

口服载胰岛素 PLGA 纳米球的制备及初步药效学评价

邱越佳¹, 孟 丹¹, 杨婷媛², 王连艳², 朱艳华^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 黑龙江哈尔滨 150050; 2. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100190)

摘要: 以聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 为载体, 采用超声复乳法结合溶剂挥发法制备载胰岛素的 PLGA 纳米球, 并优化了纳米球的处方及工艺。对最优条件下制备的纳米球进行表征, 包括粒径及粒度分布、 ζ 电位、包封率、载药量、收率、稳定性及体外释放行为。以糖尿病小鼠为模型, 进行初步药效学考察。结果显示, 优化纳米球的粒径为 $(108.3 \pm 1.4) \text{ nm}$; ζ 电位为 $(-40.8 \pm 0.7) \text{ mV}$; 包封率和载药量为 $(43.5 \pm 3.2) \%$ 和 $(4.5 \pm 0.3) \%$ 。扫描电镜结果显示所得纳米粒为球形, 且粒度分布均一。制品体外稳定性良好, 具有明显的缓释效果。糖尿病小鼠口服给予载药纳米粒, 12 h 内血糖较注射胰岛素溶液组下降平缓, 且药效持久。

关键词: 胰岛素; 纳米球; 超声复乳技术; 优化; 降血糖效果

中图分类号: R944.9 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2018)05-0614-08

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.05.012

国际糖尿病联合会 (IDF) 的一份报告指出, 2017 年全球约有 4.25 亿成人患糖尿病, 预计到 2045 年, 糖尿病患者可能达到 6.29 亿 [IDF 全球糖尿病概览 (第 8 版)]。在一些国家, 特别是发展中国家, 糖尿病已经成为最致命的疾病之一。糖尿病分为 1 型和 2 型。1 型糖尿病是胰岛素 (1) 依赖性病症, 其特征在于胰腺自身免疫系统引起的胰岛 β 细胞的破坏 (占有糖尿病病例的 10%) [1]。迄今为止 1 型糖尿病治疗方案首选每日多次注射 1, 给患者带来了极大的不便和巨大的痛苦。口服给药因其便利性和良好的患者顺从性, 成为最理想的替代途径。更重要的是, 口服途径被认为是生理性的, 因为它更真实地模拟了内源性 1 途径并提供更好的葡萄糖体内平衡 [2]。然而, 1 作为一种蛋白质药物, 和其他的蛋白类药物一样, 在口服给药中面临着很多需要解决的问题, 包括容易被胃中酸性环境、酶类等降解, 黏膜扩散受限和肠上皮膜通透性差等 [3], 这导致蛋白类药物的口服生物利用度低, 临床应用

困难。

为了克服这些问题, 研究者们尝试不同策略改善 1 口服的吸收情况, 包括纳米颗粒 [4]、脂质体 [5]、水凝胶 [6]、渗透促进剂 [3], 其中纳米颗粒作为药物递送和控制释放的载体, 有许多优点: ①可有效保护药物, 避免其降解, 提高药物的体内稳定性; ②可以控制药物释放, 延长其体内半衰期, 提高生物利用度; ③易实现靶向和定位, 可进一步改善生物利用度。在制备纳米载体的材料中, 可生物降解的聚合物具有良好的组织相容性, 受到普遍重视并得到广泛地应用。聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 是 FDA 批准的可用于注射剂的生物降解高分子聚合物, 已被广泛用于纳米药物递送系统的研究 [7]。目前载 1 的 PLGA 纳米球制备方法较为多样, 如超临界流体技术 [8]、膜乳化法 [9]、超声复乳法 [10], 其中超声复乳法以简便实用而最为常用, 然而现有制备方法中包封率、收率等仍需大幅提升。

本试验采用优化的超声复乳法结合溶剂挥发法制备 PLGA 纳米球, 通过单因素考察优化纳米球的制备工艺, 以期制品具有理想的粒度分布、较高的药物包封率和稳定的制备工艺。对优化所得的载 1 纳米球进行体外稳定性和释放行为的考察, 并初步考察其降糖效果, 为研究口服 1 的新型给药系统提供帮助。

收稿日期: 2017-10-17

基金项目: 国家科技重大专项 (子课题编号 2016ZX10004001-005)

作者简介: 邱越佳 (1994—), 女, 硕士研究生, 专业方向: 缓控释制剂与口服给药系统。

通信联系人: 朱艳华 (1970—), 女, 教授, 从事中药新药研究与开发, 缓控释制剂、外用制剂研究。

Tel (Fax): 0451-87266906

E-mail: 290471982@qq.com

1 仪器与试剂

S-450D 型超声波细胞破碎仪(美国 Branson 公司); Zetasizer Nano ZS 型粒度电位分析仪(英国 Marvin 公司); Infinite M200 型多功能酶标仪(瑞士 Tecan 集团公司); JEM-6700F 型冷场发射扫描电镜(日本 Jeol 公司); Vivaflow 50 型切向超滤器(德国 Sartorius 公司); BT600-2J 型蠕动泵(兰格恒流泵有限公司); Accu-Chek® Performa 血糖仪及试纸(Roche 公司, 试纸有效期至 2018 年 10 月)。

1(徐州万邦金桥制药有限公司, 28 u/mg, 批号 1701A12); PLGA(Lakeshore Biomaterials 公司, 乳酸与羟基乙酸摩尔比为 75 : 25, 相对分子质量为 70 000); 二氯甲烷(分析纯, 北京化学试剂公司); 胆酸钠(美国 Sigma 公司); 聚乙烯醇(PVA, 日本 Kuraray 公司, 聚合度 1 700, 醇解度 88.5%); 泊洛沙姆 188(北京化学试剂公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2 ~ 7.4, 北京索莱宝科技有限公司); 链脲霉素(北京华威锐科化工有限公司)。

清洁级雄性 C57 小鼠, 20 ~ 25 g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物许可证号 SCXK(京)2014-0004, 饲养于中国科学院过程工程研究所实验动物室, 动物使用许可证号 SYXK(京)2014-0002。

2 方法与结果

2.1 1 PLGA 纳米球的制备

采用超声复乳法制备 PLGA 纳米球。以 1 水溶液作内水相(w_1), 称取一定量 PLGA 溶解在一定量二氯甲烷中作油相(o), 将内水相加入到油相中, 在冰水浴条件下超声, 得到 w_1/o 型初乳液。将初乳液倒入含有一定量表面活性剂的外水相(w_2)中, 冰水浴条件下超声, 得到 $w_1/o/w_2$ 型预复乳液, 然后将预复乳液倒入一定体积含有表面活性剂的外水相(w_3)中, 搅拌固化挥发溶剂, 得到载 1 PLGA 纳米球。

2.2 纳米球的表征方法

2.2.1 纳米球的表面形态

纳米球的表面形貌采用扫描电镜观察。取少量纳米球溶液, 稀释后用移液枪吸取滴加到平整干净的锡箔纸上, 室温下晾干, 剪取一小块儿含有纳米球的锡箔纸, 用双面胶贴于样品台上, 将样品台置离子溅射仪上喷金(20 mV, 120 s)后, 采用扫描

电镜观察纳米球表面形貌。

2.2.2 纳米球的粒径、粒度分布及电位

取一定量的 PLGA 纳米球溶液, 采用粒度电位仪测定纳米球的粒径及粒度分布(用多分散性系数 PDI 表征)和 ζ 电位。

2.2.3 包封率、载药量及收率的测定

采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定 1 浓度。取一定量纳米球加入 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液 1 ml 中, 室温下垂直混悬, 使纳米球充分溶解, 根据试剂盒手册, 采用酶标仪检测样品吸光度, 检测波长 562 nm。照下式计算包封率(encapsulation efficiency, EE)、载药量(loading efficiency, LE)和收率。

$$\text{载药量} = \text{纳米球中 1 质量} / \text{纳米球质量} \times 100\%$$

$$\text{包封率} = \text{纳米球中 1 质量} / \text{1 投入量} \times 100\%$$

$$\text{收率} = (\text{实际载药量} / \text{理论载药量}) \times 100\%$$

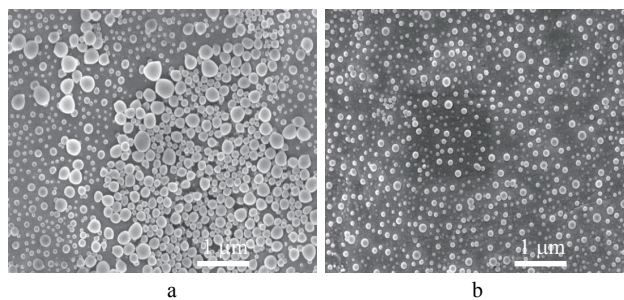
2.3 纳米球的收集方法对纳米球形貌、粒径和均一性的影响

方法一: 将超声复乳法制备的溶液在室温下低速搅拌一段时间, 再离心(20 000×g)15 min, 收集沉淀, 用蒸馏水洗涤 3 次, 得到纳米球溶液。方法二: 将超声复乳法得到的溶液在室温下低速搅拌一段时间, 经切向流超滤法多次浓缩洗涤, 得到纳米球溶液。

以 1 水溶液 10 mg 作内水相, 称取 PLGA 200 mg 溶解在二氯甲烷 10 ml 中作油相, 将内水相加入到油相中, 在冰水浴条件下超声 60 s, 得到 w_1/o 型初乳液。将初乳液倒入含有 2% 胆酸钠(表面活性剂)的外水相中, 冰水浴条件下超声 160 s, 得到 $w_1/o/w_2$ 型预复乳液, 然后将预复乳液倒入 0.5% 胆酸钠水溶液 90 ml 中, 搅拌固化挥发溶剂, 得到载 1 PLGA 纳米球。

采用上述方法制备 3 批载 1 PLGA 纳米球。以离心法(方法一)洗涤收集, 得到的纳米球粒径为(167.4±5.2)nm, PDI 为 0.231±0.13, 扫描电镜下纳米球的形貌见图 1a。结果显示, 纳米球均一性不佳、表面形态不规则。采用切向流超滤法(方法二)收集纳米球, 所得制品粒径为(106.2±3.9)nm, PDI 为 0.09±0.07, 扫描电镜照片见图 1b。由图 1b 可见,

切向流超滤法收集的纳米球粒径较小且均一, 且方法一所得纳米球的收率为 $(34.0 \pm 2.9) \%$, 方法二制品的收率为 $(82.0 \pm 4.7) \%$ 。在离心法洗涤收集纳米球的过程中, 较高的离心力不能使小粒径纳米球完全沉淀, 并且聚集后的纳米球重新分散能力较差, 导致该法收集的纳米球粒径偏大、形状不规则、收率较低。而切向流超滤法在浓缩、稀释洗涤纳米球的过程中, 条件相对温和, 不影响纳米球粒径及表面形貌, 能得到粒径均一、收率较高的纳米球。因此后续选择切向流超滤法收集纳米球。



a: 离心法; b: 切向流超滤法

图1 不同方法收集纳米球的SEM照片($\times 20\,000$)

Fig.1 SEM Micrographs of Nanospheres Collected by Different Methods ($\times 20\,000$)

2.4 单因素试验优化纳米球制备工艺

2.4.1 油水相体积比

设定处方工艺中表面活性剂为胆酸钠, 浓度为2%, 超声功率为160 W, 初乳超声时间为60 s, 复乳超声时间为160 s, 1加入量为10 mg, 考察油水相体积比分别为5:1、10:1和20:1时对纳米球粒径和药物包封率的影响。结果(图2)表明, 油水相体积比越大, 粒径越小, 包封率也越高。分析认为, 油相与水相体积比例主要影响内水相中1的分散, 当固定油相体积时, 内水相体积越小, 水相在油相分散越好, 使纳米球粒径减小, 分布均一, 且包封率高。因此, 选用20:1的油水相体积比作为较优条件。

2.4.2 外水相表面活性剂种类

设定处方工艺中油水相体积比为20:1, 其他条件同“2.4.1”项, 分别考察相同浓度表面活性

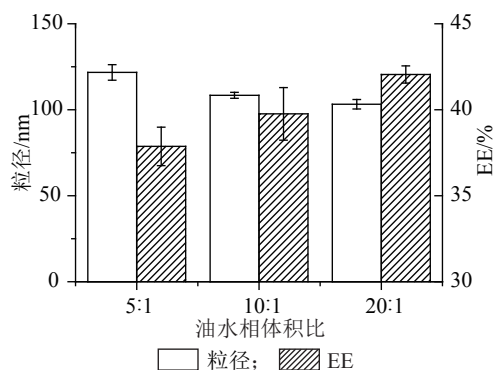


图2 油水相体积比对纳米球粒径及包封率的影响 ($n=3$)

Fig.2 Effect of Volumetric Ratio of Oil-to-Water on Particle Size and EE Value of the Nanospheres ($n=3$)

剂(胆酸钠、泊洛沙姆188和PVA)对纳米球的表面形貌、粒径和PDI值的影响。结果见图3和表1。可见, 采用胆酸钠制备的纳米球粒径最小, 平均粒径为108.2 nm, 且粒度分布较为均一, PDI值为0.12; 采用泊洛沙姆188制备的纳米球平均粒径为265.7 nm, 粒径均一性也变差, PDI值为0.24; 采用PVA制备的纳米球粒径最大, 平均粒径为432.7 nm, 粒度分布均一性最差, PDI值为0.37。分析认为, 胆酸钠作为水相表面活性剂可以使用更小的超声功率或更短的时间获得粒径更小且更均一的纳米球, 因此选用胆酸钠。

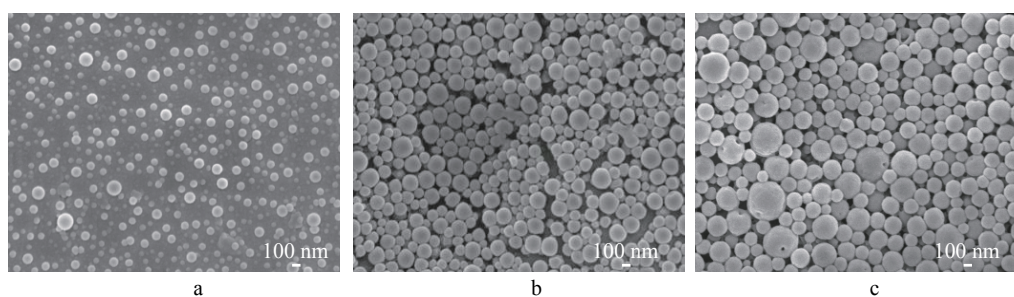
表1 表面活性剂种类对纳米球粒径及分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.1 Effect of Surfactant Type on Particle Size and Size Distribution of the Nanospheres ($\bar{x} \pm s, n=3$)

表面活性剂	粒径/nm	PDI
胆酸钠	108.2 \pm 3.2	0.12 \pm 0.07
泊洛沙姆188	265.7 \pm 9.5	0.24 \pm 0.05
PVA	432.7 \pm 6.7	0.37 \pm 0.1

2.4.3 外水相表面活性剂浓度

设定处方工艺中油水相体积比为20:1, 表面活性剂种类为胆酸钠, 其他条件同“2.4.1”项, 考察了外水相中胆酸钠浓度对纳米球粒径、均一性、载药量和包封率的影响。结果(表2)表明, 外水相胆酸钠浓度对纳米球粒径和粒径均一性影响较小,



a: 胆酸钠, b: 泊洛沙姆 188, c: PVA

图3 不同外水相表面活性剂制备的纳米球的 SEM 照片 (×30 000)

Fig.3 SEM Micrographs of Nanospheres Using Different Surfactants (×30 000)

但随着胆酸钠浓度增加, 载药量和包封率均有所下降, 分析认为表面活性剂浓度过大, 影响油相在水相中分散, 导致载药量和包封率降低。因此, 选择 1% 的胆酸钠用于后续优化。

表 2 表面活性剂浓度对纳米球性质的影响

 $(\bar{x} \pm s, n=3)$ Ta.2 Effect of Surfactant Concentration on Particle Size, PDI, LE and EE of the Nanospheres ($\bar{x} \pm s, n=3$)

浓度/%	粒径/nm	PDI	LE/%	EE/%
1	108.5±5.1	0.12±0.07	3.54±0.2	38.94±2.3
2	105.2±3.4	0.09±0.12	3.12±0.5	34.32±4.3
3	113.5±9.8	0.15±0.13	2.98±0.6	32.78±5.2

2.4.4 初乳超声时间

设定处方工艺中油水相体积比为 20 : 1, 表面活性剂为 1% 胆酸钠, 其他条件同“2.4.1”项, 考察初乳超声时间 (20、40 和 60 s) 对载 1 纳米球粒径和 1 包封率的影响。结果如图 4 所示, 初乳超声时间主要影响内水相在油相中的分布, 对粒径及粒度分布影响并不大。当超声时间为 20 s 时, 1 的包封率最低, 仅为 37.4%, 这可能是因为超声时间较短, 使得内水相在油相中乳化效果不佳, 初乳液滴不够稳定, 药物容易在固化过程中泄露, 致使药物包封率低。当超声时间为 40 和 60 s 时, 获得的初乳相对更稳定, 药物包封率提升, 但超声时间过长会影响药物活性, 因此选择初乳超声 40 s 进行后续优化。

2.4.5 复乳超声时间

设定处方工艺中油水相体积比为 20 : 1, 表

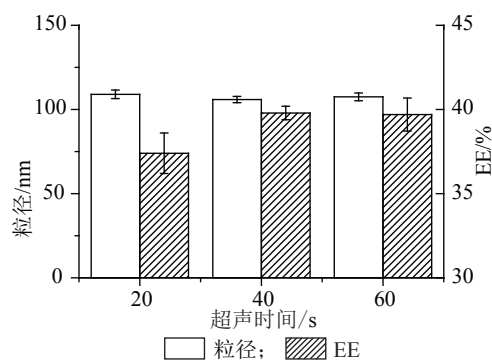


图 4 初乳超声时间对纳米球粒径及包封率的影响

 $(n=3)$ Fig.4 Influence of Ultrasonic Time of Primary Emulsion on Particle Size and EE of the Nanospheres ($n=3$)

面活性剂为 1% 胆酸钠, 初乳超声时间为 40 s, 其他条件同“2.4.1”项, 在复乳超声时间分别为 120、160 和 200 s 条件下制备了载药纳米球, 考察所得纳米球的粒径和包封率。结果 (图 5) 显示, 随着复乳超声时间的延长, 纳米球平均粒径减小, 但减小幅度不大; 但随着复乳超声时间的延长, 纳米球对 1 的包封率显著下降, 综合考虑纳米球粒径和 1 包封率, 选择复乳超声时间为 120 s。

2.4.6 超声功率

设定处方工艺中油水相体积比为 20 : 1, 表面活性剂为 1% 胆酸钠, 初乳和复乳超声时间为 40 和 60 s, 其他条件同“2.4.1”项, 同时改变初乳及复乳的超声功率, 分别为 120、160 和 200 W, 考察其对纳米球粒径和粒径均一性的影响。结果见图 6 和表 3, 可见随着超声功率增加, 内水相在油相中

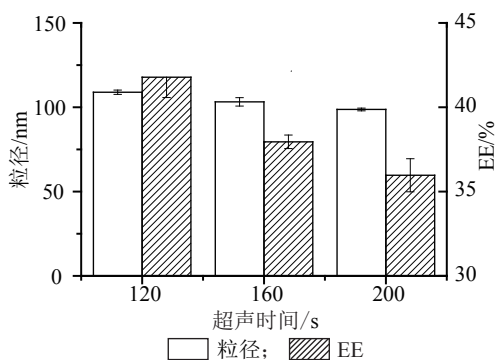


图5 复乳超声时间对纳米球粒径及包封率的影响 ($n=3$)
Fig.5 Influence of Ultrasonic Time of Multiple Emulsion on Particle Size and EE of the Nanospheres ($n=3$)

的分散效果越好, 纳米球粒径越小, 粒径均一性越好。为了获得粒径小且均一的纳米球, 选用 200 W 的超声功率进行后续优化。

表3 超声功率对纳米球粒径的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab.3 Effect of Ultrasonic Power on Particle Size and PDI of the Nanospheres ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

超声功率/W	粒径/nm	PDI
120	160.8±5.4	0.24±0.09
160	149.5±9.8	0.18±0.11
200	107.2±4.6	0.11±0.15

2.4.7 1 加入量

设定处方工艺中油水相体积比为 20 : 1, 表面活性剂为 1% 胆酸钠, 初乳和复乳超声时间为 40 和 60 s, 超声功率为 200 W, 考察了 1 加入量对载药纳米球粒径、均一性、载药量和包封率的影响, 结果见表 4。结果显示, 随着 1 用量的增加, 纳米球

粒径和均一性变化不大, 载药量随 1 加入量的增加而增大, 包封率随 1 加入量的增加有降低趋势; 一定范围内增加药物的投药量有利于提高纳米球的载药量, 但包封率有所降低, 表明药物损失较多。这可能是由于在此条件下, 纳米球对药物的包埋达到饱和水平, 增加药物量使得包埋进纳米球的药物量没有显著增加, 大部分增加的药物仅有少量被包埋进纳米球内, 导致药物损失较大。综合考虑, 选择 15 mg 的 1 用量作为较优的药物加入量。

表4 1 含量对纳米球性质的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab.4 Influence of 1 Content on Properties of the Nanospheres ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

1 含量/mg	粒径/nm	PDI	LE/%	EE/%
10	115.9±3.2	0.12±0.07	2.19±0.4	43.93±3.5
15	114.1±4.3	0.1±0.09	3.35±0.2	44.63±2.7
20	120.8±5.7	0.15±0.05	4.36±0.5	43.62±2.1

2.5 最优条件下载 1 纳米球的制备与表征

通过上述各制备因素对纳米球粒径、均一性、载药量和包封率影响的考察, 确定载 1 纳米球最优制备工艺及制备流程如下: 取 1 15 mg 溶于超纯水 0.5 ml 中作内水相 (w_1), 取 PLGA 200 mg 溶于二氯甲烷 10 ml 中作油相 (o), 将内水相加入到油相中, 在冰水浴、200 W 的超声功率下超声 40 s, 制备 w_1/o 型初乳液。将初乳液倒入含 1% 胆酸钠浓度的外水相 60 ml (w_2) 中, 在冰水浴、200 W 的超声功率下超声 120 s, 制备 $w_1/o/w_2$ 型预复乳液, 然后将预复乳液倒入含 0.5% 胆酸钠的外水相 90 ml (w_3) 中,

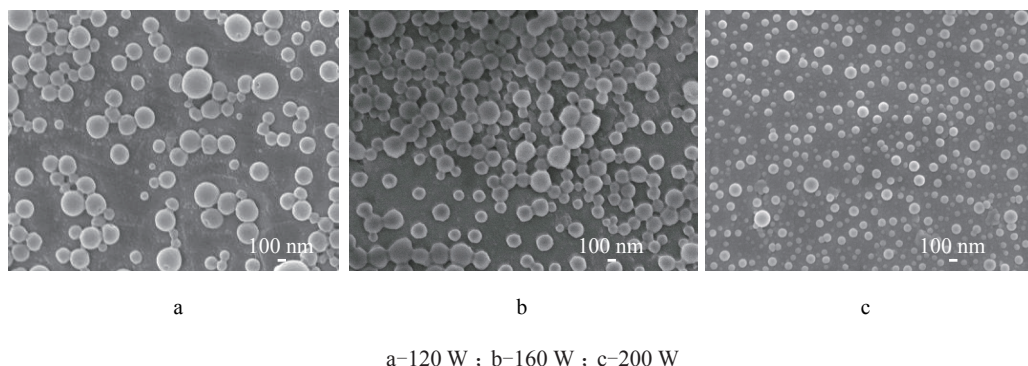


图6 不同超声功率所得纳米球的 SEM 照片 (×30 000)

Fig.6 SEM Micrographs of the Nanospheres Prepared under Different Ultrasonic Powers (×30 000)

磁力搅拌挥发二氯甲烷, 固化得到纳米球, 采用切向流超滤法收集纳米球。照优化工艺重复制备了 3 批载 **1** 纳米球, 粒度分布和扫描电镜见图 7。结果表明, 所得纳米球的平均粒径为 $(108.3 \pm 1.4) \text{ nm}$, PDI 为 0.09 ± 0.03 , 表明纳米球粒径均一性好; 呈球形, 表面圆整光滑, 纳米球之间无黏连现象, 分散性良好; ζ 电位为 $(-40.8 \pm 0.7) \text{ mV}$ ($n=3$), 表明纳米球表面荷负电; **1** 的包封率和载药量为 $(43.5 \pm 3.2) \%$ 和 $(4.5 \pm 0.3) \%$ ($n=3$), 可以用于后续体外药物释放和药效的评价。

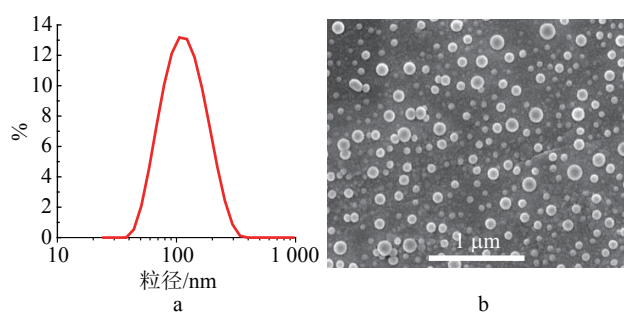


图 7 纳米球的粒度分布 (a) 和纳米球扫描电镜照片 (b, $\times 20\,000$)

Fig.7 Particle Size Distribution (a) and SEM Micrograph (b) of the Optimal Nanospheres ($\times 20\,000$)

2.6 PLGA 纳米球体外稳定性考察

将所制备的载 **1** 纳米球存放于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 定期取样对纳米球的粒径和药物包封率进行检测, 评价载药纳米球的贮存稳定性, 结果见图 8。可见, 载 **1** 纳米球存放过程中粒径和包封率基本不发生变化, 纳米球的 PDI 维持在 0.2 以下, 粒度分布较稳定, 提示载药纳米球的贮存稳定性较好。

2.7 在模拟体液中的释放行为

分别准确称量一定量载 **1** 纳米球, 加至 PBS ($\text{pH } 7.4$) 1 ml 中, 置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡器上振摇 (120 r/min)。定期离心分离, 取出上清液, 同时补加相同体积的新鲜 PBS 缓冲液。以 BCA 法测定上清液中 **1** 的含量, 根据上清液中 **1** 含量及纳米球中 **1** 总含量计算累积释放率 (Q)。结果 (图 9) 表明, 纳米球在前 2 h 释放率达到 36.54% , 24 h 累积释放率 63.32% , 后期释放缓慢, 表明该纳米球能缓慢

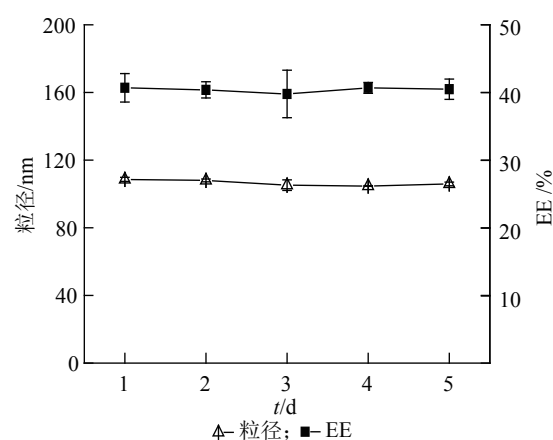


图 8 纳米球稳定性考察结果 ($n=3$)

Fig.8 Stability of the **1**-loaded Nanospheres ($n=3$)

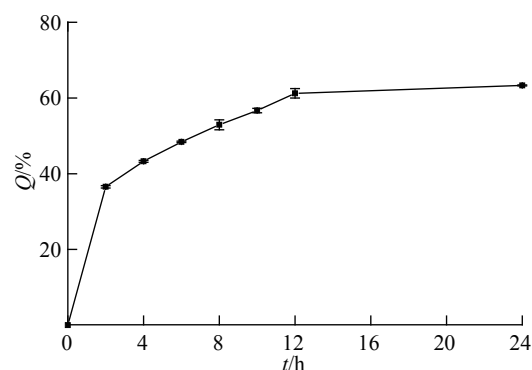


图 9 体外释放度曲线 ($n=3$)

Fig.9 *In Vitro* Release Profiles of **1** from the Nanospheres ($n=3$)

释放 **1** 以达到持续降糖效果。

2.8 降血糖作用

取雄性 C57 小鼠, 连续 5 次腹腔注射链脲霉素溶液 (50 mg/kg), 2 周后于尾静脉采血, 测定血糖含量, 取空腹血糖水平平均 $\geq 16 \text{ mmol/L}$ 者, 为糖尿病模型小鼠。取糖尿病模型小鼠, 随机分为 4 组, 每组 5 只, 口服给药之前灌胃给予碳酸氢钠溶液 (0.2 ml , 12.5 mg/ml), 以中和胃酸。各组模型鼠按以下配方给药: 口服 **1** 溶液 (**1** 溶于水溶液中得到 1 mg/ml 的溶液, 20 IU/kg)、口服载 **1** 纳米球悬浮液 (**1** 纳米球的水溶液, 20 IU/kg)、皮下注射 **1** 溶液 (**1** 溶于水溶液中得到 0.2 mg/ml 的溶液, 2 IU/kg)、口服 PBS 溶液作为空白对照。分别于 0、1、2、4、6、8、10 和 12 h 尾静脉采血, 使用血糖仪测定血糖含量。

结果(图10)显示,口服PBS溶液组1 h内血糖小幅度上升,可能是应激反应所致,之后一直维持在同一较高水平,表明糖尿病模型小鼠血糖能维持较高水平,可用于降糖药效评估。口服1溶液组在2 h内有小幅度降低,短时间内血糖恢复到较高水平,表明游离形式的1口服降糖效果非常有限,一方面可能因为1在胃酸及其酶的作用下降解失活,难以发挥药效;另一方面,1口服后吸收较差,导致口服生物利用度极低;注射1组血糖迅速下降,给药1 h血糖降至最低,下降了62%,之后随着时间的延长,在4 h内血糖迅速恢复到初始水平,表明皮下注射1能够发挥降血糖作用,但作用时间短,这与1的体内循环半衰期短有关;口服载1的纳米球具有较好的降血糖效果,给药2 h后血糖降到最低,血糖下降了36%,此后血糖缓慢恢复,12 h后接近初始血糖值,该趋势与体外释放一致,表明该纳米球具有缓释效果,能够在较长时间发挥降糖效果。

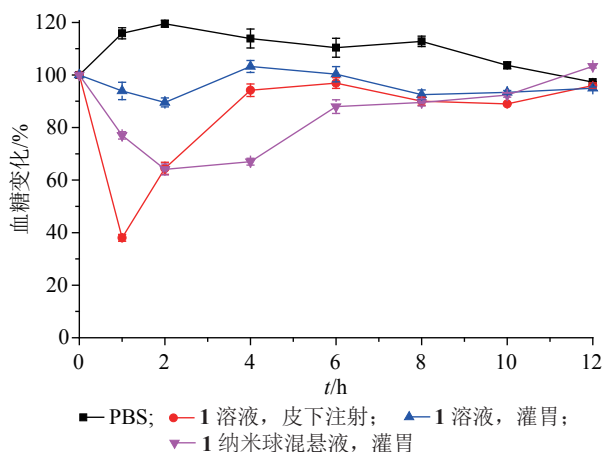


图10 不同1制剂的降血糖效果 (n=5)

Fig.10 Hypoglycemic Effects of Different 1 Formulations (n=5)

3 讨论

本试验以PLGA为载体材料,采用超声复乳技术结合溶剂挥发法制备了载1纳米球,并对载1纳米球的制备工艺进行了优化。以最优工艺制得的载药纳米球粒径为(108.3±1.4) nm; ζ电位为(-40.8±0.7) mV;包封率和载药量分别为(43.5±3.2)%和(4.5±0.3)%。对其进行表面形貌、

体外稳定性、体外释药行为评价,所制备的载1纳米球表面呈规则圆形、粒径均一、稳定性良好,具有良好的药物缓释性能。但体外试验并不能完全模拟体内环境,所以24 h累积释药可能并不完全。

预试验结果显示,本品在模拟胃酸环境中突释较快,因此在动物试验中采取给药前先给予碳酸氢钠的方式中和胃酸。初步药效学评价表明,载1纳米球具有良好的降血糖效果,在本研究基础上,后续工作将进一步探索载1纳米球的体内药动学规律,为口服蛋白类药物的临床应用奠定基础。

参考文献:

- [1] Muralidhara Krishna CS, Srikanta S. Type 1 diabetes pathogenesis - Prevention??? [J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2015, **19**(Suppl 1): S58-S63.
- [2] Sung HW1, Sonaje K, Liao ZX, *et al.* pH-Responsive nanoparticles shelled with chitosan for oral delivery of insulin: from mechanism to therapeutic applications [J]. *Acc Chem Res*, 2012, **45**(4): 619-629.
- [3] Mukhopadhyay P, Mishra R, Rana D, *et al.* Strategies for effective oral insulin delivery with modified chitosan nanoparticles: A review [J]. *Prog Polym Sci*, 2012, **37**(11): 1457-1475.
- [4] Wang XH, Sun XK, Jiang GH, *et al.* Synthesis of biomimetic hyperbranched zwitterionic polymers as targeting drug delivery carriers [J]. *J Appl Polym Sci*, 2013, **128**(5): 3289-3294.
- [5] Wu L, Liu M, Zhu X, *et al.* Modification strategies of lipid-based nanocarriers for mucosal drug delivery [J]. *Curr Pharm Design*, 2015, **21**(36): 5198-5211.
- [6] Ahmad N, Mohd Amin MC, Ismail I, *et al.* Enhancement of oral insulin bioavailability: *in vitro* and *in vivo* assessment of nanoporous stimuli-responsive hydrogel microparticles [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2016, **13**(5): 621-632.
- [7] Wang HX, Zhao YX, Wang HY, *et al.* Low-molecular-weight protamine-modified PLGA nanoparticles for overcoming drug-resistant breast cancer [J]. *J Controlled Release*, 2014, **192**: 47-56.
- [8] Zabihi F, Yang M, Leng Y, *et al.* PLGA-HPMC nanoparticles prepared by a modified supercritical anti-solvent technique for the controlled release of insulin [J]. *J Supercrit Fluid*, 2015, **99**: 15-22.
- [9] Nan F, Wu J, Qi F, *et al.* Preparation of uniform-sized colloidosomes based on chitosan-coated alginate particles

and its application for oral insulin delivery [J]. *J Mat Chem B*, 2014, 2 (42): 7403-7409.

[10] Rawat S, Gupta P, Kumar A, *et al.* Molecular mechanism

of poly (vinyl alcohol) mediated prevention of aggregation and stabilization of insulin in nanoparticles [J]. *Mol Pharm*, 2015, 12 (4): 1018-1030.

Preparation and Preliminary Pharmacodynamics of Insulin-loaded PLGA Nanospheres for Oral Administration

QIU Yuejia¹, MENG Dan¹, YANG Tingyuan², WANG Lianyan², ZHU Yanhua^{1*}

(1. College of Pharmacy Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150050; 2. State Key Lab.

Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190)

ABSTRACT: The insulin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanospheres were prepared by ultrasonic emulsification method combined with solvent evaporation method. The preparation parameters of the nanospheres were optimized with particle size and size distribution, ζ potential, encapsulation efficiency and drug loading as indexes. The optimal parameters were as follows: volumetric ratio of oil-to-water was 20 : 1, surfactant was sodium cholate with 1 %, ultrasonic time of primary emulsion and multiple emulsion was 40 s and 120 s, ultrasonic power was 200 W and insulin content was 15 mg. The prepared nanospheres were collected by tangential flow ultrafiltration method. Three batches of the optimal nanospheres were prepared and characterized. The particle size, ζ potential, encapsulation efficiency and drug loading of the nanospheres were (108.3 ± 1.4) nm, (-40.8 ± 0.7) mV, (43.5 ± 3.2) % and (4.5 ± 0.3) %, respectively. The scanning electron microscopy (SEM) observation showed that the nanospheres were spherical with a narrow size distribution. These nanospheres were rather stable at 4 °C for 5 d. The insulin from the nanospheres released in a significant sustained-release manner. Furthermore, the preliminary oral hypoglycemic effect was evaluated on diabetic mouse model. Compared with injection of insulin solution, the nanospheres demonstrated more steady and lasting hypoglycemic effect after 12 h of oral administration.

Key Words: insulin; nanosphere; ultrasonic emulsification technology; optimization; hypoglycemic effect

