

氟碳代血液的电子显微镜检测

戴志强 (中国科学院上海药物研究所, 上海 200031)

提要 用于氟碳人造血乳剂微粒检测的改良负染电镜术, 其分辨能力达 $0.01 \mu\text{m}$, 较文献报道的其它检测方法简便。以此对 I 号和 II 号氟碳人造血乳剂作检测, 并作粒径统计分析, 结果表明: 1) 两者均为 O/W 型超细乳液。在 $\geq 0.04 \mu\text{m}$ 范围, 其平均粒径分别为 $0.08 \mu\text{m}$ 和 $0.09 \mu\text{m}$ 。乳剂全部颗粒的分布峰值可能在小于 $0.02 \mu\text{m}$ 区域。两者乳化细度指标达到了较好的水平。2) II 号乳剂稳定性比 I 号稍差, 但其 $\geq 0.4 \mu\text{m}$ 颗粒仅占 0.2%, 几无毒性。

关键词 全氟碳人造血; 乳剂; 负染; 电镜术

近年来, 全氟碳化物作为人造血液已进行临床试验^(1,2)。目前最有实用价值而受到广泛注视的是 Fluosol-DA 和 Fc-43 两种乳剂^(3,4)。氟碳人造血乳剂微粒大小与乳剂的稳定性、疗效和毒性密切相关, 特别是在静脉输注或动物整体换血时, 乳剂中大于 $0.4 \mu\text{m}$ 的氟碳化物颗粒会产生明显毒性⁽⁵⁾。由于氟碳化物极易挥发, 形态观察不易得到完整的图象。国外用电镜检测氟碳乳剂微粒采取碳复型、铂金投影制样以及聚苯乙烯小球参比法^(6,7,8)。乳剂小颗粒易被淹埋、丢失, 图象质量不够满意。为了满足氟碳人造血乳剂稳定性、安全性研究的需要, 我们对一些氟碳乳剂的电镜制样技术进行了探索, 建立了改良的负染法, 对 I 号和 II 号两种氟碳人造血乳剂作透射电镜检测, 效果良好, 得到了清晰的乳剂微粒构象。为此, 我们对 I 号和 II 号氟碳乳剂所含的较大微粒 ($\geq 0.04 \mu\text{m}$) 分布作了统计比较。

材料和方法

I 号和 II 号氟碳人造血乳剂系中国科学院有机化学研究所提供。均为乳白色, 略带荧光, 呈半透明状。氟碳化物含量 200-220 g/l, 在 -5°C 冰冻保存。磷钨酸(PTA)染液均以重蒸馏水配制成 2% 浓度, 以 1 N 的 NaOH 溶液调节 pH 至 4.5, 经 $0.15 \mu\text{m}$ 微孔薄膜反复抽滤 3 次, 安瓿封装, 室温保存, 电镜制样

前, 将乳剂在室温 (20°C 左右) 融化, 充分摇匀, 然后用重蒸馏水配制成 100 g/l 乳液。PTA 染液亦用重蒸馏水稀释成 1% 浓度。

I 号和 II 号氟碳人造血乳剂的电镜制样均在乳化当天内完成。先在蜡片上滴乳剂约 20-30 μl , 然后将蒸有 Formvar 和碳膜 (碳膜厚度小于 $0.01 \mu\text{m}$, 并经辉光放电处理) 的铜载网复贴吸附 1-2 min 后, 取下载网, 悬滴面朝下, 用滤纸吸去多余乳液, 随即于载网上滴上 1% PTA 染液 1 滴, 2-3 min 后, 将载网移入平皿滤纸上, 让多余染液自然均匀地吸掉, 最后连同培养皿放进普通干燥器过夜。室温下保存 24-72 h 内取出, 用国产电镜 DXA 4-10 型观察乳剂微粒, 3 万倍随机摄片以后, 用测量仪按最大直径法⁽⁷⁾测定微粒大小, 然后统计乳剂粒径分布。

实验结果

1. 形态观察 对 I 号氟碳乳剂 2 批样品的电镜观察显示其微粒呈圆形或近似圆形, 直径 $0.01-0.027 \mu\text{m}$ 。大多数微粒反差良好, 界膜分明。镜下微粒常按粒径大小层次分布。大颗粒外周有深黑润色扩散状。颗粒间偶有粘连, 稍有变形, 各自形状可以清楚区分。个别视野可见变形大颗粒, 常以单个出现, 呈卵形, 色调略深于周围颗粒, (图 1A)。

对 II 号氟碳乳剂 3 批样品的电镜观察显示其微粒形状同 I 号氟碳乳剂, 亦呈圆形或近似圆形, 直径 $0.01-0.54 \mu\text{m}$ 。微粒中间色浅, 周围色深, 界膜明显。镜下微粒散布视野居多, (图 1B)。个别视野可见少数大颗粒挤压变形, 色调稍深; 其外周电子密度增加, 伴有深黑润色扩散状。较小颗粒与大颗粒有聚集迭合现象,

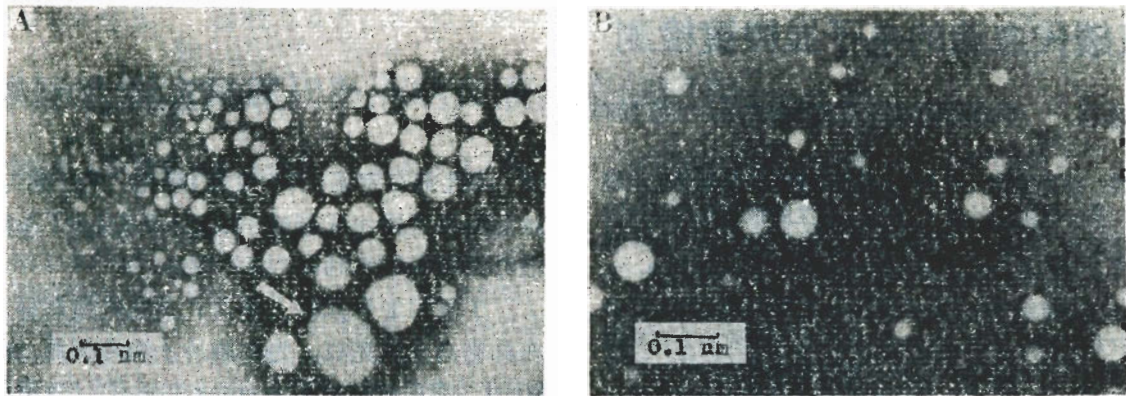


Fig 1. Electron micrographs of emulsions I(A) & II(B) sampling on the day the emulsification was prepared. Negative staining. A) Gradual distribution according to particle-size. The tone of macro particle (arrow) is darker than the adjacent. B) Obvious dispersion of particles distribution.

但各自形状仍然存在，偶而可见相邻微粒裂口相连，系载网局部干燥过份所造成。

根据负染电镜图象可以推断，I号和II号氟碳人造血乳剂微粒基本上呈球形或椭圆形。镜下微粒外周系染色液与之亲和的水相及表面活性剂 Pluronic F 68 溶液；微粒内系染色液非亲和的油相氟碳化合物。I号和II号氟碳乳剂均属典型的 O/W 型超细乳状液。

2. I 号和 II 号氟碳人造血乳剂 $\geq 0.04 \mu\text{m}$ 颗粒比较 选用相同的乳化条件、取样时间、制样环境。由图 2 可见，在相同的条件下，II 号乳剂与 I 号乳剂相比，大颗粒含量较多， $0.1 \mu\text{m}$ 以下的微粒含量略少，平均粒径有增大的趋势。实验提示其相对稳定性较 I 号乳剂差。但图 2 中，II 号氟碳乳剂 $\geq 0.4 \mu\text{m}$ 颗粒分布机率已趋近于零，约占 0.2%，远小于文献^(3,5)报道表现出明显毒性的含量。其个别大颗粒挤压变形也限于球粒局部侧面扁平，不稳定因素是比较微弱的。

讨 论

负染电镜术用于氟碳人造血乳剂微粒检测尚未见有报道。尽管负染的机理至今还不很清楚，但实践证明，检测颗粒的最后脱水应在染液凝固之后⁽⁸⁾；负染液 pH 值的正确选择及对样品适当的渗透时间^(9,10)是获得高分辨、低畸变负染电镜图象的成功要素，本实验在控制染

色时机和掌握干燥条件的同时，还注重染液和碳膜的纯化、均一，取得了稳定的实验结果。

氟碳人造血乳剂用负染电镜术作检测，分辨粒径达到 $0.01 \mu\text{m}$ 。微粒界膜分明，比文献报道^(3,5,6)的其它检测方法简便、分辨力高。

镜下氟碳人造血乳剂微粒外周润色扩散状是样品负染的正常特征。但个别变形大颗粒色调加深，可能是其外膜表面活性剂 Pluronic F 68 较厚、亲和的染液较多所致。当乳剂小颗粒融合成大颗粒时，其表面积与半径成反比，必然导致微粒外层膜厚度增大。

目前最稳定的氟碳人造血是 Fc-43 乳剂，平均直径为 $0.093 \mu\text{m}$ ，经 25 次乳化后最小直径为 $0.07 \mu\text{m}$ ^(3,4)。日本现供临床静脉输注的 Fluosol-DA 人造血乳剂平均直径是 $0.1 \mu\text{m}$

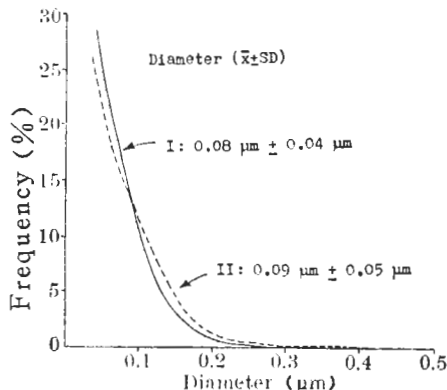


Fig 2. Droplet-size distribution curves for emulsions I & II ($\geq 0.04 \mu\text{m}$). The numbers of droplets were 1187 & 1722, respectively.

(11). 本实验所用 I 号和 II 号氟碳乳剂在电镜下均检测到 $0.01 \mu\text{m}$ 的微粒, 即便只统计乳剂中 $\geq 0.04 \mu\text{m}$ 的较大颗粒, 平均直径分别为 $0.08 \mu\text{m}$ 和 $0.09 \mu\text{m}$. 由此可以认为, 本实验所用 I 号和 II 号氟碳人造血乳剂乳化细度指标达到了一个较好的水平. 临床观察也未发现末梢毛细血管闭塞等毒性症状⁽¹¹⁾.

此外, 从图 2 可见, I 号和 II 号氟碳乳剂 $\geq 0.04 \mu\text{m}$ 颗粒分布曲线是乳状液典型的对数正态型分布⁽¹²⁾的一部分. 考虑到氟碳化物 Pluronic F 68 乳剂的粒径分布通常只有 1-2 个峰值⁽⁶⁾, 可以推测 I 号和 II 号氟碳人造血乳剂的粒径分布峰值应在小于 $0.02 \mu\text{m}$ 区域. 此值可在乳剂颗粒全分布统计时求出, 但必须注意到乳剂大小颗粒镜下分布疏密不一, 粒径最大相差 50 倍以上, 除了要求检测数足够多外, 还宜对样品的随机性处理予以周详的考虑.

致谢 中国科学院有机化学研究所 骆昌平同志协助部分工作.

Acta Pharmacologica Sinica 1982 Mar; 3 (1): 35-37

ELECTRON MICROSCOPIC DETECTIONS ON EMULSIONS OF PERFLUOROCARBON BLOOD SUBSTITUTE

DAI Zhi-qiang (*Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031*)

ABSTRACT An improved method of electron microscopy of negative staining is presented for determining the emulsion droplets of perfluorocarbon artificial blood. The resolving power is $0.01 \mu\text{m}$. This method is simpler and more reliable than those reported in literatures.

1. Both emulsions I and II consisted of ultrafine droplets of O/W type. The average diameters of droplet ($\geq 0.04 \mu\text{m}$) were $0.08 \mu\text{m}$ and $0.09 \mu\text{m}$, respectively. The maximum diameter for all droplet

- ### 参 考 文 献
- 熊汝成、章仁安、陈惠方、黄维垣、骆昌平、曹文娟. 中华外科杂志 1981 年 4 月; 19 (4):213
 - Thomas H. *Science* 1979 Oct 12; 206 (4415): 205
 - 横山和正. 表面 1977 年 3 月; 15 (3):147
 - 光野孝雄. 治疗 1978 年 4 月; 60 (4):109
 - 横山和正. 现代化学 1978 年 6 月; 87 (6):46
 - Davis SS, Purewal TS, Buscall R, Smith A, Choudhury K. The stability of fluorocarbon emulsion—the effect of the oil phase. In: Milton K, ed. *Colloid and interface science*. 1st ed. New York: Academic Press, 1976: 269-75
 - Stoeber W. *Lab Invest* 1965 Jun; 14 (6):894
 - Johnson MW, Horne RW. *J Microsc* 1970 Jun; 91:197
 - Hayat MA. *Principles and techniques of electron microscopy biological application*, vol 2. 1st ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1972:112-4
 - Harris WJ, Westwood JCN. *J Gen Microbiol* 1964 May; 34:491
 - 王广心. 国外科技动态 1980 年 1 月; 1:62
 - Becher P. *Emulsion: theory and practice*. 2nd ed. New York: Reinhold, 1965: 51-2

distributions were below $0.02 \mu\text{m}$. It seems that the droplet size target of the emulsions has caught up with more advanced levels.

2. Emulsion I was more stable than II, which contained 0.2% droplets of $\geq 0.4 \mu\text{m}$ and caused little toxicity to macro droplets.

KEY WORDS perfluorocarbon artificial blood; emulsion; negative staining; electron microscopy