

文章编号: 1001-8689(2019)07-0850-06

雷替曲塞 pH 敏感脂质体的制备研究

张彩丽 张亦斌 邓盛齐* 张金霞 罗玉莹

(1 抗生素研究与再评价四川省重点实验室, 成都大学, 四川抗菌素工业研究所, 成都 610052)

摘要: **目的** 制备雷替曲塞 pH 敏感脂质体, 并优化其处方和制备工艺, 对所优化的 pH 敏感脂质体进行评价。**方法** 采用单因素考察和正交设计试验优化处方, 考察最优处方制得的雷替曲塞 pH 敏感脂质体的粒径、Zeta 电位、外观形态、包封率、体外释放度和细胞毒性作用。**结果** 按最优处方制备的雷替曲塞 pH 敏感脂质体, 平均粒径为 $(227.0 \pm 21.4) \text{ nm}$, PDI 为 0.223 ± 0.061 , Zeta 电位为 $(-44.2 \pm 3.6) \text{ mV}$, 包封率为 $(58.3 \pm 2.1) \%$; 体外释放结果表明载药脂质体在 pH5.0 和 pH6.0 的释放介质中释放快速, 在 pH7.4 的释放介质中释放缓慢, pH 敏感作用明显; 细胞毒性试验证实脂质体载体本身安全性较高, 而载药脂质体制剂有较高的细胞毒性。**结论** 本研究表明, 优化得到的雷替曲塞 pH 敏感脂质体具有简便的制备方法、适宜的理化性质和较高的安全性, 具有广阔的临床应用前景。

关键词: 雷替曲塞; pH 敏感脂质体; 处方优化; 包封率

中图分类号: R9 **文献标志码:** A

The preparation study of raltitrexed pH-sensitive liposomes

Zhang Cai-li, Zhang Yi-bin, Deng Sheng-qi, Zhang Jin-xia and Luo Yu-ying

(1 Antibiotics Research and Re-evaluation Key Laboratory of Sichuan Province, Sichuan Industrial Institute of Antibiotics, Chengdu University, Chengdu 610052)

Abstract Objective To prepare raltitrexed pH-sensitive liposomes, optimize their formulation and preparation process, and evaluate the optimized pH-sensitive liposomes. **Methods** Single factor investigation and orthogonal optimization were performed to optimize the prescription. In addition, the particle sizes, zeta potential, encapsulation efficiency, *in vitro* release, and cytotoxicity of the raltitrexed pH-sensitive liposomes prepared by the optimal prescription were studied. **Results** The raltitrexed pH-sensitive liposomes prepared according to the optimal prescription had average particle sizes of $(227.0 \pm 21.4) \text{ nm}$, a PDI of (0.223 ± 0.061) , a Zeta potential of $(-44.2 \pm 3.6) \text{ mV}$, and an entrapment efficiency of $(58.3 \pm 2.1) \%$. It was shown that drug-loaded liposomes released faster in the release medium of pH5.0 and pH6.0 compare to the pH of 7.4. Cytotoxicity test confirmed that the liposome carrier itself was safer and the drug-loaded liposome has higher cytotoxicity. **Conclusion** In conclusion, results showed that the optimized raltitrexed pH-sensitive liposome had a simple preparation method, suitable physiochemical properties, high safety, and had broad clinical application prospects.

Key words Raltitrexed; pH-sensitive liposomes; Prescription optimization; Entrapment efficiency

脂质体作为新型的药物传递载体, 具有良好的靶向性和生物相容性^[1]。然而常规脂质体在进入人体后, 仍然会被肝和脾脏的网状内皮系统 (reticulo-

endothelial system, RES) 迅速识别和摄取, 从而缩短药物的血浆半衰期^[2]。此外, 脂质体主要通过内吞小泡的方式进入细胞, 随后进入溶酶体, 最终脂质体和

收稿日期: 2018-08-13

作者简介: 张彩丽, 女, 生于 1993 年, 在读硕士研究生, 药物新剂型与新技术, E-mail: 1600620299@qq.com

* 通讯作者, E-mail: 469330716@qq.com

被包封的药物仍然无法避免被溶酶体降解的风险。

为解决这一问题,大量物理响应、化学响应和生物响应的纳米材料被用于脂质体药物传递系统^[2-3],其中 pH 敏感脂质体被视为避免药物被溶酶体降解的最有效途径之一。由于较高的代谢速率,肿瘤组织的 pH 值(5.3~6.3)通常低于正常组织,亚细胞水平内涵体和溶酶体的 pH 值通常在 4.5~5.5 之间,这些不同组织和器官之间 pH 的差异为 pH 敏感脂质体的设计提供了思路^[4]。通常 pH 敏感脂质体在中性和弱碱性条件下较稳定,而酸性条件下不稳定^[5],当 pH 值从生理环境 7.4 变到肿瘤组织微环境 5.3~6.3 时, pH 敏感脂质体的膜结构也将发生相应的改变,从而释放内容物^[6],发挥抗肿瘤效果。因此, pH 敏感脂质体对抗肿瘤药物的研发具有重要的研究价值。

雷替曲塞是一种胸腺嘧啶合成酶抑制剂,1996 年在英国上市,目前国内外的上市制剂为注射用冻干粉针,已有 16 个国家将其作为治疗晚期结直肠癌的一线药物^[7]。由于不能有效区分正常细胞和快速增长的肿瘤细胞,使得其到达肿瘤组织的药量较少、不良反应较大^[8-9]。为进一步发挥其一线治疗的作用,做创新性的制剂改良非常必要。本研究制备雷替曲塞 pH 敏感脂质体,并对其处方和制备工艺进行优化,然后对所优化的 pH 敏感脂质体进行评价,以期望提高雷替曲塞抗肿瘤作用的靶向性,更好的发挥其抗肿瘤作用。为开发具有靶向作用的雷替曲塞新型药物传递系统提供相应的理论依据与实验基础。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20A 型高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司, LC-20AT 泵、SIL-20A 自动进样器、CTO-20A 柱温箱、SPD-20A 检测器、Chromato-Solution Light 色谱工作站), pH 酸度计(Mettler Toledo, 型号: 092ZY619), 台式微量高速离心机(湘仪®, 型号: H1650-W), 超声波细胞破碎仪(沃信仪器, 型号: VOSHIN92- II), 十万分之一电子分析天平(德国 Sartorius 公司, 型号: CPA225D), 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂, 型号: 20151345)、激光粒度仪/Zeta 电位分析仪(英国 Malvern, zetasizer nano ZS90)、酶标仪(Biotek 公司, 型号: Bio-TekELX800)、细胞培养箱(Thermo 公司, 型号: HERAcell 2401)。

1.2 材料

雷替曲塞(北京迈劲医药科技有限公司, 纯度>

99%), 雷替曲塞对照品(北京迈劲医药科技有限公司, 纯度 99.3%), 甲醇、乙腈(国药集团化学试剂有限公司, 色谱纯), 葡聚糖凝胶 G-50(瑞典 Pharmacia 公司)、磷脂酰乙醇胺(DOPE, 瑞士 Corden 公司)、胆固醇半琥珀酸酯(CHEMS, Sigma 公司)、HSPC(日本精化株式会社)、PC-98T(日本精化株式会社)、 Na_3PO_4 、 NaH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 等试剂(成都科龙试剂有限公司, 分析纯)、胎牛血清(Gibco 公司)、10%FBS 培养基(Gibco 公司)、CCK8 试剂(七海生物)、HCT-116 细胞(ATCC)。

2 方法与结果

2.1 pH 敏感脂质体的制备

采用冻融法制备脂质体。精密称取处方量的脂质材料 DOPE 和 CHEMS 溶于氯仿中, 在 40℃ 条件下通过减压旋蒸法除去氯仿使形成均匀的脂质体薄膜, 真空干燥过夜; 加入含处方量雷替曲塞的磷酸盐缓冲液 5mL; 40℃ 水化 1h, 得雷替曲塞 pH 敏感脂质体混悬液; 经超声波细胞破碎仪破碎 2min(破碎 2S, 间隔 3S)后, -20℃/40℃ 条件冻融 3 次, 即得雷替曲塞 pH 敏感脂质体。

2.2 包封率的测定

采用 SephadexG-50 凝胶柱对游离药物进行分离, 测定脂质体的包封率。精密移取雷替曲塞 pH 敏感脂质体 0.5mL, 上样, 用 0.05mol/L NaH_2PO_4 (pH8.0) 溶液进行洗脱(流速为 3mL/min), 收集 50mL 游离药物洗脱液, 测定并计算脂质体中游离药物的质量 $W_{\text{游离}}$ 。另精密移取雷替曲塞 pH 敏感脂质体 0.5mL 于 50mL 量瓶中, 加入一定量 10% triton X-100 溶解脂质体, 并用洗脱液定容至刻度, 测定并计算脂质体中总药物的质量 $W_{\text{总}}$, 按包封率公式(包封率 $(EE/\%) = (1 - W_{\text{游离}}/W_{\text{总}}) \times 100\%$) 计算脂质体包封率。

2.3 含量测定

本实验采用 HPLC 法测定雷替曲塞 pH 敏感脂质体中药物的含量。色谱条件及系统适用性实验: 色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus C_{18} (4.6mm×250mm, 5 μm); 流动相为 pH7.25 乙腈-磷酸盐缓冲液(含 0.25% 磷酸二氢钠和 0.25% 磷酸氢二钠)=14:86; 流速 1.0mL/min; 柱温: 40℃; 进样量 20 μL ; 检测波长 227nm。

2.4 单因素处方筛选(图 1)

2.4.1 磷脂种类对雷替曲塞 pH 敏感脂质体粒径和包封率的影响

磷脂双分子层是组成脂质体膜的主要成分, 因此本实验选用了 3 种不同的磷脂(HSPC、DOPE 和

PC-98T) 制备 pH 敏感脂质体, 以考察磷脂种类对 pH 敏感脂质体包封率的影响。结果表明磷脂种类对雷替曲塞 pH 敏感脂质体的粒径和包封率都有较大的影响, 其中, 采用 DOPE 制备的雷替曲塞 pH 敏感脂质体粒径最小, 且包封率最高。因此选用 DOPE 制备雷替曲塞 pH 敏感脂质体。

2.4.2 DOPE 与 CHEMS 比例对雷替曲塞 pH 敏感脂质体粒径和包封率的影响

DOPE 和 CHEMS 是组成 pH 敏感脂质体的主要成分, 因此考察了 DOPE 与 CHEMS 比例 (3:1、3:2 和 4:3, 摩尔比) 对雷替曲塞 pH 敏感脂质体包封率的影响。结果表明, 二者的比例对脂质体的粒径影

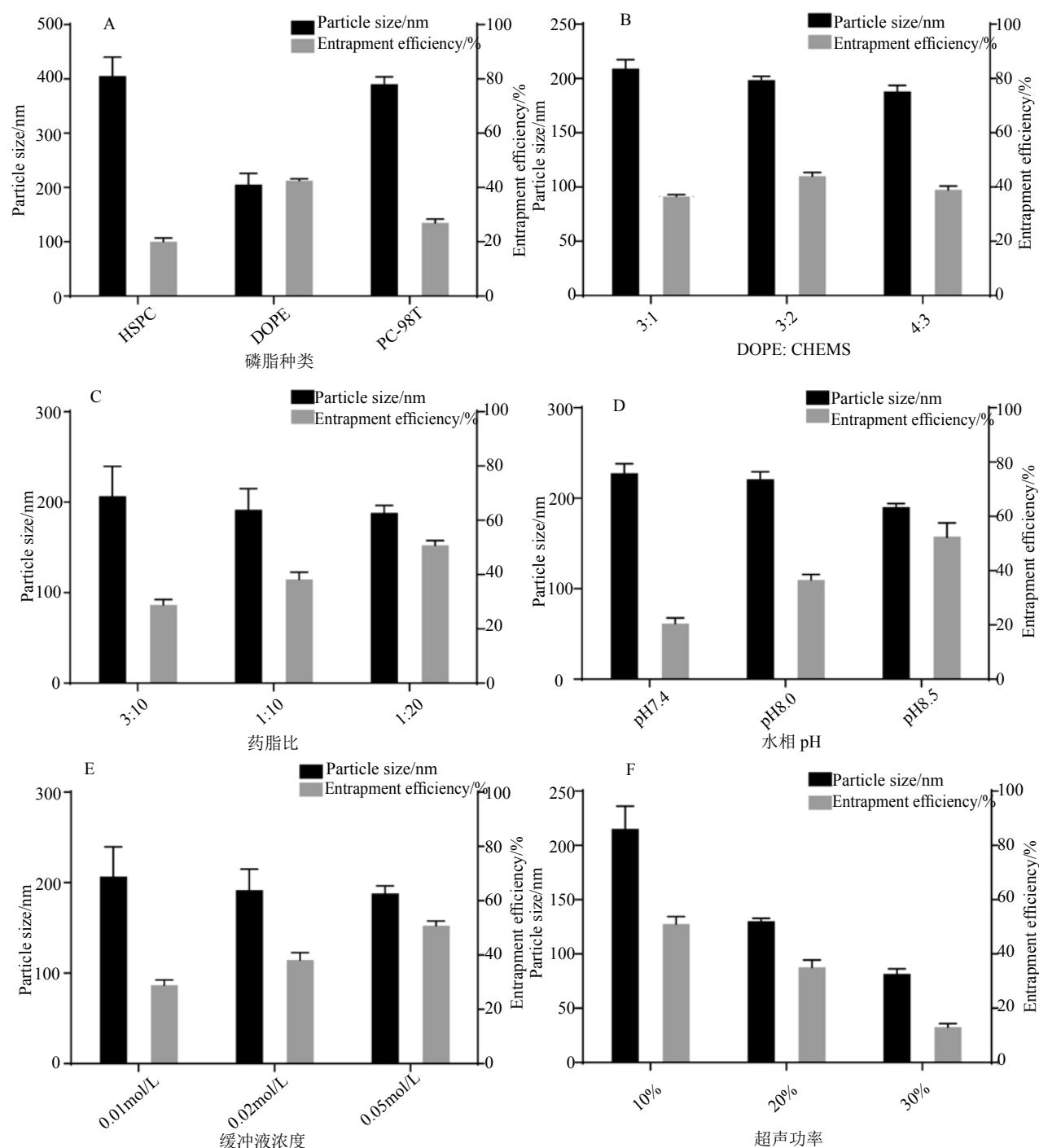


图1 磷脂种类(A)、DOPE与CHEMS比例(B)、药脂比(C)、水相pH(D)、缓冲液浓度(E)和超声功率(F)对pH敏感脂质体粒径和包封率的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

Fig. 1 Effect of the kind of lipid (A), mass ratio of DOPE to CHEMS (B), mass ratio of drug to lipid (C), the pH of aqueous (D), concentration of lipid (E), the energy of ultrasonic (F) on particle size and entrapment efficiency ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

响不大，当 DOPE:CHEMS 为 3:2 时所制备的雷替曲塞 pH 敏感脂质体包封率最高。经查阅文献和前期预实验知^[10]，当 DOPE:CHEMS 为 3:2 时所制备的 pH 敏感脂质体 pH 敏感效果最好，所以选用摩尔比为 3:2 的 DOPE 和 CHEMS 制备雷替曲塞 pH 敏感脂质体。

2.4.3 药脂比对雷替曲塞 pH 敏感脂质体粒径和包封率的影响

考察了药脂比 (3:10、1:10 和 1:20) 对雷替曲塞 pH 敏感脂质体的影响，结果表明药脂比对脂质体的粒径影响较小，对包封率的影响较大。因此，选择药脂比 1:10~1:30 用于后续多因素考察实验。

2.4.4 水相 pH 对雷替曲塞 pH 敏感脂质体粒径和包封率的影响

因为制备脂质体的膜材对 pH 较为敏感，所以水相 (磷酸盐缓冲液) pH 对雷替曲塞 pH 敏感脂质体的包封率影响较大。本实验考察了不同 pH 值磷酸盐缓冲液 (pH7.4~8.5) 对 pH 敏感脂质体粒径和包封率的影响。结果显示水相 pH 越小时脂质体越容易聚集且粒径会变大，随 pH 增大包封率也将变大。所以选择水相 pH 值在 8.0~9.0 之间。

2.4.5 缓冲液浓度对雷替曲塞 pH 敏感脂质体粒径和包封率的影响

考察了不同浓度的磷酸盐缓冲液 (0.01、0.02 和 0.05mol/L) 对脂质体粒径和包封率的影响，结果表明，随缓冲液浓度增大，脂质体包封率逐渐增大而粒径变化不明显。因此选择磷酸盐缓冲液 0.02~0.05mol/L 用于后续多因素实验。

2.4.6 超声功率对雷替曲塞 pH 敏感脂质体粒径和包封率的影响

考察了超声功率 / 能量 (10%~30%，总功率为 650w) 对 pH 敏感脂质体包封率的影响，结果表明随超声功率变大，pH 敏感脂质体的粒径和包封率将逐渐减小，可能超声功率过大将导致部分脂质体破坏泄露出被包封的药物。因此选择超声能量在 10%~20% 之间。

2.5 正交设计法优化最佳处方

单因素考察实验结果表明，在保证 pH 敏感和粒径适当的前提下，药脂比 (A)、水相 pH(B)、缓冲液浓度 (C) 和超声能量 (D) 为影响 pH 敏感脂质体包封率的主要因素，因而选取这 4 个因素作为考查对象，采用 $L_9(3^4)$ 正交表设计实验，以包封率为指标进行评价，得到优化的 pH 敏感脂质体处方。结果见表 1 所示。

根据表 1 中极差 R 分析： $A > B > D > C$ ，表

表 1 雷替曲塞 pH 敏感脂质体制备工艺参数优化
Tab. 1 Optimization of preparation parameters of raltitrexed pH-sensitive liposome

试验号	因素				包封率 / %
	A	B	C	D	
1	1(1:10)	1(8.0)	1(0.02mol/L)	1(10%)	37.3
2	1	2(8.5)	2(0.03mol/L)	2(15%)	39.7
3	1	3(9.0)	3(0.05mol/L)	3(20%)	43.1
4	2(1:20)	1	2	3	42.9
5	2	2	3	1	58.3
6	2	3	1	2	45.7
7	3(1:30)	1	3	2	42.8
8	3	2	1	3	49.6
9	3	3	2	1	52.3
K_1	40.0%	41.0%	44.2%	49.3%	
K_2	49.0%	41.0%	44.2%	49.3%	
K_3	48.2%	47.0%	48.1%	45.2%	
R	8.9%	8.2%	3.9%	6.6%	

明缓冲液浓度对雷替曲塞 pH 敏感脂质体的包封率影响最小。以表 1 中 R 值最小的因素作为误差估计，对正交试验结果进行方差分析，结果见表 2。

通过上述制备工艺参数的优化，得到雷替曲塞 pH 敏感脂质体的最优制备处方条件，即以 DOPE 和 CHEMS 的摩尔比为 3:2，药脂比为 1:20，水相为 0.05mol/L NaH_2PO_4 缓冲液 (pH8.5)，超声波细胞破碎仪的超声能量为 10% 制备雷替曲塞 pH 敏感脂质体。

2.6 pH 敏感脂质体的工艺确认

按最优处方制备 3 批雷替曲塞 pH 敏感脂质体 (批号：052401、052402 和 052403)，以外观性状、粒径及分布、多分散指数 (PDI)、Zeta 电位和包封率为评价指标对制备的 3 批 pH 敏感脂质体进行质量评价。052402 批样品的粒径分布和微观形态如图 2 所示，所制备的 3 批 pH 敏感脂质体为白色泛蓝色乳光的混悬液体，透射电镜下观察到所制备 pH 敏感脂质体大小均一圆整，平均粒径为 $(227.0 \pm 21.4)\text{nm}$ ，PDI 为 0.223 ± 0.061 ，Zeta 电位为 $(-44.2 \pm 3.6)\text{mV}$ ，包封率为 $(58.3 \pm 2.1)\%$ 。结果表明，按最优处方制备的 3 批样品，各项特性指标均符合要求，质量均一，工艺重现性

表 2 方差分析表 [$F_{0.05}(2,2)=19.00$]
Tab. 2 Variance analysis table [$F_{0.05}(2,2)=19.00$]

误差来源	偏差平方和	自由度	F 值	显著性
药脂比 (A)	147.582	2	5.868	无
缓冲液 pH(B)	108.336	2	4.308	无
超声能量 (D)	66.016	2	2.625	无
误差	25.15	2		

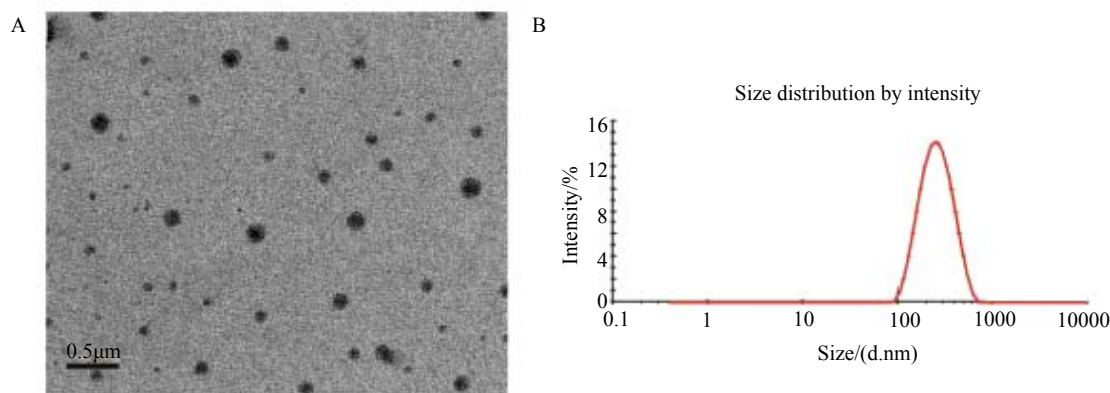


图 2 雷替曲塞 pH 敏感脂质体的透射电镜图及粒径分布
Fig. 2 The TEM and size distribute of raltitrexed pH-sensitive liposome

较好。

2.7 体外释放度考察

分别配置 pH 值为 5.0、6.0 和 7.4 的磷酸盐缓冲液各 25mL 作为体外释放介质，取所制备的载药脂质体 1mL 于透析袋（截留分子量 1000Da）中，将其置于上述释放介质内，采用恒温振荡法，分别于 0.5、1、2、4、6、8、12、24 和 48h 取样 1mL，补液 1mL，计算累积释放度，结果如图 3 所示，载药脂质体在不同 pH 介质中释放规律不同，在肿瘤组织的酸性环境即 pH5.0 和 pH6.0 的释放介质中，释放较快，在正常组织液环境即 pH7.4 的释放介质中，释放缓慢，pH 敏感作用明显。

2.8 细胞毒性试验

取对数生长期的 HCT-116 细胞悬液接种于 96 孔板，每孔 100μL（约 2000 个细胞），至于细胞培养箱内培养 24h。采用倍比稀释法配制药物浓度分别为 16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 和 0.0625μg/mL 的脂质体溶液作为载药脂质体组，空白脂质体组为相对应的脂质体浓度的溶液。每孔加入 100μL，每个浓度平行 5 孔，培养 72h。培养结束后每孔加入 10μL

CCK-8 溶液，在细胞培养箱内继续培养 2h，用酶标仪测定在 450nm 处的吸收值，计算其细胞存活率。结果表明在一定浓度范围内，空白脂质体无毒性，而载药脂质体抗结肠癌细胞的效果明显（图 4）。

3 结论与讨论

雷替曲塞 pH 敏感脂质体能够在肿瘤组织微环境（pH5.0~6.5）中快速释放，有较好的 pH 敏感作用。本研究通过处方条件的筛选和优化，成功制备了负载雷替曲塞的 pH 敏感脂质体。所制备的 pH 敏感脂质体具有适宜的理化性质，体外释放具有 pH 敏感的作用，体外细胞毒性试验证明了空白脂质体载体的安全性，载药脂质体制剂对 HCT-116 细胞的毒性较高。

对雷替曲塞药物进行理化性质研究，发现雷替曲塞为水溶性药物。由于水溶性药物的油水分配系数受介质的 pH 和离子强度影响较大、包封率条件不易控制，所以水溶性药物的包封效果往往不如脂溶性药物。除此之外，水溶性药物可同时分布在脂质体的内水相和外水相，外水相体积通常比内水相体积大得多，基于外水相的亲力和分散作用，药物

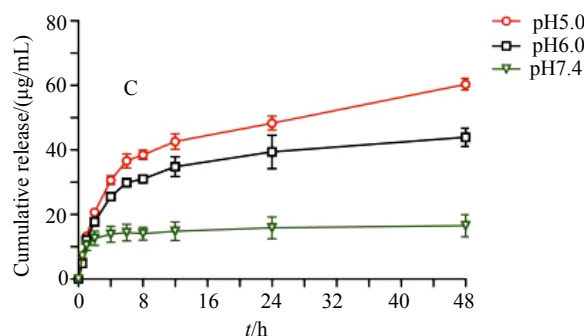


图 3 雷替曲塞 pH 敏感脂质体在 pH=5.0、6.0 和 7.4 条件下的体外释放度曲线 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig. 3 In vitro release profile of raltitrexed pH-sensitive liposome in PBS (pH=5.0, 6.0 and 7.4) ($n=3, \bar{x} \pm s$)

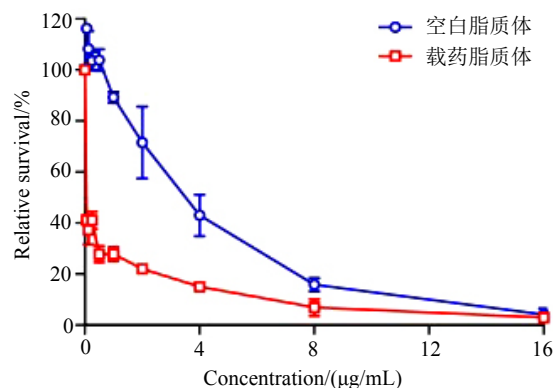


图 4 雷替曲塞 pH 敏感脂质体的细胞毒性 ($n=5, \bar{x} \pm s$)
Fig. 4 The cytotoxicity study of raltitrexed pH-sensitive liposome ($n=5, \bar{x} \pm s$)

更趋向于分布在外水相中。因此,常常采用主动载药法和逆相蒸发法等方法来制备包载水溶性药物的脂质体。通过前期预实验发现,由于 pH 敏感膜材料的存在,采用主动载药法制备雷替曲塞 pH 敏感脂质体较为困难;而逆相蒸发法所制得的雷替曲塞 pH 敏感脂质体包封率明显低于薄膜法所制备的 pH 敏感脂质体;所以最终确定雷替曲塞 pH 敏感脂质体的制备方法为冻融法。但是,采用冻融法制备的雷替曲塞 pH 敏感脂质体的包封率依旧只有 60% 左右。为了得到具有更高包封率的雷替曲塞 pH 敏感脂质体,本研究采用葡聚糖凝胶色谱柱或动态膜透析法,对所得雷替曲塞 pH 敏感脂质体中的游离药物进行分离,最终所得包封率可达到 90%。

参考文献

- [1] Lim S B, Banerjee A, Önyüksel H. Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers[J]. *J Control Release*, 2012, 163(1): 34-45.
- [2] Liu X, Huang G. Formation strategies, mechanism of intracellular delivery and potential clinical applications of pH-sensitive liposomes[J]. *Asian J Pharm Sci*, 2013, 8(6): 319-328.
- [3] Liu J, Huang Y, Kumar A, *et al.* pH-Sensitive nano-systems for drug delivery in cancer therapy[J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(4): 693-710.
- [4] Fan Y, Chen C, Huang Y, *et al.* Study of the pH-sensitive mechanism of tumor-targeting liposomes[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2017, 151(1): 19-25.
- [5] Sánchez M, Aranda F J, Teruel J A, *et al.* New pH-sensitive liposomes containing phosphatidylethanolamine and a bacterial dirhamnolipid[J]. *Chem Phys Lipids*, 2011, 164(1): 16-23.
- [6] Paliwal S R, Paliwal R, Vyas S P. A review of mechanistic insight and application of pH-sensitive liposomes in drug delivery[J]. *Drug Deliv*, 2015, 22(3): 1-12.
- [7] 戴蓉, 徐家根, 刁岩忠. 改进 HPLC 法测定雷替曲塞原料药中的光学异构体 [J]. *中国药房*, 2017, 30(1): 4295-4297
- [8] Lewis N L, Scher R, Gallo J M, *et al.* Phase I and pharmacokinetic study of irinotecan in combination with raltitrexed[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2002, 50(4): 257-265.
- [9] José María V, Manuel V, Ignacio P, *et al.* A randomized phase II study of raltitrexed and gefitinib versus raltitrexed alone as second line chemotherapy in patients with colorectal cancer(1839IL0143)[J]. *Invest New Drugs*, 2011, 29(5): 1038-1044.
- [10] 卢杉杉, 邵伟, 李荫, 等. pH 敏感脂质体的研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2014, 21(2): 166-169.