

## 负载胰岛素的水凝胶对胰岛素的体外释放研究

孙方杰<sup>1</sup>, 何雪玲<sup>1</sup>, 马瑞青<sup>2</sup>, 肖乃民<sup>2</sup>, 赵玉峰<sup>3</sup>, 杨俊<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> 新乡市高新医药研究院, 新乡, 河南, 中国

<sup>2</sup> 斯丹德科技股份有限公司, 新乡, 河南, 中国

<sup>3</sup> 新乡市高新区美加医药科技有限公司, 新乡, 河南, 中国

Received: October 21, 2015; Received revised: November 16, 2015; Accepted: November 28, 2015

### 摘要

**目的:** 研究负载胰岛素的水凝胶对胰岛素的体外释放行为, 旨在为开发胰岛素长效缓控释新型制剂提供参考。

**方法:** 将负载胰岛素的水凝胶置于1ml 1%BSA -PBS(wt%, pH7.4)释放介质中, 分别控制温度25℃以下和37℃±0.5℃, 另将胰岛素样品直接置于1ml 1%BSA -PBS(wt%, pH7.4)释放介质中, 控制温度37℃±0.5℃, 定期取样, 用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)、高效液相色谱法(HPLC)和基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)检测胰岛素释放情况。**结果:** 在25℃时, 胰岛素在1%BSA-PBS(wt%, pH 7.4)溶液中释放较快, 在第3天, 累计释放已经超过50.0%; 在37℃时, 胰岛素在1%BSA-PBS(wt%, pH 7.4)溶液中释放相对于25℃条件下明显变缓, 第35天时, 胰岛素累计释放量才超过70.0%; 单独将胰岛素溶解在1%BSA-PBS(wt%, pH 7.4)溶液中, 胰岛素释放迅速, 第1天胰岛素的累计释放量就已经超过80%; 将胰岛素负载在载体材料水凝胶中, 胰岛素的释放速率明显降低。**结论:** 37℃时, 胰岛素在1%BSA-PBS(wt%, pH 7.4)溶液中的释放速率明显比25℃条件下缓慢; 水凝胶可以显著减慢胰岛素的释放。

**关键词:** 胰岛素; 水凝胶; 体外释放行为

## Release study of insulin loaded on hydrogels in vitro

Fang-Jie Sun<sup>1</sup>, Xue-Ling He<sup>1</sup>, Rui-Qing Ma<sup>2</sup>, Nai-Min Xiao<sup>2</sup>, Yu-Feng Zhao<sup>3</sup>, Jun Yang<sup>1, 2, 3\*</sup>

<sup>1</sup> Xinxiang Institute for New Medicine, Xinxiang, Henan, China

<sup>2</sup> Standard Scientific and Technological Co., Ltd., Xinxiang, Henan, China

<sup>3</sup> Xinxiang High-Tech Distract Meijia Medicinal Technological Co., Ltd., Xinxiang, Henan, China

### ABSTRACT

**Objective:** To study the release of insulin loaded on hydrogels in vitro, aim to provide reference for developing insulin sustained and controlled release preparations. **Methods:** Place the hydrogel load insulin into 1% BSA -PBS (wt%, pH7.4) release media, control the temperature was below 25℃ and 37℃ ± 0.5℃, separately. Besides, another single insulin sample was placed into the release media directly, control the temperature was 37℃ ± 0.5℃. The samples were taken regularly to determine the release of insulin with Native-PAGE, HPLC and MALDI-TOF-MS. **Results:** The release of insulin was fast in 1% BSA-PBS (wt%, pH 7.4) solution at 25℃, the cumulative release of insulin has exceeded 50.0% in 3days. The release of insulin was significantly slower in the release media at 37℃ than 25℃, the cumulative

\*通讯作者: 杨俊, 新乡市高新医药研究院, 向阳路416号, 新乡, 河南, 453003, 中国。

电话: +86-373-7020588. 传真: +86-373-7020588.

E-mail: bcd2009@126.com.



衡时刻和达到平衡时的释放总量，用下列公式计算胰岛素释放值：

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \sum_{n=1}^{\infty} \frac{4\alpha(1+\alpha)}{4+4\alpha+\alpha^2q_n^2} \exp\left(-\frac{Dq_n^2t}{a^2}\right)$$

其中， $q_n$ 是正数，且满足下式

$$\alpha q_n J_0(q_n) + 2J_1(q_n) = 0$$

其中， $\alpha$ 是溶剂和圆柱形水凝胶的比率， $D$ 是有效扩散系数， $J_0$ 和 $J_1$ 分别是0和1级贝塞尔函数。当 $0 \leq M_t/M_\infty \leq 60\%$ ，可用幂函数方程计算胰岛素的释放值<sup>[13]</sup>。

### 3 结果与结论

#### 3.1 37℃时，胰岛素在1%BSA-PBS(wt %，pH 7.4)溶液中的释放速率明显比25℃条件下缓慢

在25℃时，胰岛素在1%BSA-PBS(wt %，pH 7.4)溶液中释放较快，在第3天，累计释放已经超过50.0%，第5-7天释放速率相对变小，在第5天时，累计释放量为73.1%，在第7天时，累计释放量为77.8%；在37℃时，胰岛素在1%BSA-PBS(wt %，pH 7.4)溶液中释放相对于25℃条件下明显变缓，在第3天，累计释放不超过40.0%，直到第7天时，胰岛素累计释放量才超过50.0%，第18天时，胰岛素累计释放量超过60.0%，第35天时，胰岛素累计释放量才超过70.0%，38天到40天，连续两天时间，胰岛素的累计释放量却没有太大变化，累计释放百分率只有2.0%左右的波动。具体的变化趋势如图1所示：

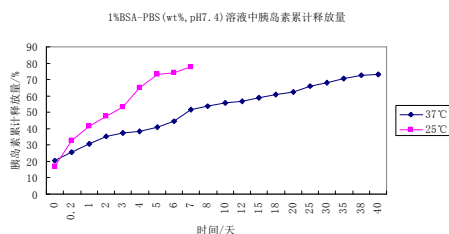


图1 25℃和37℃时，负载胰岛素水凝胶在1% BSA-PBS(wt %，pH 7.4)溶液中胰岛素的释放行为

#### 3.2 水凝胶显著减慢胰岛素的释放

单独将胰岛素溶解在1%BSA-PBS(wt %，pH 7.4)溶液中，胰岛素释放迅速，第1天胰岛素的累计释放量就已经超过80%；将胰岛素负载在载体材料水凝胶中，胰岛素的释放速率明显降低，在整个实验期间，胰岛素的释放较为平缓，第35天时，胰岛素累计释放量才超过70.0%，说明将水凝胶作为载体材料，胰岛素负载在其中，胰岛素的体外释放速率明显降低，这可以解释为水凝胶作为高分子载体材料，通过分子之间的交联形成的一种三维空间网络状结构，其有很高的吸水性和很好的生物相容性，在体内吸水溶胀，并逐渐降

解，随着材料的不断降解，药物也被不断地释放出来。两种状态下胰岛素的体外释放行为如图2所示。

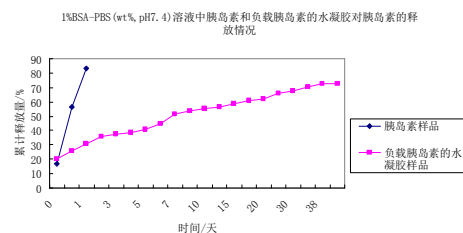


图2 胰岛素样品和负载胰岛素的水凝胶样品在1% BSA-PBS(wt%，pH7.4)溶液中对胰岛素的释放情况

### 4 讨论

目前，临床应用较多的胰岛素给药方式主要有注射给药、吸入给药两种形式。胰岛素注射给药是传统的治疗糖尿病的方法，但是由于释药稳定性差，容易导致低血糖的严重不良后果<sup>[14]</sup>。胰岛素吸入制剂作为一种胰岛素制剂的新剂型，最近几年在国内外的开发备受瞩目<sup>[15]</sup>。经肺吸入给药可较为有效地解决吸收方面的相关问题，而且能够使药物更接近人体胰岛素分泌曲线，但是与传统胰岛素相比，其需要消耗更大的剂量，因而限制了其临床应用<sup>[16]</sup>。在对胰岛素新型制剂的研究过程中，越来越多的学者将注意力集中在了用水凝胶、脂质体、纳米粒、微囊与微球等各种材料作为载体，将胰岛素负载或包裹在其中，不仅可以减少胃肠道对胰岛素的破坏和降解，又可以有效地促进其吸收<sup>[17,18]</sup>。

水凝胶根据其对外界刺激的响应情况可分为传统的水凝胶和环境敏感的水凝胶两大类<sup>[19]</sup>。环境敏感的水凝胶是指自身能感知外界环境（如温度、pH、光、电、压力等）微小的变化或刺激，并能产生相应的物理结构和化学性质变化甚至突变的一类高分子凝胶<sup>[20,21]</sup>。

由聚乙烯(N-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAAm)和葡聚糖-乳酸-2-羟乙基-甲基丙烯酸酯

(DEXlactateHEMA)组成的水凝胶同时具有热敏感性和可生物降解性，该水凝胶溶胀率约30%，胰岛素负载率82%，低临界溶解温度(lower critical solution temperature, LCST)为32℃左右，在低于LCST时，水凝胶是亲水性的，可以将亲水性药物如胰岛素等负载在其中，当被负载药物的水凝胶进入生物体后，由于人体温度要高于水凝胶的LCST，水凝胶变为疏水性的，可控制胰岛素缓慢释放，同时该水凝胶材料也会被逐渐降解<sup>[13]</sup>。

从笔者进行的研究中，可以看出将胰岛素负载在载体材料水凝胶中之后，其在生物体外的释放明显变慢，而且模拟人体生理温度条件下，负载胰岛素的水凝胶在生物体外的释放也可以长达近40天。该项研究

