

MALDI-TOF 质谱技术研究胰岛素海藻酸钠纳米粒特性

曾新华¹, 谢麟¹, 卓慧钦¹, 黄河宁², 林庆梅¹, 易瑞灶³, 黄河清¹

(1.厦门大学 生命科学学院, 福建省化学生物学重点实验室, 环境科学研究中心, 福建 厦门 361005; 2. 三明学院 化学与生物工程系, 福建 三明 365000; 3. 国家海洋局 第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要: 从海洋生物中提取海藻酸钠和壳聚糖作为纳米粒的包被材料, 并分别包装成人胰岛素纳米粒。选用基质辅助激光解吸离子化飞行时间(Matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight, MALDI-TOF) 质谱技术研究胰岛素海藻酸钠纳米粒包装、释放过程及在不同酸碱介质条件下的稳定性。

关键词: MALDI-TOF; 质谱; 胰岛素; 纳米粒包装; 稳定性

中图分类号: Q617 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2006)01-0073-05

胰岛素(Insulin, INS)分子间有很强的聚合力。一旦INS形成聚合物后,就难以通过生物屏障进入胃肠壁(上表皮细胞层)且被高效利用^[1]。如果INS直接口服给药,其生物利用度很低,几乎无临床使用价值^[2]。近年来,有关INS的高包封率、强载药量、高利用率及长体内循环时间等特性研究一直是开展INS应用研究工作的焦点问题。常用于INS纳米粒的包被材料有人工合成的高分子生物可降解脂溶性材料^[3],但由于这类包被材料毒性大,因而限制INS商品化。海洋生物多糖类化合物具有生物相容性好和毒性低等特点,很适合用于INS纳米粒的包被材料。MALDI-TOF质谱技术是一种软离子分析技术,它具有分析快速、高灵敏度、高准确率、操作简便,耗样品量少等优点^[4]。作者选用MALDI-TOF质谱技术为分析方法,研究在不同包装条件下,INS海藻酸钠纳米粒和INS壳聚糖纳米粒中的INS稳定性、包装和释放过程等特性,为探讨INS多糖纳米粒的生物利用度提供具有快速、方便和高灵敏度等特点的分析技术。

1 材料与方法

1.1 试剂、材料和设备

海藻酸钠、壳聚糖(作者课题组提取和制备)、氯化钙和多聚磷酸钠等均为化学纯。注射剂的人INS由猪INS改造的(40U),简称为INS。质谱测定

INS和它的分解产物时,所需的基质2,5-二羟基苯甲酸(DHB)购置于美国ICN生物医学公司。三氟乙酸、乙氰(纯度为99%)和冰醋酸等化学试剂均属于分析纯。

1.2 仪器设备

MALDI-TOF质谱仪(Bruker公司产品,型号:ReflexIIITM)配置脉冲氮激光(337nm)作为离子解吸电离源。透析分离装置最大截留分子质量为10000u。

1.3 方法

1.3.1 INS海藻酸钠纳米粒的制备

配制0.1%的海藻酸钠溶液,加入一定量INS溶液和0.2%氯化钙溶液,在磁力搅拌的条件下,反应30min,随后静置过夜,即得到INS海藻酸钠纳米粒溶液^[2]。

1.3.2 INS壳聚糖纳米粒制备

取一定量的壳聚糖溶于1%醋酸溶液,加入一定

收稿日期:2003-07-21;修回日期:2004-06-30

基金项目:国家自然科学基金资助项目(0402760633);福建省自然科学基金资助项目(C0310006)

作者简介:曾新华(1978-),男,江西永新人,硕士,研究方向:蛋白质结构与功能,E-mail:soxh@sohu.com;黄河清,通讯作者,教授,博导,E-mail:hqhuang@xmu.edu.cn

量的 INS 溶液和 0.1% 多聚磷酸钠溶液, 在磁力搅拌的条件下, 搅拌反应 30 min, 即得到 INS 壳聚糖纳米粒溶液^[3], 随后立即进行透析去除游离 INS 和其他分解产物。

1.3.3 INS 壳聚糖纳米粒的酸稳定性

取适量 INS 壳聚糖纳米粒混悬液装入透析袋中, 并置于在 0.01mol/L 的 HCl 溶液中, 恒温振荡(37 °C, 150 r/min)透析 3h 或透析到透析袋中不含有游离 INS 及它的分解产物。

1.3.4 INS 纳米粒分离

将 INS 海藻酸钠纳米粒和 INS 壳聚糖纳米粒的溶液分别以 38 000 r/min 转速离心 30 min (10 °C), 随后收集沉淀物, 弃上清液, 并进行透析反应。透析的目的是去除样品中的游离 INS 和它的分解产物。

1.3.5 INS 纳米粒释放 INS 和它的分解产物

采用 0.1 mol/L 的醋酸溶液 (pH4.8, 37 °C) 作为 INS 纳米粒的反应介质, 采用高灵敏度紫外可见分光光度计 (280 nm) 研究在酸性环境下, INS 纳米粒释放 INS 和它的分解产物过程与特性。

1.3.6 基质和样品配制

0.1% 的三氟乙酸 (TFA) 水溶液和 30% 的乙氰 (CAN) 按 7:1 体积混合成溶液。根据试验要求加入饱和的 DHB 于混合溶液中, 超声波处理 5 min, 并离心 (5 000 r/min) 5 min, 收集上清液, 即为饱和基质溶液。样品和饱和基质溶液按 1:1 体积混合后, 取 0.8 μL 混合物直接点滴在 MALDI-TOF 质谱仪专用样品靶上, 待样品自然干燥后, 将样品靶直接放入质谱仪的靶箱内, 进行样品分析。

2 结果和讨论

2.1 INS 海藻酸钠纳米粒外表面 INS 质谱特性

海藻酸由 β-1, 4-D 糖苷醛酸和 α-1, 4-L-古洛糖醛酸组成的杂多糖, 其醛基易与蛋白质产生非共价键结合, 海藻酸钠已广泛被用作于药物的控制材料及蛋白质固定剂。人的 INS 分子由两条多肽链组成, 分别称为 A 链和 B 链, A 链含有 21 个氨基酸残基, 而 B 链中则有 30 个, 肽链之间通过两对二硫键构成 INS, 分子质量为 5 870.20 u。作者采用 MALDI-TOF 质谱技术研究表明, 注射针剂的 INS 呈单体, 单电荷, 其 m/z 位于 5 870.2 处, 并含有微量的 INS 分解产物, 即 A (2 848.0 m/z) 和 B (3 359.5 m/z) 链。图 1 是经透析 (截留分子质量小于 10 000 u) 后, INS 海藻酸钠

纳米粒的质谱图谱, 显示了 3 个质谱峰, 其 m/z 分别位于 2 848.35, 3 359.69 和 5 780.06 处, 它们与注射针剂的 INS 所呈现出的质谱峰图谱极为相似。这一现象说明, 当海藻酸钠在进行纳米包装 INS 溶液过程中, 部分 INS 和它的分解产物络合于 INS 纳米粒外表面; 当在偏酸性的 DHB 和较强的激光作用下, 络合于 INS 纳米粒外表面多肽混合物瞬时脱离纳米粒, 同时又被基质与激光解吸成为分子离子, 并经 TOF 质量分析器检测后, 产生 3 个质谱峰 (图 1)。进一步实验还表明, INS 经海藻酸钠包被后, 其 INS 纳米粒无法被来自 MALDI 离子源的激光和 DHB 解吸成分子离子, 并表现出特征质谱峰, 即 INS 海藻酸钠纳米粒无法显示自身的质谱峰。前人的实验结果已指出, INS 海藻酸钠纳米粒的生物利用度很低。根据图 1 结果, 作者推测这一起因可能是在包被 INS 过程中, 大量的 INS 直接络合于海藻酸钠纳米粒的外表面, 少量包被在纳米粒内, 一旦它与胃肠内的酸性物质和消化酶直接分解接触后, 立即分解成无活性的短肽混合物, 造成 INS 海藻酸钠纳米粒的生物利用率很低的现象。设法提高海藻酸钠包封率和减少 INS 络合海藻酸钠纳米粒外表面的数量是改善 INS 纳米粒生物利用度的有力措施之一。

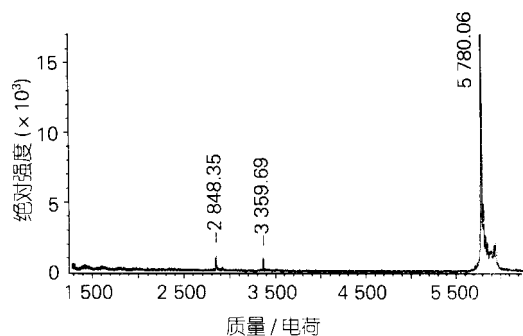


图 1 经透析后的胰岛素海藻酸钠纳米粒的质谱图

Fig. 1 Mass spectrogram of sodium alginate nanoparticles of the insulin after dialyzing

2.2 酸性介质影响 INS 海藻酸钠纳米粒的稳定性

图 2 是溶于醋酸 (pH4.8) 的 INS 海藻酸钠纳米粒的质谱图谱, 显示了 5 个特征质谱峰, 其中 m/z 为

2 840.63 和 5 780.06 质谱峰与图 1 结果相对应, 可视 为 INS 和它 A 链的质谱峰, 而其它 m/z 为 1 034.42, 2 309.30 和 4 701.59 是受醋酸根 ($-COO^-$) 作用后, INS 分解产物的质谱峰。近期, 方雪萍等人采用 MALDI-TOF 质谱技术研究表明, 在酸性 pH2-3 介质 条件下, 未经包埋的 INS 仍然呈现稳定性特性, 不易 分解^[5]。因此, 作者认为, 在弱酸环境下 H^+ 影响 INS 稳定性的能力仍然是很有限, 但由于醋酸根的作用, 迫使 INS 海藻酸钠纳米粒释放 INS 同时, 降低了 INS 或它的 A 和 B 链的稳定性, 并酸解成新的多肽产物 (图 2)。进一步 INS 释放动力学研究表明, 在醋酸 介质下, INS 海藻酸钠纳米粒可直接释放 INS, 其释 放速率 (检测波长 280 nm) 极为缓慢, 最大释放量 所需要的反应时间约 90 h 左右。这些现象说明, 在 有机化合物环境下, INS 耐酸能力明显减弱, 被分解 速率加速; 如直接采用口服 INS 给药, 其 INS 生物 利用度低的起因与胃肠中有机酸化合物引起 INS 表 现出不稳定性特性, 并被分成无活性的短肽混合物有 关。选用具有抗有机酸的纳米材料是优化 INS 纳米粒 口服制剂必需考虑的因素之一。

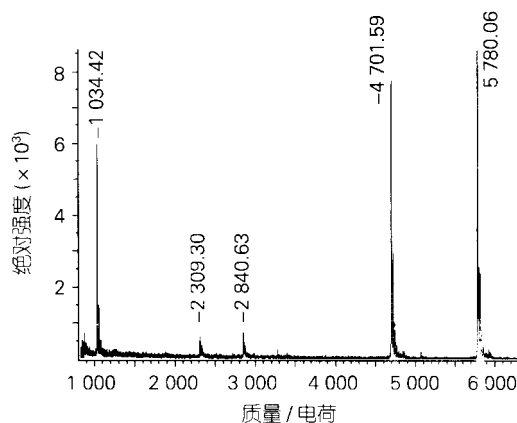


图 2 在乙酸介质(pH4.8)中胰岛素海藻酸钠纳米粒的质谱图
Fig.2 Mass spectrogram of sodium alginate nanoparticles of the insulin in the medium of acetic acid (pH4.8)

2.3 碱性介质影响 INS 海藻酸钠纳米粒的稳定性

图 3 是溶于 0.1 mol/L NaOH 的 INS 海藻酸钠纳

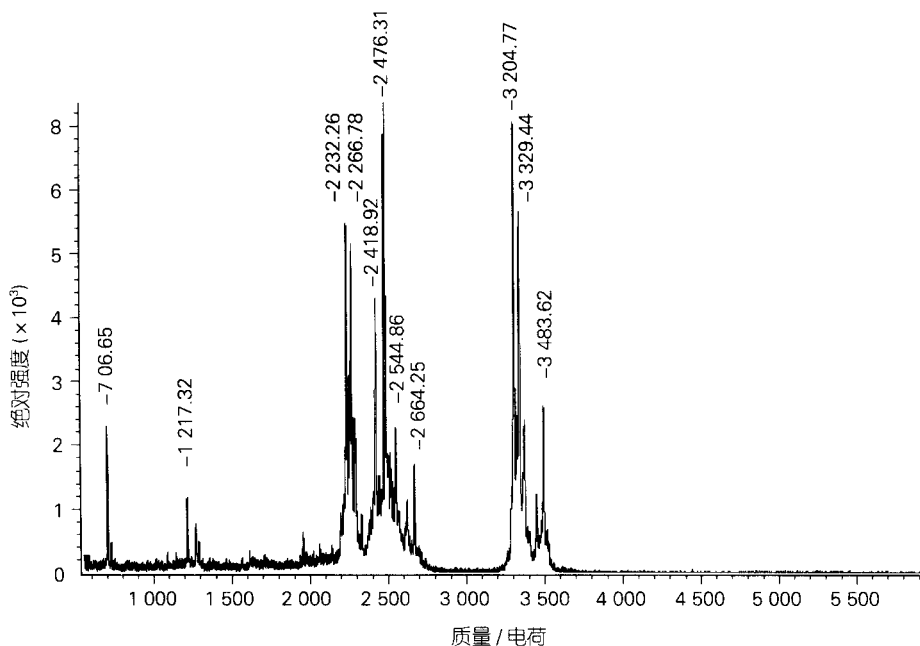


图 3 在碱性介质中 (0.1 mol/L NaOH) 胰岛素海藻酸钠纳米粒的质谱图
Fig.3 Mass spectrogram of sodium alginate nanoparticles of the insulin in the basic medium (0.1 mol/L NaOH)

米粒的质谱图。图 3 中显示了 INS 被水解成各种各样产物的质谱峰,这一现象说明了纳米包被材料海藻酸钠的抗弱碱性能力较差,易被分解,释放 INS 且碱水解成其他小分子多肽产物(图 3),因而在图 3 中未发现 INS 的质谱峰,只显示出各种 INS 分解产物的质谱峰。显然,选择和改造纳米包被材料成为具有抗弱酸碱特性也是优化 INS 口服制剂的又一重要因素。

2.4 在酸性介质 INS 壳聚糖纳米粒的稳定性

在自然界中,甲壳素含量仅次于纤维素多糖,水溶性较差。甲壳素经乙酰化处理后的产物壳聚糖,水溶性明显改善,可用于高分子微包装药物释放体系。壳聚糖组成由大部分氨基葡萄糖和少量 N-乙酰氨基葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键连接起来的直链多糖。常用壳聚糖降解的方法可分为酶法降解、无机酸降解及氧化降解法 3 种。

图 4 是在酸性介质(0.1 mol/L HCl)条件下,INS 壳聚糖纳米粒的质谱图谱,仅仅显示出位于 5780.06 m/z 处的 INS 质谱峰。由于壳聚糖具有遇酸易分解成简单多糖的特点,因而 INS 壳聚糖纳米粒在 0.1 mol/L HCl 酸性介质中,易被降解成简单多糖混合物,释放了 INS。INS 的分子结构中含有 2 对硫硫键,其结构比 INS 的 A 和 B 链产物更稳定,具有耐弱酸特点^[5]。而缺乏这种结构的 INS A 和 B 链易被酸解成小于 1 000 u 的产物,因而在图 4 中仅显示出 INS 质谱峰,并未显示出 A 和 B 链或其他酸解的小分子产物的质谱峰。

实验结果还表明,INS 壳聚糖纳米粒在醋酸溶液(pH4.8 中)和在 0.1mol/L 的 NaOH 中均无法检测到 INS 和它的分解产物质谱峰。这一现象说明壳聚糖具有抗弱酸和弱碱的能力,不易被分解,并使 INS 稳定于壳聚糖纳米粒中。冯鹏等^[6]人采用了海藻酸钠和壳聚糖包被了 INS,并发现了在反应体系 pH3.1~5.3 之间,介质中 H^+ 不影响 INS 的包封率,这些结果可借鉴说明 INS 壳聚糖纳米粒在醋酸介质(pH4.8)中呈稳定状态,而在较强酸性介质(0.1mol/L HCl)呈不稳定状态,易被较高 H^+ 浓度所分解(图 4)。Knorr 和 Daly 曾提出一个海藻酸钠-壳聚糖微囊模型,认为壳聚糖的外壳不含胰岛素。此外,作者也采用了紫外分光光度法研究了在 0.1mol/L HCl 介质中,INS 壳聚糖

纳米粒释放 INS 全过程,释放时间约为 90 h,认为图 4 所显示的 INS 质谱峰,不是络合于壳聚糖纳米粒外表面 INS 的质谱峰,而是酸解纳米粒后,所释放出 INS 后所显示的质谱峰。

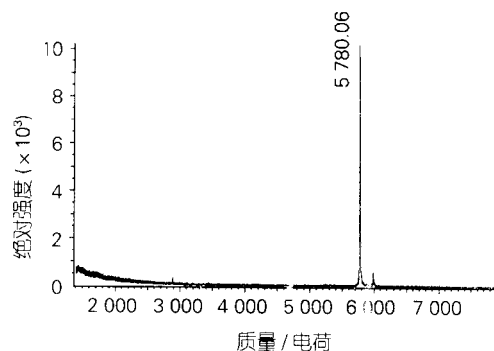


图 4 INS 壳聚糖纳米粒在酸性介质(0.1mol/L HCl)中的质谱图

Fig.4 Mass spectrogram of chitosan nanoparticles of the insulin in the acidic medium (0.1mol/L HCl)

现有血清中胰岛素含量测定均采用放射免疫技术或受体分析技术^[7],所需要的检测时间长,而且成本高。研制 INS 纳米粒口服制剂的生物利用度,其结果和论点的依据来自于血清血糖水平,无法了解 INS 纳米粒在胃及小肠中的稳定性、分解过程和利用速率等一系列有价值的信息,限制了快速地优化和改善 INS 纳米粒口服制剂包装工艺。MALDI-TOF 质谱技术具有快速、高灵敏度和高分辨率特点,并能直接测定胃肠中微量 INS 和它的分解产物,起到及时快速地分析机体利用 INS 速率,是研制 INS 纳米粒和多肽生物利用度的新颖分析技术。

参考文献:

- [1] Hovorka S W, BiesiD H, Williams T D, *et al.* High sensitivity of Zn^{2+} insulin to metal catalyzed oxidation: Detection of Z-oxo-Histidine by tandem mass Spectrometry[J]. *Pharmaceutical Research*, 2002,19(4):534-557.
- [2] 袁弘, 胡富强, 应晓英, 等, 胰岛素纳米粒的制备[J]. *中国药理学杂志*, 2002, 37(5): 349-352.
- [3] Yan P, Li Y J. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo[J]. *International Journal of*

- Pharmaceutics, 2002, 249: 139-147.
- [4] Hummon A B, Huang H Q, Sweedler J V, *et al.* A novel propeptide processing site in apolipoprotein A-II: Leu-Leu rule[J]. *Journal of Neurochemistry*, 2002, 82: 1398-1405.
- [5] 方雪萍, 黄河清. MALDI-TOF 质谱技术研究胰岛素变性和裂解过程[J]. *分析仪器*, 2003, 138(4): 15-19.
- [6] 冯鹏, 王亦农, 马建标, 等. 肽类药物口服制剂材料及控制释放能力的研究[J]. *离子交换与吸附*, 1999, 15(1): 64-70.
- [7] Mei H, Yu X C, Chan K K. NB1-C16-insulin: Site specific synthesis, purification, and biological activity[J]. *Pharmaceutical Research*, 1999, 16(11): 1680-1686.

Studies on characteristics of sodium alginate nanoparticles of the insulin by MALDI-TOF mass spectrometry

ZENG Xin-Hua¹, XIE Lin¹, ZHUO Hui-qin¹, HUANG He-ning², LIN Qing-mei¹, YI Rui-zao³, HUANG He-qing¹

(1. School of Life Sciences, The Center for Environmental Science Research, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Chemical and Biological Engineering, Sanming College, Sanming 365000, China; 3. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

Received: Jul., 21, 2003

Key word : MALDI-TOF; mass spectrometry; insulin; nanoparticle; stability

Abstract: Sodium alginate and chitosan extracted from the halobios were selected as packaging materials of nanoparticles of the human insulin nanoparticles, respectively. Matrix-assisted laser desorption ionization /time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry was used to study the processes of packaging and releasing of the insulin and its stability in the different basic and acidic mediums from the sodium alginate nanoparticles.

(本文编辑: 张培新)