



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

225010

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³

C 08 F 20/32,
C 08 F 24/00,
C 08 F 2/22,

(22) Přihlášeno 23 12 80
(21) (PV 9235-80)

(40) Zveřejněno 28 01 83

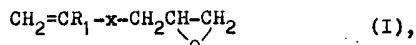
(45) Vydáno 15 02 86

(75)
Autor vynálezu

ŠVEC FRANTIŠEK ing. CSc., HŘEBEČ, BOUCHAL KAREL ing. CSc.,
ŽŮRKOVÁ EVA ing. CSc., KÁLAL JAROSLAV prof. ing. DrSc., PRAHA (ČSSR)
BATZ HANS-GEORG RNDr., TUTZING, TANSWELL PAUL PhDr.,
PLANEGG, BAIER MANFRED RNDr., PÖCKING-POSSENHOFEN (NSR)

(54) Hydrofilní latexové částice, způsob jejich přípravy

Předmětem vynálezu jsou hydrofilní latexové částice, které sestávají z homopolymeru monomeru obecného vzorce I



kde R₁ je vodík nebo methyl a x je -O- nebo -CO-O- či kopolymeru monomeru obecného vzorce I s 1 až 99 % hmot. radikálové polymerizovatelného monomeru vybraného ze skupiny zahrnující styren, divinylbenzen, alkylendiakryláty či dimethakryláty, hydroxyalkylendiakryláty či dimethakryláty, hydroxyalkylendiakryláty či dimethakryláty, hydroxyalkylakryláty či methakryláty, akryl- či dimethylakrylamidy, vinylacetát, N-vinylpyrrolidon, isopren, butadien, alkylakryláty či methakryláty a jsou ve formě stejně velkých částic sférického tvaru o průměru 0,15 až 1,5 μm.

Hydrofilní latexové částice podle vynálezu se připravují tak, že se monomer obecného vzorce I či jeho směs s jinými výše uvedenými monomery zbaví rozpuštěného kyslíku, současně se zbaví kyslíku i 8 až 16násobný objem vodního roztoku radikálového iniciátoru o koncentraci 0,5 až 1,5 g/l vody, obě složky se smísí v polymerizačním reaktoru v atmosféře inertního plynu a polymerizace nechá probíhat při teplotě 0 až 80 °C a intenzivním mícháním po dobu potřebnou k dosažení požadované konverze. Emulzní polymerace probíhá bez přidavku jakéhokoli emulgátoru nebo stabilizátoru emulze.

Vynález se týká hydrofilních latexových částic, způsobu jejich výroby a jejich použití jako nosičů biologicky nebo imunologicky aktivních substancí v diagnostických prostředcích.

Pro aglutinaci komplexu antigen - protilátka, která se využívá v imunologii v rámci mnohých diagnostických stanovení, protože může být zvláště rychle a jednoduše provedena a často pouhým okem pozorována, jsou již delší dobu používány hydrofobní latexové částice jako nosiče imunologicky aktivních látek. Tyto hydrofobní latexové částice sestávají většinou z homo- nebo kopolymerů styrenu, např. kopolymeru styren - butadien nebo kopolymerů styren-butadien-akrylonitril (ABS) a připravují se emulzní polymerací.

Při již dlouho známé emulzní polymeraci se vychází obecně ze čtyř komponent: ve vodě omezeně rozpustného monomeru nebo směsi ve vodě omezeně rozpustných monomerů, vody, emulgátoru a vodorozpustného iniciátoru. Monomer se přitom prostřednictvím emulgátoru emulguje do formy jemných kapek, přičemž se vzájemným spojením většího počtu molekul tvoří, kromě jiného, větší micely, které jsou z části prázdné a z části naplněny monomerními molekulami; poslední se označuje jako solubilizace monomerů. Vodorozpustný iniciátor tvoří radikály, které mohou vyvolat popř. aktivovat polymerizaci jak jednotlivých molekul monomeru ve vodní fázi, tak monomerním naplněných micel, tak i kapek monomeru. Ve skutečnosti probíhá ale polymerizace převážně v nabotnalých micelách, neboť na jedné straně je koncentrace monomeru v micelách podstatně větší než jednotlivých monomerních molekul rozpuštěných v okolí micel a na druhé straně pak je pravděpodobnost aktivace micel s ohledem na jejich velký počet ve srovnání s monomerními kapkami výrazně vyšší. Průměr naplněných micel se během polymerizace zvětšuje, až dojde k jejich změně na kulovité latexové částice. Polymerizací v micelě spotřebováváný monomer se přitom doplňuje z monomerních kapek difúzním transportem přes vodní roztok. Molekuly emulgátoru z neaktivovaných micel a z povrchu spotřebovaných monomerních kapek pokrývají povrch latexových částic a tak přispívají ke stabilizaci vznikající polymerní disperze.

Tyto latexy, vyráběné za přítomnosti emulgátoru nebo stabilizátoru emulze, kterými mohou být např. tenzidy, mají následující nevýhody, které vadí zejména při jejich použití jako nosičů imunologicky aktivních substancí a brání jejich použití v kontinuálních roztokových měřicích systémech:

1. Na hydrofobním povrchu latexové částice se váží vedle požadovaných imunologicky aktivních látek např. protilátek nespecificky četné jiné složky séra.

2. imunologicky aktivní látky, které jsou absorpčně a nikoliv kovalentně navázány, se mohou v průběhu diagnostického testu opět oddělit,

3. tenzidy použité při emulzní polymeraci jako emulgátory nebo stabilizátory emulze mohou ničit strukturu a tím i aktivitu biologicky aktivních proteinů, neboť difundují do vodního roztoku,

4. odstraněním stabilizujícího tenzidu koaguluje latexová suspenze podobně jako může dojít k destabilizaci odstřeďováním. Přitom vznikající sraženina může být je velmi těžko nebo vůbec ne opětovně resuspendována do původního stavu.

K odstranění těchto nedostatků byly již navrženy různé způsoby, které však umožňují vždy řešit jen část dříve uvedených:

Tak jsou známy podle DAS 2 203 377 hydrofobní latexové částice o velikosti od 0,01 do 0,9 μm z karboxylovaných styren-butadienových kopolymerů, které mohou být použity jako serologicky inertní nosiče biologicky aktivních proteinů, přičemž se proteiny váží na nosič kovalentně, a to prostřednictvím do latexu zavedených karboxylových skupin za vzniku amidických vazeb.

Z DOS 2 812 845 jsou známy hydrofobní latexy s velikostí částic od 0,05 do 1 μm z kopolymerů ABS, v nichž je latex rovněž modifikován karboxylovými skupinami a kondenzován s reaktivním bočním řetězcem, takže k němu rovněž mohou být kovalentně navázány imunologicky aktivní látky.

S těmito známými hydrofobními latexy se řeší sice problém 2. (viz výše), avšak ostatní nedostatky zůstávají beze změny.

Bylo proto rovněž vyzkoušeno namísto hydrofobních latexů použít hydrofobních gelů jako nosičů imunologicky aktivních látek. Protože hydrofilní gely nemají žádnou nebo mají jen nepatrnou absorpční schopnost, avšak na druhé straně je kovalentní vázání proteinů na takovéto gely známo, byly navrženy "mikrogely", které na základě způsobů jejich výroby a jejich velikosti částic lze rovněž označit jako "latexy". Takové latexy jsou známy např. z US patentu 4 138 383. Sestávají z kulovitých částic s průměrem menším než 0,35 μm vyráběných za podmínek emulzní polymerizace ve vodě iniciované volnými radikály, přičemž jako monomery se používají akrylamid, kyseliny akrylové a methakrylové nebo akryláty. Jako emulgátorů se používá kovových mýdel. Na takto získané hydrofilní mikrogely se váží kovalentně biologicky a/nebo imunologicky aktivní látky známým způsobem přes karbodiimid nebo glutardialdehyd. Tím se vyřeší sice problémy 1. a 2. (viz. výše), avšak nikoliv problémy 3. a 4., neboť emulzní polymerizace musí být opět provedena v přítomnosti emulgátoru nebo stabilizátoru emulze.

Tento vynález spočívá v řešení úlohy nalézt hydrofilní latexové částice a způsob jejich výroby, s nimiž by se podařilo odstranit všechny čtyři shora uvedené nedostatky. Dále spočívá zejména v řešení úkolu nalézt hydrofilní latexové částice schopné kovalentně vázat biologicky a/nebo imunologicky aktivní látky, neovlivňující strukturu a tím i aktivitu biologicky aktivních proteinů, jejichž stabilizace při odstředování nedozná změn a které lze koagulovat a následovně opět snadno resuspendovat.

Předmětem vynálezu jsou hydrofilní latexové částice, které sestávají s homopolymeru monomeru obecného vzorce I



kde R_1 je vodík nebo methyl a x je -O- nebo -CO-O či kopolymeru monomeru obecného vzorce I s 1 až 99 % hmot. radikálově polymerizovatelného monomeru vybraného ze skupiny zahrnující styren, divinylbenzen, alkylendiakryláty, hydroxyalkylendiakryláty či dimethakryláty či methakryláty, akryl- či dimethakrylamidy, vinylacetát, N-vinylpyrrolidon, isopren, butadien, alkylakryláty či methakryláty a jsou ve formě stejně velkých částic sferického tvaru o průměru 0,15 až 1,5 μm .

Hydrofilní latexové částice se vyrábějí emulzní polymerizací iniciátoru tvořícího radikály, avšak bez přídavku jakéhokoliv emulgátoru nebo stabilizátoru emulze.

Podle přednostní formy provedení vynálezu je alespoň část z monomerů, z nichž jsou latexové částice zbudovány, tvořena epoxidem obsahujícím v molekule jednu polymerizovatelnou dvojnou vazbu $\text{C}=\text{C}$.

S překvapením bylo zjištěno, že na rozdíl od mínění odborných kruhů, jež je rovněž citováno ve stavu techniky, že přídavek emulgátoru či stabilizátoru není vůbec nezbytný pro provedení emulzní polymerizace. Tím ale odpadá většinou velmi těžké a pracné odstraňování zbytků emulgátorů z polymerních latexových částic, které bylo až dosud nezbytné nutné, neboť kovová mýdla nebo tenzidy používané jako emulgátory difundovaly z latexových částic a ovlivňovaly nebo zcela zničily biologickou aktivitu proteinů kovalentně vázaných na latexové částice.

Jako mimořádně výhodné se ukázalo použití glycidylových sloučenin obsahujících minimálně jednu polymerizovatelnou dvojnou vazbu jako monomer. Struktura těchto sloučenin vykazuje hydrofobní část v místě polymerizovatelné dvojnou vazby a současně ale také hydrofilní část v podobě epoxidové skupiny, oxiranového kruhu. Podle vynálezu vzniklé latexové suspenze nekoaguluji vzdušnou nepřítomností jakéhokoli emulgátoru či stabilizátoru emulze. Stabilizace se neporuší ani odstřeďováním latexové suspenze. Protože koncové epoxidové skupiny bočních řetězců monomerních jednotek jsou lehce přístupné různým modifikacím (hydrolyza, amonolýza, aminolýza, kondenzace), musí tyto epoxidové skupiny být na povrchu částic monodisperzně distribuovaného latexu orientovány směrem do vodní fáze.

Jako monomery se podle vynálezu používají především glycidylmethakrylát, glycidylakrylát, glycidylvinylether, glycidylvinylftalát, 3,4-epoxy-1-butan. Přitom může být použit výlučně jeden z těchto monomerů, takže vznikající hydrofilní latexové částice jsou kopolymerem, avšak může být též kopolymerizována směs těchto monomerů.

K řízení obsahu epoxidových skupin mohou být s vyjmenovanými glycidylowymi skupinami kopolymerizovány také další monomery, např. styren, dieny, akrylamid, methakrylamid, alkyl-, hydroxyalkyl- a aminoalkylakryláty, alkyl-, hydroxyalkyl- a aminoalkylmethakryláty, vinyl ethery, vinylestery, N-vinylpyrrolidon a další.

Polymerizace může být provedena rovněž v přítomnosti monomerních polymerizovatelných derivátů barevných nebo fluoreskujících sloučenin, např. fluoresceinu. Tímto způsobem se získají barevné, popř. fluoreskující latexové částice, vhodné k důkazu antigenů, popř. protilátek v lidských nebo zvířecích tkáních. Tato důkazová metoda je vhodná zvláště k přípravě řezů tkání v histologii. Jako monomerní polymerizující deriváty jsou používány barevné nebo fluoreskující látky, v nichž jsou známým způsobem zabudovány methakrylové či akrylové zbytky.

Aby se snížila rozpustnost vznikajících latexových částic ve vodě, mohou být během polymerizace přidány obvyklá síťovadla, např. alkylen- nebo hydroxyalkylendiakryláty, alkylen- nebo hydroxyalkylendimethakryláty, alkylenbisakrylamidy, divinylbenzen a podobně.

Jako iniciátor může být použit každý vodorozpustný iniciátor obvykle používaný pro emulzní polymerizaci; podle vynálezu se s výhodou peroxodisulfátů, peroxoborátů, peroxidu vodíku nebo vhodných redox systémů.

Způsob bezemulgátorové emulzní polymerizace jednoho nebo více ve vodě obtížně rozpustných monomerů podle vynálezu vedoucí k hydrofilním latexovým částicím je citlivý vůči vzdušnému kyslíku, respektive kyslíku vůbec. Kyslík je proto třeba velmi pečlivě odstranit ze všech reakčních komponent a nádob buď vyvážáním nebo destilací pod inertní atmosférou nebo proháněním dusíku, argonu či jiného inertního plynu.

Bezemulgátorová emulzní polymerizace podle vynálezu se provádí s výhodou při objemovém poměru vodní a monomerní fáze v násadě od 8:1 do 16:1.

Koncentrace iniciátoru rozpuštěného ve vodní fázi obnáší s výhodou 0,5 až 1,5 g/l a koncentrace epoxidů v monomerní fázi bývá s výhodou 1 až 100 % hmot.

Emulzní polymerizace se provádí s výhodou při teplotě 0 až 80 °C. Teplota je přitom odvislá od použitého iniciátoru: při použití peroxodisulfátu draselného se pracuje převážně při 60 až 70 °C. Na volbě iniciátoru závisí rovněž doba reakce, jež činí 5 až 40 hodin.

Hydrofilní latexové částice podle vynálezu jsou přísně kulovité, monodisperzně distribuované a vzájemně přibližně stejně velké částice s průměrem od asi 0,15 do 1,5 μm. Hydrofilní latexové částice mohou po ukončené polymerizaci obsahovat zbytky nezreagovaných

monomerů, které se mohou odstranit destilací s vodní párou nebo dialýzou. Také přitom se uplatňuje zvláště výhodná vlastnost hydrofilních latexových částic podle vynálezu spočívající v tom, že latexové částice mohou sedimentovat při odstřeďování, aniž by došlo k destabilizaci, takže je lze následně opět redispergovat. Tímto způsobem může být latex podle vynálezu několikanásobně opakovaným odstřeďováním a dekantací jednoduše vyčištěn.

Koncové epoxidové skupiny bočních řetězců v latexu podle vynálezu jsou vysoce reaktivní vůči nejrozličnějším chemickým substancím.

P ř í k l a d 1

V 80 ml destilované vody se rozpustí 0,08 g peroxodvojsíranu draselného a 30 minutovým probubláváním dusíkem se z roztoku odstraní vzdušný kyslík. Současně se stejným způsobem zbaví vzdušného kyslíku 10 ml glycidylmethakrylátu. Obě komponenty se převedou do skleněného reaktoru a dalších 10 minut se probublávají dusíkem. Poté se reaktor uzavře a směs ponechá za stálého míchání 6 hodin reagovat při teplotě 65 °C. Po uplynutí této doby je konverze reakce 98 %. Reakčním produktem je latex tvořený kulovitými, monodisperzně distribuovanými částicemi polyglycidylmethakrylátu o průměru 0,44 μm.

P ř í k l a d 2

Způsobem popsaným v příkladu 1 byly odděleně zbaveny kyslíku roztok 0,08 g peroxodvojsíranu draselného ($K_2S_2O_8$) ve 160 ml vody a 10 ml směsi sestávající z 15 % hmot. glycidylmethakrylátu a 85 % hmot. styrenu, smíseny a za stálého míchání při teplotě 65 °C polymerizovány po dobu 6 hodin. Nezpolymerizované monomery byly odstraněny destilací s vodní párou. Vznikající monodisperzní latexové částice mají průměr 0,22 μm, konverze byla 71,6 %.

P ř í k l a d 3

Způsobem popsaným v příkladu 1 byla zpolymerizována směs, připravená smísením 0,1 g $K_2S_2O_8$ ve 100 ml destilované vody a 10 ml směsi, obsahující 15 % hmot. glycidylmethakrylátu a 85 % hmot. vinylacetátu. Konverze činila 80 %. Zbylé monomery byly odstraněny destilací s vodní párou. Vzniklý latex sestává z monodisperzních kulovitých částic o průměru 0,16 μm.

P ř í k l a d 4

Způsobem popsaným v příkladu 1 byla zpolymerizována násada složená z roztoku 0,1 g $K_2S_2O_8$ ve 100 ml vody (destilované) a 10 ml směsi složené z 15 % hmot. glycidylmethakrylátu a 85 % hmot. isoprenu za 24 hodin při teplotě 65 °C. Konverze reakce byla 76 %. Poté byly zbývající monomery odstraněny destilací s vodní párou. Vznikly stabilní, monodisperzní, kulovité latexové částice s průměrem 0,25 μm.

P ř í k l a d 5

Způsobem popsaným v příkladu 1 byly odděleně zbaveny kyslíku roztok 1,5 g $K_2S_2O_8$ ve 1,5 l destilované vody a 15 ml glycidylmethakrylátu zbaveného kyslíku bylo za vyloučení přístupu kyslíku kontinuálně přikapáváno do reakční nádoby po dobu 6 hodin. Poté byla polymerizace prováděna ještě dalších 30 minut. Reakční přeměna byla 85 % a vznikající částice měly průměr 1,1 μm.

P ř í k l a d 6

Způsobem popsaným v příkladu 1 byly společně polymerizovány roztok 0,1 g $K_2S_2O_8$ ve 100 ml destilované vody a 10 ml směsi složené z 1 % hmot. glycidylmethakrylátu a 99 % hmot. styrenu při teplotě 65 °C po dobu 22 hodin, přičemž vznikají hydrofilní latexové částice s průměrem 0,5 μm. Konverze byla 90 %.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Hydrofilní latexové částice, vyznačené tím, že sestávají z homopolymeru monomeru obecného vzorce I



kde R_1 je vodík nebo methyl a x je $-\text{O}-$ nebo $-\text{CO}-\text{O}-$ či kopolymeru monomeru obecného vzorce I s 1 až 99 % hmot. radikálově polymerizovatelného monomeru vybraného ze skupiny zahrnující styren, divinylbenzen, alkylendiakryláty či dimethakryláty, hydroxyalkylendiakryláty či dimethakryláty, hydroxyalkylaryláty či methakryláty, akryl- či dimethakrylamidy, vinylacetát, N-vinylpyrrolidon, isopren, butadien, alkylakryláty či methakryláty a jsou ve formě stejně velkých částic sferického tvaru o průměru 0,15 až 1,5 μm .

2. Způsob přípravy hydrofilních latexových částic podle bodu 1, vyznačený tím, že se monomer obecného vzorce I či jeho směs s jinými monomery definovanými v bodě 1 zbaví rozpuštěného kyslíku, současně se zbaví kyslíku i 8 až 16násobný objem vodního roztoku radikálového iniciátoru o koncentraci 0,5 až 1,5 g/l vody, obě složky se smísí v polymerizačním reaktoru v atmosféře inertního plynu a polymerizace se nechá probíhat při teplotě 0 až 80 °C a intenzivním mícháním po dobu potřebnou k dosažení požadované konverze.