

# Box-Behnken 响应面法优化海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒处方工艺

陈婷婷<sup>a,b</sup>, 李顺英<sup>a,b</sup>, 秦婷婷<sup>a,b</sup>, 曾庆冰<sup>a,b\*</sup> (南方医科大学药学院, a. 药用生物材料课题组; b. 广东省新药筛选重点实验室, 广州 510515)

**摘要:目的** 采用 Box-Behnken 响应面法优化海藻酸钠聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物(mPEG-b-PLGA)纳米粒的处方工艺。**方法** 合成 10% mPEG5000-b-PLGA 为基质材料,通过双乳剂法制备载胰岛素的海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒。选取胰岛素投料比、油相与外水相体积比、乳化剂浓度为考察因素,包封率和载药量为评价指标,采用 Box-Behnken 响应面法筛选最优处方,对优化所得纳米粒的基本性质和体外释药性能考察。**结果** 最优处方为:胰岛素投料比 14.67:100,油相与外水相体积比 1:3.32,乳化剂浓度为 2.01%。实际制备所得载胰岛素纳米粒包封率为 83.61%,载药量为 10.90%,与模型预测值接近。平均粒径为(271.80 ± 3.50)nm,Zeta 电位值为 -54.27 mV 具有良好的缓释性能。**结论** Box-Behnken 响应面法有效可行,可以用于优化海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒的处方工艺,优化后的纳米粒有望作为理想的胰岛素缓释载体。

**关键词:** Box-Behnken; 响应面法; 纳米粒; 胰岛素; 缓释; 处方优化

doi:10.11669/cpj.2019.19.008 中图分类号:R944 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2019)19-1590-09

## Formulation Optimization of Alginate mPEG-b-PLGA Nanoparticles by Box-Behnken Response Surface Method

CHEN Ting-ting<sup>a,b</sup>, LI Shun-ying<sup>a,b</sup>, QIN Ting-ting<sup>a,b</sup>, ZENG Qing-bing<sup>a,b\*</sup> (a. Biomaterial Research Center; b. Guangdong Provincial Key Laboratory of New Drug Screening, School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**ABSTRACT;OBJECTIVE** To optimize the formulation of alginate mPEG-b-PLGA nanoparticles by Box-Behnken response surface method. **METHODS** Using synthetic 10% mPEG-b-PLGA as nanoparticles matrix materials, the insulin-loaded alginate mPEG-b-PLGA nanoparticles were prepared by modified double emulsion-solvent evaporation method. To optimize the formulation, the mass ratio of insulin to polymer, the volume ratio of oil phase to external water and the concentration of poloxamer 188 (F68) were selected as independent variables, with encapsulation efficiency (EE%), loading capacity (LC%) as the dependent variables. The formula was optimized by Box-Behnken design and response surface methodology. The particles size, polydispersity index (PDI), Zeta potential and morphology of optimized nanoparticles were measured by dynamic light scattering (DLS), electrophoretic light scattering (ELS) and transmission electron microscope (TEM), respectively. The *in vitro* release profile of nanoparticles was investigated. **RESULTS** The optimal formulation was as follows: the mass ratio of insulin to mPEG-b-PLGA was 14.67:100, the oil phase to external water ratio was 1:3.32 and F68 (W/V) concentration was 2.01%, respectively. The entrapment efficiency, the loading capacity, average particles size and Zeta potentials were (83.61 ± 0.38)%, (10.90 ± 0.23)%, (271.8 ± 3.5) nm and (-54.27 ± 2.75) mV, respectively, which correspond closely to the predicted values. The optimized insulin-loaded nanoparticles performed good sustained release property in pH 7.4 medium. **CONCLUSION** The Box-Behnken design and response surface methodology is an effective and efficient method, which can be applied in the formula optimization of alginate mPEG-b-PLGA nanoparticles preparation. The optimized nanoparticles can be served as a promising insulin or proteins drug nanocarriers for its good sustained release property.

**KEY WORDS:** Box-Behnken; response surface method; nanoparticles; insulin; sustained release; formula optimization

糖尿病是一种由于胰腺不能分泌足够的胰岛素,或者机体不能有效地利用胰岛素,所导致的内分泌疾病。根据国际糖尿病联盟报道,2011 年全球患糖尿病的人数达到 3.66 亿,预计 2035 年该人数量将增至 5.92 亿<sup>[1]</sup>。胰岛素作为目前最有有效的治

疗药物之一,是作为 1 型糖尿病的唯一用药,2 型糖尿病的辅助用药。胰岛素为一种肽类激素,受其本身的化学结构和活性的限制,与其他蛋白类药物一样,具有稳定性差,易酶解,免疫原性和抗原性高,半衰期短等缺点。随着纳米载体技术的不断发展,通

作者简介:陈婷婷,女,硕士 研究方向:药用高分子材料学  
Tel:(020)62789462 E-mail:zengqb@smu.edu.cn

\* 通讯作者:曾庆冰,女,教授 研究方向:药用高分子材料学

过将生物可降解高分子聚合物作为胰岛素和蛋白类药物纳米载体,为包载药物提供稳定的环境,有望使蛋白类药物给药后保持生物活性,并具有靶向、缓控释和长效作用<sup>[2]</sup>。

理想的高分子聚合物载体应该是可生物降解的,生物相容性的,能够在抵抗胃 pH 梯度和酶的作用,延长所载药物在体循环中的滞留时间,减少药物过早释放<sup>[3]</sup>。聚乙二醇(PEG)是一种亲水性的惰性聚合物,能够在纳米粒表面作为一层立体屏障,从而使蛋白结合(中和)最小化,对蛋白质及多肽类药物起到保护作用。聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物(mPEG-b-PLGA)是由 PLGA 与甲氧基封端的聚乙二醇(mPEG)聚合而成的嵌段聚合物,由于加入了亲水性强的 mPEG 分子,使 mPEG-b-PLGA 成为一端亲水另一端疏水的两性分子,从而提高对水溶性蛋白类药物的载药量<sup>[4-6]</sup>。海藻酸钠是一种水溶性的天然线性多糖的钠盐,具有良好生物可降解性和生物相容性等优点,能在较低的 pH 收缩,使包封的药物滞留在胃,同时保护药物免受酶的作用而失活,因此 pH 响应性聚合物中得到了广泛的应用<sup>[7]</sup>。

Box-Behnken 响应面法具有实验次数少、周期短、精密度高等优点,可以考察试验中各因素对考察因素的影响以及各因素相互作用,并优化最佳方案,在药物制剂领域得到了广泛的应用<sup>[8-11]</sup>。本实验制备了一种具有缓释作用的新型纳米粒,以合成的两亲性二嵌段共聚物 mPEG-b-PLGA 作为纳米粒基质材料,以海藻酸钠和乳化剂泊洛沙姆 188 作为外水相,提高纳米粒的生物相容性和稳定性,采用双乳剂-溶剂挥发法负载胰岛素。采用 Box-Behnken 响应面优化法优化处方工艺,对优化所得的载胰岛素海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒的性质进行表征,考察其体外释放性能,为进一步蛋白类药物新型缓释纳米制剂研究提供实验依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Avance III 400 MHz 核磁共振波谱仪(瑞士,

Bruker 公司), Nicolet 6700 型傅里叶红外光谱仪(美国, Thermo Fisher 公司), Zetasizer Nano ZS 纳米粒度电位仪(英国, 马尔文仪器有限公司), Infinite M1000 Pro 多功能微孔板检测仪(瑞士, Tecan 公司), FreeZone 6 冷冻干燥机(美国, LABCONCO 公司)。

### 1.2 试剂

海藻酸钠, D, L-丙交酯, 乙交酯, 聚乙二醇单甲醚(mPEG<sub>5000</sub>, Mw 5 000), 辛酸亚锡[Sn(oct)<sub>2</sub>, 95%, 泊洛沙姆 188(F68, Mw 8 400)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 猪胰岛素原料药(26.9 U·mg<sup>-1</sup>, 徐州万邦金桥制药有限公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司)。二氯甲烷(DCM)、甲醇、丙酮等其他试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 两嵌段共聚物 10% mPEG<sub>5000</sub>-b-PLGA 的合成与表征

**2.1.1 两嵌段共聚物 10% mPEG<sub>5000</sub>-b-PLGA 的合成** 采用开环聚合法合成, 反应方程式见图 1。精密称量 10% 质量百分比的 mPEG<sub>5000</sub> 于圆底烧瓶中作为引发剂, 通过控制混合 mPEG<sub>5000</sub> 的量来调节与 PLGA 的相对分子质量的比例, 随后加入按 50:50 投料比加入 D, L-丙交酯和乙交酯, 加入 0.1% 单体量的辛酸亚锡作为催化剂, 加入搅拌子, 3 次抽真空, 于氮气环境下 120 °C 油浴反应 24 h, 见表 1。移出油浴锅即停止反应, 冷却至室温。用一定量的二氯甲烷溶解合成的共聚物, 在过量冷甲醇溶液中沉淀, 重复 3 次纯化产物, 减压过滤, 40 °C 下真空干燥 24 h 至恒重。

本实验通过开环聚合法一步合成 PLGA 和 mPEG<sub>5000</sub>-b-PLGA<sup>[12-13]</sup>。通过辛酸亚锡作为催化剂提高反应速率, mPEG 作为引发剂引发内酯开环。mPEG 上的活泼氢进攻内酯环上的羰基碳原子, 碳氧双键断裂形成氧离子, 烷氧键断裂形成活性中间体<sup>[14]</sup>, 随后活泼氢转移至末端, 继续进攻开环后的内酯单体, 发生链增长反应。mPEG-b-PLGA 既具有

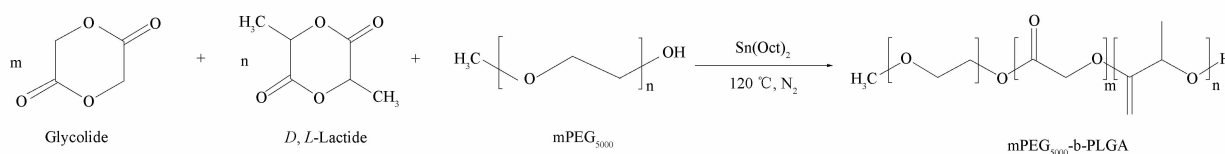


图 1 两嵌段共聚物 10% mPEG<sub>5000</sub>-b-PLGA 的合成路线

Fig. 1 Synthesis process of diblock copolymer 10% mPEG<sub>5000</sub>-b-PLGA

亲脂性 PLGA 的生物降解性和生物相容性,又具有亲水性 mPEG 的长循环性,可以自主装形成纳米粒或胶束体系,疏水性 PLGA 形成内核,亲水性 mPEG 形成稳定的外壳。

**2.1.2 傅里叶红外光谱(FT-IR)表征** 将溴化钾(KBr)置于高温烘箱中干燥,取适量的待测产物与干燥的溴化钾混合均匀,冷却后,研磨成粉末(溴化钾与待测产物的质量比为 20:1),取适量粉末样品压片,在  $350 \sim 7\,800\text{ cm}^{-1}$  波数范围扫描,分辨率  $2\text{ cm}^{-1}$ ,测定样品聚合物的红外吸收光谱图(图 2)。

从图 2 分析可见,合成产物在  $1\,760\text{ cm}^{-1}$  处有强吸收峰,为典型的羰基伸缩振动峰,表明已内酯和丙内酯发生开环聚合反应形成了直链酯键。在  $2\,900 \sim 3\,000\text{ cm}^{-1}$  区域中出现 PLGA 链段中 CH 伸缩振动峰与 mPEG 中的 CH 伸缩振动峰发生重叠,而 PEG 链段中的弯曲振动峰同时存在,表明 mPEG 已与 PLGA 形成二嵌段共聚物。在  $3\,500\text{ cm}^{-1}$  处有宽吸收峰,表明合成聚合物的末端有羟基,为 mPEG 和 PLGA 中的羟基的伸缩振动峰。红外图谱分析结果与聚合物预计结构一致,表明合成物为所需二嵌段共聚物 mPEG-b-PLGA。

**2.1.3 核磁共振氢谱( $^1\text{H-NMR}$ )表征** 以氘代氯仿( $\text{CDCl}_3$ )为溶剂,四甲基硅(TMS)为内标, $25\text{ }^\circ\text{C}$  下测定待测样品的核磁共振氢谱图(图 3)。根据

表 1 10% mPEG<sub>5000</sub>-b-PLGA 合成的投料量

Tab. 1 The weight of reactants of 10% mPEG<sub>5000</sub>-b-PLGA

Material	Molarmass	Mr	Theoretical weight/g	Actual weight/g
D,L-Lactide	30 mmol	144.13	4.323 9	4.323 2
Glycolide	30 mmol	116.07	3.482 1	3.447 3
mPEG <sub>5000</sub>	10%	5 000	0.867 3	0.867 2
Sn(Oct) <sub>2</sub>	0.1%	405.12	0.024 3	0.030 1

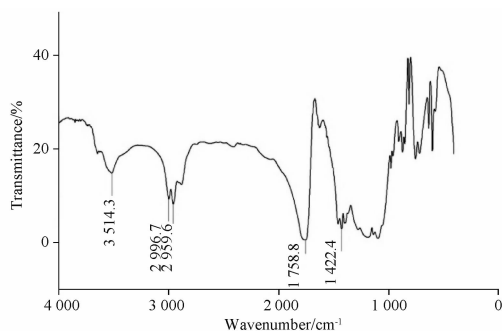


图 2 二嵌段聚合物 10% mPEG<sub>5000</sub>-b-PLGA 的红外谱图

Fig. 2 FT-IR Spectra of 10% mPEG<sub>5000</sub>-b-PLGA diblock copolymers

核磁共振氢谱图中相关峰的化学位移位置及峰面积,确定聚合物的结构组成,已知 mPEG 的相对分子质量为 5 000 作为基准,估算聚合物的相对分子质量( $M_r$ )。

图 3 所示为合成的 mPEG-b-PLGA 共聚物<sup>1</sup>H-NMR 谱图,其中  $\delta = 5.24$  和  $\delta = 4.85$  的吸收峰分别为 PLGA 链段中乙交酯 LA 的次甲基质子峰 $[-\text{O}-\text{CH}^*(\text{CH}_3)-\text{CO}-]$ 和丙交酯 GA 的亚甲基质子峰 $(-\text{O}-\text{CH}_2^*-\text{CO}-)$ ;  $\delta = 3.66$  处出现较强的吸收峰,此为 mPEG<sub>5000</sub> 中的重复单元的亚甲基质子特征峰 $(-\text{O}-\text{CH}_2^*-\text{CH}_2^*-\text{O}-)$ ;  $\delta = 1.60$  处的吸收峰为乙交酯 LA 中的重复单元的甲基质子峰 $(-\text{CH}_3^*)$ 。由此可见聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸共聚物(10% mPEG<sub>5000</sub>-b-PLGA)已成功合成,并根据 mPEG 相对分子质量为 5 000,按峰面积比估算得合成聚合物的  $M_r$  为 24 800。

**2.2 载胰岛素海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒的制备**

采用双乳剂挥发法(水包油包水, W/O/W)制备海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒。精密称取一定量的猪胰岛素原料药溶解于  $500\text{ }\mu\text{L}\ 0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液中,配置成胰岛素溶液,作为内水相。称取 100 mg 的 mPEG-b-PLGA 溶解于 5 mL 二氯甲烷-丙酮(3:2)混合溶液中,作为油相(有机相)。称取 500 mg 海藻酸钠溶解于 100 mL 蒸馏水中,配置成 0.5% 海藻酸钠溶液作为外水相,待用。取  $500\text{ }\mu\text{L}$  胰岛素溶液作为内水相加入到 5 mL 油相溶液中,超声探头乳化,总超声时间 1 min(超声时间 5 s,间隔时间 5 s,工作循环时间为 60%),得到初乳。随后将初乳转移到一定体积的外水相中,超声探头乳化 2 min(超声时间 10 s,间隔时间 10 s 工作

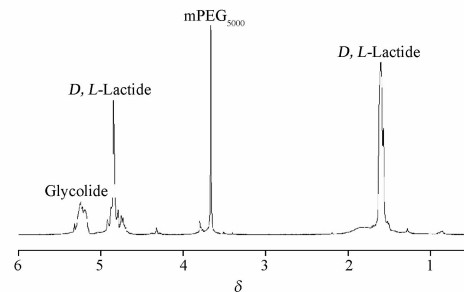


图 3 二嵌段聚合物 10% mPEG<sub>5000</sub>-b-PLGA 的核磁共振氢谱图

Fig. 3  $^1\text{H-NMR}$  Spectra of 10% mPEG<sub>5000</sub>-b-PLGA diblock copolymers

循环时间为 60%)。将制备所得的复乳剂,搅拌下缓慢滴加到一定浓度的 F68 稀释液中,稀释后终体积为 50 mL,室温下搅拌一晚,除去有机溶剂。12 000 × g, 4 °C 下离心 30 min,得到纳米粒沉淀。去离子水重混悬,离心沉淀,重复 3 次,洗净纳米粒,所得即载胰岛素的海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒,冷冻干燥,4 °C 下贮存。

### 2.3 包封率(EE%)和载药量(LC%)的测定

将制备所得的载胰岛素纳米粒溶液在 4 °C, 12 000 × g 条件下离心 30 min 后收集上清液,用去离子水洗滌沉淀 2~3 次,将洗滌液合并至上清液记录体积,取 2 mL 上清液于 2.5 mL 离心管中,10 000 × g, 4 °C, 离心 8 min,取上清液为待测样品溶液,采用 BCA 法测定上清中胰岛素含量,再根据下式计算聚合物载胰岛素纳米粒的包封率和载药量,平行测定 3 次。

### 2.4 Box-Behnken 响应面法优化处方

通过前期的单因素考察,选取了胰岛素与聚合物的投料比( $X_1$ ),油相与外水相的体积比( $X_2$ ),乳化剂 F68 的浓度( $X_3$ )作为考察指标,包封率( $Y_1$ , EE%)和载药量( $Y_2$ , LC%)作为评价指标,设计因素水平进行安排(表 2),实验设计与结果见表 3。

**2.4.1 模型拟合、方差分析与显著性检验** 采用 Design-Expert 8.0.6 统计软件对表 4 实验数据进行二次多项式方程拟合,得到回归方程: $Y_1 = 80.41 + 1.14X_1 - 7.33X_2 + 0.39X_3 + 1.78X_1X_2 + 5.54X_1X_3 - 5.63X_2X_3 - 1.72X_1^2 - 0.044X_2^2 - 1.78X_3^2$  ( $r^2 = 0.9521$ ) (1);  $Y_2 = 10.71 + 3.17X_1 - 0.91X_2 - 0.12X_3 + 0.10X_1X_2 + 0.73X_1X_3 - 0.82X_2X_3 - 0.091X_1^2 + 0.24X_2^2$  ( $r^2 = 0.9698$ ) (2)。两个拟合方程的  $r^2$  分别为 0.9521 和 0.9698,两模型均具有高度显著性 ( $P < 0.01$ ),失拟差相对于纯误差而言均不显著 ( $P > 0.05$ ),说明拟合程度良好,该模型可以用于海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒的处方优化的分析和预测<sup>[15-17]</sup>。从表 5, 6 的

表 2 Box-Behnken 响应面法的因素水平表

Tab.2 Levels of independent variables of Box-Behnken response surface method

Factor	Level		
	-1	0	+1
$X_1$ : the mass ratio of insulin to polymer (%)	10%	15%	20%
$X_2$ : the volume ratio of oil phase to external water	1:2	1:4	1:6
$X_3$ : the concentration of emulsifier F68 (%)	1%	2%	3%

表 3 Box-Behnken 响应面法的实验设计与结果

Tab.3 Design and results of Box-Behnken response surface method

No.	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$Y_1$ (EE%)	$Y_2$ (LC%)
1	15%	1:2	1%	78.87	10.92
2	20%	1:4	1%	70.66	12.97
3	15%	1:4	2%	82.94	11.65
4	10%	1:4	1%	82.77	8.84
5	10%	1:4	3%	72.09	6.83
6	15%	1:4	2%	79.26	11.01
7	10%	1:6	2%	65.93	6.24
8	15%	1:4	2%	79.61	10.25
9	15%	1:6	3%	67.04	9.36
10	20%	1:2	2%	87.81	15.29
11	20%	1:4	3%	82.13	13.87
12	15%	1:4	2%	79.54	10.25
13	15%	1:4	2%	80.70	10.40
14	15%	1:2	3%	91.31	12.65
15	15%	1:6	1%	77.11	10.90
16	20%	1:2	1%	75.06	13.52
17	10%	1:4	1%	85.79	8.41

显著性检验分析可知,模型(1)  $X_2, X_1X_3, X_2X_3$  极显著 ( $P < 0.01$ ),其他项不显著;模型(2)中  $X_1, X_2$  极显著 ( $P < 0.01$ ),  $X_2X_3$  显著,其他项不显著。

**2.4.2 响应面优化和预测** 根据拟合的二次多项式方程式,应用 Design-Expert 8.0.6 统计软件绘制各因素  $X_1, X_2, X_3$  对响应指标包封率( $Y_1$ )和载药量( $Y_2$ )的三维响应面图(图 4)。根据 Box-Behnken 响应面试验设计结果,得到预测的最优处方为:胰岛素与聚合物投料比( $X_1$ )为 14.67%,外水相与油相的体积比( $X_2$ )为 3.32:1,乳化剂 F68 浓度( $X_3$ )为 2.01%,预测包封率为 82.884 4%、载药量为 10.843 7%。

**2.4.3 最优工艺条件与验证** 根据最优处方条件,制备 3 批纳米粒,测定包封率,载药量和粒径大小,通过实际测量平均值与模型预测值进行比较,并计算偏差,结果见表 7,各项指标实测值与预测值之间偏差均小于 5%,说明最佳处方条件可靠,预测性较好<sup>[15-17]</sup>。

### 2.5 纳米粒粒径与 Zeta 电位的测定

取 1 mL 载胰岛素纳米粒溶液,加 9 mL 去离子水稀释使其均匀分散,采用动态光散射激光粒度和 Zeta 电位分析仪对制备所得的载胰岛素纳米粒进行表征,测定其粒径大小、粒径分布及 Zeta 电位,测定温度为 25 °C。结果见图 5,载胰岛素海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒的粒径大小为 (271.80 ± 3.50) nm,

表5 包封率( $Y_1$ )二次回归模型系数的显著性检验

Tab. 5 Significance test of encapsulation efficiency quadratic regression model coefficient

Factor	Sum of squares	df	Mean square	F-value	P-value	
Model	730.59	9	81.18	15.46	0.000 8	Significant
$X_1$	10.33	1	10.33	1.97	0.203 6	
$X_2$	429.58	1	429.58	81.79	< 0.000 1	
$X_3$	1.24	1	1.24	0.24	0.641 4	
$X_1X_2$	12.63	1	12.63	2.41	0.164 9	
$X_1X_3$	122.63	1	122.63	23.35	0.001 9	
$X_2X_3$	126.74	1	126.74	24.13	0.001 7	
$X_1^2$	12.39	1	12.39	2.36	0.168 5	
$X_2^2$	0.01	1	0.01	0.00	0.969 4	
$X_3^2$	13.38	1	13.38	2.55	0.154 5	
Residual	36.77	7	5.25			
Lack of fit	27.54	3	9.18	3.98	0.107 6	Not significant
Pure error	9.22	4	2.31			
Cor total	767.35	16				

表6 载药量( $Y_2$ )二次回归模型系数的显著性检验

Tab. 6 Significance test of loading capacity quadratic regression model coefficient

Factor	Sum of squares	df	Mean square	F-value	P-value	
Model	92.06	9	10.23	24.99	0.000 2	Significant
$X_1$	80.29	1	80.29	196.16	< 0.000 1	
$X_2$	6.56	1	6.56	16.04	0.005 2	
$X_3$	0.11	1	0.11	0.26	0.624 6	
$X_1X_2$	0.04	1	0.04	0.10	0.760 0	
$X_1X_3$	2.11	1	2.11	5.16	0.057 3	
$X_2X_3$	2.67	1	2.67	6.53	0.037 8	
$X_1^2$	0.03	1	0.03	0.08	0.779 5	
$X_2^2$	0.25	1	0.25	0.61	0.461 6	
$X_3^2$	0.00	1	0.00	0.00	0.988 7	
Residual	2.87	7	0.41			
Lack of fit	1.38	3	0.46	1.24	0.404 2	Not significant
Pure error	1.48	4	0.37			
Cor total	94.92	16				

Zeta 电位为  $(-54.27 \pm 2.75)$  mV, 分散系数为 0.103, 表明具有良好的分散性。Zeta 电位值绝对值大于 30 mV, 纳米粒子间的静电斥力强, 表明具有良好的稳定性。

## 2.6 纳米粒形态表征

采用透射电子显微镜 (TEM) 观察载胰岛素纳米粒分散在去离子水中的大小和形态。取适量待测纳米粒溶液, 充分稀释使其均匀分散, 滴于碳膜铜网上, 停留 2 min, 用滤纸吸去多余的溶液, 滴加 2% 磷钨酸溶液负染 30 s, 室温下干燥, 在透射电镜下观察

粒径大小和形态, 拍照。

纳米粒在去离子水溶液中分散均一, 呈球形形态, 结构完整 (图 6)。在 TEM 观测的粒径大小比 DLS 所测得的数值小, 其原因是动态光散射是以微小粒子悬浮在液体中进行的布朗运动所产生的光散射为原理, 测得的值是粒子的水合直径; 而 TEM 的测试原理则是基于电子束中的电子与干燥样品中的原子发生碰撞, 从而产生立体角散射, 所测得的是纳米粒的干态尺寸, 因此二者所得的结果略有差异。

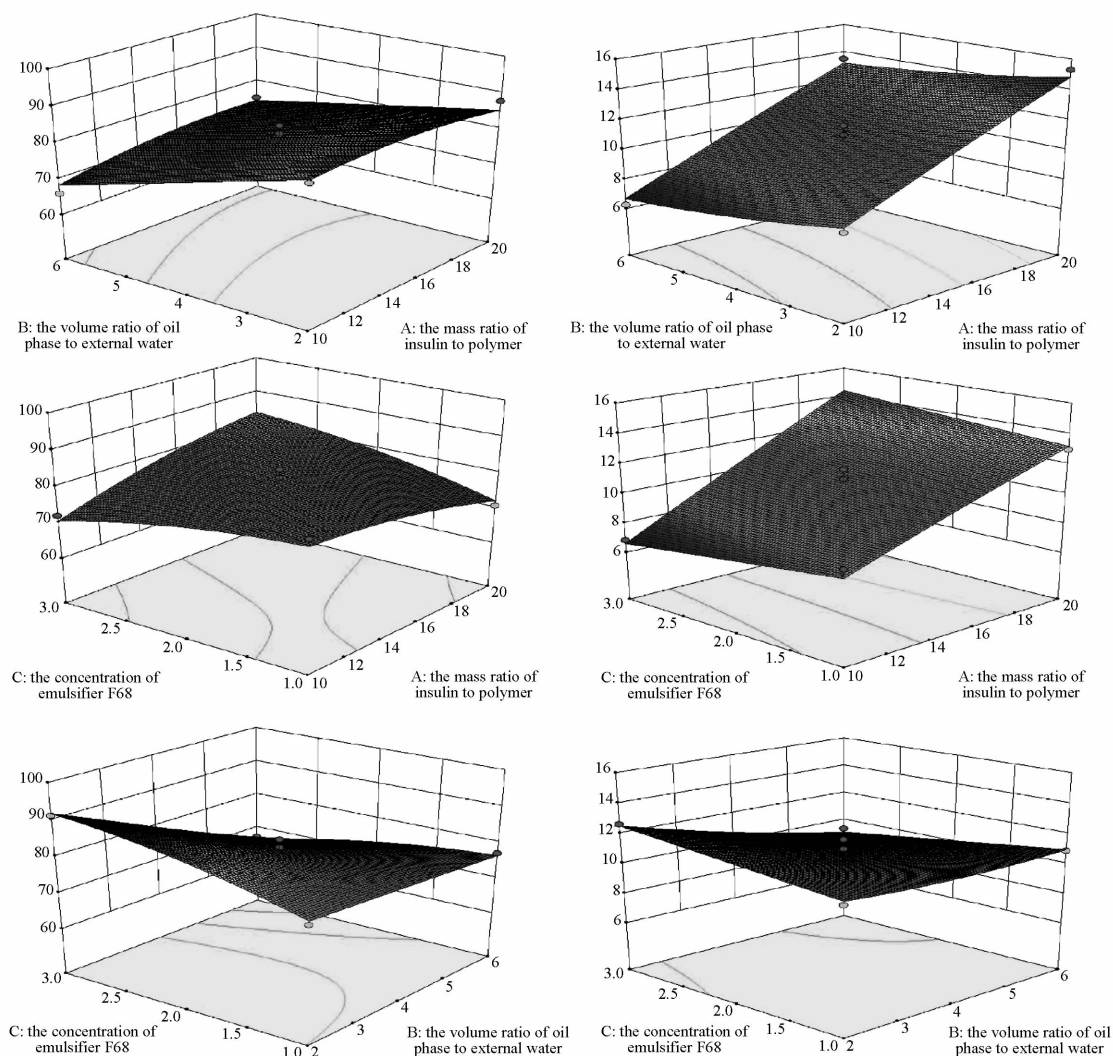


图4 考察因素对包封率( $Y_1$ )和载药量( $Y_2$ )影响的三维响应面图

Fig. 4 3D-response surfaces of the investigation factors on encapsulation efficiency( $Y_1$ ) and loading capacity( $Y_2$ )

表7 优化处方的模型值和预测值

Tab. 7 The predicted and observed values of optimized formulation

Index	Predicted value	Observed value( $n=3, \bar{x} \pm s$ )	Error/%
EE (%)	82.88	83.61 $\pm$ 0.38	0.88
LC (%)	10.84	10.90 $\pm$ 0.23	0.55

## 2.7 纳米粒体外释放性质考察

精密称取载胰岛素纳米粒冻干粉 20 mg, 溶解于 5 mL  $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中, 将纳米粒混悬液加入透析袋 (截留相对分子质量 30 000) 中, 用封口夹密封好, 浸泡在 45 mL PBS 缓冲液 (pH 7.4) 溶出介质中, 置于  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  恒温水浴摇床中, 转速为  $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。按设定的时间点即 0、1、2、3、4、5、6、10、24、30、40 h 取出 0.5 mL 样品后, 补充等温等量与释放介质相同的新鲜介

质。样品在  $4^\circ\text{C}$  离心机中,  $8\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 3 min, 取出上清液, BCA 法测定样品溶液中胰岛素含量, 计算各预设时间点内的药物累计释放率。每个样品平行操作 3 次, 以释放时间为横坐标, 以累积释放率的平均值为纵坐标, 绘制体外累计释放曲线。

为了考察处方优化后所制备的海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒的体外释放性能, 选取了正常生理环境下, 即 pH 7.4 磷酸缓冲溶液 (PBS) 为释放介质, 进行体外释放实验。对比可知, 前 5 h 为快速释放期, 胰岛素溶液组的累积释放量达到了 82.14%, 而载胰岛素纳米粒组的累积释放量为 48.42%, 载药纳米粒组的药物突释量明显低于胰岛素溶液组 (图 7)。随后 5~10 h, 载药纳米粒组的累积释放量趋于稳定, 平缓释药, 在 40 h 内累积释放率达到 70.77%。海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒

组中胰岛素的释放速度显著慢于胰岛素溶液组,且释放时间更长,表明所制备的纳米粒具有良好的稳定性和长效缓释作用。

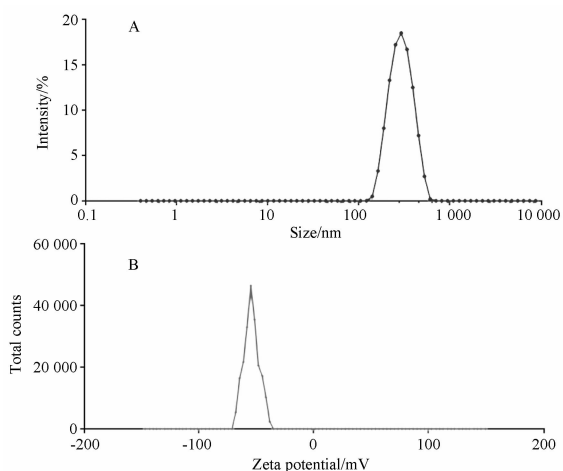


图5 海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒的粒径分布(A)和 Zeta 电位(B)图

Fig. 5 Size distribution(A) and Zeta potential(B) of alginate coated mPEG-b-PLGA nanoparticles

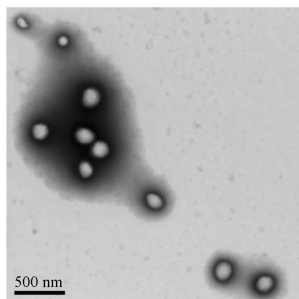


图6 载胰岛素海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒透射电子显微镜图

Fig. 6 Transmission electron microscope(TEM) image of alginate coated mPEG-b-PLGA nanoparticles

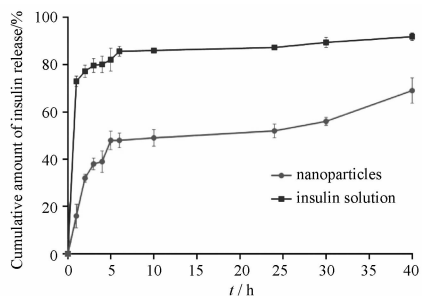


图7 载胰岛素海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒的体外累积释放率.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 7 Accumulative release rate of insulin of insulin-loaded alginate mPEG-b-PLGA nanoparticles *in vitro*.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

选取了零级动力学模型、一级动力学模型、Higuchi 模型等 7 种体外释放模型,对载胰岛素海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒的体外释放数据进行拟合,结果见表 8。以各拟合方程的相关系数  $r$  值(越接近 1 越好)、AIC 值(越小越好)及最大相对偏差(越小越好)为参数选取最佳释药模型,并根据最佳曲线拟合模型结果对体外释放性能进行初步分析。

AIC 是由日本统计学家 Akaike 定义的一种判别方法,用来衡量统计模型拟合的优良性。其计算公式为:

$$AIC = N \ln R_e + 2P$$

其中,  $N$  为实验数据的个数,本实验取 10。  $P$  为模型参数的个数,本实验取 2。  $R_e$  是权重残差平方和,其计算公式为:

$$R_e = \sum W_i (Q_{\text{实测}} - Q_{\text{拟合}})^2$$

$W_i$  是权重系数,本研究取 1。 AIC 值愈小,该模型拟合效果愈好。

表 8 载胰岛素海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒在中性介质中的释放模型拟合方程

Tab. 8 The fitting equations of insulin release from insulin loaded alginate coated mPEG-b-PLGA nanoparticles in neutral medium

Model	Fitting equations	$r$	$R_e$	AIC
Zero-order	$Q_1 = 0.010 6t + 0.288 2$	0.749 3	0.161 4	-14.24
First-order	$\ln(1 - Q_1) = -0.019 8t - 0.342 8$	0.846 3	0.145 9	-15.24
Higuchi	$Q_1 = 0.085 3t^{1/2} + 0.843 5$	0.880 3	0.083 0	-20.88
Niebergull	$(1 - Q_1)^{1/2} = -0.007 2t + 0.843 5$	0.804 7	0.052 4	-25.49
Weibull	$\ln \ln[1/(1 - Q_1)] = 0.383 7 \ln t - 1.308 4$	0.906 3	0.031 9	-26.99
Riger-Peppas	$\ln Q_1 = 0.291 5 \ln t - 1.425$	0.881 9	0.041 1	-24.73
Hixcon-Crowell	$(1 - Q_1)^{1/3} = 0.005 2t + 0.892 4$	0.819 4	0.150 1	-14.97

体外释放动力学拟合结果表明,海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒在 pH 7.4 生理环境下的释放性能与 Weibull 模型的拟合度最高,其相关系数  $r$  为 0.906 3(图 8),相对偏差值  $R_e$  最小,AIC 值最小,因此 Weibull 模型为载药纳米粒的最佳体外释药模型。Weibull 模型是药物制剂体外溶出数据处理常用的一种处理方式,与药物体外释放曲线有较高的拟合度,任何体内溶出数据,一般都能用此法处理。海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒在 pH 7.4 释放介质中的释药行存在溶出迟缓,符合理想缓释制剂在释药初期药物释放较快,后期持续平缓释放的特点<sup>[18-20]</sup>。

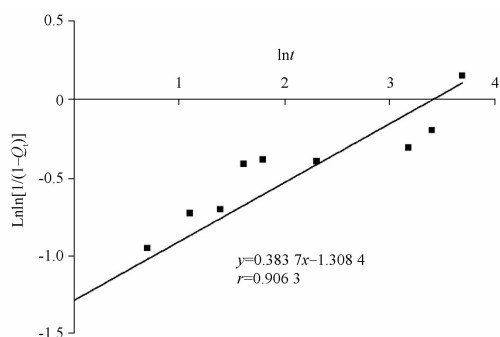


图8 载胰岛素海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒在中性介质 (pH 7.4) 的体外释放 Weibull 模型拟合曲线

Fig. 8 The fitting curves of Weibull model of insulin release from insulin-loaded nanoparticles in neutral medium (pH 7.4)

### 3 讨论

本实验通过引入亲水性的甲氧基封端的聚乙二醇,合成了两亲性共聚物 mPEG-b-PLGA,作为纳米粒基质材料,提高对水溶性蛋白类的药物的载药量,并通过加入海藻酸钠,提高所制备纳米粒的生物相容性和稳定性,是一种稳定良好的缓释载体。采用双乳剂-溶剂挥发法,制备了海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒,旨在用于胰岛素或蛋白类药物的给药呈递。由于胰岛素蛋白类药物的敏感性,容易受到 pH 环境、温度以及有机溶剂等影响而失活。选取了超声探头作为乳化的方法,超声时间越长,分散越均匀,纳米粒粒径越小,但所产生的热量越多,有可能导致胰岛素失活。此外,纳米粒属于热力学不稳定体系,有自发聚结的特性趋势,超声的频率时长均可能会纳米粒碰撞聚结而粒径增大。因此通过前期预实验,对制备工艺进行了考察,如超声时间、间隔时间、超声频率等。并通过冰浴辅助散热,确定了纳米粒的制备工艺,进行下一步的处方优化。

Box-Behnken 响应面法用于制剂工艺的优化和筛选,具有实验次数少、精密度高、预测性好等优点。与常用的正交设计法、星点效应面法相比,能够更直观的反映出各因素的影响作用,适用于因素、水平较多的线性或非线性拟合方程的处方工艺优化。包封量反映了药物与纳米基质材料的相容性,载药量则反映了通过纳米载体进入体内的药物量<sup>[21-22]</sup>。通过预实验对超声乳化条件进行了确定,制备所得的纳米粒粒径大小均在 200 ~ 300 nm 内,较为稳定,因此未选择粒径作为评价指标。考察了影响纳米粒包封率和载药量的各种因素,并筛选出了 3 个影响明显的因素,进一步通过 Box-Behnken 响应面法考察,进行处方优化。胰岛素投入量越大,载药量越大,但

随着投药量的增大,离心后上清液测得的游离胰岛素量也随之增大,药物的损失量增大。因此考察胰岛素与聚合物的投料比,可以保证胰岛素和聚合物投入量的经济合理利用,达到最佳的包封率和载药量,保证药物的充分吸收并发挥药效。油相与外水相的体积比,决定了微粒在外水相中分散的范围以及运动碰撞的次数。同时,油相与外水相的体积比改变,也是海藻酸钠修饰量的改变,有机相聚合物浓度为  $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,外水相海藻酸钠浓度为  $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,即影响因素  $X_2$ :油相/外水相中 3 个水平 1:2,1:4 和 1:6 分别对应外水相中海藻酸钠修饰量为 500,1 000 和 1 500 mg。显著性检验分析结果表明,模型(1)与模型(2)中,因素  $X_2$  均极显著,可以优选出海藻酸钠的最佳用量。海藻酸钠的羧基 ( $\text{COOH}^-$ ) 使纳米粒表面带有负电荷,粒子间同种电荷的相互斥力,可以避免纳米粒的团聚,从而起到稳定作用。海藻酸钠浓度过低,不能完全覆膜于纳米粒表面发挥修饰优化纳米粒的作用;浓度过高,则所配置的海藻酸钠溶液黏度过高,并且难以溶解,从而影响制备时的超声乳化效果,因此本实验考察并优化了油相与外水相的作用因素。为了保证乳化后的纳米粒溶液能均匀稳定的分散,因此加入乳化剂 F68 稀释纳米乳剂,保持油水界面张力稳定性。因此稀释溶液乳化剂 F68 的浓度为影响纳米粒的形态及分散稳定性的一个主要因素。浓度过低,使得油水界面总面积降低,制备所得纳米粒比表面积降低,粒径增大。浓度过高,乳化剂 F68 溶液的黏度增大,纳米粒容易发生团聚,从而影响纳米粒的分散性。

本实验根据 Box-Behnken 响应面法预测的最优处方,成功制备了载胰岛素海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒,经验证具有较好的包封率和载药量,纳米粒表征显示具有良好的分散性和稳定性,且粒径大小适宜,形态均一圆整,表明 Box-Behnken 响应面法有效、可行,建立的模型具有良好的预测性。体外释放性试验结果表明,处方优化后制备所得的载胰岛素海藻酸钠 mPEG-b-PLGA 纳米粒,具有良好的稳定性,缓释效果,有望作为理想的胰岛素及蛋白类药物缓释载体。

### REFERENCES

- [1] GUARIGUATA L, WHITING D R, HAMBLETON I, *et al.* Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 [J]. *Diabetes Res Clin Pr*, 2014, 103(2):137-149.
- [2] DING D, ZHU Q. Recent advances of PLGA micro/nanoparticles for the delivery of biomacromolecular therapeutics[J]. *Mater Sci Eng:C*, 2018, (92):1041-1060.



- [ 3 ] MENON J U, RAVIKUMAR P, PISE A, *et al.* Polymeric nanoparticles for pulmonary protein and DNA delivery[J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(6):2643-2652.
- [ 4 ] ALIBOLANDI M, ALABDOLLAH F, SADEGHI F, *et al.* Dextran-b-poly(lactide-co-glycolide) polymersome for oral delivery of insulin; *in vitro* and *in vivo* evaluation[J]. *J Controlled Release*, 2016, 227:58-70.
- [ 5 ] ALBISA A, PIACENTINI E, SEBASTIAN V, *et al.* Preparation of drug-loaded PLGA-PEG nanoparticles by membrane-assisted nanoprecipitation[J]. *Pharm Res Dordr*, 2017, 34(6):1296-1308.
- [ 6 ] GUAN Q, SUN S, LI X, *et al.* Preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluation of mPEG-PLGA nanoparticles co-loaded with syringopicroside and hydroxytyrosol[J]. *J Mater Sci:Mater Med*, 2016, 27(24):1-13.
- [ 7 ] SONIA T A, SHARMA C P. An overview of natural polymers for oral insulin delivery [J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17(13-14):784-792.
- [ 8 ] VOZZA G, DANISH M, BYRNE H J, *et al.* Application of Box-Behnken experimental design for the formulation and optimisation of selenomethionine-loaded chitosan nanoparticles coated with zein for oral delivery[J]. *Int J Pharm*, 2018, 551(1-2):257-269.
- [ 9 ] IGLESIAS N, GALBIS E, DÍAZ-BLANCO M J, *et al.* Loading studies of the anticancer drug camptothecin into dual stimuli-sensitive nanoparticles. Stability scrutiny[J]. *Int J Pharm*, 2018, 550(1-2):429-438.
- [ 10 ] LIU B L, ZHU Z J, LIU Y Y, *et al.* Formulation optimization of curcumin- cationic solid lipid nanoparticles by Box-Behnkendesigns [J]. *West China J Pharm Sci(华西药理学杂志)*, 2017, 32(5):471-474.
- [ 11 ] MA Y L, ZHAO F, PANG G X, *et al.* Optimization of prescription of ambroxol hydrochloride sandwich osmotic pump tablets by box-behnken design-response surface method[J]. *Chin Pharm J(中国药理学杂志)*, 2016, 51(12):1006-1013.
- [ 12 ] LOCATELLI E, COMES FRANCHINI M. Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system [J]. *J Nanopart Res*, 2012, 14(12):1-17.
- [ 13 ] ZHANG Y, YUAN C, JIAO J, *et al.* Preparation of MePEG-PLGA nanoparticles by modified-self-emulsion solvent evaporation method[J]. *J Instrum Anal(分析测试学报)*, 2008, 27(9):960-963.
- [ 14 ] ZHANG K, TANG X, ZHANG J, *et al.* PEG-PLGA copolymers: their structure and structure-influenced drug delivery applications [J]. *J Controlled Release*, 2014, 183:77-86.
- [ 15 ] LI J M, LI R R, TIAN J Z. Optimization of formulation and process of paclitaxel mPEG-PDLLA nanoparticles by Box-Behnken response surface methodology[J]. *Chin New Drugs J(中国新药杂志)*, 2018, 27(8):927-933.
- [ 16 ] ZENG H, WANG Z, FANG M, *et al.* Preparation of pDNA-loaded thiolated chitosan nanoparticles and optimization by using Box-Behnken design and response surface method[J]. *J Huaqiao Univ(Nat Sci)(华侨大学学报:自然科学版)*, 2017, 38(5):676-681.
- [ 17 ] ELMIZADEH H, KHANMOHAMMADI M, GHASEMI K, *et al.* Preparation and optimization of chitosan nanoparticles and magnetic chitosan nanoparticles as delivery systems using Box-Behnken statistical design[J]. *J Pharm Biomed*, 2013, 80:141-146.
- [ 18 ] CASAULT S, SLATER G W. Systematic characterization of drug release profiles from finite-sized hydrogels[J]. *Physica A:Statist Mech Its Appl*, 2008, 387(22):5387-5402.
- [ 19 ] PAPAPOPOULOU V, KOSMIDIS K, VLACHOU M, *et al.* On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms[J]. *Int J Pharm*, 2006, 309(1-2):44-50.
- [ 20 ] VILLALOBOS R, CORDERO S, MARIA VIDALES A, *et al.* In silico study on the effects of matrix structure in controlled drug release[J]. *Physica A:Statist Mech Its Appl*, 2006, 367:305-318.
- [ 21 ] GUAN Q X, YU X, LU S W, *et al.* Formulation and preparation optimization for mPEG-PLGA nanoparticles encapsulated with syringopicroside and hydroxytyrosol[J]. *Chin Tradit Pat Med(中成药)*, 2017, 39(12):2508-2512.
- [ 22 ] ZANG J N, HU Y Q, ZANG J W, *et al.* Preparation of the oral self-microemulsion by effective method of Box-Behnken response surface method[J]. *West China J Pharm Sci(华西药理学杂志)*, 2018, 33(4):359-363.

(收稿日期:2019-03-04)