УДК 678: 541.64

Н. В. Фігурка, Н. Г. Носова, А. В. Стасюк,
М. І. Нагорняк, С. Б. Германович, В. Я. Самарик
Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра органічної хімії

СИНТЕЗ ТА ВЛАСТИВОСТІ ГЕТЕРОГІДРОГЕЛЕВИХ МАТЕРІАЛІВ

© Фігурка Н. В., Носова Н. Г., Стасюк А. В., Нагорняк М. І., Германович С. Б., Самарик В. Я., 2017

На основі проведених досліджень синтезовано глюкозочутливий матеріал у вигляді гідрогелевої тривимірної матриці із рівномірними включеннями дисперсної фази, а саме: полістирольних латексних частинок. Утворення полімерного каркаса гідрогелю відбувалось за рахунок збалансованої кількості поперечних зшивок між поліакриламідом та полі-N-гідроксиметилакриламідом. Встановлено, що за допомогою розміру і кількості полістирольних частинок можна забезпечувати рівномірність включення частинок дисперсної фази у матрицю гідрогелю. Проведено дослідження зміни властивостей одержаних матеріалів. Встановлено, що синтезовані гетеро гідрогелеві матеріали мають зовнішньо чутливу тривимірну структуру, що дає можливість використовувати їх як матеріал для створення біосенсорів.

Ключові слова: біосенсор, гідрогель, поліакриламід.

N. V. Fihurka, N. G. Nosova, A. V. Stasiuk,
M. I. Nagornyak, S. B. Hermanovych, V. Ya. Samaryk

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF HETEROHYDROGEL MATERIALS

© Fihurka N. V., Nosova N. G., Stasiuk A. V., Nagornyak M. I., Hermanovych S. B., SamarykV. Ya., 2017

Glucose-sensitive heterohydrogel materials (3D hydrogel matrices) with regular inclusions of disperse phase (polystyrene latex particles) were synthezised based on the conducted studies. Formation of a hydrogel polymer frame took place by the balanced number of cross-links between polyacrylamide and poly-N-hydroxymethylacrylamide. According to an investigations, controllable size and amount of polystyrene particles provide regularity of disperse phase inclusions in the hydrogel matrix. The studies of change of the obtained materials properties were carried out. It was established that the synthesized 3D hydrogels are medium sensitive and are promising as materials for biosensors.

Key words: biosensor, hydrogel, polyacrylamide.

Постановка проблеми. Гідрогелі – це унікальні за своїми властивостями матеріали, які знаходять широке застосування у різноманітних галузях від аграрної до медичної [1–5]. Нагальним та сучасним є створення гідрогелів, придатних для використання як біосенсорів [6]. Адже завдання біосенсорів полягає у швидкому та ефективному (кількісному) визначенні наявності (концентрації) необхідної заданої сполуки, зокрема, біологічно активної чи ліків [7].

Такі матеріали повинні під дією зовнішніх факторів (температура, pH, наявність глюкози тощо) змінювати свої характеристики, що у разі біосенсорів повинно проявлятись у зміні зовнішніх макрохарактеристик матеріалу (електропровідності, діелектричній проникності, в показнику заломлення, світлорозсіюванні). Гідрогелі відповідають цим вимогам. Переважно за зміни впливу зовнішнього чинника відбувається або колапс гідрогелю, або збільшується чи зменшується швидкість набрякання гідрогелю або його максимальний ступінь набрякання (рис. 1).

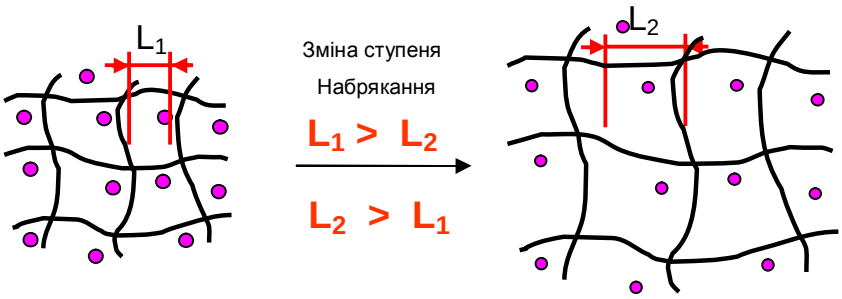


Рис. 1. Схематичне зображення зміни властивостей гідрогелю під впливом зовнішнього чинника

Предметом розгляду цієї роботи є створення гетерогідрогелевого матеріалу, який, завдяки своїй структурі, може використовуватись як біосенсор для визначення та реєстрації рівня глюкози у крові людини під час лікування цукрового діабету. Незважаючи на велику кількість досліджень у цій області цей науковий напрямок є актуальним.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Під терміном “біосенсор” потрібно розуміти пристрій, у якому чутливий шар безпосередньо реагує на присутність компонента, концентрація якого визначається. Пристрій генерує сигнал, функціонально пов’язаний з концентрацією цього компонента, що дає можливість його реєструвати [8]. Конструктивно біосенсори є комбінованими пристроями, які складаються з двох перетворювачів – біохімічного та фізичного, що знаходяться у тісному контакті один з одним. Біохімічний перетворювач виконує функцію елемента розпізнавання, перетворюючи інформацію у фізичну або хімічну властивість або сигнал, а фізичний перетворювач цю властивість фіксує за допомогою спеціальної апаратури.

Саме для визначення рівня глюкози у крові створено найбільше різних біосенсорів, що пов’язано з потребою у контролі за вмістом цукру в біорідинах, наприклад, в крові, під час діагностування і лікування таких захворювань, як діабет [9]. Мабуть, найпоширенішим є амперометричний біосенсор для визначення цукру у крові на основі іммобілізованої глюкозооксидази. Як фізичний перетворювач у ньому використаний т. зв. електрод Кларка. Перевага цього типу біосенсора, створеного на кисневому електроді Кларка, полягає насамперед в його високій селективності та точності визначення. Проте є обмеження і недоліки під час використання цієї конструкції біосенсора, які зумовлені впливом кисню та інших сторонніх речовин, здатних просочуватись через мембрану.

Привабливим виглядає використання боронової кислоти та її похідних, які мають доволі високу специфічність до зв’язування глюкози, для створення відповідних біосенсорів [10, 11]. Ця група матеріалів являє собою великий інтерес для дослідників. Конструювання таких біосенсорів узгоджується з “класичним” підходом – процес взаємодії сенсора (кон’югат гідрогелю та боронової кислоти) і розчину, що аналізується, викликає фізичні зміни у системі: зміну інтенсивності світла, яке розсіює гідрогель як дисперсна система.

Можна вважати, що найпридатнішими для отримання числових значень, які прямо пропорційні до ступеня набрякання гелю, є ефекти, пов’язані зі змінами оптичних параметрів системи. Тому створення гетерогідрогелевого матеріалу, який за зміни своїх властивостей, дасть змогу реєструвати ці зміни.

Мета роботи – отримати полімерні гетерогідрогелеві матеріали у вигляді регулярно структурованої 3D-матриці з макромолекул водорозчинного кополімеру, який модифікований 3-амінобензенборонової кислотою, із рівномірними включеннями дисперсної фази для використання їх як біосенсорів.

Виклад основної інформації і обговорення результатів. Перед викладом основної інформації наведемо експериментальну частину з описанням методів синтезу та методик проведення експериментів.

Поліакриламід (ПАА) з молекулярною масою у діапазоні (130–1300)·10^3 г/моль одержали згідно з методикою, наведеною у [12].

Полі-N-(гідроксиметил)акриламід (СТ) з молекулярною масою в інтервалі (180–1800)·10^3 г/моль одержували взаємодією формальдегіду з поліакриламідом у водному середовищі за pH=10 та 333 К – згідно з методикою, наведеною в [11]. Отриманий активний кополімер зберігали і використовували у вигляді 5–9 %-х розчинів у воді. Структруру полі-N-(гідроксиметил)акриламіду підтверджували методами ІЧ- та ПМР-спектроскопії.

Дисперну фазу – частинки полістирольного латексу заданих розмірів – синтезували методом мініемульсійної полімеризації за методикою, наведеною у [13].

Синтез гідрогелевих матеріалів проводили з використанням поліакриламіду (ПАА) та полі-N-гідроксиметилакриламіду (СТ) різних молекулярних мас, за різних співвідношень ПАА:СТ. У приготовану суміш добавляли дисперсію полістирольного латексу заданих розмірів. Приготовану композицію підкислюють введенням 10 % кислоти азотної кислоти, перемішують упродовж години до pH 2–3 та прогрівають за температури 313÷343 К протягом заданого часу. Для проведення модифікації зразки гідрогелів поміщали у 0,5 % розчин 3-амінобензенборонової кислоти (АРВА) у воді з розрахунку 3 % АРВА від кількості метилольних груп у зразку гетерогідрогеля. Зразки набрякали у розчині АРВА протягом 8 год. Далі для перебігу реакції між АРВА та полі(акриламідом) зразки поміщали у дистильовану воду, підкислену до pH=1,5, або у лужному середовищі за pH=9 упродовж доби за температури 293 К.

Обговорення результатів. Для отримання глюкозочутливого гетерогідрогелевого матеріалу у вигляді гідрогелевої регулярно-структурованої 3D-матриці із рівномірними включеннями дисперсної фази синтезу проводили у дві стадії (рис. 2): на першій стадії проводили формування гетерогідрогелевого матеріалу у вигляді регулярно структурованої 3D-матриці із рівномірними включеннями дисперсної фази (полістирольних частинок); на другій стадії у сформований гетерогідрогелевий матеріал вводили 3-амінобензенборонову кислоту з подальшим її прищепленням до залишкових метилольних груп полі(N-гідроксиметилакриламіду, який утворює разом з поліакриламідом регулярно структуровану 3D-матрицю.

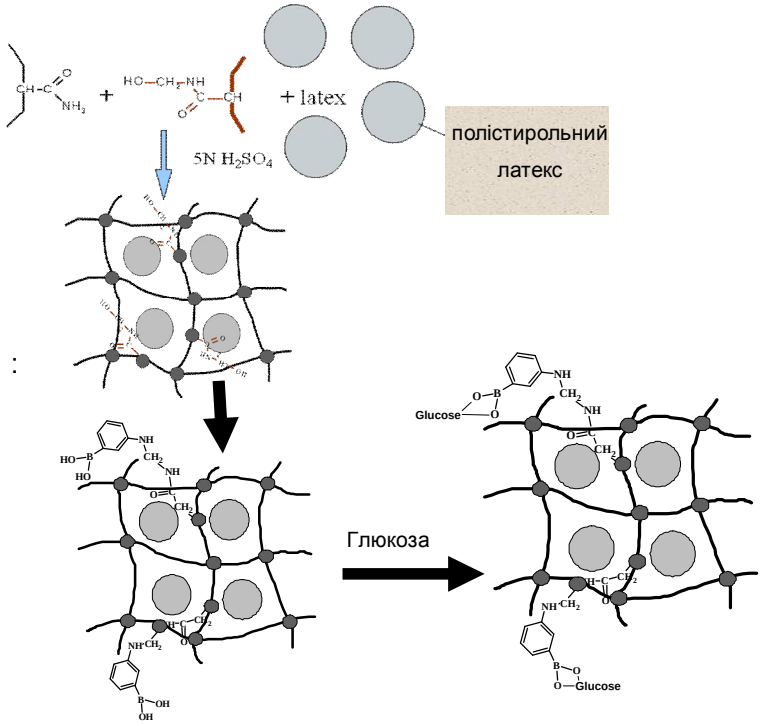
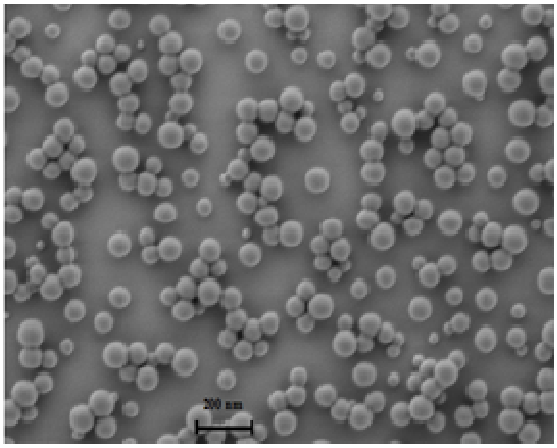


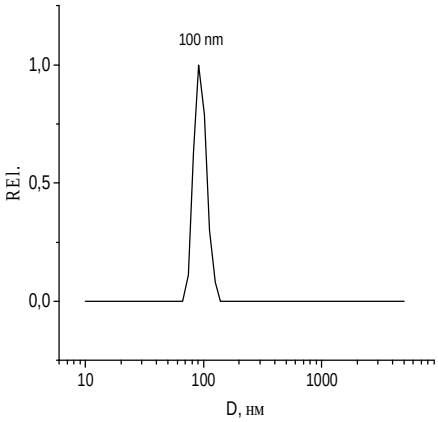
Рис. 2. Схема утворення гідрогелю, наповненого латексними частинками, за взаємодії акриламіду та полі-N-(гідроксиметил)акриламіду з додаванням латексних частинок

Формування гетерогідрогелів на першій стадії відбувається через структурування форполімерів (реакційно здатних водорозчинних полімерів – похідних акриламіду) з одночасним введенням дисперсної фази за методикою, наведеною в експериментальній частині. Введення дисперсної фази гідрофобних полістирольних частинок та рівномірне розташування їх у тривимірній сітці гідрогелю приведе до набуття цим гетерогідрогелевим матеріалом оптичних властивостей, що, з своєю чергою, і дозволить використовувати цей матеріал як біосенсор.

Дисперну фазу – полістирольні частинки різних розмірів синтезували методом емульсійної полімеризації. Для характеристики синтезованих полістирольних частинок проведені дослідження методом скануючої електронної мікроскопії зображення зразка показано на рис. 3, *а* та методом динамічного світлорозсіювання визначено гідродинамічний діаметр полістирольних частинок (рис. 3, *б*).



а



б

Рис. 3. Визначення розміру синтезованих полістирольних колоїдних частинок: а – методом скануючої електронної мікроскопії; б – методом динамічного світлорозсіювання

Одержані полімерні частинки гідрофобної природи на основі полістиролу (з розмірами частинок 100, 120 та 200 нм) мають вузький розподіл за розміром, що дає змогу використовувати їх як дисперсну фазу під час одержання гетерогідрогелевих матеріалів.

З'ясовано, що в діапазоні сумарних концентрацій форполімерів 5–8 % мас, за умови їх співвідношення СТ:ПАА=1.4:1, за 8–10 год досягається повне структурування гідрогелю [12] і ці умови були вибрані, як робочі для проведення подальших досліджень. Концентрація полістирольних латексних частинок – дисперсної фази у гідрогелі – змінювалась у межах від 0 до 5 %.

За класичною методикою [13] були проведені дослідження після визначення значення ступеня максимального набухання одержаних гідрогелів. У табл. 1 наведені граничні значення набухання гетерогідрогелів, отриманих з використанням частинок різного розміру та за їх різного вмісту.

Дослідження значень максимального ступеня набухання гетерогідрогелевих матеріалів, синтезованих у присутності гідрофобної дисперсної фази, показали, що її введення приводить до симбатного щодо концентрації введеної дисперсної гідрофобної фази зменшення максимального ступеня набухання. Ця залежність спостерігається під час введення полістирольних колоїдних частинок незалежно від їх розмірів. При цьому падіння ступеня набухання відбувається значно швидше для гідрогелів, які містили дисперсну фазу більшого розміру 200±4 нм.

Кількість дисперсної фази неоднаково впливає на ступінь набрякання за її низьких та вищих концентрацій. Максимально ступінь набухання зменшується на 50–60 % за вмісту дисперсної фази 0.1–5 %. За вищого вмісту дисперсної фази у гідрогелі (більше 15 %) видимий, а ступінь набухання зростає. Цей ефект пояснюється тим, що впливом введеної дисперсної фази на процеси структурування гетерогідрогелевого матеріалу, тобто на можливість утворення ковалентнозшитих

тривимірних комірок гідрогелевої матриці. Колоїдні частинки за високих концентрацій уже є просторовими перешкодами для міжланцюгових взаємодій під час утворення мережі гідрогелю. Підтвердженням цього є зменшенням золь-фракції зразків гетерогідрогелів за вмісту частинок, більшому за 5 %.

Залежність фізико-механічних властивостей отриманих гідрогелевих матеріалів від вмісту дисперсної фази та розміру частинок має складніший характер. Значення динамічного модуля пружності залежно від швидкості навантаження (рис. 4, *а*) збігається для усіх серій синтезованих зразків на основі форполімерів різної молекулярної маси і дає підстави вважати, що вони мають природу тривимірної полімерної сітки, іншими словами є перехресно зшитими структурами. Це підтверджується збереженням сталого значення динамічного модуля пружності за незначних швидкостей навантаження. При цьому перехресна зшивка реалізується для усіх зразків гетерогідрогелевих матеріалів, одержаних під час використання СТ з молекулярною масою у діапазоні від $378{,}5 \cdot 10^3$ до $1916{,}7 \cdot 10^3$ (таблиця).

.

Значення максимального набухання та значення динамічного модуля пружності залежно від умов формування гетерогідрогелевого матеріалу

№ з/п	Концен-трація, %		Молекулярна маса СТ, 10^3 г/моль	Максимальне набрякання, *г поглинутої води на г полімера*		№ з/п	Концен-трація, %		Молекулярна маса СТ, $\cdot 10^3$ г/моль	Динамічний модуль пружності G^1, Па	
	ПАА та СТ	Дисперсія		100±4 нм	200±4 нм		ПАА та СТ	Дисперсія		100±4 нм	200±4 нм
1	7	0	378,5	6,63	6,63	**1**	7	0	378,5	30	20
2	7	0.9	378,5	6,6	6,4	**2**	7	1	378,5	116	95
3	7	2	378,5	5,69	6,14	**3**	7	2	378,5	230	130
4	7	3.75	378,5	4,57	3,74	**4**	7	4	378,5	140	140
5	7	5	378,5	3,8	2,4	**5**	7	5	378,5	70	80
6	7	0	943,4	13	13	**6**	7	0	943,4	300	274
7	7	0.9	943,4	12,66	12,8	**7**	7	2	943,4	490	370
8	7	2	943,4	10,45	11	**8**	7	3	943,4	1200	520
9	7	3.75	943,4	8	9,2	**9**	7	4	943,4	550	1050
10	7	5	943,4	4,95	5	**10**	7	5	943,4	200	300
11	7	0	1916,7	9,54	9,54	**11**	7	0	1916,7	900	840
12	7	0.9	1916,7	9,23	9,15	**12**	7	2	1916,7	1050	1000
13	7	2	1916,7	8,19	8,6	**13**	7	3	1916,7	1200	1300
14	7	3.75	1916,7	7,03	6	**14**	7	4	1916,7	1900	1875
15	7	5	1916,7	3,91	5,45	**15**	7	5	1916,7	1000	1589

У таблиці 1 наведені також значення динамічного модуля пружності для зразків гетерогідрогелевого матеріалу з різним вмістом дисперсної фази. З даних таблиці бачимо, що за невеликих концентрацій дисперсної фази (полістирольних колоїдних частинок) у гідрогелі із її збільшенням спостерігається збільшення динамічного модуля пружності. При цьому для усіх зразків гетерогідрогелевих матеріалів, одержаних під час використання СТ різних молекулярних мас, спостерігається різке збільшення значення динамічного модуля за певних концентрацій дисперсної фази з проходженням його через максимум. Значення динамічного модуля пружності у максимальній точці та концентрація дисперсної фази, за якого спостерігається цей максимум,

визначається молекулярною масою використаних форполімерів та розміром частинок дисперсної фази. Максимальні значення росту динамічного модуля пружності реалізуються для зразків, одержаних з використанням СТ з молекулярною масою $1916{,}7 \cdot 10^3$ (номери від 11 до 15, таблиця). Але максимальне збільшення в області максимуму динамічного модуля пружності спостерігається для зразків з номерами від 5 до 10, одержаними з використанням СТ з молекулярною масою $943{,}4 \cdot 10^3$. Потрібно вважати, що максимум динамічного модуля пружності реалізується у тому випадку, коли кількість введених частинок дисперсної фази корелюється з середнім розміром комірки одержаного тривимірного гетерогідрогелевого матеріалу. Очевидно, синергізм настає тоді, коли більшість комірок зайняті частинками дисперсної фази. Подальше збільшення кількості частинок розміром 100±4 нм, а тим більше 200±4 нм призведе до порушення формування тривимірного каркаса гетерогідрогелевого матеріалу та зменшення його міцності, що проявляється у стрімкому падінні значення динамічного модуля пружності.

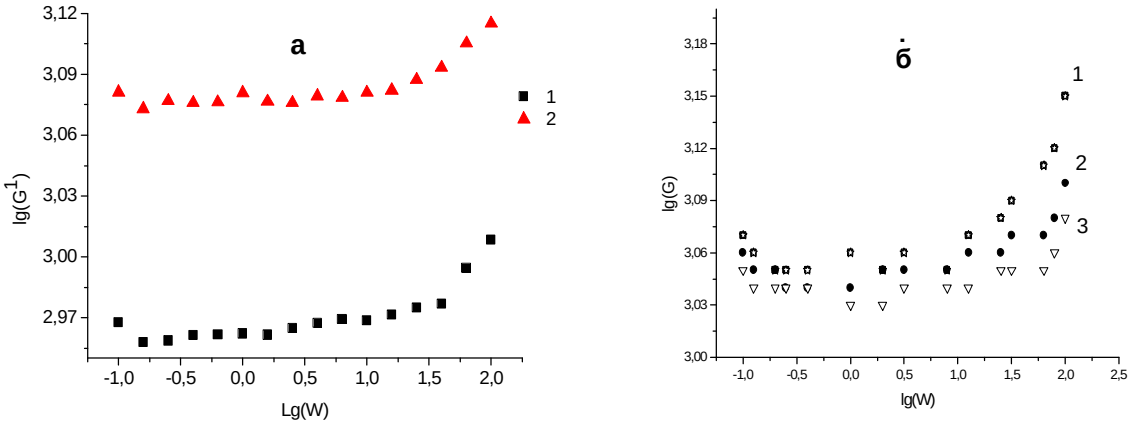


Рис. 4 ***а****: Залежність значення динамічного модуля пружності від швидкості навантаження для зразків гетерогідрогелевих матеріалів: 1 – контрольний зразок гідрогелевого матеріалу без введення дисперсної фази; 2 – зразок гетерогідрогелевого матеріалу з вмістом дисперсної фази 2 %;*
4 б*: Залежність значення динамічного модуля пружності від швидкості навантаження для зразків гетерогідрогелевих матеріалів: 1 – зразок гетерогідрогелевого матеріалу з вмістом дисперсної фази 2 %; 2, 3 – зразки гетерогідрогелевого матеріалу з вмістом дисперсної фази 2 % та вмістом АРВА – 20 % модифікація проводилась за лужного pH та за кислого pH*

Отже, використання гідрофільних форполімерів з різною молекулярною масою та зміна концентрації та розміру частинок дисперсної фази дає змогу конструювати тривимірний каркас гетерогідрогелевого матеріалу та у широких межах регулювати його фізичні та фізико-механічні властивості.

Фактично для усіх зразків спостерігається оптимум залежності фізико-механічних властивостей від величини молекулярної маси СТ. Тобто формування тривимірної сітки з одночасним рівномірним розміщенням дисперсної фази та з задовільними фізичними та фізико-механічними властивостями спостерігається для гетерогідрогелевого матеріалу, який сформований за використання СТ з молекулярною масою $943{,}4 \cdot 10^3$ г/моль та за концентрації введеної дисперсної фази у межах від 0,1–5 %.

На другій стадії сформований гетерогідрогелевий матеріал модифікували 3 амінобензенбороновою кислотою за методикою, наведеною в експериментальній частині.

Введення глюкозочутливого фрагмента в уже сформований гетерогідрогелевий матеріал на його фізико-механічні властивості незначний за умови модифікації АРВА у лужному чи кислому середовищах. Помітніше зменшення динамічного модуля пружності зразків (рис. 4, *б*) спостерігається під час проведення модифікації гетерогідрогелевого матеріалу АРВА у кислому середовищі (3) порівняно з введенням АРВА із застосуванням лужного середовища (2), що може бути пояснене руйнуванням тривимірної сітки за рахунок інтенсивнішого перебігу процесів гідролізу.

Загалом можна вважати, що фізико-механічні характеристики зразків, отриманих під час введеня 3-амінобензенборонової кислоти у сформований гетерогідрогель не мають аномальних відмінностей від зразків без 3-амінобензенборонової кислоти.

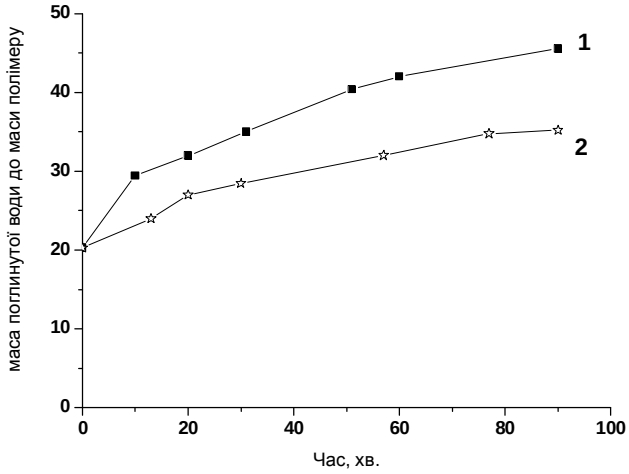


Рис. 5. Залежність ступеня набрякання АРВА-вмісного гетерогідрогелевого матеріалу: 1 – у розчині, що містить глюкозу; 2 – у воді

Введення АРВА до складу гелеутворювального полімеру надає останньому властивості глюкозочутливого гелю. На рис. 5 показано залежність ступеня набрякання АРВА-вмісного гетерогідрогелевого матеріалу у воді та у розчині, який містить глюкозу. Як можна побачити з цього рисунка, введення до складу гідрогелю АРВА приводить до збільшення набрякання гідрогелю у розчині глюкози порівняно з набряканням аналогічного зразка у воді. Така різниця у ступені набрякання істотно впливає на середню відстань між частинками дисперсної фази. Зміна середньої відстані між частинками зумовлює відповідно істотну різницю в оптичних властивостях зразків, що дає можливість припустити можливість використання цього ефекту для створення нового типу біосенсора.

Висновки. Отже, встановлено умови для синтезу гетерогідрогелевого глюкозочутливого матеріалу, придатного для використання як основи біосенсорів. Встановлено, що використання гідрофільних форполімерів з різною молекулярною масою під час конструюваня тривимірного каркаса гетерогідрогелевого та зміна концентрації і розміру частинок дисперсної фази, дає змогу цілеспрямовано регулювати його фізичні та фізико-механічні властивості. Визначено оптимальні умови отримання гетерогідрогелю (концентрація та молекулярна маса форполімерів, вміст дисперсної фази). Модифікація структури гідрогелю ковалентним прищепленням глюкозочутливих фрагментів АРВА істотно не впливає на фізичні та фізико-механічні властивості гетерогідрогелевого матеріалу, проте має вплив на ступінь набрякання гідрогелю у присутності глюкози.

1. Dagani R. Intelligent Gels//Chemical & Engineering News. – 1997. – June 9. – P. 55–60. 2. Langer R., Peppas N. A. Advances in biomaterials, drug delivery, and bionanotechnology // AIChE Journal. – 2003. – Vol. 49, Is. 12. – P. 2990–3006. 3. Karlsson J. O., Gatenholm P. Surface Mobility of Grafted Hydrogels // Macromolecules. – 1999. – Vol. 32 (22). – P. 7594–7598. 4. Скорохода В. Й., Суберляк О. В., Семенюк Н. Б., Мельник Ю. Я. Матеріали біомедичного призначення на основі (ко)полімерів полівінілпіролідону. – Львів: Вид-во Львівської політехніки, 2015. – 244 с.

5. Скорохода В. Ю., Семенюк Н. Б., Мельник Ю. Я., Дзяман І. З., Суберляк О. В. Бактерицидні гідрогелеві матеріали і мякі контактні лінзи на їхній основі // Вісник Національного університету "Львівська політехніка", "Хімія, технологія речовин та їх застосування". – 2016. – № 841. – С. 428–432. 6. Koschwanez, H. E.; Reichert, W. M. In vitro, in vivo and post explantation testing of glucosedetecting biosensors: Current methods and recommendations // Biomaterials. – 2007. – 28, 3687–3703. 7. Matsumoto A.; Yoshida R.; Kataoka K. Glucose-responsive polymer gel bearing phenylborate derivative as a glucose-sensing moiety operating at physiological pH. Biomacromolecules. – 2004. – 5. – 1038–1045. 8. Биосенсоры: основы и приложения / под ред. Э. Тер- нера и др. – М.: Мир, 1992. – 614 с. 9. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. N. Engl. J. Med. – 1993. – 329. – S. 977–986. 10. Pan X., Yang X., Lowe C. R. Evidence for a cross-linked mechanism underlying glucoseinduced contraction of phenylboronate hydrogel. J. Mol. Recognit. – 2008. – 21. – S. 205–209. 11. Ancla C., Lapeyre V., Gosse I., Catargi B., Ravaine V. Designed glucose-responsive microgels with selective shrinking behavior. Langmuir. – 2011. – 27. – S. 12693–12701. 12. Varvarenko S. Covalent grafting of polyacrylamide-based hydrogels to apolypropylene surface activated with functional polyperoxide / S. Varvarenko, A. Voronov, V. Samaryk and other // Reactive and Functional Polymers. – 2010. – No. 70. – P. 647–655. 13. Торопцева А. М., Белогородская К. В., Бондаренко В. М. Лабораторный практикум по химии и технологии высокомолекулярных соединений. – Л.: Химия, 1978. – С. 416.