

积雪草苷 mPEG-PLGA 微球的制备工艺优化及其体外评价

蔡佳婧¹, 张雪琼¹, 胡晨¹, 陈海霖¹, 丁杰^{2*}

1. 武汉理工大学化学化工与生命科学学院 药学系, 湖北 武汉 430070

2. 湖北省妇幼保健院 口腔科, 湖北 武汉 430070

摘要: 目的 以聚乙二醇-聚乳酸羟基乙酸共聚物 (polyethylene glycol-poly(lactic acid-glycolic acid) copolymer, mPEG-PLGA) 为载体, 探究积雪草苷 mPEG-PLGA 微球的最佳制备工艺。方法 首先从微球固化温度、乳化剂 PVA 质量浓度、搅拌速度、水油比以及 mPEG-PLGA 质量浓度中, 筛选出影响积雪草苷微球制备的关键工艺参数, 随后采用 Box-Behnken 设计-响应面法 (Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM) 实验进一步优化载药微球的制备条件, 并对该微球形态、粒径分布、载药量、包封率、体外释放行为以及生物相容性进行综合评价。结果 固化温度、搅拌速度、乳化剂 PVA 与 mPEG-PLGA 质量浓度及水油比均影响微球包封率与形态。其中, 固化温度与 mPEG-PLGA 质量浓度影响较大, 固化温度过高或过低均降低微球包封率; mPEG-PLGA 质量浓度增加可提高包封率, 但过高却导致微球粘连与粒径增大。优化的条件为 40 ℃、1 800 r/min、适量乳化剂 PVA 与 mPEG-PLGA。选取 mPEG-PLGA 质量浓度、水油比和乳化剂 PVA 质量浓度作为考察因素, 进行 3 因素 3 水平 BBD 实验设计, 得到的积雪草苷 mPEG-PLGA 微球的最佳制备工艺为 mPEG-PLGA 质量浓度 123.8 g/L、PVA 质量浓度 9.8 g/L, 水油比 12.7 : 1。制备的积雪草苷微球粒径均匀, 为 (58.97.90 ± 4.44) μm, 载药量为 (8.43 ± 0.16) %, 包封率达 (62.66 ± 0.84) %, 在 96 h 以内以稳定速度释放约 80% 的积雪草苷, 与 L929 细胞共培养 72 h 后仍有高于 90% 的存活率。结论 成功制备积雪草苷 mPEG-PLGA 微球, 所得微球粒径均匀、包封率与载药量较高, 可实现药物缓释, 并具有良好的生物相容性。该体系利用 mPEG-PLGA 的亲水性改善了药物稳定性与释放行为, 为积雪草苷的高效递送提供了新策略。

关键词: 积雪草苷; 微球; mPEG-PLGA; 响应面法; 缓释

中图分类号: R283.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2026)09-3365-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.09.010

Optimisation of preparation process of asiaticoside mPEG-PLGA microspheres and its *in vitro* evaluation

CAI Jiajing¹, ZHANG Xueqiong¹, HU Chen¹, CHEN Hailin¹, DING Jie²

1. Department of Pharmacy, School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Sciences, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China

2. Department of Stomatology, Hubei Provincial Maternal and Child Health Hospital, Wuhan 430070, China

Abstract: Objective This study aimed to investigate the optimal preparation process for asiaticoside microspheres using polyethylene glycol-poly(lactic acid-glycolic acid) copolymer (mPEG-PLGA) as the carrier. **Methods** Key process parameters affecting microsphere preparation were first screened from factors including curing temperature, emulsifier PVA concentration, stirring speed, water-to-oil ratio, and mPEG-PLGA concentration. Subsequently, a Box-Behnken design-response surface methodology (BBD-RSM) experiment was employed to further optimize the preparation conditions for the drug-loaded microspheres. Their morphology, particle size distribution, drug loading, encapsulation efficiency, *in vitro* release behavior, and biocompatibility were comprehensively evaluated. **Results** Curing temperature, stirring speed, emulsifier PVA and mPEG-PLGA concentrations, and water-to-oil ratio all influenced the encapsulation efficiency and morphology of the microspheres. Among them, curing temperature and mPEG-PLGA concentration had a greater impact: both excessively high and low curing temperatures reduced encapsulation efficiency; increasing mPEG-PLGA concentration improved encapsulation efficiency, but excessively high concentrations led to adhesion and increased particle size. The

收稿日期: 2025-12-17

基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目 (2025AFD706)

作者简介: 蔡佳婧, 女, 硕士研究生, 研究方向为药剂学。Tel: 15179400988 E-mail: 15179400988@168.com

*通信作者: 丁杰 (1991—), 女, 硕士, 主治医师, 主要从事儿童牙病综合治疗。Tel: 17362980804 E-mail: 1292842991@qq.com

optimized conditions were 40 °C, 1 800 r/min, with appropriate emulsifier PVA and mPEG-PLGA concentrations. Using mPEG-PLGA concentration, water-to-oil ratio, and emulsifier PVA concentration as investigation factors in a 3-factor, 3-level BBD experimental design, the optimal preparation process for asiaticoside mPEG-PLGA microspheres was determined as: mPEG-PLGA concentration 123.8 g/L, PVA mass concentration 9.8 g/L, and water-to-oil ratio 12.7 : 1. The resulting microspheres had uniform particle size (58.97 ± 4.44) μm , a drug loading of (8.43 ± 0.16)%, and an encapsulation efficiency of (62.66 ± 0.84)%. They released approximately 80% of asiaticoside at a stable rate within 96 h, and maintained over 90% cell viability after 72 h of co-culture with L929 cells. **Conclusion** Asiaticoside-loaded mPEG-PLGA microspheres were successfully prepared. The obtained microspheres exhibit uniform particle size, relatively high encapsulation efficiency and drug loading, enable sustained drug release, and possess good biocompatibility. This system utilizes the hydrophilicity of mPEG-PLGA to improve drug stability and release behavior, providing a new strategy for the efficient delivery of asiaticoside.

Key words: asiaticoside; microspheres; mPEG-PLGA; response surface methodology; sustained release

积雪草苷在重塑慢性伤口微环境中展现出明确的多靶点治疗潜力：它通过抑制核因子- κB 等通路下调促炎因子，促进巨噬细胞向修复型（M2型）极化；通过激活转化生长因子- β /Smad 信号显著上调胶原合成，刺激成纤维细胞增殖与血管新生；同时其强大的抗氧化能力有助于清除过量的活性氧，打破氧化应激与慢性炎症的恶性循环^[1-3]。然而，其治疗潜力受限于水溶性差和渗透性低^[4]。因此，构建能够实现药物可控释放、促进药物吸收并且更加高效的载体系统至关重要。

在创伤修复领域，以微球为基础的药物递送系统因能实现局部长效缓释、减少全身暴露而备受关注。积雪草苷微球常以聚乳酸羟基乙酸共聚物（polylactic acid-glycolic acid copolymer, PLGA）为载体进行构建^[5-6]。然而乳酸的固有疏水性很容易增加有机相和水相之间的表面张力，导致制备过程中药物分布不均并加剧释放初期的突释行为^[7-9]。且 PLGA 微球结构致密表面较为光滑组织黏附性不佳，不利于在伤口床附着^[10]。因此，选用亲水性更强的单甲氧基聚（乙二醇）[monomethoxy poly(ethylene glycol), mPEG] 修饰的 PLGA (mPEG-PLGA) 作为积雪草苷载体，有望克服这些缺陷。mPEG 链段可显著降低包封过程中有机相与水相之间的界面张力，这不仅能促进乳液均一稳定、改善药物包封的均匀性，更能从源头上减少制备环节的药物不稳定因素。同时，mPEG 的引入能有效限制 PLGA 链的自催化降解过程^[11-12]，从而在宏观上实现对药物释放速率更平稳、持久的控制，达成良好的缓释效果。

本研究旨在探究 mPEG-PLGA 多孔微球的最佳制备工艺，用于局部递送积雪草苷，以获得最大包封率与载药量，同时提供一种具有临床创伤治疗潜

力的新型制剂。首先选用 mPEG-PLGA 为载体，以包封率和载药量为考察指标设计单因素实验，考察 mPEG-PLGA 质量浓度、制备温度、水油比、PVA 质量浓度、搅拌速度对微球的影响，为后续的 Box-Behnken 设计-响应面法（Box-Behnken design-response surface methodology, BBD-RSM）优化实验筛选因素条件，并系统评价其理化性质与体外释放行为，为积雪草苷缓释制剂开发提供理论支持。

1 仪器与材料

1.1 仪器

DF-101S 型磁力搅拌器，元楷仪器设备（上海）有限公司；Hitachi SU8010 型扫描电子显微镜（scanning electron microscope, SEM），日立科学仪器（北京）有限公司；LC-16 型高效液相色谱仪，岛津（上海）实验器材有限公司；ME204 型十万分之一天平，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；DGJ-10C 型冷冻干燥机，上海博登生物科技有限公司；Allegrea 64R 型冷冻离心机，贝克曼库尔特有限公司；SW-CJ-2FD 型超净工作台，苏州安泰空气技术有限公司；MCO175 型细胞培养箱，日本 SANYO 公司；Multiskan GO 型酶标仪，美国 Thermo Fisher 公司。

1.2 试剂与耗材

聚乙二醇-聚乳酸-羟基乙酸二嵌段共聚物（polyethylene glycol-polylactic acid-glycolic acid copolymer, mPEG-PLGA），50 : 50，截留相对分子质量（ M_w ）14 000，济南岱罡生物工程有限公司；积雪草苷原料药，批号 B20586，质量分数 $\geq 98.0\%$ ，上海源叶生物科技有限公司；积雪草苷对照品，批号 JZ23120111，质量分数 99.4%，南京景竹生物科技有限公司；聚乙烯醇（polyvinyl alcohol, PVA），醇解度 86.5%~89.0%，黏度 4.6~5.4 mPa·s，上海

阿拉丁生化科技股份有限公司；二氯甲烷，分析纯，上海麦克林生化科技股份有限公司；甲醇、乙腈，色谱纯，萨恩化学技术（上海）有限公司。

小鼠成纤维 L929 细胞，中国典藏培养物宝藏中心；RPMI 1640 培养基，Gibco 公司；青霉素-链霉素双抗，美国 Thermo Fisher 公司；胎牛血清，浙江天杭生物科技股份有限公司；CCK-8 试剂盒，上海碧云天生物技术股份有限公司。

2 方法与结果

2.1 微球的制备

采用乳化溶剂挥发法制备积雪草苷微球。首先精密称取 120 mg mPEG-PLGA，溶于 1 mL 二氯甲烷，另精密称取 10 mg 积雪草苷溶于 0.5 mL 甲醇，超声混合后作为油相。再称取 500 mg PVA 溶于适量去离子水中，在 90 °C 恒温下磁力搅拌至完全溶解，随后自然冷却至室温，定容至 50 mL 制得质量浓度为 10 g/L 的 PVA 溶液作为水相。在 40 °C 下，将有机相缓慢注入 12 mL 水相，经磁力搅拌器 1 800 r/min 转速搅拌 10 min，后将转速降至 800 r/min 搅拌 6 h 使有机溶剂挥发完全，得到固化后的 mPEG-PLGA 载药微球。将 0.5 mL 甲醇加入 120 mg/mL mPEG-PLGA 的二氯甲烷溶液中，超声混合作为空白油相，同法制备得空白微球。随后以 8 000 r/min 离心（离心半径为 6.4 cm）10 min，弃去上清液，用纯化水重复洗涤 3 次，最终保留约 20% 水分，冷冻干燥后将微球置于 4 °C 条件下保存。

2.2 体外分析方法的建立

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取积雪草苷对照品 25 mg，置于 25 mL 量瓶中，加甲醇定容至刻度线，超声溶解，得到质量浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 积雪草苷母液，保存，备用。

2.2.2 供试品溶液的配制 精密称取适量积雪草苷微球置于 10 mL 量瓶中，加 0.5 mL 二氯甲烷，超声溶解，加甲醇定容，摇匀，得积雪草苷微球溶液，保存，备用。

2.2.3 空白微球溶液的配制 精密称取适量空白微球，置于 10 mL 量瓶中，加 0.5 mL 二氯甲烷，超声溶解，用甲醇定容至刻度线，摇匀，得空白微球溶液，保存，备用。

2.2.4 色谱条件 色谱柱为 Agilent Innoval ODS-2 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm)；检测波长 205 nm；流动相为乙腈-水 (30 : 70)；柱温 30 °C；体积流量 1 mL/min；进样量 20 μL ；理论塔板数以积雪草苷峰

计不低于 4 000。

2.2.5 专属性考察 分别取“2.2.1”项下的对照品溶液和“2.2.2”项下的积雪草苷微球供试品溶液，在“2.2.4”项下色谱条件进行测定，记录色谱图，结果见图 1。通过对比色谱图，空白微球溶液及甲醇溶剂在积雪草苷对照品保留时间处均无色谱峰出现，基线平稳，表明微球辅料及溶剂对主药的测定无干扰。另外，供试品溶液中积雪草苷峰与相邻最近的杂质峰（或辅料峰）的分离度大于 1.5，满足《中国药典》2025 年版对于基线分离的要求。结果表明，该方法于微球中积雪草苷含量的测定具有良好的专属性。

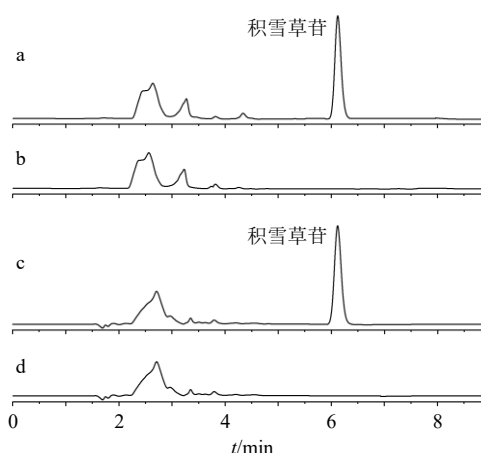


图 1 积雪草苷微球供试品溶液 (a)、空白微球溶液 (b)、积雪草苷对照品溶液 (c)、甲醇溶剂 (d) 的专属性 HPLC 图
Fig. 1 Specificity HPLC of asiaticoside microspheres test solution (a), blank microsphere solution (b), asiaticoside reference substance solution (c), and methanol solvent (d)

2.2.6 线性关系考察 分别取一定量积雪草苷对照品溶液，置于 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度线，分别配制为 50、100、200、300、400、600 $\mu\text{g/mL}$ 系列质量浓度的对照品溶液，按照“2.2.4”项下色谱条件进样测定，以质量浓度为横坐标 (X)，峰面积为纵坐标 (Y)，绘制标准曲线，进行线性回归拟合，得回归方程 $Y=5\,050X+13\,450$ ， $R^2=0.9998$ ，结果表明积雪草苷在 50~600 $\mu\text{g/mL}$ 内，该方法线性关系良好。

2.2.7 精密度考察 配制低、中、高 (42.5、170.0、340.0 $\mu\text{g/mL}$) 3 个质量浓度的积雪草苷对照品溶液，超声 10 min 使其溶解，按照“2.2.4”项下色谱条件进样测定，分别在 1 d 内测定 6 次，记录色谱峰面积，计算得低、中、高质量浓度对照品溶液中积雪草苷峰面积的 RSD 分别为 1.97%、1.35%、1.37%，

符合《中国药典》2025年版中分析方法验证指导原则(RSD 小于 2%),表明该方法的操作精密度良好。

2.2.8 稳定性考察 称取适量载药微球,按照“2.2.2”项下方法处理制备供试品溶液,置于室温条件下,分别于制备后 0、8、24、36、48、72 h 进样测定,记录峰面积,其 RSD 为 1.12%,表明由该方法处理的积雪草苷微球供试品溶液在 72 h 内稳定。

2.2.9 重复性考察 按照“2.2.2”项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按照“2.2.4”项下色谱条件进行测定,计算得积雪草苷质量分数的 RSD 为 0.14%,结果表明该方法重复性良好。

2.2.10 加样回收率考察 取 9 份“2.2.2”项下已测知质量浓度供试品溶液,分为 3 组,每组分别加入相当于供试品溶液中药物积雪草苷质量浓度 80%、100%、120%的对照品溶液,按照“2.2.4”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算加样回收率,结果积雪草苷的平均加样回收率为 100.46%,RSD 为 1.67%,结果表明该方法加样回收率良好。

2.2.11 样品测定 精密称取 49.13 mg 积雪草苷微球,按照“2.2.2”项下方法制得积雪草苷微球溶液。按照“2.2.4”项下色谱条件进行测定,计算得积雪草苷质量浓度为 353.24 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 包封率和载药量测定

精密称定纯化后的积雪草苷微球,置于离心管中,加入适量二氯甲烷,超声破碎微球,使积雪草苷完全释放,再加入 5 倍量甲醇使积雪草苷均匀分散,涡旋 10 min 后 8 000 r/min 离心,取上清液,0.22 μm 针筒式滤膜滤过后,用甲醇稀释定容至量瓶中,通过 HPLC 测定溶液中药物含量。

载药量 = 微球中药物总量 / 干燥后微球总质量

包封率 = 微球中药物总量 / 制备微球时总投药量

2.4 单因素实验考察积雪草苷微球制备处方工艺

mPEG-PLGA 可以在表面活性剂中,受到剪切力的影响发生自组装包载药物生成载药微球,在微球的制备过程中药载比、有机相和水相比、乳化剂(PVA)质量浓度等因素均会影响到微球的包封率以及载药量大小^[13-14],本研究设置不同温度、不同 PVA 质量浓度、不同转速、不同 mPEG-PLGA 质量浓度、不同水油比梯度,制备多组微球,考察不同因素对于微球的影响。

2.4.1 固化温度考察 在采用乳剂挥发法制备微球的过程中,固化温度是影响微球形态的关键因素。改变微球制备温度后,微球的载药量以及包封率均

发生变化。按照“2.1”项下方法制备载药微球,改变固化温度测定所得微球的包封率和载药量。结果如表 1 所示,当温度设置较低时,积雪草苷的甲醇溶液与水相接触时间延长,可能导致药物提前逸散,影响包封效果。适当升高温度可加速有机溶剂的挥发,从而缩短固化时间,有利于微球成型。然而,当温度升高至 50 $^{\circ}\text{C}$ 时,由于有机相挥发过快,固化时间过短,反而不利于微球的完整形成,致使包封率显著下降。因此,本研究将后续实验温度统一控制于 40 $^{\circ}\text{C}$,并在此基础上系统考察其他因素对微球性能的影响。

表 1 固化温度考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Investigation results of curing temperature ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

固化温度/ $^{\circ}\text{C}$	包封率/%	载药量/%
25	9.81 \pm 0.24	1.95 \pm 0.12
35	23.65 \pm 0.35	2.15 \pm 0.16
40	47.84 \pm 1.27	6.91 \pm 0.32
45	31.22 \pm 0.39	2.79 \pm 0.22
50	26.12 \pm 0.46	2.09 \pm 0.20

2.4.2 搅拌速度考察 按照“2.1”项下方法制备载药微球,改变搅拌速度测定所得微球的包封率和载药量。结果如表 2 所示,包封率随乳化转速先升高后降低,转速过慢会导致固化时间增加,药物在固化过程中逸出导致包封率减小^[15]。当乳化转速过大时,液体飞溅在杯壁上,同时增加了药物在外水相中的溶解度。为了缩短实验周期,另外避免由于搅拌速度过高导致表面活性剂大量起泡,最终选定溶剂挥发搅拌速度为 1 800 r/min。

2.4.3 乳化剂 PVA 质量浓度考察 按照“2.1”项下方法制备载药微球,改变 PVA 质量浓度测定所得微球的包封率和载药量。结果如表 3 所示,PVA 质量浓度在超过 10 g/L 后,微球的包封率和载药量降低,可能是由于 PVA 质量浓度增大,药物在水相中的溶解度增大,导致药物向水相泄漏增加,包封率

表 2 搅拌速度考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Investigation results of stirring speed ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

搅拌速度/(r \cdot min $^{-1}$)	包封率/%	载药量/%
1 000	22.81 \pm 1.75	2.45 \pm 0.29
1 200	29.57 \pm 0.93	2.74 \pm 0.15
1 500	47.81 \pm 1.34	7.62 \pm 0.36
1 800	59.09 \pm 2.12	8.93 \pm 0.32
2 100	57.92 \pm 1.88	8.37 \pm 0.61

表3 乳化剂 PVA 质量浓度考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Investigation results of emulsifier PVA mass concentration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PVA/(g·L ⁻¹)	包封率/%	载药量/%
5	26.74 ± 1.12	1.95 ± 0.20
8	36.25 ± 1.79	2.15 ± 0.19
10	47.75 ± 1.58	7.83 ± 0.47
15	44.19 ± 2.03	6.92 ± 0.88
20	40.32 ± 0.97	5.86 ± 0.39

降低^[16]。

2.4.4 mPEG-PLGA 质量浓度考察 按照“2.1”项下方法制备载药微球, 改变 mPEG-PLGA 质量浓度测定所得微球的包封率和载药量。结果如表 4 所示, 随着 mPEG-PLGA 质量浓度增大, 其包封率和载药量增大, 可能是由于 mPEG-PLGA 质量浓度增大, 使药物与水相接触减少, 药物损失减少^[17]。但 mPEG-PLGA 质量浓度为 150 g/L 时, 由于其质量浓度过大, 使微球粘连以及材料析出, 导致材料的浪费, 另外, 通过光学显微镜观察到随着 mPEG-PLGA 质量浓度增加, 微球的粒径随之增大。这是由于在其他制备条件不变的情况下, mPEG-PLGA 浓度增加使得有机相黏度增加, 在乳化过程中产生更大的黏性阻力, 使得净剪切应力降低, 从而生成更大尺寸的乳滴。

2.4.5 水油比考察 按照“2.1”项下方法制备载药微球, 改变水相的体积测定所得微球的包封率和载药量。结果如表 5 所示, 当水油体积比过低时, 体系黏度较大, 微球在制备过程中易发生团聚粘连, 难以收集, 致使包封率与载药量不符合筛选标准。随着水油体积比增加至 8:1 及以上, 分散性改善, 包封率与载药量随之提高; 但若水相比比例继续增加, 药物在外水相中的溶解损失将成为主导因素, 导致载药性能下降^[18]。为确保良好的微球形态及较高的载药效率, 选择水油体积比 8:1 及以上作为后续

表4 mPEG-PLGA 质量浓度考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Investigation results of mPEG-PLGA mass concentration ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

mPEG-PLGA/(g·L ⁻¹)	包封率/%	载药量/%
60	7.60 ± 1.41	1.77 ± 0.39
80	26.59 ± 1.53	3.50 ± 0.17
100	45.84 ± 1.75	5.94 ± 0.25
120	60.61 ± 2.06	7.57 ± 0.67
150	61.23 ± 2.37	8.13 ± 0.92

表5 水油比考察结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Investigation results of water-oil ratio ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水油比	包封率/%	载药量/%
6:1	40.20 ± 2.47	4.73 ± 0.32
8:1	42.26 ± 3.05	6.82 ± 0.47
10:1	45.02 ± 1.42	7.12 ± 0.51
12:1	60.28 ± 1.84	9.09 ± 0.76
14:1	55.69 ± 2.16	8.22 ± 0.40

优化的水平范围。

2.5 BBD-RSM 实验优化积雪草苷微球制备处方工艺

2.5.1 因素与水平设计 考察单个因素变化时响应值的变化趋势, 找到响应值较高且稳定的区域, 最终选取 mPEG-PLGA 质量浓度 (X_1)、PVA 质量浓度 (X_2) 和水油比 (X_3) 作为考察因素, 以包封率 (Y_1) 和载药量 (Y_2) 为考察指标, 进行 3 因素 3 水平 BBD-RSM 实验设计, 结果如表 6 所示。

2.5.2 二次回归方程建立 按照实验设计制备 17 组微球, 测定其包封率和载药量如表 6 所示, 运用 Design Expert 13 软件进行二元回归模型的拟合和优化, 经数据拟合后得到如下响应方程: $Y_1 = -258.8789 + 2.3679 X_1 + 102.4306 X_2 + 19.0414 X_3 + 0.0594 X_1 X_2 + 0.2433 X_1 X_3 - 3.2717 X_2 X_3 - 0.0104 X_1^2 - 34.8870 X_2^2 - 0.7802 X_3^2$, $R^2 = 0.9925$, $R_{adj}^2 =$

表6 BBD-RSM 实验设计和结果 ($n = 3$)

Table 6 Experimental design and results of BBD-RSM ($n = 3$)

序号	X_1 /(g·L ⁻¹)	X_2 /(g·L ⁻¹)	X_3	Y_1 /%	Y_2 /%
1	115 (0)	10 (0)	11 (0)	60.42	8.54
2	150 (+1)	15 (+1)	11	52.12	6.29
3	115	10	11	61.28	7.95
4	115	10	11	58.34	8.18
5	150	10	8 (-1)	42.23	5.32
6	115	15	14 (+1)	43.45	6.74
7	150	5 (-1)	11	45.69	5.17
8	80 (-1)	15	11	28.84	3.39
9	115	5	8	34.84	4.34
10	80	10	14	32.67	4.17
11	150	10	14	58.23	6.48
12	115	5	14	50.61	7.62
13	80	5	11	26.57	2.33
14	115	10	11	59.25	8.37
15	80	10	8	26.89	1.77
16	115	15	8	47.31	6.62
17	115	10	11	59.69	8.04

0.982 9; $Y_2=57.246 3+0.619 0 X_1+14.693 7 X_2+3.290 2 X_3+0.000 9 X_1X_2-0.003 0 X_1X_3-0.526 7 X_2X_3-0.002 4 X_1^2-4.052 0 X_2^2-0.097 0 X_3^2$, $R^2=0.995 8$, $R_{adj}^2=0.990 3$ 。

2.5.3 方差分析和显著性检验 软件模拟出的包封率和载药量方差分析结果见表 7, 2 种模型的方差均大于 0.95, P 值在 0.05 以下 (显著), 且失拟项的 P 值在 0.05 以上 (不显著), 证明该 2 次多项回归模

型较为准确, 干扰小且可信度高, 能够很好的反应出 Y_1 、 Y_2 和 X_1 、 X_2 、 X_3 之间的关系。

2.5.4 效应面分析与优化 基于 2 种回归模型对 2 个评价指标的三维效应面图进行分析, 结果如图 2 所示, 预测积雪草苷 mPEG-PLGA 微球最佳工艺为 mPEG-PLGA 质量浓度 123.8 g/L、PVA 质量浓度 9.8 g/L 与水油比 12.7 : 1, 包封率和载药量为 62.14%、8.56%。

表 7 载药量与包封率响应面二次回归模型的方差分析

Table 7 Analysis of variance for quadratic regression model of drug loading and encapsulation efficiency in RSM

来源	载药量					包封率				
	平方和	自由度	均方	F值	P值	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	73.750	9	8.190	183.390	<0.000 1	2 505.55	9	278.39	103.02	<0.000 1
X_1	16.820	1	16.820	376.440	<0.000 1	867.36	1	867.36	320.98	<0.000 1
X_2	1.600	1	1.600	35.850	0.000 5	24.54	1	24.54	9.08	0.019 6
X_3	6.060	1	6.060	135.520	<0.000 1	141.88	1	141.88	52.50	0.000 2
X_1X_2	0.001	1	0.001	0.020	0.891 1	4.33	1	4.33	1.60	0.246 2
X_1X_3	0.384	1	0.384	8.600	0.021 9	26.11	1	26.11	9.66	0.017 1
X_2X_3	2.500	1	2.500	55.870	0.000 1	96.33	1	96.33	35.65	0.000 6
X_1^2	35.610	1	35.610	796.890	<0.000 1	686.54	1	686.54	254.06	<0.000 1
X_2^2	4.320	1	4.320	96.700	<0.000 1	320.29	1	320.29	118.53	<0.000 1
X_3^2	3.210	1	3.210	71.820	<0.000 1	207.60	1	207.60	76.82	<0.000 1
残差	0.313	7	0.045			18.92	7	2.70		
失拟项	0.081	3	0.027	0.466	0.721 5	13.89	3	4.63	3.69	0.119 8
净误差	0.232	4	0.058			5.02	4	1.26		
总离差	74.060	16				2 524.46	16			

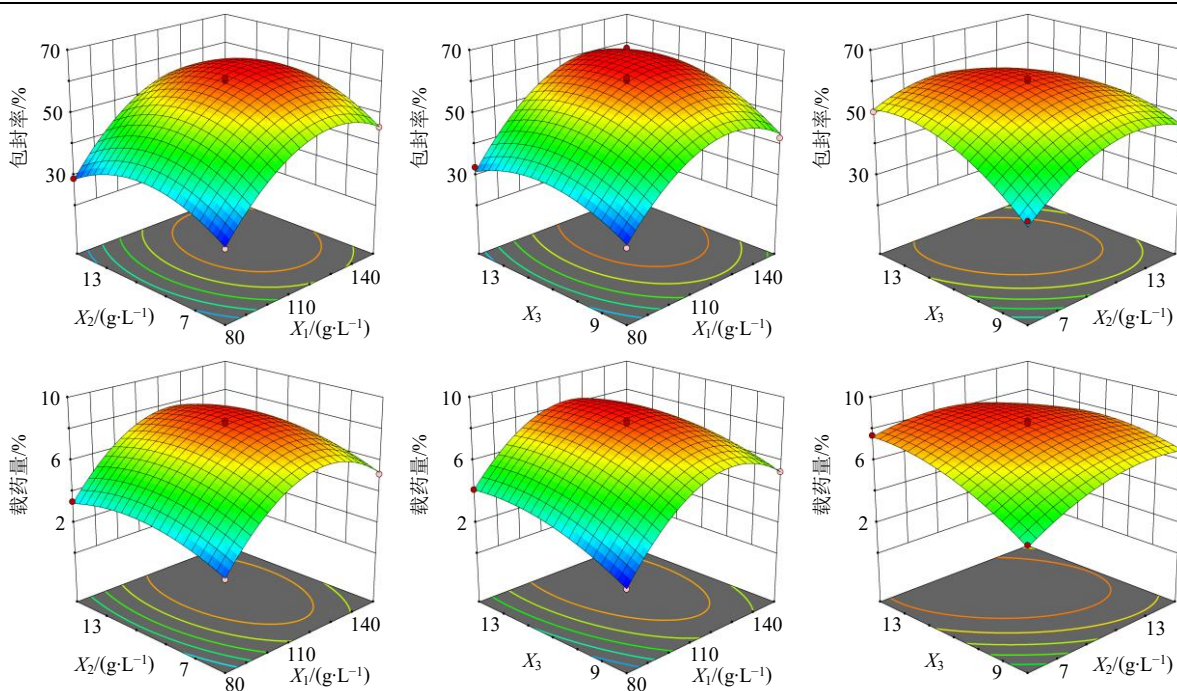


图 2 考察因素 X_1 、 X_2 、 X_3 对响应值 Y_1 、 Y_2 影响的三维效应曲面图

Fig. 2 Three-dimensional response surface plots showing effects of factors X_1 , X_2 , X_3 on response values Y_1 , Y_2

2.5.5 处方工艺的验证 由上述实验得到的积雪草苷 mPEG-PLGA 微球的最佳制备工艺为 mPEG-PLGA 质量浓度 123.8 g/L、PVA 质量浓度 9.8 g/L 与水油比 12.7:1。根据上述最佳工艺处方制备 3 组微球，取纯化的积雪草苷多孔微球，按照公式计算积雪草苷多孔微球包封率、粒径实际值和预测值之间的偏差，以验证模型是否准确，结果见表 8。积雪草苷 mPEG-PLGA 微球包封率和粒径的相对偏差均小于 5%，证明采用 BBD-RSM 优化积雪草苷 mPEG-PLGA 微球的工艺处方结果可靠，具有很高的重现性。

$$\text{偏差} = (\text{预测值} - \text{实际值}) / \text{预测值}$$

表 8 最佳工艺处方验证结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Verification results of optimal process prescription ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	粒径/ μm	载药量/%	包封率/%
实际测量值	58.97 \pm 4.44	8.43 \pm 0.16	62.66 \pm 0.84
预测值	59.39	8.56	62.14
偏差	0.71	1.54	0.83

2.6 微球的粒径与形貌评价

使用 SEM 观察微球的超微结构，取少量冻干微球置于载物台上，喷镀导电层后进行观察拍片，并对不同微球粒径进行统计。药物从多孔微球中的释放规律，主要受其多孔结构特征的影响。多孔性提供了药物扩散的主要通道，是调控药物释放行为的关键因素。通过 SEM 观察微球表面形貌，并统计其粒径分布，结果如图 3、4 所示。从图中可以观察到，积雪草苷 mPEG-PLGA 微球呈球状，表面多孔，且孔径分布均匀，为积雪草苷的高效携带与稳定性释放提供了保障。经统计，微球的直径集中分布在 (59.39 \pm 1.48) μm ，大小较为均一，且不易透过皮



图 3 微球 SEM 图

Fig. 3 SEM image of microspheres

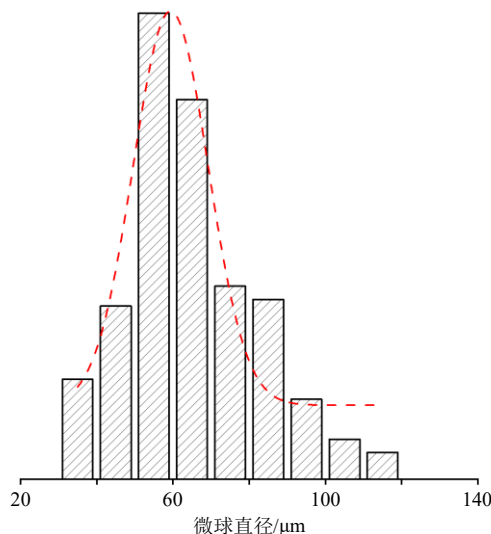


图 4 微球直径分布

Fig. 4 Microsphere diameter distribution chart

肤屏障，可将药物保留在作用部位实现局部长效释放，降低全身吸收风险。与 PLGA 微球中通常观察到的光滑表面和固体内部结构相比，其表面形态和内部结构有很大不同^[10-11]。另外观察到部分微球表面形成花边状褶皱，这是由于 PEG-PLGA 的两亲性，在有机相挥发过程中 mPEG-PLGA 促进液滴的界面不稳定性，这种界面不稳定性是由基体聚合物本身的固有特性引发的，能在一定程度上增强药物的释放能力，而无需额外的化学品或后处理，从而简化了工艺并使其更加环保。

2.7 微球的体外释放

以磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 为释放介质，采用透析法测定微球的体外释药行为。精密称定 30 mg 积雪草苷微球溶于 10 mL PBS，置于透析袋 (截留相对分子质量 3 500) 中，并将封口后的透析袋浸泡在 20 mL PBS 中。称取同质量的积雪草苷对照品作为对照，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中以 75 r/min 的速率持续振摇。在设定的时间点取样 2 mL，同时补足 2 mL 的 PBS^[19]。

采用 HPLC 法测定积雪草苷含量，根据公式计算积雪草苷的累积药物释放率，并绘制释放曲线。结果如图 5 所示。可以发现，前 12 h 约 30% 的初始爆发释放，可归因于积雪草苷在折叠表面上的吸附和微球的可渗透性 mPLGA-PEG 壳。微球在 24 h 累积释放达 58%，并在 96 h 内以稳定速度释放约 80% 的封装积雪草苷。该释放效率的提高归结于微球的亲水成分和松散的多孔结构，增强了水的润湿性，促进了降解和药物释放^[20]。此外，得益于多孔结构

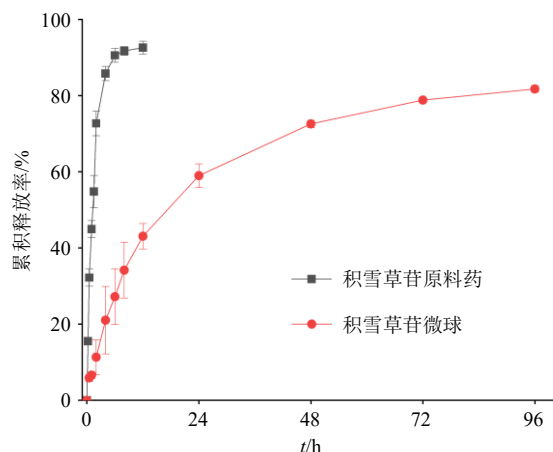


图5 积雪草苷微球释放曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Release curve of asiaticoside microspheres ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

对聚乳酸酸性降解产物的快速外排作用，本微球有效抑制了自催化降解引发的药物突释，实现了5 d内稳定且持续的药物释放。该释药周期精准匹配了皮肤创面增殖修复期，确保了在治疗窗口期内局部药物浓度维持在有效阈值以上^[5,21-22]。这一设计不仅通过减少药物在全身的代谢损失提高了生物利用度，还规避了传统长效制剂可能带来的全身不良反应，为皮肤创面的高效、安全治疗提供了新策略。

$$\text{累积释放量} = (30 C_n + 2 \sum_{i=1}^{n-1} C_i) / m_{\text{药物}}$$

2.8 细胞毒性实验

采用细胞计数试剂盒 (CCK-8) 评价微球的细胞毒性。将积雪草苷溶于甲醇后，用细胞培养基稀释，配制为含0.5%甲醇的积雪草苷培养基溶液。同时，设置含0.5%甲醇的培养基作为空白对照组。微球紫外辐照灭菌后，分别在37 °C的CO₂湿化气氛中，在细胞基础培养基中浸泡24 h得到相同浓度的微球溶液。细胞以每孔1×10⁴个细胞的密度接种于96孔板中。37 °C孵育24 h后，将培养基替换为微球溶液，孵育24 h和72 h。随后，在培养液中加入10 μL/孔的CCK-8工作溶液，在37 °C下孵育2 h，在450 nm波长处测定吸光度 (A)。体外细胞毒性实验结果如表9所示，经30 mg/mL积雪草苷微球浸提液培养72 h后，L929细胞的存活率仍高于90%，表明积雪草苷微球的细胞毒性较低，具有良好的生物安全性。

进一步比较不同质量浓度的积雪草苷溶液与积雪草苷微球对L929细胞增殖的影响，结果如表10所示。积雪草苷溶液对成纤维细胞的增殖促进作用随质量浓度升高而缓慢增强，而积雪草苷微球则表

表9 不同质量浓度下积雪草苷微球与细胞共培养24、72 h的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 9 Cell viability of asiaticoside microspheres cocultured with cells for 24, 72 h under different mass concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

积雪草苷微球/ (mg·mL ⁻¹)	细胞存活率/%	
	24 h	72 h
30.00	108.99 ± 4.42	96.33 ± 8.90
15.00	103.86 ± 7.78	99.90 ± 4.37
7.50	121.07 ± 8.59	95.64 ± 6.42
3.75	136.25 ± 3.69	103.75 ± 12.04

表10 不同质量浓度下积雪草苷溶液与积雪草苷微球的细胞存活率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 10 Cell viability of asiaticoside solution and asiaticoside microspheres at different mass concentrations ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	细胞存活率/%	
	积雪草苷溶液	积雪草苷微球
62.50	107.23 ± 2.96	108.09 ± 5.96
125.00	112.77 ± 0.34	111.09 ± 4.85
250.00	113.60 ± 2.87	133.79 ± 4.11*
500.00	116.32 ± 4.33	142.46 ± 2.26*

与积雪草苷溶液比较: *P < 0.05.

*P < 0.05 vs asiaticoside solution.

现出更为显著的促增殖效果。当药物质量浓度达到250 μg/mL及以上时，微球组的细胞存活率显著高于同质量浓度药物溶液组 (P < 0.05)，提示经mPLGA-PEG微球携带后，积雪草苷对成纤维细胞的增殖活性得到有效增强。推测其原因，可能与微球作为药物储库，能够提高难溶性药物在局部的表观溶解度及药物浓度，从而增强细胞对药物的可及性及摄取效率有关^[23]。

3 讨论

积雪草苷的低溶解性与渗透性，使其在常规局部制剂中难以有效释放并向创面组织递送，这一局限性严重制约了其在创伤修复中的疗效与应用。因此构建一种能够持续、稳定地将足量药物递送至作用部位并维持预期疗效的药物传递系统，成为制剂研究的关键方向之一^[24-25]。在皮肤给药系统中，多孔微球作为一种有效载体，因其难以穿透角质层，可在皮肤表面滞留并持续释放药物，从而实现局部长效递送^[4]。

在微球制备过程中，提高药物包封率的核心在于减少制备阶段的药物泄漏^[26-27]。本研究以载药量与包封率为评价指标，系统考察了mPEG-PLGA质

量浓度、乳化剂浓度及水油比等关键工艺参数对微球性能的影响,成功优化出积雪草苷 mPEG-PLGA 微球的制备条件。所得微球内部呈现典型多孔结构,与常规 PLGA 微球通常具备的光滑表面和致密内部结构存在显著差异。这一结构特征可归因于 mPEG-PLGA 的两亲性所引起的固化行为变化,进而影响微球的最终形貌和内部构造^[28-29]。所制备的积雪草苷 mPEG-PLGA 微球粒径分布均匀,载药量较高,体外释放研究表明,其具有良好的缓释性能。与积雪草苷游离溶液相比,微球能够有效包裹药物,并在 96 h 内以稳定速率释放约 80% 的药物,展现出理想的释放周期,有助于维持稳定的局部药物浓度。

尽管本研究在工艺优化与体外释放方面取得了良好进展,但仍存在若干不足之处。例如,微球制备过程中药物与聚合物的相互作用机制尚未深入探讨;体外释放模型与真实皮肤环境存在差异;微球在皮肤表面的滞留能力及角质层渗透行为仍需进一步验证。积雪草苷 mPEG-PLGA 多孔微球作为一种具有潜力的皮肤给药载体,在湿疹、皮炎及创面愈合等局部疾病治疗中具备良好的应用前景。后续研究可聚焦于微球的体内药效学评价及其皮肤靶向性,并探索其与皮肤屏障之间的相互作用机制,以推动该制剂向临床转化。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 秦慧真,林思,邓玲玉,等. 积雪草苷的药理作用及机制研究进展 [J]. 中国药房, 2021, 32(21): 2683-2688.
- [2] Shen H Y, Zhu F, Li J S, *et al.* Protective effect of asiaticoside on radiation-induced proliferation inhibition and DNA damage of fibroblasts and mice death [J]. *Open Life Sci*, 2020, 15: 145-151.
- [3] He Z L, Hu Y Y, Niu Z Q, *et al.* A review of pharmacokinetic and pharmacological properties of asiaticoside, a major active constituent of *Centella asiatica* (L.) Urb [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 302: 115865.
- [4] Chen X S, Zhang H M, Liang Y Y, *et al.* Inflammation-modulating antibacterial hydrogel sustained release asiaticoside for infection wound healing [J]. *Biomater Adv*, 2023, 147: 213302.
- [5] Lee Y J, Kim M S. Advances in drug-loaded microspheres for targeted, controlled, and sustained drug delivery: Potential, applications, and future directions [J]. *Biomed Pharmacother*, 2025, 189: 118244.
- [6] 邱晓明,甄平,李松凯. 聚乳酸-羟基乙酸共聚物载药微球制备工艺研究进展 [J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(10): 1599-1604.
- [7] Chen W W, Li H, Zhang X Y, *et al.* Microfluidic preparation of monodisperse PLGA-PEG/PLGA microspheres with controllable morphology for drug release [J]. *Lab Chip*, 2024, 24(19): 4623-4631.
- [8] Zhou Y, Liu Z H, Luo X, *et al.* Controllable fabrication of porous PLGA microspheres with adjustable degradability and morphology as cell carrier [J]. *Mater Today Commun*, 2026, 50: 114520.
- [9] Pu C G, Wang Q, Zhang H J, *et al.* In vitro-in vivo relationship of amorphous insoluble API (progesterone) in PLGA microspheres [J]. *Pharm Res*, 2017, 34(12): 2787-2797.
- [10] Xing D D, Tang L H, Yang H Y, *et al.* Effect of mPEG-PLGA on drug crystallinity and release of long-acting injection microspheres: In vitro and in vivo perspectives [J]. *Pharm Res*, 2024, 41(6): 1271-1284.
- [11] Anwar A, Sun P F, Rong X X, *et al.* Process analytical technology as in-process control tool in semi-continuous manufacturing of PLGA/PEG-PLGA microspheres [J]. *Heliyon*, 2023, 9(5): e15753.
- [12] Tu S C, Mai S T, Shu D, *et al.* Microfluidic-based preparation of PLGA microspheres facilitating peptide sustained-release [J]. *Mater Lett*, 2024, 368: 136675.
- [13] Yi K F, Wang X L, Li P L, *et al.* Amphiphilic mPEG-PLGA copolymer nanoparticles co-delivering colistin and niclosamide to treat colistin-resistant Gram-negative bacteria infections [J]. *Commun Biol*, 2025, 8: 673.
- [14] Zhang C Z, Niu J, Chong Y S, *et al.* Porous microspheres as promising vehicles for the topical delivery of poorly soluble asiaticoside accelerate wound healing and inhibit scar formation in vitro & in vivo [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 109: 1-13.
- [15] An T, Choi J, Kim A, *et al.* Sustained release of risperidone from biodegradable microspheres prepared by in-situ suspension-evaporation process [J]. *Int J Pharm*, 2016, 503(1/2): 8-15.
- [16] Reddy P L, Shanmugasundaram S. Optimizing process parameters for controlled drug delivery: A quality by design (QbD) approach in naltrexone microspheres [J]. *AAPS Pharm Sci Tech*, 2024, 25(5): 105.
- [17] Esnaashari S S, Amani A. Optimization of noscapine-loaded mPEG-PLGA nanoparticles and release study: A response surface methodology approach [J]. *J Pharm Innov*, 2018, 13(3): 237-246.
- [18] Zhang P H, Tang R M, Yang S L, *et al.* Preparation and in vitro release of mPEG-PLA microspheres of *Panax*

- notoginseng saponins [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 217: 922-930.
- [19] Liu R, Wang Y, Ma Y D, *et al.* Effects of the molecular weight of PLGA on degradation and drug release *in vitro* from an mPEG-PLGA nanocarrier [J]. *Chem Res Chin Univ*, 2016, 32(5): 848-853.
- [20] Narisepalli S, Salunkhe S A, Chitkara D, *et al.* Asiaticoside polymeric nanoparticles for effective diabetic wound healing through increased collagen biosynthesis: *In-vitro* and *in-vivo* evaluation [J]. *Int J Pharm*, 2023, 631: 122508.
- [21] Yang Z Y, Wei K, Zhang Y, *et al.* Study on the preparation of pramipexole sustained-release PLGA microspheres: Effect of fatty acids and polymer blending on the properties of microspheres [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2025, 114: 107462.
- [22] White C, Schwendeman S P. Formulation and characterization of exenatide-loaded PLGA microspheres prepared by coacervation [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2025, doi: 10.1007/S13346-025-02008-2.
- [23] Wei P S, Chen Y J, Lin S Y, *et al.* *In situ* subcutaneously injectable thermosensitive PEG-PLGA diblock and PLGA-PEG-PLGA triblock copolymer composite as sustained delivery of bispecific anti-CD3 scFv T-cell/anti-EGFR Fab Engager (BiTEE) [J]. *Biomaterials*, 2021, 278: 121166.
- [24] Pande S. Factors affecting response variables with emphasis on drug release and loading for optimization of liposomes [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2024, 52(1): 334-344.
- [25] Luo D, Huang L X, Bai B X, *et al.* Sequential drug-release microsphere system for scarless wound healing [J]. *Mater Today Bio*, 2025, 35: 102310.
- [26] 姜朝瑞, 许燕, 熊莹, 等. 氧化石墨烯复合材料载药微球的制备与性能研究 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(22): 3467-3473.
- [27] Zhang Y, Awang Nawi M A, Shaari R, *et al.* Enhancing drug efficacy: A review of research progress in drug-loaded microspheres [J]. *Cureus*, 2025, 17(8): e90498.
- [28] Wang S Y, Feng X B, Liu P, *et al.* Blending of PLGA-PEG-PLGA for improving the erosion and drug release profile of PCL microspheres [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2020, 21(11): 1079-1087.
- [29] Hajian M, Erfani-Moghadam V, Arabi M S, *et al.* A comparison between optimized PLGA and CS-Alg-PLGA microspheres for long-lasting release of glatiramer acetate [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2023, 82: 104355.

[责任编辑 郑礼胜]