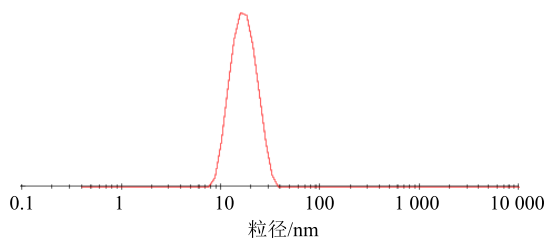


图 6 载药微乳的粒径

Fig. 6 Particle size of drug-loaded microemulsion

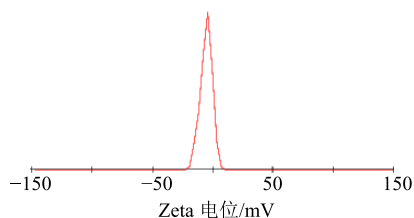


图 7 载药微乳的 Zeta 电位

Fig. 7 Potential of drug-loaded microemulsion

表 2 川芎嗪不同油相处方微乳的粒径、Zeta 电位测定结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Results of particle size and potential measurement of different oil phase prescription microemulsions of ligustrazine ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

油相	粒径/nm	PDI	Zeta 电位/mV
油酸乙酯	16.80 ± 0.91	0.13 ± 0.07	-5.24 ± 0.52
油酸	129.50 ± 1.21	0.23 ± 0.01	-13.77 ± 0.40
IPM	18.51 ± 0.24	0.24 ± 0.03	-6.51 ± 0.43

液的包封率。分别精密量取川芎嗪不同油相处方微乳液 500 μL 置于超滤离心管内管中，8 000 r/min 下离心 30 min，取离心液，乙腈定容至 25 mL，按照“2.7.1”项下色谱条件测定游离的川芎嗪含量，即 $W_{游}$ ；另取川芎嗪微乳液 500 μL，加入乙腈稀释至近刻度线，超声 30 min 破乳，定容至 50 mL，再移取 0.2 mL 至 10 mL 量瓶中，乙腈稀释定容，按照“2.7.1”项下色谱条件测定川芎嗪含量，即 $W_{总}$ 。按照包封率 = $(W_{总} - W_{游}) / W_{总}$ 进行包封率的测定。结果 3 种油相油酸乙酯、油酸、IPM 制备的川芎嗪微乳液包封率分别为 (87.43 ± 0.20) %、(89.91 ± 0.24) %、(87.89 ± 0.09) %，油酸载药微乳的包封率最高，油酸乙酯和 IPM 载药微乳的包封率接近。

2.11 不同油相处方微乳体外释放度考察

采用透析法测定药物的释放行为。分别精密量取油酸、油酸乙酯、IPM 为油相制备的川芎嗪微乳溶液 2.0 mL 置于截留相对分子质量为 8 000~14 000 的透析袋中，两端用透析夹夹紧，放置于盛有 500

mL 的 0.5% T80 高纯水溶液的锥形瓶中，37 °C 水浴，以 350 r/min 的速度搅拌，分别在 0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、18、24 h 吸取释放介质 1 mL，同时补加相同体积空白介质。按照“2.7.1”项下色谱条件测定川芎嗪含量，并计算不同时间点的累积释放率 (Q_n)。释放曲线见图 8。

$$Q_n = (WC_n + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times 1) / W$$

C_n 为第 n 点测得的药物质量浓度，1 为取样 1 mL， W 为给药总量

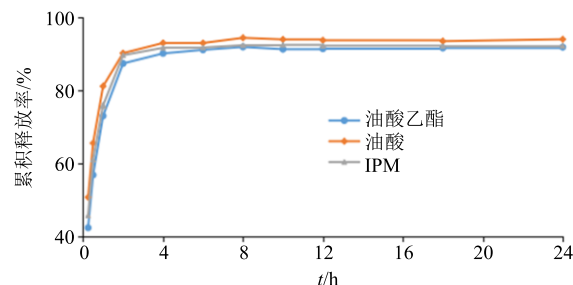


图 8 川芎嗪不同油相处方微乳的体外释放曲线

Fig. 8 *In vitro* release profile of different oil phase prescription microemulsions of ligustrazine

由图 8 可知，油酸乙酯、油酸、IPM 3 种油相制备的川芎嗪微乳体外释放趋势相似，4 h 时释放率均达到 90%，达到释放平衡时油酸乙酯、油酸、IPM 为油相的处方微乳累积释放率分别为 91.91%、94.07%、92.30%。不同油相（油酸乙酯、油酸、IPM）制备的川芎嗪微乳及其粒径大小对川芎嗪的体外释放无明显差异。

3 讨论

川芎嗪在防止血栓形成、抗缺血再灌注损伤、改善微循环、缺血性脑血管疾病等方面具有良好的治疗效果^[15-16]。而川芎嗪具有在体内存留时间短、水中溶解度差的问题^[17]。已有大量文献研究表明，微乳对难溶性成分有良好的增溶性，可延长体内滞留时间，有效提高药物的生物利用度^[18-23]。

本实验采用 HPLC 法测定川芎嗪微乳中川芎嗪的含量，该方法专属性高、准确性好、灵敏度高。通过川芎嗪在不同油相中的溶解度考察，确定了以油酸乙酯为油相，通过伪三元相图形成微乳区域面积大小优化出 EL-35 为乳化剂、无水乙醇为助乳化剂。 K_m 值筛选时，随着 K_m 值的增大，微乳区域面积呈先增大后减小的趋势。原因可能是乳化剂在油/水界面膜具有柔嫩性，随着 K_m 值的增大，乳化剂的相对含量增加，乳化能力增强，减少微乳形成界

面膜张力,促进微乳的形成^[24-26]。当 K_m 值由 2:1 增大到 3:1 时,微乳区域面积减小,原因可能是助乳化剂无水乙醇具有良好的流动性,可渗透到乳化剂界面膜中,增强界面柔性,易于微乳形成,当助乳化剂含量降低时体系黏稠度增加,表面张力增大,易于形成凝胶相,水包油微乳区域面积减小^[27-30]。最终确定处方中油相、乳化剂、助乳化剂、水质量比为 1:6:3:90,微乳体系中川芎嗪质量分数为 1.2 mg/g。此处方制得微乳外观澄清泛淡紫色乳光、粒径均匀,形成稳定均一的微乳体系。

本实验通过变更油相制备不同粒径大小的川芎嗪微乳,并对其释放行为进行对比研究,油酸乙酯、油酸、IPM 为油相制备成的微乳粒径分别为 (16.80±0.91)、(129.50±1.21)、(18.51±0.24) nm,然而 3 种处方微乳在 4 h 时释放率均达到 90%,提示粒径因素对微乳体外释药行为无显著性影响。

目前研究显示,不同粒径纳米制剂其药动学行为具有一定的差异。李卉芳等^[31]制备了平均粒径为 177 和 319 nm 的灯盏花素聚乳酸纳米粒,静脉给药后显示不同粒径组之间 AUC 存在显著差异,小粒径组具有更高的生物利用度。于洋等^[32]制备了平均粒径分别为 30、118、230 nm 的聚合物胶束,静脉给药后显示小粒径 (30 nm) 及大粒径 (230 nm) 胶束在血液中被快速清除,中间粒径 (118 nm) 胶束的 AUC 是前两者的 1.81 倍,具备较长的血液循环时间。Wang 等^[33]制备了 100、250、480 nm 的介孔二氧化硅纳米粒,口服给药结果显示较小粒径的介孔二氧化硅纳米粒 AUC 和 C_{max} 显著增加,具有较高生物利用度。上述药动学方面的差异,可能是由于不同粒径纳米制剂在体内吞噬、转运、稳定性方面的差异所造成的。川芎嗪纳米乳粒径因素对于细胞内吞,细胞转运,组织分布方面的影响有待进一步研究。

参考文献

[1] 程先超. 川芎嗪衍生物的设计、合成及其心脑血管药理活性研究 [D]. 济南: 山东大学, 2005.

[2] 王 丽, 吕圭源, 陈素红. 川芎嗪药理作用的研究进展 [J]. 医学信息: 下旬刊, 2011, 24(2): 1116-1118.

[3] 蒋跃绒, 陈可冀. 川芎嗪的心脑血管药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(5): 707-711.

[4] 王丽娜, 吴晓琳. 丹参川芎嗪注射液联合阿替普酶治疗老年急性脑梗死的疗效观察 [J]. 现代药物与临床,

2018, 33(10): 2511-2514.

[5] 杨 倩, 吕莉莉, 孙 蓉. 基于网络药理学的丹参川芎嗪注射液作用机制分析 [J]. 中草药, 2018, 49(11): 2606-2613.

[6] 马仙红, 张 瑜. 银杏达莫与丹参川芎嗪注射液治疗老年急性心肌梗死的临床对照研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(10): 1449-1452.

[7] 郭 军, 孟 华, 王骊丽, 等. 川芎嗪的药动-药效学研究近况 [J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2002, 18(5): 318-320.

[8] 张春兵. 川芎嗪抗脑缺血再灌注损伤作用的机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2008.

[9] 王 洁, 李 倩, 吴静华, 等. CD133 抗体修饰的紫草素微乳的制备及抗三阴性乳腺癌研究 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1587-1595.

[10] 党明抄, 扈本荃. 微乳在中药制剂中的研究进展 [J]. 广州化工, 2016, 44(21): 4-6.

[11] 贾 山, 张紫薇, 谭佳威, 等. 通窍散瘀方微乳的制备及评价 [J]. 天津中医药大学学报, 2018, 37(5): 393-398.

[12] 傅荣萍, 刘玉萍, 张毕桥, 等. 大蒜素二烯丙基三硫醚微乳的制备及其对肿瘤细胞增殖与迁移的影响 [J]. 中草药, 2018, 49(23): 5541-5547.

[13] 张美玉, 孙 进, 何仲贵. 纳米粒形状对体内药动学的影响及非球形纳米粒制备方法的研究进展 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(10): 846-852.

[14] Zheng M, Yu J. The effect of particle shape and size on cellular uptake [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2016, 6(1): 67-72.

[15] 刘 柳, 蒋 超, 赵紫昊. 丹参川芎嗪注射液联合甲钴胺对糖尿病周围神经病变患者的治疗效果和对氧化应激反应的影响 [J]. 中草药, 2019, 50(11): 2670-2674.

[16] 李 晶, 刘访遥, 陈剑超. 川芎嗪 PEG-PE 纳米胶束的体外评价、细胞摄取及抗心肌细胞凋亡研究 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(14): 1743-1748.

[17] Liu X Y, Liu H, Zeng Z W, *et al.* Pharmacokinetics of ligustrazine ethosome patch in rats and anti-myocardial ischemia and anti-ischemic reperfusion injury effect [J]. *Int J Nanomed*, 2011(6): 1391-1398.

[18] 王利胜, 郭 琦, 韩 坚, 等. 川芎嗪在小鼠血、脑和肝中的药动学研究 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 935-938.

[19] 完茂林, 刘子荣, 桂双英, 等. 川芎嗪口服油包油微乳的研制及大鼠体内药物代谢动力学研究 [J]. 安徽中医学院学报, 2011, 30(2): 60-64.

[20] 马 丽. 川芎嗪油基纳米给药系统的组织分布、体外吸收及抗 AD 脑损伤作用的评价 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2013.

[21] Lochhead J J, Thorne R G. Intranasal delivery of

- biologics to the central nervous system [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2012, 64(7): 614-628.
- [22] Sonvico F, Clementino A, Buttini F, *et al.* Surface-modified nanocarriers for nose-to-brain delivery: From bioadhesion to targeting [J]. *Pharmaceutics*, 2018, 10(1): 1-34.
- [23] Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2000, 11(1): 1-18.
- [24] 郭 静, 蒋建国, 韦林洪, 等. 橄榄油微乳体系的相行为及影响因素研究 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40(7): 35-40.
- [25] 张佩华, 梅 子, 傅玉颖. 全稀释食品级单辛酸甘油酯微乳体系的构建 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34(16): 125-130.
- [26] 李绍林, 段 启, 赵珍东, 等. 石菖蒲挥发油微乳鼻喷剂的制备及其质量评价 [J]. *中草药*, 2019, 50(8): 1935-1941.
- [27] Chiappisi L, Noirez L, Gradzielski M. A journey through the phase diagram of a pharmaceutically relevant microemulsion system [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2016, 473: 52-59.
- [28] Kaur G, Chiappisi L, Prévost S, *et al.* Probing the microstructure of nonionic microemulsions with ethyl oleate by viscosity, ROESY, DLS, SANS, and cyclic voltammetry [J]. *Langmuir*, 2012, 28(29): 10640-10652.
- [29] 鲁 争, 王振才, 葛 祉, 唐 云, 等. 不同助乳化剂对艾叶油微乳成乳区域的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(4): 968-969.
- [30] 刘 欣, 周志磊, 毛 健. 玫瑰精油微乳制备及性质研究 [J]. *食品与生物技术学报*, 2019, 38(5): 79-85.
- [31] 李卉芳, 刘明星, 刘清飞, 等. 表面修饰的灯盏花素聚乳酸纳米粒的制备和大鼠体内药动学 [J]. *中国新药杂志*, 2007, 16(8): 614-618.
- [32] 于 洋. 基于粒径的生物效应构建肿瘤微酸环境响应性药物载体及其应用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [33] Wang Y, Cui Y, Zhao Y, *et al.* Effects of surface modification and size on oral drug delivery of mesoporous silica formulation [J]. *J Colloid Interf Sci*, 2018, 513: 736-747.