ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЧНОСТИ МИКРООБЪЕКТОВ С ПОМОЩЬЮ СКАНИРУЮЩЕГО НАНОТВЕРДОМЕРА "НАНОСКАН"

INVESTIGATION OF THE STRENGTH OF MICRO-OBJECTS BY NANOSCAN SCANNING NANOHARDNESS TESTER

А.Усеинов¹, К.Кравчук¹, И.Маслеников¹, В.Решетов², М.Фомкина³ / useinov@mail.ru
A.Useinov¹, K.Kravchuk¹, I.Maslenikov¹, V.Reshetov², M.Fomkina³

Современные технологии полимерного синтеза обеспечивают практически неограниченные возможности использования полимерных материалов для создания новых объектов и систем. Большой интерес представляют полимерные функциональные покрытия, композитные системы на основе полимерных матриц, а также нано- и микрокапсулы, применение которых в последнее время расширяется. В статье представлены результаты исследования механической прочности полиэлектролитных микрокапсул с применением нанотвердомера "НаноСкан-4D".

Modern polymer synthesis technologies provide virtually unlimited use of polymeric materials to create new features and systems. Functional polymeric coatings, composite systems based on polymer matrix as well as nano- and microcapsules, the use of which has recently expanded, are of the utmost interest. The article presents the results of a study of mechanical strength of polyelectrolyte microcapsules with the NanoScan-4D nanohardness tester.

Полимерные капсулы используются в медицине и фармацевтике для хранения и доставки белков и пептидов [1, 2], олигонуклеотидов [3, 4], гормонов [5], факторов роста [6, 7] и других биологически активных веществ. При этом они работают и как самостоятельные препараты, и как функциональные элементы диагностических систем. Микрокапсулирование, то есть заключение микроскопических объемов твердых, жидких или газообразных продуктов в защитные оболочки, является современной перспективной технологией [8, 9, 10].

Прочностные свойства микрокапсул до сих пор малоизучены. Известно, что механическая устойчивость полимерных структур возрастает с увеличением их молекулярной массы, а также при переходе от линейных к разветвленным и сетчатым структурам. При этом стереорегулярные структуры имеют более высокую прочность, чем полимеры с разупорядоченной структурой.

Увеличение механической прочности микрокапсул важно для сохранения их содержимого

при адресной доставке лекарств и хранении биообъектов в микрокапсулированном виде. Актуальной задачей является повышение механической устойчивости полиэлектролитных структур, используемых при конструировании биосенсоров на основе полимерных микрокапсул. Информация о механических свойствах важна при разработке различных микрообъектов на основе полиэлектролитных капсул.

Ниже представлены результаты исследования механической прочности полиэлектролитных микрокапсул, полученных в ИТЭБ РАН.

ФОРМИРОВАНИЕ КАПСУЛ МЕТОДОМ ПОСЛОЙНОЙ АДСОРБЦИИ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ

Разработано множество способов получения микрокапсул химическими, физическими и физико-химическими методами. Исследованные капсулы были получены по технологии послойной адсорбции (LbL), основанной на поочередной адсорбции поликатионов и полианионов на заряженной подложке. Решающим фактором для формирования многослойной структуры

¹ ФГБНУ ТИСЧУМ / FSBI TISNCM

² НИЯУ МИФИ / National research nuclear university "MEPhI"

³ ИТЭБ РАН / Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS

является электростатическое взаимодействие и изменение знака заряда поверхности после каждого этапа адсорбции ПЭ.

Используемый метод получения микрочастиц CaCO_3 позволяет выращивать пористые сферические частицы диаметром от 3 до 12 мкм (с разбросом от 4 до 20%), имеющих схожую внутреннюю структуру [11]. Частицы практически не агрегируют между собой, и при комнатной температуре в сухом виде могут храниться неограниченное время. Схема формирования таких частиц представлена на рис.1.

В настоящее время активно изучаются основные свойства полиэлектролитных микрокапсул. Полиэлектролитная оболочка капсулы оказалась непроницаема для высокомолекулярных соединений, а низкомолекулярные вещества и неорганические ионы могут проникнуть через их стенки [12–13]. Оболочка полиэлектролитных капсул чувствительна к условиям окружающей среды: pH и ионной силе раствора, растворителям, температуре и другим факторам. Эти факторы сильно влияют на структуру комплексов полиэлектролита и, соответственно, на проницаемость капсул [14–17].

Для механической характеристики подобных объектов часто используют нанотвердомеры или атомно-силовые микроскопы [18–22], но вместо

Рис.1. Схема формирования ПЭ-пленки на поверхности положительно заряженной коллоидной частицы методом последовательной адсорбции ПЭ (а-е). Удаление коллоидной матрицы приводит к формированию полиэлектролитной микрокапсулы (е-ф). ПЭ (-) и ПЭ (+) – отрицательно и положительно заряженные полиэлектролиты

Fig.1. Diagram of the formation of the PE film on the surface of positively charged colloidal particle by consecutive adsorption of PE (a-e). Removal of the colloidal matrix leads to the formation of polyelectrolyte microcapsule (e-f). PE (-) and PE (+) – negatively and positively charged polyelectrolytes

Polymeric capsules are used in medicine and pharmacy for the storage and delivery of proteins and peptides [1, 2], oligonucleotides [3, 4], hormones [5], growth factors [6, 7] and other biologically active substances. At the same time, they act as the independent agents and functional elements of the diagnostic systems. Microencapsulation, that is the conclusion of microscopic amounts of solid, liquid or gaseous products in the protective shell, is a modern perspective technology [8, 9, 10].

The mechanical properties of microcapsules have by now been poorly studied. It is known that the mechanical stability of polymer structures increases with their increased molecular weight and during the transition from

the linear structures to the network and branched ones. Thus stereoregular structures have greater strength than polymers with a disordered structure.

It is important to increase the mechanical strength of microcapsules in order to preserve their contents during the targeted drug delivery and storage of biological objects in a microencapsulated form. There is a vital task to increase the mechanical stability of polyelectrolyte structures used in the construction of biosensors based on polymeric microcapsules. Information about mechanical properties is important in the development of various microscopic objects based on polyelectrolyte capsules.

Below are the outcomes of a study of the mechanical strength

of polyelectrolyte microcapsules obtained in the Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences.

FORMATION OF CAPSULES BY THE LBL ADSORPTION OF POLYELECTROLYTES

There is a variety of techniques for preparing microcapsules with chemical, physical and physico-chemical methods. The studied capsules were prepared by the layer-by-layer adsorption technology (LbL) based on the sequential adsorption of polyanions and polycations on a charged substrate. The decisive factor for the creation of a multilayer structure is the electrostatic interaction and the change in sign of the surface charge

Рис.2. Нанотвердомер "НаноСкан-4D"

Fig.2. NanoScan-4D scanning nanohardness tester

обычного кантилевера с иглой на конце применяют кантилеверы без острия, и механическое воздействие на частицу оказывают кончиком кантилевера или закрепленным на нем специальным микроскопическим шариком [22]. Также используются наноинденторы в виде цилиндрического штампа с плоским кончиком [18-21]. Следует отметить, что подобная методика широко применяется для биологических объектов, частиц красящего вещества в тонерах принтеров и для испытания мелкодисперсного абразивного материала [18, 19].

ИСПОЛЬЗОВАННОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Исследование механической прочности микрокапсул осуществлялось с применением нанотвердомера "НаноСкан-4D". Общий вид прибора представлен на рис.2. Данный прибор дает возможность проводить испытания методом склерометрии, измерение твердости и модуля упругости методом инструментального индентирования, а также реализовывать ряд методов атомно-силовой микроскопии. Индентирующая головка прибора позволяет прикладывать нагрузки в диапазоне от единиц

Рис.3. Оптическое изображение алмазного индентора в виде плоского штампа (вид сбоку)

Fig.3. The optical image of the diamond indenter, in the form of a flat stamp (side view)

after each stage of polyelectrolyte adsorption.

The used method for obtaining CaCO_3 microparticles allows growing porous spherical particles with a diameter of 3 to 12 μm (with a spread in values from 4% to 20%) with a similar inner structure [11]. Particles virtually do not aggregate between themselves, and they can be stored for an indefinite period at room temperature in dry form. The pattern of creation of these particles is shown in fig.1.

Currently, the basic properties of polyelectrolyte microcapsules are actively studied. The polyelectrolyte shell of a capsule is impervious to

high-molecular compounds while low-molecular substances and inorganic ions can penetrate into their walls [12-13]. The shells of polyelectrolyte capsules are sensitive to environmental conditions, i.e. pH and the ionic strength of solutions, solvents, temperatures and other factors. These factors have a great impact on the structure of the polyelectrolyte complexes and therefore on the permeability of capsules [14-17].

For the mechanical characterisation of these items often use nanohardness testers or atomic force microscopes [18-22], in which for the mechanical impact on

a particle the tip of the cantilever or a special microscopic bead attached to it [22] are used. Also used are nanoindenters in the form of a cylindrical die with a flat tip [18-21]. It should be noted that this method is widely used for biological objects, colorant particles in the toner of printers and testing of the abrasive finely-divided material [18,19].

EQUIPMENT

The study of mechanical strength of the microcapsules was carried out using the NanoScan-4D nanohardness tester. A general view of the device is presented in fig.2.

Рис.4. Слева – частица до индентирования (расположена на перекрестии), справа – остатки частицы, сфотографированные после ее разрушения

Fig.4. Left – particle before indenting (located in the cross); right – the rests of particle, photographed after its destruction

микроньютон до нескольких ньютон, а также измерять смещения в диапазоне от единиц нанометров до миллиметра.

Прибор может быть оснащен различными типами наконечников, в число которых входят пирамидальные инденторы Берковича и Виккерса, а также наконечники в форме плоского штампа. Для определения предельной нагрузки, выдерживаемой микрокапсулой, был использован алмазный плоский штамп (рис.3), диаметр рабочей области которого составлял 100 мкм.

Для определения положения исследуемых частиц использовался оптический микроскоп, входящий в состав прибора "НаноСкан-4D" [23]. Данный микроскоп может быть использован и для измерения размеров частиц. Перемещение между оптической и индентирующей головками осуществляется при помощи линейных трансляторов, оснащенных энкодерами, которые обеспечивают точность взаимного позиционирования штампа и частицы лучше 1 мкм.

This device makes it possible to carry out tests by the sclerometry measurement method, to measure hardness and elastic modulus by instrumental indentation as well as to implement a number of atomic force microscopy methods. The indentation head of the device allows to apply the load in the range from a few microNewton to several Newton, and to measure displacements in the range from a few nanometers to a millimeter.

The device can be equipped with different types of tips, which include pyramidal Berkovich and Vickers indenters as well as tips in the form of a flat die. To determine

the limit load withstood by microcapsules a diamond flat die was used (fig.3), the diameter of the working area of which was 100 microns.

To determine the position of the studied particles, an optical microscope was used, which is part of the NanoScan-4D device [23]. This microscope can be used to measure the particle size. Movements between the optical head and the indentation head are implemented using the linear translators equipped with encoders that provide accurate relative positioning of the stamp and particles better than 1 micron.

MEASURING PARTICLE STRENGTH

The strength of particles was measured by compressing it with an indenter having the shape of a flat die. During compression the load-displacement diagram was recorded, which was then used to determine the nature of the destruction as well as the bearable particle load limit.

The device allows measurements in both the liquid medium and the air. In this study, a few drops of a solution containing microcapsules were placed on a glass substrate. Measurements were carried out for several hours after the evaporation of the liquid while the capsules remained on the substrate. To

Рис.5. Зависимость силы от перемещения при разрушении единичной капсулы (а) и пример "некорректного" измерения, при котором зависимость имеет несколько скачков (б)

Fig.5. The dependence of the force on displacement at the destruction of a single capsule (a) and an example of "incorrect" measurement, in which the dependence has a few jumps (b)

ИЗМЕРЕНИЕ ПРОЧНОСТИ ЧАСТИЦ

Прочность частицы измерялась путем ее сдавливания индентором, имеющим форму плоского штампа. В процессе сдавливания проводилась запись диаграммы нагрузка-смещение, по которой затем определялся характер разрушения, а также выдерживаемая частицей предельная нагрузка.

Прибор позволяет проводить измерения как в жидкой среде, так и на воздухе. В рамках данного исследования несколько капель раствора, содержащего микрокапсулы, были нанесены на стеклянную подложку. Измерения проводились через несколько часов после испарения жидкости, в то время как капсулы оставались на подложке. Для определения прочно-

сти с помощью оптического микроскопа выбирались частицы, находящиеся на достаточном удалении от других объектов (рис.4), чтобы в процессе сдавливания под штамп попадала одна капсула.

Характерный размер приведенной на рис.4 частицы составляет порядка 10 мкм. Нагружение и разгрузка производились с поддержанием постоянной скорости развертки по силе. На рис.5а представлена типичная диаграмма для случая нагружения единичной капсулы. На рис.5б для сравнения приведена "некорректная" диаграмма с несколькими скачками по силе, что свидетельствует о проскальзывании или контакте с несколькими частицами. Диаграммы, подобные пред-

determine the strength, the particles, which are at a sufficient distance from other objects, were selected with an optical microscope (fig.4), so that only one capsule was under the stamp during compression.

The typical size of the particle shown in fig.4 is about 10 microns. Both loading and unloading are performed while maintaining a constant scanning speed by force. Fig.5 shows a typical diagram for the case of loading a single capsule. For comparison, fig.5b shows an "incorrect" diagram with several surges in strength that indicating slip-page or contact with a few particles. Diagrams like those shown in

fig.5b weren't used to measure the mechanical properties.

On the presented diagram (fig.5), the load limit, at which there was a destruction of the capsule unit, was 25 mN, the capsule was thereby compressed by the value of 1.1 microns. The obtained data on the maximum strength and size of particles allow measuring the mechanical strength. For this purpose it is possible to use the methods of numerical simulation using a priori information about the object properties.

It is possible to measure the particle material strength by using the formula obtained for the case of compression of a spherical body with two

dotty forces. After a number of simplifying assumptions, a formula [24] was obtained, which allows to link the strength during destruction F_c , the distance between the points of application of force dp during destruction and tensile strength of the particle material σ :

$$\sigma = \frac{2.8F_c}{\pi d_p^2}$$

Based on the data obtained by indentation, the dp value can be taken as the difference between the value of displacement of the indenter, at which the force starts to increase after the destruction of the capsule ($z_2 \approx 7.5$ microns, see

ставленной на рис.5б, для оценки механических свойств не использовались.

На корректной диаграмме (рис.5а) предельная нагрузка, при которой произошло разрушение единичной капсулы, составила 25 мН, капсула при этом была сжата на величину 1,1 мкм. Полученные данные о максимальной силе и размере частиц позволяют рассчитать их механическую прочность. Для этого можно использовать методы численного моделирования и априорную информацию о свойствах объекта.

Оценить прочность материала, из которого состоит частица, можно с помощью формулы, полученной для случая сдвливания сферического тела двумя точечными силами. После ряда упрощающих допущений была получена формула [24], позволяющая связать силу при разрушении F_c с расстоянием между точками приложения силы d_p в момент разрушения и пределом прочности материала частицы σ :

$$\sigma = \frac{2.8F_c}{pd_p^2}$$

Исходя из полученных при индентировании данных, величину d_p можно оценить как разницу между величиной смещения индентора, при котором сила начала расти после разрушения капсулы ($z_2 \approx 7,5$ мкм, см. рис.5а), и величиной углубления, при котором произошел разрыв ($z_1 = 1$ мкм, см. рис.5а). Соответственно, величина расстояния определяется как разность $d_p = z_2 - z_1$. Таким образом, используя значения $F_c = 25$ мН и $d_p \approx 6,5$ мкм, получаем величину $\sigma \approx 0,5$ ГПа. Естественно, это верхняя оценка, поскольку

исследуемые капсулы не являются сплошными. Рассматриваемая частица – гетерогенный объект, и взаимодействие со штампом и подложкой происходит на значительном участке ее поверхности, поэтому более точную информацию о механических свойствах материала капсулы можно получить, дополнив экспериментальные данные методами численного моделирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование демонстрирует универсальный характер метода инструментального индентирования и широкие измерительные возможности приборов "НаноСкан", способных осуществлять совместное прецизионное измерение силы и перемещения. Представленное исследование микрокапсул наглядно показало возможность оперативного контроля их механических свойств и может быть использовано для оптимизации их формы, толщины стенок и размера.

Следует отметить важную особенность прибора "НаноСкан-4D", позволяющего не только осуществлять измерения твердости и модуля упругости однородных материалов, но и проводить прецизионное индентирование в область, указанную на оптическом микроскопе, интегрированном в состав прибора. Измерения зависимости силы и смещения от времени позволяют получать численные оценки механических свойств различных объектов, в том числе микрокапсул, имеющих естественное или искусственное происхождение. Наноиндентирование может быть использовано для

fig.5), and size of the deepening in which a break occurs ($z_1 = 1$ micron, see fig.5a). Accordingly, the distance value is determined as the difference $d_p = z_2 - z_1$. Thus, using the values $F_c = 25$ mN and $d_p \approx 6.5$, we obtain the value $\sigma \approx 0.5$ GPa. Naturally, this is the upper estimate because the capsules under study are not solid. The particles in question are a heterogeneous objects, and any interaction with the stamp and substrate takes place at a significant part of its surface, so more accurate information on the mechanical properties of the material of the capsule can be obtained by adding numerical simulation to the experimental data.

CONCLUSION

The study demonstrates the generic nature of the instrumental indentation method and the wide measurement scope of the NanoScan devices capable of jointly precise measurements of force and displacement. The present study has clearly shown the possibility of rapid control of their mechanical properties, and it can be used for optimising their shape, size and wall thickness.

Special emphasis should be put on important feature of the NanoScan-4D allowing not only to measure the hardness and elastic modulus of homogeneous materials

but also to conduct precision indentation in the area specified in an integrated optical microscope. Measurements of the dependence of force and displacement on time allow to obtain the numerical evaluation of the mechanical properties of various objects including microcapsules that are of a natural or artificial origin. Nanoindentation can be used for the characterisation of different mechanical properties of particles including for study of their strength, toughness and elasticity. ■

In studies the equipment of the Centre for Common Use of FSBI TISNCM was used.

характеризации различных механических свойств микрочастиц, в том числе для исследования их прочности, вязкости и упругости.

При проведении экспериментальных исследований в рамках данной работы использовалось оборудование ЦКП ФГБНУ ИСНУМ.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Lameiro M.H., Lopes A., Martins L.a., Alves P.M., Melo E.** Incorporation of a model protein into chitosan-bile salt microparticles // *Int. J. Pharm.* 2006. V. 312. M1. P. 119-130.
2. **Grenha A., Seijo B., Remunan-Lopez C.** Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein deliver // *Eur. J. Pharm. Sci.* 2005. V. 25. NQ 4-5. P. 427-437.
3. **Lambert G., Fattal E., Couvreur P.** Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2001. V. 47. NQ 1. P. 99-112.
4. **De Rosa G., Quaglia F., La Rotonda M., Besnard M., Fattal E.** Biodegradable microparticles for the controlled delivery of oligonucleotides // *Int. J. Pharm.*, 2002. V. 242. № 1-2. P. 225-228.
5. **Hattori Y., Maitani Y.** Folate-linked lipid-based nanoparticles for targeted gene delivery // *Curro Drug. Deliv.* 2005. V. 2. № 3. P. 243-252.
6. **Peter S.J., Lichun L.U., Kim D.J., Stamatas G.N., Miller M.J., Yaszemski M.I, Mikos A.G.** Effects of transforming growth factor bl released from biodegradable polymer microparticles on marrow stromal osteoblasts cultured on poly (propylene fumarate) substrates // *J. Biomed. Mater. Res.* 2000. V. 50. NQ 3. P. 452-462.
7. **Lu L., Yaszemski M.J., Mikos A.J.** TGF-f31 Release from Biodegradable Polymer Microparticles: Its Effects on Marrow Stromal Osteoblast Function // *The Journal of Bone and Joint Surgery.* 2001. V. 83. P. 82-92.
8. **Бабак В.Г.** Коллоидная химия в технологии микрокапсулирования / Под ред. Т.В. Мамонтова. Ч.1. – Свердловск: Из-во Урал.Ун-та, 1991, 171 с.
9. **Суздаев И.П.** Нанотехнология: физико-химия нанокластеров, наноструктур и наноматериалов. – М.: КомКнига, 2006, 589 с.
10. **Пул Ч., Оуэнс Ф.** Нанотехнологии. – М.: Техносфера, 2004, 334 с.
11. **Sukhorukov G.B., Volodkin V.D., Gunther A.M., Alexander I. Petrov A.I., Shenoy D. B., Mohwald H.** Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds // *J. Mater. Chern.* 2004. V. 14. P. 2073-2081.
12. **Sukhorukov G. B., Donath E., Moya S., Susha A.S., Voigt A., Hartmann I., Mohwald H.** Microencapsulation by means of step-wise adsorption of polyelectrolytes // *Journal of Microencapsulation.* 2000. V. 17(2). P. 177-185.
13. **Sukhorukov G. B., Brumen M., Donath E., Mohwald H.** Hollow polyelectrolyte shells: Exclusion of polymers and donnan equilibrium // *Journal of Physical Chemistry B.* 1999. V. 103 (31). P. 6434-6440.
14. **Sukhorukov G. B., Antipov A. A, Voigt A, Donath E, Mohwald H.** pH-controlled macromolecule encapsulation in and release from polyelectrolyte multilayer nanocapsules // *Macromolecular Rapid Communications.* 2001. V. 22 (1). P. 44-46.
15. **Sukhorukov G.B., Donath E., Davis S., Lichtenfeld H., Caruso F, Popov V, Mohwald H.** Stepwise polyelectrolyte assembly on particle surfaces: a novel approach to colloid design // *Polymers for Advanced Technologies.* 1998. V. 9 (10-11). P. 759767.
16. **Lvov Y., Antipov A. A., Mamedov A, Mohwald H, Sukhorukov G.B.** Urease encapsulation in nanoorganized microshells // *Nano Letters.* 2001. V. 1. N 2-3. P. 125-128.
17. **Kohler K., Shchukin D. G., Mohwald H, Sukhorukov G.B.** Thermal behavior of polyelectrolyte multilayer microcapsules. The effect of odd and even layer number // *Journal of Physical Chemistry B.* 2005. V. 109 (39). P. 18250-18259.
18. **Stark, Meryl; Lloyd, Ashley; Towers, Emily; and Hicks, Kiefer,** "Micron Scale Toner Particle Characterization (Lexmark)" (2012). 2012 SCOPE Projects. Paper 4.
19. **Vieregge J.** Mechanical Characterization in Printing and Fabrication of Materials from Nano-Micro Scale. 2013. http://www.hysitron.com/Portals/0/Focus Markets/NIPbooklet r1.f_reduced.pdf.
20. **Arfsten J., Bradtmöller C., Kampen I., Kwade a.** Compressive testing of single yeast cells in liquid environment using a nanoindentation system // *J. Mater. Res.* 2008. Vol. 23, № 12. P. 3153-3160.
21. **Zhou Z.L., Ngan A.H.W., Tang B., Wang A.X.** Reliable measurement of elastic modulus of cells by nanoindentation in an atomic force microscope // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2012. Vol. 8. P. 134-142.
22. **Ounkomol C., Xie H., Dayton P. a., Heinrich V.** Versatile horizontal force probe for mechanical tests on pipette-held cells, particles, and membrane capsules // *Biophys. J. Biophysical Society,* 2009. Vol. 96, № 3. P. 1218-1231.
23. www.nanoscan.info.
24. **Hiramatsu Y., Oka Y.** Determination of the tensile strength of rock by a compression test of an irregular test piece // *Int. J. Rock Mech. Min. Sci. Geomech. Abstr.* 1966. Vol. 3, № 2. P. 89-90.