

Box-Behnken 效应面法优化多西他赛长循环脂质体处方

程 怡*, 吴 琼, 余秋强, 赵菊香

广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 优化多西他赛长循环脂质体 (DLCL) 处方。方法 采用薄膜蒸发法制备 DLCL, 分别以卵磷脂 (PC) 与多西他赛 (DOC) 质量比 (X_1)、PC 与胆固醇 (Chol) 质量比 (X_2)、DSPE-PEG 2000 与 PC 物质的量之比 (X_3) 为考察对象, 包封率 (Y_1)、载药量 (Y_2)、综合指标 OD 值为评价指标, 采用 Box-Behnken 效应面法筛选 DLCL 的最佳处方。结果 最优处方为 $X_1=0.616 2$, $X_2=1.0$, $X_3=-1.0$; DLCL 的包封率为 $(94.71 \pm 1.75)\%$, 载药量为 $(5.37 \pm 0.43)\%$, 标准偏差均小于 10%; 平均粒径 139.6 nm, 分布均匀, 体外释放试验结果表明其具有明显的缓释效果。结论 采用 Box-Behnken 效应面法优化 DLCL 处方是有效、可行的。

关键词: 多西他赛; 长循环脂质体; Box-Behnken; 效应面法; 体外释放

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2012)10-1946-05

Formula optimization of Docetaxel long-circulation liposomes by Box-Behnken design and response surface method

CHENG Yi, WU Qiong, YU Qiu-qiang, ZHAO Ju-xiang

School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To optimize the formula of Docetaxel (DOC) long-circulation liposomes (DLCL). **Methods** DLCL was prepared by the membrane-hydration method. The effects of phosphatidylcholine (PC)-DOC (X_1), PC-cholesterol (Chol) (X_2), and the amount of DSPE-PEG 2000 (X_3) were observed. The encapsulation efficiency (Y_1), drug loading amount (Y_2), and the general requirements (Y_3) were evaluated and the formula was optimized by Box-Behnken design and response surface method. **Results** The optimal formula was as following: $X_1=0.616 2$, $X_2=1.0$, and $X_3=-1.0$; The encapsulation efficiency was $(94.71 \pm 1.75)\%$, drug loading amount was $(5.37 \pm 0.43)\%$. The standard deviations were all below 10%. The average particle size was 139.6 nm. Moreover, *in vitro* release tests showed that the prepared DLCL had obvious sustained-release effects. **Conclusion** Using Box-Behnken design and response surface method to prepare DLCL is effective and feasible.

Key words: Docetaxel (DOC); long-circulating liposomes; Box-Behnken design; response surface method; *in vitro* release

多西他赛 (多西紫杉醇, Docetaxel, DOC) 是由浆果紫杉 (*Taxus baccata* L., European yew) 针叶提取物经结构修饰合成制备, 为白色结晶粉末, 难溶于水, 对卵巢癌、乳腺癌、非小细胞肺癌及其他实体瘤等均有显著的抑制作用^[1-2]。现上市的药物有泰素帝 (Taxotere), 由法国罗纳普朗克乐安公司开发, 以注射剂为主, 辅以粉针和胶囊剂, 但注射剂易引起严重的过敏反应且生物利用度低。因此研发一种有良好溶解性能、不良反应低、生物利用度高的新的载药系统一直是研究的热点。目前普通脂质体、微乳、纳米粒等新剂型的开发研究已有相关

文献报道, 但尚在实验阶段^[3-4], 且各种给药系统都或多或少存在缺陷, 仍需继续研究。

长循环脂质体即普通脂质体经 PEG 修饰, 以增加脂质体的柔顺性和亲水性, 有效阻止血浆中促吞噬物质 (如调理素、抗体、高密度脂蛋白等) 的活性, 阻碍单核吞噬细胞系统 (mononuclear-phagocyte system, MPS) 的吞噬作用, 使得制剂的稳定性、血浆中的稳定性等方面皆优于普通脂质体。Immordino 等^[5]比较了普通脂质体和 PEG 化脂质体剂型的包封率、稳定性、生物分布及药动学特征, 得出以卵磷脂/磷脂酰丝氨酸/二硬脂酰磷脂乙醇胺-聚乙二醇

收稿日期: 2012-02-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30772790)

作者简介: 吴 琼 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药物载体及其新型给药系统。Tel: 15915769101 E-mail: cupid881221@126.com

*通讯作者 程 怡 Tel: (020)39358041 E-mail: vip.chengyi@gzhtcm.edu.cn

网络出版时间: 2012-08-14 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120814.1117.004.html>

2000/胆固醇 (PC/PG/DSPE-PEG 2000/Chol 9:1:2:0.2) 制备的脂质体最有效。为显著提高 DOC 脂质体的稳定性, 延长其在体内的循环时间, 本实验采用薄膜蒸发法制备 DOC 长循环脂质体 (Docetaxel long-circulation liposomes, DLCL), Box-Behnken 效应面法 (response surface methodology, RSM) 进行处方优化, 力求得到质优的 DLCL^[6]。

1 仪器与材料

Dionex 高效液相色谱仪 (P680 型泵, PDA-100 型检测器, ASI-100 自动进样器, 美国戴安公司), JY96-II 超声波细胞粉碎机 (宁波心之生物科技), Zetasizer Nano 激光粒度分析仪 (英国 Malvern 公司), 90-1 型恒温磁力搅拌器 (上海沪西分析仪器有限公司), ZRS-8G 智能溶出试验仪 (天津市盛鑫通达科技有限公司), Sartorius BS110S 电子天平 (北京赛多利斯天平有限公司), 微孔滤膜 (德国 Membrana 公司), MD34 透析袋 (M_w $0.8 \times 10^4 \sim 1.4 \times 10^4$, 上海百赛生物技术有限公司)。

DOC 原料药 (质量分数 >99%, 北京诺瑞医药技术有限公司), DOC 对照品 (质量分数 98.0%, 批号 10066-201002, 中国药品生物制品检定所), 注射用蛋黄卵磷脂 (PC-98T, 上海艾维特有限公司), 二氢胆固醇 (Chol, 质量分数 >96%, Acros 公司), DSPE-PEG 2000 (德国 Lipoid 公司), 甲醇、乙腈

为色谱纯, 其他试剂皆为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 DLCL 的制备

按处方量称取 DOC、PC、Chol、DSPE-PEG 2000 等辅料溶于适量无水氯仿中, 真空旋转蒸发除去有机溶剂, 制得均匀磷脂膜, 置真空干燥器内干燥过夜。加入一定体积的 PBS 7.2 溶液真空 50 °C 下水化 30 min, 超声后过 0.45、0.22 μm 的微孔滤膜即得 DLCL, 于 0 °C 下保存。

2.2 定量测定方法学的建立

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Diamonsil C₁₈(2) 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (55:45), 检测波长 230 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 20 μL , 柱温 35 °C, 理论塔板数以 DOC 色谱峰计算大于 3 000, DOC 保留时间为 8.8 min。

2.2.2 方法的专属性 100 mg/L DOC 对照品溶液; 供试品溶液: 取 DLCL 脂质体 0.5 mL 置 25 mL 量瓶中, 甲醇破乳并稀释至刻度, 即得; 空白对照液: 按“2.1”项方法制备缺 DOC 空白脂质体, 取空白脂质体 0.5 mL 置 25 mL 量瓶中, 甲醇破乳并稀释至刻度, 即得。在上述色谱条件下, DOC 与辅料分离度良好, 峰形稳定, 辅料及溶剂对 DOC 的测定无干扰, 见图 1。

2.2.3 线性关系考察 取 DOC 对照品适量, 精密

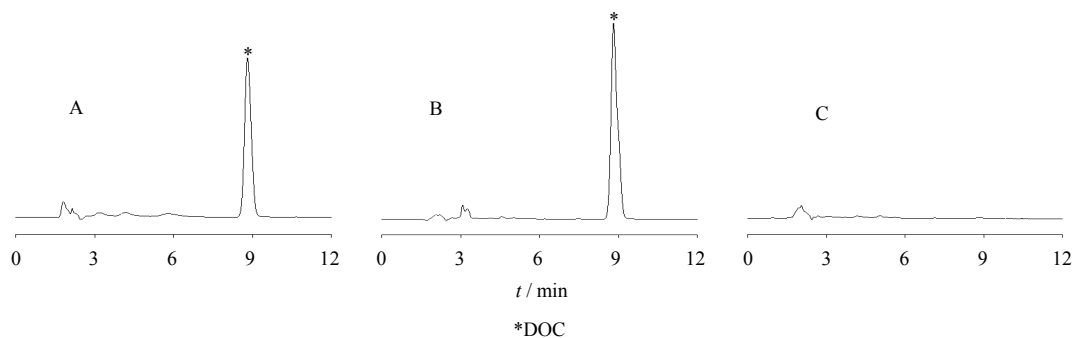


图 1 DOC (A)、DLCL 供试品溶液 (B) 和空白对照液 (C) 的 HPLC 色谱图
Fig. 1 HPLC chromatograms of DOC (A), DLCL (B), and blank control solution (C)

称定, 加甲醇溶解并稀释成 1 mg/mL 对照品储备液。精密移取一定量的储备液, 配制成 5、25、50、75、100 mg/L 系列对照品溶液, 按上述色谱条件进行测定, 记录峰面积。以质量浓度 (C) 为横坐标, 峰面积 (A) 为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $A = 419\,365\,C - 303\,638$, $r = 0.999\,5$, 结果表明 DOC 在 5~100 mg/L 与峰面积呈良好的线性关系。

2.2.4 回收率和精密度的测定 取 DOC 对照品储

备液 0.1、0.5、1 mL, 分别加入 0.5 mL 空白脂质体, 甲醇定容破乳至 10 mL。重复 3 次, 在 230 nm 处测定峰面积, 计算回收率, 分别为 99.03%、97.82%、98.59%, RSD 分别为 1.40%、0.91%、0.62%。

取 5、50、100 mg/L 的对照品溶液, 于 1 d 内重复进样 5 次, 计算日内精密度, RSD 分别为 1.29%、1.74%、0.93%; 连续 5 d 分别进样 5 次, 计算日间精密度, RSD 分别为 1.74%、1.45%、0.98%。

结果回收率和精密度均符合试验要求。

2.2.5 稳定性考察 取“2.2.2”项下 DLCL 供试品溶液，分别在 2、4、6、12 h 注入液相色谱仪，记录峰面积，结果 12 h 内峰面积值稳定，RSD 为 0.24%。

2.2.6 重复性考察 取同一批号的 DLCL 5 份，按“2.2.2”项下配制供试品溶液，进样，液相色谱仪测定，结果 DOC 质量浓度值稳定，RSD 为 1.13%。

2.3 包封率和载药量测定

采用透析法测定。精密移取 DLCL 1 mL 于透析袋内，两端用透析夹夹紧后，置 150 mL 0.5% 聚山梨醇酯透析液中，0 °C 下磁力搅拌，透析 8 h 后，完全转移透析袋内的溶液于 25 mL 量瓶中，甲醇定容，过 0.45 μm 微孔滤膜，进样，高效液相色谱仪测定 DOC 质量浓度为 C₁；另取 DLCL 1 mL 置 25 mL 量瓶中，甲醇破乳并稀释至刻度，过 0.45 μm 微孔滤膜，进样，高效液相色谱仪测定 DOC 总质量浓度为 C₂；计算 DOC 包封率和载药量。

$$\text{包封率} = C_1 / C_2$$

$$\text{载药量} = m_{\text{drug}} / m_{\text{lipid}}$$

m_{drug} 为 DLCL 中 DOC 的质量，m_{lipid} 为 DLCL 处方的总质量

2.4 Box-Behnken 效应面法优化处方

采用 Box-Behnken 设计，在预试验的基础上选择对 DLCL 性质影响较显著的 3 个因素，即卵磷脂与 DOC 质量比 (X₁)、卵磷脂与胆固醇质量比 (X₂) 以及 DSPE-PEG 2000 与 PC 物质的量之比 (X₃)，以包封率 (Y₁)、载药量 (Y₂) 为评价指标，建立模型，优化 DLCL 处方。试验设计见表 1。

在多指标的优化试验中，每个指标优选的条件可能会相互矛盾，因此引入综合指标 OD 值^[7-8]可考察各指标的综合效果，得到较优的结果。本试验中 Y₁、Y₂ 都欲达到最大化的指标，因此需要采用 OD 值进行综合评价。计算出 Y₁、Y₂ 两指标的 d_i 值后，即可计算 OD 值。

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

$$\text{OD} = (d_1 d_2 d_3 \cdots d_n)^{1/n}$$

Y_i 为实测值，Y_{min} 和 Y_{max} 分别为各指标可以接受的最小值和最大值

最小值的选择依据是试验结果中的较低值或满足药典规定的最低要求；最大值的选择依据是当指标值超过最大值时，产品质量无明显改善。因此，当某个试验的指标 ≥ Y_{max} 时，将 d_i 设为 1；反之，当指标 ≤ Y_{min} 时，d_i 则设为 0。根据试验目的和结果，设定每个评价指标的最小值和最大值：Y₁ 80%~

表 1 Box-Behnken 设计表及效应值 (n=3)

Table 1 Box-Behnken design and OD values (n=3)

| 标准序 | 运行序 | X ₁ | X ₂ | X ₃ /% | Y ₁ /% | Y ₂ /% | OD |
|-----|-----|----------------|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|
| 8 | 1 | 10 (-1) | 3 (-1) | 4 (0) | 87.44 | 2.82 | 0 |
| 15 | 2 | 20 (1) | 3 (-1) | 4 (0) | 85.89 | 4.08 | 0.252 |
| 6 | 3 | 10 (-1) | 5 (1) | 4 (0) | 91.59 | 3.05 | 0.076 |
| 10 | 4 | 20 (1) | 5 (1) | 4 (0) | 88.91 | 4.06 | 0.307 |
| 4 | 5 | 10 (-1) | 4 (0) | 2 (-1) | 76.39 | 5.14 | 0 |
| 12 | 6 | 20 (1) | 4 (0) | 2 (-1) | 84.62 | 4.44 | 0.258 |
| 13 | 7 | 10 (-1) | 4 (0) | 6 (1) | 98.19 | 2.92 | 0 |
| 1 | 8 | 20 (1) | 4 (0) | 6 (1) | 79.46 | 3.11 | 0 |
| 5 | 9 | 15 (0) | 3 (-1) | 2 (-1) | 77.36 | 3.18 | 0 |
| 9 | 10 | 15 (0) | 5 (1) | 2 (-1) | 94.58 | 5.53 | 0.607 |
| 7 | 11 | 15 (0) | 5 (1) | 6 (1) | 85.69 | 2.88 | 0 |
| 14 | 12 | 15 (0) | 4 (-1) | 4 (1) | 91.36 | 3.13 | 0.122 |
| 2 | 13 | 15 (0) | 4 (0) | 4 (0) | 92.62 | 3.17 | 0.146 |
| 3 | 14 | 15 (0) | 4 (0) | 4 (0) | 92.48 | 3.09 | 0.106 |
| 11 | 15 | 15 (0) | 4 (0) | 4 (0) | 91.86 | 3.21 | 0.158 |

100%，Y₂ 3%~8%。试验结果见表 1。

2.4.1 模型拟合 采用 Minitab 15 软件对各因素进行拟合，根据各项指标 F 检验的结果，剔除 P>0.1 项后，再进行二次拟合，得到简化模型。

$$Y_1 = 91.93 - 1.84 X_1 + 2.34 X_2 + 2.72 X_3 - 3.17 X_1^2 - 4.38 X_3^2 - 6.74 X_1 X_3 - 5.72 X_2 X_3 \quad (R^2 = 0.954)$$

$$Y_2 = 3.35 + 0.22 X_1 + 0.28 X_2 - 0.78 X_3 + 0.43 X_3^2 - 0.65 X_2 X_3 \quad (R^2 = 0.804)$$

$$\text{OD} = 0.095 + 0.093 X_1 + 0.077 X_2 - 0.093 X_3 + 0.075 X_2^2 - 0.065 X_1 X_3 - 0.182 X_2 X_3 \quad (R^2 = 0.899)$$

2.4.2 方差和显著性检验 其中方程 OD 的 R² 为 0.899，方差分析结果显示回归 (regression)、线性 (linear)、平方 (square)、交互作用 (interaction) 的 P 值皆 < 0.05，方程失拟 (reaidual error) 检验的 P 值 > 0.05，说明该回归模型拟合情况良好。方程 Y₁ 和 Y₂ 的 R² 分别为 0.954 和 0.804，方差分析结果显示回归、线性、平方、交互作用的 P 值皆 < 0.1，方程失拟检验的 P 值 < 0.05 说明该回归模型拟合情况不是很理想，不能准确分析预测包封率和载药量。

从表 2 回归系数显著性检验结果可知，模型 OD 除 X₂X₂ 项不显著 (P>0.05) 外，大多数项都很显著 (P<0.05)；模型 Y₁ 各项都很显著 (P<0.05)；模型 Y₂ 大多数项都不显著。综合考虑选用模型 OD 对 DLCL 处方进行分析和预测。

2.4.3 效应面优化和预测 应用 Mintab 15 软件绘制较显著的 2 个因素对评价指标 OD 的三维曲面图

(另一自变量设为中心点值), 见图 2, 考察较显著的 2 个因素对评价指标 OD 的影响。

2.4.4 优化工艺验证试验 根据 Box-Behnken 效应面法试验设计结果, 得到优化后的处方为 $X_1 = 0.6162$, $X_2 = 1.0$, $X_3 = -1.0$ 。按最优处方制备 3 批 DLCL, 测定其包封率和载药量, 结果见表 3。

试验值与模型预测值对比, 结果偏差绝对值均

小于 10%, 说明模型 OD 可较好地描述因素与指标之间的关系, 能较好地预测分析 DLCL 的处方。

2.5 粒径的测定

将按优化处方制备的 3 批 DLCL 混悬液, 分别用水稀释到适当质量浓度, 加入粒径分析仪的石英测量池中, 测其粒径大小及分布情况, 结果见图 3。粒径分布呈单峰正态, 范围在 50~200 nm, 平均粒

表 2 回归方程系数的显著性检验

Table 2 Significance test of coefficient in regression equation

| 考察项 | Y_1 | | | Y_2 | | | OD | | |
|----------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|
| | SE | T | P | SE | T | P | SE | T | P |
| 常量 | 0.928 | 99.109 | 0.000 | 0.179 | 18.695 | 0.000 | 0.027 | 3.568 | 0.007 |
| X_1 | 0.683 | -2.699 | 0.031 | 0.168 | 1.311 | 0.222 | 0.025 | 3.702 | 0.006 |
| X_2 | 0.683 | 3.426 | 0.011 | 0.168 | 1.720 | 0.119 | 0.025 | 3.078 | 0.015 |
| X_3 | 0.683 | 3.983 | 0.005 | 0.168 | -4.655 | 0.001 | 0.025 | -3.712 | 0.006 |
| X_1X_1 | 1.002 | -3.169 | 0.016 | 剔除 | | | 剔除 | | |
| X_2X_2 | 剔除 | | | 剔除 | | | 0.037 | 2.050 | 0.075 |
| X_3X_3 | 1.002 | -4.374 | 0.003 | 0.246 | 1.779 | 0.109 | 剔除 | | |
| X_1X_2 | 剔除 | | | 剔除 | | | 剔除 | | |
| X_1X_3 | 0.965 | -6.982 | 0.000 | 剔除 | | | 0.035 | -1.823 | 0.106 |
| X_2X_3 | 0.965 | -5.928 | 0.001 | 0.237 | -0.274 | 0.023 | 0.035 | -5.151 | 0.001 |

SE-系数标准误; T-回归方程系数 t-检验的统计量; P-P 概率

SE-standard error of coefficient; T-statistic of t-test; P-P value

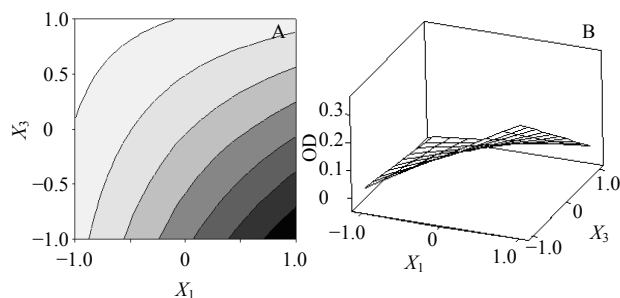


图 2 X_1 和 X_3 对效应值 OD 的等高线图 (A) 和三维曲面图 (B)

Fig. 2 Contour (A) and three dimension surface chart (B) of X_1 and X_3 against OD

表 3 优化处方的预测值和观察值 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Predicted and observed values of optimized formula ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

| 指标 | 预测值 | 观察值 | 预测误差 / % |
|---------|-------|--------------|----------|
| 包封率 / % | 94.71 | 95.24 ± 1.75 | 0.56 |
| 载药量 / % | 5.63 | 5.37 ± 0.43 | 4.62 |
| OD 值 | 0.62 | 0.63 ± 1.65 | 1.61 |

预测误差 = (预测值 - 观察值) / 预测值

Predicted error = (predicted value - observed value) / predicted value

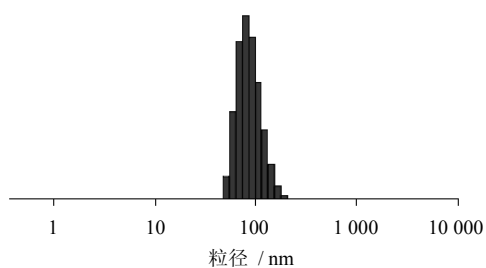


图 3 DLCL 粒径分布图

Fig. 3 Particle size distribution of DLCL

径为 139.6 nm。

2.6 DLCL 体外释放度的测定

取 DOC 溶液、DOC 普通脂质体及 DLCL 各 2.0 mL (DOC 质量浓度相同), 分别加入预处理好的透析袋中, 两端扎牢, 绑于溶出仪的搅拌浆上, 按照《中国药典》2010 年版第三法测定释放度。释放条件: pH 7.4 的 PBS 250 mL (脱气), (37 ± 0.5) °C, 100 r/min。定时取样 2 mL, 并及时补充等温的同体积空白介质。微孔滤膜滤过后进样, 高效液相色谱仪测其累积释放量 (M_n), 进而计算累积释放度, 结果见图 4。DOC 普通脂质体及 DLCL 药物累积释放

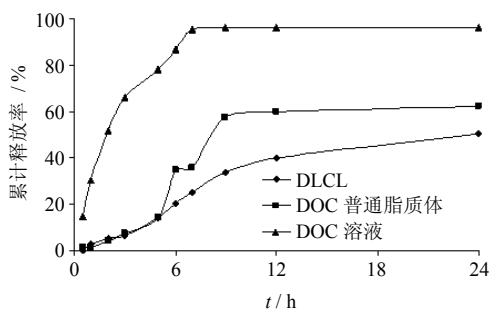


图4 累积释放曲线

Fig. 4 Cumulative release curves

度(Q)对时间(t)进行模型拟合,结果符合 Higuchi 方程,分别为 $Q = -0.159 + 0.186 t^{1/2}$ ($r = 0.944 0$) 和 $Q = -0.118 + 0.134 t^{1/2}$ ($r = 0.956 7$)。

$$M_n = c_n V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} c_{n-1} V$$

V_0 为释放介质体积 (mL), c_n 为第 n 次取样时的质量浓度 (mg/mL), V 为取样体积 (mL)

3 讨论

Box-Behnken 效应面法是近年来国外药学工作者常用的试验设计方法,适用于多因素多水平试验设计,解决了正交设计、均匀设计试验精度不够,无法精确得到最佳点,不能灵敏地考察各因素的交互作用等缺点,相比于中心复合设计法试验次数少,节约成本。

本实验采用 Box-Behnken 效应面法优化 DLCL 的处方,构建了 3 个模型,其中模型 OD 拟合情况良好。研究表明,影响脂质体质量的主要因素是卵磷脂与 DOC 质量比和 DSPE-PEG 2000 与 PC 物质的量之比,但卵磷脂与 DOC 质量比与包封率成负相关、与 OD 值成正相关; DSPE-PEG 2000 与 PC 物质的量之比与包封率成正相关、与 OD 值成负相关,评价指标 Y_1 和 OD 出现了相互矛盾的情况,且模型 Y_1 方程失拟的 P 值 < 0.05 , 方程失拟,所以选择 OD 值为最重要指标,其值越大越好,得到最佳优化处方。经验证优化处方的包封率、载药量的预测值与试验值吻合情况良好,基本达到脂质体设计的指标^[9-10]。

通过激光粒度分析仪测定优化的 3 批 DLCL 的粒径大小及分布情况,结果平均粒径为 139.6 nm,

分布均匀,符合药典规定的粒径要求。

体外释放度试验表明,DOC 普通脂质体和 DLCL 体外释药过程相似,有明显的缓释效果,相比于 DOC 溶液在前 7 h 已经释放 95% 左右的药物,DLCL 的释放量仅为 25% 左右,DOC 普通脂质体释放量为 40% 左右。DLCL 与普通脂质体相比,DSPE-PEG 2000 修饰可降低脂质体中药物的释放速率,单位时间内 DLCL 的累积释放量和 24 h 总释药量均明显低于普通脂质体,此外 2 种脂质体在前 0.5 h 释放速率较快,与 DOC 溶液相似,可能是未包封进脂质体内的游离药物所致。

参考文献

- [1] 王子平, 孙 燕, 张湘茹, 等. 多西他赛治疗晚期乳腺癌的临床研究 [J]. 中华肿瘤杂志, 2006, 28(6): 468-470.
- [2] 郑 颖, 刘建华, 杜 敏, 等. 多西他赛治疗非小细胞肺癌患者过敏反应的护理 [J]. 护理学报, 2005, 13(8): 62-64.
- [3] 张翠霞, 王东凯, 张文涛, 等. 多西紫杉醇脂质体的制备及其性质考察 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(10): 780-783.
- [4] 张晓燕, 平其能. 多西紫杉醇白蛋白纳米粒的制备及体外评价 [J]. 药学进展, 2008, 32(5): 223-226.
- [5] Immordino M L, Brusa P, Arpicco S, et al. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing docetaxel [J]. *J Controlled Release*, 2003, 91(3): 417-429.
- [6] 郭 洁, 洪子雯, 方晓玲. Box-Behnken 实验设计法优化阿霉素脂质体的处方工艺 [J]. 复旦学报: 医学版, 2007, 34(6): 816-820.
- [7] 李 娟, 陆 洋, 王广基. Box-Behnken 效应面法优化甘草次酸长循环脂质体的处方 [J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(2): 120-124.
- [8] 杨 勇, 奉建芳, 张 慧, 等. 星点设计效应面法优化蟾酥固体脂质纳米粒制备工艺 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(8): 650-653.
- [9] 郝吉福, 房信胜, 王建筑, 等. 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 [J]. 中草药, 2011, 42(11): 2221-2225.
- [10] 杨春荣, 孙 忻, 赵秀峰, 等. Box-Behnken 效应面法优化石杉碱甲纳米结构脂质载体处方 [J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(10): 769-773.