

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* ***** *
* 計 畫 : The effect of radiation on the syntheses of *
* 名 稱 : chitosan-coated nanoparticle for hyperthermia *
* ***** *

執行計畫學生： 邱于玟
學生計畫編號： NSC 98-2815-C-040-037-B
研究期間： 98年07月01日至99年02月28日止，計8個月
指導教授： 陳拓榮

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學影像暨放射科學系

中華民國 99年03月25日

行政院國家科學委員會補助

大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* 計畫 : The effect of radiation on the syntheses of *
* 名稱 chitosan-coated nanoparticle for hyperthermia *

執行計畫學生：邱于玟

學生計畫編號：NSC 98-2815-C-040-037-B

研究期間：98年7月1日至99年2月底止，計8個月

指導教授：陳拓榮

處理方式(請勾選)：立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學醫學影像暨放射科學系

中華民國 99 年 2 月 20 日

目錄

目錄.....	I
圖目錄.....	II
1. 摘要.....	1
2. 研究動機與研究問題.....	2
3. 文獻回顧與探討.....	3
4. 研究材料與方法.....	5
4.1 甲殼素(chitosan)於合成後照射輻射線.....	6
4.2 甲殼素於合成磁流體前照射輻射線.....	9
4.3 得知 SAR(specific absorption rate,W/g).....	11
5. 結果與討論.....	12
5.1磁流體熱產率.....	12
5.2磁流體的物理特性.....	15
5.3磁流體變化.....	17
6. 結論.....	18
7. 參考文獻.....	19

圖目錄

圖 1. 流程圖.....	5
圖 2. 合成出的磁流體.....	8
圖 3. 本實驗使用的高周波感應加熱設備.....	12
圖 4. 合成後照射不同劑量的時間溫度曲線.....	13
圖 5. 合成後照射不同劑量的 SAR 變化.....	13
圖 6. 合成後照射不同劑量的 SAR 變化.....	14
圖 7. 合成前照射不同劑量時間溫度曲線.....	14
圖 8. 合成前照射不同劑量的 SAR 變化.....	15
圖 9. 合成後照射輻射磁流體的 TEM.....	15
圖 10. 合成前照射輻射磁流體的 TEM.....	16
圖 11. 實驗中合成磁性粒子的磁滯曲線.....	16
圖 12. 實驗中合成出的磁流體.....	17
圖 13. 接受大劑量照射的磁流體.....	17

1. 摘要

隨著時代的變遷，人們接觸致癌物的機率大大增加，也使得惡性腫瘤在這麼多年以來一直都是十大死因之一，在臨床上對於腫瘤的治療不外乎外科手術、化學治療以及放射治療，然而在這麼多種的治療方式所造成的副作用影響也都非常的大，反觀熱治療(hyperthermia)是所有治療癌症方式中最沒有副作用的一種，當對腫瘤組織加熱到一定程度腫瘤組織就會壞死，而正常組織的散熱效果較佳所以不會受到太大的影響。

熱治療是藉由不同的方法對細胞加熱，例如：無線電射頻(radiofrequency)、微波(microwave)、超音波 (ultrasound)，以及雷射(laser)等，當溫度達 41°C ~ 46°C 超過細胞所能忍受的範圍，細胞則會死亡，在這麼多的治療方式中其中的一種應用方法就是利用磁性奈米粒子來加熱，因此本研究裡我們利用磁性奈米粒子來加熱，且將甲殼素(chitosan)作為震盪時的界面活性劑來包覆磁性物質，使磁性物質能均勻散佈在容液當中，控制條件是以不同的劑量照射甲殼素於合成磁流體前和合成磁流體後，再利用交流磁場(Alternating Current magnetic field)加熱磁流體，最後評估磁場對於輻射照射甲殼素合成磁流體前和合成磁流體後，不同照射劑量所造成的 SAR(specific absorption rate,W/g)影響。

2. 研究動機與研究問題

根據行政院衛生署的統計資料，近20年來惡性腫瘤一直都是十大死因的第一名，起初人們看待惡性腫瘤幾乎可以和不治之症畫上等號，但是隨著科技的日新月異，對於惡性腫瘤的治療方式也有許多選擇，不過不管是外科手術、化學治療和放射線治療都存在著許多的風險和副作用。

根據研究發現，細胞對溫度具相當高之敏感性，且細胞存活率隨加熱時間增加亦會大幅遞減。舉例來說，當加熱溫度維持在43°C一小時左右，細胞之存活率將會降至1%以下，若將溫度升高1°C，則要達到相同加熱效果之時間又可縮短一半，以此類推。因此，用熱的形式來破壞人體不想要的組織也是一個很好的選擇。

而人類很早之前就知道利用熱的機制來治療人體的疾病，早在兩千年前人類就將蒸汽浴當作一種治療方法。在1886年，一名癌症病患因為丹毒引發高燒後，而發現腫瘤有消失的現象；甚至在西元1912年，Lambert也提出熱治療理論後，隨著科技的日益發達，利用高熱達到治療效果近年來在癌症治療上，也有很大的發展，例如：攝護腺熱療法，是目前臨床上的一種應用方式，主要是利用特製的尿導管，其前端約有三公分的熱線圈，當傳入微波(915MHz或2450MHz或電磁波2000KHZ)即可對攝護腺產生加熱作用，而達到治療的效果。

所以本研究希望將磁性奈米粒子放置於交流磁場中，利用交流磁場的作用而使磁性奈米粒子產熱，但是產熱的效果好與壞，是否能達到熱治療的標準，關鍵就在於甲殼素所照射的輻射劑量高低，以及照射輻射線的時間點，因此本實驗要探討高輻射劑量和低輻射劑量以及照射的時間點對甲殼素包覆之奈米粒子的SAR(specific absorption rate,W/g)，最後希望能將結果應用於腫瘤細胞的治療上。

3. 文獻回顧與探討

熱治療是指將特定組織與器官加熱 41°C~46°C 之間，癌細胞會因此被破壞導致死亡，而正常細胞本身對熱的散熱機制相對於腫瘤細胞來的佳，所以正常細胞則有較高的存活機會，利用此基礎來達到治療的目的就是熱治療，其中磁性奈米粒子是當中一種應用。有很多的研究報告運用交流(AC)磁場在熱治療上【1-4】其產熱的效果主要取決於磁體的材質、包覆物的材質和合成的過程。在這個實驗中我們利用甲殼素(chitosan, poly[β-(1-4)-linked-2-amino-2-deoxy-D-glucose])來當作介面活性劑，是因為甲殼素具有性質穩定、無毒、具生物分解性和有一活性強之胺基，與生物體細胞有良好的生物相容性【5-6】。在有些研究指更出輻射會破壞甲殼素的鍵結，甚至可以縮小甲殼素的大小

【7-8】，而使甲殼素包覆之磁流體的粒徑縮小，達到更好的升溫效果，因此我們利用 Co-60 當作射源來照射甲殼素，所以最後在輻射劑量的照射上會決定磁性奈米粒子的產熱效果的好壞。

Fe₃O₄磁性奈米粒子的特性

磁性奈米粒子一般常是Fe₃O₄、MnFe₂O₄、CoFe₂O₄ 等單晶所構成，其不溶於水，因此需要在磁性奈米粒子表面披覆上一層親水性的界面活性劑，以使磁性奈米粒子能穩定地分散在水中。此溶液即所謂的磁性流體。磁性流體中磁性奈米粒子受水分子熱擾動的作用，在無外加磁場下，該流體無自發性磁偶極。但當有磁場施加在該流體時，液體中的磁性粒子之磁矩會傾向沿著外加磁場方向，因而產生了磁偶極。而當外加場移除時，由於磁性奈米粒子受水分子熱擾動的作用，再度呈現出零磁偶極。這現象即所謂之超順磁性 (superparamagnetism)。磁性奈米粒子另一個重要特性，就是其大小與生物分子相近，故藉由適當地改造粒子表面的生化特性，可使粒子與特定生物分子相結合，致使生物分子帶有磁性標記。【9】

4. 研究材料及方法

本研究將分成兩大主軸來探討，分別是(1)將甲殼素在合成磁流體後照射輻射線，(2)甲殼素在合成磁流體前照射輻射線，最後再將這兩種方法得到的產物分別作數據分析。

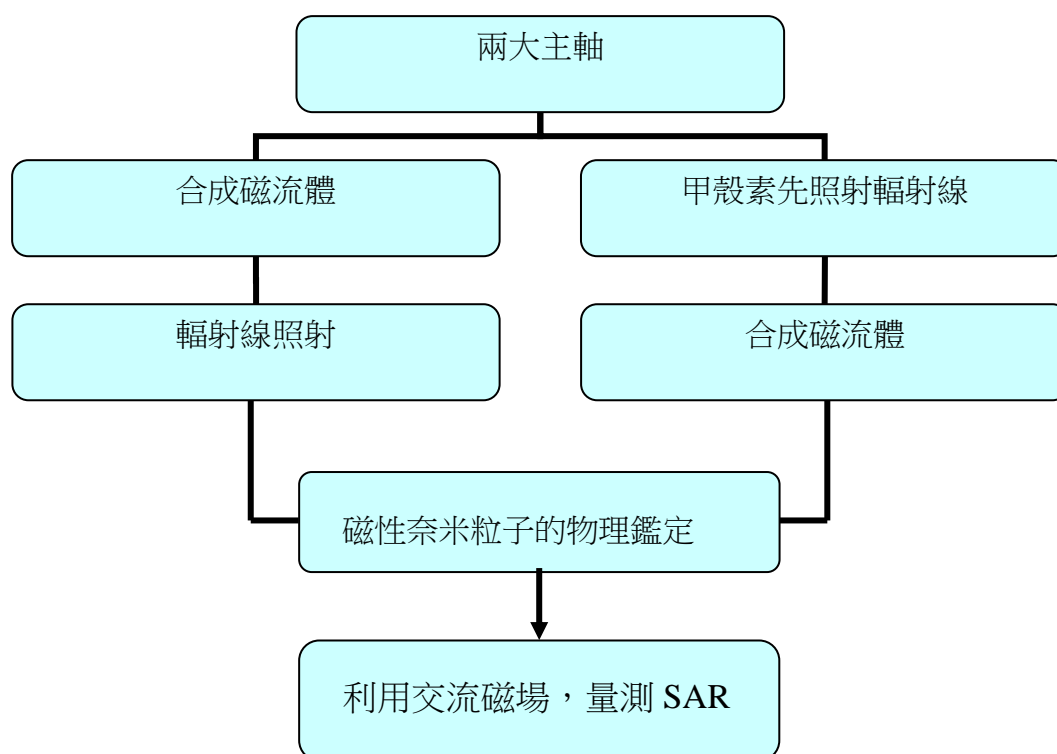
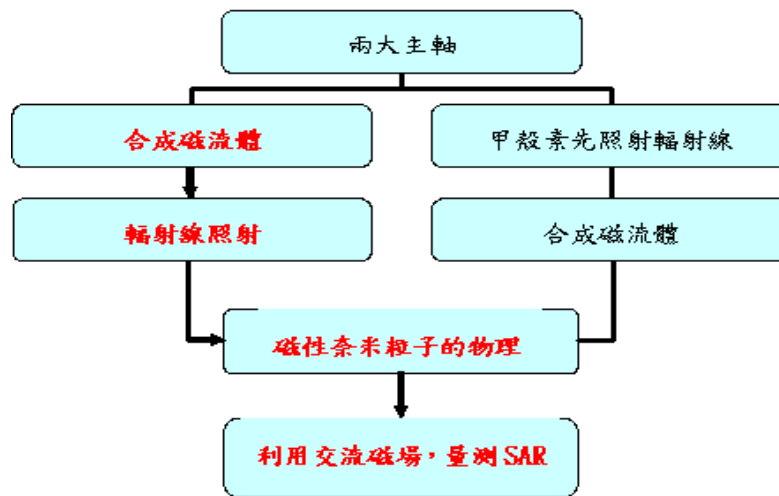


圖 1. 流程圖

4.1 甲殼素(chitosan)於合成後照射輻射線



4.1.1 磁流體的合成

(1) 磁性粒子的製備

利用氯化鐵(FeCl_3)與氯化亞鐵(FeCl_2)以及氨水(NH_4OH)作為製備原料，接著使用化學共沉法在室溫下製備磁性奈米粒子，為了避免氧化，所以通以氬氣 (Argon) 攪拌溶液，其化學式子如下：



將 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3.244g) 與 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.268g) 【最好的比例介於 2~2.5】溶於二次水中，並移至五頸瓶中慢慢滴入氨水並通以氬氣，然後使用冷凝迴旋加熱系統，加熱到 85°C 持續 30 分鐘。用二次水沖洗此溶液 5 次，使其 PH 接近 7，得到精細的磁性粒子。

(2) 磁性粒子的包覆

因為未包覆的磁性鐵粒子通常不容於水，因此需要在磁性奈米粒子表面披覆上一層親水性的界面活性劑，以使磁性奈米粒子能穩定地分散在水中並，故本研究利用甲殼素的包覆，使磁性奈米粒子能均勻的懸浮於溶液中。

將甲殼素溶於冰醋酸 (glacial acetic acid) 當中慢慢滴入上述製備出的磁性粒子溶液中。然後用二次水沖洗 2 次，因為磁性鐵粒子已經被包覆所以不容易被超強磁鐵吸引而沉降。

4.1.2 用輻射照射奈米粒子

(1) 分裝磁流體：運用參考文獻【10】

$$\text{公式 } m_i = \delta_i \times \frac{(m_{ff} - \delta_w \times v_{ff})}{\delta_i - \delta_w} \text{ ----- (1)}$$

m_{ff} = 流體重量， m_w = 水的重量， m_i = Fe_3O_4 重量， v_{ff} = 磁流體體積，
 v_w = 水的體積， v_i = Fe_3O_4 體積， δ_i = Fe_3O_4 密度， δ_w = 水的密度。

其中 $m_{ff} = m_w + m_i$ ， $v_{ff} = v_w + v_i$ ， $\delta = m/v$

算出磁流體中 Fe_3O_4 的重量，因為磁流體不可以烘乾，但利用此公式可得知磁流體的重量，之後進行稀釋就可以分裝。圖 1 分裝後的磁流體。【註：每毫升 0.01 公克】

(2) 將分裝好的磁流體送去核能研究所照射 Co-60

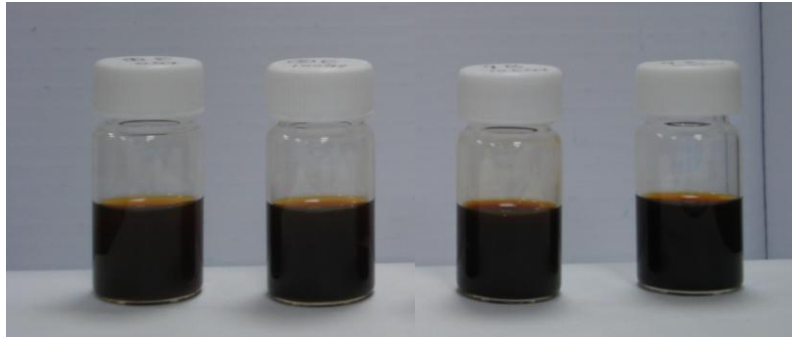


圖 2. 合成出的磁流體

4.1.3 磁性奈米粒子的物理鑑定

為了了解奈米粒子的粒徑大小、穩定度、磁特性…等特性，以利往後實驗研究。用到以下儀器

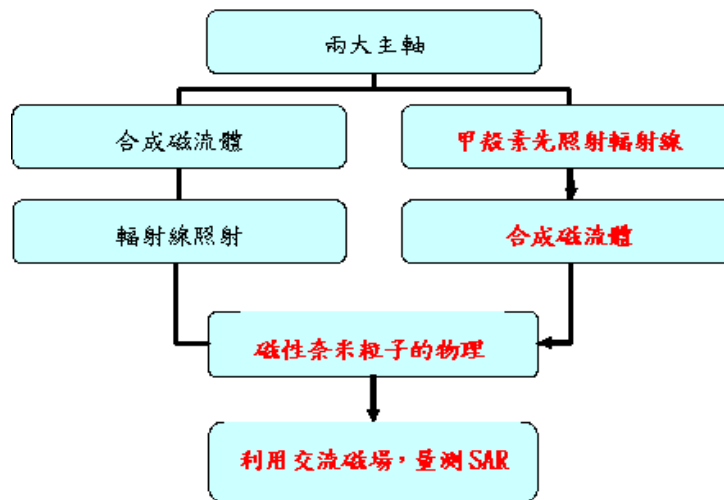
(a) 穿透式電子顯微鏡(Transmission Electron Microscope，簡稱 TEM)

目的：奈米粒子外觀型態(Morphology)分析與粒徑檢測。

(b) 超導量子干涉儀(Superconducting Quantum Interference Device，簡稱 SQUID)

目的：樣品磁性鑑定(磁滯曲線，M-H)。

4.2 甲殼素於合成磁流體前照射輻射線



4.2.1 甲殼素的照射

將甲殼素在合成磁流體前先送至核能研究所照射不同劑量的 Co-60，因為甲殼素是一種幾丁聚糖，本實驗利用輻射線將其鍵結打斷，使合成出的磁流體粒徑不要過大。

4.2.2 磁性粒子的製備

利用氯化鐵(FeCl₃)與氯化亞鐵(FeCl₂)以及氨水(NH₄OH)作為製備原料，接著使用化學共沉法在室溫下製備磁性奈米粒子，為了避免氧化，所以通以氬氣 (Argon) 攪拌溶液，其化學式子如下：



將 FeCl₃·6H₂O (3.244g) 與 FeCl₂·4H₂O (1.268g) 【最好的比例介於 2~2.5】溶於二次水中，並移至五頸瓶中慢慢滴入氨水並通以氬氣，然後使用冷凝迴旋加熱系統，加熱到 85°C 持續 30 分鐘。用二次

水沖洗此溶液 5 次，使其 PH 接近 7，得到精細的磁性粒子。

(2) 磁性粒子的包覆

將甲殼素溶於冰醋酸 (glacial acetic acid) 當中慢慢滴入上述製備出的磁性粒子溶液中。然後用二次水沖洗 2 次，因為磁性鐵粒子已經被包覆所以不容易被超強磁鐵吸引而沉降。

4.2.3 用輻射照射奈米粒子

(1) 分裝磁流體：運用參考文獻【10】

$$\text{公式 } m_i = \delta_i \times \frac{(m_{ff} - \delta_w \times v_{ff})}{\delta_i - \delta_w} \text{ ----- (1)}$$

m_{ff} = 流體重量， m_w = 水的重量， m_i = Fe_3O_4 重量， v_{ff} = 磁流體體積，

v_w = 水的體積， v_i = Fe_3O_4 體積， δ_i = Fe_3O_4 密度， δ_w = 水的密度。

其中 $m_{ff} = m_w + m_i$ ， $v_{ff} = v_w + v_i$ ， $\delta = m/v$

算出磁流體中 Fe_3O_4 的重量，因為磁流體不可以烘乾，但利用此公式可得知磁流體的重量，之後進行稀釋就可以分裝。

【註：每毫升 0.01 公克】

4.2.4 磁性奈米粒子的物理鑑定

(a) 穿透式電子顯微鏡 (Transmission Electron Microscope，簡稱 TEM)

(b)超導量子干涉儀(Superconducting Quantum Interference Device ,
簡稱 SQUID)

4.3 得知 SAR(specific absorption rate, W/g)

利用高周波感應加熱設備－交流磁場設備(Alternating Current
magnetic field , 簡稱 AC magnetic field)。

目的：利用交流磁場使磁性奈米粒子震盪，進而產生熱。

時間與溫度曲線量測求得 SAR(specific absorption rate , W/g)：

將 4.1 和 4.2 所製備出的磁性奈米粒子，為了使樣品散佈均勻而使誤差得到最小，所以在測試前所有樣品用超音波震盪 10 分鐘後，接著將其暴露在交流磁場中，每 3 分鐘紀錄一次溫度上升變化，紀錄 30 分鐘，再經由 SAR 公式，算出各組的 SAR(specific absorption rate , W/g)。

$$SAR = C \frac{\Delta T}{\Delta t} \frac{1}{m_{Fe}} \text{-----}(2)$$

C 是樣品比熱，等於 Fe₃O₄ 粒子的比熱(C_{mag}=0.937 J/gK)和水的比熱(C_{wat}=4.18 J/gK)的質量平均。【11】



圖 3. 本實驗使用的高周波感應加熱設備

5. 結果與討論

5.1 磁流體熱產率

經過上述的實驗步驟，將合成出的甲殼素包覆之磁性奈米粒子放入交流磁場設備，測得的數據如圖 4、圖 7，分別是合成磁流體後照射輻射線和合成前先將甲殼素照射輻射線，圖 4. 可發現隨著時間的增加磁流體的溫度也會跟著增加，但在 10kGy 時的升溫效果卻沒有小劑量照射來的好，根據圖 5. 可以更明顯的看到在 0Gy 和 100Gy 的 SNR 都比 10kGy 來的佳。

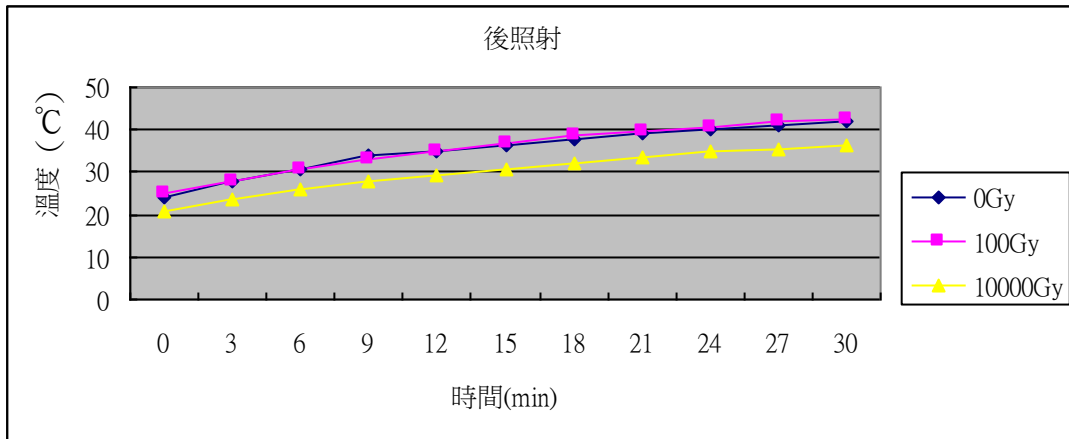


圖 4. 合成後照射不同劑量的時間溫度曲線

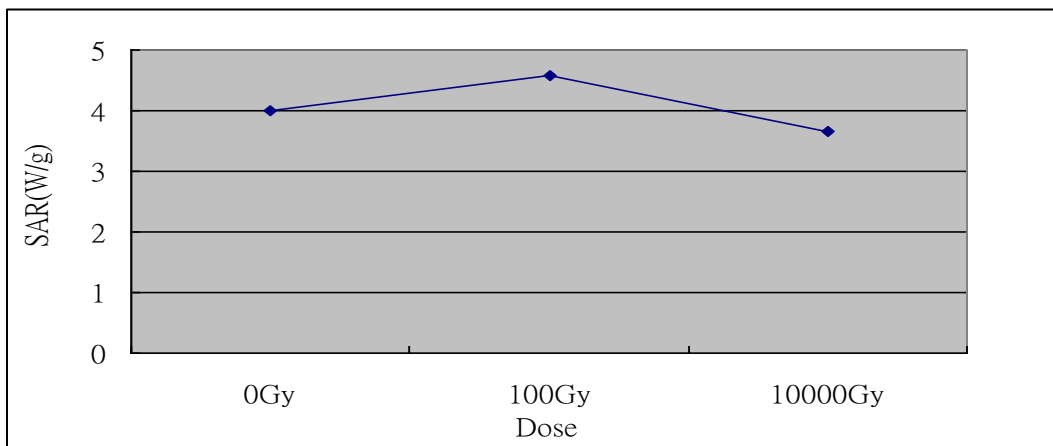


圖 5. 合成後照射不同劑量的 SNR 變

圖6. 則是將磁流體照射輻射的劑量範圍縮小，SAR的圖可發現在 500Gy的劑量SAR值達到最高峰，大於500Gy以後的SAR就快速的往下掉，且不再有升高的趨勢。

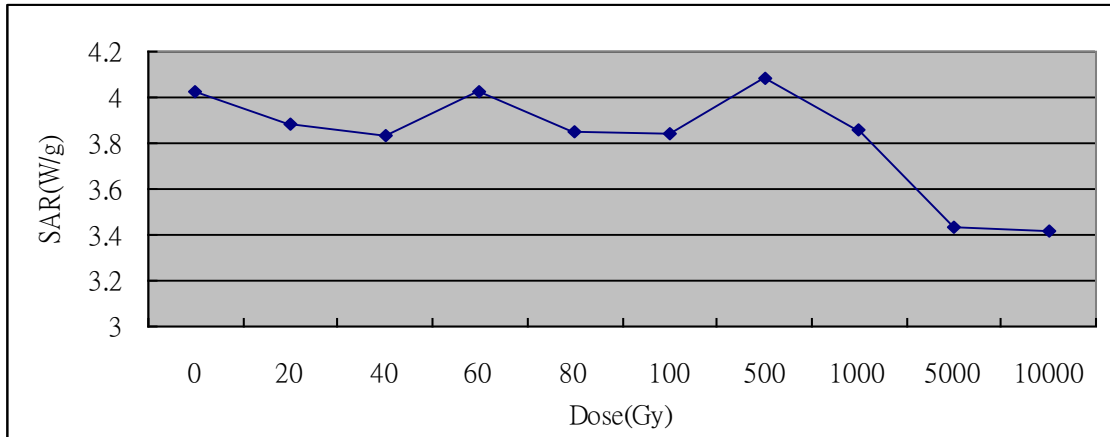


圖 6. 合成後照射不同劑量的 SNR 變化

接著由圖7. 看到的是先照射甲殼素在合成磁流體的升溫效果，由此可發現隨著時間和照射劑量的增加，磁流體的溫度也會跟著增加，再來從圖8.，橫軸是照射劑量，縱軸是SNR，由於SNR的望大特性，本實驗可以發現當輻射照射的劑量愈高SNR也會愈高。

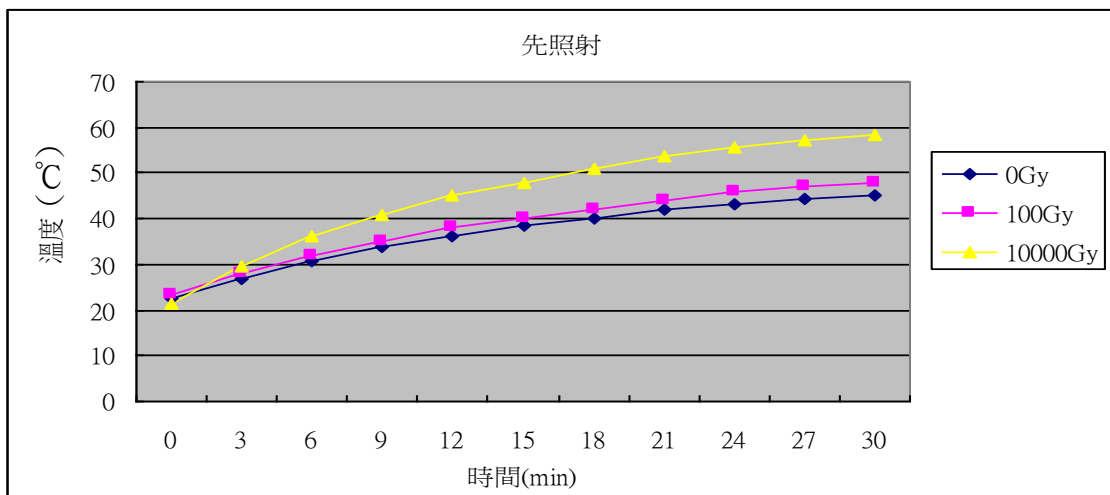


圖 7. 合成前照射不同劑量時間溫度曲線

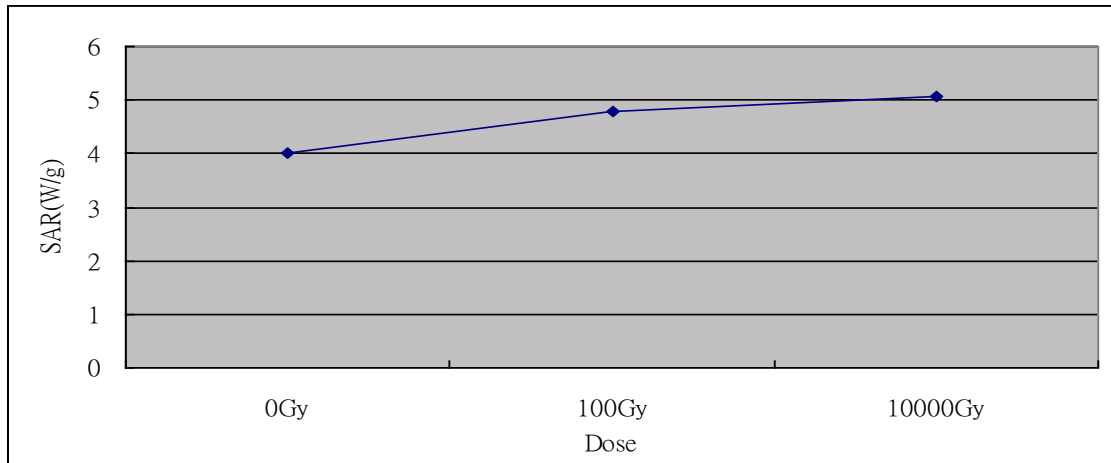


圖 8. 合成前照射不同劑量的 SNR 變化

5. 2磁流體的物理特性

5. 2. 1 磁性奈米粒子的外觀型態

圖9.和圖10.分別為合成後照射輻射線和合成前照射輻射線的 TEM 影像，由圖9.可發現合成磁流體後在照射輻射線的奈米粒子有部分凝聚的現象。由圖10.可發現在合成磁流體前先照射輻射線的奈米粒子就有較佳的分散效果，經由粒子的型態上來看就可發現這兩者的升溫效果就會有些許的差異了。

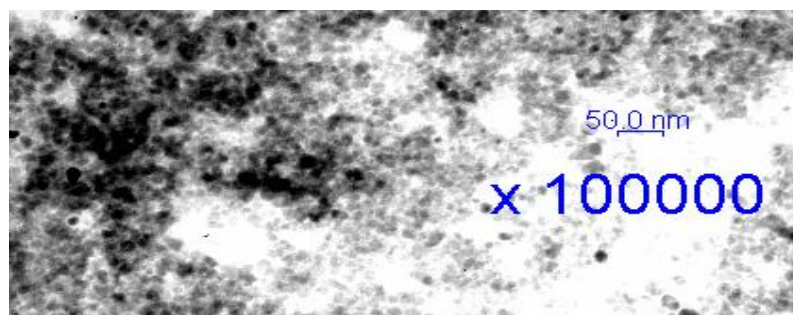


圖 9. 合成後照射輻射磁流體的 TEM

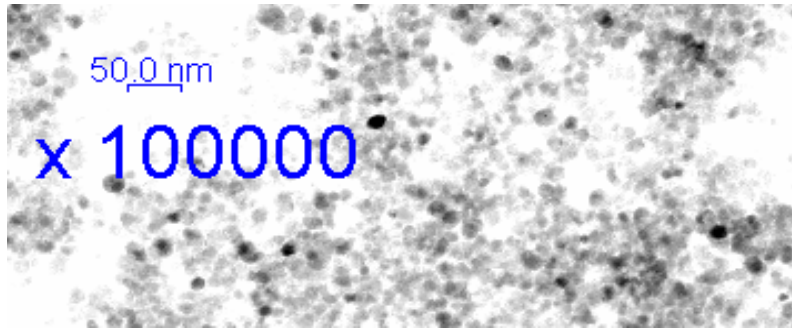


圖 10. 合成前照射輻射磁流體的 TEM

5.2.2 磁性分析

圖 11. 是本實驗合成的甲殼素包覆之磁性奈米粒子的磁滯曲線，外加磁場由 -10kOe 到 10kOe，圖中顯示出此流體並無磁滯現象，又因為其磁性粒子非常的小，所以由圖可看到此磁性奈米粒子表現出超順磁性現象。

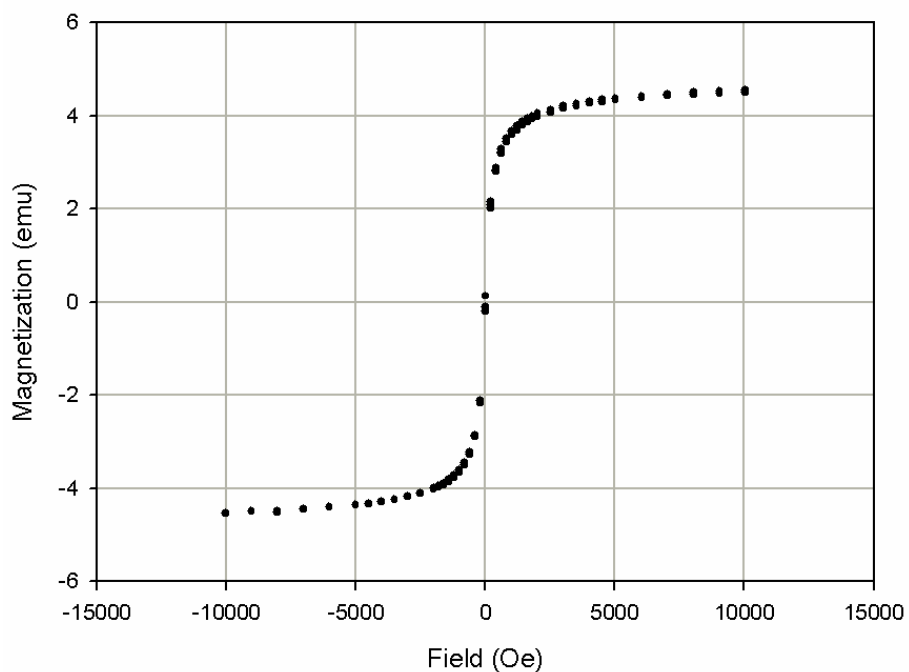


圖 11. 實驗中合成磁性粒子的磁滯曲線

5.3 磁流體變化

實驗合成出來磁流體正常的外觀顏色應該如圖12.，但在合成後的磁流體受到5000Gy和10kGy的劑量照射後就變成圖13.所示，由此可以發現合成後的磁流體受到高劑量的輻射照射會打壞其鍵結，甲殼素和鐵離子的鍵結斷裂，而使鐵離子無法均勻的分散在水當中，造成圖13.的結果。

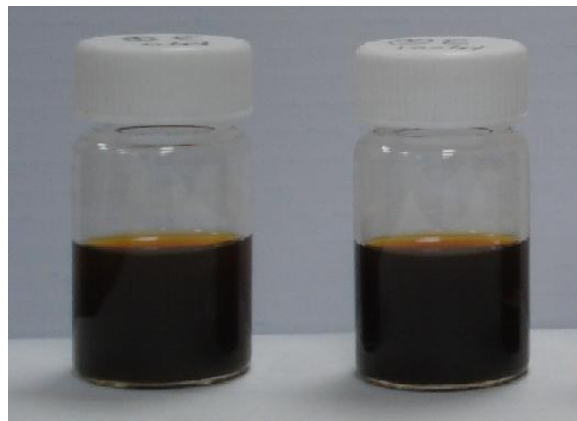


圖 12. 實驗中合成出的磁流體



圖 13. 接受大劑量照射的磁流體

6. 結論

本實驗探討Co-60的照射對甲殼素包覆之磁性奈米粒子的影響，發現在合成後照射輻射線的磁流體，其升溫效果會隨著輻射劑量的提升而升高，但到達約1000Gy的劑量後，會因為實驗中所使用的界面活性劑(甲殼素)和鐵離子的鍵結被破壞，而使磁性粒子和水分離，進而導致SAR的快速下降。

在甲殼素合成磁流體前就先照射輻射線，則可將甲殼素的鍵結打斷，而使實驗中合成磁流體的粒徑比較小，和合成磁流體後照射輻射線相較之下有較佳的升溫效果，且隨著所給予的輻射劑量升高而升高。

最後由實驗中得知，不管是先照射輻射線或是後照射輻射線，在1000Gy輻射劑量內隨著照射的劑量增加而會有較佳升溫效果，但是合成後照射的磁流體最後溫度只有40°C左右，在500Gy時溫度的上升可以達到最高值45°C，當劑量達10Kgy時最後溫度卻降到35°C左右。於合成前照射甲殼素的磁流體最後溫度都有45°C，且隨著劑量的增加有些磁流體的上升溫度甚至可高達58°C。

目前本實驗只完成一個階段性的任務，未來還希望能標定磁流體，再將磁流體打入體內後能夠自動的和腫瘤組織做結合，最後置於交流磁場中就可以達到熱治療的效果。

(六) 參考文獻

- 【1】 Lukov R, Denardo S J, Daum W, Foreman A R, Goldstein R C, Nemkov V S and Denardo G L 2005 Application of high amplitude alternating magnetic field for heat induction of nanoparticle localized in cancer *Clin. Cancer Res.* **11** 7093s-7103s
- 【2】 Babincova M, Leszczynska D, Sourivong P, Cicmanec P and Babinec P 2001 Superparamagnetic gel as a novel material for electromagnetically induced hyperthermia *J. Magn. Magn. Mater.* **225** 109-112
- 【3】 Jordan A, Scholz R, Wust P and Shirra H 1994 Endocytosis of dextran and silane-coated magnetite nanoparticles and the effect of intracellular hyperthermia on human mammary carcinoma cells in vitro *J. Magn. Magn. Mater.* **194** 185-96
- 【4】 Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T 2001 Heat-inducible TNF α gene therapy combined with hyperthermia using magnetic nanoparticles as a novel tumor-targeted therapy *Cancer Gene. Ther.* **8** 649-54
- 【5】 Jiang D S, Long S Y, Huang J, Xiao H Y and Zhou J Y 2005 Immobilization of Pycnopus sanguineus laccase on magnetic chitosan microspheres *Biochem. Engineer.* **25** 15-23
- 【6】 Bhattarai S R, Bahadur R K C, Aryal S, Khil M S and Kim H Y 2007 N-Acylated chitosan stabilized iron oxide nanoparticles as a novel nano-matrix and ceramic modification *Carbohydrate Polymers* **69** 467-77
- 【7】 Ulanski P, Rosiak J M 1992 Preliminary study on radiation-induced changes in chitosan *Radiat. Phys. Chem.* **39** 53-7
- 【8】 Wasikiewicz J M, Yoshii F, Nagasawa N, Wach R and Mitomo H 2005
- 【9】 楊謝樂 “磁性奈米粒子於生物醫學上之應用” 物理雙月刊 28，

692-697 2006/8

- 【10】 Hilger I, Fruhauf K, Andra W, Hiergeist R, Hergt R, Kaiser W A
2002“Heating Potential of Iron Oxides for Therapeutic Purposes in
Interventional Radiology”
- 【11】 Ma M. Wu Y., Zhou J., et al. “Size dependence of specific power
absorption of Fe_3O_4 particles in AC magnetic fie”J. Magn. Mater
268 33-39(2004)
- 【12】 許文林，施榕平，熊佩韋，蘇志中，吳錦榕，林光大“The
Temperature Distribution in Hyperthermia Treatment”放射腫瘤治
療學 335-343(1994)