葡萄糖修饰的载胰岛素脂质体以包封率为指标的制备工艺研究

易茂全, 袁明清, 何 娜, 何 勤

[摘 要] 目的 基于乙醇对脂质双分子层膜的去稳定作用制备得较高包封率的载胰岛素脂质体。方法 本研究以空白大单室脂质体在乙醇存在的条件下对胰岛素进行主动载药。考察了脂质处方、乙醇浓度、孵育温度、孵育时间、PEG2000-succ-Chol用量、药脂比等对包封率的影响。结果 乙醇存在条件下空白大单室脂质体对胰岛素进行主动载药而得粒径(180±70) nm的小多室脂质体, 包封率为 28% ~32%。结论 该方法制备所得的胰岛素脂质体比文献报道的包封率提高了近 2倍, 而且避免了使用有机溶剂, 最大程度保护了胰岛素的生物活性。

[关键词] 胰岛素; 脂质体; 包封率
[中图分类号] R943 [文献标志码] A [文章编号] 1008-9926(2010)03-0219-04
[DOI] 10.3969/j.issn.1008-9926.2010.03.010

Preparation of Glucosylated Liposomes With High Encapsulation Efficiency of Insulin

YI Mao-quan, YUAN Ming-qing, HE Na, HE Qin
West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[Abstract] Objective To prepare insulin liposmes with high encapsulation efficiency by ethanol destabilized method. Methods In the presence of ethanol, insulin was positively encapsulated in large unilamellar vesicles. The effect of composition of phospholipid, ethanol concentration, incubation temperature, incubation time, and the presence of PEG2000-succ-Chol on the encapsulation efficiency of insulin was investigated. Results The interaction of large unilamellar vesicles with insulin leads to the formation of small multilamellar liposomes the size of (180±70) nm, and the encapsulation efficiency achieved 28%-32%. Conclusion The present method could achieve 2-fold higher entrapment efficiency than methods reported in literature. Toxic solvents are avoided to maintain the maximum bioactivity of insulin.

[Key words] insulin; liposomes; encapsulation efficiency

胰岛素在 1、2型糖尿病的药物治疗中发挥着重要作用, 目前主要的给药方法为皮下注射。这种皮下注射的给药方式虽然对绝大多数糖尿病患者有效, 但也易于引起超高胰岛素血症、刺激平滑肌细胞增殖等不良反应。不仅费用昂贵给药不方便, 而且易造成精神压力甚至引起感染[1]。所以安全、有效、经济、方便的给药方式对充分发挥胰岛素在糖尿病治疗中的作用至关重要。胰岛素分子易被体内的蛋白水解酶水解而使其生物半衰期短, 其亲水性和较大的相对分子质量不利于机体的吸收。为了克服这些障碍, 研究人员以脂质体作为胰岛素的给药载体进行研究。肠黏膜上皮细胞刷状缘侧分布的葡萄糖主动转运载体对葡萄糖的亲和力强。若脂质体表面经葡萄糖修饰则可以利用这种受体配体的强亲和力促进载胰岛素的脂质体经肠吸收[2]。脂质体作为一种药物传递系统, 将药物递送到作用部位并在一定时间内维持治疗所需的药物浓度, 以提高治疗的有效性和安全性。现已采用的胰岛素脂质体的制备方法包括薄膜水合分散法[3,4]、逆相蒸发法[5,6], 所得脂质体的包封率低, 制备过程中使用的有机溶剂对胰岛素的生物活性有影响, 使胰岛素脂质体的应用受到极大的限制。本研究使用乙醇稀释法制备得到了较高包封率的葡萄糖修饰的载胰岛素口服脂质体, 制备过程中避免了使用三氯甲烷、乙醚等毒性有机试剂。

基金项目: 四川省科技支撑计划, № 2009SZ0141
作者简介: 易茂全, 在读硕士。研究方向: 药物新剂型与新制剂及其应用基础研究。Tel: 13882037113; E-mail: yimaoquanymq@163.com
作者单位: 610041 四川成都, 四川大学华西药学院
通讯作者: 何 勤, Tel: (028)85502532; E-mail: qinhe317@126.com

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 仪器与试药

Alltech高效液相色谱仪（Alltech 426泵，50 μl定量环，UVIS-201紫外检测器，ChromStation色谱工作站〔Alltech Scientific (china)公司〕；Sizer Nano ZS90型激光粒度及 zeta电位分析仪（Malvern instruments Ltd, UK）；JEM-100SX型透射电子显微镜（日本电子公司）；薄膜挤出器（AVESTIN Ltd, Canada）；氢化豆磷脂 S PC-3（Lipoid, Germany，批号：256264-1）；胆固醇（上海伯奥生物科技有限公司）；胰岛素（27.7 IU/mg，徐州万邦金桥制药有限公司，批号：0812A07）；胃蛋白酶（1∶3000，Amresco 0685，上海生工生物工程有限公司）；胰蛋白酶（>2500 U/mg，Amresco 0785，上海生工生物工程有限公司）；PEG-2000-succ-cholesterol（PEG-Chol，纯度≥95%，本室合成，批号：200903）；Glucosylated cholesterol（纯度≥98%，本室合成，批号：200812）；乙腈为色谱纯，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 胰岛素脂质体的制备 将适当组成的脂质混合物溶解在无水乙醇中作为贮备液，取 0.4 ml脂质溶液 40℃恒温振荡条件下缓慢滴加到 0.6 ml枸橼酸缓冲液（200 mmol/L，pH 4.0）中，最终悬液中脂质浓度为 10 mg/ml，形成的脂质囊在室温条件下挤压过 200 nm聚碳酸酯膜得含乙醇的脂质体，将胰岛素溶液漩涡振荡条件下滴加到含乙醇的脂质体悬浮液中，混匀后 40℃孵育 1 h，然后在 1000倍量的枸橼酸缓冲液（200 mmol/L，pH 4.0）中透析 6 h，每 2 h换液 1次，以除尽乙醇[7]。游离胰岛素经葡聚糖凝胶柱（Sephadex G-50）分离除去得胰岛素脂质体。

2.2 胰岛素脂质体粒径的测定 取 0.2 ml制备所得的脂质体悬液用 1 ml去离子水稀释后，加入到样品池中，用 Nano ZS90测定其粒径和多分散指数（polydispersity index，PDI）。胰岛素脂质体的平均粒径为（180±70）nm，其 PDI值为 0.07±0.016，粒径分布较均匀，见图 1。

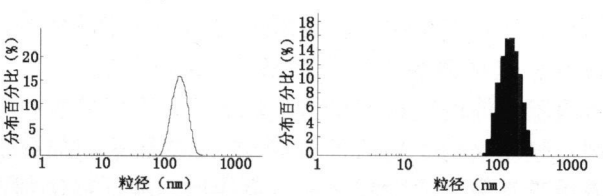


图 1 胰岛素脂质体的粒径分布

2.3 胰岛素脂质体的形态学观察 取胰岛素脂质体分散液适量，加蒸馏水稀释到合适浓度，取适量滴至覆有支持膜的铜筛网上，用 2%磷钨酸溶液染色，自然干燥后用透射电镜观察其形态，并拍摄照片，见图 2。由图 2可见胰岛素脂质体的透射电子显微镜照片显示脂质体的粒径分布较均匀，且绝大部分脂质体的粒径都在 200 nm以下，这与 Nano ZS90测得的粒径分布结果相符。脂质囊和脂质双分子层清晰可见，除了少部分为单室脂质体外，大部分为小多室脂质体，由 3~8层脂质双分子层构成。

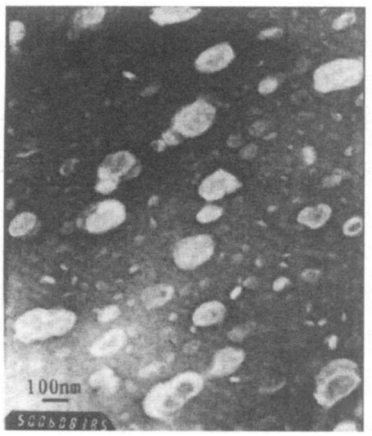


图 2 胰岛素脂质体的透射电子显微镜图（2%磷钨酸溶液染色，100 nm）

2.4 胰岛素脂质体包封率的测定

2.4.1 高效液相色谱法色谱条件 色谱柱：Diamonsil C_{18}（4.6 mm×200 mm，5 μm），流动相：0.2 mol/L无水硫酸钠水溶液（用磷酸调 pH 2.3）-乙腈（72∶28），流速：1.0 ml/min，检测波长：214 nm，进样量：20 μl，柱温：40℃。

2.4.2 标准曲线的绘制 精密称取胰岛素对照品适量，用枸橼酸缓冲液（200 mmol/L，pH 4.0）溶解，配制成浓度分别为 5、10、20、30、40、50、80、100 μg/ml的对照品溶液。分别取 20 μl进样，以峰面积对质量浓度进行线性回归，得回归方程为：

$$A = 11\,652\,C - 1438,\quad r = 0.9995$$

胰岛素在 5~100 μg/ml浓度范围内线性关系良好。

2.4.3 精密度试验 取空白脂质体分别加入高、中、低 3种浓度的胰岛素对照品溶液混匀，取 1 ml混合液，漩涡振荡条件下加入 Triton X-100（10%，W/V）50 μl，混匀后室温放置 20 min，所得样品经 10 000 r/min离心 1 min，取 20 μl进样测定其峰面积，得日内精密度 RSD为 0.64%，日间精密度 RSD为 0.76%。

2.4.4 回收率试验 取空白脂质体分别加入高、中、低 3种浓度的胰岛素对照品溶液，混匀，取 1 ml混合液，漩涡振荡条件下加入 Triton X-100（10%，

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

W/V) 50 μL混匀后室温放置 20 min,所得样品经 10 000 r/min离心 1 min,取 20 μL进样测定其峰面积,计算回收率,结果见表 1。

表 1 回收率试验结果 (n=3)

加入量 (μg/mL)	测得量 (μg/mL)	回收率 (%)	x (%)	RSD (%)
81.27	79.37	97.66		
81.27	80.13	98.60		
81.27	80.92	99.57		
30.58	29.49	96.53		
30.58	29.81	97.84	96.74	1.2
30.58	29.44	95.36		
11.25	10.52	93.51		
11.25	10.84	96.36		
11.25	10.71	95.20		

2.4.5 胰岛素包封率的测定 取 1 mL胰岛素脂质体,漩涡振荡条件下加入 Triton X-100 (10%, W/V) 50 μL混匀后室温放置 20 min,所得样品经 10 000 r/min离心 1 min,取 20 μL进样测定被脂质体包封的胰岛素的浓度 (Ceffect)。凝胶柱分离前脂质体悬液同比例稀释后取 1 mL按同法操作测定脂质体分散液中胰岛素的总浓度 (Ctotal)。则胰岛素脂质体的包封率为 Ceffect/Ctotal。

2.5 脂质处方对胰岛素包封率的影响 不同脂质组成的脂质体对胰岛素的包封率也不同,当处方中氢化豆磷脂与胆固醇的比值为 70∶30 (mol%)时可以获得约 32%的包封率,见表 2。随着胆固醇比例的增大或 PEG-chol用量的增多,包封率会明显下降。处方中胆固醇比例增加会增强脂质双分子层的稳定性,使脂质膜的刚性增强而膜的流动性降低,从而限制了孵育过程中胰岛素分子跨越脂质双分子层进入内水相的量,使包封率下降。

表 2 不同脂质组成对胰岛素包封率的影响 ($\bar{x}\pm s$, n=3)

脂质组成 (mol%) 氢化豆磷脂/胆固醇/Glucosylated cholesterol/PEG2000-chol	包封率 (%)
70/30/0/0	32.60
70/30/0/5	28.70
70/30/0/10	20.30
70/30/8/5	28.10
60/40/0/0	25.20
60/40/0/5	19.10
60/40/5/5	13.40
50/50/0/0	17.10
50/50/0/5	10.30
50/50/5/5	7.80

2.6 乙醇浓度对包封率的影响 乙醇在脂质双分子层膜与水相的界面与磷脂分子的极性头部相互作用,使脂质分子在双分子层中的排列发生扭曲[8],从而增加脂质双分子层膜的表面积,增强脂质双分子层膜的流动性和对蛋白质分子的渗透性。若脂质体悬液中的乙醇浓度低于 20%则对胰岛素的包封率没有明显影响,此浓度范围内乙醇对脂质双分子层膜的渗透性影响不大。随着乙醇浓度增加包封率也增加。当乙醇浓度为 40%时包封率达到最大,见图 3。若乙醇浓度继续增加则包封率会下降而且脂质体会发生融合沉降,因为高浓度的乙醇会使脂质双分子层膜流动性增强,增加所载药物的泄漏率而使包封率下降。

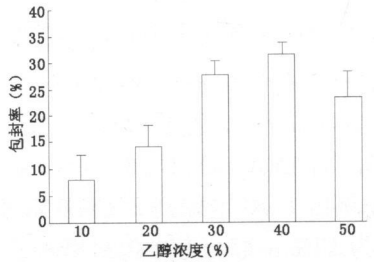


图 3 乙醇浓度对胰岛素包封率的影响

2.7 孵育温度对包封率的影响 孵育温度对脂质双分子层膜的流动性和渗透性影响较大,升高温度使膜的渗透性增强而对胰岛素的包封率增加。孵育温度为 40℃时包封率达最大,见图 4。若高于 40℃会使脂质双分子层的完整性受损,药物泄漏增加而使包封率降低。

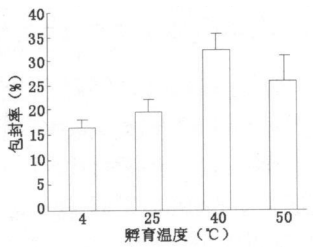


图 4 孵育温度对胰岛素包封率的影响

2.8 孵育时间对包封率的影响 孵育时间的延长使外水相中的胰岛素分子跨越脂质双分子层进入脂质体内水相的几率增加,有利于包封率的提高。1~2 h的孵育时间可使包封率达到最大,再延长孵育时间对包封率的影响不大,见图 5。为了缩短制备过程将孵育时间定为 1 h。

2.9 PEG-Chol用量对包封率的影响 PEG-Chol作为脂质成分之一组装到脂质双分子层中,亲水性的 PEG 2000能在脂质体表面形成一层亲水性的保护膜而增加脂质体的稳定性[9]。若脂质处方中 PEG-Chol的量低于 5% (mol%),脂质体在孵育和透析过程中会融合成团并沉淀下来而使脂质和胰岛素的回收率显著下降。而处方中 PEG-Chol用量的增加会显著降低胰岛素的

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

包封率，见表 2。因为 PEG-Chol的空间位阻效应抑制了外水相中的胰岛素分子跨越脂质双分子层向脂质体的内水相转移从而降低了胰岛素的包封率。所以选定处方中 PEG-Chol的用量为 5%（mol%）。

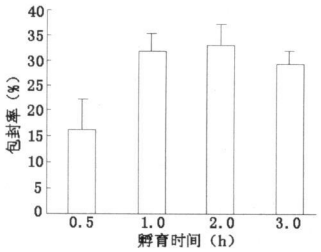


图 5 孵育时间对胰岛素包封率的影响

2.10 药脂比对包封率的影响 稳定脂质体悬液中脂质浓度为 10 mg/ml，改变胰岛素与脂质的质量比分别为 1∶30、1∶15、1∶10、2∶15。随着胰岛素/脂质（W/W）比例由 1∶30增加到 2∶15，胰岛素的包封率由 38%降为 17%。综合考虑包封率和载药量，将药脂比定为 1∶15，见图 6。

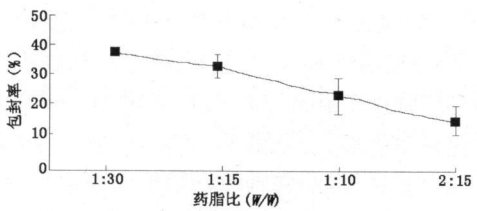
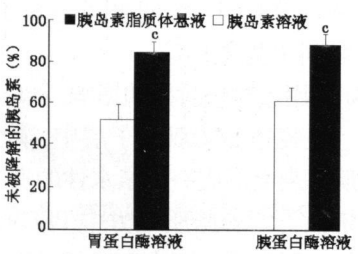


图 6 药脂比对胰岛素包封率的影响

2.11 胰岛素脂质体稳定性试验 以胃蛋白酶溶液（0.05 mg/ml，Tris-HCl缓冲液，pH=2）和胰蛋白酶溶液（0.36 mg/ml，磷酸盐缓冲液，pH=7.4）分别模拟人工胃液和人工肠液。分别取 2 ml胰岛素脂质体悬液，加入到相同体积的胃蛋白酶溶液及胰蛋白酶溶液中，混匀，50 r/min搅拌条件下 37℃孵育 2 h，然后取出 1 ml悬液漩涡振荡条件下加入 Triton X-100（10%，W/V）50 μl，按 2.4.5项下高效液相色谱法测定未被降解的胰岛素量。取相同量的胰岛素对照品溶液同法操作测定未被降解的胰岛素量，见图 7。



注：与胰岛素溶液比较，$^{c}P<0.01$。

图 7 胰岛素脂质体在蛋白水解酶中的稳定性

与胃蛋白酶孵育 2 h后，胰岛素溶液和胰岛素脂质体悬液中分别有 49.5%和 13.3%的胰岛素被降解。与胰蛋白酶孵育 2 h后，胰岛素溶液和胰岛素脂质体悬液中分别有 39.4%和 10.4%的胰岛素被降解。可见脂质体有效地降低了胃蛋白酶及胰蛋白酶对胰岛素的降解破坏作用。

3 讨论

本研究以乙醇改变空白大单室脂质体双分子层膜的渗透性，对胰岛素进行主动载药，制备所得的胰岛素脂质体的包封率比现有文献报道的包封率[3,6]提高了近 2倍，脂质体的稳定性良好，而且制备过程中避免了毒性有机溶剂（如三氯甲烷）的使用，最大限度保护了胰岛素的生物活性。该方法制备工艺简单，耗时短，而且可以应用于其他蛋白质药物脂质体的制备。这种高包封率的口服胰岛素脂质体正在进行动物体内药效学评价。

[参考文献]

[1] Thomas F Jood, MD. Advances in insulin delivery systems and devices: beyond the vial and syringe[J]. Insulin, 2006, 1(3): 99-108

[2] Ikumi Tamai, Akira Tsuji. Carrier-mediated approaches for oral drug delivery[J]. Adv Drug Deliv Rev, 1996, 20(1): 5-32

[3] Patel HM, Ryman BE. Oral administration of insulin by encapsulation within liposomes[J]. FEBS Lett, 1976, 62(1): 60-63

[4] Chono S, Fukuchi R, Seki T, et al. Aerosolized liposomes with dipalmitoyl phosphatidylcholine enhance pulmonary insulin delivery[J]. J Control Release, 2009, 137(2): 104-109

[5] Zhang N, Ping QN, Huang GH, et al. Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration[J]. Int J Pharm, 2005, 294(2): 247-259

[6] Kim A, Yun MO, Oh YK, et al. Pharmacodynamics of insulin in polyethylene glycol-coated liposomes[J]. Int J Pharm, 1999, 180(1): 75-81

[7] Maurer N, Wong KF, Stark H, et al. Spontaneous entrapment of polynucleotides upon electrostatic interaction with ethanol-destabilized cationic liposomes[J]. Biophys J, 2001, 80(5): 2310-2326

[8] Barry JA, Gawrisch K. Direct NMR evidence for ethanol binding to the lipid-water interface of phospholipids bilayers[J]. Biochemistry, 1994, 33(26): 8082-8088

[9] Moghimi SM. The effect of methoxy-PEG chain length and molecular architecture on lymph node targeting of immuno-PEG liposomes[J]. Biomaterials, 2006, 27(1): 136-144

（收稿日期：2010-01-07；修回日期：2010-03-29）

（本文编辑 梁爱君）

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net