

· 研究报告 ·

温控型胰岛素液体缓释肛门栓体外释放研究

杨文慧^{1,2}, 肖秋生², 姜宗文², 张肃², 宋海艳¹, 王殿荣³ (1. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133000; 2. 解放军 208 医院, 吉林 长春 130021; 3. 浩特陶海牧场兽医站, 内蒙古 海拉尔 021000)

[摘要] 目的 用高效液相色谱法建立温控型胰岛素液体缓释肛门栓中胰岛素含量测定的方法, 以察温控型胰岛素液体缓释肛门栓的体外释放特性。方法 色谱柱: Welch ultimate C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 0.2 mol/L 硫酸盐缓冲液-乙腈 (74 : 26, 乙醇胺调 pH 到 2.3); 检测波长: 214 nm; 柱温: 40 °C; 流速: 1 ml/min, 对胰岛素含量进行测定。采用无膜释放模型、牛肠黏膜释放模型、羊肠黏膜释放模型, 以胰岛素原料药为模型药物; 考察温控型胰岛素液体缓释肛门栓的体外释放机制。结果 温控型胰岛素液体缓释肛门栓在 1.0 ~ 40.0 U/ml 范围内线性关系良好 ($r = 0.999 1$), 平均回收率 99.35%, RSD 为 0.79%; 无膜释放: $Q = 0.495 4t - 2.611 8$ ($r = 0.997 7$); 牛肠黏膜释放: $(1-Q)1/3 = 0.001 6t + 2.927 4$ ($r = 0.975 5$); 羊肠黏膜释放: $\ln Q = 0.878 3 \ln t - 4.931 1$ ($r = 0.970 5$)。结论 此方法简便, 重复性好、专属性强、结果准确、可靠, 适用于该制剂中胰岛素含量的测定。可考察温控型胰岛素液体缓释肛门栓机制。

[关键词] 胰岛素; 无膜释放; 牛肠黏膜释放; 羊肠黏膜释放

[中图分类号] R977.1⁴, R944.2³ **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)01-0056-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.01.016

***In vitro* release of thermosensitive slow-release rectal liquid suppository of insulin**

YANG Wenhui^{1,2}, XIAO Qiusheng², JIANG Zongwen², ZHANG Su², SONG Haiyan¹, Wang Dianrong³ (1. School of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133000, China; 2. No. 208th Hospital of PLA, Changchun 130021, China; 3. The Vet Ranch of Haotetaohai, Inner Mongolia Hailaer 021000, China)

[Abstract] **Objective** To establish HPLC method for the content determination of insulin in thermosensitive slow-release rectal liquid suppository, evaluate release characteristics *in vitro*. **Methods** The separation was performed on a Welch ultimate column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm). The mobile phase was composed of 0.2 mol/L sodium sulfate buffer (pH was adjusted to 2.3 with ethanolamine)-acetonitrile (74 : 26) with flow rate 1 ml/min, detected at 214 nm, the insulin levels were determined. Adopting membrane less release model, bovine intestinal mucosa release model, the gut mucosa release model, insulin was used as model drug, drug release mechanism of thermosensitive slow-release rectal liquid suppository of insulin *in vitro* was evaluate. **Results** The insulin *in situ* gel was linear in the range of 1.0-40.0 U/ml ($r = 0.999 1$). The average recovery was 99.35%, RSD was 0.79%; membrane-less release: $Q = 0.495 4t - 2.611 8$ ($r = 0.997 7$); bovine intestinal mucosa release: $(1 - Q)1/3 = 0.001 6t + 2.927 4$ ($r = 0.975 5$); gut-mucosa release: $\ln Q = 0.878 3 \ln t - 4.931 1$ ($r = 0.970 5$). **Conclusion** The method was simple, fine repeatability, sensitive, accurate and reliable. The method could be applicable to the preparation of the content determination of insulin and evaluate release mechanism thermosensitive slow-release rectal liquid suppository of insulin.

[Key words] Insulin *in situ* gel; *in vitro* release; membraneless release; release; bovine intestinal mucosa release; gut mucosa release

胰岛素是目前用于治疗糖尿病最常用的药物, 临床上主要用于治疗 1 型糖尿病 (即胰岛素依赖型糖尿病), 在患者口服降糖药无效、过敏或病情加重条件下可作为治疗 2 型糖尿病 (即非胰岛素依赖型糖尿病) 而选择的药物^[1]。因为胰岛素的特殊性质不宜口服给药只能注射给药, 给患者带来了较大的不便和痛苦。

本试验研究采用温控型胰岛素液体缓释肛门栓

给药新剂型, 剂型以液体的形式进入直肠后, 在生理温度下迅速由液体变为半固体凝胶态, 固定在给药部位, 可以有效地避免肝脏首过效应, 提高药物的生物利用度^[2]。笔者采用高效液相色谱法建立温控型胰岛素液体缓释肛门栓的含量测定的方法, 并对其体外释放机制进行研究, 以改善糖尿病患者的治疗方式和治疗效果。

1 仪器与试药

LC-10AVT 高效液相色谱仪, SPD-10AV 紫外检测器 (日本岛津), N-2000 双道色谱工作站 (浙江大

[作者简介] 杨文慧, 女, 硕士研究生. Tel: 18704405314, E-mail: ww-wyangwenhui@126.com.

学智能信息工程研究所), AT-130 柱温箱(天津市鑫州科技有限公司), pHs-3C 精密酸度计(上海虹益仪器仪表有限公司), 微量电子天平 CP225D(北京赛多利斯仪器系统有限公司), 电磁搅拌器(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司), THZ-82 水浴恒温振荡器(金坛市华城创威实验仪器厂)。

胰岛素标准品(批号:5048708, 27 u/mg, 中国药品生物制品检定所), 胰岛素原料药(批号:1112A05, 1203A10, 1207A09, 徐州万邦金桥制药有限公司), 泊洛沙姆 407(批号:20111101, 南京威尔化工有限公司), 泊洛沙姆 188(批号:20110506, 南京威尔化工有限公司), 壳聚糖(批号:20110316, 国药集团化学试剂有限公司), 尼泊金乙酯(天津市华东试剂厂, 批号:20111117)。甲醇、乙腈为色谱纯; 其余试剂均为分析纯, 水为重蒸水。

牛肠、羊肠购于内蒙古呼伦贝尔。

2 方法与结果

2.1 方法 温控型胰岛素液体缓释肛门栓处方制备: 本试验的凝胶基质选用的是泊洛沙姆 407 和泊洛沙姆 188, 称取泊洛沙姆 407 7.5 g, 泊洛沙姆 188 12.5 g, 加入适量的水溶解, 边加边搅拌, 放置过夜; 称取壳聚糖 200 mg, 胰岛素 175 mg, 用适量 2% 的醋酸溶解, 加入到泊洛沙姆溶液中, 边加水边搅拌, 加入 0.05% 尼泊金乙酯, 将混合液放置于冰箱中 10 ~ 12 h, 使其充分水化, 除去气泡, 调节 pH 值, 再加入适量的水, 使其成 50 g 溶液。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 Welch ultimate C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 0.2 mol/L 硫酸盐缓冲液(取无水硫酸钠 28.4 g, 加水溶解后, 加磷酸 2.7 ml, 乙醇胺调 pH 至 2.3 加水至 1 000 ml)-乙腈(74:26); 检测波长: 214 nm; 柱温: 40 °C; 流速: 1 ml/min, 进样量 20 μl^[3]。

2.2.2 系统适用性试验 精密取胰岛素对照品适量, 加 0.01 mol/ml 盐酸溶液制成每 1 ml 约含 40 U 的对照品溶液, 室温放置 24 h 后, 取 20 μl 注入高效液相色谱仪内, 记录色谱图(胰岛素峰相对保留时间约为 7.732 min), 理论塔板数为 6 610, 见图 1。

2.2.3 线性关系考察 精密称取胰岛素对照品 13.8 mg, 用 0.01 mol/L 盐酸溶液制成浓度为 40.0 U/ml 的储备液。分别精密量取上述储备液, 加入 0.01 mol/L 盐酸溶液稀释浓度分别为 1.0、5.0、10.0、15.0、20.0、30.0、40.0 U/ml 的一系列溶液, 按“2.1”项下色谱条件取 20 μl 注入高效液相色谱仪, 记录峰面积; 以胰岛素浓度(U/ml)为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归, 得回归方

程: $Y = 2 \times 10^5 X + 690\ 136$, $r = 0.999\ 1$ 。结果表明: 胰岛素在 1.0 ~ 40.0 U/ml 范围内与其峰面积呈较良好的线性关系。

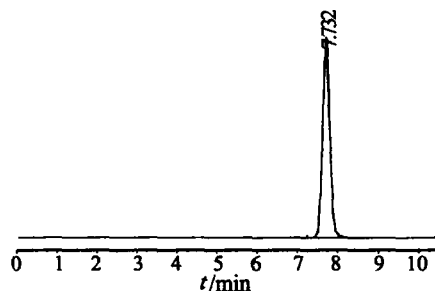


图 1 温控型胰岛素液体缓释肛门栓胰岛素对照品

2.2.4 精密度试验 精密吸取同一对照品溶液(40 U/ml), 按“2.1”项下色谱条件, 取 20 μl 进样, 连续进样 6 次, 测得胰岛素主峰面积的 RSD 为 0.32%, 表明仪器精密度良好。

2.2.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液(40 U/ml), 室温放置, 按“2.1”项下色谱条件, 取 20 μl 进样, 分别在 24、36、48 h 进样分析, 结果 RSD 为 0.84%, 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.2.6 重复性试验 取同一供试品溶液(40 U/ml) 6 份, 按“2.1”项下色谱条件, 测定峰面积, 结果测得胰岛素峰面积的 RSD 为 1.08%, 表明该方法的重复性良好。

2.2.7 加样回收率试验 取已知含量的供试品溶液 1 ml 共 9 份, 置 10 ml 容量瓶中, 分别加入 3 种不同浓度胰岛素对照品溶液, 加 0.01 mol/L 的盐酸稀释到刻度, 摇匀, 按“2.1”项下色谱条件取 20 μl 注入色谱仪, 计算回收率, 平均回收率($n = 9$) 98.81%, RSD 为 1.15%。结果见表 1。

表 1 加样回收率试验

样品中含量 (U/ml)	加入量 (U/ml)	实测量 (U/ml)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
10.14	5.07	15.15	99.60		
10.14	5.07	15.31	100.65		
10.14	5.07	15.00	98.62		
10.14	10.14	20.06	98.92		
10.14	10.14	20.35	100.35	99.35	0.79
10.14	10.14	20.20	99.61		
10.14	15.22	24.85	97.98		
10.14	15.22	25.05	98.77		
10.14	15.22	25.28	99.65		

2.2.8 样品含量测定 取 3 个批号的样品 1 ml 加入 0.01 mol/L 的盐酸稀释至 10 ml, 按“2.1”项下色谱条件及供试品溶液制备的方法, 每个批号的样品连续进样 3 次, 进行含量测定, 结果见表 2。

表 2 3批温控型胰岛素原位凝胶肛门液体栓含量

批号	胰岛素(U/ml)	RSD(%)
120216	10.13	0.47
120309	10.15	0.35
120420	10.14	0.69

3 体外药物释放的考察

3.1 无膜溶出法 采用无膜溶出模型研究温控型胰岛素液体缓释肛门栓的溶蚀动力学,同时考察药物的体外释药机制^[4]。称取 20 g 胰岛素原位凝胶液体栓剂加入到已知重量的 100 ml 烧杯中,置于 (36 ± 0.5) °C 的水浴恒温振荡器中,预热 20 min 使溶液完全形成凝胶。加入生理盐水(36 °C) 2 ml 作为释放介质,小心操作注意保持凝胶的表面完整,在恒温水浴振荡器(100 r/min)中振荡 20 min^[5],然后将释放介质倾倒入,用滤纸把烧杯外及凝胶表面擦干,并迅速称重记录,再加入生理盐水 2 ml,再放入到水浴恒温振荡器中振荡 20 min,依照上法反复操作 8 次^[6]。相邻时间点的样品的重量之差为凝胶溶蚀量^[7]。以凝胶累积溶蚀百分率对时间作图,得到凝胶溶蚀曲线,见图 2。上述试验重复 3 次,RSD 为 0.35%。

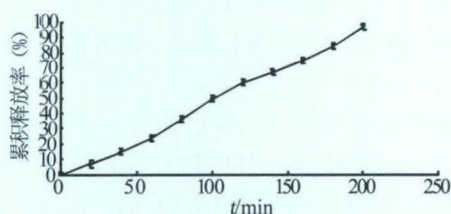


图 2 温控型胰岛素液体缓释肛门栓凝胶溶蚀曲线

将以上得到的释放介质用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,按“2.1”项下色谱条件,取 20 μl 注入 HPLC 分析,测定药物浓度,上述试验重复 3 次,RSD 为 0.20%。以药物累积释放率对时间作图,得到药物释放曲线,结果见图 3。

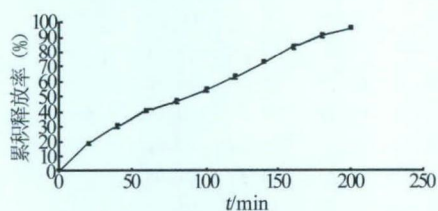


图 3 温控型胰岛素液体缓释肛门栓累积释放率曲线

结果表明,药物的溶蚀方程为 $A = 0.4587t + 8.4873$ ($r = 0.9929$);药物的体外释放方程为 $Q = 0.4954t - 2.6118$ ($r = 0.9977$)。可知温控型胰岛素液体缓释肛门栓在无膜释放模型中药物是通过溶

蚀作用进入人体的。

3.2 牛肠黏膜释放研究 牛肠黏膜的制备:将刚宰杀的牛肠取出,切开牛肠,用镊子将覆盖在牛肠黏膜上的脂肪剔除,小心的将肠膜剥离出来,用生理盐水清洗干净,平整的放在锡箔纸上包好,于 -15 °C 冷冻保存。

采用 Franz 扩散池(自制装置),供给室与接受池的容积均为 7.5 ml,扩散面积为 0.97 cm²,接受池内加入 36 °C 的生理盐水,将牛肠黏膜的黏膜层向上固定在供给室与接受池之间,置于温度为 (36 ± 0.5) °C 的恒温水浴振荡器中平衡 20 min,取温控型胰岛素原位凝胶肛门液体栓 200 μl 均匀覆盖在牛肠黏膜上。分别在 15、30、45、60、90、120、180、240、300、360 min 从接收池取样 200 μl,每次取样后补加等量的 36 °C 的释放介质,将以上得到的样品用 0.45 μm 微孔滤膜滤过供 HPLC 分析,测定药物浓度,计算累积释放量,以累计释放率对时间作图^[8],见图 4。上述试验重复 3 次,RSD 为 0.79%。

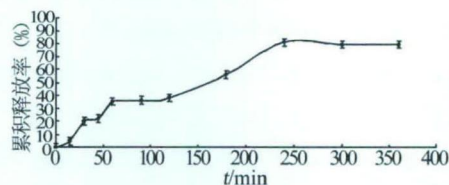


图 4 温控型胰岛素液体缓释肛门栓牛肠黏膜体外释放曲线

得出的数据分别用 Higuchi 方程、Ritger-Peppas 方程、Hixson-Crowell 方程进行拟合结果列于见表 3。结果表明:牛肠黏膜的最佳曲线拟合: $(1-Q)^{1/3} = 0.0016t + 2.9274$ ($r = 0.9756$),符合 Hixson-Crowell 方程。在使用牛肠黏膜进行体外释放研究时药物是通过溶蚀方式释放的。

表 3 温控型胰岛素液体缓释肛门栓牛肠黏膜体外释放曲线拟合

编号	方程	r
Higuchi	$Q = 0.0500t_{1/2} - 0.1102$	0.9389
Ritger-Peppas	$\ln Q = 0.7650 \ln t - 4.5551$	0.9348
Hixson-Crowell	$(1-Q)^{1/3} = 0.0016t + 2.9274$	0.9756

3.3 羊肠黏膜释放研究 羊肠黏膜的制备:将刚宰杀的羊取出肠管并切开,用镊子将覆盖在羊肠黏膜上的脂肪剔除,小心的将肠膜剥离,用生理盐水清洗干净,平整的放在锡箔纸上包好,于 -15 °C 冷冻保存。

采用 Franz 扩散池(自制装置),供给室与接受池的容积均为 7.5 ml,扩散面积为 0.97 cm²,接受池

(下转第 67 页)

390-391.
[3] 李树森. 小剂量米非司酮联合米索前列醇终止妊娠的疗效观察[J]. 中国药房, 2010, 21(40): 3798-3800.
[4] 张晓霞, 李 彬. 米非司酮配伍米索前列醇终止 13~25 周妊娠 70 例效果观察[J]. 山东医药, 2010, 50(27): 21.
[5] 俞颂梅, 耿菊惠, 赵纯燕. 不同剂量米非司酮配伍米索前列醇终止早孕的临床分析[J]. 江苏医药, 2010, 36(5): 596-597.
[6] 曾美苑, 朱兰芳, 李爱贤. 米非司酮配伍米索前列醇终止 12~16 周妊娠 80 例临床分析[J]. 重庆医学, 2009, 38(9): 1100-1101.

[7] 盖牟慧子, 闫 萍. 米非司酮对子宫雌孕激素受体影响的研究进展[J]. 河北医科大学学报, 2010, 3(2): 241-243.
[8] 吕榜权. 米索前列醇与米非司酮用于早孕人工流产软化宫颈的临床效果观察[J]. 广西医学, 2011, 33(7): 869-870.
[9] 张晓华, 陶 芳. 米索前列醇用于 10~14 周无痛人流的体会[J]. 中国实用医药, 2011, 6(18): 145-146.
[10] 韩 华, 闫 萍. 米非司酮终止早孕的研究进展[J]. 河北医科大学学报, 2008, 29(5): 795-798.

[收稿日期] 2013-05-22 [修回日期] 2013-10-17

[本文编辑] 李睿昊

(上接第 58 页)

内加入 36℃ 的生理盐水, 将羊肠黏膜的黏膜层向上固定在供给室与接受池之间, 置于温度为 (36 ± 0.5)℃ 的恒温水浴振荡器中平衡 20 min, 取温控型胰岛素原位凝胶肛门液体栓 200 μl 均匀覆盖在羊肠黏膜上。分别在 15、30、45、60、90、120、180、240、300、360 min 从接收池取样 200 μl, 每次取样后补加等量的 36℃ 的释放介质, 将以上得到的样品用 0.45 μm 微孔滤膜滤过供 HPLC 分析, 测定药物浓度, 计算累积释放量, 以累计释放率对时间作图, 见图 5。上述试验重复 3 次, RSD 为 0.55%。

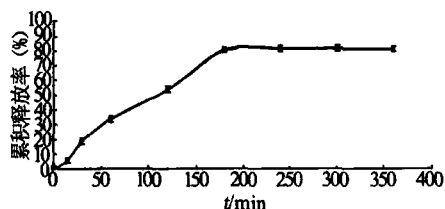


图 5 温控型胰岛素液体缓释肛门栓羊肠黏膜体外释放曲线

得出的数据分别用 Higuchi 方程、Ritger-Peppas 方程、Hixson-Crowell 方程进行拟合见表 4。结果表明: 羊肠黏膜释放的最佳曲线拟合: $\ln Q = 0.878 3 \ln t - 4.931 1$ ($r = 0.970 5$), 符合 Ritger-Peppas 方程, 在使用羊肠黏膜进行体外释放研究时药物是通过扩散与溶蚀相结合的方式释放的。

表 4 温控型胰岛素液体缓释肛门栓羊肠黏膜体外释放曲线拟合

编号	方程	r
Higuchi	$Q = 0.063 2 t_{1/2} - 0.115 94$	0.962 1
Ritger-Peppas	$\ln Q = 0.878 3 \ln t - 4.931 1$	0.970 5
Hixson-Crowell	$(1-Q)^{1/3} = 0.966 8 - 0.001 6 t$	0.938 2

4 讨论

通常直肠缺乏规律性的蠕动, 直肠内的液体的量在 2~3 ml, pH 值 7.3 左右^[9]。本试验自制了简

易的模拟装置, 模拟凝胶在直肠环境下逐渐溶蚀和扩散的过程, 研究凝胶在人体内的释放。试验还证实, 通过计算药物累积释放率可以得出本凝胶有一定的缓释作用。

本试验利用无膜释放试验考察温控型胰岛素液体缓释肛门栓的溶蚀过程, 药物是通过扩散作用进入人体的, 并不是因为凝胶的溶蚀作用; 采用生物膜 (牛肠黏膜和羊肠黏膜) 释放是为了模拟人肠黏膜对药物的吸收情况, 采用多种回归方法进行拟合, Higuchi 方程是反映扩散机制的, Ritger-Peppas 方程是验证机制的, Hixson-Crowell 方程是反映溶蚀机制的, 拟合后可知凝胶中的药物主要是通过溶蚀和扩散方式释放的。温控型胰岛素液体缓释肛门栓的药理学及药效学还有待进一步研究。

【参考文献】

[1] Hinchcliffe M, Ilium L. Intranasal insulin delivery and therapy [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1999, 35: 199.
[2] 何文, 代文兵, 吴燕, 等. N-三甲壳壳聚糖对胰岛素液体栓剂直肠吸收的促进作用研究[J]. 中国药理学杂志, 2006, 4(16): 1240.
[3] 国家药典委员会, 中华人民共和国药典 2010 年版二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 846.
[4] Desai SD, Blanchard J. In vitro evaluation of pluronic F127-based controlled-release ocular delivery systems for pilocarpine [J]. J Pharm Sci, 1998, 87: 226.
[5] 袁园, 王晓辉, 张莉, 等. 无膜释放模型考察直肠用温敏型原位凝胶的体外释放情况[J]. 中国药房, 2011, 22(29): 2750.
[6] 王军. 胰岛素眼用温度敏感型凝胶的制备及其体外释药考察[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(4): 1132.
[7] 冯敏, 何文. 眼用维生素 A 棕榈酸酯阳离子脂质体原位凝胶的研制及体外释药研究[J]. 中国药师, 2010, 13(5): 631.
[8] 肖金宝, 李洪斌, 刘福强, 等. 银杏叶提取物温度敏感型原位凝胶体外释放研究[J]. 中成药, 2013, 35(1): 46.
[9] 梁文权. 生物药剂学与药物动力学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 79.

[收稿日期] 2013-06-05 [修回日期] 2013-11-21

[本文编辑] 陈静