

胰岛素聚酯微粒的制备及大鼠体内药效学研究

马利敏¹, 张 强^{2*}, 李玉珍¹, 顾忠伟³

(1. 北京医科大学人民医院药剂科, 北京 100044; 2. 北京医科大学药学院药剂研究室, 北京 100083;
3. 国家计划生育委员会科学技术研究所, 北京 100081)

摘要: 目的 探讨利用一种新型聚酯材料— ϵ -己内酯-*D, L*-丙交酯嵌段共聚物(PCLA)制备微粒型药物载体的可能性。方法 通过双乳化溶剂蒸发技术制备 ϵ -己内酯-*D, L*-丙交酯嵌段共聚物微粒(PCLA-MP), 用扫描电镜观察其形态, 粒径分析仪 (particle analyser) 测定粒径; 以胰岛素(INS)为模型药物, 制备胰岛素聚酯微粒(INS-PCLA-MP); 建立了测定 INS 包封率的 HPLC 方法; INS 抗体捕捉实验考察 PCLA-MP 载药机理; 以 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液为介质, 探讨 INS-PCLA-MP 体外释药特性; 建立了药物致大鼠糖尿病模型, 通过葡萄糖氧化酶法(GOD-PAP)测定血糖值来评价 INS-PCLA-MP 经皮下给药后的降血糖作用; 以 INS-SOL 为对照, 计算药理相对生物利用度。结果 制备的微粒大小均匀, 表面光滑圆整, 平均粒径 1.9 μm ; INS 的包封率为 76.46%; 抗体捕捉实验证实, 被包封的 INS 中只有小部分(18.25%)分布在 MP 的表面; INS-PCLA-MP 的体外释放曲线包括突释相及随后的缓慢释放相; 药效学研究表明, 12 $\text{u}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 INS-PCLA-MP 经糖尿病大鼠皮下给药后具有明显的降血糖作用, 药理相对生物利用度为 132.95%。结论 PCLA 嵌段共聚物作为药物输送系统的载体材料有着良好的前景, PCLA-MP 有可能成为一种新型的药物载体。

关键词: ϵ -己内酯-*D, L*-丙交酯嵌段共聚物; 微粒; 胰岛素; 降血糖作用

中图分类号: TQ460.6; R965.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2000)11-0850-04

近年来, 生物降解聚合物材料作为药物载体被应用于多种药物输送系统(包括微粒和纳米粒), 包括生物活性药物(如多肽、蛋白、抗原等)和非生物活性药物^[1,2], 其中生物降解的聚酯微粒受到了广泛的重视, 主要因为聚酯高分子材料有很好的生物相容性, 在体内可降解为非毒性的单体; 某些易受 pH 值影响或易被酶降解的药物(如蛋白)被包裹在微粒中, 经口服给药后能起到很好的保护作用; 被包裹药物的释放速率可通过改变聚酯材料的分子量及单聚物的比例得到较好控制。聚酯高分子材料多为合成的化合物, 如聚乳酸(PLA)、聚己内酯(PCL)、聚乙醇酸(PGA)及各聚合单体的开环共聚物。

生物降解聚酯微粒的制备方法包括乳化蒸发法、界面缩聚法、盐析法及喷雾干燥法等。但对于多肽及蛋白等生物活性药物, 特别是对于水溶性多肽和蛋白, 由于制备方法的不同, 药物活性的保持及包封率存在很大的差异。

本文用一种新型的嵌段聚酯高分子化合物(ϵ -己内酯-*D, L*-丙交酯嵌段共聚物)(poly [ϵ -caprolactone-block-*D, L*-lactide), PCLA] 为载体材料, 用全新的超声双乳化溶剂蒸发方法制备聚酯微粒药物输送系统, 并选择了亲水性的多肽类药物胰岛素(insulin, INS)为模型药物, 制备了胰岛素嵌段聚酯共聚物微粒(INS-PCLA-MP), 测定了粒径及包封率, 研究了胰岛素聚酯纳米粒的体外释药特性及对糖尿病大鼠皮下给药后的降血糖作用, 对其作为药物载体输送系统进行了初步的评价。

实验部分

1 材料与仪器

INS 原料(26.3 $\text{u}\cdot\text{mg}^{-1}$, 徐州生化厂); ϵ -己内酯-*D, L*-丙交酯嵌段共聚物(PCLA, 85/15, $\overline{M}_n = 10\,000$, $[\eta] = 0.35$, 国家计划生育委员会科学技术研究所提供); 聚乙烯醇(PVA17-88, 购自北京有机化工厂); 血糖测定试剂盒(北京, 中生生物技术公司); ¹²⁵I-胰岛素放免分析药盒(北京, 中国原子能科学研究院); 乙腈(HPLC级, USA); 其他试剂均为分析纯。

Spectra System P1000 型 HPLC 系统(美国 TSP

收稿日期: 2000-01-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(59833140)

作者简介: 马利敏, 男, 硕士研究生。

张 强, 男, 教授, 博士生导师。

* 联系人 Tel: (010) 62091717, Fax: (010) 62015584,

E-mail: zqdodo@mail.bjmu.edu.cn

公司)及 WDL-95 色谱工作站(大连化物所); C_{18} 反相柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m, 大连伊利特公司);XL-90 超速离心机(Beckman, USA);粒径分析仪(Submicron Particle Sizer Model 370, Santa Barbara, California, USA);S-450 扫描电子显微镜(日本日立);SN-695BY 计数器(上海核工业研究院);TH2-881 型多用途台式振荡器(江苏太苍鹿合电讯器材厂);721 分光光度计(上海分析仪器厂)。

Wistar 大鼠, δ , (250 \pm 50) g, 北京医科大学实验动物中心提供。

2 INS-PCLA-MP 的制备

采用超声双乳化溶剂蒸发法制备微粒^[3,4]。PCLA 200 mg 溶于二氯甲烷 1.0 mL 中,加入 15.62 mg \cdot mL⁻¹ INS 溶液(0.01 mol \cdot L⁻¹ 稀盐酸溶液配制) 0.1 mL, 超声乳化 60 s, 再加入 5.0% PVA 水溶液 2.0 mL, 1 000 r \cdot min⁻¹ 搅拌 60 s, 将制得的复乳转移至 pH 5.0 的蒸馏水 50 mL 中, 于 300 r \cdot min⁻¹ 搅拌至二氯甲烷蒸发完全, 得到乳白色混悬液, 定容后, 于 10 000 r \cdot min⁻¹ 离心 30 min, 收集上清液用以测定包封率, 沉淀自然干燥后, 即得 INS-PCLA-MP。

3 INS-PCLA-MP 的粒径测定和表面形态观察

取少量干燥的微粒粉末用水稀释后, 粒径分析仪测定平均粒径及粒径分布;扫描电子显微镜观察微粒的表面形态。

4 包封率的测定

反相高效液相色谱法, 流动相为 0.1 mol \cdot L⁻¹ NaH₂PO₄-0.05 mol \cdot L⁻¹ Na₂SO₄-乙腈(36:36:28), 磷酸调至 pH 2.0, 检测波长 214 nm, 流速 1.0 mL \cdot min⁻¹, 取定容后的离心上清液 20 μ L 进样, 测定 INS 浓度为 X' , 加入的 INS 总浓度为 X'' , 按下式计算包封率:

$$\text{包封率}(\%) = [(X'' - X') / X''] \times 100\%$$

5 MP 的载药机理

设计抗体捕捉实验, 即 INS-PCLA-MP 表面吸附的 INS 可以被 INS 抗体捕捉到, 通过放射免疫法(radioimmunoassay, RIA)可测定吸附的 INS 的量, 从而可以得到吸附的 INS 占总包封 INS 的百分含量, 确定被包封的 INS 以何种主要形式存在, 是吸附还是包裹。

6 体外释药测定

经离心后的 INS-PCLA-MP 沉淀适量, 加入 pH 7.4 的 PBS 缓冲液 20.0 mL 再分散, 于 37 $^{\circ}$ C, 60 r \cdot min⁻¹ 恒温振荡, 不同时间点取样 1.0 mL, 并补加

新鲜的 PBS 液 1.0 mL, 样品经 10 000 r \cdot min⁻¹ 离心 30 min 后, 按测定包封率方法测定 INS 浓度, 计算累计溶出百分率。

7 血糖值测定

采用葡萄糖氧化酶(GOD-PAP)法, 血清 10 μ L 为样品管, 蒸馏水 10 μ L 为空白管, 标准葡萄糖液(1 mg \cdot mL⁻¹) 为标准管, 各加缓冲液 1.8 mL, 酶试剂 0.2 mL, 混合均匀后于 37 $^{\circ}$ C 保温 10~15 min, 505 nm 处比色法测定血糖值。

8 INS-PCLA-MP 对糖尿病大鼠降血糖作用

Wistar 大鼠, δ , (250 \pm 50) g, sc 四氧嘧啶液 200 mg \cdot kg⁻¹, 给药前禁食 12 h, 3 d 后尿糖试纸测定, 显棕色为糖尿病大鼠, 随机分组, 每组 5~6 只, 分别 sc 胰岛素溶液(INS-SOL) 12 u \cdot kg⁻¹ 和 INS-PCLA-MP 12 u \cdot kg⁻¹ 以及对照组空白 PCLA-MP 100 mg \cdot kg⁻¹, 于不同时间点尾尖取血 0.2 mL, 6 000 r \cdot min⁻¹ 离心 10 min, 取血清 10 μ L, 按血糖测定的方法测定血糖值。

统计方法 两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异, $P < 0.01$ 有极显著差异。

结 果

1 INS-PCLA-MP 的粒径测定和表面形态观察

超声双乳化溶剂蒸发法制备的 INS-PCLA-MP 平均粒径为 1.9 μ m, 干燥的 MP 为松散的粉末。扫描电镜照片可见, INS-PCLA-MP 呈园整的球形, 大小均匀, 单个 MP 观察, 微粒表面光滑致密, 无可见的孔洞。

2 包封率测定

实验表明, 在 4.85~96.90 μ g \cdot mL⁻¹, INS 浓度(C) 与其峰面积(A) 间线性关系良好, 标准曲线为 $A = 47.6084C - 0.04699$, $r = 0.9997$, INS 的 3 个浓度 9.69, 24.20 和 72.70 μ g \cdot mL⁻¹ 的回收率分别为 99.92%, 99.97% 和 100.78%, RSD 分别为 0.76%, 0.93% 和 0.21%。3 批样品平均包封率测定结果为 76.46%。

3 MP 载药机理

INS-PCLA-MP 适量, 用水稀释至适当浓度, 照 RIA 方法测定沉淀的 γ 计数, 计算 INS 浓度, 即为存在于 MP 表面的 INS 量, 从而可算出 INS-PCLA-MP 表面存在的 INS 占总的微粒所包封 INS 的分数, 以此为基础测定 3 批, 结果平均值为 18.25%, 由此可见, INS 大部分(约 81.75%) 被包埋在 MP 内部, PCLA-MP 则主要以包裹的形式载药。

4 INS-PCLA-MP 体外释药特性

HPLC 测定释放结果绘制累计释药曲线(图1),从曲线上可看出 INS-PCLA-MP 具有明显的“突释效应”(burst effect)(2 h 左右),随后进入慢释放期,24 h 的累计释放量为 58.67%。“突释效应”的产生可能是由于微粒表面吸附的 INS 被快速释放;同时,超声再分散过程中会有少量 INS 透过细小孔洞进入释放介质。而后期的缓慢释药则决定于水渗入微粒的快慢、形成的孔洞的大小及载体材料 PCLA 的降解,有关研究认为,类似的聚酯材料在体外降解需数周甚至数月的时间^[5]。

5 血糖值的测定

GOD-PAP 法测定结果表明,浓度在 0.5 ~ 4 mg·mL⁻¹,吸光度值(A)与葡萄糖浓度(C)间呈良好的线性关系,标准曲线方程为: $A = 0.004033 C - 0.05027$, $r = 0.9995$,血糖的 3 个浓度 0.50, 2.01 和 4.02 mg·mL⁻¹ 的回收率分别为 91.68%, 104.34% 和 100.84%, 5 次测定的 RSD 分别为 0.51%, 1.72% 和 1.13%。

6 INS-PCLA-MP 对糖尿病大鼠降血糖作用

结果表明,与对照组 100 mg·kg⁻¹ 空白 PCLA-

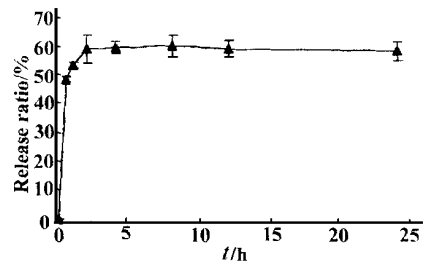


Fig 1 *In vitro* release profile of insulin from poly(ε-caprolactone-block-D,L-lactide) microparticle encapsulated insulin (n = 3)

MP 相比,糖尿病大鼠 sc 12 u·kg⁻¹ 的 INS-SOL 和 INS-PCLA-MP,均呈现显著的降血糖作用(表1)。用梯形法计算血糖下降百分率-时间曲线上面积(area above the curve, AAC)来评价 INS-PCLA-MP 的药理相对生物利用度(pharmacological bioavailability, PBA),以 sc 12 u·kg⁻¹ 的 INS-SOL 的 AAC_{INS-SOL} 作为对照,INS-PCLA-MP 的 AAC_{INS-PCLA-MP} 与其相比得到 PBA 值为 123.08%。结果表明,INS 被包裹在微粒内部,可明显提高其药理相对生物利用度,且具有一定的长效作用。

Tab 1 Blood glucose changes after subcutaneous administrations of 12 u·kg⁻¹ INS-PCLA-MP and 12 u·kg⁻¹ INS-SOL to diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, n = 5)

Condition	Change of blood glucose level / %						
	0 h	0.5 h	1.0 h	2.0 h	4.0 h	8.0 h	12.0 h
Control	100	100 ± 4	97 ± 6	101 ± 6	101 ± 9	98 ± 5	101 ± 6
INS-SOL	100	77 ± 9**	60 ± 11**	29 ± 4**	34 ± 16**	79 ± 13**	100 ± 8
INS-PCLA-MP	100	70 ± 11**	47 ± 7**	26 ± 8**	10.9 ± 2.6**	75 ± 12**	100 ± 4

Control: 100 mg·kg⁻¹ PCLA-MP without insulin; Blood glucose level at 0 h was 100%. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs control

讨 论

本实验选择生物相容性和生物降解性较好的 ε-己内酯-D,L-丙交酯嵌段共聚物为载体材料,采用超声双乳化溶剂蒸发法制备了粒径较小、大小均匀、表面光滑圆整的微粒,并对亲水性多肽药物-胰岛素进行了载药研究,结果制得了包封率较高(> 75%)的 INS-PCLA-MP,并根据 INS 抗体抗原竞争抑制实验,应用 RIA 方法测定了微粒表面存在的 INS 的量,从而确定了 PCLA-MP 主要以包裹形式载药的机理。

采用 HPLC 方法测定包封率及体外释放,专属性强、简便、灵敏度高。GOD-PAP 法测定血糖值,同样具有线性范围宽、灵敏度高、方便等特点。

从释放曲线可看到明显的“突释效应”,这可能是由于 INS 具有很强的亲水性,而微粒表面包裹的 PVA 同样具有亲水性,当释放介质从分布于微粒表面的细小孔洞渗入到内部后,INS-PCLA-MP 微粒表面及孔洞中的 INS 被快速释放,形成“突释效应”即快速释放期。随后到来的缓慢释放期,是由于微粒内部结构逐渐变得紧密,释放介质的渗入受阻;同时,由于此聚酯材料的体外降解速度非常缓慢,都会造成 INS 很缓慢地被释放出来^[6,7],由此可见,如何通过提高 PCLA 的亲水性,以增加其对亲水性药物的亲和性,以及通过改变单体的比例来提高材料的降解速度,是改善微粒“突释效应”的关键。

INS-PCLA-MP 的体内降血糖作用明确,降血糖持续时间达 8 h 以上,药理生物利用度为

132.95%。INS-PCLA-MP 提高 INS 的药理生物利用度,主要是由于 INS 被包裹在微粒内部,可以减少体液中酶的降解;另外,相比 INS-SOL 而言,INS-PCLA-MP 可以较缓慢地释放 INS 进入体液,具有一定的缓释作用。但如何减少“突释效应”,使 INS-PCLA-MP 降血糖时间进一步延长,有待进一步研究。

本文的研究结果为今后研制具有一定亲酯和亲水性聚酯嵌段共聚物材料奠定了一定的基础。

REFERENCES:

- [1] Raouf G, Johan C. Biological activity of lysozyme after entrapment in poly(*D, L*-lactide-co-glycolide)-microspheres [J]. *Pharm Res*, 1997, **14**(11): 1556 - 1565.
- [2] Megee JP, Davis SS, Derek J. Zero order release of protein from poly(*D, L*-lactide-co-glycolide) microparticles prepared using a modified phase separation technique [J]. *J Controlled Release*, 1994, **34**(1): 77 - 86.
- [3] Herrmann J, Bodmeier R. Somatostatin containing biodegradable microspheres prepared by a modified solvent evaporation method based on W/O/W multiple emulsions [J]. *Int J Pharm*, 1995, **126**(2): 129 - 138.
- [4] Schugens C, Laruelle N, Nihant N, *et al.* Effect of the emulsion stability on the morphology and porosity of semicrystalline poly *L*-lactide microparticles prepared by W/O/W double emulsion-evaporation [J]. *J Controlled Release*, 1994, **32**(2): 161 - 176.
- [5] Wang ZY, Liao GT. Degradability and toxicity of nanoparticle's carrier materials *in vivo* and *in vitro* [J]. *Chin Pharm J* (in Chinese), 1999, **34**(2): 1 - 7.
- [6] Courreur P, Puisieux F. Nano and microparticles for the delivery of polypeptides and proteins [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1993, **10**(2): 141 - 162.
- [7] Yan CH, Resau JH, Hewtson J, *et al.* Characterization and morphological analysis of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles prepared by water-in-oil-in-water emulsion technique [J]. *J Controlled Release*, 1994, **32**(3): 231 - 241.

STUDY ON PREPARATION AND PHARMACODYNAMICS OF INSULIN LOADED POLYESTER MICROPARTICLES

MA Lit min¹, ZHANG Qiang², LI Yur-zheng¹, GU Zhong-wei³

(1. Department of Pharmacy, People's Hospital of Beijing Medical University, Beijing 100044, China;

2. Department of Pharmaceutics, Beijing Medical University, Beijing 100083, China;

3. National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the possibility of using poly(ϵ -caprolactone-block-*D, L*-lactide) (PLCA) as a kind of materials to prepare the microparticles drug carrier. **METHODS** PCLA-MP (microparticle, MP) was prepared by double-emulsification solvent evaporation method. Its morphology was examined by scanning electron microscope. Its size diameter was examined by particle analyser. Insulin (INS), as a model drug, was then encapsulated into PCLA-MP (INS-PCLA-MP). HPLC method was established for determining INS in INS-PCLA-MP. An "antibody-capture" procedure was devised for investigating encapsulation mechanism. The *in vitro* release behaviour of INS-PCLA-MP was determined in phosphatic buffer solution (pH 7.4). The diabetic rat model was established and blood glucose levels were measured using glucose oxidase (GOD-PAP) method to evaluate the hypoglycaemic effects after subcutaneous administration of INS-PCLA-MP. The pharmacological bioavailability (PBA) of INS-PCLA-MP was calculated from the area above the curve (AAC) in contrast with INS-solution. **RESULTS** The mean diameter of INS-PCLA-MP was 1.9 μm , while the encapsulation ratio of INS reached to 76.46%. Only 18.25% encapsulated INS was on the surface of the microparticles, it could be measured by "antibody-capture" experiment. The *in vitro* release curve of INS-PCLA-MP consists of initial rapid release stage followed by slower exponential stage. In pharmacodynamic studies, after subcutaneous administration of INS-PCLA-MP $12 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$, the hypoglycaemic effect was significant. The PBA of INS-PCLA-MP was 123.08%. **CONCLUSION** PCLA might become a new drug carrier material in the future.

KEY WORDS: poly(ϵ -caprolactone-block-*D, L*-lactide); microparticles; insulin; hypoglycaemic effect