

口服胰岛素肠溶聚合物脂质杂化纳米粒的制备与评价

林霞[#], 李娜[#], 李金蔚, 杨子毅^{*}, 金坚

(江南大学药学院, 无锡 214122)

摘要 为了提高胰岛素的口服生物利用度,本研究以聚乙二醇聚乳酸共聚物(PEG-PLA)为高分子载体材料、磷脂 s75 为脂质材料、Eudragit L100 为肠溶材料制备口服胰岛素肠溶聚合物脂质杂化纳米粒(INS-NPs L100),并对其体内性能进行评价。采用 W/O/W 复乳溶剂挥发法制备胰岛素聚合物脂质杂化纳米粒(INS-NPs),以包封率、粒径和释药行为为评价指标,采用单因素法对方剂进行优化;将最优 INS-NPs 与肠溶材料 Eudragit[®] L100 混合制备成 INS-NPs L100,并对其形态、体外释放及健康大鼠灌胃后的降血糖作用进行评价。以最优处方制备的 INS-NPs 包封率为 $(62.18 \pm 4.51)\%$,平均粒径为 (225.2 ± 94.3) nm,多分散系数为 0.191 ± 0.068 ,Zeta 电位为 $-(14.84 \pm 1.26)$ mV。包裹肠溶材料后所制备的 INS-NPs L100,在 pH 1.0 盐酸溶液中 2 h 累积释放量为 8.01%,在 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液中 6 h 累积释放量为 67.31%。将所制备的 INS-NPs L100 经口给予健康大鼠(38 IU/kg)后,具有明显的持续降血糖作用,3.5 h 时血糖浓度可降至初始值的 76%。实验结果表明,本研究所制备的 INS-NPs L100 可有效减缓胰岛素在胃液中的释放速度,提高蛋白在胃肠道中的稳定性,为多肽、蛋白类药物口服给药提供了新的研究思路。

关键词 胰岛素;口服肠溶制剂;聚合物-脂质杂化纳米粒;制备

中图分类号 R944 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2019)03-0308-09

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20190306

引用本文 林霞,李娜,李金蔚,等.口服胰岛素肠溶聚合物脂质杂化纳米粒的制备与评价[J].中国药科大学学报,2019,50(3):308-316.
Cite this article as: LIN Xia, LI Na, LI Jinwei, et al. Preparation and evaluation of an oral insulin enteric preparation based on polymer-lipid hybrid nanoparticles[J]. J China Pharm Univ, 2019, 50(3):308-316.

Preparation and evaluation of an oral insulin enteric preparation based on polymer-lipid hybrid nanoparticles

LIN Xia[#], LI Na[#], LI Jinwei, YANG Ziyi^{*}, JIN Jian

School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract To improve the oral bioavailability of insulin, an insulin-loaded enteric polymer-lipid hybrid nanoparticles (INS-NPs L100) was prepared using methoxy PEG-poly(D, L-lactide) (PEG-PLA), phospholipid s75 and Eudragit L100; *in vitro* and *in vivo* behaviors of INS-NPs L100 were evaluated. Insulin-loaded polymer-lipid hybrid nanoparticles (INS-NPs) were prepared by W/O/W double emulsion solvent evaporation method. INS-NPs formulation was optimized by single factor experiment using encapsulation efficiency, particle size, and *in vitro* release behavior of the corresponding INS-NPs L100 as evaluation indexes. The morphology, *in vitro* drug release profile and hypoglycemic effect of the INS-NPs L100 using the optimal INS-NPs and Eudragit[®] L100 (used as enteric polymer) were assessed. The results showed that the encapsulation efficiency of the optimal INS-NPs was $(62.18 \pm 4.51)\%$. The average particle size, PDI and Zeta potential was (225.2 ± 94.3) nm, 0.191 ± 0.068 , and $-(14.84 \pm 1.26)$ mV, respectively. The cumulative drug release from the INS-NPs L100 was only 8.01% at 2 h in pH 1.0 HCl solution, exhibiting a slow drug release behavior; while the drug release from INS-NPs L100 was 67.31% at 6 h in phosphate buffer of pH 6.8. Moreover, after oral administration of INS-NPs L100 with a

收稿日期 2019-03-07 *通信作者 Tel:0510-85197769 E-mail:ziggyang@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 81603060);江苏高校品牌专业建设工程资助项目(No. PPZY2015B146)

[#]林霞,李娜对本论文的贡献相同

dose of 38 IU/kg, the blood glucose concentration of healthy rats was reduced to 76% of the initial values at 3.5 h, exhibiting a sustained hypoglycemic effect. In summary, the INS-NPs L100 prepared in this study could effectively decrease the release rate of insulin in gastric juice, improve the stability of protein in the gastrointestinal tract, and provide a new approach for the oral administration of peptides and protein drugs.

Key words insulin; oral enteric preparation; polymer-lipid hybrid nanoparticles; preparation

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81603060) and the Top-notch Academic Programs Project of Jiangsu Higher Education Institutions (No. PPZY2015B146)

#LIN Xia and LI Na contributed equally to this work

糖尿病已成为目前全球最严重的健康问题之一,根据国际糖尿病联合会的数据,全球成年糖尿病患者人数在 2017 年已经达到 4.25 亿,预计到 2045 年将达到 6.29 亿。而中国是糖尿病患者最多的国家,约有 1.14 亿糖尿病患者^[1]。胰岛素(INS)是一种广泛应用于糖尿病患者的生物大分子药物,其半衰期短,脂溶差,不易穿透生物膜,长期以来一直以注射给药为主。这种给药方式不仅顺应性差,还会出现一些不良反应(如耐药和注射部位炎症、硬结等)^[2]。

为此,许多国内外学者致力于 INS 非注射剂型的研究与应用,如口服制剂、鼻用制剂、肺部给药系统等^[3-6]。自诺和诺德公司宣布放弃口服胰岛素研发后,目前仅有 Diasome 公司的 HDV-I 和 Oramed 公司的 ORMD-0801 胰岛素胶囊进入 III 期临床试验^[7-8]。目前,关于胰岛素口服给药系统的研究主要集中于脂质体、纳米粒、胶囊、微球、乳剂等^[9]。其中,纳米粒作为蛋白多肽类药物的口服给药载体时,由于其不仅能防止药物被消化道内的强酸和消化酶降解,而且在肠道中纳米粒可以以整体形式被 Peyer 淋巴结上的 M 细胞吞噬,通过肠黏膜上的淋巴系统吸收,或者通过细胞间通道吸收^[10],已成为胰岛素口服给药系统的研究热点之一。近年来,研究发现将胰岛素包载于聚合物-脂质杂化纳米粒中,可有效控制药物释放,且可获得较高的包封率^[10]。Sun 等^[11]以胰岛素-油酸钠复合物和聚乳酸羟基乙酸共聚物(PLGA)制备的纳米粒口服生物利用度为 37.7%。但当以亲水性载体材料制备纳米粒时,载体易溶解于组织液中,无法控制蛋白药物在胃肠道中缓慢释放;以疏水性材料为载体时,由于胰岛素的高度亲水性,二者相容性差、包封率低,且很容易引起突释,仍无法控制药物在胃肠道中缓慢释放^[12]。因此,研究一种可在

胃肠道中稳定缓慢释放并有效吸收的口服胰岛素制剂仍是目前多肽蛋白药物口服给药系统亟需解决的问题。

本研究拟以两亲性高分子载体 PEG-PLA 为聚合物载体材料,以磷脂 s75 为脂质材料、制备胰岛素聚合物脂质杂化纳米粒(INS-NPs),再将 INS-NPs 与肠溶材料 Eudragit L100 混合,制备胰岛素口服肠溶聚合物脂质杂化纳米粒(INS-NPs L100);以包封率、粒径和体外释放为评价指标进行处方优化,并对最优处方进行健康大鼠降血糖作用评价,旨在探索出一种在胃肠道中可缓慢释放、生物利用度较高的胰岛素口服给药系统,为口服胰岛素提供新的研究思路。

1 材 料

1.1 药品与试剂

胰岛素(insulin, INS, 江苏万邦生化医药有限公司,效价 27 IU/mg,批号 1806A11);胆酸钠(sodium cholate, SC, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司);单甲氧基聚乙二醇聚乳酸共聚物(mPEG5000-PLA14808, PEG-PLA, 山东济南岱罡生物科技有限公司);单、双硬脂酸甘油酯(geoleol mono and diglycerides NF, GMD, 批号 158661 法国 Gattefosse 公司);磷脂 s75(德国 Lipoid 公司);泊洛沙姆 188(Poloxamer 188, 德国巴斯夫公司);聚丙烯酸树脂 L100(Eudragit® L100, 德国 Evonik 公司);邻苯二甲酸羟丙甲基纤维素酯 55(HP-55, 信越化学工业株式会社);胃蛋白酶和胰酶(上海麦克林生化科技有限公司);乙腈为色谱纯,其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪 器

高效液相色谱系统(Agilent 1260, 美国安捷伦公司);JY92-II 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);T18 高速剪切分散机(德国

IKA 公司);超速冷冻离心机(天美科学仪器有限公司);SU-1510 扫描电子显微镜(日本日立株式会社);NICOMP™ 380ZLS 动态光散射粒度测定仪(美国 PSS 公司);冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司);MX-S 涡旋仪(美国 Scilogex 公司);BSA24S 电子天平(德国赛多利斯公司);pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司);血糖仪(三诺生物传感股份有限公司)。

1.3 动物

SPF 雄性 SD 大鼠, (250 ± 20) g, 购于昭衍(苏州)新药研究中心有限公司, 动物生产许可证号 SCXK(苏)2018-0006, 动物质量合格证编号 No. 201806730, 伦理审核编号 JN. No20180430S0250531[71]。

2 方法

2.1 胰岛素经口肠溶聚合物脂质杂化纳米粒(INS-NPs L100)的制备

2.1.1 胰岛素聚合物脂质杂化纳米粒(INS-NPs)的制备 采用 W/O/W 复乳-溶剂挥发法制备 INS-NPs。称取适量胰岛素和胆酸钠, 溶解于 0.01 mol/L 盐酸溶液作为内水相。精密称取适量 PEG-PLA 和脂质超声溶解于乙酸乙酯中作为油相。另配制 1% Poloxamer 188 水溶液作为外水相。将内水相边涡旋边注入油相中, 涡旋 0.5 min, 然后冰水浴探针式超声 3 min, 功率 40%, 形成 W/O 初乳。再将初乳在高速搅拌下注入外水相中, 8 000 r/min 搅拌 0.5 min, 然后常温水浴探针式超声 6 min, 超声功率 60%, 形成 W/O/W 的复乳。37 °C 下将所得复乳减压旋转蒸发至乙酸乙酯挥发完全, 即得胰岛素聚合物脂质杂化纳米粒(INS-NPs)。

2.1.2 INS-NPs L100 的制备 将 INS-NPs 与 10% 肠溶材料水溶液等体积混匀, 再加入适量 2 mol/L 盐酸溶液使之沉淀, 12 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 冷冻干燥, 即得 INS-NPs L100。

2.2 INS-NPs 的粒径、多分散系数(PDI)及 Zeta 电位的测定

将 INS-NPs 用去离子水稀释至适当浓度, 采用动态光散射粒度测定仪测定粒径、PDI 及 Zeta 电位。

2.3 载药量和包封率的测定

2.3.1 色谱条件 C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm,

5 μm, 美国安捷伦公司), 流动相: 0.2 mol/L 无水硫酸钠溶液(pH 2.3)-乙腈(73:27), 检测波长: 214 nm, 流速: 1 mL/min, 柱温: 40 °C, 进样量: 20 μL, 胰岛素的浓度采用外标法以峰面积定量。

2.3.2 载药量的测定 精密称取适量 INS-NPs L100 于 10 mL 量瓶中, 加入 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 1 mL 使包衣材料溶解, 再加入乙腈 2 mL 超声使纳米粒溶解, 用 0.01 mol/L 盐酸稀释至刻度。15 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 进样, 测定峰面积。按外标法计算出胰岛素的浓度, 按公式(1)计算载药量:

$$\text{载药量} = (\text{胰岛素浓度} \times 10 \text{ mL}) / \text{INS-NPs L100 的质量} \times 100\% \quad (1)$$

2.3.3 包封率的测定 取新制备的 INS-NPs 溶液 6 mL, 超高速离心机离心 1 h, 转速 30 000 r/min, 以分离未游离的胰岛素, 收集上清溶液。胰岛素含量用 HPLC 法测定, 按公式(2)计算纳米粒包封率(encapsulation efficiency, EE):

$$\text{包封率}(\%) = (\text{投入胰岛素总量} - \text{上清液中游离胰岛素量}) / \text{投入胰岛素总量} \times 100 \quad (2)$$

2.4 INS-NPs L100 的体外释放

将冻干的 INS-NPs L100 20 mg 分散于 pH 1.0 的介质 45 mL 中, 于 37 °C、100 r/min 水浴摇床中释放, 2 h 时加入 0.2 mol/L 磷酸钠溶液 15 mL, 调 pH 为 6.8。即溶出条件为 37 °C、100 r/min, 0 ~ 2 h 在 pH 1.0 盐酸介质中, 2 ~ 8 h 在 pH 6.8 的溶出介质中, 分别于 5 min 和 1、2、2.25、2.5、2.75、3、4、6、8 h 取出溶出介质 200 μL, 并补充等体积的新鲜溶出介质 200 μL, 采用 HPLC 测定游离胰岛素含量, 绘制累积药物释放曲线。

2.5 INS-NPs 的表面形态

将少量冻干后的纳米粒和包裹肠溶材料的纳米粒涂在导电硅胶黏性面, 然后真空喷金, 在扫描电子显微镜下观察粒子的外貌形态。

2.6 INS-NPs L100 在人工胃液中的稳定性试验

参照《中华人民共和国药典》(2015 年版) 四部 0921 附注, 配制人工胃液(SGF)。

分别称取 INS NPs 和 INS-NPs L100 50 mg 各 3 份, 分别分散于装有人工胃液 5 mL 的离心管中, 再将离心管置 37 °C、100 r/min 水浴摇床孵育。分别于 5 min、1 h 和 2 h, 采用 HPLC 法测定人工胃液中 INS-NPs 和 INS-NPs L100 的胰岛素浓度, 计算胰岛

素百分含量。

2.7 INS-NPs L100 在人工肠液中的稳定性试验

参照《中华人民共和国药典》(2015 年版)四部 0921 附注,配制人工肠液(SIF)。

分别称取 INS-NPs、INS-NPs L100 和 INS-NPs + Eudragit® L100 物理混合物 50 mg 各 3 份,分别分散于装有人工肠液 5 mL 的离心管中,再将离心管置于 37 °C、100 r/min 水浴摇床孵育。分别于 5 min、3 h 和 6 h 测定人工肠液中 INS-NPs 和 INS-NPs L100 的胰岛素浓度,计算胰岛素百分含量。

2.8 健康大鼠经口给药降血糖试验

将 24 只雄性 SD 大鼠随机分成 4 组,实验组每组 6 只,给药前禁食不禁水 12 h。阳性对照组:皮下注射胰岛素注射液,参考文献[11]给药剂量设定为 1 IU/kg;阴性对照组:灌胃给予复溶后的空白纳米粒(NP L100);实验组 A:灌胃给予复溶后的 INS-NPs,参考文献[11]给药剂量设定为 38 IU/kg;实验组 B:灌胃给予用 1% 的羧甲基纤维素钠(CMCNa)混悬的 INS-NPs L100,20 IU/kg。于给药前 0 h 和给药后 0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、8 和 10 h 尾静脉取血,采用血糖仪测定大鼠的血糖浓度。

以血糖浓度下降百分比绘制血糖下降百分比-时间曲线,血糖下降百分比 = t 时血糖浓度/0 时血糖浓度 $\times 100\%$ 。

3 结 果

3.1 INS-NPs L100 处方优化

前期试验研究显示内水相与油相体积比为 1:5,油相与外水相体积比为 1:8 时,所制备的纳米粒粒径最小。因此,确定 W/O/W 体积比为 1:5:40 条件下进行其他处方因素的优化。

3.1.1 胰岛素与胆酸钠物质的量比的确定 胰岛素具有高度亲水性,脂溶性差,采用传统的 W/O/W 法所制备的纳米粒 EE 很低,不足 20%。据文献报道,将胰岛素与胆酸钠制备成脂质复合物,能显著改善胰岛素的脂溶性,从而能提高纳米粒的 EE^[13-14]。因此,本研究以胆酸钠为脂质复合物材料,制备胰岛素-胆酸钠脂质复合物,以提高 EE。对胰岛素与胆酸钠的物质的量比进行了考察,胰岛素与胆酸钠的物质的量比对 INS-NPs 的粒径和 EE 的影响如图 1 所示。结果显示,随着胆酸钠比例的增加,纳米粒的

EE 逐渐增加,粒径逐渐减小,当胰岛素与胆酸钠的物质的量比为 1:22.5 时,所制备的纳米粒 EE 最高为 75.98%,粒径最小。继续增加胆酸钠比例时,EE 不再增加,粒径反而增大。因此,确定胰岛素与胆酸钠的物质的量比为 1:22.5。

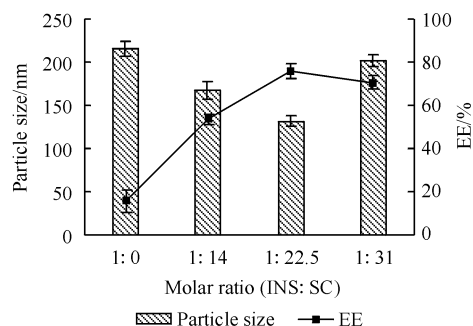


Figure 1 Effect of the insulin (INS)/sodium cholate (SC) molar ratio on the particle size and encapsulation efficiency (EE) of insulin loaded polymer-lipid hybrid nanoparticles (INS-NPs) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.1.2 PEG-PLA 质量浓度的确定 对 PEG-PLA 在油相中的质量浓度(20、30、40 mg/mL)进行了考察,PEG-PLA 对纳米粒的粒径和 EE 的影响如图 2 所示。由图 2 可知,随着 PEG-PLA 质量浓度增加,EE 无明显增加的趋势,尽管 PEG-PLA 质量浓度为 20 mg/mL 时 EE 较高,但粒径较大。综合考虑 EE 和粒径,优选 PEG-PLA 质量浓度为 30 mg/mL。

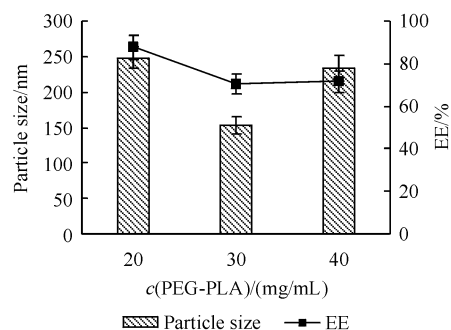


Figure 2 Effect of the methoxy PEG-poly(D,L-lactide) (PEG-PLA) concentration on the particle size and EE of INS-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.1.3 胰岛素质量浓度的确定 对内水相中胰岛素质量浓度(10、15、20 mg/mL)进行考察,其对 INS-NPs 粒径及 EE 的影响如图 3 所示,随着胰岛素质量浓度的增加,EE 逐渐增加。但由于胰岛素在 0.01 mol/L HCl 中的质量浓度大于 20 mg/mL 后便不易迅速溶解,因此确定内水相中胰岛素质量浓度为 20 mg/mL。

3.1.4 脂质材料的确定 比较了磷脂 s45、s75 和 GMD 3 种脂质对 INS-NPs 的 EE 和粒径的影响,结

果如图4-A所示。结果显示,由GMD制备的纳米粒EE最高,粒径最小。将所制备的3种INS-NPs参照“2.1.2”项下方法以Eudragit L100为肠溶材料分别制备成INS-NPs L100肠溶制剂后,对其体外药物释放进行评价,结果如图4-B所示。结果显示,以磷脂s75为脂质材料所制备的INS-NPs L100在人工肠液(pH 6.8磷酸盐缓冲液)中药物释放速度最慢,以GMD为脂质材料所制备的INS-NPs L100在人工肠液(pH 6.8磷酸盐缓冲液)中药物释放速度最快。因此确定以磷脂s75为脂质材料制备INS-NPs L100。

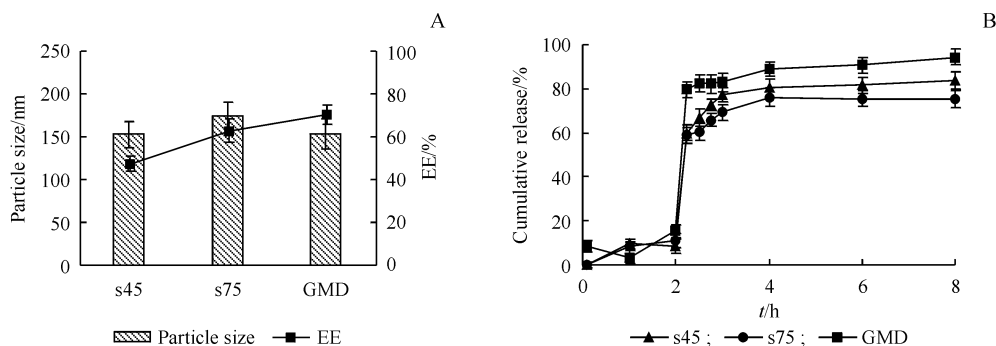


Figure 4 Effect of lipid on the particle size and EE of INS-NPs (A) and *in vitro* drug release from INS-NPs L100 in HCl (pH 1.0, 0-2 h) and phosphate buffer (pH 6.8, 2-8 h) at 37 °C (B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)
GMD: Geleol mono and diglycerides NF

3.1.5 磷脂 s75 与 PEG-PLA 质量比的确定 由于脂质材料与聚合物材料的比例不同,导致载体与胰岛素的相互作用不同,有机相黏度也不同,进而影响 INS-NPs 的粒径、EE 和药物释放速度。因此,本研究考察了磷脂 s75 与 PEG-PLA 的质量比对 INS-NPs 的 EE 和粒径影响,结果如图 5-A 所示。由图 5-A 可知,随着磷脂 s75 与 PEG-PLA 的质量比的增加,EE 呈现先增加后不变或微降的趋势。当磷脂 s75 与 PEG-PLA 的质量比为 1:10 时 EE 最高,为 70.24%,粒径最小,为 153.3 nm。

以 Eudragit L100 为肠溶材料,将上述 INS-NPs 制备成 INS-NPs L100 肠溶制剂,进一步评价磷脂 s75 与 PEG-PLA 的质量比对药物释放的影响,结果如图 5-B 所示。图 5-B 显示,随着脂质比例的增加,释放减慢。当磷脂 s75 与 PEG-PLA 的比例为 1:5 时,释放最为缓慢,pH 1.0 盐酸溶液中 2 h 的累积释放量小于 10%,pH 6.8 磷酸盐缓冲液 8 h 的累积释放为 67.31%。由于纳米粒在体内释放越慢越有利于提高胰岛素在胃肠道中的稳定性,进而提高其生物利用度,故确定脂质材料为磷脂 s75 及

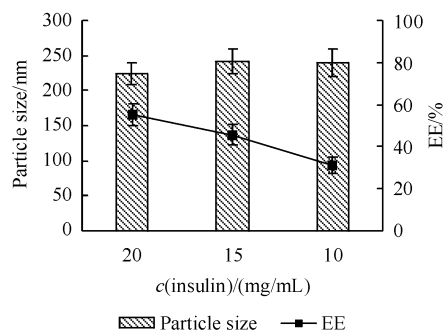


Figure 3 Effect of the INS concentration on the particle size and EE of INS-NPs ($\bar{x} \pm s, n=3$)

其与 PEG-PLA 的质量比 1:5。

根据上述研究结果,最终确定胰岛素与胆酸钠的物质的量比为 1:22.5,PEG-PLA 的质量浓度为 30 mg/mL,胰岛素质量浓度为 20 mg/mL,脂质材料为磷脂 s75 与 PEG-PLA 的比例为 1:5,即磷脂 s75 的质量浓度为 6 mg/mL。

3.1.6 肠溶材料的确定 本研究选用肠溶制剂常用的两类肠溶材料,包括纤维素酯类 HP-55 和聚丙烯酸树脂类 Eudragit L100,分别制备胰岛素肠溶制剂(INS-NPs HP55 和 INS-NPs L100),评价肠溶材料种类对胰岛素肠溶制剂药物释放的影响,结果如图 6-A 所示。结果显示,INS-NPs HP55 在 pH 1.0 盐酸水溶液中,2 h 时累积释放量高达 50%;而 INS-NPs L100 在 pH 1.0 盐酸水溶液中 2 h 的累积释放量仅为 8.01%,释放速度显著低于 INS-NPs HP55。在 pH 6.8 磷酸缓冲液中 1 h 时,INS-NPs HP55 药物累积释放量已达 80% 以上,INS-NPs L100 的释放速度显著低于 INS-NPs HP55。由此可见,INS-NPs L100 在人工胃液和人工肠液中的药物释放速度均显著低于 INS-NPs HP55。因此,确定以

Eudragit L100 为肠溶材料,制备胰岛素肠溶制剂。

3.1.7 Eudragit L100 浓度的确定 由于 Eudragit L100 浓度(即肠溶材料与 INS-NPs 的质量比)可直接影响肠溶材料对 INS-NPs 的包载作用,因此,本研究以药物释放速度为评价指标,对 Eudragit L100 浓度进行了考察,结果如图 6-B 所示。结果显示,当 Eudragit L100 浓度为 2% 时,所制备的 INS-NPs L100 在 pH 1.0 盐酸水溶液中 5 min 时的药物累积

释放已达到 70% 以上,几乎无肠溶作用。随着 Eudragit L100 浓度的增加,INS-NPs L100 在人工胃液和人工肠液中的药物释放速度逐渐降低。当 Eudragit L100 浓度增加至 10% 时,在 pH 1.0 盐酸水溶液中 2 h 时的药物释放量不足 8%,在 pH 6.8 缓冲液中也具有明显的缓释效果。因此,最终确定 Eudragit L100 浓度为 10%。

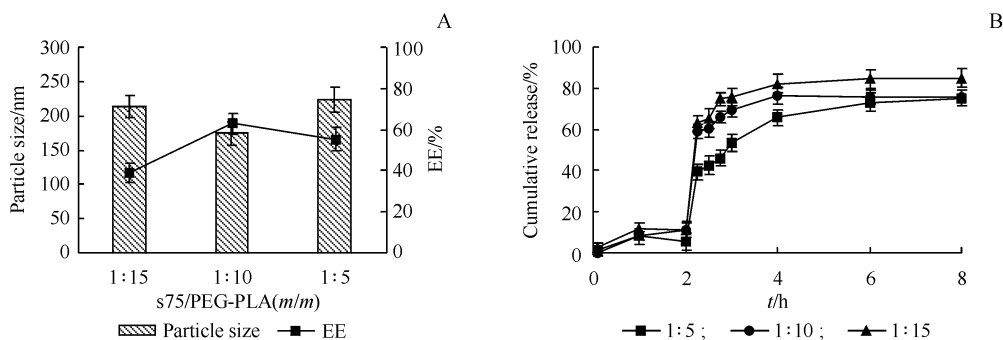


Figure 5 Effect of the Lipid s75/PEG-PLA (m/m) ratio on the particle size and EE of INS-NPs (A) and *in vitro* drug release from INS-NPs L100 in HCl (pH 1.0, 0-2 h) and phosphate buffer (pH 6.8, 2-6 h) at 37 °C (B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

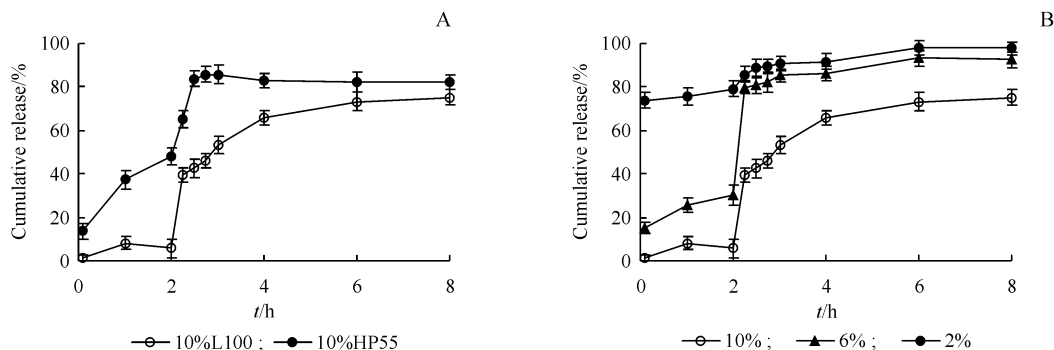


Figure 6 *In vitro* drug release from INS-NPs encapsulated with different enteric materials (A) and different concentrations of Eudragit L100 (B) in HCl (pH 1.0, 0-2 h) and phosphate buffer (pH 6.8, 2-8 h) at 37 °C (B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 INS-NPs L100 的表征

采用优化后的处方制备 INS-NPs L100,并对其粒度分布、EE、体外药物释放进行系统评价。

3.2.1 粒度分布及 Zeta 电位的测定 采用动态光散射粒度测定仪测定最优处方制备的 Ins-NPs 和 INS-NPs L100 复溶后的粒度分布及其 Zeta 电位,结果显示,Ins-NPs 的平均粒径为 225.2 nm, PDI 为 0.191, Zeta 电位为 -14.84 mV。INS-NPs L100 经人工肠液复溶后的平均粒径为 278.0 nm, 多分散系数为 0.596, Zeta 电位为 -13.21 mV, 均较新制备的 INS-NPs 略有增加。

3.2.2 载药量与包封率的测定 采用 HPLC 测得冻干后的 INS-NPs L100 载药量为 8.34 $\mu\text{g}/\text{mg}$, EE

为 62.18%。

3.2.3 形态学观察 采用扫描电镜对 INS-NPs 经肠溶衣包裹前后的表面形态进行观察,如图 7 所示。图 7-A 为按最优处方制备的 INS-NPs 的外观形态,呈现为淡蓝色胶体体系。图 7-B 为经冻干后 INS-NPs 的表面形态,可明显观察到大量球形粒子,且分散性良好。而上述 INS-NPs 经 Eudragit L100 肠溶材料包裹后所制备的 INS-NPs L100 肠溶制剂,呈片块状,表面仅可观察到少量球形纳米粒子(图 7-C 箭头所示)。上述结果表明,经 Eudragit L100 肠溶材料包裹后,可将大部分 INS-NPs 包裹于肠溶制剂内部。

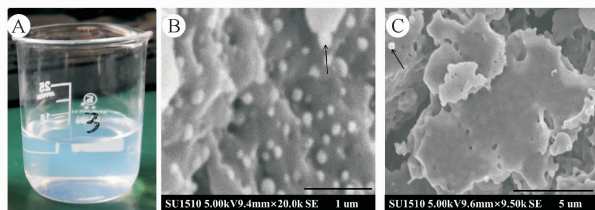


Figure 7 Photo pictures of INS-NPs solution (A), and the morphology of INS-NPs (B) and INS-NPs L100 (C) observed by scanning electron microscope

3.2.4 INS-NPs L100 体外释放 为模拟药物口服给药后在胃中及从胃进入小肠中的释放,分别考察了 INS-NPs 和 INS-NPs L100 在 pH 1.0 盐酸水溶液 (0~2 h) 和 pH 6.8 磷酸盐缓冲液 (2~8 h) 的药物释放,释放曲线如图 8 所示。结果显示,INS-NPs 在 pH 1.0 盐酸水溶液中,5 min 时已释放 94.2%,最大累积释放量为 95.83%;INS-NPs L100 在 pH 1.0 的盐酸水溶液中 2 h 的累积释放量为 8.01%,在 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液 8 h 的累积释放量为 67.31%,较 INS-NPs 有明显的肠溶缓释效果。

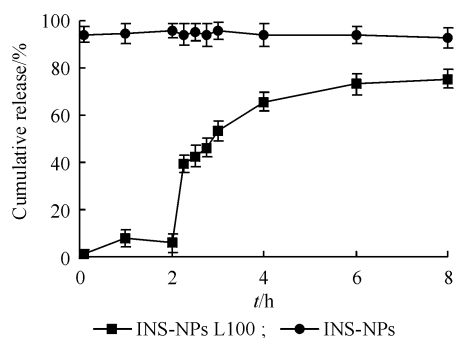
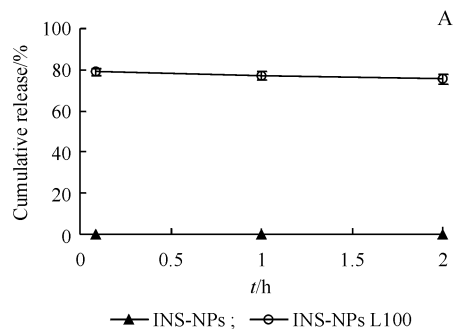


Figure 8 *In vitro* drug release profiles of INS-NPs and INS-NPs L100 in HCl (pH 1.0, 0~2 h) and phosphate buffer (pH 6.8, 2~8 h) at 37 °C ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2.5 INS-NPs L100 在人工胃液和人工肠液中的稳定性 为进一步确证 INS-NPs L100 能提高在胃肠道中的稳定性,本研究对 INS-NPs L100 和 INS-



NPs 在 SGF 和 SIF 中的稳定性进行了评价,结果如图 9 所示。

图 9-A 显示,INS-NPs 在人工胃液中 5 min 后胰岛素浓度已低于检测限,表明 INS-NPs 中的胰岛素可迅速被胃蛋白酶降解,胃稳定性差。而 INS-NPs L100 在 37 °C 的人工胃液中孵育 2 h 后仍未溶解,胰岛素百分含量高达 75.36%,胰岛素降解百分比不足 25%。与 INS-NPs 相比,INS-NPs L100 在 SGF 中的稳定性显著提高,这是由于 INS-NPs 在人工胃液中胰岛素释放速度快,5 min 时已释放大部分药物,导致所释放的胰岛素迅速被胃蛋白酶降解,稳定性差;而 INS-NPs L100 在人工胃液中药物释放速度慢,大部分胰岛素被包载于肠溶制剂内部,可有效避免胃蛋白酶的降解,稳定性显著提高。

图 9-B 显示,INS-NPs 在人工肠液中稳定性差,5 min 后胰岛素浓度已低于检测限。而 INS-NPs L100 在人工肠液中 37 °C 孵育 5 min 后胰岛素含量约为 50%,6 h 后胰岛素含量仍为 39.28%,稳定性显著提高。此外,研究发现,INS-NPs 与 Eudragit L100 的物理混合物在人工肠液中初始稳定性较好,孵育 5 min 时胰岛素含量约为 40%;但 3 h 时,胰岛素含量已降至 10% 以下,这可能是由于 Eudragit L100 可以抑制胰酶活性,从而提高胰岛素稳定性。与 INS-NPs 相比,INS-NPs L100 可显著提高胰岛素在人工肠液中的稳定性,这可能是由于以下两方面原因:一方面是由于 Eudragit L100 可能会抑制胰酶活性,使稳定性提高;另一方面可能是由于将 INS-NP 制备成肠溶制剂后,粒径增大,在人工肠液中药物释放速度明显变慢,进而提高了胰岛素的稳定性。

上述结果表明,与 INS-NPs 相比,INS-NPs L100 可显著提高胰岛素在人工胃液和人工肠液中的稳定性,有望提高胰岛素口服降血糖作用。

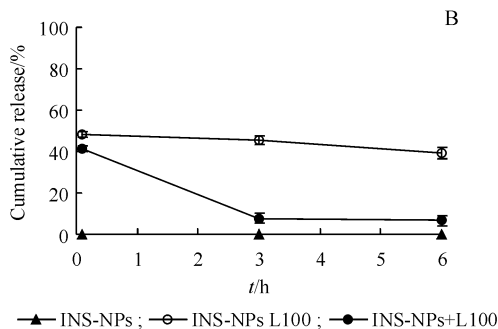


Figure 9 Stability of INS-NPs L100, INS-NPs L100 in simulated gastric fluid (SGF) (A), and stability of INS-NPs, INS-NPs L100, physical mixture of INS-NPs and Eudragit L100 (INS-NPs + L100) in simulated intestinal fluid (SIF) (B) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 INS-NPs L100 对健康大鼠的降血糖作用

以皮下注射胰岛素溶液为阳性对照组,对 INS-NPs、INS-NPs L100、空白肠溶纳米粒(NPs L100)经口给予健康大鼠后的降血糖作用进行了评价,结果如图 10 所示。结果显示,经皮下注射给予大鼠胰岛素溶液后,血糖浓度迅速下降,1.5 h 降至最低水平,4 h 后恢复至正常血糖浓度,降血糖作用约持续了 4 h。经口给予大鼠空白肠溶制剂(NPs L100)后,无明显降血糖作用,表明本研究所使用的载体材料对血糖无明显作用。经口给予 INS-NPs 的大鼠在给药后 2 h 血糖浓度出现略微降低,在 2.5 h 血糖浓度降至最低,为初始血糖浓度的 94%,几乎无明显降血糖作用;经口给予 INS-NPs L100 的大鼠在 2 h 血糖浓度开始降低,2.5 h 血糖浓度为初始浓度的 91%,于 3.5 h 降至最低,为初始浓度的 76%,具有明显的降血糖作用,且降血糖作用约持续了 8 h。此外,经口给予 INS-NPs 和 NPs L100 后 0.5 h 血糖浓度均出现异常升高现象,可能是由于在大鼠尾静脉取血时对动物造成一定的刺激所导致的应激反应。

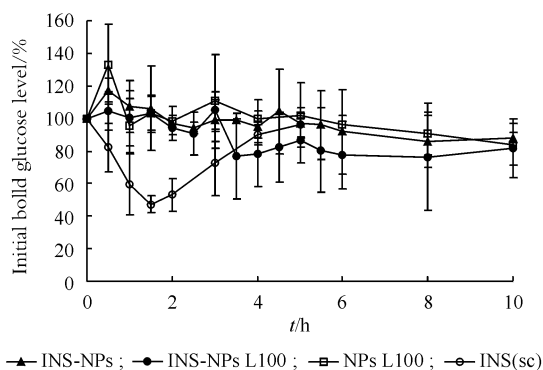


Figure 10 Profiles of plasma glucose level versus time in healthy rats after subcutaneous administration of INS solution at dose of 1 IU/kg, and after oral administration of INS-NPs, INS-NPs L100 and NPs L100 at dose of 38 IU/kg ($\bar{x} \pm s, n=6$)

上述结果表明,与皮下注射胰岛素溶液相比,INS-NPs L100 降血糖作用持续时间更久,具有明显的缓释效果。与 INS-NPs 相比,INS-NPs L100 降血糖作用更优。这与体外释放结果及在人工胃液和人工肠液中的稳定性结果相一致。将胰岛素制备成 INS-NPs,直接灌胃后,由于药物在胃中释放速度极快,5 min 即可达到 90% 以上,导致所释放的胰岛素在胃蛋白酶作用下快速失活,从而导致无明显的降血糖作用。而对于 INS-NPs L100,其在胃液

中释放速度极慢,2 h 时释放量不足 8%,从而使胰岛素在胃中稳定性大幅度提高;经胃排空作用进入肠段后,肠溶载体逐渐溶解,释放出 INS-NPs,由于其粒径增大,药物释放速度减慢,肠中稳定性提高,可保证部分在胰岛素 INS-NPs 凭借脂质材料的亲脂性,以整体形式进入体循环,逐渐释放胰岛素,发挥持续降血糖作用。

4 讨 论

胰岛素与其他大分子蛋白质多肽类药物一样,受到细胞间紧密连接(1~5 nm)的限制,不能穿透细胞旁通路。INS-NPs 在肠道的吸收主要有两种基本机制,一种是纳米粒黏附于肠上皮黏液层(由杯状细胞产生)通过细胞间通道吸收;另一种是通过跨细胞途径的渗透(M 细胞内吞作用;被动扩散通过肠细胞、纤毛细胞)^[11]。

本研究使用安全无毒的两亲性聚合物载体材料 PEG-PLA 和脂质材料磷脂 s75 作为胰岛素纳米粒的载体。这种杂化系统具备两种载体材料的优势:一方面高分子载体 PEG-PLA 的亲水性链段 PEG 可提高载体与胰岛素的相容性和分散性,疏水性链段 PLA 则控制胰岛素的释放速率,从而可有效地调控载体的亲疏水性、药物释放速率和载药率^[15];另一方面,脂质材料磷脂 s75 能增加纳米粒药物的脂溶性,提高纳米粒在小肠黏膜上的吸收和转运^[16];同时,由于胰岛素与胆酸钠形成脂溶性复合物可使胰岛素脂溶性增加,显著提高了纳米粒的 EE 与稳定性^[11]。在此基础上,本研究以 Eudragit L100 为肠溶载体,将纳米粒包载于肠溶载体中,进一步避免胃液对纳米粒或胰岛素的破坏作用,使纳米粒在小肠段释放,以提高口服胰岛素的生物利用度^[11]。本研究制备的 INS-NPs L100 在 pH 1.0 的盐酸中的释放明显低于 INS-NPs,降血糖效果也较 INS-NPs 更为显著,作用时间更长,生物利用度更高。

5 结 论

本研究采用乳化溶剂挥发法制备了一种基于聚合物(PEG-PLA)-脂质(磷脂)杂化纳米粒的口服胰岛素肠溶制剂(INS-NPs L100)。当胰岛素与胆酸钠物质的量比为 1:22.5,脂质材料为磷脂 s75 与 PEG-PLA 质量比为 1:5 时,所制备的 INS-NPs

L100 经复溶后平均粒径为 278.0 nm, EE 为 62.18%; 在可显著降低人工胃液中药物释放量, 2 h 仅释放 8.01%, 显著提高胰岛素胃中稳定性; 在人工肠液环境中可缓慢释药。健康大鼠经口给予 INS-NPs L100 后, 与 INS-NPs 相比, 具有明显的持续降血糖作用。本研究结果表明, 本研究所设计的基于聚合物-脂质杂化纳米粒的口服肠溶制剂在蛋白多肽类药物的口服递送中具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] Wang L, Gao P, Zhang M, *et al.* Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013[J]. *JAMA*, 2017, **317**(24): 2515–2523.
- [2] Li CY, Huang WL, Qian H. Advances in the research of long-acting strategy of insulin and GLP-1 analogs[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2018, **49**(6): 660–670.
- [3] Wong CY, Al-Salami H, Dass CR. Microparticles, microcapsules and microspheres: a review of recent developments and prospects for oral delivery of insulin[J]. *Int J Pharm*, 2018, **537**(1/2): 223–244.
- [4] Deutel B, Laffleur F, Palmberger, *et al.* *In vitro* characterization of insulin containing thimeric microparticles as nasal drug delivery system[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2016, **81**: 157–161.
- [5] Ledet G, Graves RA, Bostanian LA, *et al.* A second-generation inhaled insulin for diabetes mellitus[J]. *Am J Health-Syst Pharm*, 2015, **72**(14): 1181–1187.
- [6] Cai L, Zhu Z. Progress in non-invasive routes for insulin preparations[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2007, **38**(2): 105–107.
- [7] Geho WB, Rosenberg LN, Schwartz SL, *et al.* A single-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial of oral hepatic-directed vesicle insulin add-on to oral antidiabetic treatment in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2014, **8**(3): 551–559.
- [8] Eldor R, Arbit E, Corcos A, *et al.* Glucose-reducing effect of the ORMD-0801 oral insulin preparation in patients with uncontrolled type 1 diabetes: a pilot study[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(4): 59524.
- [9] Li CY, Huang WL, Qian H. Advances in the research of long acting strategy of insulin and GLP-1 analogs[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2018, **49**(6): 660–670.
- [10] Grigoras AG. Polymer-lipid hybrid systems used as carriers for insulin delivery[J]. *Nanomedicine*, 2017, **13**(8): 2425–2437.
- [11] Sun S, Liang N, Yamamoto H, *et al.* pH-sensitive poly(lactide-co-glycolide) nanoparticle composite microcapsules for oral delivery of insulin[J]. *Int J Nanomed*, 2015, **10**: 3489–3498.
- [12] Ben-Shabat S, Kumar N, Domb AJ. PEG-PLA block copolymer as potential drug carrier: preparation and characterization[J]. *Macromol Biosci*, 2006, **6**(12): 1019–1025.
- [13] Liu J, Gong T, Wang C, *et al.* Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: preparation and characterization[J]. *Int J Pharm*, 2007, **340**(1/2): 153–162.
- [14] García-Díaz M, Foged C, Nielsen HM. Improved insulin loading in poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles upon self-assembly with lipids[J]. *Int J Pharm*, 2015, **482**(1/2): 84–91.
- [15] Ghasemi R, Abdollahi M, Emamgholi Zadeh E, *et al.* mPEG-PLA and PLA-PEG-PLA nanoparticles as new carriers for delivery of recombinant human growth hormone (rhGH)[J]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 9854.
- [16] Gou J, Feng S, Liang Y, *et al.* Polyester–solid lipid mixed nanoparticles with improved stability in gastro-intestinal tract facilitated oral delivery of larotaxel[J]. *Mol Pharm*, 2017, **14**(11): 3750–3761.