



Получена: 07.03.2017 г.

Приета: 21.03.2017 г.

## ИЗСЛЕДВАНЕ НА НЕРАЗТВОРИМИ МОНОСЛОЕВЕ ОТ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МАРКИРАН ФОСФОЛИПИД НА ИНТЕРФЕЙСА ВОДА–ВЪЗДУХ

Г. Иванов<sup>1</sup>, З. Полевска<sup>2</sup>

*Ключови думи:* Лангмюирови и Лангмюир-Блоджетови филми, неразтворими монослоеве на интерфейса вода–въздух, фосфолипиди, фазови преходи, нанотехнологии

### РЕЗЮМЕ

Еднокомпонентни монослоеве от Дипалмитоил Фосфатидил Етаноламин, маркирани в главата с флуоресцентния хромофор Нитробензоксадиазол (DP-NBD-PE), са изследвани на интерфейса вода–въздух като Лангмюирови филми чрез комбиниране на измервания на изотермата, на повърхностния потенциал и микроскопия под Брюстъргов ъгъл. Първоначално при компресията на слоя, още при повърхностно налягане от 5,9 mN/m, се забелязва зараждането на твърдата фаза, която прераства в кръгли домейни с различен диаметър и ярко изразена вътрешна структура. Повърхностният, потенциал започва да нараства след средата на главния фазов преход от течна към твърда фаза поради преориентация на електричния дипол в главата на молекулата.

### 1. Въведение

Областта на Лангмюир-Блоджетовите филми се разви значително през последните 30 години. Въпреки това систематичното изследване на структурно сложни молекули все още позволява откриването на нови ефекти. Ние започнахме изследването на флуоресцентно маркирани фосфолипиди преди около 28 години и през годините сме

---

<sup>1</sup> Георги Иванов, доц. д-р инж., кат. „Физика”, УАСГ, бул. „Хр. Смирненски“ № 1, 1046 София, e-mail: george@at-equipment.com

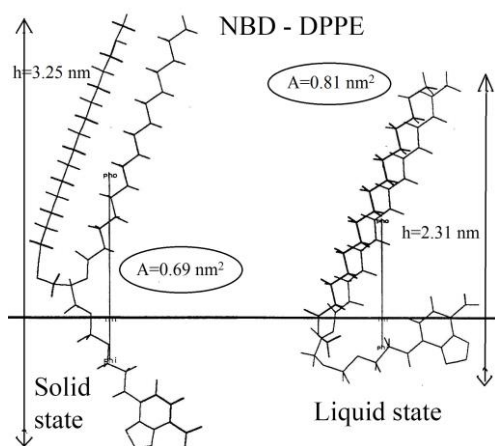
<sup>2</sup> Зорица Полевска, ас., кат. „Физика”, УАСГ, бул. „Хр. Смирненски“ № 1, 1046 София, e-mail: zorica.polevska@gmail.com

открили 3 нови ефекта [1, 2]. Съсредоточили сме усилията си върху флуоресцентно маркирания в главата фосфолипид Дипалмитоил Фосфатидил Етаноламин с флуоресцентния хромофор Нитробензоксадиазол (DP-NBD-PE). Нашият фокус в такъв тип молекули се дължи на 2 причини: а) биомиметичния аспект на тази на молекула, която е подобна на липидите в биологични мембрани и ще спомогне за разбирането на процесите в биомембраните; б) NBD хромофорът се счита за най-подходящ за оптични биосензори поради високата чувствителност на спектралните му характеристики към околната среда в близост до молекулата [3].

Тази статия допринася за разбирането на наскоро открит от нас нов ефект – формиране на стабилни 3D наноразмерни агрегати в Лангмюир-Блоджетови (ЛБ) монослоеве от DP-NBD-PE върху твърда подложка, когато отлагането е направено при повърхностно налягане, значително по-ниско от равновесното налягане на разстилане (ESP). В предишни изследвания е имало значителен дебат за причините за възникването на подобни 3D агрегати. Но тези структури са наблюдавани над ESP, при което монослоят е в метастабилно термодинамично състояние (суперсатурация) или пък монослоят е смес от няколко молекули. Като механизъм на колапс, при който монослоят добива 3-мерна структура, е предложено моментното зародишно образуване [4], но това се наблюдава при високи повърхностни налягания. Последователен колапс също е наблюдаван в неразтворими монослоеве от органични молекули на интерфейса вода-въздух (Лангмюирови филми), който започва в района на твърдата фаза [5], но няма информация за ESP в този случай.

## 2. Материали и методи

1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (DP-NBD-PE) (фиг. 1), разтворен в хлороформ, е закупен от Avanti Polar Lipids (САЩ). Чистотата е над 99% и веществото се използва без допълнително пречистване. Това е фосфолипидна молекула с две наситени с по 16 въглеродни атома опашки и хромофорен маркер в главата. За данните в тази статия се използва наскоро доставено и отворено непосредствено преди измерванията вещество, за да се избегне окисляването му.

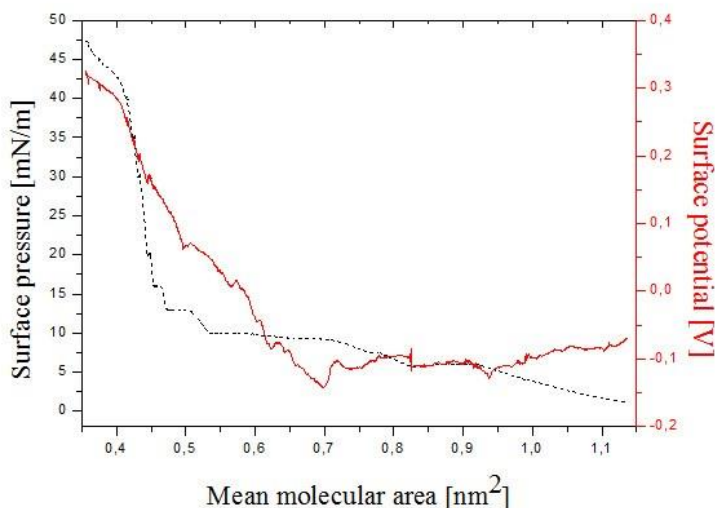


**Фиг. 1.** Структура на DP-NBD-PE молекулата и най-вероятните конформации в твърда и течна фаза заедно с височината  $h$  и площта за една молекула  $A$  съгласно проведеното компютърно моделиране на симулиран интерфейс вода-въздух

Изотермите на повърхностното налягане  $\pi$  като функция на площта за една молекула  $A$  са измерени на дълга ЛБ вана от фирмата KSV-NIMA (Финландия). Заедно с изотермите измерваме и повърхностния потенциал чрез датчик с вибриращ електрод и микроскопия под Брюстъргов ъгъл (ВАМ), позволяващ чрез поляризирана лазерна светлина да се визуализират нехомогенностите на повърхността на водата. Тези уреди са произведени от същата компания. За да избегнем кинетични ефекти, компресията на монслоя я извършваме на стъпки от 2 – 4 mN/m, като след всяка стъпка влизаме в режим на поддържане на постоянно налягане и даваме време на слоя да релаксира. Зависимостта на тази релаксация от времето също я следим и следваща стъпка на компресия се предприема, само когато слойт релаксира в значителна степен.

### 3. Резултати и дискусия

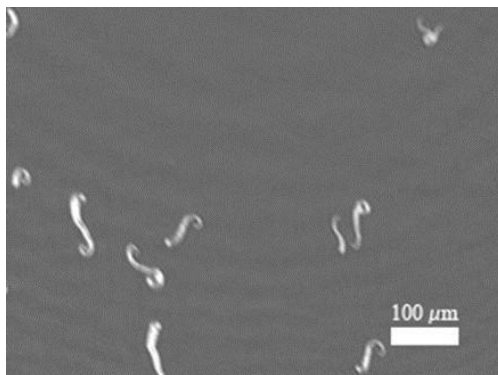
$\pi$ -А изотермите при различни температури на чиста вода или в присъствието на различни метални противйони е представено по-рано [6]. Измерванията са съчетани с флуоресцентна микроскопия, като в твърда фаза флуоресценцията се самогаси и се получава добър контраст между твърдата и течната фаза. Главният фазов преход от течно разширена към течна кондензирана фаза при 20 °C за субфаза от чиста вода е при 6,9 mN/m. На фиг. 2 е показано прецизно измерване на  $\pi$ -А изотермата при 25 °C като компресията се извършва на стъпки. Показан е и едновременно измереният повърхностен потенциал.



**Фиг. 2.** Изотерма при 25 °C на Лангмюиров монслоя от DP-NBD-PE върху чиста вода (пунктирна линия, лява скала) и повърхностен потенциал (плътна линия, дясна скала)

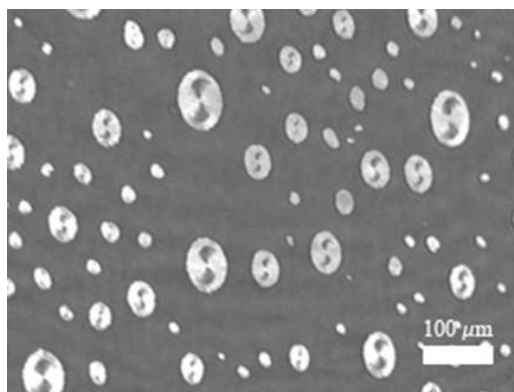
На пръв поглед главният фазов преход при 25 °C започва при повърхностно налягане около 9 mN/m с типичното почти хоризонтално плато. Преди това обаче сме компресирали до 6 mN/m, влезли сме в режим на поддържане на постоянно налягане и данните от придвижването на бариерите като функция на времето показват, че слойт не релаксира, а обратно – придвижването на бариерите се ускорява. Това навежда на мисълта, че фазовият преход към течна кондензирана фаза е започнал още при това налягане.

Образуване на твърди домейни при това налягане се наблюдава и с ВАМ микроскопията (фиг. 3). От тази фигура се вижда и че домейните в твърдата фаза първоначално нямат кръгла форма. Формата на твърдите домейни се получава поради баланс на силите на повърхностното напрежение, които се стремят да минимизират периметъра, т.е. да се получат кръгли домейни. Силите на електростатично отблъскване между еднакво ориентирани електрични диполи в молекулите, които обратно, се стремят да увеличат площта на домейните и се получават дендридни структури. В самото начало на домейно-образуването роля играе и хиралността на молекулите, които се стремят да усучат домейните и точно това се наблюдава на фиг. 3.



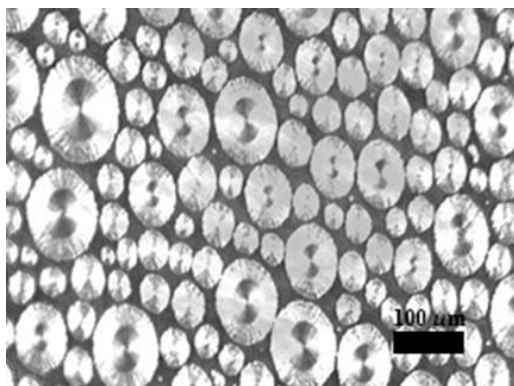
**Фиг. 3.** Брюстърска микроскопия на Лангмюиров филм от DP-NBD-PE. Повърхностното налягане е  $5,9 \text{ mN/m}$ , а средната площ за една молекула е  $0,82 \text{ nm}^2$

В средата на главния фазов преход при средна площ за една молекула около  $0,65 \text{ nm}^2$  повърхностният потенциал започва да се увеличава (фиг. 2). При измервания при  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  екстраполираната към нулево повърхностно налягане на молекулите в твърда фаза площ беше  $0,66 \text{ nm}^2$ , което е в отлично съгласие с нашите резултати от компютърното моделиране (фиг. 1), които предсказват средна площ за една молекула в твърдата фаза от  $0,69 \text{ nm}^2$  [6]. Основната област на оптична абсорбция при  $460 \text{ nm}$  за NBD маркираните липиди се дължи на вътрешномолекулен пренос на заряд [7], който е придружен от голяма ( $\sim 4 \text{ Debye}$ ) промяна в диполния момент на хромофора [8]. Тъй както експериментите тук са извършени в осветено помещение, то молекулите поглъщат светлина и този диполен момент е налице. Молекулният конформационен анализ на симулиран интерфейс въздух–вода предполага, че в течна фаза областта на групата на главата на молекулата, където е и NBD хромофорът, е хоризонтална, дори сочи малко нагоре към интерфейса на въздух–вода, докато в твърдата фаза тя сочи почти вертикално надолу към обема на водата (вж. фиг. 1). Има почти  $90^\circ$  промяна в ориентацията на диполния момент, което дава отличен контраст, когато се използва Атомно силова микроскопия със сканиране на повърхностния потенциал [9]. Тази средна област на платото на главния преход съответства на фиг. 4, когато са се образували кръгли домейни от твърдата фаза. Домейните са с различни диаметри, което предполага второ поколение на кристализационни центрове, които са с по-малки размери. При измервания с по-висока разделителна способност с флуоресцентна микроскопия [10] и Атомно силова микроскопия [6] домейните са първоначално почти кръгли, но при по-високо повърхностно налягане стават дендридни поради споменатия баланс на силите на повърхностното напрежение и електростатичните сили. Атомно силовата микроскопия показва също, че не винаги има строга граница между твърдата и течната фаза и има островчета от твърдата фаза, „плуващи“ в течната фаза покрай големите домейни в твърда фаза.



**Фиг. 4.** Брюстърска микроскопия на Лангмюиров филм от DP-NBD-PE. Повърхностното налягане е  $9,35 \text{ mN/m}$ , а средната площ за една молекула е  $0,65 \text{ nm}^2$

При по-високи повърхностни налягания твърдите домейни започват да се допират един до друг (фиг. 5) и наклонът на  $\pi$ -А изотерма се увеличава. Повърхностният потенциал продължава да расте почти линейно, поради по-големия брой твърди домейни, влизаци в зоната под вибриращ електрод и съответно по-голям брой молекули в твърда фаза със съответно по-голям диполен момент.



**Фиг. 5.** Брюстърска микроскопия на Лангмюиров филм от DP-NBD-PE. Повърхностното налягане е  $13 \text{ mN/m}$ , а средната площ за една молекула е  $0,47 \text{ nm}^2$

На фиг. 5 ясно се вижда структурата на твърдия домейн. Тя се състои от централна кръгла област с 2 типа области с различни ориентации и наклон на молекулите, което се вижда от различния интензитет на светлината при наблюдението с поляризираната светлина. Около този централен район има друга област, съставена от по-малки ивици с не толкова голям поляризационен контраст. Предполагаме, че първоначално домейните са кръгли и растат от един зародишен център. След това, при увеличаване на повърхностното налягане, по-малки домейни започват да се прилепват към по-големия централен кръгов домейн [10]. Този механизъм сме го наблюдавали ясно в Лангмюиров филм от DP-NBD-PE при  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  [6], където бе необходимо по-голямо повърхностно налягане, за да преодолеят домейните отблъскването и да започнат да се сливат.

Без да навлизаме в подробности, ще отбележим образуването на 3D наноразмерни агрегати в еднокомпонентен ЛБ филм, отложен върху твърда подложка при налягания

значително под ESP, при които за тази молекула бе измерено, че е 19,6 mN/m [6]. Когато ЛБ филмът се отлага под главния фазов преход, тези агрегати липсват и се наблюдава с Атомно силовата микроскопия само течна гладка фаза. Въпреки това, точно над началото на главния фазов преход при около 7 mN/m при 20 °C се наблюдават цилиндрични структури с двуслойна височина. Ако отлагането се извършва при по-високо повърхностно налягане от ESP, тези цилиндри растат на височина първоначално до 13 nm за отлагане при 33 mN/m и до 35 nm, а в някои случаи до 100 nm при 43 mN/m. Въпреки това, ако монослоят се остави да релаксира при нормални лабораторни условия за известно време (50 дни в този случай), тези цилиндри отново стават с двуслойна височина [6]. Типичният диаметър на цилиндрите е 50 до 150 nm.

#### 4. Заключение

Съвместното измерване на  $\pi$ -А изотермата, повърхностния потенциал и микроскопията под Брюстъргов ъгъл на неразтворими монослоеве на интерфейса вода–въздух за флуоресцентно маркирания фосфолипид DP-NBD-PE дава важна информация за структурата на филма, за разбиране на ново откритите ефекти в този филм и за възможностите за бъдещи приложения. Прецизните наблюдения показват, че дори минималните използвани скорости на компресия за този филм надвишават релаксационните му способности и поради това, въпреки че визуално главният фазов преход при 25 °C от течна в твърда фаза настъпва при 9 mN/m, то реално това става още при 5,9 mN/m. Повърхностният потенциал започва да нараства от средата на платото на главния преход, което е свързано с преориентацията на молекулите от течна в твърда фаза и съответно нарастване на компонентата на електричния дипол в главата на молекулата. Брюстърговата микроскопия показва удължена усукана структура на твърдите домейни в самото начало на прехода. След това те придобиват сложна кръгла форма с централна част, състояща се от две зони с различен наклон на молекулите и прилепени към нея отделни малки части без ярко изразена ориентация на молекулите. Тези изследвания спомагат за обяснението на 3D агрегатите, които наблюдаваме при отлагането на монослоеве върху твърда подложка по метода на Лангмюир и Блоджет.

#### Благодарности

Тази разработка е подпомогната от дог. № БН-176/15 с ЦНИП при УАСГ. Благодарности и към фирма KSV-NIMA (Финландия) от групата Violin за възможността да посетим лабораторията им и да работим на тяхната апаратура със закупено от тях вещество.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Ivanov, G. R.* First observation of fluorescence self-quenching in Langmuir films. *Chem. Phys. Lett.*, **193**, 323, 1992.
2. *Ivanov, G. R., Fujihira, M.* Novel phenomena in organized organic monolayers. in *Thin Film Materials and Devices – Developments in Science and Technology*, eds. J. M. Marshall, N. Kirov, A. Vavrek, J. M. Maud, World Scientific, Singapore, 261, 1999.

3. Brennan, J. D., Kallury, K. M. R., Krull, U. J. Transduction of the reaction between urea and covalently immobilized urease by fluorescent amphiphilic membranes. *Thin Solid Films*, **244**, 898, 1994.

4. Vollhardt, D. Three-dimensional instantaneous nucleation in 2-docosylamino-5-nitropyridine monolayers at the air-water interface. *Colloids and Surfaces A*, **156**, 79, 1999.

5. Hatta, E. Sequential collapse transitions in a Langmuir monolayer. *Langmuir*, **20**, 4059, 2004.

6. Ivanov, G. R., Georgiev, G., Lalchev, Z. Fluorescently Labeled Phospholipids – New Class of Materials for Chemical Sensors for Environmental Monitoring, in *Relevant Perspectives in Global Environmental Change*, ed. J. Agboola, ISBN: 978-953-307-709-3, Rijeka: (InTech) 89, 2011.

7. Paprica, P. A., Baird, N. C., Petersen, N. O. Theoretical and experimental analyses of optical transitions of nitrobenzoxadiazole (NBD) derivatives. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **70**, 51, 1993.

8. Mukherjee, S. A., Chattopadhyay, A., Samanta, A., Soujanya, T. Dipole moment change of NBD group upon excitation studied using solvatochromic and quantum chemical approaches: implications in membrane research. *Phys. Chem.*, **98**, 2809, 1994.

9. Ivanov, G. R., Fujihira, M. Single component Langmuir-Blodgett film investigated with 5 scanning probe microscopy methods. *Colloids and Surfaces A*, **198 – 200**, 305, 2002.

10. Ivanov, G. R., Geshev, N. I. New effects in Langmuir and Langmuir-Blodgett monolayers from fluorescently labelled phospholipids and their possible use for water quality control. *IOP Science, Journal of Physics: Conference Series*, **682**, 012037, 2016.

## INVESTIGATION OF INSOLUBLE MONOLAYERS FROM A FLUORESCENTLY LABELLED PHOSPHOLIPID AT THE AIR–WATER INTERFACE

G. Ivanov<sup>1</sup>, Z. Polevska<sup>2</sup>

**Keywords:** *Langmuir and Langmuir-Blodgett films, insoluble monolayers at air-water interface, phospholipids, phase transitions, nanotechnologies*

### ABSTRACT

Single-component monolayers from Dipalmitoyl Phosphatidyl Ethanolamine head labelled with the fluorescent chromophore NitroBenzoxaDiazole (DP-NBD-PE) were investigated at the air-water interface as Langmuir films combining the measurement of surface

---

<sup>1</sup> George Ivanov, Assoc. Prof. Dr. Eng., Dept. “Physics” and University laboratory “Nanoscience and nanotechnology”, UACEG, 1 H. Smirnenki Blvd., Sofia 1046, e-mail: george@at-equipment.com

<sup>2</sup> Zorica Polevska, Assistant, Dept. “Physics” and University laboratory “Nanoscience and nanotechnology”, UACEG, 1 H. Smirnenki Blvd., Sofia 1046, e-mail: zorica.polevska@gmail.com

pressure – mean molecular area isotherm, surface potential measurements and Brewster angle microscopy. At the compression of the monolayer at surface pressure of 5,9 mN/m, solid domains start to develop which at further compression obtain circular shape with well-developed inner structure. Surface potential starts to increase in the middle of the main phase transition from liquid to solid phase due to the reorientation of the electric dipole in the chromophore head group of the molecule.