

- Cancer Chemother Pharmacol*, 2001, 47(1): 83—88.
- [8] Motzer RJ, Rakhit A, Ginsberg M, *et al.* Phase I trial of 40-kD branched PEGylated interferon alfa-2a for patients with advanced renal cell carcinoma [J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(5): 1312—1319.
- [9] Reddy KR, Wright TL, Pockros PJ, *et al.* Efficacy and safety of PEGylated (40-kD) interferon alpha-2a compared with interferon alpha-2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C [J]. *Hepatology*, 2001, 33(2): 433—438.
- [10] Bullock J, Chowdhury S, Severdia A, *et al.* Comparison of results of various methods used to determine the extent of modification of methoxy polyethylene glycol 5000-modified bovine cupri-zinc superoxide dismutase [J]. *Anal Biochem*, 1997, 254(2): 254—262.
- [11] Somack R, Saifer MG, Williams LD. Preparation of long-acting superoxide dismutase using high molecular weight polyethylene glycol (41 000-72 000 Daltons) [J]. *Free Radic Res Commun*, 1991, 12—13(Pt 2): 553—562.
- [12] Li YP, Pei YY, Ding J, *et al.* PEGylated recombinant human tumor necrosis factor alpha: preparation and anti-tumor potency [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(6): 549—555.
- [13] Koumenis IL, Shahrokh Z, Leong S, *et al.* Modulating pharmacokinetics of an anti-interleukin-8 F(ab')₂ by amine-specific PEGylation with preserved bioactivity [J]. *Int J Pharm*, 2000, 198(1): 83—95.
- [14] Katre NV. Immunogenicity of recombinant IL-2 modified by covalent attachment of polyethylene glycol [J]. *J Immunol*, 1990, 144(1): 209—213.
- [15] Goodson RJ, Katre NV. Site-directed PEGylation of recombinant interleukin-2 at its glycosylation site [J]. *Biotechnology(NY)*, 1990, 8(4): 343—345.
- [16] Marwaha VR, Italia DH, Esper F, *et al.* Extreme thrombocytosis in response to PEG-ADA: early therapeutic and risk indicator [J]. *Clin Pediatr (Phila)*, 2000, 39(3): 183—186.
- [17] Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(3): 214—221.

微泡超声造影剂的研究进展

赵应征¹, 张彦²综述 梅兴国¹审校

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 解放军总医院, 北京 100853)

摘要: 根据近年来微泡超声造影剂的国外研究进展, 阐述了微泡超声造影剂的制法、靶向制备技术、体内过程和物理原理, 并讨论了其在治疗上的应用和发展前景。

关键词: 微泡超声造影剂; 制法; 靶向制备技术

中图分类号: R94 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2003)05-0298-05

自Gramiak等首先将超声造影技术应用于临床后, 超声造影剂(ultrasound contrast agents)的发展经历了三个阶段。早期超声造影剂为自由气体(主要是空气或氧气), 无成膜物质, 不稳定, 不能经外周静脉注射, 而通过心导管插入主动脉或心腔内, 属创伤性检查方法。加之微泡在血液循环中持续时间极为短暂、制剂成泡太大、不能通过肺循环, 导致左心不能显影, 只能使右心显影, 因此使用受到限制。

1984年, Feinstein等发明了声振白蛋白形成的包裹气泡超声造影剂, 使超声造影剂研究得以快速发展。这类超声造影剂是在空气气泡周围包裹白蛋白、脂类或多糖等作为膜稳定剂。以Albunex和利声显(Levovist)为代表的这类超声造影剂, 直径明显

减小($< 8 \mu\text{m}$), 在血液中的持续时间明显延长, 仅经外周静脉注射就能够通过肺循环使左心腔及外周血管显影^[1], 同时增强了血液的多普勒信号, 实现了超声造影由创伤性向非创伤性的发展, 从而使这一技术进入了一个新的发展阶段。

近10年来, 在包裹气泡超声造影剂基础上研制出新型超声造影剂——由氟碳类气体制备成的微球、乳剂、脂质体和微泡等超声造影剂。其中微泡超声造影剂使用最为广泛, 其微泡直径约几微米, 由一层厚度为几十纳米的膜包裹而成。由于增强了微泡弹性外壳的韧性和采用低弥散度大分子量的气体, 使微泡直径更为缩小并趋于一致, 进而提高了稳定性。此外, 二次谐波显像技术、触发成像技术、脉冲反相谐波成像技术、相干造影成像技术等超声工程

技术方面的进展,有效地抑制了不含微泡的组织运动引起的杂波,使得超声造影剂信号的敏感性明显提高,从而更有利于疾病的诊断和鉴别^[2-4]。

1 超声造影剂的分类

微泡超声造影剂有多种分类方法,其中根据微泡中气体的种类和成分可分为:(1)含二氧化碳气体的微泡超声造影剂;(2)含氧气的微泡超声造影剂;(3)含空气的微泡超声造影剂;(4)含大分子惰性气体(多为氟碳气体)的微泡超声造影剂。根据稳定微泡的成膜材料的不同,又可将其分为:(1)以磷脂类化合物为成膜材料的微泡超声造影剂;(2)以白蛋白为成膜材料的微泡超声造影剂;(3)以糖类为成膜材料的微泡超声造影剂;(4)以非离子表面活性剂为成膜材料的微泡超声造影剂;(5)以可生物降解的高分子多聚物为成膜材料的微泡超声造影剂。

天然的或合成的高分子多聚物抗压性和稳定性高,氟碳气体分子量较大、溶解度和弥散度较低,因此,制备高分子多聚物为成膜材料内含氟碳气体的微泡具有直径小、分布均匀、半衰期长等优点,是近年来超声造影剂的研究热点^[5]。

2 超声造影剂的制法

理想的微泡超声造影剂必须满足以下条件:(1)安全无毒,对循环系统没有生理上的影响;(2)易于使用,可静脉注射;(3)微泡大小符合要求,可通过肺、心脏和毛细血管循环,并且保持稳定;(5)反射性好,衰减伪差小,增强多普勒信号。微泡超声造影剂的制备是一个复杂的、有相当难度的过程,目前,常用方法有中和法、吸附法、机械匀化法、声振空化法、冷冻干燥法和薄膜-水化法等。

2.1 中和法

含二氧化碳气体的微泡超声造影剂是以中和法制备的,常用的方法是在5%碳酸氢钠溶液中加入酸性溶液,如维生素C(pH=2.0)、1%盐酸或2%醋酸等。

2.2 吸附法

以糖类为基质的超声造影剂多用此法制备,此类造影剂以单糖基半乳糖晶体微粒为核心,与溶剂混合振荡时吸附空气,形成大量微泡。例如,德国先灵公司的SHU508(商品名Levovist)^[6],其制备是将蒸馏水加入到含0.1%棕榈酸的半乳糖粉末中,剧烈摇动5~10s,形成牛奶状悬浮液,微泡直径为2~

4 μm。

2.3 机械匀化法

Soetanto等^[7]用注射器以每分钟60次连续吸挤0.5%的十二烷酸钠溶液,并伴以机械搅拌生成大量的微泡。然后用量管吸取微泡进行分馏,溶液分成两层,上层含有较大的微泡,下层含有大量微泡的牛奶状溶液,可用于超声造影。Unger等^[8]制备了MRX-552超声造影剂微泡,将紫杉醇混悬于大豆油中,再加入磷脂混悬液,充以全氟丁烷气体,密封,以4200 r·min⁻¹的速度振荡,制得平均粒径为2.9 μm的紫杉醇脂质微泡。

2.4 声振空化法

对某些低浓度有一定粘度的溶液进行超过空化域值强度的声振处理,可在液体中形成无数瞬时负压核,从而产生微泡。

制备是以表面活性剂为成膜材料的微泡超声造影剂ST68^[9]:司盘60与NaCl在乳钵中混合,加入10 mL磷酸盐缓冲液(pH=7.4)研匀。另将吐温80与10 mL磷酸盐缓冲液研匀,与上液混合,再加入剩余磷酸盐缓冲液混匀。120℃灭菌15 min,搅拌至室温。以20 kHz,110 W条件下声振处理3 min。转置于分液漏斗中,溶液分成三层,分出中间微泡层,然后洗3遍,微泡数量可达4×10¹² L⁻¹。

2.5 冷冻干燥法

通常以磷脂类化合物为成膜材料,加入适量的表面活性剂和合适的助悬剂,采用冷冻干燥法制备。如制备Sonovue造影剂,将聚乙二醇(PEG)2000和磷脂类成分溶解在叔丁醇中,以0.2 mbar下冷冻干燥。将生成的粉末用六氟化硫(SF₆)气体饱和,加入蒸馏水轻轻混合可得到微泡超声造影剂。

2.6 薄膜-水化法

Hasik等^[10]利用类似脂质体的薄膜法制备脂质包裹的微泡,泡壁成分含粉状脂质、PEG和硬脂酸盐(摩尔比为10:1)。所有成膜材料混合,逐滴加入氯仿直至完全溶解。通风干燥成白色薄膜,残余氯仿于干燥器中干燥。薄膜在磷酸盐缓冲液中水化,于47℃孵育2~4 h,超声,样品变成牛奶状含空气的微泡混悬液。样品瓶室温冷却3 min使材料从液态膜转成固体膜微粒,制成微泡超声造影剂。

2.7 其他方法

有的微泡超声造影剂是由乳剂转化而来的,可以参见乳剂制法。如Echogen(QW3600)^[11],该制剂为两相制剂,在体外为2%全氟戊烷乳剂,静脉注射

后,当体内温度大于 29.5°C 时,则成为直径 $2\sim 3\ \mu\text{m}$ 的微气泡随血流全身分布。

3 超声造影剂的靶向制备技术

制备靶向微泡超声造影需达到以下要求:(1)微泡能够流动经过靶位;(2)微泡有足够稳定时间以便在靶位循环和积累;(3)结合到靶位上的微泡应在超声检查过程中保持稳定;(4)微泡与靶位的结合应牢固,不能在血流作用下分开;(5)靶位显像的造影剂用量应少,最好是毫克级或更少;(6)可以很快实现靶位与背景的高比率对比^[12]。

制备靶向超声造影剂的关键是将靶向配体(多为蛋白分子)连接到微泡上,连接方式有以下三种:(1)直接连接法:靶向配体或靶向配体混合物直接连接到泡壁成分上,此法取决于泡壁材料的化学组成和配体的性质。例如,蛋白质为成膜材料的微泡泡壁上具有氨基酸集团,可以共价结合配体^[13]。(2)利用锚着残基连接法:此法有两种方式,一种是先将配体共价结合到锚着残基上,微泡形成后这些配体和锚着残基就镶嵌于泡壁上;另一种是先将锚着残基嵌入泡壁中,微泡形成后再结合配体^[12,13]。许多蛋白分子在高温和超声条件下失活,因此后一种方式应用较多。锚着残基可以是脂质、聚合物或蛋白,为了结合到泡壁中,锚着残基可以在微泡制备前加入到含有其他泡壁成分的水相中。此法也用于将共价标记物结合到微泡表面上,如将荧光素结合到蛋白包被的微泡表面上。(3)Hybrid 方法:此法用于制备包被有抗体的微泡^[13]。首先引入必要的化学基团对锚着残基进行结构修饰形成功能基团,微泡形成后激活功能基团,然后与抗体结合。例如,先制备亲水端带有羧基的配体衍生物,然后与水相中其他的磷脂/表面活性剂成分混合,制成表面含羧基的微泡。利用水溶性碳二亚胺激活微泡表面的羧基后就可以与抗体结合。

连接方法主要由配体的性质决定,如单克隆抗体在剧烈的制备条件(如超声)下失活,而糖类配体、短链缩氨酸或缩氨酸类似物可以耐受这些条件,因此,根据不同性质的配体选用适宜方法连接到预成型的泡壁上。

由于自由流动的配体在血管中会先与靶位结合,这样就减少了微泡与靶位的结合。因此,必须纯化微泡。简单的浮选技术可用于纯化微泡。利用含气体微泡比周围的水相轻的特点,通过离心后收集

顶部微泡,用新配的缓冲液洗去微泡上未结合的配体即可完成纯化微泡。

4 超声造影剂的体内过程和物理原理

4.1 超声造影剂的体内过程

微泡在体内溶解分为三个阶段^[14]:(1):微泡在空气中迅速膨胀,膨胀速率取决于微泡表面张力、血管压力、氧气代谢水平和充填气体在微泡中的摩尔分数;(2)充填气体从微泡中缓慢地扩散出来,微泡直径的平方随时间呈线性降低,速率正比于 Ostwald 系数和充填气体的扩散率;(3)充填气体的部分压力升高导致微泡最终变成液体。微泡直径和可压性急剧降低,超声检测不到微泡。为了延长微泡在血流中的寿命,充填气体在体内温度条件下必须具有较低的 Ostwald 系数($\leq 10^{-4}$)和相对较高的饱和蒸汽压($\geq 30\ \text{kPa}$)。

4.2 超声造影剂的物理原理

多数超声造影剂通过改变声衰减、声速和增强后散射等,改变声波与组织间的基本作用(吸收、反射和折射),使得所在部位的回声信号增强^[15]。最常用和最有效的超声造影剂是含气体的封闭微泡形式。应用微泡超声造影剂的目的是通过提高血中背向散射回声信号提供改进的超声显像诊断方式。微泡超声造影的效果可能会受到成膜材料性质、血液流速、微泡浓度和声场压力等因素的影响^[10,16,17]。

5 超声造影剂在治疗上的应用和发展前景

微泡超声造影剂特别是氟碳类气体的超声造影剂的研制成功并应用于临床,推动了超声诊断学的发展。目前,国外批准上市的微泡超声造影剂有:Albunex, Sonovue, AI-700 和 Optison (FSO69)等。正在研制中的微泡超声造影剂有 PESDA, Aerosomes (MRX 115)和 Sonovist (SHU563A)等。微泡超声造影剂现用于体内许多重要器官(如肝、肾、子宫、卵巢等)和心血管系统的血流供应情况的检查,尤其对于左右心腔和心肌的超声造影已取得了重大成就。微泡超声造影剂在诊断上应用日益广泛,近来的研究表明,它在治疗方面还有很大的潜力。

5.1 增强治疗性超声的溶栓作用

微泡在声场中破坏时产生的空化作用可以有助于溶解血栓。Luo 等^[18]研究表明,微泡超声造影剂能加速体内尿激酶(UK)等向血栓内渗透,可增强治疗性超声的溶栓作用。Nishioka 等^[19]的体内外研

究表明, DDFP 微泡超声造影剂能够增强超声的空化效应, 有明显的溶栓功效。

5.2 携带药物或治疗基因的载体

微泡超声造影剂作为一种能携带微粒穿过内皮层进入靶组织的非创性载体, 可增加靶组织的药物浓度和基因表达量。运用超声破坏含有载体的微泡可在特定组织释放药物或治疗基因^[20]。例如, 超声联合造影剂的基因治疗, 通过超声破坏造影剂微泡, 把循环中的基因输送到靶组织。若用配体和基因标记的造影剂, 会提高靶组织的基因表达量。运用此法能输送常用的基因治疗载体到达靶组织, 并能高水平表达转基因。Unger 等^[8]体外研究表明, 利用自制的 MRX-552 微泡超声造影剂作为紫杉醇药物递送载体, 结合超声技术(持续超声和脉冲超声)可望实现局部定位释药的目的。

5.3 治疗肿瘤

超声造影剂中微气泡的破坏可促使供应肿瘤的微血管破裂而引起肿瘤退变; 携带血栓形成物的造影剂在肿瘤内被超声破坏, 可形成血栓或阻塞血管, 使肿瘤坏死。

6 结语

微泡超声造影剂的成膜材料日趋多样化, 但是不同材料各有其优缺点, 如多聚体成膜材料较白蛋白和磷脂类成膜材料抗压性好, 持续时间长, 需要较高的声学输出才能产生较强的对比成像。然而, 较高的声学输出容易产生生物学效应(如引起细胞溶解和毛细血管破裂等), 造成局部出血或粘膜淤血, 因此, 许多新型微泡超声造影剂还处于研究阶段。

随着高分子材料的快速发展和微泡制备工艺的不断完善, 微泡超声造影剂必将朝着更加个性化的方向发展, 未来的微泡超声造影剂不仅能应用于不同生理和病理状态下的超声成像, 还可以作为携带药物或治疗基因的载体, 实现治疗基因和药物的靶向输送。

参考文献

[1] Heman B, Einav S, Vered Z. Feasibility of mitral flow assessment by echo-contrast ultrasound. Part I. Determination of the properties of echo-contrast agents[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2000, 26(5): 787-795.

[2] Forsberg F, Liu JB, Chiu HJ, et al. Comparison of funda-

mental and wideband harmonic contrast imaging of liver tumors[J]. *Ultrasonics*, 2000, 38(1-8): 110-113.

- [3] Porter TR, Xie F, Kricsfeld D, et al. Improved myocardial contrast with second harmonic transient ultrasound response imaging in human using intravenous perfluorocarbon-exposed sonicated dextrose albumin[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1996, 27(6): 1497-1501.
- [4] Verbeek XA, Ledoux LA, Willigers JM, et al. Experimental investigation of the pulse inversion technique for imaging ultrasound contrast agents[J]. *J Acoust Soc Am*, 2000, 107(4): 2281-2290.
- [5] Richard CW, Kwan OL, Michael H, et al. Initial safety and myocardial perfusion imaging results with AF-700: a new ultrasound contrast agent[J]. *J Am Soc Echocardiogr*, 2001, 14(5): 457.
- [6] von Bibra H, Becher H, Firschkec, et al. Enhancement of mitral regurgitation and normal left atrial color Doppler flow signals with peripheral venous injection of a saccharide-based contrast agent[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1993, 22(2): 521-528.
- [7] Soetanto K, Chan M. Fundamental studies on contrast images from different sized microbubbles: analytical and experimental studies[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2000, 26(1): 81-91.
- [8] Unger EC, McCreery TP, Sweitzer RH, et al. Acoustically active lipospheres containing paclitaxel: a new therapeutic ultrasound contrast agent[J]. *Invest Radiol*, 1998, 33(12): 886-892.
- [9] Basude R, Duckworth JW, Wheatley MA. Influence of environmental conditions on a new surfactant-based contrast agent, ST68[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2000, 26(4): 621-628.
- [10] Hasik MJ, Kim DH, Howle LE, et al. Evaluation of synthetic phospholipid ultrasound contrast agents[J]. *Ultrasonics*, 2002, 40(9): 973-982.
- [11] Graybum PA, Erickson JM, Escobar J. Peripheral intravenous myocardial contrast echocardiography using a 2% dodecafluoropentane emulsion: identification of myocardial risk area and infarct size in the canine model of ischemia[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1995, 26(5): 1340-1347.
- [12] Klibanov AL. Targeted delivery of gas-filled microspheres-contrast agents for ultrasound imaging[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999, 37(1-3): 139-157.
- [13] Klibanov AL, Hughes MS, Villanueva FS, et al. Targeting and ultrasound imaging of microbubble-based contrast agents[J]. *MAGMA*, 1999, 8(3): 177-184.
- [14] Kabalno A, Klein D, Pelura T, et al. Dissolution of multi-

- component microbubbles in the bloodstream. 1. Theory[J]. *Ultrasound Med Biol*, 1998, 24(5): 739-749.
- [15] Deng CX, Lizzi FL. A review of physical phenomena associated with ultrasonic contrast agents and illustrative clinical applications[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2002, 28(3): 277-286.
- [16] Uhlendorf V, Scholle FD, Reinhardt M. Aoustic behaviour of current ultrasound contrast agents[J]. *Ultrasonics*, 2000, 38(1-8): 81-86.
- [17] Moran CM, Anderson T, Pye SD, et al. Quantification of microbubble destruction of three fluorocarbon-filled ultrasonic contrast agents[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2000, 26(4): 629-639.
- [18] Luo H, Nishioka T, Fishbein MC, et al. Transcutaneous ultrasound augments lysis of arterial thrombi *in vivo*[J]. *Circulation*, 1996, 94(4): 775-778.
- [19] Nishioka T, Luo H, Fishbein MC, et al. Dissolution of thrombotic arterial occlusion by high intensity, low frequency ultrasound and dodecafluoropentane emulsion; an *in vitro* and *in vivo* study[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1997, 30(2): 561-568.
- [20] Evan CU, Terry OM, Thomas MC, et al. Therapeutic applications of microbubbles[J]. *J Eur Radiol*, 2002, 42: 160-168.

固相微萃取在生物体液分析中的研究进展

张 丽^{1,2}综述 顾明松¹, 谢剑炜¹ 审校

(1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 武警医学院, 天津 300162)

摘要: 固相微萃取是一种无溶剂样品预处理技术。固相微萃取以其无需使用溶剂、样品用量少、有一定的富集作用等特点而受到广大分析工作者的关注。本文着重综述了该方法的装置、原理、影响因素及其应用, 尤其是在使用气相色谱-质谱联用、高效液相色谱-质谱联用技术分析生物体液中的应用。

关键词: 固相微萃取; 气相色谱-质谱; 高效液相色谱-质谱; 生物体液

中图分类号: R914.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2003)05-0302-07

固相微萃取(solid-phase microextraction, SPME)是一种相对较新型的样品前处理技术。它基于气-固吸附、液-固吸附平衡的原理, 利用待测物对活性固体表面有一定的吸附亲和力而达到分离富集的目的。它由固相萃取(solid-phase extraction, SPE)技术发展而来, 具有简单、高效、灵敏度和精密度高的特点。SPME集制备、分离于一体, 将以往传统的取样、萃取、浓缩及进样多步分析操作简化为一个简单过程, 尤其是在操作过程中不需要使用溶剂是其最大的优点。既降低了消耗, 又避免了污染环境。SPME于1990年首先由Arthur等^[1]提出, 广泛用于环境方面的分析。近年来, 更多的研究用于药物分析, 与色谱装置联用, 尤其是气相色谱-质谱联用(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)和HPLC-MS。SPME-GC-MS适用于分析强挥发性或中等挥发性的中低极性化合物, 而SPME-HPLC-MS适

用于分析低挥发性或不挥发性的高极性化合物。两者相互补充, 扩展了SPME的应用范围。在液体样品中痕量有机污染物的萃取及生物体液中一系列组分的分析工作中获得广泛应用。

1 固相微萃取

1.1 装置

SPME装置如同一种改进的注射器(图1)。有一个不锈钢的微型管在它的注射针内, 这个微型管是用于承载上面涂有有机聚合物(如聚二甲基硅氧烷, PDMS)的熔融石英纤维, 这个纤维长约1 cm, 置于针头内。操作时, 将带有涂层的纤维伸出直接浸入样品中或者置于样品顶空中, 几分钟后, 待测物吸附于纤维上, 达平衡后, 将纤维收回。与GC联用时, 将纤维直接插到GC的进样口, 升温热解吸后进行分析。与HPLC联用时, 在进样前采用一定的解吸附溶剂将待测物解吸附后导入色谱柱进行分析(图2)。这需要一个特定的接口才能实现。SPME是一个复杂的多项平衡的过程, 待测物在样品和涂