

应用 Box-Behnken 实验设计优化水飞蓟素固体脂质纳米粒处方研究

郝吉福^{1,4}, 房信胜², 王建筑¹, 郭丰广¹, 孔志峰¹, 彭新生^{3*}

1. 泰山医学院药学院, 山东 泰安 271016
2. 山东农业大学农学院, 山东 泰安 271018
3. 广东医学院药学院, 广东 东莞 523808
4. 山东大学药学院, 山东 济南 250012

摘要: 目的 应用 Box-Behnken 实验设计, 优化水飞蓟素固体脂质纳米粒的最佳处方。方法 采用三因素三水平 Box-Behnken 实验设计, 以水飞蓟素为模型药物, 采用乳化蒸发-低温固化法制备固体脂质纳米粒。利用效应曲面法对影响固体脂质纳米粒包封率、载药量和粒径的主要因素进行考察, 以包封率、载药量和粒径为响应值, 建立相应的二项式数学模型优化处方。结果 最优处方为固体脂质纳米粒中脂质单硬脂酸甘油酯量为 5.05%, 7.25% Poloxamer 188 作为乳化剂, 药物的量为 15%。结论 采用 Box-Behnken 实验设计可用于水飞蓟素固体脂质纳米粒的处方优化筛选。

关键词: 水飞蓟素; Box-Behnken 实验设计; 固体脂质纳米粒; 效应面法; 乳化蒸发-低温固化法

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)11-2221-05

Optimization of solid lipid nanoparticles of silymarin by using Box-Behnken experimental design

HAO Ji-fu^{1,4}, FANG Xin-sheng², WANG Jian-zhu¹, GUO Feng-guang¹, KONG Zhi-feng¹, PENG Xin-sheng³

1. College of Pharmacy, Taishan Medical University, Tai'an 271016, China
2. College of Agronomy, Shandong Agriculture University, Tai'an 271018, China
3. College of Pharmacy, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, China
4. College of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China

Abstract: Objective To optimize the formulation parameters of solid lipid nanoparticles (SLN) of silymarin by Box-Behnken experimental design. **Methods** A three-factor and three-level Box-Behnken experimental design was employed using emulsion evaporation-low temperature solidification technique to prepare SLN with silymarin as model drug. Response surface methodology was used to investigate the factors affecting entrapment efficiency (EE), drug loading (DL), and particle size. Binomial mathematical model-optimized formulation was established with EE, DL, and particle size as response values. **Results** The optimal formulation was as follows: the amount of glycerol monostearate was 5.05%, the concentration of Poloxamer 188 was 7.25%, and the amount of drug was 15%. **Conclusion** The Box-Behnken experimental design could be used to optimize the SLN of silymarin.

Key words: silymarin; Box-Behnken experimental design; solid lipid nanoparticles (SLN); response surface methodology (RSM); emulsion evaporation-low temperature solidification

水飞蓟素为菊科植物水飞蓟 *Silybum marianum* (L.) Gaertn. 种子中提取的黄酮类化合物, 主要由水飞蓟宾 (silibinin or silybin)、水飞蓟宁、水飞蓟亭等同分异构体组成。临床上用于治疗急、慢性肝炎、肝硬化和代谢中毒性肝损伤等疾病^[1-2]。Box-Behnken 实验设计是效应曲面法 (response surface

methodology, RSM) 中的一种实验设计方法, 近年来被广泛用于实验设计与优化过程中^[3]。本实验以水飞蓟素作为模型药物, 以包封率、载药量和粒径为评价指标, 通过 Box-Behnken 实验设计考察药物质量分数、油相及乳化剂 Poloxamer 188 用量等因素对固体脂质纳米粒 (solid lipid nanoparticle, SLN)

收稿日期: 2011-03-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81001643, 81102820); 广东省科技计划 (2011B037100058)

作者简介: 郝吉福 (1976—), 讲师, 在读博士, 研究方向为中药与天然药物新剂型研究与开发。

Tel: (0538)6229753-8005 E-mail: haojifu@163.com

*通讯作者 彭新生 Tel: (0769)22896561 E-mail: pxsgz@yahoo.com.cn

的影响,采用多元二次回归方程拟合因素和效应值之间的函数关系,通过分析回归方程来寻求目标参数,优化水飞蓟素固体脂质纳米粒处方。

1 仪器与材料

JY92—II探头超声波细胞粉碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);岛津高效液相色谱仪(含LC—10AD泵、SPD—10A检测器、7225进样器、C—R6A数据处理器);超速冷冻离心机(日本Hitachi公司);Mastersizer 3 000粒度分析仪(英国Malvern公司);Zetasizer Nano电位分析仪(英国马尔文公司);Eyela FDU—1200冷冻干燥机(日本理化器械株式会社)。

单硬脂酸甘油酯(分析纯,天津市科密欧化学试剂开发中心);PluronicF-68(Poloxamer 188, BASF公司);水飞蓟素原料药[批号20090726,含水飞蓟宾(水飞蓟宾A和B)93.2%,陕西森弗生物技术有限公司];水飞蓟宾对照品(批号100281-200903,中国药品生物制品检定所);水为双蒸水,其他所用试剂均为分析纯或色谱纯。

2 方法与结果

2.1 水飞蓟素 SLN 的制备

采用乳化蒸发-低温固化方法制备SLN^[4-7]。称取处方量的水飞蓟素原料药、单硬脂酸甘油酯,溶于适量无水乙醇中,置于80℃恒温水浴中使之充分溶解,形成油相。同时将适量Poloxamer 188溶于25 mL双蒸水中,恒温水浴至80℃左右形成水相。将熔融好的油相放到已加热的磁力搅拌器上在搅拌条件(400 r/min)下缓缓加入水相,制得乳白色初乳,在(80±5)℃保温条件下用探头式超声细胞粉碎仪处理10 min(功率700 W),得淡黄色透明的胶体溶液,将其快速分散于50 mL 0~2℃双蒸水中,冰浴下继续搅拌至充分冷却,定容至100 mL,即得水飞蓟素SLN水分散体。

2.2 水飞蓟素的测定

2.2.1 色谱条件

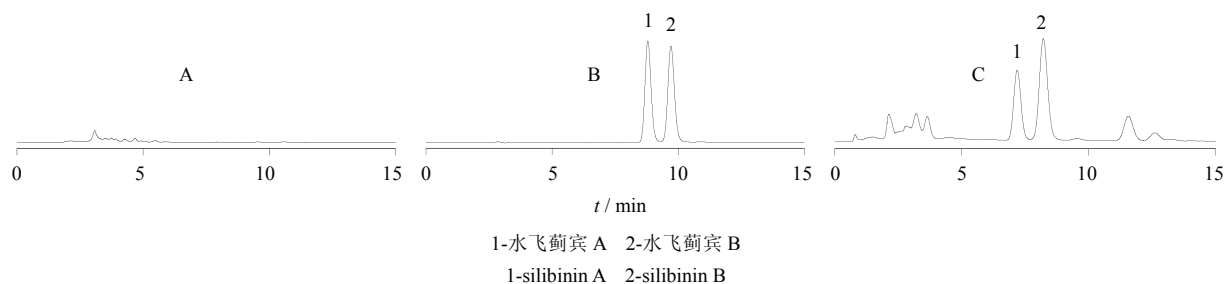


图1 空白SLN(A)、水飞蓟宾对照品(B)和水飞蓟素SLN(C)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank SLN (A), silibinin reference substance (B), and silymarin-loaded SLN (C)

mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.35 mol/L醋酸溶液(48:52),体积流量1 mL/min,检测波长288 nm,进样量20 μL。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取水飞蓟宾对照品10.3 mg置于50 mL量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,得质量浓度为206 mg/L对照品储备液,置4℃冰箱保存,备用。

2.2.3 水飞蓟素 SLN 及空白 SLN 供试品溶液的制备 精密量取水飞蓟素SLN水分散体溶液1 mL,置于25 mL量瓶中加甲醇适量,水浴80℃加热10 min后,冷却至常温,25 000 r/min离心15 min,取上清液加甲醇稀释至刻度,再精密吸取上清液2 mL至10 mL量瓶中,流动相定容,经0.22 μm微孔滤膜滤过,即得水飞蓟素SLN供试品溶液;同法制得空白SLN供试品溶液。

2.2.4 线性关系考察 分别精密量取对照品储备液0.5、1、2、3、4 mL于10 mL量瓶中,用流动相稀释至刻度,分别取20 μL进样测定,记录峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度(X)为横坐标进行线性回归分析,得回归方程 $Y=52\ 168\ X+143\ 142$ ($r=0.999\ 1$),结果表明水飞蓟宾在10.3~82.4 mg/L有良好的线性关系。

2.2.5 专属性考察 取“2.2.3”项下制备的供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样20 μL,结果表明在本色谱条件下,空白辅料对水飞蓟宾的测定无干扰。色谱图见图1。

2.2.6 精密度试验 精密量取对照品储备液适量至10 mL量瓶中,用流动相定容,配制低、中、高(10.3、41.2、82.4 mg/L)3个质量浓度溶液各5份,按“2.2.1”项下色谱条件进样20 μL,分别每间隔2 h测定1次,共测定5次,连续测定5 d,记录峰面积,并计算日内和日间精密度,结果3种质量浓度对照品溶液的日内RSD分别为0.79%、0.83%、0.67%;日间RSD分别为1.25%、1.69%、1.43%。

2.2.7 稳定性试验 取同一水飞蓟素 SLN 供试品溶液, 分别在 0、2、4、6、8、12、24 h 进行测定, 结果水飞蓟素峰面积的 RSD 为 1.12% ($n=6$), 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.8 加样回收率试验 分别精密吸取对照品储备液 0.1、2、4 mL, 至 10 mL 量瓶中, 以空白 SLN 胶体溶液定容, 按“2.2.3”项下方法制成供试品溶液, 以“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 计算回收率。结果 3 种质量浓度供试品溶液的平均回收率分别为 98.93%、99.76%、99.82%, RSD 分别为 1.04%、0.78%、0.97%。

2.3 水飞蓟素 SLN 包封率和载药量的测定

2.3.1 包封率的测定 采用低温超速离心法测定水飞蓟素 SLN 的包封率。精密量取水飞蓟素 SLN 2.0 mL 置超速离心管中, 25 000 r/min 离心 15 min, 移取下层澄清液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定游离水飞蓟素的质量 ($M_{\text{游离}}$), 同时量取水飞蓟素 SLN 溶液 0.5 mL, 加入适量无水乙醇, 水浴加热, 冷却后 25 000 r/min 离心, 将上清液置 10 mL 量瓶中流动相稀释至刻度, 测定上清液中水飞蓟素的总质量 ($M_{\text{总量}}$), 计算药物包封率 (EE)。

$$EE = (M_{\text{总量}} - M_{\text{游离}}) / M_{\text{总量}}$$

2.3.2 载药量的测定 采用冷冻干燥法测定水飞蓟素 SLN 的载药量。精密量取水飞蓟素 SLN 溶液 2.0 mL 经冷冻干燥后测定冻干粉质量 ($M_{\text{冻干}}$), 根据下列公式计算药物载药量 (DL)。

$$DL = (M_{\text{总量}} - M_{\text{游离}}) / (M_{\text{冻干}} - M_{\text{游离}})$$

2.4 SLN 粒径的测定

所制备的水飞蓟素 SLN 为淡黄色透明胶体溶液。精密量取水飞蓟素 SLN 溶液 5.0 mL 置 25 mL 量瓶中, 加双蒸水稀释至刻度后, 采用 Malvern 激光粒度分布仪测定粒径。

2.5 处方优化试验

2.5.1 试验设计^[8-10] 采用 Box-Behnken 效应面法优化处方。在单因素考察的基础上, 选取对水飞蓟素 SLN 包封率、载药量和粒径影响较为显著的 3 个因素, 即处方中油相的质量分数, 乳化剂的用量与药物的质量分数, 在 3 个水平上进行了优化研究, 以水飞蓟素 SLN 的包封率 (Y_1)、粒径 (Y_2) 和载药量 (Y_3) 为响应值, 建立数学模型优化处方。3 个因素为单硬脂酸甘油酯的质量分数、乳化剂的质量分数、药物的质量分数分别记作 X_1 、 X_2 、 X_3 , 每个因素的低、中、高 3 个水平分别记作 -1、0、+1,

表 1 列出了各因素的不同水平。

2.5.2 数据处理 分别测定 Y_1 、 Y_2 和 Y_3 3 个指标, 结果见表 1, 利用 Box-Behnken 实验设计软件对各指标数据进行回归分析, 得二次多元回归模型为:

$$Y_1 = 99.06 + 0.26 X_1 + 0.93 X_2 + 0.27 X_3 - 0.32 X_1 X_2 - 0.12 X_1 X_3 + 1.53 X_2 X_3 + 0.44 X_1^2 - 1.28 X_2^2 - 0.71 X_3^2 \quad (r=0.9525)$$

$$Y_2 = 108.4 + 60.8 X_1 - 131 X_2 + 24.67 X_3 - 52.17 X_1 X_2 + 27.5 X_1 X_3 - 5.83 X_2 X_3 + 6.71 X_1^2 + 79.55 X_2^2 + 5.88 X_3^2 \quad (r=0.9943)$$

$$Y_3 = 8.88 + 0.016 X_1 + 0.033 X_2 + 4.11 X_3 - 0.059 X_1 X_2 + 0.053 X_1 X_3 + 0.054 X_2 X_3 + 0.10 X_1^2 + 2.250 \times 10^{-3} X_2^2 - 0.11 X_3^2 \quad (r=0.9995)$$

表 1 Box-Behnken 实验设计及响应值 ($n=3$)

Table 1 Box-Behnken experimental design and response values ($n=3$)

处方	因 素			$Y_1/\%$	Y_2/nm	$Y_3/\%$
	$X_1/\%$	$X_2/\%$	$X_3/\%$			
1	5 (-1)	2 (-1)	10 (0)	96.20	207	8.85
2	10 (1)	8 (1)	10 (0)	99.60	78	9.00
3	5 (-1)	8 (1)	10 (0)	99.20	55	9.06
4	5 (-1)	5 (0)	15 (1)	99.40	63	12.94
5	7.5 (0)	5 (0)	10 (0)	99.07	119	9.00
6	10 (1)	2 (-1)	10 (0)	—	—	—
7	7.5 (0)	5 (0)	10 (0)	99.05	92	8.99
8	7.5 (0)	5 (0)	10 (0)	99.07	124	9.00
9	7.5 (0)	2 (-1)	5 (-1)	97.90	300	4.70
10	7.5 (0)	5 (0)	10 (0)	99.07	102	8.70
11	10 (1)	5 (0)	15 (1)	99.20	234	13.05
12	7.5 (0)	5 (0)	10 (0)	99.05	106	8.70
13	5 (-1)	5 (0)	5 (-1)	98.14	63	4.79
14	7.5 (0)	2 (-1)	15 (1)	—	—	—
15	10 (1)	5 (0)	5 (-1)	98.40	124	4.69
16	7.5 (0)	8 (1)	5 (-1)	96.20	44	4.63
17	7.5 (0)	8 (1)	15 (1)	99.30	76	12.94

从 3 个拟合的二项式方程的相关系数来看, 说明设计模型拟合程度较好, 该模型是合适的, 可以用此模型对水飞蓟素 SLN 的处方进行分析和预测。从统计结果分析可知, 模型 (Y_1) 中 X_2 、 $X_2 X_3$ 、 X_2^2 ($P<0.05$) 显著, 其他不显著; 模型 (Y_2) 中 X_3 、 $X_1 X_2$ 、 $X_1 X_3$ ($P<0.05$) 显著, X_1 、 X_2 、 X_2^2 ($P<0.001$) 极显著, 其他不显著; 模型 (Y_3) 中 X_3 ($P<0.001$)

极显著；其他不显著。

2.5.3 效应面优化与预测 根据剂型设计需要，目标参数要求获得 EE 和 DL 数值较大而粒径分布较小的处方，应用 Design Expert 实验设计软件绘

制各因变量对响应值影响的三维曲面图（图 2），按照上述限定条件进行优化，得到优化后处方见表 2。

按此处方制备了 4 批水飞蓟素 SLN，其包封率、

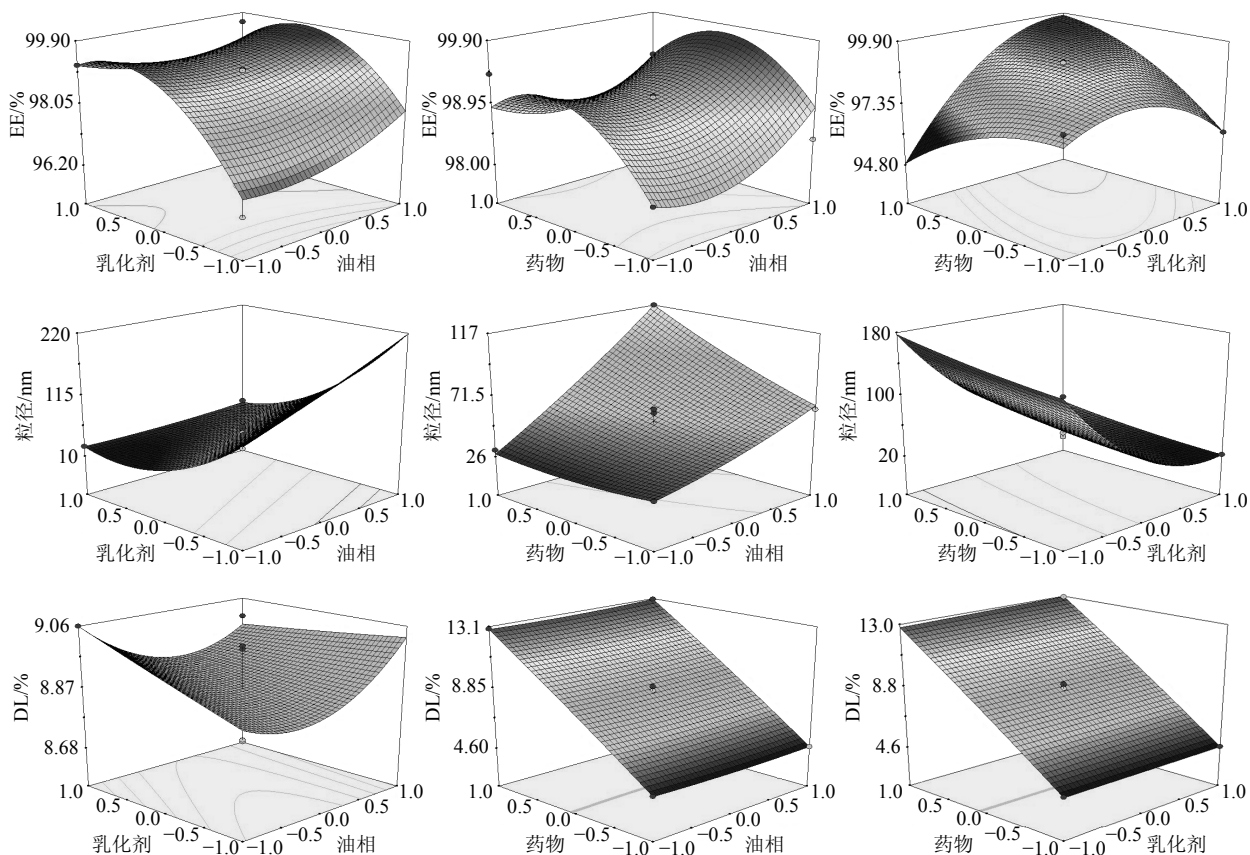


图 2 各因素与响应值的三维图

Fig. 2 Three-dimensional plot of independent factors and response values

表 2 水飞蓟素 SLN 模型验证中的预测值和实测值

Table 2 Predicted and actual values of silymarin-loaded SLN formulation

编号	X_1	X_2	X_3	EE/%			粒径/nm			DL/%		
				预测值	实测值	偏差	预测值	实测值	偏差	预测值	实测值	偏差
1	-0.81	0.67	1.00	100.11	99.27	0.84	51	56	-9.80	13.01	12.95	0.46
2	-0.86	0.75	0.96	100.24	99.23	1.00	66	52	-21.21	13.01	12.83	1.38
3	-0.97	0.69	0.96	100.22	99.12	1.09	54	48	-11.10	13.01	12.79	1.69
4	-0.98	0.75	1.00	100.26	99.09	1.17	57	58	-1.65	13.02	12.94	0.64

偏差 = (预测值 - 实测值) / 预测值

error = (predicted value - actual value) / predicted value

载药量和粒径见表 2。可知，因 4 号处方的实验观察值和模型预测值比较接近，偏差最小，模型的预测性良好，故选择 4 号处方作为优化处方。

2.5.4 处方确定及水飞蓟素 SLN 的表征 将代码优化数值通过下列公式转化成优化的实际数值。

代码值 = (实际值 - 实际值的平均值) / 实际值的差值

油相质量分数/% = $2.5(X_1) + 7.5$

乳化剂质量分数/% = $3(X_2) + 5$

药物质量分数/% = $5(X_3) + 10$

即优化后的处方为 5.05% 单硬脂酸甘油酯，

7.25% Poloxmer 188 作为乳化剂, 药物的质量分数为 15%, 采用“2.1”项下方法制备水飞蓟素 SLN, 并进行电镜观察, 测定其粒径分布范围及 ζ 电位, 平均粒径为 58.41 nm, 多分散指数 (PDI) 为 0.301, ζ 电位为 -15.8 mV。结果见图 3。

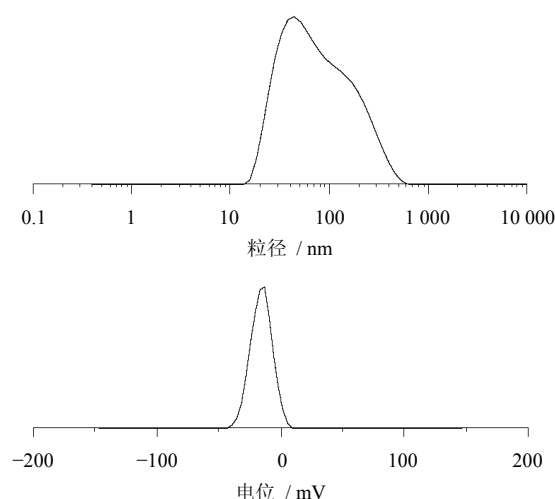


图 3 水飞蓟素 SLN 粒径分布及 ζ 电位图

Fig. 3 Particle distribution and ζ -potential of silymarin-loaded SLN

3 讨论

目前药剂学处方优化过程中, 普遍采用正交设计和均匀设计即用线性数学模型进行拟合, 试验次数虽少, 但精度不够, 对于非线性拟合的模型不适合, 而 Box-Behnken 实验设计属于效应面法的一种设计, 它可以在因素与响应值之间建立数学模型, 通过对数学模型的处理得出多变量之间的相互关系与影响因素, 从而获得最佳工艺条件^[11]。

在采用 Box-Behnken 实验设计优化水飞蓟素 SLN 处方的过程中, 从各因素与响应值之间的三维效应曲面图可以看出, 随油相质量分数的增加, 包封率和载药量呈增加趋势, 这与油相作为脂溶性药物的溶剂有关, 当油相质量分数增加时能使更多的药物溶解进入油相中使包封率和载药量增加; 但粒径分布也呈增加趋势, 意味着所制备的 SLN 的粒径变大, 原因是随脂质浓度的增大, 在高浓度情况下脂质会发生合并, 同时脂质提供额外的空间用来包封药物分子, 减少总的表面积而使粒径变大。随 Poloxamer 188 浓度的增加粒径减小, 这由于表面活性剂能够降低水相和油相的表面张力, 同时有助于稳定新生成的相而防止粒子聚集。包封率随 Poloxamer 188 浓度的增加而增加, 由于水相中表面

活性剂的浓度升高而使药物在水相中的溶解度增加, 而一部分药物被附着在 SLN 的表面而使包封率增加^[12]。因此在考虑 SLN 处方时要进行综合评价从而得出最优处方。

在 SLN ζ 电位测定过程中, 其 ζ 电位值绝对值低于 25~35 mV, 预示着所制备的 SLN 不太稳定, 长时间放置后有可能出现絮凝合并, 在以后的研究中还需进一步优化乳化剂的种类, 如采用混合乳化剂作为乳化剂以增加 SLN 的稳定性。

参考文献

- [1] 孙铁民, 李 钺. 水飞蓟素药理研究进展 [J]. 中草药, 2000, 31(3): 229-231.
- [2] 韩月恒, 韩 炯, 李 莹, 等. 水飞蓟素对乳腺癌细胞系的作用及其机制研究 [J]. 中草药, 2003, 34(3): 238-241.
- [3] 刘泽玉, 苏柘瑾, 杨 明, 等. 青黛炮制过程中靛蓝定向生成的工艺设计与优化 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 56-60.
- [4] Bhalekar M R, Pokharkar V, Madgulkar A, *et al.* Preparation and evaluation of miconazole nitrate-loaded solid lipid nanoparticles for topical delivery [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2009, 10(1): 289-296.
- [5] 张 卿, 张良珂, 袁 佩, 等. 和厚朴酚固体脂质纳米粒的制备及性质研究 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 691-693.
- [6] Zhao X L, Yang C R, Yang K L, *et al.* Preparation and characterization of nanostructured lipid carriers loaded traditional Chinese medicine, zedoary turmeric oil [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2010, 36(7): 773-780.
- [7] 据 辉, 郝存江, 尹 飞, 等. 姜黄素固体脂质纳米粒的制备及表征 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 420-426.
- [8] 马 伟, 尹莉芳, 周建平, 等. Box-Behnken 中心组合设计优化甘草酸二铵缓释片的处方 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1486-1490.
- [9] 郭 洁, 洪子雯, 方晓玲. Box-Behnken 实验设计法优化表阿霉素脂质体的处方工艺 [J]. 复旦学报: 医学版, 2007, 34(6): 816-820.
- [10] 邢传峰, 胡海洋, 杨春荣, 等. Box-Behnken 效应面法优化长春西汀长循环脂质体处方 [J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(10): 761-766.
- [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]. 中国现代应用药学杂志, 2007, 24(6): 455-457.
- [12] Yang C R, Zhao X L, Hu H Y, *et al.* Preparation, optimization and characteristic of huperzine a loaded nanostructured lipid carriers [J]. *Chem Pharm Bull*, 2010, 58(5): 656-661.