技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)03-0396-03

葡聚糖修饰的纳米级超顺磁性氧化铁稳定性检测

李梦雅,文 明,李少林
(重庆医科大学附属第一医院放射科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究共沉淀法制备葡聚糖修饰的纳米级超顺磁性氧化铁的稳定性。方法:参照一般注射试剂的基本要求,对采用共沉淀法制备葡聚糖修饰的纳米级超顺磁性氧化铁液体,分别进行强化实验和长期实验,观察或测定样品的性状、pH 值、铁浓度、粒径、饱和磁化强度及 T2 磁豫率等参数。结果:与实验前所检测的数据比较,实验后各项数据无统计学差异。结论:葡聚糖修饰的纳米级超顺磁性氧化铁稳定性好,为进一步将其作为磁共振成像对比剂及靶向基因载体研究奠定了基础。

【关键词】超顺磁性氧化铁;纳米粒子;稳定性
【中国图书分类法分类号】R921.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-16

The stability study of superparamagnetic iron oxide nanoparticles modified by dextran

LI Meng-ya et al
(*Department of Radiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the stability of Superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles modified by dextran prepared by co-precipitation. *Methods*: To evaluate its stability through compared the characteristic parameters which contained the character, pH, iron content, size, saturated magnetization and T2 relaxivity before and after the strengthen experimentation and the long-term experimentation. All that was carried according to the basic request of injection requirements. *Results*: The above characteristic parameters had no statistic differences between before experimentation and after experimentation. *Conclusion*: The research showed that SPIO made by coprecipitation had good stability, can be further used as the contrast media of magnetic resonance imaging and target gene carrier.

【Key words】Superparamagnetic iron oxide; Nanoparticles; Stability

纳米级超顺磁性氧化铁(Superparamagnetic iron oxide, SPIO)性状上为一般注射用液体药物,广泛应用于示踪活体干细胞(如神经干细胞、胚胎干细胞和间充质干细胞等)、肿瘤细胞,或作为靶向基因载体,是分子影像学研究的热点[1-4]。由于纳米级的磁粒巨大的比表面能以及磁粒之间的相吸力,使得磁粒存在永久性的聚集作用。因此,防止磁粒团聚,并保持其稳定性,是研究中的一项重要课题,稳定性也自然成为评价 SPIO 的重要性能指标之一。

有关 SPIO 的稳定性研究,文献仅涉及制备过程中,若干工艺条件对其稳定性的影响[5]。本研究参照我国药物试剂稳定性实验指导原则,通过强化实验和长期实验,观察或测定样品的性状、pH 值、铁浓度、粒径、饱和磁化强度及 T_2 磁豫率等参数变化,对制备的 SPIO 样品稳定性做出评价。

作者介绍:李梦雅(1984-),女,硕士,
研究方向:肿瘤分子影像学。
通讯作者:文 明,男,副教授,E-mail: liuyucun65@163.com。

基金项目:国家自然科学基金(编号:30940021);重庆市自然科学基金(编号:2008BB5209);重庆市卫生局医学科研基金(编号:062025);重庆医科大学附属第一医院科研基金(编号:YXJJ2009-08)。

1 材料与方法

1.1 主要材料及仪器

葡聚糖 T-40 购自国药集团化学试剂公司,三氯化铁、二氯化铁、氨水和冰乙酸均为国产分析纯,HiprepTM16/60 型色谱柱购自美国 Amersham Biosciences 公司;日本 HITACHI 公司 7500 型透射电子显微镜,美国 GE 公司 1.5T 超导型 MR 仪,南京大学电子研究所 HH-15 振动样品磁强计,重庆大学恒瑞纳米技术工作站研制的原子力显微镜 IPC-208B 型,美国奥立龙公司 Thermo Orion 868 型 pH 仪,日本 HITACHI 公司 Z-5000 型原子吸收光谱仪,上海云泰仪器仪表公司不锈钢手提式压力蒸汽灭菌器,重庆永恒实验仪器厂恒温恒湿试验箱,药物制剂国家工程研究中心低温光照仪 LS-03-12 型。

1.2 方法

1.2.1 葡聚糖修饰的 SPIO 粒子制备及主要指标检测方法 采用化学共沉淀法进行,具体方法参见笔者文献[6,7]。按照这

一方法,连续 3 月分别制备 3 个批次样品。样品性状通过肉眼观察;铁浓度为原子吸收光谱法测定;核心粒径通过透射电子显微镜观察后确定,变异为 ± 2 nm;葡聚糖修饰后的整个粒径由原子力显微镜测定;饱和磁化强度及 T2 磁豫率由 1.5T 超导型 MR 仪及振动样品磁强计检测确定。

1.2.2 稳定性实验方法 参照 2005 版二部中华人民共和国药典附录 XIXC 原料药和药物制剂稳定性实验指导原则[8],分别对 SPIO 样品进行强化实验(包括高温实验、恒温加速实验和强光照射实验)和长期实验,通过观察或测定样品的性状、pH 值、铁浓度、粒径、饱和磁化强度及 T_2 磁豫率等参数,评价其稳定性。

1.2.3.1 高温实验 将 3 批 SPIO 置于压力蒸汽灭菌器内,在高温(126℃)下加热 30 min,记录加热前后上述观察参数的变化情况。

1.2.3.2 恒温加速实验 取 1 批 SPIO,放置于恒温恒湿试验箱,调节温度(40 ± 2)℃,相对湿度 75% ± 5%,共放置 6 个月,分别在第 1、2、3、6 个月末取样 1 次,观察上述参数变化情况。

1.2.2.3 强光照射实验 取 1 批 SPIO,放置于低温光照仪中,调节光照强度 5000LX,放置 10 d,分别于第 3、5、10 d 取样,观察上述参数变化情况。

1.2.2.4 长期实验即室温留样观察实验 取 1 批 SPIO,放置于实验室玻璃柜中,分别于第 1、3、6、12、18 个月末取样 1次,观察上述参数变化情况。

1.3 统计学处理

采用完全随机设计的方差分析,结果以均数 ± 标准差表示($\bar{x} \pm s$);及重复测量资料的多变量分析,采用 Hotelling T2 检验。数据用 SAS8.0 统计软件处理,$P \leq 0.05$ 表示差异有统计意义。

2 结 果

2.1 实验前 3 个批次样品的主要指标

3 个批次样品均呈黄褐色,肉眼下无沉淀,检测的主要指标见表 1。

完全随机设计的方差分析:比较 3 批样品均指,以 v 组间 =2,v 组内 =9 查 F 界值表,F0.05(2,9)=4.26,得 P 值>0.05,差别无统计学意义。证实实验前、室温留样(长期实验)、高温实验样品指标无改变。

2.3 恒温加速实验后样品的检测指标

一般性状无变化,葡聚糖修饰后整个粒径范围 20 ~ 35 nm,检测的主要指标见表 3。

重复性测量资料 Hotelling T_2 检验,各指标 P 值>0.05,$u_1=u_2=u_3=u_6$。证实恒稳加速样品在 1、2、3、6 月后指标无改变。

2.4 强光照射实验后样品的检测指标

一般性状均无变化,葡聚糖修饰后整个粒径范围 20 ~ 35 nm,检测的主要指标见表 4。表 4 强光照射实验后 3 个批次样品的主要检测指标

重复性测量资料 Hotelling T_2 检验,各指标 P 值>0.05 $u_3=u_5=u_{10}$。证实强光照色下样品在 3、5、10 d 后指标无改变。

3 讨 论

化学共沉淀法制备 SPIO 的反应原理为:$Fe^{2+}+2Fe^{3+}+8OH^- \rightarrow Fe_3O_4+4H_2O$,虽然人们不断探索各种实验条件,期望得到粒径更小、磁性更高的 SPIO,但目前仍然没有成熟而统一的实验步骤。笔者综合相关文献[1,3,4],将生产氧化铁纳米粒子的反应放在葡聚糖溶液中进行(即一步法),步骤简单,价格低廉,毒性低,样品的理化性质及磁学性质完全可以满足作为基因载体用于磁共振成像的需要[6,7]。

研究显示[5],影响磁性液体稳定性的因素纷繁复杂,归纳起来主要有外部因素和内部因素两个方面。外部因素主要有重力场和外界磁场,内部因素主要有晶体、表面活性剂和基液的物理化学性质及它们之间的相互作用,其中晶体之间的相互作用是最主要的内部因素,选择适当的表面活性剂,利用其在颗粒表面形成永久牢固的吸附层,产生的静电作用和空间位阻作用,可以大大增加晶体的稳定性。

能够作为 SPIO 的表面活性剂有多糖类、蛋白质或糖蛋白等,笔者选择葡聚糖作为表面活性剂,除了因为葡聚糖分子带正电荷,能与带负电荷的 Fe_3O_4 产生静电吸附外,还考虑到葡聚糖是一种完全由 α - D- 吡喃葡萄糖单体组成的多糖,其侧链由(1,4)和(1,6)连接的葡聚糖残基构成,每 5 个葡聚糖残基组成的重复单元有 1 个分支,位于主链葡聚糖残基的 6-O 位上,可与 Fe 产生共价键结合,自然能在保持 SPIO 磁流体的稳定性方面发挥作用[9]。此外,葡聚糖结构中还包含有大量的"-OH"基团,能与一些生物大分子的氨基形成

表 1 实验前、室温留样、高温实验批次样品的主要检测指标

$\bar{x} \pm s$	pH 值	铁浓度(mmol/L)	核心粒径(nm)	葡聚糖修饰后整个粒径(nm)	比饱和磁化强度(emu/g Fe)	T2 磁豫率($mol^{-1}.s^{-1}$)
实验前	7.423 ± 0.004	7.349 ± 0.127	5.000 ±	20 ~ 35	74.023 ± 3.594	0.157 ± 0.006
室温留样	7.408 ± 0.017	7.179 ± 0.005	5.000 ±	20 ~ 35	78.150 ± 4.401	0.153 ± 0.004
高温实验	7.424 ± 0.005	7.350 ± 0.128	5.000 ±	20 ~ 35	74.103 ± 3.609	0.159 ± 0.004
F 值	3.48					
P 值	>0.05					

表 3 恒温加速实验后 3 个批次样品的主要检测指标

检测指标		时间(月)				P 值
		1	2	3	6	
pH 值	第一批	7.431	7.428	7.430	7.422	0.4614
	第二批	7.419	7.415	7.413	7.409	
	第三批	7.428	7.419	7.378	7.411	
铁浓度	第一批	7.200	7.207	7.202	7.213	0.835
	第二批	7.487	7.482	7.491	7.484	
	第三批	7.370	7.374	7.366	7.371	
核心粒径	第一批	5 ±	5 ±	5 ±	5 ±	0.328
	第二批	5 ±	5 ±	5 ±	5 ±	
	第三批	5 ±	5 ±	5 ±	5 ±	
饱和磁化强度	第一批	78.16	78.21	78.14	78.17	0.932
	第二批	69.37	69.25	69.33	69.21	
	第三批	74.41	74.39	74.49	74.32	
T_2 磁豫率	第一批	0.157	0.150	0.152	0.151	
	第二批	0.163	0.161	0.164	0.157	
	第三批	0.153	0.157	0.151	0.160	

表 4 强光照射实验后 3 个批次样品的主要检测指标

检测指标		时间(d)			P 值
		3	5	10	
pH 值	第一批	7.427	7.427	7.430	0.934
	第二批	7.415	7.415	7.411	
	第三批	7.429	7.429	7.432	
铁浓度	第一批	7.190	7.190	7.189	0.519
	第二批	7.491	7.491	7.499	
	第三批	7.370	7.370	7.367	
核心粒径	第一批	5 ±	5 ±	5 ±	0.060
	第二批	5 ±	5 ±	5 ±	
	第三批	5 ±	5 ±	5 ±	
饱和磁化强度	第一批	78.13	78.13	78.17	0.837
	第二批	69.47	69.47	69.48	
	第三批	74.39	74.39	74.45	
T2 磁豫率	第一批	0.157	0.157	0.162	
	第二批	0.163	0.163	0.169	
	第三批	0.156	0.156	0.150	

Schiff 碱，产生共价键紧密连接，为 SPIO 作为载体，将短链氨基酸、多肽、小分子蛋白质等靶向转运进入细胞内，用于研制同时具有 MR 成像及基因治疗的双功能探针创造条件[10,11]。

2005 版二部中华人民共和国药典附录 XIXC，对原料药和药物制剂的稳定性实验做出了详细规定。参照这些规定，笔者选择对 SPIO 样品进行强化实验（包括高温实验、恒温加速实验和强光照射实验）和长期实验，尽管这些实验方法的侧重点各不相同，但目的均是考察制剂在不同化学或物理条件影响下，随时间变化而变化的规律，为推算该制剂的有效期提供科学的依据[8]。实验结果证实，自制的纳米级超顺磁性氧化铁在实验条件下，仍然保持了葡聚糖修饰后的空间状态（核心粒径和葡聚糖修饰后整个粒径无明显变化），磁学性质稳定，形状、pH 值及铁浓度无变化，这为进一步将其作为靶向磁性载体研究奠定了基础。

技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)03-0399-04

新型扩张皮肤面积测量法——薄膜涂色法的实验评价

谭子明,沈为民,彭旦生
(重庆医科大学附属第一医院整形美容外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨一种精密、准确、简便、高效且适用于临床的扩张皮肤面积测量新技术方案。方法:采用重复测量设计分别获得薄膜涂色法、传统方法及金标准方法 3 组数据。其中薄膜涂色法依据技术流程通过三维模转换为二维数字图像,结合 IPP 6.0 医学图像分析软件测得面积资料。各组资料运用 SPSS 统计分析软件做独立样本均数的 t 检验,分别比较新方法、传统方法与金标准方法的统计学差异。以变异系数(Coefficient of variation,CV)度量技术方案的精密度;以各组测量均数与金标准测量均数之间的差异度量技术方案的准确度。结果:t 检验 $t_{1,3}=0.107$,$P>0.91$,薄膜涂色法与金标准差异不具有统计学意义;$t_{2,3}=19.150$,$P<0.01$,传统方法与金标准方法差异具有统计学意义。$CV_1=1.97\%$,$CV_2=2.52\%$,$CV_3=0.04\%$,各组精密度均符合CV<5%的标准;$\bar{x}_1=71.217\ cm^2$,$\bar{x}_2=79.779\ cm^2$,$\bar{x}_3=71.183\ cm^2$,薄膜涂色法测量均数与金标准测量均数相差 0.05%,准确度符合标准;传统方法测量均数与金标准测量均数相差 12.08%,准确度不符合标准。结论:薄膜涂色法是一种精密、准确、简便、高效的扩张皮肤测量方法,适于在临床及科研领域中推广。

【关键词】薄膜涂色法;面积测量;扩张器; Image Pro Plus 医学图像分析软件;重复测量设计
【中国图书分类法分类号】R622+.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-01

An empirical research and estimate of bepainted membrance method for measuring expanded area in skin and soft tissue expansion

TAN Zi-ming, et al
(*Department of Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate bepainted membrance method (BMM) for measuring expanded area in skin and soft tissue expansion (SSTE). *Method*: To establish three groups of SSTE measuring method model: BMM model, traditional model and golden standard model. Using BMM to obtain 3D images from standard. Flat 3D images to 2D images and translate them to the digital images. Three groups of expanded area data which were measured by Image-Pro Plus (IPP) from digital images has been collected statistics with Statistical Product and Service Solutions (SPSS). Repeated

作者介绍:谭子明(1983-),男,硕士,
研究方向:伤口愈合。
通讯作者:沈为民,男,副教授,E-mail:swm19570115@sina.com。

参 考 文 献

[1] Corot C,Robert P,Idée J M,et al.Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging [J].Adv Drug Deliv Rev, 2006,58 (14): 1471-1504

[2] Bahadur D, Giri J. Biomaterials and magnetism[J]. Sadhana,2003, 28(3&4): 639-656.

[3] Kim E H, Lee H S, Kwak B K, et al. Synthesis of ferrofluid with magnetic nanoparticles by sonochemical method for MRI contrast agent [J]. J Magn Magn Mater, 2005, 289(3): 328-330.

[4] Choi H,Choi S R,Zhou R,et al. Iron oxide nanoparticles as magnetic resonance contrast agent for tumor imaging via folate receptor-targeted delivery [J]. Acad Radiol, 2004, 11(9): 996-1004.

[5] 张银燕,尹衍升,张金升. 纳米 Fe3O4 磁性液体稳定性的研究[J]. 化学物理学报,2004,17(1):83-86.

[6] 柏 玮,宋 琳,文 明,等. 超顺磁性氧化铁纳米粒子的制备及性能检测[J]. 重庆医科大学学报,2007,32(9):922-925.

[7] 文 明,柏 玮,李少林,等. 超小型 Fe3O4 纳米的磁学性能测定[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2007,32(6):15-18.

[8] 国家药典委员会主编.中华人民共和国药典 2005 版二部,附录 XIX C[M]. 北京:北京化学工业出版社,2005.197-198.

[9] Mornet S,Vasseur S,Grasset F. Magnetic nanoparticle design for medical applications [J].Prog in Solid State Chem,2006,34(2-4): 237-247.

[10] Talanov V S, Garmestani K, Regino C A, et al. Preparation and in vivo evaluation of a novel stabilized linker for 211At labeling of protein [J]. Nucl Med Biol, 2006, 33(4): 469-480.

[11] Wen M, LI B, Ouyang Y, et al. Preparation and quality test of superparamagnetic iron oxide labeled antisense oligodeoxynucleotide probe: a preliminary study [J].Ann Biomed Eng, 2009,37(6):1240- 1250.

(责任编辑:冉明会)