

# 纳米银温敏原位凝胶的制备及流变学考察

郑英<sup>1,2\*</sup>, 付再林<sup>2</sup>, 陶蓉<sup>3</sup>, 邹晓华<sup>2</sup>, 陈素红<sup>4</sup>, 吕圭源<sup>1#</sup> (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.解放军第117医院, 杭州 310004; 3.浙江医院, 杭州 310004; 4.温州医学院药学院, 浙江温州 325035)

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)21-1983-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.21.22

**摘要** 目的:制备纳米银(Ag-NPs)温敏原位凝胶并考察其流变学性质。方法:采用NaBH<sub>4</sub>还原AgNO<sub>3</sub>法制备Ag-NPs,通过四唑盐(XTT)试验考察其对几种常见菌的抑菌效果;以不同质量比例的泊洛沙姆188(P188)-泊洛沙姆407(P407)为凝胶基质,制备Ag-NPs温敏原位凝胶,采用旋转流变仪、扫描电镜分别考察其流变学性质及该凝胶表征。结果:该Ag-NPs平均粒径为12.4 nm,多分散系数为0.241,且10 μg/ml Ag-NPs对白色念珠菌的抑菌效果[抑制率(78.28±3.54)%]与1 μg/ml两性霉素B[抑制率(83.33±4.55)%]相当( $P=0.058$ ),对金黄色葡萄球菌的抑菌效果[抑制率(88.66±2.94)%]与4 u/ml庆大霉素[抑制率(89.92±3.78)%]相当( $P=0.780$ )。Ag-NPs温敏原位凝胶室温下为液体,升高至相变温度(Tg)则迅速呈半固态,并随P407质量比例的增加Tg下降,且pH对其无显著影响;当P407与P188比例分别为8%:22%、10%:20%、12%:18%、15%:15%时,其对应Tg分别为34.8、31.2、28.7、25.6 °C。结论:所制备的Ag-NPs温敏原位凝胶具有良好的流变学特性及较强的抑菌活性。

**关键词** 纳米银;制备;泊洛沙姆;温敏原位凝胶;流变学;抑菌活性

## Preparation and Rheological Study of Silver Nanoparticles Thermosensitive Situ Gel

ZHENG Ying<sup>1,2</sup>, FU Zai-lin<sup>2</sup>, TAO Rong<sup>3</sup>, ZOU Xiao-hua<sup>2</sup>, CHEN Su-hong<sup>4</sup>, Lü Gui-yuan<sup>1</sup> (1.Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310053, China; 2.No. 117 Hospital of PLA, Hangzhou 310004, China; 3.Zhejiang Hospital, Hangzhou 310004, China; 4.Pharmacy College, Wenzhou Medical College, Zhejiang Wenzhou 325035, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare Silver nanoparticles (Ag-NPs) thermosensitive situ gel and investigate its rheological property. METHODS: Ag-NPs were prepared by the borohydride reduction of AgNO<sub>3</sub>. XTT test was used to investigate the antibacterial effects of Ag-NPs on several common bacteria. The gels were prepared by dissolving the mixture of different proportions of P188 and P407 in the Ag-NPs solution. The rheological property and microstructural analysis were tested via rheometer and scanning electron microscope. RESULTS: Mean particle size of Ag-NPs was 12.4 nm, and polydispersity index was 0.241. The anti-bacterial effects of 10 μg/ml Ag-NPs to *Monillia albicans* [inhibitory rate of (78.28±3.54)%] was equal to that of 1 μg/ml Amphotericin B [inhibitory rate of (83.33±4.55)%] ( $P=0.058$ ); the anti-bacterial effects to *Staphylococcus aureus* [inhibitory rate of (88.66±2.94)%] was equal to that of 4 u/ml Gentamicin [inhibitory rate of (89.92±3.78)%] ( $P=0.780$ ). Ag-NPs thermosensitive situ gel was liquid at room temperature, and represented as semi-solid when increasing to phase-transition temperature (Tg). As the increase of P407 proportion, Tg decreased. pH had no significant effect on it. P407:P188=8%:22%, 10%:20%, 12%:18%, 15%:15% corresponded to Tg of 34.8, 31.2, 28.7, 25.6 °C. CONCLUSIONS: Prepared Ag-NPs thermosensitive situ gel shows sound rheological properties and anti-bacterial activity.

**KEY WORDS** Silver nanoparticles; Preparation; Poloxamer; Thermosensitive situ gel; Rheology; Anti-bacterial activity

纳米银(Ag-NPs)特有的表面效应、小尺寸效应和量子隧道效应等使其具备抑菌能力强、抑菌谱广、毒性小及不易产生耐药性的特点,其通过损伤细菌DNA、促自由基产生、致脱氢酶失活、菌体内容物泄漏及抑制蛋白磷酸化等多途径起到抑菌作用<sup>[1-2]</sup>。泊洛沙姆作为环氧乙烷(EO)和环氧丙烷(PO)共聚物,其特有的EOx-POy-EOx结构使其溶液具有受热胶束化、呈“反向温敏性”的特点,即常温下为液体,具有优异的涂布性,凝胶化温度下具有适当的胶凝强度及黏附性<sup>[3-6]</sup>。本研究

综合以上两者特点,制备Ag-NPs温敏原位凝胶,并考察其流变学性质及抑菌活性,拟在烧烫伤、机械损伤感染创面及腔道感染上应用。

### 1 材料

恒温磁力搅拌器(南京皓海仪器仪表有限公司);Zetasizer Nano ZS激光粒径测定仪(英国Malvern公司);CX-100扫描电子显微镜(韩国Coxem公司);恒温培养箱(上海齐欣科学仪器有限公司);Spectramax M2e酶标仪(美国Molecular Devices公司);Haake RheoStress 6000流变仪(德国Thermo Scientific公司);倒置显微镜(德国Leica公司)。

泊洛沙姆188(P188,批号:188WPWA544C,纯度:>96%)、泊洛沙姆407(P407,批号:WPED591C,纯度:>96%)、聚维酮

\* 副主任药师, 博士研究生。研究方向:药理学。电话:0571-87340953。E-mail:zhengying117th@163.com

# 通信作者:教授, 博士研究生导师。研究方向:药理学。电话:0571-86613601。E-mail:lv\_gy01@163.com

(PVP)K90(纯度: >97%)均来自德国 BASF 公司; AgNO<sub>3</sub>(北京化工厂, 批号: F20030713, 纯度: >99.7%); NaBH<sub>4</sub>(天津化工研究院, 批号: 20050202, 纯度: >95%); 硫酸庆大霉素(浙江瑞新制药厂, 批号: 20110707); 两性霉素 B(华北制药厂, 批号: HAN1102201); 四唑鎓盐(XTT, 纯度: >90%)、吩嗪二甲酯硫酸盐(PMS, 纯度: >95%)均购自美国 Sigma 公司; 牛肉膏、蛋白胨(北京奥博星生物技术有限公司); 其他试剂均为分析纯。

文中所有菌种均来自浙江工业大学药学院。

## 2 方法

### 2.1 Ag-NPs 的制备<sup>[7]</sup>

配制 PVP K90(0.02 g/ml, 90 ml), 加 NaBH<sub>4</sub> 至 0.01 mol/L, 调节溶液 pH=11.5, 冰浴条件下磁力搅拌, 滴加 0.05 mol/L AgNO<sub>3</sub> 溶液 5 ml (0.5 ml/min), 即得 0.27 mg/L 橘红色 Ag-NPs 溶液, 调节 pH 至 7.0。

### 2.2 Ag-NPs 抑菌活性的考察

配制细菌培养液过滤备用。用培养液分别稀释 Ag-NPs 溶液至 2.5、5、10、20、40 μg/ml, 稀释阳性对照药庆大霉素、两性霉素 B 分别至 4 u/ml 及 1 μg/ml。以空白培养液为阴性对照组, 分别取 180 μl 至 96 孔板, 每组 6 个复孔, 加入菌悬液 20 μl (大肠杆菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、枯草芽孢杆菌 ATCC 6633、黑曲霉 ATCC 16404 及白色念珠菌 ATCC 10231), 最终菌浓度为 5×10<sup>4</sup> 个/孔, 孵育 30 min 后加 XTT-PMS 作用 3 h, 450 nm 波长处检测吸光度<sup>[9]</sup>。每组以各不同质量浓度的 Ag-NPs 溶液加不含细菌的培养液作为调零孔。

### 2.3 Ag-NPs 温敏原位凝胶的制备

取不同质量比例的 P188、P407 于冰浴条件下溶于 20 μg/ml 的 Ag-NPs 胶体溶液中, P407 与 P188 比例分别为 8%:22%、10%:20%、12%:18%、15%:15%。该混合物于 4 °C 冰箱内放置过夜, 消除气泡备用。扫描电子显微镜用以检测 Ag-NPs 在凝胶中的分布。

### 2.4 Ag-NPs 温敏原位凝胶流变学性质的测定

流变法: 将振荡频率设定为 1 Hz, 控温仪精确控制在 ±0.1 °C, 恒温 10 min 后, 持续 15 min 将凝胶从 20 °C 缓慢升温至 40 °C, 不同温度下测定样品的弹性模量(G)和黏性模量(G')。当 G>G' 定义为凝胶相变温度(T<sub>g</sub>)。以温度(T)与 lgG 或 lgG' 作曲线图。为模拟各生理条件下的 pH 值, 将各比例凝胶调节 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.5, 进而考察 pH 值对流变学性质的影响。

## 3 结果

### 3.1 制备所得 Ag-NPs 的性质

该试验得到的 Ag-NPs 为橘红色胶体溶液(0.27 mg/L), Ag-NPs 及 AgNO<sub>3</sub> 的紫外吸收见图 1A 所示; 其中 Ag-NPs 在 391 nm 波长处有一个较强的吸收峰, 证明在 NaBH<sub>4</sub> 的还原作用及 PVP K90 的分散稳定作用下, AgNO<sub>3</sub> 被还原成 Ag-NPs。其动态光散射平均粒径为 12.4 nm, 多分散系数为 0.241, 详见图 1B。

### 3.2 Ag-NPs 的抑菌试验

#### 3.2.1 体外抑真菌试验。Ag-NPs 抑真菌活性结果见表 1。

由表 1 可见, Ag-NPs 呈显著抑真菌活性, 其对白色念珠菌(*Monillia albican*)及黑曲霉(*Aspergillus niger*)的半数抑菌浓度(IC<sub>50</sub>)值分别 <10、5 μg/ml, 前者较后者对 Ag-NPs 更敏感。当 Ag-NPs 质量浓度均为 10 μg/ml 时, 与两性霉素 B(1 μg/ml)作用效果相当或更优(P 分别为 0.058、0.001)。

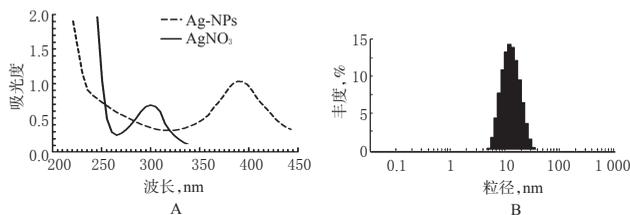


图 1 Ag-NPs 紫外吸收及粒径分布

A. AgNO<sub>3</sub> 和 Ag-NPs 紫外吸收; B. Ag-NPs 粒径分布

Fig 1 UV absorption and size distribution of Ag-NPs

A. UV absorption of AgNO<sub>3</sub> and Ag-NPs; B. particle size distribution of Ag-NPs

表 1 Ag-NPs 抑真菌活性结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 1 Anti-fungal activities of Ag-NPs( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量, μg/ml	抑制率, %	
		白色念珠菌	黑曲霉菌
阴性对照组		0	0
Ag-NPs	2.5	15.66 ± 10.61	0
	5	36.87 ± 4.55	74.87 ± 3.21
	10	78.28 ± 3.54	93.05 ± 3.74
	20	93.94 ± 1.01	93.58 ± 2.14
	40	94.44 ± 2.02	96.79 ± 0.53
两性霉素 B	1	83.33 ± 4.55	80.75 ± 4.81

#### 3.2.2 体外抑细菌试验。Ag-NPs 抑细菌活性结果见表 2。

表 2 Ag-NPs 抑细菌活性结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 2 Anti-bacterial activities of Ag-NPs( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量, μg/ml	抑制率, %		
		金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	枯草芽孢杆菌
阴性对照组		0	0	0
Ag-NPs	2.5	27.73 ± 9.66	6.07 ± 5.42	0
	5	50.00 ± 6.72	23.83 ± 5.88	71.04 ± 4.52
	10	88.66 ± 2.94	67.76 ± 3.27	94.11 ± 7.26
	20	94.11 ± 2.52	82.24 ± 6.87	92.76 ± 3.37
	40	94.96 ± 1.68	93.46 ± 4.67	95.02 ± 1.68
庆大霉素, u/ml	4	89.92 ± 3.78	27.73 ± 4.21	86.87 ± 2.26

由表 2 可见, Ag-NPs 可剂量依赖性杀灭病原菌, 其中大肠杆菌对 Ag-NPs 的敏感性略低。Ag-NPs 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)及枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的 IC<sub>50</sub> 值分别 <5、10、5 μg/ml。当 Ag-NPs 质量浓度为 10、5、20 μg/ml 时, 与阳性对照药庆大霉素(4 u/ml)作用相当或更优(P 分别为 0.780、0.216 及 0.042)。

### 3.3 Ag-NPs 温敏原位凝胶表征

参照“2.3”项下方法制备 Ag-NPs 温敏原位凝胶(P407 与 P188 比例为 12%:18%)。扫描电镜图见图 2。结果 Ag-NPs 在凝胶中均匀分布, 呈球形, 颗粒尺寸大小相对集中, 分布范围为 10~30 nm。

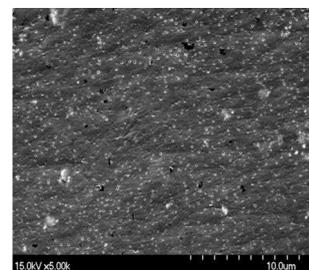


图 2 电镜下 Ag-NPs 在温敏凝胶流变学性质中的分布(×5 000)

该凝胶室温下为液体, 升高至 T<sub>g</sub> 则迅速呈半固态, 并随 P407 质量比例的

增加, T<sub>g</sub>下降, 而pH升高对T<sub>g</sub>无显著影响, 详见图3。

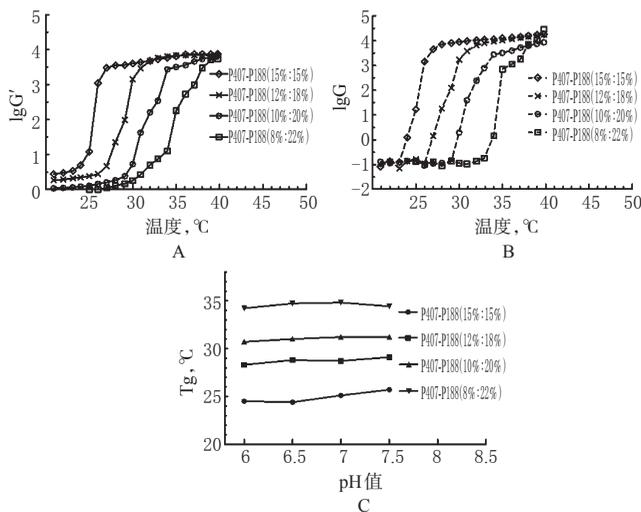


图3 Ag-NPs温敏原位凝胶流变学性质考察

Fig 3 Rheological evaluation of Ag-NPs thermosensitive situ gel

当P407与P188比例分别为8%:22%、10%:20%、12%:18%、15%:15%时, 其对应T<sub>g</sub>分别为34.8、31.2、28.7、25.6 °C。相变时的表征变化如图4所示, 可见常温时凝胶表面平滑, 当温度升高时迅速收缩。

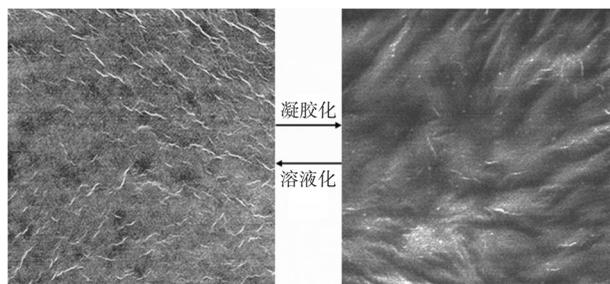


图4 Ag-NPs凝胶在相变时的表征变化

Fig 4 Characterization change of Ag-NPs thermosensitive gel during phase transformation

#### 4 讨论

目前, 银制剂已广泛应用于烧烫伤及腔道内的感染, 且具有长效、低毒的特点。本试验通过NaBH<sub>4</sub>还原AgNO<sub>3</sub>法制得Ag-NPs, 其平均粒径为12.4 nm, 分布相对集中, 具有极大的比表面积。抑菌试验结果显示, Ag-NPs对革兰阳性菌、革兰阴性菌均有显著抑制作用, 其对各细菌的IC<sub>50</sub>为5.0~10.0 μg/ml。同时抑菌试验结果显示, 革兰阴性菌较阳性菌耐药, 可能由于阴性菌细胞壁中丰富致密的脂多糖一定程度阻碍了Ag-NPs进入菌体内部。白色念珠菌及黑曲霉为常见致病真菌, 特别是白色念珠菌通常感染生殖道、胃肠道及口腔等部位, 造成严重炎症<sup>[9-10]</sup>。在抑真菌试验中, Ag-NPs对以上试验菌同样有效。

Ag-NPs作为接触型抗菌药, 使银微粒充分接触致病菌, 增加接触时间至关重要。泊洛沙姆的“反向温敏性”可使Ag-NPs温敏原位凝胶在T<sub>g</sub>以下为液体, 其较卡波姆水凝胶等具更优异的涂展性, 能够使其在创伤面、溃疡面甚至在具有较多褶皱的腔道上均匀涂布<sup>[11]</sup>。Ag-NPs温敏原位凝胶能及时凝胶化及增加黏附力, 确保Ag-NPs和感染面紧密接触, 增加Ag-NPs与致病菌的接触时间, 理论上能够显著增强Ag-NPs的抑菌活

性。

该温敏原位凝胶采用不同质量比例组合的泊洛沙姆为凝胶基质, 其T<sub>g</sub>为25~35 °C, 该温度范围能够适应体表及腔道等不同给药部位的温度变化。当凝胶温度升高至T<sub>g</sub>时则迅速呈半固态, 并随P407质量比例的增加, T<sub>g</sub>呈现下降趋势, 该特性与泊洛沙姆中EO及PO的质量比例有关。另外, pH的变化对T<sub>g</sub>无显著影响, 说明各生理pH值对凝胶体系的流变学性质无显著影响。

笔者制备了Ag-NPs及其泊洛沙姆温敏原位凝胶, 还评价了其流变学特性, 为进一步考察其在体内的抑菌活性提供实验室依据。

#### 参考文献

- [1] Lok CN, Ho CM, Chen R, *et al.* Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles[J]. *J Proteome Res*, 2006, 5(4):916.
- [2] Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(1):76.
- [3] Niu G, Zhang H, Song L, *et al.* Thiol/Acrylate-modified PEO-PPO-PEO triblocks used as reactive and thermosensitive copolymers[J]. *Biomacromolecules*, 2008, 9(10):2621.
- [4] Chang JY, Oh YK, Choi HG, *et al.* Rheological evaluation of thermosensitive and mucoadhesive vaginal gels in physiological conditions[J]. *Int J Pharm*, 2002, 241(1):155.
- [5] Koffi AA, Agnely F, Besnard M, *et al.* In vitro and in vivo characteristics of a thermogelling and bioadhesive delivery system intended for rectal administration of quinine in children[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008, 69(1):167.
- [6] Kissel T, Li Y, Unger F. ABA-triblock copolymers from biodegradable polyester A-blocks and hydrophilic poly(ethylene oxide) B-blocks as a candidate for in situ forming hydrogel delivery systems for proteins[J]. *Adv Drug Deliver Rev*, 2002, 54(1):99.
- [7] 杨立群, 林凯城, 沈荣春, 等. 含纳米银的抗菌水凝胶研究[J]. *中山大学学报*, 2011, 50(6):58.
- [8] 赵爱华, 贾淑珍, 寇丽杰, 等. 应用四唑鎓盐法快速检测卡介菌活菌含量[J]. *中国医药生物技术*, 2009, 4(1):33.
- [9] Kim KJ, Sung WS, Suh BK, *et al.* Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*[J]. *Biometals*, 2009, 22(2):235.
- [10] Mohapatra S, Xess I, Swetha JV, *et al.* Primary cutaneous aspergillosis due to *Aspergillus niger* in an immunocompetent patient[J]. *Indian J Med Microbiol*, 2009, 27(4):367.
- [11] Koffi AA, Agnely F, Ponchel G, *et al.* Modulation of the rheological and mucoadhesive properties of thermosensitive poloxamer-based hydrogels intended for the rectal administration of quinine[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 27(4):328.

(收稿日期:2012-11-27 修回日期:2013-01-31)