

温控型胰岛素液体直肠栓的制备及处方筛选^Δ

肖秋生^{1*}, 杨文慧², 姜宗文^{1#}, 肖金宝¹(1.解放军第208医院461临床部, 长春 130021; 2.内蒙古林业总医院, 内蒙古牙克石 022150)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)41-3892-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.41.17

摘要 目的:制备温控型胰岛素液体直肠栓。方法:以胰岛素含量为指标,以泊洛沙姆407-泊洛沙姆188的比例、壳聚糖含量、pH为因素,采用正交设计试验筛选温控型胰岛素液体直肠栓的处方;并采用无膜、动物黏膜溶出法考察所制栓剂的体外释药机制。结果:所制温控型胰岛素液体直肠栓的胰岛素含量为0.35%;泊洛沙姆407-泊洛沙姆188的比例对栓剂中胰岛素含量影响显著($P<0.05$);最优处方为泊洛沙姆407-泊洛沙姆188比例为15%:25%、壳聚糖含量为0.4%、pH为5;使用无膜和牛肠黏膜时是通过溶蚀方式释放,使用羊肠黏膜时是通过扩散与溶蚀相结合的方式释放。结论:成功制得温控型胰岛素液体直肠栓。

关键词 温控型胰岛素;液体直肠栓;制备;释放机制

Preparation and Prescription Screening of Thermosensitive Insulin Rectal Liquid Suppository

XIAO Qiu-sheng¹, YANG Wen-hui², JIANG Zong-wen¹, XIAO Jin-bao¹(1.No. 461 Clinical Department, No. 208 Hospital of PLA, Changchun 130021, China; 2.Inner Mongolia Forestry General Hospital, Inner Mongolia Yakeshi 022150, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Thermosensitive insulin rectal liquid suppository. METHODS: The formulation of Thermosensitive insulin rectal liquid suppository was optimized by orthogonal test with the ratio of poloxamer P407-P188, the content of chitosan and pH value as factors using the content of insulin as index. The *in vitro* release mechanism of the suppository was investigated by membraneless dissolution model and animal mucosal dissolution model. RESULTS: The content of insulin was 0.35%, and was influenced by the ratio of poloxamer P407-P188 significantly ($P<0.05$). The optimal formulation was as follows: the ratio of poloxamer P407-P188 was 15%:25%; the content of chitosan was 0.4%; pH value was 5. *In vitro* release test confirmed that the drug entered membraneless and bovine intestinal mucosa through erosion; entered the ovine intestinal mucosa through a combination of diffusion and erosion. CONCLUSIONS: Thermosensitive insulin rectal liquid suppository has been prepared successfully.

KEYWORDS Thermosensitive insulin; Rectal liquid suppository; Preparation; Release mechanism

胰岛素(Insulin, Ins)是治疗1型糖尿病和许多2型糖尿病的重要药物,但胰岛素是多肽类蛋白,口服易分解,注射给药易产生皮下脂肪萎缩、皮下组织增生等局部反应,还可能会由于释药不稳定导致低血糖反应。鉴于传统给药方式不便、顺应性差的问题^[1],现研究者致力于开发新型给药系统,如经皮以及直肠给药等。笔者采用泊洛沙姆为栓剂材料制备了温控型胰岛素液体直肠栓(液体栓剂即原位凝胶),该栓剂在常温下为液体,在体温环境下形成凝胶,有适宜的胶凝强度,给药后不易漏出,通过直肠吸收可避免首关效应,从而提高胰岛素的生物利用度^[2];而且该栓剂具有给药方式简单方便的优点,提高了患者的用药依从性,使得直肠给药有望于将来取代皮下注射成为胰岛素新的给药途径。

1 材料

1.1 仪器

LC-10AVT 高效液相色谱仪、SPD-10AV 紫外检测器(日本

^Δ 基金项目:吉林省科技发展计划项目(No. 201205033)

* 副主任药师, 硕士。研究方向:药剂学和医院管理。电话:0431-86946285。E-mail:jiangzw5637@163.com

通信作者:副主任药师, 硕士。研究方向:药剂学和临床药学。电话:0431-86946285。E-mail:jzw461@163.com

岛津公司);N-2000 双道色谱工作站(浙江大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)。

1.2 药品与试剂

胰岛素标准品(中国食品药品检定研究院,批号:5048708,纯度:≥27 u/mg);胰岛素原料药(徐州万邦金桥制药有限公司,批号:1112A05、1203A10、1207A09,纯度:27.8 u/mg);泊洛沙姆407(P407,批号:20111101)、泊洛沙姆188(P188,批号:20110506)均购自南京威尔化工有限公司;壳聚糖(国药集团化学试剂有限公司,批号:20110316,);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。

1.3 动物与组织

健康日本大耳兔,♀♂各半,体质量1.8~2.4 kg,由长春生物制品研究所有限责任公司提供,许可证号:SCXK(吉)2013-0002;饲养于中国人民解放军第208医院实验动物中心,饲养环境温度20~25℃,湿度40%~70%,通风良好。牛肠、羊肠购于内蒙古呼伦贝尔。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3]

色谱柱: Welch ultimate C₁₈(250 mm×4.6 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), 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 214 nm; 柱温: 40 °C; 进样量: 20 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 标准品溶液。精密称取胰岛素标准品适量, 加 0.01 mol/L 盐酸溶液制成 40.0 u/ml 的标准品溶液。

2.2.2 供试品溶液。精密量取样品 4 ml, 置于 10 ml 量瓶中, 加 0.01 mol/L 盐酸溶液适量, 超声溶解, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

2.2.3 空白基质溶液。精密量取不含胰岛素的其余处方辅料 4 ml, 按“2.2.2”项下制备方法制成溶液, 即得。

2.3 方法专属性考察

分别精密吸取胰岛素标准品溶液、供试品溶液(第 1 批次样品)和空白基质溶液各 20 μl, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱。结果胰岛素主峰保留时间为 7.298 min, 理论板数按胰岛素计为 6 610, 空白基质对其测定无干扰, 色谱图见图 1。

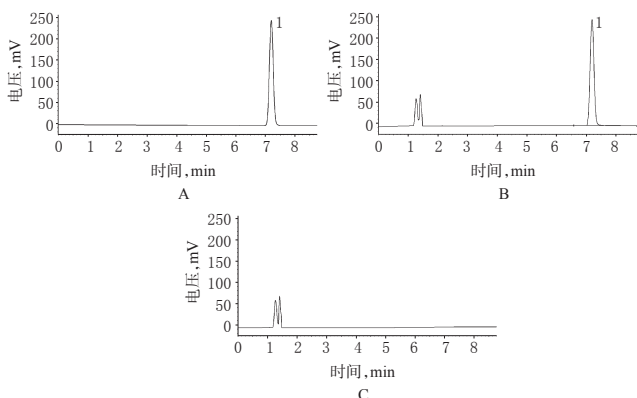


图 1 高效液相色谱图

A. 对照品; B. 供试品; C. 空白基质; 1. 胰岛素

Fig 1 HPLC chromatograms

A. substance control; B. test samples; C. blank suppository matrix; 1. insulin

2.4 线性关系考察

精密量取胰岛素标准品溶液 0.25、1.25、2.50、3.75、5.00、7.50、10.00 ml, 分别置于 10 ml 量瓶中, 用 0.01 mol/L 盐酸溶液制备成 1.0、5.0、10.0、15.0、20.0、30.0、40.0 u/ml 的系列溶液。精密吸取上述不同浓度的标准品溶液各 20 μl 注入高效液相色谱仪中, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录峰面积。以胰岛素浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线, 得回归方程为: $y = 2 \times 10^5 x + 690 136$ ($r = 0.999 1, n = 7$)。结果表明, 胰岛素在 1.0~40.0 u/ml 范围内与峰面积呈较良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取标准品溶液, 连续进样测定 6 次, 测得胰岛素峰面积的 RSD 为 0.32% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取样品(第 1 批次样品), 按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液, 分别于 0、24、36、48 h 进样测定, 测得胰岛素峰面积的 RSD 为 0.84% ($n = 4$), 表明供试品溶液在 48 h 内稳定。

2.7 重现性试验

取供试品溶液(第 1 批次样品)6 份, 分别进样测定, 记录峰

面积, 结果测得胰岛素峰面积的 RSD 为 1.08% ($n = 6$), 表明该方法的重现性良好。

2.8 回收率试验

取已知含量的供试品溶液(第 1 批次样品)共 9 份, 置于 10 ml 量瓶中, 分别加入低、中、高浓度的胰岛素标准品溶液, 用 0.01 mol/L 盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 进样测定, 记录峰面积, 计算回收率。结果平均回收率为 99.35%, RSD 为 0.79% ($n = 3$)。

2.9 样品含量测定

取 3 批次的样品, 按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液, 进样测定, 记录峰面积, 代入回归方程计算含量。结果 3 批样品的胰岛素含量分别为 0.349%、0.351%、0.349%, RSD 分别为 0.47%、0.35%、0.69% ($n = 3$)。

2.10 正交设计试验

根据文献^[4-6]和预试验的结果, 选用 P407 和 P188 为栓剂的基质, 壳聚糖为辅料以增加胶凝强度和生物黏附力, 同时还可作为胰岛素的促吸收剂, 因胰岛素在弱酸性溶液中较稳定, 同时考虑到直肠可承受的 pH 范围。因此, 选用 P407-P188 比例(A)、壳聚糖含量(B)、pH(C)作为考察因素, 每个因素选 3 个水平, 按 L₉(3³)正交表设计试验, 以胰岛素含量为考察指标, 测得量/加入量作为评分值, 100% 为 1 分。正交设计试验因素与水平见表 1, 结果与极差分析见表 2, 方差分析见表 3。

表 1 正交设计试验因素与水平

Tab 1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素		
	A	B	C
1	15% : 15%	0.2%	4
2	15% : 20%	0.3%	5
3	15% : 25%	0.4%	6

表 2 正交设计试验结果与极差分析

Tab 2 Results of orthogonal experiment and analysis of range

试验号	A	B	C	评分
1	1	1	1	0.90
2	1	2	2	0.87
3	1	3	3	0.89
4	2	1	2	0.91
5	2	2	3	0.90
6	2	3	1	0.92
7	3	1	3	0.94
8	3	2	1	0.95
9	3	3	2	1.00
K ₁	2.66	2.75	2.77	
K ₂	2.73	2.72	2.78	
K ₃	2.89	2.81	2.73	
R	0.23	0.09	0.05	

表 3 正交设计试验结果的方差分析

Tab 3 Results of orthogonal experiment and analysis of variance

方差来源	离均差平方和	自由度	方差	F	P
A	0.009 3	2	0.000 465	23.25	<0.05
B	0.001 4	2	0.000 7	3.5	>0.05
C	0.000 5	2	0.000 025	1.25	>0.05
D(误差)	0.000 8	2			

注: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

Note: $F_{0.05}(2, 2) = 19.00$

由表 2 结果可知, 各因素对温控型胰岛素液体直肠栓中胰

胰岛素含量的影响效果依次为A>B>C,最优处方为A₃B₃C₃,即P407-P188比例为15%:25%、壳聚糖含量为0.4%、pH为5。由表3结果可知,P407-P188比例对温控型胰岛素液体直肠栓中胰岛素含量具有显著影响($P<0.05$)。根据最优处方制备3批次的温控型胰岛素液体直肠栓,其色泽均匀,含量为0.35%,RSD为1.05%,表明该工艺可行。

2.11 处方与制备

通过正交试验,确定本研究中温控型胰岛素液体直肠栓的处方(总量50 ml):P407 7.5 g,P188 12.5 g,壳聚糖200 mg,胰岛素含量为0.35%。参照文献^[4-6]方法,按比例将P407、P188,加适量的重蒸水溶解,边加边搅拌,置于4℃冰箱冷藏过夜取出;另取壳聚糖、胰岛素,用适量2%的醋酸溶解,加入到P407-P188混合溶液中,边加边搅拌,再加入0.05%尼泊金乙酯1 ml;将混合液放置于冰箱中10~12 h,使其充分水化,除去气泡,再加入重蒸水,至50 ml即可。重复制备3批次。

2.12 体外释放考察

2.12.1 无膜溶出法。采用无膜溶出模型研究温控型胰岛素液体直肠栓的溶蚀动力学,同时考察药物的体外释药机制。称取温控型胰岛素液体直肠栓20 g,加入到已知质量的100 ml烧杯中,置于(36±0.5)℃的水浴恒温振荡器中预热20 min,使溶液完全形成凝胶;加入36℃的生理氯化钠溶液2 ml作为释放介质,小心操作注意保持凝胶的表面完整,100 r/min下恒温水浴振荡不同时间,然后将释放介质倾出,用滤纸把烧杯外及凝胶表面擦干,并迅速称质量记录;再加入36℃的生理氯化钠溶液2 ml,依照上法反复操作,重复3次,结果RSD为0.35%^[5]。相邻时间点的样品质量之差为凝胶的溶蚀量^[6]。以凝胶累积溶蚀百分率(A)对振荡时间(t)作图,得到凝胶溶蚀曲线,见图2。

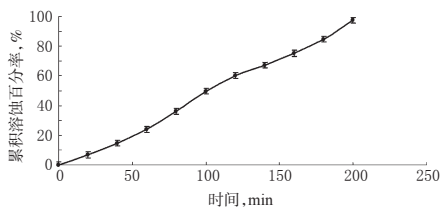


图2 温控型胰岛素液体直肠栓凝胶的溶蚀曲线

Fig 2 Dissolution curves of Thermosensitive insulin rectal liquid suppository gel

将倾出的释放介质用0.45 μm微孔滤膜滤过,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,试验重复3次,结果峰面积的RSD为0.20%。以药物累积释放率(Q)对振荡时间(t)作图,得到药物释放曲线,见图3。

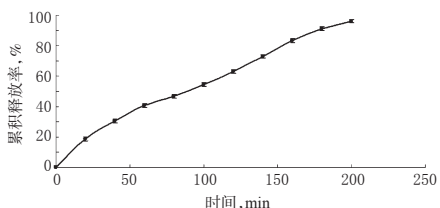


图3 温控型胰岛素液体直肠栓的释放曲线

Fig 3 Accumulative release curves of Thermosensitive insulin rectal liquid suppository

结果表明,药物的溶蚀曲线方程为 $A=0.458 7t+8.487 3$ ($r=0.992 9$);药物的释放曲线方程为 $Q=0.495 4t-2.611 8$

($r=0.997 7$)。可知温控型胰岛素液体直肠栓在无膜释放模型中药物是通过溶蚀作用进入人体的。

2.12.2 牛肠黏膜制备与释放。采用Franz扩散池(自制装置),供给室与接收池的容积均为7.5 ml,扩散面积为0.97 cm²,接收池内加入36℃的生理氯化钠溶液,将牛肠的黏膜层向上固定在供给室与接收池之间,置于温度为(36±0.5)℃的恒温水浴振荡器中平衡20 min,取温控型胰岛素液体直肠栓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℃的释放介质,将以上得到的样品用0.45 μm微孔滤膜滤过,进样测定胰岛素含量。试验重复3次,结果RSD为0.79%。将药物累积释放率(Q)和时间(t)分别用Higuchi方程、Ritger-peppas方程、Hixson-crowell方程进行拟合。结果温控型胰岛素液体直肠栓的牛肠黏膜体外释放符合Hixson-crowell方程,表明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,曲线方程见表4。

表4 温控型胰岛素液体直肠栓的牛肠黏膜体外释放曲线拟合
Tab 4 Fitted release curves of Thermosensitive insulin rectal liquid suppository in bovine intestinal mucosa in vitro

模型	方程	r
Higuchi	$Q=0.050 0t^{1/2}-0.110 2$	0.938 9
Ritger-peppas	$\ln Q=0.765 0 \ln t-4.555 1$	0.934 8
Hixson-crowell	$(1-Q)^{1/3}=0.001 6t+2.927 4$	0.975 6

2.12.3 羊肠黏膜制备与释放。除用牛肠黏膜替换为羊肠黏膜外,释放试验和测定方法同“2.12.2”项操作。试验重复3次,结果RSD为0.55%。将药物累积释放率(Q)和时间(t)分别用Higuchi方程、Ritger-peppas方程、Hixson-crowell方程进行拟合。结果温控型胰岛素液体直肠栓的羊肠黏膜体外释放符合Ritger-Peppas方程,表明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,曲线方程见表5。

表5 温控型胰岛素液体直肠栓的羊肠黏膜体外释放曲线拟合
Tab 5 Fitted release curves of Thermosensitive insulin rectal liquid suppository in ovine intestinal mucosa in vitro

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

3 讨论

泊洛沙姆是目前研究最深入的用来制备温度敏感型原位凝胶的高分子材料,单独使用P407胶凝温度较高,需与其他辅料按一定比例合用。笔者通过预试验,最终选择P407与P188合用,并添加了壳聚糖;在确定胶凝温度合适后,以形成凝胶所需的时间作为评价指标,以求液体栓剂进入人体后迅速形成凝胶,黏附在肠黏膜上,避免药物的流失。

本试验利用无膜释放试验考察温控型胰岛素液体直肠栓的溶蚀过程,得出药物通过扩散作用进入人体,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)释放模拟人肠黏膜对药物的吸收情况,利用多种回归方法进行拟合的结果表明凝胶中的药物主要是通过溶蚀和扩散方式释放的。

直肠内蛋白水解酶活性比胃肠道低,且环境pH接近中性或微酸性^[7],胰岛素以栓剂形式给药后,经过直肠黏膜直接吸收进入全身血液循环,作用迅速,药效维持时间较长。

参考文献

羧甲基玉米朊阿司匹林肠溶微丸的制备及体外释放度考察

张祥*, 孙亚楠, 丁启, 刘力, 鲁传华[#](安徽中医药大学药学院, 合肥 230031)

中图分类号 R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)41-3895-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.41.18

摘要 目的:制备羧甲基玉米朊阿司匹林肠溶微丸,并考察其在大鼠体内的药动学特征。方法:以羧甲基玉米朊为肠溶材料,与阿司匹林按2:1混合,加入乙醇作为黏合剂,采用挤压滚圆法制备羧甲基玉米朊阿司匹林肠溶微丸。以阿司匹林微丸作为参比制剂,考察受试制剂羧甲基玉米朊阿司匹林肠溶微丸灌胃给予15 mg/kg后在大鼠体内48 h内的药动学特征和4 h(前2 h在人工胃液中,后2 h在人工肠液中)内的体外释放度($n=5$)。结果:所制羧甲基玉米朊阿司匹林肠溶微丸粒径为1 mm,规格为每丸3 mg。受试制剂与参比制剂的药动学特征均符合二室模型,主要药动学参数分别为 $t_{1/2\beta}$:(12.63±0.60)、(2.42±0.61) h, t_{\max} :(11.07±1.10)、(3.41±0.84) h, c_{\max} :(34.45±5.33)、(45.78±3.30) μg/ml, $AUC_{0-\infty}$:(613.52±41.14)、(550.69±34.44) μg·h/ml;与参比制剂比较,受试制剂的 $t_{1/2\beta}$ 、 t_{\max} 、 $AUC_{0-\infty}$ 均明显增加, c_{\max} 明显减小($P<0.05$)。参比制剂2 h的累积释放度为87%,受试制剂2 h的累积释放度为1.7%、3 h的累积释放度达100%。结论:成功制得体外释放符合肠溶制剂要求的羧甲基玉米朊阿司匹林肠溶微丸。

关键词 羧甲基玉米朊;阿司匹林;肠溶微丸;药动学;体外释放度

Preparation of Carboxymethyl Zein Aspirin Enteric-coated Pellets and Its Release Rate *in vitro*

ZHANG Xiang, SUN Ya-nan, DING Qi, LIU Li, LU Chuan-hua (School of Pharmacy, Anhui University of TCM, Hefei 230031, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Carboxymethyl zein aspirin enteric-coated pellets, and to investigate pharmacokinetic characteristics of it in rats. METHODS: Carboxymethyl zein was used as enteric-coated material and mixed with aspirin with ratio of 2:1 using ethanol as adhesive. Carboxymethyl zein aspirin enteric-coated pellets were prepared by extrusion spherulization method. Using Aspirin pellets as reference preparation, 48 h pharmacokinetic characteristic and 4 h *in vitro* drug release of Carboxymethyl zein aspirin enteric-coated pellets as test preparation were investigated in rats after intragastric administration of test preparation 15 mg/kg ($n=5$). RESULTS: Prepared pellets was 1 mm in particle size and 3 mg/pellet in specification. The pharmacokinetics of both reference and test preparations were in line with two-compartment model. Main pharmacokinetic parameters of reference preparations vs. test preparations: $t_{1/2\beta}$: (12.63±0.60) h vs. (2.42±0.61) h; t_{\max} : (11.07±1.10) h vs. (3.41±0.84) h; c_{\max} : (34.45±5.33) μg/ml vs. (45.78±3.30) μg/ml; $AUC_{0-\infty}$: (613.52±41.14) μg·h/ml vs. (550.69±34.44) μg·h/ml. Compared with reference preparation, $t_{1/2\beta}$, t_{\max} and $AUC_{0-\infty}$ of test preparation increased significantly, while c_{\max} decreased greatly ($P<0.05$). 2 h accumulative release rate of reference and test preparation were 87% and 1.7%, and test preparation was released completely within 3 h. CONCLUSIONS: Prepared Carboxymethyl zein aspirin enteric-coated pellets which are up to the requirements of enteric-coated preparation are prepared successfully.

KEYWORDS Carboxymethyl zein; Aspirin; Enteric-coated pellets; Pharmacokinetics; Release rate *in vitro*

肠溶制剂是利用肠溶材料在低pH下不溶、在高pH下可溶的特性建立的一种给药系统^[1],通常是在口服制剂外部包裹肠溶性材料制得。肠溶制剂能防止某些药物对胃黏膜的刺激,增加酸敏感药物的稳定性,延缓药物吸收时间等。常用的肠

溶材料有虫胶、邻苯二甲酸乙酸纤维素、丙烯酸树脂等^[2]。阿司匹林通过抑制花生四烯酸代谢过程中的环氧化酶,使前列腺素合成减少而产生强大的解热镇痛抗炎作用,但其最大的缺点是对胃黏膜有刺激作用,常使患者出现恶心、呕吐,甚至

- [1] 刘慧敏,朱雪松,陈富超,等.胰岛素新型给药系统的研究进展[J].实用药物与临床,2013,16(4):329.
[2] 何文,代文兵,吴燕,等.N-三甲基壳聚糖对胰岛素液体栓剂直肠吸收的促进作用研究[J].中国药学杂志,2006,41(16):1240.
[3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:846.

- [4] 王军.胰岛素眼用温度敏感型凝胶的制备及其体外释放考察[J].广东药学院学报,2011,27(4):1132.
[5] 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.
[6] 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.
[7] Adikwu AU. Evaluation of snail mucin motifs as rectal absorption enhancer for insulin in non-diabetic rat models[J]. Biol Pharm Bull, 2005, 28(9):1801.

* 硕士研究生。研究方向:药用高分子材料及其新型制剂。电话:0551-65169146。E-mail:514926112@qq.com

通信作者:教授。研究方向:药用高分子材料和纳米药物。电话:0551-65169146

(收稿日期:2013-03-18 修回日期:2014-07-17)