

УДК 541(183+64):542.952

## СИНТЕЗ ПОЛИМЕРНЫХ СУСПЕНЗИЙ ДЛЯ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

© 2002 г. И. А. Грицкова, Н. И. Прокопов, А. Н. Лобанов,  
Я. М. Станишевский, А. Ожеховски

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова  
117571 Москва, пр. Вернадского, 86

Поступила в редакцию 05.06.2002 г.  
Принята в печать 16.07.2002 г.

Проанализированы способы синтеза полимерных супензий с различными диаметрами частиц, свойства которых отвечают требованиям, предъявляемым при их использовании в медицине и биологии. Для получения полимерных супензий использовали методы безэмульгаторной и затравочной полимеризации. Определены условия синтеза, при которых полимерные микросфера отвечают предъявляемым к ним требованиям. Подробно изучены свойства полимерных супензий на всех стадиях формирования тест-систем, в которых в качестве носителей биолигандов использованы полистирольные микросфера с диаметром частиц от 0.04 до 2.5 мкм.

### ВВЕДЕНИЕ

Радикальная гетерофазная полимеризация является наиболее распространенным способом получения полимерных супензий, широко используемых в медицине, биологии и биотехнологии [1–4].

Основные требования, которым должны удовлетворять полимерные частицы, – это биологическая, химическая и коллоидная устойчивость в физиологических жидкостях, узкое распределение частиц по размерам, возможность образования прочной связи между функциональными группами биолигандов и полимерными частицами супензий.

Носители биолигандов могут быть разделены на две большие группы. Одна из них представляет собой биодеградируемые объекты: бактерии, липосомы, химически модифицированные эритроциты, крахмальные шарики и т.п., а другая – недеградируемые: активированный уголь, коллоидное золото, эмульсии парафинового масла, покрытого альбумином, полимерные микросфера, стеклянные шарики. Каждая из этих групп характеризуется специфическими свойствами, определяющими область

их применения. Следует отметить, что биодеградируемые носители, как правило, имеют природное происхождение и трудно поддаются контролю, в то время как синтетические объекты стабильны и являются контролируемыми, т.е. могут быть охарактеризованы по заряду, химическому строению, гидрофильно-липофильному балансу и т.д.

Среди синтетических носителей особенно перспективны полимерные микросфера, которые могут быть синтезированы с узким распределением по размерам (**РЧР**) в широком интервале диаметров, что важно для получения высокочувствительных диагностических тест-систем. Однородность частиц по размерам дает определенное преимущество для использования их в диагностических реакциях, поскольку позволяет достаточно точно определить площадь поверхности носителя белковых молекул и установить степень ее покрытия антигеном или антителом. Кроме того, однородность распределения частиц по размерам обусловливает похожий характер их поведения во время биохимической реакции, что облегчает “прочтение” результатов реакции.

E-mail: fun-latex@mtu-net.ru (Прокопов Николай Иванович).

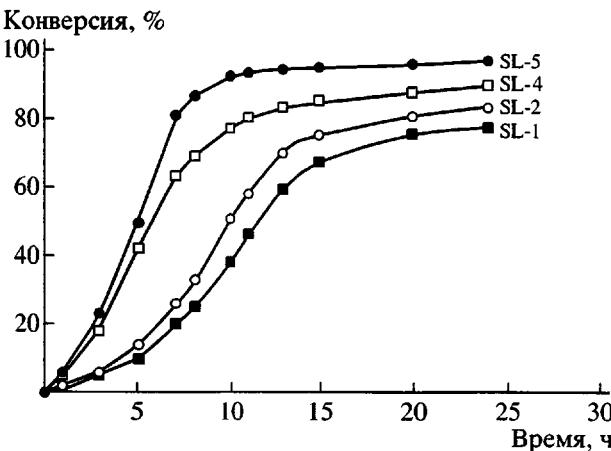


Рис. 1. Зависимость конверсии стирола от времени полимеризации при объемных соотношениях фаз стирол : вода = 1 : 3 (SL-1); 1 : 5 (SL-2); 1 : 10 (SL-4); 1 : 20 (SL-5).

К полимерным супензиям с узким РЧР обычно относят супензии, содержащие частицы полимера строго сферической формы и одинакового диаметра, диспергированные в воде [4]. Типичные значения коэффициента вариации (мера отклонения диаметров частиц от среднего значения) составляют 1–3% (для частиц с диаметром в интервале 0.1–10 мкм) и 10–30% (для частиц с диаметром в интервалах менее 0.06 и более 10 мкм) [5].

К настоящему времени определены принципы синтеза полимерных супензий различной природы с узким РЧР в широком интервале диаметров (от 0.1 до 10 мкм) [6, 7].

Однако принципов их выбора для применения в разных биохимических реакциях до сих пор нет и, как свидетельствуют литературные данные, выбор частиц осуществляют методом экспериментального поиска. В первую очередь это связано с невысокой устойчивостью частиц в биологических средах и отсутствием исследований по изучению их поведения на всех этапах создания тест-систем.

Цель настоящей работы – подробное изучение всех этапов формирования тест-систем, в которых в качестве носителей биолигандов используют полистирольные микросфера с диаметром частиц от 0.04 до 2.5 мкм.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мономеры, воду, инициаторы очищали по методикам [8]. Полимеризацию проводили в дилатометрах и автоклавах периодического действия [9].

Концентрацию альдегидных, эпоксидных и карбоксильных групп определяли кондуктометрическим методом на приборе “Mera-Elwro N5721” при температуре 25°C и частоте 3500 Гц [10].

Микрофотографии полимерных дисперсий получены с помощью электронного сканирующего микроскопа S-570 “Hitachi”. Средний размер частиц полимерных дисперсий, распределение по диаметрам и  $\zeta$ -потенциалам определяли методами электронной сканирующей микроскопии и фотон-корреляционной спектроскопии на приборах “Malvern” и “Autosizer”.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ опубликованных экспериментальных исследований по применению синтетических полимерных носителей показал, что универсальные частицы для получения тест-систем различного целевого назначения синтезировать невозможно. Это обусловлено тем, что в каждом конкретном случае необходимо синтезировать полимерные микросфера с определенным диаметром, содержащие краситель или флуоресцентную метку, функциональные группы на поверхности частиц для ковалентного связывания с функциональными группами биолиганда или специального вещества, специфически взаимодействующего с ним. На каждой стадии создания полимерных микросфер и их коньюгатов с биолигандом необходимым требованием является сохранение их устойчивости в биологической среде, индивидуальности и узкого РЧР.

Нами прослежены все этапы формирования тест-системы с использованием полистирольных микросфер, полученных полимеризацией стирола, инициированной персульфатом калия, в отсутствие ПАВ и последующей затравочной полимеризацией мономеров с целью получения полимерных супензий, отвечающих сформулированным требованиям.

Выбор частиц полистирольных супензий в качестве объекта исследований определялся тем, что их широко используют в качестве носителей биолигандов многие исследователи и в литературе обоснованы преимущества их использования [4].

**Таблица 1.** Коллоидно-химические свойства полистирольных супензий, полученных при различных объемных соотношениях фаз мономер : вода и различных концентрациях персульфата калия

Суспензия	Объемное соотношение мономер : вода	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> , % от массы воды	Диаметр частиц, мкм	Коэффициент вариации, %	Количество коагюляма, %
SL-1	1 : 3	0.2	1.59	9.2	21
SL-2	1 : 5	0.2	1.22	4.8	7
SL-3	1 : 7	0.2	0.95	4.0	5
SL-4	1 : 10	0.2	0.70	3.1	3
SL-5	1 : 20	0.2	0.58	2.3	1
SL-6	1 : 5	0.1	1.60	7.7	10
SL-7	1 : 5	0.4	0.92	3.6	Следы

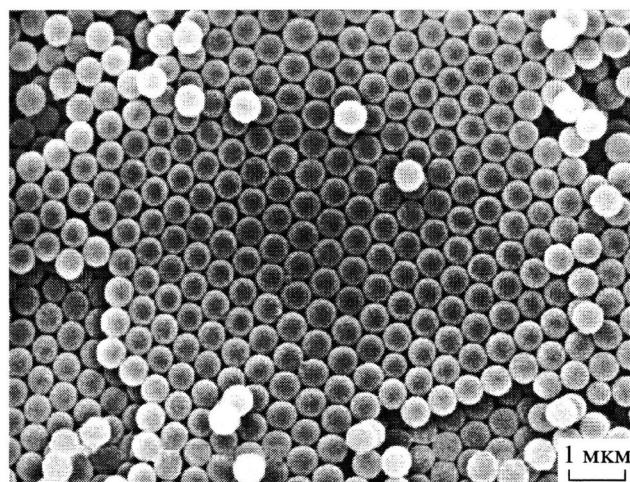
Было изучено влияние соотношения стирол : вода и концентрации инициатора на диаметр и распределение частиц по размерам, на их устойчивость в процессе полимеризации и окрашивания. На рис. 1 приведены кинетические кривые конверсия – время, полученные при полимеризации стирола при различных соотношениях стирол : вода и постоянной концентрации инициатора, равной 0.2 мас. % в расчете на водную фазу. Температура полимеризации 70°C. Видно, что скорость полимеризации возрастает по мере уменьшения объема мономерной фазы. Максимальная скорость полимеризации наблюдается при массовом соотношении мономер : вода = 1 : 20, минимальная – при соотношении 1 : 3.

Из данных табл. 1 видно, что диаметр частиц полимерных супензий SL-1 – SL-5 существенно зависит от объема мономерной фазы в эмульсии, при этом заметно изменяется и устойчивость реакционной системы: если при массовом соотношении мономер : вода = 1 : 3, содержание коагюляма составляет 20 мас. % (в расчете на мономер), то при массовом соотношении 1 : 5 реакционная система устойчива.

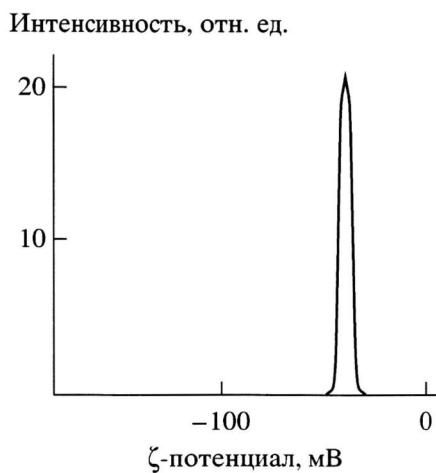
Узким РЧР характеризовались только полимерные супензии, полученные в процессе полимеризации стирола при массовом соотношении фаз мономер : вода = 1 : 20, что продемонстрировано данными электронно-микроскопических исследований (рис. 2). В этом случае величина  $\zeta$ -по-

тенциала на поверхности частиц составляет –40 мВ, что в сочетании со структурно-механическим фактором стабилизации, формирующимся за счет образования высокомолекулярного полимера в межфазных слоях частиц, обеспечивало полимерно-мономерным частицам устойчивость, начиная с низких конверсий мономера.

Влияние концентрации инициатора на скорость полимеризации, диаметр частиц и РЧР, на устойчивость реакционной системы изучали при массовом соотношении мономер : вода = 1 : 5. Полимериза-



**Рис. 2.** Микрофотография полистирольных микросфер, синтезированных при объемном соотношении фаз стирол : вода = 1 : 20.



**Рис. 3.** Гистограмма распределения  $\zeta$ -потенциалов по частицам полистирольной супензии SL-2.

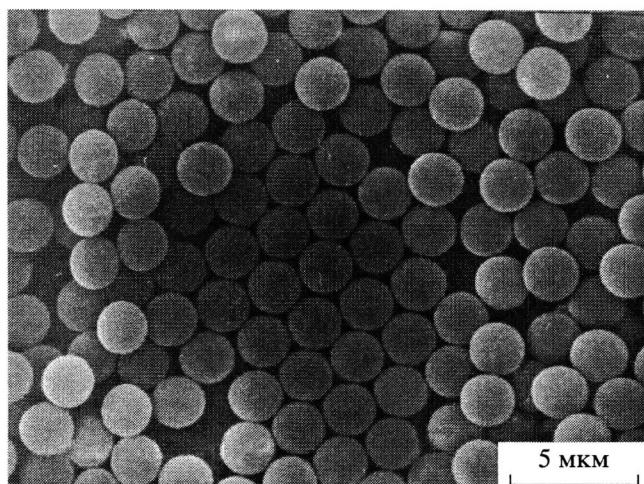
цию проводили при 70°C в течение 24 ч. Как и следовало ожидать, с увеличением концентрации инициатора скорость полимеризации возрастает, средний диаметр частиц уменьшается, повышается устойчивость реакционной системы и сужается РЧР (табл. 1, супензии SL-2, SL-6, SL-7).

Значение  $\zeta$ -потенциала составляет  $-38.5$  мВ (рис. 3), а прочность межфазных адсорбционных слоев  $P_s = 2.5 \times 10^{-3}$  мН  $m^{-1}$ , что обеспечивает образование полимерных супензий с узким РЧР.

Окрашивание полимерной супензии не привело к заметному изменению РЧР, хотя значение  $\zeta$ -потенциала частиц стало меньшим.

**Таблица 2.** Рецепт проведения затравочной полимеризации стирола на основе полистирольной супензии SL-2

Компонент	Содержание компонента, мас. ч.
Полистирольная супензия SL-2 (на массу полимера)	100.0
Стирол	100.0
Вода	2400.0
Додецилсульфат натрия	2.4
ДАК	3.6
Персульфат калия	0.4



**Рис. 4.** Микрофотография полистирольной супензии SSL-1.

Таким образом, методом эмульсионной полимеризации стирола в отсутствие эмульгатора можно синтезировать полимерные микросфера с узким РЧР только в интервале диаметров 0.6–1.0 мкм.

На стадии получения тест-систем, т.е. коньюгата полимерная микросфера–биолиганд, водную фазу полимерной супензии заменяют водным раствором буфера (обычно это фосфатно-солевой буфер с  $pH \sim 7.2$ ). Анализ поведения полимерных супензий в буферном растворе методом световой микроскопии показал, что частицы флокулируют с образованием агрегатов, состоящих из двух, трех или четырех частиц, по-видимому, за счет недостаточной устойчивости и гидрофобного взаимодействия между частицами.

Решить эту проблему удалось путем добавления в супензию альбумина, полимерного ПАВ, широко используемого в биологических реакциях. Альбумин адсорбировался на поверхности частиц и образовывал слой толщиной  $\sim 7$  нм, т.е. формировался дополнительный структурно-механический барьер по Ребиндери. Концентрация альбумина составляла 0.09 мас. %.

Частицы полимерных супензий, синтезированных в описанных выше условиях, были успешно использованы для получения тест-систем на иерсиниоз, бруцеллез и сальмонеллез.

Полимерные микросфера со средними диаметрами 1.0–2.5 мкм получали методом затравочной полимеризации мономеров различной приро-

ды – стирола, метакриловой кислоты, глицидилметакрилата, акролеина, используя в качестве затравочных частиц полимерные супензии, полученные в отсутствие эмульгатора.

Вначале были определены условия полимеризации мономеров, при которых процесс протекает только в частицах затравочной полимерной супензии SL-2 (табл. 2).

В качестве инициатора применяли маслорастворимый ДАК, чтобы исключить возможность протекания процесса в водной фазе. Затравочную полимеризацию проводили в две стадии. На первой стадии к полистирольной супензии добавляли мономер с инициатором, который растворялся в полимерных микросферах при комнатной температуре в течение 22–24 ч. На второй стадии осуществляли собственно затравочную полимеризацию в течение 24 ч при 60°C. Для обеспечения стабилизации частиц добавляли додецилсульфат натрия, концентрация которого во всех случаях была ниже критической концентрации мицеллообразования.

В результате полимеризации была получена полистирольная супензия с размерами частиц 1.66 мкм (рис. 4), коэффициентом вариации 6.5% и  $\zeta$ -потенциалом, равным –38.5 мВ (SSL-1).

Для получения частиц большего диаметра проводили затравочную сополимеризацию стирола и стиролсульфоната натрия, используя в качестве затравки частицы полимерной супензии с размером 1.66 мкм (SSSL-1). Особенностью этого процесса было то, что вначале проводили затравочную полимеризацию стирола до конверсии ~75%, а затем добавляли стиролсульфонат натрия и доводили процесс сополимеризации до полной конверсии мономеров.

Полимеризацию инициировали ДАК (3 мас. % в расчете на мономер). Такой порядок подачи мономеров обеспечивал локализацию сополимера стирола со стиролсульфонатом натрия в межфазных слоях полимерных микросфер, создавая возможность формирования дополнительного электростатического фактора стабилизации за счет ориентации групп  $\text{SO}_3^-$  на границе раздела и структурно-механического фактора стабилизации за счет ориентации в межфазном слое звеньев-

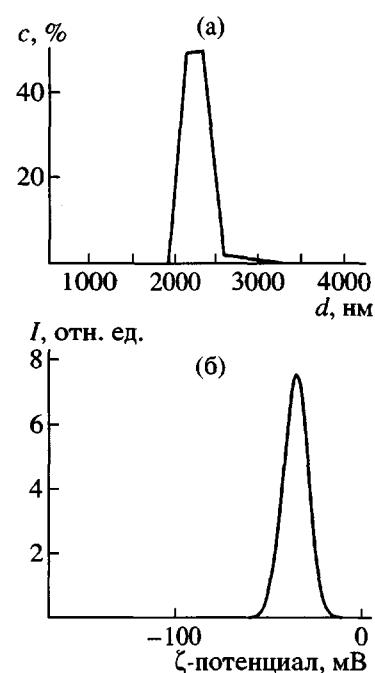


Рис. 5. Распределение частиц полистирольной супензии SSSL-1 по размерам (а) и распределение  $\zeta$ -потенциалов по ее частицам (б).

ев стирольсульфоната, находящихся в сополимерной цепи. На рис. 5 представлены данные по распределению частиц полимерной супензии по размерам и величине  $\zeta$ -потенциала. Видно, что они

Таблица 3. Рецепты проведения затравочной полимеризации на полистирольной супензии SSSL-1

Компонент	Содержание компонента в полимерной супензии (мас. ч.)		
	SSSL-2	SSSL-3	SSSL-4
Полистирольная супензия SSSL-1 (на массу полимера)	100.0	100.0	100.0
Стирол	20.0	20.0	20.0
Вода	2400.0	2400.0	2400.0
Метакриловая кислота	0.6		
Глицидилметакрилат		0.6	
Акролеин			0.6
ДАК	3.6	3.6	3.6
Додецилсульфат натрия	2.4	2.4	2.4
Стиролсульфонат натрия	1.0	1.0	1.0
Персульфат калия	0.4	0.4	0.4

**Таблица 4.** Коллоидно-химические свойства полимерных супензий, полученных методом затравочной полимеризации

Супензия	Средний диаметр частиц, мкм	Коэффициент вариации, %	Концентрация функциональных групп, мкмоль/г полимера	Площадь поверхности, приходящаяся на одну функциональную группу, $\text{\AA}^2/\text{группа}$
SSSL-2	2.30	7.2	1.7	540
SSSL-3	2.29	8.7	1.6	325
SSSL-4	2.37	9.0	2.3	230

сохранили узкое РЧР, что подтверждает протекание полимеризации только в затравочных частицах. Средний диаметр частиц был равен 2.12 мкм, а значение  $\zeta$ -потенциала составляло  $-35 \text{ мВ}$ .

Для получения полимерных микросфер с функциональными группами на поверхности проводили затравочную полимеризацию метакриловой кислоты, глицидилметакрилата и акролеина, используя в качестве затравочных частицы полимерной супензии SSSL-1. Условия проведения затравочной полимеризации мономеров и свойства полимерных супензий представлены в табл. 3 и 4. Видно, что все они характеризуются узким РЧР.

Однако и в этих случаях при замене водной фазы буферным раствором наблюдалась флоккуляция полимерных микросфер, чего можно было избежать добавлением в полученную супензию альбумина в количестве 0.09 мас. %.

Таким образом, проведенный сопоставительный анализ полимерных супензий, частицы которых различались составом их межфазного слоя (природой полимера и функциональных групп), показал, что использовать их в качестве носителей биолигандов в биологических реакциях можно только при добавлении в супензию полимерного ПАВ, например альбумина, на стадии замены водной фазы раствором буфера.

В этом случае полимерные микросфера отвечали предъявляемым к ним требованиям и были использованы в качестве носителей биолигандов

для создания диагностических тест-систем на инфекционные заболевания.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Emulsion Polymerization and Emulsion Polymers / Ed. by Lovell P.A., El-Aasser M.S. London: Wiley, 1997.
2. Polymer Colloids : A Comprehensive Introduction / Ed. by Fitch R.M. New York: Acad. Press, 1997.
3. Polymeric Dispersions : Principles and Applications (NATO ASI Series. Series E, Applied Sciences, V. 335.) / Ed. by Asua J.M. New York: Kluwer Acad. Publ., 1997.
4. Прокопов Н.И., Грицкова И.А., Черкасов В.Р., Чалых А.Е. // Успехи химии. 1996. Т. 65. № 2. С.178.
5. Ugelstad J., Mfutakamba H.R., Mork P.C., Ellingsen T., Berge R., Holm L., Schinid R., Jorgedal A., Hansen F.K., Nustad K. // J. Polym. Sci., Polym. Symp. 1985. V. 72. P. 225.
6. Прокопов Н.И. Дис. ... д-ра хим. наук. М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 1999.
7. Bang L.B. Uniform Latex Particles. Indianapolis: Sera-dyn Inc., 1984.
8. Грицкова И.А., Седакова Л.И., Мурадян Д.С., Синекаев Б.М., Павлов А.В., Праведников А.Н. // Докл. АН СССР. 1978. Т. 243. № 2. С. 403.
9. Трегубенков С.И., Седакова Л.И., Скворцов В.Г., Грицкова И.А., Праведников А.Н. // Высокомолек. соед. Б. 1985. Т. 27. № 11. С. 873.
10. Черкасов В.Р. Дис. ... канд. хим. наук. М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 1992.

## Synthesis of Polymer Suspensions for Immunoassay

I. A. Gritskova, N. I. Prokopov, A. N. Lobanov,  
Ya. M. Stanishevskii, and A. Ozhekhevski

*Lomonosov State Academy of Fine Chemical Technology,  
pr. Vernadskogo 86, Moscow, 117571 Russia*

**Abstract**—The methods of preparing polymer suspensions with the varying diameter of particles the properties of which meet requirements imposed on particles used in medicine and biology were analyzed.

Polymer suspensions were prepared using emulsifier-free and seed polymerization techniques. The synthetic conditions which provide polymer microspheres suiting requirements imposed on these species were elaborated. At all stages of test systems formation in which polystyrene microspheres with the diameter of particles ranging from 0.04 to 2.5  $\mu\text{m}$  were used, the properties of polymer suspensions were comprehensively studied.