维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)09-0922-04

超顺磁性氧化铁纳米粒子的制备及性能检测

柏 玮[1],宋 琳[1],文 明[2],李少林[1],李必波[3],彭志平[1]

(1. 重庆医科大学基础医学院放射医学教研室;2. 重庆医科大学附属第一医院放射科;
3. 重庆医科大学药学院药化教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:制备超顺磁性磁共振对比剂四氧化三铁纳米颗粒,并检测其物理和磁学性质,以探讨作为反义基因载体的可能性。方法:共沉淀一步法制备葡聚糖包被的四氧化三铁纳米颗粒,采用 X 射线粉末衍射法分析其结构,用透射电镜及原子力显微镜测量其大小及分布,用振动样品磁强计检测磁化率等参数。结果:所得样品核心为四氧化三铁晶体,核心粒径为 5nm 左右,包被葡聚糖后整体颗粒直径为 20~35nm,驰豫率为 0.155×10^6/(mol·s),质量饱和磁场强度为 69.42162emu/g Fe。结论:制备的样品具有粒径小,分散性好,超顺磁性等优点,符合作为磁共振对比剂的要求,可以作为磁共振成像反义基因载体。

【关键词】超顺磁性氧化铁;磁共振成像;对比剂;纳米粒子
【中国图书分类法分类号】R811.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-04-12

Preparation and performance testing for super-paramagnetic contrast agent of magnetic resonance

BAI Wei, et al

(*Department of Radiation Medicine, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the possibility as antisense gene carriers. Preparation of super paramagnetic iron oxide MR contrast agent Iron oxide nanoparticles and test their physical and Magnetic Properties. *Methods*: the iron oxide nanoparticles is obtained by means of Co-precipitation method, its structure is analyzed by X-ray powder diffraction method, its size and distribution is measured by transmission electron microscope, and its Susceptibility is measured by Vibrating Sample Magnetometer dollars. *Results*: Testing after dextran-coated particle diameter overall, the size is20 ~35nm, core diameter of around is 5nm, These particles possessed some characteristics of super paramagnetic. Relaxation rate Of the sample is 0.155×10^6/(mol·sec) and quality saturation magnetic intensity is 69.42162emu/g Fe. *Conclusion*: the sample possessed the advantages of small size, dispersed, super-paramagnetic, so it could be used as an anti-gene carriers.

【Key words】 SPIO; Magnetic resonance imaging; Contrast agent; Nanoparticles

外包葡聚糖的四氧化三铁纳米粒子,具有粒径较小、超顺磁性及较好的水溶性,可逃脱机体网状内皮系统的吞噬等特点,作为磁共振对比剂,广泛应用于分子影像学研究。但是,该产品目前在国内市场上难觅踪影,国外商业产品不仅价格昂贵,核心颗粒大小从几十到几百纳米不等,且颗粒外的包被物也各不相同,这对于我们开展具有知识产权的创新性研究十分不利[1~3]。本实验采用共沉淀一步法制备超顺磁性氧化铁纳米粒子(SPIO),从物理性质和磁学性质两方面进行检测,探讨其作为磁共振对比剂应用于分子影像学领域的可能性。

作者介绍:柏 玮(1983-),女,硕士。
主要研究方向:分子影像学及肿瘤学基础。

基金项目:重庆市卫生局医学科研项目(编号 062025),
重庆医科大学优秀博士基金(重医大 2006-182 号文)。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 Hitachi-600 透射电镜(日本日立公司),BDX3200 X 射线衍射仪(北京大学),KDC-160HR 高速冷冻离心机(科大创新股份有限公司中佳分公司),CL-2 型恒温磁力搅拌器(河南巩义予华仪器厂),HH-15 震动样品磁强计(南京大学仪器厂),旋转蒸发器(上海青浦沪西仪器厂),紫外分光光度计 Ultrospec2100pro(英国安玛西亚公司)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1.2 试剂 氯化铁($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)、氯化亚铁($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)、氨水等化学试剂均为国产分析纯，Dextran T-40(相对分子质量为 40000，批号为 20050726)为国药集团化学试剂有限公司产品。

1.2 方 法

采用共沉淀一步法制备外包葡聚糖的四氧化三铁纳米颗粒[4]，具体步骤为：精密称取 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 1.17g 与 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.43g(摩尔约比为 2:1)，葡聚糖 T-40 2.5g 在充氮气的环境下溶于 15ml 超纯水中。用恒温磁力搅拌器搅拌，同时滴加 28%氨水 15ml，升温至 60℃，600r/min，反应 1h，得到黑色胶状体 30ml。冷却后离心 12000r/min、10min，弃去沉淀，保留上清液。将上清液用超声探头搅拌，再加入适量冰乙酸，调节 pH 值至 7.0，超纯水稀释 100 倍，放置透析袋过滤 24h 后，0.22μm 滤膜再过滤，超声振荡 5min，分装后灭菌，置于 4℃冰箱备用。

1.3 样品的性能检测

包括物理性质和磁学性质两方面。

1.3.1 物理性质 晶体结构采用 X 射线粉末衍射法：取经过真空干燥的四氧化三铁纳米颗粒，研细成粉末，置于 BDX3200 X 射线衍射仪进行扫描，将所得图谱与国际粉末衍射标准联合会出版的 PDF 标注卡片进行比较，确定样品是否为四氧化三铁晶体结构。

粒径大小及分布用透射电镜及原子力显微镜测量透射电镜：铜网上制膜后，取一定量的样品滴于铜网上，用滤纸吸除边缘多余的液体，自然晾干并置于透射电镜观察孔下，观察样品的核心粒径、分布等。

原子力显微镜：小金片用无水乙醇清洗后，再用去离子水冲洗，烘干后涂上检测样品，待自然晾干后进行检测，观察其形貌及分布、大小。

铁含量的测定用原子吸收光谱法取液体样品适量，用盐酸溶解后，加水稀释 10 倍后直接测定。

1.3.2 磁学性质 磁化曲线检测用振动样品磁强计进行：将样品真空烘干，置于特制的容器中，逐渐加大磁场强度，并从显示屏观察磁化曲线，直到样品的磁化强度不再增加为止。记录磁化曲线相关数据，处理后获得样品的饱和磁化强度、比饱磁化强度、比剩余磁化强度和剩磁等参数。

测定 T_2 弛豫率：取适量 SPIO 溶液，经盐酸溶解后，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、0.20mmol/L，依次取这些浓度的样品稀释液 10ml 分装于 9 支管径为 1cm 的试管，另外取 10ml 纯净水作对照。将这 10 只试管分次放置于 3.4 英寸线圈，采用美国 GE 公司 1.5T 超导型 MR 仪进行横断位扫描。扫描序列选择 Carr-Purell-Meiboom-Gill 序列，扫描条件为层厚 15mm，视野 18cm，TR/TE=2000/20ms，共获 6 个回波像，然后用 ROI 程序直接测量每管的 T_2 值（测定范围为 65 个象素）。以铁浓度(mmol/L)为横坐标(X)，所对应的 T_2 值倒数(即 1/ T_2 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 结 果

2.1 物理性质

经 X 射线粉末衍射法分析（图 1），显示在 30.18°，35.51°，62.74°出现 3 个衍射峰，与 Fe_3O_4 标准卡片的位置一致，可确定样品为 Fe_3O_4 晶体结构。

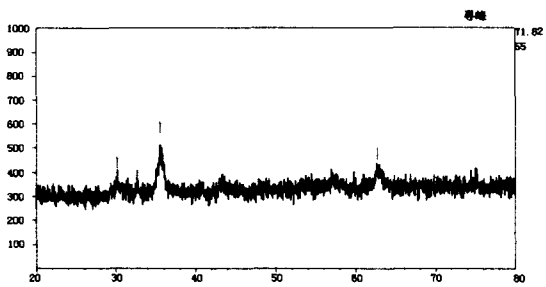


图 1 SPIO 样品的 X 射线衍射图

在 120000 倍透射电镜下观察，可以见到氧化铁核心部分为分散均匀、圆整的颗粒，以透射电镜标尺 100nm，估算出其粒径不超过 5nm(图 2)。

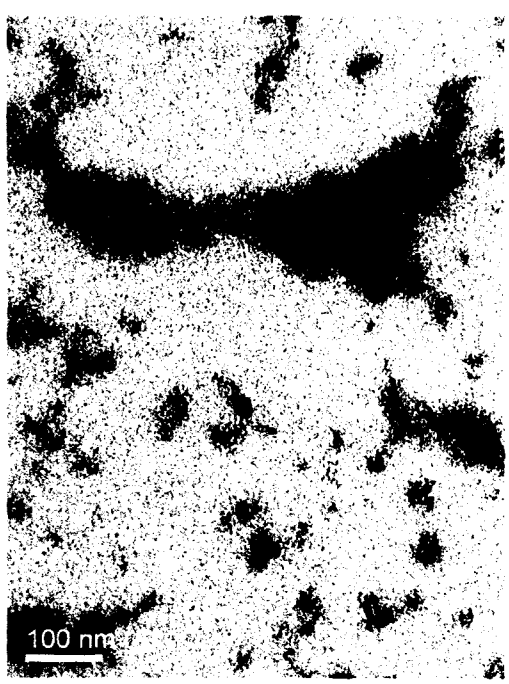


图 2 SPIO 样品的透射电镜图

原子力显微镜结果见图 3，红色表示氧化铁核心大小，黄色表示外包葡聚糖，蓝色表示颗粒之间间隙。从本图可见，本样品分散性良好，外面包裹葡聚糖后的颗粒总粒径在 20~35nm 之间。

铁含量：样品中的铁浓度为 11.2mg/ml。

维普资讯 http://www.cqvip.com

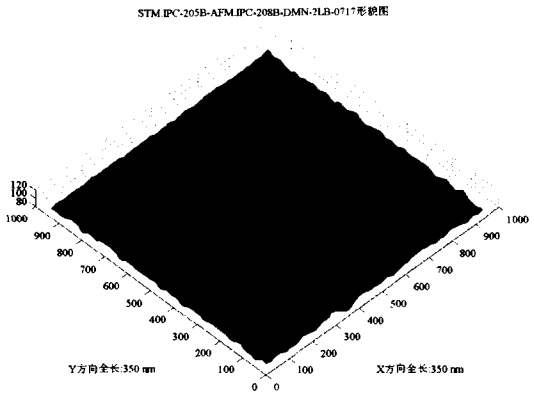


图 3 SPIO 样品的原子力显微镜彩色图

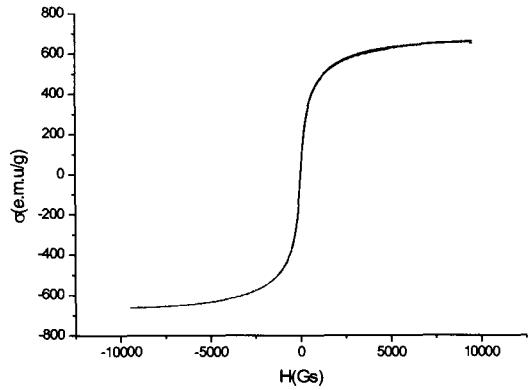


图 4 SPIO 样品的磁化曲线

2.2 磁学性质

2.2.1 磁化曲线(图 4) 从图 4 可以发现,随着外加磁场强度的增大,样品的磁化强度值相应增大;当外加磁场增大到 3000Gs 时,继续增大外加磁场强度(本实验加大到 10000Gs),样品磁化强度值保持不变,即达到磁饱和。此外,磁化曲线为一条过原点的单一曲线,说明当外加磁场为 0 时,SPIO 样品几乎没有剩磁,具有超顺磁性。

通过外推法求得所制备样品的饱和磁化强度为 69.42162emu/g Fe,比饱和磁化强度 68.39568e-mu/g,比剩余磁化强度为 30.4648emu/g,剩磁为 21.46374Gs(几乎为 0)。

2.2.2 驰豫率(表 1 及图 5) 从表 1 及图 5 可见,随着铁浓度的增加,T_2 值逐渐下降求得的回归方程为:$Y=0.0031X-0.0005$,$r=0.99940$,$n=9$,所以该 SPIO 样品的驰豫率为 $0.155\times10^6/(mol\cdot s)$。

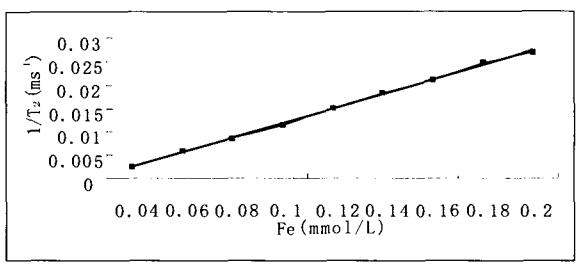


图 5 SPIO 样品的驰豫率回归曲线

表 1 各种浓度条件下 SPIO 样品的 T_2 值

铁浓度(mmol/L)	T_2 值(ms)	$1/T_2$ 值(ms^{-1})
0.04	386.72	0.0025858
0.06	170.33	0.0058709
0.08	115.59	0.0086512
0.10	86.74	0.0115287
0.12	66.40	0.0150602
0.14	54.37	0.0183924
0.16	47.29	0.0211461
0.18	40.36	0.0247772
0.20	37.12	0.0269396
纯净水	1374.64	0.0007274

3 讨 论

SPIO 属于水基磁性液体,又称磁流体,是一种由纳米级氧化铁颗粒通过表面活性剂高度均匀分散于水相中而形成的稳定胶体溶液,即使处在重力、离心力、磁力的作用下也不会分离,即既有固体材料的磁性,又有液体材料的流动性。所以,制备 SPIO 应满足粒径小、磁响应性强、悬浮稳定性好等条件,便于削弱磁偶极矩之间的静磁作用,使颗粒能在水相载体中作无规则的热运动。但是,由于纳米粒子的表面能高,缺少邻近的配位原子,相互之间容易产生吸附,故解决团聚问题是制备中的一个难点。近年来,随着纳米技术的飞速发展,学者们研究出了较多的制备方法,如机械球磨法、共沉淀法、乳化法、溶胶-凝胶法、液相微介质电加热法、气相沉淀法、水热法等[5],其中较为简单有效且技术成熟者当属共沉淀法。值得一提的是,采用共沉淀法在制备时 Fe^{2+} 易氧化为 Fe^{3+},得到的产物为 $r-Fe_2O_3$ 而非 Fe_3O_4,所以在整个制备过程注意用氮气保护[4];此外,我们还选择 Fe^{2+} 与 Fe^{3+} 比例为 1:2,实际操作时 Fe^{2+} 比例可相对高些以确保结果。试验还对样品运用超声搅拌及超声破碎等手段,使纳米颗粒直径

维普资讯 http://www.cqvip.com

更小,分散性更好。本实验曾对葡聚糖的用量进行过比较,结果显示并非葡聚糖的量越大,样品的分散性越好,例如当葡聚糖加大到 7.5g 时,四氧化三铁纳米颗粒根本无法形成。实验过程中也发现,氯化铁、氯化亚铁、氨水及葡聚糖的量,pH 值,搅拌速度与时间等,都会影响 SPIO 颗粒的大小[6,7]。

采用 X 线衍射仪检测晶体结构,确认 SPIO 样品核心颗粒为 Fe_3O_4;在透射电镜检测晶体核心大小的基础上,运用先进的原子力显微镜对样品进行扫描,能更深度了解外包葡聚糖后的实际颗粒大小[8,9]。实验所采用的原子力显微镜最高检测精度为横向 0.11nm,纵向 0.01nm,最大扫描范围位 25mm×25mm,放大倍数 10^{10},如此之高的分辨率,在测量样品大小的同时,对颗粒的分布及分子之间的内在排列也有更直观的认识。检测结果显示,样品的颗粒大小优于文献报道的国外商品[2]。

样品的磁学性能测定包括 T_2 弛豫率、饱和磁化强度、比饱和磁化强度、比剩余磁化强度和剩磁等参数[5]。T_2 弛豫率主要反应对比剂对质子横向弛豫过程速率的影响程度。弛豫率越大,则表示一种顺磁性物质缩短质子弛豫时间的能力强,在 MRI 上造成组织间的信号差别就越大,负性对比剂的造影效果也就越明显,那么这种物质就越适合用作 MRI 对比剂。从本研究可见,我们制备的 SPIO 的弛豫率为 $0.155\times10^6/(mol\cdot s)$,与文献报道的国外商业化对比剂如 Resovist、Ferumoxides 等十分接近[7~10],适于用作 MRI 的阴性对比剂。本研究还发现,样品在外加磁场下有良好磁响应性,当撤销磁场后剩磁为 21.46374Gs,几乎接近零。这是因为,样品经过透射电子显微镜和原子力显微镜观察,总粒径在 20~35nm 之间,每个粒子都是一个单磁畴,此时样品的磁化率不再服从居里-外斯定律,磁化方向就不再固定在一个易磁化方向,而是产生无规则的变化,结果导致超顺磁性的出现。本研究样品的饱和磁化强度为 69.42162emu/g Fe,比饱和磁化强度 68.39568emu/g,而文献记载的 SPIO 如 Ferumoxides 为 83emu/g Fe,大大高于 MRI 对比剂所要求的最低强度 41emu/g Fe 的标准[5~7]。

结果证明,本实验在制备工艺,检测手段方面建立了一种成熟的方法,样品更稳定,物理性质与磁学性质更符合作为磁共振对比剂的要求,可以作为反义基因载体。

参 考 文 献

[1] Choi SH,Moon WK,Hong JH,et al. Lymph node metastasis: ultrasmall superparamagnetic iron oxide-enhanced MR imaging versus PET/CT in a rabbit model[J]. Radiology,2006;242(1):137-143.

[2] Wang YJ,Hussain SM,Krestin GP. Superparamagnetic iron oxide contrast agents:physicochemical characteristics and applications in MR imaging[J]. Eur Radiol,2001;11(11):2319-2331.

[3] 文 明,李少林.磁共振成像用于分子影像学研究[J]. 中国医学影像技术,2007;32(1):147-150 .

[4] CAO zhenguo,ZHOU siwei,SUN kai. Preparation of Superparamagnetic Dexyra-coated Iron Oxide Nanopalticles used as a Novel gene Carrier into human Bladder cancer cells[J]. The Chinese-German Journal Clinical Oncolgy,2005;4(3):183-186.

[5] 李 建,赵保刚,主编.磁性液体:基础与应用[M]. 重庆,西南师范大学出版社,2002.12-161.

[6] 刘世霆,晏 媛,陈志良,等.超顺磁性葡聚糖氧化铁纳米颗粒的研制及表征[J]. 南方医科大学学报,2006;26(3):331-334.

[7] Daldrup-Link HE,Rudelius M,Piontek G,et al. Migration of iron oxide-labeled human hematopoietic progenitor cells in a mouse model:In 1.5T MR imaging equipment[J]. Radiology,2005;234(1):197-205.

[8] Yang XH,Wang YF,Liu AP,et al. Studies on magnetic nanomaterials by atomic force microcopy with high resolution[J]. Modern physic letters B,2005;19(9-10):469-472.

[9] 杨学恒,陈红兵,费德国,等.一种高精度原子力显微镜及其应用[J].中国机械工程,2004;15(21):1909-1911.

[10] Vogl TJ,Schwarz W,Blume S,et al. Preoperative evaluation of malignant liver tumor:comparison of unenhanced and SPIO (Resovist)-enhanced MR imaging with biphasic CTAP and intraoperative US[J]. Eur Radiol,2003;13(1):262-272.