

# Box-Behnken 响应面法优化吲哚美辛固体脂质纳米粒处方<sup>Δ</sup>

陈凯<sup>1,2\*</sup>, 李收<sup>3</sup>, 金凯<sup>1</sup>, 赵晶<sup>1</sup>, 郝吉福<sup>1#</sup>(1.泰山医学院药学院, 山东泰安 271016; 2.济宁医学院附属医院药剂科, 山东济宁 272000; 3.枣庄科技职业学院医学技术系, 山东枣庄 277500)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)22-3118-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.22.28

**摘要** 目的:优化吲哚美辛固体脂质纳米粒处方。方法:以吲哚美辛为模型药物、山嵛酸甘油酯为油相、泊洛沙姆188和聚乙二醇-12-羟基硬脂酸酯为乳化剂,以浊度、包封率、载药量为指标,采用Box-Behnken响应面法优化处方中油相用量、乳化剂-油相比、药物-油相比。采用扫描电镜、差示扫描热分析(DSC)表征固体脂质纳米粒的理化性质。结果:最优处方的油相用量为0.91%,乳化剂-油相比为1:1,药物-油相比为1:5;所制吲哚美辛固体脂质纳米粒的浊度为1 025~1 030 NTU,包封率为98.94%~99.08%,载药量为2.43%~2.46%,粒径为181.5~182.3 nm,多分散性指数(PDI)为0.340~0.341( $n=3$ );DSC结果显示吲哚美辛不是以结晶状态存在于固体脂质纳米粒中。结论:成功筛选出最优处方,制得吲哚美辛固体脂质纳米粒。

**关键词** 吲哚美辛;固体脂质纳米粒;Box-Behnken响应面法;优化处方

## Formulation Optimization of Indomethacin-loading Solid Lipid Nanoparticles by Box-Behnken Response Surface Methodology

CHEN Kai<sup>1,2</sup>, LI Shou<sup>3</sup>, JIN Kai<sup>1</sup>, ZHAO Jing<sup>1</sup>, HAO Jifu<sup>1</sup>(1.College of Pharmacy, Taishan Medical University, Shandong Tai'an 271016, China; 2.Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Jining Medical University, Shandong Jining 272000, China; 3.Dept. of Medical Technology, Zaozhuang Vocational College of Science and Technology, Shandong Zaozhuang 277500, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To optimize the formulation of indomethacin-loading solid lipid nanoparticle (SLN). METHODS: Using indomethacin as model drug, glyceryl behenate as oil phase, poloxamer 188 and polyethylene glycol-12-hydroxystearic acid as emulsifier, with turbidity, entrapment efficiency and drug loading amount as index, Box-Behnken response surface methodology was used to optimize the amount of oil phase, emulsifier-oil phase ratio, drug-oil phase ratio. The physicochemical properties of SLNs were characterized by SEM and DSC. RESULTS: The optimal formulation was as follows as oil phase of 0.91%, emulsifier-oil ratio of 1:1, drug-oil phase ratio of 1:5. The turbidity, entrapment efficiency and drug loading amount of prepared nanoparticle were 1 025-1 030 NTU, 98.94%-99.08%, 2.43%-2.46%, respectively; particle size and polydispersity index (PDI) were 181.5-182.3 nm and 0.340-0.341 ( $n=3$ ). The results of DSC showed that indomethacin was not present in crystalline state dispersed into SLNs. CONCLUSIONS: The optimal formulation is screened successfully, and indomethacin-loaded SLNs have been prepared.

**KEYWORDS** Indomethacin; Solid lipid nanoparticle; Box-Behnken response surface methodology; Formulation optimization

吲哚美辛(Indomethacin, IDM)为非甾体抗炎药,通过抑制前列腺素的合成而发挥解热、镇痛、消炎作用,临床上用于治疗类风湿性关节炎及电光眼、角膜炎、巩膜炎等多种眼部炎症<sup>[1-2]</sup>。近年来,微粒载体在黏膜递药系统中发展迅速,固体脂质纳米粒(Solid lipid nanoparticles, SLN)是以脂质材料包裹或镶嵌脂溶性药物形成的粒径为10~1 000 nm的固态胶粒。纳米级粒径赋予SLN较好的黏膜附着性与渗透性,使其易于通过融合或穿透机制进入黏膜而具有独特优势<sup>[3-4]</sup>。

Box-Behnken设计是普遍采用的一种优化方案<sup>[5-7]</sup>。本试验以IDM为模型药物,拟通过制备成SLN以改善其溶解度低的缺点,利用纳米颗粒增加黏膜渗透性与穿透性等作用以提高IDM在治疗眼部疾病中的应用,并采用Box-Behnken响应面法通过数学模型回归方程优化IDM-SLN处方。

<sup>Δ</sup> 基金项目:2013年地方高校国家级大学生创新创业训练计划项目(No.201310439013)

\* 学士。研究方向:临床药学。电话:0538-6229751

# 通信作者:副教授,硕士。研究方向:药剂学、药物新剂型研究与开发。E-mail: haojifu@163.com

## 1 材料

### 1.1 仪器

JY92-II 探头超声波细胞粉碎仪(宁波新芝科技股份有限公司);超速冷冻离心机(美国Sigma公司);WZS-185 浊度计(上海雷磁仪器厂)。

### 1.2 药品与试剂

IDM对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100258-200904,纯度:99.4%);IDM原料药(郑州德宝精细化工有限公司,批号:20131218,纯度:99.3%);山嵛酸甘油酯(Compritol<sup>®</sup> 888 ATO,法国Gattefossé公司);聚乙二醇-12-羟基硬脂酸酯(HS15)和泊洛沙姆188(北京凤礼精求商贸有限公司);其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 IDM-SLN的制备

采用熔融乳化超声法制备IDM-SLN。将山嵛酸甘油酯、IDM原料药与适量无水乙醇水浴加热至85℃融化作为油相。将泊洛沙姆188和HS15溶于蒸馏水中,水浴加热至85℃左右形成水相。在搅拌下将水相加入熔融的油相中形成初乳,超

声(功率:600 W)10 min,制得淡蓝色透明胶体溶液,0 ℃冰浴,1 000 r/min搅拌至油相脂质材料充分冷却,即得IDM-SLN胶体溶液<sup>[8]</sup>。

## 2.2 包封率和载药量的测定

2.2.1 IDM的含量测定及方法学考察 采用紫外分光光度计测定IDM-SLN中IDM的含量。精密称取IDM对照品适量,用无水乙醇制备成系列质量浓度的标准溶液,于200~400 nm波长范围内进行扫描。结果发现,IDM在319 nm波长处有最大吸收。以IDM的质量浓度( $c$ )为横坐标、吸光度( $A$ )为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $A=7.2347c-0.0024$ ( $r=0.9996$ ),表明IDM质量浓度在0.025~4 μg/ml范围内线性关系良好。按相关方法考察0.025、0.25、2.5 μg/ml的IDM溶液的日内RSD分别为3.12%、1.87%、2.64%( $n=5$ ),日间RSD分别为3.78%、2.79%、3.17%( $n=5$ ),回收率分别为102.32%、99.25%、99.76%(RSD=1.63%),均符合方法学考察要求。

2.2.2 包封率的测定 采用乙醇溶解破坏和盐析沉淀的方法测定IDM-SLN的包封率。精密量取1.0 ml IDM-SLN胶体溶液于10 ml量瓶中,加无水乙醇定容至刻度,400 W功率下超声10 min,1 800×g离心10 min,取上清液在319 nm波长处测定吸光度( $A$ ),由标准曲线计算上清液中IDM的总含量( $M_{\text{总量}}$ );另取1.0 ml IDM-SLN胶体溶液加饱和硫酸铵盐析,1 800×g离心10 min,取下层溶液测定吸光度( $A$ )。由标准曲线计算游离IDM的含量( $M_{\text{游离}}$ ),计算包封率= $(M_{\text{总量}}-M_{\text{游离}})/M_{\text{总量}}\times 100\%$ 。

2.2.3 载药量的测定<sup>[9]</sup> 采用冷冻干燥法测定IDM-SLN的载药量。同“2.2.2”项下方法测定 $M_{\text{总量}}$ 和 $M_{\text{游离}}$ 。另精密量取IDM-SLN胶体溶液1.0 ml,经冷冻干燥后测定冻干粉末中IDM的含量( $M_{\text{冻干}}$ ),计算载药量= $(M_{\text{总量}}-M_{\text{游离}})/(M_{\text{冻干}}-M_{\text{游离}})\times 100\%$ 。

## 2.3 浊度的测定

精密量取IDM-SLN胶体溶液5.0 ml,置于50 ml量瓶中,加双蒸水稀释至刻度,通过WZS-185浊度计测定浊度。

## 2.4 处方优化

2.4.1 Box-Behnken设计试验 根据预试验结果,选择显著影响IDM-SLN处方的3个因素,即油相(山嵛酸甘油酯)的用量( $X_1$ , % (m/m))、乳化剂(泊洛沙姆188-HS15)-油相的比例( $X_2$ )、药物-油相的比例( $X_3$ ),每个因素的高、中、低3个水平分别以1、0、-1计,以浊度( $Y_1$ )、包封率( $Y_2$ )和载药量( $Y_3$ )为响应值,采用Box-Behnken设计试验建立数学模型优化处方,并用Design Expert软件对试验数据进行拟合分析<sup>[10]</sup>。因素与水平见表1,Box-Behnken试验设计与响应值结果见表2。

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

因素	水平		
	-1	0	1
$X_1$ , % (m/m)	0.6	0.8	1
$X_2$	1:1	1.25:1	1.5:1
$X_3$	1:2	1:3.5	1:5

2.4.2 数据处理 利用Box-Behnken试验软件对各指标数据进行回归分析,将数据拟合为二项式方程模型。结果 $Y_1=926.09+390.88X_1+75.12X_2-103.62X_3+159.37X_1X_2-200.88X_1X_3-120.12X_2X_3-235.38X_1X_2X_3$ ,经 $F$ 检验显示方程具有显著性( $P=0.0398$ ),表明该回归模型的拟合情况良好,能准确预测实际

表2 Box-Behnken试验设计与响应值结果( $n=3$ )

Tab 2 Design and response values of Box-Behnken test ( $n=3$ )

序号	$X_1$ , %	$X_2$	$X_3$	$Y_1$ , NTU	$Y_2$ , %	$Y_3$ , %
1	0	0	0	658	97.14	1.970
2	-1	1	-1	287	89.89	1.044
3	0	0	0	895	97.41	1.946
4	0	0	0	837	97.51	1.912
5	1	1	-1	2 260	93.70	0.757
6	-1	1	1	712	94.95	2.018
7	-1	-1	-1	686	88.67	1.324
8	1	-1	-1	1 080	96.18	1.217
9	1	-1	1	1 182	97.59	2.744
10	-1	-1	1	650	94.41	2.371
11	1	1	1	940	97.74	2.180

浊度; $Y_2=0.95+0.022X_1-7.051\times 10^{-4}X_2+0.02X_3-5.09\times 10^{-3}X_1X_2-6.682\times 10^{-3}X_1X_3+2.452\times 10^{-3}X_2X_3+4.138\times 10^{-3}X_1X_2X_3$ ,经 $F$ 检验显示方程无显著性( $P=0.406$ ),说明该回归模型的拟合情况不佳,不能准确预测实际包封率; $Y_3=0.018+1.767\times 10^{-4}X_1-2.072\times 10^{-3}X_2+6.214\times 10^{-3}X_3-4.875\times 10^{-4}X_1X_2+1.16\times 10^{-3}X_1X_3-2.23\times 10^{-4}X_2X_3-3.891\times 10^{-5}X_1X_2X_3$ ,经 $F$ 检验显示方程具有显著性( $P=0.0314$ ),表明该回归模型的拟合情况良好,能准确预测实际载药量。

2.4.3 响应面法优化 根据制剂设计需要,目标参数要求获得 $Y_1$ 较小而 $Y_2$ 、 $Y_3$ 较大的处方。应用Design Expert设计软件绘制因素对响应值影响的三维图,结果见图1。

由图1中可知,油相的增加会使浊度明显增大,而增大乳化剂的量会使浊度降低;当乳化剂-油相的比例增加时,包封率呈增加趋势;乳化剂和药物含量对载药量影响显著。在影响载药量的各因素中,不同因素作用不尽相同:随乳化剂的增加,载药量呈降低趋势;当药物含量增加时,载药量呈增加趋势;但当乳化剂量固定时,随油相增加载药量呈略减小趋势<sup>[11-12]</sup>。用Design Expert设计软件对目标限定条件进行优化,将代码数值转化成优化的实际数值,优化后的处方为:油相(山嵛酸甘油酯)用量为0.91%、乳化剂(泊洛沙姆188-HS15)-油相的比例为1:1、药物与油相的比例为1:5。

## 2.5 验证试验及形态观察

按“2.4”项下优化后的处方制备3批IDM-SLN,测定浊度、包封率、载药量、粒径大小及多分散指数(Polydispersity index, PDI),并用电镜观察形态。验证试验结果见表3,粒径分布见图2,扫描电镜图见图3。

## 2.6 表征

将IDM原料药、山嵛酸甘油酯、IDM-SLN以及物理混合物进行差示扫描量热法分析,升温速度为10 ℃/min,升温至230 ℃,氮气保护。记录差示扫描量热曲线,结果见图4。

由图4可知,IDM的熔点为160.68 ℃,而IDM-SLN中并未出现IDM的吸热峰,表明IDM在IDM-SLN中可能不是以结晶形态存在;物理混合物中表现出典型的山嵛酸甘油酯的吸热峰,但并未表现出显著IDM的熔融峰,这可能与差示扫描量热测试环节温度持续升高的过程中IDM与熔融的脂质载体形成低共融混合物有关。

## 3 讨论

目前在药剂学处方优化过程中,可以采用多种方法对处

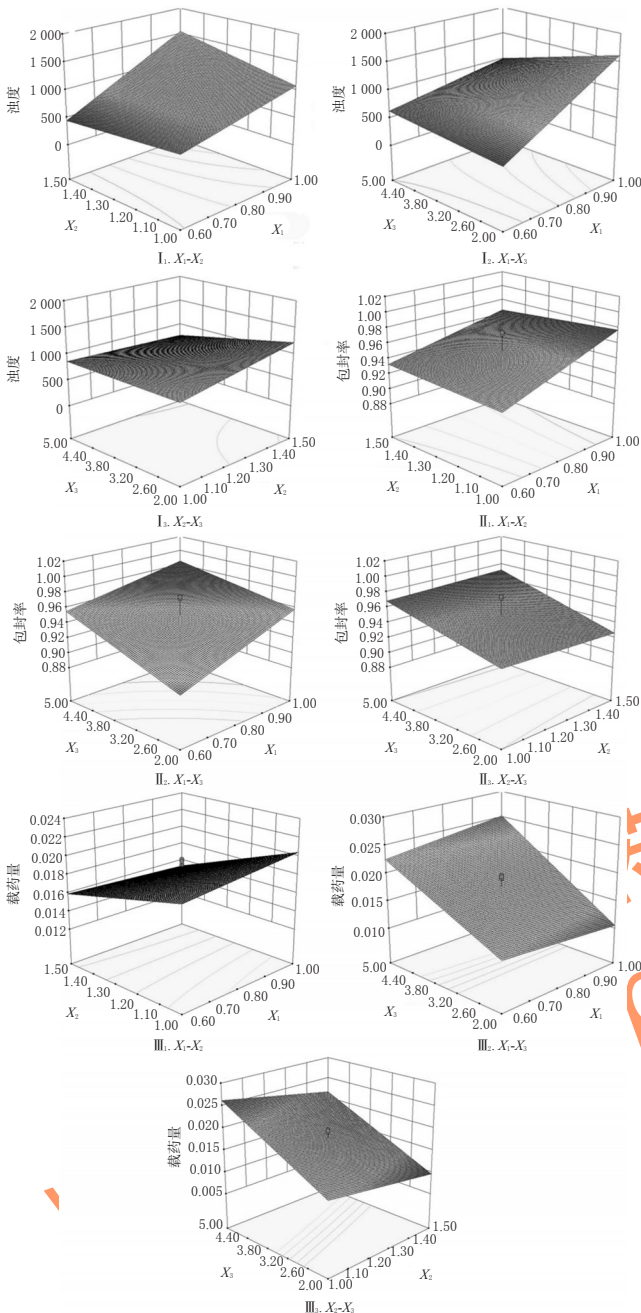


图1 因素与响应值关系的三维图  
I. 浊度; II. 包封率; III. 载药量

Fig 1 Three-dimensional response surface plot of factors to response value

I. turbidity; II. entrapment efficiency; III. drug loading amount

表3 验证试验结果(n=3)

Tab 3 Results of validation test(n=3)

批号	浊度, NTU	包封率, %	载药量, %	粒径, nm	PDI
1	1 030	99.08	2.45	182.3	0.341
2	1 020	99.01	2.46	181.5	0.340
3	1 025	98.94	2.43	182.0	0.341

方进行设计,常用的有正交试验设计和均匀试验设计等方法,这两种方法具有试验次数少、使用普遍等优点,但所选择的变量为一个点,不能对处方设计过程中形成的连续变量进行分析与预测处理。而Box-Behnken设计属于响应面试验设计的一种,可以在各设计的因素点与响应值之间连接成曲面,预测

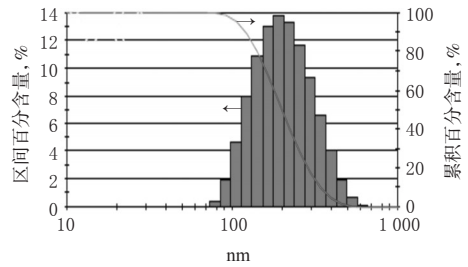


图2 IDM-SLN的粒径分布

Fig 2 Particle size distribution of indomethacin-loading SLNs

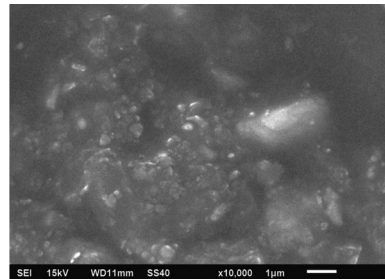


图3 IDM-SLN的扫描电镜图

Fig 3 SEM photograph of indomethacin-loading SLNs

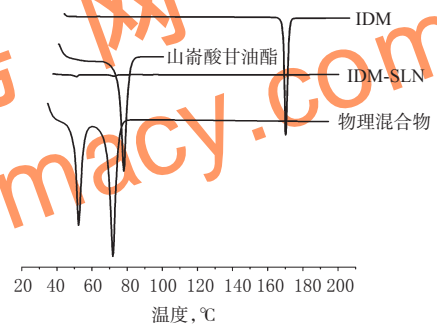


图4 4种样品的差示扫描量热图

Fig 4 DSC of 4 kinds of sample

与分析在某个曲面过程中所选择因素对响应值变化的影响,因而可以更直观、更形象地分析因素与目标响应值之间的关系;同时还可以在因素与响应值之间建立数学模型,通过对数学模型的拟合进行分析,从而更准确地获得最优工艺条件;其局限性在于试验次数较多<sup>[13]</sup>。

浊度是液体中悬浮物质对光线透过时所形成的阻碍程度,通过对浊度的测定可以间接反映粒径大小。

由于SLN属于高分散体系,乳化剂的增加能降低两相之间表面张力,提高系统的稳定性,这与采用熔融乳化分散法形成SLN的机制有关。当脂质材料在加热至其熔点后,形成液态的脂质载体,能够溶解脂溶性药物,故当脂质材料增加时能够包载或镶嵌更多的药物,导致其包封率增加。在乳化剂对包封率的影响过程中,由于随着乳化剂含量的增加系统稳定性增强,而使包载的药量增大;但对载药量而言,随乳化剂浓度的增加,在体系中能形成胶团而促进药物的溶解,因而使载药量降低<sup>[14-15]</sup>。

本文应用Box-Behnken设计对IDM-SLN处方进行优化,并通过对数学模型的分析处理得出因素与响应值之间的相互关系,使其能够方便、快捷、准确地获得最优工艺条件,为IDM-SLN的进一步研究奠定基础。

## 参考文献

- [ 1 ] Ghanbarzadeh S, Hariri R, Kouhsoltani M, *et al.* Enhanced stability and dermal delivery of hydroquinone using solid lipid nanoparticles[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2015, doi:10.1016/j.colsurfb.2015.10.041.
- [ 2 ] Limón D, Amirthalingam E, Rodrigues M, *et al.* Novel nanostructured supramolecular hydrogels for the topical delivery of anionic drugs[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2015, doi:10.1016/j.ejpb.2015.09.007.
- [ 3 ] Hippalgaonkar K, Adelli GR, Hippalgaonkar K, *et al.* Indomethacin-loaded solid lipid nanoparticles for ocular delivery: development, characterization, and in vitro evaluation[J]. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2013, 29(2):216.
- [ 4 ] Muller RH, Shegokar R, Keck CM. 20 years of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications[J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2011, 8(3):207.
- [ 5 ] 刘泽玉, 苏柘僮, 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.
- [ 6 ] Das S, Ng WK, Kanaujia P, *et al.* Formulation design, preparation and physico-chemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: effects of process variables[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2011, 88(1):483.
- [ 7 ] Wang F, Chen L, Jiang S, *et al.* Optimization of methazolamide-loaded solid lipid nanoparticles for ophthalmic delivery using Box-Behnken design[J]. *J Liposome Res*, 2014, 24(3):171.
- [ 8 ] Gokce EH, Korkmaz E, Deller E, *et al.* Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, doi: 10.2147/IJN.S29710.
- [ 9 ] Hao J, Fang X, Zhou Y, *et al.* Development and optimization of solid lipid nanoparticle formulation for ophthalmic delivery of chloramphenicol using a Box-Behnken design[J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, doi: 10.2147/IJN.S17386.
- [10] 郝吉福, 王建筑, 郭丰广, 等. 基于 Box-Behnken 实验优化龙血竭固体脂质纳米粒的制备[J]. *中成药*, 2011, 33(10):1713.
- [11] Zhang C, Gu C, Peng F, *et al.* Preparation and optimization of triptolide-loaded solid lipid nanoparticles for oral delivery with reduced gastric irritation[J]. *Molecules*, 2013, 18(11):13340.
- [12] 丁立新, 杨珊珊, 张楠楠, 等. 毛蕊花苷固体脂质纳米粒的处方优化及其质量评价[J]. *中国药房*, 2014, 25(3):231.
- [13] Dejaeger B, Heyden YV. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 56(2):141.
- [14] Wang S, Chen T, Chen R, *et al.* Emodin loaded solid lipid nanoparticles: preparation, characterization and antitumor activity studies[J]. *Int J Pharm*, 2012, 430(1/2):238.
- [15] Gidwani B, Vyas A. Preparation, characterization, and optimization of altretamine-loaded solid lipid nanoparticles using Box-Behnken design and response surface methodology[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2016, 44(2):571.

(收稿日期:2016-02-01 修回日期:2016-05-26)

(编辑:邹丽娟)

## 国家卫生和计划生育委员会、全国爱卫办召开2016年全国爱国卫生暨预防接种工作会议

本刊讯 2016年7月7日,国家卫生和计划生育委员会、全国爱卫办在四川省成都市召开2016年全国爱国卫生暨预防接种工作会议,深入贯彻2016年全国爱国卫生运动委员会全体会议精神特别是刘延东副总理重要讲话精神,贯彻实施新修订《疫苗流通和预防接种管理条例》,部署2016年爱国卫生及预防接种重点工作,确保近期预防接种重点工作任务有效落实,推动健康城市健康村镇建设工作全面开展。国家卫生和计划生育委员会党组书记、主任李斌对会议作出重要批示。

李斌在批示中指出,2015年以来,各地认真贯彻落实中央决策部署,爱国卫生工作取得显著进展。希望大家认真贯彻

落实刘延东副总理重要讲话精神,紧紧围绕健康中国的目标,坚持预防为主、源头治理,深入推进城乡环境卫生整洁行动,加强卫生城镇常态化管理,全面开展健康城市健康村镇建设。要认真贯彻落实新修订《疫苗流通和预防接种管理条例》的精神,依法、科学、规范开展预防接种,有效保护人民群众健康。要完善群众宣传和动员机制,努力实现工作内容从偏重环境卫生治理向全面社会健康管理的转变,工作模式从粗放式管理向精细化管理的转变,以爱国卫生工作的新发展促进健康中国战略目标的实现。