

¹И.Ю.Широкова, ¹В.И.Кучук, ²Г.А. Панкова, ²А.Ю.Меньшикова, ²Н.Н.Шевченко¹Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Россия, г. Санкт-Петербург²Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, Россия, г. Санкт-Петербург
E-Mail: nata_non@hq.macro.ru

Разработка методов синтеза субмикронных латексов с заданными поверхностными свойствами для применения в биотехнологии

В работе были исследованы особенности синтеза моодисперсных полимерных катионных частиц методом безэмульгаторной эмульсионной сополимеризации стирола с N-винилформамидом. Представлены характеристики синтезированных частиц (диаметр, распределение частиц по размерам, ζ -потенциал частиц, концентрация поверхностных функциональных групп). Описаны результаты модификации частиц люминофором, а так же сорбции биолиганда белковой природы (бычьего сывороточного альбумина).

Ключевые слова: полимерные катионные частицы, синтез, люминофор, модификация, сорбция, биолиганд.

Введение

Латексы по своей природе являются коллоидными системами, в которых в качестве дисперсной фазы выступают полимеры различной природы, а непрерывной фазой в подавляющем большинстве случаев является вода. Характерной особенностью латексов является развитая межфазная поверхность, обуславливающая значительный избыток свободной энергии. В таких системах самопроизвольные процессы приводят к сокращению межфазной поверхности, то есть к коагуляции частиц. Агрегативная устойчивость – способность сохранять во времени первоначальный размер частиц – является одной из основных характеристик латексов при их практическом применении. Она может быть обеспечена наличием на поверхности частиц гидрофильных, ионогенных групп или адсорбционных слоев, образованных поверхностно-активными веществами (ПАВ) различного строения. Полимерные дисперсии также характеризуются распределением частиц по размерам (РЧР). К коллоидным системам с узким РЧР относят латексы, содержащие частицы полимера сферической формы, с отклонением диаметров от среднего значения не более чем на 5%. Такие латексы первоначально являлись объектами изучения фундаментальной науки как модельные системы при изучении их реологического поведения, устойчивости, адсорбции веществ различной природы.

Использование гидрофильных функциональных сомономеров и/или ионогенных инициаторов в процессе синтеза моодисперсных полимерных частиц обуславливает существование на их поверхности различных функциональных групп. Такие группы обеспечивают поверхностный заряд частиц, величину которого можно варьировать изменением концентрации вводимого функционального сомономера, а также параметров дисперсионной среды (рН, ионная сила раствора, полярность непрерывной фазы). Поверхностную концентрацию функциональных групп измеряют методами кондуктометрического и/или потенциометрического титрования латекса. Поверхностный заряд латексных частиц определяет их коллоидно-химическое поведение и весь комплекс электроповерхностных свойств. При ионизации поверхностных функциональных групп формируется двойной электрический слой (ДЭС), который обеспечивает электростатическую стабилизацию частиц в процессе синтеза, а также при хранении полимерной дисперсии и последующим ее применением в нанотехнологии.

Таким образом, коллоидные полимерные системы могут обладать различными свойствами. Выбор необходимых свойств осуществляется в соответствии с областью дальнейшего использования, например, для получения носителей биолигандов, при изучении процессов самосборки частиц в трехмерно-упорядоченные структуры. В связи с этим, становится актуальной разработка методов синтеза моодисперсных полимерных частиц с заданными свойствами.

Экспериментальная часть

Синтез полимерных моодисперсных латексов с диаметром частиц в диапазоне от 200 до 800 нм, которые могут выступать в качестве носителей биологически-активных веществ,

осуществляется различными методами полимерной химии: эмульсионной полимеризацией, безэмульгаторной эмульсионной полимеризацией, дисперсионной полимеризацией в органических средах. Выбор метода синтеза влияет не только на дисперсность образующихся латексов, но и на конечные характеристики частиц: величину поверхностного заряда, образование «ворсистого» (гидрофильного) поверхностного слоя, концентрацию поверхностных функциональных групп и т.д.

В настоящее время в литературе наиболее изученными являются частицы с отрицательным зарядом поверхности, тогда как синтез катионных частиц представляет одно из перспективных направлений современной химии высокомолекулярных соединений. В данной работе с целью создания на поверхности полимерных частиц положительного заряда в поверхностный слой частиц вводили алифатические аминогруппы методом безэмульгаторной эмульсионной сополимеризации (БЭП) стирола (Ст) с N-винилформамидом (ВФА). Поскольку Ст с ВФА имеют разные константы сополимеризации, для формирования частиц на их основе в процессе БЭП в реакционную систему вводили сшивающий агент, диметакриат этиленгликоля (ДМЭГ), который способствовал ковалентному связыванию с частицами полимерных цепей обогащенных звеньями ВФА.

Результаты и обсуждение

Варьирование соотношения сомономеров, концентрации радикального азоинициатора, а также температуры реакционной смеси позволило получить серию монодисперсных частиц (П(Ст-ВФА-ДМЭГ)) диаметром 200–550 нм при его среднеквадратичном отклонении менее 5%. Уменьшение температуры реакционной системы на 20°С закономерно привело к увеличению диаметра частиц на 40 нм. Электронная микроскопия синтезированных частиц показала, что частицы, имеют широкое РЧР и «малиноподобную» структуру поверхностного слоя. С целью увеличения конечного диаметра образующихся частиц, в реакционную систему вводили буферную соль, в концентрации $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Введение буферной соли с одной стороны снижает pH реакционной системы с нейтральной до слабокислой среды, а с другой, увеличивает ионную силу дисперсионной среды, что приводит к уменьшению эффективной электростатической стабилизации концевых групп от инициатора АИП, В результате возрастает время формирования первичных полимерно-мономерных частиц и диаметр образующихся частиц. Оказалось, что в этих условиях диаметр частиц возрастает незначительно, а «малиноподобная» структура поверхностного слоя сохраняется (рисунок 1а.). Одновременное увеличение концентрации сомономеров по отношению к массе дисперсионной среды и снижение концентрации функционального сомономера ВФА позволило увеличить средний диаметр частиц до 411 нм и получить частицы с однородной структурой поверхностного слоя (рисунок 1б). Следует отметить, что увеличение концентрации сшивающего агента в реакционной системе приводит как к возрастанию размера частиц, так и сохранению высоких значений РЧР.

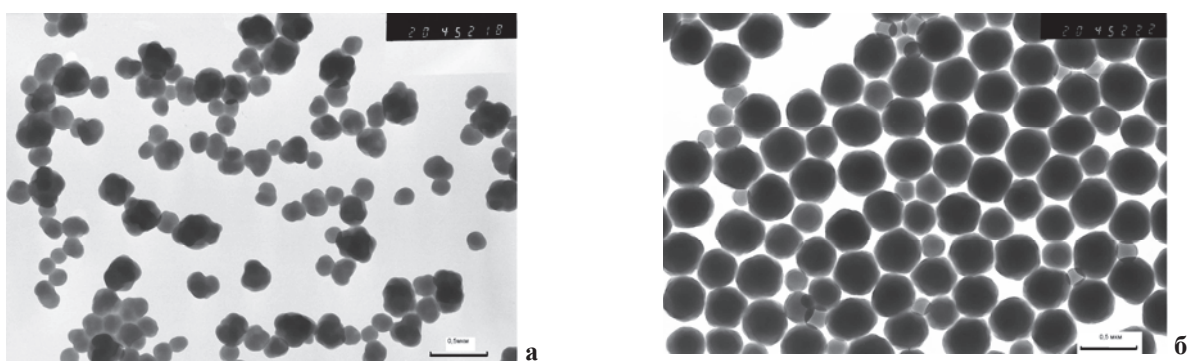


Рисунок 1 – Электронные микрофотографии частиц П(Ст-ВФА-ДМЭГ)

Условия полимеризации и последующий гидролиз поверхности П (Ст-ВФА- ДМЭГ) частиц существенно влияют на знак и величину их ζ -потенциала и его зависимость от состава дисперсионной среды. Протонирование имидозолиновых, а также алифатических аминогрупп, образующихся при гидролизе звеньев ВФА, обуславливает положительный заряд поверхности. Отрицательный заряд обеспечивают карбоксильные группы, формирующиеся при гидролизе концевых звеньев инициатора в процессе сополимеризации при высокой температуре, а также при последующей обработке частиц в кислой среде. В результате, полученные частицы агрегативно

устойчивы в широком диапазоне pH, а их функциональные группы позволяют ковалентно связывать биолиганды и люминофоры.

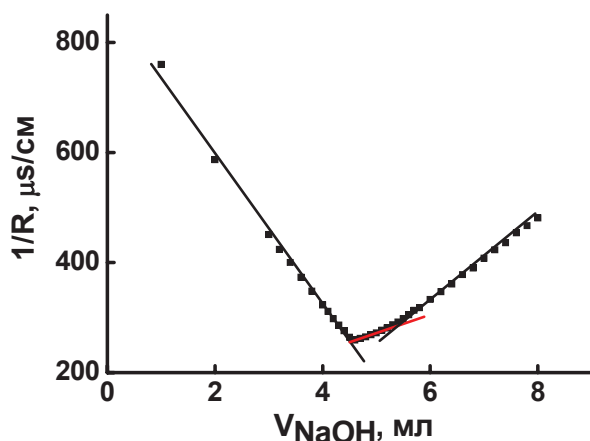


Рисунок 2 – Кривая кондуктометрического титрования

Общая концентрация поверхностных функциональных групп частиц П(Ст-ВФА-ДМЭГ) до и после гидролиза была определена методом кондуктометрического титрования (рисунок 2). В процессе сополимеризации при высоких температурах (60°C) возможен частичный гидролиз как звеньев ВФА, так и концевых групп АИП, в результате формируется бифункциональная поверхность. Так, для большинства полученных частиц, концентрация поверхностных групп после гидролиза возрастает в 1,5 раза. Для частиц П(Ст-ВФА-ДМЭГ) диаметром 200 нм общая поверхностная концентрация

титруемых групп до и после гидролиза: $1 \cdot 10^{-6}$ и $1,3 \cdot 10^{-6}$ моль/ м^2 соответственно, а для частиц диаметром 400 нм $1,1 \cdot 10^{-6}$ и $1,7 \cdot 10^{-6}$ моль/ м^2 соответственно. Таким образом, условия сополимеризации (соотношение функциональных сомономеров, концентрация инициатора) влияют на общее количество поверхностных функциональных групп формирующихся частиц. По-видимому, большее увеличение общей концентрации функциональных групп для образца со средним диаметром 200 нм связано с тем, что эти частицы характеризуются очень широким распределением частиц по размерам, при этом фракция мелких частиц существенна, в результате общая титруемая площадь возрастает. Однако для последующего применения синтезированных частиц П (Ст-ВФА-ДМЭГ) в биотехнологии необходимо тестировать такие частицы, которые обладают минимальным распределением частиц по размерам, поскольку это обеспечит воспроизводимость получаемых результатов.

Значение ζ -потенциала измеряли в водной среде и в среде NaCl (концентрация NaCl 10^{-3} моль/л), поскольку увеличение ионной силы раствора приводит к сжатию диффузного слоя. В результате для частиц с гидрофильной поверхностью резко возрастает их ζ -потенциал, а для частиц с гидрофобной поверхностью значение ζ -потенциала снижаются. Оказалось, что условия полимеризации существенно не влияют на знак и абсолютную величину ζ -потенциала частиц. В основном значения ζ -потенциала всех синтезированных частиц лежат в диапазоне (40-50) мВ. Следует отметить, что большинство синтезированных частицы П(Ст-ВФА-ДМЭГ) характеризуются гидрофильным поверхностным слоем, поскольку с увеличением ионной силы раствора значения ζ -потенциала возрастают.

С целью исследования влияния условий синтеза на стабильность синтезированных частиц проводили измерение ζ -потенциала частиц в зависимости от pH дисперсионной среды. Для этого pH варьировали в диапазоне 2 – 10 путем добавления в полимерную дисперсию растворов HCl или NaOH при концентрации фонового электролита NaCl равной 10^{-3} моль/л. Показано, что величина ζ -потенциала частиц уменьшается в щелочной среде (pH более 9), при этом инверсия знака заряда происходит при pH 9,4 (рисунок 3).

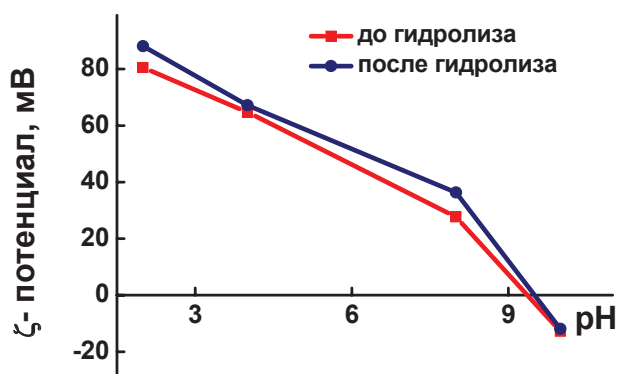


Рисунок 3 — . Зависимость ζ -потенциала частиц П(Ст-ВФА-ДМЭГ) от pH дисперсионной среды до и после гидролиза

Положение изoeлектрической точки (ИЭТ) в щелочной области свидетельствует о большей концентрации аминогрупп на поверхности частиц П(Ст-ВФА-ДМЭГ) по сравнению с карбоксильными группами. После гидролиза амидные функциональные группы переходят в алифатические аминогруппы, а концевые амидиновые группы АИП - в карбоксильные, в результате значения ζ -потенциала частиц возрастают. Неизменное положение ИЭТ (pH 9,4) позволяет предположить, что концентрации образовавшихся в ходе гидролиза amino- и карбоксигрупп соизмеримы, что

не противоречит условиям синтеза. Полученные зависимости позволяют сделать вывод о том, что образующиеся частицы имеют гидрофильную поверхность. Очевидно, для частиц П(Ст-ВФА-ДМЭГ) концентрация алифатических аминогрупп превосходит концентрацию карбоксильных групп. Кроме того, следует отметить, что для всех синтезированных частиц наблюдается агрегативная устойчивость в широком диапазоне pH, что открывает путь для последующей модификации таких частиц различными биологически активными веществами, а также люминофорами.

Связывание люминофора с аминогруппами, локализованными в поверхностном слое частиц, проводили в водно-спиртовой среде при постоянном перемешивании в течение трех часов. Оказалось, что концентрация люминофора на поверхности частиц П(Ст-ВФА-ДМЭГ) оставляет 0,1 и 0,15 $\mu\text{моль}/\text{м}^2$ соответственно. Полученные соотношения согласуются с данными по концентрациям поверхностных аминогрупп: 1,3 и 1,7 $\mu\text{моль}/\text{м}^2$ соответственно. Таким образом, из 10 титруемых аминогрупп примерно одна участвует в присоединении люминофора. Это может быть обусловлено стерическими затруднениями доступа большой молекулы люминофора ко всем титруемым аминогруппам, распределенным в объеме гидрофильного поверхностного слоя частиц. Такой результат подтверждается также уменьшением положительного ζ -потенциала частиц П(Ст-ВФА-ДМЭГ) после связывания с молекулами люминофора всего на 5-10 мВ в нейтральной и слабокислой среде. Кроме того, после модификации частиц П(Ст-ВФА-ДМЭГ) люминофором положение ИЭТ сместилось в кислую область (pH 6,5). Это также вызвано снижением концентрации аминогрупп за счет их ковалентного связывания с молекулами люминофора. Однако величины ζ -потенциала частиц П(Ст-ВФА-ДМЭГ) после модификации люминофором оставались довольно высокими (более 50 мВ в слабокислой среде, -30--40 мВ в слабо щелочной среде), что обеспечивает таким частицам агрегативную устойчивость при последующем их применении.

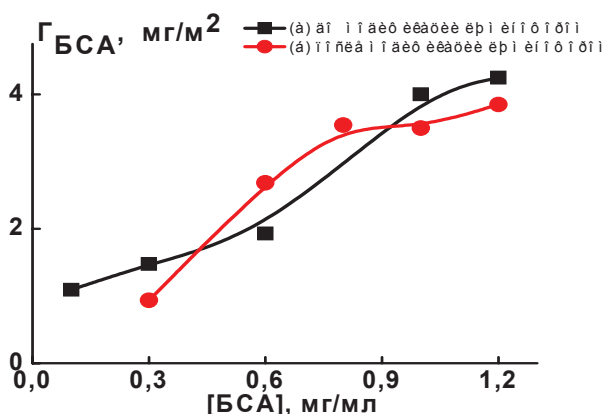


Рисунок 4 – Адсорбция БСА на поверхности частиц П(Ст-ВФА-ДМЭГ) до (а) и после (б) их модификации люминофором

Также была изучена способность частиц сополимеров П(Ст-ВФА-ДМЭГ) с поверхностными карбоксильными и аминокеттогруппами к связыванию биомолекул белковой природы на примере модельного белка, в качестве которого использовали бычий сывороточный альбумин (БСА). В результате были получены кривые адсорбции, выходящая на плато для гидролизированных частиц П(Ст-ВФА-ДМЭГ) до и после их модификации люминофором ФИТЦ (рисунок 4). Выходу на плато соответствует состояние насыщения поверхности

частиц белком, т.е. такое состояние, когда все доступные карбоксильные группы связаны с реакционными центрами белка. Для исследуемого образца адсорбция БСА на поверхности составила 5,7 и 5,0 мг/м² для частиц до и после их модификации люминофором соответственно. Снижение значений адсорбции БСА на 11% для частиц модифицированных люминофором свидетельствует о том, что присутствие связанного люминофора затрудняет последующую адсорбцию белка вследствие стерического фактора. Однако полученные значения сорбции БСА являются достаточно высокими, что позволяет сделать вывод о перспективности использования таких частиц в качестве биомаркеров.

Заклучение

Метод безэмульгарной эмульсионной сополимеризации позволяет синтезировать в присутствии сшивающего агента субмикронные монодисперсные частицы на основе сополимеров стирола с N-винилформамидом под действием катионного азоинициатора.

При хемосорбции люминофора 1(4-изотиоциано)флуоресцеина на поверхности синтезированных частиц П(Ст-ВФА-ДМЭГ). Примерно 1 из 10 аминокеттогрупп ковалентно связывается с молекулой люминофора. Синтезированные частицы хорошо адсорбируют бычий сывороточный альбумин (30-50 мкг/м²), что определяет возможность применения таких частиц в иммунном анализе при их модификации специфическими белками (антителами или антигенами).

И.Ю.Широкова, В.И.Кучук, Г.А.Панкова, А.Ю.Меньшикова, Н.Н.Шевченко

Биотехнологияда қолдануға арналған беттік қасиеттері алдын-ала берілген субмикронды латексті синтездеу әдісін жасау

Стиролдың N-винилформамидпен эмульгатордың өтетін эмульсиялық сополимеризациясымен монодисперсті полимерлік катиондық бөлшектер алу ерекшеліктері зерттелген. Синтезделген бөлшектердің сипаттамалары берілген (диаметр, бөлшектердің өлшемдер бойынша таралуы және ξ -потенциалдары, беттік функционал топтарының концентрациясы). Бөлшектерді люминоформен өңдеу және ақуыз табиғатты биомолекулды сорбциялау нәтижелері келтірілген.

Кілттік сөздер: полимерлік катиондық бөлшектер, синтез, люминофор, өңдеу, сорбция, биомолекул.

I.Yu. Shirokova, V.I.Kuchuk, G.A.Pankova, A.Yu.Menshykova, N.N.Shevchenko

Development of synthesis methods submicron latex given surface properties for use in biotechnology

In this work were investigate features of the synthesis of monodisperse polymer particles by without emulgatoric cationic emulsion copolymerization of styrene and N-vinyl formamide. The characteristics of the synthesized particles (diameter, particle size distribution, ξ -potential of the particles, the concentration of surface functional groups). The results of modified phosphor particles, as well as sorption bioligands protein nature (bovine serum albumin).

Keywords: polymeric cationic particles, synthesis, phosphor, processing, sorption, bioligands.