



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101775094 B

(45) 授权公告日 2011. 10. 05

(21) 申请号 201010103428. 0

审查员 段然

(22) 申请日 2010. 01. 26

(73) 专利权人 宁波美康盛达生物科技有限公司
地址 315104 浙江省宁波市鄞州区启明南路
299 号

(72) 发明人 邹炳德

(74) 专利代理机构 宁波市鄞州甬致专利代理事
务所 33228

代理人 代忠炯

(51) Int. Cl.

C08F 212/08 (2006. 01)

C08F 220/06 (2006. 01)

C08F 2/22 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

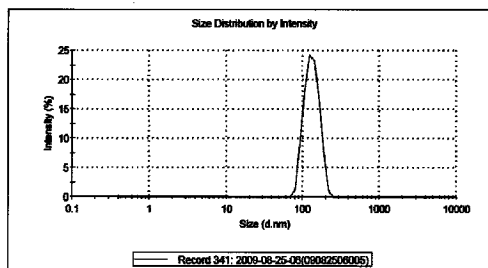
(54) 发明名称

用于免疫检测技术的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳的制备方法

(57) 摘要

本发明公开一种用于免疫检测技术的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳的制备方法, 制备步骤包括: 将苯乙烯、甲基丙烯酸、水加入到三口烧瓶后搅拌 10 ~ 30min; 上述甲基丙烯酸与苯乙烯的摩尔比是 0.1 ~ 0.2 : 1; 搅拌结束后, 向反应体系中通入 N₂, 然后加过硫酸钾和氯化钠的水溶液, 使得反应体系中氯化钠的浓度为 0.064mol/L、过硫酸钾的浓度范围为 7.00 × 10⁻⁴ ~ 25.0 × 10⁻³ mol/L, 然后再继续通入 N₂; 升温至 60 ~ 80℃, 反应 12 ~ 24h; 反应完成后冷却到室温后得到本发明的目标产物。本发明制备的胶乳其粒径均一, 单分散性好、稳定性强, 同时胶乳表面具有较高的羧基含量, 适于用于胶乳增强免疫浊度测定法。

Results			
	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 127.8	Peak 1: 133.2	100.0	28.86
Pdi: 0.017	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.949	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			



1. 一种用于免疫检测技术的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳的制备方法,其特征在于:制备步骤包括:

(1) 将苯乙烯、甲基丙烯酸、水加入到反应容器后搅拌 10 ~ 30min;上述甲基丙烯酸与苯乙烯的摩尔比是 0.1 ~ 0.2 : 1;

(2) 步骤(1)所得的反应混合物搅拌结束后,向该反应混合物中通入 30min 的氮气,用以除去反应混合物中的空气,然后再向该反应混合物中加入过硫酸钾水溶液和氯化钠水溶液,使得加完后所得的反应混合物中 NaCl 的浓度为 0.064mol/L、过硫酸钾的浓度范围为 $7.00 \times 10^{-4} \sim 25.0 \times 10^{-3}$ mol/L,然后再向此时的反应混合物中继续通入 20min 的氮气;

(3) 步骤(2)所得的反应混合物在氮气通入 20min 后,停止通入氮气,再将此时的反应混合物升温至 60 ~ 80°C,反应 12 ~ 24h;

(4) 反应完成后冷却到室温,得到表面经过羧基改性的聚苯乙烯胶乳即带有羧基的聚苯乙烯胶乳;

所述步骤(1)中加入的水和步骤(2)中配制过硫酸钾水溶液和氯化钠水溶液所用的水,两部分所用水的总量要使得步骤(1)所加的甲基丙烯酸在该总用水量中的浓度为 0.0819 ~ 0.174mol/L。

2. 根据权利要求 1 所述的用于免疫检测技术的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳的制备方法,其特征在于:表面带羧基的聚苯乙烯胶乳的颗粒粒径为 100 ~ 500nm。

用于免疫检测技术的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于免疫检测技术的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳的制备方法。

背景技术

[0002] 在免疫检测领域的一般情况下,首先将抗原抗体反应形成免疫复合物,然后用浊度法定量测定,但形成抗原-抗体复合物需要较长时间。胶乳增强免疫浊度测定法(简称LETIA)是近年来免疫检测领域出现的一种新的免疫检测技术,LETIA不需要特殊仪器,自动、半自动生化分析仪即可测定,适宜在广大基础医疗单位推广应用。目前已被应用于许多分析物定量测定有数十种之多,如ASO、RF、CRP、转铁蛋白、弓形体、风疹、 β_2 -微球蛋白及药物监测等。

[0003] LETIA其原理是包被了抗原或抗体的胶乳微粒(免疫胶乳),与标本中相应抗体或抗原发生免疫反应后,形成凝集颗粒,凝集物的形成使反应混合系统形成一定浊度,浊度增加的程度与标本中被检物浓度成正比关系,在一定波长下进行浊度测定,即可测出标本中被检物的含量。因此,如何制备出适合的胶乳(免疫胶乳)是胶乳增强免疫浊度测定的关键。

[0004] 目前,常规胶乳制备过程,多要使用乳化剂作为辅助原料,但是胶乳制备完成后,其中往往会残留一定量的乳化剂,而乳化剂的存在会影响胶乳最终的使用性能。

[0005] 另,胶乳增强免疫浊度测定用的波长与所用胶乳粒径大小有关,而现有技术制备的胶乳颗粒的粒径均一性不是很理想,因此会影响测定的精度。

[0006] 据研究表明,表面有羧基修饰的聚苯乙烯胶乳是以聚苯乙烯为内核,其表面的羧基能够通过化学法偶联抗原或偶联抗体,该胶乳适于用于胶乳增强免疫浊度测定法,但是,关于制备表面具有较高羧基含量且粒径均一的聚苯乙烯胶乳却鲜有报道。

发明内容

[0007] 本发明针对现有技术的上述不足,提供一种无乳化剂残留,胶乳颗粒粒径均一,测定精度高、且表面带有羧基能够通过化学法偶联抗原或偶联抗体的用于免疫检测技术的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳的制备方法。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明是通过如下技术方案实现的:本发明的一种用于免疫检测技术的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳的制备方法,制备步骤包括:

[0009] (1) 将苯乙烯(St)、甲基丙烯酸(MAA)、水加入到反应容器后搅拌10~30min;上述甲基丙烯酸与苯乙烯的摩尔比是0.1~0.2:1;

[0010] (2) 步骤(1)所得的反应混合物搅拌结束后,向该反应混合物中通入30min的氮气(N_2),用以除去反应混合物中的氧气,然后再向该反应混合物中加入过硫酸钾(KPS)水溶液和氯化钠(NaCl)水溶液,使得加完后所得的反应混合物中氯化钠的浓度为0.064mol/L、过硫酸钾的浓度范围为 $7.00 \times 10^{-4} \sim 25.0 \times 10^{-3}$ mol/L,然后再向此时的反应混合物中继续通

入 20min 的 N_2 ;

[0011] (3) 步骤 (2) 所得的反应混合物在氮气通入 20min 后, 停止通入氮气, 再将反应混合物升温至 $60 \sim 80^\circ\text{C}$, 反应 12 ~ 24h;

[0012] (4) 反应完成后冷却到室温, 得到本发明表面经过羧基改性的聚苯乙烯胶乳即表面带羧基的聚苯乙烯胶乳。

[0013] 本发明一种用于免疫检测技术的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳的制备方法, 制备步骤还包括: 将步骤 (4) 所得的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳用去离子水多次离心沉降清洗, 直至离心出的上清液的电导率与去离子水的相似为止。

[0014] 本发明制备的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳的颗粒粒径为 $100 \sim 500\text{nm}$ 。

[0015] 上述步骤 (1) 中加入的水和步骤 (2) 配制过硫酸钾水溶液和氯化钠水溶液所用的水, 两部分所用水的总量要使得步骤 (1) 所加的甲基丙烯酸在该总用水量中的浓度为 $0.0819 \sim 0.174\text{mol/L}$ 。

[0016] 氯化钠电解质:

[0017] 本发明的反应体系为无皂聚合体系, 对于无皂聚合体系来说, 由于所用的引发剂为过硫酸钾, 引发剂分裂后的硫酸根吸附在高聚物周围, 由于静电排斥作用保持体系的稳定。当加入氯化钠电解质时, 随着离子强度增大, 乳胶粒双层变薄, 静电排斥力逐渐下降, 体系变得越来越不稳定, 使得初始离子失去稳定性而彼此凝结, 因而胶乳颗粒的粒径变大, 形成粒径较大的聚合物胶乳。由于离子强度增大导致体系失稳, 胶乳粒子因此也分布不均, 从而分散系数增大。当离子强度增大到一定程度, 其对粒径影响较小, 而对分散性影响较大。

[0018] 甲基丙烯酸共聚单体:

[0019] 亲水性共聚单体 (甲基丙烯酸) 的加入, 使得聚苯乙烯胶乳颗粒的粒径明显减小。这是因为亲水性共聚单体所起到的稳定作用远远大于引发剂的亲水基团, 使得生成的胶乳颗粒比较稳定, 颗粒之间不会发生聚集。

[0020] 溶剂:

[0021] 极性或非极性溶剂的加入, 由于对单体和聚合物的溶解度不同, 因此对胶乳粒径和分散性有着一定的影响。

[0022] 本发明的优点和有益效果:

[0023] 1. 本发明制备的聚苯乙烯胶乳其表面具有较高的羧基含量, 表面有羧基修饰的聚苯乙烯胶乳以聚苯乙烯为内核, 其表面的羧基通过化学法偶联抗原或抗体, 因此, 适于利用胶乳增强免疫浊度测定法, 测定效果好。

[0024] 2. 本发明是通过无皂乳液聚合制备的聚苯乙烯胶乳, 制备过程没有使用乳化剂, 因此, 消除了常规乳液聚合产物中由于残留乳化剂而影响其最终使用性能这一不利因素。

[0025] 3. 本发明制备的聚苯乙烯胶乳是采用无皂乳液聚合制备的, 制备的胶乳微球比表面积大, 粒径分布均匀, 表面洁净, 并且表面的一些性质如亲水性、功能基团的数目和分布在一定程度上可以控制, 因此利用本发明制备得到的聚苯乙烯胶乳在均一性和羧基含量方面满足 LETIA 中对胶乳的要求。

附图说明

[0026] 图 1 本发明实施例 1 所得的聚苯乙烯胶乳颗粒粒度纳米分析。

[0027] 图 2 本发明实施例 1 所得的聚苯乙烯胶乳颗粒透射电子显微镜图 (TEM)。

具体实施方式

[0028] 下面结合具体实施例进一步描述本发明,但本发明并不仅限于下述实施例。

[0029] 实施例 1

[0030] (1) 将苯乙烯、甲基丙烯酸、水加入到三口烧瓶后搅拌 10min;上述苯乙烯为 0.041mol、甲基丙烯酸为 8.7mmol,水 10ml;

[0031] (2) 步骤 (1) 所得的反应体系搅拌结束后,向反应体系中通入 30min 的 N_2 ,然后将约 0.066g 的过硫酸钾和约 0.207g 的氯化钠加入到 40ml 的水中配置成水溶液,将上述配置的水溶液加入到反应体系中,加完后反应体系中 NaCl 的浓度为 0.064mol/L、KPS 的浓度为 4.38×10^{-3} mol/L(总用水量即步骤 (1) 所加的水和步骤 (2) 配置氯化钠和过硫酸钾所用的水为 50ml,配置 NaCl 和 KPS 水溶液所用的水只是确保能将 NaCl 和 KPS 完全溶解在水中,因为若以固态的形式将 NaCl 和 KPS 加入到反应体系中的话,有苯乙烯存在,不一定能确保 NaCl 和 KPS 的溶解性;只要确定加入 NaCl 和 KPS 水溶液之后,整个反应体系中 NaCl 和 KPS 的浓度为上述浓度即可,实施例 2~5 亦同),然后再继续通入 20min 的 N_2 ,在整个反应体系中,所加入的水的总量为 50ml,此时步骤 (1) 所加的甲基丙烯酸在总用水量中的浓度为 0.174mol/L;

[0032] 步骤 (1) 加入的水的量小于总用水量 50ml,剩余的水只要保证能够完全溶解步骤 (2) 需要加入的 NaCl 和 KPS 即可,因此,每次步骤 (1) 加入的水的量和溶解步骤 (2) 的 NaCl 和 KPS 所用的水量均可以是不固定的或者是固定的,总用水量为 50ml,实施例 2~5 亦同。

[0033] (3) 氮气通入完成后,将步骤 (2) 所得的反应体系升温至 70℃,反应 17.5 小时;

[0034] (4) 反应完成后冷却到室温后得到表面经过羧基改性的聚苯乙烯胶乳。制得的胶乳用去离子水多次离心沉降清洗,直至离心出的上清液的电导率与去离子水的相似为止,然后用水稀释,以乳液形式保存。

[0035] 利用粒度纳米分析仪和透射电子显微镜 (TEM),对制得的胶乳粒径进行了检测。利用反向电导滴定法对胶乳表面的羧基含量进行了测定,测得的羧基含量为 2.60mmol/g。

[0036] 由图 1 和图 2 可以看出该胶乳粒径在 120nm 左右,单分散指数是 0.017,表面光滑,形态规整,粒径均一,具有较好的单分散性。

[0037] 实施例 2

[0038] (1) 将苯乙烯、甲基丙烯酸、水加入到三口烧瓶后搅拌 10min;上述苯乙烯为 0.041mol、甲基丙烯酸为 8.7mmol,水 10ml;

[0039] (2) 步骤 (1) 所得的反应体系搅拌结束后,向反应体系中通入 30min 的 N_2 ,然后将约 0.117g 的过硫酸钾和约 0.207g 的氯化钠加入到 40ml 的水中配置成水溶液,将上述配置的水溶液加入到反应体系中,加完后反应体系中 NaCl 的浓度为 0.064mol/L、KPS 的浓度为 7.88×10^{-3} mol/L,然后再继续通入 20min 的 N_2 ,在整个反应体系中,所加入的水的总量为 50ml,此时步骤 (1) 所加的甲基丙烯酸在总用水量中的浓度为 0.174mol/L;

[0040] (3) 氮气通入完成后,将步骤 (2) 所得的反应体系升温至 70℃,反应 17.5 小时;

[0041] (4) 反应完成后冷却到室温后得到表面经过羧基改性的聚苯乙烯胶乳。制得的胶乳用去离子水多次离心沉降清洗,直至离心出的上清液的电导率与去离子水的相似为止,

然后用水稀释,以乳液形式保存。

[0042] 由粒度纳米分析测得该胶乳粒径为 163.9nm,单分散指数为 0.021,具有较好的单分散性。

[0043] 实施例 3

[0044] (1) 将苯乙烯、甲基丙烯酸、水加入到三口烧瓶后搅拌 10min;上述苯乙烯为 0.041mol、甲基丙烯酸 8.7mmol,水 10ml;

[0045] (2) 步骤(1)所得的反应体系搅拌结束后,向反应体系中通入 30min 的 N_2 ,然后将约 0.12g 的过硫酸钾和约 0.207g 的氯化钠加入到 40ml 的水中配置成水溶液,将上述配置的水溶液加入到反应体系中,加完后反应体系中 NaCl 的浓度为 0.064mol/L、KPS 的浓度为 8.14×10^{-3} mol/L,然后再继续通入 20min 的 N_2 ,在整个反应体系中,加入的水的量为 50mL,此时步骤(1)所加的甲基丙烯酸在总用水量中的浓度为 0.174mol/L;

[0046] (3) 氮气通入完成后,将步骤(2)所得的反应体系升温至 70℃,反应 17.5 小时;

[0047] (4) 反应完成后冷却到室温后得到表面经过羧基改性的聚苯乙烯胶乳。制得的胶乳用去离子水多次离心沉降清洗,直至离心出的上清液的电导率与去离子水的相似为止,然后用水稀释,以乳液形式保存。

[0048] 由粒度纳米分析测得该胶乳粒径为 176.9nm,单分散指数为 0.054,具有较好的单分散性。

[0049] 实施例 4

[0050] (1) 将苯乙烯、甲基丙烯酸、水加入到三口烧瓶后搅拌 10min;上述苯乙烯为 0.041mol、甲基丙烯酸为 7.6mmol,水 10ml;

[0051] (2) 步骤(1)所得的反应体系搅拌结束后,向反应体系中通入 30min 的 N_2 ,然后将约 0.118g 的过硫酸钾和约 0.207g 的氯化钠加入到 40ml 的水中配置成水溶液,将上述配置的水溶液加入到反应体系中,加完后反应体系中 NaCl 的浓度为 0.064mol/L、KPS 的浓度为 7.88×10^{-3} mol/L,然后再继续通入 20min 的 N_2 ,在整个反应体系中,加入的水的量为 50mL,此时步骤(1)所加的甲基丙烯酸在总用水量中的浓度为 0.152mol/L;

[0052] (3) 氮气通入完成后,将步骤(2)所得的反应体系升温至 70℃,反应 17.5 小时;

[0053] (4) 反应完成后冷却到室温后得到表面经过羧基改性的聚苯乙烯胶乳。制得的胶乳用去离子水多次离心沉降清洗,直至离心出的上清液的电导率与去离子水的相似为止,然后用水稀释,以乳液形式保存。

[0054] 由粒度纳米分析测得该胶乳粒径为 204.0nm,单分散指数为 0.025,具有较好的单分散性。

[0055] 实施例 5

[0056] (1) 将苯乙烯、甲基丙烯酸、水加入到三口烧瓶后搅拌 10min;上述苯乙烯为 0.041mol、甲基丙烯酸为 7mmol,水 12ml;

[0057] (2) 步骤(1)所得的反应体系搅拌结束后,向反应体系中通入 30min 的 N_2 ,然后将约 0.118g 的过硫酸钾和约 0.207g 的氯化钠加入到 38ml 的水中配置成水溶液,将上述配置的水溶液加入到反应体系中,加完后反应体系中 NaCl 的浓度为 0.064mol/L、KPS 的浓度范围为 7.88×10^{-3} mol/L,然后再继续通入 20min 的 N_2 ,在整个反应体系中,加入的水的量为 50mL,此时步骤(1)所加的甲基丙烯酸在总用水量中的浓度为 0.14mol/L;

[0058] (3) 氮气通入完成后,将步骤(2)所得的反应体系升温至 70℃,反应 17.5 小时;

[0059] (4) 反应完成后冷却到室温后得到表面经过羧基改性的聚苯乙烯胶乳。制得的胶乳用去离子水多次离心沉降清洗,直至离心出的上清液的电导率与去离子水的相似为止,然后用水稀释,以乳液形式保存。

[0060] 由粒度纳米分析测得该胶乳粒径为 251.0nm,单分散指数为 0.051,具有较好的单分散性。

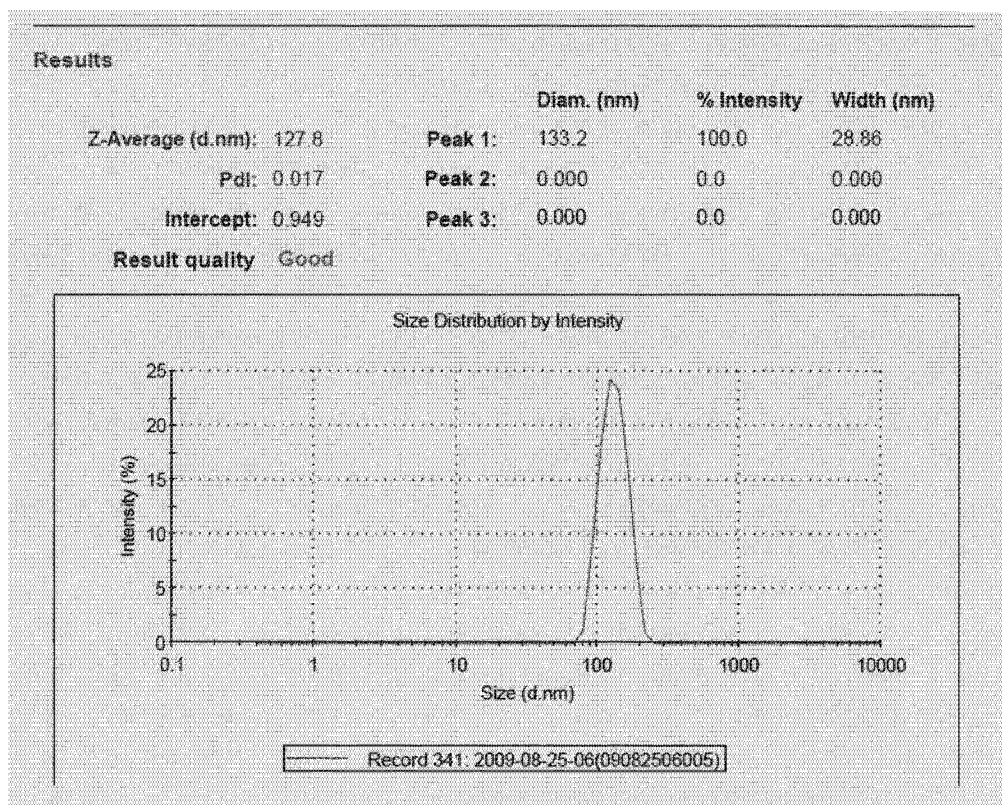


图 1 粒度（纳米）分析

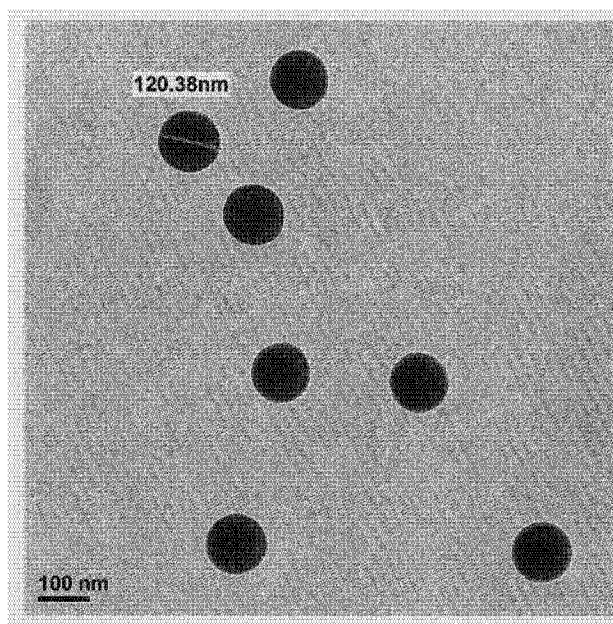


图 2 透射电子显微镜

专利名称(译)	用于免疫检测技术的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳的制备方法		
公开(公告)号	CN101775094B	公开(公告)日	2011-10-05
申请号	CN201010103428.0	申请日	2010-01-26
[标]申请(专利权)人(译)	宁波美康生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	宁波美康生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	宁波美康盛达生物科技有限公司		
[标]发明人	邹炳德		
发明人	邹炳德		
IPC分类号	C08F212/08 C08F220/06 C08F2/22 G01N33/531		
审查员(译)	段然		
其他公开文献	CN101775094A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种用于免疫检测技术的表面带羧基的聚苯乙烯胶乳的制备方法，制备步骤包括：将苯乙烯、甲基丙烯酸、水加入到三口烧瓶后搅拌10~30min；上述甲基丙烯酸与苯乙烯的摩尔比是0.1~0.2:1；搅拌结束后，向反应体系中通入N₂，然后加过硫酸钾和氯化钠的水溶液，使得反应体系中氯化钠的浓度为0.064mol/L、过硫酸钾的浓度范围为7.00×10⁻⁴~25.0×10⁻³mol/L，然后再继续通入N₂；升温至60~80℃，反应12~24h；反应完成后冷却到室温后得到本发明的目标产物。本发明制备的胶乳其粒径均一，单分散性好、稳定性强，同时胶乳表面具有较高的羧基含量，适于用于胶乳增强免疫浊度测定法。

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 127.8	Peak 1: 133.2	100.0	28.86
Pdi: 0.017	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.949	Peak 3: 0.000	0.0	0.000
Result quality Good			

