

以硬脂酸纳米粒为载体的胰岛素小肠吸收部位研究

吴琼珠, 平其能

(中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009)

摘要 目的 为了研究以硬脂酸纳米粒作为载体的胰岛素在小肠各部位的吸收。方法 采用在体大鼠小肠段回流实验, HPLC法测定药物浓度, 依据药物在小肠段中的减少量来确定药物的吸收, 同时采用糖尿病模型大鼠小肠段内直接给药测定其血糖值。结果 胰岛素在回肠中的吸收明显高于其它肠段, 其降血糖作用因给药部位的不同而不同(回肠 60.34%、空肠 48.38%、十二指肠 46.75%)。结论 回肠是以硬脂酸纳米粒作为载体的胰岛素的最好吸收部位。

关键词 胰岛素; 在体实验; 小肠吸收; 血糖

中图分类号: TQ467.32 文献标识码: A 文章编号: 1000-5048(2002)03-0192-04

胰岛素(Insulin)是治疗胰岛素依赖型(I型)糖尿病的必备药物, 患者需终生每日3~4次皮下注射胰岛素, 非常痛苦与不便。近年来, 人们一直在努力寻找一种非注射给药的途径, 如直肠、鼻粘膜、眼、肺部给药等等^[1]。口服给药仍是最受患者欢迎的给药途径。但胰岛素口服吸收的难点在于: (1)在胃肠道中易失活; (2)分子量大且有很强的分子间聚合趋势, 从而难以透过胃肠道上皮细胞膜吸收。应用纳米粒作为胰岛素载体以增加胃肠道吸收、避免破坏已得到许多研究工作者证实, 但其在胃肠道中的最佳吸收部位及吸收机理尚未清楚。

小肠是口服药物吸收的主要部位, 人体小肠(包括十二指肠、空肠、回肠)不同区段的生理状况各不相同, 药物在不同区段的吸收情况往往有较大差异, 考察药物在小肠的最佳吸收部位, 对于合理选择处方, 拟订制剂工艺从而提高其生物利用度具有指导意义。最佳吸收部位的研究, 可通过离体、在体、体内多种途径来进行, 人体内研究目前国外已见报道, 但费用大、设备要求高, 难度大。采用动物在体实验方法, 早已有多种方案, 对于不同性质药物均可通过适当调整进行研究, 其吸收特点与人体吸收的相关性也经实验证实并得到确认。本文采用大鼠小肠在体灌流和小肠内直接注入药物的方法, 对胰岛素硬脂酸纳米粒最佳吸收部位进行实

验探讨, 奠定其口服制剂研究的理论基础。

1 药品、仪器及动物

胰岛素(徐州生化制药厂, 批号980207, 干品效价26.6 IU/mg); 硬脂酸(SA)(上海凌峰化学试剂有限公司, 批号: 000721); 大豆磷脂(上海浦江磷脂有限公司, 批号: 981204); Poloxamer 188(Sigma公司); 四氧嘧啶(Sigma公司); 葡萄糖测定试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司); 乙腈(HPLC grade, USA); 其它试剂均为分析纯。

LC-10A型高效液相色谱仪(Shimadzu, Japan), WDL-95色谱数据处理系统(大连化物所), 7502分光光度计(上海分析仪器厂), 501型超级恒温水浴(上海市实验仪器厂), HL-2型恒流泵(上海沪西生化仪器厂), KQ-25型超声波清洗器(昆山超声仪器厂), 电磁搅拌器(深圳天南海北实业有限公司)。

动物: SD大鼠, 体重 250 ± 20 g, 雌雄不限(南京医科大学动物实验中心)。

2 实验方法

2.1 胰岛素硬脂酸纳米粒的制备

采用乳化-溶剂挥发法制备^[2]称取硬脂酸75 mg, 加入丙酮5.0 ml并超声溶解, 再加入适量大豆磷脂氯仿液, 构成有机相。称取胰岛素50 mg, 用含

有稳定剂的缓冲液($\text{pH}=5.5$)溶解,与有机相混合,超声 60S,形成初乳。另称取 400 mg Poloxamer 188 溶于 25 ml 蒸馏水中构成水相。将初乳用 6 号针头注入 1000 r/min 电磁搅拌的水相中,继续搅拌 4 h,使有机溶剂挥发完全,补充水相至 50 ml,0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得乳光明显的胰岛素硬脂酸纳米粒胶体溶液。

2.2 胰岛素硬脂酸纳米粒的含量测定

采用 HPLC 法测定^[3]。精密吸取胰岛素硬脂酸纳米粒胶体液 0.5 ml 于 5 ml 量瓶中,以 80%乙醇酸水溶液溶解并定容,20 μl 进样测定,记录峰面积。色谱条件:色谱柱为 Lichrospher 5- C_{18} 柱(200 mm \times 4.6mm, 15 μm);流动相为乙腈-含 0.01%三氟乙酸的水溶液(30:70);检测波长 214 nm;流速 1.0 ml/min;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;灵敏度 0.05 AUFS;进样量 20 μl 。

2.3 大鼠小肠在体回流实验及其影响因素考察

2.3.1 溶液的配制 空白回流液(Lock's 缓冲液):称取 NaCl 9.2 g、KCl 0.42 g、CaCl₂ 0.23 g、NaHCO₃ 0.15 g 和葡萄糖 1.0 g 加水溶解并稀释至 1000 ml;供试药液:精密量取胰岛素硬脂酸纳米粒胶体液适量,用空白回流液稀释成 0.4 mg/ml 的供试液。

2.3.2 在体回流实验方法 实验前,大鼠在自然饮水条件下禁食 12 h,用乌拉坦 1.2 g/kg 腹腔注射麻醉,固定于恒温板上,保持 37 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 体温,沿腹中线打开腹腔,用生理盐水和空白回流液清洗肠道。按以下方法取各小肠段进行结扎^[4]:十二指肠段自幽门 1 cm 处开始,空肠段离幽门 15 cm 开始,回肠段距离盲肠 20 cm 处开始,各段均取 10 cm 左右。将插管接上恒流泵,恒温 37 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 的药液 40 ml 以 1 ml/min 的流速回流 2 h,各肠段同法操作,结束后用空气排出药液,将所得回流液移入 50 ml 容量瓶,另用空白回流液冲洗 5 min,并入容量瓶,用空白回流液稀释至刻度。另取未经回流的药液,按“2.1”项下方法分别测定药物浓度,计算原药液浓度 C_0 及回流后药液浓度 C_t 。实验结束后,在一玻璃板上滴加 37 $^{\circ}\text{C}$ 空白回流液,将各肠段沿插管两端剪下,轻放于液滴中,测量肠段长度 L 。

2.3.3 肠壁物理吸附的影响 剪取清洗后的空白小肠段约 10 cm(共三段),用玻璃棒将粘膜层翻出,置于 40 ml 已知浓度的药液中,于 37 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 水浴

中孵育 2 h,取出肠段,测定孵育液的药物浓度,考察大鼠小肠壁对药物的物理吸附。

2.3.4 空白回流液对测定方法及药物稳定性的影响 同“2.3.2”项下操作,对大鼠全小肠插管,用空白回流液 100 ml 回流 2 h,依法操作,HPLC 法测定,考察空白回流液对测定方法有无干扰。另用空白回流液配制 3 份药液,置于 37 \pm 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 2 h,测定孵育前后药物浓度,考察胰岛素硬脂酸纳米粒在空白回流液中的稳定性。

2.4 大鼠血糖值测定

2.4.1 血糖测定方法 采用葡萄糖氧化酶法(GOD-PAP)测定。取血清 20 μl 为样品管,蒸馏水 20 μl 为空白管,1 mg/ml 的标准葡萄糖液 20 μl 为标准管,分别加酶酚混合液 3.0 ml,混合均匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 20 min,于 505 nm 处测定吸光度(A),计算待测血清的葡萄糖含量(C) $C = A(T)/A(S) \times 100$ (mg/dl),其中 $A(T)$ 为样品管的吸光度, $A(S)$ 为标准管的吸光度)。

2.4.2 糖尿病大鼠模型的建立 SD 大鼠(250 \pm 20 g),禁食 12 h 后,皮下注射四氧嘧啶溶液 160 mg/kg,3 d 后从眼底静脉丛中取血,离心取血清,按“2.4.1”项下方法测定血糖值,血糖值达 300 mg/dl 以上者为糖尿病模型大鼠。

2.4.3 降血糖作用 取糖尿病模型大鼠 24 只,随机分成 4 组,每组 6 只,空腹状态下腹腔注射乌拉坦 1.2 g/kg 麻醉,分离颈静脉,预先留置肝素化导管以备采血。沿腹中线打开腹腔,分别在十二指肠、空肠和回肠(给药位置同在体回流实验)内注射胰岛素硬脂酸纳米粒胶体液 100 IU/kg,一组未给药作为对照,于不同时间 0,1,2,4,8,10 h 从颈静脉中取血,离心取血清,按“2.4.1”项下方法测定血糖值。

3 实验结果

3.1 胰岛素含量测定

方法专属性考察结果表明,在本色谱条件下,载体材料及溶剂等均不干扰胰岛素的测定。胰岛素浓度(C_1)在 19.6~156.8 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与峰面积(A_1)呈良好的线性关系,其回归方程为 $C_1 = 2.5634 \times 10^{-6} A_1 + 0.2329$, $r = 0.9999$ ($n = 5$)。胰岛素高、中、低三个浓度(20, 80, 160 $\mu\text{g/ml}$)的回收率分别为 96.42%, 98.2% 及 100.84%。中间浓度(80

μg/ml)的日内差为 2.16%(n=5), 日间差为 4.52%(n=5)。测得三批胰岛素硬脂酸纳米粒的含量为 0.97±0.06 mg/ml。

3.2 大鼠小肠在体回流实验影响因素考察结果
剪取空白小肠段置已知浓度的药液中孵育 2 h, 测得孵育液的药物浓度为原药物浓度的 99.90%±2.12%(n=3), 可认为大鼠小肠壁对药物基本无物理吸附。对大鼠全小肠插管在体回流实验结果表明, 空白回流液对测定方法无干扰。用空白回流液配制的胰岛素硬脂酸纳米粒药液孵育 2 h 后, 其孵育后的药物浓度为原药物浓度的 99.82%±0.20%(n=3), 可认为胰岛素硬脂酸纳米粒在空白回流液中稳定。

3.3 大鼠各小肠段药物的吸收量
经回流后药物在小肠段的减少量即为药物的吸收量, 可按下式计算: 药物吸收量 $C_1=[40C_0-50C_t] \times 10/L$; 药物吸收百分率(%)= $C_1/40C_0 \times 100\%$ (其中: C_0 、 C_t 分别为原药液和回流后的药物浓度; L 为小肠段长度)。计算结果分别为 10 cm 肠段 2 h 的吸收量(见表 1)。

Tab 1. Uptake of Insulin from various in situ rat intestine segments ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Intestine segments	Dng Uptake(mg)	Dng Uptake(%)
Duodenum	0.3358±0.3184	2.12±2.01
Jejunum	0.4055±0.2788	2.56±1.76
Ileum	0.7635±0.4990	4.82±3.15

3.4 大鼠血糖值测定

3.4.1 血糖值的测定 GOD-PAP 法测定结果表明, 在 0.5~5 mg/ml 的浓度范围内, 葡萄糖浓度(C_2)与吸收值(A_2)有良好的线性关系: $C_2=4.3151A_2-0.0093$, $r=0.9999$ ($n=3$)。葡萄糖高、中、低三个浓度(0.5, 2.5, 5.0 mg/ml)的回收率分别为 97.88%, 100.12%和 98.34%。中间浓度(2.5 mg/ml)的日内差和日间差分别为 0.84%和 1.60%($n=3$)。

3.4.2 糖尿病大鼠小肠各段给药降血糖作用 不同小肠段直接注入胰岛素硬脂酸纳米粒(100 IU/kg)后, 不同时间采血测定血糖值, 结果见表 2。

从表 2 可发现, 大鼠小肠各段包括十二指肠、空肠及回肠均可吸收胰岛素, 但以回肠部位吸收最

Tab 2 The blood glucose changed after intro-intestine segments($n=6$)

T(h)	Contrast	Duodnam	Jejunam	Ileum
0	304.55±6.52	302.99±6.02	302.50±4.58	305.12±2.26
1	312.31±4.54	210.25±7.20	193.38±6.24	139.45±3.23
2	306.04±4.22	161.42±10.84	156.18±7.98	120.97±5.81
4	302.91±5.02	172.28±4.60	164.12±6.03	123.08±9.04
8	308.43±4.53	192.13±7.12	198.25±4.14	148.55±8.24
10	318.06±6.38	221.33±4.83	238.32±6.18	196.49±12.08

好。经配对 t 检验, 十二指肠、空肠、回肠与对照组间均有非常显著性差异, $P<0.01$ 。回肠与空肠间有非常显著性差异, $t=4.2573$, $P<0.01$, 回肠与十二指肠间有显著性差异, $t=3.6188$, $P<0.05$, 而十二指肠与空肠间无显著性差异, $t=0.7926$, $P>0.05$ 。血糖下降百分率(R): $R=[(X_0-X_t)/X_0] \times 100\%$, 其中: X_0 为 0 时间的血糖值, X_t 为 t 时间的血糖值)的计算结果见表 3。

Tab 3. The hypoglycemia effect of insulin stearic acid nanoparticles ($n=6$)

T(h)	Duodnum	Jejunum	Ileum
1	36.31±1.19	36.05±2.60	54.29±1.19
2	46.75±2.60	48.38±2.33	60.34±2.19
4	43.13±1.62	43.54±1.67	52.32±1.95
8	36.56±2.83	34.45±2.02	35.77±2.46
10	23.61±2.96	21.11±1.23	20.03±4.55

4 讨 论

1)口服胰岛素是目前多种非注射给药方法中最简便、最易被患者接受的, 但胃及十二指肠内的大量蛋白水解酶可迅速使胰岛素变性失活, 过去公认胰岛素口服是不能降血糖的。但实验结果及很多研究者均发现胰岛素分子能透过肠壁吸收入血, 小肠吸收率最高, 结肠和直肠也有较高的吸收率^[4]。通过大鼠在体各小肠段回流实验, 结果表明: 大鼠小肠各段均能吸收胰岛素, 其中回肠段吸收最好, 十二指肠和空肠相类似。与小肠段内直接注射给药后测定血糖值的结果一致, 说明用在体回流后药物减少量来研究药物吸收、选择最佳吸收部位的方法是合理的。

2)纳米粒给药系统可经细胞旁路及小肠壁的集合淋巴结(PP)中的 M 细胞转运吸收^[5]。以硬脂酸纳米粒作为载体的胰岛素在大鼠回肠较十二指肠及空肠有较好的吸收及降血糖作用, 可能是由于回肠具有丰富的 PP, 纳米粒可选择性地趋向于 PP

表面, 通过 M 细胞转运吸收。但其透过 M 细胞的转运机制还有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] 吴琼珠(Wu QZ), 平其能(Ping QN). 胰岛素非注射给药途径的研究进展[J]. 解放军药学报(*Pham J Chin PLA*), 2000, **16**(1): 28-30

[2] 郭健新(Guo JX), 平其能(Ping QN), 张 磊(Zhang L). 胰岛素柔性脂质体经小鼠皮肤给药的降血糖作用[J]. 中国药学报(*Chin Pham J*), 2001, **36**(1): 35-38

[3] 任献忠(Ren XZ), 张钧寿(Zhang JS), 王恒斌(Wang HB). 红霉素肠道吸收机理及最佳吸收部位研究[J]. 中国药科大学学报(*J Chin Pham Univ*), 1997, **28**(1): 17-22

[4] Michel C, Aprahamian M, Defontaine L, *et al.* The effect of site of administration in the gastrointestinal tract on the absorption of insulin from nanocapsules in diabetic rats. *J Pham Pharmacol*[J]. 1991, **43**(1): 1-5.

[5] 李凤前(Li FQ), 陆 彬(Luo B). 经胃肠道上皮吸收的微粒给药系统研究概况[J]. 国外医药——合成药、生化药、制剂分册(*World Pharm*), 2000, **21**(5): 307-310.

Studies on The Intestinal Absorption Site of Insulin In Stearic Acid Nanoparticles as Cairrers

WU Qiong-Zhu, PING Qi-Neng
Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

ABSTRACT **AIM** The purpose is to clarify the difference in the absorption of insulin stearic acid nanoparticles from various sites along the intestinal tract. **METHODS** The intestinal absorption was investigated using in situ perfusion method in the rats and studied by measuring fasted glycaemia in diabetic rats after a single administration at various sites along the gastrointestinal tract. **RESULTS** Compared with other segments, significant higher percentage of insulin uptaked from ileum after it was perfused at same concentration for 2 hours. The hypoglycemic effect was dependent on the site of administration(ileum 60.34%, jejunum 48.38%, duodenum 46.75%). **CONCLUSION** The results suggest that the ileum was the most potent site of absorption.

KEY WORDS Insulin; Stearic acid nanoparticles; Absorption site; Blood glucose

中国药科大学最新科研合作项目 (生化药物与生物制品)

1. 国际首创新型二肽甜味剂——天-丙甜二肽

2. CURDLAN SULFATE (CURDLAN 硫酸酯)

3. 二类新药系列产品的开发

4. 蚯蚓纤溶酶系列项目

5. 胸腺肽结肠溶胶囊

6. 胰酶系列
7. 胰岛素口服片剂(四类新药)

8. 小分子肝素口服胶囊(四类新药)

9. “尿崩停”气雾剂(四类新药)

10. 透明质酸骨关节注射液

11. 表皮生长因子(EGF)漱口片

12. 超氧化物歧化酶

13. CH-冻疮乳剂

14. 壳聚糖止血贴
15. 微生物发酵法生产天然型脱落酸

16. 酶法研制 D-苯甘氨酸(D-PG)

17. 酶法合成抗肿瘤核苷药物氟铁龙(Furtulon)新工艺

18.β-葡聚糖酶生产技术

19. 发酵法生产肌苷

20. 高产糖化酶生产技术

21. 生物杀虫剂和生物肥