

# 口服胰岛素毫微球的体外释药及对糖尿病大鼠的降血糖作用

张 强 丁继军 叶国庆 魏树礼

(北京医科大学药学院, 北京 100083)

**摘要** 为研制一种生物利用度较高而降血作用时间短的口服 INS 制剂。制备了胰岛素聚氰基丙烯酸烷基酯毫微球(INS-NP)。其平均粒径为 252.4 nm, 胰岛素的结合率为  $70.1\% \pm 2.3\%$ 。INS-NP 的体外释药符合双指数函数式, 酸性介质中释放更快。Wistar 大鼠 po 不同剂量的 INS-NP 和胰岛素溶液(INS-SOL), 结果显示  $10 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$  和  $20 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 INS-NP 可显著降低血糖, 但两个剂量间无显著性差异而 INS-SOL 无降糖作用。用曲线上面积比较 po INS-NP 和 sc INS-SOL 后的降糖作用, 结果前者的相对生物利用度为 7.58%。在血糖下降的时间范围内, 体外释药的百分率与降糖速率间有一定相关性。

**关键词** 胰岛素; 胰岛素毫微球; 体外释药; 降血糖作用

胰岛素(insulin, INS)是治疗 INS 依赖性糖尿病(IDDM)的必备药物。IDDM 病人长期每日 3~4 次皮下注射给药, 痛苦不堪, 因而开展了改变 INS 给药途径的广泛研究<sup>[1]</sup>。INS 口服吸收的主要难点在于:(1) INS 在胃肠道中易水解失活;(2) INS 分子有很强的分子间聚合趋势, 可使分子量超过 6 000, 从而难以有足够量的 INS 分子扩散通过胃肠壁的上皮细胞层, 所以 INS 口服给药是一个世界性的难题。INS 口服给药的研究虽不少, 包括脂质体<sup>[2]</sup>、乳剂<sup>[3]</sup>和肠溶制剂<sup>[4]</sup>等, 但还存在许多问题, 其中之一是生物利用度太差, 一般远小于 5%, 所以只能通过用很大剂量才能达到治疗效果, 故实际上不可行。

用毫微球(nanoparticles, NP)作 INS 的载体以增加胃肠道的吸收已有报道<sup>[5,6]</sup>, 但也有生物利用度较低问题。另外作用时间较长, 并不一定很合适, 因 IDDM 病人的血糖水平在 1 d 内时高时低, 长时间的降血糖作用可能造成低血糖, 不如作用周期短的药剂在临床上更容易控制。本文对自制的 INS 氰基丙烯酸烷

基酯毫微球(INS-NP)的体外释药特征和降血糖作用进行考察, 旨在得到一种生物利用度较高而降血糖作用时间较短的口服 INS 制剂。

## 材 料 与 方 法

**材料与仪器** INS 注射剂(每支 400 u)由北京京航制药公司提供, 氰基丙烯酸烷基酯(BCA)购自深圳南方医用胶公司, Dextran 70 为瑞士 Pharmacia 产品, Pluronic F68 购自 Sigma, 四氧嘧啶为 Sigma 进口分装。INS-NP 样品采用改进的乳化聚合法制备。其他试剂均为分析纯。

透析袋(孔径为 2 nm, 27/32 型)购自 Sigma。THZ88-1 型多用途台式水浴振荡器为江苏太仓鹿河电讯器材厂产品, WFJ80-1 型分光光度计为北京第二光学仪器厂产品, 粒度分析仪为美国 Brookhaven Instruments 公司产品。

Wistar 大鼠由本校实验动物中心提供。

**INS-NP 的粒度测定** 取 INS-NP 样品适量, 用水稀释后在粒度分析仪上进行测定。Elapsed time(待测时间)为 6.38 min, 通过 Dynamic Light Scattering Software(动态光散射处理软件, 版本 1.17)进行处理, 记录并打印测

定结果。

**INS-NP 包封率与载药量的测定** 按文献方法<sup>[7]</sup>制作 INS 的标准曲线。精密配制一系列不同浓度的标准液,于 276 nm 处测定吸收度(A),线性回归得如下标准曲线:

$$A = 0.5096C + 0.0100 \quad (\gamma = 0.9998)$$

A 为 276 nm 处的吸收度, C 为 INS 的浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )

精密吸取 INS-NP 和空白 NP 样品各 5 ml, 分别放入透析袋中, 置于 25 ml 蒸馏水中, 在室温下透析 24 h, 取透析液 1 ml, 于 276 nm 处测定 A 值, 计算 INS-NP 和空白 NP 吸收之差, 用标准曲线计算透析液中 INS 的量, 再按下式分别计算 INS 的包封率和载药量:

$$\text{包封率} = (X_{\text{INS}} - X_{\text{D}}) / X_{\text{INS}} \times 100\%$$

$$\text{载药量} = (X_{\text{INS}} - X_{\text{D}}) / X_{\text{BCA}} \times 100\%$$

其中  $X_{\text{INS}}$  为 INS 给与量;  $X_{\text{D}}$  为透析液中 INS 的量;  $X_{\text{BCA}}$  为载体 BCA 的量。

**INS-NP 的体外释药** 取 INS-NP, 相同浓度的 INS-SOL 和空白 NP 各 5 ml, 分别加入 0.9% NaCl 溶液 5 ml, 装入透析袋中, 置于盛有 100 ml 0.9% NaCl (pH 7.0 或 2.5) 溶液的 250 ml 具塞量瓶中, 将量瓶放入  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  恒温台式振荡水浴中, 振荡频率为 50 cpm, 在不同时间间隔取样 2 ml, 补液 2 ml, 按前法测定 INS 含量。每个时间点 INS-NP 样液的吸收值用相应时间点空白 NP 的吸收值进行校正。

**血糖值测定** 采用英国药典 1980 年版的邻甲苯胺法测定血糖值。试剂的配制和葡萄糖标准曲线的制作按文献方法<sup>[8]</sup>进行。由此建立的标准曲线方程为:

$$A = 0.2546X + 0.0002 \quad (\gamma = 0.9999)$$

其中 X 为血糖水平 ( $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), A 为 630 nm 处吸收度测定值。

测定时, 待血样凝固后离心 ( $3000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1} \times 20 \text{ min}$ ), 精密吸取血清 0.1 ml, 空白对照取蒸馏水 0.1 ml, 加显色剂 5 ml, 按标准曲线制作的方法操作, 用上述标准曲线计算血糖值。经 6 次实验, 葡萄糖的 3 个浓度 (1.21, 2.27 和  $3.24 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) 在血清中的回收率分别为

$120.3\% \pm 1.7\%$ ,  $112.8\% \pm 0.8\%$  和  $107.4\% \pm 1.1\%$ , 平均值为  $113.5\% \pm 1.2\%$ 。

**INS-NP 的降血糖实验** 取健康 Wistar 大鼠若干只, 体重  $250 \pm 50 \text{ g}$ , 同次试验性别相同。禁食 24 h 后, 以  $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  尾静脉给与新配制的四氧嘧啶水溶液, 正常饲养 60 h, 测定血糖水平, 取血糖值在  $250 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$  以上的大鼠, 随机分组, 每组 6 只。po 给与不同剂量的 INS-NP 样品, 或者 po, sc INS-SOL, 在不同时间间隔, 于大鼠眼眶后静脉取血 0.5 ml, 离心取血清 0.1 ml, 按前述方法测定血糖值。

## 结 果

### 1 INS-NP 的粒度测定

平均粒径为 252.4 nm, 多分散性 (poly dispersity) 为 0.005。粒度分布在  $168.41 \pm 41.40 \text{ nm}$  者占 4%,  $251.20 \pm 41.40 \text{ nm}$  者占 91%, 而  $313.98 \pm 41.40 \text{ nm}$  者占 5%。可见本文制备的 INS-NP 粒径非常均匀, 粒度分布的范围相当小。

### 2 INS-NP 的包封率和载药量

经 5 次测定, 平均包封率为  $70.1\% \pm 2.3\%$ , 平均载药量为  $0.14 \text{ u}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

### 3 INS-NP 的体外释药动力学

当介质 pH 为 2.5 和 7.0 时 INS-NP 的体外释药数据和 pH 为 7.0 时 INS-SOL 的数据见图 1。后者表明透析袋对 INS 的释放有一定的阻滞作用。按前文<sup>[9]</sup>所述方法采用 AIC、残差平方和 (SS) 以及拟合度 ( $r^2$ ) 等作为判据, 对释药数据进行拟合, 结果表明, 双指数函数式的拟合效果最佳 (图 1), 按双指数函数式  $Y = 1 - [A \exp(-\alpha t) + B \exp(-\beta t)]$ , 在微机上提取释药动力学参数, 得释药动力学方程为:

$$Y = 1 - [50.69 \exp(-0.022t) + 49.85 \exp(-0.002t)] \quad (1)$$

$$Y = 1 - [64.16 \exp(-0.044t) + 35.45 \exp(-0.002t)] \quad (2)$$

其中 Y 表示 t 时刻累积释放的百分数, (1) 和 (2) 式分别表示 pH 为 7.0 和 2.5 时的释药动

力学方程。

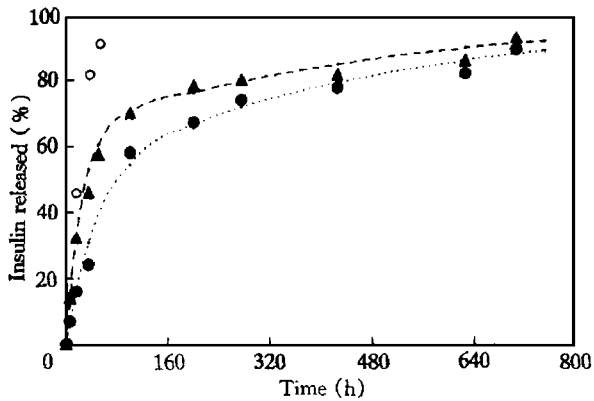


Fig 1 Release profiles of insulin-loaded nanoparticles at pH 7.0 (●) and pH 2.5 (▲) as well as insulin solution at pH 7.0 in saline (○) at 37°C.

从图中可见,INS-NP 释药过程中存在明

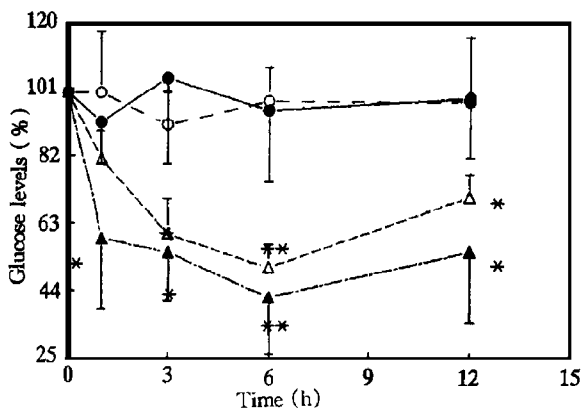


Fig 2 Effect of a single intragastric administration of insulin-loaded nanoparticles of  $5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ (○),  $10 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ (▲) and  $20 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ (△) on glycemia in diabetic rats fasted overnight. The glucose concentration at time zero served as the basis for comparison (%). Results are means  $\pm$  RSD for 5 or 6 animals. The control is insulin solution (●). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$  vs insulin solution.

图 2 为不同剂量的 INS-NP 的降血糖作用以及与 INS-SOL 的比较。可见 INS-SOL po 几乎无效,而低剂量( $5 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ )时 INS-NP 给药也无效,与 INS-SOL 组无显著性差异( $P >$

显的爆发效应,在 pH 2.5 时这种效应更明显,这从(2)式中 A 与  $\alpha$  值更大也可说明。但与溶液组相比,NP 的缓释效果也是比较明显的。二条释药曲线的  $\beta$  值相等,表明慢释阶段释药特性的一致。

#### 4 糖尿病大鼠模型的建立

分别按 3 个剂量  $30, 40$  和  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  给与大鼠四氧嘧啶水溶液,60 h 后测定血糖值。结果  $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组的大鼠血糖值在  $150 \sim 200 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$  之间,稍微偏低。 $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组的大鼠血糖值在  $500 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$  以上,动物出现部分死亡。 $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组的大鼠血糖值在  $350 \sim 400 \text{ mg}\cdot\text{dL}^{-1}$  之间,比较适中,故以此剂量建立糖尿病大鼠模型。

#### 5 INS-NP 的降血糖作用

结果见图 2 和图 3。

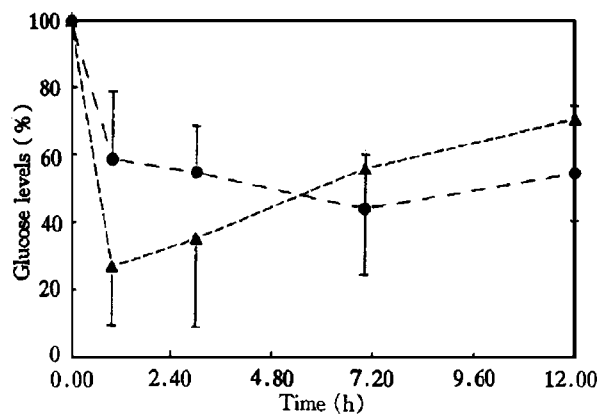


Fig 3 Area over the curve (AOC) of the glucose level (%) versus time profile upon intragastric administration of  $10 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$  insulin loaded nanoparticles (●) to diabetic rats as compared with subcutaneous administration of insulin solution  $1 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ (▲).

$0.05$ );当剂量为  $10 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$  和  $20 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$  时,INS-NP 组的降血糖作用十分明显,其中除  $20 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$  组在 1 h 时与 INS-SOL 组无显著性差异( $P > 0.05$ )外,在各测定点各组与 INS-SOL

组均有显著性差异;但  $10 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$  和  $20 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$  给药后各测定点均无显著性差异,尽管  $10 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$  给药的降血糖作用似乎更好。

图 3 是 INS-NP( $10 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) po 给药与 INS-SOL( $1 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) sc 给药后降血糖作用的比较。可见 INS-SOL sc 给药的特点是降血糖作用迅速,然后回升也较快。INS-NP po 给药后,降血糖速度低于 INS-SOL 的 sc 给药,而作用的持续时间较长,血糖水平相对较为稳定,在 6~7 h 左右降至最低,以后缓慢回升。用梯形法计算曲线上面积(area over the curve, AOC), INS-NP po  $10 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$  和 INS-SOL sc  $1 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$  的 AOC 分别为 431.73 和 569.84,据此计算相对生物利用度( $F = \text{AOC}_{\text{po}} \times \text{sc 剂量} / \text{AOC}_{\text{sc}} \times \text{po 剂量}$ ),  $F$  达到 7.58%。表明 po INS-NP 有较高的生物利用度。

## 6 体外释药与降血糖作用的相关性

分析体外释药与降血糖作用的实验数据,可见血糖在下降过程(0~7 h)中其血糖下降%与体外释药%之间有一定相关性,见表 1。在  $20 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$  给药时,INS-NP 的降糖%与在 pH 7 介质中的释药%相关性明显( $\gamma = 0.9953$ ),在  $10 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$  给药时两者的相关系数也达 0.9303。可见降血糖作用的快慢与体外释药的速度有关。

**Tab 1 Correlation between the % of insulin released in INS-NP at pH 7.0 and the % of glucose decreased upon intragastric administration of 10 and  $20 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$  INS-NP to diabetic rats**

Time (h)	Insulin released (%)	Glucose decreased (%)	
		$20 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$	$10 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$
0	0.00	0.00	0.00
1	32.80	19.84	41.24
3	67.50	39.78	45.01
7	74.17	49.06	57.60
		$\gamma = 0.9953$	$\gamma = 0.9303$

## 讨 论

本实验研究表明,毫微球确可增加 INS 在胃肠道的吸收,从而引起血糖水平的降低。已

经明确的机理有:① 小于 500 nm 的毫微球可在胃肠道的派伊尔氏淋巴结集(Peyer's patches)中累积,并以完整的结构通过淋巴结集中的 M 细胞,将药物释放到循环中去<sup>[10]</sup>;② 由于 INS 分子结合于毫微球,使 INS 受到毫微球的保护,与蛋白水解酶的接触机会大大下降,从而增加了吸收的机会。体外实验已证实<sup>[11]</sup>, INS 与毫微球结合后,其活性在很大程度上可免于水解蛋白酶的破坏。但也可能还存在其他机理,例如由于 INS 分子结合于毫微球,使 INS 分子间的聚合程度得到一定的控制,分子量有较大的下降,通过胃肠道的可能性增加;在十二指肠等部位存在大量微绒毛,这也是药物吸收的主要部位,与溶液剂相比, NP 颗粒显然更容易被微绒毛捕获,能较长时间地滞留在吸收部位,从而大大增加吸收的机会。但这些推测有待证实。

在本研究中,INS-NP 的降血糖作用并不完全是剂量依赖性的。 $20 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$  给药的降血糖作用与  $10 \text{ u}\cdot\text{kg}^{-1}$  给药无显著性差异。分析原因可能是在胃肠道的吸收部位, NP 可以保护 INS 分子的数量是有限的,多了仍可能被酶所破坏;同样,毫微球在一定程度上防止 INS 聚合的能力也是有限的,当 INS 与载体的比例超出某个限度时,就会有一些 INS 分子不能与 NP 结合,因此仍会相互聚合。但在本实验中, INS 与 NP 的比例是不变的,增加剂量只是通过增大给药样液的体积,所以推测非剂量依赖性的主要原因,是胃肠道淋巴集结和微绒毛捕获 NP 的数量应是有限的。

本研究证实,在血糖下降的时间范围内, INS-NP 的体外释药速率与体内降血糖作用的快慢有相关性。由于作用周期短的降血糖制剂在临床上可能更为实用,故本文研制的 INS-NP,从制备工艺等角度对释药速度进行了控制,使其具有较快的释药性能,因此降糖作用周期较文献报道<sup>[5]</sup>的 20 d 左右(2d 血糖才达最低点)要短得多。由于体外释药与体内降糖作用的相关性,故体外释药的结果还可作为质量控制的指标。

## 参 考 文 献

- 1 Chien YW, Banga AK. Potential developments in systemic delivery of insulin. *Drug Dev Ind Pharm*, 1989, **15**:1601
- 2 Moufti A, Weingarten C, Pnisiex F, *et al.* Hypoglycemia after liposomized insulin in the rat. *Pediatr Res*, 1980, **14**:95
- 3 Shchiri M, Kawamori R, Yoshida M, *et al.* Short-term treatment of alloxan diabetic rats with intrajejunal administration of water-in-oil-in-water insulin emulsion. *Diabetes*, 1975, **24**:971
- 4 Touitou E, Rubinstein A. Targeted enteral delivery of insulin to rats. *Int J Pharm*, 1986, **30**:95
- 5 Damge C, Michel C, Aprahamian M, *et al.* Nanocapsules as carriers for oral peptide delivery. *J Controlled Release*, 1990, **13**:233
- 6 Michel C, Aprahamian M, Defontaine L, *et al.* The effect of site of administration in the gastrointestinal tract in the absorption of insulin from nanocapsules in diabetic rats. *J Pharm Pharmacol*, 1991, **43**:1
- 7 中华人民共和国药典. 二部. 1985 版. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 附录 376
- 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. 中国医药工业杂志, 1990, **21**:445
- 9 张强, 廖工铁. 硫酸庆大霉素聚氧基丙烯酸正丁酯毫微球的体外释药动力学研究. 药理学报, 1995, **30**:459
- 10 Jani P, Halbert GW, Longridge J. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J Pharm Pharmacol*, 1990, **42**:826
- 11 Lowe PJ, Temple CS. Calcitonin and insulin in isobutyl-cyanoacrylate nanocapsules: protection against proteases and effect in intestinal absorption in rats. *J Pharm Pharmacol*, 1994, **46**:547

## IN VITRO RELEASE KINETICS AND HYPOGLYCEMIC EFFECT ON DIABETIC RATS AFTER ORAL ADMINISTRATION OF INSULIN LOADED NANOPARTICLES

Zhang Qiang(Zhang Q), Ding Jijun(Ding JJ), Yie Guoqing(Yie GQ) and Wei Shuli(Wei SL)

(School of Pharmaceutical Sciences, Beijing Medical University, Beijing 100083)

**ABSTRACT** The insulin-loaded polyalkylcyanoacrylate nanoparticles (INS-NP) were made with Dextran 70 as the stabilizer. The mean diameter of INS-NP was 252.4 nm with a poly dispersity of 0.005. The associating ratio of insulin to the nanoparticles reached  $70.1\% \pm 2.3\%$ , while the loading capacity was  $0.14 \text{ u} \cdot \text{mg}^{-1}$ . Studies on *in vitro* release kinetics showed that release profiles can be well modelled using a biexponential function. The burst effect was obvious, and a faster release was observed in acidic media. After various doses of INS-NP were intragastrically given to diabetic rats, significant decrease of glucose level was achieved in the 10 and  $20 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$  groups, with no significant difference between these two doses. The relative bioavailability after po administration of INS-NP  $10 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$  over sc administration of insulin solution  $1 \text{ u} \cdot \text{kg}^{-1}$  was 7.58% calculated by the area over the curve of glucose level (%) versus time profiles. The correlation was obvious between the % of insulin released at pH 7.0 and the % of glucose decreased within the first 7 hours. Hence, an oral insulin preparation with rather high bioavailability was provided in this study, and its shorter effective time will make it more convenient for the control of the glucose level in clinics.

**KEY WORDS** Insulin; Insulin loaded nanoparticles; *In vitro* release kinetics; Hypoglycemic effect