

· 论著 ·

基于 D-SERS 法表征两性霉素 B 对白色念珠菌抑制作用的研究

范加腾, 陆峰, 许激扬 (中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏 南京, 210000)

[摘要] **目的** 建立动态表面增强拉曼光谱法(D-SERS)快速表征两性霉素 B(AMB)对白色念珠菌的抑制作用。**方法** 采用 D-SERS 法, 选用敏感的白色念珠菌分别与不同浓度的 AMB 相互作用, 在不同的作用时间下, 通过考察拉曼位移在 656 cm^{-1} 和 729 cm^{-1} 处的峰强比和药物浓度之间的关系, 分析 AMB 对白色念珠菌拉曼光谱的影响。**结果** 在一定药物浓度和作用时间下, 峰强比与 AMB 浓度呈负相关, 可用于描述 AMB 对白色念珠菌的抑制作用, 且药物浓度低于其最小抑菌浓度。**结论** 该方法简便、快捷, 实现了 AMB 对白色念珠菌的快速表征, 同时为表征更多药物-病原体相互作用提供了更简单、快速的检测方法。

[关键词] 白色念珠菌; 两性霉素 B; 动态表面增强拉曼光谱法

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)02-0156-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.011

Research on the inhibitory effect of amphotericin B against *Candida albicans* by D-SERS

FAN Jiateng, LU Feng, XU Jiyang (College of life science and technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210000, China)

[Abstract] **Objective** To develop a rapid method to characterize the inhibitory effect of amphotericin B(AMB) against *Candida albicans* by dynamic surface enhanced Raman spectroscopy(D-SERS). **Methods** D-SERS were applied to analyze the effect of AMB on the Raman spectra of *C. albicans* by examining the relationship between the peak intensity ratio and the concentration of drug at Raman shift at 656 cm^{-1} and 729 cm^{-1} under different interaction time by a sensitive *C. albicans* and different AMB concentrations. **Results** The peak intensity ratio was negatively correlated with the concentration of AMB, which could be used to describe the inhibitory effect of AMB on *C. albicans* in a certain concentration and action time. **Conclusion** This method could characterize the inhibitory effect of AMB against *C. albicans* rapidly, which provided a simpler and faster detection method for characterizing more drug-pathogen interactions.

[Key words] *Candida albicans*; amphotericin B; dynamic surface enhanced Raman spectroscopy

近 20 年来,全球真菌感染率急速上升,尤其是深部真菌感染的死亡率高达 40% ^[1-2],其中,念珠菌是最主要的条件性致病真菌之一。

目前,能够治疗真菌感染的药物主要有:唑类抗真菌药物,此类药物为抑菌剂,仅能抑制白色念珠菌的生长,而不能起到杀菌效果^[3-5]。烯丙胺类抗真菌药物,主要治疗浅部真菌感染。棘白菌素类药物对白色念珠菌具有杀灭作用^[6]。而多烯类抗真菌药物,以其杀菌效果强、治疗范围广、耐药菌较少为广大医务人员所青睐,本研究以多烯类抗真菌药物两性霉素 B 作为研究对象^[7],来表征该药物对白色念

珠菌的抑制作用。

传统的用于表征药物与菌株相互作用的方法非常费时,需要培养菌株以检测菌株生长或生长行为^[8-9]。因此,亟需更加快速、简便的方法。

动态表面增强拉曼光谱法(D-SERS),即在纳米溶胶从湿态到干态的转变过程中进行检测^[10-15]。随着 D-SERS 的调控条件的优化以及其本身强大的优势,其应用范围也越来越广泛,我们研究小组曾将其成功地应用于相关的药品快检^[16]和对植物性膳食补充剂中掺杂药物的高灵敏现场检测^[17]中。因此,笔者决定采用动态增强拉曼光谱法分析药物与菌株的相互作用,以期建立更加快速、简便的方法来表征两性霉素 B 对白色念珠菌的抑制作用,为后续对微生物菌株的鉴别和分析药物的作用效果和机制奠定基础。

[作者简介] 范加腾,硕士研究生,Email:952241837@qq.com

[通讯作者] 许激扬,教授,硕士生导师,研究方向:手性药物合成,Email:jiyangx@126.com

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

硝酸银(AgNO₃)、二水合柠檬酸三钠(Na₃C₆H₅O₇·2H₂O)、丙酮(C₂H₆O)、乙醇、双氧水(30% H₂O₂)、浓硫酸(H₂SO₄)、硝酸(HNO₃)、氢氧化钠(NaOH)、碳酸氢钠(NaHCO₃)等均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。临床敏感白色念珠菌 311 由上海长海医院皮肤科提供。实验用水为三蒸水和去离子水。酵母浸膏、葡萄糖(C₆H₁₂O₆)、蛋白胨、琼脂、RPMI 1640(Gibco BRL)、吗啡啉丙磺酸(MOPS)(Sigma)购自于探索平台。对照品两性霉素 B(AMB)、米卡芬净(MCF)购自于大连美伦生物科技有限公司。

YPD 培养液:酵母浸膏 10 g,葡萄糖 20 g,蛋白胨 20 g,加 900 ml 三蒸水溶解定容至 1 000 ml。高温高压灭菌(121 °C, 15 min),放于干燥处备用。

沙氏培养基:葡萄糖 40 g,蛋白胨 10 g,琼脂 20 g,加入三蒸水溶解并定容至 1 000 ml。121 °C, 15 min 高压蒸汽灭菌。

RPMI 1640 培养液:RPMI 1640(Gibco BRL) 10 g、NaHCO₃ 2.0 g、吗啡啉丙磺酸(MOPS)(Sigma)34.5 g(0.165 mol/L),加三蒸水 900 ml 溶解,用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0(25 °C)。三蒸水定容至 1 000 ml,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,分装后于 4 °C 保存备用。

Piranha 溶液:30% H₂O₂ 与浓硫酸按体积比 3:7 称量,将 30% H₂O₂ 溶液缓慢加入浓硫酸中,于 75 mm 培养皿中静置,冷却后备用。

1.2 仪器

K-sens 拉曼光谱系统(上海复享公司);TU-1901 型双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);TG16-WS 型高速离心机(上海卢湘离心机有限公司);KQ-250DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Zeiss EVO MA-10 扫描电镜显微镜(德国 Carl-Zeiss);Eppendorf 5417R 高速冷冻离心机,(德国 Eppendorf);Zetasizer Nano ZSE 纳米粒度仪(英国马尔文);JEM-2100F 200 kV 场发射透射电子显微镜(日本 JEOL);Vortex-Genie2 多功能旋涡混合器(美国 Scientific Industries);不锈钢立式电热压力蒸汽灭菌锅(上海三申);MJX 型智能霉菌培养箱(宁波江南仪器厂);Multiskan MK3 酶标分析仪(美国 Thermo fisher);TS-1 型脱色摇床(江苏海门市麒麟医用仪器厂)。

1.3 增强试剂的制备与表征

本实验采用经典的 Lee 法制备纳米银胶^[18]。将 36 mg 的 AgNO₃ 溶于 200 ml 去离子水中,加热搅拌至微沸,加入 4 ml 质量分数 1% 复溶柠檬酸三钠水溶液,溶液颜色由无色透明逐渐变成淡黄色,再变为淡灰色并略带绿色,保持微沸 30 min 停止反应,水浴冷却。即得到粒径约为 75 nm 的纳米银球,避光保存。取用银胶溶液时,由于纳米银的制备过程中有微量表面离子干扰,故将配好的纳米银溶液进行表面离子清洗。具体方法为将银胶溶液以 6 500 r/min 离心,6 min 后除去上清液,以相同体积的去离子水复溶,振荡摇匀后备用。同时,通过紫外以及扫描电镜图对银胶进行表征。

1.4 细胞培养与 MIC₈₀ 的测定

取-80 °C 冰箱中冻存的临床白色念珠菌,接种于 1 ml YPD 培养液中,于 30 °C,200 r/min 振荡培养 16 h,使白色念珠菌处于指数生长后期,活化 2 次。划板并培养于沙氏培养基上,2 d 后长至正常菌株大小。待光谱测定前,将白色念珠菌接种于 1 ml YPD 培养液中,于上述条件下传代培养 16 h。

白色念珠菌的 MIC₈₀ 测定方法为:将传代好的白色念珠菌用新鲜 RPMI 1640 培养液稀释至 10⁵ CFU,分别加入 96 孔板,加入相应体积 AMB 药物标准品溶液,按照倍比稀释法,使 AMB 浓度分别为 16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.062 5、0 μg/ml,置于 30 °C 培养箱,培养 24 h 后用酶标仪测定每孔光密度值,并计算相应的 MIC₈₀ 值。

1.5 光谱检测

为除去硅片表面有机物,需要对硅片进行清洗。首先将硅片放入新配制并放置冷却的 Piranha 溶液中浸泡。待取用时,将硅片取出并用大量去离子水进行冲洗,之后分别用丙酮、乙醇、去离子水超声清洗各 1 h,干燥后备用。

考虑菌液中 YPD 溶液对结果的干扰,故用去离子水对传代 16 h 的菌液清洗。具体方法为将菌液以 5 000 r/min 进行离心 4 min,除去上清液,加入等体积去离子水。重复 3 次确保 YPD 培养液去除彻底。

将用二甲基亚砜(DMSO)溶解后的两性霉素 B 加入到清洗干净的菌液中,配成药物浓度为 0、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16 μg/ml 的溶液(且 DMSO 浓度低于 2%),涡旋混匀后放入摇床中,作用时间 5、60、120、240 min,将溶液进行离心(5 000 r/min,4 min),去除上清液,再加入等体积的去离子水,重复清洗 3 次。

将清洗后的菌液和纳米银胶混合并涡旋振荡混

匀。取 3 μl 的混合溶液滴于硅片表面, 无需干燥, 直接置于拉曼光谱仪下检测。光谱检测参数: 激光功率 100 mW, 积分时间 5 s, 显微系统放大倍数 100。

1.6 数据的预处理

使用 Matlab 13.0 软件对光谱数据进行预处理, 取光谱波段在 $550\sim 1\ 800\ \text{cm}^{-1}$ 用于光谱分析 ($550\ \text{cm}^{-1}$ 之前有硅片 $520\ \text{cm}^{-1}$ 的干扰, 而 $1\ 800\ \text{cm}^{-1}$ 后几乎没有光谱特征), 后面依次对光谱进行基线校正 (airPLS 法), 平滑 (Sgolay 法) 以及规范化 (Min-Max Normalization)。

2 结果

2.1 MIC_{80} 的测定

常用的微量稀释法作为一种金标准方法, 准确性好, 测得 AMB 对白色念珠菌的最小抑菌浓度为 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.2 纳米银球的表征

在 SERS 基底中, 最常见的是采用纳米银来增强拉曼信号, 而 Lee 法也成为了最经典的制备方法。在生命科学领域, 有不少将纳米银球用于细胞检测的例子, 尤其在微生物的检测方面。因此, 本研究制备纳米银来进行微生物的拉曼信号的增强。图 1 为纳米银球的紫外表征和扫描电镜图。图 1 中可以观察到纳米银近似球状, 因此在紫外图中表现出的是一个单峰。纳米粒子的分散程度通常可用紫外吸收峰的半峰宽来反映。约为 $50\ \text{nm}$ 的半峰宽体现出纳米粒子具有良好的分散性, 纳米银球排列均匀。

2.3 AMB 与白色念珠菌作用的光谱图

将两性霉素 B 溶液加入到清洗干净的菌液中, 配成药物浓度为 $0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液, 涡旋混匀后放入摇床中孵育 $5, 60, 120, 240\ \text{min}$, 之后将混合液清洗 3 遍后滴于硅片表面进行检测。采集到的光谱图进行基线校正, 平滑, 归一化后, 选取光谱波段 $550\sim 1800\ \text{cm}^{-1}$, 得到结果如图 2。从图中可以看出拉曼位移在 $656\ \text{cm}^{-1}$ 和 $729\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰强度最强且变化最为明显。当药物浓度比较低甚至为 $0\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 的时候, $656\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰强要高于 $729\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰强度, 随着药物浓度逐渐升高, $656\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰强逐渐降低, $729\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰强逐渐升高。

因此, 笔者将考察该两处拉曼位移峰的峰强比和药物浓度之间的关系 (峰比值法), 来观察不同浓度的 AMB 对白色念珠菌拉曼光谱的影响 (图 3)。从图中可以清楚的看出随着 AMB 浓度的升高, 峰强比迅速下降, 当达到一定浓度后峰强比逐

渐趋于平稳, 即 AMB 浓度在 $0\sim 2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内, 峰强比与 AMB 浓度呈负相关, 而且当药物浓度为 $0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 时即可接近于高浓度的药物作用时所表现出来的峰强比, 低于 AMB 对白色念珠菌的最小抑菌浓度 (MIC_{80}) $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$, 这在药物量的使用上要优于传统的方法。从药物的作用时间上分析, AMB 与白色念珠菌作用 $5\ \text{min}$ 即可与作用 $60, 120, 240\ \text{min}$ 所测的谱图效果一致, 因此, AMB 对白色念珠菌的抑制作用可以在其相互作用只有 $5\ \text{min}$ 的时间内, 用所检测的拉曼位移 $656\ \text{cm}^{-1}$ 与 $729\ \text{cm}^{-1}$ 处的峰强比来进行表征, 与传统的方法相比, 大大节省了实验时间。

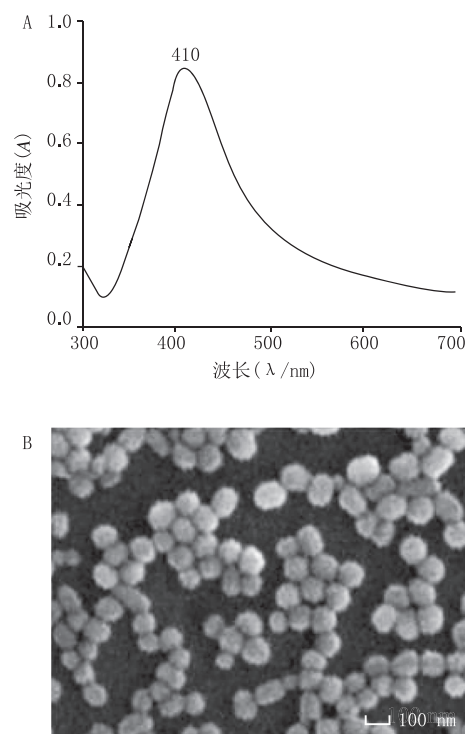


图 1 75 nm 纳米银球的紫外吸收谱 (A) 和扫描电镜图 (B)

2.4 MCF 与白色念珠菌作用的光谱图

同时, 笔者考察了同样是杀菌剂的棘白菌素类抗生素米卡芬净钠 (MCF) 对白色念珠菌的抑制作用, 将 MCF 用去离子水溶解, 配成药物浓度为 $0, 0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 的菌液, 其他条件和分析方法与上述一致, 结果见图 4 和图 5。

结果表明, MCF 与白色念珠菌作用的时间为 $5\ \text{min}, 60\ \text{min}$ 和 $120\ \text{min}$ 时, 峰强比与 MCF 的浓度并没有明显的相关性, 作用时间为 $120\ \text{min}$ 时, 只有高浓度的 MCF 下才会表现出 MCF 的浓度与峰强比趋于负相关; 当作用时间高达 $240\ \text{min}$ 时, MCF 的浓度与峰强比趋于负相关, 且只在较高浓度 $2, 4\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 时峰值才趋于平稳, 远远高于 MCF 对白色念珠菌的 MIC_{80} ($0.25\ \mu\text{g}/\text{ml}$)。

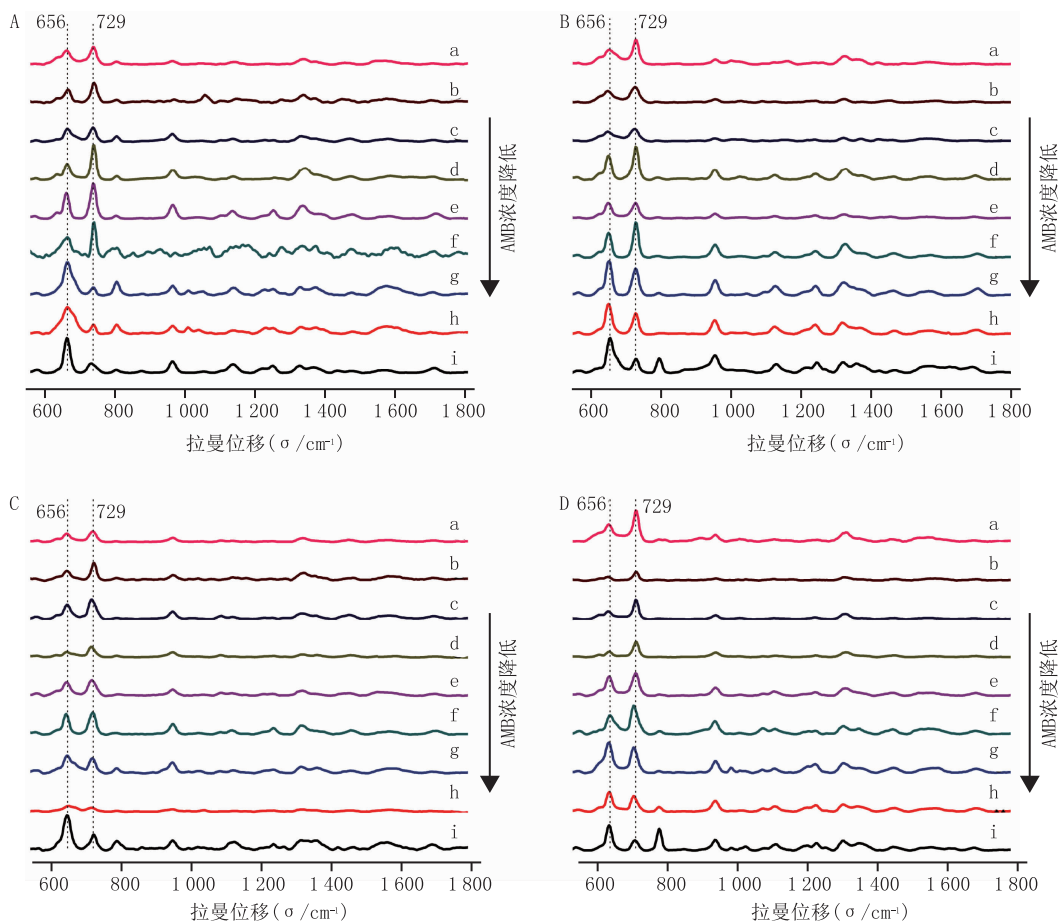


图2 AMB与白色念珠菌不同相互作用时间的拉曼光谱图

A. 孵育 5 min; B. 孵育 60 min; C. 孵育 120 min; D. 孵育 240 min (AMB 的浓度由 a 至 i 依次为 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0 $\mu\text{g/ml}$)

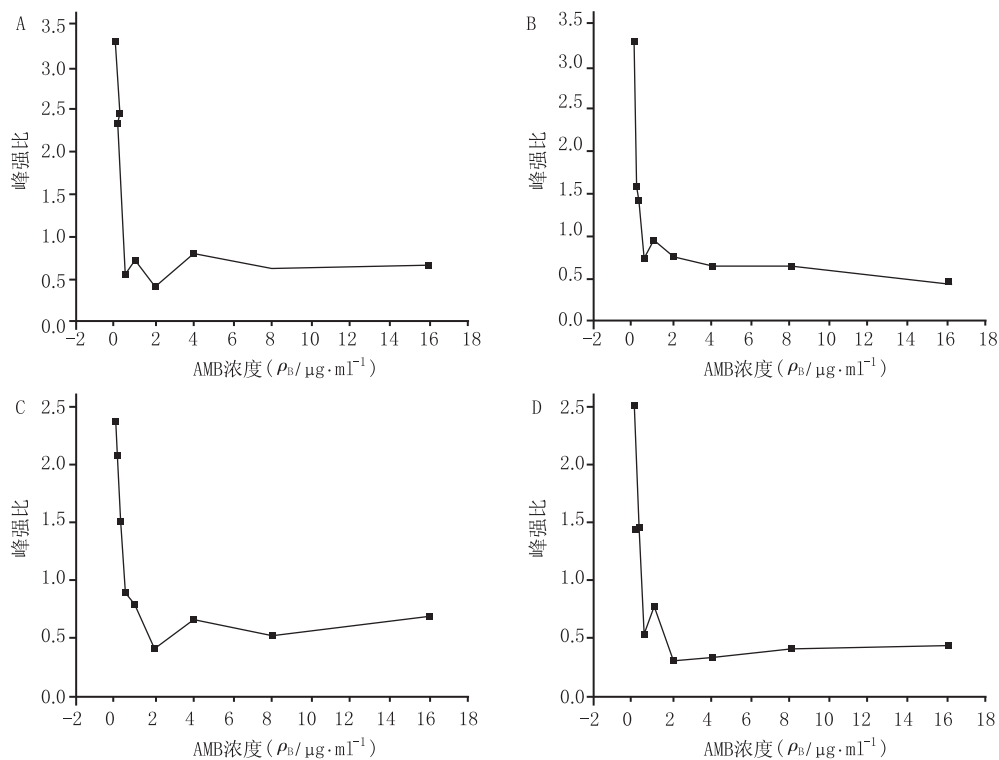


图3 不同作用时间对峰比值与 AMB 浓度的关系

A. 5 min; B. 60 min; C. 120 min; D. 240 min

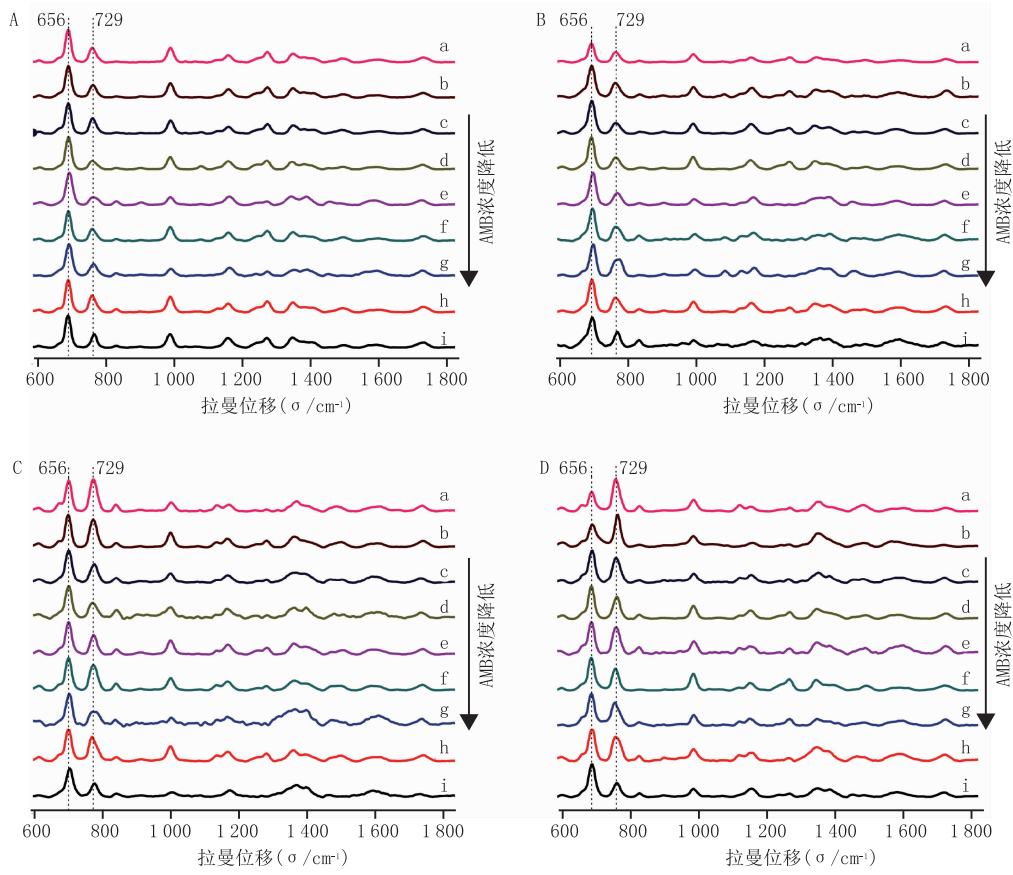


图 4 MCF 与白色念珠菌不同相互作用时间的拉曼光谱图

A. 5 min; B. 60 min; C. 120 min; D. 240 min (MCF 的浓度由 a 至 i 依次为 4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.03125、0 μg/ml)

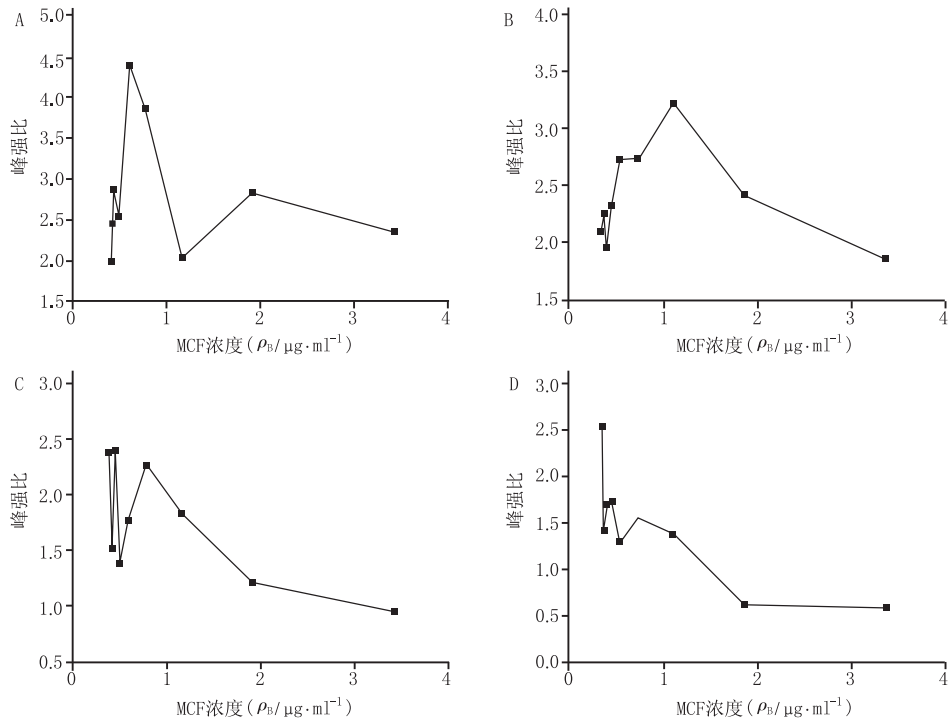


图 5 不同作用时间对峰比值与 MCF 浓度的关系

A. 5 min; B. 60 min; C. 120 min; D. 240 min

3 讨论

液体在硅片表面从湿到干变化的过程中,由于毛细现象,粒子的间距逐渐变小,团聚增加的同时“热点”也会相应地增多,因此待测分析物的 SERS 信号大大增强(主要增强为电磁增强)。白色念珠菌 656 cm^{-1} 和 729 cm^{-1} 的特征峰归属于嘌呤代谢物^[19-21],因而产生较大拉曼散射截面的嘌呤代谢物能够显示在 SERS 光谱中。

当不同浓度 AMB 与白色念珠菌相互作用后,AMB 浓度在 $0\sim 2\ \mu\text{g/ml}$ 范围内,拉曼位移 656 cm^{-1} 与 729 cm^{-1} 处的峰强比与 AMB 浓度成负相关,当 AMB 浓度在低于其最小抑菌浓度 $0.5\ \mu\text{g/ml}$ 时即可接近于高浓度的药物作用时所表现出来的峰强比,且 AMB 与白色念珠菌作用时间仅为 5 min 时即可达到上述的规律及优点,因此,AMB 对白色念珠菌的抑制作用可以在其相互作用只有 5 min 的时间内,用所检测的拉曼位移 656 cm^{-1} 与 729 cm^{-1} 处的峰强比来进行表征。

关于 2 种杀菌药物测定结果的差异,我们的解释如下:由于 MCF 类药物的作用机制是在细胞中非竞争性抑制白色念珠菌细胞壁的重要组成成分 β -1,3-葡聚糖合成,破坏细胞壁结构的完整性导致细胞死亡,因此其原因是可能由于此类药物进入细胞后非竞争性抑制 β -1,3-葡聚糖合成酶的作用,而不像 AMB 一样造成膜孔致使细胞内容物外流,其造成的损害过程较为缓慢的,但因此类药物抑制了细胞壁的合成,随着时间增长,药物浓度升高,细胞壁的破坏较为严重,影响细胞膜的通透性,导致细胞内容物外流,具有较大散射截面的嘌呤代谢物才能够被检测到,在光谱图中显示出来。

4 结论

本研究表明 D-SERS 法可用于描述 AMB 对白色念珠菌的杀菌作用,为表征 AMB 对白色念珠菌的抑制作用提供了一种更简单、快速的检测方法。

同时,随着科技的发展,方法的稳定性得以提高后,还可进一步应用于其他药物与菌株,其快速检测能为临床病原菌的早期诊断提供基础。

【参考文献】

[1] 廖万清. 深部真菌感染治疗进展[C]. 2003 中国中西医结合皮肤性病学术会议论文汇编, 2003, 597-600.
[2] PFALLER M A. Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission[J]. Clinical Infectious

Diseases, 1996, 22(2): S89-S94.
[3] SZWEDA P, GUCWA K, ROMANOWSKA E, et al. Mechanisms of azole resistance among clinical isolates of *Candida glabrata* in Poland [J]. J Med Microbiol, 2015, 64 (6): 610-619.
[4] WHITE T C, MARR K A, BOWDEN R A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance[J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(2): 382-402.
[5] FEKETE-FORGÁCS K, GYÜRE L, LENKEY B. Changes of virulence factors accompanying the phenomenon of induced fluconazole resistance in *Candida albicans*[J]. Mycoses, 2000, 43(7-8): 273-279.
[6] SANGUINETTI M, POSTERARO P, POSTERARO B. Echinocandin antifungal drug resistance in *Candida* species: a cause for concern[J]. Curr Infect Dis Rep, 2010, 12(6): 437-443.
[7] KHAN A A, JABEEN M, ALANAZI A M, et al. Antifungal efficacy of amphotericin B encapsulated fibrin microsphere for treating *Cryptococcus neoformans* infection in Swiss albino mice[J]. Braz J Infect Dis, 2016, 20(4): 342-348.
[8] BREHM-STECHER B F, JOHNSON E A. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68(3): 538-559, table of contents.
[9] JORGENSEN J, FERRARO M. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices[J]. Clin Infect Dis, 2009, 49(11): 1749-1755.
[10] LI P, LIU H, YANG L, et al. The time-resolved D-SERS vibrational spectra of pesticide thiram [J]. Talanta, 2013, 117(22): 39-44.
[11] HE W, ZHOU Y T, WAMER W G, et al. Mechanisms of the pH dependent generation of hydroxyl radicals and oxygen induced by Ag nanoparticles[J]. Biomaterials, 2012, 33(30): 7547-7555.
[12] LIU H, YANG Z, MENG L, et al. Three-dimensional and time-ordered surface-enhanced raman scattering hotspot matrix[J]. J Am Chem Soc, 2014, 136(14): 5332-5341.
[13] ZHU Y, LI M, YU D, et al. A novel paper rag as 'D-SERS' substrate for detection of pesticide residues at various peels [J]. Talanta, 2014, 128: 117-124.
[14] YANG L, LI P, LIU H, et al. A dynamic surface enhanced Raman spectroscopy method for ultra-sensitive detection: from the wet state to the dry state[J]. Chem Soc Rev, 2015, 44(10): 2837-2848.
[15] TANG X, CAI W, YANG L, et al. Monitoring plasmon-driven surface catalyzed reactions in situ using time-dependent surface-enhanced Raman spectroscopy on single particles of hierarchical peony-like silver microflowers [J]. Nanoscale, 2014, 6(15): 8612-8616.
[16] WU M, LI H, LV D, et al. Dynamic-SERS spectroscopy for the in situ discrimination of xanthine analogues in ternary mixture[J]. Anal Bioanal Chem, 2017, 409(23): 5569-5579.

5 讨论

5.1 制剂溶媒的选择

制备盐酸溴己新滴鼻剂时,由于盐酸溴己新水溶性较差,若选择水为分散介质,盐酸溴己新漂浮于液面,且易粘附在容器壁上,经搅拌无法均匀分散;若以甘油为分散介质,但滴鼻液处方中甘油含量过大时,使用后鼻黏膜会有不适灼烧刺激性;以液状石蜡为分散介质,药物均匀分散,且粒子沉降速度慢,沉降后没有结块现象,振摇后能迅速均匀分散,故选择液状石蜡为制剂分散介质。

5.2 流动相的确定

关于流动相选择,曾试验《中国药典》上盐酸溴己新含量测定项下流动相磷酸盐缓冲液-乙腈(20:80)^[6],但试验结果发现出峰情况较差,峰型不正常不对称,基线不平稳,所以未采用该流动相。根据参考文献[7]中使用的流动相甲醇-醋酸溶液(70:30),通过预试验发现盐酸溴己新出峰情况较好,再经过调试,最终确定流动相为甲醇-醋酸溶液(55:45),系统适用性试验结果良好,样品分离度好,峰型对称,基线平稳。

5.3 透皮接受液的选择

体外透皮试验中,根据盐酸溴己新的溶解性,选

择流动相甲醇-醋酸溶液(55:45)作为接收介质,同时为了防止流动相挥发,整个透皮试验均在密封下进行。通过检测24h渗透给药后接收液中盐酸溴己新含量,发现药物渗透量与时间成正相关,表明盐酸溴己新滴鼻剂的透皮效果良好。

【参考文献】

- [1] 中华医学会呼吸病学分会《雾化吸入疗法在呼吸疾病中的应用专家共识》制定专家组. 雾化吸入疗法在呼吸疾病中的应用专家共识[J]. 中华医学杂志, 2016, 96(34): 2696-2708.
- [2] 金伟华, 陈华, 于波涛, 等. 盐酸溴己新栓剂的制备及含量测定[J]. 解放军药学学报, 2017, 12(30): 542-544.
- [3] 于波涛, 范开华, 金伟华, 等. 氮酮用量对马尼地乳膏离体透皮吸收影响的研究[J]. 西南国防医药, 2011, 21(3): 250-252.
- [4] 宋玉华, 杜光焰, 隋广志, 等. 不同浓度的氮酮对鼻宁滴鼻剂透皮吸收的影响[J]. 解放军药学学报, 1999, 15(5): 53-54, 封三.
- [5] 周密, 徐晓勇, 马凤森, 等. 雷公藤涂膜剂的制备及其体外透皮试验[J]. 中成药, 2015, 37(3): 526-529.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)2015年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 9-10.
- [7] 王烽, 方东伟, 谢展鹏. 高效液相色谱法测定盐酸溴己新片的含量[J]. 中国药业, 2007, 16(19): 19.

[收稿日期] 2018-07-06 [修回日期] 2019-01-26

[本文编辑] 陈盛新

(上接第161页)

- [17] FANG F, QI Y, LU F, et al. Highly sensitive on-site detection of drugs adulterated in botanical dietary supplements using thin layer chromatography combined with dynamic surface enhanced Raman spectroscopy[J]. Talanta, 2016, 146: 351-357.
- [18] LEE P C, MEISEL D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols[J]. J Phys Chem, 1982, 86(17): 3391-3395.
- [19] JANA N R, GEARHEART L, MURPHY C J. Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal

and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template[J]. Adv Mater, 2001, 13(18): 1389-1393.

- [20] PREMASIRI W R, LEE J C, SAUER-BUDGE A, et al. The biochemical origins of the surface-enhanced Raman spectra of bacteria: a metabolomics profiling by SERS[J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408(17): 4631-4647.
- [21] SAYIN I, KAHRAMAN M, SAHIN F, et al. Characterization of yeast species using surface-enhanced Raman scattering[J]. Appl Spectrosc, 2009, 63(11): 1276-1282.

[收稿日期] 2018-05-05 [修回日期] 2018-11-13

[本文编辑] 陈盛新