

Ю. Б. Стецишин, Т. В. Шевцова, М. Б. Костенко
Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра органічної хімії
yrstecushun@ukr.net

ВОДОДИСПЕРСНІ ФЛУОРЕСЦЕНТНІ НАНОМАТЕРІАЛИ НА ОСНОВІ БОРОНІТРИДНИХ НАНОТРУБОК

<https://doi.org/10.23939/ctas2020.02.169>

Вододисперсні флуоресцентні наноматеріали на основі боронітридних нанотрубок та прищеплених щіток полі(акрилової кислоти-ко-флуоресцеїн акрилату) були успішно синтезовані під час двостадійного процесу. Функціоналізація нанотрубок підтверджена спектроскопічним та гравіметричним методами. Нанотрубки модифіковані полімерними щітками демонструють інтенсивну емісію зеленої флуоресценції при 520 нм. Розроблена гібридна структура потенційно може використовуватися для візуалізації клітин, як “розумна” поверхня, нанотрансдуктор та наноносій.

Ключові слова: боронітридні нанотрубки, флуоресценція, полімерні щітки, модифікація поверхні.

Вступ

В останні роки значні зусилля спрямовано на розробку гібридних наноматеріалів, зокрема нанотрубок, з регульованими властивостями за допомогою зовнішніх подразників, таких як рН, температура, світло та магнітне поле. Інтенсивно вивчаються вуглецеві нанотрубки, металеві нанотрубки, оксидні нанотрубки, а також боронітридні нанотрубки (БННТ) [1]. Причина широкого інтересу до нанотрубок пов'язується з їх високим потенціалом застосування відразу у кількох сферах, таких як медицина, техніка, біотехнологія *тощо*. БННТ були вперше синтезовані групою вчених на чолі з професором А. Чопроу в 1995 р.

БННТ мають високі механічні властивості та є слаботоксичними. Вони є супергідрофобними, не можуть бути дисперговані у водному середовищі та в більшості органічних розчинників. Для покращення їх диспергованості у водних середовищах використовуються численні методи функціонування поверхні.

Стратегії функціоналізації БННТ можна поділити на три групи [2–7]:

- 1) не ковалентне прищеплення до поверхні БННТ,
- 2) ковалентне прищеплення до поверхні БННТ,
- 3) утворення аміно- та/або гідроксильних груп на місцях дефектів БННТ.

На сьогодні найперспективнішою процедурою функціоналізації БННТ є ковалентне прищеплення полімерних щіток шляхом полімеризації “від поверхні” [8]. Зокрема, БННТ були модифіковані гідрофобними полімерними щітками полістиролу та полі(гліцидилметакрилату). Модифіковані нанотрубки показали високу диспергованість у різноманітних органічних розчинниках [8]. У наших попередніх роботах плоскі неорганічні поверхні функціоналізували прищепленими полімерними щітками [9–10]. Цей напрямок знайшов продовження у роботі [11], де БННТ модифікували температурочутливим полі(*N*-ізопропілакриламідом), що вело до їх диспергування у воді. Крім того, їхній гідродинамічний радіус зменшувався вдвічі при температурі вище 32 °С.

Поряд з іншими наноматеріалами, нанотрубки часто використовують, як флуоресцентні зонди для ряду біологічних застосувань, починаючи від доставки ліків у клітини та до впливу на геном [2–7]. Як і всі нанотрубки, БННТ не є флуоресцентними, і флуорофорні групи (наприклад, органічна молекула або квантова точка) вводяться за допомогою поверхневої модифікації.

Інший підхід – це модифікація поверхні прищепленими полімерами, що містять органічні флуорофори. Однією з найчастіше використовуваних міток є флуоресцеїн. У біомедичних

застосуваннях флуоресцеїн має низку переваг перед іншими барвниками [12–13]:

- 1) не токсичність,
- 2) висока розчинність у воді,
- 3) чутливість до рН.

Флуоресцеїн демонструє високу ефективність флуоресценції при значеннях $\text{pH} > 7$, проте втрачає флуоресцентні властивості у кислому середовищі.

Модифікація БННТ за допомогою прищеплених щіток полі(акрилової кислоти-ко-флуоресцеїн акрилату) була здійснена у двохстадійному процесі, де спочатку через дефектні аміногрупи до поверхні БННТ було ковалентно прищеплено олігопероксид за допомогою його залишкових хлорангідридних груп [11]. Потім задіяно метод прищепленої полімеризації “від поверхні” БННТ модифікованої олігопероксидом [11].

Мета дослідження

Синтез та дослідження вододисперсних флуоресцентних наноматеріалів на основі бороїтридних нанотрубок та щіток полі(акрилової кислоти-ко-флуоресцеїн акрилату), з потенційним застосуванням для клітинної візуалізації, як “розумні” поверхні, а також у якості нанотрансдукторів та наноносіїв.

Матеріали та методи досліджень

Матеріали. Піридин та інші органічні розчинники очищалися за стандартними методами. Полі(етиленгліколь) (ПЕГ-9) (Merck Chemical); акрилова кислота та флуоресцеїн акрилату (Sigma-Aldrich). БННТ отримані від професора Мустафи Цулху (Туречинна).

Синтез трет-бутилового гідропероксиду.

Трет-бутиловий гідропероксид отримували та очищували вакуумною ректифікацією. Збирали фракцію в інтервалі температур 45–47 °С (при 1.6 кПа). Визначений коефіцієнт заломлення трет-бутилового гідропероксиду ($n_d^{20} = 1.40020 \pm 0.00002$) узгоджується з літературними даними ($n_d^{20} = 1.4010$).

Синтез хлорангідриду піромелітової кислоти. У колбу з круглим дном об'ємом 500 мл, обладнаній термометром і зворотним холодильником, з'єднаними з водним скрублером, завантажували 43.6 г (0.2 моль) піромелітового діангідриду та 91.6 г (0.44 моль) PCl_5 , перемішували і доводили до кипіння на масляній бані, поки суміш не стала однорідною. Суміш

перемішували при 130–135 °С протягом 15–16 годин. Потім конденсатор зі зворотним холодильником замінювали конденсатором Лібіха і відганяли приблизно 60–63 г POCl_3 протягом 8 год. Після закінчення перегонки, температуру суміші піднімали до 180–185 °С протягом 1 год. Неочищений продукт перекристалізовували з бензену, одержуючи 51.2 г (78.1 %) кристалічного продукту з температурою плавлення 67 °С (літературне значення 68 °С) та кислотним числом $\text{КЧ} = 1373$ мг KOH/g (теоретичне значення становить 1368 мг KOH/g).

Синтез олігопероксиду із залишковими хлорангідридними групами. 4.6 г (0.014 моль) хлорангідриду піромелітової кислоти розчиняли в 15 мл безводного дихлоретану і змішували з 1.26 г (0.014 моль) трет-бутил гідропероксиду у трьохгорлій колбі обладнаній мішалкою. Суміш охолоджували до 5 °С і потім по краплях додавали 1.1 г (0.014 моль) піридину, розчиненого в 10 мл безводного дихлоретану при 5 °С. Суспензію перемішували протягом 1 години. Згодом додавали 5.6 г (0.014 моль) ПЕГ-9, і знову додавали по краплях розчин 2.2 г (0.028 моль) піридину в 10 мл безводного дихлоретану. Суміш перемішували ще 3 години, а температуру поступово підносили до температури навколишнього середовища. Осад хлориду піридинію відфільтровували. Розчинник відганяли, а отримані гранули сушили у вакуумі (100–200 Па) при 40 °С протягом 3 год, отримуючи 8.2 г (81 %) олігопероксиду. Вміст активного кисню – 1.9 % (теор. 2.2 %); вміст активного хлору – 5.4 % (теор. 4.9 %); $\text{КЧ} = 163.1$ мг KOH/g (теор. 155.3 мг KOH/g); характерні інфрачервоні спектри поглинання $\nu(\text{C}=\text{O})$ в Ag-C(O)Cl , $\nu(\text{C}=\text{O})$ у естерній групі при 1760 та 1752 cm^{-1} ; дублет при 1390, 1365 cm^{-1} та смуга трет-бутоксигрупи при 848 cm^{-1} .

Модифікація БННТ олігопероксидом. 50 мг порошку БННТ змішували з 50 мл розчину олігопероксиду в безводному діоксані (1 мг/мл) і енергійно перемішували протягом 24 годин. Надлишок олігопероксиду видаляли багаторазовим диспергуванням з ультразвуком у діоксані та толуолі та осадженням нанотрубок за допомогою центрифугування. Очищені, модифіковані олігопероксидом БННТ сушили і використовували для прищепленої полімеризації П(АК-ко-ФА).

Синтез прищеплених щіток П(АК-ко-ФА). БННТ з прищепленими макромолекулами оліго-

пероксиду поміщали у ампулу з 0.1 М водним розчином акрилової кислоти та 0.01 М водним розчином флуоресцеїн акрилату на ультразвукову баню протягом 20 хв. Потім суміш нагрівали в атмосфері аргону до 90 °С протягом 48 год, в результаті чого отримували БННТ з прищепленими щітками П(АК-ко-ФА), які очищали диспергуванням у етанолі та воді на ультразвуковій бані та осаджувалися центрифугуванням. Очищені БННТ з прищепленими щітками П(АК-ко-ФА) сушили і зберігали у вигляді порошку.

Термогравіметричний аналіз (ТГА). Аналіз ТГА проводили за допомогою приладу TGA Perkin Elmer Pyris з програмним забезпеченням для термічного аналізу та Pyris версії 11.1.1.0497. Зразки аналізували під потоком нітрогену при температурі від 30 до 600 °С.

Інфрачервона Фур'є-спектроскопія (ІЧ). ІЧ-спектри були записані на спектрометрі NICOLET iS50 FTIR (Thermo Scientific, США). Спектри записували у діапазоні 7800–350 cm^{-1} з кроком 5 cm^{-1} .

Лазерна скануюча конфокальна мікроскопія (ЛСКМ). Модифіковані БННТ були дослідженні за допомогою лазерного скануючого конфокального мікроскопа Zeiss Axio Imager M2 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Zeiss, Jena, Німеччина). Для дослідження були вибрані довжини хвиль збудження та випромінювання при 490 та 520 нм, відповідно.

Динамічне розсіювання світла (ДРС). Вимірювання розподілу розмірів нанотрубок проводили за допомогою приладу Zetasizer Nano ZS (Малверн, США) при температурі 25 °С. Nano ZS містить 4 мВт He-Ne лазер, що працює на довжині хвилі 633 нм і лавиновий фотодіодний детектор. Розсіяне світло було виявлено під кутом 173°. Показник заломлення та поглинання наноматеріалу вважалися рівними 2.0 та 1.500 відповідно. Всі вимірювання розміру та зета-потенціалу проводилися в трьох комірках. Всі дані були проаналізовані за допомогою програмного забезпечення Malvern Instrument DST 5.00. 1 мг зразка суспендували в 1 мл дистильованої води і озвучували протягом 2–10 хв. Після дії ультразвуку проводили центрифугування з низькою швидкістю (5 хв., 25 °С).

Скануюча електронна мікроскопія (СЕМ). БННТ розміщували на вуглецевому диску та покривали шаром золота товщиною 5 нм,

використовуючи як розпилювач Baltex SDC 005. Зображення СЕМ були отримані за допомогою приладу Carl Zeiss Evo-40 в умовах високого вакууму та прискорювальної напруги 10 кВ.

Результати досліджень та їх обговорення

Модифікація БННТ за допомогою прищеплених щіток полі(акрилової кислоти-ко-флуоресцеїн акрилату) була здійснена у дво-стадійному процесі, де спочатку до аміногруп на поверхні БННТ було ковалентно прищеплено олігопероксид за допомогою його залишкових хлорангідридних груп [11]. Потім задіяно метод прищепленої полімеризації “від поверхні” БННТ попередньо функціоналізованих макромолекулами олігопероксиду [11].

На рис. 1. показані термогравіметричні криві БННТ (а), БННТ з прищепленими макромолекулами олігопероксиду (б) та БННТ з прищепленими щітками П(АК-ко-ФА) (в). Втрата маси олігопероксиду (рис. 1, крива б), є відносно низькою і становить лише кілька відсотків. БННТ з прищепленими щітками кополімеру П(АК-ко-ФА), навпаки, показують значну втрату маси, яка становить майже 40 %. Вони демонструють відносну термостабільність до 80 °С та поступову деградацію прищепленого полімеру до 550 °С.

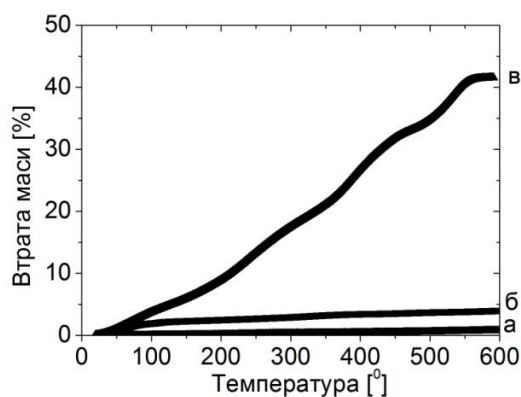


Рис. 1. Термогравіметричні криві БННТ (а), БННТ модифікованих олігопероксидом (б) та БННТ з прищепленими щітками П(АК-ко-ФА) (в).

Записані ІЧ-спектри вихідних та функціоналізованих БННТ представлені на рис. 3. Спектр вихідних БННТ складається з двох широких асиметричних смуг поглинання, при 1327 cm^{-1} та 758 cm^{-1} , що характерно для В–N–В зв'язків (рис. 2а). Після модифікації БННТ кополімером П(АК-ко-ФА) було виявлено кілька нових смуг, пов'язаних із процесом модифікації

(рис. 3б). Так, з'явилися неіндексовані смуги поглинання при 1327 см^{-1} та 758 см^{-1} . Широка смуга поглинання при 3330 см^{-1} належить до -ОН групи акрилової кислоти. Смуга при 2920 см^{-1} пояснюється коливаннями С-Н зв'язків, а смуга поглинання при 1730 см^{-1} утворюється карбонільним фрагментом карбоксильної та естерної груп флуоресцеїну та акрилової кислоти. Характерний пік бензольного кільця флуоресцеїну проявляється приблизно при 1580 см^{-1} . Крім того, зв'язки С-О-С в естерних фрагментах проявляються за рахунок коливань при 1120 та 1050 см^{-1} . Все це підтверджує успішне проходження процесу модифікації БННТ.

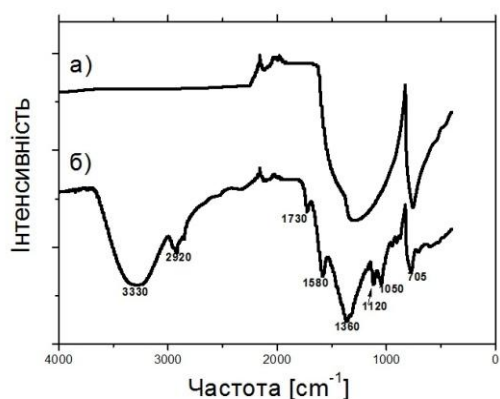


Рис. 2. Спектри вихідних БННТ (а) та БННТ з прищепленими щітками П(АК-ко-ФА) (б).

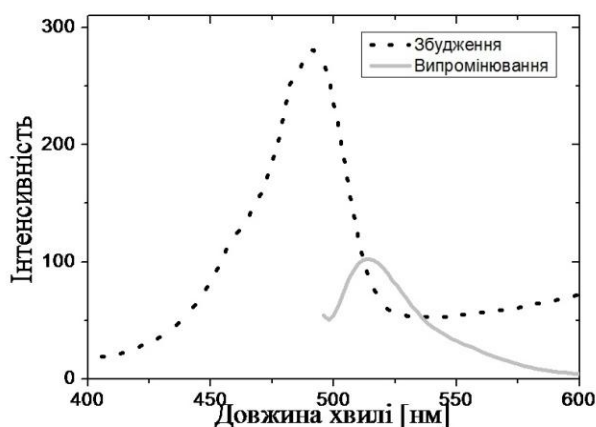


Рис. 3. Флуоресцентне спектроскопія БННТ з прищепленими щітками П(АК-ко-ФА). Довжина хвилі збудження - 490 нм , довжина хвилі випромінювання - 520 нм .

Оптичні властивості модифікованих БННТ вивчалися методом конфокальної мікроскопії. На рис. 3 показані результати флуоресцентного

сканування модифікованих БННТ, для яких спектри флуоресценції зберігають максимум збудження при $\lambda=490\text{ нм}$ та максимум випромінювання при $\lambda=520\text{ нм}$, що відповідає літературним даним для флуоресцеїну [12–13]. Тобто, на відміну від вихідних БННТ, де флуоресценція відсутня, БННТ модифіковані П(АК-ко-ФА) демонструють інтенсивну зелену флуоресценцію при довжині хвилі випромінювання $\lambda=520\text{ нм}$, зумовлену $\pi\text{-}\pi^*$ переходами у спряженій хромовій системі флуоресцеїну акрилату.

СЕМ зображення вихідних та модифікованих БННТ після диспергування у воді та висихання на поверхні скла представлені на рис. 4. Модифіковані БННТ розміщені на поверхні поодинокі, водночас вихідні БННТ формують один суцільний переплетений клубок.

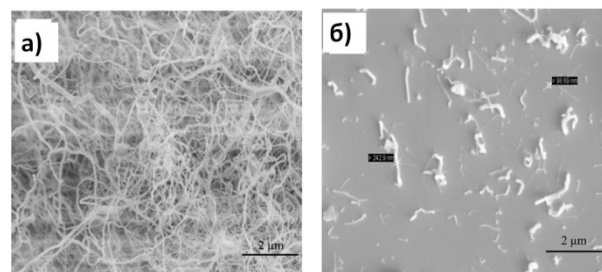


Рис. 4. СЕМ зображення вихідних БННТ (а) та БННТ з прищепленими щітками П(АК-ко-ФА) (б) після диспергування у воді.

Розподілу розмірів нанотрубок у воді, отриманих за допомогою методу ДРС, наведено на рис. 5.

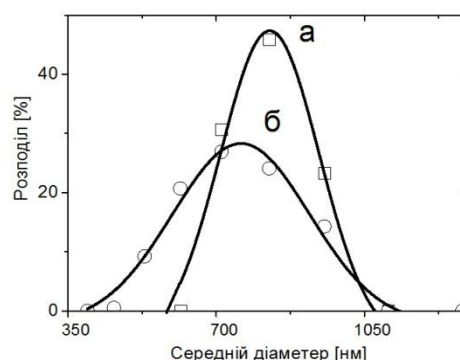


Рис. 5. Розподілу розмірів БННТ (а) та БННТ з прищепленими щітками П(АК-ко-ФА) (б) у воді. Концентрація нанотрубок 1 мг/мл .

БННТ модифіковані прищепленими щітками П(АК-ко-ФА) показують менший середній

діаметр, порівняно з вихідними БННТ, що свідчить про їхню кращу диспергованість у воді.

Висновки

Флуоресцентні вододисперсні наноматеріали на основі БННТ та полімерних щіток були успішно синтезовані в двостадійному процесі. Функціоналізовані БННТ добре диспергуються у воді та демонструють флуоресценцію при 520 нм, що дає змогу використовувати їх для візуалізації клітин та як наноносіїв лікарських препаратів.

Модифікація БННТ була показана за допомогою методів термогравіметричного аналізу, інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є, динамічного розсіювання світла, лазерної сканувальної конфокальної мікроскопії та сканувальної електронної мікроскопії.

References

1. Cavallaro, G., Lazzara, G., Milioto, S., Parisi, F., Evtugyn, V., Rozhina, E., Fakhrullin, R. (2018). Nanohydrogel formation within the halloysite lumen for triggered and sustained release. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 10, 8265. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b19361>
2. Marchenko, I., Yashchenok, A., German, S., Inozemtseva, O., Gorin, D., Bukreeva, T., Mohwald, H., Skirtach, A. (2010). Polyelectrolytes: Influence on evaporative self-assembly of particles and assembly of multilayers with polymers, nanoparticles and carbon nanotubes. *Polymers*, 2, 690. <https://doi.org/10.3390/polym2040690>
3. Lisuzzo, L., Cavallaro, G., Lazzara, G., Milioto, S., Parisi, F. (2018). Stability of halloysite, imogolite, and boron nitride nanotubes in solvent media. *Appl. Sci. (Switzerland)*, 8, 1068. <https://doi.org/10.3390/app8071068>
4. Ciofani, G., Genchi, G., Liakos, I., Athanassiou, A., Dinucci, D., Chiellini, F., Mattoli, V. (2012). A simple approach to covalent functionalization of boron nitride nanotubes. *J. Colloid Interface Sci.*, 374, 308. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.01.049>
5. Zhi, C., Bando, Y., Tang, C., Xie, R., Sekiguchi, T., Golberg, D. (2005). Perfectly dissolved boron nitride nanotubes due to polymer wrapping. *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 15996. <https://doi.org/10.1021/ja053917c>
6. Terao, T., Zhi, C., Bando, Y., Mitome, M., Tang, C., Golberg, D. (2010). Alignment of boron nitride nanotubes in polymeric composite films for thermal conductivity improvement. *J. Phys. Chem. C*, 114, 4340. <https://doi.org/10.1021/jp911431f>
7. Gao, Z., Zhi, C., Bando, Y., Golberg, D., Serizawa, T. (2014). Noncovalent functionalization of boron nitride nanotubes in aqueous media opens application roads in nanobiomedicine. *Nanobiomedicine*, 1, 7. <https://doi.org/10.5772/60000>
8. Ejaz, M., Rai, S.C., Wang, K., Zhang, K., Zhou, W., Grayson, S.M. (2014). Surface-initiated atom transfer radical polymerization of glycidyl methacrylate and styrene from boron nitride nanotubes. *J. of Materials Chem. C*, 2, 4073. <https://doi.org/10.1039/c3tc32511c>
9. Stetsyshyn, Y., Kostruba, A., Harhay, K., Donchak, V., Ohar, H., Savaryn, V., Kulyk, B., Ripak, L., Nastishin, Y. (2015). Multifunctional cholesterol-based peroxide for modification of amino-terminated surfaces: Synthesis, structure and characterization of grafted layer. *Appl. Surf. Sci.*, 347, 299. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.04.110>
10. Stetsyshyn, Y., Awsiuk, K., Kusnezh, V., Raczkowska, J., Jany, B., Kostruba, A., Harhay, K., Ohar, H., Lishchynskiy, O., Shymborska, Y., Kryvenchuk, Y., Krok, F., Budkowski, A. (2019). Shape-Controlled synthesis of silver nanoparticles in temperature-responsive grafted polymer brushes for optical applications. *Appl. Surf. Sci.*, 463, 1124. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.09.033>
11. Kalay, S., Stetsyshyn, Y., Lobaz, V., Harhay, K., Ohar, H., Çulha, M. (2015) Water-dispersed thermo-responsive boron nitride nanotubes: Synthesis and properties. *Nanotechnology*, 27, 035703. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/3/035703>
12. Song, A., Zhang, J., Zhang, M., Shen, T., Tang, J. (2000). Spectral properties and structure of fluorescein and its alkyl derivatives in micelles. *Colloids Surf. A*, 167, 253. [https://doi.org/10.1016/s0927-7757\(99\)00313-1](https://doi.org/10.1016/s0927-7757(99)00313-1)
13. Martin, M., Lindqvist, L. (1975). The pH dependence of fluorescein fluorescence. *J. Lumin.* 10, 381. [https://doi.org/10.1016/0022-2313\(75\)90003-4](https://doi.org/10.1016/0022-2313(75)90003-4)

Y. B. Stetsyshyn, T. V. Shevtsova, M. B/ Kostenko

Lviv Polytechnic National University,
Department of Organic Chemistry

WATER-DISPERSED FLUORESCENCE NANOMATERIALS BASED ON BORON NITRIDE NANOTUBES

Water-dispersed fluorescence nanomaterials based on boron nitride nanotubes and grafted copolymer brushes (poly(acrylic acid-co-fluorescein acrylate) were successfully fabricated in a two-step process. The functionalization of BNNTs was confirmed by spectroscopic, gravimetric and imaging techniques. In contrast to "pure" BNNTs, functionalized BNNTs demonstrate intense green fluorescence emission at 520 nm. The developed hybrid structure can potentially be used for cellular imaging, as "smart" surfaces, nanotransducers and nanocarriers.

Key words: boron nitride nanotubes, fluorescence, polymer brushes, surface modification.