超小的羧甲基壳聚糖超顺磁氧化铁纳米粒制备及处方优化

范彩霞^{1a,2},高文慧^{1a},陈志良^{1a*},陈志喜³,李明瑛^{1b}(1.南方医科大学南方医院,a 药学部,b 心血管内科,广州 510515; 2.湘南学院药理教研室,湖南 郴州 423000; 3.湘南学院附属医院耳鼻喉头颈外科,湖南 郴州 423000)

摘要:目的 优化羧甲壳聚糖超小超顺磁氧化铁纳米粒(O-carboxymethyl-chitosan ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticle, OCMCS-USPIO-NPs)处方并对其理化性质进行表征。方法 共沉淀法合成超顺磁氧化铁纳米粒核并用羧甲基壳聚糖对其表面进行共价修饰,用正交实验 L₉(3⁴)对 OCMCS-USPIO-NPs 的处方优化和工艺进行优化筛选;用透射电镜、电子相关光谱仪(LSD)、X-Ray 衍射法、傅立叶红外、磁性测定仪、MRI 扫描仪和邻二氮菲法测定铁含量等对制备的 OCMCS-USPIO-NPs 进行表征;用普鲁士蓝染色法体外评价 OCMCS-USPIO-NPs 抗吞噬能力。结果 正交实验处方优化 处方为: 羧甲基壳聚糖的分子量为 1~2 万,浓度为 3%,超声时间为 45 min,功率为 600 W;傅立叶红外和 X-Rays 结果 证实了 OCMCS-SPIO-NPs 的合成,羧甲基壳聚糖的修饰显著降低超顺磁氧化铁的流体粒径及超顺磁性,修饰后饱和磁性 为 73.4 emu·g⁻¹ Fe,磁性较强;同时增加纳米粒表面的 Zeta 电位,普鲁士蓝染色结果表明巨噬细胞吞噬的纳米粒量依次 是: uncoated SPIO-NPs > dextran-SPIO-NPs > OCMCS-SPIO-NPs。结论 合成的 OCMCS-USPIO-NPs 的流体粒径<50 nm,具有强的超顺磁性,分散性好,能逃避巨噬细胞的摄取,可用于 MRI 照影。 关键词: 羧甲基壳聚糖;超小超顺磁氧化铁纳米粒;正交实验;MRI 造影剂

中图分类号: R943.42 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2010)09-0825-07

The Synthesis and Characterizations of *O*-Carboxymethyl-Chitosan Ultra-small Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles

FAN Caixia^{1a, 2}, GAO Wenhui^{1a}, CHEN Zhiliang^{1a*}, CHEN Zhixi³, LI Mingyan^{1b}(1.Nanfang Hospital, Southern Medical University, a.Department of Pharmacy, b.Department of cardiology, Guangzhou 510515, China; 2.Department of

作者简介:范彩霞,女,博士,讲师 Tel: (020)62787236 E-mail: mydream0509@yahoo.com.cn *通信作者:陈志良,男,教授 Tel: (020)62787236 E-mail: lifanlei@fimmu.com

中国现代应用药学 2010 年 9 月第 27 卷第 9 期

Chin JMAP, 2010 September, Vol.27 No.9 • 825 •

OIL

Pharmacy, Xiangnan University, Chenzhou 423000, China; 3.Department of Otolaryngologyz-Head and Neck Surgery, Affiliated Hospital of Xiangnan University, Chenzhou 423000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a novel USPIO-NPs system by surface-modifying superparamagnetic iron oxide nanoparticles (USPIO-NPs) with O-carboxymethyl-chitosans (OCMCS) to improve their biocompatibility and ability to evade reticuloendothelial system(RES). METHODS The OCMCS-USPIO-NP was synthesized by two-step methods: at first, the plain SPIO-NPs was synthesize by alkaline co-precipitation, then the surface of the SPIO-NPs were modified by conjugating the OCMCS to USPIO-NPs, orthogonal experimental design of $L_9(3^4)$ was used to optimize the technology of preparing OCMCS-USPIO-NPs. The resulting USPIO nanoparticles were characterized by dynamic light scattering (DLS), fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscope (TEM), zeta-potential measurement and vibrating sample magnetometry (VSM) and MRI. The internalization of uncoated SPIO-NPs, dextran-SPIO-NPs and OCMCS-USPIO-NPs was visualized via prussian blue staining to evaluate the ability of the different SPIO-NPs to escape the macrophage capture. **RESULTS** The orthogonal experimental design demonstrated that the best technology was as follows: carboxymethyl chitosan molecular weight was 10-20 K, the concentration of OCMCS was 3%, ultrasonic time was 45 min, ultrasonic power was 600 W. FTIR and XRD results confirmed that the successful synthesis of OCMCS-SPIO-NPs. VSM results demonstrated both the modified magnetic Fe₃O₄ nanoparticles and the uncoated SPIO-NPs were superparamagnetic. The results of characterization also demonstrated that the modification with OCMCS results in a drop in hydrodynamic size, saturated hysteresis (r) while lead to a increase in zeta potential. The prussian blue staining in vitro results indicated the internalization of OCMCS-USPIO-NPs into macrophage was much lower than that of dextran-SPIO-NPs and further lower than SPIO-NPs. CONCLUSION The synthesized OCMCS-USPIO-NPs system is stable with hydrodynamic size less than 50 nm, strong electrostatic repulsion, strong super-paramagnetic and low macrophage uptake. Thus, OCMCS-USPIO-NPs system can be a desirable alternative for MRI contrast agent.

KEY WORDS: *O*-carboxymethyl-chitosan; ultra-small superparamagnetic iron oxide nanoparticle; orthogonal experimental design; MRI contrast agent

超顺磁氧化铁纳米粒(superparamagnetic iron oxide, SPIO)作为 MRI 造影剂, 主要是由于 其在选择适当弛序列前提下,可以负性提高 T, 和 T_2^* 松弛时间,对 T_1 时间影响小。由于正常组 织细胞和病变组织细胞对 SPIO 的吞噬能力存在 差异,产生对比效果,用于疾病的诊断。但是未 经修饰的 SPIO 纳米粒,由于 SPIO 粒子之间存 在强的磁偶极-偶极作用,容易聚集成团,使其 溶液相当不稳定。进入体内的 SPIO 纳米粒由于 粒径小、吸附面积大,可以大量的吸附血液中各 种蛋白质等大分子物质,使得粒径迅速增大,而 易被网状内皮细胞吞噬,并迅速代谢,导致体内 半衰期缩短,应用受限。为了增加 SPIO 的稳定 性及拓展其应用的空间, SPIO 的表面常被修饰。 常见的方法是将高分子物质与 Fe³⁺和 Fe²⁺以摩 尔比2:1反应,采用共沉淀制备,如葡聚糖-超 顺磁氧化铁纳米粒的合成;或者是采用先合成 SPIO 纳米粒,以核-壳形式进行修饰,如合成 SPIO 纳米粒后,再以 SPIO 纳米粒作为核,与高 分子材料如 PVA、PEG 或者是 PEO 反应形成简 单核-壳结构,增加 SPIO 的稳定性和亲水性,制 成隐形纳米粒,从而减少体内血管内皮系统吞噬 细胞的吞噬,增加 SPIO 的稳定性和亲水性,延 长作用时间;或者制备 SPIO 核后,外面直接包

被大分子物质,通过大分子物质之间的相互作用 形成稳定的壳结构,如 SPIO-壳聚糖纳米粒,或 者是制备 SPIO 纳米粒后,采用乳化溶剂法制备 PLGA-PLA-SPIO 纳米粒等^[1]。

羧甲基壳聚糖(carboxymethyl chitosan, OCMCS)是壳聚糖的衍生物,生物相容性好,可生 物降解,无细胞毒性,具有较强的抗菌^[2]、抗肿瘤 和增强免疫的作用^[3],而且价格低廉。与壳聚糖相 比,由于壳聚糖 6 位的羟基上的氢被羧基取代使 得其水溶性增加,而且羧基在碳二亚胺的作用可 以活化,与超顺磁氧化铁上的氧发生亲核反应, 形成共价结合,可增加 SPIO 的稳定性和亲水性, 减少聚集,形成稳定的 CMC-SPIO 纳米粒^[4]。通 过控制 OCMCS-USPIO-NP 的粒径在 50 nm 以下, 减少肝、脾、骨髓等网状内皮系统的吞噬,使其 消除速率变慢,半衰期延长,可用于肿瘤的淋巴 结转移,脑内肿瘤、炎症和退行性疾病的诊断, 利用血管池造影原理可以用于心脏疾病、动脉粥 样硬化等疾病的诊断^[5]。

本研究采用二步合成法合成超小的羧甲基壳 聚糖-超顺磁氧化铁纳米粒用正交实验对其合成工 艺进行优化筛选,控制其粒径在 50 nm 以内,并 对终产物在粒径、晶型、Zeta 电位、傅立叶红外 扫描和铁含量等方面进行表征。

1 材料

1.1 试剂

碳二亚胺(Sigma 公司); SephacryS-300HR 凝 胶(美国 Pharmacia 公司); 透析袋(截留相对分子 质量 8 000~15 000,上海源聚生物科技有限公司分 装); 超滤离心管(截留分子量 10 k,北京赛百奥科 技有限公司); 羧甲基壳聚糖(分子量为 1~2 万、5 万、15 万,脱乙酰化度≥93%,羧基取代度≥87%, 浙江仙台壳聚糖有限公司); 氯化铁(FeCl₃·6H₂O)、 酸亚铁(FeSO₄·7H₂O)、浓盐酸、亚铁氰化钾、浓 氨水、95%的乙醇均购于广州分析化学有限公司; 菲立磁(dextran-SPIO-NP,美国 Advanced Magnetics 公司); DMEM 培养基(Hyclone); 胎牛血清(Hyclone, 澳洲); 青霉素-链霉素双抗(普博新生物技术有限 公司); 胰蛋白酶(Sigma,北京普博新生物技术有 限公司分装),高精度的 pH 试纸,超纯水等。

1.2 主要仪器

Malvern-3000HS 光子相关光谱仪(英国 Malvern 公司); MPMS XL-7 磁学性质测量系统(美国 Quantum Design 公司); FS-600 超声波处理仪(上海 生析仪器有限公司); D/Max-IIIAX-射线粉末(多晶) 衍射仪(日本理学电机);日本电子公司 JEM-100CX II型,日立 H-300 型透射电镜; RFX-65A 傅立叶 变换红外光谱(美国 Analect 公司); Unicam UV550 紫外分光光度计(美国热电公司); 5810R 低温离心 机(Eppendorf 公司); Eclipse TS100 倒置显微镜 (Nikon 公司); OLYMPUS 1X71 荧光倒置显微镜, QB9001 微孔板快速振荡器(其林贝尔); HERMLE Z360 高速低温离心机(德国); CL-2 型恒温磁力搅 拌器(河南巩义予华仪器厂); 电接点温度计, DZF-6020真空干燥箱。

2 方法

2.1 制备工艺

2.1.1 合成超顺磁氧化铁纳米粒 按摩尔比为 2:1称取 FeCl₃和 FeSO₄,加水搅拌使其溶解,并 加入 0.1 mol·L⁻¹盐酸溶液,调节 pH 至 3.0,升温 至 30℃,充氮 30 min,除掉溶解的氧气,逐滴加 入 25%的氨水溶液适量,使溶液的 pH 升至 10.0, 反应 30 min,升温至 80℃,消化 1 h,停止反应, 磁性分离,分别用水和乙醇溶液洗 3 遍,于 70℃ 真空干燥 24 h。

2.1.2 羧甲基壳聚糖超顺修饰磁氧化铁纳米粒 精密称取干燥的超顺磁氧化铁纳米粒 0.2 g, 加入

中国现代应用药学2010年9月第27卷第9期

4 mL Buffer A 溶液(0.003 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液, 含 1 mol·L⁻¹ NaCl, pH 6.0)和含碳二亚胺浓度为 60 g·L⁻¹ Buffer A 溶液 1 mL,超声分散 10 min,加入 羧甲基壳聚糖溶液,保持羧甲基壳聚糖和超顺磁 氧化铁纳米粒的质量比恒定为(3:1),超声分散, 产物于 3 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,弃去沉淀,取上 清液,超滤浓缩后,过 HS 300 R 葡聚糖凝胶柱, 以 0.003 mol·L⁻¹ pH 6 磷酸盐缓冲液(PBS)作为流 动相,收集首峰溶液,并取首峰溶液用蒸馏水透 析 24 h,超滤浓缩,得到黑色混悬液,部分留样 后剩余产物分别用水和 95%乙醇洗 3 遍,于 55 ℃ 真空干燥。

2.1.3 采用正交实验对羧甲基壳聚糖超顺磁氧化 铁纳米粒合成的工艺优化 本实验采用正交实验 制备粒径小于 50 nm 的超小的 OCMCS-USPIO 纳 米粒,羧甲基壳聚糖的分子量及其浓度、超声的 时间、强度是影响超顺磁氧化铁纳米粒粒径大小 的重要因素,因此本实验以羧甲基壳聚糖的分子 量(A)、羧甲基壳聚糖的浓度(B)、超声时间(C)、 超声强度(D)作为自变量,以羧甲基壳聚糖纳米粒 的粒径作为因变量,进行正交设计 L₉(3⁴),得到 9 个处方,具体的方案见表 1 和表 2,并测定各个处 方的亲水粒径,结果见表 2。并用 SPSS 13.0 软件 对该正交实验进行方差分析,确定最佳处方。根 据最佳处方工艺制备 OCMCS-USPIO-NPs 并对其 进行表征。

表1	正交实验因素和水平
Tab 1	Factors and levels

	因素				
水平	公子昰/10V	OCMCS 溶	超声时	超声强	
, 1 - 1	力」重/IUK	液的浓度/%	间/min	度/W	
	A	В	С	D	
1	1~2	2	30	300	
2	5	3	45	450	
3	15	4	60	600	

2.2 表征

2.2.1 X-Ray 衍射 取真空干燥的 OCMCS-USPIO 和 SPIO 纳米粒研细,置 D/Max-IIIAX-射线粉末衍 射仪,采用镍过滤的 Cū Kα 放射线,以 4θ min⁻¹ 的速度扫描,扫描范围是 2θ 为 10°~90°。

2.2.2 红外光谱 取干燥的 SPIO 纳米粒粉末,分散于 KBr 的小片中,采用美国 Analect 公司 RFX-65A 傅立叶变换红外光谱仪在 4 000~400 cm⁻¹内扫描,记录红外光谱。

表 2 正交实验结果 Tab 2 Results of orthogonal design

	OCMCS	OCMCS 溶	超声时	超声功	OCMCS-
处方	分子量/10 K	液浓度/%	间/min	率/W	USPIO-NP 的
	А	В	С	D	亲水粒径/nm
1	1~2	4	45	450	77.5
2	5	4	60	300	114.7
3	5	3	30	450	82.8
4	5	2	45	300	85.9
5	15	4	30	600	96.5
6	15	3	45	600	93.9
7	15	2	60	450	102.0
8	1~2	2	30	300	98.1
9	1~2	3	60	600	40.5
K1	213.1	290.0	278.4	298.7	
K2	284.4	217.2	256.3	262.3	
K3	294.39	286.7	258.5	230.9	
R	25.43	23.83	7.36	22.6	

2.2.3 磁化率 精密称取真空干燥后的纳米粒适量,于JDM-13D磁性测定仪中,测定温度为300K,随着外磁场从-4000~4000Oe,记录磁滞的变化情况,并绘制对应的磁性曲线。

2.2.4 驰豫率 取 OCMCS-USPIO 溶液适量,分 别加水稀释至铁浓度为 0.04, 0.06, 0.08, 0.10, 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.20 mmol·L⁻¹, 依次取这 些浓度的样品稀释液 10 mL 分装于 9 支管径为 1 cm 的试管,采用经典的 Carr-Purell-Meiboom-Gill 序列对各管进行横断成像,扫描条件为层厚15mm, Fov=17 cm, TR/TE=4 000/40 ms, 共获 6 个回波像, 然后用 ROI 程序直接测量每管的值(测定范围为 65 个 Pixels)。以铁的浓度(mmol·L⁻¹)为横坐标(X), 所对应的横向弛豫时间(T₂)的 1/T₂ 值为纵坐标(Y) 作图,所得直线的斜率即为该SPIO样品的驰豫率。 2.2.5 铁含量 参照无机化学试验方法采用邻二 氮菲铁法测定纳米粒中铁的含量,在 510 nm 的波 长处测定吸收度,以亚铁氰化钾作为标准品绘制 标准曲线后,取样晶适量,液体样晶精密取样晶 1 mL,固体样品精密称取样品约 10 mg,于 50 mL 量瓶中,加入15mL30%浓盐酸溶液,待充分溶解 后,加水至刻度。取样品1mL,于50mL量瓶中, 加入 10%盐酸羟胺溶液 1 mL,充分振荡,加入 0.15%邻二氮菲溶液 2 mL,加入 1 mol·L⁻¹乙酸钠 溶液 5 mL 后,用水稀释至刻度。在 510 nm 波长 处测定吸收度,代入对应的标准曲线,求出铁含量。 2.2.6 透射电镜检查 采用高分辨的日本电子公 司 JEM-100CX II 型进行检查, 取留样观察的纳米

粒的水溶液,用乙醇稀释至适当浓度,取一滴滴 入有支撑膜的 200 目的铜网中,常温干燥后,置 透射电镜下观察 SPIO 纳米粒的形状和分布。

2.2.7 粒径及 ζ 电位测定 吸取适量 4 C 留样观 察的 OCMCS-USPIO 和未为包被的 SPIO 纳米粒混 悬 液稀释 至 适 当 倍 数 , 用 激 光 粒 度 分 布 仪 (Nano3000HS, Malvern)测定上述纳米粒的粒径大 小及分布和 ζ 电位。

2.3 体外巨噬细胞摄取实验

2.3.1 细胞培养 RAW264.7(小鼠白血病巨噬细胞株)常规培养于含 10%胎牛血清和 100 单位的青链霉素双抗溶液 DMEM 全培中,放置于温度为 37 ℃、CO₂浓度为 5%的培养箱中,每隔 1 d 换液 1 次,用 EDTA-胰酶消化传代。

2.3.2 普鲁士蓝染色 将 RAW264.7 细胞接种于 培养瓶中培养,加入含10%胎牛血清的 DMEM 溶 液适量,于 37 ℃、5% CO2 培养 24 h 后,细胞达 到 80%~90%汇合,用 PBS 液洗 2 遍,加入 0.25% 胰酶-EDTA(0.02%)消化,加入 PBS 液适量后,制 备细胞悬液,离心,弃去上清,加入 DMEM 全培, 制成细胞悬液,浓度为 2.5×10⁵·mL⁻¹,接种于六 孔板上,每孔细胞数为5×105,孵化24h后,用 PBS 液洗 3 遍后, 加入含铁量 800 µg·mL⁻¹的 SPIO, dextran-SPIO, CMCS-SPIO DMEM 溶液 1 mL, 孵 化 24 h, 用 PBS 溶液充分洗 3 遍, 加入 1 mL 4% 多聚甲醛溶液,固定 20 min 后,加入含 2%亚铁氰 化钾溶液和 2%HCl(2:1 混合液)1 mL, 在 37 ℃, 孵化 30 min 后,用 PBS 液洗 3 遍后,于倒置显微 镜下观察, 拍照并用未加入 SPIO 溶液的细胞作为 空白对照。

3 结果

3.1 正交实验处方优化

根据表 2 统计分析结果,各因素对粒径的影 响依次是羧甲基壳聚糖的分子量(A)>超声强度(D) > 羧甲基壳聚糖溶液的浓度(B)>时间(C),其中羧 甲基壳聚糖的分子量、超声强度、浓度是影响 OCMCS-USPIO 粒径的决定因素,超声时间对粒 径的影响较小。随着超声强度的增加,OCMCS 分 子量下降,细胞的粒径随之下降,浓度对粒径的 影响表现为先随着浓度增加粒径减少,接着增加 的趋势,其中 OCMCS 的浓度为 3%时,粒径最小。 因此最佳工艺处方是 A1B2C2D3,即羧甲基壳聚 糖的浓度为 3%,分子量为 1~2 万,超声时间为

45 min,强度为 600 W。根据最佳工艺重新制备 OCMCS-USPIO-NPs,对制备的纳米粒进行表征, 并与未修饰的 SPIO-NPs 进行对照,考察两者之间 各性质的差异。

3.2 OCMCS-SPIO-NPs 和 uncoated-SPIO-NPs 表征 **3.2.1** X-ray 粉末衍射 从 OCMCS-USPIO 样品 的 XRD 图谱可以看出: SPIO 粒子的 XRD 谱分别在 20 为 30.14°, 35.44°, 43.20°, 53.80°, 56.90°, 62.58°时出现主要衍射峰,其位置与 Fe₃O₄的标准 谱图中的位置一致,说明合成产物的主要成分即 为 Fe₃O₄。见图 1。



图 1 SPIO-NPs 和 OCMCS-USPIO-NPs 的 X-Ray 图谱 A-羧甲基壳聚糖超小超顺磁氧化铁纳米粒; B-未包被超顺磁氧化铁纳 米粒

Fig 1 The X-Ray images of OCMCS-USPIO-NPs and SPIO-NPs

A-OCMCS-USPIO-NPs; B-SPIO-NPs

3.2.2 红外光谱 Fe₃O₄ 纳米粒、OCMCS-USPIO 纳米粒和 OCMCS 的透射红外光谱图见图 2。Fe₃O₄ 纳米粒在564 cm⁻¹的特征吸收峰归因于Fe-O的伸 缩振动,是 Fe_3O_4 的典型吸收峰,3 437 cm⁻¹的吸 收峰是-OH和-FeOO⁻伸缩振动引起,这表明 Fe₃O₄ 纳米粒子表面存在一些活性-OH 基团。OCMCS 出 现了一系列典型的吸收峰,它们分别为3438 cm⁻¹ 处的-NH2和-OH 的伸缩振动吸收峰, 2915 cm⁻¹ 处的 C-H 振动吸收峰, 1609 cm⁻¹ 与 1411 cm⁻¹ 处的-COO⁻的反对称振动峰和-COO⁻的对称振动 吸收峰, 1 060 cm⁻¹ 处是仲醇羟基相连的 C-O 的 伸缩振动吸收峰。通过比较 OCMCS-Fe₃O₄, Fe₃O₄ 和 OCMCS 的红外光谱图,发现 Fe₃O₄ 红外光谱 中 564 cm⁻¹ 处的 Fe-O 吸收峰, OCMCS 的光谱图 3 438 cm⁻¹ 和 1 626 cm⁻¹ 处的吸收峰,在 OCMCS-Fe₃O₄ 红外光谱发生位移,分别至 560,3421 和 1 622 cm⁻¹ 处, OCMCS 粉末的特征峰 1 609, 1 411 和 1060 cm⁻¹ 特征峰位移至 1622, 1410 和 1059 cm⁻¹,而且峰对应的强度也发生了改变。由 此可知 OCMCS 与 Fe₃O₄ 磁性粒子已经形成复合 物,Fe-O和OCMCS的-COO⁻和仲醇羟基可能参

与了复合物形成过程中化学键的形成。



图 2 OCMCS, SPIO 纳米粒和 OCMCS-USPIO 纳米粒的 红外扫描图

A-OCMCS; B-OCMCS-USPIO-NPs; C-SPIO-NPs

Fig 2 FT-IR spectrum of the OCMCS, SPIO nanoparticles and OCMCS-USPIO nanoparticles A-OCMCS; B-OCMCS-USPIO-NPs; C-SPIO-NPs

3.2.3 磁化率 SPIO 和 OCMCS-USPIO 纳米粒的 磁化曲线见图 3,两曲线都为过原点的单一曲线, 既是当外磁场为 0 时,SPIO 没有剩磁,当有外磁 场存在时产生剩磁。说明合成的纳米粒具有超顺 磁性,从图中可以看出,随着外加磁场强度的增 大,磁化强度值增大,且两者之间呈非线形关系。 当外加磁场增大到一定值时,继续增大外加磁场 强度,磁化强度值保持不变,此时达到磁饱和,



图 3 超顺磁氧化铁的磁化曲线

A-SPIO 纳米粒; B-OCMCS-USPIO 纳米粒

Fig 3 Magnetization curve of SPIO-NP and OCMCS-SPI-NP

A-SPIO nanoparticles; B-OCMCS-USPIO nanoparticles

测得 SPIO 纳米粒和 OCMCS-USPIO 纳米粒粒质量 饱和磁化强度为 98.02 emu·g⁻¹ Fe 和 71.37 emu·g⁻¹ Fe,高于 SPIO 样品所要求的最低质量标准 41 emu·g⁻¹ Fe。

3.2.4 驰豫率 T₂信号强度随铁浓度变化所对应的值,见表 3。由表可知,随着铁浓度的增加,T₂信号强度下降很快,适于用作核磁共振造影剂的阴性增强剂。因为 T₂ 弛豫率定义为含铁浓度与 $1/T_2$ 直线方程的斜率,以铁的浓度(mmol·L⁻¹)为横坐标(*X*), $1/T_2$ 为纵坐标(*Y*)作图,回归方程为: *Y*=0.168 5*X*+0.004 2(R^2 =0.994 7),*n*=9。可见该批次OCMCS-USPIO的驰豫率为0.168 5 × 10⁶mol·s⁻¹,高于 SPIO 作为磁共振造影剂 T₂驰豫率需大于0.062×10⁶mol·s⁻¹的最低标准。图4最左边为空白,从右到左,浓度依次增加,信号依次变暗,表明合成的OCMCS-USPIO-NPs可以改变MRI信号的能力,而且信号随着浓度增加下降。

图 4 T₂信号随 Fe 浓度变化 MRI 图

Fig 4 T₂ profile with the concentration of SPIO

表 3 SE 序列扫描条件下 OCMCS-NPs 溶液中不同铁浓度 所对应的 T_2 及 $1/T_2$

Tab 3 Spin relaxation time (T_2) and $1/T_2$ change with different iron contents in the OCMCS-SPIO-NPs solution scanned in SE sequence

编号	药物浓度/ mmol·L ⁻¹	弛豫时间 (T ₂)/ms	$1/T_2/ms^{-1}$
空白	0.00	337.39	0.003
1	0.04	83.13	0.012
2	0.06	66.53	0.015
3	0.08	55.78	0.018
4	0.10	47.30	0.021
5	0.12	41.62	0.024
6	0.14	37.39	0.027
7	0.16	31.62	0.032
8	0.18	28.19	0.035
9	0.20	26.94	0.037

3.2.5 铁含量 按照邻二氮菲法测定铁含量, OCMCS-USPIO-NP 溶液中铁含量为 5.70 mg·mL⁻¹, 粉末真空干燥后铁含量为 613.39 mg·g⁻¹。

3.2.6 粒径及电位 SPIO 纳米粒子和 OCMCS-USPIO 纳米粒的透射电镜(TEM)图见图 5。SPIO 纳米粒、OCMCS-USPIO 纳米粒子和 CMCTS2Fe₃O₄ 纳米粒都呈球状, SPIO 纳米粒子的平均粒径为 10.7 nm, OCMCS-USPIO 纳米粒平均粒径为 13.9

• 830 • Chin JMAP, 2010 September, Vol.27 No.9

nm。马尔文粒径电位粒径仪测定的粒径均为41.3 nm,分散度为0.18, Zeta 电位为21.76±0.34。



图5 SPIO 纳米粒子和 OCMCS-USPIO 纳米粒的透射电镜图 A-未包被的 SPIO 纳米粒; B-OCMCS-USPIO 纳米粒 Fig 5 TEM images of SPIO nanoparticles and OCMCS-USPIO nanoparticles

A-uncoated-SPIO nanoparticles; B-OCMCS-USPIO nanoparticles

3.3 RAW264.7 细胞普鲁士蓝染色

RAW264.7 细胞分别与相同浓度的 SPIO-NPs,dextran-SPIO-NPs,CMCS-SPIO-NP孵 化24h后,进行普鲁士蓝染色,颜色由浅到深依 次是空白<CMCS-SPIO<dextran-SPIO<SPIO组,普 鲁士蓝染色的色泽是由吞噬进入细胞内铁含量所 决定,CMCS-SPIO组颜色很浅,几乎和空白对照 接近,染色照片见图6。实验表明经过羧甲基壳聚 糖的共价修饰可以显著减低 SPIO纳米粒的摄取, 甚至低于目前上市的菲力磁的摄取量,显示其逃 避吞噬的能力。



图 6 RAW264.7 细胞普鲁士蓝染色照片

A-空白; B-OCMCS-SPIO-NPs; C-dextran-SPIO-NPs; D-uncoated SPIO-NPs

Fig 6 Prussian blue staining images of RAW264.7 cells A-without contrast agent; B-OCMCS- SPIO-NPs; C-dextran-SPIO-NPs; D-uncoated SPIO-NPs

4 讨论

SPIO 的有效成分 Fe₃O₄或者 γ-Fe₂O₃,只有这 两种晶型的氧化铁才有强磁性,其中 Fe₃O₄的磁性 最强,粒径足够小。因此在两步法合成中,为了

控制 SPIO 核的粒径,必须充分控制好反应的条件, 重要的有 Fe³⁺和 Fe²⁺的比例,必须将摩尔比控制在 2:1,在充氮的条件下进行,因为氧气可以使 Fe₃O₄ 继续氧化生成 Fe(OH)₃,生成没超顺磁性的 物质;反应的温度、pH、搅拌速度也是影响反应 的重要条件:pH 过高,生成产物的磁性低,温度 低,形成晶格速度慢,生成 SPIO 纳米粒的粒径较 大,超顺磁性增强,搅拌速度也是影响 SPIO 粒径 的重要因素,必须控制搅拌速度在较高的水平(大 于 800 rmin⁻¹),防止局部过浓,粒径分布不均, 在放置过程中,晶格重新排列,导致小粒子变小, 大粒子增加。因此在 SPIO 生成过程中必须严格控 制 Fe³⁺和 Fe²⁺的比例,在充氮,pH 控制在酸性条 件下,适当的温度和搅拌速度下进行^[6]。

两步法合成羧甲基壳聚糖超顺磁氧化铁纳米 粒,影响因素多,羧甲基壳聚糖共价结合到 SPIO 上,超声时间、强度及羧甲基壳聚糖分子量及其 溶液的浓度和体积都是影响 OCMCS-USPIO-NP 粒径的重要因素。因此本实验对上述因素进行正 交实验,对工艺进行优化筛选,得到处方的工艺 稳定性好,能控制 OCMCS-USPIO-NP 的粒径在 10~100 nm,有强的超顺磁性,减少血管网状内皮 系统的吞噬,达到长循环的作用,用于全身的肿 瘤、淋巴转移性质判断及血管池造影等。

超顺磁氧化铁纳米粒由于其本身的疏水性及比 表面积大及粒子之间的磁偶极作用,范德华力作用 导致其体外放置过程中相当不稳定,进入体内容易 吸收大量蛋白质等大分子物质,导致粒径迅速增大, 被网状内皮系统吞噬而导致其半衰期缩短。为了增 加稳定性,需对其表面进行物理或者化学修饰,表面材料的性质、厚度及其亲水性,粒径等决定了超顺磁氧化铁纳米粒的性质(生物相容性、抗吞噬作用及靶向性等)^[7]。羧甲基壳聚糖水溶液中,由于存在大量的-COO⁻基团,可以与溶液中的水分子产生水合作用,形成水化层,另外由于 Zeta 电位比较大,形成分子之间的排斥力,可以阻止超顺磁氧化铁纳米粒之间聚集,形成强大的磁偶极作用,增加体系的稳定性。本实验将要进一步对合成的OCMCS-USPIO-NP的毒性、药效进行体内外考察,将在另篇文章中作进一步的报道。

REFERENCES

- GUPTA A K, GUPTA M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications [J]. Biomaterials, 2005, 26(18): 3995-4021.
- [2] AGNIHOTRI S A, MALLIKARJUNA N N, AMINABHAVI T M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery [J]. J Control Release, 2004, 100(1): 5-28.
- [3] ELSABEE M Z, MORSI R E, AL-SABAGH A M. Surface active properties of chitosan and its derivatives [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2009, 74(1): 1-16.
- [4] LI G Y, HUANG K L, JIANG Y R, et al. Preparation and characterization of carboxyl functionalization of chitosan derivative magnetic nanoparticles [J]. Biochem Eng J, 2008, 40(3): 408-414.
- [5] COROT C, ROBERT P, IDEE J M, et al. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2006, 58(14): 1471-1504.
- [6] GNANAPRAKASH G, MAHADEVAN S, JAYAKUMAR T, et al. Effect of initial pH and temperature of iron salt solutions on formation of magnetite nanoparticles [J]. Mater Chem Phys, 2007, 103(1): 168-175.
- BERRY C C, WELLS S, CHARLES S, et al. Dextran and albumin derivatised iron oxide nanoparticles: influence on fibroblasts *in vitro* [J]. Biomaterials, 2003, 24(25): 4551-4557.

收稿日期: 2009-11-02