

学校编码: 10384

分类号 R944.9 密级 公开

学号: 24520111153413

UDC 615.1

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

胰岛素巯基化透明质酸纳米粒的制备
与性质评价

Preparation and characterization of insulin-loaded thiolated
hyaluronic acid nanoparticles

赵佳丽

指导教师姓名: 宋洪涛 教授

专 业 名 称: 药理学

论文提交日期: 2014 年 4 月

论文答辩时间: 2014 年 5 月

学位授予日期: 2014 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2014 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文,并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版),允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索,将学位论文的标题和摘要汇编出版,采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于:

() 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文,于 年 月 日解密,解密后适用上述授权。

() 2. 不保密,适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文,未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的,默认为公开学位论文,均适用上述授权。)

声明人(签名):

年 月 日

摘 要

多肽类药物口服给药的研究一直是国内外药剂学研究者热衷的领域，但这类药物由于自身理化性质等特点，口服生物利用度低。这其中研究者尤为关注的是胰岛素。胰岛素是临床上治疗 I 型糖尿病的一线药物，但存在的突出问题是药物半衰期短，需长期频繁地注射给药。而胰岛素口服给药是一种患者顺应性好、服用方便的给药方式，符合内源胰岛素的分泌模式。然而，胰岛素直接口服给药时遭遇胃肠道酶降解以及膜透过性差等诸多障碍。生物黏附性聚合物纳米粒可以通过延长胃肠道药物滞留时间和减少胃肠道中消化酶对胰岛素的降解等方式，有效改善胰岛素口服生物利用度。

本研究将生物黏附性聚合物透明质酸与 L-半胱氨酸通过酰胺键连接制备了巯基化透明质酸(HA-Cys)，其游离巯基含量为 $(225.7 \pm 4.4) \mu\text{mol g}^{-1}$ 。核磁共振以及红外图谱确证了其结构。体外黏附性实验表明聚合物黏附性质良好。

以 HA-Cys 为载体，采用超声乳化法，制备了载胰岛素的巯基化透明质酸纳米粒(Ins-HA-Cys-NPs)。通过单因素考察，确定了对 Ins-HA-Cys-NPs 影响较大的因素为油相、水相体积比，HA-Cys 用量以及 Ins 用量，并通过星点设计-效应面优化法，以包封率、载药量、粒径以及多分散指数为评价指标，优化了纳米粒的制备工艺。最终得到的最优处方为水相、油相体积比为 1 : 4.12，HA-Cys 用量为 25.95 mg，Ins 用量为 8.04 mg。通过激光粒度分析仪测定纳米粒粒径和分布，平均粒径(PS)为 $(178.5 \pm 0.75) \text{nm}$ ，多分散系数(PDI) 为 0.214 ± 0.01 ，Zeta 电位(ZP)为 $(-38.47 \pm 0.46) \text{mV}$ ；反相高效液相法测定纳米粒包封率和载药量，包封率(EE)为 $(48.85 \pm 0.66) \%$ ，载药量(DL)为 $(4.79 \pm 0.13) \%$ 。

进行了纳米粒的形态观察、黏附性质、体外释放与抗酶降解特性的研究，评价了胰岛素巯基化透明质酸纳米粒的大鼠口服给药的降血糖效果。实验结果表明，所制得的 Ins-HA-Cys-NPs 外观圆整，且分布均一；制备的 Ins-HA-Cys-NPs 具有良好的体外黏附特性，黏蛋白与 Ins-HA-Cys-NPs 纳米粒混悬液混合后 Zeta 电位由 $(-17.32 \pm 0.38) \text{mV}$ 下降到 $(-36.06 \pm 0.62) \text{mV}$ ；与胰岛素溶液相比，Ins-HA-NPs 及 Ins-HA-Cys-NPs 药物释放时间均延长；以胃蛋白酶、胰蛋白酶为代表，研究 Ins-HA-Cys-NPs 的抗酶解作用，说明 Ins-HA-Cys-NPs 具有较好的抗酶降解作用；药效学实验中，糖尿病大鼠口服

Ins-HA-Cys-NPs 后 1-12 h 中，显示出平缓的降血糖效果，相对生物利用度为 6.9 %。

关键词：口服给药；胰岛素；巯基化透明质酸；纳米粒

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

The research of the oral route for the administration of peptide drugs has been a hotspot for pharmacy researchers at home and abroad. Oral bioavailability of these drugs is very low to their own physicochemical properties and other characteristics. Among these drugs, researchers are particularly concerned about the insulin. Insulin is clinically suspected first-line drug for the treatment of Type 1 diabetes. Patients usually need long and frequent injections because of the short half-life period of insulin. Oral insulin with easy application and good patient compliance conforms with endogenous insulin secretion pattern. However, gastrointestinal enzymatic degradation and poor membrane permeability largely impede the appliance of insulin's oral administration. Use of polymer nanoparticles as carriers for oral administration of insulin can improve the oral bioavailability by prolonging drug residence time and preventing enzymatic degradation.

In this study, we prepared thiolated hyaluronic acid (HA-Cys) by connecting hyaluronic acid and L-cysteine through an amide bond. The resulting conjugates exhibited (225.7 ± 4.4) μmol immobilized free thiol groups per gram polymer. Its structure was confirmed by $^1\text{H-NMR}$ and IR. Adhesion experiments in vitro showed a good adhesion property of HA-Cys.

Insulin-loaded thiolated hyaluronic acid nanoparticles (Ins-HA-Cys-NPs) were prepared by using HA-Cys as carriers by ultrasound-emulsification method. An oil phase/aqueous phase volume ratio, HA-Cys dosage and Insulin dosage were determined for Ins-HA-Cys-NPs preparation by single factor experiment. In addition, central composite design-response surface methodology was introduced for optimizing the preparation technology of nanoparticles according to entrapment efficiency, drug loading, particle size and polydispersity index (PDI) of Ins-HA-Cys-NPs. The optimal composition of oil/aqueous phase volume ratio was 1: 4.12. The best dosage of HA-Cys and insulin was 25.95mg and 8.04mg respectively. The size of nanoparticles was $178.5 \pm 0.75\text{nm}$, the PDI was 0.214 ± 0.01 ,

and zeta potential was -38.47 ± 0.46 mV. The insulin encapsulation efficiency (EE) was $(48.85 \pm 0.66)\%$ and drug loading capacity (DL) was $(4.79 \pm 0.13)\%$.

The morphology, adhesion properties, release behavior in vitro and antidiabetic effect of Ins-HA-Cys-NPs, as well as pharmacodynamics in vivo, were studied. The results showed that Ins-HA-Cys-NPs were spherical solid particles with a good polydispersity index. The zeta potential changed from (-17.32 ± 0.38) mV to (-36.06 ± 0.62) mV after mixing Ins-HA-Cys-NPs with mucin showed that Ins-HA-Cys-NPs had good adhesion properties in vitro. Ins-HA-Cys-NPs prolonged drug release time when compared to Ins-HA-NPs. Moreover, Ins-HA-Cys-NPs had good resistance to enzymatic degradation including pepsin and trypsin enzyme. Diabetic rats showed gently hypoglycemic effect after oral administration of the nanoparticles for 1-12 h. The relative bioavailability of the nanoparticles was 6.9%.

Keywords: oral administration; insulin; thiolated hyaluronic acid; nanoparticles

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
前 言.....	1
第一章 巯基化透明质酸的合成与表征	6
1 材料与仪器.....	6
1.1 材料.....	6
1.2 仪器.....	6
2 实验方法.....	7
2.1 巯基化透明质酸（HA-Cys）的合成.....	7
2.2 巯基化透明质酸的表征.....	8
2.2.1 游离巯基（-SH）含量测定.....	8
2.2.2 核磁共振氢谱结构验证.....	8
2.2.3 红外光谱结构验证.....	9
2.3 HA-Cys 体外黏附性质评价.....	9
3 结果与讨论.....	9
3.1 巯基化透明质酸（HA-Cys）的合成.....	9
3.2 游离巯基（-SH）含量测定.....	10
3.3 核磁共振氢谱分析.....	11
3.4 红外光谱分析.....	11
3.5 HA-Cys 体外黏附性质评价.....	12
4 结论.....	13
第二章 胰岛素巯基化透明质酸纳米粒的制备	14
1 材料与仪器.....	14

1.1 材料.....	14
1.2 仪器.....	14
2 实验方法.....	15
2.1 胰岛素含量测定分析方法学的建立.....	15
2.1.1 吸收波长的确定.....	15
2.1.2 色谱条件.....	15
2.1.3 线性关系考察.....	16
2.1.4 空白辅料的影响.....	16
2.1.5 精密度考察.....	16
2.1.6 稳定性考察.....	16
2.1.7 回收率考察.....	16
2.1.8 过膜回收率考察.....	16
2.2 巯基化透明质酸纳米粒的制备.....	16
2.3 单因素考察的质量评价指标.....	17
2.4 处方和制备工艺的单因素考察.....	17
2.5 星点设计-效应面法优化处方.....	19
3 结果与讨论.....	19
3.1 胰岛素含量测定分析方法学建立.....	19
3.2 处方和制备工艺的单因素考察结果.....	22
3.3 星点设计-效应面法优化处方.....	27
4 结论.....	32
第三章 胰岛素巯基化透明质酸纳米粒的性质评价.....	33
1 材料与仪器.....	33
1.1 材料.....	33
1.2 仪器.....	33
2 实验方法.....	34
2.1 纳米粒粒径、电位以及包封率的测定.....	34
2.2 纳米粒形态观察.....	34
2.3 纳米粒冻干保护剂筛选.....	34
2.4 纳米粒稳定性考察.....	35

2.5 纳米粒体外黏附性评价.....	35
2.6 纳米粒体外释药试验.....	35
2.7 纳米粒抗酶降解试验.....	35
3 结果与讨论.....	36
3.1 纳米粒粒径、电位以及包封率的测定.....	36
3.2 纳米粒形态观察.....	36
3.3 纳米粒冻干保护剂筛选.....	37
3.4 纳米粒稳定性考察.....	39
3.5 纳米粒体外黏附性评价.....	39
3.6 纳米粒体外释药试验.....	40
3.7 纳米粒抗酶降解试验.....	40
4 结论.....	41
第四章 大鼠体内药效学研究.....	43
1 材料、仪器与动物.....	43
1.1 材料.....	43
1.2 仪器.....	43
1.3 动物.....	43
2 实验方法.....	43
2.1 溶液配制.....	43
2.2 糖尿病大鼠模型的建立.....	44
2.3 给药方案.....	44
2.4 统计方法.....	44
3 结果与讨论.....	45
3.1 链脲佐菌素 (STZ) 致糖尿病的作用机理.....	45
3.2 糖尿病大鼠模型的观察.....	45
3.3 大鼠降血糖作用结果.....	45
3.4 胰岛素口服途径的讨论.....	47
4 结论.....	47
全文结论.....	48

参考文献.....	50
附录.....	55
致谢.....	56
攻读硕士学位期间发表的论文	57

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Content

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Preface	1
Chapter 1 Synthesis and Characteristics of HA-Cys	6
1 Materials and Instruments	6
1.1 Experimental materials	6
1.2 Experimental instruments	6
2 Methods	7
2.1 Synthesis of HA-Cys.....	7
2.2 Characteristics of HA-Cys	8
2.2.1 -SH degree of HA-Cys	8
2.2.2 ¹ H-NMR of HA-Cys.....	8
2.2.3 FT-IR of HA-Cys.....	9
2.3 Adhesion studies in vitro of HA-Cys.....	9
3 Results and discussion	9
3.1 Synthesis of HA-Cys.....	9
3.2 -SH degree of HA-Cys.....	10
3.3 The ¹ H-NMR spectra of HA-Cys.....	11
3.4 The IR spectra of HA-Cys	11
3.5 Adhesion studies in vitro of HA-Cys.....	12
4 Conclusion	13
Chapter 2 Preparation of Ins-HA-Cys-NPs	14
1 Materials and Instruments	14

1.1 Experimental materials	14
1.2 Experimental instruments	14
2 Methods	15
2.1 HPLC analytical method for insulin	15
2.1.1 Absorption wavelength selection	15
2.1.2 Chromatographic conditions.....	15
2.1.3 Linear relation.....	16
2.1.4 The influence of blank material	16
2.1.5 Precision test.....	16
2.1.6 Stability test	16
2.1.7 Recovery test	16
2.1.8 Recovery test through membrane	16
2.2 Preparation of Ins-HA-Cys-NPs	16
2.3 The evaluation index of single factor investigation.....	17
2.4 Single factor investigation	17
2.5 Central composite design-response surface methodology	19
3 Results and discussion.....	19
3.1 HPLC analytical method for insulin	19
3.2 Results of single factor investigation.....	22
3.3 Results of central composite design-response surface methodology.....	27
4 Conclusion.....	32
Chapter 3 Characteristics of Ins-HA-Cys-NPs	33
1 Materials and Instruments	33
1.1 Experimental materials	33
1.2 Experimental instruments	33
2 Methods	34
2.1 Particle size, potential and encapsulation efficiency of Ins-HA-Cys-NPs	34
2.2 Morphologic observation of Ins-HA-Cys-NPs	34
2.3 Selection cryoprotectant.....	34
2.4 Stability test for Ins-HA-Cys-NPs	35

2.5 Adhesion studies in vitro of nanoparticles.....	35
2.6 Releasing test	35
2.7 Enzyme degradation test	35
3 Results and discussion.....	36
3.1 Results of particle size, potential and encapsulation efficiency	36
3.2 Morphologic observation of Ins-HA-Cys-NPs	36
3.3 Selection cryoprotectant.....	37
3.4 Stability test for Ins-HA-Cys-NPs	39
3.5 Adhesion studies in vitro of nanoparticles.....	39
3.6 Releasing test	40
3.7 Enzyme degradation test	40
4 Conclusion.....	41
Chapter 4 Pharmacodynamics research in vivo	43
1 Materials and Instruments	43
1.1 Experimental materials	43
1.2 Experimental instruments	43
1.3 Experimental animals.....	43
2 Methods	43
2.1 Solution preparation.....	43
2.2 Diabetic rats model	44
2.3 Dosage regimen	44
2.4 Statistical analysis	44
3 Results and discussion.....	45
3.1 Mechanism of STZ inducing diabetics	45
3.2 Observation of diabetic rats model	45
3.3 Results of hypoglycemic effect.....	45
3.4 Discussion of insulin oral delivery	47
4 Conclusion.....	47
Conclusion.....	48

References	50
Appendix	55
Acknowledgements.....	56
Published paper	57

厦门大学博硕士学位论文摘要库

前 言

随着生物技术和生物化学等学科快速发展，涌现出大量具有很强生物学活性的蛋白质、多肽类药物。这类药物具有活性高，用量少，毒副作用小等优点。但多肽、蛋白质类药物也存在着分子量大，多数水溶性强，膜透过性差，半衰期短，不稳定易被降解，对制剂的处方工艺要求较高等缺点，使得这类药物的临床应用受到限制^[1]。目前临床上这类药物常用的剂型为注射制剂，给药途径单一，给药时间间隔短，患者的顺应性差。蛋白质、多肽类药物非注射给药途径的研究与开发一直是国内外药剂学研究者热衷的领域。非注射给药途径主要有口服给药、鼻腔给药、肺部给药以及经皮给药等等。其中口服给药因为经济、方便、给药剂量准确，一直是研究者主要努力的方向。

多肽、蛋白质类药物的口服递送存在诸多障碍^[2]：①生理屏障：胃肠道的上皮细胞是低渗透性的细胞排列致密的结构，由黏膜肌层以及固有层支撑的单层柱状上皮细胞组成的。这些细胞相互紧密排列，从而抑制细胞间的转运（即旁路转运）使其成为物理性吸收的屏障。上皮层折叠成绒毛以及微绒毛（刷状缘），在上皮细胞层的表面形成约 1 mm 的指状突起。这些结构上含有消化酶也阻碍了蛋白质的吸收。此外，上皮细胞层顶部还具有糖萼，一层硫酸黏多糖，和一层包含糖蛋白，酶，电解质和水的黏液。此多糖和黏液呈现出蛋白转运的又一物理屏障。②酶屏障：蛋白质降解由胃蛋白酶开始，随后进入肠道，由各类肠道酶持续降解，包括胰蛋白酶、糜蛋白酶和羧肽酶等。这些胰腺分泌的酶可降解 20% 的蛋白质。其余部分由刷状缘膜上的各种肽酶或者在肠道的肠细胞内降解。此外还存在一种特定的胞质酶，成为胰岛素降解酶完成对胰岛素的降解。③药物自身的理化性质：蛋白质复杂的内部结构决定其生物活性。破坏其结构将会使其失活。最有可能影响蛋白质结构以及稳定性的因素有温度、pH 值、溶剂等等。对于实际制备相关剂型的过程中，这些因素是至关重要的^[3]。

为了克服以上障碍，提高蛋白、多肽类药物口服生物利用度，目前人们已经尝试多种制剂学手段：①对蛋白质药物进行结构修饰。该方法可以增加药物亲脂性，减少消化酶的降解作用，进而提高药物生物利用度^[4]。也可采用聚乙二醇（PEG）对蛋白类药物进行修饰，提高药物分子量，使得肾小球的滤过减少，并且 PEG 的屏障作用还保护了

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫