

# 脂质体中卵磷脂的氧化产物与溶血的关系

翁帼英 陈明非\* 王玲玲

(南京药物研究所)

卵磷脂是构成脂质体膜的基本骨架,其化学性质不稳定,易氧化水解,氧化产物直接影响脂质体的密封率,且增加毒性<sup>[1,2]</sup>。作者曾用氧化指数作为检测卵磷脂氧化的质量指标<sup>[1]</sup>,但不理想,无法定量,且易受脂质体中其它组分干扰。根据卵磷脂氧化产物丙二醛(MDA)在酸性条件下可与硫巴比妥(TBA)反应,生成红色颜色(TBA-Pigment),在535nm处有特异吸收,可反映脂的氧化程度。我们参考Buege<sup>[3]</sup>的TBA-MDA的方法,略做修改,设计了一种简便、快速、灵敏的测定MDA含量的方法,并观察了卵磷脂氧化与溶血的关系及维生素E(Vit E)对卵磷脂的抗氧化作用。

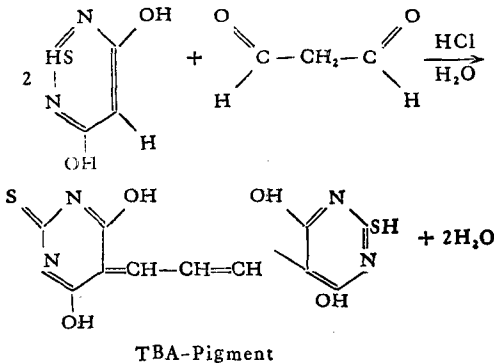
## 材料与 方法

### 1. 材料

蛋黄卵磷脂(自制,层析一个点);胆固醇(分析纯);十八胺(本所合成);氮甲喋呤;硫巴比妥酸,三氯醋酸(分析纯);维生素E。

### 2. 测定MDA方法

蛋黄卵磷脂系不饱和类脂,其氧化的最初阶段形成共轭二烯,然后形成环状的过氧化物,最后生成丙二醛及其他短链的醛酸等<sup>[4]</sup>。丙二醛在酸性条件下与硫巴比妥酸发生下面的化学反应:



红色产物在535nm处有特异吸收,吸收系数为4780。

三氯醋酸(TCA)75g, TBA1.875g, 加0.25mol/L 盐酸500ml, 温热溶解, 滤纸过滤。

精密量取MTX脂质体1ml, 置10ml容量瓶中, 加入TCA-TBA-HCl试液5ml, 混匀, 100℃水浴30min, 放冷, 加TCA-TBA-HCl试液至刻度, 混匀后4000r/min离心5min, 以TCA-TBA-HCl试液为空白, 测定535nm处的吸收值。

## 结果与 讨论

**1. 吸收光谱的稳定性** 在TBA-MDA试验中, 我们观察了加热反应时间, 放置时间, 以及光线对吸收光谱的影响(图1, 2)。从图1可以看出100℃水浴15min, 反应尚未完全, 继续加热至25min, 吸收值增加, 加热时间延长至40min, 吸光值基本不变。实验表明100℃水浴25min, TBA-MDA反应已基本完全, 且红色(TBA-Pigment)在加热100℃情况下是稳定的。图2表明光线对TBA-Pigment的吸收光谱有影响, 曝光放置24h, 535nm处的吸收值下降5.87%。

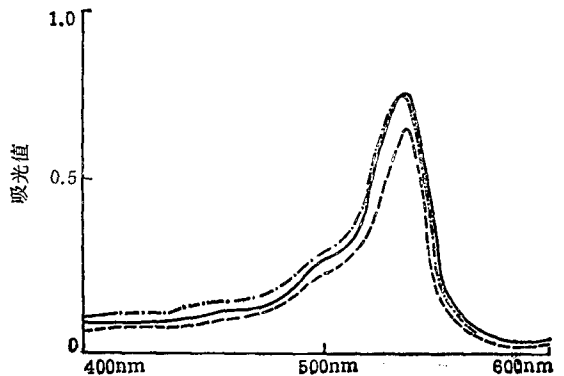


图1 加热时间对吸收光谱的影响

----: 加热15min —: 加热25min  
- · - : 加热40min

**2. MTX脂质体其他组分对吸收光谱的影响** 我们观察了MTX脂质体的其他成分: 胆固醇(Chol), 十八胺(Stem), MTX及维生素E(Vit E)对TBA-MDA试验吸收光谱535nm无影响(图略)。

\* 福建省卫生学校药剂教研室。

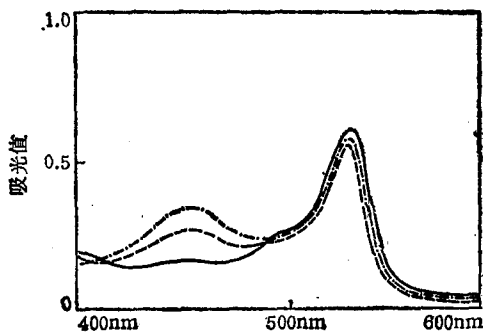


图2 光线对吸收光谱的影响

—: 反应完全立即测定    ---: 曝光放置 3h  
- · -: 曝光放置 4h

3. 从表1可以看出不同批号不同温度下长期放置的MTX脂质体中MDA的量均有所增加。37°C长期存放的样品MDA量均高于冰箱内存放的样品。45°C恒温水浴20天(批号810923, 820603), 535nm的吸收值增加一倍。

表1 不同放置条件下MDA的含量

批号	PC mg/ml	放置时间	MDA $\mu\text{g}/10\text{mg PC}$	
			冰箱	37°C
810923	11mg/ml	1年4个月	0.198	0.320
820603	25mg/ml	7个月	0.115	0.136

实验表明测定MTX脂质体中MDA量可以反应脂质体中类脂的氧化程度。

4. MTX脂质体中其他组分对氧化指数测定的干扰 MTX脂质体的其他组分Chol, Stem, MTX, Vit E等对氧化指数的测定均有干扰,使PC(磷脂酰胆碱)的吸收光谱发生变化, 215nm的吸收峰偏离或吸收值增加,使 $A_{233}$ 与 $A_{215}$ 的比值(即氧化指数)发生改变。这表明氧化指数不能用作MTX脂质体氧化程度的测定。

### 5. 卵磷脂的氧化程度与溶血的关系

1) 取精制的蛋黄卵磷脂,曝光于空气中。间隔一定天数精密称取卵磷脂200mg几份,分别溶于10ml 0.9%的NaCl溶液中,超声制成空白脂质体(含PC 20mg/ml),充 $N_2$ 后,冰箱存放,供做溶血试验及测定MDA用。

2) 间隔一定天数,取适量PC(约10mg),溶于无水乙醇中(约20ml),测定其氧化指数。结果表明,在最初阶段,氧化指数急骤上升,而后逐渐缓慢,当氧化指数达到1.2左右时,不再上升趋于稳定。重复实验,结果相同。在5天内,氧化指数保持在1.22左右。这表明氧化指数仅反映氧化初始阶段产生共轭二烯的

程度,它不能反映氧化产物进一步的增加。而相同条件下测得MDA量仍随时间增加而增加。

3) 溶血试验 2%血球混悬液的配制: 取兔血10-20ml,用玻璃棒搅拌,除去纤维蛋白,再用0.9% NaCl溶液冲洗,离心,反复三次,除去上清液至上清液不呈红色为止。然后取血球2ml,用0.9% NaCl溶液稀释至100ml。

取待测样品(含PC 20mg/ml) 2ml于试管中,加2%血球混悬液2ml,混匀,37°C存放0.5, 1, 2, 3h,离心,观察是否溶血。结果表明,氧化指数在0.8以下的样品,37°C, 3h均不溶血,MDA含量超过0.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 以上的氧化卵磷脂(20mg/ml)可造成溶血,因氧化指数仅表示 $A_{233}$ 与 $A_{215}$ 的比值,不能作为定量测定,且卵磷脂进一步氧化后,氧化指数变化不明显。实验证明采用测定氧化卵磷脂中MDA含量的方法反映其氧化程度是适合的。当每ml含20ng卵磷脂的生理盐水溶液中含丙二醛超过2 $\mu\text{g}$ 时,37°C 2h即可产生溶血。丙二醛含量越高,溶血越严重。

此外,在MTX脂质体安瓿中,分别充 $N_2$ ,  $O_2$ 于45°C恒温水浴中放置20天后,测定MDA量分别为0.178 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和0.186 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,溶血试验表明,37°C未见溶血,与上述实验相符。

### 6. Vit E对卵磷脂的抗氧化作用

取一定量的卵磷脂与Vit E,同溶于氯仿中减压抽去氯仿,然后曝光,空气中存放20天后测定MDA的含量及外观变化(表2)

表2 Vit E对卵磷脂的抗氧化作用

样品	MDA含量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )		外观	
	第1天	第20天	第1天	第20天
不含Vit E	0.0884	0.2512	白	黄
含5% Vit E	0.0884	0.0242	白	白
含10% Vit E	0.0884	0.0284	白	白

表2表明Vit E对卵磷脂具有较强的抗氧化作用。在空气中放20天MDA外观未起变化,其含量未增加。这可能为提高脂质体中卵磷脂的稳定性提供了一个方法。

### 参 考 文 献

- 李煊杞等. 药学报, 1982; 17(3): 218
- Rahman Y-E et al. J Lab Clin Med, 1974; 83: 640
- Buege, J A et al. Method in Enzymology, 1978; 50: 302
- Gray, J I et al. J American oil Chem Soc, 1978; 55: 539

[本文于1988年10月4日收到]