



CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
Faculty of Science
Department of Physical and Macromolecular
Chemistry



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie



INSTITUTE OF
MACROMOLECULAR CHEMISTRY
AS CR, v. v. i.
Department of Supramolecular Polymer Systems



ÚSTAV MAKROMOLEKULÁRNÍ CHEMIE
AV ČR, v. v. i.
Oddělení nadmolekulárních polymerních soustav

Polymeric nanoparticles stabilised by surfactants

Polymerní nanočástice stabilizované surfaktanty

Doctoral Thesis Abstract

Souhrn disertační práce

Jiří Pánek

Jiří Pánek

Supervisor: RNDr. Petr Štěpánek, DrSc.

Školitel: RNDr. Petr Štěpánek, DrSc.

PRAGUE 2010

PRAHA 2010

ÚVOD

V současnosti se nanotechnologie stává hybnou silou vývoje nových materiálů, jak v oblasti materiálové vědy tak v biomedicínských aplikacích. Nanomateriály mohou být konstruovány „shora“, tj. vytvářením nových struktur v již existujících materiálech, nebo „zespodu“, tedy spontánním uspořádáním stavebních kamenů na molekulární úrovni s využitím různých fyzikálně chemických interakcí. Pro konstrukci spontánně uspořádaných nanomateriálů jsou vhodnými stavebními kameny polymery a kopolymery, protože umožňují velké množství kombinací základních jednotek a jejich vzájemných interakcí. Cíle mé disertace sledují současný vývoj a jsou orientovány na přípravu polymerních nano-objektů s využitím principů spontánního uspořádání.

Společný přístup, použitý pro všechny typy níže popisovaných systémů, je založen na omezení rozsahu *makrofázové* separace složek směsi v případě, kdy se složky stanou nemísitelnými nebo nekompatibilními vlivem vnějšího působení. Podle klasické teorie je energie systému určena entalpickým a entropickým příspěvkem a interakční parametr χ je dán Flory-Hugginsovým vztahem $\chi = a/T + b$, kde T je absolutní teplota a a a b jsou konstanty specifické pro dvojici polymer/polymer nebo polymer/rozpouštědlo. Pro složitější systémy musí být přidán třetí člen χ_s

$$\chi = a/T + b + \chi_s \quad (1)$$

V této jednoduché reprezentaci třetí člen popisuje všechny další interakce v systému, například efekt rozdílné teplotní roztažnosti složek systému a různé specifické interakce (vodíkové vazby, iontové interakce atd.). Formování nano-objektů je vždy řízeno termodynamikou (nárůstem parametru χ v rovnici (1)), ale může být ovlivněno specifickými interakcemi s amfifilními molekulami a kinetickými a hydrodynamickými efekty. V této disertaci jsou vyžívány efekty změny kvality rozpouštědla nebo změny teploty směsi pro přípravu polymerních nanočástic.

CÍLE

Jednoduchost přípravy polymerních nano-objektů je důležitým faktorem, protože s sebou často přináší dobrou reprodukovatelnost, efektivnost a možnost rozšíření výroby z laboratorního měřítka do praxe. V překládané disertaci jsou testovány fyzikálně chemické metody přípravy polymerních nanočástic. Jsou zde zahrnuty dva typy objektů: surfaktanty stabilizované polymerní nanočástice a termosenzitivní polymerní micely. V druhém případě je přítomnost surfaktantu nahrazena amfifilními charakterem použitých blokových kopolymerů. Za určitých podmínek mohou být oba typy objektů zformovány pomocí stejných fyzikálně chemických principů a mohou vykazovat podobné rysy. Cíle této práce jsou:

1. Studovat modelové nanočástice stabilizované surfaktanty, připravené z hydrofobních polymerů (poly(methyl methakrylát), PMMA, nebo polystyren, PS, metodou změny kvality rozpouštědla. Zjistit vliv vlastností složek a podmínek přípravy na charakteristiku nanočástic.
2. Připravit surfaktanty stabilizované nanočástice z termosenzitivního polymeru (poly(*N*-isopropylakrylamid), PNIPAM. Popsat závislost charakteristik nanočástic na vlastnostech polymeru a surfaktantů.
3. Studovat teplotně závislé micelární chování nových trojblokových kopolymerů na bázi polyoxazolinů. Najít optimální složení kopolymeru s ohledem na teplotu fázového přechodu a rozměr micel.
4. Připravit radioizotopově značené polymerní micely termosenzitivních kopolymerů popsaných v bodě 3 a optimalizovat jejich vlastnosti s ohledem na zamýšlené aplikace.

METODY

Měření rozptylu záření patří mezi nejdůležitější metody v analýze polymerních materiálů. Tyto techniky využívají principy interakce záření s látkou a jsou přesným nástrojem k určování strukturních nebo dynamických charakteristik systémů obsahujících makromolekuly nebo jejich nadmolekulární systémy. V současné době jsou dostupné dostatečně silné zdroje laserového, rentgenového nebo neutronového záření vhodné pro měření rozptylů. Systémy studované v této disertaci jsou zředěné vodné disperze polymerních nanočástic a k jejich charakterizaci byly použity dynamický rozptyl světla (DLS), statický rozptyl světla (SLS), malouhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS) a malouhlový rozptyl neutronů (SANS). Pro metodu SAXS bylo také provedeno časově rozlišené měření na rentgenovém paprsku generovaném synchrotronem.

Každá z uvedených metod má svou specifickou použitelnost. Na rozdíl od DLS, který je citlivý k dynamickým procesům, jsou SLS a malouhlové rozptylové techniky citlivé na hmotnost a strukturu molekul nebo částic přítomných ve vzorku. V případě použití SAXS a SANS kromě velikosti a tvaru může být zkoumána také jejich struktura. Synchrotronové rentgenové záření je dostatečně intenzivní, aby umožnilo měření rozptylových obrazců během krátkých expozičních časů. Pomocí této vlastnosti lze provádět časově rozlišená měření v milisekundové oblasti. V případě použití neutronového svazku jako zdroje záření vykazují chemické prvky různé velikosti rozptylových amplitud. Velké rozdíly v rozptylových amplitudách se mohou projevit i pro prvky s podobnými atomovými hmotnostmi a dokonce i pro izotopy jednoho prvku. Důležitým příkladem takových izotopů je vodík (rozptylová amplituda $b_1 = -3.74$ fm) a deuterium ($b_1 = +6.67$ fm). Záměnou jednoho izotopu druhým lze učinit složky měřených systémů pro neutrony „viditelnými“ nebo „neviditelnými“, což značně rozšiřuje možnosti použití SANS.

VÝSLEDKY

Tato kapitola popisuje některé ze získaných výsledků. Celkový stručný přehled výsledků je uveden v kapitole Závěry.

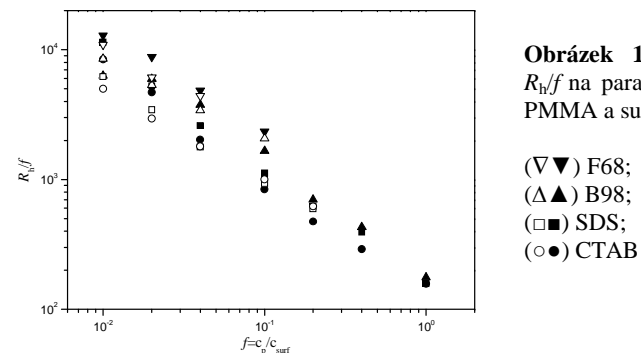
1. Změna kvality rozpouštědla a nanočástice stabilizované surfaktanty

Polymerní nanočástice stabilizované surfaktanty mohou být připraveny ovlivněním parametrů a a b v rovnici (1). Tyto parametry jsou specifické pro každý systém. Pro danou dvojici polymer/rozpouštědlo může být tedy fázová separace vyvolána záměnou rozpouštědla. Úspěšně byla testována samoorganizace polymerů a surfaktantů vyvolaná změnou kvality rozpouštědla, pomocí které se podařilo připravit stabilní a uniformní nanočástice ve vodných disperzích. Částice byly připraveny z modelových hydrofobních polymerů PMMA a PS. Postup spočívá v rychlém smíchání roztoku polymeru v organickém rozpouštědle s roztokem surfaktantu ve vodě. Organické rozpouštědlo bylo posléze odstraněno odpařením. Byly studovány kombinace polymerů s různými molárními váhami a surfaktantů s různým elektrickým nábojem a složením. Vznikající částice byly charakterizovány technikami DLS, SLS a SANS. Studie ukazuje, jak se parametry nanočástic mění nejen při použití různých výchozích složek a i při změně podmínek během postupu přípravy [1].

Dynamický rozptyl světla (DLS)

Systematicky byla testována různá složení vstupních komponent. Při zafixované vstupní koncentraci surfaktantu c_{surf} rozměr nanočástic roste s rostoucí koncentrací polymeru c_p . Opačná závislost nasává při rostoucí koncentraci surfaktantu (pro konstantní koncentraci polymeru), kdy hydrodynamický poloměr částic R_h klesá. Obě závislosti lze vynést do jednoho grafu ukázaného na **obrázku 1**, kde je vyneseno zlomek R_h/f jako funkce parametru složení směsi f , kde $f=c_p/c_{\text{surf}}$. Všechny koncentrační závislosti vypadají v této reprezentaci stejně. Toto pozorování ukazuje, že formování nanočástic je do velké míry řízeno poměrem c_p a c_{surf} . Kromě parametru f ovlivňuje podstatně tvorbu nanočástic rychlost přidavku vodného roztoku surfaktantu do roztoku polymeru a teplota složek během smíchání. Ačkoli

povaha surfaktantu, jeho hydrofobicita, náboj a molární hmotnost mají také vliv na rozměr a hustotu částic, nebyla v tomto vztahu nalezena přímá korelace, což může být způsobeno složitostí procesu formování nanočástic.



Obrázek 1. Závislost R_h/f na parametru f pro PMMA a surfaktanty:

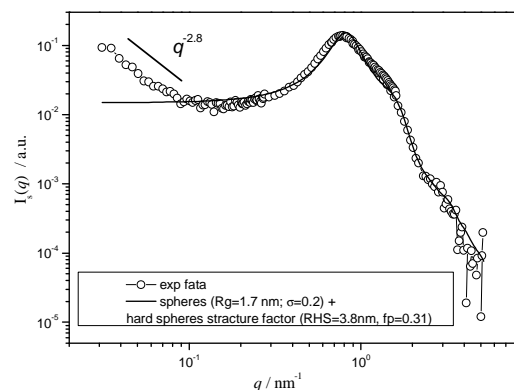
(∇) F68;
(Δ) B98;
(\square) SDS;
(\circ) CTAB

Maloúhlový rozptyl neutronů (SANS)

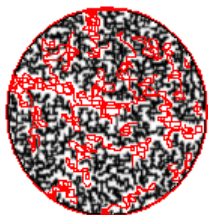
Experimenty s variací kontrastů složek při měření maloúhlového rozptylu neutronů byly provedeny v laboratoři Leon Brillouin v CEA (Saclay, Francie) na spektrometru PAXY. Selektivní substitucí vodíku za deuterium bylo dosaženo rozdílu v hustotách rozptylových amplitud a byly takto zobrazovány jednotlivé složky systému. Konkrétně jako složky nanočástic byly použity deuterovaný surfaktant dodecylsulfát sodný (d-SDS) a deuterovaný polystyren (d-PS) v kombinaci s nedeuterovanými, tj. protonovanými látkami (h-SDS, h-PS). Byly připraveny 3 sady vzorků:

- (i) deuterovaný polymer + protonovaný surfaktant v D_2O , kdy koherentní rozptyl pochází pouze od surfaktantu a je velmi slabý. Kvůli zvýšení intenzity rozptylu byly tyto vzorky koncentrovány odpařením části rozpouštědla (D_2O).
- (ii) protonovaný polymer + protonovaný surfaktant v D_2O rozptyl pochází od polymeru i surfaktantu, tedy rozptyluje celá částice.
- (iii) protonovaný polymer + deuterovaný surfaktant v D_2O . Hustoty rozptylové amplitudy deuterovaného surfaktantu a D_2O jsou téměř shodné a tedy většina rozptýleného záření pochází od polymeru.

Typická rozptylová křivka pro systém d-PS + h-SDS, kde „viditelný“ je pouze surfaktant, je ukázána na **obrázku 2**. Experiment využívající variaci kontrastů ukazuje, že nanočástice jsou objekty s rovnoměrně rozloženou hustotou a molekuly polymeru a surfaktantu jsou rovnoměrně rozloženy v částici. Taková struktura se liší od struktury micel nebo vesiklů. Možné rozložení surfaktantu uvnitř objemu nanočástice je zjednodušeně nakresleno na **obrázku 3**.



Obrázek 2. Rozptylová intenzita I_s jako funkce rozptylového vektoru q pro různé systémy. (○) d-PS/ h-SDS; (▲) h-PS/h-SDS; (□) h-PS/d-SDS. Plná čára je fritovací křivka.

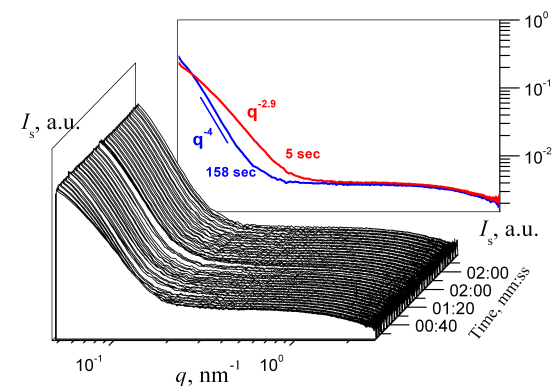


Obrázek 3. Možné rozložení surfaktantu (červená barva) a polymeru (černá barva) uvnitř nanočástice podle výsledků SANS.

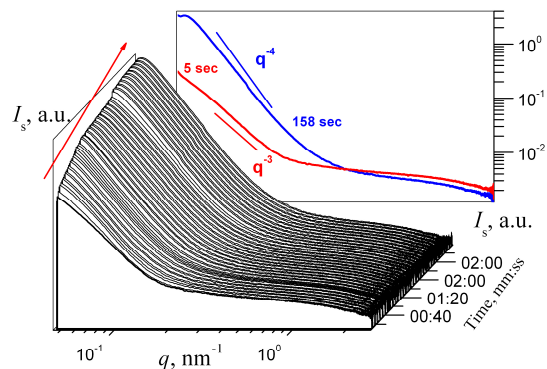
Časově rozlišený SAXS (TR-SAXS)

Časové měření formování polymerních nanočástic popsaných v předchozím odstavci bylo provedeno synchrotronovým svazku ID02 v ESRF (Grenoble, Francie). Měření bylo provedeno pomocí jednoduché aparatury, která umožnila míchání shodných objemů polymeru v organickém rozpouštědle a vodného roztoku surfaktantu v měřicí kapiláře umístěné přímo ve svazku. Po smíchání bylo spuštěno měření a načítána rozptylová data.

Výsledky ukazují, že kinetika formování nanočástic v přítomnosti iontových surfaktantů, jako například dodecylsulfátu sodného (SDS), je mnohem rychlejší (v řádu milisekund – všechny rozptylové křivky jsou téměř identické během 2 minut po smíchání, viz **obrázek 4**) než u částic obsahujících neiontové surfaktanty, jako je Pluronic F68 (v řádu několika sekund – rozptylové intenzity se během 2 minut po smíchání mění v čase, viz **obrázek 5**). V reálném čase byla pozorována změna povrchu z přechodné struktury do plné sféry a měření také ukazuje, že vznik částic má dvě fáze: začíná nukleačním stadiem, které je následováno „obdobím růstu“ [2].



Obrázek 4. Časový vývoj rozptylové intenzity měřené pomocí TR-SAXS pro PMMA-SDS systém.



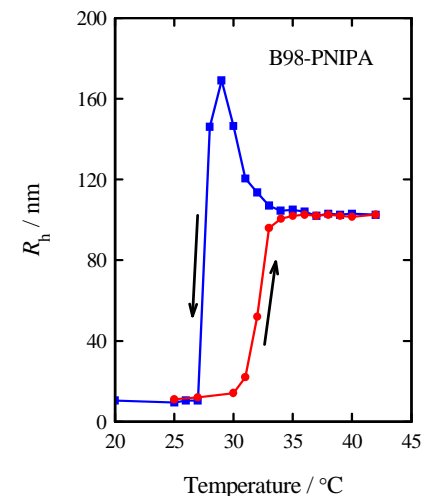
Obrázek 5. Časový vývoj rozptylové intenzity měřené pomocí TR-SAXS pro PMMA-F68 systém.

2. Termosenzitivní polymerní nanočástice stabilizované surfaktanty

Další část disertace je věnována případu, kdy fázové separace je dosaženo změnou teploty v rovnici (1). Některé polymery vykazují ve vodném prostředí rychlé, reverzibilní změny indukované změnou teploty z hydrofilního stavu na hydrofobní a jsou proto nazývány „termosenzitivní.“ Mezi nejstudovanější termosenzitivní polymery patří poly(*N*-isopropylakrylamid), PNIPAM, vodorozpustný polymer s mnoha zajímavými vlastnostmi. Změna jeho mikrostruktury z polymerního klubka na globuli nastává při 32 °C (dolní kritická rozpouštěcí teplota, LCST). Tato vlastnost je důsledkem složité polarity jeho makromolekul.

Pomocí rozptylu světla bylo studováno teplotní chování roztoků PNIPAM s iontovými a neiontovými surfaktanty v teplotním rozmezí 15–45 °C. Na rozdíl od dřívějších studií jiných autorů, kdy surfaktanty byly přidávány v přebytku, v této práci jsou použity jejich nízké koncentrace ($c_{\text{surf}} \leq 5 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Za takových podmínek při zvýšení teploty nad LCST již surfaktant není schopen zabránit intermolekulární agregaci a je pozorován vznik dobře definovaných nanočástic PNIPAM. Byla provedena systematická studie vlivu koncentrací a molárních hmotností složek na parametry vznikajících nanočástic a na teplotu fázového

přechodu v roztocích. Na **obrázku 6** je ukázán příklad měření teplotní závislosti hydrodynamického poloměru R_h objektů přítomných v roztoku (makromolekulárních klubek pod LCST a nanočástic nad LCST) [3].



Obrázek 6.

Červená křivka odpovídá postupnému ohřevu a modrá pomalému ochlazení po rychlém ohřátí roztoku na 40 °C.

Koncentrace polymeru: $c_{\text{PNIPAM}} = 5 \times 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Koncentrace surfaktantu: $c_{\text{B98}} = 5 \times 10^{-5} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$. M_{η} PNIPAM: 122 000.

Byl navržen kvalitativní strukturální model nanočástice, který v prvním přiblížení předpokládá uspořádání podobné micelám blokových kopolymerů. Nerozpustné jádro částice je seskládáno z hydrofobních makromolekul PNIPAM, hydrofilní slupku tvoří hydrofilní části molekul surfaktantu. Přechodová vrstva na rozhraní jádra a slupky obsahuje jak hydrofobní části molekul surfaktantů tak makromolekulární řetězce PNIPAM. Na základě volby surfaktantu je možno připravit nanočástice s biokompatibilním pokrytím, například poly(ethylen oxidem).

3. Termosenzitivní polymerní micely pro cílený transport radioizotopů

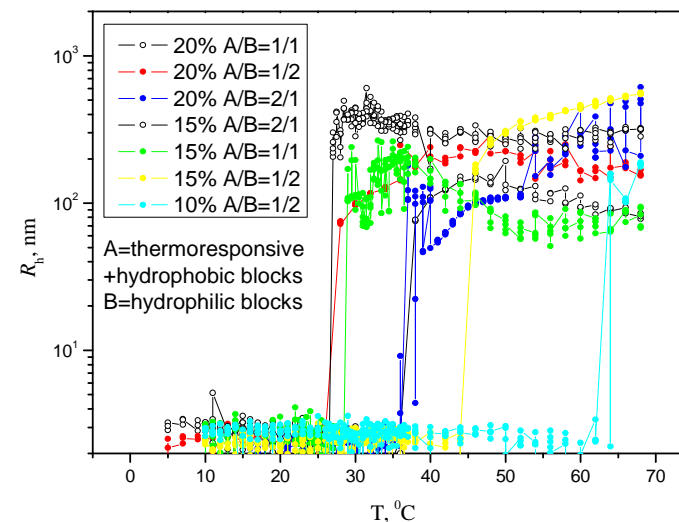
Polymerní micely patří mezi nejvíce studované systémy pro cílený transport léčiv. Použití takových systémů v nukleární medicíně přináší navíc další výhody. Radionuklid se například nemusí uvolnit z komplexu s nosičem, aby splnil svou funkci radiodiagnostika nebo radioterapeutika. Nositelům žadaného efektu je emitované ionizující záření vznikající při rozpadu jader a ten není významně ovlivněn chemickým okolím. Pokud efektivní dosah a tím i biologická účinnost záření zvoleného radionuklidu je dostatečná, transportní systém nesoucí izotop ani nemusí proniknout do buňky.

Termosenzitivní polymerní micely s termoresponzivním jádrem a hydrofilní korónou mohou být snadno připraveny pouhým ohřátím vodného roztoku blokového nebo roubovaného kopolymeru z teploty místnosti na teplotu lidského těla. Pokud je kopolymer správně navržen, rozměr micel může být vhodný pro spontánní akumulaci micel v cílové tkáni.

Byly testovány na míru připravené kopolymery poly(2-alkyl-2-oxazolinů), které jsou atraktivní pro biomedicinální výzkum díky své struktuře příbuzné peptidům a díky nastavitelným fyzikálně chemickým a biologickým vlastnostem. Dr. Hrubý z našeho ústavu syntetizoval trojblokové ABA kopolymery typu poly[2-metyl-2-oxazolin *-blok-* (2-isopropyl-2-oxazolin *-co-* 2-butyl-2-oxazolin) *-blok-* 2-metyl-2-oxazolin]. Polymery mají dva hydrofilní bloky A a jeden centrální termosenzitivní blok B a obsahují různé poměry monomerních jednotek. Tyto kopolymery jsou rozpustné ve vodném prostředí, jsou molekulárně rozpuštěny pod teplotou fázového přechodu („cloud point temperature“, CPT) termosenzitivního bloku a tvoří micely při vyšších teplotách.

Pomocí DLS a SLS bylo charakterizováno jejich teplotně závislé micelární chování ve vodném prostředí. K formování micel dochází v úzkém teplotním rozmezí, jejich CPT je funkcí složení kopolymeru a roste s rostoucím obsahem hydrofilního 2-metyl-2-oxazolinu. Optimalizovaný kopolymer obsahuje 15 molárních % hydrofobního 2-butyl-2-oxazolinu v centrálním termosenzitivním bloku při hmotnostním poměru termosenzitivního a hydrofilního bloku 1:1. Tento

kopolymer tvoří při ohřátí nad jeho CPT, která je 28 °C, ve vodném prostředí micely s hydrodynamickým poloměrem $R_h = 80 - 100$ nm [4]. Přehled teplotně závislého micelárního chování studovaných systémů je ukázán na **obrázku 7**.



Obrazek 7. Teplotní závislost objemově váženého R_h nanočástic, chlazení (koncentrace polymeru $c_p = 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$).

Během syntézy optimalizovaného kopolymeru byla část monomerních jednotek 2-butyl-2-oxazolinu nahrazena ekvimolárním množstvím 2-(3-butenyl)-2-oxazolinu a následně byla zavedena fenolová skupina. Takto modifikovaný kopolymer byl označen radioizotopem ^{125}I s dobrým výtěžkem značení a dostatečnou stabilitou v modelových podmínkách *in vitro* [4].

ZÁVĚRY

1.

Byly systematicky studovány polymerní nanočástice stabilizované surfaktanty připravené metodou změny kvality rozpouštědla. Pro studii byly použity modelové hydrofobní polymery (PMMA, PS) a několik iontových a neutrálních surfaktantů. Vznikající částice s hydrodynamickým poloměrem v rozmezí 50-250 nm jsou stabilní ve vodném prostředí. Důležitým parametrem ovlivňujícím rozměr nanočástic je koncentrační poměr složek $f=c_p/c_{surf}$, velikost nanočástic roste s rostoucím f . Kromě koncentračního poměru složek jsou rozměry částic ovlivněny rychlostí smíchání složek a teplotou roztoků během přípravy. Ačkoli hydrofobicita surfaktantu, jeho elektrický náboj a molární hmotnost také ovlivňují velikost a hustotu částic, přímá korelace mezi veličinami nebyla nalezena, což je vysvětlováno složitostí procesu formování částic.

Získané výsledky ukazují, že nanočástice mají sférický tvar a dobře definovaný povrch. Metoda variace kontrastů při maloúhlovém rozptylu neutronů ukázala, že molekuly polymeru a surfaktantu jsou rovnoměrně rozloženy v celém objemu částic. Taková struktura je odlišuje od micel, vesíklů nebo komplexů. Proces formování částic, studovaný pomocí časově rozlišeného měření maloúhlového rozptylu rentgenového záření, probíhá ve dvou fázích. Počáteční nukleační stadium je následováno „obdobím růstu“. Náboj surfaktantu hraje během formování důležitou roli. Kinetika růstu nanočástic v přítomnosti neutrálních surfaktantů je výrazně pomalejší než v přítomnosti surfaktantů nabitých.

2.

Pomocí DLS a SLS bylo prokázáno, že lze připravit termosenzitivní, dobře definované nanočástice ohřátím vodného roztoku PNIPAM s nízkým přídatkem surfaktantu nad LCST polymeru. Změnou chemického složení surfaktantu, koncentrace surfaktantu a polymeru nebo molární hmotností polymeru lze modifikovat hydrodynamický poloměr částic v intervalu 21-136 nm a jejich molární hmotnost v širokém rozsahu M_w . Byl navržen kvalitativní model struktury nanočástic, který předpokládá rozložení podobné micelám blokových kopolymerů. Nerozpustné jádro částice je seskládáno z hydrofobních makromolekul PNIPAM,

hydrofilní slupku tvoří hydrofilní části molekul surfaktantu. Přechodová vrstva na rozhraní jádra a slupky obsahuje jak hydrofobní části molekul surfaktantů tak makromolekulární řetězce PNIPAM.

3.

Bylo studováno teplotně závislé micelární chování na míru připravených trojblokových kopolymerů typu ABA, syntetizovaných Dr. Hrubým. Kopolymery na bázi oxazolinů se skládají ze dvou hydrofilních bloků A a jednoho centrálního termosenzitivního bloku, který je statistickým kopolymerem 2-isopropyl-2-oxazolinu a 2-butyl-2-oxazolinu. CPT kopolymerů je funkcí jejich složení. Nárůst obsahu hydrofobního monomeru v termosenzitivním bloku B vede ke snížení CPT. Srovnání kopolymerů s různými poměry hmotností termosenzitivního a hydrofilního bloku ukazuje, že nárůst hydrofilního bloku podstatně zvyšuje CPT celého kopolymeru. Celková hydrofilnost/hydrofobicita trojbloku má přinejmenším stejný význam vliv na hodnotu CPT jako poměr monomerních jednotek v termosenzitivním bloku samotném. Hmotností poměr bloků A a B také ovlivňuje rozměr micel. Optimalizace složení vede k poměru termosenzitivního k hydrofilnímu bloku 1:1 a k obsahu 15 molárních % hydrofobního monomeru v bloku B. Takový kopolymer tvoří ve vodném prostředí micely s hydrodynamickým poloměrem 80-100 nm při hodnotě CPT = 28 °C, tedy blízko fyziologické teplotě lidského těla.

4.

Do optimalizovaného kopolymeru byla během jeho syntézy zavedena fenolová skupina umožňující značení radioizotopy jódu. Takto modifikovaný kopolymer byl označen radionuklidem ^{125}I s dobrým výtěžkem radiochemického značení a dostatečnou stabilitou v modelových podmínkách *in vitro*. Z označeného kopolymeru mohou být připraveny radioaktivní micely, potenciálně aplikovatelné v nukleární medicíně.