

СИНТЕЗ АМИНОСОДЕРЖАЩИХ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР ЗАТРАВОЧНОЙ СОПОЛИМЕРИЗАЦИЕЙ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ

**А.В. Бахтина^{1,@}, А.А. Сиваев¹, С.М. Левачев², С.А. Гусев³, Н.А. Лобанова¹,
М.А. Лазов¹, И.А. Грицкова¹**

¹Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Москва 119571, Россия

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва 119899, Россия

³Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, Москва 119435, Россия

@Автор для переписки, e-mail: anna_artisyuk@mail.ru

В данной работе представлены результаты по изучению затравочной сополимеризации глицидилметакрилата с этиленгликольдиметакрилатом на затравочных полиглицидилметакрилатных частицах с целью получения частично сшитых полимерных микросфер с диаметром порядка 3.5 мкм для их использования в иммунохимических реакциях в качестве носителей библигандов. Физико-химические свойства полимерных микросфер, полученных в разных условиях, были изучены следующими методами: диаметры частиц – методами электронной сканирующей и световой микроскопии, краевой угол смачивания – методом «лежащей капли», скорость седиментации – макрометодом в капилляре по движению границы раздела фаз полимерная суспензия/вода (буферный раствор), дзета-потенциал – методом динамического светорассеяния. Изучив физико-химические свойства всех полимерных суспензий, был сделан вывод, что оптимальными частицами для создания на их основе диагностической тест-системы с высокой чувствительностью, работающей по принципу реакции латексной агглютинации, являются полиглицидилметакрилатные частицы с равным процентным содержанием глицидилметакрилата и этиленгликольдиметакрилата, аминированные гексаметилендиамином в среде n-пропанола, так как они обладают достаточным количеством аминогрупп, не теряют седиментационных свойств после всех стадий синтеза.

Ключевые слова: диагностические тест-системы, затравочная сополимеризация, латексная агглютинация, полиглицидилметакрилат, физико-химические свойства.

SYNTHESIS OF AMINE-CONTAINING POLYMERIC MICROSPHERES BY SEED COPOLYMERIZATION FOR APPLICATIONS IN BIOTECHNOLOGY

**A.V. Bakhtina^{1,@}, A.A. Sivaev¹, S.M. Levachev², S.A. Gusev³, N.A. Lobanova¹,
M.A. Lazov¹, I.A. Gritskova¹**

¹Moscow Technological University (M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow 119571, Russia

²M.V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Moscow 119899, Russia

³Federal Scientific-Clinical Center of Physico-Chemical Medicine FMBA of Russia, Moscow 119435, Russia

@Corresponding author e-mail: anna_artisyuk@mail.ru

This paper presents the results of studies of seed copolymerization of glycidyl methacrylate with ethylene glycol poly(glycidyl methacrylate) on seed particles in order to obtain partially cross-linked polymer microspheres with a diameter of about 3.5 microns for use in immunochemical reactions, as carriers of bioligands. The physico-chemical properties of polymeric microspheres obtained under different conditions were studied by the following methods: the diameters of the particles – by electron scanning and light microscopy; the wetting angle – by the method of "lying droplets"; the sedimentation velocity – by the macromethod in a capillary tube by the movement of the (polymer slurry)/water phase boundary (buffer solution); the zeta-potential – by dynamic light scattering. Having studied the physical-chemical properties of all polymer slurries we concluded that the optimal particles to create on the basis of their diagnostic test systems with high sensitivity working on the principle of latex agglutination reaction are poly(glycidyl methacrylate) particles with equal percentage of glycidyl methacrylate and ethylene glycol dimethacrylate aminated with hexamethylenediamine in the environment of n-propanol, because they have a sufficient number of amino groups and do not lose their sedimentation properties after all stages of the synthesis.

Keywords: diagnostic test systems, seed copolymerization, latex agglutination, poly(glycidyl methacrylate), physico-chemical properties.

Введение

Затравочная полимеризация является наиболее общим и удобным методом получения композиционных полимерных частиц с самой разнообразной морфологией. В основе этого метода лежит разделение процесса синтеза композиционных полимерных частиц на кинетически независимые стадии. На первой стадии любым методом гетерофазной полимеризации (эмульсионной, суспензионной, дисперсионной, полимеризацией в отсутствие эмульгатора и т.д.) синтезируют исходную полимерную суспензию (затравку), частицы которой обычно состоят из полимера одного вида. Эти частицы являются центрами полимеризации на второй стадии синтеза композиционных полимерных частиц путем затравочной полимеризации. На этой стадии к синтезированным затравочным частицам добавляют мономер (или смесь мономеров), выдерживают систему до равновесного набухания частиц мономером, а затем добавляют стабилизатор, инициатор, другие целевые компоненты и проводят полимеризацию. При этом условия полимеризации подбирают таким образом, чтобы исключить образование новых частиц, т.е. чтобы полимеризация протекала исключительно в частицах затравки.

Для улучшения свойств полимерных частиц, образующихся при дисперсионной полимеризации, при затравочной полимеризации используют их сшивку различными сшивающими агентами. Одним из таких сшивающих агентов, используемых при полимеризации глицидилметакрилата (ГМА), является этиленгликольдиметакрилат (ЭГДМА), который при полимеризации в полярной среде выступает в роли сомономера и сшивающего агента [1]. Считают [2], что чем выше концентрация ЭГДМА, тем больше частицы имеют правильную сферическую форму из-за увеличения их жесткости. Отмечают, что начиная с концентрации ЭГДМА, равной 10%, образуются полимерные суспензии с узким распределением по размерам.

В данной работе изучена затравочная сополимеризация глицидилметакрилата с этиленгликольдиметакрилатом на затравочных полиглицидилметакрилатных (ПГМА) частицах с целью получения частично сшитых полимерных микросфер с диаметром порядка 3.5–5 мкм для их использования в иммунохимических реакциях в качестве носителей биолигандов.

Выбор диаметра полимерных микросфер был сделан на основании данных подробного изучения кинетики и топохимии реакции пассивной гемагглютинации, выполненных в работах [3–5]. Согласно этим исследованиям, критерием выбора природы полимера и размера полимерных микросфер является скорость их седиментации. Определение скорости седиментации полимерных микросфер проводили по методике, принятой для оценки скорости седиментации эритроцитов. Было показано, что для замены эритроцитов полимерными микросферами их скорость седиментации должна находиться в диапазоне 3–8 мм/ч; была получена зависимость скорости седиментации частиц от их диаметров и плотности полимера [6]. Для полиглицидилметакрилатных микросфер (плотность 1.150–1.170 г/см³) при замене эритроцитов их диаметр должен находиться в диапазоне от 3.5 до 5 мкм.

Предварительные расчеты показали, что для получения полимерных микросфер с диаметром от 3.5 до 5 мкм необходимо иметь затравочные полимерные частицы с диаметром от 1.8 до 2.5 мкм соответственно и правильно выбранное объемное соотношение мономер/затравочные частицы.

Экспериментальная часть

Исходные вещества

Глицидилметакрилат – очищенный технический продукт, $d_4^{20} = 1.076$ г/см³, $n_d^{20} = 1.4505$;

Этанол фирмы «СпиртМед», 96%;

Диоктилсульфосукцинат натрия (АОТ) фирмы Sigma Aldrich, CAS 577-11-7, 99%;

Поливинилпирролидон (ПВП) фирмы Sigma Aldrich, K30, $M_w = 40000$, CAS 25249-54-1, 99%;

Динитрил азоизомасляной кислоты (ДАК), $M_w = 164.21$ г/моль, предварительно очищали перекристаллизацией из метанола. Массовая доля вещества не менее 98%;

Этиленгликольдиметакрилат (ЭГДМА) фирмы Bisomer, $n_d^{20} = 1.4553$ -1.4563, $d_4^{20} = 1.051$ г/см³, CAS № 97-90-5, 98.4%;

Перекись бензоила фирмы Люперокс А75, 76.5%;

Поливиниловый спирт (ПВС) – имеет формулу $[-CH_2-CH(OH)-]_n$, Mowiol 40-88, $M_w \sim 205000$ г/моль. В работе использовали продукт фирмы Sigma Aldrich;

Этилендиамин фирмы Acros Organics, 99%, CAS 107-15-3;

Гексаметилендиамин фирмы Acros Organics, 99.5%, CAS 124-09-4;

Фосфатно-солевой буферный раствор – получали из PBS Tablets, Phosphate Buffered Saline, Biotechnology Grade – «Helicon» (Россия);

Твин 20 – Tween 20, Polyoxyethylene-20-sorbitan monolaurate, Reagent Grade – «Helicon» (Россия);

Дистиллированная вода – использовали воду, полученную с помощью аквадистиллятора ДЭ-25 фирмы ООО «Завод «Электромедоборудование» (Россия);

Толуол для спектроскопии фирмы «Рехим» (Россия);

Карбодимид ((CH₃)₂N-(CH₂)₃-N=C=N-C₂H₅·HCl) N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride, purum, ≥ 98.0% (AT) фирмы «Sigma-Aldrich» (Германия);

Дифтерийный анатоксин – очищенный концентрированный дифтерийный анатоксин – ОАО «Биомед» им. И.М. Мечникова (Россия);

Контрольная противодифтерийная сыворотка – сыворотка противодифтерийная лошадиная очищенная концентрированная жидкая с активностью 10 МЕ/мл – НПО «Микроген» (Россия).

Методы исследования

Дисперсионная полимеризация ГМА

В круглодонном реакторе в спиртовой среде при 40 °С одновременно растворяли поливинилпирролидон (ПВП) и диоктилсульфосукцинат натрия (АОТ) до образования гомогенного раствора. После полного растворения компонентов системы температуру поднимали до 50 °С, вводили мономер с растворенным в нем инициатором (ДАК). Затем температуру поднимали согласно температурному профилю со скоростью 0.5 °С/мин и удерживали при этом значении 1 ч. При нуклеации прозрачная гомогенная реакционная смесь начинала опалесцировать и со временем становилась молочно-белой вследствие образования полимерной фазы.

При проведении полимеризации концентрацию спирта изменяли в диапазоне 20–40% об., концен-

трация глицидилметакрилата составляла 20% об. В качестве инициатора использовали ДАК при концентрации 3% мас. в расчете на мономер, стабилизаторов – АОТ – 2.6% мас. в расчете на дисперсионную среду, ПВП – 3% мас. в расчете на дисперсионную среду. В качестве растворителей использовали спирты с различной длиной углеводородного радикала.

Затравочная полимеризация

Затравочная полимеризация на ПГМА-микросферах изначально задумывалась как способ получения сшитого сополимера глицидилметакрилата. Мономерная фаза состояла из глицидилметакрилата (ГМА) и этиленгликольдиметакрилата (ЭГДМА), взятых в объемном соотношении 1:1, а также инициатора - перекиси бензоила (ПБ), взятого в количестве 1% к мономерной фазе. Таким образом были получены полимерные частицы со средним диаметром 3.6 мкм состава 50% ГМА–50% ЭГДМА.

Методика проведения затравочной полимеризации была следующей. В круглодонный реактор помещали затравочные частицы, диспергированные в 1%-ом растворе поливинилового спирта (ПВС). Далее при перемешивании добавляли мономерную фазу с предварительно растворенным в ней инициатором, затем температуру в реакторе поднимали до 50 °С. Затравочные частицы полностью поглощали мономерную фазу в течение 30 мин. Далее к реакционной смеси добавляли еще 1 мл раствора ПВС, температуру в реакторе поднимали до 82 °С и поддерживали в течение 3 ч. Полученную суспензию промывали водой 5 раз для удаления стабилизатора на фильтре Шотта. Изучение кинетики набухания проводили при порционном добавлении мономерной фазы к суспензии микросфер.

Определение размеров частиц

Микрофотографии полимерных частиц были получены на электронном сканирующем микроскопе «S-570» фирмы «Hitachi» (Япония), при ускоряющем напряжении 15 кВ. Подготовку образцов производили путем нанесения водной суспензии частиц с концентрацией 0.1% мас. на металлический столик, сушки образцов в течение суток и нанесения платино-паладиевого слоя толщиной 100 Å на приборе «Eiko IB-3» (Япония).

Размеры частиц оценивали и методом динамического светорассеяния. Для этого готовили 0.1% водную суспензию полимерных частиц, которую исследовали на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZS фирмы «Malvern» (Великобритания).

При определении размера частиц полимерных суспензий методом световой микроскопии использовали фотографии полимерной суспензии, полученные на световом микроскопе Motic B Series, оснащенном цветной видеокамерой KY-F32. Для этого на предметное стекло микроскопа наносили 0.1% суспензию частиц. Анализ полученных фотографий

проводили с помощью программы «ImagePro-Plus 6.0». Статистическую обработку данных проводили в программе «Microsoft Excel».

Определение скорости седиментации полимерных микросфер макрометодом в капиллярах

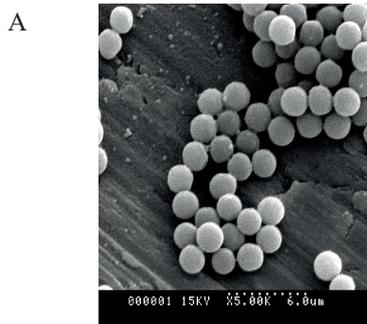
Приготовили 2 мл суспензии полистирольных и полиглицидилметакрилатных частиц в дистиллированной воде с конечной концентрацией частиц 0.2% мас. Скорость седиментации определяли макрометодом в капилляре. Фотографировали капилляр каждые 30 мин. Скорость седиментации определяли по движению границы раздела фаз полимерная суспензия/вода.

Определение краевого угла смачивания методом «лежащей капли»

Полимерные частицы высушивали, растворяли в толуоле. Полученный раствор наносили на предметное стекло, распределяя раствор в виде тонкой пленки с размерами 2×2 см. Далее предметное стекло высушивали до полного испарения толуола. Фотографировали профиль капли. Полученное изображение профиля капли обрабатывали на компьютере.

Методика создания диагностической тест-системы на основе полиглицидилметакрилатных микросфер

Водные суспензии (4%-ые) полиглицидилметакрилатных частиц со средним диаметром 3.5 мкм, трижды отмытые дистиллированной водой путем замены супернатанта после центрифугирования, смешивали с водным раствором карбодиимида с концентрацией 10 мг/мл в соотношении объемов 10:1 и инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании на шейкере. После их трижды отмывали дистиллированной водой и переводили в фосфатно-солевой буфер (PBS). После этого их инкубировали с раствором дифтерийного анатоксина в фосфатно-солевом буфере в течение 24 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. По окончании реакции полимерные суспензии трижды отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и использовали в дальнейшем в качестве теста.



Постановка и учет результатов реакции латексной агглютинации

Реакцию латексной агглютинации (РЛА) проводили в полистирольном планшете на 96 U-образных лунок. Латексный диагностикум разводили до 0.4%-ной концентрации фосфатно-солевым буферным раствором, содержащим 0.2% Твина 20. В каждую лунку вносили по 0.050 мл фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего 0.2% Твин 20. В первую лунку вносили 0.050 мл испытуемой сыворотки, разбавленной в требуемое количество раз, и проводили раститровку вплоть до 6-ой лунки, откуда 0.050 мл удаляли. Вносили в каждую лунку по 0.050 мл разбавленного диагностикума. 7-ая и 8-ая лунки служили контролем диагностикумов на отсутствие спонтанной агглютинации.

Иммунологический планшет оставляли на ровной поверхности при комнатной температуре, исключая его перемещение. Учет результатов РЛА проводили через 3–4 ч после постановки реакции (допускался учет реакции через 18–22 ч). За титр испытуемой сыворотки принимали последнее разбавление, дающее агглютинацию полимерных частиц «на три креста» («+++»). Реакция в контрольных лунках на отсутствие спонтанной агглютинации диагностикума должна была быть отрицательной.

Результаты и их обсуждение

Для получения затравочных полиглицидилметакрилатных частиц осуществляли дисперсионную полимеризацию ГМА. Надо отметить, что с момента нуклеации течение полимеризации зависит от температурного профиля проведения процесса. Варьируя количество стационарных температурных точек, можно в значительной степени влиять на дисперсный состав конечной дисперсии [7–10]. Дисперсионную полимеризацию ГМА проводили при плавном регулировании температуры на начальной стадии процесса в присутствии динитрила азоизомаляной кислоты (ДАК) (3% мас.), диоктилсульфосукцината натрия (АОТ) (2.6% мас.), поливинилпирролидона (ПВП) (3% мас.) в этаноле при температуре 72 °С. Концентрация ГМА составляла 20% об., количество воды 0–5% об. Электронная микрофотография полученной полимерной дисперсии и гистограмма распределения частиц по размерам (РЧР) приведены на рис. 1. Видно, что полимерная суспензия характеризу-



Рис. 1. Электронная микрофотография (А) и гистограмма распределения по размерам (Б) частиц, полученных при дисперсионной полимеризации глицидилметакрилата, при концентрации мономера 20% об. в этаноле.

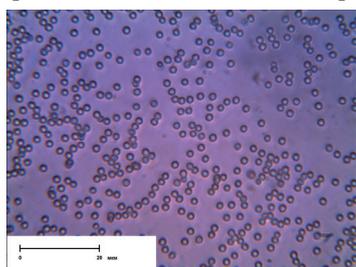
ется узким распределением частиц по размерам и среднечисловым диаметром частиц, равным 1.8 мкм.

Полученные затравочные полиглицидилметакрилатные частицы набухали смесью мономеров ГМА и ЭГДМА, взятых при двух объемных соотношениях, равных 1:1 и 9:1. Массовое соотношение затравочные частицы/мономеры изменяли в широком интервале значений: от 1:1 до 1:20. Предельное равновесное набуха-

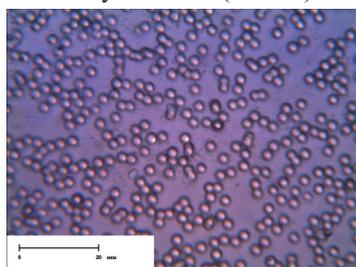
ние затравочных частиц мономерами при их объемном соотношении, равном 1:1, наблюдалось при массовом соотношении затравочные частицы/мономеры, равном 1:8, а при объемном соотношении ГМА:ЭГДМА, равном 9:1 – соответственно 1:15.

При повышении содержания мономеров наблюдалось образование в дисперсионной среде новых частиц и распределение частиц по размерам становилось широким (рис. 2).

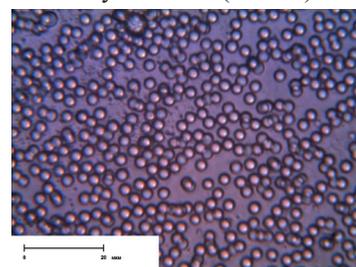
Исходные затравочные полиглицидилметакрилатные частицы



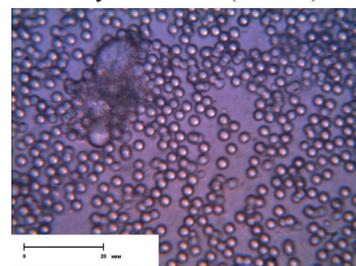
Набухание 1:4 (20 мин)



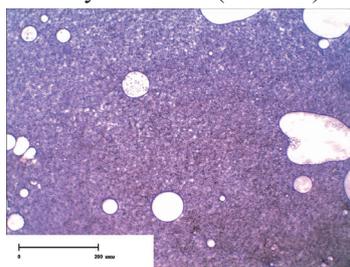
Набухание 1:8 (40 мин)



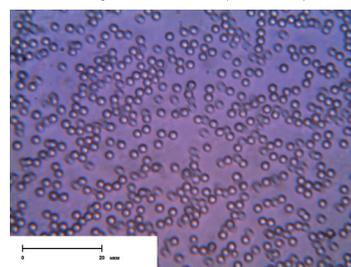
Набухание 1:12 (80 мин)



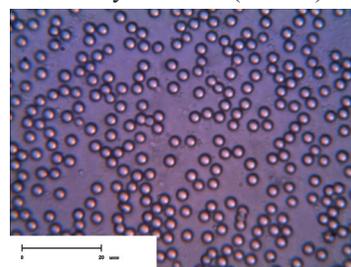
Набухание 1:20 (120 мин)



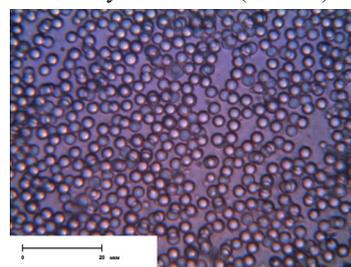
Набухание 1:2 (10 мин)



Набухание 1:6 (30 мин)



Набухание 1:10 (60 мин)



Набухание 1:15 (100 мин)

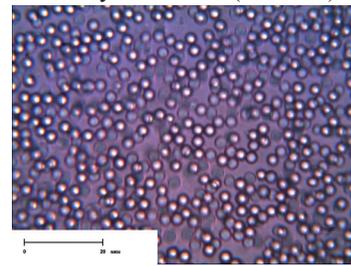


Рис. 2. Кинетика набухания затравочных полиглицидилметакрилатных частиц смесью мономеров ГМА и ЭГДМА на примере смеси с концентрацией ЭГДМА, равной 10% мас.

Затравочную сополимеризацию ГМА и ЭГДМА проводили в присутствии перекиси бензоила (ПБ) в качестве инициатора, поливинилового спирта (ПВС) в качестве стабилизатора.

Были синтезированы затравочные сополимерные суспензии ГМА/ЭГДМА при разном массовом содержании ЭГДМА (5, 25, 50 и 75%). Диаметры всех синтезированных полимерных микросфер и их рас-

пределение по размерам отличались незначительно. На рис. 3 в качестве примера показаны электронная микрофотография частиц, полученных затравочной сополимеризацией ГМА и ЭГДМА при концентрации ЭГДМА, равной 50% мас., и гистограмма РЧР.

Сополимерные микросферы модифицировали первичными диаминами – гексаметилендиамином (ГМДА) и этилендиамином (ЭДА) (рис. 4).

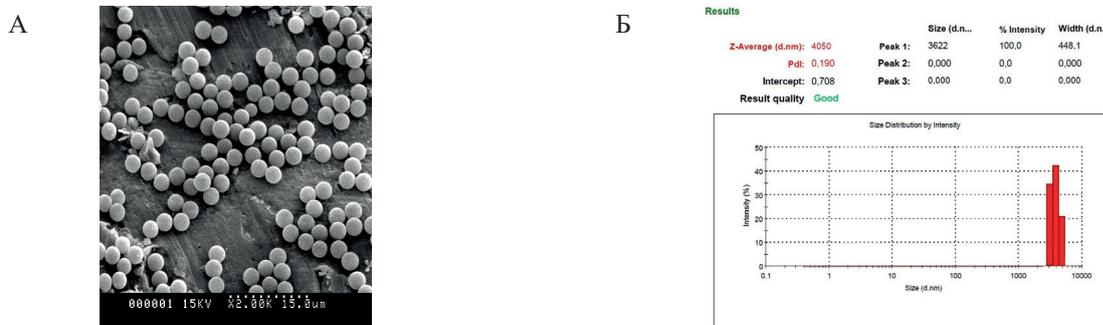


Рис. 3. Электронная микрофотография (А) и гистограмма распределения по размерам (Б) частиц, полученных затравочной сополимеризацией ГМА и ЭГДМА, при концентрации ЭГДМА, равной 50% мас.

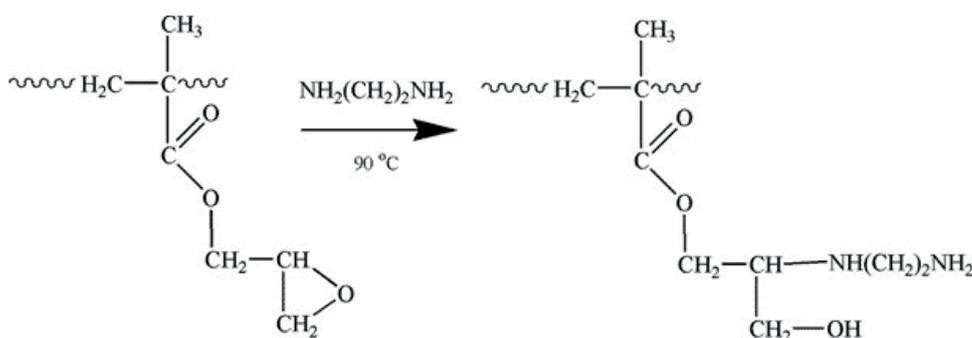


Рис. 4. Схема аминирования эпокси-групп полиглицидилметакрилатных микросфер этилендиамином.

В первом случае (при аминировании ГМДА) полимерные микросферы и раствор ГМДА в *n*-пропиловом спирте загружали в реактор и смесь выдерживали 2 ч при перемешивании, температуре 90 °С, затем охлаждали, промывали на фильтре Шотта водой. Состав исходной реакционной смеси представлен в табл. 1.

Таблица 1. Рецепт аминирования полимерных микросфер

Компонент	Навеска, г
Полимерные микросферы	10
Гексаметилендиамин	30
<i>n</i> -Пропанол	30

При аминировании полимерных микросфер ЭДА в реактор загружали полимерные частицы, добавляли 4-х-кратный избыток ЭДА и выдерживали при температуре 90 °С в течение 2 ч.

Для определения количества аминогрупп в полимерных микросферах использовали элементный анализ и электронную спектроскопию для химиче-

ского анализа (ЭСХА). Результаты элементного анализа приведены в табл. 2. Видно, что аминирование ПГМА-микросфер протекает достаточно эффективно, причем с увеличением содержания ЭГДМА содержание азота в сополимере несколько снижается.

Физико-химические свойства сополимерных модифицированных микросфер приведены в табл. 3.

Таблица 2. Данные элементного анализа ПГМА-микросфер, модифицированных ЭДА

Тип частиц	N, %	Общее содержание аминогрупп в сополимере, %
ПГМА-5% ЭГДМА-NH ₂ (ЭДА)	15.75±0.05	81
ПГМА-25% ЭГДМА-NH ₂ (ЭДА)	10.82±0.05	60
ПГМА-50% ЭГДМА-NH ₂ (ЭДА)	5.72±0.05	40
ПГМА-75% ЭГДМА-NH ₂ (ЭДА)	3.05±0.05	20

Таблица 3. Коллоидно-химические свойства ПГМА-суспензий, модифицированных ЭДА

Тип частиц	Диаметр частиц, мкм	ξ-потенциал, мВ	Угол смачивания, град.	Скорость седиментации, мм/ч	Плотность осадка частиц после седиментации
ПГМА-5% ЭГДМА-NH ₂ (ЭДА)	4.5±0.1	+20.1±0.1	0	6.4±0.3	рыхлый осадок
ПГМА-25% ЭГДМА-NH ₂ (ЭДА)	4.1±0.1	+19.3±0.1	0	5.2±0.4	рыхлый осадок
ПГМА-50% ЭГДМА-NH ₂ (ЭДА)	4.1±0.1	+17.1±0.1	0	4.8±0.4	рыхлый осадок
ПГМА-75% ЭГДМА-NH ₂ (ЭДА)	4.1±0.1	+16.7±0.1	0	4.6±0.5	рыхлый осадок

Видно, что все аминированные этилендиамином полимерные микросферы характеризуются гидрофильной поверхностью (угол смачивания близок к 0°) и близкими значениями скорости седиментации. При повышении содержания ЭГДМА в сополимере величина ξ-потенциала частиц практически не изменяется, а содержание аминогрупп уменьшается, видимо, из-за увеличения степени сшивания полимерных цепей. Полимерные частицы, модифицированные ЭДА, во всех случаях седиментируют с образованием рыхлого осадка, что, видимо, связано с формированием на поверхности частиц гидрогеля из-за гидратации поверхностных групп и групп, находящихся в приповерхностном слое. В результате контакта частиц, покрытых гидрогелем, в процессе их седиментации формируется осадок, характеризующийся невысокими значениями энергии взаимодействия между частицами. В результате происходит частичная пепти-

зация осадка, он становится легкоподвижным, и можно визуально фиксировать легкость его взмучивания. Элементный анализ показал, что в этих полимерных частицах содержание аминогрупп большое, поверхность частиц лиофильна (угол смачивания равен 0°).

При замене этилендиамина на гексаметилендиамин увеличение длины углеводородного радикала в молекуле диамина обеспечивает распределение аминогрупп между приповерхностным слоем полимерной частицы и близлежащим объемом. Это означает, что содержание полярных групп в приповерхностном слое полимерных микросфер снижается, что приводит к уменьшению степени гидратации поверхностного слоя, увеличению угла смачивания и образованию плотного осадка при их седиментации.

Влияние среды, в которой протекает аминирование, на свойства полимерных микросфер, модифицированных ГМДА, показано в табл. 4.

Таблица 4. Коллоидно-химические свойства ПГМА-суспензий, модифицированных ГМДА в водной и спиртовой средах

Тип частиц [среда]	Диаметр частиц, мкм	ξ-потенциал, мВ	Угол смачивания, град.	Скорость седиментации, мм/ч	Плотность осадка частиц после седиментации
ПГМА-5% ЭГДМА-NH ₂ (ГМДА) [водн.]	3.5±0.1	+1.6±0.1	3.0±1	6.1±0.3	рыхлый осадок
ПГМА-25% ЭГДМА-NH ₂ (ГМДА) [водн.]	3.0±0.1	+2.9±0.1	20.0±1	6.7±0.3	плотный осадок
ПГМА-50% ЭГДМА-NH ₂ (ГМДА) [водн.]	3.5±0.1	+1.7±0.1	25.1±1	6.0±0.4	плотный осадок
ПГМА-75% ЭГДМА-NH ₂ (ГМДА)-[водн.]	3.5±0.1	+1.0±0.1	22.0±1	5.9±0.5	плотный осадок
ПГМА-5% ЭГДМА-NH ₂ (ГМДА) [спирт.]	3.5±0.1	+2.0±0.1	0	6.0±0.3	рыхлый осадок
ПГМА-25% ЭГДМА-NH ₂ (ГМДА) [спирт.]	3.5±0.1	+22.5±0.1	31.2±1	6.5±0.4	менее плотный осадок
ПГМА-50% ЭГДМА-NH ₂ (ГМДА) [спирт.]	3.5±0.1	+15.6±0.1	47.2±1	6.2±0.5	плотный осадок
ПГМА-75% ЭГДМА-NH ₂ (ГМДА) [спирт.]	3.5±0.1	+2.9±0.1	30.4±1	6.3±0.5	плотный осадок

Результаты, представленные в табл. 4, показывают, что гидрофильность поверхности полимерных микросфер зависит от содержания ЭГДМА в сополимере. Это связано с уменьшением числа эпокси-групп, способных к реакции присоединения диаминов. При содержании 5% мас. ЭГДМА в сополимере при синтезе частиц в водной и спиртовой среде угол смачивания равен 3° и 0° соответственно, поверхность полимерных микросфер гидрофильна и при их седиментации образуется рыхлый осадок.

Данные элементного анализа аминированных ГМДА полиглицидилметакрилатных микросфер приведены в табл. 5 и показывают, что содержание аминогрупп в ПГМА-микросферах, аминированных ГМДА в спирте, выше, чем в полимерных микросферах аналогичного мономерного состава, аминированных ГМДА в водной среде.

Таблица 5. Данные элементного анализа ПГМА-микросфер, модифицированных ГМДА в водной и спиртовой средах

Тип частиц [среда]	N, %	Общее содержание аминогрупп в сополимере, %
ПГМА-5% ЭГДМА-NH ₂ (ГМДА) [водн.]	4.86±0.05	24
ПГМА-25% ЭГМА-NH ₂ (ГМДА) [водн.]	3.12±0.05	21
ПГМА-50% ЭГМА-NH ₂ (ГМДА) [водн.]	1.65±0.05	10
ПГМА-75% ЭГМА-NH ₂ (ГМДА)[водн.]	0.76±0.05	5
ПГМА-5% ЭГДМА-NH ₂ (ГМДА) [спирт.]	9.30±0.05	48
ПГМА-25% ЭГМА-NH ₂ (ГМДА) [спирт.]	4.00±0.05	30
ПГМА-50% ЭГМА-NH ₂ (ГМДА) [спирт.]	3.61±0.05	24
ПГМА-75% ЭГМА-NH ₂ (ГМДА) [спирт.]	1.49±0.05	10

Полимерные микросферы были апробированы в реакции латексной агглютинации (РЛА). В качестве биолганда использовали дифтерийный анатоксин. Реакцию активации проводили при температуре 4-6 °C и pH 6-7 в течение 2-4 ч в присутствии водорастворимого карбодимида.

Обнаружено, что поведение полимерных микросфер в РЛА зависит от условий их модификации

Список литературы:

1. Cao K., Yu J., Li B.-G., Li B.-F., Pan Z.-R. Micron-size uniform poly(methyl methacrylate) particles by dispersion polymerization in polar media: 1. Particle size and particle size distribution //Chem. Eng. J. 2000. V. 78. Iss. 2-3. P. 211-215.

диаминами. Полимерные микросферы, аминированные ЭДА, были неустойчивы в фосфатно-солевом буфере, и создать диагностическую тест-систему на их основе не удалось. Полимерные микросферы, модифицированные ГМДА, содержали меньшее количество аминогрупп в поверхностном слое частиц, и их агрегативная устойчивость зависела от объемного соотношения мономеров.

Так, сополимерные суспензии, содержащие 75% мас. ЭГДМА и 25% мас. ГМА, были агрегативно устойчивы, но содержание аминогрупп на поверхности частиц было невысоким, а сополимерные суспензии, содержащие 25% мас. ЭГДМА и 75% мас. ГМА, были агрегативно неустойчивы, и только при равном процентном содержании сомономеров в сополимерной цепи агрегативная устойчивость сополимерной суспензии была высокой. В этом случае содержание азота в сополимере по данным элементного анализа и ЭСХА практически совпадают и составляют соответственно 3.6 и 3.8%.

При проведении РЛА с использованием вместо эритроцитов полимерных микросфер, содержащих в сополимере разное количество ЭГДМА, было показано, что высокую чувствительность имеют диагностические тесты, полученные с использованием сополимерных микросфер, имеющих равное процентное содержание ГМА и ЭГДМА.

Заключение

Таким образом, в ходе исследований удалось показать, что аминоксодержащие полимерные микросферы могут быть использованы в качестве биолгандов при содержании аминогрупп на поверхности частиц в пределах от 15 до 50% мол. При больших концентрациях аминогрупп происходит избыточная гидрофилизация поверхности частиц, которая не позволяет провести иммобилизацию антигена. При меньшем содержании первичных аминогрупп полимерные суспензии неустойчивы. Такое содержание аминогрупп обеспечивает величину краевого угла смачивания от 10° и выше и седиментацию частиц с образованием плотного осадка.

Показано, что полиглицидилметакрилатные микросферы со средним диаметром 3.5 мкм, содержащие 50% мас. ГМА и 50% мас. ЭГДМА, модифицированные гексаметилендиамином, соответствуют требованиям, которые позволяют их использовать в качестве носителей биолгандов.

References:

1. Cao K., Yu J., Li B.-G., Li B.-F., Pan Z.-R. Micron-size uniform poly(methyl methacrylate) particles by dispersion polymerization in polar media: 1. Particle size and particle size distribution //Chem. Eng. J. 2000. V. 78. Iss. 2-3. P. 211-215.

2. Kim J.-W., Suh K.-D. Highly monodisperse crosslinked polystyrene microparticles by dispersion polymerization // *Colloid and Polymer Science*. 1998. V. 276. Iss. 10. P. 870–878.

3. Волкова Е.В., Грицкова И.А., Гусев С.А., Лукашевич А.Д., Гусев А.А., Левшенко Е.Н., Злыднева Л.А., Сочилина К.О. Разработка полимерных микросфер для иммунофлуоресцентного анализа // *Биотехнология*. 2012. № 4. С. 74–77.

4. Волкова Е.В., Лукашевич А.Д., Левачева И.С., Левачев С.М., Гусев С.А., Грицкова И.А. Выбор полимерных микросфер для проведения реакции латексной агглютинации в плащечном формате // *Вестник МИТХТ*. 2013. Т. 8. № 6. С. 68–72.

5. Прокопов Н.И., Грицкова И.А., Черкасов В.Р., Чалых А.Е. Синтез монодисперсных функциональных полимерных микросфер для иммунодиагностических исследований // *Успехи химии*. 1996. Т. 65. № 2. С. 178–192.

6. Санджиева А.В., Бахтина А.В., Сиваев А.А., Басырева Л.Ю., Гусев С.А., Грицкова И.А. Пути повышения специфичности реакции латексной агглютинации // *Тонкие химические технологии*. 2016. Т. 11. № 2. С. 17–22.

7. Paine A.J. Dispersion polymerization of styrene in polar solvents. A simple mechanistic model to predict particle size // *Macromolecules*. 1990. V. 23. № 12. P. 3109–3117.

8. Paine A.J., Luymes W., McNulty J. Dispersion polymerization of styrene in polar solvents. 6. Influence of reaction parameters on particle size and molecular weight in poly(N-vinylpyrrolidone)-stabilized reactions // *Macromolecules*. 1990. V. 23. № 12. P. 3104–3109.

9. Kawaguchi S., Winnik M.A., Ito K. Dispersion copolymerization of N-butylmethacrylate with poly(ethylene oxide) macromolecules in methanol-water – Comparison of experiment with theory // *Macromolecules*. 1995. V. 28. № 4. P. 1159–1166.

10. Tseng C.M., Lu Y.Y., El Aasser M.S., Vanderhoff J.W. Uniform polymer particles by dispersion polymerization in alcohol // *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* 1986. V. 24. № 11. P. 2995–3007.

2. Kim J.-W., Suh K.-D. Highly monodisperse crosslinked polystyrene microparticles by dispersion polymerization // *Colloid and Polymer Science*. 1998. V. 276. Iss. 10. P. 870–878.

3. Volkova E.V., Gritskova I.A., Gusev S.A., Lukashevich A.D., Gusev A.A., Levshenko E.N., Zlydnev L.A., Sochilina K.O. Development of polymeric microspheres for immunofluorescence analysis // *Biotechnologiya (Biotechnology)*. 2012. № 4. P. 74–77. (in Russ.).

4. Volkova E.V., Lukashevich A.D., Levichev I.S., Levachev S.M., Gusev S.A., Gritskova I.A. Selection of polymeric microspheres for carrying out the latex agglutination reaction in the spot format // *Vestnik MITHT (Fine Chemical Technologies)*. 2013. T. 8. № 6. P. 68–72. (in Russ.).

5. Prokopov N.I., Gritskova I.A., Cherkasov V.R., Chalykh A.E. Synthesis of monodisperse functional polymeric microspheres for immunodiagnostics research // *Uspekhi khimii (Russian Chem. Rev.)*. 1996/ V. 65. № 2. P. 178–192. (in Russ.).

6. Sandzhiyeva A.V., Bakhtin V.A., Sivaev A.A., Batyreva L.Y., Gusev S.A., Gritskova I.A. Ways to improve specificity of the latex agglutination reaction // *Tonkie khimicheskie tekhnologii (Fine Chemical Technologies)*. 2016. V. 11. № 2. P. 17–22. (in Russ.).

7. Paine, A.J. Dispersion polymerization of styrene in polar solvents. A simple mechanistic model to predict particle size // *Macromolecules*. 1990. V. 23. № 12. P. 3109–3117.

8. Paine A. J., Luymes W., McNulty J. Dispersion polymerization of styrene in polar solvents. 6. Influence of reaction parameters on particle size and molecular weight in poly(N-vinylpyrrolidone)-stabilized reactions // *Macromolecules*. 1990. V. 23. № 12. P. 3104–3109.

9. Kawaguchi S., Winnik M.A., Ito K. Dispersion copolymerization of N-butylmethacrylate with poly(ethylene oxide) macromolecules in methanol-water – Comparison of experiment with theory // *Macromolecules*. 1995. V. 28. № 4. P. 1159–1166.

10. Tseng C.M., Lu Y.Y., El Aasser M.S., Vanderhoff J.W. Uniform polymer particles by dispersion polymerization in alcohol // *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* 1986. V. 24. № 11. P. 2995–3007.

Об авторах:

Бахтина Анна Владимировна, аспирант кафедры химии и технологии высокомолекулярных соединений им. С.С. Медведева Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86).

Сиваев Андрей Александрович, аспирант кафедры химии и технологии высокомолекулярных соединений им. С.С. Медведева Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86).

Левачев Сергей Михайлович, доктор химических наук, доцент Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (119899, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1).

Гусев Сергей Андреевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией морфологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России» (119435, Россия, Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1А).

Лобанова Надежда Александровна, кандидат химических наук, доцент кафедры химии и технологии высокомолекулярных соединений им. С.С. Медведева Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86).

Лазов Михаил Александрович, аспирант кафедры аналитической химии им. акад. И.П. Алимарина Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86).

Грицкова Инесса Александровна, доктор химических наук, профессор кафедры химии и технологии высокомолекулярных соединений им. С.С. Медведева Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86).