

水溶性纳米 Fe_3O_4 -阿魏酸抗凝血材料的合成及性能

高琦宽¹ 王喜存² 宋玉民^{*2}

(¹ 甘肃卫生职业学院, 兰州 730000)

(² 西北师范大学化学化工学院, 兰州 730070)

摘要: 为提高具抗凝血性能的阿魏酸分子在水中的溶解性进而提高其药效, 利用 DBI(3,4-二羟基苯甲醛)、PEG(聚乙二醇 4000) 和纳米 Fe_3O_4 , 采用接枝的方法制备了水溶性纳米 Fe_3O_4 -DBI-PEG-阿魏酸抗凝血杂化材料, 用 IR、¹H NMR、TG、SEM、TEM、VSM 和粒度测试方法表征了产物。结果表明阿魏酸(FA)接枝在了经过 DBI-PEG 活化后的纳米 Fe_3O_4 氧化物表面。杂化材料具有良好的水溶性(溶解度大于 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和顺磁性。抗凝血试验表明相同条件下杂化材料的抗凝血时间和复钙时间比阿魏酸要长, 杂化材料的活化部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶原时间(PT)比空白组要长, 杂化材料的抗凝血时间随浓度的增大而延长。

关键词: 阿魏酸; 纳米 Fe_3O_4 ; 水溶性; 抗凝血

中图分类号: O614.81·1

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2015)12-2365-08

DOI: 10.11862/CJIC.2015.301

Synthesis and Anticoagulant Properties of Water Soluble Nano-Oxides Fe_3O_4 -Ferulic Acid Hybrid Material

GAO Qi-Kuan¹ WANG Xi-Cun² SONG Yu-Min^{*2}

(¹Gansu Health Vocational College, Lanzhou 730000, China)

(²College of Chemistry and Chemical Engineering, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: A hybrid materials of Fe_3O_4 -DBI-PEG-ferulic acid (DBI = 3,4-bihydroxy benzaldehyde, PEG = polyethylene glycol) were prepared by the method of grafting. The materials were characterized by IR, ¹H NMR, TG, SEM, TEM, VSM and particle size tests, which showed that the ferulic acid was grafted on the surface of Fe_3O_4 nano-oxides which was modified by DBI-PEG. Meanwhile, the hybrid materials are dissoluble in water (solubility > $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) and with paramagnet. The anticoagulant properties of ferulic acid and the hybrid materials were tested by coagulation time (CT), recalcification time (RT), activated partial thromboplastin time (APTT), and prothrombin time (PT). The results indicated that the hybrid materials have better anticoagulant action than that of ferulic acid.

Key words: ferulic acid; Fe_3O_4 nano-oxides; dissoluble; anticoagulant

近年来, 血栓栓塞类疾病越来越受到人们的关注, 它是一类严重危害人类健康和生命的疾病, 可发生于全身各处血管中, 从而表现出各种症状, 是中风、心梗塞、脑梗塞的直接原因之一^[1-3]。华法灵钠、肝素、枸橼酸钠是目前通用的抗凝血药物, 但经常使用

或大量使用非常容易引起自发性出血, 所以研究和开发更好的抗凝血药物, 成为药学专家和生物化学家的一个目标, 如焦天权、朱元成等曾研究过稀土元素配合物的抗凝血性质^[4-5]。从当归、川穹、阿魏、升麻中提取的阿魏酸(Ferulic acid, 化学名称为 4-羟基-3-

收稿日期: 2015-06-25。收修改稿日期: 2015-09-25。

国家自然科学基金(No.21362031), 甘肃省教育厅(2015B-221)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: songym@nwnu.edu.cn; 会员登记号: S06N8225M1006。

甲氧基肉桂酸, Scheme 1), 具有抗氧化、抗动脉粥样硬化、抗炎、抗凝血等多种药理学作用, 因此广泛应用于药物、食品、保健等领域, 临床上可用于心脏病、脑血管病、某些血液病等疾病的治疗^[6-8]。但是阿魏酸(FA)分子中含有苯环结构, 属于憎水基团, 很难溶于水和透过生物膜双分子层, 所以对阿魏酸分子进行改性以得到阿魏酸衍生物或制备水溶性阿魏酸金属配合物成为研究的热点之一^[9]。本课题组曾研究过过渡金属与阿魏酸二元配合物、稀土元素与阿魏酸二元配合物的抗凝血作用^[10-11], 结果表明这些二元配合物的抗凝血时间比阿魏酸的抗凝血时间要长, 但二元配合物的水溶性仍然较差。由于阿魏酸及其衍生物的水溶性差, 直接影响到其药用效果, 如何提高其药物的利用效率和靶向给药性, 一直是药物学家和化学家关注的课题。Wang 等通过化学修饰的方法将 DBI-PEG 水溶性长链分子接枝到 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的表面^[12], 在水溶性长链的末端通过席夫碱($\text{C}=\text{N}$)把抗癌药物色酮甲醛接枝到 Fe_3O_4 磁性纳米粒子上, 药物的水溶性大大提高, 而且由于 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的定向作用, 药物达到了更好的治疗效果。针对阿魏酸水溶性差的特性, 作者参考 Wang 等的方法, 先在 DBI-PEG 水溶性长链分子末端通过化学反应将阿魏酸分子接枝上去, 后将已接枝阿魏酸分子的 DBI-PEG 水溶性长链分子接枝到 Fe_3O_4 磁性纳米粒子的表面, 得到了水溶性较好的 Fe_3O_4 -DBI-PEG-阿魏酸长链分子(溶解度 $>10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 而阿魏酸溶解度 $<1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。抗凝血实验表明, Fe_3O_4 -DBI-PEG-阿魏酸长链分子, 比阿魏酸分子的抗凝血时间、复钙时间要长。说明 Fe_3O_4 -DBI-PEG-阿魏酸比阿魏酸分子具有更好的抗凝血性质。本文报道了 Fe_3O_4 -DBI-PEG-阿魏酸磁性纳米粒子杂化材料的合成、表征及体外抗凝血性质研究结果。在外磁场存在下的该杂化材料在动物体内的靶向给药性研究正在进行中。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

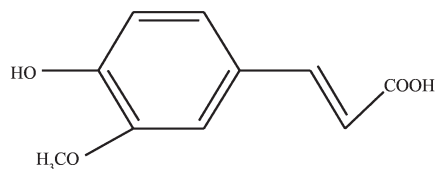
FTS-3000 型红外光谱仪(美国 PE 公司, KBr 压

片, 摄谱范围 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$); Mercury plus 400 超导核磁仪(美国 Varian 公司); TG/DTA-6300 热重-差热分析仪(美国 PE 公司); 数显智能控温磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂); 恒温水浴锅(郑州长城科工贸有限公司); KQ-100M 超声波清洗器(东莞市科桥超声波设备有限公司)。产品的表面形貌的表征采用的仪器是扫描电子显微镜(XL-20, 飞利浦公司, 荷兰), 操作电压为 25 kV; 透射电镜(Philips EM420 120 kV); 振动样品磁强计(美国 Lake shore 7404); 激光粒度仪(Zetasizer Nano-Zs laser particle size instrument, Malvern, UK)。聚乙二醇 4000, CH_2Cl_2 , 三乙胺, $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$, 3,4-二羟基苯甲醛均为分析纯。 Fe_3O_4 纳米粒子(20 nm) 购自 Aladdin Chemistry Co. Ltd, 阿魏酸(上海中秦化学试剂有限公司)。

1.2 杂化材料的合成

1.2.1 合成 $\text{H}_2\text{N}-\text{PEG}-\text{NH}_2$

在 250 mL 烧瓶中加入 5 mmol 聚乙二醇 4000 和 150 mL 干燥后的 CH_2Cl_2 , 再加入 15 mL 三乙胺, 混合冰浴下逐滴加入 7 mL $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{Cl}$ 。加完后移去冰浴, 室温下反应 24 h, 用 150 mL $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaHCO_3 溶液洗涤后用 CH_2Cl_2 萃取过滤。



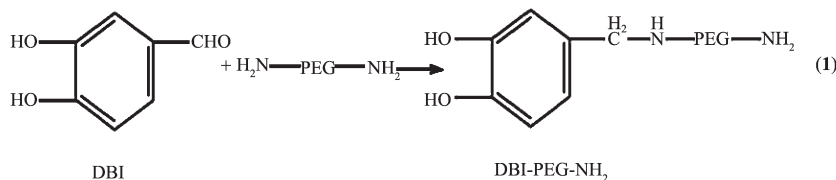
Scheme 1 Molecular structure of ferulic acid

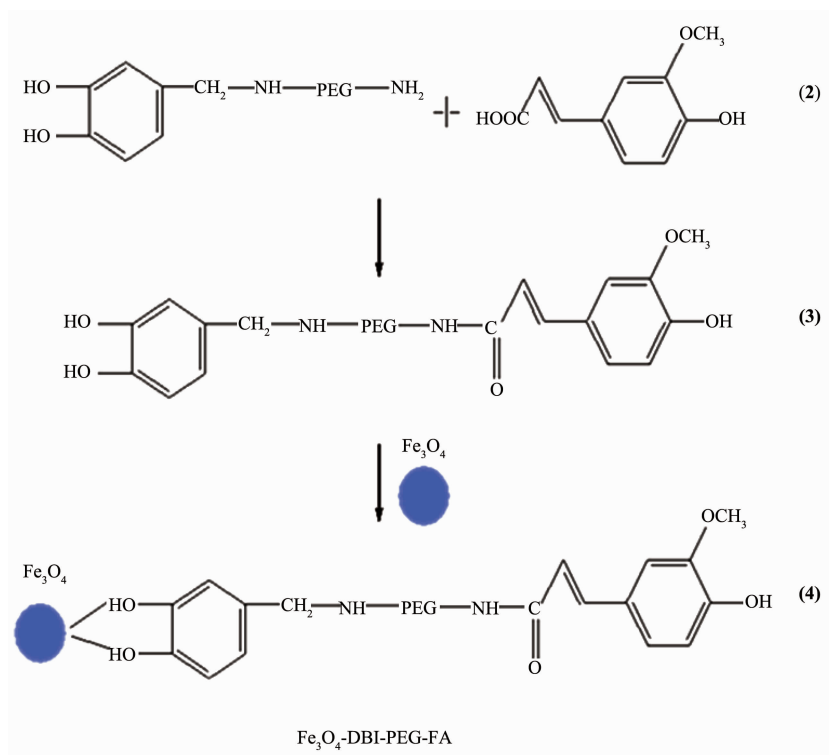
1.2.2 合成 DBI-PEG- NH_2

称取 0.2 mmol $\text{H}_2\text{N}-\text{PEG}-\text{NH}_2$, 加 25 mL 乙醇和 25 mL CH_2Cl_2 于圆底烧瓶中, 称取 0.2 mmol 3,4-二羟基苯甲醛, 用 50 mL 乙醇溶解后置于恒压漏斗中, 缓慢滴加进入圆底烧瓶(12 h), 同时冰浴(反应过程如(1)式)。再加入 0.2 mmol NaBH_4 搅拌 4 h。常压过滤, 蒸干后加乙醚抽滤, 得到产物, 产率 40%^[13]。

1.2.3 合成阿魏酸杂化材料

分别称取 0.25 mmol 阿魏酸, 0.03 mmol DCC(N,N' -二环己基碳二亚胺, 脱水缩合剂) 和 0.05 mmol NHS(N -羟基丁二酰亚胺, 酰胺化试剂)于圆底烧瓶





中,用 15 mL DMF 进行溶解,在常温下搅拌 24 h 后再加入 DBI-PEG- NH_2 0.25 mmol,氯仿 3 mL,完全溶解后搅拌 12 h(反应过程如(2)、(3 式)),后加入氯仿分散的 Fe_3O_4 ,无沉淀生成(反应过程如(4)式)。继续搅拌 12 h 后将溶液转移到离心管内加石油醚高速离心,分离离心管上层清液。将油状沉淀用二氯甲烷和石油醚处理成固体沉淀后再离心,去掉离心管上层清液。用乙醇清洗沉淀表面,晾干,得到粉末状产物,标记为 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DBI-PEG-FA}$ 。

1.2.4 杂化材料溶液的配制

杂化材料用二次蒸馏水溶解,并超声 10 min,配制成 2.0,0.20,0.020 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的溶液。

1.3 凝血实验

1.3.1 全血凝血实验(CT)

取 3 组干净的试管,每组 3 支。第 1 组为空白组,第 2、3 组分别为阿魏酸(FA)、阿魏酸杂化材料(加入溶液的浓度均为 2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,体积为 0.25 mL)。

将空白组试管和加好样品的 2 组试管放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中进行恒温,之后沿各试管壁加入 1 mL 人血,继续在水浴中恒温 2 min,同时开启秒表,每隔 30 s 以 30 $^{\circ}$ 轻轻倾斜试管并观察,直至血液不再流动为止,记录该时间为全血凝血时间。

运用上述实验方法测定 0.20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和

0.020 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶液的凝血时间。

1.3.2 复钙实验(RT)

将阿魏酸及 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DBI-PEG-FA}$ 固体放入 0.154 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的生理盐水中浸泡 24 h,烘干。取 3 组洁净的试管,每组 3 支。第 1 组为空白组,第 2、3 组分别加入 0.1 g 的 FA,FA 杂化材料,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴恒温 2 min。向 3 组试管中分别加入人血 0.3 mL,0.025 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CaCl_2 溶液 0.3 mL,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中恒温,同时开启秒表,将一根不锈钢小钩伸入溶液中均匀缓慢地搅动,并检查是否有纤维蛋白的形成。当小钩上刚出现丝状物时,记录时间,此时间即为复钙时间。

1.3.3 抗凝血活性实验

采用活化部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶原时间(PT)2 个指标来考查杂化材料对凝血系统的影响^[13]。

取 5 组洁净的试管,每组 3 支,第 1 组为空白样,第 2~5 组分别加入浓度为 0.20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿魏酸及阿魏酸杂化材料溶液 0.25 mL。向 15 支试管中分别加入 0.5 mL 血浆,0.025 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CaCl_2 溶液 0.3 mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴恒温后,记录出现纤维蛋白丝的时刻,该时间为 APTT。凝血酶原时间实验中,快速加入 PT 试剂,记录凝固时间,该时间为 PT。

2 结果与讨论

2.1 杂化材料表征

2.1.1 红外光谱

在 $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$ 红外光谱图中, 出现很强的 $-\text{C-H}$ 伸缩振动吸收峰($2\ 887\ \text{cm}^{-1}$), 很强的 $\nu_s(-\text{C-O-C})$ 振动吸收出现在 $1\ 111\ \text{cm}^{-1}$, 中等强度的 (CH_2) 吸收出现在 $1\ 467\ \text{cm}^{-1}$; 在 DBI-PEG- NH_2 的红外谱中, 不仅出现有 $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$ 的基团特征吸收峰($2\ 887$ 、 $1\ 112\ \text{cm}^{-1}$), 还出现 $\nu(-\text{OH})$ 的吸收峰($3\ 445\ \text{cm}^{-1}$), 说明 3,4-二羟基苯甲醛与 $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$ 反应, 生成 DBI-PEG。在 Fe_3O_4 -DBI-PEG 红外光谱图中, 不仅有 DBI-PEG- NH_2 分子基团的特征吸收峰($3\ 445$ 、 $2\ 887$ 、 $1\ 112\ \text{cm}^{-1}$), 还出现很强的金属 Fe-O 吸收峰($616\ \text{cm}^{-1}$)。

在阿魏酸、 Fe_3O_4 -DBI-PEG-阿魏酸杂化材料的红外图谱中可以看出阿魏酸与杂化材料相比某些特征吸收峰发生了明显的位移, 强度也有着相应的变化, 说明阿魏酸接枝到纳米氧化物表面。阿魏酸分子羧酸中 O-H 的面外变形振动吸收峰出现在 $950\sim 900\ \text{cm}^{-1}$ [14], 羧基振动峰出现在 $1\ 686\ \text{cm}^{-1}$, 在 $3\ 425\ \text{cm}^{-1}$ 处的酚羟基伸缩振动吸收峰, 形成杂化材料后变成了一个平滑的宽峰 ($3\ 300\sim 3\ 600\ \text{cm}^{-1}$), 是阿魏酸杂化材料中 O=C-N 基团中的胺基 ($3\ 300\sim 3\ 500\ \text{cm}^{-1}$) 振动吸收峰与阿魏酸酚羟基的伸缩振动吸收峰的叠加结果。阿魏酸在 $1\ 686\ \text{cm}^{-1}$ 处的羧基振动峰在杂化材料的红外谱图出现在 $1\ 635\ \text{cm}^{-1}$ 处, 向低波数移动, 说明阿魏酸的羧基与 PEG 的 NH_2 发生作用, 生成了酰胺基团。由此可见阿魏酸杂化材料被成功合成。

2.1.2 杂化材料的 ^1H NMR 分析

阿魏酸在 CDCl_3 中 ^1H NMR 为: $\delta=3.83(-\text{OCH}_3)$, $6.37(-\text{CH}=\text{C-benzene})$, $7.54(-\text{benzene-CH}=\text{C})$, $9.57(-\text{OH})$, $12.16(-\text{COOH})$ 。 $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$ 在 CDCl_3 中 ^1H NMR 为: $\delta=2.49(-\text{NH}_2)$, $3.33(\text{N-CH}_2)$, $3.49(-\text{CH}_2)$ 。DBI-PEG- NH_2 在 CDCl_3 中 ^1H NMR 为: $\delta=2.97(\text{t}, 2\text{H}, \text{NH}_2\text{CH}_2)$, $3.63(\text{brs, ca. } 373\text{H, PEG } 4000)$, $3.68(\text{t}, 2\text{H}, \text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2)$, $6.45(\text{d}, 1\text{H, Ph})$, $6.44(\text{d}, 1\text{H, Ph})$, $6.36(\text{s}, 1\text{H, Ph})$ 。DBI-PEG-FA 在 CDCl_3 中 ^1H NMR 为: $\delta=2.32(-\text{NH})$, $6.45(-\text{CH}=\text{C-benzene})$, $7.56(-\text{benzene-CH}=\text{C})$, $3.79(-\text{OCH}_3)$, $10.51(-\text{OH})$ 。

显然形成杂化材料以后, $-\text{NH}$ 中的 ^1H NMR 由最初的 2.49 位移至 2.32 , $-\text{CH}=\text{C-benzene}$ 由 6.37 位

移到 6.45 , $-\text{benzene-CH}=\text{C}$ 由 7.54 位移到 7.56 , $-\text{OCH}_3$ 由 3.83 位移到 3.79 , $-\text{OH}$ 由 9.57 位移到 10.51 , 而 $-\text{COOH}$ 的 ^1H NMR 消失, 说明阿魏酸已接枝到 $\text{H}_2\text{N-PEG-NH}_2$ 的一端, 与 DBI 和 Fe_3O_4 共同形成了杂化材料。

2.1.3 杂化材料的热分析

以 $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ 为参比, 以 $10\ ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 为升温速率, 在 N_2 保护下从室温升至 $800\ ^\circ\text{C}$, 得阿魏酸和杂化材料的热重(TG-DTA)曲线。图 1 为阿魏酸(a)和阿魏酸杂化材料(b)的 TG 曲线图。

从图 1 中可以看出, 对于 Fe_3O_4 -DBI-PEG- NH_2 的热重曲线(a), 在 $25\sim 220\ ^\circ\text{C}$ 温度范围内失重 5% 左右, 是该物质失去的自然吸附水造成的。第二阶段在 $230\sim 450\ ^\circ\text{C}$ 温度范围内, 失重 26.0%, 这是失去的嫁接在纳米四氧化三铁表面的 DBI-PEG- NH_2 所致。然而对于 Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA 的热重曲线(b), 在第一阶段 $25\sim 250\ ^\circ\text{C}$ 失重 2.0% 的自然吸附水, 而在 $250\sim 650\ ^\circ\text{C}$ 急剧失重约 58.0%, 这部分是因为失去了嫁接在 Fe_3O_4 纳米粒子表面的 DBI-PEG-FA, 最终产物为 Fe_3O_4 。接枝的阿魏酸大约占 3.0%, 所有这些信息说明 Fe_3O_4 -DBI-PEG-阿魏酸分子被合成了。

与文献报道的阿魏酸分解温度 $190\ ^\circ\text{C}$ 相比 [15], 杂化材料的分解温度在 $250\ ^\circ\text{C}$ 以上, 表明杂化材料的稳定性大于阿魏酸。

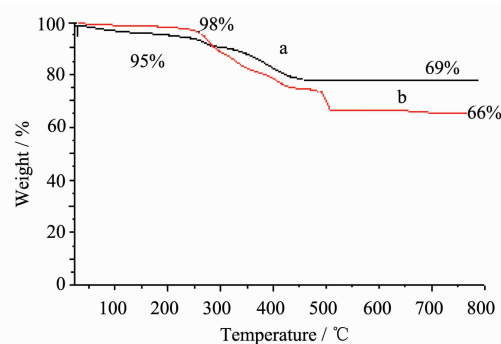
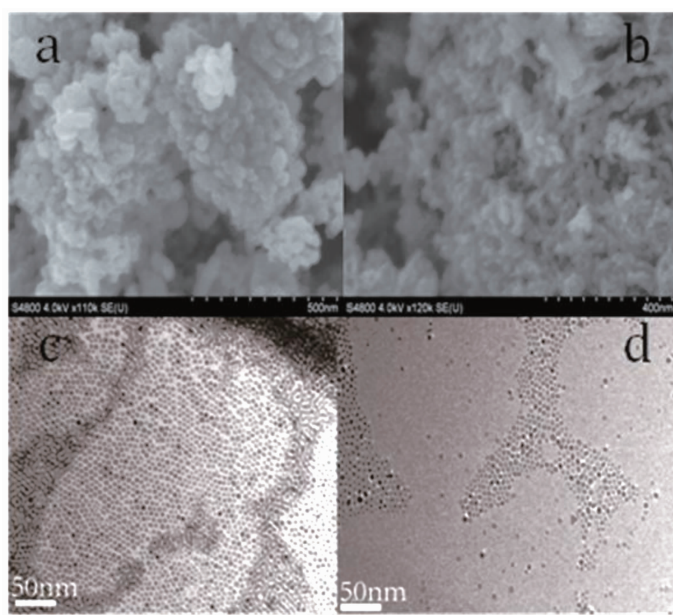


图 1 (a) Fe_3O_4 -DBI-PEG- NH_2 和 (b) Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA 热重图

Fig.1 TG of Fe_3O_4 -DBI-PEG- NH_2 (a) and Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA (b)

2.1.4 合成材料的电镜图分析

图 2 为 Fe_3O_4 和 Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA 的电镜图。从电镜图可以看出有一定团聚现象的球形纳米 Fe_3O_4 粒子, 如图 2a。当纳米 Fe_3O_4 粒子通过 DBI-PEG- NH_2 嫁接到阿魏酸上后, 由于分子体积变大导致粒径增大, 粒子更加分散, 长度在 $40\sim 100\ \text{nm}$ 不

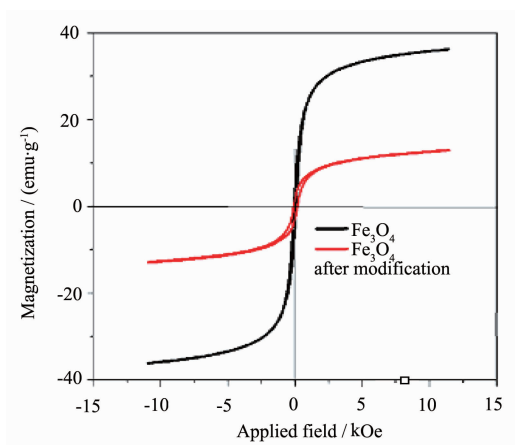
图 2 Fe_3O_4 和 Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA 的电镜图Fig.2 SEM images of Fe_3O_4 nanoparticles (a) and Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA (b); TEM images of Fe_3O_4 nanoparticles (c) and Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA (d)

等,杂化材料分别为层状和纳米纤维状结构的固体,进一步说明纳米氧化物被 DBI-PEG- NH_2 改性,并和阿魏酸反应接枝,在扫描电镜中基本看不到纳米氧化物粒子,这表明在纳米氧化物表面成功的发生了接枝反应,阿魏酸已将氧化物粒子完全包覆,如图 2b。但在透射电镜图中(图 2c),可以明显看出球形聚集的纳米 Fe_3O_4 粒子,还可以看出单独的纳米 Fe_3O_4 粒子和在阿魏酸杂化材料(图 2d)中的纳米粒子非常相似,由于透射电镜无法反映有机基团,只能看到纳米粒子周围存在有白色物质,说明 Fe_3O_4 粒子被有机物 DBI-PEG-FA 包裹。

2.1.5 合成材料的磁性能分析

由图 3 可以看到在相同强度磁化场内, Fe_3O_4 纳米粒子单位质量的磁感强度较大而 Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA 粒子单位质量的磁感强度较小。这说明两种物质都含有 Fe_3O_4 磁性粒子。 Fe_3O_4 纳米粒子磁感强度较大是因为样品全部是 Fe_3O_4 粒子,而 Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA 粒子的磁感强度较小是因为样品含有部分 Fe_3O_4 粒子部分有机基团,导致磁性的 Fe_3O_4 粒子的含量降低。由此可说明有机基团的引入导致 Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA 单位质量的磁感强度降低。

由于引入 Fe_3O_4 纳米粒子,杂化材料表现出顺磁性。合成的杂化材料的水溶液在没有外磁场的情况下能够稳定存在(图 4a)。当有外磁场存在时,该溶

图 3 纳米 Fe_3O_4 和 Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA 的振动样品磁强计图Fig.3 VSM images of Fe_3O_4 NPs and Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA NPs

液中的杂化材料分子就会向磁场方向移动,聚集到一起,如图 4b 所示。杂化材料的这种顺磁性是该材料在动物体内可以具有靶向给药性的依据。

2.1.6 合成材料的粒径测试

图 5 是 DBI-PEG 和杂化材料 Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA 的粒径分布强度,可以看出 DBI-PEG 的粒径大小约为 114 nm,而当其与阿魏酸接枝形成 Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA 后其粒径增大,为 176 nm,说明阿魏酸已经接枝到了 DBI-PEG 上,形成了杂化材料。且其

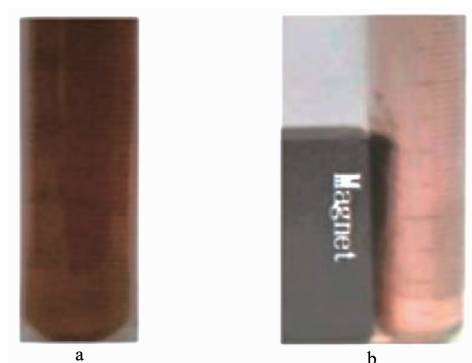


图 4 杂化材料的磁性

Fig.4 Hybrid materials solution without magnet(a) and with magnet(b)

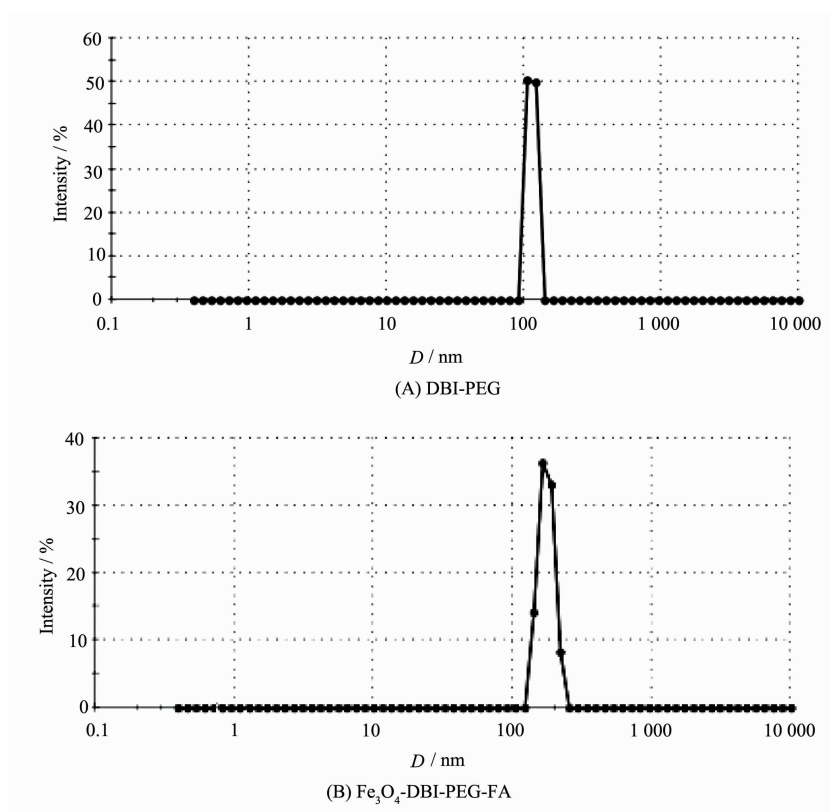


图 5 粒径分布图

Fig.5 Particle size distribution

分布峰变宽, 所形成的杂化材料表现出一定的团聚性。

2.2 抗凝血试验

2.2.1 全血凝血实验(CT)

表 1 为不同浓度的阿魏酸及杂化材料的凝血时间。从表中可以看出, 空白样的凝血时间最短, 其次是阿魏酸, 相同浓度杂化材料的凝血时间均大于阿魏酸。从表中还可以看出, 随着浓度的增加, 阿魏酸和杂化材料的凝血时间均有延长。但是如果浓度过

大, 分子会在人体内大量累积, 不利于新陈代谢, 甚至会危害健康。在同一浓度时, 与阿魏酸相比, 杂化材料的凝血时间几乎是阿魏酸的 2 倍, 这说明阿魏酸杂化材料具有较好的抗凝血性质。本实验合成的阿魏酸杂化材料加入血液后, 影响凝血过程中凝血因子的激活及凝血复合物的形成^[6], 阻止了凝血酶原转化为凝血酶, 因此, 杂化材料的有效抗凝血时间得以延长。

2.2.2 复钙实验(RT)

表 1 不同浓度的 Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA 的凝血时间

Table 1 Coagulation time of different concentrations compound

Compound	Volume / mL	Concentration / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	CT / min
Blank	0	0	4(± 0.1)
FA	0.25	0.020	4.2(± 0.1)
	0.25	0.20	6.5(± 0.1)
	0.25	2.0	7.0(± 0.2)
Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA	0.25	0.020	10(± 0.1)
	0.25	0.20	11(± 0.1)
	0.25	2.0	12(± 0.2)

表 2 为阿魏酸杂化材料的复钙时间(RT)。从表中数据可知,不加任何物质的空白样的复钙时间最短,其次是阿魏酸,杂化材料复钙时间最长。因此,杂化材料的抗凝血性优于阿魏酸。与前面所做的凝血时间实验结果相一致。

2.2.3 凝血活性综合实验

活化部分凝血活酶时间(APTT)和凝血酶原时间(PT)是内源性凝血活性和外源性凝血活性的综合性指标。二者的延长表明存在先天性凝血因子异常或多种凝血因子的缺乏及循环抗凝血素的增加的可能性^[13]。从表 3 的实验结果可以看出:(1)与空白组相比,阿魏酸和杂化材料的 APTT、PT 时间均有所延

长,且 APTT 时间延长较多,这是由于在测试组的血液样品中加入了阿魏酸和杂化材料,说明不仅阿魏酸具有抗凝血作用,合成的杂化材料也具有抗凝血作用。(2)同等实验条件下,浓度较大的阿魏酸和杂化材料的溶液比浓度较小的阿魏酸和杂化材料溶液的 APTT、PT 时间稍有延长,这表明抗凝作用与测试样品的浓度有关,样品浓度越大,抗凝血时间越长。(3)在表中所列的实验条件下,阿魏酸和杂化材料的 APTT、PT 测试时间结果均在正常值的范围内,因此可以看出,当在体外血液中加入少量杂化材料时,没有引起血液性质的较大变化,此种杂化材料有望进入临床抗凝血药物的筛选范围。

表 2 Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA 的复钙时间

Table 2 Recalcification time of Compound

Compound	RT / s
Blank	85(± 1)
FA	88(± 2)
Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA	91(± 2)

表 3 Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA 凝血活性实验

Table 3 Coagulant activity of Compound

Compound	Concentration / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Volume / mL	APTT / s	PT / s
Blank	0	0	27.50(± 1)	12.40(± 1)
FA	0.20	0.25	34.00(± 2)	13.00(± 1)
	2.0	0.25	34.20(± 2)	13.60(± 1)
Fe_3O_4 -DBI-PEG-FA	0.20	0.25	33.70(± 2)	13.30(± 1)
	2.0	0.25	34.70(± 2)	13.50(± 1)
Reference value			25~37	10~13

3 结 论

利用 DBI-PEG4000 活化纳米 Fe_3O_4 和接枝的方

法制备了一类纳米氧化物阿魏酸杂化抗凝血材料,通过红外光谱、热重-差热分析和扫描电镜、透射电镜、磁强计表征产物,结果表明阿魏酸接枝在了经过

DBI-PEG-NH₂ 活化后的纳米 Fe₃O₄ 氧化物表面。抗凝血实验说明杂化材料具有良好的水溶性和抗凝血性能。克服了阿魏酸水溶性差的缺点, 相同条件下抗凝血时间和复钙时间比阿魏酸要长。杂化材料的抗凝血时间长短与材料的溶液浓度有直接的联系, 浓度越大, 抗凝时间越长。少量杂化材料在体外血液中的加入并没有引起血液性质的较大变化, 此种杂化材料的抗凝血性能可为临床抗凝血药物的筛选提供实验依据。

参考文献:

- [1] Yang M L, Song Y M. *RSC Adv.*, **2015**, **5**:17824-17833
- [2] Eitsuka T, Tatewaki N, Nishida H, et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2014**, **453**(3):606-611
- [3] Woranuch S, Yoksan R. *Carbohydr. Polym.*, **2013**, **96**(2):495-502
- [4] Jiao T Q, Wu J G, Zeng F L, et al. *Synth. React. Inorg. Met.-Org. Chem.*, **1999**, **29**(5):725-735
- [5] ZHU Yuan-Chen(朱元成), YAO Ka-Lin(姚卡玲), LI Yin(李英), et al. *J. Lanzhou Univ.*(兰州大学学报), **2005**, **41**(6):61-64
- [6] YIN Hua-Fang(殷华芳), QIAN Xiao-Ping(钱晓萍), LIU Bao-Rui(刘宝瑞). *Mod. J. Integr. Trad. Chin. West. Med.*(现代中西医结合杂志), **2010**, **19**(32):4238-4240
- [7] ZHAO Dong-Ping(赵东平), YANG Wen-Yu(杨文钰), CHEN Xin-Fu(陈兴福). *Lishizhen Med. Mater. Medic. Res.*(时珍国医国药), **2008**, **19**(8):1839-1841
- [8] Zhao Z H, Mo H, Dai S A. *Food Chem.*, **2008**, **109**:691-702
- [9] MA Fen-Shi(马逢时), LI Jia-Ming(李家明). *Asia-Pac. Med. Trad.*(亚太传统医药), **2008**, **4**(5):55-57
- [10] WANG Pu-Yu(王璞玉), BIAN Chang-Xing(卞常鑫), SONG Yu-Ming(宋玉民). *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2012**, **28**(8):1609-1616
- [11] SONG Yu-Ming(宋玉民), BIAN Chang-Xing(卞常鑫), WANG Pu-Yu(王璞玉). *Chem. Bioeng.*(化学与生物工程), **2011**, **28**(12):32-34
- [12] Wang B D, Xu C J, Xie J, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, **130**(44):14437-14437
- [13] CHEN Yu(陈于), XU Can(徐灿), SU Jia-Can(苏佳灿), et al. *Chinese J. Inorg. Chem.*(无机化学学报), **2011**, **27**(4):625-630
- [14] ZHOU Hong-Hao(周宏灏). *Pharmacology*(药理学). Beijing: Science Publishing House, **2007**:318-329
- [15] ZHOU Cai-Rong(周彩荣), AN Na(安娜), SHI Xiao-Hua(石晓华), et al. *J. Zhengzhou Univ.*(郑州大学学报), **2007**, **28**(2):47-48
- [16] FAN Xiao-Li(樊小力). *Physiology*(生理学). Beijing: People's Medical Publishing House, **2002**:54-60