



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0002748

(51) **A61K 49/06; A61K 41/00**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00126

(22) 23/03/2018

(67) 1-2018-01215

(45) 25/12/2021 405

(43) 27/08/2018 365A

(73) Viện Kỹ thuật nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VN)
18 Hoàng Quốc Việt, quận Cầu Giấy, thành phố Hà Nội

(72) Trần Đại Lâm (VN); Lê Thế Tâm (VN); Vương Thị Kim Oanh (VN); Phạm Hồng
Nam (VN); Lê Trọng Lư (VN); Đỗ Hùng Mạnh (VN); Nguyễn Xuân Phúc (VN).

(54) QUY TRÌNH CHẾ TẠO HỆ CHẤT LÔNG TỪ TÍNH NANO Fe_3O_4 ĐỂ LÀM THUỐC
TƯƠNG PHẢN TRONG CHẨN ĐOÁN HÌNH ẢNH BẰNG KỸ THUẬT CỘNG HƯỞNG
TỪ MRI

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình chế tạo chất lông từ tính để làm thuốc tương
phản trong chẩn đoán hình ảnh bằng kỹ thuật cộng hưởng từ MRI trên nền hạt Fe_3O_4 với
sản phẩm thu được có cỡ hạt nhỏ (kích thước trung bình <12 nm trước khi chuyển pha và
bọc bằng polyme), sự phân bố đồng đều, độ bền cao (thế zeta đạt trên 45 mV), trị số từ độ
bão hòa cao (đạt trên 60 emu/g sau khi chuyển pha và bọc bằng polyme) và có khả năng
tương thích sinh học cao. Quy trình này bao gồm các công đoạn: a) tạo hạt nano từ
 Fe_3O_4 ; và b) chuyển pha và bọc bằng poly (anhydrit-alt-1-octadexen maleic) (PMAO) để
thu sản phẩm.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực tạo ra quy trình sản xuất chất có khả năng ứng dụng trong y sinh, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình ổn định chế tạo hệ chất lỏng từ tính nano Fe_3O_4 , để làm thuốc tăng mức độ tương phản trong chẩn đoán hình ảnh bằng kỹ thuật chụp cộng hưởng từ MRI, đạt tiêu chuẩn được với các tiêu chí chính tương đương sản phẩm nhập ngoại.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Trên thế giới, hiện nay việc tạo hạt nano từ hướng tới sản phẩm có chất lượng cao hơn đáp ứng các yêu cầu đòi hỏi cho các ứng dụng trong y sinh. Các ứng dụng này, ngoài việc cần thiết đối với các hạt nano từ về cỡ hạt phải đủ nhỏ, độ đồng đều cao và từ tính mạnh, còn phải có khả năng phân tán tốt trong môi trường nước và độ tương thích sinh học cao. Để thu được các hạt nano từ chất lượng cao, việc tạo mẫu được thực hiện trong dung môi hữu cơ ở nhiệt độ sôi cao. Tuy nhiên, để ứng dụng trong y sinh, các hạt nano từ cần phải chuyển từ dung môi hữu cơ sang dung môi nước, quá trình chuyển pha này gặp rất nhiều khó khăn do đó hạn chế tính phổ biến của các phương pháp đã biết. Cho đến nay, các nghiên cứu về quy trình tạo chất lỏng từ bằng cách bọc hạt hay chuyển pha từ dung môi hữu cơ sang dung môi nước vẫn đang cần đến các nghiên cứu tiếp tục một cách toàn diện và có hệ thống. Ngoài ra, chưa có đủ các kết quả thí nghiệm *in-vitro* và *in-vivo*.

Hiện nay trong chẩn đoán hình ảnh bằng chụp cộng hưởng từ MRI, các tác nhân tương phản T_1 đã trở thành thương phẩm truyền thống, đó là phức của ion thuận từ có trị số mômen spin lớn như Gd^{3+} (có 7 điện tử chưa ghép cặp). Các ion Gd^{3+} này được kết hợp với các phân tử như DTPA (axit dietyltriethylamin penta axetic) và tạo ra các cấu trúc dạng phức “càng cua” Gd-DTPA . Trong quá trình hồi phục, sự tương tác giữa mômen từ của proton với mômen từ của các ion thuận từ khiến cho thời gian T_1 bị giảm, nhờ vậy tốc độ hồi phục R_1 tăng. Nồng độ các tác nhân là khác nhau trong mỗi vùng mô tế bào, do vậy mang lại hiệu quả tương phản trên ảnh chụp MRI. Trong khoảng gần 20 năm nay, cùng với sự phát triển

của công nghệ tạo ra hạt nano sắt oxit (iron oxide - IO) đang được nghiên cứu mạnh và thực tế đến nay đã có nhiều dòng sản phẩm thương mại tăng mức độ tương phản MRI dùng loại vật liệu sắt oxit này, chứng minh rằng các sắt oxit-MRI có thể cho chất lượng tăng mức độ tương phản tốt hơn cả loại Gd-DTPA vì hạt sắt oxit có hệ số cảm cảm từ lớn hơn. Các chất IO-MRI có thể làm giảm cả T_1 và T_2 , tăng được tốc độ hồi phục MRI chụp theo cả 2 chế độ chụp MRI trọng T_1 và trọng T_2 . Các yêu cầu quan trọng đối với sản phẩm tăng tương phản ảnh MRI là hạt nano từ tính phải có mức phân bố hạt tương đối đều và từ độ bão hòa đủ lớn, và chất bọc phải có độ tương hợp sinh học tốt. Trong khi một số sản phẩm thương mại trên thế giới như Resovist dùng chất bọc là dextran, với hạt lõi cỡ 65 nm tạo ra từ độ bão hòa khoảng 65 emu/g. Các sản phẩm với cỡ hạt nằm trong vùng 20-40nm như AMI-227:Sinerem/Combix là thích hợp với bạch huyết và xương. Trong khoảng 10 năm gần đây người ta đang nghiên cứu để tạo các hạt nano siêu thuận từ với cỡ hạt nhỏ hơn 20nm (còn được gọi là loại siêu nhỏ nếu cỡ hạt $D < 10$ nm) và đặc biệt là các hạt sắt oxit có đánh dấu từ nhằm mục đích chụp ảnh MRI hướng đích.

Ở Việt Nam, cho đến nay việc tạo các hạt nano nói chung và hạt nano từ nói riêng đã được tập trung nghiên cứu theo hai phương diện: Nghiên cứu cơ bản và nghiên cứu định hướng ứng dụng. Các kết quả nghiên cứu chuyên sâu được công bố chủ yếu từ các cơ sở nghiên cứu mạnh như: Trường Đại học Quốc gia Hà Nội, Đại học Bách khoa Hà Nội và Viện Hàn lâm Khoa học và công nghệ Việt Nam. Việc tổng hợp vật liệu nano từ đa phần được thực hiện trong môi trường nước và bằng các phương pháp tổng hợp như phương pháp đồng kết tủa, phương pháp thủy nhiệt, phương pháp vi sóng và phương pháp tổng hợp điện hóa siêu âm. Do tổng hợp trong môi trường nước nên các hạt nano từ đã được tạo ra có chất lượng chưa cao, các hạt không đồng đều về cỡ hạt và không đồng nhất về hình dạng và vì vậy chúng bị hạn chế sử dụng cho các ứng dụng in vivo trong y sinh như dùng làm thuốc tương phản trong chẩn đoán hình ảnh bằng kỹ thuật chụp cộng hưởng từ MRI, đốt nóng cảm ứng từ, v.v.. Ngoài ra, chính sự không đồng đều đó còn ảnh hưởng ngay cả đến kết quả nghiên cứu các tính chất từ của chúng. Do đó, việc lựa chọn các điều kiện trong quá trình tạo chất lỏng từ tính nano Fe_3O_4 nhằm tạo ra các hạt có cỡ hạt nhỏ, có sự phân bố đều, đồng nhất về hình dạng, độ bền cao, từ tính cao và có khả năng tương thích sinh học cao, nhờ đó có khả năng ứng dụng

làm thuốc tương phản trong chẩn đoán hình ảnh bằng kỹ thuật chụp cộng hưởng từ MRI đã và đang được nhóm tác giả tập trung nghiên cứu.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp là đề xuất quy trình công nghệ cho phép chế tạo chất lỏng từ tính với các yêu cầu để chẩn đoán hình ảnh MRI với độ ổn định và lặp lại cao.

Theo một phương án, giải pháp đề xuất chất lỏng từ tính nano Fe_3O_4 được tạo ra bằng phương pháp phân hủy nhiệt, bao gồm các công đoạn sau:

a) Tạo hạt bao gồm các bước

- định lượng các thành phần: $\text{Fe}(\text{acac})_3$, FeCl_2 , Octadecanol, axit oleic (OA) và oleyamin (OLA),

- nạp các chất này vào bình phản ứng, trong đó $\text{Fe}(\text{acac})_3$, FeCl_2 (với tỉ lệ 2:1 về số mol); OA và OLA (tỉ lệ 1:1 về thể tích),

- nạp dung dịch chứa dung môi octadexen, dibenzyl ete vào bình phản ứng, trong đó tỉ lệ dung môi octadexen và dibenzyl ete là 1:1 theo thể tích,

- khuấy đều liên tục bình phản ứng trong thời gian 30 phút trước khi tăng nhiệt tới các thời gian và nhiệt độ phản ứng khác nhau. Tốc độ tăng nhiệt cho giai đoạn từ 25 đến 100 °C là 7 °C/phút khi nhiệt độ đạt 100 °C duy trì nhiệt độ này trong khoảng 30 phút, giai đoạn từ 100 đến 200 °C là 10 °C/phút, khi nhiệt độ đạt 200 °C duy trì trong khoảng 60 phút và tốc độ tăng nhiệt từ 200 đến 300 °C là 7 °C/phút, khi nhiệt độ đạt 298 đến 300 °C duy trì trong khoảng 60 phút,

- làm nguội dung dịch này đến nhiệt độ trong phòng,

- rửa bằng etanol kết hợp ly tâm,

- phân tán hỗn hợp thu được trong dung môi n-hexan;

Theo một phương án của giải pháp, các dung môi hữu cơ có nhiệt độ sôi cao là octadexen, dibenzyl ete, phenyl ete, diphenyl ete.

Theo một phương án của giải pháp, quy trình rửa bằng etanol kết hợp ly tâm là: lấy một lượng nhất định của mẫu cho vào các ống sạch. Cho tiếp etanol vào các ống nghiệm này rồi xử lý bằng siêu âm trong thời gian 10 phút (lần 1), rồi ly tâm ở tốc độ quy định trong thời gian quy định. Sau đó, lấy pipet hút hết

chất lỏng bên trên rồi tiếp tục cho thêm etanol vào, tiếp đó xử lý bằng siêu âm và ly tâm lần nữa (lần 2). Phần mẫu lắng sau khi ly tâm lần 1 và lần 2, được cho một lượng nhất định n-hexan vào để hòa tan mẫu bằng cách xử lý bằng siêu âm trong thời gian quy định. Tiếp tục cho etanol vào hỗn hợp dung dịch này và ly tâm với tốc độ quy định trong thời gian quy định. Sau khi ly tâm, phần dung dịch phía trên không còn mẫu được loại bỏ. Lặp đi lặp lại quy trình này trong một số lần. Khi dung dịch phía trên sau khi ly tâm có màu vàng sáng thì loại bỏ dung dịch, lấy phần mẫu hòa tan trong một lượng nhất định n-hexan rồi dồn vào một ống thu được mẫu sạch.

b) Chuyển pha bao gồm các bước

- định lượng các thành phần: hạt nano từ Fe_3O_4 , poly (maleic anhydrit-alt-1-octadexen) (PMAO) và NaOH,
- nạp riêng rẽ hạt nano từ Fe_3O_4 , poly (anhydrit-alt-1-octadexen maleic) (PMAO) vào các bình khác nhau,
- nạp dung dịch chứa dung môi clorofom vào các bình nêu trên, theo tỉ lệ cứ 50mg hạt từ phân tán trong 1ml clorofom và 100mg PMAO trong 1ml clorofom,
- phân tán hỗn hợp các bình này bằng cách siêu âm trong thời gian 10 phút,
- trộn các hỗn hợp có trong các bình với nhau, nạp vào bình phản ứng, sau đó phân tán hỗn hợp này trong thời gian quy định,
- khuấy sản phẩm thu được ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 3 đến 5 giờ cho clorofom bay hết để thu được chất rắn dạng sệt,
- nạp dung dịch chứa NaOH vào bình phản ứng nêu trên,
- khuấy đều hỗn hợp này trong thời gian 10 đến 12 giờ,
- rửa bằng nước cất;

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các dấu hiệu và ưu điểm của giải pháp sẽ trở nên rõ ràng hơn qua phần mô tả chi tiết các phương án làm ví dụ cùng với hình vẽ kèm theo, trong đó:

Hình 1 là ảnh được xác định bằng phương pháp kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM: Transmission Electron Microscopy) của mẫu Fe_3O_4 trước chuyển pha (a) và b) mẫu Fe_3O_4 sau khi chuyển pha và bọc bằng PMAO chế tạo bằng phương pháp của giải pháp hữu ích.

Hình 2 là hình minh họa thể zeta của hệ chất lỏng từ Fe_3O_4 bọc bằng PMAO chế tạo bằng phương pháp của giải pháp hữu ích.

Hình 3 là đồ thị minh họa trị số từ độ bão hòa của mẫu Fe_3O_4 và mẫu Fe_3O_4 sau chuyển pha và bọc bằng PMAO chế tạo bằng phương pháp của giải pháp hữu ích.

Hình 4 là đồ thị minh họa mối tương quan độ hồi phục T_2 cho các mẫu chất lỏng từ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ ở nồng độ khác nhau.

Hình 5 là đồ thị minh họa mối tương quan độ hồi phục ngang r_2 của mẫu chất lỏng từ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ theo nồng độ.

Hình 6 là ảnh MRI trên thỏ chụp theo chế độ T_1 và T_2 : trước khi tiêm (a) (c) và sau khi tiêm (b) và (d).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp sẽ được mô tả cùng với các hình vẽ kèm theo, trong đó các phương án làm ví dụ của giải pháp được thể hiện.

Giải pháp hữu ích đề xuất quy trình chế tạo chất lỏng từ tính nano Fe_3O_4 , bao gồm các công đoạn sau:

Công đoạn a) là công đoạn tạo hạt. Các hóa chất ban đầu bao gồm: $\text{Fe}(\text{acac})_3$, FeCl_2 (với tỉ lệ 2:1 về số mol); OA và OLA (tỉ lệ 1:1 về thể tích), Octadecanol và Octadexen được nạp vào bình phản ứng có chứa dung môi dibenzyl ether (với tỉ lệ octadexen và dibenzyl ete 1:1 về thể tích). Hỗn hợp được khuấy đều liên tục trong thời gian 30 phút trước khi tăng nhiệt tới các thời gian và nhiệt độ phản ứng khác nhau. Tốc độ tăng nhiệt cho giai đoạn từ 25 đến 100 °C là 7 °C/phút khi nhiệt độ đạt 100 °C duy trì nhiệt độ này trong khoảng 30 phút, giai đoạn từ 100 đến 200 °C là 10 °C/phút, khi nhiệt độ đạt 200 °C duy trì trong khoảng 60 phút và tốc độ tăng nhiệt từ 200 đến 300 °C là 7 °C/phút, khi nhiệt độ đạt 298 đến 300 °C duy trì trong khoảng 60 phút. Sau đó, dung dịch được làm nguội tự nhiên đến nhiệt độ trong phòng và rửa bằng etanol kết hợp ly tâm trước khi phân tán trong dung môi n-hexan hoặc clorofom ta thu được hạt nano từ Fe_3O_4 . Các mẫu được sấy khô trước khi khảo sát các đặc trưng cấu trúc, kích thước hạt và tính chất từ.

Công đoạn b) là công đoạn chuyển pha. Trước khi có thể sử dụng trong y sinh, các hạt nano từ này sẽ được chuyển từ dung môi hữu cơ sang dung môi nước thông qua các quá trình chuyển pha (phase transfer process) bằng cách sử

dụng loại polyme có một đầu ưa nước và một đầu kỵ nước là poly(anhydrit-alt-1-octadexen maleic) (PMAO). Các hạt nano sau khi tổng hợp được rửa nhằm loại bỏ tạp chất là các chất dư và sản phẩm phụ trong quá trình tổng hợp. Sau đó cân lấy một lượng chính xác hạt nano từ Fe_3O_4 rồi phân tán trong clorofom (theo tỉ lệ cứ 50 mg hạt từ phân tán trong 1 ml clorofom), xử lý bằng siêu âm 10 phút để đảm bảo các hạt phân tán đều. Lấy một lượng poly (anhydrit-alt-1-octadexen maleic) (PMAO) và phân tán trong clorofom (theo tỉ lệ cứ 100 mg PMAO trong 1 ml clorofom), xử lý bằng siêu âm từ 3 đến 5 phút cho tan đều. Trộn 2 dung dịch này lại với nhau và xử lý bằng siêu âm khoảng 30 phút đảm bảo dung dịch được trộn đều, không lắng cặn. Sản phẩm thu được được khuấy đều ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi clorofom (khoảng thời gian 3 đến 4 giờ) bay hết ta thu được chất rắn dạng sệt, tiếp tục cho dung dịch NaOH 1M vào, khuấy từ cho đến khi phân tán đều (khoảng 10 đến 12 giờ), sau đó tiến hành rửa bằng nước cất cho đến khi thu được dung dịch màu đen, thu được các hạt Fe_3O_4 phân tán trong nước.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích sẽ được minh họa rõ hơn qua các ví dụ sau đây, các ví dụ hoàn toàn không nhằm mục đích giới hạn phạm vi của giải pháp.

Ví dụ 1: Quy trình chế tạo hạt nano Fe_3O_4

Các hóa chất ban đầu bao gồm: 1,8075 gam $\text{Fe}(\text{acac})_3$ (tương ứng 5,1 mmol), 0,3236 gam FeCl_2 (tương ứng 2,5 mmol); 3,2433 gam Octadecanol; 4,8 ml OA: (tương ứng 15,12 mmol) và 4,8 ml OLA: (tương ứng 15,06 mmol); và 20 ml Octadexen được nạp vào bình phản ứng có chứa 20 ml dung môi dibenzyl ete. Hỗn hợp được khuấy đều trong thời gian 30 phút trước khi tăng nhiệt tới các thời gian và nhiệt độ phản ứng khác nhau. Tốc độ tăng nhiệt cho giai đoạn từ 25 đến 100 °C là 7 °C/phút khi nhiệt độ đạt 100 °C duy trì trong khoảng 30 phút, giai đoạn từ 100 đến 200 °C là 10 °C/phút, khi nhiệt độ đạt 200 °C duy trì trong khoảng 60 phút và tốc độ tăng nhiệt từ 200 đến 300 °C là 7 °C/phút, khi nhiệt độ đạt 300 °C duy trì trong khoảng 60 phút. Sau đó, dung dịch được làm nguội tự nhiên đến nhiệt độ trong phòng và rửa bằng etanol kết hợp ly tâm trước khi phân tán trong dung môi n-hexan.

Quy trình rửa mẫu như sau: lấy 3 ml mẫu cho vào 3 ống sạch. Cho tiếp etanol vào các ống nghiệm rồi xử lý bằng siêu âm trong thời gian 10 phút (lần 1), rồi ly tâm ở tốc độ 12000 vòng/phút trong thời gian khoảng 10 phút. Sau đó lấy pipet

hút hết chất lỏng bên trên rồi tiếp tục cho thêm etanol, sau đó xử lý bằng siêu âm và ly tâm lần nữa (lần 2). Phần mẫu lắng sau khi quay ly tâm lần 1 và lần 2, được cho khoảng 0,5 ml n-hexan vào để hòa tan mẫu bằng cách xử lý bằng siêu âm trong thời gian 10 phút. Tiếp tục cho etanol vào hỗn hợp dung dịch và ly tâm tốc độ 12000 vòng/phút trong thời gian khoảng 5 phút. Sau khi ly tâm, phần dung dịch phía trên không còn mẫu thì được loại bỏ. Lặp đi lặp lại quy trình 3 lần. Khi dung dịch phía trên sau khi ly tâm được màu vàng sáng thì loại bỏ dung dịch, lấy phần mẫu hòa tan trong 0,5 ml n-hexan rồi dồn vào 01 ống ta thu được mẫu sạch.

Ví dụ 2: Quy trình chuyển pha và bọc hạt nano Fe_3O_4 bằng PMAO

Trước khi có thể sử dụng trong y sinh, các hạt nano từ này sẽ được chuyển từ dung môi hữu cơ sang dung môi nước thông qua các quá trình chuyển pha bằng cách sử dụng loại polyme có một đầu ưa nước và một đầu kỵ nước là poly(anhydrit-alt-1-octadexen maleic) (PMAO). Các hạt nano sau khi tổng hợp được rửa nhằm loại bỏ tạp chất là các chất dư và sản phẩm phụ trong quá trình tổng hợp. Sau đó cân lấy 50 mg hạt phân tán trong 1 ml clorofom, xử lý bằng siêu âm 10 phút để đảm bảo các hạt phân tán đều. Cân 1,0 g PMAO và phân tán trong 10 ml clorofom (siêu âm từ 3 đến 5 phút cho tan đều). Trộn 2 dung dịch này lại với nhau và xử lý bằng siêu âm khoảng 30 phút đảm bảo dung dịch được trộn đều, không lắng cặn. Sản phẩm thu được được khuấy đều ở nhiệt độ trong phòng cho đến khi clorofom (khoảng thời gian 3-4 giờ) bay hết ta thu được chất rắn dạng sệt, tiếp tục cho 12 ml dung dịch NaOH 1M vào, khuấy từ cho đến khi phân tán đều (khoảng 10-12 giờ), sau đó tiến hành rửa bằng nước cất cho đến khi thu được dung dịch màu đen, ta thu được các hạt Fe_3O_4 phân tán trong nước.

Các mẫu được sấy khô trước khi khảo sát các đặc trưng cấu trúc, kích thước hạt và tính chất từ. Tiến hành kiểm tra với các phương pháp phân tích hiện đại thì cho được kết quả thể hiện trong Bảng 1:

Bảng 1. Tính chất của sản phẩm chất lỏng từ chứa hạt Fe_3O_4 bọc bằng PMAO

kích thước nano

Tính chất	Đơn vị	Đặc điểm
Dạng hạt	-	Hình cầu
Đặc tính pha	-	Đơn pha spinel

Cỡ hạt	nm	Đồng đều Trước khi chuyển pha và bọc bằng PMAO (<12 nm) Sau khi chuyển pha và bọc bằng PMAO (<17 nm)
Trị số từ độ bão hòa	emu/g	65-70
Tính thuận từ	-	Siêu thuận từ
Thế zeta	mV	+60,5

Ảnh TEM như được thể hiện ở Hình 1 cho thấy các tiểu phân hạt nano trước và sau khi chuyển pha và bọc bằng PMAO có dạng hình cầu, phân bố đều, có kích thước bé $D_{TEM} < 12\text{nm}$ trước khi chuyển pha và bọc và 15-20 nm sau khi chuyển pha và bọc bằng PMAO.

Trong hệ phân tán thế zeta thường được sử dụng như là một ngưỡng để đánh giá sự ổn định. Đối với các phân tử và các hạt đủ nhỏ, thế zeta cao (âm hoặc dương) sẽ cho độ ổn định cao, hệ phân tán sẽ chống lại sự keo tụ. Thế zeta đo được của mẫu đạt +60,5 mV như được thể hiện ở Hình 2. Như vậy, với kết quả đo được cho thấy mẫu có độ bền cao.

Để khảo sát đặc trưng từ tính của mẫu chất lỏng từ ở nhiệt độ phòng đường cong từ hóa của mẫu được đo với từ trường cực đại 10kOe. Qua Hình 3 cho thấy, số liệu thực nghiệm trên đường $M(H)$ của mẫu chưa chuyển pha và bọc bằng PMAO và mẫu chuyển pha và bọc bằng PMAO khớp theo hàm Langevin với độ chính xác là $R^2=0,9969$. Và do vậy, có thể cho rằng mẫu chất lỏng từ này có tính chất siêu thuận từ ở nhiệt độ phòng, với trị số từ độ bão hòa M_s trước và sau khi chuyển pha và bọc bằng PMAO là 70 emu/g và 65 emu/g.

Ví dụ 3: Tính độ hồi phục r_1, r_2 của hệ chất lỏng từ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$

Bằng thử nghiệm này, khả năng tăng độ tương phản của hệ chất lỏng từ được khảo sát. Từ đó tính được r_1, r_2 (độ hồi phục dọc và độ hồi phục ngang) của hệ chất lỏng từ. Các phép đo và chụp ảnh MRI trên mẫu chất lỏng từ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ ở các nồng độ khác nhau được thực hiện trên thiết bị cộng hưởng từ Siemens, tần số từ trường xoay chiều 64 MHz, từ trường 1,5 tesla.

Vật liệu

Bột Agar, hệ chất lỏng từ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ ở các nồng độ khác nhau. Đĩa nuôi cấy tế bào 24 giếng. Micropipet có thể tích 1000 μl , đầu tip (corning) cỡ 1000 μl , bếp nhiệt có khuấy từ.

Chuẩn bị mẫu

Pha 500ml agar 1,5%: đun nóng và khuấy đều trong 10-15 phút (nếu sử dụng lò vi sóng thì chú ý tắt lò ngay khi thấy sôi).

Chuẩn bị đĩa 12 giếng: Khi rõ kí hiệu lên cả nắp lẫn cạnh giếng để tránh nhầm lẫn.

Bước 1: Chuẩn bị dãy dung dịch hệ chất lỏng từ.

Hệ chất lỏng từ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ có nồng độ pha loãng trong vùng từ 0 – 0,3 mmol (tính cho nguyên tố Fe) với các nồng độ: 0,025 mM; 0,05 mM; 0,1 mM; 0,15 mM; 0,25 mM và 0,3 mM tương ứng với các nồng độ 2,5 $\mu\text{g/ml}$; 5,0 $\mu\text{g/ml}$; 10,0 $\mu\text{g/ml}$; 15,0 $\mu\text{g/ml}$; 25,0 $\mu\text{g/ml}$ và 30,0 $\mu\text{g/ml}$ (tính theo chất lỏng từ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$) được cho vào trong các giếng có dung tích 2 ml (với 1 lớp dưới có chứa 0,3 ml agar 1,5%) của đĩa giếng, sau đó cho tiếp 0,7 ml agar 1,5% lên ở phía trên của giếng.

Dãy đĩa giếng cuối cùng được pha dung dịch agar 1,5% được dùng làm mẫu đối chứng. Chuẩn bị các hệ hạt nano từ, tính toán thể tích sẽ tra và mỗi giếng của mỗi hệ.

Mẫu	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Hệ chất lỏng từ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$	2,5 $\mu\text{g/ml}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ + 700 μl agar	5,0 $\mu\text{g/ml}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ + 700 μl agar	10,0 $\mu\text{g/ml}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ + 700 μl agar	15,0 $\mu\text{g/ml}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ + 700 μl agar	25,0 $\mu\text{g/ml}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ + 700 μl agar	30,0 $\mu\text{g/ml}$ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ + 700 μl agar
Mẫu đối chứng	700 μl agar	700 μl agar	700 μl agar	700 μl agar	700 μl agar	700 μl agar

Bước 2: Tra vào mỗi giếng 700 μl agar 1,5% (có thể thay đổi sao cho phù hợp nhưng phải đảm bảo cột dung dịch cuối cùng đủ cao để tiến hành cắt lớp chụp MRI).

Lưu ý: Tra agar nhẹ nhàng, tuyệt đối tránh tạo bọt khí (có thể tra dọc theo thành giếng hoặc tra thẳng vào giữa đáy giếng khi đã quen tay). Nếu xuất hiện bọt khí thì phải dùng đầu corn để chọc vỡ.

Phương pháp đo

Hệ số r_1 (độ hồi phục dọc) được đo theo trình tự spin-echo (SE) biến thiên TR, còn r_2 (độ hồi phục ngang) đo theo trình tự chuỗi xung đa lát cắt và đa tiếng vang (Multi-Slice Multi-Echo) (MSME) giữ TR cố định. Sử dụng phần mềm syngo®fastView (hãng Siemens Healthcare GmbH, Đức), Matlab (bản 9.5.0.944444) và EFilm Workstation (hãng Merge Healthcare, USA) xác định cường độ tín hiệu trên diện tích vùng quan tâm (region of interest – ROIs) (cm^2). Phương trình số mũ đơn (exponential) được sử dụng để tính độ tăng trở lại giá trị cực đại T_1 :

$$y = A + C(1 - e^{\frac{-TR}{T_1}}) \quad (1)$$

Đường cong suy giảm tín hiệu được fit bởi phương trình suy giảm số mũ đơn (exponential) để tính T_2 theo biểu thức sau:

$$y = A + C e^{\frac{-TE}{T_2}} \quad (2)$$

Các chất tương phản ảnh MRI có tác động giống nhau là làm tăng giá trị tín hiệu chế độ chụp ảnh trọng T_1 (tăng tốc độ hồi phục dọc R_1) và làm giảm tín hiệu chế độ chụp trọng T_2 (giảm tốc độ hồi phục ngang R_2). Nghịch đảo của các thời gian hồi phục T_1 , T_2 là tốc độ hồi phục R_1 , R_2 . Tuy vậy, khả năng tăng hay giảm tín hiệu này lại phụ thuộc vào độ hồi phục r_i ($i = 1, 2$, tương ứng cho hồi phục dọc và hồi phục ngang) của từng chất lỏng từ cụ thể. Độ hồi phục r_i của các chất lỏng từ có thể xác định từ quan hệ tuyến tính giữa tốc độ hồi phục R_i với nồng độ C_i của ion từ trong chất lỏng pha loãng,

$$R_{1,2} = 1/T_{1,2} = R_{0,2} + r_{1,2} \cdot C \quad (3)$$

Trong đó: $R_{1,2}$ – tốc độ hồi phục, $R_{0,2}$ – tốc độ hồi phục khi không có chất tương phản, $r_{1,2}$ – hằng số độ hồi phục tính theo đơn vị $(\text{mM.s})^{-1}$, C – nồng độ chất tương phản tính theo đơn vị milimol ($1 \text{ mM} = 10^{-3} \text{ M/lit}$).

Trình tự chuỗi xung đa lớp cắt và đa tiếng vang (Multi-Slice Multi-Echo) (MSME) để xác định đường cong suy giảm và phục hồi được thực hiện với các tham số sau: TE hiệu dụng với 09 tiếng vọng trong vùng 4,25-138 ms, TR = 3500 ms, từ trường quan sát (FOV) x-y $103 \times 103 \text{ mm}^2$, chiều dày lát cắt 30 mm, kích

thuốc ma trận 391x512 cho độ phân giải x-y $200 \mu\text{m}^2$, số các lần lấy trung bình bằng 2, tổng thời gian ghi dữ liệu là 06 phút 09 giây. Các mẫu đo T_1 được thực hiện với việc dùng trình tự chuỗi xung điểm vang spin (spin-echo) (SE) biến thiên TR, với các tham số sau: TE = 15 ms, TRs trải từ 50 đến 3500 ms, FOV x-y $71 \times 71 \text{ mm}^2$, độ dày lớp cắt 10 mm, kích thước ma trận 138×320 cho độ phân giải x-y $200 \mu\text{m}^2$, số lần lấy trung bình bằng 1, toàn bộ thời gian lấy mẫu là 01 giờ 21 phút.

Từ các phép làm khớp các đường hồi phục bằng các hàm số mũ đơn (exponential) từ Hình 4, thu được các giá trị thời gian hồi phục T_1 , T_2 theo biểu thức (1), (2). Nghịch đảo của các thời gian hồi phục T_1 , T_2 là các giá trị tốc độ hồi phục R_1 , R_2 tương ứng cho mẫu chất lỏng $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$. Đường phụ thuộc R_1 và R_2 vào nồng độ được xây dựng để tính toán các giá trị độ hồi phục dọc và ngang r_1 và r_2 cho mẫu chất lỏng này như được thể hiện ở Hình 5 và Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả tính toán độ hồi phục r_1 , r_2 và tỷ số r_1/r_2 cho mẫu

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ và chất so sánh.

Mẫu	$r_1 (\text{mM s})^{-1}$	$r_2 (\text{mM s})^{-1}$	r_1/r_2
$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$	1,867	151,99	0,0122
Resovist	7,4 (7,0-7,8)	95 (86-104)	0,077
Ferumoxytol	15	89	0,168
Ferumoxid (Endorem)	-	120	-

Việc làm khớp hàm phụ thuộc của R_1 và R_2 vào nồng độ mẫu chất lỏng theo biểu thức (3) cho thấy sự phụ thuộc này là tuyến tính. Từ Bảng 2, ta thấy rằng mẫu chất lỏng từ chuyển pha và bọc bằng PMAO của chúng tôi cho độ hồi phục dọc kém hơn các chất thương phẩm Resovist (Đức), Ferumoxytol (Mỹ) nhưng có độ hồi phục ngang cao hơn hẳn giá trị của các chất thương phẩm này. Như vậy, đúng như mong muốn, chất lỏng từ hạt siêu thuận từ trên nền Fe_3O_4 của chúng tôi có thể sử dụng làm chất tăng tương phản chụp ảnh MRI theo chế độ trọng T_2 tốt được.

Ví dụ 4: Thử nghiệm khả năng ứng dụng làm thuốc tương phản trong kỹ thuật cộng hưởng từ MRI trên thỏ

Các hình ảnh MRI trên mẫu chất lỏng từ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ thử nghiệm trên thỏ được sử dụng trên máy đo cộng hưởng từ hãng Siemens có từ trường 1,5 Tesla. Thỏ được tiêm theo đường tĩnh mạch với 5 ml hạt từ có nồng độ là 3 mg/ml (tương ứng với 0,16 mM Fe).

Gây mê: Trước khi tiêm chất lỏng từ thỏ sẽ được gây mê dạng hít (isofluran) hoặc tiêm thuốc mê Ketamin với xylazin * 22 - 50 mg/kg với 2,5 - 10 mg/kg xylazin. Ở đây thỏ sẽ được tiêm thuốc mê 45 mg ketamin với 5mg xylazin, bằng cách tiêm tĩnh mạch ở tai với con thỏ có trọng lượng 1,5 kg.

Tần số hình ảnh: Thỏ được chụp trước và sau khi tiêm chất lỏng từ để so sánh tín hiệu hình ảnh. Quá trình chụp MRI quét kéo dài từ giữa 15 phút và 2 giờ (nếu dùng gây mê isofluran thì sẽ cho các buổi chụp ảnh lâu hơn, và khi các động vật đang được chụp ảnh tại các khoảng thường xuyên).

Các hình ảnh MRI trên thỏ được chụp ở 2 chế độ khác nhau, chụp theo chế độ T_1 (hồi phục dọc) và chụp theo chế độ T_2 (hồi phục ngang). Kết quả cho thấy ở Hình 6, sau thời gian 10 phút tiêm thuốc (mẫu chất lỏng từ $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$) các cơ quan nội tạng của thỏ trên ảnh MRI đã thể hiện rõ ràng hơn so với ảnh MRI trước khi tiêm thuốc. So với ảnh MRI chụp theo chế độ T_1 thì ảnh MRI chụp theo chế độ T_2 cho độ tương phản rõ nét hơn nhiều. Từ Hình 6, cho thấy tại vị trí mô gan, khi chụp theo chế độ ảnh trọng T_1 với $\text{TR}=659$ ms, $\text{TE}=9,2$ ms với chuỗi xung điểm vang spin (spin-echo) thì độ sáng tối hình ảnh tại mô gan hầu như không thay đổi với tỉ lệ cường độ tín hiệu trước khi tiêm $I_a=325$ và cường độ tín hiệu sau khi tiêm $I_b=369$. Trong khi chụp ảnh theo trọng T_2 ($\text{TR}=3571$ ms, $\text{TE}=94$ ms với trình tự xung điểm vang spin nhanh (turbo spin echo) thì độ sáng tối hình ảnh tại mô gan thay đổi với tỉ lệ cường độ tín hiệu tăng lên $I_a/I_b=2,3$ lần. Ảnh MRI chụp theo chế độ trọng T_2 rõ hơn chế độ trọng T_1 có thể được giải thích như sau: Khi chụp tác nhân tăng tương phản theo cơ chế T_1 về bản chất hóa học, các tác nhân tương phản T_1 là phức của ion thuận từ có giá trị mômen spin lớn như Gd^{3+} . Trong quá trình hồi phục, sự tương tác giữa các mômen từ của các ion thuận từ khiến thời gian T_1 bị suy giảm nhờ vậy tốc độ hồi phục R_1 tăng lên. Trong khi các tác nhân tăng tương phản theo chế độ T_2 là dòng sản phẩm thương mại sử dụng hạt nano oxit sắt làm chất tương phản MRI, về mặt lý thuyết hạt nano oxit sắt có thể cho chất lượng tăng tương phản tốt hơn cả loại $\text{Gd} - \text{DTPA}$ vì hạt oxit sắt có hệ số cảm từ lớn đây chính là lý do chụp ảnh theo chế độ T_2 cho ảnh rõ nét hơn so với chụp ảnh ở chế độ T_1 . Kết quả thu được trên ảnh MRI đối với mẫu

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ được thử nghiệm ở các nồng độ khác nhau và thử nghiệm trên thỏ cho thấy hệ vật liệu được nghiên cứu có chất lượng tốt (với kích thước hạt đồng đều, từ tính mạnh, phân tán tốt và có độ bền cao). Đặc biệt, mẫu chất lỏng $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ có giá trị r_2 cao hơn so với mẫu thương phẩm Resovist (Bảng 2). Các kết quả thử nghiệm này cho thấy, mẫu chất lỏng $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{PMAO}$ có tính chất hoàn toàn phù hợp trong ứng dụng MRI.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Quy trình chế tạo hệ chất lỏng từ tính nano trên nền hạt Fe_3O_4 , ứng dụng làm thuốc tăng tương phản trong chuẩn đoán chụp ảnh MRI theo giải pháp hữu ích có ý nghĩa quan trọng đối với phát triển một hướng khoa học công nghệ đa ngành là Công nghệ nano cho Y học, mục đích của giải pháp là chế tạo được hệ chất lỏng từ đạt tiêu chuẩn được với các tiêu chí chính tương đương sản phẩm nhập ngoại. Từ đó có thể ứng dụng làm chất tăng tương phản để có thể phát hiện sớm căn bệnh ung thư trong chẩn đoán hình ảnh.

Ưu điểm của giải pháp là nhóm tác giả đã sử dụng phương pháp phân hủy nhiệt với các dung môi hữu cơ có nhiệt độ sôi cao, đồng thời sử dụng thêm các tiền chất muối vô cơ để giảm chi phí sản xuất, và kết hợp với polime có tính tổng quát như PMAO, do đó sản phẩm thu được có sự phân bố đồng đều về hình dạng, kích thước, độ bền trong dung dịch cao, đồng thời có tính tương thích sinh học cao đối với cơ thể, đạt các tiêu chuẩn ứng dụng trong chụp cộng hưởng từ MRI.

Khả năng ứng dụng trong công nghiệp

Sản phẩm tăng tương phản ảnh: thế giới đã phát triển khá nhiều loại trong khoảng 10-15 năm lại đây, nhưng ở nước ta chưa quen dùng nên chưa thể so sánh. Cả nước hiện nay đã và đang lắp đặt trên 60 máy MRI, và theo chúng tôi biết thì mặc dù nhu cầu chuẩn đoán bệnh sử dụng chất tương phản là rất lớn, các cơ sở đã có hầu như nhập loại tác nhân tương phản gốc Gd truyền thống, chưa có cơ sở nào nhập chính thức được phẩm tăng tương phản nền oxit sắt. Chế phẩm tăng độ tương phản trong chụp cộng hưởng từ MRI nếu thành công sẽ có thể ứng dụng cho hàng loạt thiết bị MRI trên cả nước.

Yêu cầu bảo hộ

1. Quy trình chế tạo hệ chất lỏng từ tính trên nền hạt Fe_3O_4 có độ bền, độ phân tán cao, cỡ hạt nhỏ và có trị số từ độ bão hòa cao, quy trình này bao gồm công đoạn tạo hạt nano a) và công đoạn chuyển pha b), trong đó:

công đoạn tạo hạt a) bao gồm các bước:

- định lượng các thành phần: sắt (III) axetylaxetonat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$), FeCl_2 , octadecanol, axit oleic (OA) và oleyamin (OLA),
- nạp các chất này vào bình phản ứng, trong đó $\text{Fe}(\text{acac})_3$, FeCl_2 với tỉ lệ 2:1 về số mol; OA và OLA tỉ lệ 1:1 về thể tích,
- nạp dung dịch chứa dung môi octadexen, dibenzyl ete vào bình phản ứng, trong đó tỉ lệ dung môi octadexen và dibenzyl ete là 1:1 theo thể tích,
- khuấy đều liên tục bình phản ứng trong thời gian 30 phút trước khi tăng nhiệt tới các thời gian và nhiệt độ phản ứng khác nhau, trong đó tốc độ tăng nhiệt cho giai đoạn từ 25 đến 100 °C là 7 °C/phút khi nhiệt độ đạt 100 °C duy trì nhiệt độ này trong khoảng 30 phút, giai đoạn từ 100 đến 200 °C là 10 °C/phút, khi nhiệt độ đạt 200 °C duy trì trong khoảng 60 phút và tốc độ tăng nhiệt từ 200 đến 300 °C là 7 °C/phút, khi nhiệt độ đạt 298 đến 300 °C duy trì trong khoảng 60 phút,
- làm nguội dung dịch này đến nhiệt độ trong phòng,
- rửa bằng etanol kết hợp ly tâm,
- phân tán hỗn hợp thu được trong dung môi n-hexan; và

công đoạn chuyển pha b) bao gồm các bước:

- định lượng các thành phần: hạt nano từ Fe_3O_4 , poly (maleic anhydrit-alt-1- octadexen) (PMAO) và NaOH,
- nạp riêng rẽ hạt nano từ Fe_3O_4 , poly (anhydrit-alt-1-octadexen maleic) (PMAO) vào các bình khác nhau,
- nạp dung dịch chứa dung môi clorofom vào các bình nêu trên, theo tỉ lệ cứ 50mg hạt từ phân tán trong 1ml clorofom và 100mg PMAO trong 1ml clorofom,
- phân tán hỗn hợp các bình này bằng cách siêu âm trong thời gian 10 phút,

- trộn các hỗn hợp có trong các bình với nhau, nạp vào bình phản ứng, sau đó phân tán hỗn hợp này,

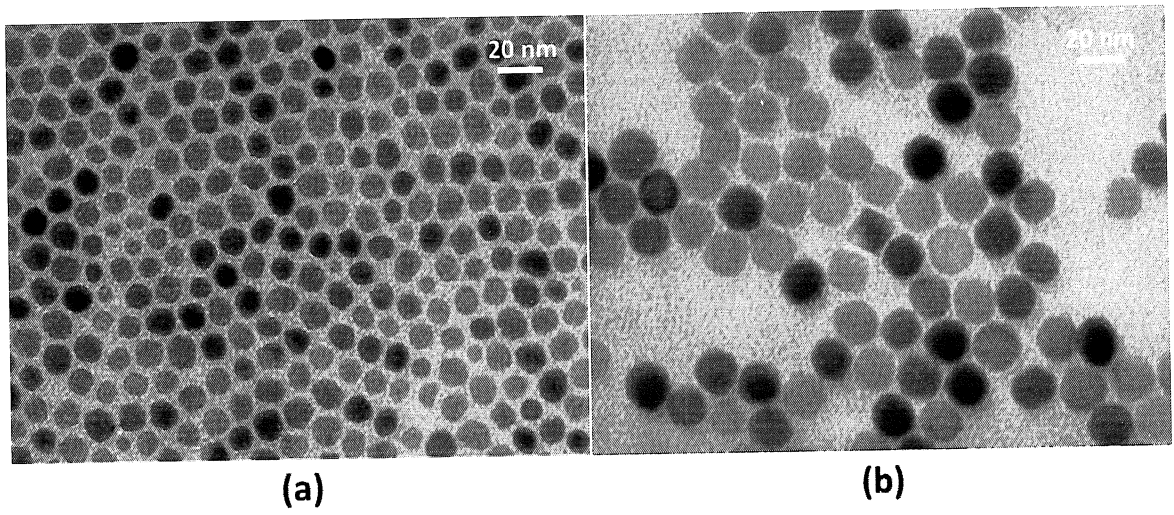
- khuấy sản phẩm thu được ở nhiệt độ trong phòng trong khoảng thời gian 3 đến 5 giờ cho clorofom bay hết để thu được chất rắn dạng sệt,

- nạp dung dịch chứa NaOH vào bình phản ứng nêu trên,

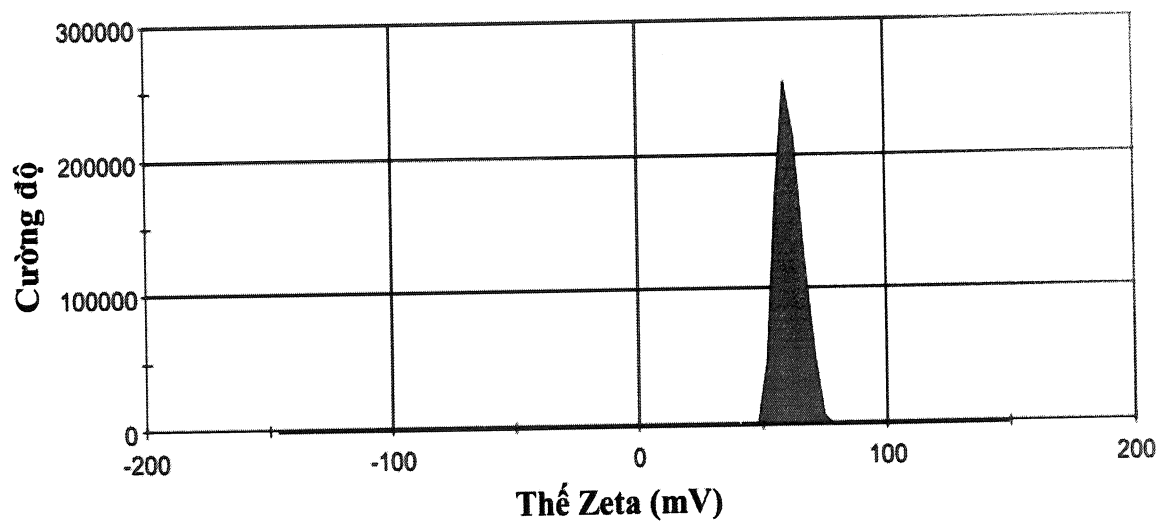
- khuấy đều hỗn hợp này trong thời gian 10 đến 12 giờ,

- lọc, rửa bằng nước cất;

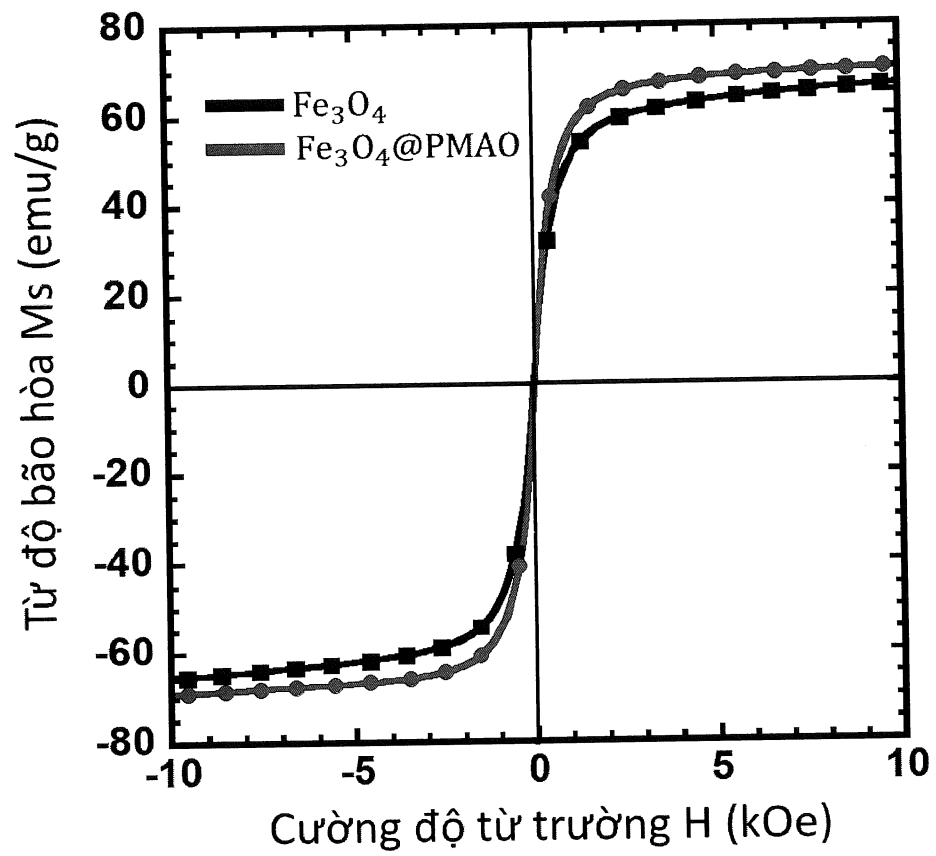
2. Quy trình theo điểm 1, trong đó bước rửa để loại bỏ tạp chất bằng etanol nhằm thu được hạt nano từ Fe_3O_4 được thực hiện 3 đến 4 lần.



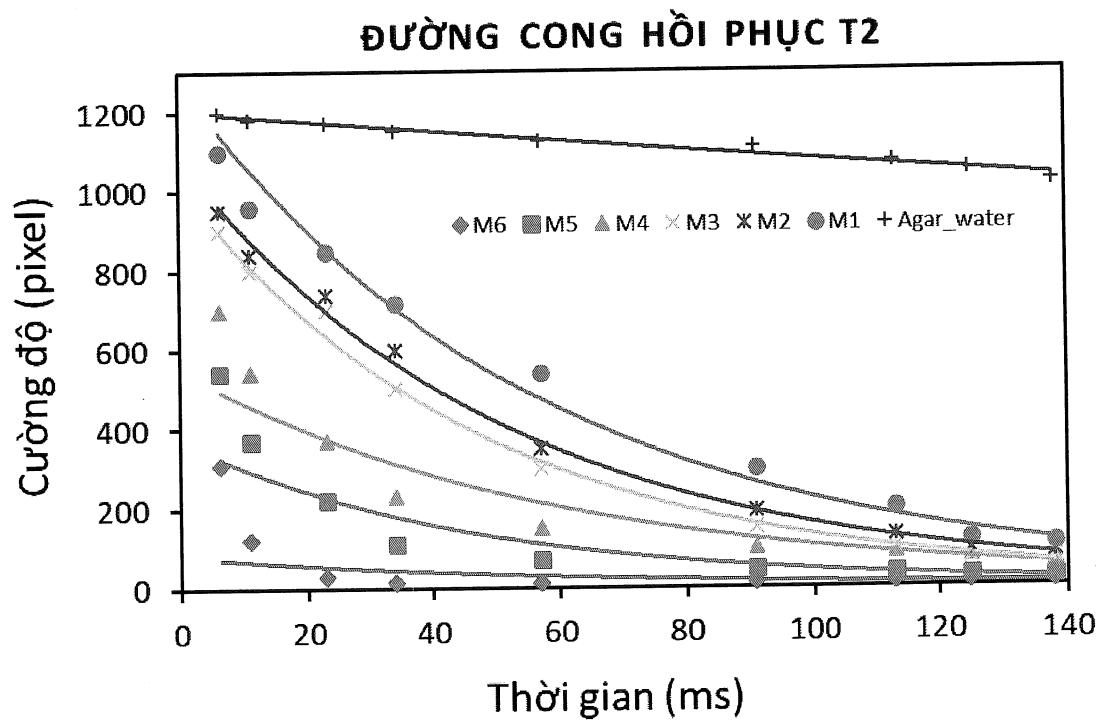
Hình 1



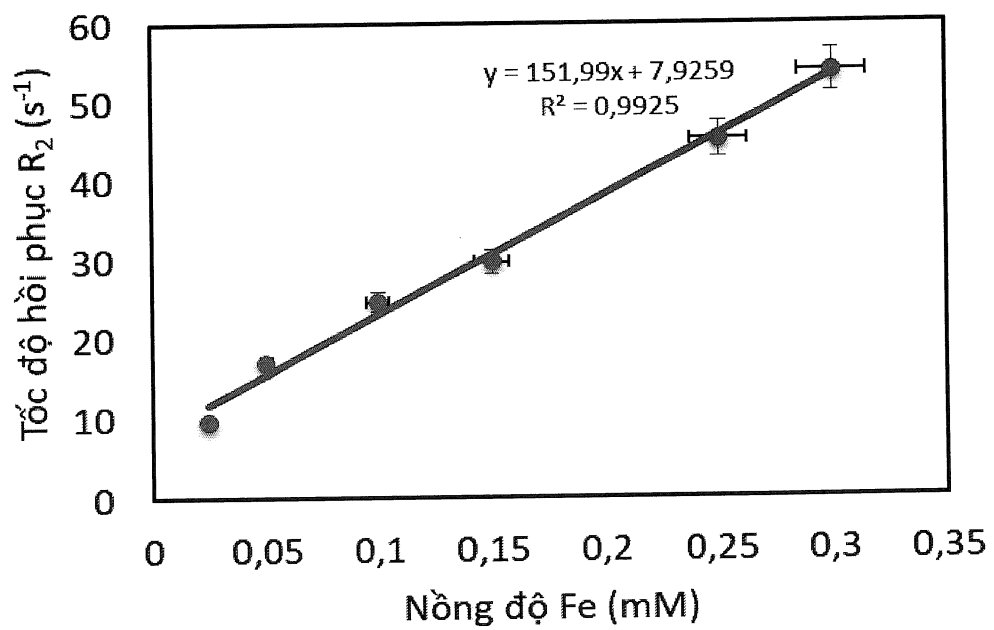
Hình 2



Hình 3



Hình 4



Hình 5

(b)



(d)

-20-