

Box-Behnken 效应面法优化吴茱萸次碱脂质液晶纳米粒的处方研究

徐玲霞, 刘水婷, 刘 骏, 申宝德, 金 晨, 朱卫丰*

江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要:目的 采用 Box-Behnken 效应面法筛选吴茱萸次碱脂质液晶纳米粒(rutaecarpine lipid liquid crystalline nanoparticles, Rut-LLCN)的最优处方。方法 采用前体注入联合高压均质法制备 Rut-LLCN, 以甘油单油酸酯(GMO)的用量、泊洛沙姆 407(F127)与 GMO 的质量分数、吴茱萸次碱(Rut)的用量为考察对象, 以包封率、载药量、粒径、多分散指数(PDI)为考察指标, 利用 3 因素 3 水平 Box-Behnken 效应面设计法筛选 Rut-LLCN 的最优处方。结果 Rut-LLCN 的最优处方为 GMO 的用量为 450 mg, F127-GMO 的质量分数为 12%, Rut 的用量为 20 mg, 优化处方各指标和目标值接近。按最优处方制备的 Rut-LLCN 的包封率为 $(84.02 \pm 7.99)\%$, 载药量为 $(3.24 \pm 0.30)\%$, 平均粒径为 (186.90 ± 13.50) nm, PDI 为 0.313 ± 0.020 。结论 采用 Box-Behnke 效应面法优化了 Rut-LLCN 的处方, 以包封率、载药量、平均粒径、PDI 为指标评价该模型, 表明该模型预测性良好。

关键词: 吴茱萸次碱; 脂质液晶纳米粒; Box-Behnken 效应面法; 包封率; 载药量; 粒径; 多分散指数; 处方优化

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)21-5076-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.21.019

Formulation optimization of rutaecarpine lipid liquid crystalline nanoparticles by Box-Behnken design-response surface methodology

XU Ling-xia, LIU Shui-ting, LIU Jun, SHEN Bao-de, JIN Chen, ZHU Wei-feng

Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine of Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To optimize the formulation of rutaecarpine lipid liquid crystalline nanoparticles (Rut-LLCN) by Box-Behnken design-response surface methodology. **Methods** Rut-LLCN were prepared by precursor injection-high pressure homogenization method. A three factor and three-level Box-Behnken design was employed with the glyceryl monoolein quality, percentage of poloxamer in glyceryl monoolein and the rutaecarpine quality as independent variables, the entrapment efficiency, drug loading, mean particle size and polydispersity index as the dependent variables to screen the optimal formula. **Results** Optimized prescription was GMO 450 mg, F127-GMO 12%, and Rut 20 mg. All items of optimized prescription were similar to target values. According to the optimized prescription, the entrapment efficiency, drug loading, average particle size, and PDI of Rut-LLCN were $(84.02 \pm 7.99)\%$, $(3.24 \pm 0.30)\%$, (186.90 ± 13.50) nm, and 0.313 ± 0.020 , respectively. **Conclusion** The prescription optimization model of Rut-LLCN was optimized by Box-Behnken designs-response surface methodology, and entrapment efficiency, drug loading, mean particle size, and PDI of Rut-LLCN are measured to investigate the model.

Key words: rutaecarpine; lipid liquid crystalline nanoparticles; Box-Behnken designs-response surface methodology; entrapment efficiency; drug loading; particle size; PDI; formula optimization

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa*

(Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实^[1]。吴茱萸次碱(rutaecarpine, Rut)作为其主要的药理活性成分之一, 具有抗高血压、抗癌、

收稿日期: 2018-06-06

基金项目: 国家重点研发项目(2017YFC1702900)

作者简介: 徐玲霞, 女, 硕士研究生, 主要从事药物新制剂与新技术研究。Tel: (0791)87118614 E-mail: 1046717126@qq.com

*通信作者 朱卫丰, 女, 博士, 教授, 研究方向为中药外用制剂。Tel: (0791)87118614 E-mail: zwf0322@126.com

抗炎、抗血栓形成等广泛的药理作用^[2-4]。近年来,国内外诸多研究报道 Rut 能够通过促进内源性降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)的合成与释放从而发挥降压作用和舒张血管作用,这提示 Rut 降压作用确切,且作用机制独特,符合新型抗高血压药物的发展趋势,具有良好的应用前景^[5]。然而,文献报道 Rut 脂水均难溶,口服吸收少,生物利用度极低,一定程度上限制了其临床应用^[6]。脂质液晶纳米粒(lipid liquid crystalline nanoparticles, LLCN)是指两亲性分子在水溶剂或其他溶剂中自发形成的液晶^[7-8]。与其他制剂相比,LLCN 具有良好的生物黏附性及可降解性、较强的药物包封能力(水溶性、脂溶性及两亲性药物分子均可包载)、简单的制备工艺、促进药物缓控释以及提高药物生物利用度等特点,已被用于多种药物的递送研究^[8-10]。本实验将通过前体注入联合高压均质法制备吴茱萸次碱脂质液晶纳米粒(Rut-LLCN),通过 Box-Behnken 效应面法优化处方,并对优化后的 Rut-LLCN 进行质量评价,以期对 Rut 的深入研究与临床应用奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 仪器

BT25S 十万分之一电子天平,德国 Sartorius 公司;BSA124S 万分之一电子天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;GEA Niro Soavi 高压均质机,意大利 Niro Soavi 公司;ZNCL-BS 智能磁力搅拌器,西安安泰仪器科技有限公司;Nano-S 马尔文纳米粒度仪,英国马尔文公司;EPED 实验室级超纯水器,南京易普易达科技发展有限公司;KQ-500VDE 数控超声波清洗器,昆山舒美超声仪器有限公司;Agilent1200 型高效液相色谱仪,美国安捷伦科技有限公司;Tecnaï G 2 透射电子显微镜,美国菲达康有限责任公司。

1.2 试药

Rut 对照品,中国食品药品检定研究院,批号 110801-201608,质量分数 99.7%;Rut,南京泽朗医药科技有限公司,批号 20171027,质量分数 99%;甘油单油酸酯(GMO),西亚试剂有限公司,质量分数 99%,批号 NO321;无水乙醇,西陇化工股份有限公司;泊洛沙姆 407(F127),德国 BASF 公司,批号 WPAK588B;Sephadex LH-20,北京瑞达恒辉科技发展公司,批号 9048-71-9;甲醇为色谱纯,美国天地有限公司;超纯水;其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 Rut-LLCN 的制备

2.1.1 Rut-LLCN 制备工艺的单因素考察 预试验结果显示前体注入联合高压均质法制备 Rut-LLCN 的效果较好。将本品的基本处方暂定为 GMO 500 mg, F127 与 GMO 的质量分数 10%, Rut 20 mg。采用单因素法考察磁力搅拌温度分别在 50、60、70、80 °C,磁力搅拌速率分别为 1 000、1 200、1 400、1 600 r/min,磁力搅拌时间分别为 1、2、3、4 h 时 Rut-LLCN 包封率、粒径的变化情况。结果显示,当磁力搅拌温度为 70 °C 时,搅拌速率为 1 200 r/min 及搅拌时间为 3 h 时,能够达到实验要求。将制备的 Rut-LLCN 在 70 °C 磁力搅拌中以 1 200 r/min 搅拌 3 h 后高压均质,在相同均质时间下压力取 600、800、1 000 MPa,结果在 600 MPa 时,粒径就能达到要求,包封率最高。在 600 MPa 下分别均质 5、10、15、20 min,结果表明,均质 15 min,包封率最高,其他时间粒径相差不大。因此,确定均质压力为 600 MPa,时间为 15 min。

2.1.2 Rut-LLCN 的制备 精密称取 500 mg GMO、20 mg Rut、50 mg F127 溶解于 30 mL 无水乙醇,形成前体溶液;在 70 °C 下,以 1 200 r/min 磁力搅拌,将前体溶液缓慢滴加入 80 mL 水相中,持续搅拌 3 h,得粗分散液;在高压均质 600 MPa 下均质 15 min,得到粒径均一的 Rut-LLCN 分散液。同法制备空白 LLCN。

2.2 Rut 含量测定方法的建立

2.2.1 色谱条件 迪马 Platisil ODS C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(95:5)等度洗脱;体积流量 1.0 mL/min;检测波长 343 nm;柱温 25 °C;进样 10 μL。理论塔板数以 Rut 峰计算为 16 767。

2.2.2 专属性考察 分别称取空白 LLCN 1 mL、Rut-LLCN 1 mL、Rut 对照品溶液 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,用甲醇定容。用 0.22 μm 微孔有机滤膜滤过,取续滤液按色谱条件进样分析,结果见图 1。

2.2.3 线性关系考察 精密称取吴茱萸次碱对照品一定量,用甲醇溶解,配制成质量浓度 65.50 μg/mL 的储备液。再用甲醇逐级稀释成质量浓度为 0.655、1.310、2.620、6.550、13.100、32.750、65.500 μg/mL 的 Rut 对照品溶液,按色谱条件进样分析,记录峰面积,分别以 Rut 质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)作图,绘制标准曲线,结果显示 Rut

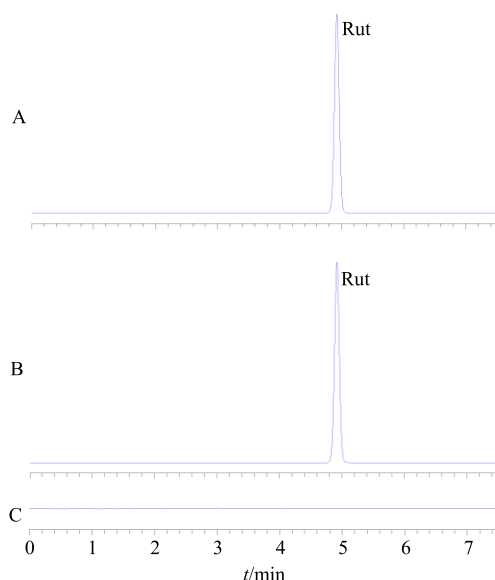


图1 Rut-LLCN (A)、Rut对照品 (B) 和空白 LLCN (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of Rut-LLCN (A), Rut reference substance (B), and blank LLCN (C)

的线性方程为 $Y=39.038 X+20.987$, $r=0.999 7$, Rut 在 $0.655\sim 65.500 \mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

2.2.4 精密度、稳定性和回收率试验 按相关方法操作。结果符合测定要求, 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 0.5%, 供试品溶液在 24 h 内稳定; 加样回收率试验中平均回收率在 95.77%~100.95%, RSD 均小于 3.0%。

2.3 包封率的测定方法

2.3.1 流出曲线的绘制 取 Rut-LLCN、Rut 对照品溶液 1 mL, 分别加入 Sephadex LH-20 柱 (50 mm×10 mm), 用纯水为洗脱剂以 4 mL/min 洗脱 8 min, 再用 80% 甲醇为洗脱剂以 4 mL/min 洗脱 15 min, 每 2 毫升收集洗脱液 1 份, 样品氮气浓缩后, 加甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中。分别测定 Rut-LLCN、Rut 对照品收集液在 343 nm 处的吸光度 (A) 值。以流出体积为横坐标, A 值为纵坐标, 绘制游离药物 Rut、Rut-LLCN 的流出曲线。结果如图 2 所示, 游离药物 Rut 在 36~72 mL 被洗脱下来; Rut-LLCN 在 0~12 mL 洗脱下来, Rut-LLCN 中未被包封的 Rut 在也 36~72 mL 洗脱下来。流出曲线结果表明, 采用 Sephadex LH-20 微柱凝胶法可将 Rut-LLCN 和游离药物 Rut 进行有效的分离, 该方法适用于 Rut-LLCN 包封率的测定。

2.3.2 包封率的测定 精密吸取 Rut-LLCN 1 mL, 缓缓加入 Sephadex LH-20 凝胶柱顶部, 用纯水洗脱

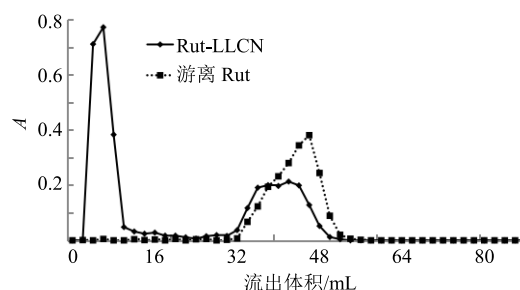


图2 游离药物 Rut 与 Rut-LLCN 的流出曲线

Fig. 2 Elution profiles of Rut free drug and Rut-LLCN

30 mL, 再用 80% 甲醇洗脱 60 mL, 体积流量为 4 mL/min, 收集 20 mL 纯水段溶液, 旋干溶剂, 用甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 摇匀。精密吸取 Rut-LLCN 1 mL, 加入甲醇溶解并定容至 10 mL, 摇匀, 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜, 取续滤液, 进样, 计算 Rut 的包封率。

包封率 = Rut-LLCN 药物含量 / 总药物含量

2.4 Box-Behnken 效应面法优化处方

2.4.1 实验设计与数据处理 预试验和单因素实验结果显示, GMO 质量 (X_1)、F127 与 GMO 的质量分数 (X_2)、Rut 质量 (X_3) 是影响制剂成功的主要因素, 并确定其用量范围, 实验设计及水平值见表 1。按处方制备 Rut-LLCN, 测定包封率、载药量、平均粒径、多分散系数 (PDI)。通过查阅文献^[11] 可知, 每个指标均标准化为 0~1 的归一值, 各指标归一值求算几何平均数, 得总评归一值 (OD), 公式为 $OD=(d_1d_2\cdots d_k)^{1/k}$, k 为指标数。

对取值越大越好的因素 (包封率、载药量) 和取值越小越好的因素 (平均粒径、PDI) 采用 Hassan 方法分别进行数字转换求归一值 $d_{\max}$ 和 $d_{\min}$ 。Box-Behnken 效应面法实验结果见表 1。

$$d_{\max}=(Y_i-Y_{\min})/(Y_{\max}-Y_{\min})$$

$$d_{\min}=(Y_{\max}-Y_i)/(Y_{\max}-Y_{\min})$$

2.4.2 数据处理

(1) 二次回归方程的建立: 应用 Design Expert 8.0.6 软件进行二次多项式逐步回归拟合, 得到方程: $OD=0.09+1.02\times 10^{-3} X_1+0.02 X_2-2.85\times 10^{-3} X_3-5.08\times 10^{-5} X_1X_2+2.31\times 10^{-5} X_1X_3+3.57\times 10^{-4} X_2X_3-2.48\times 10^{-6} X_1^2-1.02\times 10^{-4} X_2^2-1.18\times 10^{-4} X_3^2$ ($r^2=0.890 3$, $P=0.011 9$)。

(2) 效应面分析与优化: 使用 Design Expert 8.0.6 软件, 根据回归方程结果, 选择 X_3 为 20 mg, 考察 X_1 、 X_2 对 OD 值的影响, 并将固定 X_1 、 X_2 的中值, 绘制其等高线图与曲线图 (图 3)。根据 Box-

表 1 Box-Behnken 效应面法的试验安排与结果
Table 1 Arrangement and results of Box-Behnken design

序号	X_1/mg	$X_2/\%$	X_3/mg	包封率/%	载药量/%	平均粒径/nm	PDI	OD 值
1	20.00 (-1)	3.00 (-1)	32.50 (0)	25.59	22.3	773.72	0.597	0.000 0
2	500.00 (+1)	3.00	32.50	55.48	3.79	306.68	0.377	0.332 5
3	20.00	25.00 (+1)	32.50	17.67	21.7	575.80	0.599	0.088 9
4	500.00	25.00	32.50	61.48	2.97	186.89	0.281	0.367 7
5	20.00	14.00 (0)	5.00 (-1)	44.59	4.97	394.01	0.459	0.285 4
6	500.00	14.00	5.00	64.89	0.43	196.85	0.223	0.000 0
7	20.00	14.00	60.00 (+1)	83.99	65.7	711.98	0.643	0.091 1
8	500.00	14.00	60.00	88.34	8.43	201.20	0.420	0.485 7
9	260.00 (0)	3.00	5.00	65.79	1.01	211.90	0.206	0.270 0
10	260.00	25.00	5.00	67.26	1.05	162.87	0.183	0.285 9
11	260.00	3.00	60.00	17.24	4.12	270.13	0.343	0.000 0
13	260.00	25.00	60.00	74.80	12.2	264.48	0.490	0.448 1
13	260.00	14.00	32.50	82.67	6.21	200.82	0.424	0.436 6
14	260.00	14.00	32.50	86.12	8.66	206.29	0.377	0.505 9
15	260.00	14.00	32.50	82.75	8.21	224.48	0.392	0.481 8
16	260.00	14.00	32.50	84.21	8.57	195.82	0.412	0.486 2
17	260.00	14.00	32.50	82.87	8.17	259.04	0.500	0.411 4

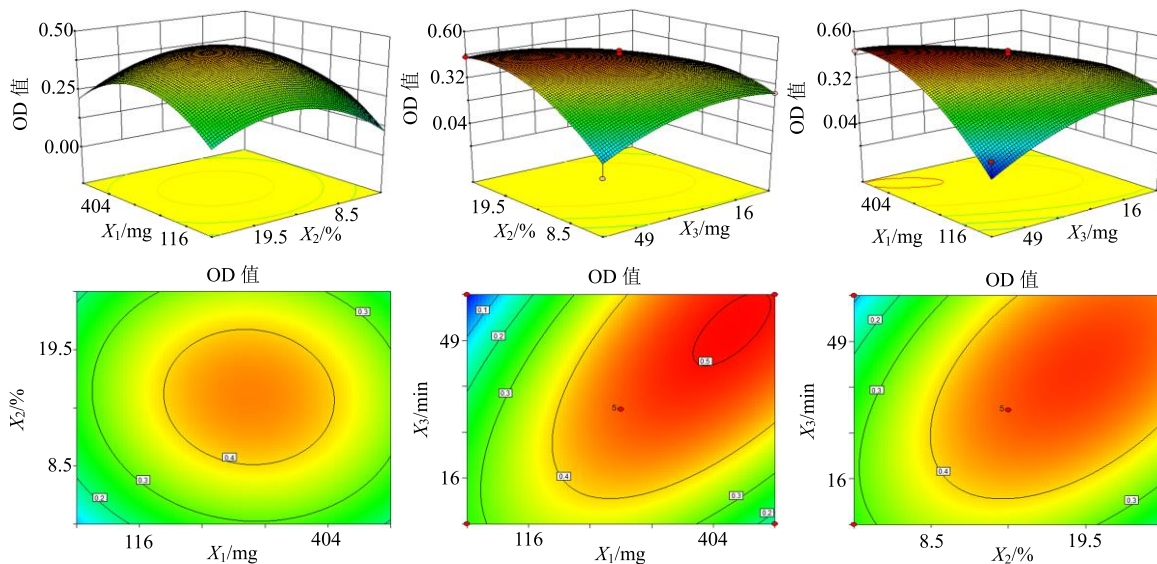


图 3 X_1 、 X_2 、 X_3 因素对 OD 值影响的效应面图与等高线图

Fig. 3 Contour plot and response surface of effect of variables X_1 , X_2 , and X_3 on OD

Behnken 响应面实验设计结果, 对各个评价制备进行适当范围的限定, 得到优化后的处方为 $X_1=450$ mg, $X_2=12\%$, $X_3=20$ mg。

2.5 最优处方验证试验

按照预测的处方平行进行 3 次实验, 各评价指标与预测值接近, 表明建立的回归方程预测性良好, 结果见表 2。

2.6 优化处方制备的 LLCN 表征

取 Rut-LLCN 适量, 蒸馏水稀释适当倍数, 用马尔文纳米粒度仪测其粒径及分布, 平行测定 3 次。结果显示 Rut-LLCN 平均粒径为 (192.83 ± 3.58) nm, PDI 为 0.381 ± 0.045 。取 Rut-LLCN 适量, 滴入载玻片上, 慢慢盖上盖玻片以防止气泡的产生。调节偏光显微镜偏光片, 使得偏光角度为 90° , 视野为暗

表 2 预测值与实测值的比较

Table 2 Comparison of predicted and measured values

比较项	包封率/%	载药量/%	平均粒径/nm	PDI	OD 值
预测值	83.39	4.74	185.56	0.318	0.367 5
实测值	84.02±7.99	3.24±0.30	186.9±13.50	0.313±0.020	0.390 5±0.014
偏差/%	0.75	-3.16	0.72	-1.59	6.26

黑色，将样品玻片置入偏光显微镜中观察，结果见图 4-A。取稀释 10 倍的样品 10 μL 滴在覆有支持膜的铜网上，静止 5 min 后用滤纸吸干，再滴加 1% 磷钨酸溶液于铜网上染色 5 min，置于透射电镜下观察，结果见图 4-B，TEM 视野下，Rut-LLCN 呈立方状。

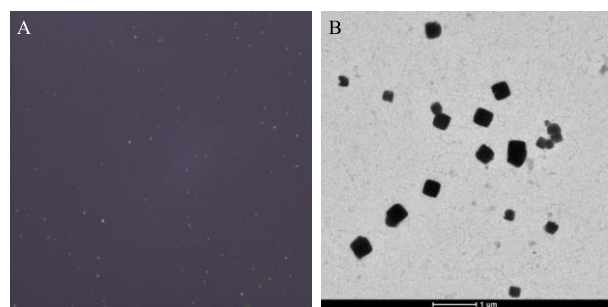


图 4 LLCN 的偏光显微镜图 (A) 和透射电镜图 (B)

Fig. 4 POM image (A) and TEM images (B) of LLCN

3 讨论

本实验采用前体注入联合高压均质法制备了 Rut-LLCN，包封率高，粒径分布均匀。包封率是 LLCN 质量评价的重要指标。根据包封药物不同、LLCN 的种类及所用脂质材料不同，所采用的测定方法亦不相同^[12]。预试验已考察了微柱离心法、超滤离心法、葡聚糖凝胶色谱法、透析袋法，结果显示，微柱在离心时出现大量气泡甚至柱子断裂，低速离心需多次离心后，才能洗脱游离药物，操作繁杂；超滤离心法耗时长、转速高，且滤膜对药物有吸附作用；透析袋法操作简单、经济，但所需时间较长，一般需要 8 h 以上^[13]。故本研究选用葡聚糖凝胶柱法测定 Rut-LLCN 的包封率。

正交设计与均匀设计是药物制剂研究、中药炮制提取等工艺中常用的 2 种实验设计方法^[14-16]。然而，在药物制剂的处方和制备工艺的筛选中，常需要考虑影响结果的多因素以及因素之间的交互作用，并优化结果。但是均匀设计、正交设计是基于线性模型的设计，某些设计表如 $L_9(3^4)$ 不适于二次以上多项式模型，只能指出某一因素的取值方向，

无法求得极值^[17]。Box-Behnken 效应面法是一种采用二元多次方程来拟合因素和评价指标之间的函数关系，然后通过计算机分析得到最优值^[18-19]。一般最优值的实验条件区域变化比较明显，实验条件的微小变化会造成效应值的巨大变化，因此用非线性模型（Box-Behnken 效应面法）来拟合因素与评价指标之间的函数关系更适合。此外，Box-Behnken 实验设计具有实验设计全面、实验次数少、效率高和可以分析多个因素交互作用等特点，可以克服正交、均匀设计的缺点^[20]。因此选用 Box-Behnken 实验设计优化 Rut-LLCN 的处方。

本研究采用前体注入联合高压均质法制备了 Rut-LLCN，选用了 GMO 的质量、F127 与 GMO 的质量分数、Rut 的质量这 3 个因素作为考察对象，以包封率、载药量、平均粒径、PDI 为考察指标，并将各指标标准化为归一值，计算出总评归一值进行了 Box-Behnken 效应面实验设计，得到最佳 Rut-LLCN 处方组成。通过处方验证实验表明，各评价指标的实测值与预测值之间的偏差的绝对值较小，所建立的数学模型有良好的预测能力。Rut 为难溶性药物，前期实验结果表明其在水中的溶解度仅为 $(43.0 \pm 1.1) \mu\text{g/L}$ ，本实验通过将其制备成脂质液晶纳米粒不仅能够解决 Rut 自身溶解度低的问题，而且也为吴茱萸的中药现代化制剂提供一种新的制剂形式，使饱受高血压病折磨的患者多一种用药选择。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 薛宝娟, 李志慧, 张玉杰, 等. 吴茱萸次碱对 5 种黄连生物碱大鼠体外肝代谢的抑制作用 [J]. 中草药, 2014, 45(9): 1293-1296.
- [3] Son J K, Chang H W, Jahng Y. Progress in studies on rutaecarpine. II. Synthesis and structure-biological activity relationships [J]. *Molecules*, 2015, 20(6): 10800-10821.
- [4] 严春临, 张 季, 刘 敏, 等. 星点设计-效应面法优化

- 吴茱萸次碱固体脂质纳米粒处方 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1307-1313.
- [5] Xu S X, Peng J, Li Y J, *et al.* Pharmacokinetic comparisons of rutaecarpine and evodiamine after oral administration of Wu-Chu-Yu extracts with different purities to rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(2): 395-400.
- [6] 李 岱. 降钙素基因相关肽与高血压及吴茱萸次碱的治疗作用 [D]. 长沙: 中南大学, 2008.
- [7] 房盛楠, 张美敬, 余 越, 等. 脂质液晶纳米粒的制备、表征以及作为药物载体的应用 [J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(18): 1877-1881.
- [8] 邱 玲, 尹蓉莉, 申宝德, 等. 芍药苷脂质液晶纳米粒制备及体外释放研究 [J]. 中草药, 2015, 46(23): 3495-3499.
- [9] 刘丽丽, 陈谢谢, 陈家乐, 等. 脂质立方液晶纳米粒的研究进展及其在经皮给药系统中的应用 [J]. 中国药学杂志, 2017, 52(12): 1005-1010.
- [10] 陈玉林, 桂双英, 钱珊珊. 脂质液晶纳米粒作为药物载体的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(6): 654-659.
- [11] 刘艳杰, 项荣武. 星点设计效应面法在药学试验设计中的应用 [J]. 中国现代应用药学, 2007, 6(24): 455-457.
- [12] 聂 华, 赵 莹, 叶小玲, 等. 葡萄糖修饰脑靶向紫杉醇脂质体包封率测定方法的比较 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(23): 15-19.
- [13] 付建武, 涂瑶生, 孙冬梅, 等. 复方姜黄素脂质立方液晶纳米粒中姜黄素和胡椒碱的包封率测定 [J]. 中药新药与临床药理, 2013, 24(2): 200-205.
- [14] Auriemma G, Mencherini T, Russo P, *et al.* Prilling for the development of multi-particulate colon drug delivery systems: Pectin vs pectin-alginate beads [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(1): 367-373.
- [15] 王同顺, 房志仲. 复方甘草锌与氨来咕诺口腔复合膜的处方筛选 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(3): 207-210.
- [16] 杨艳梅, 赵丽艳, 王东晗, 等. 均匀设计法优化姜黄素TPGS/F127/P123 混合胶束的处方工艺 [J]. 中草药, 2018, 49(7): 1556-1561.
- [17] Hao J F, Fang X S, Zhou Y F, *et al.* Development and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for ophthalmic delivery of chloramphenicol using a Box-Behnken design [J]. *Int J Nanomed*, 2011, 4(6): 683-692.
- [18] 沈成英, 王 治, 徐 和, 等. Box-Behnken 设计-效应面法优化波棱甲素新型纳米混悬速溶膜 [J]. 中草药, 2014, 45(1): 37-41.
- [19] 权 亮, 赵永峰, 陈志敏, 等. 基于信息熵赋值法的正交联用 Box-Behnken 设计-响应面法优化黄丝郁金醋炙工艺研究 [J]. 中草药, 2018, 49(8): 1823-1828.
- [20] 徐方楚, 沈成英, 连王权, 等. Box-Behnken 效应面法优化美洛昔康纳米晶舌下速溶膜的处方研究 [J]. 中国药学杂志, 2018, 53(1): 46-51.