

胰岛素乳酸/羟基乙酸共聚物纳米粒的制备及口服药效学研究

潘妍*, 徐晖, 赵会英, 魏刚, 郑俊民

(沈阳药科大学药剂教研室, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 探索可生物降解乳酸/羟基乙酸共聚物[poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA]纳米粒作为大分子蛋白质类口服给药系统的可能性。方法 用复乳溶剂挥发法制备了胰岛素乳酸/羟基乙酸共聚物纳米粒(INS-PLGA-NPs);光子相关光谱法测定了平均粒径;HPLC法测定了胰岛素的包封率;放射免疫法研究了纳米粒的载药方式;考察了INS-PLGA-NPs的体外释放特性;评价了口服给予纳米粒对糖尿病大鼠降血糖作用。结果 以1% poloxamer 188为乳化剂制备的纳米粒,平均粒径为149.6 nm,多分散度为0.09,包封率为42.8%;同时抗体捕捉实验发现纳米粒主要以吸附方式载药;胰岛素的体外释放分为两相;以 $10 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量给予该纳米粒,4 h后血糖浓度显著降低($P < 0.05$),10 h血糖降至最低,药理相对生物利用度(10.3 ± 0.8)%。结论 PLGA-NPs可能成为大分子蛋白质药物口服给药的新型载体。

关键词: 胰岛素; 乳酸/羟基乙酸共聚物; 纳米粒; *po* 给药; 药效学

中图分类号: R943.44; R945.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2002)05-0374-04

自1922年Banting等^[1,2]发现胰岛素以来,研制生物利用度高的非注射给药制剂一直是科研工作者面临的严峻挑战。当前,为保证糖尿病患者维持正常的血糖水平仍需频繁注射胰岛素,给病人带来极大痛苦,迫切需要一种顺应性好的给药剂型。为提高口服生物活性蛋白类药物的生物利用度,许多药学工作者采取了不同的方法,如加入吸收促进剂,加入蛋白酶抑制剂,包肠溶衣或制成聚合物微球等已获得了不同程度的成功,但仍存在各种困难。胰岛素纳米粒的研究,国外已有鼻腔及肺部给药制剂^[3,4],但用PLGA作为载体制备胰岛素口服纳米粒报道较少,且国内外报道的制备方法^[5]中大多用PVA为乳化剂,本文选用poloxamer 188为乳化剂制备了该聚合物纳米粒,对体外释药特性和载药方式进行了研究;并初步考察了INS-PLGA-NPs的口服给药药效学。

材料与 方法

材料与试剂 胰岛素原料(INS, $27.6 \text{ u} \cdot \text{mg}^{-1}$,

徐州生化制药厂); PLGA (50/50, $M_n = 11 \text{ ku}$, Alkermes, Inc. Ohio, USA); 聚乙烯醇(PVA41-55, Wako Pure Chemical Industry, Japan); poloxamer 188 (BASF Corporation, USA); 血糖试剂盒(北京北化抗泰临床试剂有限公司); ¹²⁵I-INS 免疫分析试剂盒(北京,中国原子能科学研究院); 乙腈(色谱纯,山东禹王试剂厂); 四氧嘧啶(Sigma, USA); 其他试剂均为分析纯。

仪器 高效液相色谱仪(日本岛津LC-10A); Hitachi-低温超速离心机(Kaki Co., Ltd., Japan); 粒度分析仪(Zetasizer 3000, Malvern Instruments Ltd. UL, England); FJ-2021 放射免疫计数器(西安国营二六二厂); ZS501-A型恒温磁力振荡仪(沈阳博大科学仪器有限公司)。

实验动物 ♂ Wistar 大鼠(250 ± 30) g, 沈阳药科大学实验动物中心。

INS-PLGA-NPs的制备 参照文献^[5]用复乳溶剂挥发法制备PLGA纳米粒。复乳制备时分别用3.5% PVA和1% poloxamer 188为乳化剂并分别进行粒度测定,用减压旋转蒸发挥发有机溶剂,制得带有乳光的胶体溶液再经低温超速离心(10°C , $40\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 30 min),沉淀即为PLGA纳米粒。

INS-PLGA-NPs的粒度测定 取INS-PLGA-NPs胶体溶液适量,光子相关光谱法(photo correlation spectrometry)测定纳米粒的平均粒径及粒度分布。

胰岛素 PLGA 纳米粒包封率的测定及影响因

收稿日期: 2001-07-19.

作者简介: 潘妍(1977-),女,硕士研究生;

郑俊民(1929-),男,教授,博士生导师.

* Tel: (024) 23843711 - 3661, Fax: (024) 23883595,

E-mail: chryms@163.net

素的考察 测定离心后上清液中胰岛素的浓度为 C' , 未经包封时胰岛素的总浓度是 C , 以下式计算包封率 X : $X(\%) = (C - C') / C \times 100\%$ 。上清液中胰岛素的浓度采用高效液相色谱法测定^[5]。色谱条件: 流动相为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4 - 0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$ -乙腈(35:35:30), 用磷酸调至 pH 2.5, 检测波长 214 nm, 流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $20 \mu\text{L}$ 。在此条件下辅料对胰岛素的测定无干扰, 胰岛素的浓度在 $2.3 \sim 52.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性关系良好 ($r = 0.9996$, $n = 6$), 日内差 $< 1\%$, 日间差 $< 3\%$, 胰岛素的 3 个浓度 4.6, 32.2 和 $48.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的回收率分别为 98.97%, 99.65% 和 100.53%, RSD 分别为 0.64%, 0.73% 和 0.35%。

本文主要考察了乳化剂的种类、浓度、PLGA 的用量、胰岛素的浓度和内水相 pH, 内水相中是否加入 PVA 及溶剂挥发方法对包封率的影响。

纳米粒载药方式的研究 按文献方法^[5], 根据抗原-抗体特异性反应原理, 表面吸附的胰岛素可以被胰岛素抗体捕获, 通过放射免疫法记录抗原-抗体复合物的放射性计数, 从而确定该纳米粒的载药方式。

体外释药特性的研究 INS 纳米胶体溶液经超速离心后, 分散于一定体积 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中, 于 37°C , $50 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$ 恒温振荡, 不同时间点取样, 样品经 $40\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 测定上清液中胰岛素的含量。

糖尿病大鼠模型的建立 取健康 δ Wistar 大鼠, 给药前禁食 24 h, 可自由饮水, 于尾 iv 四氧嘧啶溶液 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 48 h 后眼眶采血, 按葡萄糖氧化酶法测定血糖值, 以血糖浓度在 $1.39 \sim 19.4 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为高血糖大鼠^[6]。

糖尿病大鼠口服胰岛素纳米粒降血糖作用 取糖尿病大鼠, 随机分为 5 组(各组大鼠血糖值差别不得超过 $\pm 6 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。分别 sc 胰岛素溶液 $1 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$, po 胰岛素溶液 $10 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$, po 空白纳米粒胶体溶液 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, po 胰岛素纳米胶体溶液 $10 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。于不同时间点, 眼眶取血 0.5 mL , 离心分离血清, 按葡萄糖氧化酶法测定血糖值。

统计方法 各组之间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 有显著性差异, $P < 0.01$ 非常显著性差异。

结 果

1 胰岛素纳米粒平均粒径的测定

图 1 是选用不同的乳化剂制备胰岛素纳米粒的粒径分布图。用 3.5% PVA 为乳化剂, 平均粒径为 260.9 nm, 多分散度 (polydispersity index) 为 0.15, 而用 1% poloxamer 188 为乳化剂, 平均粒径为 149.6 nm, 多分散度为 0.09, 后者粒度分布较均匀。

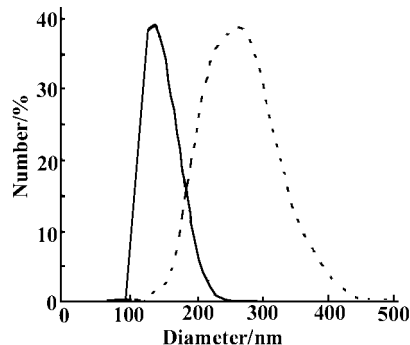


Figure 1 Size distribution of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles: (---) 3.5% polyvinyl alcohol (PVA) and (—) 1% poloxamer 188 used as emulsifier

2 不同因素对包封率的影响

对影响包封率的因素考察中发现, 制备中用减压旋转蒸发与磁力搅拌挥发有机溶剂相比, 提高了包封率, 内水相中含 0.5% PVA 可提高 INS 的包封率。因而在减压蒸发且内水相中加入 0.5% PVA 的条件下, 对影响包封率的其他各因素进行了考察, 结果见表 1。由表 1 可知, 当乳化剂的浓度较高, PLGA 用量较少, 胰岛素的浓度较低, 胰岛素溶液的 pH 值接近等电点 ($pI = 5.3$) 时包封率较高。经过各条件的筛选得该纳米粒最优化处方中胰岛素的包封率为 $(42.8 \pm 1.5)\%$ 。

3 纳米粒的载药方式

抗体捕获实验对纳米粒载药方式的研究发现, 纳米粒吸附载药占有较大的比例。以 1% poloxamer 188 为乳化剂制备的纳米粒, 粒径为 149.6 nm, 吸附载药约占 56.5%, 而用 3.5% PVA 制备的纳米粒, 粒径为 260.9 nm, 吸附载药约占 48.6%。

4 体外释药特性的考察

图 2 是以 1% poloxamer 188 为乳化剂制备的 INS-PLGA NPs 的体外释放曲线。该纳米粒体外释放存在两相, 前 5 h 处于快速释放期, 胰岛素在此阶段累积释放量达 39.8%, 此后进入缓慢释放期, 16 h 末累积释放量接近 43.9%。由胰岛素包封率为 42.8% 推算, 该纳米粒体外释放在快速释放期释放量占制备过程中投入胰岛素总量的 17.0%, 随后的

缓慢释放期 16 h 释放量只相当于制备过程中投入总量的 19% 左右。调整制剂处方及制备工艺可能进一步优化该纳米粒的体外释放特性。

Table 1 Effects of various factors on the entrapment efficiency of insulin loaded PLGA nanoparticles prepared by adding 0.5% PVA to the internal water phase during emulsification procedure and using a vacuum rotating evaporator to evaporate ethyl acetate ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

Poloxamer 188 / %	$C_{PLGA} / \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$C_{INS} / \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	pH (INS solution)	Entrapment efficiency / %
0.4	50	3.048	6	19 ± 4
0.7	50	3.048	6	30.4 ± 2.1
1.0	50	3.048	6	42.8 ± 1.5
1.0	60	3.048	6	38.6 ± 0.9
1.0	70	3.048	6	30 ± 3
1.0	50	5.024	6	32.3 ± 2.0
1.0	50	7.214	6	19.6 ± 0.9
1.0	50	3.048	2	20.1 ± 2.3
1.0	50	3.048	9	34.5 ± 0.9

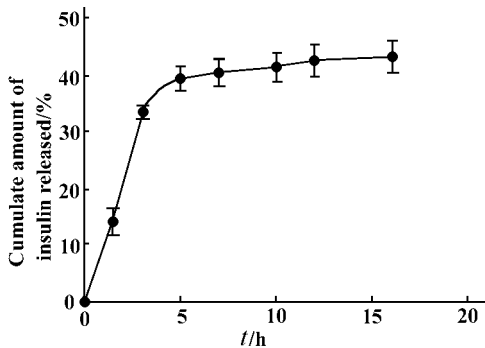


Figure 2 Release profile of insulin-loaded PLGA nanoparticles *in vitro* at pH 7.4 phosphate buffer solution ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

5 糖尿病大鼠体内药效学

图 3 是用 poloxamer 188 为乳化剂制备的 PLGA 纳米粒口服给药后血糖水平曲线。由图可知,口服胰岛素纳米粒胶体溶液组与饥饿空白对照组、口服溶液组及空白纳米粒胶体溶液组相比,具有明显的降血糖效果。给药后 4 h,血糖值显著降低,10 h 血糖降到最低,随后血糖值逐渐上升。梯形法计算曲线上面积得口服 $10 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的 INS-PLGA NPs 相对于 sc 给药药理相对生物利用度为 $(10.3 \pm 0.8) \%$ 。

以上结果表明:用复乳-溶剂挥发法制备了 INS-PLGA NPs,构成该纳米粒的载体生物相容性好且毒性低。以 poloxamer 188 为乳化剂可得到粒径较小、

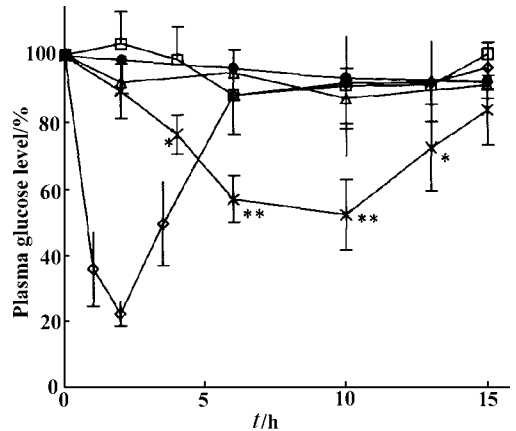


Figure 3 Profiles of plasma glucose level changes in diabetic rats after oral administration of insulin-loaded PLGA nanoparticles of $10 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$ NPs ($\times - \times$), blank NPs ($\triangle - \triangle$) and oral $10 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$ insulin solution ($\square - \square$), blank ($\bullet - \bullet$) and sc $1 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$ insulin solution ($\diamond - \diamond$)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs oral administration of insulin solution ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

分布均匀且稳定性好的纳米粒胶体分散系,离心分离后得到的纳米粒重分散性好。制备过程中采用减压旋转蒸发法以挥发有机溶剂,条件温和,缩短了溶剂挥发时间,减少蛋白质的活性损失及药物的渗漏;内水相中加入 PVA,增加了粘度,降低了药物的扩散速度,有利于提高包封率。

讨 论

PLGA 载药纳米粒,大量的胰岛素吸附在表面,粒径越小,吸附药物的相对量越大,产生这一现象可能是制备过程中使用不同表面活性剂的结果。纳米粒体外释药存在一个较快的释放期(前 5 h),可能包括有表面吸附的药物快速解吸附。后期胰岛素的释放缓慢且不完全,可能是被包埋的胰岛素通过纳米粒微孔的扩散变得困难,PLGA 体外降解缓慢且与胰岛素之间存在的相互作用可能阻碍了胰岛素的释放^[7]。结合体内生理环境特点对释放条件进行适当的调整可能得到该纳米粒体外释放与体内条件相关性数据,从而进一步反映该纳米粒体内释放与吸收情况。

糖尿病大鼠口服该纳米粒降血糖作用显著,在 15 h 内与 sc 相比,药理相对生物利用度 $(10.3 \pm 0.8) \%$ 。但这一生物利用度仍然较低,这可能是由于纳米粒的载药方式造成的。对纳米粒进行适当的

表面修饰如用聚乙二醇包衣以降低该纳米粒的突释效应^[8],有望进一步提高口服生物利用度。对 INS-PLGA NPs 口服给药药效学的初步探讨发现, PLGA 纳米粒有助于胰岛素肠道粘膜的吸收。

REFERENCES:

- [1] Li SX, Zou LJ, Zhang TM. Insulin [A]. Wang FS, Ling PX. *Biochemistry Drug Research* (生化药物研究) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1997. 442 - 447.
- [2] Carino GP, Jacob JS, Mathiowitz E. Nanosphere based oral insulin delivery [J]. *J Controlled Release*, 2000, **65**(1) :261 - 269.
- [3] Rocio FU, Pilar C, Carmen RL, et al. Enhancement of nasal absorption of Insulin using chitosan nanoparticles [J]. *Pharm Res*, 1999, **16**(10) :1576 - 1581.
- [4] Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, et al. Pulmonary delivery of insulin with nebulized DL-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect [J]. *J Controlled Release*, 1999, **62**(1 - 2) :279 - 287.
- [5] Ma LM, Zhang Q, Li YZ, et al. Preparation and drug efficacy of insulin-loaded polyester nanoparticles [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2001, **36**(1) :38 - 42.
- [6] Yu SJ, Lei HP. Experiment method of hypoglycemic drugs [A]. Xu SY, Bian RL, Chen X. *Methodology of Pharmacological Experiments* (药理实验方法学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1982. 982 - 996.
- [7] Maria MG, Dolores B, Maria EM, et al. Formulation of L-asparaginase-loaded PLGA nanoparticles: influence of polymer properties on enzyme loading, activity and *in vitro* release [J]. *J Controlled Release*, 1998, **52**(1) :53 - 62.
- [8] Huang YY, Chung TW, Tzeng TW. A method using biodegradable polylactides/polyethylene glycol for drug release with reduced initial burst [J]. *Int J Pharm*, 1999, **182**(1) :93 - 100.

STUDY ON PREPARATION AND ORAL EFFICACY OF INSULIN LOADED POLY(LACTIC CO GLYCOLIC ACID) NANOPARTICLES

PAN Yan, XU Hui, ZHAO Huiying, WEI Gang, ZHENG Junmin

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the possibility of poly(lactic-co-glycolic acid) as a carrier for the delivery of macromolecular. **METHODS** Insulin loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles (INS-PLGA NPs) was prepared by a double-emulsion solvent evaporation method. The size distribution was examined by photo-correlation spectrometry. The entrapment efficiency was determined by HPLC and important factors that affected the entrapment efficiency were investigated. The loading mechanism of different size nanoparticles was assayed by radioimmunoassay (RIA). INS-PLGA NPs release behavior *in vitro* was carried out under sink condition. After oral administration of the nanoparticles to alloxan induced diabetic rats, its glucose level was determined by glucose oxidize method and the oral pharmacological bioavailability in contrast to sc of insulin solution was calculated according to the area over the curve. **RESULTS** The INS-PLGA NPs was prepared with poloxamer 188 as a emulsifier, the mean diameter was 149.6 nm and the polydispersity index was decreased to 0.09. While the entrapment efficiency was increased to 42.8%. Most of the insulin loaded was adsorbed on the surface of the nanoparticles. The release behavior *in vitro* showed an initial burst effect followed by a slower rate stage. After oral administration of $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ INS-PLGA NPs, the plasma glucose level decreased significantly after 4 h ($P < 0.05$), 10 h later the glucose level decreased to the lowest ($52.4\% \pm 10.2\%$, $P < 0.01$) and the relative pharmacological bioavailability is (10.3 ± 0.8)%. **CONCLUSION** PLGA NPs might be used as a new oral carrier for protein drug delivery systems in the future.

KEY WORDS: insulin; poly(lactic-co-glycolic acid); nanoparticles; oral administration; drug efficacy