

# 口服胰岛素聚乳酸纳米粒的研制

陈军<sup>1</sup>, 易以木<sup>2</sup> (1. 南京大学医学院附属鼓楼医院药剂科, 江苏 南京 210008; 2. 华中科技大学同济医学院药剂学教研室, 湖北 武汉 430030)

**摘要:**目的 研制一种新型的口服胰岛素(INS)纳米粒制剂。方法 以溶剂-非溶剂法制备了INS-PLA NP,进行了形态、粒径、包封率、载药量等主要性质的考察。以糖尿病小鼠为动物模型,初步考察了口服INS-PLA NP后的降血糖药效。结果 制得的INS-PLA NP均匀圆整,平均粒径为(84.34±14.76)nm,平均包封率为(65.93±3.45)%,平均载药量为(0.62±0.03)u·mg<sup>-1</sup>。糖尿病小鼠口服50,60,80u·kg<sup>-1</sup>剂量的INS-PLA NP后均表现出显著的降血糖作用。而口服40u·kg<sup>-1</sup>剂量的INS-PLA NP无效。结论 使用PLA NP作INS口服给药的载体具有可行性。

**关键词:**胰岛素;纳米粒;药效学

中图分类号:R977.15;TQ467.32 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2003)04-0263-03

## Study on preparation and pharmacodynamics of oral insulin loaded poly(lactic acid) nanoparticles

CHEN Jun<sup>1</sup>, YI Yi mu<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacy, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University, Nanjing 210008, China; 2. College of Pharmacy, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**ABSTRACT:OBJECTIVE** To develop poly(lactic acid) nanoparticles(PLA NP) for oral administration of insulin(INS). **METHOD** INS contents in PLA NP were determined by UV. INS-PLA NP was prepared by solvent-nonsolvent method. And the major characters were measured. After various doses of INS-PLA NP was intragastrically given to diabetic mice, hypoglycemic effect was observed. **RESULTS** The mean diameter of INS-PLA NP was (84.34±14.76)nm. The encapsulation ratio of insulin to PLA NP reached (65.93±3.45)%, while the loading capacity was (0.62±0.03)u·mg<sup>-1</sup>. Significant decrease of glucose level was achieved in the 50,60 and 80 u·kg<sup>-1</sup> groups. Glucose level was not modified significantly in 40 u·kg<sup>-1</sup> groups. **CONCLUSION** Oral INS-PLA NP was feasible.

**KEY WORDS:** insulin; nanoparticles; pharmacodynamics

胰岛素(Insulin,INS)是治疗糖尿病尤其是1型糖尿病的首选药物之一,通常以皮下注射途径给药,每天需频繁注射3~4次,长期用药,患者痛苦不堪。近年来,改变INS的给药途径业已成为国内外药学界的一个研究热点。口服给药是患者最乐于接受的给药途径,但INS直接口服后的生物利用度几乎为零。使用纳米粒(nanoparticles,NP)作载体,可显著提高INS在胃肠道中的稳定性,改善其口服给药后的吸收,有望应用于临床以方便用药。自20世纪80年代中期开始,国内外药学工作者主要对采用聚氰基丙烯酸酯NP作INS口服给药的载体进行了系统深入的研究,药效学实验已取得了初步满意的效果<sup>[1,2]</sup>。但由于聚氰基丙烯酸酯作为一种常见的医用胶,尚未被批准成为药用辅料,因而使用该材料制备的INS-NP很难在短期内投入实际应用。因此,采用常规药用辅料制备口服INS-NP已成为近几年来一个新兴的研究方向。

聚乳酸(Poly(lactic acid),PLA)是一无毒、可生物降解的聚合物,有很好的生物相容性,已经被FDA批准用作制备微

球、微囊、埋植剂等制剂的辅料,在我国也已被批准作为药用辅料使用。本研究首次采用PLA作材料制备了口服INS-NP,并对其降血糖作用进行了初步考察。

### 1 材料与仪器

胰岛素(徐州生化制药厂,28.0u·mg<sup>-1</sup>,批号991203);聚乳酸(山东省医疗器械研究所,相对分子质量为20000,批号990608);普朗尼克F<sub>68</sub>(美国Sigma公司);葡萄糖酶法血糖测定试剂盒(上海科欣生物技术研究所);N,N-二甲基甲酰胺(分析纯,湖北大学化工厂);其它试剂均为分析纯。

81-2型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器厂);JEM-100CXII型透射电子显微镜(日本电子公司);UV-260型紫外分光光度计(日本岛津);XL-90型超速冷冻离心机(美国Backman公司);800型离心沉淀器(上海手术器械厂);501型超级恒温器(上海第二五金厂)。

昆明种小鼠,♂,18~22g,(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供)。

### 2 实验方法

作者简介:陈军,电话:(025)3304616-66669 E-mail:chenjun75@163.com

## 2.1 INS-PLA-NP 的制备

采用溶剂-非溶剂法制备。精密称取适量 INS 原料药,溶于少量  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸中,用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠调 pH 为 4。将此 INS 溶液加入溶有 PLA 的重蒸丙酮中制成油相。取适量普朗尼克 F<sub>68</sub> 溶于 pH 5.5 的磷酸盐缓冲液中制成水相。将  $0 \sim 2 \text{ }^\circ\text{C}$  的油相加入  $0 \sim 2 \text{ }^\circ\text{C}$  的水相中,所得半透明体系减压蒸发除去丙酮,即得 INS-PLA-NP 胶体溶液。

## 2.2 形态观察和粒径测定

应用 1% 磷酸铝负染色制备样品,用透射电镜拍摄其形态。将电镜照片放大后,测 500 个粒子的直径,统计分析。

## 2.3 包封率和载药量的测定<sup>[3]</sup>

### 2.3.1 标准曲线的制备

精密称取 INS 适量,以 N,N-二甲基甲酰胺- $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸(9:1, v/v) 为溶剂溶解后配成  $29.06 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液,分别吸取 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5 mL 置于 10 mL 量瓶中,加溶剂稀释至刻度,摇匀,即得一系列不同浓度的 INS 溶液。以空白溶剂为参比,于 276 nm 处测定吸光度。将 INS 浓度(C)与吸光度(A)进行线性回归,得回归方程:  $A = 0.03498 + 0.03222C$   $r = 0.9999$

### 2.3.2 回收率的测定

取不含 INS 的空白 PLA-NP 沉淀,加入不同浓度的 INS 溶液,溶解后测定吸光度,根据标准曲线求实测结果,以测得量与加入量的比值计算回收率。共测定高( $12.85 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),中( $8.29 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),低( $4.16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 3 个浓度,每个浓度测定 3 次。平均回收率分别为  $(102.82 \pm 0.74) \%$ ,  $(104.95 \pm 1.27) \%$ ,  $(107.21 \pm 1.81) \%$ 。

### 2.3.3 样品的测定

精密吸取一定体积的 INS-PLA-NP 胶体溶液,加一滴  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸调为酸性,冷冻超速离心( $35000 \text{ rpm}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , 90 min),取沉淀用溶剂溶解后进行包封率和载药量测定。共

表 1 糖尿病小鼠口服 INS-PLA-NP 后的降血糖效果

Tab 1 The hypoglycemic effect after oral administration of INS-PLA-NP for diabetic mice

t (h)	INS-SOL 组	$40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组	$50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组	$60 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组	$80 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
1	$99.01 \pm 7.48$	$96.13 \pm 18.29$	$87.34 \pm 8.90^{1)}$	$80.12 \pm 15.42^{2)}$	$69.60 \pm 15.86^{3)}$
3	$95.27 \pm 9.65$	$96.14 \pm 13.10$	$80.44 \pm 8.44^{2)}$	$64.72 \pm 12.15^{3)}$	$57.27 \pm 15.39^{3)}$
6	$91.62 \pm 10.77$	$79.59 \pm 21.11$	$59.55 \pm 17.84^{3)}$	$52.86 \pm 18.47^{3)}$	$52.64 \pm 13.96^{3)}$

注:与对照组比较( $t$  检验) <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ , <sup>3)</sup>  $P < 0.001$

由实验结果可知,糖尿病小鼠口服  $40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  INS-PLA-NP 后基本无效,而口服  $50, 60, 80 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  3 个剂量后均有显著的降血糖效果,并且随剂量的增加,起效加快,药效增强。3 个有效剂量的降血糖效果都比较和缓,1h 左右起效,之后血糖缓慢下降。见表 1。

## 4 讨论

溶剂-非溶剂法制备纳米粒的机制为:有机相紊流-溶剂扩散混溶-高分子聚集成粒<sup>[4]</sup>。本法具有简单快捷的优点,现已广泛用于制备载有肽类和蛋白质类药物的纳米粒。

本实验利用紫外分光光度法<sup>[3]</sup>进行含量测定,操作简便,易于开展,结果可靠,尤其适用于 INS-PLA-NP 研制初期

测定 3 批样品,计算平均值。

## 2.4 血糖值的测定

采用经典的葡萄糖氧化酶法测定。将 0.1% 苯酚溶液与等量的酶试剂混合成酶工作液。血清  $20 \mu\text{L}$  为样品管,蒸馏水  $20 \mu\text{L}$  为空白管,标准葡萄糖液( $5.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $20 \mu\text{L}$  为标准管。各加酶工作液 3 mL,混合均匀后于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴保温 20 min。以空白管校正零点,于 505 nm 处用比色法分别测定标准管与样品管的吸光度,并计算血糖值。

## 2.5 糖尿病小鼠模型的建立

将健康  $\delta$  小鼠按  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量腹腔注射四氧嘧啶生理盐水溶液,给药 5 d 后,即成糖尿病动物模型。

## 2.6 初步药效学研究

将成型小鼠随机分为 5 组,每组 8 只,分别给予  $80 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 INS 溶液(INS-SOL)及不同剂量( $40, 50, 60, 80 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 的 INS-PLA-NP。实验前禁食 3 h,灌胃给药,并于给药前及给药后 1, 3, 6 h 从小鼠眼静脉丛中取血约  $0.2 \text{ mL}$ ,  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,取血清  $20 \mu\text{L}$ ,测定血糖。计算相对于 0h 血糖的百分比,实验组与 INS-SOL 对照组采用  $t$  检验进行比较。

## 3 结果

### 3.1 形态观察与粒径测定

制得的 INS-PLA-NP 外观为乳白色的胶体溶液。透射电镜照片显示,本研究中制备的 INS-PLA-NP 基本呈较圆整的球形,且大小均匀,粒径分布窄。测得的 INS-PLA-NP 的平均粒径为  $(84.34 \pm 14.76) \text{ nm}$ 。其中粒径处于 70 - 90 nm 范围内的 NP 占 72.93%。

### 3.2 包封率与载药量的测定

平均包封率为  $(65.93 \pm 3.45) \%$ ,平均载药量为  $(0.62 \pm 0.03) \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

### 3.3 药效学实验结果

反复大量地进行含量测定的需要。由于制得的 INS-PLA-NP 胶体溶液 pH 值在 5 ~ 5.5 之间,游离的 INS 在此条件下几乎不溶,因此在测定前需预先将所吸取的溶液调为酸性以使其充分溶解,否则定量结果会偏高。

药效学实验结果显示糖尿病小鼠口服 INS-PLA-NP 后降血糖作用较和缓。由于本实验制得的 INS-PLA-NP 中的 INS 大部分位于 PLA-NP 的表面或近表面部位,释药较迅速<sup>[5]</sup>,故 INS-PLA-NP 自身的缓释性并非是造成这一实验现象的主要原因。这一实验现象可能与本研究中制备的 INS-PLA-NP 表面有非离子表面活性剂普朗尼克 F<sub>68</sub>(即泊洛沙姆 188) 吸附有很大关系。有报道<sup>[6]</sup>指出,该类表面活性剂

可以疏水性的聚氧丙烯基团吸附于同样是疏水性的 NP 表面,而将两条亲水性的聚氧乙烯链伸入水性介质中,从而改善了 NP 表面的亲水性。因此该类表面活性剂修饰的 NP 很容易黏附于小肠的黏液中,而小肠黏液又是 NP 口服吸收前的主要聚集地<sup>[7]</sup>。因此,INS-PLA-NP 口服后的吸收速度变慢,降血糖作用趋于和缓。

选用糖尿病小鼠作实验动物具有成本低、造模成型率高的优点,已被多个 INS 制剂的药效学研究所采用<sup>[8,9]</sup>。但由于小鼠血样收集次数有限,加之血糖不能长时间保持稳定,故更长时间的降血糖效果未能进一步观察。

本实验初步证明了糖尿病动物口服 INS-PLA-NP 后可产生良好的降血糖效果,并找到了最低有效剂量,为口服 INS-PLA-NP 的进一步研究奠定了坚实的基础。

## 参考文献

- [1] 张强,丁继军,魏树礼.口服胰岛素毫微球的特性及降血糖作用[J].北京医科大学学报,1998,30(3):239.
- [2] Damge C, Vranckx H, Balschmidt P, *et al.* Poly(alkyl cyanoacrylate) nanoparticles for oral administration of insulin[J]. J Pharm Sci, 1997,86(12):1403.

- [3] 陈军,易以木.紫外分光光度法测定胰岛素聚乳酸纳米粒中胰岛素的含量[J].广东药学院学报,2001,17(4):281.
- [4] Allemann E, Gurny R, Doelker E. Drug-loaded nanoparticles-preparation methods and drug targeting tissues[J]. Eur J Pharm Biopharm, 1993, 39(5):173.
- [5] 陈军,易以木,杨希雄,等.胰岛素聚乳酸纳米粒的初步研究[J].华西药理学杂志,2002,17(4):272.
- [6] Pimienta C, Chouinard F, Labib A, *et al.* Effect of various Poloxamer coatings on *in vitro* adhesion of isohexylcyanoacrylate nanospheres to rat ileal segments under liquid flow[J]. Int J Pharm, 1992,80:1.
- [7] Jani PU, McCarthy DE, Florence AT. Nanosphere and microsphere uptake via Peyer's patches: observation of the rate of uptake in the rat after a single oral dose[J]. Int J Pharm, 1992, 86:239.
- [8] 吴琼珠,平其能,刘国华.小鼠口服胰岛素复乳后降血糖效果的实验研究[J].中国医药工业杂志,1990,21(10):445.
- [9] 卞生杰,赵会英,丁平田,等.胰岛素传递体经小鼠和家兔活体透皮吸收的初步评价[J].沈阳药科大学学报,2000,17(5):324.

收稿日期:2001-11-14