



Overfladeanalyse i biologiske miljøer

Strange, M.; Kingshott, P.

Published in:
Plast Panorama

Publication date:
2003

Document Version
Også kaldet Forlagets PDF

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):
Strange, M., & Kingshott, P. (2003). Overfladeanalyse i biologiske miljøer. *Plast Panorama*, 52(7/8), 24-26.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Overfladeanalyse i biologiske miljøer

Med avancerede karakteriseringsmetoder i nanometerskalaområdet kan interaktioner mellem biomolekyler og plastoverflader vurderes f.eks. til implantater

Af Marianne Strange & Peter Kingshott

I forbindelse med udviklingen af nye og forbedrede plastprodukter i direkte kontakt med kroppen spiller biokompatibiliteten en vigtig rolle. Implantater f.eks. skal kunne tolereres af det omgivende væv for ikke at blive afstødt af kroppen, de må ikke være giftige og ikke medføre langsigtede skader.

Også uden for kroppen er biokompatible overflader vigtige i anvendelser som diagnostiske DNA og proteintest, celledyrkning, sensorer til test af blod og urin og til kontrol af bakterier i fødevarer og drikkevand.

Overflademodificering

Plastmaterialer er særlig velegnede til fremstilling af biokompatible overflader, fordi de kan skræddersyes på uendelig mange måder. Ofte er det nødvendigt at ændre materialernes overfladeegenskaber for at gøre dem biokompatible og hertil findes der en række kemiske og fysiske overflademodificeringsteknikker. Herved er det også muligt at indbygge særlige funktioner, der kan gøre en overflade aktiv, f.eks. ved at forhindre at bakterier eller særlige proteiner binder sig til overfladen af et implantat, hvilket kan fremkalde en infektion.

Til fremstilling af en aktiv biokompatibel overflade spiller den topografiske eller formmæssige del en vigtig rolle. Men også overfladens kemiske og fysiske natur er meget afgørende for interaktionen med det omgivende biologiske miljø, således at overfladen kun reagerer med de ønskede molekyler

eller celler og forhindrer uønskede bindinger. For at kunne udvikle nye biokompatible plastoverflader med de ønskede egenskaber er det nødvendigt at have adgang til analysemetoder, der opererer i nanometerskalaområdet. Herved bliver det muligt at studere interaktioner mellem biomolekyler og naturlige eller kunstigt fremstillede overflader.

Avanceret overfladeanalyse

Polymeroverflader kræver sofistikerede multiteknik-analysemetoder til bestemmelse af deres egenskaber. Parametre, der kan påvirke overfladens egenskaber, er: specifik kemisk funktionalitet, fordeling af overfladekemi, orientering af kemiske grupper, overfladetopografi, overfladeenergi, kontaminering, etc. En række af de analyseteknikker der i dag anvendes til karakterisering af polymeroverflader i forbindelse med interaktion med biologiske systemer inkluderer XPS, TOF-SIMS, Maldi TOF-MS og AFM, der beskrives nærmere i det nedenstående:

Røntgenanalyse

X-Ray photoelectron spectroscopy (XPS) eller electron spectroscopy for chemical analysis (ESCA) er en analysemetode, der kan anvendes til at fastlægge den kemiske sammensætning af en polymeroverflade.

Prøven anbringes i et vakuumkammer og bestråles med bløde røntgen-

stråler, der er i stand til at slå fastbundne elektroner ud af deres baner omkring atomkernerne, der ligger i overfladen af materialet (se figur 1). Elektronerne er bundet til atomerne med karakteristiske bindingseenergi (E_{binding}). Ved at måle bevægelsesenergien (kinetisk energi) af de løsrevne elektroner (E_{kinetisk}) og trække disse energier fra røntgenstrålingens veldefinerede energi ($h\nu$) kan man få et spektrum over bindingsenergiene, som elektronerne havde i atomerne. Den teoretiske sammenhæng kan derfor beskrives som:

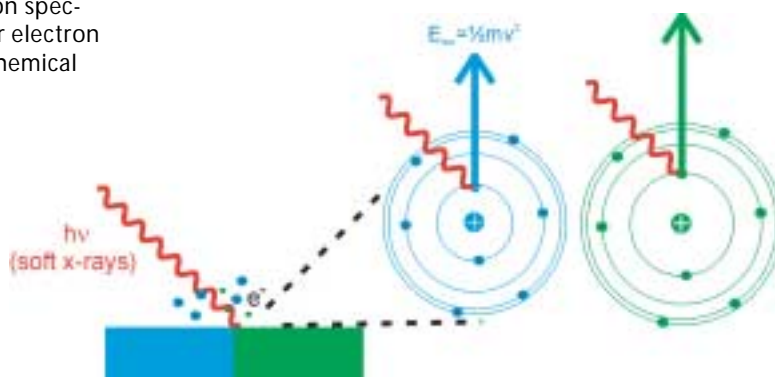
$$E_{\text{binding}} = h\nu - E_{\text{kinetisk}}$$

Bindingsenergien er karakteristisk for de enkelte grundstofelementer, og en kvantificering af bindingsenergiene i et spektrum kan derfor anvendes til at bestemme grundstofsammensætningen kvantitativt. Bindingsenergiene kan dog også påvirkes af de omkringliggende atomer eller molekyler, og det er derfor også muligt at få information om f.eks. bindings- og/eller oxidationstilstanden for de fleste atomer. Analysemetoden kan altså identificere alle grundstof-

fer (undtagen H og He) i de yderste 5-10 nm af overfladen og har en detektionsgrænse på ca. 0,1 atom procent.

Flyvetids-massespektroskopi

Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) eller flyvetids-massespektroskopi er en kvalitativ analyseteknik, der kan identificere molekyler i overflader. Ved denne metode bombarderes overfladen med energirige ioner (1-50 keV), hvorved atomer og molekylære fragmenter løsriveres fra de yderste 1-2 nm af overfladen (se figur 2). Kun en lille del af de løsrevne fragmenter får en elektrisk ladning og det er disse (sekundære) ioner der analyseres. Efter løsrivelsen accelereres ionerne op i et kraftigt elektrisk felt til de alle har samme kinetiske energi og herefter sendes de ind i et massespektrometer. Ioner med samme kinetiske energi med forskellig masse vil flyve med forskellig hastighed dvs. lette ioner vil flyve hurtigere end tunge ioner. Ionerne kommer dermed hurtigere eller langsommere igennem



Figur 1. Ved ESCA metoden løsriver røntgenstråler elektroner fra atomer i overfladen. De løsrevne elektroners bevægelsesenergi bestemmes og resultatet er en kvantitativ grundstofanalyse af overfladen.

time-of-flight analysatoren og massen af ionerne bestemmes ud fra flyvetiden. Ved at anvende lange flyverør (typisk 1-2 m) og ved at fokusere energien ved anvendelse af en reflektron, er det muligt at opnå ekstrem høj masseopløsning ($M/\Delta M > 10.000$), og dvs. at man med meget stor nøjagtighed kan skelne imellem molekyler med forskellig vægt.

Efter en statisk overfladeanalyse er blevet udført, som beskrevet ovenfor, er det muligt at dykke ned i overfladen for at undersøge den kemiske sammensætning længere inde i materialet. Teknikken kaldes for dynamisk SIMS og anvender en argon ion kanon (sputter) som kan fjerne materiale fra overfladen som efterfølgende analyseres på normal vis. Ved skiftevis at fjerne og analysere materiale i overfladen kan instrumentet lave en kemisk dybdeprofilering af materialet.

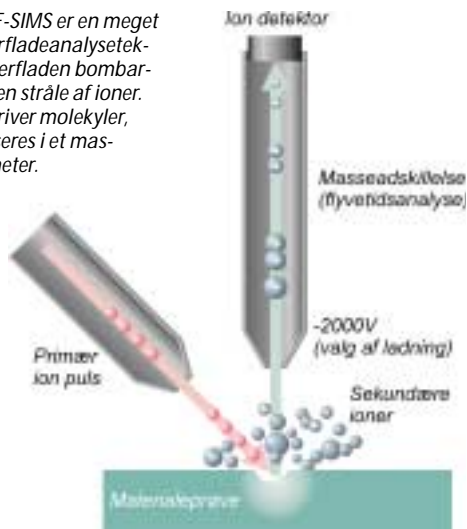
Teknikken giver også mulighed for at vise et meget illustrativt 2-dimensionelt billede af den kemiske fordeling af molekyler på en overflade. Ved denne teknik som også kaldes imaging-SIMS rastes overfladen med en fokuseret ion stråle hvorefter løsrevne sekundære ioner opfanges i de specifikke positioner. Metoden er derfor meget velegnet til karakterisering af fordelingen og lokaliseringen af molekyler på en overflade.

Bestemme molekylvægt af store makromolekyler

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) er en teknik, der kan anvendes til analyse og nøjagtig bestemmelse af molekylvægten af store makromolekyler som proteiner, peptider, polysakkarider, nukleinsyrer og syntetiske polymerer. Metoden karakteriseres også som en »blød« ioniseringsteknik, fordi molekylerne fragmenteres minimalt, hvilket tillader bestemmelser på intakte molekyler. Det er vigtigt, fordi en eksakt masse er en karakteristisk parameter for hvert molekyle og derfor essentiel for den strukturelle bestemmelse.

Princippet i teknikken er, at analytten (biomolekylet) bliver indlejret i en absorberende matrice, der sædvanligvis består af en svag organisk syre. Herefter bliver matricen bestrålet med en nanosekund laserpuls - enten fra en nitrogen UV laser ($\lambda = 337 \text{ nm}$) eller, hvis der er tale om større sensitive molekyler, en Er:YAG (Erbium Yttrium Aluminum Garnet) IR laser ($\lambda = 2,94 \mu\text{m}$). Det meste af laserenergien absorberes af matricematerialet, hvilket forhindrer en uønsket fragmentering af biomolekylet, der løsrives og ioniseres sammen med matricemolekylerne. Det ioniserede biomolekyle accelereres i et elektrisk felt og ledes gen-

Figur 2. TOF-SIMS er en meget følsom overfladeanalyseteknik hvor overfladen bombarderes med en stråle af ioner. Ionerne løsriver molekyler, som analyseres i et massepektrometer.



nem en masseanalysator, der på baggrund af flyvetiden kan angive vægten af molekylet.

Metoden er meget følsom og kan analysere små mængder (10^{-15} - 10^{-18} mol) makromolekyler med en molekylvægt mellem 400 og 350.000 g/mol, med en nøjagtighed på 0,1-0,01 procent.

Scanner topografien

Et atomic force microscopy (AFM) mikroskop kan skane en overflades topografi med en tynd nål eller probe. Proben føres hen over over-

Forhindring af proteins adsorption og cellers adhæsion til overflader

Proteiner vil spontant sætte sig på de fleste overflader, hvorefter celler - ved genkendelse af peptidsekvenser i proteinet - vil binde sig til proteinet. Biologiske væsker som f.eks. blod indeholder mange proteiner og typen af proteiner, der sætter sig fast på plastoverfladen vil have en afgørende indflydelse på biokompatibiliteten. Derfor ligger der en stor udfordring i at have kontrol over proteinadsorp-

Prøve	% kulstof (C)	% oxygen (O)	% nitrogen (N)
PET	70.8	29.2	0.0
PET-COOH-PA	69.7	22.7	7.6
PET-COOH-PA-PEG	65.6	32.7	1.7

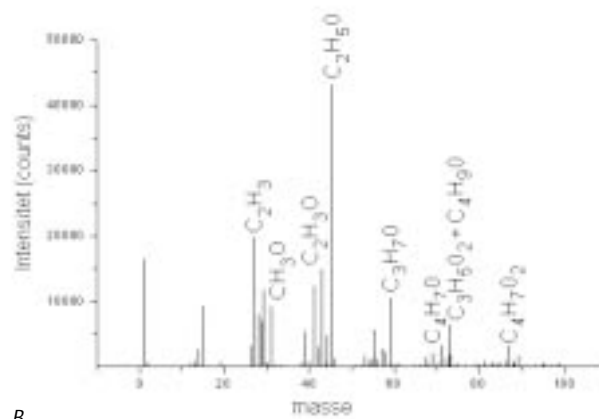
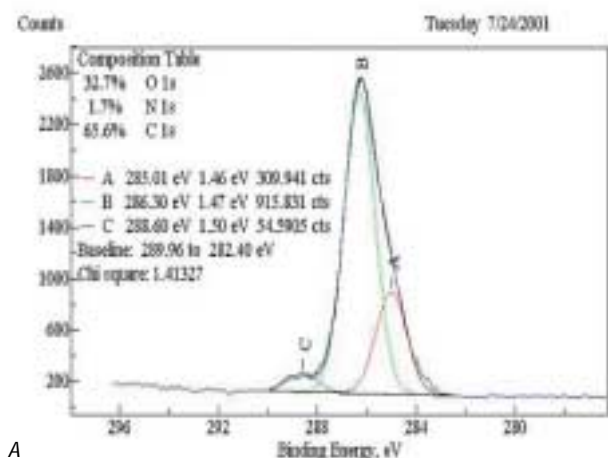
Tabel 1. Kemisk sammensætning for overflademodifikationen af PET med PEG.

fladen i et stort antal parallelle linier, mens kraften imellem proben og overfladen holdes konstant. Probens bevægelser registreres, hvorefter en computer kan rekonstruere topografien som et 3-dimensionelt billede. Resultatet er et billede med molekylær opløsning, hvilket betyder, at man kan se biologisk materiale som proteiner, DNA, fedtstoffer og celler på en overflade. Det område, der analyseres, kan være op til ca. $(100 \times 100 \times 5) \mu\text{m}$ i luft eller $(5 \times 5 \times 5) \mu\text{m}$ i en væske. Opløsningsevnen er typisk 1-10 Å i de horisontale retninger og 0,1-0,5 Å i den vertikale retning.

tionen til implantater i kroppen. I forsøg på at modificere plast eller polymerer med molekyler, der kan forhindre proteins adsorption til overflader, har det vist sig, at poly (ethylene glycol) (PEG) er meget effektiv. En kombination af en kemisk modifikation, hvor lineære PEG kæder bindes til polymeroverflader, og følsomme analyseteknikker har vist sig at være uvurderlig for en optimal modificering. Poly (ethylene terephthalate) (PET) er blevet overflademodificeret med PEG og analyseret både før og efter modificeringen med XPS og TOF-SIMS.

Centerkontrakt

Dansk Polymercenter på Risø (www.risoe.dk/pol/) er udstyret med en række *state-of-the-art* avancerede overfladeanalyse-instrumenter og deltager inden for det konkrete område i en centerkontrakt: *Center for Nanostrukturerede Polymeroverflader til Medicinsk Anvendelse*, støttet af Ministeriet for Videnskab, Teknologi og Udvikling. Udover Risø deltager Bioteknologisk Institut, og firmaerne Nunc, Coloplast, Novo Nordisk, SMB og Danfoss. Formålet med centerkontrakten er at øge forståelsen og styringen af sammenkoblingen af celler og biologiske molekyler med plastoverflader. Det forventes at kunne resultere i udviklingen af bedre overflader til implantater, som kan fremme vedhæftningen mellem implantater og væv.



Figur 3. Overfladeanalyse af en protein-afvisende PEG coating. A) Høj opløst C 1s spektrum der viser forskellige oxidationstilstande af kulstof for PEG overfladen. B) Det tilsvarende TOF-SIMS spektrum der viser fragment ionerne fra PEG kæderne.

I teorien, vil lineære PEG kæder der er bundet til (graftet på) en overflade forhindre proteinadsorption når graft-densiteten og kædelængden er optimeret. Det er dog ikke helt ukompliceret og kræver optimering af coatingsproceduren. Proteinets størrelse er i nanometerskala, så en forhindring af disses adsorption til overfladen, kræver at overfladeegenskaberne også kan kontrolleres på en nanometerskala. Dette kan opnås ved først at modificere PET, således at der dannes reaktive carboxylsyregrupper (-COOH), hvortil en højmolekylær polyamin (-PA) kan bindes. Til sidst kan PEG delen kobles på. Polyamin er med til at sikre at den initiale reaktive gruppedensitet er høj nok til dannelse af en høj graft-densitet. XPS blev først anvendt for at få information om den kemiske sammensætning af overfladen og i tabel 1 er resultaterne for en serie XPS prøver sammenfattet for på den måde at få information om effektiviteten af overflademodificeringen. I figur 3A er vist den tilsvarende højopløste analyse af kulstof området for den PEG modificerede overflade. Resultaterne viser, at der er en betydelig forskel i overfladens kemiske sammensætning efter modificeringen. TOF-SIMS analyse er anvendt til at understøtte XPS resultaterne og massespek-

trene giver flere strukturelle informationer. Figur 3B viser et typisk TOF-SIMS spektrum (positive ioner, masseområde 0-100 Da) for den PEG modificerede overflade. De mest intense ioner er fra fragmenteringen af PEG kæder og bekræfter, at overfladen har en høj grad af den PEG dækning, som er nødvendigt for, at overfladen ikke binder proteiner. Proteinadsorption kunne da heller ikke påvises ved XPS og TOF-SIMS analyser ved en efterfølgende test med proteinet β -lactoglobulin, som bl.a. findes i mælk. Overfladen er herudover blevet eksponeret for en cellesuspension med serumproteiner uden at nogen mammale celler (mammalia=pattedyr) kunne påvises på overfladen.

Konklusion

Kombinationen af forskellige avancerede overfladeanalyseteknikker er således meget værdifuld for den kemiske analyse af polymerer efter f.eks. en overflademodificering, og øger forståelsen for interaktioner imellem plastoverflader og substanser i det omkringliggende miljø. Dette kan derfor også i høj grad lede til optimering og udvikling af nye plastprodukter med ønskede specifikke funktioner.

Mini CV

Begge forfattere er ansat på Dansk Polymercenter, Forskningscenter Risø.

Marianne Strange, Ph.D. har været ansat som Projekt Pilot (tlf. 4777 4677, marianne.strange@risoe.dk) siden december 2002 og arbejder primært som konsulent i industrirelaterede projekter. Tidligere beskæftiget med forskning og udvikling af plastprodukter hos Nunc A/S. Oprindelig uddannet som civilingeniør-kemi fra Danmarks Tekniske Universitet i 1992.

Peter Kingshott, Ph.D. (peter.kingshott@risoe.dk) er seniorforsker og har været ansat på Risø siden oktober 2000. Han arbejder primært inden for overfladeanalyse og overflademodificering af polymerer til biomedicinske anvendelser. Har tidligere været ansat på institutter og universiteter i Australien (hvor han er uddannet), USA og Tyskland.

Tungmetalindholdet i plast

Mængden af tungmetaller i plastmaterialer kan nu analyseres på ppm niveau. FORCE Technology's Division for Materialer og Analyse kan med røntgenfluorescens (XRF) identificere, hvad ukendte materialer indeholder af bestemte grundstoffer. Grundstofsammensætningen har siden 1970 kunnet bestemmes ved hjælp af XRF, men det nye er, at nøjagtigheden er blevet stærkt forbedret. Metoden egner sig også til flydende materialer. Ifølge afdelingschef Ole Bundgaard (olb@force.dk, tlf. 4326 7539), Kemisk Analyse, består metoden i, at materialet bestråles, hvorved det får tilført energi.

Når energimængden frigives, fremstår grundstoffernes art og sammensætning helt tydeligt. Jo større strålingsmængden er, desto mere er der til stede af det givne grundstof. Analyseresultatet fremkommer via tabeller, som herefter kan omsættes til en rapport. Metoden er blevet både hurtig, præcis og billig ligesom anvendelsesmulighederne er meget brede.



Mange emner og væsker kan analyseres med XRF.