

УДК 541.64:537.6

СИНТЕЗ МАГНИТОНАПЛНЕННЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР ДЛЯ ИММУНОМАГНИТОМЕТРИЧЕСКОГО АНАЛИЗА¹

© 2006 г. В. Р. Черкасов*, А. Ю. Гервальд**, Н. И. Прокопов**, И. А. Грицкова**,
П. И. Никитин***, П. Г. Свешников*

*Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения

113149 Москва, Симферопольский б-р, 8

**Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова

117571 Москва, пр. Вернадского, 86

***Центр естественно-научных исследований Института общей физики Российской академии наук

119991 Москва, ул. Вавилова, 38

Поступила в редакцию 07.07.2005 г.

Принята в печать 14.11.2005 г.

Разработан метод синтеза магнитонаполненных полимерных микросфер, позволяющий получать магнитные метки с высокой магнитной восприимчивостью; микросфера содержит на поверхности функциональные группы для иммобилизации биолигандов и отвечают требованиям проведения иммуномагнитометрического анализа. Полученные магнитонаполненные полимерные микросфера были подвергнуты сравнительным испытаниям с коммерческими магнитными латексами.

Разработка новых методов регистрации иммунохимических реакций остается актуальной проблемой современной науки [1]. В настоящий момент все большее внимание привлекает иммуномагнитометрический анализ, основанный на использовании магнитных частиц в качестве аналитических маркеров [2, 3]. Основная идея анализа заключается в количественном определении специфических комплексов антиген–антитело, меченых магнитными метками, путем приложения внешнего магнитного поля и регистрации соответствующей величины магнитной восприимчивости магнитного материала метки, пропорциональной концентрации иммунокомплекса. В качестве таких магнитных меток можно применять магнитонаполненные полимерные микросфера.

В патентной и научной литературе описано большое количество методов получения таких микросфер, которые отличаются большим разнообразием размеров и содержанием магнитно-

го материала, но они оптимизированы и предназначены главным образом для применения в технологиях, основанных на магнитной сепарации. Однако практически оказываются вне зоны внимания такие критически важные для иммуномагнитометрического анализа параметры, как равномерность распределения магнитного материала по частицам латекса, уровень магнитной восприимчивости, оптимальное содержание магнитного материала в полимерной матрице и размер микросфер [4].

Цель настоящего исследования – разработка метода синтеза магнитонаполненных полимерных микросфер с высокой магнитной восприимчивостью, содержащих на поверхности функциональные группы для иммобилизации биолигандов и отвечающих требованиям иммуномагнитометрического анализа.

Исследования проводили в направлении получения высокодисперсной устойчивой суспензии магнитных частиц в мономере (стироле) и в выборе условий проведения полимеризации, обеспечивающих образование равномерно наполненных магнетитом полимерных микросфер.

¹ Работа выполнена при финансовой поддержке Агентства по снижению угрозы (Defence Thread Reduction Agency, США) при содействии Международного Научно-технического центра (грант 1233).

E-mail: prokopov@mitht.ru (Гервальд Александр Юрьевич).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез магнитного материала (магнетита) проводили с использованием реакции конденсации Элмора [5]. Полученную дисперсию магнетита стабилизировали в водной фазе олеатом калия. Магнитную жидкость на основе стирола готовили путем замены дисперсионной среды.

Водную эмульсию формировали в реакторе объемом 200 мл, снабженном водяным затвором для ввода механической мешалки и системой продувки инертного газа. В течение по крайней мере 1 ч при умеренном перемешивании и температуре 65–70°C в воде растворяли додецилсульфонат натрия и цетиловый спирт, затем при интенсивном перемешивании к полученному раствору добавляли стирол, образовавшуюся эмульсию перемешивали еще 15 мин, после чего ее обрабатывали ультразвуком в течение 3–5 мин.

Полимерные суспензии получали в стеклянном реакторе объемом 120 мл, снабженном теплообменной рубашкой, якорной стеклянной мешалкой и системой для продувки инертного газа при $70 \pm 0.5^\circ\text{C}$. В реактор загружали приготовленную описанным выше способом эмульсию, включали перемешивание и продувку инертного газа, после чего вводили раствор инициатора и отмечали время начала полимеризации. Умеренный ток инертного газа поддерживали постоянным в течение всей полимеризации.

Конверсию мономера находили гравиметрическим методом по сухому остатку.

Магнитную восприимчивость магнитных латексов определяли по показаниям магнитометра БиоМаг 1 (разработка сотрудников Центра естественно-научных исследований Института общей физики РАН) и выражали ее в условных единицах. Измерения проводили в пластиковых пробирках объемом 2 мл по методике, рекомендованной производителем.

Магнитные латексы очищали методом мембранный диафильтрации с использованием системы Amicon (США) и дисковых полисульфоновых мембран с полосой пропускания 100 кДа ("Millipore", США).

Размер частиц полимерных суспензий определяли с помощью электронной просвечиваю-

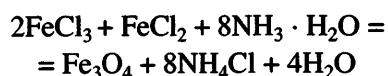
щей микроскопии ("Jeol-120M", Япония) и многоуглового анализатора субмикронных частиц ("Coulter N4 MD", Франция) по стандартной методике. Средний размер частиц полимерных суспензий и коэффициент вариации находили путем обсчета соответствующих микрофотографий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Магнитонаполненные полимерные микросферашироко используются в биотехнологии, медицинской практике, при оценке состояния окружающей среды [6]. Особый интерес представляет применение таких микросфер в иммунодиагностике.

В научной и патентной литературе широко описаны методы получения магнитных наночастиц, в которых используют магнетит.

Свойства магнитонаполненных полимерных микросфер в значительной степени зависят от свойств магнитного материала. Одним из основных свойств магнитного материала является магнитная восприимчивость, физический смысл которой – коэффициент пропорциональности между напряженностью магнитного поля и намагничиваемостью вещества. Магнитная восприимчивость магнетита определяется главным образом его кристаллической структурой и существенно зависит от условий протекания реакции его образования:



Известно, что наилучшие магнитные свойства магнетита достигаются при равном мольном соотношении оксидов железа (II) и (III) [7]. В литературе практически отсутствуют систематизированные данные о влиянии условий синтеза на магнитную восприимчивость получаемого магнетита. В связи с этим, в настоящей работе проведено изучение влияния мольного соотношения солей железа (II) и (III), а также концентрации гидрата аммиака на указанное свойство. Для исследований был использован магнитометр БиоМаг 1, предназначенный для быстрого количественного определения чрезвычайно малого количества магнитного

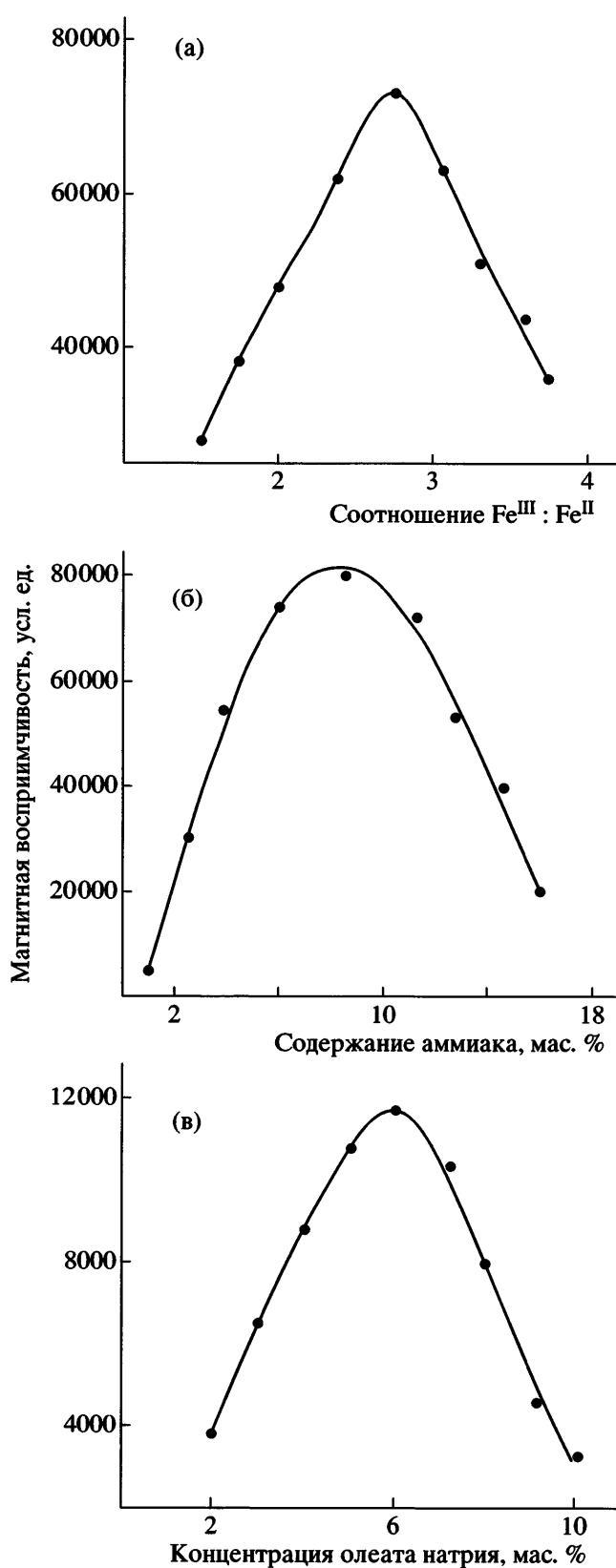


Рис. 1. Зависимость магнитной восприимчивости от мольного соотношения солей железа (а), от содержания аммиака в исходном растворе (б) и от концентрации стабилизатора (в).

материала в достаточно большом объеме по величине магнитной восприимчивости образца, выраженной в условных единицах.

Как видно из данных, приведенных на рис. 1а и 1б, эти зависимости носят экстремальный характер с явно выраженным максимумом. При оптимальных значениях мольного соотношения солей железа (II) и (III), а также концентрации гидрата аммиака, равных соответственно 1:2.75 и 6 мас. %, получен магнетит с максимальной магнитной восприимчивостью.

Были выбраны следующие оптимальные условия синтеза магнетита: 0.0026 М раствор FeCl₂, 0.0072 М раствор FeCl₃, 0.036 М раствор гидрата аммиака; температура 40°C [7].

Для синтеза магнитосодержащих полимерных микросфер, предназначенных для иммуномагнитометрического анализа, было необходимо получить водную суспензию коллоидного магнетита. Анализ литературных данных показал, что наночастицы магнетита можно стабилизировать в присутствии таких ПАВ, как олеат натрия, додециламин, лаурат аммония, ундекилят натрия и другие [7, 8].

Изучение седиментационной и агрегативной устойчивости водных суспензий показало, что большей устойчивостью и технологичностью характеризуются суспензии, частицы которых стабилизированы олеатом натрия.

Максимальное значение магнитной восприимчивости суспензии достигнуто в интервале концентраций олеата натрия 5–6.5 мас. % (рис. 1в).

Для проведения эмульсионной полимеризации было предложено использовать суспензию магнетита в мономере, полученную путем замены водной фазы магнитной жидкости на стирольную при сохранении устойчивости, магнитных свойств и среднего размера коллоидного магнетита.

Замену среды осуществляли дестабилизацией водной суспензии коллоидного магнетита ледяной уксусной кислотой. Уксусную кислоту добавляли в двойном избытке от стехиометрического количества для обеспечения полного превращения олеата натрия в олеиновую кислоту. Осадок многократно промывали водой для удале-

ния остатков кислоты, а затем добавляли стирол в количестве, соответствующем заданной концентрации магнетита в магнитной жидкости.

В результате получена концентрированная (более 20%) стирольная магнитная жидкость, которую в дальнейшем использовали для синтеза магнитонаполненных полимерных микросфер.

Основным требованием, которое необходимо было выполнить при разработке метода синтеза магнитонаполненных полимерных микросфер, являлось насыщение полимерных микросфер определенным количеством магнитных частиц для создания заданного уровня магнитной восприимчивости, а также обеспечение равномерного распределения магнитных частиц между полимерными микросферами. Кроме того, важно обеспечить высокую коллоидную устойчивость полимерных микросфер на последующих стадиях иммунохимических испытаний в физиологическом буферном растворе ($\text{pH } 7.4$) и в процессе хранения.

Принимая во внимание требования к магнитным полимерным частицам, было высказано предположение о том, что только при определенном соотношении между дисперсностью магнитных наночастиц и полимерно-мономерных частиц, формирующихся из микрокапель мономера при инициировании полимеризации, реализуется равномерное распределение магнитного материала между полимерными микросферами и узкое распределение полимерных микросфер по размеру.

На первом этапе получения микросфер в воде перемешивали додецилсульфат натрия и цетиловый спирт при 65°C , затем к раствору добавляли стирол, и образовавшуюся эмульсию интенсивно перемешивали со скоростью 700 об/мин, а затем воздействовали ультразвуком. В результате получали высокодисперсную эмульсию стирола, в которой инициировали полимеризацию добавлением раствора персульфата калия при 70°C . Полимеризацию проводили в течение 1.5–2 ч.

Формирование магнитонаполненных полимерных частиц, синтезируемых таким методом, можно представить следующим образом. При смешении мономера и водной фазы, содержащей

ПАВ и со-ПАВ, происходит перераспределение со-ПАВ из водной фазы в мономерную, в которой он хорошо растворим. Диффундируя через границу раздела фаз, цетиловый спирт понижает межфазное натяжение, что способствует протеканию процесса микроэмulsionирования стирола с образованием микрокапель мономера. Эти микрокапли обладают высокой устойчивостью из-за адсорбции из водной фазы додецилсульфата натрия (ДСН) и формирования двойного диэлектрического слоя на поверхности микрокапель, а также воздействия структурно-механического фактора за счет адсорбции из мономерной фазы комплекса цетилового спирта с ДСН, который повышает прочность межфазного слоя до $150 \times 10^{-3} \text{ мН/м}$ [9]. Дальнейшая обработка ультразвуком приводит к диспергированию всей мономерной фазы до микрокапель. При инициировании полимеризации персульфатом калия происходит дальнейшее интенсивное дробление капель мономера за счет превращения теплоты полимеризации в поверхностную энергию и снижение межфазного натяжения до низкого значения. Образованные из микрокапель мономера полимерно-мономерные частицы уже с низких конверсий будут характеризоваться устойчивостью, так как в их межфазных слоях формируются электростатический (за счет адсорбции додецилсульфата натрия) и структурно-механический (за счет адсорбции комплекса цетилового спирта с ДСН из мономерной фазы и возникновения полимера в межфазном слое) факторы стабилизации. В процессе образования микрокапель мономера наблюдается капсулирование магнитных частиц, протекающее в одинаковых условиях и приводящее к получению одинаковых микросфер с равномерно распределенным магнитным материалом.

Чтобы выбрать концентрацию эмульгатора и цетилового спирта, достаточную для формирования заданного числа полимерных частиц и их стабилизации, было исследовано влияние концентрации системы ПАВ–со-ПАВ на средние размеры полимерных микросфер.

Полученные результаты представлены в табл. 1. Видно, что при увеличении концентрации смеси ПАВ–со-ПАВ средний диаметр частиц практически

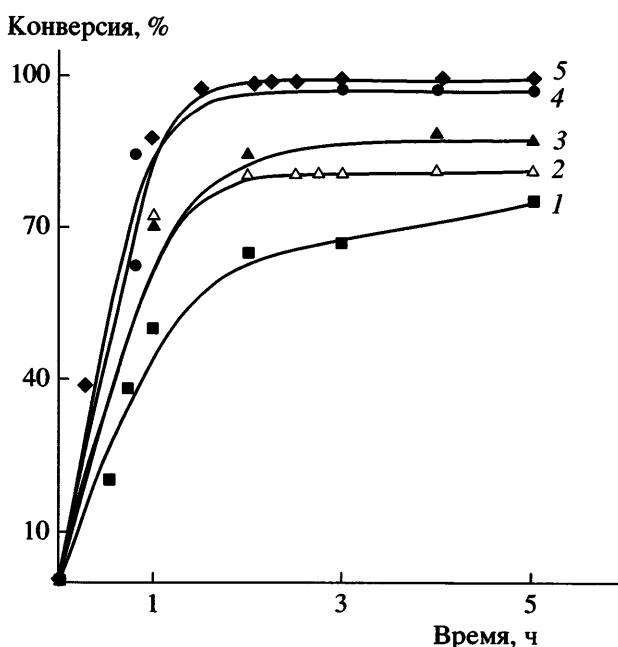


Рис. 2. Зависимость конверсии мономера от времени. 1, 2, 3 – увеличение концентрации инициатора (образцы 1, 2, 3 из табл. 1), 4 – добавление перекиси бензоила (1 мас. ч.), 5 – полимеризация в присутствии магнетита.

ски не изменяется. Это является прямым подтверждением образования полимерно-мономерных частиц из микрокапель мономера.

Данные по влиянию концентрации инициатора на дисперсность микросфер также приведены в табл. 1, из которой следует, что с повышением

концентрации персульфата калия диаметр частиц уменьшается, и распределение частиц по размерам становится более узким.

Зависимость конверсии мономера от времени при различных условиях полимеризации представлена на рис. 2. Видно, что процесс не протекает до полной конверсии мономера. Увеличения глубины конверсии мономеров удалось добиться путем добавления в систему маслорастворимого инициатора – перекиси бензоила.

На основании полученных результатов был выбран следующий рецепт синтеза полимерных магнитных микросфер: суспензия магнетита в стироле – 100 мас. %, персульфат калия – 0.36 мас. %, перекись бензоила – 1.00 мас. %, доодецилсульфат натрия – 1.45 мас. %, цетиловый спирт – 2.90 мас. %, вода – 634.0 мас. %.

Из кривой 5 на рис. 2 следует, что полимеризация стирола в присутствии магнетита и без него протекает с близкими скоростями, при этом не наблюдается образования коагулюма.

Синтезированный магнитный латекс обладал высокой магнитной восприимчивостью, которая повышалась при увеличении концентрации магнетита в стироле (рис. 3).

В результате исследований была получена суспензия полимерных магнитных частиц со средним диаметром 0.08–0.10 мкм, узким распределением частиц по размерам и содержанием магнети-

Таблица 1. Данные лазерной автокорреляционной спектроскопии

Образец, №	Концентрация, моль/л		Данные лазерной автокорреляционной спектроскопии ("Coulter", Франция)	
	инициатора	ПАВ–со–ПАВ	средний диаметр микросфер, нм	коэффициент вариации размера, %
1	0.00072	1.17	120	35
2	0.0012	0.59	123	25
3	0.0018	0.59	93	17
4	0.002	0.32	84	23
5	0.002	0.64	78	27
6	0.002	0.48	82	25

та не менее 25%. Измерение магнитных свойств показало, что полученный латекс имеет высокую магнитную восприимчивость, достаточную для использования в иммуномагнитометрическом анализе.

Наличие функциональных групп на поверхности микросфер, способных ковалентно связывать молекулы биолигандов, является одним из основных требований, предъявляемых в иммуномагнитометрических исследованиях. В то же время следует учитывать, что введение функциональных мономеров, особенно гидрофильных и хорошо растворимых в воде, в исходную эмульсию на стадии полимеризации может в значительной степени повлиять на условия формирования полимерно-мономерных частиц и, в конечном счете, сказаться на свойствах магнитного латекса. Поэтому было решено синтезировать магнитонаполненные полимерные микросфера с хлорметилстирольными группами на поверхности путем проведения затравочной полимеризации с использованием относительно гидрофобного мономера – хлорметилстирола.

Затравочную полимеризацию хлорметилстирола проводили традиционным способом. В начале осуществляли набухание полистирольных частиц хлорметилстиролом. Концентрация хлорметилстирола, достаточная для насыщения мономером поверхности частицы, была выбрана из литературных данных [10]. Для исключения реакции гидролиза хлорметильных групп затравочную полимеризацию инициировали окисительно-восстановительной системой персульфат калия – бисульфит натрия при пониженной температуре.

Магнитная восприимчивость, усл. ед.

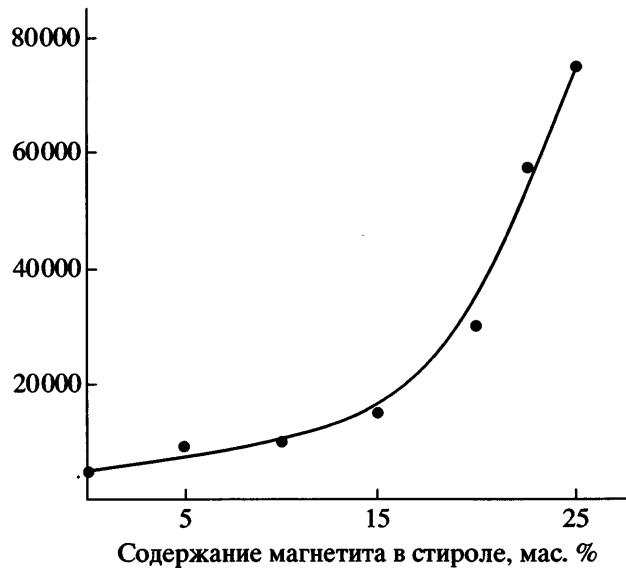


Рис. 3. Зависимость магнитной восприимчивости латекса от количества введенной на стадии эмульсионной полимеризации стирольной магнитной жидкости.

В результате проведения затравочной полимеризации были получены магнитные латексы с узким распределением частиц по размерам, с хлорметильными группами на поверхности частиц и с высокой магнитной восприимчивостью. Методом потенциометрического титрования функциональных групп с использованием хлоридного ион-селективного электрода и щелочного раствора глицерина в качестве титранта показано наличие хлорметильных групп на поверхности полимерных микросфер в концентрации, соответствующей предельному заполнению (0.61 ммоль/г полимера) межфазных адсорбционных слоев.

Таблица 2. Сравнительная характеристика полимерных магнитных микросфер, использованных в иммуномагнитометрическом анализе

Магнитный латекс	Средний диаметр частиц, мкм	Коэффициент вариации размера частиц, %	Содержание магнитного материала, мас. %	Удельная магнитная восприимчивость, усл. ед.	Функциональные группы	
					типа	концентрация
Получен в настоящей работе	0.09	17	35	120000	Хлорметильные	0.61
Коммерческий латекс Estapore (США)	0.84	10	45	40000	Карбоксильные	–

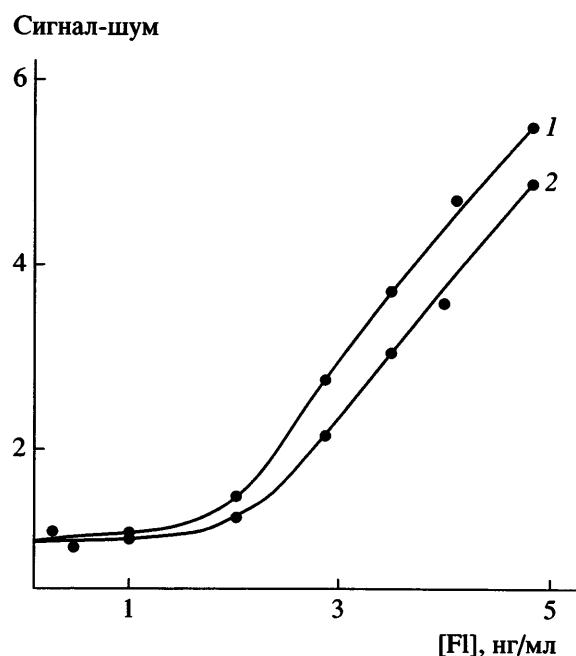


Рис. 4. Сравнение зависимостей сигнал–шум от концентрации капсуллярного антигена F1 из *Y. Pestis* при его иммуномагнитометрическом определении с использованием магнитных микросфер: 1 – специально оптимизированные микросфера, 2 – коммерческие магнитные микросфера Estapore (“Bangs Laboratories”, США).

Полученные магнитонаполненные полимерные микросфера были сопоставлены с коммерческими магнитными латексами Estapore фирмы “Bangs Laboratories” (США) при проведении иммуномагнитометрического определения капсуллярного антигена F1 из *Y. Pestis*. Свойства используемых магнитных латексов приведены в табл. 2.

Иммуномагнитометрический анализ проводился в микроколонках по стандартной методике [11]. Сравнительные кривые зависимостей сигнал–шум от концентрации антигена F1, полученные при использовании указанных латексов, представлены на рис. 4. В качестве уровня “шума” использовали уровень неспецифического связывания магнитных частиц. Электронный шум прибора БиоМаг позволяет регистрировать на два-три порядка меньшее количество частиц магнитных латексов.

Как видно из рис. 4, кривые сигнал–шум не различаются при концентрации антигена F1 ниже

10 нг/мл и несколько превышают значения, измеренные при использовании магнитных латексов Estapore при концентрации F1 > 10 нг/мл.

Таким образом, использование специально синтезированных и оптимизированных для данного магнитометрического анализа магнитных микросфер обеспечивает большую чувствительность и разрешающую способность измерений по сравнению с латексами Estapore.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Andreotti P.E., Ludwig G.V., Peruski A.H., Tuite J.J., Morse S.S., Peruski L.F. // Bio Techniques. 2003. V. 35. № 4. P. 850.
- Никитин П.И., Ветошико П.М. Пат. 2166751 Россия. Приоритет от 09.03.2000.
- LaBorde R.T., O'Farrell B. // IVD Technology. 2002. № 1. P. 36.
- Rife J.C., Miller M.M., Sheehan P.E., Edelstein R.L., Tamanaha C.R., Tondra M., Whitman L.J. // Sensors and Actuators. A. 2003. V. 107. № 3. P. 209.
- Elmore W.C. // Phys. Rev. 1938. V. 54. № 4. P. 309.
- Baselt R.D., Lee G.U., Natesan M., Metzeder S.W., Sheehan P.E., Colton R.J. // Biosensor Bioelectronics. 1998. V. 13. № 7–8. P. 731.
- Берковский Б.М., Медведев В.Ф., Краков М.С. Магнитные жидкости. М.: Химия, 1989.
- Фертман В.Е. Магнитные жидкости – конвекция и теплообмен. Минск: Наука и техника, 1978.
- Симакова Г.А. Дис. ... д-ра хим. наук. М.: МИТХТ им. М.В. Ломоносова, 1990.
- Stefan A.F. Bon, Henno Van Beek, Pieter Piet, Anton L. German // J. Appl. Polym. Sci. 1995. V. 58. № 1. P. 19.
- Свешников П.Г., Киселев В.И., Северин Е.С., Пальцев М.А. // Молек. медицина. 2004. Т. 4. № 1. С. 67.

Synthesis of Polymer Magnetic Microspheres for Immunomagnetometric Assay

V. R. Cherkasov*, A. Yu. Gerval'd**, N. I. Prokopov**,
I. A. Gritskova**, P. I. Nikitin***, and P. G. Sveshnikov*

*All-Russia Scientific Center of Molecular Diagnostics and Therapy,
Simferopol'skii bul. 8, Moscow, 113149 Russia

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

***Center of Natural Sciences Research, Institute of General Physics, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 38, Moscow, 119991 Russia

Abstract—A method for the synthesis of polymer magnetic microspheres which allows the production of magnetic labels with a high magnetic susceptibility was developed. The microspheres contain surface functional groups for immobilization of bioligands and meet the requirements for immunomagnetometric assay. The obtained polymer magnetic microspheres were subject to comparative tests with commercial magnetic latexes.