

• 药剂与工艺 •

Box-Behnken 设计-效应面法优化柚皮素自微乳给药系统王章姐¹, 胡容峰^{2,3,4*}, 王国凯², 程 卉²

1. 安徽新华学院药学院, 安徽 合肥 230088
2. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230031
3. 安徽省中药研究与开发重点实验室, 安徽 合肥 230038
4. 安徽省 115 现代中药研发创新团队, 安徽 合肥 230038

摘要: 目的 优化柚皮素自微乳给药系统处方。方法 通过测定柚皮素在各辅料中的溶解度, 利用伪三元相图初步筛选柚皮素自微乳给药系统组分; 以柚皮素在不同自微乳处方中的载药量和粒径为指标, 采用 Box-Behnken 设计-效应面法优化, 确定最佳处方。结果 柚皮素自微乳最佳处方选择油酸乙酯为油相, 聚山梨酯 80 为乳化剂, PEG 400 为助乳化剂, 比例为 14.02 : 44.36 : 30, 最佳处方中载药量为 347.167 mg/g, 粒径为 38.21 nm。结论 应用 Box-Behnken 效应面法优化柚皮素自微乳给药系统是有效可行的。

关键词: 柚皮素; 自微乳给药系统; Box-Behnken 设计-效应面法; 溶解度; 载药量; 粒径

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)17-2461-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.17.008

Optimization of self-microemulsifying drug delivery system of naringenin by Box-Behnken design and response surface methodWANG Zhang-jie¹, HU Rong-feng^{2,3,4}, WANG Guo-kai², CHENG Hui²

1. School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Xinhua College, Hefei 230088, China
2. Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China
3. Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine in Anhui Province, Hefei 230038, China
4. Anhui 115 Modern Traditional Chinese Medicine Innovation Team, Hefei 230038, China

Abstract: Objective To optimize the formula of self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for naringenin. **Methods** The solubility test of naringenin in different secondary solvents and pseudoternary phase diagram was utilized to select components of naringenin SMEDDS. According to the drug loading and particle size of naringenin in different self-microemulsifying drug prescriptions, the optimal prescription was determined using the Box-Behnken design and response surface method. **Results** The optimal prescription of naringenin SMEDDS was composed of Ethyloleate (oil), Polysorbate 80 (surfactant), and PEG 400 (co-surfactant), with a weight ratio of 14.02 : 44.36 : 30. The drug loading of naringenin was 347.167 mg/g, and particle size was 38.21 nm in the optimal prescription. **Conclusion** It is effective and practical to use Box-Behnken design and response method for optimizing the naringenin SMEDDS.

Key words: naringenin; self-microemulsifying drug delivery system; Box-Behnken design and response method; solubility; drug loading; particle size

柚皮素(naringenin)是一种二氢黄酮类化合物, 具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、镇咳^[1-3]等多方面药理

作用, 但柚皮素水溶性和脂溶性均较差、口服生物利用度较低, 故其口服制剂在临床上应用受到了限

收稿日期: 2014-04-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274100)

作者简介: 王章姐(1982—), 女, 安徽安庆人, 主要从事药物新剂型研究。Tel: 15375209482 E-mail: 40462634@qq.com

*通信作者 胡容峰 Tel: (0551)65169371 E-mail: hurongfeng@163.com

制。自微乳给药系统 (self micro-emulsifying drug delivery system, SMEDDS) 是由油相、乳化剂和助乳化剂构成的均一、澄清的液体, 该系统在胃肠道内通过胃肠道蠕动自发形成粒径小于 100 nm 的 O/W 型乳剂, SMEDDS 可作为疏水性、难吸收等药物的优良载体, 可增加药物的表面积和溶解度, 使药物易于通过胃肠壁水化层传递到吸收部位, 从而提高药物溶解度和肠渗透性^[4-6]。因此本研究将柚皮素制成自微乳制剂, 采用 Box-Behnken 设计-效应面法优化柚皮素自微乳处方, 为制备临床应用新剂型提供参考。

1 仪器与材料

85—2A 型数显恒温磁力搅拌器, 江苏金坛市金城国胜实验仪器厂; Zetasizer Nano ZS 纳米粒电位分析仪, 马尔文仪器有限公司; 日本岛津高效液相色谱仪, LC—6A 高压输液泵, SPD—20A 紫外检测器, N2010 色谱工作站; AS3120 型超声清洗器, Autoscience 公司; CP2115D 电子天平, Satorius 公司。

柚皮素原料药, 批号 HK20131222, 质量分数 98%, 陕西慧科植物开发有限公司; 柚皮素对照品, 批号 110722-201018, 质量分数 99%, 中国食品药品检定研究院; 聚氧乙烯氢化蓖麻油 (Cremophor RH40), 北京凤礼精求商贸有限公司; 聚山梨酯 80, 天津市光复精细化工研究所; 辛酸葵酸三甘油酯 (GTCC), 英国 Croda 公司; 油酸乙酯, 上海源叶生物科技有限公司; 1, 2-丙二醇, 北京凤礼精求商贸有限公司; 聚乙二醇 400 (PEG 400), 上海润捷化学试剂有限公司; 油酸、异丙醇, 国药集团化学试剂有限公司; 聚氧乙烯辛基苯基醚 (OP 乳化剂), 上海玖意化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 柚皮素自微乳给药系统的制备

精密称取一定量的辅料置具塞三角锥形瓶中, 混匀后, 加入柚皮素原料药, 将三角锥形瓶置于 60 °C 水浴中缓慢振摇使药物完全溶解, 直至形成均一、澄明溶液。

2.2 柚皮素自微乳定量测定方法的建立^[7-8]

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 C₁₈ 柱 (300 mm×3.9 mm, 4 μm), 流动相为甲醇-水-冰醋酸 (49:50:1), 检测波长 288 nm, 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 40 °C, 进样量 20 μL。

2.2.2 对照品储备液的制备 精密称取经 105 °C

干燥至恒定质量的柚皮素对照品 10.2 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 即得对照品储备液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取柚皮素自微乳制剂适量, 加甲醇溶解配成一定质量浓度的供试品溶液。

2.2.4 空白溶液的制备 取处方量油酸乙酯、聚山梨酯 80、PEG 400 混匀后用甲醇稀释, 配成辅料空白溶液。

2.2.5 方法专属性考察 取对照品溶液、供试品溶液和空白溶液, 按上述色谱条件分别测定, 空白溶液在对照品色谱峰位置无吸收峰, 表明各辅料对柚皮素的测定无干扰, 结果见图 1。

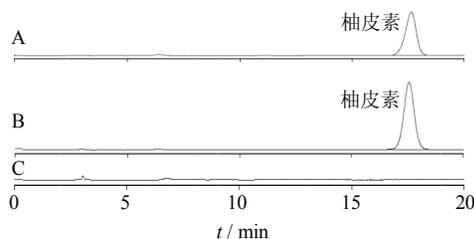


图 1 柚皮素对照品 (A)、柚皮素自微乳样品 (B) 和空白溶液 (C) 的 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of naringenin reference substance (A), naringenin-SMEDDS solution (B), and blank solution (C)

2.2.6 标准曲线的建立 分别精密量取对照品储备液 0.5、1、1.5、2、2.5 mL, 置 20 mL 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀得质量浓度为 25.5、51.0、76.5、102.0、127.5 μg/mL 的对照品溶液, 分别取上述溶液 20 μL 注入高效液相色谱仪, 记录色谱峰面积, 以峰面积积分值 (Y) 对柚皮素质量浓度 (X) 作线性回归, 得回归方程为 $Y=70\ 368 X-46\ 758$, $R^2=0.999\ 9$, 表明柚皮素在 25.5~127.5 μg/mL 线性关系良好。

2.2.7 精密度试验 配制低、中、高 3 个质量浓度 (25.5、76.5、127.5 μg/mL) 的柚皮素对照品溶液, 连续进样 3 次, 日内精密度 RSD 分别为 1.08%、0.81%、1.71% ($n=5$); 日间精密度 RSD 分别为 1.42%、1.92%、2.32% ($n=5$), 表明本方法精密度良好。

2.2.8 稳定性试验 取同一供试品溶液, 于 1 d 内每隔 2 h 进样测定 1 次, 记录峰面积, 计算柚皮素峰面积的 RSD 为 0.86%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.9 重复性试验 取柚皮素自微乳样品 6 份, 平

行配制供试品溶液进行测定，连续进样6次，记录峰面积，计算柚皮素质量浓度的RSD为0.59%，表明该方法的重复性较好。

2.2.10 回收率试验 按照处方量称取辅料，按处方量的80%、100%、120%加入柚皮素对照品，平行制备3份，测定样品中柚皮素的量，计算回收率。结果平均回收率分别为99.72%、98.95%、100.34%，RSD分别为0.92%、1.47%、1.61%。

2.3 柚皮素在各辅料中溶解度的测定

分别称取约2g不同油相、乳化剂和助乳化剂置于带塞西林瓶中，加入过量的柚皮素，于60℃水浴中涡旋搅拌，以促进其溶解，然后在37℃水浴中平衡48h，5000r/min离心20min，上清液用0.45μm的微孔滤膜滤过，取续滤液用甲醇稀释至适宜倍数，作为供试品溶液。分别精密吸取供试品20μL，以上述HPLC法测定，记录峰面积，计算柚皮素在不同辅料中的溶解度。结果见表1。

2.4 伪三元相图初步筛选处方

由表1可以看出，柚皮素油相中溶解度均较小，但油酸乙酯溶解度明显大于油酸和GTCC，考虑到载药量的要求，故油相确定为油酸乙酯；乳化剂选择OP乳化剂和聚山梨酯80；助乳化剂选择PEG400和异丙醇。固定乳化剂与助乳化剂的质量比(K_m)

表1 柚皮素在各辅料中的溶解度

Table 1 Solubility of naringenin in various adjuvants		
类型	辅料	溶解度 / (mg·g ⁻¹)
油相	油酸	1.840±0.257
	GTCC	1.988±0.472
	油酸乙酯	6.608±0.836
乳化剂	OP 乳化剂	157.765±0.318
	聚山梨酯 80	64.096±0.524
	Cremonophor RH40	7.292±0.293
助乳化剂	1,2-丙二醇	51.899±0.223
	异丙醇	113.940±0.529
	PEG 400	315.110±0.488

为2:1，再与油相按9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6、3:7、2:8、1:9的比例混匀，37℃水浴磁力搅拌条件下，滴加水相至形成澄清透明溶液，以乳化剂和助乳化剂作为1个顶点，其余2个顶点分别为油相和水相，将能形成澄清或带有少许蓝色乳光的处方点确定为相图中可形成自微乳的区域点，记录自微乳形成时各组分的量，用Origin 8.0程序绘制伪三元相图，为自微乳化区域。以相图中自微乳存在区域的大小来筛选乳化剂和助乳化剂。结果见图2。

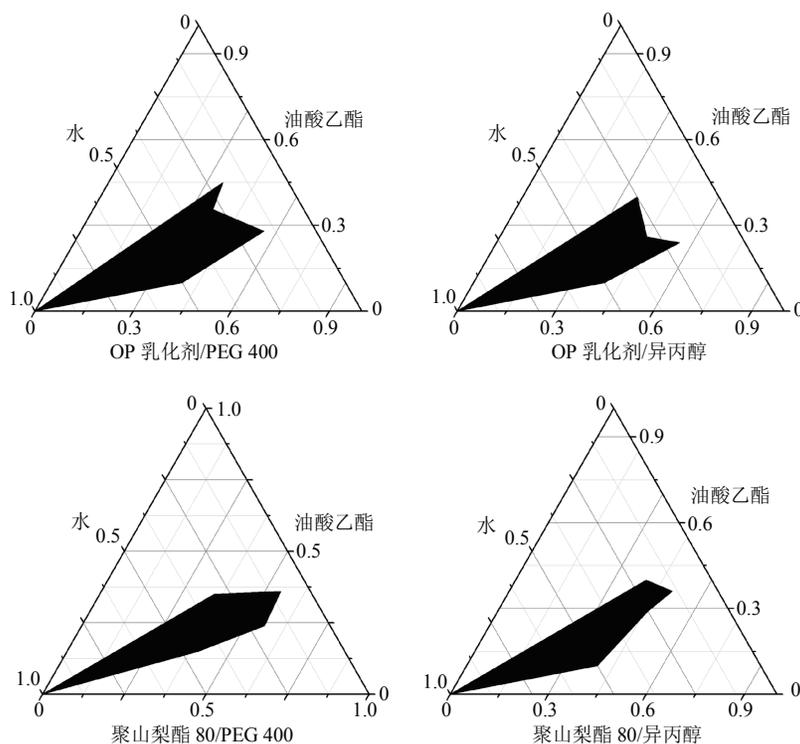


图2 不同乳化剂及助乳化剂的伪三元相图

Fig. 2 Pseudo-ternary phase diagram of different surfactants and cosurfactants

由图 2 可知,以油酸乙酯为油相,聚山梨酯 80 为乳化剂、PEG 400 为助乳化剂的伪三元相图,所成微乳的区域最大,最终选用油酸乙酯、聚山梨酯 80、PEG 400 作为柚皮素自微乳的处方。

改变 K_m 值,绘制不同 K_m 值 (3:1、2:1、1:

1、1:2、1:3) 的伪三元相图,根据伪三元相图可知, K_m 小于 2 时,随着 K_m 值的增大微乳区变大,当 K_m 大于 2 时,随着 K_m 值的增大微乳区减小, $K_m=2$ 时,微乳区最大,故聚山梨酯 80 与 PEG 400 的比例为 2:1,结果见图 3。

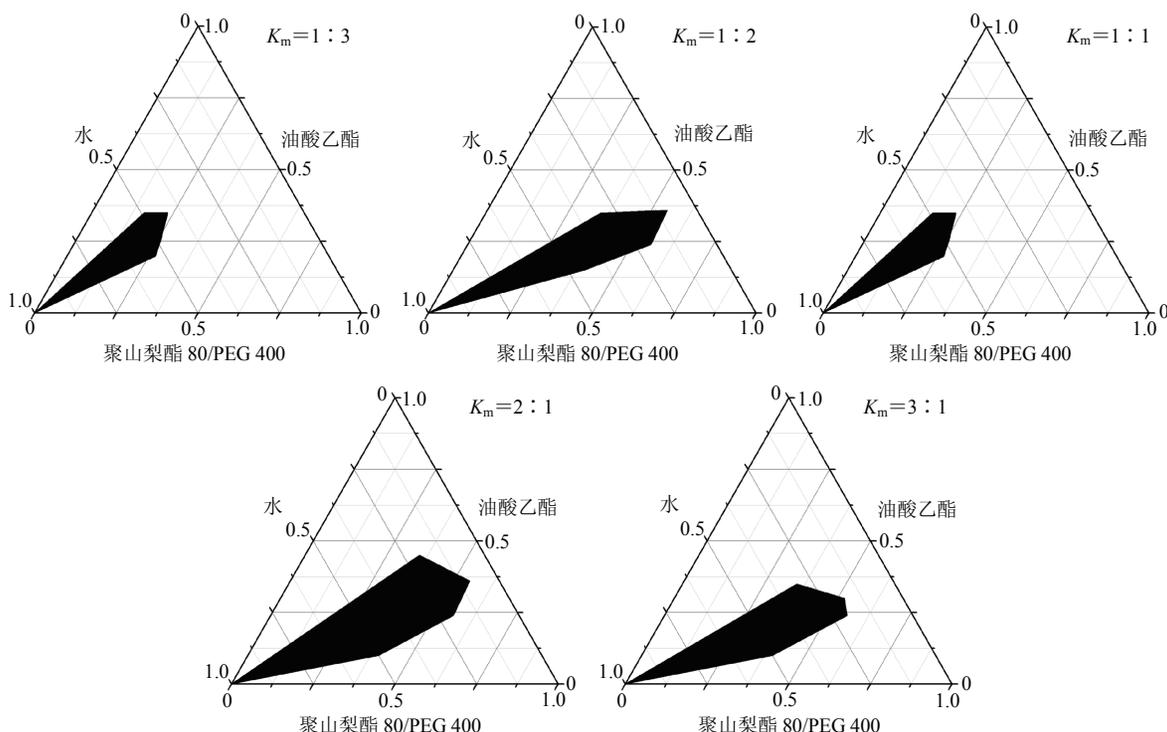


图 3 不同 K_m 值的伪三元相图

Fig. 3 Pseudo-ternary phase diagram of different K_m values

2.5 考察指标

2.5.1 自微乳粒径的测定 取柚皮素自微乳适量,加水稀释 50 倍,用纳米粒分析仪测定自微乳乳滴的粒径。

2.5.2 饱和载药量的测定 将过量的柚皮素加入到空白自微乳中,于 60 °C 水浴中涡旋搅拌,以促进其溶解,然后在 37 °C 水浴中平衡 48 h, 5 000 r/min 离心 20 min, 上清液用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,取续滤液用甲醇稀释至适宜倍数,采用 HPLC 测定柚皮素的量,计算饱和载药量。

2.6 Box-Behnken 效应面法优化柚皮素自微乳给药系统处方

2.6.1 Box-Behnken 实验设计^[9] 通过预试验和伪三元相图的考察,仅确定了柚皮素自微乳的处方组成,其处方比例需进一步优选,本实验选取油相 (A)、乳化剂 (B)、助乳化剂 (C) 为考察因素,以载药量、粒径为评价指标,采用 Box-Behnken 效应面法对工艺进行优化,因素水平见表 2,试验设

计与结果见表 2。

2.6.2 模型拟合 采用 Design Expert 8.05 软件,分别对各因素水平进行多元线性回归和非线性回归 (二项式公式拟合),多元线性回归方程:载药量 $Y_1=279.99+7.28 A+0.42 B+20.17 C$, $r=0.619$; 粒径 $Y_2=67.10+51.03 A+1.44 B+1.50 C$, $r=0.807$; 从多元线性回归方程相关系数均较低,表示自变量与因变量之间线性相关性较差,多元线性回归拟合度不佳,预测性较差,故采用二项式拟合。二项式拟合模型为载药量 $Y_1=-320.79+7.28 A+0.42 B+20.17 C-2.25 AB+2.77 AC-7.04 BC-10.76 A^2-95.24 B^2+19.30 C^2$, $r=0.974$; 粒径 $Y_2=62.10+51.03 A+1.44 B+1.50 C+3.04 AB+2.90 AC+1.88 BC+24.00 A^2-14.67 B^2+1.31 C^2$, $r=0.996$ 。2 个二项式拟合方程的 r 分别是 0.974 和 0.996,表明此设计模型拟合程度良好,可以用此模型对柚皮素自微乳处方进行预测和分析。

2.6.3 效应面优化 由 Design Expert 8.05 软件绘制

不同影响因素对于响应值的三维曲线，分别固定油相、乳化剂和助乳化剂3个影响因素其中之一，考察其他2个因素对载药量、粒径影响的效应曲面图，

结果见图4。根据方程和效应面图确定柚皮素自微乳的最优含药处方为柚皮素-油酸乙酯-聚山梨酯80-PEG 400 (0.35 : 0.16 : 0.51 : 0.33) [10]。

表2 Box-Behnken 实验设计与结果
Table 2 Box-Behnken design and results

序号	A/g	B/g	C/g	载药量 / (mg·g ⁻¹)	粒径 / nm	序号	A/g	B/g	C/g	载药量 / (mg·g ⁻¹)	粒径 / nm
1	25 (0)	45 (0)	22.5 (0)	298.437	62.06	10	40	45	15	317.481	136.61
2	25	60 (+1)	30 (+1)	278.064	51.72	11	25	45	22.5	324.831	62.18
3	25	30 (-1)	30	267.946	45.34	12	25	60	15	235.823	48.38
4	40 (+1)	45	30	347.371	148.82	13	25	45	22.5	323.988	62.36
5	25	45	22.5	324.023	61.93	14	10	45	15	316.821	31.78
6	40	30	22.5	239.778	113.56	15	10	45	30	335.634	32.39
7	10 (-1)	30	22.5	212.335	26.16	16	10	60	22.5	194.309	23.21
8	25	30	15 (-1)	197.554	49.51	17	40	60	22.5	212.742	122.78
9	25	45	22.5	332.672	61.97						

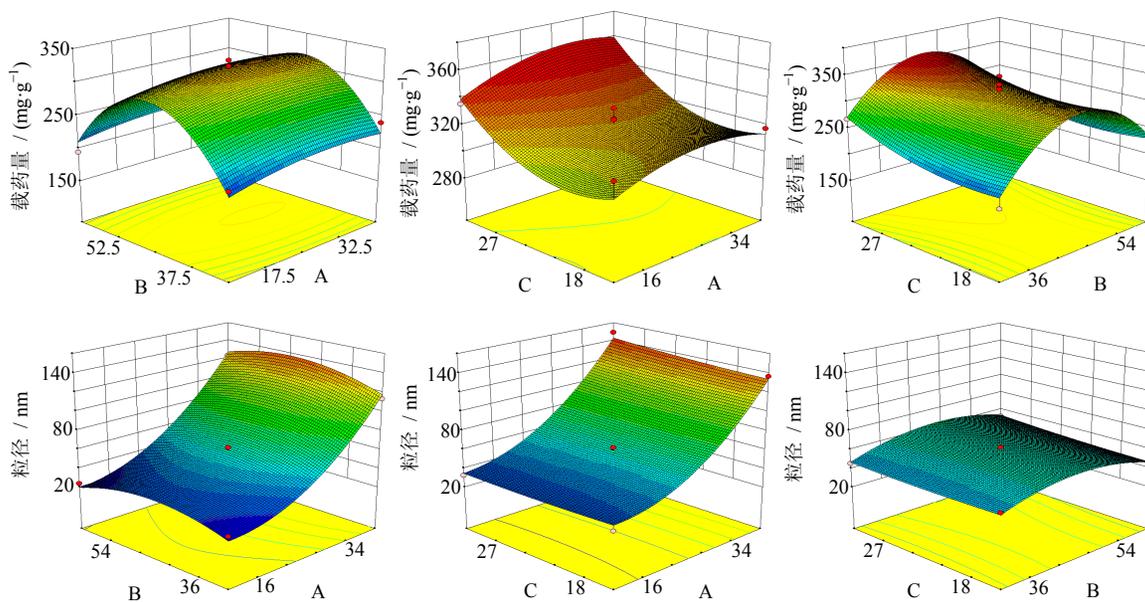


图4 载药量和粒径的效应面三维图

Fig. 4 Response surface (3D) plot of drug loading capacity and particle size

2.7 验证试验

根据优化的最佳处方精密称取 0.16 g 油酸乙酯, 0.51 g 聚山梨酯 80, 0.33 g PEG 400, 混匀后加入 0.35 g 柚皮素, 制备 3 批柚皮素自微乳样品, 并对载药量和粒径进行测定, 结果见表 3。其中偏差 = (预测值 - 实测值) / 预测值。通过验证试验可知, Box-Behnken 效应面法所建立的模型预测性良好, 方法可行, 结果可靠, 可较好地应用于柚皮素自微乳的处方优化。

表3 Box-Behnken 效应面优化法验证

Table 3 Verification of Box-Behnken response surface method

指标	预测值	真实值 (n = 3)	偏差 / %
载药量 / (mg·g ⁻¹)	347.167	343.283 ± 0.24	1.12
粒径 / nm	38.21	39.87 ± 0.13	4.34

3 讨论

通过本实验建立了柚皮素自微乳定量测定方法,

甲醇-水和乙腈-水是 HPLC 法测定柚皮素常用的流动相组成, 本实验分别测定了不同系统的流动相, 发现甲醇-水-冰醋酸(49:50:1)所得柱效高、峰形好, 经方法学考察精密度、重复性均较好。

通过测定柚皮素溶解度的测定, 结果表明柚皮素在油酸乙酯中溶解度最大, 且明显大于其他油相; 乳化剂中聚山梨酯 80 和 OP 乳化剂对柚皮素溶解度均较好; 助乳化剂中 PEG 400 溶解度最大, 异丙醇次之, 均可考虑作为处方成分使用。本实验利用伪三元相图所形成微乳区的大小初步筛选出乳化剂和助乳化剂。同时进一步利用伪三元相图考察不同比例乳化剂与助乳化剂对微乳区的影响, 实验结果显示, 在一定范围内, 随着乳化剂用量的增加, 形成自微乳的区域也逐渐增大; 但当乳化剂超过一定量后, 对体系的乳化能力减弱, 反而使自微乳区域减小, 最终确定 K_m 值为 2。

本实验以载药量和粒径为考察指标, 考虑粒径影响体系的稳定性和在体内的吸收, 粒径越小, 油水界面面积越大, 稳定性、吸收越好, 生物利用度越高; 载药量的大小直接影响到药物的临床应用剂量, 载药量越大, 越易满足临床需要。

采用 Box-Behnken 效应面法优化自微乳中乳化剂、助乳化剂、油相的用量, 根据 K_m 值设计因素水平, 充分考虑各因素之间的交互作用, 运用非线性方程模型拟合, 确定柚皮素自微乳最佳处方。

参考文献

- [1] Zhang F Y, Du G J, Zhang L, *et al.* Naringenin enhances the anti-tumor effect of doxorubicin through selectively

inhibiting the activity of multidrug resistance-associated proteins but not P-glycoprotein [J]. *Pharm Res*, 2009, 26(4): 914-925.

- [2] Yen F L, Wu T H, Lin L T, *et al.* Naringenin-loaded nanoparticles improve the physicochemical properties and the hepatoprotective effects of naringenin in orally-administered rats with CCl₄-induced acute liver failure [J]. *Pharm Res*, 2009, 26(4): 893-902.
- [3] Galati E M, Monforte M T, Kirijavanein S, *et al.* Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): antiinflammatory and analgesic activity [J]. *Farmaco*, 1994, 40(11): 709-712.
- [4] 吕娟丽, 李彦, 沈丹, 等. 微乳促进药物口服吸收的机理及应用概述 [J]. *中国药师*, 2008, 11(5): 575-578.
- [5] 轩肖玉, 王亚静, 张伟玲, 等. 芒果苷自微乳给药系统的制备及其大鼠体内药动学研究 [J]. *药物评价研究*, 2013, 36(3): 166-170.
- [6] 张晓峰, 韦玮, 陆皞然, 等. 自微乳释药系统 (SMEDDS) 的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2009, 24(5): 261-264.
- [7] 韦丽华, 路玫. 复方青骨凝胶中柚皮素的 HPLC 测定 [J]. *中国医药工业杂志*, 2009, 40(10): 778-779.
- [8] 李江. 反相高效液相色谱法测定化橘红中柚皮苷和柚皮素含量 [J]. *实用临床医药杂志*, 2009, 13(10): 74-75.
- [9] 姜雯, 何承辉, 薛桂蓬, 等. Box-Behnken 中心组合设计优化复方一枝蒿滴丸成型工艺 [J]. *中草药*, 2013, 44(9): 1134-1140.
- [10] 叶蕾, 胡容峰, 王晓华, 等. 星点设计-效应面法优化葛根素自微乳工艺 [J]. *中成药*, 2014, 36(3): 514-519.