

ФИЗИКА КОНДЕНСИРОВАННОГО СОСТОЯНИЯ ВЕЩЕСТВА

Получение полиэлектролитных микрокапсул с химически связанными и адсорбированными молекулами флуоресцеина изотиоцианата и их разрушение при лазерных воздействиях

А. Н. Баранов^{1,a}, Т. В. Букреева^{2,b}, И. В. Марченко^{2,3,c}, Г. С. Плотников^{3,d},
А. М. Салецкий^{1,e}

*Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет,
¹кафедра общей физики; ³кафедра общей физики и молекулярной электроники.
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.*

*²Институт кристаллографии имени А. В. Шубникова РАН.
Россия, 119333, Москва, Ленинский пр-т, д. 59.*

*E-mail: ^abarnov@physics.msu.ru, ^bbukreeva@ns.crys.ras.ru, ^ciramarchenko85@mail.ru,
^dplot@vega.phys.msu.ru, ^esalzky@rambler.ru*

Статья поступила 24.03.2010, подписана в печать 26.05.2011

Получены полиэлектролитные капсулы с включенными в оболочку молекулами флуоресцеина изотиоцианата. Включение в оболочку капсул молекул красителя обеспечивает возможность фотосенсибилизированного разрушения таких структур. Измерение интенсивности флуоресценции красителя, находящегося в оболочке, показало, что происходит эффективная диссипация энергии фотовозбужденных молекул окружающей органической матрицей. Суспензию капсул облучали лазером в полосе поглощения молекул флуоресцеин изотиоцианата. Измеряя распределение капсул по размерам до и после облучения лазером, было показано, что происходит разрушение капсул под действием лазерного излучения.

Ключевые слова: полиэлектролитные капсулы, красители, лазерное излучение.

УДК: 544.77:535. PACS: 78.66.Qn.

Введение

Полиэлектролитные микрокапсулы могут быть использованы для доставки лекарств, заключенных внутри их оболочки, в нужные области живых организмов [1, 2], а также для пассивации реагентов, последующего их транспорта в реакционном объеме и активизации на нужной стадии синтеза при формировании сложных молекулярных систем. Для достижения этих целей необходимо уметь создавать микрокапсулы с заданными свойствами и размерами, а затем контролируемо разрушать для освобождения их содержимого.

В наших работах изучались микрокапсулы, модифицированные молекулами органических красителей. Внедрение в структуру капсул молекул красителя приводит к возможности фотосенсибилизированного разрушения таких структур. Облучение квантами света в полосе поглощения внедренных молекул может приводить к их эффективному возбуждению и, при определенных условиях, к переносу энергии в оболочке капсулы, что может сопровождаться ее перестройкой и даже развалом [3]. Эффективность данных процессов зависит от ряда факторов: 1) от способа внедрения молекул красителей в оболочку капсулы; 2) от концентрации и типа молекул красителей; 3) от материала, из которого изготовлены капсулы; 4) от концентрации самих капсул и температуры, при которых происходит лазерное воздействие. Выяснению роли этих факторов и посвящена настоящая работа.

Исследование полиэлектролитных микрокапсул, модифицированных молекулами органических красителей,

имеет как практический интерес — оптимизировать условия разрушения таких структур, так и научный аспект, поскольку позволяет исследовать механизм переноса и диссипации энергии фотовозбужденных молекул в упорядоченных органических матрицах.

Методика экспериментов

В работе были использованы следующие вещества: полистиролсульфонат натрия (ПСС), м.м. 70 000; хлорид натрия; хлорид кальция; карбонат натрия (Acros Organics, США); полиаллиламин гидрохлорид (ПАА), м.м. 70 000; флуоресцеин изотиоцианат; тринатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (Sigma-Aldrich, Германия).

В качестве ядер капсул были взяты сферические частицы карбоната кальция. Методика получения монодисперсных сферических коллоидных частиц CaCO_3 представлена в работе [4]. Аморфный осадок CaCO_3 , образующийся при быстром смешивании растворов CaCl_2 и Na_2CO_3 , в результате коллоидной агрегации переходит в упорядоченные сферолиты микронного размера. Варьируя условия проведения процесса (концентрацию реагентов, температуру, интенсивность перемешивания реакционной смеси, его продолжительность), можно получать микросферолиты со средним диаметром от 2 до 15 мкм с достаточно узким распределением по размеру. В настоящей работе реакционную смесь перемешивали со скоростью 500 об/мин в течение 30 с при комнатной температуре (концентрация растворов

CaCl₂ и Na₂CO₃ 0.33 M), в результате получая сферолиты с диаметром 4.5 ± 0.5 мкм. После завершения процесса частицы CaCO₃ промывали дистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу в течение 1 ч при 60°С.

Для формирования полиэлектролитной оболочки использовали методику, описанную в работе [5]. К 0.015 г ядер добавляли 2 мл раствора ПАА (концентрация 2 мг/мл) в 0.5 M растворе NaCl. Суспензию перемешивали в течение 15 мин с помощью минишейкера, затем центрифугировали 1 мин при 330g после чего отбирали субстрат, а частицы трехкратно промывали водой (осаждение центрифугированием со скоростью 330g, 1 мин). Затем такую же процедуру проводили, используя раствор ПСС с концентрацией 2 мг/мл в 0.5 M растворе NaCl. Далее методом поочередной адсорбции противоположно заряженных макромолекул на коллоидных частицах получали оболочку, состоящую из 8 слоев полиэлектролитов. Для предотвращения агрегации частиц при нанесении первых двух-трех слоев суспензию перемешивали с использованием ультразвука (пробирки с суспензией на 10 с помещали в ультразвуковую ванну, 35 кГц).

В ходе работы были получены капсулы без красителя, состоящие из восьми слоев полиэлектролитов (ПАА/ПСС)₄, и капсулы с включенным в оболочку флуоресцеин изотиоцианатом (ФИТЦ). ФИТЦ включали в оболочку двумя способами. В первом случае был получен полиаллиламин гидрохлорид, химически связанный с красителем (ФИТЦ-ПАА) по методике, описанной в работе [6]. В процессе формирования оболочки при нанесении одного из слоев раствор полиаллиламин гидрохлорида был заменен на раствор ФИТЦ-ПАА с концентрацией 2 мг/мл в 0.5 M растворе NaCl. Во втором случае краситель был включен с помощью адсорбции на оболочку.

Для получения химически связанного красителя раствор ПАА с концентрацией 6 мг/мл в 0.1 M водном растворе гидрокарбоната натрия перемешивали в течение 3 ч на магнитной мешалке с раствором ФИТЦ в диметилформамиде с концентрацией 20 мг/мл (1 мл первого и 100 мкл второго раствора). Затем полученную смесь осаждали ацетоном и высушивали в сушильном шкафу при температуре 60°С. Молекула ФИТЦ образует связь с аминогруппой ПАА. Количество связанного красителя составляет примерно 1 молекулу красителя на 125 мономеров ПАА [7].

Для адсорбции красителя после нанесения на поверхность ядер CaCO₃ пяти полиэлектролитных слоев (ПАА/ПСС)₂ ПАА эти частицы были помещены в водный раствор ФИТЦ и суспензия перемешивалась с помощью минишейкера в течение 30 мин. Затем наносили слой ПСС. В результате получили оболочку с составом (ПАА/ПСС)₂ ПАА/ФИТЦ/ПСС/(ПАА/ПСС)₂. Адсорбция красителя, по-видимому, связана с межмолекулярными взаимодействиями с полиэлектролитами оболочки (например, с образованием водородной связи между C=O-группой молекулы флуоресцеина изотиоцианата и N-H-группами молекулы ПАА [5]).

Получение полых полиэлектролитных оболочек — проницаемых капсул — осуществляли путем растворения ядер CaCO₃ при добавлении тринатриевой соли

этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). В результате происходит удаление кальция из капсулы за счет образования устойчивого комплекса этого металла с ЭДТА. Раствор ЭДТА с pH 7.5 приливали к суспензии капсул и перемешивали в течение 20 мин, затем суспензию три раза промывали водой (осаждение центрифугированием, 220g, 8 мин).

Визуализация микрочастиц проводилась с использованием оптического микроскопа Nikon Eclipse E200 с увеличением 100 с флуоресцентной приставкой.

Установление размера микрокапсул осуществлялось методом корреляционной спектроскопии рассеянного света. Источником света служил полупроводниковый лазер (λ = 650 нм) мощностью до 100 мВт. Для устранения собственных шумов ФЭУ луч рассеянного под углом θ света с помощью делительной пластинки разделялся и попадал на два ФЭУ Hamamatsu R6358P, работающих в режиме счета фотонов. Сигналы с ФЭУ после усиления поступали в одноплатный логарифмический 32-битный коррелятор Photocor-FC, измеряющий функцию взаимной корреляции в реальном масштабе времени при числе каналов 288 и 10 нс на одну точку. Поскольку на ФЭУ попадает свет из одного рассеивающего объема, рассеянный под одним и тем же углом, то полученная функция корреляции эквивалентна корреляционной функции света, рассеянного образцом, так как собственные шумы двух ФЭУ не коррелированы.

Гидродинамический радиус микрокапсул определялся из следующего уравнения [9]:

$$\Gamma = \frac{k_B T}{3\eta R_h} \cdot 8\pi \frac{n^2}{\lambda^2} \sin^2 \frac{\theta}{2},$$

где показатель преломления среды $n = 1.33$; $\lambda = 632.8$ нм; $T = 295$ К; вязкость $\eta = 0.89 \cdot 10^{-2}$ г/см·с; θ — угол рассеяния, k_B — постоянная Больцмана; Γ — диффузионное уширение, характеризующее ширину спектрального контура, которое определялось из корреляционной функции

$$G(\tau) = \int_0^{\infty} E(t)E(t + \tau) dt;$$

$E(t)$ — набор данных, измеряемых с шагом τ .

В связи с тем что в растворах могут находиться объекты различного размера, исследованные растворы микрокапсул рассматривались как полидисперсные. Нами было установлено их распределение по размерам. Для этого были получены распределения $A(\Gamma(R_h))$ диффузионного уширения спектрального контура рассеянного света. Распределение числа капсул по размерам $N(R_h)$ определялось по формуле [9]

$$N(R_h) = \frac{A(\Gamma(R_h))}{R_h^6}.$$

Полученные результаты и их обсуждение

После удаления ядер из CaCO₃ образовались полиэлектролитные капсулы правильной сферической формы. Молекулы красителя ФИТЦ, внедренные в оболочку капсул, позволили эффективно осуществить их визуализацию с помощью флуоресцентного микроскопа (рис. 1) и оценить размеры отдельных капсул, радиус

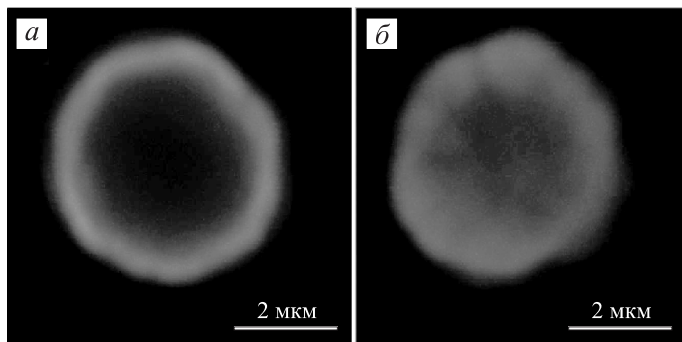


Рис. 1. Изображение в конфокальном микроскопе капсул с включенными в оболочку молекулами ФИТЦ: а — химически связанный краситель; б — адсорбированный краситель

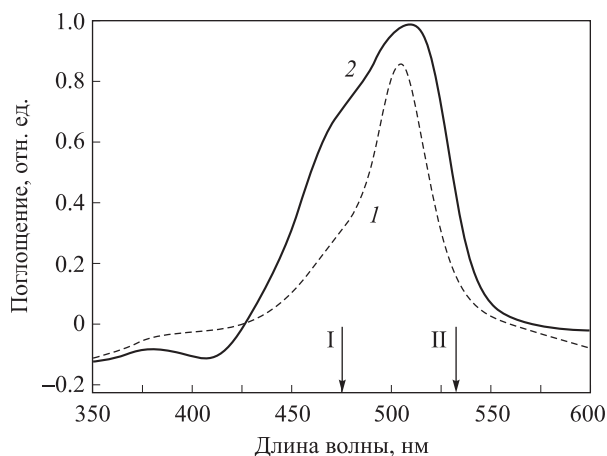


Рис. 2. Спектры поглощения капсул с ФИТЦ в оболочке (с вычитанием спектра поглощения капсул без красителя): 1 — химически связанный краситель, 2 — адсорбированный краситель. Стрелками показаны максимум поглощения ФИТЦ в водном растворе (I) и длина волны, на которой происходило облучение (II)

которых составлял около 2 мкм. Максимум в спектрах поглощения молекул красителя, находящихся внутри оболочки капсул, был сдвинут в длинноволновую область относительно спектров поглощения водных растворов красителя — стрелка I на рис. 2. Для адсорбированных молекул ФИТЦ сдвиг максимума составлял 30 нм, для химически связанных — до 42 нм.

Спектры флуоресценции молекул красителя, находящихся в оболочке капсулы, как и в случае [3], по форме практически не отличались от спектров флуоресценции красителя, адсорбированного на нейтральной кварцевой подложке.

Форма спектральных линий флуоресценции молекул красителей, зафиксированных на поверхности, при прочих равных условиях весьма чувствительна к локальным зарядам в окружающей краситель матрице, и заметное их уширение обычно связано с эффектом неоднородного уширения спектров [10]. Отсутствие этого эффекта в капсулах обоих типов говорит о том, что при послойной адсорбции полиионов, образующих матрицу, происходит практически полная компенсация их зарядов, и структура оболочки капсул является довольно совершенной. Интенсивность флуоресценции

от водной суспензии окрашенных капсул более чем на порядок ниже, чем интенсивность флуоресценции от растворов красителей (при нормировании на одинаковую среднюю концентрацию молекул ФИТЦ во взвеси окрашенных капсул и в растворе красителя). При этом интенсивность свечения молекул красителя, химически связанных с оболочкой капсулы, была существенно ниже интенсивности флуоресценции адсорбированных молекул при их сопоставимой концентрации. Резкое уменьшение интенсивности флуоресценции молекул красителя в оболочке капсул говорит об эффективной диссипации энергии фотовозбужденных молекул окружающей органической матрицей, что реализуется при совпадении колебательных частот молекулы ФИТЦ и образующих матрицу полиионов [10].

Для определения интегральных характеристик взвеси окрашенных капсул (концентрации капсул во взвеси, распределения капсул во взвеси по размерам) весьма эффективно оказалось использовать оптические методы. Интенсивность флуоресценции окрашенных капсул оказалась пропорциональной концентрации капсул в широком диапазоне ее изменения. Используя нормированные на определенную концентрацию спектры, можно было быстро оценивать концентрацию капсул, причем в различных частях взвеси.

Обработка данных по рассеянию света неокрашенными и окрашенными капсулами позволила вычислить средние размеры капсул, а также получить кривые распределения капсул по размерам. Для капсул всех типов, изучаемых нами в данной работе, их радиусы варьировались от 1600 до 1900 нм.

Кривая 1 на рис. 3 показывает распределение микрокапсул с адсорбированными в оболочке молекулами красителя по размерам. Для неокрашенных капсул и для капсул с химически связанными молекулами красителя исходные кривые распределения капсул по размерам были практически такими же.

Для определения возможности разрушения капсул мы подвергли их взвеси интенсивному лазерному облучению с длиной волны в полосе поглощения зафиксированных в оболочке капсул молекул красителя (стрелка II на рис. 2). Облучение растворов с капсулами в течение 5 мин осуществлялось второй гармоникой гранатового (Nd:YAG) лазера LF114 с длиной волны 532 нм, диаметр луча примерно 7 мм, энергия в импульсе 500 мДж, длительность импульса 10 нс,

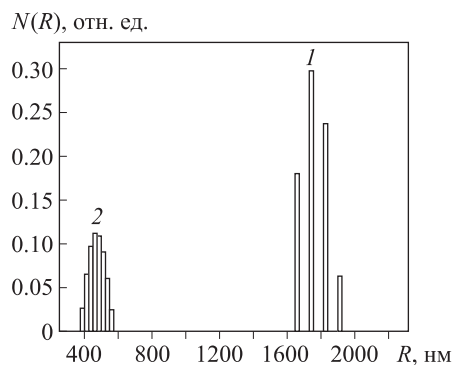


Рис. 3. Распределение по размерам капсул с адсорбированным красителем до (1) и после (2) облучения лазером

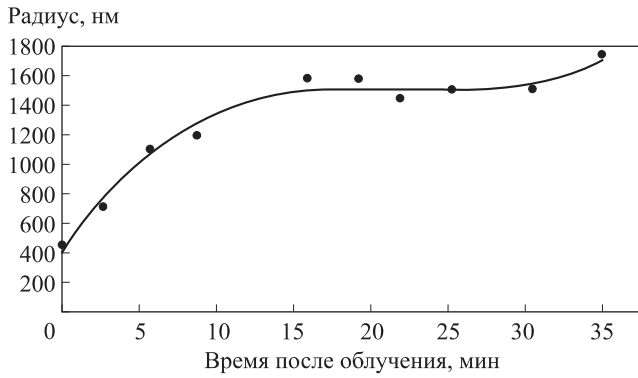


Рис. 4. Радиус капсул с адсорбированным красителем в зависимости от времени, прошедшего после облучения лазером

частота следования импульсов 10 Гц. Такое воздействие практически не влияло на характер рассеяния света неокрашенными капсулами и капсулами с химически связанными молекулами ФИТЦ и кардинально его изменяло для капсул с внедренными в их оболочку адсорбированными молекулами красителя (рис. 3, кривая 2). В последнем случае обработка данных по рассеянию света дала значение среднего размера рассеивающих частиц взвеси 480 нм (рис. 3, кривая 2). Полученные результаты свидетельствуют о разрушении в результате проведенной лазерной обработки значительной части окрашенных капсул. На это также указывают прямые микроскопические наблюдения этих взвесей. Если этим же методом рассматривать динамику изменения среднего размера частиц от времени, прошедшего после завершения лазерной обработки, то за времена порядка 15 мин размеры рассеивающих частиц опять несколько возрастают (рис. 4). Данный эффект, по-видимому, связан с агломерацией осколков капсул. Кроме того, прямые микроскопические наблюдения фиксируют появление кластеров неправильной формы, сильно различающихся по размерам.

Некоторое уменьшение размеров капсул при лазерной обработке взвеси неокрашенных капсул наблюдалось ранее [11] и было связано со значительным нагреванием взвеси. В нашем случае нагревание взвесей окрашенных и неокрашенных капсул было примерно одинаковым и поэтому не могло быть причиной наблюдаемых эффектов при облучении окрашенных структур. К тому же возможное изменение размеров капсул при нагревании является необратимым эффектом [12]. При нагревании суспензий окрашенных и неокрашенных капсул до температуры 40°С наблюдалось одинаковое уменьшение среднего размера капсулы (примерно в 4 раза). Изменение размера объясняется тем, что благодаря тепловой энергии электростатическое притяжение между противоположно заряженными группами полиэлектролита преодолевается, приводя к взаимному проникновению полиионов и заживлению пустот [12]. Таким образом, эффект резкого изменения относительного размера капсул с адсорбированными молекулами красителя в результате лазерного облучения и его отсутствие для капсул других типов обусловлен именно воздействием лазера и не является следствием изменения температуры взвесей.

Заключение

Фотосенсибилизированное разрушение капсул при интенсивном облучении в полосе поглощения адсорбированных молекул красителя может быть обусловлено эффективной диссипацией энергии электронного возбуждения молекул по колебательным уровням молекулы с последующим ее переносом в окружающую молекулы красителя полимерную матрицу. Такой перенос может происходить по индуктивно-резонансному механизму и реализуется при совпадении отдельных полос в колебательных спектрах молекул красителя и молекул полимера [10], что в нашем случае и реализуется. Критический радиус переноса энергии в подобных молекулярных системах составляет до 5 нм. Если учесть, что адсорбированные молекулы красителя и их кластеры располагаются неравномерно внутри полимерных капсул, описанный выше процесс может приводить к неравновесному локальному нагреву полимерной матрицы, разрыву связей и в итоге к разрушению капсул. Ранее подобные эффекты фотосенсибилизированной структурной перестройки и дефектообразования наблюдались нами в нанометрических по толщине слоях различных объектов: в полимерных сегнетоэлектрических пленках [13], в пленках Лэнгмюра–Блоджетт на поверхности полупроводников [14]. Отсутствие эффекта разрушения капсул, в состав которых входят химически связанные молекулы того же красителя, может быть обусловлено следующими причинами: 1) такие молекулы более равномерно распределены в слое полимера, о чем свидетельствуют их более узкие, по сравнению со спектрами адсорбированных молекул, спектры поглощения (рис. 2); 2) происходит весьма эффективная диссипация энергии фотовозбуждения по колебательным уровням модифицированных красителем молекул полимера, поскольку интенсивность флуоресценции молекул красителя в этом случае, как отмечалось выше, почти на порядок меньше, чем в капсулах с адсорбированными молекулами. В результате этого происходит быстрая термализация энергии фотовозбужденных молекул по всему объему капсулы и ее неоднородного нагрева и разрушения не происходит. Может также иметь значение и то, что линия лазерного возбуждения попадает на край более узкого спектра поглощения химически связанных молекул, что снижает эффективность их возбуждения.

Таким образом, исследование полиэлектролитных микрокапсул, модифицированных молекулами органических красителей, имеет как научный интерес, поскольку позволяет использовать различные системы с микрокапсулами в качестве модельных для изучения механизма переноса и диссипации энергии фотовозбужденных молекул в органической матрице; так и практический интерес, поскольку в таких системах при определенных условиях удастся реализовать процессы фотосенсибилизированной перестройки и разрушения микрокапсул.

Список литературы

1. *Rosi N.L., Mirkin C.A.* // Chem. Rev. 2005. **105**. P. 1547.
2. *Peyratout C., Dahne L.* // Angew. Chem. 2004. **43**. P. 3762.

3. Марченко И.В., Плотников Г.С., Баранов А.Н., Салецкий А.М., Букреева Т.В. // Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. 2010. № 2. С. 14.
4. Volodkin D.V., Petrov A.I., Prevot M. et al. // Langmuir. 2004. **20**. P. 3398.
5. Sukhorukov G.B., Donath E., Davis S. et al. // Polym. Adv. Technol. 1998. **9**. P. 759.
6. Nargessi R.D., Smith D.S. // Methods Enzymol. 1986. **122**. P. 67.
7. Hiller S., Loporatti S., Schnackel A. et al. // Biomacromolecules. 2004. **5**. P. 1580.
8. Эпштейн Л.М., Шубина Е.С. // Природа. 2003. № 6. С. 40.
9. Лебедев Л.Д., Левчук Ю.Н., Ломакин А.В., Носкин В.А. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. Киев, 1987.
10. Плотников Г.С., Зайцев В.Б. Физические основы молекулярной электроники. М., 2000. С. 164.
11. Loporatti S., Gao C., Voigt A. et al. // Eur. Phys. J. E. 2001. **5**. P. 13.
12. Kohler, K., Shchukin D.G. et al. // J. Phys. Chem. B. 2005. **109** (39). P. 18250.
13. Zaitsev V.B., Nevzorov A.N., Plotnikov G.S. // Mater. Sci. 2002. **20**, N 3. P. 37.
14. Беляев В.В., Зайцев В.Б., Панова Т.В. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Физ. Астрон. 2002. № 1. С. 44.

Formation of polyelectrolyte microcapsules with chemically bounded and adsorbed fluorescein isothiocyanate molecules and their destruction by influence of laser

A. N. Baranov^{1,a}, T. V. Bukreeva^{2,b}, I. V. Marchenko^{2,3,c}, G. S. Plotnikov^{3,d}, A. M. Saletskiy^{1,e}

¹Department of General Physics; ³Department of General Physics and Molecular Electronics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia.

²A. V. Shubnikov Institute of Crystallography, Russian Academy of Sciences, Leninsky ave. 59, Moscow 119333, Russia.

E-mail: ^abaranov@physics.msu.ru, ^bbukreeva@ns.crys.ras.ru, ^ciramarchenko85@mail.ru,

^dplot@vega.phys.msu.ru, ^esalzky@rambler.ru.

Polyelectrolyte capsules with fluorescein isothiocyanate molecules included into the shell were obtained. Inclusion of the dye molecules into the shell can provide possibility of destruction of the capsules by photosensibilisation. Measurements of fluorescence intensity showed effective energy dissipation to surrounding matrix. The capsule suspension was irradiated by the laser light in the absorption band of the dye. Measurements of size distribution of capsules before and after laser irradiation showed that the capsules are destroyed by laser illumination.

Keywords: polyelectrolyte capsules, dyes, laser radiation.

PACS: 78.66.Qn.

Received 24 March 2011.

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 5(2011).

Сведения об авторах

1. Баранов Анатолий Николаевич — канд. физ.-мат. наук, старший преподаватель; тел. (495) 939-26-36, e-mail: baranov@physics.msu.ru.
2. Букреева Татьяна Владимировна — канд. хим. наук, зав. лабораторией; тел. (499) 135-60-10, e-mail: bukreeva@crys.ras.ru.
3. Марченко Ирина Валерьевна — аспирант; тел. (499) 135-40-20, e-mail: iramarchenko85@mail.ru.
3. Плотников Геннадий Семенович — докт. физ.-мат. наук, профессор; тел. (495) 939-30-27, e-mail: plot@vega.phys.msu.ru.
4. Салецкий Александр Михайлович — докт. физ.-мат. наук, профессор; тел. (495) 939-36-32, e-mail: salzky@rambler.ru.