

ВКЛЮЧЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ КРАСИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНОГО ТИПА В СОСТАВ ОБОЛОЧЕК ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КАПСУЛ МЕТОДОМ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЙ АДСОРБЦИИ

© 2015 И. В. Марченко^{1,2}, Б. В. Набатов², Т. В. Букреева^{1,2}

¹НИЦ «Курчатовский институт», пл. Академика Курчатова, д. 1, 123182 Москва, Россия

²Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова РАН, Ленинский проспект, д. 59, 119333 Москва, Россия
e-mail: iramarchenko85@mail.ru

Поступила в редакцию 19.08.2015 г.

Аннотация. Проведена модификация оболочек полиэлектролитных капсул флуоресцентными красителями родамином 6Ж, метиловым фиолетовым и индигокармином за счет адсорбции на полиэлектролитные слои. Полученные капсулы исследованы методом конфокальной флуоресцентной микроскопии и с помощью измерения дзета-потенциала системы. Спектрофотометрически проведено сравнение эффективности включения красителей в оболочку, полученную из различных полиэлектролитов. Продемонстрировано разрушение капсул, содержащих в оболочке краситель, под действием лазерного излучения.

Ключевые слова: полиэлектролитные капсулы, флуоресцентные красители, воздействие лазерного излучения.

ВВЕДЕНИЕ

Микрокапсулы, получаемые последовательной адсорбцией противоположно заряженных полиэлектролитов на коллоидные частицы, перспективны в качестве новых средств доставки лекарств [1]. При этом для контролируемого высвобождения инкапсулированных веществ в нужном месте организма можно использовать лазерное излучение. Воздействие лазера носит локальный характер, что важно для медицинского применения. В качестве компонентов оболочек капсул, поглощающих лазерное излучение, используют плазмонно-резонансные частицы — наночастицы золота и серебра [2]. Также дистанционное вскрытие капсул под действием лазерного излучения возможно при включении в состав полиэлектролитных оболочек флуоресцентных красителей. Например, разрушение оболочек капсул осуществляли при включении в их состав порфиринов и фталоцианинов, в результате облучения которых образуются активные радикалы [3]. В работе [4] в состав оболочек капсул из полиаллиламина и полистиролсульфоната был включен ИК-флуоресцентный краситель IR806 и проведено лазерное вскрытие капсул в результате нагрева, вызванного конверсией энергии.

Для эффективного разрушения полиэлектролитных капсул под действием лазерного излучения

необходима разработка методик включения красителей различного типа в оболочки капсул и исследование физико-химических процессов, обеспечивающих такое включение. В данной работе проведена модификация оболочек полиэлектролитных капсул флуоресцентными красителями родамином 6Ж (**Р6Ж**), метиловым фиолетовым (**МФ**) и индигокармином (**ИнК**) (рис. 1) за счет адсорбции на полиэлектролитные слои. Выбранные красители обладают флуоресценцией в области длин волн, подходящей для применения в методе неинвазивной флуоресцентной диагностики. То есть модификация капсул такими красителями может обеспечить и лазерное вскрытие оболочек и детектирование положения капсул в организме.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы следующие вещества: полистиролсульфонат натрия (**ПСС**); хлорид натрия; хлорид кальция; карбонат натрия (Acros Organics, США); полиаллиламин гидрохлорид (**ПАА**); полидиаллилдиметиламмоний (**ПДАДМА**); индигокармин; родамин 6Ж; метиловый фиолетовый; тринатриевая соль этилендиаминтетра-уксусной кислоты (**ЭДТА**) (Sigma-Aldrich, Германия); полиэтиленимин (**ПЭИ**) (Serva, Германия).

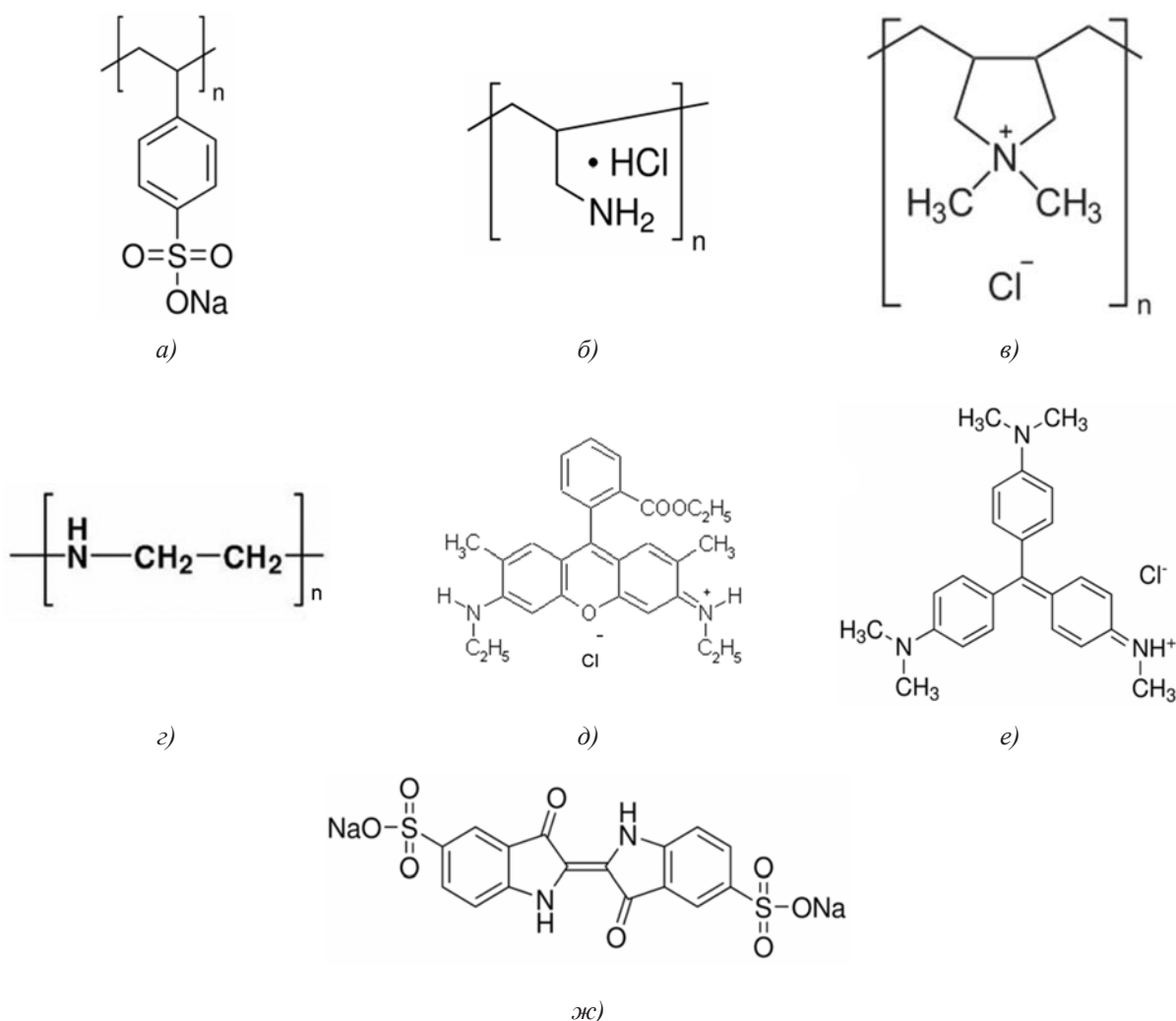


Рис. 1. Формулы полиэлектролитов (а-г) и флуоресцентных красителей (д-ж), используемых в работе:

(а) — полистиролсульфонат натрия; (б) — полиаллиламин гидрохлорид; (в) — полидиаллилдиметиламмоний хлорид; (з) — полиэтиленимин; (д) — родамин 6Ж; (е) — метиловый фиолетовый; (ж) — индигокармин

В качестве ядер капсул были взяты сферические частицы карбоната кальция, полученные по методике [5]. Такие ядра могут заключать в себе биоактивные соединения, кроме того, их растворимость в мягких условиях позволяет инкапсулировать функциональные вещества без потери их биоактивности. Оболочка капсул была получена по методике [6] с помощью последовательной адсорбции полистиролсульфоната (ПСС) в качестве полианиона и различных поликатионов: полиаллиламина (ПАА), полидиаллилдиметиламмония (ПДАДМА) и полиэтиленимина (ПЭИ) (рис. 1).

Флуоресцентные красители были включены в состав оболочек капсул путем адсорбции из водных растворов (концентрация раствора 1 мг/мл, 1 мл раствора на количество микрочастиц, полу-

ченных с использованием 20 мг исходных ядер). Для родамина 6Ж также использовали растворы с концентрацией $1 \cdot 10^{-4}$ М, $5 \cdot 10^{-4}$ М и $3 \cdot 10^{-2}$ М.

Получение полых полиэлектролитных капсул осуществляли путем растворения ядер CaCO_3 при добавлении тринатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты.

Также были получены образцы капсул без красителя с составом оболочек $(\text{ПДАДМА/ПСС})_4$, $(\text{ПАА/ПСС})_4$ и $(\text{ПЭИ/ПСС})_4$.

Визуализацию микрочастиц проводили с использованием конфокального флуоресцентного лазерного сканирующего микроскопа TCS SPE (Leica, Германия). Прибор снабжен $100\times$ иммерсионным объективом, имеющим цифровую апертуру 1.4. Для возбуждения флуоресценции использовали лазеры с длинами волн 532 нм и 635 нм.

Дзета-потенциал поверхности оболочек измеряли с помощью анализатора частиц Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Каждое значение получали путем усреднения 15 значений для трех последовательных измерений.

Спектры поглощения суспензий капсул и растворов, содержащих красители, в ультрафиолетовой/видимой областях спектра снимали с помощью двухлучевого сканирующего спектрофотометра Lambda-650 (Perkin-Elmer, Германия) с диапазоном длин волн 190—900 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Родамин 6Ж и метиловый фиолетовый имеют положительный заряд, поэтому эти красители адсорбировали на поверхность полиэлектролитной оболочки после нанесения отрицательно заряженного слоя ПСС. Результаты измерения дзета-потенциала (табл.) показывают, что после адсорбции обоих красителей поверхностный заряд остается отрицательным, поэтому для получения стабильной структуры после красителя наносили слой

поликатиона. При этом МФ изменяет величину дзета-потенциала частицы более эффективно, и наилучший результат наблюдается при использовании ПДАДМА в качестве поликатиона.

Индигокармин имеет отрицательный заряд, этот краситель адсорбировали на поверхность полиэлектролитной оболочки после слоя поликатиона. Поликатионы обычно имеют меньшую величину заряда полииона, чем полианионы, поэтому неудивительно, что в случае ПАА поверхность капсулы до адсорбции красителя была практически нейтральной. После адсорбции МФ поверхность частицы приобрела отрицательный заряд (табл.), и на нее был нанесен слой поликатиона. Для оболочки с ПДАДМА и ПЭИ после нанесения индигокармина поверхность осталась положительной, поэтому после слоя красителя был нанесен слой ПСС. Состав полученных оболочек приведен в таблице. Величина дзета-потенциала итоговых оболочек свидетельствует о довольно высокой устойчивости созданных коллоидных систем.

Таблица. Дзета-потенциал частиц на разных этапах нанесения оболочки с включенными в состав красителями

| Краситель | Состав и средний дзета-потенциал (мВ) оболочки до адсорбции красителя | | Состав и средний дзета-потенциал (мВ) оболочки после адсорбции красителя | | Состав и средний дзета-потенциал (мВ) итоговой оболочки | |
|------------------------|---|---------------------------|--|--------------------------------|---|---|
| | Р6Ж | (ПДАДМА/ПСС) ₃ | -43 | (ПДАДМА/ПСС) ₃ /Р6Ж | -31 | (ПДАДМА/ПСС) ₃ /Р6Ж/ПДАДМА/ПСС |
| (ПАА/ПСС) ₃ | | -30 | (ПАА/ПСС) ₃ /Р6Ж | -22 | (ПАА/ПСС) ₃ /Р6Ж/ПАА/ПСС | -29 |
| (ПЭИ/ПСС) ₃ | | -21 | (ПЭИ/ПСС) ₃ /Р6Ж | -15 | (ПЭИ/ПСС) ₃ /Р6Ж/ПЭИ/ПСС | -20 |
| МФ | (ПДАДМА/ПСС) ₃ | -43 | (ПДАДМА/ПСС) ₃ /МФ | -10 | (ПДАДМА/ПСС) ₃ /МФ/ПДАДМА/ПСС | -40 |
| | (ПАА/ПСС) ₃ | -30 | (ПАА/ПСС) ₃ /МФ | -15 | (ПАА/ПСС) ₃ /МФ/ПАА/ПСС | -28 |
| | (ПЭИ/ПСС) ₃ | -21 | (ПЭИ/ПСС) ₃ /МФ | -16 | (ПЭИ/ПСС) ₃ /МФ/ПЭИ/ПСС | -18 |
| ИнК | (ПДАДМА/ПСС) ₃ /ПДАДМА | 28 | (ПДАДМА/ПСС) ₃ /ПДАДМА/ИнК | 21 | (ПДАДМА/ПСС) ₃ /ПДАДМА/ИнК/ПСС | -27 |
| | (ПАА/ПСС) ₃ /ПАА | 3 | (ПАА/ПСС) ₃ /ПАА/ИнК | -9 | (ПАА/ПСС) ₃ /ПАА/ИнК/ПАА/ПСС | -30 |
| | (ПЭИ/ПСС) ₃ /ПЭИ | 13 | (ПЭИ/ПСС) ₃ /ПЭИ/ИнК | 1 | (ПЭИ/ПСС) ₃ /ПЭИ/ИнК/ПСС | -22 |

Изображения, полученные методом конфокальной флуоресцентной микроскопии (рис. 2), а также

спектры поглощения (рис. 3) суспензий капсул с родамином 6Ж и метиловым фиолетовым демон-

стрируют эффективное включение этих красителей в оболочку. В случае индигокармина, несмотря на успешную адсорбцию по данным изменения дзета-потенциала системы, происходит его вымывание при нанесении последних полиэлектролитных слоев. В результате получают оболочки, содержащие лишь незначительное количество красителя. Это можно объяснить тем, что заряд полиэлектролитного слоя, на который адсорбируется индигокармин, невелик, взаимодействие слабое, ион красителя вытесняется при адсорбции последующих полиэлектролитных слоев.

Сравнение спектров поглощения суспензий капсул одинаковой концентрации (количество капсул определяли с помощью камеры Горяева) и различного состава оболочки показали зависимость степени включения красителя от используемого поликатиона. И для родамина 6Ж (рис. 3а), и для метилового фиолетового (рис. 3б) максимальное количество красителя адсорбируется на оболочку, полученную с использованием ПАА в качестве поликатиона. Эти данные противоречат результатам по изменению дзета-потенциала оболочки после адсорбции красителя, где максимальный эффект был получен для системы с ПДАДМА. По-видимому, это обусловлено вкладом других, не

электростатических сил, обеспечивающих взаимодействие красителя с молекулами полиэлектролитной оболочки.

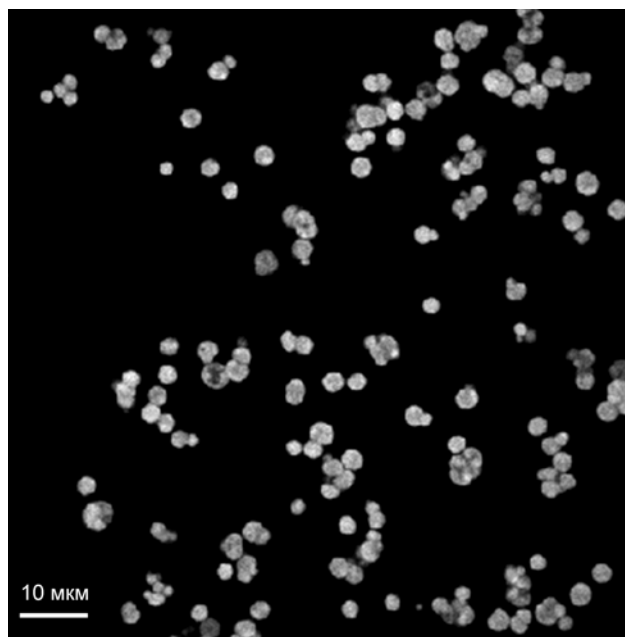


Рис. 2. Изображение полых капсул с составом оболочки (ПАА/ПСС)₃/МФ/ПАА/ПСС (конфокальная флуоресцентная микроскопия)

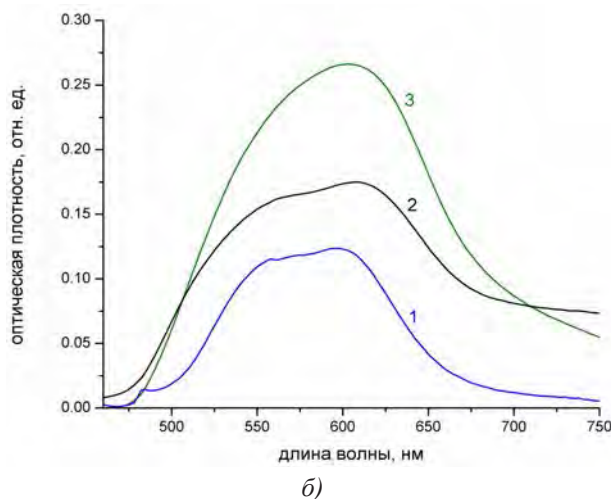
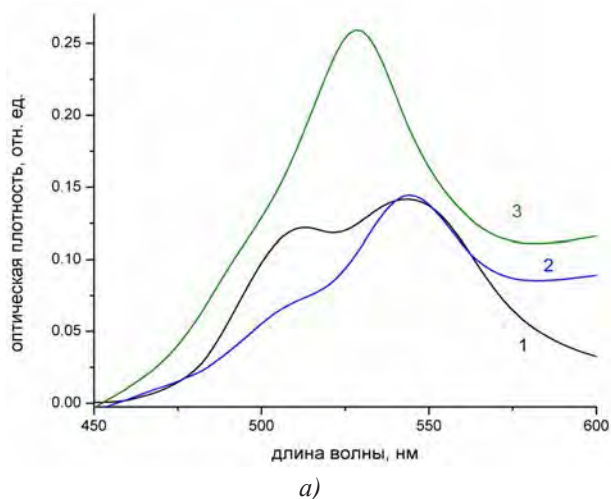


Рис. 3. Спектры поглощения полых капсул с включенными в оболочку родиамином 6Ж (а) и метиловым фиолетовым (б):

1 — (ПЭИ/ПСС)₃/Краситель/ПЭИ/ПСС относительно (ПЭИ/ПСС)₄; 2 — (ПДАДМА/ПСС)₃/Краситель/ПДАДМА/ПСС относительно (ПДАДМА/ПСС)₄; 3 — (ПАА/ПСС)₃/Краситель/ПАА/ПСС относительно (ПАА/ПСС)₄

Суспензии полых капсул с составом оболочки (ПДАДМА/ПСС)₂/Р6Ж/ (ПДАДМА/ПСС)₂/Р6Ж/ ПДАДМА/ПСС и капсул без красителя (ПДАДМА/ПСС)₆ облучали интенсивным светом в полосе поглощения молекул красителя (вторая гармоника

гранатового (Nd: YAG) лазера LF114 с длиной волны 532 нм, диаметр луча 7 мм, энергия в импульсе 180 мДж, длительность импульса 10 нс). Микроскопические наблюдения показали, что в результате лазерной обработки значительная часть

окрашенных капсул разрушается (рис. 4). Механизм такого разрушения может быть обусловлен эффективным поглощением молекулами красителей падающего излучения и дальнейшим переносом энергии в окружающую молекулы матрицу, что возможно при совпадении колебательных мод молекулы и полимерных звеньев [7]. В этом случае происходит перенос колебательной энергии возбуждения по индуктивно-резонансному механизму,

что приводит к локальному неравновесному нагреву ближайшего окружения молекул красителя и разрыву связей в оболочке капсулы. По литературным данным в колебательных спектрах родамина 6Ж присутствует полоса 1606 см^{-1} , связанная со скелетными колебаниями в фенильной группе [8]. Эта полоса перекрывается с полосой на 1607 см^{-1} , имеющейся в колебательном спектре ПСС, которая связана с валентными колебаниями С=С связи [9].

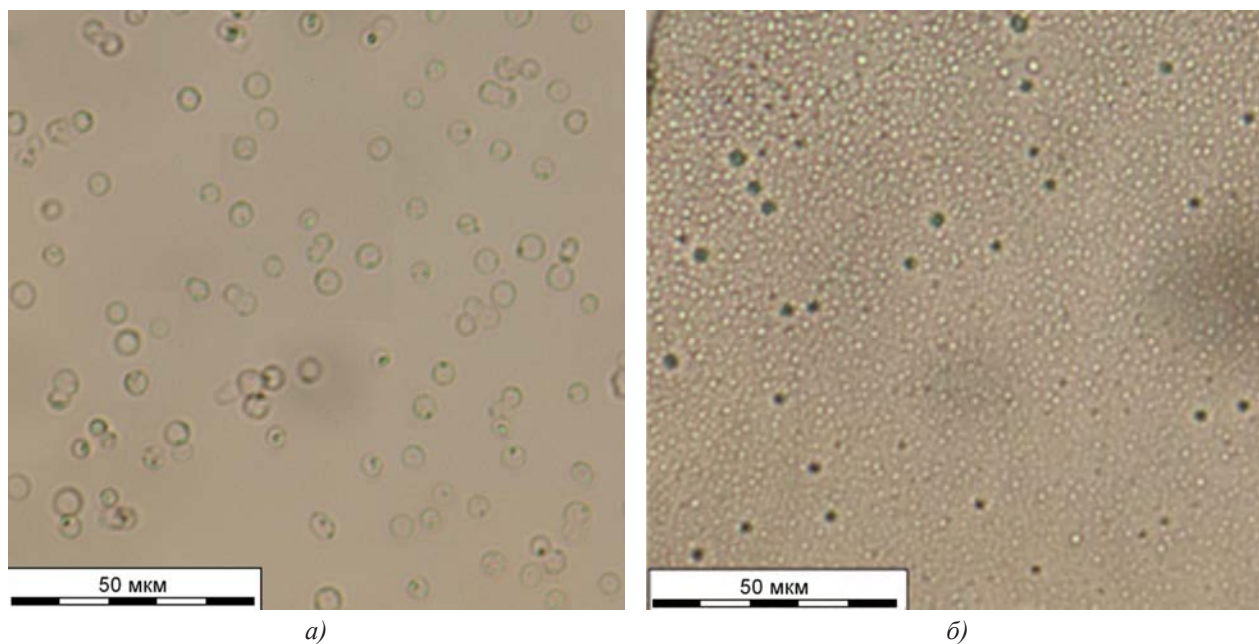


Рис. 4. Изображение в оптическом микроскопе капсул с максимальной концентрацией родамина 6Ж до (а) и после (б) лазерного облучения

Для повышения эффективности лазерного воздействия на капсулы важно регулировать количество красителя, включенного в оболочку. Это может быть достигнуто путем варьирования концентрации раствора, из которого происходит адсорбция. Спектры поглощения суспензий капсул с составом оболочки $(\text{ПДАДМА/ПСС})_4/\text{Р6Ж}/(\text{ПДАДМА/ПСС})_4/\text{Р6Ж}/\text{ПДАДМА/ПСС}$ (рис. 5) показывают увеличение количества включенного в оболочку красителя при повышении концентрации раствора, из которого адсорбируется родамин 6Ж.

ВЫВОДЫ

С помощью последовательной адсорбции из водных растворов проведено эффективное включение флуоресцентных красителей родамина 6Ж и метилового фиолетового в оболочку полиэлектролитных капсул различного состава. Показана возможность регулирования количества включенного в оболочку красителя и проведено разрушение

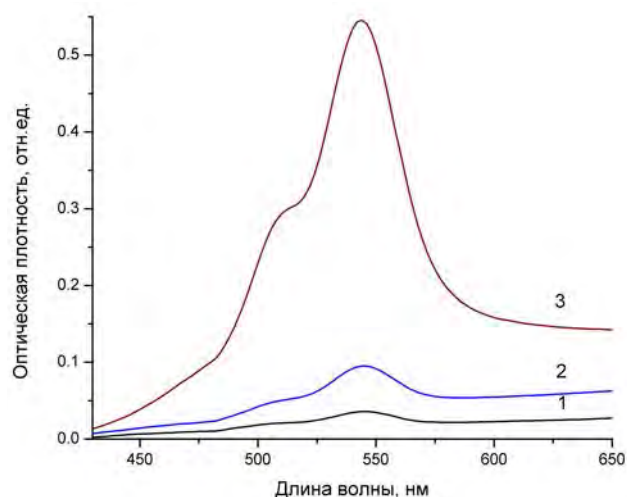


Рис. 5. Спектры поглощения суспензий капсул с двумя слоями родамина 6Ж, адсорбированного из растворов разной концентрации:

1 — $1 \cdot 10^{-4}$ М; 2 — $5 \cdot 10^{-4}$ М; 3 — $3 \cdot 10^{-2}$ М (относительно спектров капсул без красителя)

модифицированных оболочек капсул воздействием лазерного излучения. Полученные результаты могут быть использованы при разработке новых средств доставки лекарств на основе полиэлектролитных капсул, меченых флуоресцентными красителями.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИК РАН при частичной поддержке Минобрнауки (проект RFMEFI62114X0005) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-03-00979a).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. De Cock L. J., De Koker S., De Geest B. G., et al. // *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, vol. 49, pp. 6954—6973.

2. Bukreeva T. V., Parakhonsky B. V., Skirtach A. G., et al. // *Crystallography Reports*, 2006, vol. 51, pp. 863—869.

3. Bedard M. F., Sadasivan S., Sukhorukov G. B., Skirtach A. G. // *J. Mater. Chem.* 2009, vol. 19, pp. 2226—2233.

4. Skirtach A. G., Antipov A. A., Shchukin D. G., Sukhorukov G. B. // *Langmuir*, 2004; vol. 20 pp. 6988—6992.

5. Volodkin D. V., Petrov A. I., Prevot M., et al. // *Langmuir*, 2004, vol. 20, pp. 3398—3406.

6. Sukhorukov G. B., Donath E., Davis S., et al. // *Polym. Adv. Technol.*, 1998, vol. 9, pp. 759—767.

7. Плотников Г. С., Зайцев В. Б. *Физические основы молекулярной электроники*. Москва, МГУ, 2000, с. 164.

8. Majoube M., Henry M. // *Spectrochim. Acta A*. 1991, vol. 47, pp. 1459—1466.

9. Chen L., Yuan C., Dou H., et al. // *Electrochim. Acta*, 2009, vol. 20, pp. 2335—2341.

INCLUSION OF FLUORESCENT DYES OF DIFFERENT TYPES IN THE SHELLS OF POLYELECTROLYTE CAPSULES BY STEPWISE ADSORPTION

©2015 I. V. Marchenko^{1,2}, B. V. Nabatov², T. V. Bukreeva^{1,2}

¹ National Research Center «Kurchatov Institute», Akademika Kurchatova sq., 1, 123182 Moscow, Russia

² Shubnikov Institute of Crystallography, Russian Academy of Sciences, Leninskiy pr., 59, 119333 Moscow, Russia
e-mail: iramarchenko85@mail.ru

Received 19.08.2015

Abstract. Microcapsules obtained by stepwise adsorption of oppositely charged polyelectrolytes on colloid particles are prospective as novel drug delivery systems. The inclusion of dye molecules in the polyelectrolyte shells can allow the photosensitized destruction of the capsules. For effective destruction of capsules by laser radiation the development of techniques of inclusion of different dyes in the capsule shells is necessary. In this work polyelectrolyte microcapsules were modified with fluorescent dyes rhodamine 6G, methyl violet and indigo carmine by adsorption on polyelectrolyte layers. The obtained capsules were investigated by confocal fluorescent microscopy and zeta-potential measurements. The amount of the dye included in the polyelectrolyte shell formed of different polyelectrolytes was compared by spectrophotometry. Confocal microscopy images and absorption spectra of the obtained capsules demonstrate effective inclusion of rhodamine 6G and methyl violet in the capsule shell whereas only negligible amount of indigo carmine remained in the shell after capsule formation. Possibility to control the amount of the dye included in the shell was shown. The capsules with rhodamine 6G in the shell were irradiated by a laser in the absorption band of the dye molecules. By measuring the size distribution of the capsules before and after irradiation with a laser it was shown that the capsules are destroyed under the effect of laser radiation. The chosen dyes possess fluorescence in the range of wavelengths suitable to use in noninvasive medical diagnostics. Modification of capsules by such dyes can provide both destruction of the shells and detection of location of the capsules in the body.

Keywords: polyelectrolyte capsules, fluorescent dyes, laser irradiation.

REFERENCES

1. De Cock L. J., De Koker S., De Geest B. G., et al. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, vol. 49, pp. 6954—6973. DOI: 10.1002/anie.200906266
2. Bukreeva T. V., Parakhonsky B. V., Skirtach A. G., et al. *Crystallography Reports*, 2006, vol. 51, pp. 863—869. DOI: 10.1134/S1063774506050178
3. Bedard M. F., Sadasivan S., Sukhorukov G. B., Skirtach A. G. *J. Mater. Chem.* 2009, vol. 19, pp. 2226—2233. DOI: 10.1039/b818774f
4. Skirtach A. G., Antipov A. A., Shchukin D. G., Sukhorukov G. B. *Langmuir*, 2004; vol. 20, pp. 6988—6992. DOI: 10.1021/la048873k
5. Volodkin D. V., Petrov A. I., Prevot M., et al. *Langmuir*, 2004, vol. 20, pp. 3398—3406. DOI: 10.1021/la036177z
6. Sukhorukov G. B., Donath E., Davis S., et al. *Polym. Adv. Technol.*, 1998, vol. 9, pp. 759—767. DOI: 10.1002/(SICI)1099—1581(1998100)9:10/11<759::AID-PAT846>3.0.CO;2-Q
7. Plotnikov G. S. and Zaitsev V. B. *Fizicheskie osnovy molekulyarnoy elektroniki*. [Physical basics of molecular electronics]. Moscow, MSU Publ., 2000, p. 164.
8. Majoube M., Henry M. *Spectrochim. Acta A.*, 1991, vol. 47, pp. 1459—1466. DOI: 10.1016/0584—8539(91)80237-D
9. Chen L., Yuan C., Dou H., et al. *Electrochim. Acta*, 2009, vol. 20, pp. 2335—2341. DOI: 10.1016/j.electacta.2008.10.071

Марченко Ирина Валерьевна — к. ф.-м. н., научный сотрудник, НИЦ «Курчатовский институт»; тел.: +7(499) 1967021, e-mail: iramarchenko85@mail.ru

Набатов Борис Викторович — к. ф.-м. н., старший научный сотрудник, Институт кристаллографии им. А. В. Шубникова РАН; тел.: +7(499) 1351300, e-mail: bnabatov@ns.crys.ras.ru

Букреева Татьяна Владимировна — к. х. н., доцент, начальник лаборатории НИЦ «Курчатовский институт»; тел.: +7(499) 1969817, e-mail: bukreeva@crys.ras.ru

Marchenko Irina V. — Cand. Sci. (Phys.-Math.), Researcher, National Research Center «Kurchatov Institute»; ph.: +7(499) 1967021, e-mail: iramarchenko85@mail.ru

Nabatov Boris V. — Cand. Sci. (Phys.-Math.), Senior Researcher, Shubnikov Institute of Crystallography, RAS; ph.: +7(499) 1351300, e-mail: bnabatov@ns.crys.ras.ru

Bukreeva Tatiana V. — Cand. Sci. (Chem.), Associate Professor, Head of Laboratory, National Research Center «Kurchatov Institute»; ph.: +7(499) 1969817, e-mail: bukreeva@crys.ras.ru