

# 壳聚糖-EDTA 螯合物对胰岛素口服纳米脂质体的影响

吴正红, 平其能\*, 宋梅, 李建英, 蔡鹏

(中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009)

**【摘要】** 目的: 研究不同修饰程度和不同浓度的壳聚糖-EDTA 螯合物(CEC) 包覆胰岛素脂质体的性质和口服降血糖作用。方法: 用壳聚糖合成 CEC; 采用逆相蒸发法制备胰岛素脂质体, 用 CEC 对胰岛素脂质体进行包覆; 用透射电镜和光子相关光谱及激光多普勒测定仪测定其形态、Zeta 电位和粒径; 用 HPLC 法和超速离心法测定包封率; 用胃蛋白酶和胰蛋白酶溶液实验考察 CEC 包覆脂质体对胰岛素的保护作用; 用酶-苯酚法测定小鼠血糖值。结果: 当壳聚糖的 D-葡萄糖胺亚单位与 EDTA 的摩尔比为 1:10 时, CEC 的粘度最高。在 CEC 包覆胰岛素脂质体中, 随着修饰度的增加, Zeta 电位和粒径稍有下降; 随 CEC 浓度增加, Zeta 电位和粒径则相应有所增加。包封率与 CEC 修饰度和浓度相关性不大, 形态均为球形或近球形。在胃蛋白酶溶液中, CEC 对胰岛素溶液具有较好的保护作用, 用 CEC 包覆胰岛素脂质体对胰岛素具有明显的保护作用, 其中以 CEC2 的保护作用最佳, 且随浓度的增加而有所增强。在胰蛋白酶溶液中, CEC 本身对胰岛素溶液有较好的保护作用; 但用 CEC 包覆的胰岛素脂质体反而加速胰岛素的降解。CEC 包覆的胰岛素脂质体均具有一定的降血糖作用, 以 CEC2 包覆的胰岛素脂质体降血糖作用最佳, 并呈浓度依赖性, 其中 2% CEC2 包覆的胰岛素脂质体的最大降血糖值为最初血糖值的 39.3%, 维持 38.8% 以上的降血糖值达 4 h 以上。结论: CEC 对胃蛋白酶和胰蛋白酶都有抑制作用, 并可促进胰岛素口服吸收, CEC 修饰度和浓度对其包覆的胰岛素脂质体降血糖作用有一定的影响。

**【关键词】** 壳聚糖-EDTA 螯合物; 胰岛素; 脂质体; 降血糖作用

**【中图分类号】** R943 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2004)05-0417-07

近年来, 壳聚糖的粘膜粘附性和吸收促进作用已应用于非损伤性多肽和蛋白质的给药系统<sup>[1,2]</sup>。但壳聚糖无酶抑制特性, 甚至还有提高胰蛋白酶和羧肽酶 B 的活性趋向<sup>[3]</sup>。在没有酶抑制特性的聚合物载体系统中, 多肽药物无法避免快速的系统前代谢, 这将导致此类药物的生物利用度过低。尽管与酶抑制剂共同服用可将酶降解减到最小, 但酶抑制剂在聚合物载体系统中不能保持过高浓度, 因它们可经粘膜组织吸收而产生全身性毒副作用<sup>[4]</sup>。如果将酶抑制剂与壳聚糖共价连接, 则可在药物载体基质中可保持较高浓度, 对多肽药物提供强有力的酶保护作用, 并无系统性毒副作用<sup>[5,6]</sup>。特别是通过壳聚糖结构单元 2-位上的伯氨基团, 酶抑制剂和配位剂很容易共价附着在壳聚糖上, 致使该聚合物有利于无损伤性多肽传递系统。

壳聚糖-EDTA 螯合物(chitosan-EDTA conjugates, CEC) 有较强的生物粘附性, 在水及碱性水溶液中

更易水合, 能有效抑制肠道酶对多肽及蛋白质类药物的降解<sup>[7-9]</sup>。Na<sub>2</sub>-EDTA 通过络合作用能消耗肠道中的 Ca<sup>2+</sup> 从而影响连接细胞的紧密结的通透性, 增加药物细胞旁路转运<sup>[10,11]</sup>。CEC 与 Ca<sup>2+</sup> 的亲合性较高, 也可能通过增加膜的通透性而具有吸收促进作用<sup>[7]</sup>。

本文研究了壳聚糖-EDTA 螯合物包覆胰岛素口服纳米脂质体的性质、酶稳定性和降血糖作用。

## 1 实验材料

### 1.1 仪器

ZFQ-85A 型旋转蒸发仪(上海医械专机厂); J-250 型水循环真空泵(河南巩义市英峪仪器厂); GH-82 型水浴恒温振荡器(上海医械专机厂); 80-2 型离心沉淀器(上海手术器械厂); Alpha 1-2 冷冻干燥机(Martin Christ); JY-92 II 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所); NDJ-79 型旋转式粘度

\*【收稿日期】 2003-11-25 【\*通讯作者】 Tel: 025-83271299 Fax: 025-83301606 E-mail: Pingqn@cqu.edu.cn

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(No. 39930200)

计(上海同济大学机械厂); UV-9200 型紫外可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司); Zetasizer 3000SH 测定仪(Malvern Instruments Ltd); H600A-2 型电镜(日本日立); L8-60M 超速离心机(Beckman); 岛津 LC-10AT 泵、岛津 SPD-10A 检测器。

## 1.2 试药

胰岛素(徐州生化制药厂,批号 980102, 26 IU/mg); 胰岛素标准品(中国药品生物制品检定所); 卵磷脂(Serva 进口分装,上海伯奥生物科技有限公司,批号 991006); 胆固醇(上海化学试剂站分装厂,批号 Q/CYDZ-152-96); 壳聚糖(徐州新星生物制品有限公司,食品级,  $M_w$  1 000 kDa, 乙酰化度 10%, 批号 20011001); 胆酸钠(Serva 进口分装,上海化学试剂站分装厂,批号 960426); 磷钨酸钠(复旦大学化学试剂厂,分析纯); 乙二胺四乙酸(EDTA,上海化学试剂公司,分析纯); 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDAC, Merck-Schuchardt); 2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS, Sigma); 胃蛋白酶和胰蛋白酶(Sigma 公司); 葡萄糖测定试剂盒(上海荣盛生物技术有限公司); 乙腈为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

PBS 缓冲液<sup>[12]</sup>: 每 1 000 ml 内含 NaCl 137 mmol, KCl 2.6 mmol,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  6.4 mmol,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.4 mmol; pH 7.4。

## 1.3 动物

昆明种小鼠, (20±2) g, 中国药科大学实验动物中心提供。

## 2 实验方法

### 2.1 壳聚糖纯化<sup>[13]</sup>

取 5 g 食品级壳聚糖溶解于 400 ml 1% 醋酸中, 过滤, 用  $\text{NH}_4\text{OH}$  将滤液调至中性, 过滤, 用水反复洗涤, 然后冷冻干燥。

### 2.2 CEC 的合成以及修饰度和粘度的测定<sup>[6, 7]</sup>

2.2.1 CEC 的合成 取 1 g 纯化的壳聚糖 ( $M_w$  1 000 kDa) 悬浮于 90 ml 去离子水中, 不断滴加 1 mol/L HCl, 保持 pH 值为 3, 使壳聚糖完全溶解, 用去离子水稀释至 100 ml。取壳聚糖溶液 10 ml, 按表 1 所示量加入 EDTA, 用 5 mol/L NaOH 调 pH 值至 6。加入 EDTA 至最终浓度达 0.1 mol/L, 以促

进壳聚糖氨基与 EDTA 羧基间的酰胺键的形成, 在室温下持续搅拌孵化 12 h, 得到的产物依次用去离子水、0.05 mol/L NaOH、去离子水反复透析, 纯化后经冷冻干燥, 室温保存备用。

2.2.2 CEC 修饰度的测定 采用 TNBS 测定修饰与未修饰壳聚糖的游离氨基来确定 CEC 的修饰度。取 8 mg CEC 溶胀于 2 ml 去离子水中, 加入 2 ml 4%  $\text{NaHCO}_3$  和 2 ml 0.1% TNBS 于 37 °C 孵化 2 h。然后, 加入 2 ml 2 mol/L HCl 在 344 nm 波长处测定吸收度。游离氨基量通过测定一系列浓度的未修饰壳聚糖所得的标准曲线来计算。

2.2.3 CEC 粘度的测定 取 CEC 溶胀于去离子水中使其浓度为 0.25%。在室温下, 用旋转式粘度计测定粘度。

### 2.3 脂质体的制备

采用逆相蒸发法制备胰岛素脂质体。将适量磷脂和胆固醇溶于 10 ml 乙醚中。称取胰岛素 4 mg 溶于 0.5 ml 的 0.01 mol/L HCl, 再加入 2.5 ml PBS, 然后与乙醚液混合, 振摇, 浴式超声乳化, 所得乳液在旋转蒸发仪上减压除去有机溶剂, 探针式超声 0.5 min, 加 CEC 溶液在 10 °C 水浴旋转孵化 30 min, 即得 CEC 包覆的胰岛素脂质体混悬液。

### 2.4 脂质体形态、粒径和 Zeta 电位的测定

2.4.1 脂质体形态 将 3% 磷钨酸钠溶液滴加到蜡板上, 另将稀释至一定浓度的脂质体混悬液滴加到铜网正面, 用滤纸吸去过多样品液, 将铜网正面朝下盖到染液滴上, 负染 20 min, 取出铜网, 用滤纸吸取过多染液, 将铜网正面朝上置于玻璃皿中, 晾干, 在透射电子显微镜下观察并照相。

2.4.2 脂质体粒径和 Zeta 电位的测定 取脂质体混悬液用蒸馏水稀释至适宜浓度, 用 Zetasizer 测定仪测定脂质体的粒径和 Zeta 电位。

### 2.5 脂质体包封率的测定

2.5.1 色谱条件 色谱柱 Lichospher ODS-C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 0.05 mol/L 硫酸盐缓冲液 [0.05 mol/L  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 0.025 mol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 用  $\text{H}_3\text{PO}_4$  调 pH 至 2.0] - 乙腈 (72:28); 流速 1.0 ml/min; 柱温 40 °C; 检测波长 214 nm。

2.5.2 脂质体胰岛素总量测定 采用反相 HPLC 法测定胰岛素含量。取胰岛素脂质体混悬液

0.2 ml, 用 PBS 稀释至 10 ml, 混匀后, 取 2.5 ml, 加入 0.2 ml 10 mg/ml 的胆酸钠溶液、2.3 ml PBS 溶液以及 1 ml 氯仿, 涡旋混匀, 2 500 r/min 离心 15 min, 取上清液进样测定, 计算胰岛素总量。

2.5.3 游离胰岛素测定 量取胰岛素脂质体混悬液 4 ml, 置超速离心机, 以 50 000 r/min 在 10 °C 下离心 4 h。取上清液进样测定, 计算游离胰岛素量。

按下式计算包封率(Entrapment efficiency, EE):

$$\text{包封率(EE)} = (W_{\text{总}} - W_{\text{游}}) / W_{\text{总}} \times 100\%$$

其中:  $W_{\text{总}}$  表示脂质体药物总量,  $W_{\text{游}}$  表示游离药物量。

## 2.6 酶对胰岛素的降解

分别取适量的胰岛素溶液、未包覆的胰岛素脂质体混悬液和 CEC 包覆的胰岛素脂质体混悬液, 等体积加入到 pH 2 的 Tris-HCl 缓冲液配制的 0.05 mg/ml 胃蛋白酶溶液或 pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液配制的 3.6 mg/ml 胰蛋白酶溶液中, 置于恒温振荡器上 37 °C 孵化, 定时取样, 加 0.05 mol/L 氢氧化钠或 0.1 mol/L 盐酸溶液终止反应, 按“2.5.2”项下操作, 进样测定, 计算各时间点的胰岛素剩余率。

## 2.7 正常小鼠灌胃给药的降血糖试验

取正常雄性小鼠 (20 ~ 22 g), 禁食 8 h, 以 250 IU/kg 的剂量灌胃给药, 分别在 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4 h, 用玻璃毛细管于眼底静脉丛取血, 离心, 取 20  $\mu$ l 血清, 采用葡萄糖氧化酶法 (GOD-PAP) 测定血糖值, 以零时为 100%, 计算各时间点血糖的百分率和药效-时间曲线下面积 (Area under curve of efficacy-time, AUE)。

## 3 实验结果

### 3.1 CEC 的合成以及修饰度和粘度的测定

在表 1 中列出了 EDTA 的加入量, 以及 CEC 修饰度和粘度。

### 3.2 脂质体形态、粒径和 Zeta 电位的测定

3.2.1 脂质体形态 从图 1 可见脂质体的形态为球形或近球形。

3.2.2 脂质体粒径和 Zeta 电位的测定 表 2 和表 3 考察了不同修饰度和不同浓度的 CEC 对胰岛素脂质体的 Zeta 电位和粒径的影响。

Tab 1. Comparison of the degree of modification and viscosity different CEC resulting out of an increasing share of EDTA during the coupling reaction

EDTA (g)	Resulting polymer	Remaining free amino groups (% , n=6)	Viscosity (polymer concentration, 0.25%) (cp n=6)
1.82	Conjugate 1'10(CEC1)	4.1 ± 0.28	982 ± 81
3.63	Conjugate 1'20(CEC2)	0.1 ± 0.07	191 ± 77
7.26	Conjugate 1'40(CEC3)	—	179 ± 79

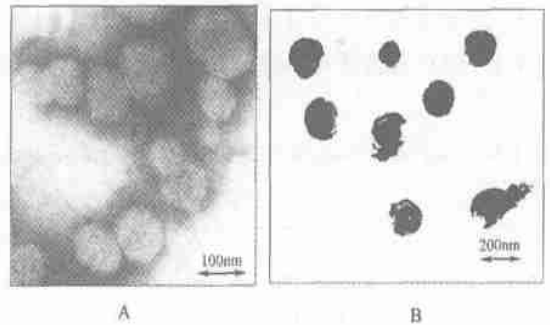


Fig 1. Transmission electron photomicrograms of insulin liposomes

A. uncoated liposomes; B. CEC-coated liposomes

Tab 2. Effect of 1% CEC with different degree of modification on size and Zeta potential of insulin-liposomes

CEC(1%)	Zeta potential (mV)	Size (nm)	Polyindex
CEC1	1.8	230.7	0.294
CEC2	1.6	226.4	0.251
CEC3	1.5	221.0	0.212

Tab 3. Effect of CEC2 with different concentrations on size and Zeta potential of insulin-liposomes

Concentration (%)	Zeta potential (mV)	Size (nm)	Polyindex
0	-2.8	170.3	0.273
0.5	1.3	207.4	0.142
1.0	1.6	226.4	0.251
1.5	1.9	239.2	0.009
2.0	2.1	253.7	0.163

### 3.3 脂质体包封率的测定

表 4 和表 5 列出了不同修饰度和浓度的 CEC 包覆的胰岛素脂质体的包封率。

Tab 4. Entrapment efficiencies of insulin-liposomes coated by 1% CEC with different degree of modification

CEC(1%)	Entrapment efficiency (%)
CEC1	74.4
CEC2	72.7
CEC3	73.5

Tab 5. Entrapment efficiencies of insulin-liposomes coated by CEC2 with different concentrations

CEC2(%)	Entrapment efficiency(%)
0	79.1
0.5	74.3
1.0	73.7
1.5	72.9
2.0	75.3

### 3.4 胰岛素脂质体在胃蛋白酶中的稳定性

#### 3.4.1 CEC 包覆胰岛素脂质体在胃蛋白酶中的稳

定性 表 6 列出了不同修饰度的 CEC 包覆的胰岛素脂质体在胃蛋白酶中的降解情况;表 7 列出了不同浓度的 CEC 包覆的胰岛素脂质体在胃蛋白酶中的降解情况。

3.4.2 CEC 包覆胰岛素脂质体在胰蛋白酶中的稳定性 表 8 列出了不同修饰度的 CEC 包覆的胰岛素脂质体在胰蛋白酶中的降解情况;表 9 列出了不同浓度的 CEC 包覆的胰岛素脂质体在胰蛋白酶中的降解情况。

Tab 6 Remaining ratio of insulin after incubation of insulin-liposomes coated by 1% CEC with different degree of modification in pepsin solution( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

t(min)	Ins(%)	Ins+CEC2(%)	Uncoated(%)	CEC1(%)	CEC2(%)	CEC3(%)
0	100.00	100	100.00	100	100	100
0.5	87.6±5.15	99.3±1.41	94.6±4.50	91.1±2.74	91.5±1.21	89.4±2.36
1	70.4±4.17	99.2±2.33	85.9±3.24	91.0±1.91	90.7±1.83	88.0±2.71
2	58.9±1.43	96.2±2.14	75.3±2.14	86.4±2.87	87.3±2.02	86.2±2.44
5	45.1±2.31	95.5±1.98	50.9±4.23	85.4±1.73	85.7±1.33	84.6±1.55
10	25.3±3.26	95.4±2.63	22.7±2.33	82.8±2.64	83.2±2.19	76.1±3.02
15	10.8±2.73	93.8±0.79	13.8±3.19	80.1±1.18	81.8±1.41	75.2±2.63
30	6.4±1.08	91.4±1.10	3.91±2.78	77.1±3.02	79.6±0.88	62.6±0.94

Tab 7. Remaining ratio of insulin after incubation of insulin-liposomes coated by CEC2 with different concentrations in pepsin solution( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

t(min)	0.5% CEC2(%)	1.0% CEC2(%)	1.5% CEC2(%)	2.0% CEC2(%)
0	100	100	100	100
0.5	89.3±2.31	91.5±1.21	99.3±2.44	98.1±1.20
1	85.1±2.57	90.7±1.83	92.9±2.75	94.2±2.02
2	80.6±1.76	87.3±2.02	91.6±1.99	93.9±3.07
5	69.8±0.92	85.7±1.33	90.0±2.11	91.6±1.18
10	65.6±3.03	83.2±2.19	87.5±3.03	91.5±2.71
15	55.9±1.72	81.8±1.41	85.1±0.74	90.2±1.95
30	35.2±2.94	79.6±0.88	79.9±1.38	84.4±3.01

Tab 8 Remaining ratio of insulin after incubation of insulin-liposomes coated by 1% CEC with different degree of modification in trypsin solution( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

t(h)	Ins(%)	Ins+CEC2(%)	Uncoated(%)	CEC1(%)	CEC2(%)	CEC3(%)
0	100	100	100	100	100	100
0.25	97.3±2.33	96.1±1.37	90.4±4.61	79.8±2.12	86.8±1.56	76.3±1.11
0.5	96.6±4.26	96.0±2.12	80.8±1.25	58.3±3.28	68.2±2.37	53.5±2.50
1	85.8±3.35	94.3±3.24	71.3±3.24	46.9±3.72	42.4±1.55	52.0±2.47
1.5	74.8±2.01	92.0±4.11	62.8±1.22	38.7±2.44	32.3±3.11	30.9±1.53
2	64.5±2.17	91.4±0.87	45.5±2.55	24.1±1.97	24.6±2.19	25.8±2.61
3	48.9±3.02	82.8±1.18	40.4±3.31	14.0±2.68	19.0±2.78	23.4±0.93
4	31.4±1.21	80.2±2.43	29.6±3.23	9.41±3.54	11.1±2.42	10.7±3.14
5	27.8±0.79	69.5±2.39	22.6±2.13	6.90±1.71	9.42±2.63	5.11±1.15

Tab 9. Remaining ratio of after incubation of insulin-liposomes coated by CEC2 with different concentrations in trypsin solution ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

$t$ (h)	0.5%CEC2(%)	1.0%CEC2(%)	1.5%CEC2(%)	2.0%CEC2(%)
0	100	100	100	100
0.25	87.2 $\pm$ 1.13	86.8 $\pm$ 1.56	96.0 $\pm$ 2.14	90.7 $\pm$ 1.94
0.5	74.8 $\pm$ 2.18	68.2 $\pm$ 2.37	74.8 $\pm$ 1.77	75.3 $\pm$ 2.16
1	53.3 $\pm$ 1.51	42.4 $\pm$ 1.55	46.6 $\pm$ 2.29	56.3 $\pm$ 0.76
1.5	43.7 $\pm$ 1.83	32.3 $\pm$ 3.11	43.7 $\pm$ 3.18	44.2 $\pm$ 3.02
2	31.9 $\pm$ 2.26	24.6 $\pm$ 2.09	29.2 $\pm$ 1.62	31.9 $\pm$ 1.15
3	26.2 $\pm$ 0.95	19.0 $\pm$ 2.78	20.3 $\pm$ 1.22	26.2 $\pm$ 2.32
4	14.5 $\pm$ 1.07	11.1 $\pm$ 2.42	14.5 $\pm$ 3.10	16.2 $\pm$ 1.61
5	9.02 $\pm$ 2.31	9.42 $\pm$ 2.63	9.79 $\pm$ 2.02	11.1 $\pm$ 2.01

### 3.5 CEC 包覆胰岛素脂质体的降血糖作用

图 2 列出了不同修饰度的 CEC 包覆的胰岛素脂质体的降血糖情况;图 3 列出了不同浓度的 CEC 包覆的胰岛素脂质体的降血糖情况。

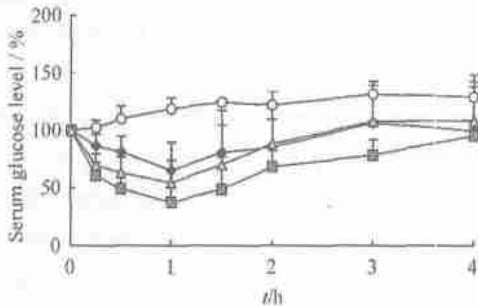


Fig 2 Hypoglycemia of insulin-liposomes coated by CEC with different modification ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

—○—Ins; —◆—CEC1-coated; —■—CEC2-coated; —▲—CEC3-coated

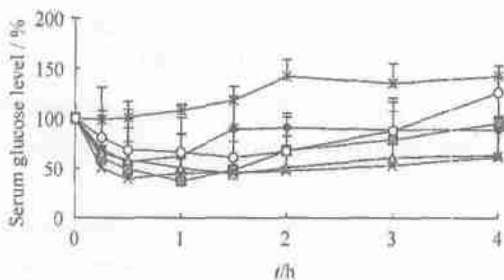


Fig 3. Hypoglycemia of insulin-liposomes coated by CEC2 with different concentrations ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

—\*—Uncoated; —◆—0.5%CEC2-coated; —■—1.0%CEC2-coated;  
—▲—1.5%CEC2-coated; —×—2.0%CEC2-coated;  
—○—2.0%CEC2+Ins

## 4 讨论

### 4.1 CEC 的合成

EDTA 通过酰胺键以共价方式附于壳聚糖上,当壳聚糖的 D-葡萄糖胺亚单位与 EDTA 的摩尔比为

1:20 时,游离氨基几乎全被修饰;再增加 EDTA 的量,并未导致取代度的升高。当摩尔比为 1:10 时,CEC 的粘度最高,可能是由于在 EDTA 与壳聚糖之间有更多交联形成所致。

### 4.2 脂质体的形态、Zeta 电位和粒径

经逆相蒸发法制备得到的脂质体为乳白色混悬液。经负染电镜观察,脂质体形态均为球形或近球形,但由于 CEC 亲水性,经负染在电镜下观察到包覆脂质体的外观颜色较深,指纹特征被亲水包覆层掩蔽。

在 CEC 包覆胰岛素脂质体中,随着修饰度的增加,Zeta 电位和粒径均稍有下降,主要由于 CEC 粘度下降,导致覆盖在磷脂膜表面的 CEC 减少,从而使得 Zeta 电位和粒径有所下降;另外,随着修饰度的增加,游离氨基随之减少,脂质体的 Zeta 电位也随之降低。当 CEC 浓度增加时,Zeta 电位和粒径则相应有所增加,主要因为 CEC 浓度增加时,其粘度也增加,导致包覆在磷脂膜表面的 CEC 增多,从而引起 Zeta 电位和粒径的增大。同未包覆胰岛素脂质体比较,CEC 包覆的胰岛素脂质体的 Zeta 电位和粒径均有所增加。

### 4.3 脂质体的包封率

同未包覆胰岛素脂质体相比,CEC 包覆的胰岛素脂质体的包封率均有所下降,可能是在孵育包覆过程中,脂质体中药物向外发生泄漏的结果,与 CEC 修饰度和浓度相关性不大。

### 4.4 胃蛋白酶的降解

在胃蛋白酶溶液(pH 2 的 Tris-HCl 缓冲液)中,胃蛋白酶对胰岛素有较强的降解作用;未包覆的脂质体对胰岛素无保护作用。由于在 pH 2 的情况下,磷脂带负电荷,胃蛋白酶带正电荷。当没用聚

合物包覆时,胃蛋白酶易附着于脂质体表面,从而导致胰岛素的迅速降解。

在 CEC 包覆胰岛素脂质体中,由于 CEC 覆盖在脂质体表面,覆盖层厚度随着 CEC 浓度的增加而增加,阻止胃蛋白酶对胰岛素降解作用也随之增强。另外,在酸性环境中,CEC 不能水合溶胀,当含有 CEC 的胰岛素溶液加到 pH 2 胃蛋白酶的 Tris-HCl 溶液中时,CEC 聚集,胰岛素被 CEC 包裹,可有效阻止胃蛋白酶与胰岛素的接触,防止胰岛素降解。所以用 CEC 包覆胰岛素脂质体对胰岛素具有明显的保护作用,其中以 CEC2 的保护作用最佳,且随浓度的增加而有所增强。但由于在 pH 2 胃蛋白酶的 Tris-HCl 溶液中 CEC 对胰岛素脂质体的包覆不及对胰岛素本身的包覆紧密,因而 CEC 对胰岛素溶液的保护作用比对胰岛素脂质体强。

#### 4.5 胰蛋白酶的降解

在胰蛋白酶溶液(pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液)中,胰蛋白酶对胰岛素也有较强的降解作用;未包覆的脂质体对胰岛素无明显的保护作用。由于在 pH 7.4 的情况下,磷脂带负电荷,胰蛋白酶带正电荷,当没用聚合物包覆时,胰蛋白酶易附着于脂质体表面,从而导致胰岛素的迅速降解。

CEC 本身对胰岛素溶液有较好的保护作用;但用 CEC 包覆的胰岛素脂质体反而加速胰岛素的降解。由于在 pH 7.4 时 CEC 处于溶胀状态,对钙离子具有较强的亲合力,当它与磷脂的亲水基团通过氢键相互作用时,可引起对钙离子的亲合力下降,导致对钙依赖型胰蛋白酶的抑制作用减弱;同时,在此 pH 值条件下,胰岛素和 CEC 带负电荷,而胰蛋白酶带正电荷,则胰岛素更易于被胰蛋白酶降解,从而导致在胰蛋白酶中 CEC 包覆的胰岛素脂质体对胰岛素的保护作用丧失。

#### 4.6 CEC 包覆胰岛素脂质体的降血糖作用

CEC 包覆的胰岛素脂质体均具有一定的降血糖作用。在不同修饰度的 CEC 中,以 CEC2 包覆的胰岛素脂质体降血糖作用最佳,并有浓度依赖性,其中 2%CEC2 包覆的胰岛素脂质体的最大降血糖值为最初血糖值的 39.27%,维持 38.77% 以上的

降血糖值达 4 h 以上。

#### 【参考文献】

- [ 1 ] Lußen HL, de Leeuw BJ, Langemeyer MW, *et al.* Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. VI. Carbomer and chitosan improve the intestinal absorption of the peptide drug busirelin *in vivo* [ J ] . *Pharm Res*, 1996, **13**(11): 1668-1672.
- [ 2 ] Illum L, Famaj NF, Davis SS. Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drug[ J ] . *Pharm Res*, 1994, **11**(8): 1186-1189.
- [ 3 ] Lußen HL, Rentel CO, Kotz AF, *et al.* Mucoadhesive polymers in peroral peptide drug delivery. IV. Polycarboxyl and chitosan are potent enhancers of peptide transport across intestinal mucosae *in vitro* [ J ] . *J Control Rel*, 1997, **45**(1): 15-23.
- [ 4 ] Bemkop-Schnürch A. The use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administered therapeutic peptides and proteins[ J ] . *J Control Rel*, 1998, **52**(1): 1-16.
- [ 5 ] Bemkop-Schnürch A. Polymer-inhibitor conjugates: A promising strategy to overcome the enzymatic barrier to perorally administered (poly) peptide drugs[ J ] . *STP Pharma Sci*, 1999, **9**(1): 78-86.
- [ 6 ] Bemkop-Schnürch A. Chitosan and its derivatives; Potential excipients for peroral peptide delivery systems[ J ] . *Int J Pharm*, 2000, **194**(1): 1-13.
- [ 7 ] Bemkop-Schnürch A, Knažiček ME. Mucoadhesive polymers as platforms for peroral peptide delivery and absorption; synthesis and evaluation of different chitosan-EDTA conjugates[ J ] . *J Control Rel*, 1998, **50**(3): 215-223.
- [ 8 ] Bemkop-Schnürch A, Paikl CH, Valenta C. Novel bioadhesive chitosan-EDTA conjugate protects leucine enkephalin from degradation by aminopeptidase N[ J ] . *Pharm Res*, 1997, **14**: 917-922.
- [ 9 ] Bemkop-Schnürch A, Kast CE. Chemically modified chitosans as enzyme inhibitors[ J ] . *Adv Drug Del Rev*, 2001, **52**(2): 127-137.
- [ 10 ] Aungst BJ, Saitoh H, Burcham DL, *et al.* Enhancement of the intestinal absorption of peptides and non-peptides[ J ] . *J Control Rel*, 1996, **41**(1): 19-31.
- [ 11 ] Aungst BJ, Rogers NJ. Site dependence of absorption-promoting actions of laureth-9, Na salicylate, Na<sub>2</sub>EDTA, and aprotinin on rectal, nasal, and buccal insulin delivery[ J ] . *Pharm Res*, 1988, **5**(5): 305-308.
- [ 12 ] Morishita M, Morishita I, Takayama K, *et al.* Site-dependent effect of aprotinin, sodium caprate, Na<sub>2</sub>EDTA and sodium glycocholate on intestinal absorption of insulin[ J ] . *Biol Pharm Bull*, 1993, **16**(1): 68-72.
- [ 13 ] Mumper RJ, Hoffman AS, Puolakkainen A, *et al.* Calcium alginate beads for the oral delivery of TGF-beta[ J ] . *J Control Rel*, 1994, **30**(3): 241-251.

# Effects of Chitosan-EDTA Conjugates on Insulin Nano-liposomes

WU Zheng-Hong, PING Qi-Neng, SONG Yun-Mei, LI Jian-Ying, CAI Peng

(Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

**【ABSTRACT】** AIM: To evaluate the characteristics and the hypoglycemic efficacy of insulin liposomes coated by chitosan-EDTA conjugates (CEC) having different degrees of modification and concentrations after oral administration in mice. METHOD: CEC was synthesized from chitosan. Insulin-liposomes were prepared by reversed-phase evaporation. CEC coating was carried out by mixing the liposomal suspensions with the CEC solution, followed by incubation. The morphological examination of insulin-liposomes was performed with transmission electron microscopy (TEM). The particle size and Zeta potential were analyzed by using photon correlation spectroscopy and laser doppler anemometry. The entrapment efficiency was determined with HPLC and ultracentrifuge. The protection of insulin from peptic and tryptic digestion was studied with HPLC. The hypoglycemic effects of CEC-coated insulin liposomes were investigated using the glucose oxidase method after oral administration in mice. RESULT: A molar ratio of 1:20 (*D*-glucosamine subunit of chitosan; EDTA) leads to an almost quantitative modification of all free amino groups. A higher excess of EDTA during the coupling reaction did not lead to a higher degree of modification. In contrast, a lower molar ratio than 1:20 leads to a polymer conjugate of comparable higher viscosity. The Zeta potentials and the particle sizes of CEC-coated insulin-liposomes were found to be increased with increasing concentration of CEC, but slightly decreased with increasing degree of modification. The entrapment efficiencies had no obvious correlation with the degree of quaternization and the concentration of CEC. All insulin-liposomes were of spherical or ellipsoidal shape. In peptic solutions, CEC and CEC-coated liposomes had abilities of protecting insulin from peptic digestion, which were increased with increased concentration of CEC. However, the abilities of CEC-coated liposomes were slightly lower than those of CEC. In all CEC-coated liposomes, the protective action of CEC2-coated liposomes was the strongest. In tryptic solutions, CEC had the ability of protecting insulin from tryptic digestion. However, CEC-coated liposomes had no protective action of insulin, even it could enhance digestion of insulin. All CEC-coated liposomes had definite hypoglycemic effects, and the effect was found to be increased with increasing concentration of CEC. As compared with the other CEC-coated insulin liposomes, CEC2-coated insulin liposomes have better hypoglycemic effects. The minimum blood glucose was 39.3% of the initial blood glucose. The blood glucose reducing effect could last 4 h after oral administration by mice. CONCLUSION: Proteolytic activity of pepsin and trypsin could be inhibited by CEC. CEC-coated liposomes could enhance enteral absorption of insulin. Degree of modification and concentrations of CEC were well correlated with the hypoglycemic effect of CEC-coated insulin liposomes.

**【KEY WORDS】** Chitosan-EDTA conjugates; Insulin; Liposomes; Hypoglycemic effect

**【Foundation Item】** This study was supported by National Natural Science Foundation (No. 39930200)