

# 重组降血压肽乳酸-羟基乙酸共聚物缓释微球的制备与体外释放研究

孙海燕, 方科伟, 刘冬\* (深圳职业技术学院, 广东 深圳 518055)

**摘要:** 目的 制备重组降血压肽(rAHP, 氨基酸序列为 VLPVPR) 缓释微球。方法 以不同单体比和相对分子质量的乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为缓释材料, 利用正交设计优化微球制备的最佳工艺条件, 并考察微球的体外释药特性。结果 乳酸-羟基乙酸共聚物相对分子质量越小, 微球粒径越小( $P < 0.05$ ), 孔隙率越高; 乳酸-羟基乙酸共聚物中乳酸比例越大, 微球粒径越大( $P < 0.05$ ); 微球制备的最优工艺为: 油相中乳酸-羟基乙酸共聚物质量浓度 $\rho_{PLGA}$ 为 $12 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ 、初乳搅拌速度 $V_{\text{stir}}$ 为 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、内水相与油相体积比 $R_{w/o}$ 为1:7.5, 外水相聚乙醇酐124(PVA)质量浓度 $\rho_{PVA}$ 为 $4 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ , 按此工艺制得重组降血压肽乳酸-羟基乙酸共聚物微球包封率在90%以上, 载药量11%以上, 微球粒径70~90  $\mu\text{m}$ ; 载药微球在PBS缓冲液中2 h内的累积释药量在40%以内, 乳酸-羟基乙酸共聚物相对分子质量越小, 释药速度越快( $P < 0.05$ ), 羟基乙酸含量越高释药速度也越快( $P < 0.05$ ), 释药曲线符合Higuchi方程, 表明微球通过扩散机制进行缓释。结论 该微球制备工艺成熟, 包封率高, 具有缓释能力。

**关键词:** 重组降血压肽; 聚乳酸-聚羟基乙酸; 缓释微球; 体外释放

中图分类号: R944

文献标志码: A

文章编号: 1001-2494(2012)24-2012-05

## Preparation and *in Vitro* Release of Recombinant Peptide-PLGA Sustained Release Microspheres

SUN Hai-yan, FANG Ke-wei, LIU Dong\* (Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To prepare recombinant peptide(rAHP, amino acid sequence is VLPVPR) PLGA sustained release microspheres by double emulsion solvent evaporation method. **METHODS** The rAHP-PLGA microspheres preparation process was optimized by orthogonal experiments using PLGA copolymers with different LA/GA ratios or different molecular weights as sustained material, and *in vitro* drug release profiles of the microspheres were also investigated. **RESULTS** The microspheres were smaller( $P < 0.05$ ) and more porous with lower molecular weight of PLGA. The optimal preparation process of rAHP-PLGA microspheres was as follows: PLGA concentration was  $12 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ , the stirring rate of the first emulsion was  $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , the volume ratio of inner water phase to oil phase was 1:7.5, and the PVA concentration was  $4 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ . The encapsulation efficiency of the rAHP-PLGA microspheres prepared by the optimum process was more than 90%, the drug loading was above 11% and the average particle diameter was in the range of 70-90  $\mu\text{m}$ . The cumulative *in vitro* release percentage in PBS buffer was less than 40% within 2 h, the release speed increased( $P < 0.05$ ) with lower molecular weight or lower ratio of LA/GA. The drug release curve was fit to Higuchi equation, suggesting that rAHP released from the microspheres based on diffusion mechanism. **CONCLUSION** The rAHP-PLGA microspheres can be prepared easily with good morphology, high entrapment efficiency and certain sustained release capacity.

**KEY WORDS:** recombinant peptide; poly(D,L-lactide-co-glycolide); sustained microsphere; *in vitro* release

降血压肽(antihypertensive peptide, AHP)是一类与血管紧张素转化酶抑制剂具有相同降压机制的多肽,其降压效果显著且无毒副作用,是一种极具开发潜力的多肽类抗高血压药物<sup>[1]</sup>。本实验室已成功利用基因工程技术制备出重组降血压肽(recombinant antihypertensive peptide, rAHP),体内外实验表明,重组降血压肽具有明显的降压作用,且对正常血压无影响<sup>[2-3]</sup>。但降血压肽口服不易吸收,生物利用度在1%以下<sup>[4-6]</sup>。动物实验表明,给药后2 h

体内血药浓度达峰值,降压效果显著,但很快下降至有效浓度以下,降压效果呈现较为明显的“峰谷”波动,不利于高血压患者的平稳降压<sup>[3]</sup>。因此,降血压肽长效缓释制剂的开发研制对保证其良好治疗作用的平稳发挥具有重要的意义。

本实验选用人工合成的可生物降解聚合物乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)为载体材料,利用复乳-液中干燥法制备重组降血压肽缓释微球,以包封率、载药量、粒径分布等作为考察指标,运用正交设计对

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B030803016); 深圳职业技术学院重点项目(2208K017BA)

作者简介: 孙海燕,女,博士,教授,研究方向: 药物制剂及药效学研究 \* 通讯作者: 刘冬,男,教授,研究方向: 生物活性成分的制备及功能研究 Tel: (0755) 26019170 E-mail: liudongsz@163.com

影响微球性状的主要处方和工艺因素进行优化,同时考察微球的体外释放行为,评价制得的 rAHP-PLGA 缓释微球的特性,探索降血压肽缓释药物制剂的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器

LC 20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司); Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 反相柱(4.6 mm × 250 mm)(美国 Agilent 公司); ALPHA 2-4 真空冷冻干燥机(德国 CHRIST 公司); 磁力搅拌器(美国 Barnstead 公司); 机械搅拌器(德国 IKA 公司); SK-747R 震荡培养箱(美国 Amerex 公司); H550S 显微照相系统(日本 Nikon 公司); IX71-A21PH 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); S3500 激光粒度分析仪(美国 Microtrac 公司); S-520 扫描电镜(日本 Hitachi 公司)。

### 1.2 材料与试剂

rAHP(序列为 VLPVPR,本实验室通过基因工程方法制得,纯度 ≥ 99%); 乙腈(ACN)和三氟乙酸(TFA)(均为色谱纯,美国 Sigma 公司); 药用明胶(广东环凯微生物科技有限公司); 聚乙烯醇 124(PVA,国药集团化学试剂有限公司); 乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA,LA/GA 分别为 50/50 和 75/25,相对分子质量分别为 8 000、14 000 和 20 000,山东岱罡生物科技有限公司)。其他试剂均为市售分析纯。

### 1.3 微球的制备

采用复乳-溶剂蒸发法制备微球<sup>[7]</sup>。将适量 rAHP 溶解于 1% 的明胶水溶液中作为内水相,取不同 LA/GA 并不同相对分子质量的 PLGA 溶解于二氯甲烷作为油相,两者在冰浴及机械搅拌条件下搅拌 5 min 得 W<sub>1</sub>/O 初乳。在 800 r · min<sup>-1</sup> 磁力搅拌器搅拌条件下将初乳倒入一定浓度的 100 mL 的 PVA 水溶液中,搅拌 3 min,得到 W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub> 复乳。在室温 25 °C 条件下继续搅拌 5 h,挥发有机溶剂固化微球,离心洗涤后冷冻干燥得到 rAHP 微球。

### 1.4 rAHP 的测定

标准曲线的制备:称取适量 rAHP,用去离子水配制成 1、0.5、0.2、0.1、0.05、0.01 mg · mL<sup>-1</sup> 的标准溶液。RP-HPLC 测定 rAHP 的峰面积,以药物质量浓度  $\rho$  与峰面积  $A$  作线性回归。结果表明 rAHP 浓度在 0.01 ~ 1 mg · mL<sup>-1</sup> 内线性关系良好,  $r^2 = 0.9998$  ( $n = 3$ ), 回归方程为:  $A = 30\,049\rho - 121.35$ 。

RP-HPLC 测定 rAHP 的色谱条件: 色谱柱: VY-DAC 238EV54 C<sub>18</sub>(4.6 mm × 200 mm, 5 μm); 流动

相: 乙腈-水(19:81, 0.05% TFA); 流速: 1.0 mL · min<sup>-1</sup>; 检测波长: 199 nm; 柱温: 30 °C; 灵敏度: 0.01 AUFS; 进样量: 20 μL。

### 1.5 微球得率、包封率和载药量的测定

1.5.1 得率测定 微球固化后用超纯水洗涤 3 次,离心,真空冷冻干燥后得到微球干粉,称重,计算所得微球的质量与投药量(投入的降血压肽的量)和壁材 PLGA 的总重量的比值,即微球得率,计算公式如下。

得率% = 微球干重 / (投入的多肽质量 + 投入的 PLGA 质量) × 100%。

1.5.2 包封率测定 微球制备后,离心,用超纯水洗涤 3 次,合并离心上清液,定容至 50 mL,RP-HPLC 测定,代入标准曲线,计算上清液中游离的 rAHP 量,按下式计算包封率:

包封率% = (投药量 - 游离药量) / 投药量 × 100%。

1.5.3 载药量测定 校准曲线的制备:分别准确称取 50 mg 空白 PLGA 微球 6 份,用 1 mL 的二氯甲烷溶解,加入适量 rAHP,配成 rAHP 质量浓度分别为 0.05、0.15、0.3、0.6、1.5 和 3 mg · mL<sup>-1</sup> (真实值),然后加入 3 mL 超纯水萃取 3 次,合并萃取液,RP-HPLC 检测,代入标准曲线计算萃取液中 rAHP 含量(测量值)。以真实值( $X$ )对测量值( $Y$ )进行线性回归,得微球载药量校准曲线方程为:  $Y = 0.9701X$ ,  $r^2 = 0.9999$  ( $n = 3$ )。

检测方法的建立:准确称取 50 mg 载药微球,用 1 mL 的二氯甲烷溶解,然后加入 3 mL 超纯水萃取 3 次,合并萃取液,用 RP-HPLC 检测,根据标准曲线计算萃取液中 rAHP 含量,然后根据校准曲线计算微球中 rAHP 的真实含量,计算载药量。载药量计算公式如下:

载药量% = 微球中药物含量 / 微球干重 × 100%

### 1.6 微球粒径及粒径分布测定

取微球适量,加蒸馏水分散,用激光粒度分析仪测定微球的粒径和粒径分布。粒径分布用跨度(Span)表示:

$$\text{Span} = \frac{D_{90} - D_{10}}{D_{50}}$$

式中  $D_{10}$ 、 $D_{50}$  和  $D_{90}$  分别指粒径累积分布图中 10%、50%、90% 处所对应的粒径。Span 值越小,粒度分布越窄,微球越均匀。

### 1.7 微球制备工艺优化

根据单因素实验结果,确定油相中 PLGA 的质量浓度( $\rho_{\text{PLGA}}$ )、初乳搅拌速度( $V_{\text{stir}}$ )、内水相与油相

体积比( $R_{w/o}$ )以及外水相 PVA 质量浓度( $\rho_{PVA}$ )等对微球特性影响大,采用 L9( $3^4$ ) 正交实验设计对此 4 个因素进行优化,见表 1。

具体的正交实验设计见表 2。

用包封率( $S_1$ )、微球得率( $S_2$ )、粒径分布跨度为指标对微球进行评价,其中粒径分布是否均匀用跨度( $S_3$ )来衡量,跨度越小越均匀;包封率、得率都是越大越好。分别采用归一化法,把  $S_1$ 、 $S_2$  和  $S_3$  3 个指标转化为综合评价指标  $S$ :

$$S = 3 \sqrt{\frac{S_1 \cdot S_2}{S_3}}$$

### 1.8 微球的体外释放度实验

精密称取 10 mg 微球到 10 mL 具塞离心管中,加入 5 mL pH 7.4 的磷酸缓冲液(含 0.02% 叠氮化钠)密封,于 37 °C 水浴中低速恒温震荡,振荡频率为 50 次  $\cdot$  min<sup>-1</sup>,分别于 0.5、2、8、16、24、48、72、96、120 和 144 h 取样,每支离心管 1 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 离心 1.5 min,取 100  $\mu$ L 上清,用 RP-HPLC 检测 rAHP 的含量,取样后离心管中分别补加 100  $\mu$ L 磷酸缓冲液,继续恒温震荡。

## 2 结果

### 2.1 微球制备工艺优化结果

不同类型 PLGA 制备的 rAHP 微球的正交实验结果见表 3 ~ 6(在此仅列出了 LA / GA = 50/50,

表 1 重组降血压肽(rAHP)微球制备工艺 L9( $3^4$ ) 正交实验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal experiments

Levels	Factors			
	$\rho_{PLGA} / g \cdot 100 mL^{-1}$	$V_{stir} / r \cdot min^{-1}$	$R_{w/o}$	$\rho_{PVA} / g \cdot 100 mL^{-1}$
1	5	800	1/5	2
2	8	1 000	1/7.5	4
3	12	1 200	1/10	6

表 2 rAHP 微球制备正交实验设计表

Tab. 2 The orthogonal design table for preparation of microspheres

Factors	$\rho_{PLGA} (A)$	$V_{stir} (B)$	$R_{w/o}$	$\rho_{PVA} (D)$
	$/ g \cdot 100 mL^{-1}$	$/ r \cdot min^{-1}$	(C)	$/ g \cdot 100 mL^{-1}$
Experiment 1	5	800	1/5	2
Experiment 2	5	1 000	1/7.5	4
Experiment 3	5	1 200	1/10	6
Experiment 4	8	800	1/7.5	6
Experiment 5	8	1 000	1/10	2
Experiment 6	8	1 200	1/5	4
Experiment 7	12	800	1/10	4
Experiment 8	12	1 000	1/5	6
Experiment 9	12	1 200	1/7.5	2

$M_w$  8 000 和 LA/GA = 75/25,  $M_w$  8 000 两组正交实验数据和分析,其他略)。实验结果都表明,微球制备的最优工艺为:  $A_3B_2C_2D_2$ , 即油相中 PLGA 质量浓度  $\rho_{PLGA}$  为 12 g  $\cdot$  100 mL<sup>-1</sup>、初乳搅拌速度  $V_{stir}$  为 1 000 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup>、内水相与油相体积比  $R_{w/o}$  为 1/7.5, 以及外水相 PVA 质量浓度  $\rho_{PVA}$  为 4 g  $\cdot$  100 mL<sup>-1</sup>, 此时综合评价指标  $S$  值最大。微球制备过程中各因素影响大小顺序为: 外水相 PVA 质量浓度 > 内水相与油相体积比 > 油相中 PLGA 的质量浓度 > 初乳搅拌速度。PVA 在微球制备中的作用是乳化剂,促进复乳的形成, PVA 的质量浓度如果太低,复乳形成慢,如果浓度较高,增加了外水相的黏度,不利于溶剂的挥发,影响微球的形成;同时由于外水相黏度大,造成微球的黏壁,会严重影响微球的得率。内水相与油相体积比的大小主要影响微球的包封率,比值越大,包封率越高,所以在实际生产中可以利用增加内水相与油相体积比的方法来提高包封率; PLGA 的质量浓度主要影响包封率, PLGA 质量浓度越高,其包封率越高;初乳搅拌速度主要是影响初乳的形成和微球粒径的大小,如果对微球粒径大小没严格要求,在实际生产中选用适当的初乳搅拌速度即可。

### 2.2 优化工艺所得 rAHP-PLGA 微球的特性

选用不同 LA/GA 单体比和相对分子质量的 PLGA 按优化后的处方和工艺每组制备 3 批微球,其特性见表 7。可见,载药微球的包封率在 90% 以上,载药量在 11% 以上,微球得率在 85% 以上,微球粒径在 70 ~ 90  $\mu$ m 之间,跨度小,粒径分布比较均匀。同一种 LA/GA 材料制备的微球,相对分子质量越小,粒径越小( $P < 0.05$ ),但是包封率、得率、载药量没有显著差异( $P > 0.05$ )。相同相对分子质量不同 LA/GA 配比的微球, LA 比例越大,微球粒径越大( $P < 0.05$ ),在包封率、载药量、得率和跨度方面均无显著差异( $P > 0.05$ )。

表 3 PLGA(LA / GA = 50/50,  $M_w$  8 000) 制备 rAHP 微球正交实验中微球的评价结果.  $n = 3 \bar{x} \pm s$

Tab. 3 The results of orthogonal test for microspheres preparation(LA/GA = 50/50,  $M_w$  8 000).  $n = 3 \bar{x} \pm s$

No.	$S_1 / \%$	$S_2 / \%$	$S_3$	$S$
1	82.32 $\pm$ 0.32	76.24 $\pm$ 0.09	3.03 $\pm$ 0.21	12.75 $\pm$ 0.50
2	86.29 $\pm$ 0.15	83.71 $\pm$ 0.50	1.19 $\pm$ 0.08	18.24 $\pm$ 0.92
3	90.37 $\pm$ 0.59	74.62 $\pm$ 0.33	2.02 $\pm$ 0.25	14.95 $\pm$ 0.89
4	91.92 $\pm$ 0.73	65.35 $\pm$ 0.19	1.12 $\pm$ 0.10	17.50 $\pm$ 1.10
5	92.10 $\pm$ 0.29	70.22 $\pm$ 0.57	2.23 $\pm$ 0.37	14.26 $\pm$ 0.71
6	90.22 $\pm$ 0.11	66.35 $\pm$ 0.35	1.61 $\pm$ 0.19	15.49 $\pm$ 0.55
7	95.16 $\pm$ 0.53	87.72 $\pm$ 0.30	1.36 $\pm$ 0.26	18.31 $\pm$ 0.87
8	93.25 $\pm$ 0.62	87.15 $\pm$ 0.14	1.12 $\pm$ 0.12	19.58 $\pm$ 0.90
9	94.13 $\pm$ 0.39	69.9 $\pm$ 0.21	1.79 $\pm$ 0.07	15.43 $\pm$ 0.99

表4 rAHP 微球制备正交实验结果直观分析表(LA/GA = 50/50,  $M_w$  8 000)

Tab. 4 The intuitive analysis table of the results of orthogonal test(LA / GA = 50/50,  $M_w$  8 000)

Line	A ( $\rho_{PLGA}$ )	B ( $V_{stir}$ )	C ( $R_{w/o}$ )	D ( $\rho_{PVA}$ )	S
Experiment 1	1	1	1	1	12.75
Experiment 2	1	2	2	2	18.24
Experiment 3	1	3	3	3	14.95
Experiment 4	2	1	2	3	17.50
Experiment 5	2	2	3	1	14.26
Experiment 6	2	3	1	2	15.49
Experiment 7	3	1	3	2	18.31
Experiment 8	3	2	1	3	19.58
Experiment 9	3	3	2	1	15.43
K1	45.94	48.56	47.82	42.44	
K2	47.25	52.08	51.17	52.04	
K3	53.32	45.87	47.52	52.03	
R	2.46	2.07	1.22	3.20	

$A_3B_2C_2D_2$

表5 PLGA(LA/GA = 75/25,  $M_w$  8 000) 制备 rAHP 微球正交实验中微球的评价结果.  $n = 3$   $\bar{x} \pm s$

Tab. 5 The results of orthogonal test for microspheres preparation (LA/GA = 75/25,  $M_w$  8 000).  $n = 3$   $\bar{x} \pm s$

No.	$S_1/\%$	$S_2/\%$	$S_3$	S
1	85.91 ± 0.43	84.69 ± 0.32	2.19 ± 0.17	14.92 ± 0.93
2	78.73 ± 0.31	89.01 ± 0.37	1.35 ± 0.20	17.31 ± 0.87
3	87.11 ± 0.50	89.22 ± 0.49	2.12 ± 0.44	15.42 ± 1.05
4	88.23 ± 0.23	80.35 ± 0.12	1.59 ± 0.03	16.46 ± 0.97
5	87.12 ± 0.30	83.24 ± 0.40	2.10 ± 0.20	15.12 ± 1.11
6	92.99 ± 0.27	79.52 ± 0.35	2.23 ± 0.39	14.91 ± 0.89
7	87.67 ± 0.39	82.75 ± 0.27	1.37 ± 0.19	17.43 ± 0.68
8	87.35 ± 0.58	74.21 ± 0.15	1.32 ± 0.52	17.00 ± 0.57
9	89.79 ± 0.70	52.33 ± 0.28	1.63 ± 0.45	14.23 ± 1.09

表6 rAHP 微球制备正交实验结果直观分析表(LA/GA: 75/25,  $M_w$  8 000)

Tab. 6 The intuitive analysis table of the results of orthogonal test(LA/GA = 75/25,  $M_w$  8 000)

Line	A ( $\rho_{PLGA}$ )	B ( $V_{stir}$ )	C ( $R_{w/o}$ )	D ( $\rho_{PVA}$ )	S
Experiment 1	1	1	1	1	14.92
Experiment 2	1	2	2	2	17.31
Experiment 3	1	3	3	3	15.42
Experiment 4	2	1	2	3	16.46
Experiment 5	2	2	3	1	15.12
Experiment 6	2	3	1	2	14.91
Experiment 7	3	1	3	2	17.43
Experiment 8	3	2	1	3	17.00
Experiment 9	3	3	2	1	14.23
K1	47.65	48.81	46.83	44.27	
K2	46.49	49.43	48.00	49.65	
K3	48.66	44.56	47.97	48.88	
R	0.72	1.62	0.39	1.79	

$A_3B_2C_2D_2$

利用扫描电镜观察微球的形态,见图1。可见微球呈规则的球形,表面光滑、圆整、致密。不同相对分子质量的 PLGA 制备的微球表面孔隙率不同,相对分子质量越大,孔隙率越小。如 LA/GA = 50/50 时,从图1中可以明显看到,  $M_w$  8 000 微球表面的小孔数量明显多于  $M_w$  14 000 和  $M_w$  20 000; 对于 LA/GA = 75/25 不同相对分子质量 PLGA 制备的微球也有同样的规律。

### 2.3 优化工艺所得 rAHP-PLGA 微球的体外释放度

不同单体比及不同相对分子质量的 rAHP-PLGA 缓释微球的体外释药情况见图2。

在释放的前 2 h,微球中 rAHP 处于快速释放期,2 h 内累积释放率在 20.1% ~ 35.6% 之间,这个阶段释放出来的主要是微球表面及近表面吸附的多肽分子,见图2。在 24、48 和 72 h 内累积释放率分别为 50.9% ~ 71.2%、55.7% ~ 76.3% 和 59.1% ~ 79.7%,72 h 后药物释放速度减缓,至 144 h 累积释放率达到 66.2% ~ 82.4%。

同一 LA/GA 配比的微球,相对分子质量越小,整个释放过程释放速度越快( $P < 0.05$ )。而同一相对分子质量不同 LA/GA 配比的微球,GA 含量高的释药速度更快( $P < 0.05$ )。其原因可能是由于相对分子质量小的 PLGA 微球平均粒径相对较小,且孔隙率较高,使微球溶蚀更快,药物更易释放出来;而 GA 含量高时,微球亲水性更强,释药也更快。

将各种材料载药微球的体外释药曲线按照零级动力学方程、一级动力学方程和 Higuchi 方程这三种模型进行拟合,选取相关系数( $r$ )最大而均方误差(MSE)最小的拟合结果,发现所制备的载药微球体外释放曲线最符合 Higuchi 方程,说明载药微球的缓释是通过扩散机制控制的。

### 3 讨论

本实验以 PLGA 为材料,探讨了制备重组降压肽缓释微球的可行性。结果表明,不同 LA/GA 配比和不同相对分子质量的 PLGA 都能成功制备缓释微球。所制得的各种不同配方的微球,包封率在 90% 以上,载药量在 11% 以上,微球得率在 85% 以上,微球粒径在 70 ~ 90  $\mu\text{m}$  之间,跨度小,粒径分布比较均匀。不同相对分子质量和不同 LA/GA 配比的 PLGA 对微球粒径、孔隙率有显著影响,但对包封率、得率、载药量影响不显著。

体外释药实验显示,相对分子质量越小、GA 比例越大的 PLGA 制得的微球,释药速度越快。其中

表7 不同 LA/GA 单体比和相对分子质量的 rAHP-PLGA 微球特性.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab.7 Characteristics of microspheres prepared by different LA/GA ratios and molecular weights.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Groups	Encapsulation efficiency /%	Yield rate /%	Drug loading rate /%	Average particle diameter / $\mu\text{m}$	Span
LA/GA = 50/50, $M_w$ 8 000	92.31 $\pm$ 0.62	85.73 $\pm$ 0.68	12.45 $\pm$ 0.41	70.12 $\pm$ 1.37	1.33 $\pm$ 0.07
LA/GA = 50/50, $M_w$ 14 000	91.95 $\pm$ 0.58	86.99 $\pm$ 0.29	12.31 $\pm$ 0.43	76.33 $\pm$ 1.26	1.21 $\pm$ 0.02
LA/GA = 50/50, $M_w$ 20 000	90.77 $\pm$ 0.76	85.81 $\pm$ 0.92	11.75 $\pm$ 0.49	84.39 $\pm$ 1.53	1.49 $\pm$ 0.11
LA/GA = 75/25, $M_w$ 8 000	92.01 $\pm$ 0.79	86.51 $\pm$ 0.90	12.39 $\pm$ 0.44	75.20 $\pm$ 2.13	1.92 $\pm$ 0.17
LA/GA = 75/25, $M_w$ 14 000	91.63 $\pm$ 0.47	86.76 $\pm$ 0.35	12.01 $\pm$ 0.50	82.65 $\pm$ 1.95	1.85 $\pm$ 0.10
LA/GA = 75/25, $M_w$ 20 000	90.72 $\pm$ 0.51	87.46 $\pm$ 0.91	11.54 $\pm$ 0.46	88.53 $\pm$ 1.91	1.71 $\pm$ 0.15

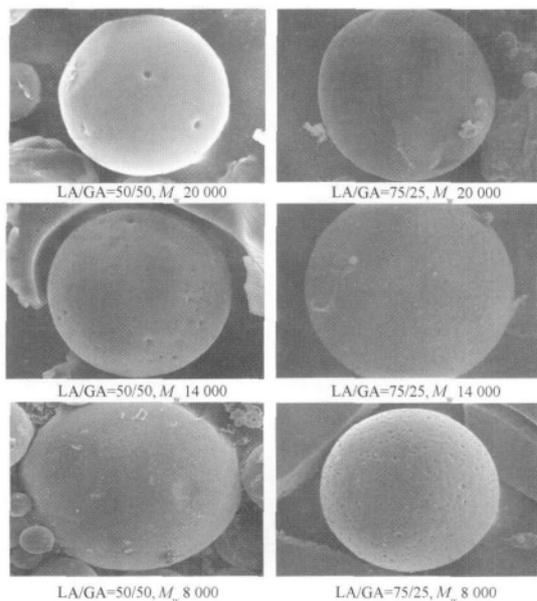


图1 优化工艺所得 rAHP-PLGA 微球在扫描电镜下的照片 ( $\times 400$  倍)

Fig.1 The electron microscope photos of rAHP-PLGA microspheres ( $\times 400$ )

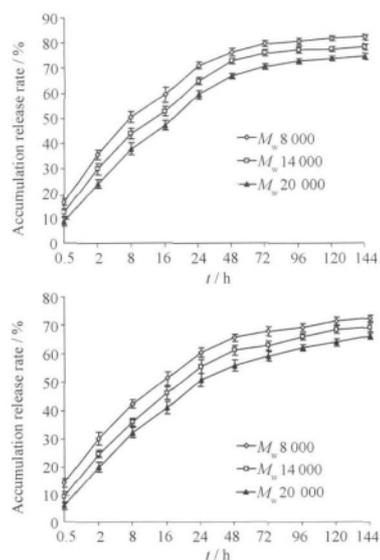


图2 载 rAHP 微球的体外释放情况.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig.2 The *in vitro* drug release of rAHP-PLGA microspheres.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

利用 LA/GA = 50/50、相对分子质量为 8000 的 PLGA 制备的微球释药速度最快,在 2 h 内的累积释药率为 35.6%,24 h 内的累积释药率为 71.2%;而 LA/GA = 75/25、相对分子质量为 20000 的微球释药速度最慢,在 2 h 内的累积释药率为 20.1%,144 h 内的累积释药率为 66.2%。按照《中国药典》对缓释制剂的指导原则要求<sup>[8]</sup>,前者更适用于进一步开发为口服制剂,后者则更适用于进一步开发为注射制剂。本实验为解决多肽药物应用的瓶颈,促进降压肽的临床使用提供了重要的实验基础。

## REFERENCES

- [1] LUSCHER T F, YANG Z. Calcium antagonists and ACE inhibitors effect on endothelium and vascular smooth muscle [J]. *Drugs*, 1993, 46( suppl 2 ): 121-132.
- [2] LIU D, SUN H Y, ZHANG L J, *et al.* High-level expression of milk-derived antihypertensive peptide in *Escherichia coli* and its bio-activity [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55( 13 ): 5109-5112.
- [3] SUN H Y, FANG K W, LIU D, *et al.* The acute antihypertensive effects of recombinant angiotension converting enzyme inhibitory peptides on spontaneously hypertensive rats [J]. *Chin J Hyper* (中华高血压杂志), 2010, 18( 1 ): 91-94.
- [4] LEI L, SUN H Y, LIU D, *et al.* Transport of Val-Leu-Pro-Val-Pro in human intestinal epithelial( Caco-2) cell monolayers [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56( 10 ): 3582-3586.
- [5] HAIYAN S, DONG L, SHIMIN L *et al.* Transepithelial transport characteristics of the antihypertensive peptide, Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro, in human intestinal Caco-2 cell monolayers [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73( 2 ): 293-298.
- [6] FANG K W, SUN H Y, LIU D, *et al.* Stabilities and antihypertension effect of highly expressed anti-hypertensive peptide by genetic engineering [J]. *J Clin Rehabil Tiss Eng Res* (中国组织工程研究与临床康复), 2008, 27( 12 ): 5313-5316.
- [7] WEI G, LU L F, CHEN W, *et al.* Biodegradable microspheres loaded with recombinant human growth hormone. I. Study on preparation and *in vitro* release [J]. *J Chin Med Ind* (中国医药工业杂志), 2006, 37( 10 ): 669-673.
- [8] *Ch. P* (2012) Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010.

( 收稿日期: 2011-12-02)