

口服胰岛素纳米脂质体的制备及其降血糖作用

张磊, 平其能*, 郭健新, 刘哲

(中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009)

摘要 目的:改进胰岛素纳米脂质体的制备方法,考察脂质体经正常大鼠小肠给药和灌胃给药的降血糖效果。方法:通过改变油相容积及油/水相比例,采用逆相蒸发-超声法制备了胰岛素纳米脂质体;测定了纳米脂质体的包封率;通过灌胃和小肠途径,给正常大鼠以 350 IU/kg 的剂量,用酶-苯酚法测定大鼠血糖,并与空白纳米脂质体、胰岛素溶液及生理盐水相比较。结果:胰岛素纳米脂质体的平均粒径为 83.3nm,多分散系数为 0.445,包封率为 78.5%;大鼠灌胃给药后未能显示降血糖作用,但小肠给药后 0.25 h 血糖下降 37.6%±13.9%,0.5 h 血糖下降了 89.3%±9.5%,维持 50%左右降血糖水平 2 h,而同法给予的胰岛素溶液、生理盐水和空白纳米脂质体组均无降血糖作用。结论:实验初步证实制备的纳米脂质体可以保护胰岛素在小肠中的活性并促进胰岛素吸收。

关键词 胰岛素; 纳米脂质体; 逆相蒸发法; 包封率; 降血糖

中图分类号: R944.9; R961 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2001)01-0025-05

胰岛素作为临床糖尿病治疗的一线药物,现在仍以注射途径给药,这给病人带来极大的不便和痛苦。从长远来看,口服给药途径是人们最乐意接受的。介于脂质体的生物膜特性和药物转输能力,将胰岛素以脂质体作载体给药将有利于提高其口服生物利用度和病人的顺应性^[1,2]。但脂质体作为胰岛素的载体口服给药存在两方面关键问题未得到解决,第一是脂质体对脂溶性药物的包封率一般可以达到 95%以上,但是对水溶性药物的包封率一般只有 30%~60%,对水溶性大分子药物的包封率更低^[3];第二是脂质体包封的生物大分子药物所面临胃肠环境因素的灭活。本文通过对传统制备方法处方的优化,试图制备粒径更小的胰岛素纳米脂质体在更有利于口服的同时提高包封率,通过灌胃及经小肠直接给药初步考查了其降血糖效果以确定胰岛素灭活的主要因素和确定制剂的发展方向。

1 实验材料

1.1 实验药品

胰岛素(徐州生化制药厂,批号 980102效价

26 IU/mg);注射级豆磷脂(上海浦江磷脂有限公司,批号 961204);乙腈(色谱纯);三氟乙酸(进口分装);聚氧乙烯蓖麻油(Serva进口分装,批号 960426,上海化学试剂站分装厂);葡萄糖测定试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司)。其它试剂均为分析纯

1.2 实验仪器

JY-92I 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所);ZFQ-85A型旋转蒸发器(上海医械专机厂);高效液相色谱仪(Shimadzu LC-10A,日本);岛津 SPD-10A型紫外检测器;755B UV-可见分光光度计。Zetamaster 光子相关光谱仪(英国马尔文仪器公司);H-7000型透射电镜(日本 Hitachi 公司)。

1.3 动物

Waster大鼠(中国药科大学实验动物中心)

2 实验方法

2.1 纳米脂质体的制备

采用逆相蒸发法制备胰岛素脂质体。将适量磷脂(3.5%)溶于1 ml氯仿中,室温下旋转蒸干,使磷脂于圆底烧瓶中成一均匀膜,将一定量的乙醚加入烧瓶中溶解磷脂。定量称取胰岛素6 mg溶于pH 7.6磷酸盐缓冲液中,形成含药1.65 mg/ml的溶液,与乙醚液混合,浴式超声仪超声5 min。所得乳剂减压蒸去有机溶剂至得到半固体胶状物,真空干燥12 h。以pH 4.0甘氨酸缓冲液水合,探针式超声1 min即得到纳米脂质体。在水合介质中加入聚氧乙烯蓖麻油得到含有表面活性剂的纳米脂质体。

2.2 纳米脂质体的形态和大小的测定

应用1%磷钼酸负染色制备样品,于透射电镜下观测并照相。应用Zetamaster光子相关光谱仪测定纳米脂质体的平均粒径和分散性。

2.3 纳米脂质体的含药量测定

采用反相HPLC法测定药物含量^[4]。色谱柱,Shim-pack CLC-ODS(150 mm×6 mm,中科院大连化物所);流动相,乙腈-0.01%三氟乙酸(30:70);柱温,室温;色谱泵,Shimadzu LC-6A,流速,1.0 ml/min;检测器,Shimadzu SPD-10A UV-VIS,检测波长,210 nm;进样体积,20 μl。用微量进样器吸取脂质体样品100 μl,移入试管加80%无水乙醇溶解,进样测定制剂中药物含量。

2.4 纳米脂质体的包封率的测定

纳米脂质体的包封率通过凝胶柱层析法测定。柱层析条件为:Sephadex-G50柱(16 cm×3 cm),洗脱液pH 7.4缓冲液,流速0.5 ml/min,室温下层析。移取胰岛素纳米脂质体1.0 ml上柱,以柱层析条件洗脱,每3.0 ml收集一次,游离药物量应用含量测定的HPLC条件进行测定。包封率=($W_{总}-W_{游}$)/ $W_{总}$ ×100%。 $W_{总}$ 表示含量, $W_{游}$ 表示游离药物量。

2.5 血糖测定方法

采用经典的酶苯酚分光光度法进行。量取1%苯酚液10 ml,蒸馏水加至100 ml,配成0.1%苯酚溶液。量取酶试液100 ml,将上述两试液混匀即为酶酚混合液。测定血糖时,受试管和标准管中分别加入20 μl血清和对照液,均与3.0 ml酶酚混合液混匀,置37℃水浴,20 min后在分光光度计510 nm处,以酶酚混合液为空白,30 min内读取测

定值。血清葡萄糖含量 $C = A_{(T)} / A_{(S)} \times 100$ (mg/dl),其中 $A_{(T)}$ 为受试管的吸收值, $A_{(S)}$ 为标准管的吸收值。

2.6 正常大鼠小肠给药降血糖试验

将正常雄性大鼠16只,随机分成4组,每组4只,一组为生理盐水空白组,一组为空白纳米脂质体组,一组为胰岛素纳米脂质体组(含量为1.76 mg/ml),另外一组给予胰岛素溶液(胰岛素浓度为1.67 mg/ml)。大鼠禁食一夜后,以40 mg/Kg腹腔注射戊巴比妥钠麻醉,于大鼠小肠两端插管,用pH 7.4磷酸盐缓冲液洗涤小肠后,以350 IU/Kg的剂量将脂质体混悬液用恒流泵送进小肠。取空白血测空白血糖,再分别于药物输入小肠后0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6 h分别于眼底静脉丛取血,离心,取20 μl血清,按“2.5”项下进行测定。

2.7 正常大鼠灌胃给药降血糖试验

将正常雄性大鼠16只,随机分成4组,每组4只,一组为生理盐水空白组,一组为胰岛素溶液(胰岛素浓度为1.67 mg/ml)组,一组为胰岛素纳米脂质体组(含量为1.76 mg/ml),另外一组给予含有聚氧乙烯蓖麻油的胰岛素纳米脂质体(含量为1.68 mg/ml)。禁食一夜后,以350 IU/Kg的剂量灌胃给药。取空白血测空白血糖,再分别于灌胃后0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 6 h分别于眼底静脉丛取血,离心,取20 μl血清,按血糖测定方法项下进行测定。

3 结果与讨论

3.1 纳米脂质体的形态和大小

经逆相蒸发法制备得到的脂质体为乳白色混悬液,经探针式超声后变成透明胶体溶液。随着超声时间的延长,脂质体的粒径逐渐下降,在超声1 min后粒径基本保持不变。长时间超声会引起脂质体中胰岛素的降解,致使含量下降,因此实际操作中选择1 min为限。胰岛素纳米脂质体的平均粒径为 83.3 ± 7.5 nm,多分散性指数为0.445。图1为脂质体的透射电镜图,可见清晰的指纹状螺旋。

3.2 纳米脂质体混悬液的含药量

方法专一性考察结果表明,在本色谱条件下,脂质体材料以及溶剂等杂质峰并不干扰胰岛素的含量测定。胰岛素峰面积 A 与药物浓度 C (mg/ml)回归方程为 $C = 2.5 \times 10^{-5} A + 1.1 \times 10^{-3}$ (r

= 0.9992), 线性范围: 0.015~ 0.292 mg/ml. 方法回收率为 $97.31\% \pm 2.30\%$, 日间差为 4.91%, 日内差为 1.92%。测得胰岛素纳米脂质体混悬液的含量为 $1.77 \pm 0.06 \text{ mg/ml} (n=3)$ 。

3.3 纳米脂质体的包封率

空白纳米脂质体和胰岛素溶液的 Sephadex-G50柱的回收率为 $100.30\% \pm 1.68\%$ 和 $99.98\% \pm 1.94\%$ 。空白脂质体的出峰体积为 23~ 29 ml, 胰岛素的出峰体积为 35~ 53 ml, 两者的分离度为 1.75 它们的柱洗脱曲线见图 2

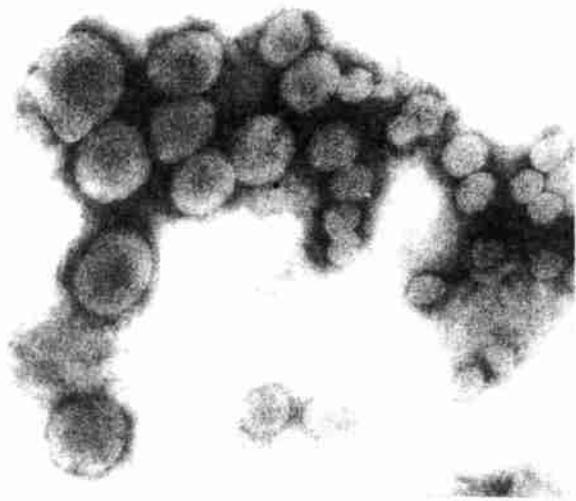
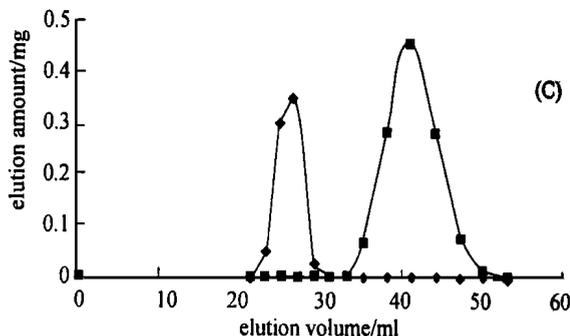
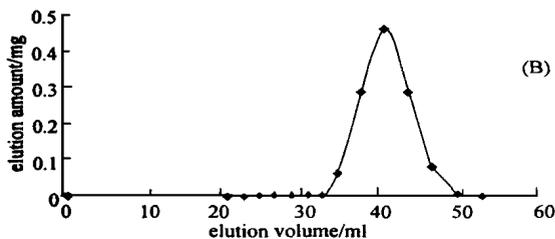
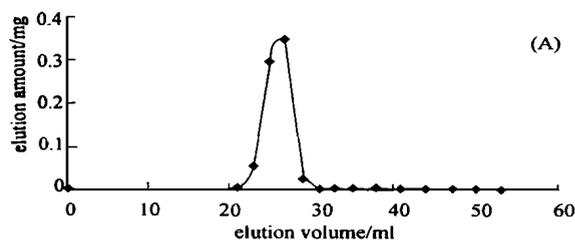


Fig 1. Transmission electron photomicrograms of lecithin nano-liposomes containing insulin ($\times 300\,000$)



—◆— blank nano-liposomes —■— insulin

Fig 2. The elution curve of insulin nano-liposomes and free drugs (A) blank nano-liposomes, (B) insulin, (C) mixture of blank nano-liposomes and insulin

逆相蒸发法是制备水溶性大分子脂质体时的常用方法,在一般情况下脂质体的包封率比较低,在制备时其关键步骤是形成乳剂和减压蒸发除去有机溶剂。选择适当的有机溶剂和采用适当的水相/油相比,将有利于提高大分子药物的包封率。实验发现,当油水相比例减小到 3:1 以下时就很难形成均一的乳剂。采用与水比重接近的有机溶剂(如乙醚等)有利于乳剂的形成,而与水的比重相差较大的溶剂(如氯仿)所形成的乳剂稳定时间较短,随着减压蒸发的进行发生分层而减小药物的包封率。

文献报道,应用旋转薄膜蒸发法、逆相蒸发法以及冻融法,胰岛素的包封率一般均低于 40%^[5],本实验通过对逆相蒸发法的油相溶剂和油水相比的改进,使胰岛素的包封率达到 78.5% ($n=3$)。

3.4 胰岛素脂质体大鼠在体给药后降血糖作用

由于药物口服吸收的主要部位是小肠,因此首先采用了大鼠小肠直接给药的方式进行胰岛素脂质体的降血糖效果考察。图 3A 列出了大鼠经小肠直接给药后的血糖随时间的变化情况。结果表明,在小肠以 350IU/Kg 的剂量直接给予胰岛素纳米脂质体混悬液后,大鼠血糖即开始降低,0.25 h 血糖下降 $37.6\% \pm 13.9\%$,0.5 h 降低了 $89.3\% \pm 9.5\%$,50% 低血糖水平可以维持 2 h,而给予胰岛素溶液、生理盐水和空白纳米脂质体组均无降血糖作用。胰岛素纳米脂质体给药 3 h 后,大鼠血糖恢复正常水平。

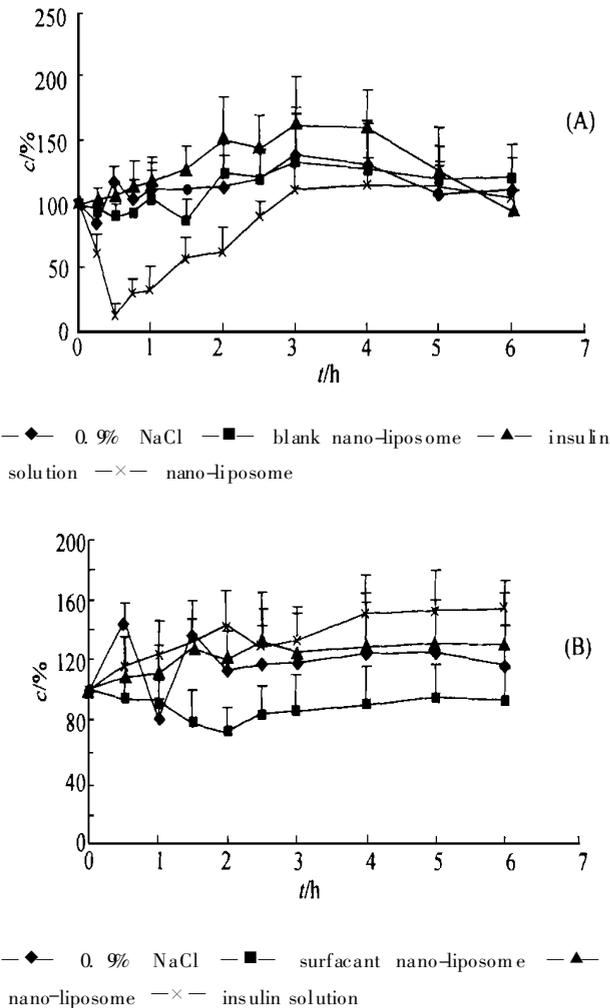


Fig 3. The blood glucose change after directly intestinal administration (A) and p. o. administration (B) of nano-liposome

小肠直接给药实验中,纳米脂质体能够促进胰岛素的吸收,发挥降血糖作用;而小肠同样剂量(350IU/Kg)给以胰岛素溶液却没有降血糖的作用。初步证实了本文制备的纳米脂质体可以促进胰岛素小肠吸收,对胰岛素活性有一定的保护作用。脂质体是一种具有同生物膜性质类似的磷脂双分子层结构载体,它可以和小肠粘膜细胞膜相互作用,进而融合,促使药物尤其是小肠无法吸收的大分子药物得以吸收。脂质体的包裹可以使胰岛素避开肠道环境的破坏而靶向于 Peyer's 区,适当减小

脂质体粒径也有利于肠道内其他途径的吸收^[6-8]。另外,小肠粘膜细胞也可以通过胞饮和胞吞作用使得纳米脂质体直接吸收而不发生形态上的改变,从而使包裹在脂质体内部的大分子蛋白类药物在小肠吸收后,凭借脂质双分子层的保护通过药酶系统。

图 3B 列出了脂质体灌胃给药后大鼠血糖变化情况,可以看出胰岛素脂质体口服后没有降血糖的效果,表面活性剂也未能促进脂质体的吸收。结合小肠给药实验,纳米脂质体很有可能在胃酸中及胃肠道内酶的作用下被破坏降解,这个问题可以尝试通过同时使用抑肽酶或进行肠溶包衣而得到解决。

参考文献

- [1] Regine Peschka, Cathi Dennehy, Francis C, *et al.* A simple *in vitro* model to study the release kinetics of liposome encapsulated material. *J Control Rel*, 1998, **56** 41-51.
- [2] Yoshie Maitani, Hidetaka Moriya, Naoto Shimoda, *et al.* Distribution characteristics of entrapped recombinant human erythropoietin in liposomes and its intestinal absorption in rats. *Int J Pharm*, 1999, **185** 13-22.
- [3] New RRC. Preparation of liposomes. In: *Liposomes-a practical approach*, ed. New RRC. New York: Oxford University Press. 1990. 71-74.
- [4] 郭健新 (Guo JX), 胡一桥 (Hu YQ), 郑梁元 (Zheng LY) 等. RP-HPLC测定胰岛素聚乳酸微球中胰岛素的含量 [J]. 中国药科大学学报 (*J Chin Pharm Univ*), 1999, **30** (1): 24-26.
- [5] Kato Y, Hosokawa T, Hayakawa E, *et al.* Influence of liposomes on typical digestion on insulin [J]. *Biol Pharm Bull*, 1993, **16** 457.
- [6] Bargoni A, Cavalli R, Caputo O, *et al.* Solid nanoparticles in lymph and plasma after duodenal administration to rats [J]. *Pharm Res*, 1998, **15** 745-750.
- [7] Florence AT. The oral absorption of micro- and nanoparticles: neither exceptional nor unusual [J]. *Pharm Res*, 1997, **14** 259-266.
- [8] Jenkins PG, Howard KA, Blackhall NW, *et al.* Microparticle absorption from the rat intestine [J]. *J Control Rel*, 1994, **29** 339-350.

Preparation of Oral Insulin Nano-liposomes and Its Hypoglycemic Effect

ZHANG Lei, PING Qi-Neng, GUO Jian-Xin, LIU Zhe

Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract **AIM** The present research was developed to prepare lecithin nano-liposomes encapsulating insulin and evaluate the enhancing effect of these vesicles on the absorption of hydrophilic proteins in the intestine. **METHODS** Insulin nano-liposomes were prepared by reverse-phase evaporation and treated further by sonication. The content and entrapment efficiency of nano-liposomes were analyzed by HPLC. When liposomes were applied to the rats at a dose of 350IU/kg through both directly into the intestine and i. g. *in vivo*, the hypoglycemic effect was investigated. **RESULTS** The particle size of nano-liposomes was 83.3nm with polydispersity index of 0.445. The entrapment efficiencies of nano-liposomes were 78.5%. *In vivo* hypoglycemic study showed the level of blood glucose reduced by nano-liposomes was $37.6\% \pm 13.9\%$ at 0.25 h, reached $89.3\% \pm 9.5\%$ at 0.5 h and remained less than 5% within 2 h. Blank nano-liposomes, insulin solution and saline had no hypoglycemic effect. **CONCLUSION** Nano-liposomes may become a promising carrier for enhancing absorption of hydrophilic proteins in intestine.

Key words insulin; nano-liposomes; reverse phase evaporation; entrapment efficiency; blood glucose

· 新药之窗 ·

曲通 曲通(盐酸曲马多分散片 规格 50 mg)是一种新型强效镇痛药,具有独特的双重作用机制:①激动阿片受体②通过调节神经递质(去甲肾上腺素和 5羟色胺)的释放和吸收,从而增加中枢神经系统对疼痛的下行传导抑制作用。

曲通的阿片类因素和非阿片类因素协同增效而发挥其对中度至重度疼痛的镇痛作用,其镇痛强度与吗啡中等剂量的镇痛强度相当,但克服了传统阿片类镇痛药固有的缺陷:便秘、呼吸抑制、镇静作用等,长期使用曲通,几乎不产生成瘾与耐受。曲通可有效解除产痛,促进分娩,缩短产程,且不会引起婴儿呼吸窘迫症和加重新生儿黄疸。因此,在妇产科有较大应用价值。

曲通的临床适应症是各种中度至重度疼痛,包括①外科术后疼痛,②骨折、挫伤、创伤等引起的外科伤病;③产痛;④癌痛及其他。目前国内专家已将曲马多推荐为癌痛三阶梯治疗第二阶梯的主导药物。

曲通采用分散片剂型,既可直接用于吞服,也可放入水、牛奶或果汁中,搅拌至混悬状态后服用,更适合于吞咽有困难的老年患者和儿童。本品用量视疼痛程度而定。一般成人及14岁以上中度疼痛的患者,曲通的单剂量为 50 mg~ 100 mg,1岁以上儿童的服用剂量为每公斤体重 1~ 2 mg,必要时 4~ 6小时后可重复使用,每日最重剂量通常不超过 400 mg。

生产厂商:南京东元制药有限公司

地址:南京江浦经济技术开发区天浦路 10号

电话:(025)8182999

传真:(025)8182555

邮编:211800