

尼尔雌醇皮埋剂的研制及体内外释放实验

刘石平 廖二元 伍汉文 伍贤平 邓小戈 陈海林 陈良康

【摘要】 目的 研制尼尔雌醇皮埋剂,了解其体内、体外释药行为,为长期雌激素替代治疗防治绝经后骨质疏松提供一种新的选择。**方法** 首先制成尼尔雌醇皮埋剂;接着建立其体外药物释放体系及药物体外释放量的反相高效液相色谱(RP-HPLC)的检测方法;同时将尼尔雌醇皮埋剂植入SD大鼠体内,于植入后4、5、8个月取出,用剩余药量推算体内释药量;最后对体内、外累积释放量(Q)与时间(t)进行线性回归分析并绘制尼尔雌醇皮埋剂体外释放曲线和体内、外 $Q-t$ 曲线。**结果** 尼尔雌醇皮埋剂体外释放最初1周释放量较大,之后平稳释放, Q 和 t 线性相关良好($r=0.996$, $P=0.000$),平均体外释放量为 $33.0566\mu\text{g}/\text{日}\cdot\text{支}$;体内释放实验中 Q 和 t 也呈良好的线性相关($r=0.985$, $P=0.015$),平均体内释放量为 $19.65\mu\text{g}/\text{日}\cdot\text{支}$ 。**结论** (1)尼尔雌醇皮埋剂体外释放在最初1周存在爆破效应,之后符合零级动力学释放;其在体内释放也符合零级动力学释放,尼尔雌醇皮埋剂有可能达到长效控释的目的。(2)NYL皮埋剂周期性或持续性加用孕激素可能成为长期雌激素替代治疗防治绝经后骨质疏松的一种新的选择。

【关键词】 尼尔雌醇皮埋剂; 研制; 药物体外释放实验; 药物体内释放实验

Preparation of nylestriol implants and investigation of release test in vivo and in vitro LIU Shiping, LIAO Eryuan, WU Hanwen, et al. Institute of Metabolism and Endocrinology, The Second Affiliated Hospital, Hunan Medical University, Changsha 410011, China.

【Abstract】 Objectives To prepare nylestriol implant and investigate its release characteristics *in vitro* and *in vivo* in order to provide a new choice for estrogen replacement therapy (ERT) of postmenopausal osteoporosis. **Methods** Nylestriol implants in the form of Norplant implants were prepared. Their release system *in vitro* and method of reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) for the determination of release quantities *in vitro* were established. At the same time, the release quantities of nylestriol implants in SD rats were computed according to the residual drug in the implants. Finally, the relations of accumulative release quantities of nylestriol implants *in vivo* and *in vitro* and release time were analyzed by linear regression analysis; in addition, release curve *in vitro* and accumulating release quantities-time ($Q-t$) curve *in vivo* and *in vitro* were plotted. **Results** The release quantities of nylestriol implant were greater in the first week, then kept steady. The linear correlation of accumulative release quantities ($Q-\mu\text{g}$) *in vitro* with release time ($t-\text{day}$) was high ($r=0.996$, $P=0.000$), and the average release quantity *in vitro* was $33.0566\mu\text{g}/\text{day}\cdot\text{rod}$. The linear correlation of accumulative release quantities ($Q-\text{mg}$) *in vivo* with release time ($t-\text{month}$) was also good ($r=0.985$, $P=0.015$), and the average release quantity *in vivo* was $19.65\mu\text{g}/\text{day}\cdot\text{rod}$. **Conclusion** (1) Nylestriol implants have blast effects in the first week of release *in vitro*, and then tend to be in line with zero dynamic release; and their release *in vivo* in SD rats also conforms to zero dynamic release, the implants being long-acting and release-controlled. (2) Periodic or continuous addition of progestin to nylestriol implant provides a new choice for ERT if needed for a long time.

【Key words】 Nylestriol implant; Preparation; Drug release test *in vitro*; Drug release test *in vivo*

雌激素缺乏是绝经后骨质疏松的首要病因^[1],对于没有雌激素使用禁忌症的病人,雌激素替代治疗(ERT)是绝经后骨质疏松(PMO)的首先治疗方案^[2]。关于雌激素的最佳使用维持时间,目前尚未统一。Felson等^[3]研究表明绝经后妇女至少需要7

年以上的治疗;流行病学^[4]研究表明雌激素作用时间和治疗持续时间可能同样长,揭示应尽可能延长雌激素的使用,才能保持雌激素对骨矿的长期维持作用,并减少骨质疏松引起骨折的危险性。要长期坚持雌激素治疗,患者的依从性是一个很重要的问题。现临床上ERT的主要给药方式是口服给药和经皮给药。由于作用维持时间短,必须不断补充给药,不易坚持;而且口服给药存在肝脏首过效应,经

基金项目:卫生部重点学科建设项目

作者单位:410011 长沙,湖南医科大学附属二院代谢内分泌研究所(刘石平、廖二元、伍汉文、伍贤平、邓小戈);上海计划生育研究所(陈海林、陈良康)

皮给药存在皮肤反应等缺点,人们对硅橡胶对甾体激素释药特性的认识以及长效避孕皮埋剂(如:Norplant)的问世^[6],给长期 ERT 药物的剂型开发带来一个有益的启示。芬兰 Leiras 公司已研制成雌二醇(E_2)皮埋剂^[7],合用孕激素避孕环已成功应用于 PMO 的防治,有效维持时间为 4~6 月。在本研究中,我们也利用硅橡胶的释药特性制成尼尔雌醇(NYL)皮埋剂,以期充分发挥皮埋剂的优点,克服其他给药方式和剂型的弊端,丰富 ERT 的药物选择。

材料和方法

1. 材料

皮埋剂释药管:购自山东橡胶制品研究所,为医用硅橡胶制作。封端剂:为上海橡胶制品研究所生产的 SYZ-2 医用粘合剂。尼尔雌醇原料药:购自北京四环制药厂,批号为 980612。高效液相色谱仪:HP1100 型 HPLC 仪(美国惠普公司)。甲醇:为上海陆都实业有限公司生产的色谱醇甲醇,批号为 981208。氯化钠注射液(生理盐水):为湖南衡阳制药厂生产,批号为 990122168。METTLER AG240 十万分之一的分析天平(瑞士)。IKA 混合器(马来西亚)。THZ-82 型恒温振荡器(江苏)。

2. 方法

(1)皮埋剂制作:先用 95% 的乙醇清洁释药管,然后用医用粘合剂封其一端,接着装药,再用粘合剂封另一端,继之放在水蒸气罩内使粘结,最后用 75% 乙醇消毒即得。规格为外径 2.4 mm,内径 1.57 mm,长度为 3 cm,内含尼尔雌醇 36 mg。皮埋剂的制作委托上海计划生育科研所协助完成。

(2)体外释放量的测定:①选用 1046 型荧光检测器(FLD)(美国惠普公司)。②色谱条件,ODS Hypersil($5\ \mu\text{m}$ $125\times 4\ \text{mm}$);流动相:甲醇/去离子水 80:20(v/v);流速 1 ml/min;柱温 30°C ;激发波长(EX)232 nm;发射波长(EM)310 nm;进样量 $20\ \mu\text{l}$ 。③线性关系的建立:用十万分之一的分析天平准确称取 5.5 mg 尼尔雌醇于 50 ml 容量瓶中,加甲醇溶解至刻度,再分别配制成 0.55、1.1、2.2、5.5、11、55 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的系列标准应用液,各液混匀后吸取 $20\ \mu\text{l}$ 进样,计算峰面积与浓度的关系,建立校正表和校正曲线。④最低检测限、精密度(日内 RSD)和重复性的测定:以信噪比为 3 的进样量作为最低检测限。对 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的已知样品在 1 d 内连续 12~13 次进样和对 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的已知样品在不同的 5 d 内进样以计算日

内、日间 RSD,并且观察尼尔雌醇在释放液和甲醇中的稳定性。

(3)体外释放试验:①将 5 支尼尔雌醇皮埋剂分别置于 125 ml 棕色试剂瓶中,加经过孔径为 $0.45\ \mu\text{m}$ 的有机相滤膜过滤的 40% 甲醇生理盐水介质液各 50 ml,在 $(37\pm 0.5)^\circ\text{C}$ 的空气恒温箱中旋转振荡,频率为 (85 ± 5) 次/min,每 24 h 取样,然后更换介质,连续释放 60 d。用反相高效液相色谱(RP-HPLC)外标法直接测定释放液中尼尔雌醇的含量。②样品留置后,置 4°C 冰箱保存,测定前放于室温 30 min 后,充分混匀进样。

(4)体内释放试验:21 只 SD 大鼠被随机分为 4 组。第一组 3 只,每只大鼠去卵巢后皮下各植入 1 支 3 cm 长空释药管;第 2 组 8 只,每只大鼠去卵巢后皮下各植入 1 支尼尔雌醇皮埋剂,4 个月后取出;第 3~4 组各 5 只,每只大鼠去卵巢后皮下各植入 1 支尼尔雌醇皮埋剂,分别于 5、8 个月取出。各皮埋剂从大鼠体内取出后,立即用去离子水洗净, 50°C 烤箱中干燥 4 h,冷却后用十万分之一的天平称重,以植入前、后重量差表示皮埋剂在体内的释放量。

结 果

1. 尼尔雌醇色谱峰峰面积与其浓度的校正曲线方程为: $Y = 29.12716X$, 其中 X : 浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$); Y : 峰面积; $r = 0.99945$ 。校正曲线见图 2。线性范围为 0.55~11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。最低检测限为 0.67 ng。对 1、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 样品日内 RSD 分别为 2.34%、5.56%,对 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的样品日间 RSD 为 3.24%。

2. 样品进样色谱图见图 1。

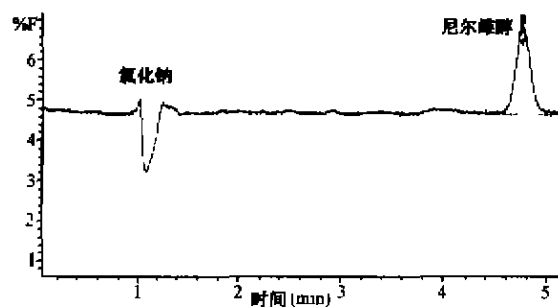


图 1 体外释放液中尼尔雌醇的色谱峰

3. 采用模拟体内条件的体外释放装置对尼尔雌醇皮埋剂进行了 60 d 的体外释放研究,其释放曲线如图 3,表明最初 12 d 释放量较大,自第 13 天开始趋于稳定释放。

4. 以体外释放时间(t)为横坐标,以累积释放量