维普资讯 http://www.cqvip.com

论著 文章编号:0253-3626(2008)09-1096-03

TLC 法考察阿霉素脂质体的稳定性

赵俊义,朱 莉,胡春梅,潘黎军,王 驰

(重庆医科大学药学院药剂教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:通过以 TLC 分离阿霉素脂质体各组分及其降解产物,考察其作为阿霉素脂质体稳定性评价方法的适用性以及进行方法改进。方法:分别用 4 种 TLC 展开系统进行 2 次展开,用 4-甲氧基苯甲醛显色。结果:以氯仿-甲醇-水-氨水(65∶35∶2.5∶2.5)作展开剂,分离效果较好。结论:TLC 法操作简便、重复性好,可用作脂质体质量控制的一种方法。

【关键词】脂质体;TLC;阿霉素;稳定性;双展开法

【中国图书分类法分类号】R927.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-05

Investigation of the stability of adriamycin liposome by TLC

ZHAO Jun-yi, et al

(*Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abastract】*Objective*: To investigate the usability of TLC as a evaluating method for adriamycin liposome stability by separating its composition and degradation products with TLC and improve this method. *Methods*: The plates were developed twice with four development systems, visualized by 4-methoxybenzaldehyde. *Results*: It was better to separate EPC, cholesterol and their degradation products by using chloroform-methanol-water-ammonia(65∶35∶2.5∶2.5) as the mobile phase. *Conclusion*: TLC could be used for the quality control of the adriamycin liposome due to its simple operation and high reproducibility.

【Key words】 Liposome; TLC; Adriamycin; Stability; Double-development Method

阿霉素是蒽环类抗肿瘤抗生素,对急性白血病有明显疗效,对其它恶性肿瘤也有作用,但因其严重的心脏毒性[1],使其临床应用受到极大限制。利用脂质体作为药物载体[2],将阿霉素制备成脂质体,可提高阿霉素的靶向性,降低其心脏毒性,提高治疗指数。现已上市的阿霉素脂质体 Doxil,临床显示极大的提高了阿霉素的治疗指数。但是脂质体在储藏期间不稳定,易氧化和水解,导致药物泄露,增加了药物毒性。因此,脂质体在储藏期间的稳定性成了关键问题。

脂质体稳定性是脂质体质量控制中的一项重要指标。本文用 TLC 法考察脂质体的稳定性,国内未见文献报道。该法是先将阿霉素脂质体降解,以 TLC 分离溶液各组份,然后在显色剂下显色,根据斑点情况定性研究脂质体的稳定性。相对于其它方法,TLC 具有操作简单,无需大型仪器及特殊的样品处理,显色稳定的独特优势。

作者介绍:赵俊义(1981-),男,硕士,研究方向:靶向制剂。

通讯作者:王 驰,男,副教授,E-mail:wangchi639@sohu.com。

1 实验材料

卵磷脂标准品(上海东尚实业有限公司);卵磷脂原料药(中国医药集团上海化学试剂公司);胆固醇(中国医药集团上海化学试剂公司);阿霉素(浙江海正药业有限公司);4-甲氧基苯甲醛(国药集团化学试剂有限公司);硅胶 G(5μm,青岛海洋化工分厂);透析袋(MW8000~14400,北京鼎国试剂有限公司);层析缸、显色缸;甲醇、氯仿、冰醋酸、氨水等均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 标准溶液及分解产物的制备

2.1.1 卵磷脂标准溶液及分解产物的制备 称取 100mg 卵磷脂于试管中,加甲醇 5ml 得卵磷脂标准溶液(20mg/ml);另称取 100mg 卵磷脂于试管中,加入 0.5ml 37%(w/w)HCl,充分溶解,然后在 100℃的水浴中加热 30min,冷却至室温,再加入 10ml 氯仿进行提取,提取液作为卵磷脂的降解溶液备用。

2.1.2 胆固醇标准溶液及分解产物的制备 称取

维普资讯 http://www.cqvip.com

10mg 胆固醇于试管中,加氯仿 5ml 得胆固醇标准溶液(2mg/ml);胆固醇的降解溶液制备方法同卵磷脂。

2.1.3 阿霉素标准溶液的制备 称取 5mg 阿霉素于试管中,加甲醇 5ml 得阿霉素标准溶液(1mg/ml)。

2.2 阿霉素脂质体及降解溶液的制备

分别称取卵磷脂、胆固醇 72mg、28mg 于烧杯中,加入 10ml 氯仿,磁力搅拌充分溶解。然后 50℃旋转蒸发成膜,40℃干燥过夜。加 10ml 硫酸铵水化30min,超声 10min,得小单室空白脂质体,在 PBS 溶液中透析 3 次,每次用透析液 1 000ml,透析 6h。透析后的脂质体中加 5mg 阿霉素,40℃孵育 30min,得阿霉素脂质体。

取 5ml 阿霉素脂质体,加入甲醇至 20ml,超声 10min,得阿霉素脂质体溶液;另取 5ml 阿霉素脂质体,在 45℃的水浴中加热 24h,加入甲醇至 20ml,超声 10min,得脂质体的降解溶液。

2.3 TLC 条件选择

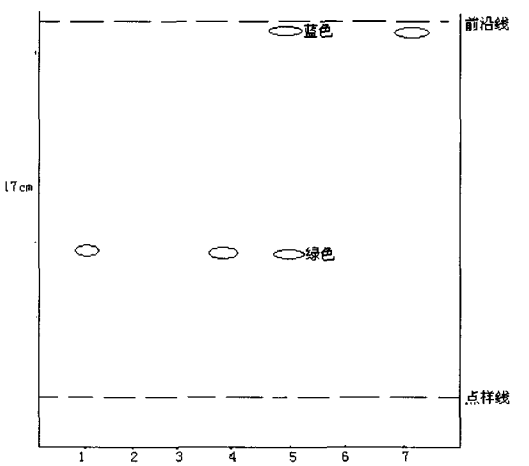
TLC 板的制备:称取羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 2.4g,加蒸馏水 300ml,100℃加热溶解,冷却取上清液,然后缓慢加入到 120g 硅胶 G 中,边加边顺时针搅拌,混匀后铺板(10cm×20cm),待薄板自然晾干,置烘箱中 110℃烘烤、30min 后取出,于干燥器中保存备用。

展开剂:考察了 4 种展开系统的分离效果,结果见表 1。

显色剂:1%(V/V)的 4- 甲氧基苯甲醛[4]。溶液的配制:4- 甲氧基苯甲醛 -98% 硫酸 -98% 醋酸 - 乙醇 - 水(1∶2∶10∶60∶30)。

2.4 TLC 过程

采用单向双展开法进行展开。分别用毛细管吸取上述溶液在点样线上等距离点样(见图 1),在预先用展开剂饱和 30min 的层析缸中展开(展距17cm,1.5h),取出后室温下(25℃)凉干,红色斑点为阿霉素斑点。为了使分离效果更好,在同一方向进行第 2 次展开,操作同第 1 次。当展开后,用电吹风把展开剂吹干,把 TLC 板浸入 4- 甲氧基苯甲醛显色缸中,10s后取出,110℃烘烤 8min,取出后 12min,在黑色背景上显绿、蓝色的斑点,且斑点颜色稳定,蓝色斑点代表胆固醇及其降解产物,绿色斑点代表卵磷脂及其降解产物。每种溶液进行 3 次平行实验。



1. 卵磷脂标准品; 2. 卵磷脂的降解溶液; 3. 阿霉素标准品; 4. 鲜制脂质体; 5. 降解后脂质体; 6. 胆固醇降解溶液; 7. 胆固醇标准品

图 1 卵磷脂、胆固醇与其降解产物的分离图谱
展开剂:氯仿-甲醇-水(65:25:4)

表 1 卵磷脂、胆固醇、阿霉素与其降解产物在不同展开剂中的 Rf 值(n=3)

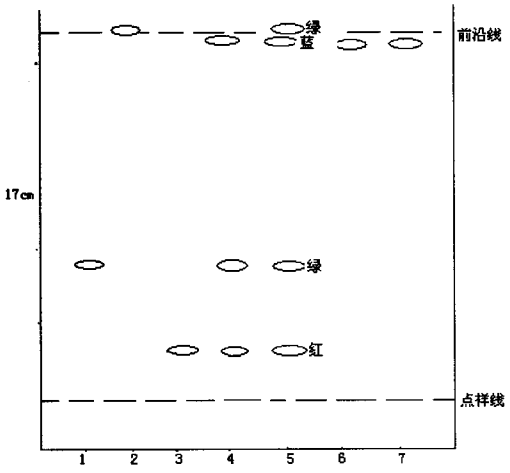
分析物	展开剂			
	系统 1	系统 2	系统 3	系统 4
卵磷脂标准品	0.38	0.34	0.86	0.38
卵磷脂的降解溶液	0.96	1.00	0.96	0.63
胆固醇标准品	—*	0.98	0.98	0.95
胆固醇降解溶液	—*	0.98	0.92	0.75
阿霉素标准品	0.38	0.10	0.25	0.19
鲜制脂质体	0.38,0.96	0.10,0.34,0.98	0.25,0.86,0.98	0.19,0.38,0.95
降解后脂质体		0.10,0.34, 0.98,1.00	0.25,0.74,0.86, 0.92,0.98	0.19,0.38,0.63, 0.65,0.75,0.95

(—*)表示没展开。系统 1:氯仿 - 甲醇 - 水(65∶25∶4);系统 2:乙酸乙酯 - 环已烷(35∶35);系统 3:氯仿 - 甲醇 - 丙酮 - 水 - 乙酸(30∶10∶40∶5∶10);系统 4:氯仿 - 甲醇 - 水 - 氨水(65∶35∶2.5∶2.5)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

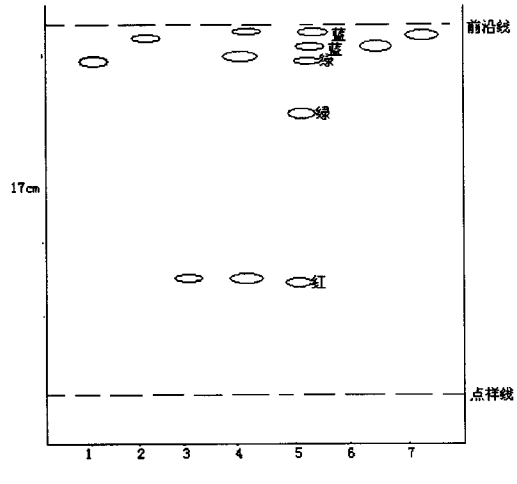
2.5 结果

通过比较，以系统 4 作展开剂，阿霉素脂质体各组分及其降解产物能达到良好的分离，除 R_f 值为 0.63 和 0.65 的 2 个斑点外，分离度均大于 1.5。TLC 图谱见图 4，计算 R_f 值（见表 1）。



1. 卵磷脂标准品； 2. 卵磷脂的降解溶液； 3. 阿霉素标准品； 4. 鲜制脂质体； 5. 降解后脂质体； 6. 胆固醇降解溶液； 7. 胆固醇标准品

图 2 卵磷脂、胆固醇与其降解产物的分离图谱
展开剂：乙酸乙酯-环己烷（35:35）

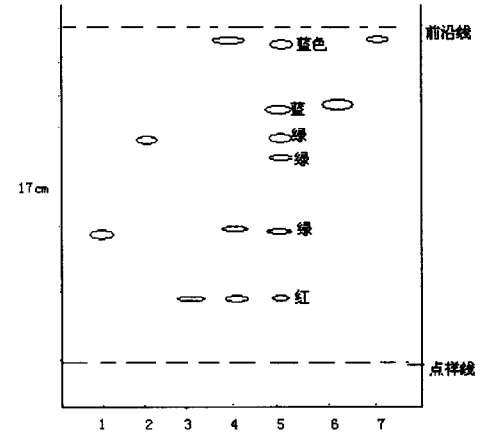


1. 卵磷脂标准品； 2. 卵磷脂的降解溶液； 3. 阿霉素标准品； 4. 鲜制脂质体； 5. 降解后脂质体； 6. 胆固醇降解溶液； 7. 胆固醇标准品

图 3 卵磷脂、胆固醇与其降解产物的分离图谱
展开剂：氯仿-甲醇-丙酮-水-乙酸（30:10:40:5:10）

3 讨 论

脂质体在储藏期间膜材易发生氧化和水解。卵磷脂的降解包括氧化和水解，氧化主要发生在不饱和脂肪链上，最终导致不饱和脂肪链的断裂，生成



1. 卵磷脂标准品； 2. 卵磷脂的降解溶液； 3. 阿霉素标准品； 4. 鲜制脂质体； 5. 降解后脂质体； 6. 胆固醇降解溶液；7. 胆固醇标准品

图 4 卵磷脂、胆固醇与其降解产物的分离图谱
展开剂：氯仿-甲醇-水-氨水（65:35:2.5:2.5）

多种过氧化物，水解生成溶血卵磷脂和脂肪酸，溶血卵磷脂在体内具有很强的溶血作用；胆固醇氧化生成毒性的 7-酮固醇。为了防止阿霉素脂质体在降解过程中药物泄露和产生一系列毒性产物，对它的稳定性进行考察非常必要。

脂质体稳定性的考察方法有：外观检查（颜色、絮凝）、显微镜检查（晶体）、pH 值测定（磷脂水解）、过氧化值测定（磷脂氧化）、包封率测定、HPLC 法[3]（测定脂质体各组份及降解产物）等，常用方法是测定包封率。在脂质体的几种稳定性考察方法中，外观检查和 pH 值测定的灵敏度不高；包封率测定虽然能直接反映脂质体的稳定性，但是操作繁琐，需要定量取样过柱或离心分离；HPLC 法虽然能定量测定阿霉素脂质体各组分及其降解产物，但卵磷脂、胆固醇和降解产物在紫外光下无吸收，需要使用特殊的检测器，如蒸发光散射检测器，或衍生化使之有紫外吸收，这些都需对样品做特殊的制备和提取，使分析复杂化。本文所用 TLC 方法能克服上述方法的不足，操作简便、斑点显色稳定，能作为阿霉素脂质体稳定性考察的一种方法，是否能对其它脂质体的稳定性进行研究还需做进一步的实验。

从实验结果来看，TLC 能很好的分离卵磷脂、胆固醇、阿霉素与其降解产物。图 1 显示(5)比(4)多3个斑点，其中蓝色斑点为胆固醇的降解产物，绿色斑点为卵磷脂分解生成的两种脂肪酸，说明脂质体在

（下转第 1102 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

织的干扰而产生伪影,影响图像质量。故提出,在实际应用中,若能将 MRI T-Map 与二维解剖图像有效结合起来,监控效果更佳。前者动态监控 HIFU 辐照过程中靶区域的温度变化,从而调控超声剂量,避免过度及不足损伤,后者 HIFU 术前定位,术中焦域的引导,避免遗漏病灶或损伤周围正常组织,及术后凝固性坏死的评价和随访。

近年来,国外已有学者成功地将磁共振引导的聚焦超声治疗系统应用于子宫肌瘤和肝脏、肾脏、骨及前列腺肿瘤的临床治疗中,且对于其他疾病如动静脉畸形等的临床应用也在积极的探讨和摸索中[5-9]。目前该方面的研究大多停留在动物实验和Ⅰ期临床试验阶段。本研究亦仅为初步的探索性实验,相信随着实验设备的不断改进,MRI 测温技术的进一步发展及 T-Map 与二维解剖图像更加紧密的结合,MRI 在聚焦超声治疗术中发挥的作用将有着不可比拟的优势。

参 考 文 献

[1] Cohen ZR,Zaubermann J,Harnof S,et al. Magnetic resonance imaging-guided focused ultrasound for thermal ablation in the brain: a feasibility study in a swine model[J]. Neurosurgery,2007;60(4):593-600.

[2] Ram Z,Cohen ZR,Harnof S,et al. Magnetic resonance imaging-guided,high-intensity focused ultrasound for brain tumor therapy [J]. Neurosurgery,2006;59(5):949-956.

[3] Gorny KR,Hanqiandreou NJ,Hesley GK,et al.MR guided focused ultrasound:technical acceptance measures for a clinical system [J]. Phys Med Biol,2006;51(12):3155-3173.

[4] Quesson B,de Zwart JA,Moonen CT.Magnetic resonance temperature imaging for guidance of thermotherapy[J]. Magn Reson Imaging, 2000;12(4):525-533.

[5] Rabinovici J,Inbar Y,Revel A,et al.Clinical improvement and shrinkage of uterine fibroids after thermal ablation by magnetic resonance-guided focused ultrasound surgery[J]. Ultrasound Obstet Gynecol,2007;30(5):771-777.

[6] Stewart EA,Gostout B,Rabinovici J,et al.Sustained relief of leiomyoma symptoms by using focused ultrasound surgery[J]. Obstet Gynecol,2007;110(2 pt 1):279-287.

[7] Gedroyc WM,Anstee A.MR-guided focused ultrasound[J]. Expert Rev Med Devices,2007;4(4):539-547.

[8] Pauly KB,Diederich CJ,Rieke V,et al. Magnetic resonance-guided high-intensity ultrasound ablation of the prostate[J]. Top Magn Reson Imaging,2006;17(3):195-207.

[9] Gedroyc WM.New clinical applications of Magnetic resonance-guided focused ultrasound[J]. Top Magn Reson Imaging,2006; 17(3):189-194.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 1098 页)

该条件下不稳定,组成成份发生了降解。我们也考察了脂质体在常温下放置 10d 后的情况,在 TLC 板上出现明显的降解产物斑点,但 pH 值变化不明显,表明 TLC 方法比其它方法灵敏。

在 4 种展开系统中,系统 1 不能对降解产物展开;系统 2 中卵磷脂降解产物的迁移速度过快,且不能把胆固醇标准品与降解产物分离;系统 3 各组分的分离度不大,只有系统 4 能很好的分离各组分,因此选择系统 4 作为最佳展开剂。系统 4 中所含少量氨水的主要作用是调整展开剂的 pH,使分离斑点集中,减少拖尾现象。比较系统 3 与系统 2、4 可发现,由于系统 4 展开剂中含有丙酮后卵磷脂的 R_f 值增大,说明丙酮有助于卵磷脂的分离。

以系统 4 作为展开剂时,要达到很好的分离需 1.5h。有文献报道,采用反相 TLC 后时间缩短至0.5h,而且斑点小,定量准确。该法所用的 TLC 板在硅胶上键合了 C_{18} 链。如果能以溶血卵磷脂、过氧化物、多种脂肪酸标准品对照,确定脂质体的降解产物,并对它们进行薄层扫描,测定每种产物的含量,则能够准确知道脂质体在不同时间发生的降解情况,更易于控制好条件减少脂质体在储藏期间的降解,这些都有待做进一步的工作。

参 考 文 献

[1] Quiles J,Huertas JR,Battino M,et al. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity[J]. Toxicology,2002;180(1):79-95.

[2] Alfred Fahr,Liu XL. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs[J]. Expert Opin Drug Deliv,2007;4(4):403-416.

[3] Homan R,Anderson MK. Rapid separation and quantitation of combined neutral and polar lipid classes by high-performance liquid chromatography and evaporative light-scattering mass detection[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl,1998;708(2):21-26.

[4] Gabriels M,Brisaert M,Plaizier-Vercammen J. Densitometric thin layer chromatographic analysis of tretinoin and erythromycin in lotions for topical use in acne treatment[J]. Eur J Pharm Biopharm,1999; 48(1):53-58.

(责任编辑:关蕴良)