

ICP-MS 法研究 3 nm TiO₂ 的小鼠体内分布

殷吉磊^{1,2} 李玉峰³ 康成³ 诸颖¹ 李玉兰¹
李文新¹ 龚千锋² 黄庆¹ 李晴暖¹

1 (中国科学院上海应用物理研究所 上海 201800)

2 (江西中医学院 南昌 330006)

3 (中国科学院研究生院 北京 100049)

摘要 采用溶胶-凝胶法合成粒径为 3 nm 的 TiO₂ 颗粒, 通过尾静脉注射到小鼠体内, 在不同时间点剖取重要脏器, 并用电感耦合等离子体-质谱法(ICP-MS)测量各个器官内 TiO₂ 的含量。结果显示, 尾静脉注射进入小鼠体内的 TiO₂, 很快随血流分布到全身各脏器, 滞留在体内的 TiO₂ 主要集中在肺、肝、脾三脏, 每克组织的摄取量(%ID/g)分别在 6 h、1 h、1 h 达到最大值 141.73%、25.55%、18.07%。实验还发现, 对照组小鼠脑中 Ti 的含量高于血液, 静脉注射 3 nm TiO₂ 后, 小鼠脑中 Ti 的含量显著增加, 在实验的各个时间点(除 0.5 h), 实验组小鼠脑中 Ti 的含量都比血液高。结果表明纳米 TiO₂ 颗粒的脑毒性研究可能成为其生物效应研究的重点。

关键词 TiO₂, 静脉注射, ICP-MS, 生物分布

中图分类号 TB383, O657.63, O95-33

TiO₂ 纳米颗粒具有表面效应、量子尺寸效应等纳米粒子特性, 其光吸收性能好、表面活性大、导热性好^[1-3]。此外, 纳米 TiO₂ 颗粒能吸收紫外光, 在化工、电子、环保、化妆品等的生产中广泛用作光催化剂^[4,5]。环境或日常生活用品中的纳米 TiO₂ 颗粒可通过呼吸、皮肤接触、胃肠道摄入等途径进入体内, 沉积于肺部或越过生物屏障进入体循环, 产生各种效应^[6-11]。其生物体内吸收、分布、代谢和排泄, 在生物效应研究中不可或缺。由于缺少特异和便捷的纳米材料在生物体内分布的检测分析手段, 有关纳米 TiO₂ 颗粒的生物体内分布数据非常有限。ICP-MS 检测灵敏、快速、准确, 在金属纳米材料生物效应研究特别是体内分布研究中受到重视^[6,7]。本文采用 ICP-MS 法检测 3 nm 的 TiO₂ 颗粒在小鼠体内的分布, 为进一步研究纳米 TiO₂ 颗粒的生物效应和生物应用的开发, 提供基础生物分布参数。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

健康昆明小鼠 28 只, 体重 18-22 g, 购自中国科学院斯莱克动物中心, 许可证号: SCXK2007-

0005。饲养在温度 18℃-22℃、相对湿度 55±10% 的动物房内, 用灭菌颗粒料和纯净水喂养。正式实验前, 小鼠有一周以上的时间适应本实验室的饲养条件。

钛酸四正丁酯(化学纯), 异丙醇(分析纯), 硝酸(分析纯), 购自国药集团。使用前均不进行处理。

原子力显微镜(AFM), Nanoscope IIIa 型, 美国 Digital Instruments 公司; ICP-MS, X-7, 美国 Thermo Elemental 公司。

1.2 纳米 TiO₂ 的制备与表征

参考文献[12-15]的方法并加以改进: 将 13 mL 的钛酸四正丁酯与 4 mL 的异丙醇混合均匀后, 缓慢滴加到置于 0℃ 冰水浴中的 150 mL 稀硝酸(浓度 0.015 mol/L)溶液中, 同时剧烈搅拌。滴加完后, 继续搅拌反应 30 min, 转入 75℃ 水浴中, 搅拌至溶液变透明(约 8 h)。

将制得溶胶置于亚沸蒸馏水透析至中性, 用 AFM 和 SEM 表征纳米 TiO₂。用纯水稀释透析后的 TiO₂ 溶胶, 并用 ICP-MS 测得稀释后 TiO₂ 溶液的浓度为 1.2 mg/mL。

国家重大基础研究专项基金(2006CB705600), 国家自然科学基金(10775169), 上海市纳米专项(0752nm021)资助

第一作者: 殷吉磊, 男, 1982 年出生, 2006 年毕业于华北煤炭医学院, 现为江西中医学院硕士研究生

通讯作者: 李晴暖

收稿日期: 2008-12-23, 修回日期: 2009-02-26

1.3 动物实验

28 只小鼠随机分成两组：对照组(4 只)和实验组(24 只)。用 0.5%戊巴比妥钠麻醉后，实验组每只尾静脉注射 0.2 mL TiO₂(合 240 μg)，对照组每只静脉注射 0.2 mL 生理盐水。

静脉注射后 0.5、1、3、6、24、48 h，实验组随机选出 4 只小鼠，腹腔注射 0.3 mL 的 0.5%戊巴比妥酸钠溶液实施麻醉，在右心房切小口，将 37℃ 灌注液(0.124 mol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1.25 mmol/L NaH₂PO₄, 0.026 mol/L NaHCO₃, 2 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgCl₂, 0.01 mol/L 右旋葡萄糖, 20000 IU 肝素, pH 值 7.4)注入左心室(灌注压约 100 mmHg)，直到从右心房流出的灌注液无色为止。剖取脏器，称重，-20℃ 保存，以备 ICP-MS 分析。

对照组 4 只小鼠在 48 h 时间点按上述方法进行处理。

1.4 组织中 Ti 含量检测

将样品取出解冻，放入聚四氟乙烯杯，加入 2.5 mL 浓 HNO₃ 和 0.5 mL 30% 的 H₂O₂ 溶液，置于钢罐中，密封后 80℃ 消解 3 h，升温至 160℃ 消解 12 h。自然冷却卸压，在电热板上控温蒸发消解液。待蒸发至消解液剩余 0.5 mL 左右时，用 2% 的 HNO₃ 定容至 10 mL。用 ICP-MS 测定 Ti 含量。

2 结果与讨论

2.1 AFM 表征

图 1 为 TiO₂ 的 AFM 图，平均粒径约为 3 nm。

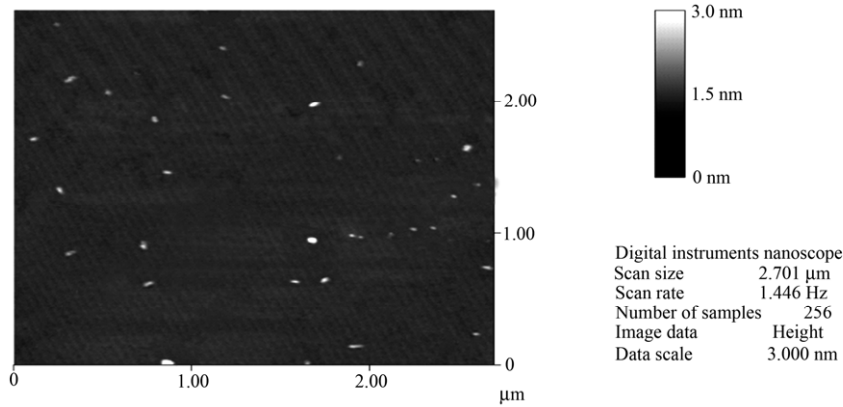


图 1 TiO₂ 纳米颗粒的 AFM 图像
Fig.1 AFM image of TiO₂ the nanoparticles.

2.2 小鼠体内分布

表 1 为 TiO₂ 颗粒的小鼠体内分布数据。尾静脉进入小鼠体内 TiO₂ 颗粒很快随血流分布到各脏器，主要集中在肺、肝、脾。肺部摄取最多，注射后 6 h

%ID/g 达最高值 141.73%，之后缓慢下降；肝中 TiO₂ 颗粒的摄取量在静注后 1 h 达到最高值 25.55%，之后缓慢下降，在 48 h 出现回升；脾中 TiO₂ 颗粒的摄取量在静注后 1 h、24 h 点出现峰值(18.07%和

表 1 尾静脉注射 TiO₂ 在小鼠体内的分布(%ID/g)
Table 1 Biodistribution of TiO₂ in mice injected intravenously with 3 nm TiO₂ particles (%ID/g±SD)

样品 Samples	0.5 h	1 h	3 h	6 h	24 h	48 h	48 h, Control
血 Blood	2.71 ±1.00	0.43 ±0.13	0.24 ±0.02	0.22 ±0.01	0.19 ±0.01	0.31 ±0.11	0.15 ±0.02
肝 Liver	22.24 ±0.03	25.55 ±5.77	14.30 ±1.72	8.02 ±2.02	5.66 ±1.88	13.41 ±0.94	0.32 ±0.03
肺 Lung	108.98±0.66	95.16±11.14	91.05±24.52	141.73±6.87	40.04±14.69	32.37 ±6.81	0.75 ±0.22
脾 Spleen	10.63 ±1.31	18.07 ±4.81	10.64 ±3.54	14.85 ±2.02	18.22 ±3.57	10.81 ±3.17	0.95 ±0.35
肾 Kidney	0.84 ±0.16	1.44 ±0.31	0.81 ±0.21	0.92 ±0.08	0.73 ±0.02	0.58 ±0.09	0.31 ±0.07
脑 Brain	0.50 ±0.02	0.50 ±0.08	0.59 ±0.06	0.58 ±0.06	0.43 ±0.05	0.41 ±0.03	0.31 ±0.02
骨 Bone	0.86 ±0.06	0.68 ±0.03	0.84 ±0.22	1.49 ±0.71	1.44 ±0.63	0.80 ±0.04	0.52 ±0.07

18.22%)。肝和脾中 TiO₂ 颗粒的摄取量均出现两次峰值,这可能是肺中早期截留的 TiO₂ 经一段时间后逐渐释放到血液中,使肝、脾的 TiO₂ 摄取量出现回升,且最终主要通过肝脏排泄出去。骨中也有少量摄取,至 48 h,仍有少量 TiO₂ 颗粒停留在骨中。肾摄取量不多,可见主要不是通过肾排泄。与对照组相比较,48 h 后仍有很多 TiO₂ 颗粒滞留于实验组小鼠体内。

Wang 等^[6]的研究表明,粒径为 80 nm 的 TiO₂ 颗粒经口服后在红细胞中含量最高,其次是肺、脾和肾;粒径为 25 nm 的 TiO₂ 颗粒在脾中含量最高,其次是肾和肺。Fabian Eric 等^[7]报道,静脉注射粒径为 20–30 nm 的 TiO₂ 颗粒 28 d 后,肝中的含量最高,其次是脾、肺和肾。本实验发现,静脉注射 48 h 内,3 nm TiO₂ 颗粒在肺中的量始终最高,其次为肝和脾。可见纳米 TiO₂ 颗粒的体内分布受其进入生物体的方式影响,也受粒径大小影响。Zhang 等^[16]发现,粒径小于 10 nm 的 TiO₂ 颗粒有独特的化学性质,如粒径 6 nm 的 TiO₂ 颗粒对羧酸化合物的吸附能力远大于粒径 16 nm 的颗粒,两者的 Langmuir 吸附常数 K_{ads} 相差几个数量级, $K_{ads}(6\text{ nm})/K_{ads}(16\text{ nm}) > 1000$ 。由此可推测,粒径越小并不意味着其进入生物体内后团聚程度越小。本实验的 TiO₂ 的粒径比文献^[6,7,16]的小一个数量级,理论上,小粒径的颗粒在肺中的滞留要少于大粒径的颗粒,实验结果却相反,这除了与检测的实验时间点不同有关外,两者吸附能力的差异也是造成不同分布结果的原因之一,粒径小于 10 nm 的 TiO₂ 颗粒更易吸附血液中的有形成分,形成较大颗粒在肺部滞留。

图 2 为小鼠血液和脑中 Ti 浓度随时间的变化。除 0.5 h 外,各个时间点的脑中 Ti 含量均高于血液中,在 3 h 点,摄取量达最高值 840 ng/g,而此时血液中 Ti 量仅 3.4×10^2 ng/g;随后脑中的摄取量随时间缓慢下降,到 24 h,每克脑组织的摄取量仍达 6.2×10^2 ng。由此推断,进入血循环的粒径为 3 nm TiO₂ 颗粒经过血脑屏障进入脑组织。值得注意,对照组的小鼠脑中的 Ti 量同样高于血液,脑中 Ti 含量达 450 ng/g,而每血液中含量为 220 ng/g,这说明未注射纳米 TiO₂ 的小鼠体内已有 Ti 的积累。因实验中使用的小鼠鼠龄较短,且生活在洁净环境,小鼠体内的 Ti 最大可能是食物摄入。我们检测了小鼠粮食的 Ti 含量,高达 9100 ng/g。这结果提示要正确评价纳米 TiO₂ 颗粒的生物效应,给予无 Ti 饲料是必要的。

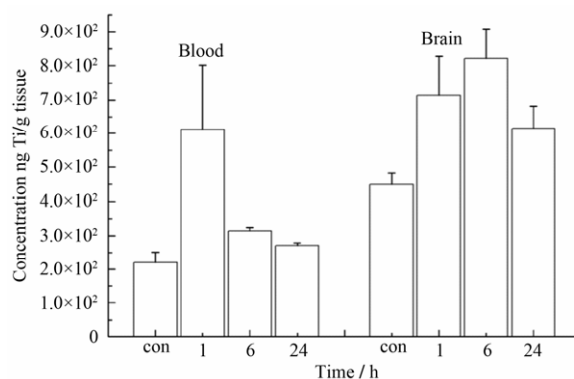


图 2 小鼠血液和脑中 Ti 浓度随时间的变化
Fig.2 Ti contents in blood and brain at different hours after injection.

3 结论

粒径为 3 nm 的 TiO₂ 颗粒尾静脉注射进入小鼠体内后,很快随血流分布到各脏器,滞留体内的 TiO₂ 颗粒主要集中在肺、肝、脾,6 h、1 h、1 h 后,每克组织的摄取量分别达最大值 141.73%、25.55%、18.07%。实验还发现,对照组小鼠脑中含有较高量的 Ti,即便如此,静脉注射后,仍有显著量的 TiO₂ 通过血脑屏障进入小鼠脑部。实验结果揭示,纳米 TiO₂ 颗粒的脑毒性研究可能成为其生物效应研究的重点。本实验结果提示要正确评价纳米 TiO₂ 颗粒的生物效应,须确保动物的饲养环境和粮食无 Ti。同时大量存在于环境中的纳米 TiO₂ 颗粒有可能影响人类的健康,因此正确评价其对环境和人类的影响非常重要。

参考文献

- 1 Choi W Y, Termin A, Hoffmann M R. *J Phys Chem*, 1994, **98**(5): 13669–13679
- 2 Song Z, Hrbek J, Osgood R. *Nano Lett*, 2005, **5**: 1327–1332
- 3 Wang C, Pagel R, Bahnemann D W, *et al.* *J Phys Chem B*, 2004, **108**: 14082–14092
- 4 Harada Denji. *Water Res*, 1990, **24**(11): 1415–1417
- 5 Chen J. *Water Res*, 1999, **33**(3): 661–668
- 6 Wang J X, Zhou G Q, Chen Ch Y, *et al.* *Toxicol Lett*, 2007, **168**: 176–185
- 7 Eric Fabian, Robert Landsiedel, Lan Ma Hock, *et al.* *Arch Toxicol*, 2008, **82**: 151–157
- 8 Grassian V H, O'Shaughnessy P T, Adamcakova-Dodd A, *et al.* *Environ Health Perspect*, **115**(3): 397–402
- 9 宋文华, 张文佳, 张金洋, 等. *南开大学学报(自然科学版)*, 2008, **41**(3): 14–18

- SONG Wenhua, ZHANG Wenjia, ZHANG Jinyang, *et al.* Acta Sci Nat Univ Nankaiensis, 2008, **41**(3): 14–18
- 10 李俊纲, 李晴暖, 李文新, 等. 纳米科技, 2006, **3**(6): 17–21
- LI Jungang, LI Qingnuan, LI Wenxin. *et al.* Nanosci Nanotechnol, 2006, **3**(6): 17–21
- 11 Bermudez E, Mangum J, Wong B, *et al.* Everitt Toxicol Sci, 2004, **77**: 347–357
- 12 郝彦忠, 李卫华, 何君勇, 等. 化学通报, 1998, **61**(7): 34–37
- HAO Yanzhong, LI Weihua, HE Junyong, *et al.* Chin Chem Soc, 1998, **61**(7): 34–37
- 13 廖东亮, 肖新颜, 张会平, 等. 化学工业与工程, 2003, **20**(5): 256–260
- LIAO Dongliang, XIAO Xinyan, ZHANG Huiping, *et al.* Chem Ind Eng, 2003, **20**(5): 256–260
- 14 王琳, 吴忆宁, 汪炎. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2006, **22**(3): 76–79
- WANG Lin, WU Yining, WANG Yan. J Harbin Univ Commer (Nat Sci Ed), 2006, **22**(3): 76–79
- 15 毛日华, 孔之瑾, 郭存济. 上海大学学报(自然科学版), 1999, **5**(6): 476–480
- MAO Rihua, KONG Zhijin, GUO Cunji. J Shanghai Univ (Nat Sci), 1999, **5**(6): 476–480
- 16 Zhang H Z, Penn R L, Hamers R J, *et al.* J Phys Chem B, 1999, **103**: 4656–4662

ICP-MS analysis for TiO₂ distribution in mice injected with 3 nm TiO₂ particles

YIN Jilei^{1,2} LI Yufeng³ KANG Cheng³ ZHU Ying¹ LI Yulan¹
LI Wenxin¹ GONG Qianfeng² HUANG Qing¹ LI Qingnuan¹

¹(Shanghai Institute of Applied, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

²(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

³(Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract In this work, TiO₂ nanoparticles of 3 nm in size were synthesized by sol-gel technique and injected intravenously into mice. The organs were collected at 0.5, 1, 3, 6, 24 and 48 h after injection. Ti content in the organs was detected by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The results indicated that injected TiO₂ nanoparticles were translocated into the organs via bloodstream immediately after injection, and deposited mostly in lung, liver and spleen. The TiO₂ uptake (%ID/g) in the three organs reached the peak value of 141.73%, 25.55%, and 18.07% at 6 h, 1 h and 1 h after injection, respectively. The results also showed that there was significant amount of Ti in the brains of the control, and the brain Ti content increased markedly after injection. At 1, 3, 6, 24 and 48 h after injection the brain Ti content was higher than that in blood. The experiment indicated that its toxicity on brain would be the emphasis of biological impact study of nano TiO₂.

Key words Titanium dioxide, Intravenous injection, ICP-MS, Biodistribution

CLC TB383, O657.63, O95-33