

葡聚糖磁性复合微粒的辐照灭菌研究

汪璐¹ 彭明丽^{1,2} 郭莉莉¹ 田云玲¹ 华恺¹ 程武^{1,2} 陈超¹ 崔亚丽¹

¹ (国家微检测系统工程技术研究中心 西安 710069)

² (合成与天然功能分子化学教育部重点实验室 西北大学化学与材料科学学院 西安 710069)

摘要 为满足葡聚糖磁性复合微粒临床无菌应用要求,采用⁶⁰Co γ 射线对该微粒进行辐照灭菌处理,考察吸收剂量为9 kGy、15 kGy和25 kGy时对其物理化学性质的影响,并对灭菌微粒进行无菌检查及方法验证。结果表明:该磁性复合微粒在3种吸收剂量下均表现出良好的稳定性,其物理化学性质均未出现明显变化;经辐照灭菌的微粒达到10⁻¹的无菌保证水平,已建立的无菌检查方法可靠。

关键词 葡聚糖磁性复合微粒,辐照灭菌,剂量

中图分类号 TL99

磁导靶向药物是一种新型的利用外磁场诱导的物理靶向药物制剂,是将具有超顺磁性的磁性载体和药物相结合,经静脉或介入等方式注入体内,利用病灶部位的外加磁场,将载药磁性载体聚集,定位于靶向区域,并通过持续缓慢释放药物,使病变组织局部具有较高药物浓度,从而减少药物的使用剂量,提高药物的治疗指数并减少其毒副作用^[1,2]。

相比于传统药物剂型,磁导靶向药物具有良好的临场应用价值,而葡聚糖磁性复合微粒(DCMN)已被证明是一种良好的磁导靶向药物载体^[3],作为一种注射用的药物载体,必须满足注射剂的无菌要求,因此寻找适合于葡聚糖磁性纳米载体的灭菌方法非常必要。对于纳米颗粒,有研究表明高压蒸汽灭菌容易导致不可逆的团聚和结块^[4];滤膜除菌法也往往由于颗粒会堵塞微孔滤膜而不适用于^[5]。

辐照灭菌利用放射性同位素⁶⁰Co的 γ 射线或电子加速器产生的高能电子达到杀死细菌的目的。目前辐照灭菌的应用已商业化,用途十分广泛,相比加热灭菌和化学灭菌而言,其不但可处理不耐热的物品,而且可避免化学试剂如环氧乙烷、甲醛等的毒性残留^[5]。目前通过辐照的方法对纳米颗粒进行灭菌研究已有报道^[6-8],如Memisoglu-Bilensoy等^[7]的研究表明用⁶⁰Co γ 射线辐照对一种 β -环糊精纳米胶囊进行灭菌是可行的;Maksimenko等^[8]用15 kGy的吸收剂量对其合成的聚丁基氰基丙烯酸酯(PBCA)纳米颗粒进行灭菌且灭菌后纳米颗粒稳定性良好。然而,目前对于葡聚糖磁性复合微粒的灭菌研究工作尚未见报道,本文选用⁶⁰Co γ 射线对

葡聚糖磁性复合微粒进行辐照灭菌研究,考察不同剂量对其物理化学性质的影响,以期找到合适的灭菌剂量,并为其后续临床应用奠定基础。

1 试验材料和方法

1.1 材料和仪器

葡聚糖磁性复合微粒冻干粉末由实验室自制^[9];无菌生理盐水购自双鹤药业有限公司;阿霉素原料药购自北京华奉联博科技有限公司。试验菌种均购自中国药品生物制品检定所;各类培养基及pH 7.0的氯化钠-蛋白胨缓冲液均购自北京三药科技开发公司;其他试剂均为国产,分析纯。动态光散射仪(英国Malvern公司, Nano ZS);傅里叶-红外光谱分析仪(美国热电公司, Nicolet 5700);透射电子显微镜(日本日立, H-600型);UV-Vis分光光度计(日本岛津, UV2550型);恒温水浴锅和隔水式培养箱均为天津泰斯特仪器有限公司产品。

1.2 初始污染菌数测定

称取0.22 g葡聚糖磁性复合微粒冻干粉末,无菌条件下溶于8.8 mL pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中,混匀制成1:40均匀的供试液。分别取供试液0.8、0.4和0.2 mL及作为阴性对照的0.8 mL缓冲液注入平皿中并迅速倒入20 mL, 45℃的琼脂培养基(细菌培养用营养琼脂培养基,霉菌培养用玫瑰红钠琼脂培养基),冷凝后,细菌于35℃培养3 d、真菌于25℃培养5 d后计数,取均值。选取细菌数

第一作者:汪璐,男,1986年5月出生,2012在西北大学获得工程硕士学位, E-mail: wanglu8606@qq.com; 共同第一作者:彭明丽,女,1976年4月出生,2004年在中国科学院理化技术研究所获理学博士学位,副教授, E-mail: mlpeng@nwnu.edu.cn

通讯作者:崔亚丽,博士生导师,教授, E-mail: yalicui@nwnu.edu.cn

收稿日期:初稿 2013-01-17, 修回 2013-04-22

不超过 300、霉菌数不超过 100 的最大供试液用量组作为计数依据。分别对 3 个批次的样品且每批平行制备 3 皿进行染菌情况检查。

1.3 D_{10} 值及灭菌剂量 (SD) 的测定

采用我国通用的公式法确定吸收剂量^[10],以抗辐射力很强的短小芽孢杆菌作为参考菌种,测定葡聚糖磁性复合微粒的平均污染菌数减少为原来的 1/10 所需要的剂量即 D_{10} ,将该剂量代入公式“ $SD=D_{10} \times (1gN+6)$ ”,其中 N 为单位样品的初始污染菌数,从而得到灭菌剂量。

1.4 辐照处理

将复合微粒分装于离心管中,送第四军医大学辐照中心辐照灭菌, ^{60}Co γ 射线为辐照源,辐照距离 40 cm,剂量率 955.48 cGy/min,灭菌剂量分别为 9、15、25 kGy,温度为室温。

1.5 葡聚糖磁性复合微粒各项性质的测定

取复合微粒原样和经辐照复合微粒复溶于纯水中并超声 5 min 使分散均匀,分别利用透射电子显微镜、动态光散射仪和傅里叶-红外光谱分析仪等方法考察辐照灭菌前后复合微粒形貌、粒径、zeta 电位、组成等物理化学性质的变化。

1.6 载药实验

应用 UV-Vis 分光光度计在波长 480 nm 处的吸光度对阿霉素含量进行测量,并建立阿霉素标准曲线。称取各处理组复合微粒 20 mg 于 50 mL 离心管中,依次加入 5 mL 纯水和 3 mL 的阿霉素(Dox)水溶液(1 mg/mL)后,避光,置 37℃ 恒温摇床,180 r/min 震荡,24 h 后测定样品的吸光度。由公式:载药率=(总的 Dox 量-游离的 Dox 量)/复合微粒总量 $\times 100\%$;包封率=(总的 Dox 量-游离的 Dox 量)/总的 Dox 量 $\times 100\%$;计算载药率和包封率,每组样品设置两个平行样。

1.7 无菌检查方法验证及无菌检查

按培养基说明书的要求配制实验所需量的培养基,相关溶液按照《中国药典》2010 年版附录 XI H^[11] 中有关规定进行配制、分装和灭菌后备用。

菌种及菌液按照《中国药品检验标准操作规范》2010 年版^[12] 无菌检查法中的方法进行制备。随机抽取经辐照灭菌处理的复合微粒样品,无菌操作下每管样品溶于 2 mL 无菌生理盐水中作为供试液,取

硫乙醇酸盐流体培养基(用量 20 mL)2 管,分别接入小于 100 CFU 的金黄色葡萄球菌(或大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌);取改良马丁培养基(用量 20 mL)2 管,接入小于 100 CFU 的白色念珠菌(或黑曲霉)。其中 1 管接入 1 mL 供试液(样品+阳性菌实验组),另 1 管作为对照(阳性菌对照组),对 7 种试验菌及相应的培养基逐一进行验证,硫乙醇酸盐流体培养基于 35℃,改良马丁培养基于 25℃,培养 5 d,逐日观察结果。试验重复 2 次。

随机选取未灭菌处理和灭菌后的 12 管复合微粒(每组 3 管),分别将复合微粒溶于 2 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液中作为供试液,再分别接种 1 mL 供试液至硫乙醇酸盐流体培养基和改良马丁培养基中,并设置两种加入 1 mL 无菌生理盐水的培养基作为阴性对照。两种培养基分别置于 35℃ 和 25℃ 隔水式培养箱中静置培养 14 d,逐日观察培养结果。试验重复 3 次。

2 结果与讨论

2.1 样品初始污染菌数测定结果

分别对 3 个批次葡聚糖磁性复合微粒进行染菌测定,灭菌前三批样品初始污染菌数分别为 66.7、33.3 和 100.0 CFU/g。未灭菌葡聚糖磁性复合微粒的总体平均初始污染菌数为 66.7 CFU/g。本研究以此设定了 9 kGy、15 kGy 和 25 kGy 三个梯度的吸收剂量,考察复合微粒对吸收剂量的耐受性。

2.2 辐照前后葡聚糖磁性复合微粒的透射电镜形貌的变化

未辐照和经 25 kGy 辐照的葡聚糖磁性复合微粒透射电镜结果见图 1。由图 1 得,该复合微粒在辐照前后形貌和分散性没有明显区别,均称球形结构,且直径约为 20 nm,这表明辐照没有对葡聚糖复合微粒的形貌和大小产生影响。

2.3 辐照对微粒粒径分布、zeta 电位、磁响应性的影响

对各实验组的复合微粒的平均粒径和 zeta 电位进行了表征,其结果见表 1,从中可以看出辐照前后复合微粒的平均粒径未发生明显改变($p>0.05$),zeta 电位也未发生明显改变($p>0.05$),且各组样品的粒径分布图也基本一致(见图 2)。

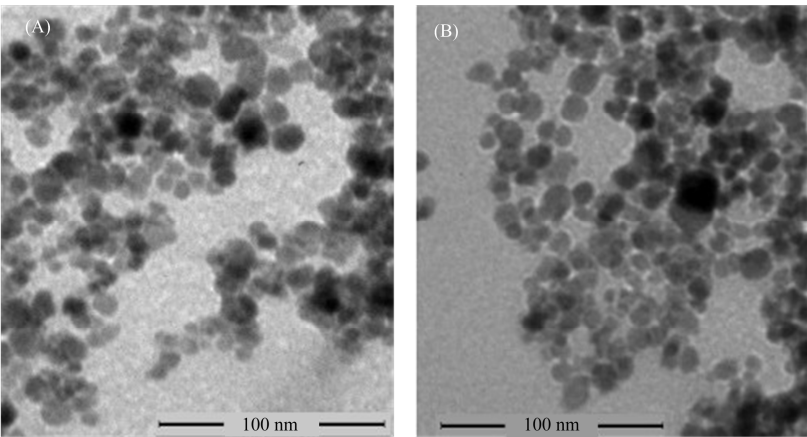


图 1 未辐照(A)和 25 kGy 辐照(B)的葡聚糖磁性复合微粒透射电子显微镜图片
Fig.1 TEM images of DCMN before (A) and after (B) irradiation of 25 kGy

表 1 不同辐照剂量的葡聚糖磁性复合微粒水合平均粒径和 zeta 电位
Table 1 Data of average diameter and zeta potential of DCMN with differnt irradiation doses

剂量/ kGy Dosage	平均直径/ nm Average diameter	zeta 电位/ mV Zeta potential
0	193.6±6.8	-21.2±0.8
9	188.5±5.1	-20.9±1.1
15	193.0±8.0	-21.4±1.1
25	196.1±8.9	-21.7±1.4

注：采用 *t*-检验的方法对其显著性进行检查。Note: The *t*-test was used to evaluate the significant difference.

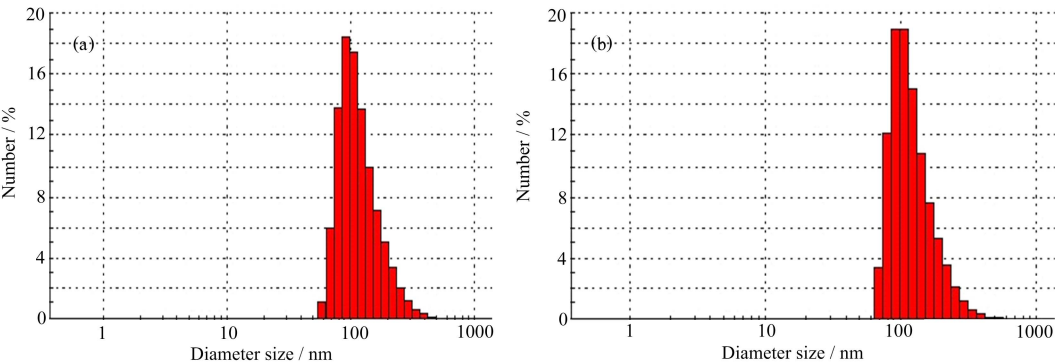


图 2 未辐照(a)和 25 kGy 辐照(b)的葡聚糖磁性复合微粒水合粒径分布图
Fig.2 Hydrodynamic diameter distribution of DCMN before(a) and after (b) irradiation of 25 kGy

辐照对磁响应性的影响是通过在磁场中的分离时间进行判断的，分别称取辐照前后的复合微粒置于离心管中，取 2 mL 纯水复溶后制成 10 mg/mL 的悬液，超声 5 min 分散均匀后，置于磁场中（钕铁硼永磁铁）进行磁分离，在磁场强度 0.5 T 条件下，分别记录溶液分离至澄清的时间。发现磁分离时间均为（950±2）s 内，无明显差异，表明辐照并未影响复合微粒的磁响应性。

2.4 辐照对复合微粒载药性能的影响

作为磁导靶向药物载体，葡聚糖载药性能是其应用的关键指标，因此对辐照前后复合微粒载药率和包封率进行了考察，其结果发现未辐照及辐照剂量为 9、15 和 25 kGy 葡聚糖磁性复合微粒的载药率分别为(14.33±0.13)%、(14.50±0.14)%、(14.33±0.10)%和(14.43±0.10)%。该结果表明辐照前后复合微粒载药率和包封率并未出现显著改变 (*p*>0.05)，

各样品组 24 h 载药率的平均值均超过 14.3%，封装率则都超过 95%。

2.5 辐照对复合微粒表面性质的影响

由于葡聚糖磁性复合微粒由葡聚糖及 Fe_3O_4 复合而成，因此采用红外光谱对灭菌前后的官能团及组分是否变化进行考察，结果如图 3 所示。谱图中 $3600-3100\text{ cm}^{-1}$ 、 $1150-885\text{ cm}^{-1}$ 分别对应羟基基

团的伸缩振动和 C-O-C 基团的伸缩振动，这些均为葡聚糖分子特征吸收；而在 596 cm^{-1} 处的吸收峰与典型的 Fe-O 基团的伸缩振动频率相对应，这证明了 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的存在。且对比辐照前 (a) 后 (b) 样品红外光谱图，可见两者无明显差别，这说明辐照并没有对复合微粒的葡聚糖以及 Fe_3O_4 的主要官能团产生显著的影响。

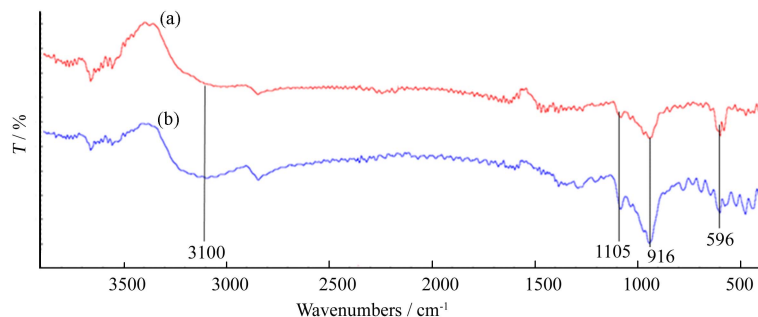


图 3 未辐照(a)和 25 kGy 辐照(b)的葡聚糖磁性复合微粒红外光谱图
Fig.3 The FTIR spectra of DCMN before(a) and after(b) irradiation of 25 kGy

2.6 无菌检查结果及方法验证试验结果

无菌检查的验证分别利用金黄色葡萄球菌 [CMCC(B) 26003]、铜绿假单胞菌 [CMCC(B) 10104]、枯草芽孢杆菌 [CMCC(B) 63501]、大肠杆菌 [CMCC(B) 44102]、生孢梭菌 [CMCC(B) 64941]、白色念珠菌 [CMCC(F) 98001]、黑曲霉 [CMCC(F) 98003] 等菌种作为试验菌，发现含样品管中的试验菌在规定时间内 (5 d) 内均生长良好，表明无菌检查方法验证通过，无菌检查的方法可行。该结果还提示该复合微粒对进行验证的菌种没有明显的抑菌作用。

对阴性对照和经 9、15、25 kGy 三个剂量辐照过的复合微粒进行 3 次无菌检查实验，结果显示，未灭菌的复合微粒长菌，而辐照后的样品在培养 14 d 后均未见长菌。且经 9 kGy 吸收剂量灭菌后，重复的 9 管样本经无菌检查发现培养 14 d 后均未出现长菌。这意味着 9 kGy 吸收剂量可以使葡聚糖复合微粒的灭菌水平达到 10^{-1} 的无菌保证水平，说明复合微粒污染菌的抗辐射力较低。

为保证满足临床注射试剂灭菌应用的要求，葡聚糖复合微粒的灭菌应达到 10^{-6} 的无菌保证水平，采用的我国通用的公式法进行吸收剂量的设定^[10]，以抗辐射力很强的 D_{10} 值为 3.0—2.2 kGy 的短小芽孢杆菌作为参考菌种，葡聚糖磁性复合微粒的在平均污染菌数为 66.7 CFU/g 的情况下，将 $N=6.67$ 和

$D_{10}=2.2\text{ kGy}$ ，代入公式 “SD(灭菌剂量) = $D_{10} \times (1gN+6)$ ”， N 为单位样品的平均污染菌数， D_{10} 值为杀灭 90% 的微生物所需的吸收剂量”，则可得 SAL 为 10^{-6} 对应的灭菌剂量为 15.01 kGy。即每个单位样品 (100 mg 葡聚糖磁性复合微粒) 达到 10^{-6} 的无菌保证水平所需剂量为 15.01 kGy。即该剂量满足临床应用要求条件下的最小剂量。

3 结论

本研究初步证明对磁性纳米载体葡聚糖复合微粒进行辐照灭菌是可行的，辐照前后复合微粒的形貌、粒径、zeta 电位、磁响应性、组成和载药性能等方面均未产生显著变化。在灭菌前样品的平均初始污染菌数为 66.7 CFU/g 的条件下，结合无菌检查结果，采用剂量设定方法可以得到在达到 10^{-6} 的无菌保证水平时，灭菌所需吸收剂量为 15.01 kGy，这为葡聚糖磁性载体在将来临床中的无菌应用奠定了基础。

参考文献

- 1 Pankhurst Q A, Connolly J, Jones S K, *et al.* Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine [J]. J Phys D: Appl Phys, 2003, 36: R167-R181
- 2 Alexiou C, Jurgons R S, Schmid R J, *et al.* Magnetic drug targeting-biodistribution of the magnetic carrier and the

- chemotherapeutic agent mitoxantrone after locoregional cancer treatment [J]. *Drug Target*, 2003, **11**(3): 139-149
- 3 Tassa C, Shaw S Y, Weissleder R. Dextran-coated iron oxide nanoparticles: A versatile platform for targeted molecular Imaging, molecular diagnostics, and therapy [J]. *Acc Chem Res*, 2011, **44**: 842-852
 - 4 Sommerfeld P, Schroeder U, Sabel B. Sterilization of unloaded polybutylcyanoacrylate nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 1998, **164**: 113-118
 - 5 Yvette N K, Robert G, Allémann E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2002, **233**: 239-252
 - 6 Razem D, Branka K-R. The effects of irradiation on controlled drug delivery/controlled drug release systems [J]. *Radiat Phys Chem*, 2008, **7**: 288-295
 - 7 Memisoglu-Bilensoy E, Hincal A A. Sterile, injectable cyclodextrin nanoparticles: effects of gamma irradiation and autoclaving[J]. *Int J Pharm*, 2006, **311**: 203-208
 - 8 Maksimenko O, Pavlov E, Tushov E, *et al.* Radiation sterilisation of doxorubicin bound to poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles [J]. *Int J Pharm*, 2008, **356**: 325-332
 - 9 康文博, 刘蓓, 夏炜, 等. 葡聚糖磁性载体在大鼠腹部皮瓣中的靶向性研究 [J]. *中国美容医学*, 2010, **19**(6): 859-862
 - KANG Wenbo, LIU Bei, XIA Wei, *et al.* Study on the targeting of dextran magnetic carders in the rot abdominal skin flap[J]. *Chin J Aesthetic Med*, 2010, **19**(6): 859-862
 - 10 李尚知, 刘清芳. 医疗保健产品辐照灭菌剂量设定方法实践应用的研究[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2008, **26**(4): 249-252
 - LI Shangzhi, LIU Qingfang. Study and application on establishing the sterilization dose of medical healthcare products[J]. *J Radiat Res Radiat Process*, 2008, **26**(4): 249-252
 - 11 中国药典委员会. 中国药典(附录) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 103-107
 - Chinese Pharmacopoeia Commission Chinese Pharmacopoeia (Appendix) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 103-107
 - 12 中国药品生物制品检定所. 中国药品检验标准操作规范[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 337-351
 - National Institute of Biology and Chemical Product. The national drug testing standard operating procedure[M]. Beijing: China medical Science Press, 2010: 337-351

Study on the radiation sterilization of dextran composite magnetic nanoparticles

WANG Lu¹ PENG Mingli^{1,2} GUO Lili¹ TIAN Yunling¹ HUA Kai¹
CHENG Wu^{1,2} CHEN Chao¹ CUI Yali¹

¹(National Engineering Research Center for Miniaturized Detection System, Xi'an 710069, China)

²(Key Laboratory of Synthetic and Natural Functional Molecular Chemistry (Ministry of Education),
College of Chemistry and Material Science, Northwest University, Xi'an 710069, China)

ABSTRACT Dextran composite magnetic nanoparticles (DCMn) were expected to be a magnetically-targeted carrier for clinical anticancer drug delivery. The feasibility of sterilization of the DCMn using ⁶⁰Co γ-rays irradiation was investigated with different absorbed doses of 9 kGy, 15 kGy, and 25 kGy. A sterility test for the particles and the validation of test was performed. The DCMn showed excellent stability with the investigated irradiation dosage range. The test results showed that irradiation did not influence the physicochemical properties of DCMn, and the radiated DCMn reached the 10⁻¹ sterilization level and the sterility test was stable and reliable.

KEYWORDS Dextran composite magnetic nanoparticles(DCMn), Sterilization, Dose

CLC TL99