

冰点渗透压仪定量二甲基亚砷标准曲线的建立^{*}

张 朕^{1,2}, 朱泽兴², 张树明^{2△} (1. 山西医科大学研究生学院, 太原 030001; 2. 中国人民解放军第二炮兵总医院骨科, 北京 100088)

【摘要】 目的 建立冰点渗透压仪定量二甲基亚砷标准曲线, 为检测提供依据, 并对该方法进行评价。 **方法** 通过对滴定标准浓度二甲基亚砷(溶剂为生理盐水)通过冰点渗透压仪进行检测。 **结果** 敏感性 $s=0.1\%v/v$, 检测范围 $0.1\% \sim 10\%v/v$, 区分度 $d=0.1\%v/v$, 不精确度 $c=\pm 2.35\%$, 得出回归方程 $\hat{Y}=308.0+142.7X+3.181X^2$ 。 **结论** 该检测方法简单、便捷、有效、费用低, 为实验检测提供依据, 亦可用于其他溶质、溶剂明确的、单一溶质为变量的溶液检测中。

【关键词】 渗透压; 二甲基亚砷; 定量; 标准曲线

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.08.029 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)08-1101-02

二甲基亚砷(DMSO, 又名二甲亚砷)是一种由二甲基硫化物氧化合成的、无色吸湿性液体, 最初来源于木浆加工废品。其化学结构使其具有高极性, 硫-氧键确定 DMSO 的极性性质, 以溶解难溶性药物的能力, 其完全溶于水、常用的有机溶剂和不饱和烃^[1]。此外, DMSO 的化学结构使其能够通过提高渗透性而不影响皮肤和身体膜的形态特征渗透膜屏障, 其优良的渗透性使其在日常生产生活中得到广泛应用^[2-3]。同时, 早在 1972 年, DMSO 就被作为渗透性冷冻保护剂应用。有报道, DMSO 利用其渗透特性, 通过保持冻融过程中蛋白质和磷脂膜的完整性来发挥作用^[4-6]。因为 DMSO 本身具有毒性, 其检测一直是各个领域的研究方向。目前, 对 DMSO 的检测方法包括气相色谱法、紫外线检测仪法、磁共振法、高效液相色谱法等, 适用于检测各种不同的溶剂中的 DMSO^[7-12]。作者在研究离断肢体冷冻保护剂的渗透性时, 利用微透析技术将冷冻保护剂从离断肢体中透析出来, 而在检测生理盐水中的 DMSO 时, 以上很多方法并不适用或有严重的缺陷^[13]。而利用联合检测技术可以得到比较纯净的样品, 从而认为溶质和溶剂的成分是明确的, 故选择利用渗透压的区别来定量生理盐水中的 DMSO。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 DMSO 由 Sigma 公司生产, 浓度大于或等于 99.5%, 细胞级; 生理盐水由大冢制药生产。微量加样枪由 BIO-DL 公司生产, 误差 0.01%, 不精确率 0.32%; 冰点渗透压仪为德国 Löser 公司生产的 OM806 型, 重复性 ($\pm 0.5\%$), 测量范围: $0 \sim 2\,500\text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$ 。检测仪器、器皿均经专业人员校准。

1.2 方法 所有操作均在第二炮兵总医院检验科完成, 室温恒定 $17.9\text{ }^\circ\text{C}$ 。以 DMSO 为溶质, 生理盐水为溶剂, 依次配制体积比浓度为 $1\% \sim 15\%v/v$ DMSO 的溶液, 每个样品 $100\text{ }\mu\text{L}$ 液体, 每个浓度分别滴定 6 个样品; 另配制 $100\text{ }\mu\text{L}$ 浓度为 $1\%v/v$ DMSO 6 个样品, 依次成倍稀释, 得到浓度为 $0.5\%v/v$ 、 $0.25\%v/v$ 、 $0.125\%v/v$ 、 $0.0625\%v/v$ 、 $0.03125\%v/v$ DMSO 的溶液。利用冰点渗透压仪检测, 每次检测结束后擦拭检测探针。

1.3 统计学处理 利用 SPSS 17.0 软件进行配对样品 t 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 数据参数 当 DMSO 浓度超过 $10\%v/v$ 时, 无法读出数据; 浓度在 $1\% \sim 10\%v/v$ 时, 样品渗透压随浓度上升逐级升高, 同一浓度不同组间差别不大, 各组内标准差最大值 $15.384\text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$, 平均 $8.2918\text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$; 浓度在 $1\%v/v$ 以内的 6 组, 样品渗透压总体随浓度上升而升高, 各组内标准差最大值 $8.735\text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$, 平均 $4.6625\text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$, 0.03125% 组和 0.0625% 组分别为 (307.67 ± 2.582) 和 $(307.67 \pm 2.503)\text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$, 因此两组数据各小组间通过对应稀释得出样品, 见图 1、表 1。两组间数值比较差异无统计学意义 ($P>0.005$); 其余相邻各组间数值差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。公式 1: 其中, $c=\max\left\{\frac{CI_{umj}-M_j}{M_j}\right\}$ 为各区组均

数的 95% 置信区间上限值, 为区组均数。由以上结果得出, 因无法区分 $0.125\%v/v$ 以下的浓度, 敏感性 $s=0.1\%v/v$; 读取有意义的下限值为 0.125% 组 $(321.50 \pm 5.320)\text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$, 上限值为 10% 组 $(2\,061.67 \pm 15.384)\text{ mOsm/kg H}_2\text{O}$, 读数范围 $0.1\% \sim 10\%v/v$; 0.25% 组与 0.125% 组数值差异有统计学意义, 区分度 $d=0.1\%v/v$; 依据公式 1 得出不精确度 $c=\pm 2.35\%$ ^[14]。综上所述, 冰点渗透压仪定量 DMSO 数据总体稳定可靠, 是一种简单、便捷的检测手段。

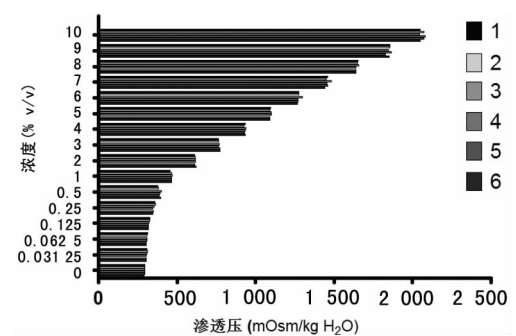


图 1 滴定标准浓度 DMSO 渗透压结果

^{*} 基金项目: 全军“十一五”医药卫生科研基金资助项目(08G051)。

[△] 通讯作者, E-mail: zsmep@tom.com。

表 1 滴定标准浓度 DMSO 渗透压统计
描述 (mOsm/kg H₂O)

分组 (%)	最小值	最大值	均值	标准差
0	292	296	294.33	1.633
0.031 25	305	312	307.67	2.582
0.062 5	305	312	307.67	2.503
0.125	316	329	321.50	5.320
0.25	344	362	352.67	7.202
0.5	379	401	389.50	8.735
1	458	469	464.67	3.777
2	614	622	615.83	3.061
3	762	774	767.50	4.806
4	927	940	933.17	4.167
5	1 089	1 100	1 094.17	4.792
6	1 268	1 297	1 276.67	10.424
7	1 439	1 482	1 457.17	14.134
8	1 638	1 659	1 645.50	8.871
9	1 826	1 866	1 849.50	13.502
10	2 045	2 083	2 061.67	15.384

2.2 拟合曲线 见图 2。利用 SPSS 17.0 软件绘制线性回归图及二次项回归图。计算得出线性回归方程 $r_1^2=0.997$,二次项回归方程 $r_2^2=1.0$,二次项回归方程优于线性回归方程,与读图结果一致。由 SPSS 17.0 软件计算得出公式 2: $\hat{Y}=308.0+142.7X+3.181X^2$, $r_2^2=1.0$ 。方差分析显示, $F=142\,206.678,P\leq 0.05$,DMSO 溶液浓度与冰点渗透压仪测定溶液渗透压之间存在相关关系,即公式 2 有意义。

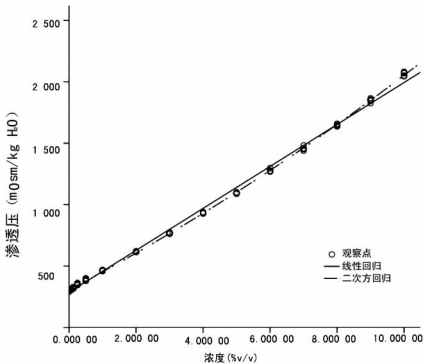


图 2 拟合曲线图

3 讨 论

当一种溶质加入到一种纯溶剂中时,溶液会发生四种变化,即冰点降低、沸点升高、渗透压升高、蒸汽压降低,这些变化被称为稀溶质的依数性;而在物理化学中,任何溶液,如果其单位体积溶液所溶解的溶质的颗粒总数相同,则引起溶液冰点下降的数值亦相同,此被称为拉乌尔冰点原理,既渗透压摩尔浓度与冰点温度下降值为线性关系^[15]。冰点渗透压仪就是利用以上理论通过检测溶液冰点的变化来测定其渗透压的仪器,单位为 mOsm/kg H₂O。

已知: $Osmolarity=\sum \varphi_i N_i C_i$,其中 ϕ 为渗透系数,N 为溶质在溶液中溶解成的游离分子数,C 为溶质的摩尔体积浓度。

$C_i=\frac{n_i}{V_s}$,其中 n 为物质的量,可得: $Osmolarity=\sum \varphi_i N_i \frac{n_i}{V_s}$ 。

已知 Osmolarity 单位为 Osm/L,而 V_s 单位为 L,推理可得:

$Osmolarity=\sum \varphi_i N_i \frac{n_i}{m_s}$,其中 m 为溶液的单位质量。渗透摩尔质量浓度(Osm/kg)为每千克溶剂溶解的渗透压克分子(Osmole)的数量,渗透压克分子受 N_i 和 n_i 影响,而这 2 个因素和 m_s 均为物质特性,故在单一溶质的情况下,渗透摩尔质量浓度为该溶液的特性,理论上不受外界影响。

将本文结果应用于研究离断肢体冷冻保护剂的渗透性,利用微透析(MD)将冷冻保护剂从离断肢体中透析出来,灌流液为生理盐水,当 DMSO 的浓度不足时,回收样品的渗透压与生理盐水的渗透压一致,结果并未受组织内生物小分子物质的影响;当提高 DMSO 的浓度时,回收样品的渗透压开始随时间的变化而升高,所有可以推断 MD 探针在断肢中透析的小分子生理成分并不足以改变回收透析液的渗透压,该实验方法具有其可行性。

本文通过对滴定标准浓度 DMSO(溶剂为生理盐水)通过冰点渗透压仪进行检测,认为该检测方法简单、便捷、有效、费用低,得到其回归方程式 2,敏感性 $s=0.1\%v/v$,检测范围为 $0.1\% \sim 10\%v/v$,区分度 $d=0.1\%v/v$,不精确度 $c=\pm 2.35\%$,在检测范围内。而随着 DMSO 的体积浓度提高,溶液渗透压随之提高,该方法亦可用于其他溶质、溶剂明确的、单一溶质为变量的溶液检测中。

志谢:第二炮兵总医院检验科在本实验过程中所提供的帮助。

参考文献

[1] Jana M,Miroslav P,Hana K. Early ontogeny,growth and mortality of common carp(cyprinus carpio) at low concentrations of dimethyl sulfoxide[J]. Acta Veterinaria Brno,2009,78(3):505-512.

[2] Kligman AM. Topical pharmacology and toxicology of dimethyl sulfoxide-Part1[J]. JAMA,1965,193(10):796-804.

[3] Kligman AM. Dimethylsulfoxide-part2[J]. JAMA,1965,193(11):923-928.

[4] Ashwood-Smith MJ, Warby C. Protective effect of low and high molecular weight compounds on the stability of catalase subjected to freezing and thawing[J]. Cryobiology,1972,9(2):137-140.

[5] Arakawa T,Carpenter JF,Kita YA,et al. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: an hypothesis [J]. Cryobiology,1990,27(4):401-415.

[6] Anchordoguy TJ,Rudolph AS,Carpenter JF,et al. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing[J]. Cryobiology,1987,24(4):324-331.

[7] Willhite CC,Katz PI. Dimethylsulfoxide[J]. J Appl Toxicol,1984,4(3):155-160.

酒精性肝病临床表现多种多样,根据肝组织病理学改变可分为轻症酒精性肝病、酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化、酒精性肝硬化,这些病变相继发生,既可单独存在,也可合并发生^[5]。

肝脏是合成凝血因子、抗凝因子及与纤溶系统有关的蛋白酶类的重要部位,人体内 14 种凝血因子有 12 种是肝脏参与合成的,机体通过清除已激活的凝血因子和纤溶激活物以及灭活肝素等方式调节体内凝血系统的平衡^[6]。酒精性肝病时肝细胞由于受到不同程度的损伤或破坏,肝细胞合成凝血因子和抗凝蛋白的能力减弱,导致凝血和抗凝机制紊乱。因此,凝血、纤溶指标与肝功能密切相关,对酒精性肝病的诊断、治疗等方面具有重要的临床价值。

本试验结果表明,随着肝脏病情的加重,各凝血指标异常程度逐渐增大,到酒精性肝纤维化和(或)肝硬化期,凝血指标与健康对照组出现显著差异。因此,PT、APTT、TT、FIB 这些指标的异常可以作为酒精性肝纤维化和(或)肝硬化阶段的鉴别指标,即当酒精性肝病患者 PT>19 s、APTT>45 s、TT>23 s、FIB<1.7 g/L 时,提示患者进入酒精性肝纤维化和(或)肝硬化阶段。酒精性肝炎组 APTT 与健康对照组比较,差异有统计学意义,表明 APTT 对酒精性肝炎期具有一定的鉴别价值。

通过凝血指标在肝病的异常率发现,APTT 在酒精性脂肪肝组和酒精性肝炎组异常率较高,分别为 19.0%、23.0%,表明 APTT 较 PT、TT、FIB 可更早地反映肝病凝血的异常及肝功能的损伤;而 APTT、TT 在酒精性肝纤维化和(或)肝硬化组的异常率最高,均为 100.0%,表明 APTT、TT 对酒精性肝纤维化和(或)肝硬化的诊断具有很好的临床价值。

PT 是反映外源性凝血系统的试验指标,也是反映肝脏病变严重程度及预后的一个重要指标^[7]。APTT 是反映内源性凝血系统最常用和较敏感的筛选试验,肝脏损害时,95.4%的患者 APTT 延长^[8]。TT 主要检测血浆 FIB 的反应性,反映凝血共同途径的指标,也是病情预后的敏感性指标^[9]。

通过研究发现,酒精性肝病患者首先影响的是内源性凝血途径,然后是共同途径,最后是外源性凝血途径。由于肝病患者肝细胞受损,将会导致维生素 K 吸收障碍,维生素 K 严重缺

乏则导致肝细胞合成羧基化酶减少或羧基化酶与其辅酶维生素 K 之间的反应减弱,引起机体内多种凝血因子合成障碍,导致多种凝血因子的缺乏,进而引起机体凝血功能障碍^[10]。凝血因子Ⅱ、Ⅶ、Ⅸ、Ⅹ属于维生素 K 依赖蛋白酶原,参与内源性凝血途径的凝血因子含有较多的维生素 K 依赖蛋白酶原,因此,推测酒精性肝病时最先累及的为内源性凝血途径。

凝血指标对酒精性肝病临床诊断和分期有着重要的临床价值,但由于酒精性肝病时凝血异常的复杂性,因此应用这些指标建立临床和实验室的标准需要积累更多的资料。

参考文献

[1] 杨如意,任世存. 加味护肝胶囊治疗酒精性肝病的临床研究[J]. 青海医学院学报,2010,31(2):100.
[2] 郑波. 药物联合治疗酒精肝胆汁淤积症的效果观察[J]. 当代医学,2014,20(7):342.
[3] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南[J]. 中华肝脏病杂志,2006,14(3):164.
[4] 曹荣,旭东,程海林,等. 丁二磺酸腺苷蛋氨酸联合熊去氧胆酸治疗黄疸型慢性乙肝病病毒性肝炎的疗效观察[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(6):481-483.
[5] 傅克模,谢圣影. 酒精性肝病的中医药诊治思路[J]. 江西中医药,2008,39(5):11.
[6] 金述满. 肝硬化患者凝血指标与血小板参数检测的临床价值[J]. 中国慢性病预防与控制,2010,18(1):89-90.
[7] 李琴王,宝恩,丛玉隆,等. 凝血指标在判断肝硬化患者病变严重程度中的价值[J]. 中华内科杂志,2005,44(3):188-190.
[8] 李琴,贾继东,王宝恩. 凝血酶原时间及凝血因子在肝病中的应用[J]. 中华肝脏病杂志,2004,12(12):767-768.
[9] 杨会霞,王长友. 肝硬化患者 PT APTT FIB ALT 检测分析[J]. 中原医刊,2003,30(9):48.
[10] 何文军,易四维,黄丽英,等. 肝病患者凝血三项检测及其临床意义[J]. 中国医疗前沿,2010,5(10):58-59.

(收稿日期:2014-11-25 修回日期:2014-12-05)

(上接第 1102 页)

[8] Susan EG, John PA. Determination of dimethyl sulfoxide in serum and other body fluids by gas chromatography[J]. J Anal Toxicol,1982,6(2):76-81.
[9] Susan EG, John PA. Comparison of dimethyl sulfoxide levels in whole blood and serum using an autosampler-equipped gas chromatograph[J]. Ann N Y Acad Sci,1983,441(6):328-331.
[10] Ivey JP, Haddad PR. Determination of dimethylsulphoxide using ion-exclusion chromatography with ultraviolet absorption detection[J]. J Chro A,1987,391:309-314.
[11] Fuller BJ, Busza AL, Proctor E. Studies on cryoprotectant equilibration in the intact rat liver using nuclear magnetic resonance spectroscopy: a noninvasive method to assess distribution of dimethyl sulfoxide in tissues[J]. Cryobiol-

ogy,1989,26(2):112-118.
[12] John FC, Patti ED. Quantitation of dimethyl sulfoxide in solutions and tissues by high-performance liquid chromatography[J]. Cryobiology,1991,28(3):210-215.
[13] Chandra S, Chaurasia, Markus M, et al. AAPS-FDA workshop white paper: microdialysis principles, application and regulatory perspectives [J]. Phar Research, 2007,24(5):589-603.
[14] Gordon HG, Andrew DO, Regina K, et al. GRADE guidelines 6. Rating the quality of evidence-imprecision[J]. J Clin Epidemiol,2011,64(12):1283-1293.
[15] Peter A. Physical Chemistry 8ed[M]. New York: W. H. Freeman and Company,2006:136-173.

(收稿日期:2014-11-10 修回日期:2014-11-21)