发酵虫草菌粉片剂的研究中，本课题组比较了湿法制粒压片、干法制粒压片、全粉末压片，湿法制粒粘合剂用量大，所得颗粒颜色较粉末明显加深，特有的香味减弱，可压性差，片面粗糙，对药物中不湿热成分破坏严重；干法制粒所得颗粒强度不够，颗粒收率低，经过压缩后的颗粒可压性更差。超微粉直接压片片面光滑，可压性得到了一定改善，在对湿法制粒压片和直接压片的片剂的比较中发现，粉末直压的片剂中麦角甾醇含量是湿法制粒压片的 2 倍，崩解时间约为湿法制粒的一半。所以最终选择超微粉碎后粉末直接压片。

可压性差是发酵虫草菌粉片剂制备困难的主要原因，发酵虫草菌粉因含大量的油脂类物质会在压缩过程中形成隔离膜，阻断了压缩时的“固体桥”作用，且粉末纤维性强，压缩后弹性复原大，导致压片硬度小，松片、裂片严重。为解决发酵虫草菌粉可压性差的问题，本课题组选择将其超微粉碎后加入具有吸附性的辅料微粉硅胶，发现可压性改善明显。微粉硅胶作为新型的制剂辅料，在发达国家得到了广泛使用。作为优良的助流剂和润滑剂，物料混合时还具有良好的抗静电作用[8]，改善物料流动性和填充性效果好；因其具有巨大的比表面积及适宜的表面结构可吸附粘性颗粒，作为油脂、浸膏类药物的吸附剂和抗粘剂，降低粉末的粘聚度，提高片剂的硬度[9-10]；还能增强物料的吸水性和润湿性，促进片剂的崩解，提高片剂的溶出度[11]。虫草菌粉微粉中加入微粉硅胶做润滑剂和吸附剂，增加微粉流动性和可压性，增加片剂崩解。另一方面处方中 AvicelPH102 为疏松多孔的海绵结构，润湿性好，在崩解过程中增加了片剂润湿的毛细管通道，促进片剂的崩解，故发酵虫草菌粉粉末直接压片不添加崩解剂即能使片剂很好的崩解、均匀的分散。

REFERENCES

[1] LI S P, TSIM KWK. Herbal and Traditional Medicine [M]. New York: Marcel Dekker, 2004: 674-683.

[2] SUN L X. Clinical study on the fermented Cordyceps powder treat diabetic nephropathy [J]. Neimenggu Med(内蒙古医学杂志), 2009, 41(7): 811-813.

[3] JIE J Q. Clinical observation on drug combination of fermented Cordyceps powder and candesartan treat diabetic nephropathy [J]. Chin Rem Clin(中国药物与临床), 2012, 12(7): 957-958.

[4] ZHU L, LI S Q, FENG Y, et al. Correlation study on physical properties of materials and tablets formability [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2010, 32(8): 1402-1404.

[5] ZHU T, ZHAO Q R, ZHANG Z Q, et al. Preparation and stability of glibenclamide tablets by direct powder compression [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2010, 41(1): 27-29.

[6] CUI D F. Pharmaceutics(药剂学) [M]. NO. 7. Beijing: People’s Health Publishing House, 2012: 265.

[7] XU B L, WANG B, PU Y Q, et al. Optimization of paeonol tablets formulation by central composite design-response surface methodology [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(17): 56-59.

[8] CUI X M, WANG H G. Silicon dioxide used as antistatic agents in powder preparation [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(9): 839-841.

[9] LI Y Q. Application of new excipients to the TCM entractive tablets containing oil [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2006, 26(7): 844-845.

[10] SU B H, WANG J Q, XU J Y. Application of new type pharmaceutical excipient micro-silica in pharmaceutical production [J]. China Pharm(中国药业), 2005, 14(5): 76-77.

[11] ZHANG D K, HANG L, QIN C F, et al. Research on micro-silica gel used for powder modification of Angelicae Dahuricae Radix extract and its mechanism of promoting disintegration of Yuanhu Zhitong dispersible tablets [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2012, 43(12): 2372-2376.

收稿日期：2013-04-02

Box-Behnken 设计法优化奥沙利铂脂质体的处方工艺

刘阳，郭伟英*(辽宁医学院药学院，辽宁 锦州 121001)

摘要：目的 采用 Box-Behnken 实验设计法优化奥沙利铂(oxaliplatin，Ox)脂质体的制备工艺。**方法** 以磷脂质量浓度(X_1)、磷脂与 Ox 质量比(X_2)和磷脂与胆固醇质量比(X_3)为考察对象，以包封率(Y) 为评价指标，采用三因素三水平的 Box-Behnken 实验设计筛选奥沙利铂脂质体最佳的处方。**结果** 最优处方是磷脂质量浓度为 10.20 g·L^{-1}，磷脂与药物的质量比为 31∶1，脂质体膜材料中磷脂与胆固醇质量比为 3.8∶1。包封率的预测值与理论值偏差较小。**结论** Box-Behnken 实验设计法可用于奥沙利铂脂质体的处方优化。

作者简介：刘阳，女，硕士生 Tel: 13188120567 E-mail: lyang0908@163.com *通信作者：郭伟英，男，硕士，教授 Tel: 13941627032 E-mail: wyinguo@163.com

关键词：奥沙利铂；脂质体；包封率；Box-Behnken 实验设计
中图分类号：TQ460.6　　**文献标志码**：B　　**文章编号**：1007-7693(2013)11-1196-07

Optimization of Oxaliplatin Liposome Formulation by Box-Behnken Experimental Design

LIU Yang, GUO Weiying*(*College of Pharmacy, Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To apply the Box-Behnken experimental design to optimize the formulation of oxaliplatin liposome. **METHODS** The independent variables were investigated by using a three-factor, three-level Box-Behnken experimental design with the concentration of phospholipid(X_1), the mass ratio of phospholipids and Ox(X_2) and the mass ratio of phospholipid and cholesterol(X_3) as the research object and the response variable was encapsulation efficiency. **RESULTS** The optimized formulation was as follows: the concentration of phospholipid is 10.20 g·L^{-1}, the mass ratio of phospholipid and drug was 31∶1 and the mass ratio of phospholipid and cholesterol was 3.8∶1. The deviation between the predicted values of entrapment efficiency and its theoretical values were small. **CONCLUSION** The Box-Behnken experimental design method can be used to optimize the formulation of oxaliplatin liposome.
KEY WORDS: oxaliplatin; liposome; entrapment efficiency; Box-Behnken experimental design

脂质体因其可在生物体内被降解且无毒，在药物载体方面表现出良好的应用价值。在研究脂质体时，包封率是评价脂质体制剂质量好坏的最重要指标之一，也是脂质体能否发挥较普通制剂高效、低毒特点的关键[1]。但是在制备脂质体的过程中，药物的性质和浓度、溶剂pH以及制备方法等各个因素均会影响脂质体的包封率，从而影响脂质体制剂的质量，所以在制备脂质体时必须考察脂质体的包封率。Box-Behnken试验设计法是一种可以评价指标与因素之间非线性关系的一种试验设计方法，可以考察各个因素对效应的影响及各影响因素间的交互作用，具有预测性好、精度高、直观、简单等优点。近年来国内外许多药学工作者将Box-Behnken试验设计法广泛用于药物处方筛选、剂型制备过程、生物过程以及化学合成过程的优化[2-4]。奥沙利铂(oxaliplatin，Ox)是第3代铂类抗癌药，与前2代铂类药物顺铂和卡铂相比，Ox在体内及体外的抗肿瘤作用效果更好，用药更安全[5]。它对结直肠癌、非小细胞肺癌、卵巢癌等多种人和动物肿瘤细胞，尤其是对顺铂和卡铂耐药肿瘤株有明显的抑制作用[6]。国内外已有注射剂上市，Ox注射入体内后，50% Ox与红细胞结合，而另外50%存在于血浆中的Ox，仅25%呈游离状态，在肿瘤组织蓄积很少，很难达到治疗浓度。将Ox制成脂质体可以有效提高疗效或者延长作用时间，提高靶向性，降低其不良反应。本实验以Ox为模型药，将其制成脂质体，以包封率作为评价指标，采用微柱离心-HPLC测定脂质体的包封率，在影响Ox脂质体包封率单因素研究的基础上，选用Box-Behnken实验设计法对影响脂质体制备的关键因素进行优化，筛选出脂质体的最优处方。

1　仪器与试剂

RE-52A 型旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂)；L-2000Elite 型高效液相色谱仪(日立高新技术集团)；UV-255 型紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司)；JEM-1010 透射电镜(日本电子株式会社)，Mastersizer2000 激光粒度测定仪(英国 Malvern 公司)；LD4-2A 低速离心机(北京医用离心机厂)。

Ox 原料药(山东铂源药业有限公司，含量>99.5%，批号：1208020X)；大豆磷脂(上海金伴药业有限公司，批号：20110408)；胆固醇(天津东方试剂厂)；葡聚糖凝胶 SephadexG-50(上海化学试剂厂)；色谱纯甲醇(天津市永大化学试剂有限公司，批号：20111212)；分析纯氯仿(天津市科密欧化学试剂有限公司，批号：20110412)。

2　方法与结果

2.1　分析方法的建立

2.1.1　色谱条件　色谱柱：HypersilBDSC$_{18}$ 柱(200 mm×4.6 mm，5 μm)；流动相：甲醇-水(5∶95)；检测波长：250 nm；柱温：25 ℃；流速：1.0 mL·min^{-1}；进样量：20 μL。

2.1.2　标准曲线的制备　精密称取 10 mg Ox，置于 10 mL 量瓶中，用流动相定容至刻度，配制成 1 mg·mL^{-1} 的标准液。然后再精密吸取 0.2，0.5，1.0，2.0，5.0 mL 的标准液，分别置于 10 mL 的量瓶中，用流动相定容至刻度，摇匀，即得浓度为 0.02，0.05，0.10，0.20，0.50 mg·mL^{-1} 的系列溶液。按“2.1.1”项下的色谱条件进样测定，以质量浓

度(C，单位：mg·mL^{-1})为横坐标，峰面积(A)为纵坐标，进行线性回归，得到回归方程：A=2 845 666.357 4C+1 0467.935 4，r=0.999 9。表明 Ox 质量浓度在 0.02~1.0 mg·mL^{-1} 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.1.3 回收率测定　向 3 个装有 0.1 mL 空白脂质体溶液的 10 mL 量瓶中分别加入不同体积的标准液，用流动相稀释并定容至刻度，配制成低、中、高浓度(0.02，0.3，1.0 mg·mL^{-1})的溶液，每个样液制备 3 份，按“2.1.1”项下色谱条件进样分析，计算回收率分别为 99.7%，100.3%，99.8%，RSD 分别为 0.83%，1.03%，1.12%(n=3)。

2.2 脂质体的制备

分别精密称取磷脂和胆固醇适量溶于氯仿溶液，置于茄形瓶内，在探头超声下，将溶有 Ox 的 PBS 缓冲液缓缓滴加到氯仿溶液中，形成均一稳定的 W/O 型乳液后，于 40 ℃下减压旋转蒸发除去氯仿，至瓶壁出现胶状物后继续减压蒸发得到脂质体混悬液。将混悬液放入–20 ℃冰箱冷冻一段时间后在室温下融化，反复冻融 3 次，最后将混悬液经 0.45 μm 滤膜过滤即得。

2.3 包封率的测定

采用微柱离心法测定脂质体的包封率[7]。具体方法如下：精密量取 3 份不同批次的 Ox 脂质体溶液 0.1 mL，上样于预先装填好的 SephadexG50 微型柱中，500 r·min^{-1} 离心 1 min 使脂质体进入微柱，继续向微柱顶端加入 0.2 mL 蒸馏水，1 000 r·min^{-1} 离心 1 min，收集洗脱液，重复操作 3 次。合并收集液于 10 mL 量瓶中，用流动相稀释并定容至刻度。按“2.1.1”项下色谱条件测定包封于脂质体中的药物浓度 C_1。精密量取 Ox 脂质体溶液 0.1 mL 于 10 mL 的量瓶中，加流动相破乳并定容至刻度，按“2.1.1”项下色谱条件测定药物的总浓度 C_0，计算包封率(EE%)：EE%= C_1/C_0×100%。

2.4 单因素试验

以包封率为评价指标，以微柱离心-HPLC为包封率的测定方法，考察磷脂浓度、磷脂与Ox质量比、磷脂与胆固醇质量比以及水相介质的pH值等因素对脂质体包封率的影响。

2.4.1 磷脂浓度对包封率的影响　固定其他因素不变，分别用不同浓度(4，8，10，12 g·L^{-1})的磷脂制备脂质体，测得包封率分别为21.6%，37.3%，51.5%，51.9%。结果表明，随着磷脂浓度增高，包封率增大。当磷脂浓度达到10 g·L^{-1}以上时，脂质体的包封率不再发生较大的变化。

2.4.2 磷脂与Ox质量比对包封率的影响　固定其他因素不变，按不同的磷脂与Ox质量比制备脂质体，当磷脂与Ox质量比分别为20∶1，30∶1，40∶1时，脂质体的包封率分别为35.6%，52.1%，49.3%。结果表明，随着脂药比的增大，包封率存在先增大后有减小的趋势。

2.4.3 磷脂与胆固醇质量比对包封率的影响　固定其他因素不变，按照磷脂与胆固醇质量比为3∶1，4∶1，5∶1分别制备脂质体，测定其包封率分别为49.5%，39.0%，30.1%。结果表明，包封率随着两者比例的增加而减小。

2.4.4 水相介质的pH值对包封率的影响　采用溶有处方量的奥沙利铂的pH值分别为5.0，6.0，7.0的PBS缓冲液制备脂质体。结果发现水相的pH值对药物的包封率影响不大，但考虑到脂质体的稳定性以及奥沙利铂的溶解度与稳定性，最终选择pH 6.0的PBS缓冲液作为水相介质。

2.4.5 冻融时间对包封率的影响　固定其他因素不变，将制备好的脂质体，混悬液置于–20 ℃的冰箱中冷冻一定时间后，在室温下融化数分钟，测定脂质体的包封率。当脂质体冰冻20 min融化40 min，冰冻30 min 融化30 min，以及冰冻40 min融化20 min后，不同脂质体的包封率分别为21.3%，29.4%，39.6%。结果表明，当冷冻时间大于融化时间时，脂质体的包封率较大。

2.4.6 冻融次数对包封率的影响　固定其他因素不变，将制得的脂质体置于冰箱冷冻后室温融化，反复5次，脂质体的包封率随着冻融次数增加而增大，但冻融次数超过3次后，包封率基本不变。所以，冻融次数选择3次，结果见图1。

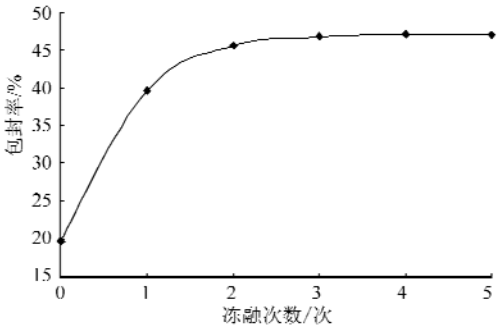

图 1 冻融次数对包封率的影响

Fig 1 Effect of freezing and thawing times on entrapment efficiency

2.5 Box-Benhnken实验设计

在单因素实验的基础上，选择对包封率有显著影响的3个因素，即磷脂质量浓度(X_1)，磷脂与Ox质量比(X_2)和磷脂与胆固醇质量比(X_3)作为自变量，以包封率(Y)为响应值，在低、中、高3个水平上进行优化研究。每个因素的低、中、高3个水平分别记作–1，0，+1，各因素及水平见表1。利用Design Expert 7.0.0 软件建立的Box-Benhnken实验设计，结果见表2。

表 1 Box-Behnken 实验设计的因素和水平

Tab 1 Factors and levels of Box-Behnken experimental design

因素	编号水平		
	–1	0	+1
X_1/g·L^{-1}	8	10	12
X_2	20	30	40
X_3	3	4	5

表 2 Box-Behnken 设计与试验结果

Tab 2 Experimental results and values of responses for Box-Behnken design

试验号	X_1	X_2	X_3	EE%
1	–1	–1	0	45.9
2	1	–1	0	46.9
3	–1	1	0	39.8
4	1	1	0	45.6
5	–1	0	–1	49.7
6	1	0	–1	54.3
7	–1	0	1	44.4
8	1	0	1	48.4
9	0	–1	–1	53.5
10	0	1	–1	50.2
11	0	–1	1	50.0
12	0	1	1	47.1
13	0	0	0	55.9
14	0	0	0	56.3
15	0	0	0	56.7
16	0	0	0	56.0
17	0	0	0	57.0

2.5.1 二次回归模型的建立　应用Design Expert 7.0.0软件对表2中数据进行二次多元回归分析，得到X_1，X_2，X_3与Y的二次多项回归方程：

$$Y=56.82+0.85X_1+1.03X_2-0.68X_3+0.10X_1X_2-0.30X_1X_3+0.35X_2X_3-4.49X_1^2-5.04X_2^2-2.59X_3^2$$

对该模型进行显著性检验，回归模型方差分析，结果见表 3。

表 3 包封率回归模型方差分析

Tab 3 Variance analysis of entrapment efficiency

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	261.79	9	29.09	340.50	<0.0001
X_1	5.78	1	5.78	67.66	<0.0001
X_2	8.41	1	8.41	98.39	<0.0001
X_3	3.64	1	3.64	42.67	0.0003
X_1X_2	0.04	1	0.04	0.47	0.5158
X_1X_3	0.36	1	0.36	4.21	0.0792
X_2X_3	0.49	1	0.49	5.74	0.0478
X_1^2	84.70	1	84.70	991.42	<0.000 1
X_2^2	106.74	1	106.74	1 249.49	<0.000 1
X_3^2	28.14	1	28.14	329.35	<0.000 1
残差	0.60	7	0.085		
失拟项	0.13	3	0.043	0.37	0.779 7
纯误差	0.47	4	0.12		
总差	262.39	16			

由结果可知，X_1，X_2，X_3，X_1^2，X_2^2 及 X_3^2 对 Y 的影响极显著(其中 X_1，X_2 的影响比 X_3 显著)，X_2X_3 的影响显著，其他项对 Y 的影响不显著。模型的概率 P<0.000 1，表明模型极显著；模型的确定系数 R^2_{adj}=0.994 8，说明方程的响应值与全体自变量间线性关系显著，响应值的变化有 99.48%来源于所选自变量，即磷脂质量浓度、磷脂与 Ox 质量比与磷脂与胆固醇质量比。模型的变异系数(CV)为 0.57%，说明模型的精密度好。同时，方程的失拟项 F 值为 0.37，概率 P>0.05，失拟项不显著，说明回归方程在整个回归区域的拟合情况良好，可用该回归模型代替实验真实点对实验结果进行分析。

2.5.2 响应曲面分析与优化条件的确定　分别固定3个影响因素其中之一，选用Design Expert 7.0.0软件绘制不同影响因素对于响应值的三维曲线图，结果见图2。

由图2A可以看出，固定磷脂与胆固醇质量比为4∶1，当磷脂浓度为10 g·L^{-1}，磷脂与Ox质量比为30∶1时，脂质体的包封率达到最大值，脂质体的包封率随着磷脂浓度和磷脂与Ox质量比的增加，先增大后有减小的趋势。由图2B可以看出，固定磷脂与Ox质量比为30∶1，当磷脂浓度为10 g·L^{-1}，磷脂与胆固醇质量比为4∶1时，包封率达到最大。磷脂浓度对包封率的影响大于磷脂与胆固醇质量比的影响，包封率随着磷脂浓度的升高先迅速增大后缓慢减小，随着磷脂与胆固醇质

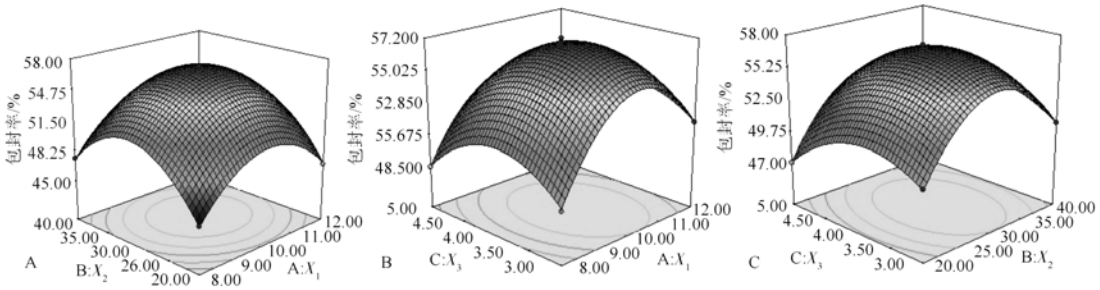

图 2 各因素对包封率的响应曲面图

A–磷脂与胆固醇质量比为 4∶1；B–磷脂与 Ox 质量比为 30∶1；C–磷脂浓度为 10 g·L^{-1}

Fig 2 Response surface plot of factors on entrapment efficiency

A–the mass radio of phospholipid and cholesterol was 4∶1; B–the mass radio of phospholipids and Ox was 30∶1; C–the concentration of phospholipid was 10 g·L^{-1}

量比增加先增大后缓慢减小。由图 2C 可知，固定磷脂浓度为 10 g·L^{-1}，当磷脂与 Ox 质量比为 30∶1，磷脂胆固醇质量比为 4∶1 时，包封率达到最大。磷脂与 Ox 质量比对包封率的影响大于磷脂与胆固醇质量比的影响，脂质体的包封率随着磷脂与 Ox 质量比增加先迅速增大后变小，随着磷脂与胆固醇质量比的增加先增大后减小。

根据Box-Behnken响应面实验设计结果，得到优化条件为：磷脂质量浓度为10.20 g·L^{-1}，磷脂与Ox质量比为31∶1，磷脂与胆固醇质量比为3.8∶1。为检验Box-Behnken响应面实验设计所得结果的可靠性，按最优处方制备3批Ox脂质体，透视电镜观察脂质体的形态见图3，测定其包封率的结果见表4。包封率的实测值与预测值的偏差<2%，说明该方法预测性能较好，可以很好地预测和分析脂质体的制备处方。从图3可见，脂质体形态均为球形或近球形，分散性良好。

表 4 包封率的实验值、预测值及其偏差

Tab 4 The observed and predicted values of entrapment efficiency and their residuals

批号	实测包封率/%	预测包封率/%	预测误差/%
1	56.6		0.70
2	57.3	57.0	0.53
3	56.1		1.58

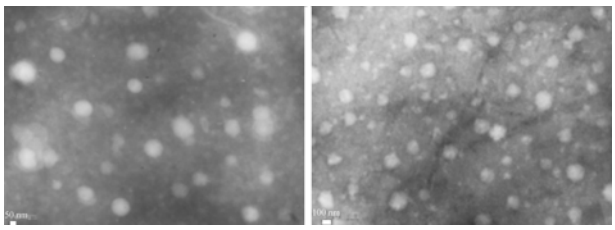

图 3 Ox 脂质体透射电镜图

Fig 3 The transmission electron microscopy picture of oxaliplatin liposomes

2.6 正交试验设计

本实验亦采用正交试验设计优化、筛选最佳处方。在单因素考察的基础上，选取磷脂浓度(*A*)、磷脂与Ox质量比(*B*)和磷脂与胆固醇质量比(*C*)作为考察因素，各因素取3个水平，用$L_9(3^4)$正交试验表安排实验，筛选最佳提取工艺条件。实验方案及测定结果见表5和表6，方差分析见表7。

表 5 因素与水平

Tab 5 Factors and levels

水平	因素			
	A	B	C	D
1	8	20∶1	3∶1	1
2	10	30∶1	4∶1	2
3	12	40∶1	5∶1	3

表 6 $L_9(3^4)$正交实验设计与结果

Tab 6 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D	EE%
1	1	1	1	1	30.5
2	1	2	2	2	39.6
3	1	3	3	3	30.0
4	2	1	3	2	34.2
5	2	3	2	1	42.7
6	2	2	1	3	49.2
7	3	1	2	3	31.2
8	3	2	3	1	38.6
9	3	3	1	2	35.8
K_1	100.1	95.9	115.5		
K_2	126.1	127.4	113.5		
K_3	105.6	108.5	102.8		
R	26.0	31.5	12.7		

http://www.chinjmap.com

表 7 方差分析

Tab 7 Analysis of variance

方差来源	离差平方和	自由度	F 值	显著性
A	125.167	2	151.411	$P<0.01$
B	167.580	2	202.718	$P<0.01$
C	31.087	2	37.605	$P<0.05$
D	0.827	2		

注：$F_{0.1}(2,2)=9.00$；$F_{0.05}(2,2)=19.00$；$F_{0.01}(2,2)=99.00$

Note: $F_{0.1}(2,2)=9.00$, $F_{0.05}(2,2)=19.00$, $F_{0.01}(2,2)=99.00$

由表6直观分析可知，正交试验的极差所确定的因素主次顺序依次为B>A>C，即磷脂与Ox质量比>磷脂浓度>磷脂与胆固醇质量比。由直观分析可知$A_2B_2C_1$为最佳方案，方差分析结果表明因素A、B对结果影响差异具有明显的显著性，因素C差异显著。

按照正交试验及设计筛选的最佳处方：磷脂浓度为10 $g\cdot L^{-1}$，磷脂与Ox质量比为30∶1，磷脂与胆固醇质量比为3∶1，制备3批脂质体，测定其平均包封率为49.9%。

2.7 脂质体的质量考察

2.7.1 粒径及ζ电位的测定　分别取上述2种不同优化工艺条件下制备的3批脂质体混悬液，稀释至一定浓度后，用激光粒度仪测定其粒径及ζ电位，结果见表8。

表 8 Ox 脂质体的粒径大小及 ζ 电位值

Tab 8 The particle diameter and ζ potential of the oxaliplatin liposomes

测定指标	Box-Behnken 优化			正交优化		
	1	2	3	1	2	3
粒径/nm	156.8	145.4	169.6	140.5	161.4	152.3
ζ 电位/mV	−50.3	−45.9	−48.1	−37.2	−40.7	−39.1

Box-Behnken 优化的脂质体平均粒径为157.3 nm，正交实验优化的脂质体平均粒径为151.4 nm。Box-Behnken优化脂质体的平均ζ电位为−48.1 mV，正交实验优化脂质体的平均ζ电位为−39.0 mV。

2.7.2 渗漏率考察　取上述2种不同优化工艺条件下制备的脂质体混悬液，分别于冰箱4℃和室温25 ℃条件下，放置1个月，定时取样，按照“2.3”项下方法测定脂质体在不同时间渗漏出来的游离药物的量，平行测定3次。按照下面公式计算渗漏率，结果见图4。

$Q_{渗}\% =(W_{总游}-W_{始游})/W_{包}\times 100\%$。式中$Q_{渗}$为渗漏率，$W_{总游}$为贮存一定时间后测得的游离药量，$W_{始游}$为贮存前测得的游离药量，$W_{包}$为贮存前包封的药量。

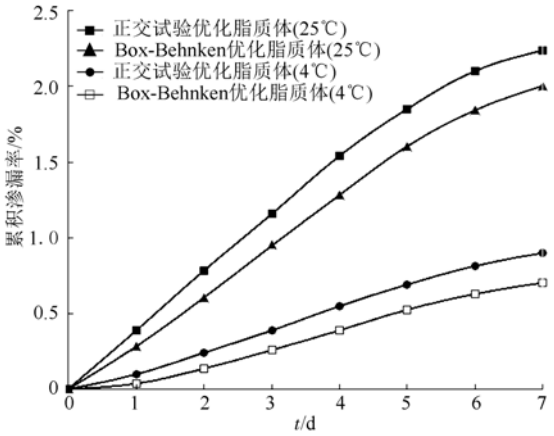

图 4 累积渗漏曲线(n=3)

Fig 4 Cumulative curve of leakage(n=3)

由图 4 可见，脂质体在室温(25 ℃)条件下保存 30 d 的渗漏率显著高于在冰箱(4 ℃)保存的渗漏率，且 Box-Behnken 优化的脂质体的渗漏率更小。

3 讨论

正交试验设计是以线性关系来拟合效应与因素之间的关系，具有试验次数较少，方法简便等特点[8]。但是正交试验设计只能对孤立的试验点进行分析，当各因素间存在交互作用时，正交试验设计不能灵敏地考察各因素间的交互作用，结果与实际情况可能有偏差[9]。事实上，影响脂质体包封率的各个因素之间不可能完全没有交互作用，因此用正交试验设计不能准确得出最佳处方。如本实验按照正交试验设计优化得到的最佳处方制备脂质体，其包封率比 Box-Behnken 效应面设计优化处方制备的脂质体的包封率略低。

Box-Behnken效应面法可以克服正交试验只能给出最佳因素水平组合，而无法找出整个区域内的因素最佳组合和最优响应值的缺陷[10-11]，能在整个区域内找到因素和响应值之间明确的函数表达式，即回归方程，考察各个因素对效应的影响及各影响间的交互作用，并能对各个因素进行优化，从而得到整个区域内因素的最佳组合和最优响应值。

脂质体的粒径对脂质体在体内的分布影响较大，脂质体的粒径越小，越易避免网状内皮系统的吞噬作用，延长在体内的作用时间。本实验制备的脂质体粒径均<160 nm，且分布较均匀。

由于脂质体表面ζ电位的存在，能够减少脂质体之间相互聚集或相互融合，增加脂质体的稳定性。因此，ζ电位是考察脂质体稳定性的一个重要

指标。当ζ电位绝对值>60 mV时，脂质体的稳定性良好；当ζ电位绝对值在30~60 mV之间时，脂质体的稳定性较好；而当ζ电位绝对值<30 mV时，脂质体的稳定性较差，容易发生聚集现象。本实验中制备的脂质体的ζ电位绝对值均在30~60 mV之间，说明制备的脂质体较稳定。且Box-Behnken优化后的脂质体的ζ电位的绝对值大于正交试验优化的脂质体的ζ电位，稳定性更好。

脂质体膜具有一定的流动性和通透性，所以包封的药物很容易渗透到膜外，因此，脂质体的渗漏率也是考察脂质体稳定性的重要指标之一。由于脂质体的渗漏率与保存温度密切相关，故本实验将制备好的脂质体分别放在冰箱(4 ℃)及室温(25 ℃)中保存30 d，结果，在冰箱(4 ℃)中存放的脂质体的渗透率小，故低温更有利于脂质体的保存。在冰箱(4 ℃)中保存的脂质体的渗透率均<0.9%，在室温(25 ℃)中保存的脂质体的渗透率均<2.5%，表明所制备的脂质体稳定性良好，且Box-Behnken优化的脂质体渗漏率更小，更稳定。

REFERENCES

[1] ZHENG N, ZHANG L D. A general situation in studies of quality control for liposomes [J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 2004, 13(12): 1282-1286.

[2] KIM M S, KIM J S, YOU Y H, et al. Development and optimization of a novel oral controlled delivery system for tamsulosin hydrochloride using response surface methodology [J]. Int J Pharm, 2007, 341(1-2): 97-104.

[3] TIAN B C, JIA C P, YANG J T, et al. Optimization of extraction of total flavonoids from Hypericum ascyron by Box-Behnken design [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2010, 32(3): 389-392.

[4] HU J B, DONG S H, SU W, et al. Preparation and *in vitro* release study of sodium ferulate gastric floating tablets [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 30(1): 43-47.

[5] STATHOPOULOS G P, BOULIKAS T, KOURVETATIS A, et al. Liposomal oxaliplatin in the treatment of advanced cancer: a phase I study [J]. Anticancer Res, 2006, 26: 1489-1493.

[6] YU B L, MA Y P, LIU Q Z, et al. Review of anticancer platinum drugs [J]. Hainan Univ(Nat Sci Ed)(海南大学学报：自然科学版), 2005, 23(1): 72-80.

[7] CUI T, GUO W Y. Determination of entrapment efficiency of capecitabine liposomes by microcolumn Centrifugation-HPLC [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2012, 43(8): 682-684.

[8] ZHAN F, LI CHAO, HAN Y P. Optimization of extraction of crocin from crocus sativus L. by orthogonal regression design [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(8): 729-732.

[9] WANG W D, WANG Y, WANG L F, et al. Optimization extraction of effective constituents from Epinedii herba based on central composite design-response surface methodology and orthogonal experimental design [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2010, 21(11): 2766-2768.

[10] QIN L H, FANG Y G, ZOU G S, et al. Optimisation of the formula of ketoconazole and tinidazole effervescent tablets using Box-Behnken surface response design [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2010, 30(17): 1436-1439.

[11] WANG X D, LIU K, HAO J F, et al. Optimized formulation of levofloxacin gastric floating tablet by Box-Behnken design [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(4): 406-411.

收稿日期：2013-05-18

肉桂提取物醇质体凝胶经皮给药研究

梁震野[1]，杨建苗[2]，杜立峰[1]，许东航[3*]，魏晓红[4](1.台州市第一人民医院，浙江 台州 318020；2.浙江省台州医院，浙江 台州 317000；3.浙江大学医学院附属第二医院，杭州 310009；4.杭州师范大学，杭州 310036)

摘要：目的 制备肉桂提取物醇质体凝胶，考察肉桂提取物醇质体凝胶的透皮速率影响因素。**方法** 采用注入法制备肉桂提取物醇质体，将醇质体与羟丙基甲基纤维素(HPMC)凝胶混合制备肉桂提取物凝胶，采用♂SD 大鼠皮肤和 Franz 单室扩散池作体外经皮研究，HPLC 测定不同时间点接受池的肉桂酸含量，考察不同 HPMC 浓度、不同促渗剂和促渗剂浓度对肉桂提取物醇质体凝胶渗透速率的影响。**结果** 不同 HPMC 浓度作为肉桂提取物醇质体基质时经皮渗透速率：2%HPMC>3%HPMC>4%HPMC>5%HPMC≈醇质体。2%氮酮-丙二醇(1∶1)处理显示最好的促渗效果，渗透速率与醇质体相比：(4.38±0.47)μg·h^{-1}·cm^{-2} *vs* (1.53±0.31)μg·h^{-1}·cm^{-2}。**结论** 2%HPMC 制备的肉桂提取物醇质体凝胶，能提高肉桂透皮速率，醇质体凝胶有望开发为肉桂提取物经皮给药剂型。

关键词： 肉桂提取物；经皮给药；醇质体；凝胶；促渗剂

中图分类号： R943.43 **文献标志码：** A **文章编号：** 1007-7693(2013)11-1202-05

作者简介： 梁震野，女，副主任药师 Tel: (0576)84016891 E-mail: lzyzjtz@163.com *__通信作者：__ 许东航，男，博士，主任药师 Tel: (0571)87784529 E-mail: xudonghang@zju.edu.cn