

**Ю.Б.Стецишин, О.Ю.Жолобок, А.М.Коструба, В.А.Дончак,
Х.І.Гаргай, Л.М.Ріпак, С.А.Воронов**

ТЕМПЕРАТУРОЧУТЛИВИ “NON-FOULING” НАНОШАРИ НА ОСНОВІ ПОЛІ(ω-ЕТИЛТРИЕТИЛЕНГЛІКОЛЬ-α-МЕТАКРИЛАТУ)

Показано можливість формування на поверхні скла прищеплених температурочутливих наночастинок полі(ω-етилтриетиленгліколь-α-метакрилату). Їх структуру та температурочутливі властивості досліджено методами еліпсометрії та визначення контактних кутів змочування. Встановлено, що отримані наночастинки практично не адсорбують білки з водного розчину в температурному інтервалі 20—32 °С.

ВСТУП. Формування на твердих поверхнях ковалентно прищеплених полімерних наночастинок зі специфічними властивостями є перспективним напрямком дизайну поверхні [1—3]. Одним із методів створення таких наночастинок є полімеризація “від поверхні”, суть якої полягає в тому, що спочатку на твердій поверхні локалізують центри радикалоутворення, за рахунок яких прищеплюють полімерні наночастинки. Центри радикалоутворення можна створити шляхом іммобілізації на поверхні полімерів або олігомерів, що містять реакційноздатні пероксидні групи, які при нагріванні генерують вільні радикали [4, 5]. У такий спосіб на поверхні скла були сформовані прищеплені наночастинки температурочутливих полімерів [6—8], поверхні яких здатні змінювати свою гідрофільність у відповідь на зміну температури [9, 10]. Найбільше дослідженими з них є наночастинки полі(*N*-ізопропілакриламід) та його кополімерів [11—13].

Відомо, що полі(ω-етилтриетиленгліколь-α-метакрилат) (ПОЕГМА) також проявляє термочутливість і нижня критична температура його розшарування з водою становить близько 25 °С [14]. Проте, на відміну від полі(*N*-ізопропілакриламід), він практично не сорбує білки, тобто належить до так званих “non-fouling” полімерів. Крім того, йому притаманні висока біосумісність та антиімунногенність, що важливо при використанні у біологічних системах [15—17].

Дана робота присвячена розробці методів формування на поверхні скла прищеплених наночастинок ПОЕГМА, дослідженню їх термочутливості та здатності проявляти “non-fouling” властивості.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА. Для формування прищеплених наночастинок використовували

силикатне скло (ДСТУ Б В.2.7-122:2009); поліетиленгліколь (Aldrich, $M_n=400$), 3-амінопропіл(триетокси)силан фірми Merck Chemical Co., ω-етилтриетиленгліколь-α-метакрилат (Aldrich, $M_r=246$); органічні розчинники, очищені за методиками [18].

Олігопероксид одержували за методикою [7]. Характеристики: $M_n=1400$; кислотне число 211 мг КОН/г (розраховано 189.4 мг КОН/г); вміст активного кисню 1.9 % (розраховано 2.2 %); вміст активного хлору 5.4 % (розраховано 4.8 %).

Для формування на поверхні скла температурочутливого наночастинок скляні пластинки занурювали у 0.2 %-й розчин 3-амінопропіл(триетокси)силану в метанолі на 24 год. Ковалентно неприщеплений силан екстрагували метанолом в апараті Сокслета [19]. На наступному етапі аміновані скляні пластинки занурювали на 2 год у 1 %-й діоксановий розчин олігопероксиду. Неприщеплений до поверхні олігопероксид екстрагували діоксаном в апараті Сокслета протягом 4 год [4, 7]. Модифіковані олігопероксидом пластинки поміщали в ампули з 0.1 М водним розчином ПОЕГМА та продували ампули аргоном. Після запаювання ампули прогрівали за 90 °С протягом 30 год. Модифіковані пластинки виймали з ампул та екстрагували неприщеплені мономер та полімер водою в апараті Сокслета протягом 4 год.

Контактний кут змочування вимірювали наступним чином. На поверхню пластинки за допомогою мікрошприца наносили краплю рідини. Кювету з пластинкою термостатували протягом 10 хв, після чого заміряли контактний кут змочування поверхні. Кількість паралельних замірів для одного виду пластинок — не менше 12.

Визначення сумарної вільної поверхневої енергії (λ_S) та її складових (Лівшиця–Ван-дер-Ваальса — λ_S^{LW} , кислотної — λ_S^- , основної — λ_S^+ та полярної — λ_S^{AB}) проводили за Лівшиця–Ван-дер-Ваальсовим кислотно-основним методом [20, 21]. Для цього вимірювали контактні кути змочування поверхні трьома рідинами (водою, диіодометаном та 1,2-етандіолом).

Топографію поверхонь модифікованого і немодифікованого скла досліджували за допомогою атомно-силової мікроскопії з використанням приладу CP Park Scientific Instruments (контактний метод), за звичайних умов в пульсаційно-силовому режимі, на площі заміру 0.5×0.5 мкм², щуп — Si₃N₄.

Товщину та оптичні параметри адсорбованих

полімерних наночарів вивчали методом еліпсометрії *ex situ* за допомогою нуля-еліпсометра LEF-3М (Інститут напівпровідникової фізики, Новоросійськ, Росія), точність оптичного елемента 0.01°. Вимірювання проводили у дистильованій воді за температури від 17 до 36 °С.

Лентіл лектин з флуоресцеїн ізоціанатом (адсорбує синє світло, $\lambda_{abc} = 490$ нм та випромінює зелене флуоресцентне світло $\lambda_{вип} = 525$ нм) використовували як модельний білок для дослідження адсорбції за різних температур. Краплю розчину білка у фосфатному буфері (рН 7.4) наносили на поверхню пластинки та інкубували протягом 15 хв за відповідної температури. Змивали неадсорбований білок буфером та дистильованою водою, сушили у потоці азоту. Флуоресценцію

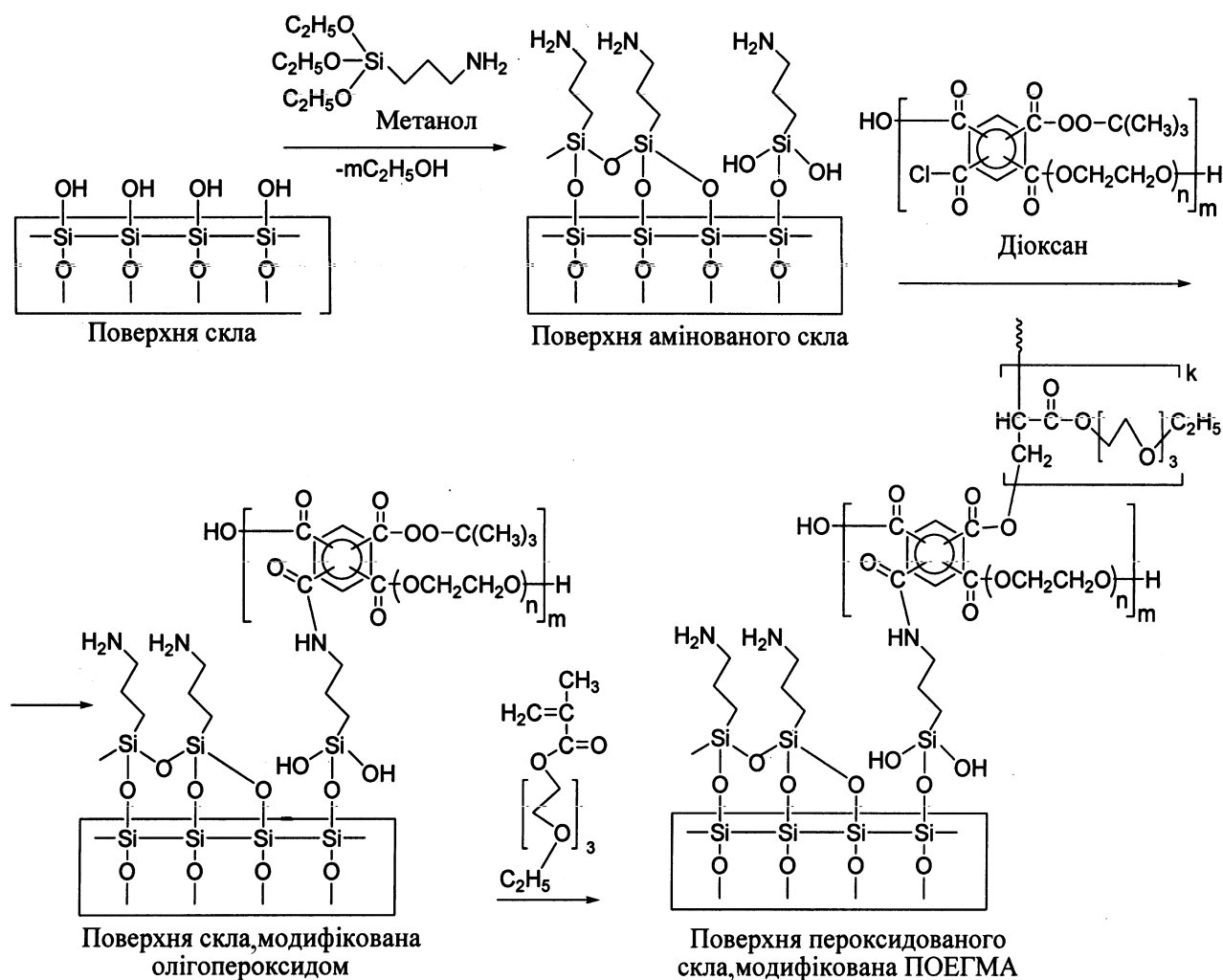


Рис. 1. Схема модифікації поверхні скла.

Значення контактних кутів змочування та величин вільної поверхневої енергії скляних поверхонь

Поверхня	Контактний кут змочування, град			Вільна поверхнева енергія, мН/м				
	H ₂ O	CH ₂ I ₂	C ₂ H ₄ (OH) ₂	λ_S^{LW}	λ_S^-	λ_S^+	λ_S^{AB}	λ_S
Скло	21 ± 3	30 ± 1.5	35 ± 2	44.1	69.7	0.3	9.3	53.4
Аміноване скло	64.8 ± 3	38 ± 3	4.05 ± 2	40.6	16.3	0.2	2.8	43.4
Модифіковане скло	73 ± 3	20 ± 3	45 ± 2	47.7	8.9	0.04	0.38	48.1

білків вивчали за допомогою оптичного мікроскопу Olympus BX51 з галогеновою лампою (100 Вт), фільтром U-MNG2 ($\lambda_{збуд} = 470\text{—}490$ нм, $\lambda_{вип} > 510$ нм) та камерою DP72.

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ. Формування ковалентно прищеплених наночарів ПОЕГМА проводили в три етапи (рис. 1). На першому — поверхню скла амінували за допомогою 3-амінопропіл(триетокси)силану для функціоналізації первинними аміногрупами. На другому — до поверхні прищеплювали олігопероксид. Олігопероксид містить функціональні хлорангідридні групи, які у м'яких умовах взаємодіють з поверхневими аміногрупами, що забезпечує ковалентне зв'язування олігопероксиду з поверхнею скла. При термообробці та розриві —O—O— зв'язків у пероксидних фрагментах утворюються вільні радикали, які забезпечують на третьому етапі методом ініціювання “від поверхні” формування прищеплених наночарів ПОЕГМА.

Підтвердженням хімічного зв'язування олігопероксиду з поверхнею амінованого скла є зміна значень контактних кутів змочування та складових вільної поверхневої енергії немодифікованої та модифікованої скляної поверхні. Як видно з таблиці, амінування поверхні скла дещо зменшує її гідрофільність і сумарну вільну поверхневу енергію порівняно з нативним склом. Подальша модифікація амінованого поверхні скла олігопероксидом веде до значного зростання гідрофобності поверхні та зменшення полярної складової вільної поверхневої енергії (λ_S^{AB}).

Іншим методом, що підтверджує прищеплення олігопероксиду до поверхні амінованого скла, є атомно-силовою мікроскопія (рис. 2). Видно, що

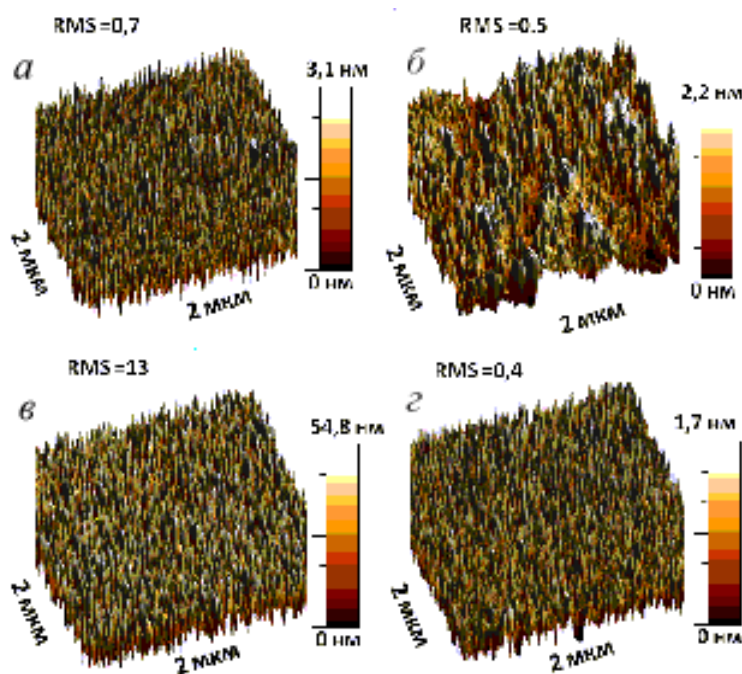


Рис. 2. АСМ мікрофотографії поверхні амінованого скла (а), пероксидованої поверхні скла (б) та з прищепленим наночаром полі(ω -етилтриетилгліколь- α -метакрилату) при модифікації протягом 5 (в) та 28 год (г).

поверхні суттєво відрізняються за своєю структурою, так, RMS (середньо-квадратична шорсткість) поверхні амінованого скла становить 0.7 нм (рис. 2, а), а RMS поверхні амінованого скла з прищепленим шаром олігопероксиду — 0.5 нм (рис. 2, б). Крім того, при модифікації поверхні наночаром олігопероксиду змінюються величини максимального та середнього перепаду висот на поверхні. Максимальний перепад висот модифікованої поверхні становить 2.2 нм, тоді як амінованого скла — 3.1 нм.

Подальше прищеплення до модифікованої поверхні наночару ПОЕГМА також веде до змі-

ни її топографії, особливо на початкових стадіях процесу (рис. 2, *в*), і характеризується значним (у 26 раз) зростанням значення RMS у порівнянні з поверхнею, модифікованою олігопероксидом (рис. 2, *б*). Слід відмітити, що така топографічна неоднорідність поверхні характерна і для початкових стадій модифікації поверхні полімерами іншої природи, наприклад, полі(*N*-ізопропілакриламідом) [4]. По мірі формування наночасу ПЕГМА значення RMS зменшується до 0.4 нм (рис. 2, *з*). Це пояснюється “заповненням” усіх вільних ділянок поверхні прищепленими штичками ПЕГМА.

Дослідження залежності контактних кутів змочування водою поверхонь, модифікованих наночасами олігопероксиду та олігопероксид-графт-ПЕГМА, від температури показали, що поверхня, модифікована наночасом олігопероксиду, не змінює своєї змочуваності водою при зміні температури у досліджуваному діапазоні (рис. 3).

У той же час спостерігається значна зміна

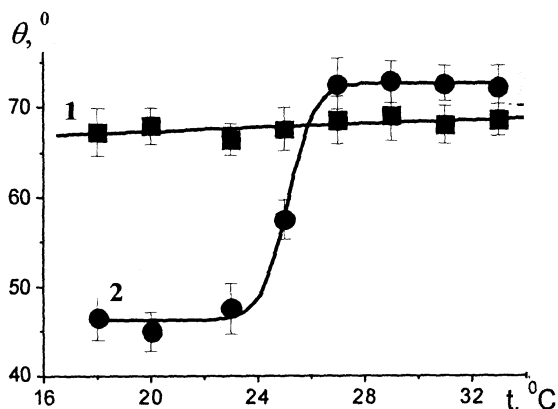


Рис. 3. Залежність контактних кутів змочування (θ) водою поверхонь, модифікованих наночасами олігопероксиду (1) та олігопероксид-графт-ПЕГМА (2) від температури.

змочуваності поверхні, модифікованої наночасом олігопероксид-графт-ПЕГМА в температурному діапазоні 23—27 °C. Причому різниця між кутами змочування є доволі суттєвою і становить майже 30 град.

Аналіз конформаційних переходів у структурі прищеплених наночасів під дією температури проводився методом еліпсометрії (рис. 4). З рисунку видно, що за температури 18 °C товщина наночасу ПЕГМА становить бли-

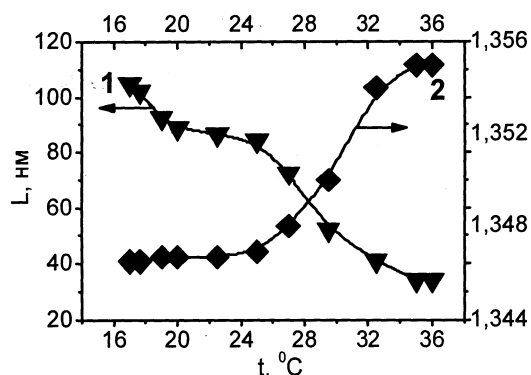


Рис. 4. Залежність висоти прищепленого наночасу (L) полі(ω -етилтриетиленгліколь- α -метакрилату) (1) та індексу його рефракції (2) від температури.

зко 100 нм, а при підвищенні температури до 36 °C вона зменшується до 35 нм. Також відбувається зростання індексу рефракції (рис. 4), що також підтверджує утворення щільно упакованих структур.

Така здатність змінювати конформацію макромолекул пов'язана з тим, що при температурі, нижчій за критичну температуру розшарування, ланки ПЕГМА утворюють водневі зв'язки з молекулами води (рис. 5), що надає поверхні

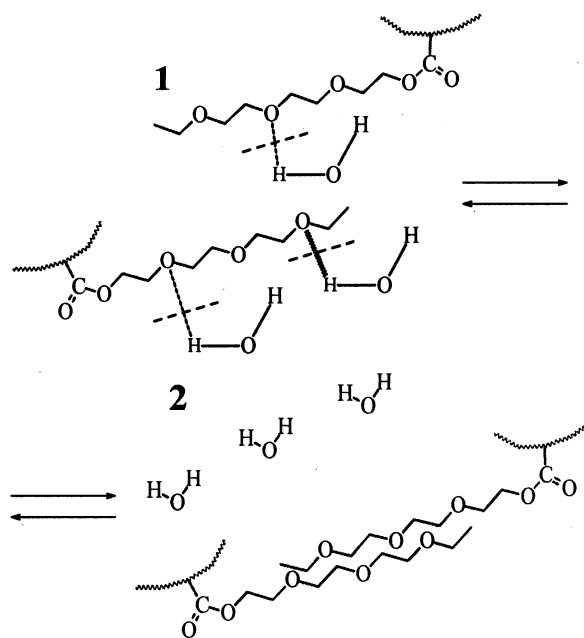


Рис. 5. Схеми утворення водневих зв'язків (1) та вандер-ваальсівських взаємодій (2) між ланками полі(ω -етилтриетиленгліколь- α -метакрилату) та молекулами води при температурі 20 (1) і 32 °C (2).

гідрофільності. При температурі, вищій за нижню критичну температуру розшарування, відбувається розрив цих зв'язків і конформацію макромолекул ПОЕГМА визначають ван-дер-ваальсівські взаємодії між їх фрагментами (рис. 5). Це веде до виштовхування молекул води з шару полімеру, він ущільнюється, його товщина зменшується і одночасно знижується гідрофільність поверхні [15]. Причому найвідчутливіші конформаційні зміни у структурі прищепленого нанощару ПОЕГМА відбуваються в температурному інтервалі 25—32 °С.

Адсорбція білків на модифіковані поверхні досліджувалась на прикладі білка сочевиці — лентил лектину з флуоресцентною міткою. На рис. 6 наведені діаграми, що показують інтенсивність флуоресценції адсорбованого білка лентил лектину на поверхнях нативного скла та скла, модифікованого прищепленим нанощаром ПОЕГМА.

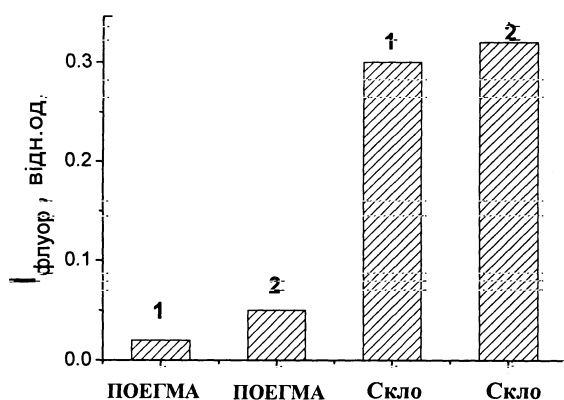


Рис. 6. Флуоресцентна інтенсивність ($I_{\text{флуор}}$) білка лентил лектину, адсорбованого на поверхнях звичайного скла та скла, модифікованого прищепленим нанощаром полі(ω-етилтриетиленгліколь-α-метакрилату) при температурі 20 (1) та 32 °С (2).

Інтенсивність флуоресценції лінійно зв'язана з кількістю адсорбованого протеїну. Адсорбцію проводили за температури 20 та 32 °С. З рис. 6 видно, що поверхня ПОЕГМА практично не адсорбує білок. В той же час, на поверхні скла спостерігається значна адсорбція білка.

ВИСНОВКИ. Розроблено метод формування на поверхні скла прищеплених термочувливих нанощарів ПОЕГМА, які здатні суттєво змінювати гідрофільність поверхні в температурному інтервалі 23—27 °С. Показано, що така особ-

ливість поведінки нанощарів зумовлена зміною конформації макромолекул ПОЕГМА за рахунок руйнування водневих зв'язків між його фрагментами та молекулами води при підвищенні температури. Отримані поверхні належать до так званих “non-fouling” поверхонь, тобто вони практично не адсорбують білки в температурному діапазоні 20—32 °С.

РЕЗЮМЕ. Показана можливість формування на поверхні скла привитих температурочувствительных нанослоев поли(ω-етилтриетиленгліколь-α-метакрилата). Их структура и температурочувствительные свойства исследованы методами эллипсометрии и определения контактных углов смачивания. Установлено, что полученные нанослои практически не адсорбируют белки из водных растворов в температурном интервале 20—32 °С.

SUMMARY. In the present work we modified a peroxide glass surface with grafted macromolecules of the poly(ethyl ether triethylene oxide methacrylate). As result on the glass surface has been formed grafted nanolayer determined thick and structure. The structure and temperature sensitive properties of the obtained nanolayers have been investigated using ellipsometry and wetting methods. We have determined that obtained nanolayer really don't adsorb proteins from aquatic solution at different temperatures.

ЛІТЕРАТУРА

1. Halperin A, Tirrell M, Lodge T.P. // Adv. Polym. Sci. -1992. -**100**, № 1. -P. 31—71.
2. Sanchez I.C. Physics of Polymer Surfaces and Interfaces. -Butterworth: London, 1992.
3. Zhao B., Brittain W. // J. Prog. Polym. Sci. -2000. -**25**, № 5. -P. 677—710.
4. Стецишин Ю., Жолобок О., Дончак В., Гаргай Х. // Вісн. Націон. ун-ту “Львівська політехніка”. Хімія, технологія речовин та їх застосування. -2010. -№ 667. -С. 351—355.
5. Stetsyshyn Yu., Donchak V., Harhay Kh. et al. // Polym. Int. -2009. -**58**, № 9. -P. 1034—1040.
6. Stetsyshyn Y., Zemla J., Zolobko O. et al. // J. Coll. Interf. Sci. -2012. -**387**, № 1. -P. 95—105.
7. Стецишин Ю.Б., Жолобок О.Ю., Коструба А.М та ін. // Докл. АН України. -2011. -№ 10. -С. 125—130.
8. Стецишин Ю., Жолобок О., Бедей І. та ін. // Вісн. Націон. ун-ту “Львівська політехніка”. Хімія, технологія речовин та їх застосування. -2011. -№ 700. -С. 387—391.
9. Tokarev I., Minko S. // Soft Matter. -2009. -**5**, № 3. -P. 511—524.