

纳米银乳膏在烧伤模型大鼠血浆及组织中银的分布[△]

孙倩^{1,2*}, 马守栋^{2#}, 李明春²(1.青岛大学药学院, 山东青岛 266071; 2.解放军401医院, 山东青岛 266000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)05-0405-02

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.05.08

摘要 目的:研究纳米银乳膏在烧伤模型大鼠血浆及组织中银的分布。方法:建立大鼠5%体表总面积(5 cm×5 cm)深Ⅱ度蒸气烧伤模型,分为纳米银乳膏组、磺胺嘧啶银乳膏组、基质对照组,每组8只,分别于受伤感染处涂药0.1~0.2 cm厚,每日1次,连续30 d,停药24 h后处死大鼠,利用电感耦合等离子体质谱仪测定各组大鼠血浆和心、肝、脾、肾组织中的银含量。仪器条件:射频功率为1 250 W,脉冲电压为1 200 V,雾化气流速为0.80 L/min,等离子气流速为15 L/min。结果:银检测质量浓度的线性范围为0.01~10.00 μg/ml($r=0.999\ 9$),加样回收率为(93.2±3.3)%~(112.5±1.0)%,RSD<3.5%($n=8$)。与基质对照组比较,磺胺嘧啶银乳膏组大鼠的血浆和心、肝、脾、肾组织中银含量均明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),而纳米银乳膏组大鼠仅脾组织中银含量明显增加($P<0.05$)。结论:纳米银乳膏在大鼠血浆和除脾以外的各组织中无明显蓄积。

关键词 电感耦合等离子体质谱仪;纳米银;乳膏;大鼠;烧伤

Distribution of Silver in Plasma and Tissues of Burnt Rats with Nano-silver Cream

SUN Qian^{1,2}, MA Shou-dong², LI Ming-chun²(1.Dept. of Pharmacy, Qingdao University, Shandong Qingdao 266071, China; 2.No. 401 Hospital of PLA, Shandong Qingdao 266000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the distribution of silver in plasma and tissues of burnt rats with Nano-silver cream. METHODS: Deep II degree scald model of 5% total body surface area (5 cm×5 cm) of rats was established and randomly divided into Nano-silver cream group, Flamazine cream group and base control group with 8 rats in each group. They were applied cream to injured infection site coating with 0.1-0.2 cm, once a day for consecutive 30 d. Rats were sacrificed 24 h after drug withdrawal. The contents of silver in plasma, heart, liver, spleen and kidney were determined by ICP-MS. The condition of determination was as follows: radio-frequency power 1 250 W, impulse voltage 1 200 V, flow velocity of atomizing gas 0.80 L/min, flow velocity of plasma gas 15 L/min. RESULTS: The linear range of silver was 0.01-10.00 μg/ml ($r=0.999\ 9$) with recoveries of (93.2±3.3)%-(112.5±1.0)% (RSD<3.5%, $n=8$). Compared with base control group, the contents of silver in plasma, heart, liver, spleen and kidney increased significantly in Flamazine cream group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the contents of silver in only spleen increased significantly in Nano-silver cream group ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Results show that no significant accumulations of Nano-silver cream in plasma and tissue except spleen of rats.

KEY WORDS ICP-MS; Nano-silver; Cream; Rats; Burn

纳米银粒子由20~15 000个银原子按照一定顺序排列组成,具有独特的理化特性和生物特性。其作为一种新型高效无机抗菌材料^[1],在医学、生物学、环境保护等领域得到了广泛应用,表现出良好的抗菌杀菌作用。但银作为重金属中的一种,如过量吸收会对肝脏等组织器官产生毒副作用。因此,有必要建立快速准确测定生物样品中银含量的方法。目前,测定银含量的方法主要有电化学方法^[2]、紫外分光光度法^[3]、原子吸收法^[4-8]、催化动力学光度法^[9],其中最常用的方法为原子吸收法。这些方法有些操作简单但灵敏度不高,有些灵敏度高但对样品处理要求较高,且测定的样品多为土壤、水质和矿物质,而测定生物样品中银含量的研究较少。电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)灵敏度高、速度快、谱线简单、干扰相对于光谱技术少、动态线性范围宽,具有很低的检测限,测定RSD可到0.1%。笔者采用ICP-MS测定纳米银乳膏^[10]在烧伤模型大鼠血浆及组织中的银分布,对预测纳米银的毒性有积极作用,为纳米银早日成药提供依据。

△ 基金项目:国家重大新药创新科技重大专项资助项目(No.2008ZXJ09004-045)

* 硕士研究生。研究方向:临床药理学。E-mail: lcsunqian@163.com

通信作者:副主任药师,博士。研究方向:药剂学、药理学。电话:0532-872904。E-mail: leima517@126.com

1 材料

1.1 仪器

702型超低温冰箱(美国Thermo公司);AE240型电子分析天平(美国Mettler公司);Elan DRC II型ICP-MS(美国Perkin Elmer公司)。

1.2 药品与试剂

磺胺嘧啶银乳膏(江门市恒健药业有限公司,批号:091003,规格:每支40 g);乳膏基质、纳米银乳膏(规格:20 μg/g)均由解放军第401医院药厂药研室自制;银标准溶液(中国海洋研究所,标准编号:GBW08610,规格:1 000 μg/ml)。

1.3 动物

成年SD大鼠24只,♀♂各半,由青岛药物研究所中心提供,动物生产许可证号:SCXK(鲁)2011-0007。实验前7 d使大鼠熟悉实验室环境,自由摄食饮水。

2 方法

2.1 工作条件设置

仪器操作条件及主要测定参数如下:射频功率为1 250 W,脉冲电压为1 200 V,雾化气流速为0.80 L/min,等离子气流速为15 L/min。数据采集模式采用跳峰模式。

2.2 建模

实验前24 h用8%硫化钠脱去大鼠后背及臀部毛,面积约5 cm×5 cm,用乙醚麻醉,取仰卧位将大鼠脱毛处置于带侧枝

的圆底烧瓶口上(内径25 mm,瓶口温度98 ℃),蒸气熏蒸9 s,造成5%体表总面积深Ⅱ度蒸气烧伤模型^[1]。

2.3 分组与给药

将模型大鼠随机分为纳米银乳膏组、磺胺嘧啶银乳膏组、基质对照组,每组8只,分别于受伤感染处涂药0.1~0.2 cm厚,每日1次,连续30 d。大鼠单笼饲养,并用胶带将颈部固定,防止舔舐药物,第30天时大鼠创面愈合完全。

2.4 标准曲线的建立

将银标准溶液经1% HNO₃逐步稀释制备成0.01、0.50、1.00、5.00、10.00 μg/ml的银标准工作溶液,在“2.1”项仪器参数条件下,以银标准工作溶液的质量浓度(x)为横坐标,测得分析峰的响应值(y)为纵坐标,建立标准曲线。得回归方程为y=0.312 7x+0.001 3(r=0.999 9),结果表明银检测质量浓度的线性范围为0.01~10.00 μg/ml。

2.5 检测限考察

以1% HNO₃作为银标准的空白溶液,对其重复测定10次,得到3倍标准偏差对应的浓度值,即为本方法的检测限。结果检测限为0.980 ng/ml,说明ICP-MS测定银含量的灵敏度较高,可以满足生物样品中银含量的测定要求。

2.6 精密度考察

取1.00、5.00、10.00 μg/ml的银标准工作溶液,按照“2.1”项仪器参数条件设置,测定其中的银含量,重复测定8次。结果,1.00、5.00、10.00 μg/ml的银标准工作溶液中银的质量浓度分别为(1.21±0.02)、(5.03±0.13)、(10.07±0.21) μg/ml,RSD分别为1.65%、2.58%、2.09%(n=8),说明方法精密度良好。

2.7 加样回收率试验

取基质对照组大鼠的肝脏样本20份,每份约0.2 g,5份为一组,分为空白组和低、中、高水平(0.1、1.0、10.0 μg/ml)组,精密称定后置于高效防腐消解罐中,分别加入对应质量浓度的银标准工作溶液0.25 ml,再加入2 ml的MOS级(高纯)硝酸密闭,移入150 ℃烘箱中加热12 h后转移至25 ml量瓶中,定容,摇匀,用ICP-MS测定组织和器官中的银含量。按公式:(测得值-空白组测得值)×0.2/(加入量×0.25)×100%计算加样回收率。结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 1 Result of recovery tests($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	加入量, μg/ml	测得值, μg/g	加样回收率, %	RSD, %
空白组	0	0.029		
低水平组	0.1	0.146	93.2±3.3	3.5
中水平组	1.0	1.436	112.5±1.0	0.9
高水平组	10.0	13.505	107.8±1.3	1.2

2.8 银含量测定

将创面愈合完全的各组大鼠停药24 h后处死,取血,解剖,称取心、肝、脾、肾组织各0.2 g,置于高效防腐消解罐中,加入2 ml的MOS级硝酸密闭,移入150 ℃烘箱中加热12 h后转移至25 ml量瓶中,定容,摇匀。按照“2.1”项下设置的仪器参数,测定各组大鼠血浆和心、肝、脾、肾组织中的银含量。结果表明,与基质对照组比较,磺胺嘧啶银乳膏组大鼠血浆和心、肝、脾、肾组织中的银含量均明显增加(P<0.05或P<0.01),而纳米银乳膏组大鼠仅脾组织中银含量明显增加(P<0.05)。表明纳米银在保证疗效的同时也减少了银在血浆和组织中的蓄积。各组大鼠血浆和组织中痕量银分布情况见表2。

3 讨论

纳米银粒径小、表面积大,物理、化学和生物活性均较高,带来了正面效应,也存在负面效应。纳米银能够通过呼吸道、消化道、暴露皮肤及其他途径进入体内,并很有可能在多个组

表2 各组大鼠血浆和组织中痕量银分布情况($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Distribution of trace silver in plasma and tissues of rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	心脏, μg/g	脾脏, μg/g	肝脏, μg/g	肾脏, μg/g	血浆, μg/ml
纳米银乳膏组	0.211 7±0.070 1	0.412 6±0.089 1*	0.231 5±0.031 2	0.298 6±0.037 1	0.231 3±0.015 2
磺胺嘧啶银乳膏组	1.378 6±0.238 3*	2.097 6±0.196 9**	1.567 2±0.135 8*	1.769 1±0.172 1*	1.471 3±0.215 7*
基质对照组	0.125 7±0.014 6	0.146 2±0.015 3	0.127 9±0.015 8	0.156 2±0.017 1	0.135 7±0.092 5

与基质对照组比较: *P<0.05, **P<0.01

vs. base control group: *P<0.05, **P<0.01

织器官中分布蓄积,从而造成病理损害。因此有必要研究纳米银在体内的分布和蓄积情况,以此了解纳米银在体内迁移、分布和蓄积的生物学特性。这就首先需要建立一种快速准确地测定生物样品中银含量的方法。

相对于传统的电化学方法、紫外分光光度法、原子吸收法、催化动力学光度法等检测痕量银的方法,本研究采用ICP-MS,检测限为0.980 ng/ml,加样回收率为(93.2±3.3)%~(112.5±1.0)%。表明用ICP-MS测定银含量具有极低的检测限和较宽的线性范围,加样回收率较高,是一种痕量元素的强有力的分析技术。进一步用该方法测定组织和血浆中的银含量,结果表明纳米银作为一种新型抗菌材料,较磺胺嘧啶银可以有效地减少银的蓄积,因此纳米银较磺胺嘧啶银有较低的毒性。但其进入体内的方式以及对各组织器官中细胞的影响还需进一步深入研究,探讨其产生毒性的机制,从而使纳米银更好、更安全地服务于临床。

参考文献

- [1] 赵婷,戴红,许伟,等.纳米抗菌材料及其在制革领域的应用[J].中国皮革,2005,34(17):31.
- [2] Song FY, Shiu KK. Preconcentration and electroanalysis of silver at polypyrrole film modified glassy carbon electrodes[J]. *J Electroanal Chem*, 2001, 498(1/2): 161.
- [3] 白祖海,周方钦,周含英,等.银(I)催化抗坏血酸还原偶氮胂Ⅲ反应的研究及痕量银的测定[J].分析实验室,2004,23(1):56.
- [4] 孙建民,徐鹏,韩雪涛,等.壳聚糖富集-火焰原子吸收法测定痕量银[J].光谱学与光谱分析,2005,25(2):290.
- [5] 钱沙华,邓红兵,汪光,等.交联壳聚糖预富集分离-石墨炉原子吸收光谱法测定痕量银[J].分析科学学报,2007,23(1):37.
- [6] 胡曙光,彭荣飞,连晓文,等.石墨炉原子吸收光谱法快速测定天然矿泉水中铬镍和银[J].理化检验:化学分册,2005,41(7):509.
- [7] Wang ZH, Zhang HZ, Zhou SP, et al. Determination of trace metoclopramide by anodic stripping voltammetry with nafion modified glassy carbon electrode[J]. *Talanta*, 2001, 53(6): 1 133.
- [8] 黄荣辉,周方钦,刘正华,等.固载硫杂杯芳烃树脂分离富集-火焰原子吸收法测定痕量银[J].分析化学,2007,35(1):99.
- [9] 吕菊波,徐强,孙琳.催化动力学光度法测定微量银[J].分析实验室,2006,25(4):76.
- [10] 马守栋,李明春,曹恩惠,等.纳米银乳膏的制备及质量控制[J].中国药房,2011,22(37):3 515.
- [11] 王金辉,郭涛,赵立春.复方虎杖蜂房喷雾剂治疗烧伤的药效学研究[J].中成药,2007,29(7):1 066.

(收稿日期:2012-07-13 修回日期:2012-09-04)

不同浓度二甲基亚砷对白色念珠菌的抑菌作用研究[△]

崔光富^{1*}, 刘瑞琪¹, 郭巧梅¹, 崔晶晶¹, 贺晓丹², 郭庆合¹, 贺志安^{1#} (1. 新乡医学院医学检验系, 河南新乡 453000; 2. 新乡医学院药学院, 河南新乡 453000)

中图分类号 R914.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)05-0407-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.05.09

摘要 目的: 探讨不同浓度二甲基亚砷(DMSO)对白色念珠菌的抑菌作用。方法: 用稀释法在含有0.14、0.42、0.70、0.99、1.27、1.55 mol/L 6个梯度DMSO的培养基中培养白色念珠菌24 h; 加入DMSO作为阳性对照组; 加入沙保罗液体培养基作为阴性对照组。计算白色念珠菌在不同浓度DMSO中的生长抑制率和芽管萌发抑制率。结果: DMSO浓度为0.14 mol/L时, 白色念珠菌生长活跃, 生长抑制率和芽管萌发抑制率与相应的阴性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 浓度 ≥ 0.42 mol/L时, 2~4 h时90%最小抑菌浓度(MIC₉₀)为0.70 mol/L, 芽管萌发MIC₉₀为0.70 mol/L; 浓度达到1.55 mol/L时, 无活菌体存在(生长抑制率达100%)。DMSO浓度 > 0.42 mol/L时, 生长抑制率和芽管萌发抑制率与各自的阴性对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: DMSO浓度 ≥ 0.42 mol/L时对白色念珠菌生长、芽管萌发具有较强的抑制作用, 且随着浓度的增加和时间的延长其作用效果越明显。

关键词 二甲基亚砷; 白色念珠菌; 抑菌作用; 芽管萌发

Inhibitory Activity of Different Concentrations of Dimethyl Sulfoxide against *Candida albicans*

CUI Guang-fu¹, LIU Rui-qi¹, GUO Qiao-mei¹, CUI Jing-jing¹, HE Xiao-dan², GUO Qing-he¹, HE Zhi-an¹ (1. Dept. of Medical Laboratory, Xinxiang Medical University, Henan Xinxiang 453000, China; 2. Medical of Pharmacy College, Xinxiang Medical University, Henan Xinxiang 453000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the inhibitory activity of different concentrations of dimethyl sulfoxide (DMSO) on *Candida albicans*. METHODS: *C. albicans* was separately cultured with dilution method in medium containing 0.14, 0.42, 0.70, 0.99, 1.27 and 1.55 mol/L DMSO for 24 h, using DMSO as positive control and liquid sabouraud medium as negative control. The inhibitory rates of *C. albicans* growth in different concentrations of DMSO and germ tube germination were calculated. RESULTS: The growth of *C. albicans* was active when the concentration of DMSO was 0.14 mol/L. There was no significant difference in inhibitory rates of *C. albicans* growth and germ tube germination between 0.14 mol/L group and negative control group ($P > 0.05$); when the concentration of DMSO was higher than 0.42 mol/L, MIC₉₀ of *C. albicans* was 0.70 mol/L during 2-4 h and MIC₉₀ of germ tube germination was 0.70 mol/L; when the concentration of DMSO was up to 1.55 mol/L, there is no bacterial survival (inhibitory rate of bacteria growth reached 100%). When the concentration of DMSO was higher than 0.42 mol/L, there was significant difference in inhibitory rates of *C. albicans* growth and germ tube germination among DMSO medium groups and negative control group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Higher than 0.42 mol/L, DMSO has a strongly inhibitory activity on the growth and germ tube germination of *C. albicans*. With the concentration and time increasing, DMSO shows more apparent inhibitory effect.

KEY WORDS DMSO; *Candida albicans*; Inhibitory activity; Germ tube germination

二甲基亚砷(DMSO)为含硫有机化合物, 常温下为无色无臭的透明液体, 具有高极性、易与水混溶、渗透性好的特点, 常作为细胞的渗透性保护剂和透皮剂^[1]以及药物溶媒广泛使用。白色念珠菌为临床常见机会性致病菌, 近年来感染率、耐药率均呈上升趋势^[2], 在其药物敏感试验中部分抗真菌药物需借助DMSO助溶^[3], 但是DMSO是否对白色念珠菌的生长有影响, 少有文献报道。为此, 笔者采用不同浓度DMSO对白色念珠菌生长以及芽管萌发的抑制作用进行了考察, 并初步探讨

其抑菌机制。

1 材料

1.1 仪器

电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂); BSC-1100 II B2-X型生物安全柜(山东博科生物产业有限公司); 血球计数板(上海求精生化试剂仪器有限公司)。

1.2 菌株

菌株来源于临床分离株, 经新乡医学院第三附属医院微生物室按《全国临床检验操作规程》(第3版)方法鉴定为白色念珠菌, 于沙保罗固体培养基上至少传代2次后, 用生理盐水调至 $(1\sim 5)\times 10^7$ CFU/ml混匀备用。

1.3 药物与培养基

DMSO(美国Sigma公司, 批号: D5879, AR级); 台盼蓝(美国Sigma公司, 批号: T6146, GR级); 沙保罗培养基(杭州天和微生物试剂有限公司, 批号: HTWSB157, BR级); 葡萄糖(北

[△] 基金项目: 河南省教育厅课题项目资助(No.2009B310004); 新乡医学院2010年大学生科研创新项目资助; 新乡医学院2011年大学生科研课题资助项目(No.DXSKYKT2011-017)

* 在校本科生。研究方向: 真菌感染机制。E-mail: cgf0204@163.com

通信作者: 教授, 硕士。研究方向: 药物活性检验。电话: 0373-3029967。E-mail: sx06@xxmu.edu.cn