

## 靶向药物载体 - 磁流体的制备及表面改性

阎玺庆<sup>1</sup>, 陈建海<sup>1</sup>, 蒋青锋<sup>1</sup>, 刘炜<sup>1</sup>, 西娜<sup>1</sup>, 吴志申<sup>2</sup> (<sup>1</sup>南方医科大学南方医院药理学部, 广东广州 510515; <sup>2</sup>河南大学特种功能材料重点实验室, 河南开封 475001)

**摘要:**应用化学共沉淀法制得 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 为母核的磁流体, 并用葡聚糖-70 对其进行表面改性, 同时对用葡聚糖改性后的磁流体在强碱条件下链接 6 个碳的有机物链, 考察其化学和物理稳定性, 并利用现代分析手段如激光粒度仪、FT-IR、XRD、TEM 等对其进行表征。经过处理后的磁流体具有很强的耐酸碱能力, 外观、稳定性和母核结构未发生明显变化。表面葡聚糖的存在大大增加了磁流体的稳定性, 适合在苛刻条件下用作药物载体或者进一步与具有相应活性基团的药物相结合。

**关键词:**磁流体; 葡聚糖-70; 纳米粒; 表面改性

**中图分类号:**R944.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-2588(2005)06-0626-04

### Preparation and surface modification of the magnetic fluid as a targeted drug carrier

YAN Xi-qing<sup>1</sup>, CHEN Jian-hai<sup>1</sup>, JIANG Qing-feng<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>1</sup>, Xi-Na<sup>1</sup>, WU Zhi-shen<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Special Function Materials, Henan University, Kaifeng 475001, China

**Abstract:** Magnetic fluid containing Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> as mother nucleus was prepared by chemical coprecipitation and treated with dextran-70 for surface modification. The dextran-70-modified magnetic fluid was reacted with 6-bromohexanoic acid and their chemical stability was studied, with the structure characterized by using laser granulometer, X-ray diffraction, Fourier-transform infrared analysis and transmission electron microscopy. The results showed that the magnetic fluid with surface modification by dextran-70 exhibited high stability in the presence strong alkali or acid. No chemical changes occurred in the magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nucleus surrounded by alkali-treated dextran-70 and the organic chain linked to the surface dextran rendered the reaction to the anti-cancer drug such as mitomycin C possible, suggesting the potential of the preparation as a drug carrier.

**Key words:** magnetic fluid; dextran-70; nanoparticles; surface modification

磁流体又称为铁磁流体, 是存在于液体载体中一种稳定的亚畴磁性纳米颗粒的胶态悬浮液<sup>[1]</sup>。稳定性和分散良好的磁流体纳米颗粒具有广泛的应有价值, 尤其是在肿瘤化疗中。磁性药物载体是近年来研究的一种新型的靶向给药系统, 它可以在足够强的外磁场作用下, 磁性载体药物通过血管注入到滋养肿瘤组织中, 使药物以受控的方式从载体中释放, 然后在肿瘤组织的细胞或亚细胞水平上发挥药效作用, 而对正常组织的细胞无太大的影响, 从而发挥靶向治疗作用, 降低其毒副作用<sup>[2,3]</sup>。但是, 开发特定生物相容性的磁流体的瓶颈在于必须用生物活性分子对磁流体的纳米磁性颗粒进行表面包裹, 而纳米颗粒表面化学吸附

的生物高分子的物理化学性质将直接影响其化学反应活性和物理及化学稳定性<sup>[4]</sup>; 同时, 如果对表面包裹生物活性高分子链接带有反应性功能基团的有机物链, 将使其与具有相应活性基团的药物分子的结合成为可能, 从而实现包载量大、稳定性好的靶向制剂。磁流体的制备方法很多, 包括粉碎法<sup>[1]</sup>、表面修饰法<sup>[5]</sup>、有机相合法<sup>[6]</sup>、化学沉淀法<sup>[7-9]</sup>等, 目前应用比较多的是化学共沉淀法。为此, 本实验用化学共沉淀法制备以 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 为母核的磁流体, 并用葡聚糖-70 对磁流体表面进行改性, 且在其表面上的葡聚糖链接具有反应活性基团的有机物已酸链, 使带有羟基、胺基等基团的药物如丝裂霉素 C 等与其活性羧基反应为前体药物成为可能, 从而实现磁性前体药物制剂, 并重点观察了它们的稳定性。

收稿日期: 2004-11-03

基金项目: 国家 863 项目 (2002AA214121); 国家自然科学基金 (30270400)

Supported by National 863 Program (2002AA214121) and National Natural Science Foundation of China (30270400)

作者简介: 阎玺庆 (1971-), 男, 博士研究生, 研究方向: 现代制剂, E-mail: yxqdoctor@163.com

通讯作者: 陈建海, 教授, 博士生导师, 电话: 020-61642173, E-mail: jhchen@fimmu.com

### 1 材料和方法

#### 1.1 仪器和试剂

实验用试剂葡聚糖-70 ( $M_r=70\ 000$ ) (Sigma 公司); 6-溴己酸 (Sigma-Aldrich 公司); FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O、盐酸、NaOH 均为分析纯。表征仪器:

JEM-2010透射电子显微镜 (TEM)(日本株式会社),X'Pert Pro X-射线粉末衍射仪 (XRD)(荷兰 Philips 公司),激光粒度仪(Malvern Instruments Ltd),红外光谱仪(Nicolet)。

## 1.2 制备

(1)量取适当浓度的 NaOH 溶液 84 ml,加热磁力搅拌下,加入由 1 mol/L 的 FeCl<sub>3</sub> 20 ml 和 FeCl<sub>2</sub> 10 ml 组成的混合溶液,立刻生成黑色沉淀。少许,用盐酸调节 pH 值至酸性,流水透析过夜,即生成以 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 为母核的磁流体。(2)将经过碱处理的 2 g 葡聚糖 -70 溶于水后与由以上所制备的磁流体混合,搅拌回流 1 h。将所得到的产物用甲醇沉淀,活水透析 24 h,即得到经过葡聚糖表面改性的磁流体 (Dextran modified magnetic fluid, 记为 DM)。(3)将所得 DM 加入到 20 ml 适宜浓度的 NaOH 溶液中,然后加入适量 6-溴己酸,80 °C 下搅拌反应一定时间,得到带悬臂的葡聚糖改性的磁流体 (Dextran-spacer conjugate magnetic fluid, 记为 DMS)。(4)作为对照,将同量碱处理的葡聚糖在同样条件下直接与 6-溴己酸反应,将反应后所得到的葡聚糖与 6-溴己酸的结合物 (Dextran-spacer conjugate, 记为 DS)加入到未经改性的磁流体。(5)同样,将 6-溴己酸直接加入未经改性的磁流体,对比观察。

## 2 结果与讨论

### 2.1 稳定性

化学共沉淀法制得的高分散的磁流体按照以下化学反应进行:  $2\text{Fe}^{3+} + \text{Fe}^{2+} + 8\text{OH}^- \rightarrow \text{Fe}_3\text{O}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$ 。Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米颗粒沉淀的形成需要对混合盐离子进行快速中和,在快速搅拌下,铁盐的混合溶液一次性倾入到过

量的碱溶液中,生成大量黑色肉眼可见颗粒。由实验所得到的微小颗粒在酸性条件下重新分散为纳米级,而在碱性条件下将重新聚集,可见磁流体在碱性条件下晶粒的表面能大,容易团聚。所得到经过葡聚糖表面改性的磁流体呈棕黑色均匀液体,放置 6 个月以上无沉淀、无团聚,分散良好。同样,葡聚糖磁流体表面经过 6-溴己酸处理后,外观和稳定性与葡聚糖磁流体无明显区别,而葡聚糖 6-溴己酸结合物加入到未经改性的磁流体中,立刻生成棕黑色沉淀,并且分层为两相。对 6-溴己酸直接加入未经改性的磁流体中,磁流体也立即分层沉淀,说明磁流体经过葡聚糖改性增加了其稳定性,同时表明磁流体被葡聚糖包裹,从而使在酸碱条件下极不稳定的磁流体能够得以长期稳定存在,而葡聚糖 6-溴己酸结合物则未能实现对磁流体的表面改性,而且快速破坏了磁流体的稳定性,所以用于磁流体表面改性的生物高分子具有一定的选择性。改性后的磁流体的稳定性见图 1。磁流体母核被葡聚糖链包裹在周围,由于葡聚糖大量羟基的亲水性使磁流体在水介质中能够得到均匀分散,表面葡聚糖长链的存在,使磁流体母核得到屏蔽,所以尽管未经改性的磁流体在 6-溴己酸或者碱性条件下极不稳定,但经过改性的葡聚糖磁流体却可以在强碱性条件下与 6-溴己酸反应,而稳定性不受影响。可见,经过葡聚糖改性后的磁流体大大增强了其抗酸碱能力,同时,增强了其热力学稳定性。通过在包裹磁流体的葡聚糖表面链接上的较长的有机链及其末端羧基功能基团的存在,降低了大分子葡聚糖与其他有机物反应的空间位阻,使葡聚糖链接与羧基易于反应的药物如丝裂霉素 C 等作用成为可能。

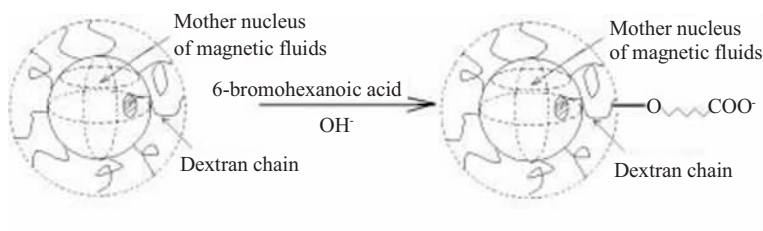


图 1 经葡聚糖表面改性的磁流体及与 6-溴己酸反应示意图

Fig.1 Schematic chart of dextran-modified magnetic fluid and its reaction with 6-bromohexanoic acid

### 2.2 FT-IR 分析

图 2 为碱性化处理的葡聚糖的红外光谱图,在 1668 cm<sup>-1</sup> 和 1392 cm<sup>-1</sup> 峰,此二峰的存在是羧酸盐由于羧酸成盐而形成了两个 C-O 基,从而使 C=O 双键性几乎消失,而看不到典型的 νC=O。其中 1668 cm<sup>-1</sup> 为 ν<sub>as</sub>, 1392 cm<sup>-1</sup> 为 ν<sub>s</sub>。说明葡聚糖经过碱性化处理生成了羧酸盐,与文献[10]有关描述一致。图 3 为葡聚糖包裹的磁流体红外光谱,对比图 2 的红外光谱图可见,在 AD 上的 ν<sub>as</sub>C-O 的 1668 cm<sup>-1</sup> 及 ν<sub>s</sub> 1392 cm<sup>-1</sup> 分别

移至 DM 的 1 641 cm<sup>-1</sup> 和 1388 cm<sup>-1</sup> 处,发生了红移,说明葡聚糖和磁流体 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 纳米粒表面之间发生了化学作用,而不是简单的物理包覆。图 4 为葡聚糖磁流体链接桥基的 FT-IR 图,对比图 3, DMS 的 1 574 cm<sup>-1</sup> 和 1 410 cm<sup>-1</sup> 两个强峰为己酸链末端羧酸盐 C-O 成盐后的 ν<sub>as</sub> 及 ν<sub>s</sub>, 而 DM 图没有这两个强峰出现, 2934 cm<sup>-1</sup> 为 CH<sub>2</sub> 的 ν<sub>as</sub>C-H, 2866 cm<sup>-1</sup> 为 ν<sub>s</sub>C-H。由于小分子游离的 6-溴己酸钠盐已经全部被透析出,因而可以认为 6-溴己酸与葡聚糖链接成功。

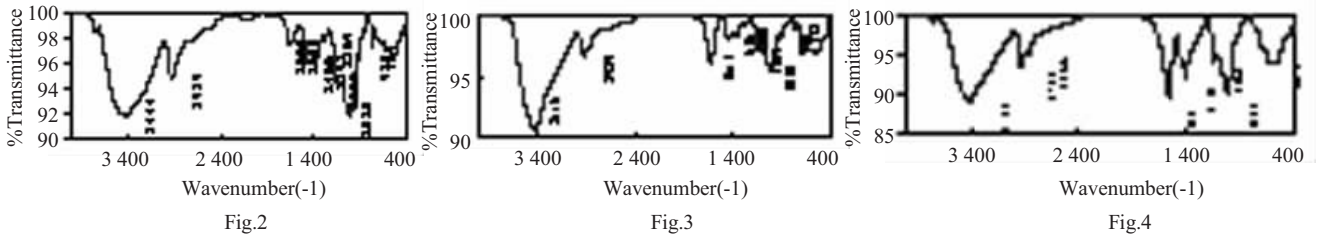


图 2 碱性化处理的葡聚糖 -70 的红外光谱图

Fig.2 Fourier transform infrared spectra of alkali-treated dextran-70

图 3 葡聚糖作用磁流体的红外光谱图

Fig.3 Fourier transform infrared spectra of dextran-modified magnetic fluids(DM)

图 4 葡聚糖磁流体与有机链链接的红外光谱图

Fig.4 Fourier transform infrared spectra of the DM with organic chain

### 2.3 XRD 分析

为了确证磁流体改性之后没有发生结构上的改变,对它们分别进行了 XRD 分析。图 5 为未经改性的磁流体,图 6 为经过葡聚糖表面处理的磁流体,图 7 为与 6- 溴己酸反应后的葡聚糖磁流体。图 2 中在  $2\theta=30.39^\circ、35.81^\circ、43.53^\circ、57.59^\circ、63.25^\circ$  的宽化的衍射峰分别对应于  $Fe_3O_4$  标准卡片上 (220)、(311)、(400)、(511)、(440) 面,说明所生成的产物为  $Fe_3O_4$  纳米核,且其晶粒细小。图中未见到其他氧化物的峰,说明在反应过程中没有发生明显的其他氧化。

根据 Scherrer 公式:  $D_{hkl} = K\lambda/B_{1/2}\cos\theta$ , 式中  $D_{hkl}$  为晶粒大小(沿晶面垂直方向),  $K$  系 Scherre 常

数,取作 0.89,  $\lambda=X$  射线波长,  $B_{1/2}$ = 半峰宽度,单位:弧度,  $\theta$ = 布拉格角, 57.3 是将度换算成弧度的换算常数。估算  $Fe_3O_4$  纳米微晶的粒径大小,经计算得:  $D_{311} = K\lambda/B_{1/2}\cos\theta = 0.89 \times 0.154 \times 57.3 / (0.6 \times \cos(51.59/2)) = 22.3 \text{ nm}$ , 即  $Fe_3O_4$  纳米晶粒的大小约为 22.3 nm。

与图 3 和图 4 对比可知衍射峰的位置和峰强没有发生变化,说明在葡聚糖磁流体的表面改性过程中,  $Fe_3O_4$  母核的结构没有发生变化,只是表面发生了作用,葡聚糖在磁流体表面形成了保护层,使表面链接对磁流体稳定性破坏明显的有机物亦未能对其母核结构产生影响。

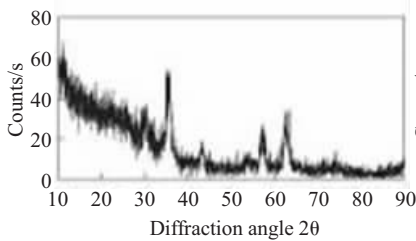


Fig.5

图 5 磁流体 XRD 图

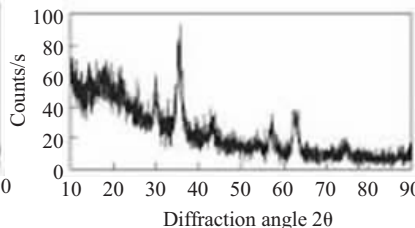


Fig.6

图 6 葡聚糖磁流体 XRD 图

Fig.6 X-ray diffraction analyses of dextran-modified magnetic fluid

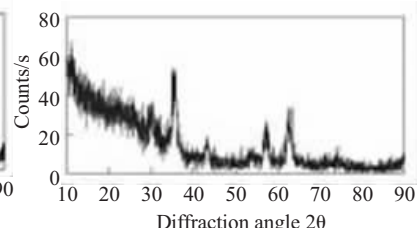


Fig.7

图 7 DMS 的 XRD 图

Fig.7 X-ray diffraction analyses of dextran-spacer conjugated magnetic fluid

### 2.4 TEM 分析及激光粒度仪粒径分布分析

图 8、9 分别是磁流体放大 50 万倍、改性之后磁流体放大 25 万倍的透射电子显微镜图。由图 5 可见,未经改性磁流体的颗粒大小为 20 nm,而图 6 中磁流体经过改性之后颗粒变为 50 nm 左右,且粒径分布均匀,无明显的团聚现象,表面圆整,提示磁流体表面有

包合物的存在。从激光粒度仪测量结果看,未经改性的磁流体数均粒径 22 nm,多分散度为 0.36。图 10 为葡聚糖磁流体纳米粒粒径分布图,经过改性后的磁流体数均粒径大小为 48 nm,多分散度为 0.35,与 TEM 结果相吻合。

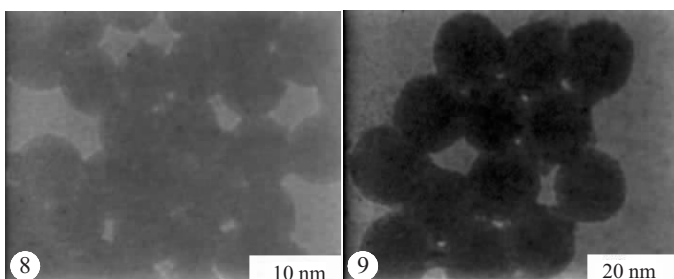


图 8 磁流体的 TEM 图 (原放大倍数:  $\times 500\ 000$ )

Fig.8 Transmission electron micrograph of the magnetic fluid (Original magnification:  $\times 500\ 000$ )

图 9 葡聚糖磁流体的 TEM 图 (原放大倍数:  $\times 250\ 000$ )

Fig.9 Transmission electron micrograph of dextran-modified magnetic fluid (Original magnification:  $\times 250\ 000$ )

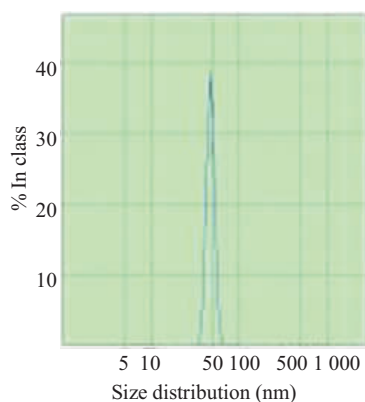


图 10 葡聚糖磁流体粒径分布图

Fig.10 Particle size distribution of dextran-modified magnetic fluid

### 3 结论

经过改性后的磁流体有很强的抗酸碱及其他化学试剂的能力,其母核结构没有发生任何变化,表面葡聚糖的存在大大增强了磁流体的稳定性,葡聚糖链接有机物链,降低了大分子葡聚糖分子空间位阻,增加了其反应活性,使其与具有相应活性基团的药物结合从而实现磁性前体药物成为可能或者直接作为药物载体。

(上接 625 页)

尤其是在肾小管上皮细胞中。本实验通过培养肾小管上皮细胞,提取其总 RNA,逆转录成 cDNA 作为模板,扩增得到 980 bp 的特异性片段,包含了完整的编码区序列;序列克隆入 4.7 kb 的 pEGFP-C1 荧光报告载体,测序结果证实克隆所得序列与 Genbank 上发表的序列一致。选用 pEGFP-C1 的目的在于该载体带有绿色荧光蛋白基因,插入片段 hUAT 在该基因的 3' 端,转染真核细胞成功后,目的基因的表达与绿色荧光蛋白 N 端融合。因此不仅能直接在荧光显微镜下观察质粒转染及表达情况,而且为研究该基因的功能和定位情况提供了良好的途径。

本研究从肾小管上皮细胞中获得 hUAT 全长基因的克隆载体,测序后与 Genebank 的序列比较,与 ecalectin 序列完全相同,与 galectin 99% 相同,与 Pinto 等<sup>[8]</sup>所克隆出的序列一致,为进一步研究 hUAT 的功能及其病理生理意义奠定了基础。关于 hUAT 在肾小管上皮细胞的定位及其功能研究正在进行中。

### 参考文献:

- [1] Matthias A. Gateway to a long life[J]? Nature, 2002, 417(6886): 393-5.
- [2] Nagahama K, Iseki K, Inoue T, *et al.* Hyperuricemia and cardio-

### 参考文献:

- [1] 康鸿业,王允军. 铁磁流体[J]. 自然杂志, 1990, 13(12): 828-31.
- [2] Galo JM, Gupta PK, Hung CT, *et al.* Evaluation of drug delivery following the administration of magnetic albumin microspheres containing adriamycin to the rat [J]. J Pharm Sci, 1989, 78 (1): 190-5.
- [3] 陈 骥,孙淑英,李潮武,等. 抗癌药物新剂型 5-Fu 磁性微球载体的研究[J]. 沈阳药学院学报 (J Shenyang Pharm Coll), 1982, 15 (1): 27-33
- [4] da Silva SW, Soler MG, Gansau C, *et al.* Study of the interactions between the surface chemisorbed layer and the surrounding media in magnetite-coated nanoparticles using Raman spectroscopy [J]. J Magn Magn Mater, 2001, (226-230): 1890-2.
- [5] Fauconnier N, Bée A, Roger J, *et al.* Synthesis of aqueous magnetic liquids by surface completion of maghemite nanoparticles[J]. J Mol Liquids, 1999, 83(1): 233-42.
- [6] Sun SH, Zeng H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles[J]. J Am Chem Soc, 2002, 128(28): 8204-5.
- [7] 阳承利,官月平,邢建民,等. 磁性 PMMA 微球的制备与表面修饰 [J]. 中国科学 B 辑 (Chin Sci: Sect B), 2004, 34 (4): 265-9.
- [8] Zhu YH, Wu QF. Synthesis of magnetite nanoparticles by precipitation with forced mixing[J]. J Nanopart Res, 1999, 1: 393-6.
- [9] Qiu XP, Françoise W. Preparation and characterization of PVA coated magnetic nanoparticles[J]. Chin J Polym Sci, 2000, 18(6): 535-9.
- [10] Hasegawa M, Hanichi T, Shoji H, *et al.* Biological behavior of dextran-iron oxide magnetic fluid injected intravenously in rats[J]. Jpn J Appl Phys, 1998, 37(3A): 1029-32.

vascular risk factor clustering in a screened cohort in Okinawa, Japan[J]. Hypertens Res, 2004, 27(4): 227-33.

- [3] Pizza M, Scarlato V, Masignani V, *et al.* Identification of vaccine candidates against serotype B meningococcus by whole-genome sequencing[J]. Science, 2000, 287(5459): 1816-20.
- [4] Mohammed A, Rafey MS, Lipkowitz E, *et al.* Uric acid transport molecular cell biology and physiology of solute transport 2003 [M]. Lippincott: Williams & Wilkins, 2003. 1062-4821.
- [5] Rafey MA, Lipkowitz MS, Pinto LE, *et al.* Uric acid transport[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003, 12(5): 511-6.
- [6] Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, *et al.* Molecular identification of a renal urate-anion exchanger that regulates blood urate levels[J]. Nature, 2002, 417(6887): 447-52.
- [7] Xu GS, Wu D, Chen XM, *et al.* Generation of mouse anti-human urate anion exchanger antibody by genetic immunization and its identification[J]. Chin Med J, 2005, 118(8): 627-32
- [8] Pinto LE, Cohen BE, Abramson RG. Functional analysis and molecular modeling of a cloned urate transporter/channel [J]. J Membr Biol, 1999, 169(1): 13-27.
- [9] Lipkowitz MS, Pinto LE, Rappoport JZ, *et al.* Functional reconstitution, membrane targeting, genomic structure, and chromosomal localization of a human urate transporter [J]. J Clin Invest, 2001, 107(9): 1103-15.
- [10] Rappoport JZ, Lipkowitz MS, Abramson RG. Localization and topology of a urate transporter/channel, a galectin, in epithelium-derived cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 281(6): C1926-39.