doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.10.016

聚合物脂质纳米球的制备优化 *

孟 丹[1] 邱越佳[1] 杨婷媛[2] 王连艳[2] 王 硕[2] 朱艳华[1△] 马光辉[2]

(1 黑龙江中医药大学药学院 黑龙江 哈尔滨 150040;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 目的:制备粒径均一且稳定、载药率和包埋率较高的聚合物脂质纳米球。**方法:**将 HSPC(氢化大豆卵磷脂)与 PLGA(聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物)两种材料结合,利用超声复乳法制备聚合物脂质纳米球,采用响应面法优化最佳制备工艺;以 HSPC(氢化大豆卵磷脂)与 PLGA(聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物)的比例、PVA 浓度、超声功率为条件优化制备参数,以粒径为响应值。**结果:**优化后的最佳工艺参数为:HSPC 与 PLGA 的比例为 1:10,PVA 浓度为 0.66%,超声功率为 51.34% (205.36 W)。**结论:**按最优工艺制备出的聚合物脂质纳米粒的粒径为 230 nm 左右,多分散系数(PDI)值为 0.057,与预测值偏差较小,且粒径分布均一,可作为蛋白及多肽类药物的递送载体。

关键词:脂质纳米球;超声复乳法;响应面法;蛋白类药物

中图分类号:R944;R918 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)10-1887-05

Preparation and Characterization of Polymer-lipid Nanoparticles*

MENG Dan[1], QIU Yue-jia[1], YANG Ting-yuan[2], WANG Lian-yan[2], WANG Shuo[2], ZHU Yan-hua[1△], MA Guang-hui[2]

(1 College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang, 150040, China;

2 National Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100190, China)

ABSTRACT Objective: In order to prepare stable polymer-lipid nanoparticles with uniform particle size, high drug loading and encapsulation efficiency. **Methods:** HSPC (Hydrogenated Soybean Phospholipids Mixed Compounds) and PLGA (Poly(lactic-co-glycolic acid)) were combined to prepare the polymer-lipid nanoparticles with ultrasonic double emulsion method. The preparation process was optimized using Response Surface Methodology(RSM). The ratios of HSPC-PLGA, PVA concentrations and ultrasonic power were employed as three main factors affecting the formation of nanoparticles in the preparation process. The particle size was chose as the response value. **Results:** The optimal conditions were obtained as follows: the ratio of HSPC-PLGA was 1:10, the concentration of PVA was 0.66%, and the ultrasonic power was 51.34% (205.36 W) respectively. **Conclusion:** The size of nanoparticles prepared under the optimal conditions was about 230 nm with narrow size distributions, and the PDI value was 0.057, which was closer to the predicted value. The established polymer-lipid nanoparticles could be used as protein and polypeptide drugs in delivery system.

Key words: Polymer-lipid nanoparticles; Ultrasonic double emulsion method; Response surface methodology; Protein drugs

Chinese Library Classification(CLC): R944; R918 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2018)10-1887-05

前言

选择蛋白药物口服递送载体时,脂质体具有良好的生物相容性和特殊的膜性结构,可与细胞膜发生相互作用并将药物递送至细胞内,但脂质体的稳定性不佳,制备脂质体的磷脂价格昂贵,给药成本较高。与脂质体相比,聚合物纳米球的稳定性更好,能有效保护蛋白多肽类药物免遭胃肠道环境的破坏和降解。然而,聚合物纳米球的药物包埋率低,突释较高,且不易被肠上皮细胞摄取,导致药物口服生物利用度较低。本文目的是将二者的优势相结合,将聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物(PLGA)与氢化大豆卵磷脂(HSPC)混合,制备聚合物脂质纳米球。本文采用响应面分析法(Response Surface Methodology, RSM)对影响脂质纳米球制备的因素进行优化,得到最佳工艺参数。选用胰岛素作为模型药物进行包埋,获得载胰岛素的聚合物脂质纳米球,并进行体外表征。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

PLGA(乳酸:羟基乙酸为 75:25)购自德国 EVONIK 公司,氢化大豆卵磷脂 (Hydrogenated Soybean Phospholipids Mixed Compounds,HSPC)购自美国 Lipoid LLC 公司,二氯甲烷购自西陇化工股份有限公司,聚乙烯醇(Polyvinylalcohol,PVA)购自日本 Kuraray 公司,猪胰岛素(纯度≥ 98%)购自徐州万邦金桥制药有限公司,Micro-BCA 试剂盒购自英国 Thermo Scientific 公司,超纯水由实验室的纯水机自制。

1.2 实验仪器

* 基金项目:国家自然科学基金项目(21476243)

作者简介:孟丹(1992-),女,硕士研究生,电话:010-82544931,E-mail: 2243047721@qq.com

△ 通讯作者:朱艳华,女,教授,主要从事中药新药研究与开发、缓控释制剂,电话:0451-87266906,E-mail: 290471982@qq.com

(收稿日期:2017-10-30 接受日期:2017-12-06)

磁力搅拌器（德国 IKA 公司），S-450D 超声波细胞破碎仪（美国 Branson 公司），ABJ 220-4M 分析天平（德国 KERN 公司），Zetasizer Nano ZS 动态光散射粒度仪（英国 Malvern Instruments 公司），JSM-6700F 扫描电子显微镜（日本 JEOL 公司），Auanti J-26XP 高效离心机（美国 Beckman 公司），Infinite M200 多功能酶标仪（瑞士 Tecan 公司）。

1.3 实验方法

1.3.1 空白聚合物脂质纳米球的制备 采用超声复乳法制备 HSPC-PLGA 脂质纳米球，取一定量的磷脂和 100 mg PLGA 共同溶解于 10 mL 二氯甲烷中，作为油相；140 mL 含有一定浓度的 PVA 溶液作为外水相。向油相中加入一定体积的超纯水作为内水相，用超声破碎仪超声 40 s，形成 W_1/O 型初乳，将初乳分散到 50 mL 含有一定浓度的 PVA 水溶液中，继续超声 2 min 形成 $W_1/O/W_2$ 型复乳，将复乳分散于 90 mL 的 PVA 水溶液中，室温下于磁力搅拌器上搅拌 4 h，固化乳液，制备得到纳米球。用超纯水在高速离心机上离心洗涤三次（20000× g，15 min/次），获得聚合物脂质纳米球。

1.3.2 聚合物脂质纳米球制备工艺优化 采用 Design Expert 8.0 软件的 RSM [1]对纳米球的制备工艺进行优化，依据 Box-Benhnken（BBD）中心组合实验设计原理，在单因素考察的基础上，确定不同条件的合理范围，分别以 HSPC 与 PLGA 的比例（A）、PVA 浓度（B）、超声功率（C）三个因素进行考察，以粒径为响应值优化得到最佳工艺[2]。实验因素及水平设计见表 1。

表 1 响应面实验影响因素及水平

Table 1 The factors and levels of RSM experiments

Factor	Level		
	-1	0	1
A: Ratios of HSPC and PLGA	1:10	3:10	5:10
B: Concentrations of PVA (%)	0.50	0.75	1.00
C: Ultrasonic power (%)	45	50	55

1.3.3 聚合物脂质纳米球粒径测定 取约 1 mL 球液加入至样品池中，采用动态光散射粒度仪测定聚合物脂质纳米球的粒径及分布，根据 PDI 值的大小评价纳米球的均一性，其数值越小，说明粒径分布越窄，样品的均一性越好。每个样品测量三次，取平均值。

1.3.4 聚合物脂质纳米球表面形貌表征 取少量制备好的脂质纳米球，用去离子水稀释，取 1-2 滴纳米球悬浮液滴到铝箔纸上，室温下自然晾干后，将样品剪成小块贴在贴有导电胶的样品台上，喷金（20 mV，120 s）后，将其置于冷场扫描电子显微镜样品室中观察纳米球表面形貌。

1.3.5 载胰岛素 - 聚合物脂质纳米球的制备及表征

1.3.5.1 载胰岛素 - 聚合物脂质纳米球的制备 在最佳工艺条件下制备载药聚合物脂质纳米球，将胰岛素溶于 0.01 M 盐酸中形成内水相，具体制备流程见 1.3.1。在不同投药量比（脂质纳米球材料与胰岛素的质量比分别为 20∶1、10∶1、7.5∶1 和 5∶1）下制备载药脂质纳米球，考察投药量比对包埋率和载药量、粒径及表面形貌的影响，优化得到最佳投药量比。

1.3.5.2 包埋率和载药量的测定 取 0.5 mL 纳米球液，加入 0.5 mL 0.2 M 的氢氧化钠溶液中，37℃下垂直混悬 15 min，使球裂解释放出胰岛素，加浓度为 0.1 M 的盐酸溶液调 pH 值到 7.0，采用 Micro-BCA 试剂盒测定裂解液中胰岛素的浓度。依照公式计算包埋率和载药量。

包封率 (EE)%= 纳米球中包埋的药物质量 / 投药总量× 100%　　(1)

载药量 (LC)%= 纳米球中包埋的药物质量 / 纳米球的总质量× 100%　　(2)

1.3.5.3 体外释放 取载药的 HSPC-PLGA 脂质纳米球和载药的 PLGA 纳米球（制备流程见 1.3.1）各 10 mg，分别悬浮于 1 mL、pH 7.4 的 PBS 溶液中，置于 37℃恒温振荡器中，以 100 次·min^{-1} 速度振荡，在特定时间点取样，离心（15000× g，10 min）取上清，micro-BCA 试剂盒测定胰岛素浓度，计算各时间点的胰岛素累积释放率，绘制体外释放曲线。

2 结果与分析

2.1 空白聚合物脂质纳米球制备工艺优化

经检验，多元二次方程的回归系数最大且 F 检验合格，选用多元二次方程模型进行拟合。通过 Design Expert 8.0 软件进行回归方差分析和显著性检验，结果如表 2 所示。模型 F 值为 5.09，且 $P<0.05$，表明模型显著。回归系数 A、B、AB 差异项显著，其他项不显著，失拟项 F 值为 2.39，P 值为 0.3089，表明失拟项不显著。说明回归方程拟合情况良好，可用于对实验结果的预测。

根据 Design Expert 8.0 软件绘制不同影响因素对于响应值的三维曲线，如图 1 所示。图中 x 轴、y 轴、z 轴分别是三个影响因素其中之一，考察其他两个因素对粒径影响。图 1A 表示 HSPC-PLGA 比例与 PVA 浓度对粒径的影响，PVA 浓度对粒径的影响较小，随着 HSPC-PLGA 比例升高粒径也在变大；图 1B 表示 HSPC-PLGA 比例与超声功率对粒径的影响，图中可看出二者对粒径的影响不大；图 1C 表示 PVA 浓度与超声功率对粒径的影响。由图可知，制备聚合物脂质纳米球的最优工艺条件为：HSPC-PLGA 的比例为 10%，PVA 浓度为 0.66 %，超声功率为 51.34%（205.36 W），模型预测的纳米球的粒径为 227.3 nm。

在最优工艺条件下制备了 3 批脂质纳米球，并与预测值进行了对比分析，所制备的脂质纳米球的粒径分别为 235.0 nm、234.1 nm 和 231.3 nm，与预测值的误差分别为 3.27%、2.90%和 1.72%，偏差较小，说明该模型能很好地预测脂质纳米球的粒径。

表 2 响应面法的方差分析

Table 2 Analysis of variance for RSM experimental results

Source	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-value	P-value	Significance
Model	3407.21	9	378.58	5.090	0.04390	significant
A	695.64	1	695.64	9.360	0.02810	
B	1090.45	1	1090.45	14.670	0.01220	
C	60.50	1	60.50	0.810	0.40830	
AB	809.40	1	809.40	10.890	0.02150	
AC	34.22	1	34.22	0.460	0.05275	
BC	7.02	1	7.02	0.094	0.77090	
A^2	129.80	1	129.80	1.750	0.24360	
B^2	485.83	1	485.83	6.540	0.05080	
C^2	62.70	1	62.70	0.840	0.40050	
Residual	371.61	5	74.32			
Lack of fit	290.48	3	96.83	2.390	0.30890	not significant
Pure error	81.13	2	40.56			
Cor total	3776.82	14				

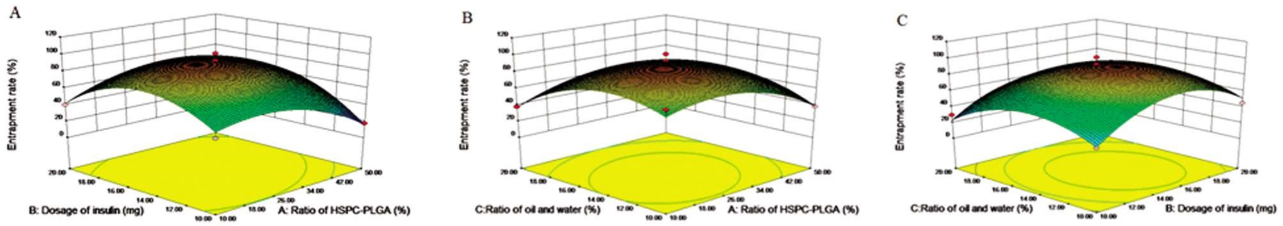

图 1 各因素响应面曲线图

Fig.1 Response curve of each factor

2.2 聚合物脂质纳米球表征

对最优条件下制备的纳米球进行表征，电镜图和粒径分布图如图 2 所示，图 A 制备的纳米球平均粒径约为 230 nm，PDI 值为 0.057，表明纳米球的粒径均一且分散性较好；图 B 电镜图显示，制备的聚合物脂质纳米球圆整、表面光滑，可用于后续药物装载。

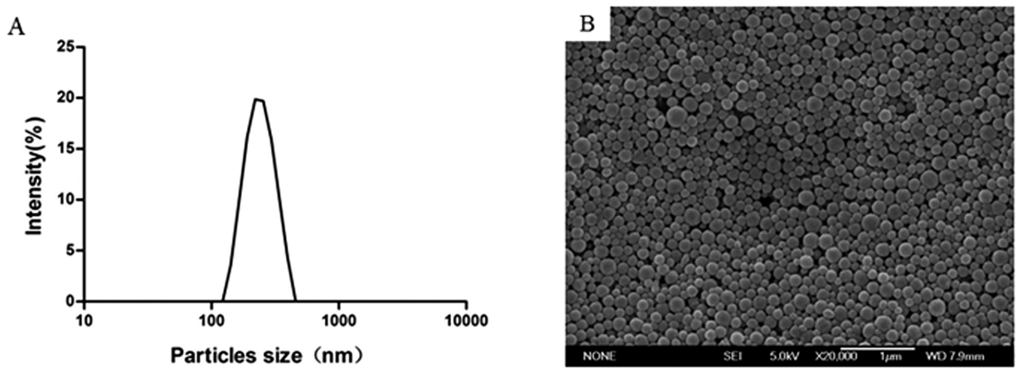

图 2 聚合物脂质纳米球的粒径分布(A)及表面形貌(B)

Fig.2 Particle size distribution(A) and scanning electron microscopy(B) of polymer lipid nanoparticles

2.3 载胰岛素的聚合物脂质球的制备与表征

2.3.1 胰岛素的投药量对脂质纳米球的影响

考察胰岛素投药量比例，制备载药聚合物脂质纳米球，研究投药量对纳米球粒径、形貌、药物包埋率和载药率的影响，结果如表 3 所示，各比例下制备的载药聚合物脂质纳米球的粒径分布如图 3 所示。

由图 3 可看出，当 PLGA 与胰岛素比例为 7.5∶1 时，聚合物脂质纳米球的粒径分布最窄，粒径较小，说明该比例下纳米球粒径分布较均一，而且纳米球的包埋率和载药率均最高。因而优化的 PLGA 与胰岛素的最佳比例为 7.5∶1。

2.3.2 体外释放

结果如图 4 所示，PLGA 纳米球药物突释达到 30%，而 HSPC-PLGA 聚合物脂质纳米球药物突释较低为 23%，24 小时后，两者均缓慢释放药物，且 HSPC-PLGA 的释放

速率比 PLGA 纳米球慢，说明磷脂的加入在降低药物突释的同时，可以延缓药物释放。

表 3 不同胰岛素投药量比例下制备的聚合物脂质纳米球的粒径、粒径分布、包埋率和载药率

Table 3 The particle size, particle size distribution, embedding rate and drug loading rate of the polymer lipid nanoparticles prepared at different insulin dosage ratios

Dosage ratios of PLGA and Insulin	Size (nm)	PDI	EE (%)	LC (%)
20:1	292.0	0.215	62.10	2.90
10:1	227.4	0.114	52.28	4.20
7.5:1	237.3	0.188	63.67	8.30
5:1	333.7	0.205	49.16	5.30

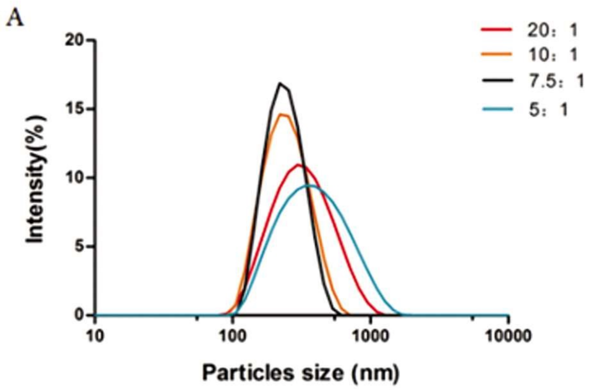

图 3 不同胰岛素投药量比例下制备的聚合物脂质纳米球的粒径分布

Fig.3 The particle size distribution of the polymer lipid nanoparticles prepared at different insulin dosage ratios

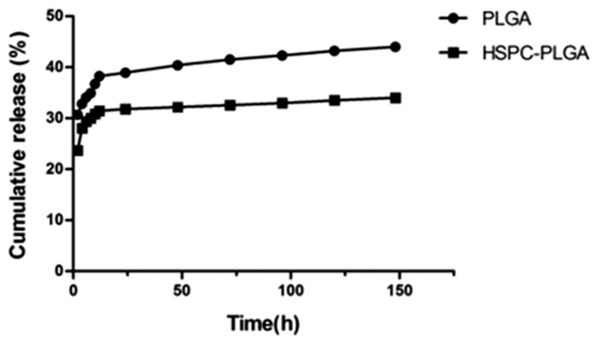

图 4 聚合物脂质载药纳米球与聚合物载药纳米球的体外释放

Fig.4 In vitro release of polymer lipid drug loaded nanoparticles and polymer drug loaded nanoparticles

3 讨论

近年来，随着生物技术的发展，蛋白及多肽类药物被大量表达和纯化并应用于临床，但蛋白及多肽类药物体内半衰期短，需要频繁注射给药才能维持有效的血药浓度，导致患者的顺应性差。口服是一种理想的给药方式，不仅用药方便，且患者顺应性好。但口服药物在胃肠道中稳定性差，口服生物利用度较低。因此，提高蛋白多肽类药物的口服吸收是实现口服给药的关键。目前国内外研究人员采用不同制剂克服口服递送药物的胃肠道屏障[3]，如脂质体[4]，微乳液[5]，微球[6]和纳米球[7]等，蛋白多肽类药物的口服递送载体的选择，要选用生物利用度高、稳定性好的生物材料作为载体。

脂质体是由磷脂双分子层包裹形成的微小囊泡，磷脂双分子层与生物膜具有类似的结构，且具有良好的生物相容性和生物安全性[8]。作为药物载体按结构和粒径特点分为多室脂质体(1-5 μm)、小单室脂质体（10-200 nm）、大单室脂质体(0.2-1 μm)等类型[9]。脂质体包载的药物具有缓释性和靶向性，作为蛋白及多肽类药物载体，能直接进入细胞内发挥作用，或长时间吸附于靶细胞周围，使药物透过靶细胞发挥作用[10]。Meng [11]等以麦角甾醇作为膜稳定剂构建脂质体作为胰岛素的口服递送系统，提高胰岛素的稳定性，并显著降低体内血糖。Hanato J[12]等制备包埋 GLP-1 的阴离子脂质体，口服给药能改善药代动力学并促胰岛素分泌。Zhang[13]等利用口服递送胰岛素的脂质体达到降低血糖并提高药物的生物利用度的目的。Liu[14]等通过自组装卵磷脂 / 壳聚糖纳米粒子(L/C NPs)借助磷脂络合技术负载胰岛素用于口服递送系统研究，使药物缓慢释放，改善口服生物利用度。

近年来对 PLGA 在口服给药上的研究颇多，Zhang[15]等制备壳聚糖包埋 PLGA 负载胰岛素的阳离子纳米球，经口服给药后比阴离子的 PLGA 载药纳米球的生物利用度高，体外吸收效果好，纳米球的表面电荷对药物的吸收有很大影响；Hurkat P [16]等研究 PLGA 纳米球经伴刀豆球蛋白 A 修饰可增加淋巴摄取的口服胰岛素递送系统。Chen[17]等利用 PLGA-PEG-PLGA 三嵌段共聚物包被熊果酸衍生物形成纳米胶束，经口服给药用于癌症的治疗；Song[18]等将羟丙基 -β- 环糊精改性的新型胰岛素负载纳米球制备羧甲基壳聚糖(CMC-HP-β-CD)以改善胰岛素的口服生物利用度。Liu[19]等构建聚乙二醇化的 PLGA 纳米球，并修饰聚精氨酸 8 用于口服胰岛素的递送，体内可显著降低血糖，且生物利用度较好；Fei Yu[20]等制备 PLGA-PEG 脂质单分散微球肠溶衣胶囊作为口服胰岛素的递送载体，避免药物在胃肠道被破坏，提高药物的生物利用度，因此肠溶衣胶囊对于药物的递送具有保护作用。

本文的研究创新点是将脂质体的性质和优点与生物可降解的纳米材料相结合，构建缓控靶向、生物安全性及生物利用度高的纳米载体，选用氢化大豆磷脂和聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物两种材料优化制备工艺制得粒径分布均一，分散性较好的聚合物脂质纳米球，并对包埋率及载药率进行研究。载药 PLGA 纳米球与载药 HSPC-PLGA 纳米球的体外释放速率进行对比，结果证实 HSPC-PLGA 纳米球的突释更低，使药物在体内的缓慢释放更具持久性。因而，初步认定可作为蛋白多肽类药物的

口服递送载体,可对纳米球表面进行修饰,使其更具靶向性,研究药物在体内的药效及生物利用度等。

4 结论

采用超声复乳法制备聚合物脂质纳米球,通过响应面法优化聚合物脂质纳米球制备的最佳工艺参数,得出以下结论:

(1) 优化出的最佳制备工艺参数为:磷脂 HSPC 与聚合物 PLGA 的比例为 10%,PVA 浓度为 0.66%,超声功率为 51.34%(205.36W)。纳米球的平均粒径为 233.4 nm, 多分散系数 PDI 值为 0.057,与预测值偏差较小,粒径分布均一且稳定。

(2) 在最优工艺参数下制备载胰岛素聚合物脂质纳米球,聚合物与胰岛素的质量比为 7.5:1。平均粒径为 230 nm 左右,胰岛素的包埋率和载药量均较高;体外释放表明,脂质纳米球的突释较聚合物纳米球低,药物释放较慢,磷脂的加入不仅可降低药物突释,还可以延缓药物释放,表明聚合物脂质纳米球可作为蛋白类药物的载体进行后续的药效学相关研究,具有良好的应用前景。

参 考 文 献(References)

[1] Liu B Y, Wang Y L, Yu J Q, et al. Optimization of Preparation of Catechin-Loaded Folate-Conjugated Chitosan Nanoparticles by Response Surface Analysis[J]. Food Science, 2014, 35(14): 46-52

[2] Xu J, Wang L Y, Yang T Y, et al. Preparation and Characterization of PLA Nanoparticles [J]. The Chinese Journal of Process Engineering, 2015, 15(3): 495-500

[3] Xiong X Y, Li Y P, Li Z L, et al. Vesicles from Pluronic/poly(lactic acid) block copolymers as new carriers for oral insulin delivery[J]. Journal of Controlled Release, 2007, 120(1-2): 11-17

[4] Cui M, Wu W, Hovgaard L, et al. Liposomes containing cholesterol analogues of botanical origin as drug delivery systems to enhance the oral absorption of insulin [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2015, 489(1-2): 277-284

[5] Li Y, Yokoyama W, Xu S, et al. Formation and stability of W/O microemulsion formed by food grade ingredients and its oral delivery of insulin in mice[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 30: 134-141

[6] Zhang Y, Wei W, Lv P, et al. Preparation and evaluation of alginate-chitosan microspheres for oral delivery of insulin [J]. European Journal of Pharmaceutics & Biopharmaceutics Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik E V, 2011, 77(1): 11-19

[7] Lopes M, Shrestha N, Correia A, et al. Dual chitosan/albumin-coated alginate/dextran sulfate nanoparticles for enhanced oral delivery of insulin [J]. Journal of Controlled Release Official Journal of the Controlled Release Society, 2016, 232: 29-41

[8] Wang Y W. Formulation and Evaluation of Naringenin-loaded Liposome[D]. Jiang Su University, 2016

[9] Yang Y F, Xie X Y, Yang Y, et al. A review on the influences of size and surface charge of liposome on its targeted drug delivery in vivo [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2013, 48(11): 1644-1650

[10] Lu B. Advances in studies on the application of liposomes as polypeptides and protein carriers [J]. China Pharmacist, 2010, 13(4): 497-501

[11] Meng C, Wei W, Hovgaard L, et al. Liposomes containing cholesterol analogues of botanical origin as drug delivery systems to enhance the oral absorption of insulin [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2015, 489(1-2): 277-284

[12] Hanato J, Kuriyama K, Mizumoto T, et al. Liposomal formulations of glucagon-like peptide-1: improved bioavailability and anti-diabetic effect [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2009, 382(1-2): 111-116

[13] Zhang X, Qi J, Lu Y, et al. Enhanced hypoglycemic effect of biotin-modified liposomes loading insulin: effect of formulation variables, intracellular trafficking, and cytotoxicity[J]. Nanoscale Research Letters, 2014, 9(1): 185-195

[14] Liu L, Zhou C, Xia X, et al. Self-assembled lecithin/chitosan nanoparticles for oral insulin delivery: preparation and functional evaluation[J]. International Journal of Nanomedicine, 2016, 11(Issue 1): 761-769

[15] Zhang X, Sun M, Zhenga A, et al. Preparation and characterization of insulin-loaded bioadhesive PLGA nanoparticles for oral administration[J]. European Journal of Pharmaceutical Sciences Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences, 2012, 45(5): 632-638

[16] Hurkat P, Jain A, Jain A, et al. Concanavalin A conjugated biodegradable nanoparticles for oral insulin delivery [J]. Journal of Nanoparticle Research, 2012, 14(11): 1-14

[17] Chen X, Chen J, Li B, et al. PLGA-PEG-PLGA triblock copolymeric micelles as oral drug delivery system: In vitro drug release and in vivo pharmacokinetics assessment [J]. Journal of Colloid & Interface Science, 2017, 490: 542-552

[18] Song Y H, Ma X L, Xiong F, et al. Preparation and Evaluation of Insulin-loaded Nanoparticles based on Hydroxypropyl-β-cyclodextrin Modified Carboxymethyl Chitosan for Oral Delivery [J]. Journal of Wuhan University of Technology (Materials Science), 2016, 31(6): 1394-1400

[19] Liu X, Liu C, Zhang W, et al. Oligoarginine-modified biodegradable nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2013, 448(1): 159-167

[20] Yu F, Li Y, Liu C, et al. Enteric-coated capsules filled with mono-disperse micro-particles containing PLGA-lipid-PEG nanoparticles for oral delivery of insulin [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2015, 484(1-2): 181-191