

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 (337 nm) 作为离子解吸电离源。透析分离装置最大截留分子质量为 10 000 u。

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 30 min, 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: hquang@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 , 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), 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) 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 μ L 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层 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 纳米粒外表层; 当在偏酸性的 DHB 和较强的激光作用下, 络合于 INS 纳米粒外表层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层, 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层的数量是改善 INS 纳米粒生物利用度的有力措施之一。

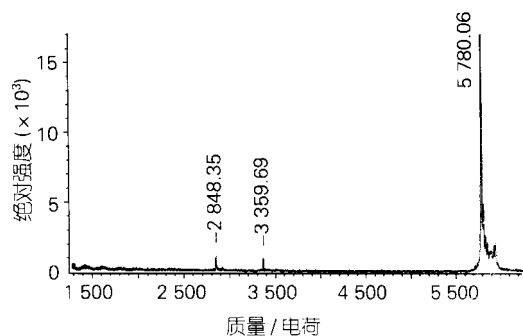


图 1 经透析后的胰岛素海藻酸钠纳米粒的质谱图

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。

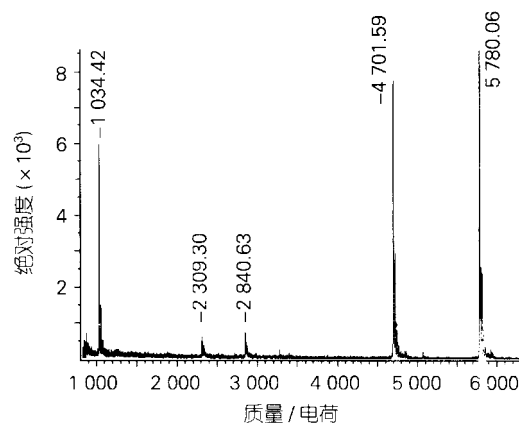


图 2 在乙酸介质(pH4.8)中胰岛素海藻酸钠纳米粒的质谱图
Fig.2 Mass spectrogram of sodium alginate nanoparticles of the insulin in the medium of acetic acid (pH4.8)

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

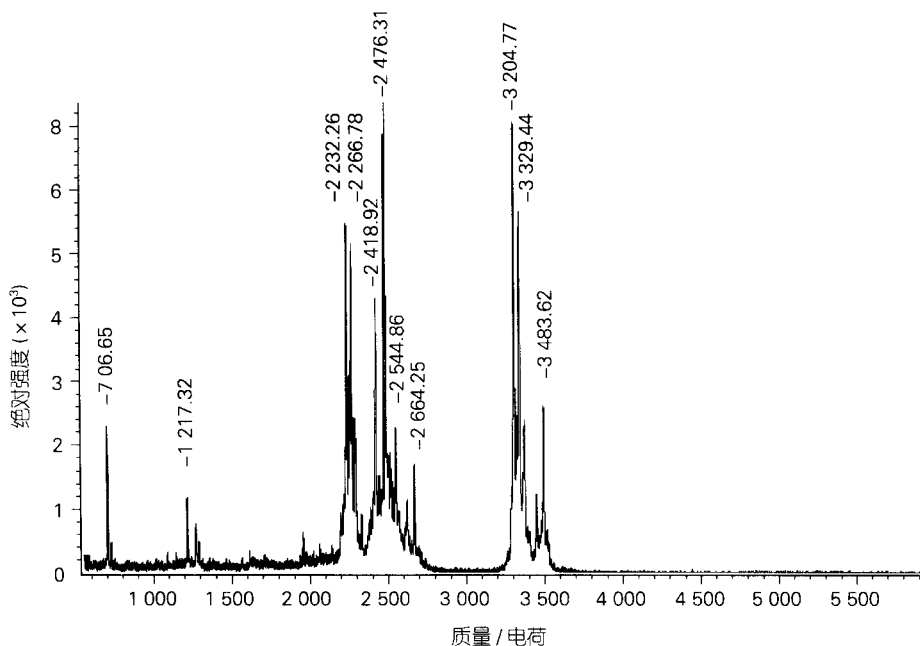


图 3 在碱性介质中 (0.1 mol/L NaOH) 胰岛素海藻酸钠纳米粒的质谱图
Fig.3 Mass spectrogram of sodium alginate nanoparticles of the insulin in the basic medium (0.1 mol/L NaOH)

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。

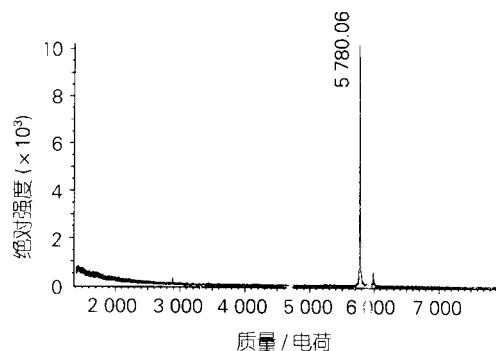


图 4 INS 壳聚糖纳米粒在酸性介质(0.1mol/L HCl)中的质谱图

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 the insulin gene: 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)